

TECNICHE DI IMAGING IN BIOLOGIA



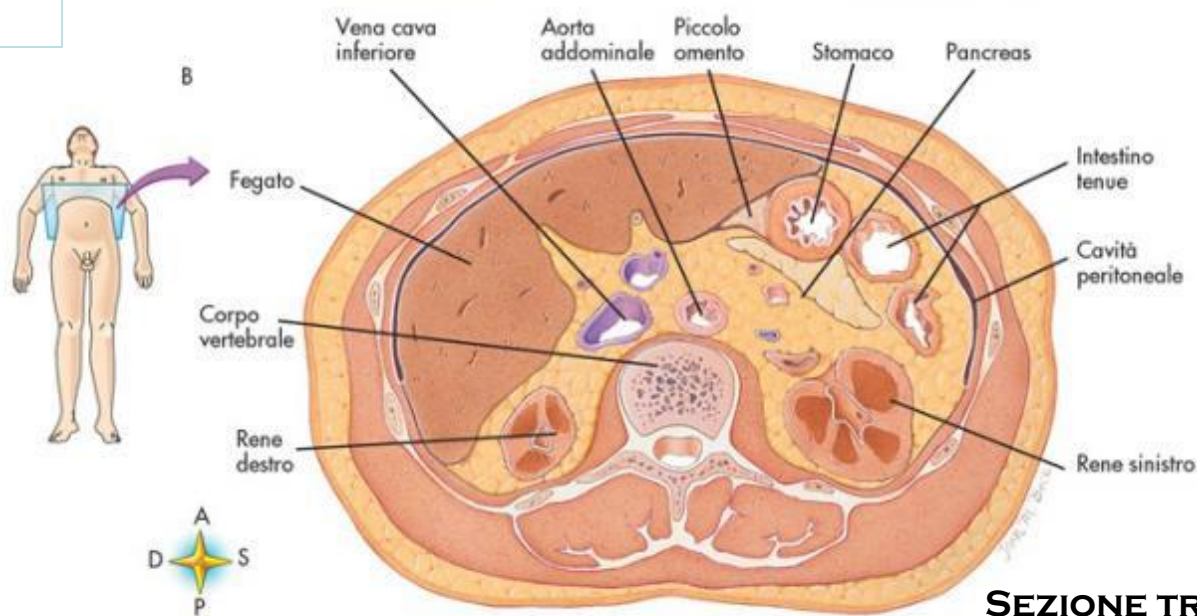
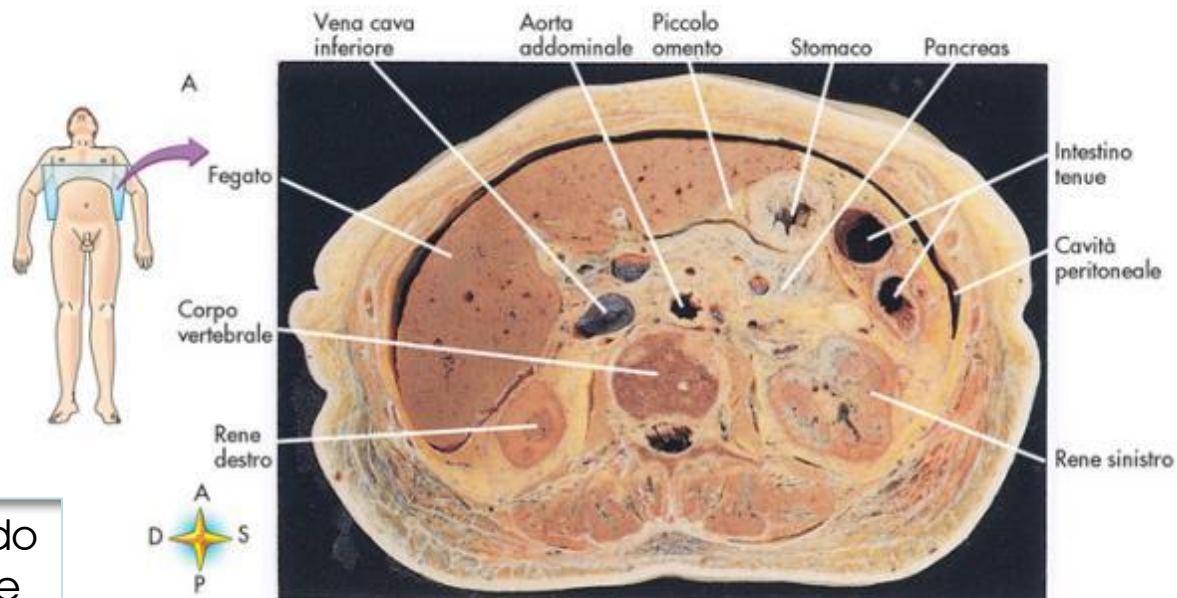
anatomia *gr.* ANĀTOMĪA = ANATOMÈ COM-
posto di ANA *in* (v. *Ana*) e TOMÈ *taglio,*
sezione, da TÈMNO *tagliare* (v. *Tomo*). —
Arte di esaminare i corpi animali o ve-
getali, separandone le parti per conoscerne
la interna struttura e le funzioni.

Deriv. *Anatòmico; Anatomista; Anatomizzàre.*



**ANALIZZARE
ATTRAVERSO LA
DISSEZIONE**

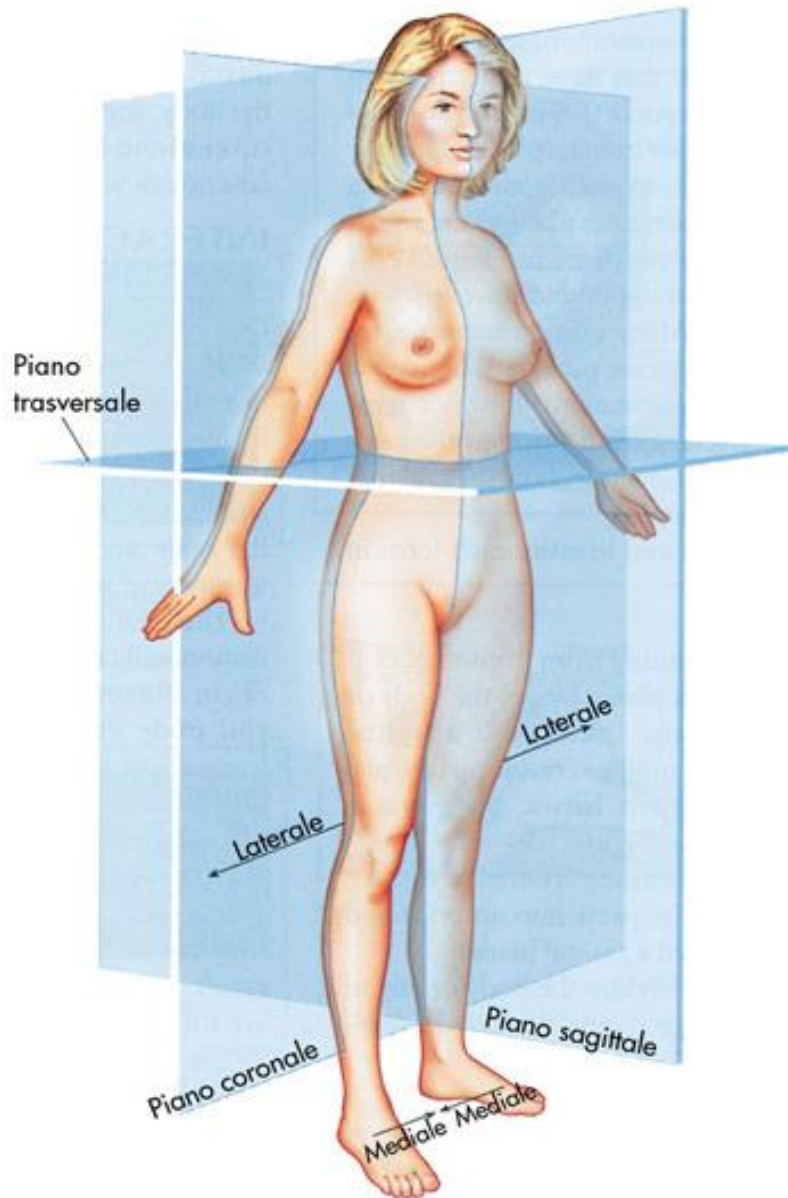
IL PREPARATO CLASSICO IN ANATOMIA E' LA SEZIONE



La sezione è un modo ordinato di analizzare l'interno del corpo.

SEZIONE TRASVERSA

Piani di sezione

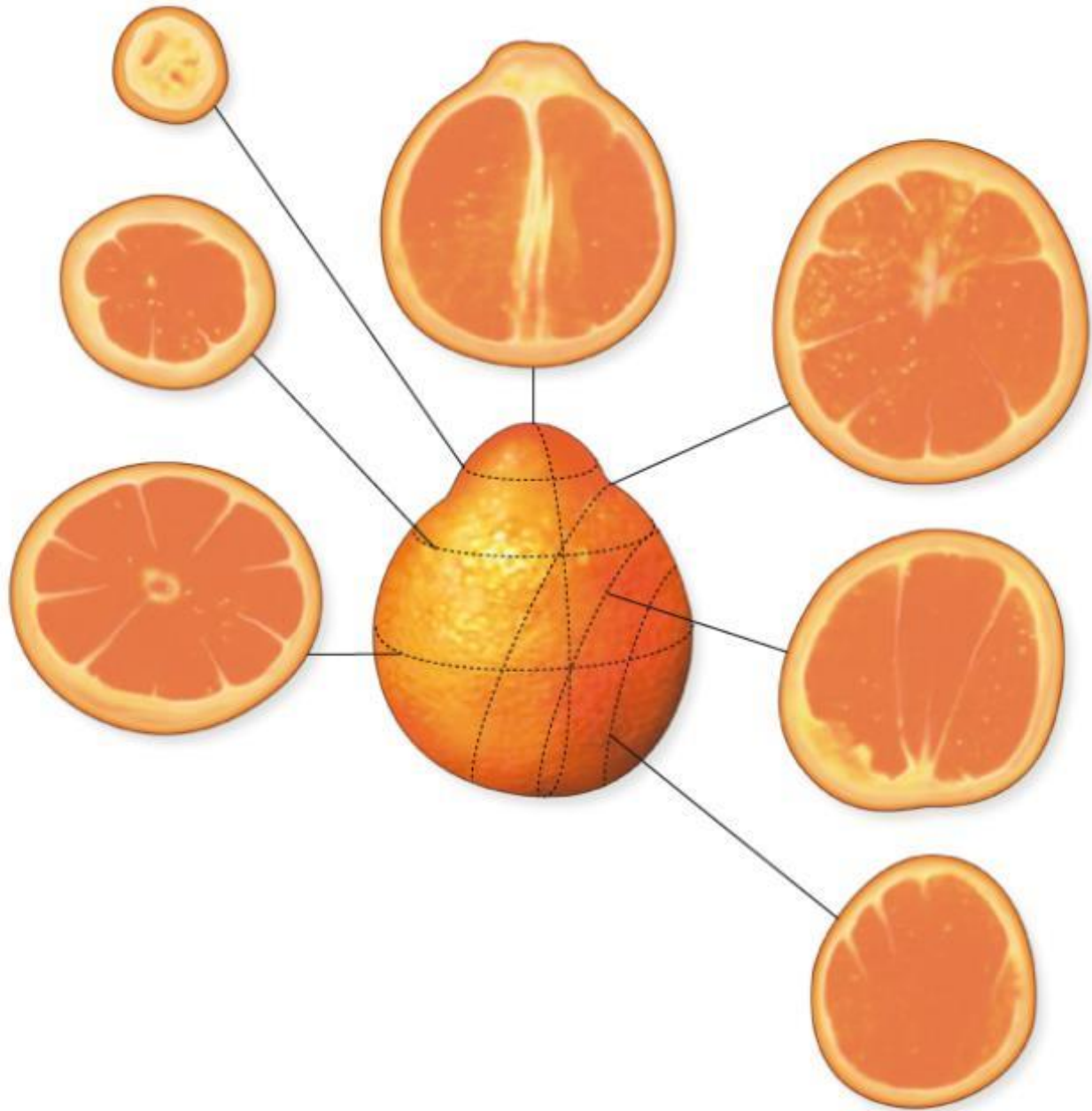


-Coronale

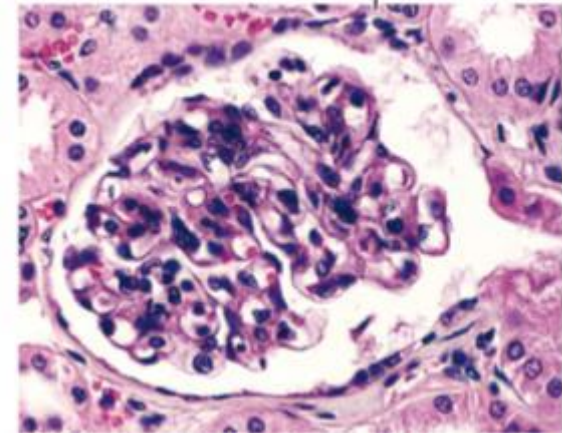
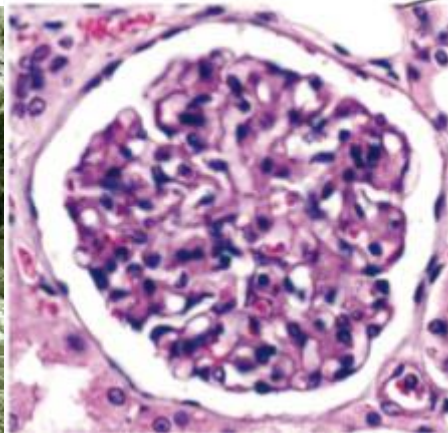
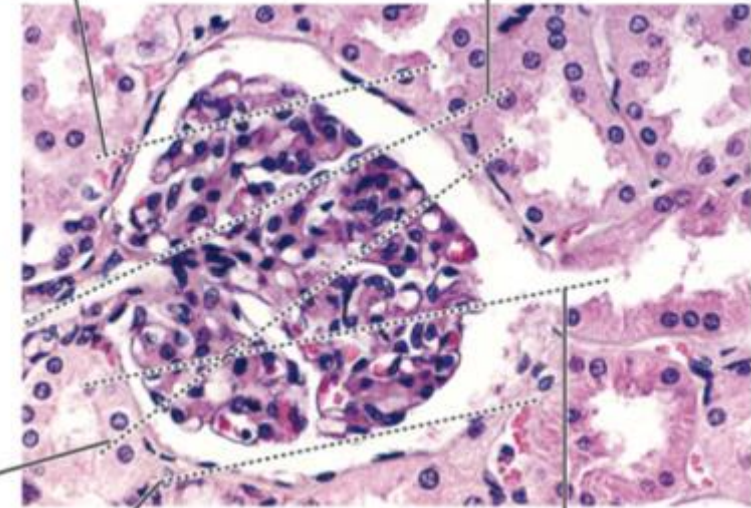
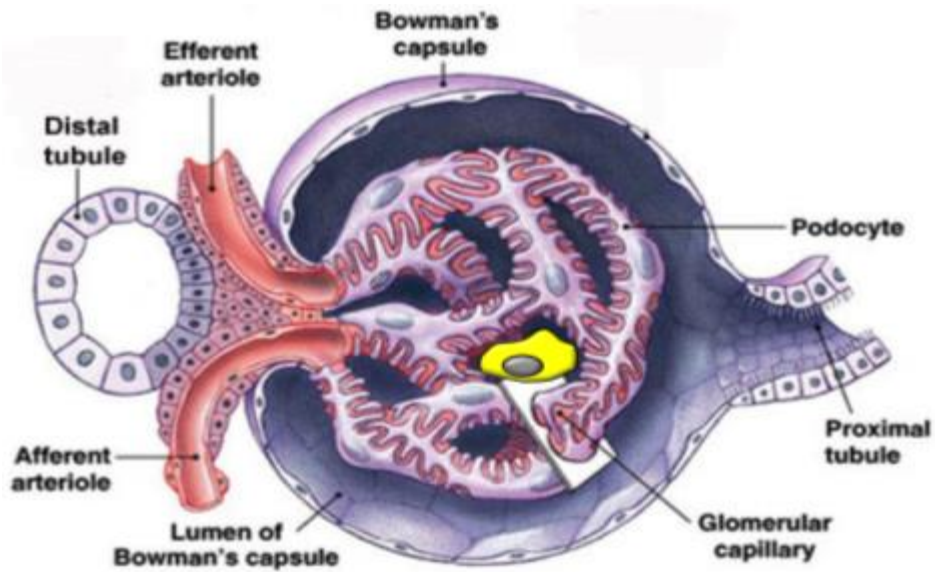
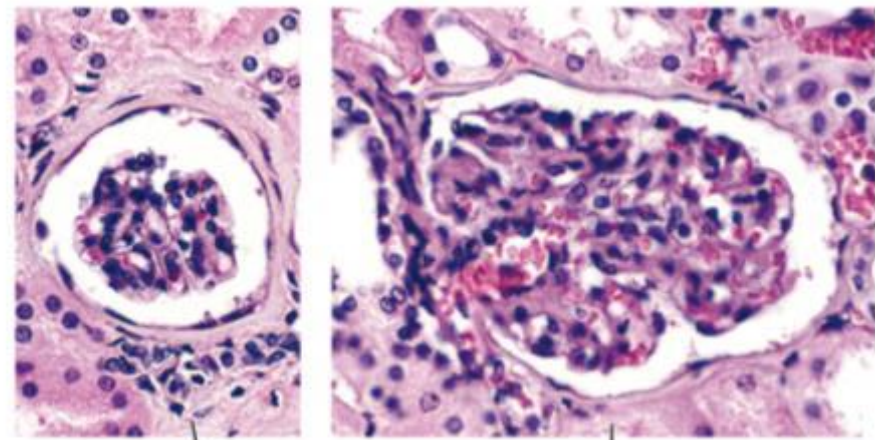
-Sagittale

-Trasverso

Utilizzare piani di
sezione definiti
SEMPLIFICA
L'INTERPRETAZIONE
DEL PREPARATO



SEZIONI DI GLOMERULO RENALE



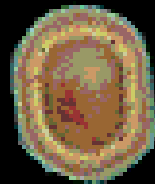
THE VISIBLE HUMAN PROJECT



DA UN CONDANNATO A MORTE, SONO STATE OTTENUTE
1871 SEZIONI
TRASVERSE DA 1 MM

DA UNA CONDANNATA
5189 SEZIONI DA
0,33MM

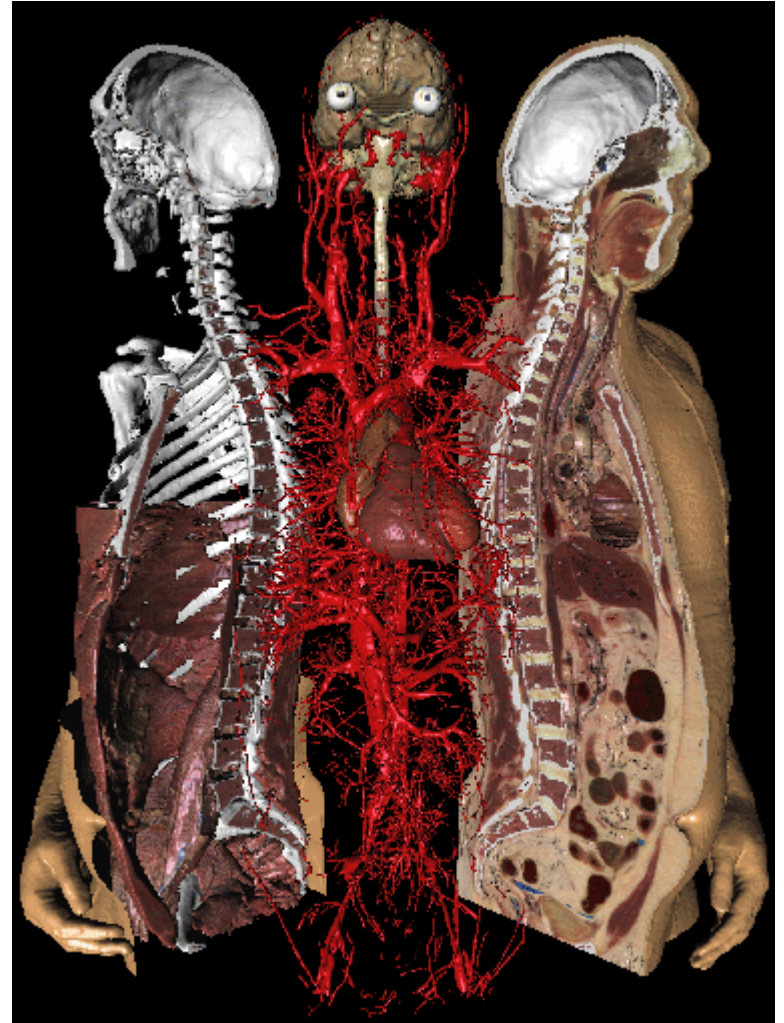
[HTTP://WWW.NLM.NIH.GOV/RESEARCH/VISIBLE/VISIBLE_HUMAN.HTML](http://www.nlm.nih.gov/research/visible/visible_human.html)



**TRACCIANDO IN OGNI SEZIONE LE STRUTTURE DI INTERESSE
(SEGMENTAZIONE)
SI POSSONO OTTENERE
RICOSTRUZIONI TRIDIMENSIONALI
DELL'INTERO OGGETTO**



COLONSCOPIA VIRTUALE



A seconda della
dimensione dell'oggetto da
esaminare
Il tipo di sezione e gli
strumenti di osservazione
cambiano

Per essere efficace uno
strumento di imaging deve
ottenere un buon livello di

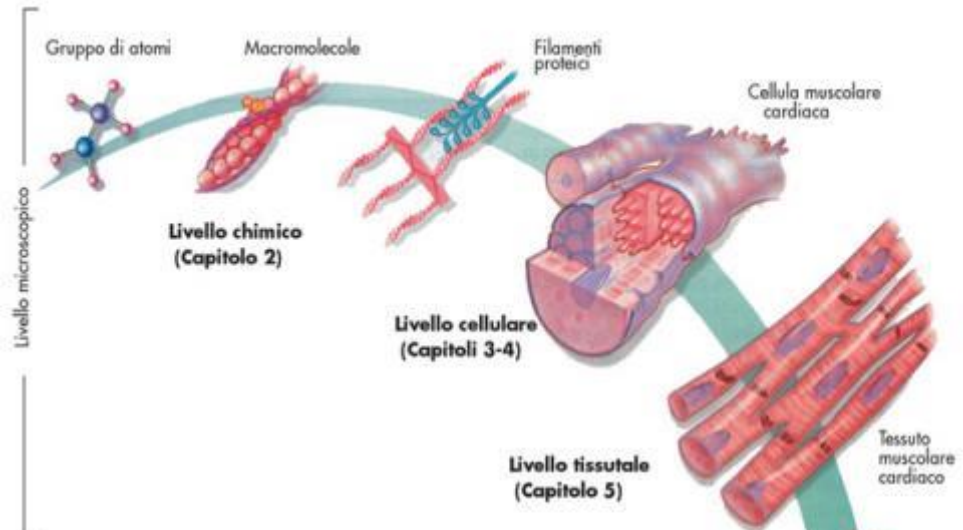
RISOLUZIONE

E

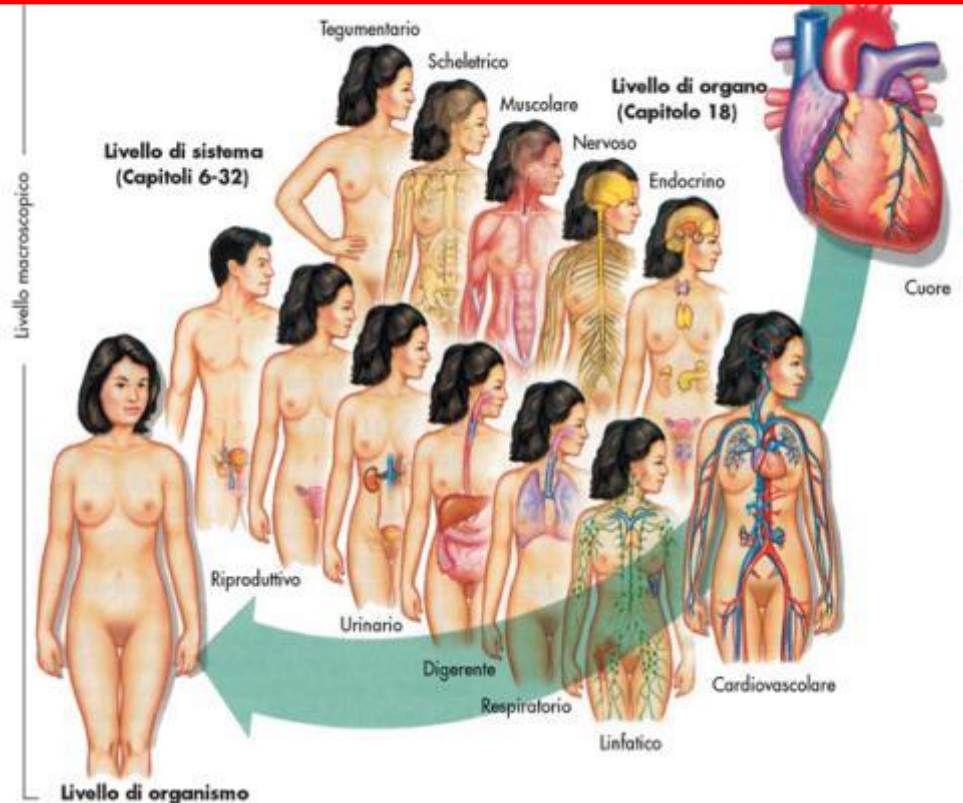
CONTRASTO

Della struttura in esame

LIVELLO MICROSCOPICO



LIVELLO MACROSCOPICO



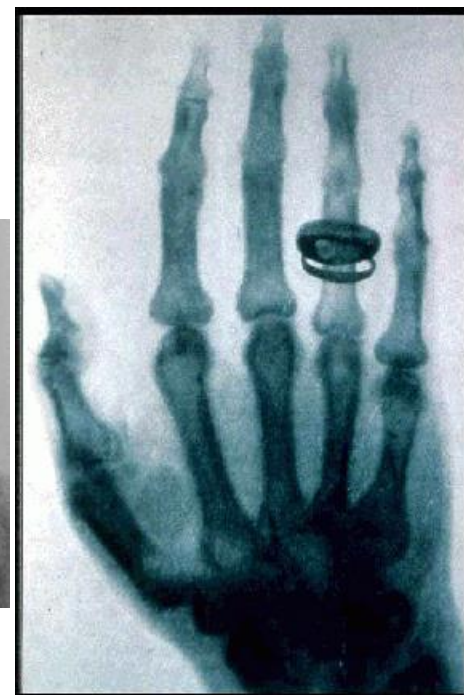
RADIOLOGIA

TECNICA DIAGNOSTICA, PER L'OSSERVAZIONE *IN VIVO*

NATA CON LO SCOPO DI ACQUISIRE IMMAGINI DELLA STRUTTURA INTERNA DEL CORPO (A LIVELLO MACROSCOPICO)

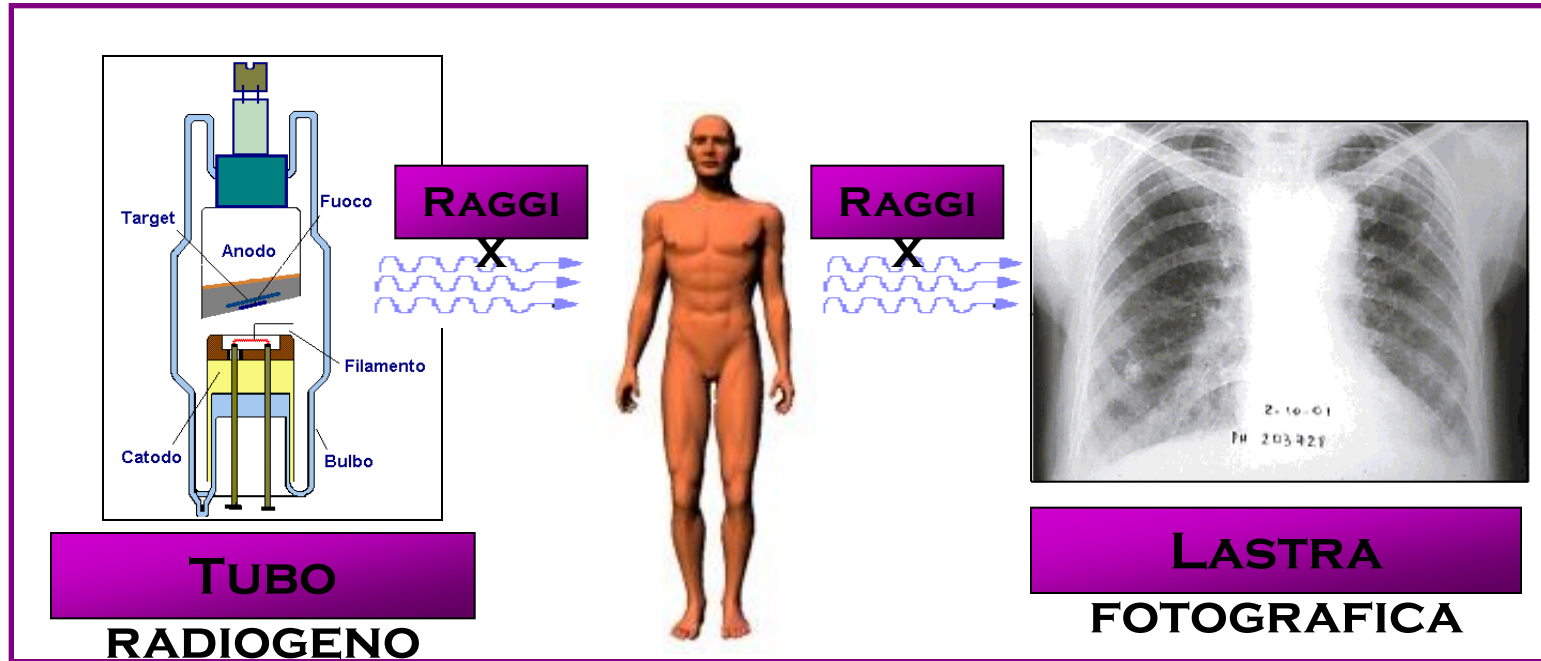
RIVELAZIONE DI RAGGI X EMESSI DA UNA SORGENTE ESTERNA DOPO CHE HANNO ATTRAVERSANO I TESSUTI IN ESAME

INTRODOTTA DA RÖENTGEN NEL 1895 CHE UTILIZZÒ PER LA PRIMA VOLTA, NEI SUOI ESPERIMENTI, LA PROPRIETÀ DI PENETRAZIONE DEI RAGGI X PER "VEDERE" LE OSSA DI UNA MANO



WILHELM_RÖENTGEN; PREMIO NOBEL 1901

RAGGI X



L'immagine generata sulla lastra è modulata dalle caratteristiche di assorbimento dei tessuti attraversati:

MANIFESTA

DIFFERENZE DI DENSITÀ

IL FASCIO DI RAGGI X È ASSORBITO NEL CORPO UMANO

Lastra=alogenuro di argento in gelatina+supporto rigido

- ★ **I RAGGI X RILASCIANO ENERGIA NELLA LASTRA PROVOCANDO L'EMISSIONE DI ELETTRONI**
- ★ **GLI ELETTRONI SONO INTRAPPOLATI NEI "CENTRI SENSIBILI" DELL'EMULSIONE (GELATINA CON MICROCRISTALLI DI ALOGENURO D'ARGENTO)**
- ★ **GLI ELETTRONI INTRAPPOLATI ATTRAGGONO E NEUTRALIZZANO GLI IONI MOBILI DI Ag^+ → IMMAGINE LATENTE**
- ★ **NELLA SOLUZIONE DI SVILUPPO ALTRO ARGENTO SI DEPOSITA NEI CENTRI SENSIBILI → L'IMMAGINE LATENTE FUNZIONA DA CATALIZZATORE**

IL GRADO DI OSCURAMENTO DI UNA REGIONE DELLA LASTRA DIPENDE DALLA QUANTITÀ DI ARGENTO LIBERO DEPOSITATO NELLA ZONA INTERESSATA E QUINDI DAL NUMERO DI RAGGI X LÌ ASSORBITI

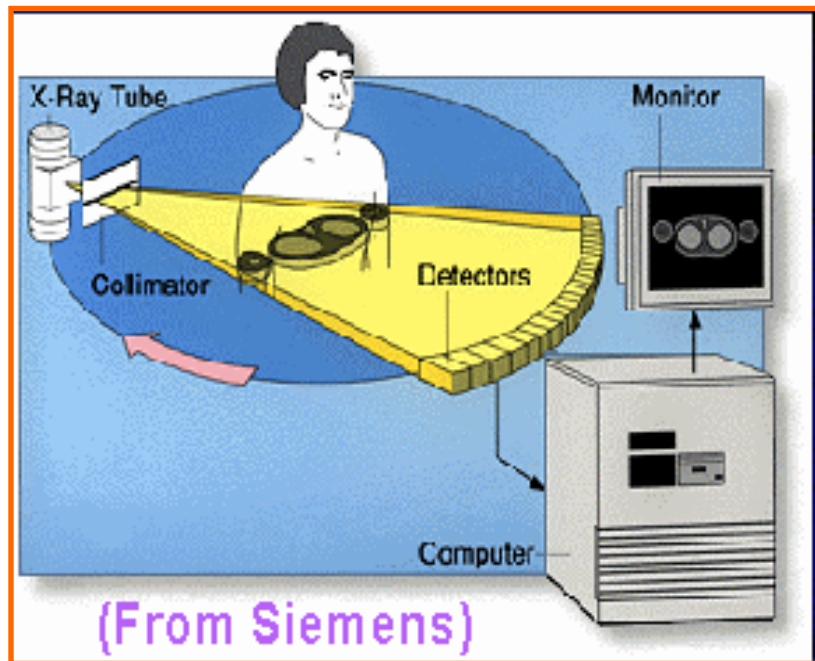
Tomografia Assiale Computerizzata (TAC)

Computed Tomography (CT)

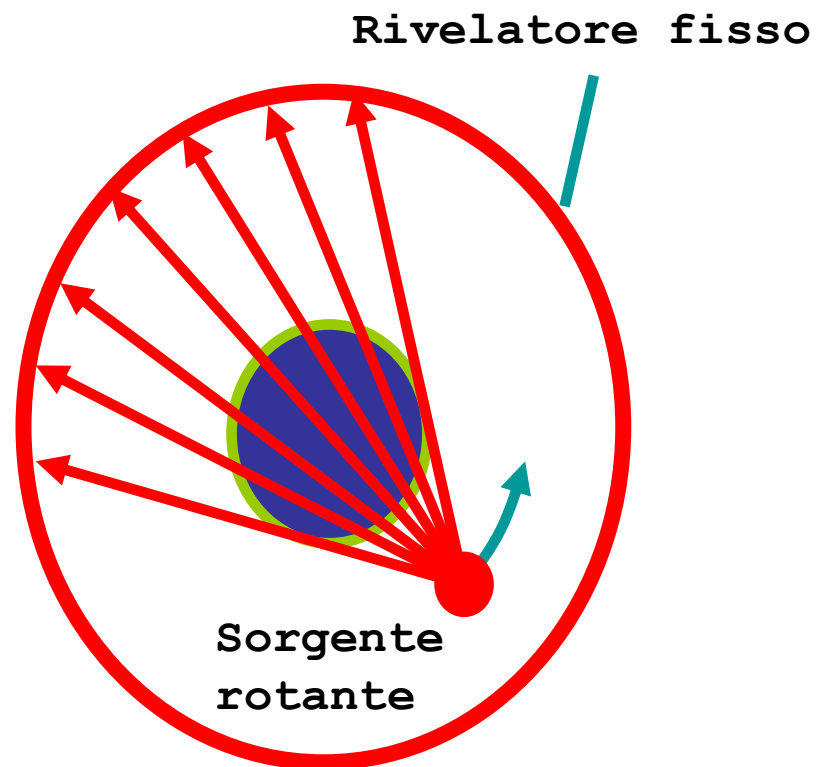
Hounsfield & Cormack Premio nobel 1979

Un fascio di raggi X è emesso da una sorgente rotante

La ricostruzione tomografica produce l'immagine di una sezione del paziente



Tomografia: dal greco
tomos (sezione)
graphein (scrivere)



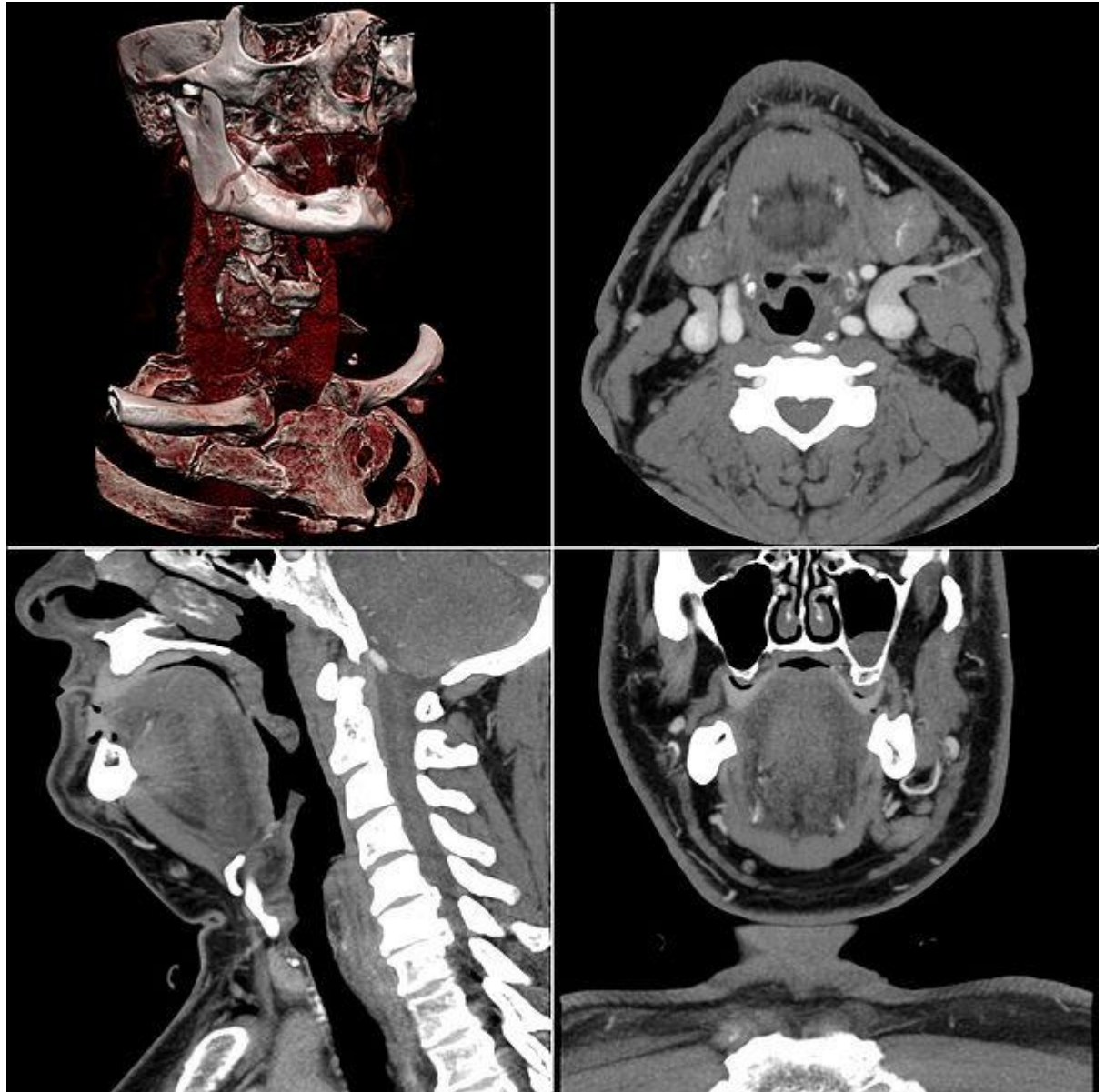
IV GENERAZIONE

Il computer elabora le immagini alle diverse angolazioni e le unisce in una unica sezione virtuale del paziente (ricostruzione tomografica)



