

Long-Term Scan rendszerek és Time-Lapse Imaging videomikroszkópia

Jákim Judit
eTox hallgatói munkacsoport

- **LTS? :Long-Term Scan (hosszú távú megfigyelés)**

Előnyei:

Nem kell ott lennem

A gép rögzíti

A sejtek „természetes” környezetében (nem kell kivenni a tenyészetet az inkubátorból)

- **Time Lapse Imaging**

Mit jelent: megadott időközönként képeket rögzítünk ugyan arról a látótérről

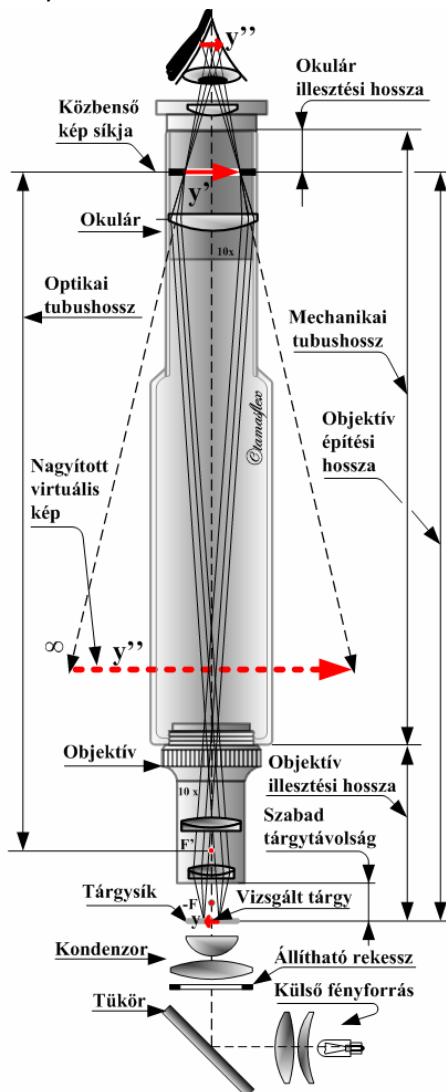
Képszekvencia: a rögzített képek sorozata, egymás után megfelelő sebességgel lejátszva videóként nézhető, valamint digitális képanalízisre képes szoftverekkel elemezhető

- **Hagyományos fénymikroszkópok**

Optikai rendszerek

Érzékelő legtöbb esetben az emberi szem, vagy egy okulárkamera

Fényút:



- **Hogy néz ki egy működő mikroszkóp fényútja?**

Objektívek

- **Nagyítás: LINEÁRISAN!** Egy a valóságban adott hosszúságú pl. 1mm-es vonal hányszor nagyobbak látszik. (Max 1500x nagyítás)
- **Numerikus apertúra:**
az optikai lencserendszerek fénygyűjtő képességének egység nélküli mérőszáma, mely meghatározza a felbontóképességet és a mélységélességet. A numerikus apertúra értékét megkapjuk, ha a szinuszát vesszük a beérkező fénysugár félkúpszögének (α) és ezt összeszorozzuk a lencse anyag, vagy közeg (légtér, víz, stb...) törésmutatójával (n). Vákuumban a numerikus apertúra értéke definíció szerint 1.
Kiszámolása: $NA = n \cdot \sin \alpha$
- **Abbé egyenlet:** Hullámelhajlási, azaz diffrakciós okok miatt egy tárgyról hullámok, például fény segítségével alkotott kép nem lehet tetszőlegesen részletgazdag. Ennek oka az, hogy egy pontszerű tárgy (mint egy optikai rács pontja vagy egy pontszerű fényforrás) képe kiszélesedett folt, úgynevezett elhajlási korong. Ha a tárgypontok az elhajlási korong méreténél közelebb kerülnek egymáshoz, akkor a képek alapján nem különíthetők el. A mikroszkópos feloldásnak tehát elméleti és gyakorlati határa van és ez a feloldási határ az alkalmazott hullám hosszával összemérhető:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}, \quad (1)$$

A feloldási határ látható fény, azaz a fénymikroszkópia esetében 0,2 μm -nek adódik. Ilyen feloldással sejtorganellumok még vizsgálhatók, de ennél kisebb képletek, például vírusrészecskék és egyedi molekulák már nem különíthetők el egy bonyolult sokaságban

Fényforrások

Vis fényforrás?

Mert látom...

CCD érzékelő

- A CCD (**Charge-coupled Device**, azaz töltés-csatolt eszköz) egy analóg jelek továbbítására szolgáló elektronikai alkatrész-lánc (analóg shift regiszter).
- **Fényérzékeny alkatrészsel, fotodiódával kombinálva a fényt elektronikus jelekké alakító** eszköz, mely egymáshoz csatolt kondenzátorokból álló integrált áramkört tartalmaz.
- Külső áramkör segítségével minden kondenzátor képes átadni a töltését a szomszédjának, így kiolvasható a kép.
- A CCD-et a **digitális fényképezés**, csillagászat területén, videokamerákban és optikai szkennerekben alkalmazzák.
- A csillagászatban részben fényességmérésre, optikai és UV-spektroszkópiára és nagysebességű technikáknál alkalmazzák.

Fényforrás

- IR
- Miért IR?
- Fény hullámhossz energia összefüggés
- Ebből következik: Nagy energiájú fény fototoxicitása (UV-ba nézni nem jó)
- IR nagy hullámhossz, alacsony energia, fototoxicitást nem tapasztalunk.
- DE NEM LÁTOM! (infravetőbe sem tanácsolt belenézni)
- Hogyan lesz kép olyan fényből amit nem látok?
- Én nem látom, a CCD szenzor igen!
- 940nm közeli infravörös épp megfelelő:

Miért?

Nem nagyobb a hullámhossza mint a megfigyelt tárgy mérete

A szenzor képalkotásra tudja használni

A sejtekre nincs káros hatással

- **Szoftverek**
- Ez a mikroszkóp sajnos nem mikroszkóp számítógép nélkül.
- DE! Bármilyen program ami kezel egy webkamerát használható lesz.
- Gyakorlaton az eTox LTS-t és a VirtualDub-ot fogjuk használni.
- Mit kell beállítani általában
- Általában be kell állítani:
 - Képfelbontás! Nagyon figyeljünk erre a paraméterre. Legalább 1024x768as képméret kell az elemzésekhez
 - Időintervallum! Mennyi időnként fotózzon
 - Szekvencia név és mentési hely (érdeemes megfelelő mennyiségű információt tárolni a névben is. Használj kódokat, és vezess jegyzőkönyvet)
 - VirtualDub-nál, és más videó felvételére is képes programnál KI KELL KAPCSOLNI a hangfelvételt.

Milyen egy jó képszekvencia:

- Tárgy a képen középen
- Nem torzít
- Egyenletesen megvilágított
- Éles, vagy az elemzést elősegítő mértékben homályos
- Kontrasztos
- Ugyan arról a látótérről!!!

Forrás és átolvasandó link (ahogy az előadáson is előkerült)

<http://hu.wikipedia.org/wiki/F%C3%A9nymikroszk%C3%B3p>