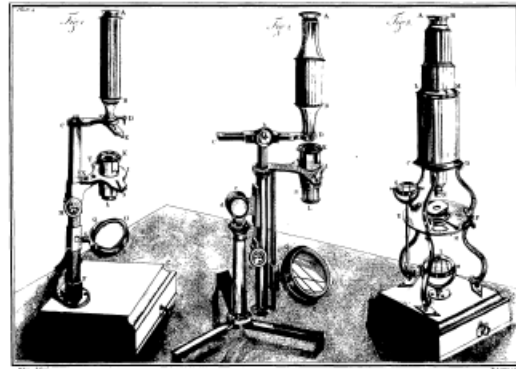


BMS 524 - “Giới thiệu kính hiển vi đồng tụ và phân tích ảnh”



**Thế hệ sau của kính hiển vi đồng tụ
kỹ thuật ghi ảnh ba chiều hiện đại**

Theo yêu cầu của khách hàng, trong một năm qua, chúng tôi đã dịch qua 16 môn học, 34 cuốn sách, 43 bài báo, 5 sổ tay (chưa tính các tài liệu từ năm 2010 trở về trước) Xem ở đây

**DỊCH VỤ
DỊCH
TIẾNG
ANH
CHUYÊN
NGÀNH
NHANH
NHẤT VÀ
CHÍNH
XÁC
NHẤT**

Chỉ sau một lần liên lạc, việc dịch được tiến hành

Giá cả: có thể giảm đến 10 nghìn/1 trang

Chất lượng: Tạo dựng niềm tin cho khách hàng bằng công nghệ 1. Bạn thấy được toàn bộ bản dịch; 2. Bạn đánh giá chất lượng. 3. Bạn quyết định thanh toán.

Tài liệu này được dịch sang tiếng việt bởi:

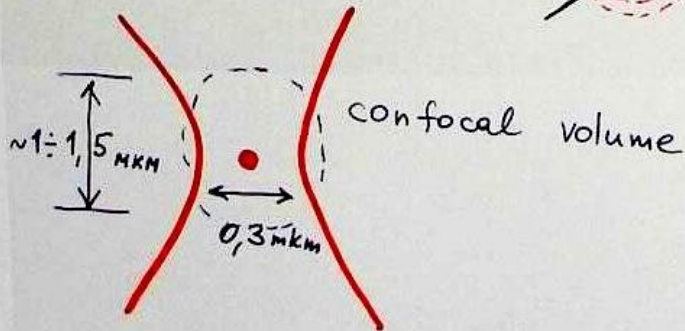
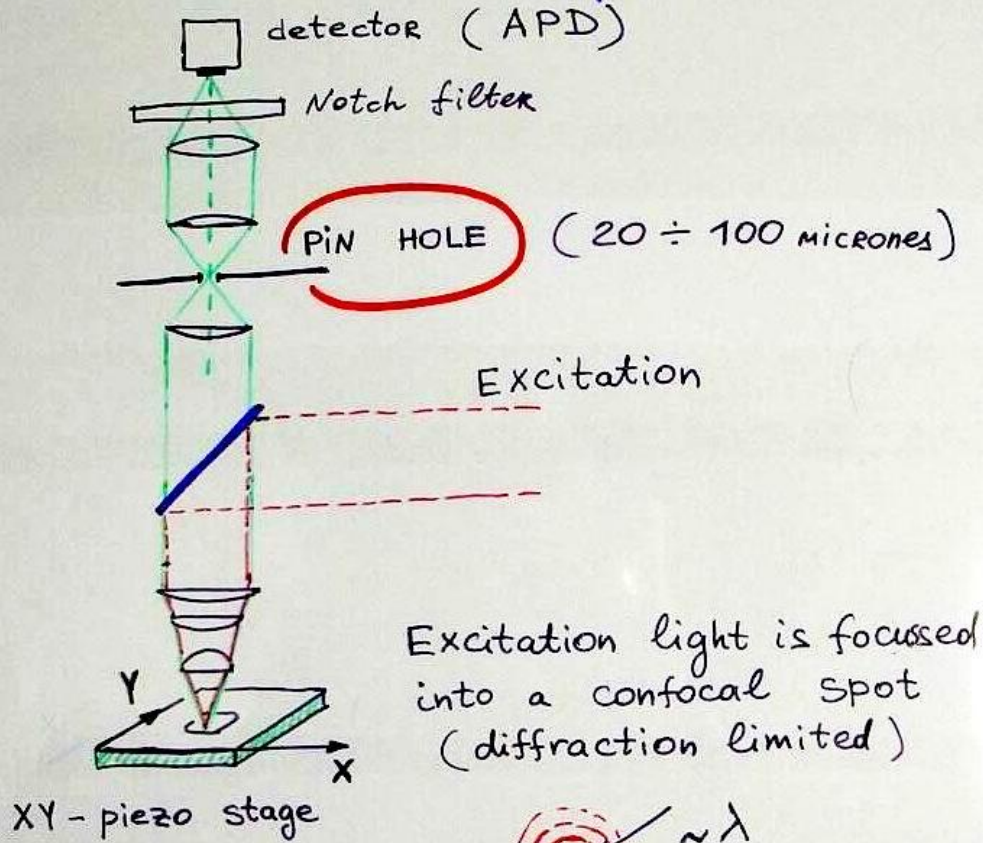
www.mientayvn.com

Các phương pháp 3D dựa trên hiện tượng quang phi tuyến

Các hiện tượng quang phi tuyến không giống với kinh nghiệm hàng ngày của chúng ta!

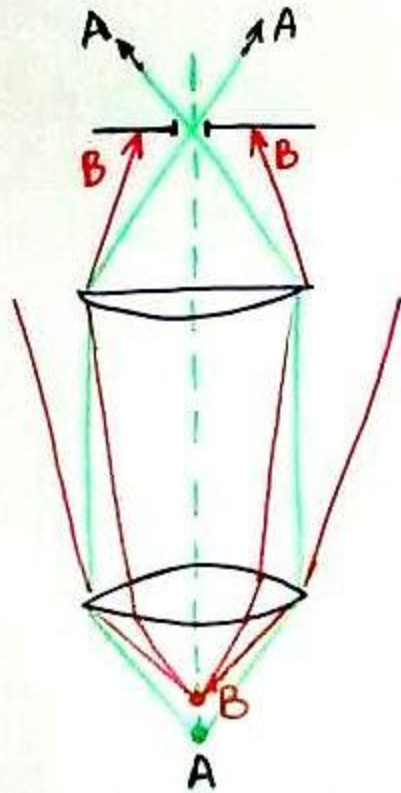
- Trong quang học “cổ điển” tính chất quang học của vật liệu không phụ thuộc cường độ chiếu sáng.
- Nếu cường độ chiếu sáng đủ mạnh, tính chất quang học phụ thuộc vào đặc tính của ánh sáng!
 - Một số kỹ thuật kính hiển vi 3D dựa vào các hiện tượng quang phi tuyến
 - Kính hiển vi 2-photon và đa photon
 - Kính hiển vi sóng hài bậc cao (SGH, TTH)
 - Kính hiển vi tán xạ Raman phản Stokes kết hợp (CARS)

Confocal microscope



How the Pin Hole Works

(SM6)



Fluorescence from the confocal volume is passing

All other light is blocked!

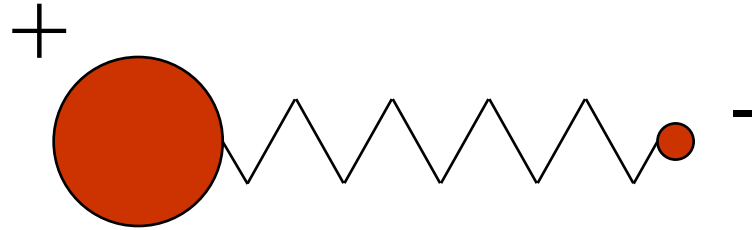
B is out of focuse.

A is in focuse

3D - imaging

Phân cực tuyến tính

Kéo căng cũng là lực
-Robert Hooke



$$m \left[\underbrace{\frac{d^2 x}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx}{dt} + \Omega^2 x}_{\text{Số hạng điều hòa}} - \underbrace{(\xi^{(2)} x^2 + \xi^{(3)} x^3 + \dots)}_{\text{Số hạng phi điều hòa}} \right] = -eE(t)$$

Số hạng điều hòa

Số hạng phi điều hòa

$$P = \frac{1}{2} \varepsilon_0 \chi E_0 \exp(-i\omega t) + c.c., \quad \text{where}$$

$$\chi = \frac{Ne^2}{\varepsilon_0 m} \frac{1}{\Omega^2 - 2i\Gamma\omega - \omega^2}$$

Vị trí của electron thay đổi theo điện trường $E(t)$

P – độ phân cực vĩ mô. Đặc trưng cho đáp ứng của sự phân bố mật độ electron với trường tĩnh điện.

Nguồn gốc của sự phi tuyến quang học

$$m \left[\frac{d^2 x}{dt^2} + 2\Gamma \frac{dx}{dt} + \Omega^2 x - (\xi^{(2)} x^2 + \xi^{(3)} x^3 + \dots) \right] = -eE(t)$$

- Khi kể đến các số hạng phi điều hòa, không còn nghiệm chính xác của phương trình chuyển động.
- Chúng ta có thể tính gần đúng nghiệm bằng cách biểu diễn x dưới dạng chuỗi lũy thừa của E . Tương tự chúng ta có thể khai triển P :

$$P = \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \chi^{(4)} E^4 \dots)$$

Một số ví dụ về các hiện tượng quang phi tuyến

- Quá trình bậc nhất (tuyến tính): hấp thụ và phản xạ
- Quá trình bậc hai: SHG, hiệu ứng Pockels
- Quá trình bậc ba: hấp thụ 2 photon, hiệu ứng Kerr, CARS
- Bậc $2m-1$: hấp thụ m photon

(MPE) Kích thích đa photon (hai photon) là gì?

