

Inovace předmětu KBB/MIK

SVĚTELNÁ A ELEKTRONOVÁ

MIKROSKOPIE

Rozvoj a internacionalizace chemických
a biologických studijních programů na
Univerzitě Palackého v Olomouci

CZ.1.07/2.2.00/28.0066



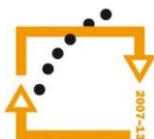
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Přednáška 4_2

Konfokální mikroskopie

Superrozlišovací mikroskopie

Pavla Válová, 2018

Konfokální mikroskopie

Rozmach optické mikroskopie v posledních letech (konec 20. a začátek 21. století)

- **vysoká kvalita nových objektivů navrhovaných počítači**
- **spojení mikroskopů s vyspělou videotechnikou**
- **technologické pokroky ve vývoji laserů, polovodičových detektorů světla (CCD kamer) a počítačů**
- **automatizace mikroskopu**

(zahrnuje motorizaci: revolverové hlavy, kondenzoru, osvětlení, fluorescenčního osvětlovače, nosičů filtrů, zaostřování)

Konfokální mikroskopie

U preparátů **silných nad 20 μm** je prudce snížen obrazový kontrast potlačením jemných strukturálních detailů nacházejících se mimo zaostřenou rovinu

→ **rušivé zamlžení obrazu**

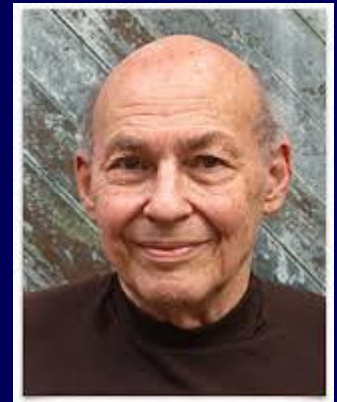
1957 – patent na konfokální mikroskop

Marvin Minski (americký vědec)

rozvoj - konec 70. let

(podíl i našich vědců

- Mojmír Petrář a Milan Hadravský; Nipkowův kotouč, patent v r. 1968)



www.computerhistory.org

Konfokální mikroskop



FluoViewFV1000,
Olympus
botany.upol.cz

Zdroj světla: laserový paprsek zaostřený na clonku

Pozn.: **konfokální** = **konjugovaný** + **fokální** (tj. sdružený s ohniskem; do stejného bodu je zaostřen paprsek osvětlující i paprsek zprostředkující pozorování)

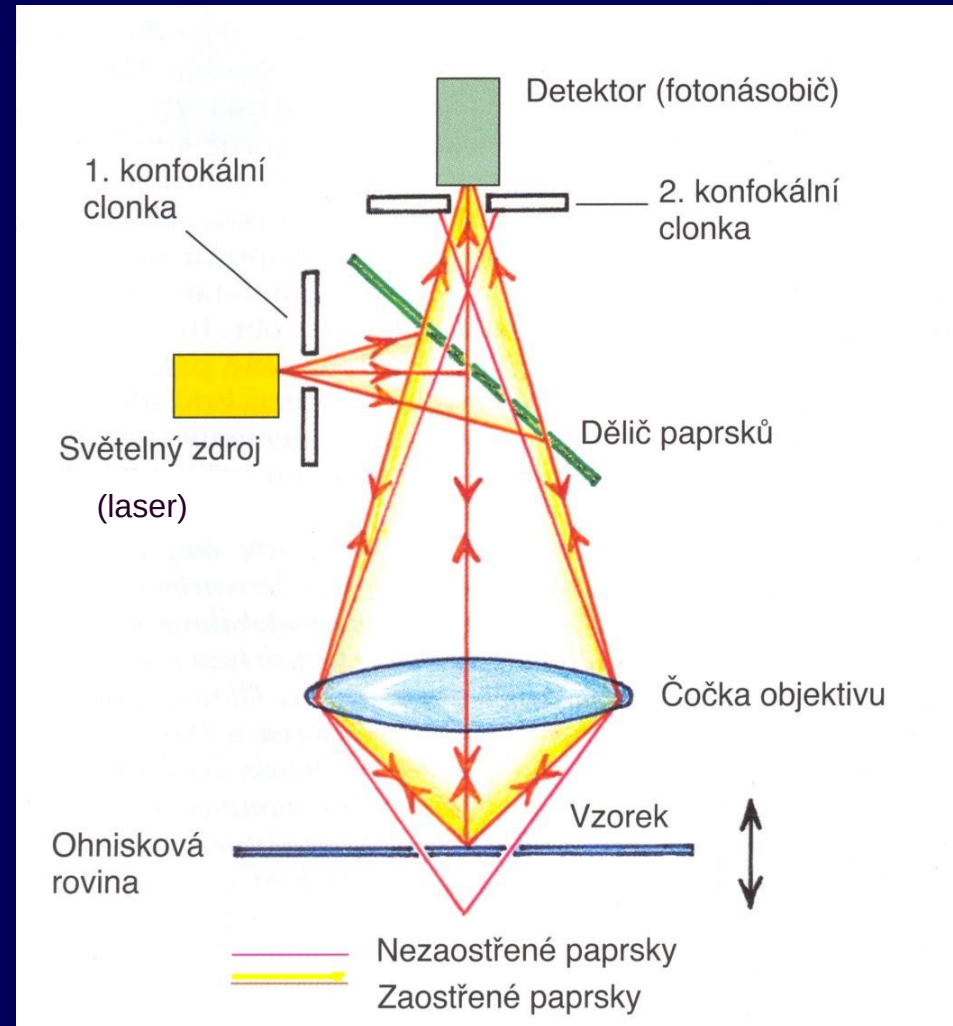
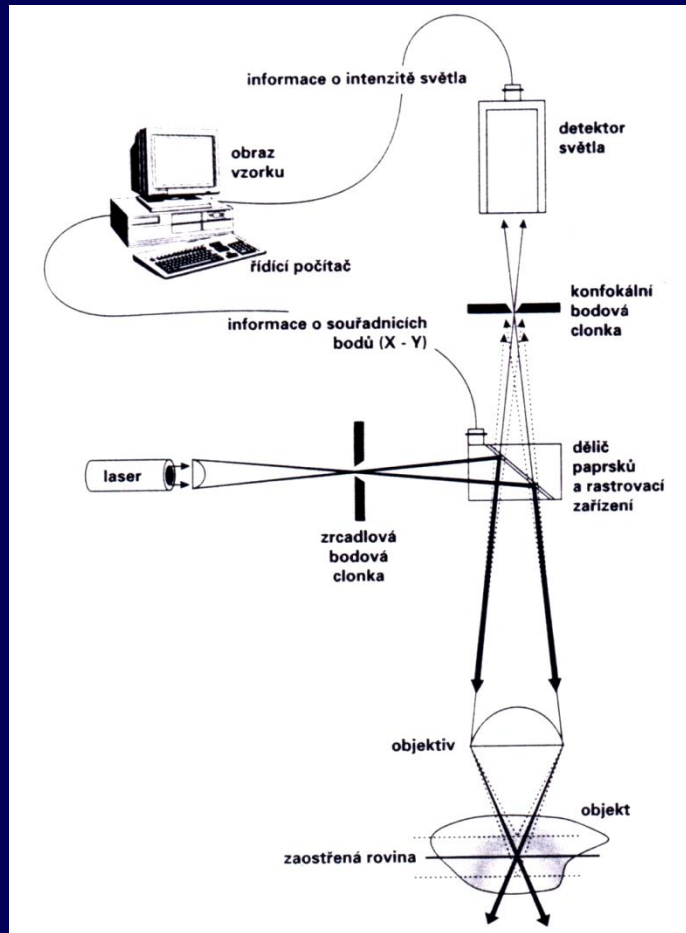
Konfokální mikroskop



LSM 710 Zeiss

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
(Ing. Tomáš Takáč, Ph.D.)

Konfokální mikroskop - schéma



Podle J. Pláška: Konfokální mikroskop.
Vesmír 9, 1995.

L. Kubínová: Pohledy do trojrozměrného mikrosvěta:
konfokální a dvoufotonová mikroskopie.
Živa 6/2006, 245-248.

2 clonky = pinhole

Konfokální mikroskopie

■ Chod paprsků:

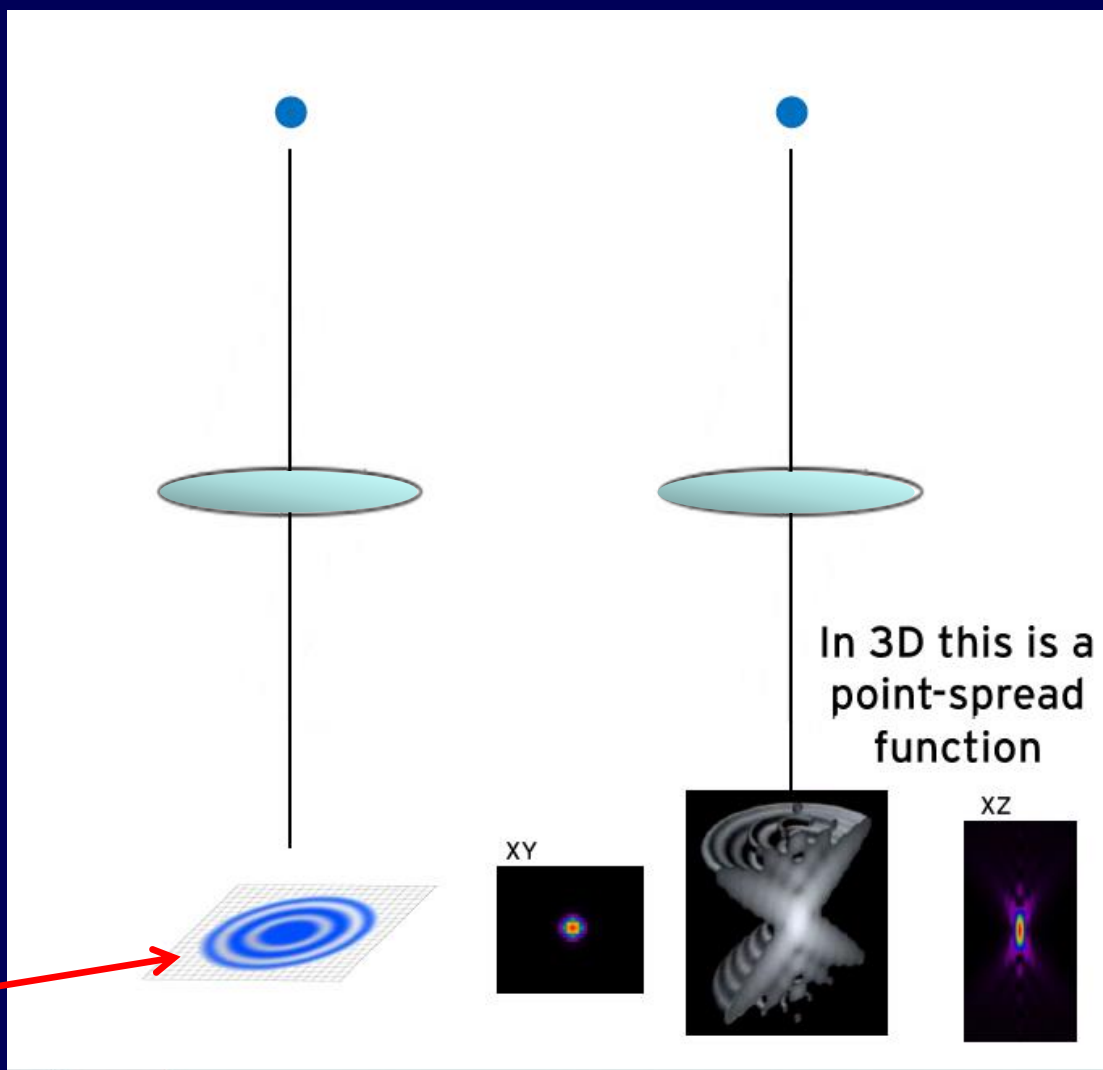
- zobrazení **první clonky** (pinhole) objektivem v podobě bodu na vzorku (průměr bodu odpovídá difrakční mezi)
- zpětně odražené světlo ze vzorku prochází znovu objektivem, děličem paprsků a dopadá před fotonásobič
- **druhá konfokální bodová clonka** blokuje průchod záření pocházejícího z míst mimo rovinu zaostření
- celkový obraz zaostřené roviny získáme jejím řádkováním (rastrováním) bod po bodu (viz vznik TV obrazu, SEM)
- signál z fotonásobiče je registrován počítačem spolu s informací o x-y souřadnicích analyzovaných bodů

