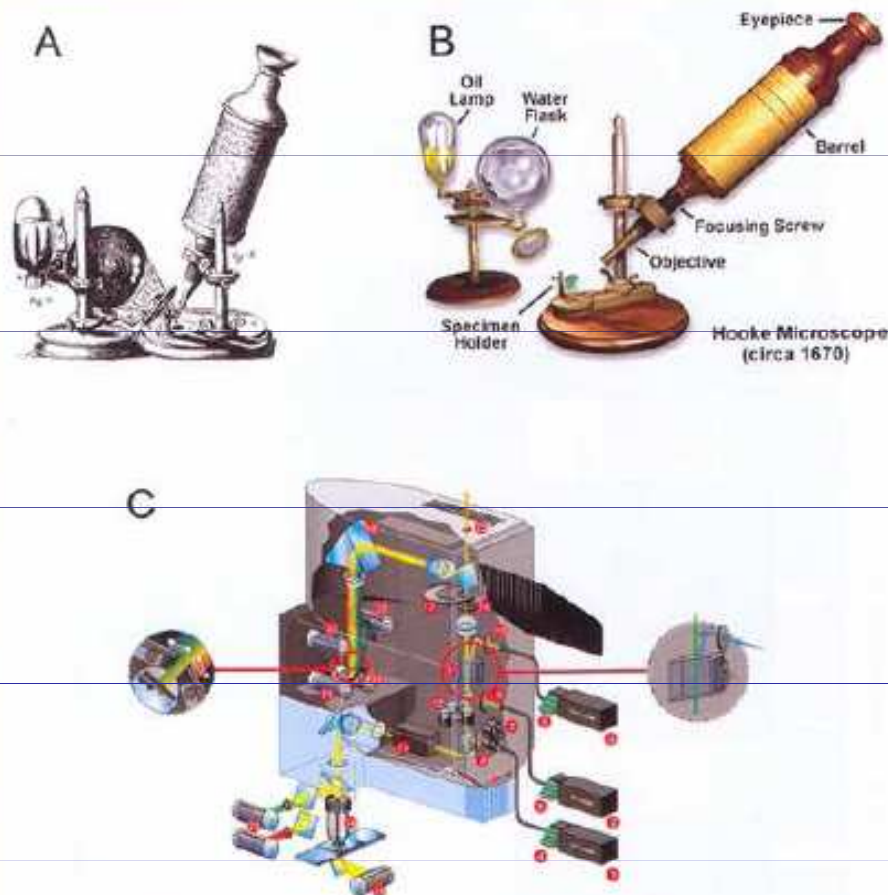


# **Metody cytometrie s vysokým rozlišením**

**E. Bártová  
BFÚ Brno**

# Cytometrie s vysokým rozlišením

- 1) **Fluorescenční mikroskopie**
- 2) Příprava preparátů
- 3) Konfokální mikroskopie – princip, varianty, živé buňky, rychlá konfokální mikroskopie
- 4) Automatizace mikroskopických technik
- 5) Analýza obrazu
- 6) Pokročilé cytometrické techniky (FRAP, FRET, „standing wave“ mikroskop)



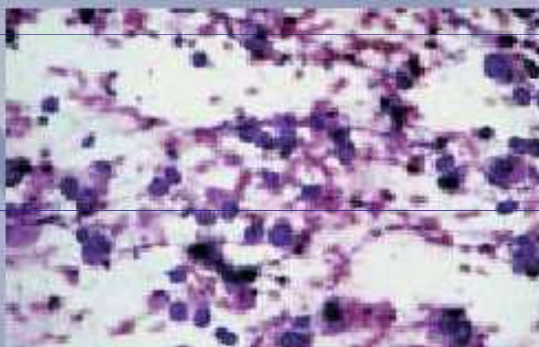
**Figure 2. Microscopy from the 17th to the 21st centuries (see page 10).**

(A) Robert Hooke's microscope as detailed in *Micrographia*, published in 1665 (23). Image reproduced with permission of the Charles Deering McCormick Library of Special Collections at Northwestern University, USA. (B) A schematic of Hooke's microscope showing the relevant components. Image reproduced with permission from the Molecular Expressions Microscopy Primer ([www.microscopy.lsu.edu/primer/museum/hooke.html](http://www.microscopy.lsu.edu/primer/museum/hooke.html)). (C) Leica Microsystems' TCS AOBS confocal scan head, commercially available from 2002 ([www.leica-microsystems.com](http://www.leica-microsystems.com)). The numbered components are as follows: 1, UV laser; 2, IR laser; 3, visible range laser; 4, UV acousto-optical tunable filter; 5, IR electro-optical modulator; 6, visible range acousto-optical tunable filter; 7, UV adaptation optics; 8, UV excitation pinhole; 9, IR excitation pinhole; 10, VIS excitation pinhole; 11, primary beam splitter; 12, adjustable pupil illumination; 13, 'K'-scanner with rotator; 14, microscope and objective; 15, transmitted light detector; 16, confocal detection pinhole; 17, analyzer wheel; 18, spectrophotometer prism; 19, photomultiplier channel 1; 20, photomultiplier channel 2; 21, photomultiplier channel 3; 22, photomultiplier channel 4; 23, external optical port; 24, nondescanned reflected light detectors.

1665 – Robert Hooke 1. mikroskop

1955 – Marvin Minsky (Harvard)  
konfokální mikroskopie  
1957-patentováno

- pozorování ve světlém poli (základní metoda, s níž se určitě setkal každý, kdo s mikroskopem někdy pracoval ve škole)



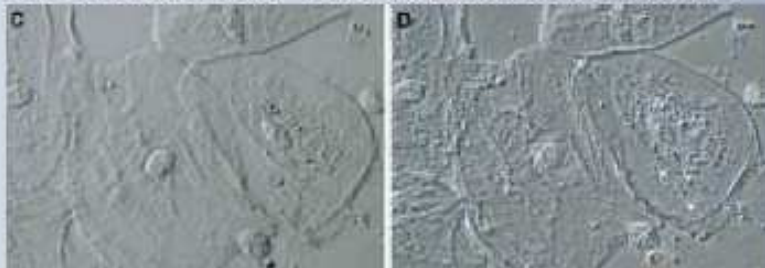
- pozorování v temném poli



- fázový kontrast



- Hoffmannův modulační kontrast



- diferenciální interferenční kontrast
- interferenční mikroskopie
- polarizační mikroskopie

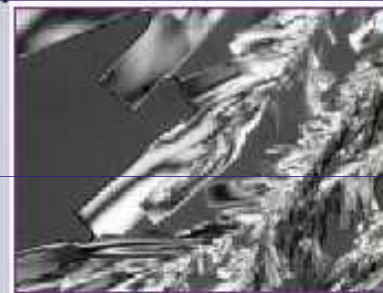
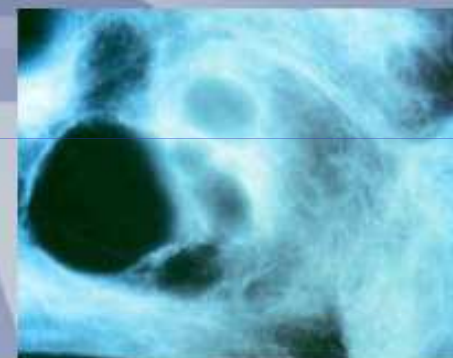


Fig. 1: Vitamin C crystals observed in polarised light.

- fluorescenční mikroskopie



## Fotoreceptorové buňky oka (ROZLIŠOVACÍ SCHOPNOST OKA)

- funkčně analogické k sensorům (picture elements, pixels) na CCD chipu televizní kamery
- absorbují světlo z obrázku, formují ho na retině pomocí rohovky a čočky
- posílají nervové impulsy do mozku
- 2 typy tyčinky – senzitivnější
  - noční vidění
- čípky – barevné vidění při dostatečné intenzitě světla
  - s rozdílnou senzitivitou ke spektru – viditelnou část spektra rozdělují na 3 pruhy, které lidské oko vnímá jako red, green, blue (RGB)
  - 3 základní barvy lidského vidění

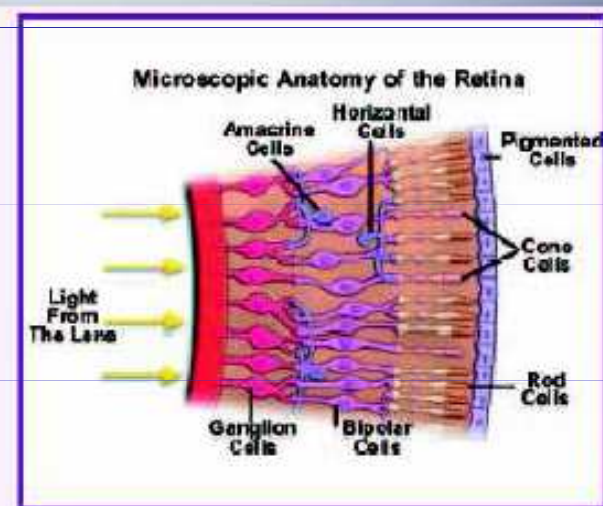
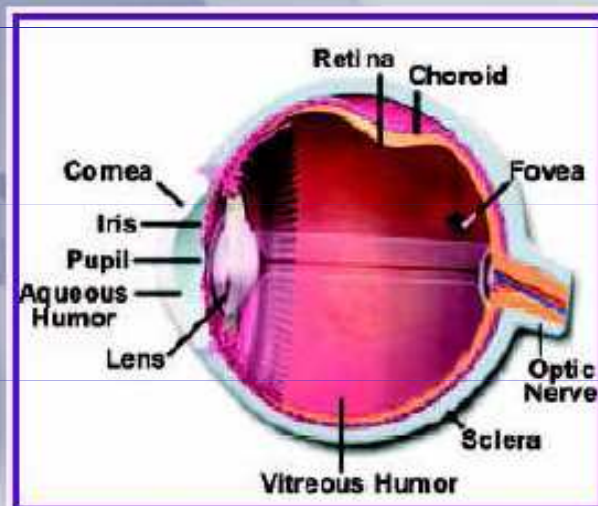
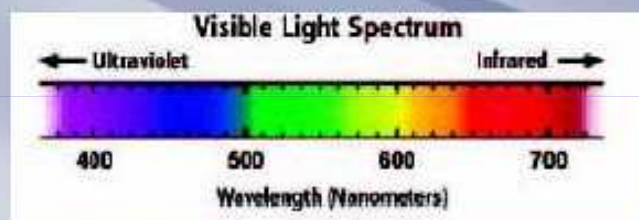
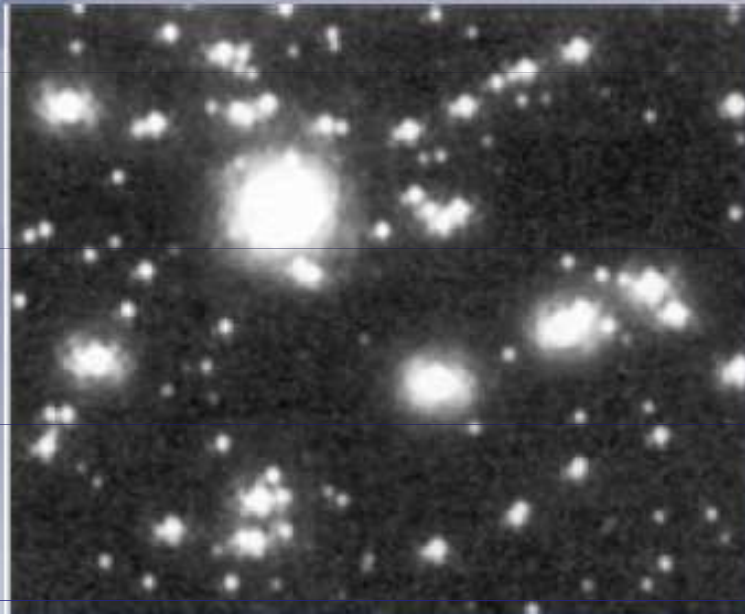
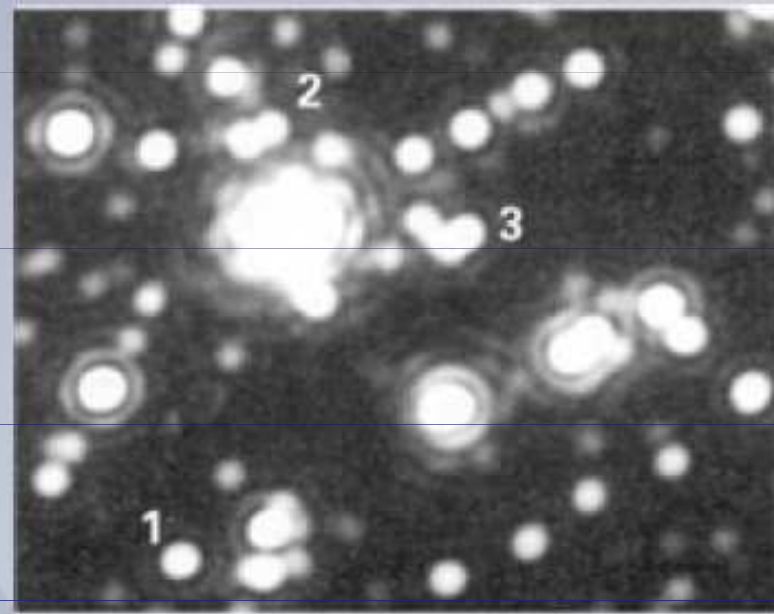


Fig. 1: Anatomy of the human eye and the retina.



Ilustrace vlivu numerické apertury objektivu na rozlišovací schopnost mikroskopu. Horní snímek – zrnka mikromletého vápence, pozorovaná v tzv. temném poli objektivem zvětšujícím 6,3krát,  $NA = 0,20$ .



Zrnka mikromletého vápence, pozorovaná v tzv. temném poli objektivem zvětšujícím 6,3krát, avšak o podstatně menší numerické apertuře ( $NA \approx 0,03$ );  
1 – izolovaný bodový objekt (zrnko) se zřetelnými Airyho kroužky,  
2 – dvě zrnka nacházející se ve vzdálenosti zhruba odpovídající teoretické rozlišovací schopnosti zvoleného objektivu,  
3 – několik splývajících zrnok.

**Numerická apertura** nejkvalitnějších objektivů bývá  $\sim 1,3$  až  $1,4$ .

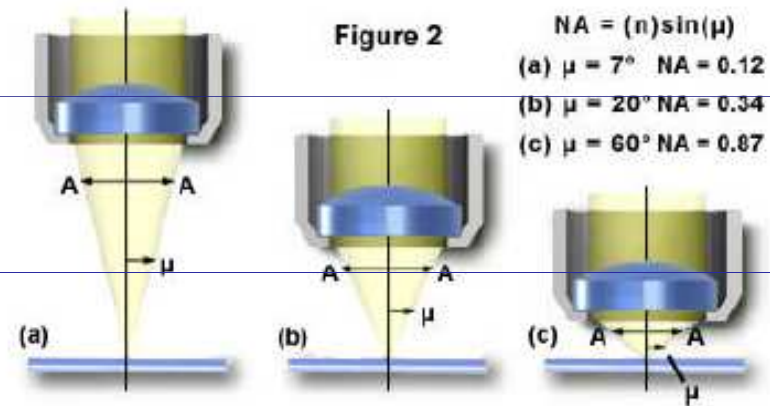
Numerická apertura objektivu (NA) je vyjádřena matematickým zápisem  $n \sin \theta$ , kde

$n$  je index lomu prostředí před objektivem

$\theta$  je polovina vrcholového úhlu kužele paprsků vstupujících do objektivu.

# Visible Light Microscopy: Objectives: numerical aperture

- NA=ability of lens to gather light and resolve detail at a fixed distance from object.
  - Dependent on ability of lens to capture diffracted light rays.
- $n$ =Refractive index is limiting (air=1.0, oil=1.51)
  - Do not mix mediums when using a lens
- Theoretical resolution depends on NA and the wavelength of light.  $NA=n \cdot \sin(\mu)$ 
  - Shorter wavelengths=higher resolution.
  - Resolution limit for green light ( $NA=1.4$ , 100X) is  $0.2 \mu\text{m}$ .
    - $R=0.61\lambda/NA$



<http://www.micro.magnet.fsu.edu/primer/java/microscopy/immersion/index.html>

# Visible Light Microscopy

## Objectives: Specifications and Identification

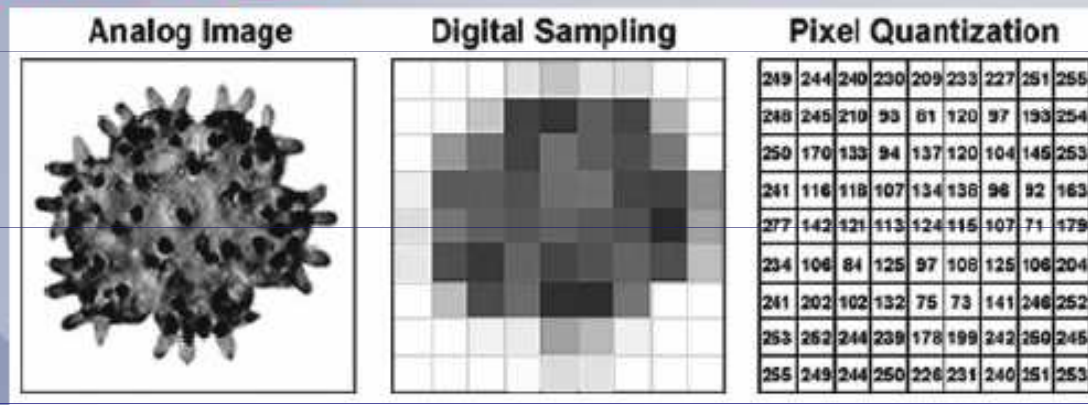
- Older lenses need to match oculars, now lenses are infinity-corrected.
- Information on objective barrel:
  - Linear magnification
  - Numerical aperture
  - Optical corrections
    - Achromatic: color (red/blue) corrected.
    - Fluorite: optical aberration corrected
    - Apochromatic: color (red, green, blue and spherical aberration corrected
  - Microscope tube length
  - Coverglass thickness (0.17mm)
  - Immersion medium (air, water, oil)



Figure 1

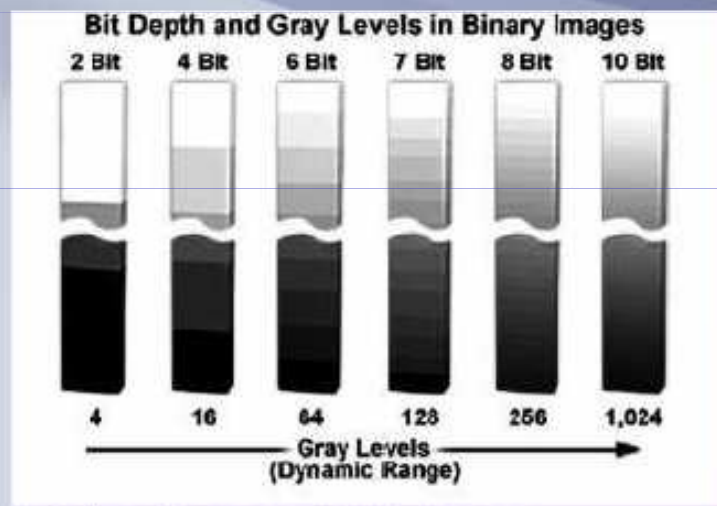


## Vytváření digitálního obrazu



Světlo generuje elektronovou díru cestou fotoelektrického efektu. Náboje se sbírají, spojují se ve svazky a následně jsou transportovány přes CCD senzor, náboj se převádí na elektrické napětí. To je amplifikováno na samotném chipu i mimo něj.

Analogově číslicový konvertor převádí napětí (signál) na binární formát o různé bitové hloubce.



Počet pixelů kamery závisí na použitém CCD chipu a na technologii vytvoření obrazu.

Fig. 2: Bit depth and grey levels in digital images

**Color models** – každý poskytuje jiný pohled, užívají se dle účelu

- konverze mezi jednotlivými modely je možná
- RGB, HSI, CYM, CYMk a další

**HSI** – hue, saturation, intensity  
př. zelený trávnik

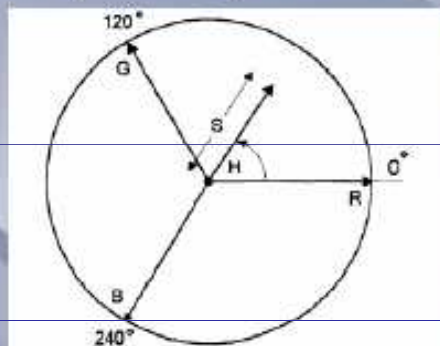


Figure 3. The color circle. Hue is an angle, and saturation is the radial variable.

**RGB** – red, green, blue  
– základní barvy

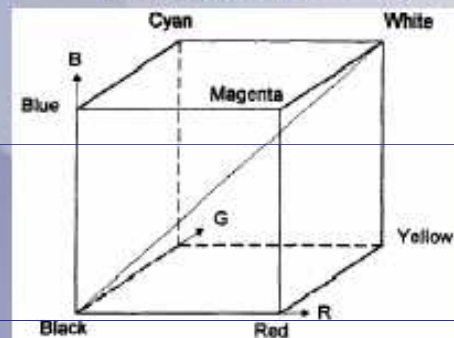
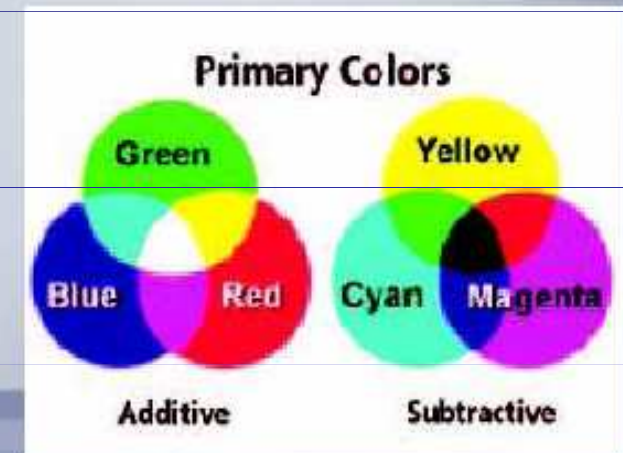
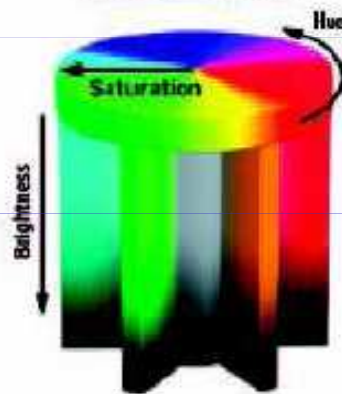


Figure 2. RGB color space. Each of the primary colors defines one axis of a three-dimensional coordinate system. Every color plots to a position in this space.

**CMYC** – cyan, yellow, magenta  
– překryté základní barvy  
– nelze vygenerovat bílou barvu



**Munsell Color Tree**

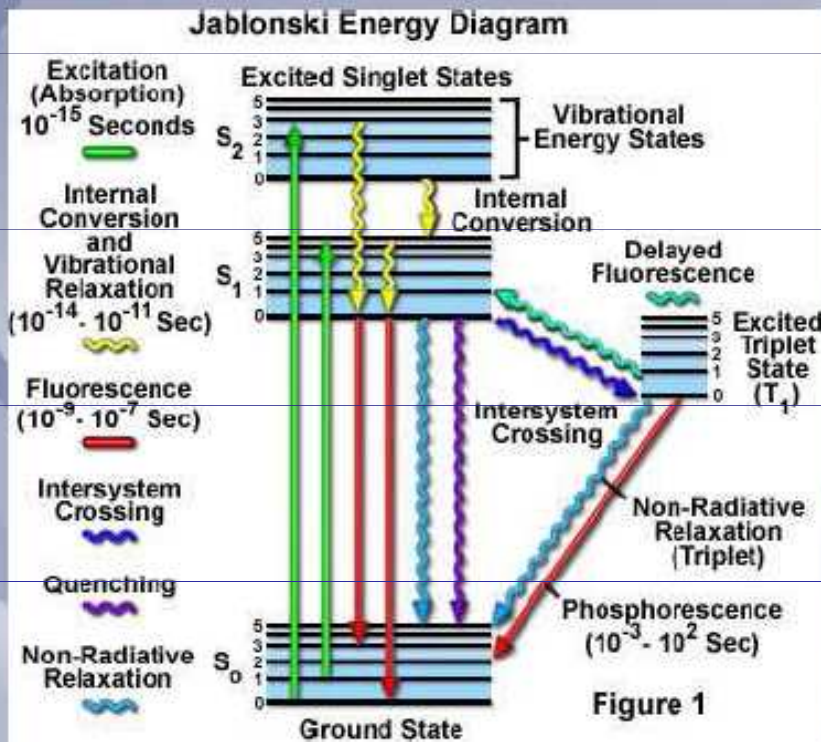


dobrý popis a rozeznání barev

lidské vnímání, digitální kamery,  
monitory, obrázkové soubory

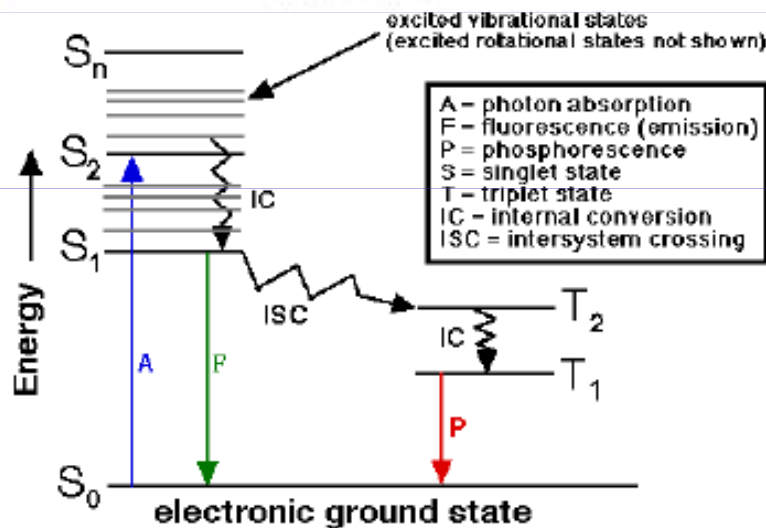
optické komponenty (filtry, tiskárny)

# Fluorescenční mikroskopie



Polský prof. Alexander Jablonski vysvětlil, jak jsou elektrony v fluoroforech excitovány ze základního stavu do stavu energeticky vyššího a jak mohou tyto excitované elektrony emisi fotonů relaxovat nebo jinými mechanismy se nakonec vrátit zpět na základní hladinu.

