

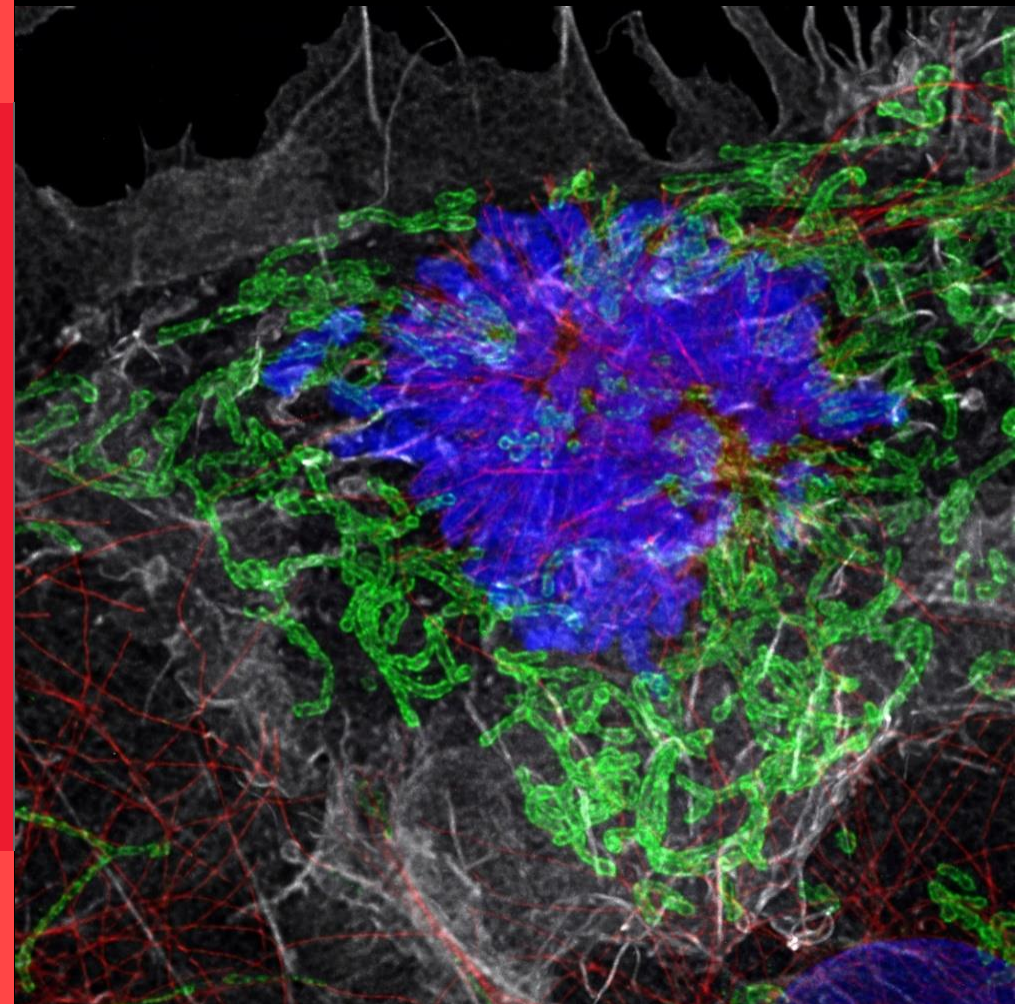
Флуоресцентная микроскопия – принцип метода и применение в биологии.

Мингазов Эдуард, к.б.н.

Руководитель группы продаж

оптической микроскопии

mingazov@bioline.ru



From Eye to Insight

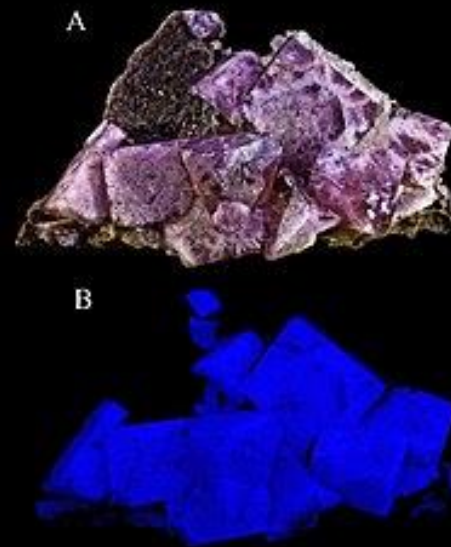


Открытие феномена флуоресценции



Джордж Габриель Стокс
1819-1903

Впервые флуоресценцию в минерале флюорита описал физик Джордж Стокс в 1852 г.



Свечение флюорита

Феномен флуоресценции

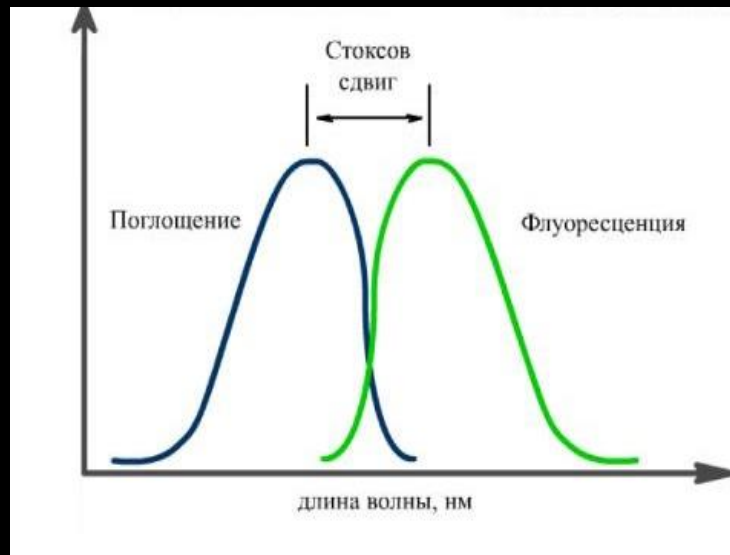
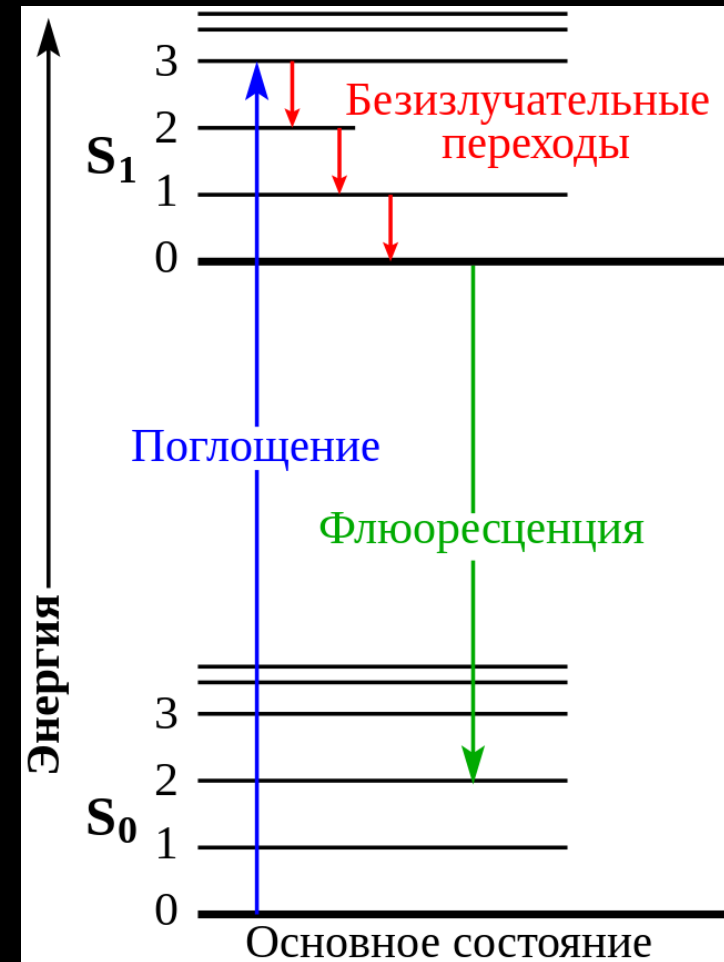


