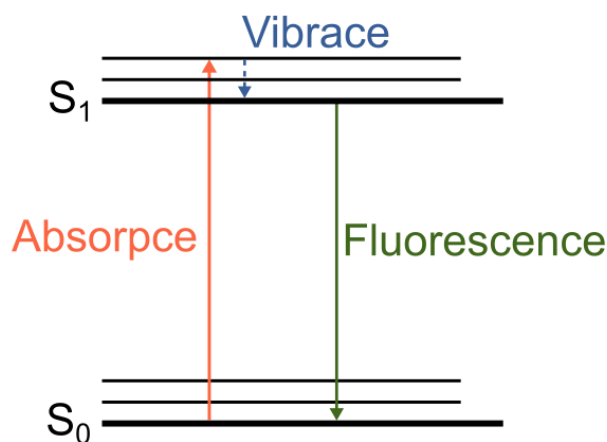


## Co nám v té buňce svítí – Fluorescenční mikroskopie

### Teoretický úvod:

#### Fluorescence

Fluorescence je jev, při kterém molekula *vyzáří/přijme* světlo. Tento jev je spojen se změnou energie *elektronů/protonů* v molekule. .... je po absorbování energie vybuzen do excitovaného stavu a po určité době ( $\sim 10^{-9}$  s) se vrací do základního stavu za rychlého uvolnění energie ve formě vyzářeného fotonu. Tento proces je zobrazen na Jablonského diagramu (Obr.1)



**Obrázek 1: Jablonského diagram zobrazující základní stav ( $S_0$ ) a excitovaný stav ( $S_1$ ) elektronu v molekule a jejich přechody.** Červená čára znázorňuje absorpci, která vybudí elektron do excitovaného stavu a zelená odpovídá přechodu elektronu do základního stavu za současného vyzáření fotonu.

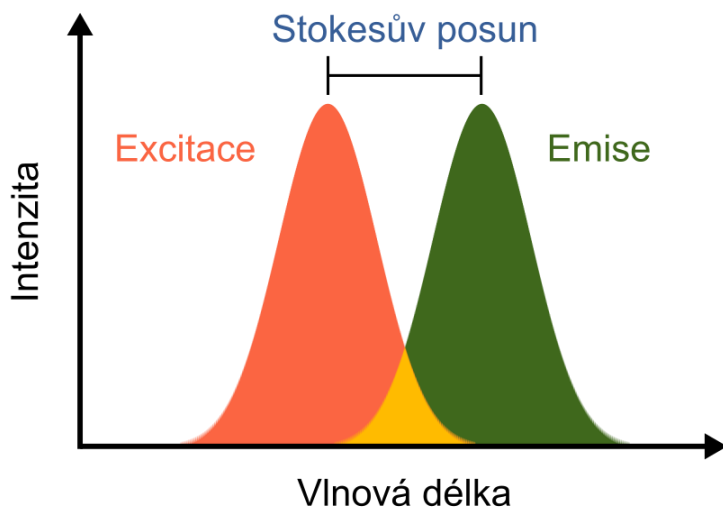
**Úkol 1:** Popište čemu odpovídá modrá šipka (Vibrace)

Absorpce (přijetí energie a vybuzení elektronu) se může nazývat také ..... a fluorescence (uvolnění energie a vyzáření fotonu) se může nazývat **Emise**. Při bližším pohledu na Jablonského diagram zjistíme, že energie emitovaného záření je nižší než absorbovaného. Existuje závislost mezi energií fotonu a vlnovou délkou fotonu.

**Úkol 2:** Spojte pojmy, které jsou ekvivalentní.

Delší vlnová délka	Vyšší energie
Kratší vlnová délka	Nižší energie

Fenomenon posunu vlnové délky záření poprvé pozoroval Sir Stokes v roce 1852. Tento posun vlnové délky byl nazván Stokesův posun (Obr.2).

