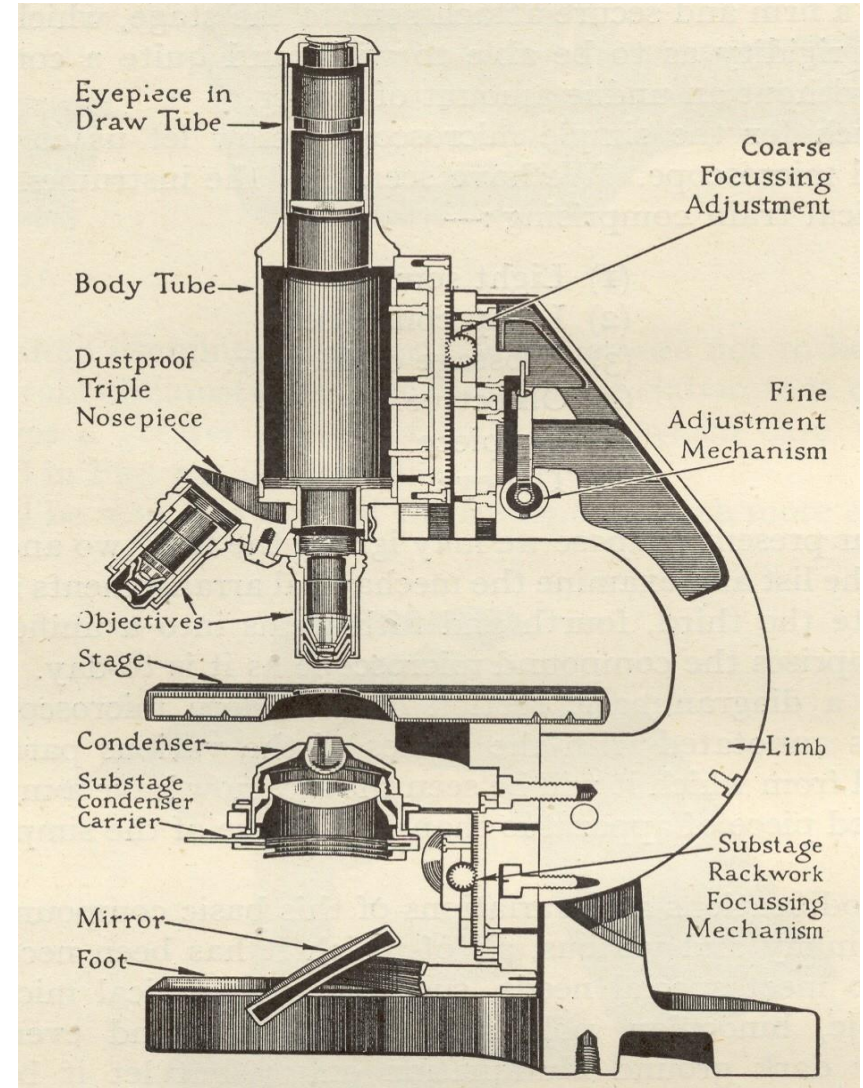
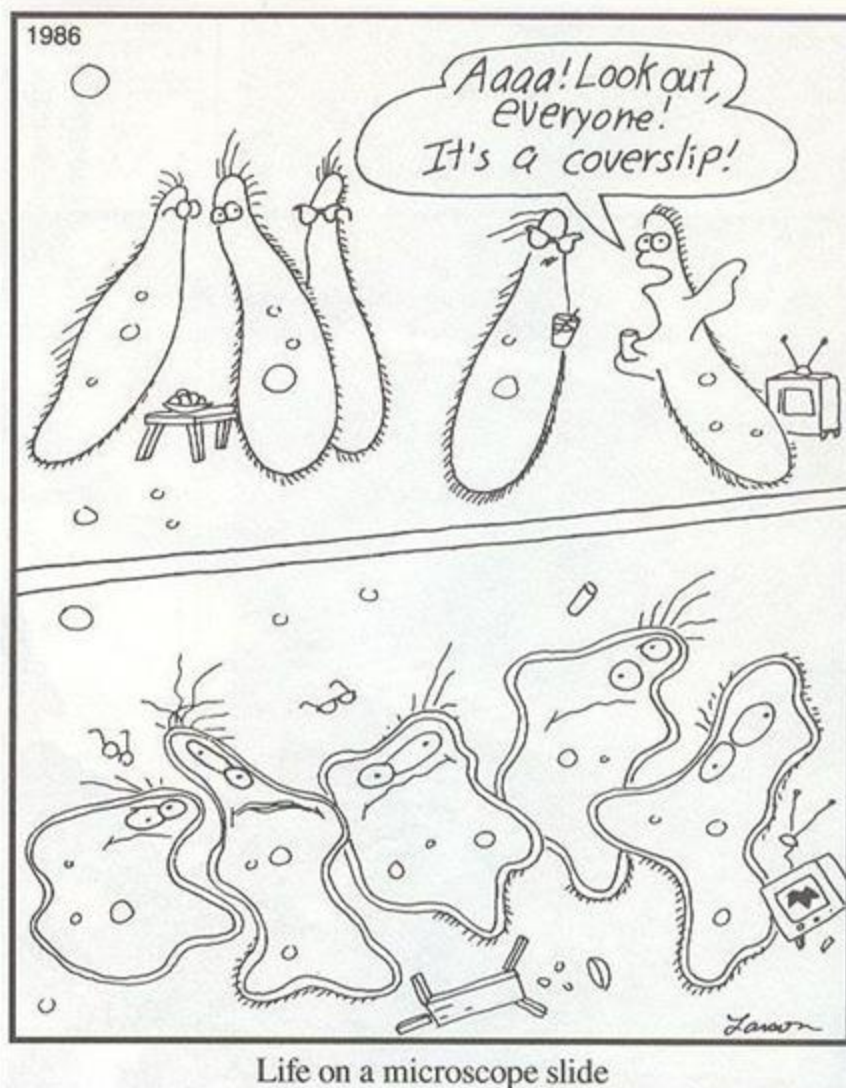
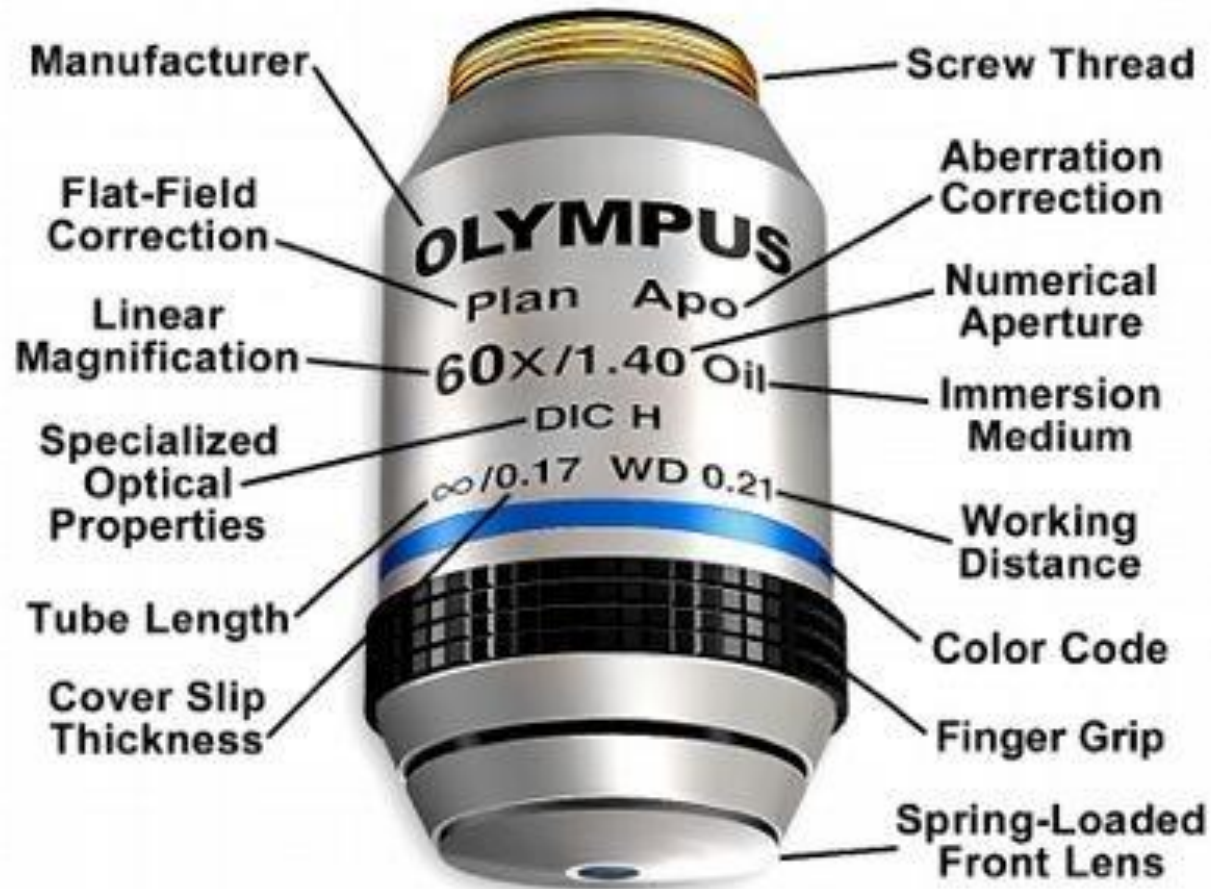


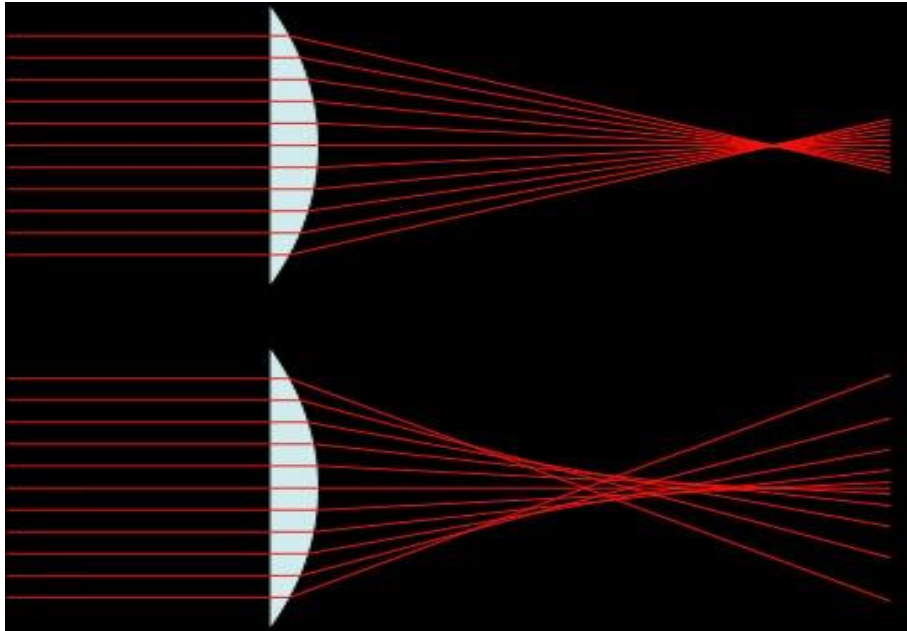
5. Světelná mikroskopie



Mikroskopový objektiv



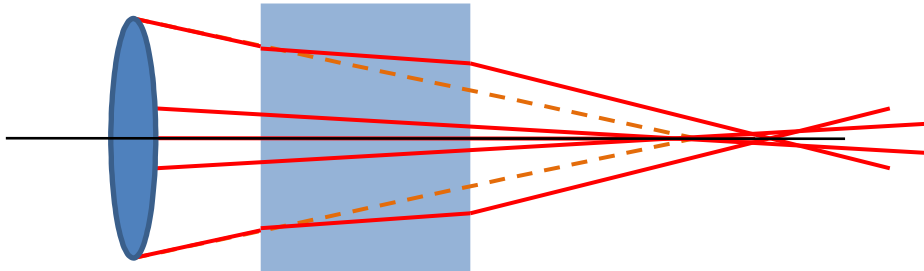
Otvorová vada objektivu



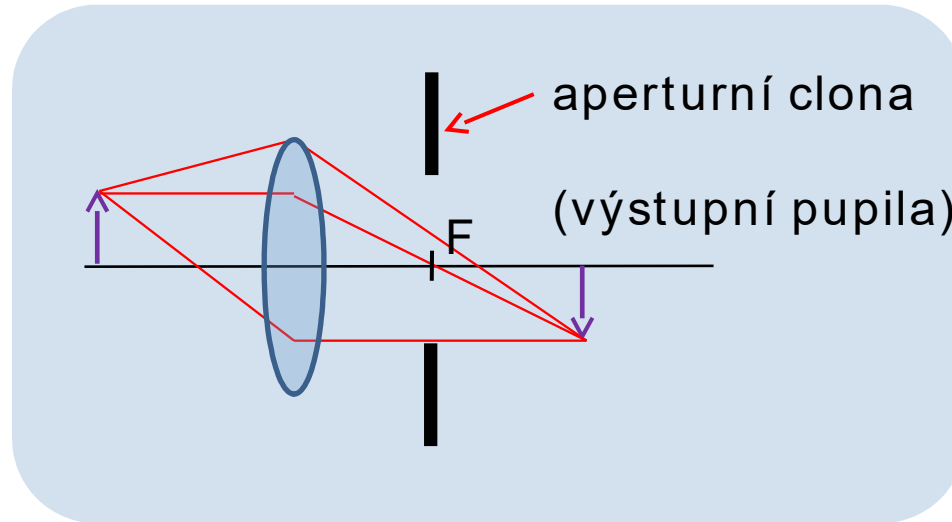
nulová

pozitivní

- lze způsobit také krycím sklíčkem či vrstvou preparátu

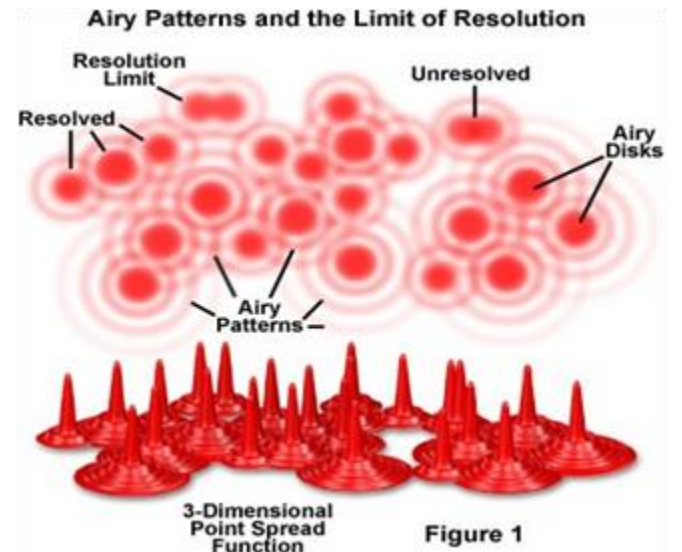
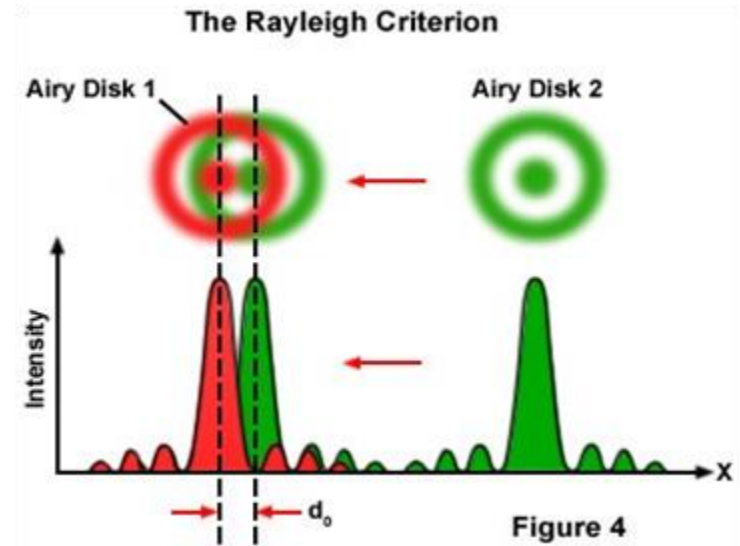
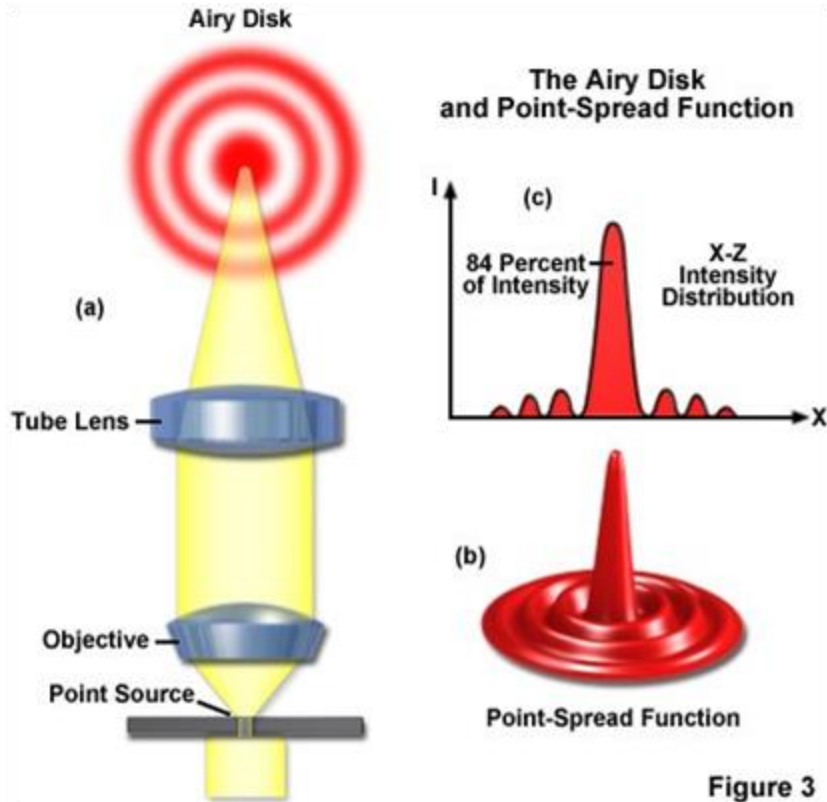


Ohraničení svazku



$$NA = n \sin \alpha$$

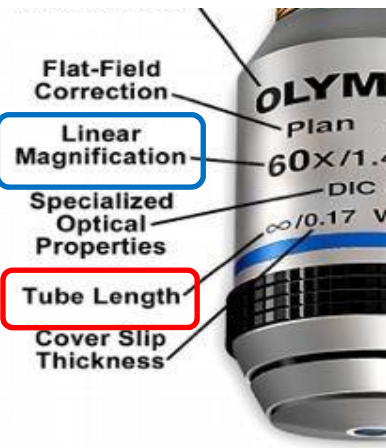
Zobrazení bodu - PSF (point spread function)



Rozlišení mikroskopu
 $d_0 = 0.61 \lambda / NA$

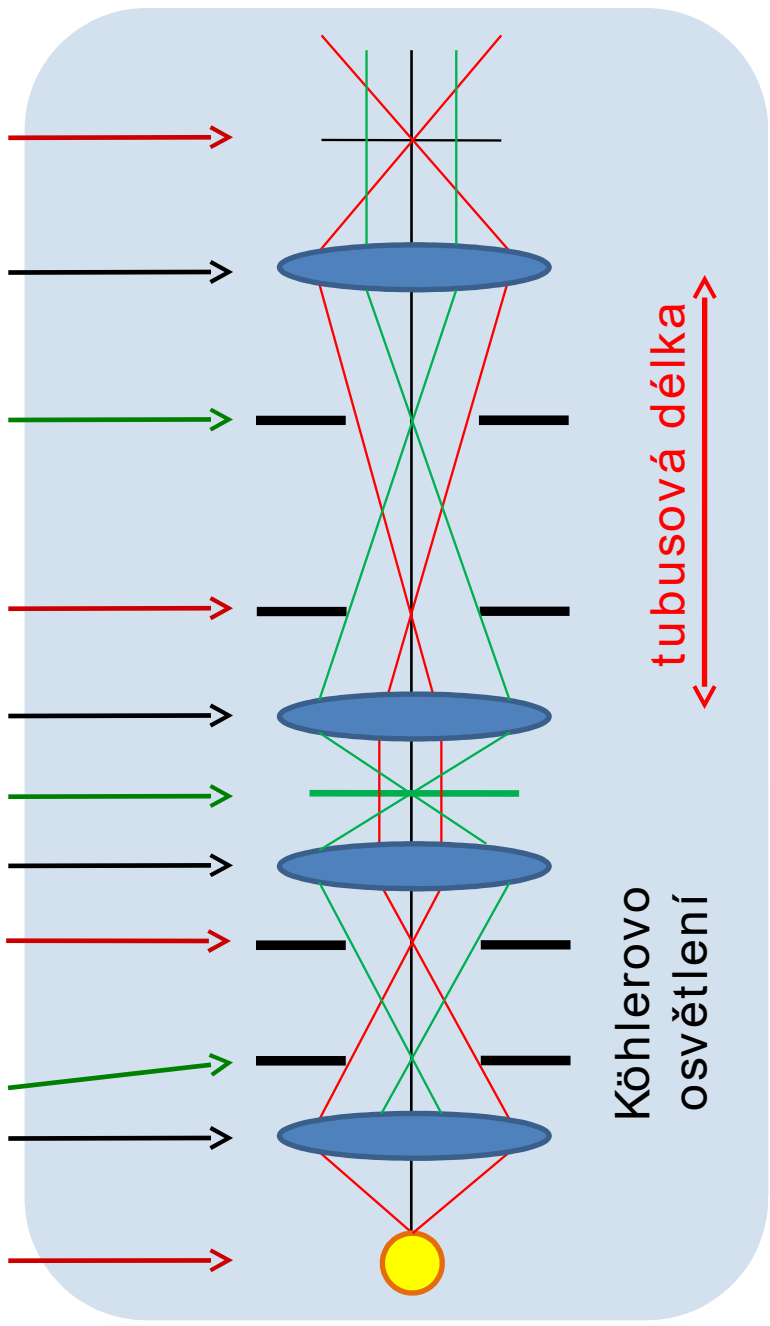
Složený mikroskop – světlé pole

$$m = m_{obj} m_{okul}$$



polní clona (měřicí rysky)
 primární zobrazení
 aperturní clona objektivu
 ohnisková rovina
 objektiv
 vzorek
 kondenzor
 aperturní clona kondenzoru
 ohnisková rovina
 polní clona kolektor
 zdroj

pupila oka
 okulár
 objektiv
 kondenzor
 zdroj



Složený mikroskop s nekonečnou tubusovou délkou



primární zobrazení
v ohnisku tubusové
čochy

tubusová čochka

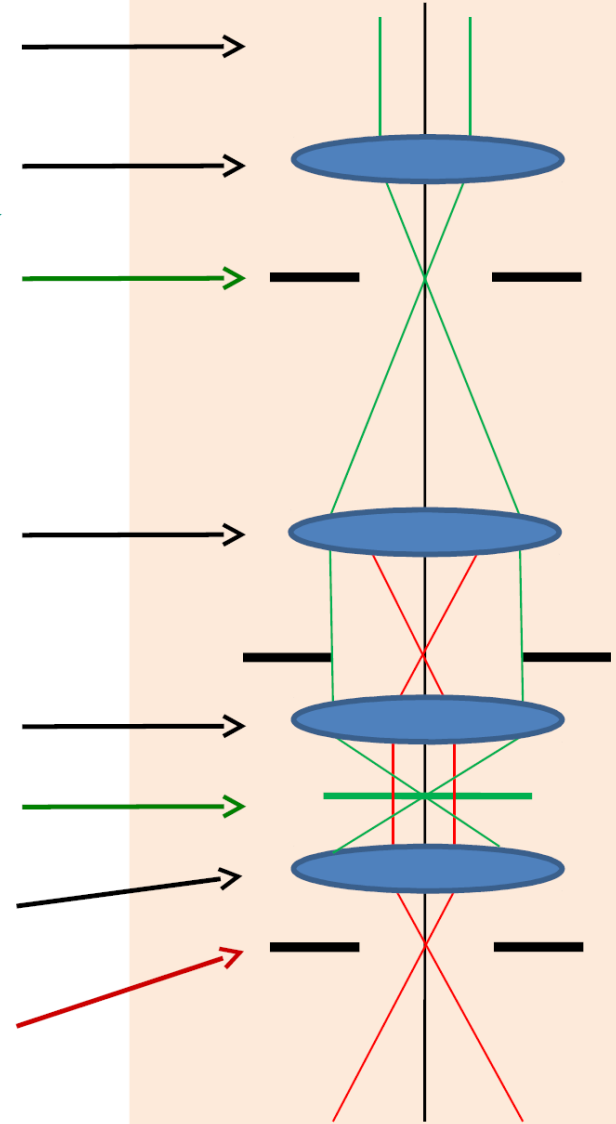
objektiv
vzorek v ohnisku
objektivu

kondenzor

aperturní clona
kondenzoru
ohnisková rovina

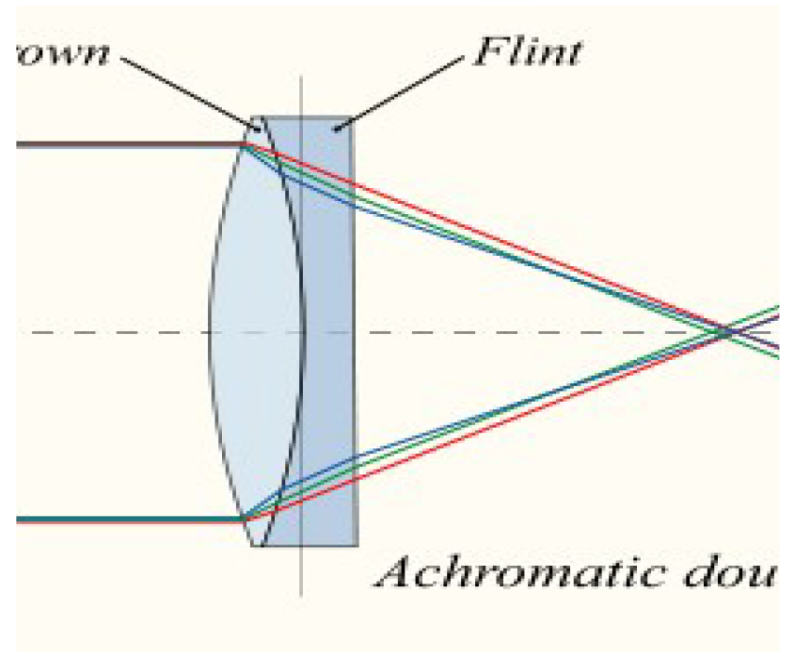
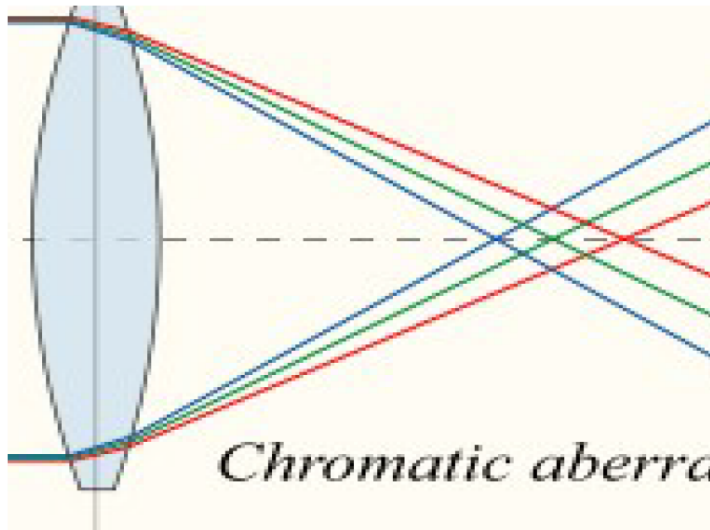
do oka

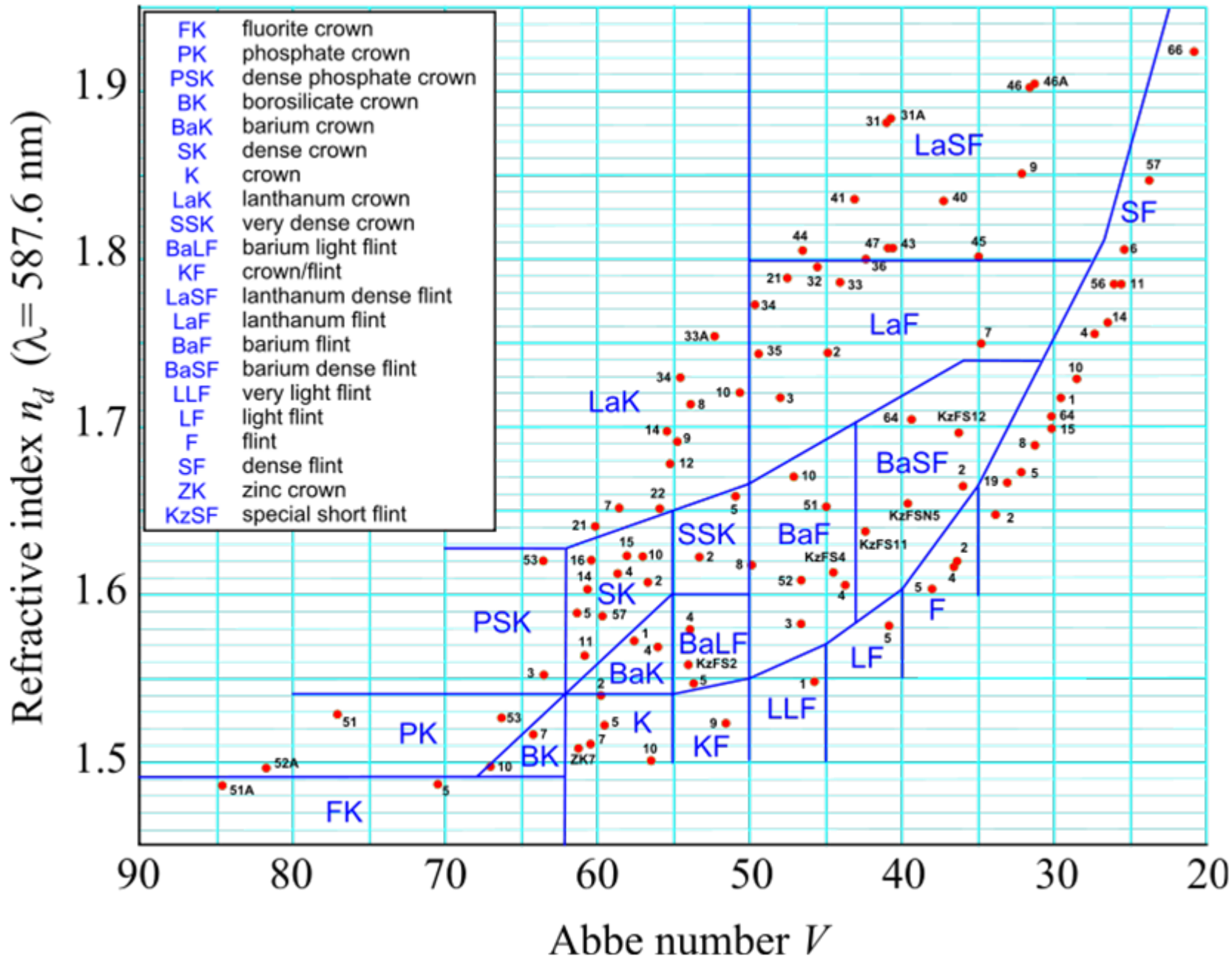
okulár



Barevná vada

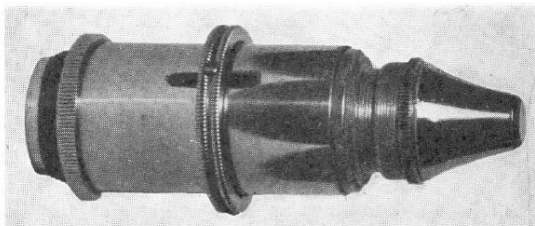
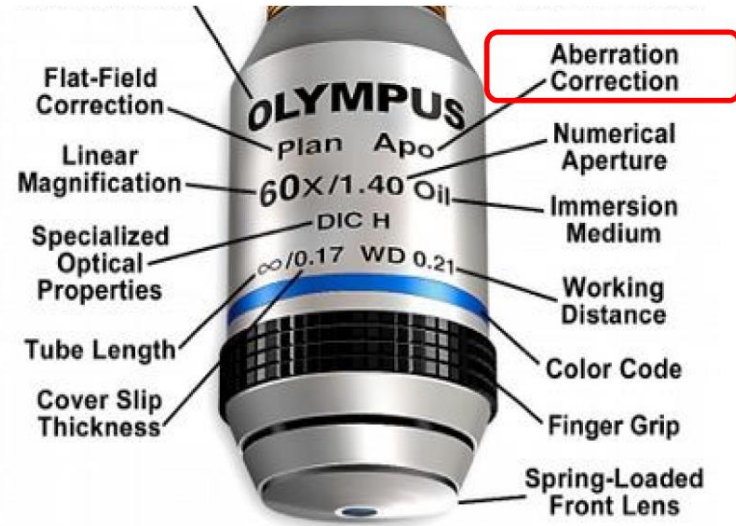
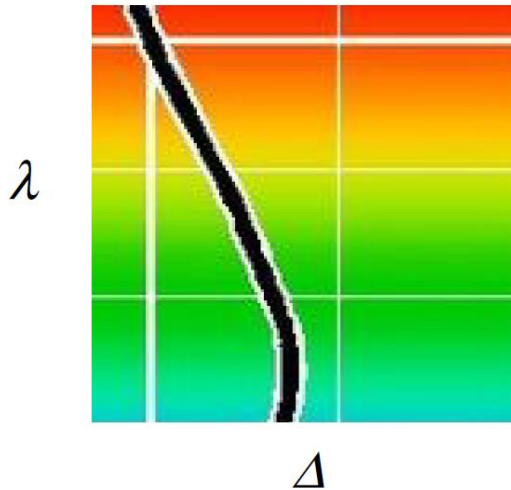
- Abbeovo číslo: $A = \frac{n_d - 1}{n_F - n_C}$ (index lomu materiálu pro Fraunhoferovy čáry d, F, C: 587,6 nm, 486,1 nm, 656,3 nm)
- podmínka pro achromatický dublet: $\frac{\Phi_1}{A_1} + \frac{\Phi_2}{A_2} = 0$





