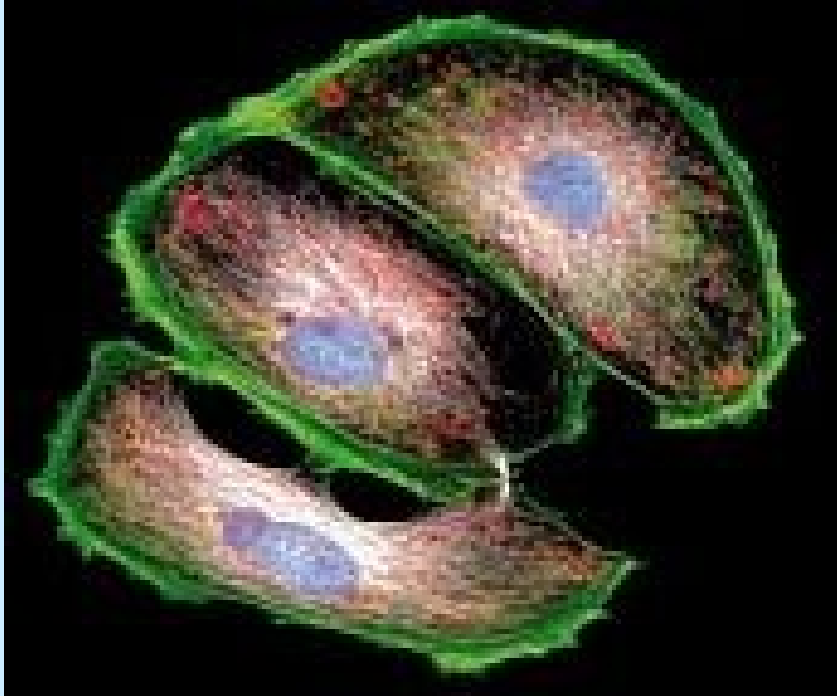


FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE



TERMÍNY

chinin v toniku



Luminiscence – emise světla látkou, která je způsobená

- světlem (fotoluminiscence)

fluorescence (vyzařování emisního světla trvá krátkou dobu a po zhasnutí excitačního světla okamžitě zhasíná)

fosforescence (k emisi dochází i dlouhou dobu po zhasnutí excitačního záření, delší doba tzv. dosvitu, až několik dní)

- chemicky (chemiluminiscence) (př. enzym luciferáza oxiduje luciferin u světlušky)
- teplem (termoluminiscence)
- zvukem (sonoluminiscence)
- mechanicky (mechanoluminiscence)

Excitační záření - které luminiscenci vyvolává

Emisní záření - vysílané látkou

Fluorofor - látka schopná fluorescence

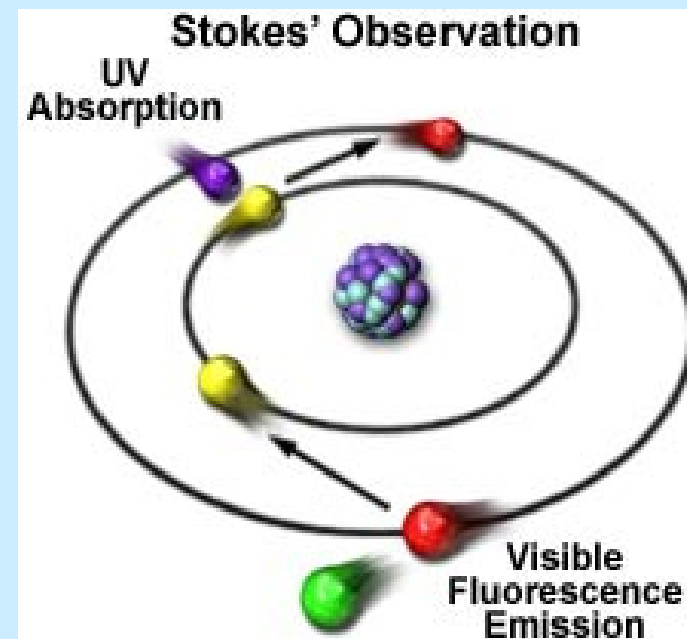


Fyzikální podstata fluorescence a fosforescence spočívá ve vlastnostech elektronového obalu atomů v molekulách fluoroforu. Elektrony těchto látek jsou schopny absorbovat foton excitačního světla, čímž se zvýší jejich energie. Část této nově nabyté energie však elektron po chvíli vyzáří jako foton s nižší energií a tedy delší vlnovou délkou.

Protože došlo ke ztrátě energie, je vlnová délka emisního světla vždy delší než vlnová délka světla excitačního (Stokesovo pravidlo).