**Gruppi di sezioni a
distanze definite
(STACK)**

**Rappresentano il
campione in 3D**

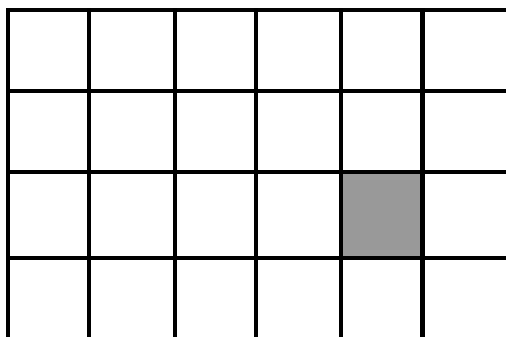


You Tube
Broadcast Yourself™

Per un esempio

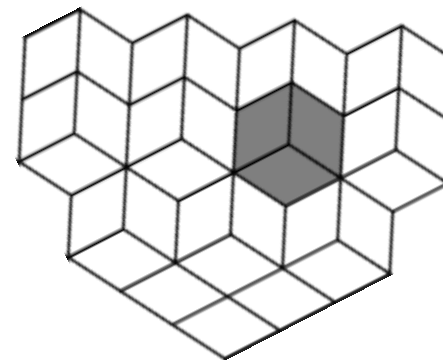
COSI' COME LE BITMAP

SONO INSIEMI DI **PIXEL**



GLI STACK

SONO INSIEMI DI **VOXEL**



Ogni voxel
possiede una coordinata

X Y Z

e rappresenta in bit
il valore di una proprietà

(per il CT, Hounsfield Units,
una misura della radiodensità)

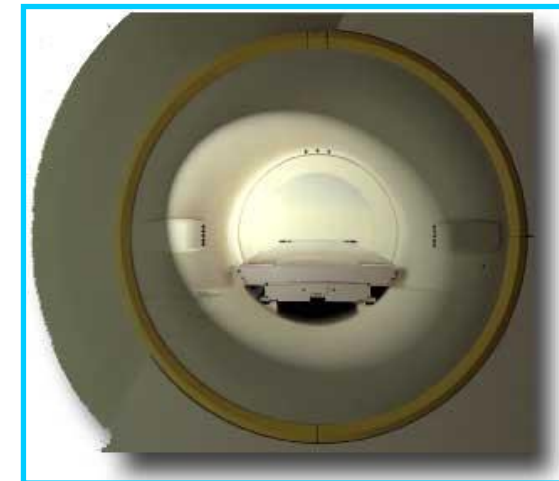
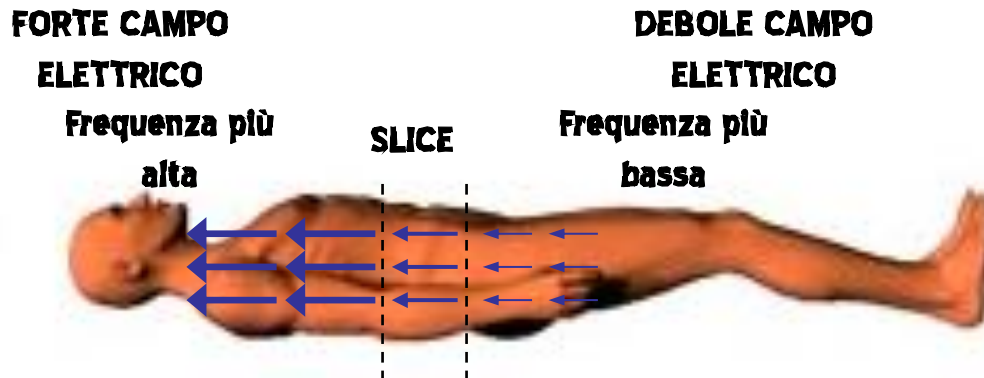


MRI

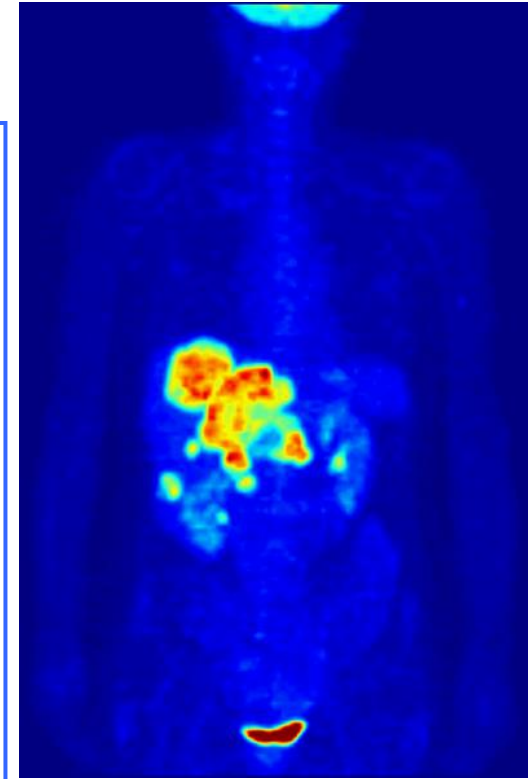
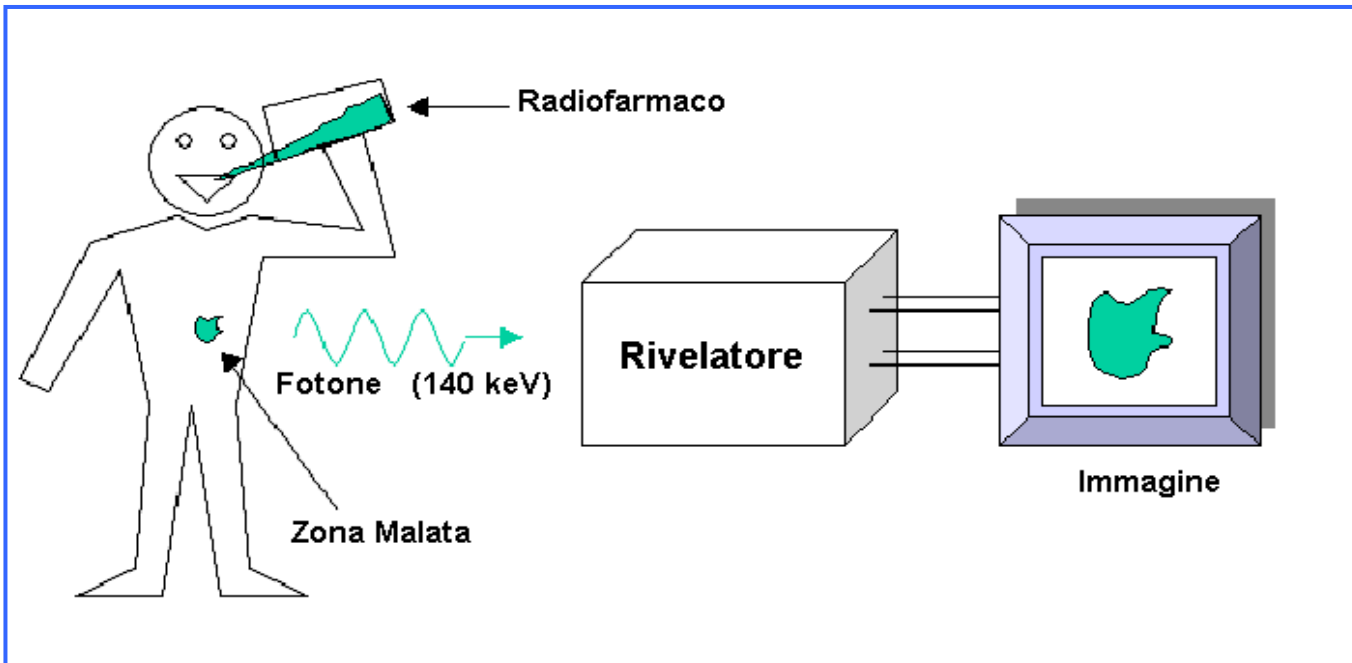
Risonanza Magnetica Nucleare

IN USO DAL 1980, LA RMN SFRUTTA LA PROPRIETÀ DI UN CAMPO MAGNETICO D'ELEVATA INTENSITÀ PER METTERE IN PRECESSIONE I NUCLEI DEGLI ATOMI DI IDROGENO PRESENTI NEL CORPO DEL PAZIENTE

- ✓ IMMAGINI DETTAGLIATE DI PIANI ORIENTATI IN QUALSIASI MODO NELLO SPAZIO (TRASVERSALE, SAGITTALE E FRONTALE)
- ✓ TECNICA DIAGNOSTICA CHE NON UTILIZZA RADIAZIONE IONIZZANTE RIDUCENDO I RISCHI PER IL PAZIENTE



SCINTIGRAFIA



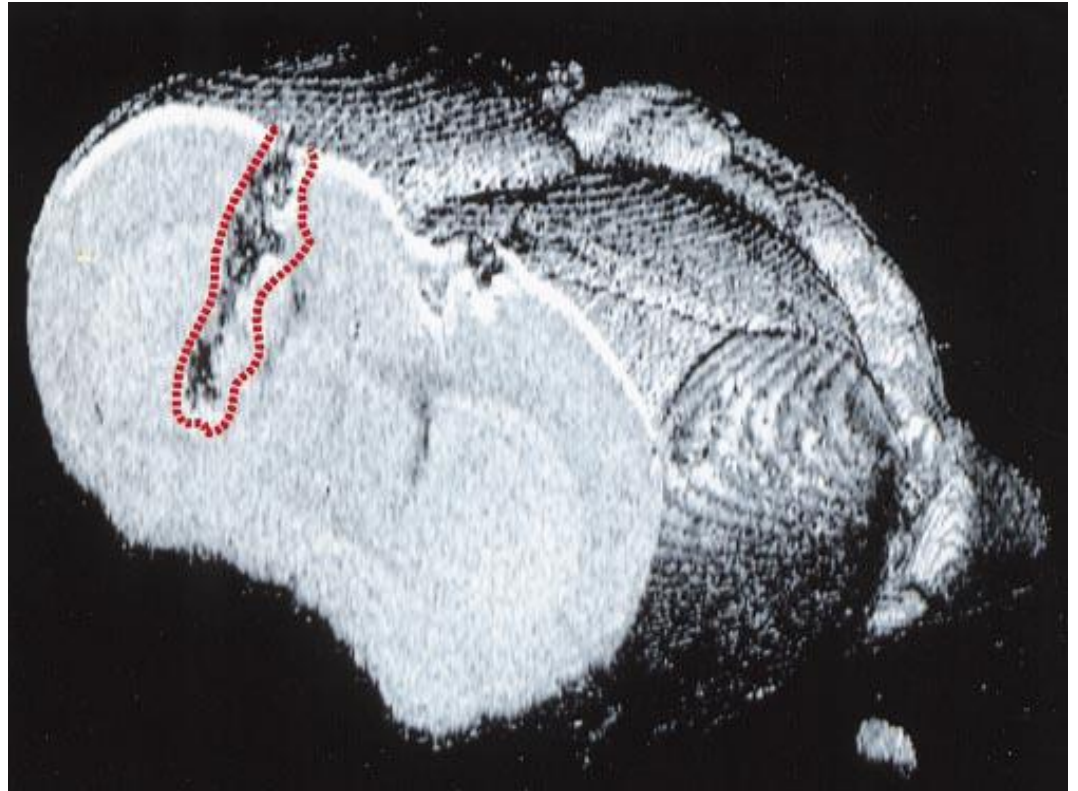
Fludeoxyglucose (^{18}F) (^{18}F -FDG), Pet di un paziente con cancro colon-rettale con metastasi al fegato

AL PAZIENTE È SOMMINISTRATO UN RADIOFARMACO CHE TENDE A CONCENTRARSI NELLA ZONA MALATA. L'EMMISSIONE GAMMA PROVENIENTE DAL TRACCIANTE RADIOATTIVO PRESENTE NEL RADIOFARMACO VIENE RACCOLTA SU UN RIVELATORE

INFORMAZIONI FUNZIONALI DEL TESSUTO IN ESAME

Il limite di risoluzione di tac, nmr e pet non arriva a livello cellulare o subcellulare.

MRI di Linfociti
marcati magneticamente
che si concentrano in
una regione tumorale
nel topo



(voxel size, 39 x 39 x 78 μm)

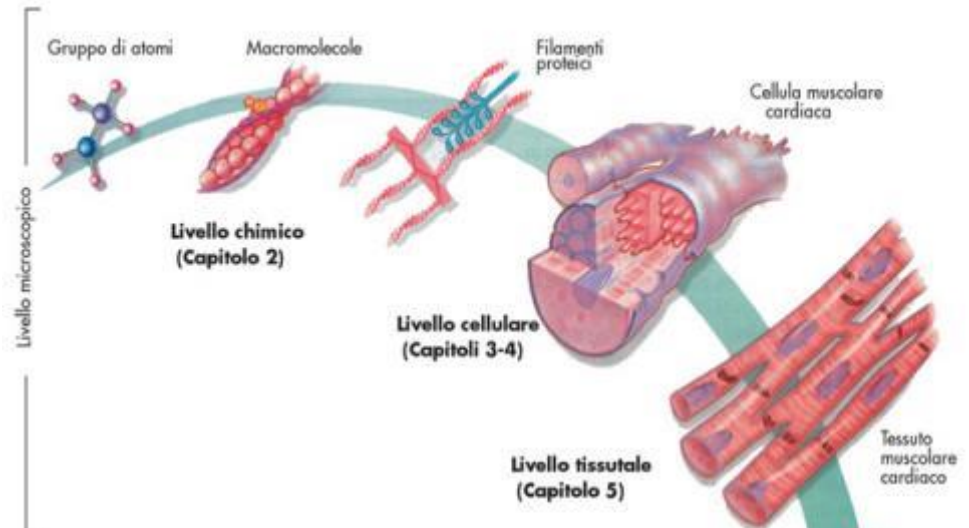
Weissleder 2010

Per l'osservazione di macromolecole a livello cellulare o subcellulare si utilizza la microscopia:

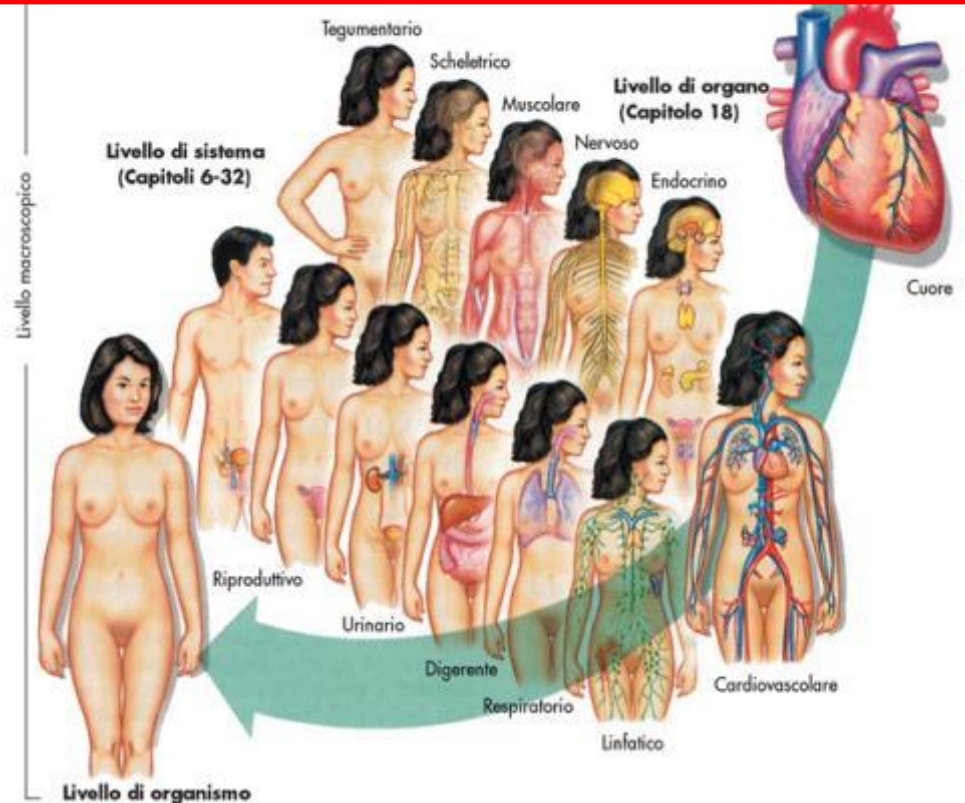
Principali tipologie di microscopi:

- **Microscopio ottico**
- **Microscopio confocale**
- **Microscopio elettronico**

LIVELLO MICROSCOPICO



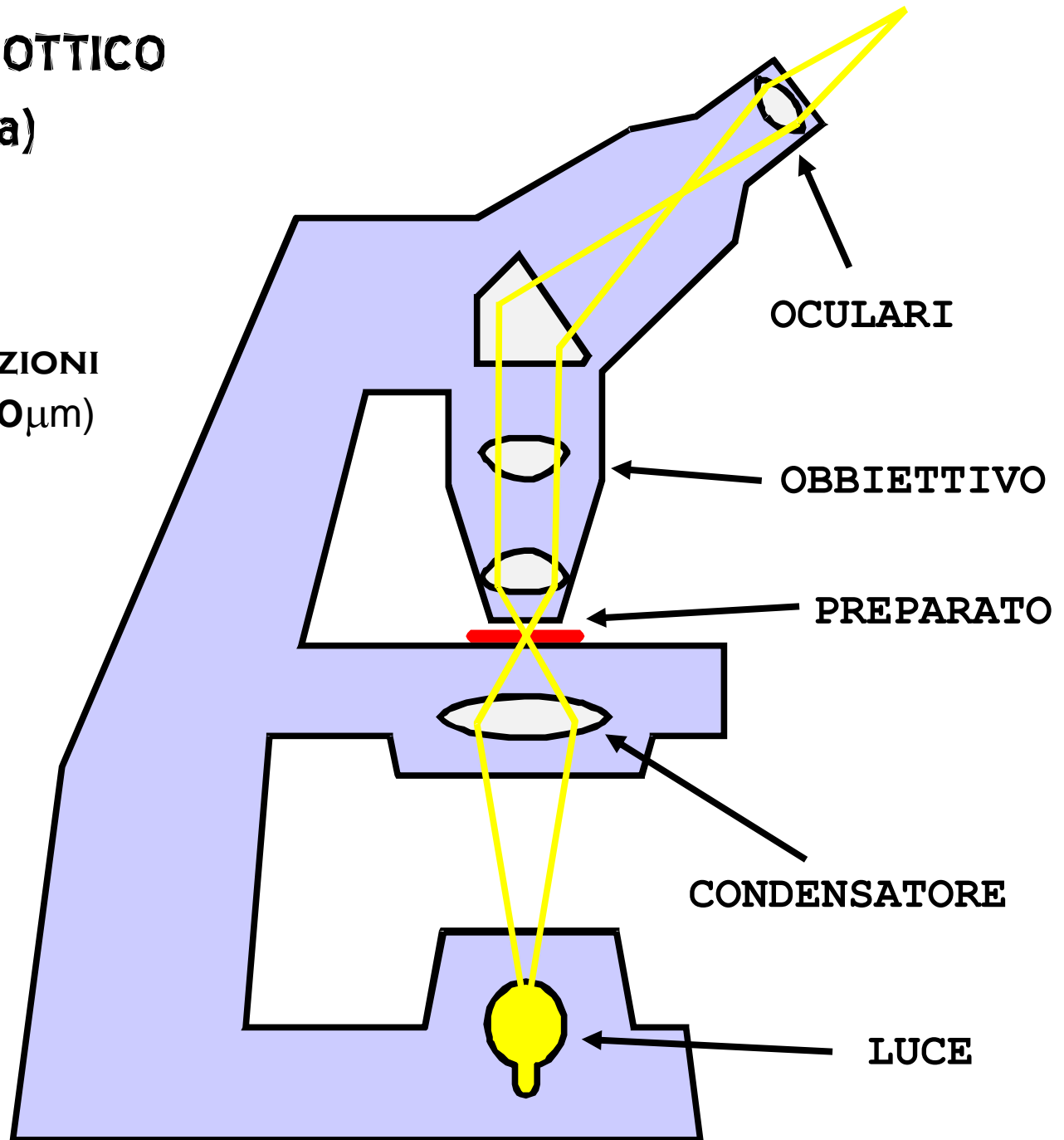
LIVELLO MACROSCOPICO



MICROSCOPIO OTTICO (luce trasmessa)

VENGONO
ANALIZZATE SEZIONI
"SOTTILI" (1-300 μ m)

LINK:MICROSCOPE
LIGHT PATH



Due importanti parametri

di una lente sono:

la distanza focale

(che dipende dalla curvatura)

Il diametro

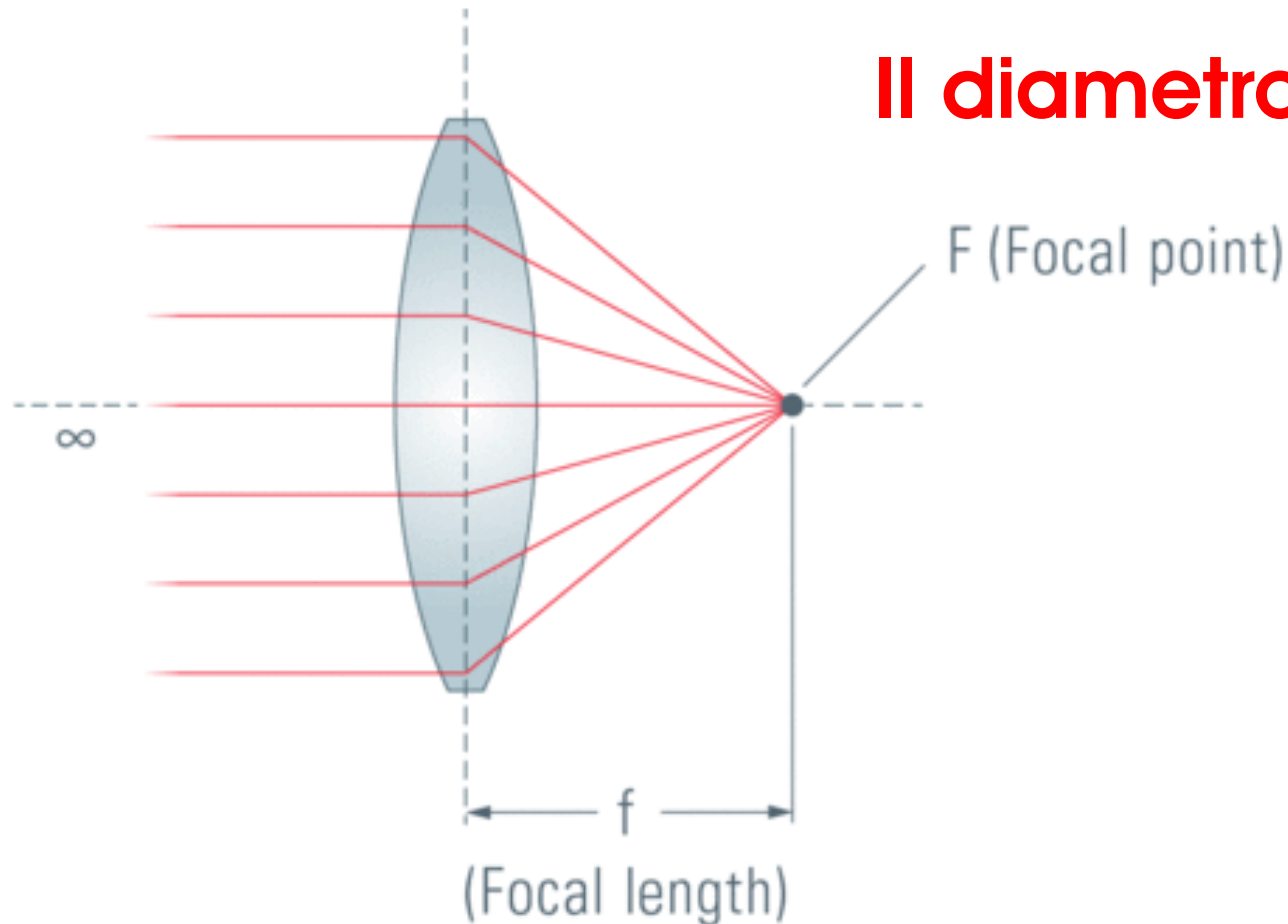


Fig. 1-2: Converging lens (left), concave mirror (right)

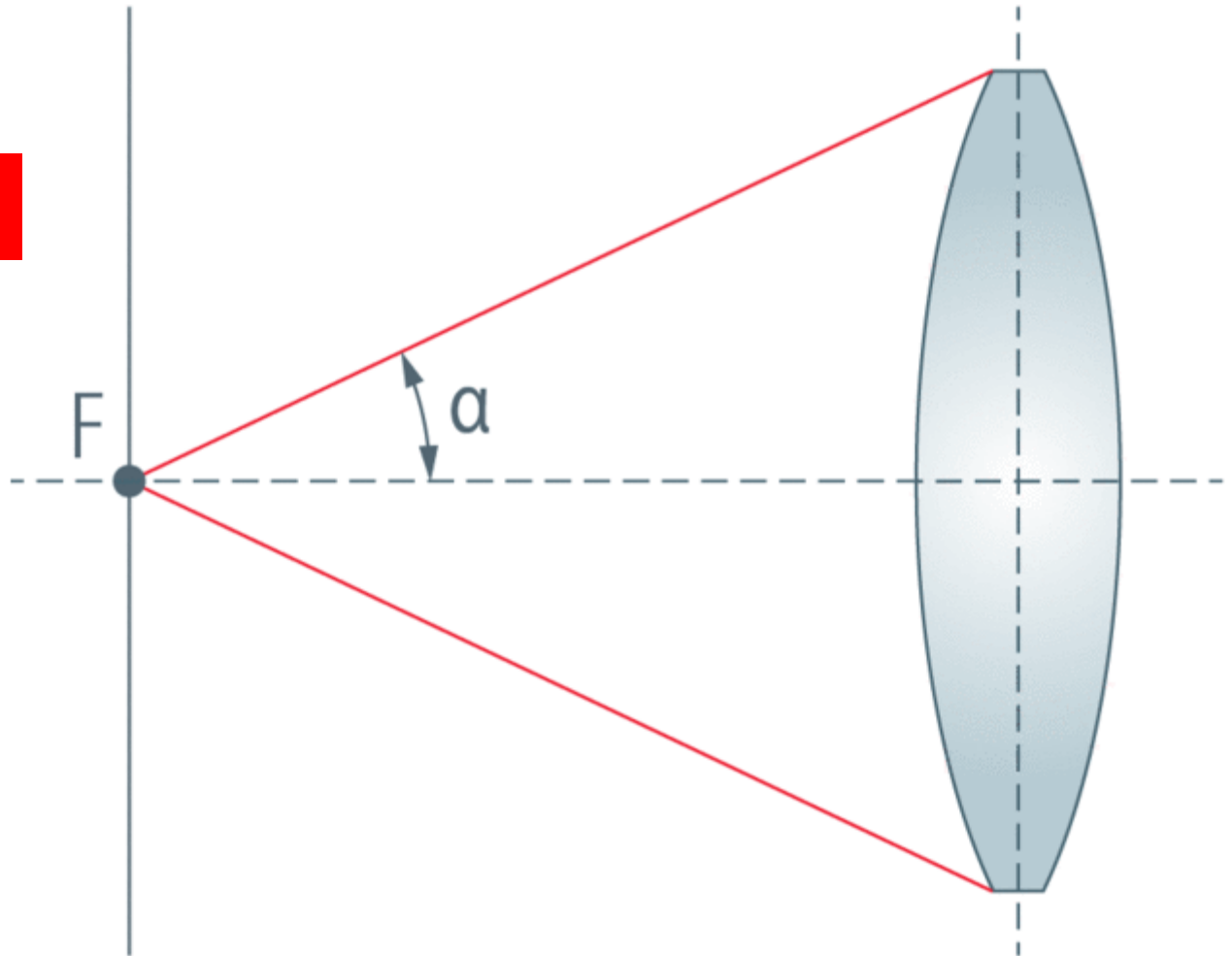
APERTURA NUMERICA

In microscopia, mette in relazione il **diametro** della lente, la **lunghezza focale** e l'**indice di rifrazione del mezzo** che separa la lente dal punto focale.

