

SPIM: MIKROSKOPIJA Z RAVNINSKO OSVETLITVIJO

MARUŠA VITEK

Fakulteta za matematiko in fiziko

Univerza v Ljubljani

PACS: 87.64.kv, 87.57.qp, 87.18.Nq

Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo je fluorescenčna metoda, pri kateri vzorec osvetljujemo pravokotno na os detekcije s tanko svetlobno plastjo. Bledenje vzorca je pri tem zelo majhno, metoda pa omogoča hitro zajemanje in dobro prostorsko ločljivost. Je pomembna na področju razvojne biologije, saj z njo lahko slikamo velike žive vzorce na različnih prostorskih in časovnih skalah.

SPIM: SELECTIVE PLANE ILLUMINATION MICROSCOPY

Selective plane illumination microscopy is a method in which the sample is illuminated by a thin light plane, perpendicular to the direction of detection. The method is fast and provides low photo-bleaching and high spatial resolution. It is important in the field of developmental biology.

Uvod

Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo (ang. selective plane illumination microscopy, SPIM) je nova metoda fluorescenčne mikroskopije [1]. Razvita je bila za potrebe eksperimentov na področju razvojne biologije, ki preučuje rast in diferenciacijo celic ter razvoj tkiv, organov in celotne anatomije živali.

Za opazovanje celotnega poteka razvoja moramo slediti številnim procesom na zelo različnih prostorskih in časovnih skalah. Prostorska skala se razteza od nekaj μm za procese znotraj celice do nekaj mm za procese na ravni zarodka, časovna skala pa se razteza od nekaj sekund do nekaj dni. Poleg široke prostorske in časovne skale je izziv za opazovanje še dejstvo, da imamo opravka s precej velikim, tridimenzionalnim, v idealnem primeru živim vzorcem, ki veliko svetlobe siplje ali absorbira. V raziskavah življenjskih procesov potrebujemo neinvazivne metode, ki vzorca ne uničijo. Le tako lahko opazujemo nespremenjene procese in njihov prispevek k celotnemu razvoju organizma.

Za opazovanje tridimenzionalnih bioloških vzorcev se v veliki meri uporabljajo fluorescenčne metode. Vzorci morajo zato vsebovati fluorofore, fluorescenčna barvila, ki se s kovalentno vezjo vežejo na makromolekule. Ob osvetljevanju se svetloba prave valovne dolžine absorbira in vzbudi molekulo v višje energijsko stanje. Z vibracijskimi prehodi molekula nato preide v nižje vzbujeno stanje, odkoder se z izsevanjem fotona vrne v osnovno stanje. Izsevana svetloba ima večjo valovno dolžino od vpadne, zato ju lahko

ločimo (npr. z dikroičnim zrcalom) in na detektor spustimo le izsevano svetlobo. Tako dobimo sliko opazovanega vzorca.

Pomembna slabost fluoroforov je, da jih določena količina vpadle svetlobe uniči. Vzorec zato s časom blede, saj zaradi uničevanja fluoroforov seva vedno manj fluorescentne svetlobe. Čas osvetljevanja mora biti čim krajši, saj obsežno osvetljevanje lahko poleg bledenja povzroči tudi poškodbe vzorca [2].

Pri metodi SPIM je čas osvetljevanja posameznega dela vzorca relativno kratek, osvetljujemo namreč le tisto plast vzorca, katere sliko zajemamo. Bledenje je zato zelo majhno, malo je tudi poškodb vzorca. Podatke je mogoče zajemati z veliko hitrostjo [1]. SPIM so razvili leta 2004, temu pa je sledil še razvoj sorodnih metod, ki so SPIM izboljšale in nadgradile.