Диаграмма Яблонского

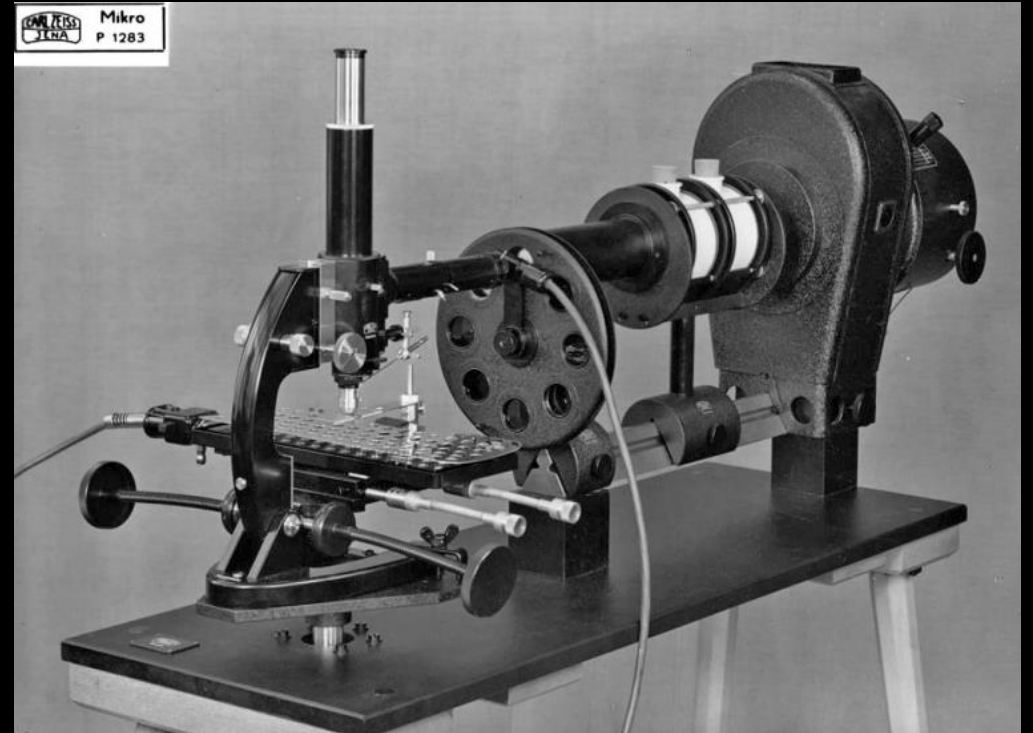


Первый флуоресцентный микроскоп

1911-1913 гг. – немецкие физики **Отто Хаймштедт** и **Генрих Леман** разрабатывают первый флуоресцентный микроскоп.

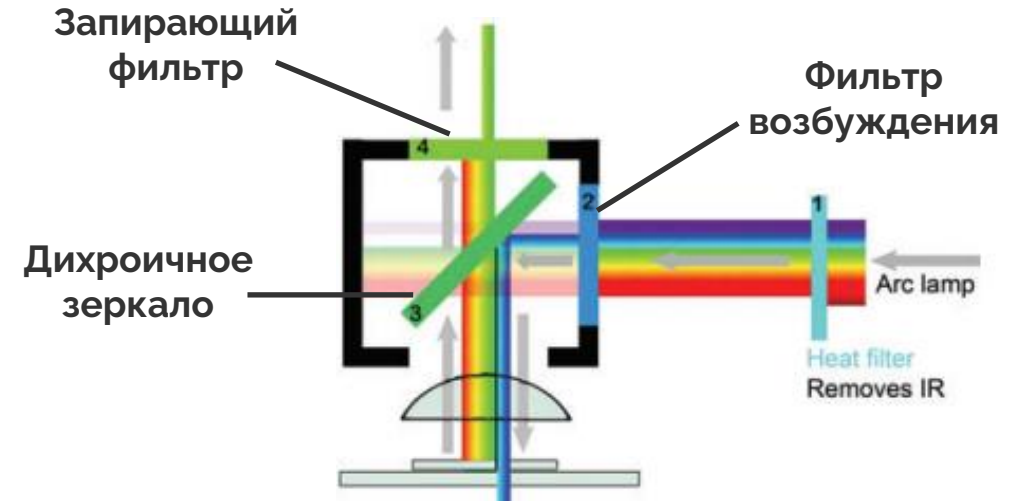
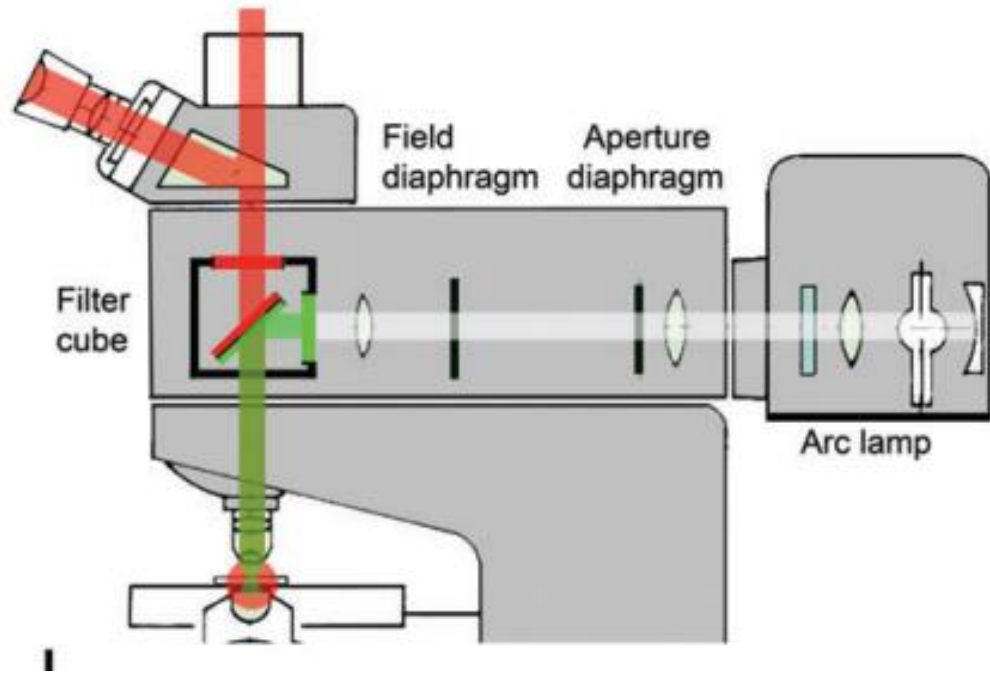
1929 г. – компания Carl Zeiss выпускает первый коммерческий флуоресцентный микроскоп.

