

Fluorescenční mikroskopie

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

FGIP

VYUŽITÍ FLUORESCENCE, PŘÍMÁ FLUORESCENCE, PŘÍMÁ A NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE, BIOTIN-AVIDINOVÁ METODA IMUNOFLUORESCENCE

Fluorescenční metody se používají především, pokud potřebujeme zviditelnit určité látky a struktury v buňce. Některé fluorochromy (DAPI, ethidium bromid, Hoechst, propidium jodid) se sami o sobě váží na určité molekuly (např. na DNA) a můžeme je tedy použít na zviditelnění těchto molekul. Tento postup se nazývá **přímá fluorescence**.

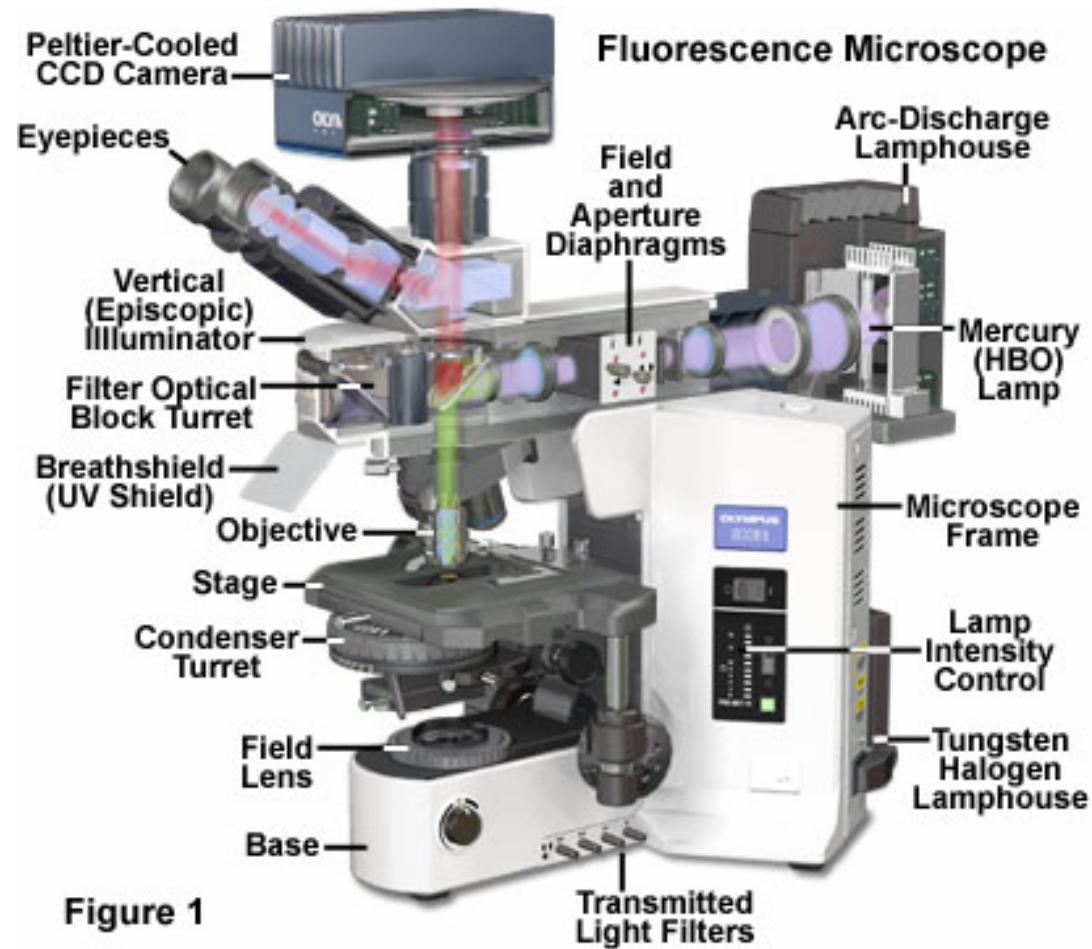
Pro většinu struktur v buňce bychom však nenašli fluorochrom, který by se na ně specificky vázal. V takovém případě používáme metody **imunofluorescence**. Jsou vypracovány postupy, s jejichž pomocí si dokážeme vyrobit protilátku, která se specificky váže na téměř jakýkoli druh molekuly. Máme-li takovouto protilátku, můžeme na ni kovalentně navázat fluorofor a vyrobit tak fluoreskující molekulu specificky rozeznávající to, co potřebujeme. V tomto případě hovoříme o přímé imunofluorescenci.

