Школа-семинар «Конфокальная микроскопия в биологии и медицине».
Москва – Звенигород. 26-30 сентября 2005 г.

Конфокальная микроскопия: мифы и реальность

Г. И. Штейн

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Мифы, о которых пойдет речь, вовсе не выдумка автора. Эти заметки появились как следствие постоянного общения с научными сотрудниками, впервые приступающими к работе на конфокальных микроскопах и не имеющими достаточного опыта и знаний в этой области. Но сначала немного о реальности.

Для чего нужен конфокальный микроскоп при исследовании клетки

В настоящее время конфокальная микроскопия широко используется в клеточной биологии. Публикуется огромное количество статей на эту тему. Однако, как не существует лекарства от всех болезней, так и не существует универсального метода исследований.

Наиболее часто встречающейся задачей для конфокальной микроскопии является изучение структуры клеток и их органоидов благодаря своему высокому разрешению и контрасту, например, цитоскелета, ядра, хромосом, или даже локализации в них отдельных генов.

Исследуется также колокализация в клетке двух и более веществ, например белков. Такое изучение помогает понять, существует ли причинно-следственная связь между ними. Предварительно белки метятся антителами с разными флуорохромами. В обычный микроскоп трудно разобрать, находятся ли они рядом или один под другим. Конфокальная микроскопия позволяет это сделать.

Записав в памяти компьютера серию оптических срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов.

Еще одна задача – исследования динамических процессов, происходящих в живых клетках. Например, движение ионов кальция и других веществ через клеточные мембраны. Правда, для этого нужен высокоскоростной конфокальный микроскоп.

Новыми перспективными направлениями являются методики FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching (Восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (Передача энергии посредством флуоресцентного резонанса). FRAP применяется для исследования подвижности биоорганических молекул посредством инициации фотохимического разложения флуорохрома в зоне облучения и последующего его рассоединения с молекулами. После выжигания молекулы с флуорохромом из необлученной зоны движутся вследствие диффузии в облученную зону образца. По времени нарастания в ней флуоресценции можно судить о подвижности молекул.

FRET применяется для определения расстояния между молекулами разных типов, их окружения и взаимодействия. Молекулы метятся двумя флуорохромами со спектром испускания донора, перекрывающимся со спектром поглощения акцептора. Энергия от донора к акцептору передается на малых расстояниях (несколько нм) в результате резонанса между энергетическими уровнями, а его вероятность зависит от расстояния между молекулами. Затем акцептор излучает энергию в видимой области спектра, которая регистрируется конфокальным микроскопом.

Это, конечно, далеко не все применения конфокального микроскопа в биологии клетки.[1]

А теперь о мифах и легендах

Миф первый: *«Недавно в нашем институте появился конфокальный микроскоп, а у меня давно приготовлены интересные препараты. Надо бы посмотреть их на этом приборе, а вдруг я увижу что-нибудь интересное?».*

Прежде всего, надо осознавать, что большинство современных конфокальных микроскопов построено на базе люминесцентного (прямого или инвертированного) микроскопа. Следовательно, объекты исследований должны быть предварительно окрашены соответствующим люминесцентным красителем или обладать собственной люминесценцией.[2] Иногда микроскоп имеет т.н. «детектор проходящего света», который позволяет наблюдать и неокрашенные объекты в режиме интерференционного контраста. Поэтому необходимо предварительно выяснить параметры вашего конфокального микроскопа, и особенно, какие имеются в комплекте лазеры, если вы хотите использовать режим люминесценции. А вдруг для вашего красителя отсутствует необходимая возбуждающая лазерная линия? Есть ли соответствующий набор фильтров и дихроичных зеркал?

Например, для выявления ДНК очень часто используются красители типа DAPI и Hoechst, имеющие люминесценцию в диапазоне 400-500 нм. В соответствии с правилом Стокса возбуждающий свет должен иметь более короткую длину волны, т.е. 300-400 нм, это ультрафиолетовый диапазон. Лазеры с такими длинами волн, конечно, созданы, но они стоят очень дорого и имеют довольно громоздкую конструкцию, поэтому, скорее всего, они отсутствуют в вашем конфокальном микроскопе. А для того, чтобы посмотреть ДНК, вам придется использовать другие красители, которые сейчас специально разработаны для конфокальной микроскопии и которые позволяют обходиться без дорогостоящей аппаратуры.

