

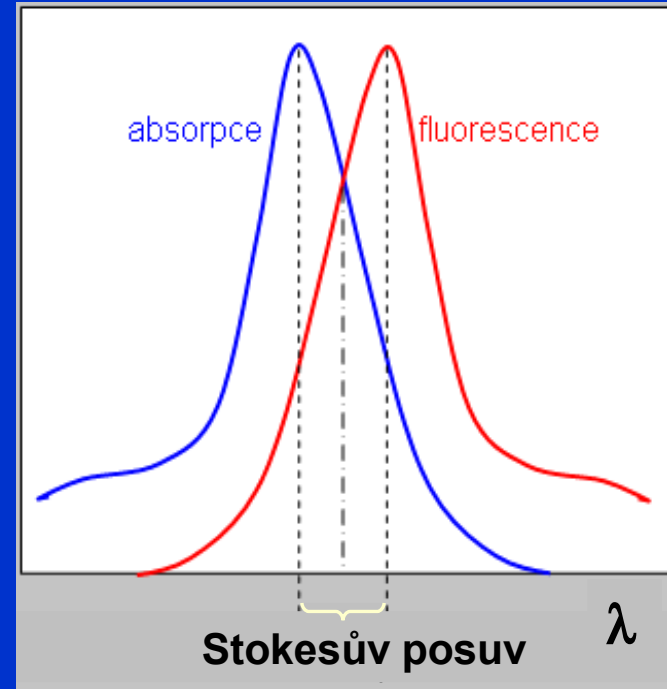
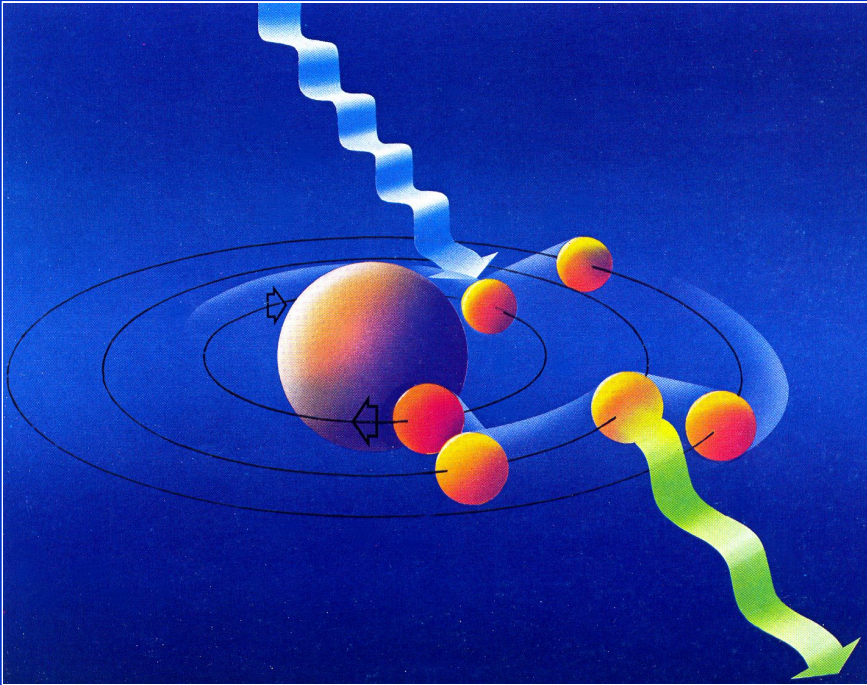
# Fluorescenční mikroskopie

principy a použití

# Luminiscence

- objekt absorbuje záření určité vlnové délky, které se vnitroatomovým přeskupením změni na záření o delší vlnové délce
- excitace – viditelné světlo, UV, x,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

# Stokesův zákon: $\lambda_E < \lambda_F$



Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii.  $E = h \cdot c/\lambda$

Rozdíl vlnových délek absorpčního (excitačního) a emisního maxima

# Luminiscence

excitace světlem:

- fosforescence - vyzařování světla trvá i po přerušení excitace
- fluorescence - nemá setrvačnost, záření zaniká po přerušení excitace

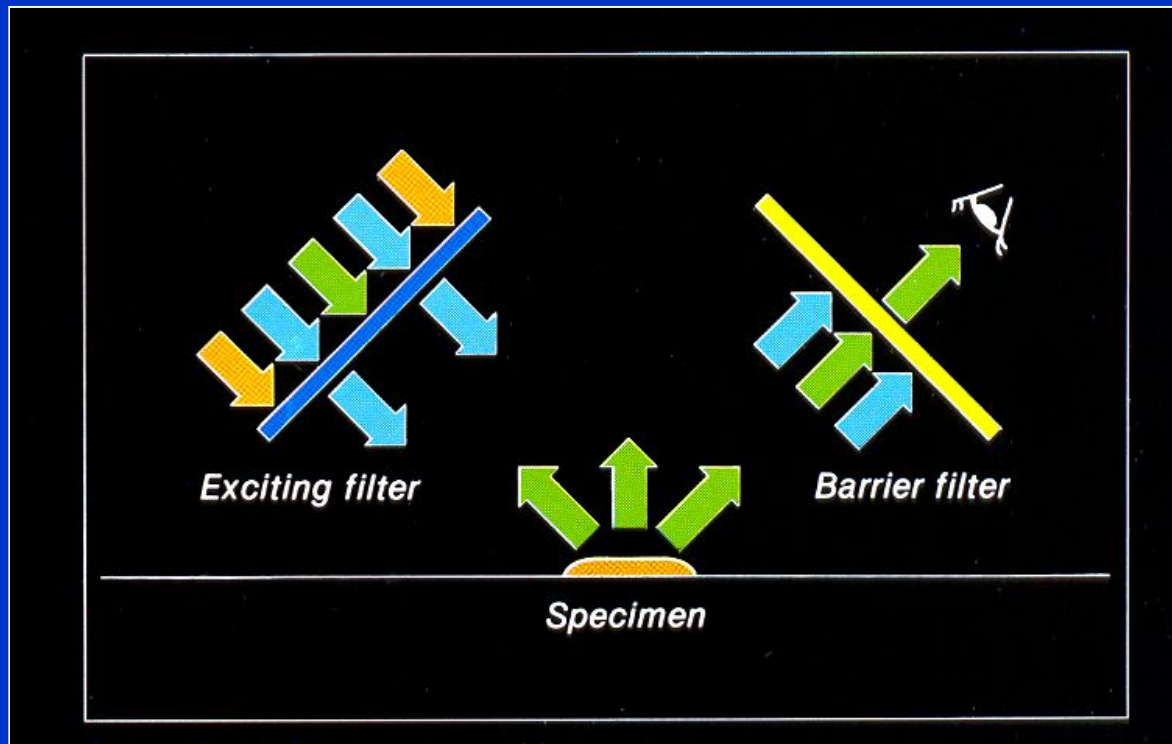
excitace vyvolaná chemickou reakcí:

- chemiluminiscence

# Detekce fluorescence

- spektrofluorometry a „microplate readers“ měří průměr vlastností vzorků ( $\mu\text{l}$  až ml).
- fluorescenční mikroskopy rozlišují fluorescenci ve dvou nebo třech rozměrech pro mikroskopické objekty (v průměru menší než  $\sim 0.1$  mm).
- fluorescenční scannery („microarray readers“) rozlišují fluorescenci ve dvou rozměrech pro makroskopické objekty jako jsou elektroforetické gely, bloty a chromatogramy.
- průtokové cytometry (Flow cytometers) měří fluorescenci každé buňky v protékajícím proudu, což umožňuje identifikovat a kvantifikovat subpopulace buněk ve velkém vzorku.
- konfokální mikroskopie

# Princip fluorescenčního mikroskopu



excitační  
(budící)  
filtr

závěrný  
(bariérový)  
filtr

vzorek



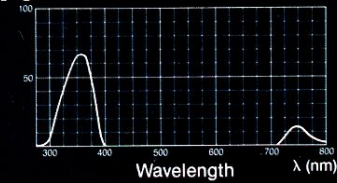
# Excitační filtry - Olympus

## Exciting Filters

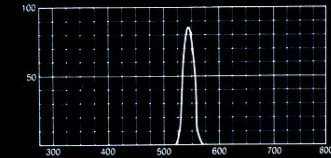
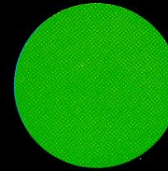
UG-1



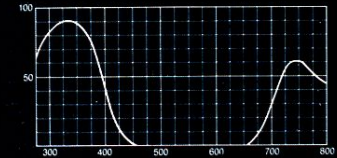
% T



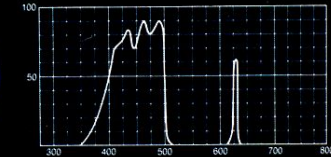
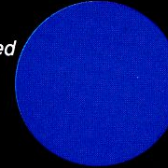
IF-545



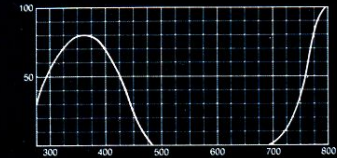
UG-5



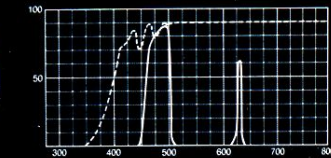
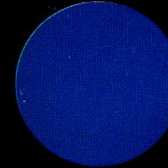
IF-490  
transmitted  
light



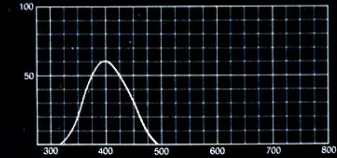
BG-3



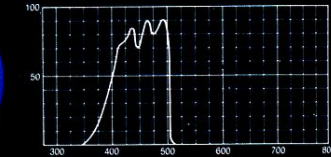
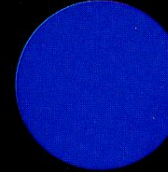
IF490  
+ UVC



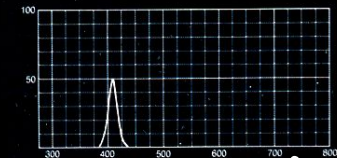
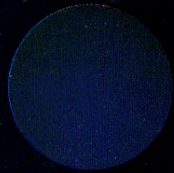
BG-12



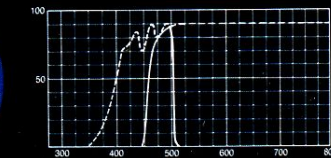
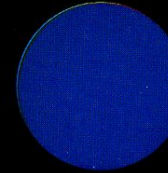
IF-490  
reflected  
light



IF-405



IF490  
+ EY455



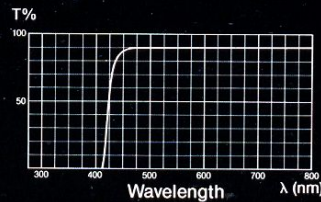
500 nm

λ

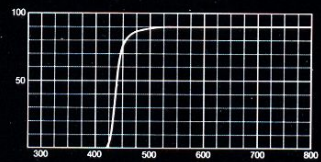
# Bariérové filtry - Olympus

## Barrier Filters

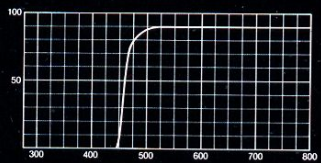
L-420



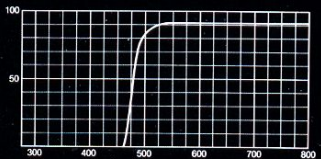
L435



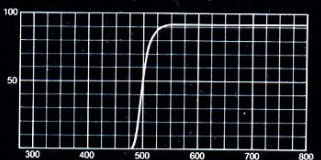
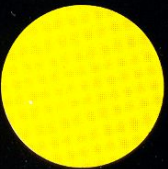
Y455



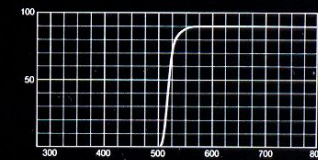
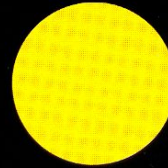
Y475



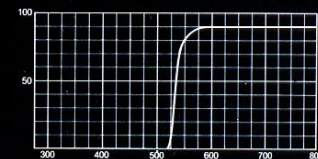
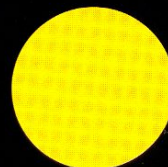
Y495



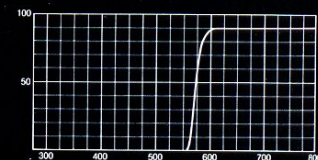
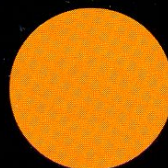
O515



