



FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

principy a použití

Botanická mikrotechnika, podzimní semestr
Hana Cempírková



LUMINISCENCE

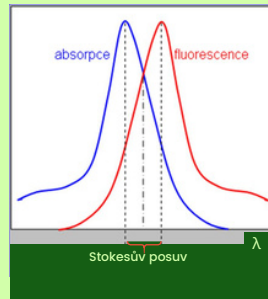
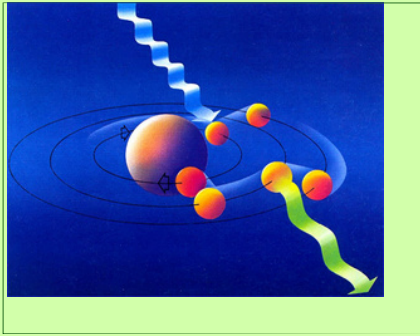
- **objekt absorbuje záření určité vlnové délky, které se vnitroatomovým přeskupením změní na záření o delší vlnové délce**
- **excitace: viditelné světlo, UV, X, ...**



Fluorescence je jedním z typů luminescence. Luminescence je jev, který můžeme pozorovat i v běžném životě nebo v přírodě, ať už jako svítící čísla na ciferníku hodin ve tmě nebo u různých živočichů, jako jsou třeba medúzy.

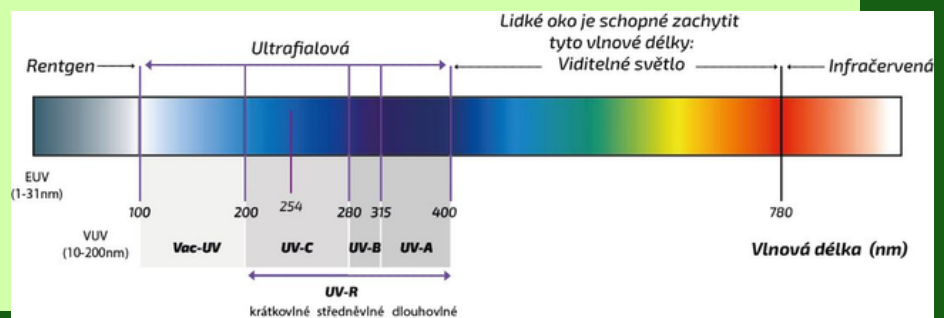
STOKESŮV ZÁKON:

$$\lambda_E < \lambda_F$$



Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii.

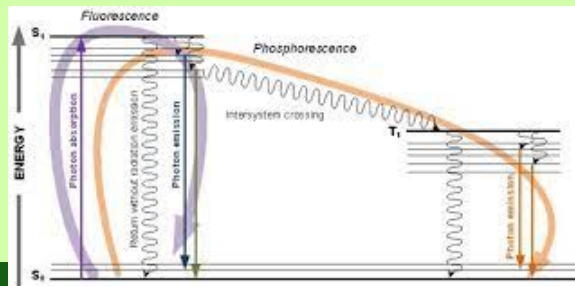
$$E = h \cdot c / \lambda$$



To, že některé objekty mohou po vystavení nějakému záření samy zářit popisuje tzv. Stokesův zákon. V něm se říká, že emitované záření má větší vlnovou délku než to absorbované. Z praktického hlediska to pro nás znamená, že zatímco excitace objektů probíhá při nižších vlnových délkách, třeba i pro člověka neviditelných (jako je UV-záření), tak emitované záření (fluorescence) je už v oblasti vlnových délek viditelného světla.

LUMINESCENCE

- **fosforescence** – vyzařování světla trvá i po přerušení excitace
- **fluorescence** – nemá setrvačnost, záření zaniká po přerušení excitace



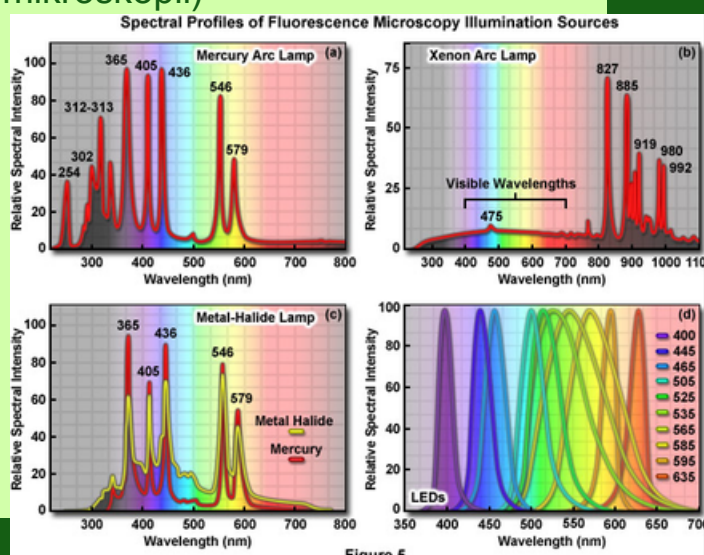
Mezi základní druhy luminiscence patří fosforescence (to jsou třeba ta svítící čísla na ciferníku ve tmě) a fluorescence, kterou využíváme mimojiné pro pozorování objektů v mikroskopii.

SVĚTELNÝ ZDROJ

- Intenzivní a téměř monochromatické záření, tj. NE halogenové lampy
- Xenonové obloukové lampy nebo rtuťové výbojky s excitačními filtry
- Lasery (nejčastěji pro konfokální mikroskopii)



- Výkonné LED



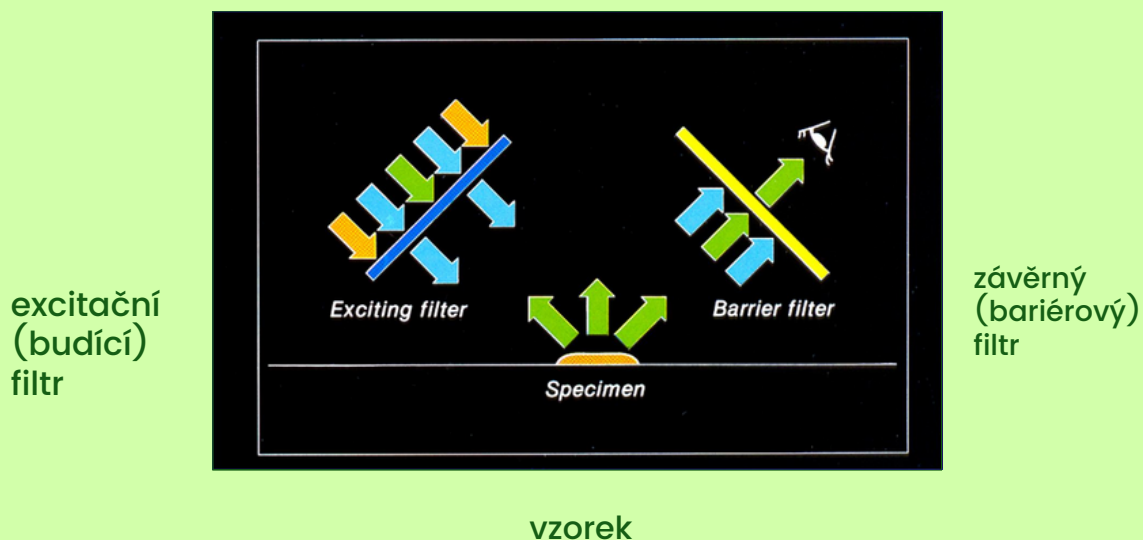
Světelné zdroje pro excitaci objektů musí mít vysokou intenzitu a měly by pokrývat širší spektrum vlnových délek. U konfokálních mikroskopů (které jsou také založeny na principu fluorescence) jsou to pak nejčastěji výkonné LED s úzkou a specifickou šířkou vlnových délek. Na obrázku nahoře vpravo vidíte jeden odpojený světelný zdroj (černá "kostka" s otvorem se namontuje na mikroskop, bílá "krabice" je elektrický zdroj a kromě zapínání (zelené tlačítko) je tam i počítadlo pro přehled, jak dlouho ještě lampa vydrží.

