

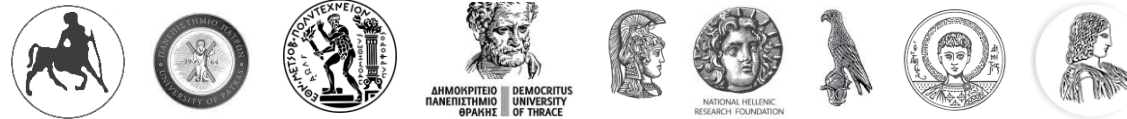


The Greek National Infrastructure on Synthetic Biology

Assist Prof . Anna-Maria Psarra

University of Thessaly

ampsarra@uth.gr



ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΕΣ ΧΡΗΣΗΣ ΣΤΟ OMIC-Engine

Αρχή της μεθόδου – Τεχνολογικά Χαρακτηριστικά

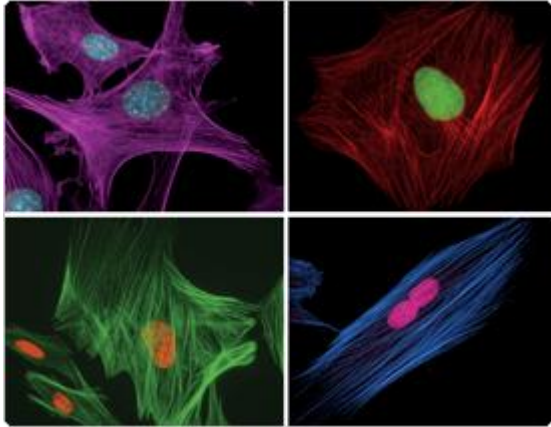
Εφαρμογές

Δυνατότητες χρήσης στο Omic-Engine



ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ



Χρήση Ιχνηθετών

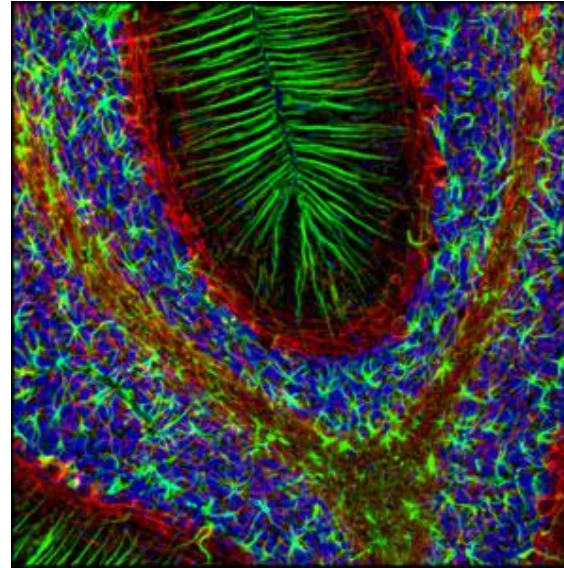
Άμεση

Phalloidin απ ευθείας σημασμένη με φθορίζουσα, εντοπισμός ακτίνης

Σήμανση Πυρήνα (DAPI, Hoechst)

