

Fluorescenční mikroskopie

Josef Jaroš

- Definice a princip fluorescence
- Fluorofory
- Fluorescenční mikroskop



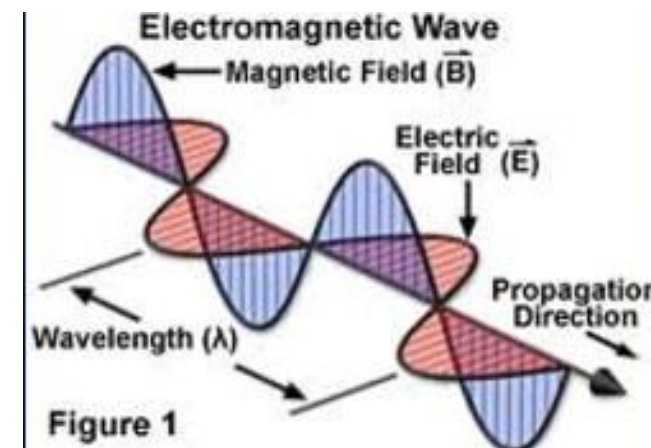
Princip fluorescenční mikroskopie

- Viditelné světlo
 - Vlnění o vlnové délce 400-700 nm
 - Elementární částice – foton (duální povaha)

Color	Wavelength	Frequency	Photon energy
violet	380–450 nm	668–789 THz	2.75–3.26 eV
blue	450–495 nm	606–668 THz	2.50–2.75 eV
green	495–570 nm	526–606 THz	2.17–2.50 eV
yellow	570–590 nm	508–526 THz	2.10–2.17 eV
orange	590–620 nm	484–508 THz	2.00–2.10 eV
red	620–750 nm	400–484 THz	1.65–2.00 eV

$$\lambda = c / f$$

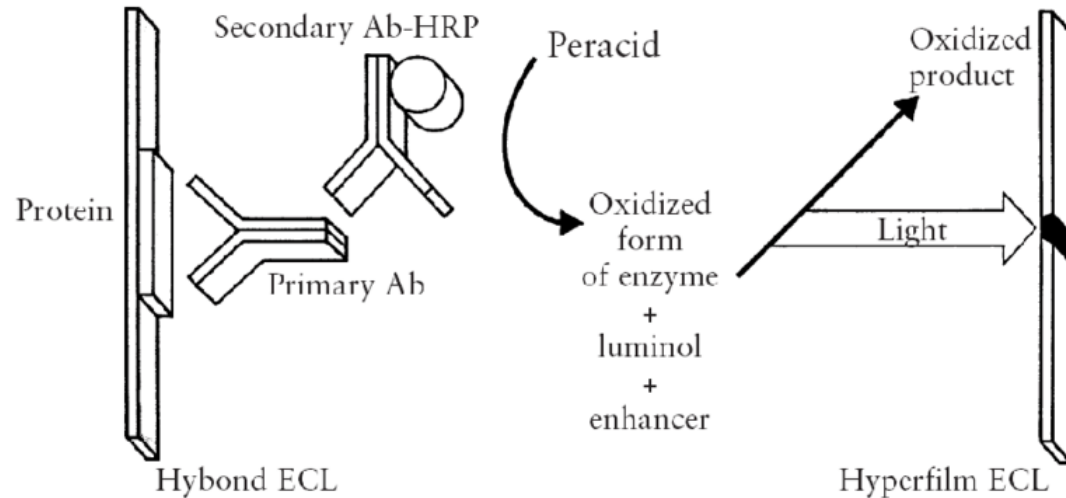
$$E = h * f = h * c / \lambda$$



h – Planckova konstanta

Luminiscence

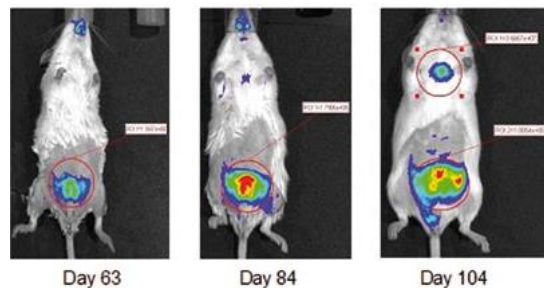
- Jev při kterém látka vysílá do prostoru světlo
- Dělení dle indukce
- Chemiluminiscence
 - Vyvoláno chemickou reakcí – např. oxidace luciferinu luciferázou u světlušek, ECL detekční činidlo



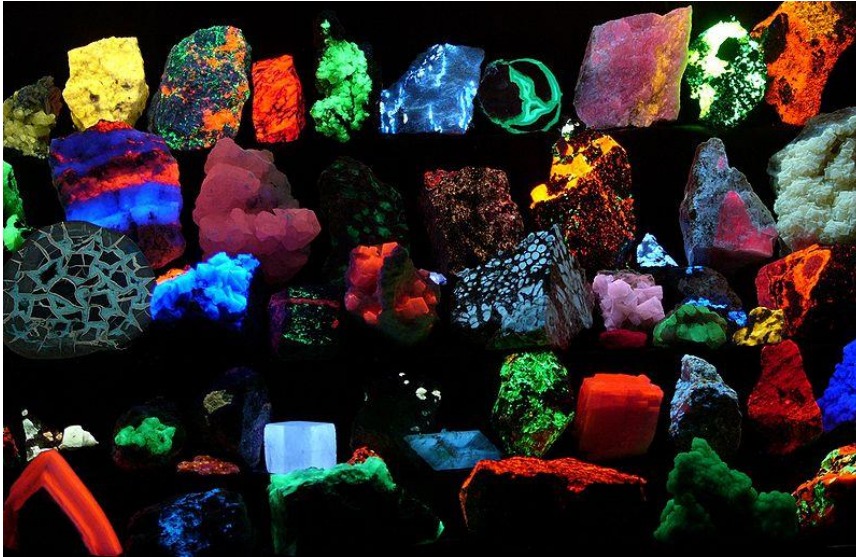
Fotoluminiscence

- Záření je vyvoláno jiným zářením
- vyzařování světla objektem poté, co byl před tím vystaven záření o (většinou) kratší vlnové délce, než-li je vlnová délka vyzařovaného záření.
- **Fluorofor (luminofor) = fluorochrom – látka schopná fosforescence**
- **Excitační záření – luminiscenci vyvolává**
- **Emisní záření – vysílané látkou**

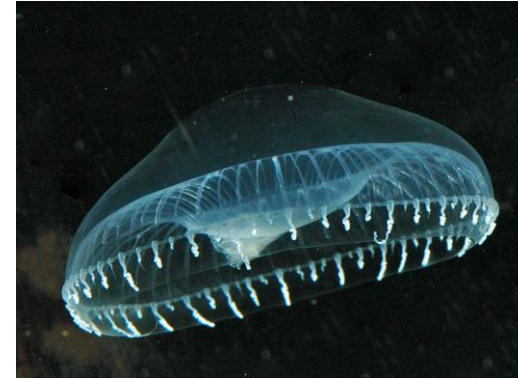
- **elektroluminiscence** - displeje starších kalkulaček
- **radioluminiscenci** - radioaktivní záření, dopad radioaktivního záření na luminiscenční stínítko vyvolává záblesky.
- **termoluminiscence, mechanoluminiscence, sonoluminiscence, chemiluminiscence** - podtypem chemi- je **bioluminiscence**



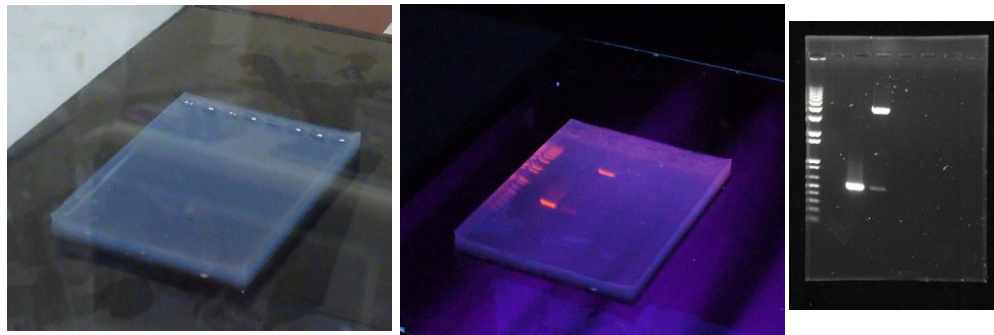
Výskyt a využití fluorescence



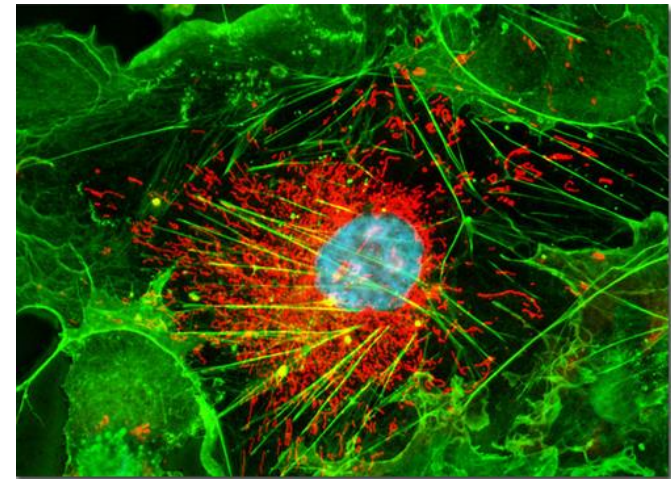
Collection of various fluorescent minerals under UV-A, UV-B and UV-C light



