

0.13  
JAPAN

**Fluorescence**



# Fluorescenční mikroskopie

**Luminiscence** – jev, kdy látka vysílá do prostoru světlo

chemická reakce – chemiluminiscence  
světlo – fotoluminiscence



fluorescence (emisní záření jen krátkou dobu po skončení excitačního záření)  
fosforescence (přetrvává i po zhasnutí excitačního záření)

Vyvolávající záření – excitační

Záření vysílané látkou – emisní (vždy delší  $\lambda$ , barva posunutá směrem k červenému konci spektra)

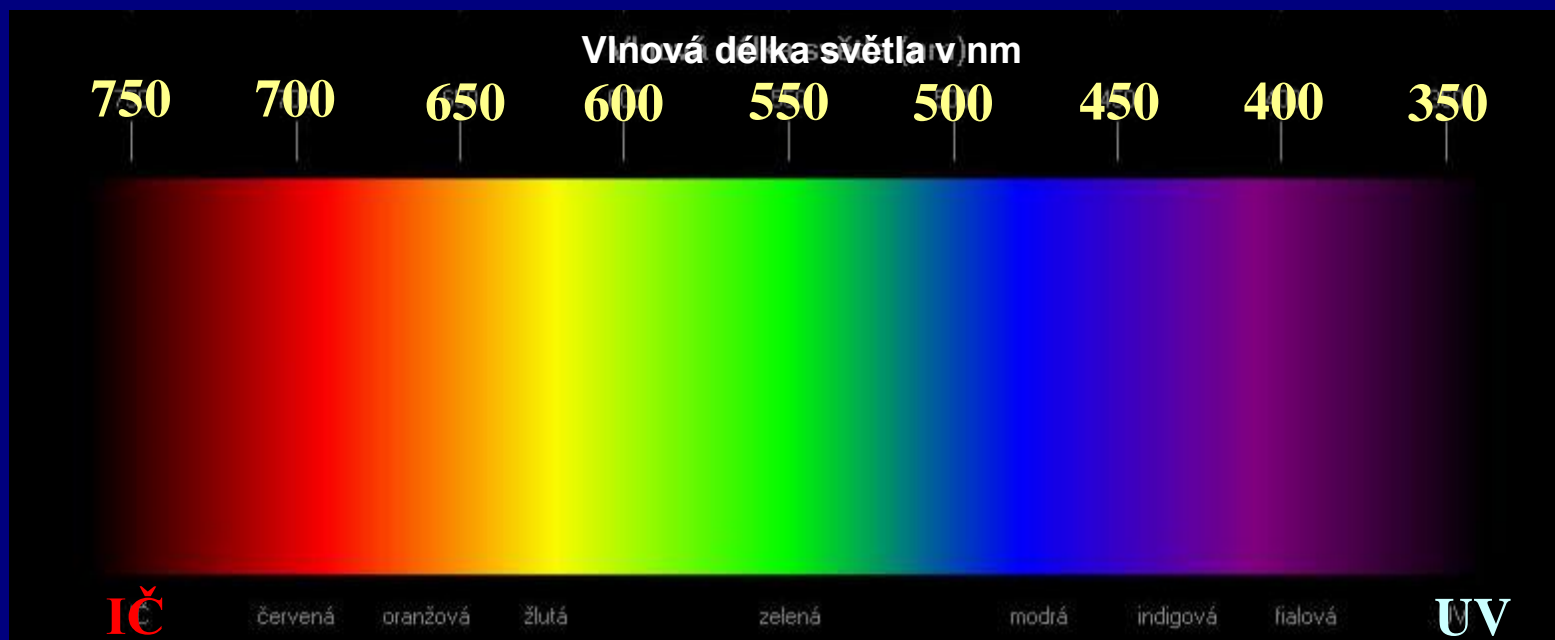
# Fluorescenční mikroskopie

- **Princip fluorescence:**

**Atomy nebo molekuly určitých látek absorbují kvanta vyšší energie (UV záření) a tuto energii opět vydávají v podobě světelného záření o větší vlnové délce (látky fluoreskují)**

Záření je vysíláno **ihned** po vybuzení (excitaci) atomů nebo molekul a odeznívá během asi  $10^{-8}$  sekundy