Начало 1940-х г. – Альбер Кунс разрабатывает метод маркировки антител флуоресцентными красителями



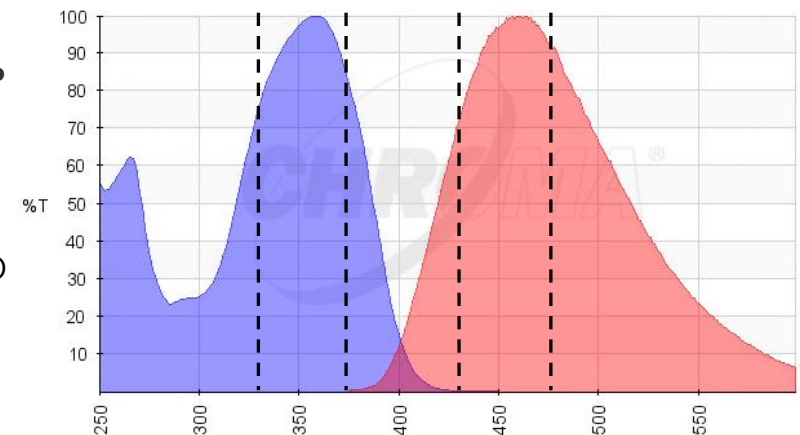
Люминесцентный микроскоп, разработанный Zeiss/Jena по конструкции Эллингера-Хирта.

Схематичное устройство флуоресцентного микроскопа



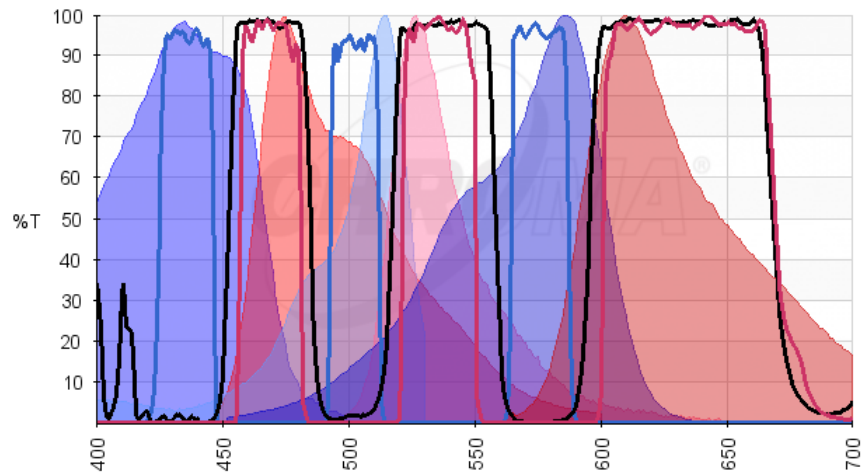
Краситель DAPI

- EX: 350/50
- DC: 400
- EM: 460/50



Длина волны

Многоцветное окрашивание препаратов



Длина волны



Клетки эндотелия легкого быка

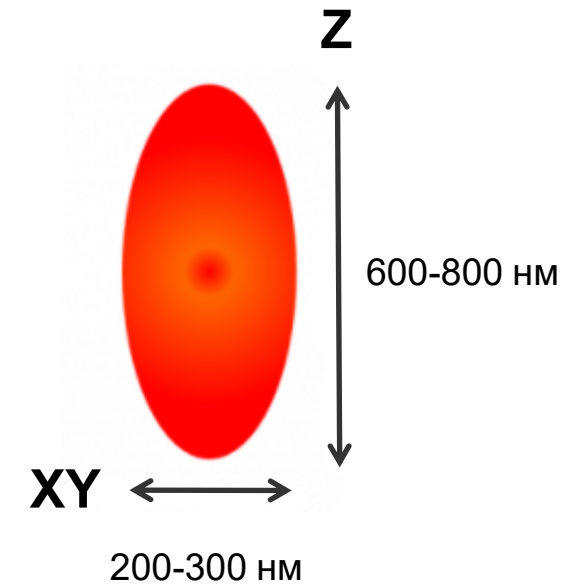
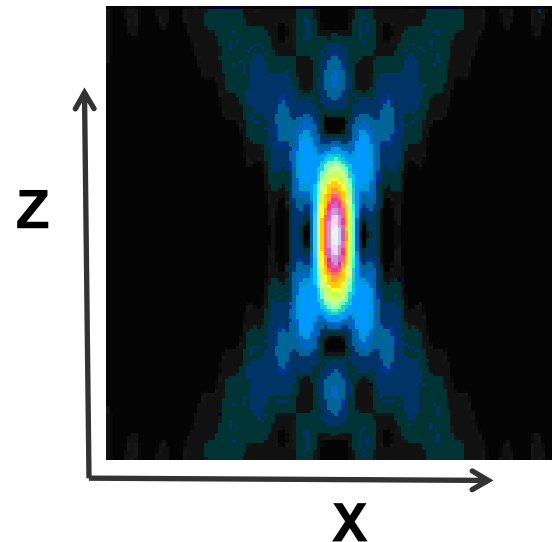
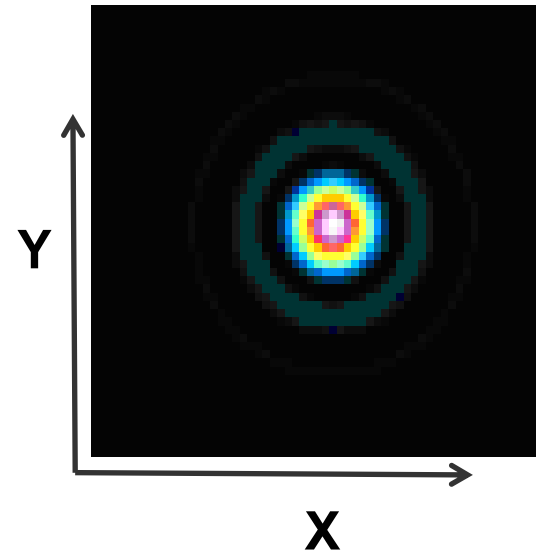
DAPI – ядро

MitoTracker - митохондрии

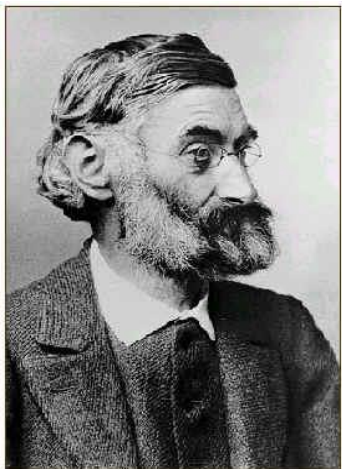
BODIPY phalloidin – нити актина

Дифракция света; Диск Эйри

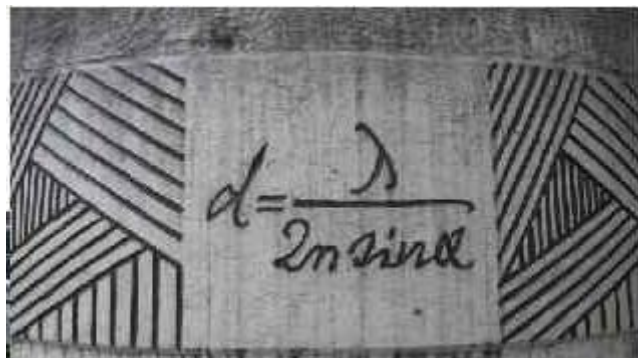
Функция рассеяния точки (PSF)



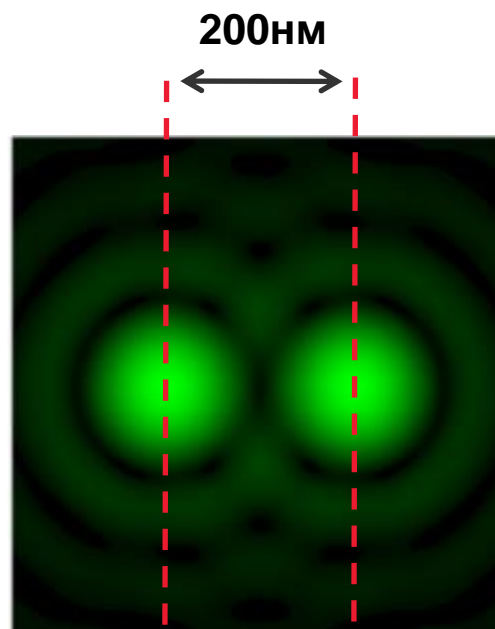
Пространственное разрешение оптического микроскопа