GFP : χιμαιρική πρωτεΐνη

Φθορίζων Ιχνηθέτες

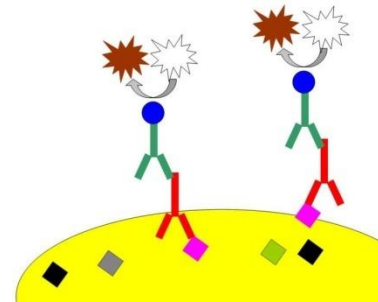


Χρήση Αντισωμάτων

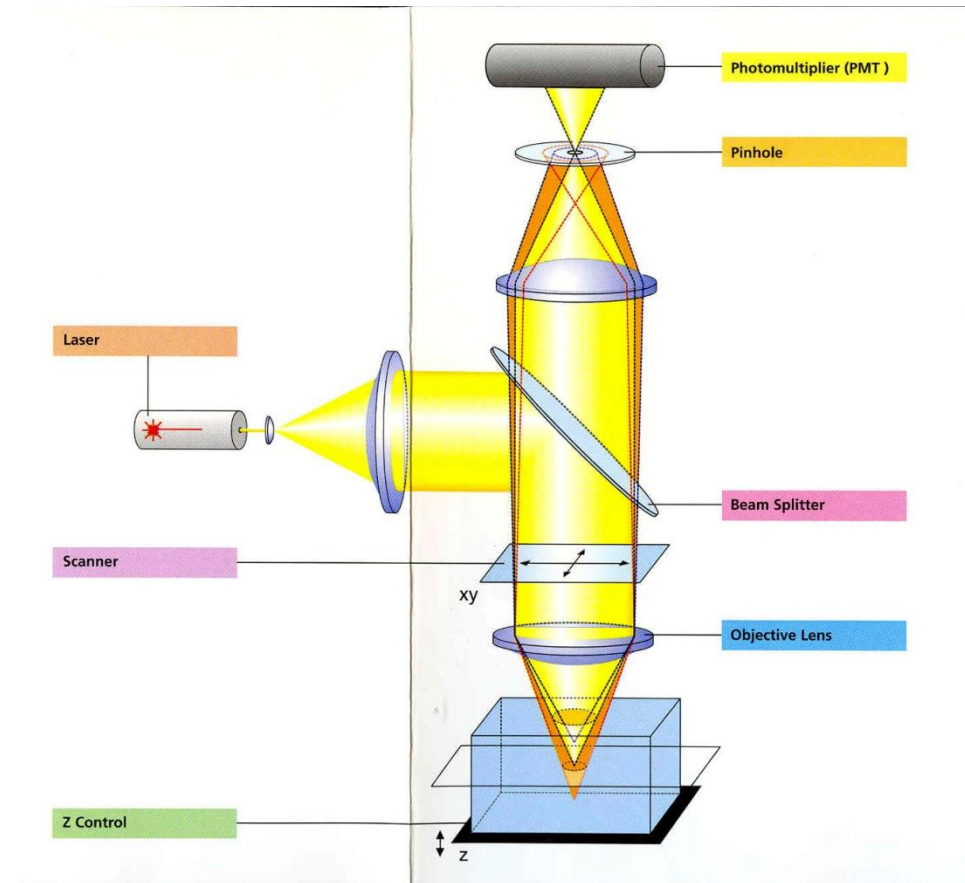
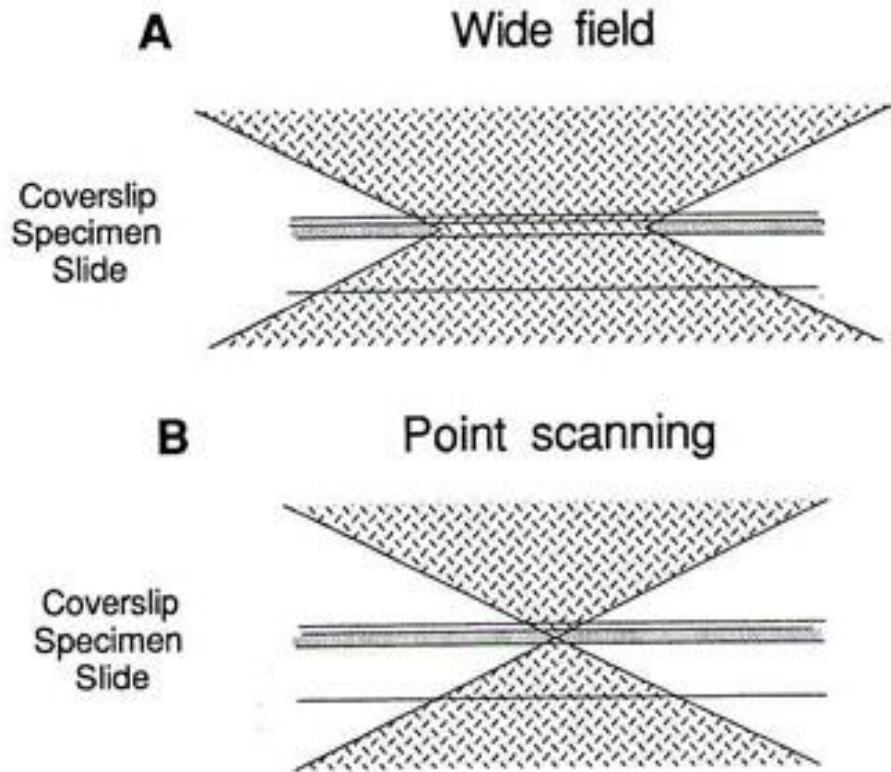
Άμεση ή Έμμεση

Αντισώματα έναντι μορίου στόχου
σημασμένα με φθορίζουσες

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)
NF (Neuronal Protein)



ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ



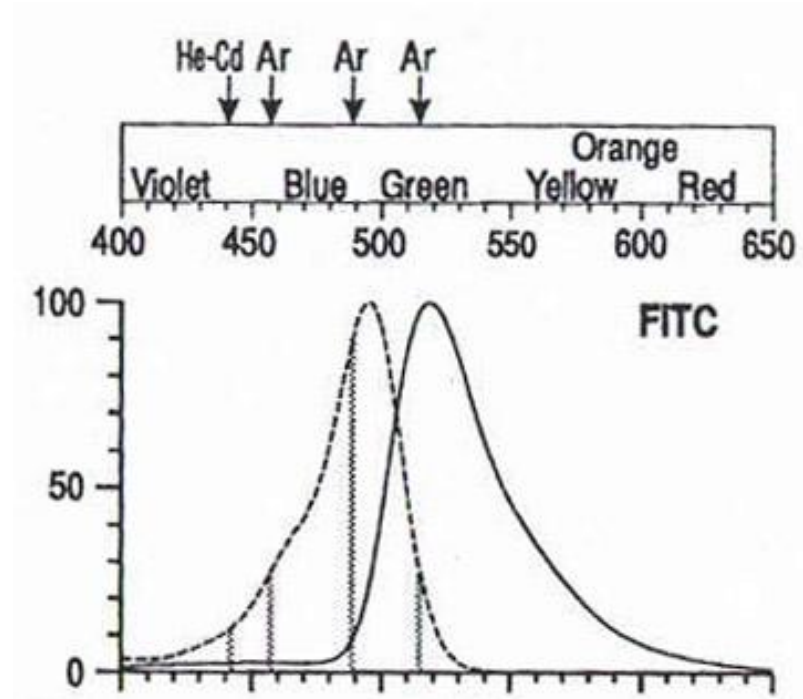
Τα συστήματα διέγερσης και ανίχνευσης εστιάζουν στον ίδιο στοιχειώδη όγκο

