MUNI
SCI

Fluorescenční mikroskop

doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.
Ústav experimentální biologie PřF MU

Program přednášky:

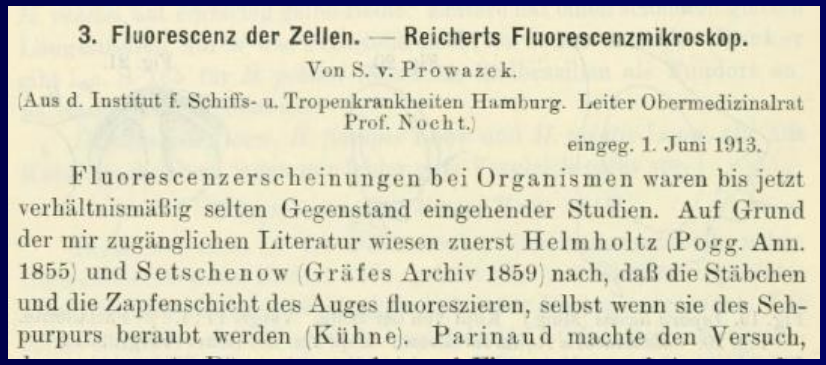
- konstrukce a princip fluorescenčního mikroskopu
- objektivy
- zdroje světla
- filtry

Otto Heimstaedt a Heinrich Lehmann (1911-1913)

- sestrojili první fluorescenční mikroskop s UV excitací
- autofluorescence bakterií, protozoí, rostlinných a živočišných buněk
- organické makromolekuly - albumin, elastin, keratin

Stanislav von Prowazek (1913)

- pozorování ve fluorescenčním mikroskopu vazbu fluoroforů na živé buňky
- odhalení původce tyfu – *Ricketsia prowazekii*



3. Fluorescenz der Zellen. — Reicherts Fluorescenzmikroskop.

Von S. v. Prowazek.

(Aus d. Institut f. Schiffs- u. Tropenkrankheiten Hamburg. Leiter Obermedizinalrat Prof. Nocht.)

eingeg. 1. Juni 1913.

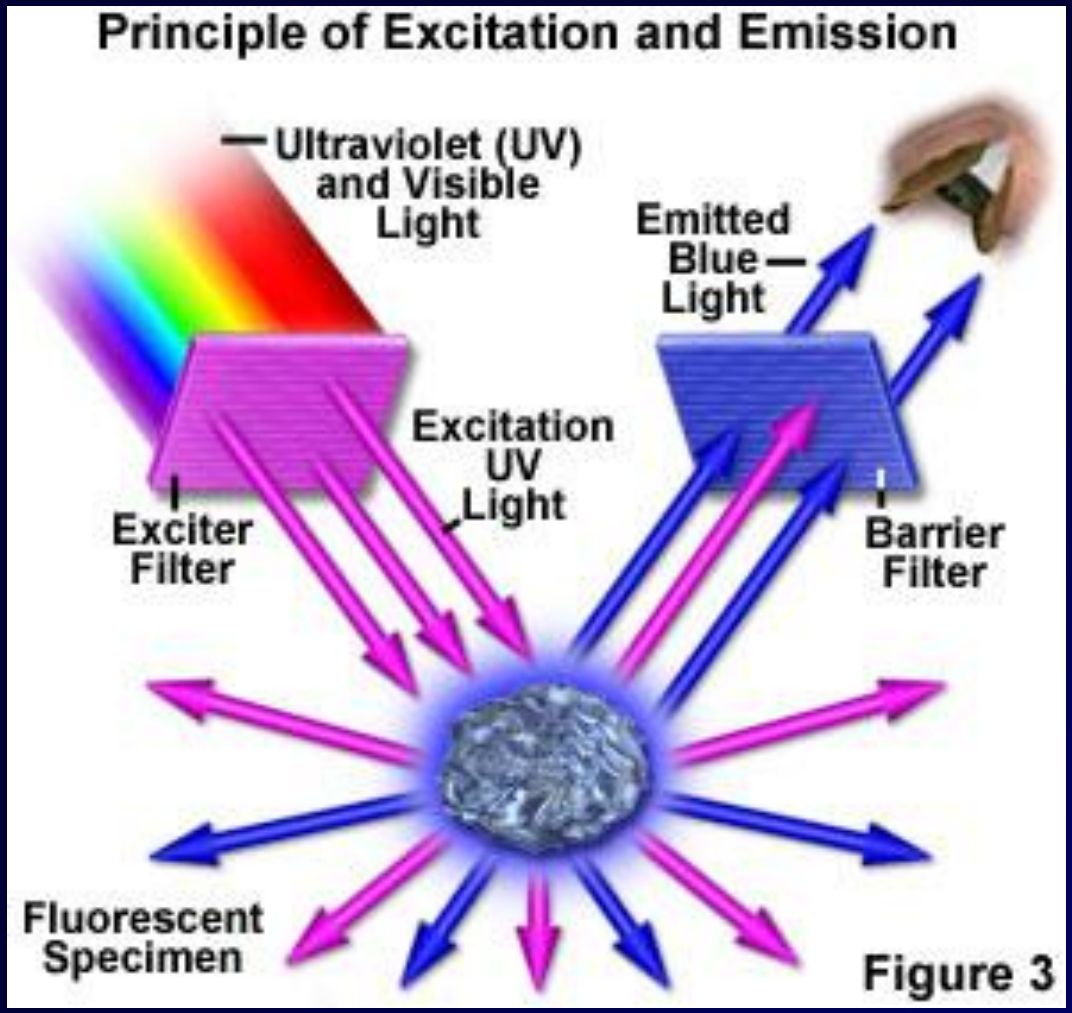
Fluorescenzerscheinungen bei Organismen waren bis jetzt verhältnismäßig selten Gegenstand eingehender Studien. Auf Grund der mir zugänglichen Literatur wiesen zuerst Helmholtz (Pogg. Ann. 1855) und Setschenow (Gräfes Archiv 1859) nach, daß die Stäbchen und die Zapfenschicht des Auges fluoreszieren, selbst wenn sie des Sehpurpurs beraubt werden (Kühne). Parinaud machte den Versuch,

MUNI SCI

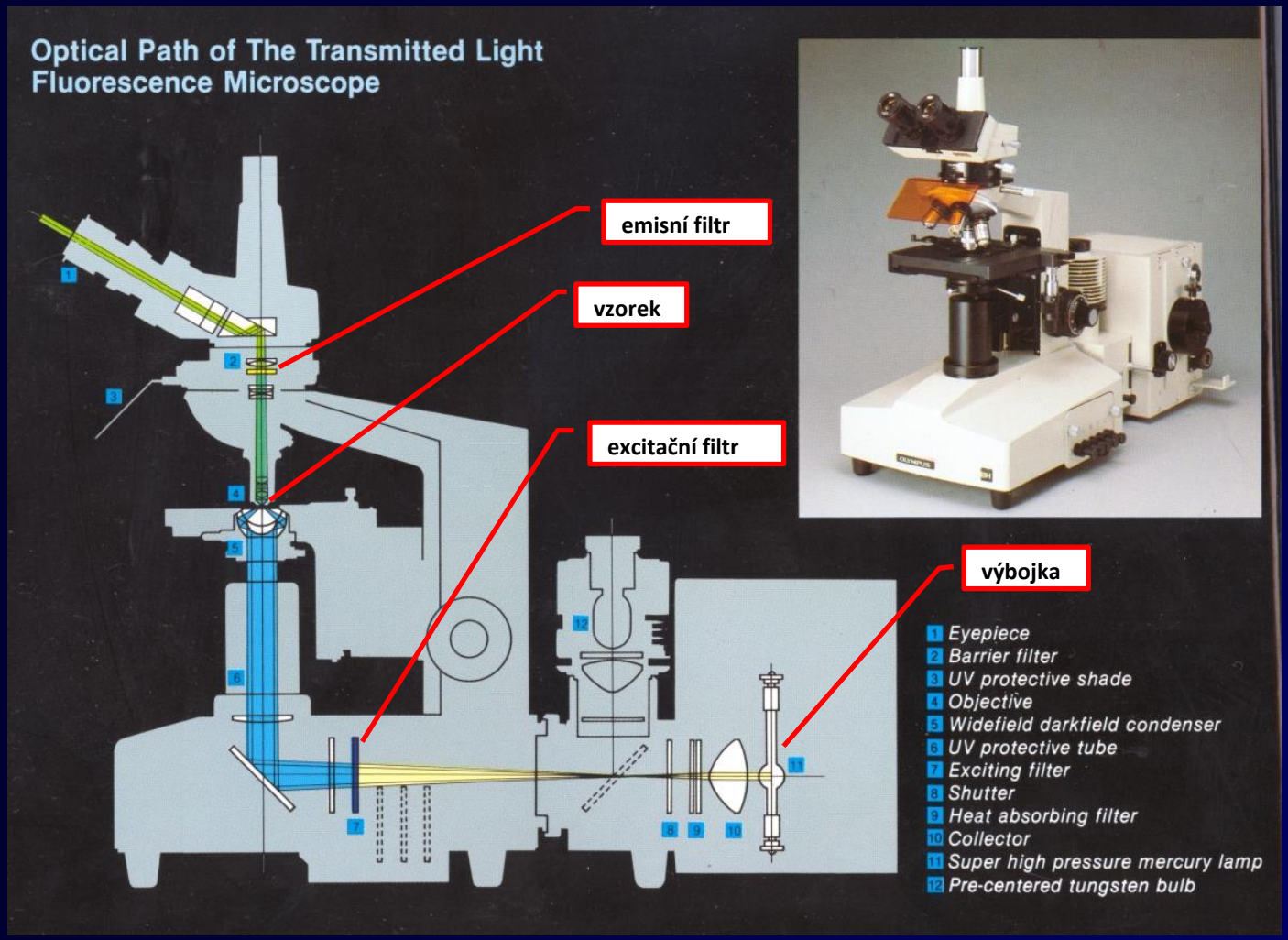
Fluorescenční mikroskop

- je mikroskopem světelným
- lze pozorovat i v procházejícím „bílém“ světle

Základní princip fluorescenční mikroskopie

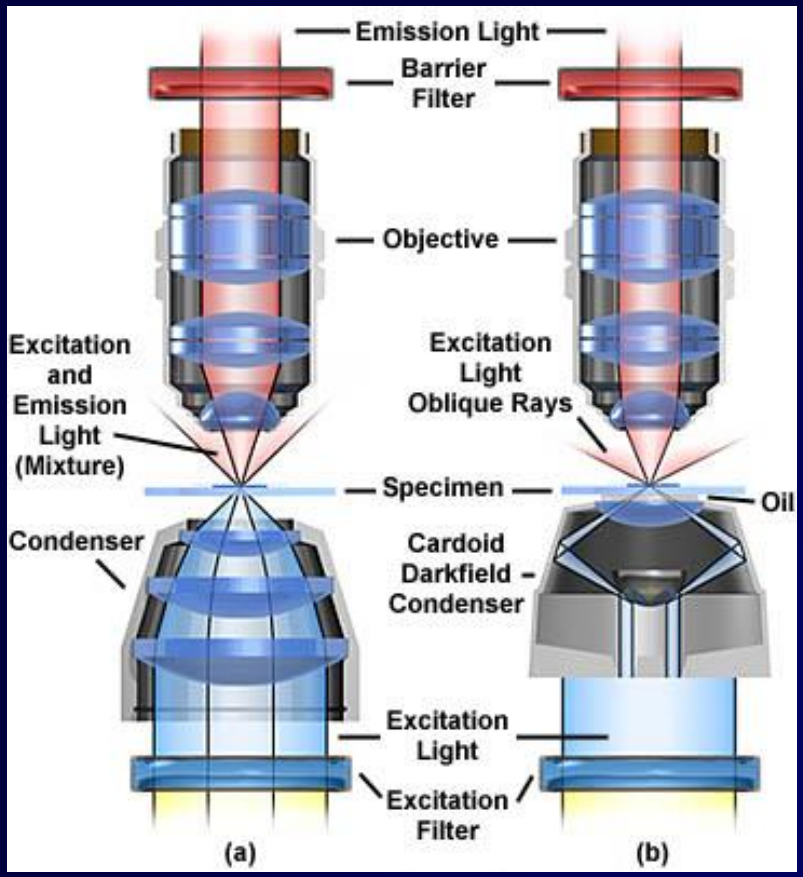


Transmisní fluorescenční mikroskop (Transmition light fluorescence microscope)



Transmisní fluorescenční mikroskop

- výhodnější použití kondenzoru pro temné pole
- excitační světlo nemíří do objektivu
- oddělené filtry

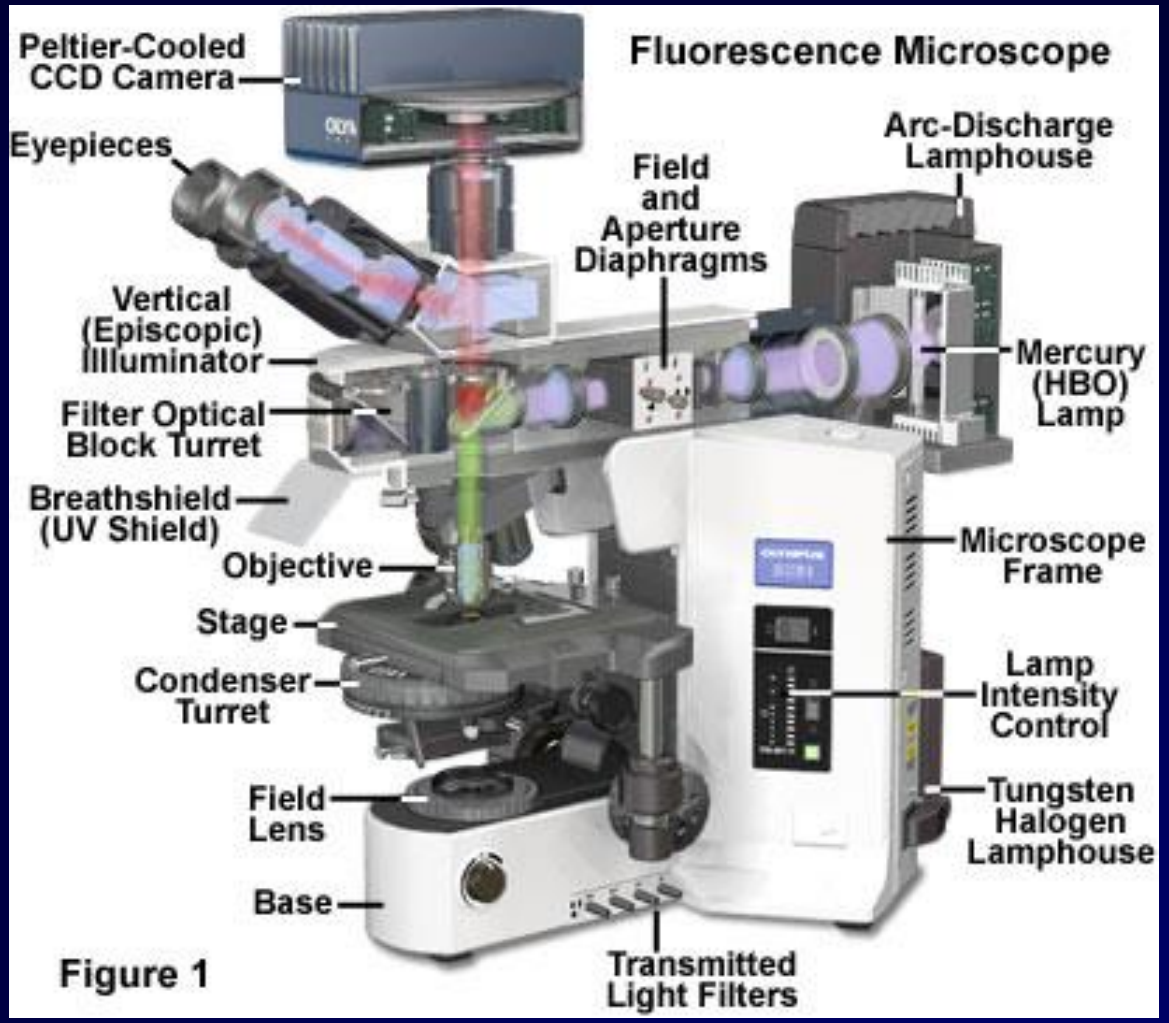


Epifluorescenční mikroskop
(Reflected light fluorescence microscope)

- kostra
- zdroj bílého světla
- kondenzor
- stolek
- objektivy
- tubus
- okuláry
- ovládací prvky:
- makro+mikrošroub
- ovládání světla
- filtry, clony...