Příprava tohoto kombinované molekuly (konjugátu) není úplně jednoduchá, a proto se často používá **nepřímá imunofluorescence**. U této metody si nejdříve připravíme v určitém zvířecím druhu (např. v králíkově) specifická protilátka proti naší molekule (primární protilátka) a necháme ji navázat na molekulu nebo strukturu, kterou chceme lokalizovat. Po odmytí přebytečné primární protilátky se na preparát přidá komerčně dodávaná protilátka konjugovaná s fluoresceinem, která specificky rozeznává všechny protilátky daného zvířecího druhu (v našem případě králíka). Ta se naváže na primární protilátku a zviditelní námi hledanou strukturu. Nevýhodou nepřímé fluorescence oproti přímé fluorescence je nižší specifita.

Biotin-avidinová imunofluorescence využívá silné vazby biotinu a bazického glykoproteinu avidinu. Biotin lze snadno navázat na molekuly primárních protilátek, na které se pak místo sekundárních protilátek s fluorochromem váže fluorochromem značený avidin. Výsledkem je jasná a ostrá fluorescence.

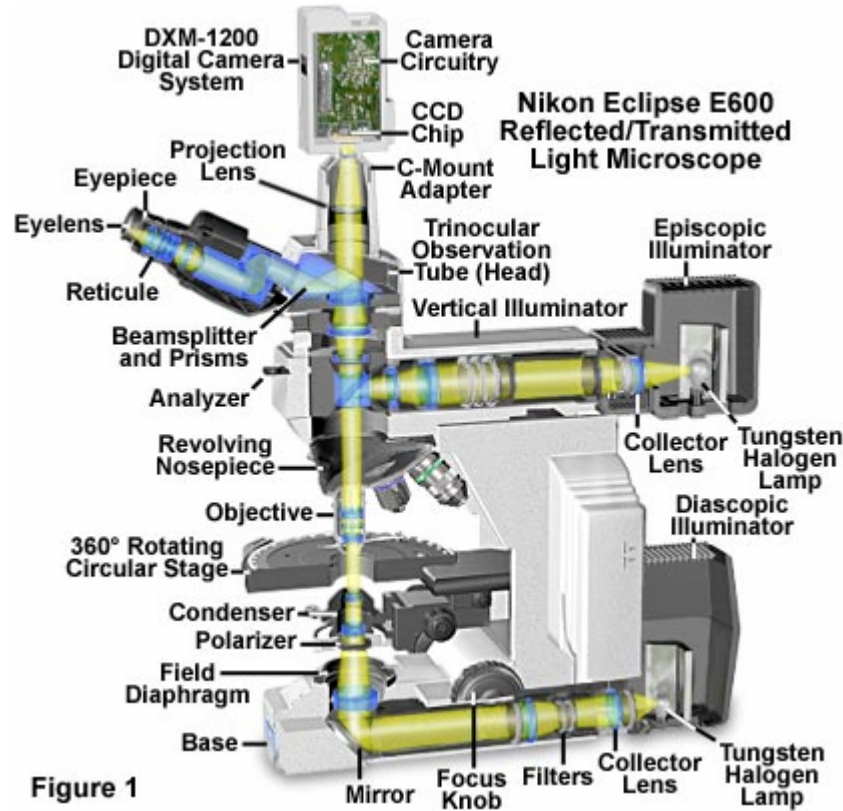
Protože máme k dispozici celé barevné spektrum fluorochromů, můžeme zviditelnit více různých struktur v téže buňce a sledovat tak jejich vzájemnou lokalizaci.