- Là một quá trình phi tuyến, xảy ra với tỷ lệ cường độ quang học cao.
- Sự hấp thụ hai photon còn xảy ra khi năng lượng của một photon nhỏ hơn năng lượng của vùng cấm nhưng các ion vẫn có thể chuyển lên mức kích thích do hấp thụ hai photon đồng thời.

Lịch sử của kính hiển vi 2 photon

VOLUME 7, NUMBER 6

PHYSICAL REVIEW LETTERS

SEPTEMBER 15, 1961

TWO-PHOTON EXCITATION IN $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$

W. Kaiser and C. G. B. Garret
Bell Telephone Laboratories, Murray Hill, New Jersey
(Received August 28, 1961)

With the development of optical masers,¹⁻³ it is now possible to study two-photon processes which necessitate intense sources of monochromatic radiation. We have investigated the generation of blue fluorescent light around $\lambda_b = 4250 \text{ \AA}$ by illuminating $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ crystals with red light, $\lambda_r = 6943 \text{ \AA}$, of a ruby optical maser.² Our experiments differ from the recent investigations by Franken et al.⁴ who observed the generation of

responding to the diameter of the incident light beam. When pure CaF_2 was illuminated by the optical maser in the same way, no light with $\lambda < \lambda_r$ was observed on the photographic plate. This observation is expected from the high symmetry of the CaF_2 lattice.

In a second experiment, the light beam leaving the quartz spectrometer was intersected by two mirrors in such a way that the red and blue parts

- Kỹ thuật quang phổ hai photon, được phát triển vào năm '60 do W. Kaiser và C.G.B. Garret dựa trên các khái niệm cơ học lượng tử phổ biến được trình diễn lần đầu bởi M. Göppert-Mayer vào năm 1931 (Göppert-Mayer M: Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 1931, 9:273-295.)

Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990 Apr 6;248(4951):73-6.

Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy

WINFRIED DENK,* JAMES H. STRICKLER, WATT W. WEBB

Molecular excitation by the simultaneous absorption of two photons provides intrinsic three-dimensional resolution in laser scanning fluorescence microscopy. The excitation of fluorophores having single-photon absorption in the ultraviolet with a stream of strongly focused subpicosecond pulses of red laser light has made possible fluorescence images of living cells and other microscopic objects. The fluorescence emission increased quadratically with the excitation intensity so that fluorescence and photobleaching were confined to the vicinity of the focal plane as expected for cooperative two-photon excitation. This technique also provides unprecedented capabilities for three-dimensional, spatially resolved photochemistry, particularly photolytic release of caged effector molecules.

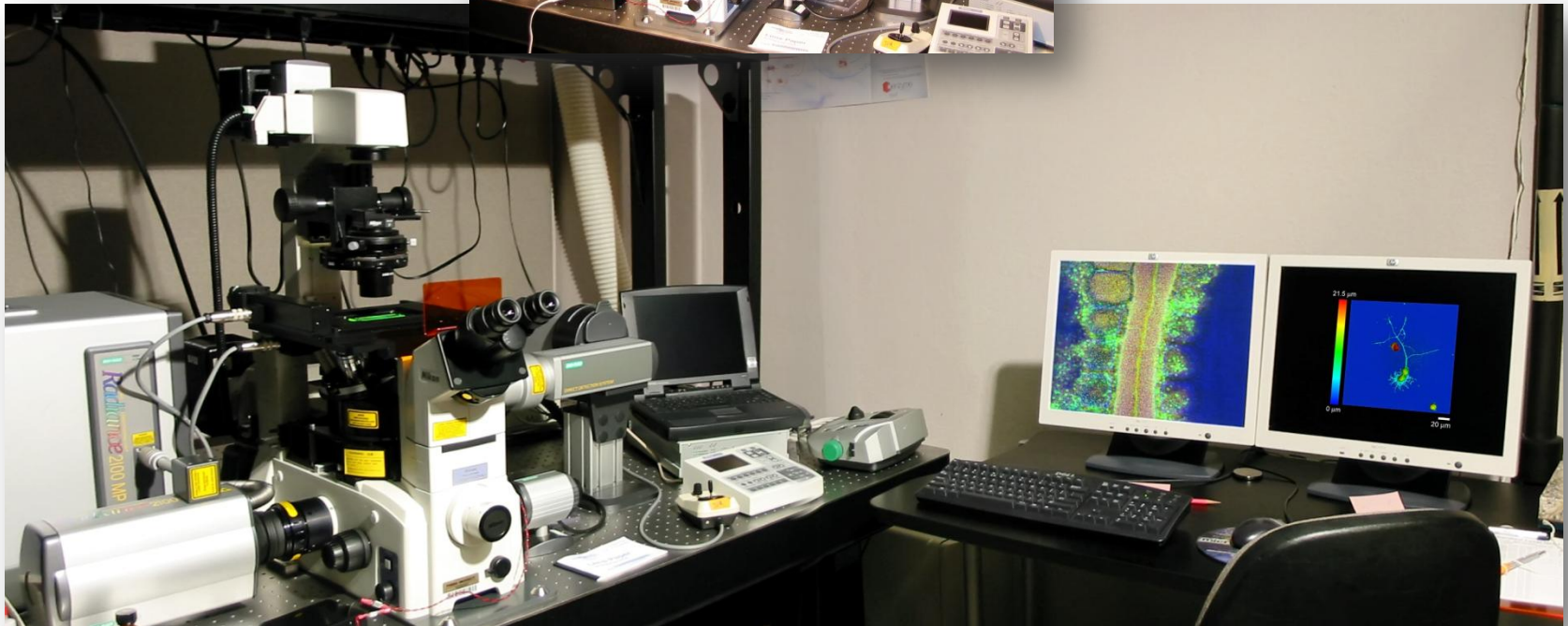
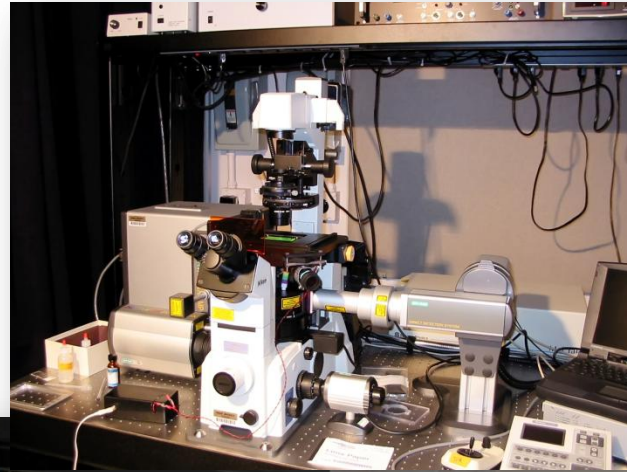
WE REPORT THE APPLICATION OF two-photon excitation of fluorescence (1) to laser scanning microscopy (LSM) (2). In LSM, the laser is focused to a diffraction-limited beam waist $< 1 \mu\text{m}$ in diameter and is raster-scanned

absorption and emission wavelengths (4, 5). Anticipated photodamage to living cells and the limitations of UV lasers have also inhibited this approach.

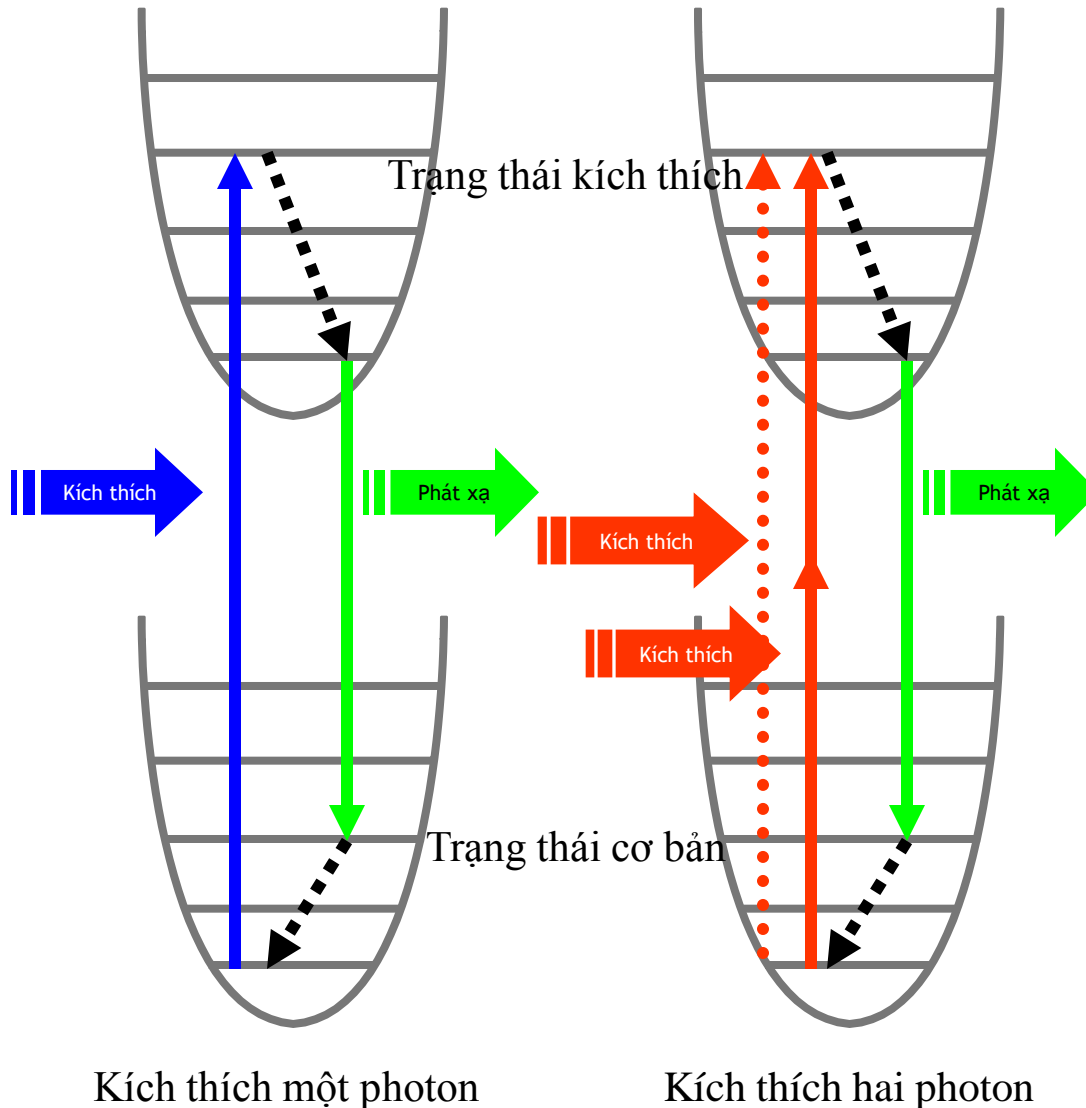
Two-photon molecular excitation (1, 6) is made possible by the very high local instan-