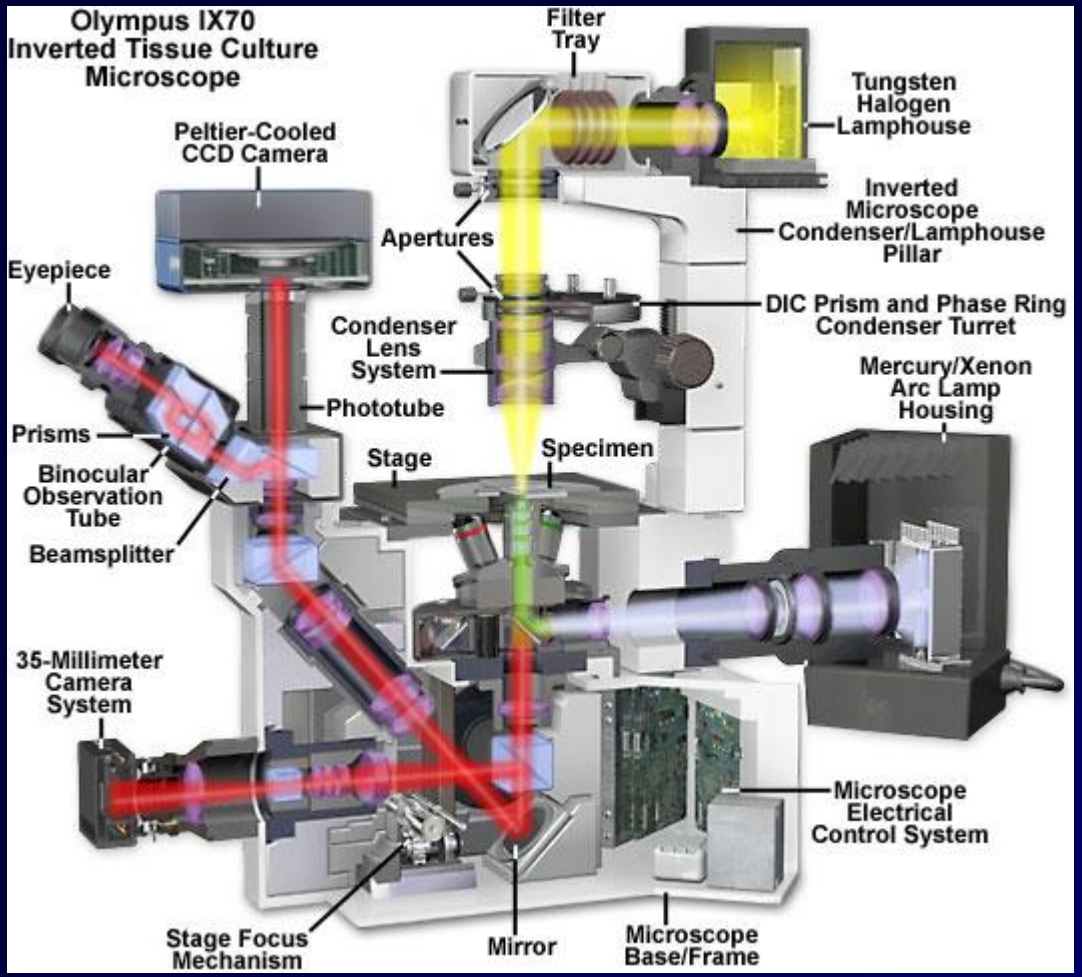
ILUMINÁTOR

- zdroj excitačního světla
- clony, filtry
- kostky

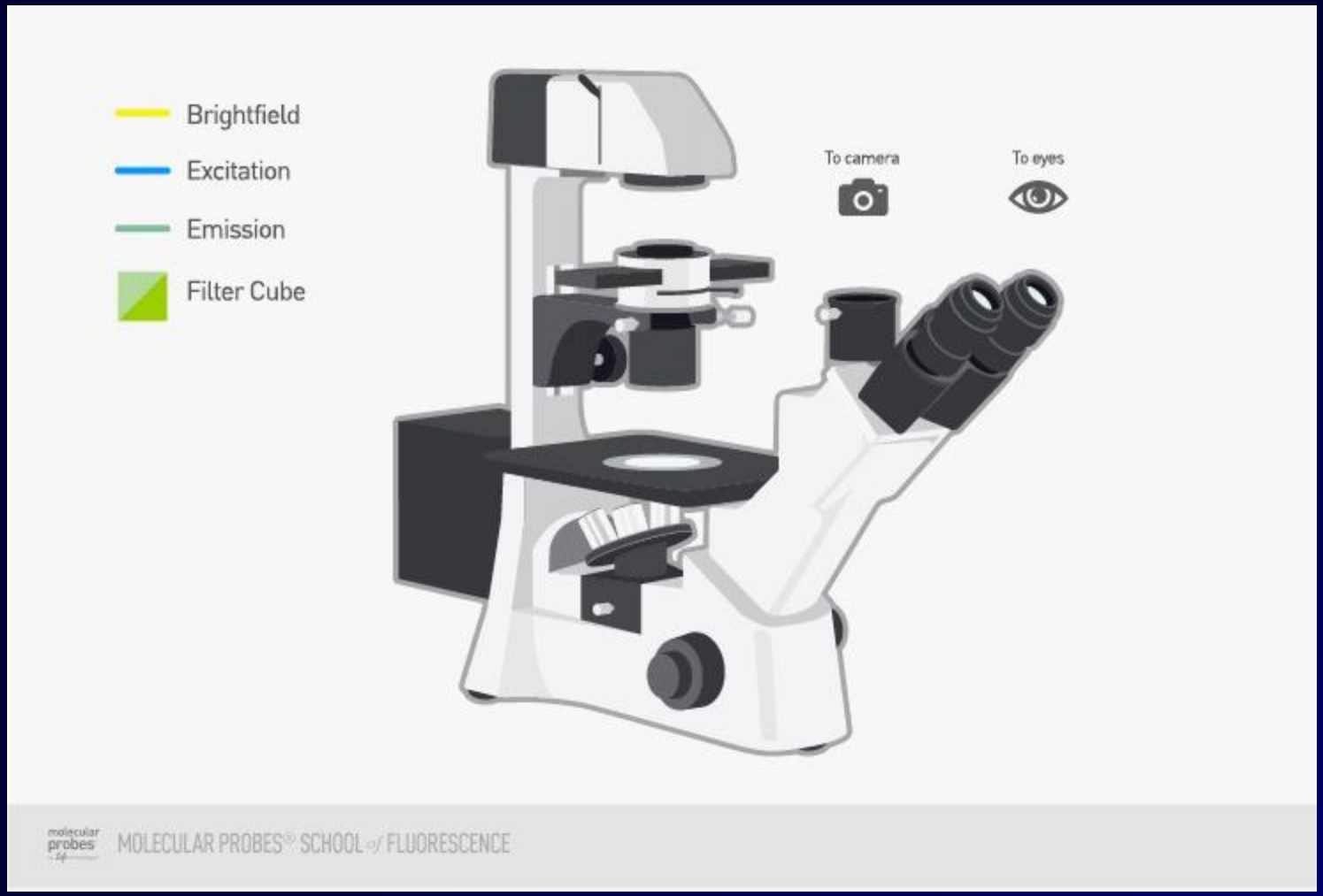


Invertovaný fluorescenční mikroskop

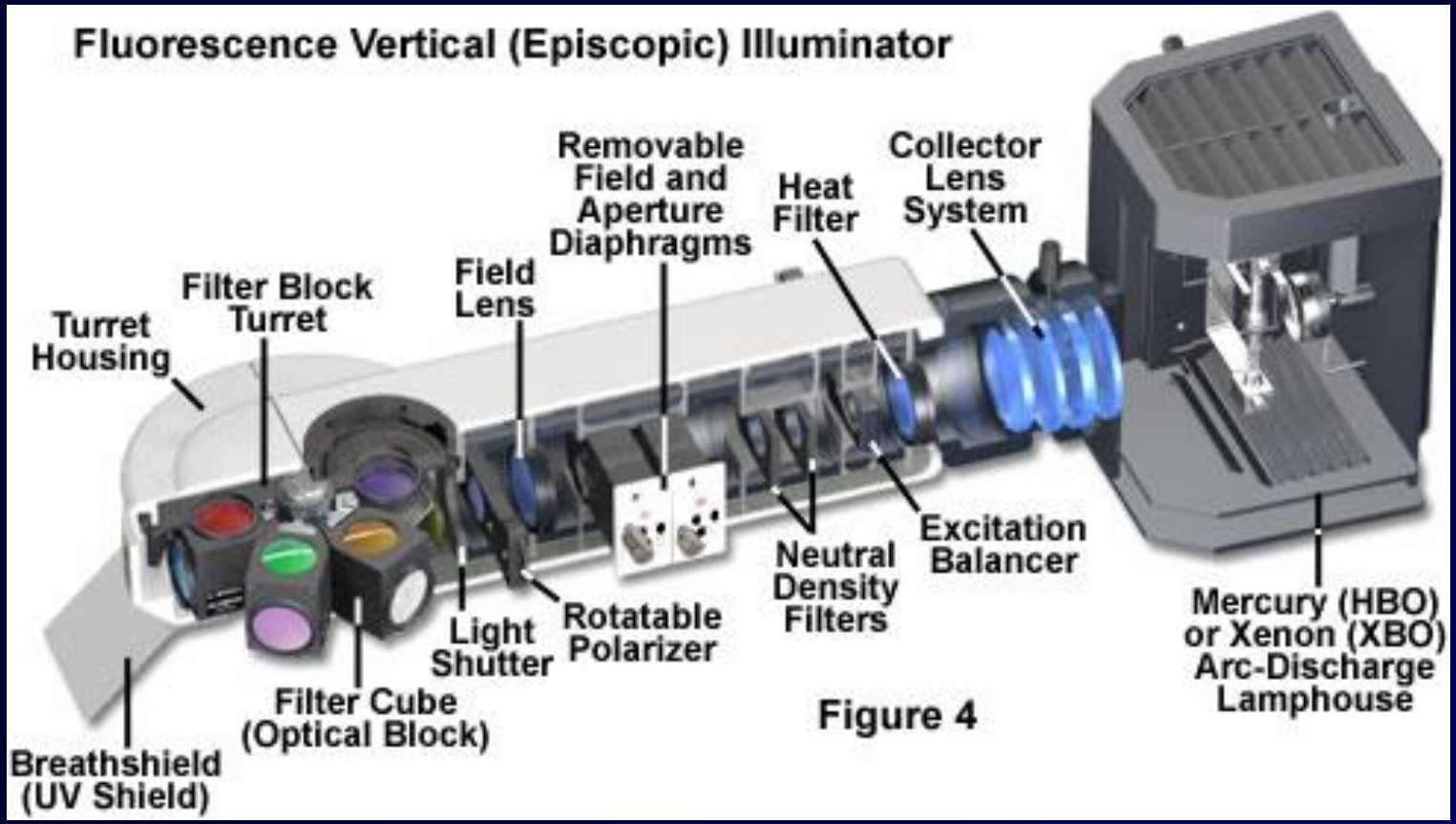
- práce s vysokým vzorkem (kultivační nádoby)



Invertovaný fluorescenční mikroskop



Fluorescenční nástavec (iluminátor)

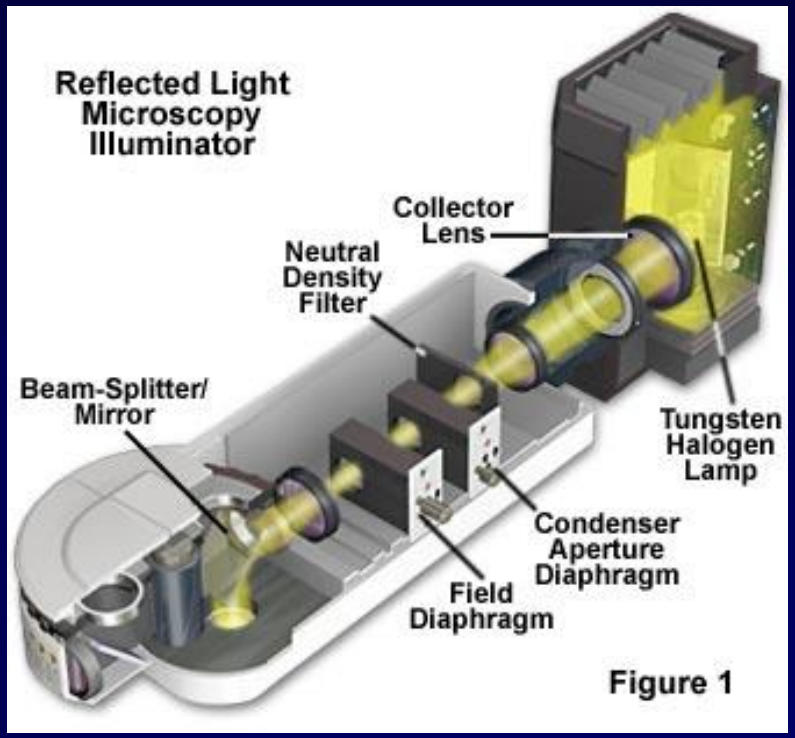


Köhlerovo osvětlení pro odražené světlo (1893-4)

- uspořádání optické soustavy pro ideální osvětlení
- výsledek: světlo vyplní celý otvor objektivu

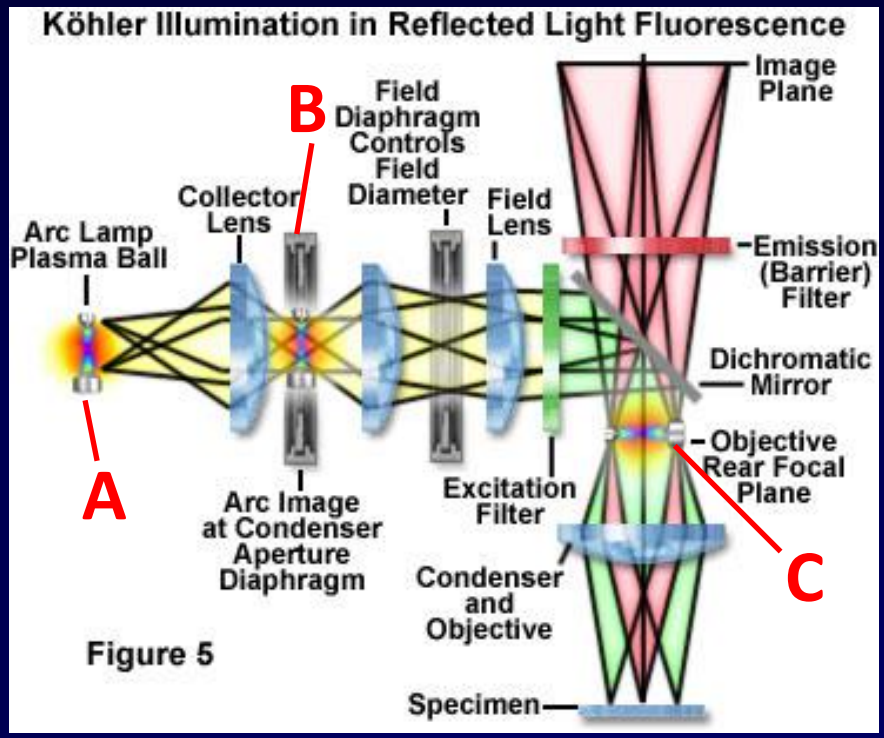
a) maximální osvětlení
zvýšení intenzity díky kolektorové čočce, zdroj světla blízko ohniska čočky

b) stejnoměrné osvětlení
filtry k redukci „hot-spots“ (místa s nadměrnou intenzitou) nebo difuzní fitr



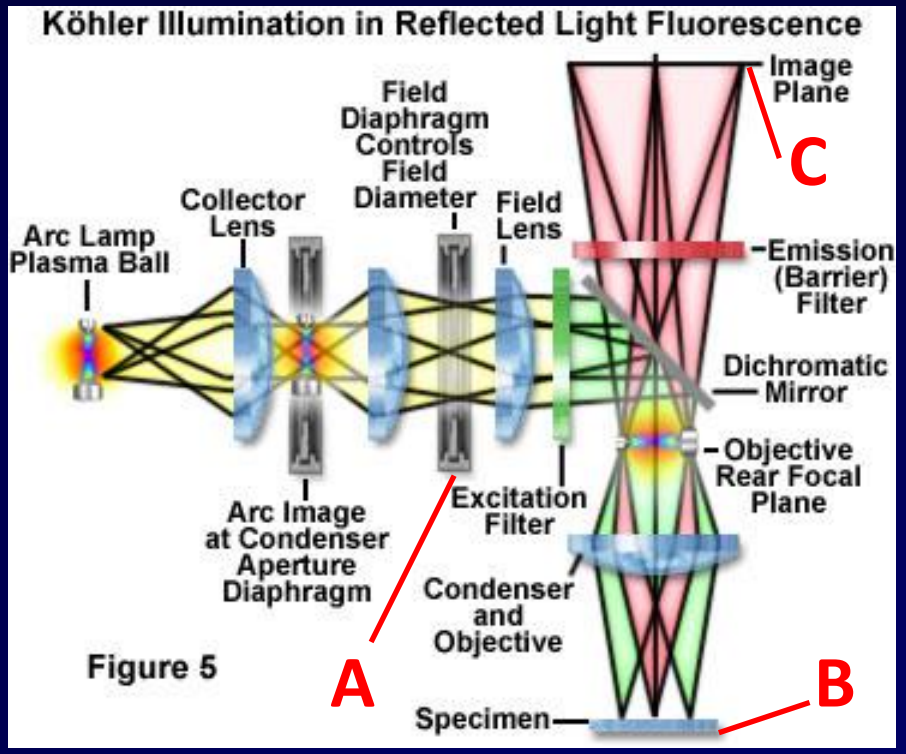
Osvětlení

- osvětlení je tvořeno 3 konjugovanými (stejně zaostřenými) rovinami
  - A) rovinou zdroje světla
  - B) rovinou aperturní clony fluorescenčního iluminátoru
  - C) zadní ohniskovou rovinou objektivu
- vypadává přítomnost kondenzoru
- osvětlení přichází z objektivu a je jím také odváděno
- intenzita a kontrast osvětlení jsou regulovány jen aperturní clonou
- nemění se tím velikost osvětleného pole