Fluorescenční mikroskop

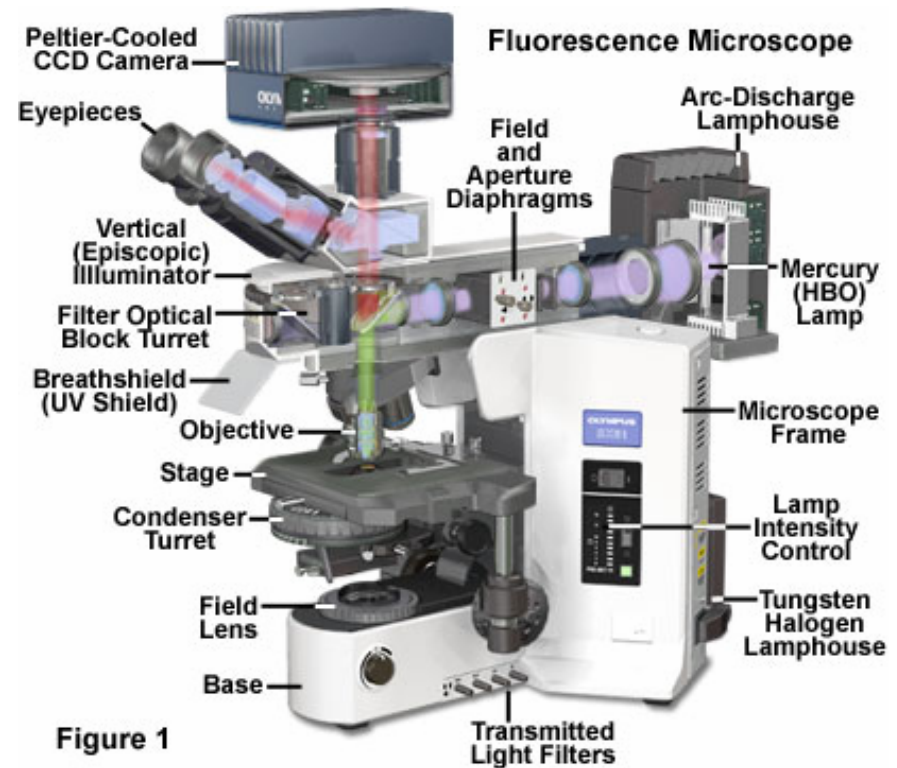


Možné uspořádání

Transmitted light microscopy

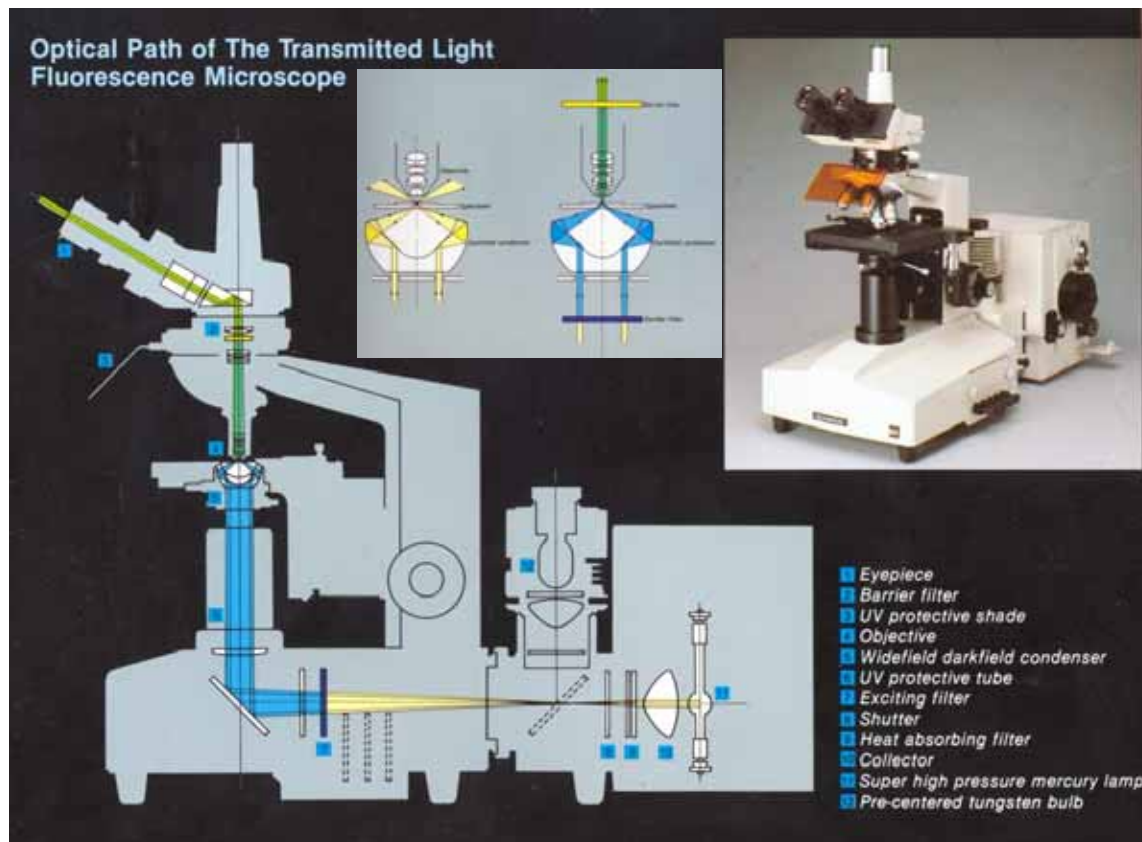


Epi fluorescence microscopy



Transmisní fluorescenční mikroskop

(Transmission light fluorescence microscope)