- 1978: C.J.R. Sheppard và T. Wilson đã khẳng định rằng hiện tượng hai photon có thể được sử dụng trong kính hiển vi quét
- 1990: W. Denk, J. Stricker và W.W. Webb đã trình diễn kính hiển vi huỳnh quang quét laser hai photon. Kỹ thuật này được cấp bằng sáng chế vào năm 1991 cho nhóm Cornell

Radiance 2100MP tại PUCL

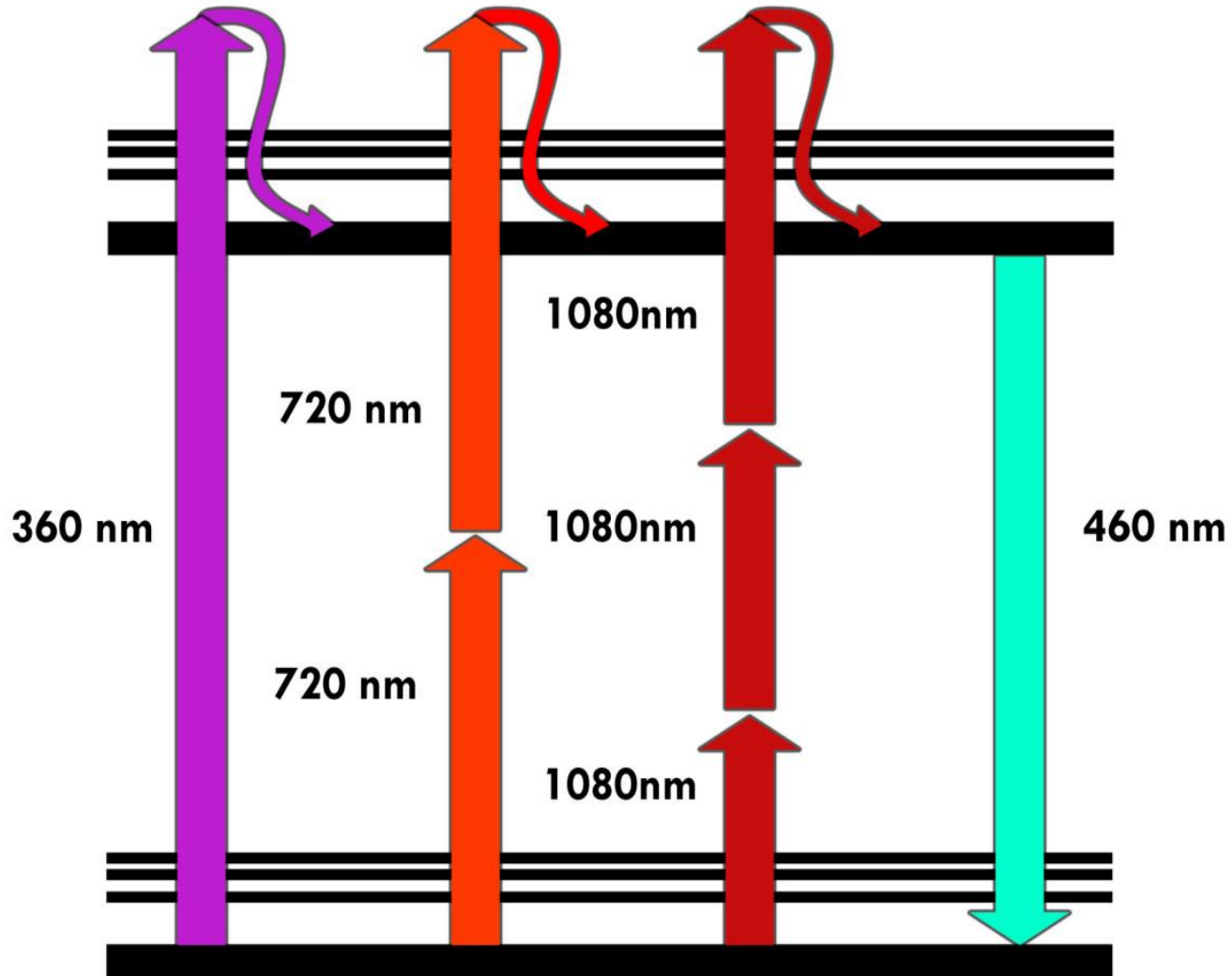


Kích thích 2 photon



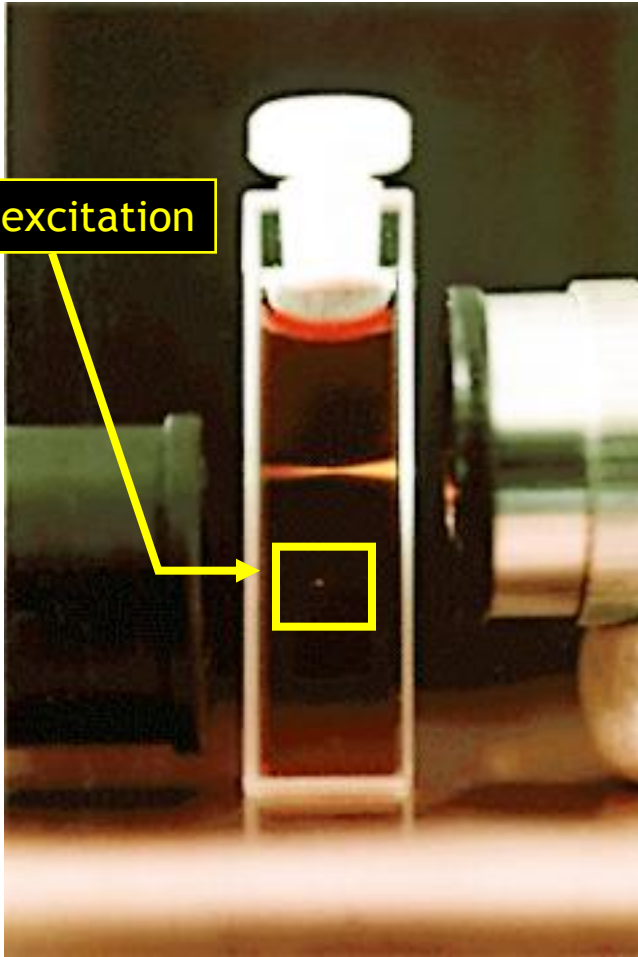
- Kích thích hai photon xuất hiện qua sự hấp phụ hai photon năng lượng thấp qua các trạng thái trung gian có thời gian sống ngắn.
- Sau mỗi quá trình kích thích, sự huỳnh quang phục hồi đến mức năng lượng thấp nhất của các trạng thái điện tử được kích thích đầu tiên qua các quá trình dao động.
- Các quá trình phát huỳnh quang tiếp theo cho cả hai mode phục hồi sẽ giống nhau..

Từ 2 photon đến đa photon...



Minh họa sự khác nhau giữa kích thích một và hai photon

2·hv excitation



Cuvette được đổ dung dịch thuốc nhuộm vào, safranin O, đòi hỏi kích thích bằng ánh sáng màu xanh. Laser He-Ne phát ánh sáng xanh liên tục (543 nm) được hội tụ vào trong cuvette bởi thấu kính. Chúng cho ta thấy một hình nón liên tục, sáng nhất ở gần tiêu cự và tắt dần về phía bên trái. Thấu kính ở góc trái hội tụ chùm tia không nhìn thấy ở vùng hồng ngoại (1046 nm) từ một laser yttrium lanthanum fluoride pha tạp Nd vào cuvette. Do đó quá trình hấp thụ hai photon xảy ra và quá trình này được giám hãm trong một vết sáng nhỏ ở giữa của cuvette.