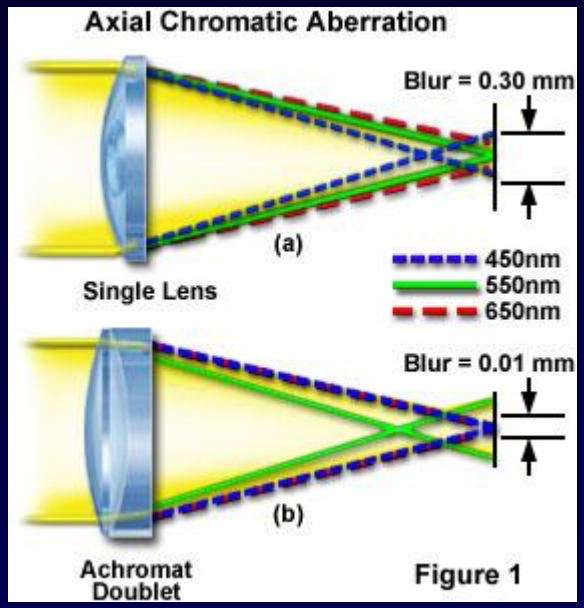
Zobrazení

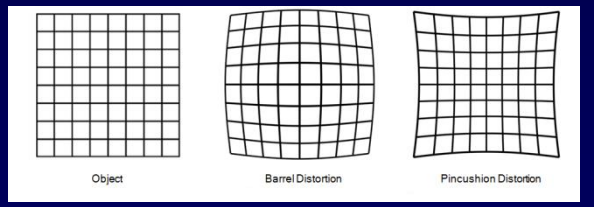
- zobrazení je tvořeno 3 konjugovanými rovinami
  - A) rovinou polní clony
  - B) rovinou zobrazovaného objektu
  - C) střední rovinou obrazu
- obraz zdroje světla je mimo rovinu zaostření -> stejnoměrné osvětlení
- polní clona reguluje změnu velikosti osvětlení pole
- nemění se tím intenzita osvětlení
- nastavení co nejmenší, ale aby nebyla vidět (x photobleaching)

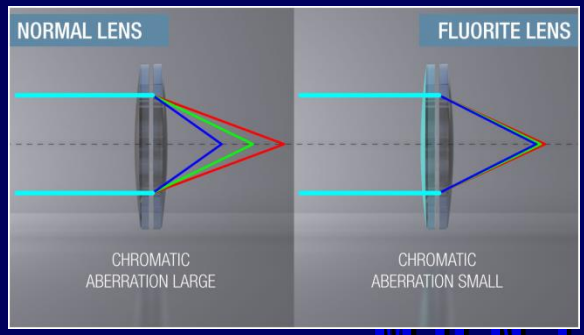


Typy objektivů

- **Achromáty** - jednoduché, složené ze 2 až 6 čoček; je u nich částečně korigovaná chromatická vada, červená a modrá je zaostřena stejně
- **Apochromáty** - korekce barevné vady pro tři základní barvy spektra, vyšší numerická apertura a lepší rozlišení detailů
- **Planachromáty** - barevně korigovány jako achromáty a korigováno i vyklenutí zorného pole (mikrofotografie)
- **Planapochromáty** - zcela odstraněno vyklenutí zorného pole i chromatická vada, patří k nejlepším a nejdražším objektivům
- **Fluoritové objektivy** - z fluoritového skla (vynikající optické vlastnosti), dobře propouští UV záření, vhodné pro fluorescenci, ale i pro pozorování ve světlém poli







Objektivy pro fluorescenční mikroskopii

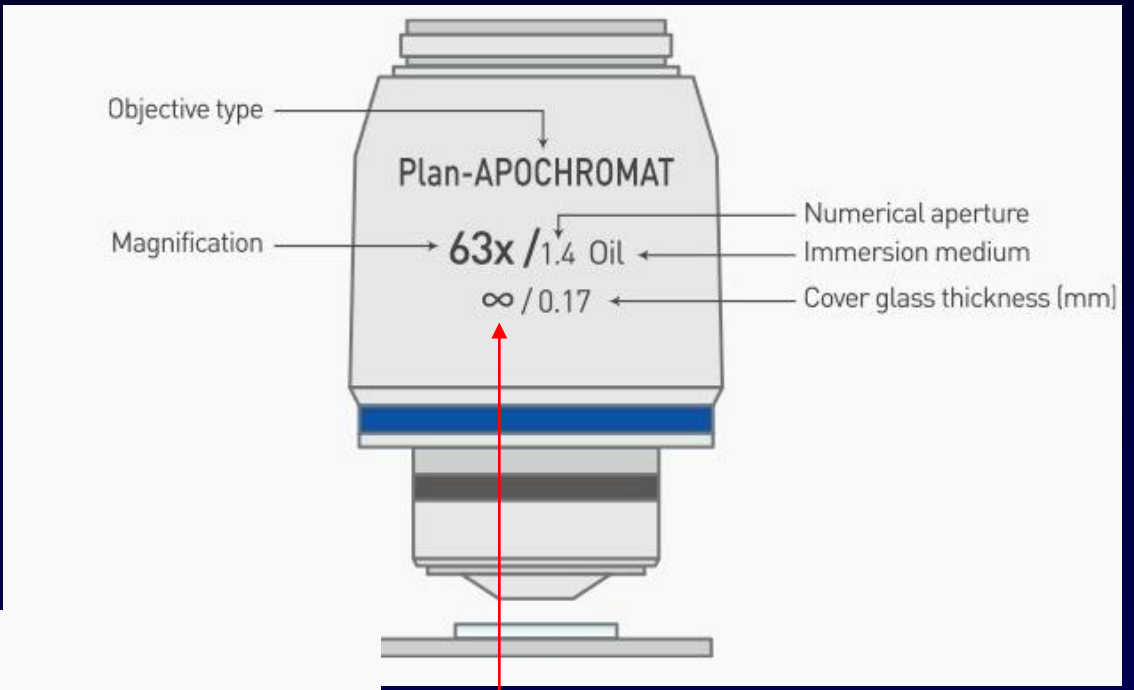
použití objektivů

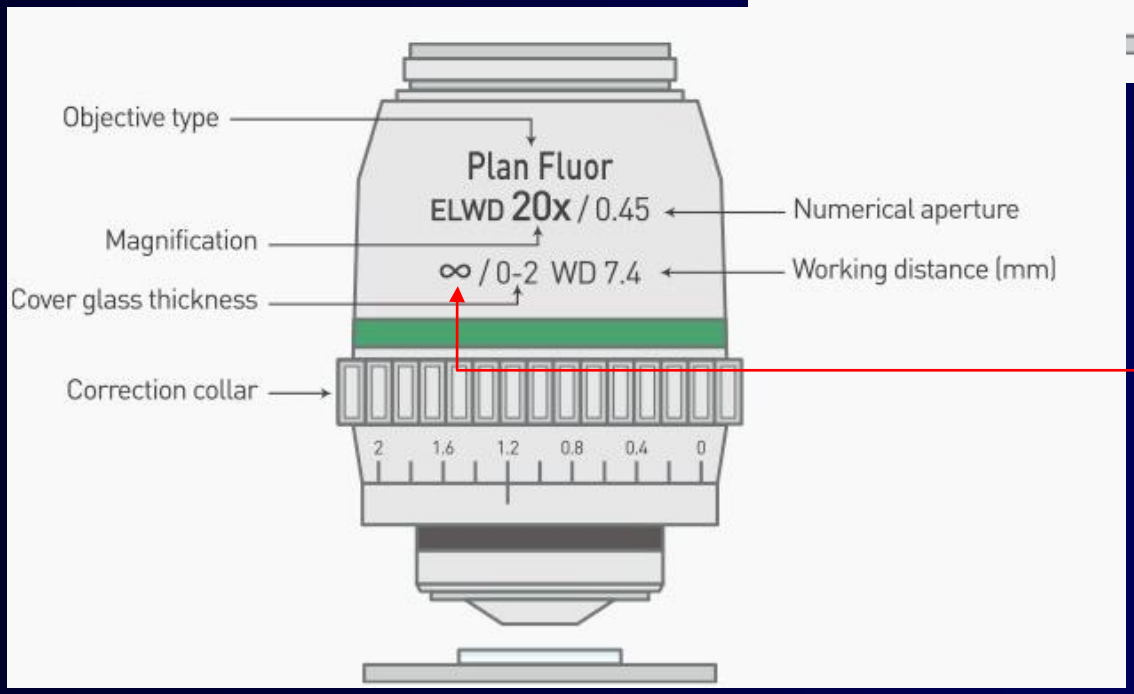
- plan-fluoritových a plan-apochromatických objektivů
- NA =1,3-1,4 pro olejovou imerzi
- musí propouštět UV a VIS světlo
- sklo musí mít minimální autofluorescenci
- antireflexní vrstvy

intenzita fluorescence (jas)

- počet fotonů na jednotku plochy za čas
- u FM snímajících odražené světlo (z preparátu), závisí na numerické apertuře objektivu (NA) a zvětšení (M)
- Intenzita ≈ NA^4/M^2

Popis objektivů





korekce na nekonečno:

světelné paprsky ze vzorku vycházejí jako rovnoběžky promítnuté do nekonečna

MUNI SCI

Numerická apertura

- udává světelnost objektivu

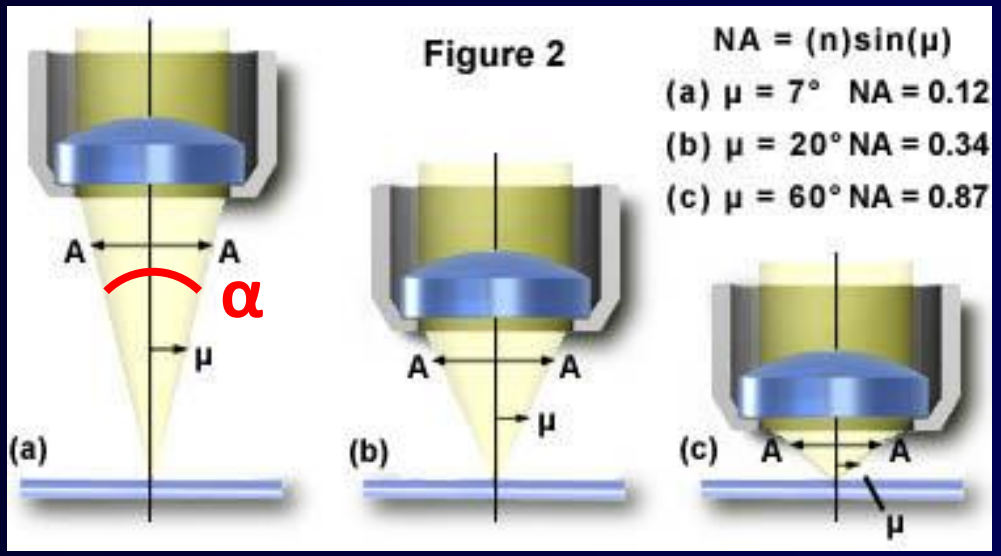
NA = n. sinμ (NA = n. sin $\alpha/2$)

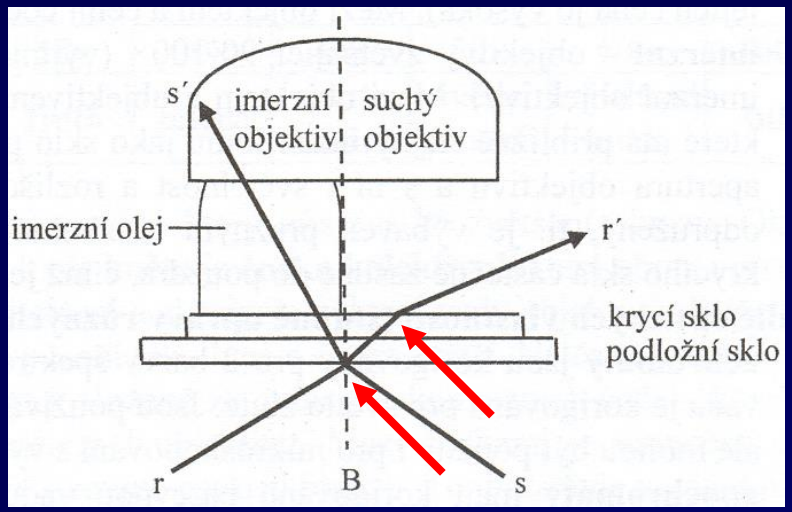
n - index lomu prostředí

μ - polovina tzv. otvorového úhlu (α)

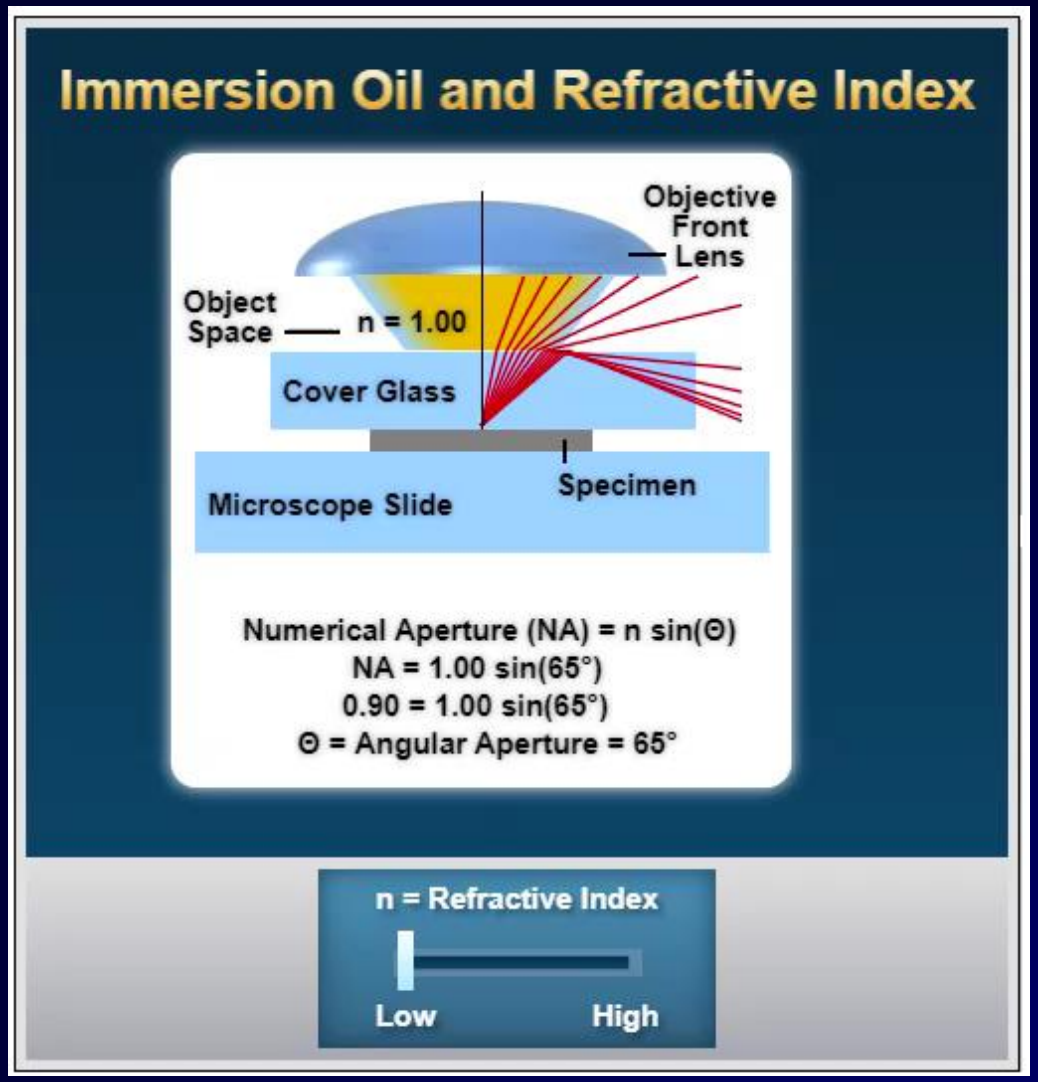
Index lomu prostředí

vzduch	(n = 1)
voda	(n= 1.33)
imerzní olej	(n = 1.51)



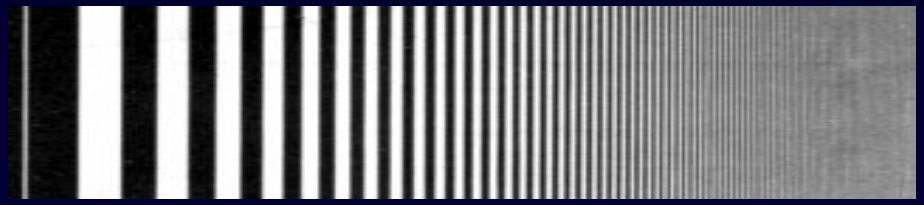


MUNI SCI

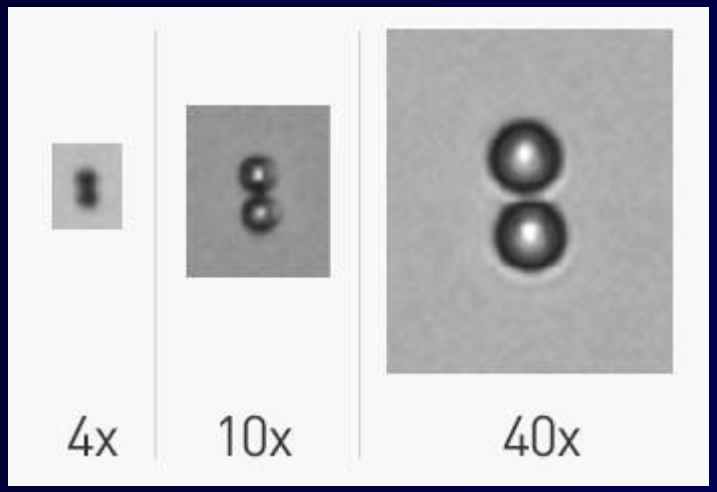


https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/microscopy/immersion/

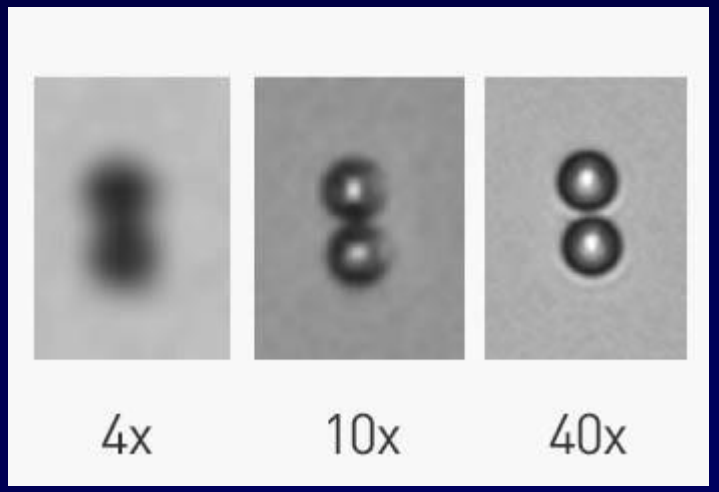
Rozlišovací schopnost



- nejmenší vzdálenost dvou bodů, které ještě vnímáme jako oddělené



Dva objekty (6 μm částice) při objektivech 4x, 10x, a 40x zv.



