

Fluorescenční mikroskopie

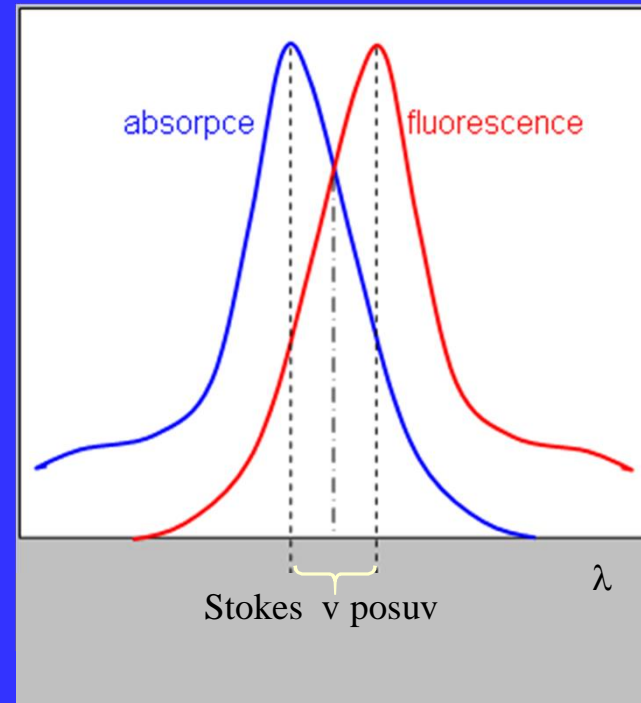
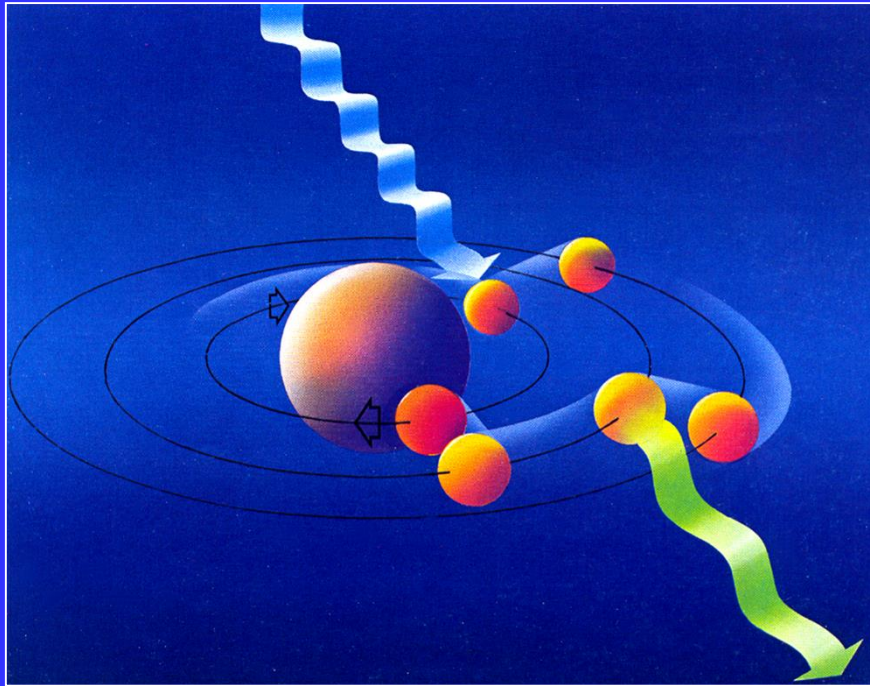
principy a použití

Luminiscence

É objekt absorbuje záření určité vlnové délky, které se vnitroatomovým přeskupením změní na záření o delší vlnové délce

É excitace: viditelné světlo, UV, X, α , β , γ

Stokesův zákon: $\lambda_E < \lambda_F$



Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii.

$$E = h \cdot c / \lambda$$

Luminiscence

É fosforescence - vyzařování světla trvá i po přerušení excitace

É fluorescence - nemá setrvačnost, záření zaniká po přerušení excitace

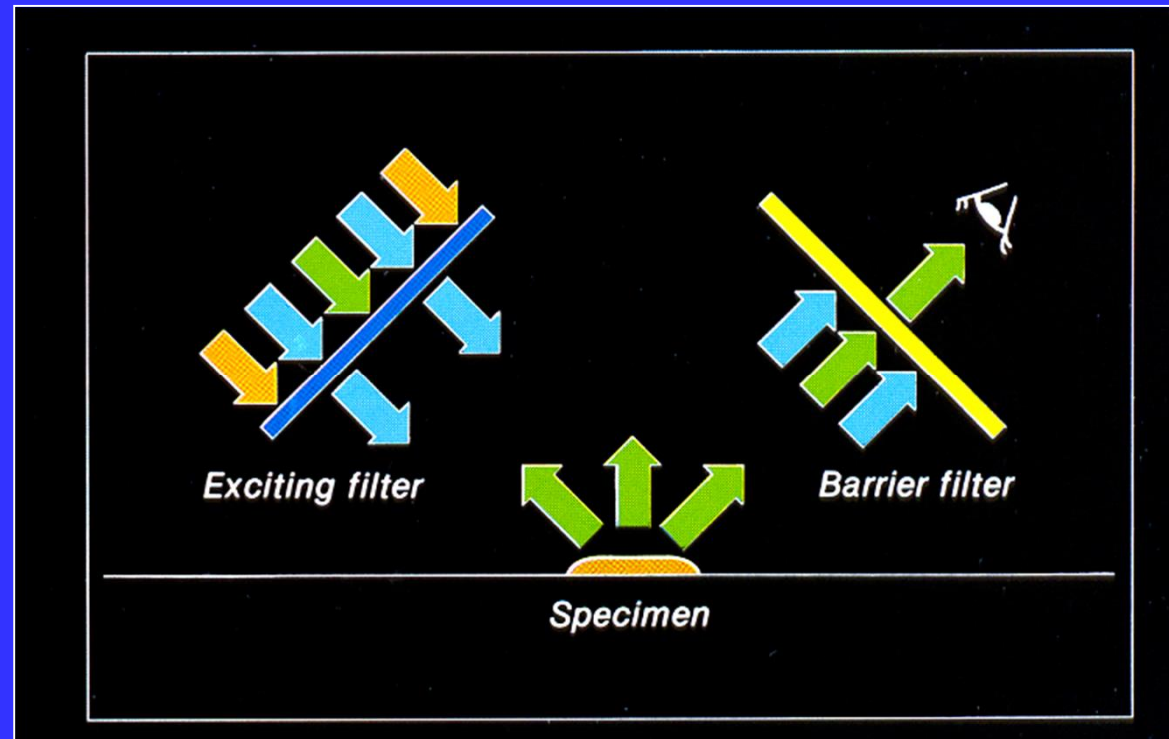
Světelný zdroj

- É Intenzivní a téměř monochromatické osvětlení, tj. NE halogenové lampy
- É Xenonové obloukové lampy nebo rtuťové výbojky s excitačními filtry
- É Lasery
- É Výkonné LED
- É Lasery nejčastěji pro konfokální mikroskopii, ostatní pro epifluorescenční mikroskopy

Detekce fluorescence

- É spektrofotometry a „microplate readers“ měří průměr vlastností vzorků (μl až ml)
- É fluorescenční mikroskopy rozlišují fluorescenci jako funkci prostorových koordinát ve dvou nebo třech rozměrech pro mikroskopické objekty (menší než ~ 0.1 mm v průměru)
- É fluorescenční scannery včetně „microarray readers“, rozlišují fluorescenci jako funkci prostorových koordinát ve dvou rozměrech pro makroskopické objekty, jako jsou elektroforetické gely, bloty a chromatogramy
- É průtokové cytometry (Flow cytometers) měří fluorescenci každé buňky v protékajícím proudu, což umožňuje identifikovat, kvantifikovat nebo sortovat subpopulace buněk ve velkém vzorku