# Spojité světelné spektrum

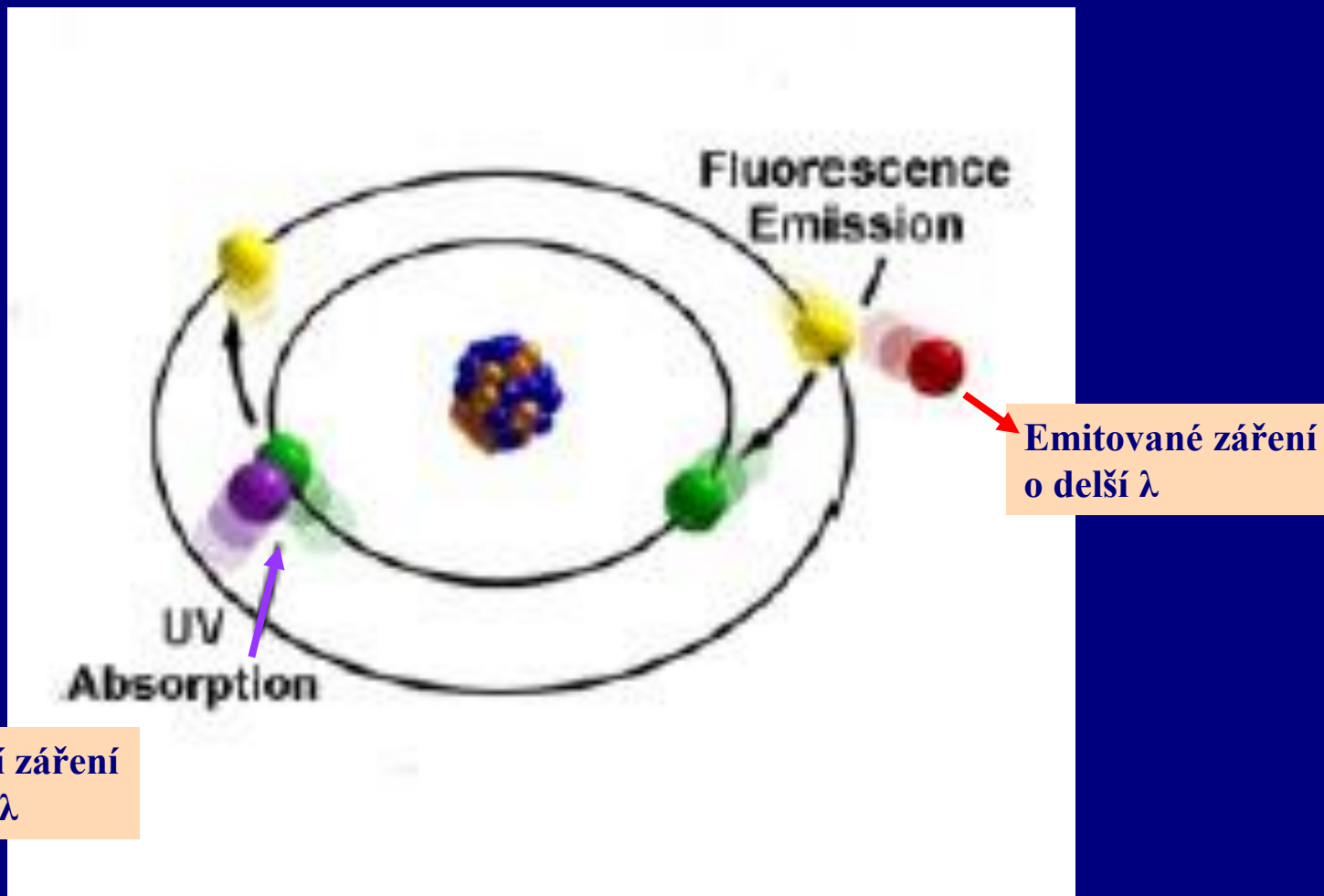


**Sedm barev duhy  
a jejich vlnové délky  
[nm]**

(1 nm =  $10^{-9}$  m)

fialová	390 - 425
indigově modrá	425 - 445
modrá	445 - 500
zelená	500 - 575
žlutá	575 - 585
oranžová	585 - 620
červená	620 - 740

# Stokesovo pozorování:



Excitační záření o krátké  $\lambda$

## Z hlediska zdroje fluorescence rozlišujeme:

### primární fluorescence

(= autofluorescence, vlastní fluorescence)

### sekundární fluorescence

(= nevlastní fluorescence)

- vazba uměle dodaných fluoreskujících barviv,  
**fluorochromů** (= fluoroforů), na určité struktury  
buněk

# Příklad fluorochromů používaných

- v buněčné biologii:

**DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole.HCl) – zvýrazňuje DNA

**FDA** (fluorescein diacetát) – životnost buněk

**Propidium jodid** – životnost buněk

**FITC** (fluorescein-isothiokyanát) - imunofluorescence

**Akridinová oranž** (RNA/DNA) - průtoková cytometrie

- v molekulární biologii:

**Ethidium bromid** (PCR – zviditelnění PCR-produktu)

**Hoechst 33258** (měření  $c$  DNA ve fluorometru)

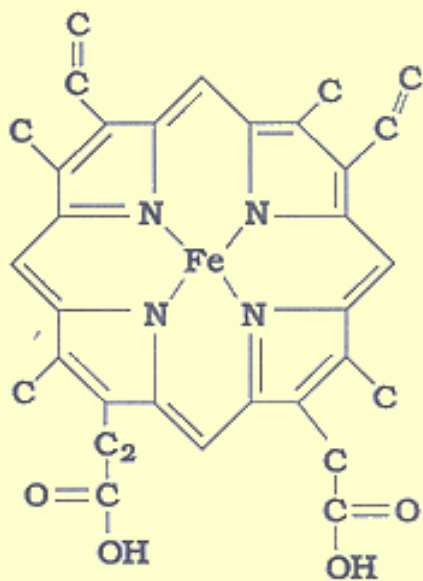
**SYBR Green** (QPCR – kvantitativní, real-time, PCR)

**TaqMan sondy** (QPCR – kvantitativní, real-time, PCR)

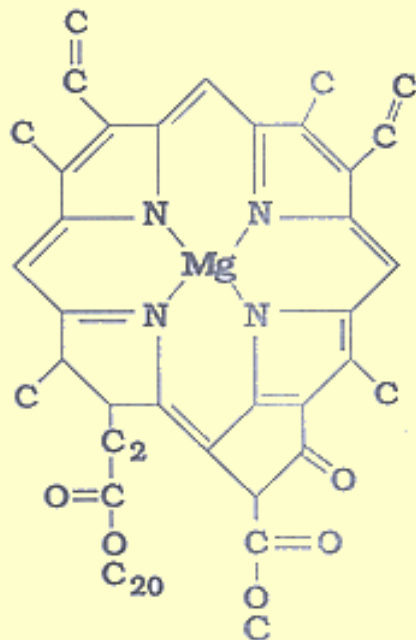
## Autofluorescence

### HEME

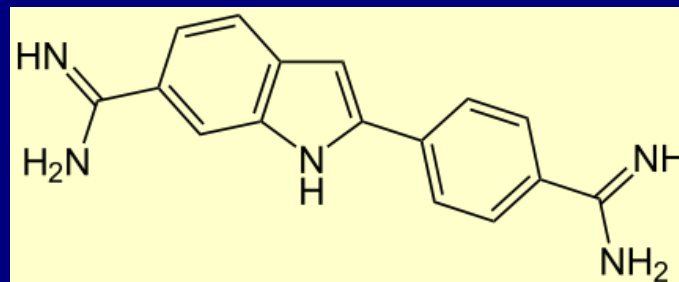
(Oxygen carrying portion of Hemoglobin)