Totéž po srovnání velikosti obrázku

Rozlišovací schopnost

R = λ / 2NA

λ = vlnová délka
NA = n . sinμ

Srovnání rozlišovací schopnosti objektivů při 550nm (zelená)

	OBJECTIVE TYPE					
	Plan Achromat		Plan Fluorite		Plan Apochromat	
Magnification	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)	N.A	Resolution (μm)
4x	0.10	2.75	0.13	2.12	0.20	1.375
10x	0.25	1.10	0.30	0.92	0.45	0.61
20x	0.40	0.69	0.50	0.55	0.75	0.37
40x	0.65	0.42	0.75	0.37	0.95	0.29
60x	0.75	0.37	0.85	0.32	0.95	0.29
100x	1.25	0.22	1.30	0.21	1.40	0.20
N.A. = Numerical Aperture						

Zdroje světla pro fluorescenční mikroskop

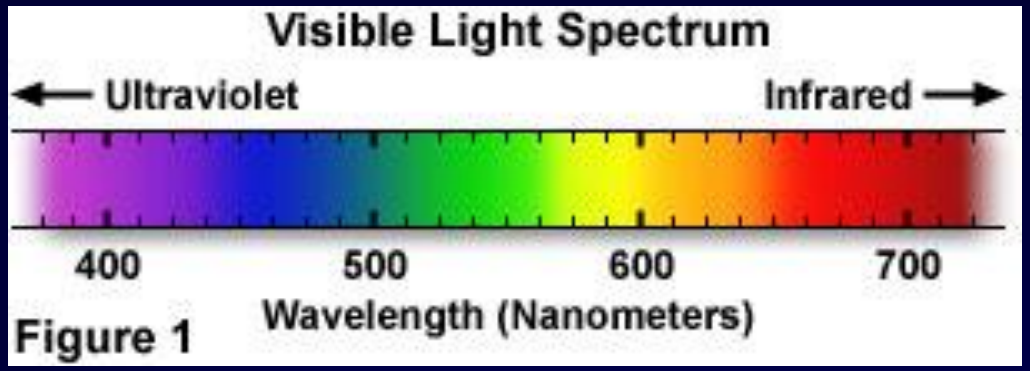


Figure 1

Wavelength Range (nanometers)	Perceived Color
340-400	Near Ultraviolet (UV; Invisible)
400-430	Violet
430-500	Blue
500-570	Green
570-620	Yellow to Orange
620-670	Bright Red
670-750	Dark Red
Over 750	Near Infrared (IR; Invisible)

Zdroje průchozího (bílého) světla

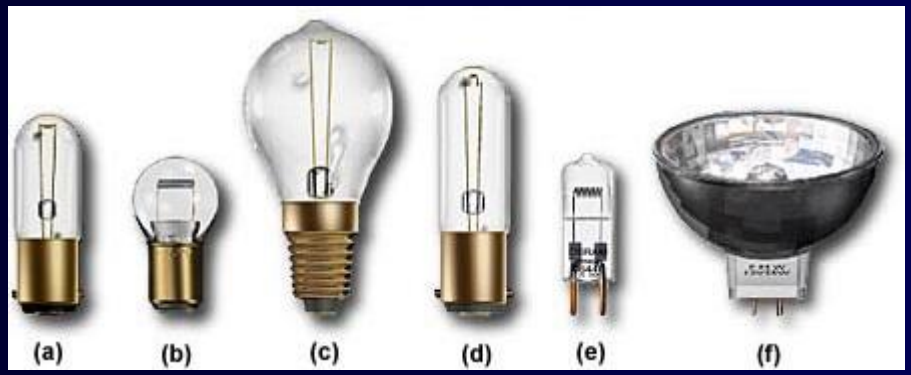
žárovky - el. proud rozžhaví vlákno

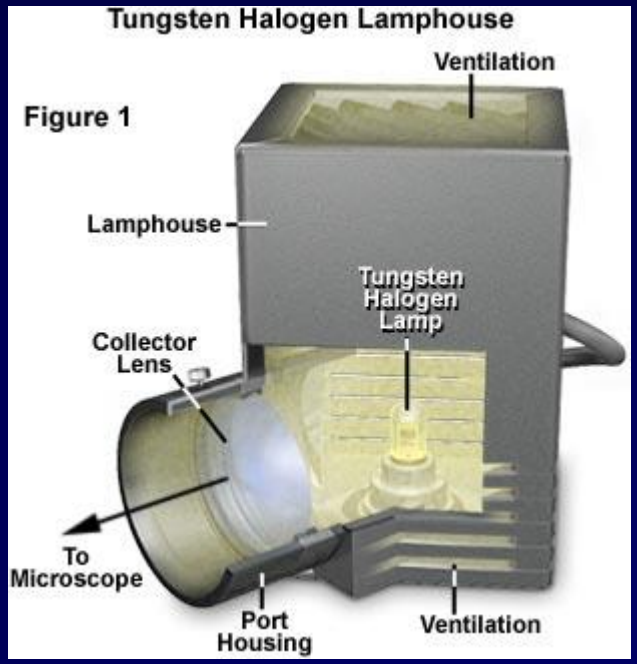
wolframová žárovka

- 300-1400nm
- W vlákno ve vakuu nebo inertní atmosféře (Kr, Xe)
- na světlo se spotřebuje 5-10% energie (zbytek na teplo)
- vysoká teplota vlákna (až 2500°C při 100W)
- s časem klesá intenzita světla, černání

wolframovo-halogenové žárovky

- v ochranné atmosféře přítomnost jódu nebo bromu
- vlákno má delší životnost

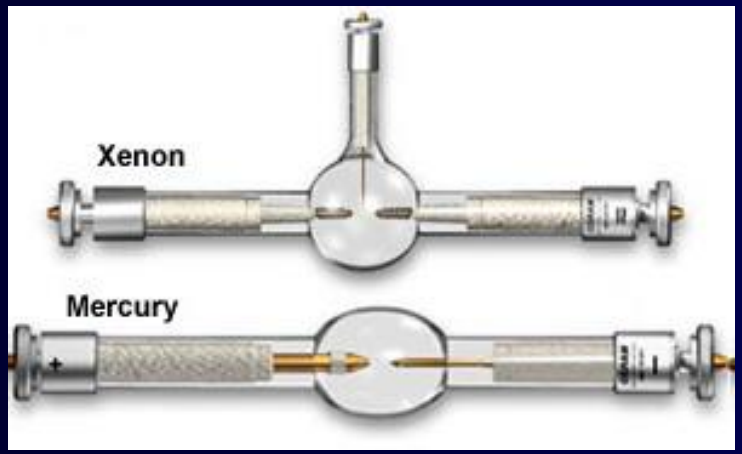


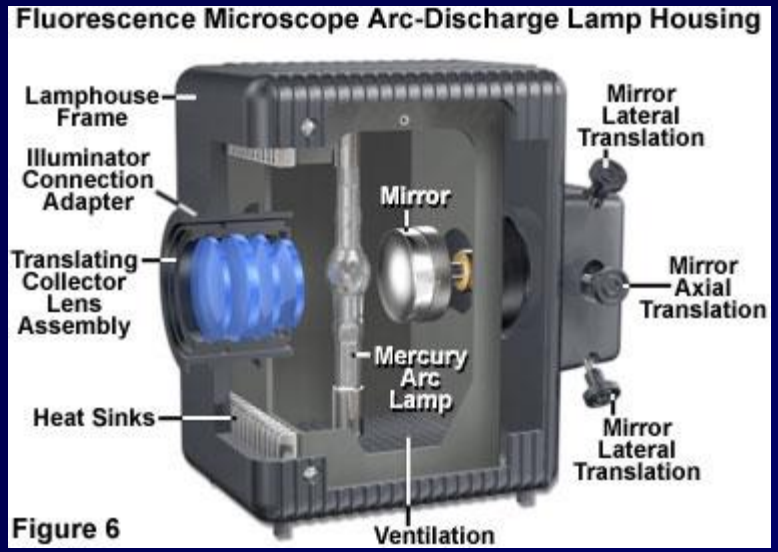


Zdroje světla pro fluorescenční mikroskop

výbojky

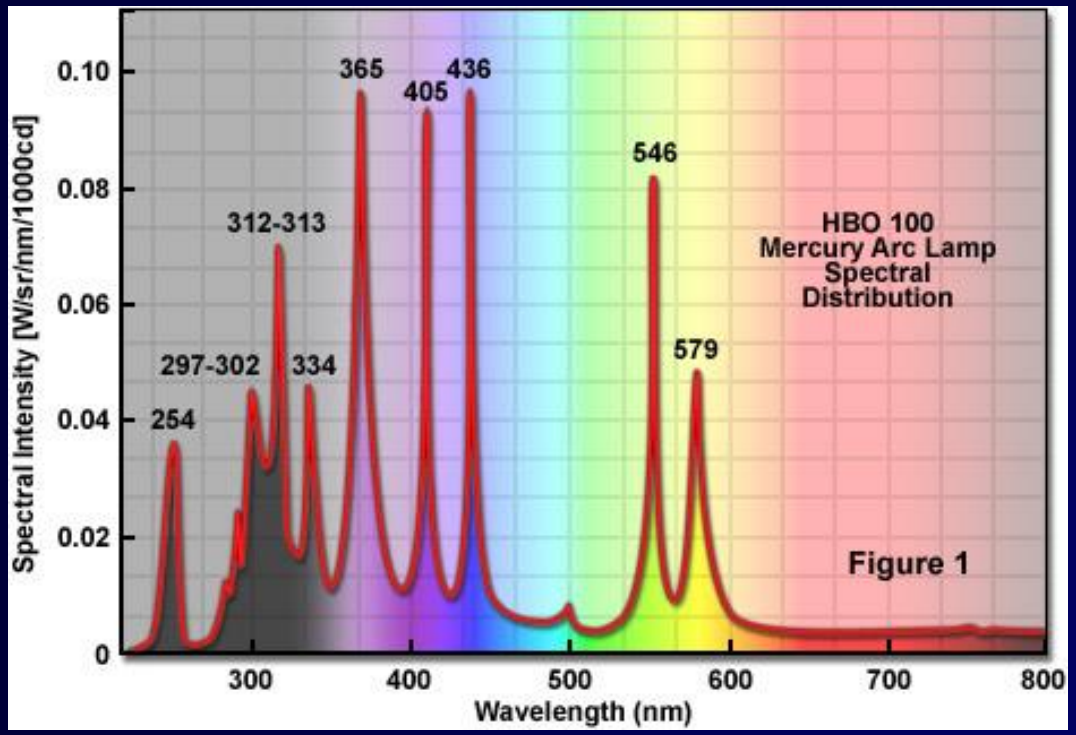
- naplněná plynem pod vysokým tlakem (xenon, páry rtuti)
- obsahuje elektrody
- světlo vzniká ionizací plynu mezi elektrodami
- 10x-100x jasnější než žárovky
- připojeno počítadlo hodin





Rtuťová výbojka (HBO)

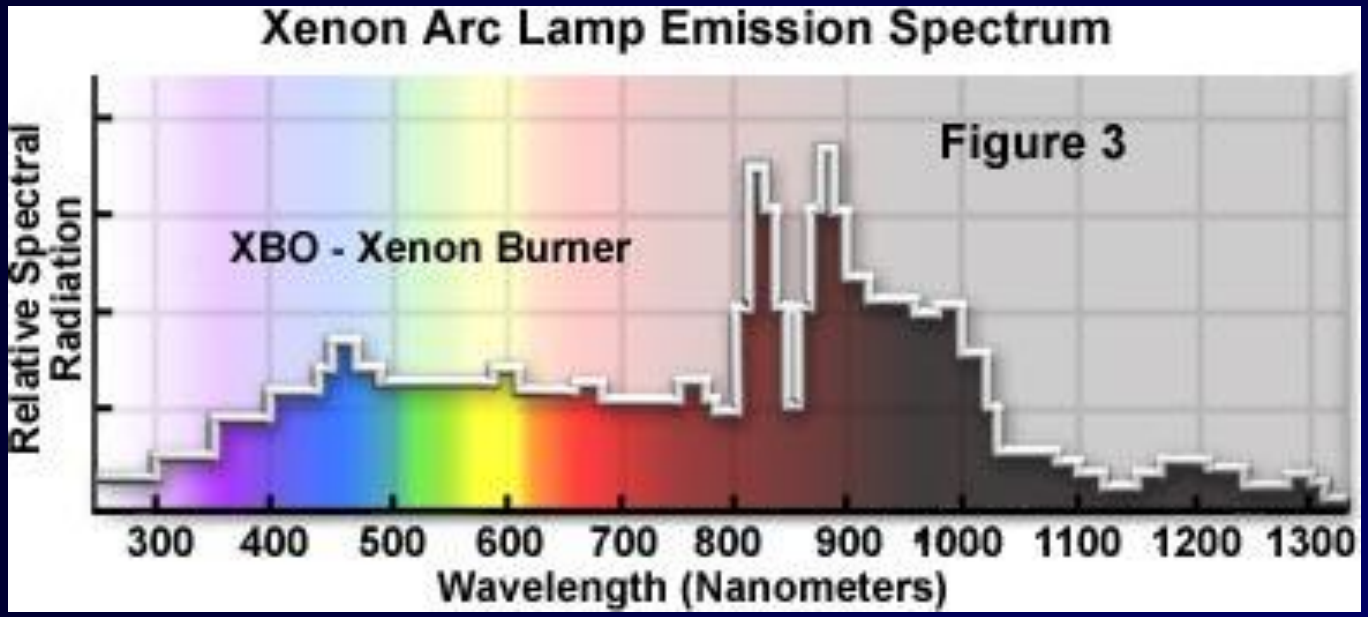
- obsahuje rtuťové páry
- neposkytuje souvislé spektrum
- emituje v několika úzkých pásmech
- UV, fialová, modrá, zelená, žlutá, oranžová
- životnost 200-400h



MUNI SCI

Xenonová výbojka (XBO)

- obsahuje xenon
- stejná intenzita ve viditelném spektru
- v UV nízká emise
- v IR vysoká emise -> přehřívání
- životnost 400-1200h