GFP - Aequorea victoria

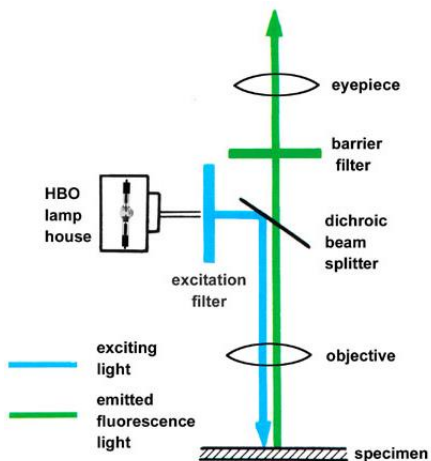
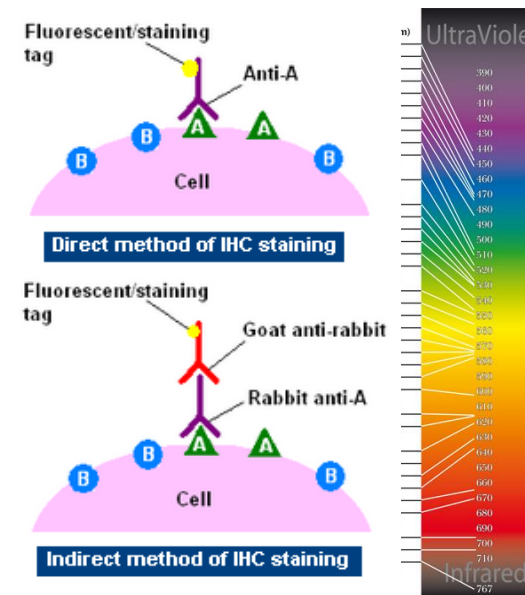
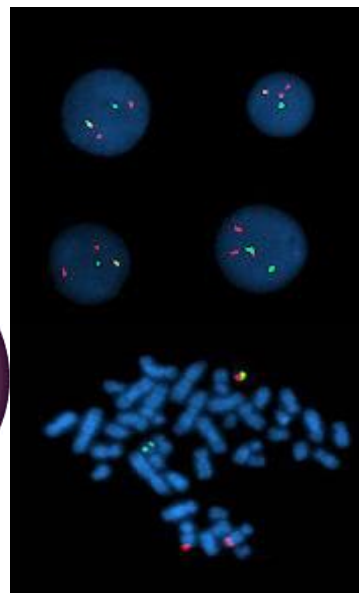
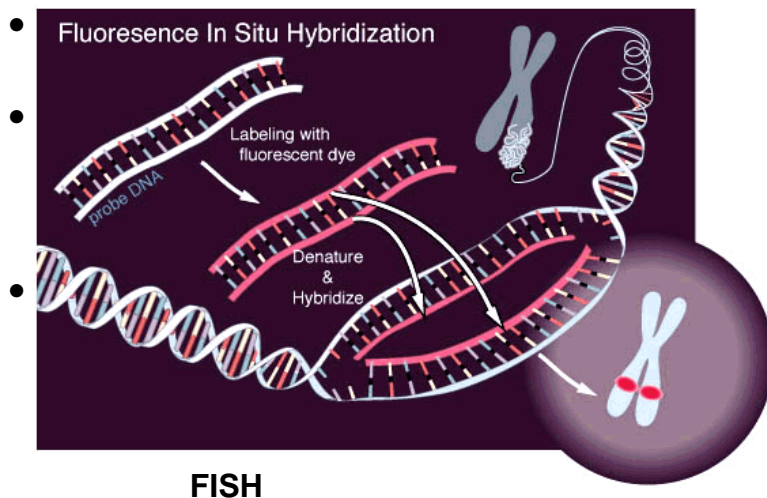


Agarose gel following [Agarose gel electrophoresis](#) on UV light box Gel from a research project on [hepatitis B virus](#)

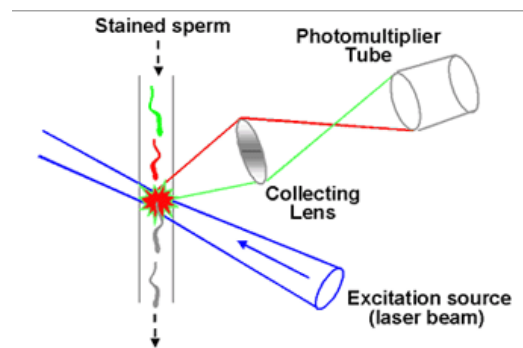


Confocal microscopy - Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells (COS-7 Line)

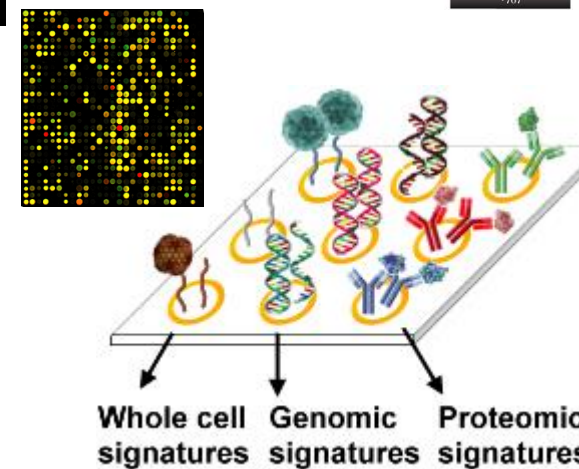
Fluorescence v molekulární biologii



Fluorescenční mikroskopie

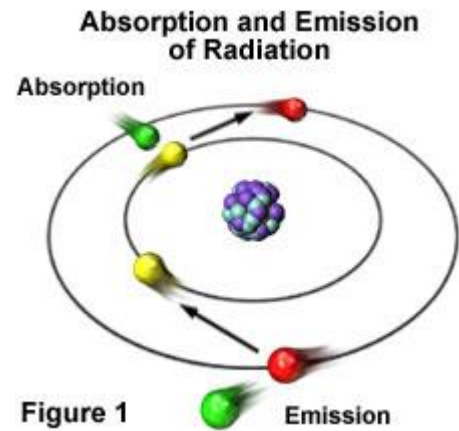


Průtoková cytometrie, třídění

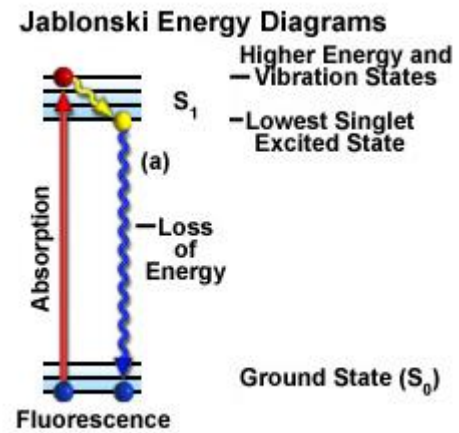
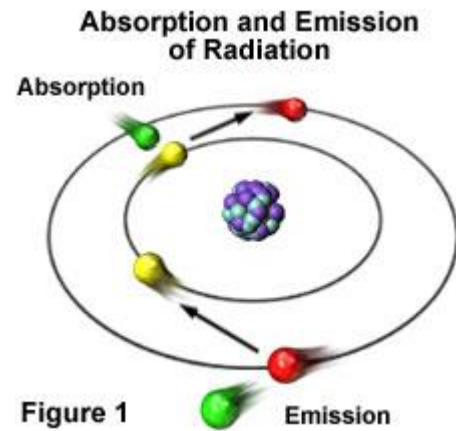


DNA, RNA, protein arrays

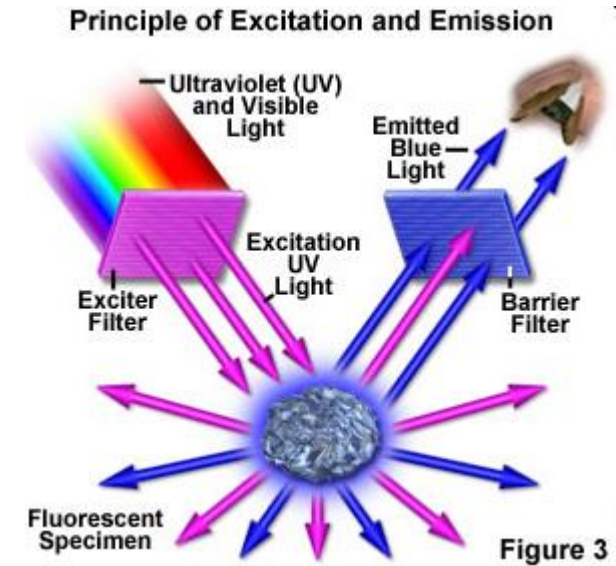
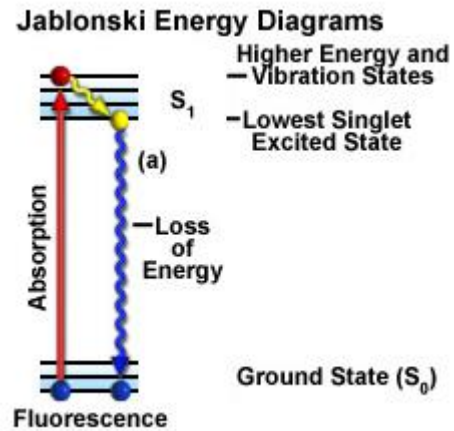
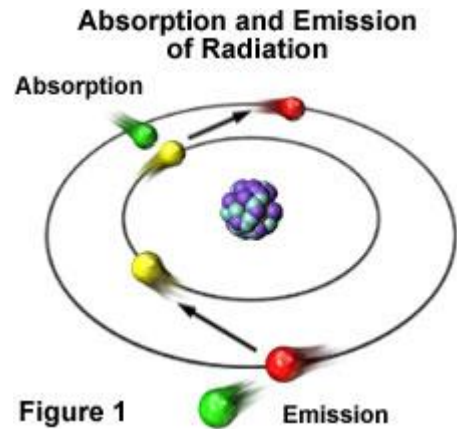
Princip fluorescence



Princip fluorescence



Princip fluorescence



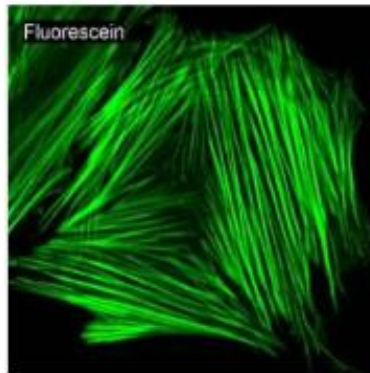
Princip fluorescence – Jablonského schéma

- molekula absorbuje světlo o vysoké energii
- tím se energie molekuly zvýší (excitovaná molekula)
 - část této energie pohlcena molekulou (vlnovka)
 - molekula vyzařuje světlo o nižší energii

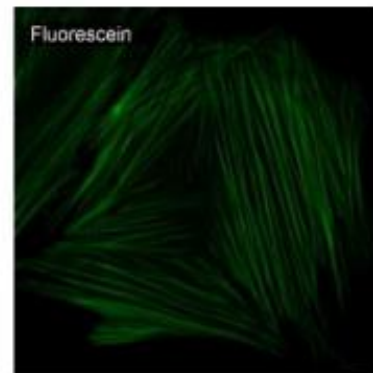
Průběh fluorescence

- Excitace – elektronů fotony ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu – trvání 10^{-15} s
- Excitovaný stav – pokles na nejnižší hladinu excitace (relaxace)
 - Ztráta energie ve formě tepla
 - Trvání 10^{-14-11} s
- Emise světla => fluorescence
 - Trvání 10^{-9-7} s = doba dohasínání