Πηγή ακτινοβολίας Laser

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

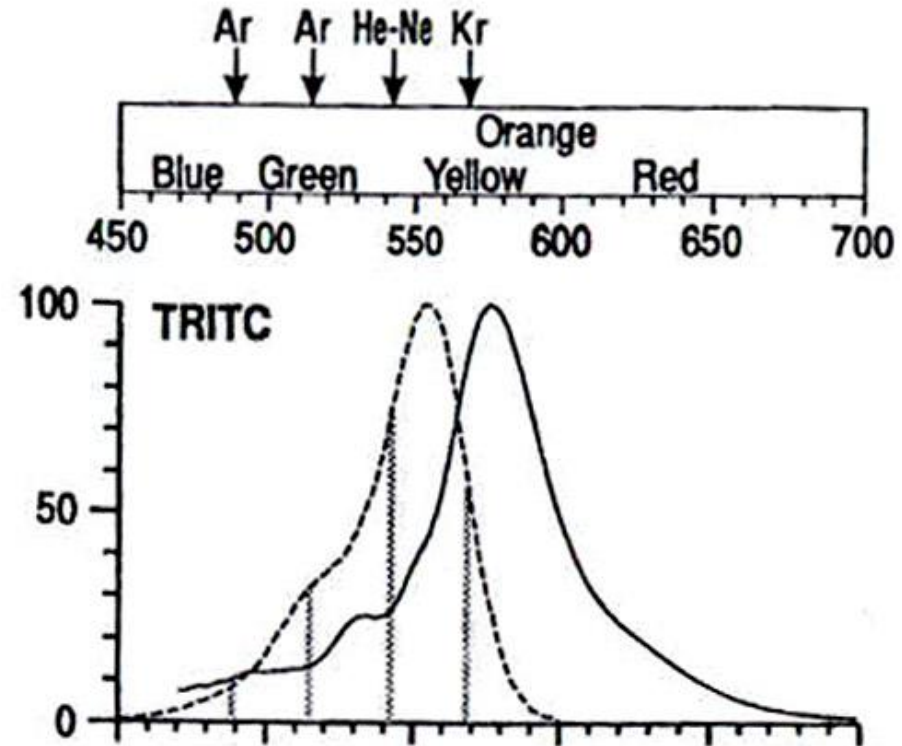
FITC (Φλουορσκεΐνη)

Φάσμα εκπομπής και διέγερσης



Διέγερση με Laser Αργού (488 nm)
Εκπομπή (510-530 nm)

TRITC (Ροδαμίνη)



Διέγερση με Laser Ηλίου-Νέου (543-548 nm)
Εκπομπή (560-620 nm)

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ_ OMIC ENGINE

LSM 800 Zeiss
Εργαστήριο μικροσκοπίας
ΤΒΒ, ΠΘ



ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ_ OMIC ENGINE

LSM 800 Zeiss

LASER: 405, 488, 561, 640

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ : 2 PMT

1 Airy Scan (με τρίτους τρόπους λειτουργίας)

Confocal mode: ως επιπλέον GaAsP ανιχνευτή,

Virtual Pinhole mode: για μεγαλύτερη ευαισθησία,

SuperResolution mode με 1,7x καλύτερη διακριτική ικανότητα (x,y,z) και βελτίωση του SNR (Signal to noise ratio)

Z drive : 10 nm

Pinhole : 0,0 έως 8 Airy units

ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ

Εφαρμογές:

image analysis & measurements,

Multi-channel,

time lapse, z-stack,

colocalization, autofocus & extended focus,

multitracking Imaging, lambda scan, linear unmixing, 2D &

OMIC ENGINE

13-06-2019

Anna-Maria Psarra, UTH

ΕΡΑΡ



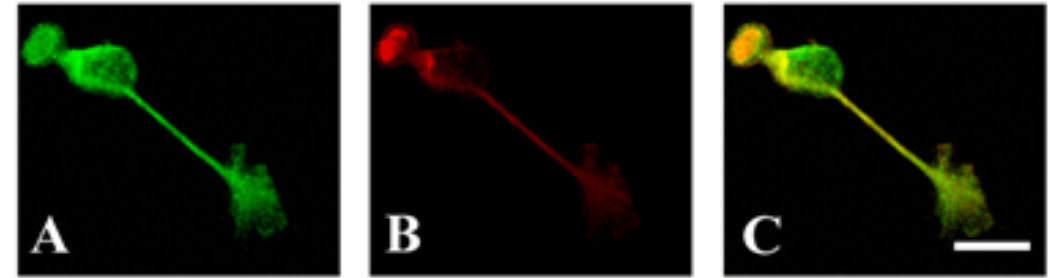
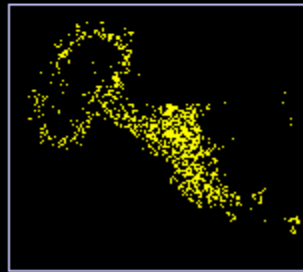
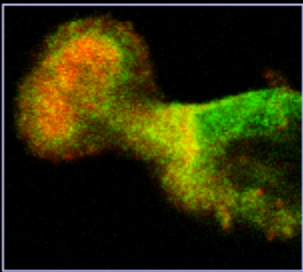
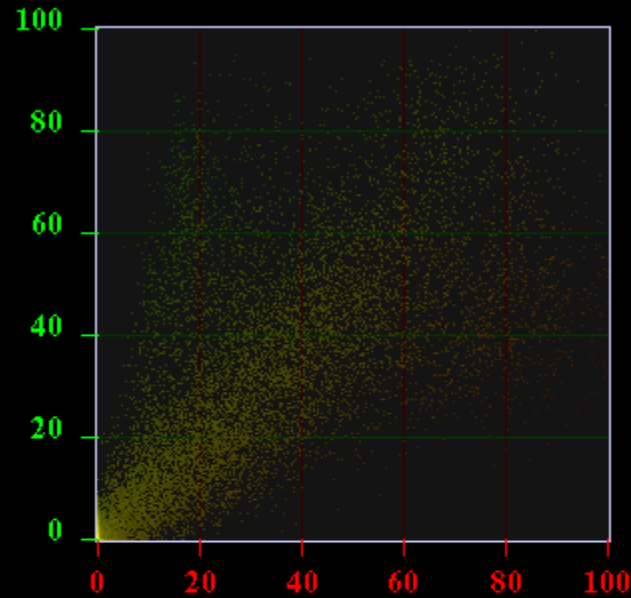
ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