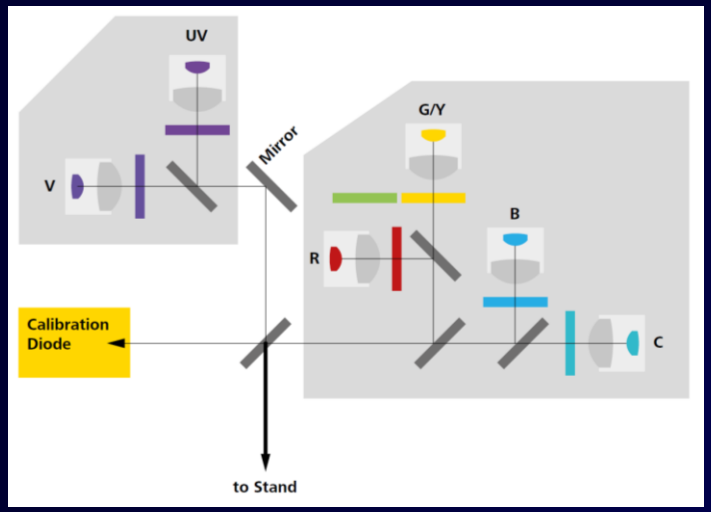


Zdroje světla pro fluorescenční mikroskop

LED – Light-Emitting Diode

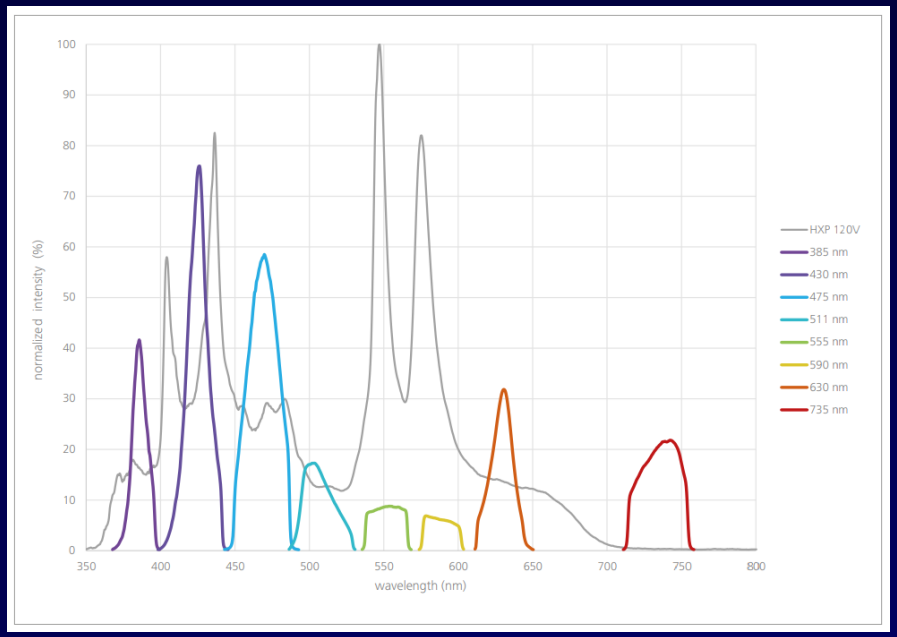
- široké spektrum barev, včetně UV a far red
- různé konstrukce – svítí vše vs. jednotlivé LED
- často LED spojeny s filtry
- lze měnit intenzitu osvětlení
- životnost x1000-x10.000 hodin, časem neklesá výkon
- nízká produkce tepla
- nejsou citlivé na vypínání/zapínání

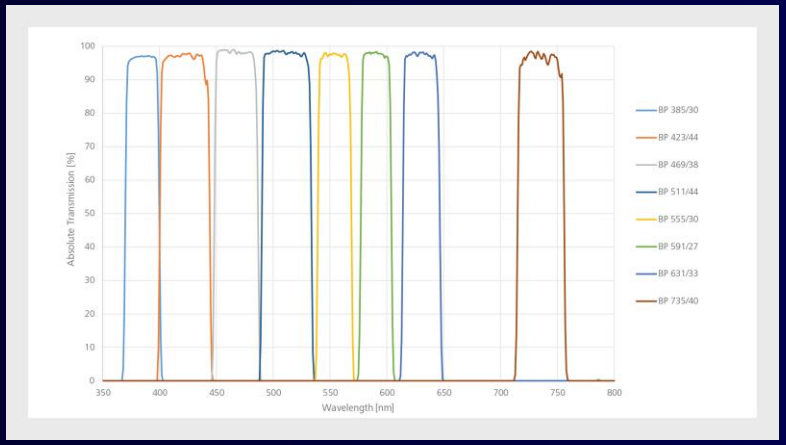
LED zdroje světla pro fluorescenční mikroskop



Rozložení diod

Srovnání LED zdroje s rtuťovou výbojkou



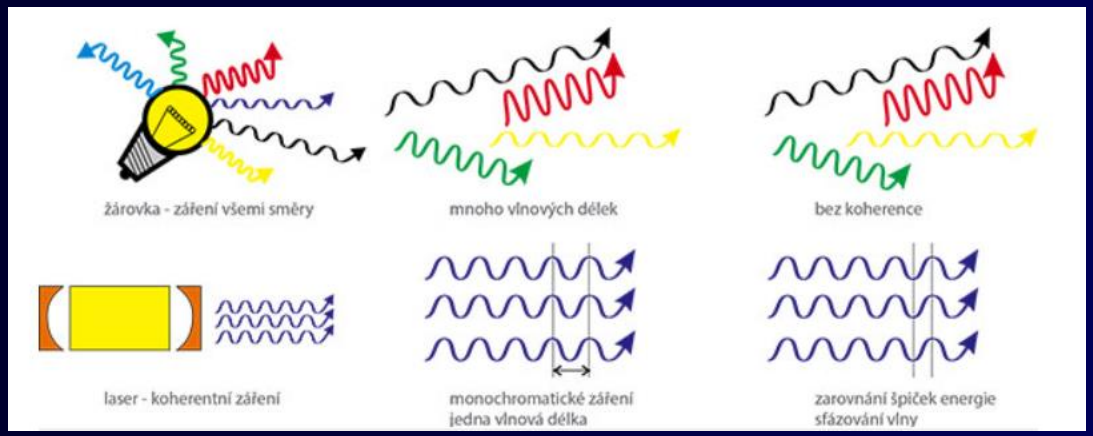


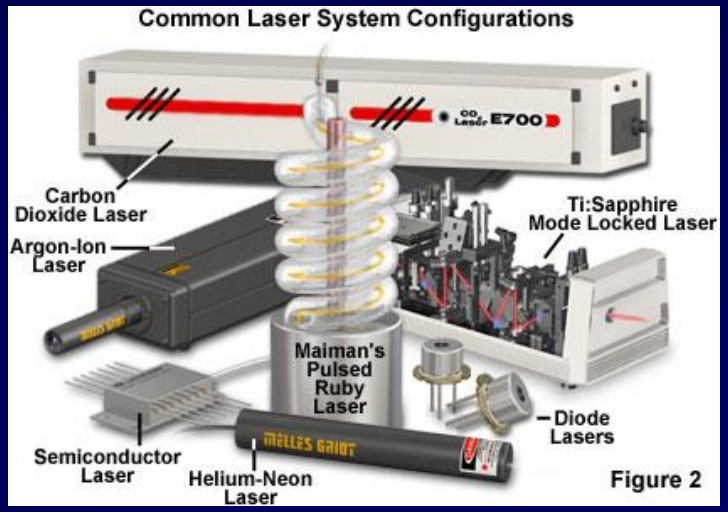
Uspořádání excitačních filtrů

Zdroje světla pro fluorescenční mikroskop

LASER -**L**ight **A**mplification by the **S**timulated **E**mission of **R**adiation

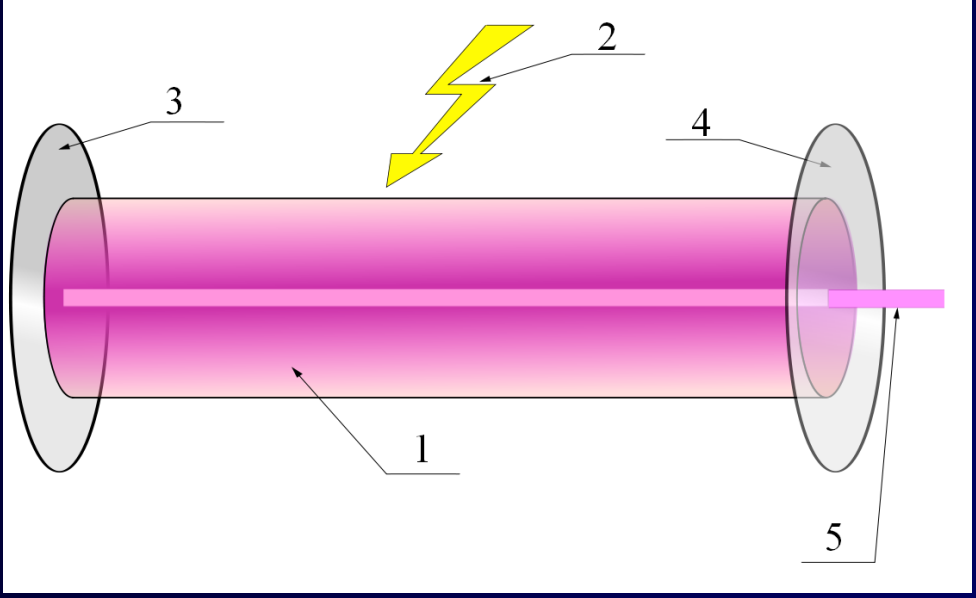
- emituje paprsek světla o určité vlnové délce (nebo několika délek)
- světlo je koherentní – má stejnou frekvenci, směr kmitání, fázi
- vlnová délka je specifická v závislosti na typu konstrukce a materiálu





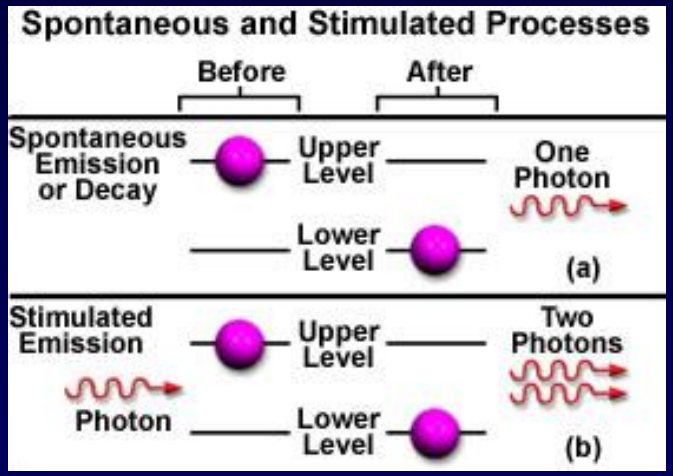
Konstrukce laseru:

1. aktivní prostředí v rezonátoru (různé skupenství - pevné, plyn, kapalina, plazma)
2. zdroj záření (elektrický proud, výbojka, chemické reakce..)
3. odrazné zrcadlo
4. polopropustné zrcadlo
5. laserový paprsek



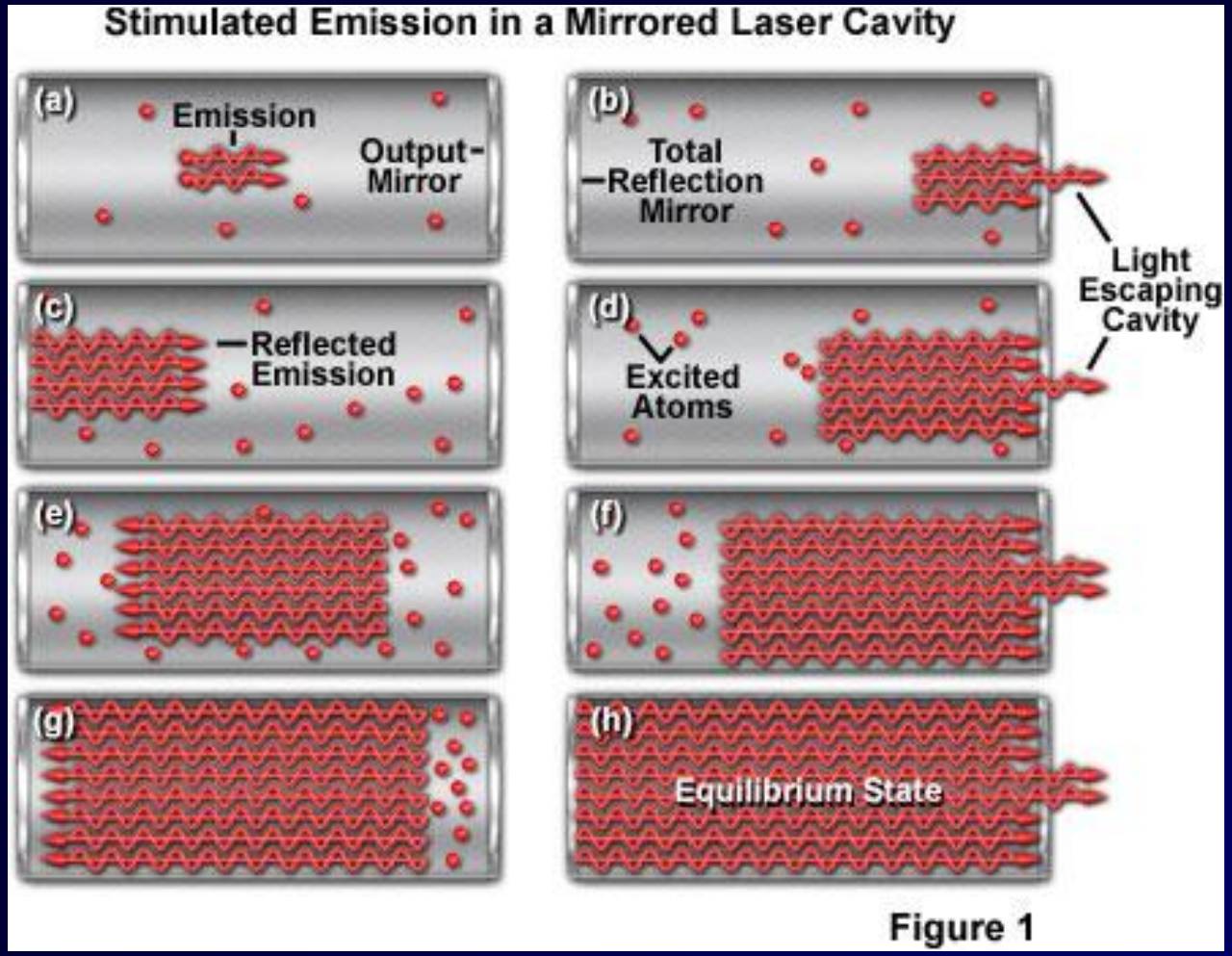
Princip laseru

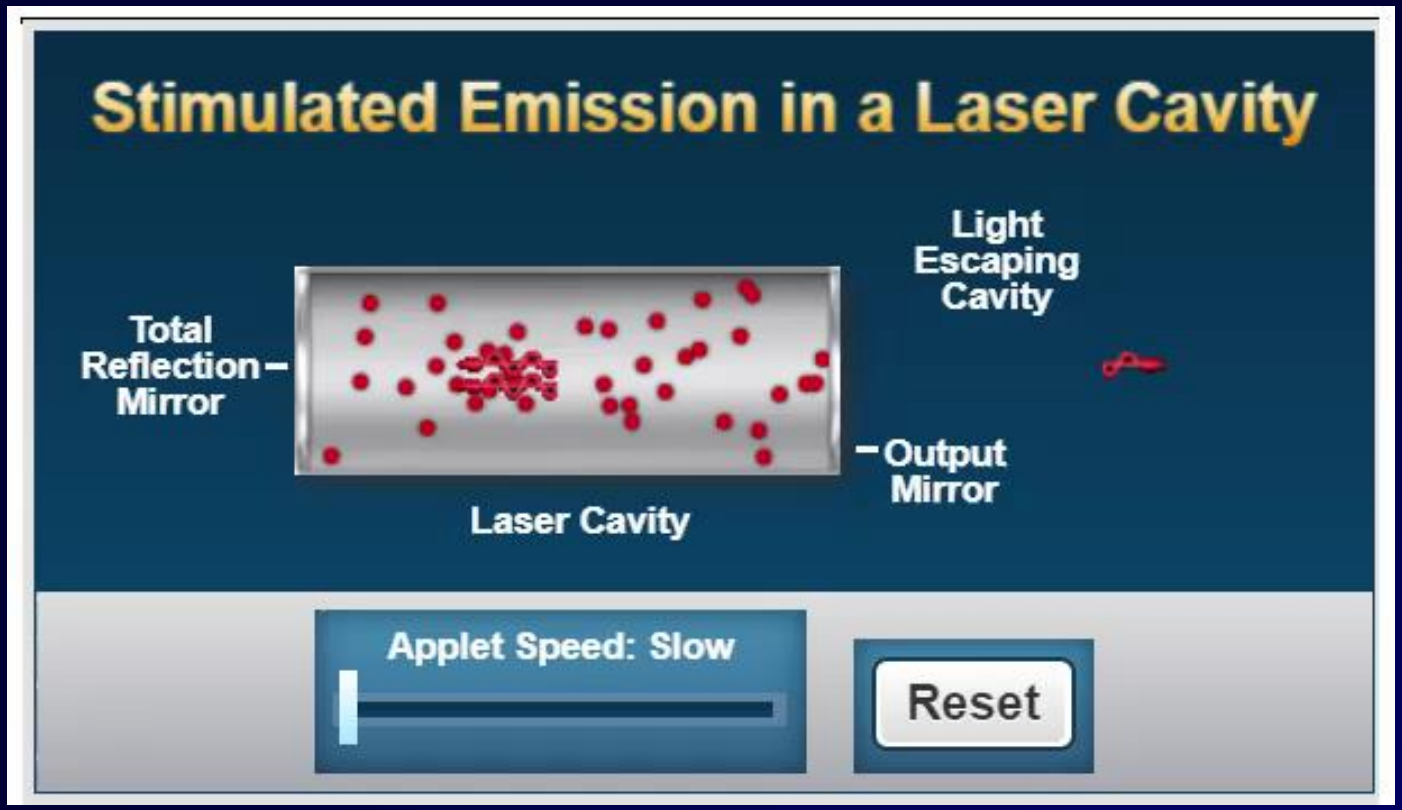
- zdroj energie vybudí elektrony aktivního prostředí ze základní energetické hladiny do vyšší energetické hladiny -> excitace
- postupná excitace většiny elektronů aktivního prostředí
- při přestupu elektronu na nižší hladinu dojde k emisi fotonů
- fotony interagují s dalšími excitovanými elektrony, spouštějí stimulovanou emisi fotonů
- emitované fotony mají stejnou frekvenci a fázi



