

Konfokale Laser-Scanning- Mikroskopie

Michael R. Koblischka

FR Experimentalphysik, Universität des Saarlandes

Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

3D-Darstellung dicker Proben mit Submikrometer-Auflösung
in Reflektion und Fluoreszenz

Prinzip:

Laser-Mikrostrahl

Strahl wird beugungsbegrenzt fokussiert (Objektiv)
Spotdurchmesser 200 nm – 500 nm

Scanning-Einheit

Stage scan – Beam scan
Höchstgeschwindigkeit: 3 Bilder/s
z-Verstellung in 40 nm-Schritten möglich

Konfokale Detektion

Pinhole (Lochblende)
out-of-focus Signale werden nicht detektiert

Konfokales Scanning Mikroskop

Marvin Minsky (MIT)

Studium in Harvard und Princeton

(Mathematik, Neurophysiologie, Embryologie, Neuroanatomie, Psychologie, Mechanik)

Post-Doc in Harvard:

Studium der Hirnfunktion (im Lyman-Physiklabor)

Problem Keine optische 3D-Darstellung von gefärbten Neuronen möglich infolge Mehrfach-Streuung

Lösung Konfokale Abbildung (Abrastern der Probe)

Lichtquelle: Bogenlampe, Objektscanning: Roboterarm

Brief vom 18.11.1955 mit Apparatur-Beschreibung
an seinen Schwager (Patentanwalt)

Patentanmeldung 7.11.1957, Erteilung 19.12.1961

Dec. 19, 1961

M. MINSKY
MICROSCOPY APPARATUS
Filed Nov. 7, 1957

3,013,467

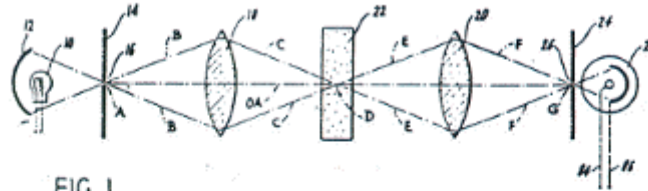


FIG. 1.

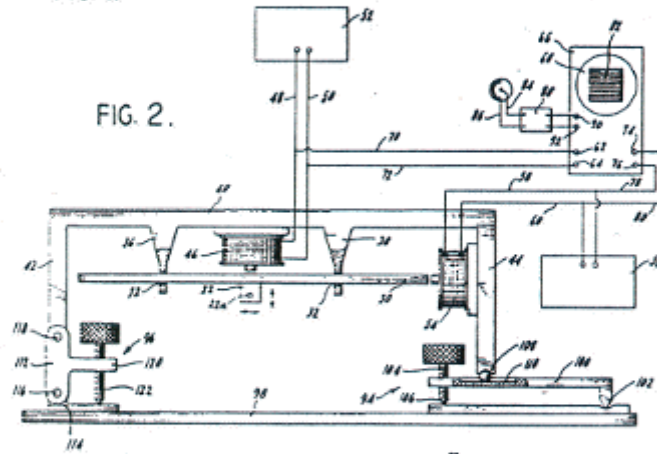


FIG. 2.

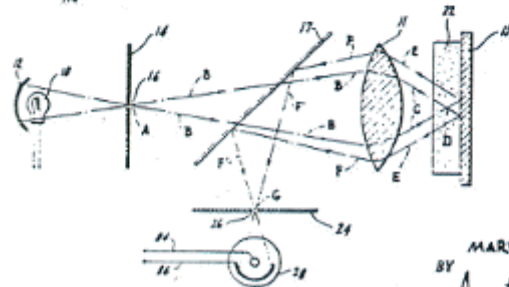
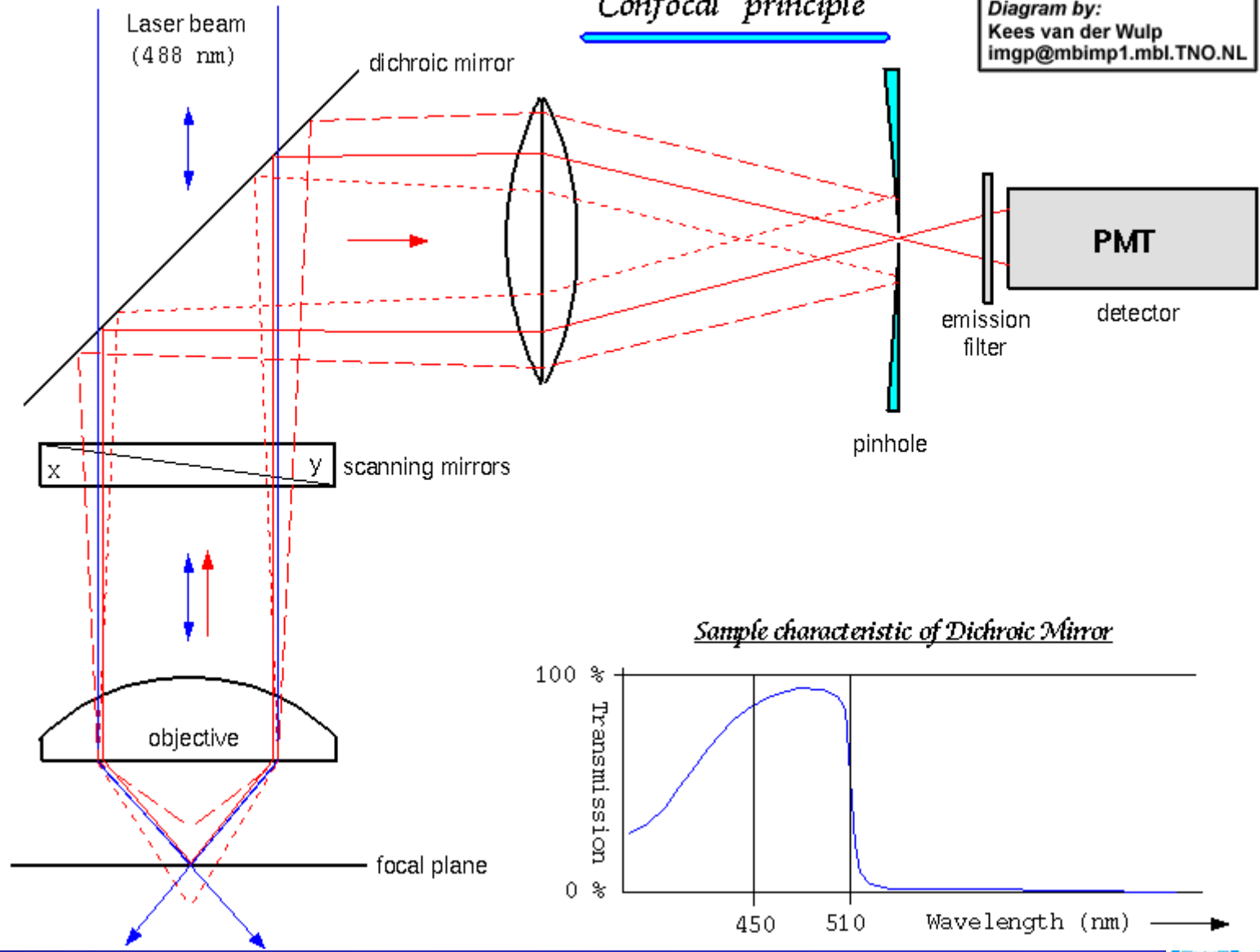


FIG. 3.

