

Microscopia

Jan Peter Ebbing, Beatrice Fiumara, Giovanni Laganà

21 Marzo 2024

Indice

1	Introduzione	2
2	Parametri di acquisizione	3
2.1	Velocità di acquisizione	4
2.2	Frame average	5
2.3	Line average	6
2.4	Formato immagine	7
2.5	z-level	8
3	Risoluzione del microscopio	8
3.1	Metodologia	10
3.2	Risoluzione laterale (x-y)	11
3.3	Risoluzione assiale z	12
3.4	Commenti	14

Abstract

In questo esperimento si sono esplorate le proprietà ottiche di un microscopio confocale a fluorescenza. L'analisi è stata suddivisa in due fasi principali. Nella prima fase si sono variati parametri quali la dimensione del pinhole, la risoluzione, la frequenza di acquisizione e il numero di medie per ogni acquisizione, al fine di valutare gli effetti di questi parametri sull'acquisizione dell'immagine. Nella seconda fase si è valutata la risoluzione dello strumento mediante l'imaging di nanoparticelle fluorescenti, andando ad analizzare la figura di diffrazione generata (disco di Airy) e studiando così la risoluzione del microscopio sia nel piano xy che lungo l'asse z.

1 Introduzione

La microscopia confocale a fluorescenza (schema del microscopio in figura [1]) si basa sull'utilizzo di una sorgente di luce laser che eccita i fluorofori presenti nel campione, i quali emettono luce ad una lunghezza d'onda maggiore. L'elemento chiave del microscopio confocale è il pinhole (diaframma), posizionato nel piano focale dell'obiettivo, che elimina la luce fuori fuoco proveniente da piani differenti della profondità del campione. Ciò consente di ottenere immagini con una maggiore risoluzione in Z (asse ottico), permettendo la ricostruzione di immagini tridimensionali del campione mediante l'acquisizione di serie di sezioni ottiche a differenti profondità.

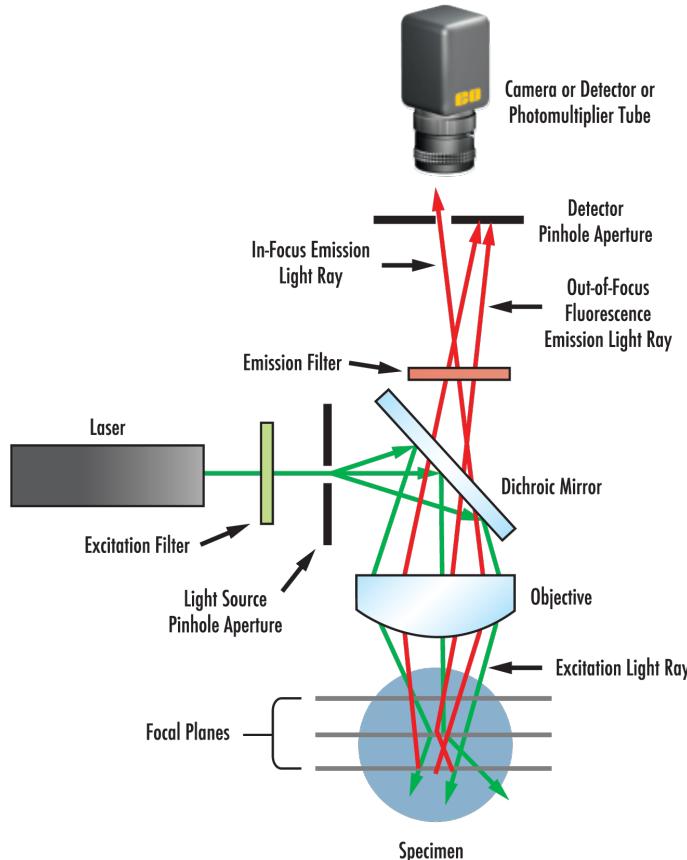


Figura 1. Rappresentazione schematica del microscopio confocale a fluorescenza. Si noti che in questa rappresentazione mancano gli specchi galvanometrici.

Un'altra componente fondamentale del microscopio è costituita da due specchi galvanometrici (figura [2]) che permettono di muovere il fascio laser attraverso il campione grazie a motori galvanometrici. Questa tecnica di movimento è nota come rastering, un metodo essenziale per mappare l'area del campione in modo sistematico e sequenziale. Questi specchi possono inclinarsi rapidamente per deviare il fascio laser su punti specifici del campione, consentendo scansioni rapide e accurate. Tale meccanismo riduce il rischio di photobleaching grazie a minori tempi di esposizione alla luce del campione.