- Ελαχιστοποίηση μη ειδικού σήματος από φθορισμό
- Το σήμα προέρχεται από στοιχειώδη όγκο και όχι από εύρος περιοχής
- Laser και όχι UV ακτινοβολία
- Οπτικές τομές, Ελαχιστοποίηση βλάβης δείγματος
- Ευκρίνεια κυτταρικών δομών
- Έλεγχος συνεντόπισης μορίων
- Τομές κατά τον Z-άξονα
- Απόκτηση τρισδιάστατης δομής κυτταρικών δομών
- Μελέτες σε ζωντανά κύτταρα
- Παρακολούθηση κίνησης μορίων σε ζωντανά κύτταρα (π.χ. FRAP)
- Παρακολούθηση αλληλεπίδρασης μορίων (FRET)
- Πολλαπλή σήμανση διαφορετικών μορίων

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΥΝΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ – ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

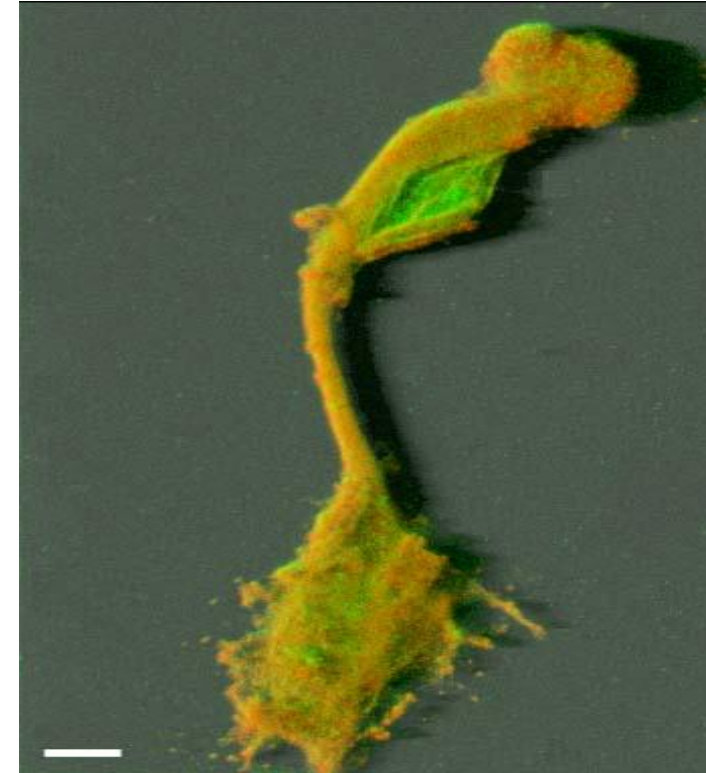
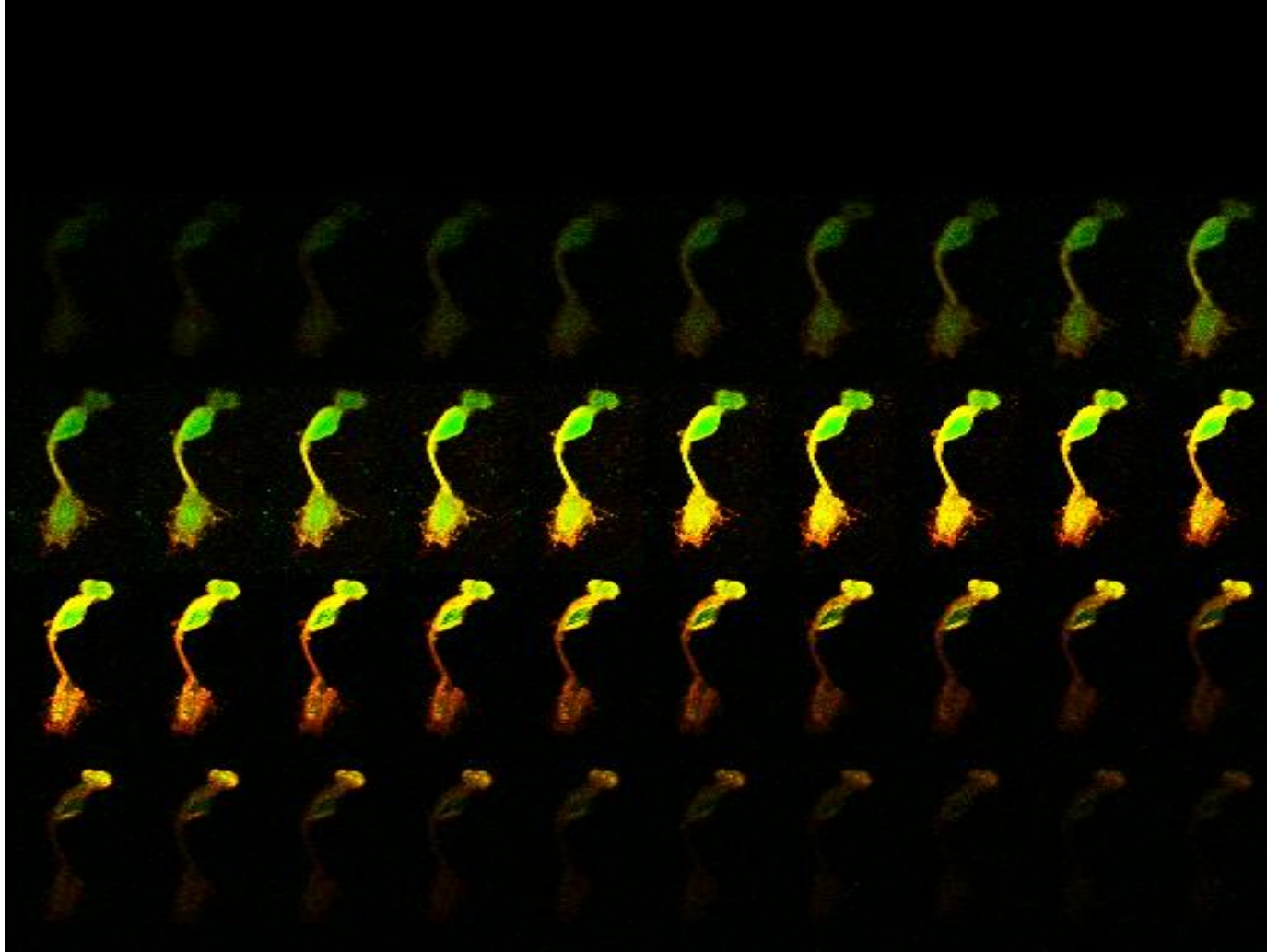
File: c x07m.ims
Title: /usr/people/piallat/Anna-Maria/c x017m
Comment: ,
Set: cox vs gr
Layer: 19