Princip fluorescenčního mikroskopu



excitační
(budící)
filtr

závěrný
(bariérový)
filtr

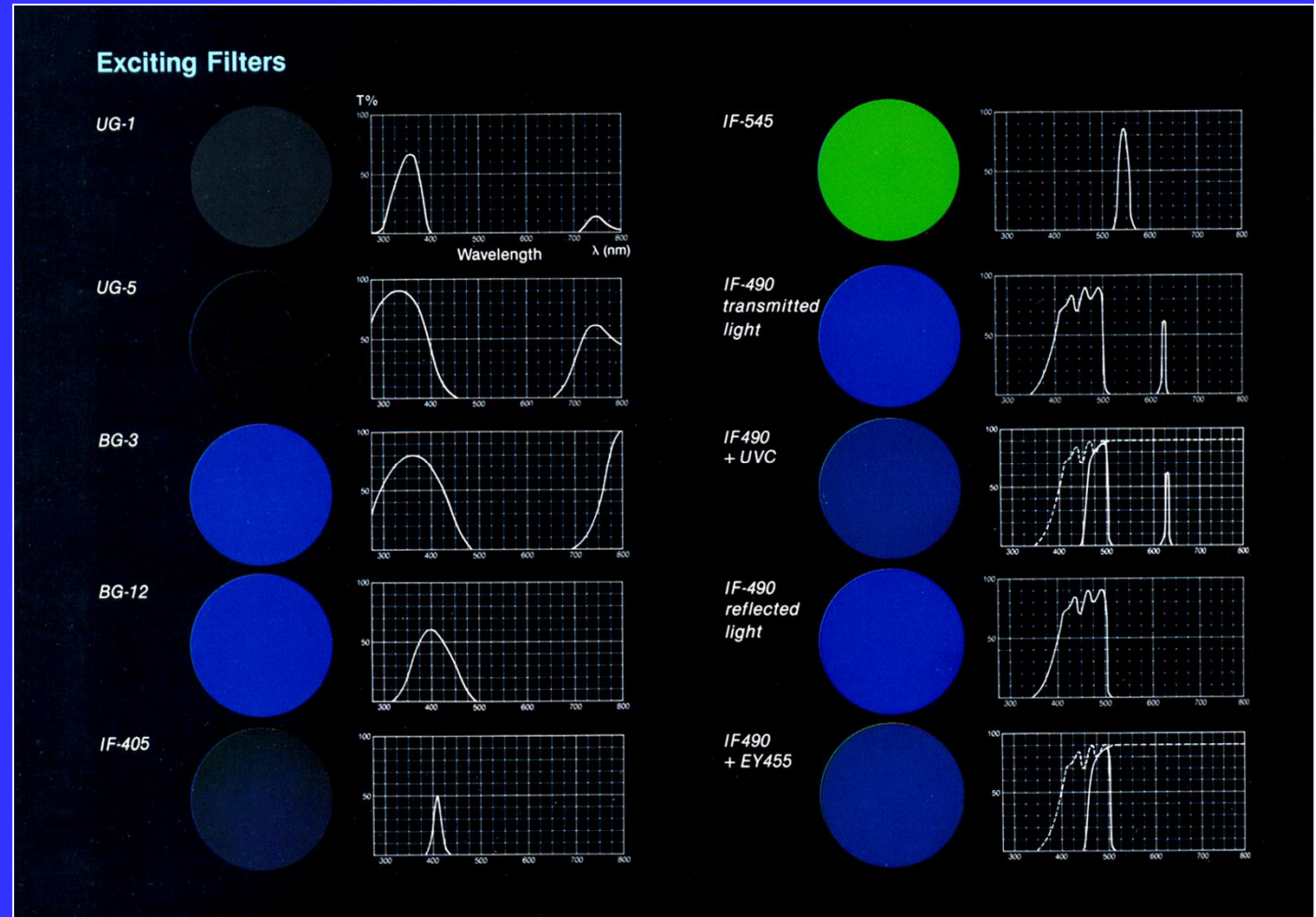
vzorek

Excitační filtry - Olympus

UG = ultraviolet glass

BG = blue glass

IF = interference filter



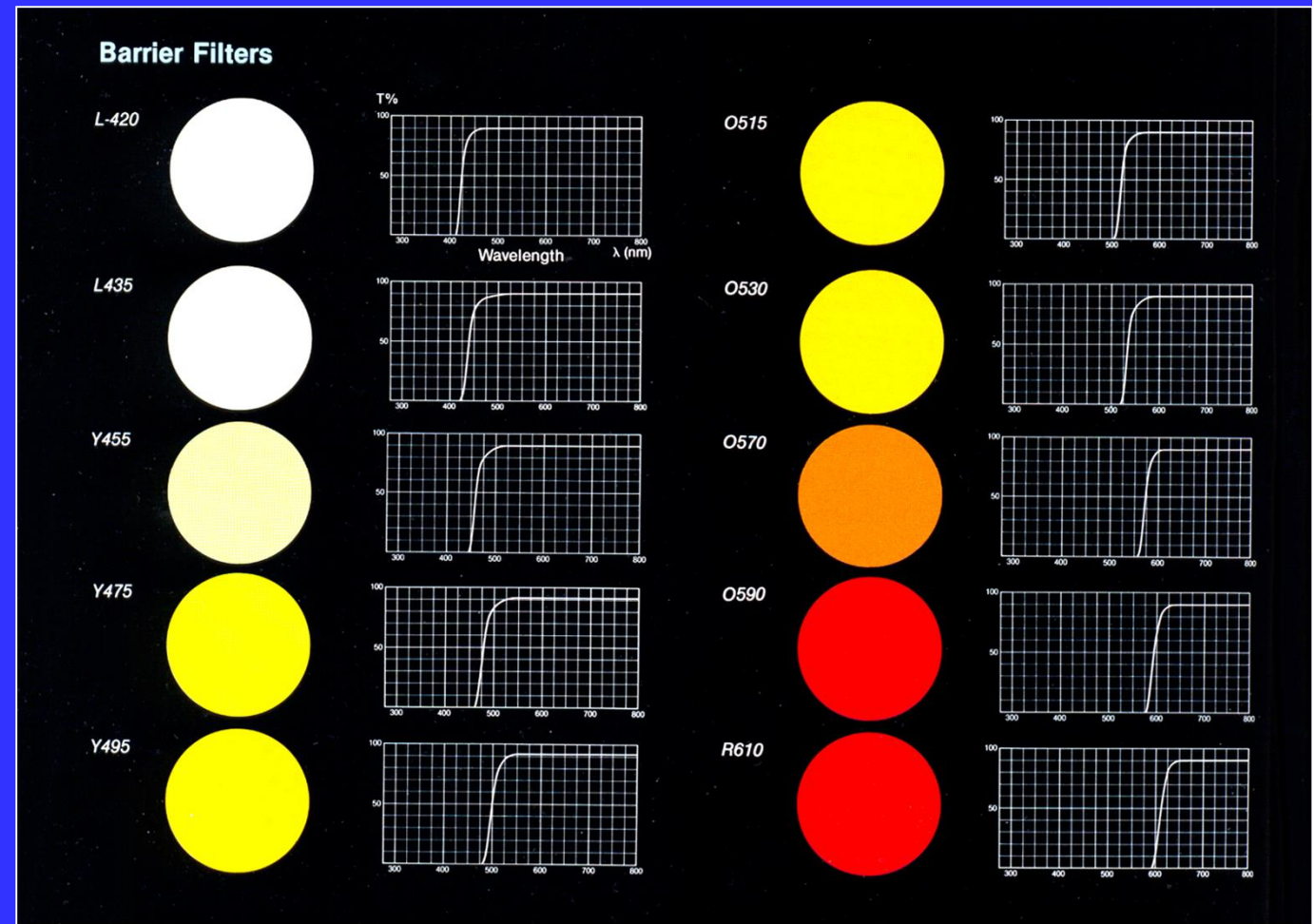
z katalogu

Bariérové filtry - Olympus

L = longpass filter

Y = yellow filter

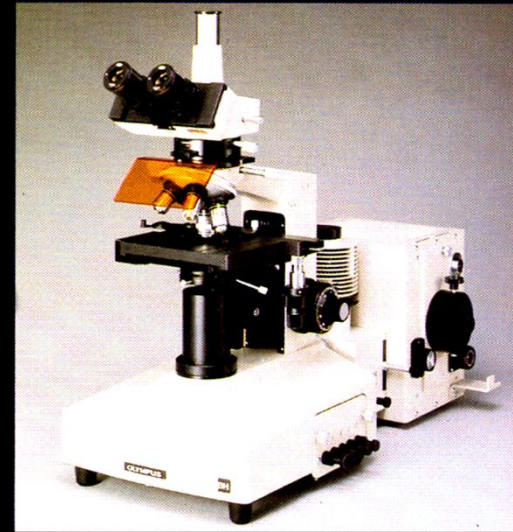
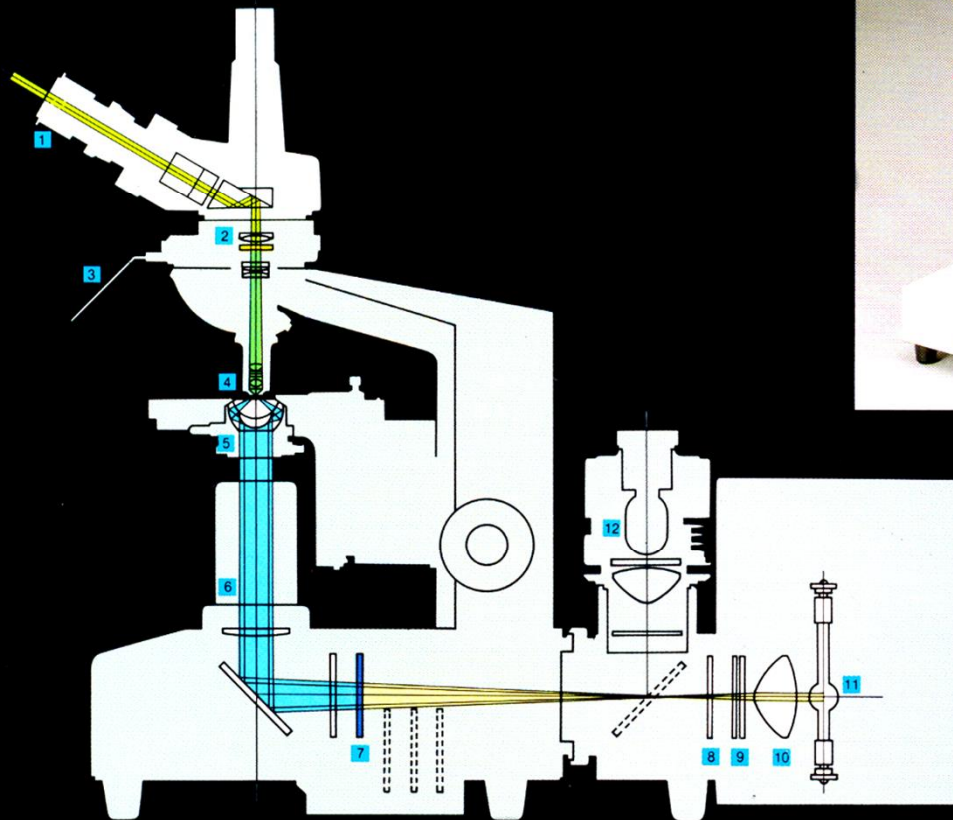
O = orange glass



z katalogu

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

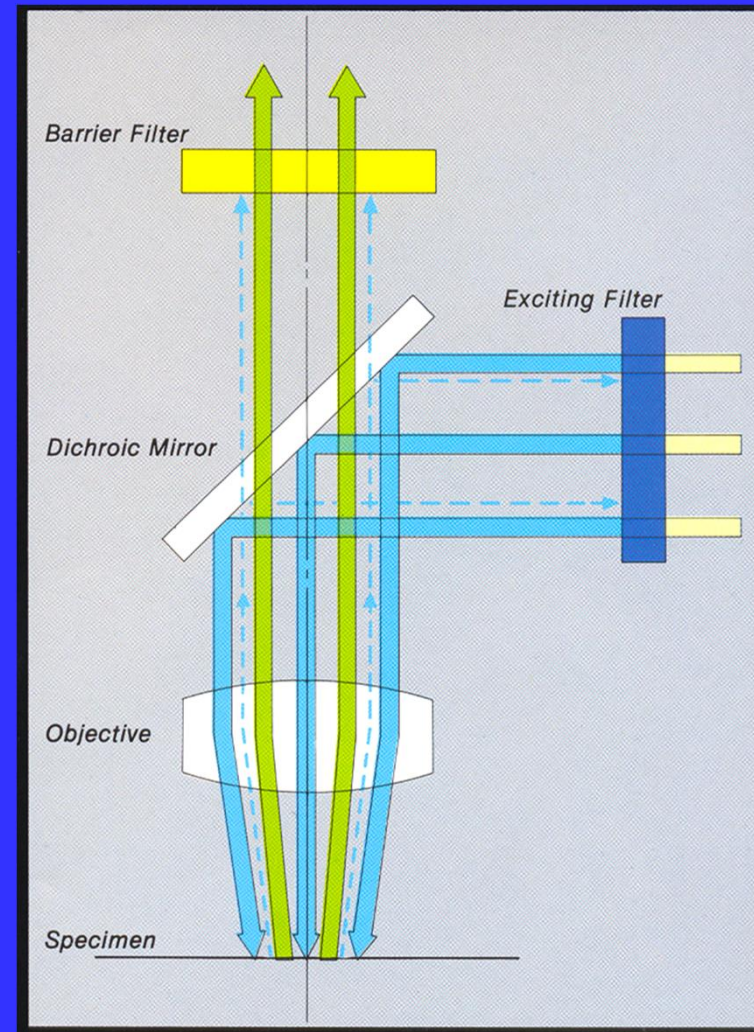
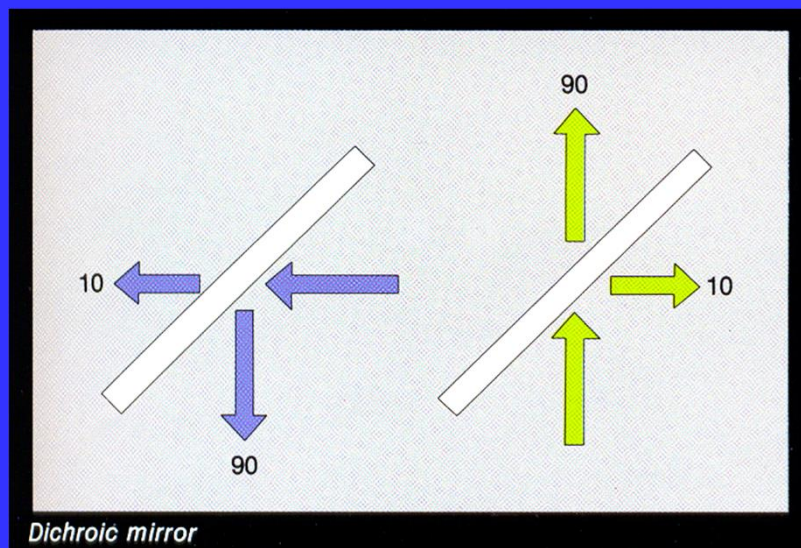
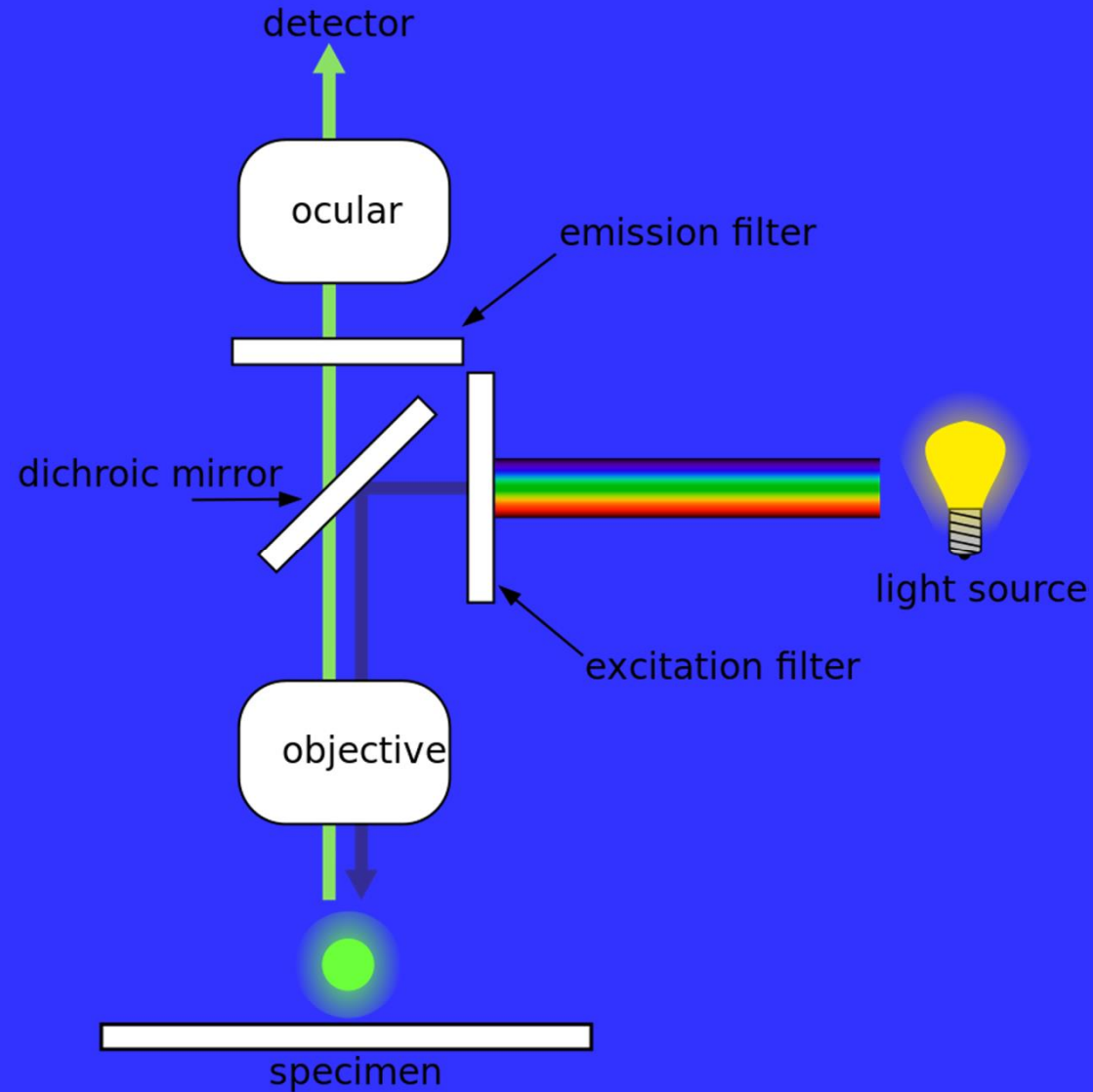
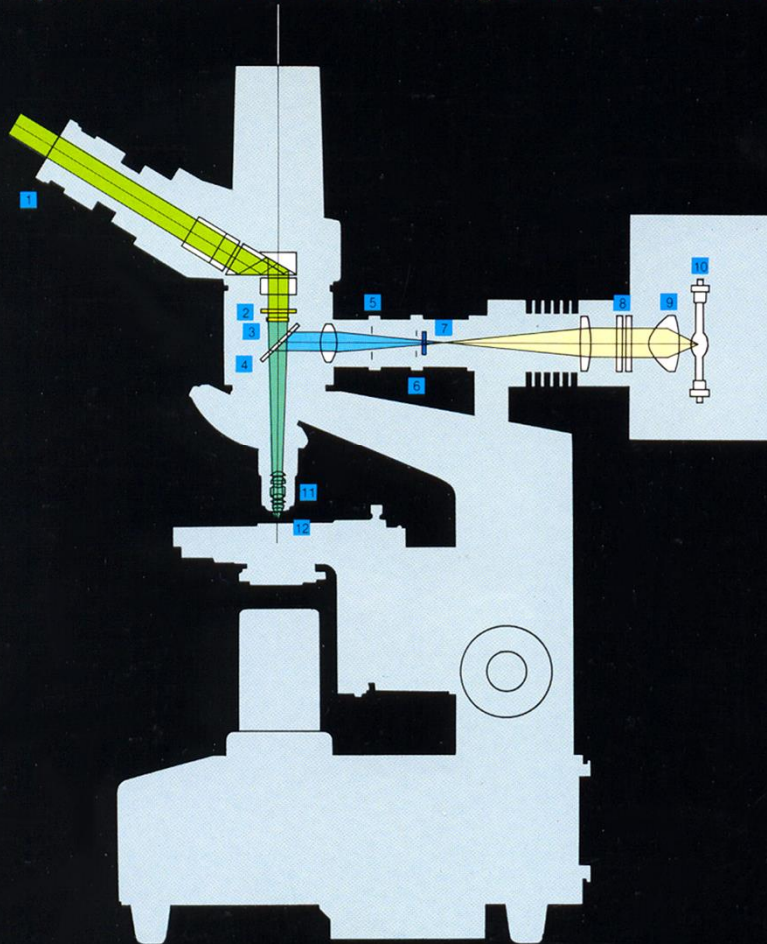