DETEKCE FLUORESCENCE

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

Kromě fluorescenčních mikroskopů existují např. spektrofluorometry, které měří fluorescenci tekutých vzorků, fluorescenční scannery, které se používají např. na snímání elektroforetických gelů nebo průtokové cytometry, které mohou měřit fluorescenci každé buňky (případně i chromozomu) v protékajícím proudu.

PRINCIP FLUORESCENČNÍHO MIKROSKOPU



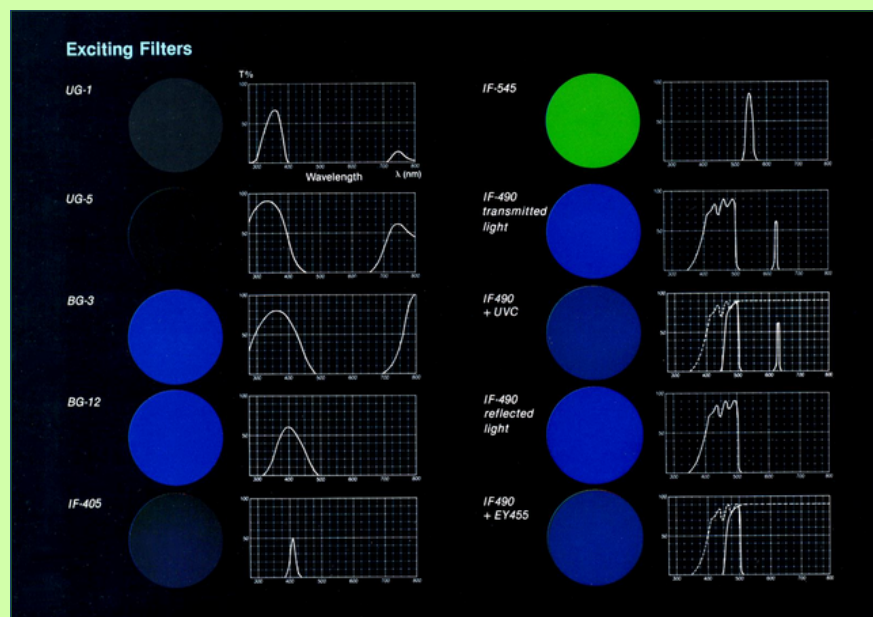
Základním principem při sledování fluorescence je excitace tzv. excitačním (nebo taky budícím) světlem a vzorek pak vyzáří záření jiných (vyšších) vlnových délek. V mikroskopii potřebujeme "vybudit" (neboli excitovat) jen specifické části vzorku, proto je před vzorek umístěn excitační filtr, který propustí jen záření o určitém rozsahu vlnových délek. Při emisi ze vzorku dochází také k vyzáření různých vlnových délek - my si určíme, které chceme sledovat pomocí tzv. závěrového (bariérového, emisního) filtru.

EXCITAČNÍ FILTRY - OLYMPUS

UG = ultraviolet glass

BG = blue glass

IF = interference filter



z katalogu

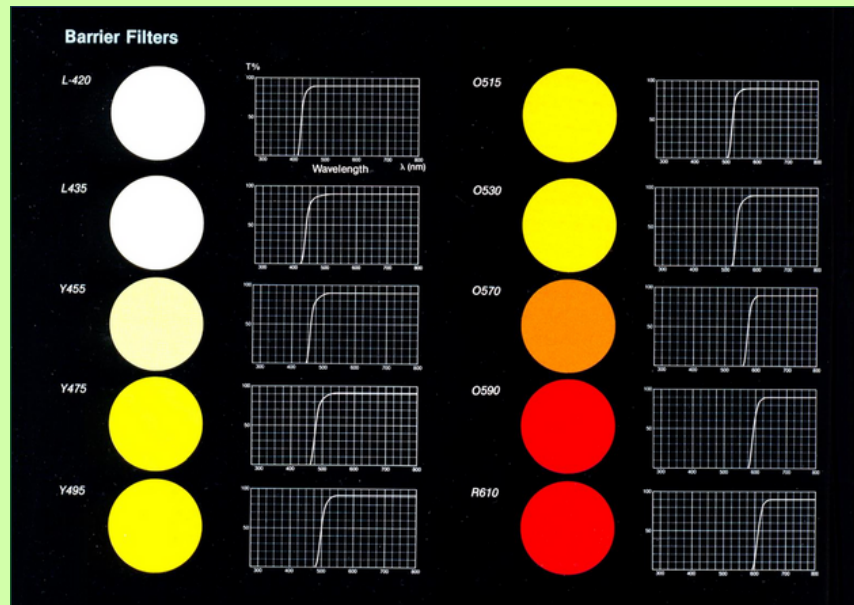
Tady jsou příklady některých filtrů, které dodává ke fluorescenčním mikroskopům firma Olympus: mohou propouštět celkem široký pás vlnových délek v UV nebo modré oblasti, nebo mohou mít relativně tenký pás vlnových délek pro specifičtější excitaci (tzv. interferenční filtry), příp. existují i jejich kombinace.