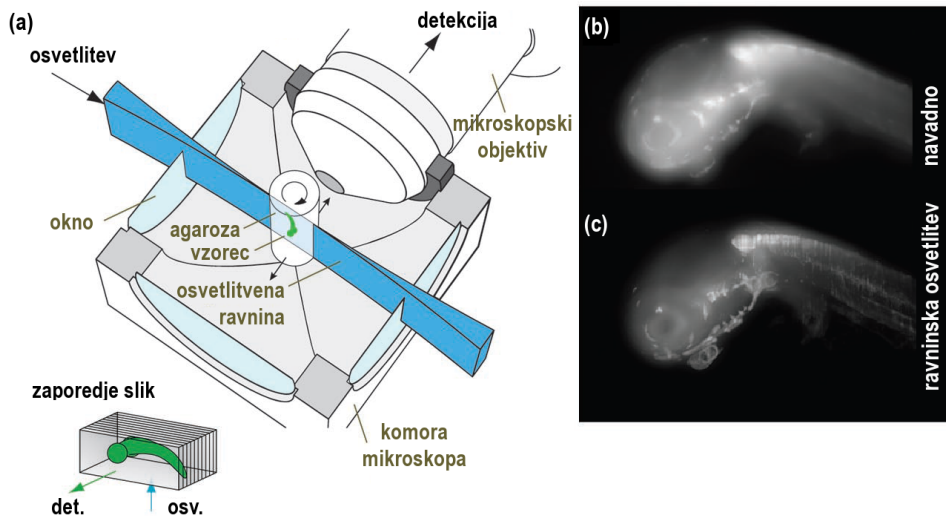
Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo

SPIM je metoda, pri kateri ločeno slikamo posamezne plasti vzorca. Optično ločevanje plasti poteka takole: vzorec od strani osvetlimo s tanko navpično svetlobno plastjo, imenovano osvetlitvena ravnina. Ta sovpada z goriščno ravnino mikroskopa in je pravokotna na vodoravno os detekcije (slika 1). Na presečišču osi detekcije in osvetlitvene ravnine je v napravo za mikropozicioniranje vpet vzorec v valju agaroze. Agarozni gel zagotavlja primerno okolje za živ vzorec, hkrati pa vzorec tudi fiksira. Naprava za mikropozicioniranje omogoča sukanje vzorca okoli navpične osi in premikanje vzdolž treh prostorskih osi.

Valj z vzorcem je potopljen v vodno okolje v komori mikroskopa. Večionoma za opazovanje uporabljamo imerzijski objektiv, ki je v stiku z vodnim okoljem v komori (slika 1), mogoča pa je tudi uporaba običajnega objektivna zunaj komore.

V vzorcu vpadna svetloba povzroči fluorescenco. S kamero detektiramo izsevano fluorescentno svetlobo iz poljubne navpične plasti vzorca. Če posnamemo slike dovolj gostega zaporedja plasti v eni smeri (ali v več smereh), lahko sestavimo tridimenzionalno sliko vzorca [1]. Tipični vzorci za opazovanje z metodo SPIM so zarodki rib medake (*Oryzias latipes*) in cebrice (*Danio rerio*) ter zarodki in odrasli osebki vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Vzorci so gensko spremenjeni, da vsebujejo fluorofore.

Svetlobno plast za osvetlitev vzorca dobimo tako, da kolimiran laserski snop primerno obrežemo, nato pa ga pošljemo skozi cilindrično lečo, ki snop v vodoravni smeri fokusira. V navpični smeri snop ostane kolimiran. Definirajmo koordinatni sistem, kjer je x -os vzporedna s smerjo detekcije, y -os navpična, z -os pa vzporedna s smerjo propagacije svetlobe v osvetlitveni plasti. Goriščna ravnina potemtakem leži v ravnini y - z . V tem koordinatnem sistemu lahko dobljeno svetlobno plast opišemo kot eno od rešitev



Slika 1. Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo. (a) Shema komore mikroskopa SPIM. Vzorec osvetljujemo s tanko svetlobno plastjo. Ta sovpada z goriščno ravnino in je pravokotna na os detekcije. Na presečišču osvetlitvene ravnine in osi detekcije je živ vzorec, denimo ribji zarodek, fiksiran v valju agaroze. Osvetlitev v plasti vzorca povzroči fluorescenco, ki jo zaznamo s kamero. Spodaj je prikazano zaporedje dvodimenzionalnih slik, ki jih lahko združimo v 3D sliko. (b) Projekcija tridimenzionalne slike zarodka ribe medake, posneta s konvencionalnim mikroskopom. (c) Projekcija tridimenzionalne slike istega vzorca, posneta z metodo SPIM. V tem primeru je kontrast bistveno boljši. Iz vira [1]. Ponatisnjeno z dovoljenjem AAAS.

