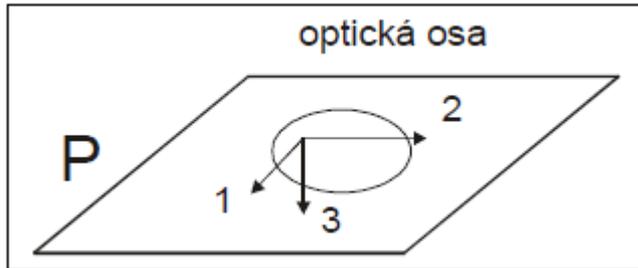


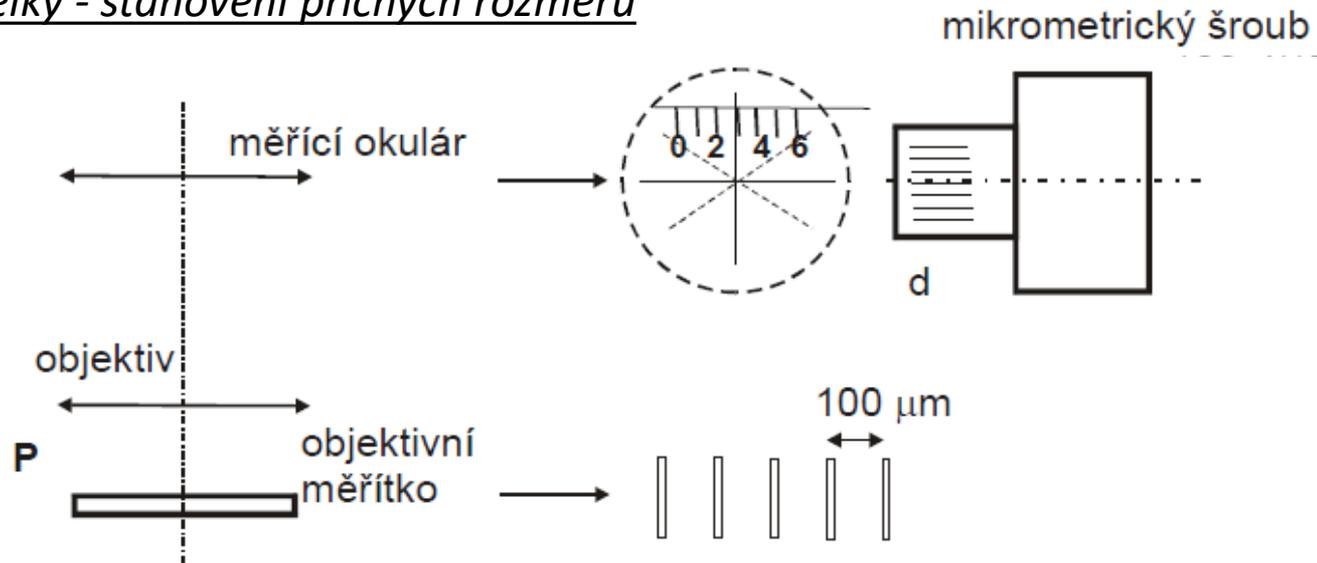
Měření rozměrů ve SM



Rozlišujeme:

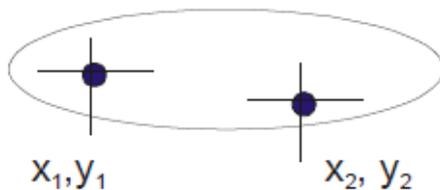
- 1, 2 – rozměry kolmé k optické ose
- 3 – rozměry podél optické osy

Měření délky - stanovení příčných rozměrů



kalibrace – přesnost měření cca 300 nm

Větší objekty: vzdálenosti bodů – posuvy P s přesností 0,1 mm

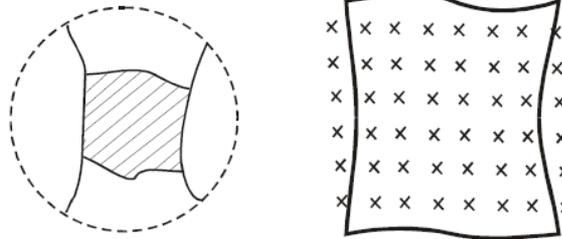


$$\Rightarrow d = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

Měření rozměrů ve SM

Měření plochy S

- Po překreslení nebo vyfocení je plocha zjištěna:
 - planimetrem – přístroj pro měření obsahu rovinných ploch
 - vážkovou metodou
- Rastrové metody: v ohniskové rovině okuláru je rastr (např. body)



3. Počítačovou analýzou obrazu

- využití ovládacího programu mikroskopu, příp. speciálních programů (např. ImageJ)

File	Area	Mean	Min	Max
1	5992704	134.899	1	255
2	14157	249.907	173	255
3	56732	122.253	2	253

Měření rozměrů ve SM

Počítání mikroskopických objektů

- pro zjišťování počtu mikroobjektů v jednotce objemu (koncentrace) se používají počítací komůrky (např. Bürkerova komůrka)
- použití např. v medicíně pro stanovení počtu červených a bílých krvinek

Červené krvinky

- krev se ředí 200x v tzv. Hayemově roztoku (HgCl_2 , Na_2SO_4 , NaCl - zabraňuje srážení krve)
- počítají se v obdélnících komůrky; norma: muži 5 miliónů v mm^3 , ženy 4.5 milionu v mm^3

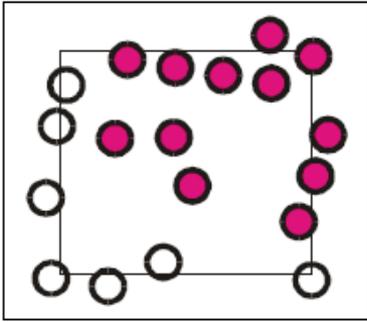
Bílé krvinky

- krev se ředí 20x v tzv. Türkově roztoku (ledová kyselina octová 1%, 1% roztok genciánová violet' - 3% H_2O)
- nejdříve dojde k hemolýze červených krvinek (rozpad), pak obarvení jader bílých krvinek
- norma: muži i ženy 4000 – 10000 v mm^3 ; počítání ve velkých čtvercích komůrky (nad 10 tis. leukóza, nad 30 tis. leukémie)

Měření rozměrů ve SM

Počítání mikroskopických objektů

Bürkerovo pravidlo:



Statistika – Poissonova: náhodná veličina, která vyjadřuje počet výskytu v určitém intervalu (objemu), když nastávají nezávisle na sobě

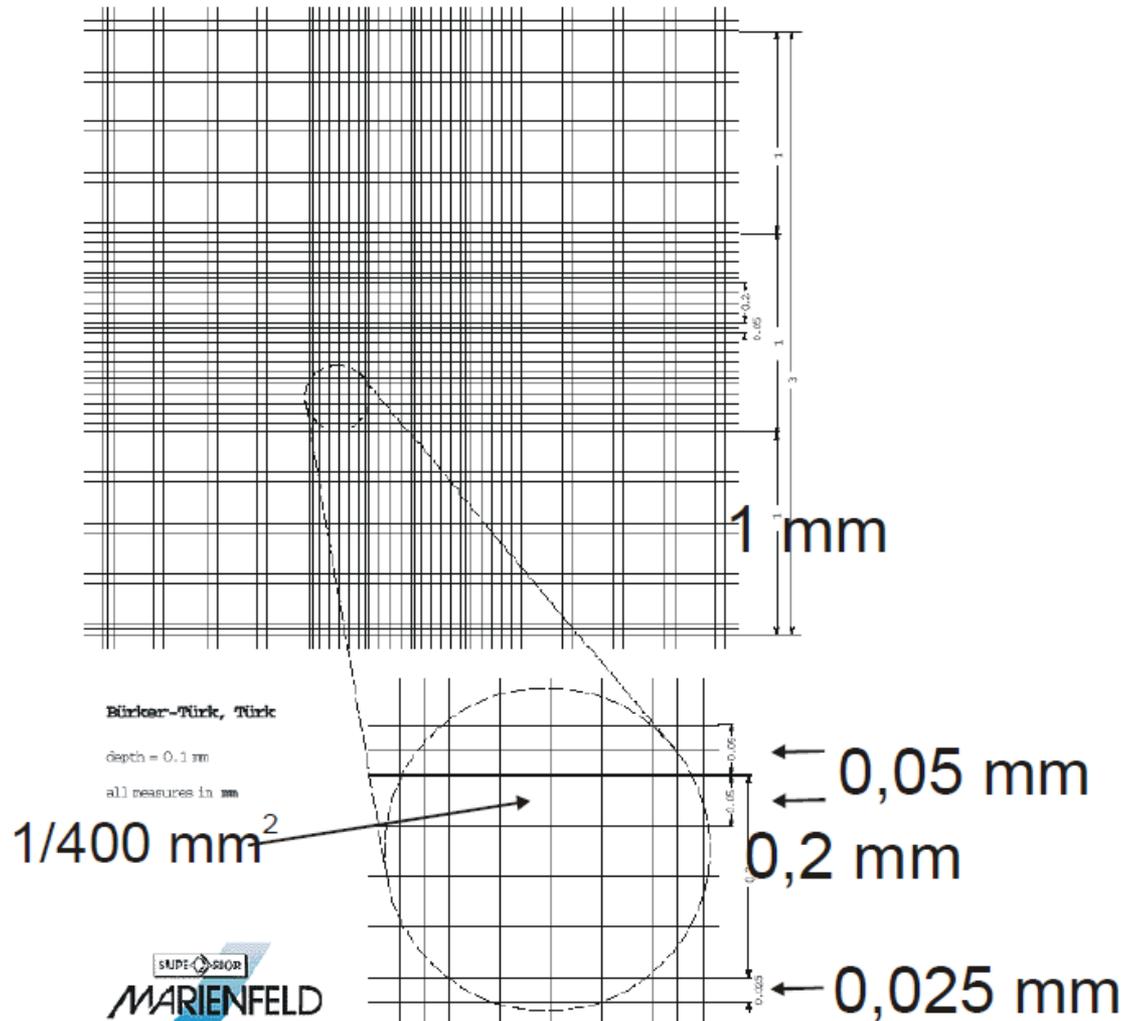
Používá se výrazu: chyba jednoho měření (relativní) = $\frac{1}{\sqrt{p}}$, p – celkový počet napočítaných krvinek

Př.: 400 krvinek – 5 % chyba

Měření rozměrů ve SM

Bürker-Türkova komůrka

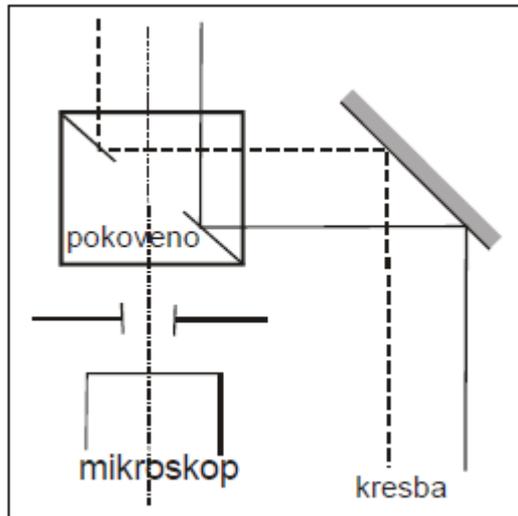
- definovaný rastr s hloubkou 0.1 mm
- při známé vrstvě roztoku – 0.1 mm, máme definované objemy pod příslušnými vrypy



Záznam obrazu ze SM

1. Kreslení

- přímo nebo použijeme okulár se sítkou a kreslíme na mm papír
- kreslicí zařízení (obraz se promítne na papír)
- Abbéův kreslicí přístroj



Nástavec okuláru: dva skleněné slepené hranoly

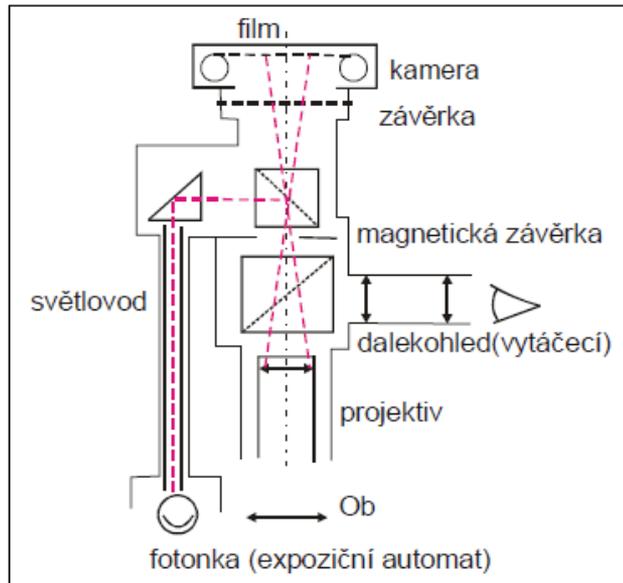
- částečně pokovené
- na rameni uchycené zrcátko - vidíme současně mikroskopický obraz i kresbu (obkreslujeme viděný obraz)



Záznam obrazu ze SM

2. Mikrofotografie

- fotografický záznam obrazu v mikroskopu
- a) kombinace mikroskop – fotografický přístroj
 - optimální sestavení – výstupní pupila splývá se vstupní pupilou fotoaparátu
 - b) propojení fotoaparátu (bez objektivu) s mikroskopem přes spojovací tubus
 - c) nasazovací kamera a projektiv



- kamera je bez objektivu
- speciální projektiv promítá obraz na film
- pomocný systém (dalekohled) – umožňuje zaostřit mikroskop a vybrat osvětlené pole

3. Mikrokinematografie

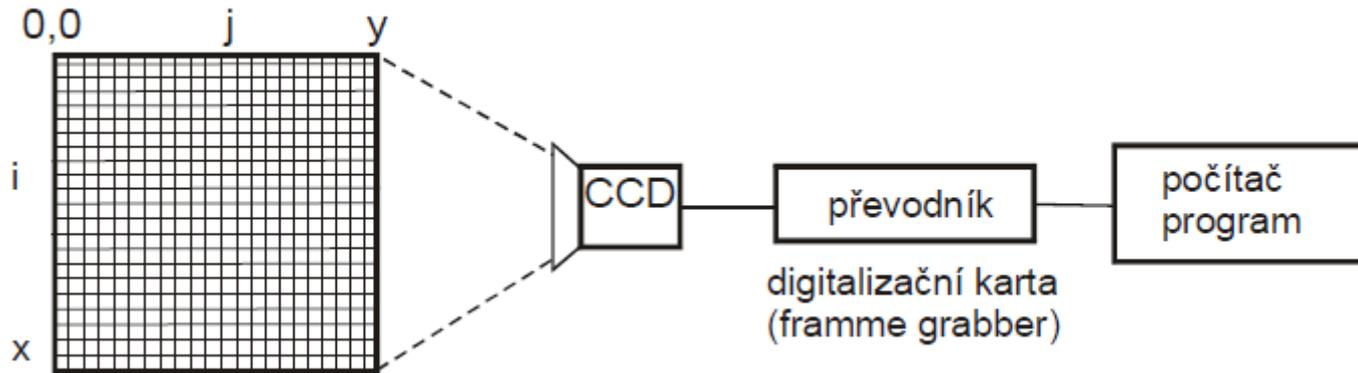
- filmová kamera, CCD, CMOS kamery, propojení na počítač s ovládacím programem

Počítačová analýza a úprava obrazu

- řada programů pro analýzy mikroskopických snímků (např. Micro Image, ImageJ)

Princip:

- Pořízení obrazu* – přímo ze SM (digitální fotoaparát, CCD, CMOS kamera), z fotografie přes scanner



- Obrazová matice: 4096x4096, 2048x2048, 1024x1024, 4008x2664, ...