Apochromatický objektiv

apochromát (Abbe 1886)



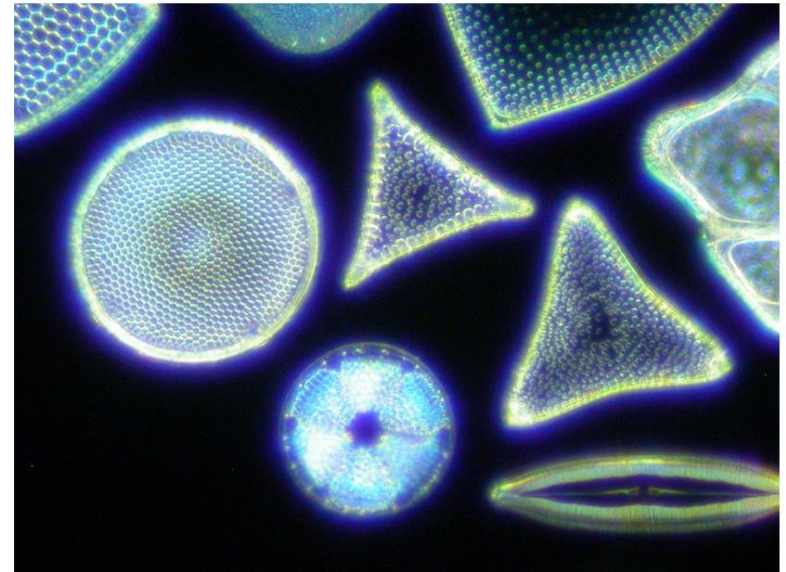
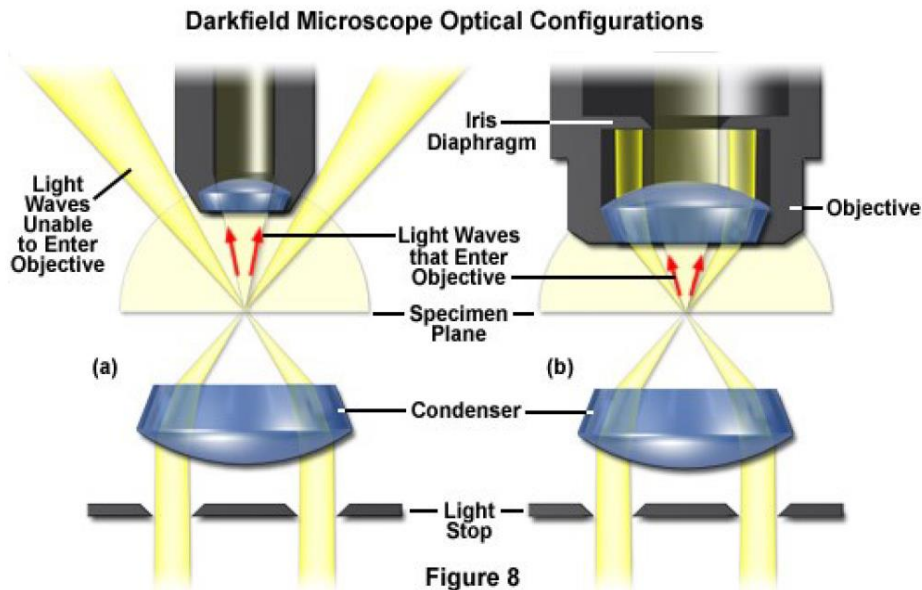
jeden z prvních apochromatických objektivů

Také:

- superachromát (korigovány 4 barvy)
- semiapochromát (fluorit CaF_2 , fluoritová skla, $A = 80 - 95$)

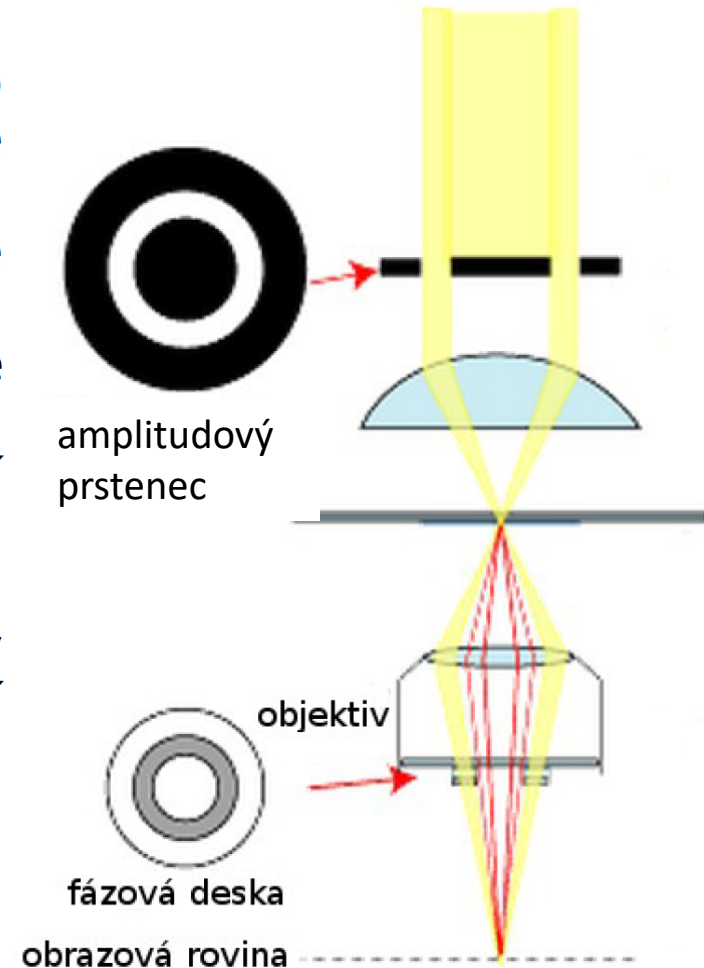
Temné pole

- první kondenzory pro temné pole kolem 1855 (G. Shadbolt, F. H. Wenham)
- metoda odstínění nerozptýleného světla
- rozlišení jako u světlého pole, kontrast podstatně zesílen



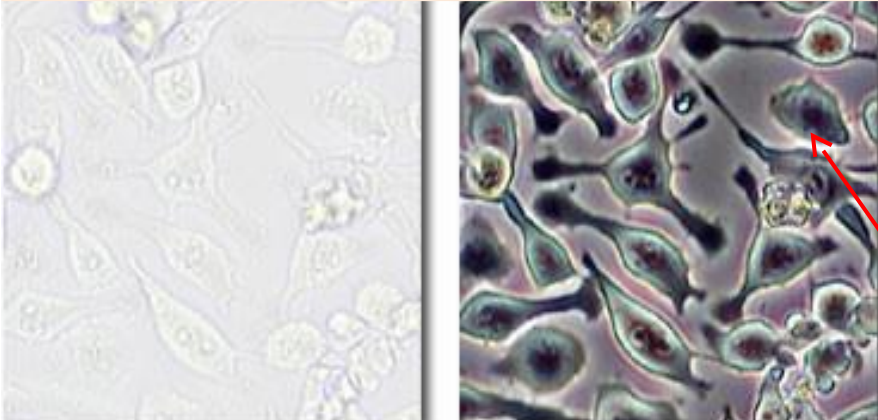
Zernikův fázový kontrast

- Umožňuje kontrastní zobrazení fázového vzorku pomocí fázové destičky vložené do zadní ohniskové roviny objektivu. (Světlo rozptýlené fázovým vzorkem je fázově posunuto. Fázové posunutí mezi paprsky **nerozptýlenými** a **rozptýlenými** je dále (a vhodně) zesíleno fázovou destičkou. V obrazové rovině pak dochází k interferenci.)
- Nevýhody: halo efekt, neznalost velikosti fázového posunutí paprsků, které prošly vzorkem (fázový kontrast není kvantitativní)
- nemožno určit rozložení hmoty buňky.



Zernikův fázový kontrast

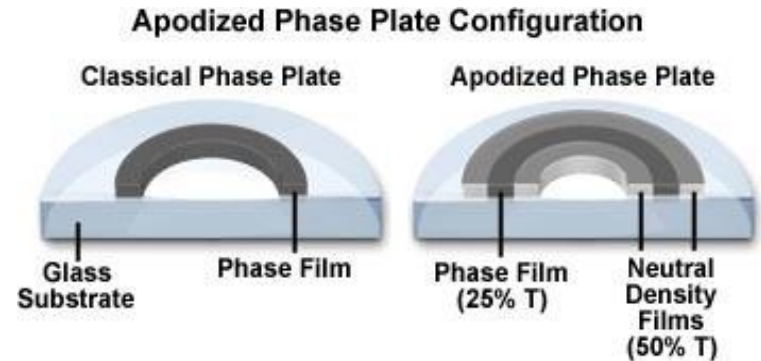
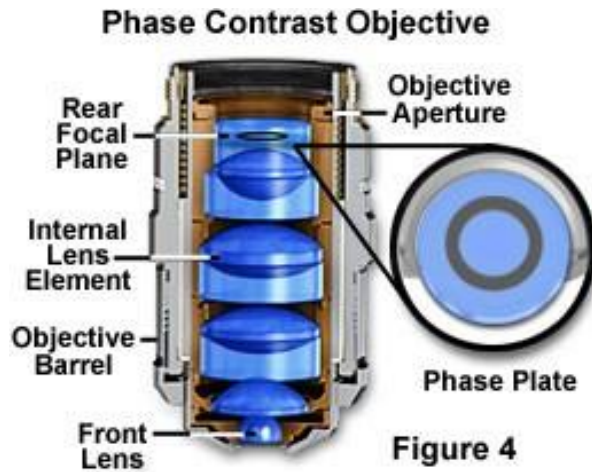
živé buňky ve světlém poli a fázovém kontrastu



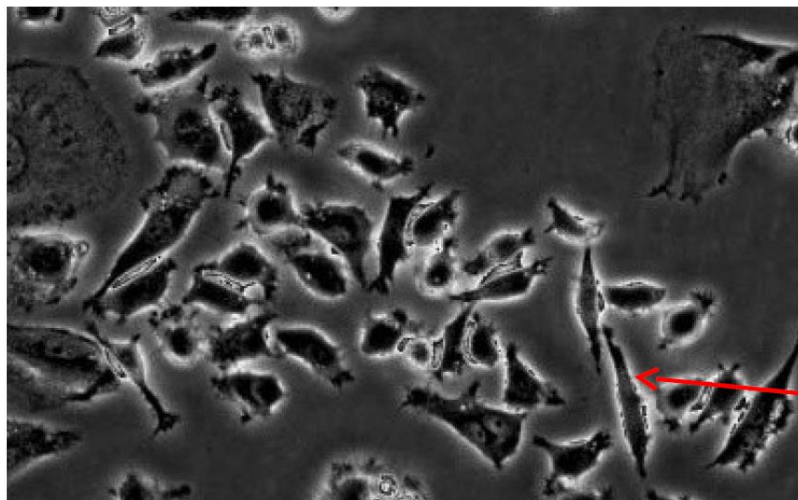
fázový rozdíl:

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} (n_{objektu} - n_{okolí})t$$

„halo-efekt“

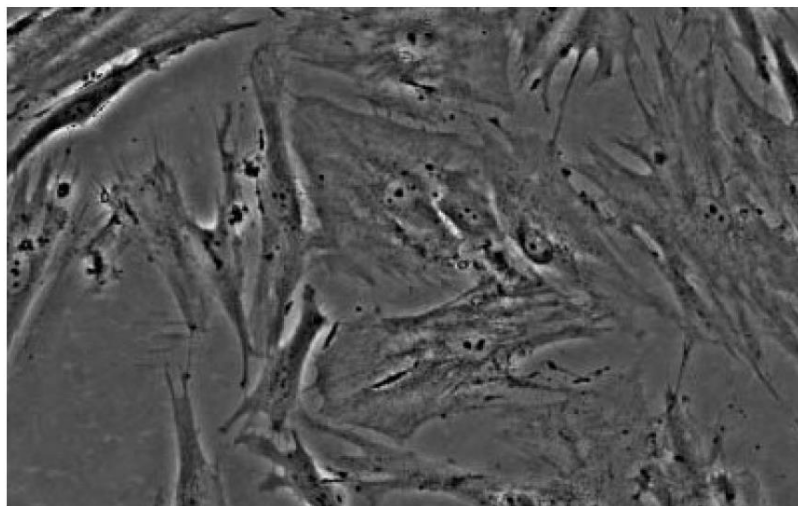


Zernikův fázový kontrast



zobrazení buněk Rousova sarkomu pomocí fázového kontrastu

„halo-efekt“

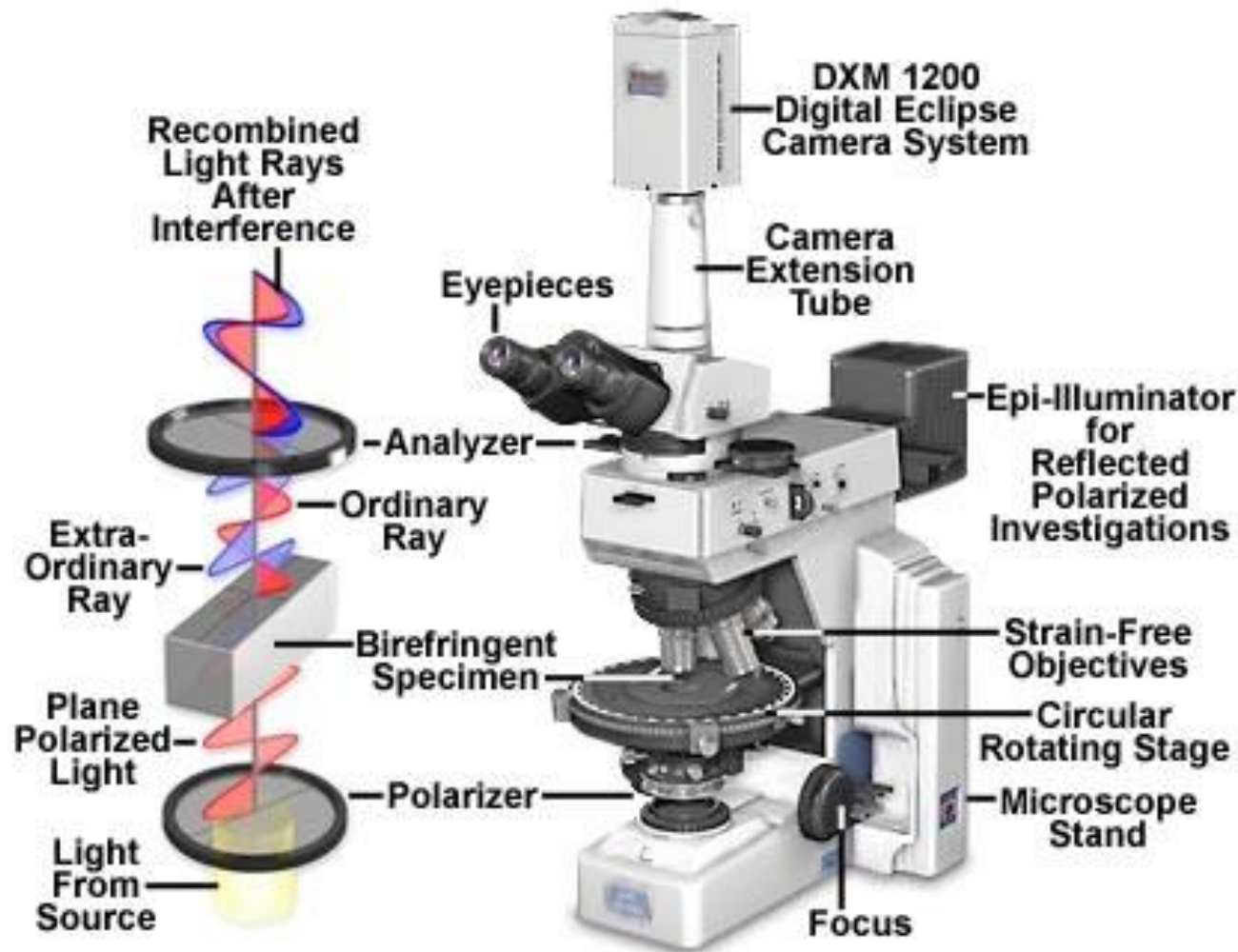


zobrazení lidských fibroblastů pomocí fázového kontrastu

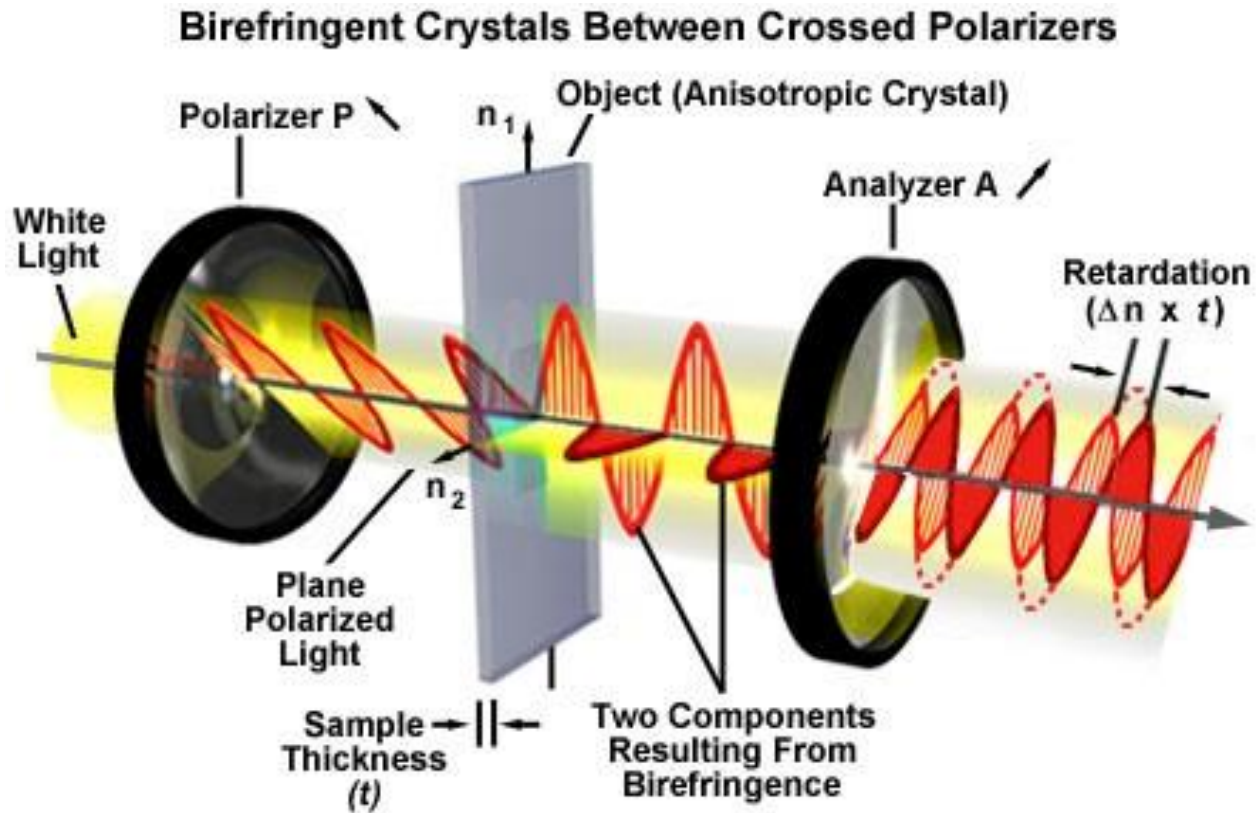
JANEČKOVÁ, H.; VESELÝ, P.; CHMELÍK, R.:
Proving Tumour Cells by Acute
Nutritional/Energy Deprivation as a Survival
Threat: A Task for Microscopy,
Anticancer Research, **29** (2009) 2339-2345

Mikroskopie s polarizovaným světlem

Polarized Light Microscope Configuration

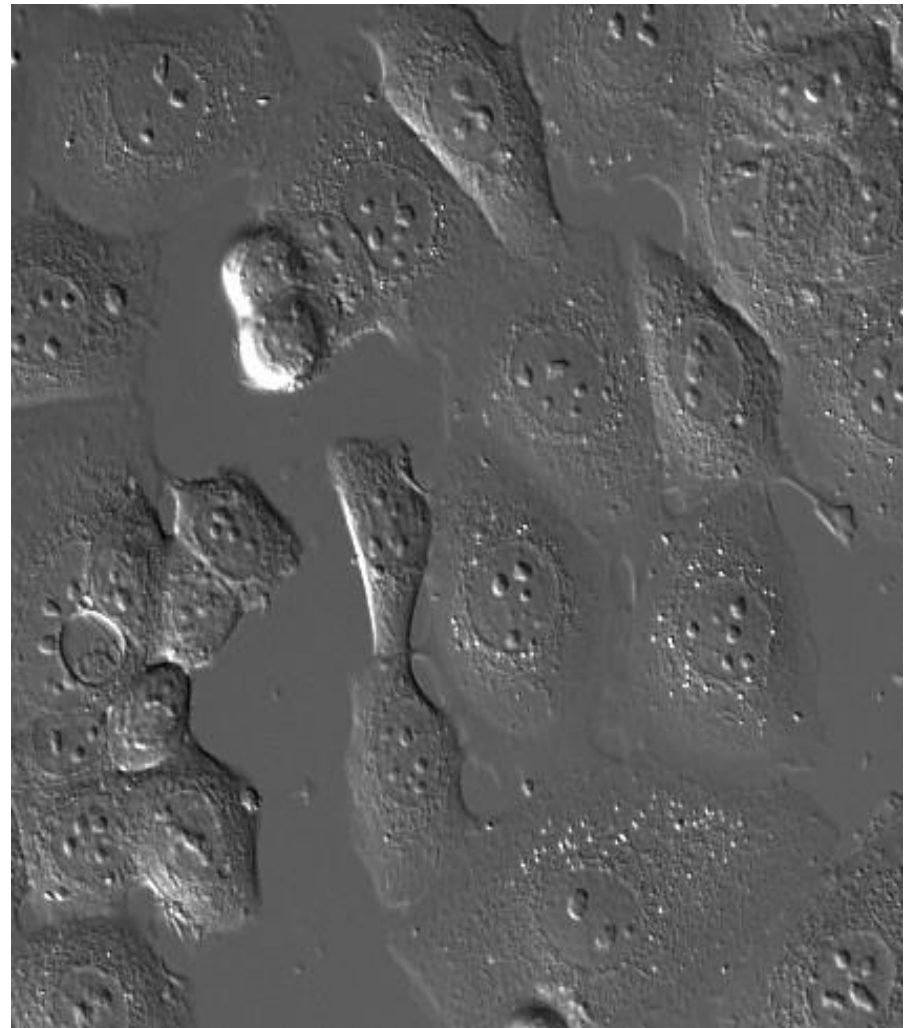
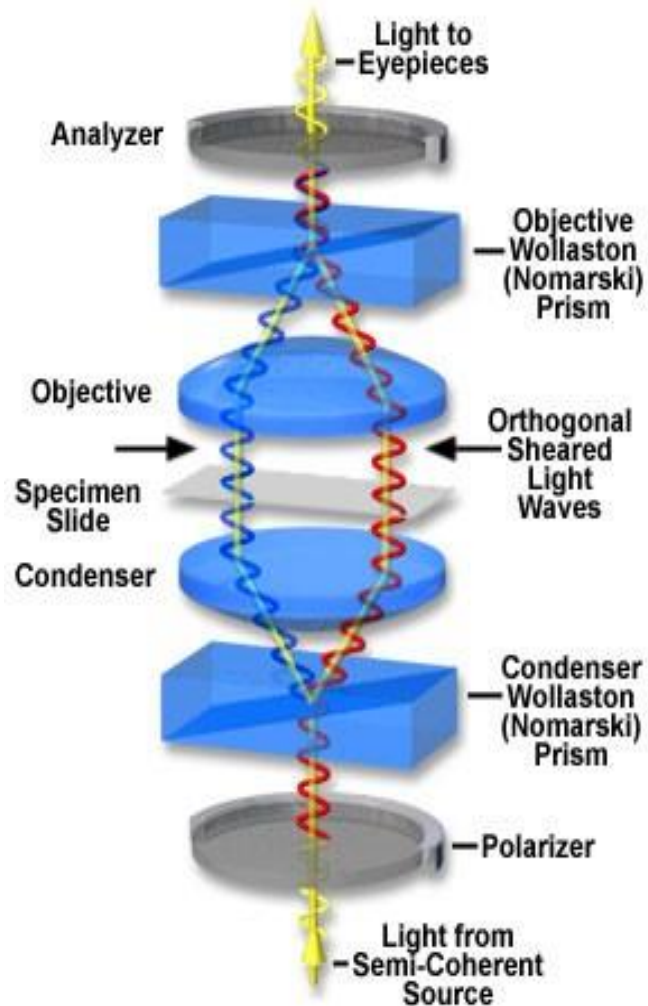


Mikroskopie s polarizovaným světlem

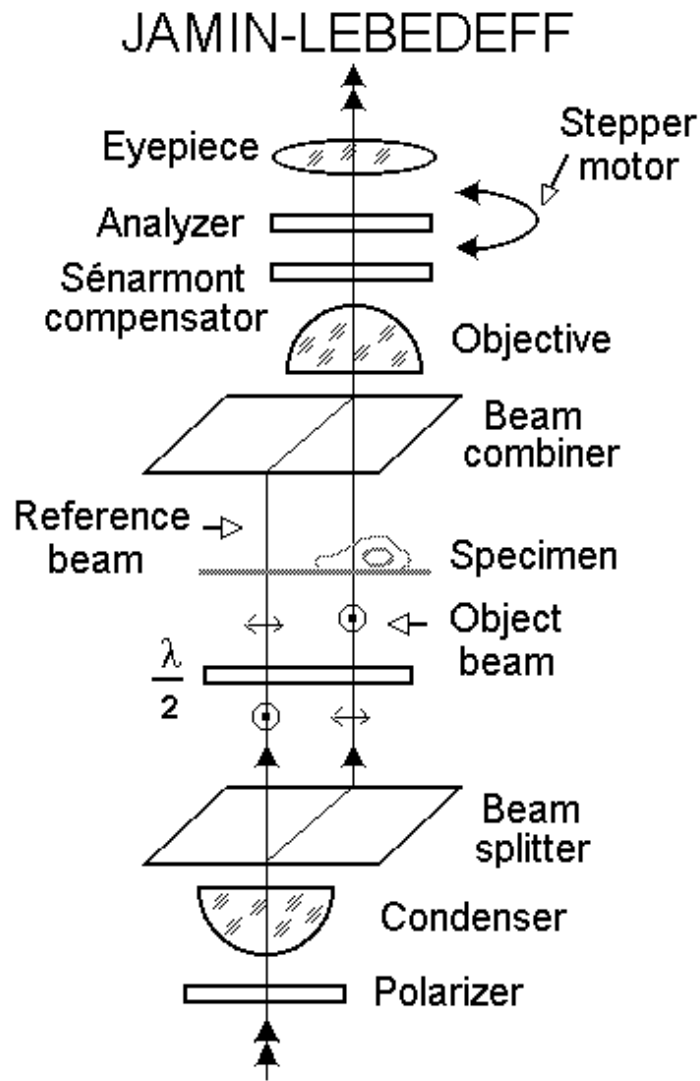
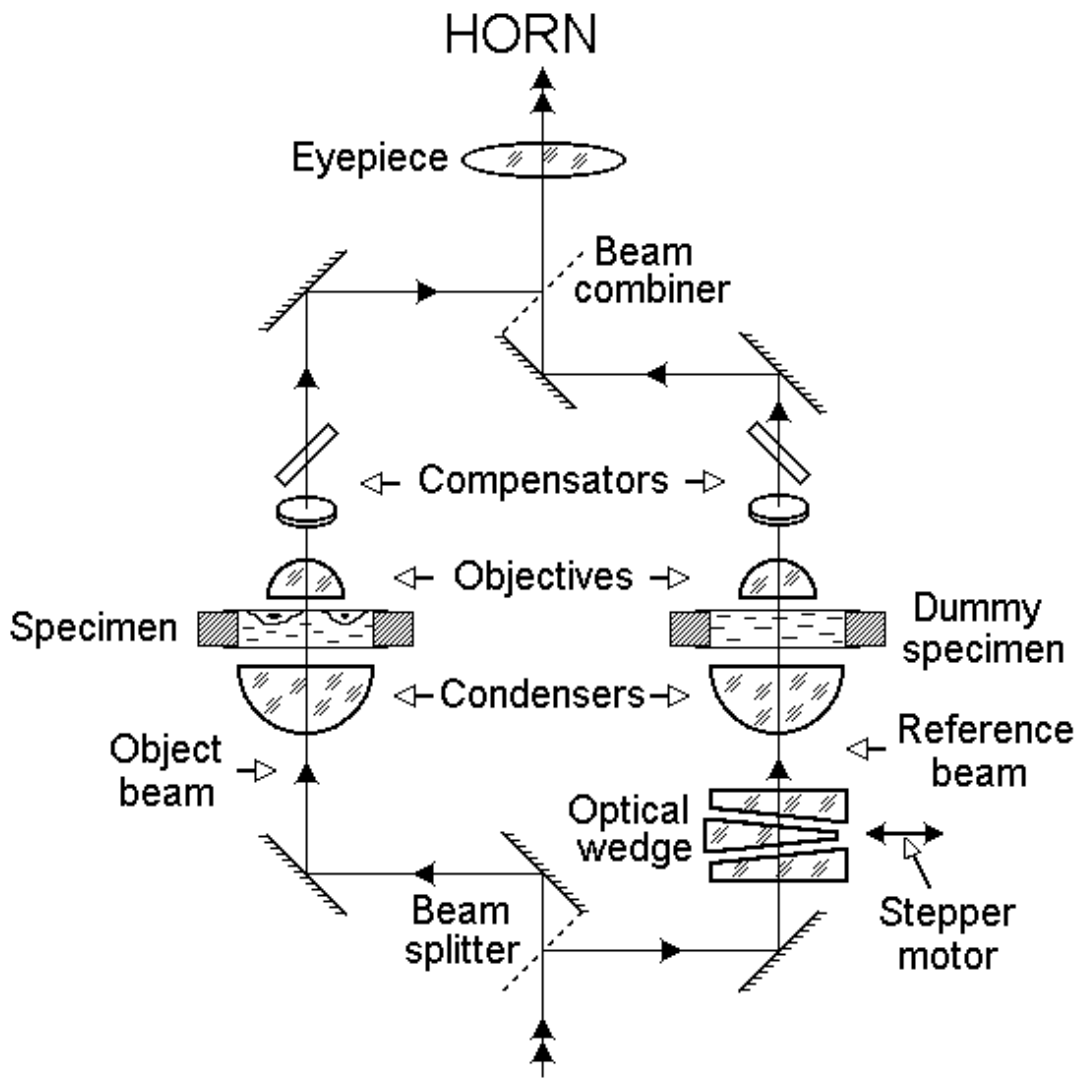


Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

Differential Interference Contrast Schematic



Transmisní interferenční mikroskop

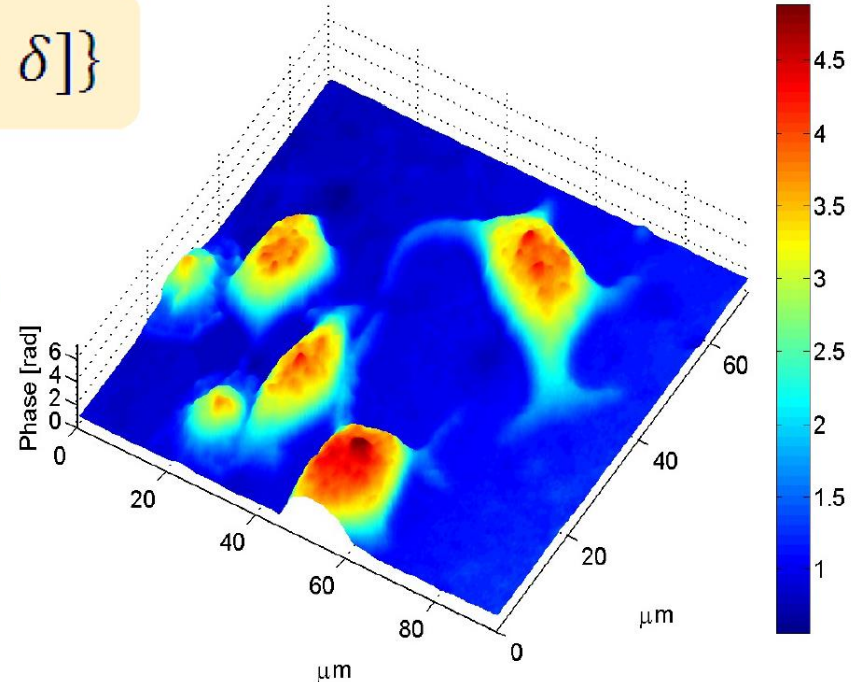
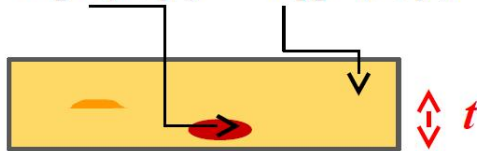


Kvantitativní fázový kontrast

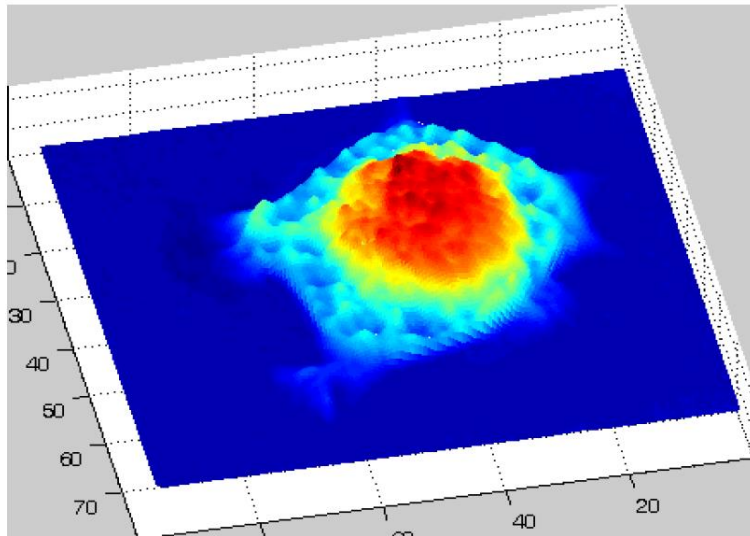
$$I(x, y) = I_0 \{1 + \gamma \cos[\varphi(x, y) + \delta]\}$$

Trasmisní uspořádání

$$\varphi(x, y) \approx k[n(x, y) - n_0]t(x, y) \quad k = 2\pi/\lambda$$



živé buňky M7 v médiu, *in vitro*
(Halogenová lampa + filtr 650 nm, objektiv 20x/0,40)



živé buňky RsK4 v médiu, *in vitro*
(Halogenová lampa + filtr 650 nm, objektiv 10x/0,25)

Transmisní interferenční mikroskop - zpracování obrazu

$$I = I_0 [1 + \gamma \cos(\varphi + \delta)]$$

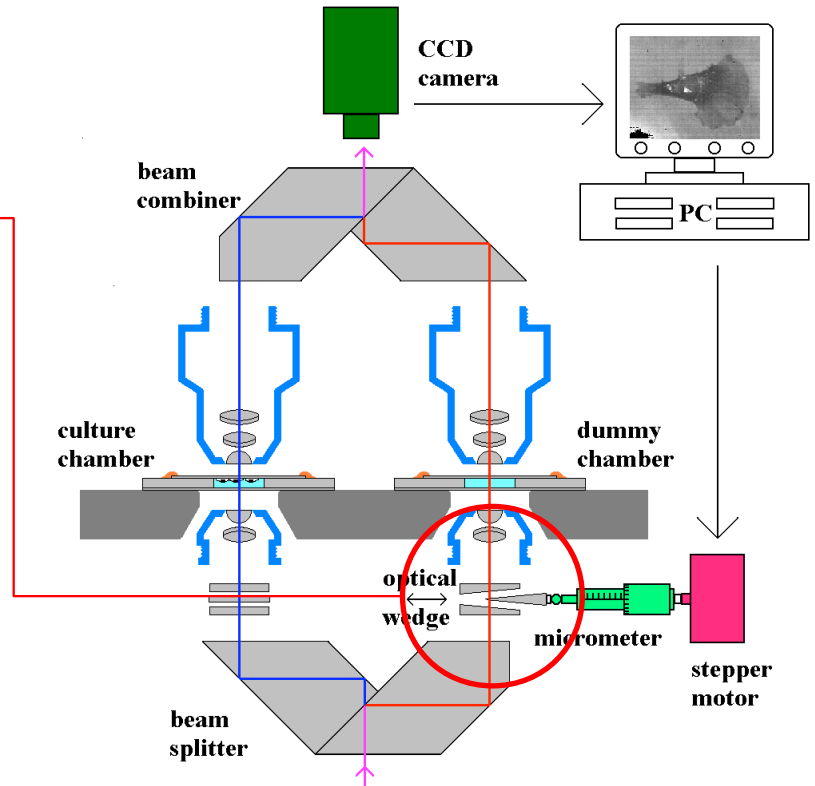
$$I_1 = I_0 [1 + \gamma \cos(\varphi + 0)] = I_0 [1 + \gamma \cos(\varphi)]$$

$$I_2 = I_0 \left[1 + \cos\left(\varphi + \frac{\pi}{2}\right) \right] = I_0 [1 - \gamma \sin(\varphi)]$$

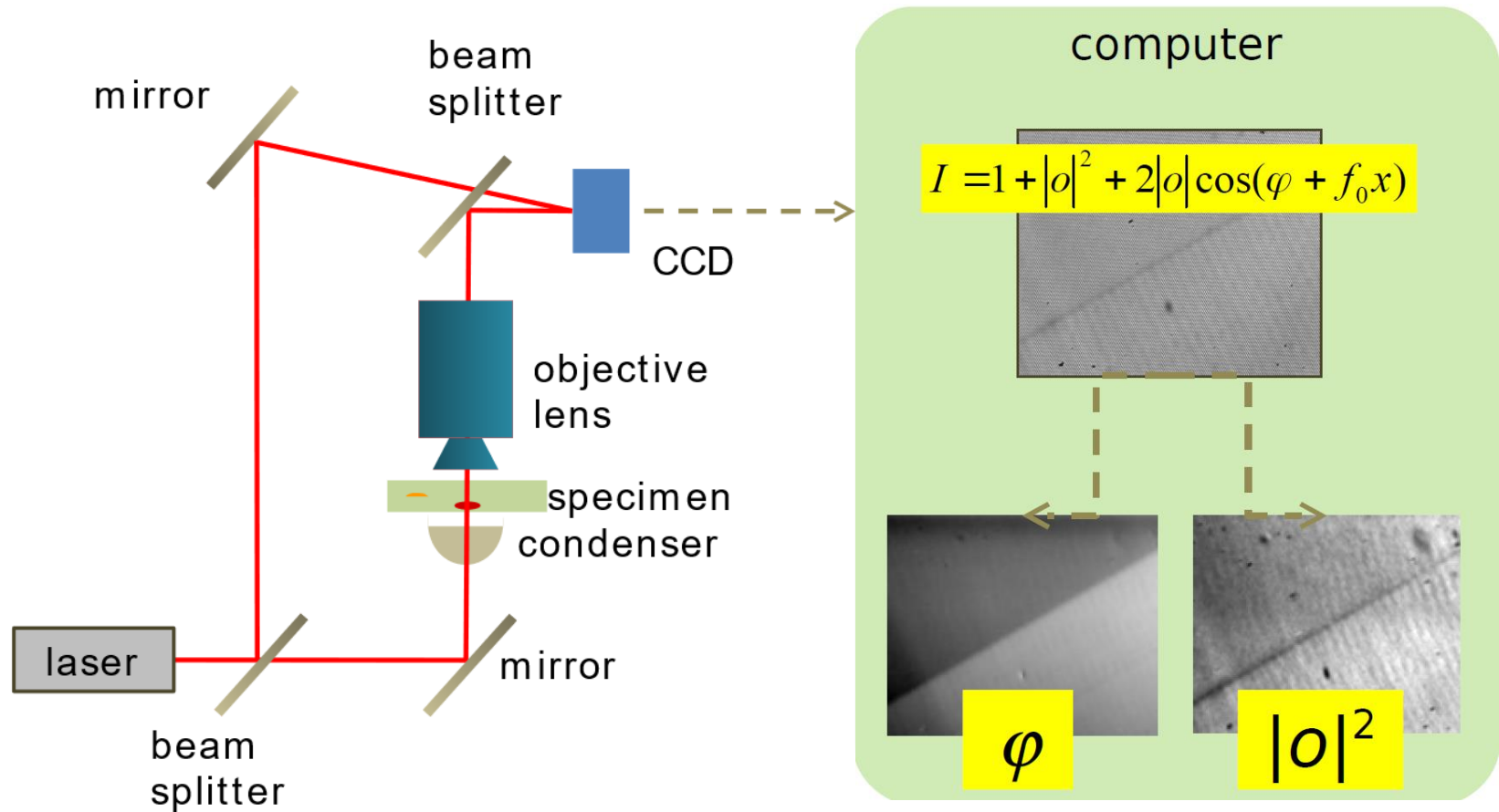
$$I_3 = I_0 [1 + \cos(\varphi + \pi)] = I_0 [1 - \gamma \cos(\varphi)]$$

$$I_4 = I_0 \left[1 + \cos\left(\varphi + \frac{3\pi}{2}\right) \right] = I_0 [1 + \gamma \sin(\varphi)]$$

$$\text{tg } \varphi = \frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}$$

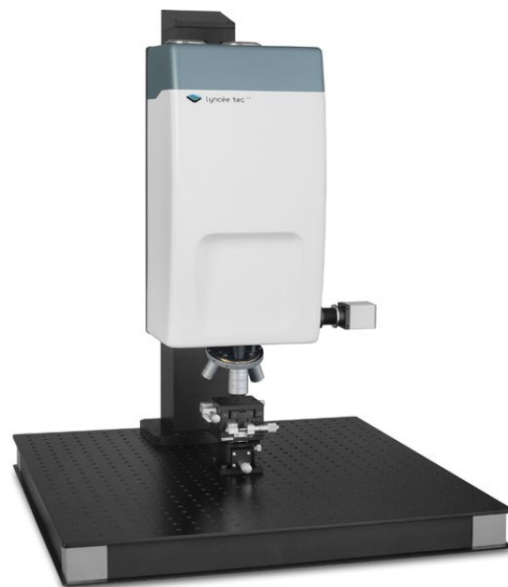


Moderní holografický mikroskop



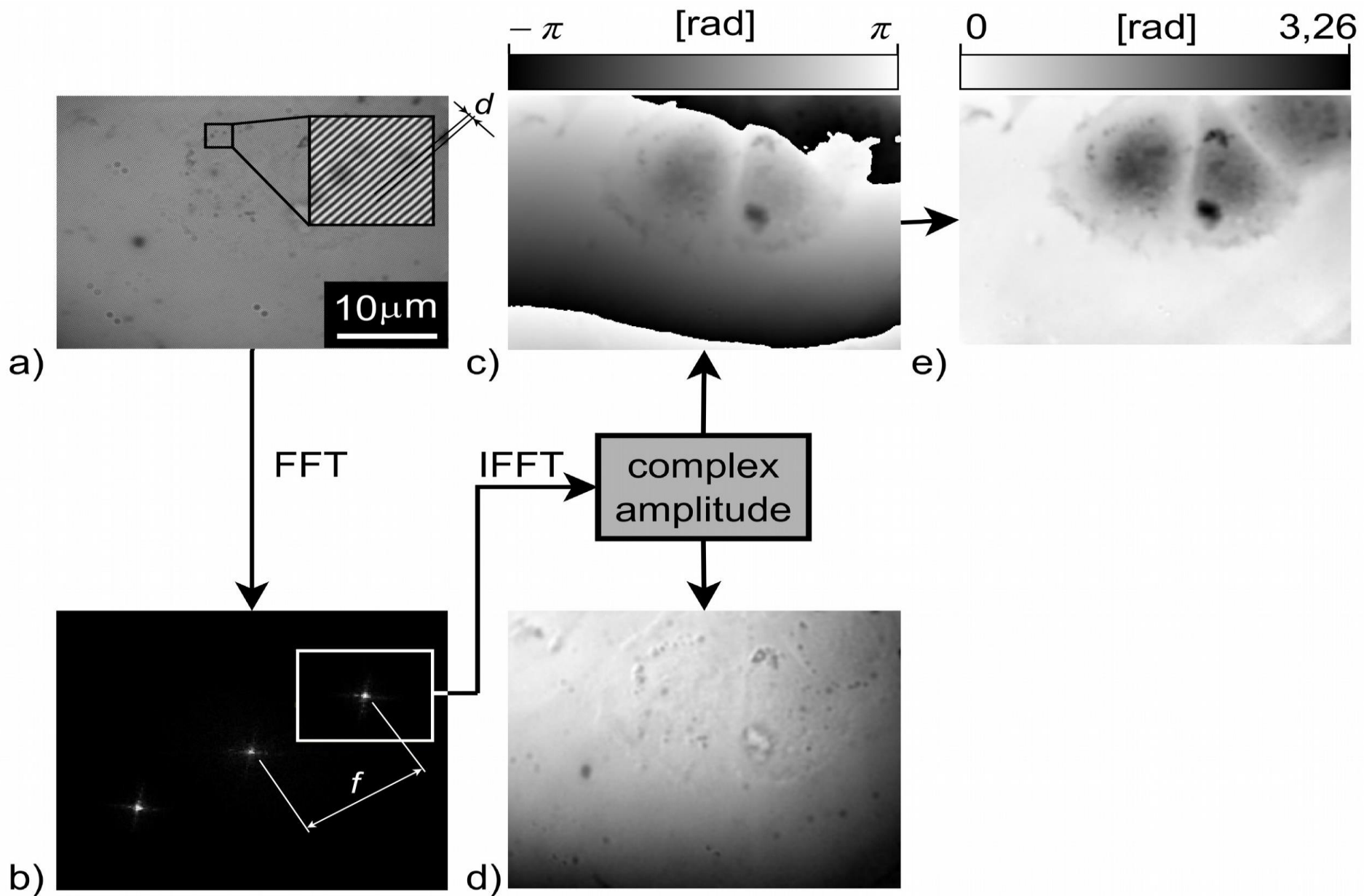
Marquet, P. et al.: Digital holographic microscopy: a noninvasive contrast imaging technique allowing quantitative visualization of living cells with subwavelength axial accuracy. *Optics Letters* **30** (2005) 468-470.

Moderní holografický mikroskop

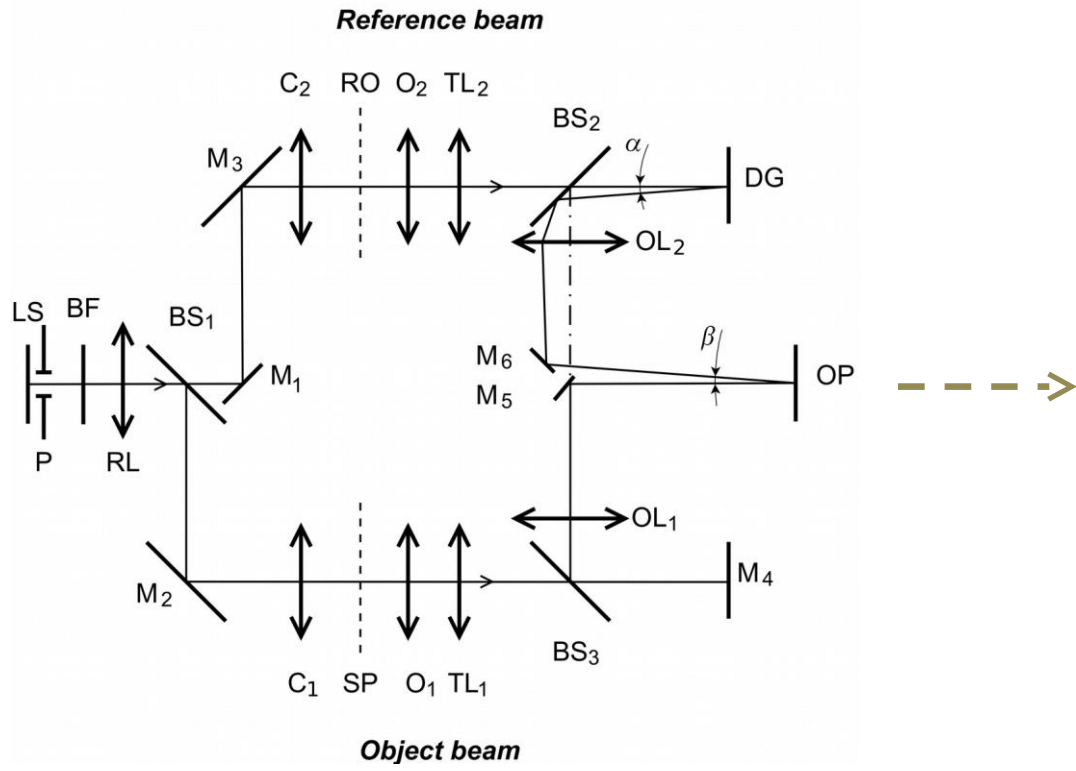


DHM ... interferenční mikroskop umožňující (obvykle off-axis a obrazový) holografický záznam opatřený digitálním detekčním systémem (CCD) a on-line připojeným počítačem, který holografický záznam zpracovává a poskytuje uživateli požadované výsledné zobrazení

Zpracování obrazu holografického mikroskopu



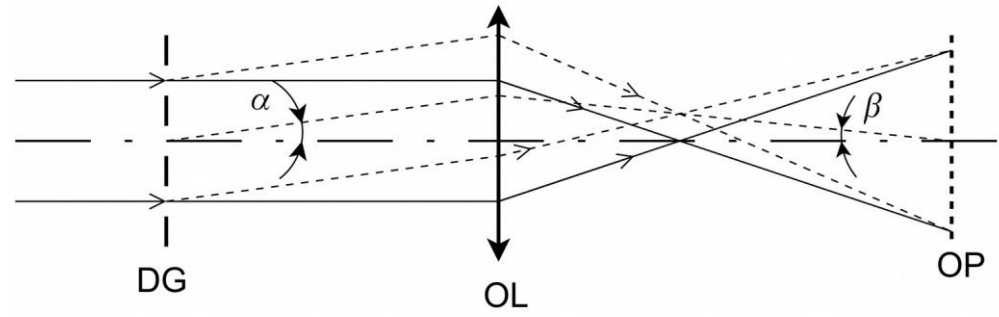
Koherenci řízený holografický mikroskop



computer

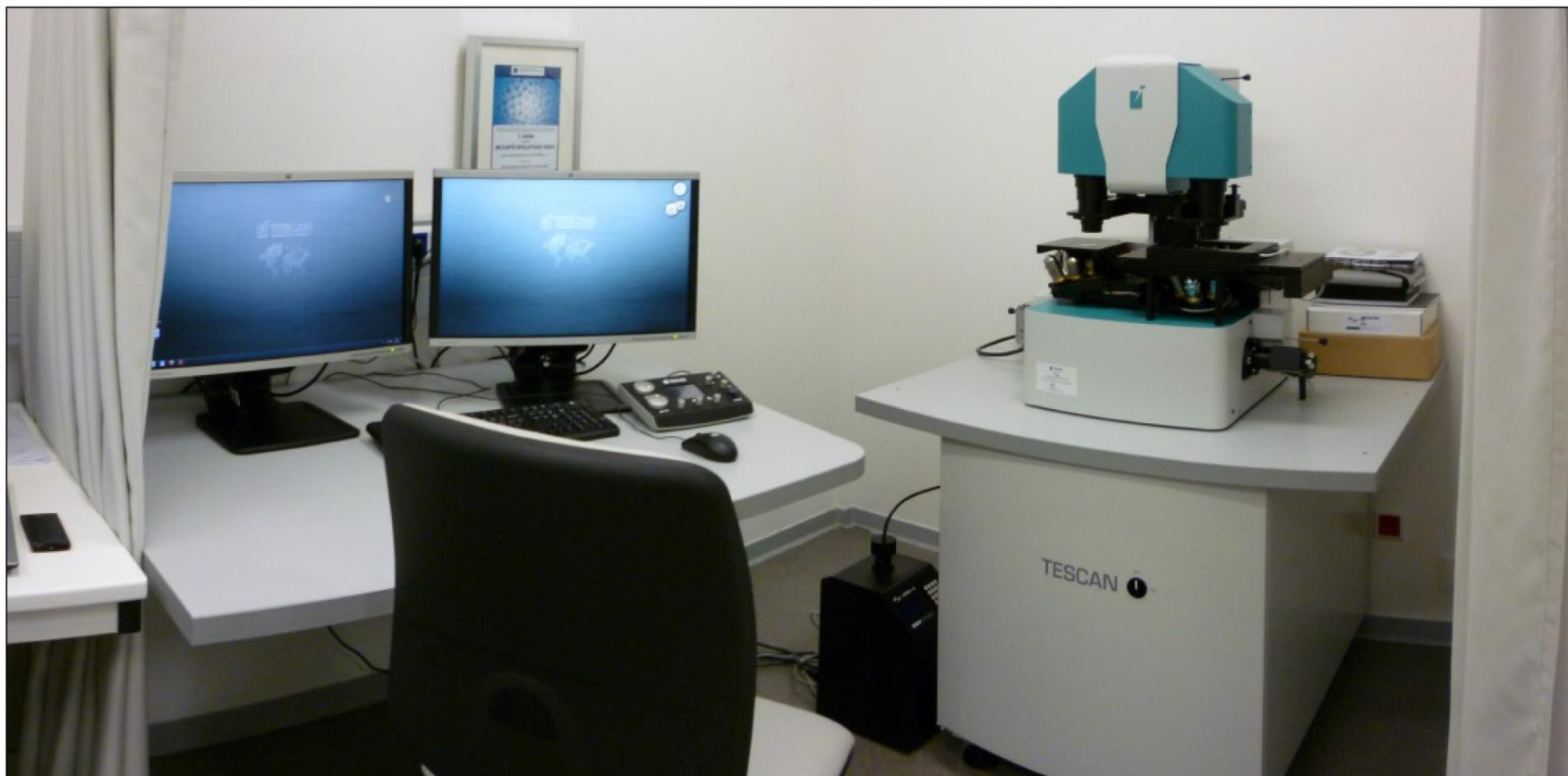
$$I = 1 + |o|^2 + 2|o| \cos(\varphi + f_0 x)$$

φ $|o|^2$



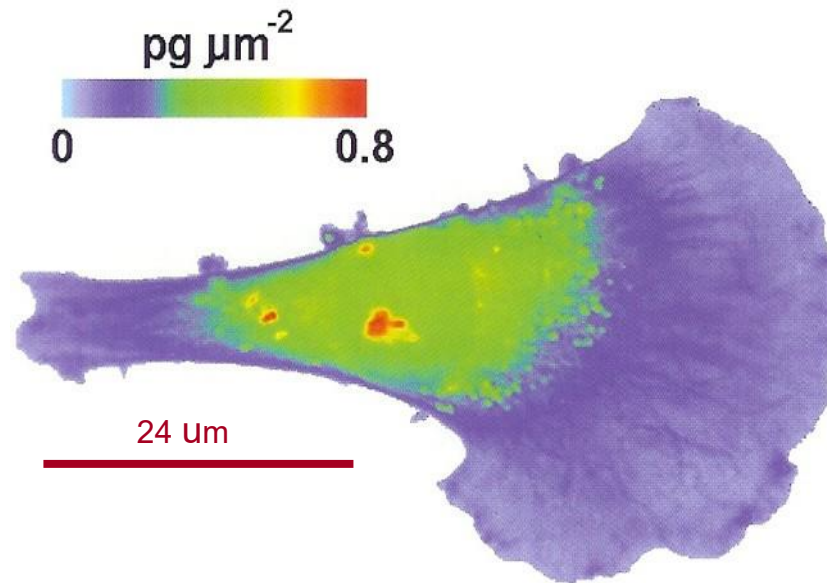
T. Slabý, M. Antoř, R. Chmelík, Z. Dostál, P. Kolman:
 Coherence-controlled holographic microscope,
 Proceedings of SPIE, Volume 7746,
 pp.77461R-1-77461R-8, ISBN 978-80-554-0238-3, (2010), SPIE

Koherencí řízený holografický mikroskop



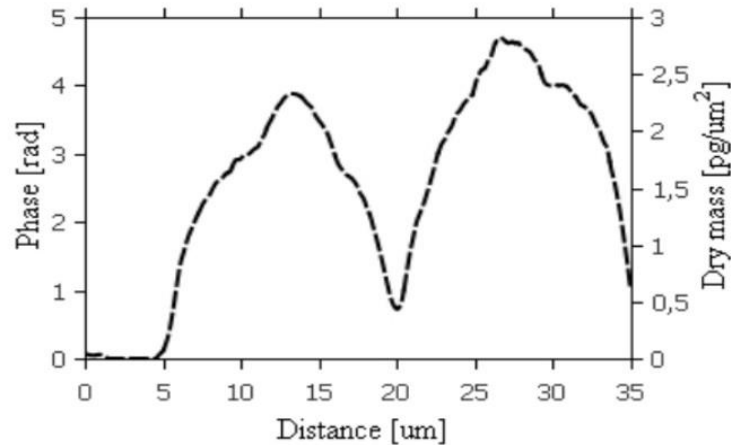
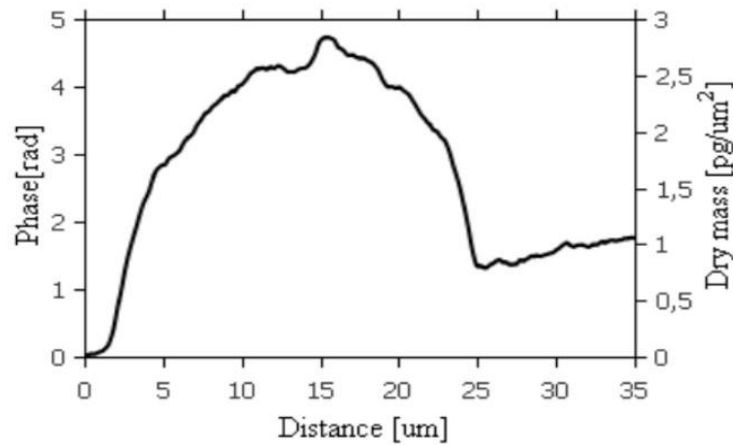
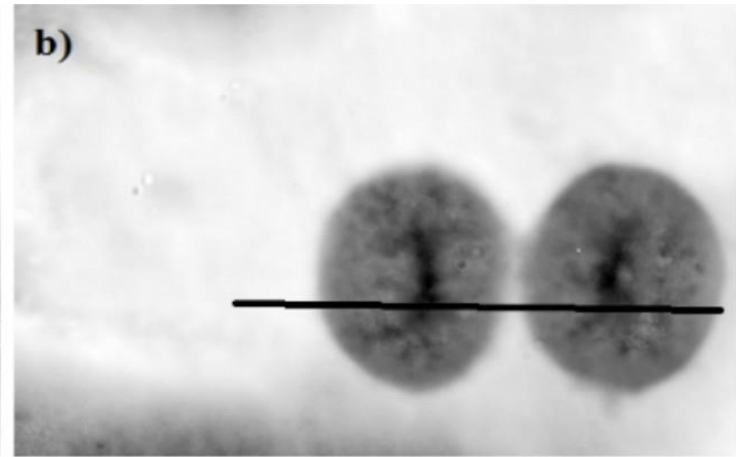
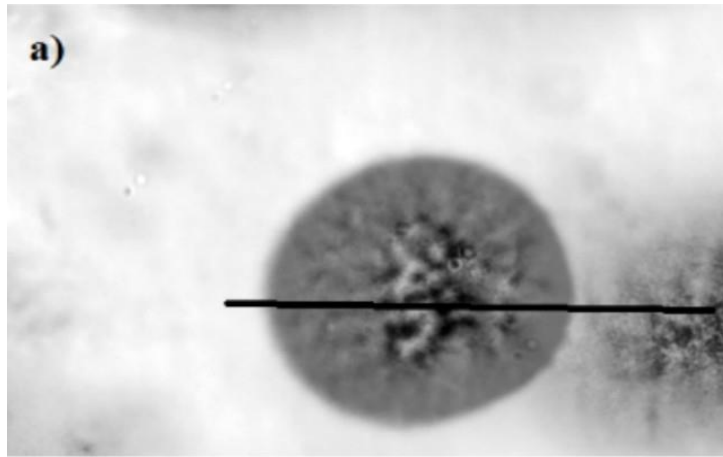
Kvantitativní fázový kontrast v biologii

Měření rozložení hustoty suché hmoty v buňce $W(i,j) = \frac{\phi(i,j)S}{\alpha k}$



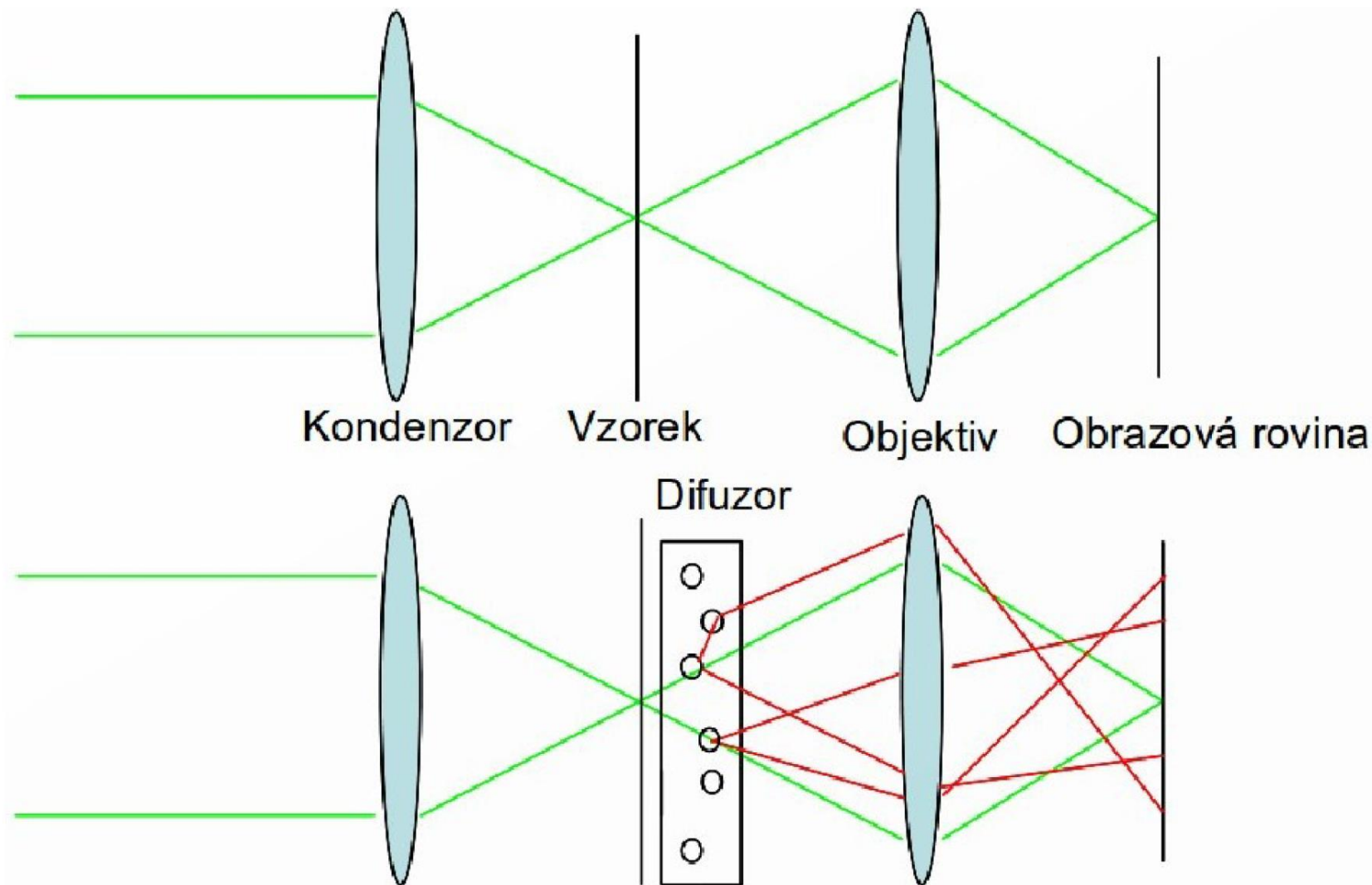
G. A. Dunn, *Proc. RMS* 33 (1998) 189-196.