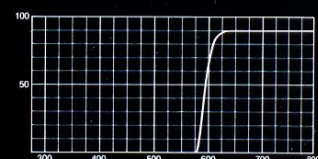
O530



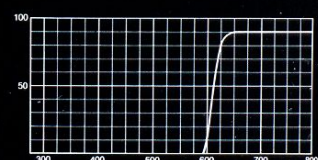
O570



O590



R610

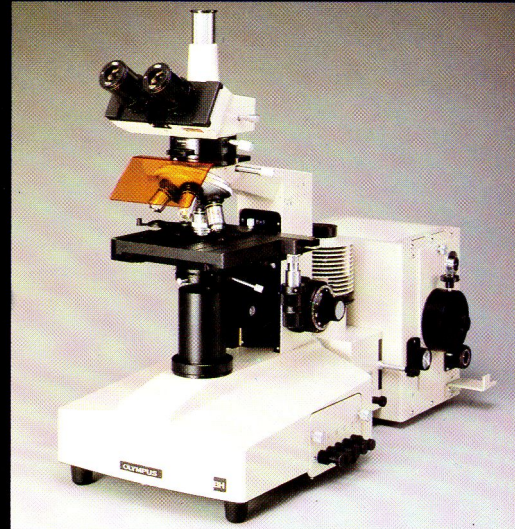
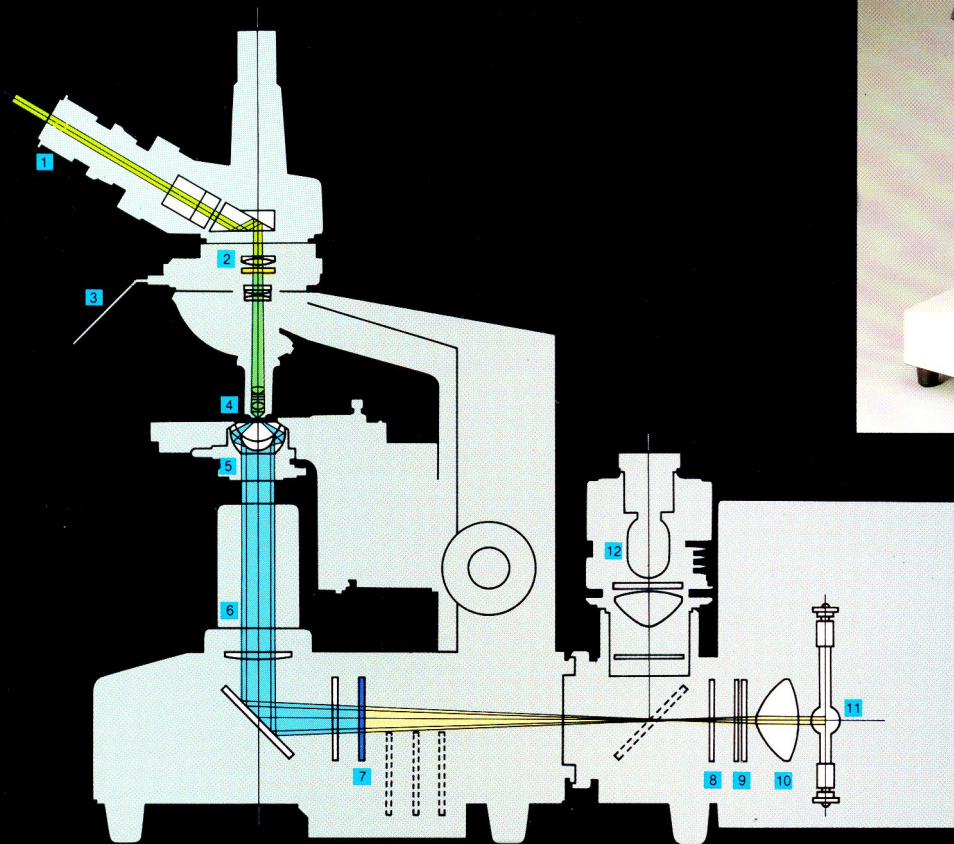


↑  
500 nm



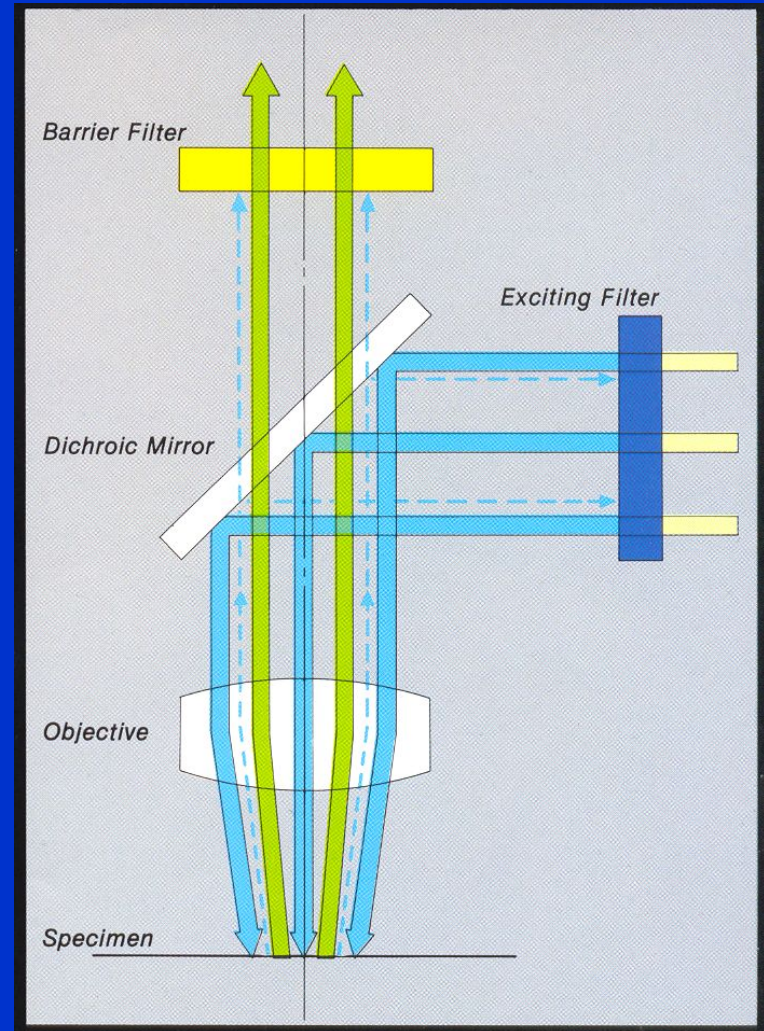
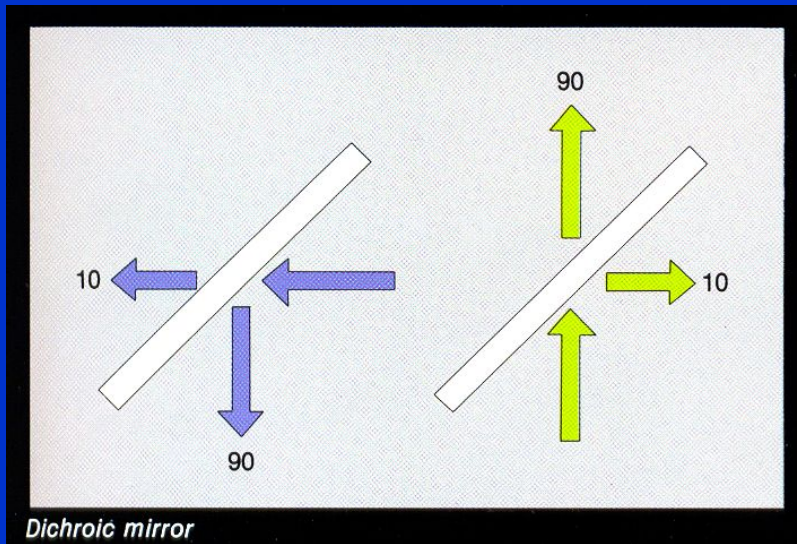
# Transmisní fluorescenční mikroskop

Optical Path of The Transmitted Light Fluorescence Microscope



- 1 Eyepiece
- 2 Barrier filter
- 3 UV protective shade
- 4 Objective
- 5 Widefield darkfield condenser
- 6 UV protective tube
- 7 Exciting filter
- 8 Shutter
- 9 Heat absorbing filter
- 10 Collector
- 11 Super high pressure mercury lamp
- 12 Pre-centered tungsten bulb

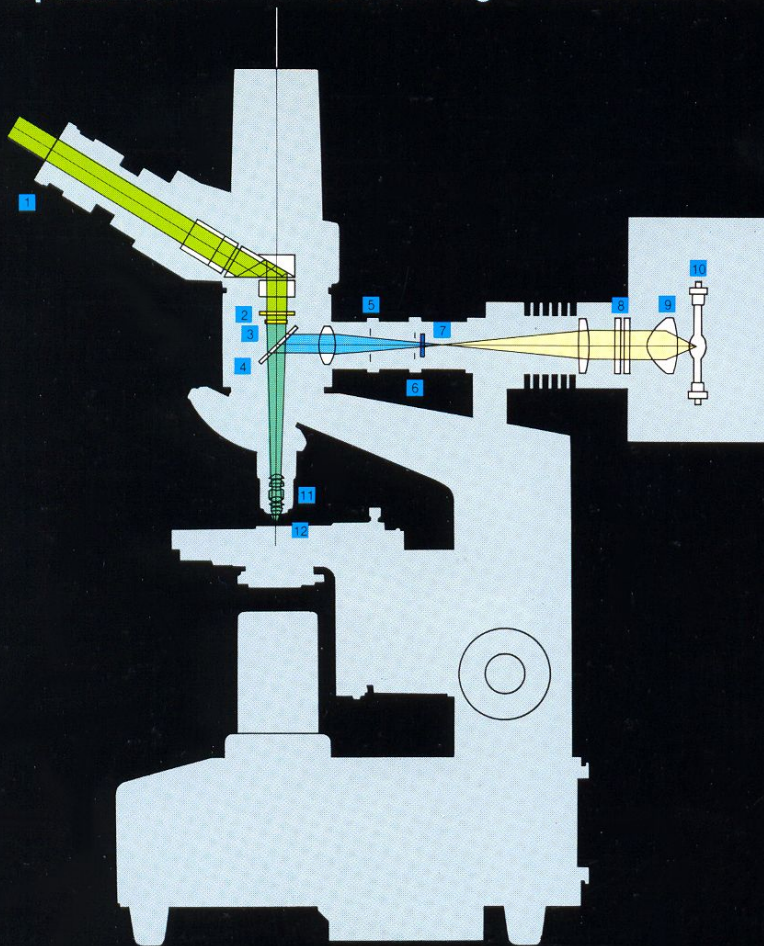
# Dichroické zrcadlo a princip funkce



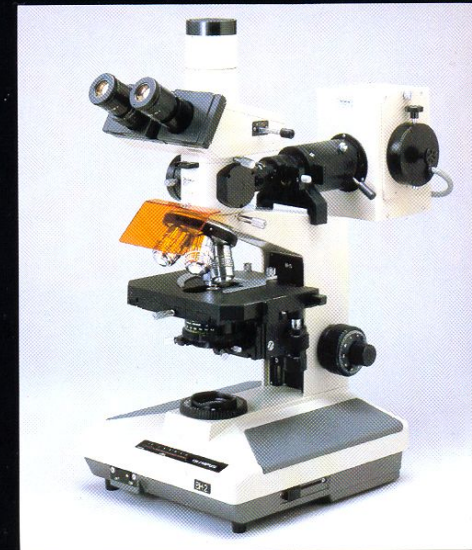


# Epifluorescenční mikroskop - Olympus

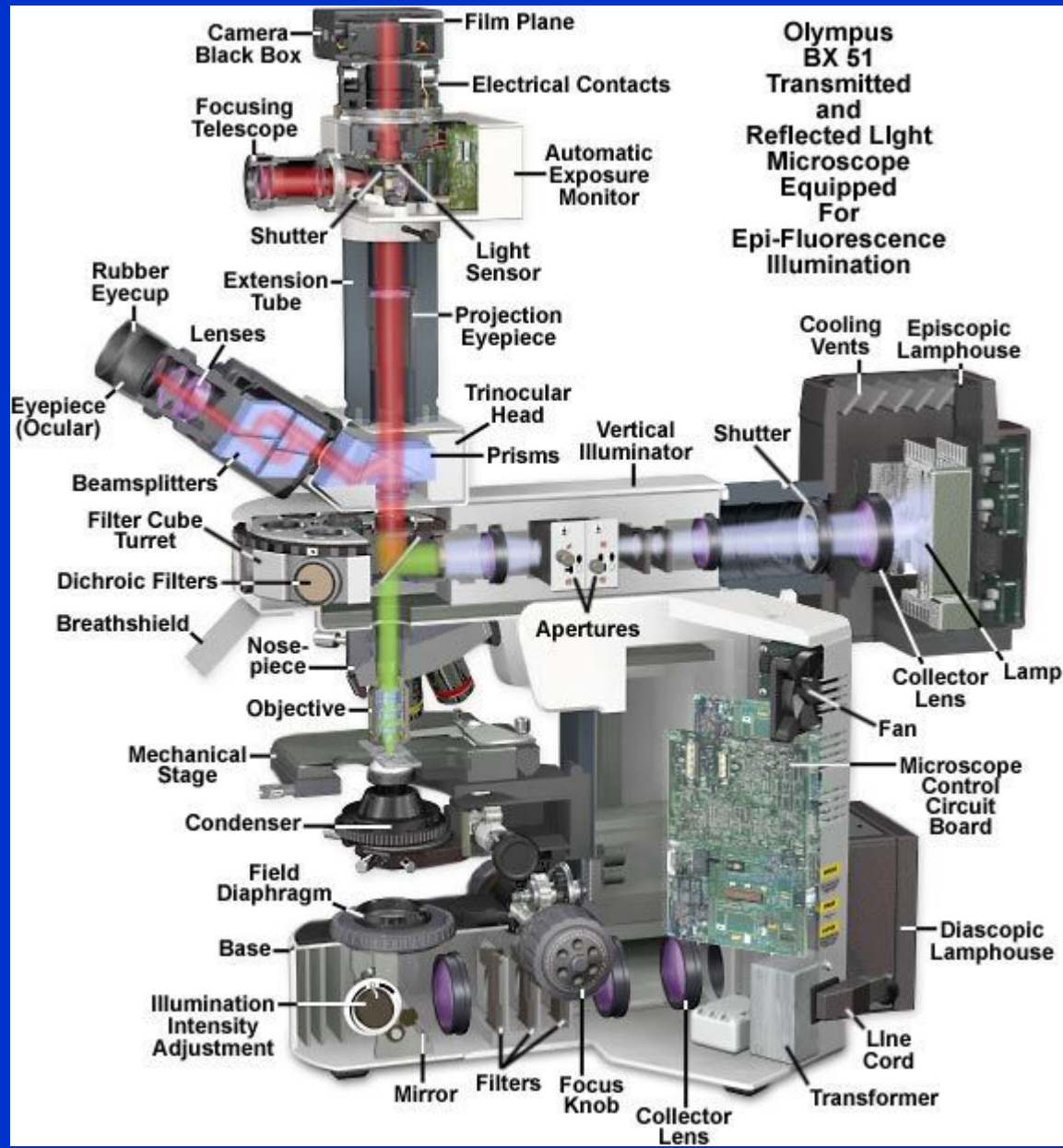
Optical Path of The Reflected Light Fluorescence Microscope