BARIÉROVÉ FILTRY - OLYMPUS

L = longpass filter

Y = yellow filter

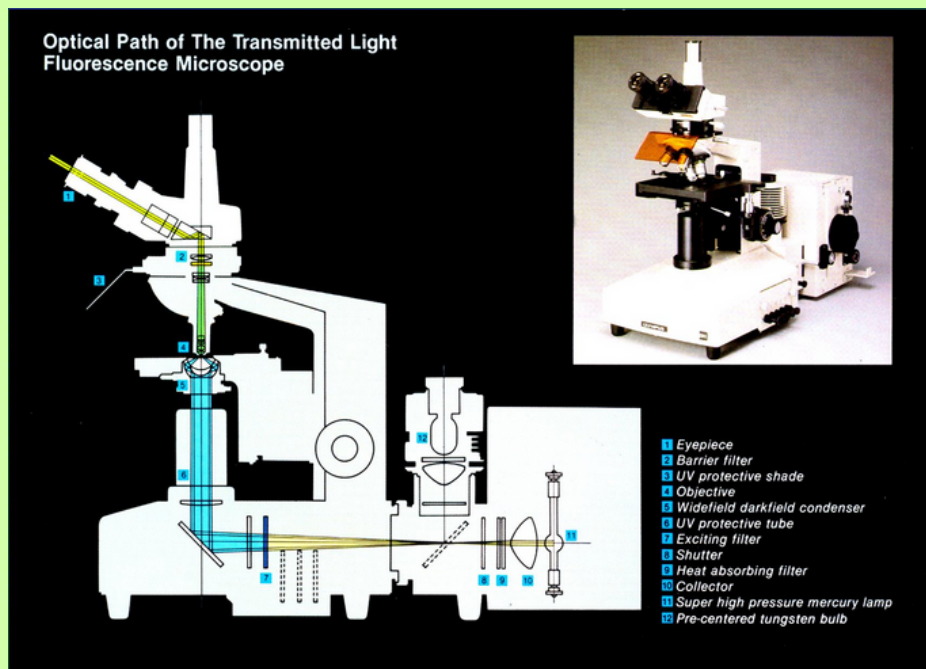
O = orange glass



z katalogu

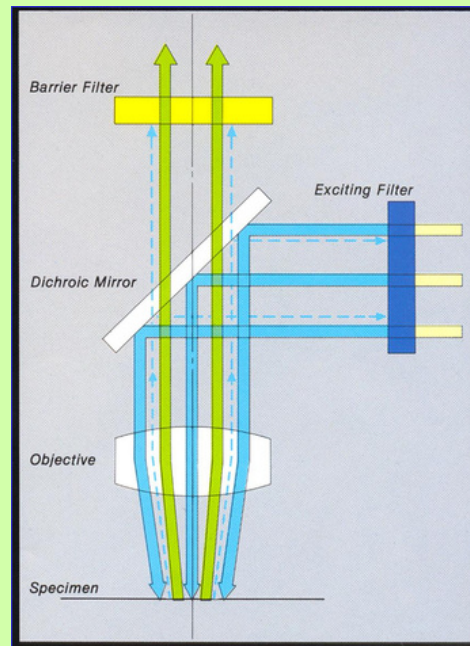
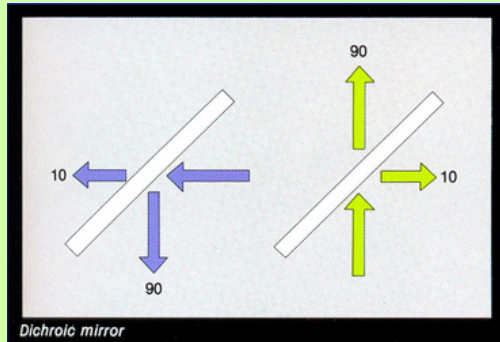
Bariérové (emisní) filtry jsou založeny na jiném principu - propustí všechno záření od určité vlnové délky. Principem správného fungování fluorescenčního mikroskopu je, že vlnové délky excitačního a emisního filtru se nesmí překrývat (pak bychom totiž mohli pozorovat i odražené excitační záření). Např. při excitaci velmi nízkými vlnovými délkami (začátek UV) se použije jako emisní filtr "longpass", ale naopak při excitaci v oblasti modrého záření bude třeba použít oranžový nebo červený filtr, který propustí pouze delší vlnové délky.

Transmisní fluorescenční mikroskop



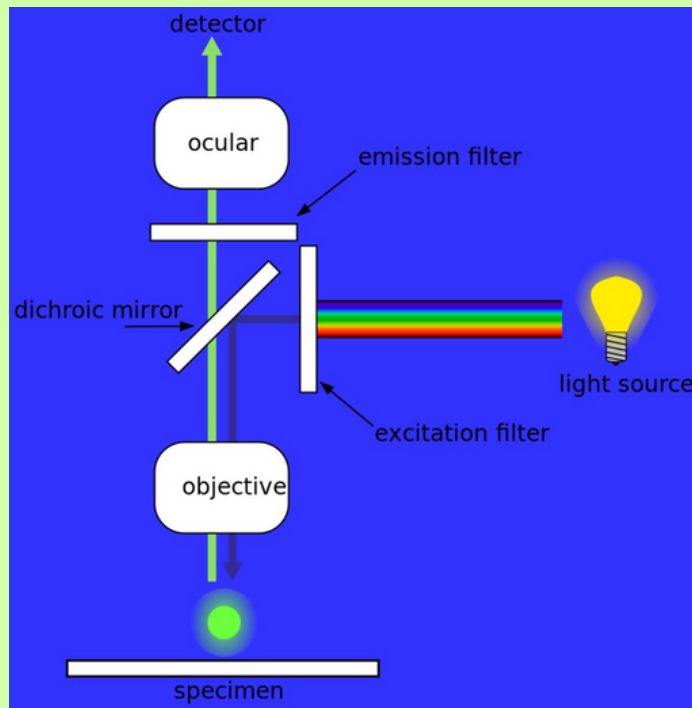
Starším typem je tzv. transmisní fluorescenční mikroskop. Světlo je přiváděno na vzorek stejnou cestou jako je klasický světelný mikroskop. Tento mikroskop má spoustu nevýhod, např. nevyužívá plného potenciálu světelného zdroje, protože osvětluje objekt širokým válcem světla, nebo nutnost používat při pozorování techniku temného pole (excitující světlo je přiváděno ke vzorku formou šikmých paprsků (viz číslo 5 na obrázku).

Dichroické zrcadlo a princip funkce



Vylepšení fluorescenční mikroskopie představuje tzv. dichroické zrcadlo. V tomto zrcadlu se při dopadu světla v jednom směru většina záření odrazí pod pravým úhlem, zatímco v opačném směru většina světla projde skrz.

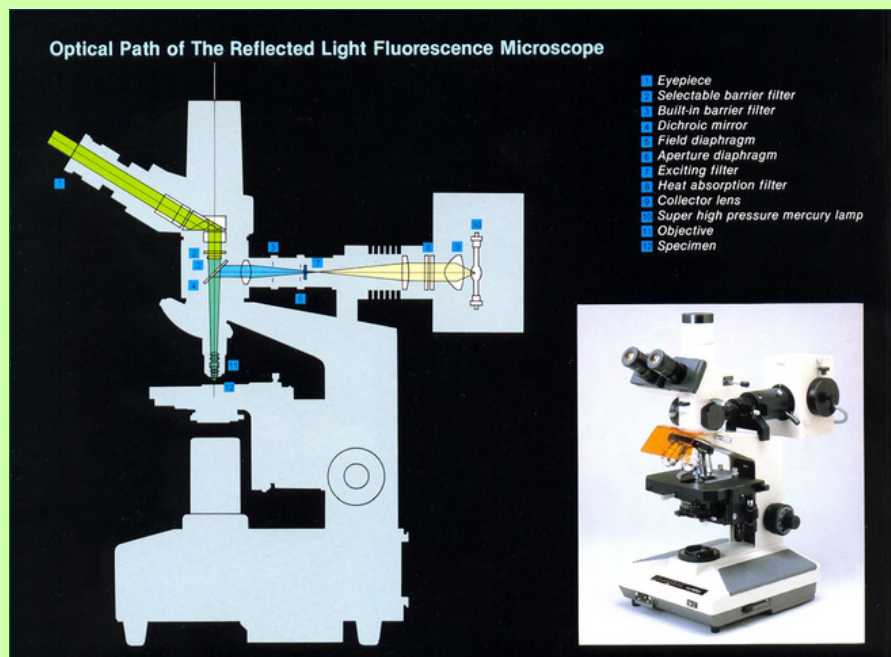
SCHÉMA EPIFLUORESCENČNÍHO MIKROSKOPU



Toto dichroické zrcadlo pak umožnilo konstrukci tzv. epifluorescenčního mikroskopu, ve kterém excitační světlo dopadá na objekt shora. Vyzářené světlo pak prochází dichroickým zrcadlem nahoru a je pozorováno za okulárem.

