



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ
INVESTICE DO VAŠÍ BUDOUCNOSTI



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Kvalab



**VYSOKÁ ŠKOLA
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
V PRAZE**



OP Výzkum a vývoj
pro inovace

3D SIM

3D STRUKTURNÍ ILUMINAČNÍ MIKROSKOP

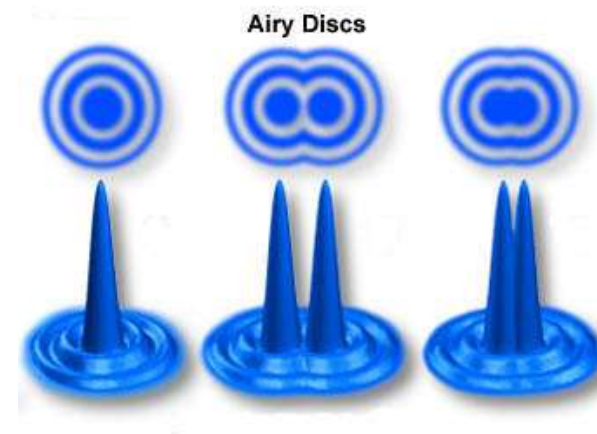
Ústav biochemie a mikrobiologie (320)

Silvie Rimpelová: silvie.rimpelova@vscht.cz; tel.: 4360

Fluorescenční mikroskopie

- limitace při zobrazování velmi malých objektů, které jsou objekty zájmu
- objekty $<200\text{-}500\text{ nm}$ se jeví rozmazané (difrakční limit)
- “rozšíření” bodu díky difrakci - rozptylová funkce (PSF, „point spread function”)

- objekty, které jsou od sebe blíže než $d \sim \lambda/2NA$ nemohou být rozlišeny jako jednotlivé body



Vysokorozlišovací fluorescenční mikroskopie

- Strukturní iluminační mikroskopie (SIM)
- Lokalizační fluorescenčně mikroskopické techniky (PALM, FPALM, STORM, dSTORM, GSDIM...)
- Mikroskopie využívající stimulované deplece emise (STED, RESOLFT)

Nobelova cena za chemii 2014



E. Betzig



S. W. Hell

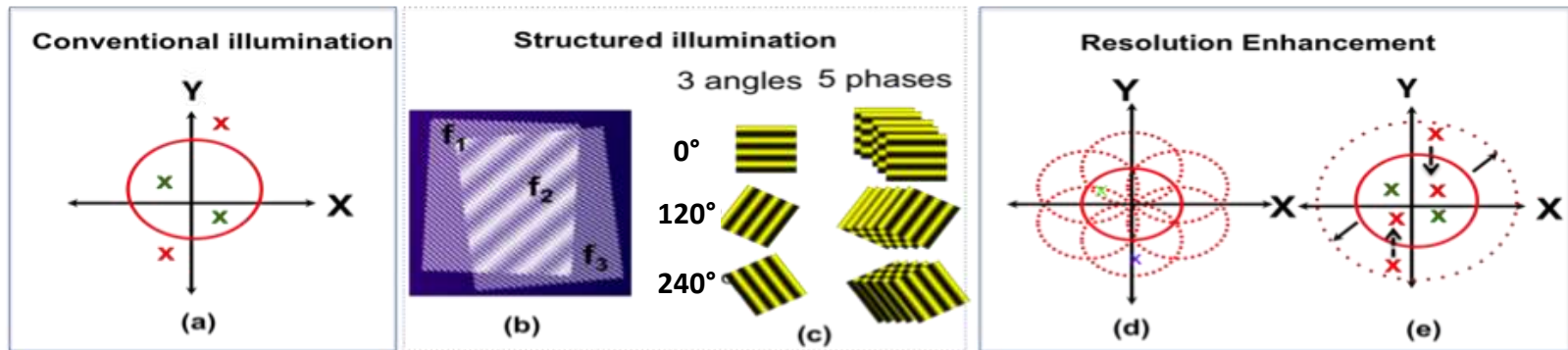


W. Moerner

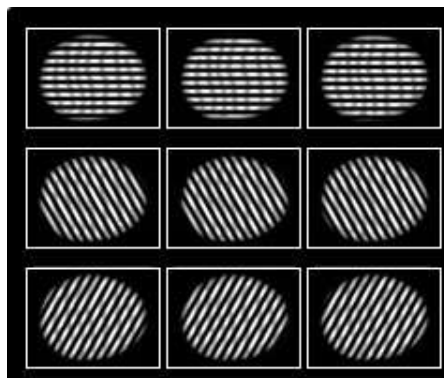


M. Gustafsson
1960–2011

Princip SIM



- excitace struktury neuniformním světelným vzorem - posun v prostorových frekvencích vzorku, vznik „Moiré fringes“
- 3D SIM: laterální posun iluminační mřížky (5 fází), 3 úhly, záznam prostorově modulovaných obrazů