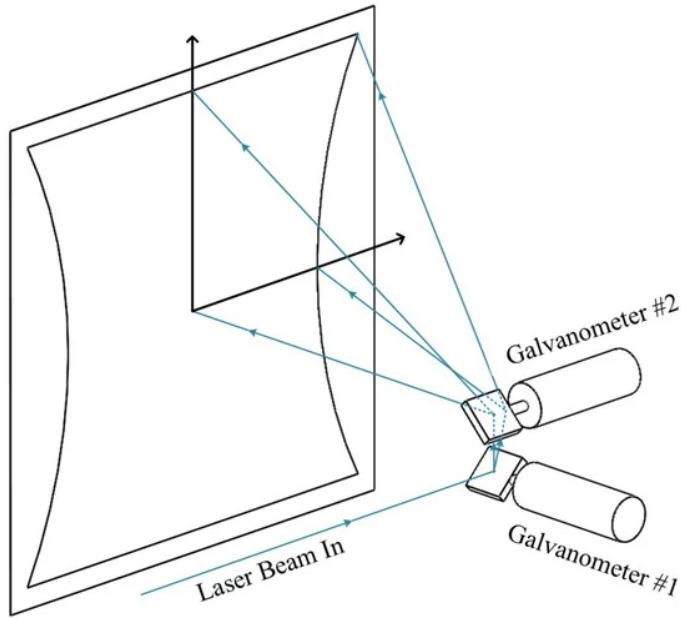


Figura 2. Specchi galvanometrici. Gli specchi galvanometrici sono utilizzati per deviare rapidamente il fascio laser sul campione. In questa configurazione, due galvanometri (Galvanometer #1 e Galvanometer #2) controllano rispettivamente i movimenti lungo gli assi X e Y, consentendo scansioni rapide e precise del campione.

2 Parametri di acquisizione

Lo strumento utilizzato per questa analisi è un microscopio confocale a fluorescenza della Leica Microsystems. Questo microscopio consente di impostare quattro canali di eccitazione e le relative bande di osservazione per il segnale di fluorescenza. Nella prima parte dell'analisi, sono state acquisite diverse immagini, variando un determinato parametro alla volta, mentre gli altri parametri sono stati mantenuti costanti. Le lunghezze d'onda di eccitazione utilizzate sono state $\lambda_1 = 488 \text{ nm}$ (fluorescenza nel verde) e $\lambda_2 = 633 \text{ nm}$ (fluorescenza nel rosso).

In questa parte dell'esperimento, si è utilizzato come campione del mughetto colorato con due coloranti fluorescenti e si sono acquisite diverse immagini. In ogni sezione, viene spiegato il parametro studiato e vengono presentate immagini a confronto. All'inizio di ciascuna è inclusa una tabella che mostra i valori degli altri parametri, fissi durante l'analisi.

2.1 Velocità di acquisizione

Formato	Line Average	Frame Average	Z Level [μm]	Zoom	Gain (V)
512x512	1	1	13.74	2.5	827

Questo parametro indica la velocità con cui i fasci di eccitazione sono direzionati attraverso la sezione del campione di interesse dagli specchi galvanometrici. Come illustrato nella figura[3], si nota che una maggiore velocità di acquisizione comporta un incremento del rumore e una diminuzione dell'intensità del segnale, effetto particolarmente evidente nella fluorescenza nel verde, la quale ha un'intensità minore rispetto alla fluorescenza nel rosso. Per analizzare meglio questo fenomeno, è stata selezionata una linea lungo cui è stato tracciato il profilo di fluorescenza sul canale verde, permettendo così di osservare distintamente le variazioni dovute alla modifica del parametro.

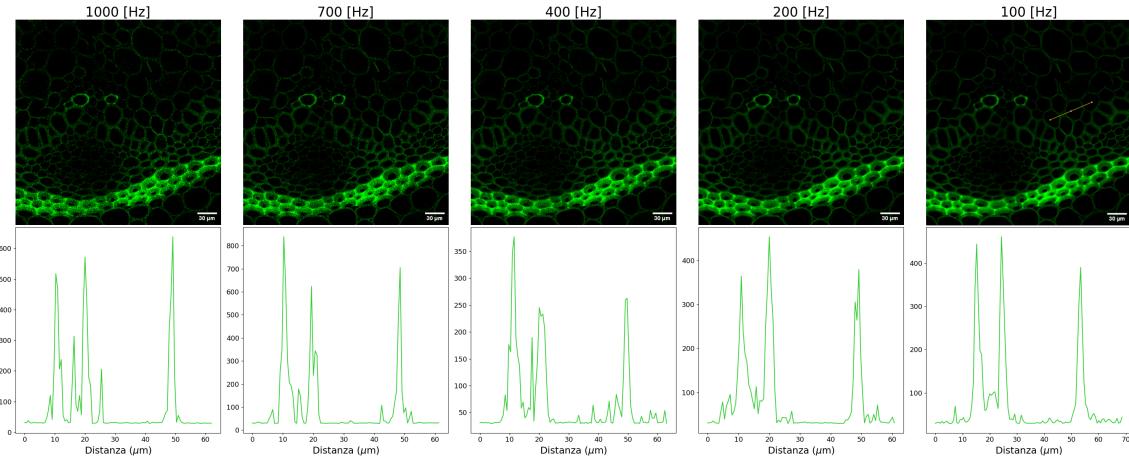


Figura 3. Confronto con diverse velocità di acquisizione: nella riga superiore sono mostrate le immagini con i due canali di fluorescenza sovrapposti. Nella seconda riga sono mostrati i plots del profilo di fluorescenza nel canale verde lungo la linea tracciata nell'immagine più a destra.