Zobrazení fluorescenčního bodu optickou soustavou

Původní bod

Optická soustava

Airyho disk
- difrakční mez



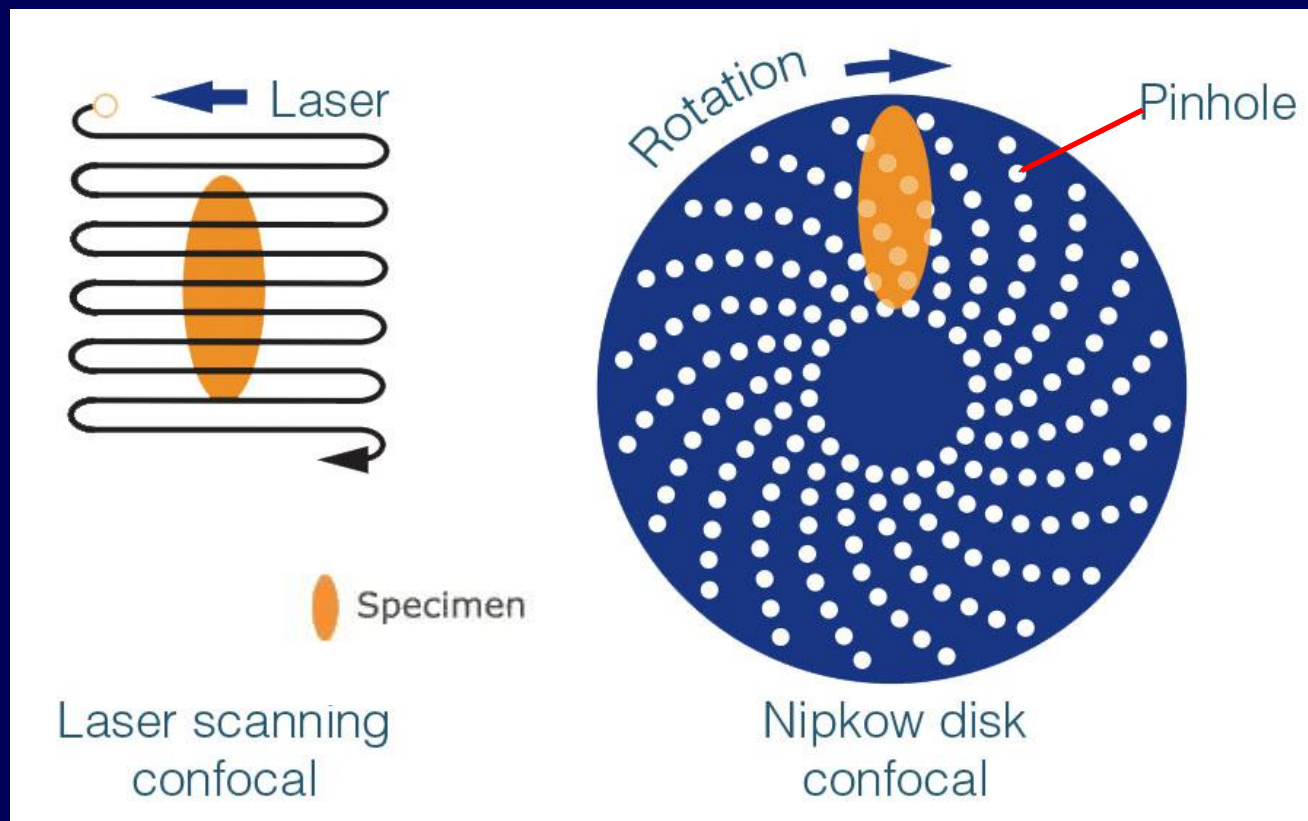
Laterální
směr – xy
(horizontální)

Axiální
směr-xz
(longitudinální
n. vertikální)

PSF
= impulzová odezva

[http://microscopy.duke.edu/
learn/WLC1.pdf/](http://microscopy.duke.edu/learn/WLC1.pdf/)

Schéma principu skenování u konfokálních mikroskopů



http://www.olympusamerica.com/seg_section/images/product/detail_full/1009_secondary_lg.jpg

Nipkowův kotouč v konfokální mikroskopii

1884 - německý technik Paul Nipkow

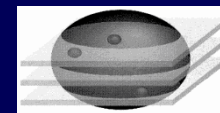
- mechanické zařízení, které umožnilo přenos obrazu na dálku (rychle rotující perforovaná destička, na které je mnoho vzájemně oddělených clonek (pinhole) a přes kterou je světlo zaměřováno na studovaný objekt)
- obsah obrazu převádí řádkováním na jeden světelný a elektrický průběh
- umožňuje zobrazovat několik bodů preparátu najednou
- **rychlé snímání, nižší intenzita světla k osvětlení preparátu**

Metoda vhodná pro pozorování rychlých dějů v živých buňkách

Konfokální mikroskopie

■ Výhoda:

- **obraz neobsahuje neostré pozadí mimokonfokálních oblastí vzorku** (obraz vzniká skládáním z jednotlivých bodů pozorovaných přes clonku – není zde limitace Rayleighovým kritériem; body bývají menší než průměr Airyho kroužků)
- **postupným snímáním při plynule se měnící hloubce zaostření získáme desítky až stovky optických řezů v jedné rovině** (→ zásobník 2D obrazů)
(tloušťka řezu při NA obj.=1,3 jen 0,4 μm)
- **přídavným software možnost získání prostorových 3D obrazů**
- **vyšší rozlišovací schopnost oproti klasickému mikroskopu**
(1,4x vyšší při stejné NA obj.)



■ Nevýhody:

- **zatíženost statistickým šumem, který nelze snadno řešit zvýšením intenzity záření**

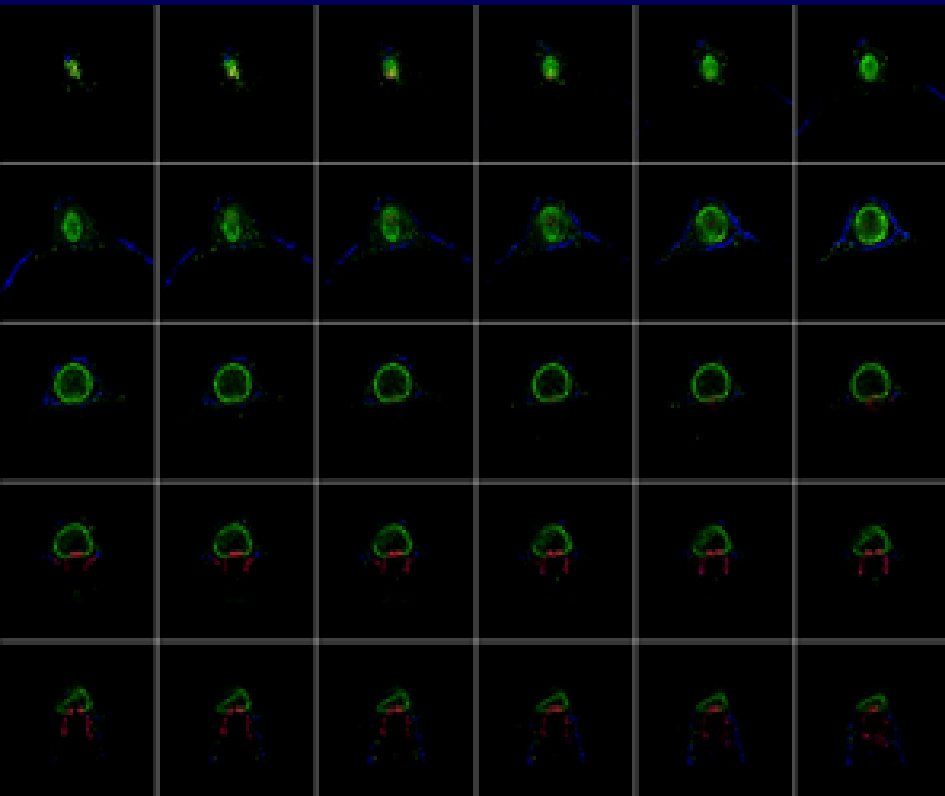
Konfokální mikroskopie

■ Využití:

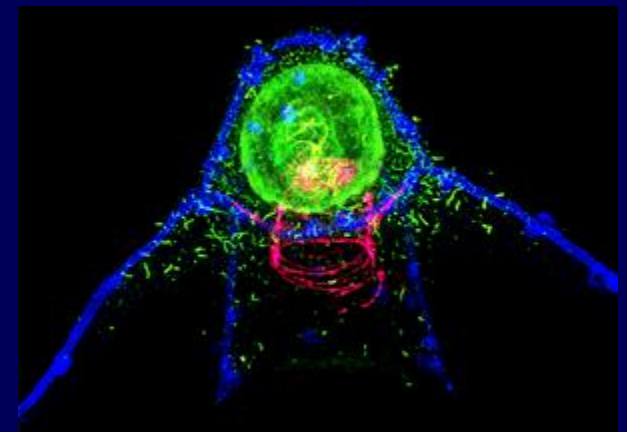
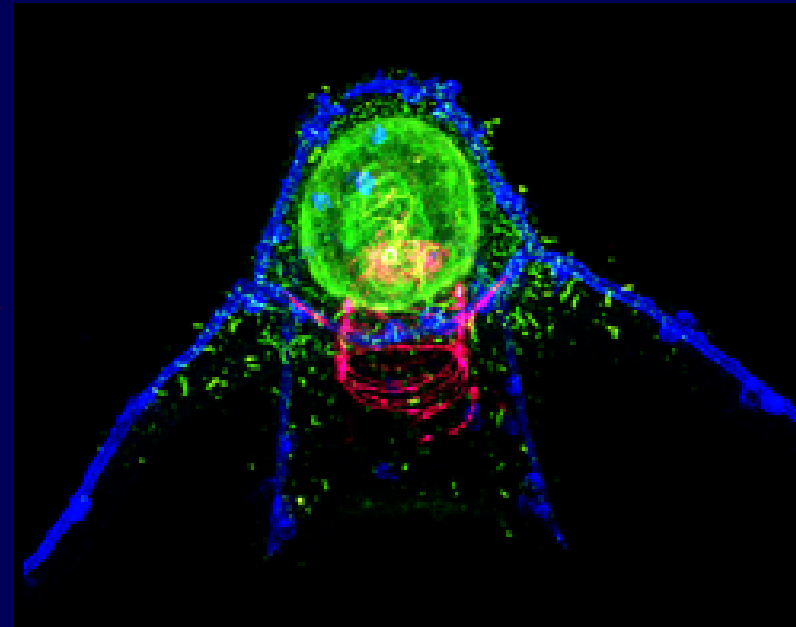
V buněčné a molekulární biologii a fyziologii:

- **tenké optické řezy buňkami nebo tkáněmi (pletivy), určení vzájemné polohy jejich komponent s využitím vícenásobného barvení** (studium trojrozměrné struktury objektů)
- **časové série zaznamenávající časové změny** (např. v koncentraci různých iontů v daných oblastech studovaného vzorku)
- **data pro kvantitativní analýzu dynamických procesů**
- **data pro počítačové trojrozměrné rekonstrukce** (→ **3D obraz**) (u firmy Olympus program Bitplane)

Gallery view of 3 color Z-stack



Maximum intensity projection



FluoView FV1000 – typ konfokálního mikroskopu firmy Olympus

Vybavení:

- dva na sobě nezávislé laserové scannery; nutnost stability excitovaného záření
- dokonalý mikroskop (BX61, invertní řady IX) s co největším počtem možných vstupů, automatizovaný
- dokumentační zařízení (CCD kamera) o vysokém rozlišení (4096 x 4096, 12 bitové obrázky), umožňující rychlé a přesné snímání v čase
- výkonný počítač se speciálním software