paraksialne valovne enačbe, eliptičen Gaussov snop:

$$\begin{aligned}
 E(x, y, z) &= \\
 &= E_0 \sqrt{\frac{w_{x,0}}{w_x(z)}} \sqrt{\frac{w_{y,0}}{w_y(z)}} \cdot \exp\left(-\frac{x^2}{w_x^2(z)}\right) \cdot \exp\left(-\frac{y^2}{w_y^2(z)}\right) \cdot \exp(-i\varphi(x, y, z)),
 \end{aligned} \quad (1)$$

kjer je E_0 amplituda, $w_{x,0}$ in $w_{y,0}$ širini grl v smeri x in y , $w_x(z)$ in $w_y(z)$ širini snopa pri z v smeri x in y in φ faza [3]. Grlo snopa je lega, v kateri je širina snopa najmanjša. V smeri y je grlo približno 200-krat širše od širine grla v smeri x . Valovna narava svetlobne plasti ni pomembna, intenziteta fluorescentne svetlobe je odvisna le od intenzitete osvetlitvene ravnine

$$I(x, y, z) = |E_0|^2 \frac{w_{x,0}}{w_x(z)} \cdot \frac{w_{y,0}}{w_y(z)} \cdot \exp\left(-\frac{2x^2}{w_x^2(z)}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2y^2}{w_y^2(z)}\right). \quad (2)$$

Laserski snop sestavlja svetloba iz modro-zelenega dela spektra z valovnimi dolžinami 488 nm in 514 nm, ki prihaja iz argonskega ionskega laserja,

ter svetloba, ki prihaja iz dveh He-Ne laserjev in ima valovni dolžini 543 nm in 633 nm [4]. Debelina osvetlitvene plasti je tipično med 3 μm in 10 μm . Omejena je s pogojem, da mora biti plast približno enako debela na celotnem vidnem polju objektivna (lahko variira do 42 %) [1]. Objektiv z desetkratno povečavo in numerično aperturo 0.30 ima na primer vidno polje veliko 660 μm . Da bo na celotnem vidnem polju debelina osvetlitvene plasti variirala za manj kot 42 %, mora biti grlo plasti v x -smeri široko vsaj 6 μm .

Za detekcijo se uporabljajo CCD kamere. Hitrost zajemanja je od ene do štirih plasti na sekundo, pri čemer je slika ene plasti velika 1344×1024 pikslov. Vzorec se da vzdolž osi detekcije premikati po korakih velikosti od 0.5 do 5 μm [1].

Zaradi osvetlitve fluorofori v vzorcu izsevajo svetlobo v polni prostorski kot. Detektiramo le svetlobo, ki se izseva v smeri detektorja. Ker slikamo tridimenzionalne vzorce, govorimo o prečni ločljivosti v goriščni ravnini in o osni ločljivosti vzdolž osi detekcije. Prečno ločljivost σ_{xy} določa izraz

$$\sigma_{xy} = \frac{\lambda}{\sqrt{3 - 2 \cos \theta - \cos 2\theta}}, \quad (3)$$

kjer je λ valovna dolžina svetlobe, θ pa polovica kota maksimalnega stožca, iz katerega lahko sistem sprejme svetlobo. Kot θ je povezan z numerično aperturo objektivna:

$$\text{NA} = n \sin \theta, \quad (4)$$

kjer je n lomni količnik okoliškega medija objektivna.

Oсна ločljivost metode je odvisna od osne ločljivosti detektorja in od debeline osvetlitvene plasti. Vedno je slabša od prečne ločljivosti.