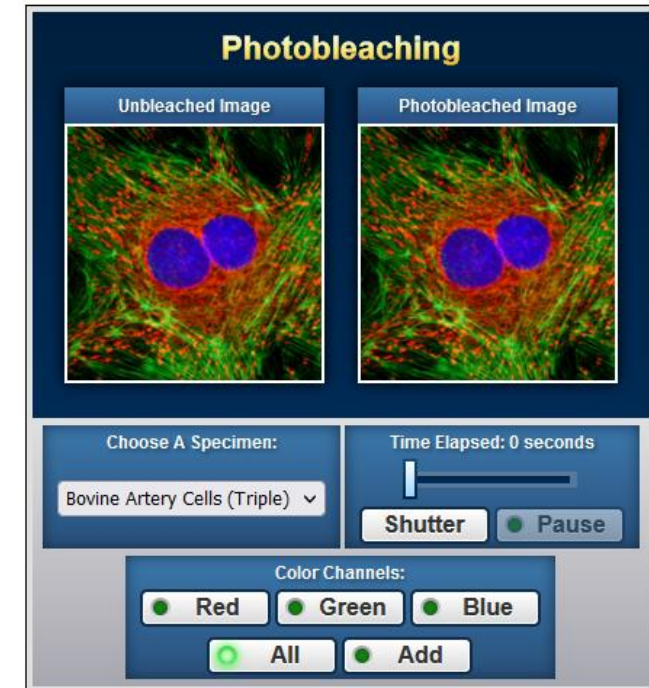
Recyklace a photobleaching



Before



Photobleaching 13 sec

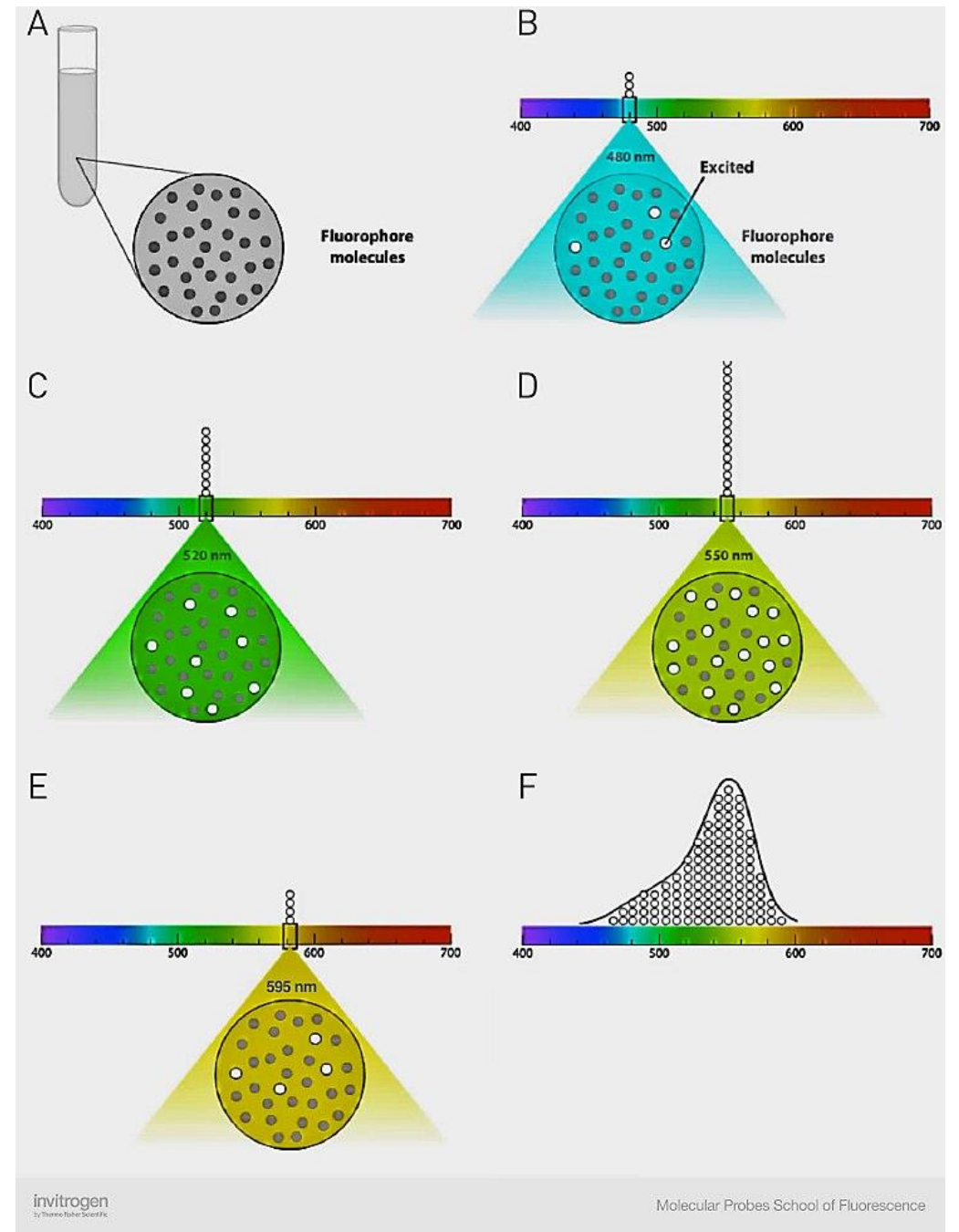


<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/fluorescence/photobleaching/>

Fluorochromy jsou schopny recyklace, ale mnohé se velmi rychle vysvěcují. Snaha je používat stabilizované.

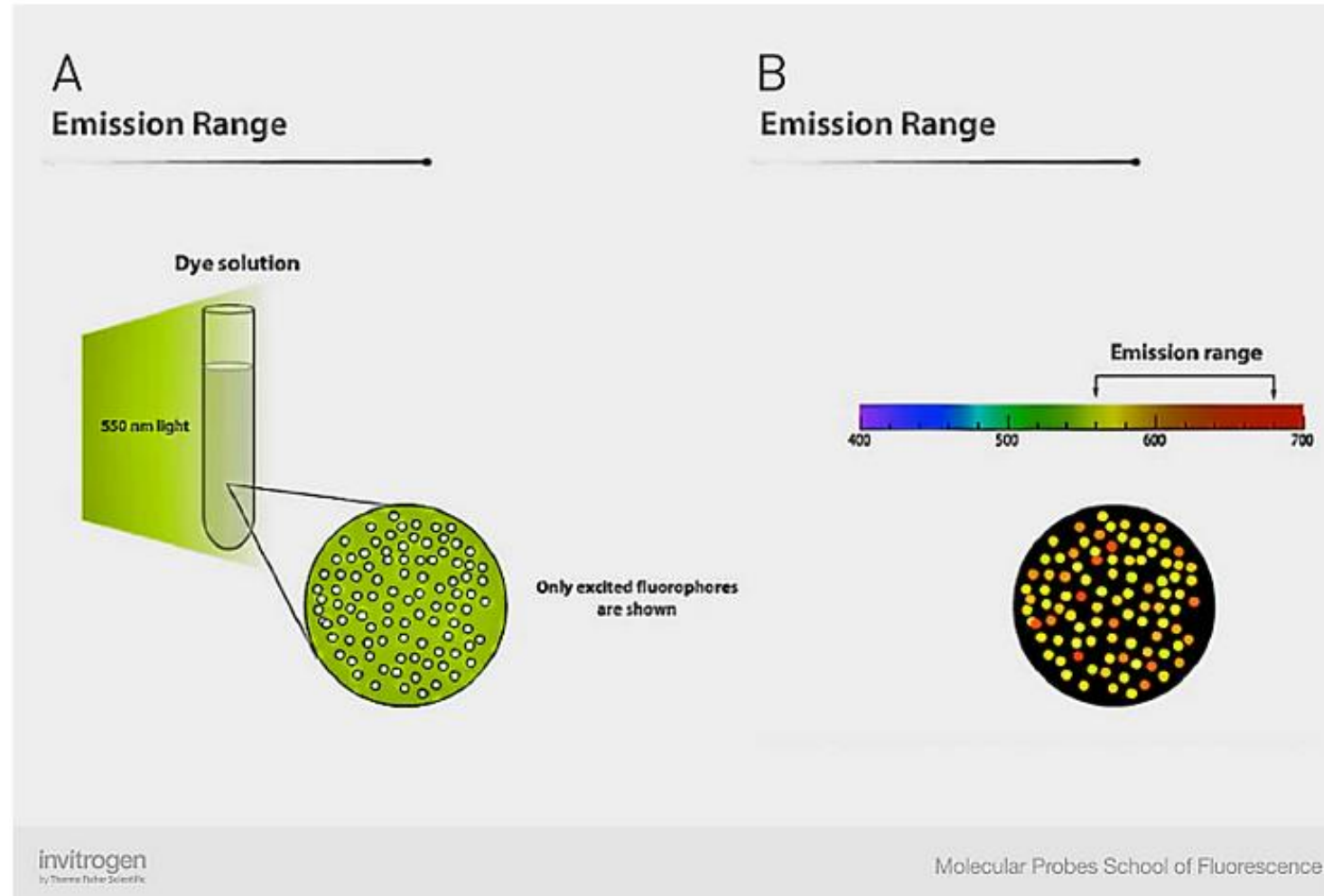
Excitace

Vzorek fluoroforu je osvětčován různými vlnovými délkami a podle toho jsou aktivovány rozdílné počty molekul – absorpční spektrum



Emise

Fluorofor vyzařuje na různých vlnových délkách – emisní spektrum



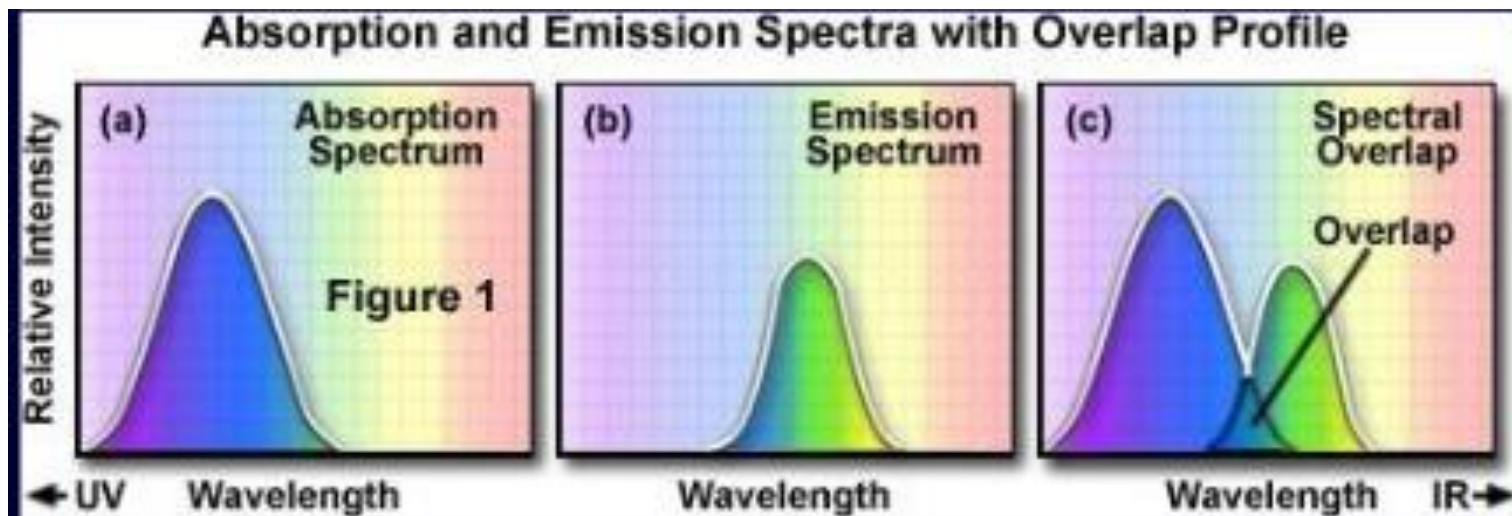
Absorbční (excitační) spektrum

závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce
(měřeno při konstantní emisní vlnové délce)

Emisní spektrum

závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při
konstantní vlnové délce excitace

- obě spektra mají své maxima
- excitační maximum
- emisní maximum
- vzdálenost mezi nimi – Stokesův posun