Software Bitplane – doplňkový prostředek k získání 3D obrázků

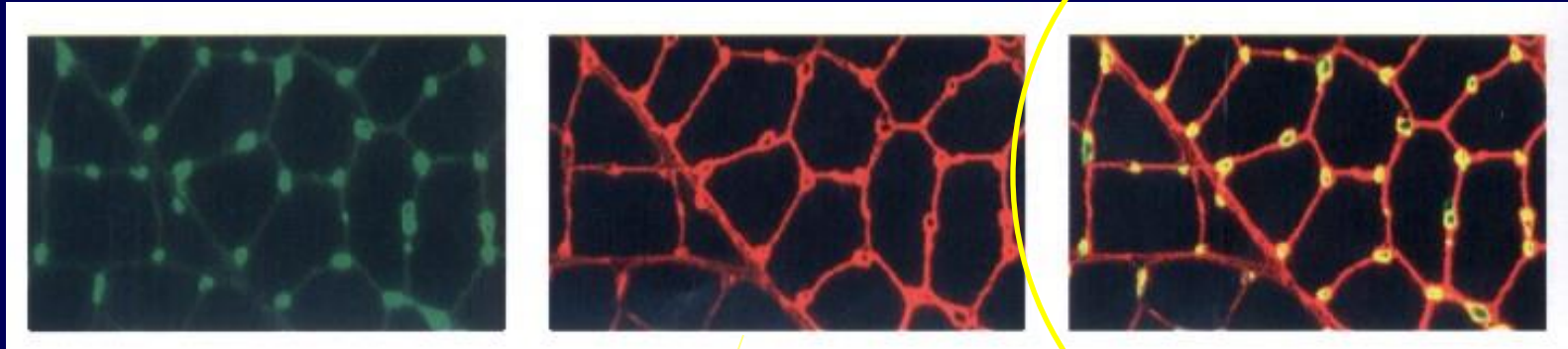
Metody: FRAP, FLIP, FRET

a další experimenty s fotonovou aktivací

<http://www.olympusfluoview.com/theory/confocalobjectives.html>

Konfokální mikroskop

- vícenásobné barvení kosterního svalu krysy



zeleně – stěny krevních vlásečnic

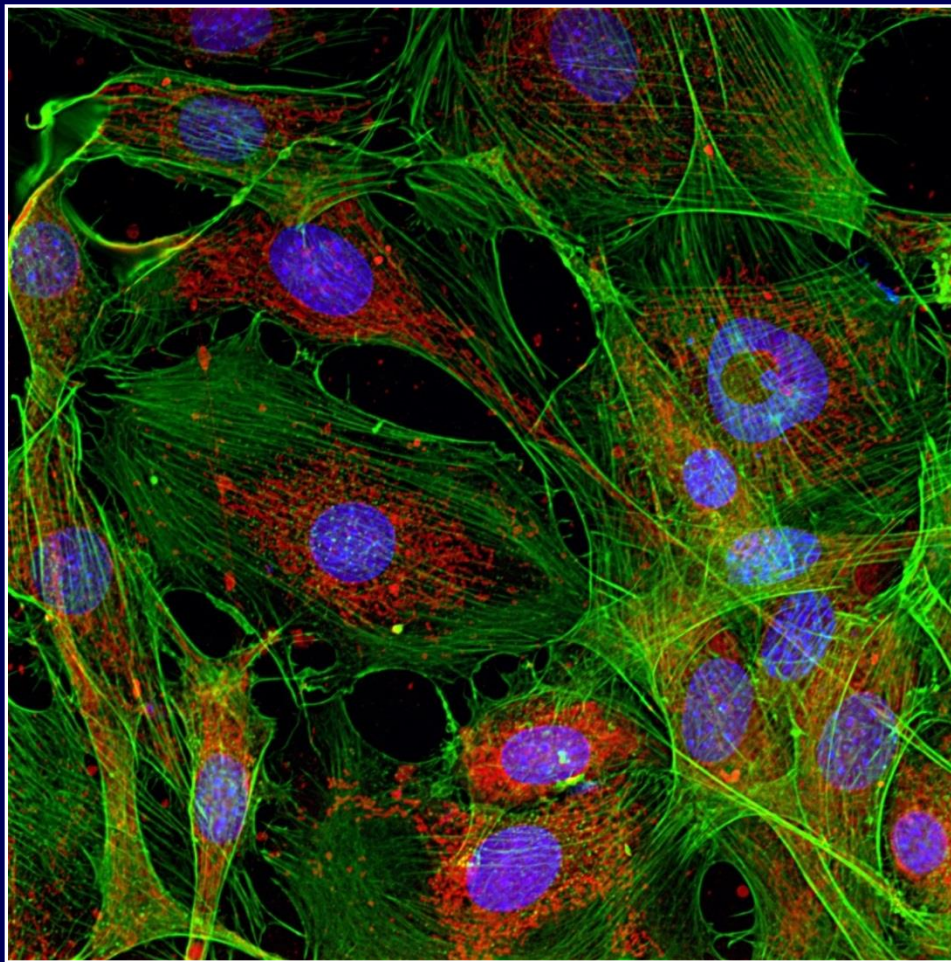
AlexaFluor 488 + protilátky
proti CD 31 a lektinu

červeně – bazální membrány
ve stěnách svalových vláken

AlexaFluor 546 + protilátky
proti lamininu

překrytí obrázků:
vzájemná poloha „žlutých“
krevních vlásečnic a
„červených“ stěn
svalových vláken

L. Kubínová, Živa 6/2006

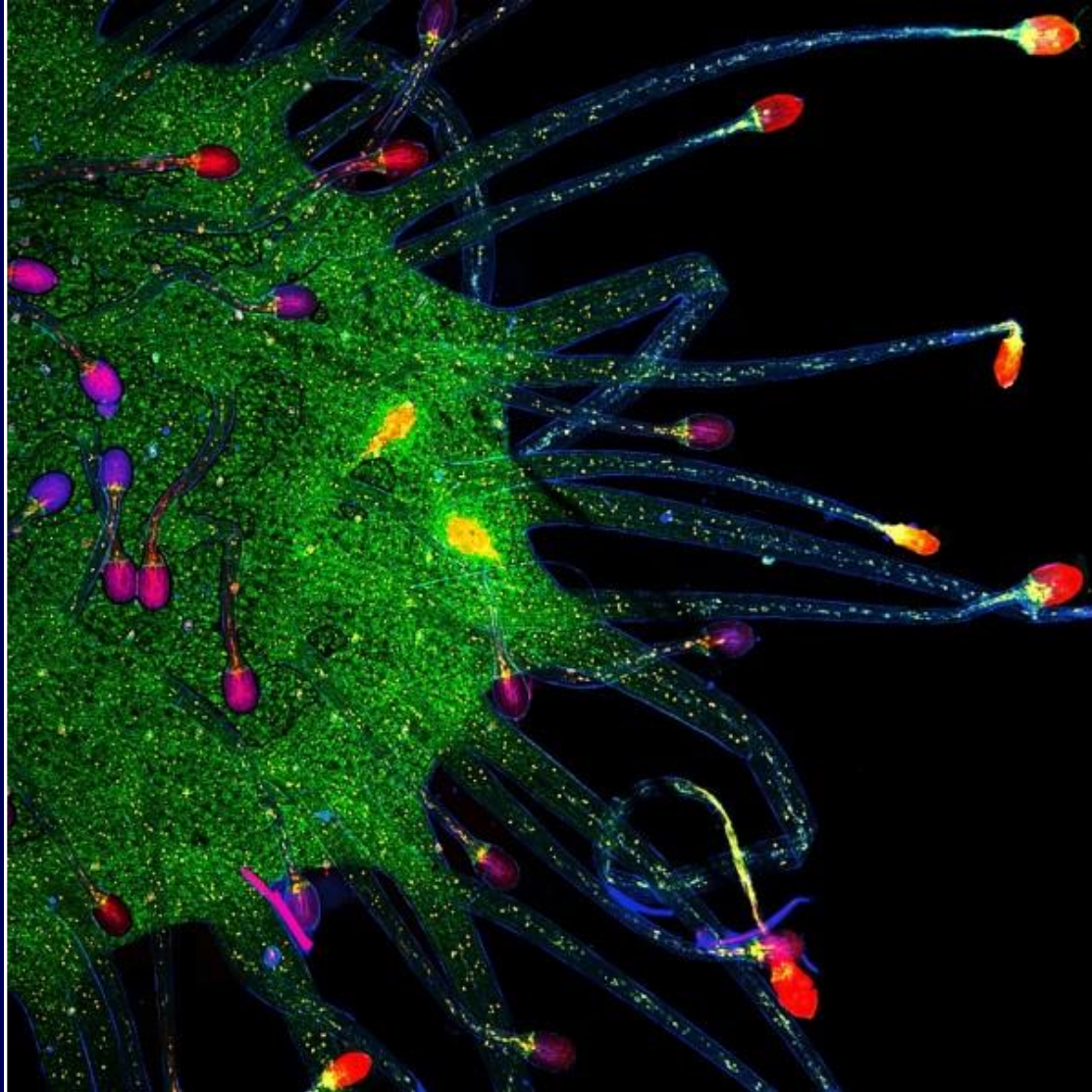


3T3 fibroblastová buněčná linie. Snímek z laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. Vzorek byl fixován, permeabilizován a specificky označen.

Zelený kanál - F-aktinová vlákna (jedna ze součástí cytoskeletu) značená phalloidinem

konjugovaným s fluorescenční sondou Alexa Fluor 488; pět konfokálních řezů po 0,850 μm ;

červený kanál - mitochondrie označené MitoTrackerem Red CMXRos; čtyři konfokální řezy po 0,850 μm ;



Drosera capensis

V kultuře běžná rosnatka kapská - špička listové čepele s tentakulemi. Stacknuto šest konfokálních řezů (rovin zaostření) od sebe vzdálených 30 μm .

http://pentaxfriends.eu/gallery/displayimage.php?album=469&pid=13029#top_display_media

Doporučené www adresy

Konfokální mikroskopie z <http://microscopy.duke.edu/>

<http://microscopy.duke.edu/learn/introtomicroscopy/confocals.html>

<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/>

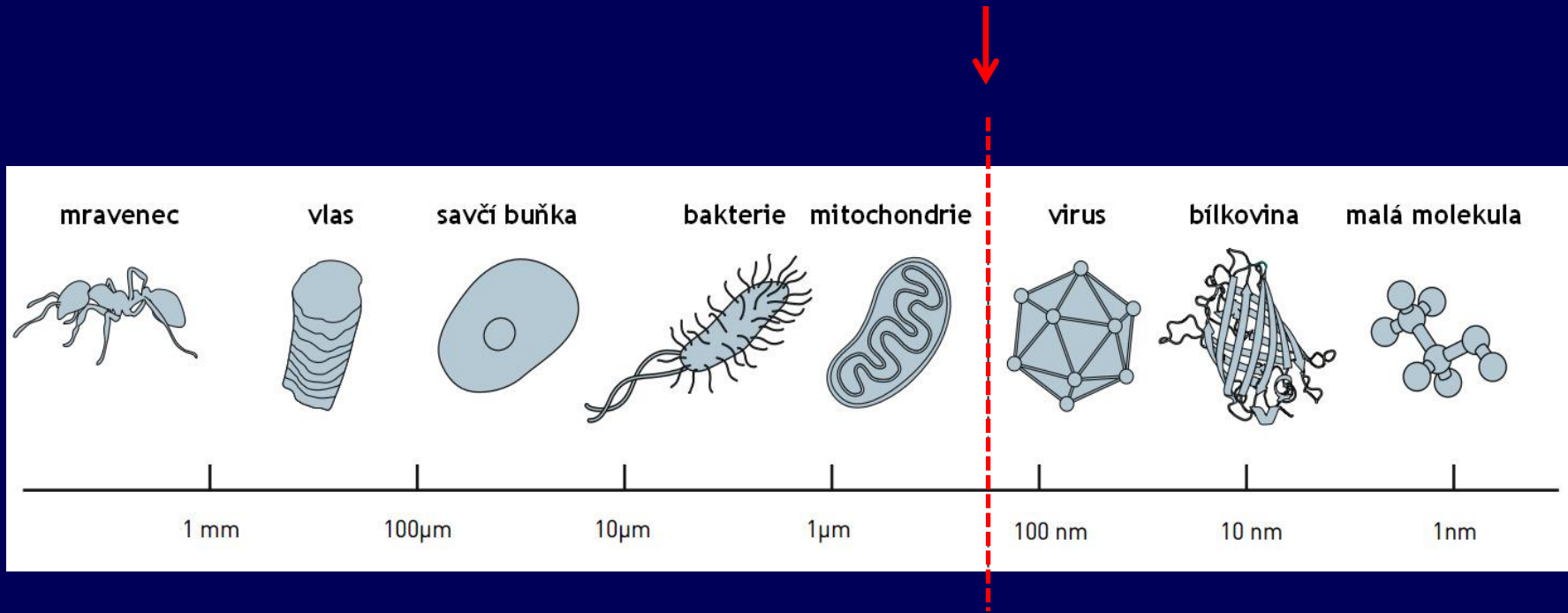
Glossary of Terms in Confocal Microscopy

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/confocal/glossary.html>

Superrozlišovací (superrezoluční) mikroskopie

Rozlišení optické mikroskopie je kvůli difrakčnímu limitu omezené – cca 250 nm

Abbého difrakční limit (0,2 μm)



<http://e-svet.e15.cz/technika/nobelova-cena-za-chemii-patri-vynalezcum-nanoskopie-1125912>

Nevýhody EM:

- vzorek je vždy fixovaný
- metoda je náchylná k tvorbě artefaktů
- značení konkrétních molekul je složité

Výhody superrezoluce:

- vzorek může být živý
- zpracování vzorku je jednoduché
- (ko)lokalizujeme konkrétní molekuly

Druhy rezoluce:

- Vylepšená geometrie fluorescenčního mikroskopu (konfokální, SIM, 4Pi)
- Stimulovaná deplece emise (STED)
- Lokalizace jednotlivých molekul (PALM, STORM)

Kombinace:

dobrý nápad + špičková technologie + výpočetní technika

Nobelova cena za chemii* pro rok 2014



Američané **Eric Betzig** a **William Moerner** a Němec **Stefan Hell**

- odůvodnění rozhodnutí Královské švédské akademie věd:
"Vyvinutím fluorescenčního mikroskopu s velmi vysokým rozlišením přeměnili optickou mikroskopii do nanoskopie"

(prolomení více než stoletého dogmatu o tom, že cokoliv menší než zhruba polovina vlnové délky světla ($0,2\ \mu\text{m}$) nelze opticky pozorovat)

*NC 2014 za chemii - důmyslné využití fotochemických nebo fotofyzikálních vlastností fluorochromů; NC 2014 za fyziku: Isamu Akasaki, Hiroši Amano a Šudži Nakamura za výzkum modrých světelných diod

Přehled superrozlišovacích metod

- Metody dalekého pole (Far-field) (zobrazení vnitřních struktur vzorku)

Konfokální zobrazování

STED - Stimulated Emission Depletion (NC 2014, Stefan Hell)

4Pi mikroskopie

Celoplošné zobrazování (Wide-field)

Mikroskopie se strukturním osvětlením

SIM - Structured Illumination Microscopy

Lokalizační mikroskopie (stochastická lokalizace):

STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

PALM - Photoactivation Localization Microscopy

FPALM - Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy

GSDIM - Ground State Depletion followed by Individual Molecule return (NC 2014, Eric Betzig a William Moerner)

- Metody blízkého pole (Near-field) (zobrazení povrchu vzorku)

NSOM - Near-field Scanning Optical Microscopy

STED

(Stimulated Emission Depletion)

= redukce fluorescence stimulovanou emisí - fluorescenční mikroskopie umožňující dosáhnout rozlišení vyšší (30 nm), než je klasická mez ($0,61 \cdot \lambda / \text{NA}_{\text{obj}}$ – tj. asi 250 nm)



Leica TCS SP8 STED

STED

(Stimulated Emission Depletion)

= redukce fluorescence stimulovanou emisí - fluorescenční mikroskopie umožňující dosáhnout rozlišení vyšší (30 nm), než je klasická mez ($0,61 \cdot \lambda / NA_{\text{obj}}$ – tj. asi 250 nm).

Princip metody:

- tlumení fluorescence excitovaných molekul v krajních partiích stopy (rozptylové funkce) skenujícího laserového svazku pomocí dvou časově synchronizovaných a prostorově koincidujících (souosých) laserových pulsů:

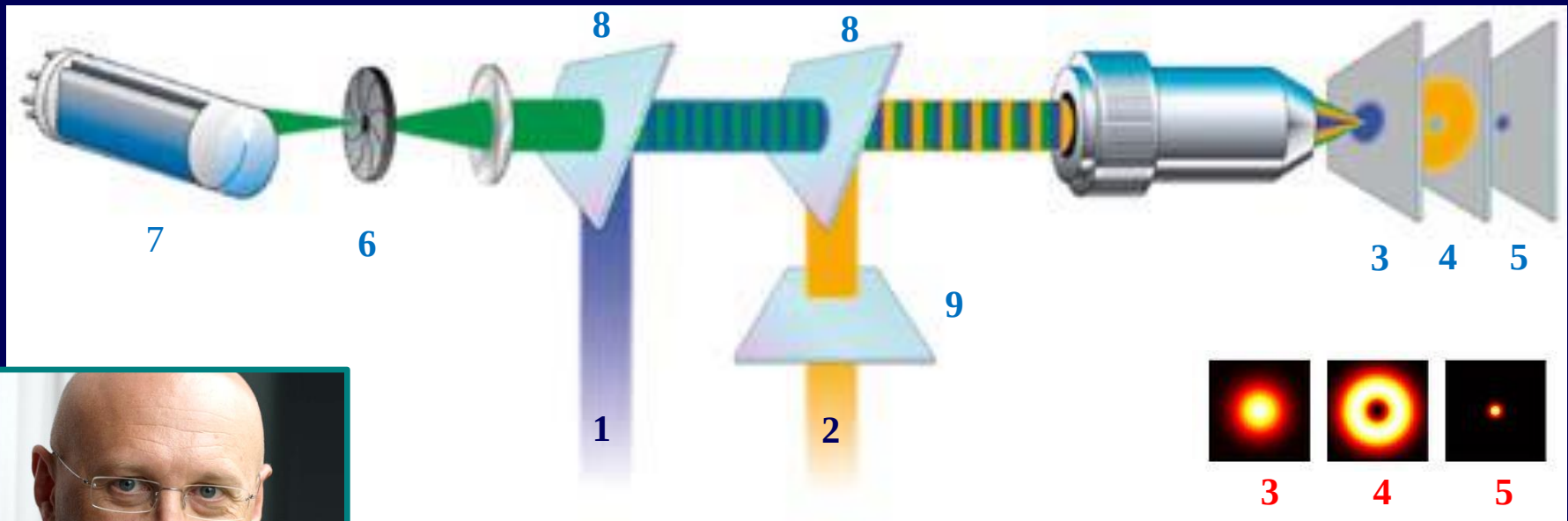
- první (excitační, budící) - provádí excitaci fluorochromů

- druhý (STED puls, depleční, redukční) - tlumí (ochuzuje) saturací emisi

K tlumení emise dochází v **okrajových partiích** stopy excitačního svazku, její střed však není tlumen → podstatné zmenšení fluorescenční stopy, a tím výrazné zvýšení rozlišení

(Point Spread Function engineering).

Princip mikroskopie STED u mikroskopu Leica TCS SP5 STED



Profesor Stefan W. Hell
(německý fyzik)
Nobelova cena za rok 2014

- 1** – paprsek budicího laseru (excitační záření)
- 2** – paprsek deplečního laseru (záření o delší λ)
- 3** – původní excitační kroužek (klasický konfokální)
- 4** – depleční (STED) kroužek
- 5** – **výsledný excitační bod** (menší než 90 nm)
- 6** – konfokální clona
- 7** – detektor
- 8** – dichroické destičky
- 9** – $\lambda/2$ fázová destička

STED (STimulated Emission Depletion)

= stimulované potlačení emise

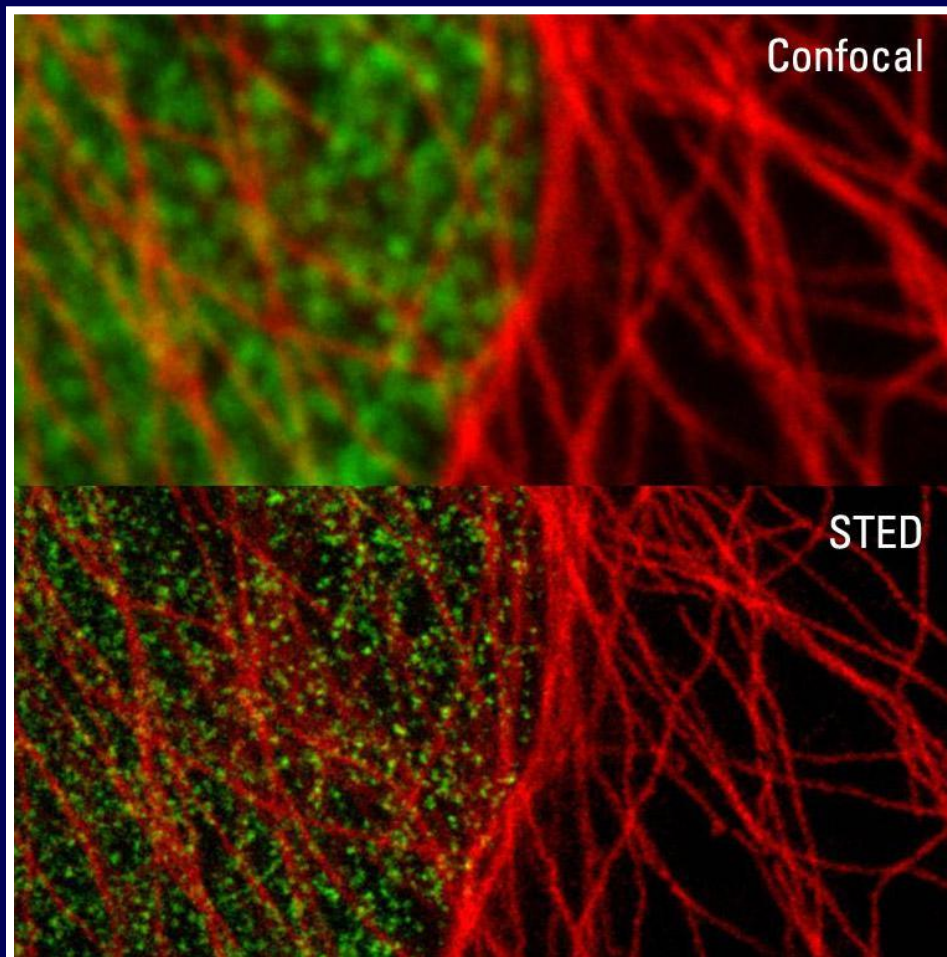
Využívá možnosti vyčerpat energii z fluoroforu stimulovanou emisí.

Zároveň s excitačním světlem se fluorofor osvětlí světlem s delší vlnovou délkou, které způsobí, že místo fluorescenčního záření se vyzáří světlo o vlnové délce excitačního záření, které je odfiltrováno. Paprsek laseru s vyšší vlnovou délkou (depleční, redukční) má na průřezu tvar mezikruží, takže ke zhášení fluorescence dochází pouze u okraje oblasti osvícené excitačním laserem.

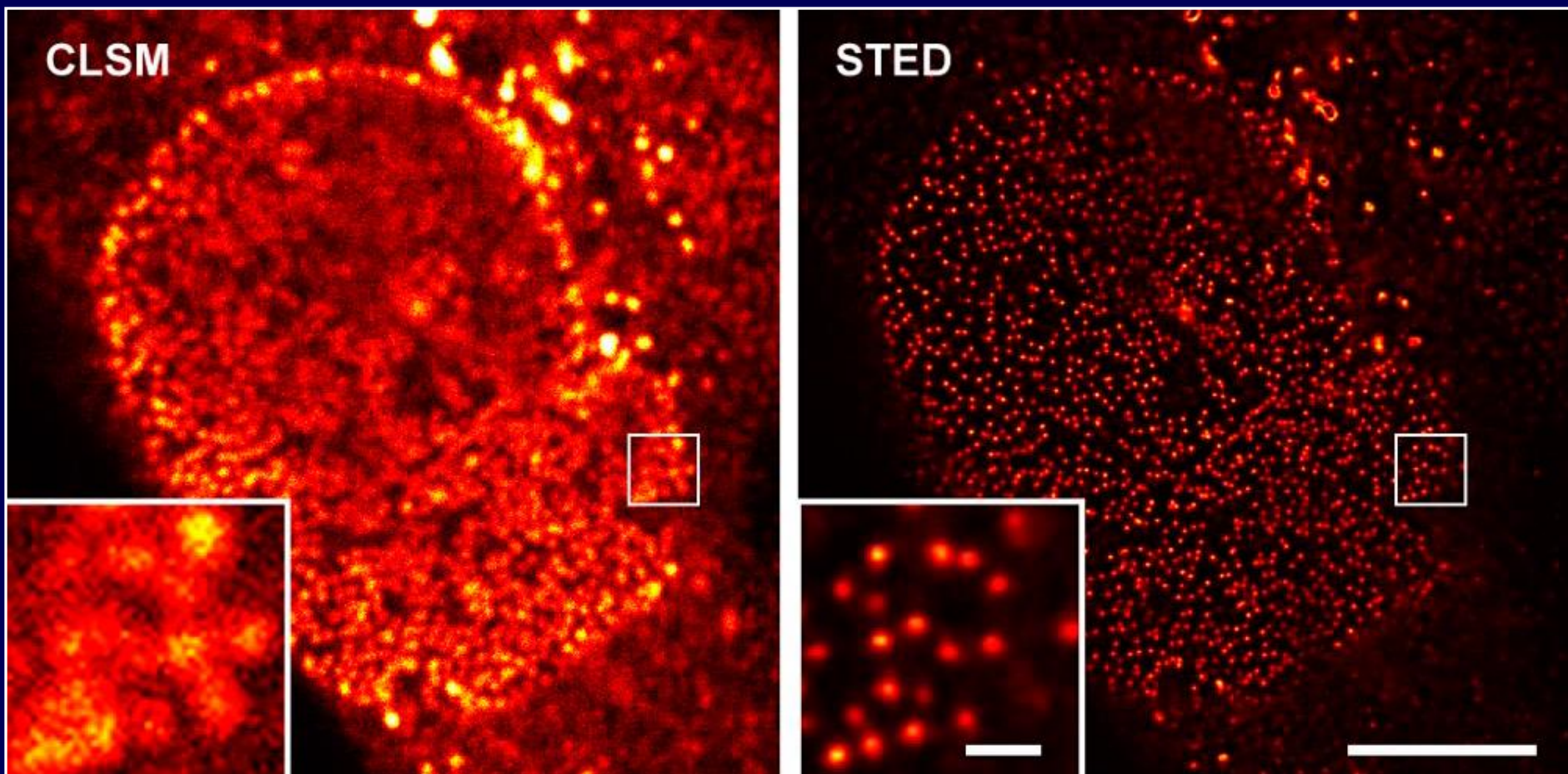
Fluorescenční záření tak vzniká pouze v nezhášené oblasti uvnitř mezikruží, čímž dochází ke zlepšení rozlišení.