Fluorescence je statisticky pravděpodobnější než fosforescence, doba existence fluorescenčního stavu je velmi krátká ( $1 \times 10^{-5}$  to  $10^{-8}$  s), zatímco fosforescence je poněkud delší ( $1 \times 10^{-4}$  s až minuty nebo hodiny)

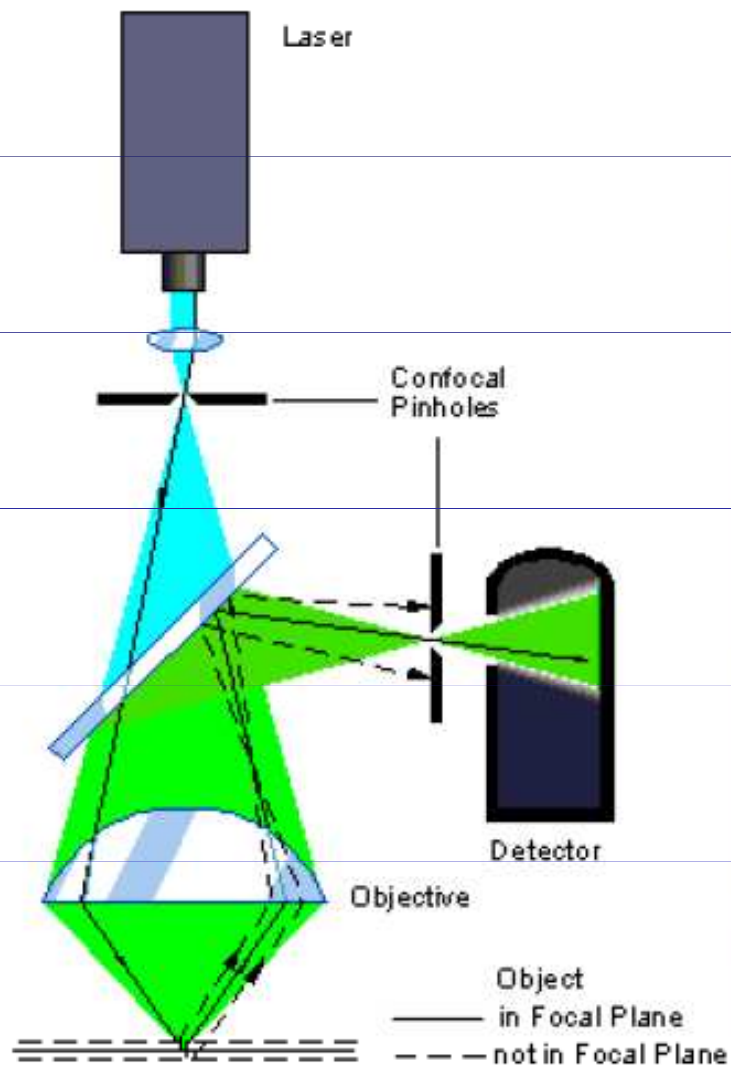


## Faktory ovlivňující citlivost fluorescence

1. Intenzita zdroje
2. Účinnost optického systému
3. Štěrbiny monochromátoru
4. Citlivost detektoru

- vzorek sám o sobě obsahuje fluorescenční molekuly (**auto-fluorescence**)
- nutno fluorochrom ke vzorku přidat v závislosti na cílech pozorování

## Principle of confocal microscopy



Kontrolovaná hĺobka pole

Eliminace degradace obrazu mimo ohnisko  
pomocí prostorové filtrace

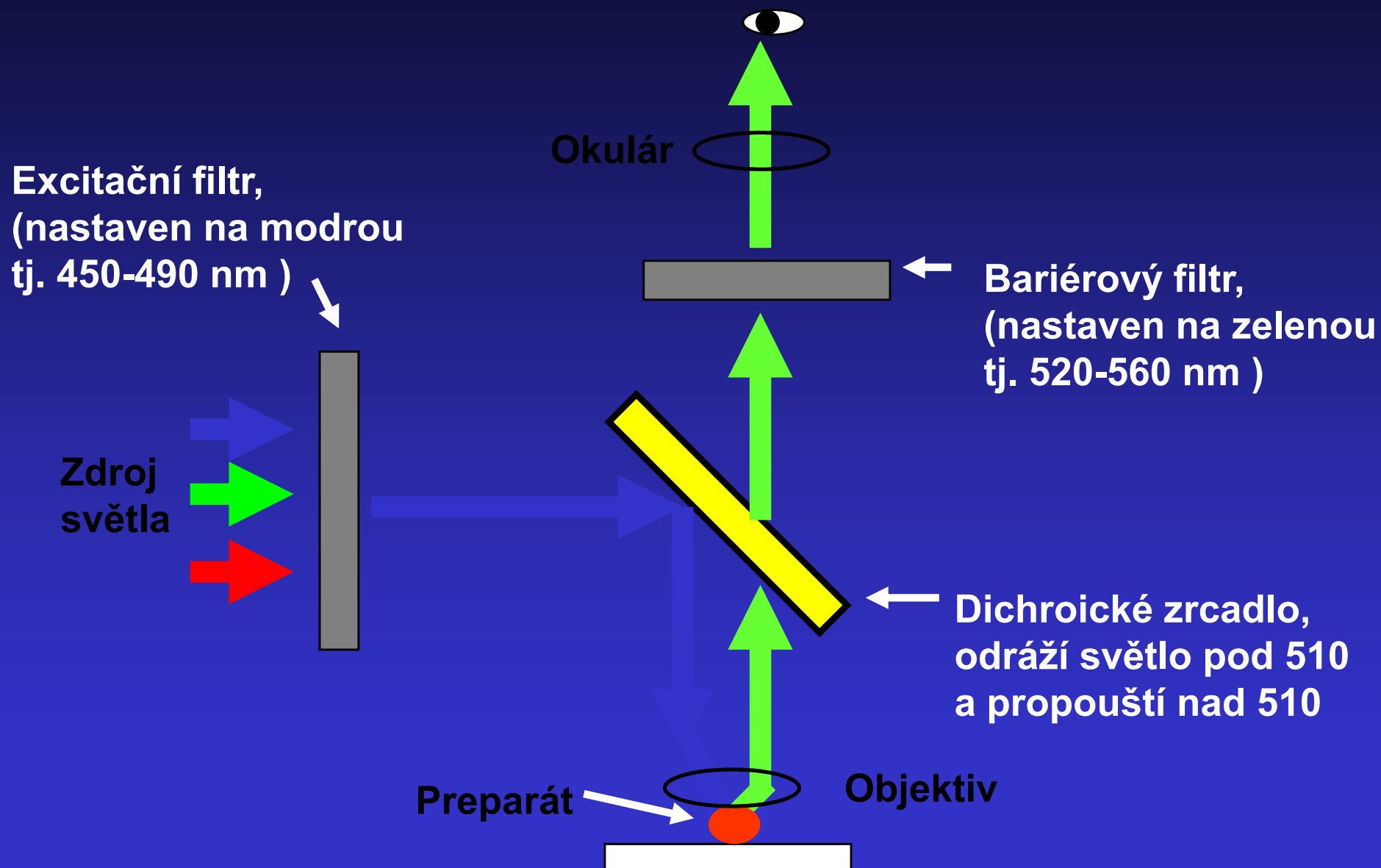
Eliminace Airy disc pattern

Série optických řezů o definované tloušťce

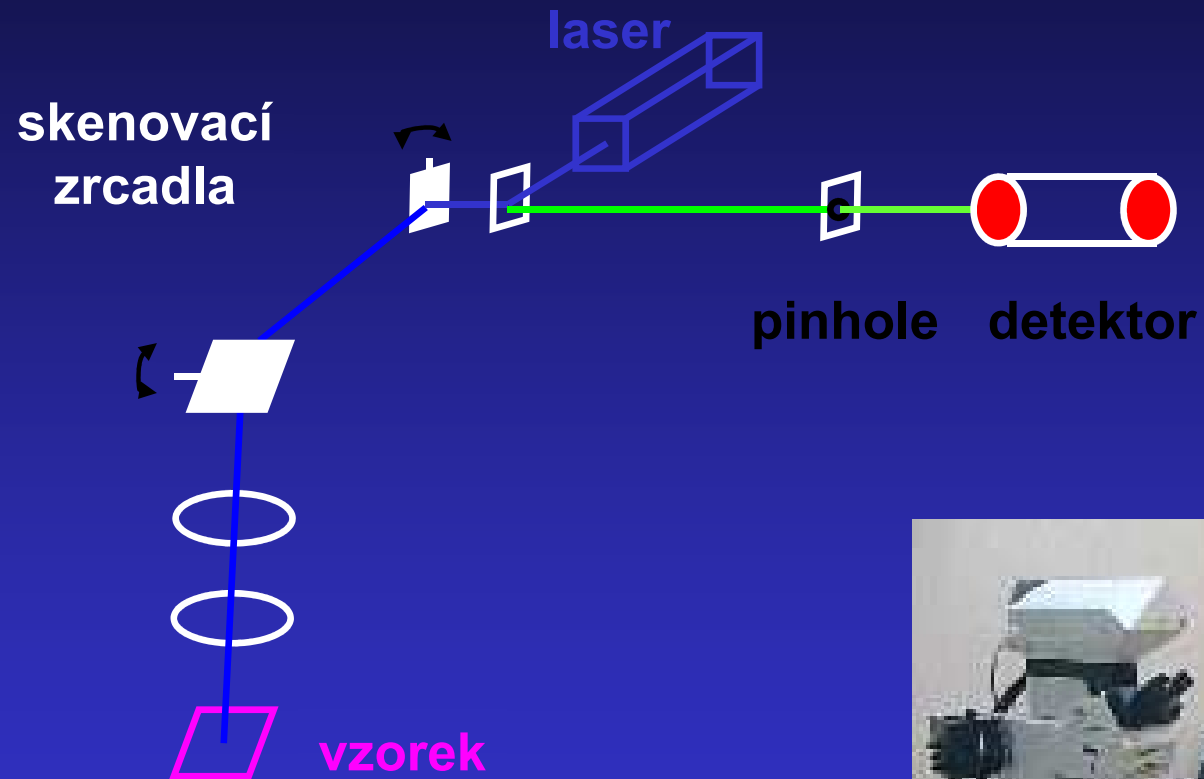
Vysoká kvalita obrazu

- Stage scanning
- Beam scanning
- Nipkow disk scanning
- LSCM

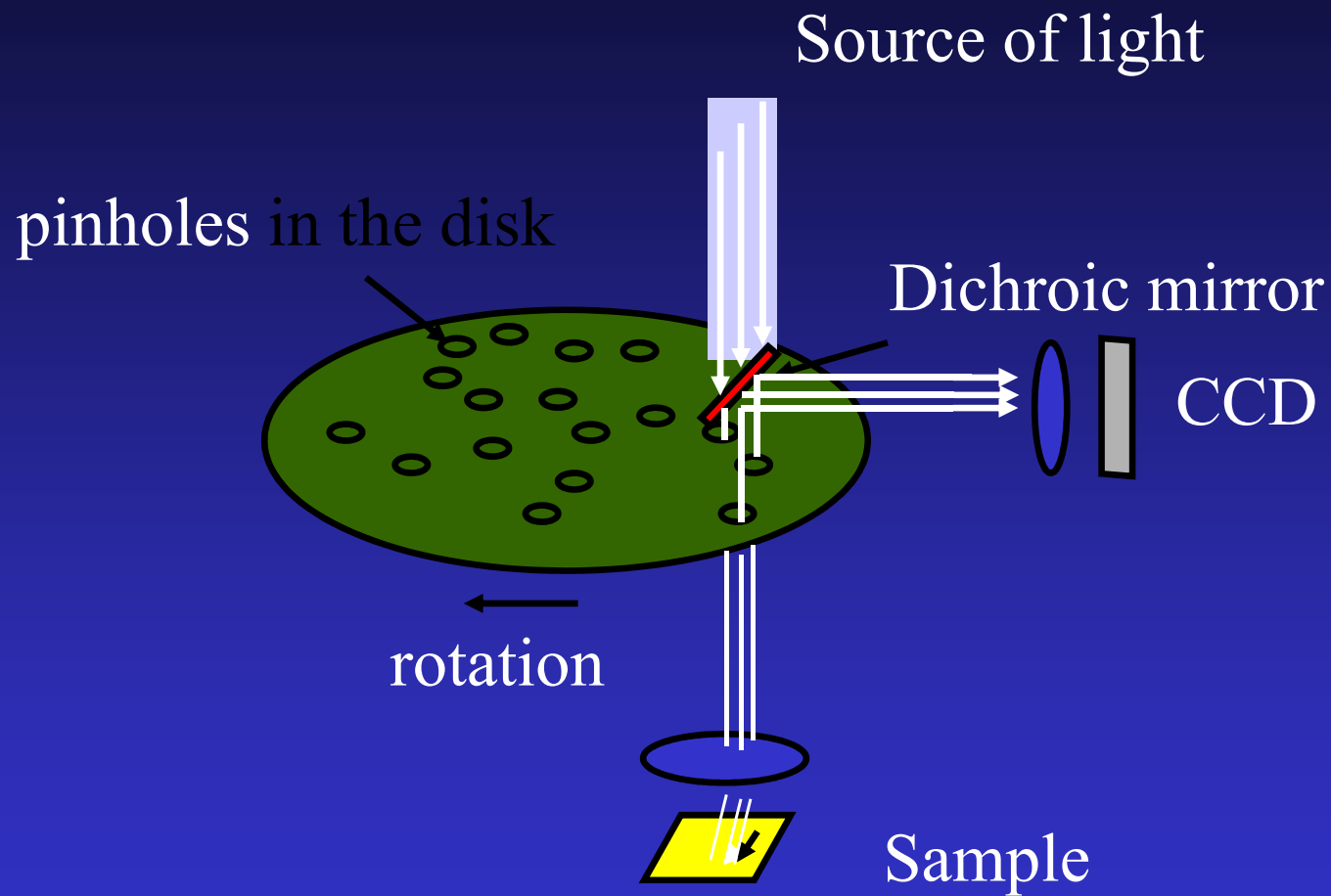
# Princip fluorescenčního mikroskopu



# LSCM mikroskop



# Tandem scanning microscopes based on Nipkow disk





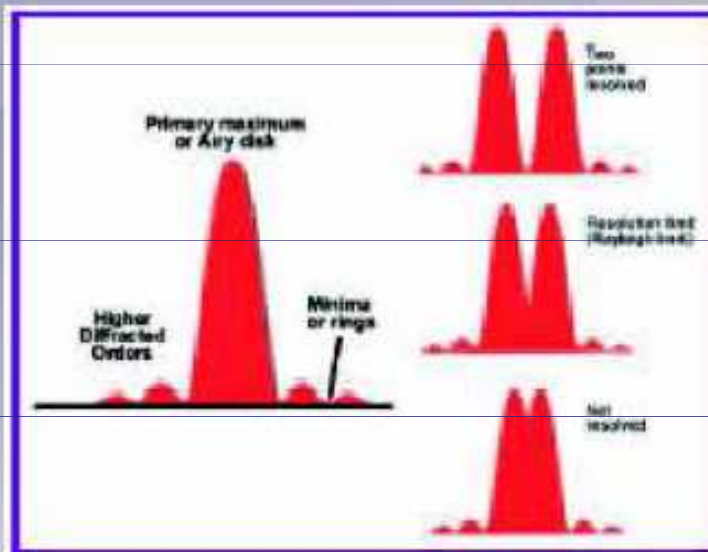


Fig. 4: Intensity profiles of the Airy disk patterns of one specimen detail and of two details at different distances.

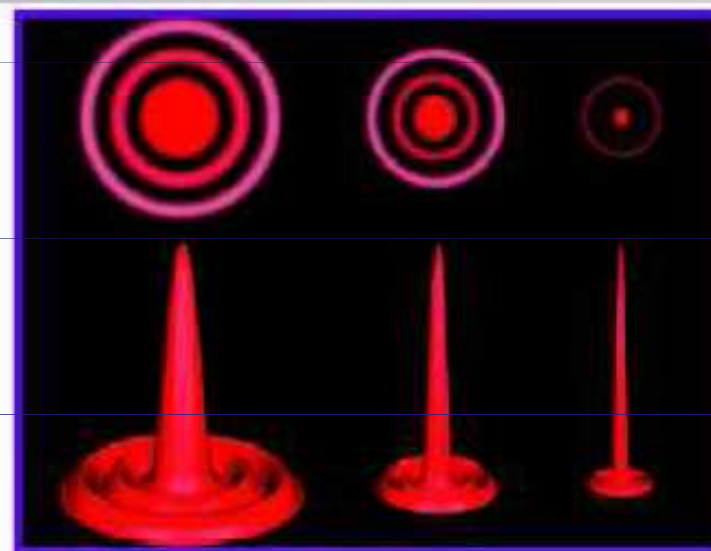
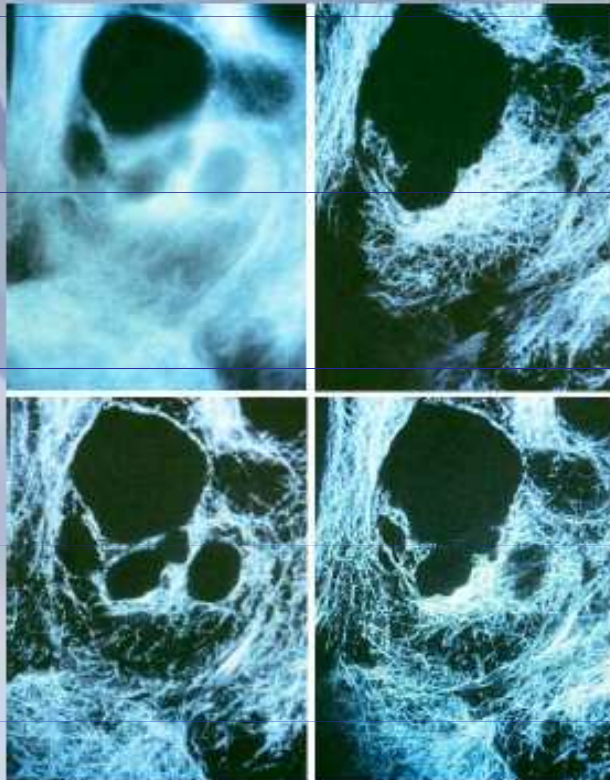


Fig.5: Airy disk patterns of different size as an example for the resolving power of low NA (left) and high NA (right) objectives.

Pod rozlišovací schopností mikroskopu se chápá minimální vzdálenost dvou bodů objektu, které se ještě zobrazí jako navzájem oddělené. Žádný objektiv nemůže zobrazit bodový objekt opět jako bod. I při dokonalé korekci všech možných vad zobrazení, které souvisí s technologií výroby objektivů, jsou obrazem bodu Airyho kroužky. Tak se nazývá difrakční obrazec vznikající ohybem zobrazujícího se světla na čočkách objektivu. Při zobrazení dvou blízkých bodů se mohou jejich Airyho kroužky překrývat, až se při jisté minimální vzdálenosti stanou téměř nerozlišitelnými. Tato mez se běžně odhaduje dle Rayleighova kritéria (1879), které v podstatě vychází ze skutečnosti, že lidský zrak zaznamená pozvolný předěl mezi dvěma difrakčními kroužky teprve tehdy, poklesne-li intenzita mezi nimi alespoň o 20 % oproti přilehlým maximům. Pro modré světlo (viditelné záření nejkratších vlnových délek) se teoretická rozlišovací schopnost blíží hodnotě kolem 0,17  $\mu\text{m}$ . Praktická rozlišovací schopnost reálných objektivů závisí ovšem také na tom, jak dokonale se při výrobě podaří zkorigovat různé vady zobrazení.

# Zeiss Axiovert 100 + konfokální jednotka CARV



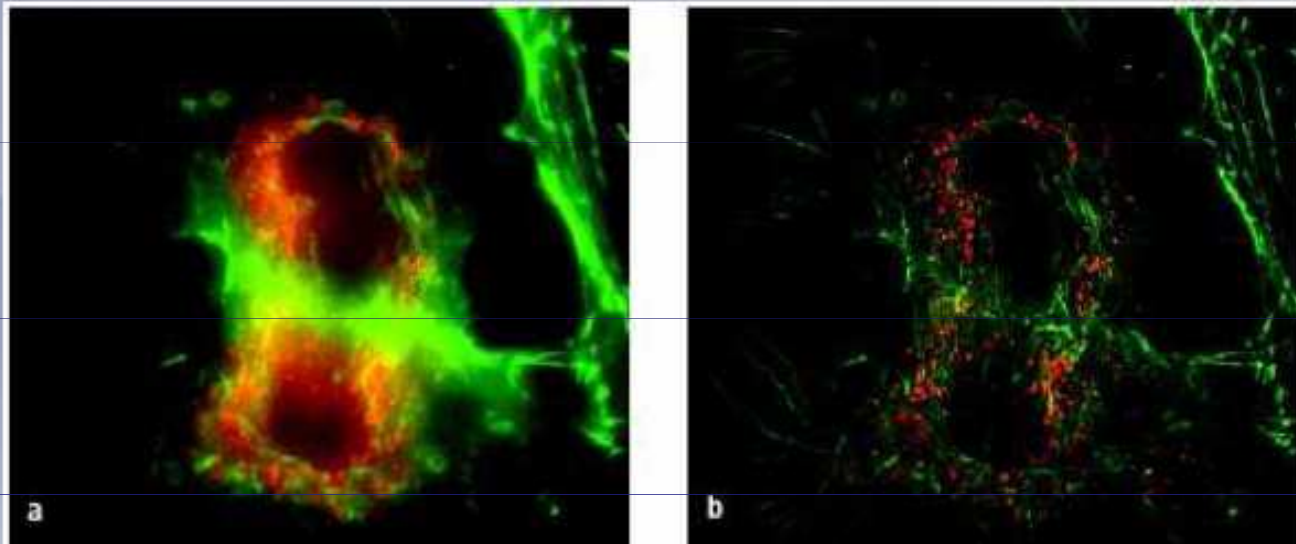


Fig. 3: Via deconvolution, artefacts can be computed out of fluorescence images. a). These artefacts are caused by the stray light from non-focused areas above and below the focus level. These phenomena, referred to as convolution, result in glare, distortion and blurriness. b). Deconvolution is a recognised mathematical procedure for eliminating such artefacts. The resulting image displayed is sharper with less noise and thus at higher resolution. This is also advantageous for more extensive analyses.