- 1 Eyepiece
- 2 Selectable barrier filter
- 3 Built-in barrier filter
- 4 Dichroic mirror
- 5 Field diaphragm
- 6 Aperture diaphragm
- 7 Exciting filter
- 8 Heat absorption filter
- 9 Collector lens
- 10 Super high pressure mercury lamp
- 11 Objective
- 12 Specimen

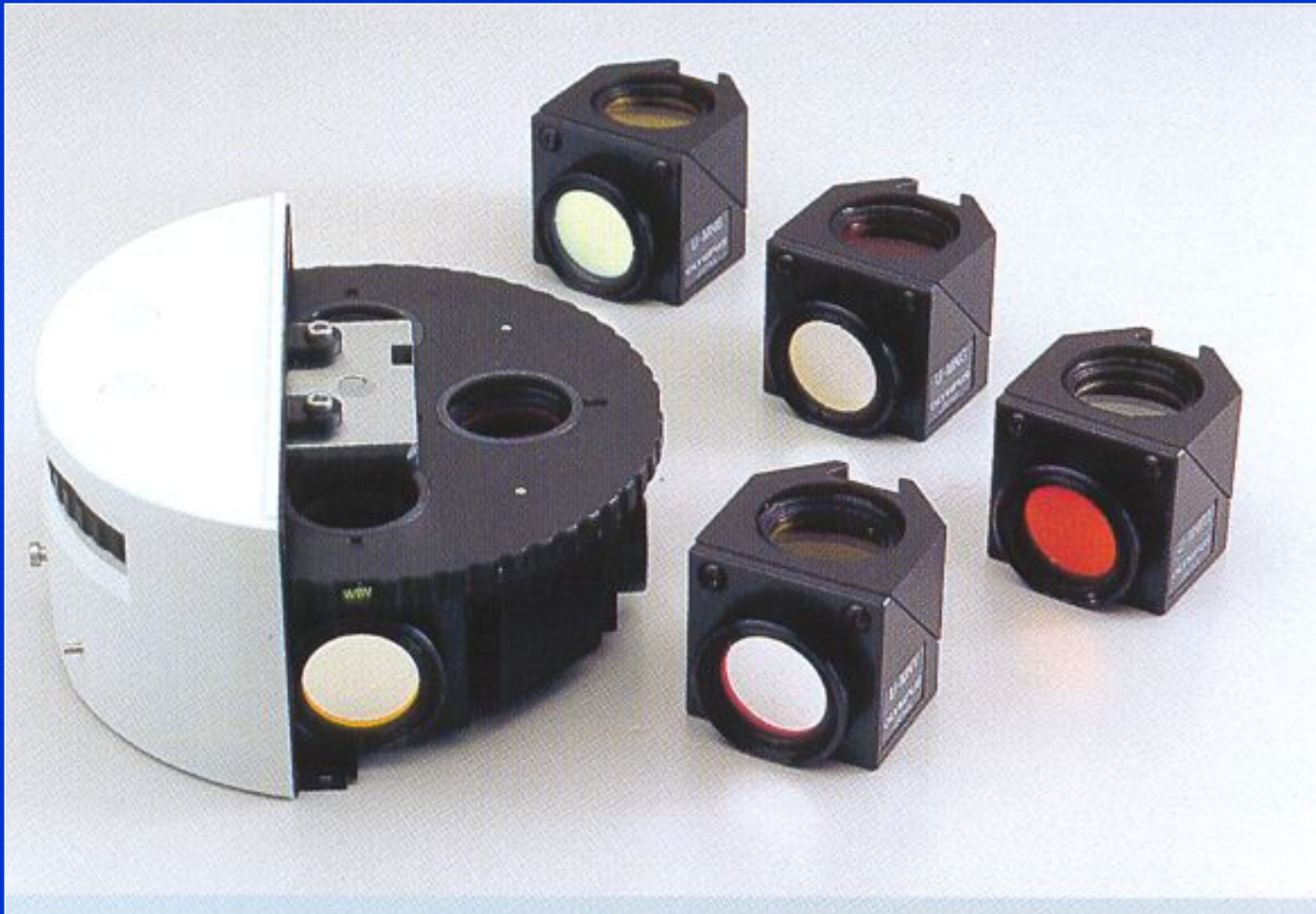


# Olympus BX-51 - epifluorescence



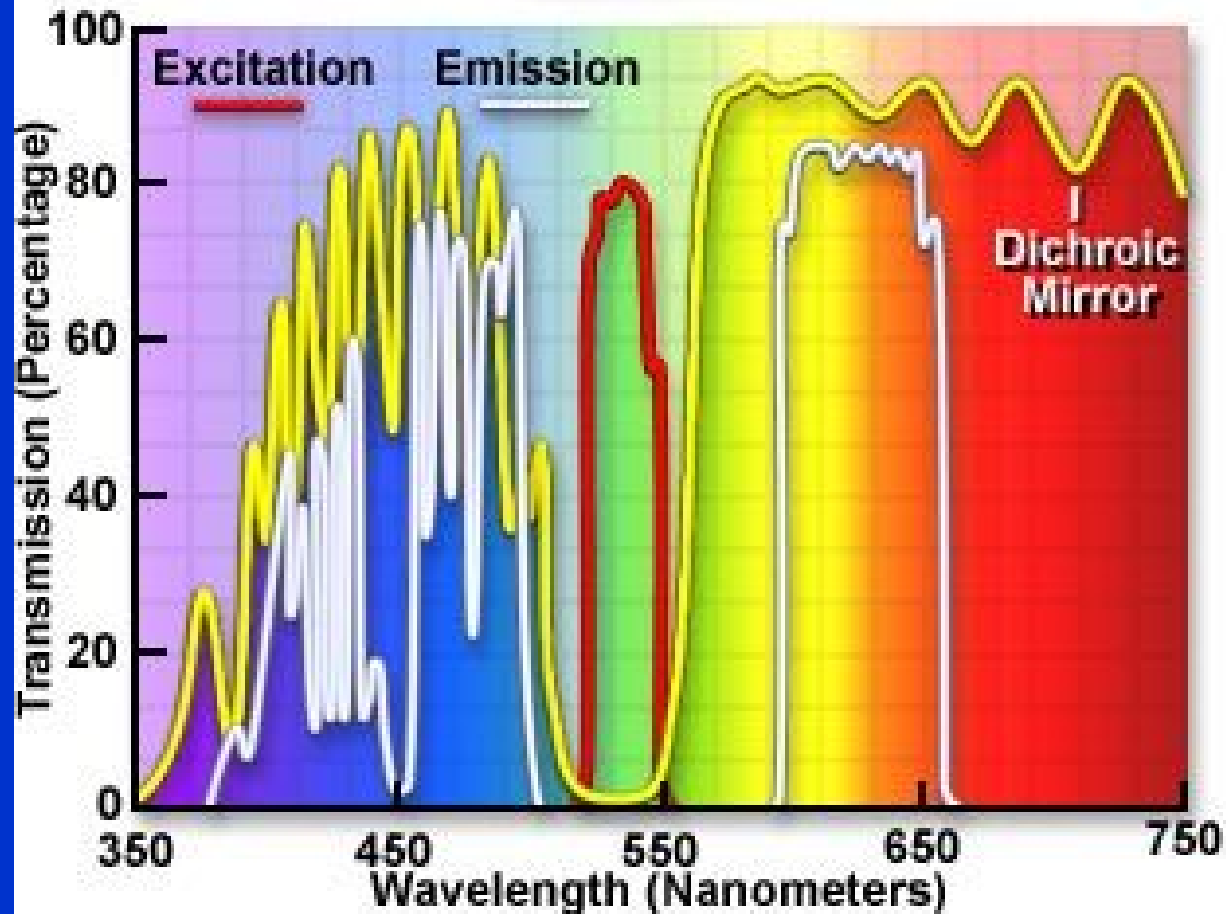


**„Kostky“ = kombinace filtrů a dichroického zrcadla pro epifluorescenci**





# Fluorescence Filter Cube and Spectra

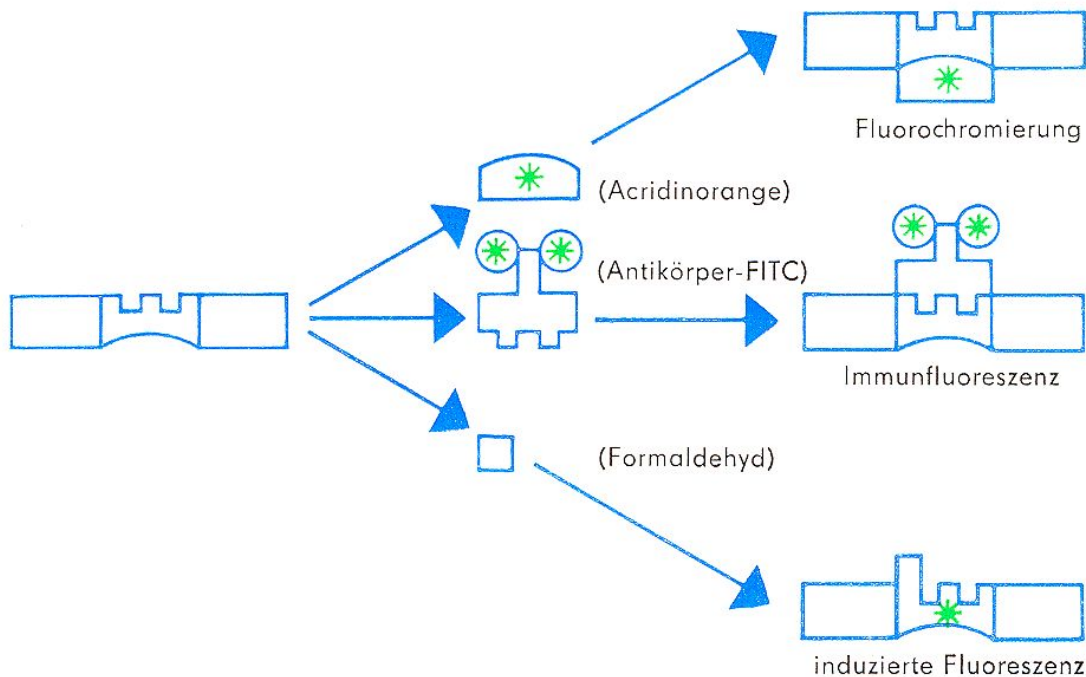


# Typy fluorescence

primární fluorescence 

autofluorescence

sekundární fluorescence



Fluorochromierung

(Acridinorange)

(Antikörper-FITC)

Immunfluoreszenz

(Formaldehyd)

induzierte Fluoreszenz

barvení  
fluorochromy

imunofluorescence =  
fluorochromem  
značené protilátky

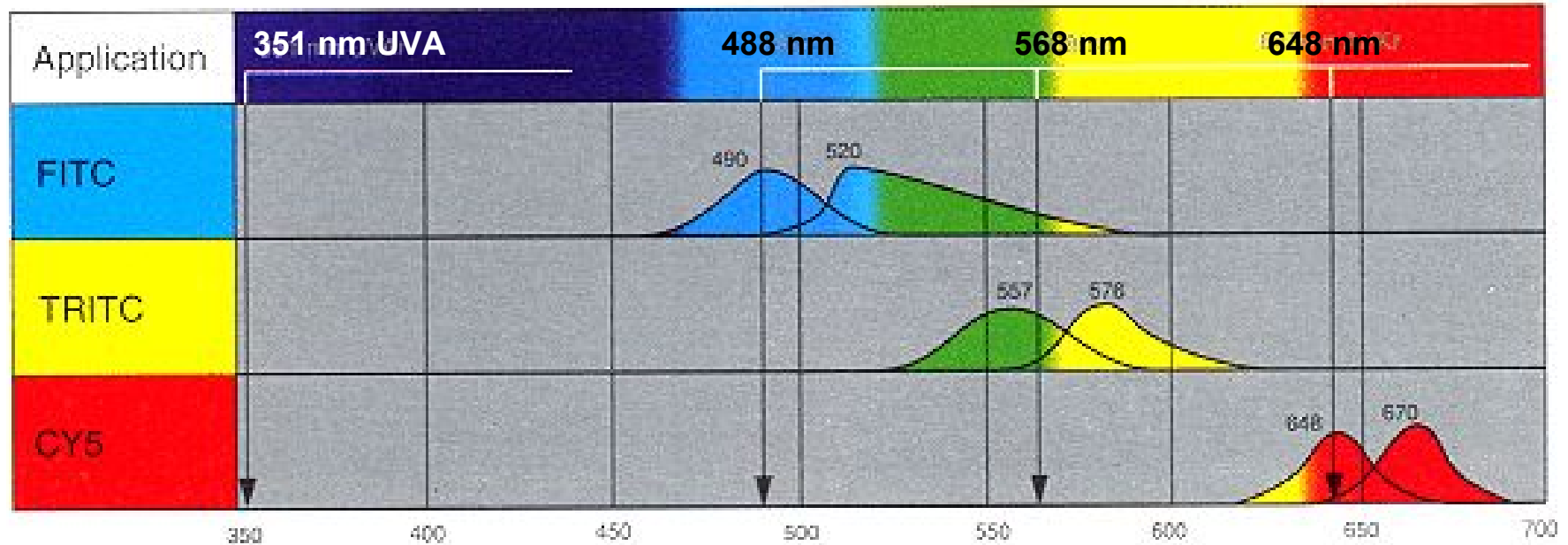
indukovaná  
fluorescence

OBJEKT

BEHANDLUNG (mit Beispiel)