Rozlišení závisí na tom, jak moc dokážeme omezit oblast, v níž nedochází k vyčerpávání fluorescence. Ta je limitována intenzitou záření laseru s delší vlnovou délkou a u biologických vzorků limituje nejlepší dosažitelné rozlišení, protože při přílišné intenzitě osvětlení dochází k poškozování vzorku.

V praxi se **maximální rozlišení pohybuje okolo 50 nm** (v ose ≥ 150 nm).



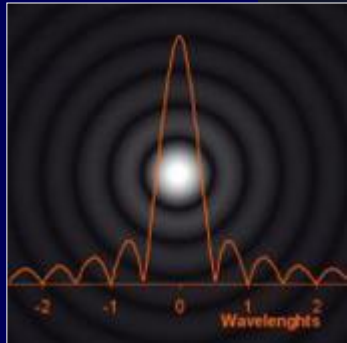
Porovnání výsledků dosažených pomocí klasické konfokální mikroskopie (nahore) a pomocí mikroskopie STED (dole).



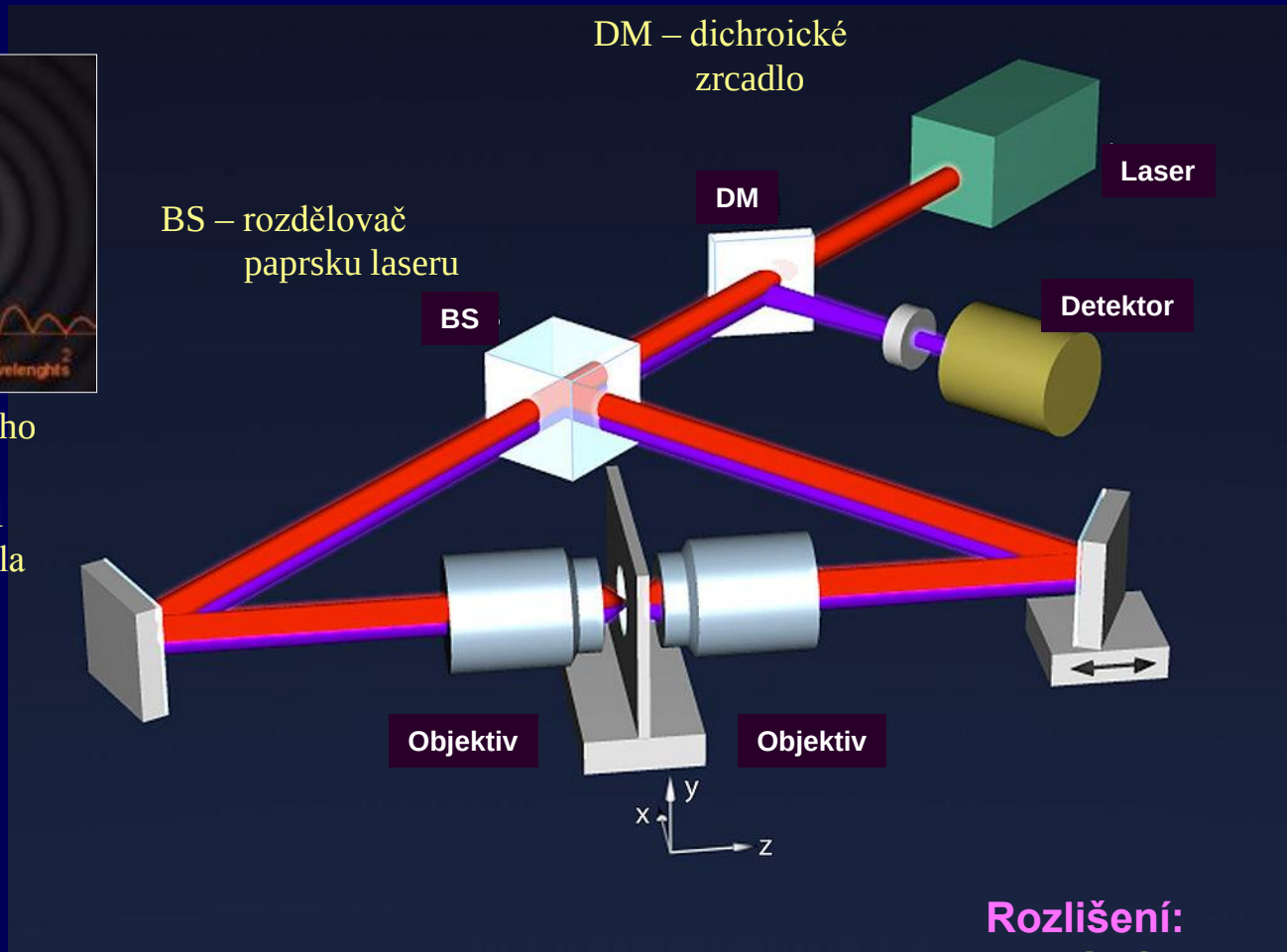
HeLa cell stained with primary antibodies against the **nuclear pore complex protein** Nup153 and secondary antibodies conjugated with ATTO647N. The image was acquired with a TCS STED confocal microscope (Leica). Bars: 5 μm (insets, 0.5 μm).

Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

4Pi mikroskop



Bod jako Airyho
kroužek
a jeho profil
intenzity světla



Rozlišení:
laterální (xy) - až 100 nm
axiální (xz) - až 190 nm

Schéma 4Pi mikroskopu

4Pi mikroskop

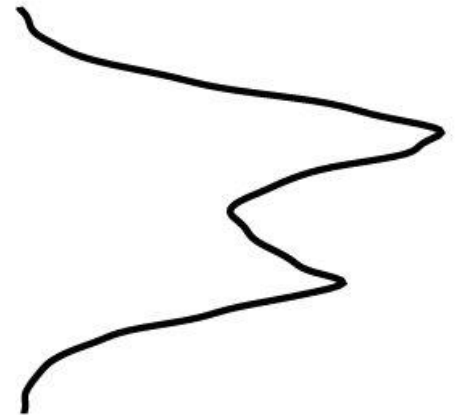
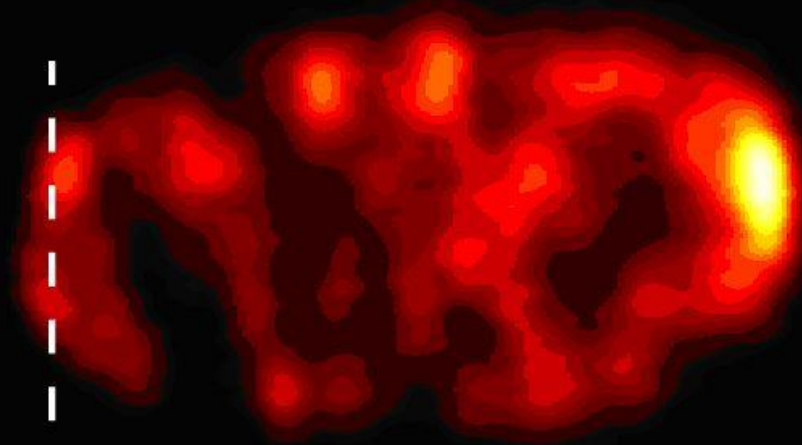
- podobný klasickému konfokálnímu mikroskopu
- má **2 stejné objektivy**, každý na opačné straně vzorku, zaostřené na stejné místo

Obrazy z objektivů se skládají a ve výsledku tak fungují jako **jeden objektiv s dvojnásobkem numerické apertury**, což vede ke zlepšení rozlišení.

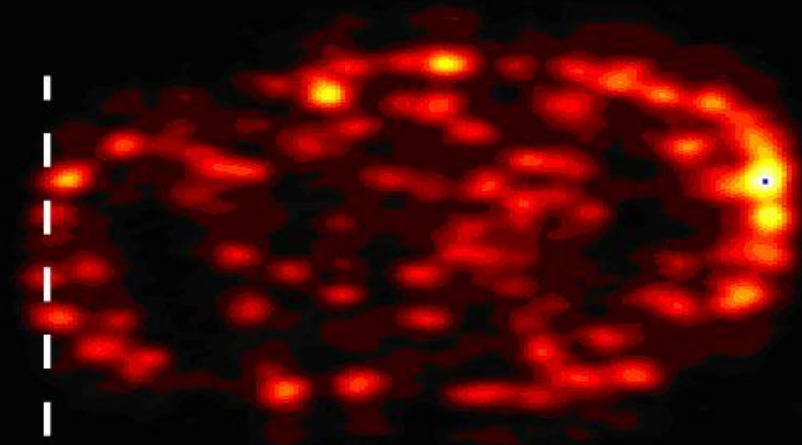
Díky **interferenci proti sobě jdoucích paprsků** se ještě více zmenšuje objem, do nějž se promítá bod, zejména v axiálním směru (ve směru osy).

Výsledné **laterální (xy) rozlišení dosahuje až 100 nm a axiální (xz) rozlišení až 190 nm.**

Confocal



4Pi raw



Microtubuli in a neuron cell

Cooperation with Max-Planck-Institut for bio-physical Chemistry, Department
NanoBiophotonik - Prof. Dr. S.W. Hell

https://www.dkfz.de/en/nanoscopy/Science/4pi_en.html

S I M

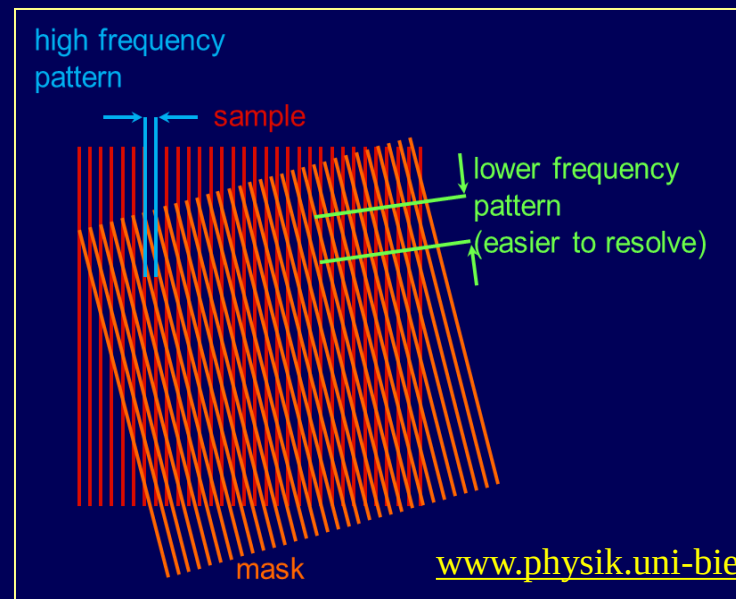
(Structured Illumination Microscopy)