È importante considerare anche il rischio di photobleaching, ovvero la degradazione del fluoroforo causata da un'eccessiva esposizione alla radiazione.

2.2 Frame average

Formato	Velocità di Acquisizione	Line Average	Z Level [μm]	Zoom	Gain (V)
512x512	400	1	13.74	2.5	827

È possibile acquisire lo stesso frame, ovvero fare una scansione della stessa sezione più volte e farne poi la media. Il parametro "*Frame average*" indica quante volte il frame viene acquisito. Chiaramente, come si vede in figura[4] più frame si acquisiscono più l'immagine risulta nitida.

Anche in questo caso il photobleaching è un effetto da tenere in considerazione, in quanto acquisendo più frames si espongono i fluorofori ad una maggiore radiazione elettromagnetica.

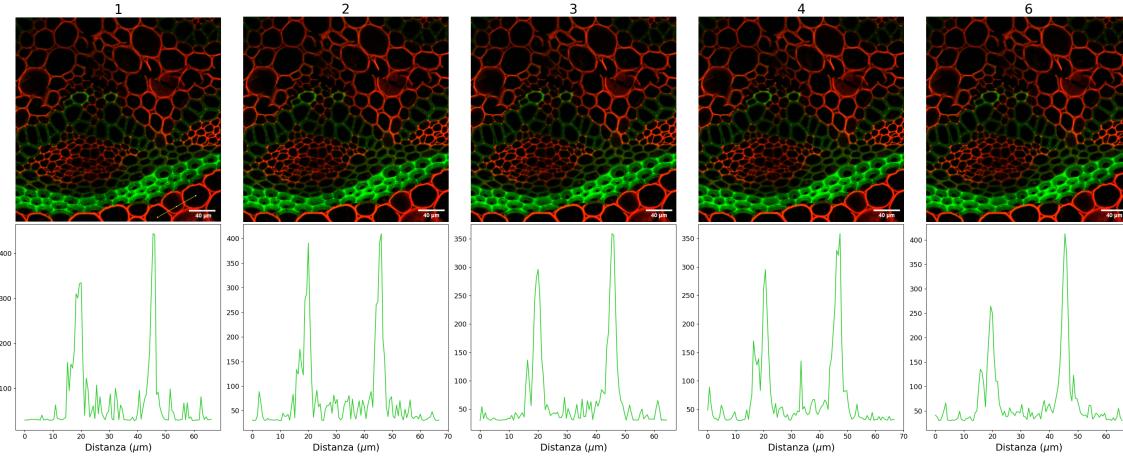


Figura 4. Confronto a diversi valori di frame average: nella riga superiore, ai diversi valori di frame average, sono mostrate le immagini con i due canali di fluorescenza sovrapposti. Sotto sono mostrati dei plot del profilo di fluorescenza nel canale verde lungo la linea tracciata nella prima figura.

2.3 Line average

Formato	Velocità di Acquisizione	Frame Average	Z Level [μm]	Zoom	Gain (V)
512x512	400	1	13.74	2.5	827

Analogamente al *frame average*, il parametro *"line average"* indica quante medie vengono fatte, ma questa volta su ciascuna riga dell'immagine e non su tutto il frame. Maggiore è il valore di questo parametro, migliore risulta il rapporto segnale rumore (figura[5]) ma anche in questo caso bisogna tenere presente la possibilità di fare photobleaching.

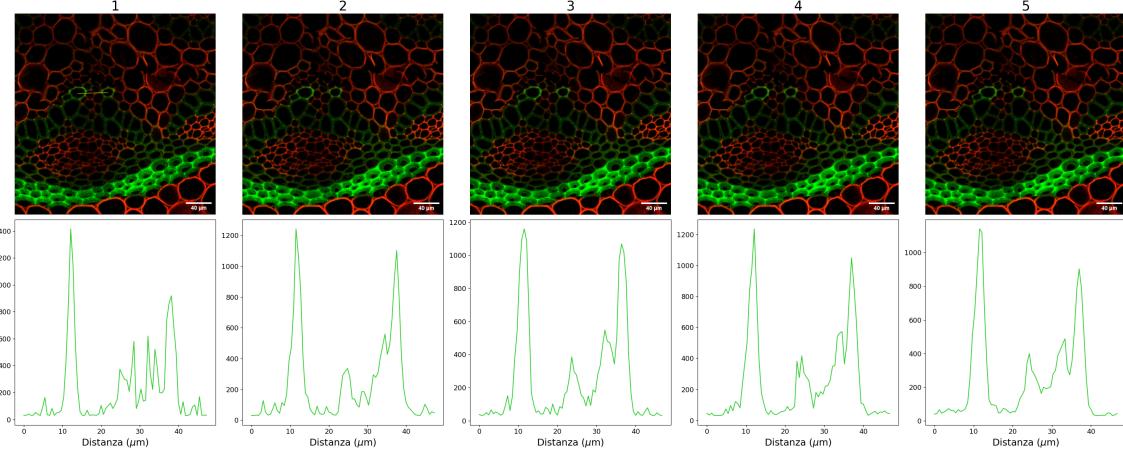


Figura 5. Confronto a diversi valori di frame average: nella riga superiore, ai diversi valori di line average, sono mostrate le immagini con i due canali di fluorescenza sovrapposti. Sotto sono mostrati dei plot del profilo di fluorescenza, nel canale verde, lungo la linea tracciata nella prima figura.