$$NA = n \sin \alpha$$

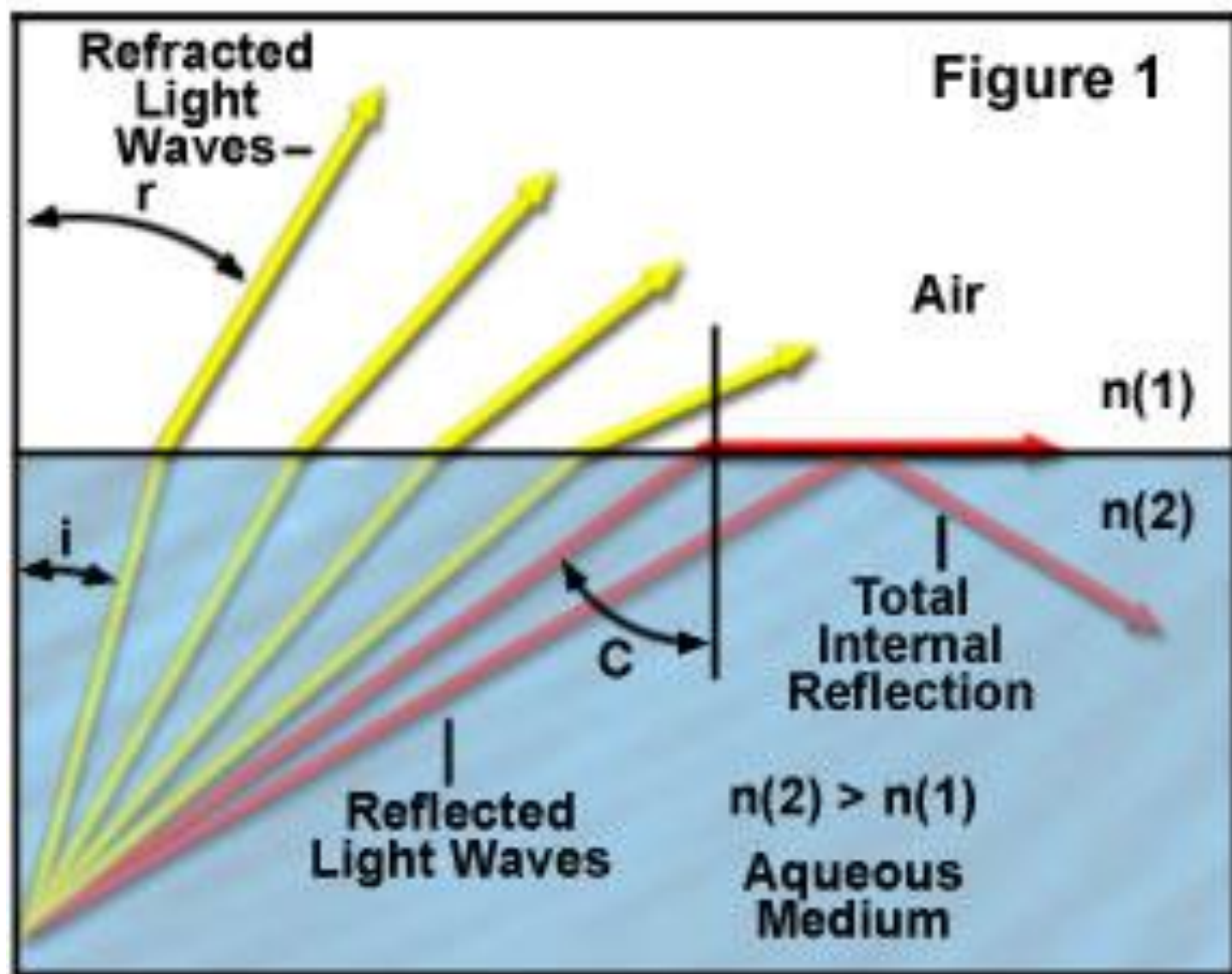
n = indice di rifrazione del mezzo

α = metà dell'angolo massimo del cono di luce che può entrare nella lente

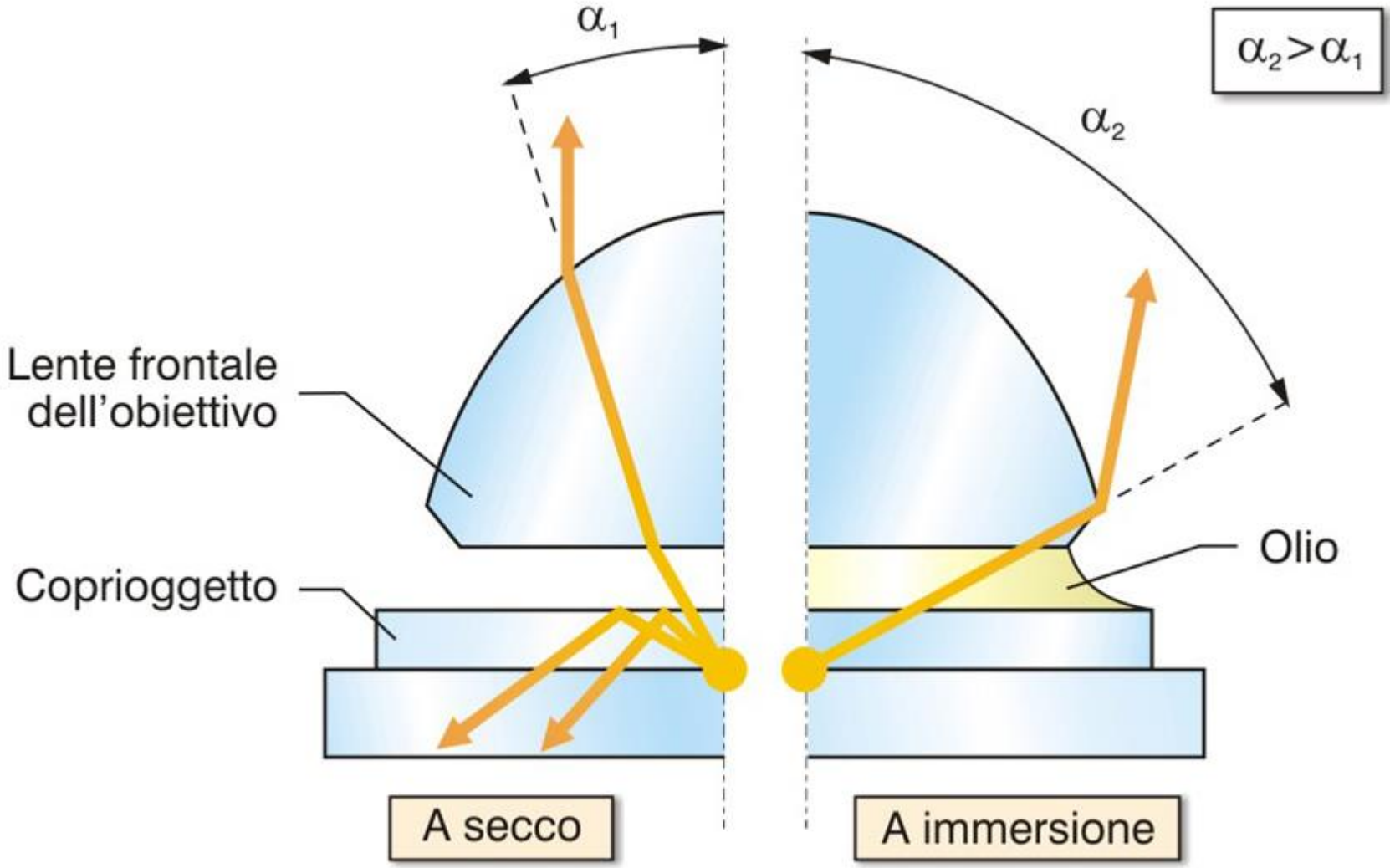


LINK: NUMERICAL APERTURE LIGHT CONES

Reflection at the Critical Angle



PER AUMENTARE L'INDICE DI RIFRAZIONE DEL MEZZO SI PUO' UTILIZZARE DELL'OLIO



© 2001 edi.ermes milano

LINK: IMMERSION OIL AND REFRACTIVE INDEX

Rapporto tra distanza dell'oggetto ed ingrandimento

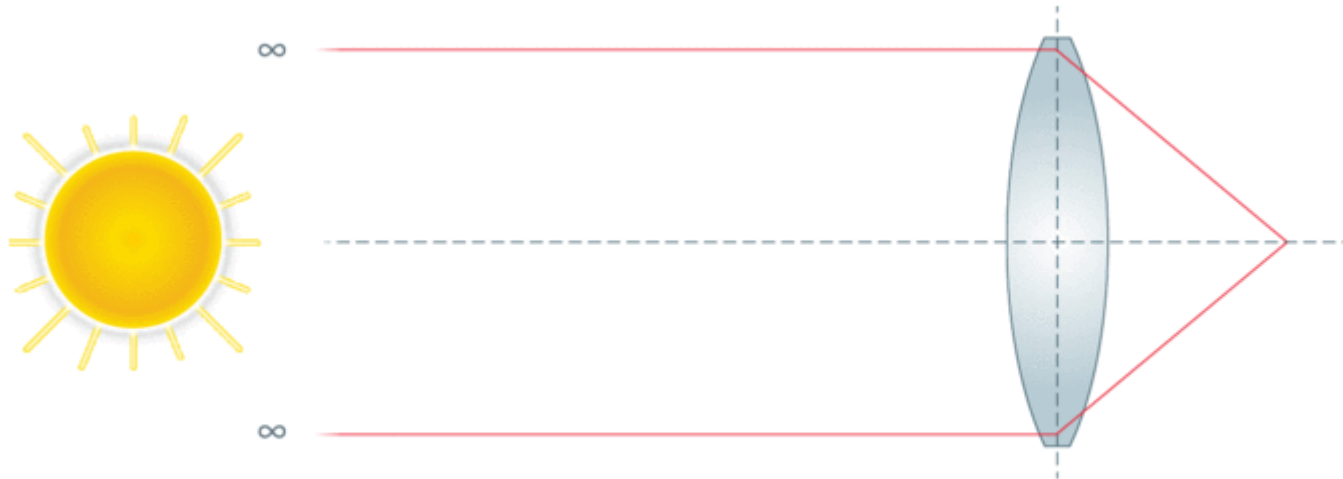


Fig. 5: Object at infinite distance

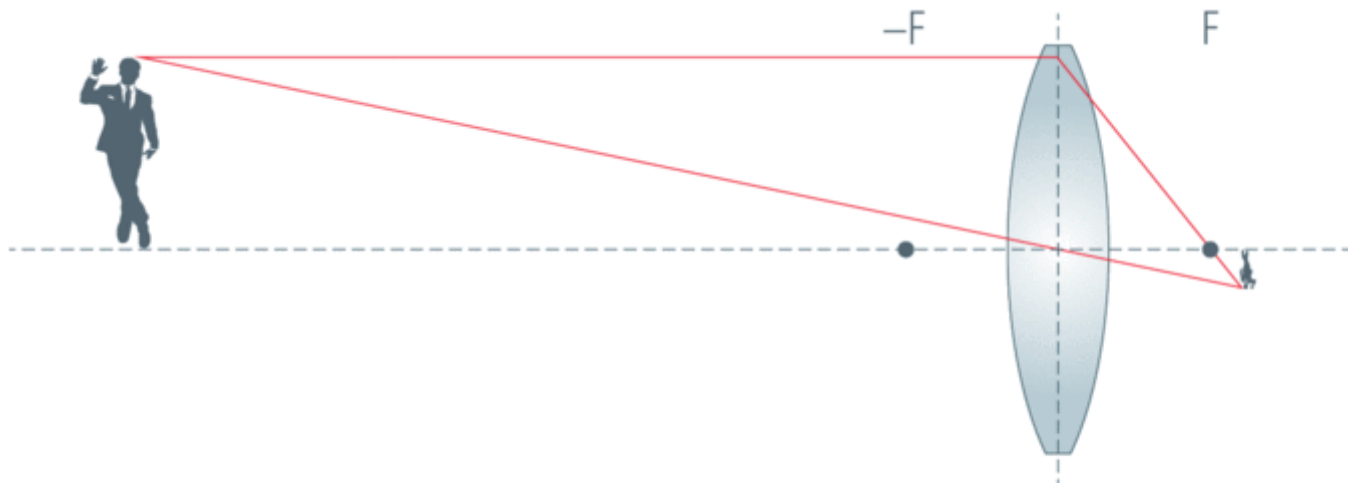


Fig. 6: Object at large distance

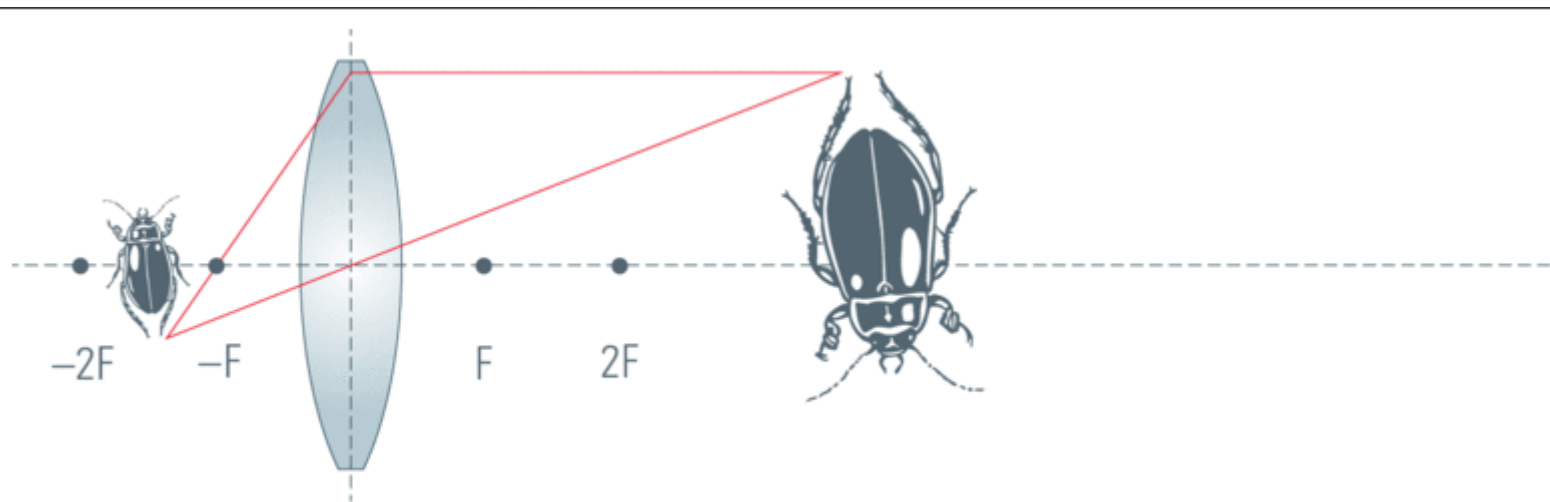


Fig. 8: Object between single and double focal plane

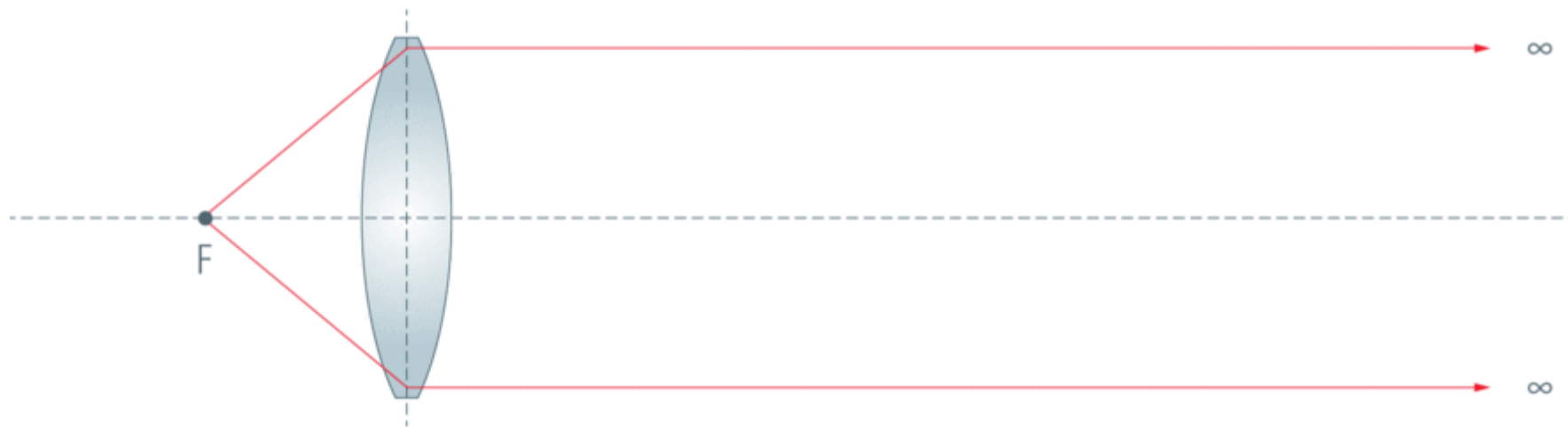


Fig. 9: Object in the focal plane

Magnified virtual image

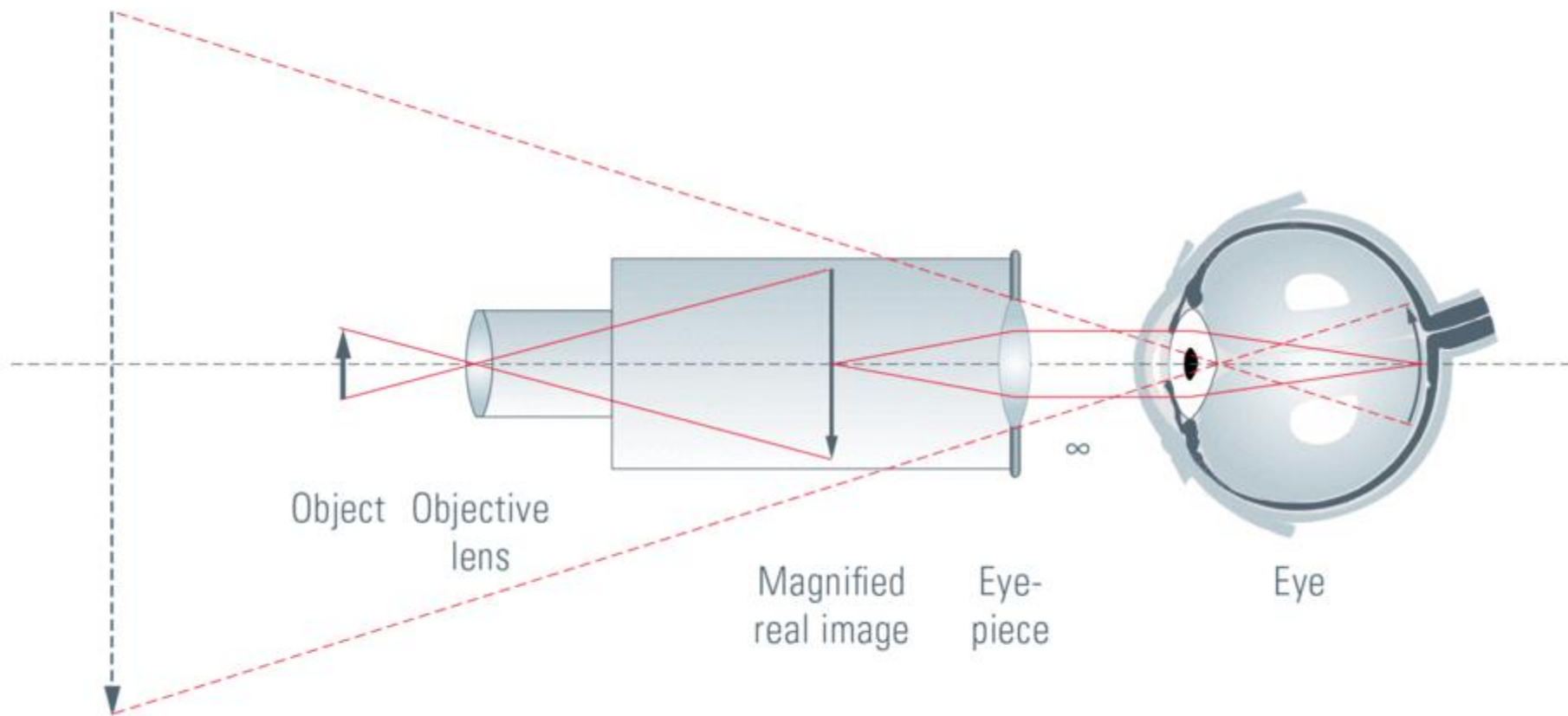


Fig. 10: Compound microscope, schematic



IL POTERE DI RISOLUZIONE

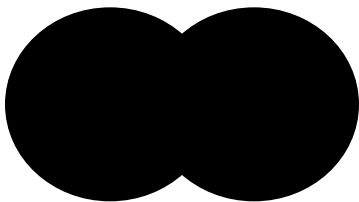
In un sistema ottico rappresenta la distanza minima a (d) cui due punti appaiono come distinti



Ben risolti



Poco risolti



**INGRANDITI MA SEMPRE..
POCO RISOLTI**

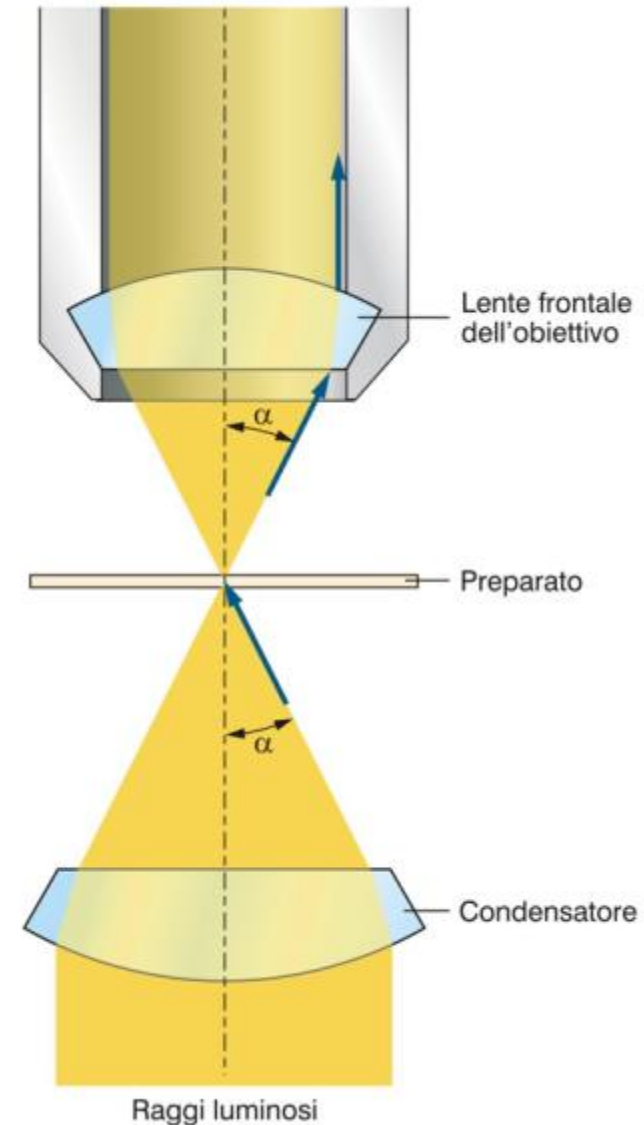
IL POTERE DI RISOLUZIONE NON DIPENDE DALL'INGRANDIMENTO

IL POTERE DI RISOLUZIONE

Da cosa dipende?

$$d = \frac{\lambda}{AN_{\text{cond.}} + AN_{\text{obb}}}$$

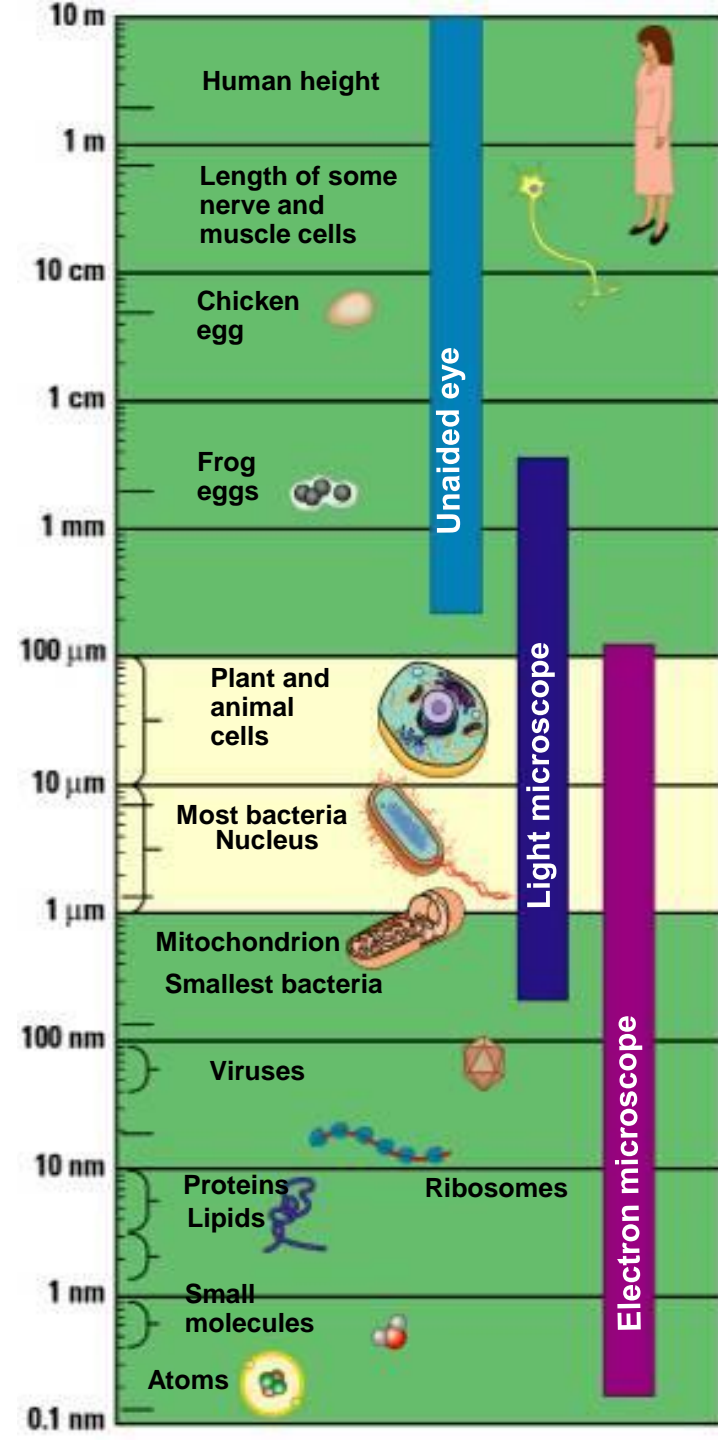
Il potere di risoluzione dipende:
dalla dalla apertura numerica degli
obiettivi ($A_N =$ circa 0.95 per obiettivi
convenzionali; 1,5 per gli obiettivi ad immersione ad olio).
lunghezza d'onda λ della
radiazione utilizzata (circa 550nm per la luce
ordinaria)

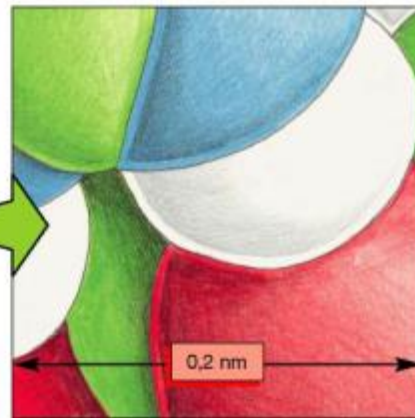
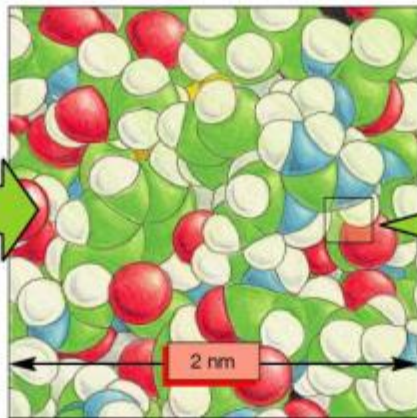
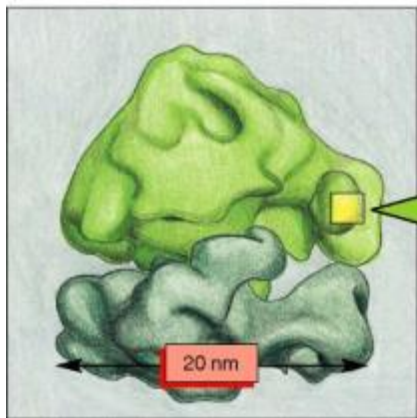
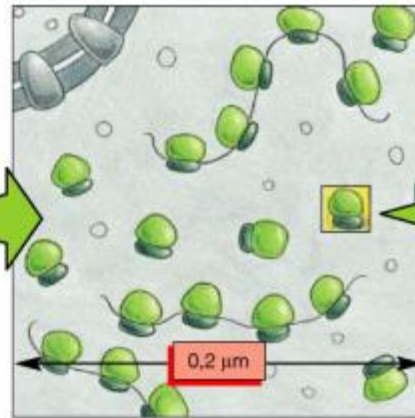
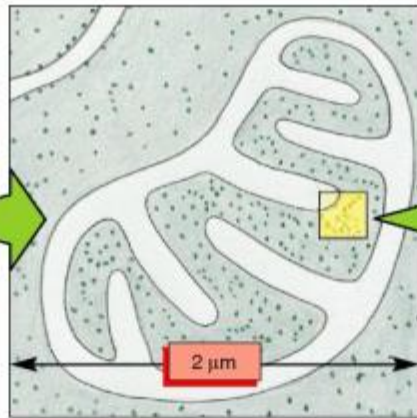
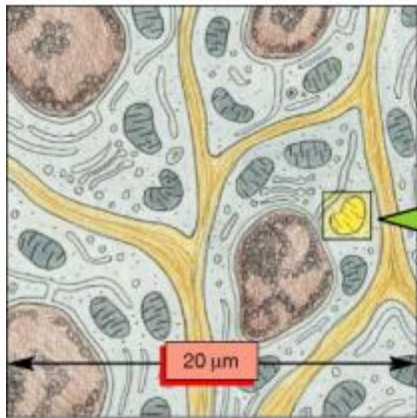
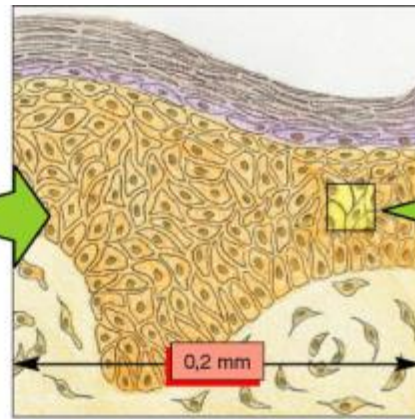
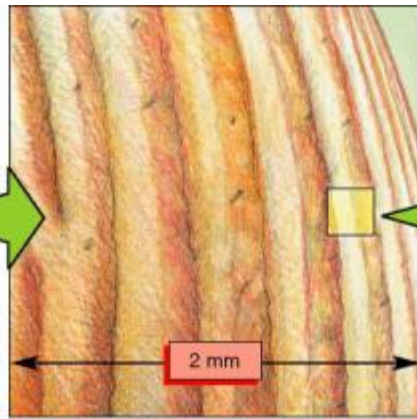
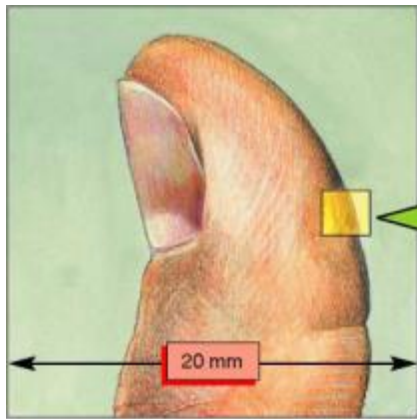


POTERE DI RISOLUZIONE DI:

- Occhio umano ~ 0,1 mm
- Microscopio ottico ~ 0,2 μm
- Microscopio elettronico (EM) ~ 0,0004 μm

**CON IL EM SI POSSONO
OSSERVARE TUTTE LE PARTI
DELLA CELLULA.**



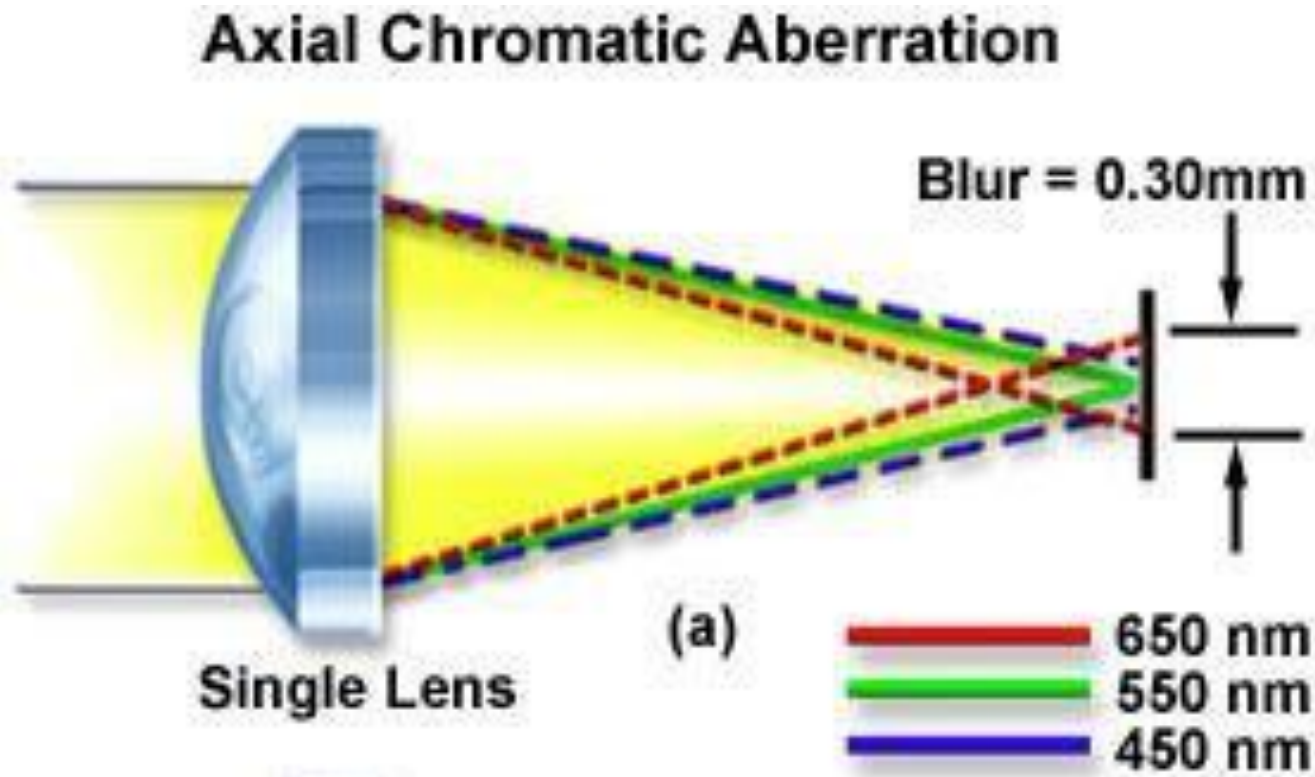


ABERRAZIONE CROMATICA



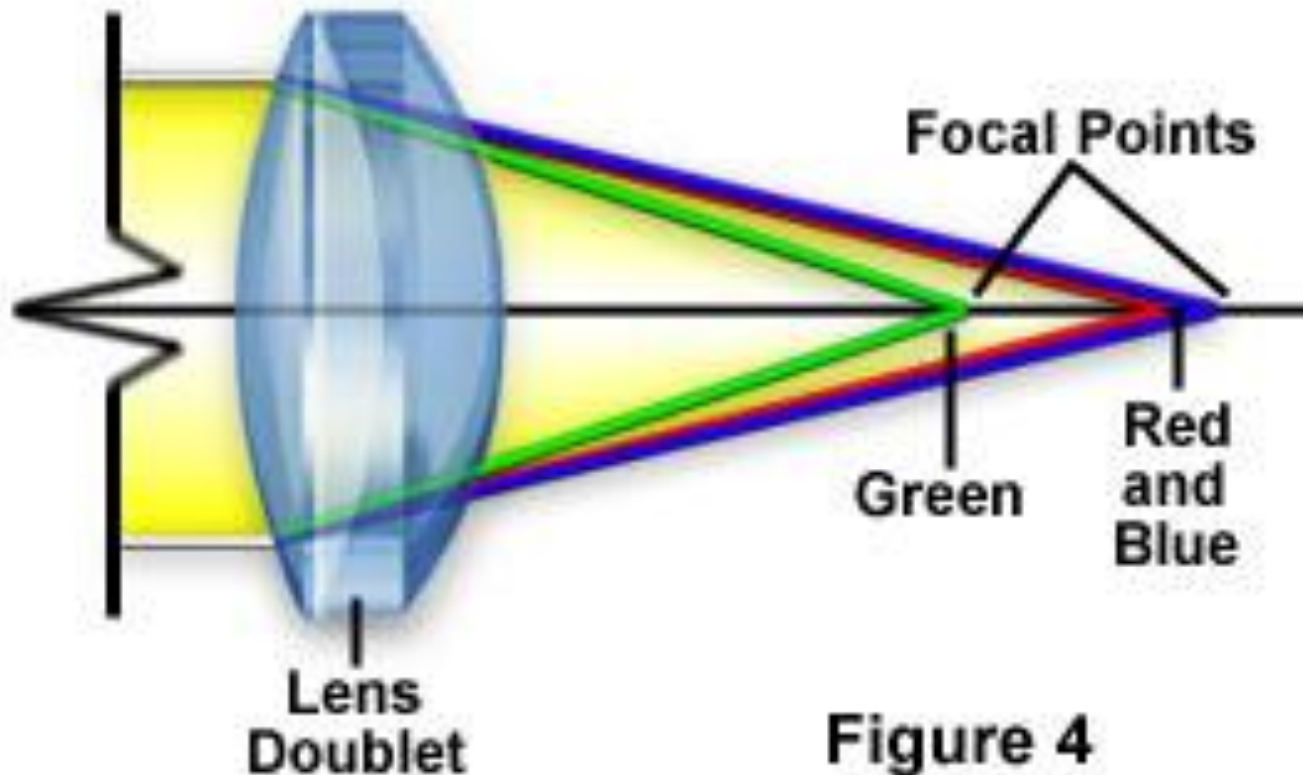
ABERRAZIONE CROMATICA

In una lente, le diverse lunghezze d'onda vengono leggermente scomposte e non vanno a fuoco nello stesso punto



Utilizzando due lenti con indici di rifrazione diverse
già alla fine dell'ottocento si riuscì a
far **coincidere il rosso ed il blu**
(questi obbiettivi sono ancora largamente utilizzati)

Achromat Doublet



Negli obiettivi **APOCHROMAT** utilizzando delle triplette di lenti, si riesce a far coincidere il fuoco di tutte le lunghezze d'onda della luce visibile

Achromatic and Apochromatic Objective Correction

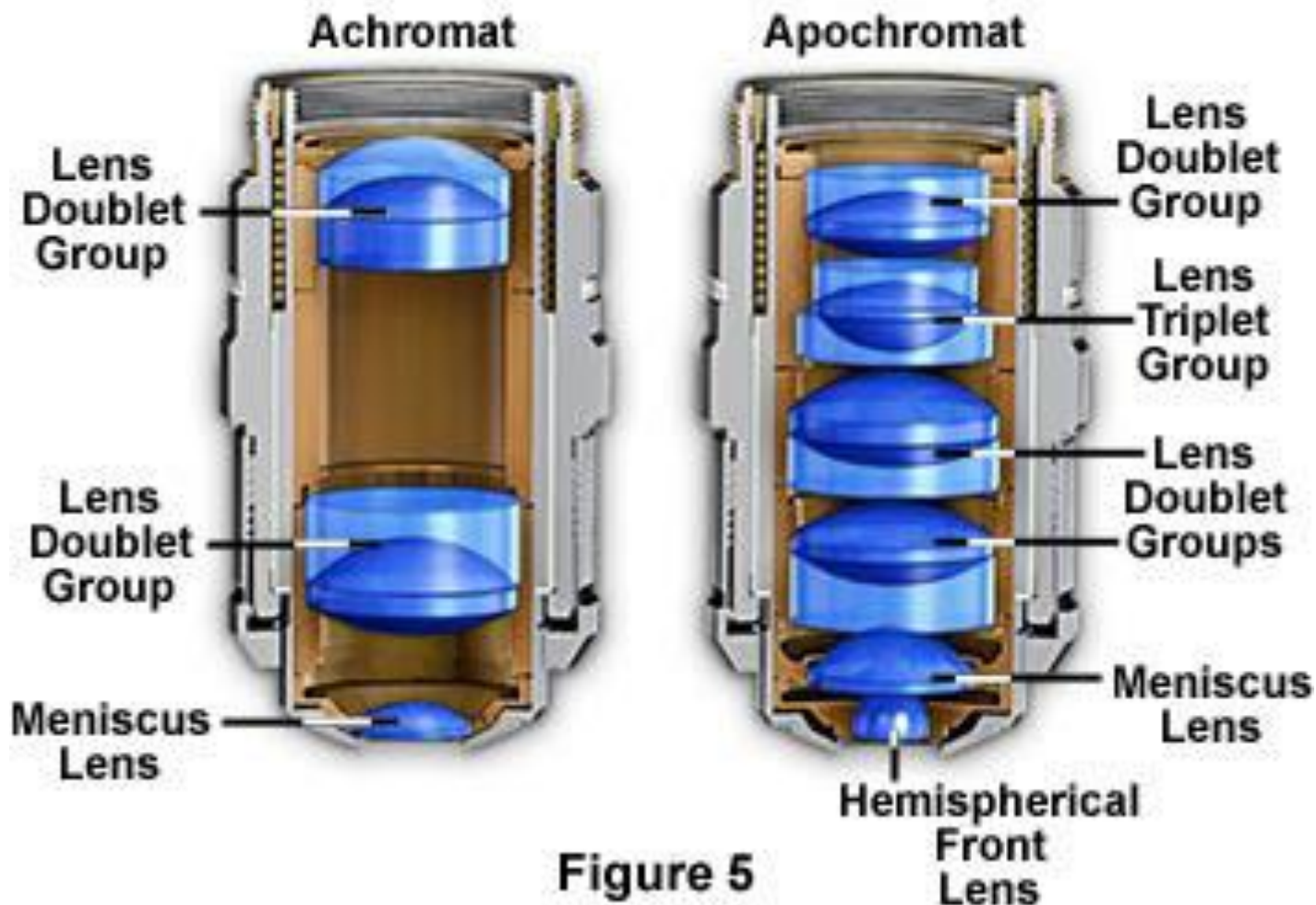


Figure 5

60x Plan Apochromat Objective

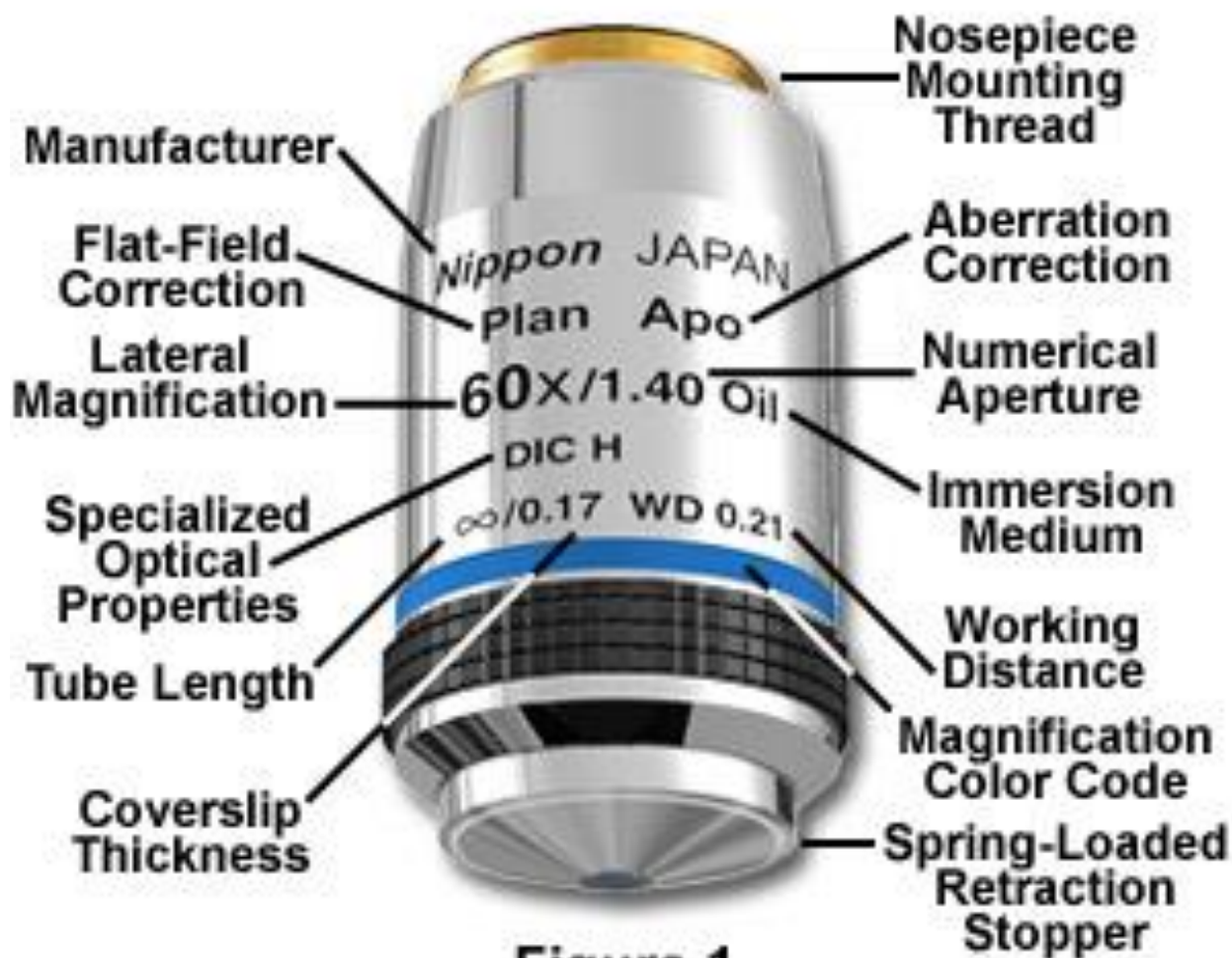


Figure 1

Objective Numerical Apertures

Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (oil)	n/a	n/a	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90

IL MICROSCOPIO ELETTRONICO (EM)

USA UN FASCIO DI ELETTRONI

Poiché la lunghezza d'onda di questi elettroni è inferiore a quella della luce visibile, il EM ha un potere di risoluzione superiore al microscopio ottico.