Psarra et al, *Glia*, 2003, 41, 38-49

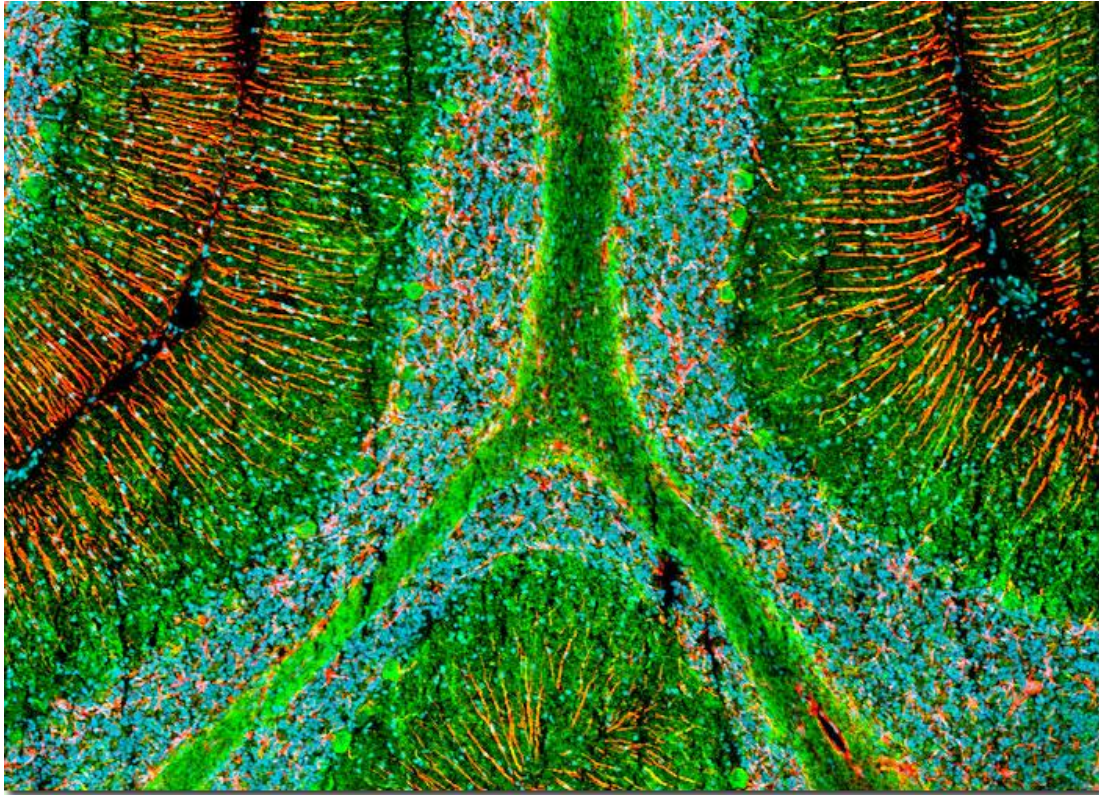


ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟΝ Ζ ΑΞΟΝΑ. 3D απεικόνιση του κυττάρου