Kvantitativní fázový kontrast v biologii

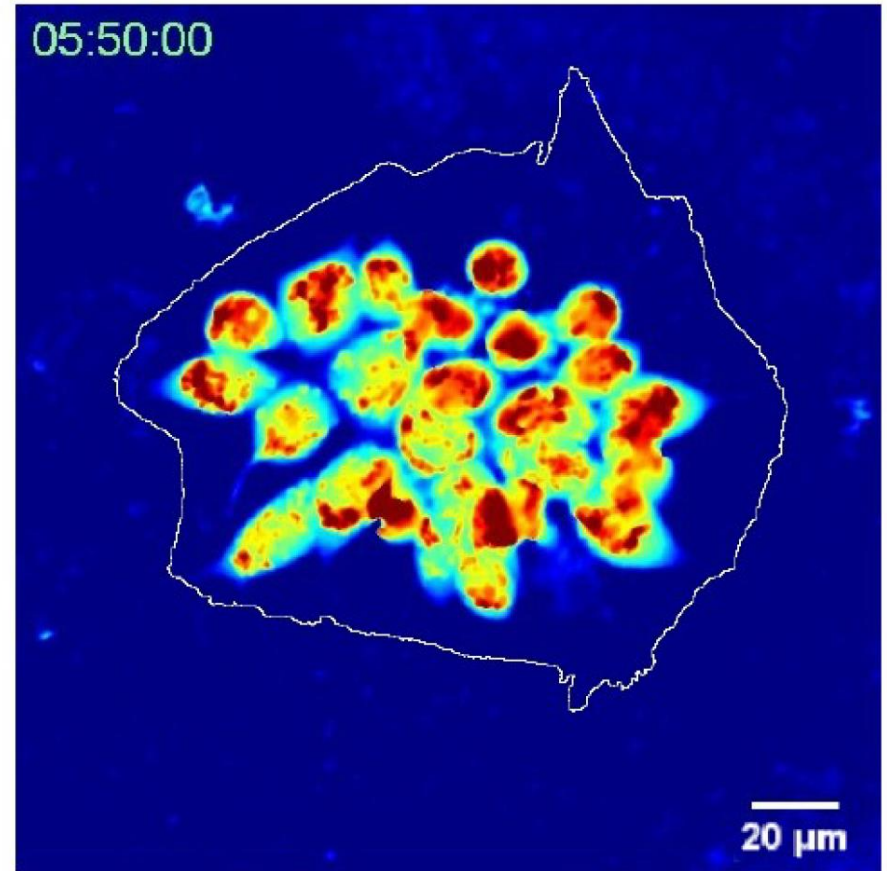
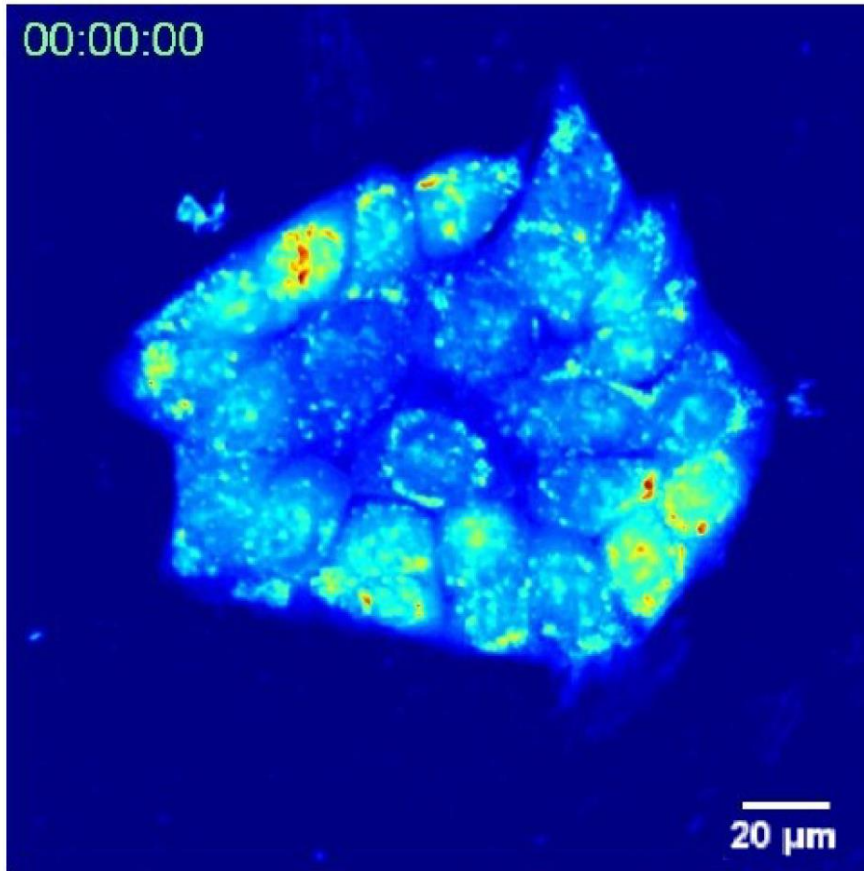


Krysí rakovinné buňky při mitóze: a) metafáze a b) cytokineze.

Efekt velmi nízké koherence v CCHM pro biologii

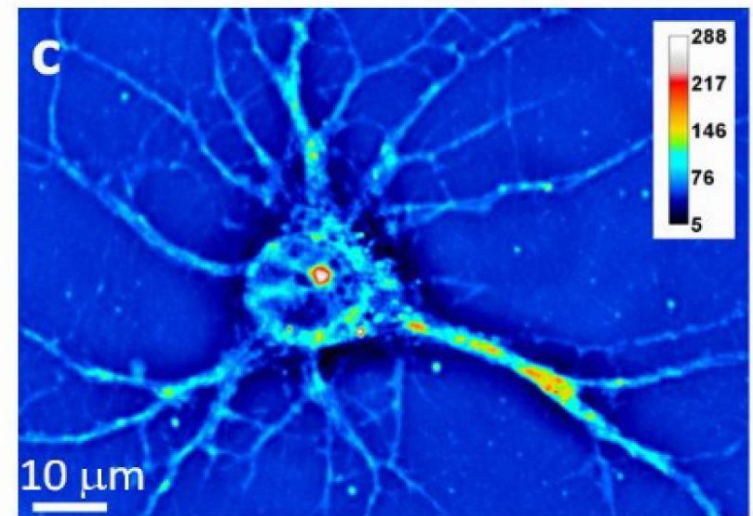
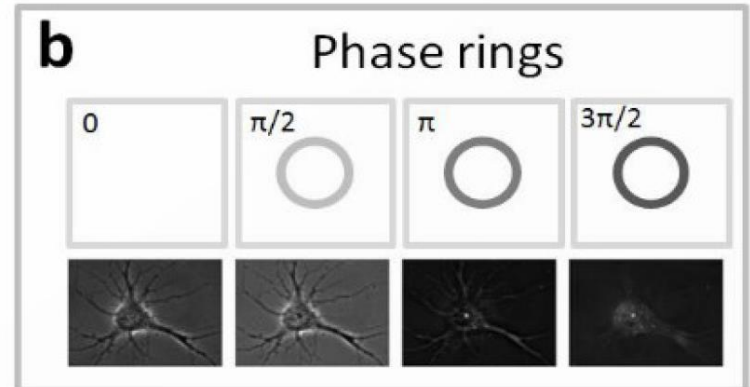
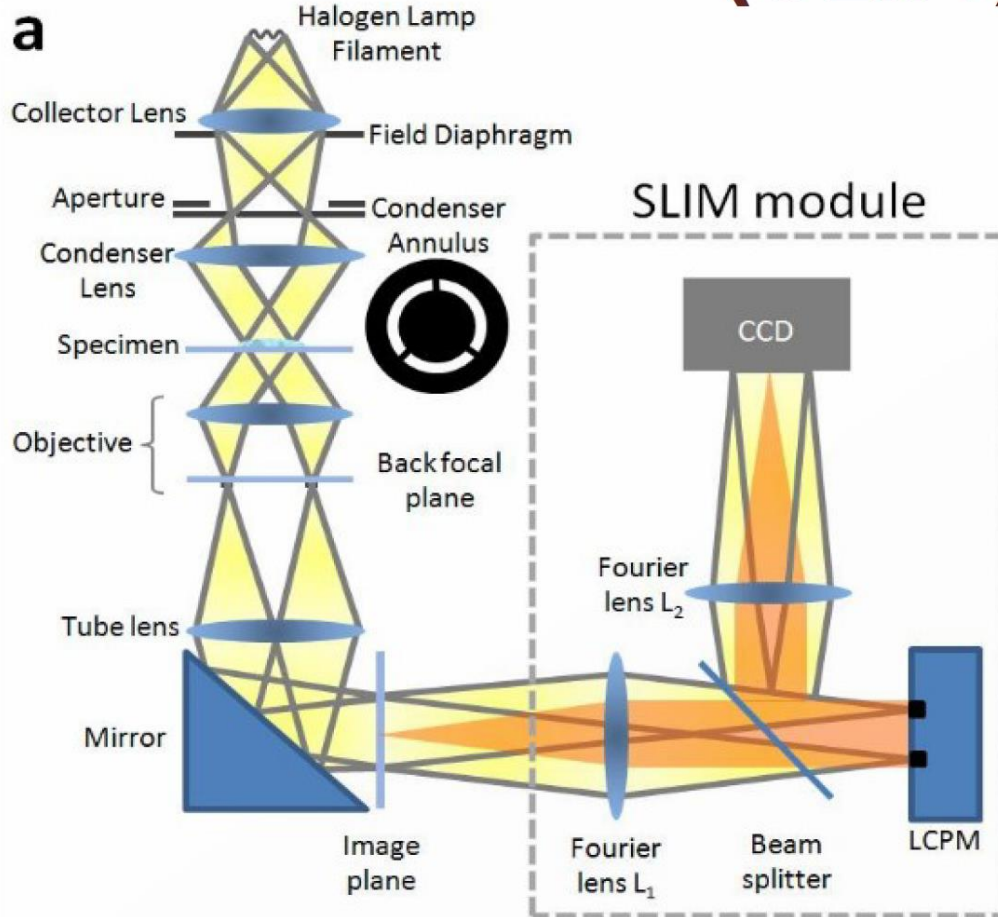


Efekt velmi nízké koherence v CCHM pro biologii



Lidské colorectální rakovinné buňky při reakci na 0.15% emulzi bioaktivních fosfolipidů: a) před a b) po reakci.

Spatial light interference microscopy (SLIM)



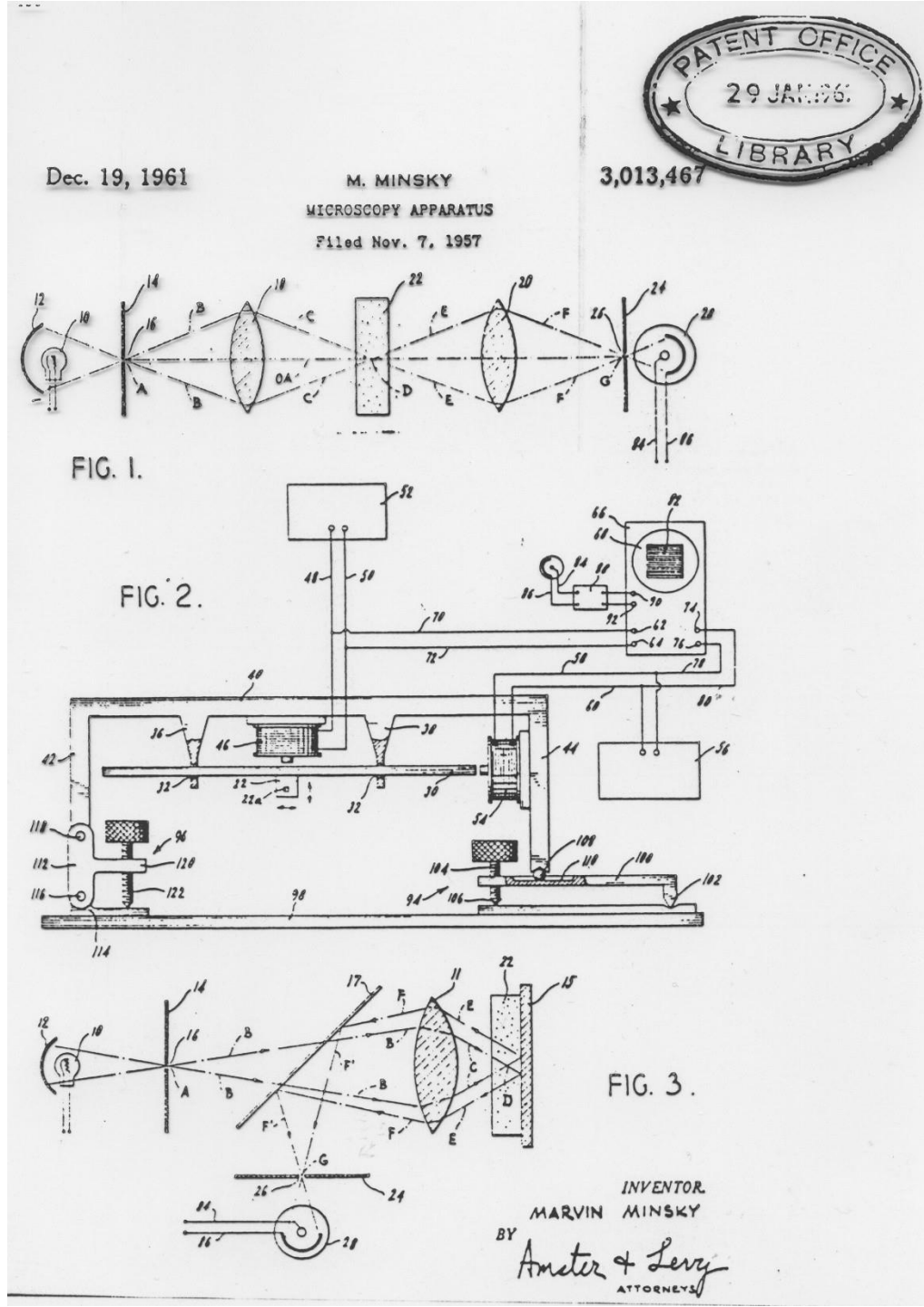
$$\Delta\phi(x, y) = \tan^{-1} \left[\frac{I(x, y; -\pi/2) - I(x, y; \pi/2)}{I(x, y; 0) - I(x, y; \pi)} \right]$$

Konfokální mikroskopie

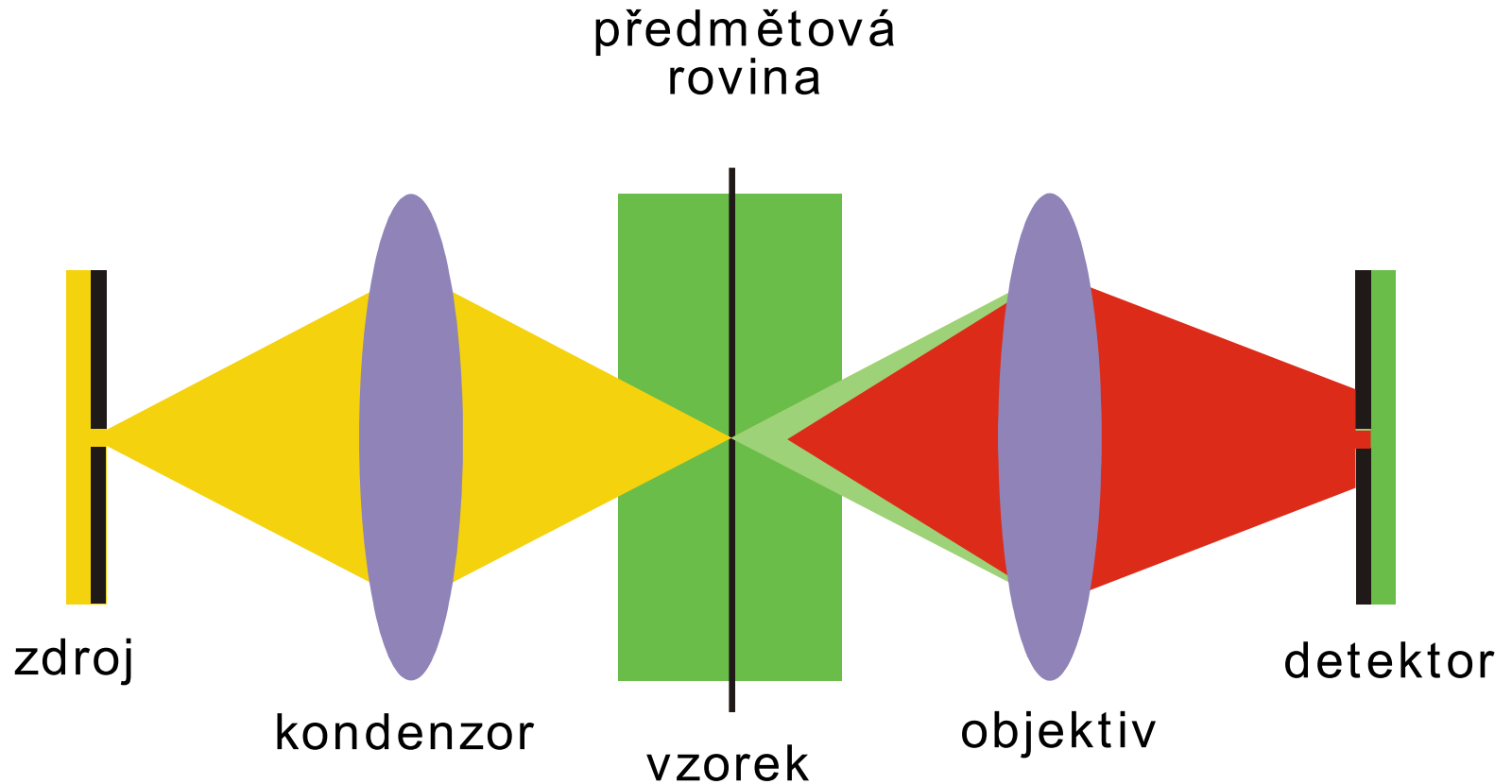


Marvin Lee Minsky (*1927)

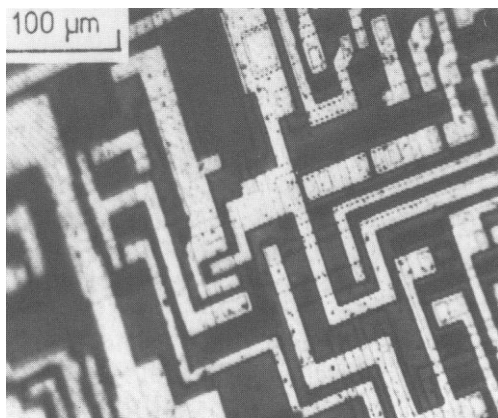
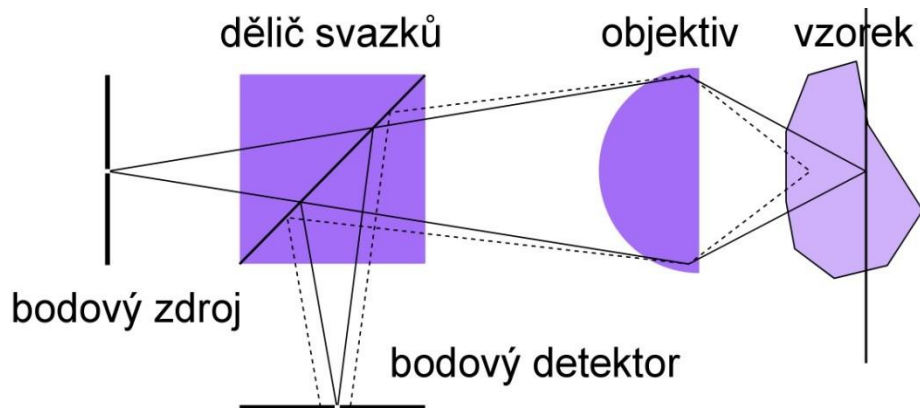
Marvin Minsky, "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope," *Scanning*, 10, pp.128-138, 1988



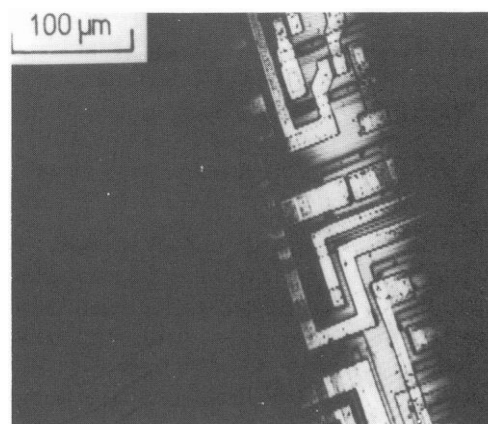
Princip konfokální mikroskopie



Hlubková diskriminace zobrazení v odraženém světle

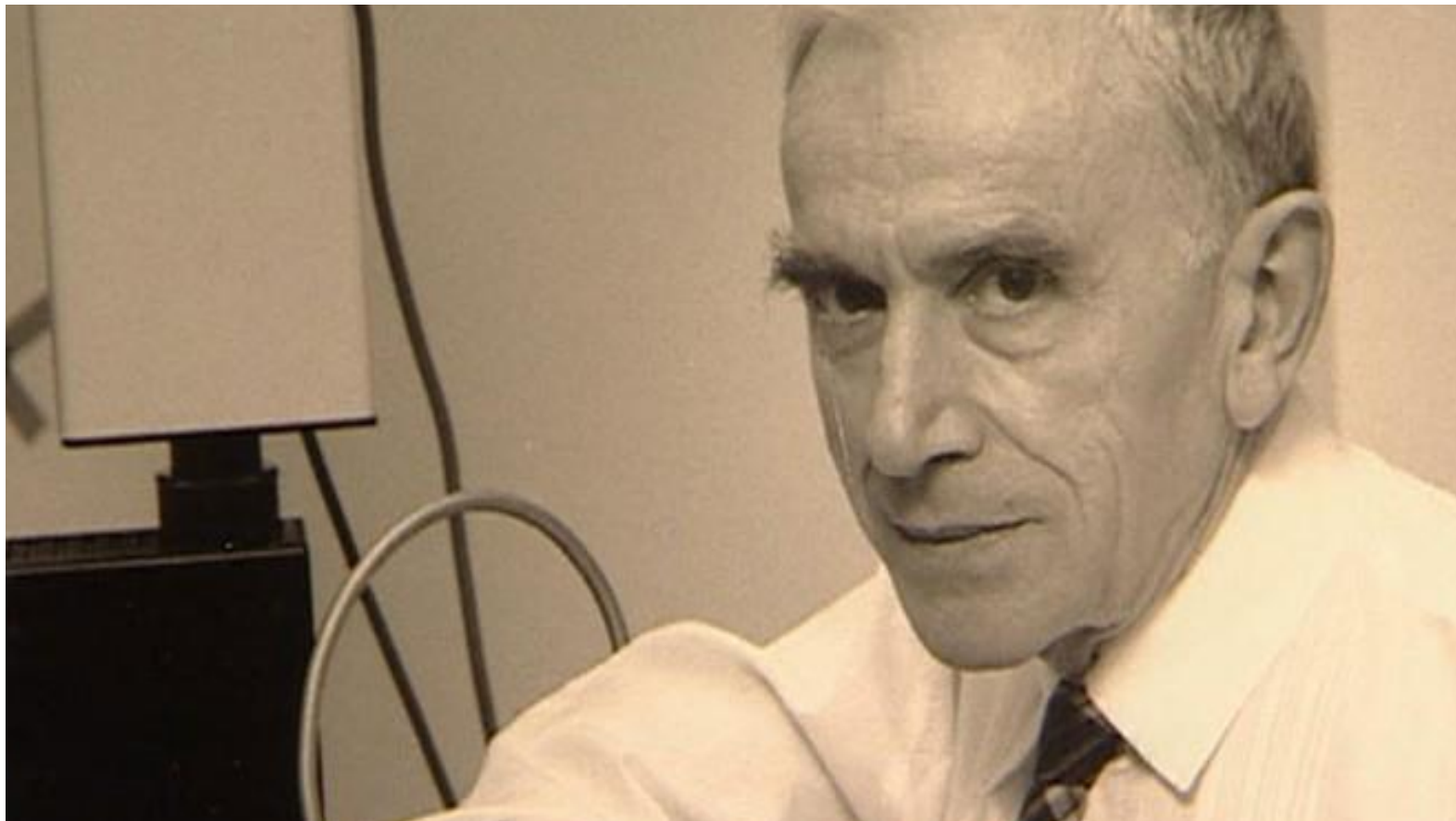


konvenční
rastrovací
mikroskop



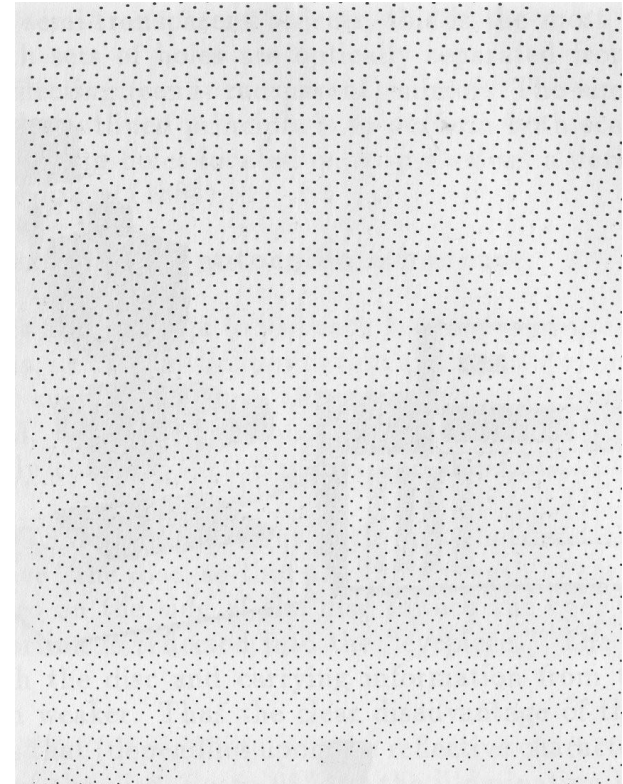
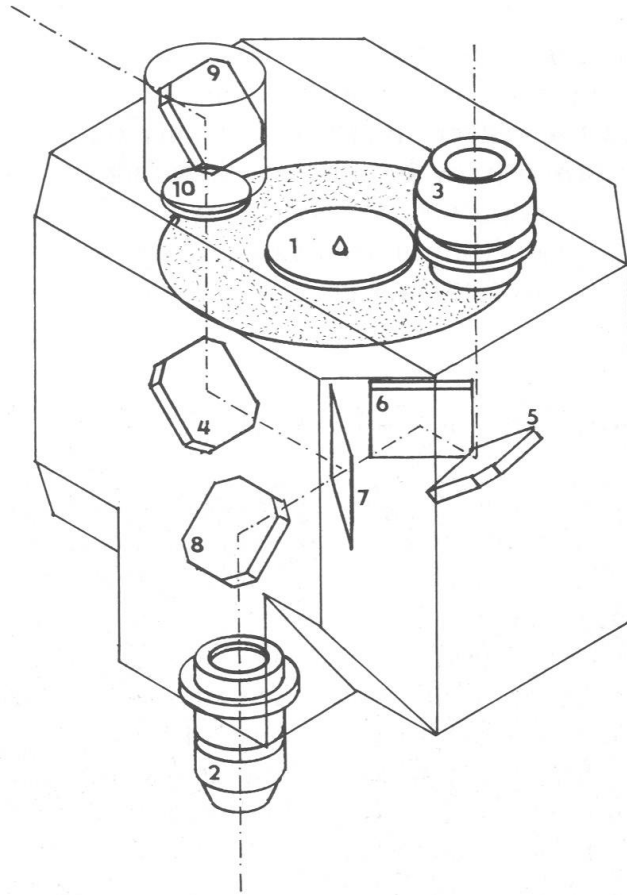
konfokální
mikroskop

