

Vybrané instrumentální techniky

Detekce jediné molekuly/atomu
 Spojení separačních technik s luminiscenční detekcí
 Sekvenování DNA
 Fluorescenční mikroskop

Detekce jednotlivých atomů a molekul

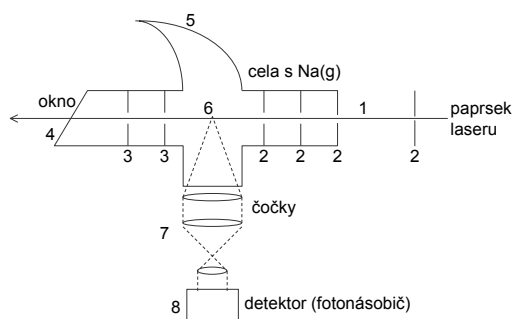
Stanovení Na(g) laserovou rezonanční fluorimetrií

Fairbank, W. M. et al. *J. Opt. Soc. Amer.* 1975, 65, 199 - 204.

- Rezonanční fluorescence - silná absorpce a fluorescence
- Výsledný detekční limit ~ desítky Na atomů/cm²
 (v detekčním prostoru: < 1 atom)

2

Stanovení Na(g) laserovou rezonanční fluorimetrií



3

Zvýšení S/N

1. Modulace λ barvivového laseru a detekce při modulační frekvenci
2. Vstupní štěrby - omezení rozptýleného záření (+ laserový paprsek)
3. Výstupní štěrby - omezení rozptýleného záření
4. Nakloněné výstupní okénko - odklonění světla (přirozený odraz)
5. Woodův roh - černé pozadí (neodráží zpět světlo)
6. Vymezení detekčního prostoru fokálním prostorem čočky
7. Čočka s dobrou kolekcí světla (velký prostorový úhel)
8. Citlivý detektor: fotonásobič, lavinová fotodioda - detekce v režimu počítání fotonů (photon counting)

4

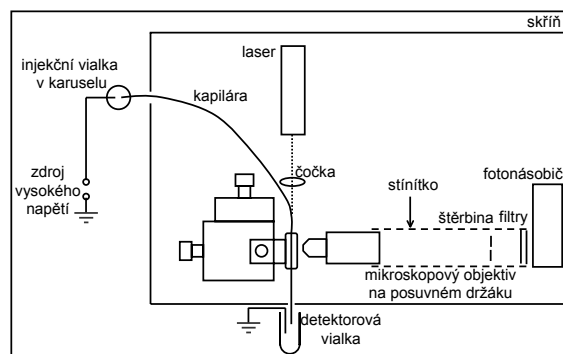
Fluorescenční detekce v kapiláře

Sledování jediné molekuly

- malé množství, ale objem též malý ($c=n/V$)
- prostorová filtrace: štěrby (excitace i emise)
- filtrace světla (λ): fitry, hranoly, mřížky (excitace i emise)
- silný excitační zdroj s vhodnými směrovými vlastnostmi: laser
- kolekční optika s dobrou světelností
- citlivý detektor – fotonásobič, lavinová fotodioda
- silně fluoreskující molekula analytu – např. rhodamin G, mnohanásobně derivatizovaná biomolekula analytu
- chemická amplifikace molekuly před detekcí