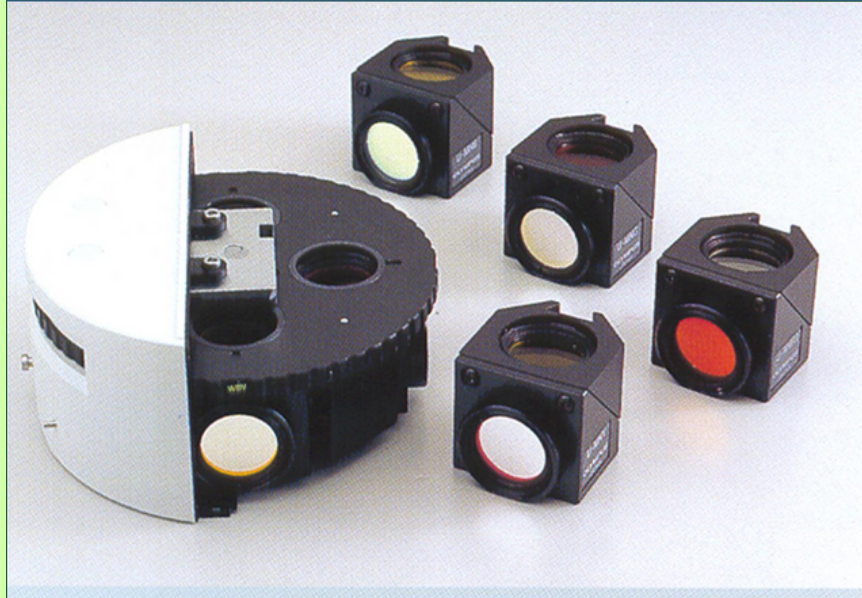
Epifluorescenční mikroskop - Olympus

BX-51



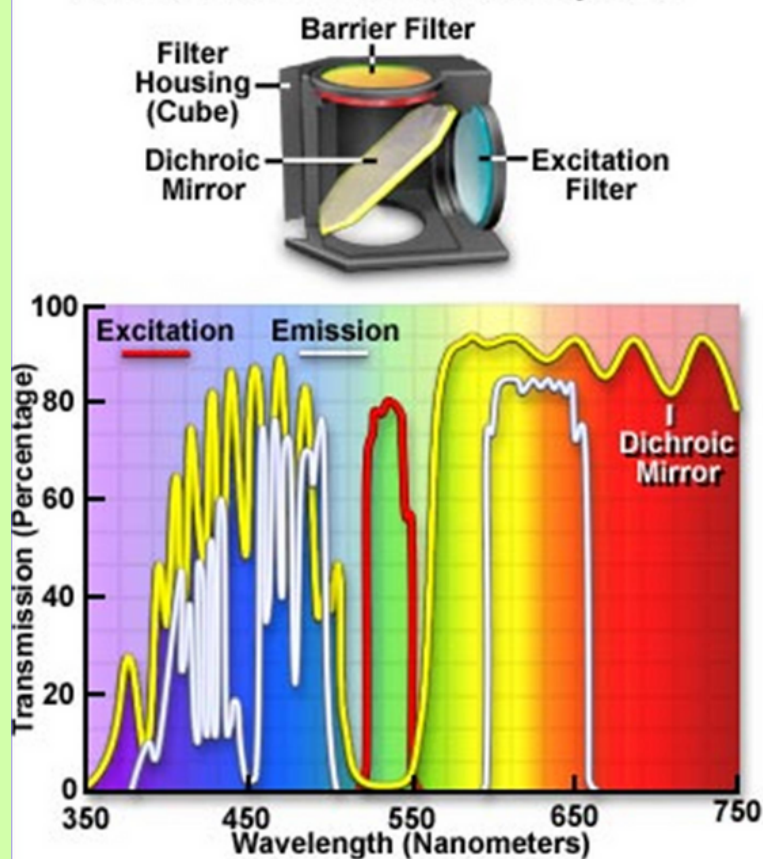
Tady ještě schéma skutečného mikroskopu se znázorněním optických drah.

„Kostky“ = kombinace filtrů a dichroického zrcadla pro epifluorescenci



Protože pro různé aplikace potřebujeme různé excitační a emisní filtry, tak tyto výrobci mikroskopů umísťují do tzv. kostek. Díky otočnému karuselu je pak změna filtrů velmi jednoduchá (a jeden mikroskop můžeme používat pro různé techniky).

Fluorescence Filter Cube and Spectra



Nikon

Konstrukce kostky je jednoduchá: na straně (ve směru, odkud přichází světlo) je excitační filtr, nahoře je bariérový filtr a mezi nimi je šikmo posazené dichroické zrcátko.

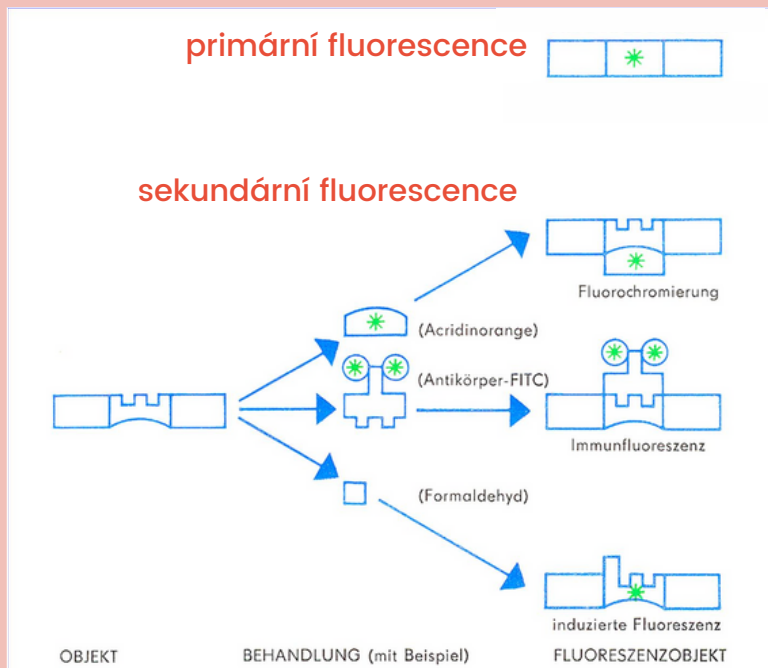
KOMBINACE FILTRŮ (OLYMPUS) A METODY

/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 – 480 490 – 470	515	FITC, Akridinoranž
G	U-MWG2 U-MNG2	DM570	510 – 550 530 – 550	590	Rhodamin, TRITC, PI, Texas red
IY	U-MWIY2	DM600	545 – 580	610	

Když používáte fluorescenční mikroskop, měli byste vědět, jaké kostky máte k dispozici, protože se liší nejenom oblastí vlnových délek, které propouští excitační filtr, ale třeba i šířkou pásu vlnových délek. Široký pás vlnových délek (např. U-MWU2 kostka, W=wide) je sice použitelný pro více barviček, ale úzký pás (např. U-MNU2 kostka, N=narrow) je zase specifitější a emitovaná fluorescence bude "ostřejší" a méně rušená emisí "nechtěných" vlnových délek (např. autorfluorescencí).

Typy fluorescence



autofluorescence

barvení =
fluorochromy

imunofluorescence =
fluorochromem
značené protilátky

indukovaná
fluorescence

Ve fluorescenčním mikroskopu můžeme pozorovat několik typů fluorescence: primární, kterou označujeme jako autofluorescence, a sekundární, která spočívá ve fluorescenci nějaké přidané látky, ať už barvičky, protilátky značené fluorochromem nebo nějakou molekulou, která indukuje fluorescenci (např. formaldehyd).

FLUORESCENCE

- **primární (autofluorescence)** – častá u rostlinných pletiv
 - chlorofyl
 - lignin, suberin
 - pryskyřice, sekundární metabolity
- **sekundární – fluorochromy** – specifická vazba na určité struktury (DAPI, Hoechst 33258)
- značení **GMO fluoreskujícími proteiny** (GFP, YFP)
- **fluorescenční imunohistochemie** – spojuje sekundární fluorescenci s reakcí: antigen x protilátka



vysoká specifická a citlivost

Autofluorescence je u rostlinných pletiv docela častá, což se dá dobře využít (levnější než používání fluorescenčních barviček).

Fluorescenční barvičky (fluorochromy se specificky vážou na určité struktury, takže je umožňují pozorovat (např. jádra, cytoskelet).