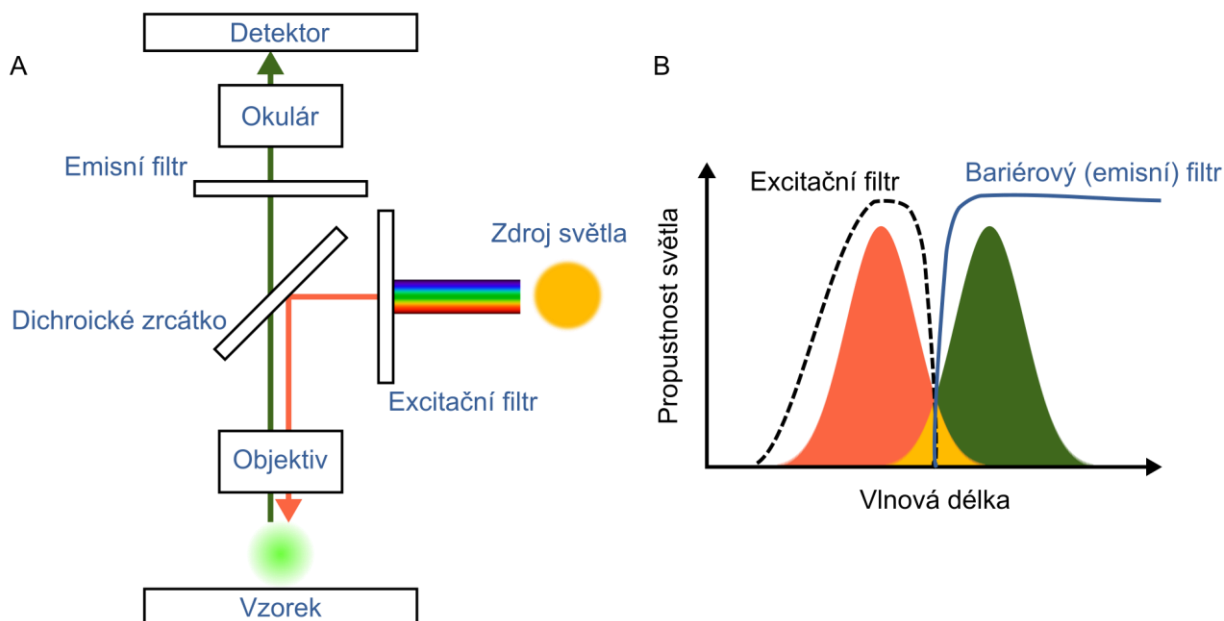


Obrázek 2: Stokesův posun zobrazující excitační a emisní spektrum a jeho Stokesův posun.

### Fluorescenční mikroskop

**Fluorescenční mikroskop** je světelný mikroskop umožňující detekci a pozorování fluoreskujících látek ve vzorku. Nejčastěji využívaný je tzv. .... mikroskop. V tomto uspořádání **excitační světlo prochází** objektivem, dopadá na preparát a **emisní světlo se vrací zpět** do objektivu. Využívá se proto zvláštní typ zrcadla nazvaný ....., které odráží excitační světlo na preparát do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru. Propouštění a odrážení světla je závislé na vlnové délce světla (Obr.3A).

Dalšími nutnými komponenty fluorescenčního mikroskopu jsou **excitační filtr**, který dokáže filtrovat (vybrat) vhodnou část spektra ze světelného zdroje a **emisní filtr (bariérový)**, který přesně vybere oblast spektra vzniklé fluorescence (Obr.3B).



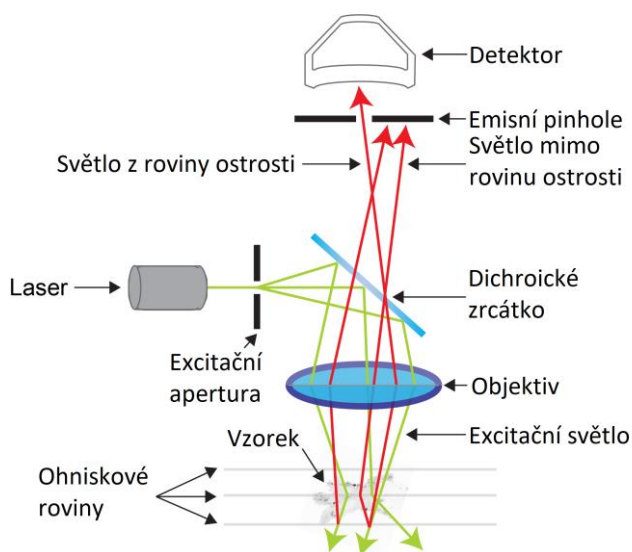
Obrázek 3: Schéma epifluorescenčního mikroskopu (A) a detail propustnosti filtrů pro selekci světla (B).