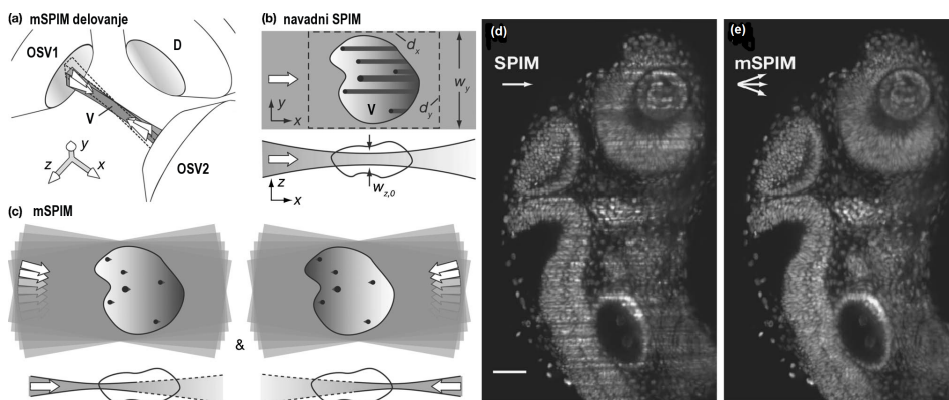
Izboljšave metode SPIM

Po letu 2004, ko so metodo SPIM prvič predstavili [1], je ta način slikanja doživel razcvet. Postal je eno glavnih orodij razvojne biologije, saj je primeren za opazovanje zelo različnih vzorcev: tankih, debelih, prozornih, delno neprozornih, različno sipajočih, in sicer na zelo različnih časovnih in prostorskih skalah. Za različne tipe vzorcev in za različne namene opazovanja je bilo mogoče metodo še izboljšati.

Največji problem pri metodi SPIM povzročata absorpcija in sipanje, saj imamo opravka z velikimi vzorci s specifično strukturo. Določeni deli vzorca svetlobo zelo močno absorbirajo. Ko se tak del vzorca znajde v osvetlitveni ravnini, za njim nastane senca, saj absorbira svetlobo, ki pride do njega. Prav tako določeni deli vzorca močno sipajo svetlobo. Ko svetloba pride do takega dela, se siplje v vse smeri. V goriščni ravnini objektivna za takšnim delom vzorca tako spet nastane senca, zaradi sipane svetlobe pa postanejo osvetljeni tudi bližnji deli vzorca, ki sicer niso v goriščni ravnini. Ta svetloba, ki ni v gorišču objektivna, prispeva le k ozadju slike in le-to zamegli. Tema problemoma se lahko delno izognemo z opazovanjem z več zornih kotov.

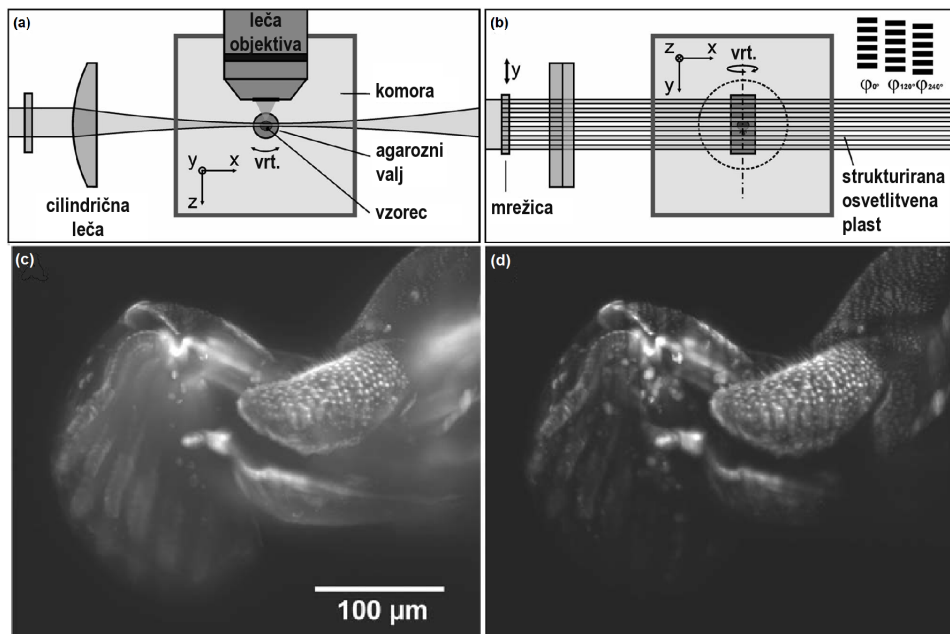
Večinoma vzorec slikamo iz štirih do osmih zornih kotov in pri vsakem kotu posnamemo 200–300 plasti [1]. Slikanje celotnega vzorca torej traja nekaj minut, kar omejuje časovno ločljivost mikroskopa. Kvaliteto slike lahko še dodatno povečamo z uporabo izboljšanih metod.