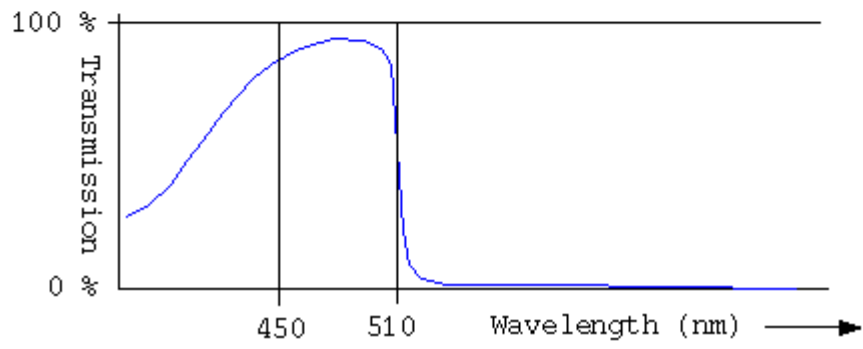
INVENTOR.
MARVIN MINSKY
BY
Ameter & Levy
ATTORNEYS

Confocal principle

Diagram by:
Kees van der Wulp
imgp@mbimp1.mbl.TNO.NL



Sample characteristic of Dichroic Mirror



Konfokales Laser Scanning Mikroskop (CLSM, LSCM)

1. Laser (Punktquelle)

Gaslaser (He-Ne, Ar+, Ar+/Kr+)

Festkörperlaser (Nd:YAG)

2. x,y-Scanning-Einheit

Beam-Scanning

kHz-Galvanospiegel, Rotationsspiegel

Piezoablenker, AO-Ablenker

Objekt-Scanning

Tischverstellung (Schrittmotor)

3. Pinhole (Blende)

kreisförmig, rechteckig

> 50 μm , variabel, vor Detektor

Laser-Scanning-Mikroskop

Grundgerät: Aufrechtes oder umgekehrtes Forschungsmikroskop

Verfahren:

- konventionell (mit Okularbeobachtung)

 - Transmission

 - Reflektion

 - Fluoreszenz

 - übliche Kontrastverfahren: Phako, DIC

- LSM-Modus

 - Transmission

 - Reflektion/Fluoreszenz

 - confocal (mit pinhole)

Nikon Modular Confocal Microscope System

C1
DIGITAL ECLIPSE

A confocal microscope that produces images of the highest quality in its class and supports almost all imaging applications of today and tomorrow.

Nikon proudly introduces a universal confocal microscope system that is ultra-compact and lightweight yet delivers confocal images of unrivaled quality. All the main components are modular, including the world's smallest and lightest scanning head, making expansion and maintenance easy. Furthermore, 3-channel detection is possible by minimum upgrade, and operation is facilitated by intuitive software. With the C1, confocal microscopy is now an affordable mainstream technique.

3-channel simultaneous detection

The C1 supports almost any imaging technique required today, including simultaneous 3-channel fluorescence, 3-channel plus DIC, time-lapse recording, and spatial analysis.

Interchangeable filters

Filters for scanning and detection are easily interchangeable, so changing the filter to match the fluorescent dyes to be used is simple and quick. This design facilitates the use of the latest probes or dyes used in laboratories today.

Modular design saves space and facilitates upgrading

All main components are modular, including the ultra-compact scanner head, laser box, and detector module, saving desk space and allowing easy upgrades and maintenance.

Intuitive software promotes multifaceted microscopic analysis

The C1's Graphical User Interface (GUI) is extremely simple and intuitive. From the time of initial use, you will probably never need to refer to the manual for standard operation.

Easy to configure, easy to operate

Each of the modules is pre-calibrated, eliminating the need for calibration during setup. Just connect the modules you need, and you are ready for optimal image capture.



Kosten für ein solches System:

ca. 150000 €



CFI60 Optics are included in all Eclipse-series Nikon Microscopes.



NIKON INSTRUMENTS EUROPE B.V.

P.O. Box 222, 1170 AE Badhoevedorp, The Netherlands Tel +31 20 4496 222 Fax +31 20 4496 298 website: www.nikon.co.jp/inst/

CIRCLE NO. 4

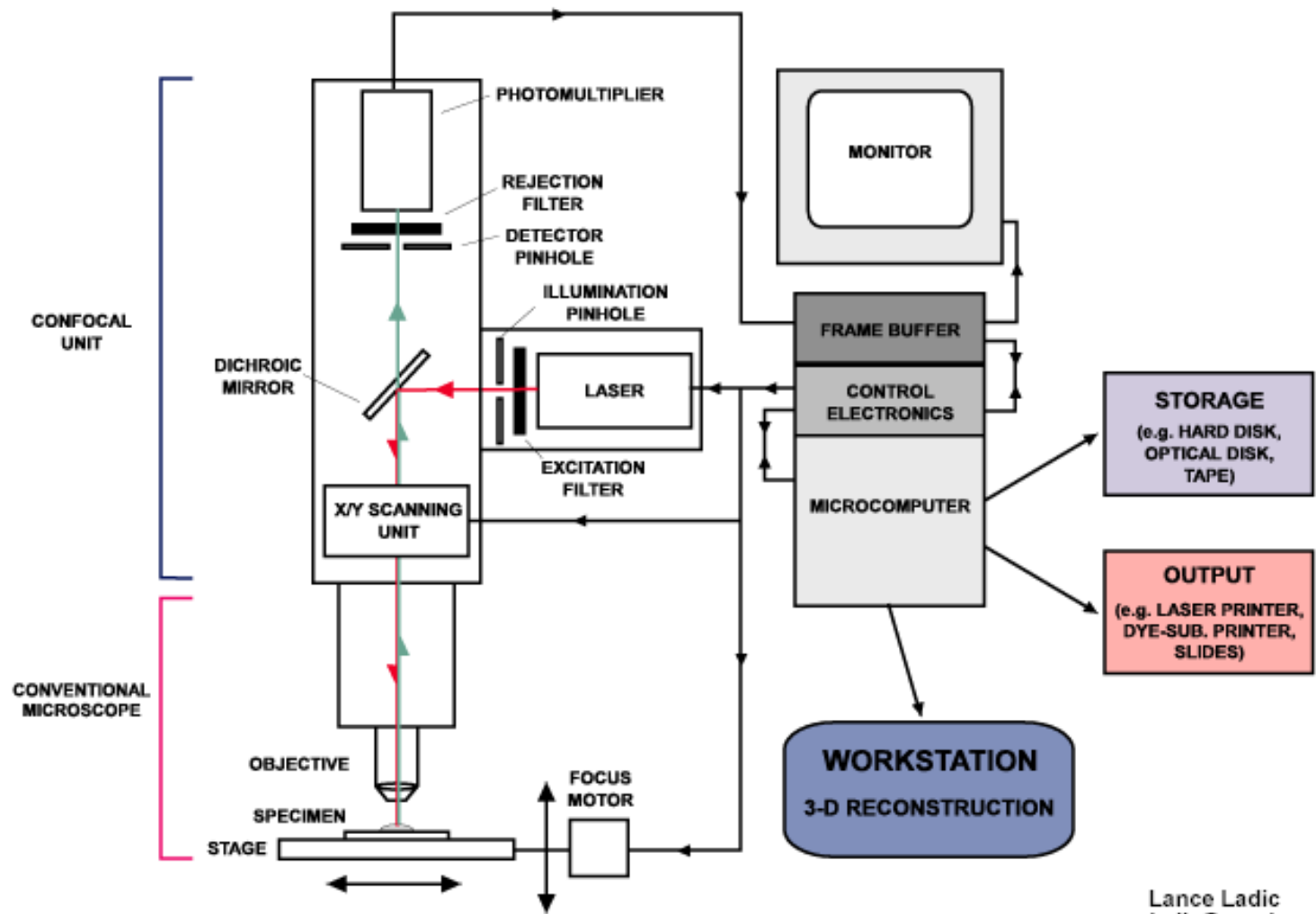
OR ONLINE www.microscopy-analysis.com/eng/inst.htm

C1 system configured with E600 microscope
(Can be attached to either upright or inverted microscopes)