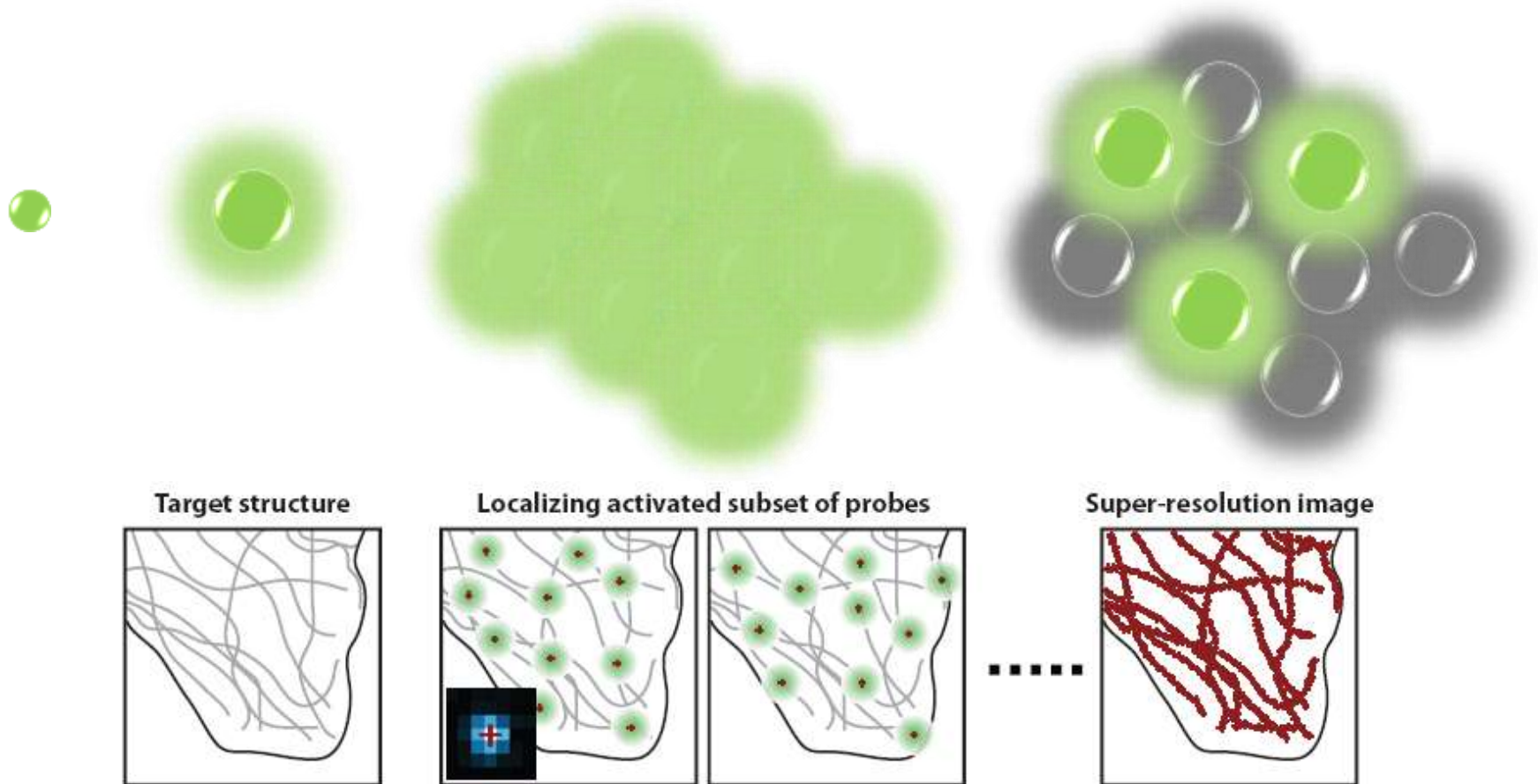


Rekonstrukce obrazu



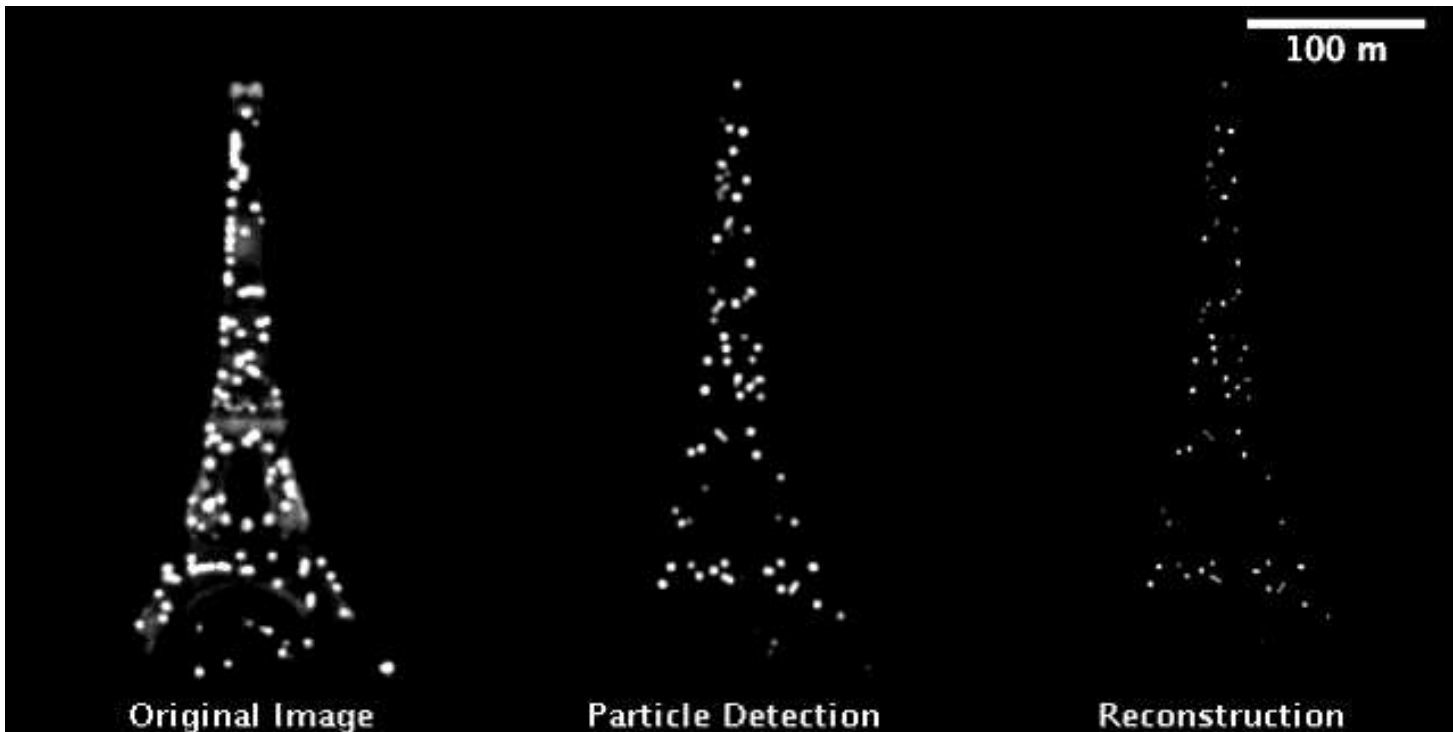
80-100 nm (x, y)
250 nm (z)

Princip PALM/STORM



Zhuang, 2009, Nat. Phot.