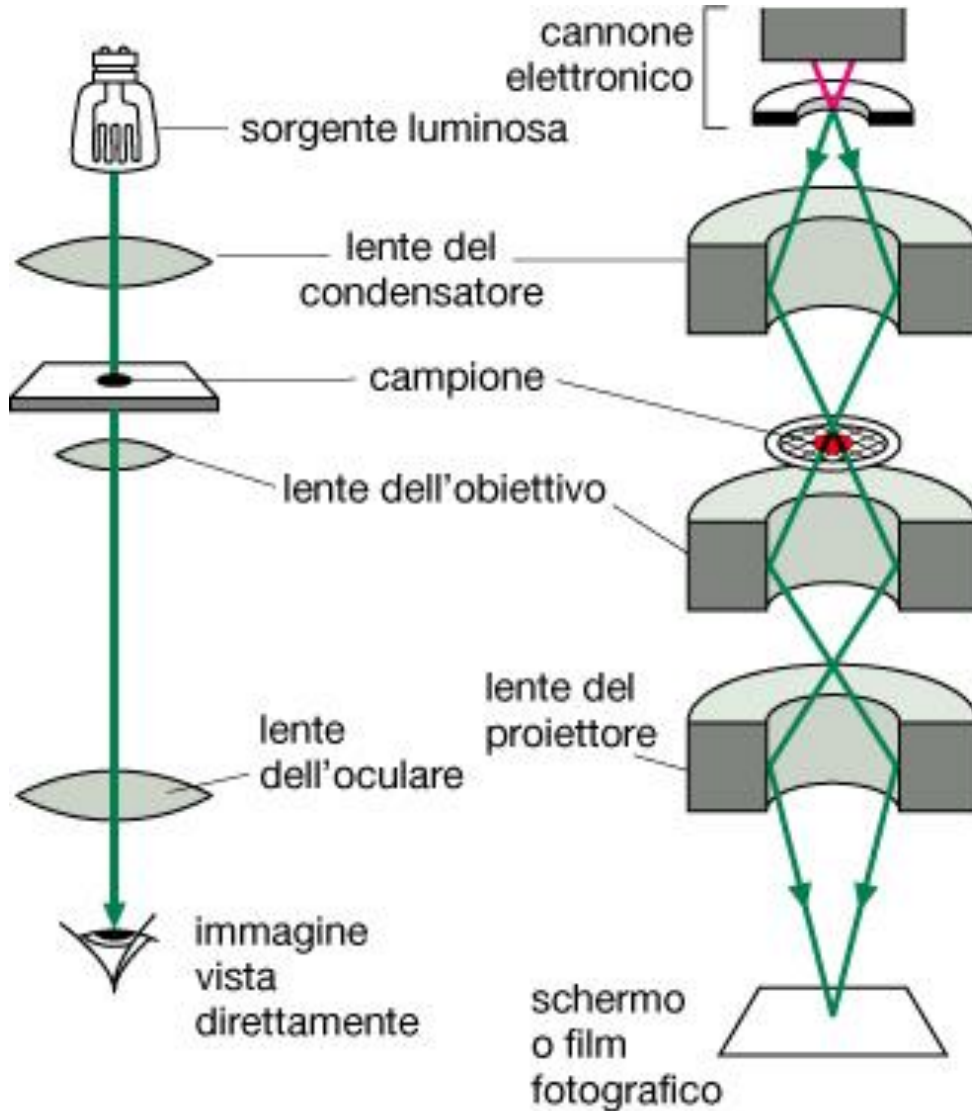


Ne esistono due tipologie principali:

- MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM)

-MICROSCOPIO ELETTRONICO A TRASMISSIONE (TEM)

Il TEM è utile per esplorare la struttura interna della cellula. Vengono analizzate sezioni sottilissime (10-100nm)



LINFOCITI

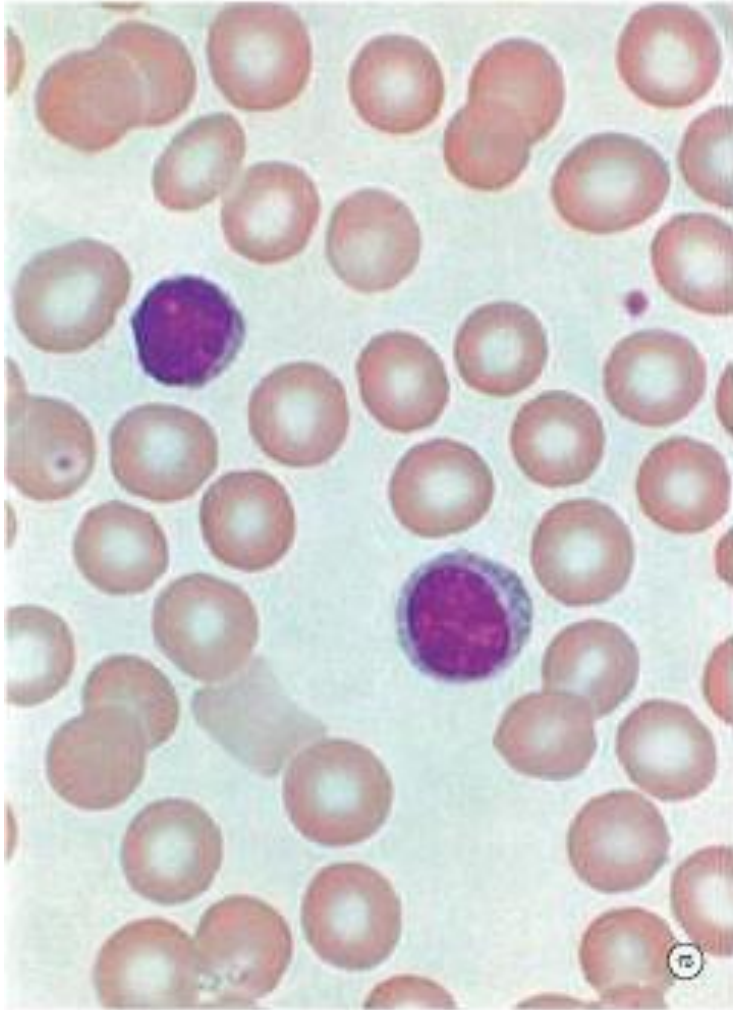


Immagine al microscopio ottico

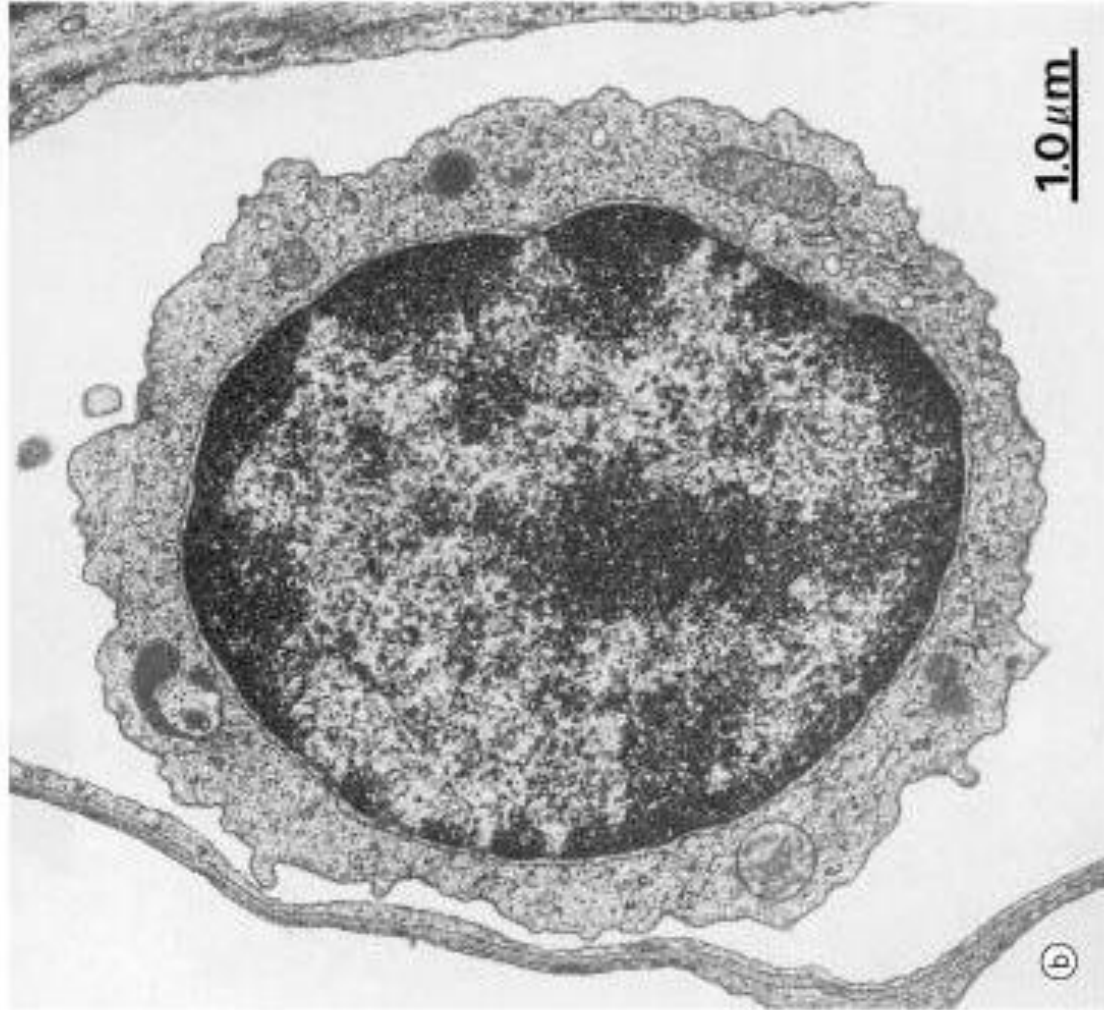


Immagine al TEM

Il SEM è utile per studiare nel dettaglio delle superfici

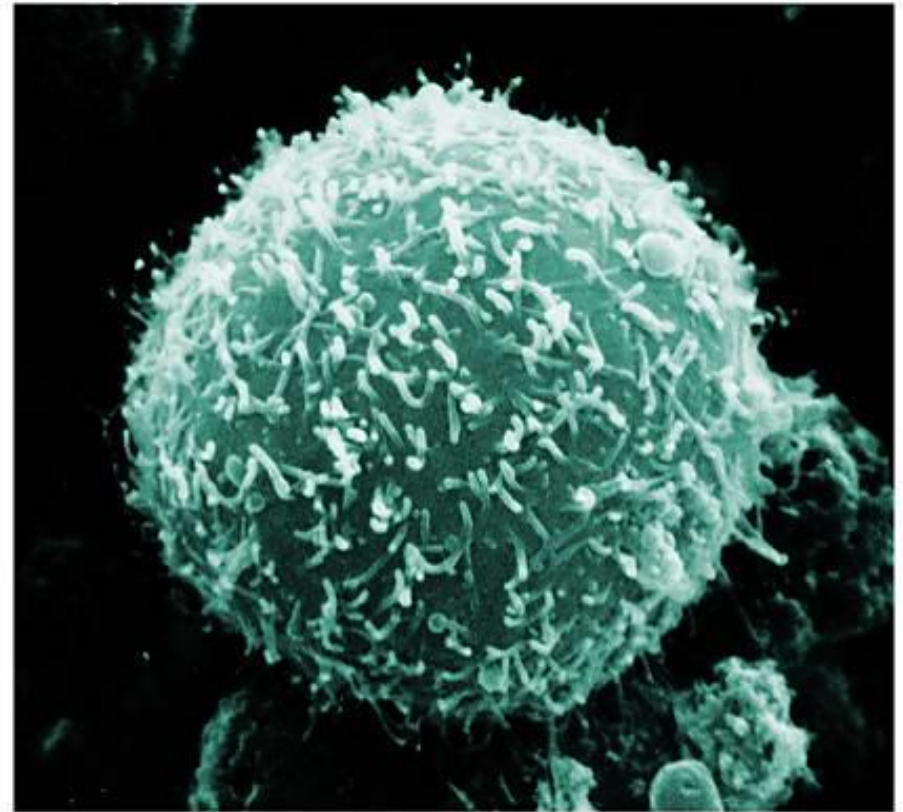
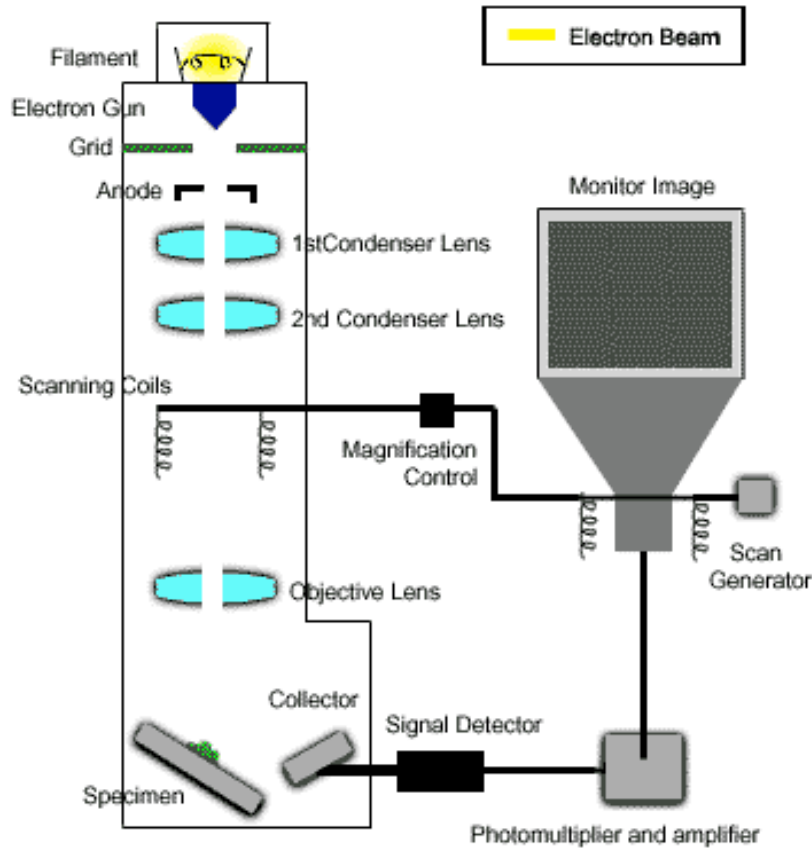
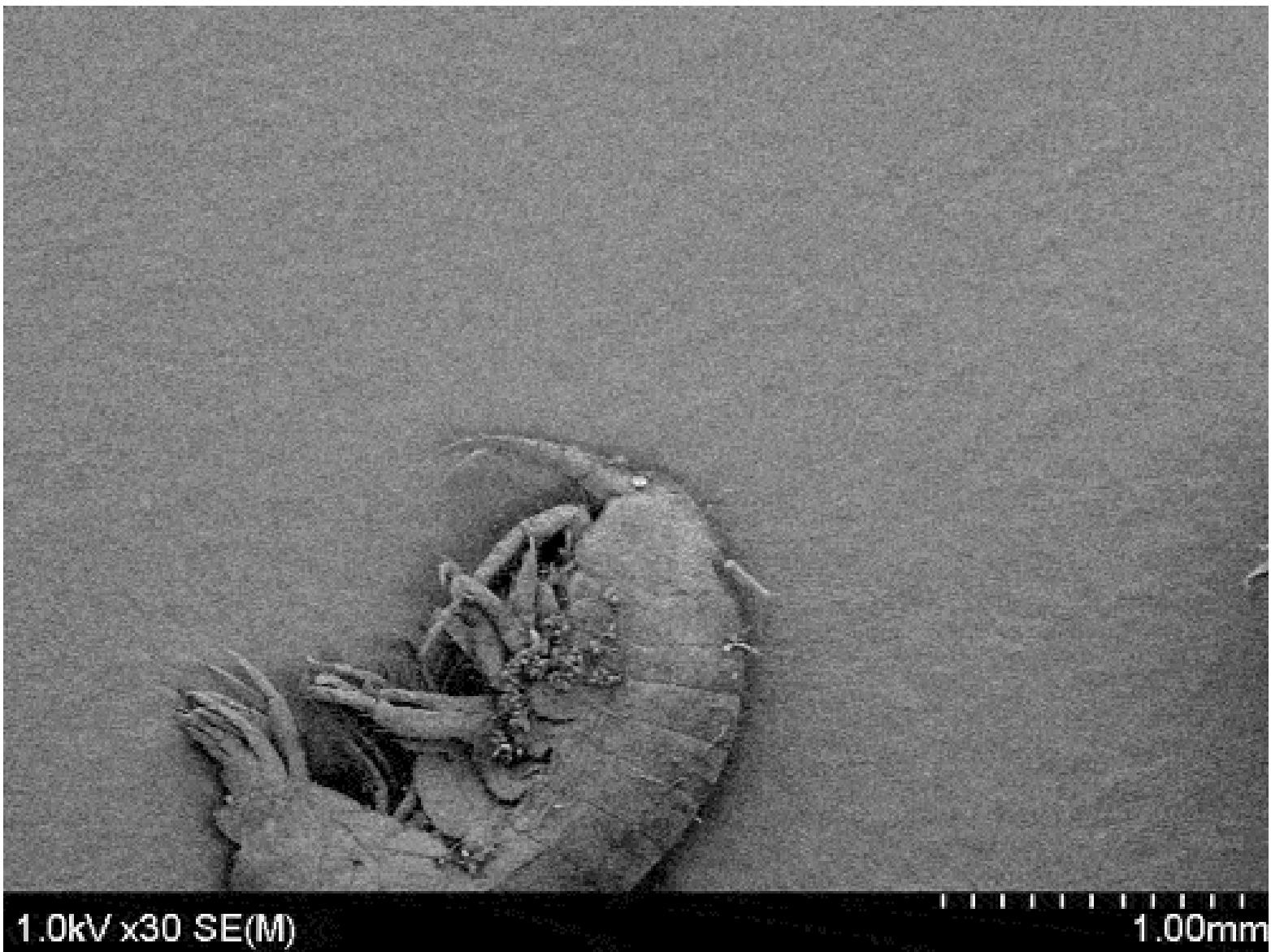
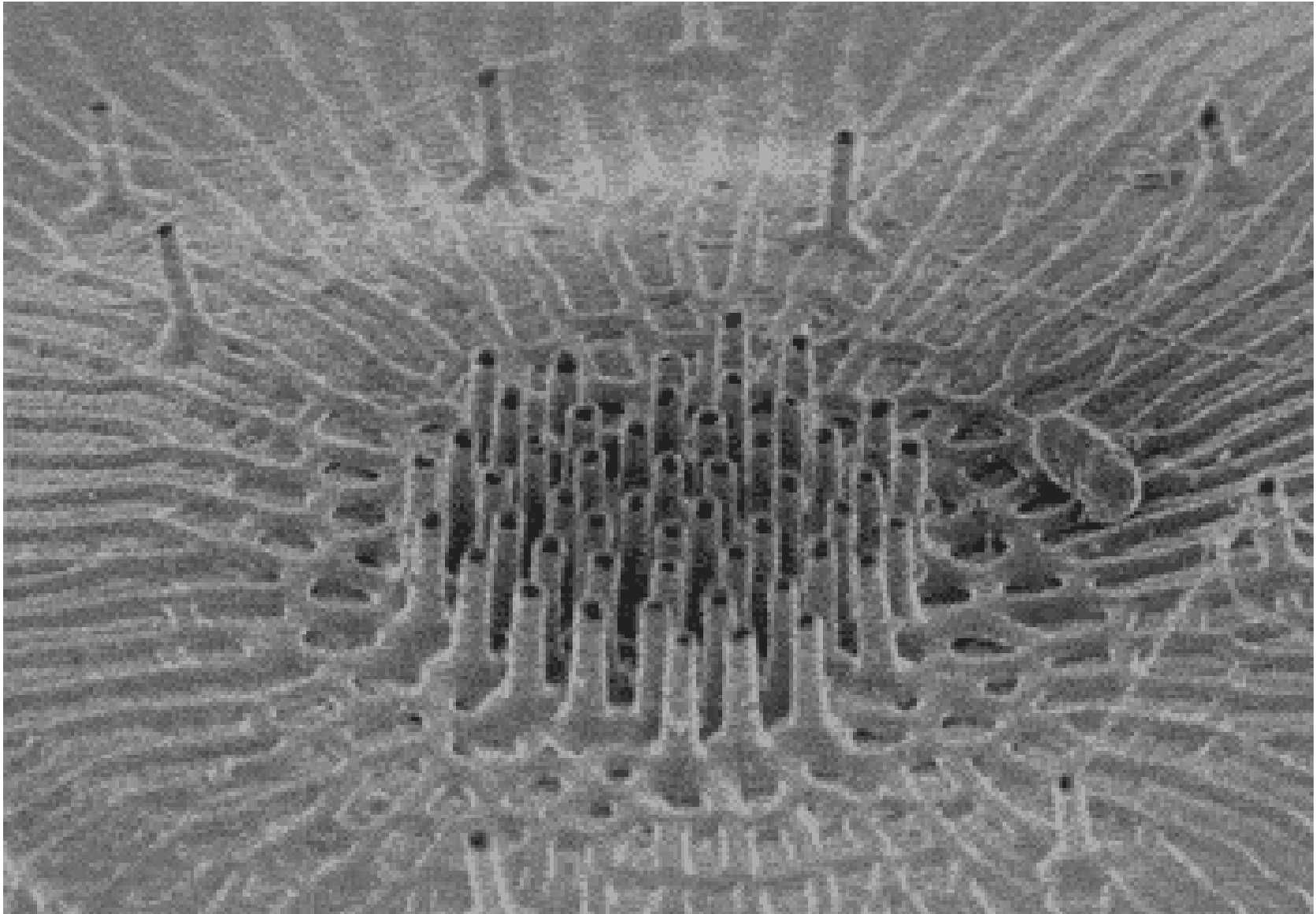
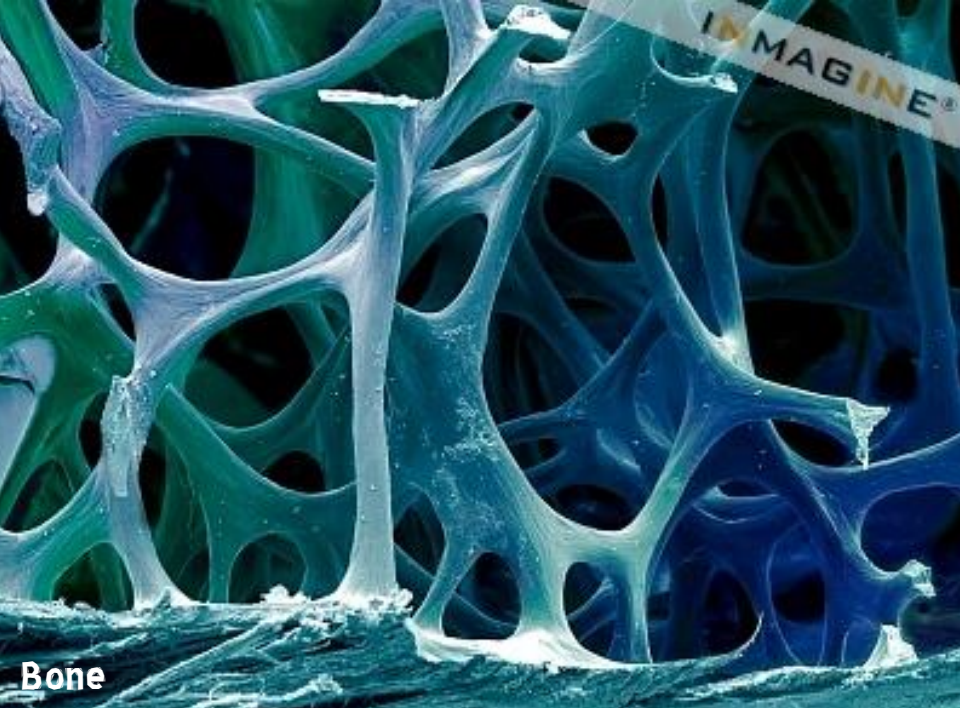


Immagine SEM di un globulo bianco

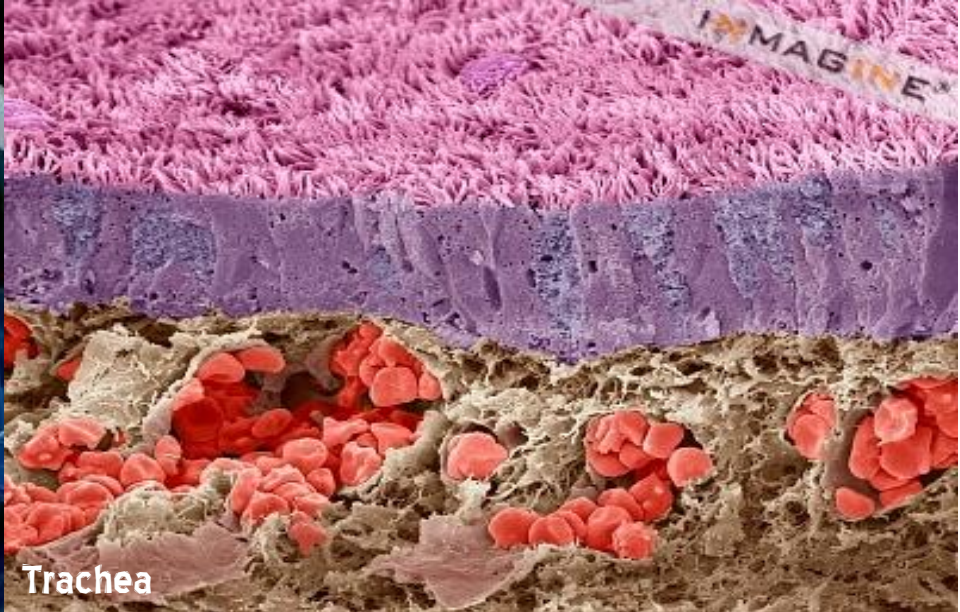


[HTTP://SCINERDS.TUMBLR.COM/POST/45925983716/MICRO-UNIVERSE-SCANNING-ELECTRON-MICROSCOPE](http://scinerds.tumblr.com/post/45925983716/micro-universe-scanning-electron-microscope)

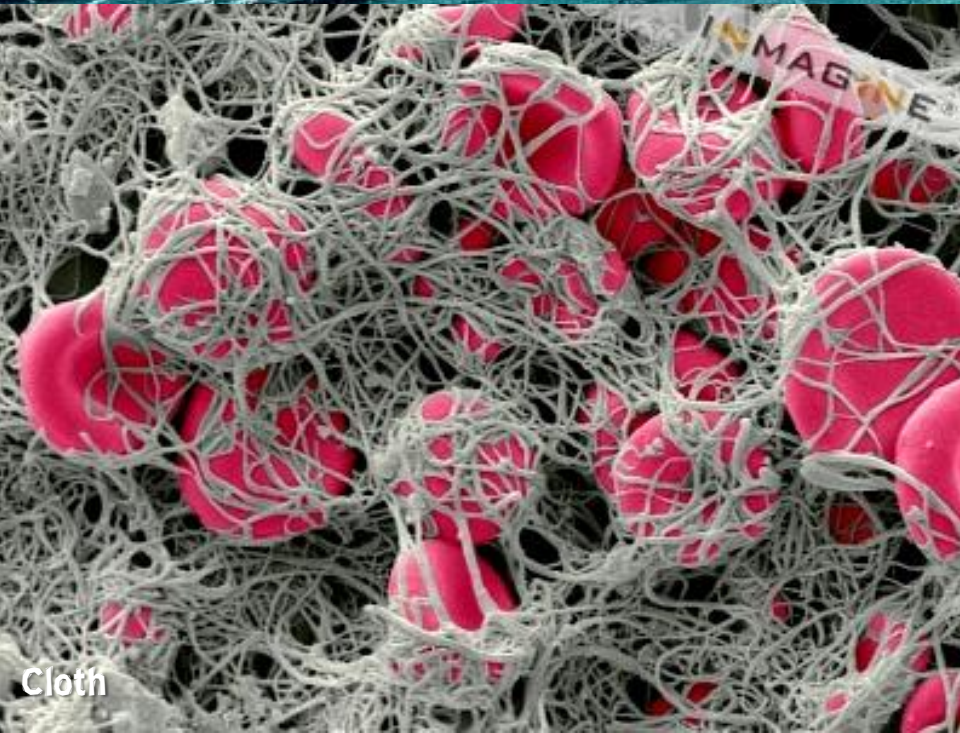




Bone



Trachea



Cloth



Sweet gland

Preparazione di un Campione Biologico per la Microscopia Ottica

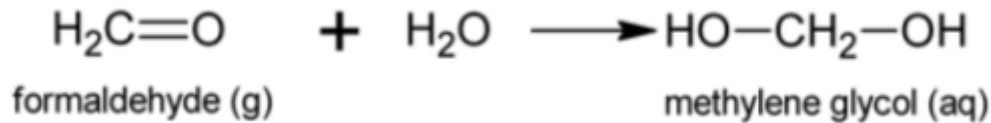
- **Acquisizione** del campione
 - Biopsia, intervento chirurgico, autopsia postmortem.

- **Fissazione** del campione (immobilizzare, "uccidere" e preservare)
 - generalmente per mezzo di aldeidi reattive (formaldeide);
 - cross-link delle macromolecole, in particolare le proteine;
 - si ottiene un effetto indurente sui tessuti "molliti";
 - deve essere fatto rapidamente per evitare la degradazione del tessuto.

Commonly used chemical fixatives for microscopy

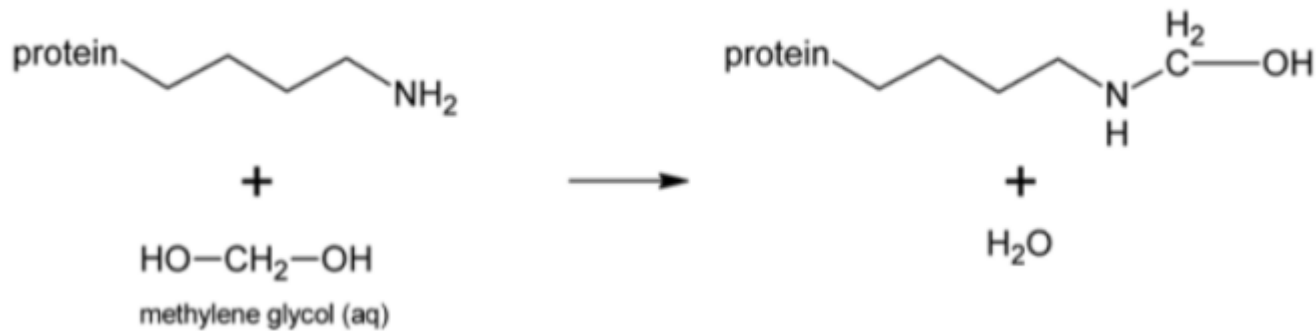
- Cross-linking (additive) fixatives: e.g., formaldehyde, glutaraldehyde, acrolein, osmium tetroxide
 - Fixative molecules form cross-linkage with their targets.
 - Formaldehyde-glutaraldehyde mixture is the most commonly used primary fixative for EM (introduced by Karnovsky in 1965 [J Cell Biol 27:137A-138A]).
- Coagulants: e.g., EtOH, MeOH
 - Coagulate and/or precipitate proteins
 - Do not fix carbohydrates and lipids
 - LM only
- Acids: e.g., acetic acid, picric acid
 - precipitate proteins
 - Do not fix carbohydrates and lipids
 - LM only

FORMALDEIDE



Si combina con l'acqua per formare glicole metilenico

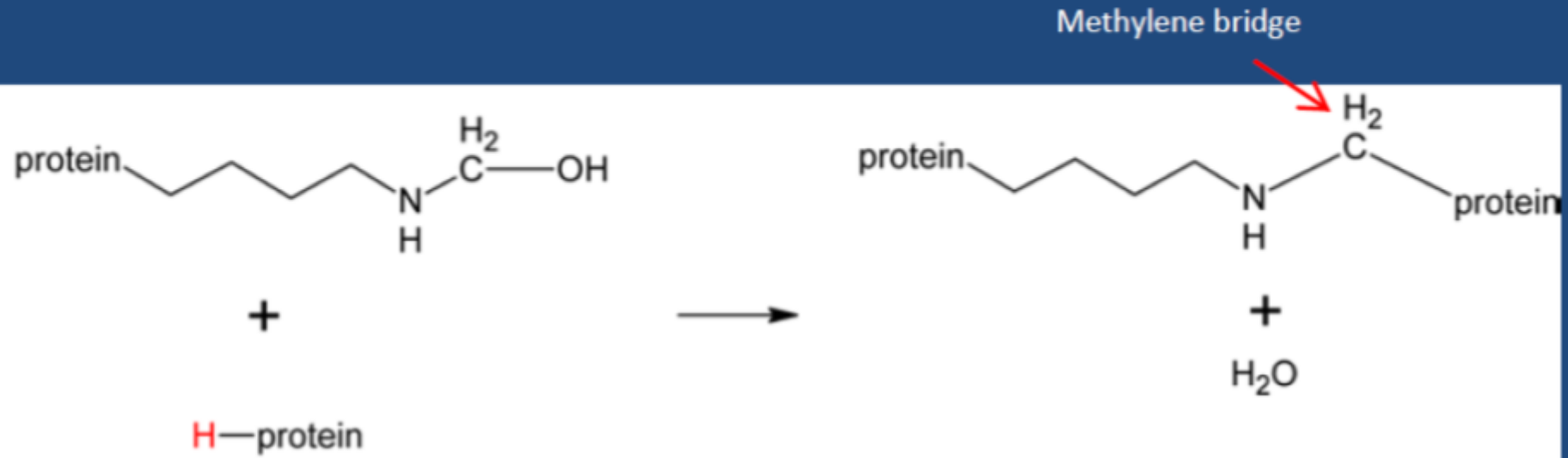
Addition of formaldehyde (methylene glycol) to a lysine side-chain (fast)



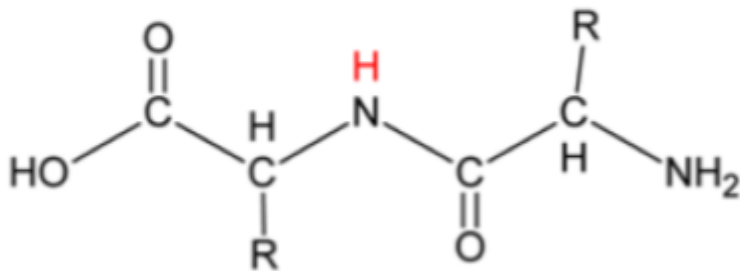
Il glicole metilenico si lega ad un gruppo aminico libero

Il gruppo aldeidico può reagire con atomi di azoto (e anche altri) formando un ponte metilénico

Formation of methylene bridge with a neighboring nitrogen atom (slow)



e.g.,



**UN PONTE DI METILENE
"CROSS-LINKA"
DUE PROTEINE**

- **Inclusione** del campione in un mezzo appropriato (paraffina o altra resina)

- La resina si indurisce e permette di sezionare il campione in sezioni abbastanza sottili



Microtomo
per pezzi in paraffina

- **Taglio** in sezioni più o meno sottili (10-60) μm
- **Montaggio** delle sezioni su vetrini per microscopia.



Sezione non colorata

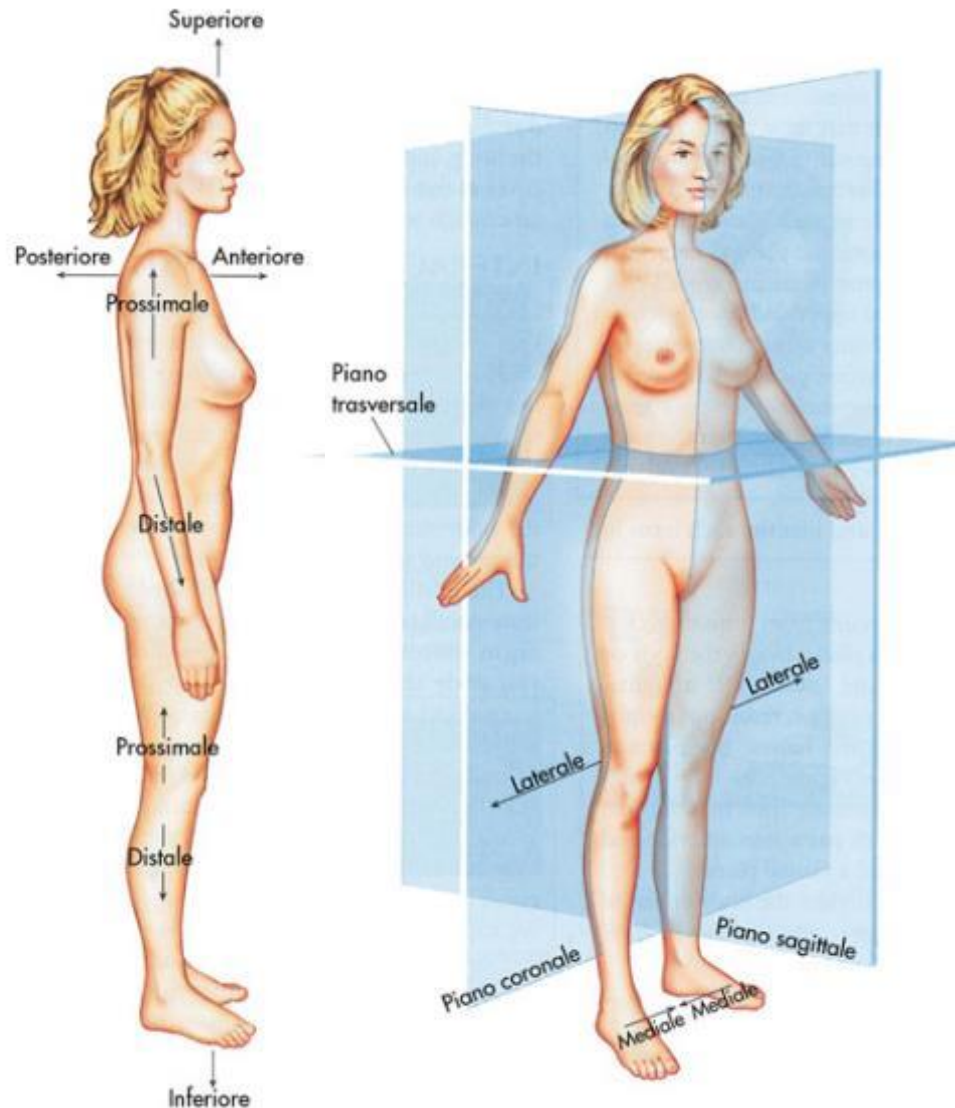
Un po' di terminologia

Riferimenti posizionali

Anteriore
Posteriore

Superiore
Inferiore

Distale
Prossimale



Piani di sezione

- Coronale
- Sagittale
- Trasverso

COLORAZIONE DEL CAMPIONE

- **Colorazioni istologiche**
- **Immunoistochimica**
- **citochimica**
- **Ibridazione in situ**
- **Proteine di fusione**
- **Geni reporter**



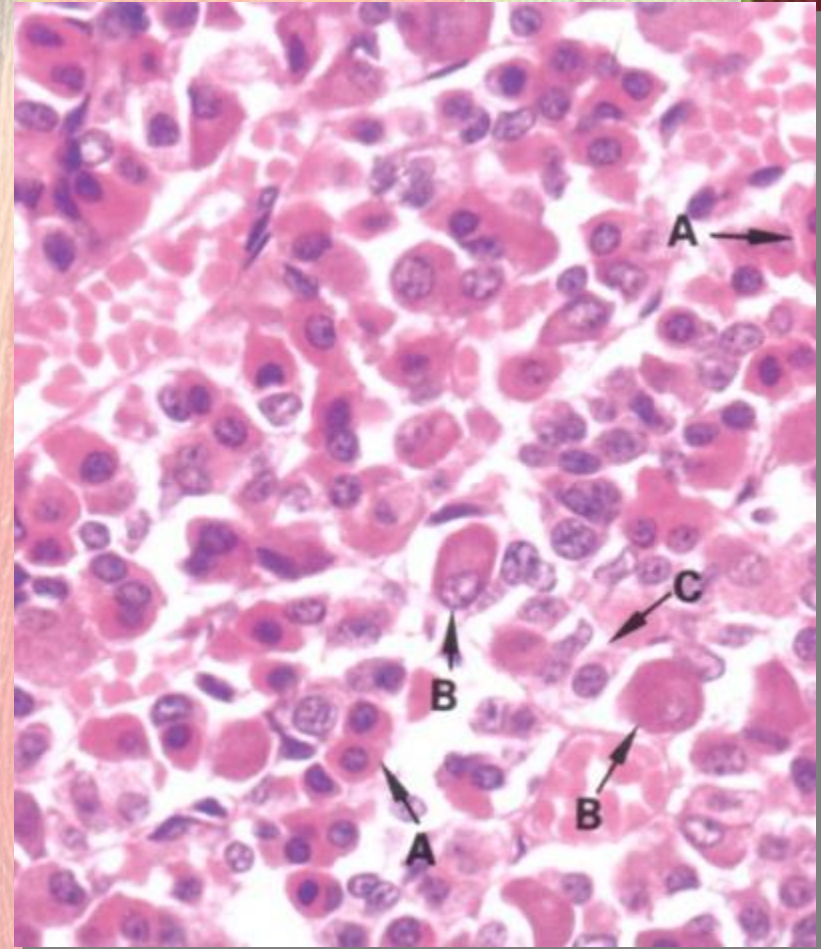
- **Colorazione** delle sezioni con il metodo più appropriato.