1. autofluorescence

Autofluorescence ligninu v xylému a sklerenchymu

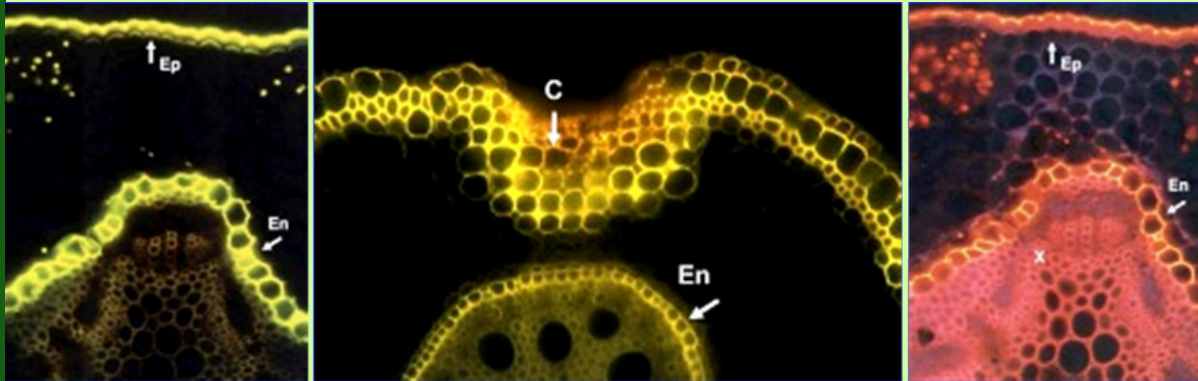
UV excitace

Snímek příčného řezu
cévním svazkem

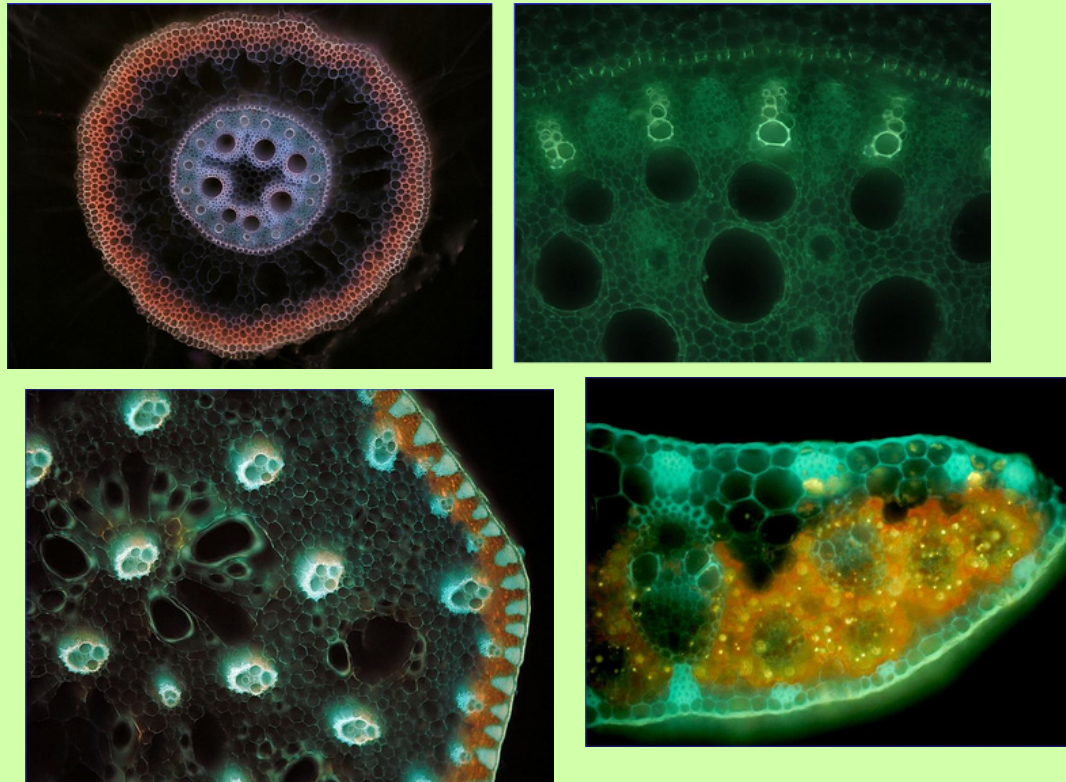
foto-soutěž Nikon,
2004



Příčný řez stonkem



zvýraznění endodermis a sekundárních krycích pletiv



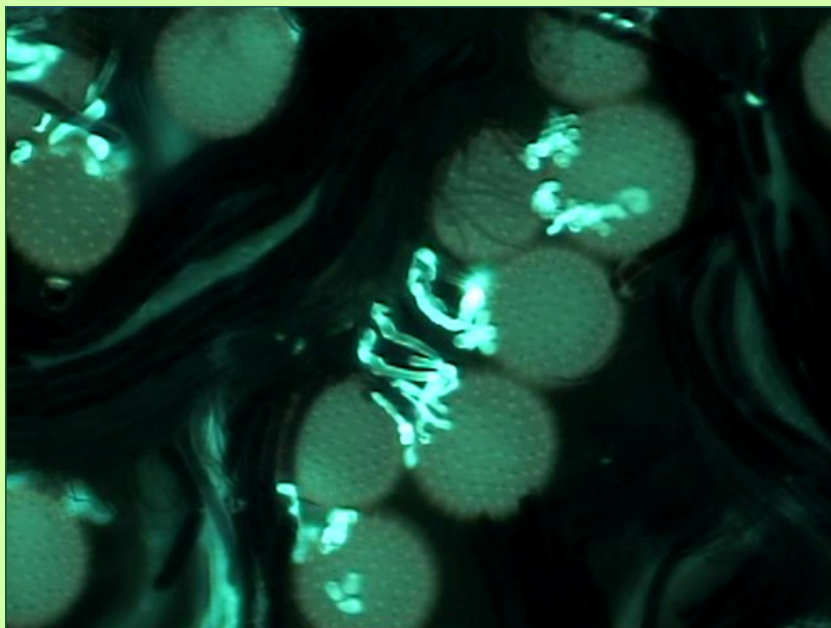
V obrázku nahoře vlevo kromě středního válce kořene můžete pozorovat i vrstvy buněk pod rhizodermis díky fluorescenci sekundárně ztloustlých buněk (tzv. hypodermis).

V obrázku nahoře napravo jde díky fluorescenci suberizovaných buněčných stěn pozorovat endodermis ve stádiu Casparyho proužků.

Na obrázku dole vlevo lze sledovat rozmístnění cévních svazků ve stonku jednoděložné rostliny, na obrázku dole vpravo pak chloroplasty v listu.