$$\lambda_{\text{emit}} > \lambda_{\text{excit}}$$

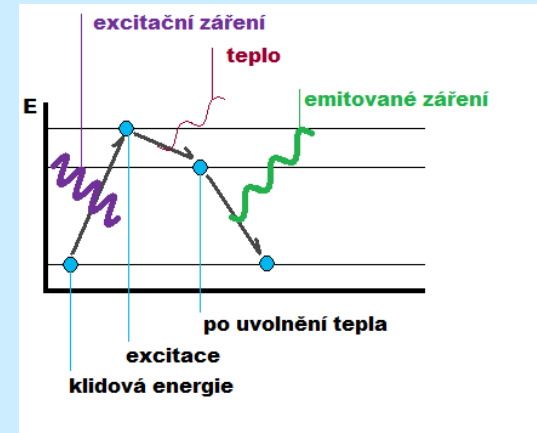
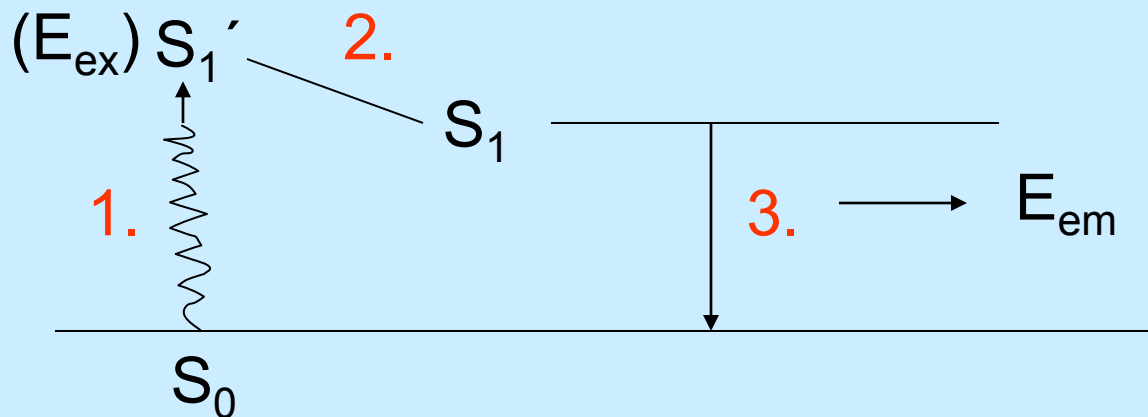
Jelikož vlnová délka udává barvu světla, pozorujeme u emitovaného světla posun k červené části spektra.



Fluorescence

Třístupňový proces :

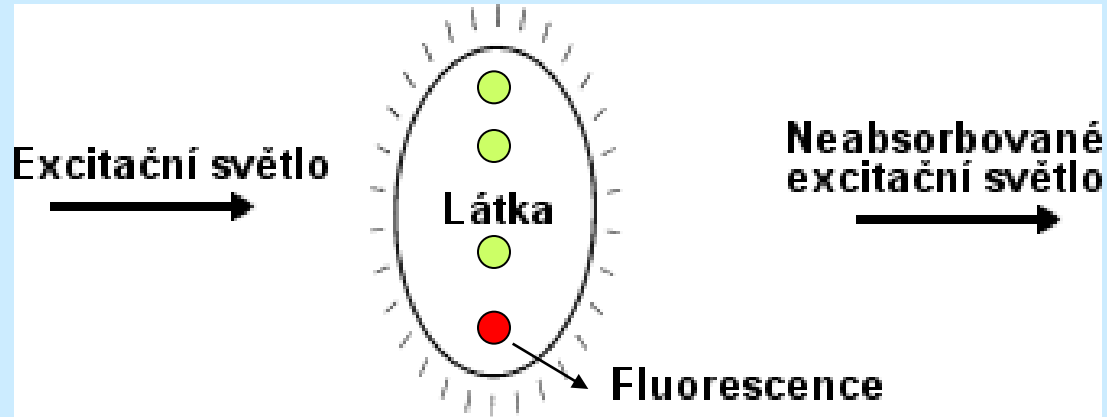
1. fáze - excitace (buzení viditelného záření)
2. fáze - vlastní doba excitovaného stavu (nevratná přeměna části energie v jiné druhy)
3. fáze - emise (vyzáření světla určité vlnové délky)



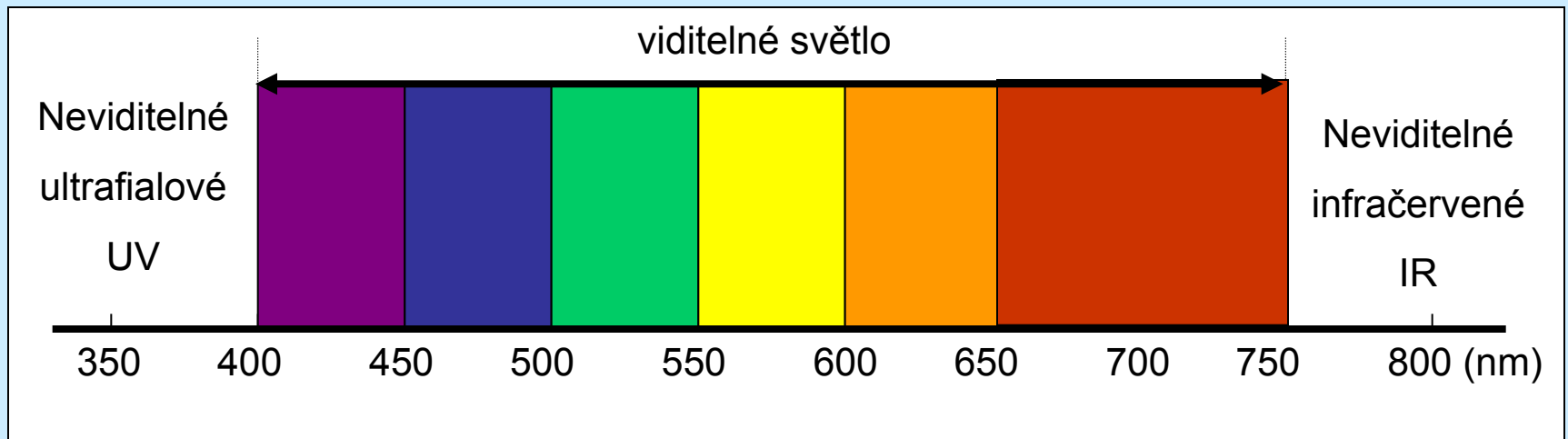
Energie excitovaného světla je **větší** než emitovaného ($E_{ex} > E_{em}$)