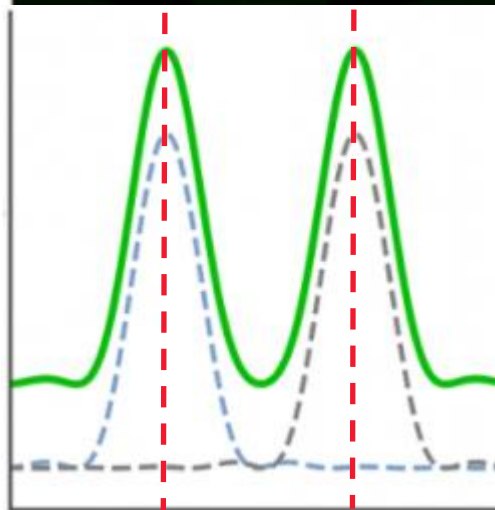
Ernst Abbe, 1873



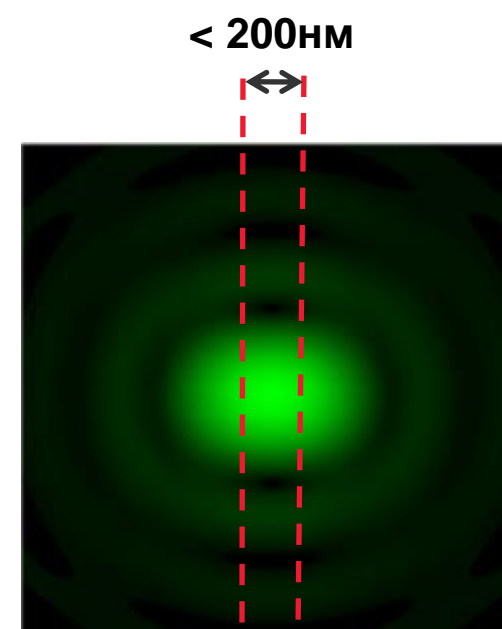
Формула минимального
дифракционного предела



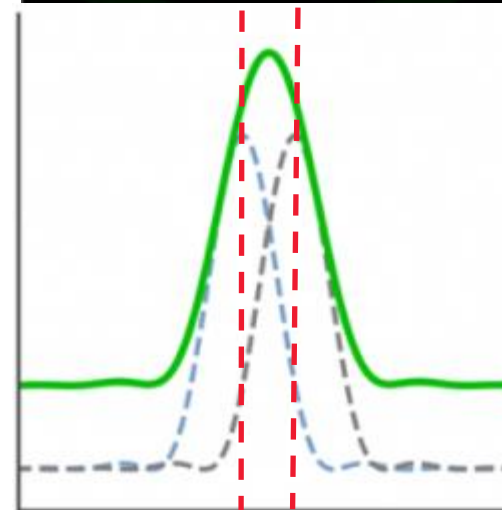
Интенсивность



Расстояние

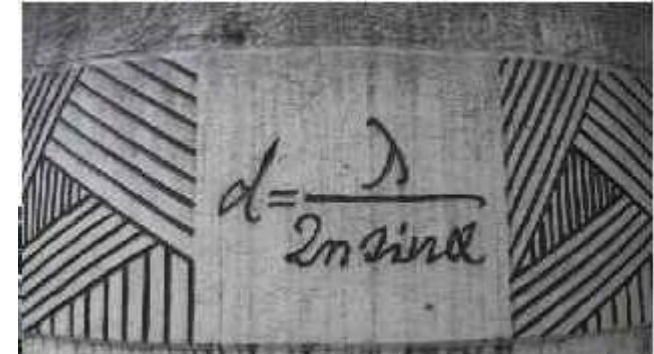
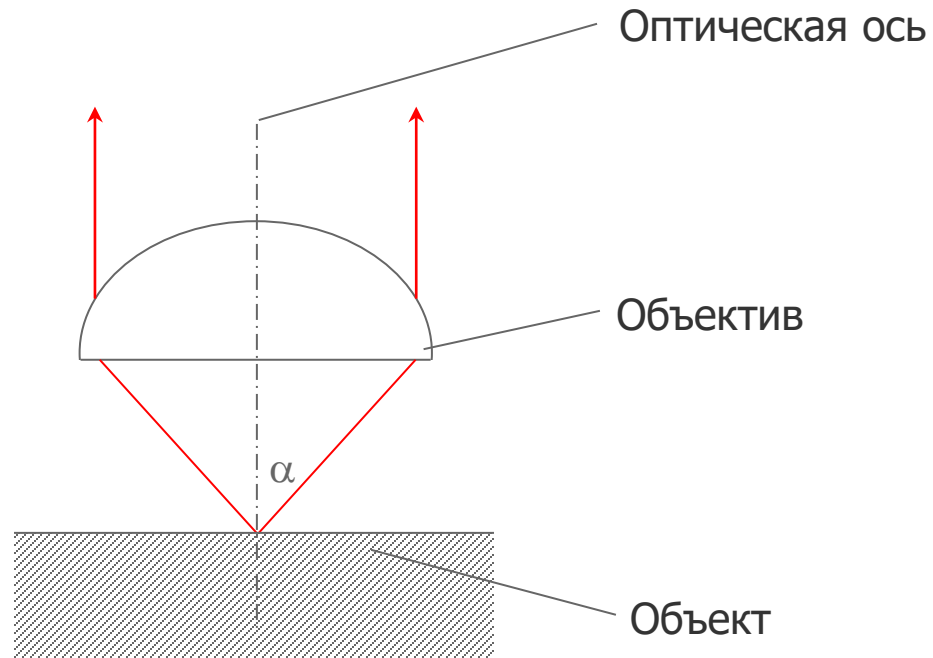