FLUORESZENZOBJEKT

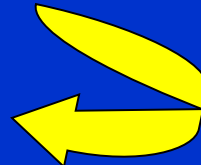
# Srovnání fluorescenčních barviv



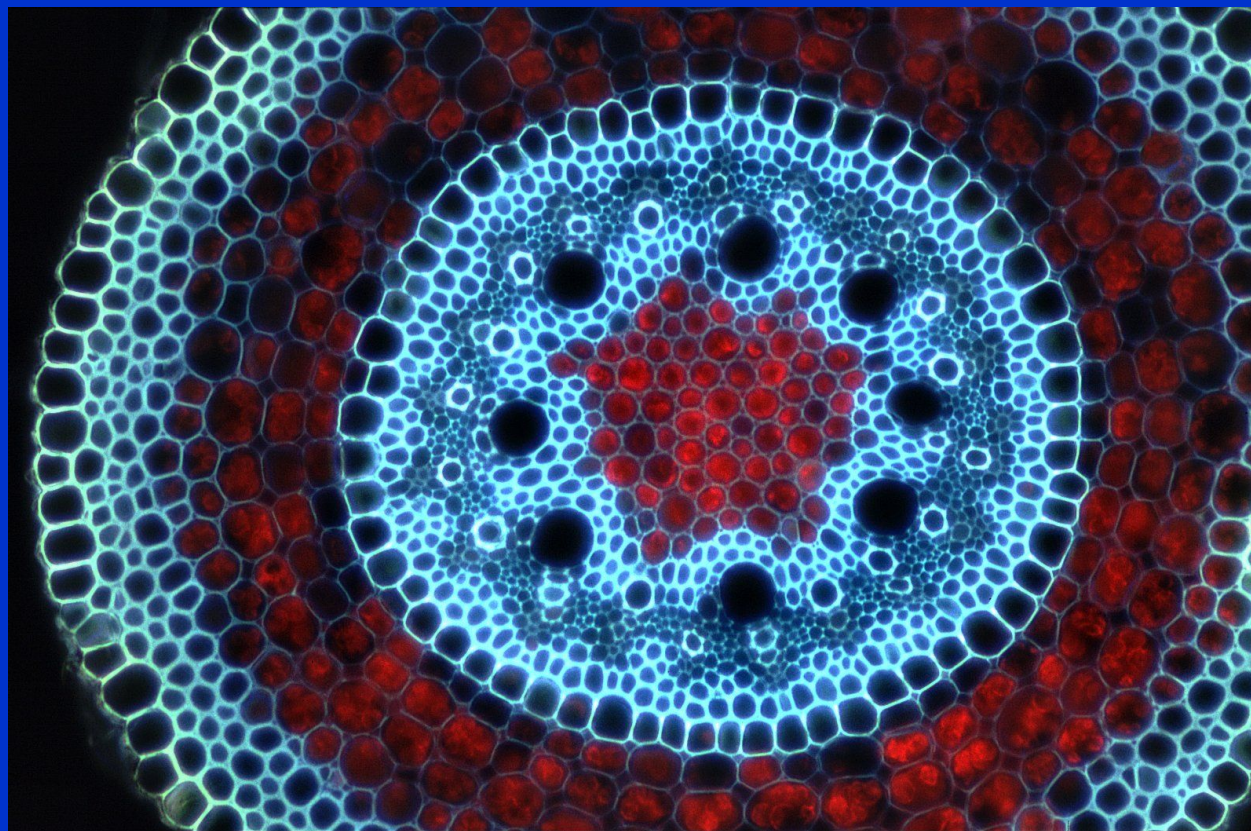
# Fluorescence

- **primární (autofluorescence)** - častá u rostlinných pletiv
  - chlorofyl
  - lignin, suberin
  - pryskyřice, sekundární metabolity
- **sekundární** - fluorochromy - specifická vazba na určité struktury (DNA - DAPI, Hoechst 33258)
- **značení GMO** fluoreskujícími proteiny (GFP, YFP)
- **fluorescenční imunohistochemie** - spojuje sekundární fluorescenci s reakcí: antigen x protilátka (detekce určitých proteinů)
- **fluorescenční in situ hybridizace** - detekce určitých sekvencí

vysoká specificita a citlivost



# Autofluorescence



příčný řez kořenem trávy *Cynodon dactylon*

A. Lux



# Autofluorescence ligninu v xylému a sklerenchymu

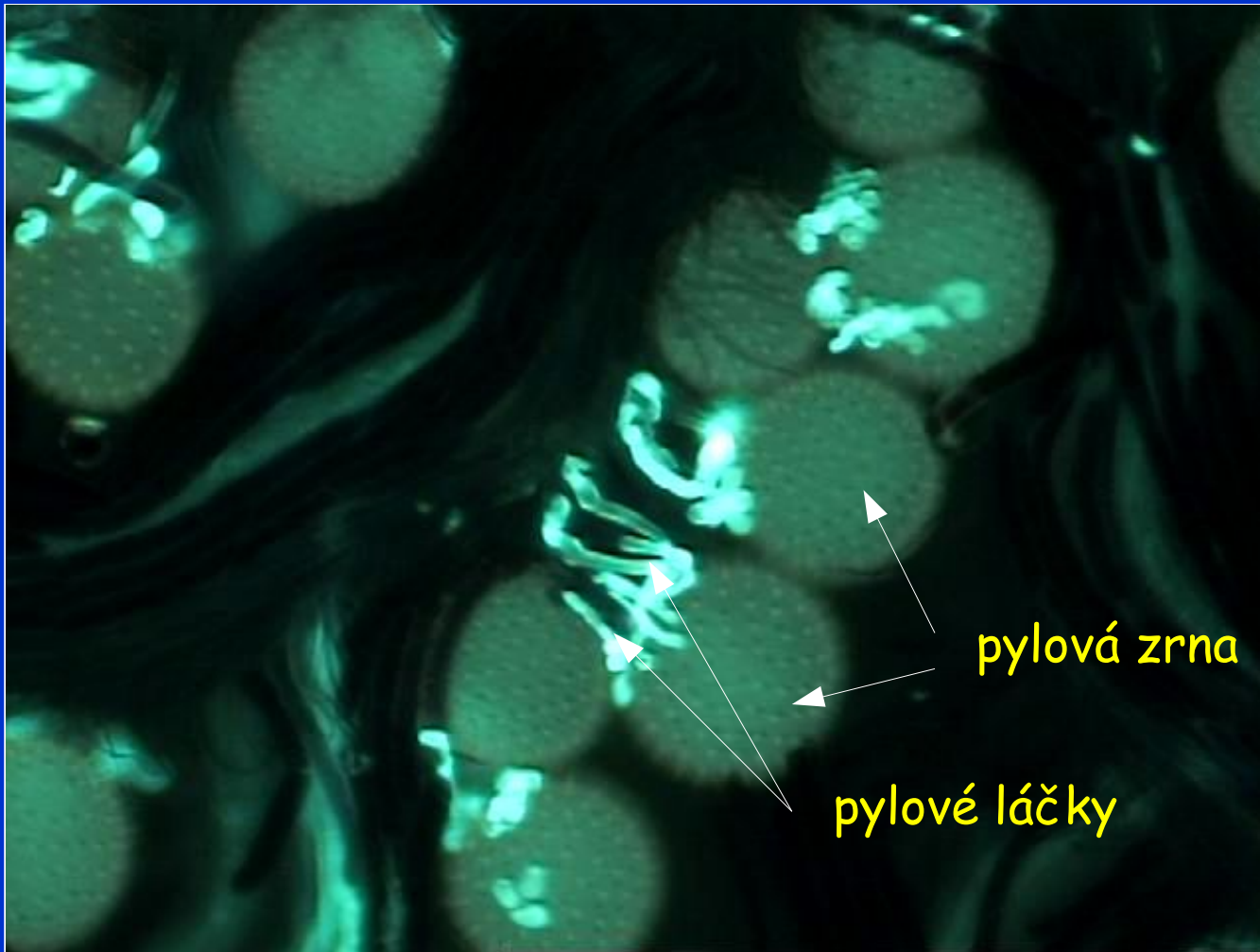
UV excitace

snímek příčného řezu  
cévním svazkem

foto-soutěž Nikon, 2004



# Kalóza v pylových láčkách



fluorochrom:  
anilínová modř

UV excitace

pylová zrna

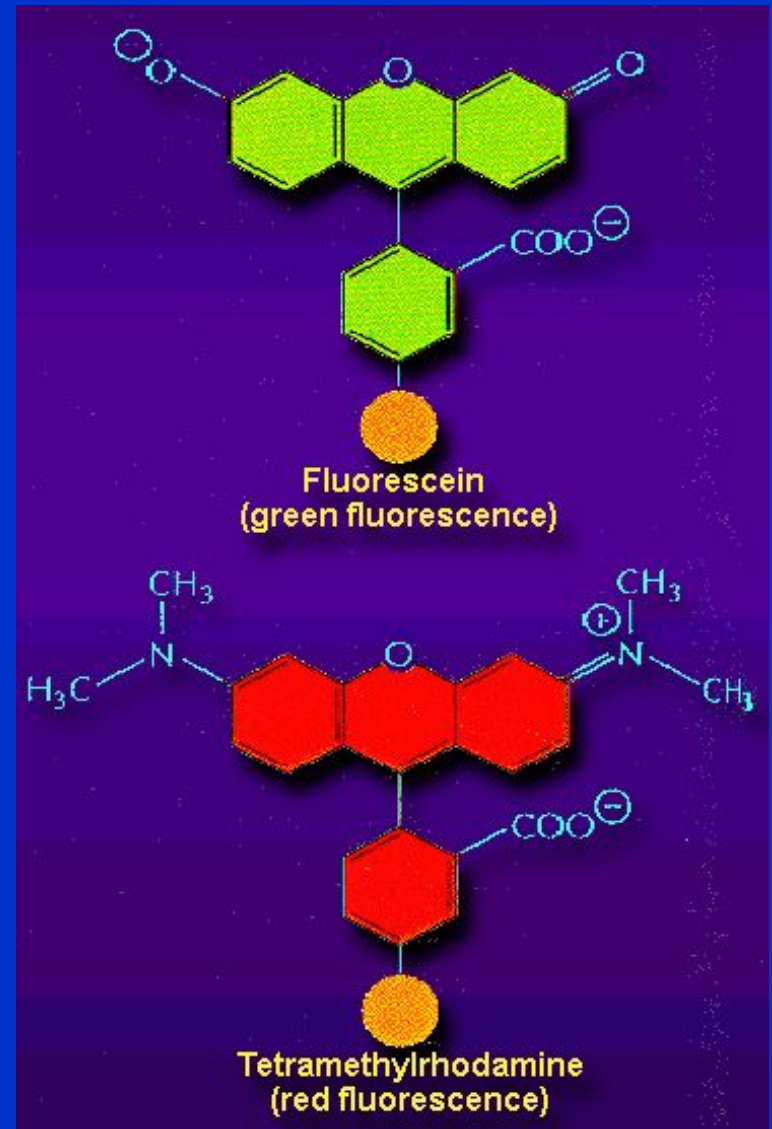
pylové láčky

# Fluorescenční barviva fluorescein a rhodamin

fluorescein emituje intenzivní  
zelenou fluorescenci po excitaci  
modrým světlem

rhodamin emituje červenou  
fluorescenci po excitaci zeleno-  
žlutým světlem

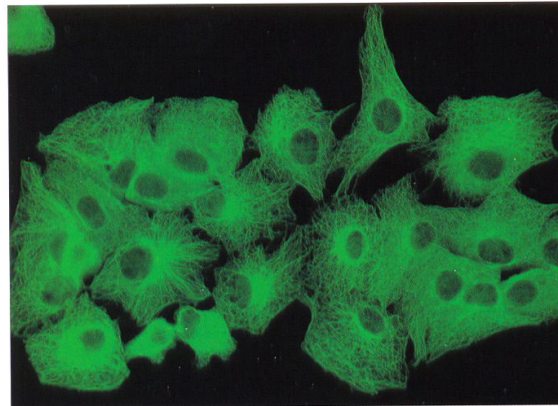
Různé složky buněk mohou být  
barveny oběma barvivy současně