2. fluorochromy

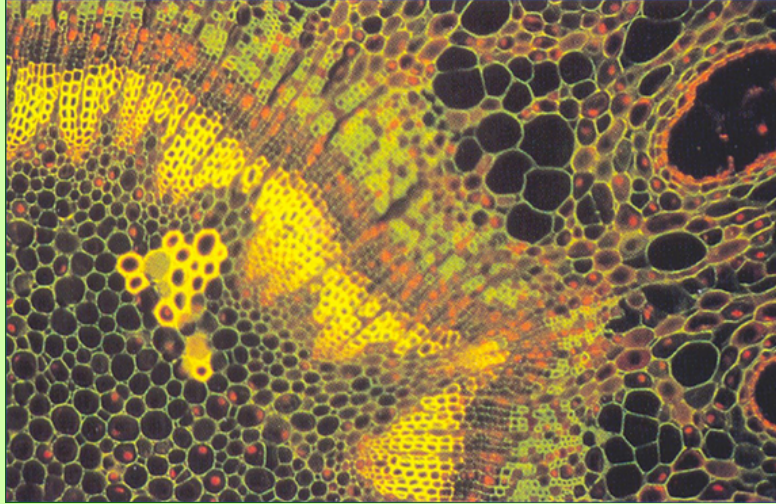
Fluorescence kalózy v pylových láčkách



fluorochrom:
anilínová modř

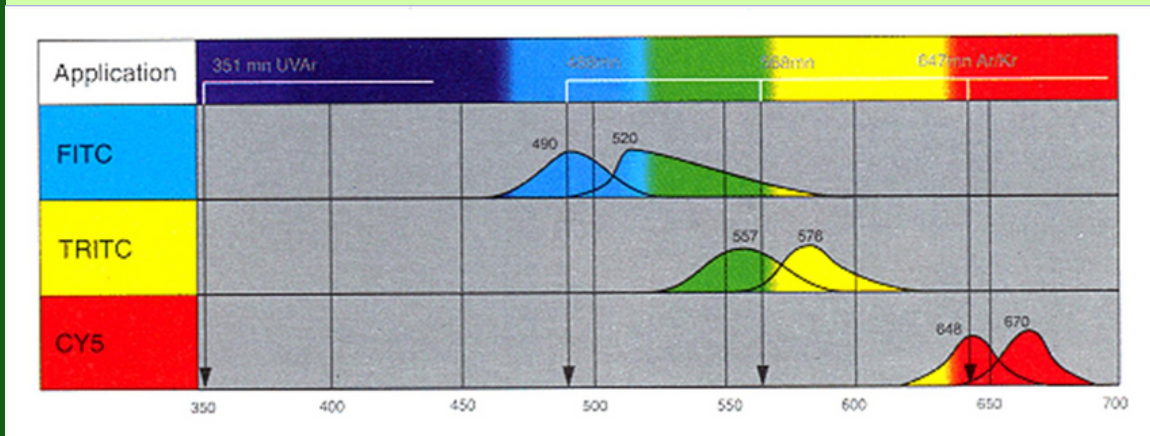
UV excitace

Stonek jedle v modrofialovém světle



barvení akridinovou oranží

Srovnání fluorescenčních barviv



V případě, že chcete pozorovat různé struktury v rámci jednoho objektu, můžete se vybrat takové barvičky, u kterých jsou odlišná excitační a emisní spektra. Tak budete moci pro každou barvičku použít jinou kostku a nakonec si složit obrázek z jednotlivých barev.

3. sledování životaschopnosti buněk

SLEDOVÁNÍ ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK

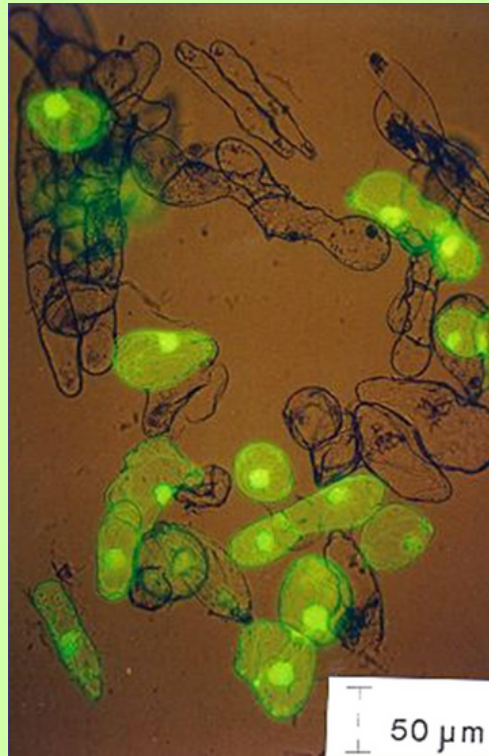
substrát: FDA (fluoresceindiacetát)



esterázy

fluorescein + acetát

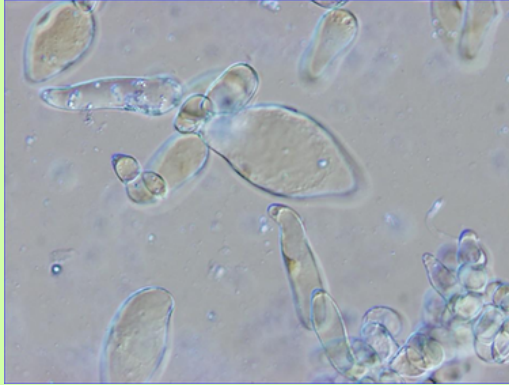
P. Debergh
kombinace obrazu fluorescence a sv. pole



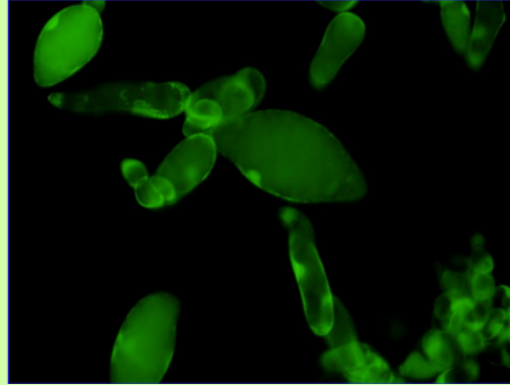
Všechny živé buňky obsahují enzymy, mj. i esterázy. Když FDA vstoupí do buňky (má schopnost rychlého přenosu do buněk), tak esterázy způsobí odštěpení acetátu a molekula fluoresceinu zazáří. Do mrtvých buněk FDA taky vstoupí, ale nedojde tam k odštěpení acetátu, tudíž k žádné fluorescenci.

BUŇKY KALUSU MRKVE

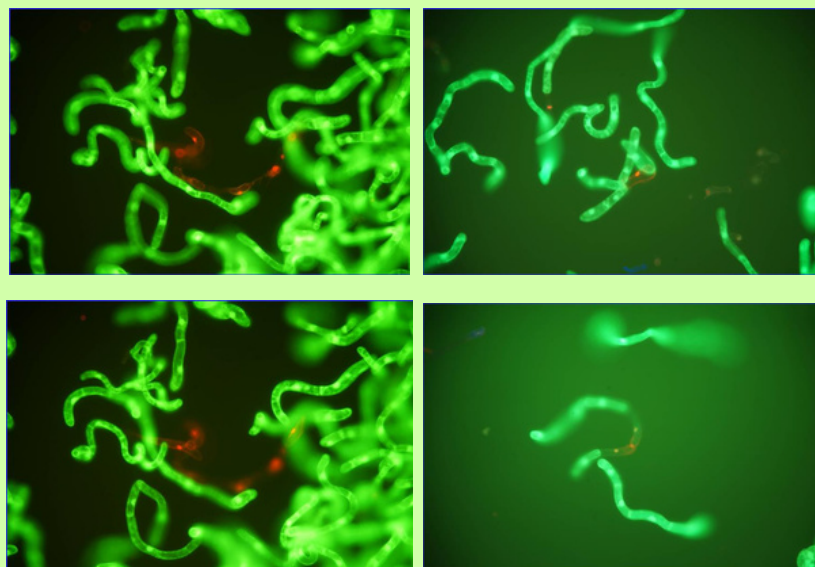
Daucus carota ssp. carota



Nomarského diferenciální
interferenční kontrast (DIC)



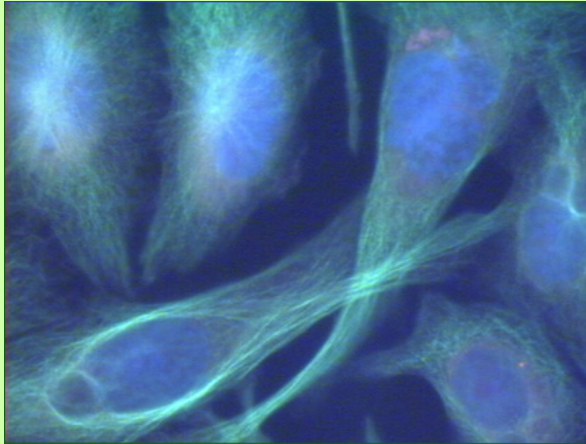
fluorescence živých buněk po
inkubaci s FDA



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

Toto sledování životnosti lze ještě podpořit barvičkou propidiumjodid (PI). To je barvička, která barví jádra (červeně). V živých buňkách červená jádra "přesvítlí" zelený fluorescein, zatímco v mrtvých buňkách vidíme pouze červeně svítící jádra.