Интенсивность



Расстояние

Числовая апертура объектива

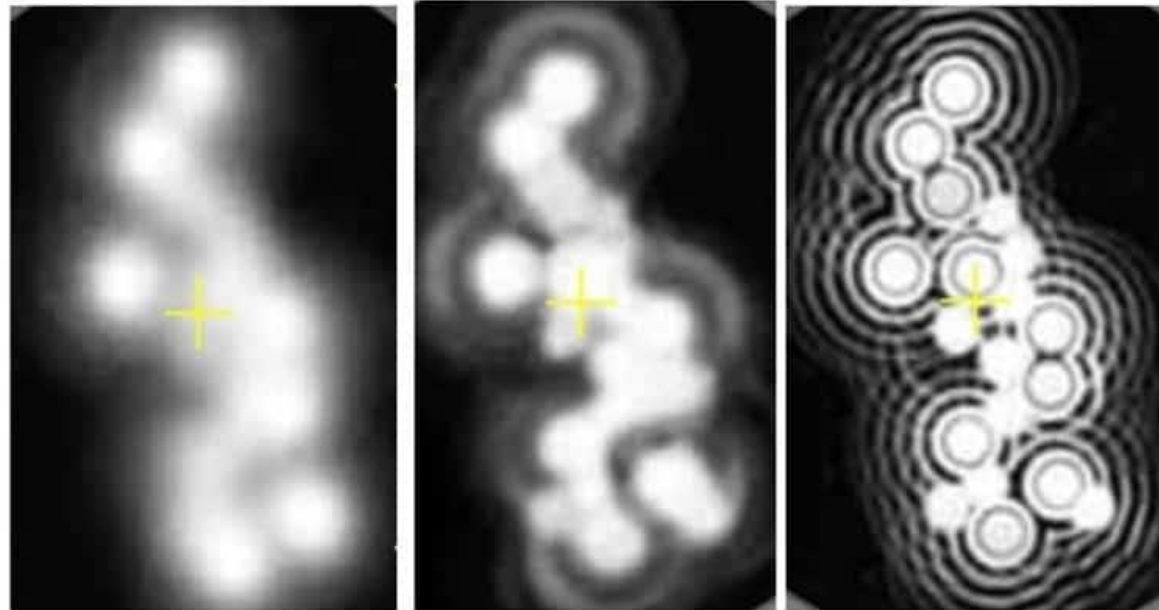
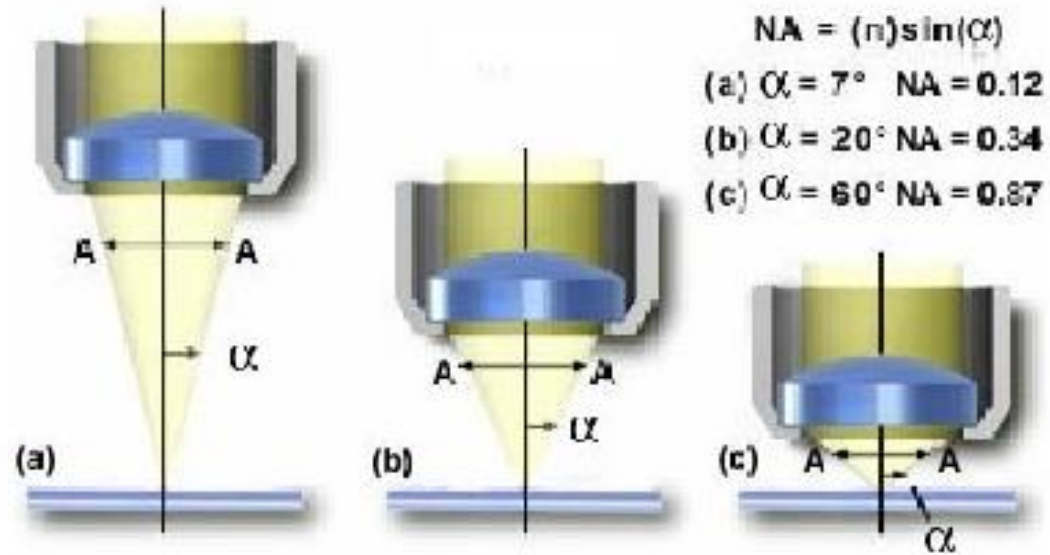


Формула минимального дифракционного предела

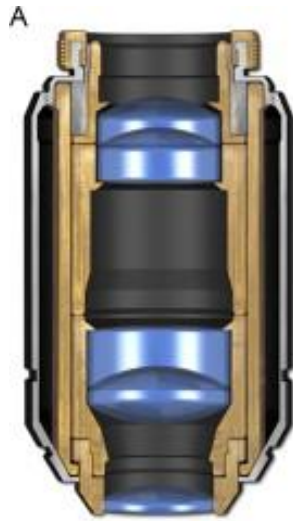
$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 NA}$$

Разрешающая способность объектива

Числовая апертура объектива



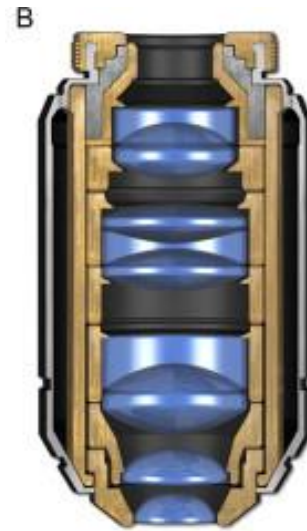
Классы объектов



Achromat

Исправлены хроматические aberrации для красной и голубой длин волн. Сферическая aberrация исправлена для зеленой длины волны.

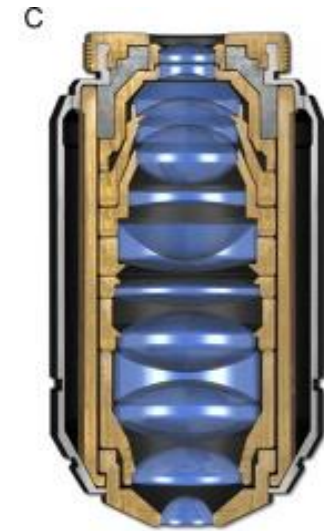
Рекомендуется использовать для работы в проходящем свете.



Fluorite

Исправлены хроматические aberrации для трех длин волн, высокая степень коррекции сферической aberrации.