Mojmír Petráň & Milan Hadravský 1965

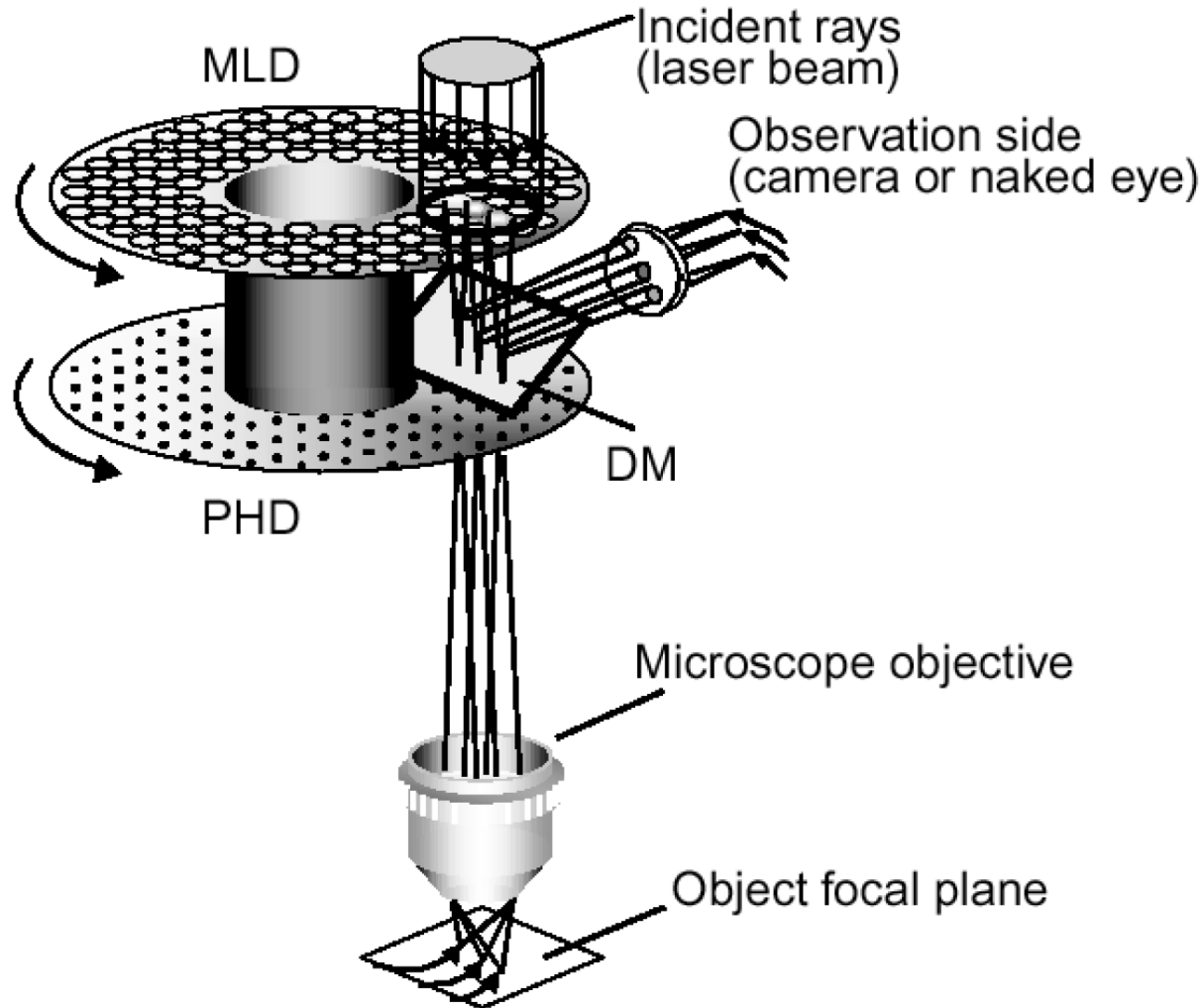


Pořad ČT o vynálezu KM: <http://bit.ly/okYX1Y>

Mojmír Petráň & Milan Hadravský Tandem scanning light microscope



Modifikace TSRLM - „Yokogawa scanner“



Olympus LEXT OLS 3100

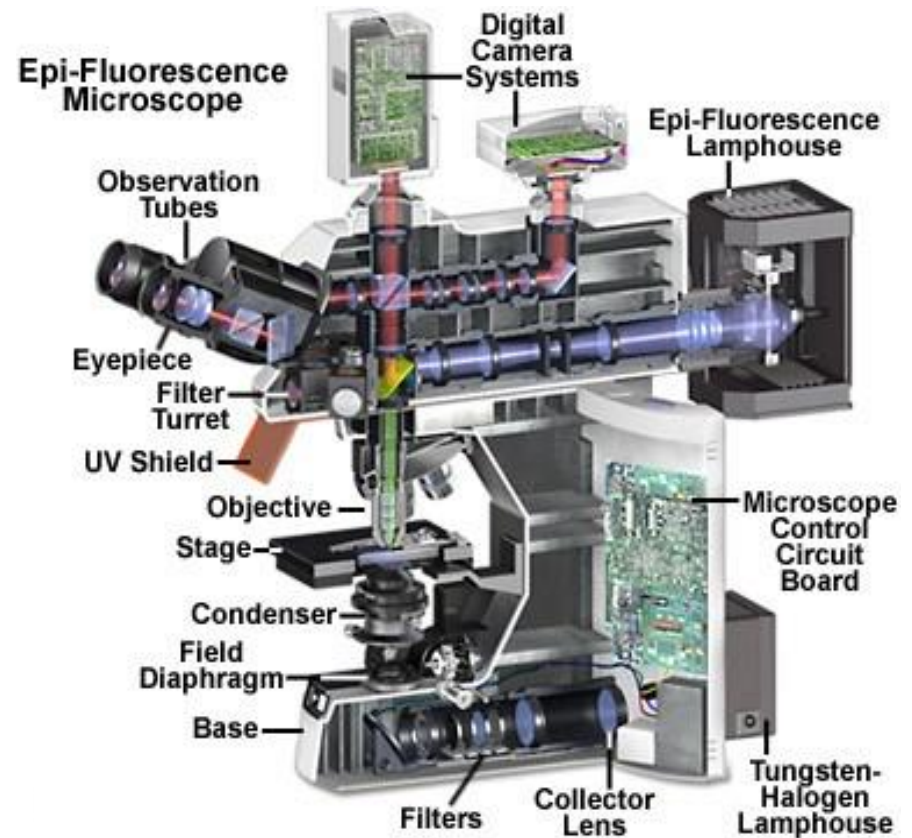
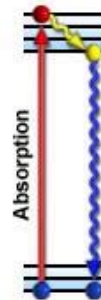
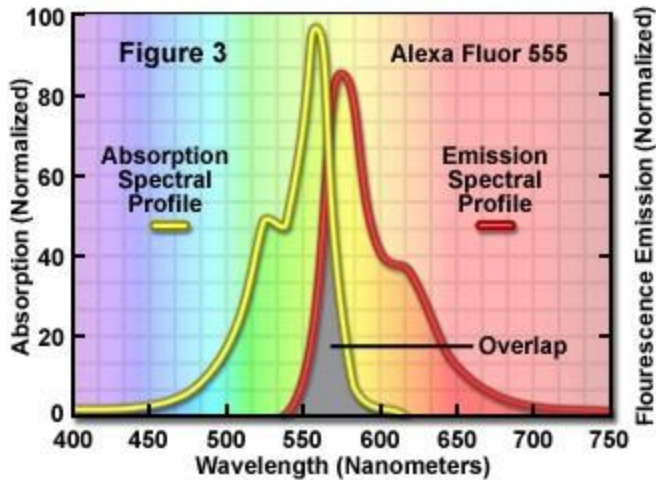
příklad konfokálního mikroskopu
specializovaného na měření povrchů:

- zobrazovací módy: BF (osvětlení bílou LED, barevné zobrazení), DIC, laserové konfokální zobrazení (laser 408 nm, konfokální UV optika), konfokální DIC
- rozlišení v laserovém konfokálním módu: **laterální: 120 nm (čarové)**
axiální: 10 nm (rovina)



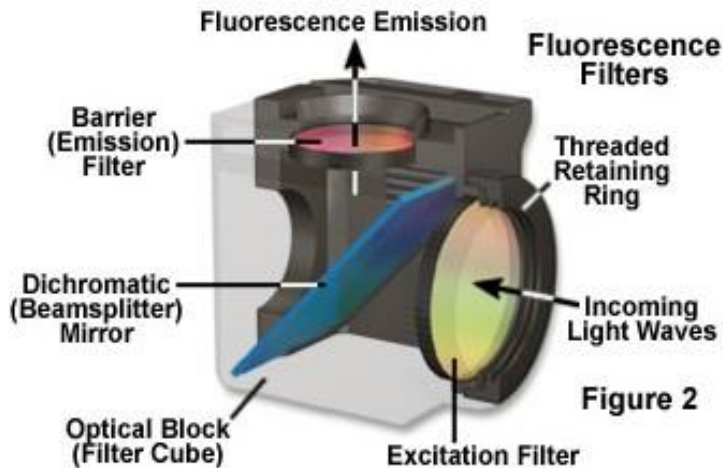
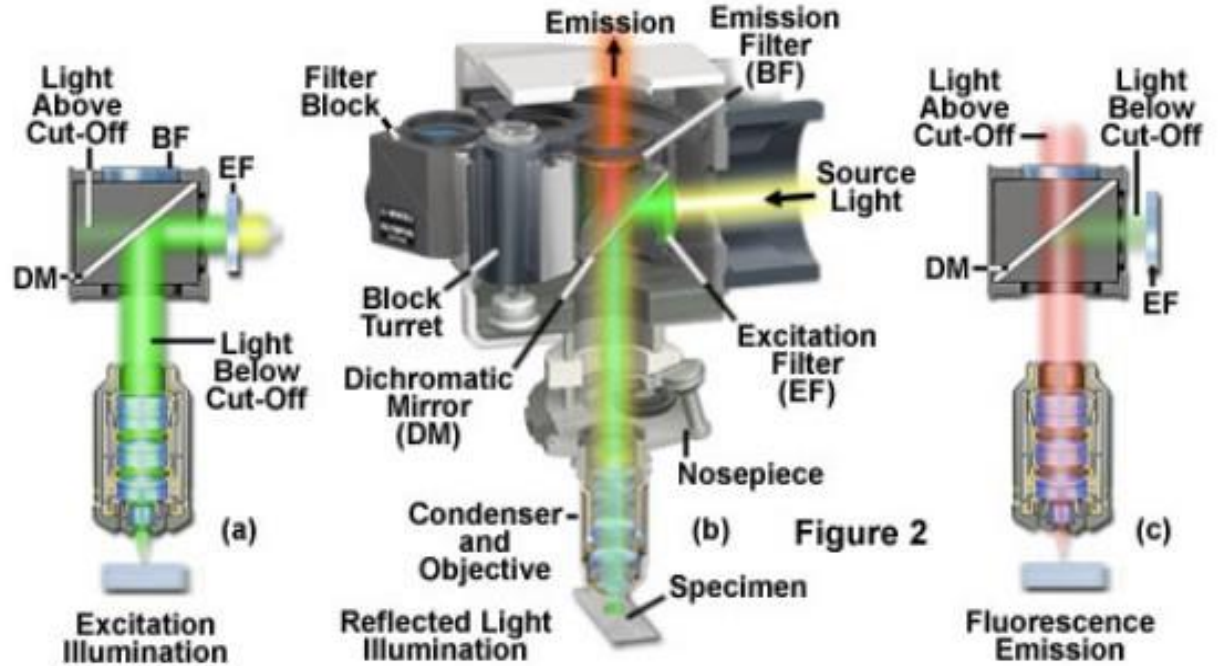
Fluorescenční mikroskopie

Fluorophore Absorption and Emission Profiles

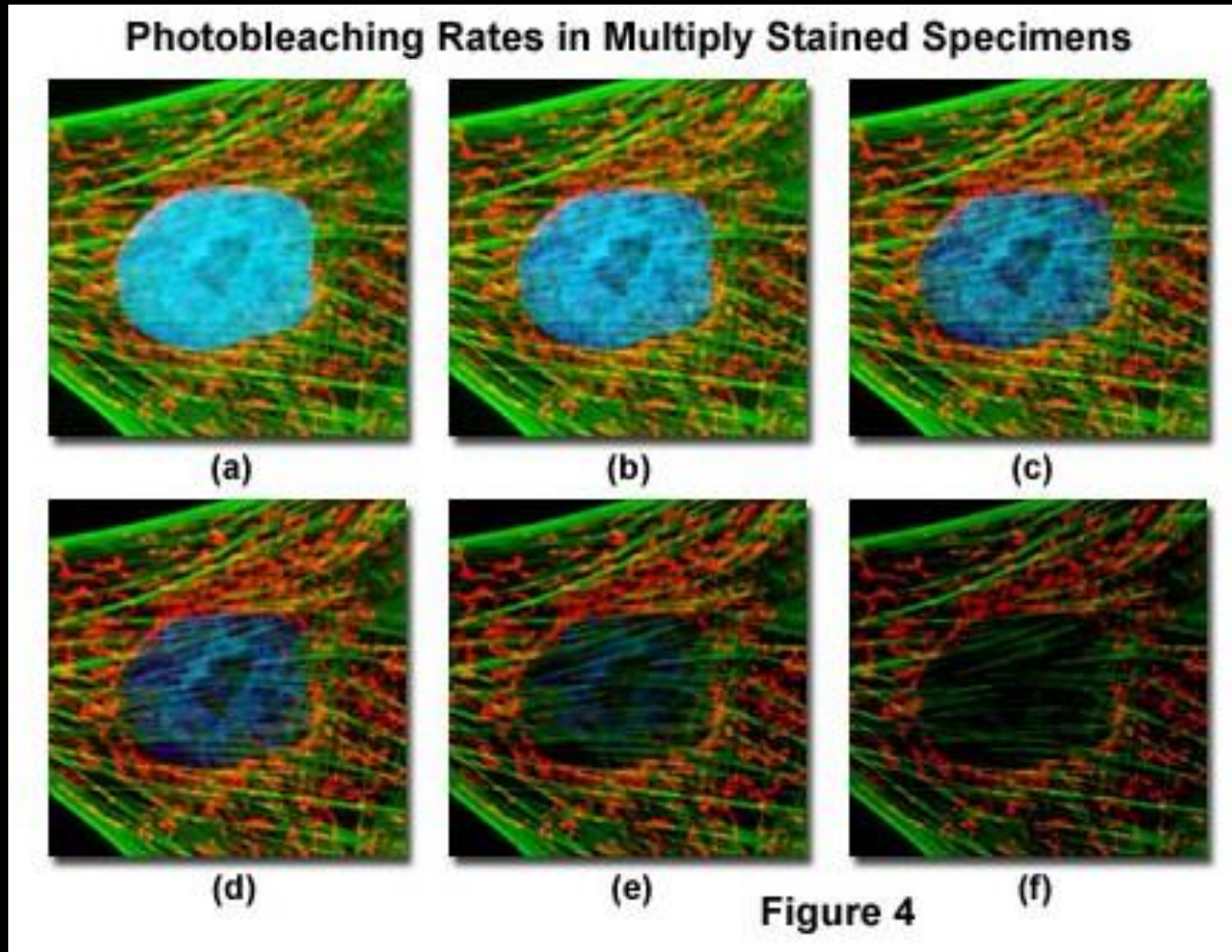


Fluorescenční mikroskopie

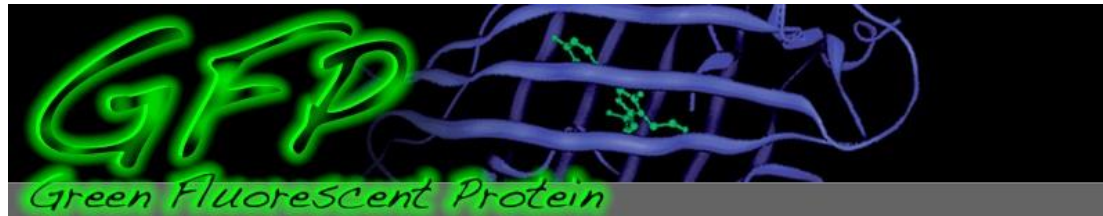
Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



Blednutí (Fading): vyhasínání (Quenching) a vybělování (Photobleaching)



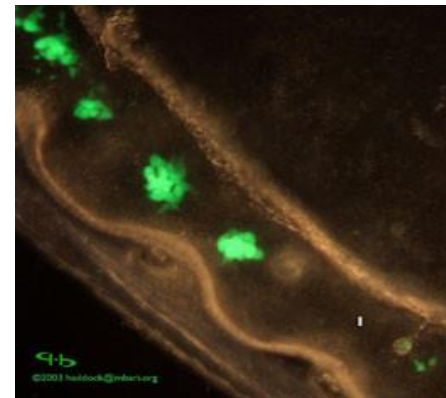
barvení: **jádro** **aktin a mitochondrie** **deriváty phalloidinu**



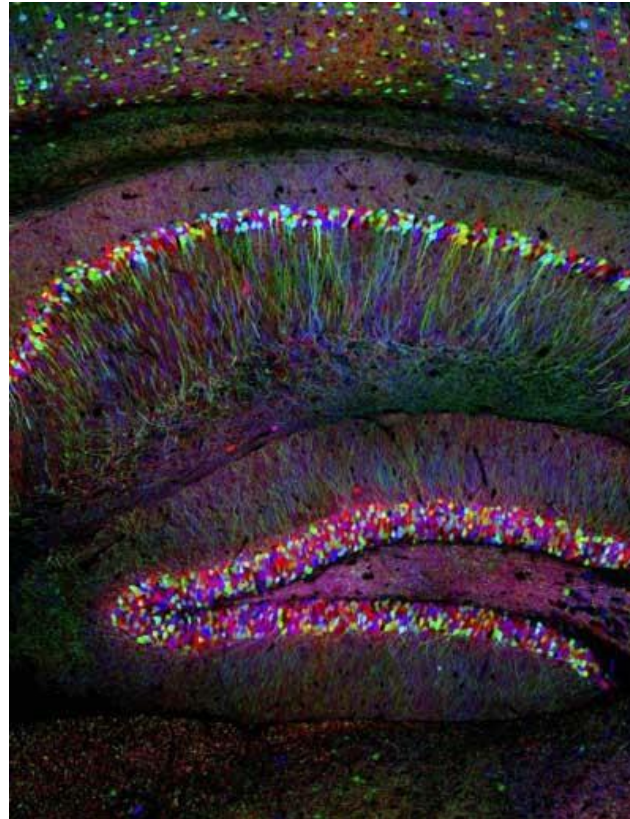
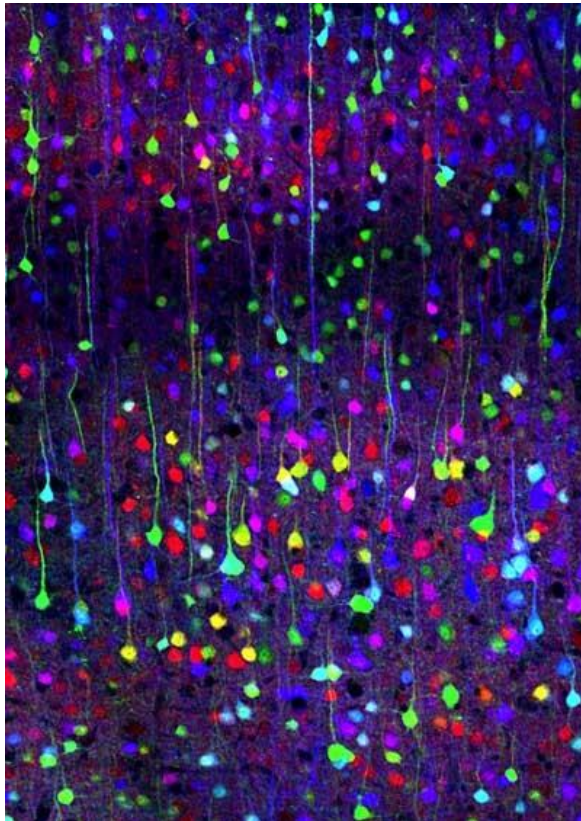
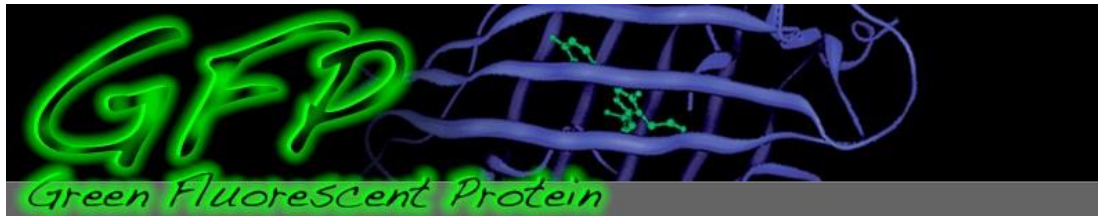
- protein, který se nachází v medúze *Aequorea victoria*
- je kódován jedním genem a okamžitě po translaci není fluorescenční, nicméně zhruba po jedné hodině sám katalyzuje modifikaci, během které se vytvoří výkonné fluorescenční centrum schované uvnitř proteinu, který svým tvarem připomíná soudek.
- díky pozičním mutacím GFP byly vytvořeny další fluorescenční proteiny s pozměněným excitačním a emisním spektrem v modro-zeleno-žlutém rozsahu.
- DNA sekvence kódující GFP může být vložena buď na začátek, nebo na konec genu kódujícího studovaný protein. To se realizuje mimo buňku s využitím plasmidu (kruhová DNA), do kterého se vloží spojená DNA sekvence požadovaného proteinu a GFP. Buňky jsou následně transfekovány tímto plasmidem a dochází k expresi fluorescenčního proteinu, který se skládá z původního proteinu a přidružené GFP oblasti. Tento GFP-fúzní protein se často v buňce chová jako původní protein a umožňuje zkoumat jeho aktivitu a lokalizaci.



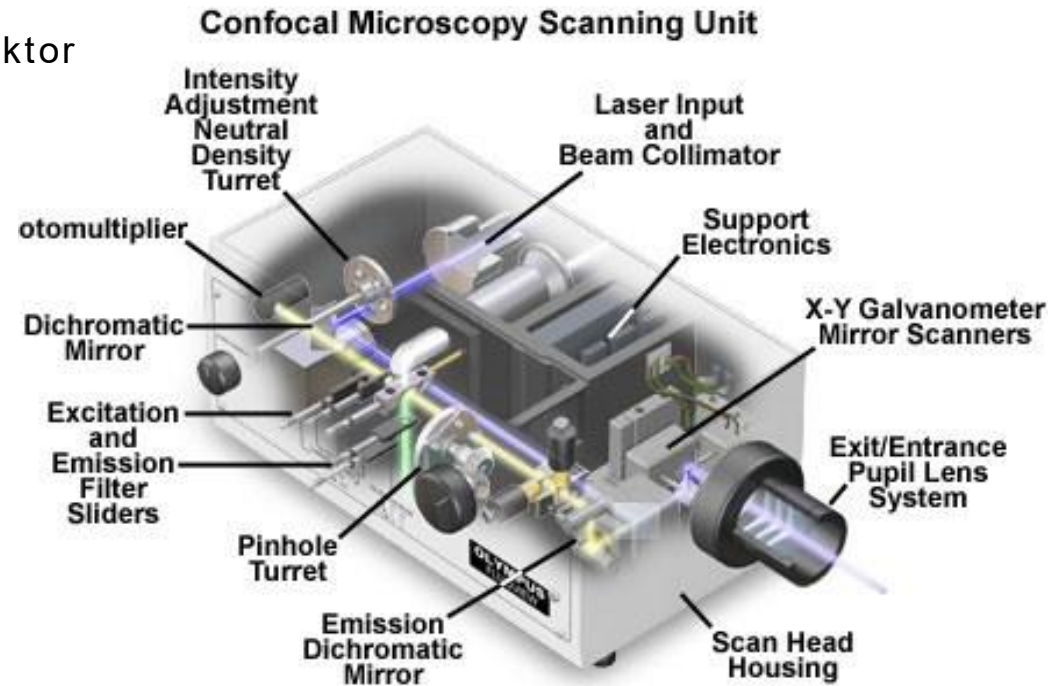
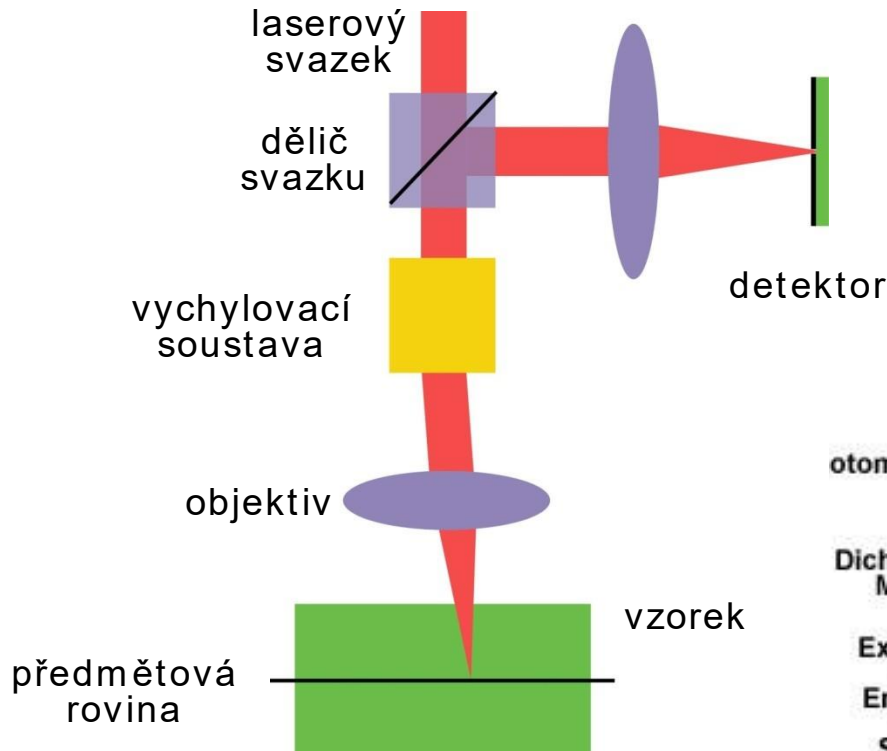
Aequorea victoria



Aequorea victoria photoorgan

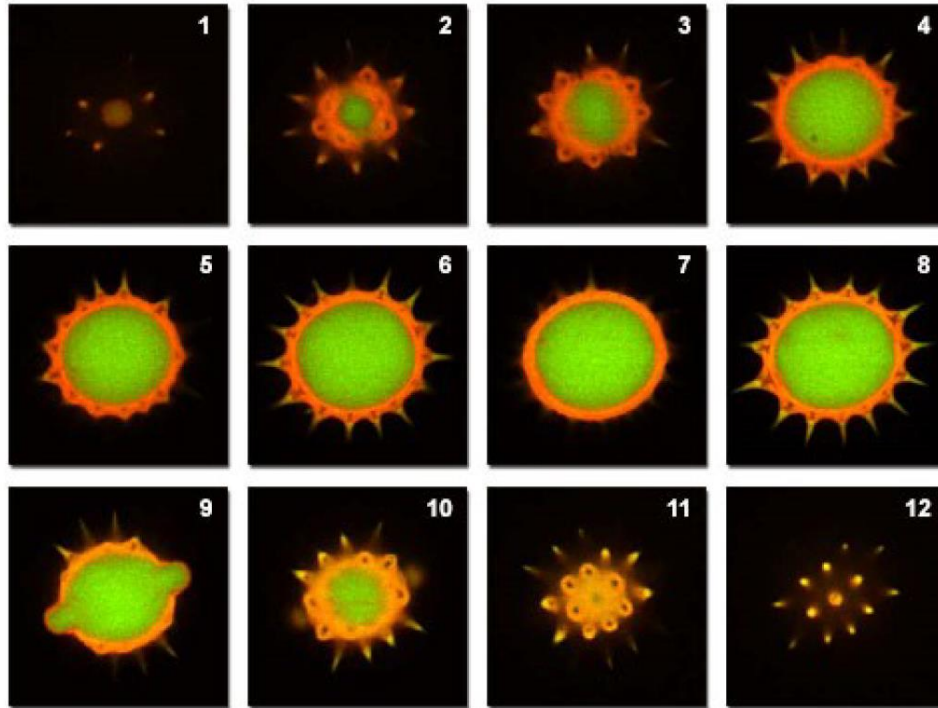


Konfokální laserový rastrovací mikroskop (CLSM)

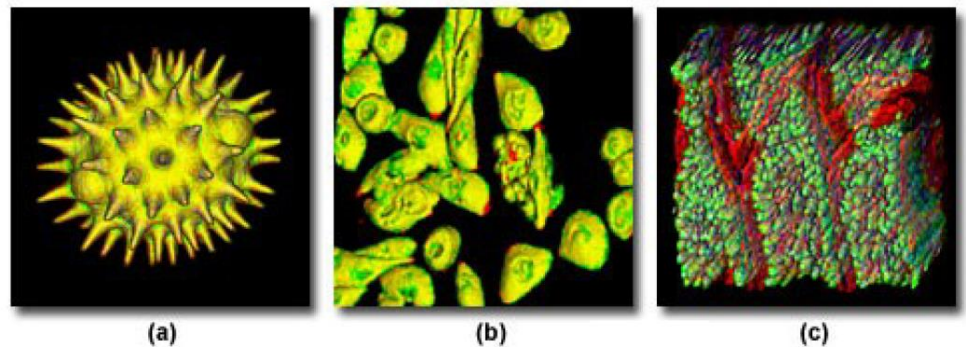


Optické řezy pomocí CLSM a fluorescence

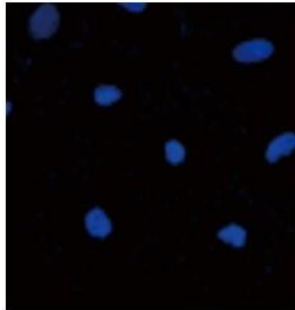
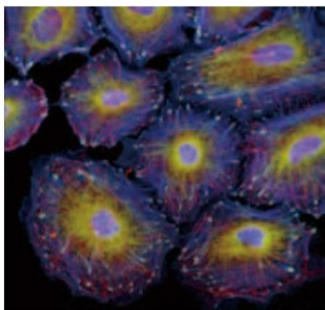
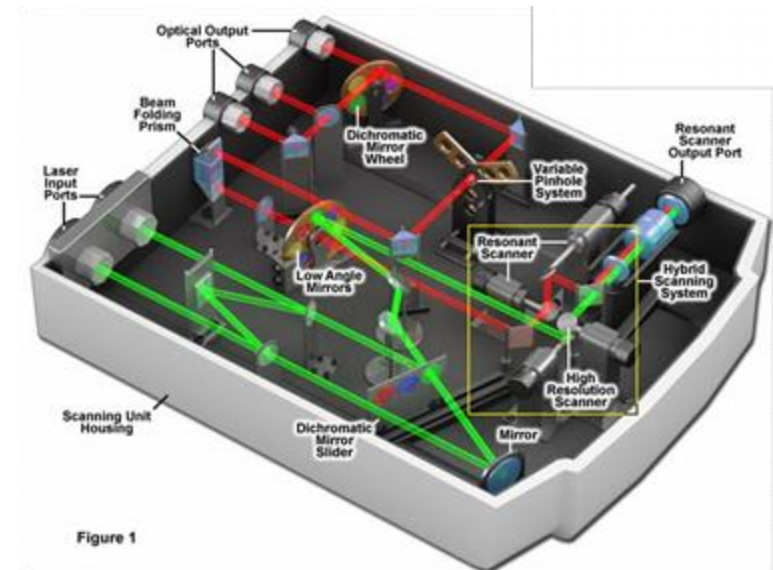
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



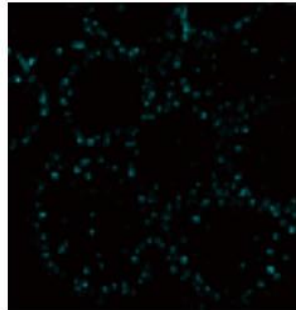
Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



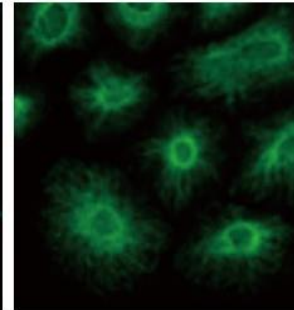
A1R⁺ konfokální mikroskop - Nikon



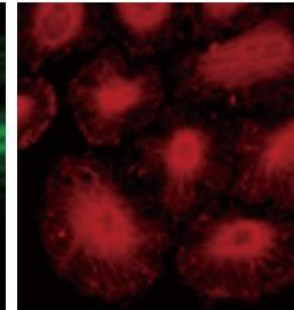
Nucleus (DAPI)



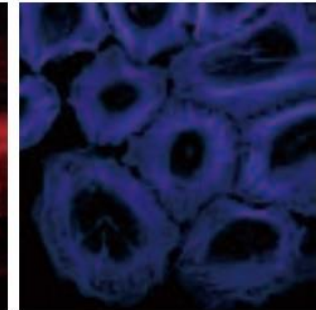
Vinculin (Alexa488)