Pojava senc in zmanjševanja intenzitete svetlobe vzdolž osvetlitvene ravnine se med samim slikanjem lahko znebimo z večsmerno ravninsko osvetlitvijo mSPIM (ang. multidirectional SPIM, slika 2) [5]. Vzorec osvetljujemo z dveh nasprotnih strani hkrati. Poleg tega svetlobno plast v goriščni ravnini premikamo tako, da spreminjamo smer širjenja svetlobe med kotoma -10° in 10° . Zaradi spreminjanja tega kota se spreminja tudi kot senc za neprozornimi deli vzorca. Spreminjanje nagiba osvetlitvene plasti je hitro (1 kHz), čas zajemanja slike pa dovolj dolg (10–30 ms), da se sence v času zajemanja ene slike izpovprečijo (slika 2).



Slika 2. Delovanje metode mSPIM. (a) Shema mikroskopa mSPIM. Na shemi (b) vidimo, da pri navadni metodi SPIM za deli vzorca, ki absorbirajo, nastanejo sence. Shema (c) ilustrira, da sence pri metodi mSPIM izginejo, saj vzorec osvetljujemo z obeh strani in smer širjenja svetlobe spreminjamo med kotoma -10° in 10° . (d, e) Glava 35 ur starega zarodka cebrice. Na sliki (d), posneti z metodo SPIM, so opazne proge, ki na sliki (e), posneti z metodo mSPIM, zbledijo. Merilo na slikah je $50 \mu\text{m}$. Iz vira [5]. Ponatisnjeno z dovoljenjem The Optical Society.

Druga izboljšava osnovne metode je mikroskopija s strukturirano ravninsko osvetlitvijo SPIM-SI (ang. SPIM with structured illumination, slika 3) [6]. Z njo lahko ločimo fluorescentno svetlobo, ki se je izsevala iz goriščne ravnine, od tiste, ki se je izsevala iz bližnjih delov vzorca, osvetljenih s sipano svetlobo. Pri tej metodi je pred cilindrično lečo, ki povzroči fokusiranje kolimiranega snopa v vodoravni smeri, postavljena mrežica, ki povzroči modulacijo svetlobne ravnine v navpični smeri. Perioda mrežice je 10–150 rež na mm, zato uklon nima pomembne vloge. Mrežico lahko premikamo v navpični smeri. Vsako plast vzorca posnamemo pri treh različnih položajih mrežice. To vsakič premaknemo za tretjino periode v navpični smeri. Za vsako plast tako posnamemo tri slike I_{0° , I_{120° in I_{240° . Indeks se nanaša



Slika 3. Metoda SPIM-SI. Shema (a) prikazuje tlorisni pogled, ki je enak kot pri metodi SPIM. Razliko prikazuje shema (b). Povsem na levi je mrežica, ki povzroča strukturirano osvetlitveno plasti: namesto enotne plasti dobimo tanke pasove. Mrežico premikamo za tretjino periode mrežice v navpični smeri. Za vsako osvetljeno plast vzorca posnamemo tri slike pri različnih pozicijah mrežice, ustrezni osvetlitveni vzorci so prikazani desno zgoraj. Spodaj sta sliki rilčka vinske mušice. Slika (c) je posneta z navadno metodo SPIM, slika (d) pa z metodo SPIM-SI. Na njej so kontrasti bistveno boljši. Iz vira [6]. Ponatisnjeno z dovoljenjem The Optical Society.

na fazni zamik periodične strukture mrežice zaradi navpičnega premika.