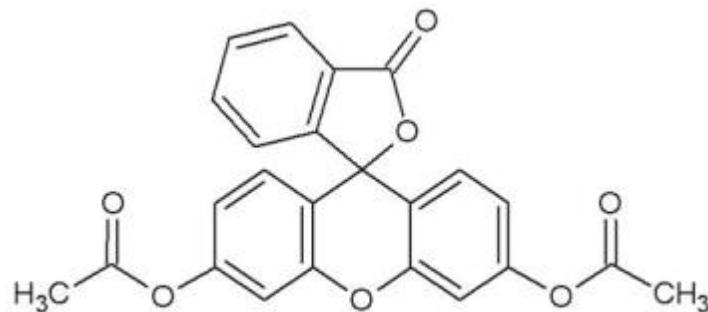
### CHLOROPHYLL



## Sekundární fluorescence



Strukturní vzorec  
fluorochromu **DAPI**



Strukturní vzorec  
fluorescein diacetátu



- **Výhoda fluorescenčních metod:**
  - **velký kontrast zobrazení**
  - **specifičnost** různých fluorochromů na absorpci a emisi světla o určité vlnové délce
  - **velký výběr fluorescenčních značek** (kovalentní vazba) **a sond** (nekovalentní)
  - **citlivost**  
(možnost zachycení přítomnosti pouhých 50 molekul v  $1\mu\text{m}^3$  (= 1 nl,  $10^{-9}$  l); nízká koncentrace barviva)

- **Nevýhoda:**

**rychlé vysvicování fluorescence** (fotobleaching)

- **fluorofory se vlivem intenzivního záření rozkládají, a ztrácejí tak schopnost excitace a emise**

- **nutnost minimalizace působení excitačního světla**

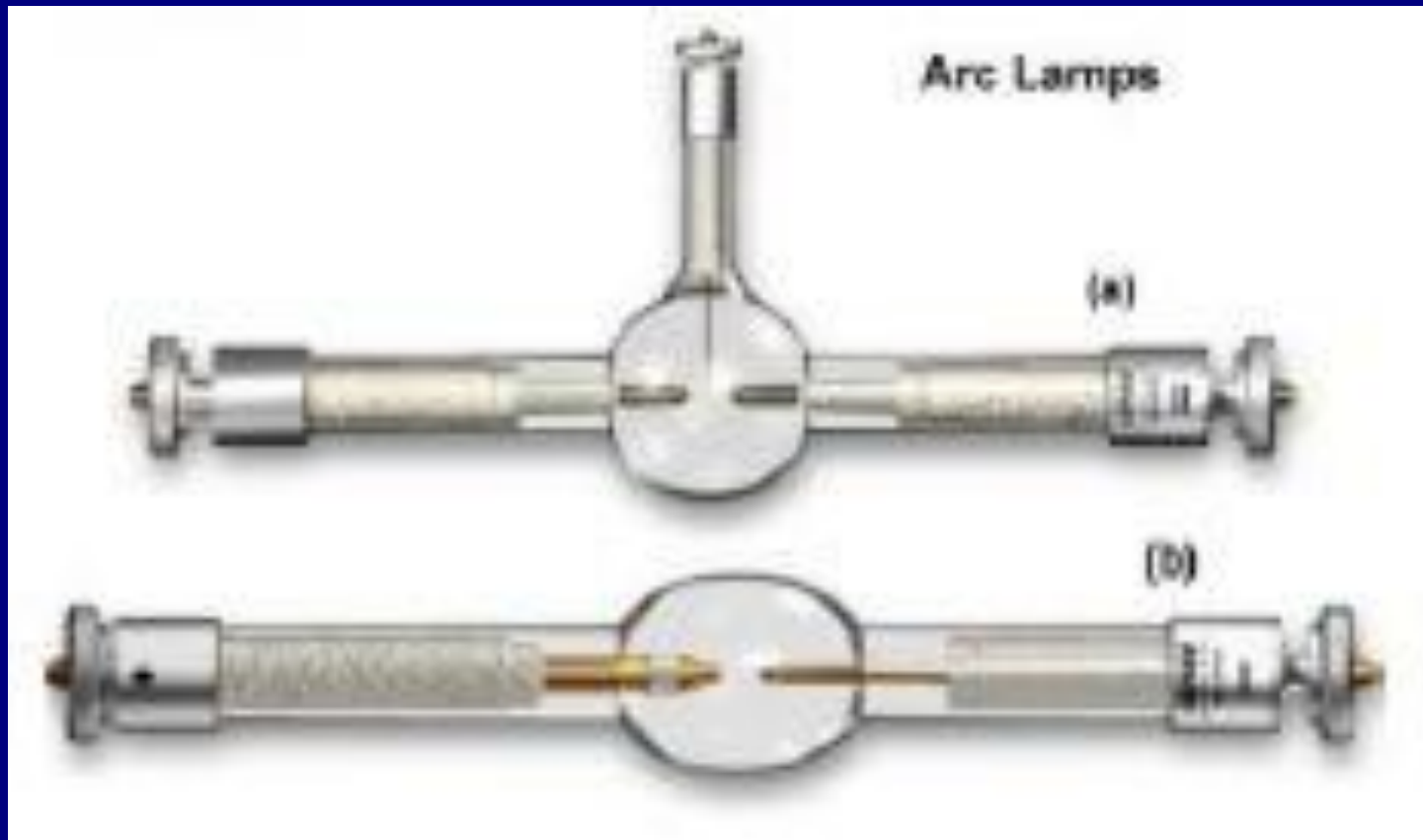
# Základní části fluorescenčního mikroskopu:

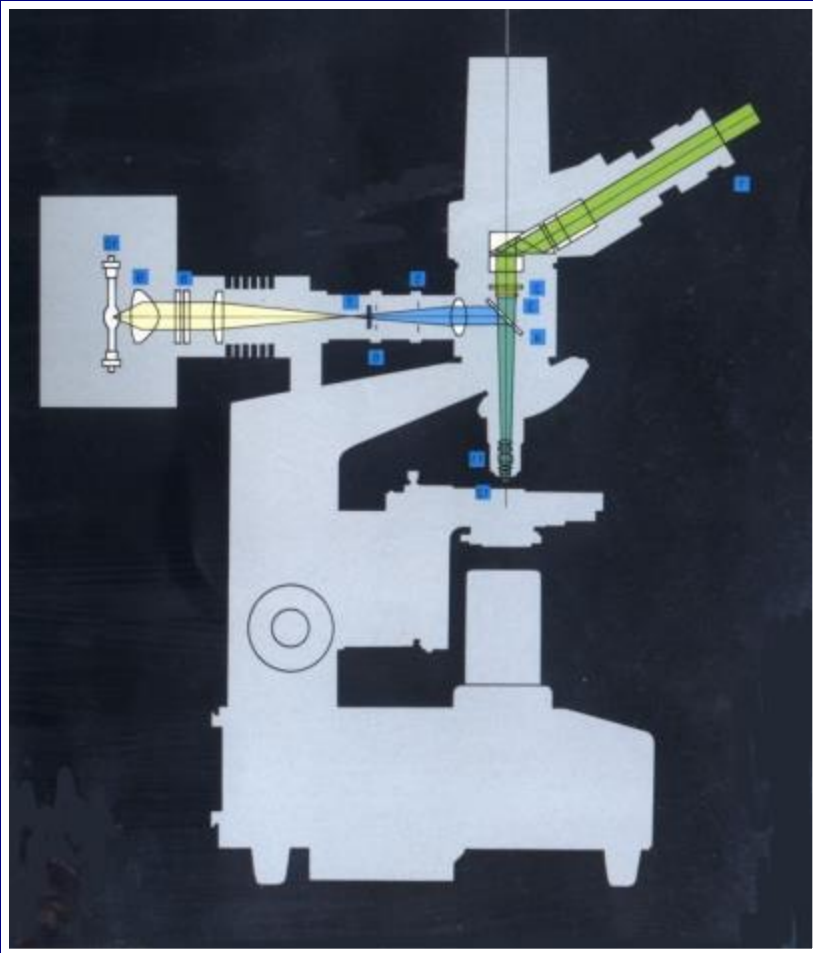
- **zdroj UV záření** (vysokotlaká rtuťová výbojka, pozor na zapínání a vypínání lampy)
- **excitační (budící) filtry**
  - ze světelného zdroje selektivně vymezují záření o určité vlnové délce vhodné ke vzbuzení fluorescence
- **ochranné (uzavírající, bariérové, zábranné) filtry**
  - zadržují excitační světlo vnikající do okuláru a odstraňují tak záření škodlivé pro oko
  - + ochranný UH kryt

## Základní části fluorescenčního mikroskopu:

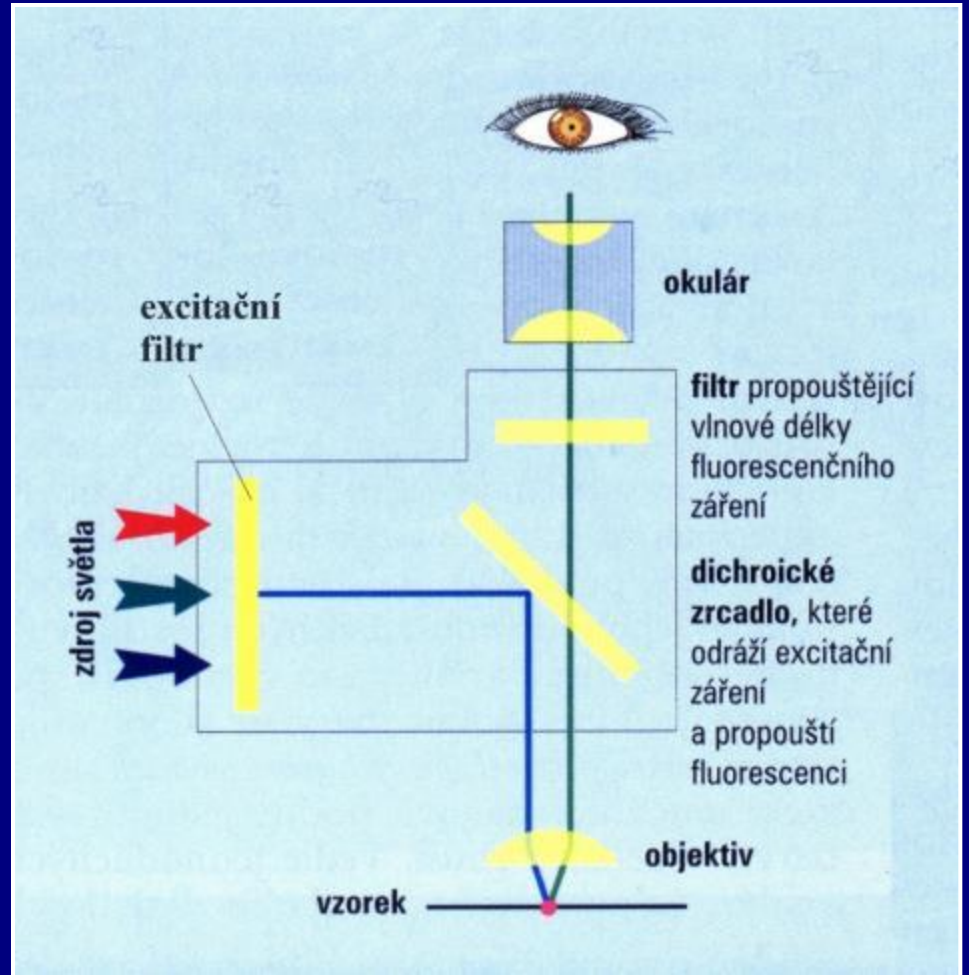
- **vhodná optika** - křemenná nebo zrcadlová
  - objektivy s co největší světelností (tj. s velkou NA)
- **dichroické zrcadlo** – speciální optický filtr (viz dále)