2.4 Formato immagine

Vel. di Acq.	Line Average	Frame Average	Z Level [μm]	Zoom	Gain (V)
400	1	1	13.74	2.5	827

Questo parametro indica la dimensione delle immagini misurata in pixel. Non solo determina la risoluzione dell'immagine, influenzando quindi la nitidezza e il dettaglio visibile (figura [6]), ma definisce anche il numero di aree in cui viene suddiviso il campione analizzato durante il rastering. Una risoluzione più alta permette di osservare maggiori dettagli, ma comporta anche un aumento del tempo necessario per l'acquisizione delle immagini e dello spazio di memoria occupato dai file risultanti.

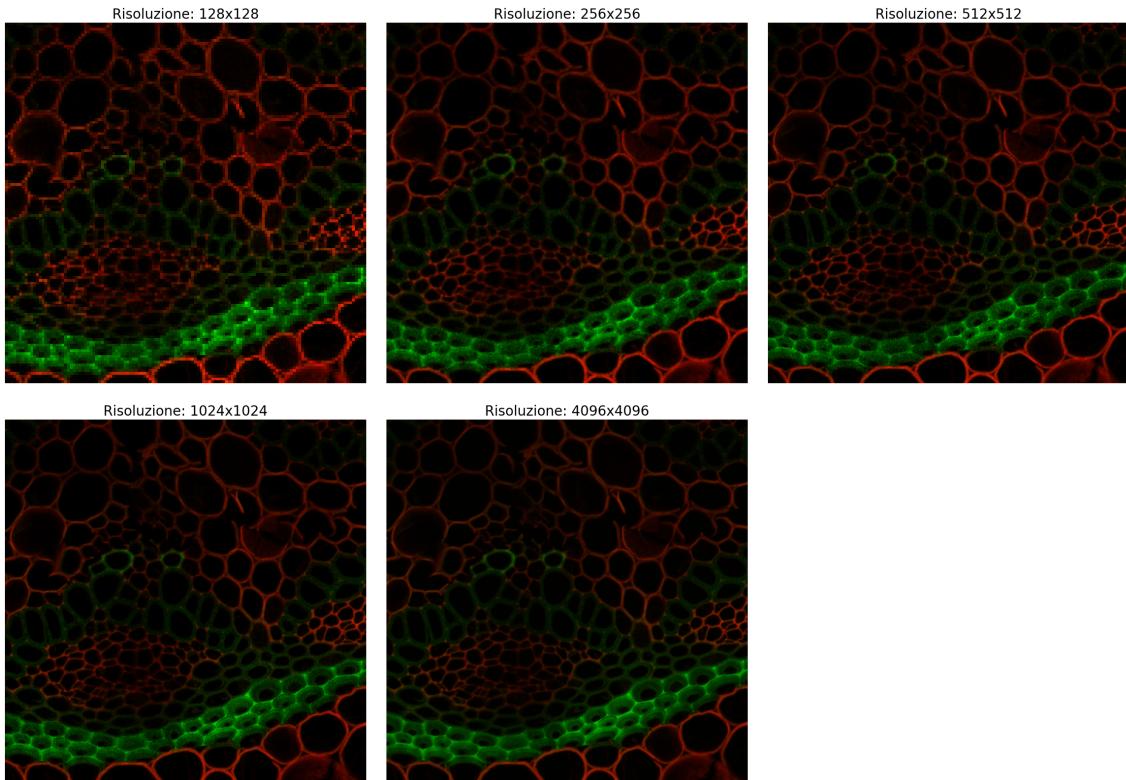


Figura 6. Confronto a diverse risoluzioni: Sono riportate le immagini di una stessa sezione del campione acquisite a risoluzioni differenti. Si noti che nel grafico le immagini vengono riscalate, ma tutte dello stesso fattore.

2.5 z-level

Formato	Vel. di Acq.	Line Average	Frame Average	Zoom	Gain (V)
512x512	400	1	1	2.5	827

Lo *z-level* specifica il livello di profondità lungo l'asse z che si desidera esaminare e va a modificare la distanza tra il pinhole e il rivelatore. Abbiamo acquisito immagini della stessa area variando lo z-level (figura [7]). In queste immagini sono visibili specifiche strutture del sistema di trasporto, che mostrano fluorescenza interna a determinati z-level. Questa caratteristica è osservabile perché il piano focale coincide con la superficie delle strutture.