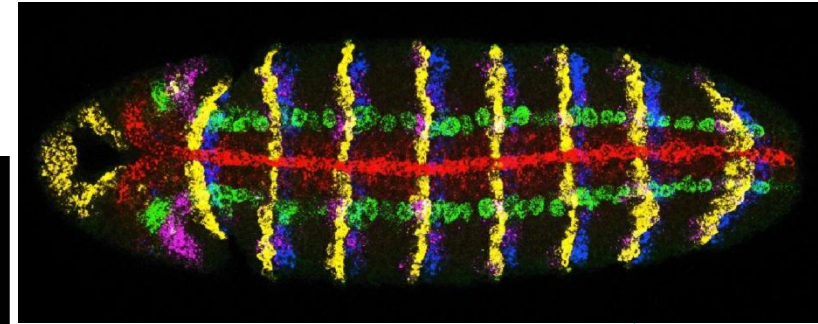
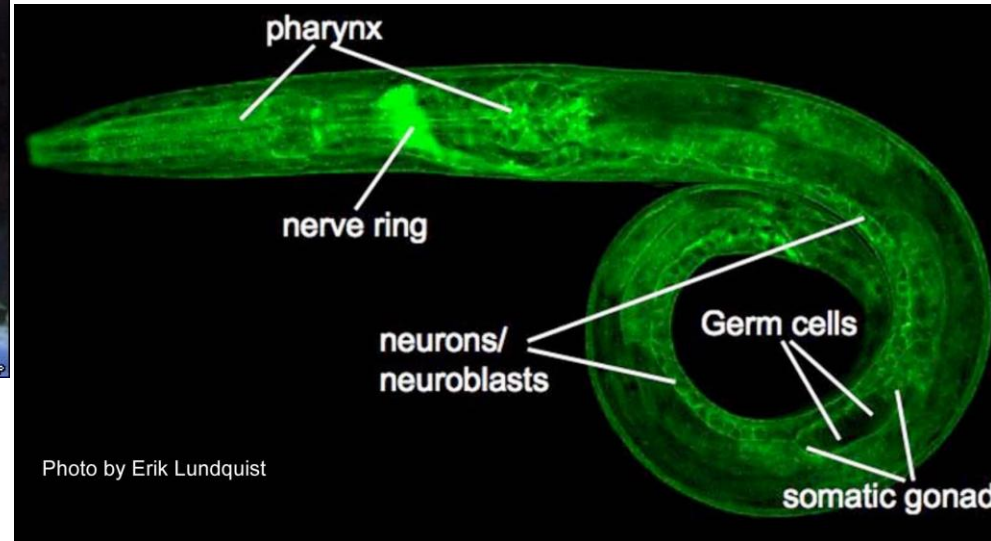


Psarra et al, *Glia*, 2003, 41, 38-49

ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
Πολλαπλές Χρώσεις - Πολυπαραγοντική μελέτη



ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ



(Zebrafish)

C. elegans

Drosophila embryo

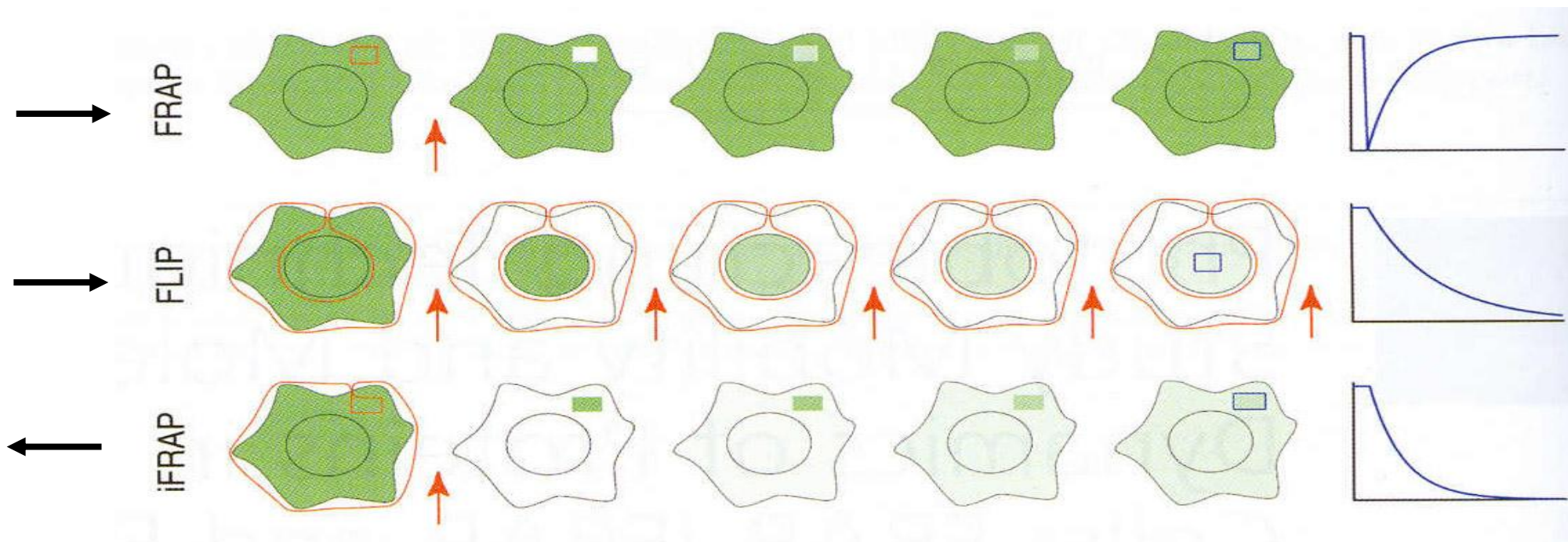
Dave Kosman, UCSD
Science and AAAS, (202)
326-6440, scipak@aaas.org

<http://www.youtube.com/watch?v=Py9zAUOYYLk>

FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

iFRAP (inverse FRAP)

FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)



Παρακολούθηση μετακίνησης μορίων μεταξύ υποκυτταρικών οργανιδίων

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)