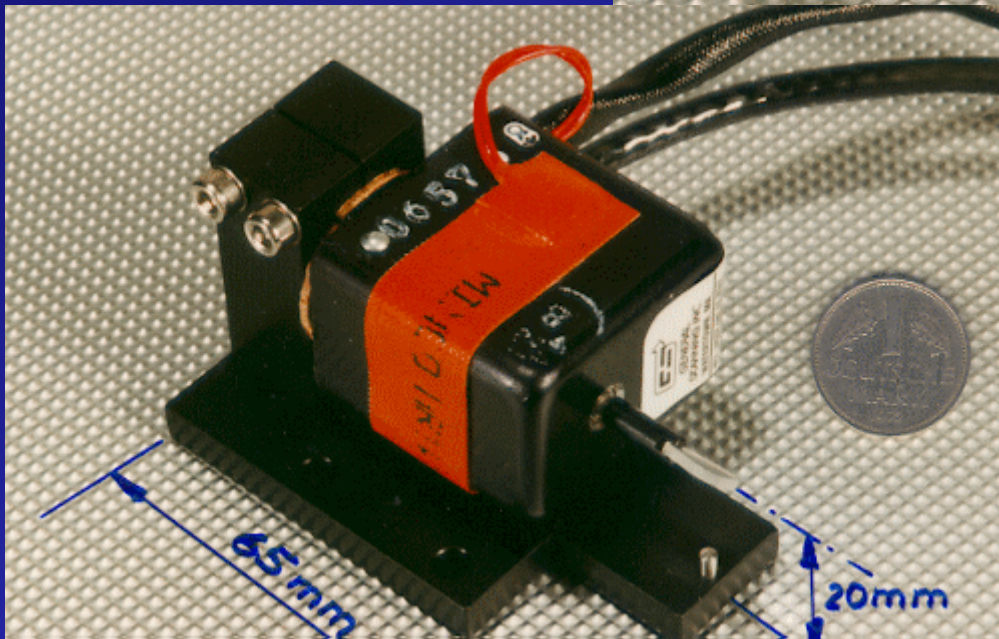
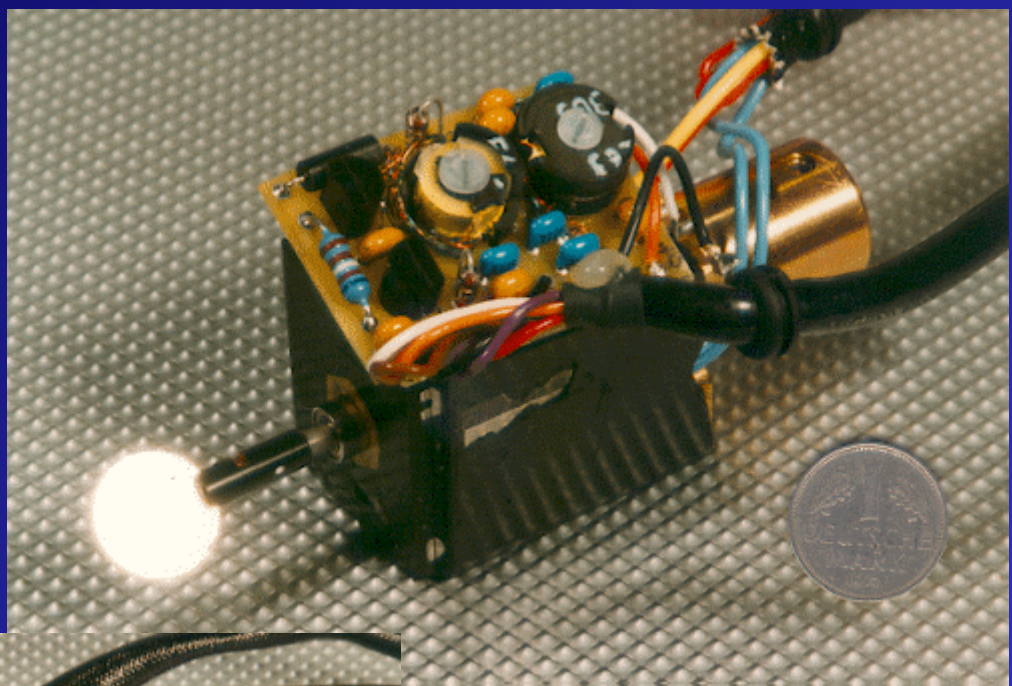


**UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES**

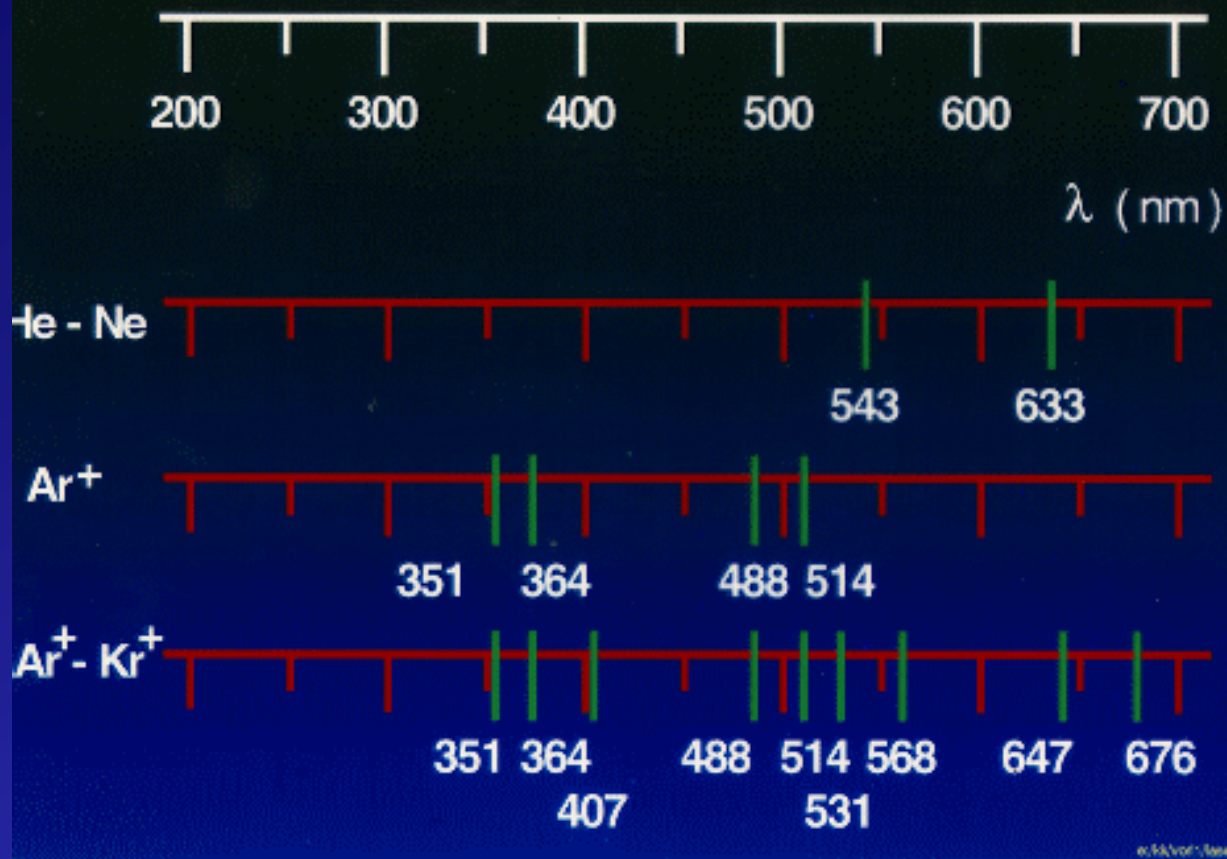
A TYPICAL LSCM SYSTEM



Lance Ladic
ladic@cs.ubc.ca

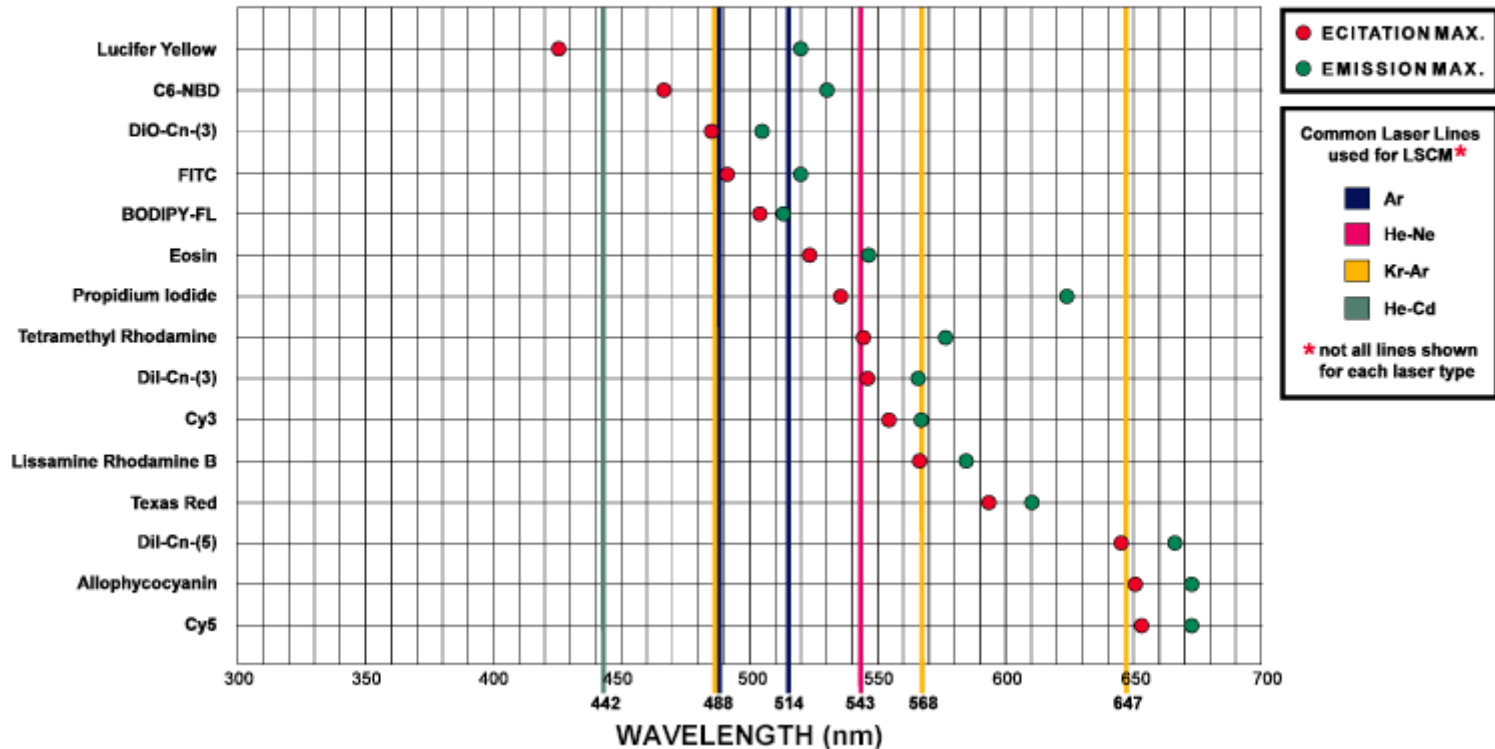


Laser für LSM



EXCITATION/EMISSION MAXIMA FOR SOME COMMON FLUOROPHORES USED FOR LSCM *

* **Note:** Values for excitation/emission maxima for each fluorophore are approximate and may vary depending on environment (pH, solvent, bound to target, conjugated to antibody, etc.)



Values were taken from several sources including Chen & Scott (1985), Haugland (1992), Tsien & Waggoner (1990).

Lance Ladic
ladic@cs.ubc.ca

3D- Mikroskopie

mechanical sectioning

Zerschneiden der Probe in Dünnschnitte

Ultradünnschnitt:	$25 \text{ nm} < d < 100 \text{ nm}$
Semi-Dünnschnitt	$0.1 \text{ } \mu\text{m} < d < 1 \text{ } \mu\text{m}$
Normalschnitt:	$1 \text{ } \mu\text{m} < d < 100 \text{ } \mu\text{m}$
Mikrotom:	$1 \text{ } \mu\text{m} < d < 30 \text{ } \mu\text{m} \times n$
Vibratom:	$10 \text{ } \mu\text{m} < d < 2 \text{ mm}$
Kryostat:	$1 \text{ } \mu\text{m} < d < 210 \text{ } \mu\text{m}$

optical sectioning

Abbilden von z-Ebenen der intakten Probe

Schnittdicke:	$40 \text{ nm} < d < \text{Probendicke}$
Begrenzung:	Lichteindringtiefe – Signalaustrittstiefe
z-Verstellung:	Probentisch oder Objektiv

Neue Entwicklungen und Ausblick

- **SNOM (Scanning Near-field Optical Microscope)**
Abstand $d \ll$ Wellenlänge (nm-Bereich)
Glasfaser als Sonde, Analogie zu Raster-Tunnel-Mikroskopie
- **Multiphotonenmikroskopie**
bes. 2 -Photonenanregung im NIR
Fluoreszenz im Sichtbaren
- **4D-Mikroskopie**
zeitliche Auflösung im 3 D- Raum

LSM Bilddarstellung

Einzelbild

einkanalig T, R, F1

mehrkanalig: Überlagerung T, R, F1 (bis 5 Kanäle)

Bildsequenzen (Schnittstapel) und deren Darstellung als Gallery

3D-Bilder

Farb-Höhenkarte (Falschfarbenzuordnung)

Schnitte x-y ($z = \text{const.}$)

x-z ($y = \text{const.}$)

y-z ($x = \text{const.}$)

Zeitfunktionen

Zeitserien

Time scan (entlang einer Linie -Fluoreszenzabklingzeit

Time spot (z-Richtung bei Punktanregung)

LSM Bildverarbeitung, Bildbearbeitung

Messfunktionen

Abstände, Flächen, Winkel
Falschfarbendarstellung
Histogrammauswertung
Messungen in ROI

Speichern und Laden von Bildern oder Serien
(PC-Schnittstelle)

Bildbearbeitung ist äusserst wichtiges Hilfsmittel für die LSCM-
Untersuchungen.

Problem: Datensätze sind recht gross!

Was kann man mit konfokaler Mikroskopie messen?

Beispiele:

Identifizierung von Stoffwechselmetaboliten

Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (FRET)

Visualisierung subzellulärer Proteinverteilung

Beobachtung von Zellteilungszyklen oder
cytoplasmatischer Ionenverteilungen (lifetime)

Intrazelluläre Messung physiologischer Parameter (pH, pCa, pO₂, etc.)

Beispiele für Einsatzgebiete:

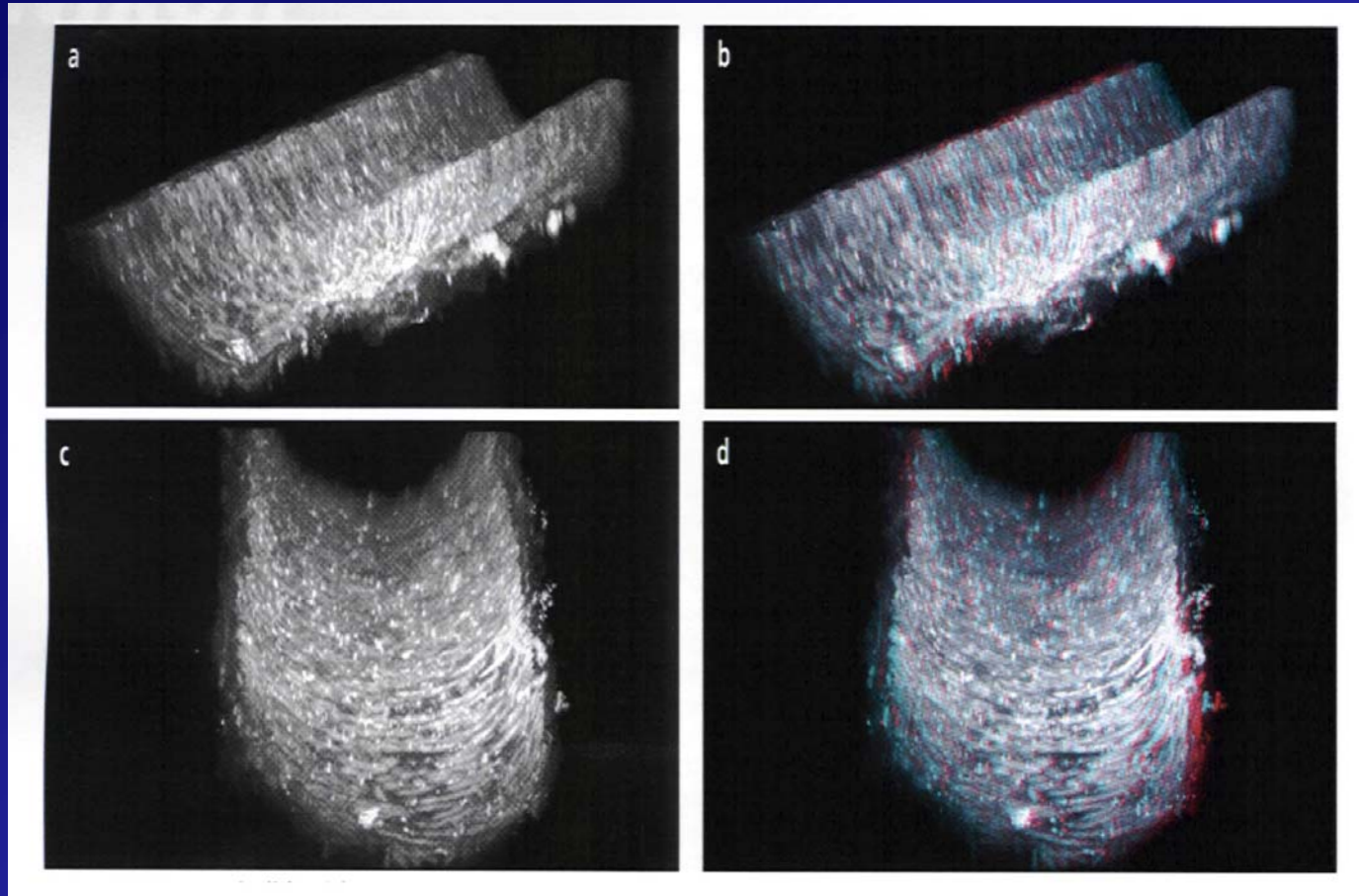
Biopharmazie

Bakterien in Gestein

Qualitätssicherung von Druckpapier

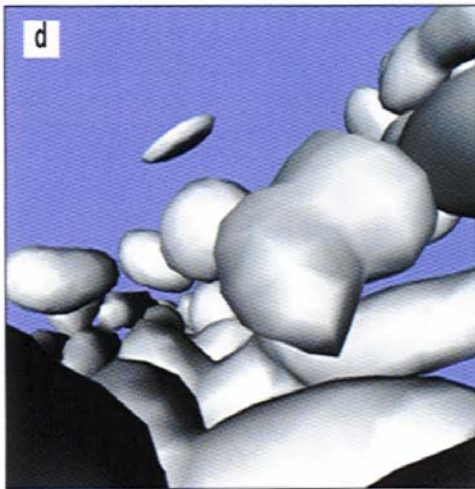
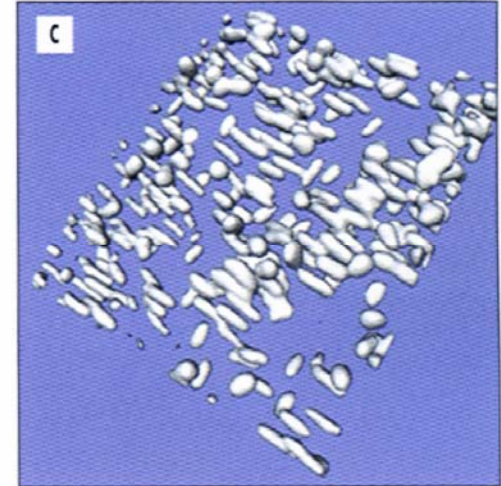
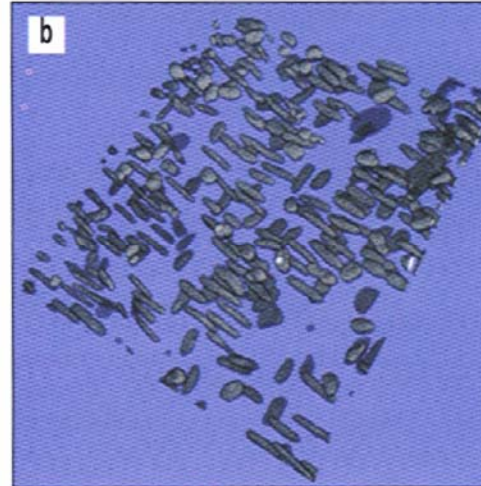
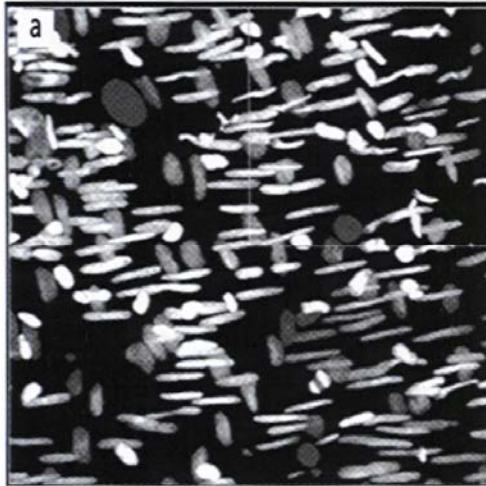
Halbleiterforschung

LSCM – Menschliche Arterie



Bilder bestehen aus 81 individuellen Schnitten, jeder Schnitt 1 MB
Gesamter Datensatz: 81 MB

Probleme bei der Bildbearbeitung in Echtzeit



LSCM-Abbildung der Arterie einer Ratte
in drei unterschiedlichen Abbildungsmoden

a.) maximale Intensität

b.) rendering, Aufsicht im hohen Winkel

c.) nur Oberfläche betont

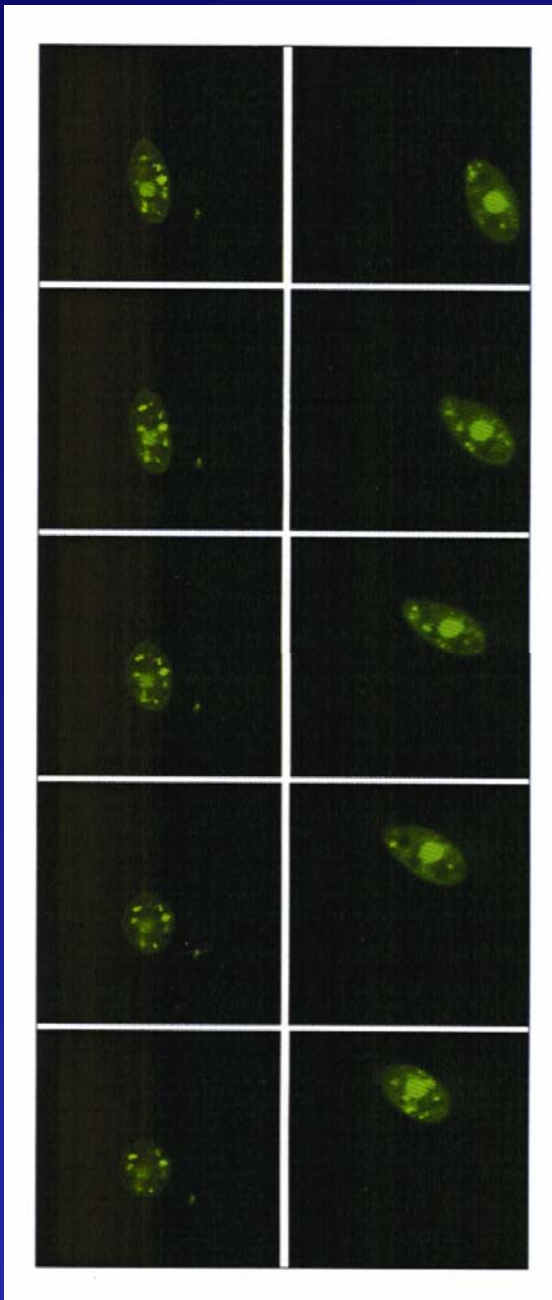
d.) Blick innerhalb der Oberfläche in den Datensatz
von c.)