# Kombinace fluorochromů a filtrů

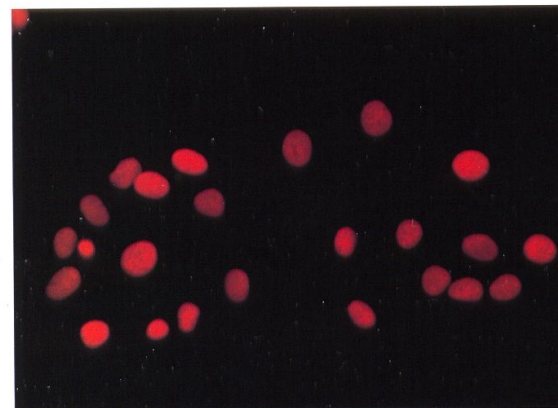
kultura buněk A549

Cell culture (A549): Microtubuli (FITC labelled) and nuclei (PI labelled)



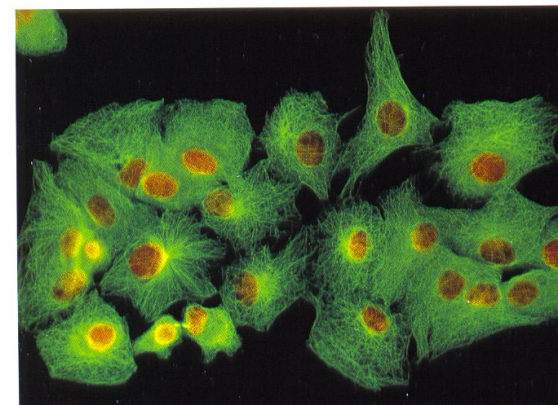
*FITC emission (Ü-MWIBA band pass filter cube)*