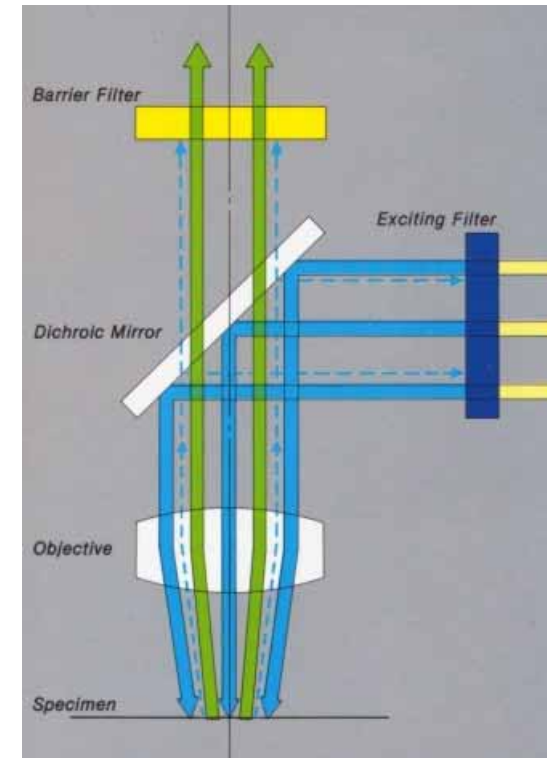
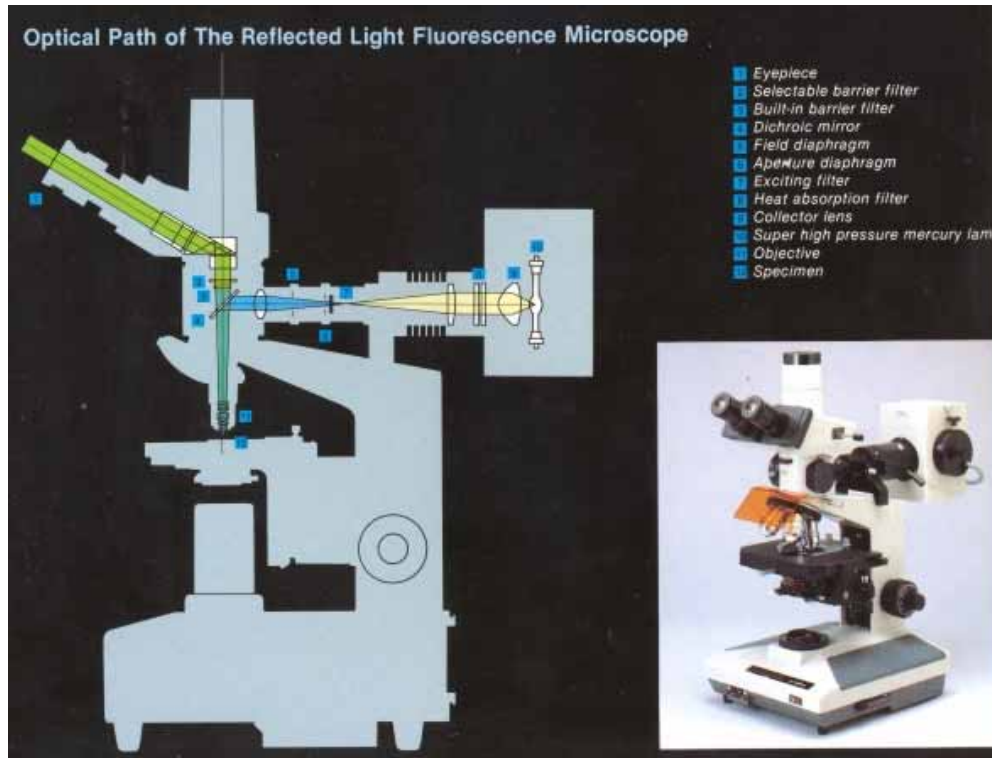


U tohoto typu mikroskopu prochází světlo excitačním filtrem a na preparát přichází zespodu jako u klasického světelného mikroskopu. Pro osvětlení preparátu se však používá kondenzor zástinový, který odráží světlo tak, že dopadá na preparát světlo z boku. Procházející excitační světlo tak prochází mimo objektiv a do objektivu se dostane emitovaná fluorescence.