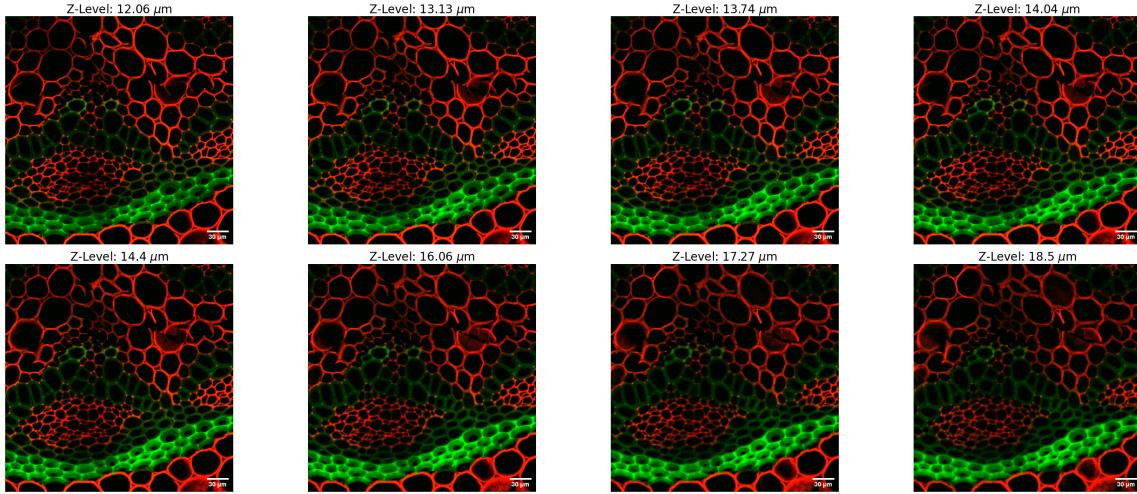


Figura 7. Confronto a diversi z-level: Sono riportate le immagini di una stessa sezione del campione acquisite a diversi z-level.

3 Risoluzione del microscopio

Quando si utilizza un microscopio, la luce, proveniente da diversi punti del campione, produce un'immagine, dove ciascun punto del campione non appare come un punto, ma piuttosto come una figura di diffrazione (*Point Spread Function*), nota come **disco di Airy**. Questo fenomeno è effettivamente dovuto alla diffrazione della luce che passa attraverso la lente. Anche in condizioni ideali con una lente perfetta (senza aberrazioni, ecc.), persiste comunque un limite alla risoluzione.

Il **criterio di Rayleigh** afferma che due punti luminosi sono considerati risolti (figura [8]) se il primo massimo del disco di Airy di uno dei due punti si trova sul primo minimo (o più distante) del disco di Airy dell'altro.

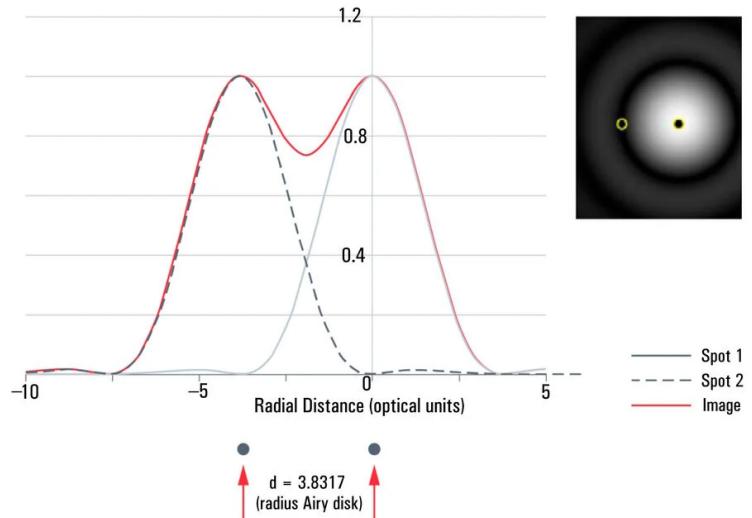


Figura 8. Criterio di Rayleigh: due punti sono considerati distintamente risolti quando il massimo principale del disco di Airy di un punto coincide almeno con il primo minimo del disco di Airy dell'altro punto o si trova più distante.

Esiste un altro criterio più frequentemente utilizzato per caratterizzare la risoluzione dei microscopi che sfrutta la FWHM (Full Width Half Maximum) della PSF (Point Spread Function). In questo caso consideriamo due punti risolti se la distanza tra i loro massimi principali dei dischi di Airy è almeno quanto la larghezza a metà altezza della PSF (figura [9]).