**KONVOLUCE** – artefakty obrázku  
 – nezaostřená místa pod nebo nad rovinou zobrazení (u fluorescence mikroskopie nebo u histologických řezů - záře, deformace obrazu, zastření).  
 – omezuje přesnost a rychlost analýzy obrazu

**DEKONVOLUCE** – matematická metoda sloužící k eliminaci artefaktů obrázku  
 – výsledný obrázek má méně šumu a větší rozlišení

# Zeiss Axiovert 100 + konfokální jednotka CARV

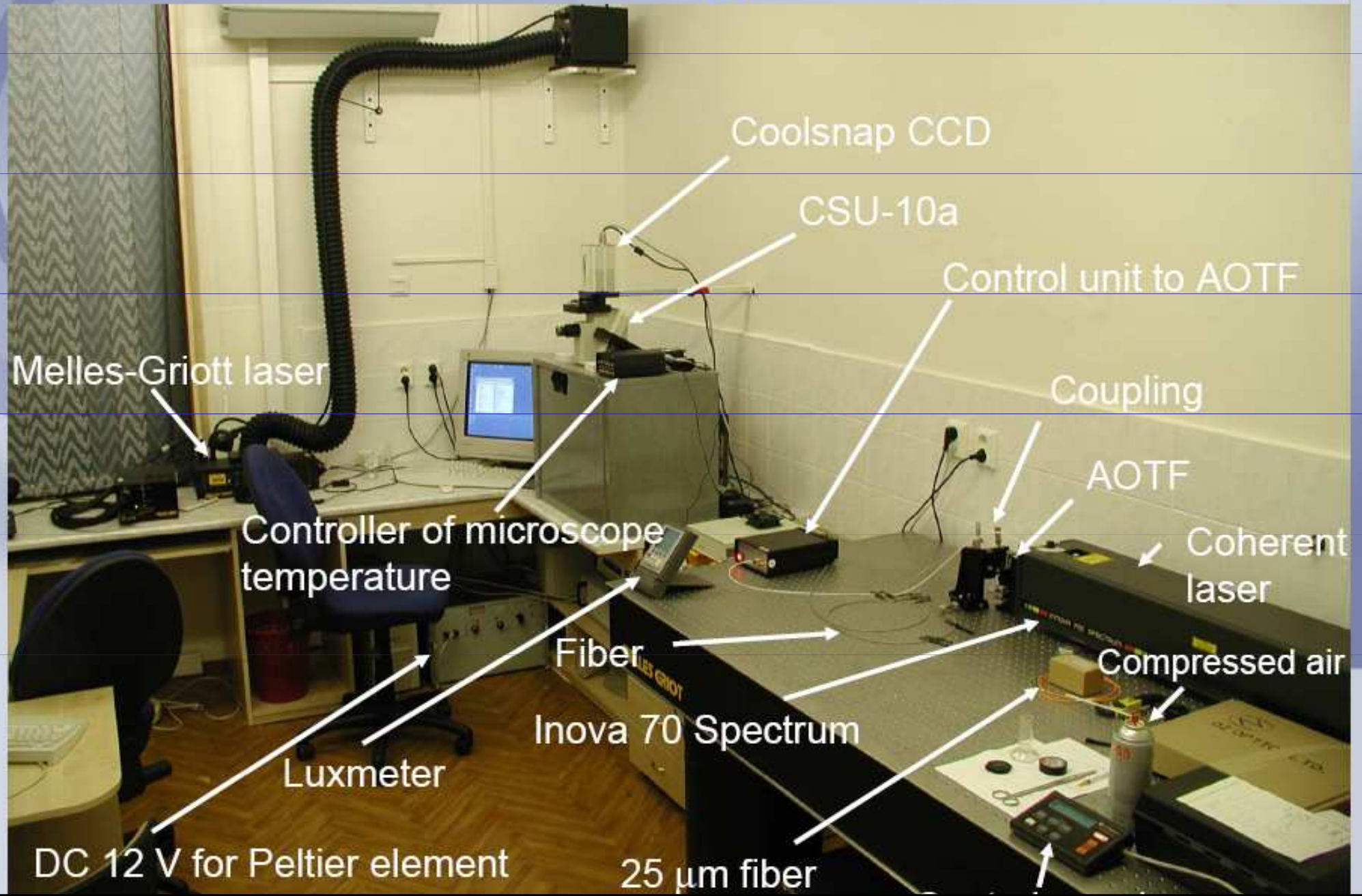


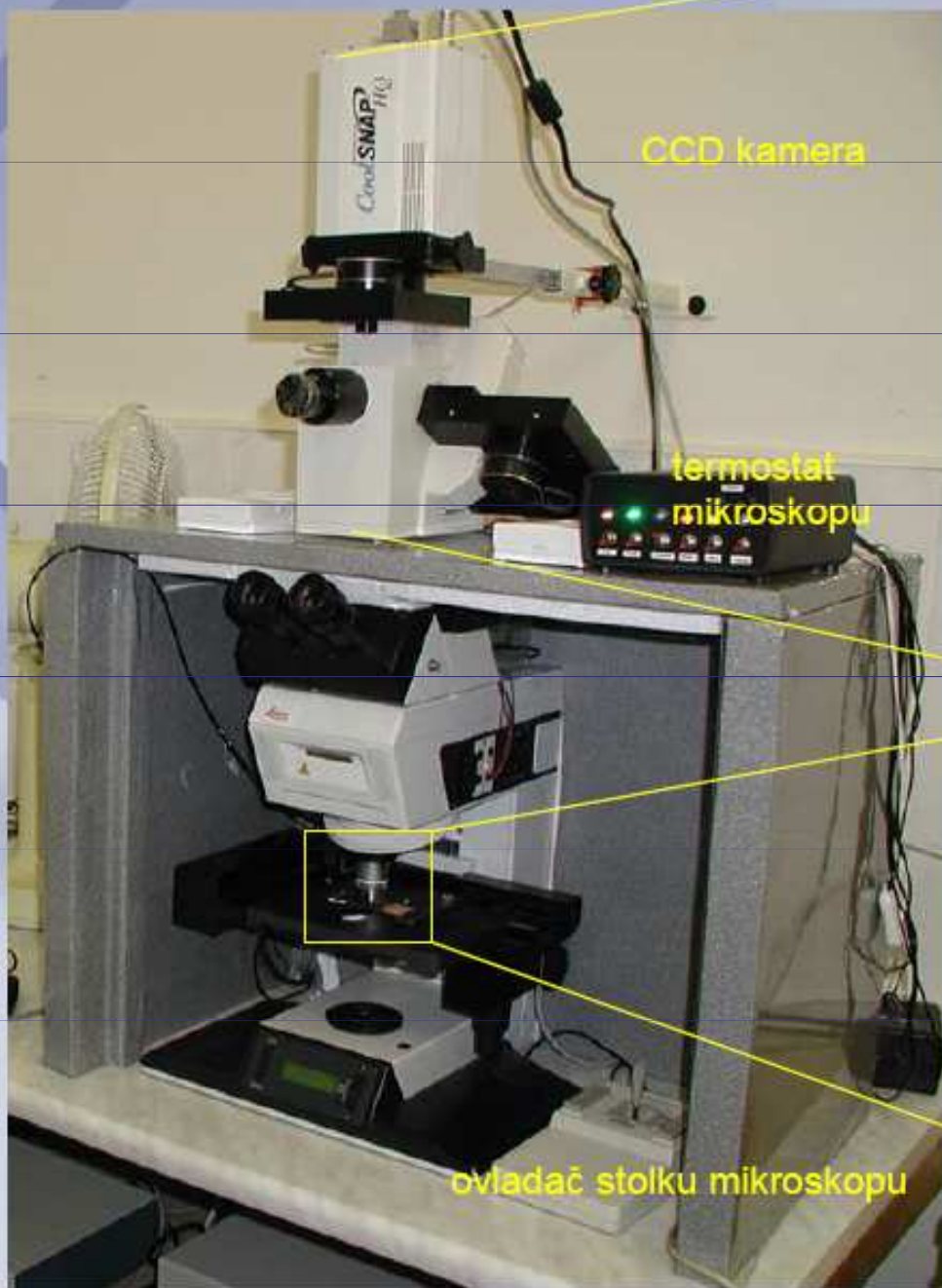
CCD MicroMax

Konfokální jednotka CARV

Axiovert 100

# Mikroskopovna

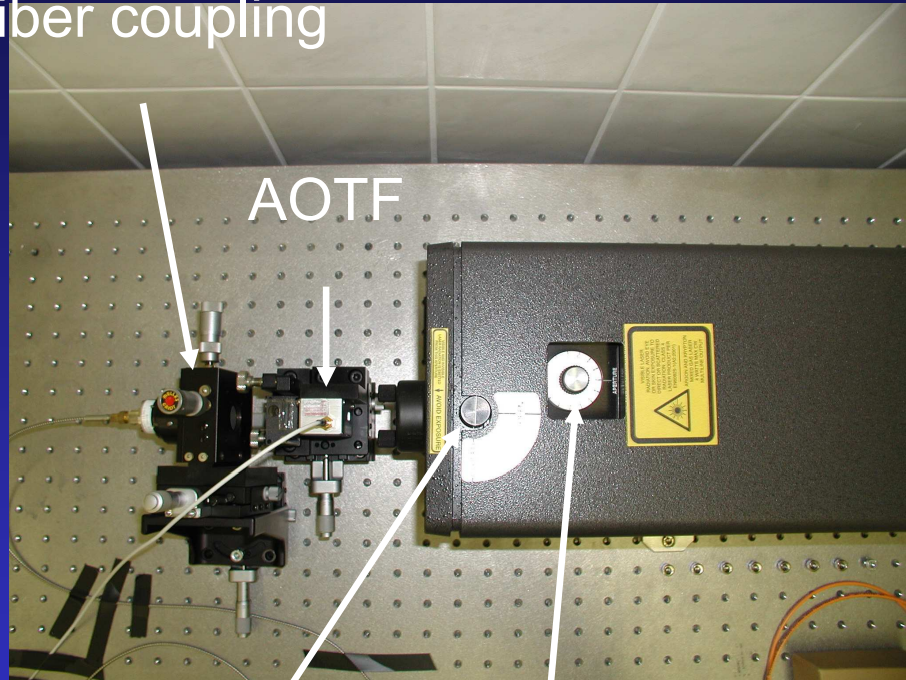




# Ar/Kr Laser Innova 70 (Coherent)

Laser head

Fiber coupling



AOTF

Internal aperture

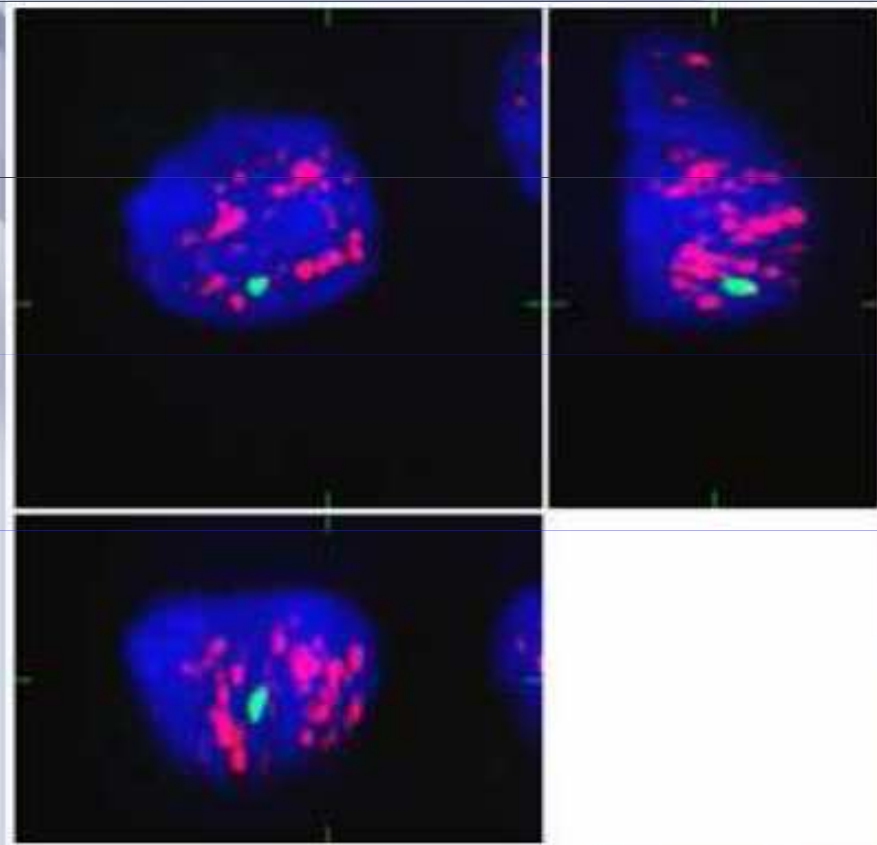
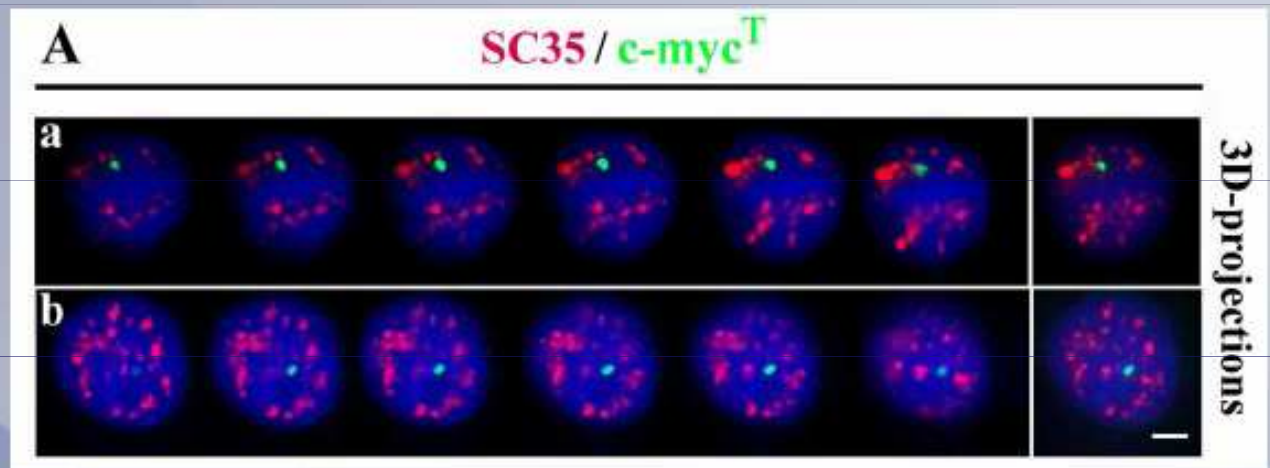
Light open/closed

Rear view on the laser



Screws adjusting rear mirror

3D-projection

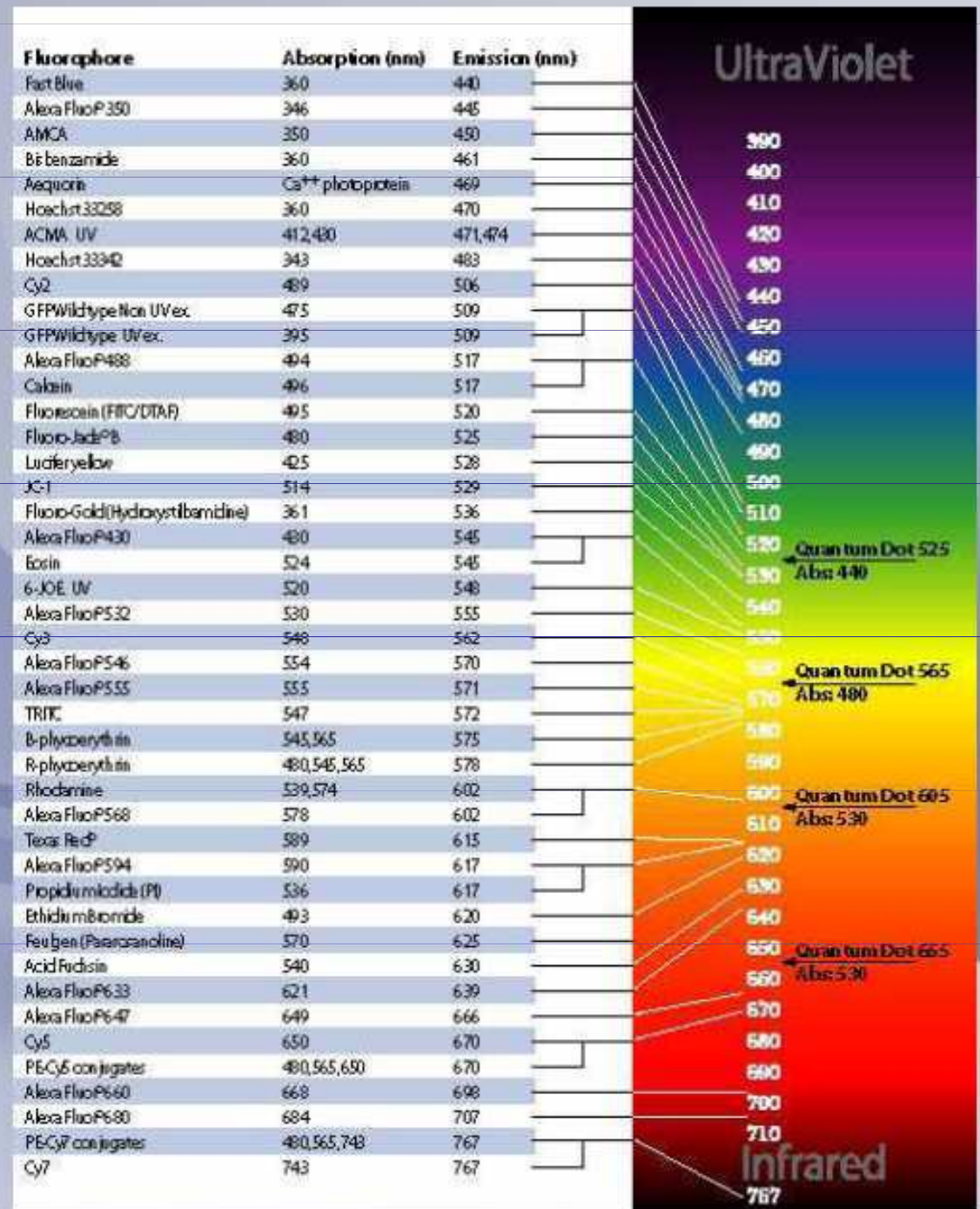




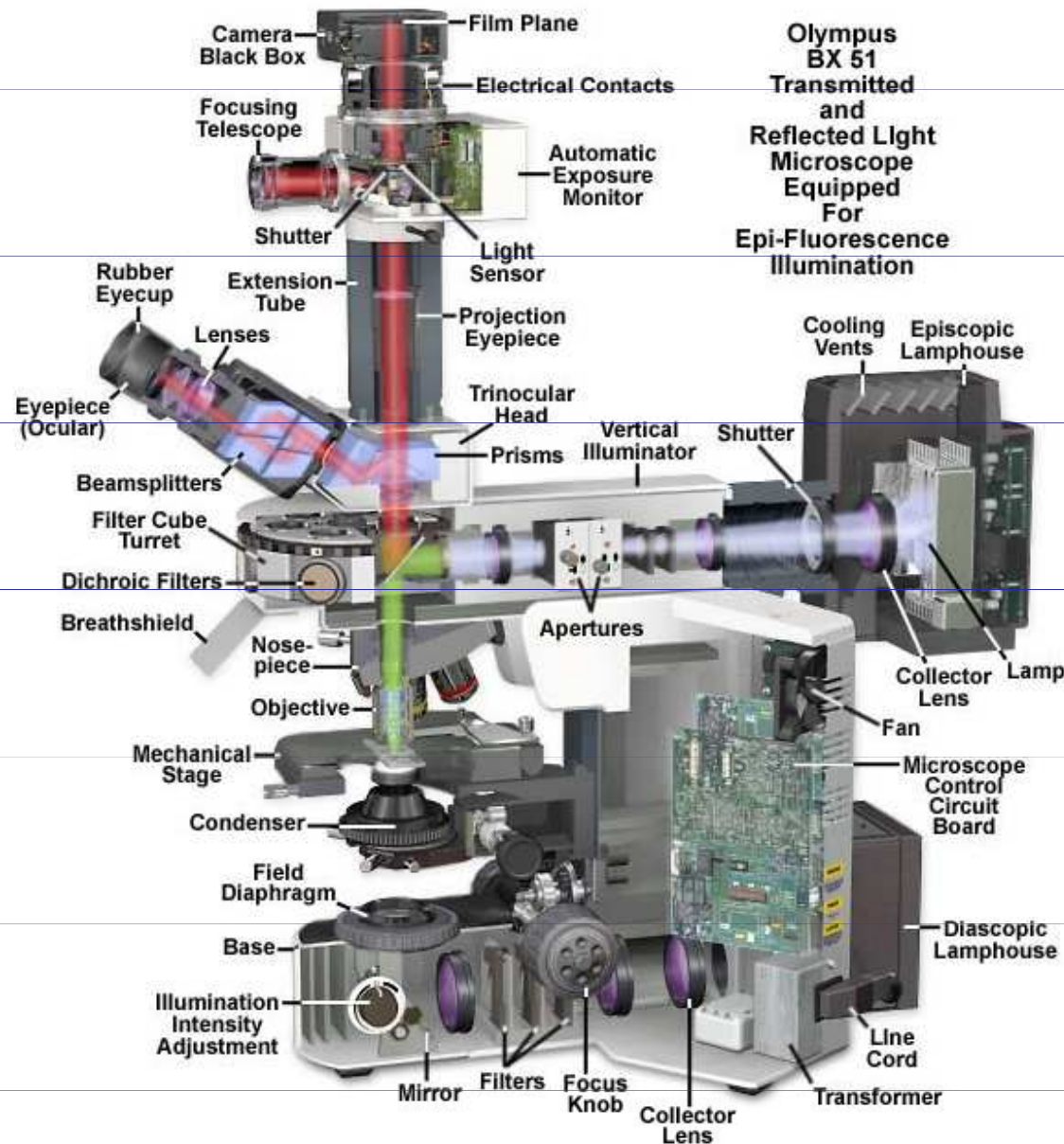
## FLUOROCHROMY:

### 3 skupiny

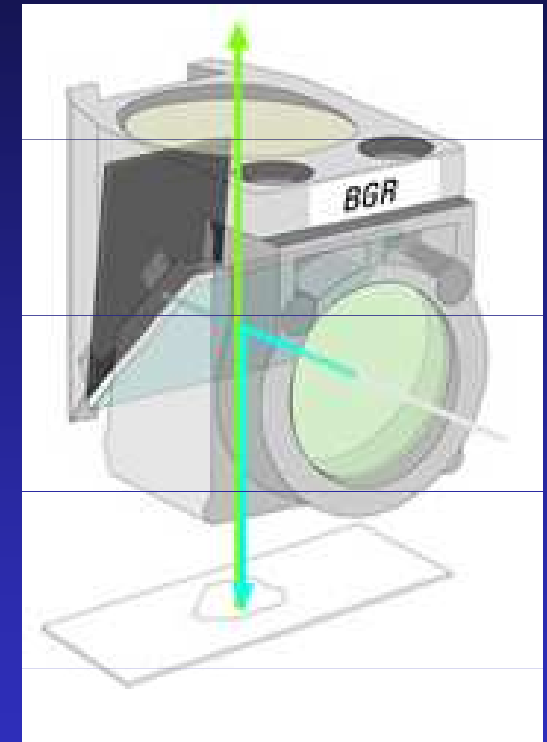
1. fluorochromy nesoucí další molekulu, která je cílená na určitou strukturu (protilátky, lektiny, ..... a tzv. quantum dots)
2. základní jejich vlastností je vazebná schopnost na nějakou strukturu (DAPI) nebo se mění jejich fluorescence, s měnícím se množstvím navázané molekuly
3. fluorochromy produkované samotnými organismy (GFP) – znázorňování živých buněk, vývojové studie a vůbec použití v molekulární biologii



## Olympus BX51 Epi-Fluorescence Microscope Cutaway Diagram



Olympus  
BX 51  
Transmitted  
and  
Reflected Light  
Microscope  
Equipped  
For  
Epi-Fluorescence  
Illumination



# Fluorescence Microscopy: Filter Cubes

- Excitation filters
  - Permit only selected wavelengths of light through to the specimen
- Barrier Filters (emission)
  - Block/absorb excitation wavelengths and permit only selected emission wavelengths to pass toward the detector.
- Dichroic Filters (mirror)
  - Reflect excitation wavelengths and pass emission wavelengths

