

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 (29.11.-2.12.2010)

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

Spoluorganizace: RNDr. Marie Kalbáčová, Ph.D., Ing. Filip Majer,
Ph.D., Mgr. Antonín Brož, Filip Linx, 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 vhodný, plášť není nutný

!!! GSM - FREE ZONE !!!



Pondělí 29.11.2010 (Sikora, Linx)

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

Úterý 30.11.2010 (Sikora, Brož, Linx)

13:00 - 14:00

Fluorescenční mikroskopie

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

14:15 - 14:45

- úvod do prováděných experimentů se živými buňkami

14:45 - 16:15

konfokální systém TE2000 - Nikon C1si + SFC

spektrální (λ) konfokální mikroskopie
swept-field konfokální mikroskopie
mikroskopie živých buněk

16:25 - 18:00

F neznamená vždy „fluorescence“

- FRET, FLIM
- FRAP
- TIRF

Středa 1.12.2010 (Majer, Kalbáčová, Brož, Sikora)

13:00 - 13:45

Fluorescenční proteiny, *in-silico* ukázka klonovací strategie (Majer)

13:50 - 15:00

Uvod do TK a transfekce (Kalbáčová)

15:00 - 15:30

Analýza obrazu - aplikační ukázka

15:45 - 17:00

**konfokální systém TE2000 - Nikon C1si + SFC
mikroskopie živých buněk**

17:00 - 18:00

Mikroskopie živých buněk - praktické ukázky aplikací, diskuze

Čtvrtek 2.12.2010 (Sikora, Brož)

13:00 - 14:00

Dekonvoluce, 3D rekonstrukce, kolokalizace

14:15 - 16:15

**konfokální systém TE2000 - Nikon C1si + SFC
mikroskopie živých buněk**

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

16:25 - 18:00

**Kritická evaluace mikroskopického systému
Jak prezentovat obrázky v publikacích, čeho se vyvarovat,
praktické tipy**

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>
8. **J. M. Lerner et al.: Calibration and validation of confocal spectral imaging systems. Cytometry A 62, 8 (Nov, 2004).**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15468110
9. **A. L. Mattheyses et al.: Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. J Cell Sci 123, 3621 (Nov 1).**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20971701

10. **J. M. Murray et al.: Evaluating performance in three-dimensional fluorescence microscopy. Journal of Microscopy 228, 390 (Dec, 2007).**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18045334
11. **R. Weigert et al.: Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. Histochemistry and Cell Biology 133, 481 (May).**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20372919
12. **R. M. Zucker et al.: Statistical evaluation of confocal microscopy images. Cytometry 44, 273 (Aug 1, 2001).**
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11500846



Mikroskopické zařízení použité pro kurz bylo částečně pořízeno v rámci projektu „Výzkumné laboratoře buněčné biologie a metabolomiky” z Operačního programu Praha – Konkurenceschopnost.

**Evropský fond pro regionální rozvoj
Praha a EU – Investujeme do vaší budoucnosti**