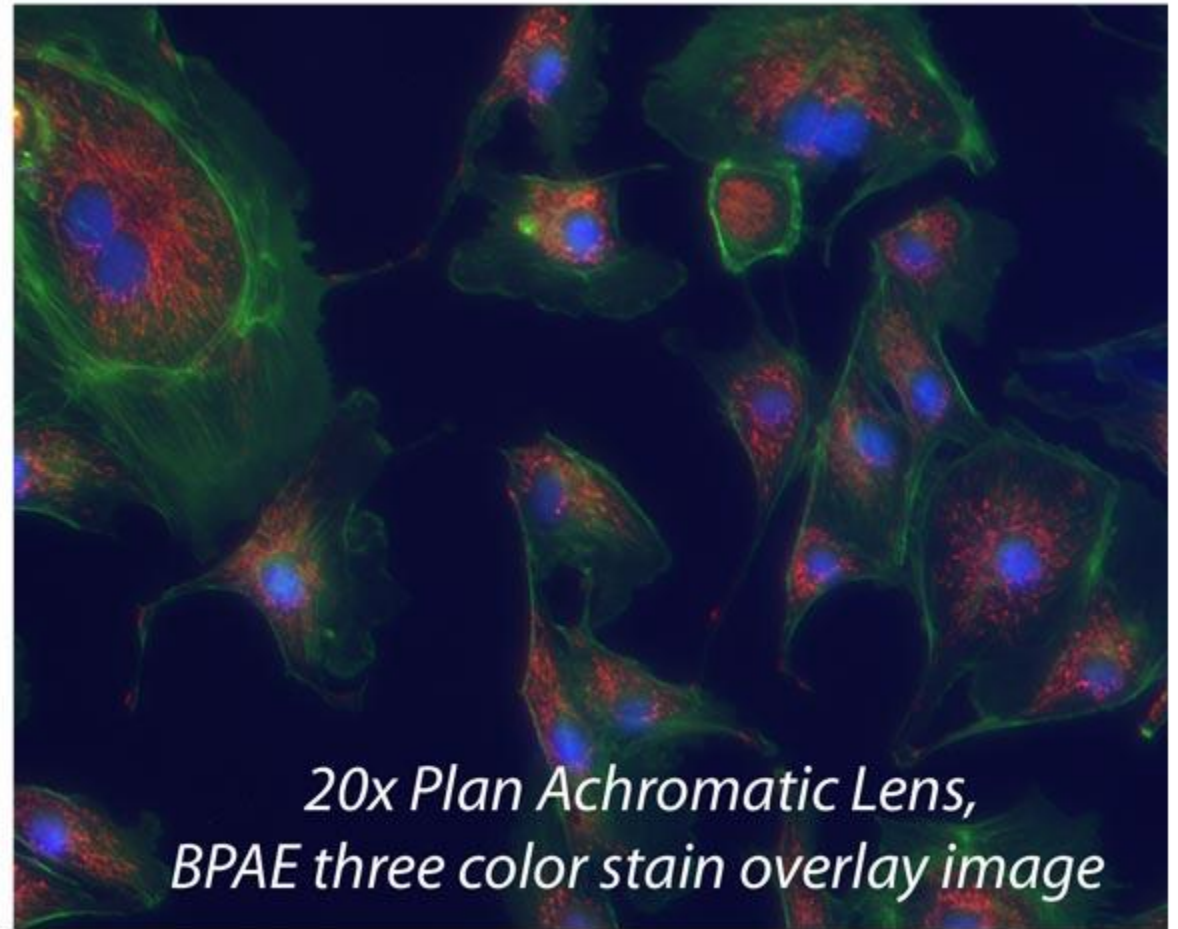
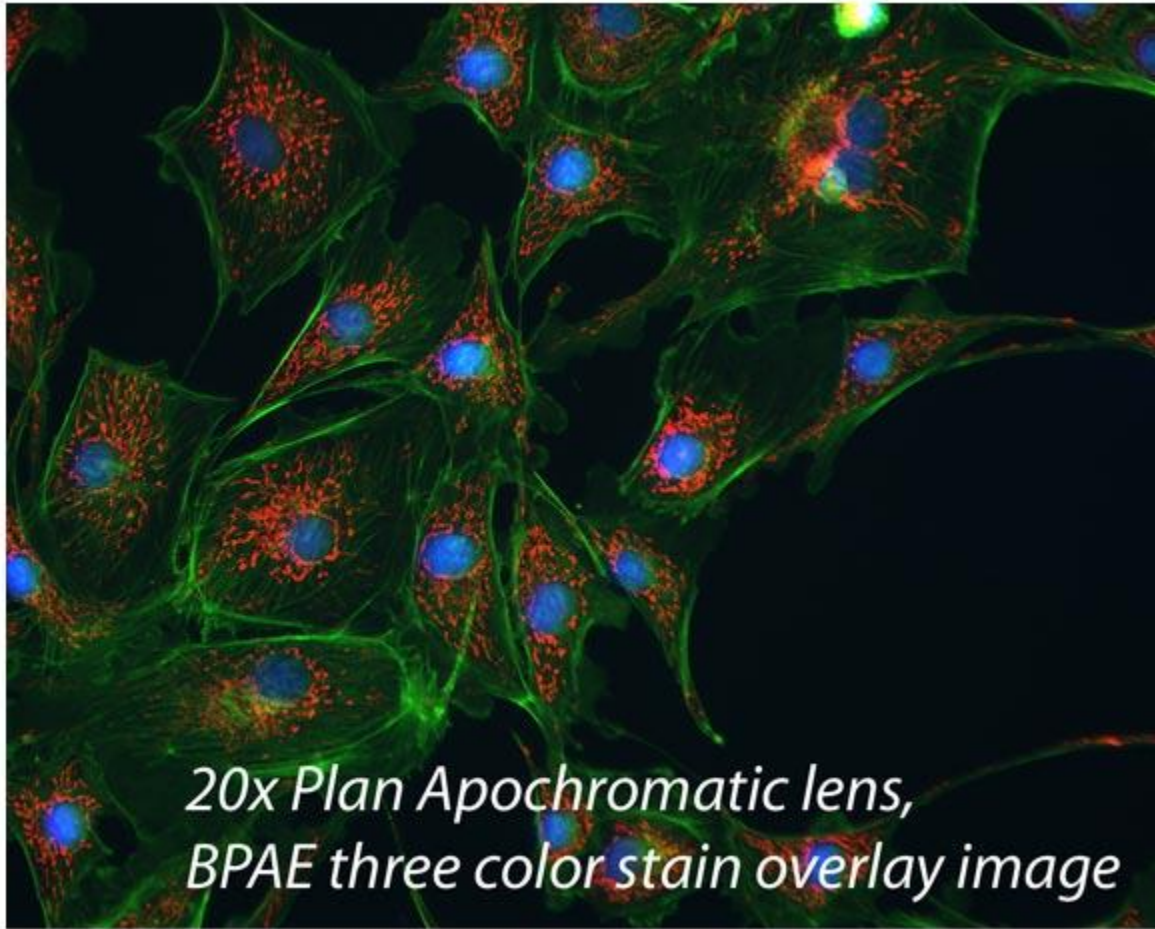
Рекомендуется использовать для работы с многоцветной флуоресценцией.



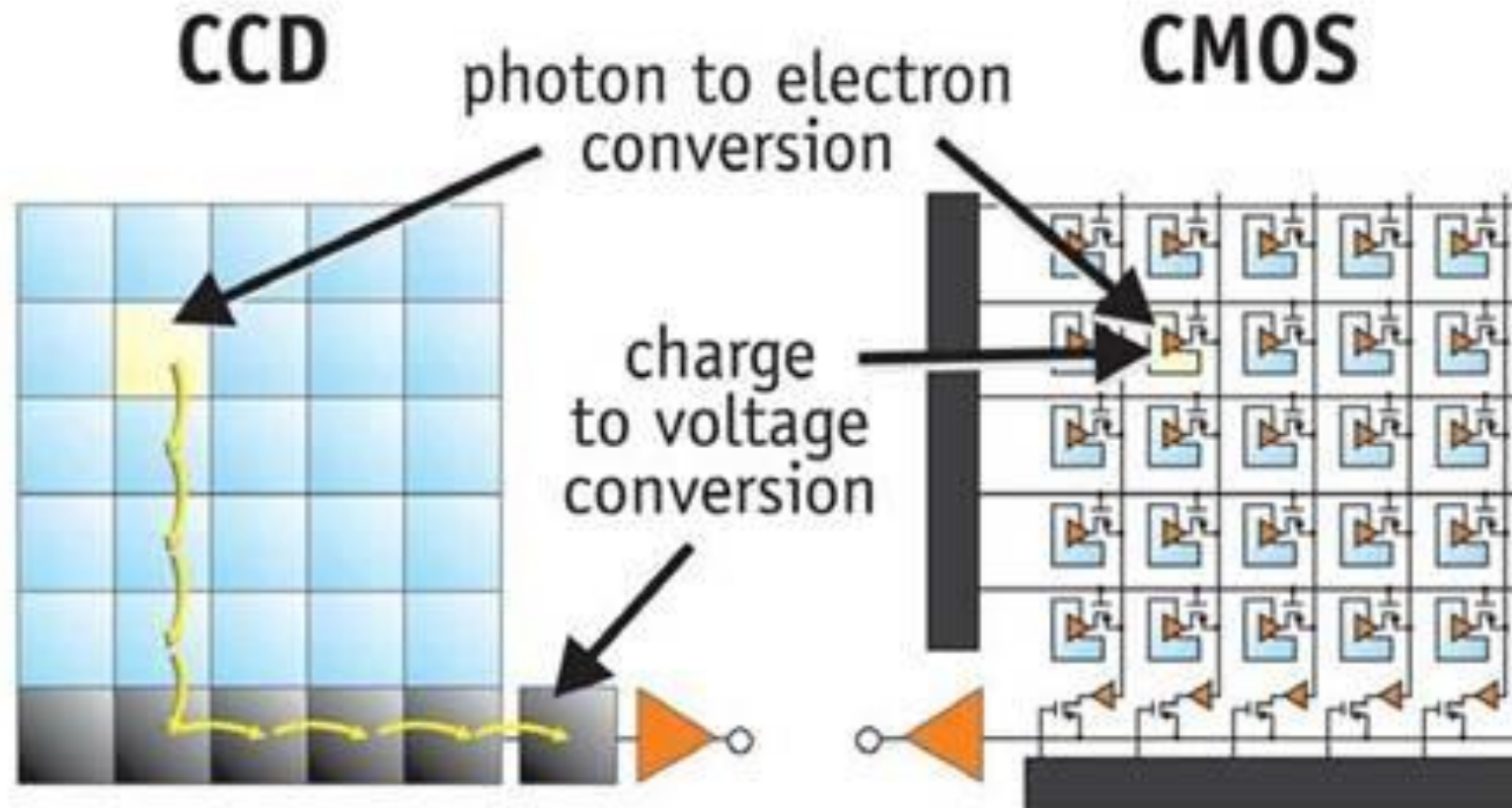
Plan apochromat

Оптические aberrации скорректированы максимально. Разрешающая способность близка к физически возможному пределу.