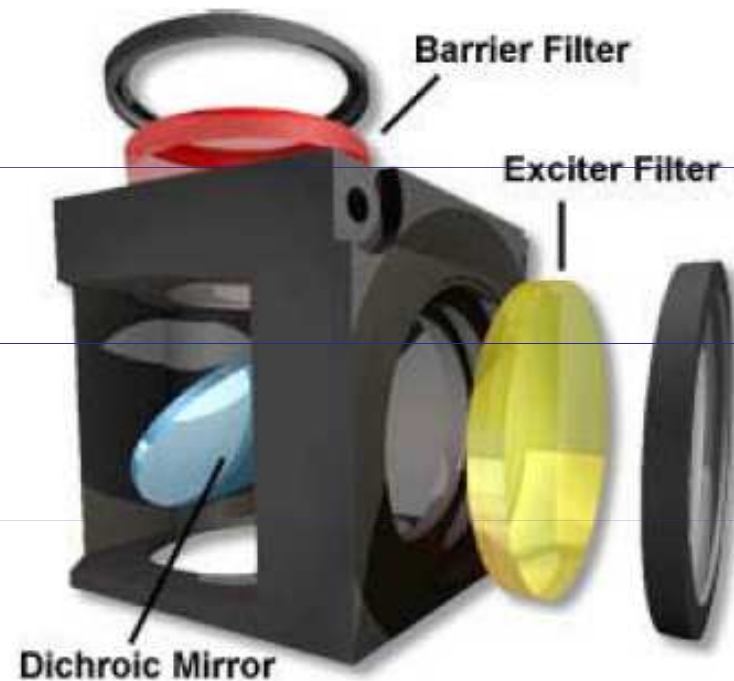


Figure 1



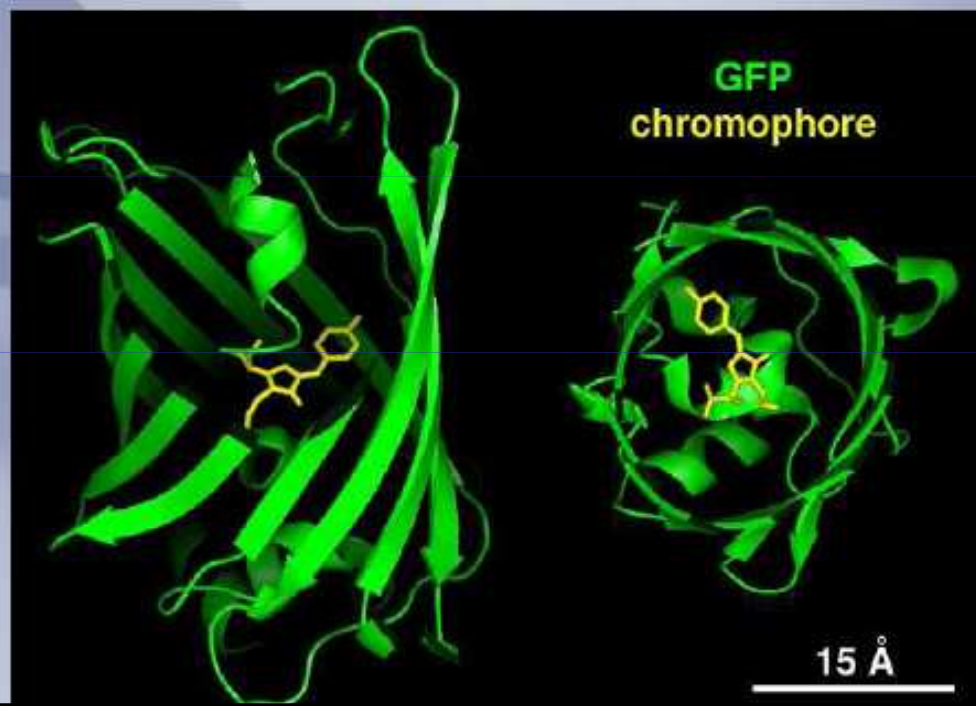
*Aequorea victoria*

Fenomén fluorescence první pozoroval Sir George Gabriel Stokes roku 1852

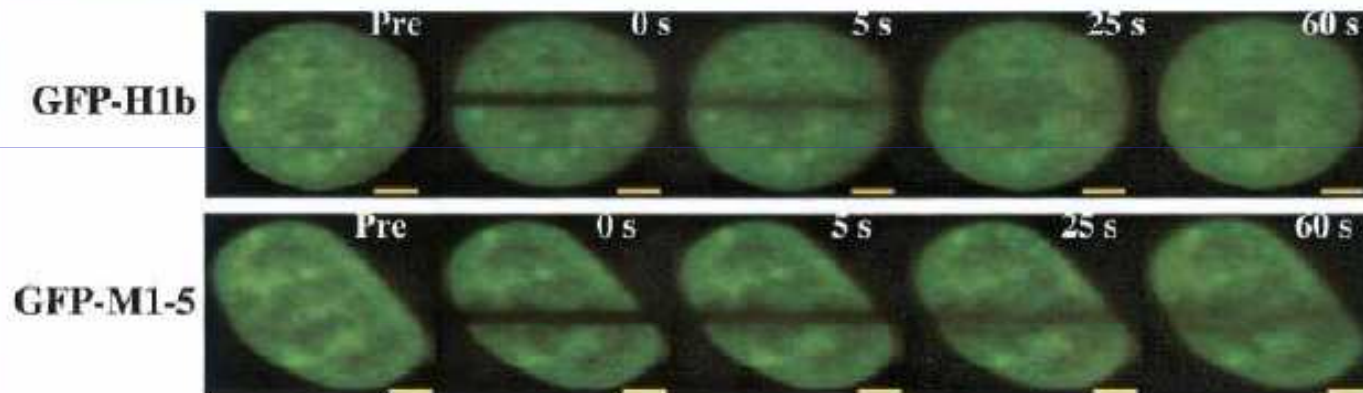
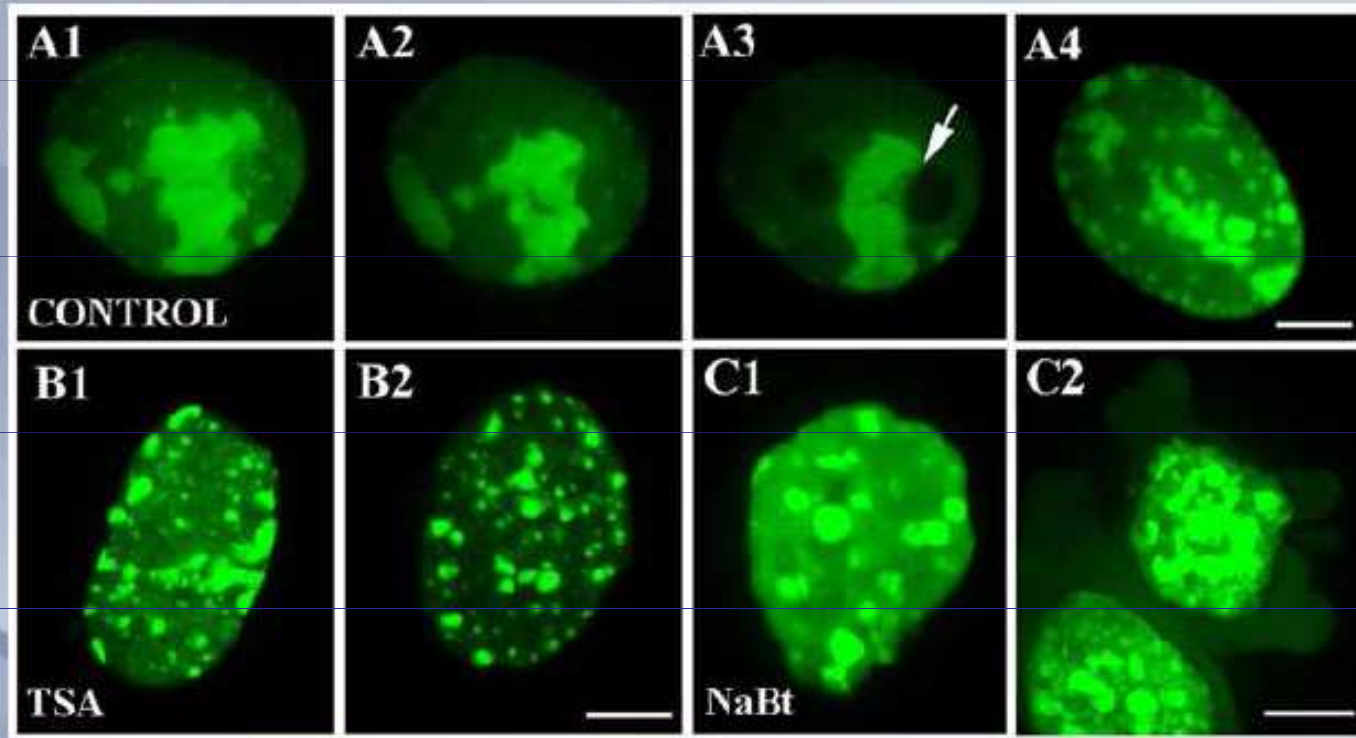
Jev byl fyzikálně popsán Alexanderem Jablonskim roku 1935

Počet užívaných fluorochromů se uzavřel v 90. letech 20. stol.

Shimomura izoloval v roce 1962 z medúzy *Aequorea victoria* žijící v Tichém oceánu **green fluorescent protein - GFP**



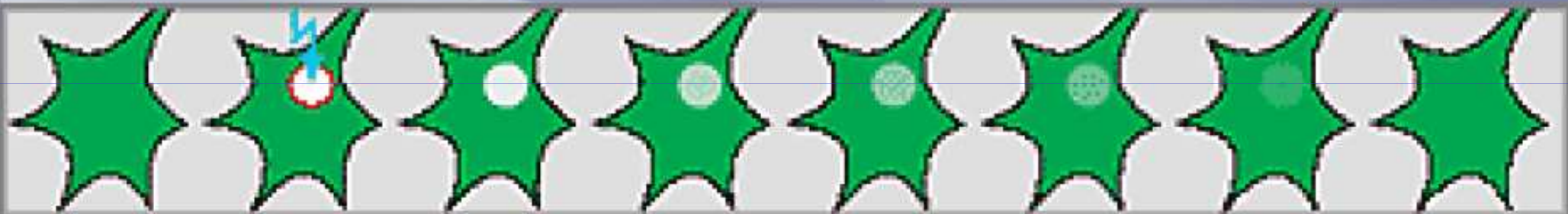
# GFP-HP1 $\beta$



## Co je to FRAP?

### FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)

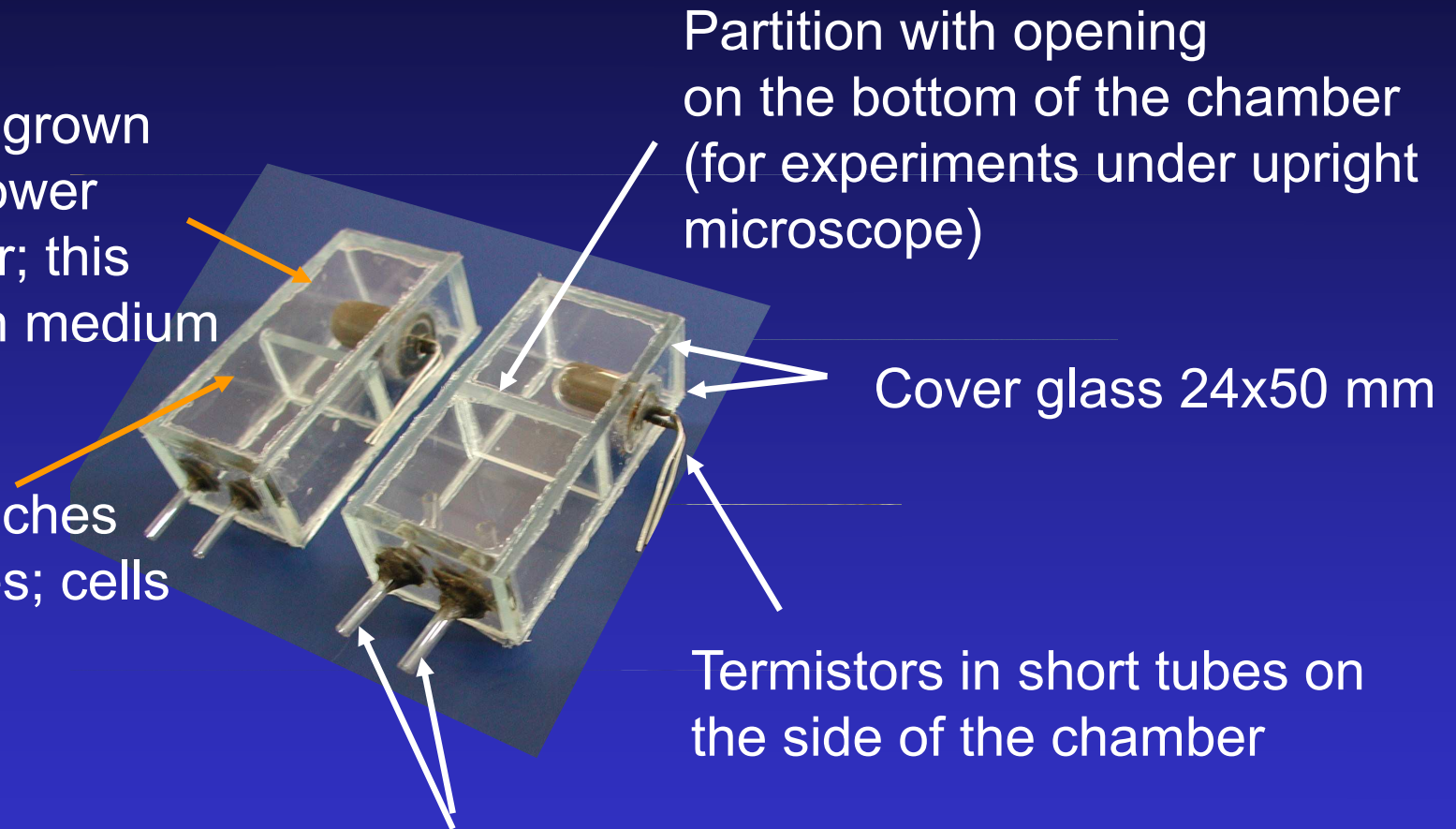
- návrat fluorescence v definované oblasti vzorku po vysvícení 'bleaching procesu'.
- výsledkem je pohyb nevysvícených fluoroforů z okolních míst vysvícené oblasti
- je využíván k měření dynamiky 2D nebo 3D mobility molekul, např. difuze, transport nebo další typy pohybů fluorescenčně značených molekul membrán nebo živých buněk



# Inkubační komůrky pro přímý mikroskop

**Part I** – cells can be grown on both upper and lower sides of the chamber; this part is filled fully with medium

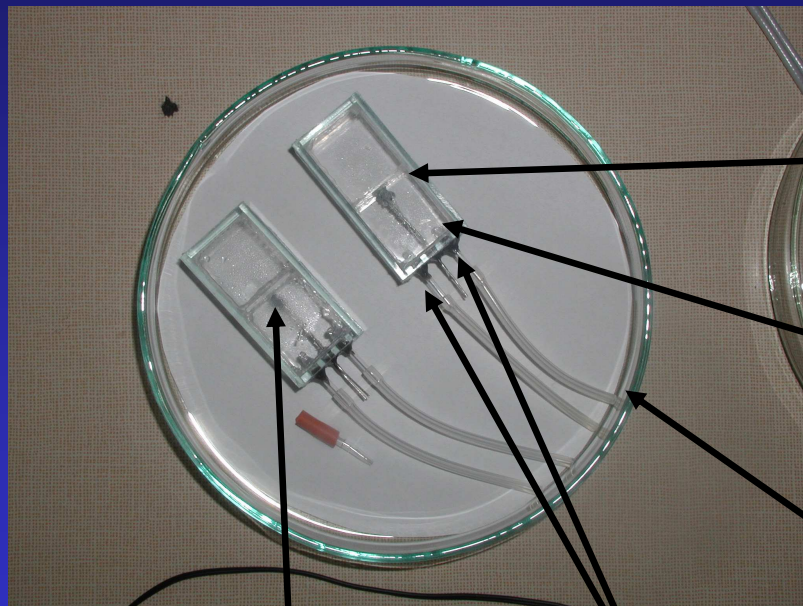
**Part II** – medium reaches under the glass tubes; cells are not grown here



Glass tubes bent under the upper glass (to enable CO<sub>2</sub> to flow above medium in the part II of the chamber)

# Inkubace živých buněk pod mikroskopem

## Inkubační komůrky



Přepážka pro experimenty  
na přímém mikroskopu

Krycí sklíčka na vrchní  
a spodní straně komůrky

Miska pro sterilizaci v autoklávu

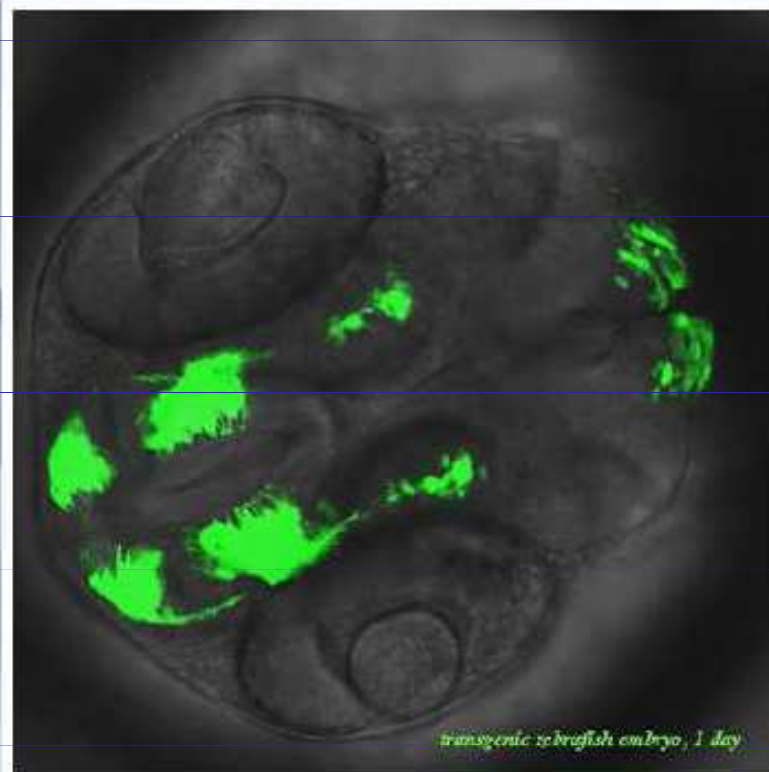
Termistor

Skleněné trubičky používané pro  
plnění komůrky a pro profukování CO<sub>2</sub>



## GFP in zebrafish (*Danio rerio*)

([www.ifom-ieo-campus.it/research/mione.php](http://www.ifom-ieo-campus.it/research/mione.php); Marina Mione)

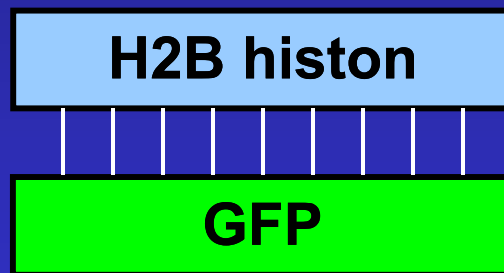


# Vizualizace vazebných míst proteinu V DNA *in vivo* pomocí GFP

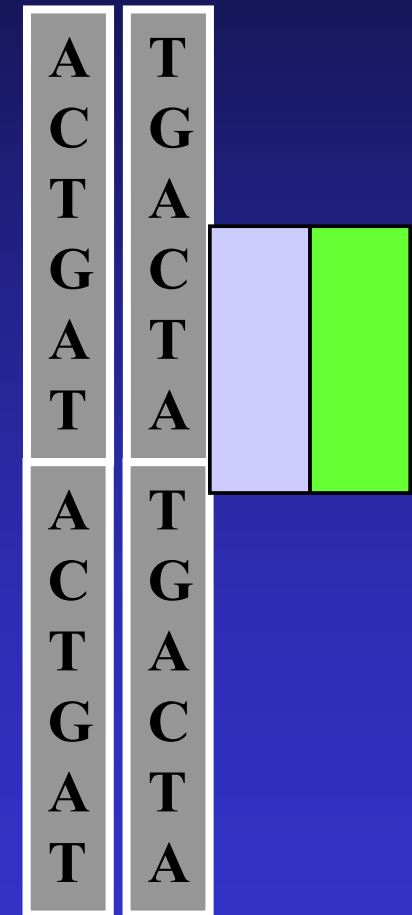
Do buňky se vloží plasmid kodující  
daný protein konjugovaný s GFP

Chromosomová DNA

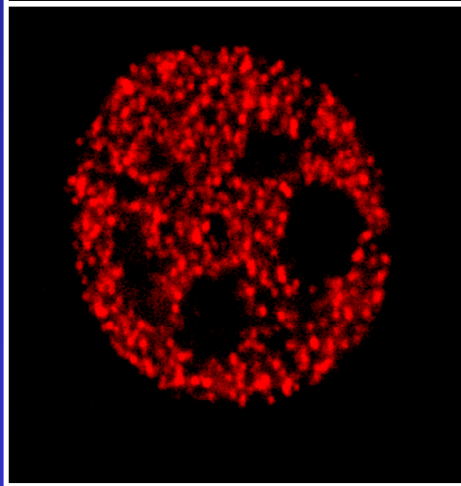
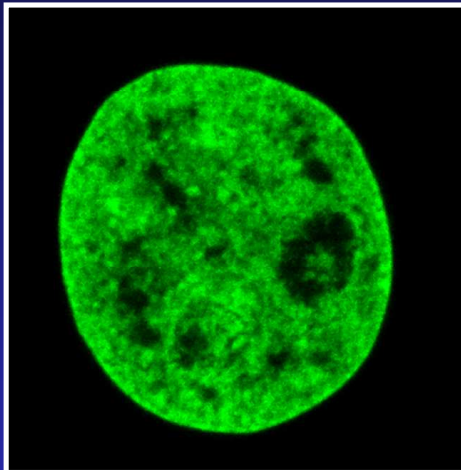
Syntéza konjugo-  
vaného proteinu



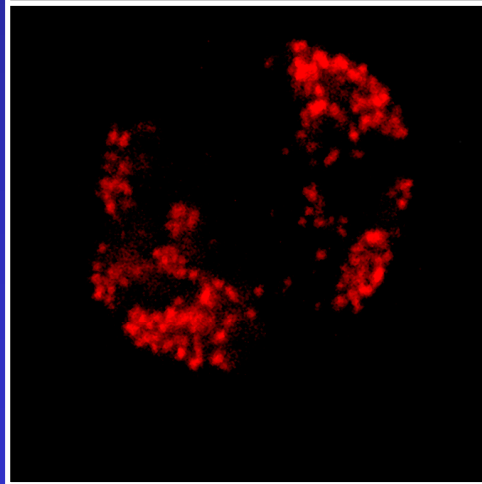
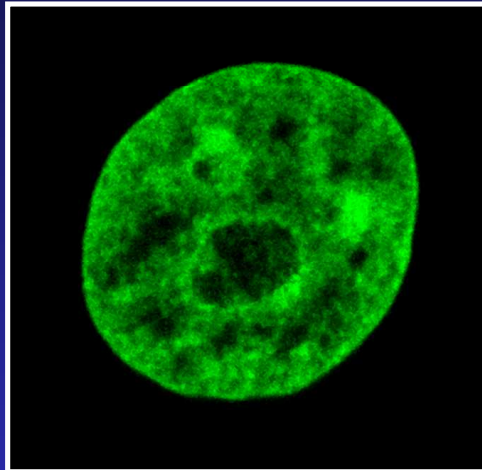
Protein se váže na  
cílová místa v DNA,  
Která potom zeleně  
fluoreskují



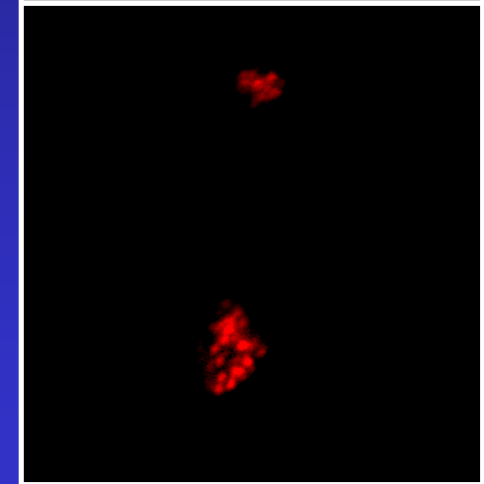
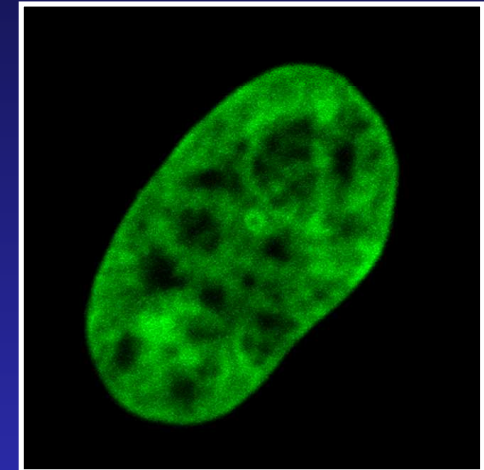
**SRL pomocí Cy3-dUTP (červená) a segregace chromosomových teritorií u jader HeLa buněk s histonem H2B konjugovaným s GFP (zelená)**



1st cycle



3rd cycle

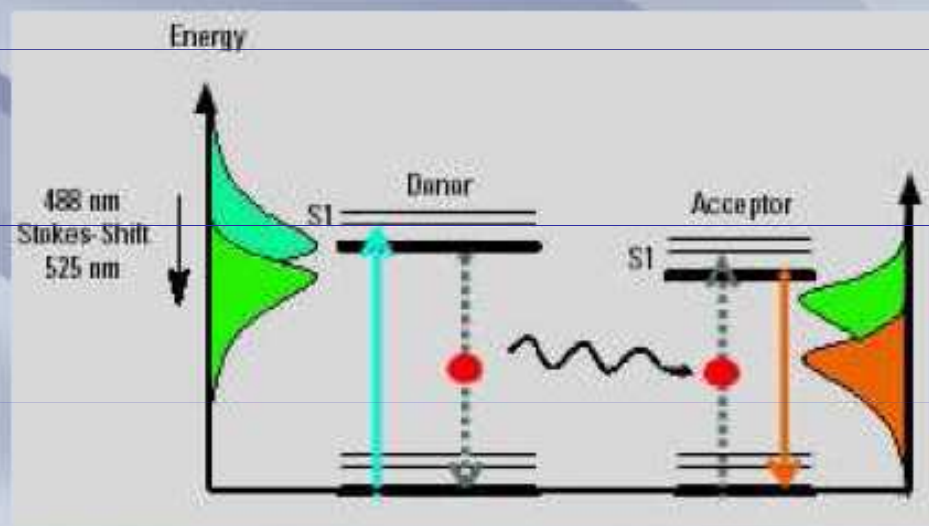


after at least 6 cycles

# Förster Resonance Energy Transfer

## *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*

studium interakcí proteinů  
nebo blízkých molekul



$$E_A(i) = \frac{B - A \times b - C \times (c - a \times b)}{C}$$

- popisuje mechanismus přenosu energie mezi dvěma fluorescenčními molekulami

- fluorescenční **donor** je excitován svojí specifickou fluorescencí o excitační vlnové délce

- dalekonosným dipol-dipole vazebným mechanismem nezářivým přenosem excitována druhá molekula - **akceptor**

- donor se vrací do elektronově základního stavu

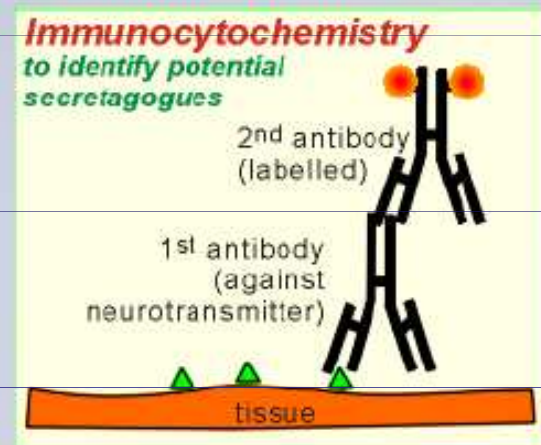
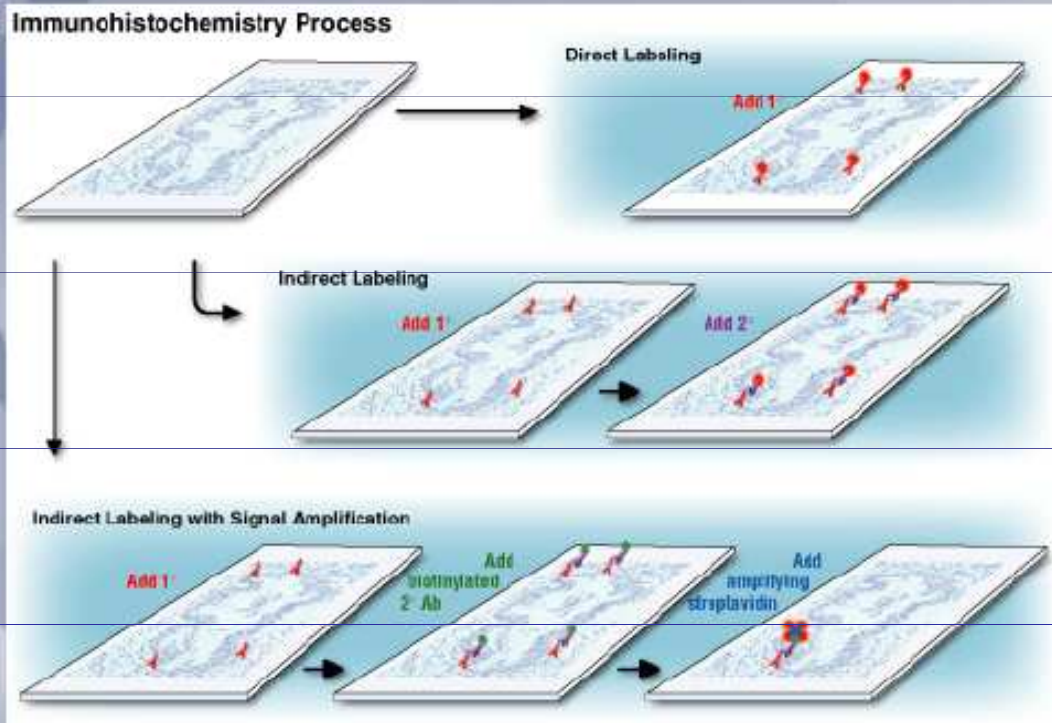
- popsany mechanismus přenosu energie je nazýván "**Förster resonance energy transfer**" (FRET), pojmenováno podle německého vědce **Theodora Förstera**. Pokud jsou obě molekuly fluorescenční, je často užíván název "fluorescence resonance energy transfer", ačkoliv **energie není**