Princip PALM/STORM



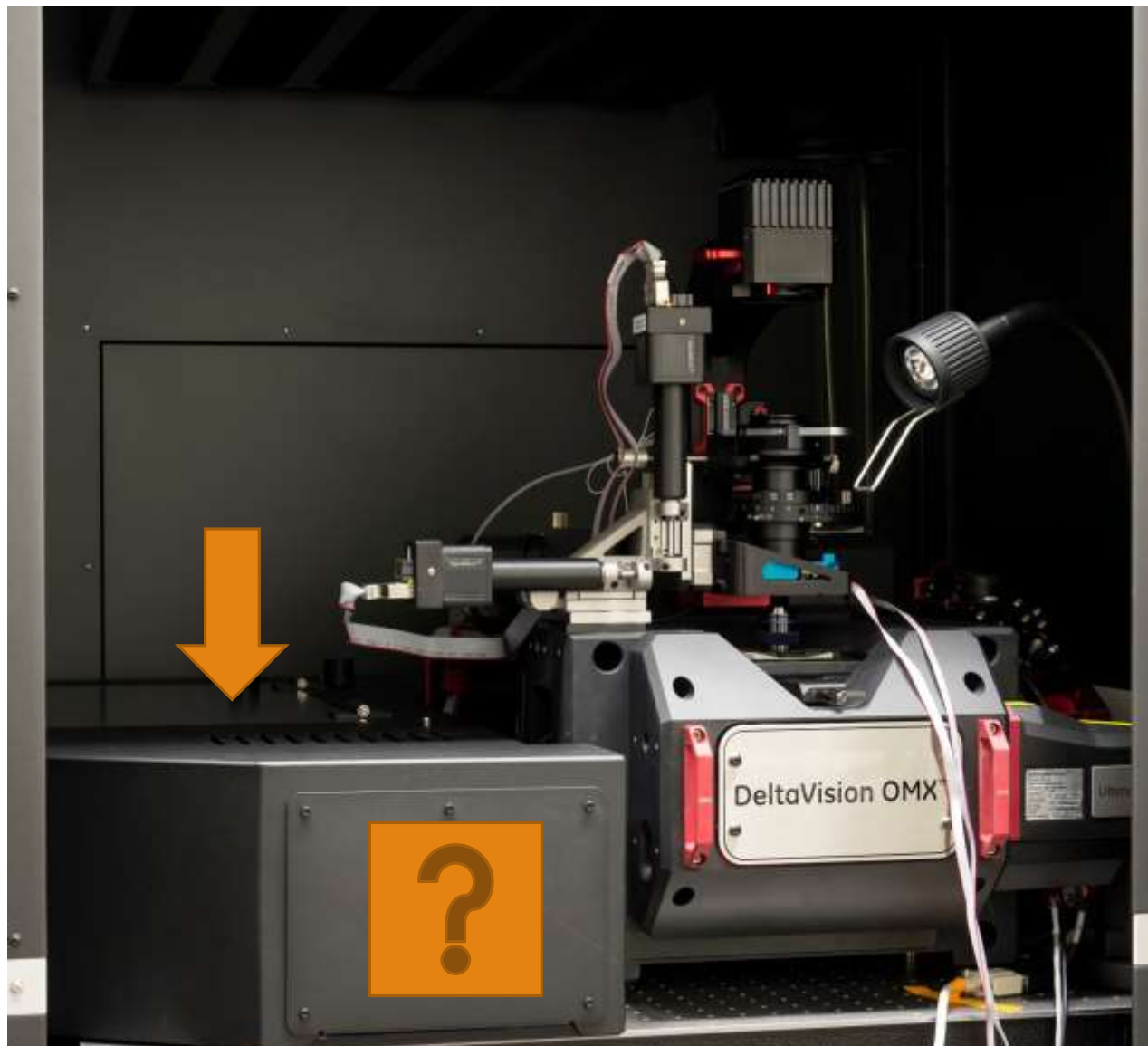
Ricardo Henriques, QUICKPALM

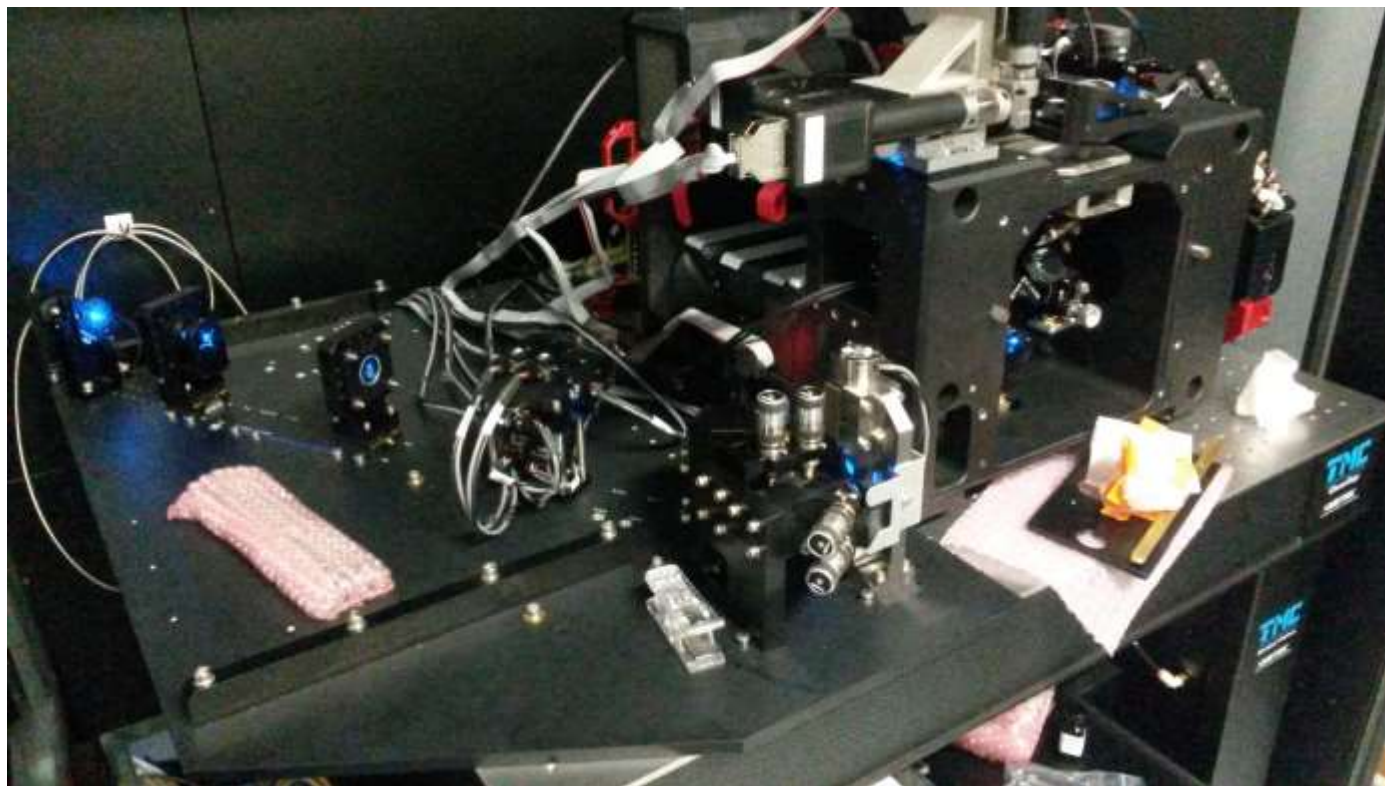
10-20 nm (x, y)
50 nm (z)

OMX Blaze

- GE Healthcare Life Sciences
- „wide-field“/TIRF optická dráha
- SIM optická dráha
- PALM/STORM
- lasery: **405, 488, 642 nm** (v budoucnu snad 568 nm)
- kamery: 2 x sCMOS (2560 x 2160 px., velikost px. 6.45 μm)
- hardwarový autofokus