- strukturovaná iluminace

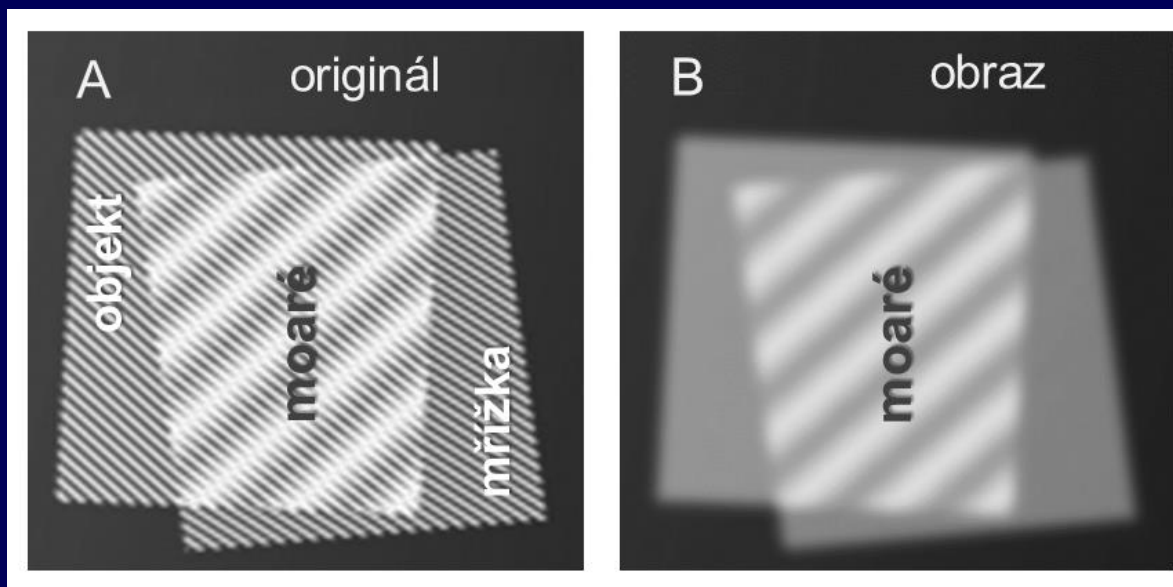
- využívá osvětlení vzorku **světlem s pruhovaným vzorem** vzniklým difrakcí na mřížce
- **interferencí** s detaily vzorku vzniká **moaré** efekt
- jeho následným **počítačovým zpracováním** lze spočítat, jak vypadaly struktury, jenž ho způsobily, a získat tak obrázek obsahující jemnější detaily **s rozlišením okolo 100 nm**



moaré efekt



Princip mikroskopie se strukturním osvětlením



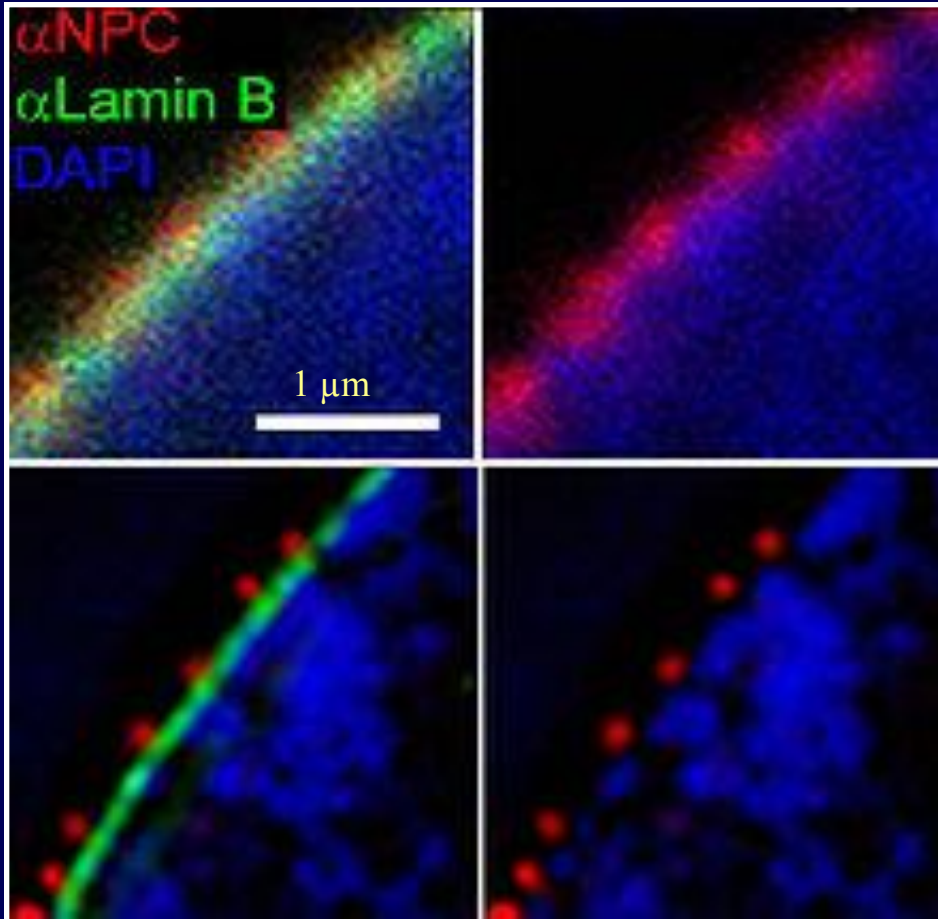
A - ukázka moaré efektu vznikajícího překryvem dvou mřížek;

B - zobrazení moaré pomocí optické soustavy s rozlišovací schopností menší, než vyžaduje prostorová frekvence mřížek
(samotné rastry se již nezobrazí, zatímco příslušný moaré efekt bude optickou soustavou stále dobře viditelný)

Plášek, Jaromír (2015): Superrozlišení v optické mikroskopii - Nobelova cena za chemii za rok 2014. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 60, p. 23-28.

S I M

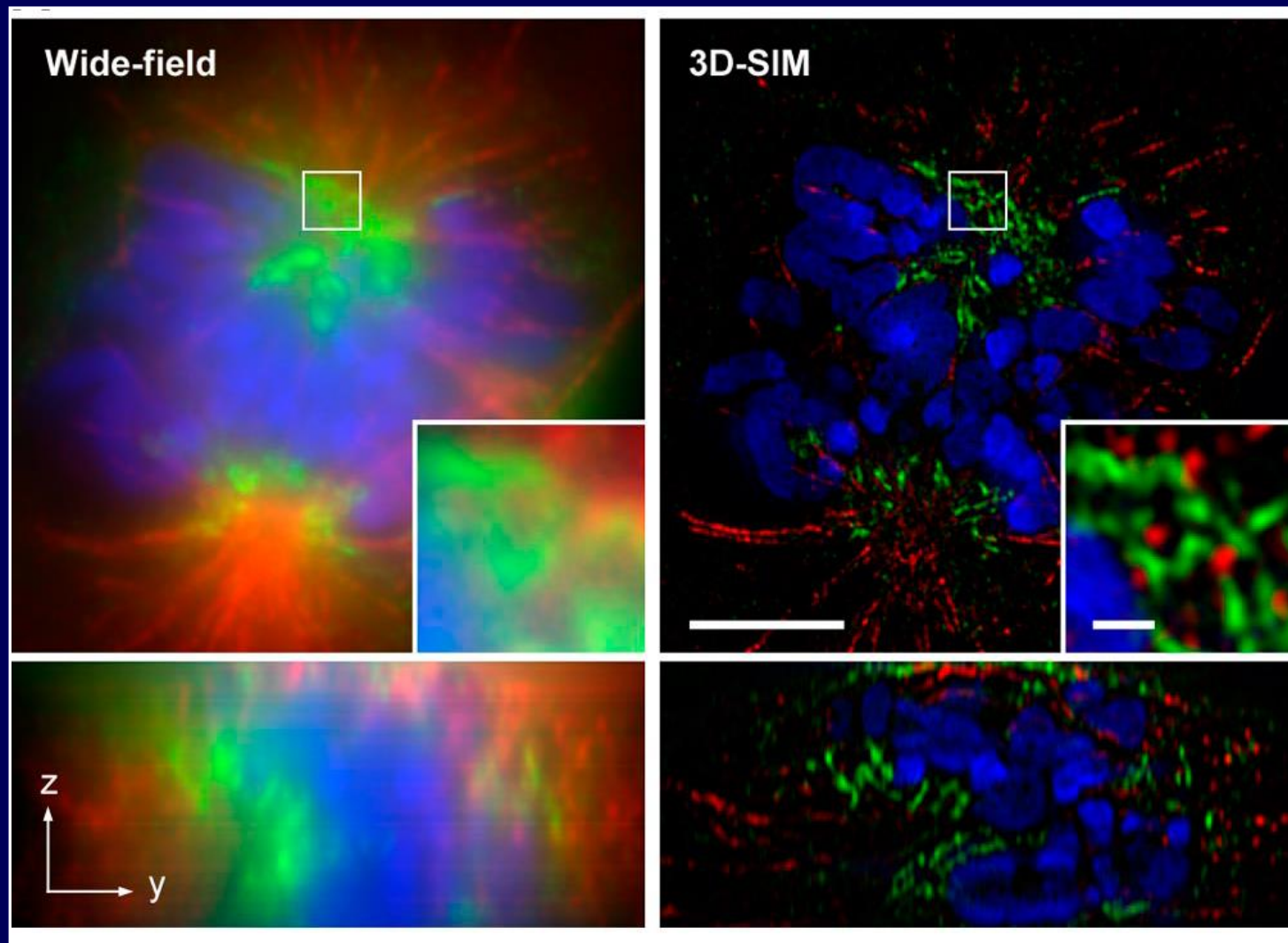
(Structured Illumination Microscopy)



Nahoře: rastrovací
konfokální mikroskop

Dole: 3D-SIM

Detail jaderné membrány:
červeně jaderné póry (anti-NPC)
zeleně jaderný obal (anti-lamin)
modře chromatin (DAPI)



Conventional wide-field image (left) and 3D-SIM image of a **mouse C2C12 prometaphase cell** stained with primary antibodies against lamin B and tubulin, and secondary antibodies conjugated to Alexa 488 (green) and Alexa 594 (red), respectively. Nuclear chromatin was stained with DAPI (blue). 3D image stacks were acquired with a DeltaVision OMX prototype system (Applied Precision). The bottom panel shows the respective orthogonal cross sections. Bars: 5 µm (insets, 0.5 µm).

Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

Metody superrozlišovací lokalizační mikroskopie

(Single-Molecule Localization Microscopy - SMLM)

Stochastická lokalizace

STORM (**ST**ochastic **O**ptical **R**econstruction **M**icroscopy)

PALM (**P**hoto**A**ctivation **L**ocalization **M**icroscopy)

FPALM (**F**luorescence **P**hoto**A**ctivation **L**ocalization
Microscopy)

GSDIM (**G**roud **S**tate **D**epletion followed by Individual
Molecule return) (NC 2014, Eric Betzig a William Moerner)

- Metody byly nezávisle publikovány krátce po sobě a využívají stejný princip.
- Fluorofory pro tyto metody mají **dva stavy - jeden schopný fluorescence a druhý fluorescence neschopný**, které se dají přepínat světlem různých vlnových délek nebo se přepínají stochasticky (nahodile).
- **Ve stavu schopném fluorescence se nachází vždy jen velmi malý podíl všech fluoroforů**, jejichž fluorescence se snímá, dokud nedojde k jejich vybělení. Poté se převede do stavu schopného fluorescence další malá část fluorofořů a snímají se, dokud se nevybělí. Tento postup se opakuje, dokud není nasnímáno dostatečné množství fluoroforů.

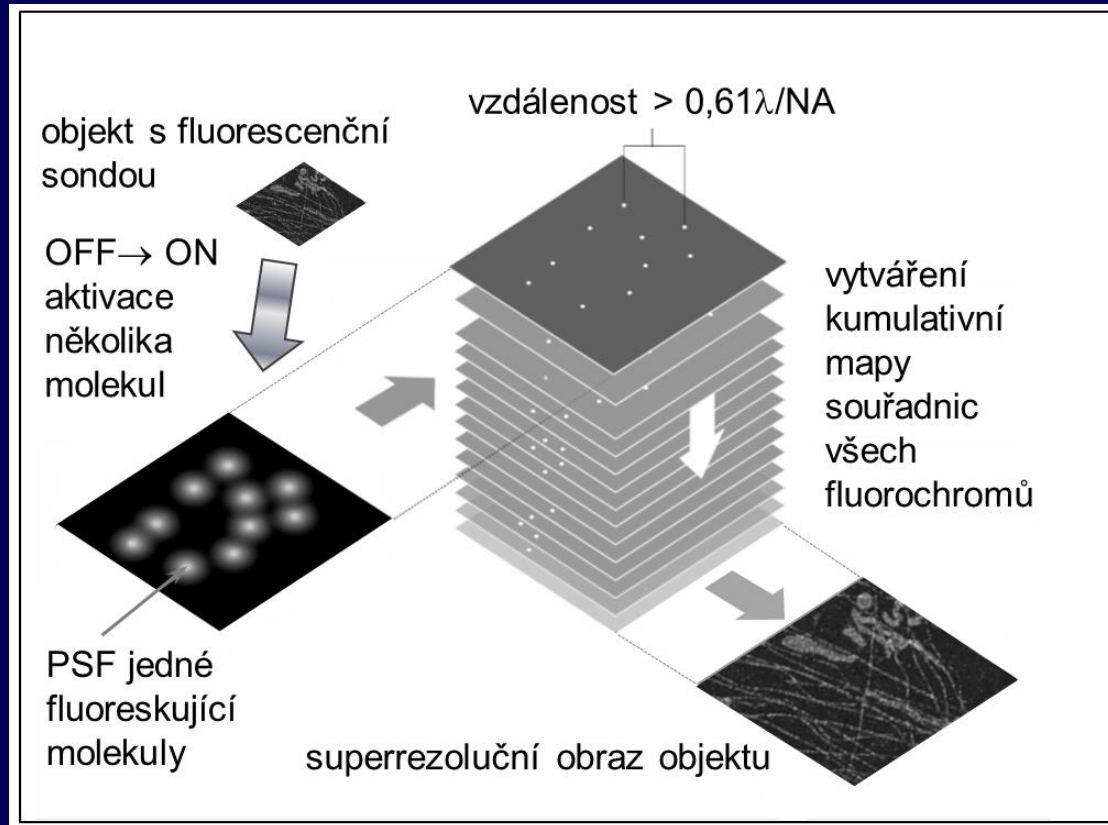
- Fotony nasnímané z jednoho fluoroforu jsou detekovány na širším prostoru podle **rozptylové funkce (PSF, point spread function)**. Poté se matematicky určí střed PSF a danému fluoroforu se přiřadí tato spočítaná souřadnice. Čím více fotonů se detekuje z daného fluoroforu, tím lépe je definovaná PSF a tím přesnější je lokalizace fluoroforu. Lze dosáhnout **rozlišení až v jednotkách nm**.