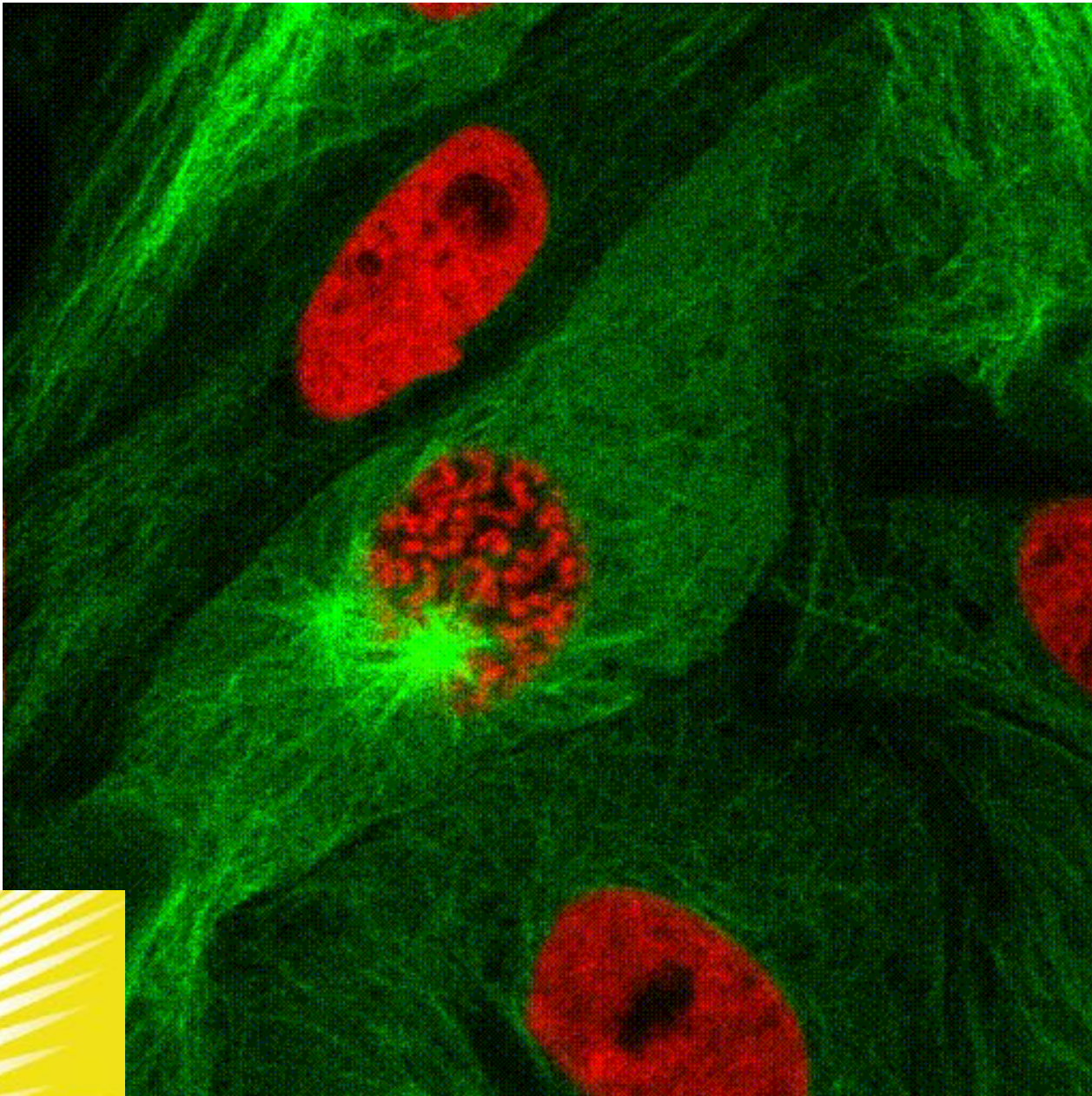
Vimentin (Alexa568)



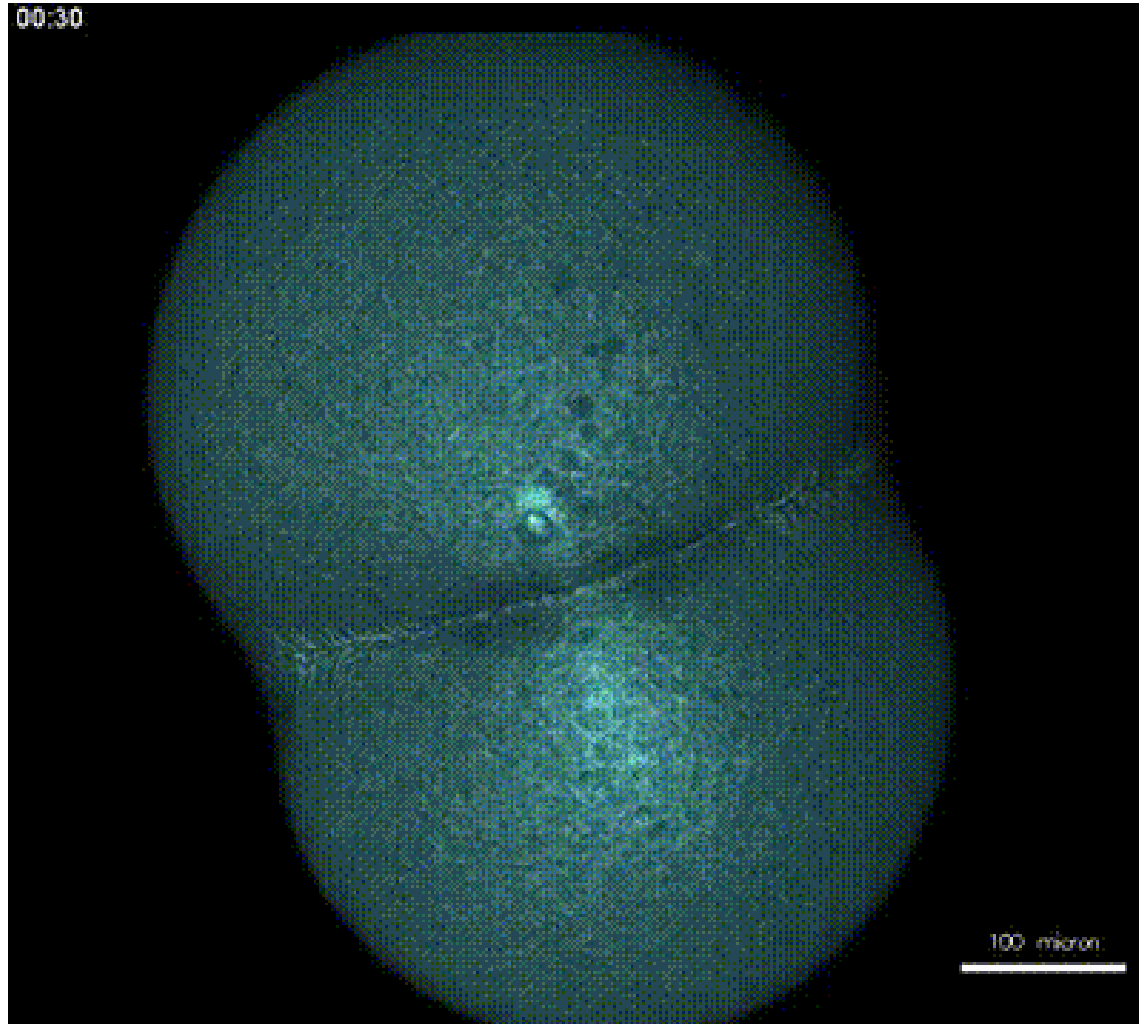
Tubulin (Alexa594)



Actin (Phalloidin-Alexa633)



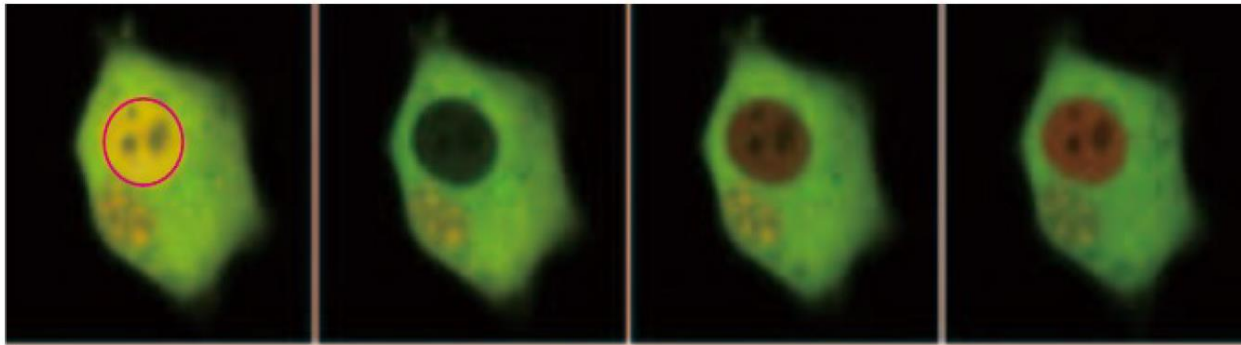
Zebra fish



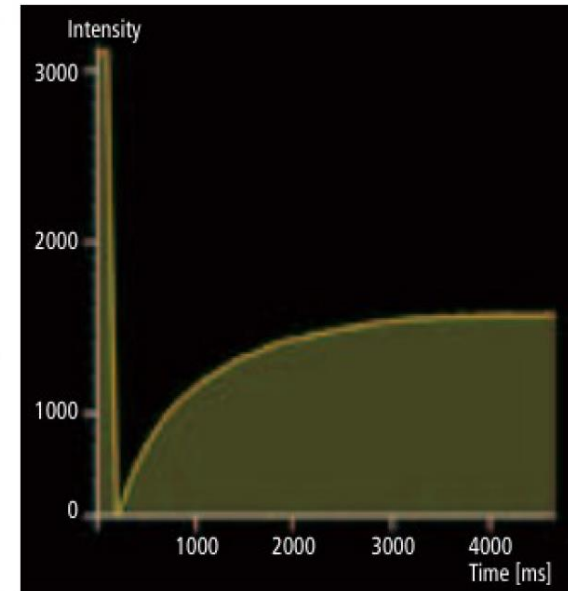
Fengzhu Xiong, Sean Megason (Harvard Medical School)

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

- Metoda vyvinuta původně pro laterální difúzi molekul v membránách.
- Fluorescenční molekula je fúzována se zkoumaným proteinem nebo membránovými lipidy.
- Po ozáření vybraného místa excitačním světlem je fluorescence molekul vysvícena.
- Pozorujeme znovuobnovení fluorescence ve vysvíceném místě, které svědčí o laterálním pohybu molekul v membránách, kontinuitě membránových organel, pohyb zkoumaných molekul nebo transportu molekul (cytoskelet).

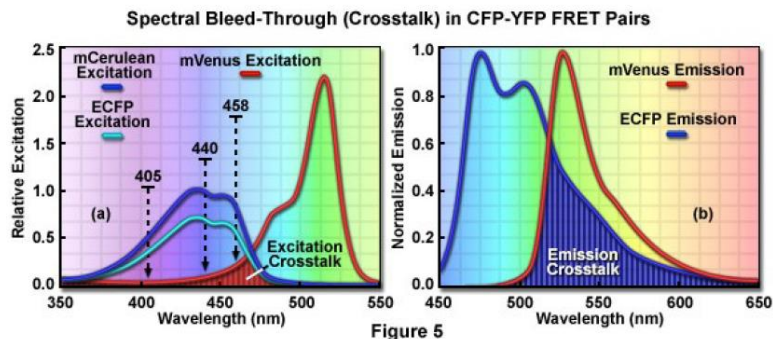


FRAP experiment observing nuclear transport of the YFP-label during a time-lapse acquisition sequence. The graph indicates the intensity change of the red ROI

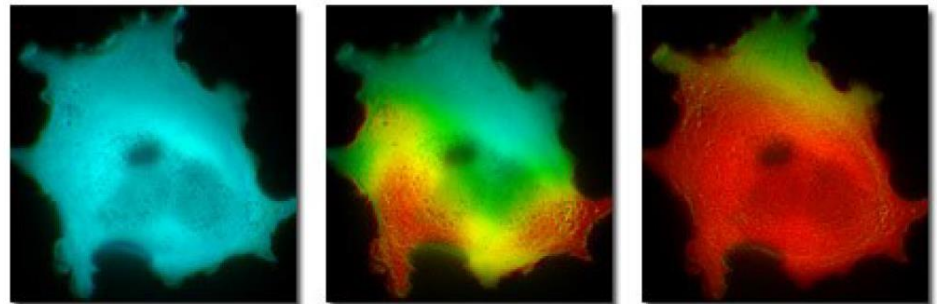


FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

- FRET umožňuje studovat interakce mezi proteiny, interakce protein-DNA a strukturní změny proteinů
- molekuly jsou označeny odlišnými fluorochromy, které jsou zvoleny tak, aby se emisní spektrum jednoho z nich překrývalo s excitačním spektrem druhého.
- Pokud tyto molekuly vzájemně reagují a jejich fluorochromy se dostanou velice blízko (méně než na 4 nm), energie excitovaného světla se může přenést z jednoho fluorochromu na druhý.
- při osvětlení komplexu excitačním světlem prvního fluorochromu dostaneme emisní spektrum světla odpovídající druhému fluorochromu.
- je používána s dvěma odlišnými spektrálními variantami GFP například při měření interakce mezi signální molekulou a jejím receptorem.
- získat kvantitativní FRET informaci z jednoho obrázku je složité - fluorescenční intenzita nezávisí jenom na účinnosti přenosu, ale i na neznámé koncentraci barviva - 8 měření s různými excitačními a emisními vlnovými délkami



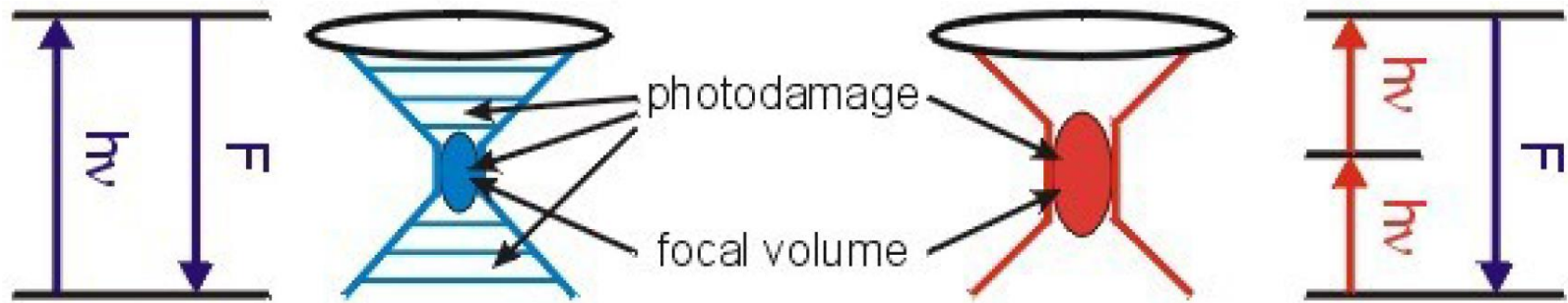
Sensitized Emission and Acceptor Photobleaching FRET



Multifotonová (konfokální) mikroskopie

- vysoké intenzitě světla - molekula pohltí dva fotony, které mají energii rovnou polovině energie nutné pro přechod z S_0 do S_1 (popř. 3 fotony o třetinové energii, atd.).
- nutno zfokusovat paprsek velmi silného laseru objektivem s velkou NA.
- Vlastnosti zobrazení
 - optické řezy mohou být získávány hlouběji z tkání než v konfokálním mikroskopu nebo v zobrazení klasickým mikroskopem
 - excitační světlo není utlumeno absorpcí fluoroforu nad rovinou zaostření
 - delší vlnové délky nejsou preparátem tolik rozptylovány
 - fluorescenční signál není degradován rozptylem uvnitř vzorku protože není zobrazován
 - všechny emitované fotony z multifotonové excitace mohou být použity pro zobrazení, proto není potřeba konfokálních clonek

2fotonová excitace molekuly



Fluorophore Excitation in Multiphoton Microscopy

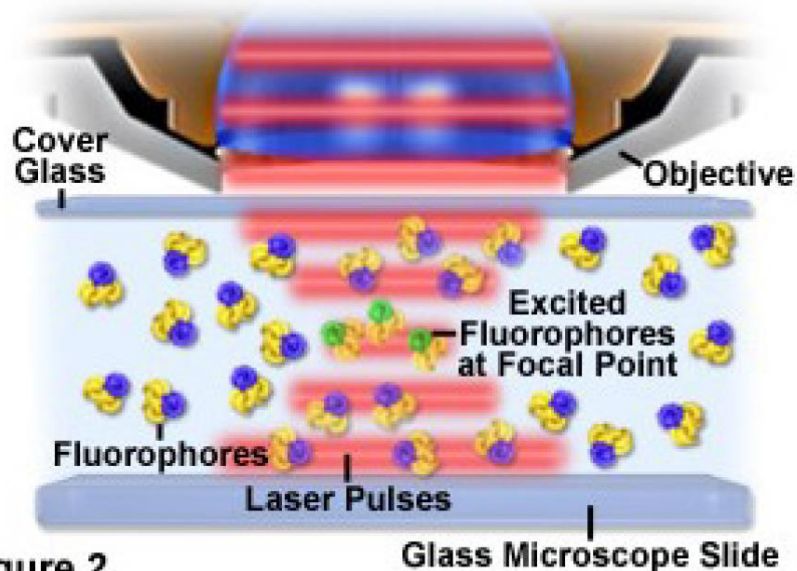
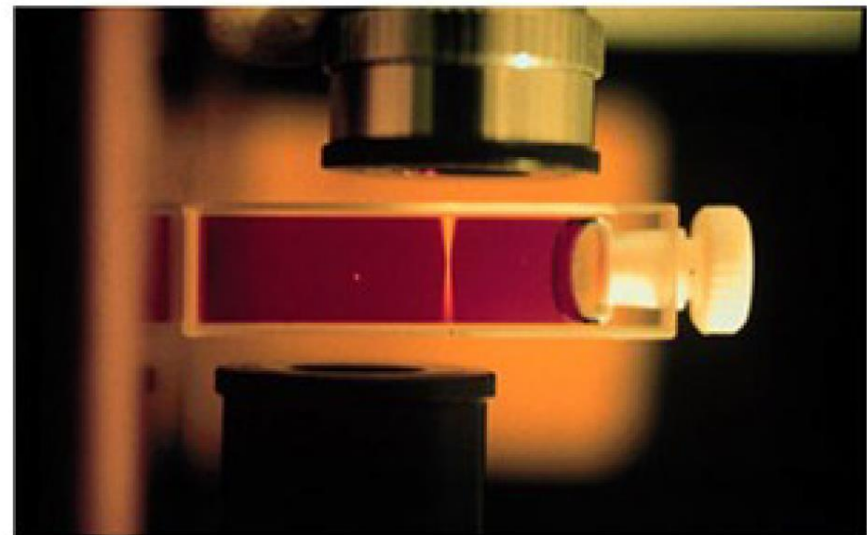
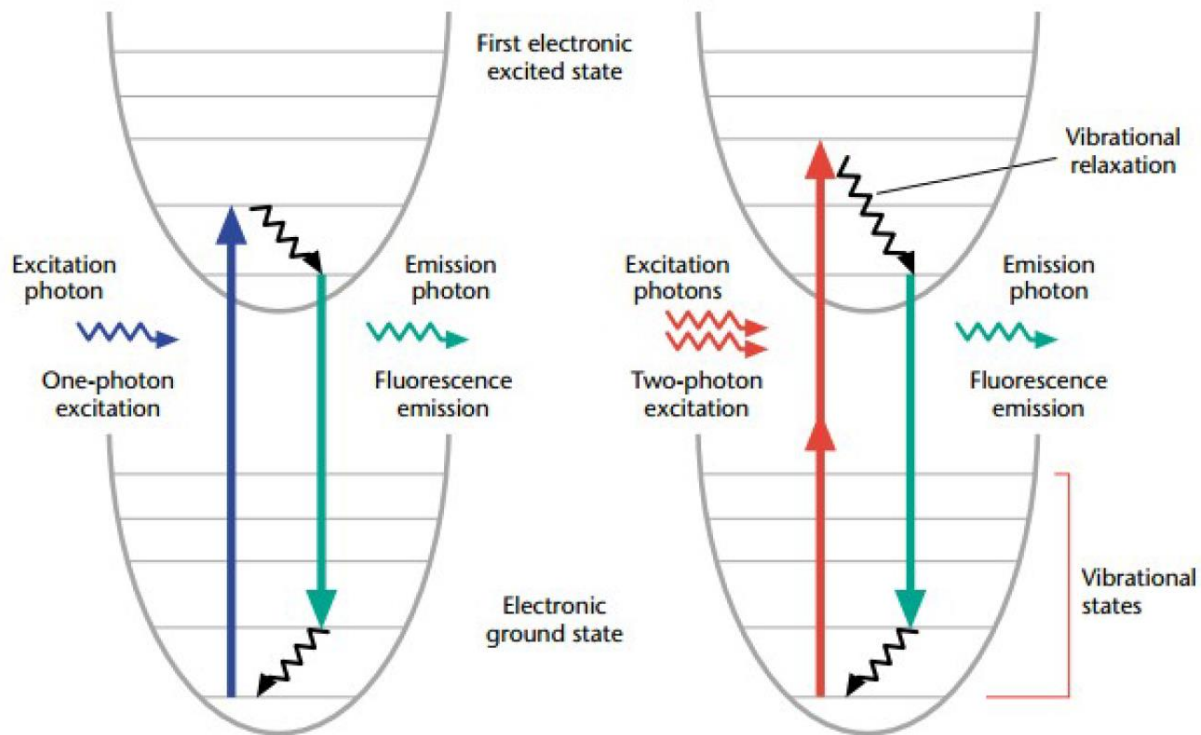


Figure 2



2fotonová excitace molekuly

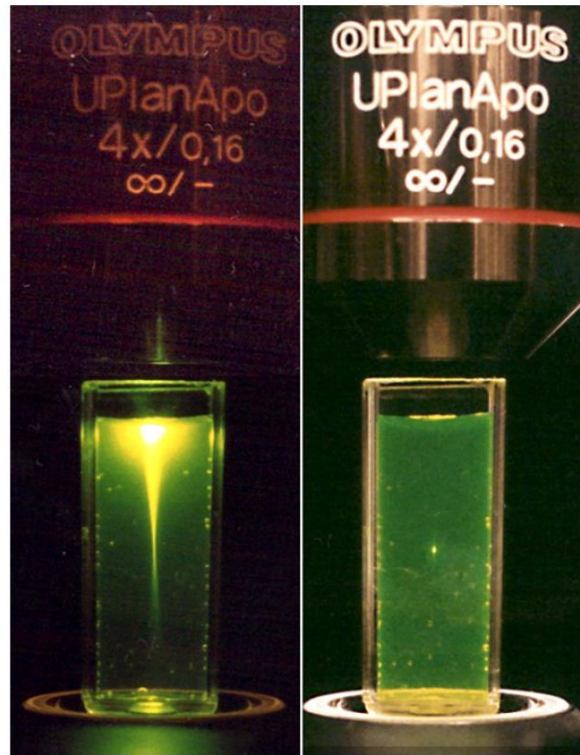
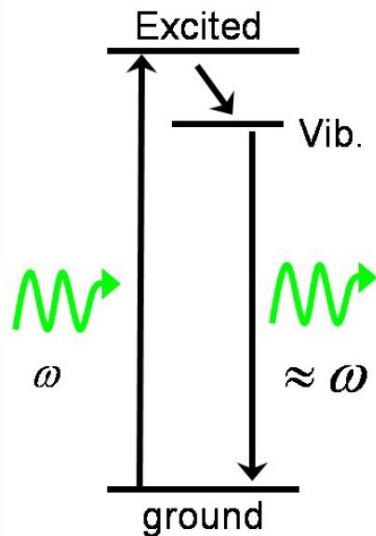


2fotonová excitace molekuly

Vznik optických řezů :

One-photon
fluorescence

$$\text{Signal} \propto I$$

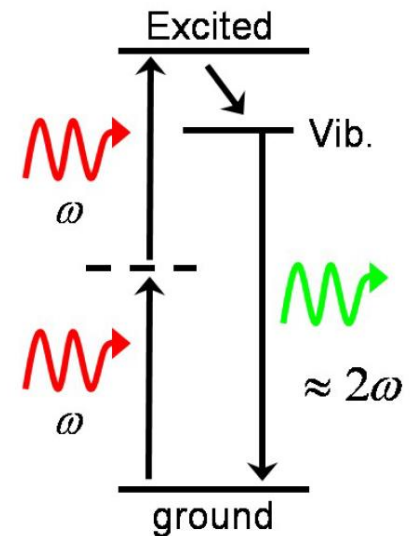


488 nm excitation

900 nm pulsed
excitation

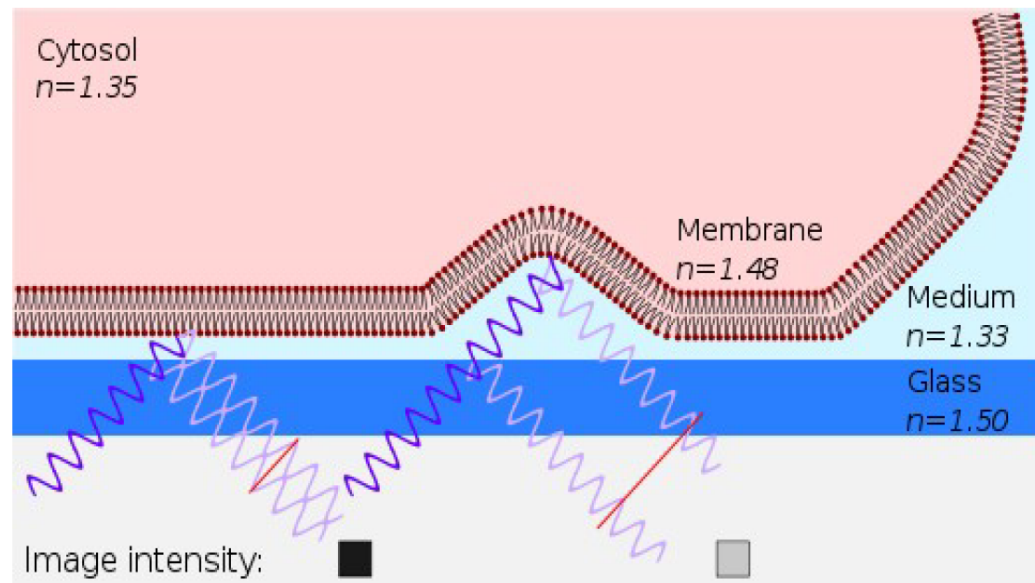
Two-photon
fluorescence

$$\text{Signal} \propto I^2$$

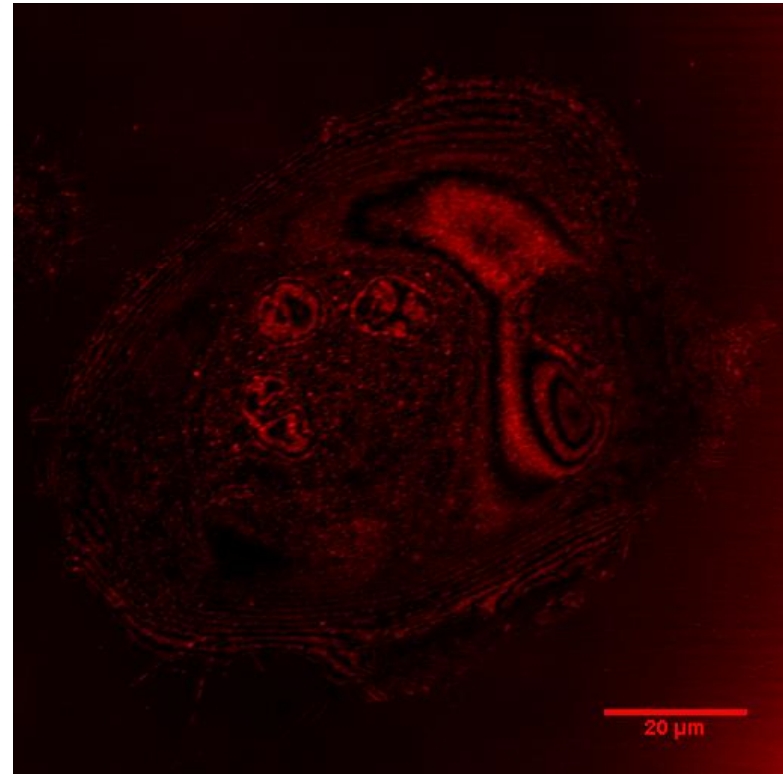
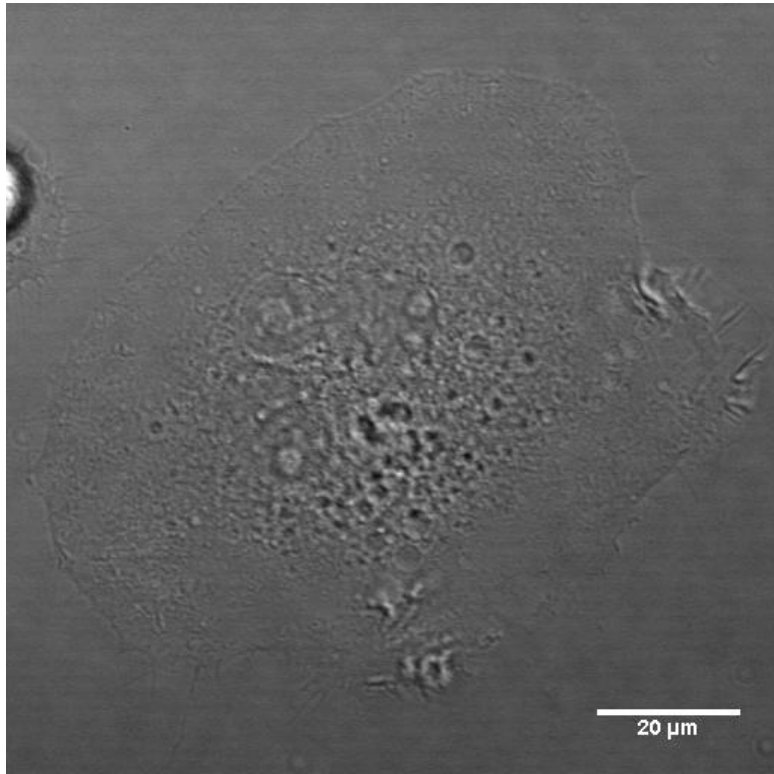


RICM (Reflection interference microscopy)

- Optická technika používaná ke studiu adheze buněk nebo pohyblivosti buněk na skleněném krycím sklíčku.
- Interference odražených světelných vln vytváří obraz s vysokým kontrastem a ostrostí.
- IRM může být použita pro téměř jakoukoliv buňku, která spočívá na povrchu skla.