Schéma epifluorescenčního mikroskopu

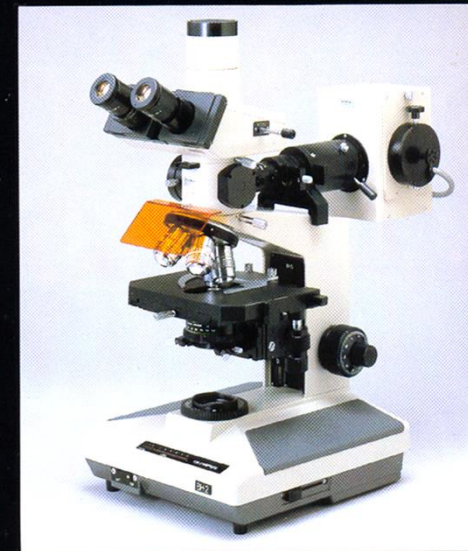


Epifluorescenční mikroskop - Olympus

Optical Path of The Reflected Light Fluorescence Microscope

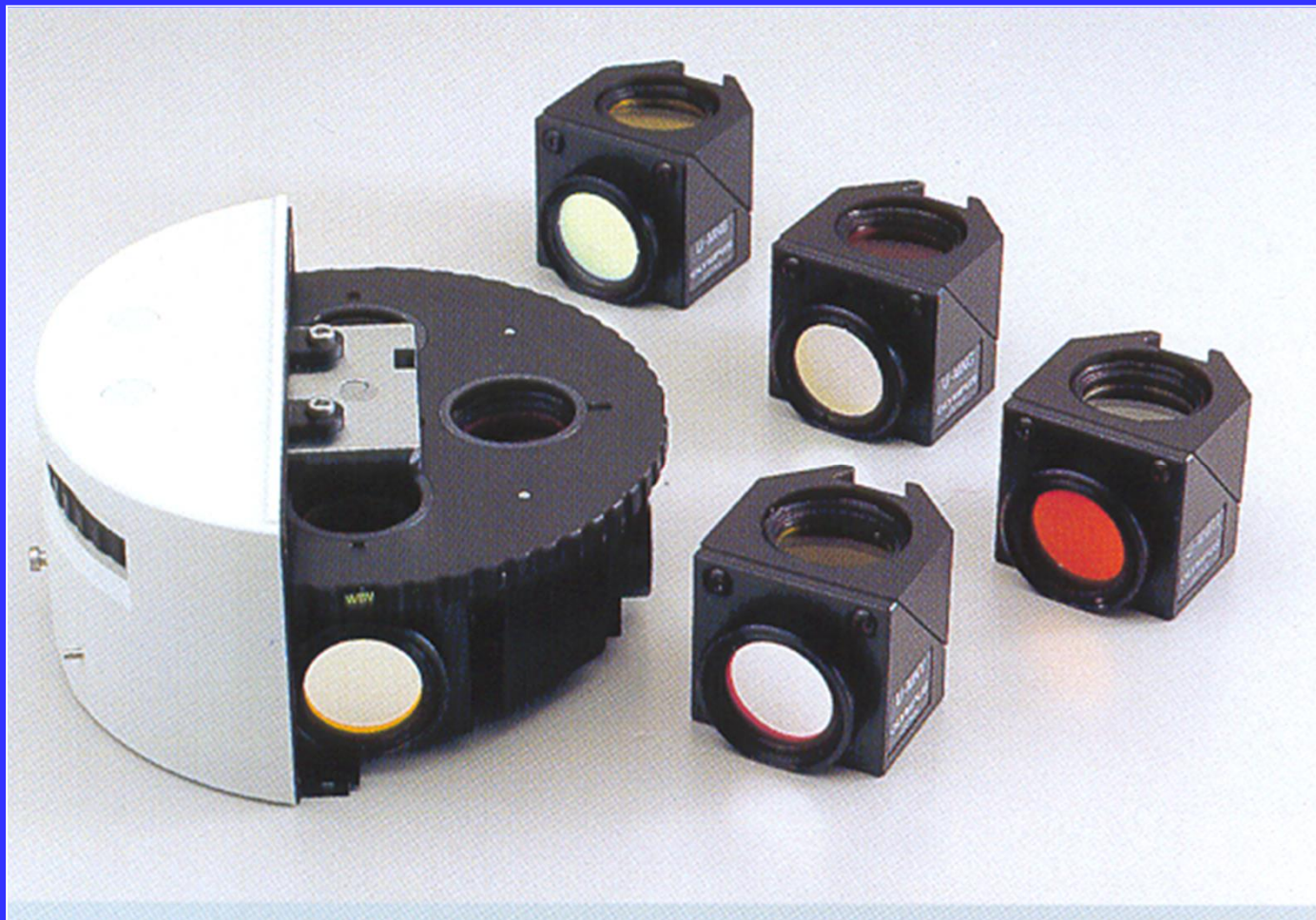


- 1 Eyepiece
- 2 Selectable barrier filter
- 3 Built-in barrier filter
- 4 Dichroic mirror
- 5 Field diaphragm
- 6 Aperture diaphragm
- 7 Exciting filter
- 8 Heat absorption filter
- 9 Collector lens
- 10 Super high pressure mercury lamp
- 11 Objective
- 12 Specimen

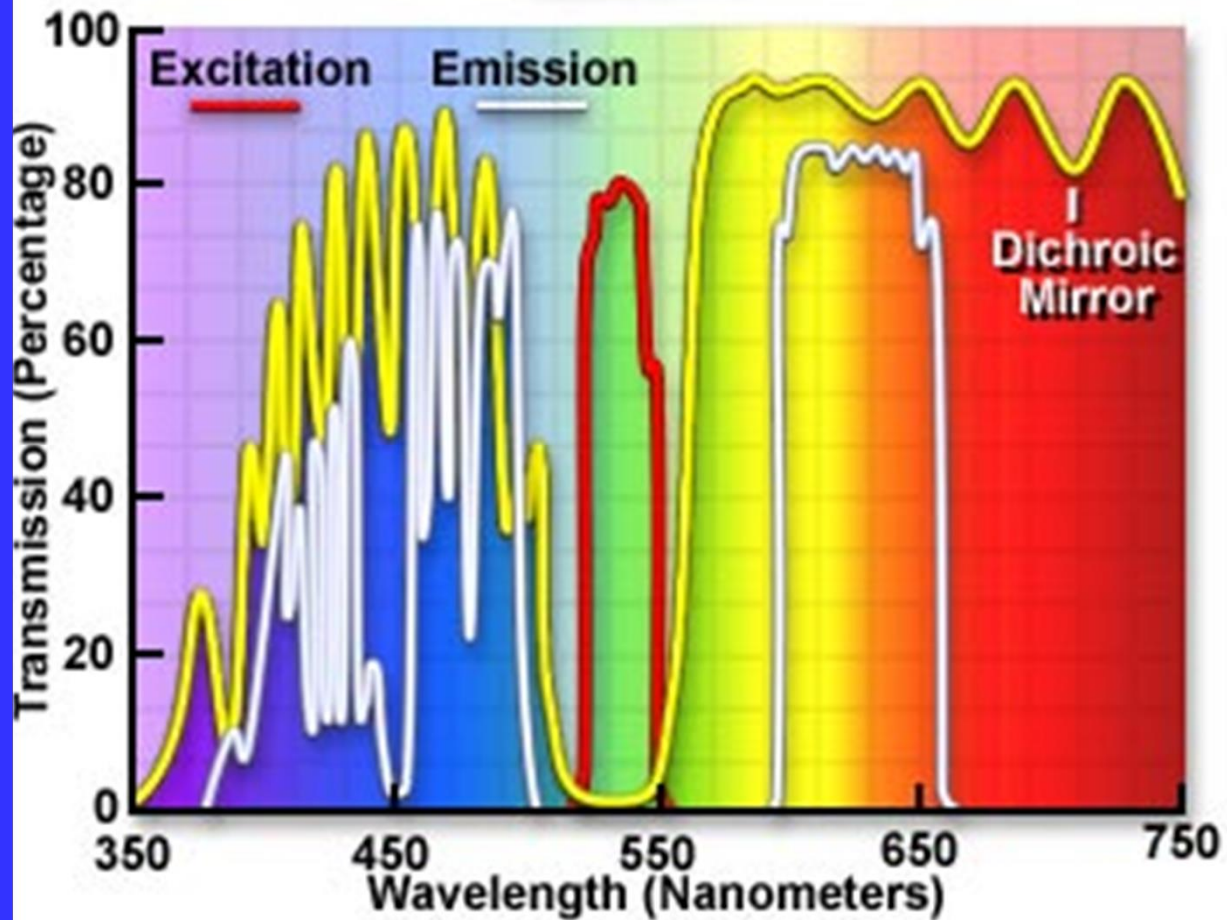
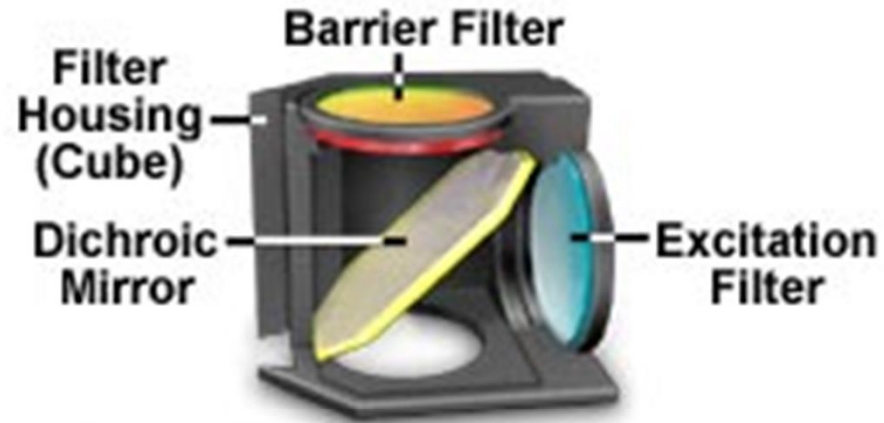


BX-51

„Kostky“ = kombinace filtrů a dichroického zrcadla pro epifluorescenci



Fluorescence Filter Cube and Spectra



Nikon

Kombinace filtrů (Olympus) a metody /nm/

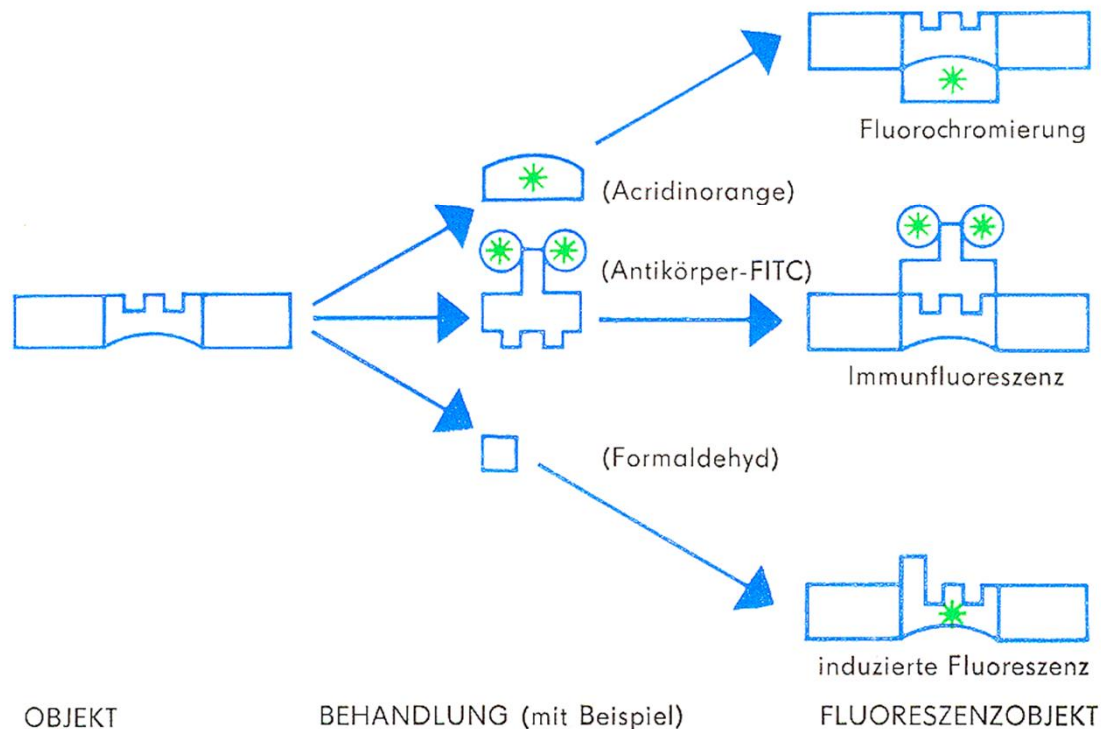
Excitace	Kostka	Dichr.zrcadlo	Excitační filtr	Bariérový filtr	Použití
UV	U-MWU2 U-MNU2	DM400	330 - 385 360 - 370	420	autofluorescence DAPI Hoechst 33258
B	U-MWB2 U-MNB2	DM500	450 - 480 470 - 490	515	FITC, Akridinoranž
G	U-MWG2 U-MNG2	DM570	510 - 550 530 - 550	590	Rhodamin, TRITC, PI,
IV	U-MWIY2	DM600	545 580	610	Texas red

Typy fluorescence

primární fluorescence



sekundární fluorescence



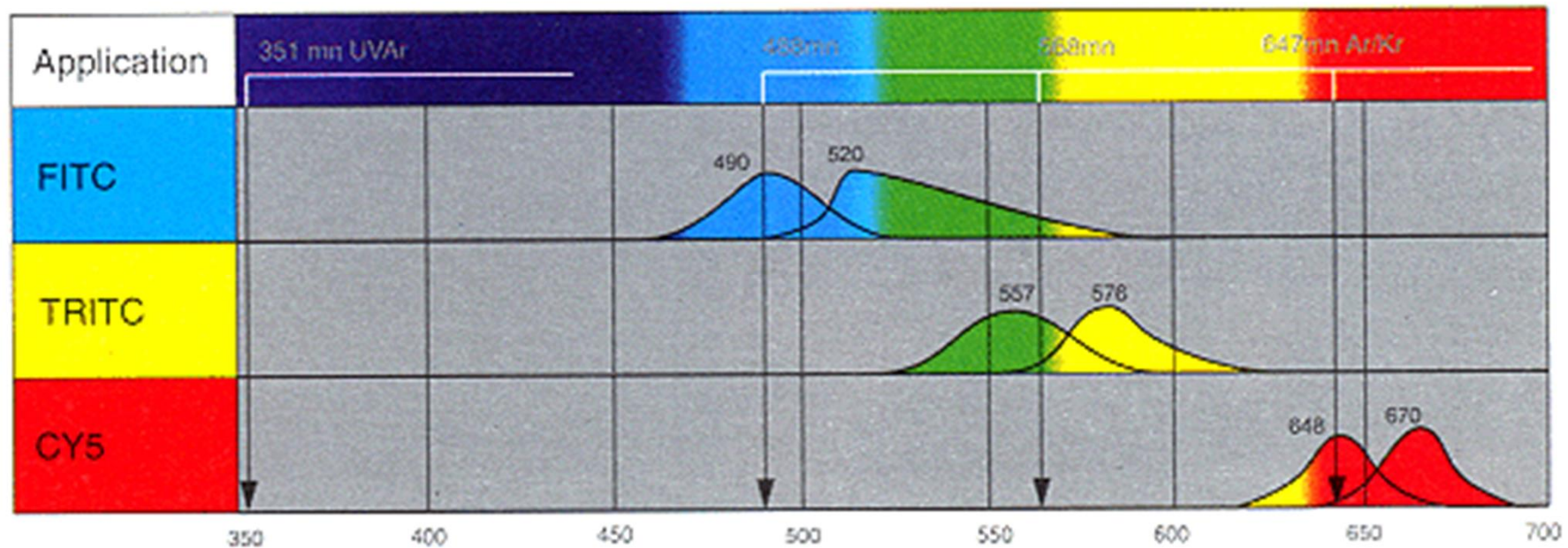
autofluorescence

barvení =
fluorochromy

immunofluorescence =
fluorochromem
značené protilátky

indukovaná
fluorescence

Srovnání fluorescenčních barviv



Fluorescence

É **primární (autofluorescence)** - častá u rostlinných pletiv

É chlorofyl

É lignin, suberin

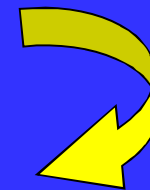
É pryskyřice, sekundární metabolity

É **sekundární** - fluorochromy - specifická vazba na určité struktury (DAPI, Hoechst 33258)