Vlnová délka excitovaného světla je **menší** než emitovaného ($\lambda_{ex} < \lambda_{em}$)

Každá látka má své charakteristické fluorescenční spektrum,
Ne všechno excitační záření je absorbováno látkou



Spektrum tzv. bílého světla



Využití tohoto jevu v mikroskopii se stalo základem tzv. **fluorescenční mikroskopie**, která nachází široké uplatnění zejména v oblasti přírodních věd a v medicíně.

Fluorescenční mikroskopie nám jak první umožnila vizualizovat **struktury cytoskeletu** eukaryotních buněk, využívá se v imunohistologii, imunocytologii a imunocytochemii. V buněčné biologii je hojně využíván k identifikaci složek **cytoskeletu**, **buněčných organel** nebo ke sledování biochemických dějů. V mikrobiologii se využívá fluorescenční mikroskop k identifikaci různých **bakteriálních rodů**.

Fluorescenční mikroskop

Rok 1852 George Stokes pojmenoval fluorescenci jako jev.

V r. 1910 pozoroval Koehler při mikroskopování s ultrafialovým světlem fluorescenci mnoha objektů (slabý zdroj UV záření).

První fluorescenční mikroskop s UV excitací vznikl v r. 1913, na jeho zkonstruování se podíleli Koehler, Reichert a Lehman

Fluorescenční mikroskopie

epifluorescence - pozorování v odraženém světle

diafluorescence = **Transmisní fluorescenční mikroskopie** - Zdroj záření je umístěn pod preparátem. Zvláště uspořádaný zástinný kondenzor pak propustí světlo na vzorek z boku. Excitační světlo pak letí mimo objektiv a objektivem prochází jen světlo emitované.

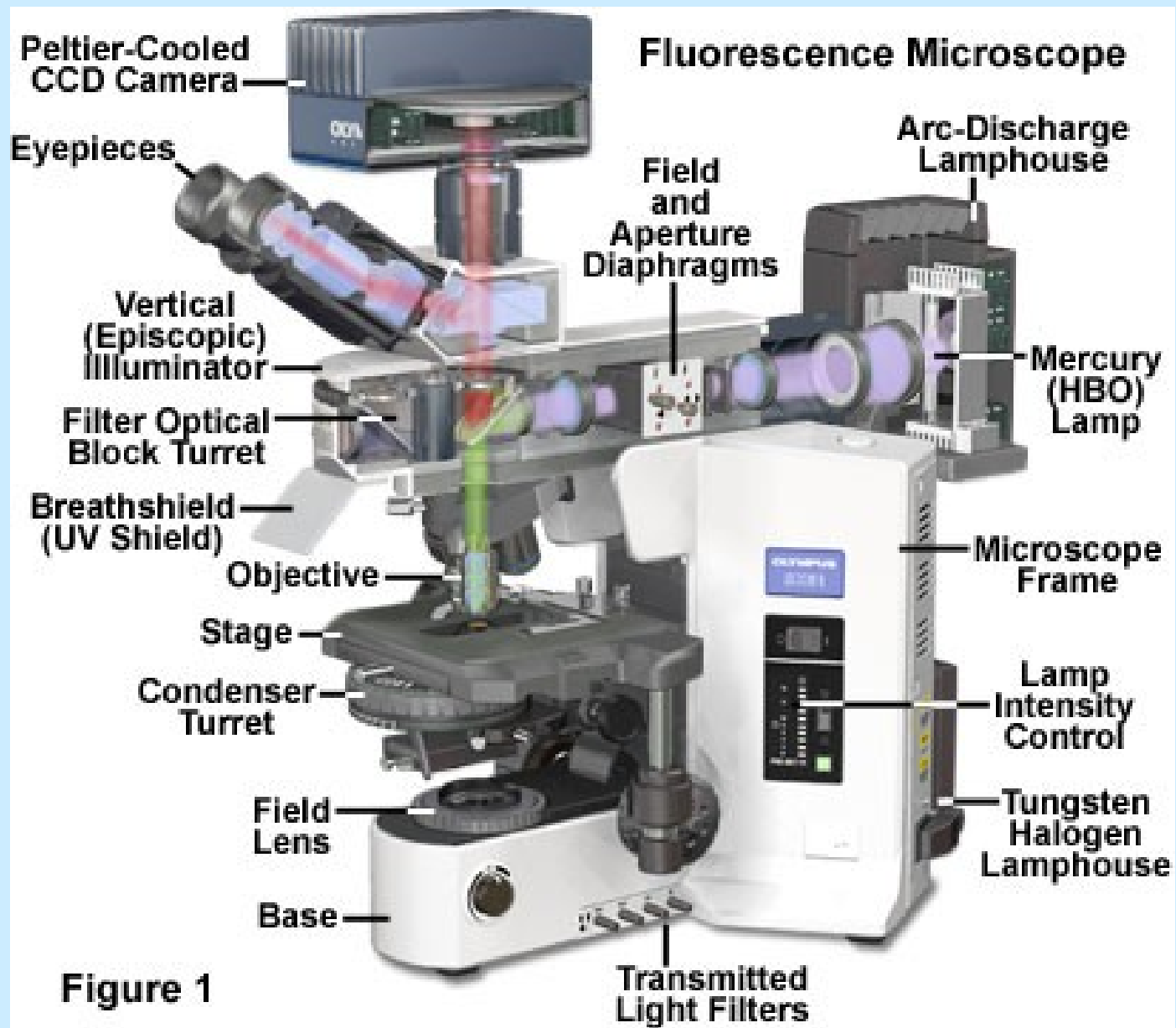
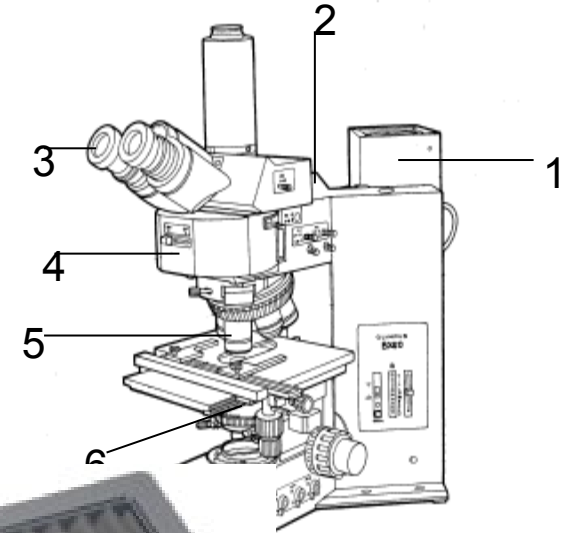