Zeitaufgelöste Beobachtung einer Tetrahymena-Zelle

Zeitabstand: 125 ms

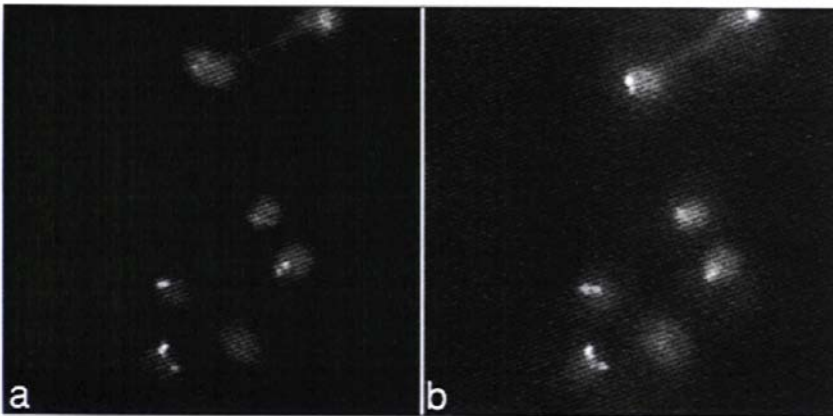
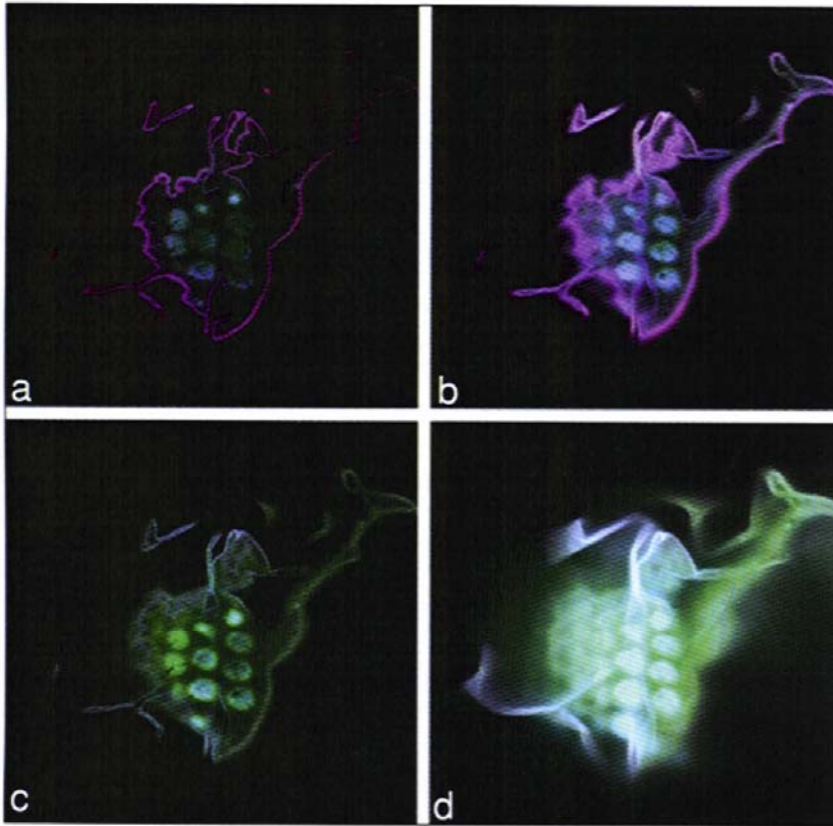
Laserlicht 488 nm