- x/y/z nanoposuvný stolek
- počítače: OMX Master Workstation, OMX Analysis Workstation













Objektivy

- 60x, NA 1.30, silikonová imerze (mikroskopie živých buněk - SIM)
- 60x, NA 1.42, olejová imerze (2D a 3D SIM)
- 100x, NA 1.49, olejová imerze (TIRFM, PALM/STORM)



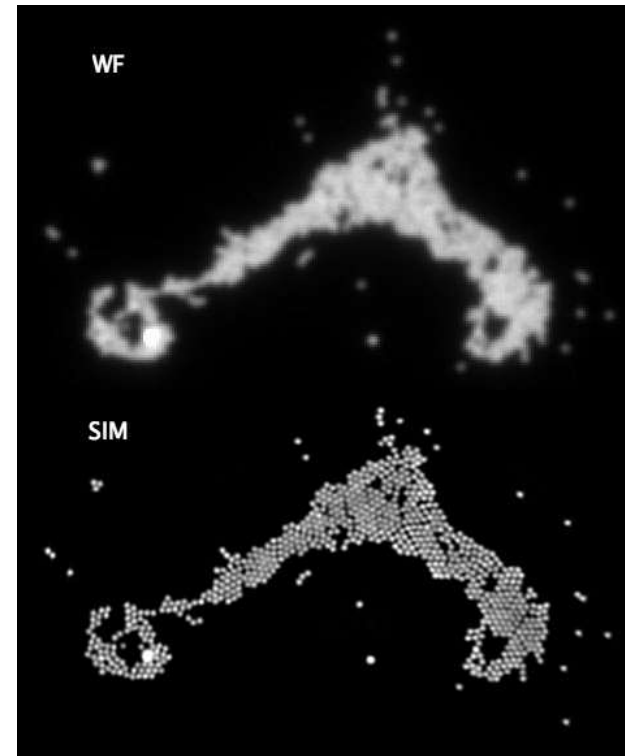
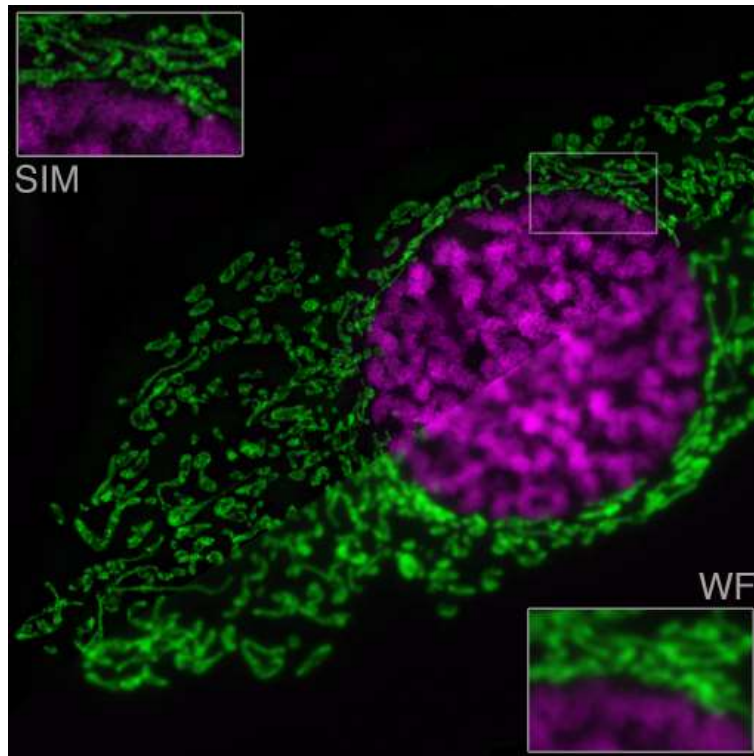
Fluorescenční mikroskopie s OMX Blaze