- mezi zrcadly (v rezonátoru) dochází k odrazu paprsku fotonů a jeho opětovnému průchodu prostředím -> zesilování toku fotonů
- paprsek opouští tělo laseru průchodem skrze polopropustné zrcadlo

Stimulovaná emise





https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lasers/heliumneonlaser/index.html

Nejčastěji používané lasery

využití - konfokální mikroskopie

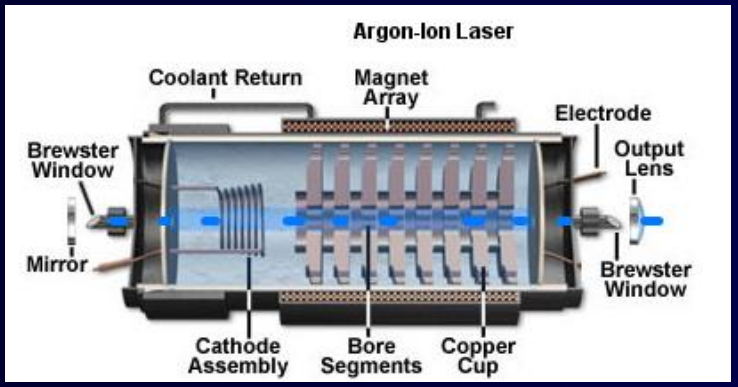
Kryptonový laser

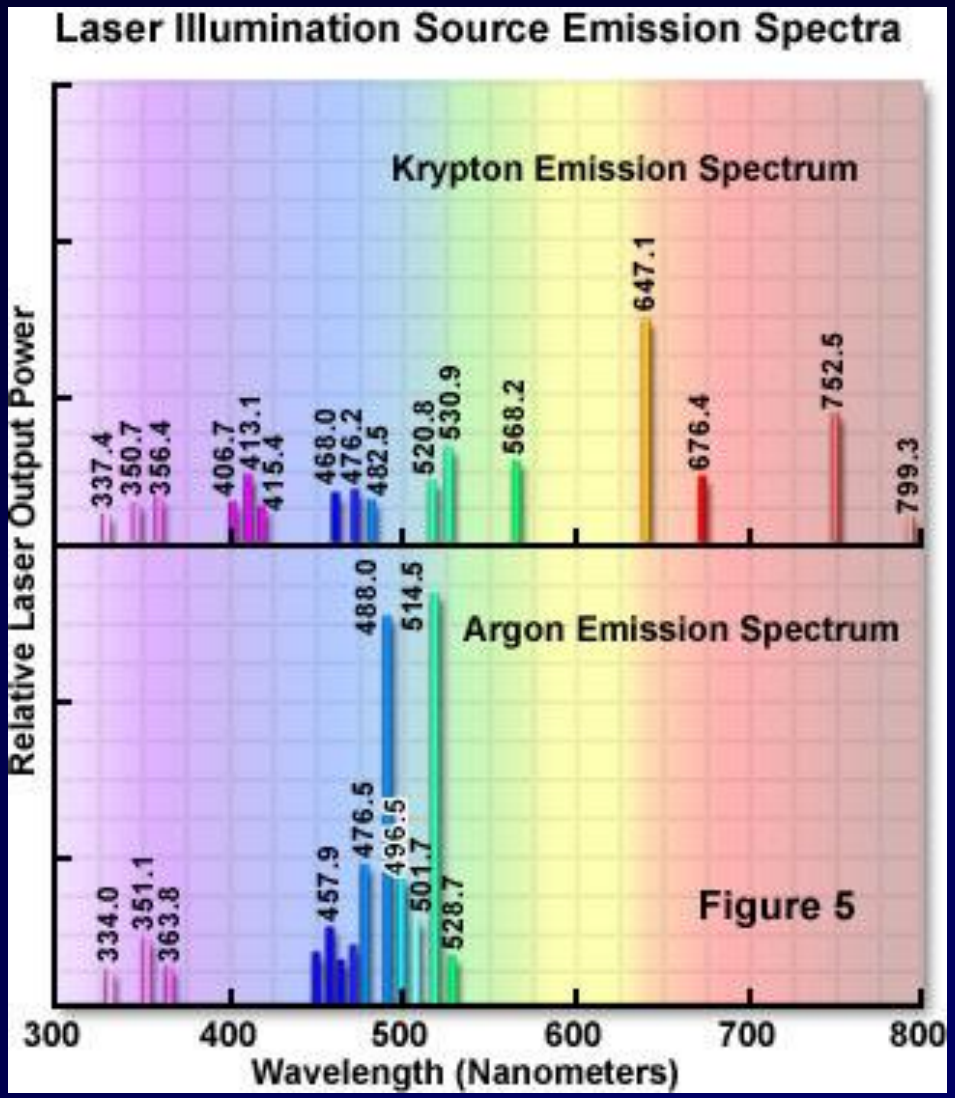
emituje v UV i VIS (647 nm)

Argonový laser

emituje v UV i VIS (488 a 514 nm)

He-Ne, He-Cd ...



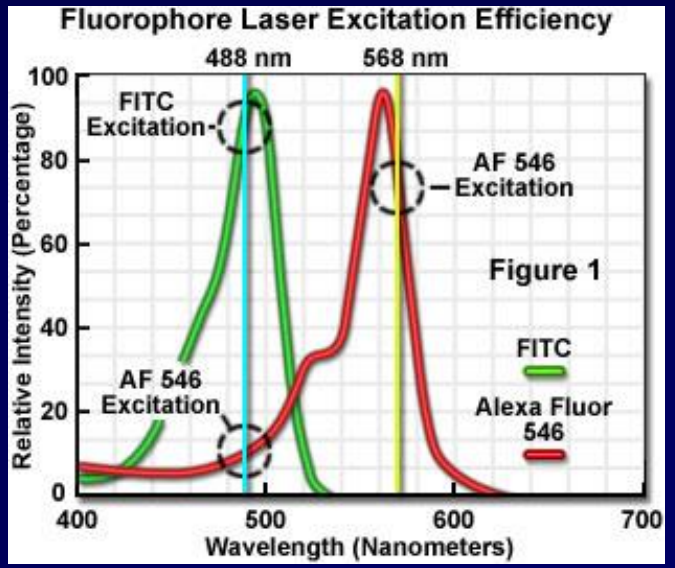


Output Wavelengths of Common Lasers

Laser Type (Spectral Region)	Wavelength(s) (Nanometers)
Argon Fluoride Excimer (UV)	193
Krypton Chloride Excimer (UV)	222
Krypton Fluoride Excimer (UV)	248
Xenon Chloride Excimer (UV)	308
Xenon Fluoride Excimer (UV)	351
Helium Cadmium (UV, Visible)	325, 442
Nitrogen (UV)	337
Krypton (Visible)	476, 528, 568, 647
Argon (Visible)	488, 514
Copper Vapor (Visible)	510, 578
Nd:YAG Frequency Doubled (Visible)	532
Helium Neon (Visible, Near IR)	543, 594, 612, 633, 1150, 3390
Gold Vapor (Visible)	628
Rhodamine 6G Dye (Visible, Tunable)	570-650
Ruby (Visible)	694
Diode Semiconductor (Visible, Near IR)	630-1600
Ti:Sapphire (Visible - Near IR)	680-1130
Nd:YAG (Near IR)	1064
Erbium (Near IR)	1540
Hydrogen Fluoride (Near IR)	2600-3000
Carbon Dioxide (Far IR)	9600, 10600

Další užívané lasery ve fluorescenční mikroskopii

Laser vs. fluorochrom



MUNI SCI

Filtry ve fluorescenční mikroskopii

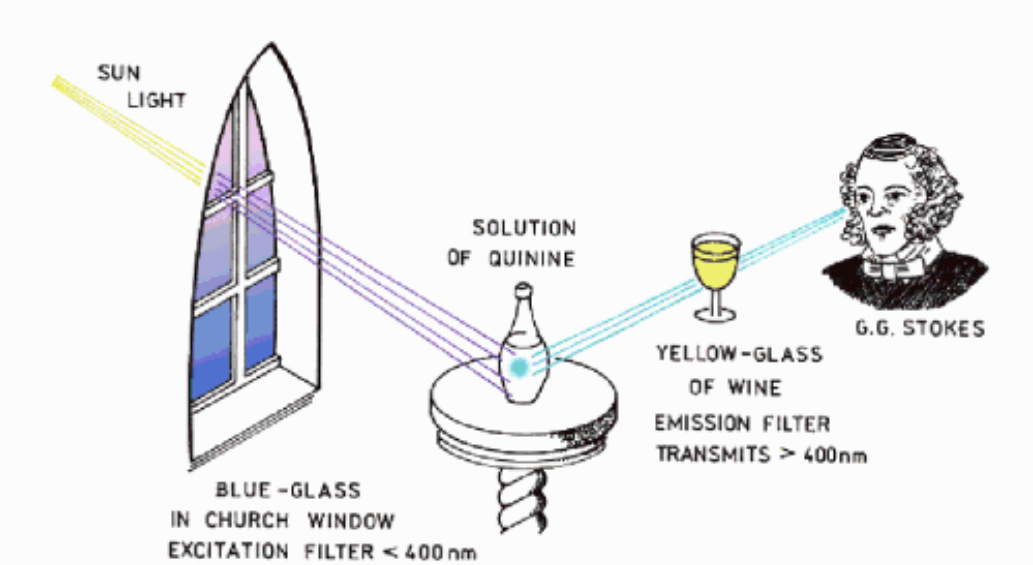


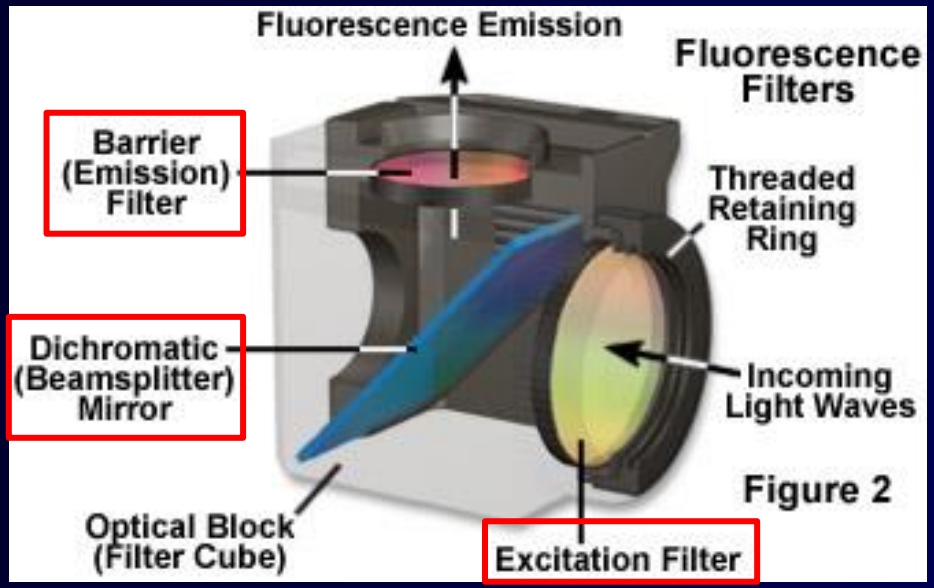
Figure 1.6. Experimental schematic for detection of the Stokes shift.

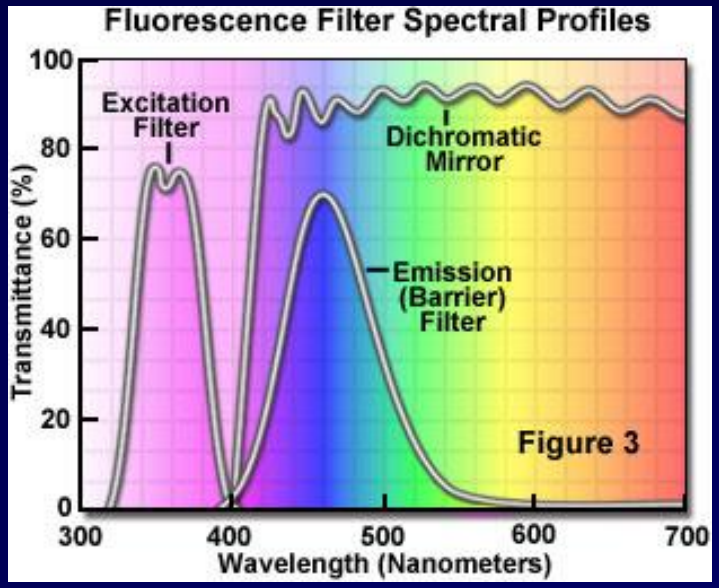
excitační filtr – propouští takové světlo, které je schopno vyvolat excitaci s následnou emisí u daného fluoroforu

emisní (bariérový) filtr – propouští světlo, které je emitováno fluoroforem

Standardní FM obsahuje 3 typy filtrů v optické dráze uloženy v bloku (kostce) – důležitá orientace

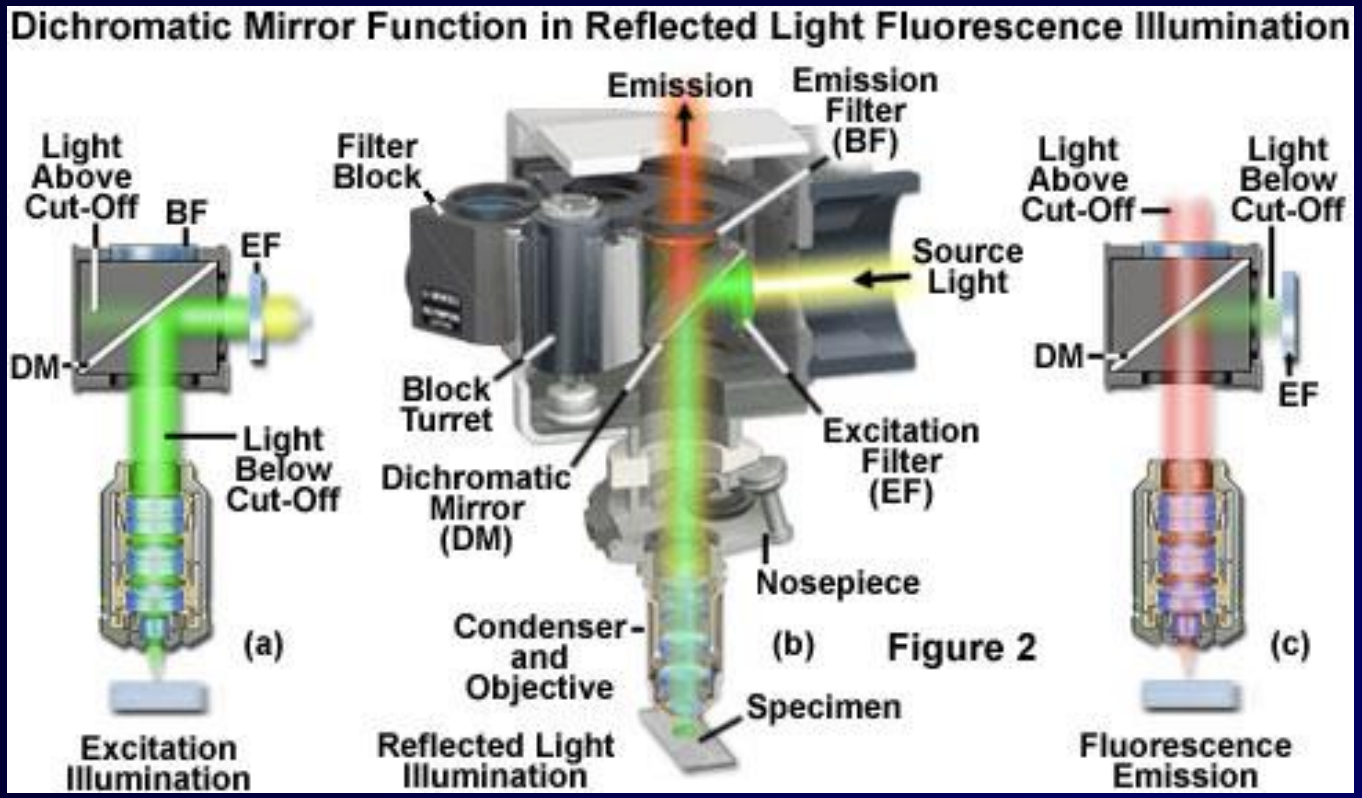
- excitační filtr
- dichromatické (dichroické) zrcátko (= beamsplitter)
- emisní filtr