Účinnost FRET je determinována třemi parametry:

1. Vzdáleností mezi donorem a akceptorem
2. Překryvem spekter – emisního spektra donoru a excitačního spektra akceptoru
3. Relativní orientaci emisního dipólového momentu donoru a absorpčního dipólového momentu akceptoru

## Příprava preparátu

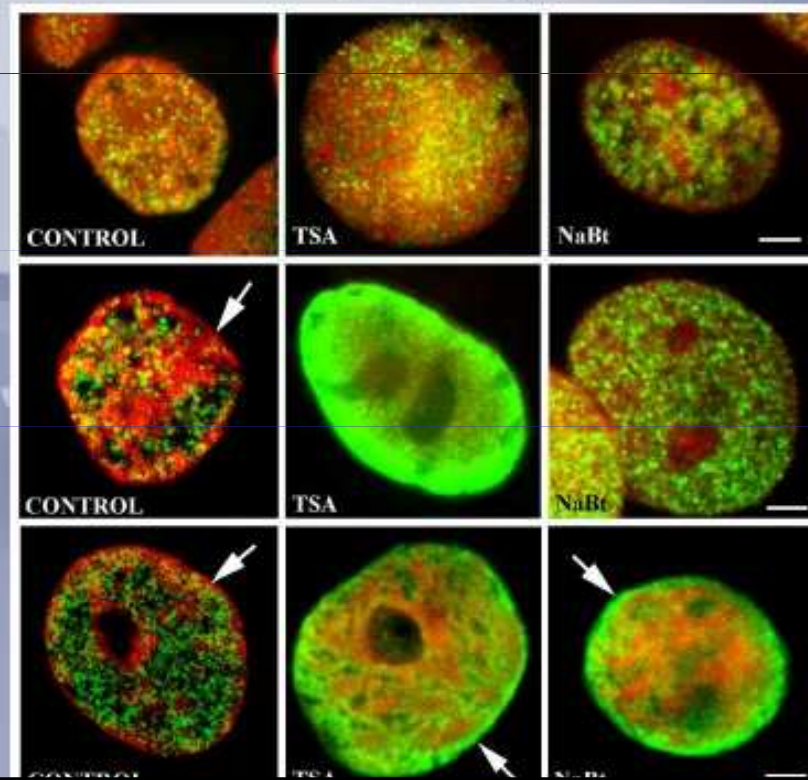
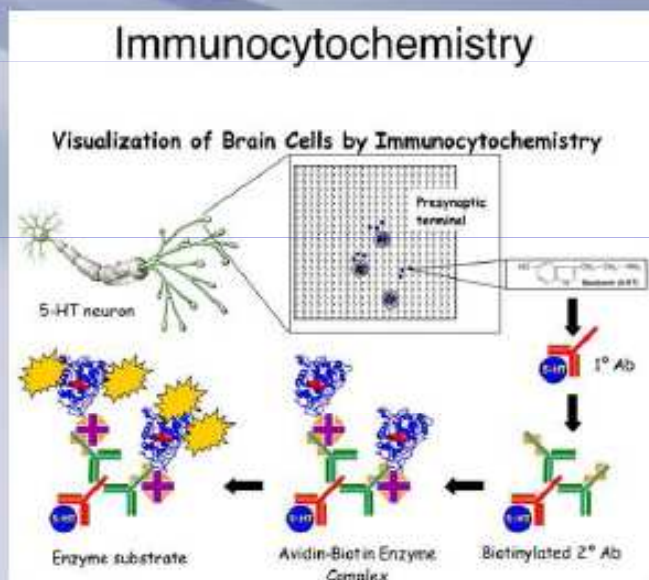
## Imunocytobarvení



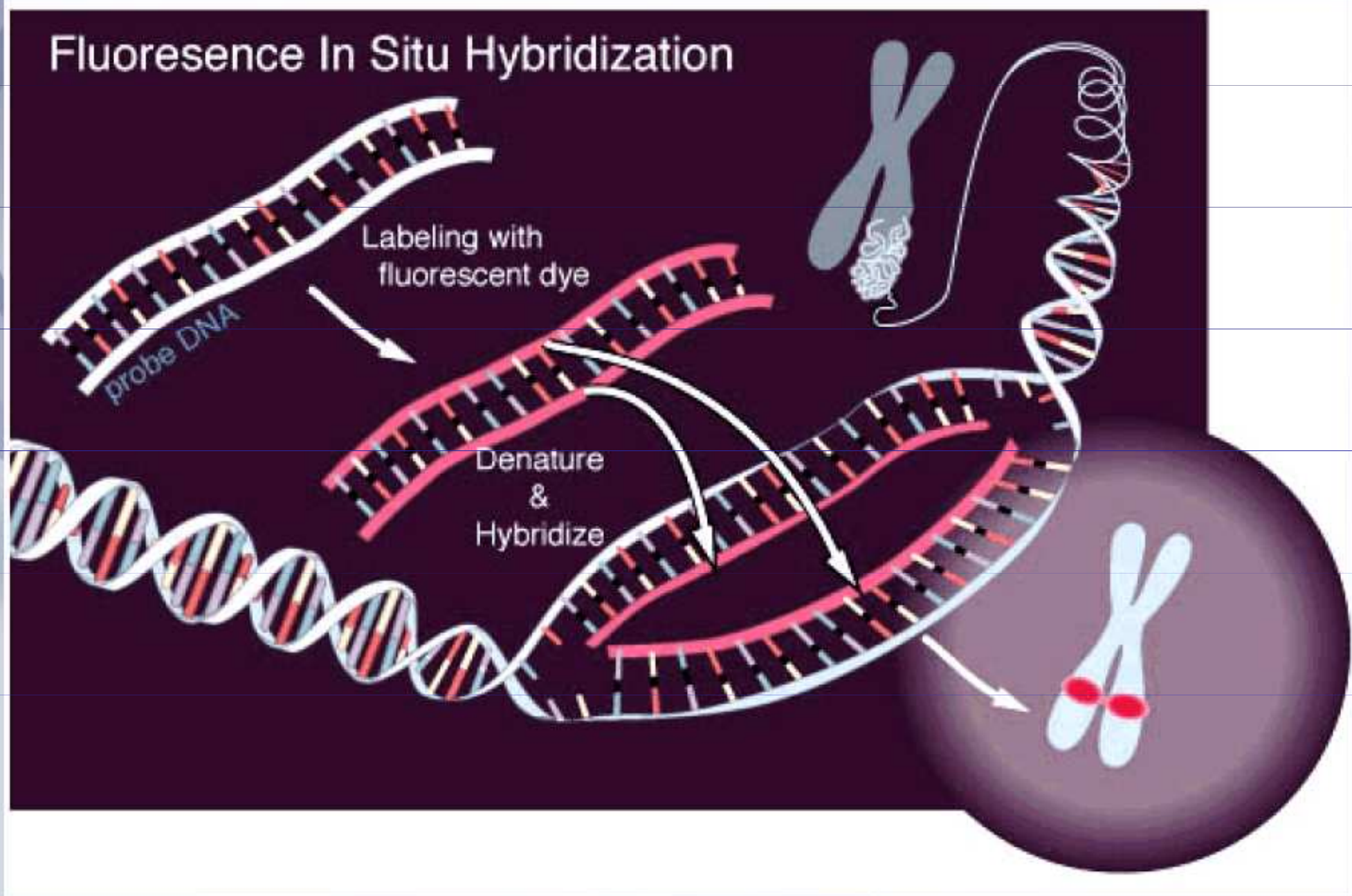
<http://www.chemicon.com>

<http://www.celanphy.science.ru.nl>

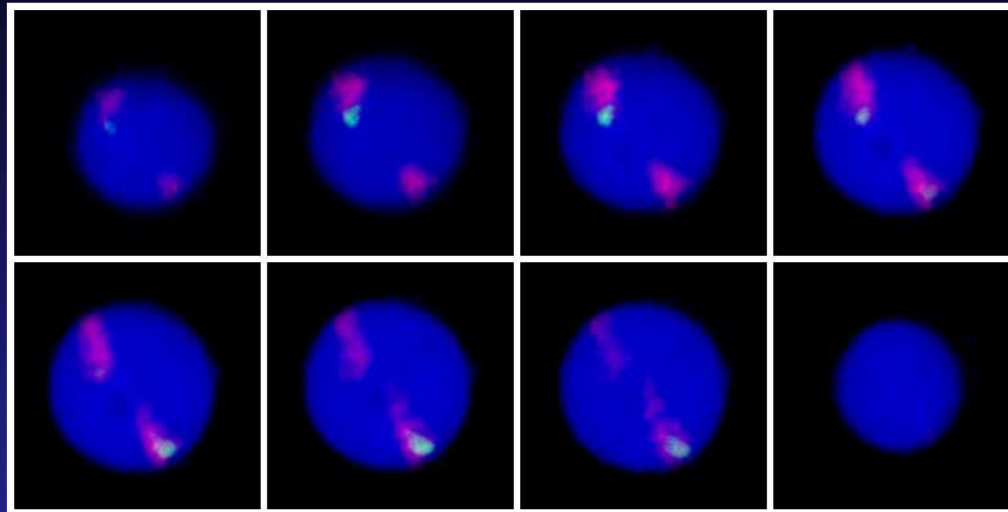
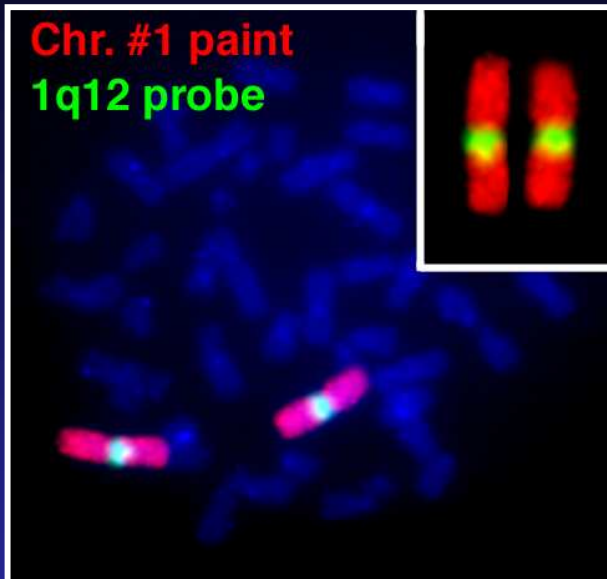
## Immunocytochemistry



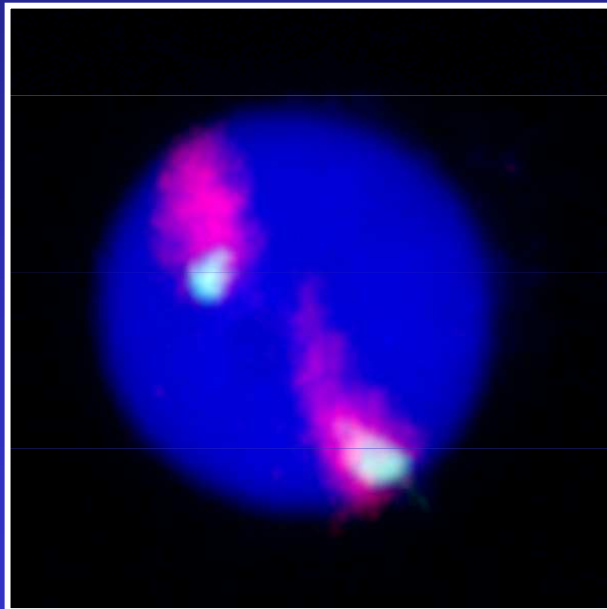
# Fluorescence In Situ Hybridization



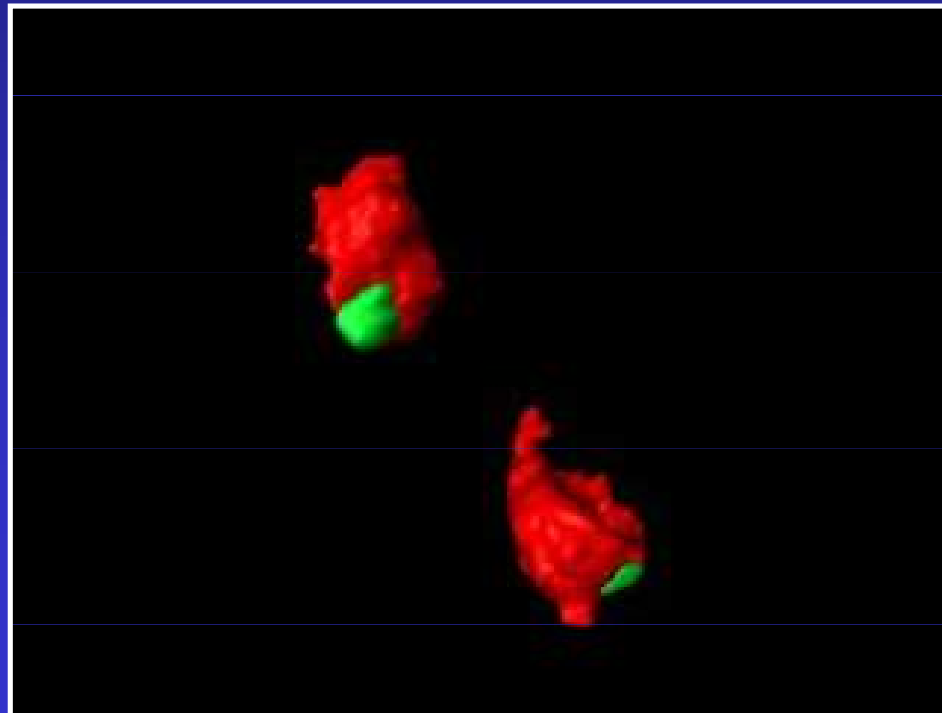
# 3D-FISH a konfokální mikroskopie



Galerie optických řezů



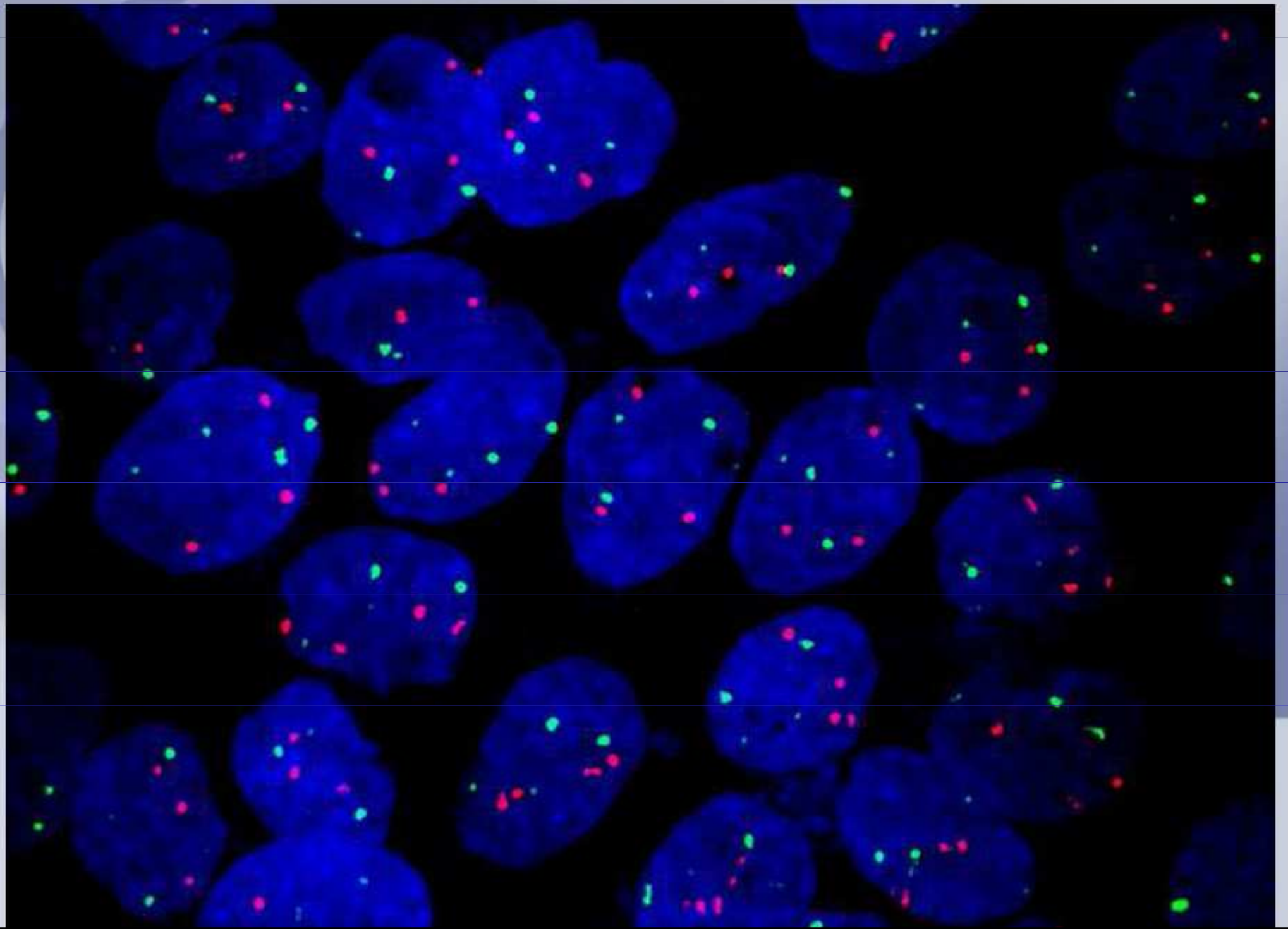
Maximální obraz  
Všech řezů



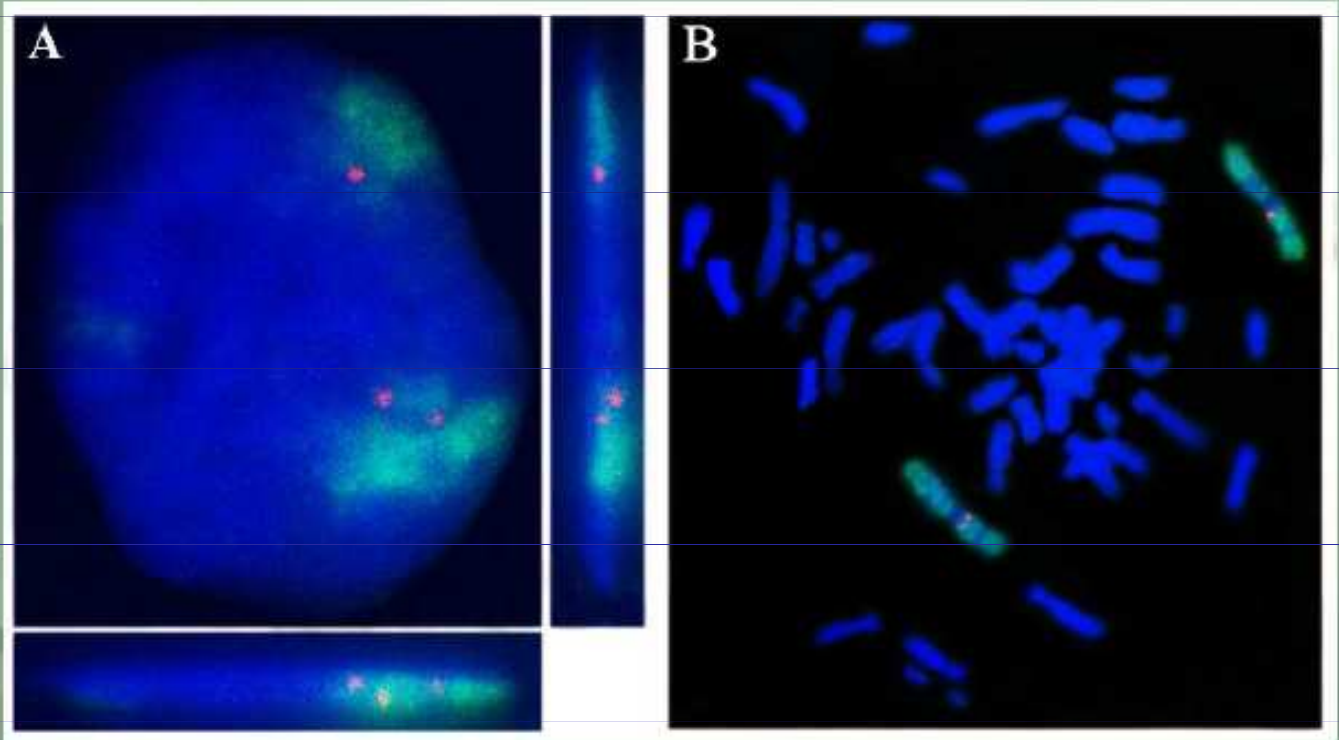
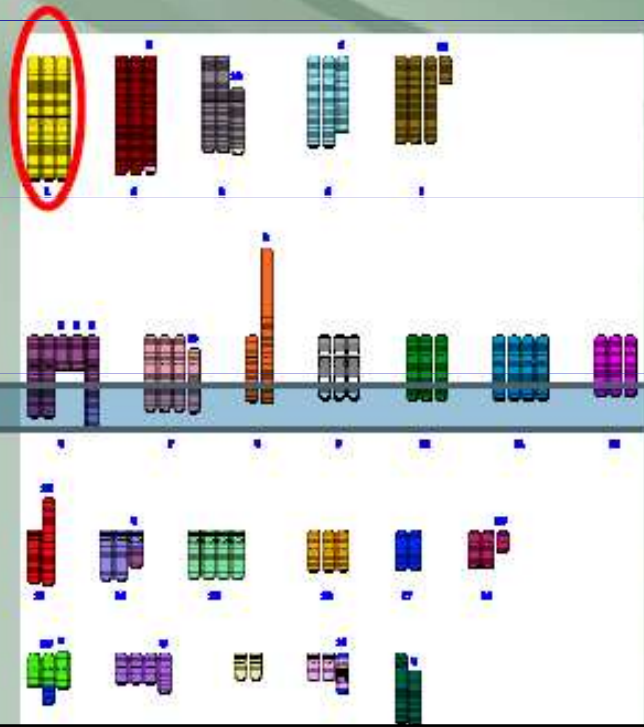
3D rekonstrukce CT