- mikroskopie ve viditelném světle, fázový kontrast
- „wide-field“ fluorescenční mikroskopie fixovaných a živých preparátů (multipoint) + dekonvoluce
- **2D a 3D strukturní iluminační mód**
- **TIRFM („total internal reflection fluorescence“ mikroskopie)**
- **PALM (fotoaktivační lokalizační mikroskopie)**
- **STORM (stochastická optická rekonstrukční mikroskopie)**

příklady

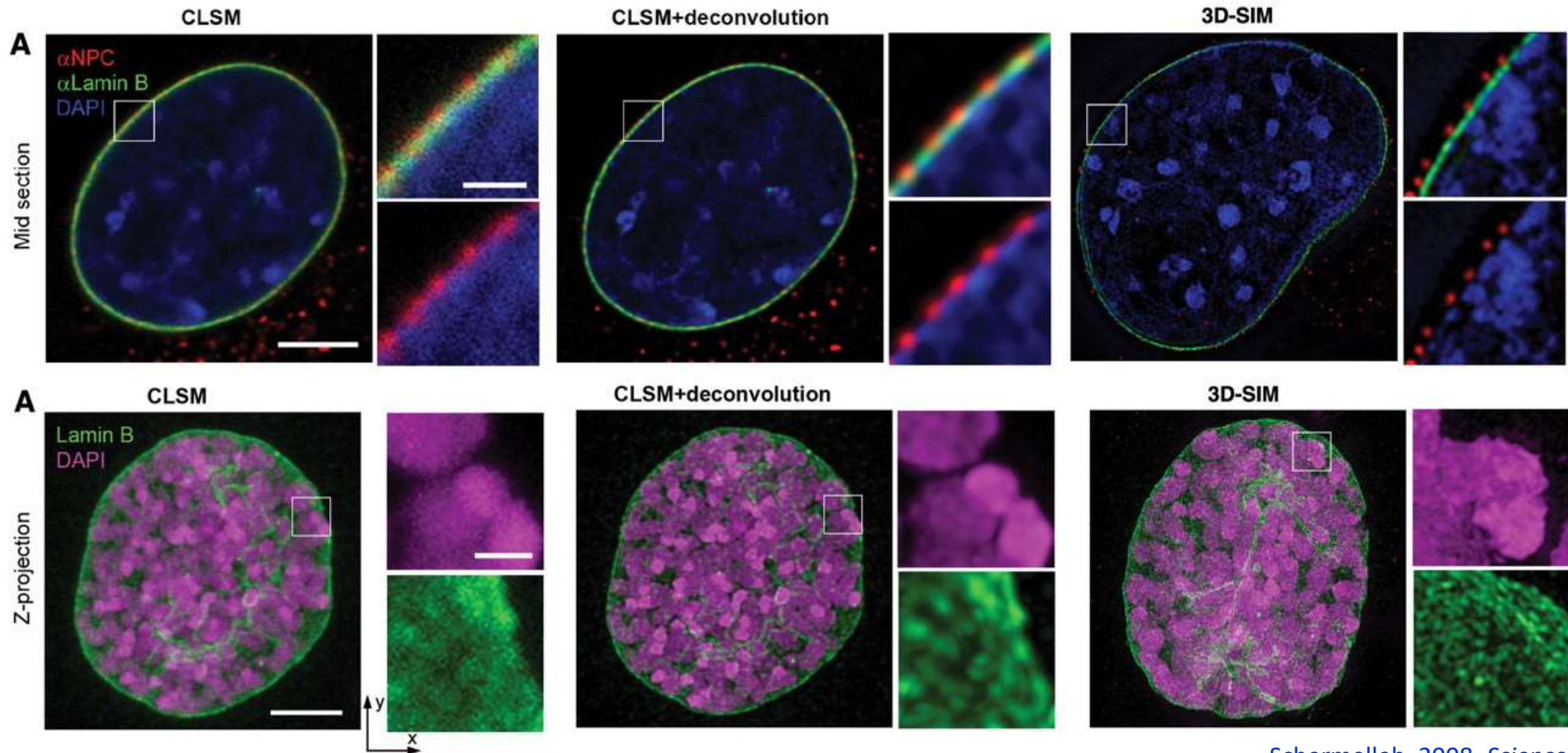


„Wide-field“ fluorescenční mikroskopie vs. SIM



<http://omx.hms.harvard.edu/>

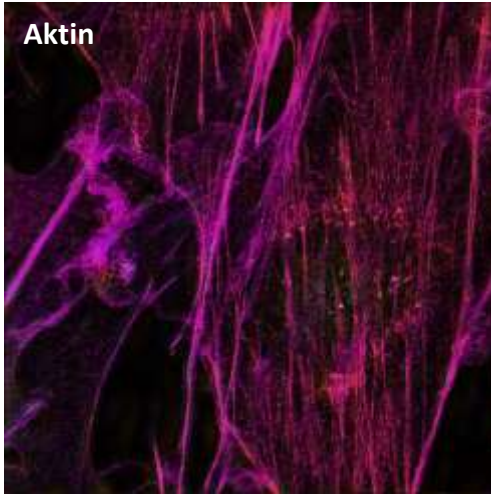
Konfokální mikroskopie - dekonvoluce vs. SIM



