

Φασματοσκοπικός διαχωρισμός φθοριζουσών ουσιών (Spectral unmixing)

Σε δείγμα που έχει σημειωθεί με περισσότερα του ενός φθοριοχρώματα με κοντινά φάσματα διέγερσης, προκύπτει συχνά το πρόβλημα της αλληλοεπικάλυψης των φασμάτων εκπομπής των φθοριοχρωμάτων με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η διάκριση τους. Για να επιλυθεί το πρόβλημα αυτό, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το λογισμικό ‘**Spectral unmixing**’ του **Olympus Cell R**. Με το λογισμικό αυτό, μπορούμε να διαχωρίσουμε τη συνεισφορά του κάθε φθοριοχρώματος στο ολικό σήμα του φθορισμού που συλλέγουμε από κάθε κανάλι.

1) Για να γίνει διαχωρισμός των φασμάτων εκπομπής των φθοριοχρωμάτων, πρέπει αρχικά να γίνει **βαθμονόμιση**/ καθορισμός του συστήματος για κάθε φθοριόχρωμα. Αυτό γίνεται χρησιμοποιώντας δείγματα σημασμένα με ένα μόνο φθοριόχρωμα. Συλλέγουμε εικόνες-αναφοράς από δείγματα σημασμένα με ένα μόνο φθοριόχρωμα, χρησιμοποιώντας τα ίδια φίλτρα και τις ίδιες παραμέτρους που θα χρησιμοποιήσουμε για την συλλογή των εικόνων από τα δείγματα με τη διπλή χρώση.

Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι εάν θέλουμε να διαχωρίσουμε το φθοριόχρωμα Alexa 488 από το PI (propidium iodide), οι εικόνες-αναφοράς στα δείγματα μονής χρώσης θα πρέπει να συλλεχθούν με τα φίλτρα FITC-1 ή 2 και C3 αντίστοιχα του Olympus Cell R.

Οι λόγοι της μέσης έντασης φθορισμού, όπως μετρώνται στα δύο φίλτρα διέγερσης (μετά από αφαίρεση/διόρθωση του background), δίνουν μια σταθερά, που είναι ειδική για κάθε φθοριόχρωμα, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Οι δύο αυτοί λόγοι είναι απαραίτητοι για το φασματοσκοπικό διαχωρισμό των φθοριοχρωμάτων σε δείγματα με τη διπλή χρώση.

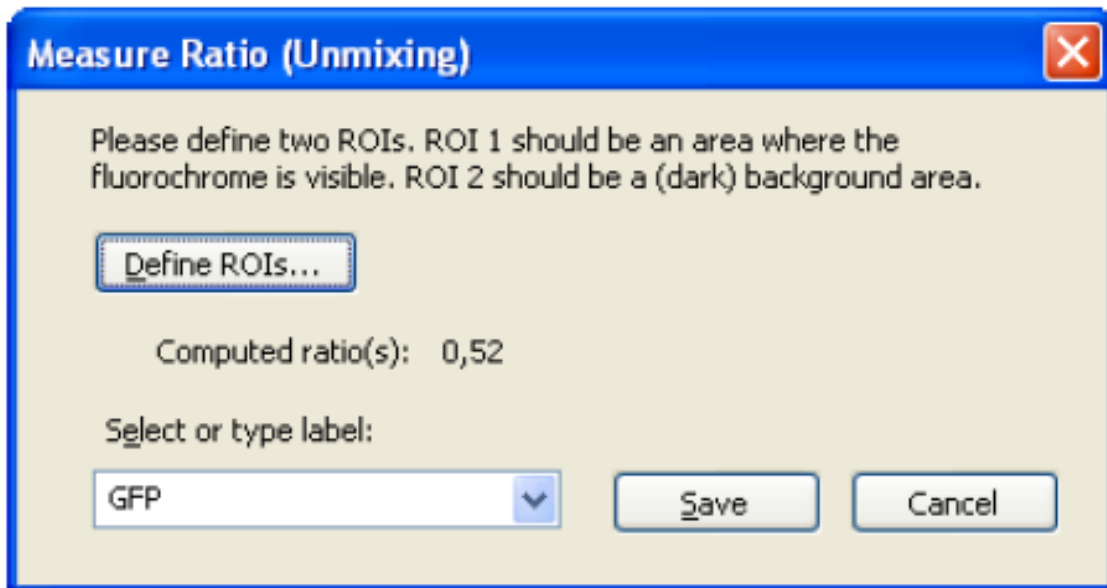
Έστω ότι θέλουμε να διαχωρίσουμε το φθοριόχρωμα Alexa 488 από το PI. Τα βήματα που ακολουθούμε είναι τα εξής:

1. CALIBRATION

Αρχικά εξετάζουμε το δείγμα που είναι σημασμένο μόνο με Alexa 488 nm.

Στον **Experiment manager**, τοποθετούμε ένα εικονίδιο image acquisition **FITC-2** (για το Alexa 488) και ένα εικονίδιο **C3** (για το PI). Γύρω από αυτά βάζουμε το multi-color frame και τα ενώνουμε μεταξύ τους με μία γραμμή. Στη συνέχεια, βλέπουμε το πεδίο στην κάμερα με τους δύο φθορισμούς και προσέχουμε να είναι και στους δύο φθορισμούς τα ίδια settings (light intensity και time exposure) και πατάμε ‘Get current camera settings’.