5

Příklad: schema sestavy CE LIF



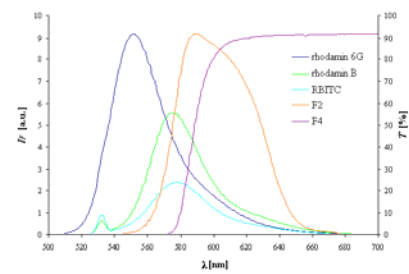
6

Konstrukce CE LIF



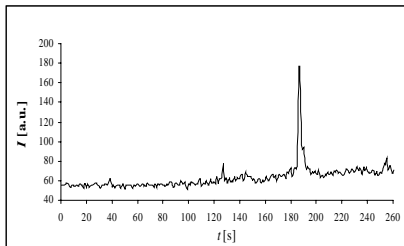
7

Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



8

CE LIF: velmi nízké detekční limity

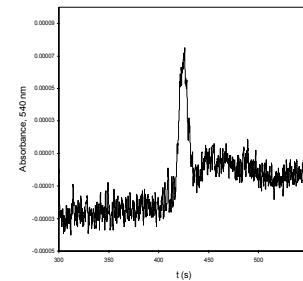


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-12}$ mol/l, excitace: 532 nm, 5 mW; emise: > 560 nm, kapilára: 50 mm *i.d.*, 375 mm *o.d.*, $l = 30/37$ cm, dávkování: $U = 5$ kV, $t_r = 10$ s nebo $\Delta h = 2$ cm, $t_d = 30$ s, separace: 0,02 mol/l fosfát v 10% MeOH, pH 10; $U = 10$ kV

LOD ~ 2×10^{-13} mol/l ... ~ 10^2 molekul

9

LOD: srovnání s absorbanční detekcí

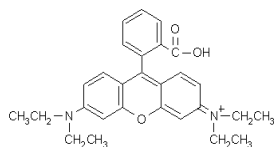


Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol/l (při obdobném dávkování)

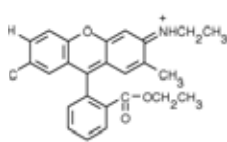
10

Separace rhodaminových barviv

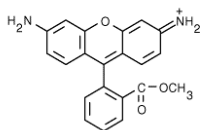
Rhodamin B



Rhodamin 6G

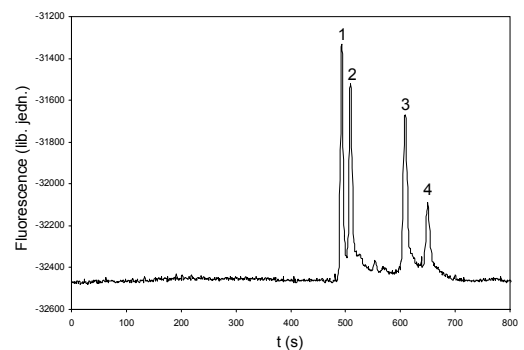


Rhodamin 123



11

Separace rhodaminových barviv



Píky: 1, 2 - Rh 123, 3 - Rh 6G, 4 - Rh B

12

Analýza obsahu jednotlivých buněk

Proč analyzovat jednu buňku?

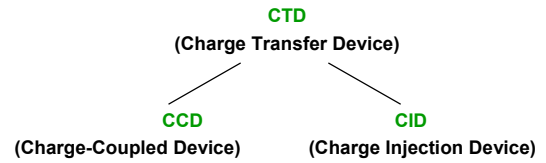
Výsledkem klasické analýzy mililitrů krve (mnoho erytrocytů) je průměrné složení. Analýza každé z buněk zvlášť může odhalit např. 1 pozměněný erytrocyt z 1000 (např. jiný poměr forem laktátdehydrogenázy) ... včasná detekce chorob (histogram).

Separaci + citlivá detekce

1. Vpravení buňky do kapiláry pod mikroskopem.
2. Uvolnění buněčného obsahu do pufru (destrukce buněčné membrány)
3. Separace (elektrolyt = laktosa + NAD + pH pufr). Separace zastavena dříve než analyty opustí kapiláru.
4. Chemická amplifikace v přít. analytu: $\text{NAD}^+ + \text{SubH} \rightarrow \text{NADH}^+ + \text{Sub}$ po delší dobu (~hodina).
5. Zapnutí elektr. pole, migrace produktů k detektoru.
6. Detekce NADH^+