И, наконец, длительное хранение ваших препаратов не улучшает их качества, особенно с точки зрения интенсивности люминесценции. Поэтому для исследований на конфокальном микроскопе приготовлением препаратов следует заниматься особо и тщательно, предварительно проконсультировавшись со специалистами.

Миф второй: *«В обычном люминесцентном микроскопе мои объекты светятся очень слабо, трудно что-либо разобрать. Надо бы попробовать их на конфокальном микроскопе. Там ведь имеется лазерный осветитель, высокочувствительные фотоприемники, компьютерная обработка изображений».*

Лазер обладает большой спектральной плотностью излучения в очень узкой полосе, в то время как полоса поглощения флуорохрома достаточно широкая. С помощью специально подобранных фильтров из излучения ртутной лампы, применяемой в качестве источника света в люминесцентном микроскопе, можно «вырезать» нужный участок спектра с мощностью излучения, иногда даже большей, чем у лазера.

Конечно, в конфокальном микроскопе с помощью электронных систем можно усилить сигнал и довести яркость изображения на экране монитора до требуемого уровня. Но тут появляется серьезная проблема. Как и в любом электронно-оптическом приборе, в конфокальном микроскопе существуют случайные флуктуации сигнала или шумы, имеющие разнообразную физическую природу (квантовую, тепловую и т.д.). Чем меньше уровень шумов (т.е. чем больше отношение сигнал/шум), тем более качественным будет изображение. Высокочастотные шумы проявляются на изображении как яркие или темные точки, и их источниками являются лазеры, фотоприемники, электронные блоки, волоконно-оптические кабели. Низкочастотные шумы видны как горизонтальные полосы. Эти шумы могут возникать из-за наводок по электрической сети, вибраций и других причин. Шумы будут «засорять» изображение и снижать его информативность.

Увеличение чувствительности фотоприемников и усиление полезного сигнала приводит и к усилению шумов.

Для увеличения яркости изображения можно попытаться увеличить мощность лазера, но при этом происходит «выцветание» препарата за счет фотохимического разложения флуорохрома, а также повреждение живых клеток. Еще один способ – это приоткрыть конфокальную диафрагму. На фотоприемники будет попадать больше света, но зато ухудшится разрешающая способность конфокального микроскопа.

Конфокальный микроскоп предназначен прежде всего для усиления контраста изображения, а не его яркости. Для слабосветящихся объектов необходимо использовать специальные высокочувствительные видеокамеры с большим временем накопления сигнала.

Миф третий: *«Сейчас на конфокальном микроскопе я поставлю объектив с максимальным увеличением, установлю максимальный формат и электронное увеличение и увижу детали изображения с размерами в несколько нанометров!».*

Разрешающая способность (resolution) конфокального микроскопа – его важнейший параметр (впрочем, как и других оптических приборов). Это минимальное расстояние между двумя точками объекта, при котором прибор может различать их как отдельные структуры. Теоретически разрешающая способность конфокального микроскопа всего в 1.4 раза лучше обычного. Она зависит прежде всего от длины волны излучения. А так как и тот и другой микроскопы – это оптические приборы видимого диапазона, то существует предел, накладываемый волновыми свойствами света. Существенное значение имеет также апертура объектива (а не его увеличение!), но и здесь существует предел, который уже конструктивно достигнут. Разрешающая способность микроскопа подразделяется на латеральную (т.е. в плоскости, перпендикулярной оптической оси системы) и аксиальную (т.е. в направлении оптической оси), причем аксиальное разрешение, как правило, в 2-3 раза хуже латерального. Диаметр конфокальной диафрагмы также имеет важное значение, поскольку от него напрямую зависит толщина слоя, с которого снимается оптический сигнал, т.е. аксиальное разрешение. Чем меньше диаметр диафрагмы, тем тоньше «оптический срез». Однако, как уже указывалось, при этом уменьшается световой поток, попадающий на фотоприемник.