É **značení GMO** fluoreskujícími proteiny (GFP, YFP)

É **fluorescenční imunohistochemie** - spojuje sekundární fluorescenci s reakcí: antigen x protilátka

vysoká specificita a citlivost



Fluorescenční mikroskopie - použití

1. autofluorescence pletiv (zvýraznění struktur bez barvení)
2. fluorochoomy: znázornění jader (barvení DAPI, Hoechst 33258 a Hoechst 33342), kalóza (anilín. modř)
3. sledování životaschopnosti buněk (FDA, PI)
4. imunohistochemie - lokalizace určitých proteinů pomocí fluorescenčně značených protilátek
5. fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) - detekce určitých sekvencí DNA
6. detekce transgenů (GFP), detekce aktivity genů

1. autofluorescence

Autofluorescence ligninu v xylému a sklerenchymu

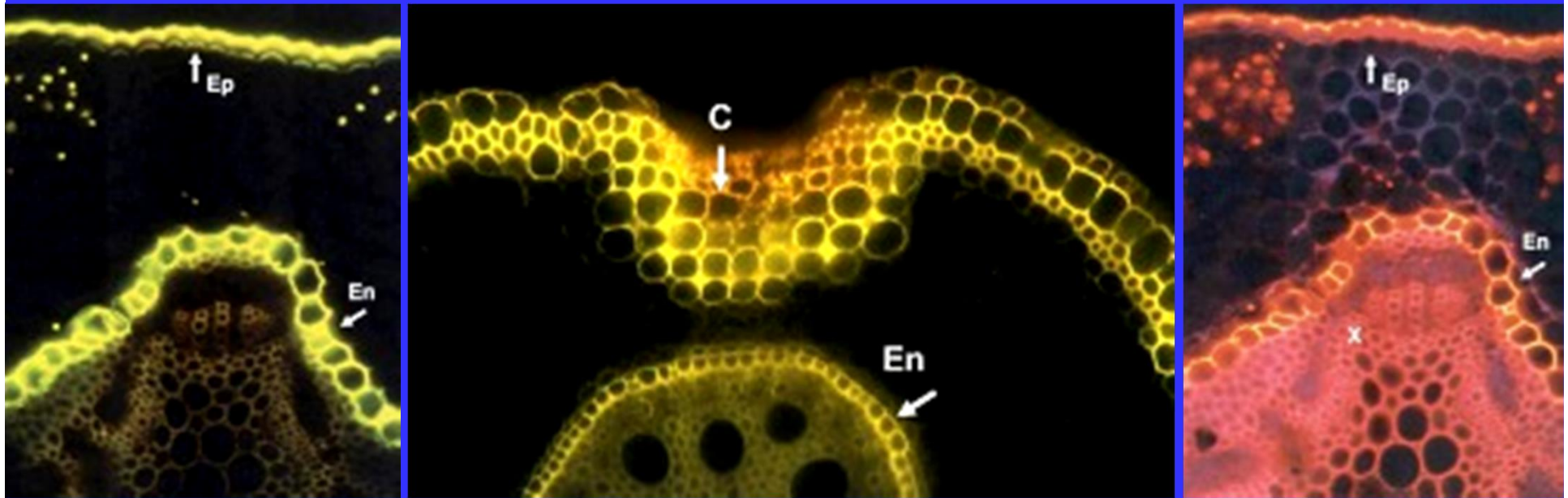
UV excitace

Snímek příčného řezu
cévním svazkem

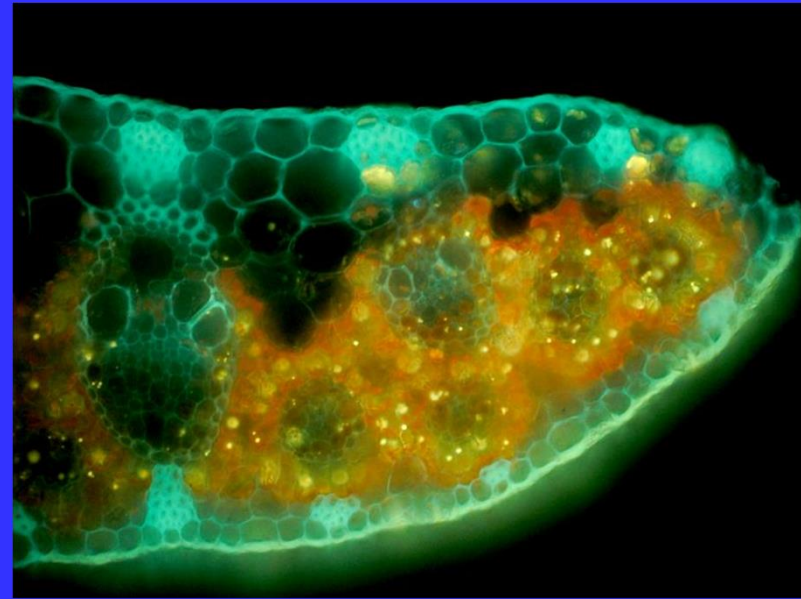
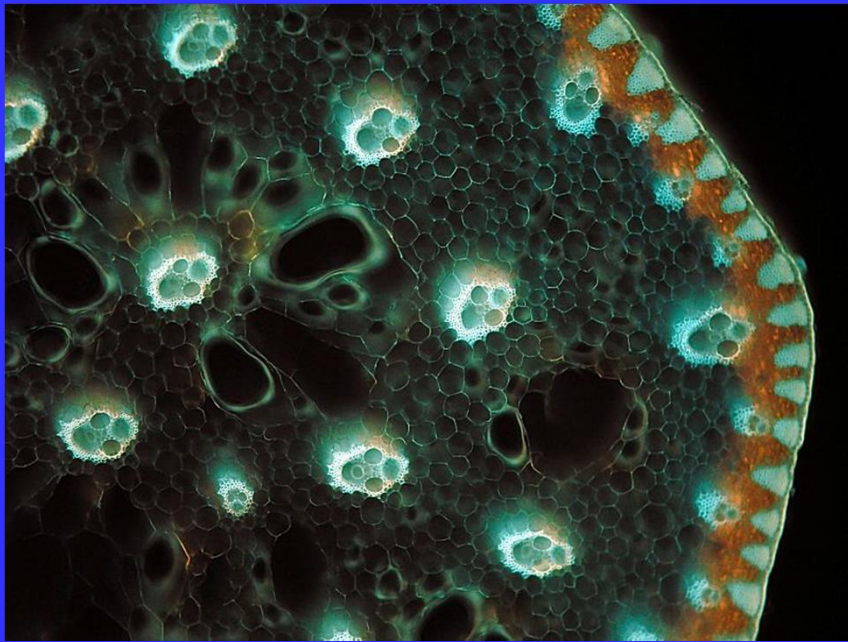
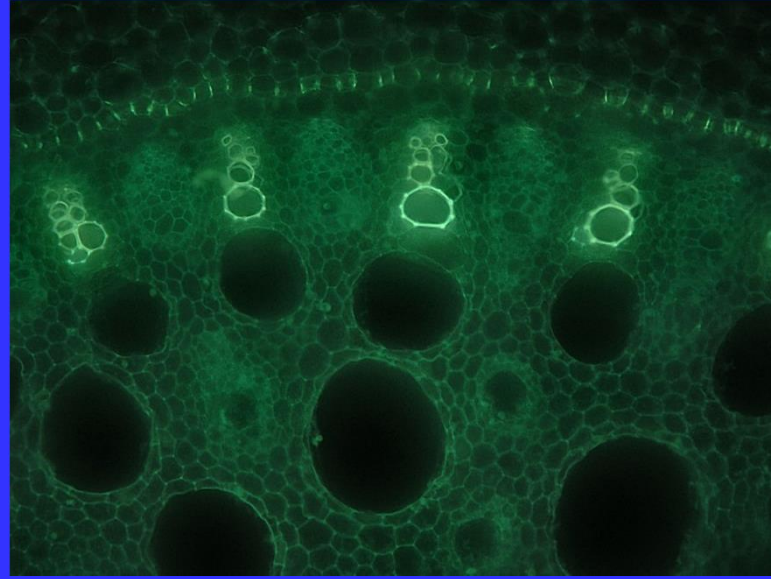
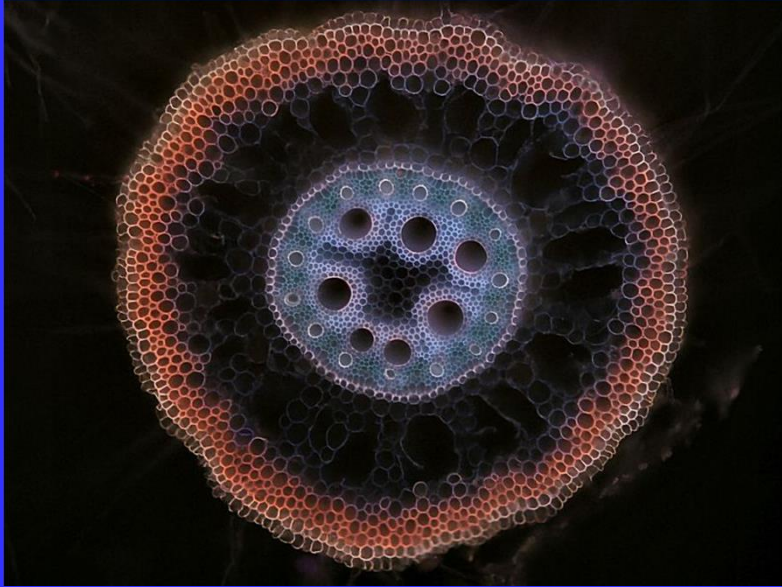
foto-soutěž Nikon,
2004

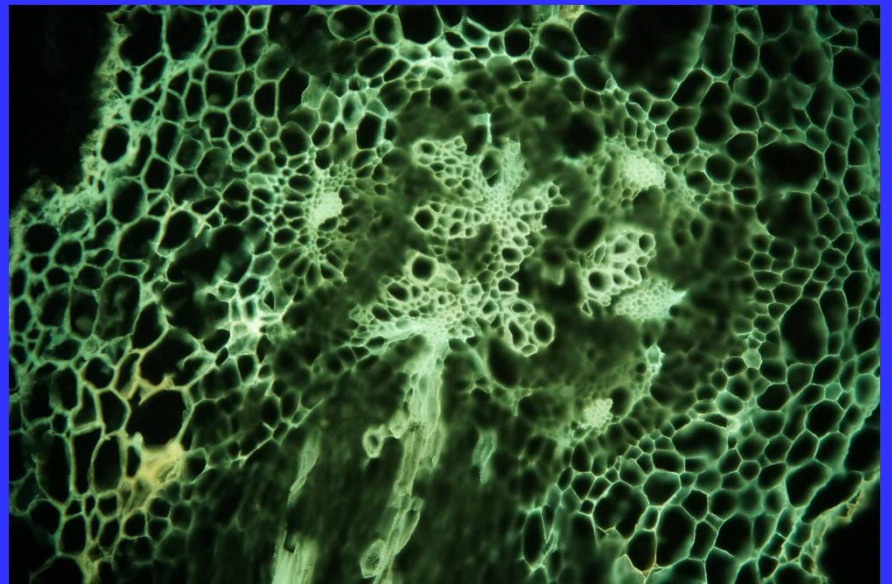
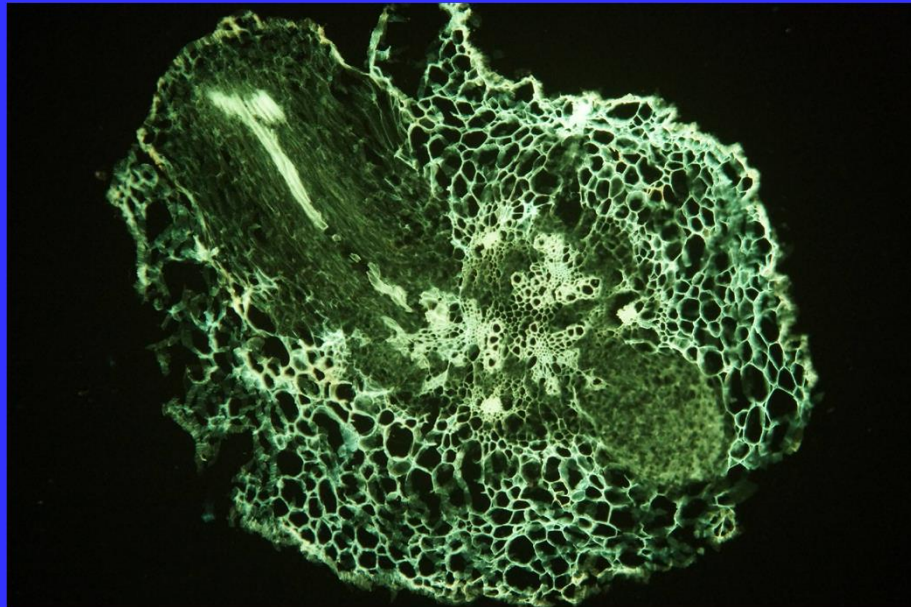
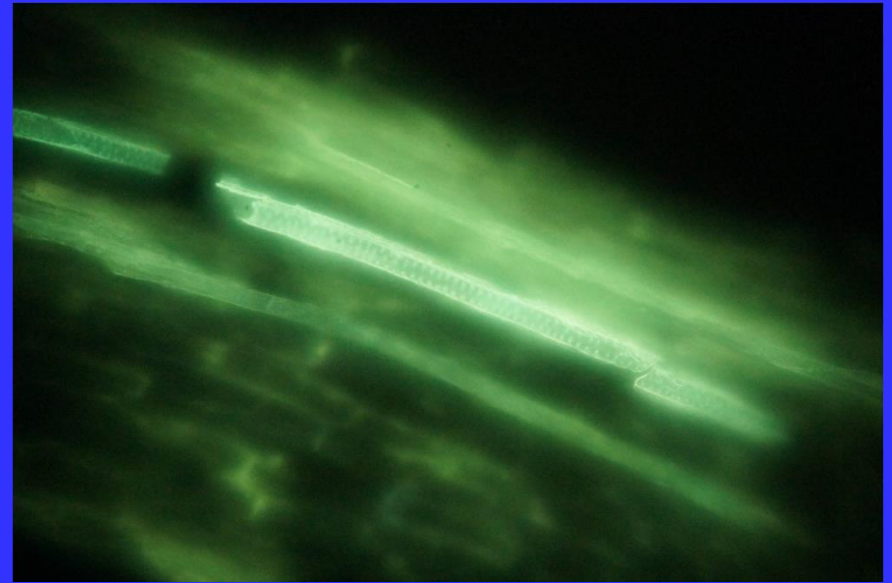
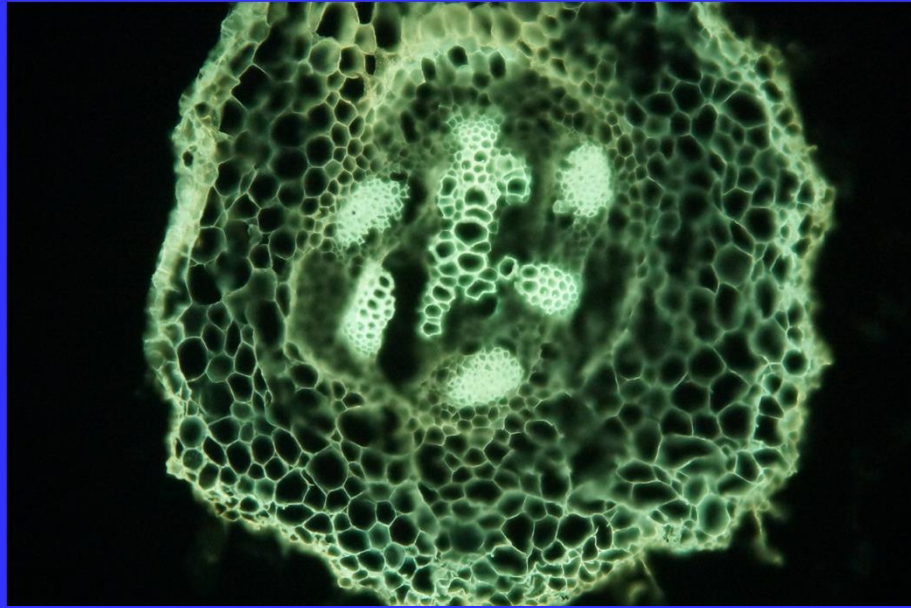