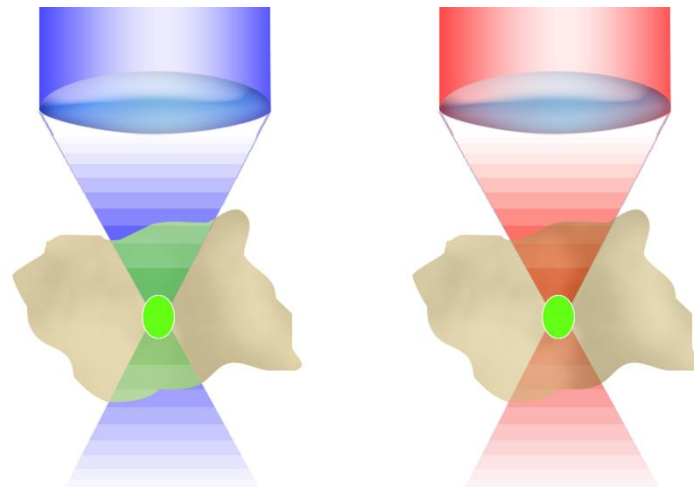
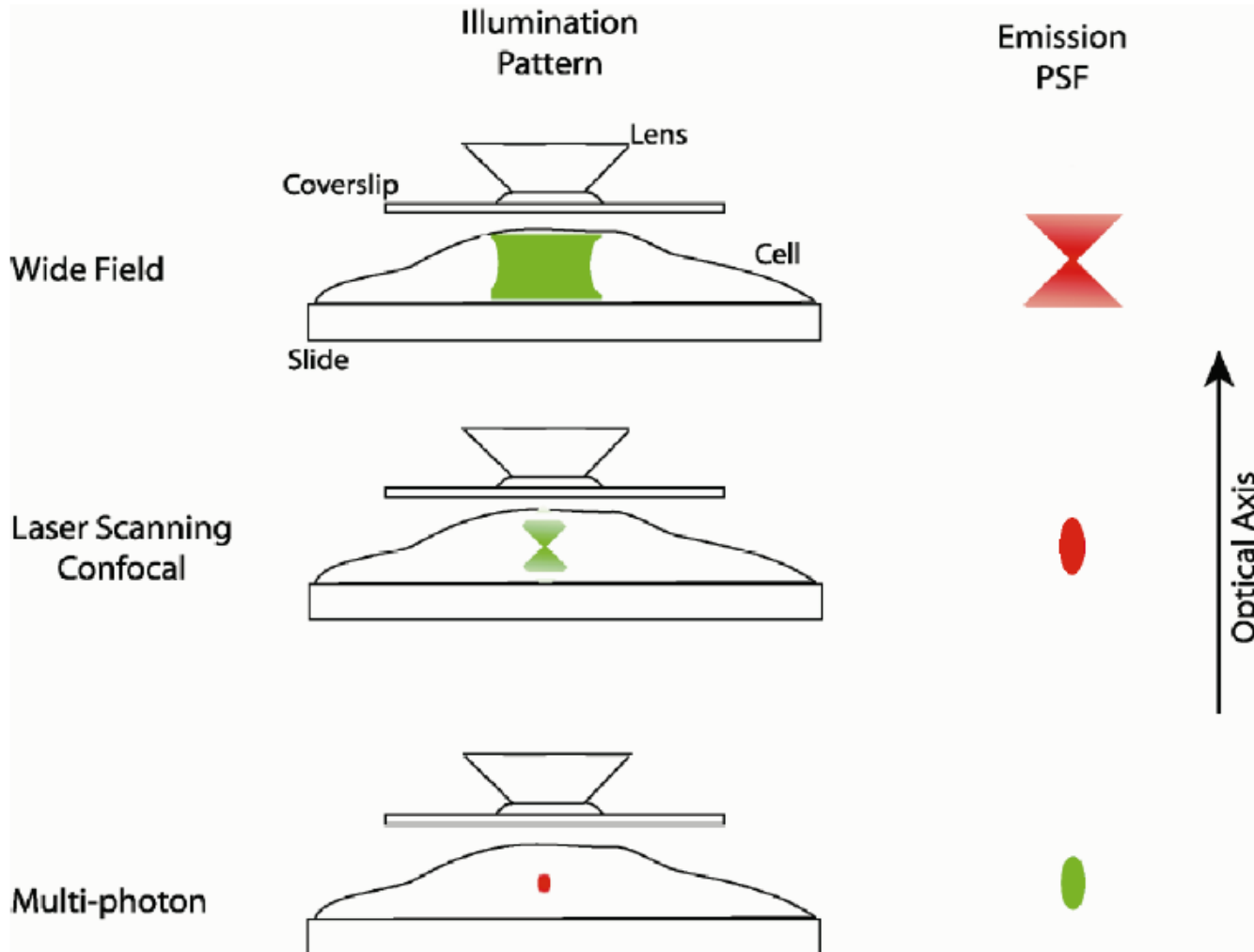


Image source: Current Protocols in Cytometry Online
Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Slide credit: Brad Amos, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom

Trường rộng, sự đồng tiêu và hai photon



Drawing by P. D. Andrews, I. S. Harper and J. R. Swedlow

One and Two-photon absorption cross sections

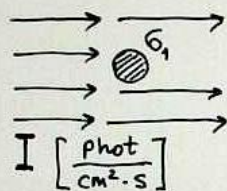
Transition dipole moment moment

Estimation of σ_2

(WB)

One-photon excitation:

2PM

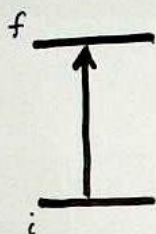


σ_1 - absorption cross-section
 "Area" of the molecule, $[\text{cm}^2]$
 How light "feels" it.

Excitation rate $[\text{s}^{-1}]$

$$K_{1ex} = \sigma_1 \cdot I$$

$$\sigma \sim 10^{-16} \text{ cm}^2$$

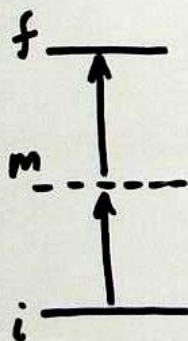


two-photon excitation:

two photons should interact with the molecule at the same time.

σ_2 - cross-section of 2-ph absorption
 Excitation rate $\sim I^2$

Maria
 Göppert-Mayer
 1929



$$K_{2ex} = \sigma_2 I^2$$

Units: $[s^{-1}]$ for K_{2ex} , $[\text{cm}^4 \cdot \text{s}]$ for σ_2 , and $[\frac{1}{\text{cm}^4 \cdot \text{s}^2}]$ for I^2 .

Typical values of σ_{2p}

$$10^{-48} \div 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} = 100 \div 1 \text{ GM}$$

for Rhodamine 6G

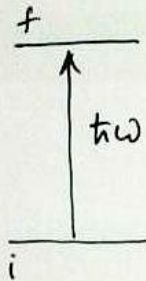
$$\sigma_{2p} \cdot \Phi = 40 \text{ GM at } \lambda_{ex} = 830 \text{ nm}$$

↑
fluorescence yield

One-photon abs:

(2P2)

$$\sigma_{1p} = \text{Const.} \cdot \left| \langle i | \hat{\mu} | f \rangle \right|^2 \omega \cdot \delta(\omega - \omega')$$

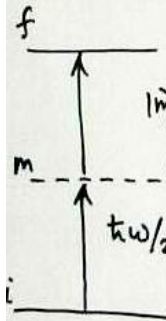


dipole moment operator

Transition dipole moment from i to f

two-photon abs:

Interaction via virtual levels



$$\sigma_{2p} = \sum_m \sigma_{i \rightarrow m \rightarrow f}$$

$$\sigma_{i \rightarrow m \rightarrow f} = \sigma_{im} \cdot \sigma_{mf} \cdot \tau_m$$

(transition dipole moment $i \rightarrow m, m \rightarrow f$)²

↑ lifetime of the virtual state

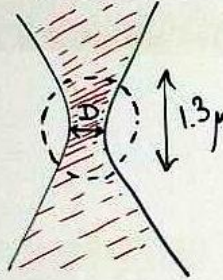
$$\sigma_{2p} \approx \sum_m \sigma_{im} \sigma_{mf} \tau_m$$

$$\sigma_{2p} \propto \sum_m \underbrace{\left| \langle i | \hat{\mu} | m \rangle \right|^2}_{\text{transition dipole moment } i \rightarrow m} \underbrace{\left| \langle m | \hat{\mu} | f \rangle \right|^2}_{\text{transition dipole moment } m \rightarrow f} \tau_m \delta(\omega - \omega')$$

Resolution of 1-photon and 2-photon microscopy

1 photon

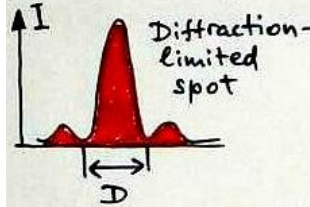
XY: $D \approx \frac{1.22 \lambda}{N.A.}$



Z: Determined by pin hole

$\lambda = 0,5 \mu$; $N.A. = 1.4$

$D = \frac{1.22 \cdot 0,5}{1.4} = 0,43 \mu$

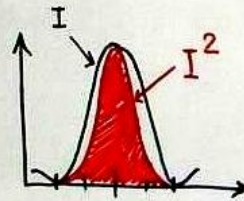


Fluorescence $\sim I$

2 photon

XY: wavelength = $\lambda/2$! D is 2^x larger!

Fluorescence $\sim I^2$



$FWHM_{2P} \approx FWHM_{1P}$

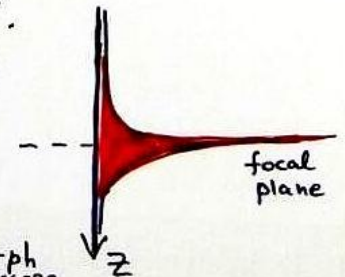
Difference in resolution is less than 2^x .