Kombinace dichroického zrcátka a obou filtrů **pro specifický fluorofor** se do mikroskopu vkládá v celku jako tzv. ...., jejíž dvě strany jsou tvořeny filtry a úhlopříčka je tvořena dichroickým zrcátkem.

**Úkol 3:** Nakreslete dichroické zrcátko a stručně popište jeho funkci.

### Konfokální mikroskop

Podstata **konfokálního mikroskopu** je do značné míry založena na zmíněné fluorescenční mikroskopii. Základním prvkem každého konfokálního mikroskopu je tzv. **konfokální štěrbin**, běžně nazývaná jako ..... Tímto přístupem je mikroskop schopen eliminovat veškeré záření, které nevzniklo přesně v rovině zaostření (Obr. 4). Kvůli odfiltrování značného množství světla je nutné použít ....., jakožto **intenzivní excitační zdroj**. Následně obraz vzniká **postupným skenováním zorného pole**, čímž je získán výsledný obraz oproti klasické fluorescenční mikroskopii *rychlejší/pomalejší*. Detektor v konfokálním mikroskopu zaujímá ....., který je schopen detekovat **jednotlivé fotony** s extrémní přesností. Díky skenování obrazu a eliminaci záření vzniklé mimo rovinu ostrosti *je/není* konfokální mikroskop ideálním přístrojem pro sběr **objemových dat** (Z-stack).



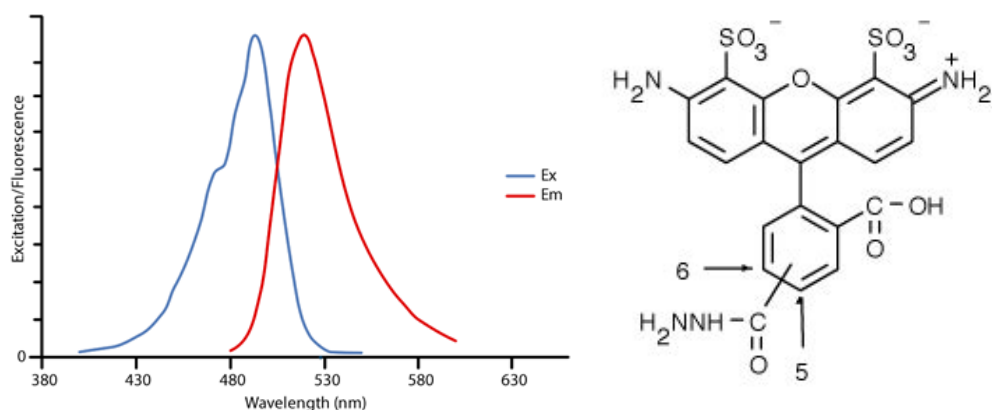
**Obrázek 4: Schéma konfokálního mikroskopu**

### Lidské buněčné linie a značení buněk

Experimenty přímo s lidskými buňkami nám dávají **nejlepší představu** co přesně se v našem těle děje. Samozřejmě není možné dělat experimenty přímo na lidech. Místo toho se používají speciálně upravené linie, které dokážou růst v laboratorních podmínkách. Nejčastěji se používají lidské buňky linie **HEK293T** (Human Embryonic Kidney Cells). Jedná se o linii originálně odvozenou z lidských embryonických buněk *ledvin/jater*.

V našem experimentu ale budeme pozorovat lidskou linii ....., jsou to buňky odvozené od **maligního nádoru** glioblastomu (mozku). Tyto buňky jsou vhodnější pro demonstraci imunofluorescence, jelikož **lépe drží přisedlé** na sklíčku a lépe se s nimi manipuluje.