Příčný řez stonkem



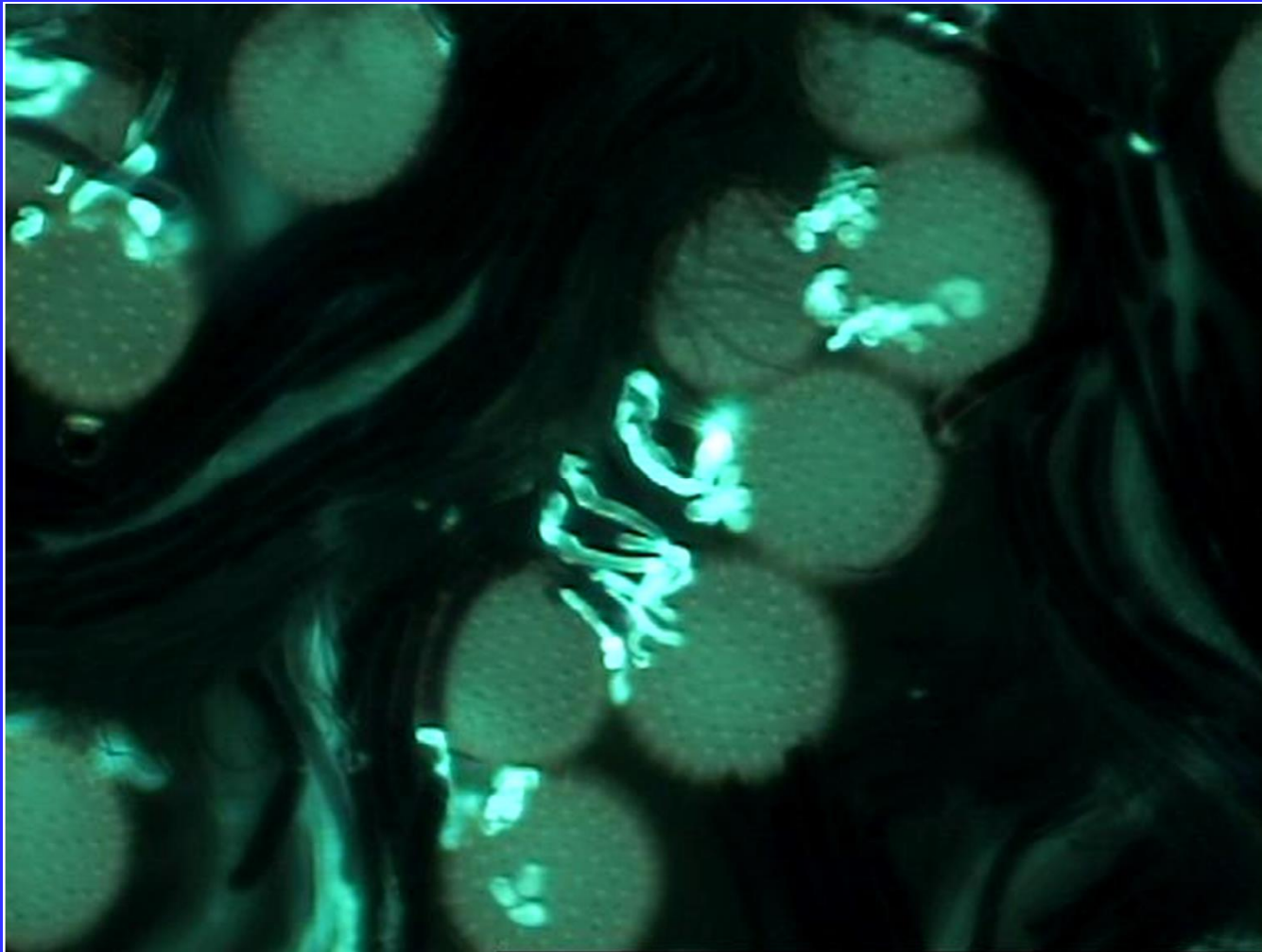
zvýraznění endodermis a sekundárních krycích pletiv





2. fluorochromy

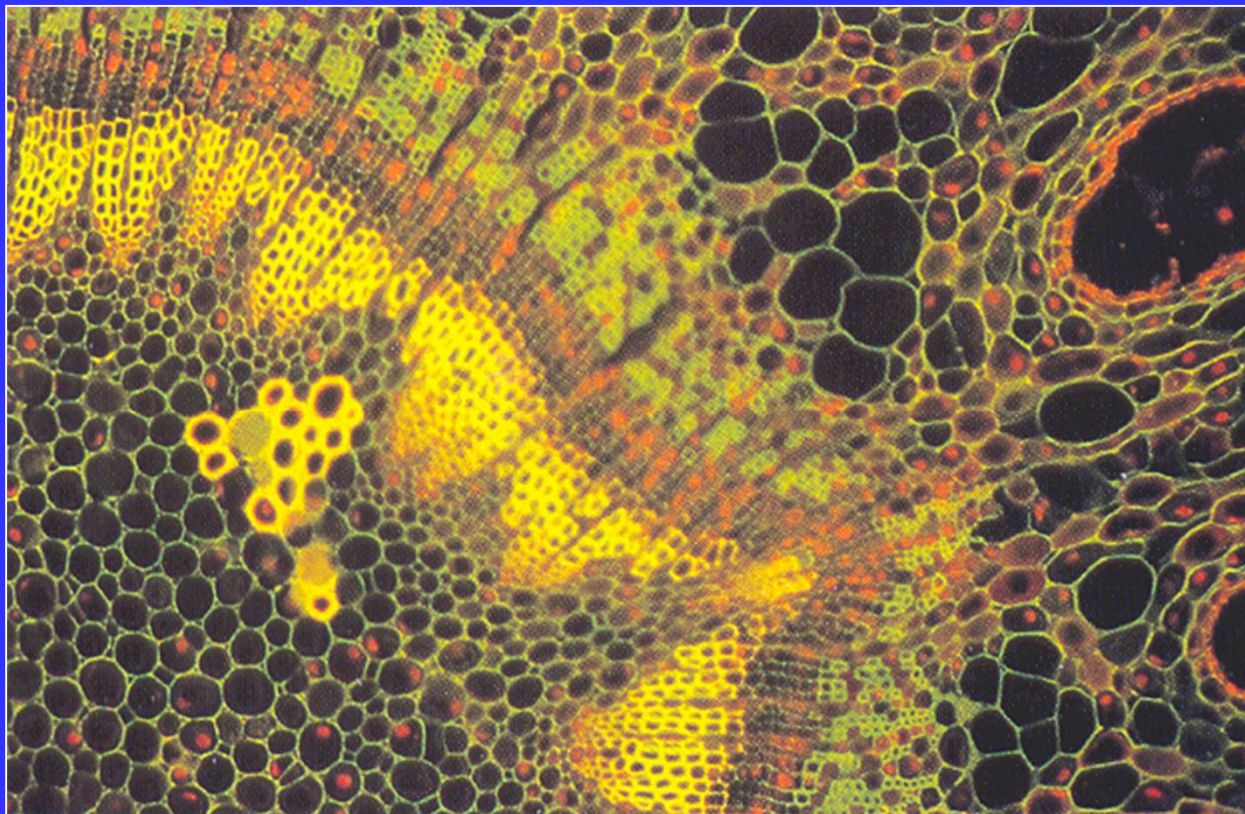
Fluorescence kalózy v pylových láčkách



fluorochrom:
anilínová modř

UV excitace

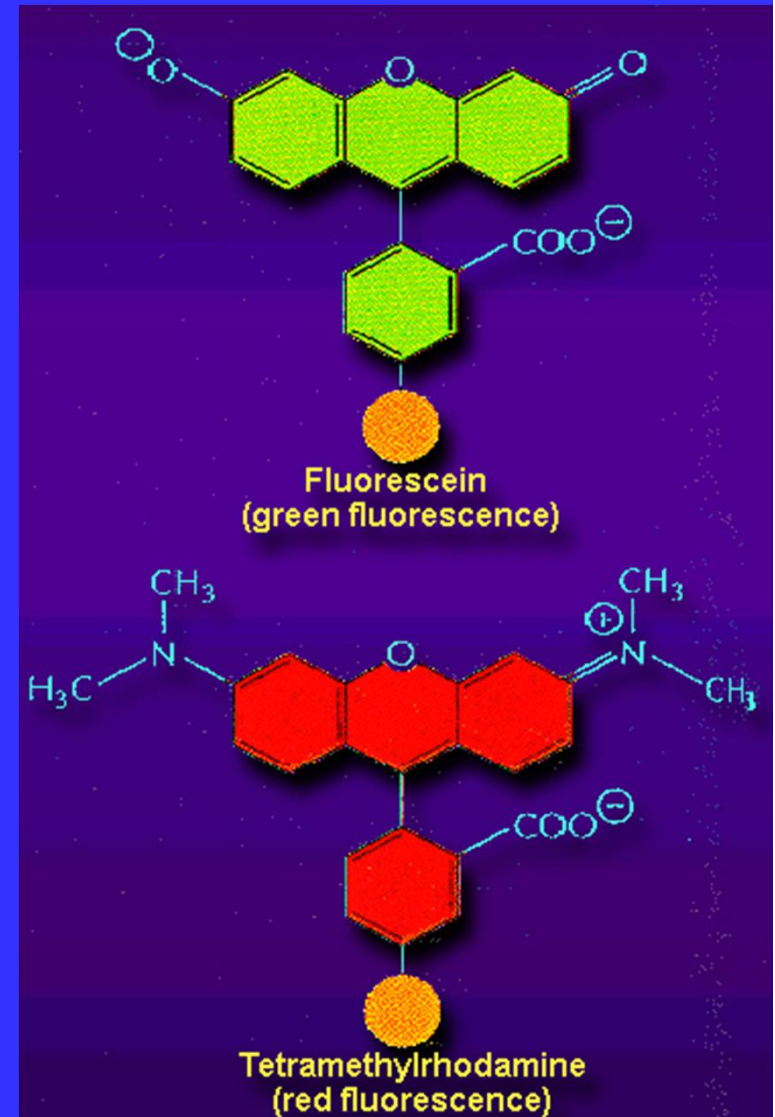
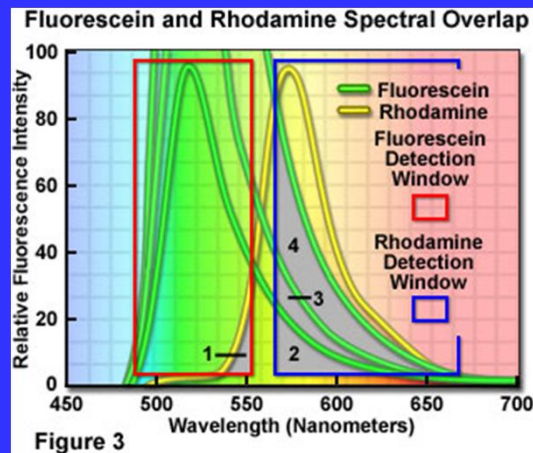
Stonek jedle v modrofialovém světle



barvení akridinovou oranží

Fluorescenční barviva fluorescein a rhodamin

Two fluorescent dyes that are commonly used in fluorescent microscopy are **fluorescein** and **rhodamine**. Fluorescein emits an intense green fluorescence when excited with blue light. Rhodamine, emits a red fluorescence when excited with green-yellow light. Different cell constituents may be stained with both molecules and visualized simultaneously under the microscope.