Fluorofory

Vlastní (vnitřní) fluorescence látek

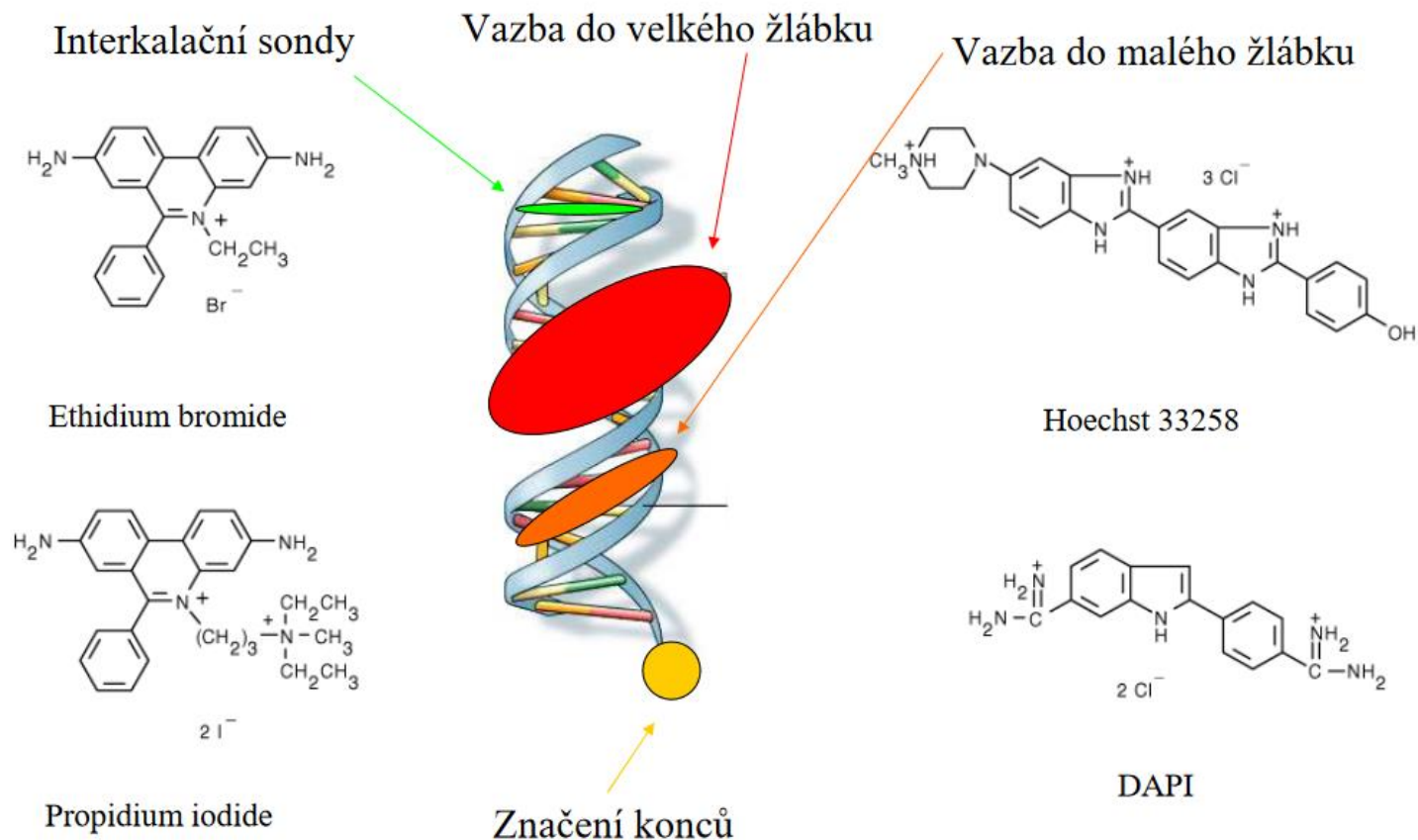
- Přirozeně se vyskytující fluorofory
- aminokyseliny, kofaktory enzymů, chlorofyl, green fluorescent protein..

Nevlastní (vnější) fluorescence látek

- Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury
- použití **sondy**
- DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána... mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH indikátory, membránový potenciál..

- Nepřímá vazba fluorochromu
- Použití **značky**
- navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny,
- phalloidin, annexin V...

Sondy pro nukleové kyseliny



Nevlastní (vnější) fluorescence

- Nepřímá vazba fluorochromu – ZNAČKY
- značky jsou vázány k molekulám (proteiny, peptidy, oligonukleotidy..) kovalentní vazbou
- proteiny – vazba na aminové (NH₂-), thiolové (SH-) skupiny nebo histidinové řetězce

požadavky

- vysoká intenzita fluorescence
- stabilita při ozařování
- minimální vliv na biologické vlastnosti vzorku

Nejčastěji používané

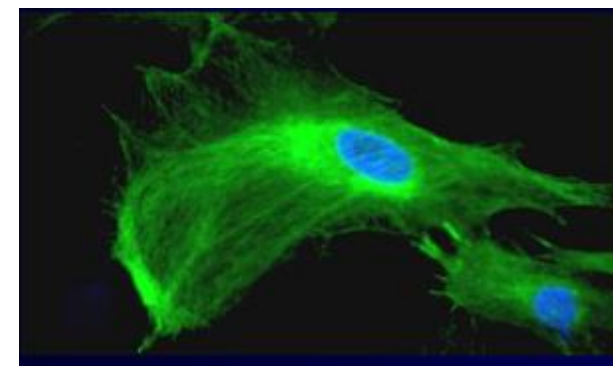
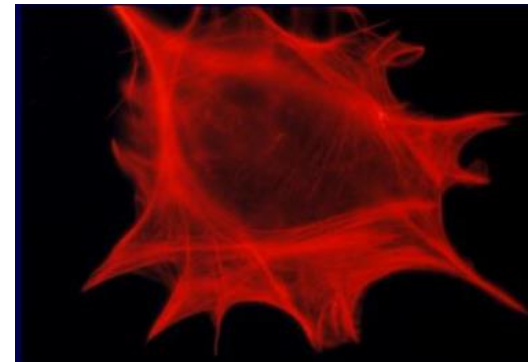
převážně na protilátky

Rhodaminy

- Ex. 541, em. 572

Fluorescein isothiocyanate (FITC)

- Ex. 495, em. 521

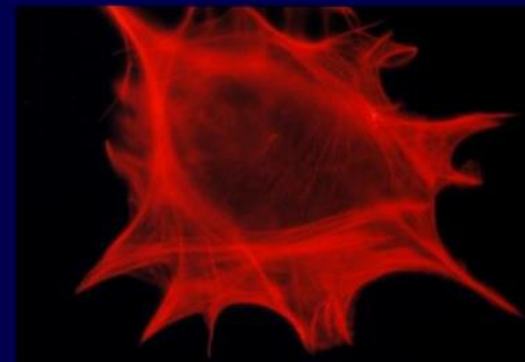


Rhodaminy

- historicky nejpoužívanější fluorescenční značky
- převážně na protilátky
- ve formě derivátů
- vysoký kvantový výtěžek 0,3-0,8
- photobleaching

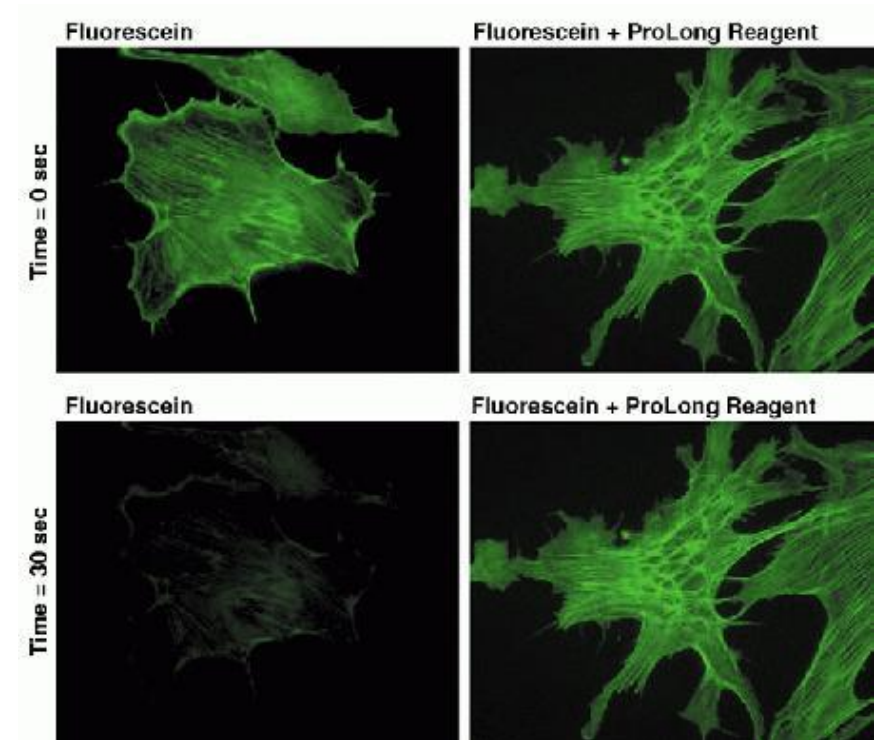
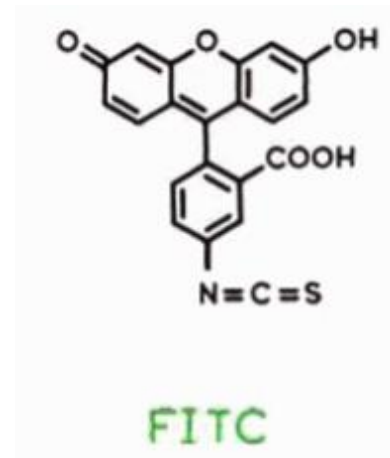
tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)

ex. – 541nm, em. – 572nm



Fluorescein isothiocyanate (FITC)

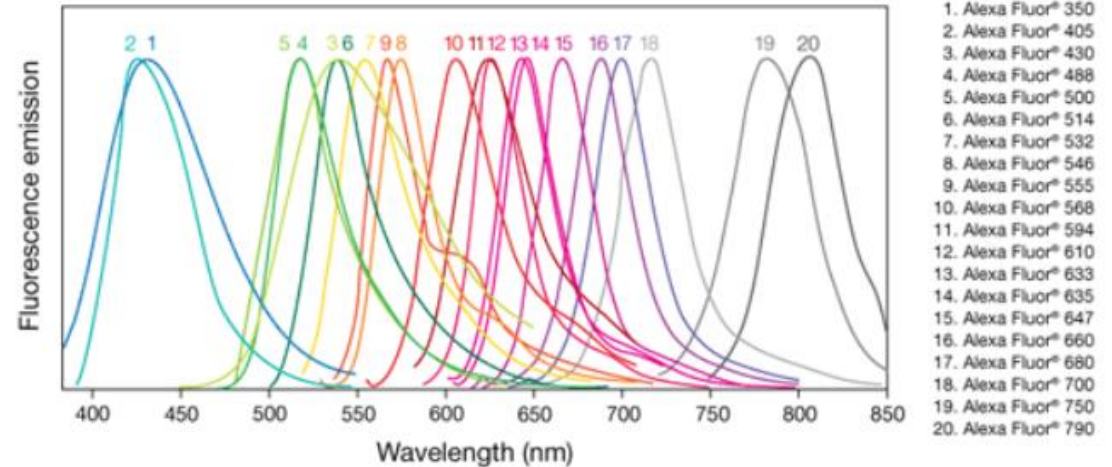
- Jasně zelený fluorofor
- omezeně rozpustný ve vodě a v alkoholech
- Používá se běžně jako fluorescenční značka ve fluorescenční mikroskopii
- Vysoký kvantový výtěžek až 0,9
- Významně podléhá bělení (photobleachingu)



