

**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](mailto: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 18.5.2009**

**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 19.5.2009**

**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 ( $\lambda$ ) konfokální mikroskopie  
swept-field konfokální mikroskopie

**16:25 - 18:00**

F neznamená vždy "fluorescence"

- FRET, FLIM
- FRAP
- TIRF

**Středa 20.5.2009**

**12:30 - 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 necht' kontaktují  
organizátora ([jakub.sikora@lf1.cuni.cz](mailto: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>