Figure 1

Schéma fluorescenčního mikroskopu

- 1- schránka s výbojkou
- 2 - iluminátor
- 3 - okulár
- 4 - kazeta na kostky s filtry
- 5 - objektiv
- 6 - univerzální kondenzor



Fluorescence Vertical (Episcopic) Illuminator

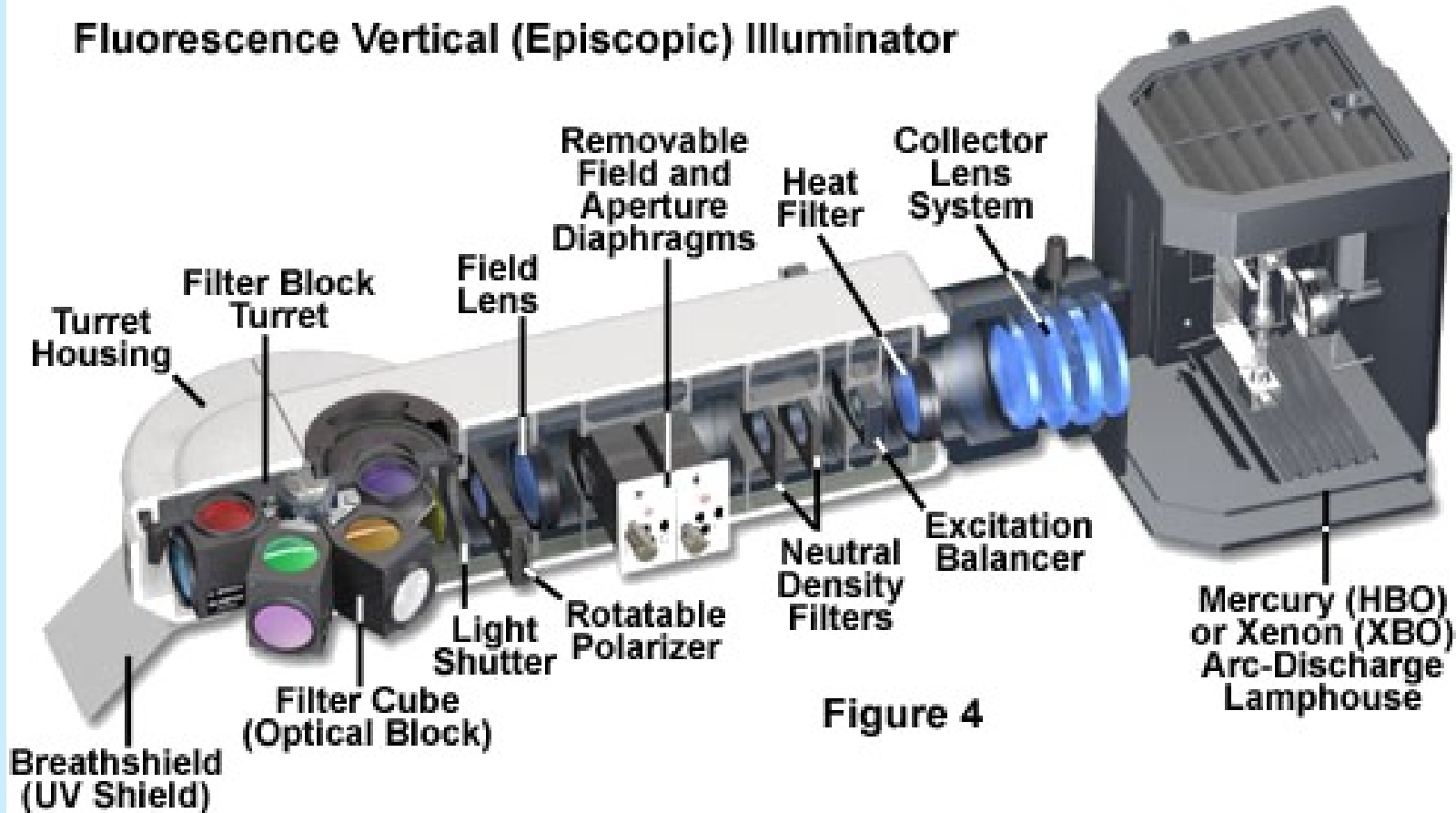
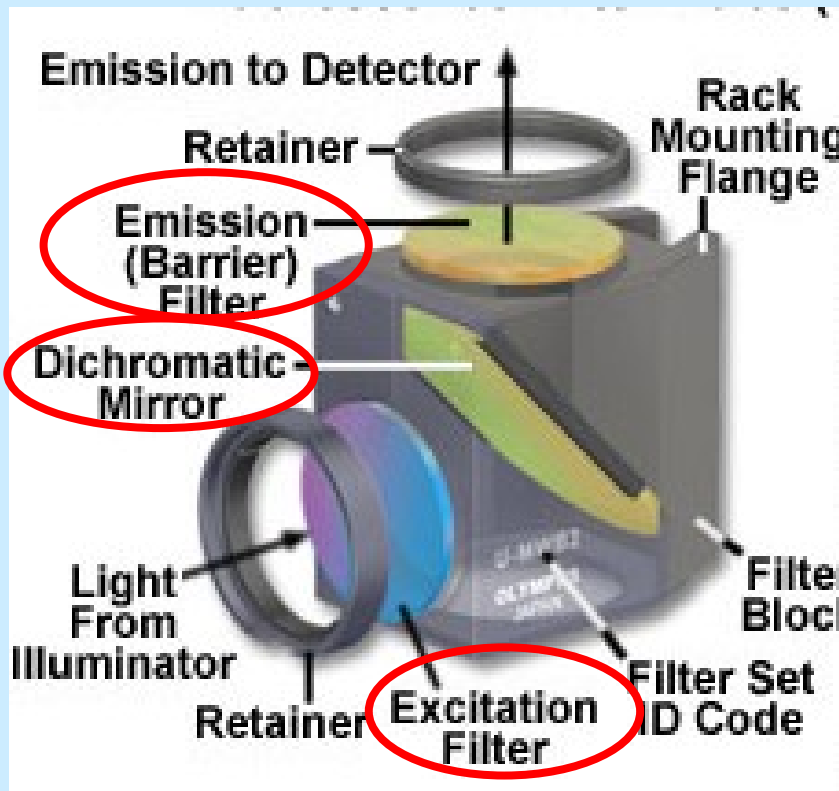
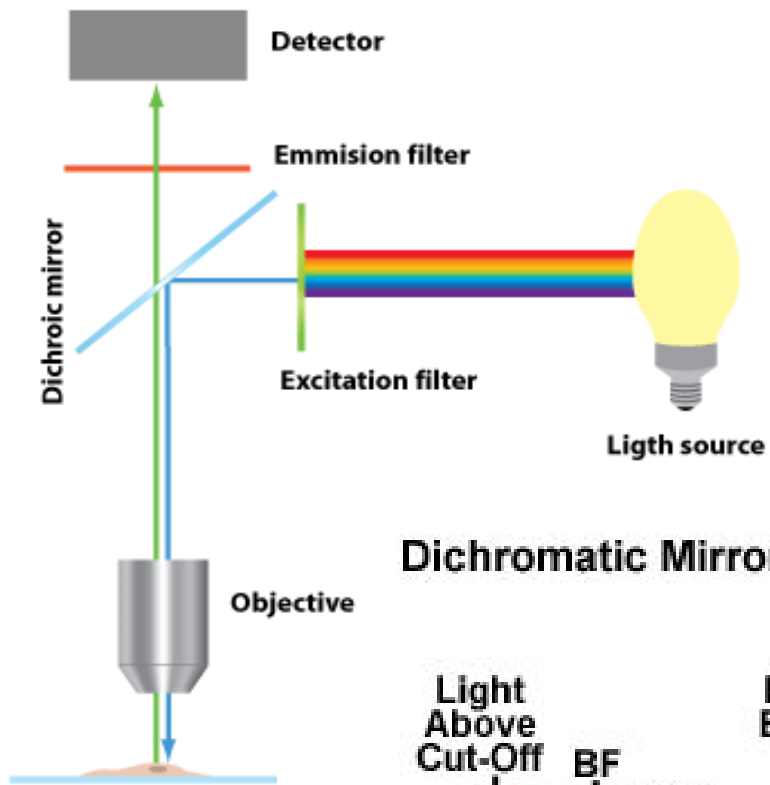