3. sledování životaschopnosti buněk

Sledování životaschopnosti buněk

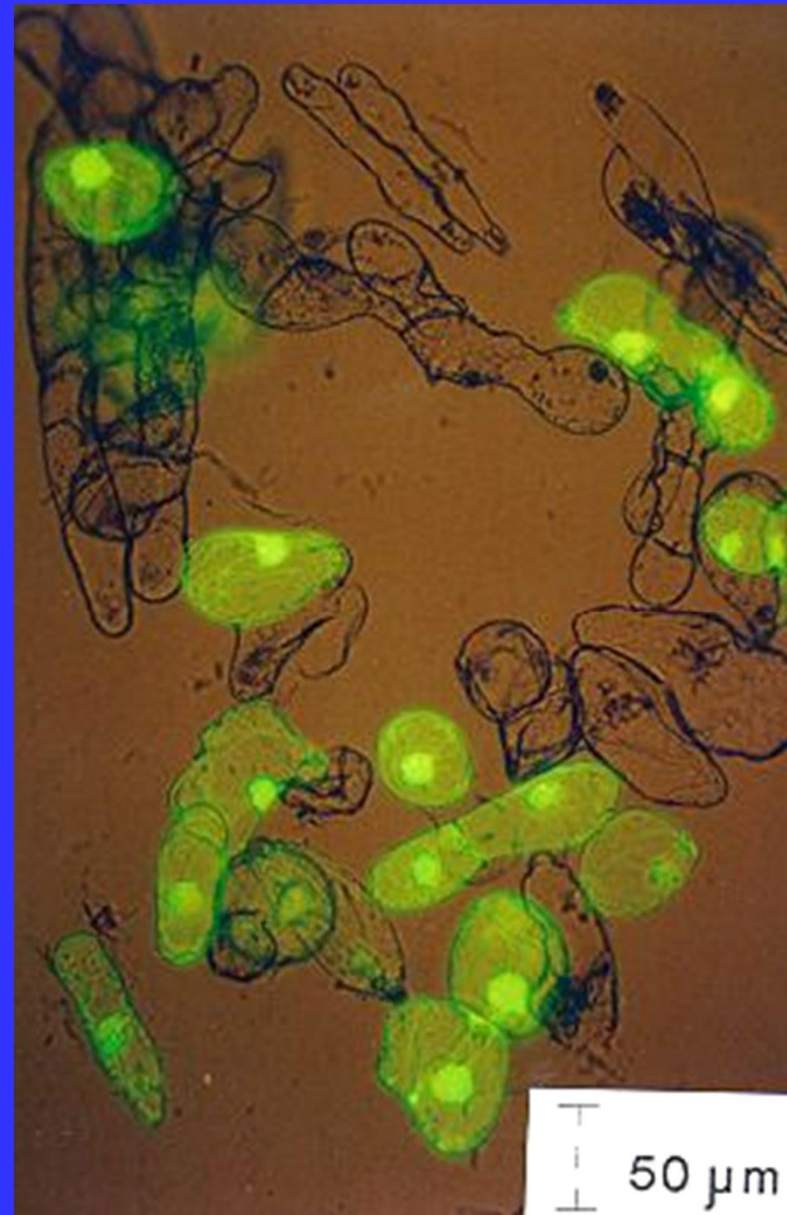
substrát: FDA (fluoresceindiacetát)



esterázy

fluorescein + acetát

P. Debergh
kombinace obrazu fluorescence a sv. pole

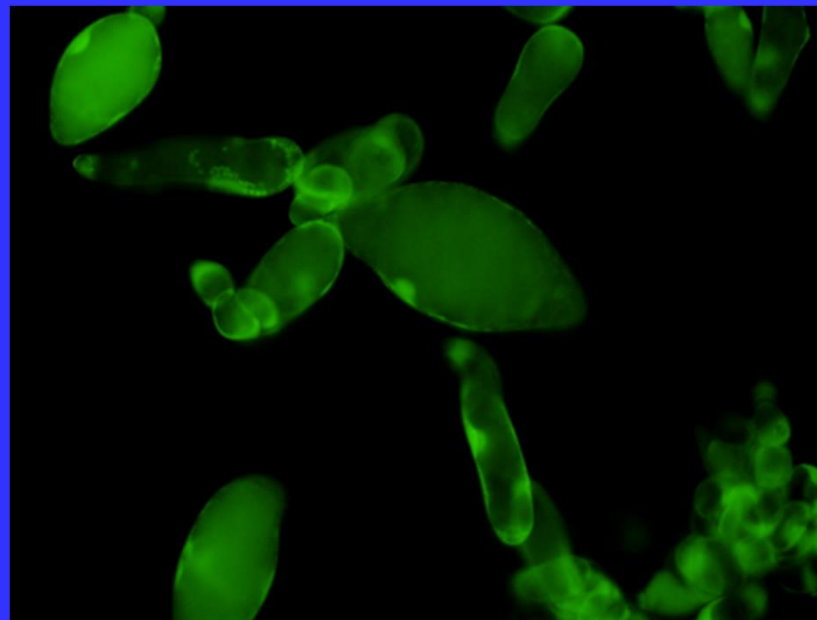


Buňky kalusu mrkve

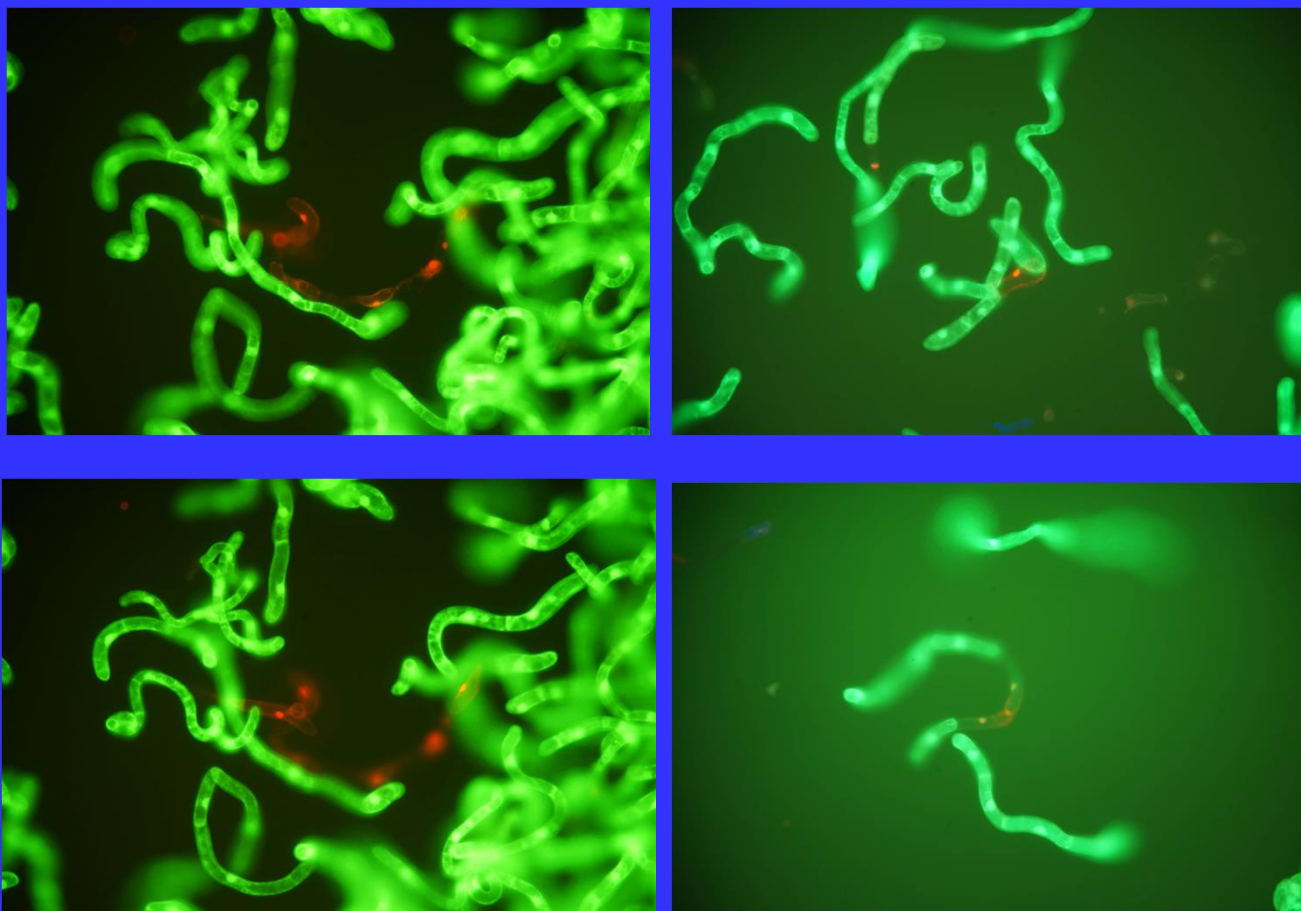
Daucus carota ssp. carota



Nomarského diferenciální
interferenční kontrast (DIC)

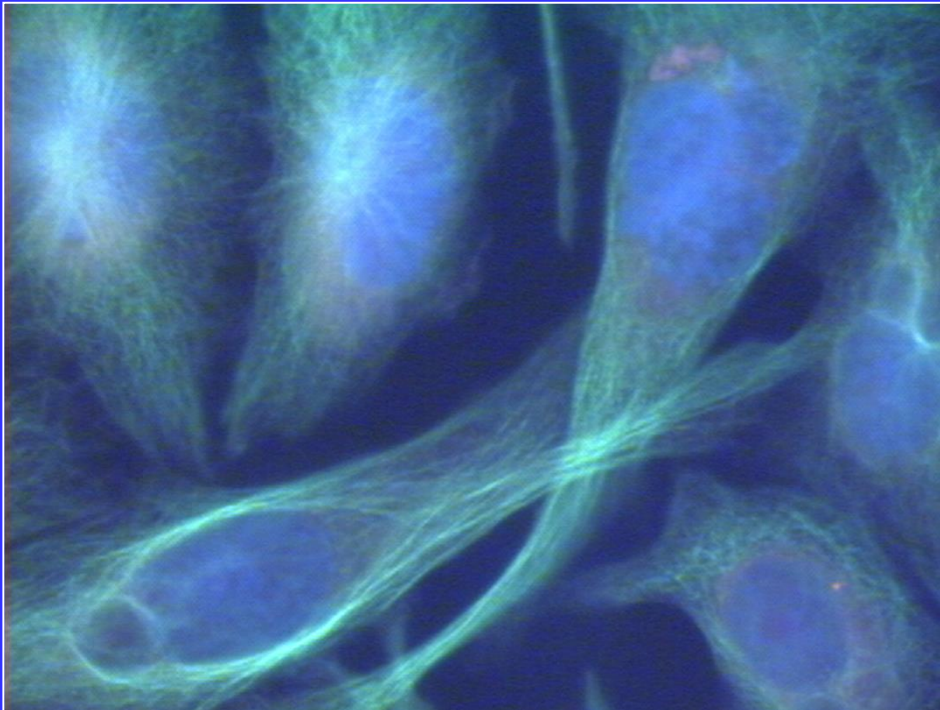


fluorescence živých buněk
po inkubaci s FDA



ukázka živé/mrtvé buňky, buněčná suspenze BY-2, FDA+PI
testování viability, živé buňky zelené, mrtvé- červená jádra (PI)

Kombinace fluorochromů a filtrů

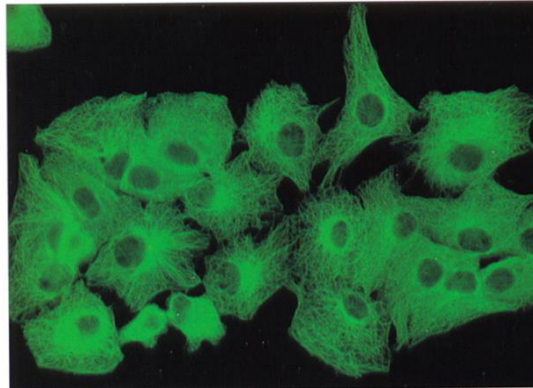


DAPI + FITC

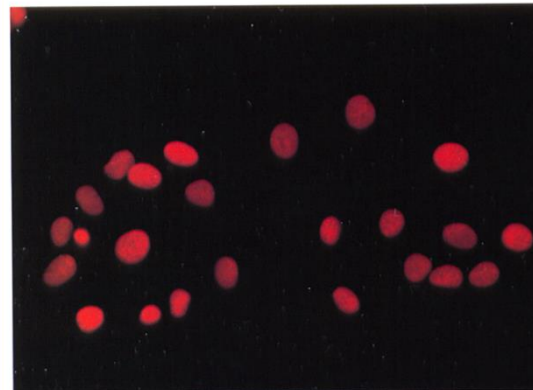
Kombinace fluorochromů a filtrů

kultura buněk A549

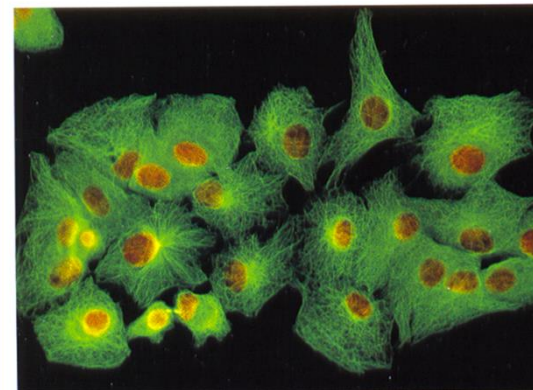
Cell culture (A549): Microtubuli (FITC labelled) and nuclei (PI labelled)



FITC emission (U-MWIBA band pass filter cube)



PI emission (U-MWIG filter cube)



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

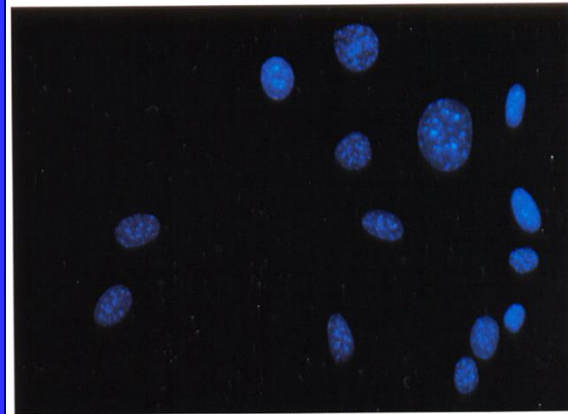
FITC
barví se
mikrotubuly

propidium
jodid
barví jádra

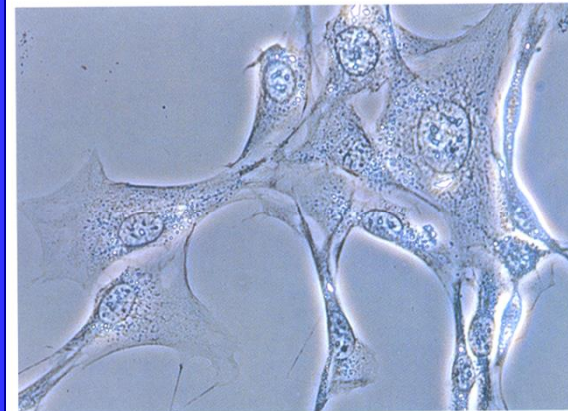
kombinovaný
obraz

Kombinace DAPI a fázového kontrastu

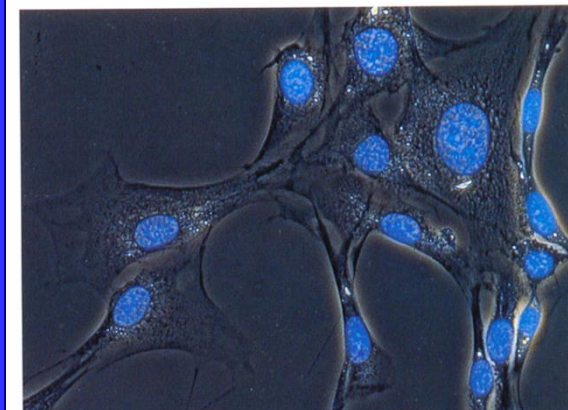
Cell culture (NIH3T3): nuclei (DAPI)



Incident light fluorescence observation.