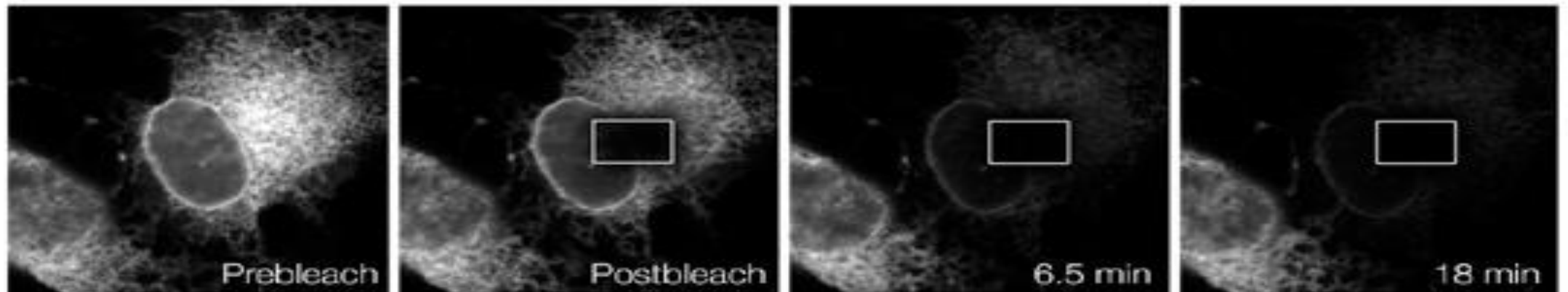
Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

FRAP

<http://www.youtube.com/watch?v=tJsb-OJMzi8>



FLIP (Fluorescence Loss In Photobleaching)



Επαναλαμβανόμενη διέγερση της περιοχής, άρα και εξαφάνιση του φθορισμού σε αυτήν την περιοχή = κάψιμο του δείγματος σε αυτήν την περιοχή

Παρακολούθηση μείωσης του φθορισμού στη γύρω περιοχή

FRAP

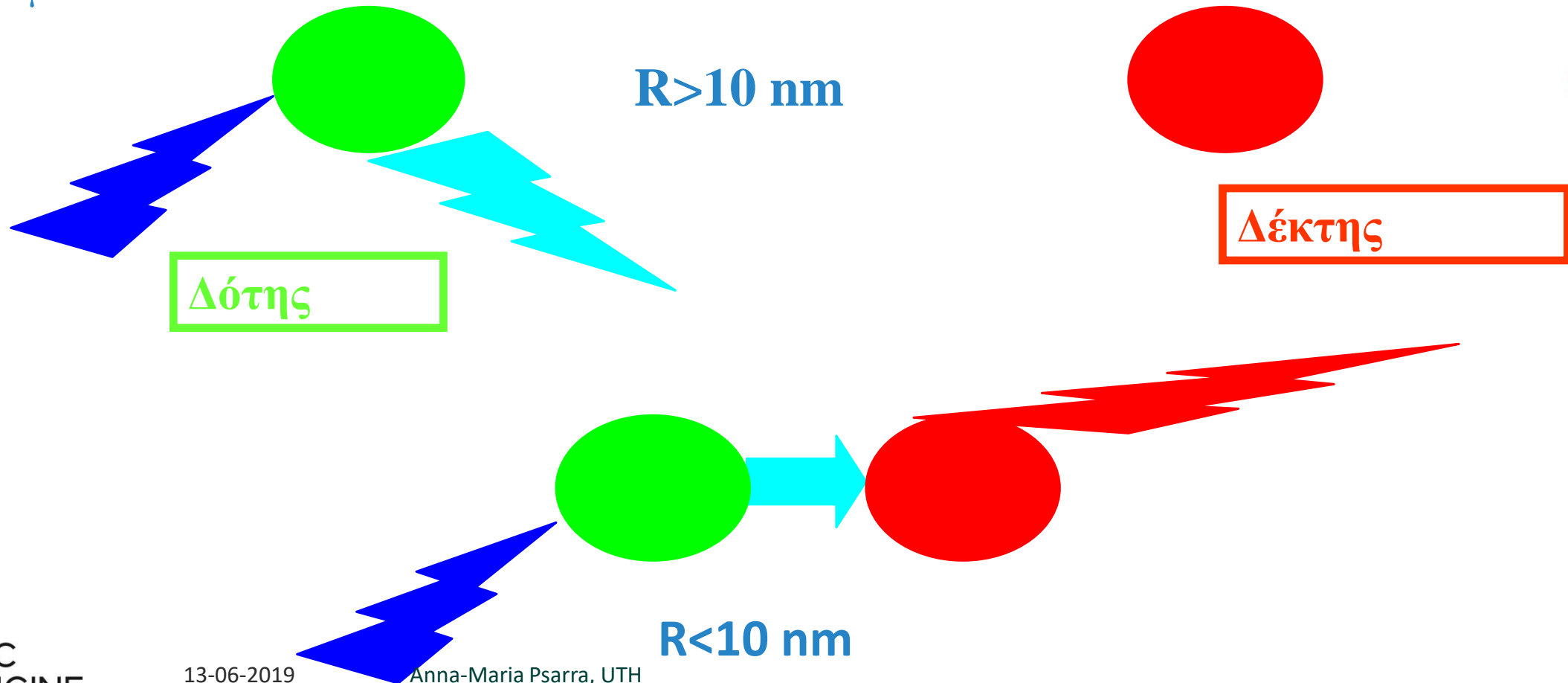
<http://www.youtube.com/watch?v=tJsb-OJMzi8>

FLIP

<http://www.youtube.com/watch?v=Av0xdkJkO0s>

Fluorescence Resonance Energy Transfer FRET

Όταν δύο μόρια, ένα σημασμένο με κατάλληλο δότη, το άλλο με κατάλληλο δέκτη είναι επαρκώς κοντά (τυπικά λιγότερα από 10 nm) ή ενέργεια διέγερσης από τον δότη μπορεί να μεταφερθεί στον δέκτη. Το φαινόμενο μπορεί να γίνει αντιληπτό. Δεδομένου ότι ο δέκτης διεγείρεται και εκπέμπει ακτινοβολία φθορισμού την οποία τελικά παρατηρούμε.