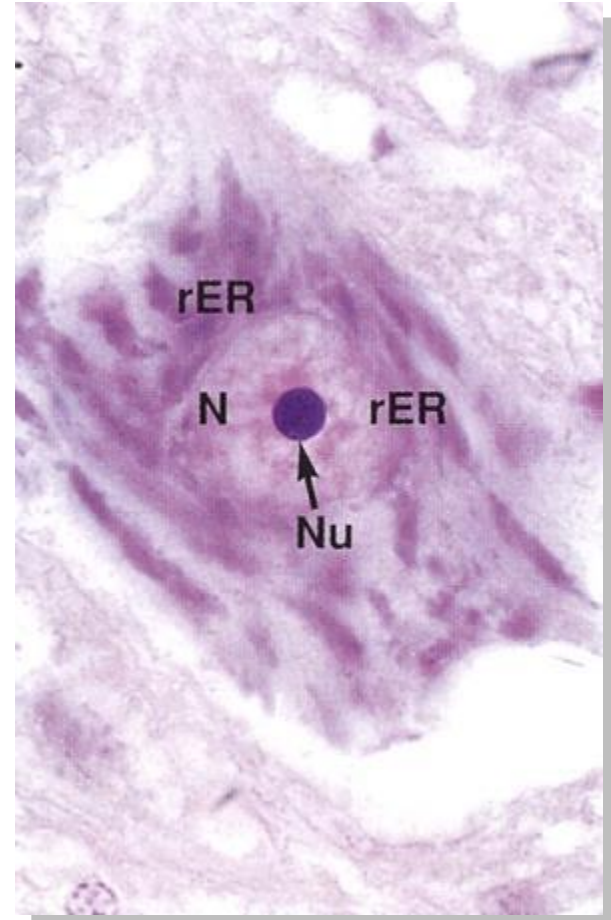
COLORAZIONI ISTOLOGICHE

Ematossilina/Eosina

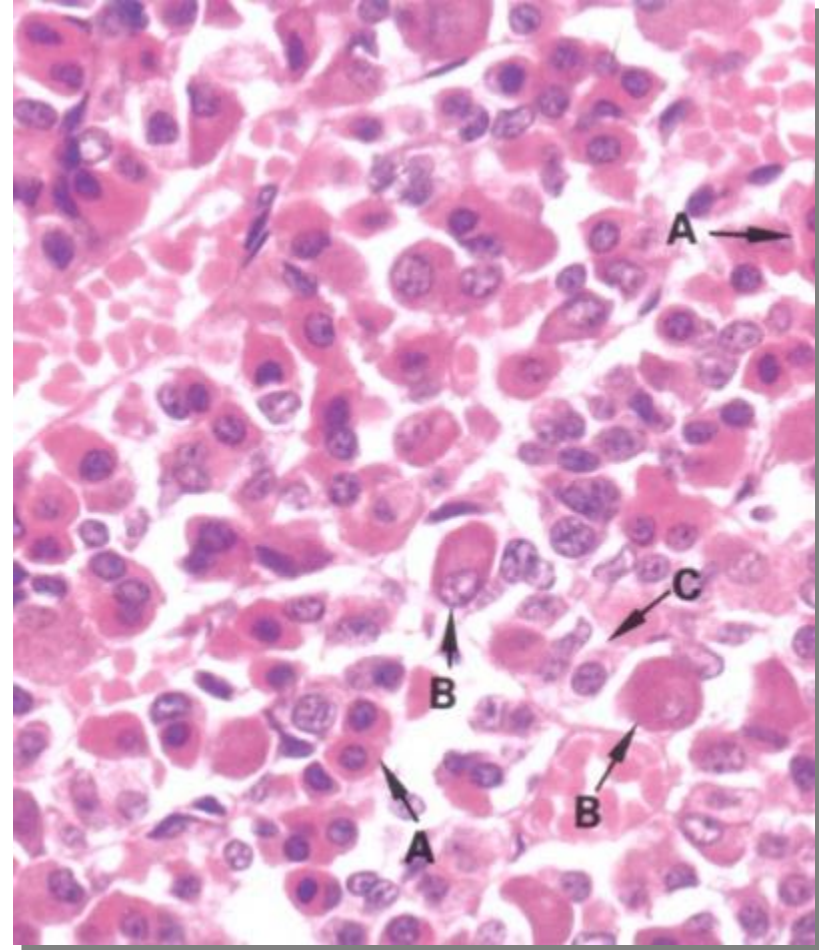
- **EMATOSSILINA**
 - Affinità per le molecole cariche negativamente
- **EOSINA**
 - Affinità per le molecole cariche positivamente



- Se una porzione di tessuto o di una cellula si colora di **blu/porpora**, è colorata dall'**ematossilina**
- viene detta *Basofila*
- **Nuclei e ribosomi** generalmente sono basofili

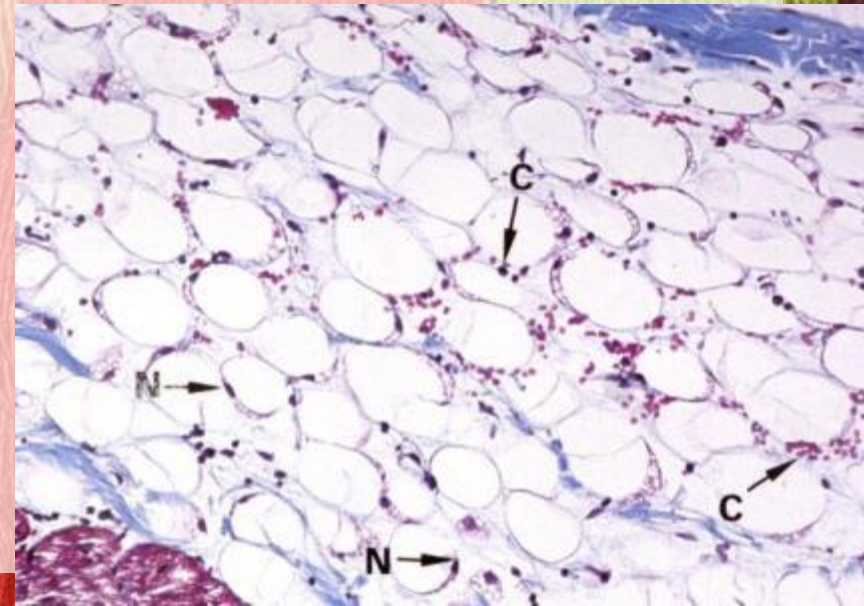
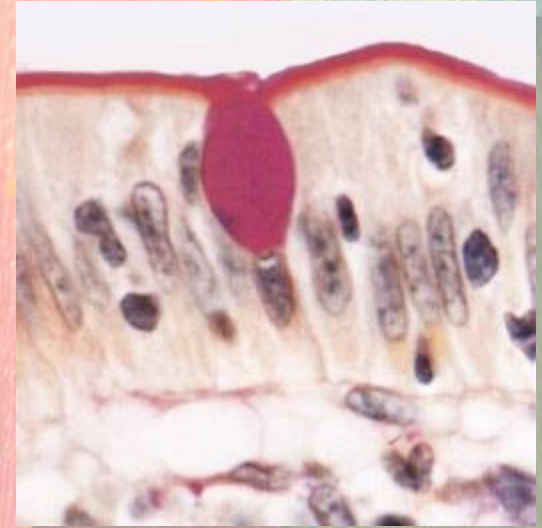


- Se una porzione si colora in **rosso / arancio / rosa**, è colorata dall'**eosina**
- viene detta **Acidofila o eosinofila**
i.e. proteine del citosol



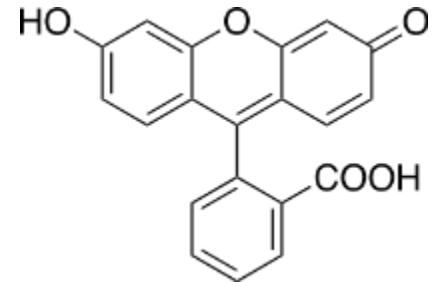
COLORAZIONI ISTOLOGICHE

- **PAS (ISTOCHIMICA)**
 - Per sostanze ricche in zuccheri (muco)
- **TRICROMICHE**
 - Aumentano la differenziazione delle strutture
 - I.e. in questo caso le fibre si colorano in blu (Con E&E sono rosa).

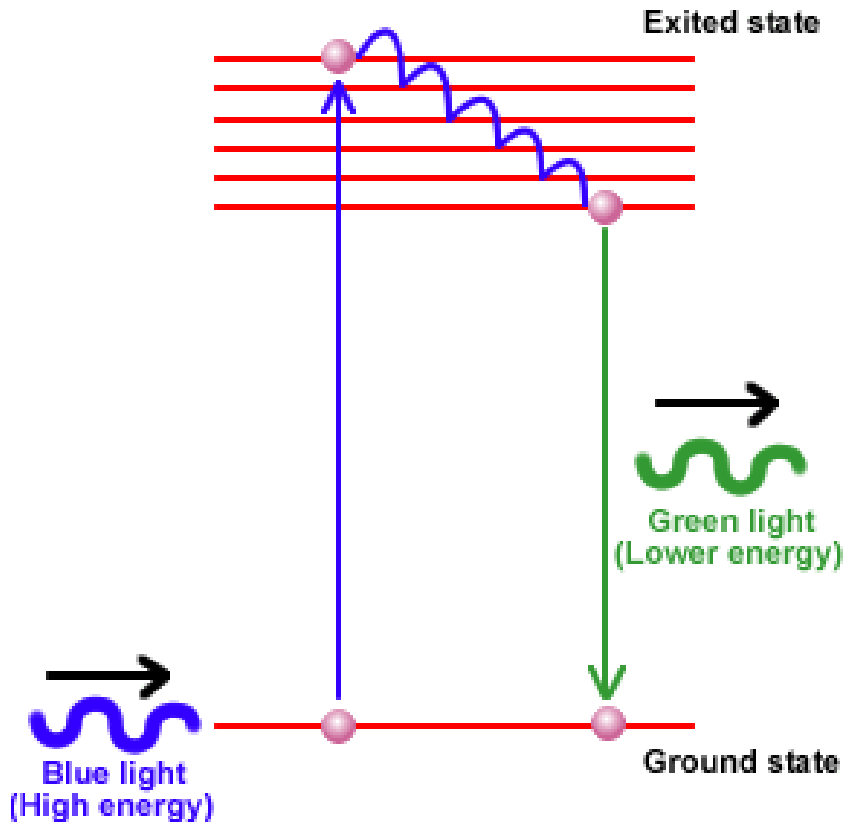


LA FLUORESCENZA

LE MOLECOLE FLUORESCENTI
ASSORBONO FOTONI, E NE RIEMETTONO
ALTRI A LUNGHEZZE D'ONDA PIU' BASSE..
(SI ILLUMINANO)



fluoresceina

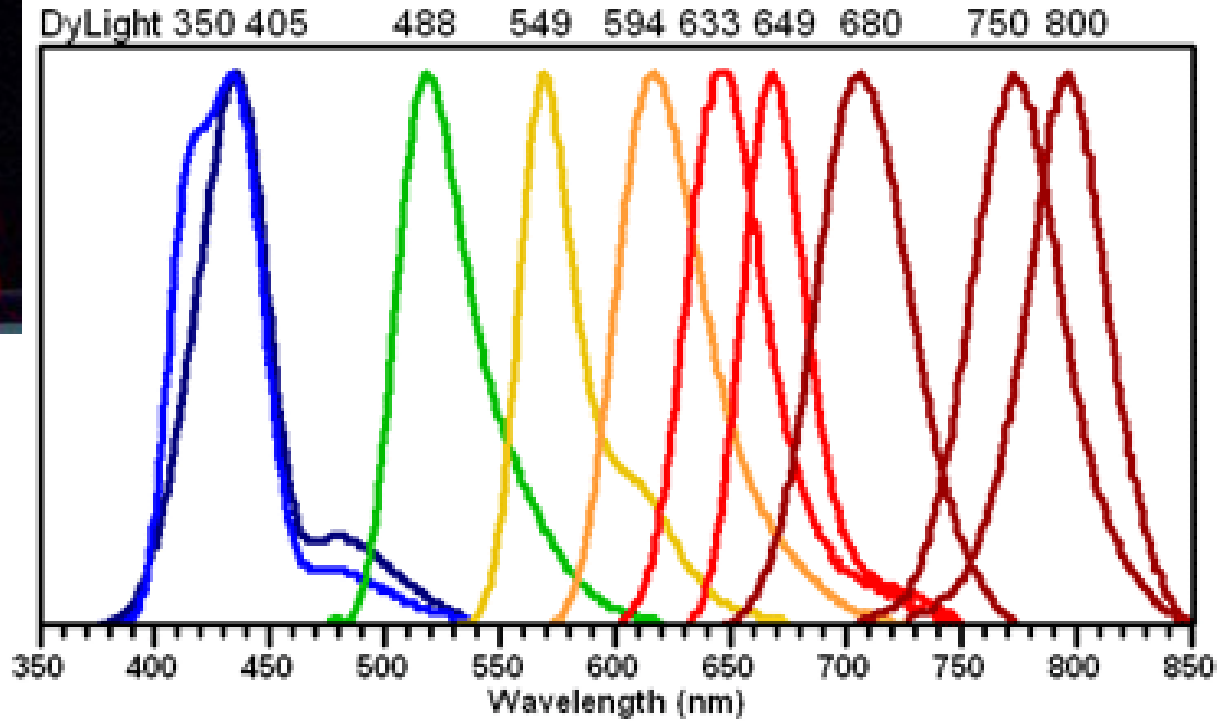




In commercio si possono trovare fluorocromi che emettono in qualunque 1 del visibile



Lunghezze d'onda di emissione per una famiglia di fluorocromi commerciali

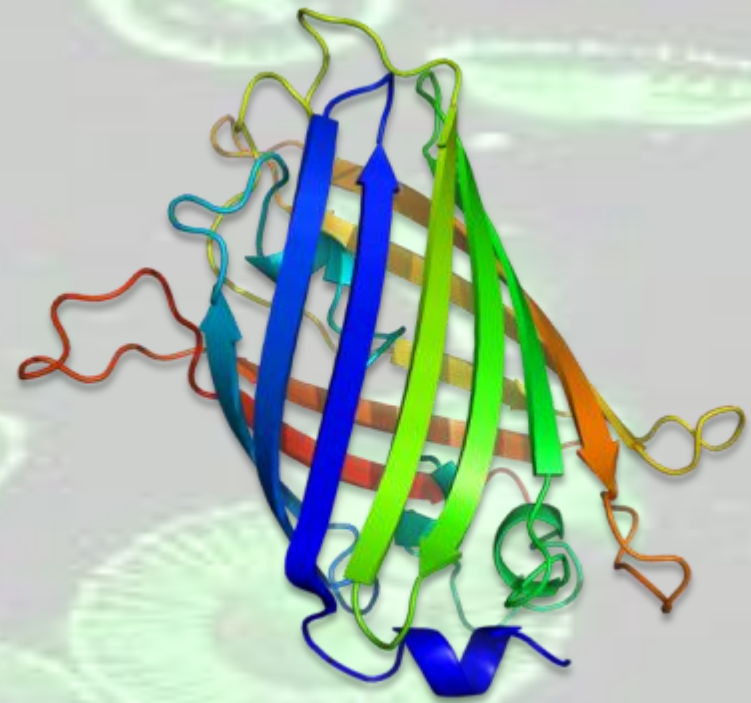


Proteine fluorescenti

Ne esistono di mille colori

Possono essere espresse nelle cellule

Migliaia di applicazioni possibili...



**GREEN
FLUORESCENT
PROTEIN**

Excitation and Emission Spectra of High-Performance Anthozoa Fluorescent Proteins

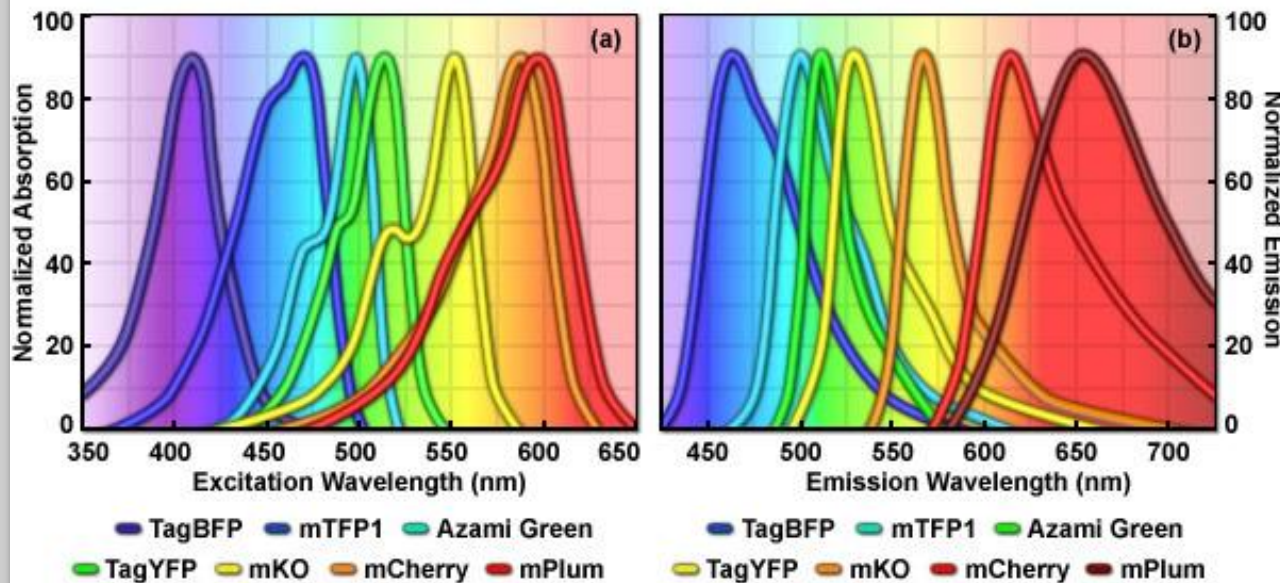


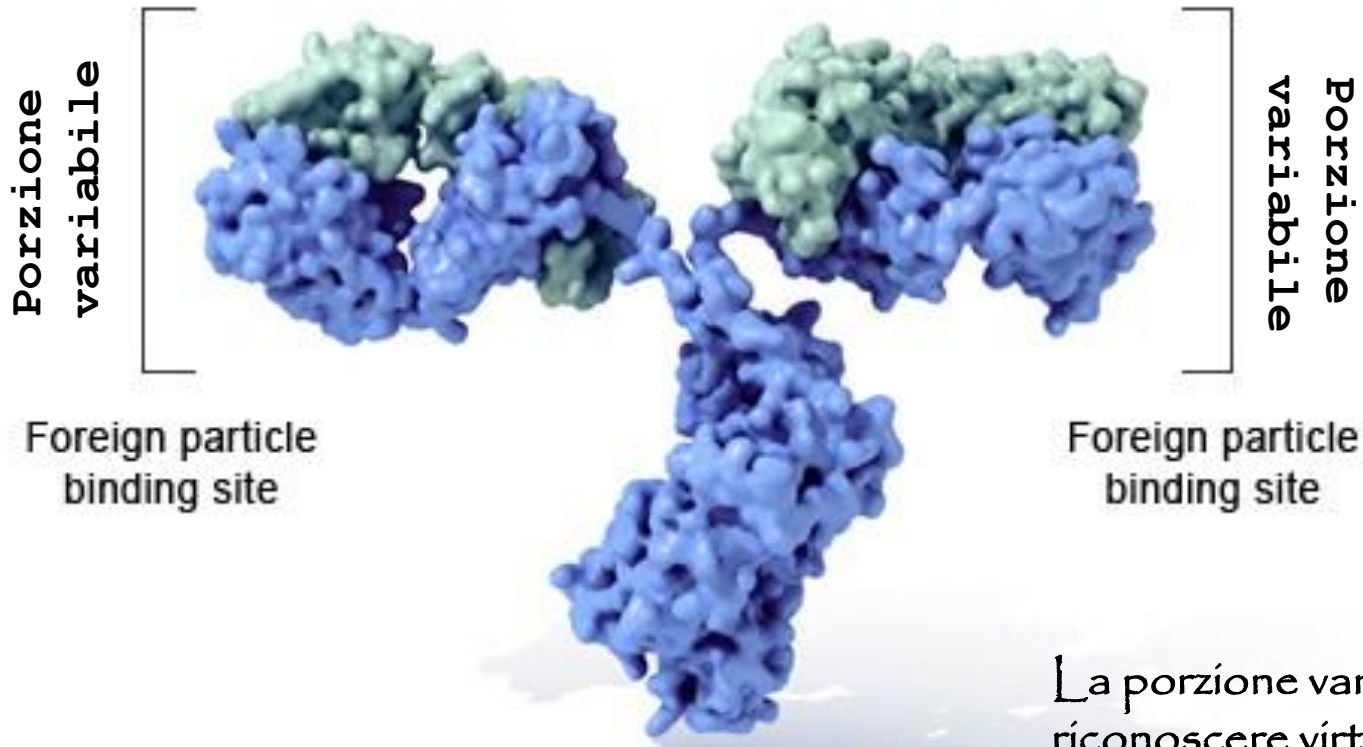
Figure 7

IMMUNOISTOCHEMICA

Gli Anticorpi:

Molecole prodotte dal sistema immunitario e in grado di legarsi stabilmente ad uno specifico motivo molecolare

Immunoglobulin G (IgG)



La porzione variabile è in grado di riconoscere virtualmente qualunque molecola

L'ISTOLOGIA DIVENTA MOLECOLARE.

Posso localizzare specifiche molecole (o **antigeni**) nel tessuto

Utilizzo un anticorpo diretto contro quell'antigene

Per sapere dov'è il mio anticorpo ne utilizzo un secondo, diretto contro il primo e legato ad un sistema di rivelazione (enzimatico, fluorescente, ecc.).

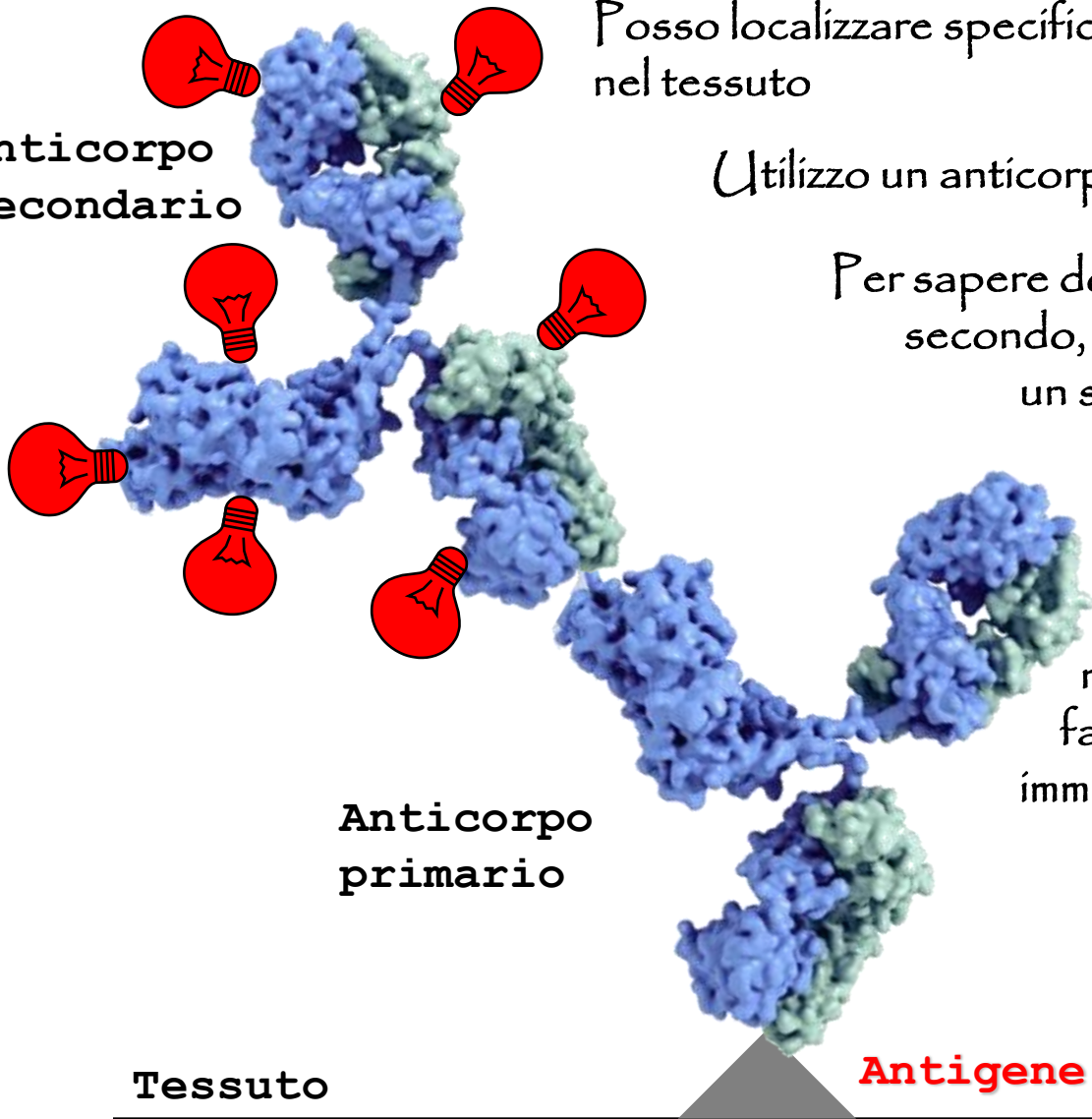
In genere gli anticorpi secondari riconoscono la specie in cui è fatto il primario o il sottotipo di immunoglobulina (IgG, IgM ecc.)

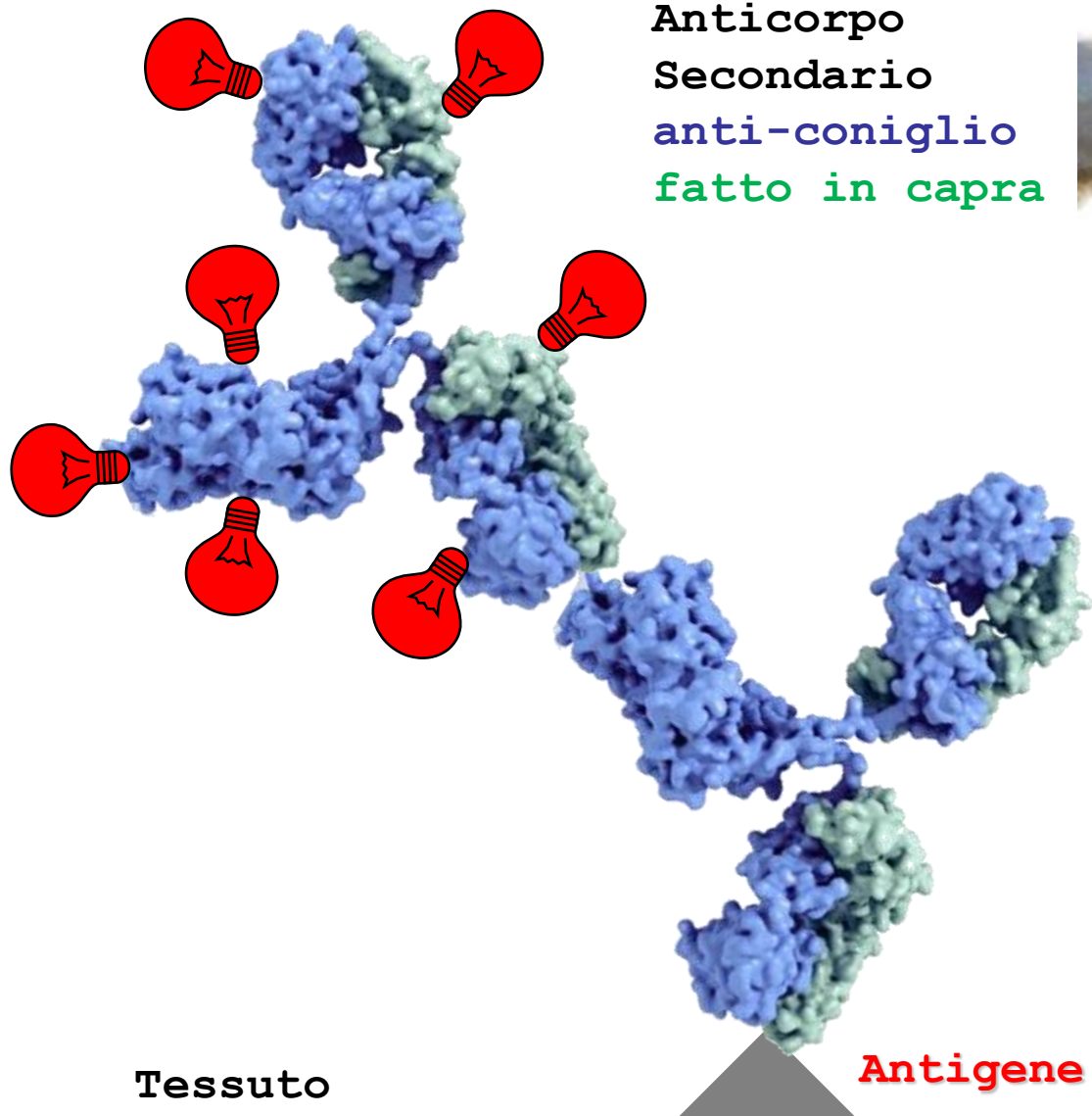
Anticorpo primario

Anticorpo secondario

Tessuto

Antigene





Anticorpo
Secondario
anti-coniglio
fatto in capra



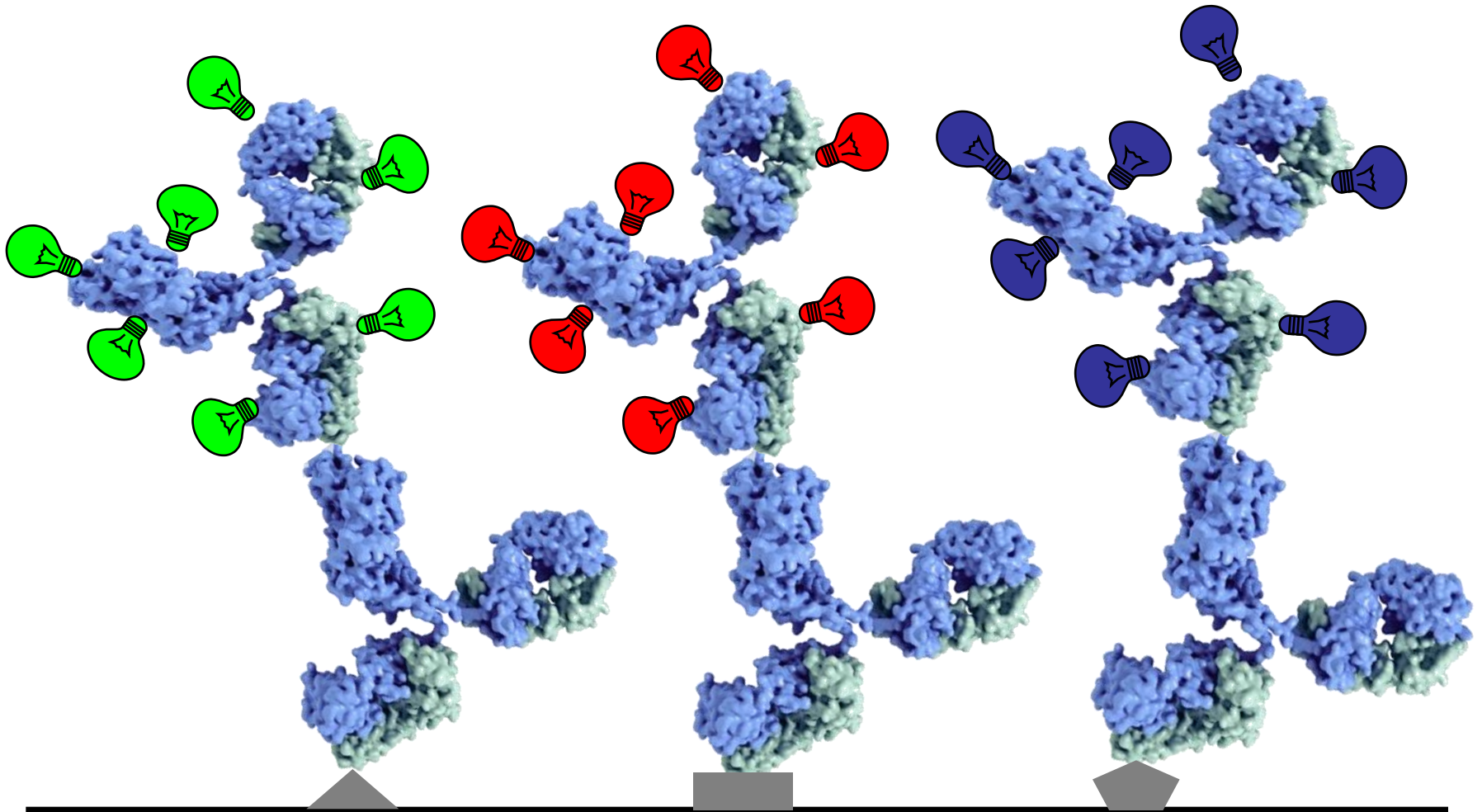
Anticorpo primario
anti-antigene
fatto in coniglio