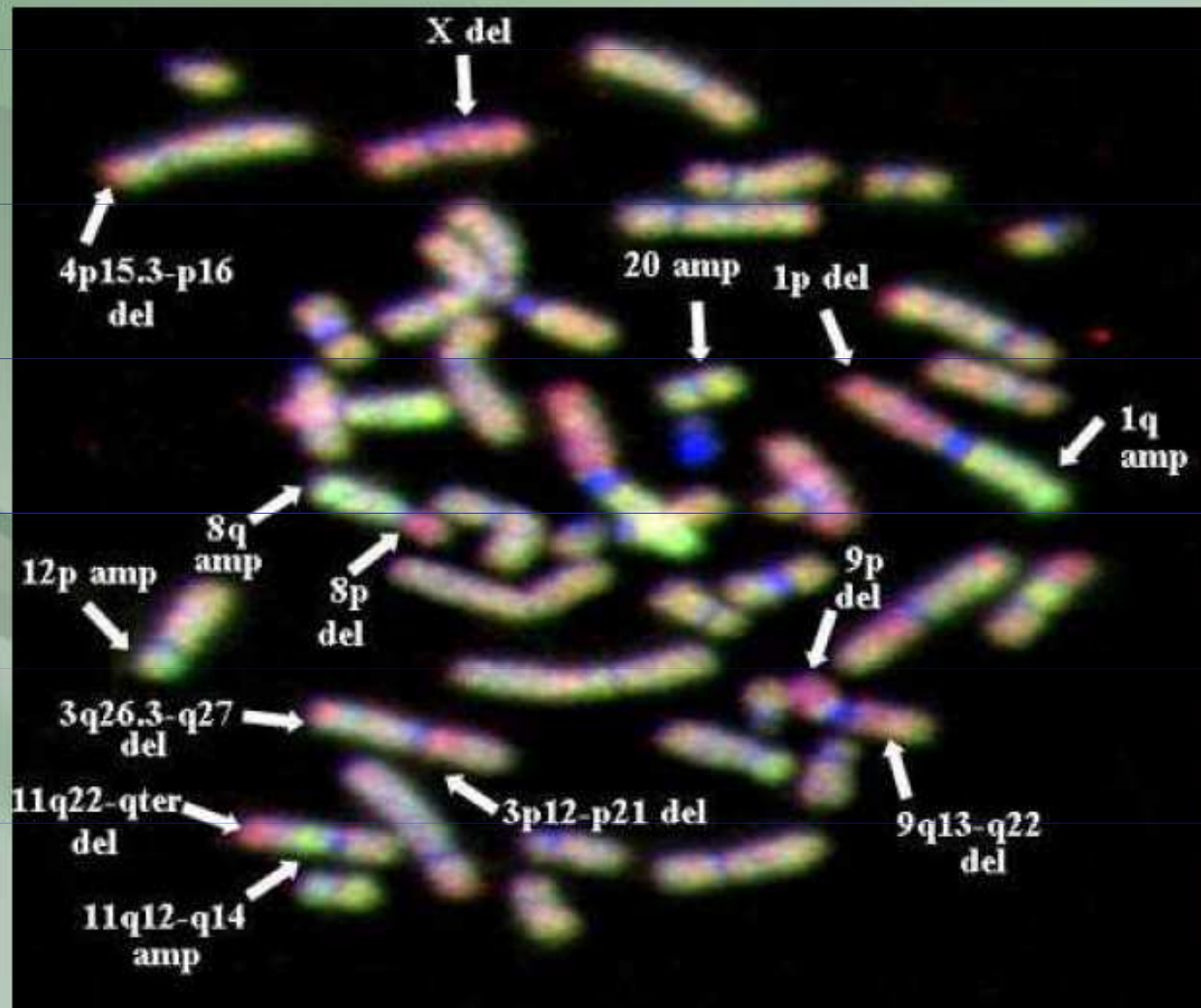
Weierich et al., (2003) in press



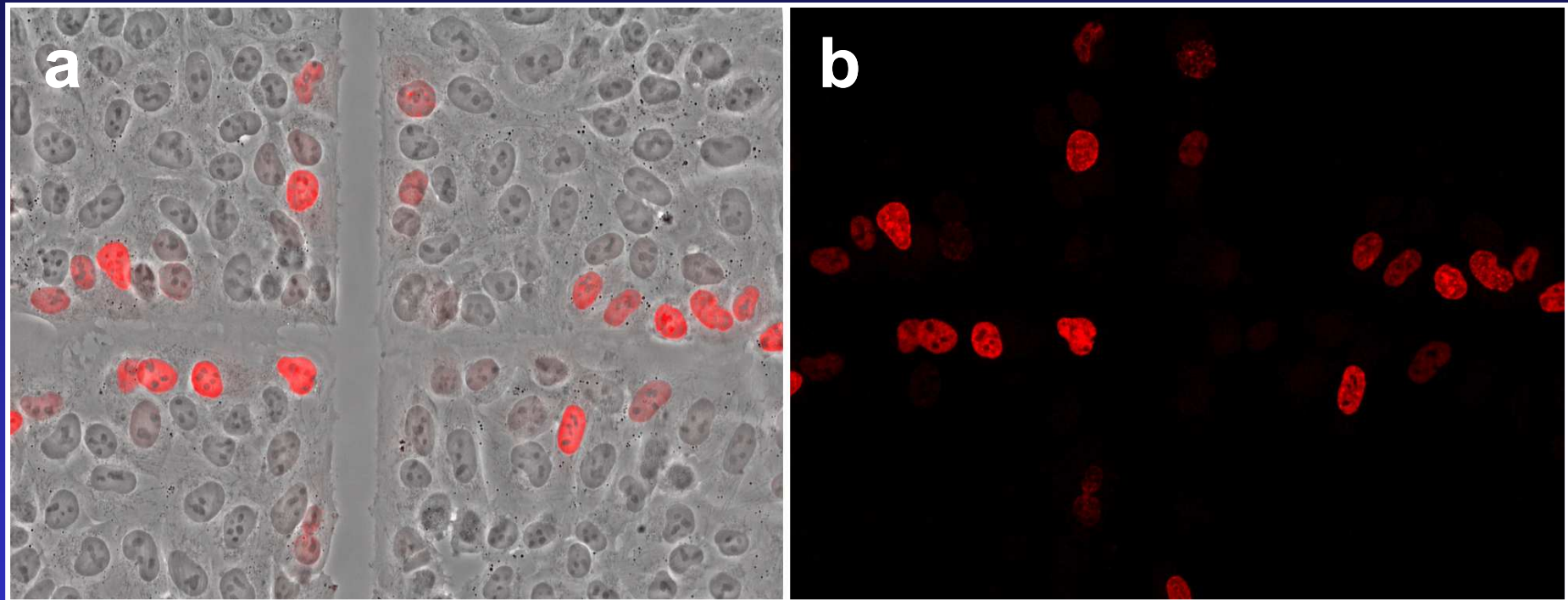


# Amplifikace 1q21



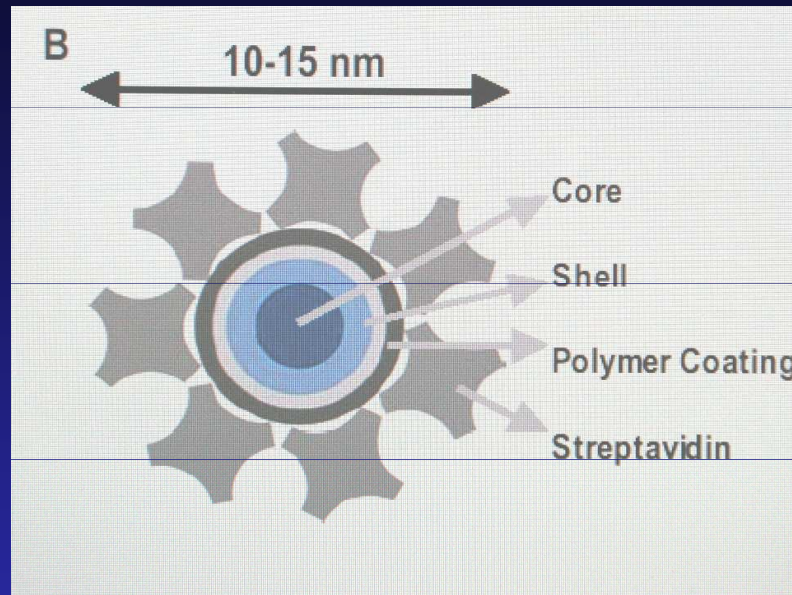


# Značení buněk metodou SRL (scratch replication labeling) užitím nukleotidů konjugovaných s fluorochromem



(SRL on neuroblastoma cells with **Cy3-dUTP** - fixed 30' after labelling)

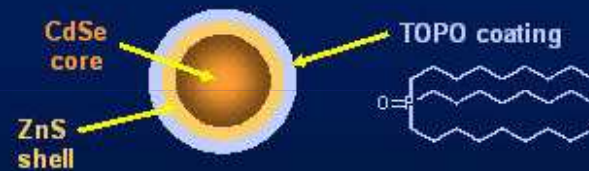
# Schéma kvantové kuličky



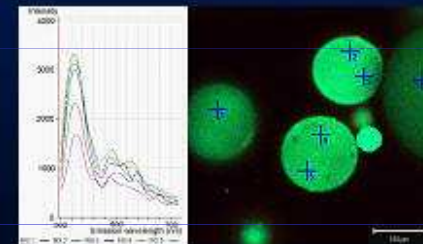
## Quantum Dots



TEM of a 4 nm CdSe quantum dot

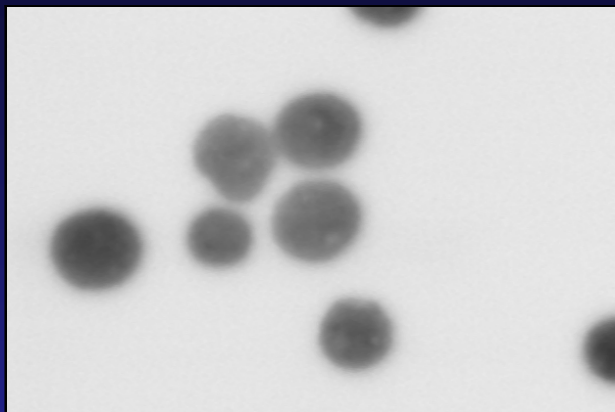


Solutions of differently sized CdSe quantum dots

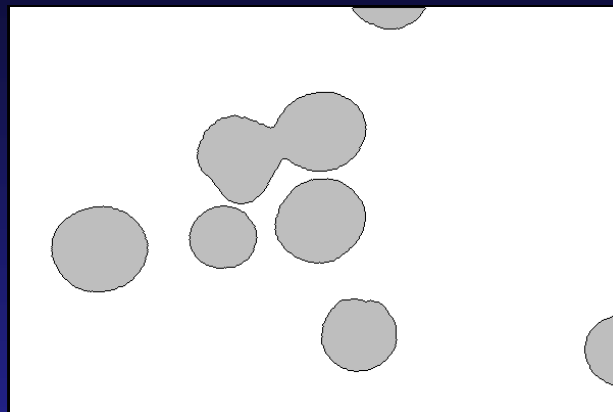


Fluorescent emission fingerprinting of polymer beads that contain CdSe quantum dots

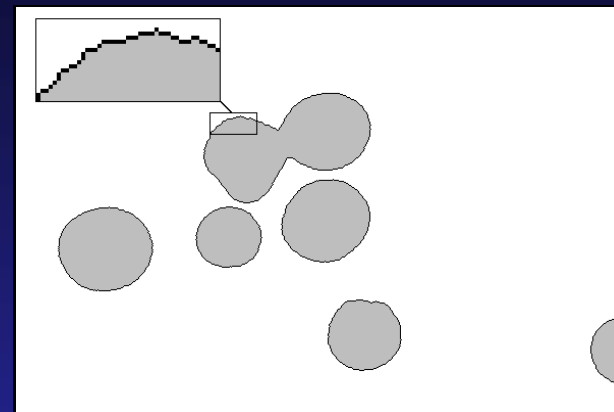
# Segmentace objektů



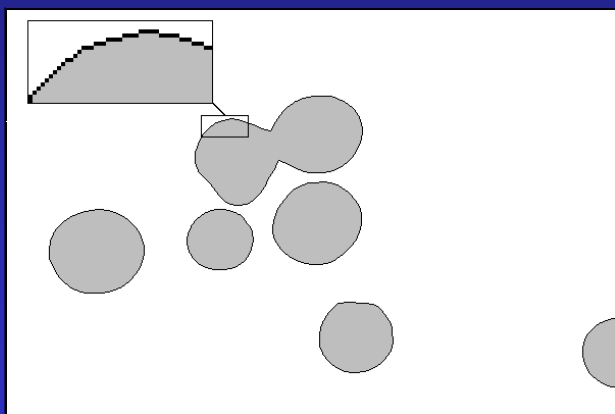
(a)



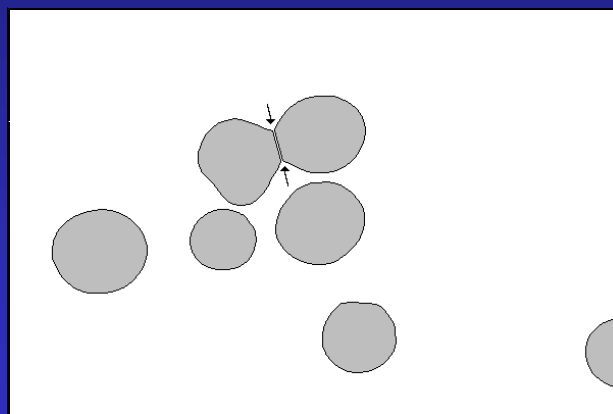
(b)



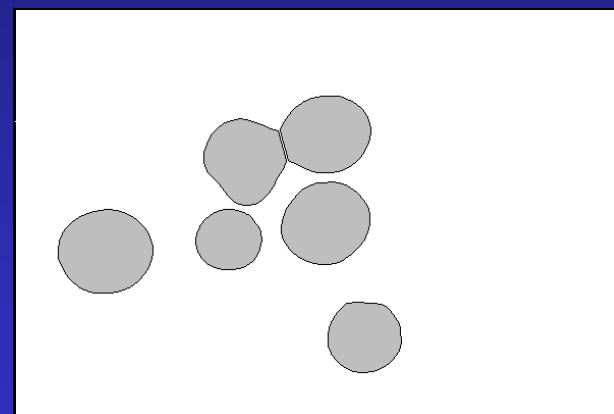
(c)



(d)

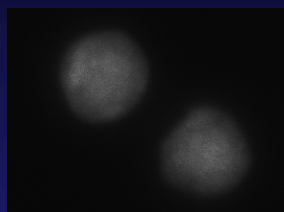


(e)

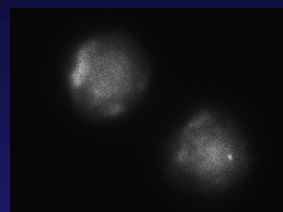


(f)

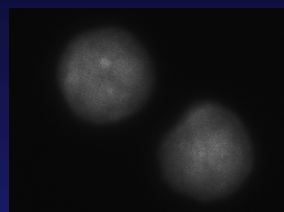
# Segmentace FISH signálů



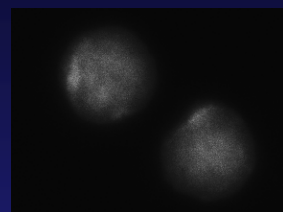
R 1



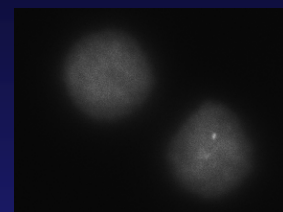
G 1



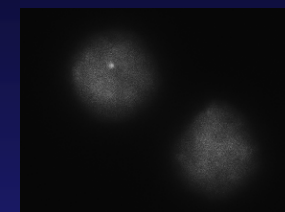
R 5



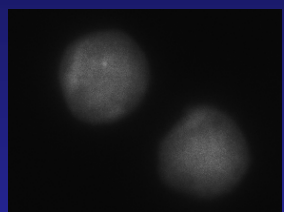
G 5



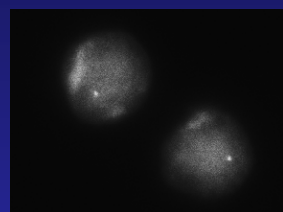
R 9



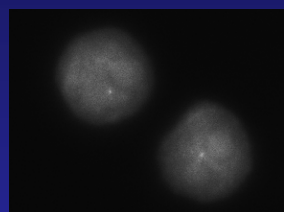
G 9



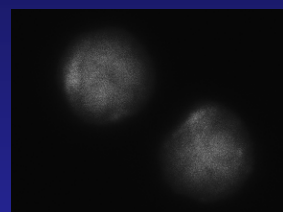
R 2



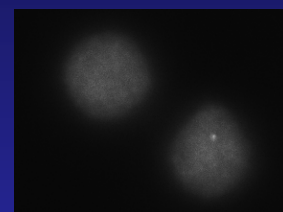
G 2



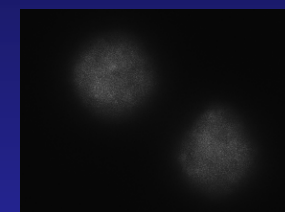
R 6



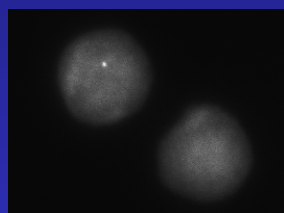
G 6



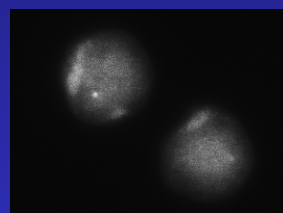
R 10



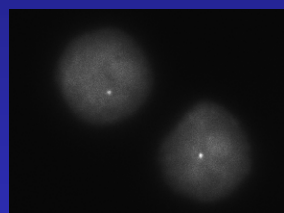
G 10



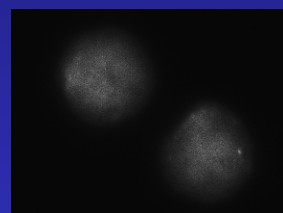
R 3



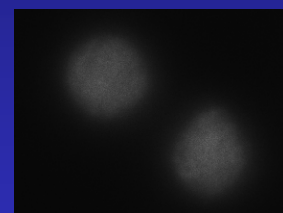
G 3



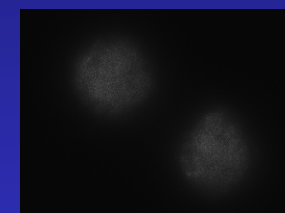
R 7



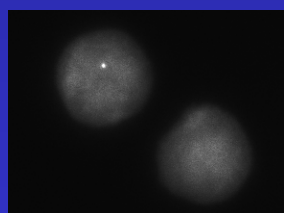
G 7



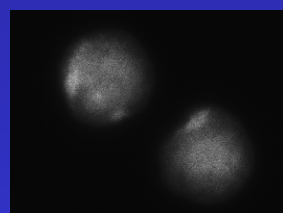
R 11



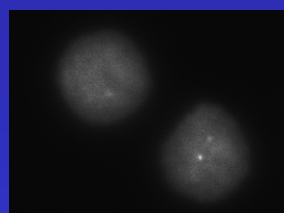
G 11



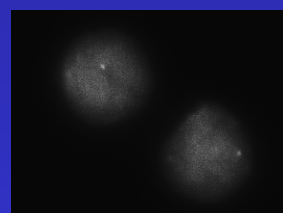
R 4



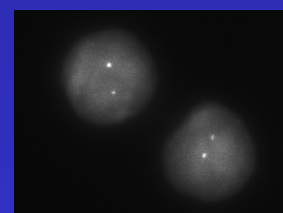
G 4



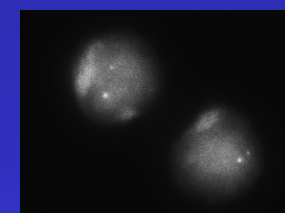
R 8



G 8

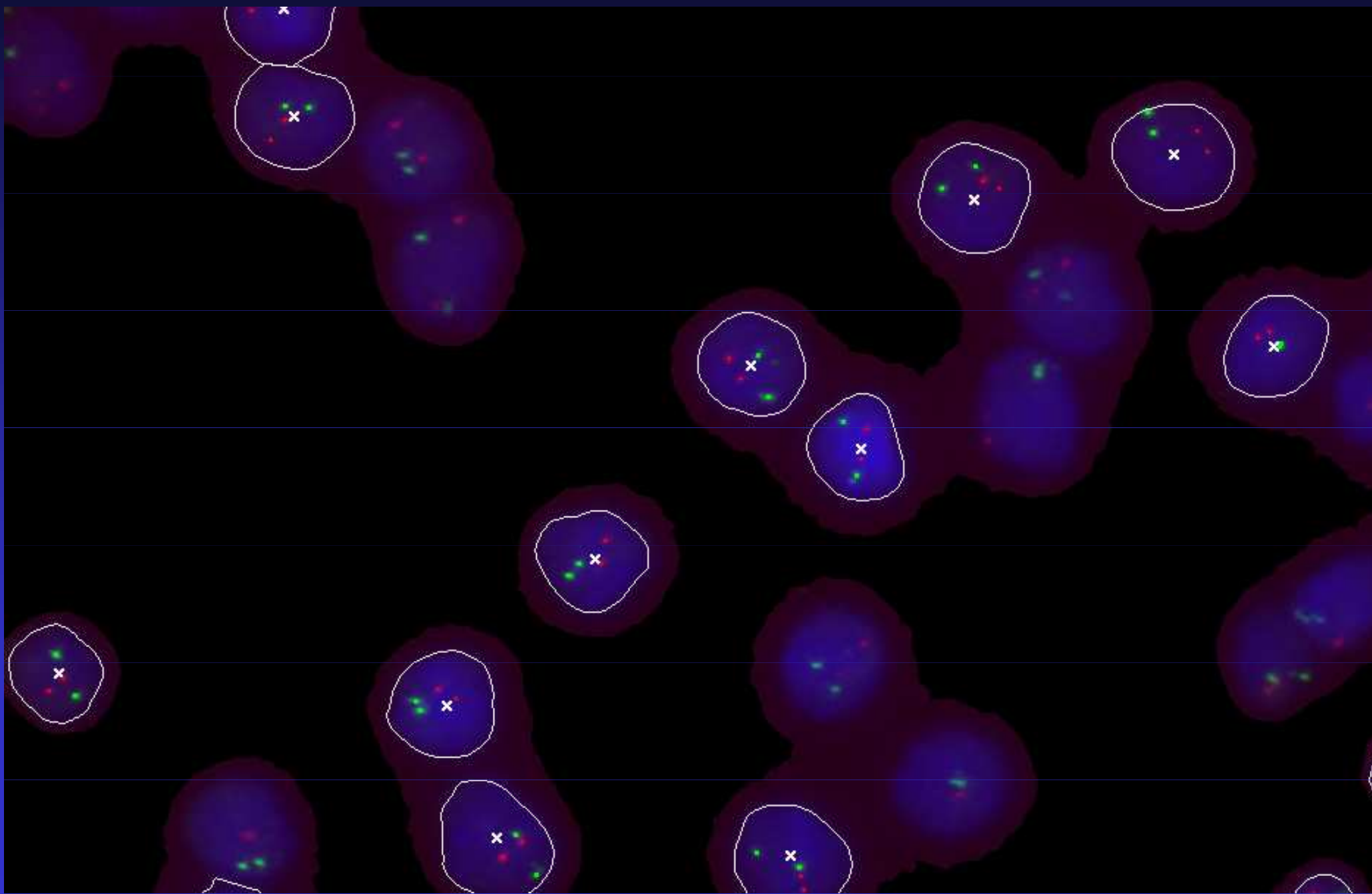


R max



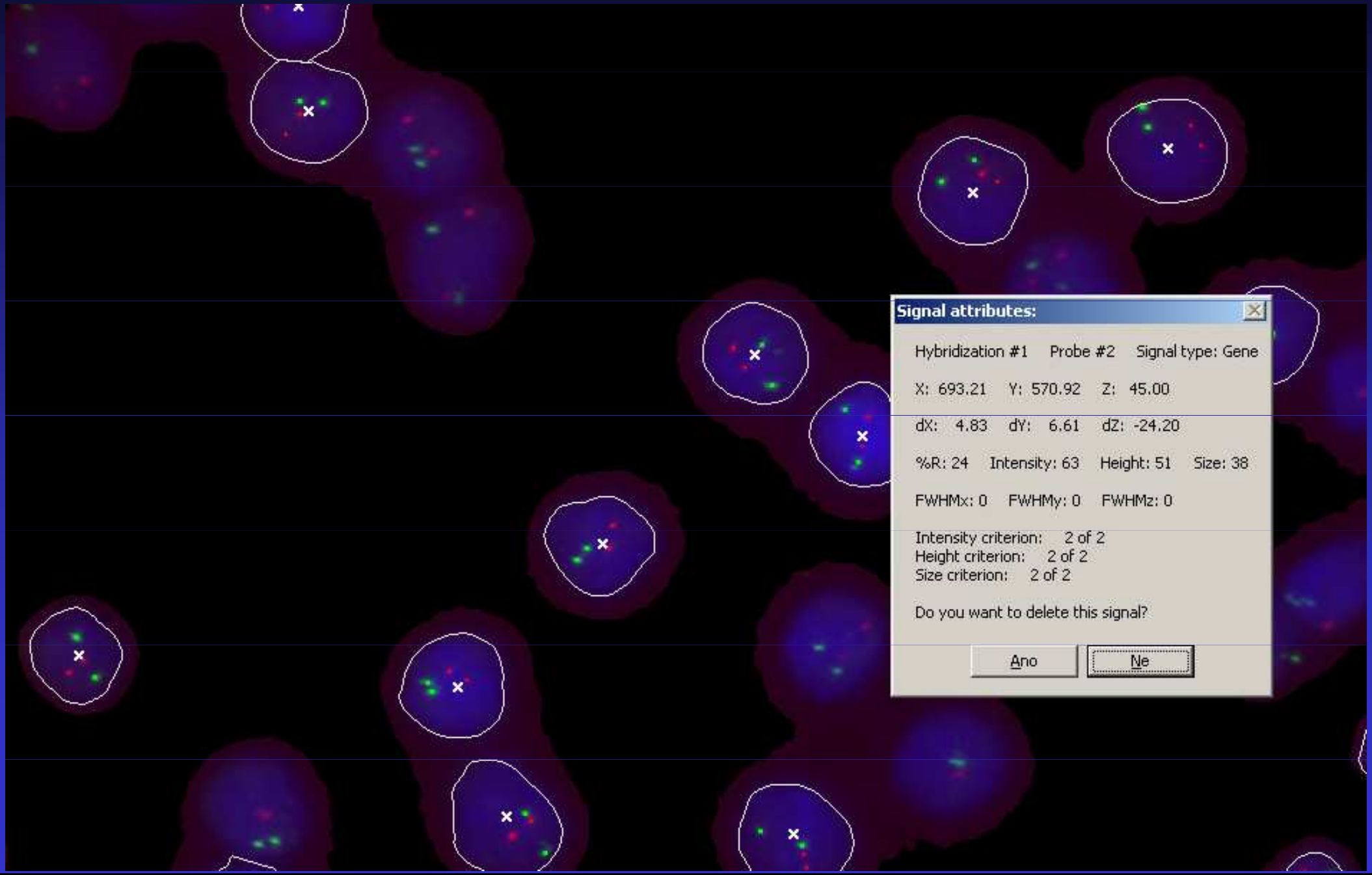
G max

# Automatická analýza obrazu





# Automatická analýza obrazu



## Signal attributes:

Hybridization #1 Probe #2 Signal type: Gene

X: 693.21 Y: 570.92 Z: 45.00

dX: 4.83 dY: 6.61 dZ: -24.20

%R: 24 Intensity: 63 Height: 51 Size: 38

FWHMx: 0 FWHMy: 0 FWHMz: 0

Intensity criterion: 2 of 2

Height criterion: 2 of 2

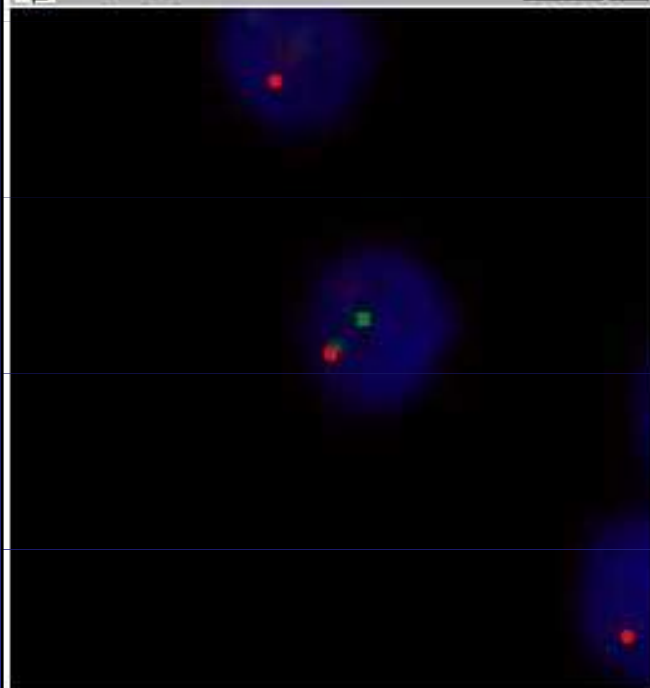
Size criterion: 2 of 2

Do you want to delete this signal?