Phase contrast observation.



The combination of phase contrast and incident light fluorescence observation.

DAPI

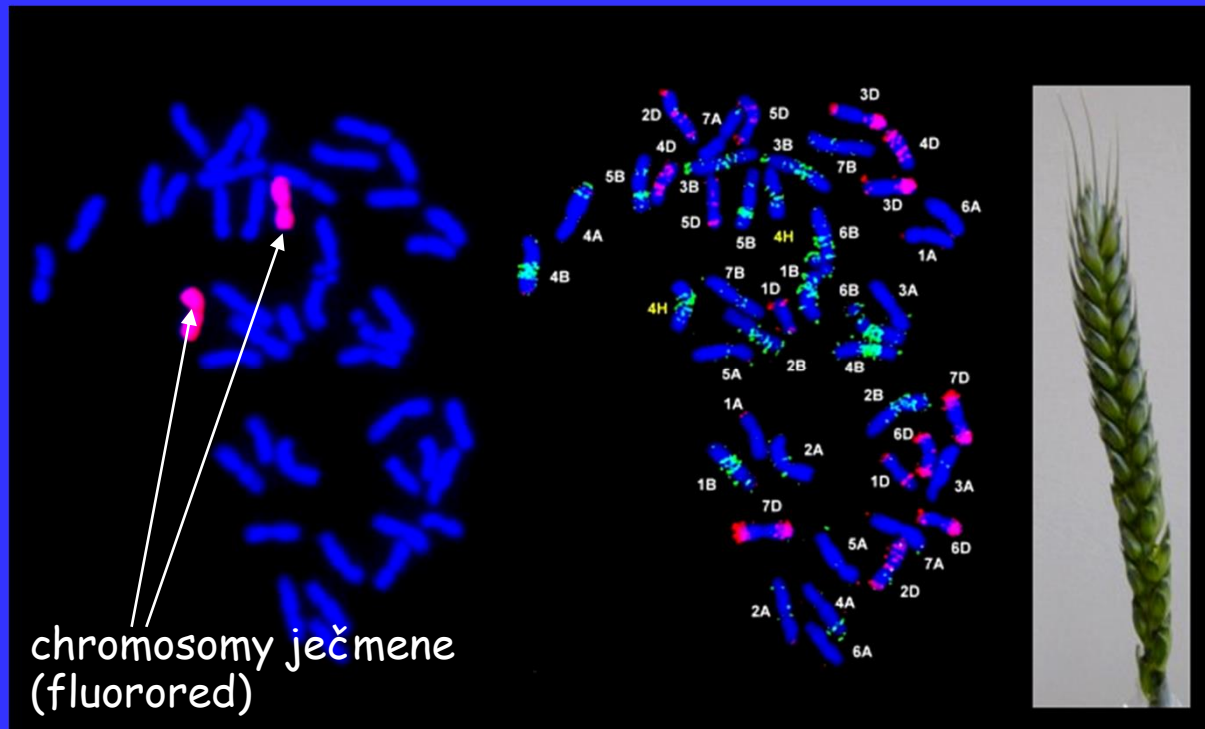
fázový
kontrast

kombinovaný
obraz

FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace)

základní metoda molekulární cytogenetiky: podstatou je hybridizace = navázání sondy k chromozomální DNA

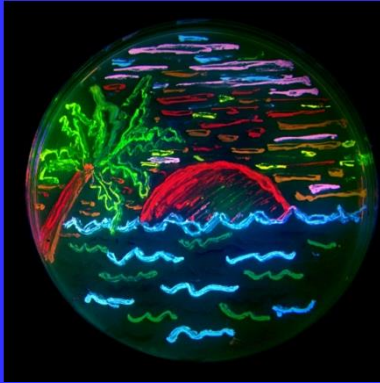
sonda = malý fragment DNA značený fluorescenčním barvivem (fluorochromem), který se váže na specifické místo chromozomu.



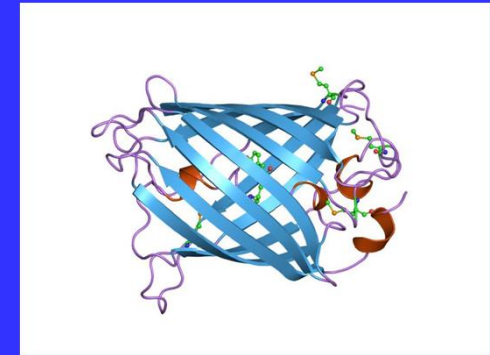
sondy:
GAA trinukleotid
sekvence (zelená)

pAs1 (červená)

Detekce transgenů,
detekce aktivity genů
(GFP)



GFP



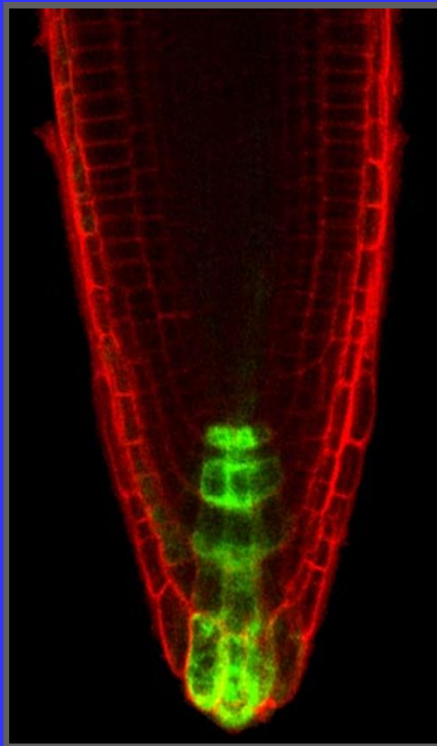
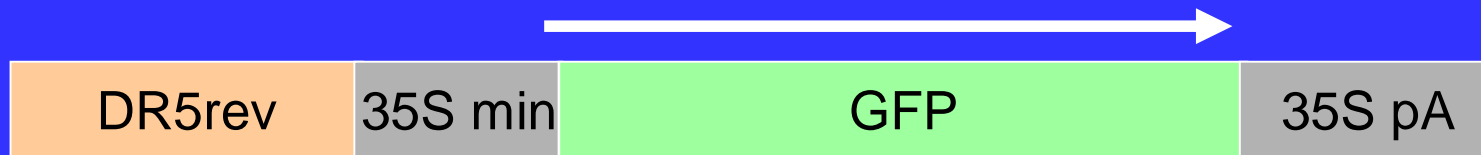
- É The **green fluorescent protein (GFP)** is a protein composed of 238 amino acid residues (26.9 kDa) that exhibits bright green fluorescence when exposed to light in the blue to ultraviolet range.^{[2][3]} Although many other marine organisms have similar green fluorescent proteins, GFP traditionally refers to the protein **first isolated from the jellyfish *Aequorea victoria***. The GFP from *A. victoria* has a major excitation peak at a wavelength of 395 nm and a minor one at 475 nm. Its emission peak is at 509 nm, which is in the lower green portion of the visible spectrum. The fluorescence quantum yield (QY) of GFP is 0.79. The GFP from the sea pansy (*Renilla reniformis*) has a single major excitation peak at 498 nm.
- É In cell and molecular biology, the GFP gene is frequently used as a reporter of expression.^[4] It has been used in modified forms to make biosensors, and many animals have been created that express GFP, which demonstrates a proof of concept that a gene can be expressed throughout a given organism, in selected organs, or in cells of interest. GFP can be introduced into animals or other species through transgenic techniques, and maintained in their genome and that of their offspring. To date, GFP has been expressed in many species, including bacteria, yeasts, fungi, fish and mammals, including in human cells. Scientists Roger Y. Tsien, Osamu Shimomura, and Martin Chalfie were awarded the **2008 Nobel Prize in Chemistry** on 10 October 2008 for their discovery and development of the green fluorescent protein.

Arabidopsis

DR5::GFP Auxin Reporter

vizualizace přítomnosti auxinu

J. Friml



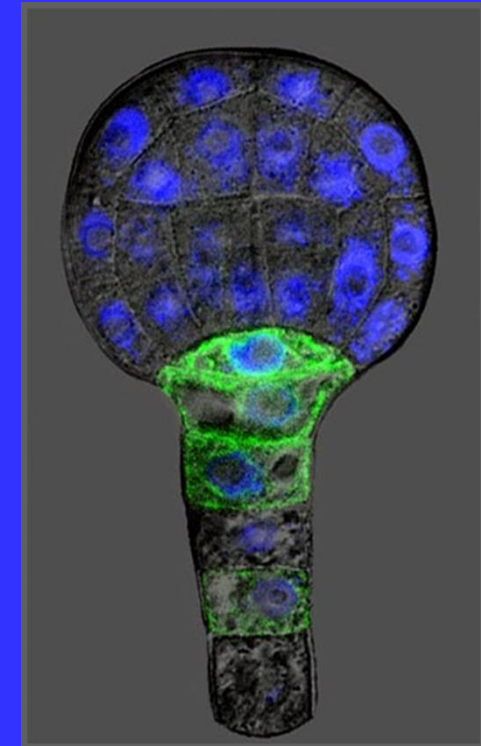
kořen



kořen + auxin



anti-IAA AB



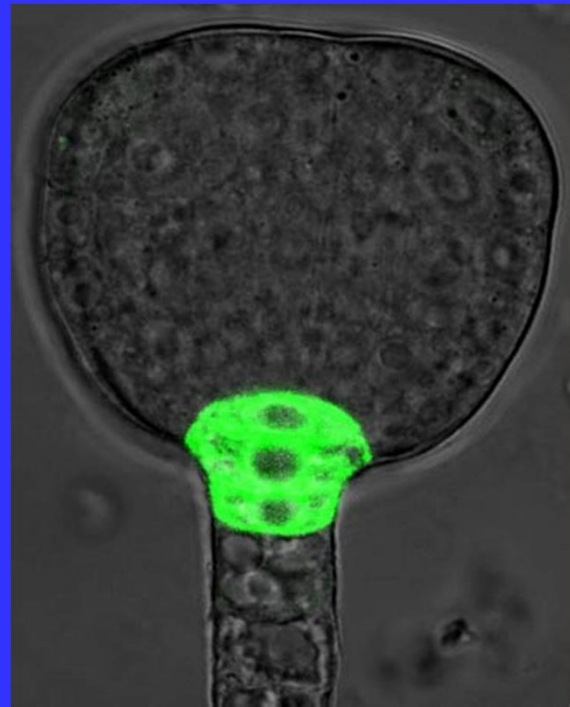
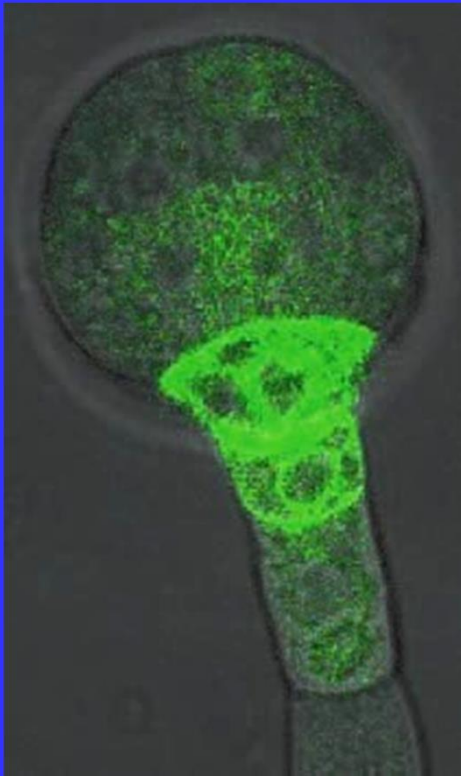
embryo

Auxin v embryogenezi *Arabidopsis*

vizualizace přítomnosti auxinu

DR5::GFP

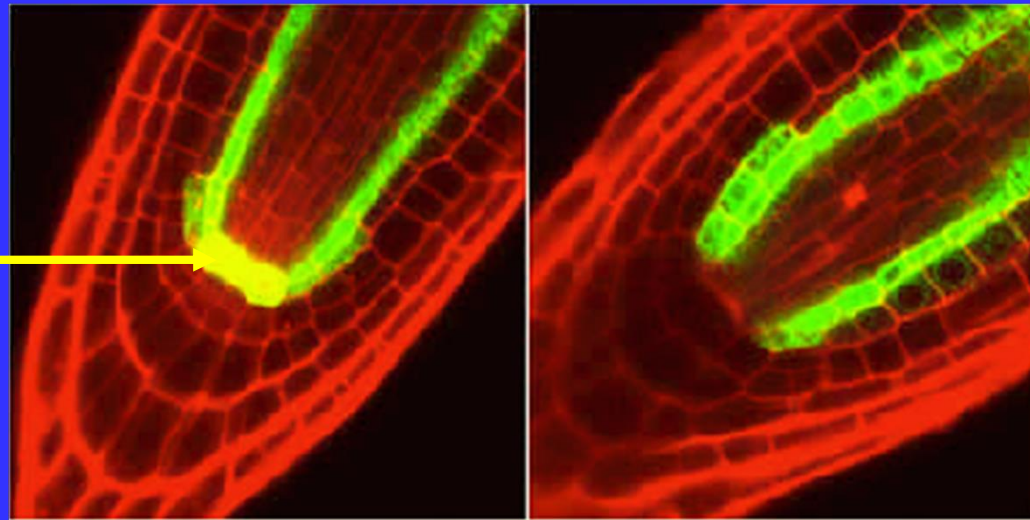
histochemická
lokalizace IAA



J. Friml

Sledování aktivity genu SCR

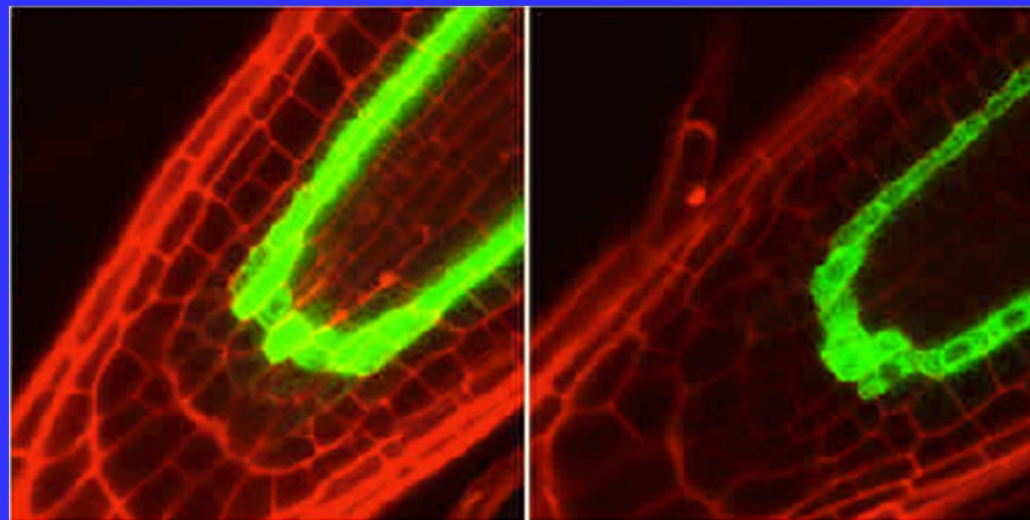
QC



0 days

1 day

SCR::GFP
(Endodermis + QC)