Figure 4

Kostka s filtry – excitační filtr
dichroické zrcátko
bariérový filtr



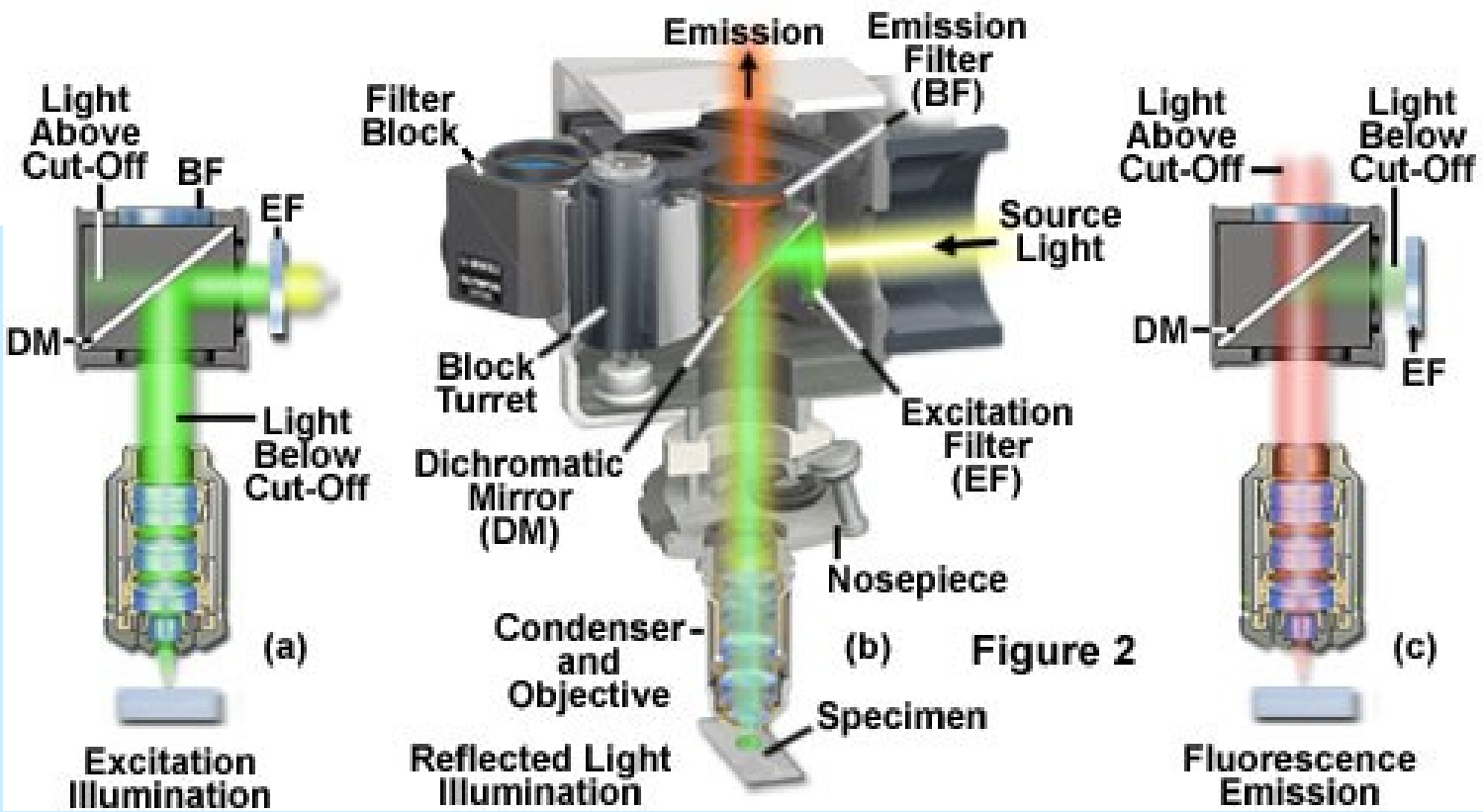
Vhodná kombinace **dichroického** zrcadla, **excitačního** a **emisního** filtru pro použitý druh fluorochromu se do mikroskopu vkládá pohromadě jako **tzv. kostka**, jejíž dvě stěny jsou tvořeny filtry a úhlopříčka dichroickým zrcadlem. Kostky jsou umístěny na výměníku a je možné je vyměňovat podle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



Excitační světlo prochází objektivem, dopadá na preparát shora a emisní světlo se vrací zpět do objektivu.

Dichroické zrcátko odráží **excitační** světlo do objektivu a propouští **emisní** světlo do okuláru podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se tedy vždy takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští.

Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



Nevýhodou klasického fluorescenčního mikroskopu je, že části vzorku nad a pod zaostřenou rovinou jsou také excitovány a světlo pocházející z těchto oblastí přispívá k **rozmazání** obrazu. Dalším jevem s kterým se setkáváme je tzv. **fotovybělování** (*photobleaching*), při kterém fluorofor trvale ztrácí schopnost emitovat záření. To se děje při intenzivním ozáření fluoroforů, ve kterých dochází k nevratným strukturním změnám vedoucím až k úplnému vyblednutí.

Světelný zdroj:

- musí emitovat dostatečně intenzivní světlo o blízkých ultrafialových vlnových délkách

1. Vysokotlaké rtuťové výbojky - v trubici z křemenného skla je malé množství inertního plynu a rtuti.
2. Xenonová výbojka - oproti rtuťové výbojce má spojitě spektrum od ultrafialových délek po blízké infračervené vlnové délky. V oblasti viditelného světla se tato výbojka blíží přírodnímu dennímu světlu.
3. Halogenové žárovky - využívají rozžhavené wolframové vlákno, jsou známé u běžných mikroskopů. Lze použít u těch fluorescenčních aplikací, kde není potřeba zdroj ultrafialového světla.

Filtry:

- k excitaci se používá pouze část ze spektra světelného zdroje a k pozorování fluorescence se používá část fluorescenčního spektra; proto hrají filtry ve fluorescenční mikroskopii tak důležitou roli

1. Interferenční filtry

Lze je vyrábět pomocí vakuovaného napařování. Tyto filtry využívají k filtraci různých vlnových délek interferenci světla na rozhraní vrstev s různými indexy lomu (excitační filtr, dichroické zrcadlo).