Alexa Fluor Dyes (Molecular Probes)

- sulfonovaný derivát rhodaminu
- vyšší kvantový výtěžek - svítivost
- zesílená fotostabilita (↓ photobleaching)
- pH stabilita
- dlouhodobě stabilní

- využití – živé buňky, tkáňové řezy, fixované preparáty
- velký výběr rozsahu ex. a em. maxim
- od UV po near-infrared oblast
- označení podle vlnové délky zdroje excitačního záření



Fluorescenční proteiny (GFP)

Aequorea victoria

Pomocí bodových mutací lze modifikovat excitační a emisní spektra

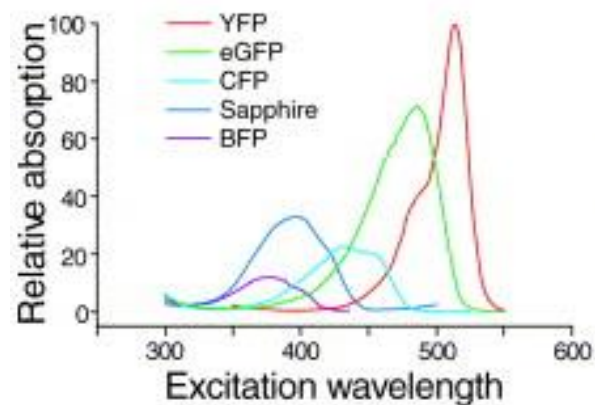
Mutace S65T – EGFP (enhanced GFP)

EGFP je základem pro další barevné varianty

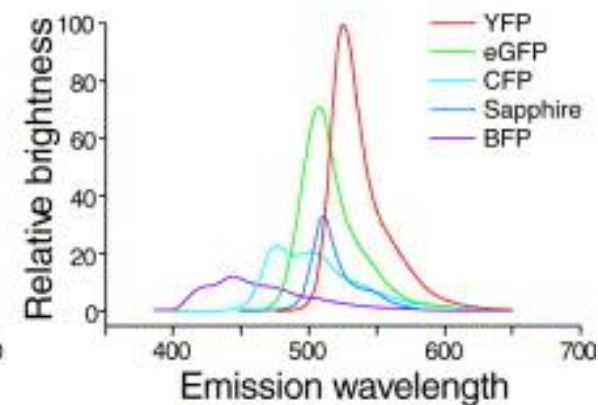
GFP - *Aequorea victoria*



(a) Excitation spectra



(b) Emission spectra



Kvantové tečky (Quantum dots)

Polovodičové fluorofory, CdS, CdSe, InP, InAs, PbSe

Výhody

Vysoký excitační koeficient

Úzké emisní spektrum

Poloha emisního spektra souvisí s velikostí částic

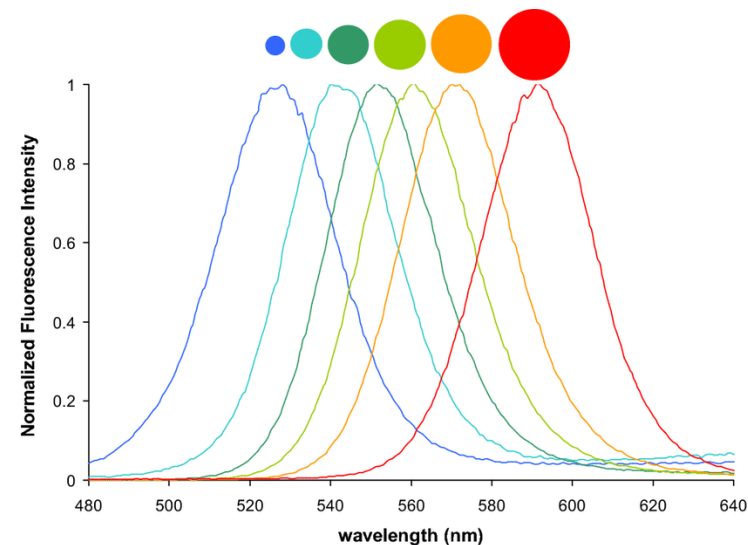
Nedochází k vybělování

Nevýhody

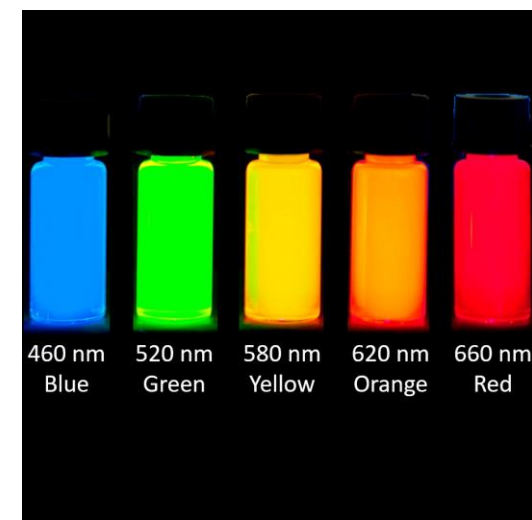
Částice o velikosti několika nm

Je důležité používat monodisperzní částice

Chemicky inertní – při navázání funkčních skupin může fluorescence zmizet

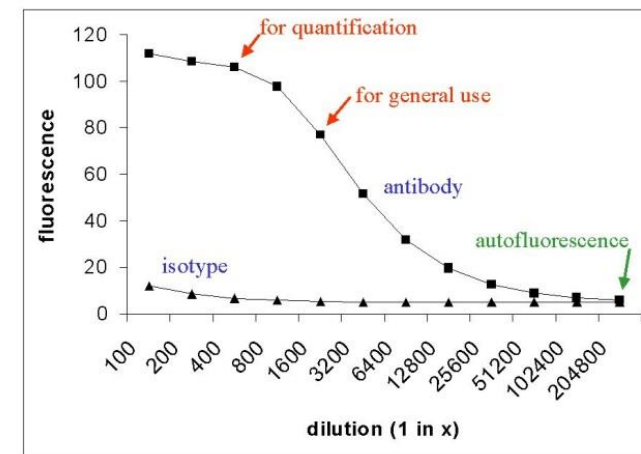
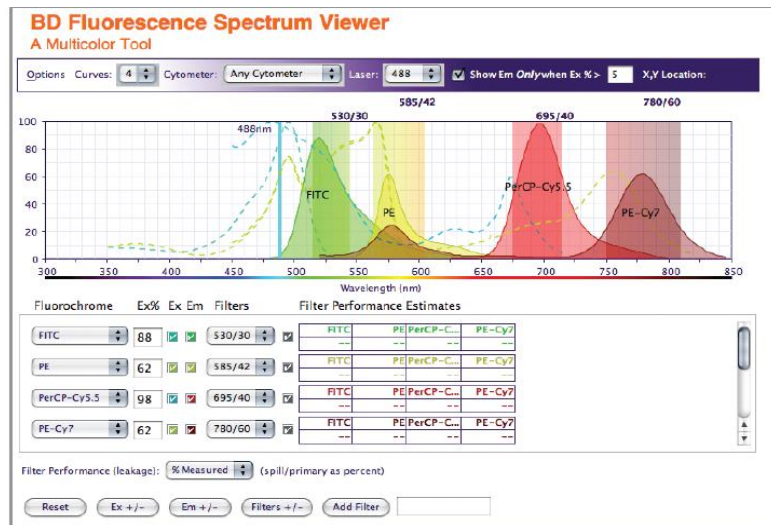


DOI:[10.1007/s41061-020-0296-6](https://doi.org/10.1007/s41061-020-0296-6)

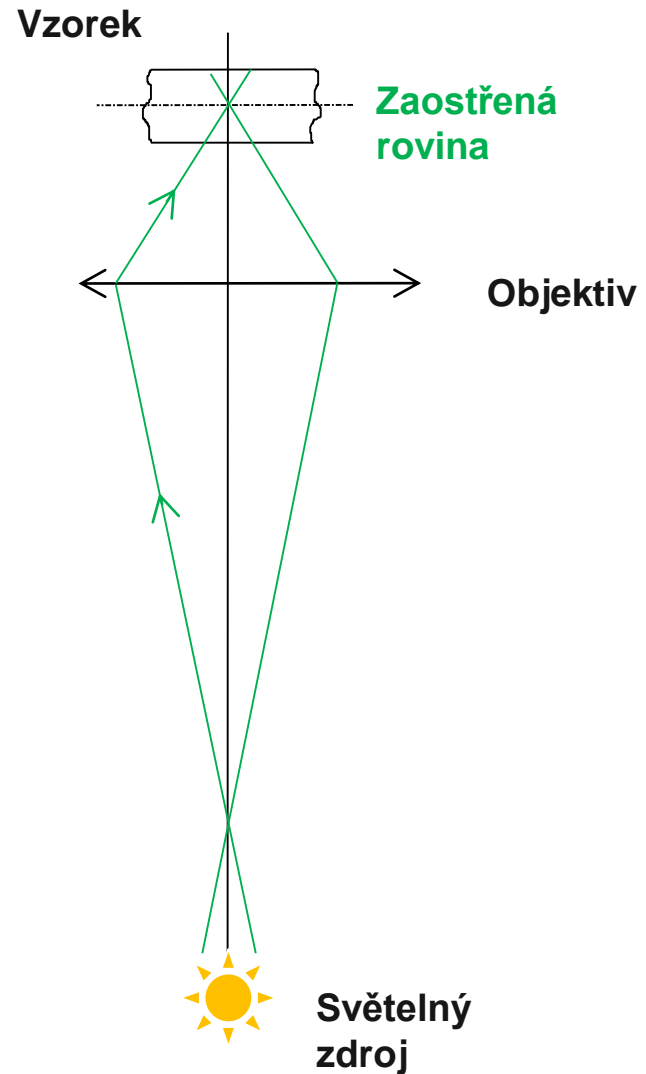


Výběr fluorochromu

- Zvážit **jas** fluorochromu
- Zvolit **nejjasnější** pro **nejméně exprimované** proteiny
- Vice versa - **méně jasné** pro **nejvíce expr.** Proteiny
- selektivita (např. sondy pro Ca^{2+} mohou vázat i Mg^{2+} , ...)