3 days

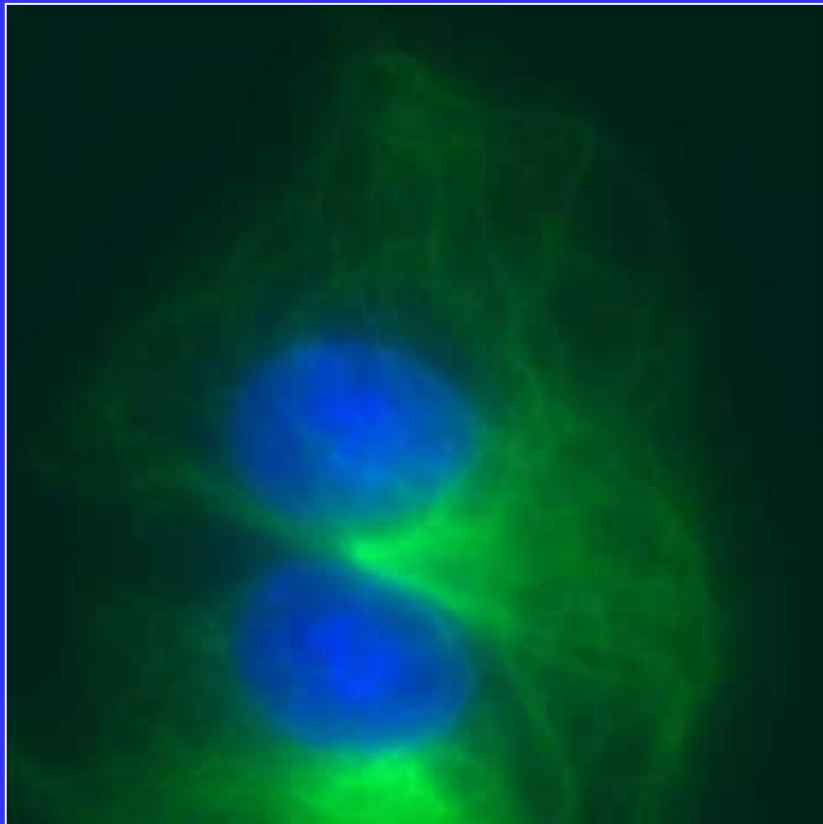
5 days

Regenerace QC

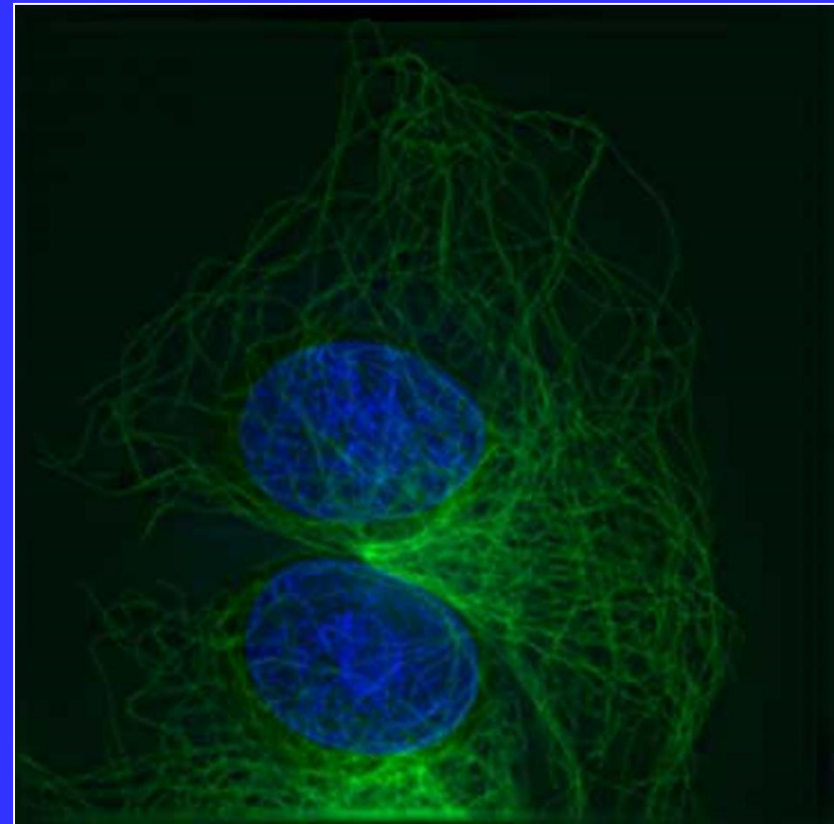
J. Friml

PtK1 buňky: mikrotubuly (protilátka proti tubulinu značená FITC = zelená) a DNA (DAPI = modrá)

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



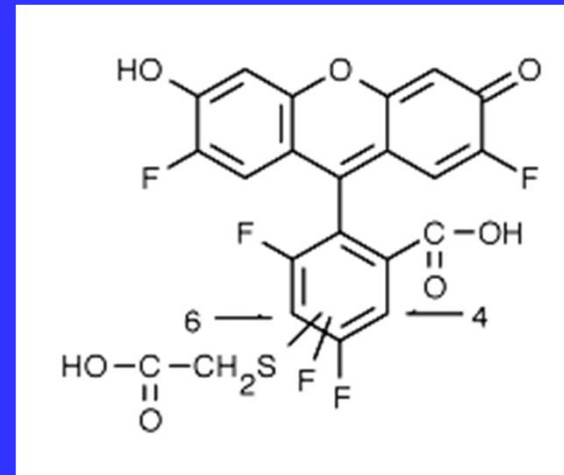
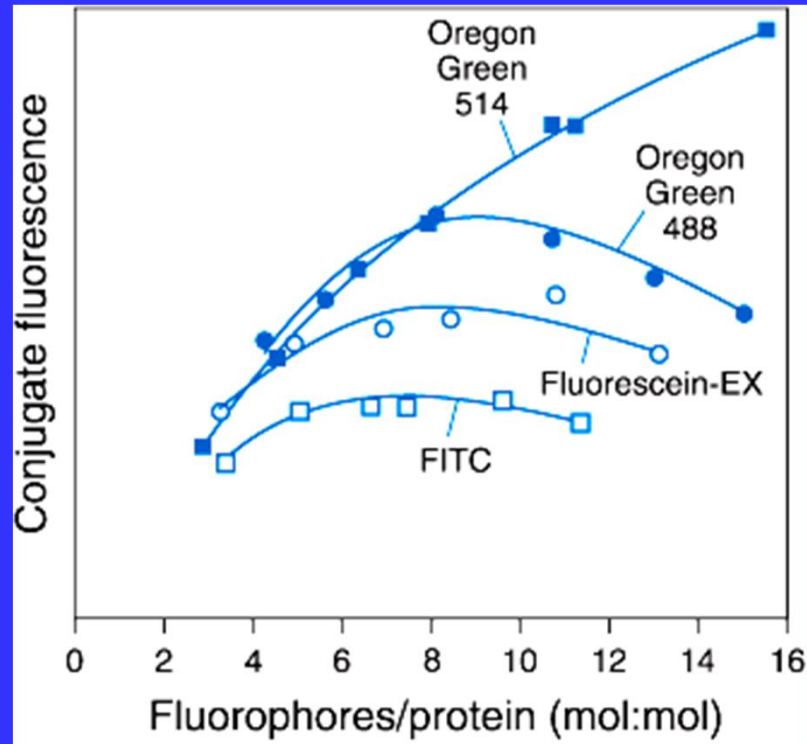
originální snímek



snímek po úpravě

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

Fotostabilita fluorescence



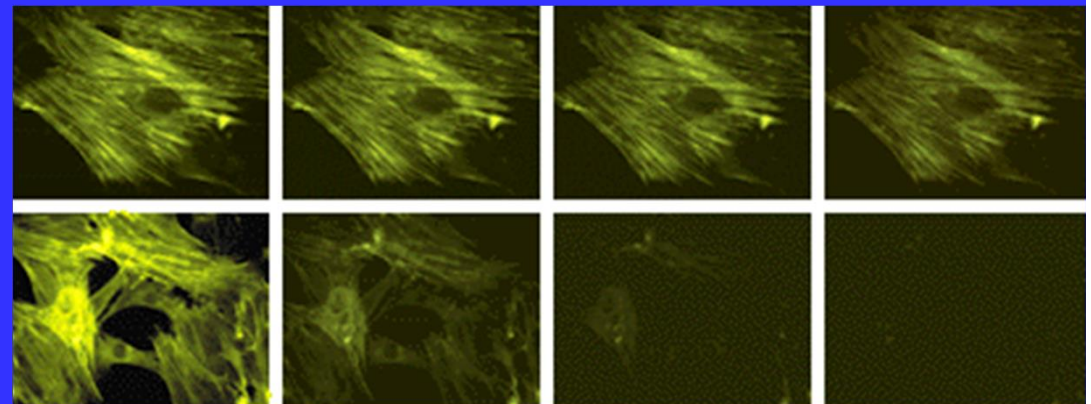
OG514

1s

10s

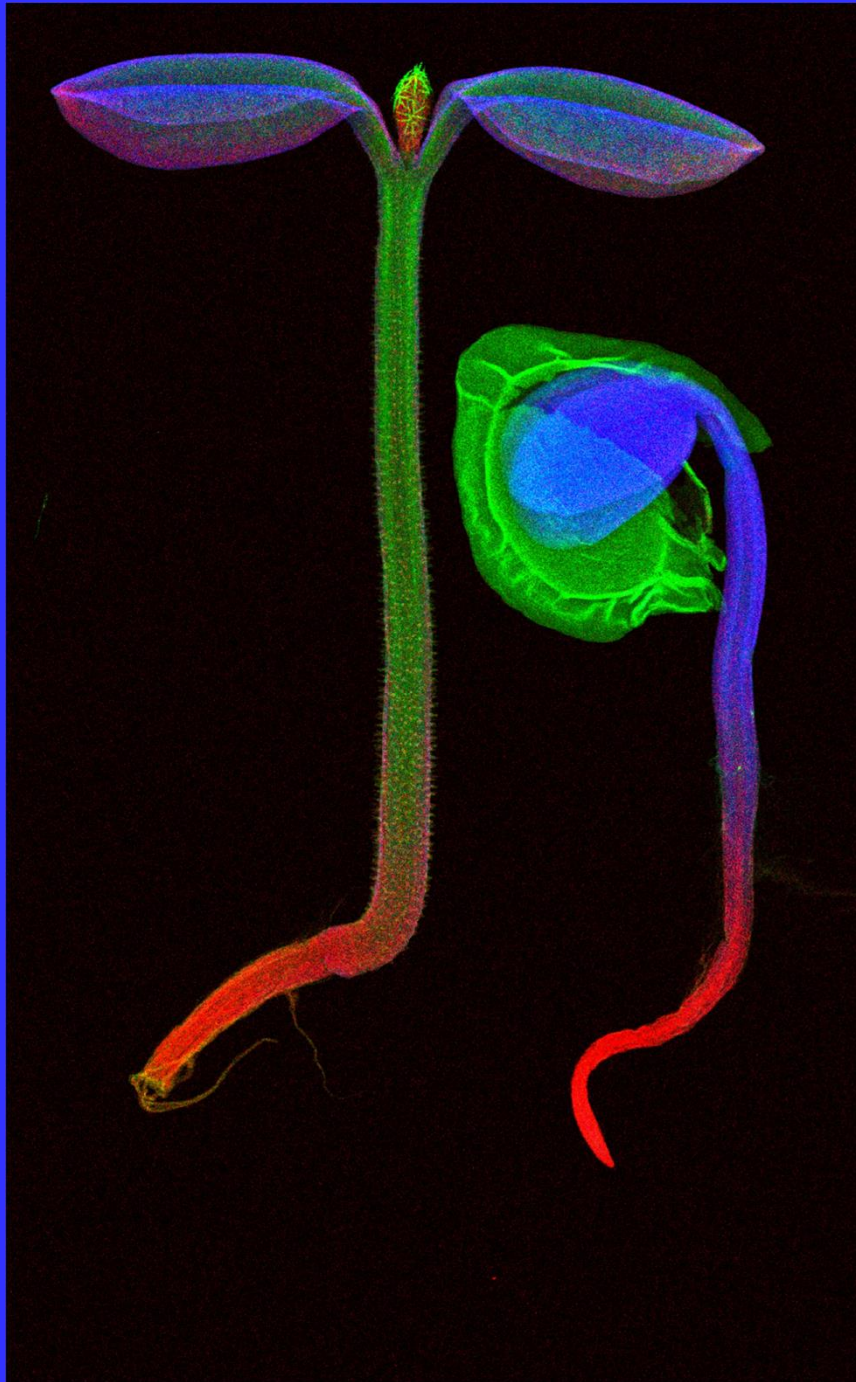
20s

30s



Oregon Green 514 phalloidin

fluorescein phalloidin



X-ray fluorescence microscopy image of the seed capsules of the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum murale*. The red colour shows its structure, whereas the green colour shows calcium, and blue shows nickel.