- Jako fluorofory se využívají buď **fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny** (např. PA-GFP), nebo **organické fluorescenční barvy** (např. syntetická kyaninová barviva Cy5 spojená s Cy3, Alexa 488 a Cy5).

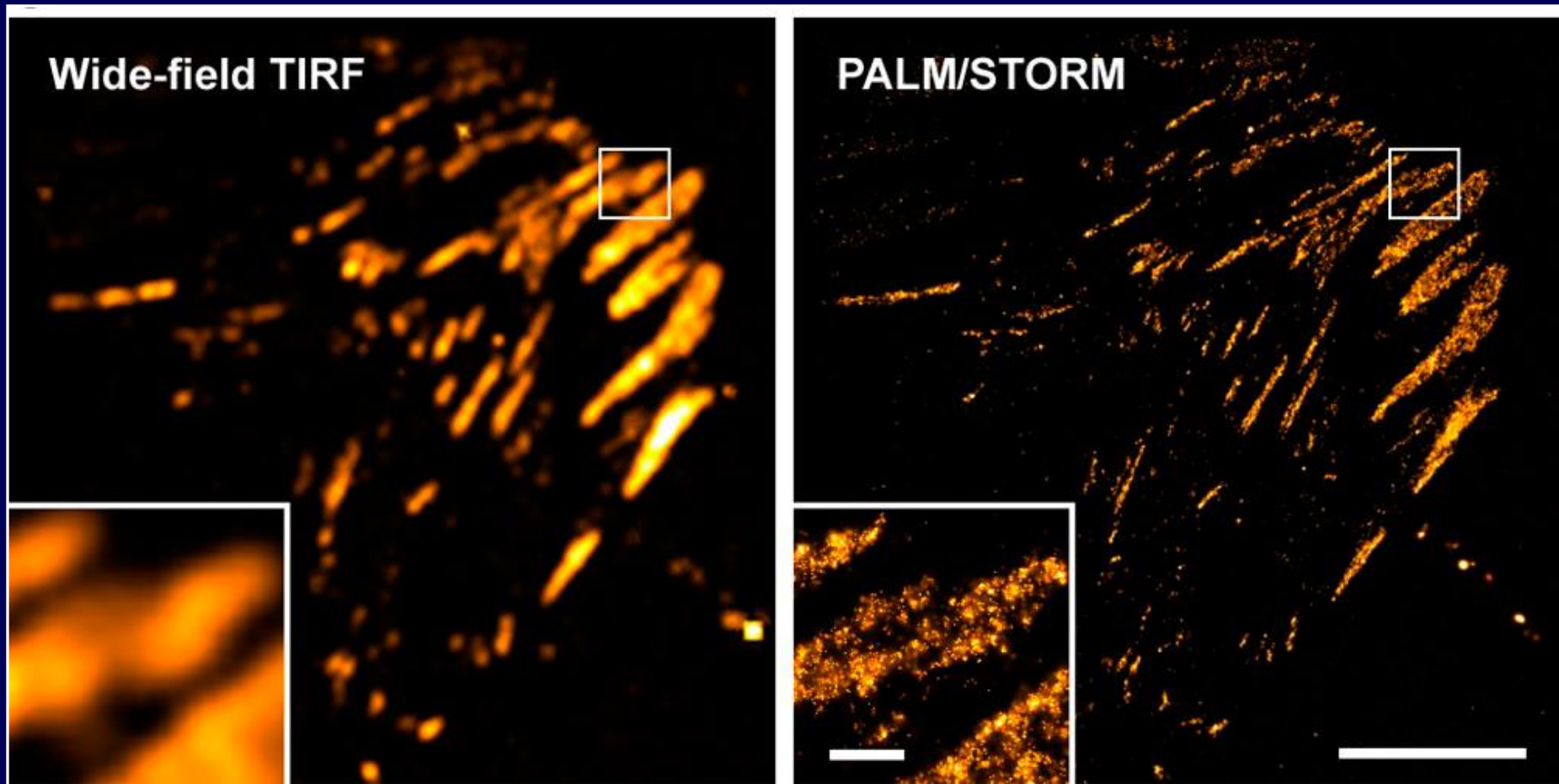
- K aktivaci fluoroforu obvykle dochází osvětlením laserem s nízkou intenzitou, využívající jinou barvu, než se poté využívá k vybuzení fluorescence.

Nevýhoda: obvykle **delší doba snímání** celkového obrazu, protože se musí nasnímat velké množství dílčích obrazů

Princip lokalizační superrezoluční mikroskopie



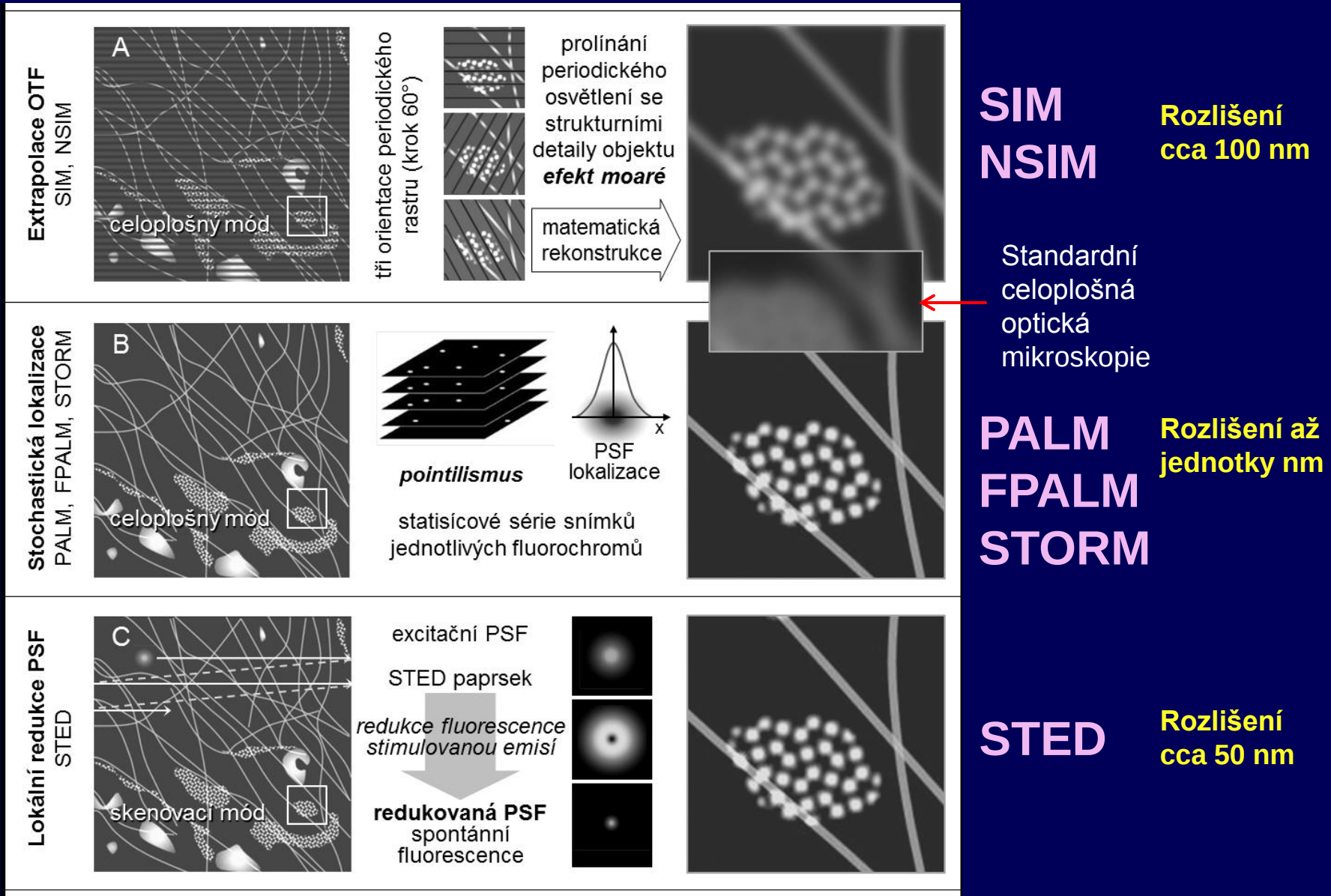
V objektu obsahujícím fotoaktivatelnou nebo fotoegulovatelnou fluorescenční sondu je malý počet nahodile (stochasticky) vybraných a dostatečně navzájem vzdálených fluorochromů přepnut aktivačním světelným pulzem do fluorescenčního stavu. Z jejich centroidních souřadnic je pak po několika desítkách tisíc opakování takové lokalizace vytvořen superrezoluční obraz distribuce fluorescenční sondy ve studovaném objektu.



TdEosFP-paxillin expressed in a **Hep G2 cell** to label adhesion complexes at the lower surface. The image was acquired on an ELYRA P.1 prototype system (Carl Zeiss, Inc.) using TIRF illumination. Single molecule positional information was projected from 10,000 frames recorded at 30 frames per second. On the left, signals were summed up to generate a TIRF image with conventional wide-field lateral resolution. Bars: 5 μm (insets, 0.5 μm).

Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175, 2010/6. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>

Porovnání tří hlavních strategií superrezoluční mikroskopie



Plášek, Jaromír (2015): Superrozlišení v optické mikroskopii - Nobelova cena za chemii za rok 2014. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 60, p. 23-28.

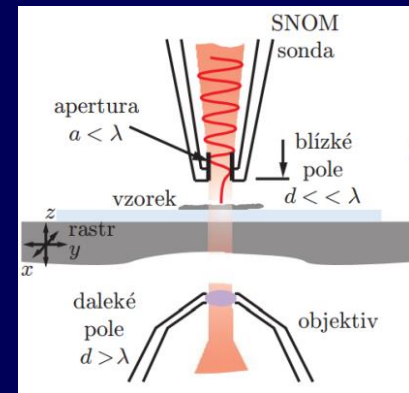
Legenda k předchozímu obrázku:

Ve třech obrázcích levého sloupce je schematicky znázorněna vnitřní struktura hypotetické buňky s mikrotubulárními vlákny a granulárními útvary. Vložené bílé rámečky lokalizují polohu oblasti zobrazené ve zvětšené podobě v pravém sloupci. Vzhled zvětšených obrázků zjednodušeně naznačuje rozdílné možnosti jednotlivých metod. Zatímco **obyčejná SIM metoda** nabízí pouze dvojnásobné zlepšení rozlišovací schopnosti, které znamená výrazné zlepšení oproti standardní celoplošné mikroskopii (viz vložený segment), ale není ještě dostatečné pro realistické zobrazení rozměrů jemných buněčných struktur, **metody stochastické lokalizace (PALM, FPALM, STORM) a metoda redukce fluorescence stimulovanou emisí (STED)** umožňují nanoskopické zobrazení mikrotubulů a dalších struktur blízkých k 20 nm.

STED je z hlediska zkoumání dynamických jevů v živých buňkách perspektivnější než metody lokalizační.