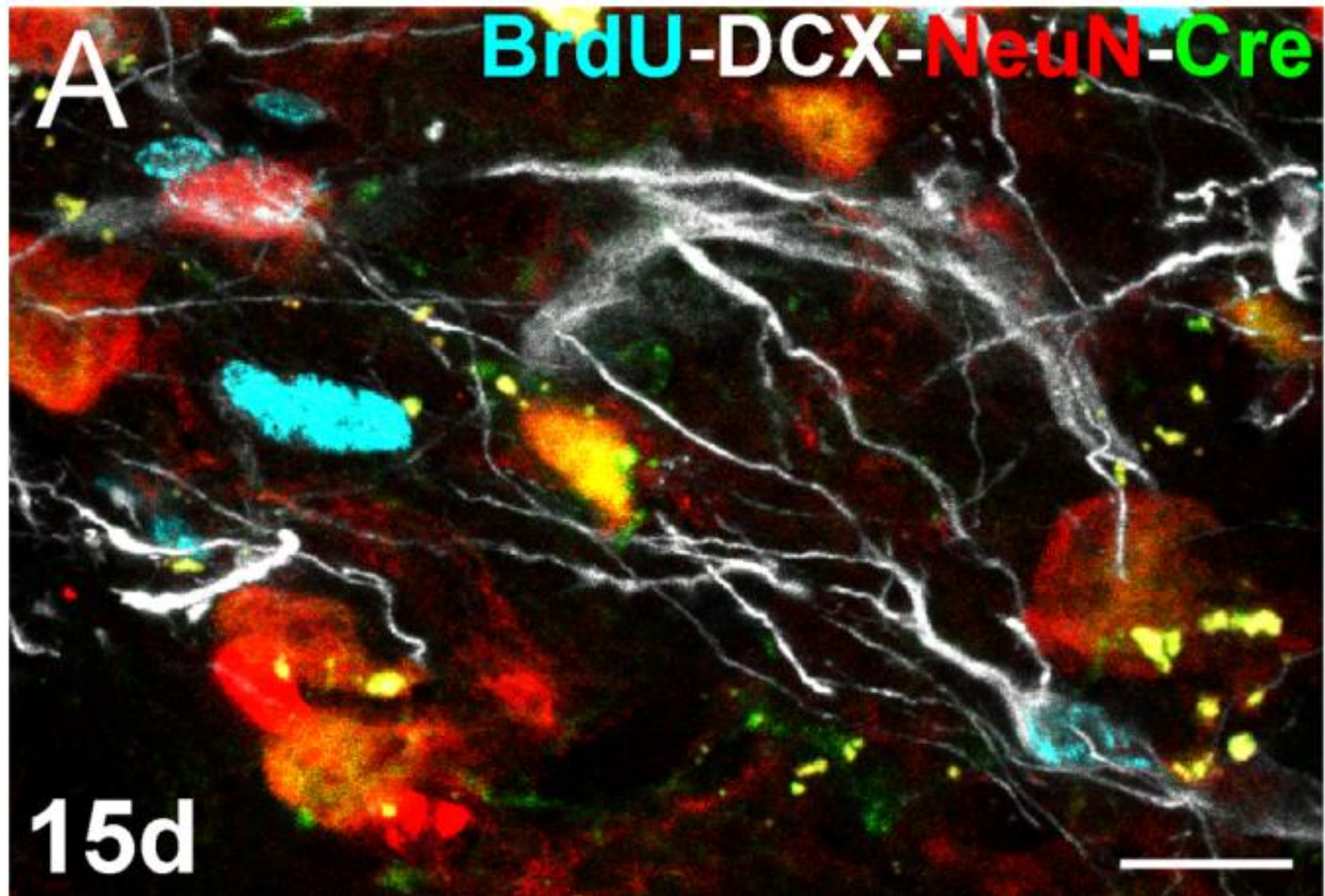


Tessuto

Antigene

NELL'IMMUNOFLUORESCENZA SI POSSONO OSSERVARE PIÙ MOLECOLE CONTEMPORANEAMENTE

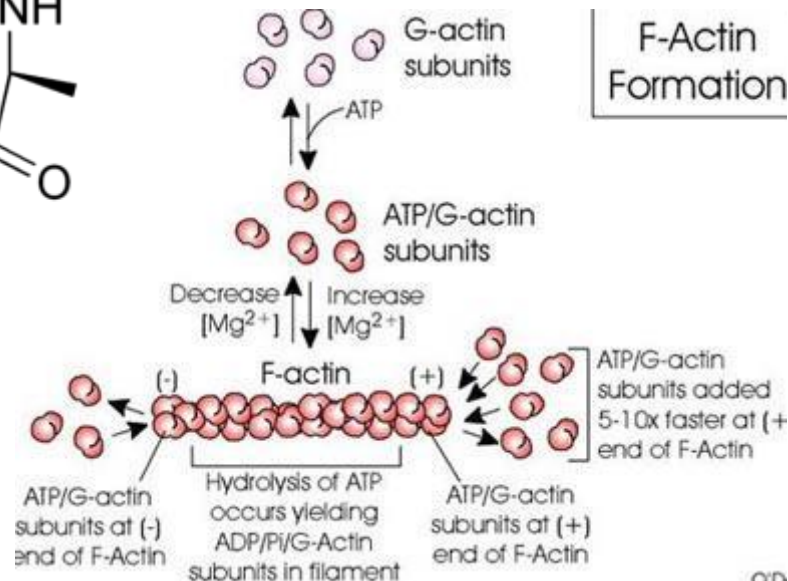
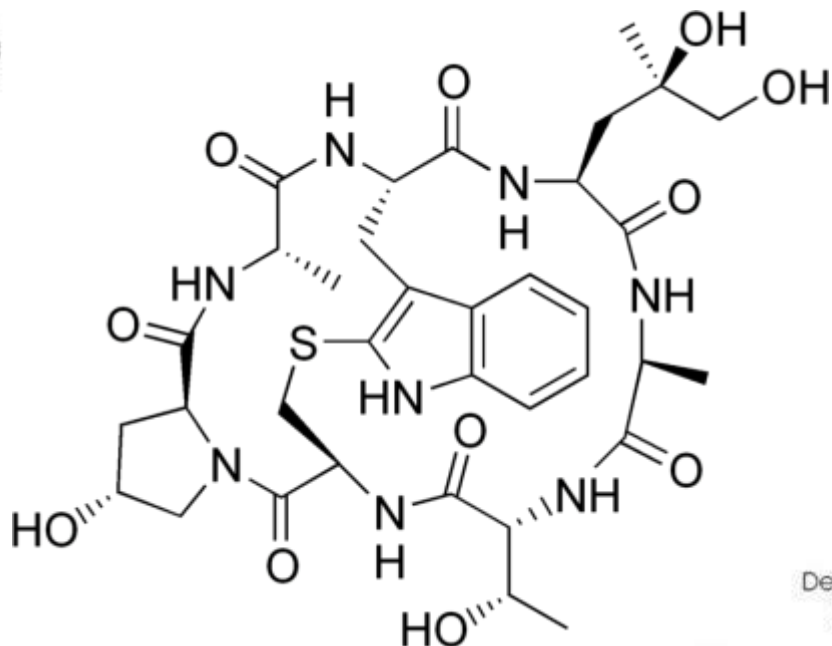
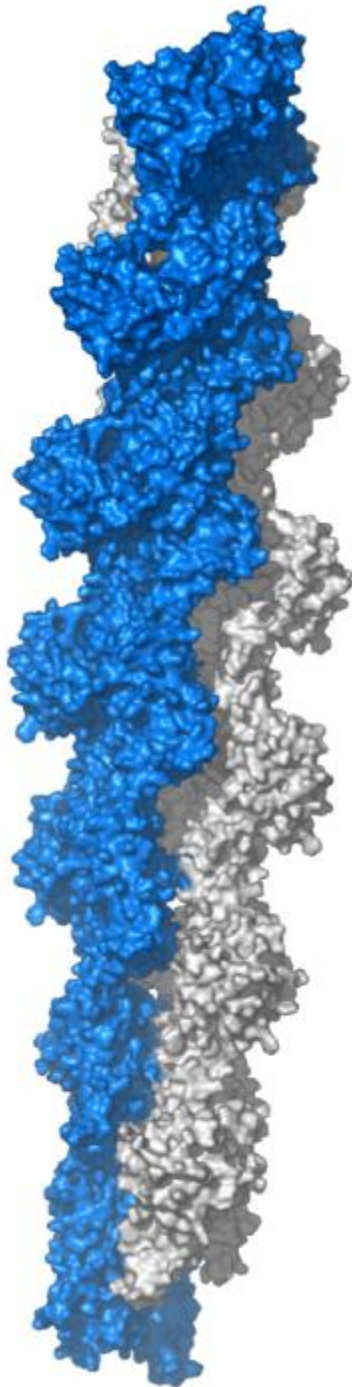




PHALLOIDIN

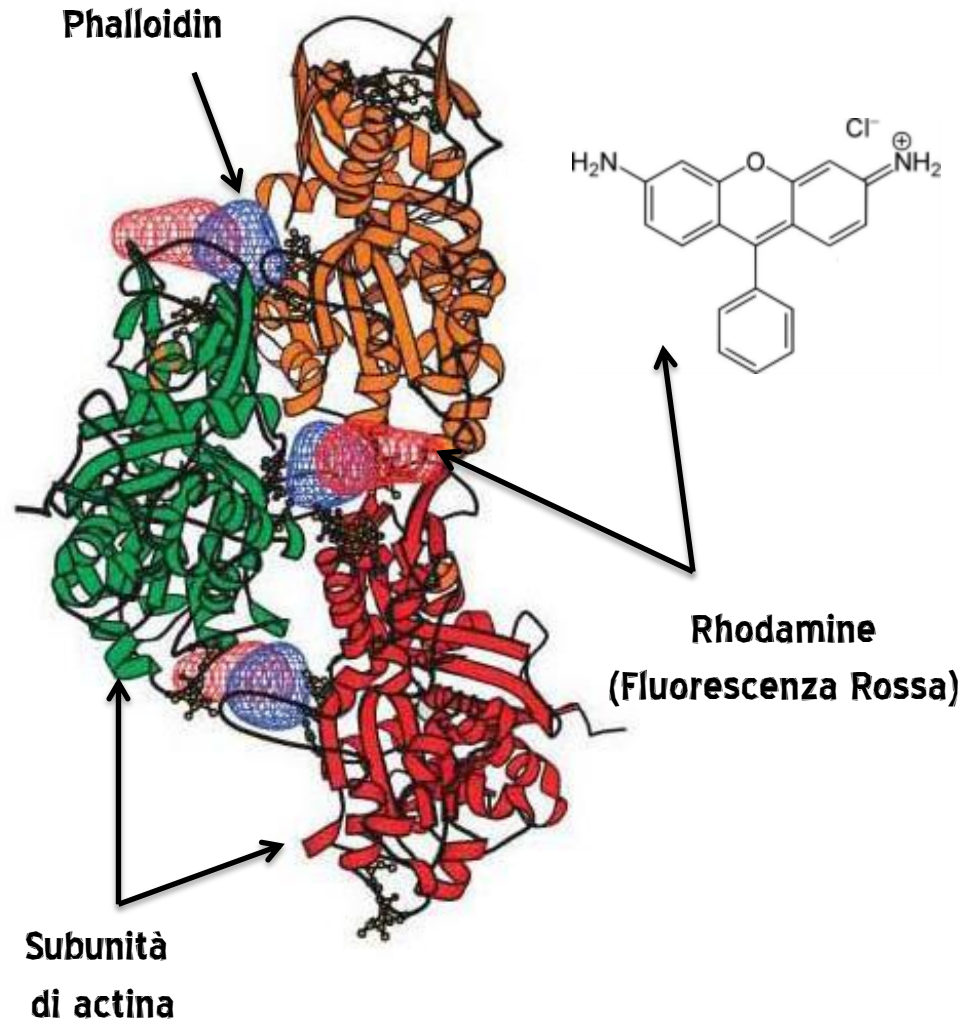
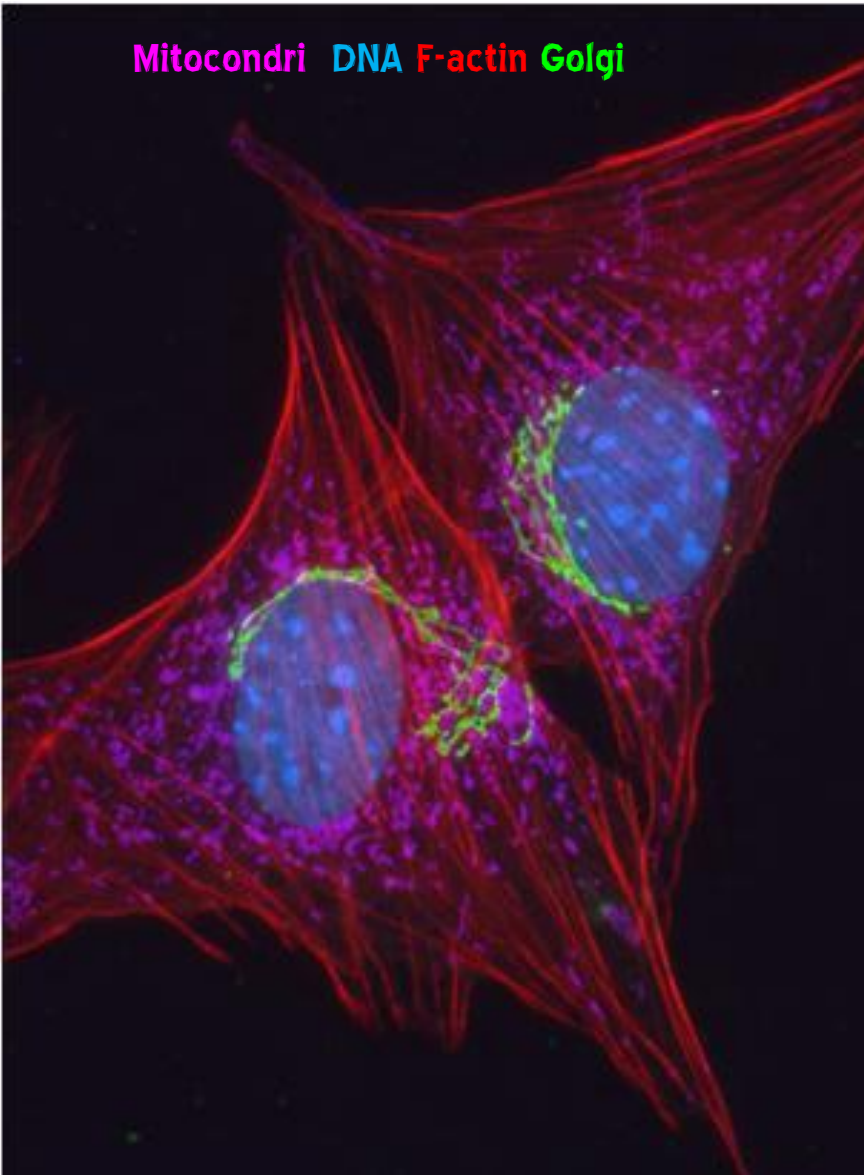
Lega la F-actina e impedendole di depolimerizzare avvelena la cellula

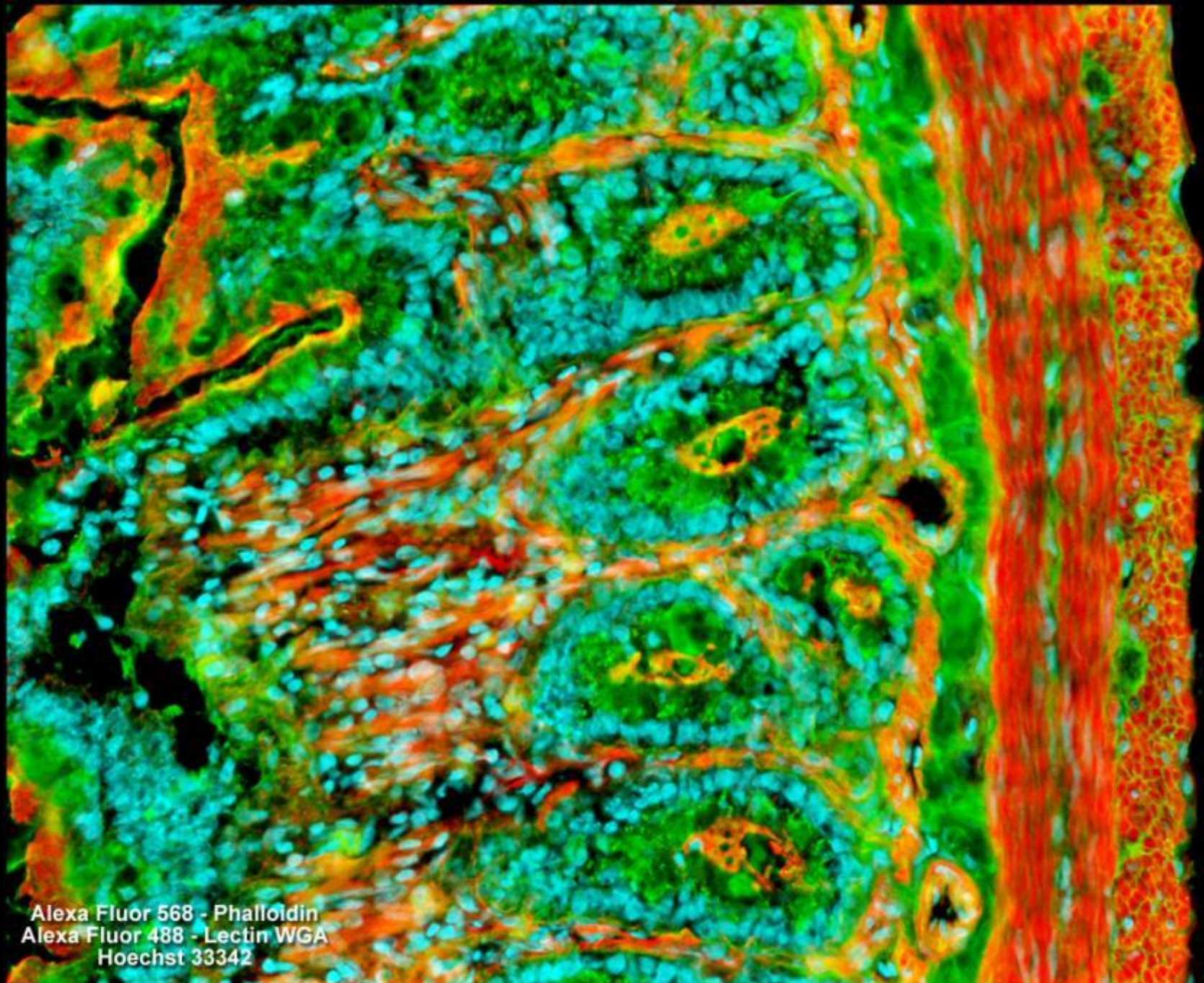
Amanita Phalloides



FLUORESCENT PHALLOIDIN

Mitocondri DNA F-actin Golgi





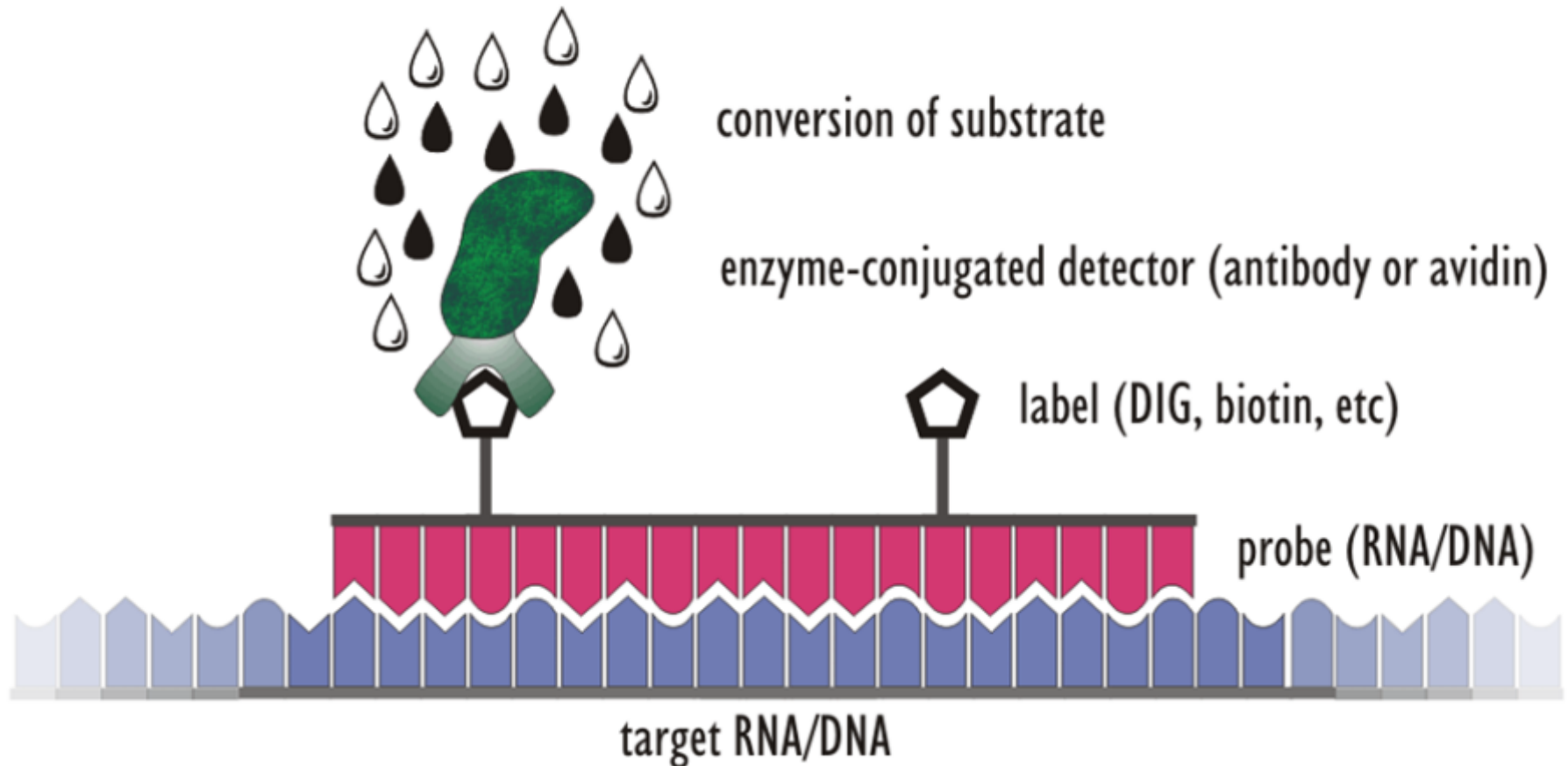
Alexa Fluor 568 - Phalloidin
Alexa Fluor 488 - Lectin WGA
Hoechst 33342

Rat Jejunum 8-Micrometer Thin Section

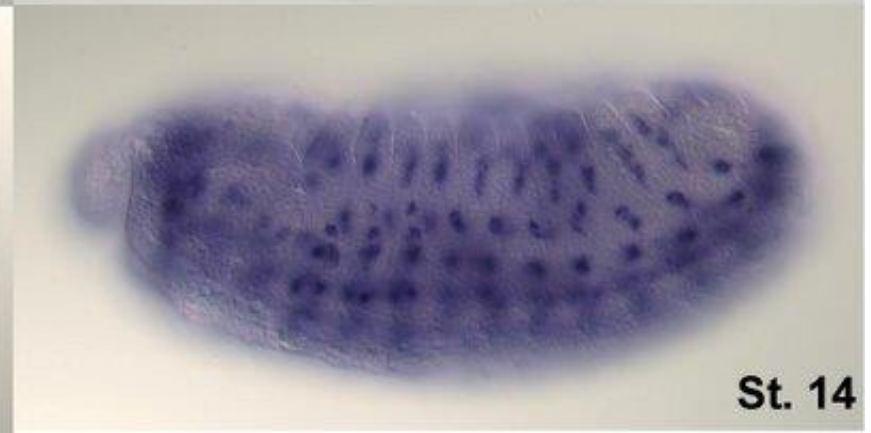
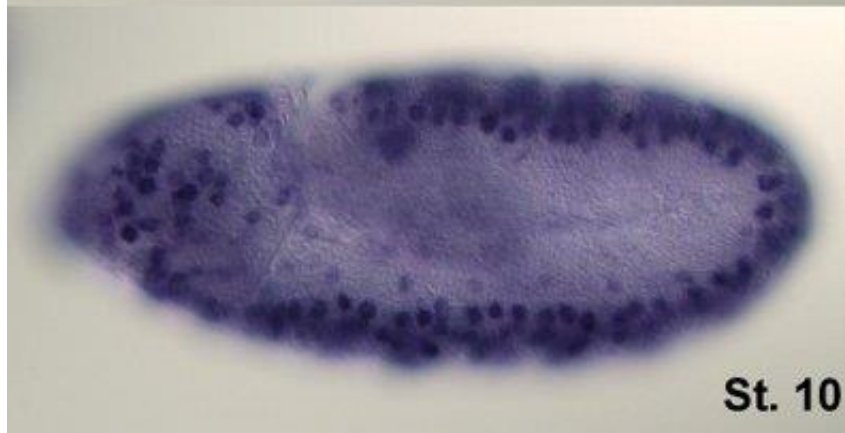
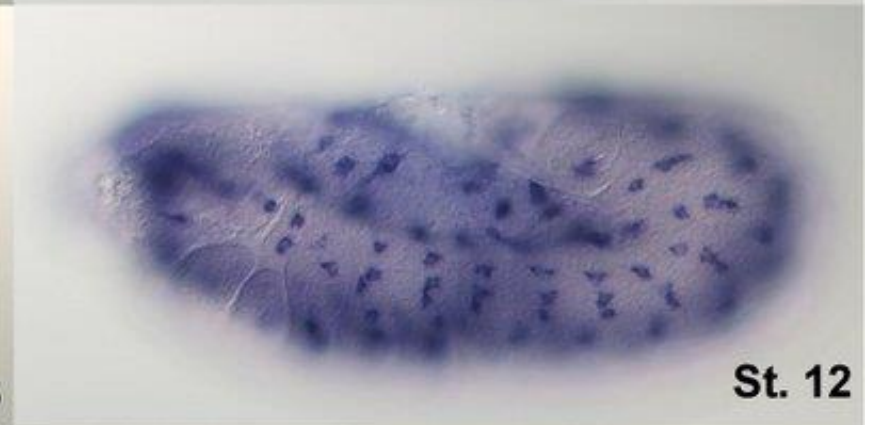
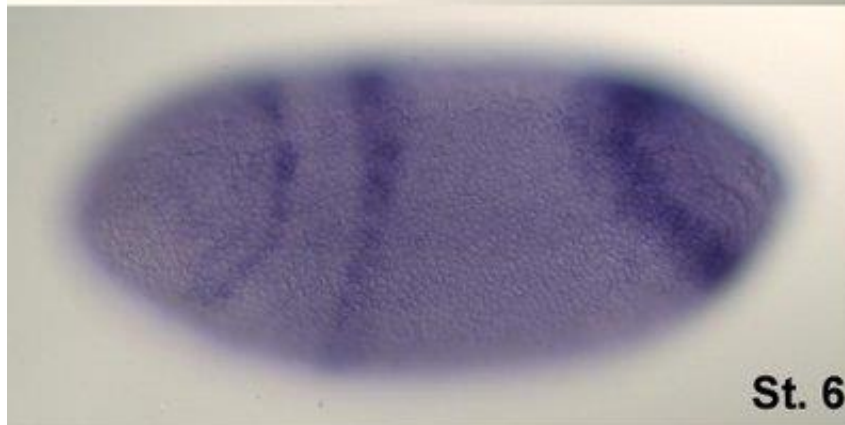
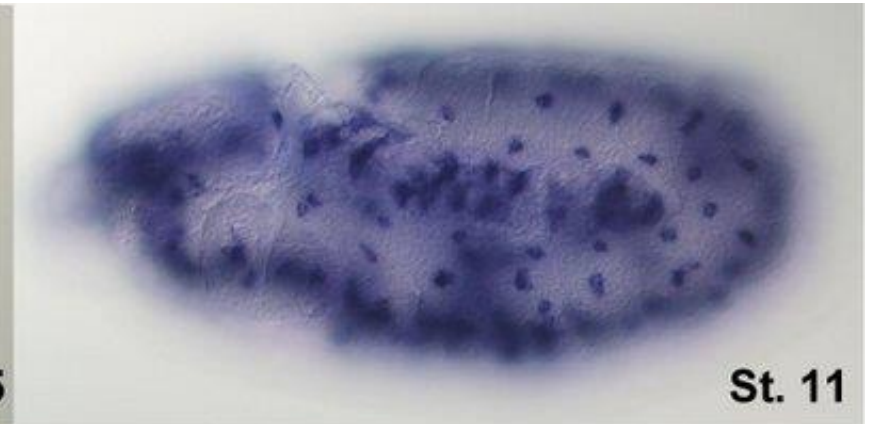
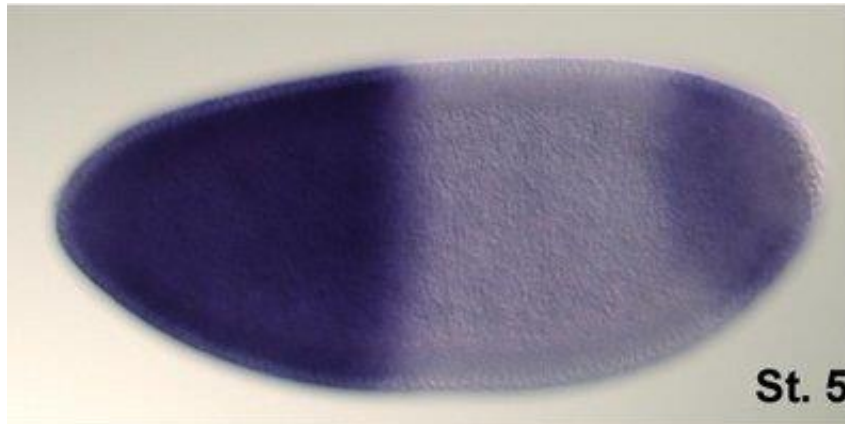
IBRIDAZIONE IN SITU

Tramite sonde ad RNA si possono localizzare sequenze di RNA o di DNA

Il metodo di rivelazione enzimatico è spesso preferito perché consente di amplificare il segnale.

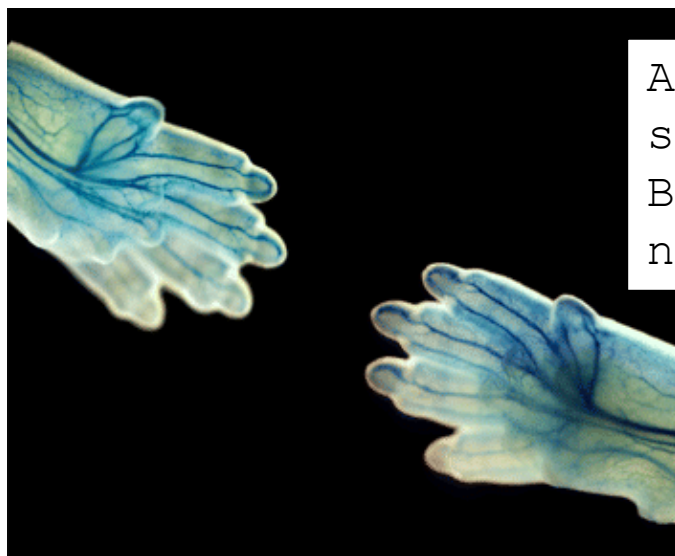


ESPRESSIONE DELL'MRNA DELLA GENE HUNCHBACK IN EMBRIONI DI DROSOFILA A DIVERSI STADI



GENI REPORTER (GFP, BGAL ..)

IL GENE REPORTER VIENE INSERITO A VALLE DEL PROMOTORE DEL GENE DI INTERESSE



Assoni di neuroni sensoriali esprimenti Brn2 (proteina nucleare)



OLIG2+ MOTORNEURONS IN ZEBRAFISH

Olig2 è un fattore di trascrizione nucleare

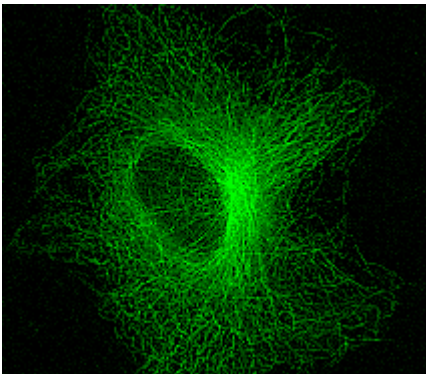


CUORE E GLOBULI ROSSI IN ZEBRAFISH

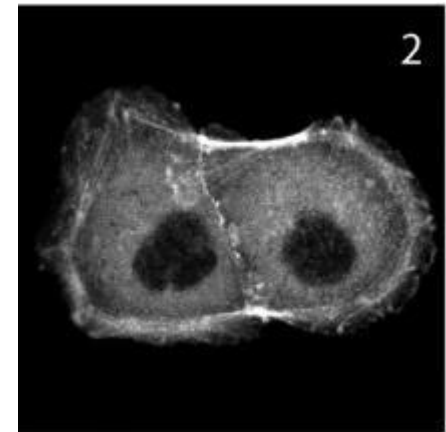
Schoenmann et al. 2010

PROTEINE DI FUSIONE (GFP o simili)

LA SEQUENZA DELLA GFP VIENE INSERITA A MONTE O A VALLE DEL GENE DI UNA PROTEINA , IN GENERE SEPARATI DA UN TRATTO LINKER

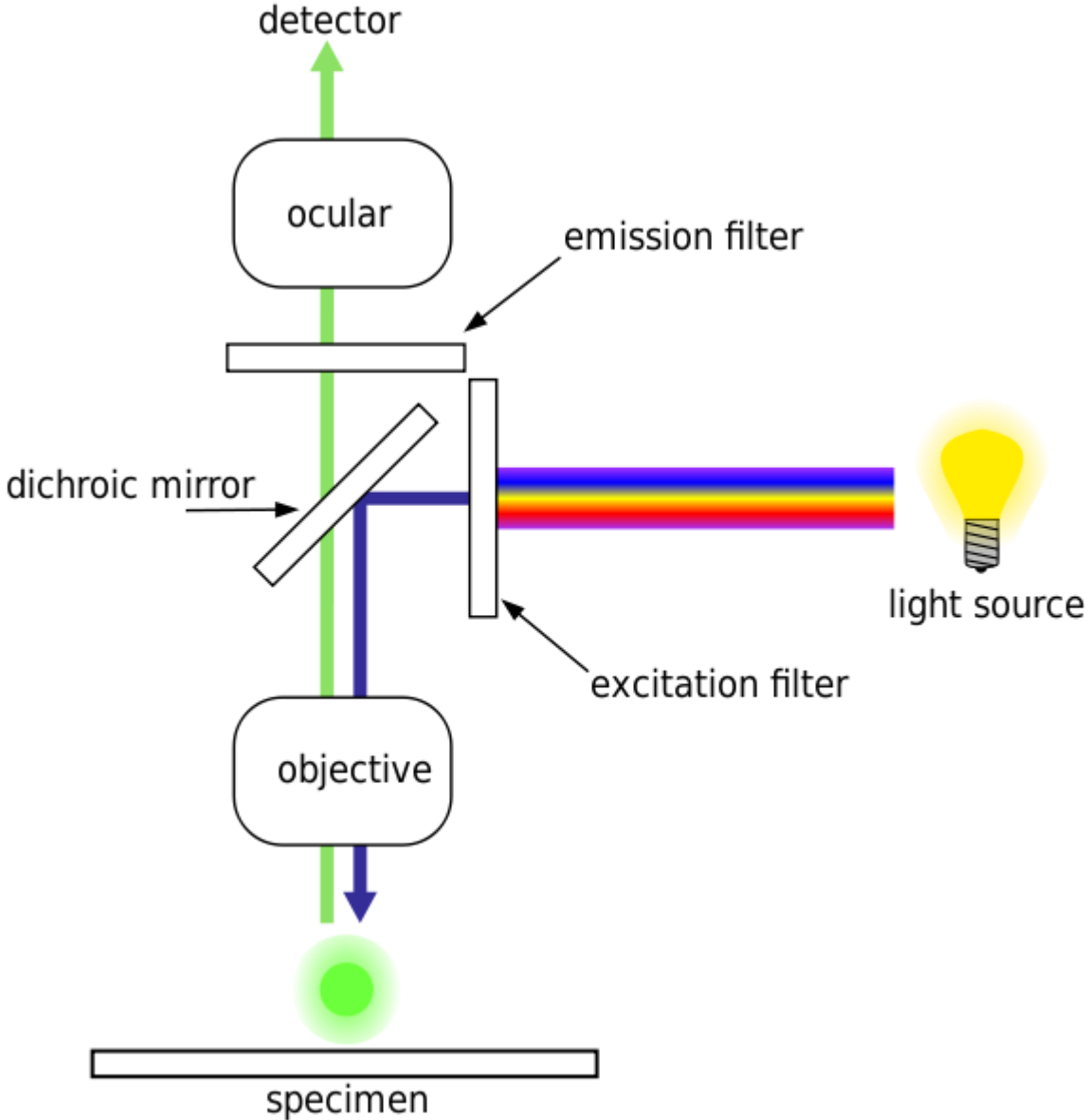


GFP-EB1 (proteina che lega l'estremità+dei microtubuli)E
GFP-tubulin



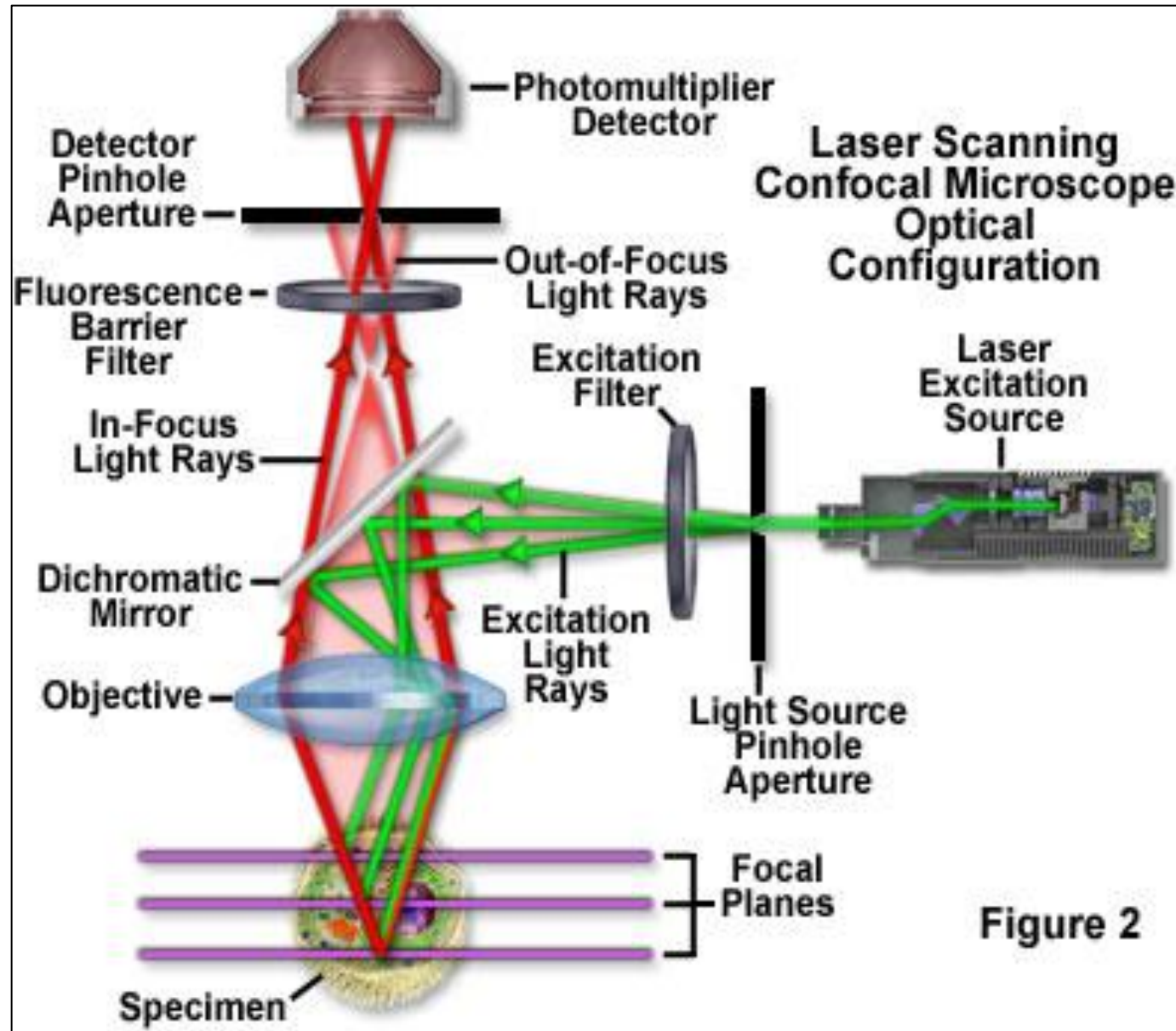
GFP-E cadherin

MICROSCOPIO A FLUORESCENZA



MICROSCOPIA CONFOCALE

MICROSCOPIO A
FLUORESCENZA IN CUI
LA LUCE EMESSA VIENE
FATTA PASSARE PER
UNA PICCOLA
APERTURA (pinhole)
CHE FILTRA LA LUCE
DEGLI OGGETTI NON A
FUOCO