2. *Digitalizace obrazu*

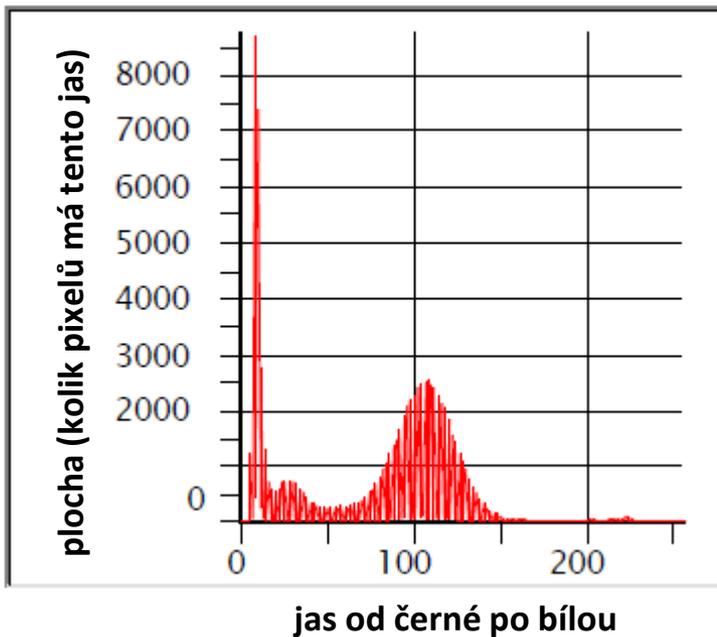
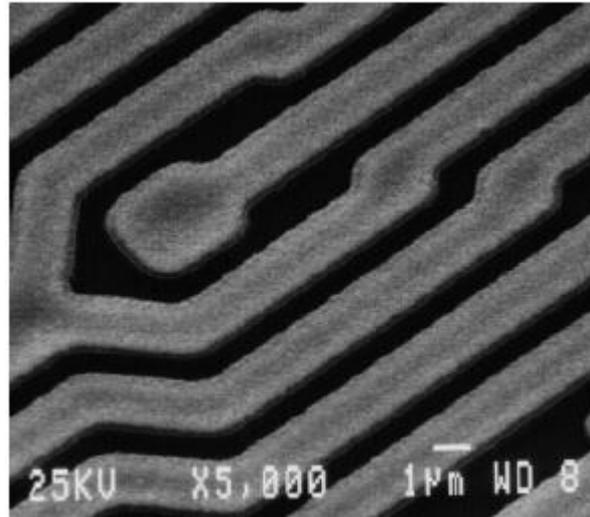
- matice obrazových bodů – pixelů (picture element)
- v každém pixelu je dán jas úrovní intenzity daného bodu - počet bitů v pixelu
- třídy obrazu: dvouúrovňová (černá-bílá), šedotónový (8, 14, 16 bitů)
- RGB (red-green-blue) – skutečné barvy

Př.: 8 –bitové šedotónové vyjádření – 256 (2^8) úrovní šedi

- RGB – 2^{24} (24 bitový RGB triplet)

Charakteristiky digitalizovaného obrazu

Integrovaný obvod



Histogram obrázku – rozložení jasu v obraze

- pomocí matematických funkcí lze omezit tvar histogramu (lineární, logaritmická, exponenciální, atd.)
- úprava histogramu – tzv. *equalizace obrazu*

Zpracování obrazu

- úprava a zpracování snímků důležité pro jeho vyhodnocení

1. Aritmetické operace

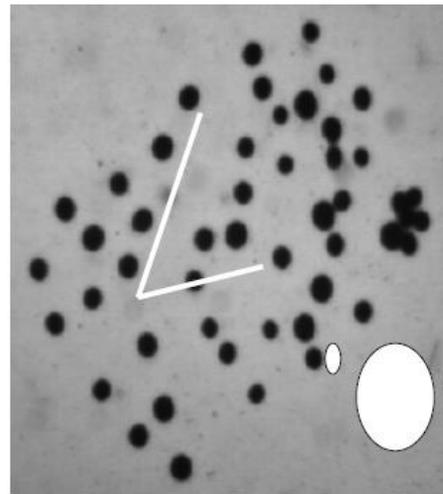
- sčítání – průměrování, redukce šumu

$$\begin{pmatrix} 2 & 25 & 13 \\ 13 & 37 & 14 \\ 4 & 17 & 9 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} 10 & 35 & 8 \\ 7 & 43 & 12 \\ 6 & 21 & 11 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 12 & 60 & 21 \\ 20 & 80 & 26 \\ 10 & 38 & 20 \end{pmatrix}$$

- odečítání – např. pozadí \Rightarrow zvýšení kontrastu
- násobení – např. korekce kontrastu, aplikace masky
- dělení – např. korekce kontrastu

2. Logické a pravděpodobnostní operace – pro černobílý obraz

3. Měření a počítání objektů v obraze



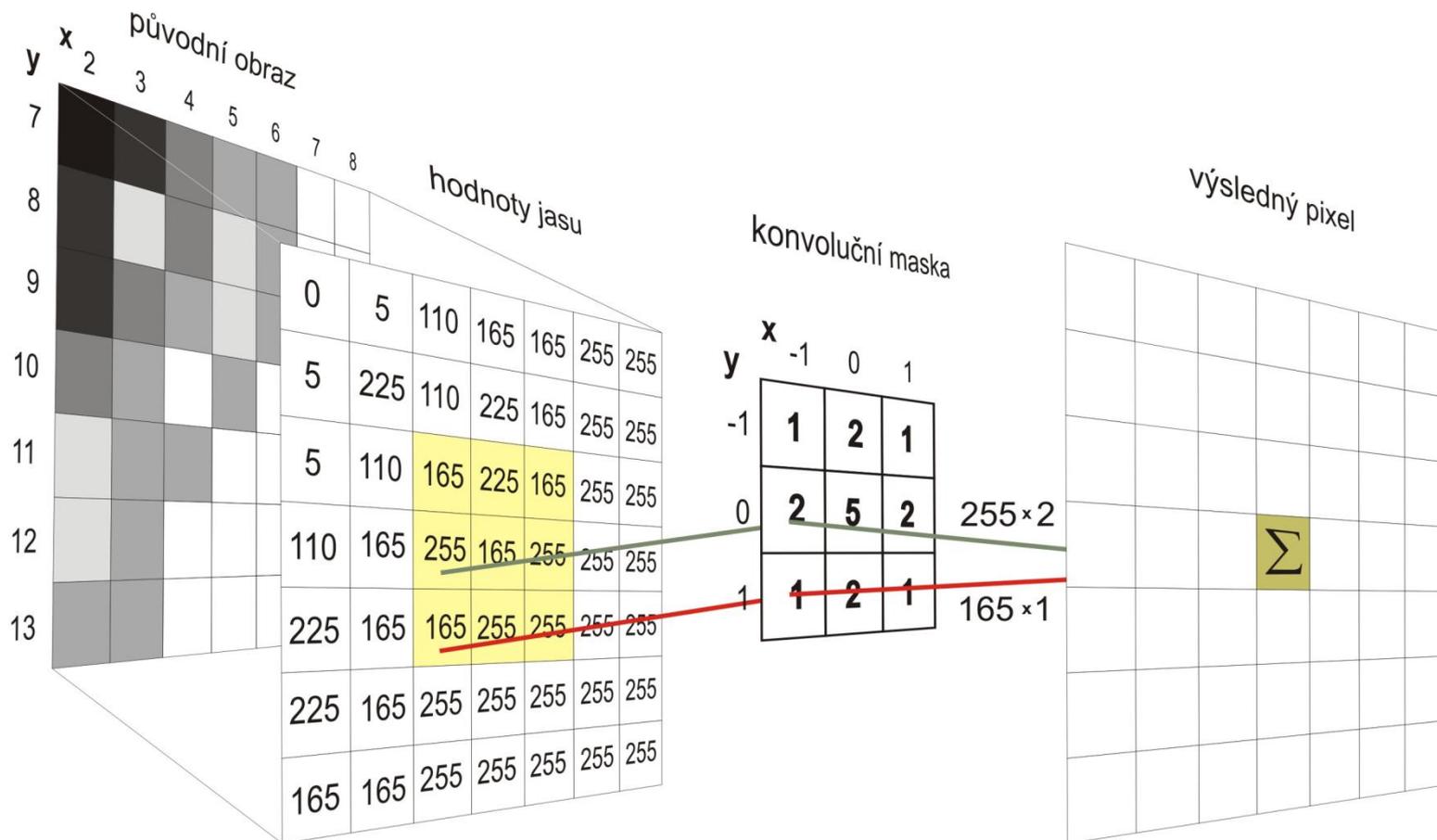
- délka úsečky mezi dvěma pixely
- úhel mezi dvěma úsečkami
- plocha P (počet pixelů ve vyznačené ploše)
- počet objektů v obraze

Zpracování obrazu

4. Filtrování – číslicové filtry

Př.: maticová konvoluce – hodnota pixelu se nahrazuje lineární kombinací pixelů v okolí (obnova ztracených údajů, rozostření, různé typy filtrů)

- velikost konvoluční matice je obvykle 3x3 až 6x6
- hodnota koeficientů v konvoluční masce závisí na typu filtru
- pro udržení bitové hloubky pixelu nutná korekce (např. dělení součtem koef. konvoluční masky)
($1 \cdot 165 + 2 \cdot 255 + 1 \cdot 165 + 2 \cdot 225 + \dots = 3555 / (1+2+1+2+5+2+1+2+1) = 209$)



4. Filtrování – číslicové filtry

zaostření



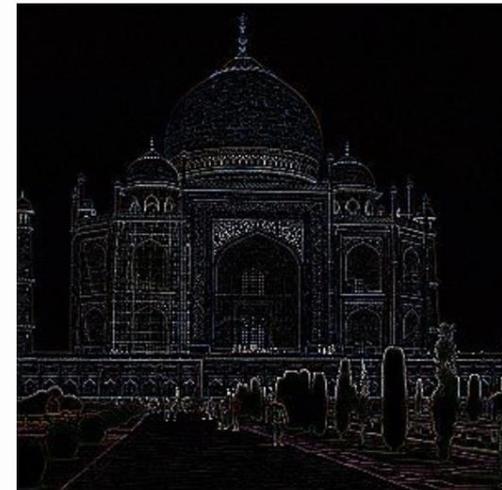
0	0	0	0	0
0	0	-1	0	0
0	-1	5	-1	0
0	0	-1	0	0
0	0	0	0	0

rozmazání



0	0	0	0	0
0	1	1	1	0
0	1	1	1	0
0	1	1	1	0
0	0	0	0	0

zvýraznění hran



	0	1	0	
	1	-4	1	
	0	1	0	

Zpracování obrazu

5. Fourierova transformace

Fourierova transformace $S(\omega)$ (funkce frekvence) a časové funkce $s(t)$ je definovaná podle známého vztahu

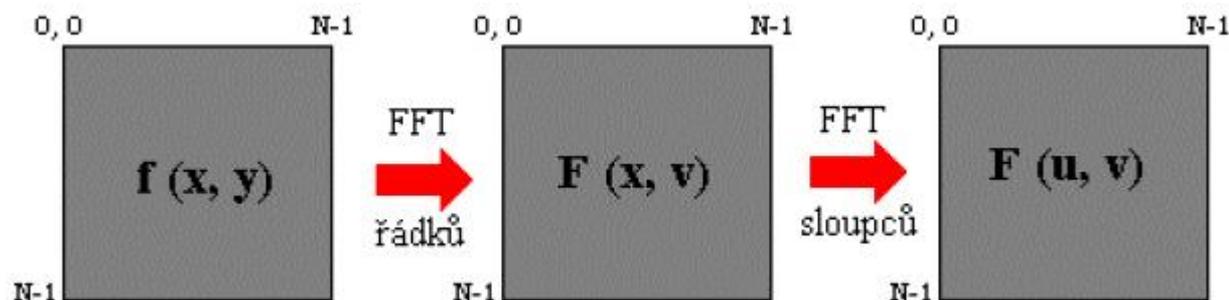
$$S(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t)e^{-i\omega t} dt \Rightarrow S(2\pi f) = \int_{-\infty}^{\infty} s(t)e^{-i2\pi ft} dt ,$$

- pro počítačové zpracování probíhající v diskrétních bodech vyjádřena pro každou spektrální čáru (frekvenci) součtem – diskrétní Fourierova transformace:

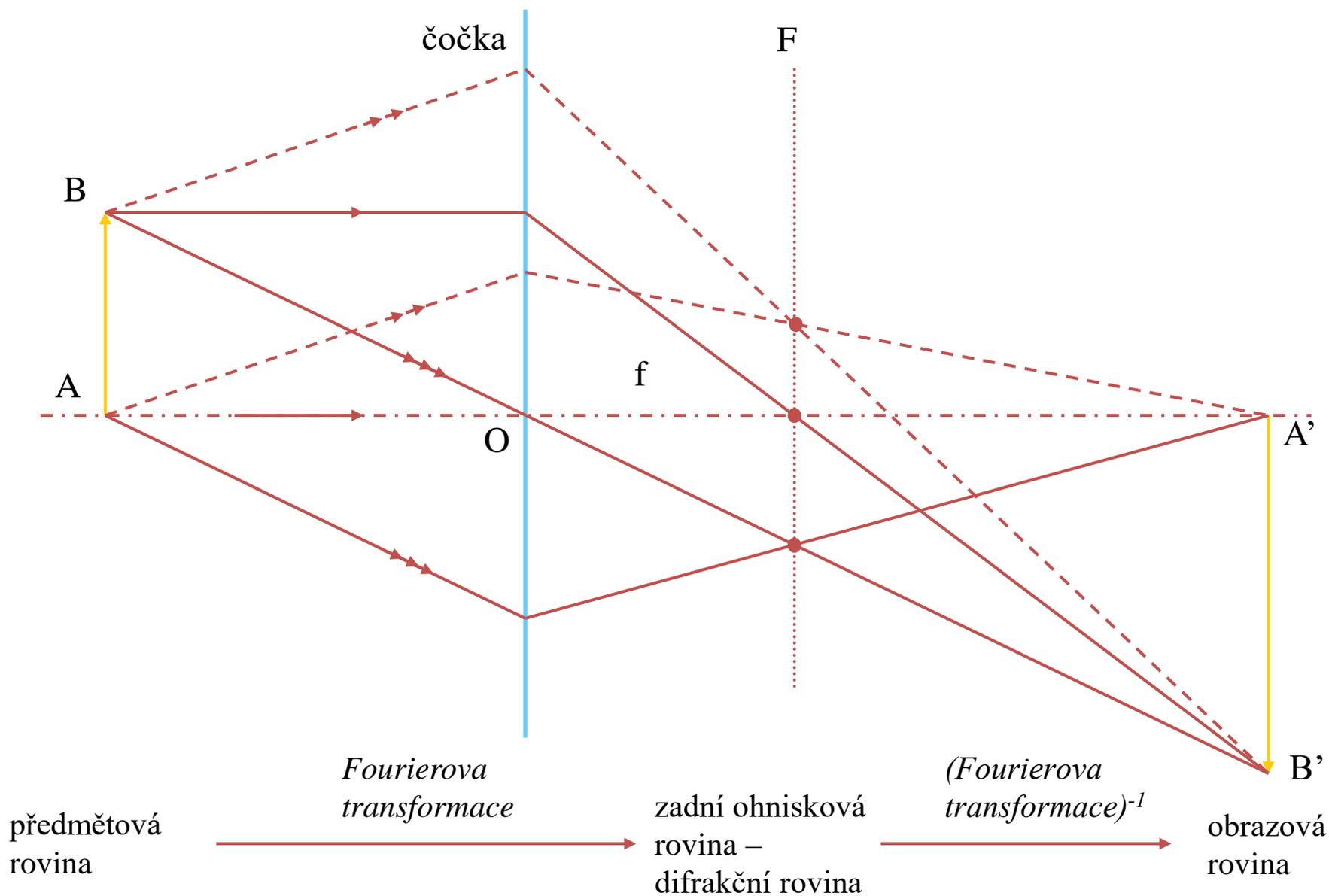
$$S(n) = \sum_{k=0}^{N-1} s(k)e^{-ink\frac{2\pi}{N}} , n = 0, \dots, N - 1$$

Díky separovatelnosti Fourierovy transformace je možné aplikovat diskrétní Fourierovu transformaci nejprve na řádky a pak na sloupce vstupního obrázku

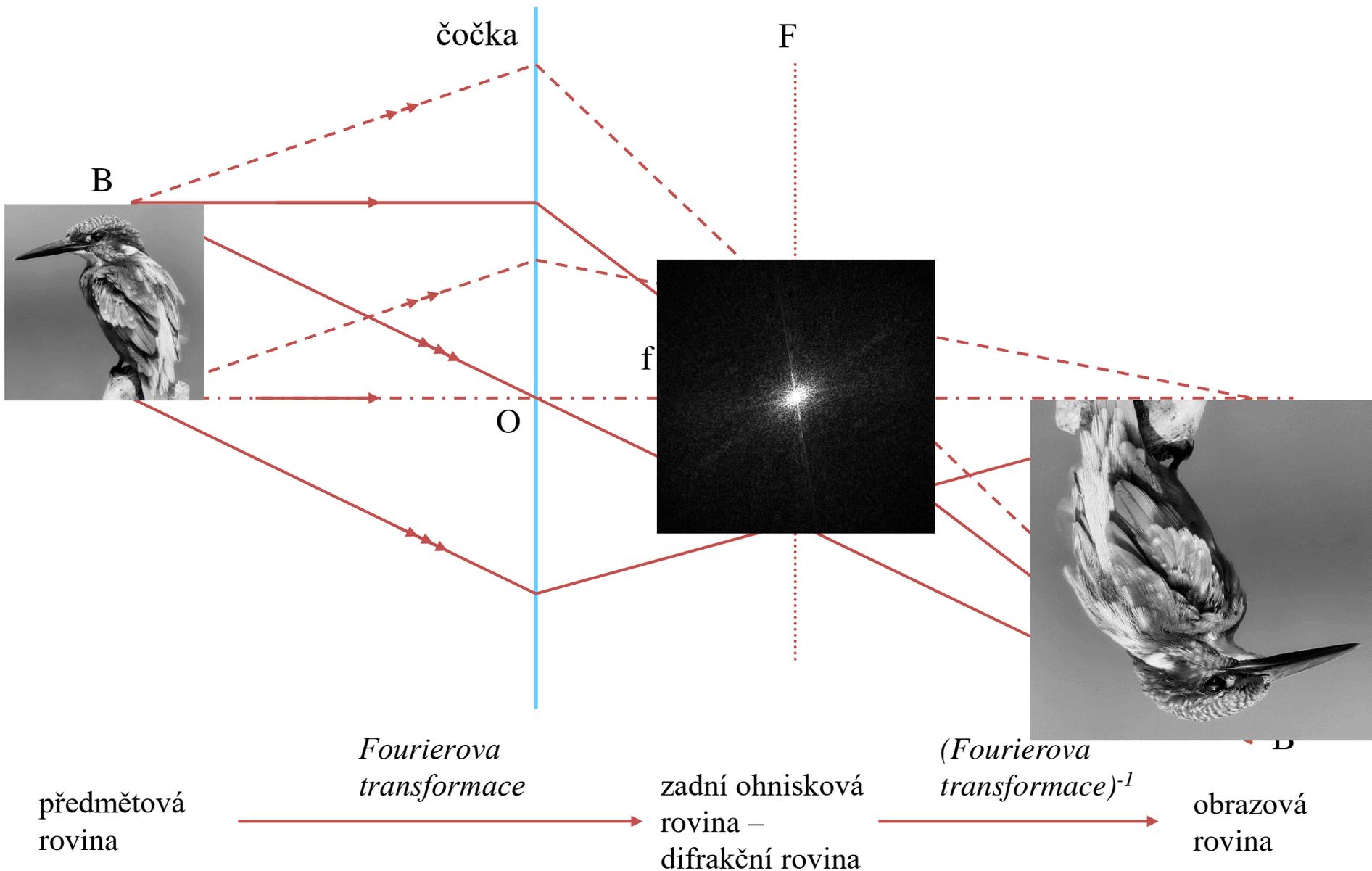
$$F(u, v) = \sum_{x=0}^{N-1} \sum_{y=0}^{M-1} f(x, y)e^{-i\frac{2\pi}{N}xu} e^{-i\frac{2\pi}{M}yv}$$



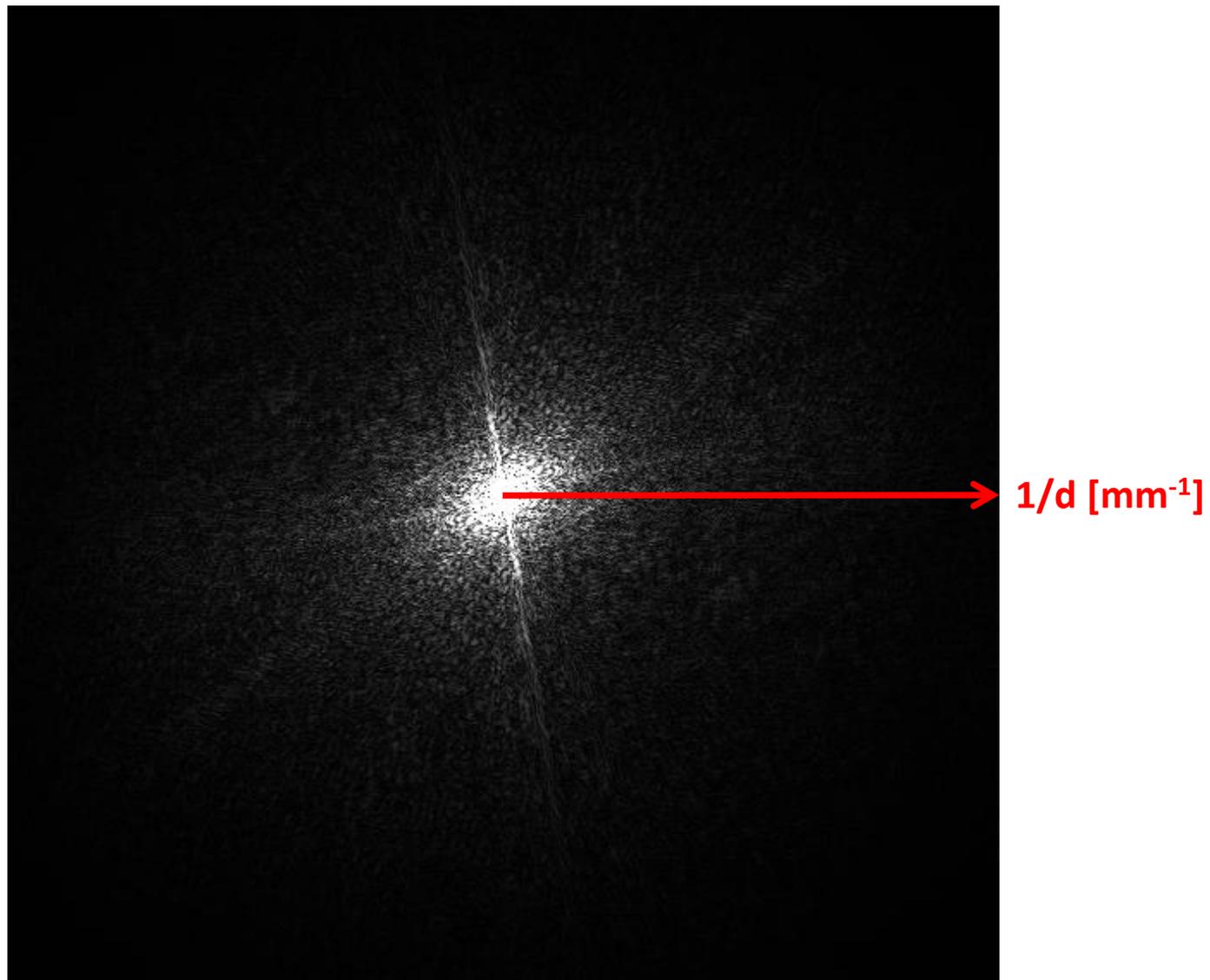
Zpracování obrazu – Fourierova transformace a zpětná Fourierova transformace



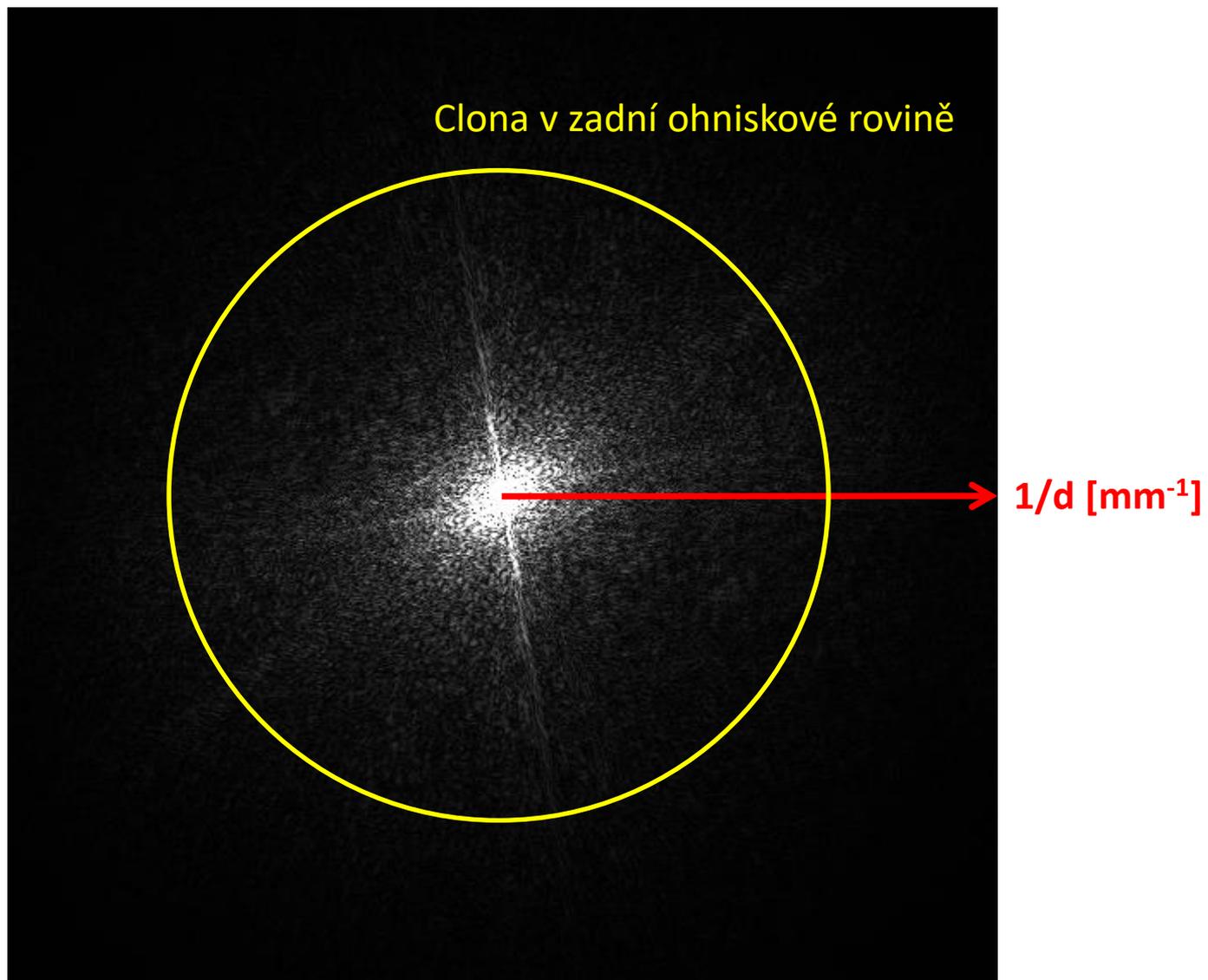
Zpracování obrazu – Fourierova transformace a zpětná Fourierova transformace



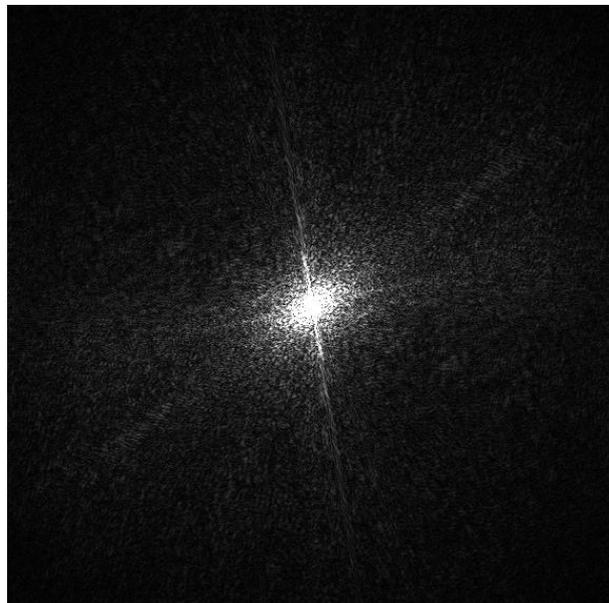
Fourierova transformace reálného obrazu v zadní ohniskové rovině



Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv filtru na rozlišení obrazu předmětu



Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



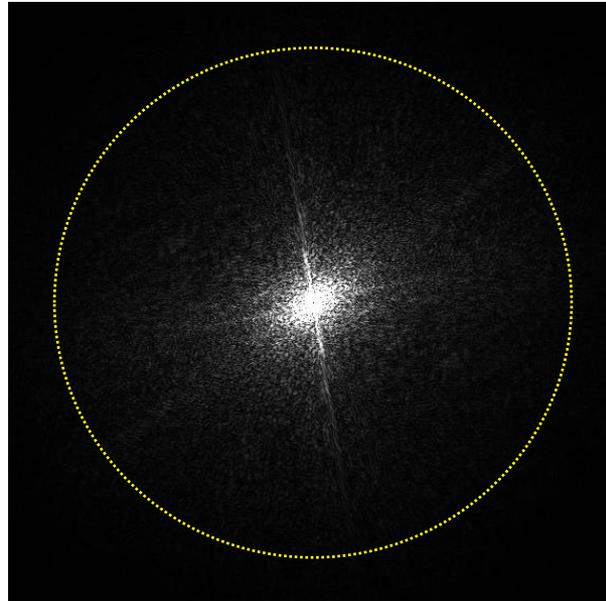
*Fourierova
transformace*

*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

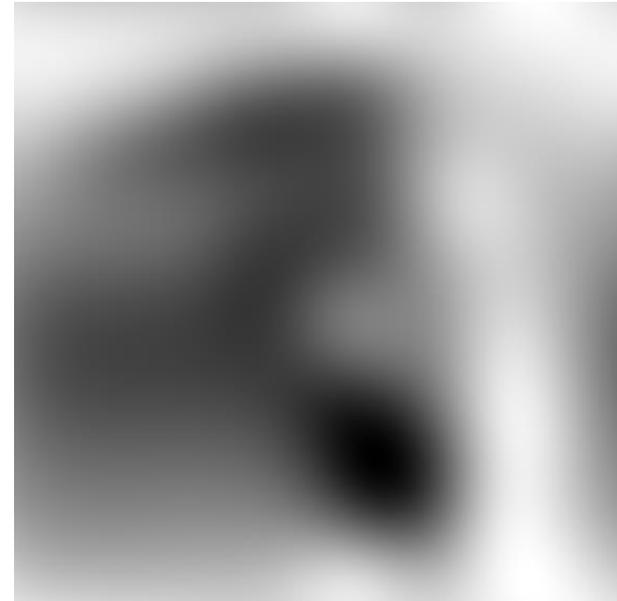
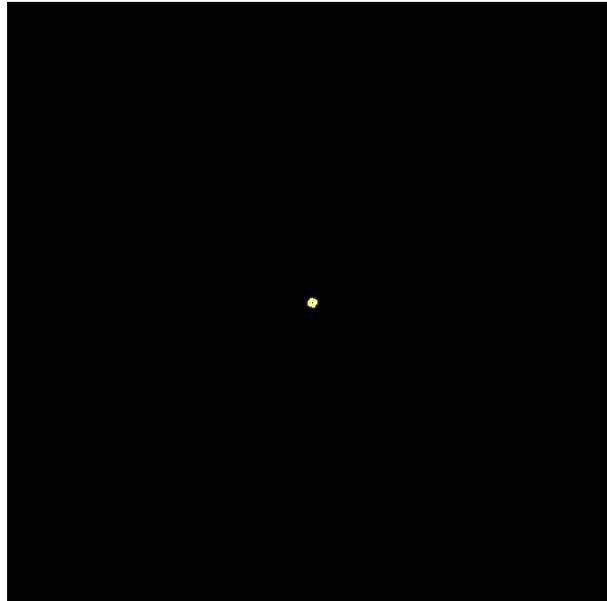
*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

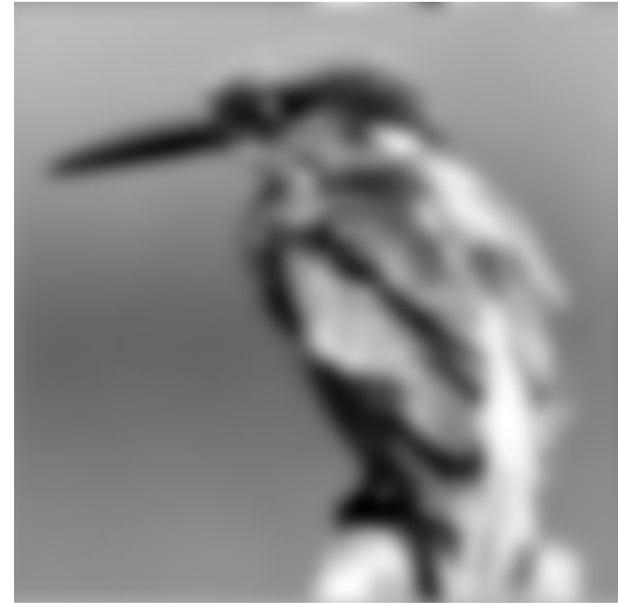
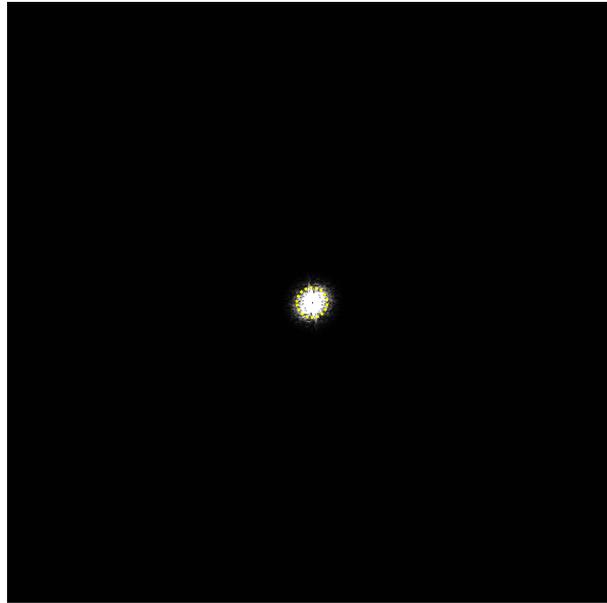
*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

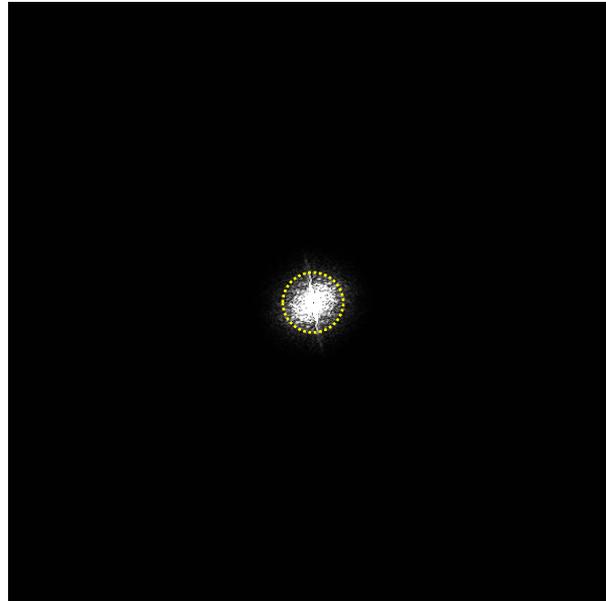
*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

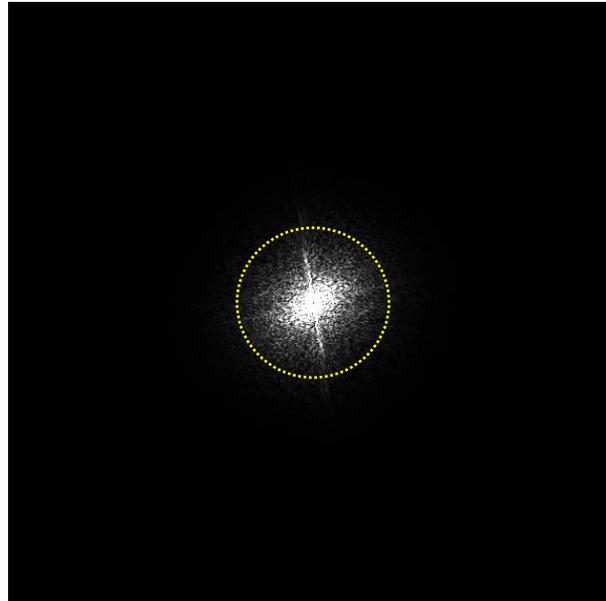
*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

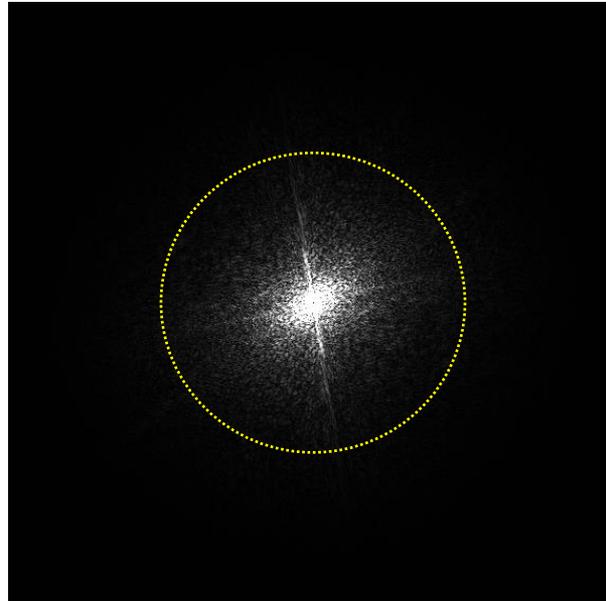
*(Fourierova
transformace)⁻¹*



obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Clona v zadní ohniskové rovině objektivu - vliv na rozlišení obrazu předmětu



předmětová
rovina



*Fourierova
transformace*

*(Fourierova
transformace)⁻¹*



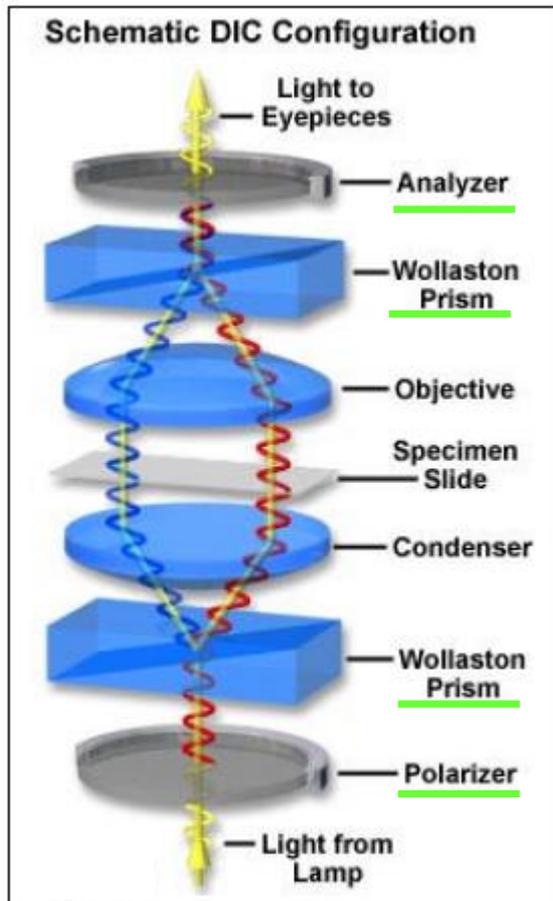
obrazová
rovina

Objektivová clona limituje rozlišení obrazu – čím menší clona, tím menší rozlišení

Normanského diferenciální interferenční kontrast (DIC)

- obecně platí, že *interferenční mikroskopie* pracuje na principu porovnání paprsku po *průchodu vzorkem* a druhého po průchodu *mimo vzorek* (vzduchem). To lze zrealizovat různým způsobem \Rightarrow různé metody interferenční mikroskopie
- vhodné pro pozorování vzorků s nízkým kontrastem

Uspořádání optických prvků – **rozdíl** oproti klasickému SM



- vložení páru Wollastonových hranolů a páru zkřížených polarizátorů

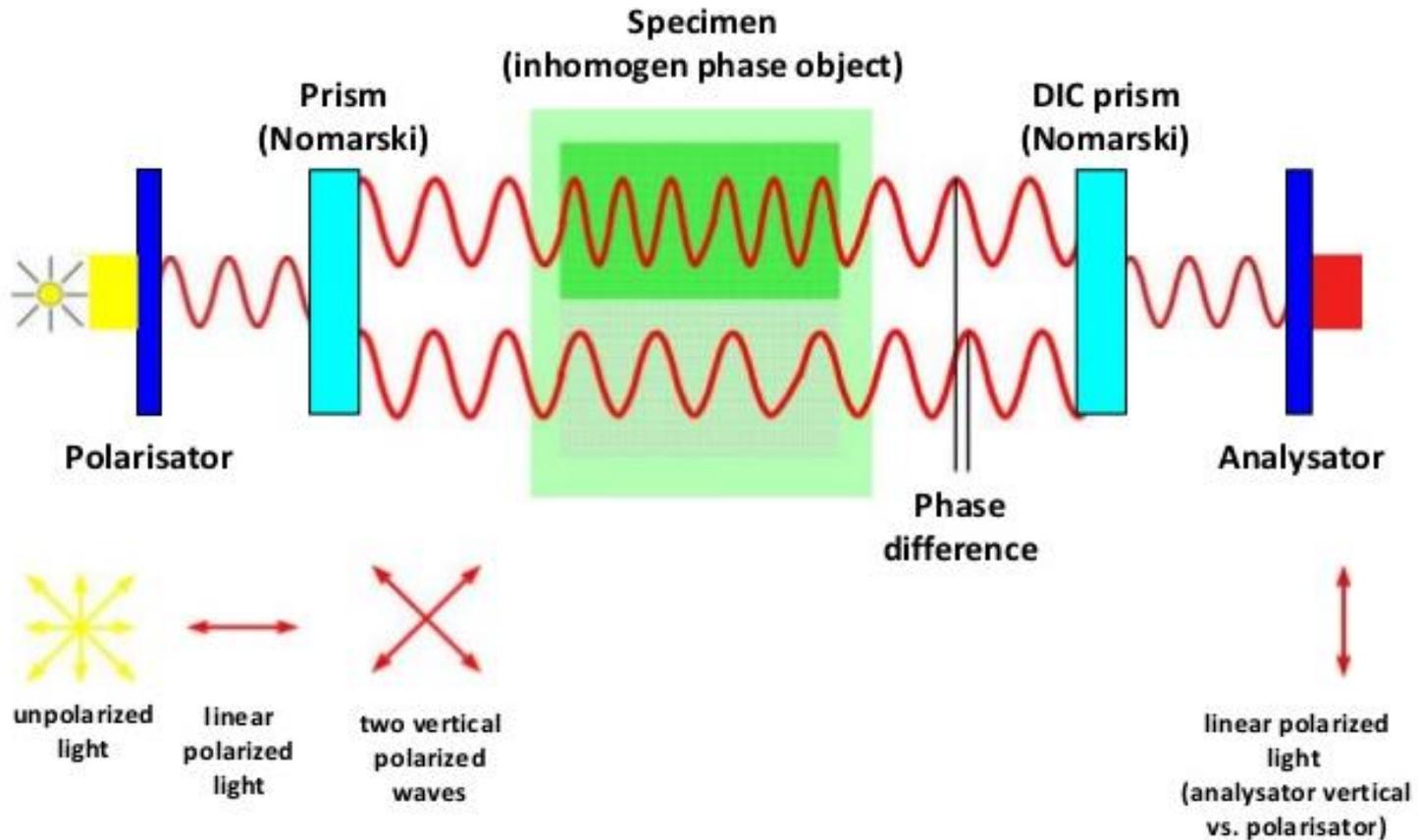
Chod paprsků:

- lineární polarizace světla polarizátorem
- chod paprsků dvojlomným děličem Wollastonova typu (vzniknou dva polarizované paprsky řádný/mimořádný)
- druhý Wollastonův hranol, shodně orientovaný s prvním je umístěn v zadní ohniskové rovině objektivu
- druhý (zkřížený) polarizátor

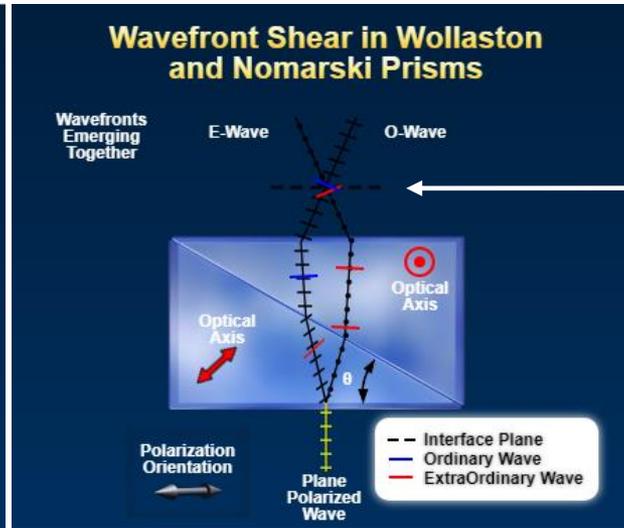
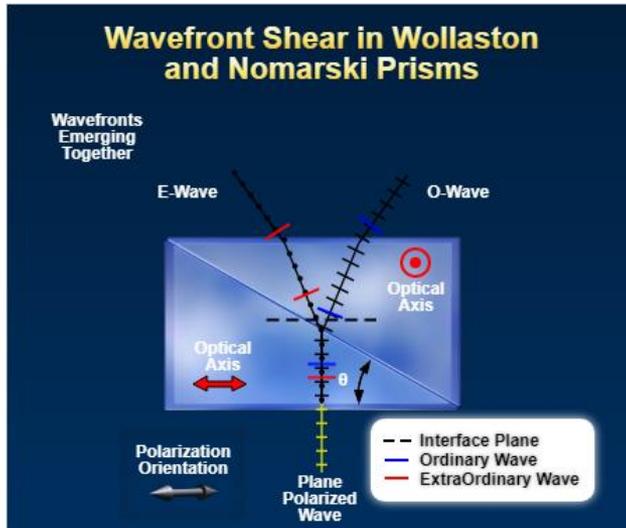
Přednosti:

- kolem detailů předmětu není v obraze rušivá „aura“ jako u fázového kontrastu
- při malých hloubkách ostrosti lze rozložit stupňovité vrstvy ~ nm

Normanského diferenciální interferenční kontrast (DIC)



Normanského diferenciální interferenční kontrast – funkce Wollastonova hranolu

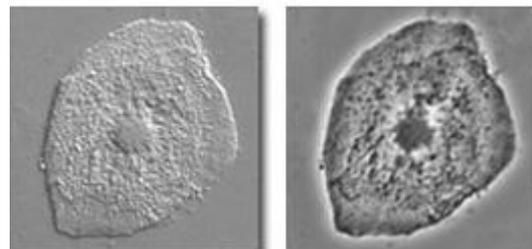


Modifikovaný hranol
ohnisko kondenzoru

- hranol rozdělí lineárně polarizované světlo na dvě vzájemně kolmo polarizované složky (*o* a *e* paprsek)
- *o* a *e* paprsky **nejdou paralelní** (úhel 10^{-4} rad)
- laterální posuv obrazů je ale **velmi malý** ~ $0.1 \mu\text{m}$ (pod rozlišovací mezí objektivu – proto vidíme 1 obraz)
- dvojice paprsků prochází vzorkem a v důsledku např. různé tloušťky preparátu, indexu lomu **dochází k fázovému rozdílu mezi *o* a *e* paprsky**
- druhý Wollastonův hranol (pozice v ohnisku objektivu) skládá *o* a *e* paprsky
- po průchodu analyzátozem mohou spolu paprsky interferovat
- modifikovaný hranol Normanského – *o* a *e* paprsky se překříží v ohniskové rovině kondenzoru \Rightarrow paprsky vstupující do vzorku jsou paralelní \Rightarrow eliminace laterálního posuvu obrazů

DIC

Phase



zdánlivý 3D obraz

Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

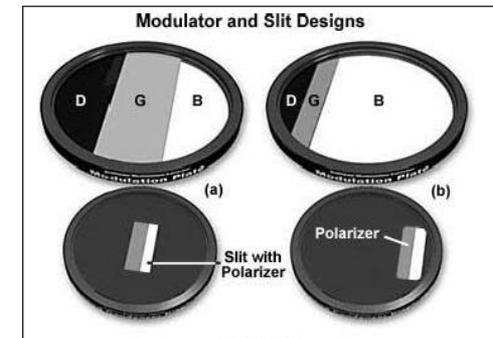
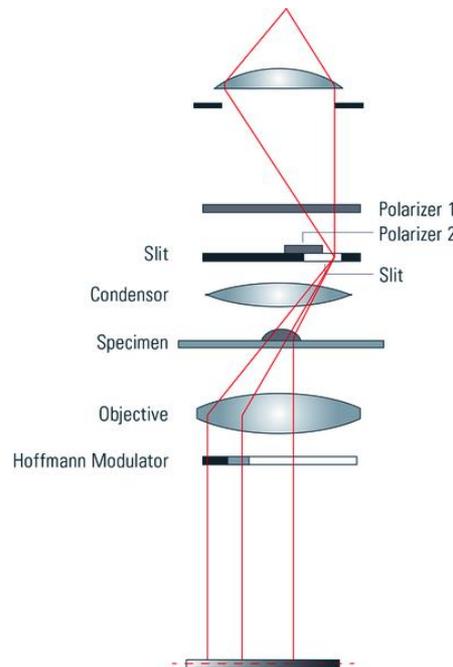
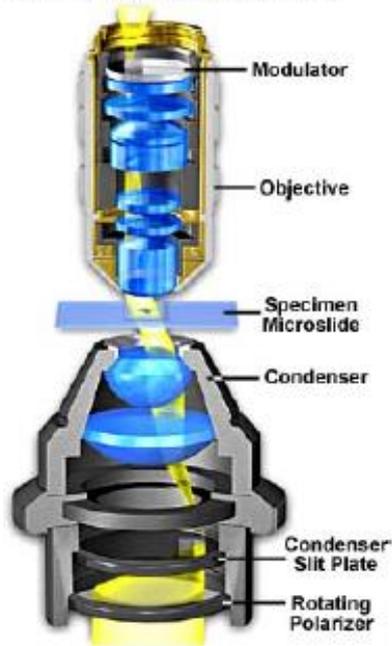
Výhody oproti Normanskému DIC:

- podobné zobrazení při nižší ceně doplňkových komponent
- možnost pozorovat objekty i na dvojlomných podložkách (např. buněčné kultury v plastových kultivačních kyvetách)
- používá se ke *zvýraznění kontrastu neabsorbujících předmětů*

HMC je dokonalou verzí šikmého osvětlení

- virtuálním zdrojem světla, zajišťujícím šikmé osvětlení je při HMC **obdélníková štěrbina** umístěná v přední ohniskové rovině kondenzoru
- v obrazové ohniskové rovině objektivu je **modulátor** (amplitudový filtr) – maska, která se kryje s obrazem štěrbinu \Rightarrow ovlivňuje množství světla propuštěného objektivem

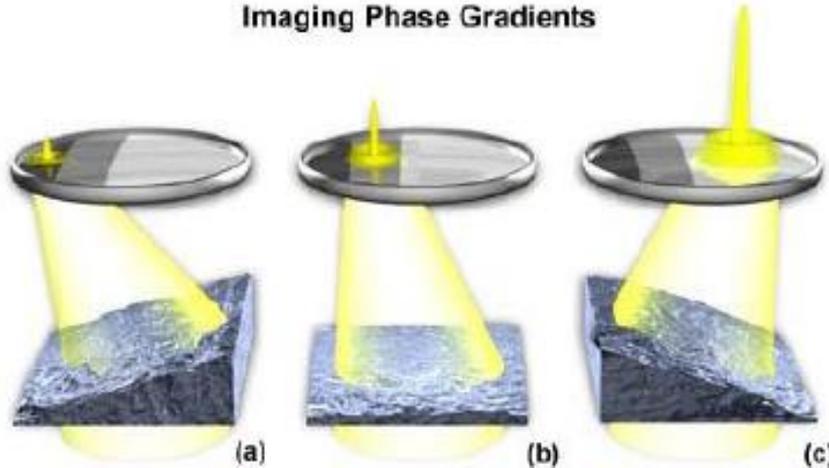
Hoffman Modulation Contrast



- štěrbina má různé umístění
- obsahuje materiál s různou propustností ($T_{G(\text{gradient})}$ a $T_{B(\text{background})}$)
- modulátor – tři oblasti (T_G, T_B, T_D)
- $T_G = 15\%$ (kryje se s obrazem štěrbinu)
- $T_D < 1\%, T_B = 100\%$

Hoffmanův modulační kontrast (HMC)

Imaging Phase Gradients

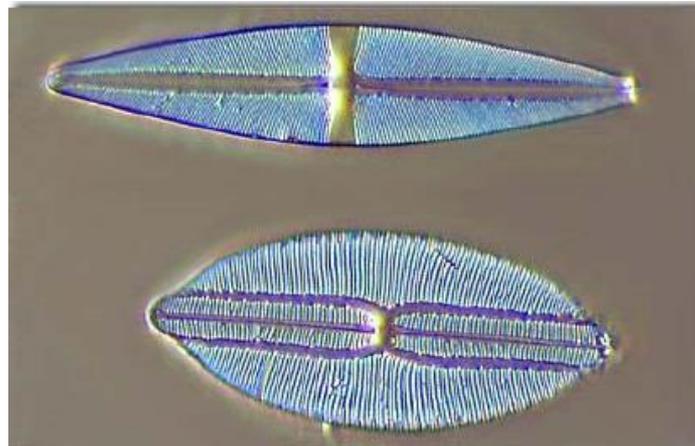


$$T_D < 1 \%$$

$$T_G = 15 \%$$

$$T_B = 100\%$$

- v místech gradientu optických tloušťek se paprsky odchylují (*úhlová odchylka*) a jednotlivé příspěvky vytvoří v zadní ohniskové rovině dílčí obrazy štěrbin
- obrazy štěrbin jsou pak posunuty vůči šedé zóně modulátoru buď do tmavé nebo světlé oblasti modulátoru
- **Výsledek:** dojem šikmo osvětleného reliéfu (světlejší a tmavší kontura)



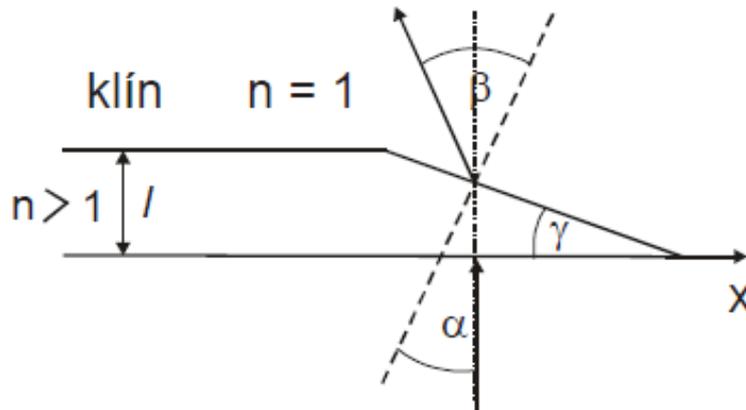
Hoffmanův modulační kontrast – odvození vzorců úhlové odchytky

úhlová odchytky je úměrná

1. $(n - 1) \cdot \frac{dl}{dx}$ grad tl. při $n = \text{konst.}$ (n – index lomu)

2. $n \cdot \frac{dn}{dx}$ grad n , při $l = \text{konst.}$ (l – tl. vzorku)

ad 1) Model 1



Platí: $n \cdot \sin \alpha = \sin \beta$

odchytky:

$$\begin{aligned} \delta \alpha &= \beta - \alpha; \quad \beta - \alpha \cong \sin \beta - \sin \alpha \\ &= n \cdot \sin \alpha - \sin \alpha = (n - 1) \cdot \sin \alpha \end{aligned}$$

gradient tloušťky:

$$\frac{dl}{dx} = \text{tg} \gamma, \quad \text{ale} \quad \gamma = \alpha$$

$$\Rightarrow \text{tg} \gamma = \text{tg} \alpha \cong \sin \alpha = \frac{dl}{dx}$$

$$\Rightarrow \delta \alpha = \beta - \alpha = (n - 1) \cdot \sin \alpha = (n - 1) \cdot \frac{dl}{dx} \quad \text{c.b.d.}$$

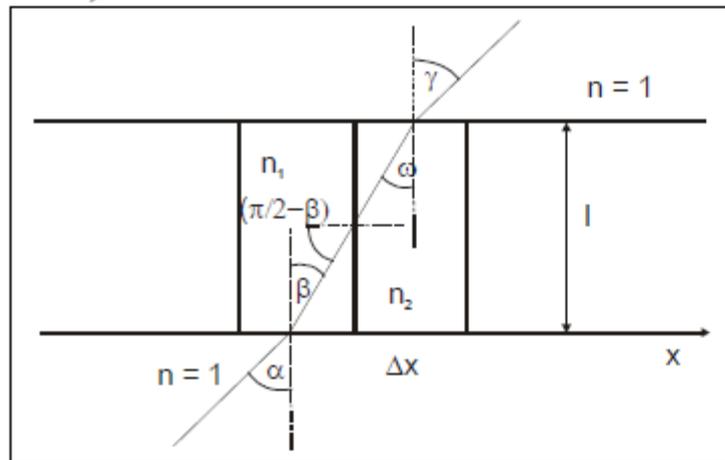
Hoffmanův modulační kontrast – odvození vzorců úhlové odchyšky