Skenovací optická mikroskopie blízkého pole (N S O M) (Near-field Scanning Optical Microscopy)

- zobrazuje vzorky pomocí **skenování sondou nanometrových rozměrů** sloužící jako zdroj světla a/nebo detektor fluorescenčního záření



autor: Ing. D. Škoda

- Jako sonda slouží hrot z průhledného materiálu v neprůhledném obalu, který má na konci miniaturní otvor (menší než vlnová délka světla), které tak nemůže projít skrz.
- V blízkém okolí otvoru se však tvoří **evanescentní vlna**, která dokáže excitovat blízké fluorofory; intenzita vlny exponenciálně klesá se vzdáleností, takže oblast, v níž se excitují fluorofory, je menší než difrakční limit (asi **100 nm**).
- **Nevýhoda:** dokáže zobrazovat jen povrch vzorku

LITERATURA K SUPERROZLIŠOVACÍ MIKROSKOPII

- **Plášek, Jaromír (2015):** Superrozlišení v optické mikroskopii - Nobelova cena za chemii za rok 2014. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie 60, p. 23-28. Dostupné online: http://www.cs.cas.cz/hanka/pmfa/1_15/plasek.pdf
- **Rous, Zdeněk (2015):** Cesta optické mikroskopie k superrozlišení - Nobelova cena za chemii 2014. Vesmír 94, p. 168, 2015/3. Dostupné online: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/cesta-opticke-mikroskopie-k-superrozliseni>
- **Schermelleh L., Heintzmann R. and Heinrich L. (2010):** A guide to super-resolution fluorescence microscopy. JCB 190, p. 165-175. Dostupné online: <http://jcb.rupress.org/content/190/2/165.full>
- **Valenta, Jan (1995):** Spektroskopie jednotlivých molekul v blízkém optickém poli. Vesmír 74, p. 126. Dostupné online: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/spektroskopie-jednotlivych-molekul-v-blizkem-optickem-poli>
- **Vrtiška, Ondřej (2014):** Nobelova cena za překonání limitů optického mikroskopu, 2014/10. Dostupné online: <http://vesmir.cz/2014/10/08/nobelova-cena-prekonani-limitu-optickeho-mikroskopu/>
- <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/super-resolution-gsd-microscopy>
- **Jaroslav Zelenka:** Superrezoluční mikroskopie (nanoskopie) - prezentace <http://clab.vscht.cz/files/uzel/0027688/Cy4tSC0qSq0CAA.pdf?redirected>

Optické mikroskopy

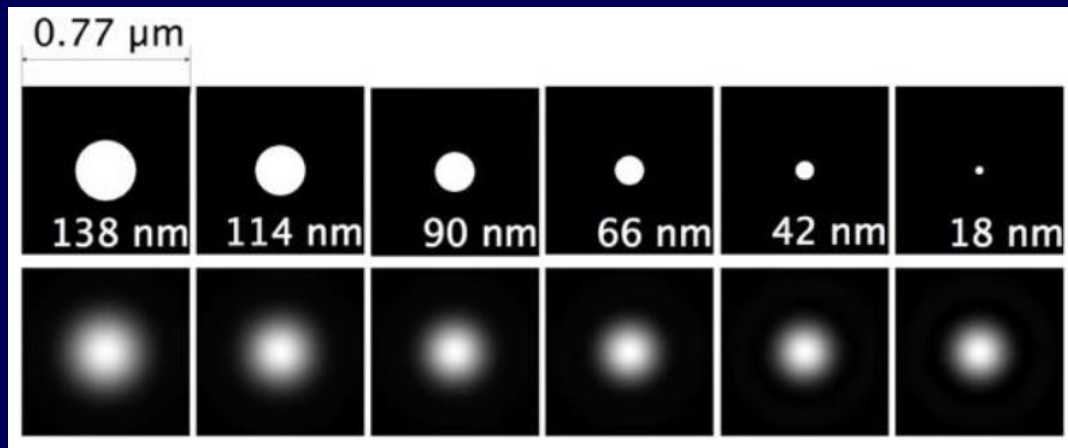
Firmy:

- **Olympus** – japonská, sídlo Tokio
Evropa: Hamburk v Německu (www.olympus.cz)
- **Nikon** – japonská, sídlo Tokio
Evropa: Badhoevedorp, Holandsko
(www.nikon.cz)
- **Leica** – švýcarská
(www.leica-mikro.cz)
- **Zeiss** – německá, Jena
(www.zeiss.cz)
- **Arsenal** (obchodní organizace) (www.arsenal.cz)
- **Meopta Přerov** (optika pro vojenské účely)

Point Spread Function (PSF)

= rozptylová funkce

(impulzová odezva - obraz bodového zdroje světla)



skutečná velikost bodu

a jeho zobrazení (laterální, xy)

obj. s $\text{NA} = 1,4$; $\lambda = 480 \text{ nm}$

<http://microscopy.duke.edu/>

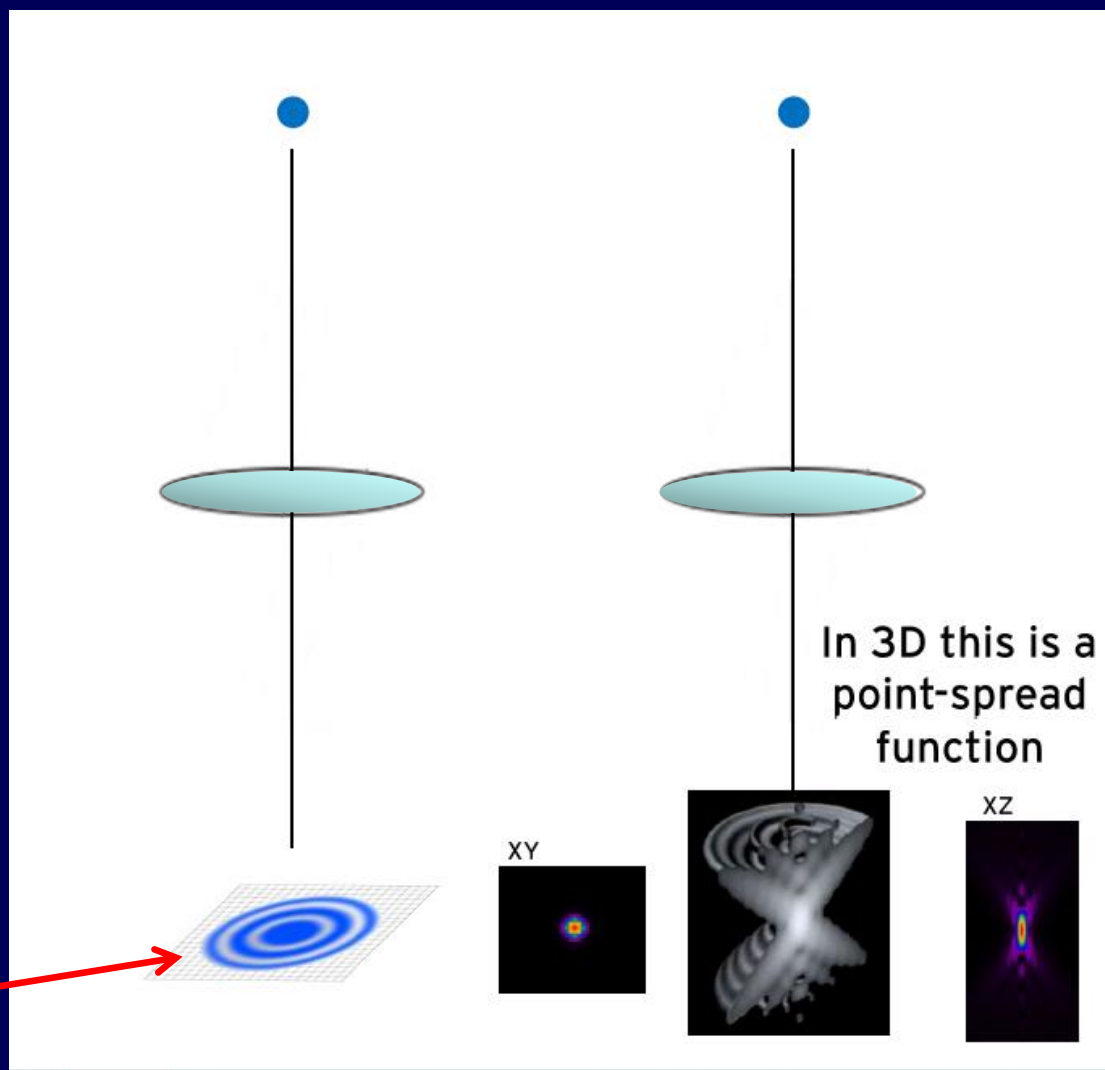
Rozptylová funkce je matematická funkce, která popisuje optickou vadu jako cestu teoretického bodového zdroje světla (nebo jiného vlnění) přes přístroj. Obvykle takový bodový zdroj přispívá do konečného obrazu **malou rozmazanou ploškou (Airyho kroužek)**. K získání původního, reálného obrazu se používají různé **dekonvoluční algoritmy**, které jsou ovšem spolehlivé jen do velikosti difrakčního limitu.

Zobrazení fluorescenčního bodu optickou soustavou

Původní bod

Optická soustava

Airyho disk
- difrakční mez



Laterální
směr – xy
(horizontální)

Axiální
směr-xz
(longitudinální
n. vertikální)

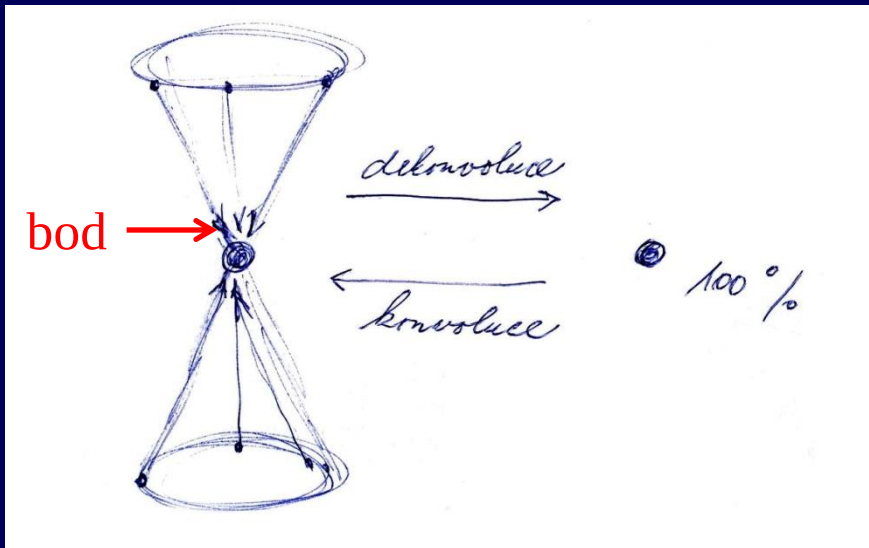
PSF
= impulzová odezva

[http://microscopy.duke.edu/
learn/WLC1.pdf/](http://microscopy.duke.edu/learn/WLC1.pdf/)

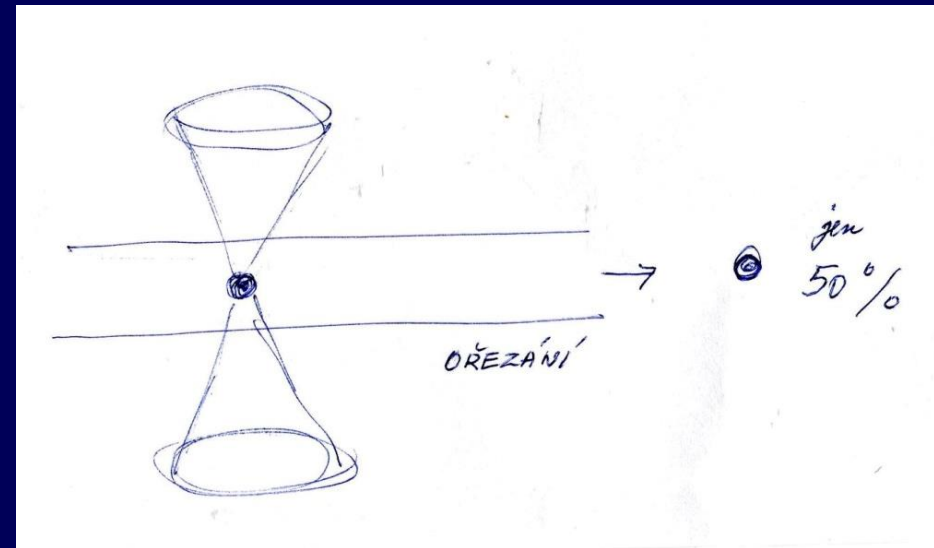
Dekonvoluce

- Metoda softwarové rekonstrukce původního nezkresleného vzorku

Zobrazení bodu
v axiálním směru (xz)



Dekonvolucí dosáhneme
100% původního
nezkresleného vzorku



Ořezem neostrých konců
dosáhneme jen 50%
původního nezkresleného
vzorku

Dekonvoluce

- matematické zpracování obrazu, které redukuje rozmazání obrazu a vylepšuje kontrast a rozlišení.