Widefield versus Confocal Point Scanning of Specimens



Figure 4

Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

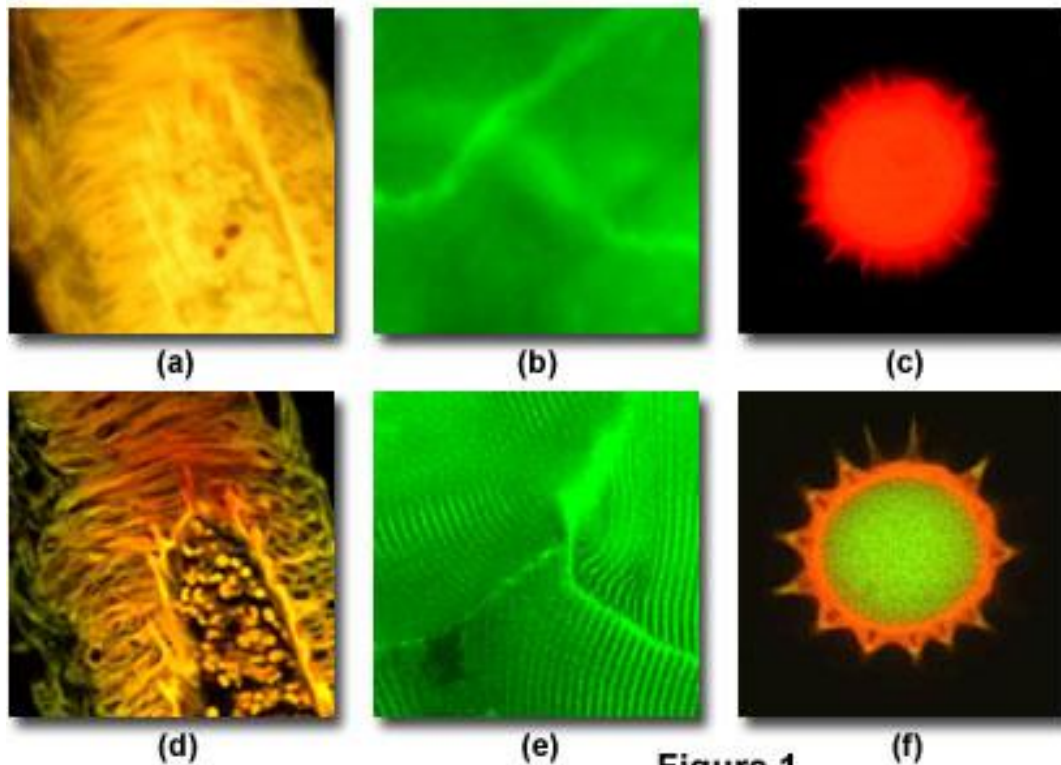
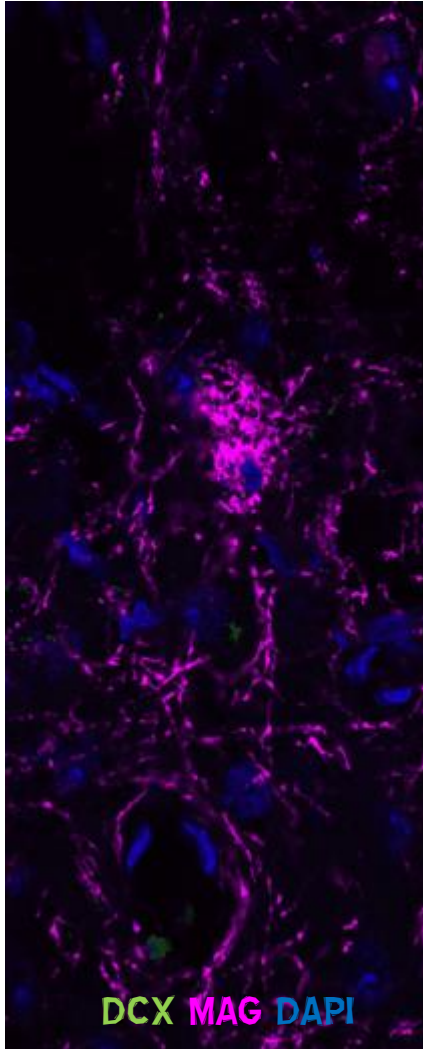


Figure 1

IL CONFOCALE PUO' ACQUISIRE **STACK** DI IMMAGINI

(VOXEL SIZE 0.15 X 0.15 x 1.2)



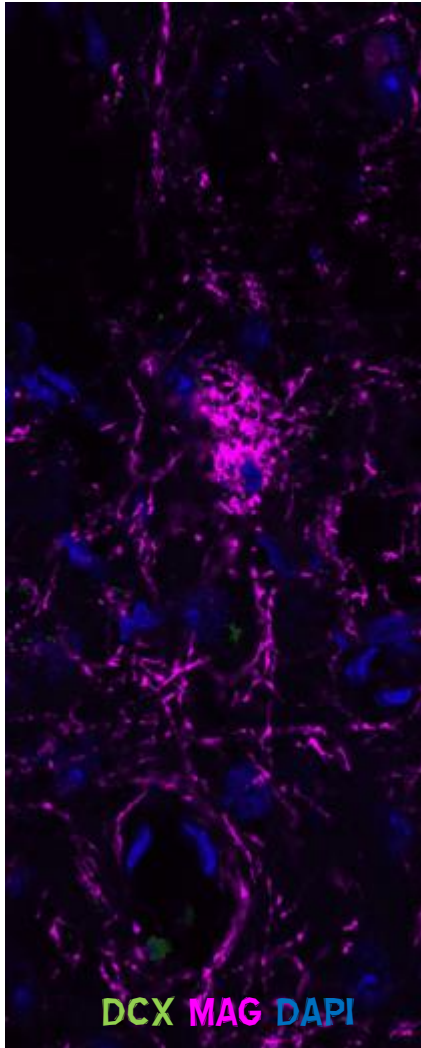
DAPI

DCX

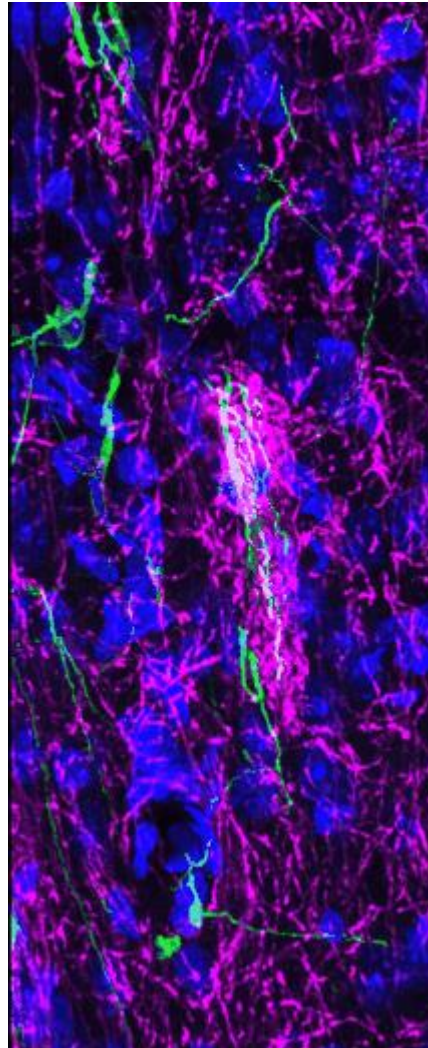
Singoli piani focali

IL CONFOCALE PUO' ACQUISIRE **STACK** DI IMMAGINI

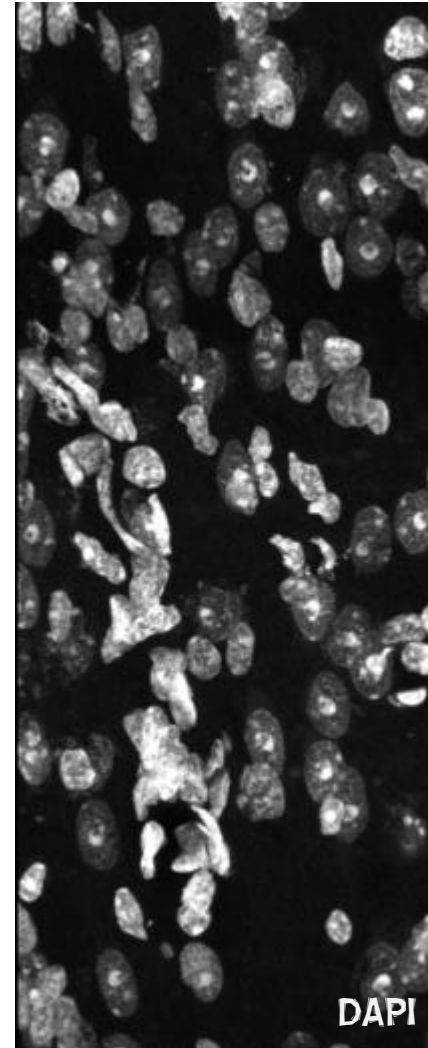
(VOXEL SIZE 0.15 X 0.15 x 1.2)



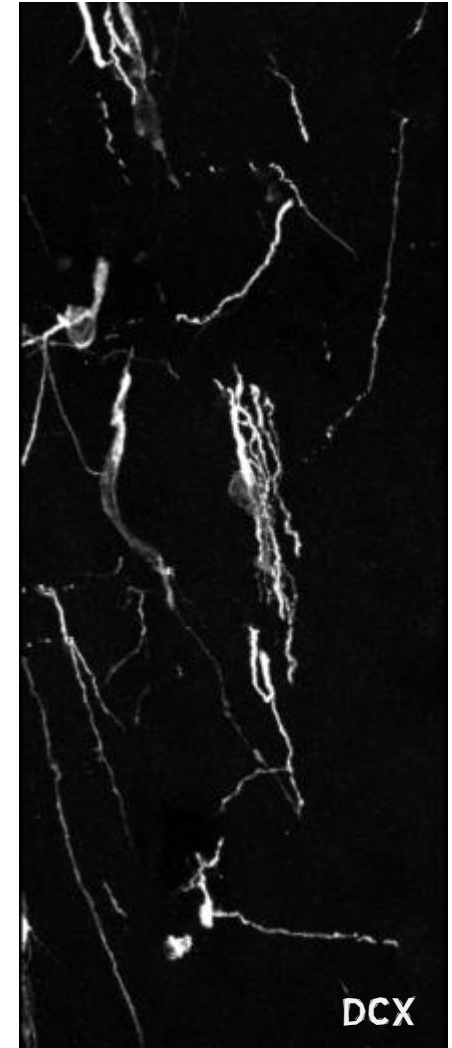
Singoli piani focali



STACK INTERO



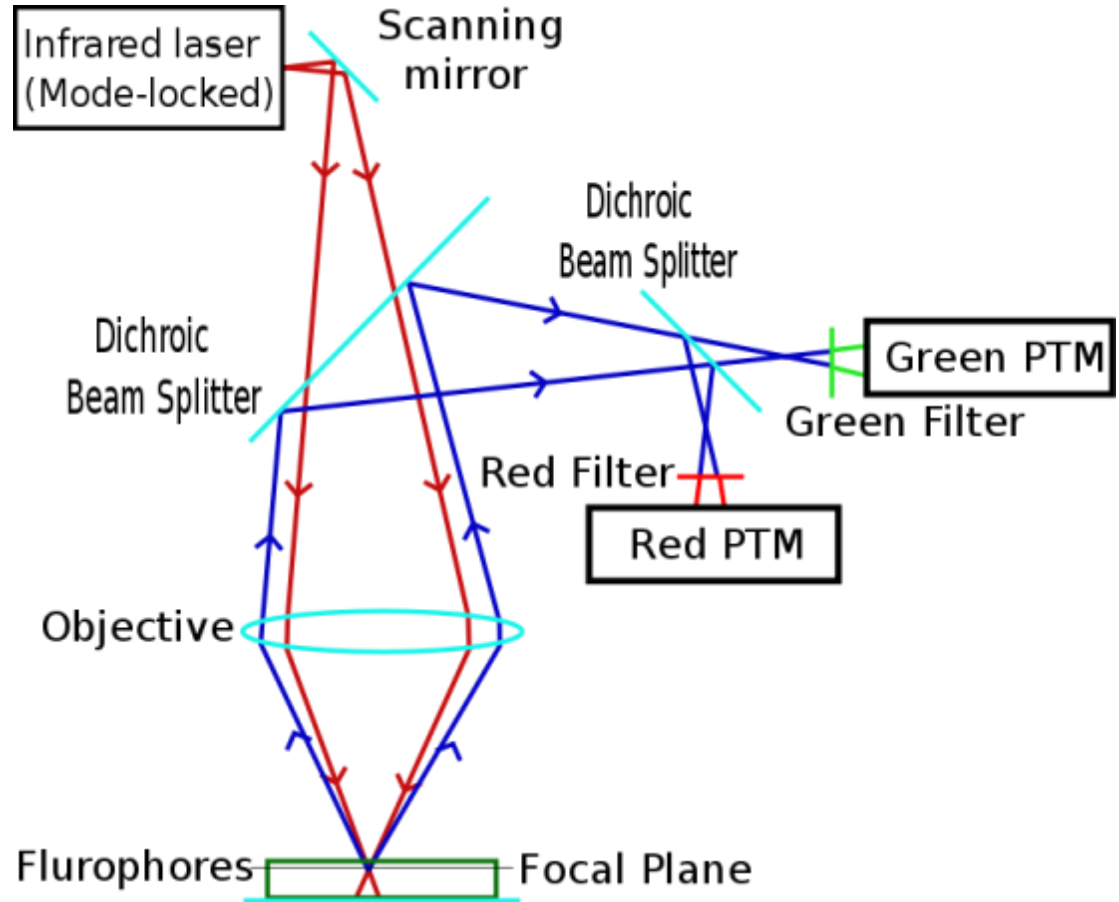
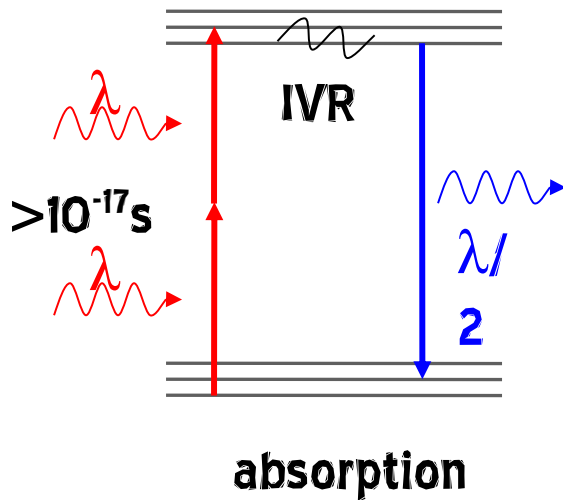
DAPI



DCX

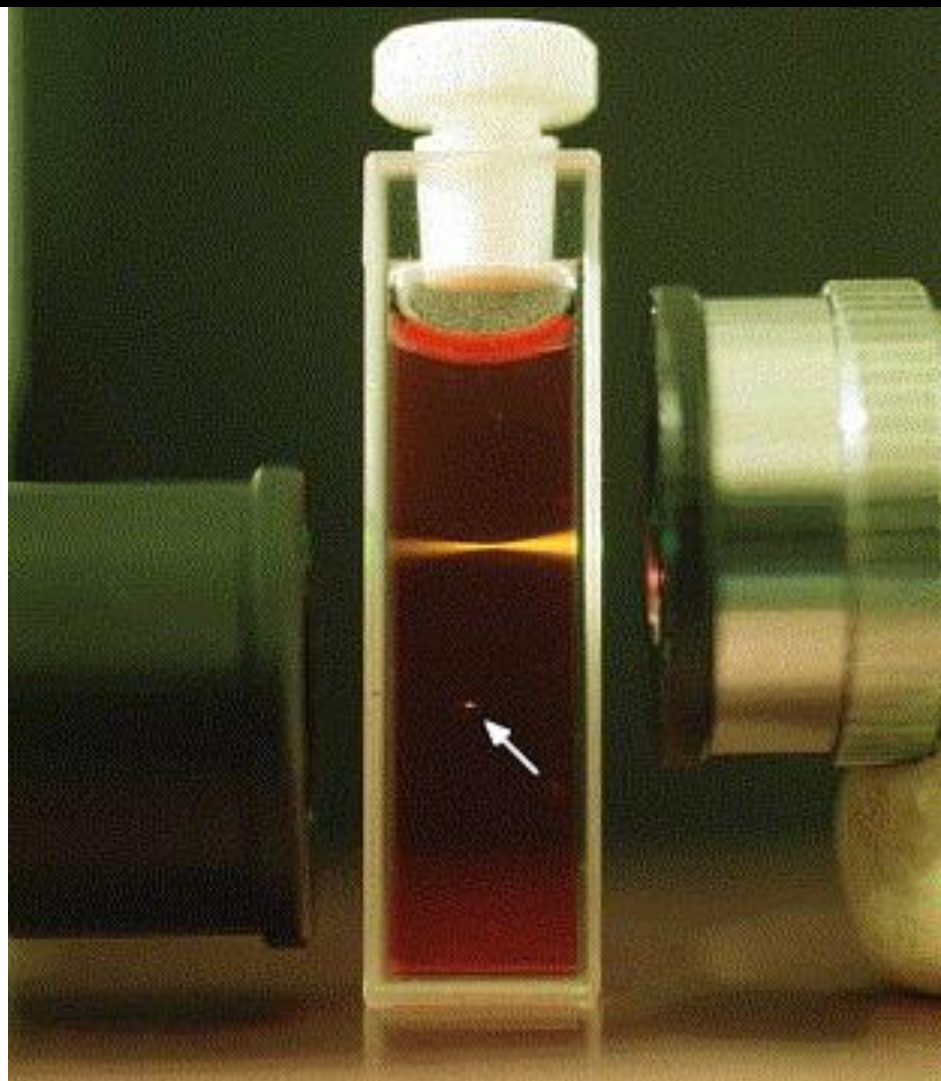
Two-photon microscopy

Eccitazione del fluorocromo attraverso due fotoni di λ minore ma che lo colpiscono in contemporanea



Two-photon excitation versus one-photon excitation

1046 NM
EXCITATION

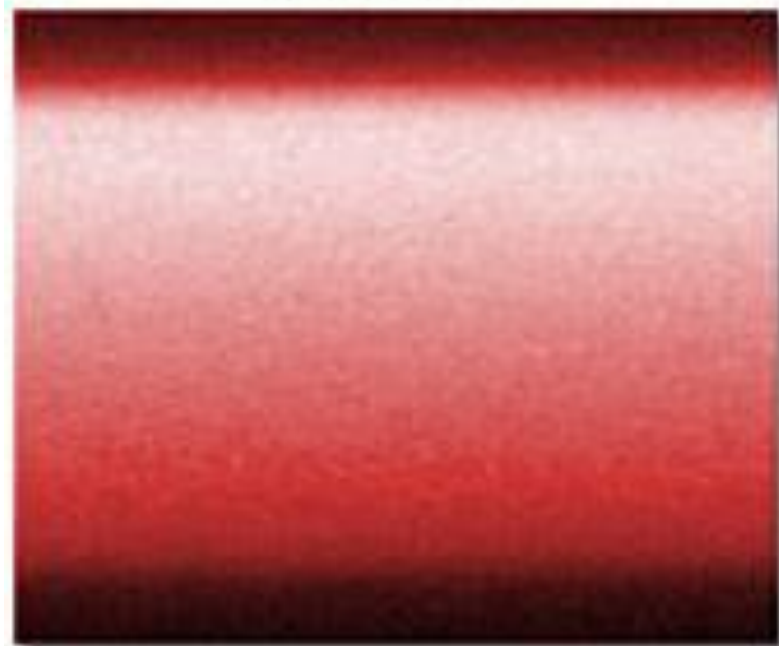


543 NM
EXCITATION

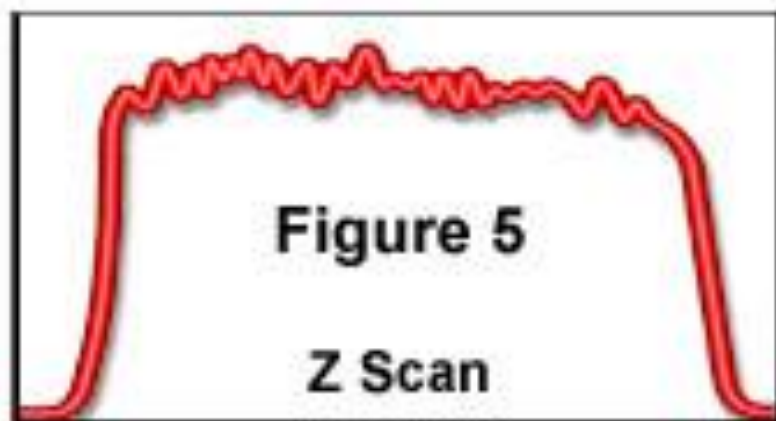
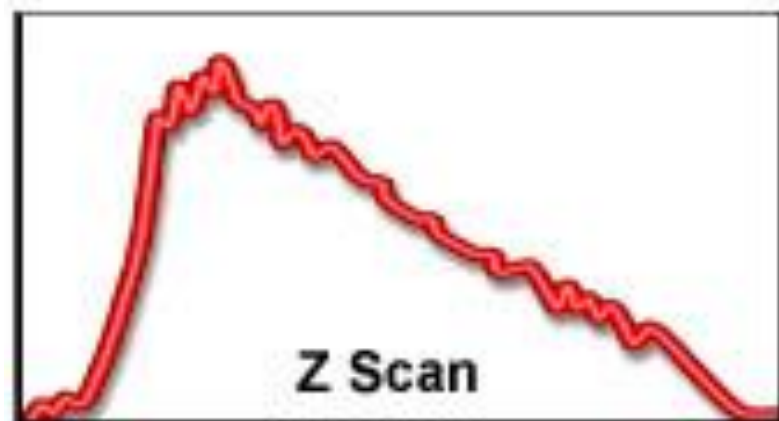
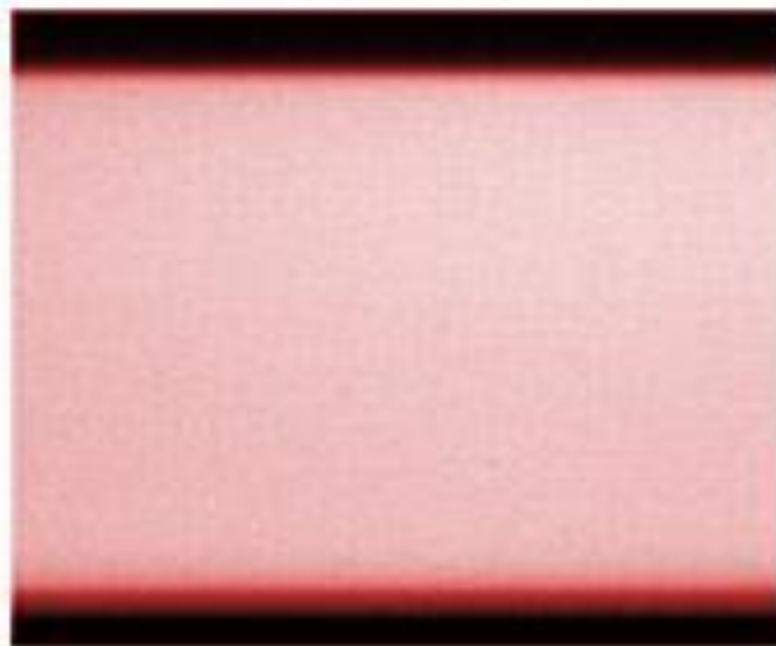
DYE SOLUTION, SAFRANIN O

Single and Two-Photon Scanning Profiles

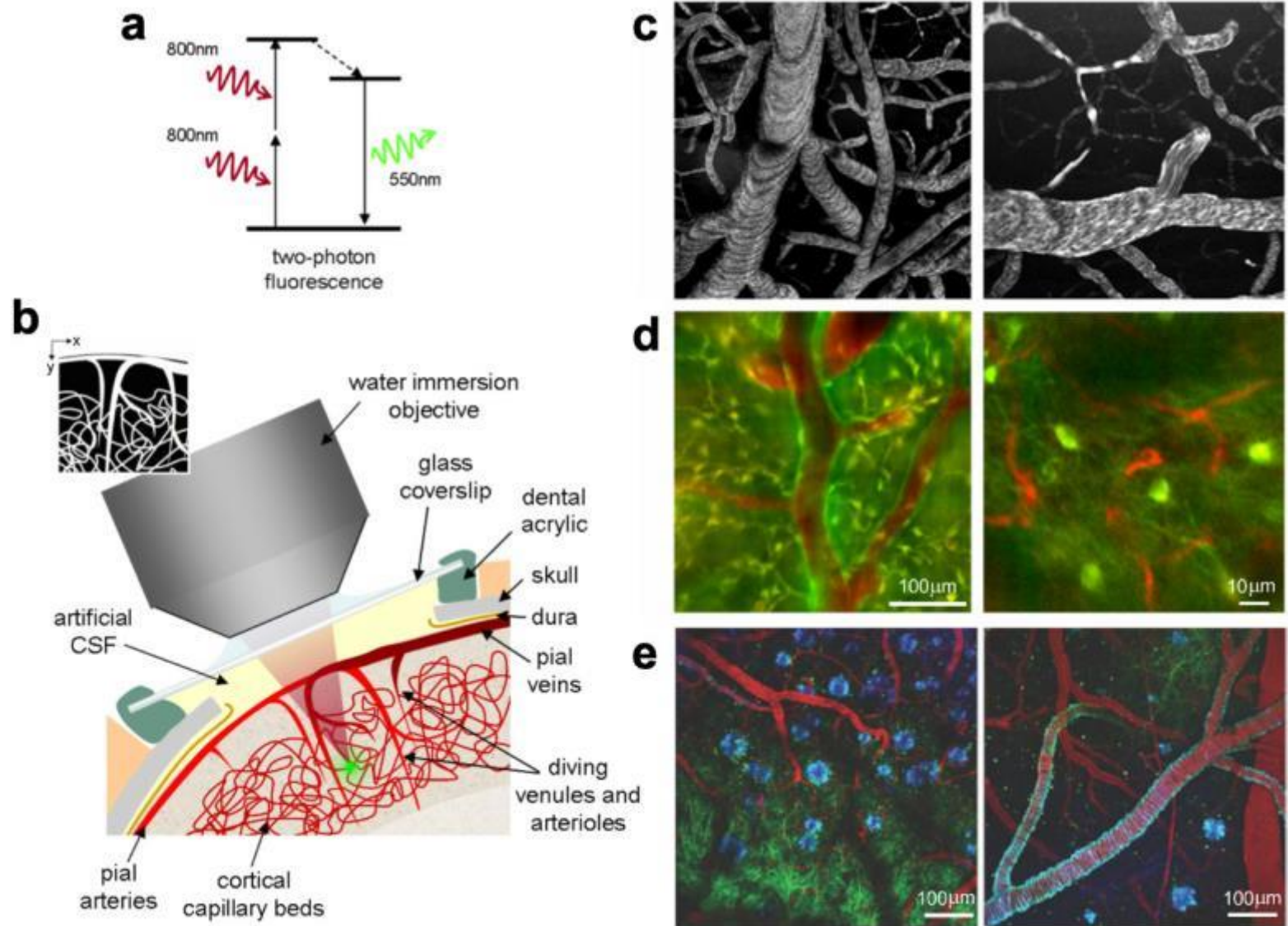
One-Photon Excitation
X-Z Scan



Two-Photon Excitation
X-Z Scan



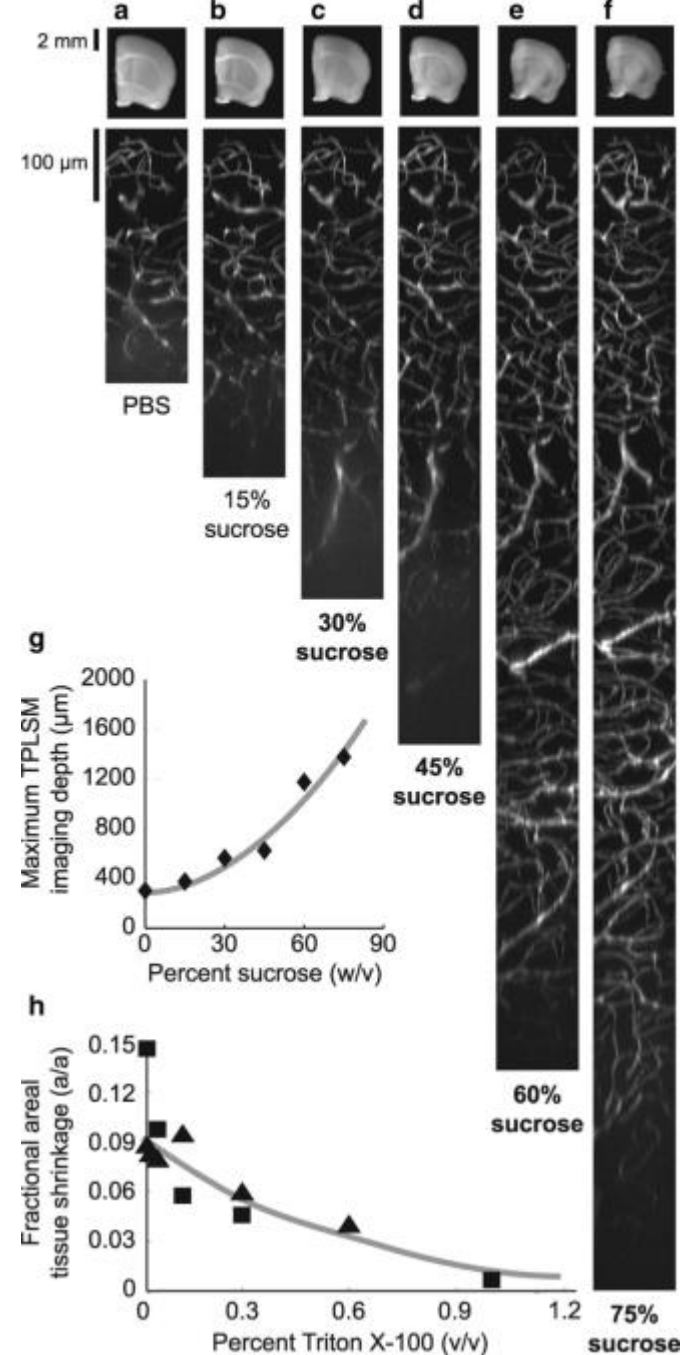
Usato anche in vivo, per ricostruire strutture superficiali, ma anche per calcium imaging



**Per andare più in profondità occorrono
metodi di chiarificazione (su fissato)**

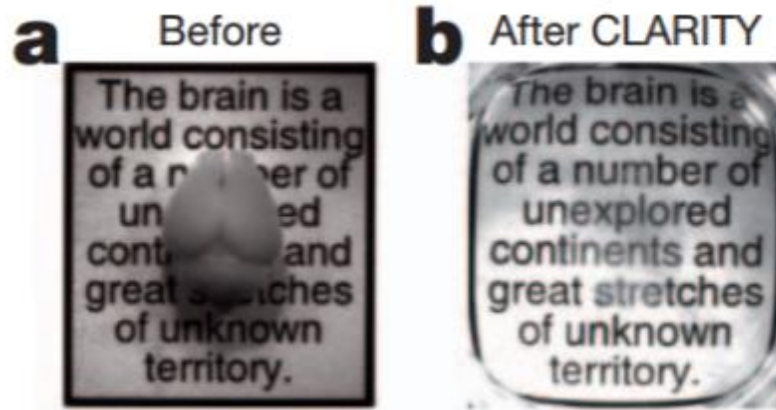
Saccarosio \rightarrow

Scale (urea) \downarrow

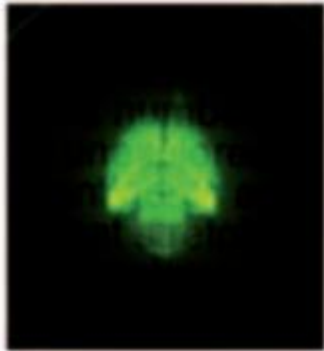


CLARITY

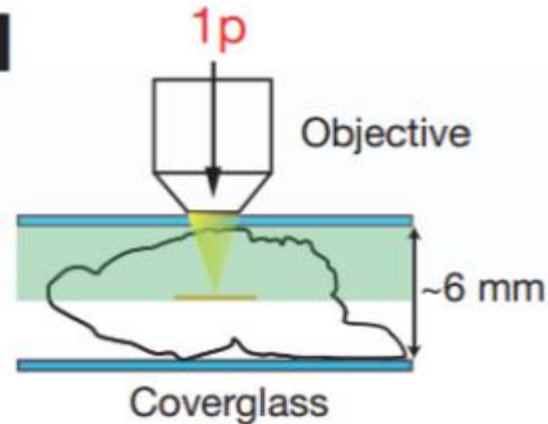
Fissazione con Acrilamide e poi estrazione dei lipidi con SDS in elettroforesi



c After CLARITY



d



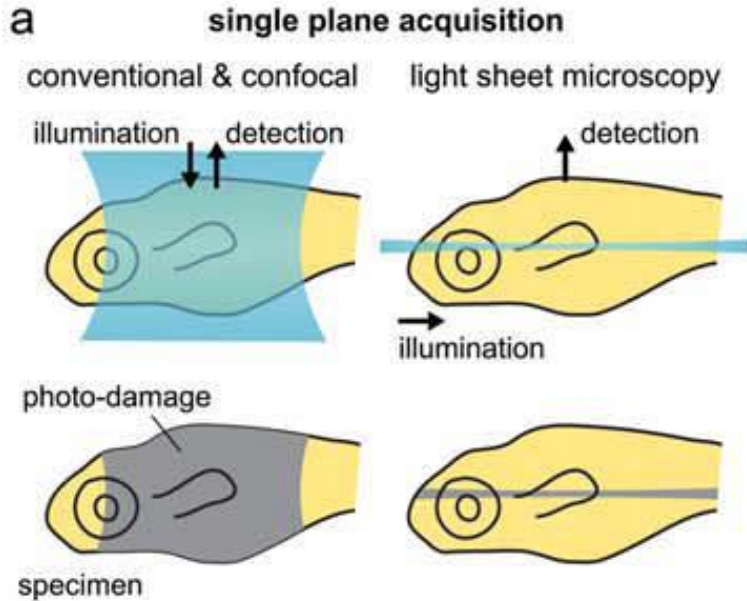
nature12107-sv3.mov



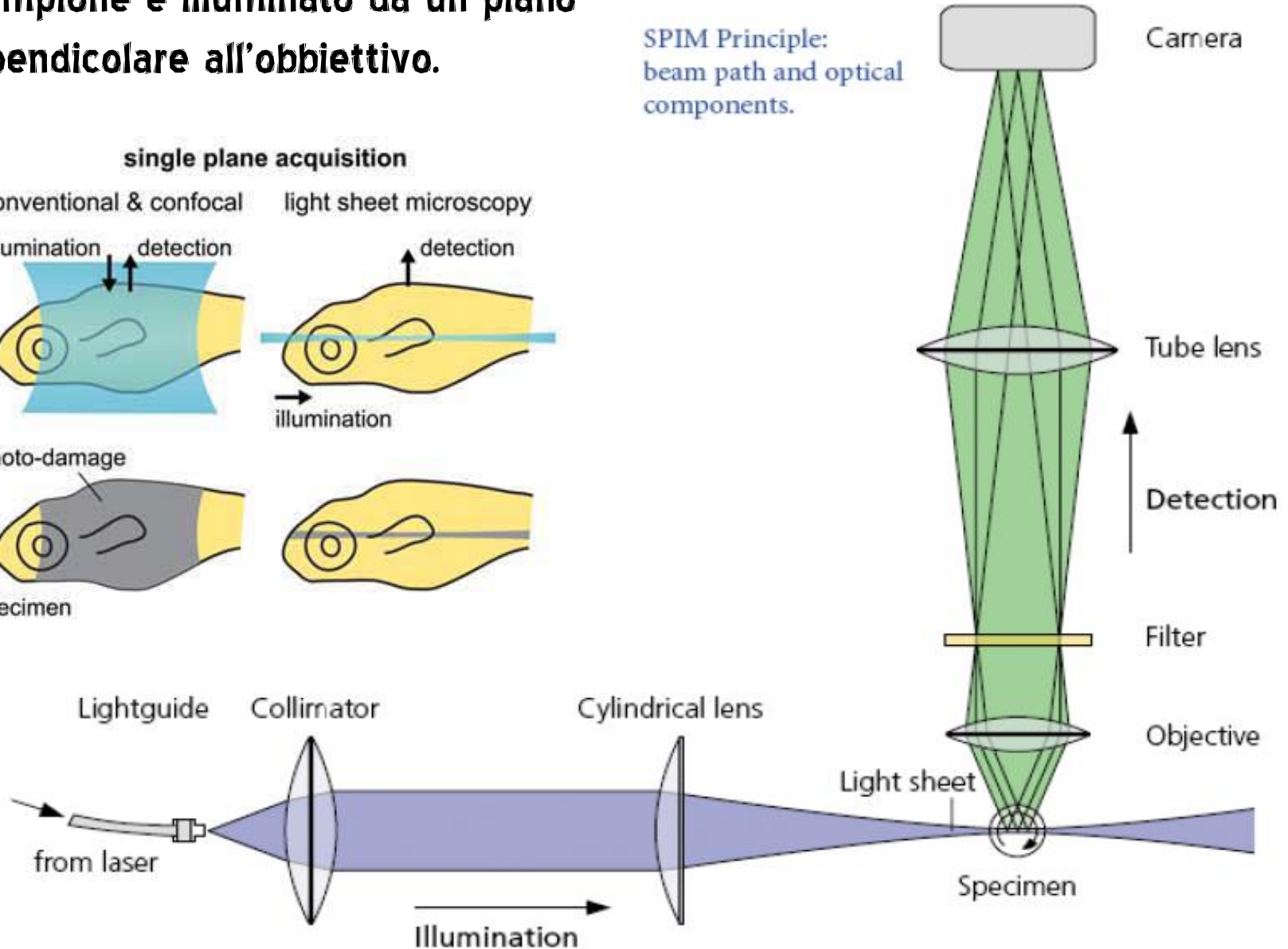
nature12107-sv4.mov

Selective plane illumination microscopy (SPIM)

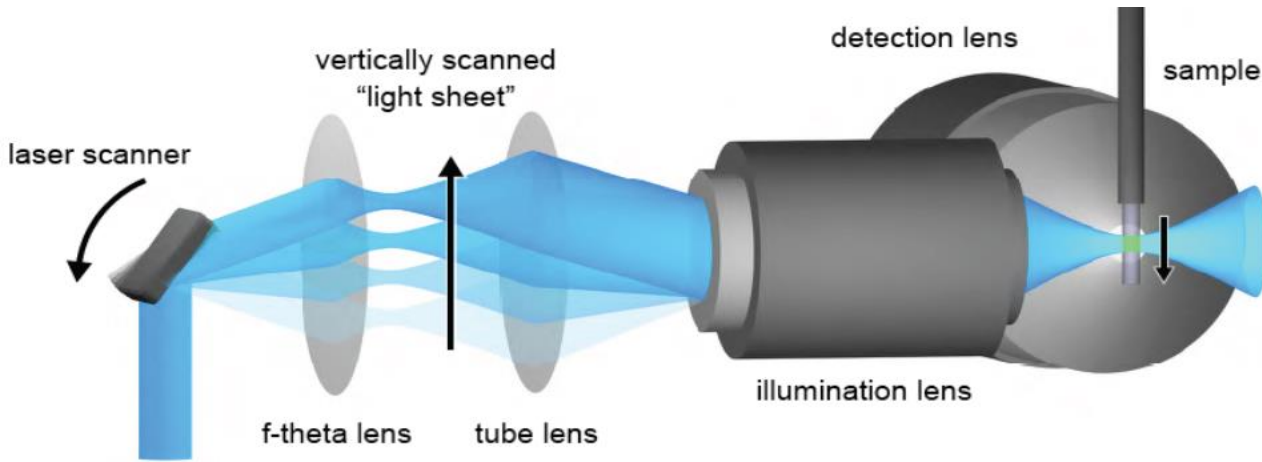
Il campione è illuminato da un piano perpendicolare all'obbiettivo.