grüne und rote Fluoreszenz in der Zelle
kann beobachtet werden

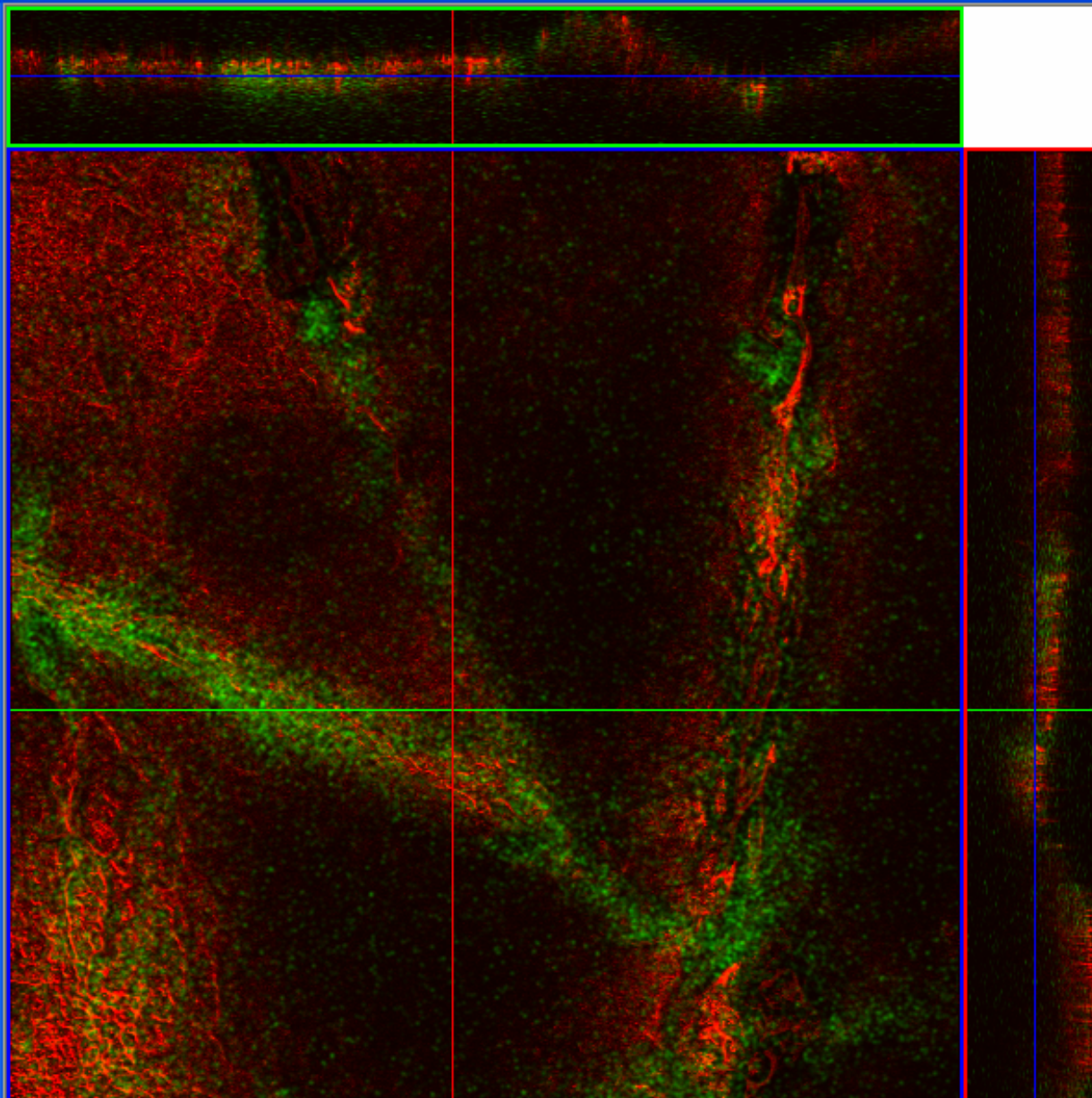


Auge des Wasserfloh

a.) ideale konfokale Konf.
b/c/d.) Bildbearbeitung und
Öffnen der Irisblende

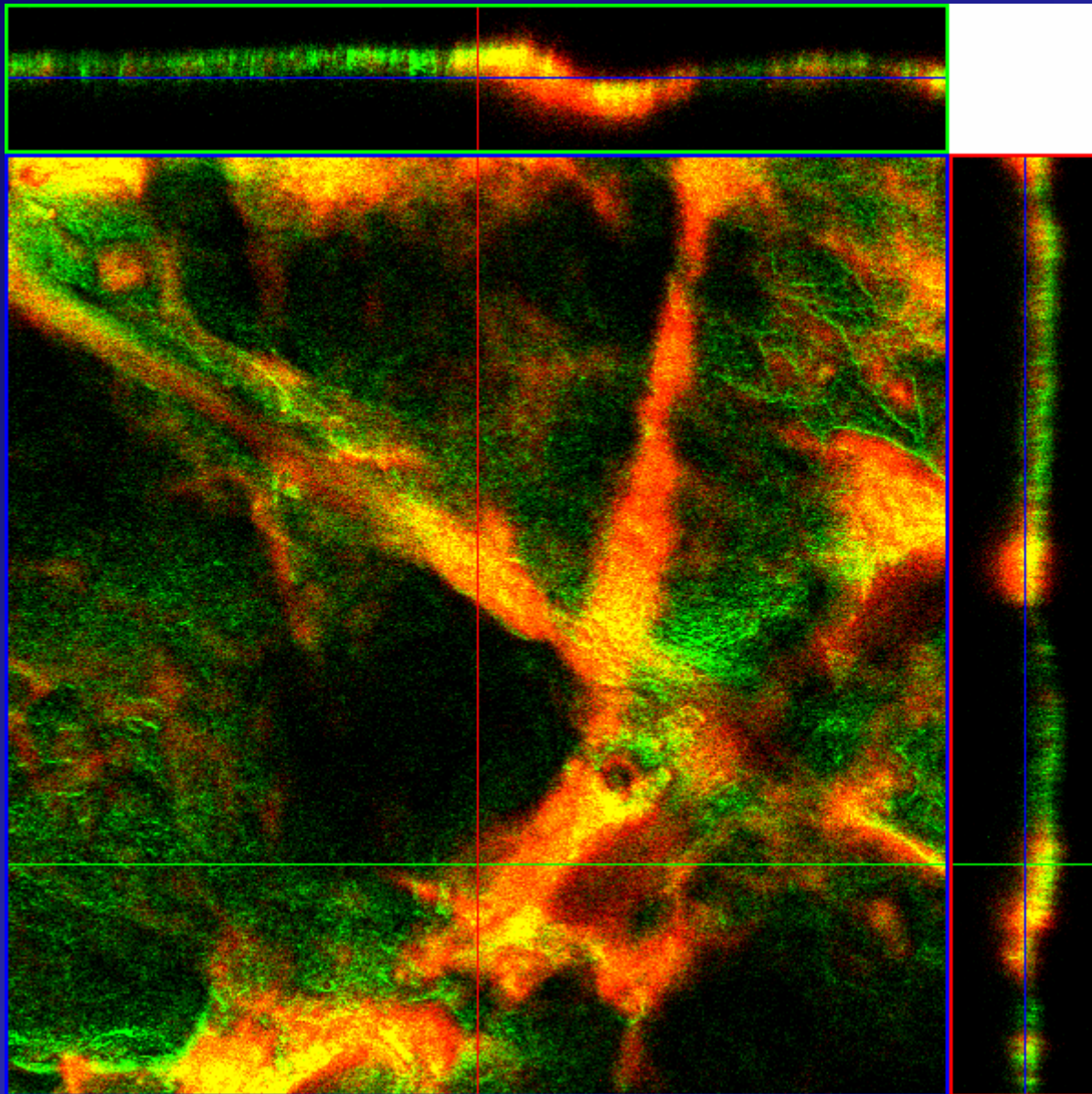


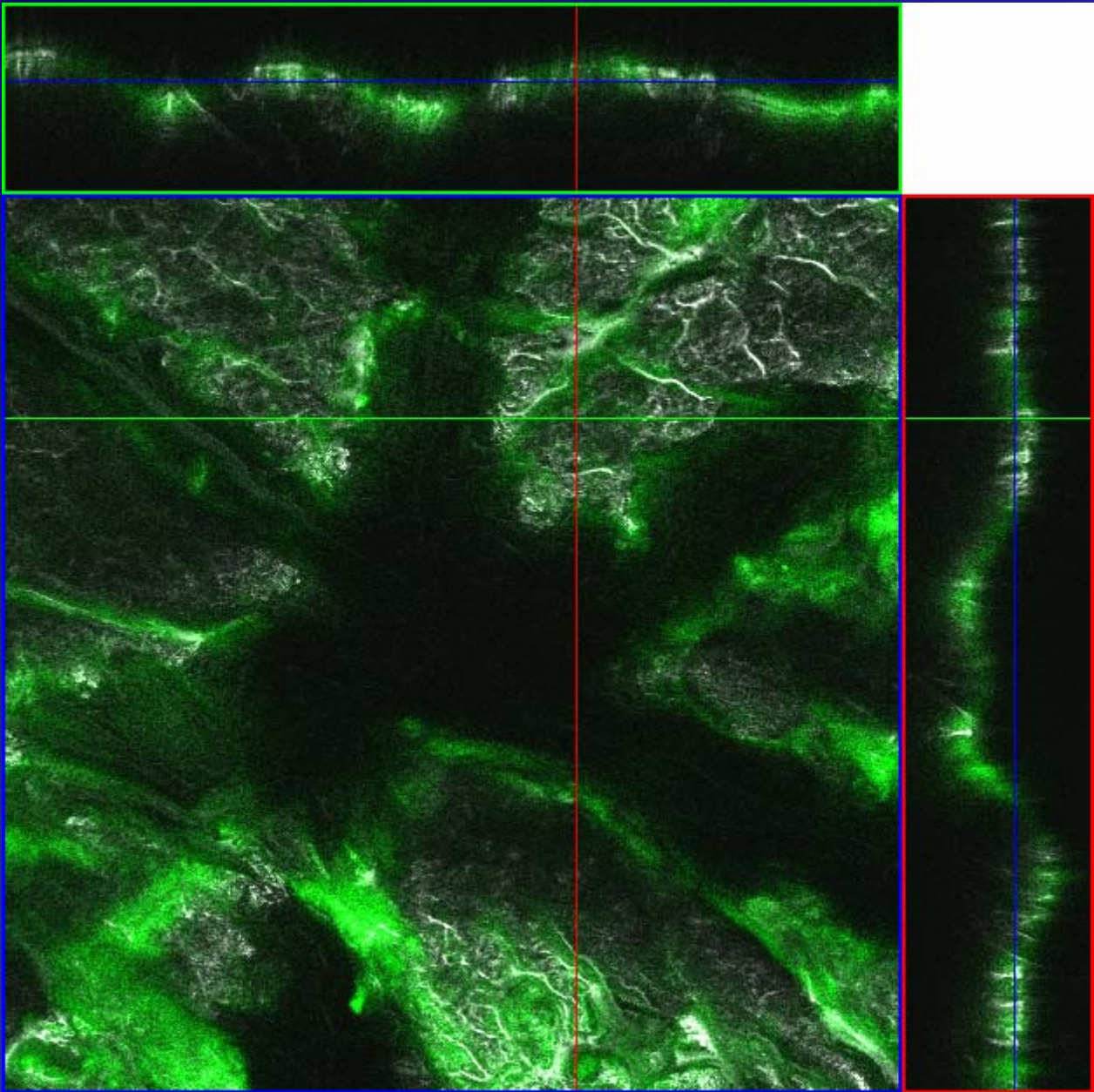
Saccharomyces cerevisiae
im Hopfen

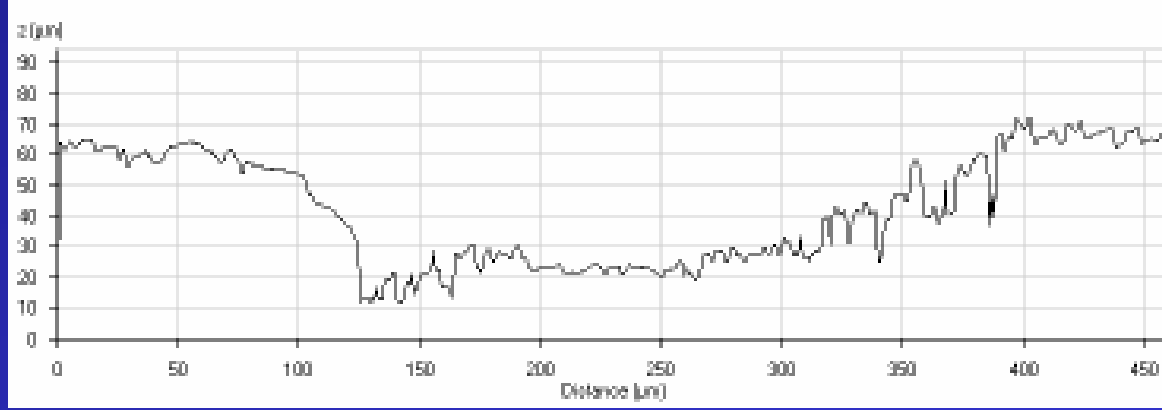
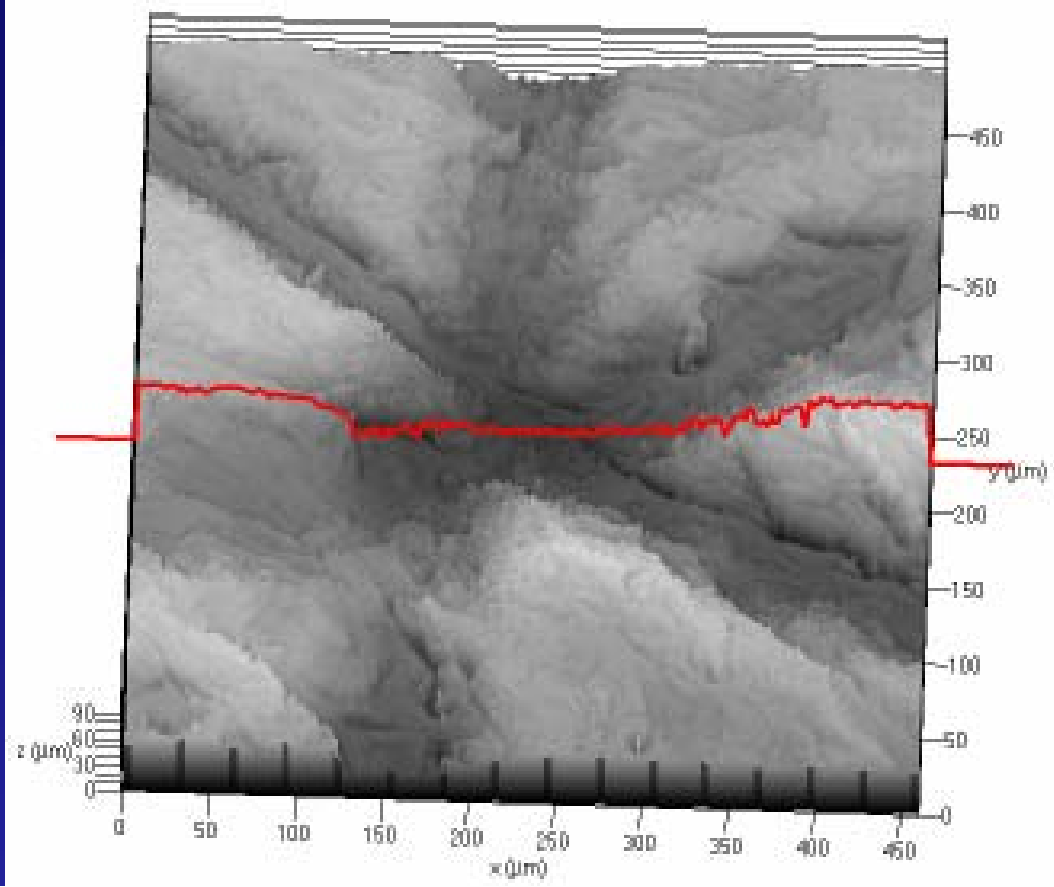


Select	Display	Orthogonal Sections		
Chan	xy	X	Y	Z
Zoom	Split xy	<input type="range"/>		