2. Filtry z barevného skla -

Tento typ filtrů se vyrábí přidáním pigmentu do skla. Tyto filtry jsou díky absorpci světla propustné pouze pro část spektra (bariérový filtr).

Kombinací zmíněných typů filtrů se ve fluorescenční mikroskopii dosáhne požadovaných vlastností systému filtrů

Fluorescenční metody se používají pro zviditelnění určité látky a struktury v buňce



Autofluorescence – vlastnost buněk (endogenní fluorofory)

Sekundární fluorescence

některé fluorofory (DAPI, ethidium bromid, Hoechst, propidium jodid) se váží na určité molekuly (např. na DNA) a můžeme je tedy použít na zviditelnění těchto molekul

2. Imunofluorescence

Pro většinu struktur v buňce bychom však nenašli fluorofor, který by se na ně specificky vázal. V takovém případě používáme metody *imunofluorescence*.

- **přímá** (protilátka s navázaným fluoroforem)

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.

- **nepřímá** (primární protilátka navázaná na strukturu, protilátka s fluoresceinem rozeznávající primární protilátku a naváže se na ni a tím ji zvýrazní)

U této metody si nejdříve připravíme v určitém zvířecím druhu (např. v králíkovi) **specifickou protilátku** 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 fluorescenci je nižší specifita.

Příklady fluoroforů:

1. Fluorofor se váže přímo na určité struktury v buňce = fluorescenční sondy:

- NK, DNA, RNA

DAPI - interkaluje do struktury DNA, barví se modře

Ethidium bromid - DNA a RNA (oranžová)

Propidium jodid – DNA (červeně)

Congo red – amyloid (růžově)

GFP zelený fluorescenční protein

2. Fluorofor se váže na protilátku a přes ni na určitý antigen = fluorescenční značky:

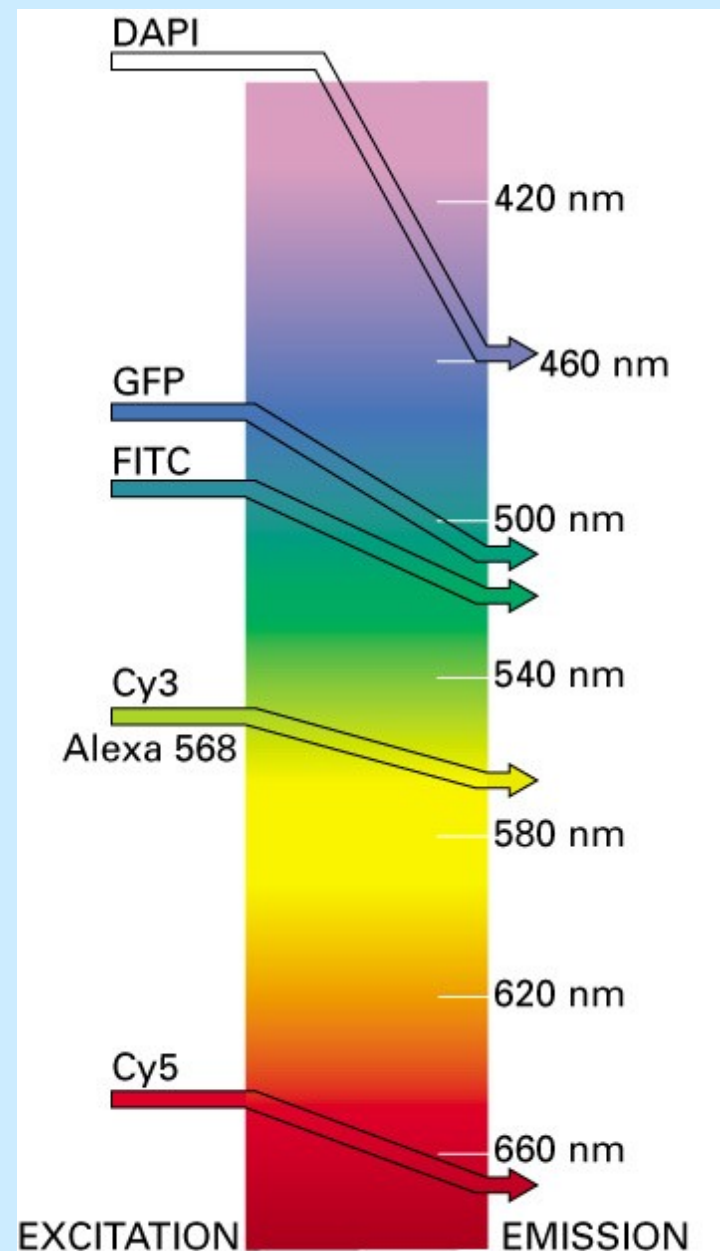
- využívají se nejvíce pro značení proteinů

Texas Red

FITC (fluorescein isothiokyanát) – na aktinová vlákna je specificky navázaná látka faloidin, který je značený FITC (zelený),

TRITC (tetramethylrhodamin isothiokyanát)