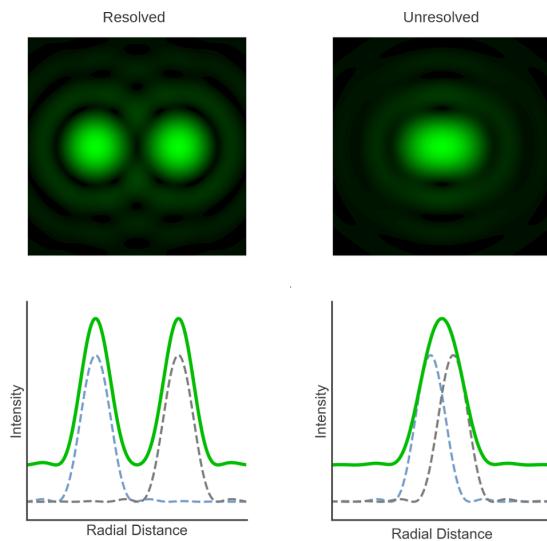


Figura 9. Criterio di Rayleigh: A destra le PSF dei due punti risultano sovrapposte e dunque l'immagine è sotto-risolta; a sinistra invece le PSF sono separate e l'immagine risulta risolta.

Utilizzando questo criterio è possibile ricavare la massima risoluzione teorica laterale (x-y) ed assiale (z) del sistema ottico (si veda [Microscope Resolution Estimation and Normalised Coordinates](#)).

$$d_{xy} = 0.6 \cdot \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} \quad (1)$$

$$d_z = 0.6 \cdot \frac{1\lambda}{(n - \sqrt{n^2 - NA^2})} \approx 0.6 \cdot \frac{2n\lambda}{NA^2} \quad (2)$$

dove NA rappresenta l'apertura numerica, ovvero $n \sin(\alpha)$, con n indice di rifrazione del mezzo interposto tra l'obbiettivo e il campione e α è metà dell'angolo di apertura dell'obbiettivo. Il fattore 0.6 davanti alla (1) ed alla (2) è dovuto al fatto che si sta facendo microscopia confocale e non a campo largo.

Si noti infine, che, a differenza di quanto fatto nell'articolo citato, in questo caso si è considerata la FWHM come la metà del diametro del primo massimo del disco di Airy e non si sono utilizzati dei coefficienti empirici.

3.1 Metodologia

In questa seconda fase dell'analisi del microscopio si sono acquisite delle immagini di sferette fluorescenti con diametro molto inferiore della risoluzione teorica. In questo modo si osservano le PSF ed è quindi possibile valutarne la FWHM. Si è studiata sia la risoluzione laterale (x-y), acquisendo semplici immagini planari, che quella assiale (z), utilizzando la modalità stack; in quest'ultima modalità vengono acquisite una serie di immagini a differenti z-level.

Le immagini sono state acquisite in zone del campione non eccessivamente popolate, per evitare i cluster di particelle aggregate (che risultano più luminose). Inoltre ogni immagine è stata acquisita in una zona diversa del campione, in quanto, dopo l'acquisizione di una prima immagine, si riscontrava un effetto di photobleaching, soprattutto per l'acquisizione in modalità stack.

Le immagini sono state prodotte utilizzando come lunghezza d'onda d'eccitazione $\lambda = 458 nm$.

Dalle immagini si sono ottenuti i valori delle FWHM di alcune sferette selezionate, utilizzando il software di analisi immagini ImageJ ed in particolare la funzione "*plot profile*", che permette di ottenere il profilo di intensità lungo una linea selezionata dall'utente (per la risoluzione laterale), oppure il profilo di intensità media in una determinata zona lungo l'asse z (per la risoluzione assiale).

Sono state scelte le sferette più isolate (in modo da avere un profilo più pulito) e non eccessivamente luminose, in quanto un eccessiva intensità potrebbe essere sintomo di un aggregato di più nanoparticelle.

Nelle sezioni successive sono riportati i valori delle FWHM, ottenuti fittando (direttamente con ImageJ) il profilo di intensità con una gaussiana (equazione(3)), da cui si ricava il parametro σ (ovvero la deviazione standard della gaussiana) che è legato alla FWHM tramite la (4).

$$y = a + (b - a) \cdot \exp \left(-\frac{(x - c)^2}{2\sigma^2} \right) \quad (3)$$

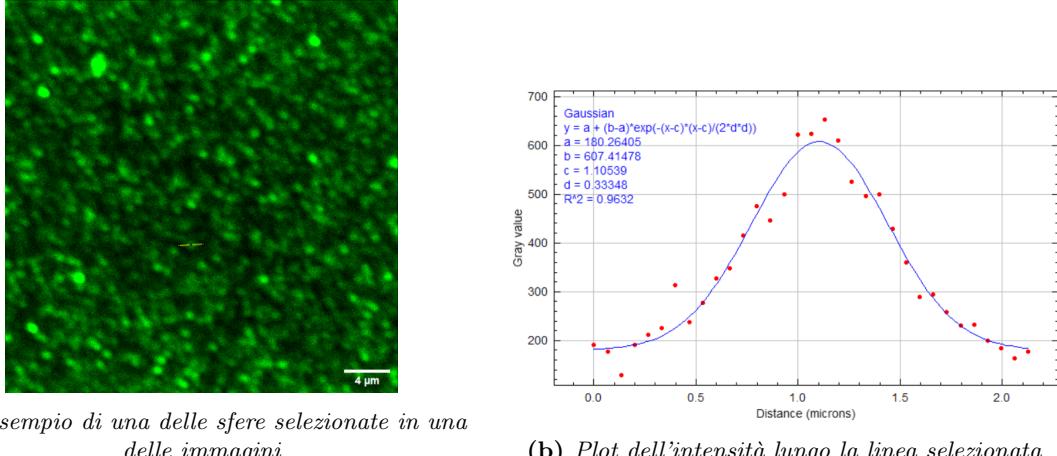
$$\text{FWHM} = 2\sqrt{2 \ln(2)} \cdot \sigma \quad (4)$$

Infine vengono presentati i confronti con i valori teorici calcolati a partire dalle equazioni (1) e (2).