13

CCD a CID kamery

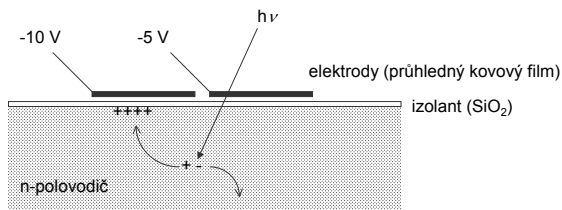


CTD ... polovodičový čip s 2-rozměrným polem fotocitlivých elementů (pixelů)



14

Princip CTD

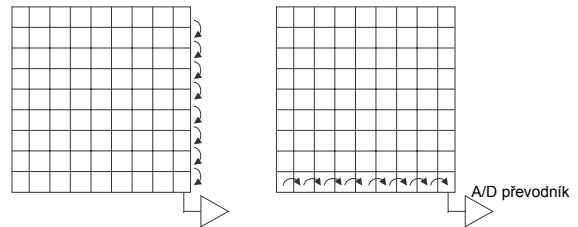


1. vznik náboje po absorpci fotonu
2. akumulace náboje (dér) v potenciálové jámě u negativně nabitě elektrody
3. přenos náboje (manipulací napětí na okolních elektrodách) k A/D převodníku

15

CCD

1. posun nábojů (celých řad)
2. posun náboje v řadě a jeho změření



- Velmi účinný přenos náboje mezi pixely (99,99999%)
- I pro stanovení náboje v jednom pixelu je nutno přečíst celé pole
- Destruktivní čtení (náboj zneutralizován během čtení)

16

CID

- Umožňuje náhodné adresování pixelů, lze číst pouze část pole
- Nedestruktivní čtení
- Pixel tvořen dvěma elektrodami s nezávislými přívody:
 - akumulace náboje (+) pod 1. elektrodou pixelu
 - převod náboje pod 2. elektrodu snížením jejího napětí
 - změření změny napětí pod 1. elektrodou
 - mnohanásobné opakování cyklu pro zlepšení S/N
 - vypuzení náboje zvýšením napětí obou elektrod

17

Sdružování pixelů CCD (Binning)

Účel: dosažení vyššího S/N

- Definována podmnožina celého pole, např. 2 x 32 pixelů.
- Náboj naakumulovaný pod 64 sdruženými pixely přečten najednou.

Zdroj a zpracování dat	1 pixel	64 pixelů (měřených zvlášť)	64 sdružených pixelů (měřených najednou)
Zvýšení S/N	1	8	64

18

Typické parametry CTD

Počet pixelů: 1000 x 1000, (1 000 000, "megapixel")
Rozměry pole: 1 x 1 cm², (tj. velikost pixelu: 10 x 10 mm)
Max. kvant. účinnost: 90% při určité vlnové délce
Rozsah vlnových délek: 200 - 1000 nm (kdy kvant. účinnost > 10 %)
Šum převodníku: 1 - 10 elektronů
Max. náboj: 106 elektronů
Zbytkový proud: < 10 elektronů/s (s chlazením)

+ velmi citlivý detektor (porovnatelný s fotonásobičem)
+ multikanálový detektor, náhrada fotografické desky
- obvykle relativně pomalý (množství dat)

19

Aplikace CTD

Spektroskopie

- absorpční, emisní
- plošný detektor za monochromátorem (pořadí pixelu = f(l))

Zobrazení (imaging)

- vzorku (mikroskop)
- paralelních vzorků (čip)

20

Sekvenování DNA

- Stanovení sekvence bazí v DNA

DNA ↔ protein. DNA: dědičnost.
Lidská buňka: 46 chromozómů (22 párů + X/Y).
6 miliard bazí (haploid, poloviční sada - 3x10⁹)

1953 Watson & Creek: model DNA.

1977 Sanger: enzymatická metoda
Maxam a Gilbert: chemická degradace

21

Amplifikace DNA

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Sangerova metoda: Analyzovaná DNA = předloha pro syntézu směsi fragmenů DNA se stejným počátkem ale různou délkou. Separace fragmentů pomocí gelové elektroforézy. Detekce radioaktivního záření nebo fluorescence.

předloha: 3'ATACGCATT5'
fragmenty: PT
 PTA
 PTAT
 :
 PTATGCGTAA

22

Analýza lidské DNA

1990 Human Genome Project (USA)

Cíl = kompletní analýza lidského genomu do roku 2003 (2005).
Znalost souvislosti mezi chorobou a geny ⇒ léčba a prevence chorob.