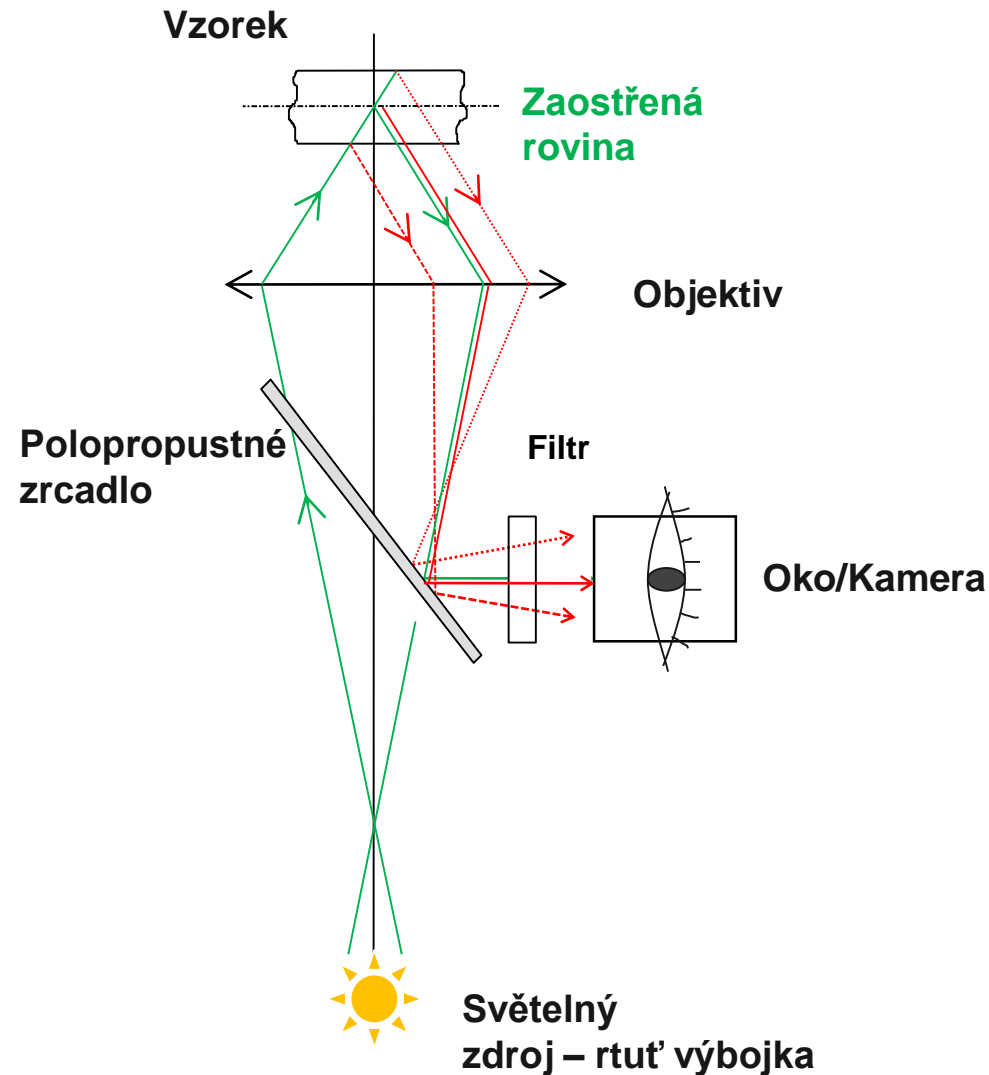


Epifluorescenční mikroskop (widefield)



Exitace fluorochromu

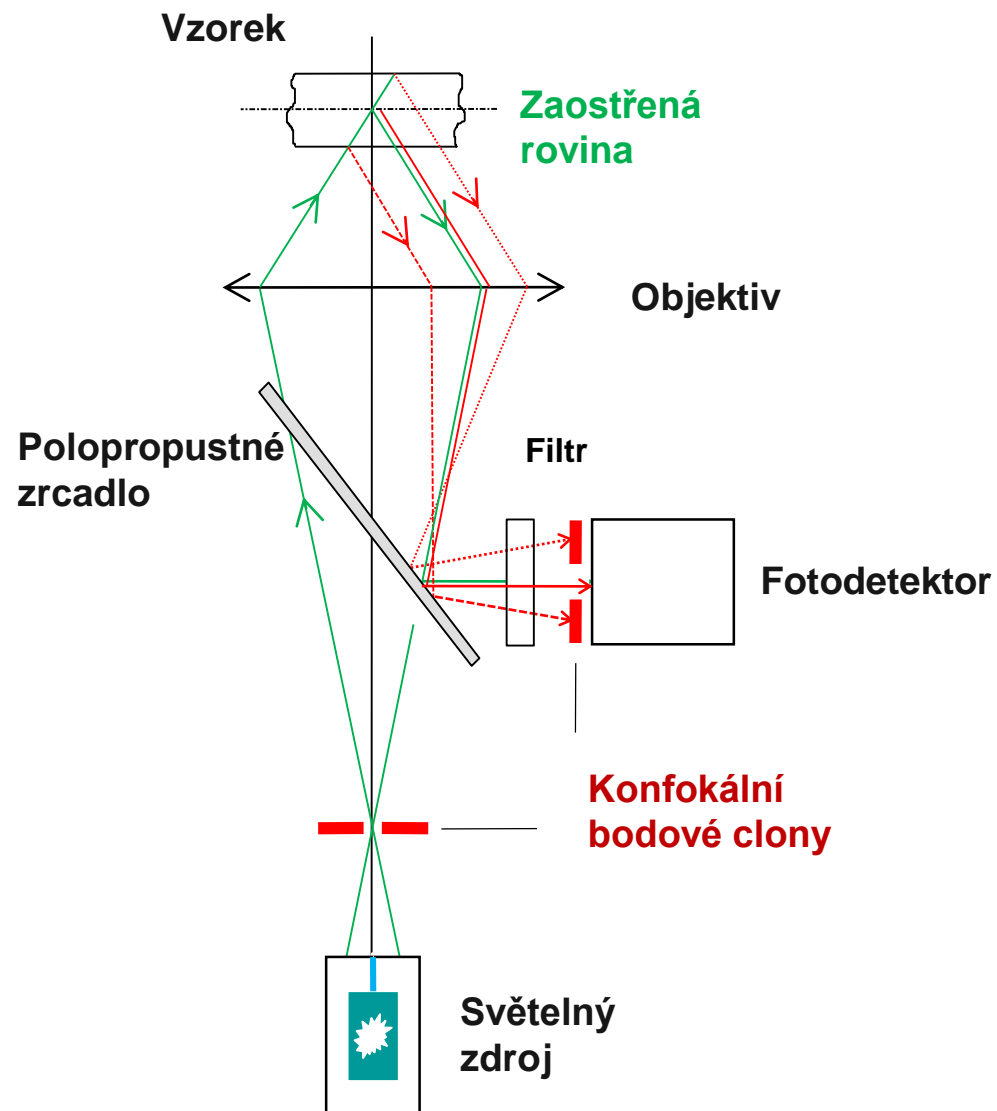
Epifluorescenční mikroskop (widefield)



Excitace fluorochromu a emise probíhá současně. Avšak barvy jsou odděleny poloprop. zrcadlem a filtrem

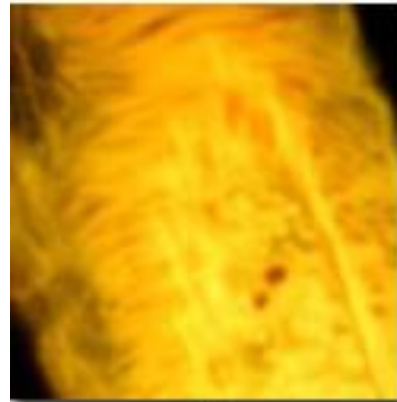


Konfokální mikroskop

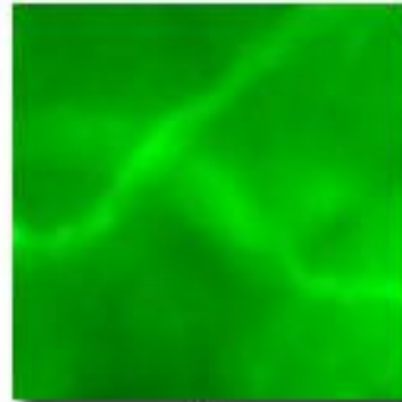


Rozdíl mezi konfokální a epifluorescenční mikroskopií

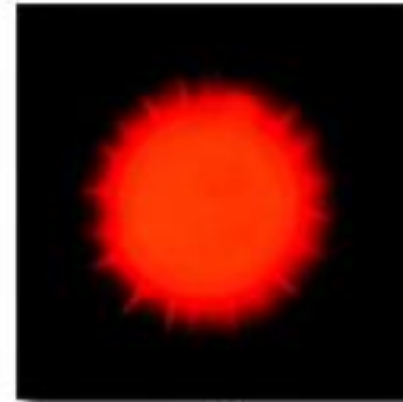
epifluorescenční



(a)

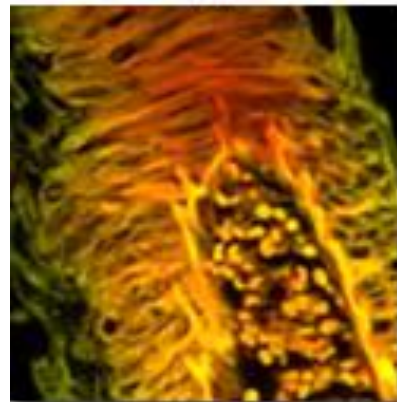


(b)

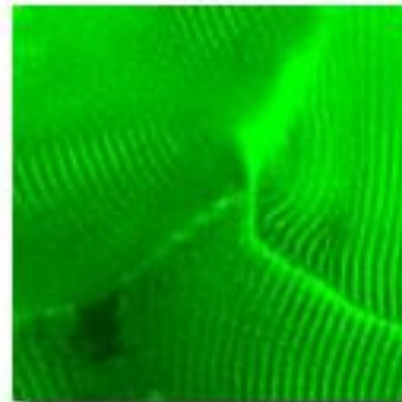


(c)

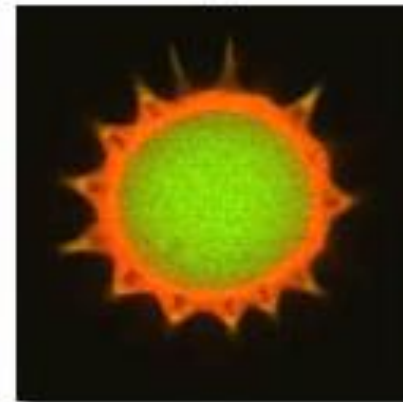
konfokální



(d)



(e)



(f)