# Zdroj světla: rtuťová výbojka





**Epifluorescence – chod paprsků mikroskopem**



**Schéma fluorescence**

# Funkce excitačního a bariérového filtru



**Excitační filtr**

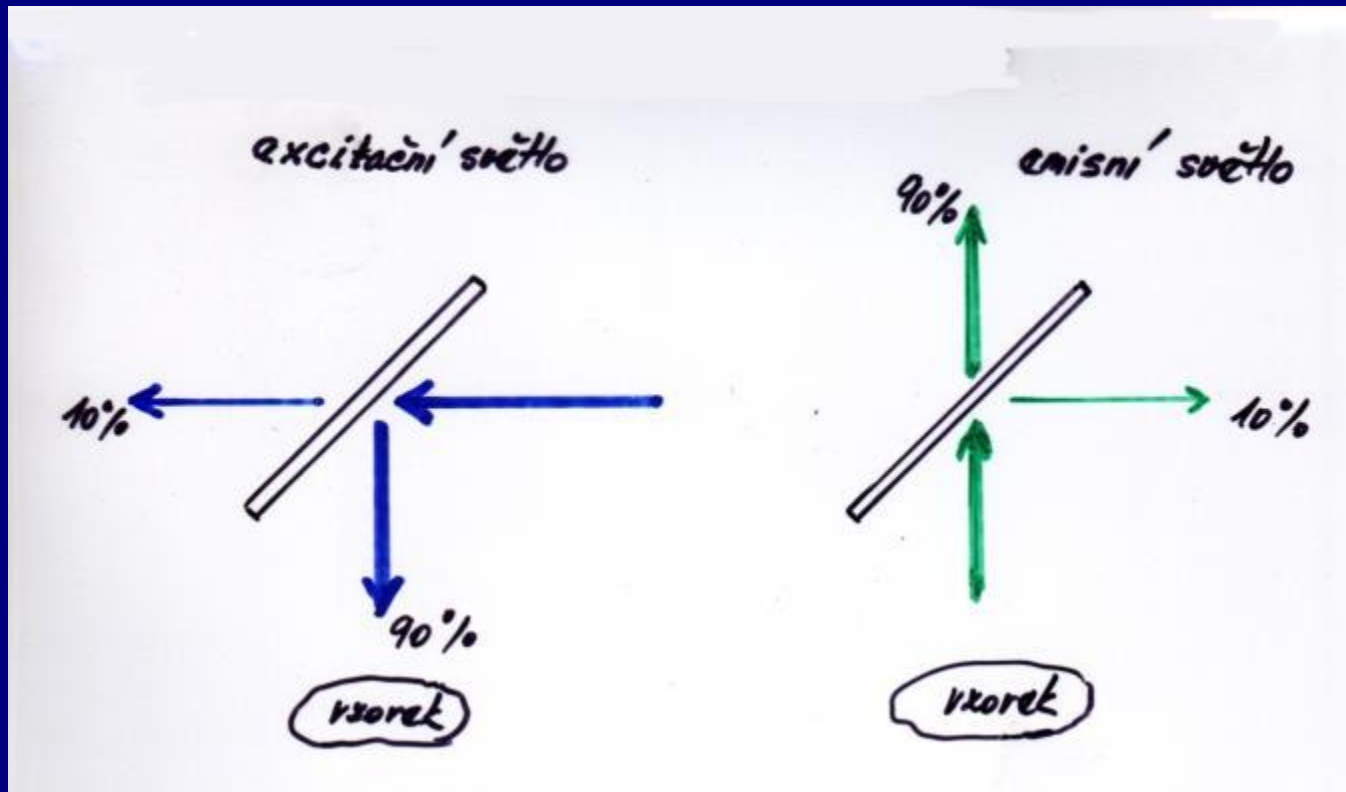
**Bariérový filtr**

**Vzorek**

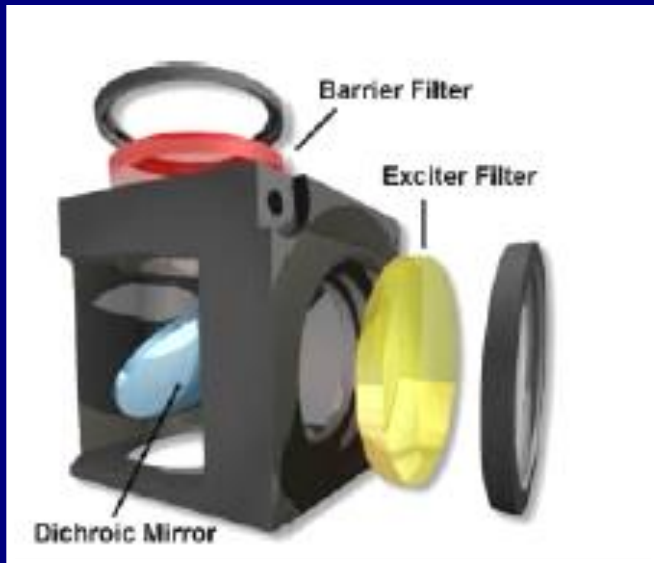
**excitační záření**

**emisní záření**  
(delší vlnová délka)

# Princip dichroického zrcadla







**Stavba fluorescenční kostky**

**Revolverový výměník**



**Umístění fluorescenčních kostek v mikroskopu**

## U – excitace (DAPI) – WU kostka

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole.HCl)