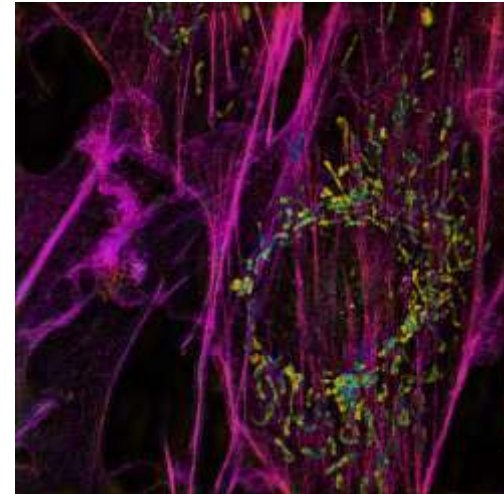
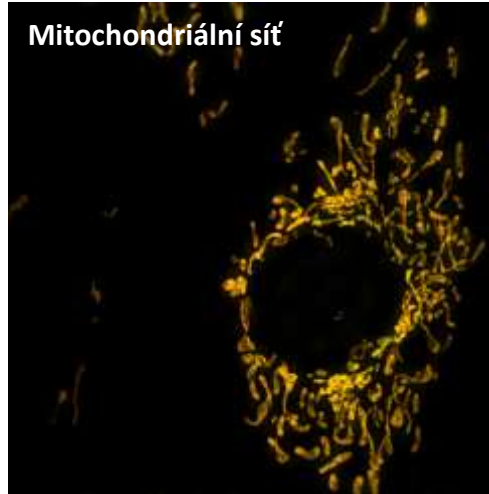
Schermelleh, 2008, *Science*

3D-SIM

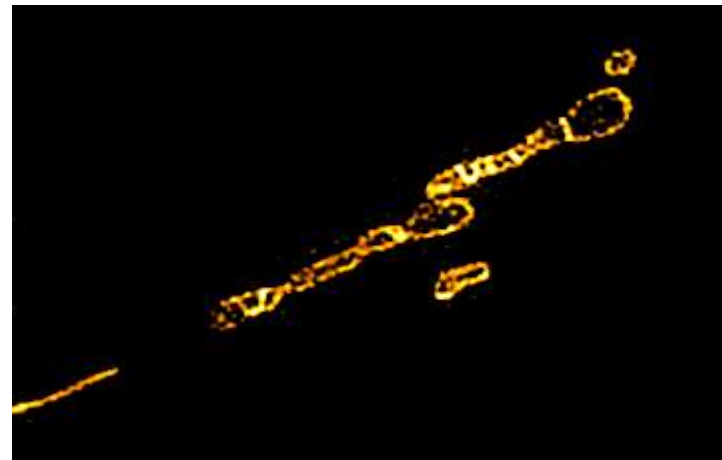
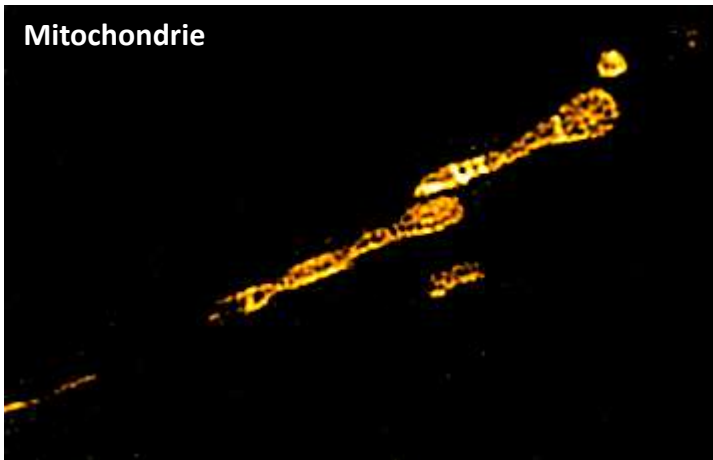
Aktin