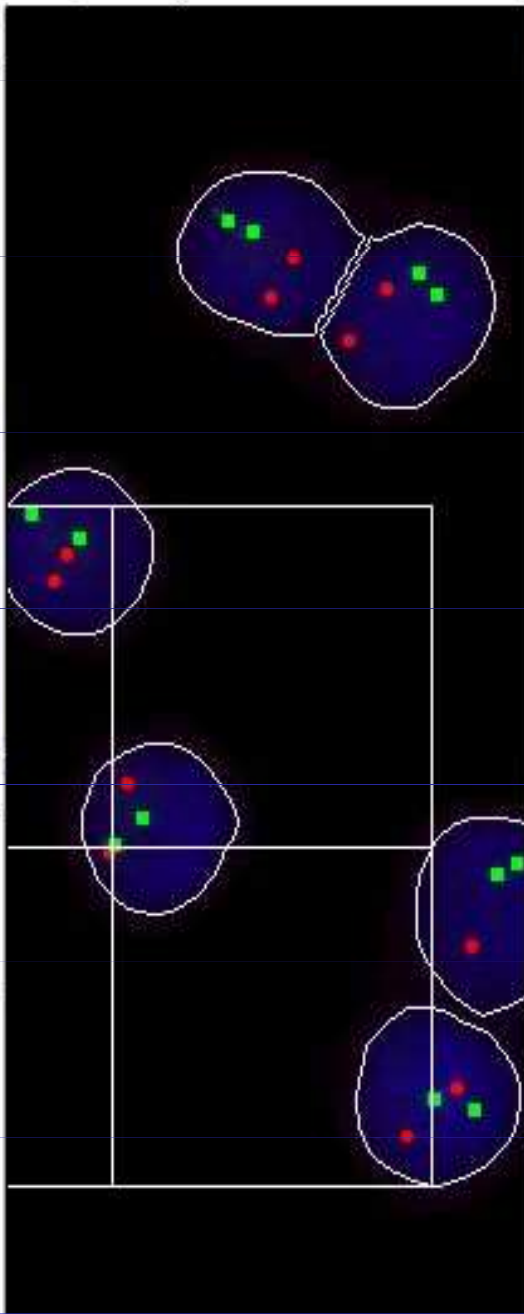
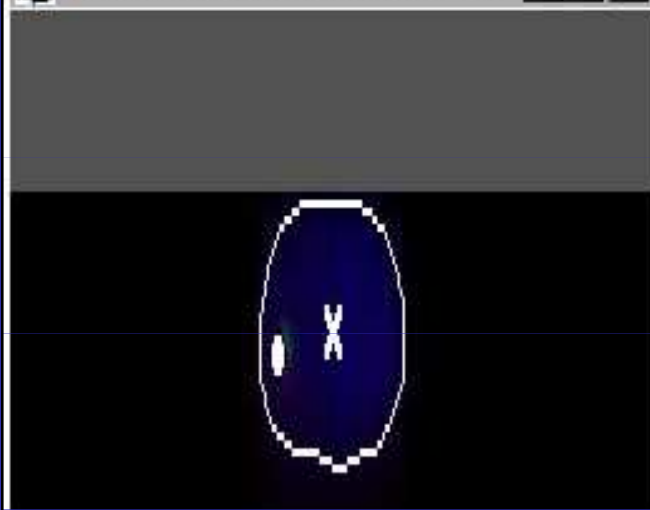
Ano

Ne

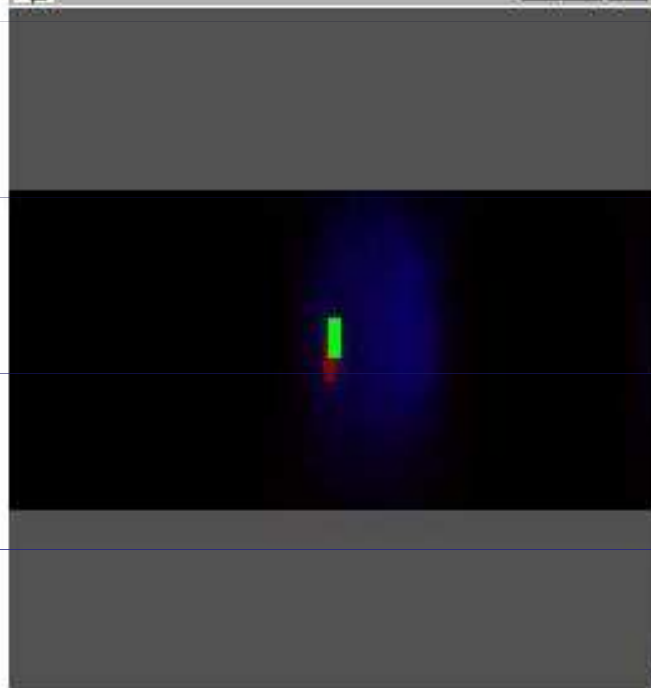
XY projection



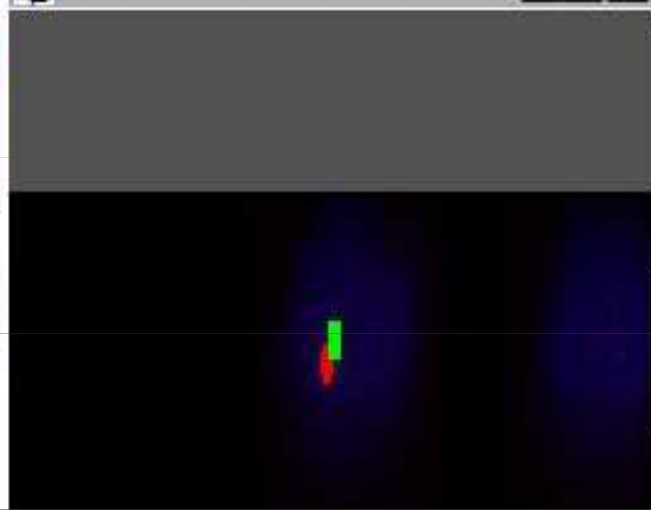
R:000 G:000 B:000 X:364 Y:39

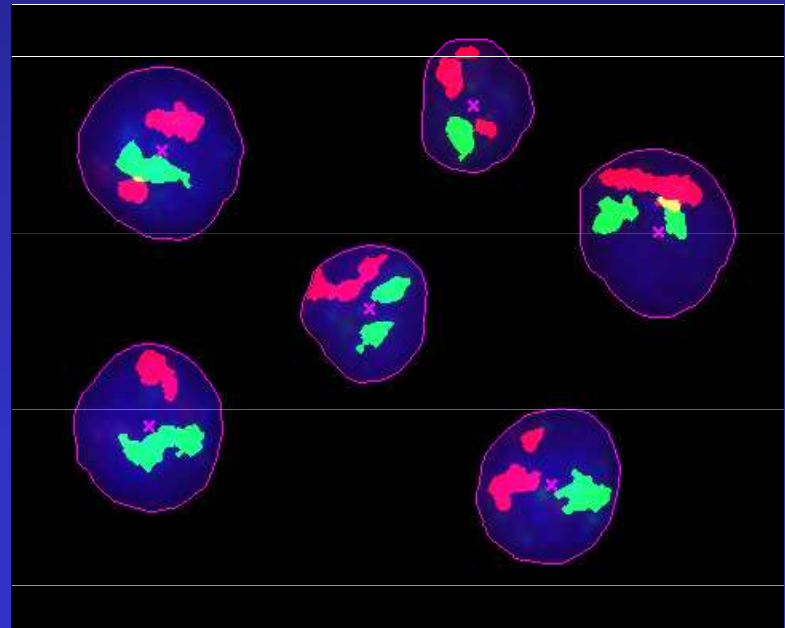
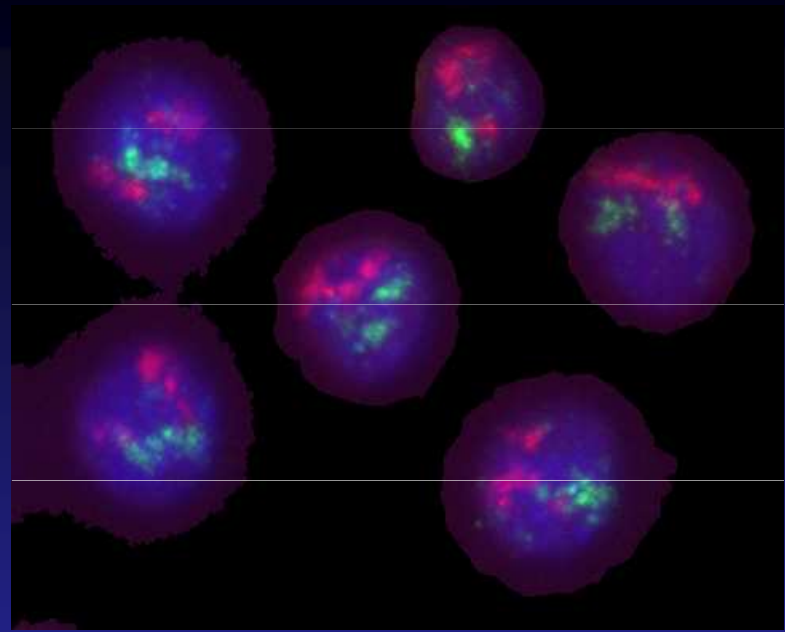
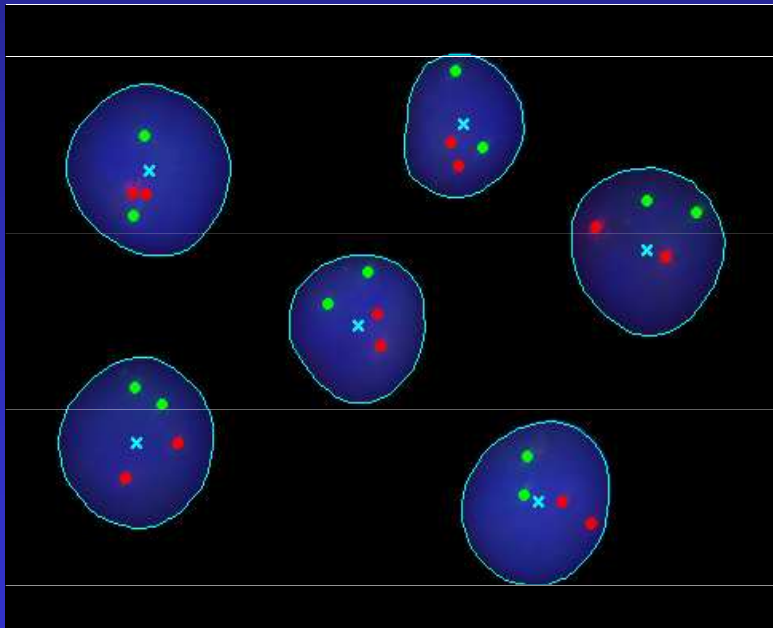
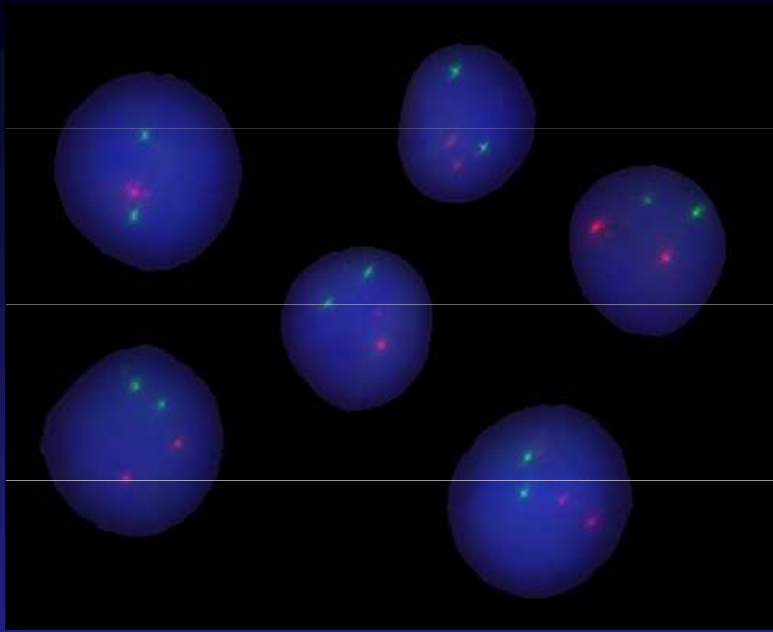


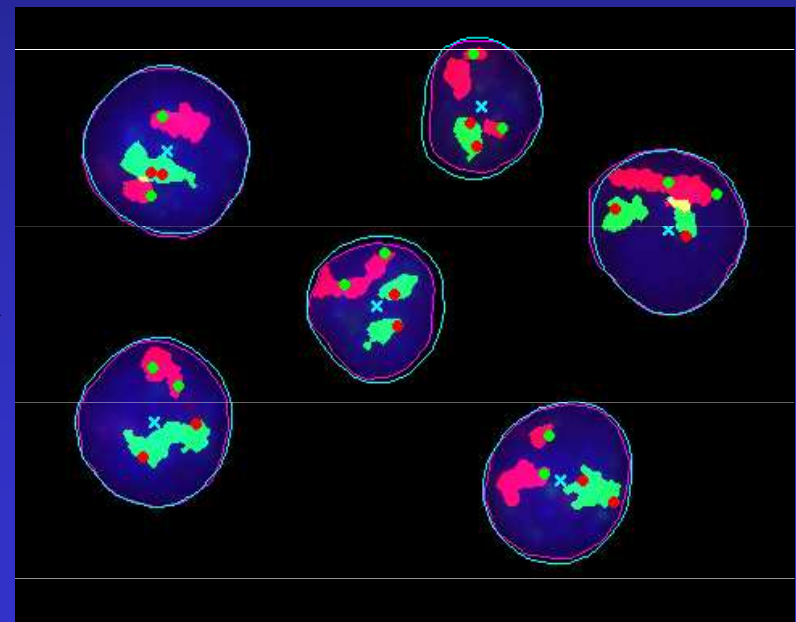
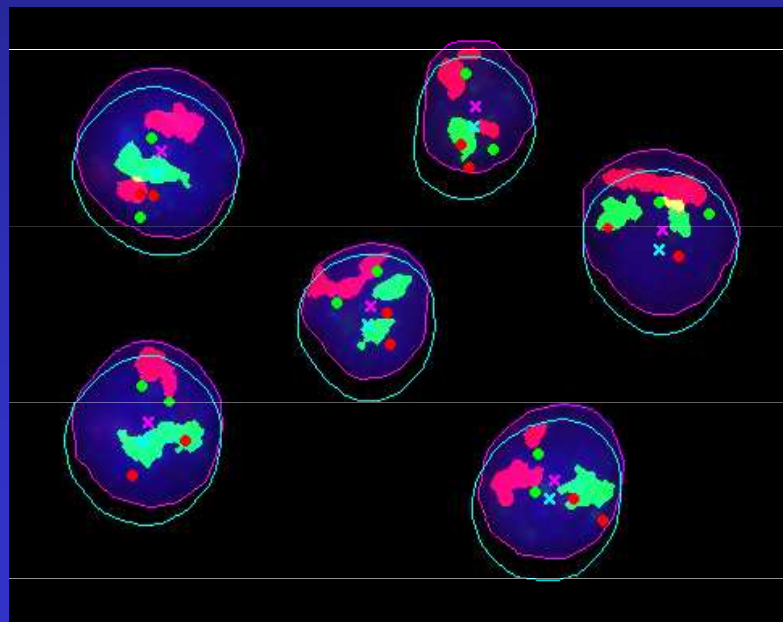
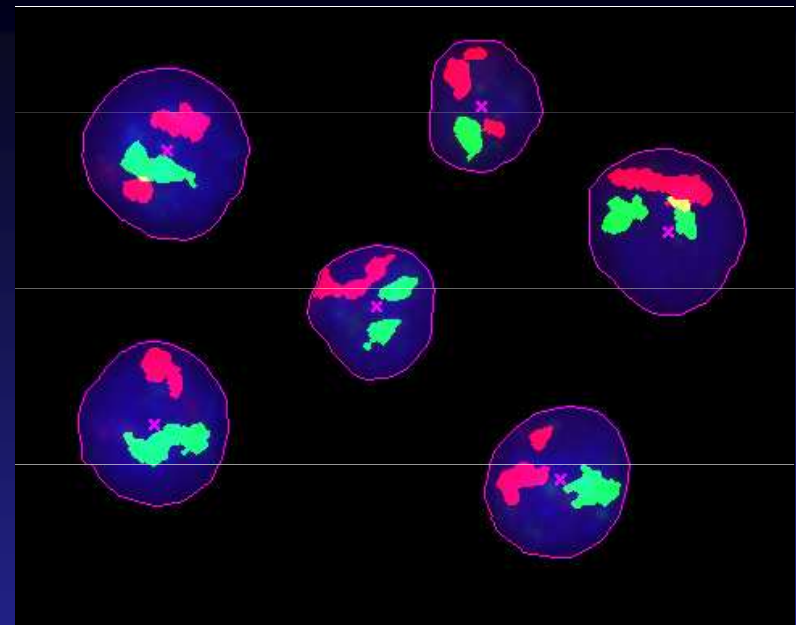
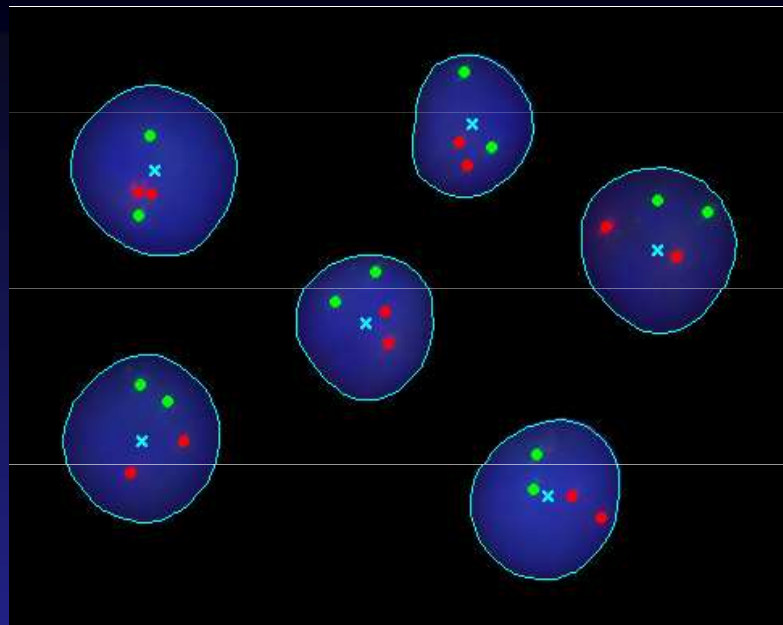
R:000 G:000 B:000 X:354 Y:29

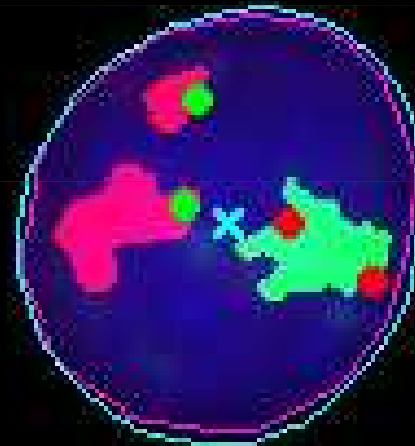
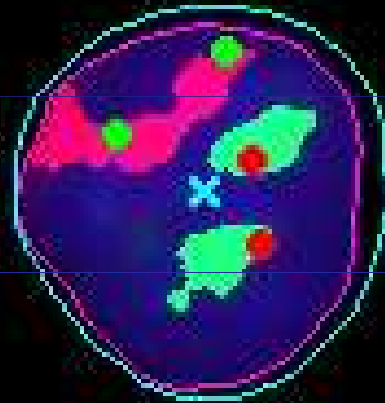
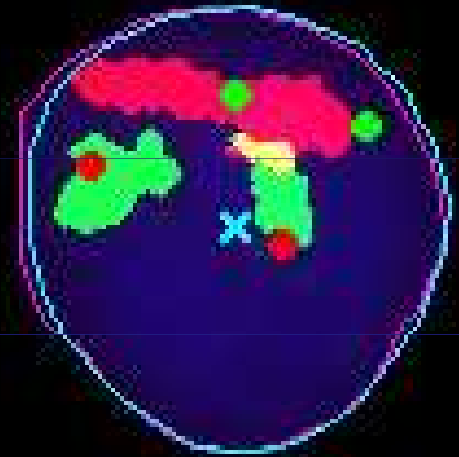
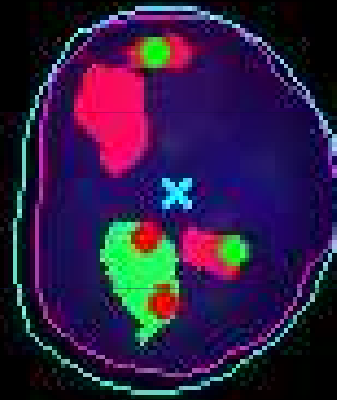
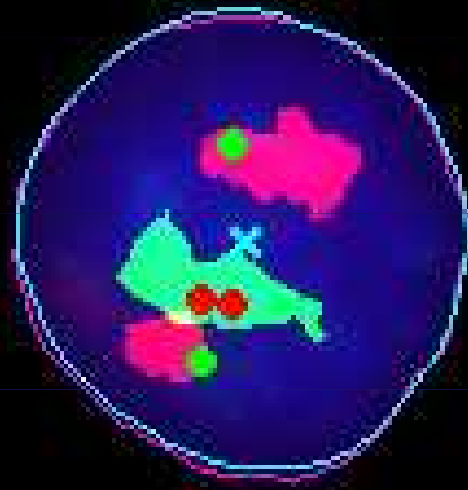


R:000 G:000 B:000 X:136 Y:39

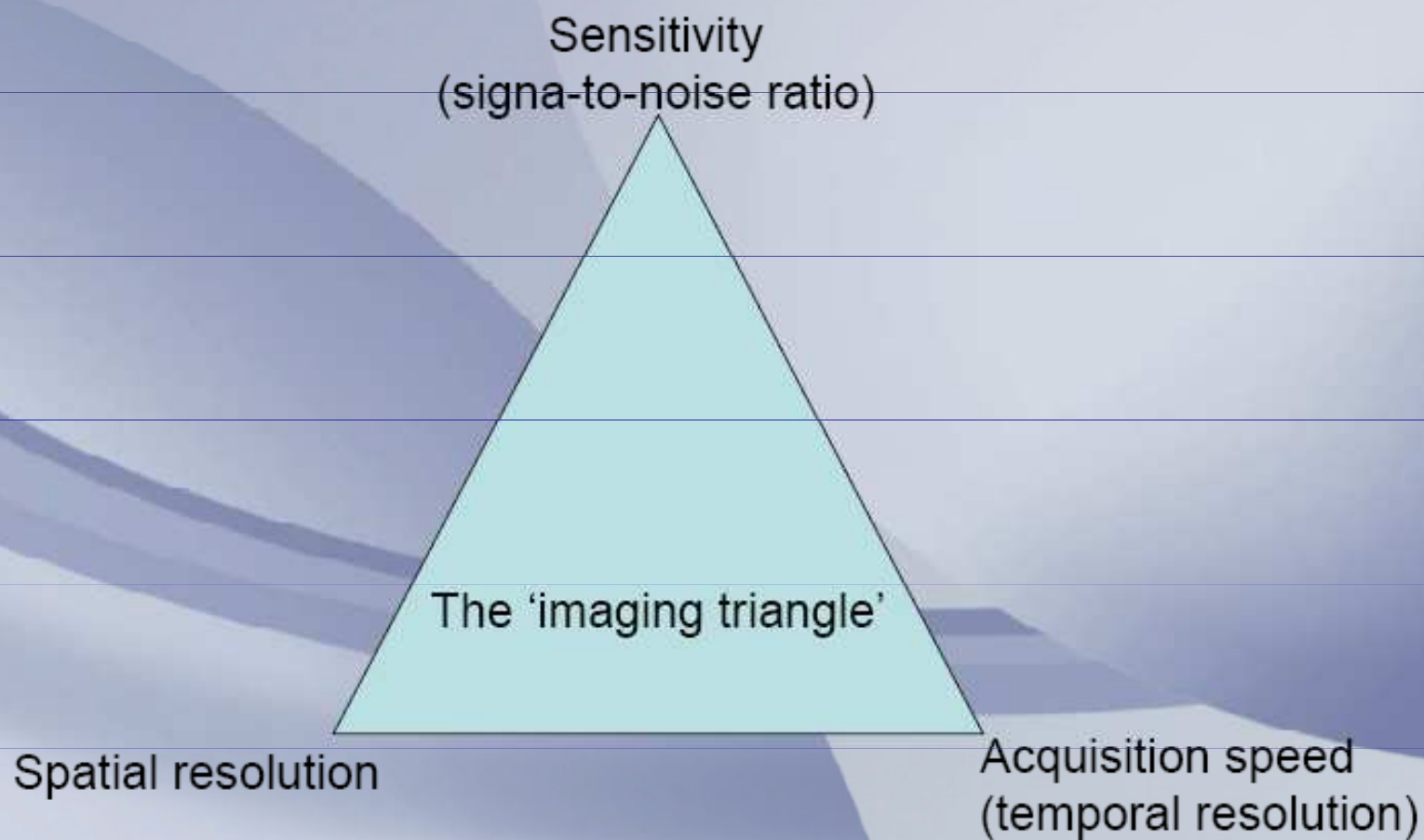








Pro uspokojivé fluorescenční zobrazení  
je nezbytné splnění třech na sobě nezávislých kritérií



## ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP

### Transmisní nebo rastrovací (skenovací)

Na každé místo vzorku je zaměřen úzký paprsek elektronů (prochází jej po řádcích – odtud řádkovací). Interakcí dopadajících elektronů s materiálem vzorku vznikají různě detekovatelné složky. Jak paprsek putuje po vzorku, mění se podle charakteru povrchu úroveň signálu v detektoru. Z těchto signálů je pak sestavován výsledný obraz. Získaný obraz je standardně monochromatický.