Podpora nových technologií pro ultrarychlé a levné sekvenování.
3x10⁹ bazí při rychlosti 1báze/s ... 100 let

26. červen 2000 Craig Venter, Celera Genomics

- ukončení základní analýzy lidského genomu
- shotgun genomics

23

Základní techniky pro sekvenování DNA

1. Sangerovo sekvenování (PCR) - gelová elektroforéza (vrstvá, kapilára)
~ 1000 nukleotidů
2. Hybridizace - čip
3. Exonukleázová reakce
postupné odštěpování koncové báze
4. MS: fragmentace
pro krátké řetězce, < 50 nukleotidů

24

Elektroforéza v kapilárních polích pro sevenování DNA

Analýza fragmentů DNA připravených Sangerovou metodou

Klasický postup

elektroforéza na vrstvě polyakrylamidového gelu
+ mnoho vzorků na jedné desce gelu (paralelní dráhy)
- časová náročnost (hodiny - den)

Kapilární elektroforéza

+ vyšší poměr povrchu substrátu k objemu gelu (kapilára versus deska) ⇒ dokonalejší chlazení a vyšší elektrické pole ⇒ kratší doba analýzy (hodina)

Gel: síťovaný polyakrylamidový gel
lineární nahraditelné gely (polyakrylamid, polyethylenoxid atd.)
- 1 kapilára = analýza pouze jednoho vzorku ⇒ kapilární pole

25

Uspořádání pro detekci fluorescence z kapilárních polí

A. Skenovací
B. Zobrazovací (imaging)

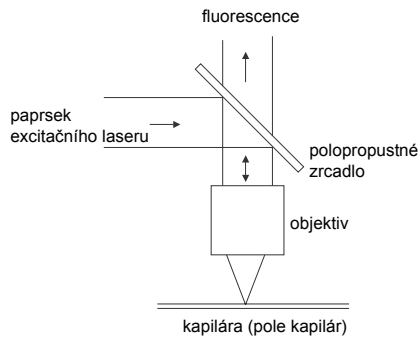
A. Skenovací detekce

(R. A. Mathies et al. Electrophoresis 1994, 17, 1852 - 59)

Konfokální excitace a emise: zaostření pomocí mikroskopického objektivu. Objektiv se pohybuje nad kapilárním polem napříč; frekvence ~ 2 Hz. Uspořádání kapilár lineární nebo na obvodu válce.
+ účinná kolekce fluorescence
+ nízké nároky na výkon laseru (pouze jedna kapilára ozářena v čase)
- pouze zlomek času se stráví excitací a detekcí dané kapiláry (duty cycle)
- pohyblivé součásti

26

Schema konfokální fluorescenční detekce



27

Zobrazovací detekce (Imaging)

a) Excitace: laser zaostřen zvrchu na pole kapilár jako čára

Detekce: CCD kamera s filtry nad polem kapilár.
(E. S. Yeung et al. Anal. Chem. 1994, 66, 1424-31)
+ excitace a detekce současně pro všechny kapiláry
+ žádné pohyblivé součásti
- neúčinná kolekce fluorescence
- vysoké nároky na výkon laseru (výkon rozdělen mezi celé pole)

b) Excitace: optickými vlákny

Detekce: kolekce fluorescence optickými vlákny, monochromátor, CCD
(A. Zhang et al. Electrophoresis 1996, 17, 1841 - 51)
+ účinná excitace a kolekce fluorescence
+ žádné pohyblivé součásti
- vysoké nároky na výkon laseru (výkon rozdělen mezi celé pole)
- problémy pro mnoho kapilár