Изображения полученные с помощью
ахроматического и апохроматического объективов



Основные типы сенсоров используемые для цифровых камер



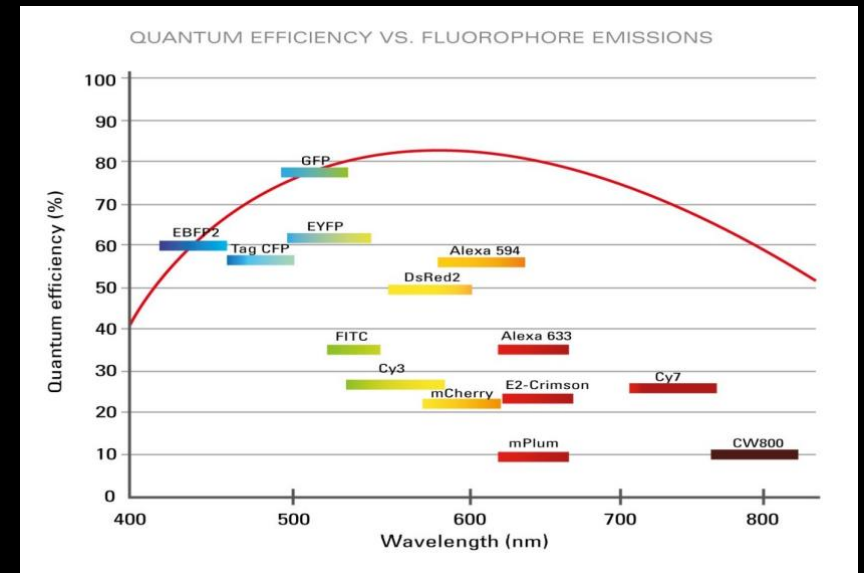
Современные монохромные sCMOS камеры

- Высокая квантовая эффективность
- Большой динамический диапазон
- Низкий шум
- Высокая чувствительность
- Большая диагональ сенсора

Квантовая эффективность (QE)

QE – возможность матрицы преобразовывать фотоны в электроны.

Высокая QE = низкая фототоксичность,
низкое фотообесцвечивание



1 ms

2 ms

4 ms

8 ms

16 ms

32 ms

64 ms

128 ms

256 ms

QE 85%



QE 54%



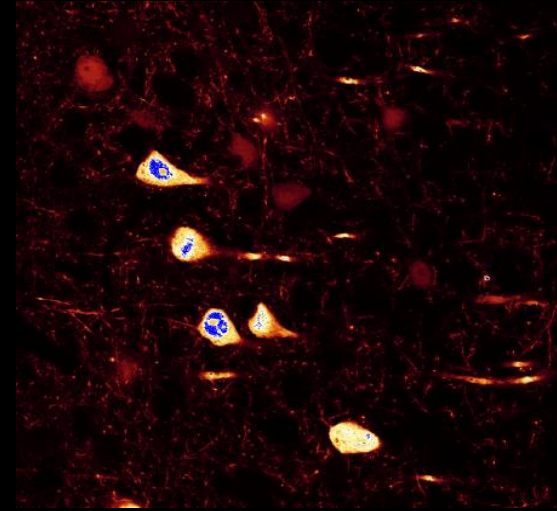
Динамический диапазон

Динамический диапазон – способность к распознаванию и одновременной передаче светлых и темных деталей изображения

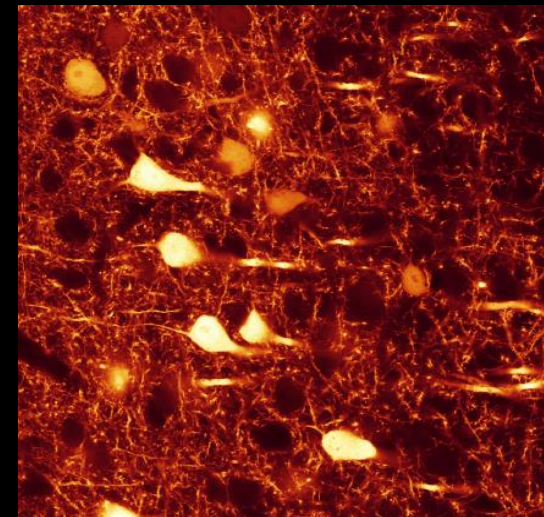
Глаз человека – 1: 44 000

sCMOS – 1: 33 000

CCD – 1: 4000



Низкий динамический диапазон



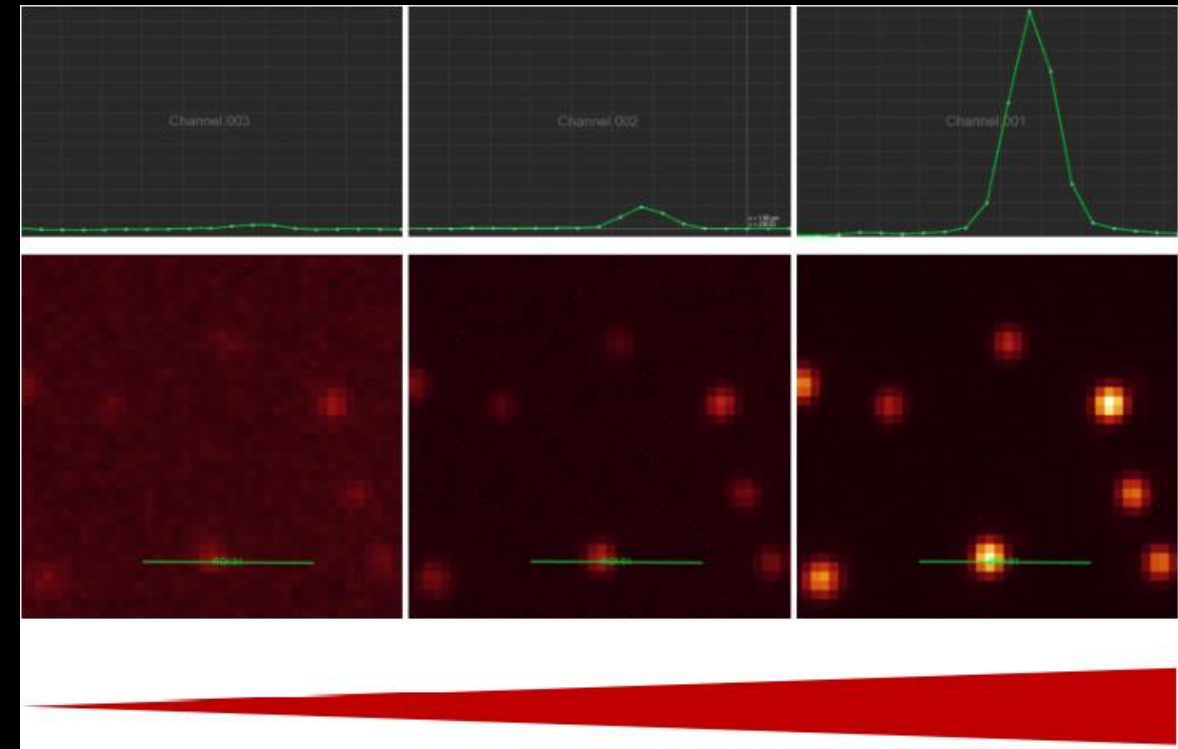
Высокий динамический диапазон

Низкий шум/Высокая чувствительность

Шум камеры - это сумма шумов:

- Темновой шум - случайная генерация электронов от нагрева матрицы.
Сжижается охлаждением матрицы.
- Шум считывания – возникает при усилении сигнала и считывании в электрических цепях.
Снижается уменьшения частоты считывания матрицы.
- Фотонный шум – естественная генерация фотонов.