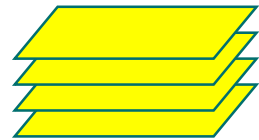
céva

žilnatění listu

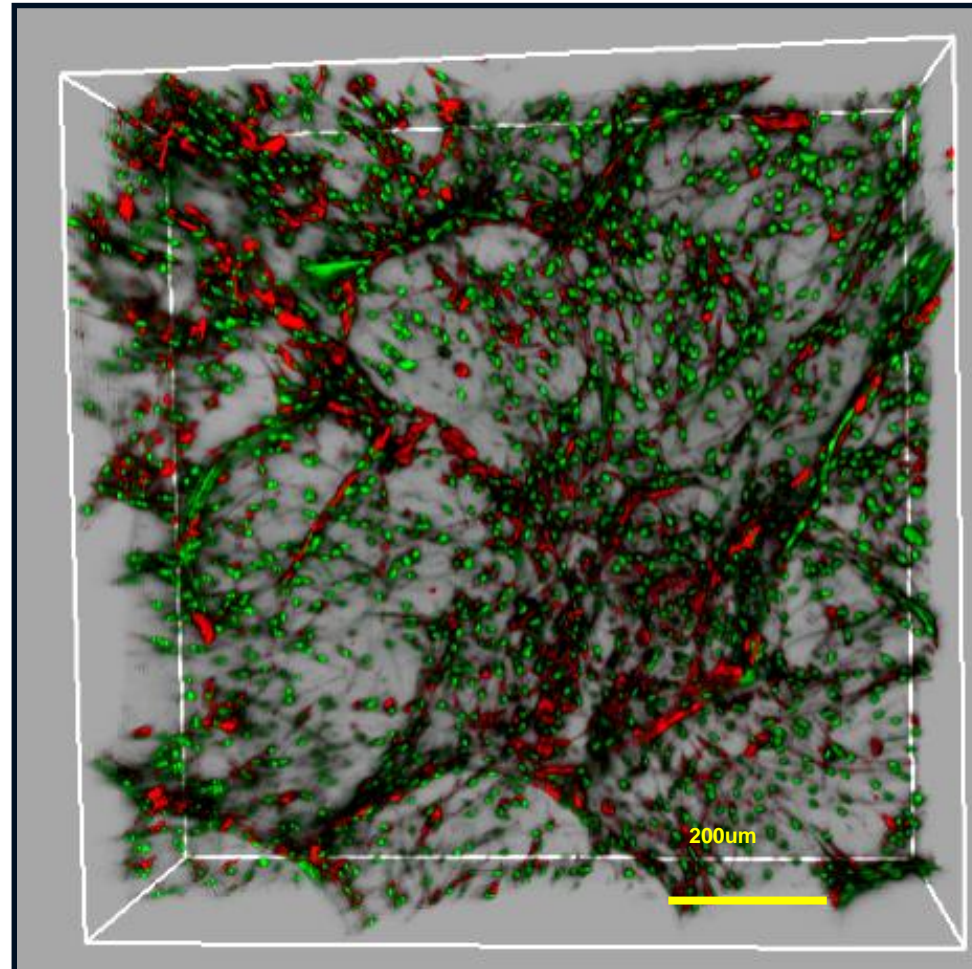
pylové zrno

Laserová skenovací konfokální mikroskopie

3D rekonstrukce obrazu



jádra
cytoskelet



Live imaging

časosběrná zobrazení buněk

- Různé režimy zobrazení
 - Procházející světlo
 - Fluorescenční značení

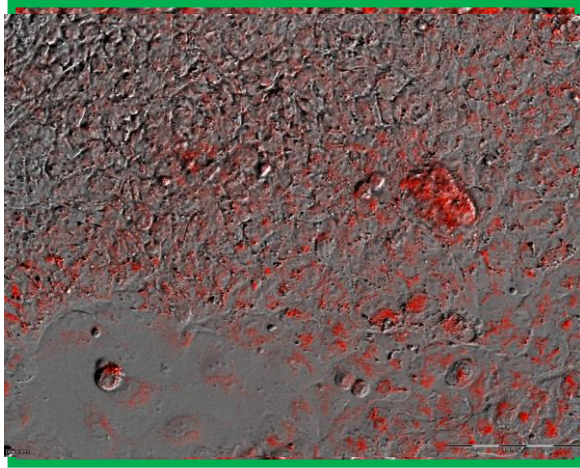
- Využití v medicíně
 - Analýzy změn chování buněk (morfologie, proliferace, apoptóza)
 - Evaluace vlivu rozpustných látek a substrátů

(Stanovení toxických/podpurných účinků)

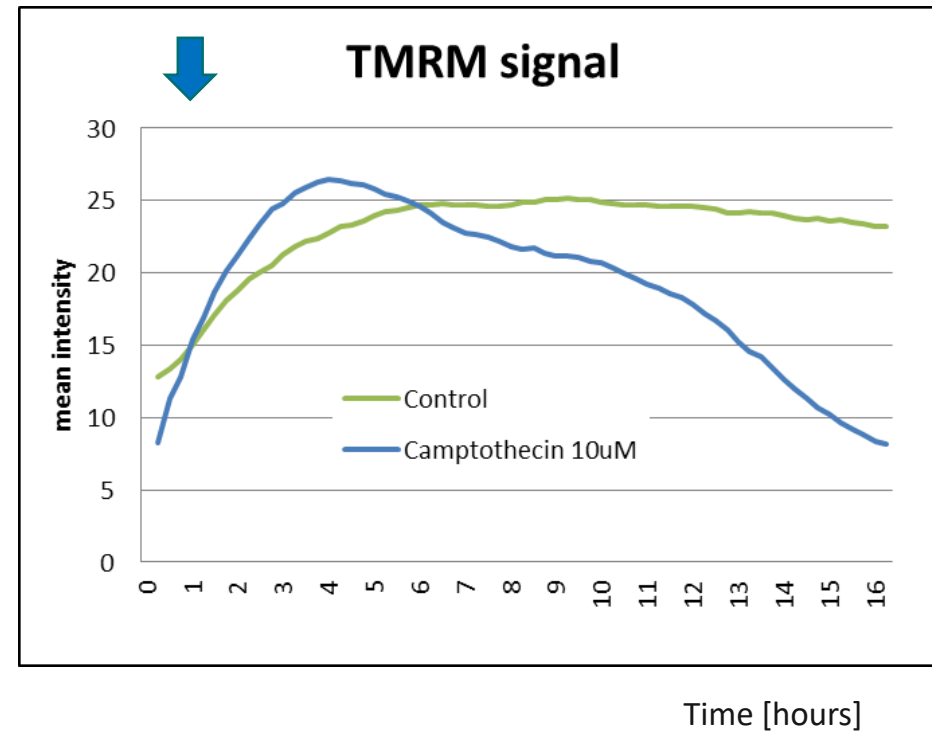
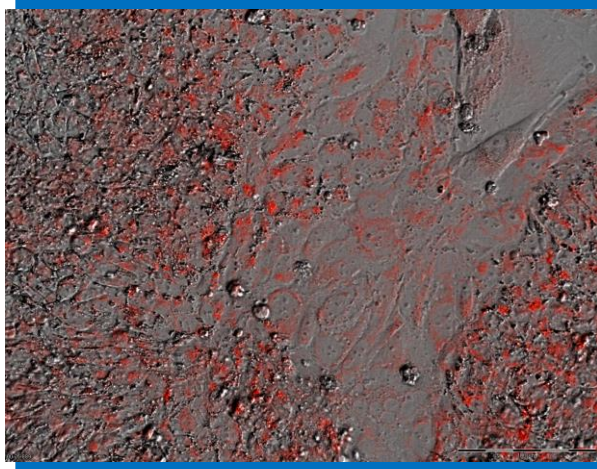