28

Zobrazovací detekce (Imaging)

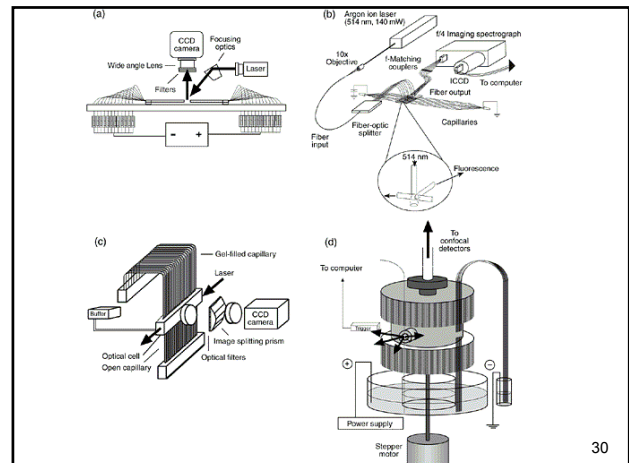
c) Excitace: laser zaostřen z boku (světelný vodič)

Detekce: CCD kamera s filtry nad polem kapilár.
(H. Kambara Anal. Chem. 1994, 66, 1021 - 26)
+ excitace a detekce současně pro všechny kapiláry
+ žádné pohyblivé součásti
+ nižší nároky na výkon laseru (paprsek se šíří skrz celé pole)
- neúčinná kolekce fluorescence
- ztráta zaostření a energie paprsku laseru při postupu polem

d) Excitace: laserem na konci kapilár

Detekce: CCD kamera oproti koncům kapilár
+ vhodné pro 2-rozměrná pole kapilár, vyšší počty kapilár
- problémy s nahrazováním gelu v kapilárách

29



30

Legenda k obrázkům

- (a) On-column line-focusing detection (Ueno, K.; Yeung, E. S. Anal. Chem. 1994, 66, 1424-31.3).
- (b) Fiber-optic array imaging detection. (Quesada, M. A.; Zhang, S. Electrophoresis 1996, 17, 1841-51).
- (c) Multiple-sheath flow detection (Takahashi, S.; Murakami, K.; Anazawa, T.; Kambara, H. Anal. Chem. 1994, 66, 1021-26.)
- (d) Rotary confocal scanning detection (Scherer, J. R.; Kheterpal, I.; Radhakrishnan, A.; Ja, W. W.; Mathies, R. A. Electrophoresis, 1999)

31

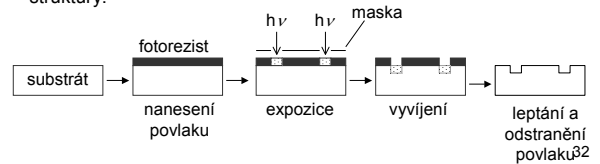
Sekvenování DNA na čipu

- A. Čip jako náhrada kapilárového pole
- B. Hybridizační pole na čipu

Čip (chip, microfluidic device, microfabricated device)

Analogie s polovodičovými čipy ne zcela přesná.

- Miniaturní zařízení vyrobené podobnými technikami jako polovodičové čipy (fotolitografie, laserová ablace) na vhodném substrátu (sklo, Si, plast). Kontrastní fotorezisty pro submikronové struktury.