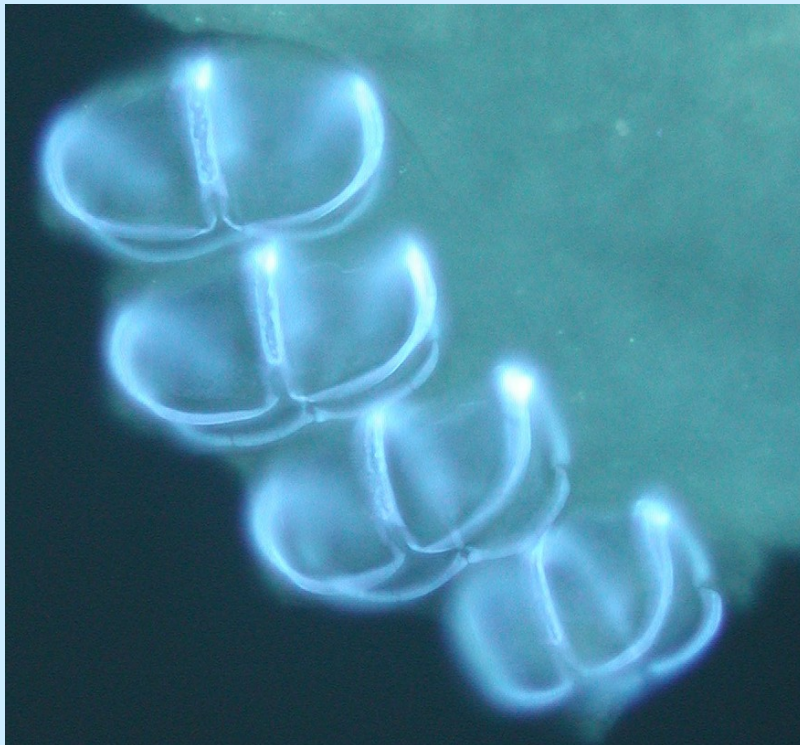
Cy3, Cy5 a Alexa 5– fluorofory vyvinuté speciálně pro fluorescenční mikroskopii vysoce fotostabilní a s vysokou účinností fluorescence.



1. Pozorování autofluorescence (bez použití barviva)

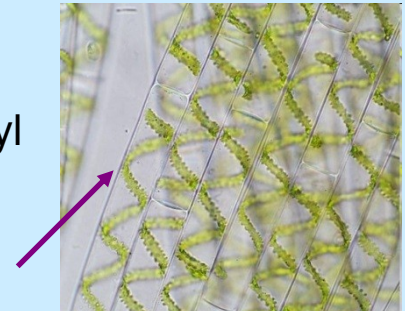
Celá řada látek fluoreskuje po ozáření UV světlem (některé tkáně, buňky a jejich integrální složky - pigmenty, chlorofyl).

lidský vlas -
keratin

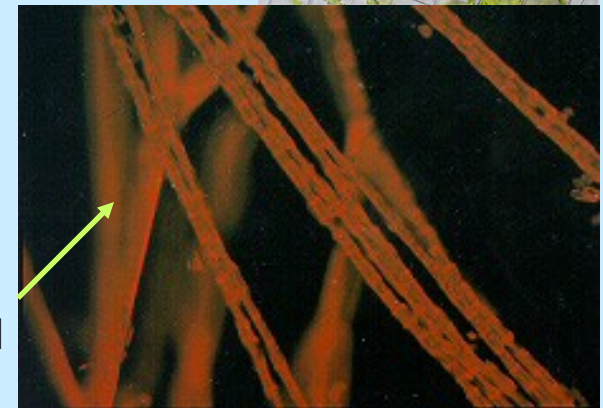


chlorofyl

Spirogyra sp.



chlorofyl



← Příchytné svorky (skleroproteinové)
žaberního parazita kaprovitých ryb
Paradiplozoon homoion (Monogenea)

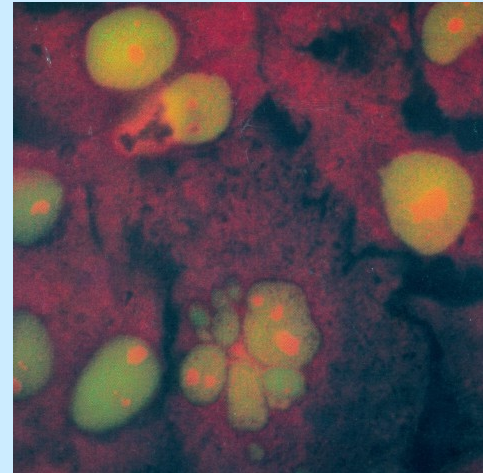
2. Pozorování sekundární fluorescence (metoda chemického barvení)

Objekt - dlaždicový epitel z ústní dutiny člověka

Fluorofor - akridinová oranž

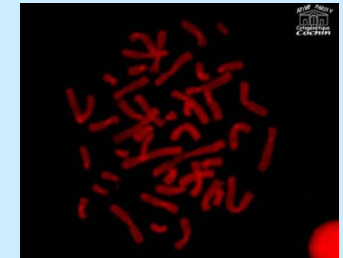
DNA – zeleně

RNA - červeně

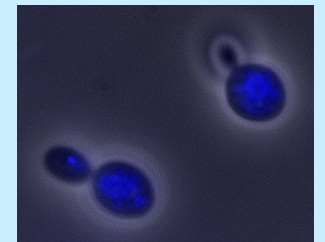


Pozorování fluorescenčního světla generovaného fluorochromem (fluoreskující barvivo), kterým se obarví látka bez vlastní fluorescence (proteiny, uhlohydráty). Pokud se obarví pouze objekty, které chcete pozorovat, lze je pozorovat odděleně od tkáně a ostatních buněk.

Aplikace: vizualizace buněčných jader, chromozómů, cytoskeletu, buněčných stěn atd.



Chromozomy fluoreskující díky propidium jodid



Barvení DAPI jádra kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*