Μετά ανοίγουμε την εικόνα του διπλού φθορισμού και πατάμε το εικονίδιο ‘**Calibrate Spectral Unmixing**’, οπότε ανοίγει το παράθυρο **Measure Ratio (Unmixing)**. Εκεί πρέπει να καθορίσουμε δύο ROIs: το **ROI 1** πρέπει να είναι σε περιοχή όπου φαίνονται και τα δύο φθοριοχρώματα και το **ROI 2** πρέπει να είναι στο background της εικόνας.



Προκειμένου να καθορίσουμε την περιοχή που πρέπει να τοποθετήσουμε το ROI 1, μπορούμε να πάμε στο

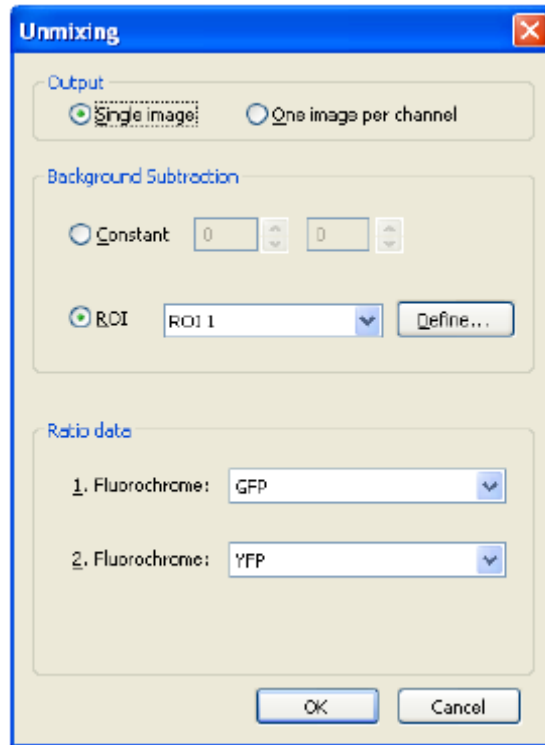
- **image**→ **adjust display**. Από εκεί μπορούμε να δούμε σε ποια σημεία συνυπάρχουν οι δύο φθορισμοί, ώστε στο ROI 1 να επιλέξει την περιοχή που έχει και τους δύο φθορισμούς στο μέγιστο.
- Κλείνουμε το **adjust display** και πάμε ξανά στα ROIs.
- Επιλέγουμε **'define ROIs'**.
- Παίρνουμε κάποιο από τα tools, π.χ. τον κύκλο και τον βάζουμε στην εικόνα στην περιοχή που θέλουμε το ROI 1. Μετά παίρνουμε άλλον ένα κύκλο και τον βάζουμε στην περιοχή που θέλουμε το ROI 2.
- Μετά πατάμε **'close'**.
- Στη συνέχεια, εμφανίζεται αυτόματα ο λόγος (computed ratio), που μας δείχνει τον λόγο των μέσων όρων της έντασης του φθορισμού στο πρώτο ROI, μετά την αφαίρεση του ROI 2 (background). Στη συνέχεια, ονομάζουμε τα settings αυτά με ένα όνομα π.χ. Alexa 488 (C3).

*** Όσο πιο υψηλή η τιμή του λόγου - computed ratio, τόσο πιο καλό spectral unmixing των φθοριοχρωμάτων μπορεί να γίνει.**

Στη συνέχεια, εξετάζουμε το δείγμα που είναι σημασμένο μόνο με τη δεύτερη φθορίζουσα ουσία, στο παράδειγμα μας, το PI. Κάνουμε ακριβώς την ίδια διαδικασία, συλλέγουμε την εικόνα με τα δύο φίλτρα FITC-2 και C3. Προσέχουμε να είναι και στους δύο φθορισμούς τα ίδια settings (light intensity και time exposure), φτιάχνουμε τα ROIs και σώζουμε με ένα όνομα τον δεύτερο λόγο π.χ. PI (FITC).

2. UNMIXING

- Στη συνέχεια, εξετάζουμε τα διπλά σημασμένα δείγματα, στο παράδειγμα μας με Alexa 488 και PI. Συλλέγουμε την εικόνα με τα δύο φίλτρα FITC-2 και C3 και επιλέγουμε **'Spectral Unmixing'**. Ανοίγει το παράθυρο 'Unmixing':



Στο **'output'** βάζουμε **'single image'**, στο **'background subtraction'** βάζουμε constant εκτός αν θέλουμε να καθορίσουμε ROIs στην εικόνα, στο **'ratio data'** βάζουμε τα δύο ονόματα των settings που είχαμε σώσει πριν, δηλαδή Alexa 488 (C3) και PI (FITC). Πατάμε OK, οπότε αρχίζει να γίνεται το unmixing. Η διορθωμένη εικόνα, που έχει υποστεί το unmixing, εμφανίζεται αυτόματα στο image buffer box.