12 <http://www.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>

Epifluorescenční mikroskop

(Reflected light fluorescence microscope)



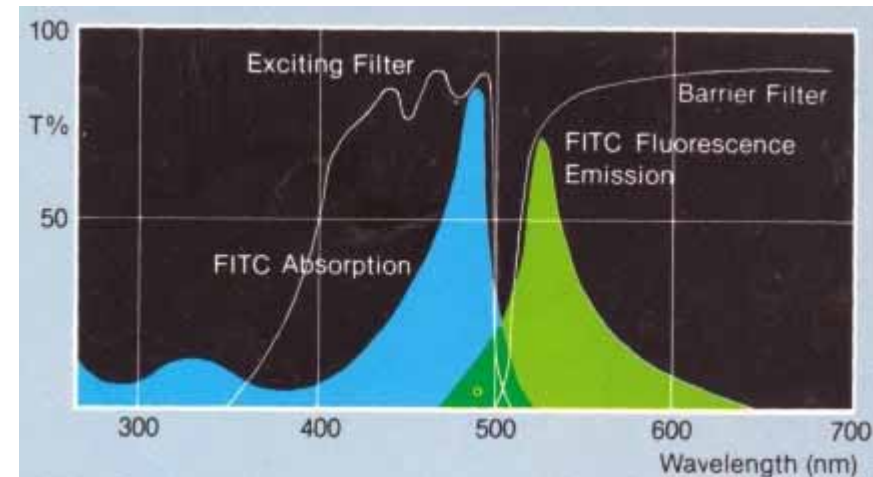
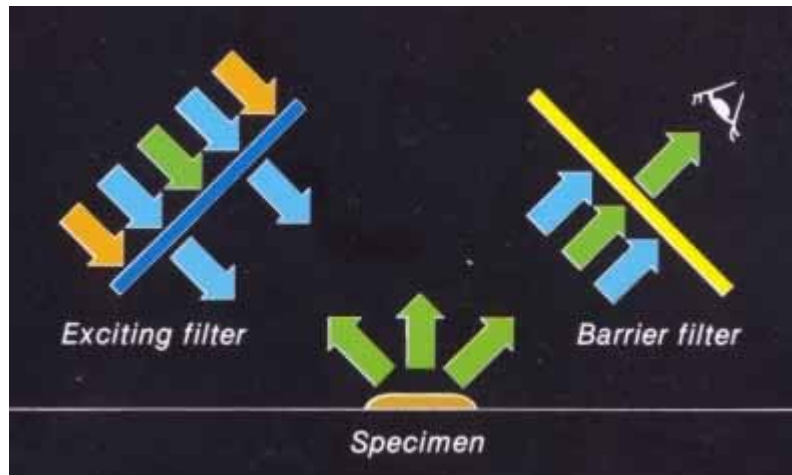
- excitační světlo prochází objektivem, dopadá na preparát a emisní světlo se vrací zpět do objektivu
- nutno použít zvláštní typ zrcadla, které odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru
- používá se dichroické zrcadlo, které propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se tedy vždy takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světa propouští.
- epifluorescenční typ mikroskopu je v současnosti více oblíbený než transmisní typ