Zdrojem elektronů je elektronová tryska, nejčastěji wolframové žhavené vlákno, umístěné v tzv. Wehneltově válci.

Elektrony jsou urychlovány směrem k vzorku urychlovacím napětím (typicky 0,1-30kV).

Svazek elektronů (paprsek) je upravován, zaostřován elektromagnetickými čočkami. Tubus obsahuje zpravidla jednu nebo více kondenzorových čoček, objektivovou čočku, vychylovací cívky rastrů a cívky stigmátorů pro korekci astigmatismu.

# Introduction to Electron Microscopy

- Electron Microscopes were not developed until the Twentieth Century
- The first Transmission Electron Microscope (TEM) was built in 1932
- The first Scanning Electron Microscope (SEM) was built in 1942
- The Scanning Tunneling Microscope was developed in 1982.
- The Atomic Force Microscope was developed in 1985

Transmission Electron Microscope



Scanning Electron Microscope



Scanning Tunneling Microscope

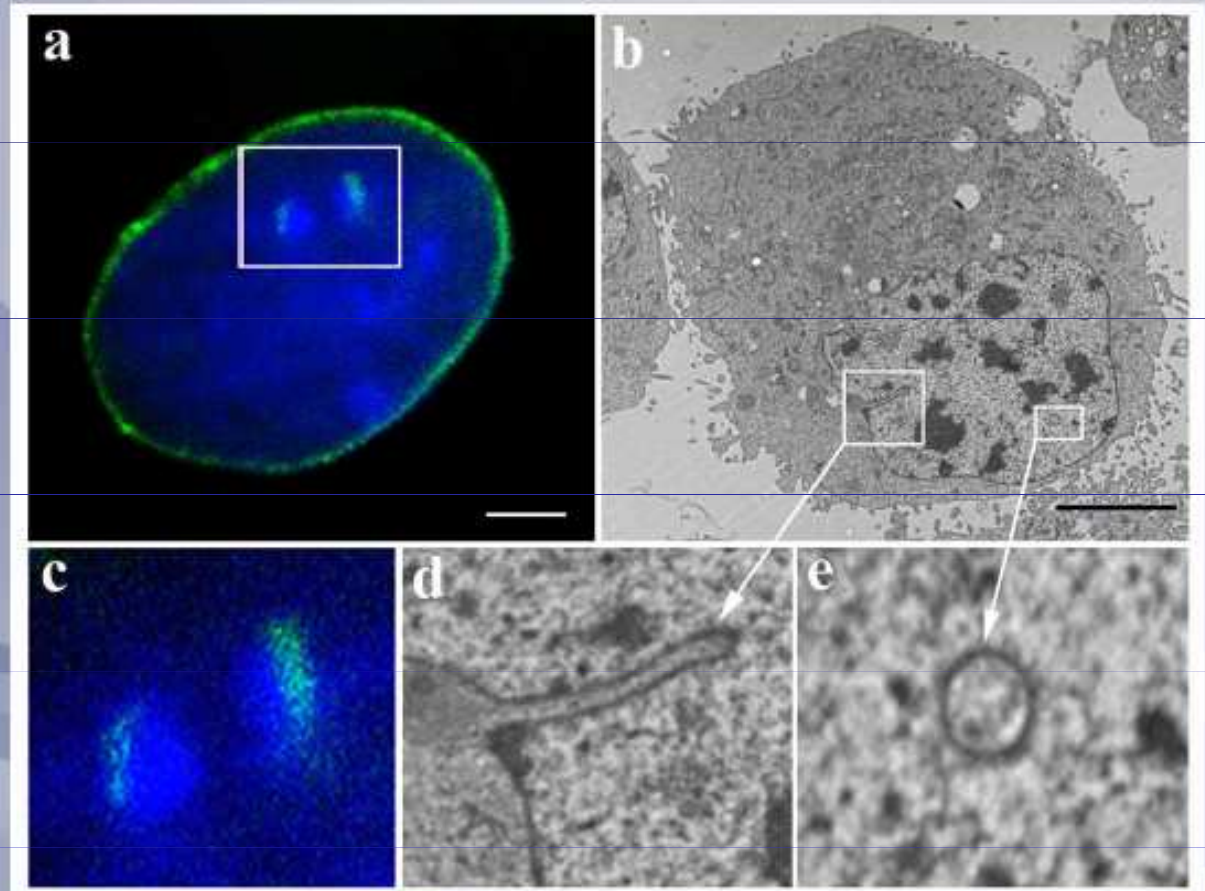


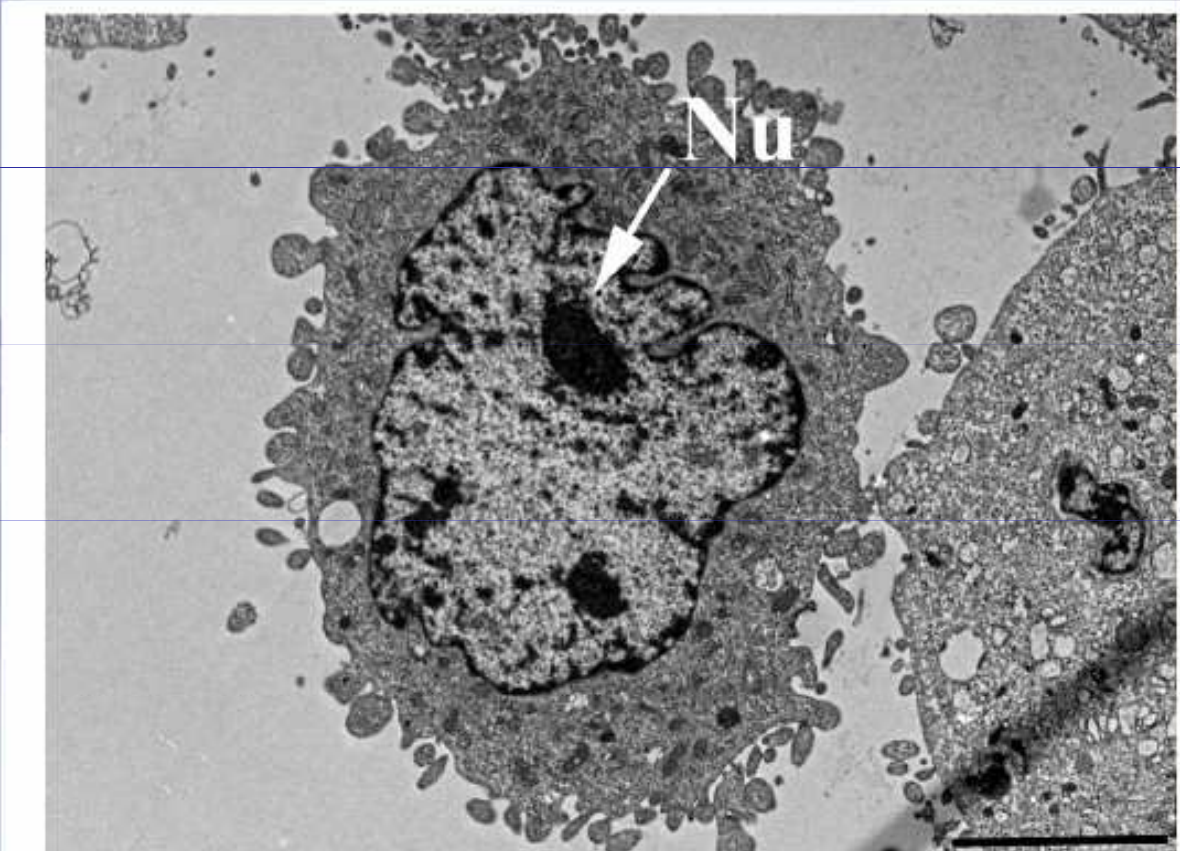
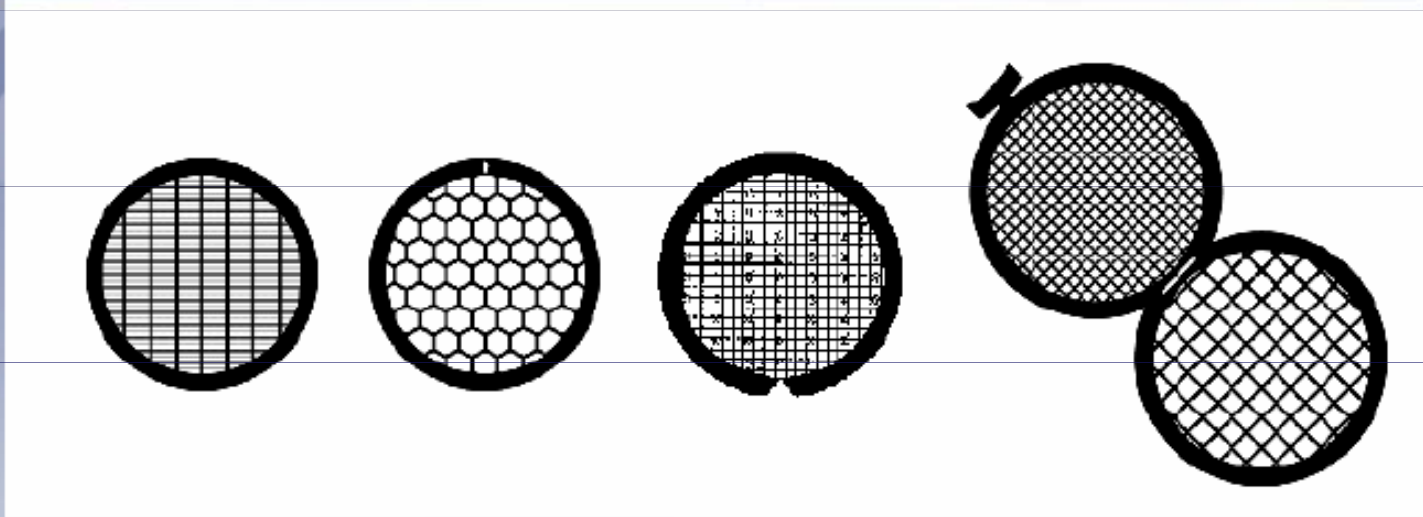
Atomic Force Microscope



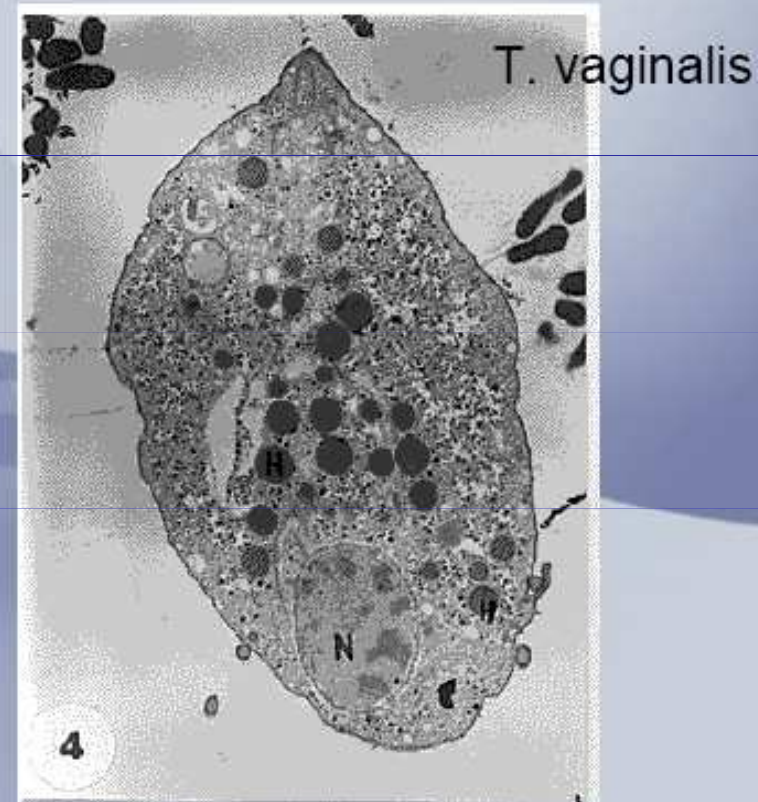
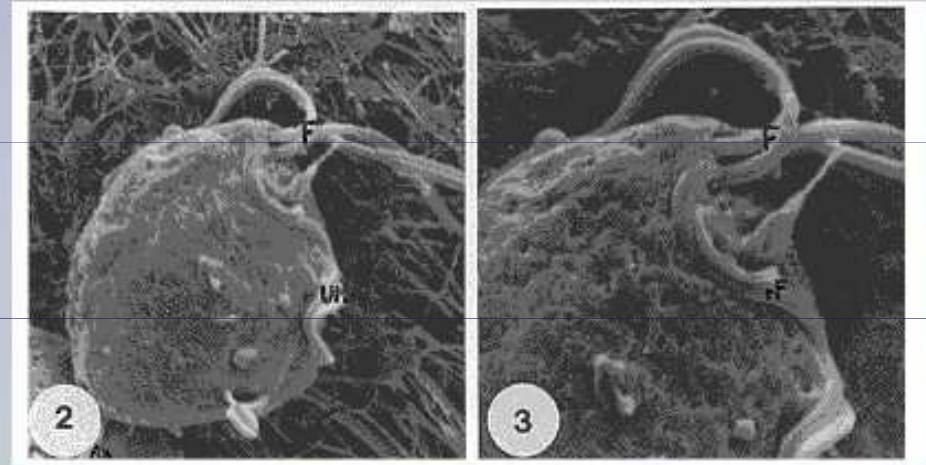
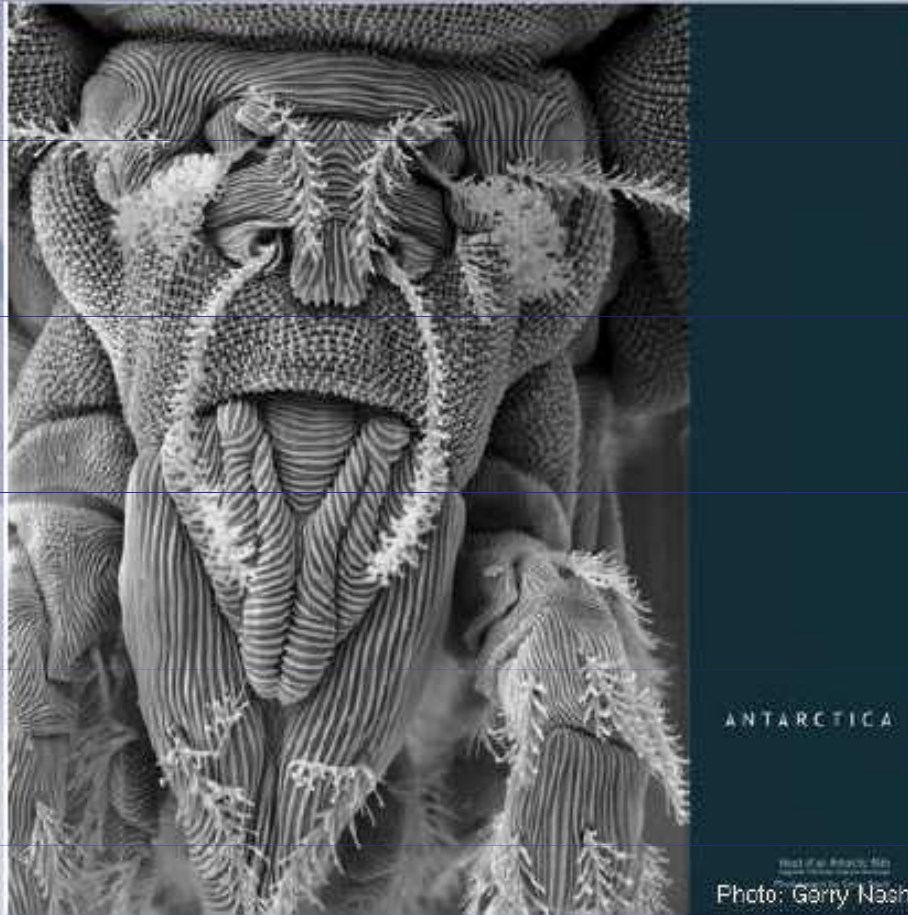


# Transmisní Elektronový Mikroskop (TEM)

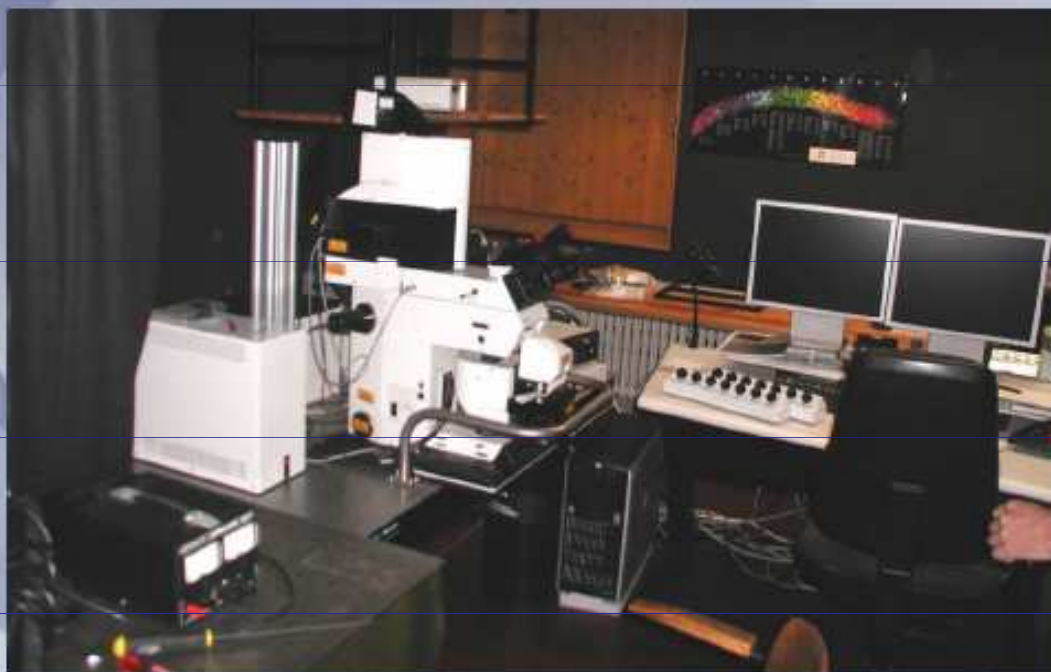




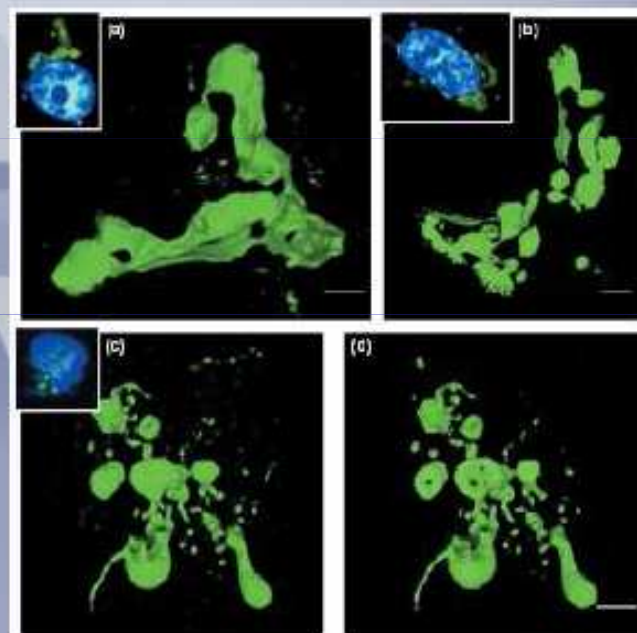
# Skenovací (Rastrovací) Elektronový Mikroskop



## atomic force microscopy - 4Pi

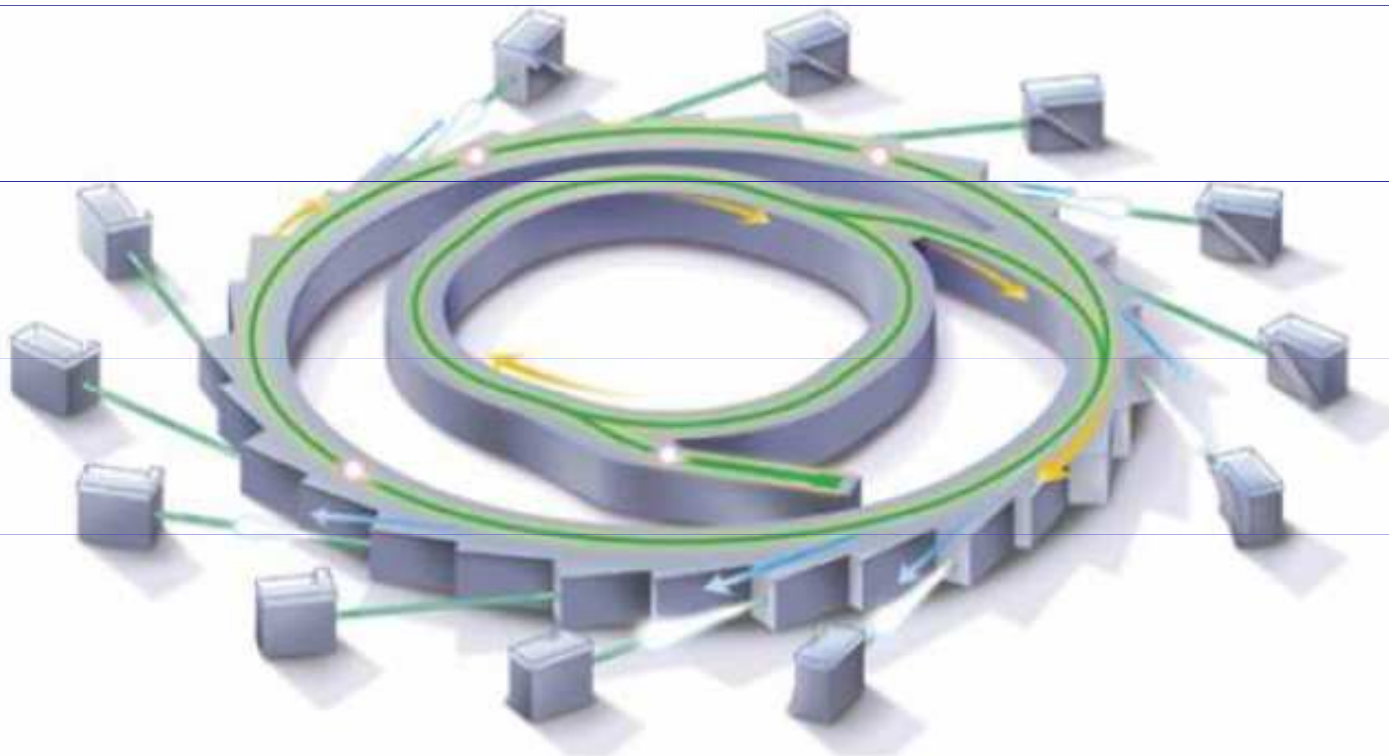


- rozlišení převyšuje možnosti konvenční mikroskopie pomocí double-objective imaging systému podobnému CLSM – nutná zvláštní skla (drahá)
- 4 až 7krát vyšší axiální rozlišení než CLSM/MP
- aplikace limitovaná hloubkou 10 mikronů
- technicky náročný
- nutnost precizně sesazených čoček a velmi precizně nastavený laser
- komerčně dostupný, ale velice drahý



## WHAT IS A SYNCHROTRON

A synchrotron is a device that accelerates electrons to almost the speed of light. As the electrons are deflected through magnetic fields they create extremely bright light. The light is channelled down beamlines to experimental workstations where it is used for research.



## X-RAY MICROSCOPY

Soft X-ray microscopes can be used to study hydrated cells up to 10  $\mu\text{m}$  thick and produce images of 30 nm resolutions. X-ray microscopy, that has the more pronounced properties of laser scanning confocal microscopy (LSCM), has been a long-standing goal for experimental science (Seres et al., 2005). Since the cells are imaged in the X-ray transmissive "water window", where organic material absorbs approximately an order of magnitude more strongly than water, chemical contrast enhancement agents are not required to view the distribution of cellular structures (Meyer-Ilse et al., 2001). In such experiments, cells must be rapidly frozen to be studied on a cryostage, showing information which is closely similar to 4D-living cell observation by LSCM.

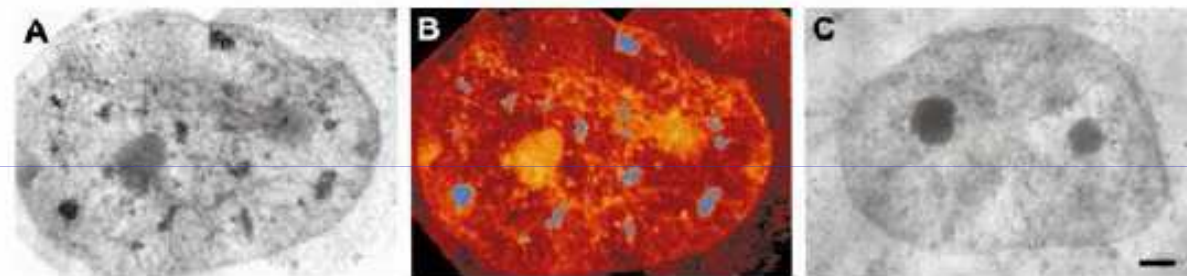


Fig. 4. Nuclei of human mammary epithelial cells (T4) labelled for RNA splicing factor (SRm300). (A) X-ray micrograph of a single nucleus after silver enhancement. This image is a montage compiled from two individual X-ray microscope images. (B) Same nucleus after colour coding to emphasize the label. (C) Control; single nucleus that was exposed to secondary antibodies and silver enhancement but not primary antibodies. This image is a montage compiled from two individual X-ray microscope images. Magnification = 2400 $\times$ , 0.034 NA with 20 nm pixel size at 517 eV ( $\lambda = 2.4$  nm).