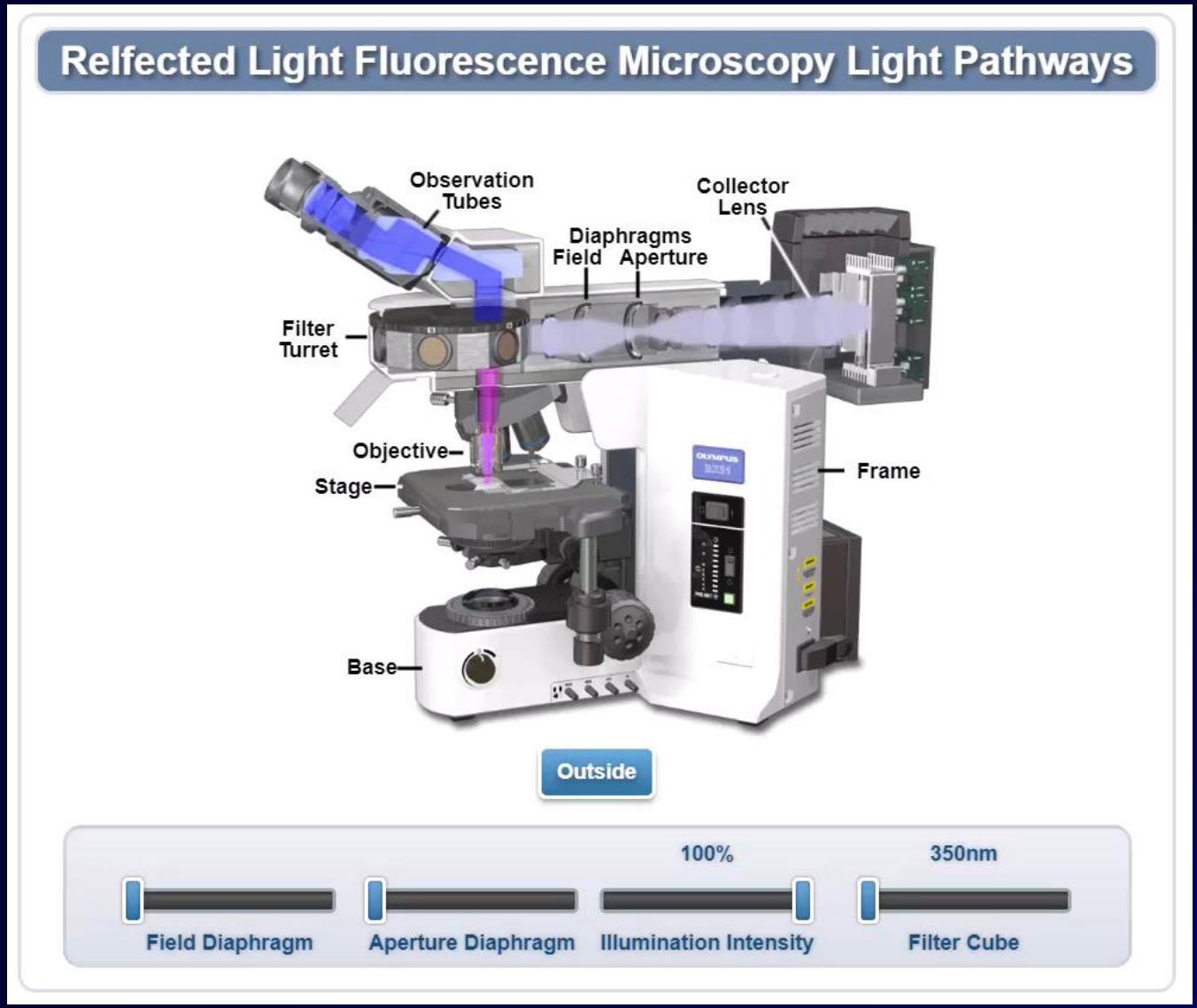




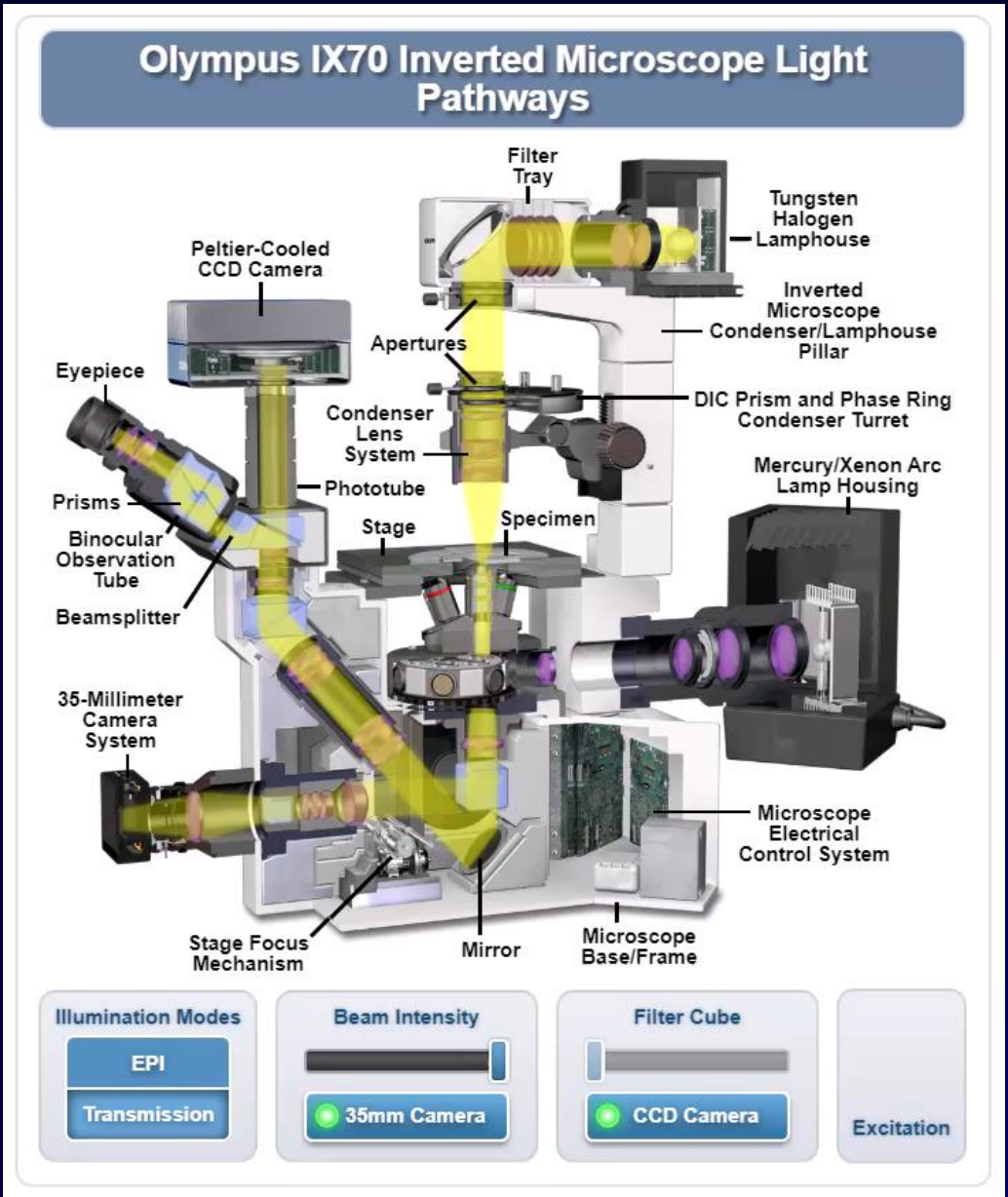
Funkce dichromatického zrcátka

- u mikroskopů s odrazem fluorescence
- odráží excitační záření
- propouští emisní žáření
- sklon 45° k excitačnímu i emisnímu filtru





https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/fluorescence/index.html

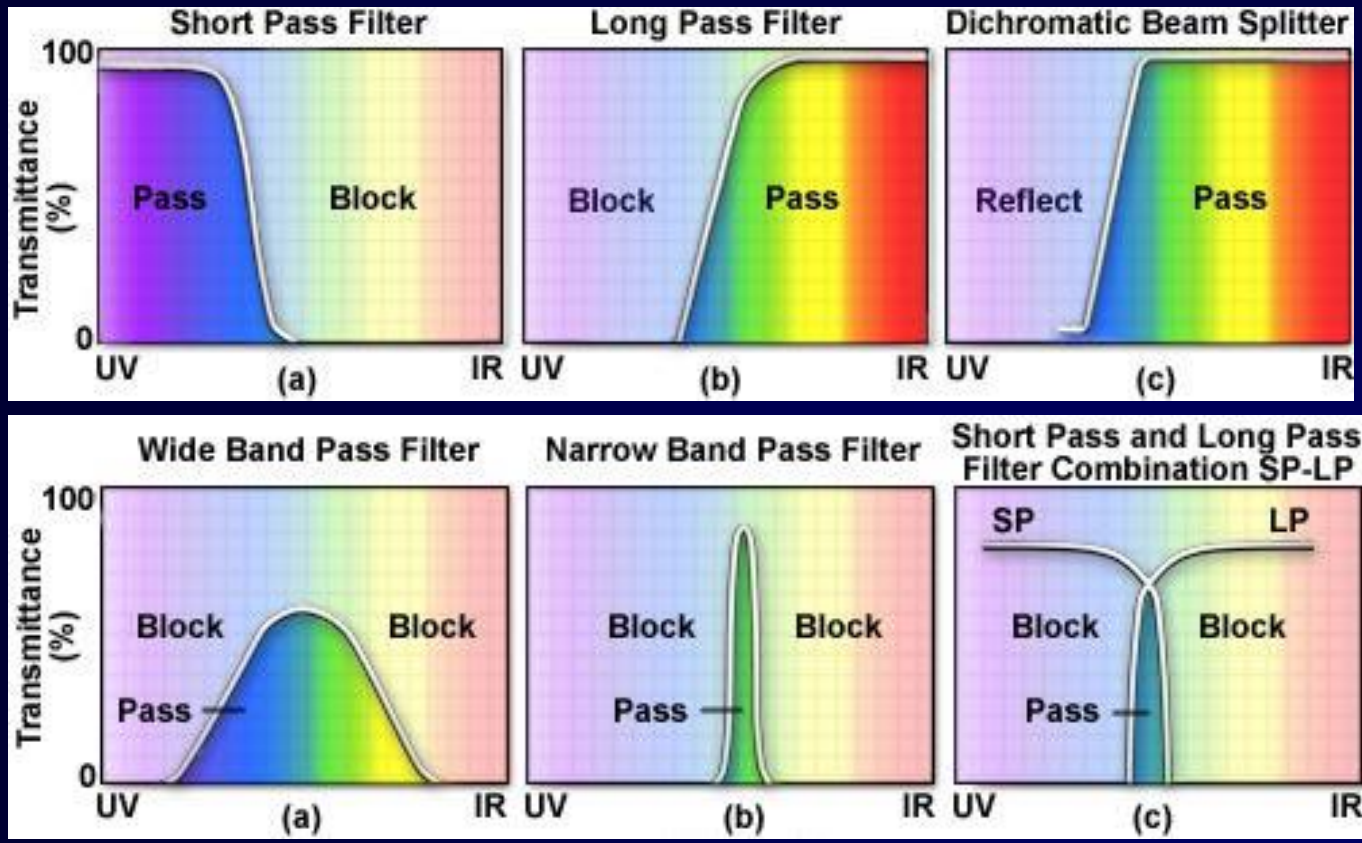


https://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/ix70fluorescence/index.html

MUNI SCI

rozdělení filtrů dle šířky propouštěného spektra

- short pass – propouští kratší vlnové délky než je určitá hodnota
- long pass – propouští delší vlnové délky než je určitá hodnota
- wide band pass – omezen z obou stran spektra
- narrow band pass – omezen na úzké rozmezí vlnové délky

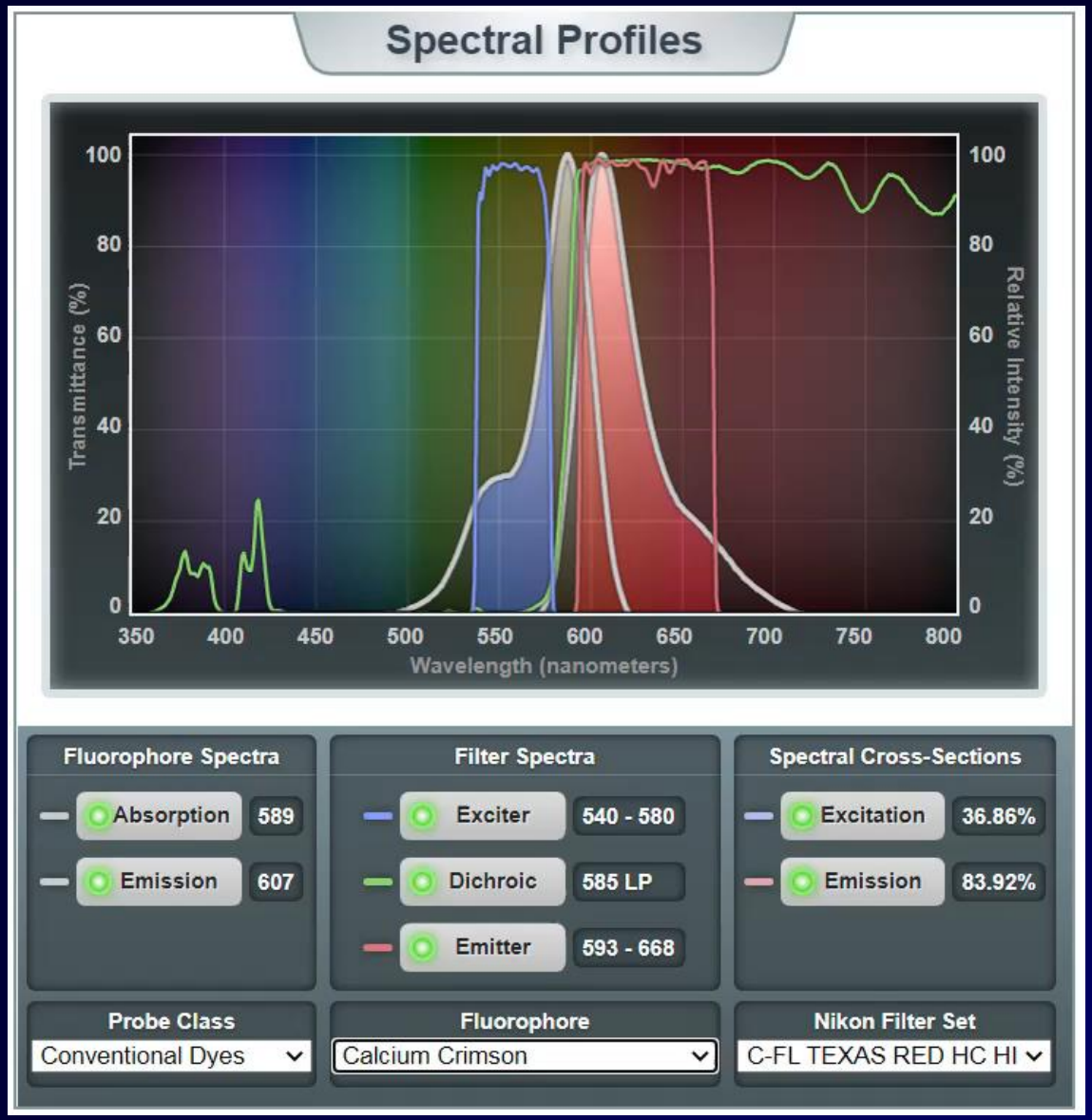


Základní typy kostek – Olympus/Evident

Excitation	Cube	Excitation Filter (nm)	Dichroic Mirror (nm)	Barrier Filter
U	U-MWU	330-385	400	420--
U	U-MNU	360-370	400	420--
U	U-MNUBP	360-370	400	420-460
V	U-MNV	400-410	455	455--
BV	U-MWBV	400-440	455	475--
BV	U-MNBV	420-440	455	475--
B	U-MWB	450-480	500	515--
IB	U-MWIB	460-490	505	515IF--
IB	U-MNIB	470-490	505	515IF--
IB	U-MNIBBP	470-490	505	515-550
IB	U-MWIBBP	460-490	505	515-550
G	U-MSWG	480-550	570	590--
G	U-MWG	510-550	570	590--
G	U-MNG	530-550	570	590--
IG	U-MNIG	520-550	565	580IF--
IY	U-MWIY	545-580	600	610IF--

Filter Color Codes

Code	Filter Type
U	Ultraviolet
V	Violet
BV	Blue-Violet
B	Blue
IB	Interference Blue Filter
G	Green
IG	Immuno Gold Staining Method
BF	Brightfield, Phase Contrast, and DIC only