Excitační a barierový (emisní) filtr

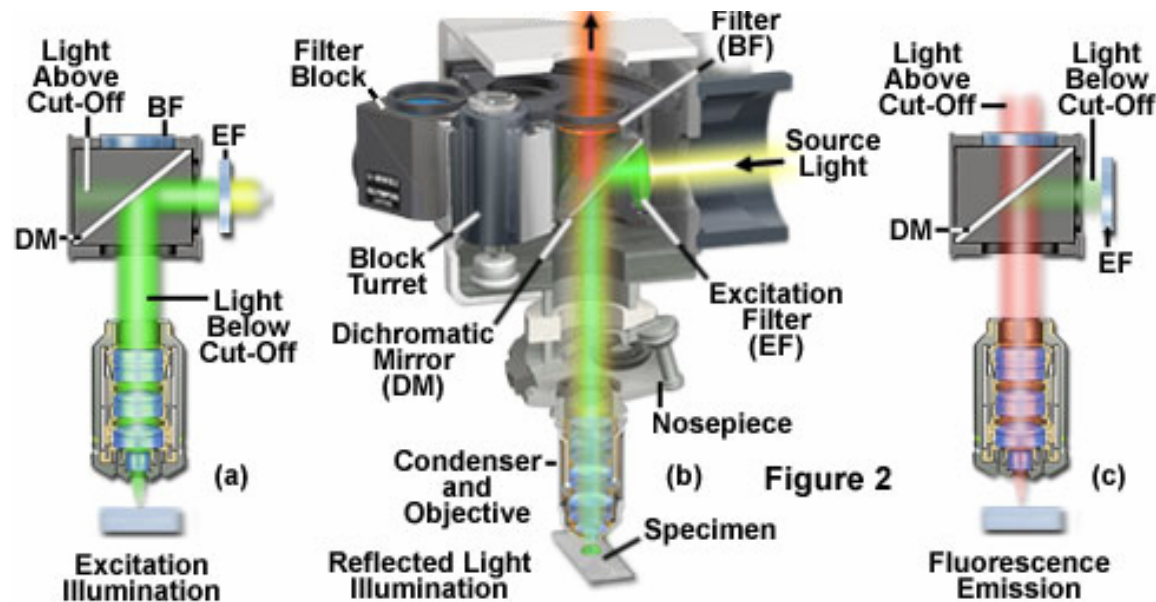
Abychom mohli dobře pozorovat emisní záření jehož intenzita je vždy mnohem nižší než intenzita excitačního záření, používáme dvojici filtrů.

Excitační filtr propouští z barevného spektra pouze část potřebnou pro excitaci fluorescence a zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí.

Bariérový filtr propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačnímu světlu. Excitační světlo se od emisního sice liší barvou, ale je mnohem intenzivnější, takže by v něm fluorescenční emisní světlo, které nám zejména jde, nebylo lidským okem rozlišitelné.



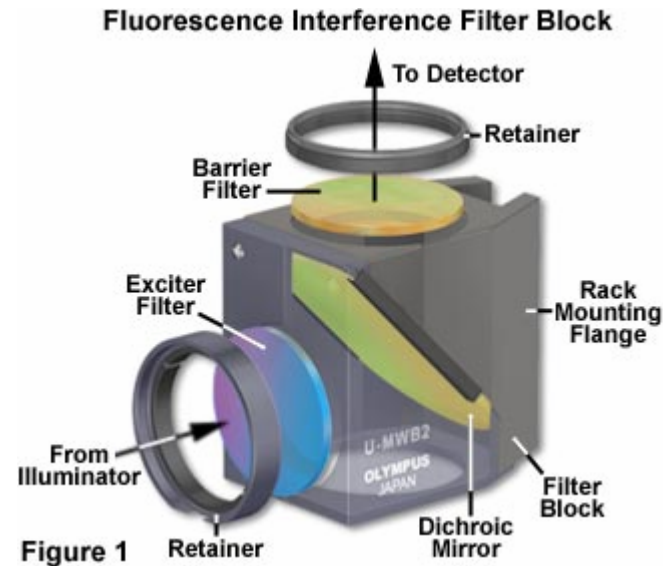
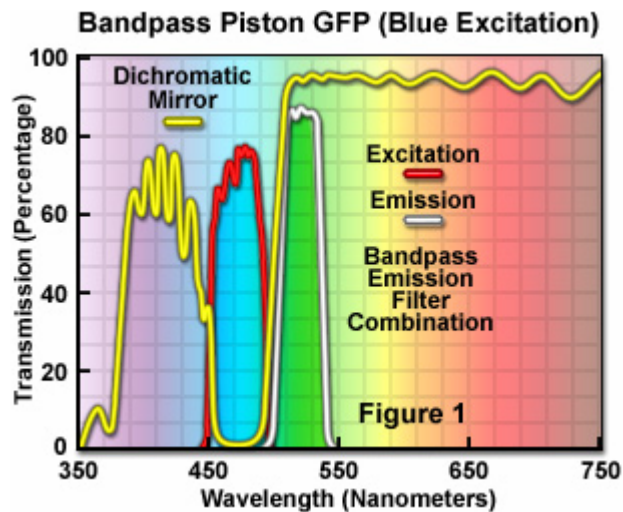
Funkce dichroického zrcadla