Z: No pin hole is needed!

Fluorescence $\sim \frac{1}{z^4}$

Z-resolution $\sim 1 \mu$.

\sim Similar resolution for 2-ph and 1-ph microscope



Resolution of 2-photon microscopy

XY, Z,

$1/z^4$ excitation probability dependence
And $1/z^2$ dependence of total fluorescence (WB)

What power is required for 2-photon excitation? (2P4)

Excitation rate for one chromophore

$$K_{2p} = \sigma_{2p} \cdot I^2 \quad - \text{by 2 photons} \quad \left| \quad \underline{\text{CW excitation}} \right.$$

$$K_{1p} = \sigma_{1p} \cdot I \quad - \text{by 1 photon}$$

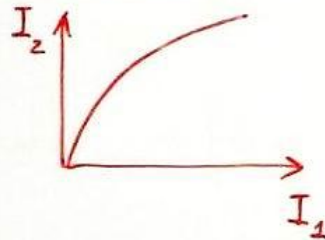
$$K_{2p} = K_{1p}; \quad \sigma_{2p} I_2^2 = \sigma_{1p} I_1$$

$$I_2 = \sqrt{\frac{\sigma_{1p}}{\sigma_{2p}} I_1}$$

$$\sigma_{1p} = 10^{-16} \text{ cm}^2$$

$$\sigma_{2p} = 10^{-49} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}$$

$$I_2 = 3 \cdot 10^{16} \sqrt{I_1}$$



one-photon
fluorescence microscopy

$$\text{Excit. Intensity} \sim \frac{1 \text{ W}}{\text{cm}^2} \quad \div \quad 100 \text{ W/cm}^2$$

$$\text{photon energy} \sim 2 \text{ eV} \approx 3 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

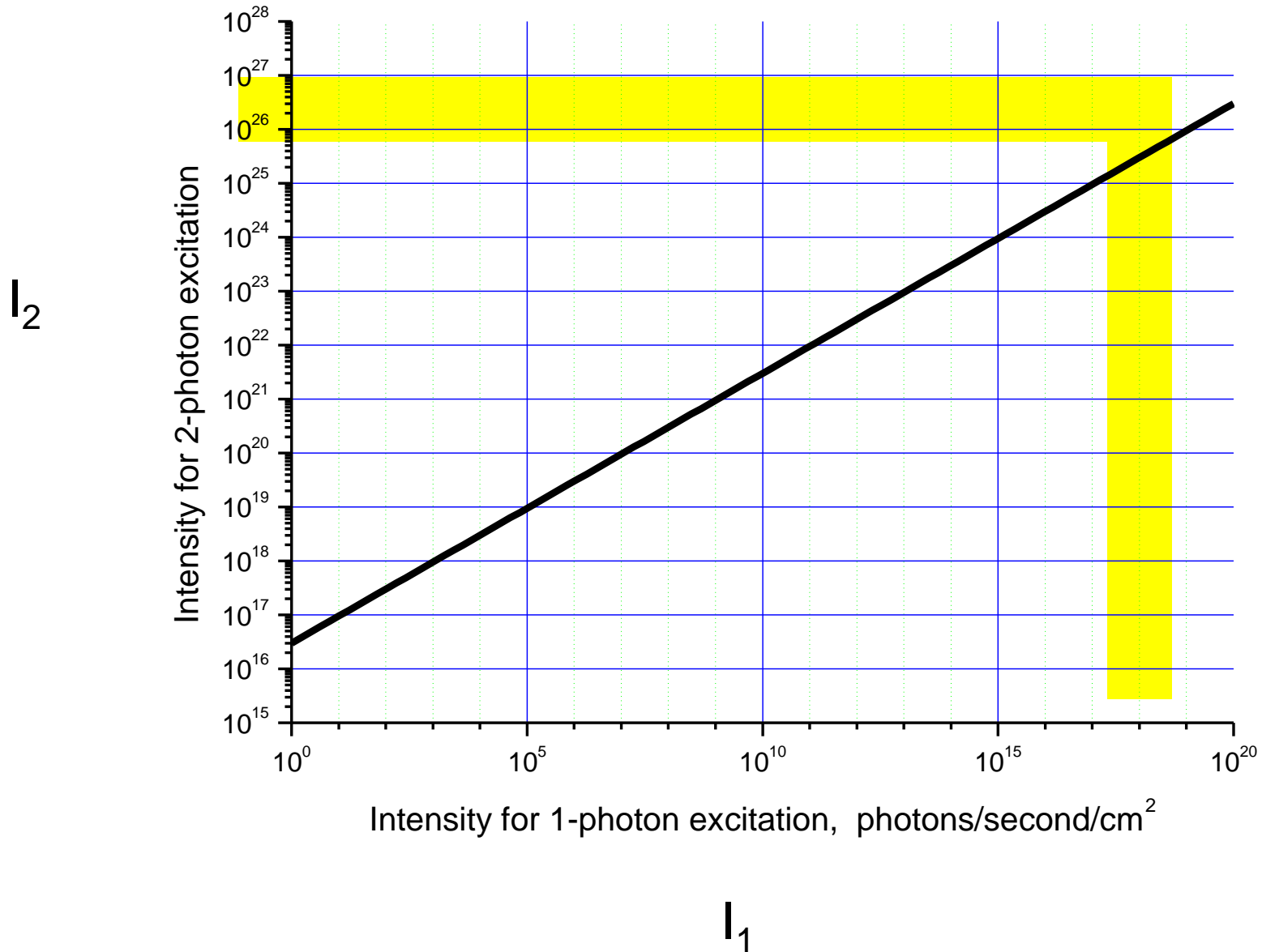
$$I_1 \approx \frac{1 \text{ W/cm}^2}{3 \cdot 10^{-19} \text{ J/phot}} = 3 \cdot 10^{18} \frac{\text{phot}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}} \quad \div \quad 3 \cdot 10^{20} \frac{\text{phot}}{\text{cm}^2 \cdot \text{s}}$$

$$I_2 = \frac{5 \cdot 10^{25}}{5 \cdot 10^{26}}$$

Power should be increased
by 7 - 6 orders of magnitude!

$$k_{1p}(I_1) = k_{2p}(I_2)$$

The same fluorescence signal from the sample



Probability of 2-photon excitation

- Với một laser có công suất trung bình và tần số tương tự, Xác suất kích thích tăng khi tăng NA của một thấu kính hội tụ và giảm với độ rộng của xung laser.
- Sự tăng NA phụ thuộc công suất kích thích được giam cầm trong không gian trong một thể tích tiêu cự nhỏ hơn.

$$n_a \propto \frac{\delta_2 P_{av}^2}{\tau_p f_p^2} \left(\frac{NA^2}{2\hbar c \lambda} \right)^2$$

where:

n_a - probability

τ_p - pulse duration

f_p - repetition rate

δ_2 - 2p cross-section

P_{av} - average power of the beam

λ - wavelength

Độ phân giải của các hệ 2 photon

Sử dụng NA cao với pháp gần đúng gần trục để ước tính sự chiếu sáng, cường độ của hệ 2 photon, độ rộng toàn phần của cạnh và trục tại nửa cực đại của vết kích thích hai photon có thể tính toán:

$$r_0 = \begin{cases} \frac{0.32 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot \text{NA}} & \text{NA} \leq 0.7 \\ \frac{0.325 \cdot \lambda}{\sqrt{2} \cdot \text{NA}^{0.91}} & \text{NA} > 0.7 \end{cases} \quad z_0 = \frac{0.532\lambda}{\sqrt{2}} \left[\frac{1}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}} \right]$$

Sự kích thích hai photon là sự kích thích cục bộ, sự thuận lợi sẵn có là do sự cải thiện độ phân giải của phương pháp này. Trong trường hợp hấp thụ 2 photon, cường độ huỳnh quang cân bằng được quan sát trong tất cả các mặt phẳng và không có sự khác biệt rõ. In the two-photon case, cường độ tích hợp giảm khi ra xa mặt phẳng tiêu.

$$V_{2h\nu} = \pi^{3/2} r_0^2 z_0$$

1) C. J. R. Sheppard and H. J. Matthews, "Imaging in a high-aperture optical systems," J. Opt. Soc. Am. A 4, 1354- (1987)

2) W.R. Zipfel, R.M. Williams, and W.W. Webb "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," Nat. Biotech. 21(11), 1369-1377 (2003)