- excitace 372 nm (fialová)
- emise 456 nm (modrá)

## B – excitace (FITC) - WB kostka

FITC (Fluorescein-isothiokyanát)

- excitace 490 nm (modrá)
- emise 520 nm (zelená)

- **Aplikace fluorescenčních technik při studiu buňky:**
- **kontrastování buněčných struktur v živých i fixovaných buňkách**  
(NK, jádra, jadérka, chromozómy, organely, cytoskelet, buněčná stěna....)
- **detekce apoptózy, studium buněčného cyklu**
- **rozlišení živých a mrtvých buněk - testy životaschopnosti buněk**  
(fluorochrom fluorescein diacetát, propidium jodid)
- **detekce bakterií aj. patogenů (kvasinek, plísní, fytoplazem)**  
v pletivech nebo tkáních, sputu, moči a likvoru

- **Aplikace fluorescenčních technik při studiu buňky:**
- **fluorescenční indikace pH, měření koncentrace intracelulárních iontů, monitorování membránového potenciálu, sledování transportu látek membránou, interakce léčiv s membránou, atd.**
- **imunofluorescenční techniky (viz dále)**
  - **lékařská diagnostika, imunologie, hematologie, genetika**

Pokud nenajdeme vhodný fluorochrom pro přímou fluorescenci ,  
využijeme

## Imunofluorescenci

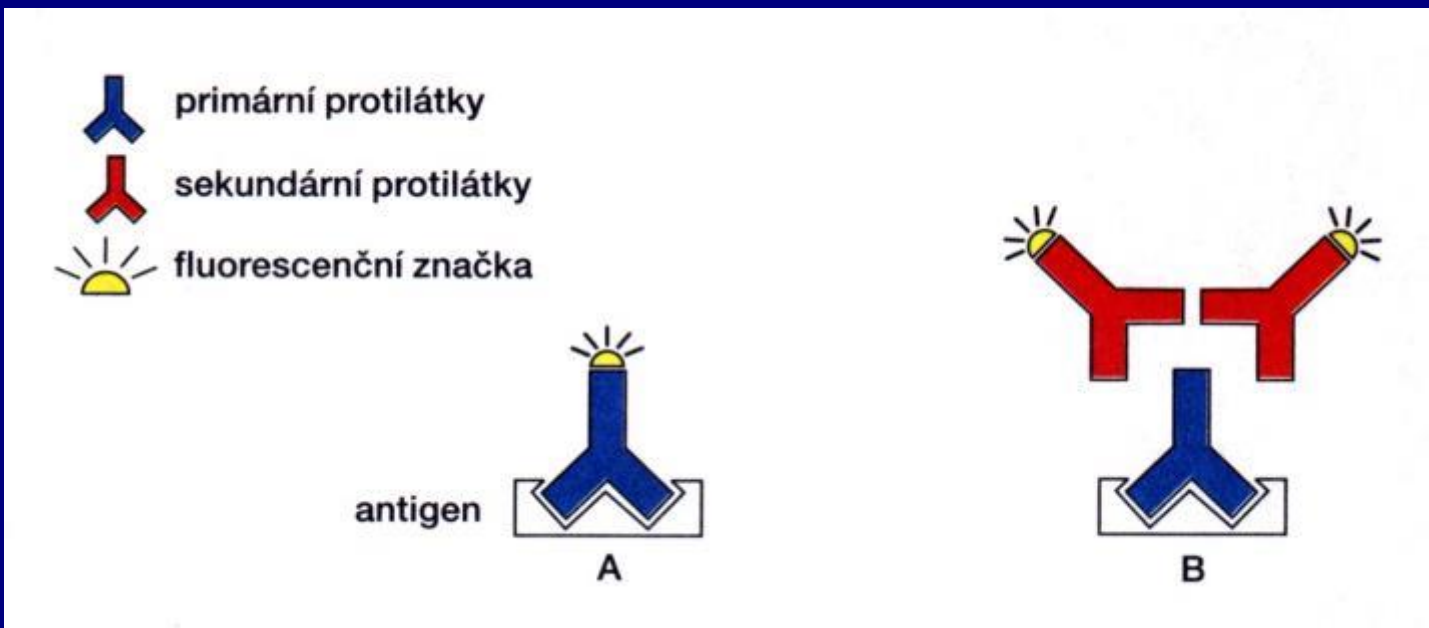
- Princip:

vazba molekuly protilátky označené navázaným  
fluorochromem s molekulami specifických buněčných  
antigenů za vzniku komplexů,