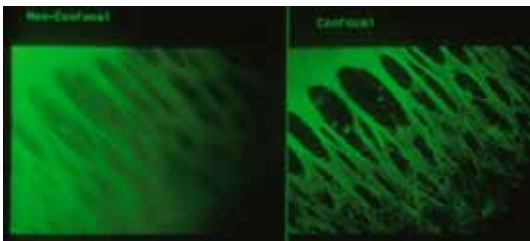
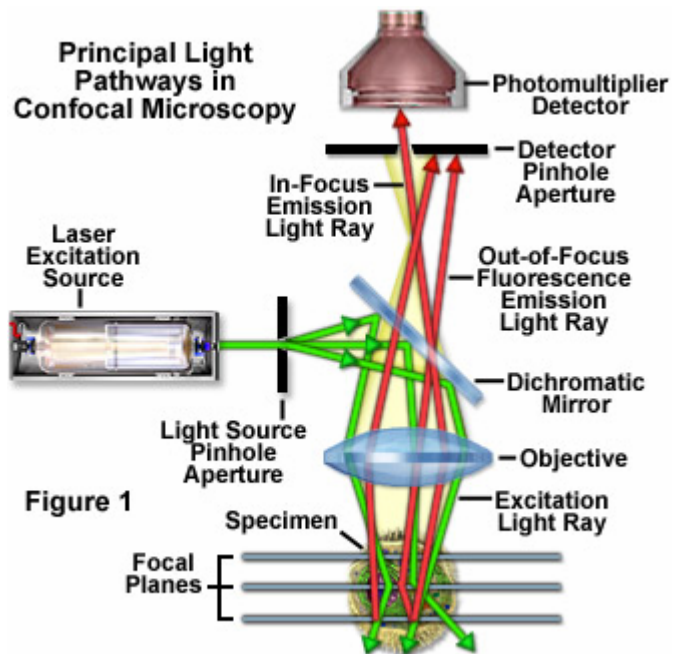
- Dichroické zrcadlo propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se vždy takový typ zrcadla, který odráží maximum excitačního světla a propouští maximum emisního světla podle excitačního a emisního maxima daného fluoroforu

Filtry

Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh fluorochromu se do epifluorescenčního mikroskopu se vkládá pohromadě jako tzv. **kostka**, jejíž dvě stěny jsou tvořeny filtry a úhlopříčka dichroickým zrcadlem. Kostky jsou umístěny na výměníku a je možné je vyměňovat podle potřeby.

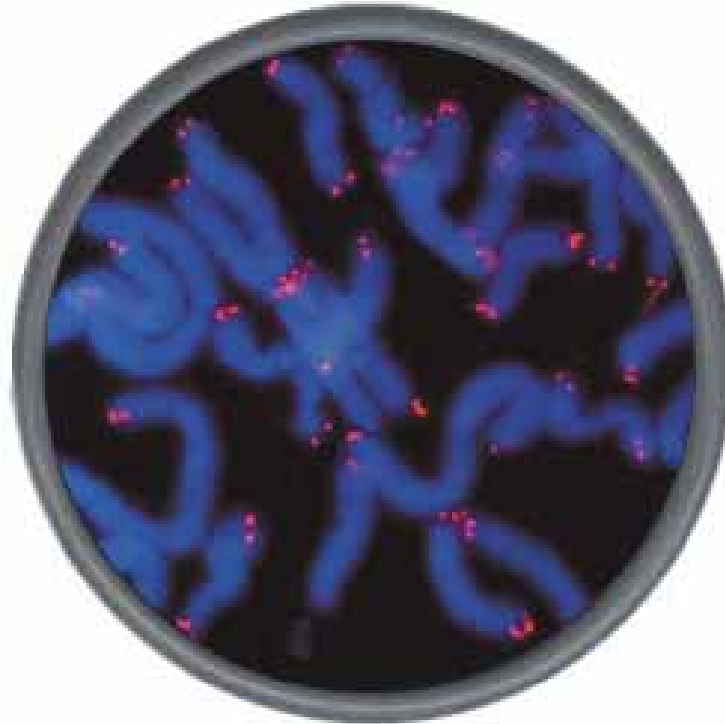


Konfokální mikroskop



- Konfokální mikroskop umožňuje odstranit z obrazu objektu šum, který vytváří světlo nebo fluorescence emitovaná z těch rovin vzorku, na které není zaostřena optika.
- Zdrojem světla je zpravidla laser, světlo prochází úzkou štěrbinou (source pinhole) a je zaostřeno do jednoho bodu vzorku. Světlo emitované z tohoto bodu je pak snímáno detektorem. Aby dopadlo na detektor, musí opět projít úzkou štěrbinou (detector pinhole), která leží v místě, kam objektiv zaměřuje světlo ze zaostřeného bodu objektu.
- Světlo emitované z osvětlených, ale nezaostřených bodů je fokusováno mimo štěrbinu a do detektoru nedopadá. Signál z detektoru je odeslán do počítače, který zároveň dostává informaci o souřadnicích snímaného bodu.
- Tímto způsobem je bod po bodu proskenován celý objekt v různých optických rovinách. Toto skenování je automatizováno a ovládáno řídicím počítačem. Z nashromážděných informací počítač sestaví celkový obraz.