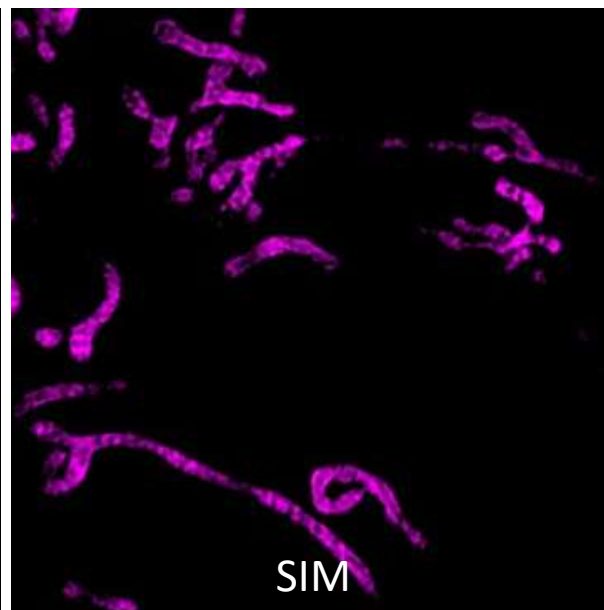
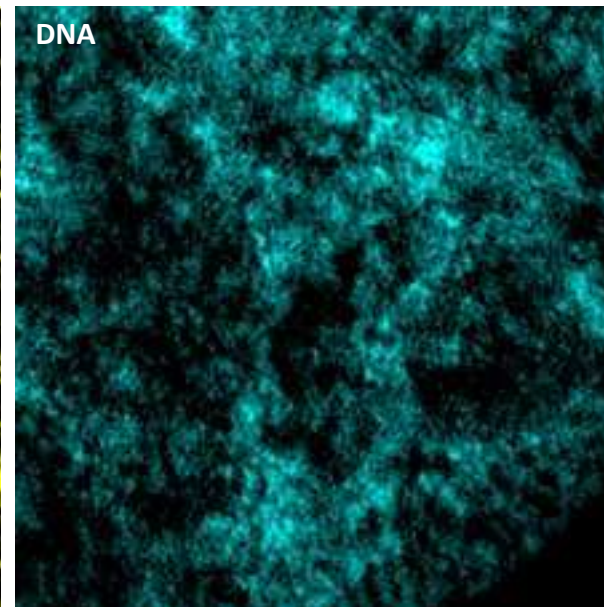
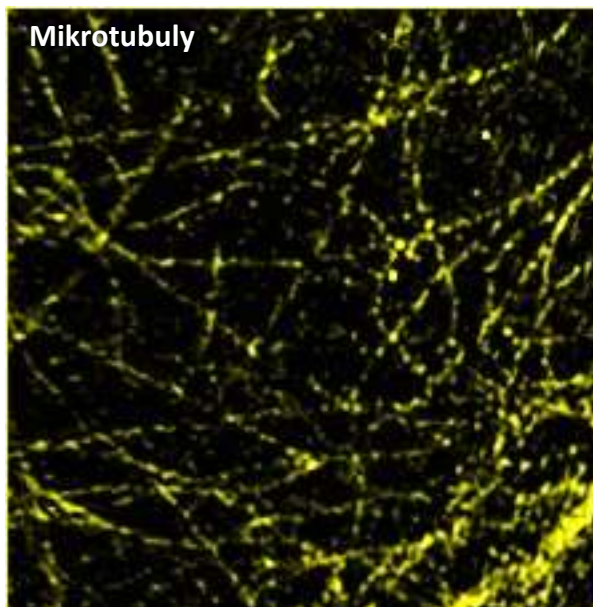
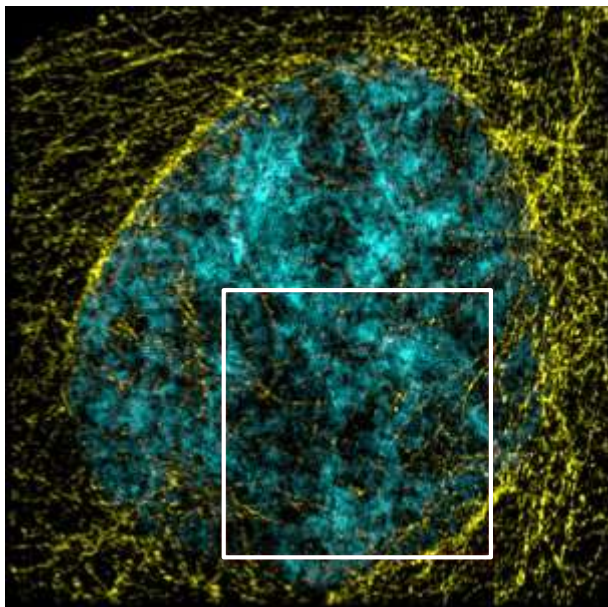


Mitochondriální síť



Mitochondrie





Mikrotubuly

DNA

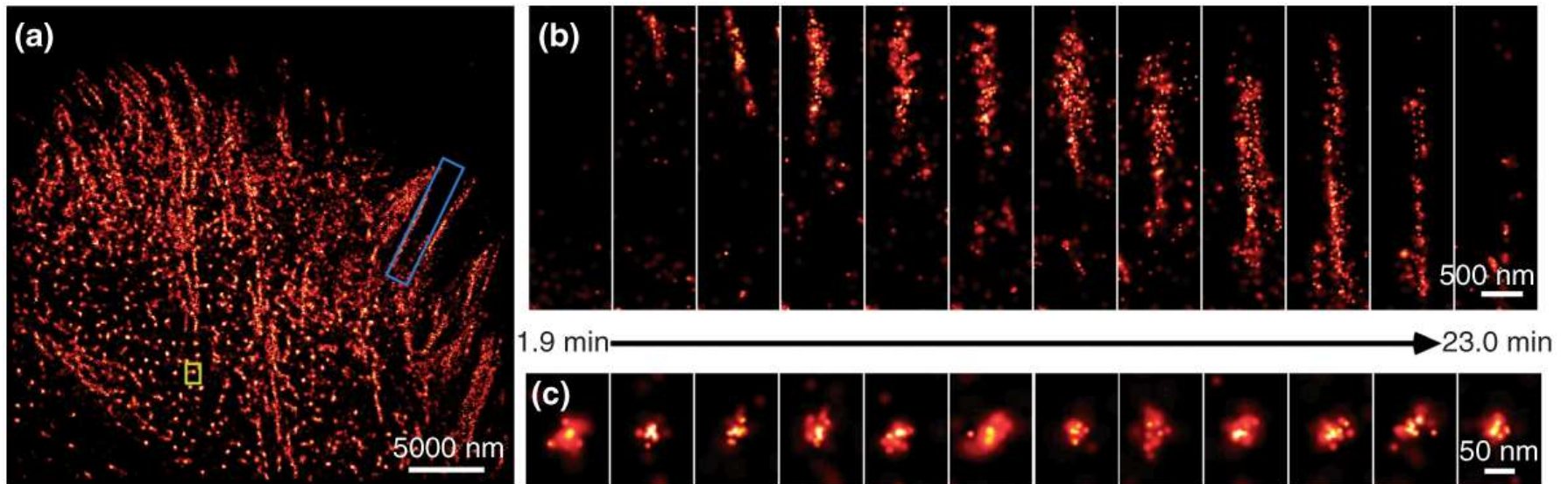
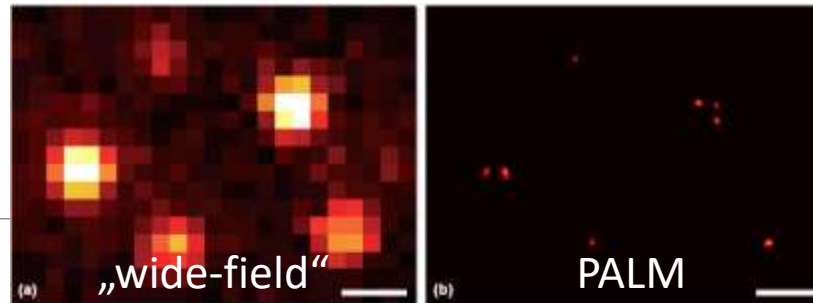
Mikrotubuly / jádro