FITC  
barví se  
mikrotubuly



*PI emission (U-MWIG filter cube)*

propidium  
jodid  
barví jádra

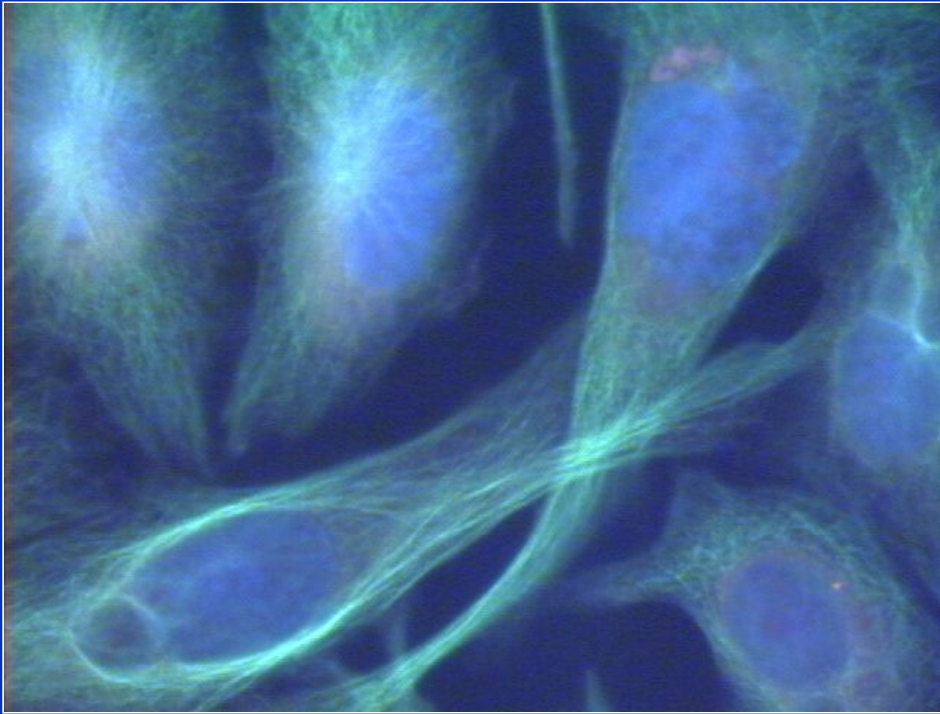


*FITC and PI simultaneous emission (U-MWIB filter cube)*

kombinovaný  
obraz -  
simultánní  
emise



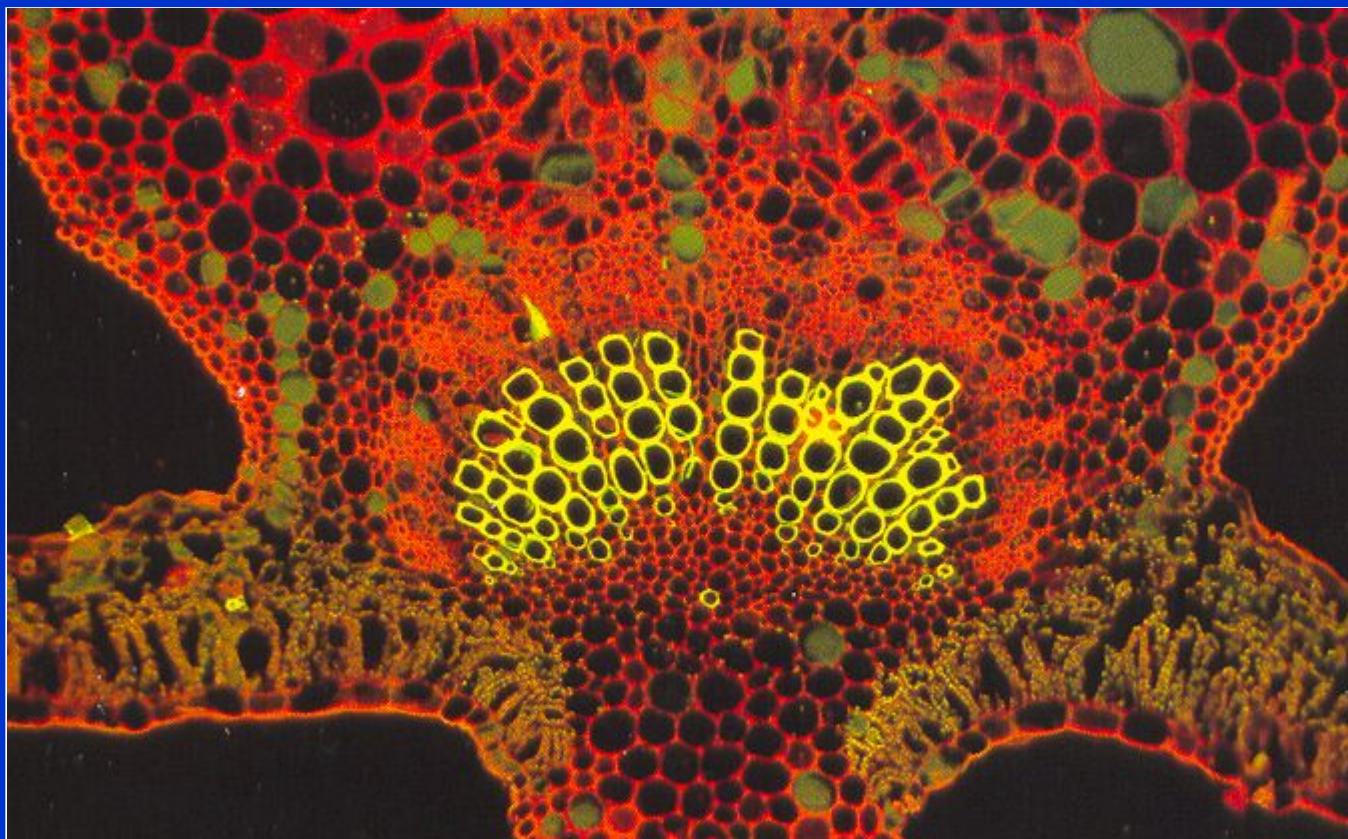
# Kombinace fluorochromů a filtrů



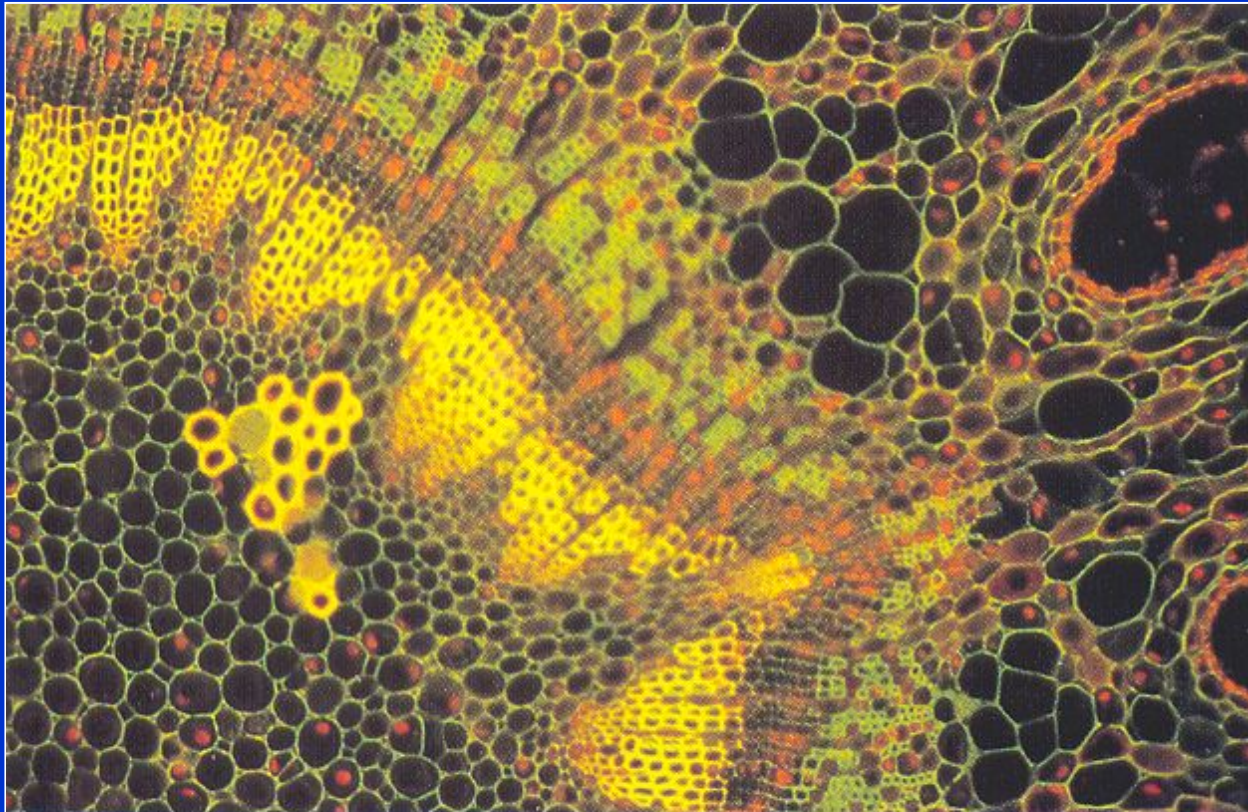
DAPI + FITC



# Řez řapíkem listu



# Stonek jedle v modrofialovém světle

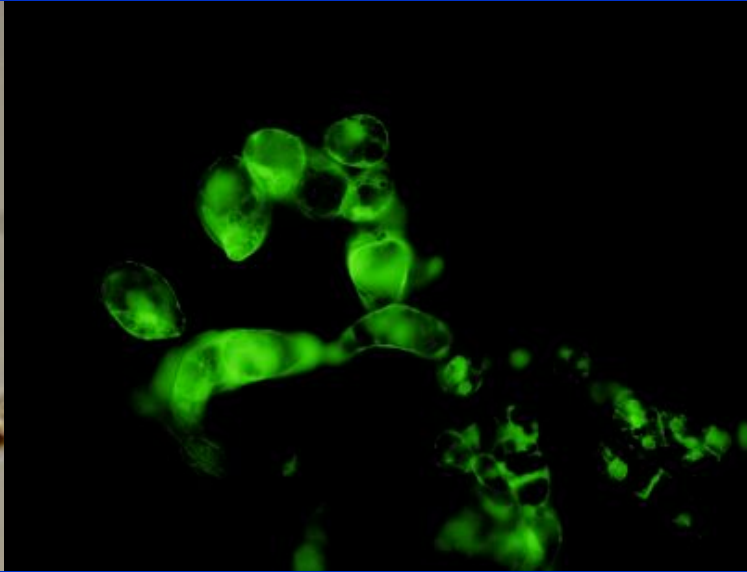


fluorochrom: akridinová oranž



# Sledování životaschopnosti buněk kalus mrkve

FDA



substrát:  
FDA

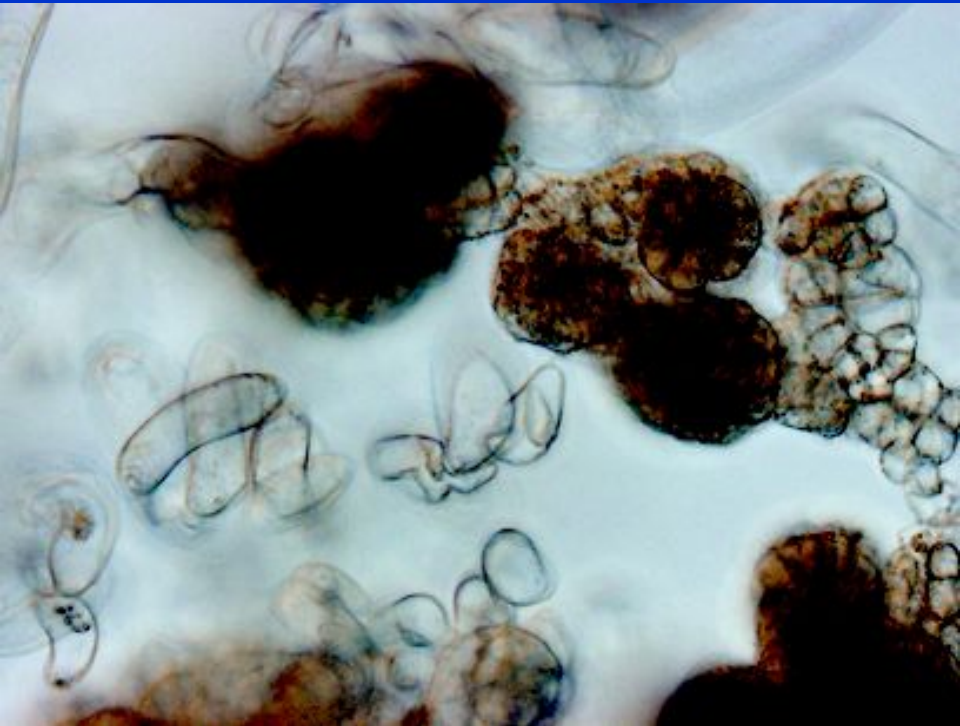


esterázy

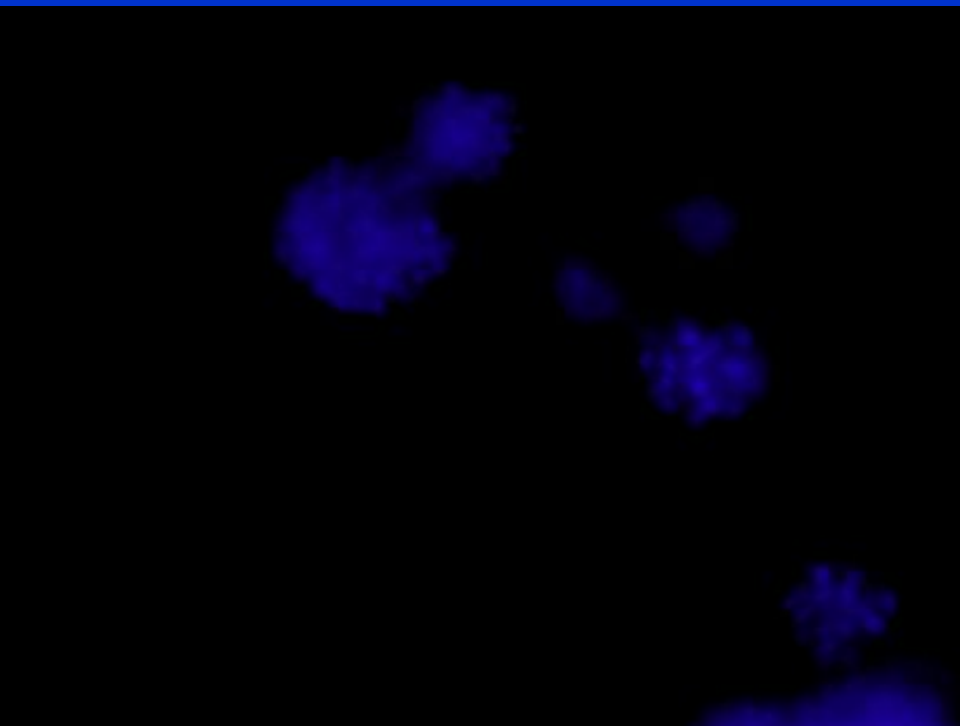


fluorescein + acetát

# Sledování vývoje kalusu mrkve



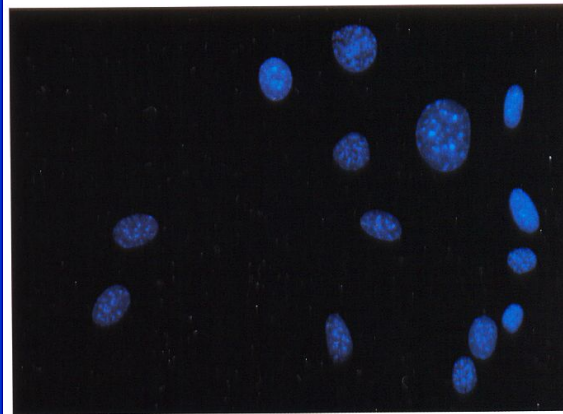
BF - DIC



DAPI

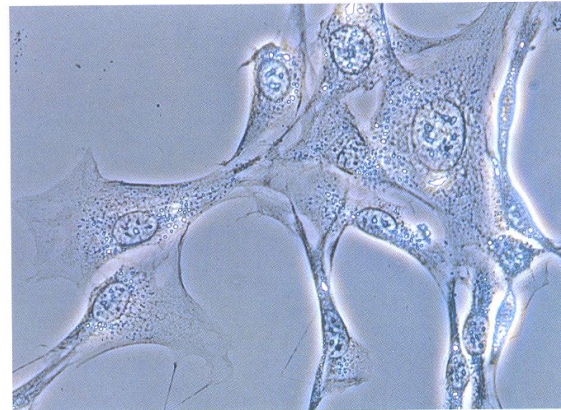
# Kombinace DAPI a fázového kontrastu

Cell culture (NIH3T3): nuclei (DAPI)



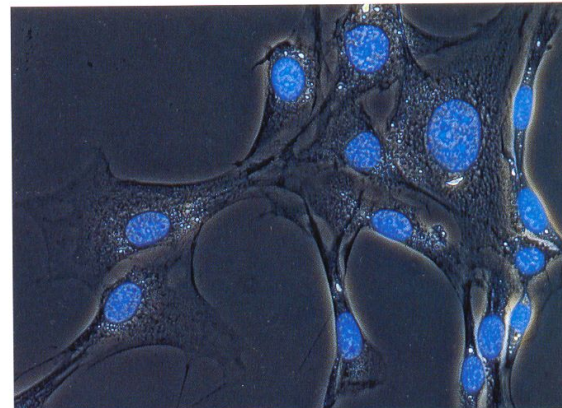
DAPI

*Incident light fluorescence observation.*



fázový  
kontrast

*Phase contrast observation.*



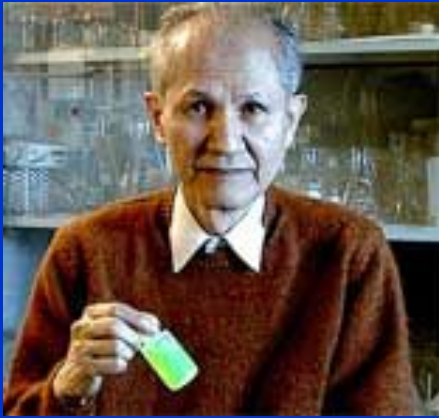
kombinovaný  
obraz

*The combination of phase contrast and incident light fluorescence observation.*

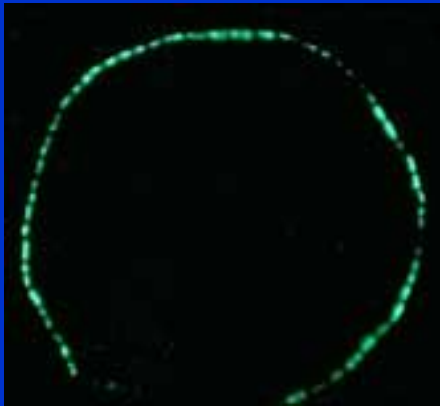


# Historie GFP

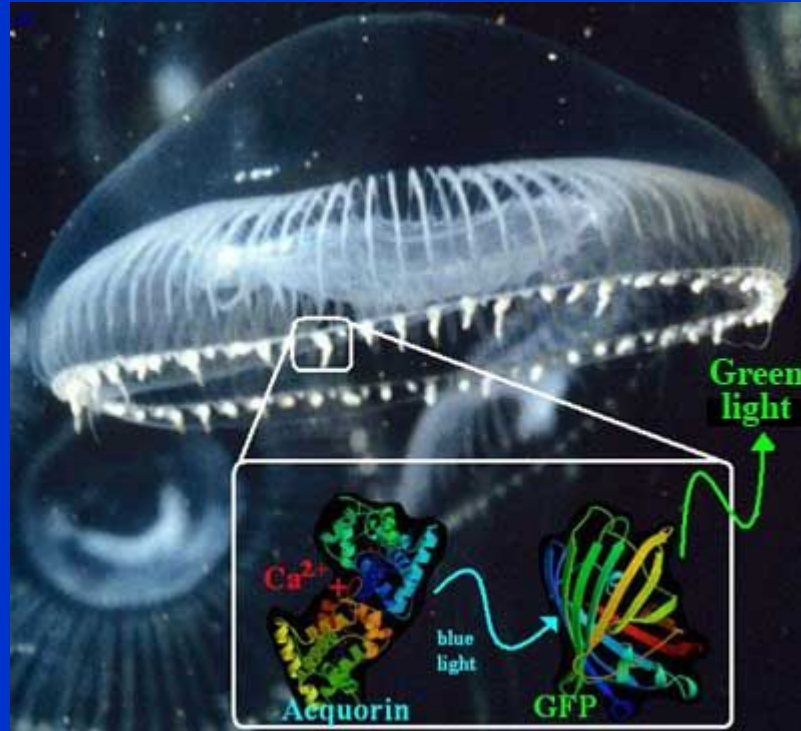
1955 první popis luminiscence medúzy



Osamu Shimomura (1962)



fotoreceptory na okraji  
klobouku medúzy



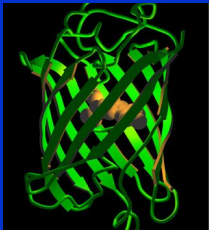
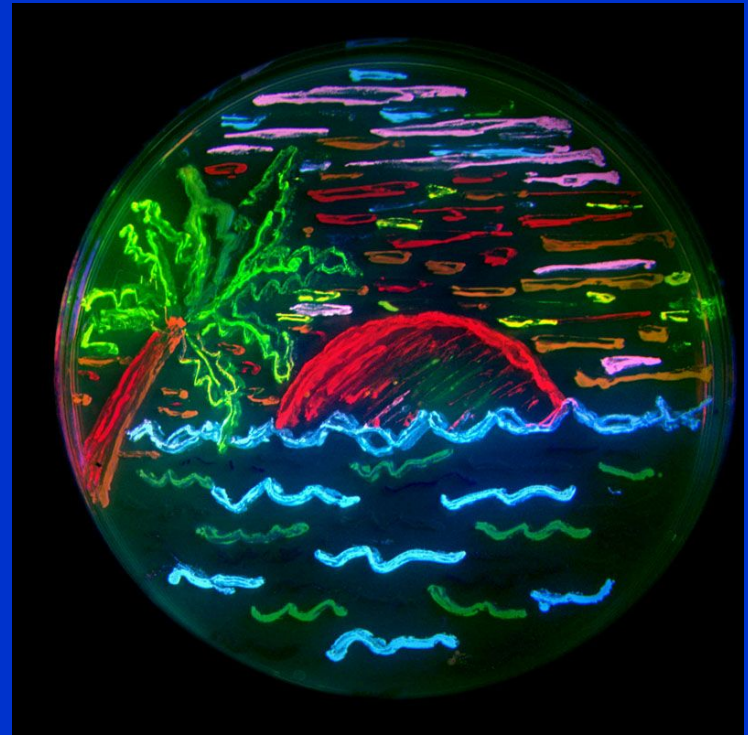
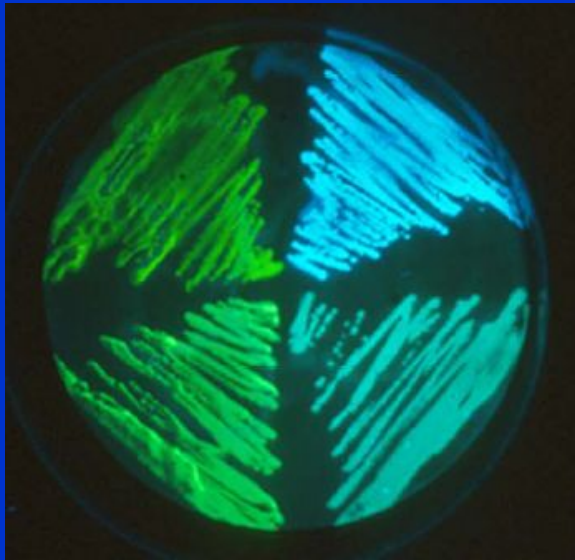
2008 Nobelova cena za chemii