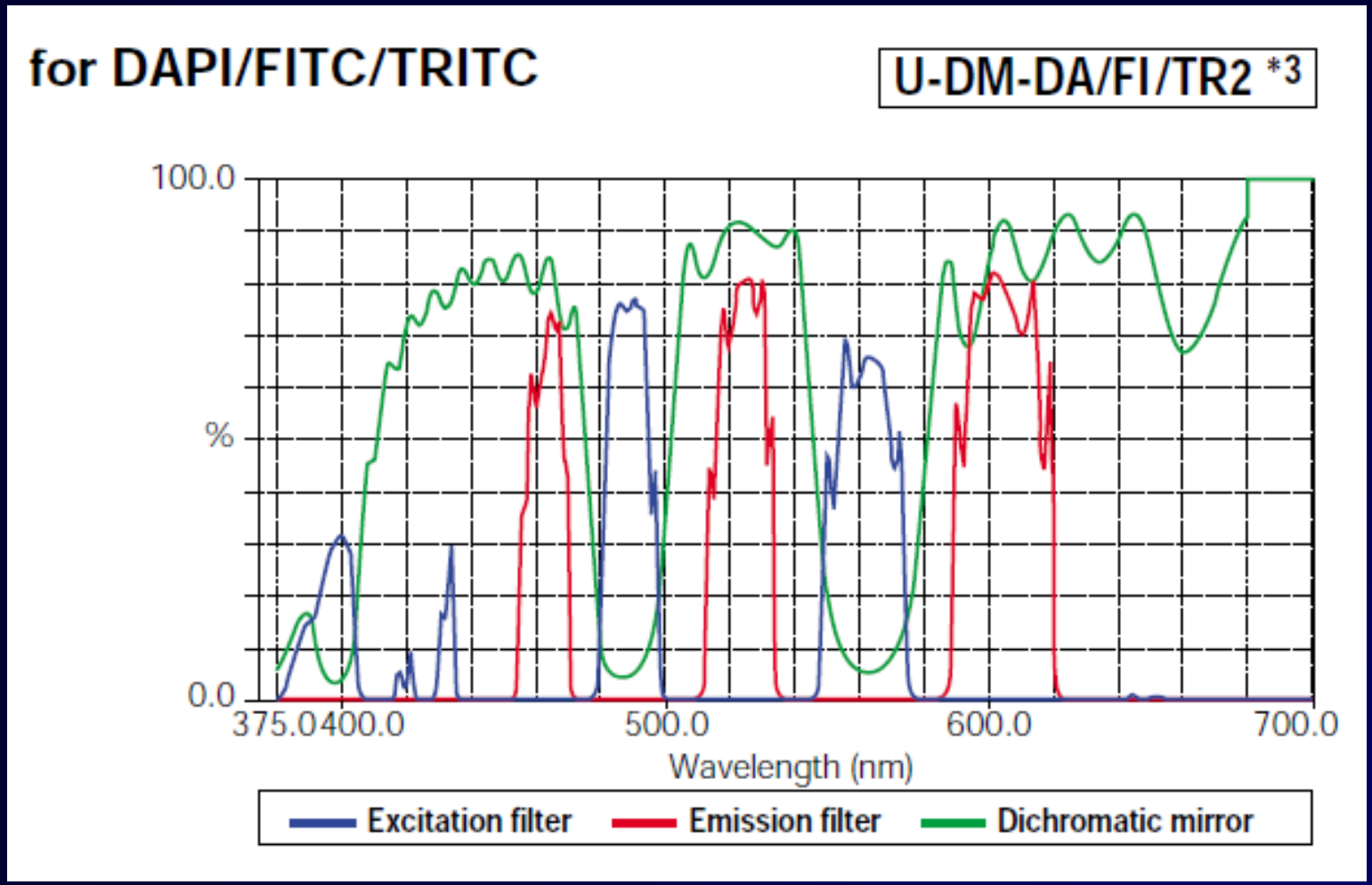
NIKON

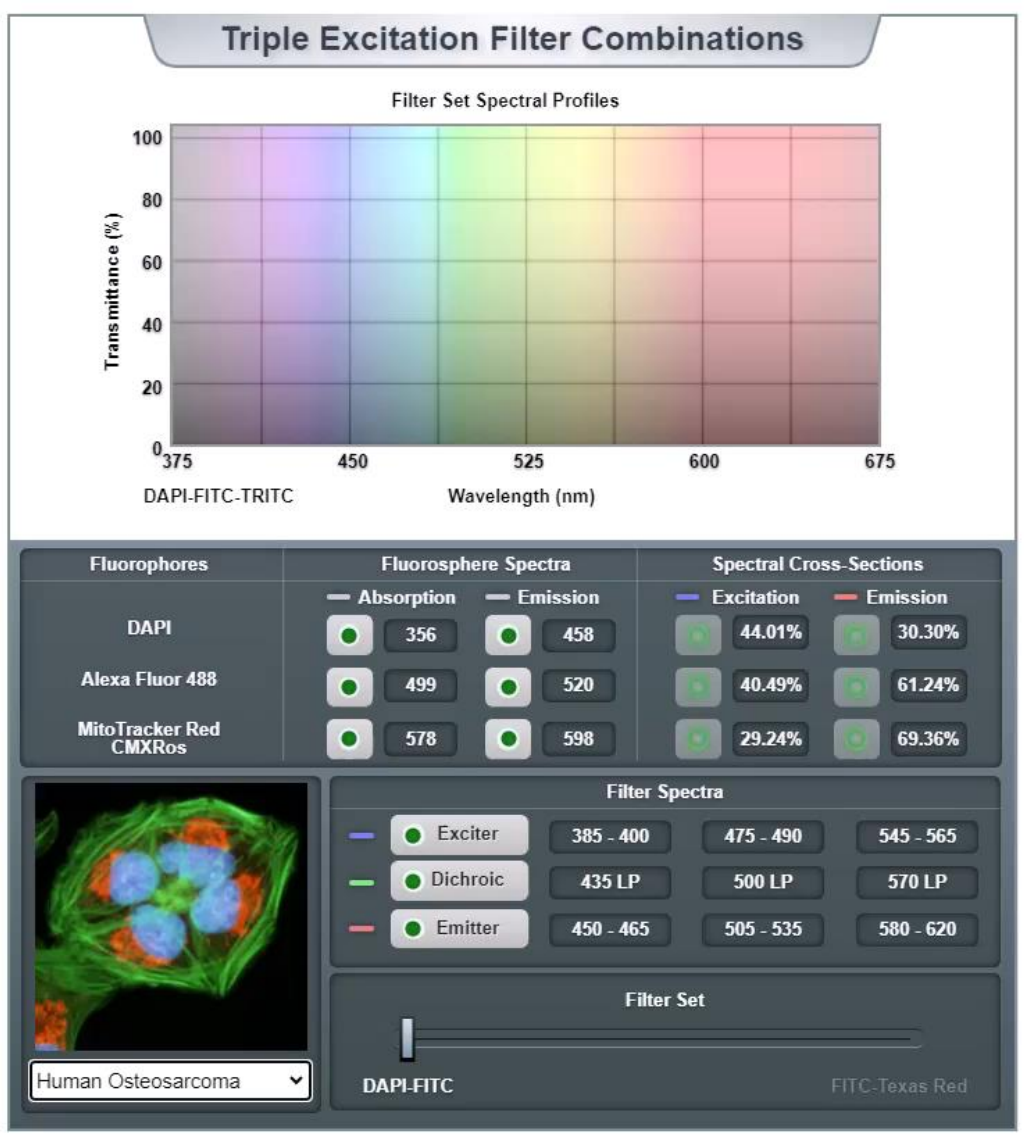
http://www.microscopyu.com/tutorials/flash/spectralprofiles/index.html

MUNI SCI

Filtry pro vícenásobné značení

- double band
- triple band



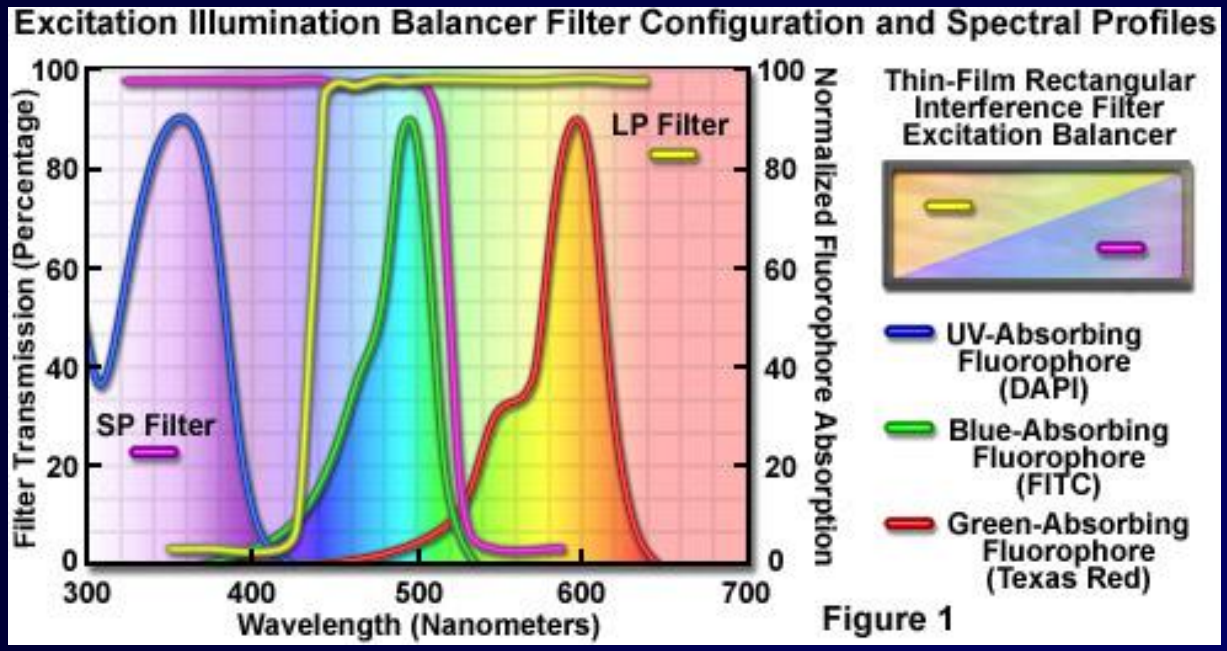


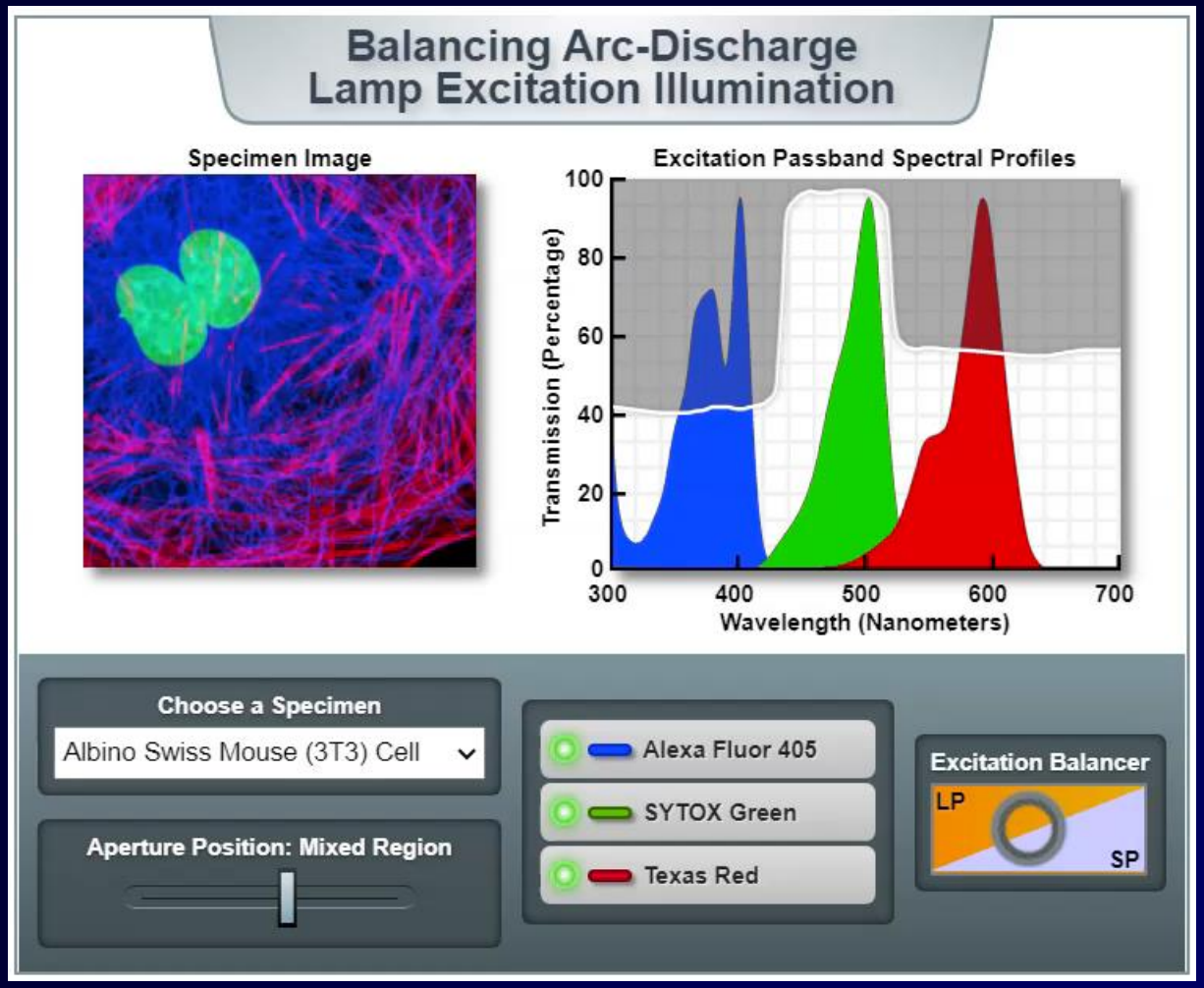
https://www.microscopyu.com/tutorials/triple-band-excitation

MUNI SCI

Excitační balancer

- při použití vícepásmových kostek
- při použití výbojky jako zdroje světla
- změna intenzity excitačních vlnových délek
- dvojice short pass a long pass filtrů

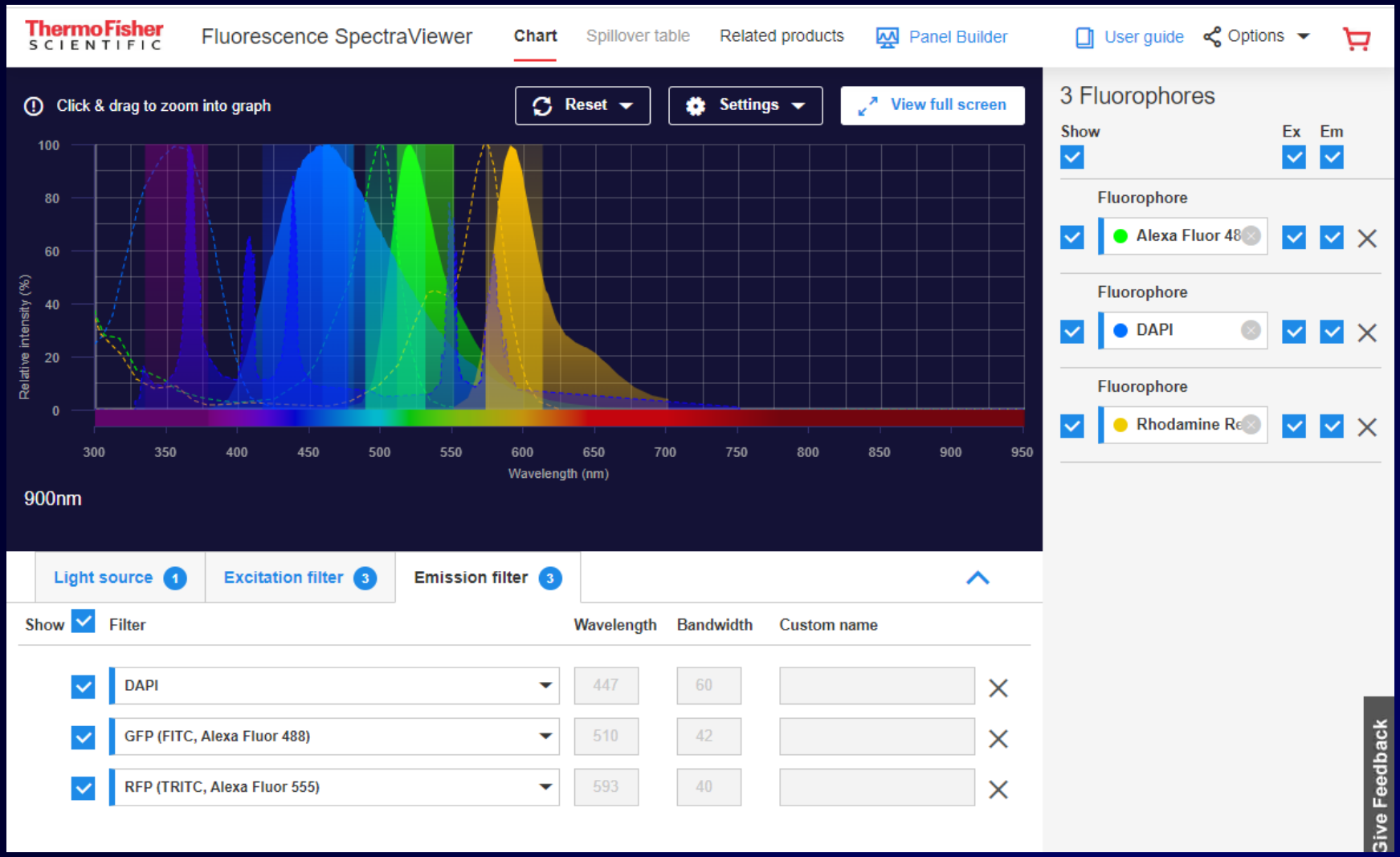




http://www.microscopyu.com/tutorials/java/fluorescence/excitationbalancer

MUNI SCI

Spectra-viewer



https://www.thermofisher.com/order/fluorescence-spectraviewer/#!/