Even scattered fluorescence photons are useful in 2-photon regime

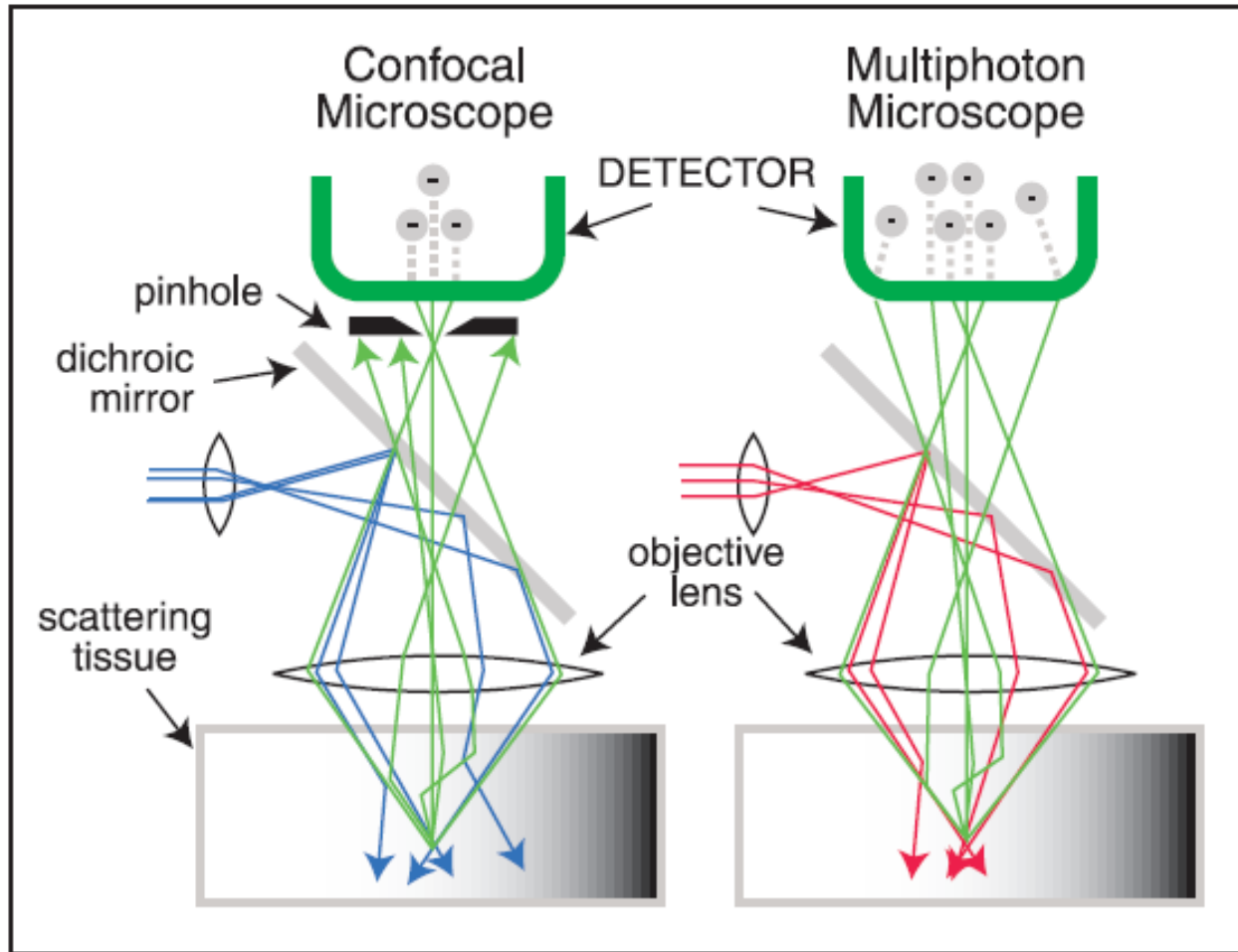
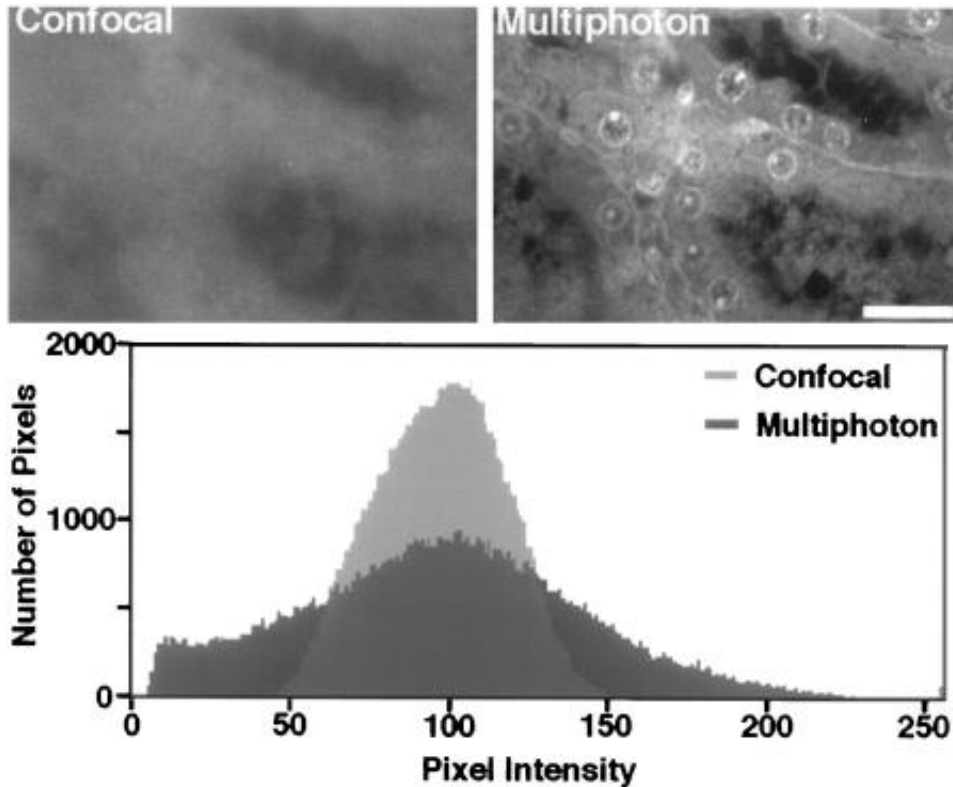


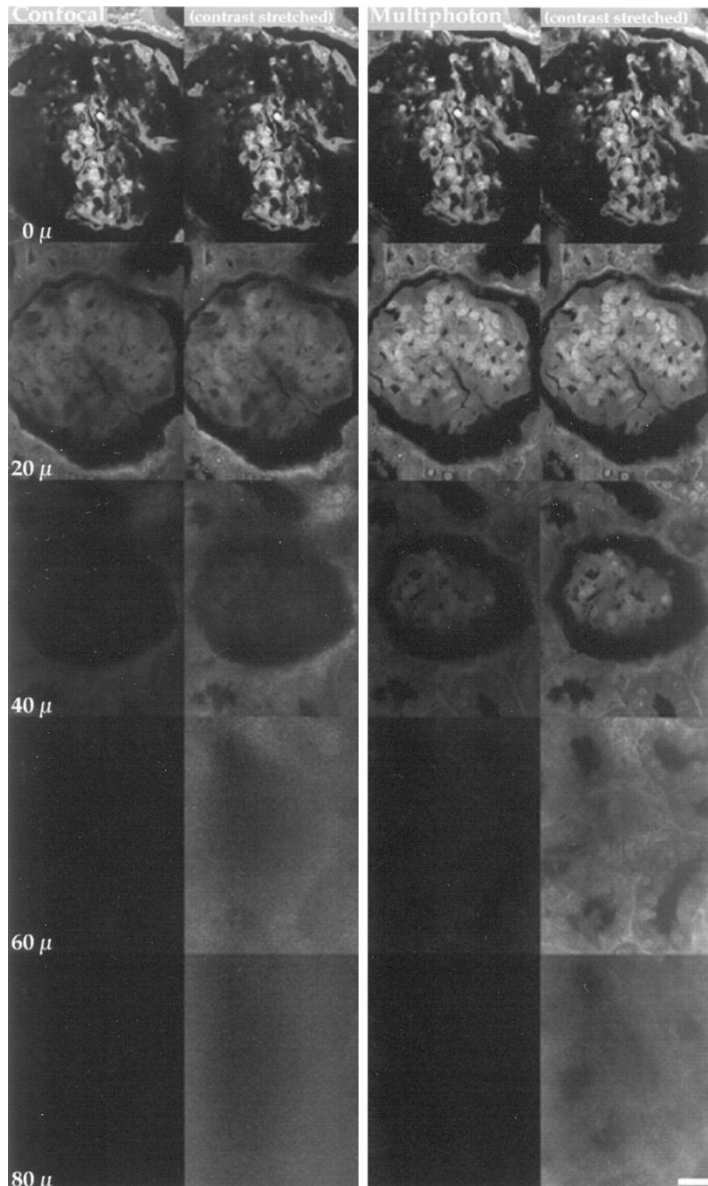
Figure 5. Comparison of a confocal and multiphoton microscope.

Độ phân giải thực tế



Hiệu quả của sự tăng công suất tới vào tín hiệu phát ra. Các mẫu thận khi được nhuộm acid fucsin được chụp ảnh ở độ sâu 60 μm bên trong mẫu bằng kỹ thuật kính hiển vi đồng tụ (ánh sáng 532 nm công suất 550 μW) và kính hiển vi đa photon (ánh sáng 1047 nm 12 mW). Các cường độ laser được điều chỉnh để tạo ra cùng một lượng photon trung bình trên một pixel. Ảnh đồng tụ cho thấy sự mở rộng cường độ pixel hẹp hơn đáng kể so với ảnh đa photon hiển thị tỉ số tín hiệu trên nhiễu nhỏ hơn. Do đó kỹ thuật ghi ảnh đa photon cung cấp độ tương phản ảnh cao thậm chí ở tại các độ sâu đáng kể trong mẫu tán xạ ánh sáng. Các ảnh được thu với độ phân giải pixel 0.27 μm với bộ lọc thu Kalman 3. Scale bar, 20 μm .