Соотношения сигнал/шум (SNR)



Чувствительность камеры

Флуоресцентные микроскопы NEXCORE

Прямой микроскоп



NE900 Series

Немоторизованный
инвертированный
микроскоп



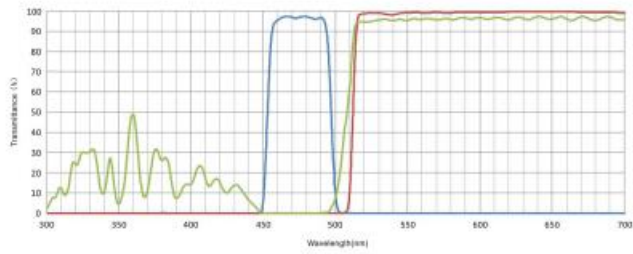
NIB620

Полностью
моторизованный
инвертированный
микроскоп

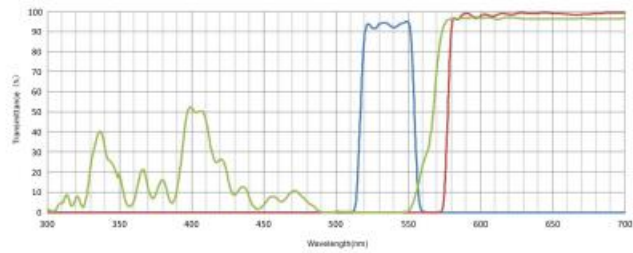


NIB900

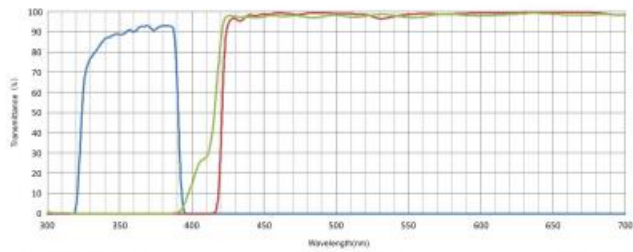
Флуоресцентные фильтры



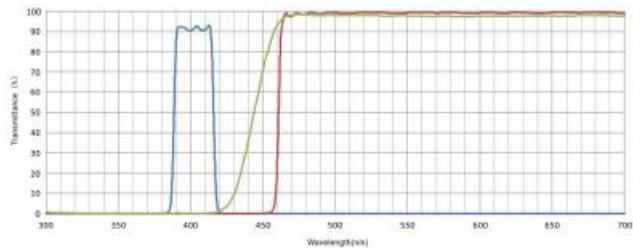
FL-B
 BP 460-495
 DM 505
 BA 510IF



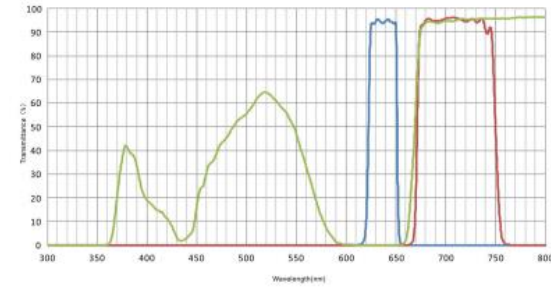
FL-G
 BP 510-550
 DM 570
 BA 575IF



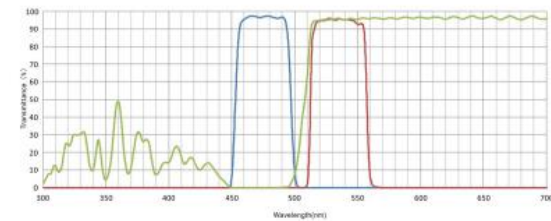
FL-U
 BP 330-385
 DM 410
 BA 420IF



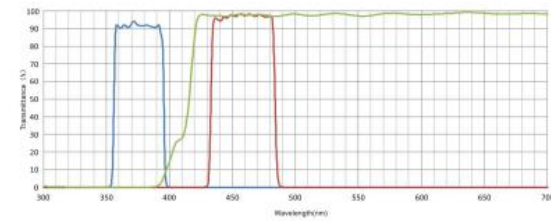
FL-V
 BP 400-410
 DM 455
 BA 460IF



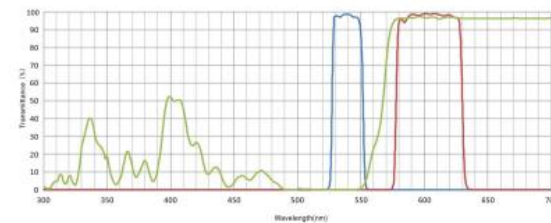
FL-R
 BP620-650
 DM660
 BA670-750



FL-FITC
 BP460-495
 DM505
 BA510-550



FL-DAPI
 BP360-390
 DM415
 BA435-485



FL-TRITC
 BP528-553
 DM565
 BA578-633

Монохромные камеры компании TUCSEN



Dhyana 400BSI V3

BSI sCMOS camera designed lighter and less power to integrate...

- 95%@600nm Peak QE
- 6.5 μ m x 6.5 μ m Pixel Size
- 2048 x 2048 Resolution
- 100fps@CL, 40fps@USB3.0
- CameraLink & USB3.0



Dhyana 400BSI V2

BSI sCMOS camera delivering perfect sensitivity and...

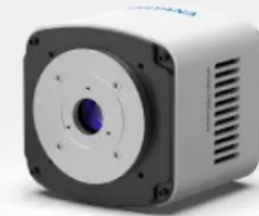
- 95%@600nm Peak QE
- 6.5 μ m x 6.5 μ m Pixel Size
- 2048 x 2048 Resolution
- 74fps@CL, 40fps@USB3.0
- CameraLink & USB3.0



Dhyana 95V2

BSI sCMOS camera delivering the highest sensitivity for low light...

- 95%@560nm Peak QE
- 11 μ m x 11 μ m Pixel Size
- 2048 x 2048 Resolution
- 48fps@12bit STD
- CameraLink & USB3.0



Dhyana 400D

4MP mono FSI sCMOS camera with 72% Peak QE high sensitivity.

- 72%@595nm Peak QE
- 6.5 μ m x 6.5 μ m Pixel Size
- 2048 x 2040 Resolution
- 35fps@16bit
- USB3.0

Монохромные камеры компании TUCSEN



Dhyana 6060BSI

Ultra-large BSI sCMOS camera with CXP high-speed interface.

- 95%@580nm Peak QE
- 10 μ m x 10 μ m Pixel Size
- 6144 x 6144 Resolution
- 26.4fps@12-bit STD
- CoaXPress 2.0



Dhyana 4040BSI

Large format BSI sCMOS camera with cameraLink high-spee...

- 90%@550nm Peak QE
- 9 μ m x 9 μ m Pixel Size
- 4096 x 4096 Resolution
- 16.5fps@CL, 9.7fps@USB3.0
- CameraLink & USB3.0



Dhyana 6060

Ultra-large FSI sCMOS camera with CXP high-speed interface.

- 72%@550nm Peak QE
- 10 μ m x 10 μ m Pixel Size
- 6144 x 6144 Resolution
- 44fps@12-bit STD
- CoaXPress 2.0



Dhyana 4040

Large FSI sCMOS camera with cameraLink high-spee...

- 74%@600nm Peak QE
- 9 μ m x 9 μ m Pixel Size
- 4096 x 4096 Resolution
- 16.5fps@CL, 9.7fps@USB3.0
- CameraLink & USB3.0

Конфокальный микроскоп



NCF950 Confocal Microscope