Apoptóza a mitochondrie

hESC Control

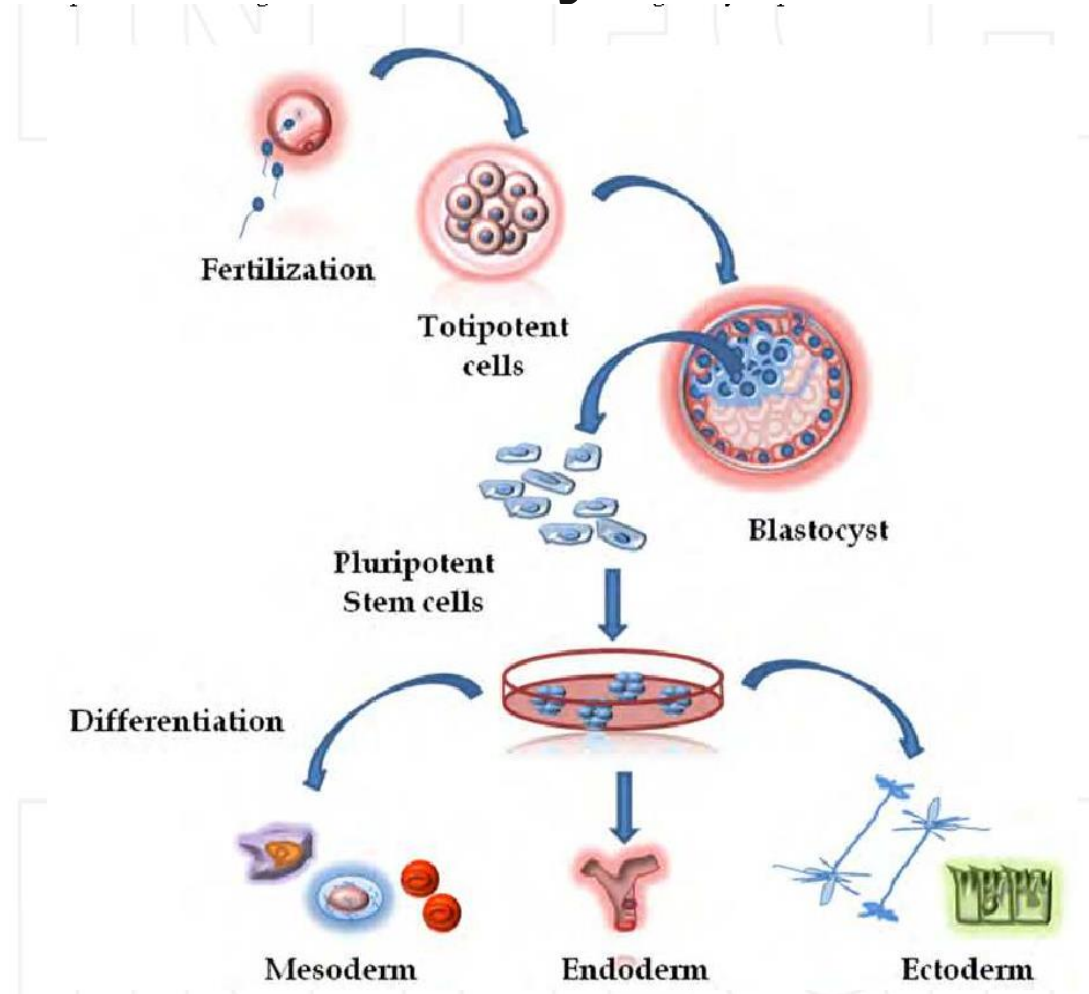


hESC + Camptothecin



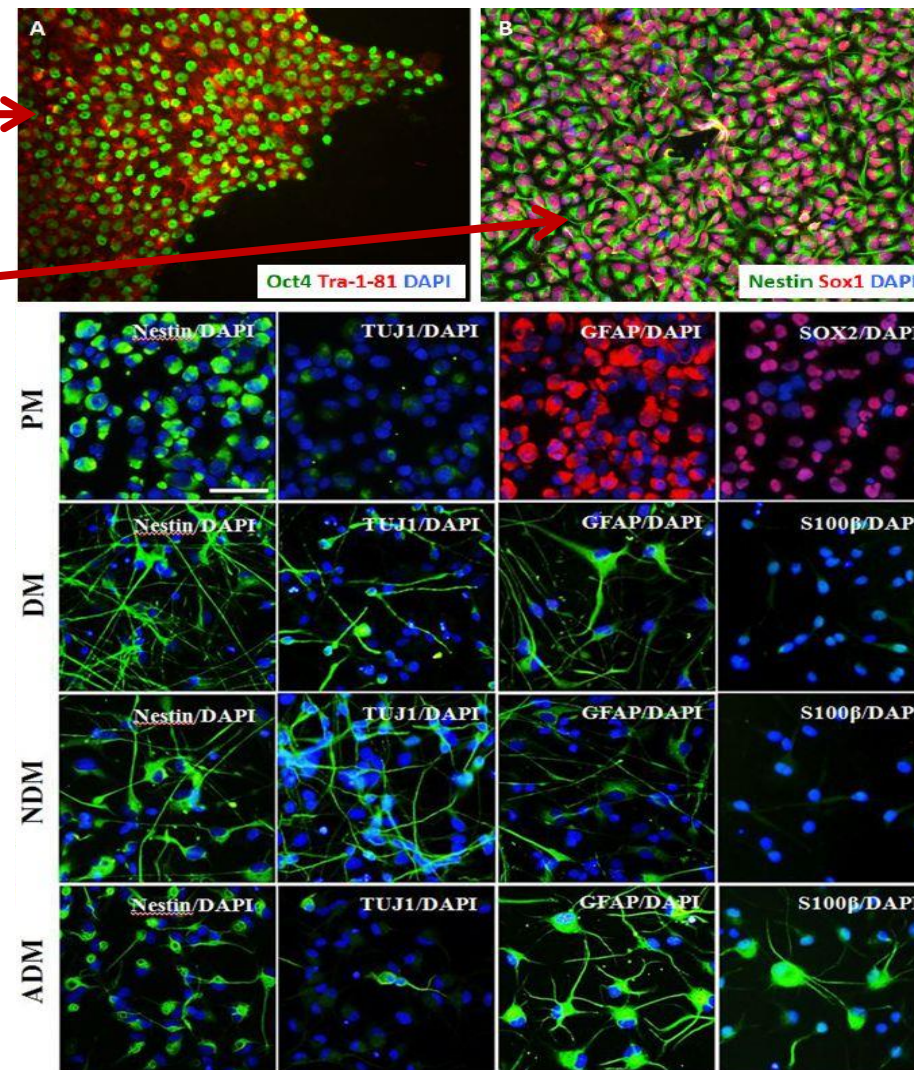
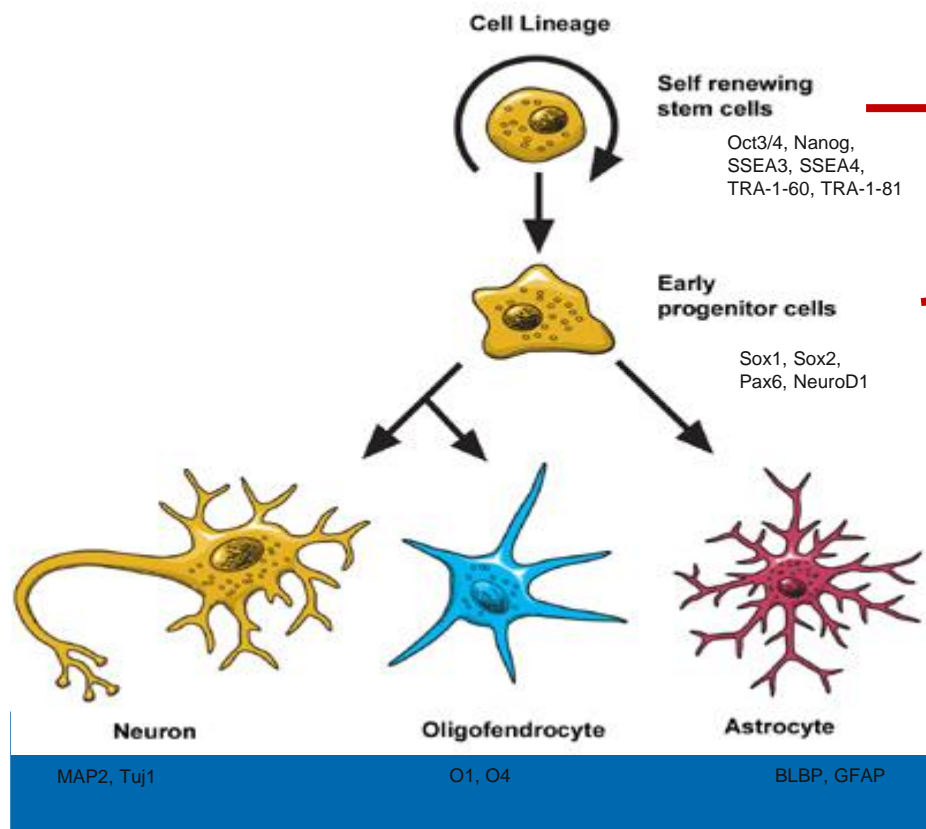
Fluorescenční mikroskopie

Kmenové buňky – diferenciace



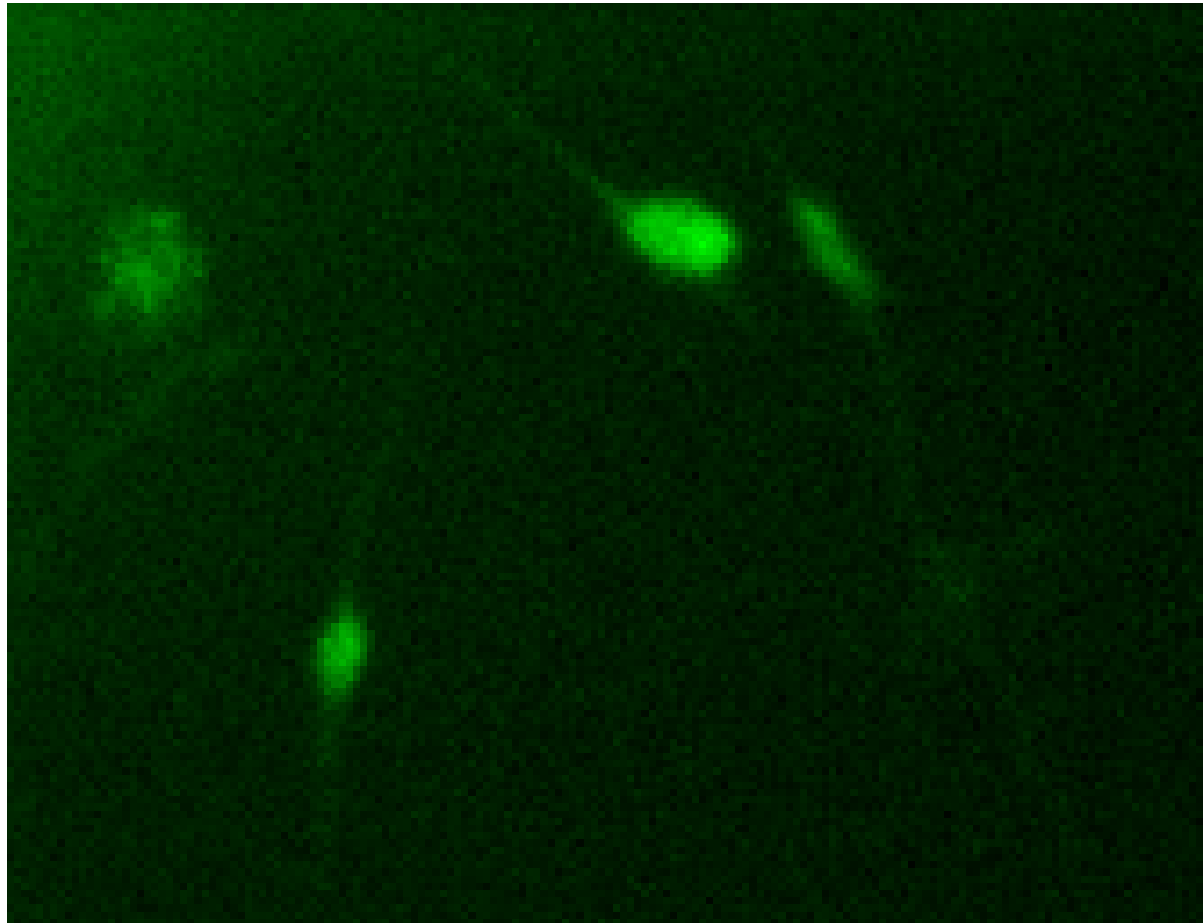
Fluorescenční mikroskopie

Neuronální kmenové buňky



Fluorescenční mikroskopie

funkční eseje - vápníková signalizace

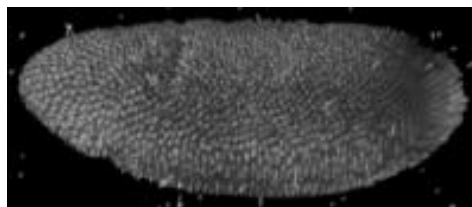


3D fluorescenční mikroskopie

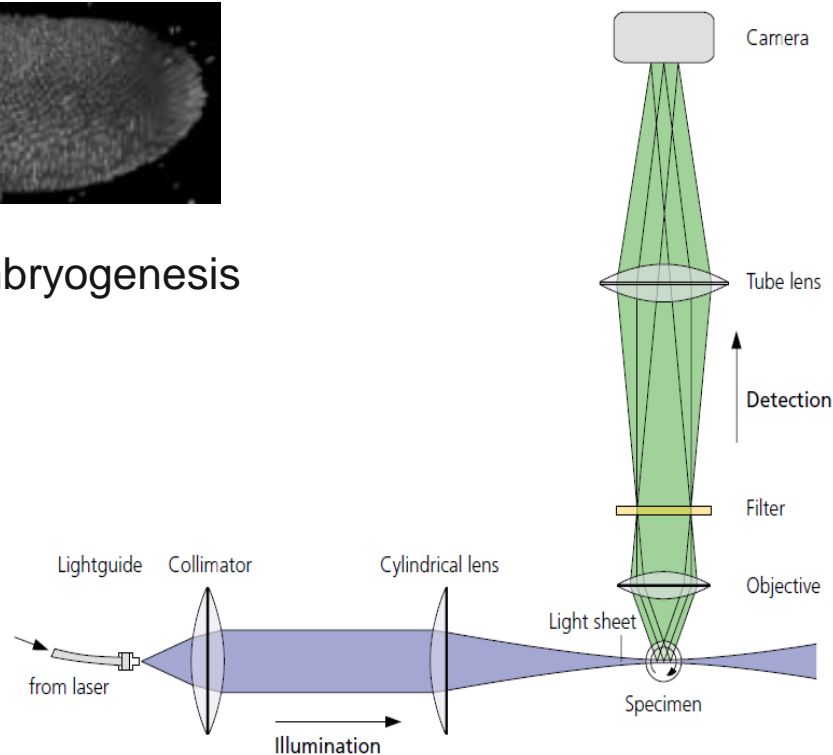
SPIM mikroskopie - *selective plane illumination microscopy*

Vzorek je uložen v tubě a je rotován během snímání

Rekonstrukcí obrazu lze pak vytvořit dynamický 3D model



Drosophila embryogenesis



<https://www.youtube.com/watch?v=yk7TWOtrpHM>
Zebrafish development

<http://vimeo.com/51955484> - zebrafish

<http://phys.org/news/2012-06-life-fast-lane.html>
[http://openspim.org/Welcome to the OpenSPIM Wiki](http://openspim.org/Welcome_to_the_OpenSPIM_Wiki)

<https://www.youtube.com/watch?v=yk7TWOtrpHM>
Zebrafish development