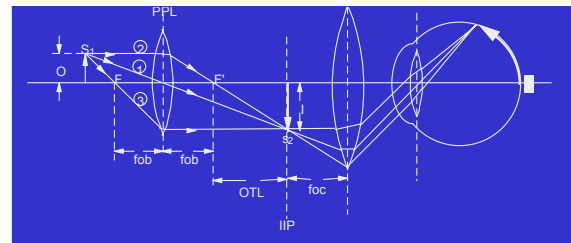


Fluorescenční mikroskopie

- obr. 34-46: výtah z Genova Lectures 2006
- http://www.fluorescence-foundation.org/2006_course.htm

33

In the compound microscope the Finite Corrected Objective Forms a Real Image At the Ocular Front Focal Plane: The Primary or Intermediate Image Plane (IIP)



Conventional Optics
Objective with finite Focal Length
(Optical Tube Length, OTL, Typically 160 mm)
 $M_{ob} = OTL/f_{ob}$

Total Magnification = $M_{ob} \times M_{oc} = OTL/f_{ob} \times 250mm/f_{oc}$ ³⁴

A word about infinity corrected optics and its advantages.

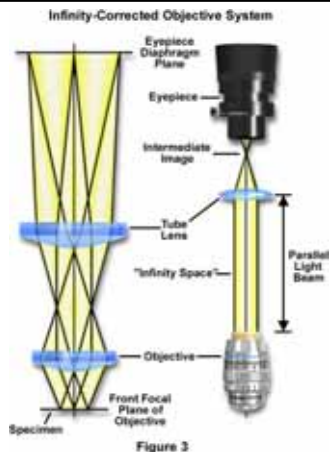
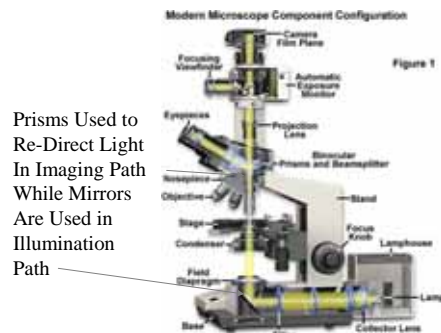


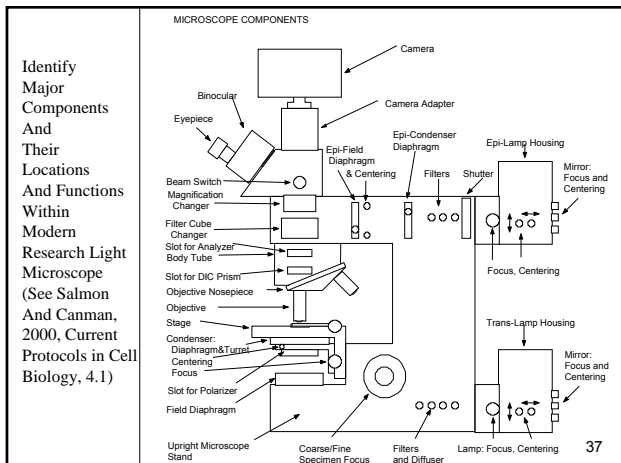
Figure 3

Modern microscope component identification



Prisms Used to Re-Redirect Light In Imaging Path While Mirrors Are Used in Illumination Path