Поскольку конфокальный микроскоп – прибор оптико-электронный, то его разрешающая способность зависит не только от оптических узлов, но и от электронных систем преобразования оптического сигнала в аналоговый электрический, а затем и в цифровой. Эти преобразования могут ухудшить разрешение. Например, такие параметры

как формат кадра (т.е. число пикселов – элементов изображения на кадр) и электронное увеличение (zoom) влияют на разрешающую способность. Чем больше формат кадра и zoom, тем меньше размеры пикселов и расстояние между ними, т.е. с большей точностью отслеживаются детали изображения. Максимальный размер пикселов, при которых еще не происходит потери оптического разрешения, определяется критерием Найквиста. Исходя из него, размеры пикселов (и расстояние между ними) должны быть по крайней мере в 2.3 раза меньше оптической разрешающей способности микроскопа. При увеличении размеров пикселов происходит потеря в разрешении конфокального микроскопа (undersampling), при уменьшении их размеров разрешение не увеличивается, но могут появиться структуры на изображении, которых на самом деле нет (oversampling). Кроме того, в этом случае возрастает плотность энергии лазерного излучения на препарате, что может привести к его выцветанию.

Поэтому для достижения максимально возможного разрешения необходимо стремиться не к максимальному увеличению прибора, а к использованию высокоапертурного объектива. Параметры сканирующей системы должны ему соответствовать. Для правильной настройки конфокального микроскопа для этого существуют специальные таблицы и графики. Кроме того, необходимо бороться с шумами, ухудшающими качество изображения. Если же вам необходимо рассмотреть (не просто обнаружить) структуры менее 0.2 мкм, то для этого придется применять другие методы, например, электронную микроскопию.

Миф четвертый: *«На серии конфокальных срезов я не увидел интересующих меня структур, все очень расплывчато. Я сделаю трехмерную реконструкцию и посмотрю на мой объект как бы сбоку. Тогда увижу что-нибудь интересное»*

Если ваш объект не структурирован, или по крайней мере четких деталей не видно ни на одном срезе, реконструкция ничего не даст. Снежный ком как ни поворачивай, как ни режь, он останется снежным комом. Возможно, что вы сделали слишком мало срезов, или они идут с большим интервалом, превышающим аксиальное разрешение. Реконструкцию наиболее эффективно применять для объектов, имеющих четкие контура для того, чтобы посмотреть его форму во всех проекциях. Хорошие результаты получаются тогда, когда внутри объекта, окрашенного одним красителем, расположены структуры другого цвета. Иногда полезны стереоизображения с применением специальных очков, но только в том случае если на оптических срезах имеются хоть какие-нибудь признаки структурированности Проблемы колокализации (т.е.

взаиморасположения разных веществ) можно решить и без трехмерной реконструкции, путем просмотра ортогональных проекций.

Светлое конфокальное будущее

Не хотелось бы оставлять читателя наедине с грустными мыслями по поводу возможностей конфокальной микроскопии, ведь наше будущее прекрасно!

Фирмы-производители постоянно создают новые более совершенные приборы. Вот только небольшой перечень инноваций за последние несколько лет. В 2002 году фирма Leica анонсировала акустооптический светоделитель (AOBS), позволяющий эффективно разделять лазерный луч возбуждения и люминесценцию. Светоделитель управляется от компьютера, и его спектральные свойства могут быстро перестраиваться, в том числе, на несколько лазерных линий. В этом же году фирма Carl Zeiss начала выпускать конфокальный микроскоп LSM 510 META с оригинальным фотоприемником, регистрирующим сигнал одновременно в 32-х спектральных каналах! В 2004 году Zeiss создает высокоскоростной LSM 5 Live, имеющий скорость сканирования в 20 раз выше обычного конфокала. Фирма Olympus разработала прибор с двумя сканерами, позволяющий более эффективно применять, например, методику FRAP. Nikon идет другим путем – создает компактный и недорогой конфокальный микроскоп упрощенной конструкции. А недавно Leica объявила о том, что будет выпускаться 4Pi-конфокальный микроскоп, улучшающий аксиальное разрешение в 4-7 раз! Как говорится, следите за рекламой.

---

[1] Принципы конфокальной микроскопии и области ее применения изложены в многочисленных руководствах, список которых занял бы не одну страницу. Приведу только одно из последних: Methods in cell biology. Vol.70. Cell biological applications of confocal microscopy. 2-nd ed. Ed. B.Matsumoto. Acad.Press. 2002. 507 p.

[2] В зарубежной литературе обычно используется термин «флуоресценция», являющаяся частным случаем люминесценции.