Virtuální mikroskopie

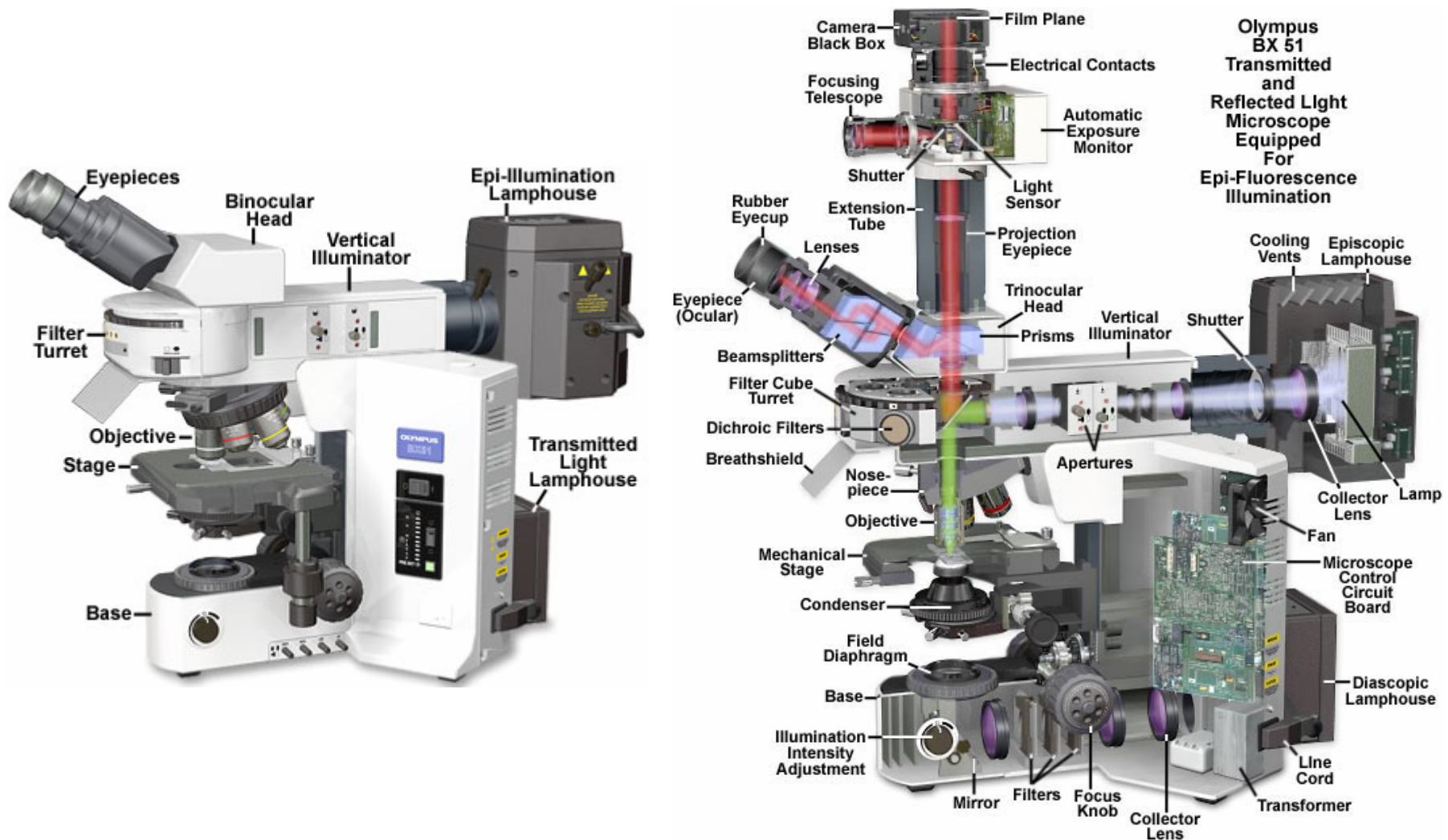


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/fluorescence/index.html>

<http://www.olympusmicro.com/galleries/fluorescence/pages/microtubulefilamentsmall.html>

<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/kohler/index.html>

Praktická ukázka fluorescenčního mikroskopu



Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.