E.D.Salmon³⁶



Key component: the objective

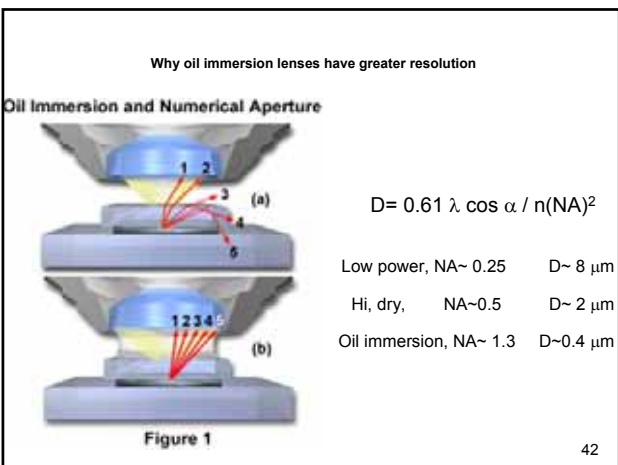
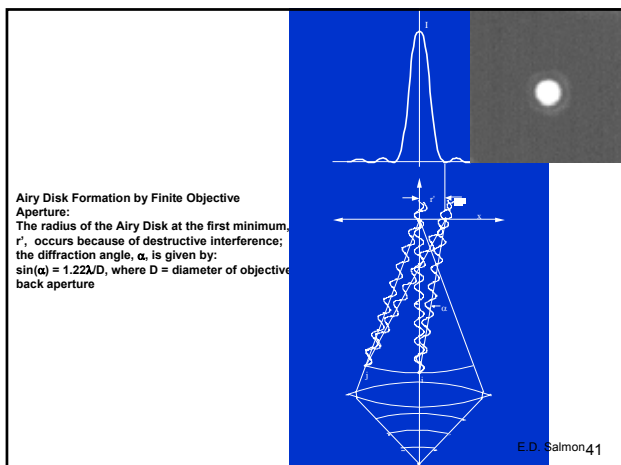
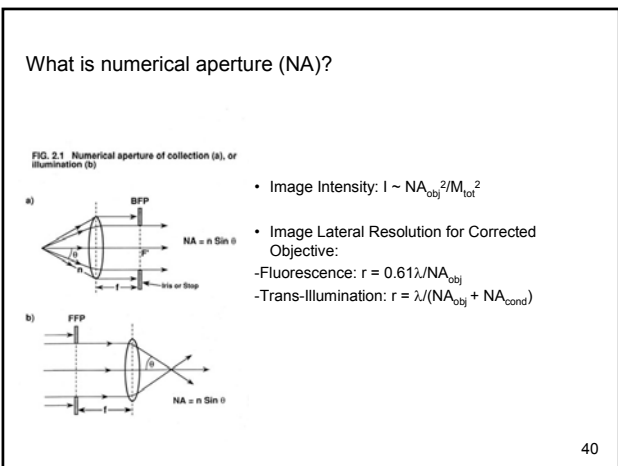
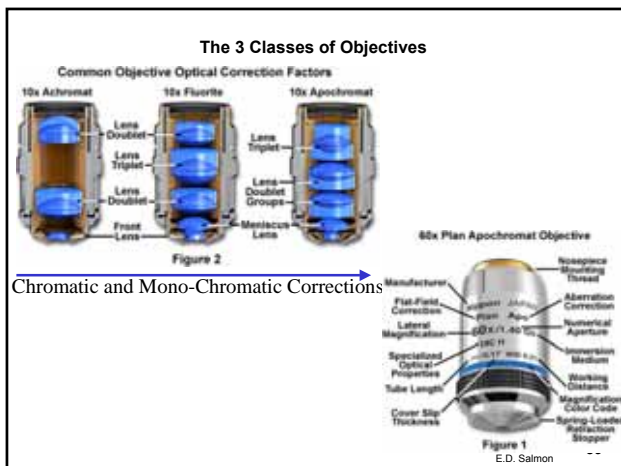
Achromats: corrected for chromatic aberration for red, blue

Fluorites: chromatically corrected for red, blue; spherically corrected for 2 colors

Apochromats: chromatically corrected for red, green & blue; spherically corrected for 2 colors

Plan-: further corrected to provide flat field

38



CONTRAST MODES OF LIGHT MICROSCOPY

MODE	MECHANISM OF CONTRAST
Brightfield	Absorption of light
Phase contrast	Optical path length (index, density)
DIC	Rate of change of optical path
Widefield fluorescence	Absorption of light, quantum yield of fluorophore
Confocal fluorescence	same as fluorescence
Darkfield	light scattering by edges in specimen
Interference reflection contrast	interference between reflections from ventral cell surface and substratum
Polarization	Extinction between crossed polars caused by specimen birefringence