Slice	Ortho	<input type="range"/>		
Overlay	Cut	<input type="range"/>		
Contr	Gallery	<input type="range"/>		
Palette	Profile	<input type="range"/>		
Anim	3D	<input type="range"/>		
Reuse	Topo	<input type="range"/>		
Crop	Prev	<input type="range"/>		
Copy	Info	239	302	43
Save	Select	Dist.	Mark	
SaveAs				

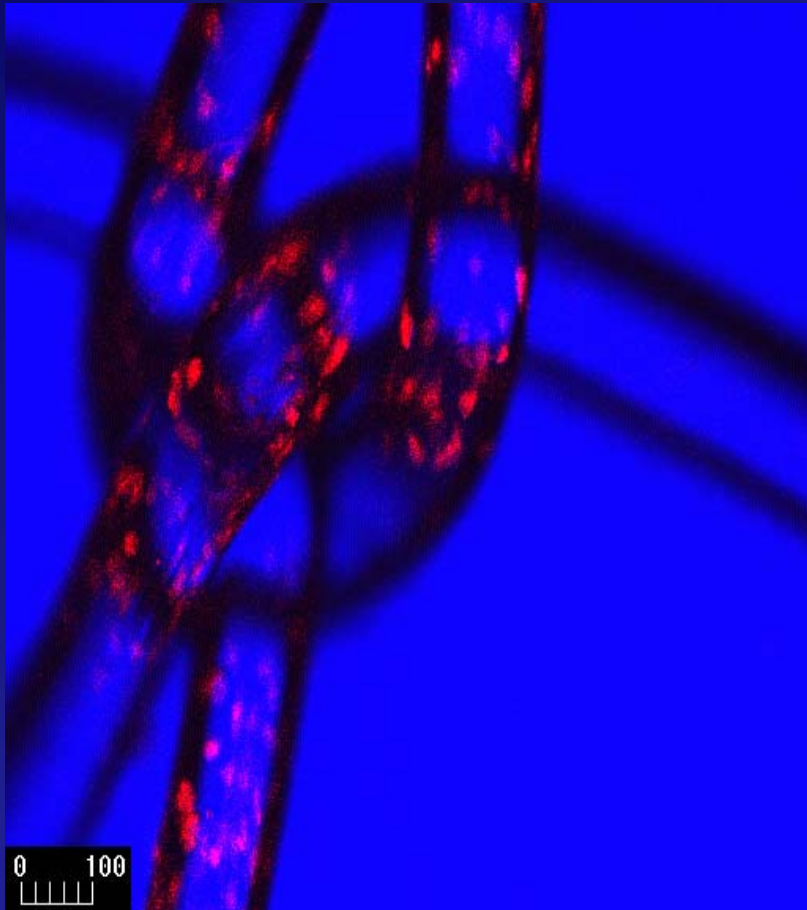
$Z = 568 \mu\text{m}$



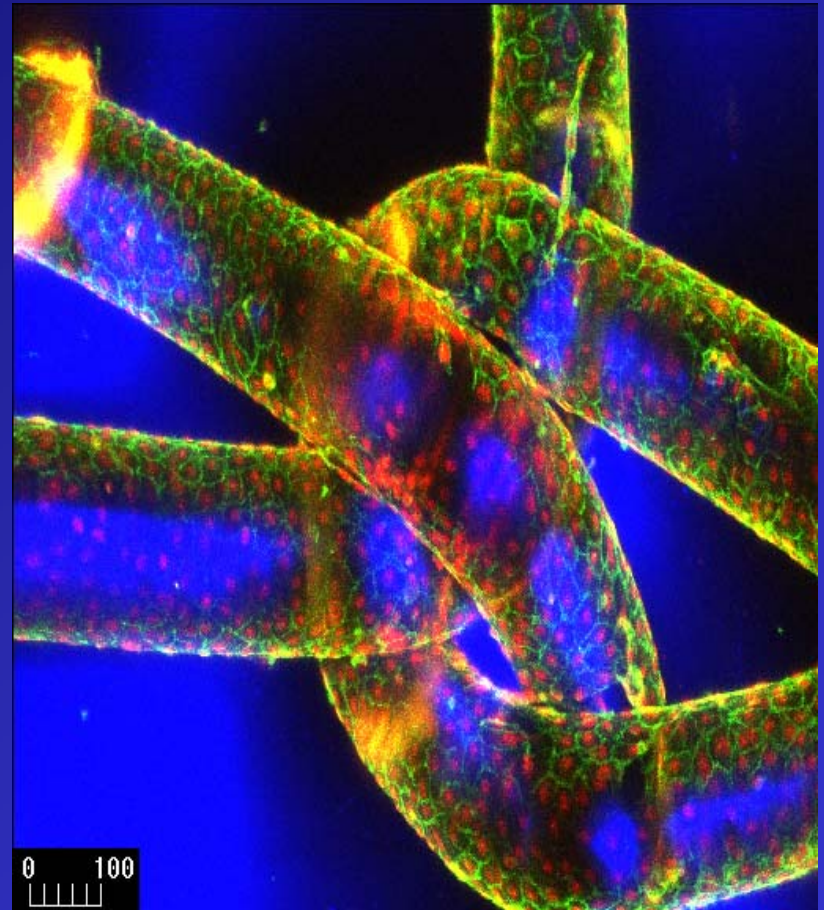




Netzartiges Implantat



unbehandelt



min3 modifiziert