Độ xuyên sâu

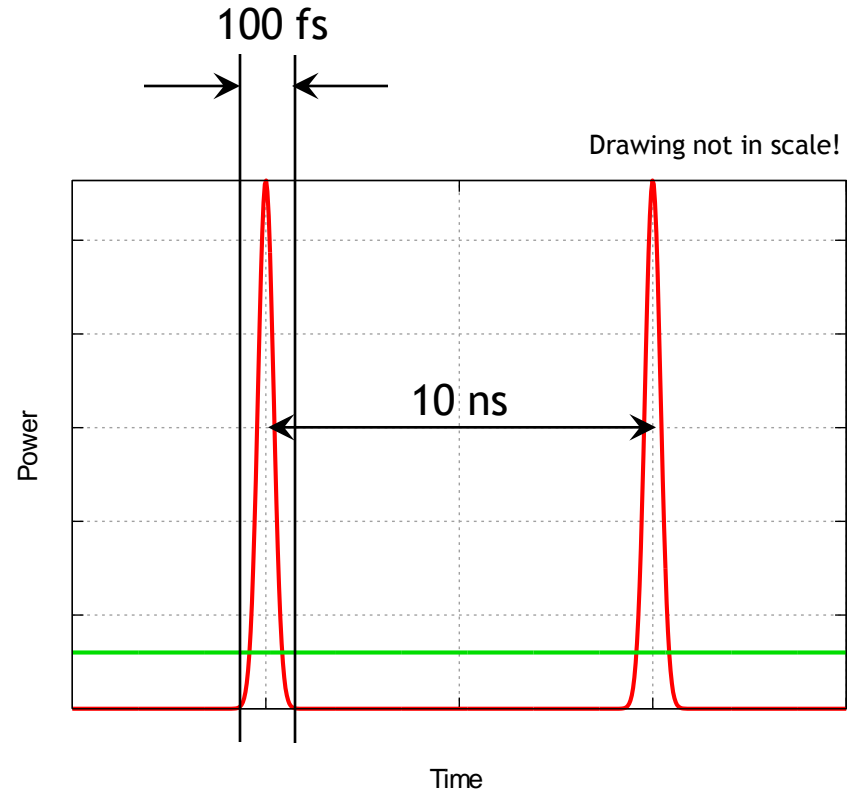


So sánh độ xuyên sâu ảnh giữa kính hiển vi đồng tụ và kính hiển vi đa photon. Tiết diện quang học qua tiểu cầu từ một mẫu bệnh học thận khi được nhuộm qua kính hiển vi đồng tụ với ánh sáng 532 nm, công suất 2 μ W (*bên trái, cột 1 và 2*) và kính hiển vi đa photon với ánh sáng 1047 nm, công suất 4.3 mW (được scan lại; *bên phải, cột 3 và 4*) được so sánh. Tại bề mặt, chất lượng ảnh và cường độ tín hiệu tương tự nhau; tuy nhiên, khi càng đi sâu vào mẫu, cường độ tín hiệu và chất lượng ảnh đồng tụ giảm nhanh hơn so với ảnh đa photon. Các ảnh được thu với độ phân giải pixel 0.27 μ m với bộ lọc thu Kalman 3. Scale bar, 20 μ m.

Centonze VE, White JG. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J.* 1998 Oct;75(4):2015-24.

Chúng ta cần một xung laser cho MPE

- Công suất trung bình của laser 100 mW được hội tụ tại mẫu vật trên một vết giới hạn nhiễu xạ có đường kính $0.5 \mu\text{m}$. Diện tích của vết là $2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$
- Công suất laser tại vết là 0.1 W
 $1/(2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2)$
 $= 5 \cdot 10^7 \text{ W cm}^{-2}$
- A “femtosecond” laser is on for ~ 100 femtoseconds every 10 nanoseconds. Tỉ số độ rộng xung và độ rộng khe là (The pulse duration to gap duration ratio) 10^{-5}
- Công suất tức thời khi laser cân bằng là $5 \cdot 10^{12} \text{ W cm}^{-2}$



Các Laser cho kính hiển vi phi tuyến

Vật liệu Laser	Công ti; Mô đun	Bước sóng	Độ rộng xung	Tần số	Công suất
Ti:Sapphire	Coherent; Mira	700-980	<200 fs	76 MHz	0.7 W, 1.3 W
	Spectra Physics; Tsunami	700-1000	<100 fs (or 2ps as option)	80 MHz	0.8 W, 1.4 W
	Coherent; Chameleon - XR	705-980	<140 fs	90 MHz	1.7 W
	Spectra Physics; Mai Tai	710-990	120 fs	80 MHz	1.5 W
	Time Bandwidth; Pallas	780-860	<100 fs	75 MHz	500 mW
	Time Bandwidth; Tiger	780-860	<100 fs	100 MHz	400 mW
	Femtosome	750-850	<12 fs	75 MHz	400 mW 600 mW
Nd:YLF	MicroLase/Coherent Scotland; BioLite	1047	200 fs	120 MHz	500 mW
Nd:Glass	Time Bandwidth; GLX200	1058	<250 fs	100 MHz	>400 mW
Ytterbium	Amplitude Systems	1030	<200 fs	50 MHz	1 W
Cr:LiSAF	Highqlasers	850	100 fs	50 MHz	>1mW
OPO	Coherent and Spectra Physics	350-1200	100 fs		~200 mW

Ưu điểm của kính hiển vi 2-p

- Mô bên trên và dưới mặt phẳng tiêu hiểm khi chịu tác dụng của ánh sáng hồng ngoại và kích thích đa photon bị giới hạn ở một thể tích hội tụ nhỏ (bởi vì huỳnh quang từ hiệu ứng hai photon phụ thuộc vào bình phương cường độ ánh sáng tới, mà cường độ ánh sáng tới lại giảm theo bình phương khoảng cách từ tiêu cự).
- Kính hiển vi 2 photon có thể ghi ảnh các mẫu mờ đục với độ phân giải **dưới micro mét đến độ sâu vài trăm micro mét.**
- Kính hiển vi 2 photon tách ánh sáng kích thích và ánh sáng phát xạ một cách hiệu quả
- Tất cả các photon được phát ra từ kích thích đa photon có thể được sử dụng để ghi ảnh (về nguyên tắc) **do đó không cần dùng các khe khóa đồng tụ.**

Sự phát sóng hài bậc hai

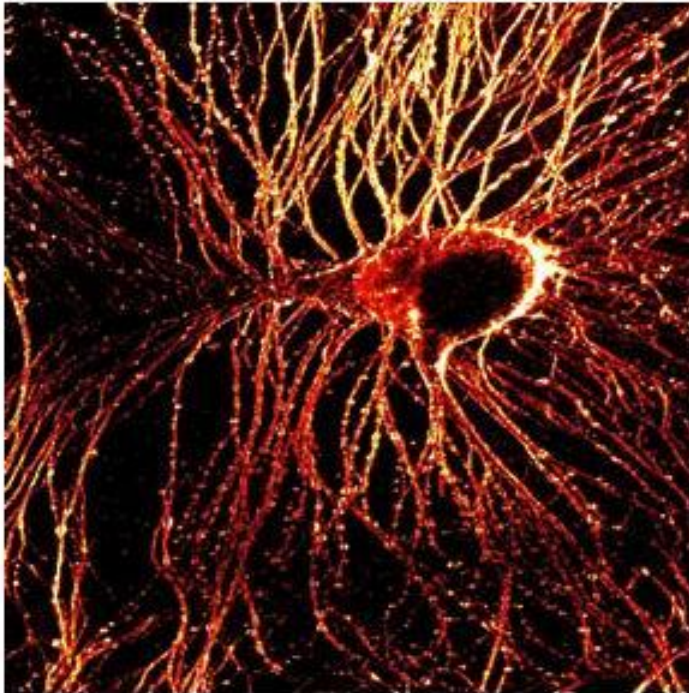
- Trường laser cường độ cao cảm ứng độ phân cực phi tuyến trong phân tử hoặc tập hợp các phân tử, dẫn đến sự tạo ra sóng kết hợp với tần số đúng bằng hai lần tần số tới.
- Biên độ của sóng hài bậc hai có thể được tăng cường cộng hưởng khi năng lượng của tín hiệu hài bậc hai bao phủ vùng hấp thụ điện tử
- Để có sóng hài bậc hai thì đòi hỏi phải có môi trường không đối xứng tâm. Tại sao?

$$P_1 = \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E_1 + \chi^{(2)} E_1^2 + \chi^{(3)} E_1^3 + \dots)$$

$$\begin{aligned} E_2 = -E_1 \quad P_2 &= \varepsilon_0 (\chi^{(1)} E_2 + \chi^{(2)} E_2^2 + \chi^{(3)} E_2^3 + \dots) \\ &= \varepsilon_0 (-\chi^{(1)} E_1 + \chi^{(2)} E_1^2 - \chi^{(3)} E_1^3 + \dots) \end{aligned}$$

$$P_2 = P_1 \quad \Rightarrow \quad \chi^{(2)} = 0$$

In an isotropic medium, reversal of the electric field will produce the same electric polarisation but in the opposite direction.