Fluorescentna svetloba, ki izhaja iz goriščne ravnine, je vsa prostorsko modulirana, prispevki, ki ne prihajajo iz goriščne ravnine, pa so posledica sipanja in niso prostorsko modulirani. Ti prispevki so na vseh treh slikah iste plasti enaki. Iz treh slik ene plasti izboljšano sliko plasti izračunamo kot

$$I = \sqrt{\frac{1}{2} [(I_{0^\circ} - I_{120^\circ})^2 + (I_{120^\circ} - I_{240^\circ})^2 + (I_{240^\circ} - I_{0^\circ})^2]}. \quad (5)$$

Tako se znebimo prispevkov zaradi sipane svetlobe, ne da bi se pri tem spremenila ločljivost. Dobimo sliko z majhnim ozadjem in velikimi kontrasti. Čas snemanja treh slik ene plasti je med 0.3 s in 1 s, tako da za celoten vzorec, razdeljen na denimo 150 plasti, porabimo od 45 do 150 s [6].

Mikroskopija z digitalnim laserskim skeniranjem

Mikroskopija z digitalnim laserskim skeniranjem, DSLM (ang. digital scanned laser light sheet fluorescence microscopy) [7], je priredba metode SPIM. V tem primeru namesto osvetlitvene ravnine uporabimo približno $1\ \mu\text{m}$ debel osvetlitveni žarek, ki ga premikamo v navpični smeri, se pravi vzdolž y -osi, in s tem skeniramo vzorec. Kamera integrira signal, ki ga dobiva, medtem ko laserski žarek skenira eno plast. Tako dobimo dvodimenzionalno sliko ene plasti. Vzorec nato enako kot pri metodi SPIM po korakih premikamo skozi goriščno ravnino, da posnamemo gosto zaporedje plasti. Ker skeniramo s konstantno hitrostjo, je osvetlitev celotne plasti vzorca enakomerna. Z uporabo fokusiranega laserskega žarka se močno izboljša izkoristek osvetlitve, saj se za osvetljevanje porabi kar 95 % svetlobe, ki pride iz laserja. Pri metodi SPIM se pri oblikovanju svetlobne ravnine izgubi velik del svetlobe. Izkoristek osvetljevanja je le 3 % [7]. Zaradi razlike v izkoristkih pri enakem laserskem izvoru in enakem času osvetljevanja vzorca dobimo pri metodi DSLM 30-krat več fluorescentne svetlobe kot pri metodi SPIM. To omogoča bistveno hitrejšo zajemanje podatkov z metodo DSLM. Eno plast vzorca posnamemo v manj kot 1 ms, celoten vzorec torej slikamo v nekaj sekundah [7].

Tudi pri metodi DSLM se da prispevek zaradi sipanja zmanjšati s strukturiranim osvetljevanjem (DSLMI-SI) [8]. Tu je prehod v strukturirano osvetlitev precej preprostejši kot pri metodi SPIM, saj strukturiranost osvetlitve dosežemo s sinusno modulacijo intenzitete laserskega žarka med skeniranjem. Frekvenco in fazo modulacije lahko hitro spreminjamo. Tudi tu sliko ene plasti posnamemo trikrat, pri fazah modulacije 0° , 120° in 240° in nato končno sliko sestavimo po enačbi (5). Pri tem se prispevki zaradi sipanja spet odštejejo in ostane nam slika z boljšim kontrastom. Pri zarodku ribe medake se kontrast z uporabo metode DSLMI-SI v povprečju poveča za 80 %, pri zarodku vinske mušice, pri katerem je efekt sipanja zelo močan, pa kar za 260 % [8].