úhlová odchyška je úměrná

1. $(n - 1) \cdot \frac{dl}{dx}$ změně tl. při $n = \text{konst.}$ (n – index lomu)

2. $n \cdot \frac{dn}{dx}$ změně n , při $l = \text{konst.}$ (l – tl. vzorku)

ad 2) Model 2



Platí:

$$\sin \alpha = n_1 \sin \beta$$

$$n_1 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} - \beta\right) = n_2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} - \omega\right)$$

$$\sin\left(\frac{\pi}{2} - \beta\right) = \cos \beta$$

$$n_1 \cdot \cos \beta = n_2 \cdot \cos \omega$$

$$\sin \gamma = n_2 \sin \omega \quad (\sin^2 \omega + \cos^2 \omega = 1)$$

$$\sin \gamma = n_2 \sqrt{1 - \cos^2 \omega} = \sqrt{1 - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2 \cos^2 \beta} = \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \left(1 - \frac{\sin^2 \alpha}{n_1^2}\right)} =$$

$$\sqrt{n_2^2 - n_1^2 + \sin^2 \alpha} \Rightarrow \sin^2 \gamma - \sin^2 \alpha = n_2^2 - n_1^2$$

$$\Rightarrow (\gamma - \alpha) \cdot (\gamma + \alpha) = (n_2 - n_1) \cdot (n_2 + n_1) \equiv \Delta n \cdot 2n$$

$$\delta \alpha \sim (\Delta n / \Delta x) \cdot 2n \cdot \text{konst} \sim n \cdot dn/dx \quad \text{c.b.d.}$$

$$\delta \alpha = \gamma - \alpha$$

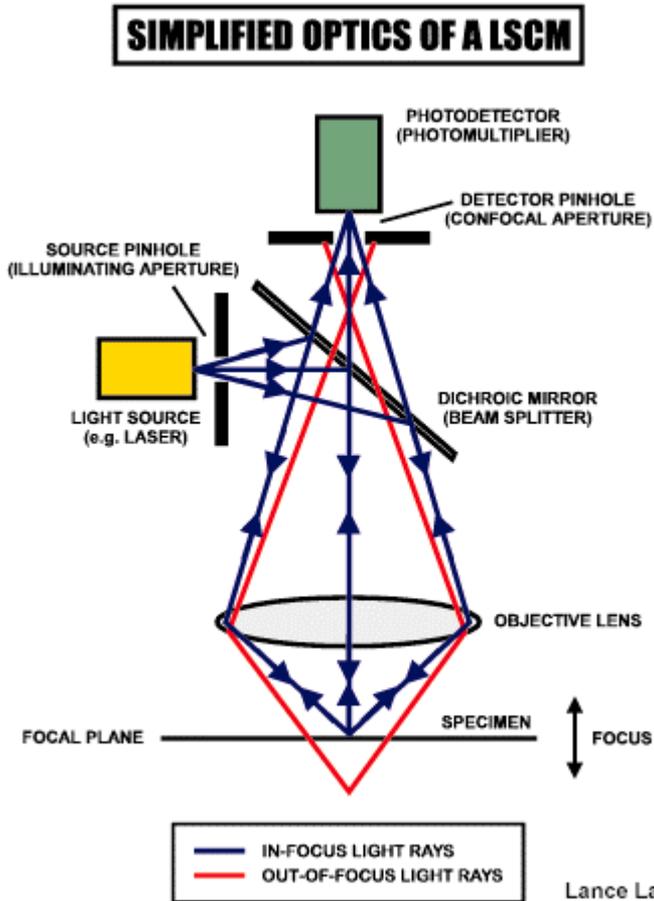
konst. $\sim l, \gamma + \alpha$

Konfokální mikroskopie

(idea Marvina Minkseho z r. 1957 – tzv. tandemová CM)

Rozdělení:

1. LSCM (konfokální skenovací laserová mikroskopie)
2. TSM (tandemová skenovací mikroskopie)



Lance Ladic
ladic@cs.ubc.ca

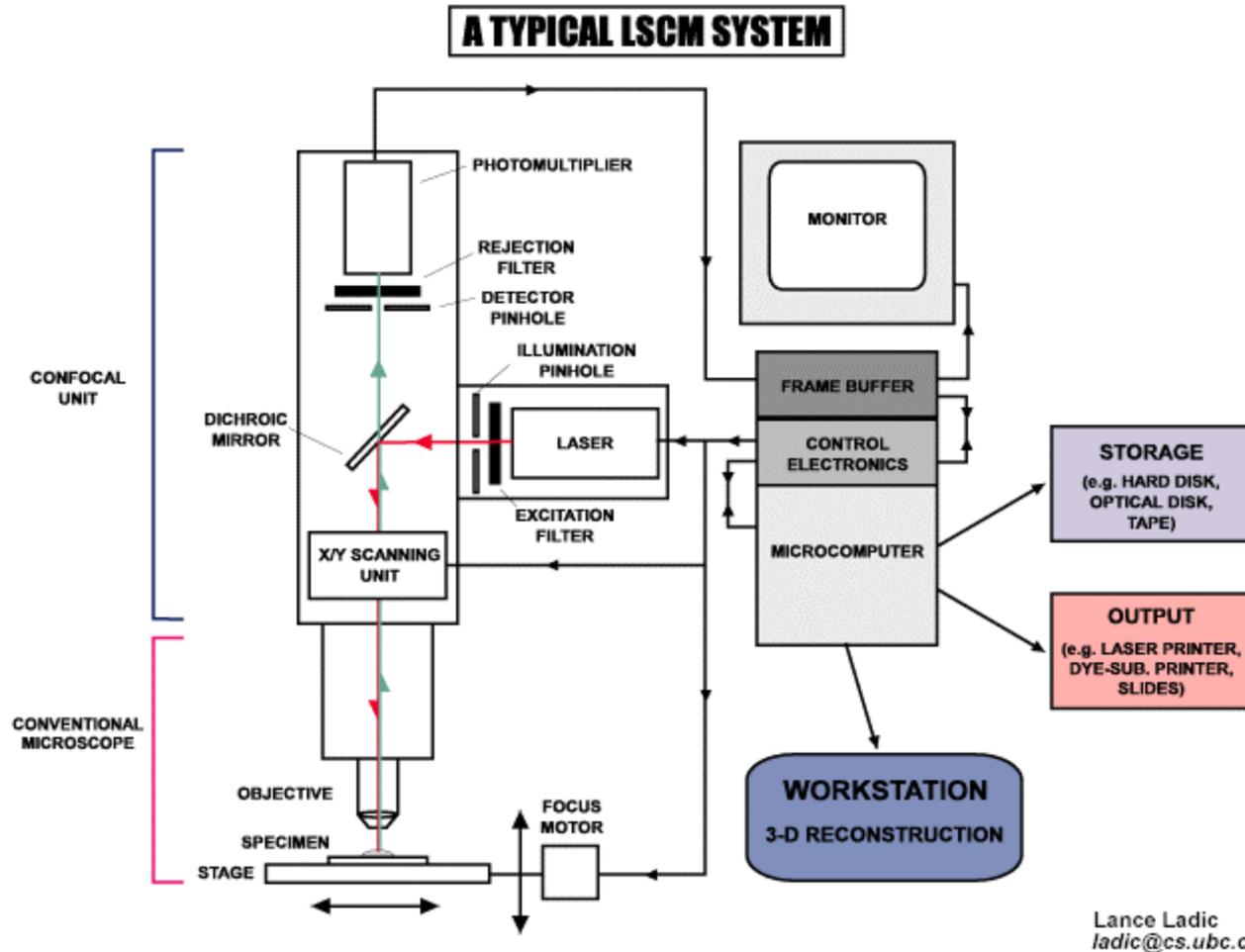
Odlišnost od klasického SM:

- laserový paprsek prochází clonkou a dále je fokusován objektivem na vzorek – průměr paprsku odpovídá difrakční mezi (rozlišovací mez)
- osvětlen je jen jeden bod, signály od okolních bodů (vedle, pod a nad) jsou u detekce omezeny otvorem
- režimy: epi (odražené) nebo fluo (fluorescenční)
- konfokální: kondenzor = objektiv (stejné ohnisko, méně odrazů)
- získání celého obrazu pomocí skenování:
 - rozmítání laserového paprsku
 - příčným posuvem vzorku před objektivem
 - posuvem objektivu nad vzorkem
- konfokální obrazy jsou vždy zaostřené a představují optické řezy vzorkem (pro $\lambda = 488 \text{ nm}$, $tl. = 0.4 \mu\text{m}$)

Počítačová rekonstrukce obrazu:

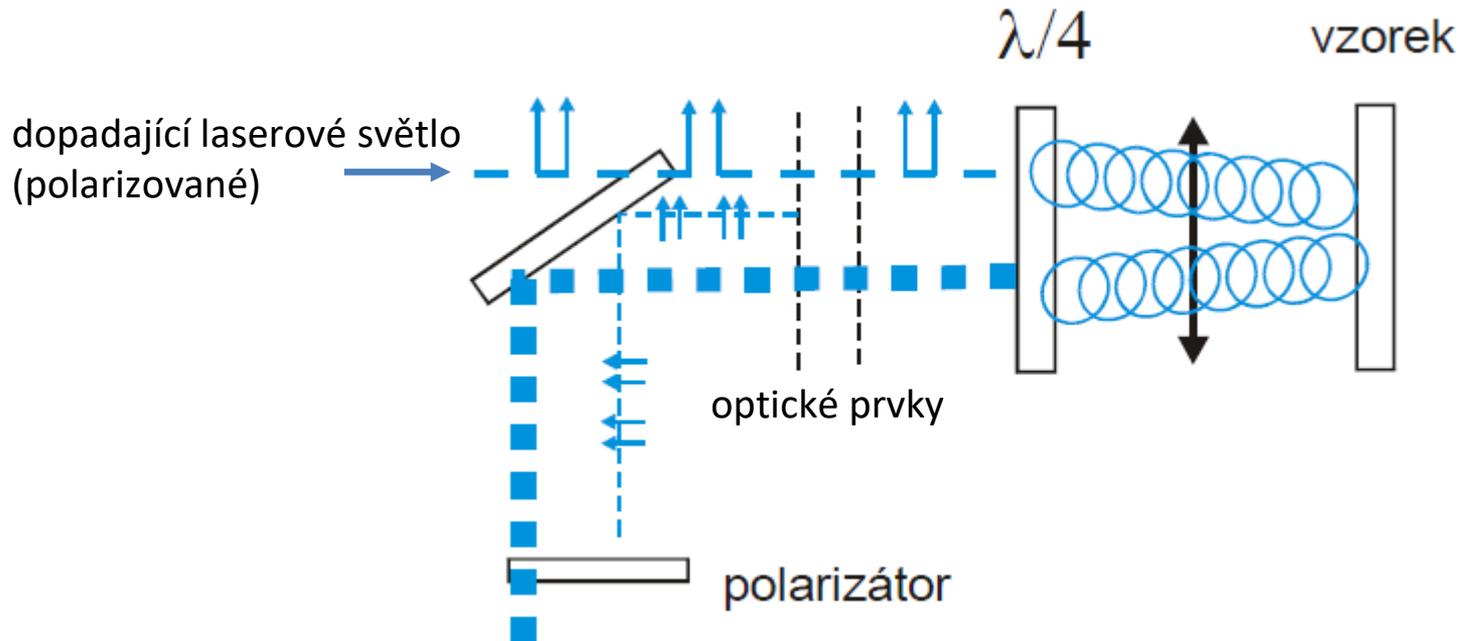
- zvýšení hloubky ostrosti skládáním obrazů
- skládání obrazů, otáčení obrazů, pronikání do hloubky vzorku
- stereoskopické obrázky, korekce pozadí atd.

Konkrétní provedení LSCM



- zrcadlový rozmítací systém může být nahrazen rychlejším systémem umožňujícím pozorování v reálném čase (viz tandemová konfokální mikroskopie)
- do optické soustavy se zařazují polarizační prvky pro eliminaci odraženého světla
- použitý laser, většinou Argonový (čáry 457, 488, 514 nm), filtry vždy monochromatické
- u laserů je nutné zeslabování světla (photobleaching) nebo krátká doba osvětlení bodu
- při slabé fluorescenci je možné zprůměrování mnoha obrázků

Použití polarizačních prvků v konfokální mikroskopii ke zkvalitnění obrazu



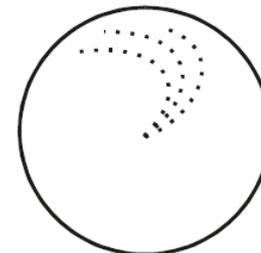
- dopadající světlo je lineárně polarizované (laserový zdroj) a po průchodu $\lambda/4$ destičkou vzniká kruhově polarizované světlo
- odražené světlo od vzorku je také kruhově polarizované, po následném průchodu $\lambda/4$ destičkou vzniká lineárně polarizované světlo otočené o 90° vůči dopadajícímu
- světlo odražené od optických prvků je stejně polarizované jako světlo dopadající a polarizátor ho nepropustí – **eliminace odražených paprsků**

Použití CM biologii:

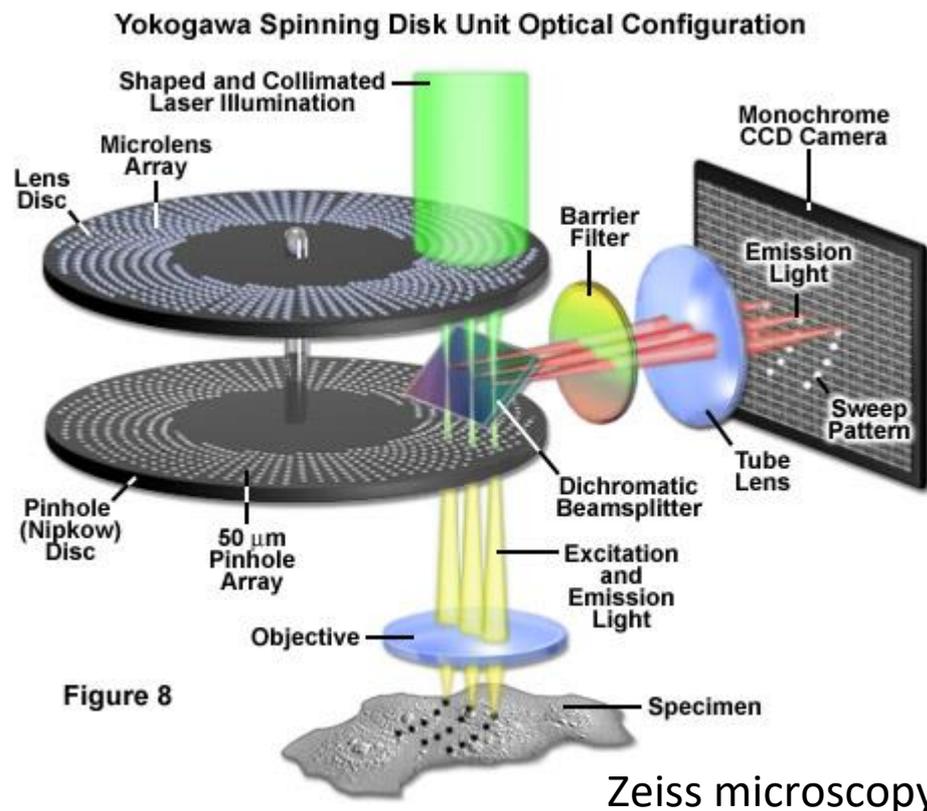
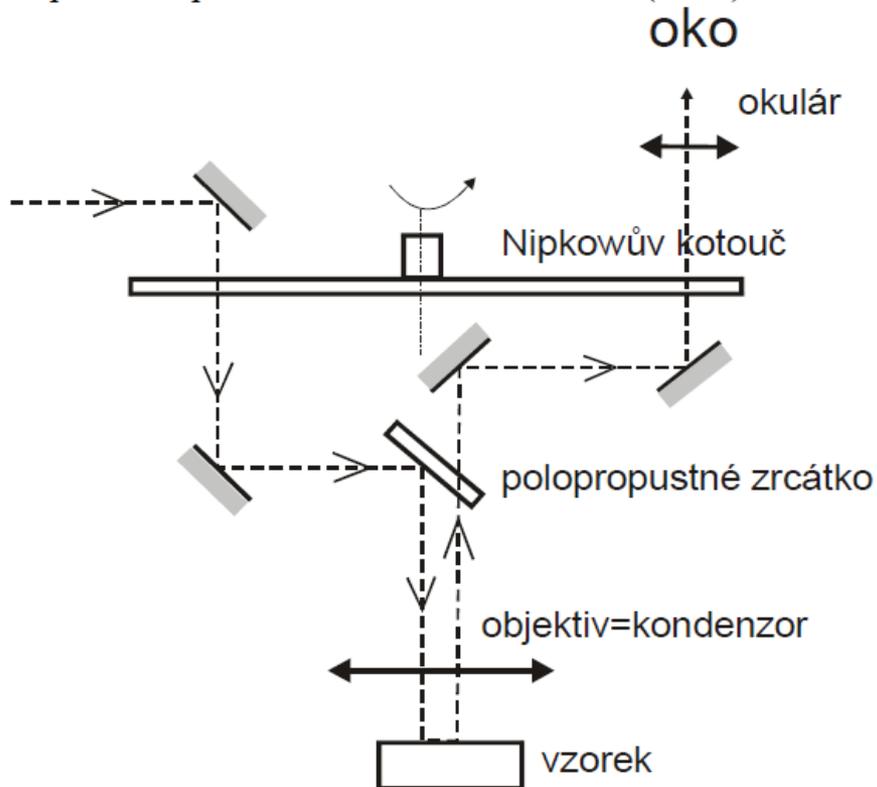
- nedestruktivní a neinvazivní způsob studia prostorové struktury buněk a tkání neuronové sítě v mozkové tkáni, selektivní rozložení fluorescenčních molekul v buňkách atd.)

Tandemová konfokální mikroskopie

- vzorek se většinou pozoruje okem (nebo chlazenou CCD kamerou) v reálném čase (okulárem)
- místo rozmítacích zrcadel se používá **Nipkowův kotouč**
- desítky až stovky tisíc otvorů v Archimedových spirálách
- kotouč rotuje (desítky Hz)
- otvory konjugované (v dopadajícím a detekovaném světle)
- v daném okamžiku je nad vzorkem (osvětlení) a obrazem (detekce) využit pouze jeden otvor



Uspořádání podle Petráně a Hadravského (1985) LF Plzeň





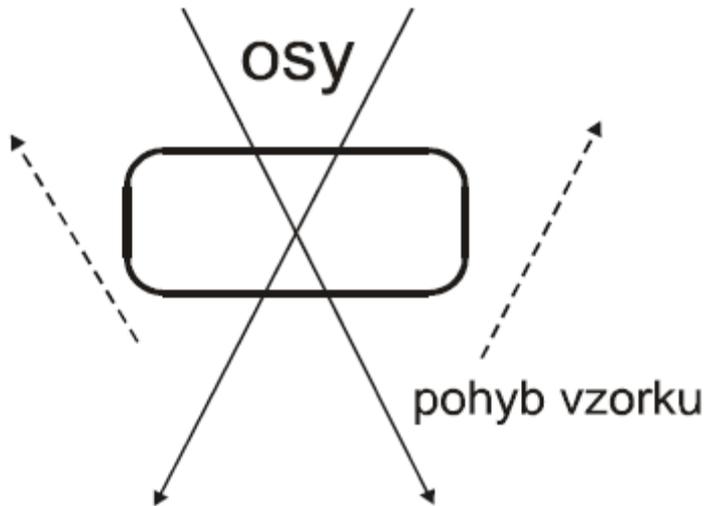
Flatfish image acquired with Andor Bench Top Confocal BC 43 (spinning disc) using multiple tile acquisition and montage. 6 tiles were acquired to compose the image covering a range of 554 μm . The image was rendered with Imaris. Image credit: Marco Campinho, University of Algarve and Claudia Florindo, Andor Technology.



Development of a *Drosophila* embryo is effortlessly visualised in 3D with up to 4 channels using the confocal imaging mode of the BC43 (spinning disc). Image credit: Ines Baião-Santos and Álvaro Tavares, University of Algarve, Claudia Florindo, Andor Technology.

Tandemová konfokální mikroskopie

Detekce stereo-obrázků



- nutné snímat obrázky pod dvěma úhly (simulace pohledu pravého a levého oka)
- vzorek se pohybuje nejprve podle jedné osy (simulace pohledu pravým okem) a postupně se zaznamená na film. Potom se pohybuje podle druhé osy (simulace pohledu levým okem).
- rekonstrukce obrazu viděného pravým a levým okem

Video-mikroskopie (video-enhanced microscopy)

- oko dokáže objekty s nízkým kontrastem identifikovat, ne však kvantitativně hodnotit.
- mikrofotografie, dlouho používaná ve SM je nahrazována video– mikroskopií (rozdíjejí se od 70. let s rozvojem CCD prvků a digitalizací obrazu)
- kvalitní CCD kamery pracují s osvětlením od 0,1 lux
- spektrální citlivost je dána optickými vlastnostmi křemíku (400 – 1100 nm). Speciální CCD detektory citlivé i od 200 nm
- citlivost kamer se zvyšuje chlazením na teplotu – 100 °C (pokles tepelného šumu)

Metody video-mikroskopie

1. Videově umocněný kontrast (VEC – Video Enhanced Contrast)
2. Zesílená fluorescenční mikroskopie (IFM – Intensified Fluorescence Microscopy)

ad 1) VEC

- Patří sem všechny metody, kdy zanikají detaily v jasů pozadí. Zesílení se provádí odečtením pozadí a vynásobením rozdílového signálu vhodným koeficientem.
- Tak je možné pozorovat objekty až o řád menší než je mezní rozlišovací schopnost SM, např. tubuly v cytoplasmě (20 – 30 nm v průměru), nebo částčky koloidního zlata (20 – 40 nm) užívané v mikroskopii jako značky.

Video-mikroskopie (video-enhanced microscopy)

ad 2) Zesílená fluorescenční mikroskopie - IFM

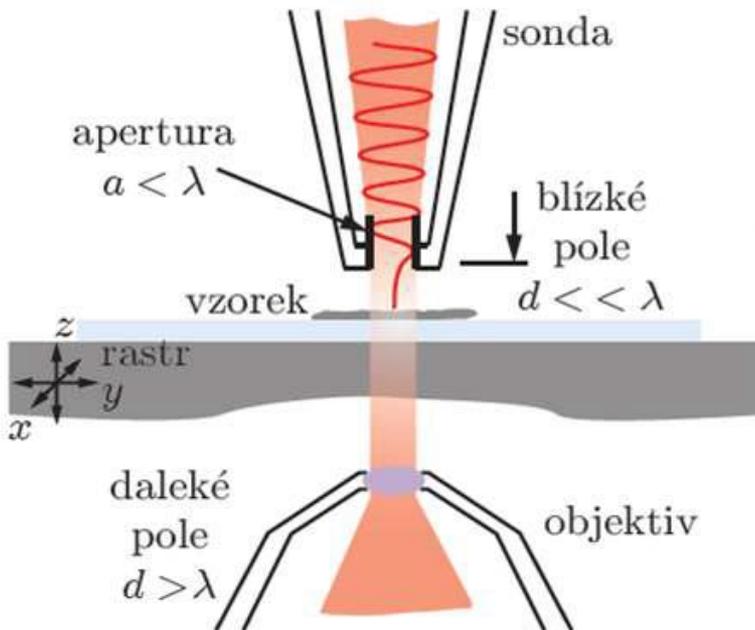
- používá zesilovače obrazů
- při zesílené fluorescenční mikroskopii lze snižovat intenzitu buzení oproti intenzitě potřebné k vizuálnímu pozorování, čímž se potlačuje „vybělování“ fluorescence.
- IFM se často kombinuje s počítačovým zpracováním obrazu, které umožňuje zlepšit poměr signál/šum integrací několika postupně snímaných obrázků.

Superrozlišovací mikroskopie

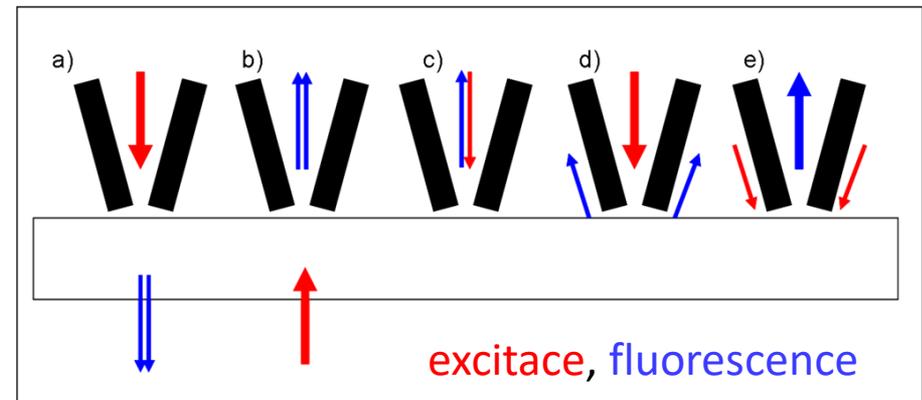
- mikroskopické metody, které „obchází“ difrakční limit světla a umožňují pozorovat objekty s vyšším rozlišením, než je difrakční limit
- neustálý vývoj nových metod
- Příklady:
 - skenovací optická mikroskopie blízkého pole (Near-field Scanning Optical Microscopy - NSOM)
 - mikroskopie evanescentního pole (Evanescence Field Optical Microscopy - EFOM)
 - vyčerpání stimulovanou emisí (Stimulated Emission Depletion Microscopy - STED)
 - metoda STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)
 - PALM (PhotoActivation Localization Microscopy)
 - FPALM (Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy)

Mikroskopie blízkého pole (near-field scanning optical microscopy - NSOM)

- **oblast blízkého pole** je definovaná jako oblast v okolí vzorku menším než je vlnová délka dopadajícího světla. V NSOM je tato vzdálenost v řádu několika nanometrů.
- detekce fluorescence z **blízké oblasti** se provádí za účelem dosažení optického rozlišení lepšího než je difrakční limit světla
- sonda (může být pokovená) s miniaturním otvorem slouží jako zdroj světla a/nebo detektor (záleží na pracovním modu)
- díky malému rozměru otvoru sondy (25-100 nm, menším než vlnová délka světla), světlo nemůže projít skrz a v okolí hrotu se tvoří evanescentní vlna, která excituje vzorek v **blízkém poli**
- detekce signálu v blízkém poli není zatížena difrakčním limitem jako signál detekovaný ve vzdáleném poli, rozlišení je dáno velikostí otvoru a nezávisí na vlnové délce použitého světla