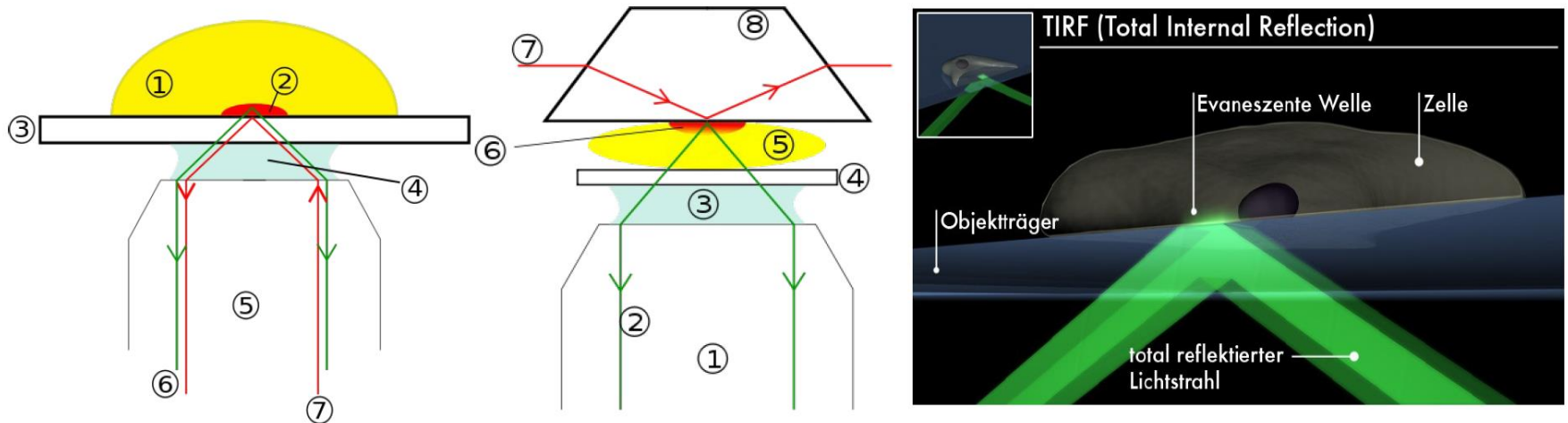


RICM (Reflection interference microscopy)

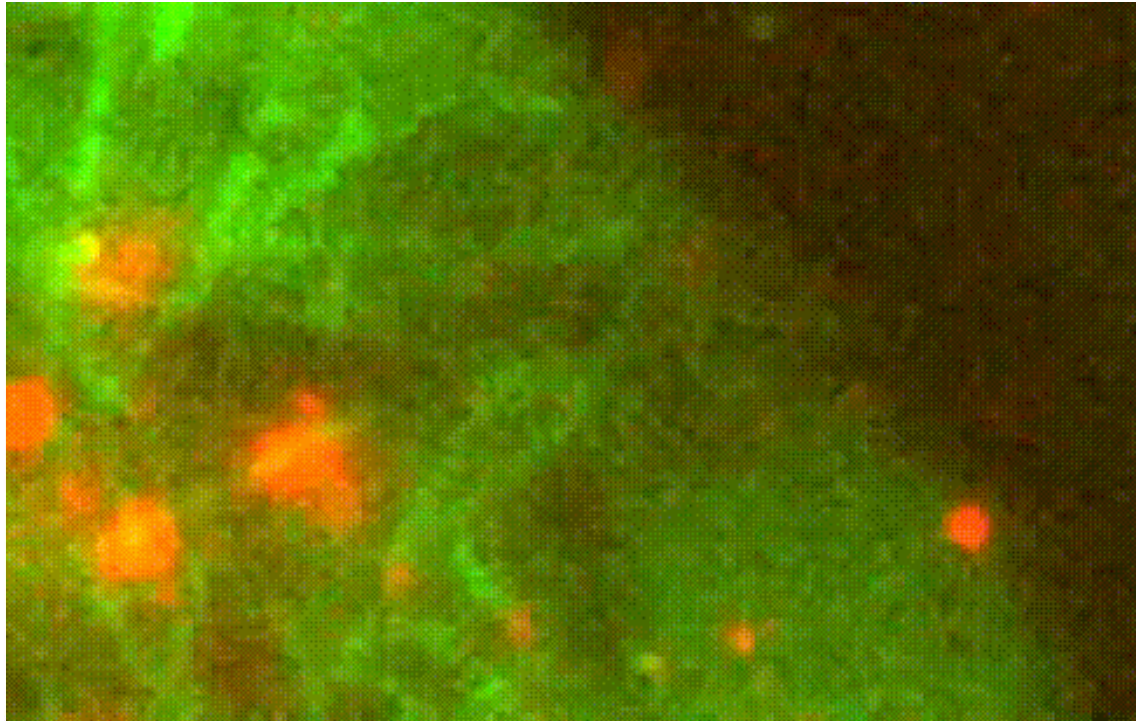


TIRF (Total internal reflection fluorescence) microscope

- Osvětlovací svazek se odráží na rozhraní sklo - vzorek
- Vzorek excitován evanescentní vlnou
- Snímána fluorescence vzorku z hloubky cca 70 - 250 nm
- Kinetické studie membrán, transportů vně buňky a zobrazení jednotlivých molekul



TIRF (Total internal reflection fluorescence) microscope



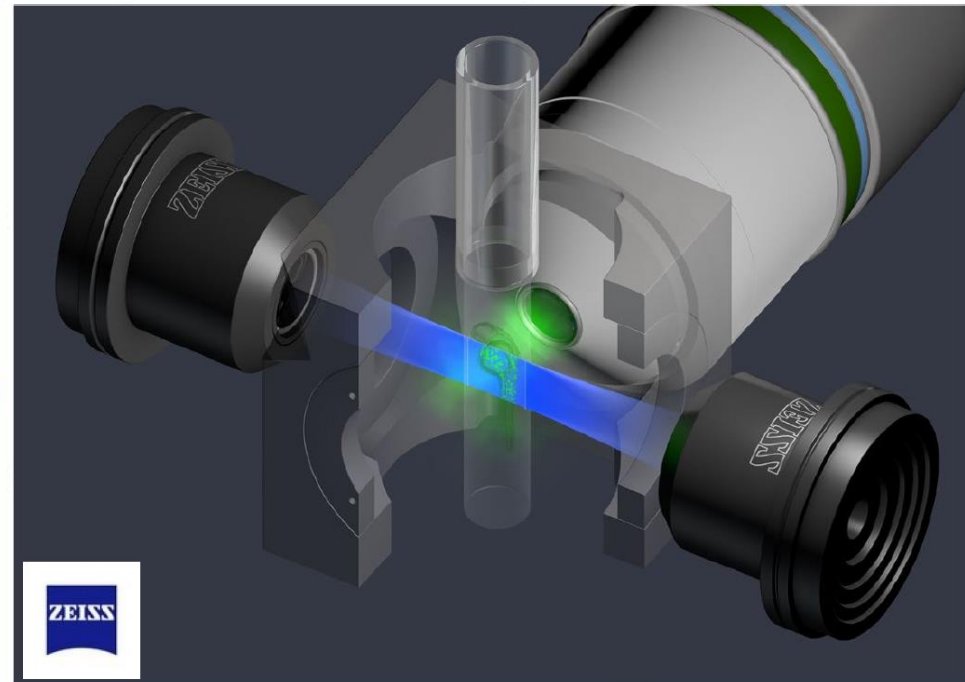
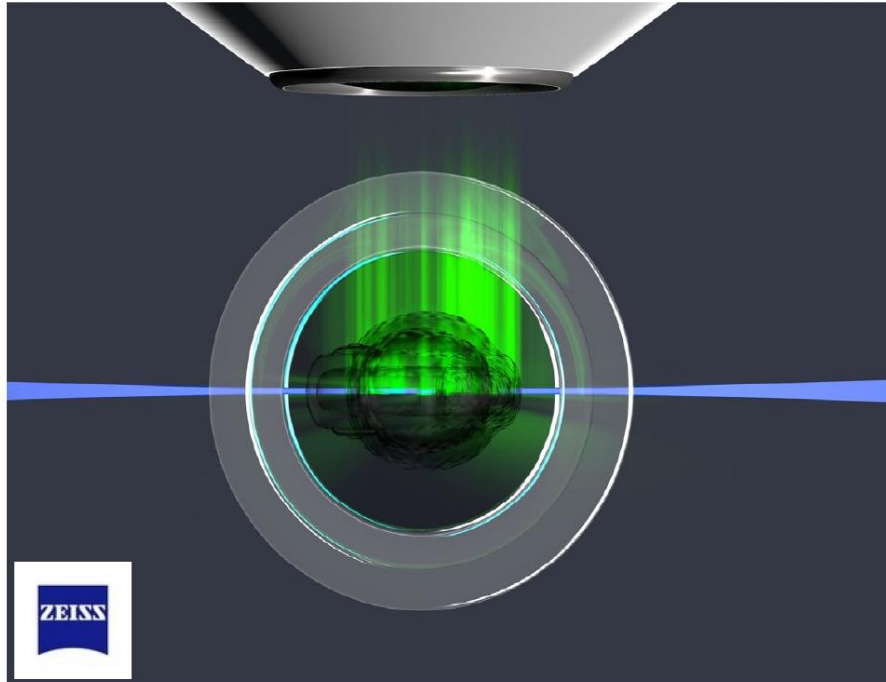
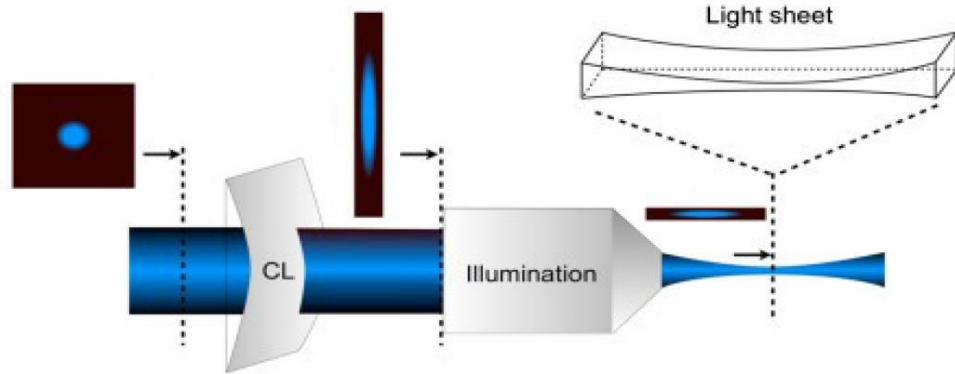
Pitt Developmental Biology

Zelená fluorescence GFP-tubulin, červená fluorescence Cx43-DsRed.
Transport Cx43-DsRed na buněčnou membránu po tubulinu.

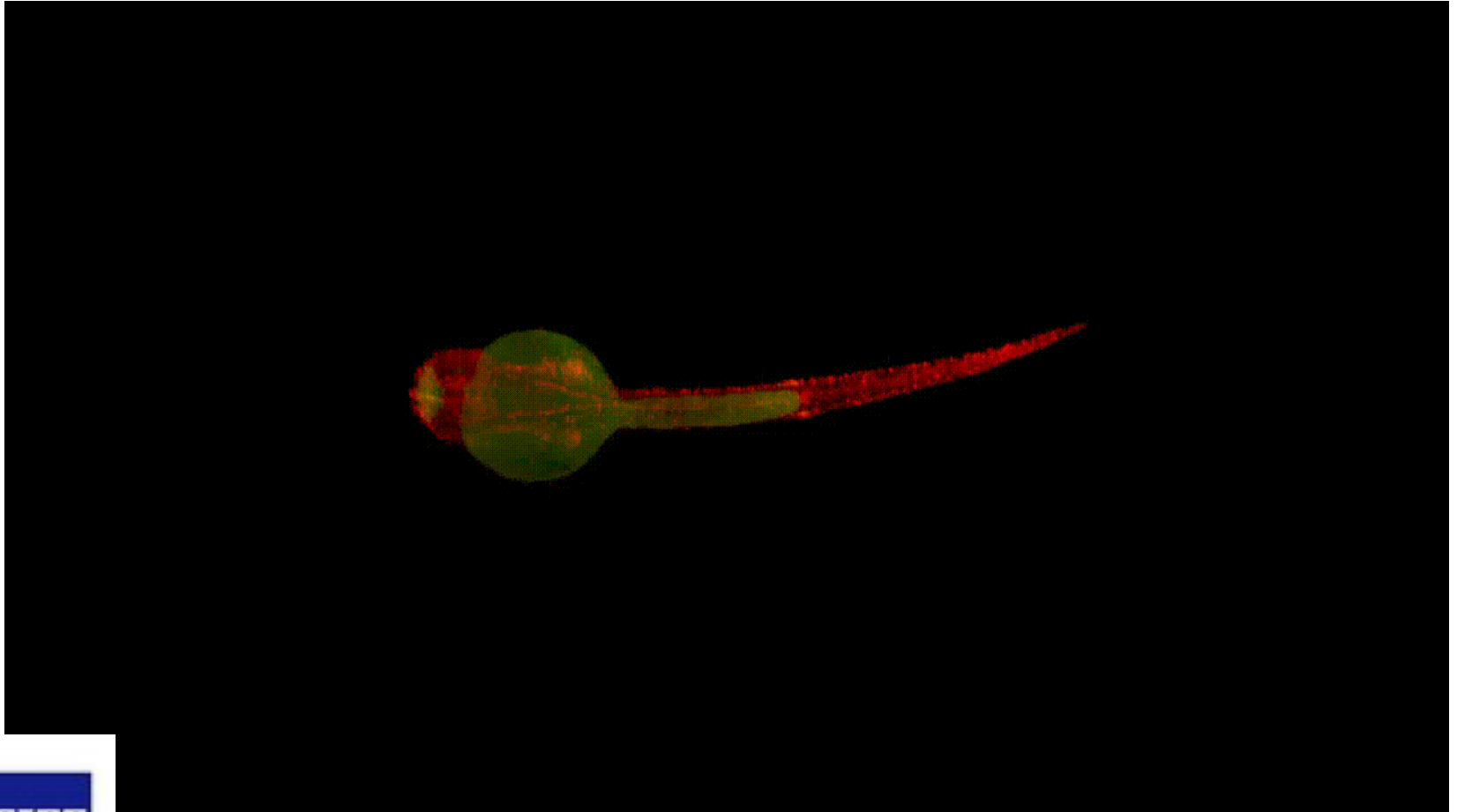
Single Plane Illumination Microscopy (SPIM) - Lightsheet

a

- Tvorba optických řezů vzorkem
- Fluorescence je buzena pouze z osvětlené roviny
- Laterální rozlišení jako u běžných mikroskopů
- Axiální rozlišení cca 4x horší



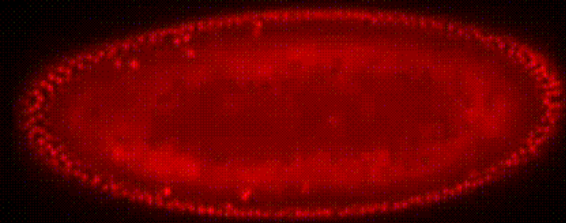
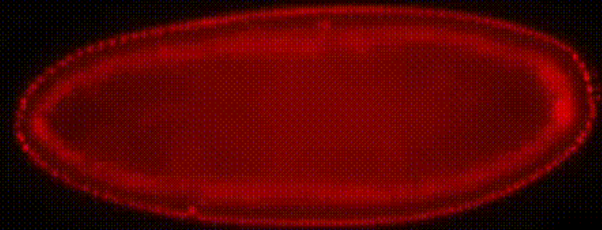
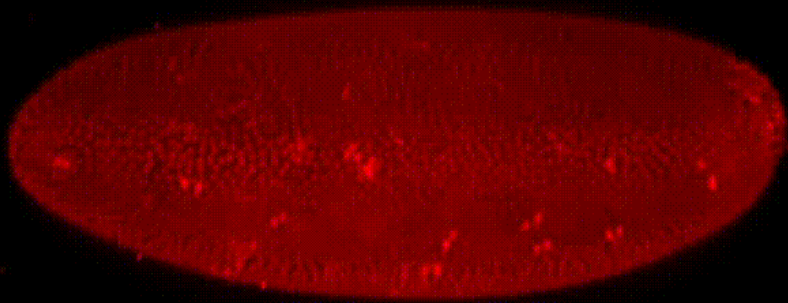
zebrafish



octomilka

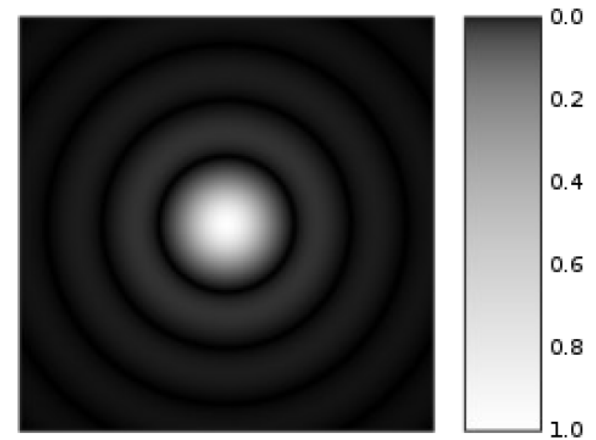


0 h 00 min



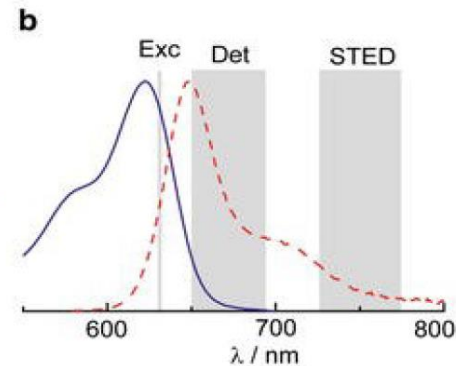
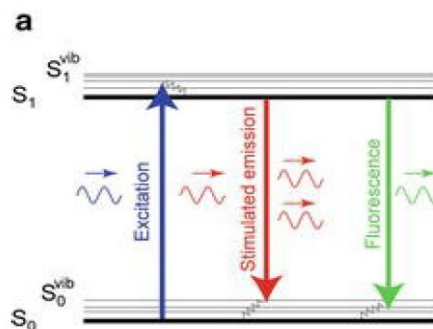
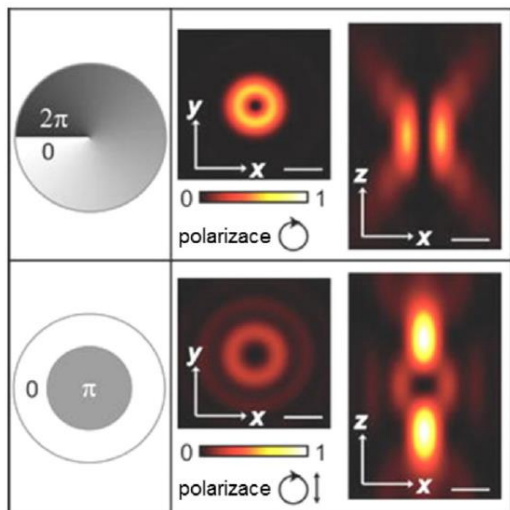
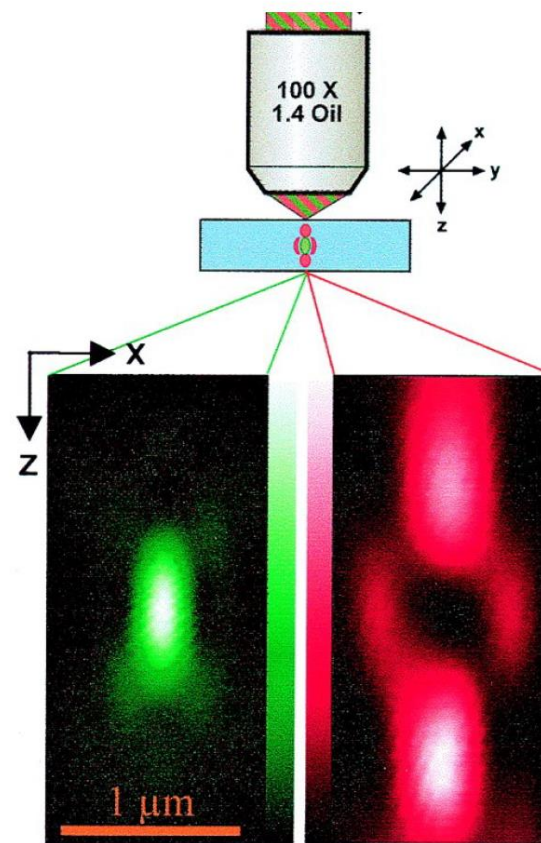
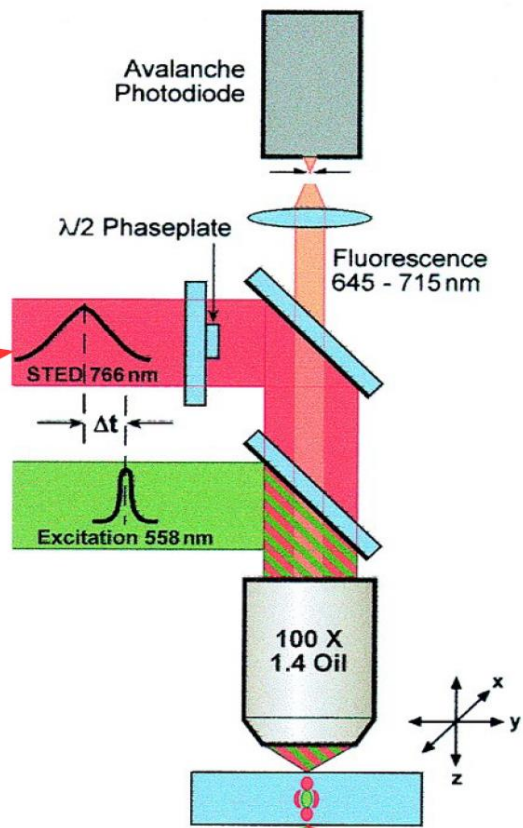
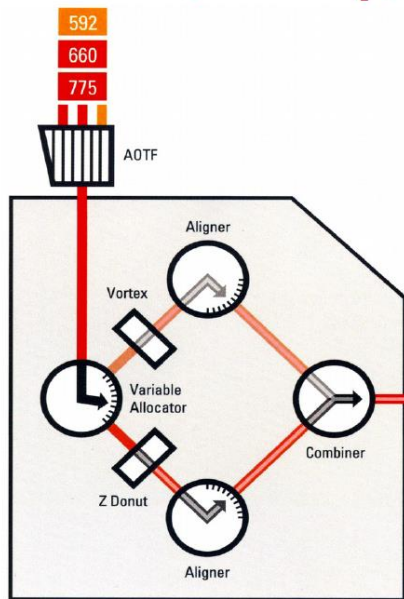
ZEISS

Superrozlišení

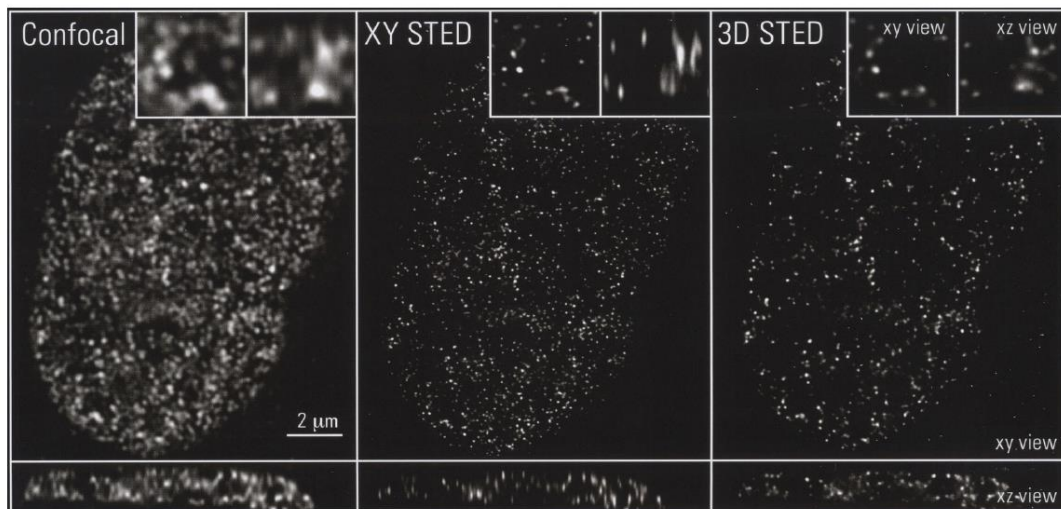
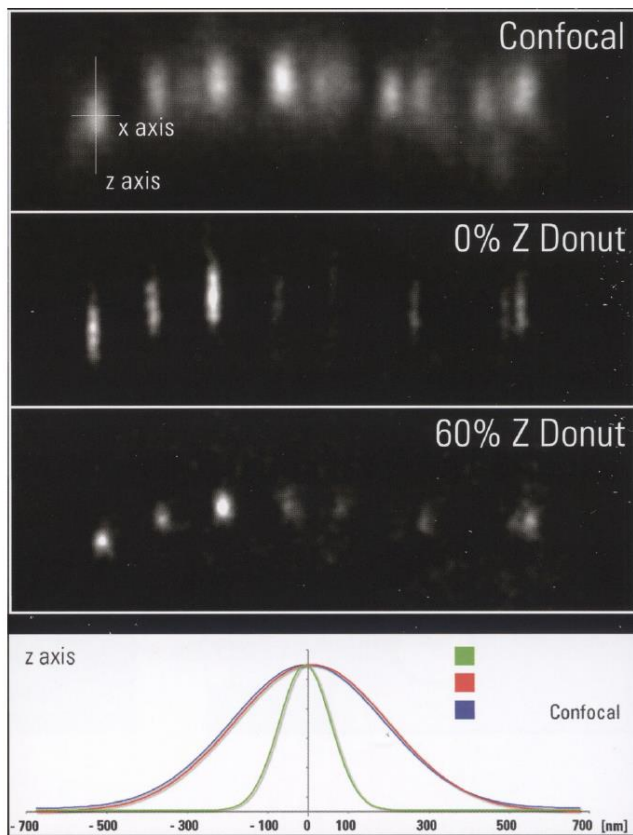
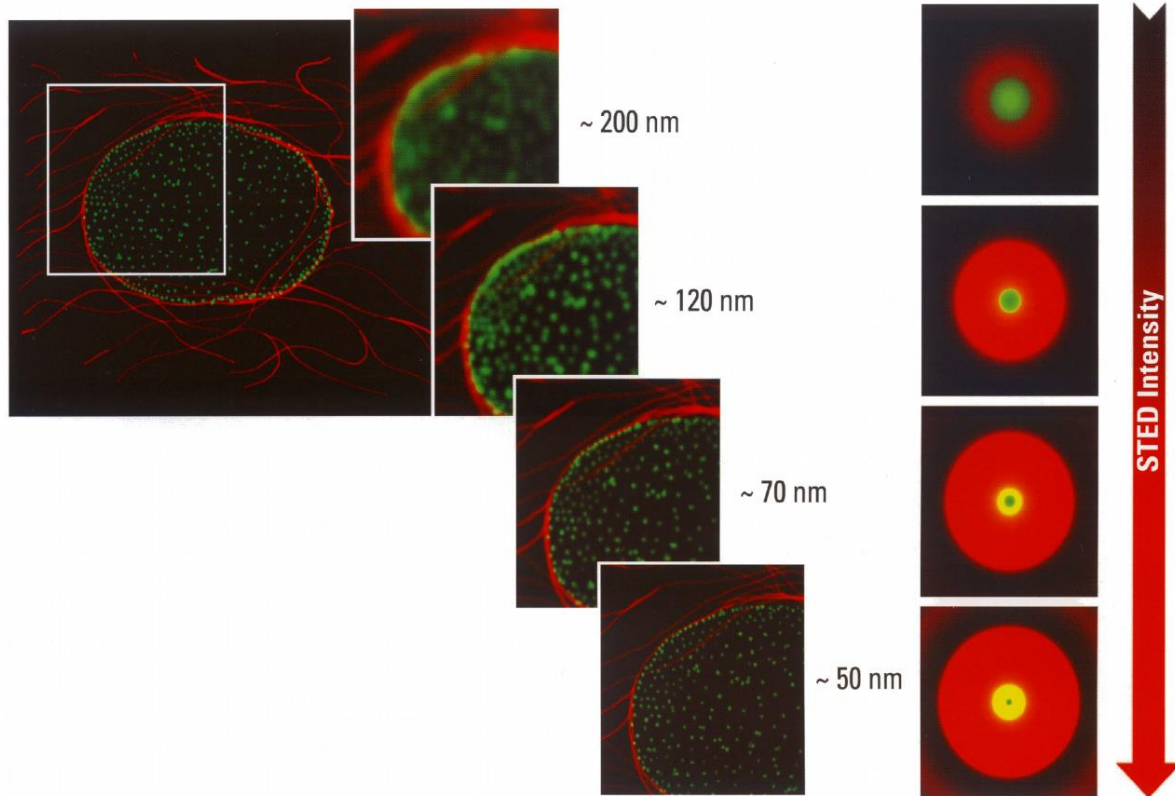


$$r_{0,Ai} = 0,61 \frac{\lambda}{A}$$

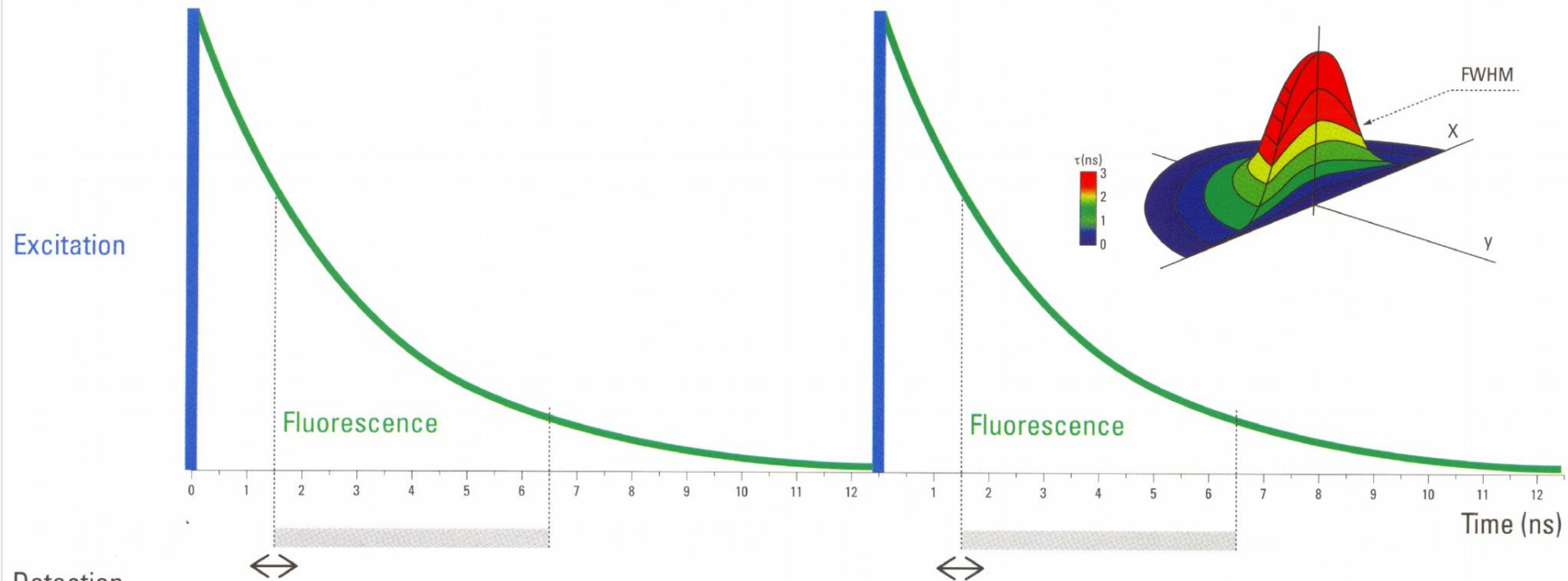
STED (Stimulated Emission Depletion)