antigen + protilátka + fluorochrom

které v excitačním záření vhodné vlnové délky fluoreskují

# Přímá (A) a nepřímá (B) imunofluorescence

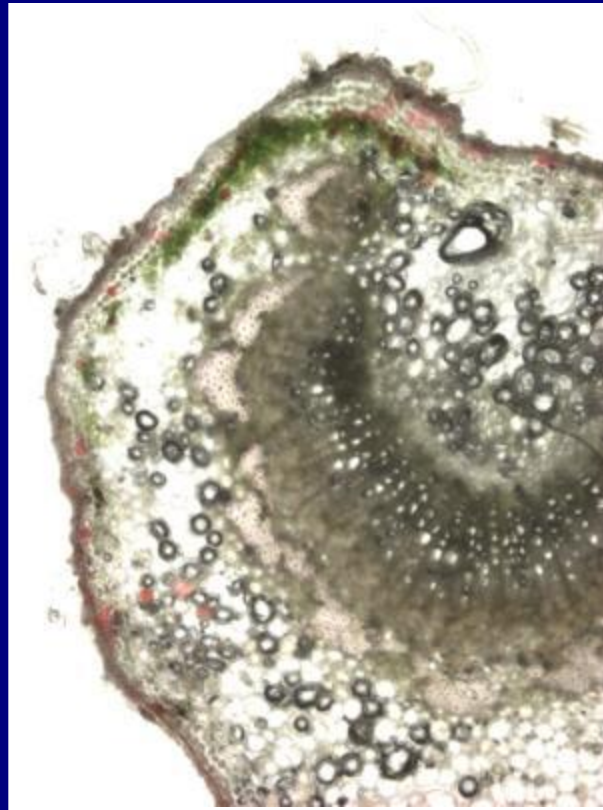


## ■ Využití imunofluorescence v klinické praxi:

- identifikace buněk T a B v krvi
- detekce specifických protilátek přítomných v krvi
- detekce imunoglobulinů v tkáních
- rychlá identifikace mikroorganismů v tkáních a v kulturách
- detekce nádorově specifických antigenů
- identifikace transplantačních antigenů v různých tkáních
- lokalizace hormonů a enzymů
- kvantitativní stanovení proteinů a protilátek v tělních tekutinách



**Nativní vodný preparát  
ve světelném mikroskopu  
- příčný řez řapíkem jabloně**



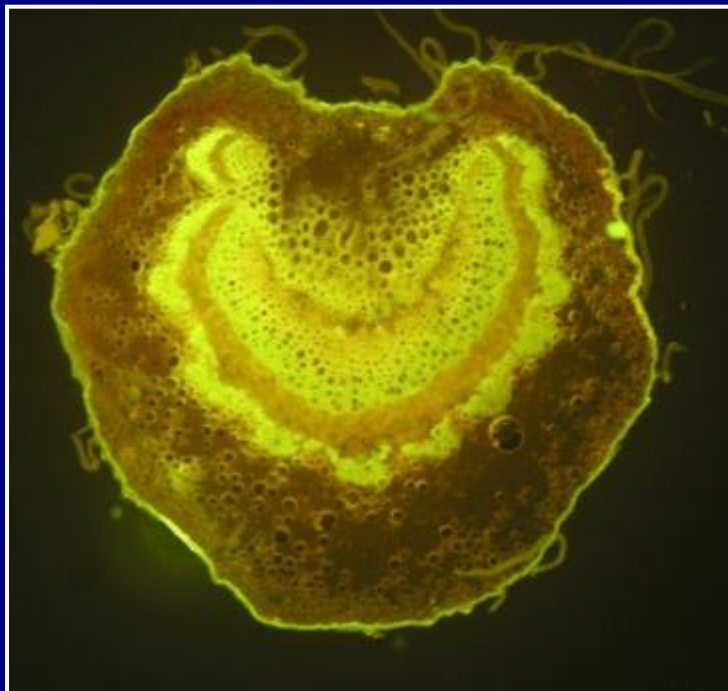
Z = 40x (4 obj. x 10 ok.)