Varianty NSOM – liší se způsobem excitace a detekce fluorescence

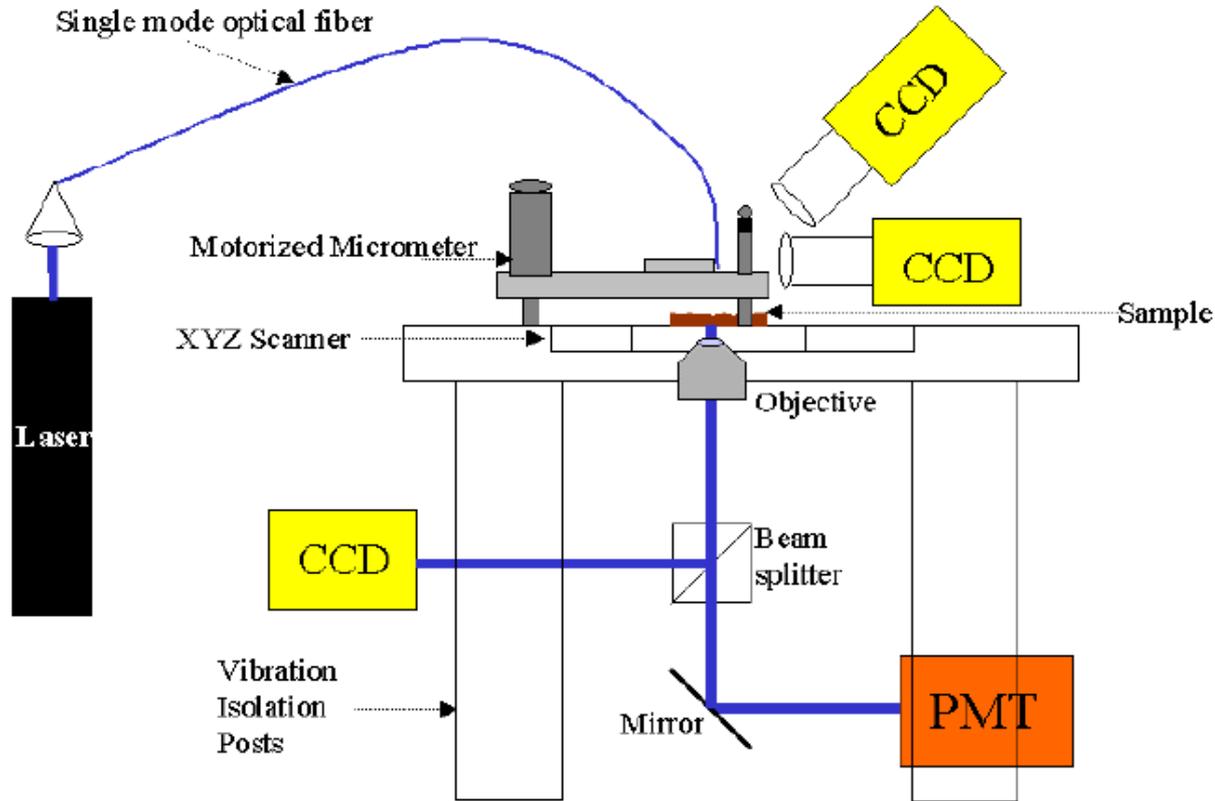


Detekce sondou – reflexní mód

Detekce vlnovodem – transmisní mód

Detekce signálu v mikroskopii blízkého pole

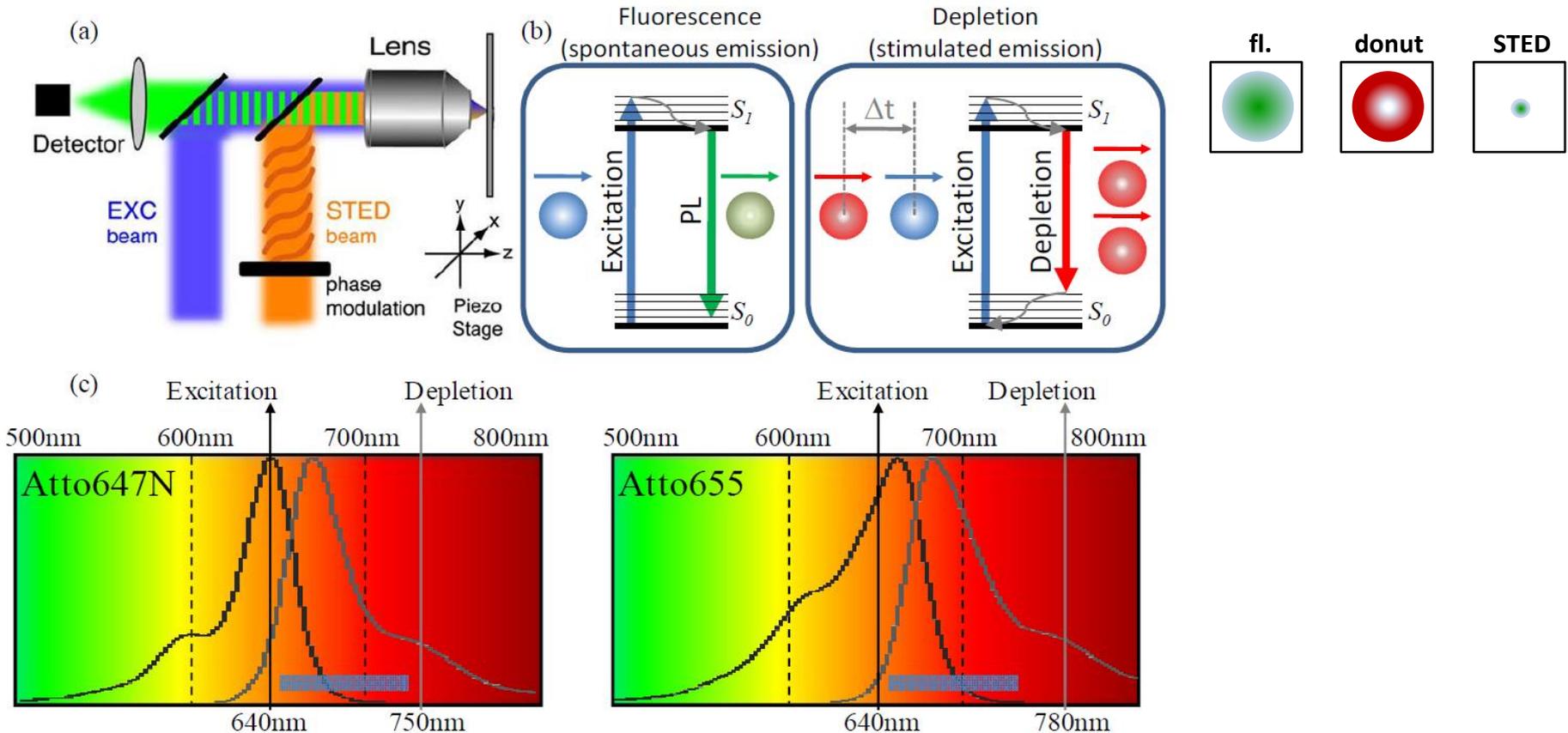
- piezoelektrický posun preparátu



- v závislosti na pracovním módu se uplatní příslušný detektor typu CCD
- *mikroskopie evanescentního pole (EFOM)* – detekce gradientu evanescentního pole v závislosti na vzdálenosti hrotu a vzorku – topografická charakterizace povrchu vzorku

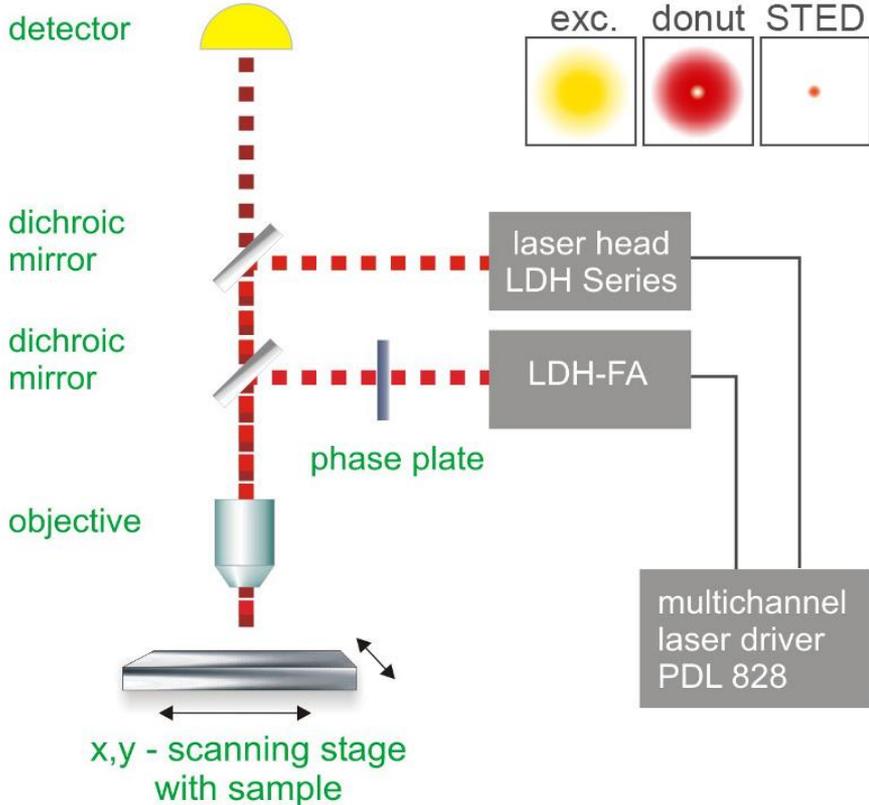
Superrozlišovací mikroskopie - STED

- STED obchází difrakční limit konfokální mikroskopie díky stimulované emisi fluoroforu

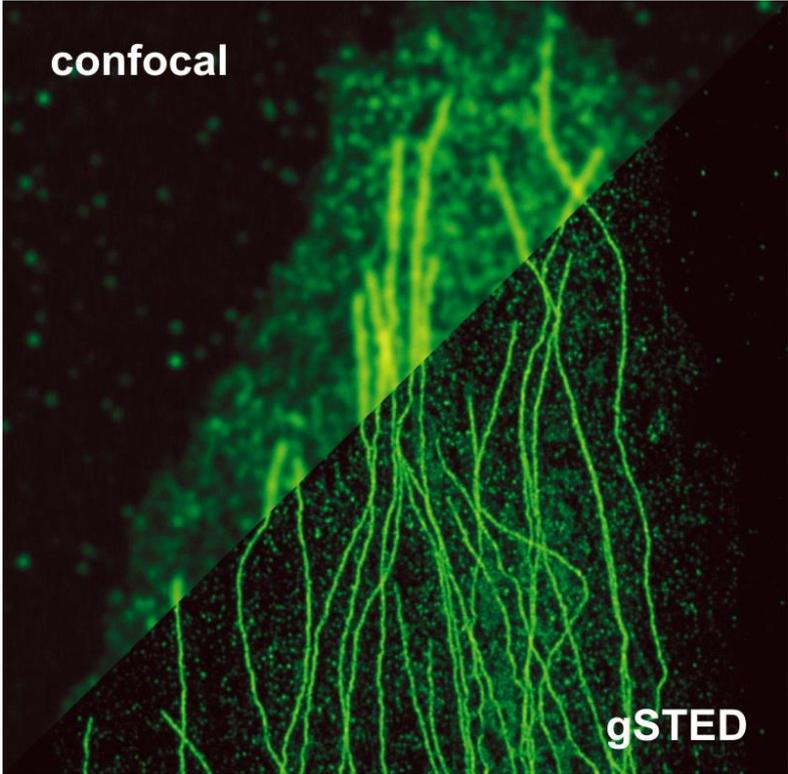


- laserový **EXC pulz** vyvolá spontánní fluorescenci – detekce fluorescence je limitována difrakčním limitem
- následný **STED pulz** (Δt a posunutý k delší λ) má tvar „donatu“ (díky průchodu speciální fázovou modulační destičkou) a vyvolá **stimulovanou emisi** fluorescence (o stejné λ jako **STED pulz**)
- stimulovaná fluorescence je mimo detekční okno spontánní fluorescence \Rightarrow detekujeme spontánní emisi pocházející ze středu „donatu“ – **zpřesnění polohy fluoroforu – vyšší rozlišení!** 44

Superrozlišovací mikroskopie - STED



Confocal vs time-gated STED



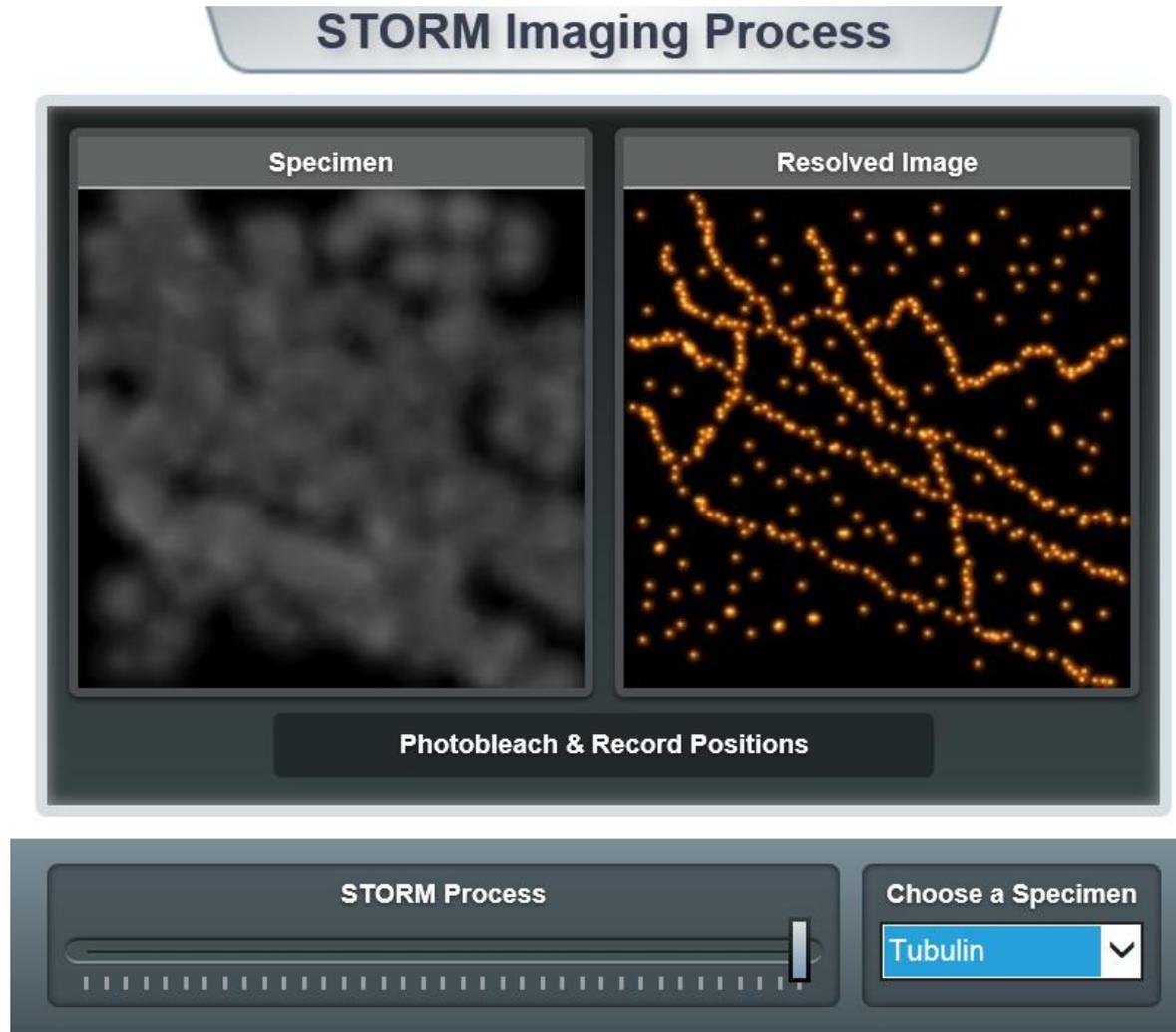
Mikroskopické metody STORM, PALM a FPALM

- metody STORM, PALM a FPALM využívají stejný princip pro ***přesnou lokalizaci fluoroforu*** ve snímku
- množství použitých fluoroforů musí být optimalizováno (jejich vzdálenost musí být vyšší jak Abbeo difrakční limit, nad cca 250 nm)
- fluorofory mají dva stavy – fluorescenční a temný (neaktivní), které se dají přepínat světlem různých vlnových délek nebo se přepínají stochasticky
- opakovaně se detekuje vždy pouze část fluoroforů (dle použití excitace)
- fotony nasnímané z jednoho fluoroforu jsou detekovány pomocí CCD – lokaci ovlivňuje rozptylová funkce (PSF, point spread function)
- matematicky určí střed PSF a danému fluoroforu se tím přiřadí přesnější pozice
- lze dosáhnout rozlišení až v jednotkách nm

Použití:

- Značení proteinů pomocí GFP nebo se využívají organické fluorescenční barvy
- nevýhodou těchto metod je obvykle delší doba snímání celkového obrazu, protože se musí nasnímat velké množství dílčích obrazů

Ukázka metody STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)



<https://www.microscopyu.com/tutorials/stochastic-optical-reconstruction-microscopy-storm-imaging>