Kombinace fluorochromů a filtrů

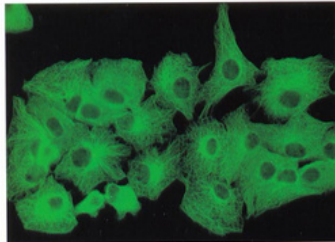


DAPI + FITC

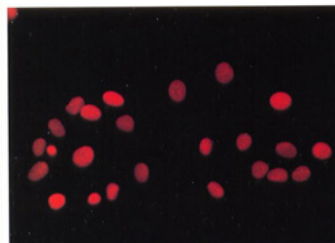
KOMBINACE FLUOROCHROMŮ A FILTRŮ

kultura buněk A549

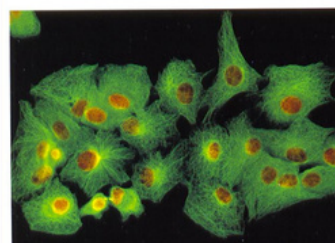
Cell culture (A549): Microtubuli (FITC labelled) and nuclei (PI labelled)



FITC emission (U-MWIBA band pass filter cube)



PI emission (U-MWIG filter cube)



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

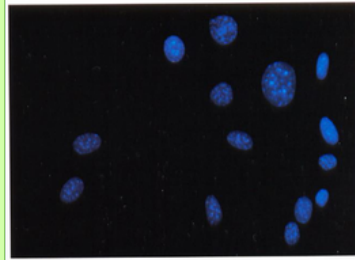
FITC
barví se
mikrotubuly

propidium
jodid
barví jádra

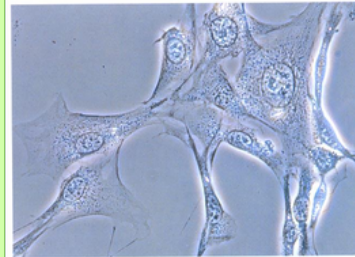
kombinovaný
obraz

Kombinace DAPI a fázového kontrastu

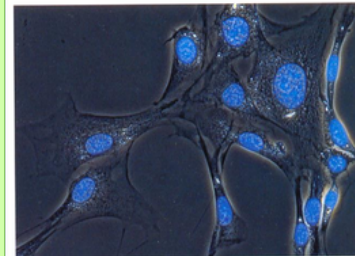
Cell culture (NIH3T3): nuclei (DAPI)



Incident light fluorescence observation.



Phase contrast observation.



The combination of phase contrast and incident light fluorescence observation.

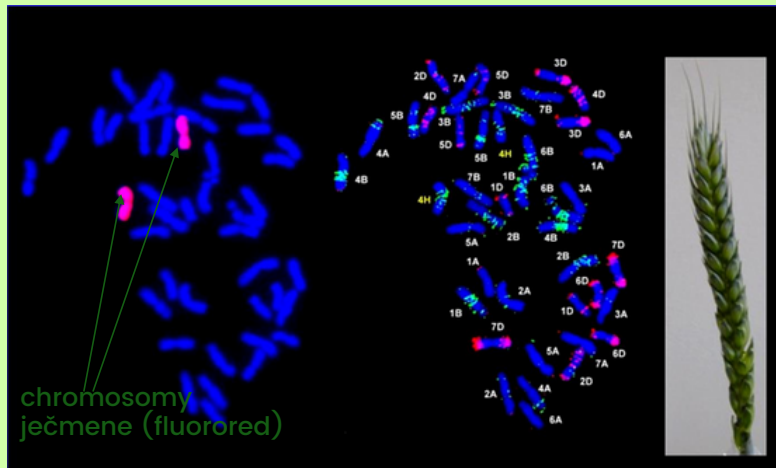
DAPI

fázový
kontrast

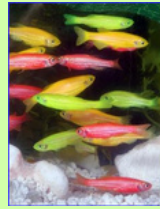
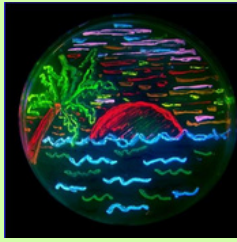
kombinovaný
obraz

FISH (FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE)

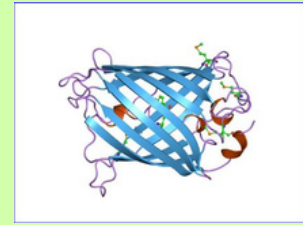
základní metoda molekulární cytogenetiky: podstatou je hybridizace = navázání sondy k chromozomální DNA
sonda = malý fragment DNA značený fluorescenčním barvivem (fluorochromem), který se váže na specifické místo chromozomu.



**Detekce transgenů, detekce aktivity genů
(GFP)**



GFP



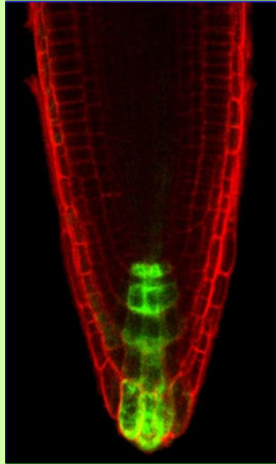
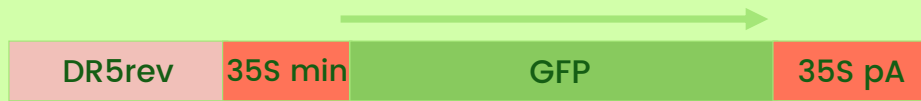
The green fluorescent protein (GFP) is a protein composed of 238 amino acid residues (26.9kDa) that exhibits bright green fluorescence when exposed to light in the blue to ultraviolet range. Although many other marine organisms have similar green fluorescent proteins, GFP traditionally refers to the protein first isolated from the jelly fish *Aequorea victoria*. The GFP from *A. victoria* has a major excitation peak at a wavelength of 395nm and a minor one at 475nm. 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 (*Renillareniformis*) has a single major excitation peak at 498nm.

In cell and molecular biology, the GFP gene is frequently used as a reporter of expression. 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.