The first demonstration of a new optical recording technique developed by Cornell biophysicists -- a second-harmonic generation microscopy image of a sea slug (*Aplysia*) neuron stained with the membrane dye DHPESBP -- from the cover of the Jan. 28, 2004, *The Journal of Neuroscience*. Copyright 2004 *The Journal of Neuroscience*. *D. Dombeck/Cornell*

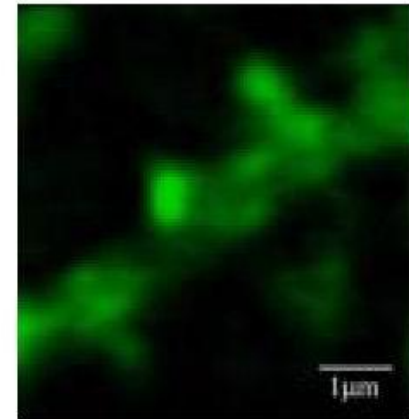
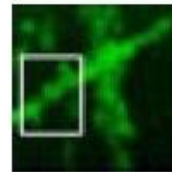
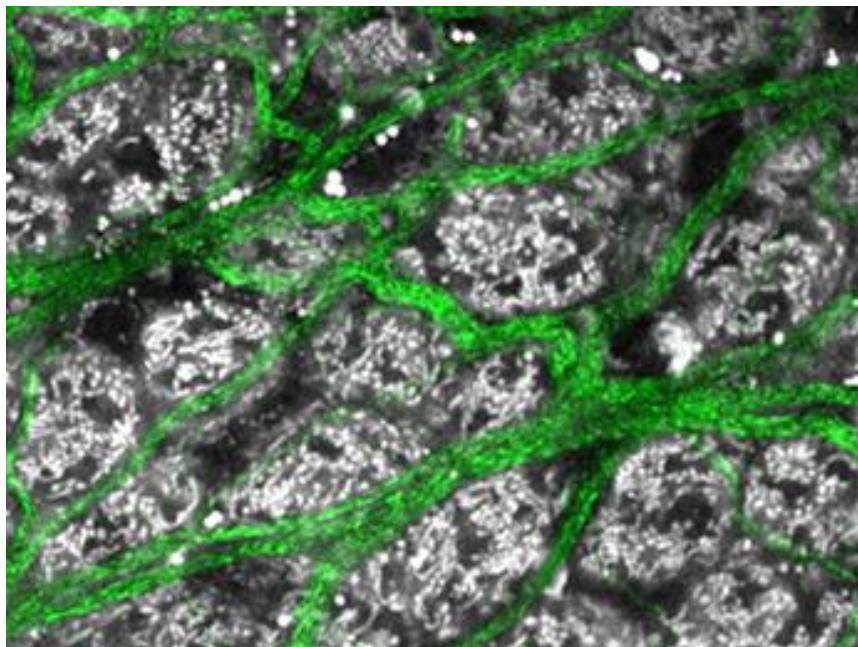


Fig. 6. THG images of three dendritic spines on a single dendrite.

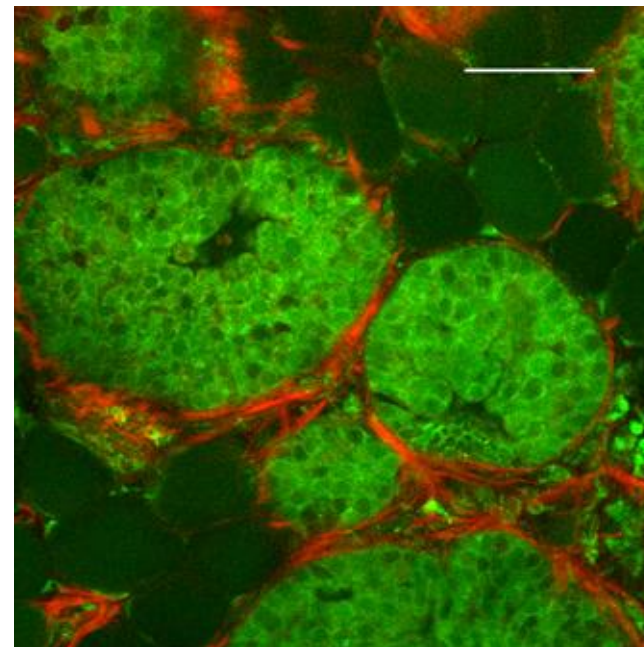
Third harmonic generation image,
No dye staining was applied

SHG và 2 photon kết hợp



Ảnh 2 photon của mô gan của chuột trưởng thành. Các tế bào gan được nhìn qua sự tự huỳnh quang xanh (greyscale) từ NAD(P)H và các vitamin có thể hòa tan lipid, chẳng hạn như retinol. Mạng collagen (xanh) được nhìn qua SHG.

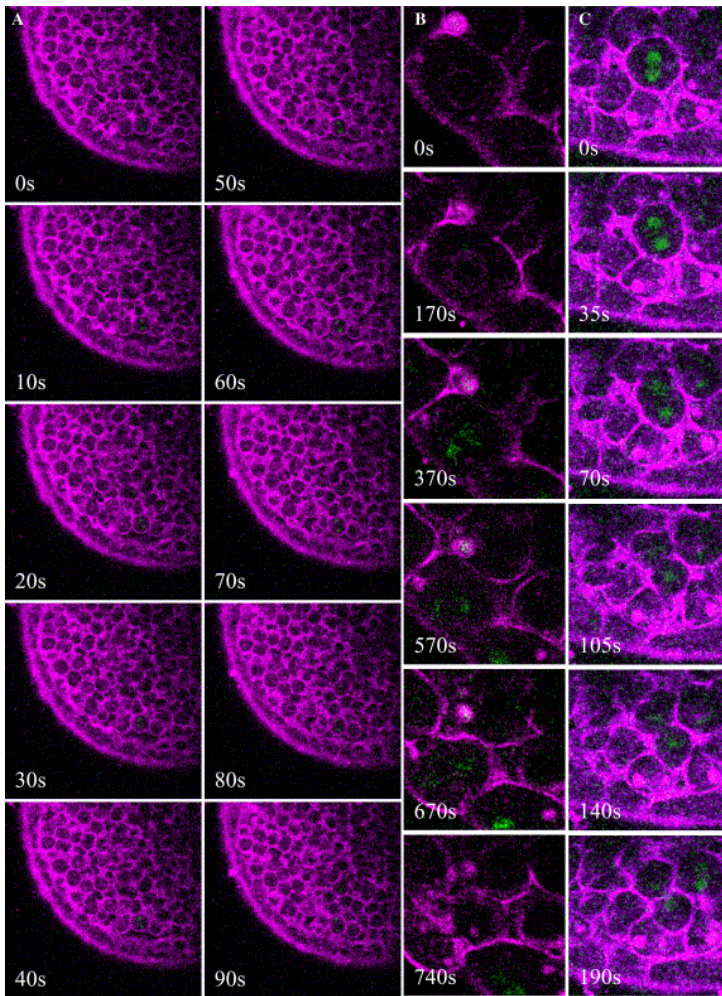
image from Watt Webb lab at Cornell University



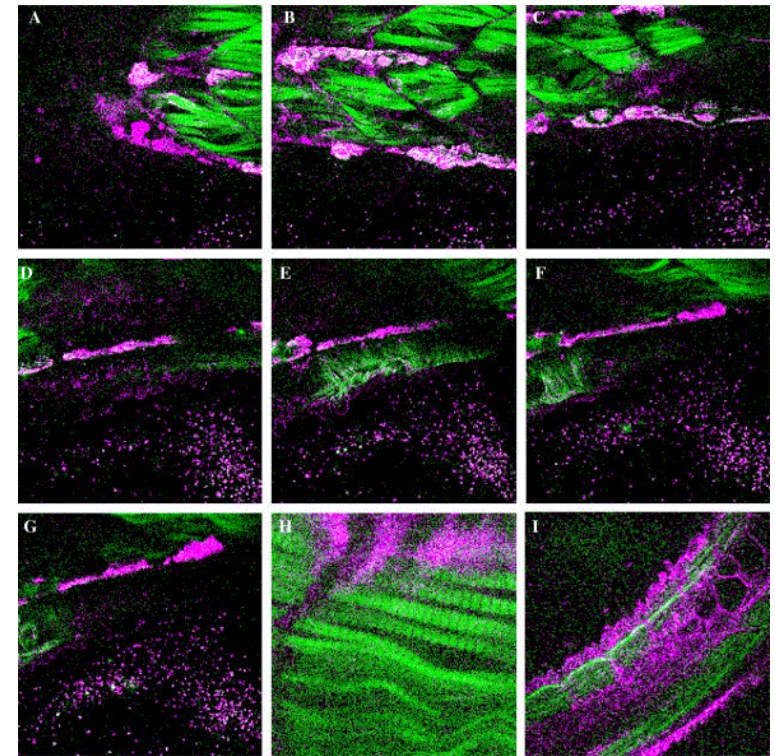
Ảnh đa photon của tuyến vú chuột. Sự tự phát huỳnh quang xanh (màu gần xanh) phác họa cấu trúc tế bào và các giọt lipid. Collagen có thể được thấy qua SHG.

image from Watt Webb lab at Cornell University. It was acquired in collaboration with Alexander Nikitin, Dept. of Biomedical Sciences, Cornell.

Kính hiển vi hai bậc cao



Chuỗi thời gian cho thấy quá trình phân bào có tư bên trong phôi cá ngựa được nhìn qua SHG, và THG. Chiều sâu ảnh là 400- μm tính từ bề mặt lớp đệm. THG (tím) ghi ảnh tất cả các bề mặt phân cách kể cả các lớp hợp bào ngoài, màng tế bào, và các màng nhân trong khi đó SHG (xanh lá cây) ghi ảnh các màng hai chóp thẳng được hình thành vi ống.



(A)-(G) Chuỗi ảnh mặt cắt của ấu trùng cá ngựa 5 ngày sau khi thụ tinh trong ống nghiệm. (H) Ảnh phóng đại bên trong đốt cho thấy phân bố của các sợi cơ. (I) Tiết diện quang học tại tâm của ấu trùng cho thấy các đoạn bên trong dây sống không bào và phân bố của đốt dọc theo cạnh bên của dây sống. Kích thước ảnh: (A)-(G) và (I): $235 \times 235\text{-}\mu\text{m}^2$; (H): $40 \times 40\text{-}\mu\text{m}^2$.

Từ “Kính hiển vi hai bậc cao cho sinh học phát triển” theo Chi-Kuang Sun và các cộng sự., *Tạp chí sinh học cấu trúc*, 147(1), 2004, Trang 19-30