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html>

# Modifikace GFP



Roger Tsien  
La Jola, Kalifornie

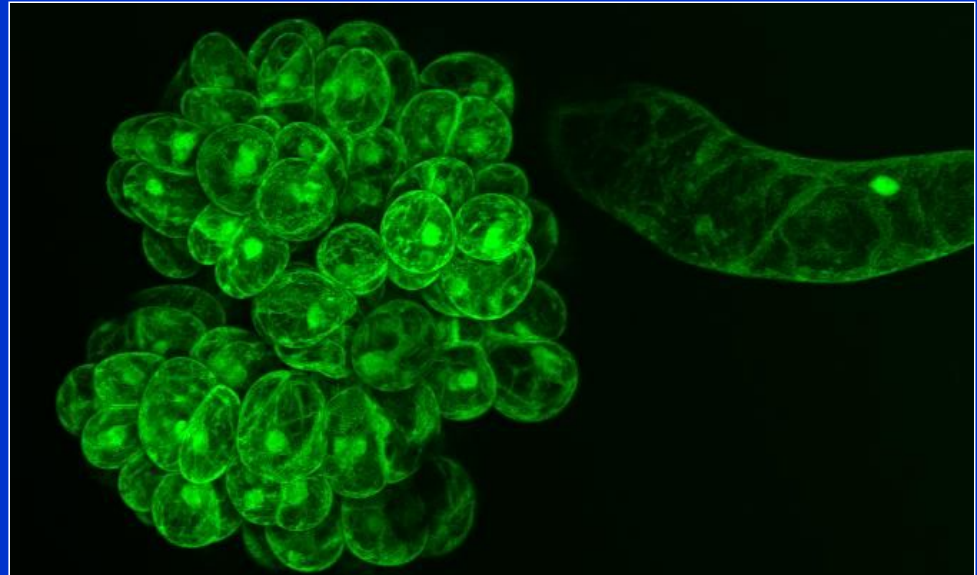


<http://www.tsienlab.ucsd.edu/People.htm>

# GFP



„jellyfish“  
*Victoria aequorea*

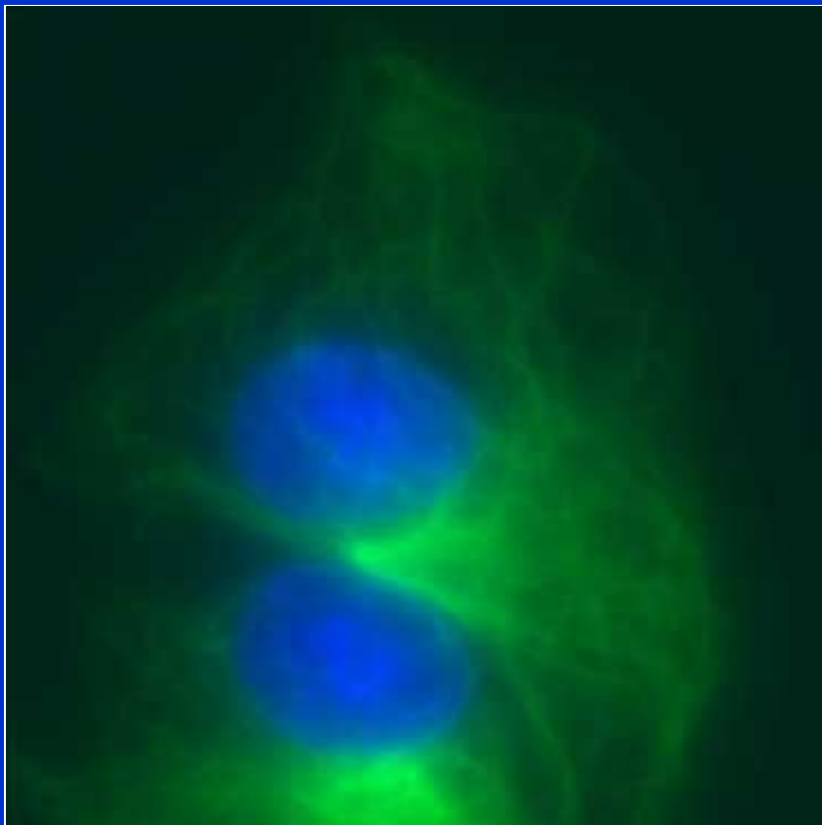


GFP in cultured tobacco cells,  
confocal image

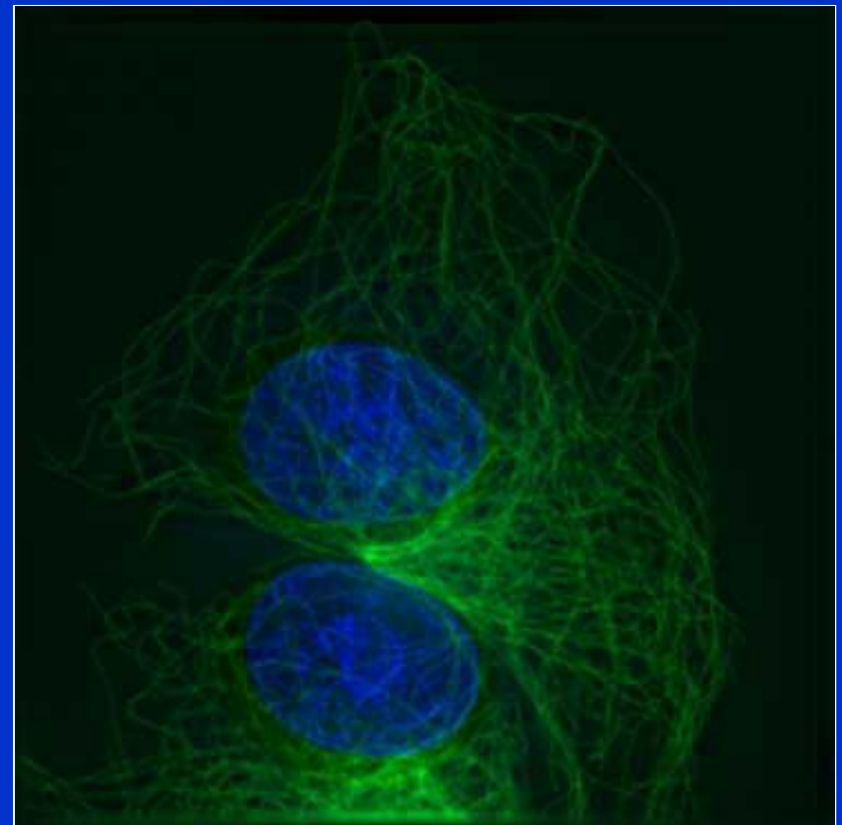
<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/GFP/GFPbackgrnd.html>

# PtK1 cell with antibody staining for microtubules (green) and DNA (blue)

(A. Khodjakov, Ph.D., Wadsworth Labs Albany, NY)



originální snímek



snímek po úpravě

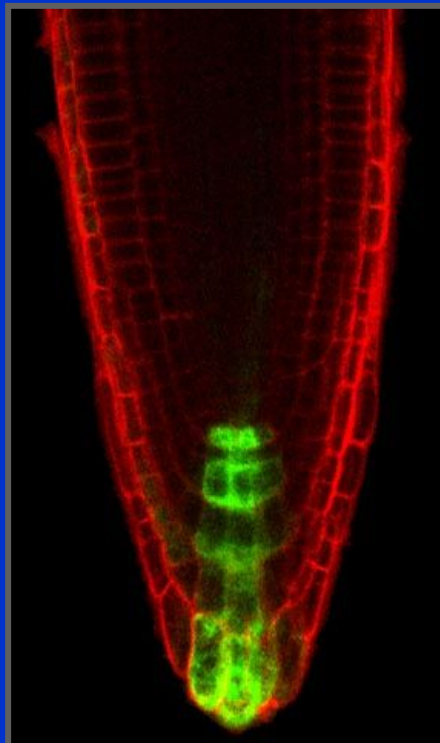
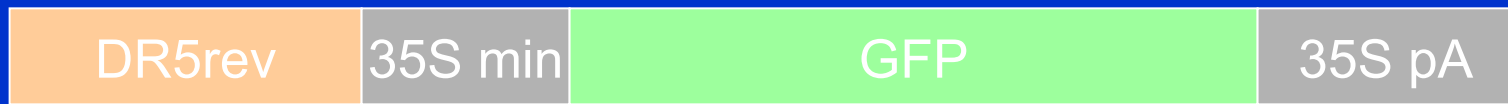
<http://www.aqi.com/index.php>



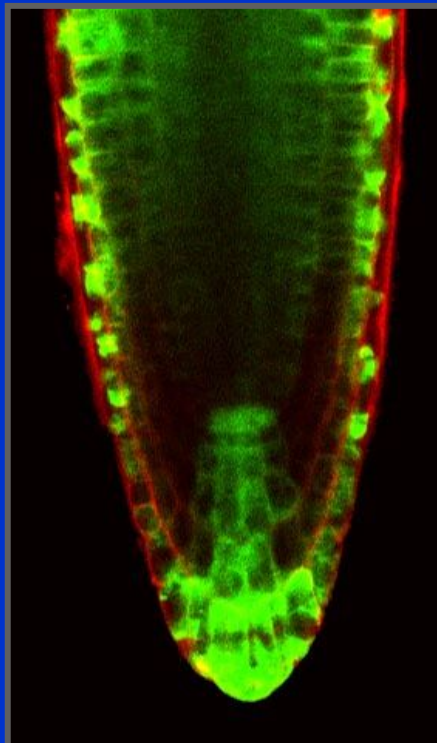
# Arabidopsis *DR5::GFP* Auxin Reporter využití GFP pro sledování auxinu