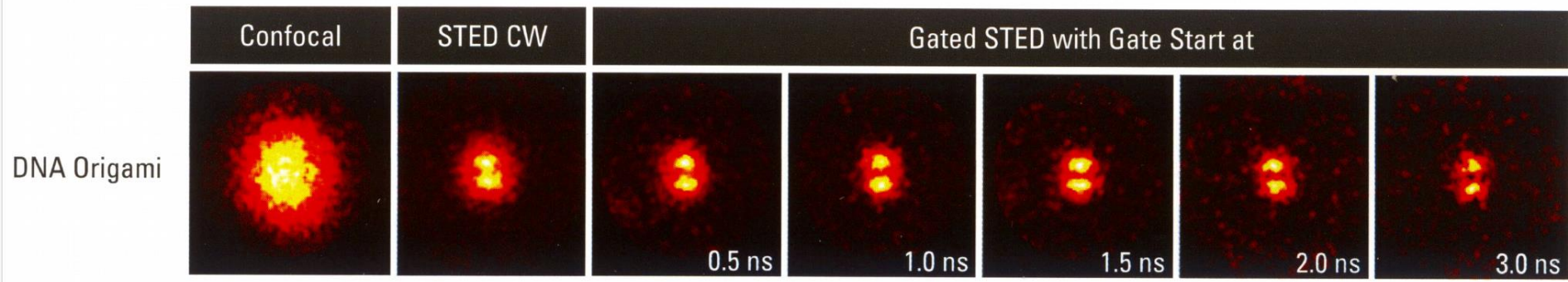
STED



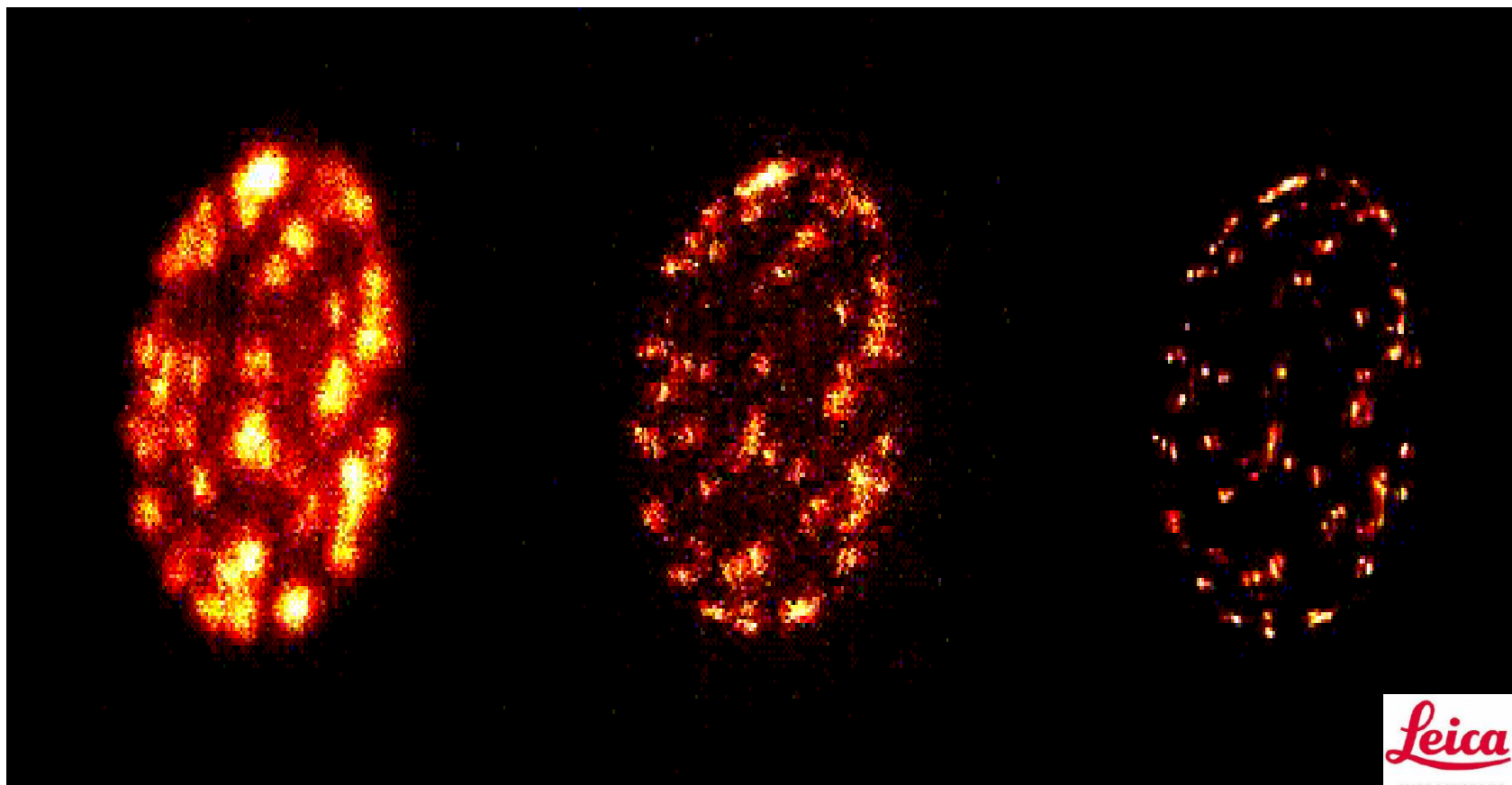
Gated STED



STED (30%)



STED



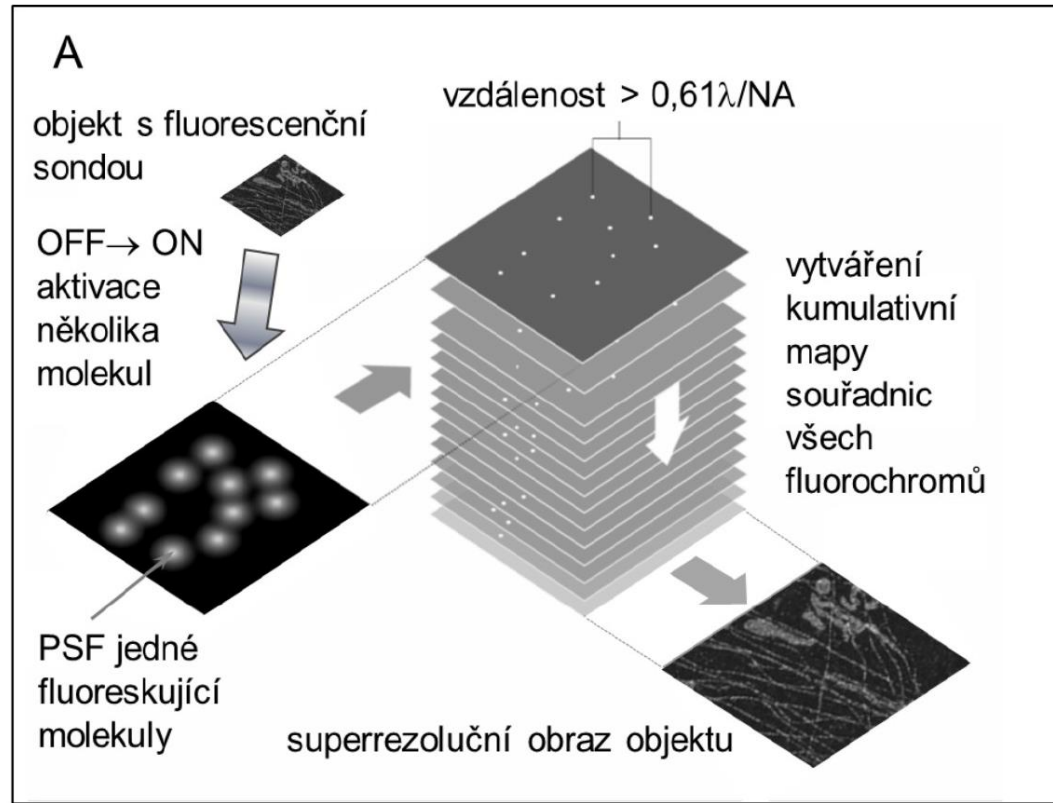
Konfokální
zobrazení

STED zobrazení

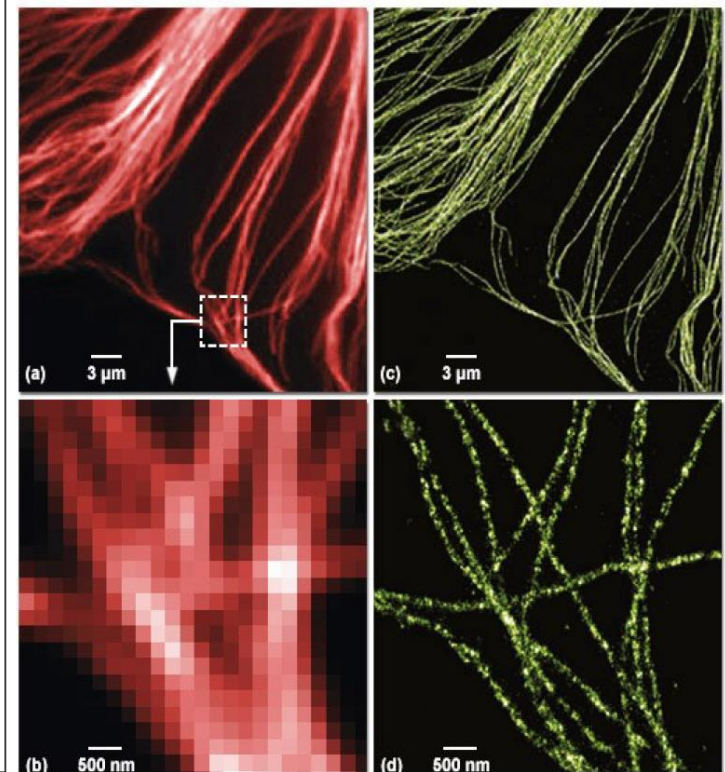
STED zobrazení
+ dekonvoluce

STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)

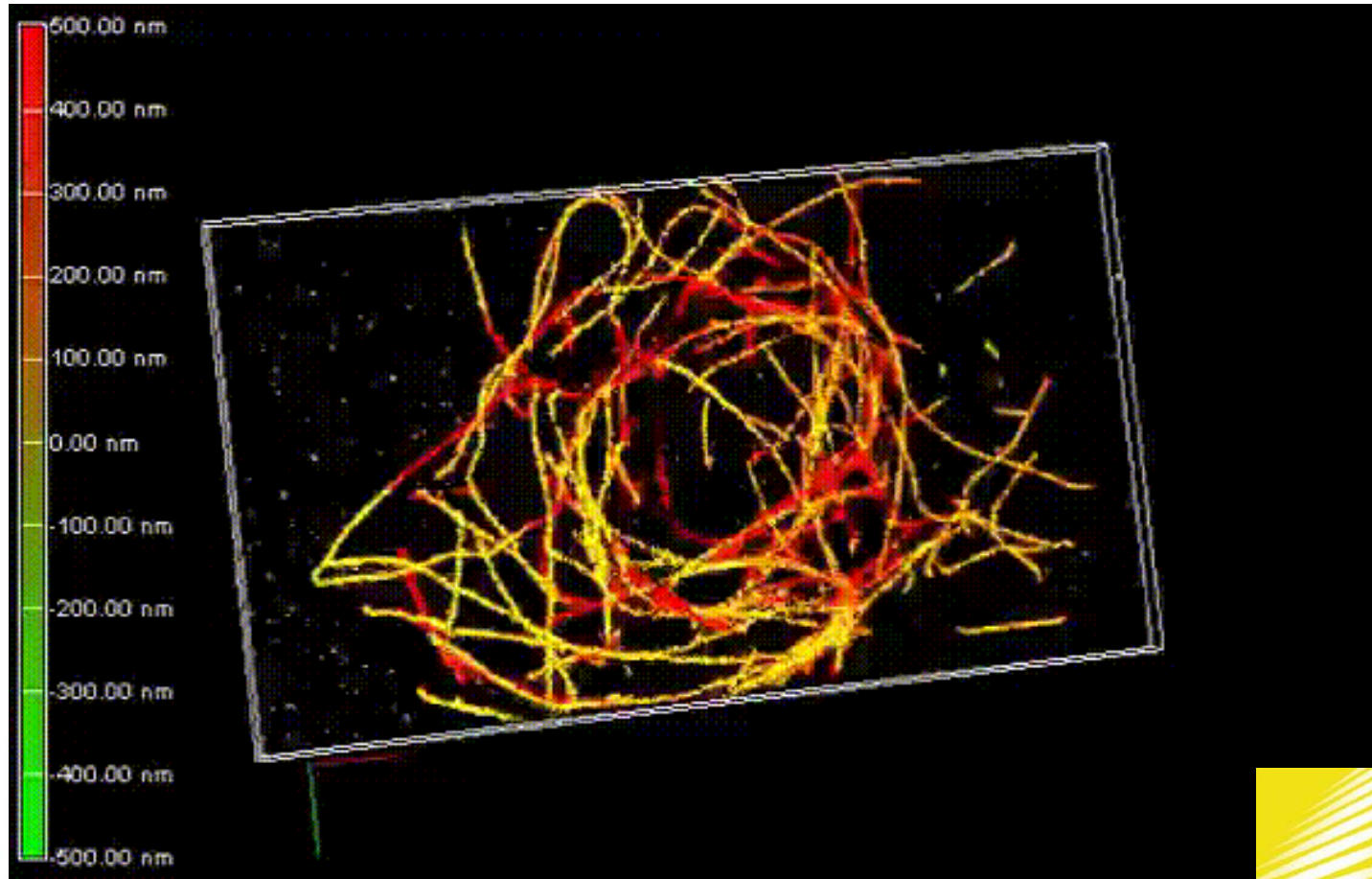
- Rozlišení na úrovni molekul
- Pozice molekuly je hledána Gausovsky s vysokou přesností
- Používá se speciální optika



Superresolution Imaging of Microtubules with STORM



STORM



Struktura tubulinu



STORM

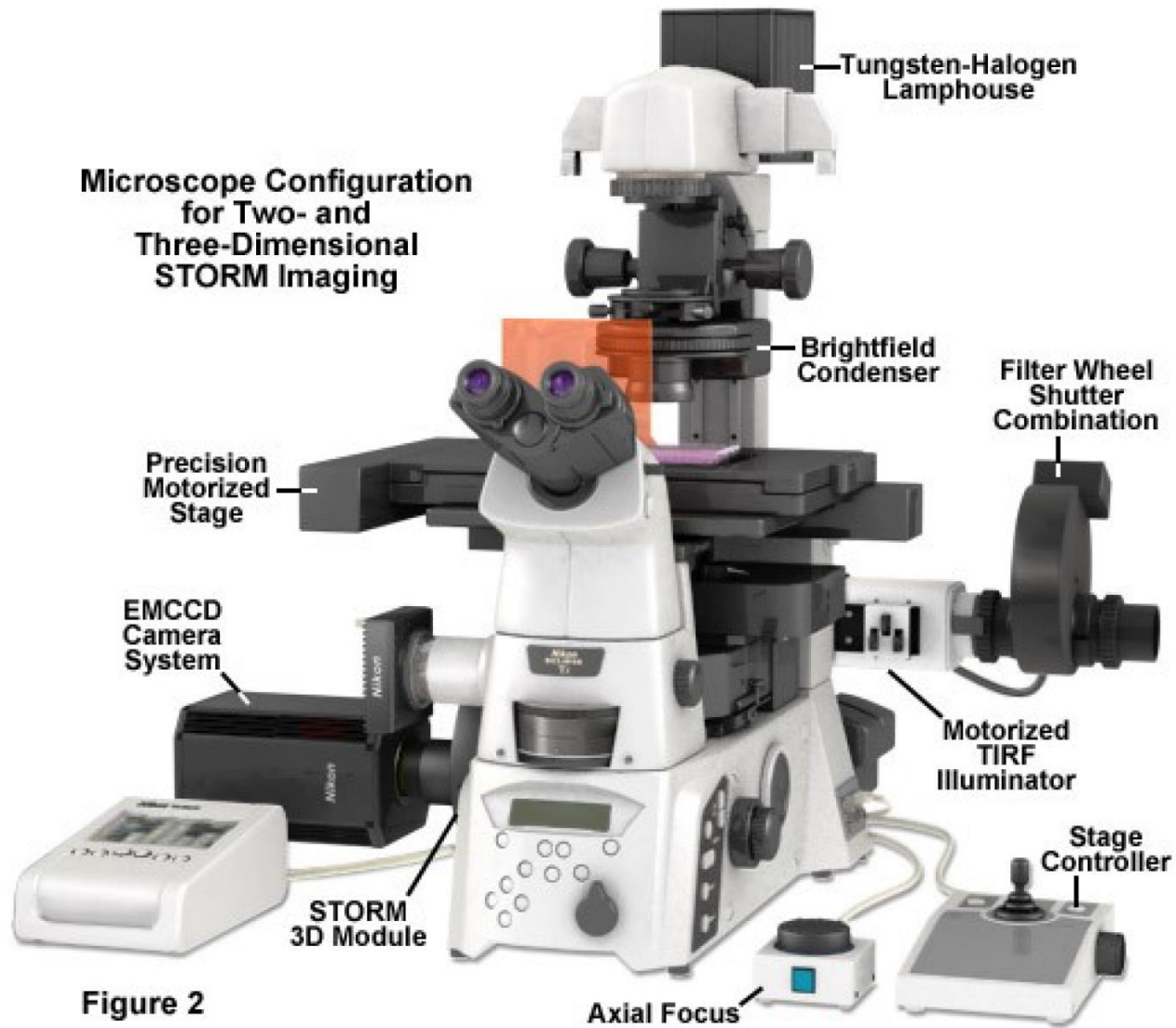
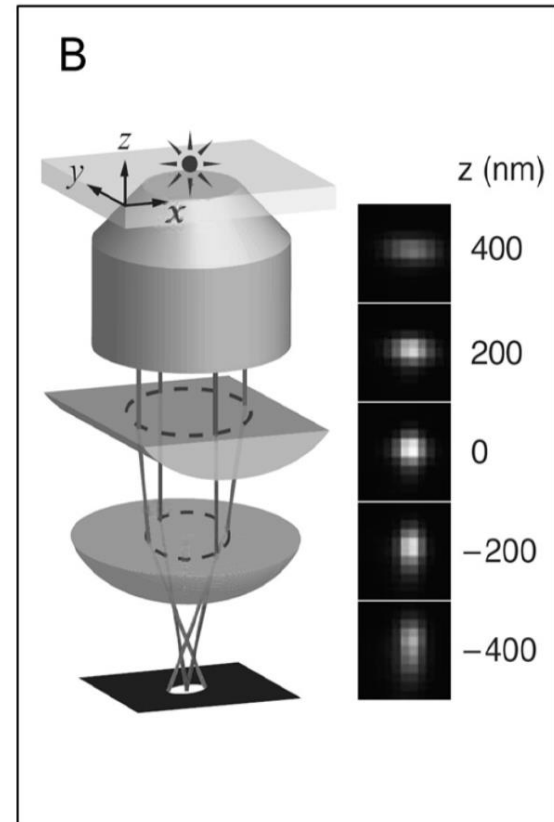
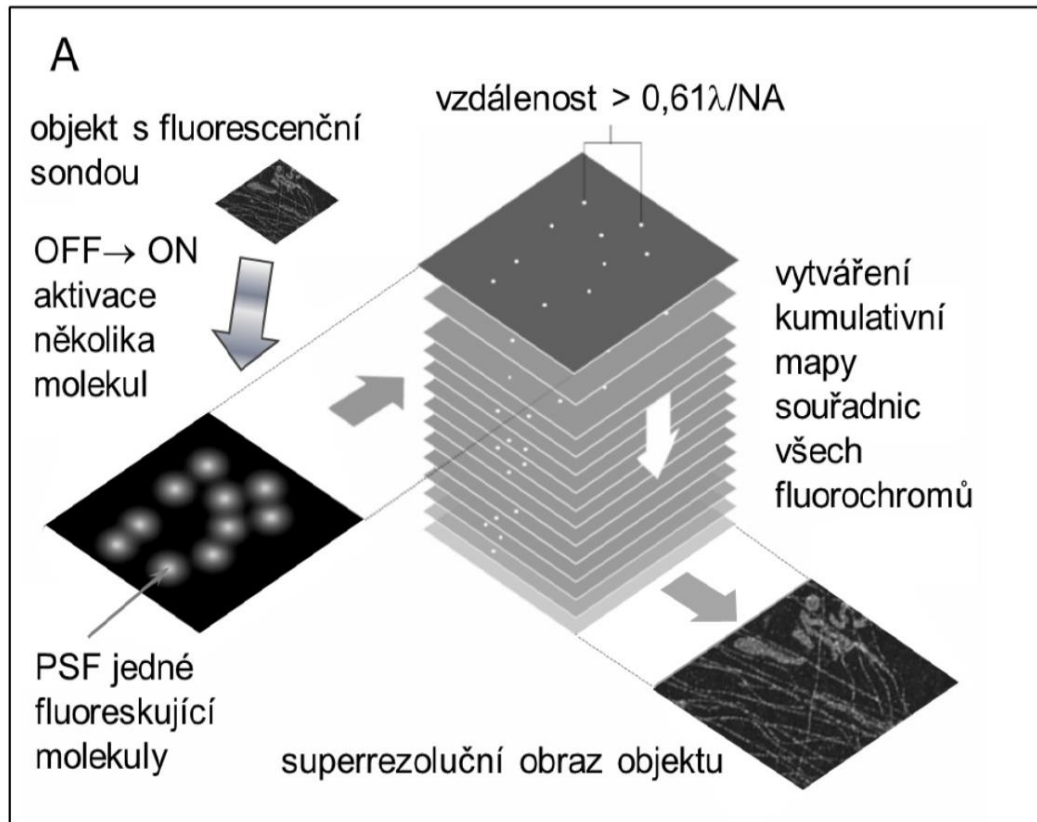


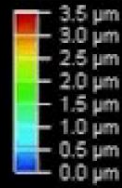
Figure 2

dSTORM/GSD (Ground State Depletion)

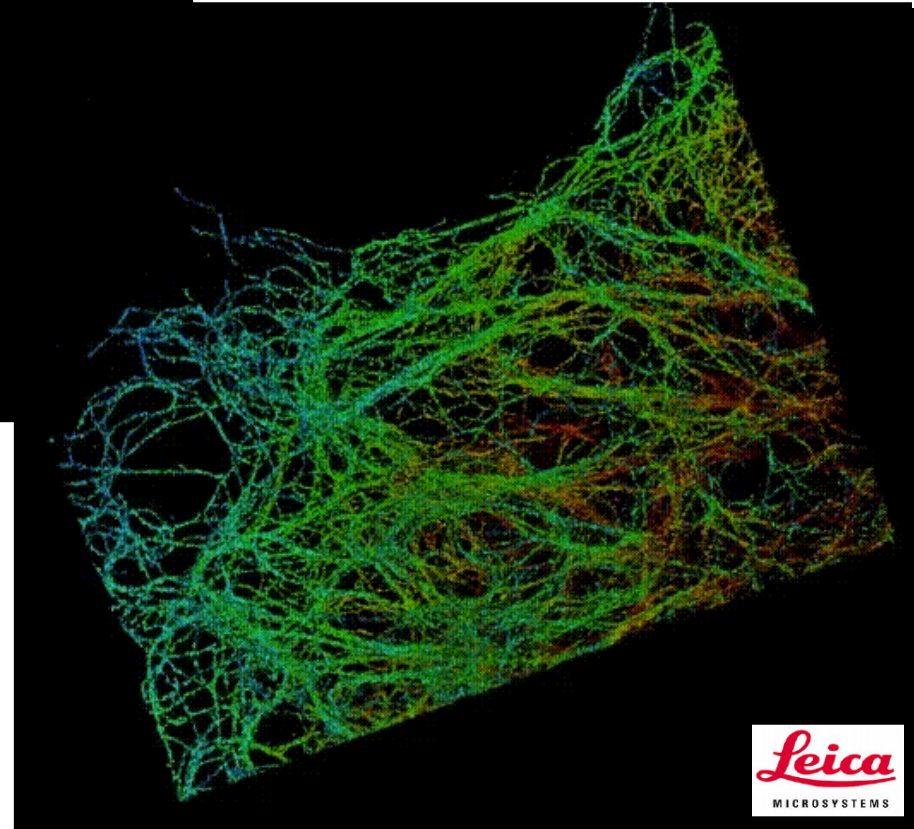


GSD

WF



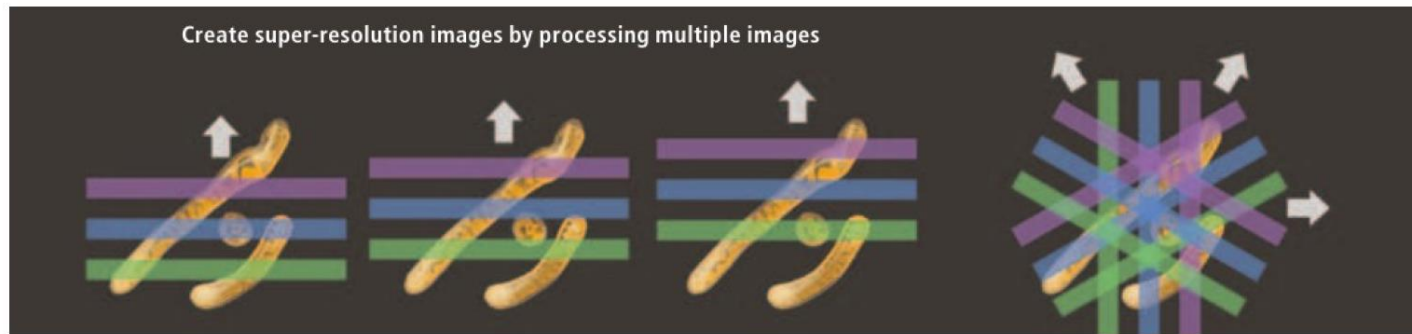
Syntéza ATP



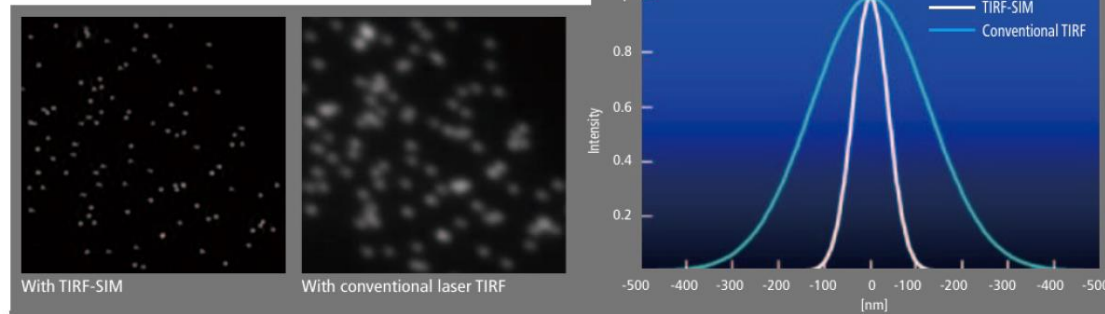
Struktura vimentinu

SIM (structured illumination microscopy)

- Do roviny vzorku jsou promítány moiré proužky s různou fází a orientací.
- Proces je snímán a výsledný obraz je pomocí Fourierovských metod skládán v prostorově frekvenční oblasti.
- Rozlišení výsledného obrazu odpovídá použití objektivu s dvojnásobnou NA.

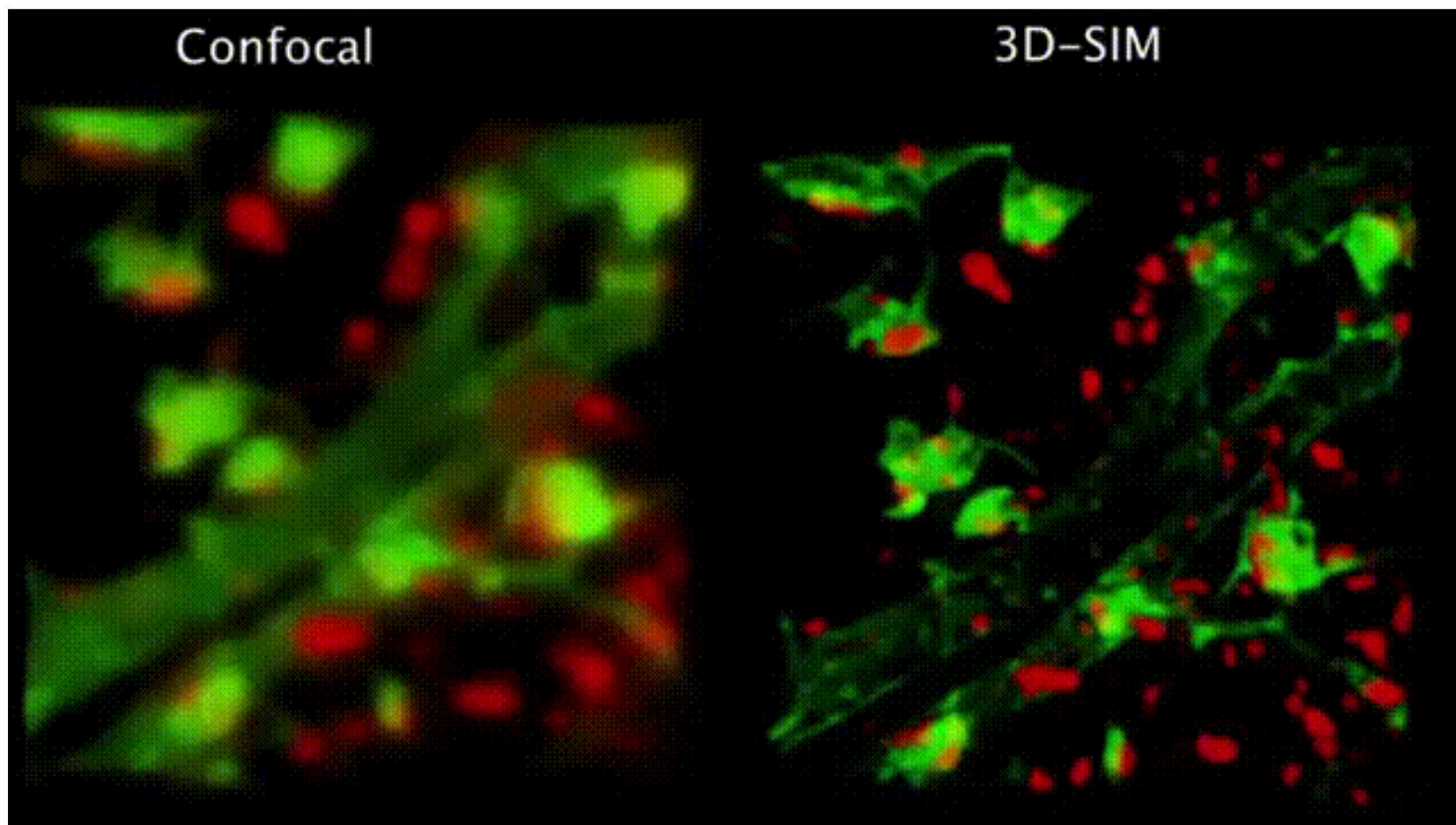


- Kombinuje se s metodou TIRF



100 nm fluoreskující
kuličky

SIM (structured illumination microscopy)



Srovnání 3D zobrazení synapsí. Konfokální mikroskop (vlevo) a 3D-SIM (Zeiss Elyra, vpravo). Zeleně je synaptický F-aktin značený F-Tractin. Červeně je aktivní zóna, značená protilátkou.

Citovaná literatura

P. N. Prasad: „Introduction to Biophotonics”, John Wiley & Sons, Inc., 2003.

J. Čolláková a kol. “Multimodální holografický mikroskop - společný projekt VUT a TESCAN”.
Jemná mechanika a optika, 2014, roč. 59, č. 6-7/ 2014, s. 160-162. ISSN: 0447- 6441.

Z. Dostál: “Interferenční a holografická mikroskopie”, přednáška, ÚFI VUT

P. N. Prasad: „Introduction to Biophotonics”, John Wiley & Sons, Inc., 2003.

M. Mir, B. Bhaduri, R. Wang, R. Zhu, G. Popescu, „Quantitative Phase Imaging“. In E. Wolf (Ed.),
Progress in Optics, Vol. 57 (pp. 133–217). Amsterdam: Elsevier, 2012

G. Popescu, „Quantitative phase imaging of cells and tissues“. New York: McGrawHill, 2011

M. K. Kim, Digital Holographic Microscopy. Principles, Techniques, and Applications. New York:
Springer, 2011

W. Drexler, M. Liu, A. Kumar, T. Kamali, A. Unterhuber, R. A. Leitgeb, „Optical coherence
tomography today: speed, contrast, and multimodality“, Journal of Biomedical Optics 19(7),
071412 (July 2014) J. Pawley, „Handbook of Biological Confocal Microscopy“, Springer, 2006

Nikon microscopy, [online], <http://www.microscopyu.com/moviegallery/sweptfield/index.html>

Ziess microscopy, [online], http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/home.html

Leica microscopy, [online], <http://www.leica-microsystems.com/>