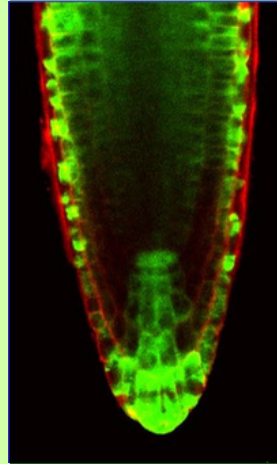
ARABIDOPSIS DR5::GFP AUXIN REPORTER

vizualizace přítomnosti auxinu

J. Friml



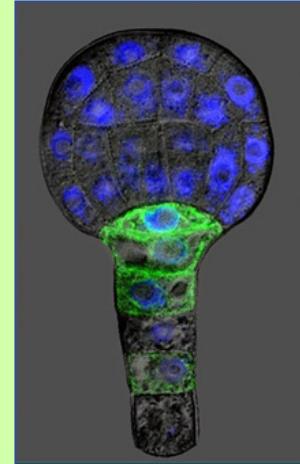
kořen



kořen+ auxin



anti-IAA AB



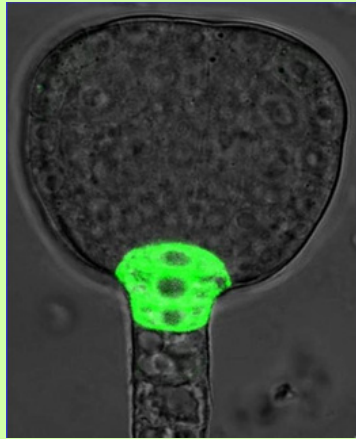
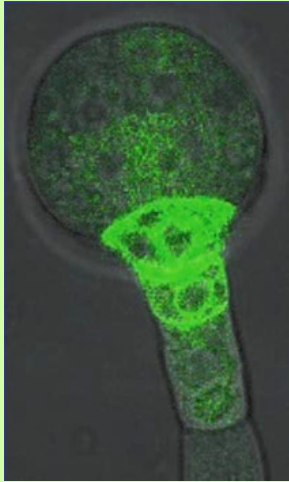
embryo

DR5rev se exprimuje jenom v přítomnosti auxinů (proto tzv. auxinový reportér). Když do stejné sekvence vložíme gen pro GFP, tak se tento bude exprimovat společně s DR5rev (všude, kde se vyskytuje auxin)

**AUXIN V EMBRYOGENEZI
ARABIDOPSIS**

vizualizace přítomnosti auxinu

DR5::GFP



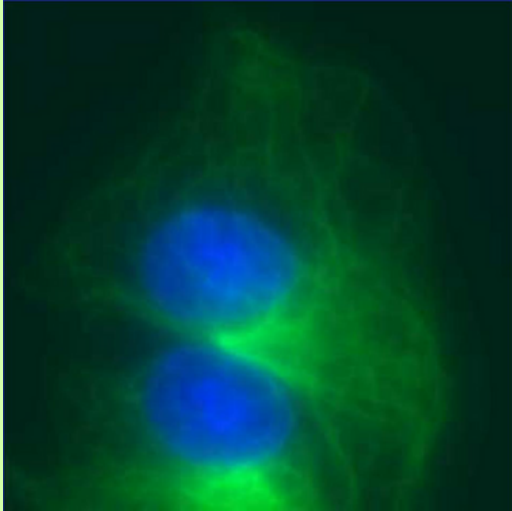
**histochemická
lokalizace IAA**



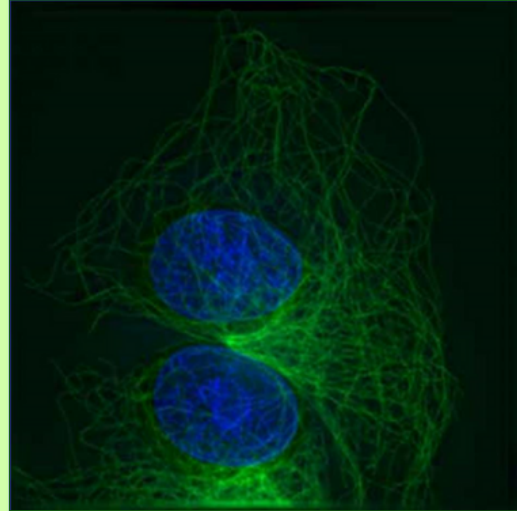
J. Friml

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

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



originální snímek

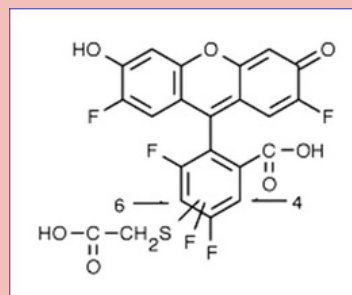
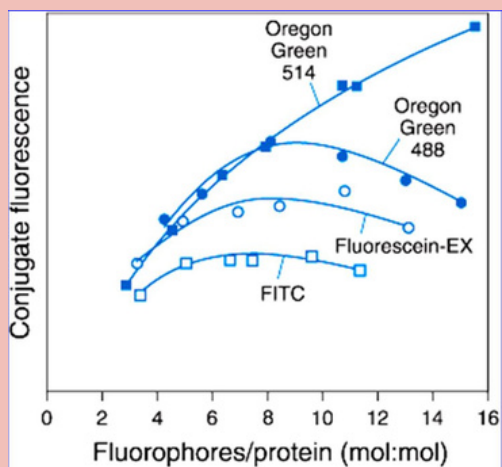


snímek po úpravě

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

Na tomto snímku je ukázána nutnost úpravy snímků - na originálním snímku dochází k "rozmazání" mikrotubulů vlivem záření, které vychází z různých rovin. Tento obrázek je možné zaostřit, aby více odpovídal skutečnosti.

FOTOSTABILITA FLUORESCENCE



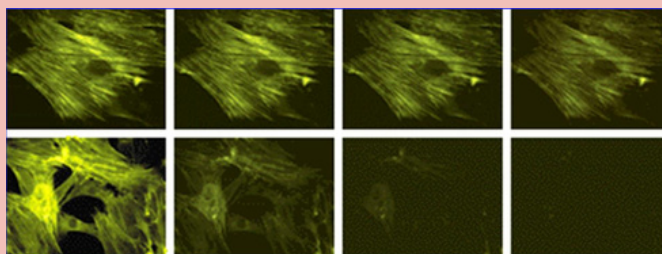
1s

10s

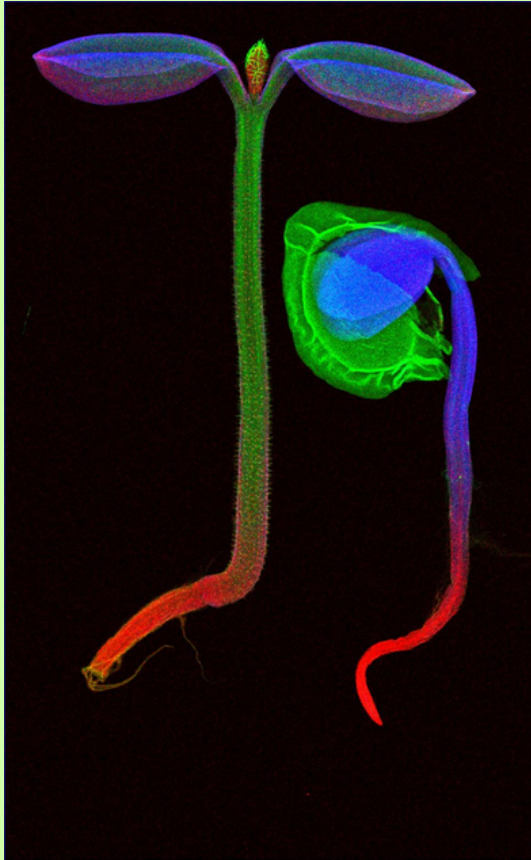
20s

30s

Oregon Green 514 phalloidin
fluorescein phalloidin



Tady chci upozornit na jeden z problémů při používání fluorescenčních barviček - většina se "vysvítí" v relativně krátké době (tzn. nejvíce intenzivní fluorescence je ihned po ozáření excitačním světlem, ale po chvílce začne intenzita fluorescence slábnout a může úplně zmizet). Naštěstí se postupně vyvíjejí i barvičky, které mají delší fotostabilitu.



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.