V primerjavi z metodo SPIM-SI ima DSLMI-SI tri pomembne prednosti. Prva je, da je modulacija laserskega žarka lahko zelo hitra, kar omogoča hitro zajemanje slik s fazno zamaknjenimi strukturami osvetlitve. Druga prednost je izjemna stabilnost in kvaliteta osvetlitvenega vzorca v nasprotju z vzorcem, ki ga pri metodi SPIM-SI tvorimo z mrežico. Ta lahko rahlo drsi in spreminja lego, zato je manj primerna za dlje trajajoče slikanje vzorca. Tretja prednost metode DSLMI-SI pa je možnost hitrega prilaganja frekvence in faze modulacije intenzitete osvetljevanja, kar omogoča spreminjanje strukture osvetlitve v skladu s spreminjanjem sipalnih lastnosti opazovanega predmeta [8].

Sklep

Mikroskopija z ravninsko osvetlitvijo vzorca je nova metoda, pomembna predvsem v razvojni biologiji. Z metodo digitalnega laserskega skeniranja

so denimo posneli tako imenovan „digitalni zarodek“ ribe cebrice. To je baza podatkov, ki vsebuje lege in hitrosti 92 % celičnih jeder zarodka vse od prve celične delitve do vzpostavitve bitja srca.

SPIM omogoča slikanje celotnih živih vzorcev, velikih do nekaj milimetrov. Je edina metoda, pri kateri je možno opazovanje celotnih živih organizmov s tako visoko ločljivostjo ($\sim \mu\text{m}$). Zelo pomembno je, da je nedestruktivna, tako da omogoča vpogled v življenjske procese in razvoj. Pri tovrstnih vzorcih zaradi absorpcije svetlobe in sipanja prihaja do težav, ki pa se jim lahko izognemo z večsmernim in s strukturiranim osvetljevanjem.

Zaradi uspešnosti metode SPIM v razvojni biologiji se je njena uporaba začela širiti tudi na druga področja. V fiziki razvijajo sorodno visokoločljivo metodo za optično sledenje nanodelcem.

SPIM je metoda z visoko ločljivostjo, hitrim zajemanjem, veliko penetracijsko globino ter odličnim razmerjem med signalom in šumom. Slabost metode pa je, da z njo lahko opazujemo samo vzorce, ki vsebujejo fluorefore. To navadno pomeni, da morajo biti vzorci gensko spremenjeni in torej niso več enaki izvornim. Leta 2011 je bil objavljen članek, ki predstavlja nizkokoherenčno mikroskopijo z ravninsko osvetlitvijo za slikanje bioloških vzorcev brez fluorescence [9]. V to smer bo verjetno tekkel tudi nadaljnji razvoj, saj je končni cilj dobiti metodo, s katero bi lahko z visoko prostorsko in časovno ločljivostjo opazovali žive nespremenjene vzorce.

LITERATURA

- [1] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt in E. H. K. Stelzer, *Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy*, *Science* **305**, 1007–1009 (2004).
- [2] J. Huisken in D. Y. R. Stainier, *Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology*, *Development* **136**, 1963–1975 (2009).
- [3] U. Kržič, *Multiple-view microscopy with light-sheet based fluorescence microscope*, Combined faculties for the natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany, doktorska disertacija, 2009.
- [4] K. Greger, J. Swoger in E. H. K. Stelzer, *Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope*, *Rev. Sci. Instrum.* **78**, 023705 (2007).
- [5] J. Huisken in D. Y. R. Stainier, *Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM)*, *Opt. Lett.* **32**, 2608–2610 (2007).
- [6] T. Breuning, K. Greger in E. H. K. Stelzer, *Lateral modulation boosts image quality in single plane illumination fluorescence microscopy*, *Opt. Lett.* **32**, 1938–1940 (2007).
- [7] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt in E. H. K. Stelzer, *Reconstruction of Zebrafish Early Embryonic Development by Scanned Light Sheet Microscopy*, *Science* **322**, 1065–1069 (2008).
- [8] P. J. Keller, A. D. Schmidt, A. Santella, K. Khairy, Z. Bao, J. Wittbrodt in E. H. K. Stelzer, *Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy*, *Nat. Methods* **7**, 637–642 (2010).
- [9] Z. Xu in T. E. Holy, *Development of Low Coherence Light Sheet Illumination Microscope for Fluorescence-free Bioimaging*, *Proc. SPIE* **8129**, 812908 (2011).