

Universita Karlova v Praze
1. Lékařská fakulta a Všeobecná fakultní nemocnice

Ústav dědičných metabolických poruch
Přednosta: Doc. MUDr. Viktor Kožich, CSc.

**Praktický kurz konfokální mikroskopie:
vícečetné fluorescenční značení, dekonvoluce,
kolokalizace, 3D rekonstrukce**

Organizátor:

MUDr. Jakub Sikora, Ph.D.
(jakub.sikora@lf1.cuni.cz)

Technická podpora:

Filip Linx, Ing. Filip Majer, Jana Sovová

Kurz se koná v prostorech Laboratoře mikroskopie Ústavu dědičných metabolických poruch 1.LF UK, budova A2, 2.patro proti výtahu.

S sebou: Přezutí v případě špatného počasí, USB disk

!!! GSM - FREE ZONE !!!



Definitivní program:

Pondělí 30.11.2009

12:30-13:00 Úvod

13:00-14:00

Světelný mikroskop jako "convolution machine"

- numerická apertura (NA)
- point spread function (PSF)
- existuje limit rozlišení?
- excitace, emise, selekce
- detekce fluorescenčního signálu v optické mikroskopii (PMT, CCD)

14:15 - 16:45 praktická část

"wide-field" systém E400

vícečetné fluorescenční značení, snímání obrazu, ukázky praktické práce se sft ImageJ

konfokální systém TE2000

měření PSF, porovnání PSF, vícečetné fluorescenční značení, xyz snímání

16:45 - 18:00

ImageJ - praktické cvičení

Ústav dědičných metabolických poruch - okružní jízda

Úterý 1.12.2009

12:30 - 14:00

Fluorescenční mikroskopie

- fluorescence a fluorescenční značky, fluorescenční proteiny
- wide-field vs. konfokální mikroskopie
- multi-photon konfokální mikroskopie
- 4-pí a STED mikroskopie

14:15 - 16:15

demonstrace GFP transgenních linií *C.elegans*

konfokální systém TE2000

**spektrální (λ) konfokální mikroskopie
swept-field konfokální mikroskopie**

16:25 - 18:00

F neznamená vždy "fluorescence"

- FRET, FLIM
- FRAP
- TIRF

Středa 2.12.2009

11:00 - 14:00

Dekonvoluce, 3D rekonstrukce, kolokalizace

14:15 - 16:15

konfokální systém TE2000

mikroskopie živých buněk

**PC stanice s instalacemi Huygens Essential, Imaris personal a ImageJ
dekonvoluce, 3D rekonstrukce, kolokalizační analýza**

16:25 - 18:00

Kritická evaluace mikroskopického systému

Jak prezentovat obrázky v publikacích, čeho se vyvarovat, praktické tipy

Seznam preparátů použitých v kurzu (PDF)

Zájemci o pdf verzi teoretických částí kurzu nechtě kontaktují organizátora (jakub.sikora@lf1.cuni.cz)

Doporučená literatura a www zdroje:

1. **Nikon USA knowledge base** - <http://www.microscopyu.com/sitemap.html>
2. **Olympus - theory of confocal microscopy**
<http://www.olympusfluoview.com/theory/index.html>
3. **Scientific Volume Imaging knowledge base** - <http://support.svi.nl/wiki/>
4. **L. LANDMANN (2002) Deconvolution improves colocalization analysis of multiple fluorochromes in 3D confocal data sets more than filtering techniques. Journal of Microscopy 208 (2), 134-147.**
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2818.2002.01068.x>
5. **S. BOLTE, F. P. CORDELIÉRES (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. Journal of Microscopy 224 (3), 213-232.**
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
6. **HOWARD R. PETTY: Fluorescence Microscopy: Established and Emerging Methods, Experimental Strategies, and Applications in Immunology. MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE 70:687-709 (2007)**
<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/114203663/PDFSTART>
7. **Brown CM: Fluorescence microscopy--avoiding the pitfalls. J Cell Sci. 2007 May 15;120(Pt 10):1703-5**
<http://jcs.biologists.org/cgi/reprint/120/10/1703>