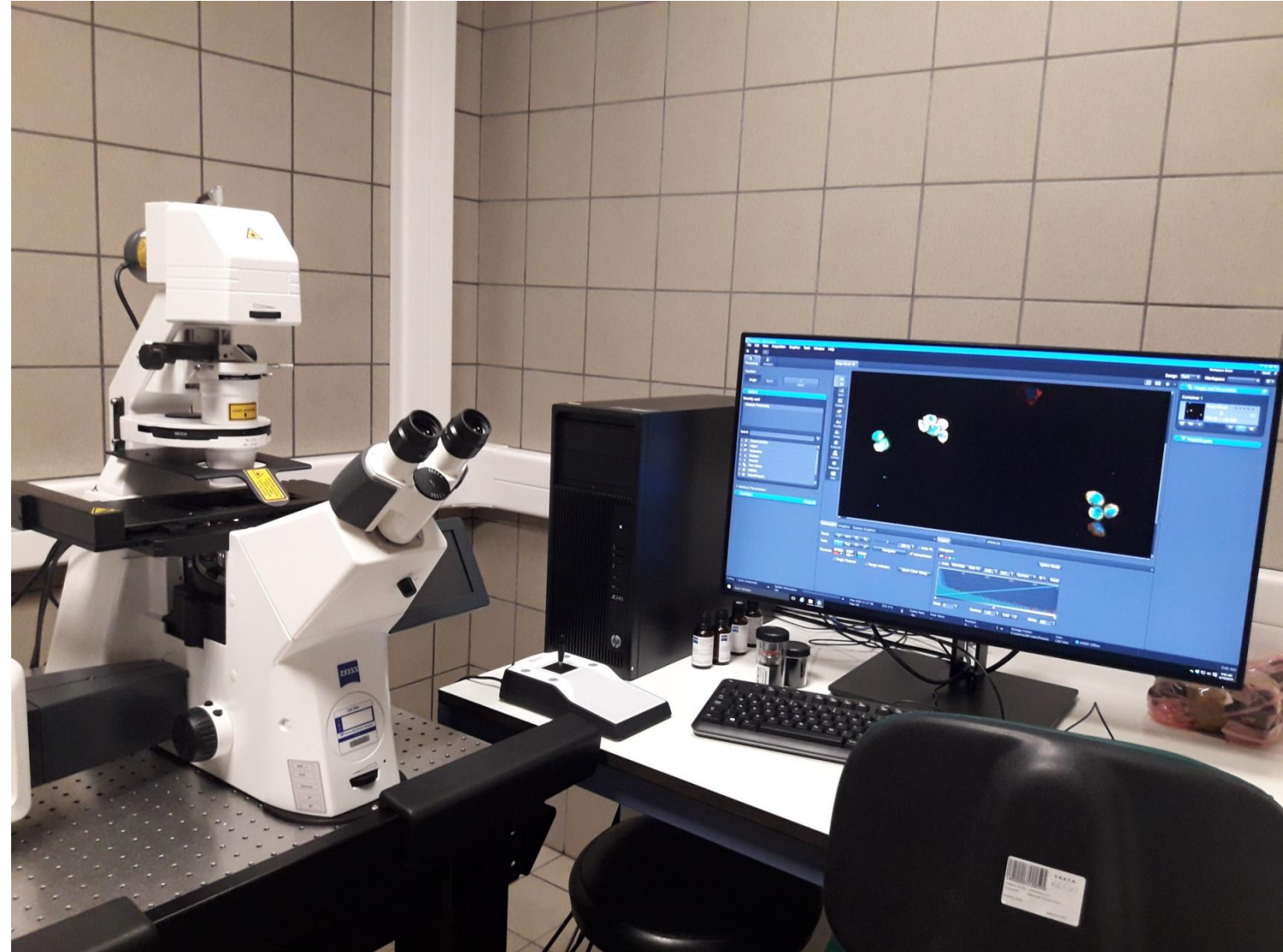
ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ_ OMIC ENGINE

LSM 800 Zeiss

ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ

Εφαρμογές:

image analysis & measurements,
Multi-channel,
time lapse,
z-stack,
colocalization,
2D & 3D imaging
FRAP
autofocus & extended focus,
multitracking Imaging,
lambda scan,
linear unmixing



ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΣΤΑΘΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΠΟΥ ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΖΟΥΝ ΜΟΡΙΑ ΣΗΜΑΣΜΕΝΑ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΕΣ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΟΡΙΩΝ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΙΚΟΥ/ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΟΣ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ (ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ) ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

ΣΗΜΑΝΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΜΕ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΕΣ ΙΧΝΗΘΕΤΕΣ – ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΥΠΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΟΡΓΑΝΙΔΙΑ

ΧΡΗΣΗ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΩΝ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΝ ΡΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗΣ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ



Acknowledgement

OMIC-ENGINE is supported by the
Greek Operational Programme
Competitiveness, Entrepreneurship
and Innovation 2014-2020 under
Grant No. 5002636



Co-financed by Greece and the European Union