Mitochondrie

„wide-field“

SIM

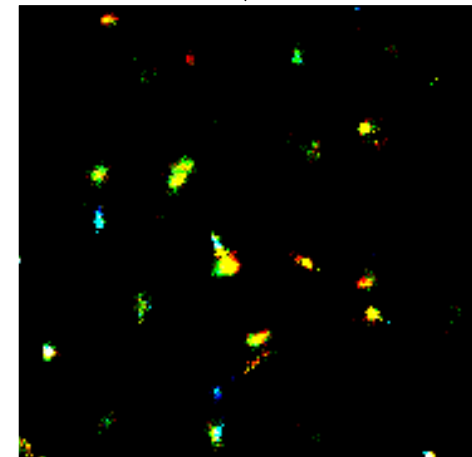
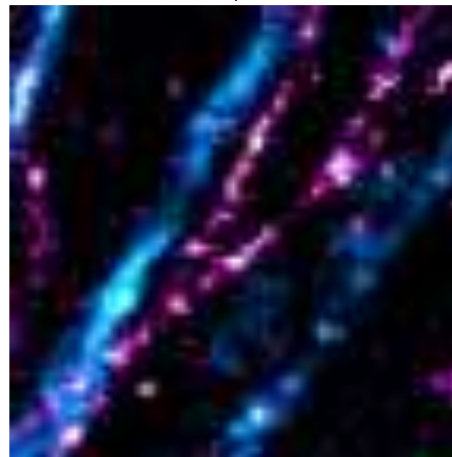
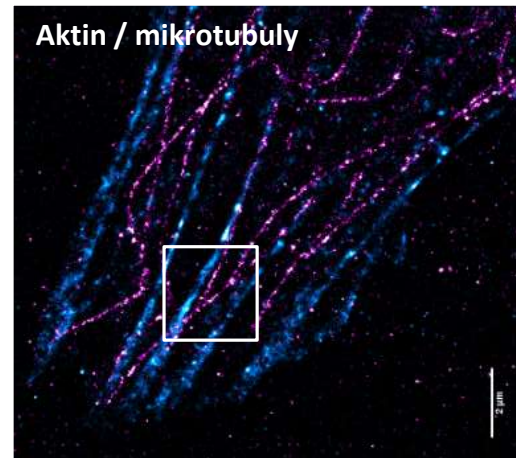
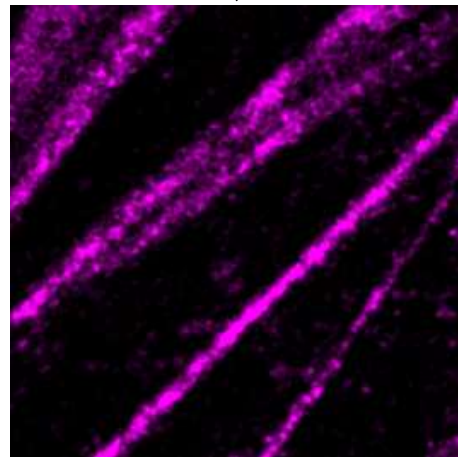
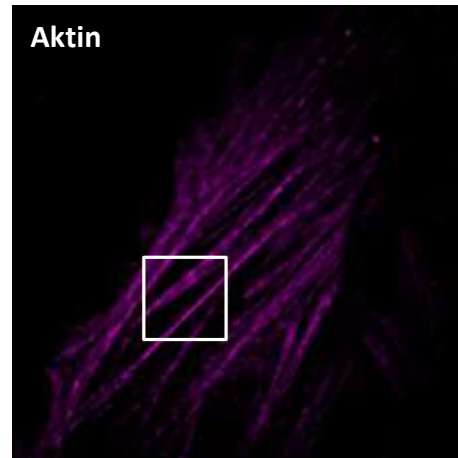
PALM



Betzig, 2008, *Nat. Methods*

- fokální adheze, paxilin v živých buňkách zobrazený metodou PALM (rozlišení 60 nm)

dSTORM



SIM *vs.* PALM/STORM

- nenáročná příprava vzorků
- možnost použití konvenčních fluoroforů (GFP)
- snímání živých dějů
- rozlišení cca 80-100 nm (x,y), 250 (z)
- vysoká rychlost

- náročná příprava vzorků
- fotoaktivovatelné FP, Alexa, Atto fluorofory
- vhodné zejména pro fixované preparáty
- rozlišení až 10-20 nm (x,y), 50 (z)

Další možné aplikace

Photokinetic methods	Biological Applications
FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) – single and multipoint	Affinity, biomolecular cycling, biomolecular environment, structural kinetics
Pattern photobleaching	Compartmental analysis, biomolecular cycling, transport
FLIP (Fluorescence loss in photobleaching)	Compartmental analysis, biomolecular cycling, transport, structural visualization
Photoactivation	Compartmental analysis, affinity, biomolecular cycling, transport, biomolecular environment, cell fate, structural kinetics, structural visualization
FRET (Förster resonance energy transfer)	Affinity, biomolecular environment
FRAP/FRET	Compartmental analysis, biomolecular cycling, transport, affinity, biomolecular cycling, biomolecular environment
Background reduction	Structural visualization

Kontaktní informace

Ústav biochemie a mikrobiologie (320)

Silvie Rimpelová: silvie.rimpelova@vscht.cz; tel.: 4360