→  
auxinem aktivovatelný promotor

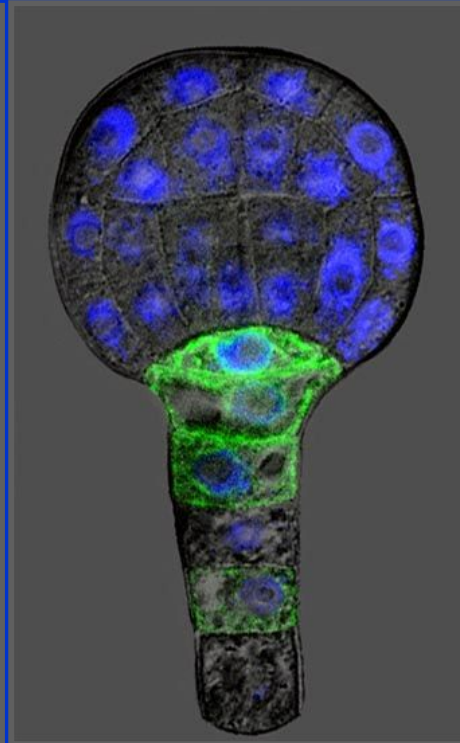
J. Friml



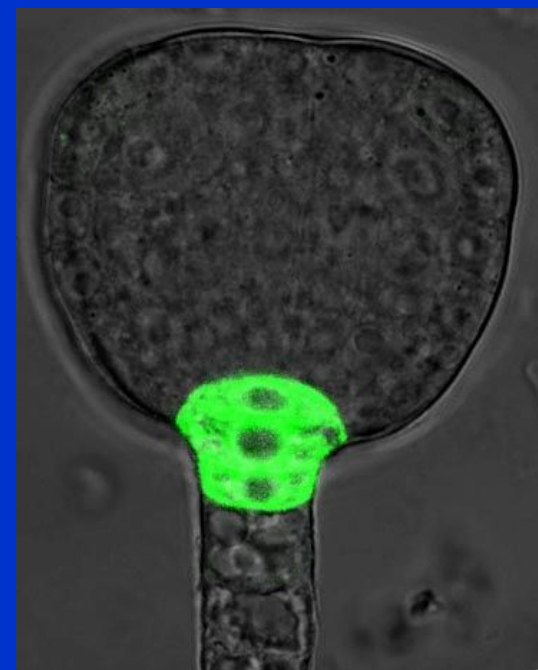
kořen



kořen + auxin



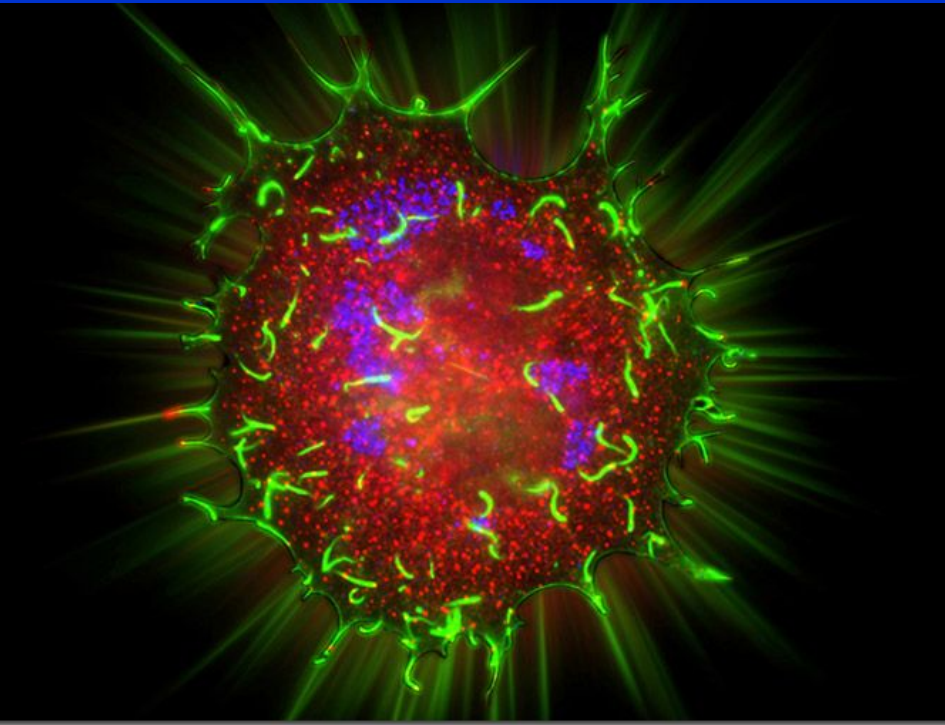
+ DAPI



embryo

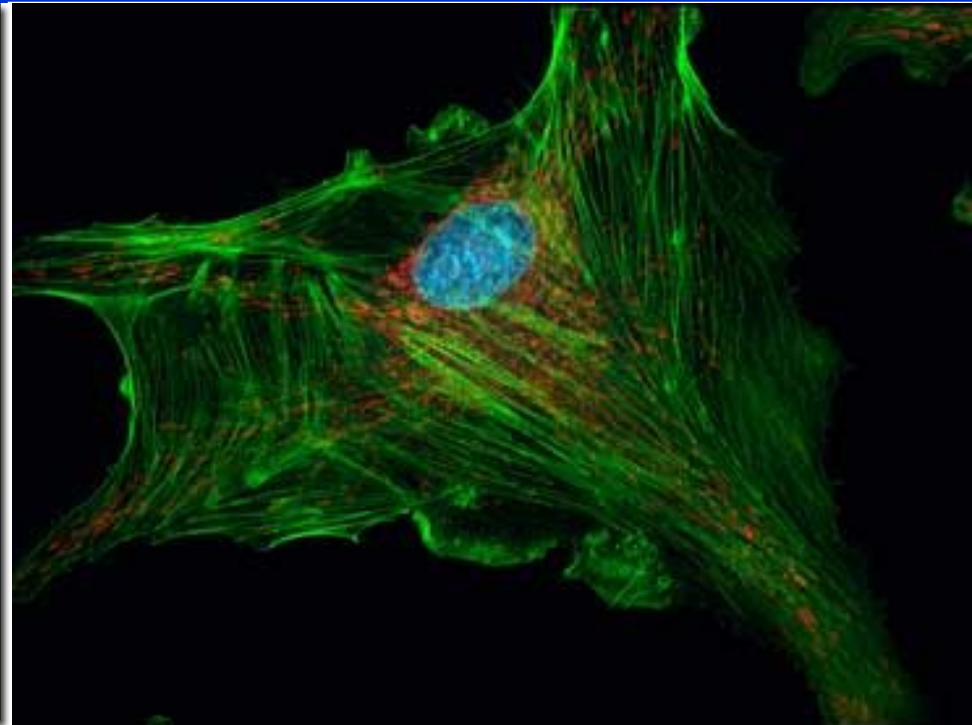


# Příklady tříbarevné fluorescence



**Cell infected with poxvirus  
(630x)**

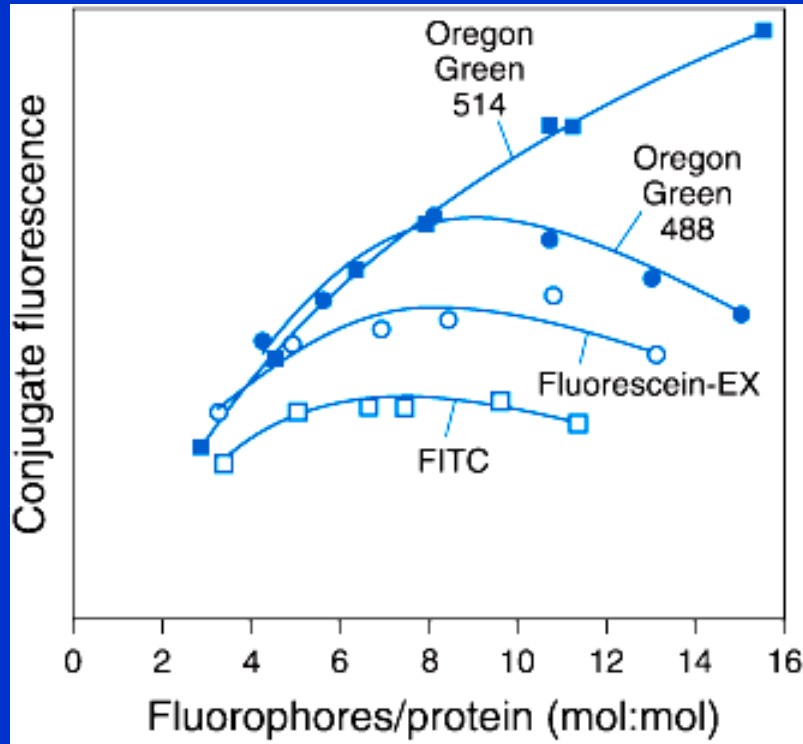
Honorable Mention,  
2007 Nikon Competition  
Dr. Daniel Kalman



**Bovine Endothelial Cell**

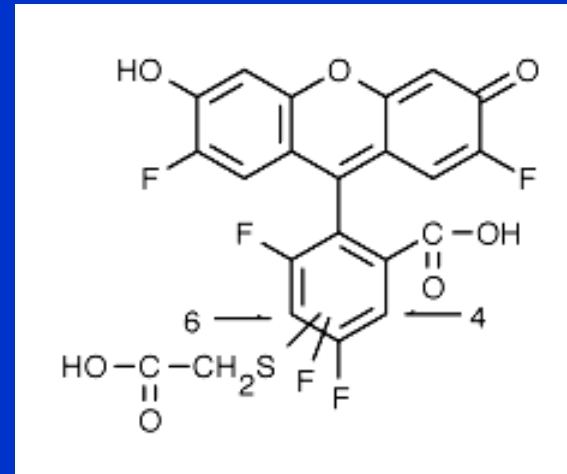
Courtesy Leica Microsystems  
Imaging Solutions, Ltd., UK.

# Fotostabilita



Oregon Green 514 phalloidin

fluorescein phalloidin



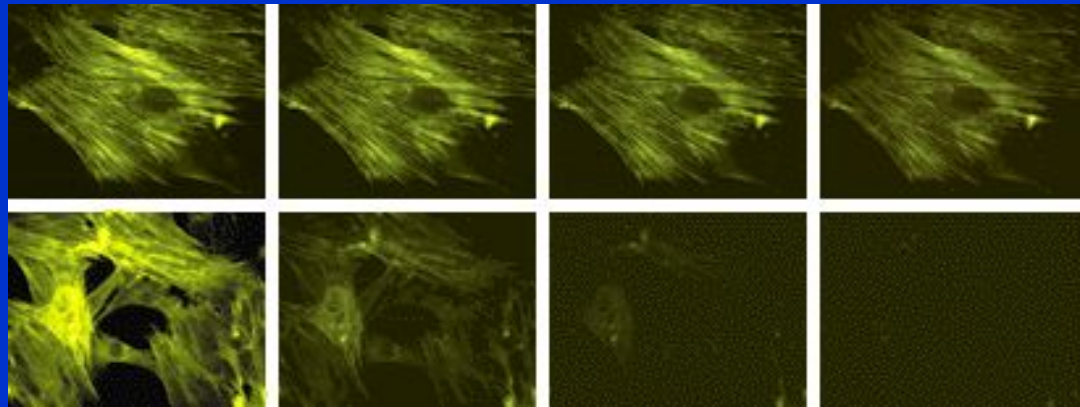
OG514

1s

10s

20s

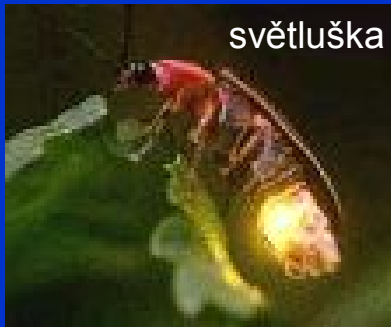
30s



# Chemiluminescence

Excitace elektronů je vyvolána chemickou reakcí  
Při deexcitaci dochází k vyzáření světla

## Bioluminescence



# Využití chemiluminiscence

- Stanovení NO



- Stanovení  $\text{H}_2\text{O}_2$

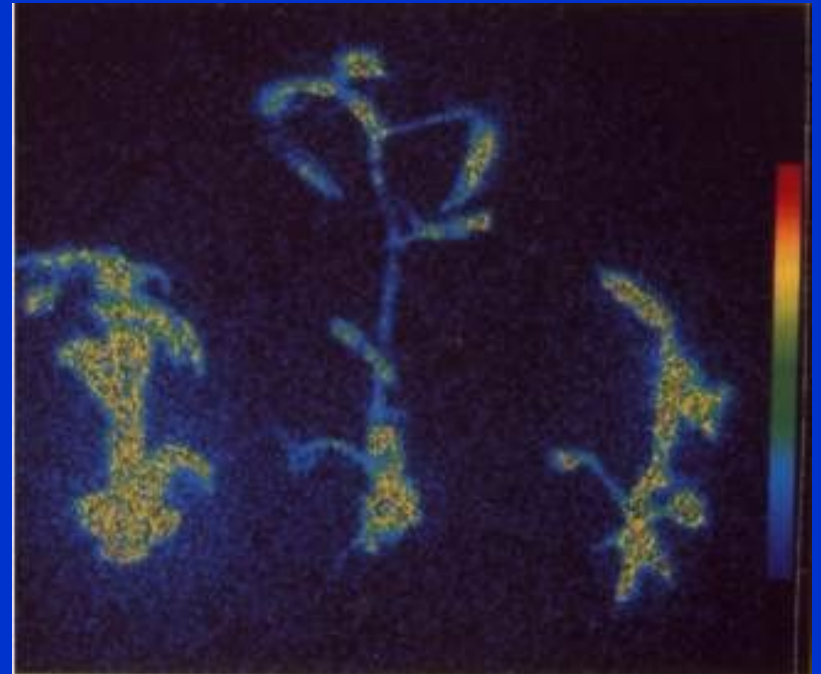


# Transformované rostlinky kasavy z embryogenní kultury

signální gen = luciferáza



rostlinky

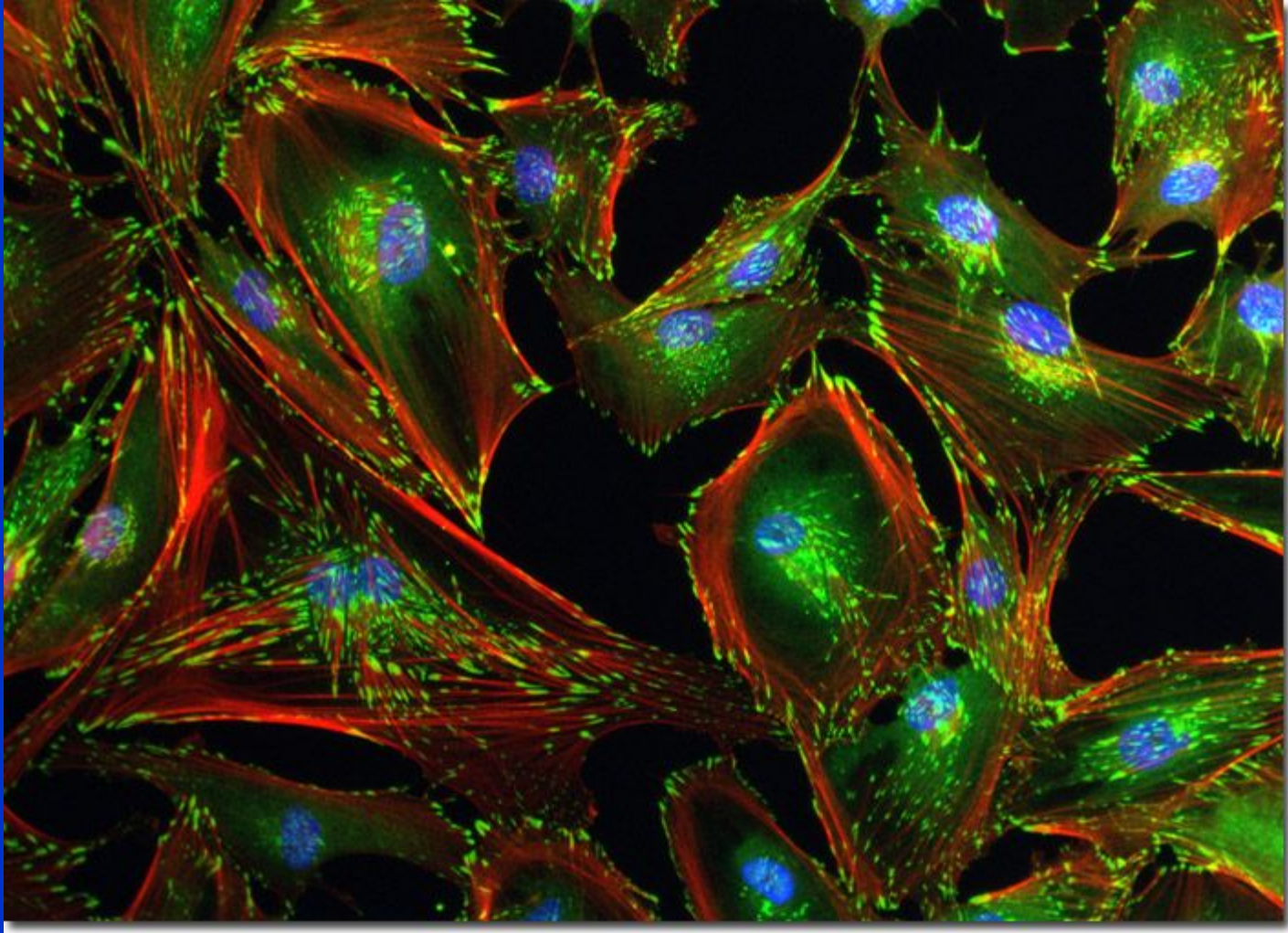


vizualizace aktivity luciferázy:  
postříkáno luciferinem - světelná  
emise měřena luminometrem



# Zajímavé adresy

- <http://www.bioscience.org/lecture/molbiol/micro/frame.htm#s0076.htm>
- <http://dept.kent.edu/projects/cell/index.htm>
- <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>
- <http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/PlantAnatomy/index.html>
- <http://www.aqi.com/index.php>
- <http://www.probes.com/handbook/>



Honorable Mention, 2007 Nikon Competition  
Carmen Laethem  
Aerie Pharmaceuticals  
Research Triangle Park, North Carolina, USA  
Primary porcine trabecular meshwork cells (20x)