SPIM Principle:
beam path and optical components.



Scanning SPIM (DLSM)



Scansione veloce

Minime photobleaching e phototoxicity

Perfetto per il live imaging

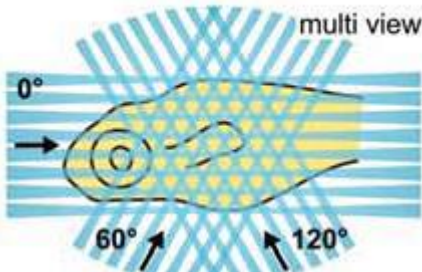
volumetric data acquisition

light sheet microscopy

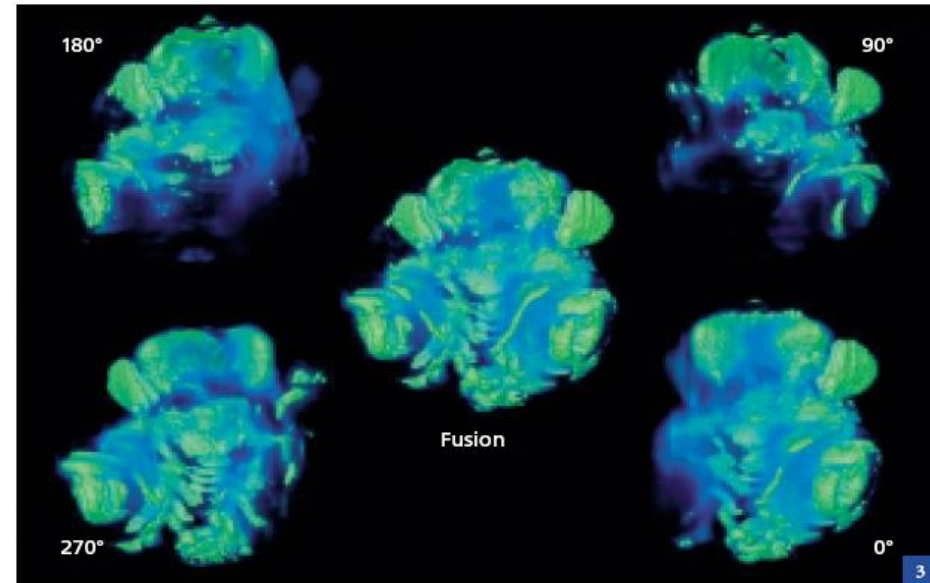
single view



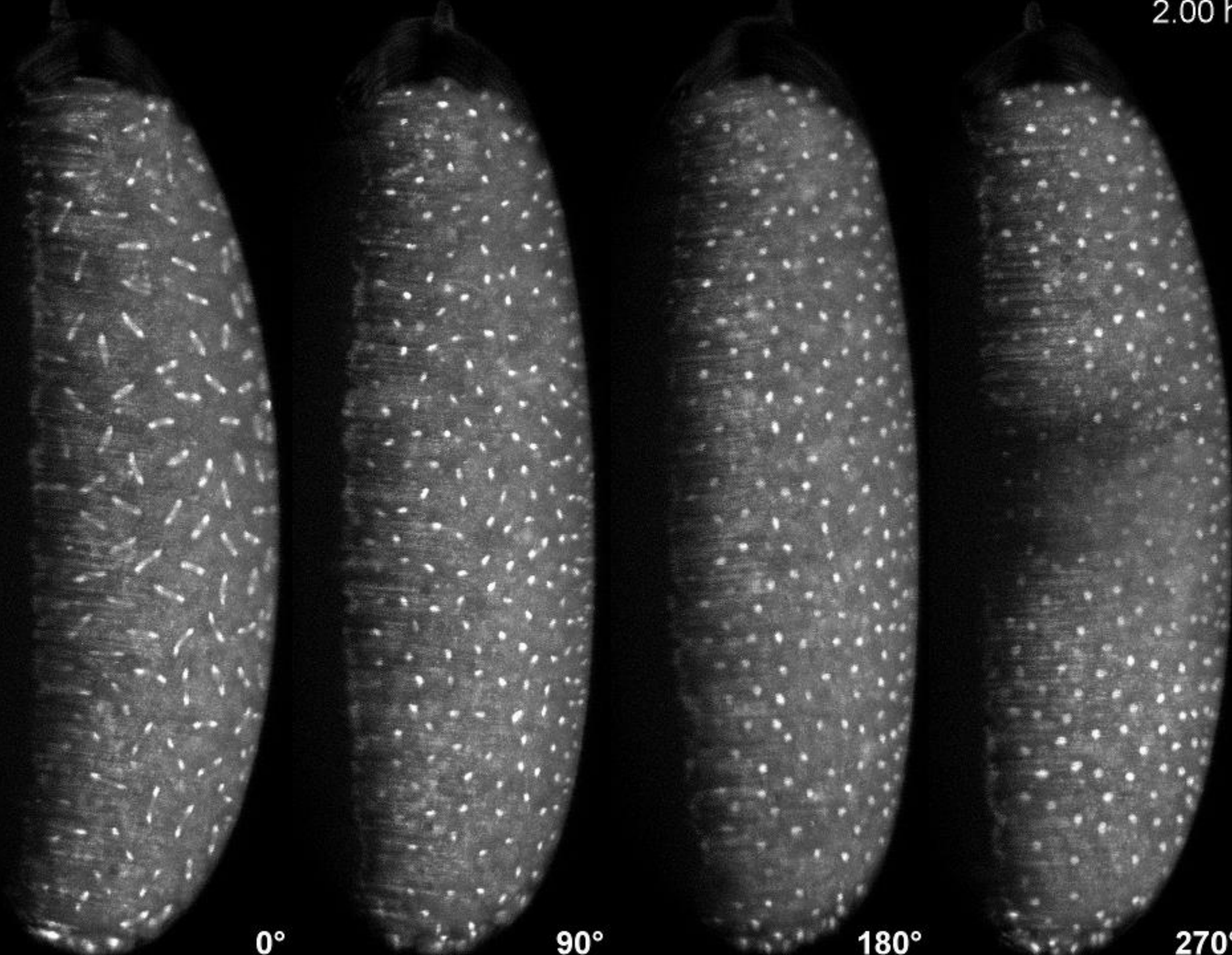
multi view



Il campione può essere ruotato. Acquisizioni multiple a diversi angoli aumentano la risoluzione in profondità



2.00 h



0°

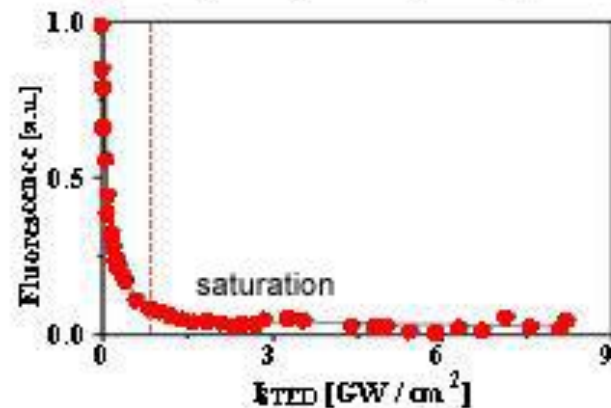
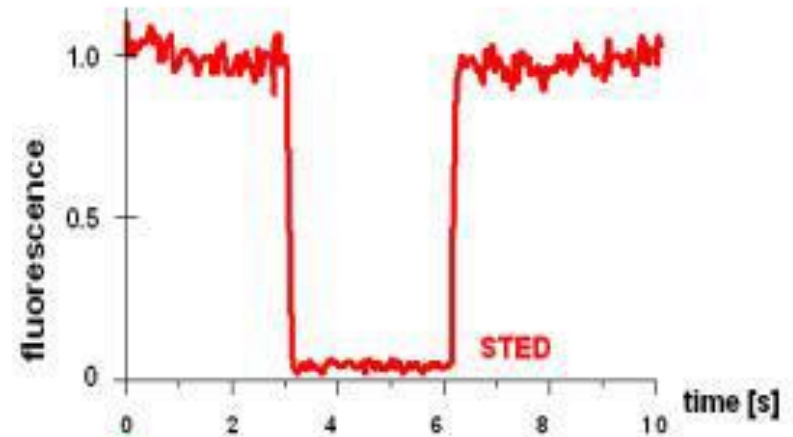
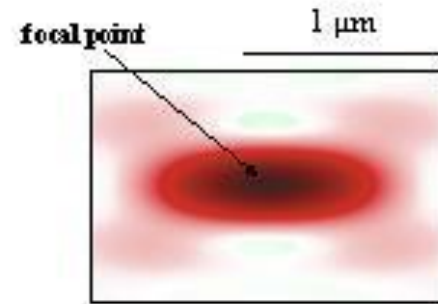
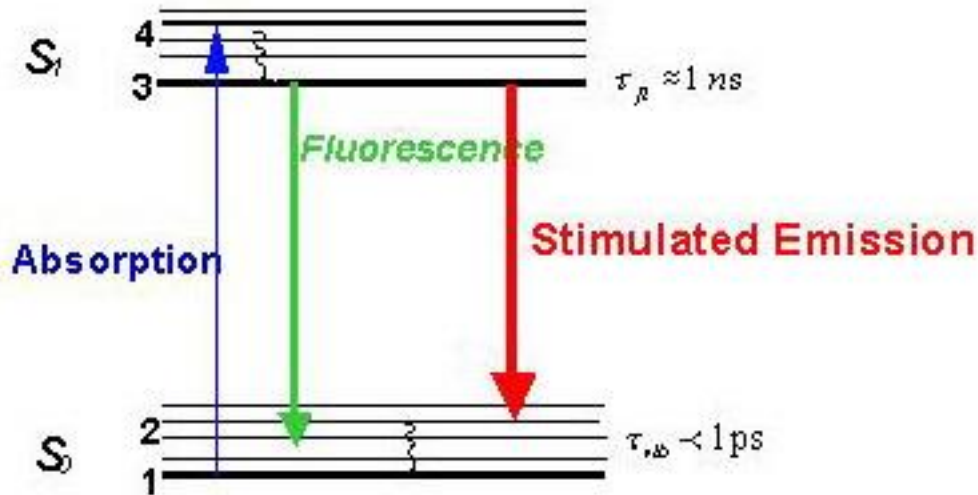
90°

180°

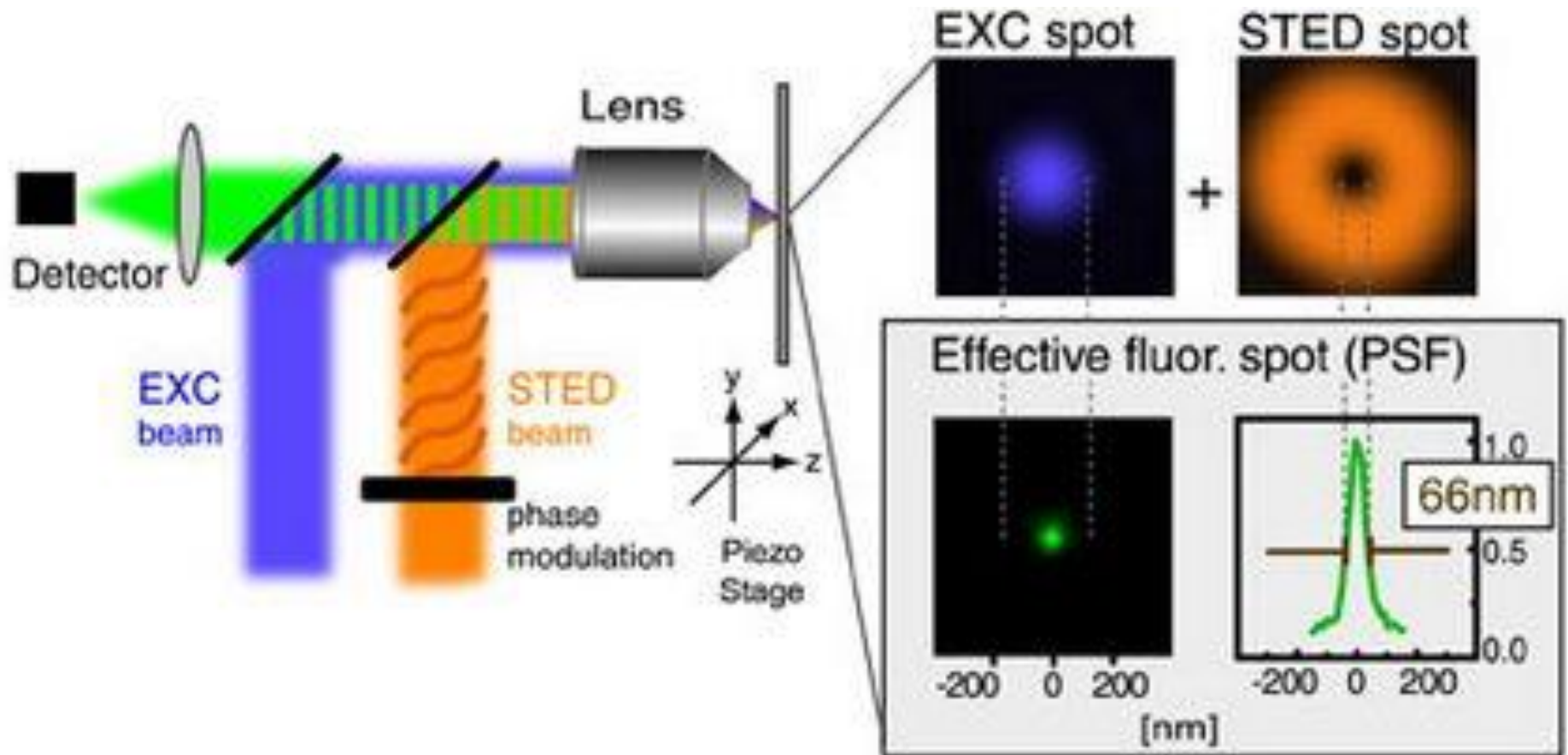
270°

Stimulated emission depletion (STED) microscopy

Super resolution microscopy, al di sotto dell limite di ABBE



Typical setup

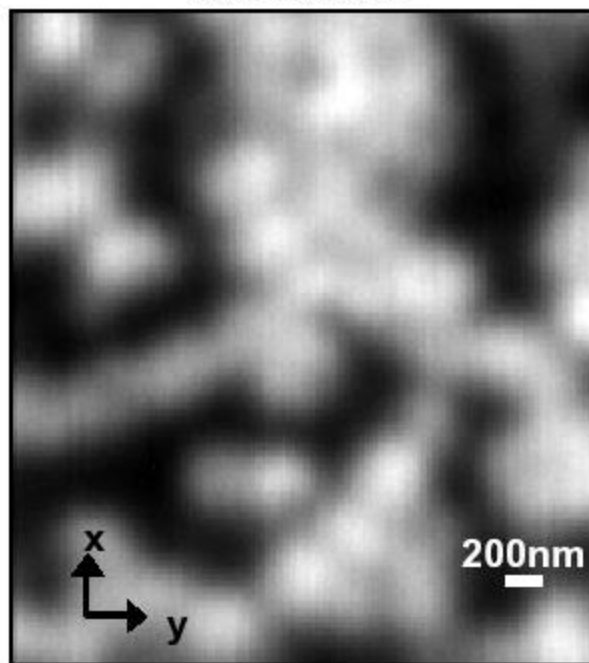


$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I/I_{sat}}}$$

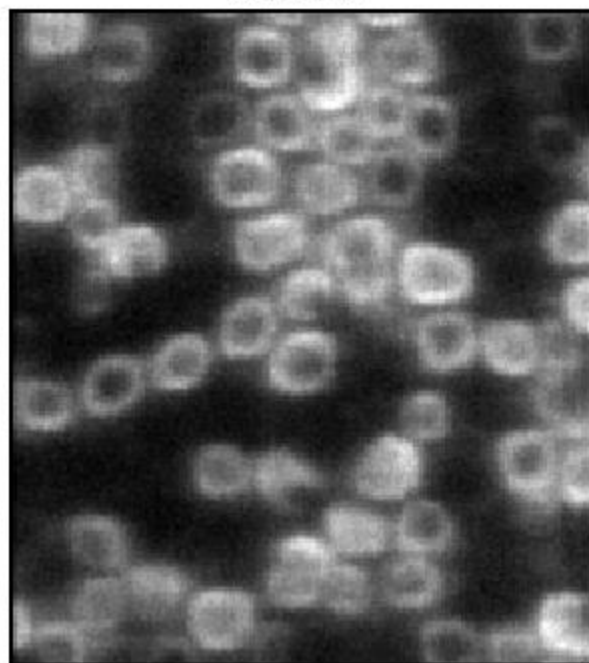
Confocal

STED

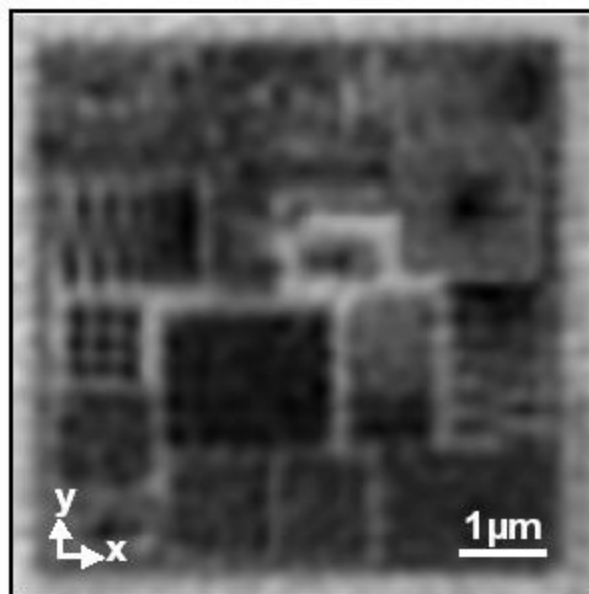
(a)



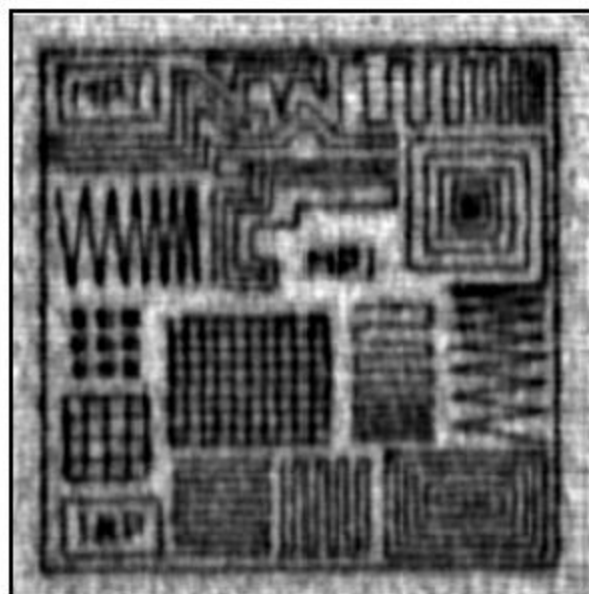
(b)



(c)



(d)



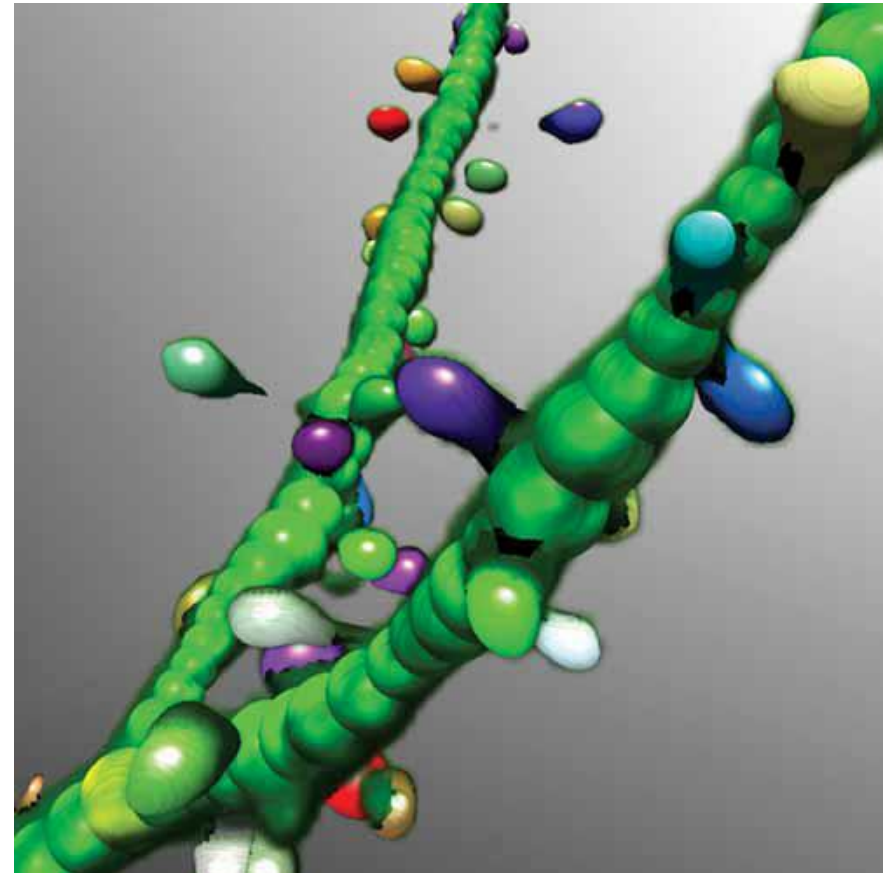
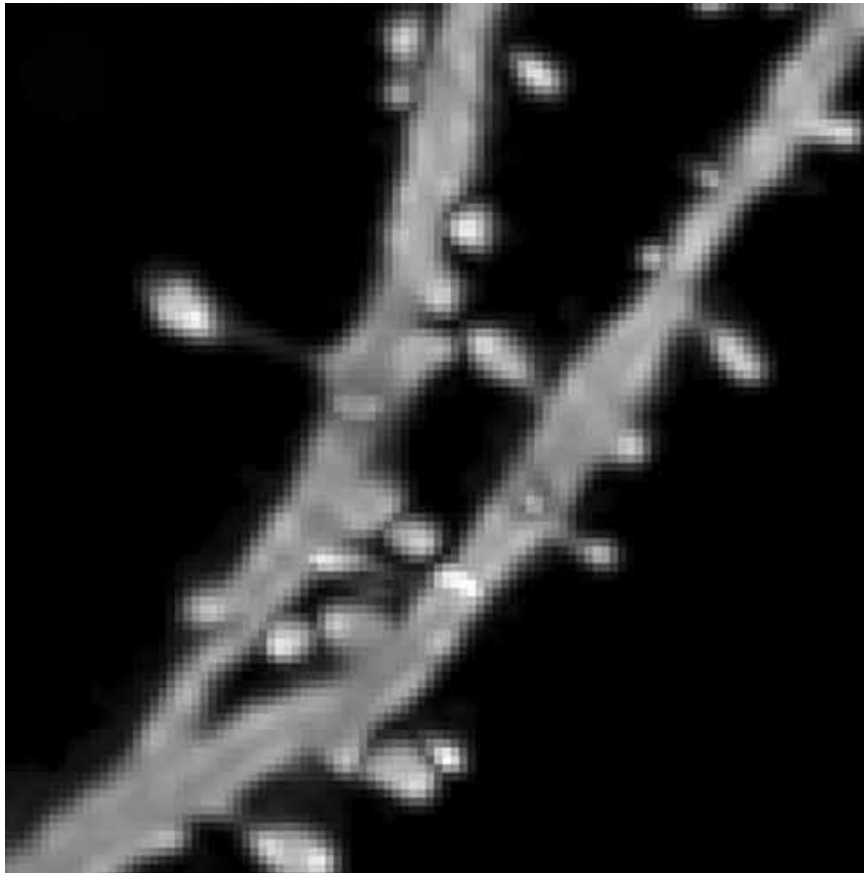
SEGMENTATION

IS THE PROCESS OF PARTITIONING
A DIGITAL IMAGE INTO MULTIPLE SEGMENTS

La segmentazione serve a riunire insieme di voxel in oggetti

Thresholding
Edge Detection
Region Growing
Pattern Recognition
Watershed Transform

.....



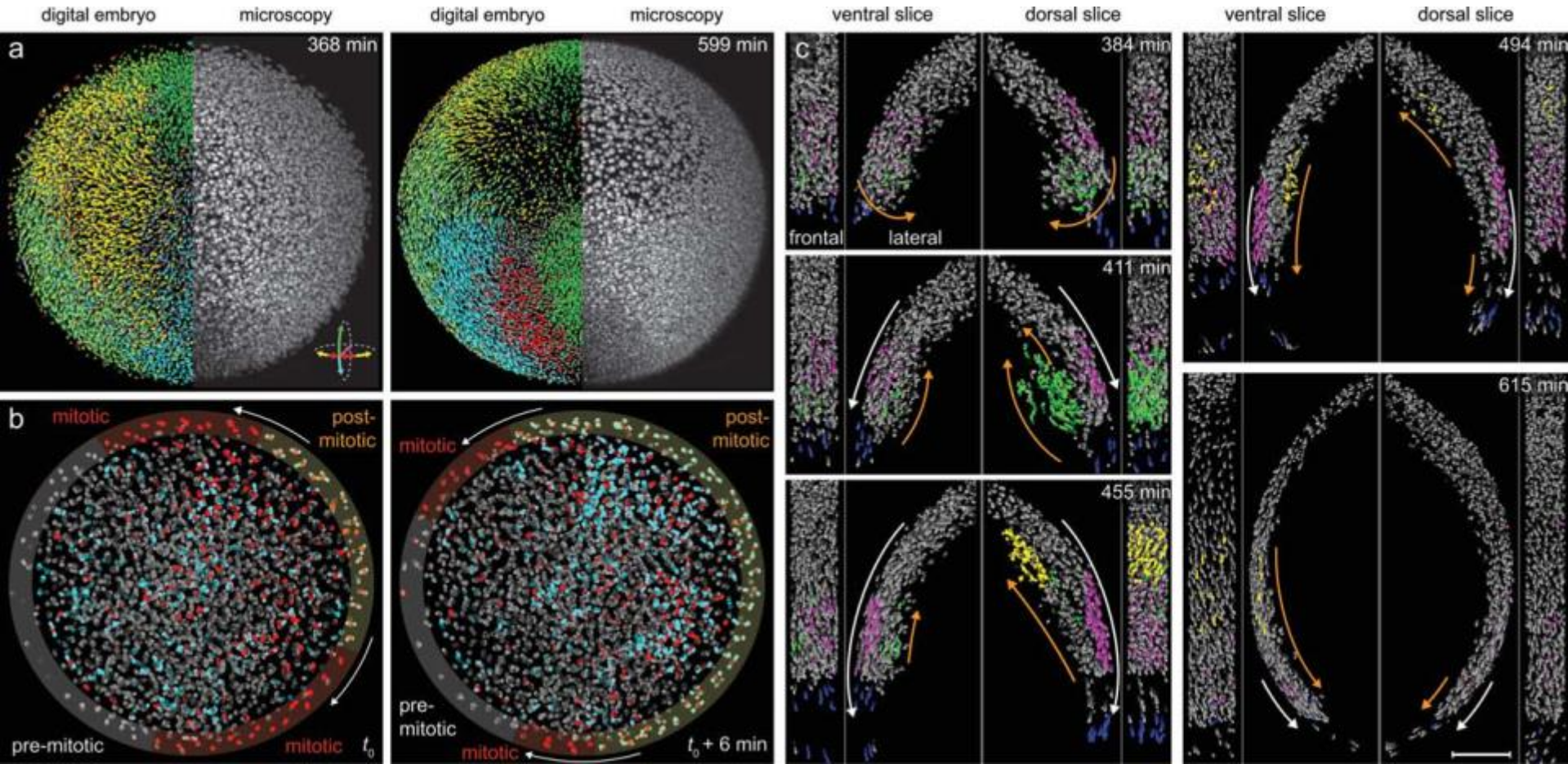
Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy



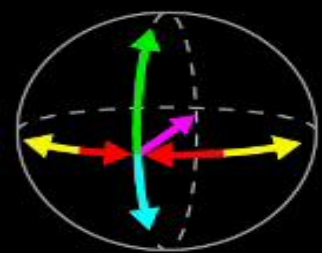
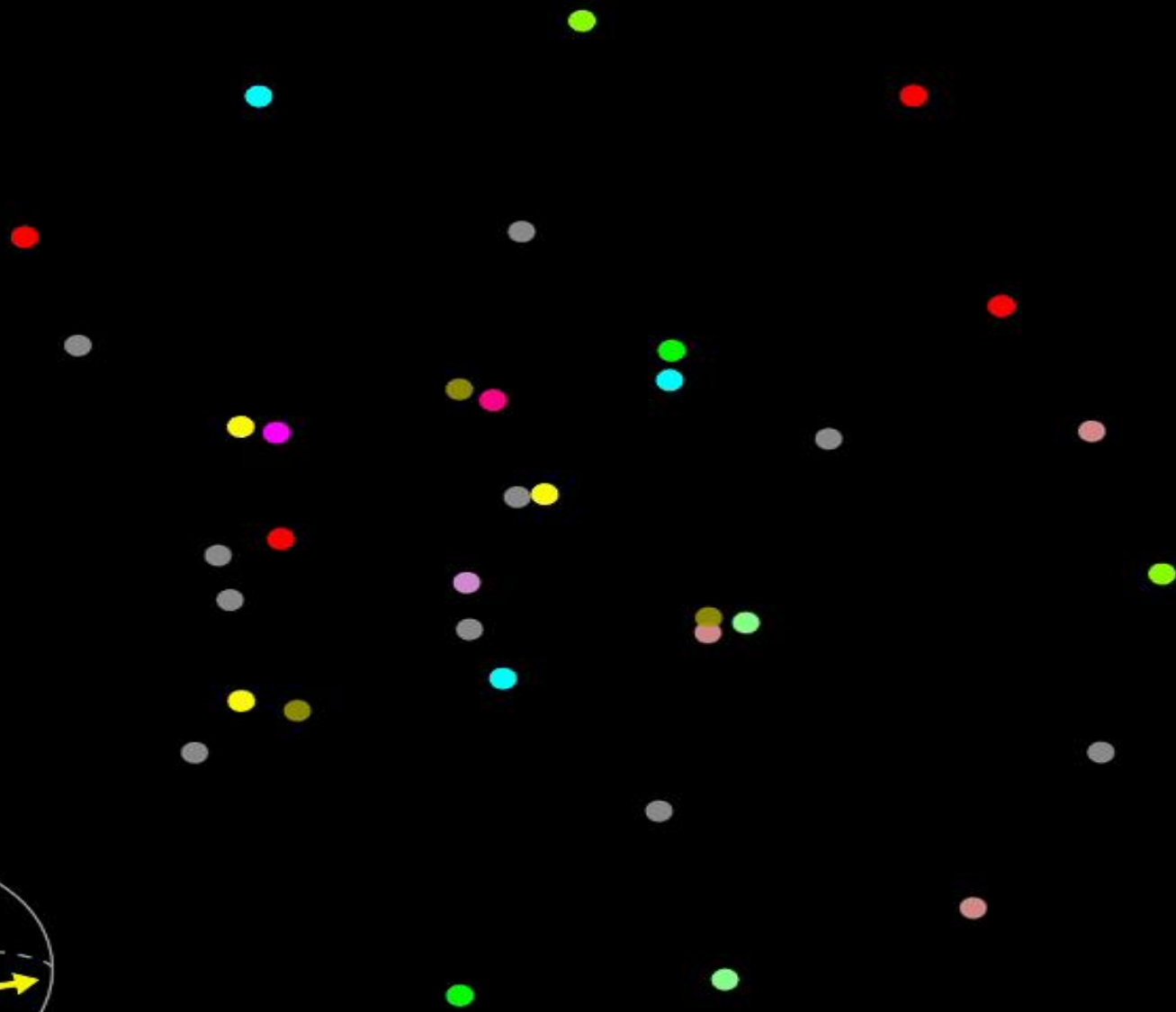
[HTTP://WWW.EMBL.DE/DIGITALEMBRYO/FISH.HTML](http://www.embl.de/digitalembryo/fish.html)

The entire data set consists of 1,226 time points, recorded in 90 s intervals. At each time point, 370 images with 2048 x 2048 pixels each were recorded with a z-spacing of 2.96 μm . The entire data set comprises

453,620 images (3.5 TBytes)

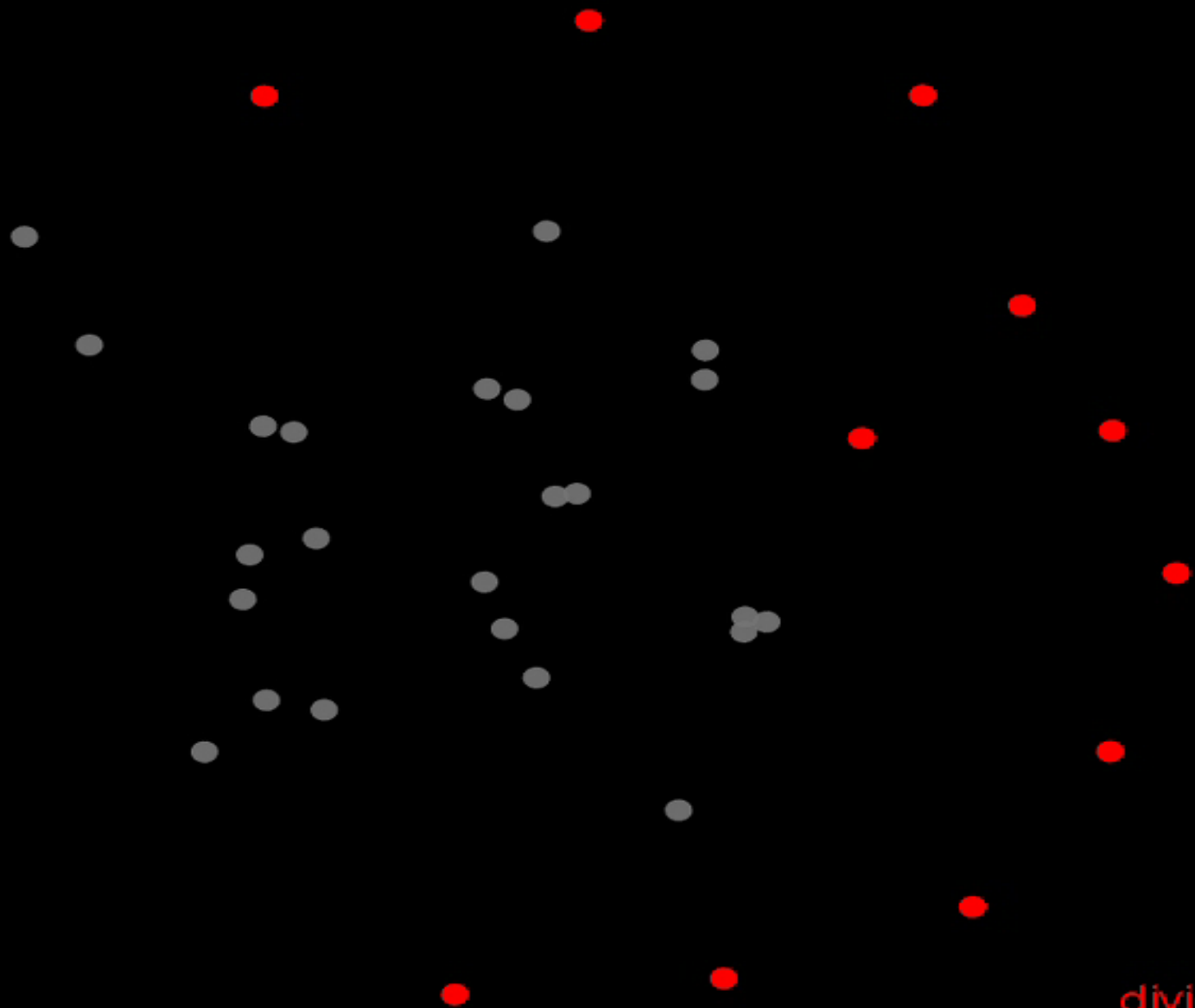


100 min



100 min

cycle 6



dividing cells
daughter cells