Specifické části v buňkách nejsou detekovatelné pouhým světelným mikroskopem, proto musíme využít fluorescence. Bohužel proteiny nefluoreskují sami od sebe, proto je potřeba je něčím **selektivně označit**. Proteiny zájmu budou označeny pomocí specifických ..... (primárních) a na ně se bude v druhém kroku vázat sekundární ..... Sekundární ..... na sobě nesou fluorescenční barvičku zvanou **Alexa Fluor 488** (Obr.5).



**Obrázek 5: Excitační a emisí spektrum barvičky Alexa Fluor 488 a její atomární struktura.**

**Úkol 4:** Zkuste ze spekter odhadnout hodnoty vlnové délky, při které bude excitace a emise maximální.

## Praktická část:

### Manipulace se sklíčkem s buňkami

Buňky rostou na krycím sklíčku v 24 jamkové destičce při 37°C. Buňky na sklíčku nesmějí dlouho zůstat suché a zároveň je potřeba hlídat si stranu, na které buňky rostly.

1. Odeberte DMEM medium z buněčné kultury.
2. Promyjte U251 buňky pomocí pufru PBS.
3. Přesuňte buňky do větší promývací destičky.
4. Připravte si kousek parafilmu do tmavé komůrky.
5. Naneste kapku naředěných protilátek na parafilm a opatrně na ni přiložte sklíčko buňkami dolů.
6. Přeneste sklíčko zpět do promývací destičky.

### Využití mikroskopu pro pozorování pylu a konvalinky

Pro první seznámení s mikroskopem se podíváme na fluorescenci řezu konvalinkou. Nejdříve zapněte externí fluorescenční lampu a poté samotný mikroskop.

**Úkol 5:** Nakreslete kousek konvalinky, kterou pozorujete v mikroskopu.

## Využití mikroskopu pro pozorování jádra a $\alpha$ -tubulinu v U251 buňkách

Pro zobrazení jader, která jsou označena barvičkou **fluorescenční barvičkou DAPI** (4',6-diamidin-2-fenylindol). Barvička DAPI je schopná procházet buněčnou membránou a pevně se váže na AT bohaté oblasti v **DNA**. Po vazbě DAPI na DNA se až **20x zesiluje intenzita fluorescence**, protože nedochází ke zhášení fluorescence molekulami vody v roztoku. Excitační maximum DAPI je 358 nm (ultrafialové světlo) a emisní maximum je 461 nm.

**$\alpha$ -tubulin** společně s  $\beta$ -tubulinem tvoří dimerní protein tubulin, který je základním **stavebním kamenem mikrotubulů**. Mikrotubuly jsou důležitou součástí ..... eukaryotických buněk. Tubulin hraje zásadní roli při *dělení/smrti* buněk.

### 1. Epifluorescenční mikroskop

Pro pozorování buněk budeme využívat objektivy se **zvětšením 16x a 40x** oba tyto objektivy potřebují ke svému správnému fungování **imerzní olej**, který omezí rušivé odrazy na krycím sklíčku i na povrchu objektivu, takže se **zvýší i kontrast** zobrazení.

### 2. Konfokální laserově-skenovací mikroskop

Zde využijeme objektiv se **zvětšením 63x**, který také vyžaduje pro správnou funkci **imerzní olej**. Nastavíme dva kanály pro snímání obrazu. Jeden pro značku **DAPI**, kde zvolíme excitační laser **405 nm** a druhý pro značku **AF488**, kde zvolíme laser **488 nm**. Poté nastavíme vhodně rozsah emisních filtrů. Budeme snímat objemová data, tzv. **Z-stack pro získání 3D obrazu**. Následně si ukážeme výsledek a rozdíl oproti klasické epifluorescenční mikroskopii a využití dekonvoluce.

**Úkol 6:** Jakou barvou je DAPI zobrazováno v mikroskopu a jakou barvou je AF488 zobrazováno v mikroskopu? Jak vypadají struktury, které jsou nabarveny?

## Závěr:

**Úkol 7:** Napište svými slovy, co je to fluorescence? Jaké jsou hlavní rozdíly mezi epifluorescenčním a konfokálním skenovacím mikroskopem? K čemu se používá barvička DAPI? Co je to konfokální šterbina?