3.2 Risoluzione laterale (x-y)

La risoluzione laterale è stata analizzata utilizzando un'apertura numerica (NA) di 0.5, con l'aria come mezzo di interfaccia tra il campione e la lente ($n = 1$). Il campione è stato eccitato con luce di lunghezza d'onda $\lambda_e = 458nm$, mentre la luce emessa è stata raccolta nel range di lunghezza d'onda compreso tra 494–655nm. Per il calcolo della risoluzione teorica è stata utilizzata $\lambda = 574.5$, ovvero quella a metà dell'intervallo e come errore è stato preso il raggio di quest'ultimo.

Sono state raccolte cinque immagini differenti da varie aree del campione, come ad esempio quella illustrata nella figura [10a].



(a) Esempio di una delle sfere selezionate in una delle immagini

(b) Plot dell'intensità lungo la linea selezionata

Figura 10. Esempio analisi sferette nel piano x-y

Per ognuna delle cinque immagini analizzate, sono state determinate le Full Width at Half Maximum (FWHM) di cinque "palline" distinte (figura [10b]). Per farlo è stata selezionata una linea attraversante la pallina ed è stato fittato il profilo di luminosità lungo quest'ultima con una gaussiana(3). Quindi si è ricavato il parametro σ e da questo il valore della FWHM per ciascuna pallina tramite la (4). I risultati di queste misurazioni sono riassunti nella tabella sottostante.

Immagine	FWHM (μm)					
1	0.49	0.78	0.49	0.49	0.45	
2	0.66	0.54	0.54	0.57	0.73	
3	0.61	0.64	0.57	0.54	0.49	
4	0.57	0.66	0.45	0.54	0.66	
5	0.57	0.52	0.57	0.52	0.80	

Si è calcolato il valor medio dalla FWHM, ovvero la $d_{(x-y)}$ a cui è stato associato come errore la deviazione standard. Il valore ottenuto è:

$$d_{(x-y)} = (578 \pm 94) nm$$

Infine, questo valore è stato confrontato con quello teorico ricavato dalla (1), ovvero:

$$d_{(x-y)}^T = 0.6 \cdot \frac{0.61 \cdot \lambda}{NA} = (421 \pm 59) \mu m$$

e dunque

$$t = \frac{|d_{(x-y)} - d_{(x-y)}^T|}{\sqrt{\sigma_{d_{(x-y)}}^2 + \sigma_{d_{(x-y)}^T}^2}} = 1.41$$

Si osserva che il valore teorico è in accordo con quello sperimentale, nonostante gli errori siano elevati (rispettivamente circa 14% e circa 16%). Questi errori ci permettono di considerare i seguenti fattori:

- Per il valore teorico non vi è un'unica lunghezza d'onda da considerare, ma bensì un range; quindi l'errore preso come raggio dell'intervallo permette di tenere in considerazione questo fattore.
- Il vetrino utilizzato presentava difetti, risultando in distorsioni diagonali simili a un 'drag' nelle immagini, il che aumenta l'errore sul valore sperimentale della risoluzione.

È ragionevole aspettarsi che il valore sperimentale sia maggiore rispetto a quello teorico, poiché il modello teorico presuppone condizioni ideali e trascura effetti quali l'aberrazione ottica. Si può quindi affermare che i risultati ottenuti rispecchiano molto bene quanto ci si aspettava.

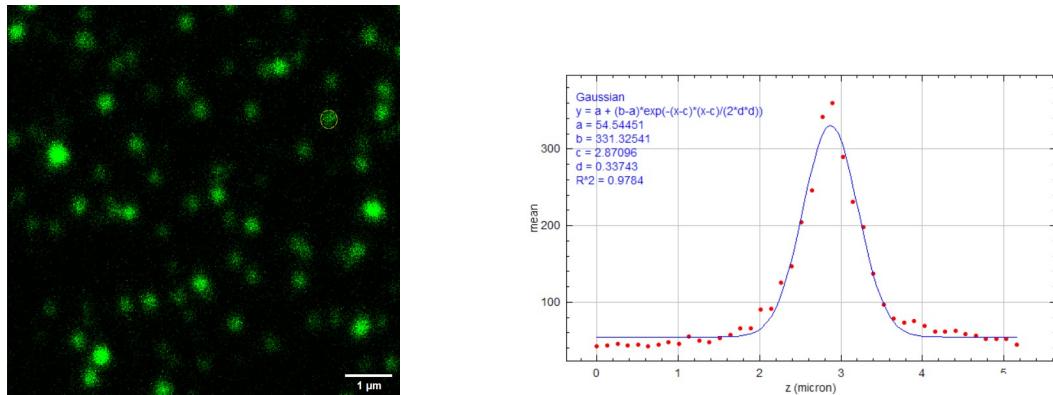
3.3 Risoluzione assiale z

Per lo studio della risoluzione assiale si è invece utilizzato come mezzo tra il campione e l'obiettivo un olio. I parametri utilizzati sono riportati nella tabella di seguito:

Parametro	Valore
λ eccitazione [nm]	458
λ emissione [nm]	526-616
n	1.518
NA	1.3

Tabella 1. Parametri Utilizzati per l'acquisizione delle immagini.

In questo caso si selezionano, tramite selezione circolare (figura [11a]), le "palline" di interesse e ImageJ effettua la media delle intensità all'interno di ciascun range selezionato per ciascun livello lungo z. Ciò che si ottiene è un plot come quello nella figura[11b]. Successivamente tali plot sono stati fittati tramite una gaussiana e, come prima, sono stati determinati i valori della FWHM, che vengono riportati nella tabella[2] (seconda colonna).



(a) Esempio di una delle sfere selezionate in una delle immagini

(b) Plot dell'intensità media all'interno della selezione in funzione dello z-level

Figura 11. Esempio analisi sferette nel piano z

Pinhole [μm]	FWHM [nm]	Media FWHM [nm]	σ_{FWHM} [nm]
39	748.24	731	44
	740.36		
	773.42		
	739.46		
	655.79		
64	727.19	750	21
	768.94		
	755.14		
163	815.47	827	27
	841.38		
	855.29		
	794.59		
245	893.44	882	27
	852.14		
	901.90		

Tabella 2. *FWHM misurate per diverse aperture del pinhole: sono state ottenute a partire dalla σ della gaussiana fittata utilizzando l'equazione (4).*

Si è calcolato il valore medio dalla FWHM, ovvero la d_z per ciascuna apertura del pinhole ed a questi valori è stata associata come errore la deviazione standard. I valori sono riportati nella tabella [2].

Si osserva che i valori ottenuti per la d_z aumentano con l'aumentare dell'ampiezza del pinhole. Possiamo immaginare che, a valori più piccoli dell'apertura del pinhole, il comportamento sia quello di un microscopio confocale, mentre a valori molto alti, tenda ad un comportamento analogo a quello di un microscopio a campo largo. Si è allora confrontato il valore di d_z all'apertura minore ($39 \mu m$) con il valore teorico ricavato dalla (2)¹; mentre si è confrontata la risoluzione all'apertura maggiore ($245 \mu m$) con la formula utilizzata per la microscopia a campo largo ovvero:

$$d_z = \frac{2n\lambda}{NA^2} \quad (5)$$

I confronti sono stati riportati nella seguente tabella:

Pinhole [μm]	d_z [nm]	d_z^T [nm]	t
39	731 ± 44	467 ± 37	4.59
245	882 ± 27	1025 ± 81	1.67

Nell'analisi corrente, l'accordo tra i valori sperimentali e quelli teorici non è soddisfacente quando si utilizza un pinhole di $39 \mu m$ con la formula per la microscopia confocale. Invece, la corrispondenza migliora sensibilmente con un pinhole di $245 \mu m$ utilizzando la formula per la microscopia a campo largo.

Questo scostamento, osservato con la formula per la microscopia confocale, potrebbe essere attribuito agli effetti ottici come l'aberrazione, che influenzano in modo più marcato la risoluzione assiale rispetto a quella laterale.

Per quanto riguarda la risoluzione calcolata con l'equazione 5, il valore ottenuto è maggiore rispetto a quello sperimentale. Questo accade perché l'esperimento è condotto in modalità confocale, anche se il pinhole utilizzato è molto aperto.

¹Anche in questo caso come valore della λ si è preso il valor medio dell'intervallo, ovvero $571 nm$, e come errore il raggio di quest'ultimo, ovvero $61 nm$ (che è stato poi propagato alla risoluzione).

3.4 Commenti

Come già detto, i valori delle risoluzioni ottenute dalle misure sono maggiori rispetto a quelli teorici. Questo è dovuto al fatto che nel calcolo teorico non si tiene conto di effetti ottici, quali l'aberrazione ottica. In particolare, visto che viene acquisito un certo range di lunghezze d'onda di emissione (e non una singola, come nelle formule teoriche), è presente il fenomeno dell'aberrazione cromatica.

Inoltre, anche l'apertura del pinhole influenza la risoluzione, in quanto un'apertura più grande permette di avere un segnale più intenso; al contempo, però, aumenta l'effetto dell'aberrazione, in quanto i raggi di luce che arrivano all'obiettivo hanno una distribuzione angolare (angolo di incidenza) più vasta. Questo si è visto nello studio della risoluzione assiale: aumentando la larghezza del pinhole, la grandezza della FWHM aumenta.