foto Pavla Válová

# Autofluorescence

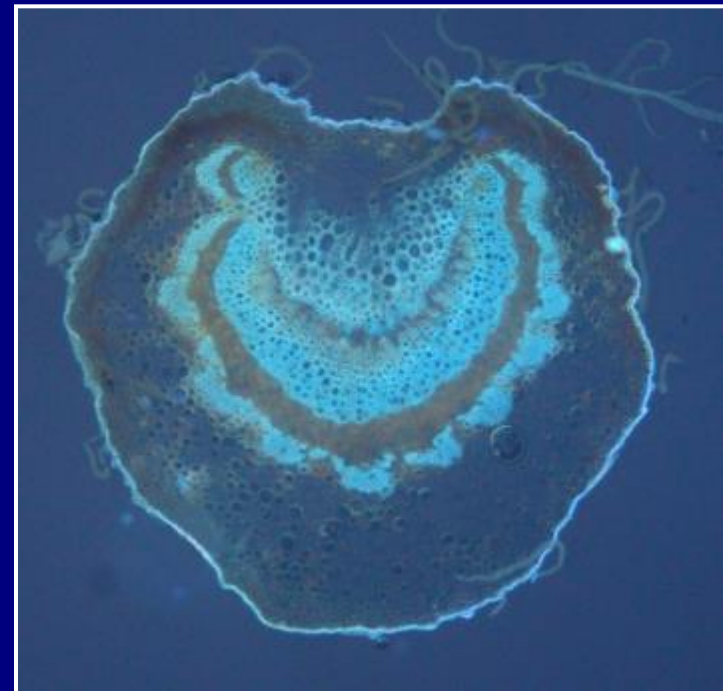
- příčný řez řapíkem jabloně

Hranol WB



Z = 40x

Hranol WU



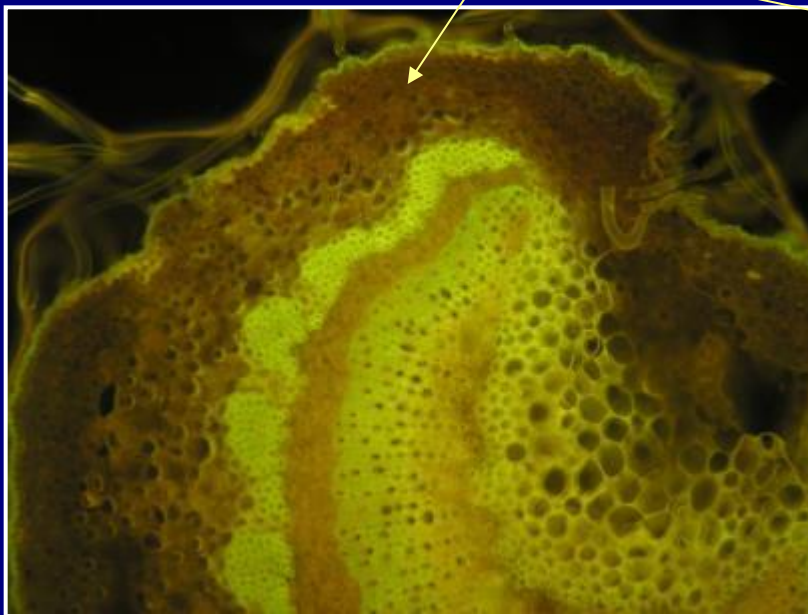
Z = 40x

# Autofluorescence

## - příčný řez řapíkem jabloně

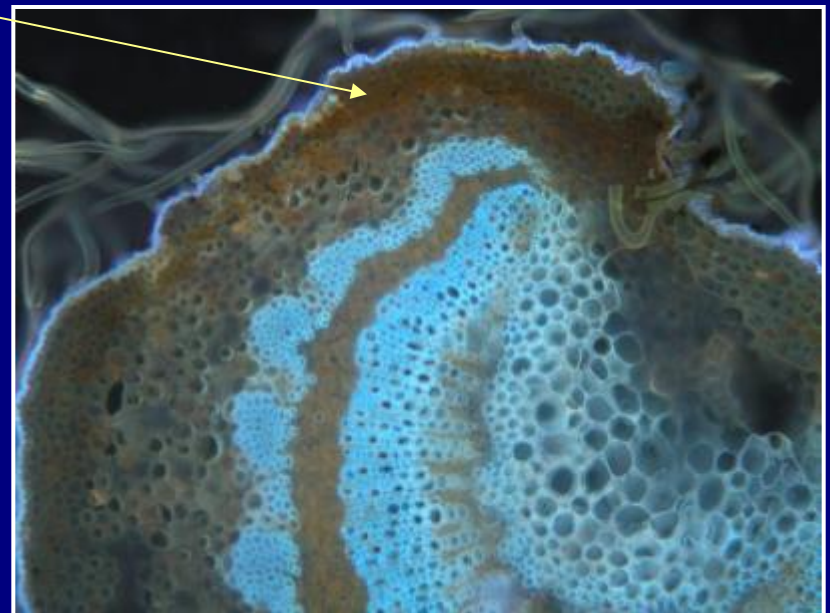
Chlorofyl \*

Hranol WB



Z = 100x

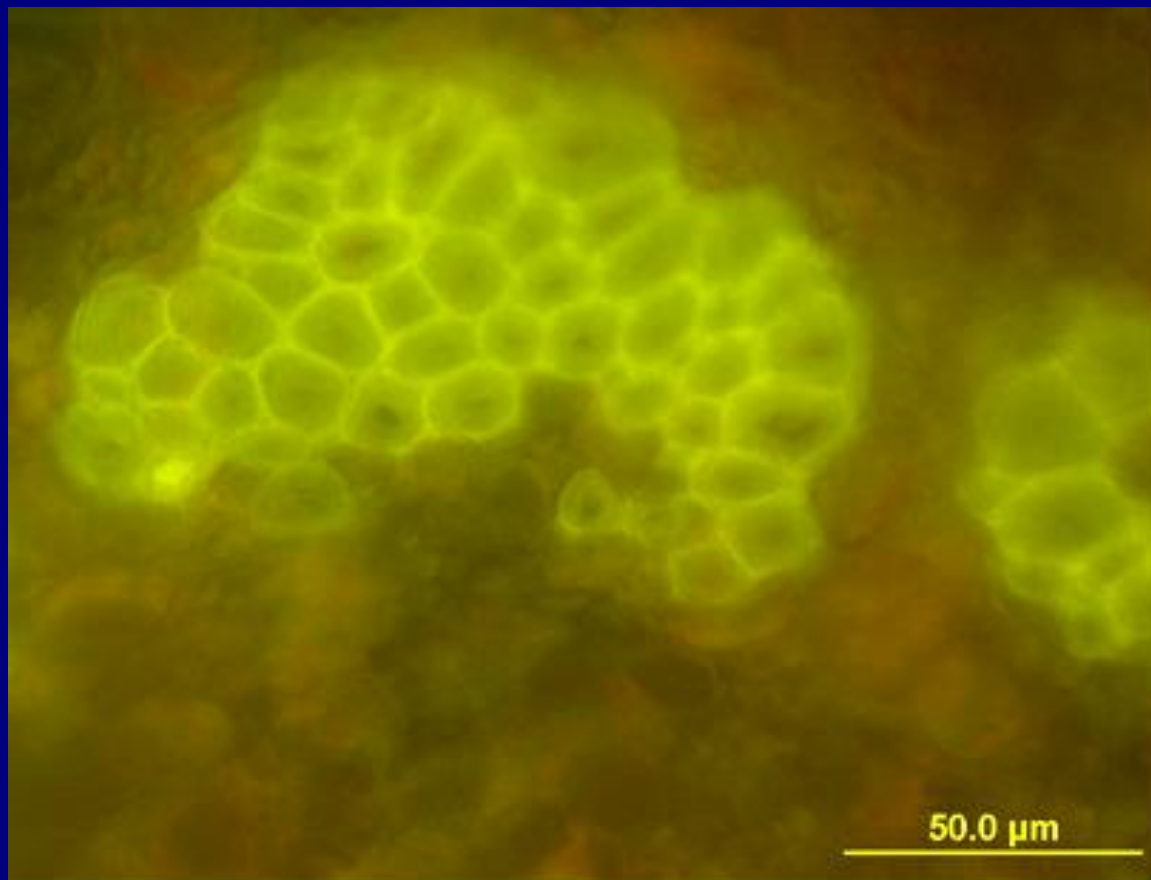
Hranol WU



Z = 100x

\* Chlorofyl (excitace 430-450; do 550 nm; emise max. 685 nm)

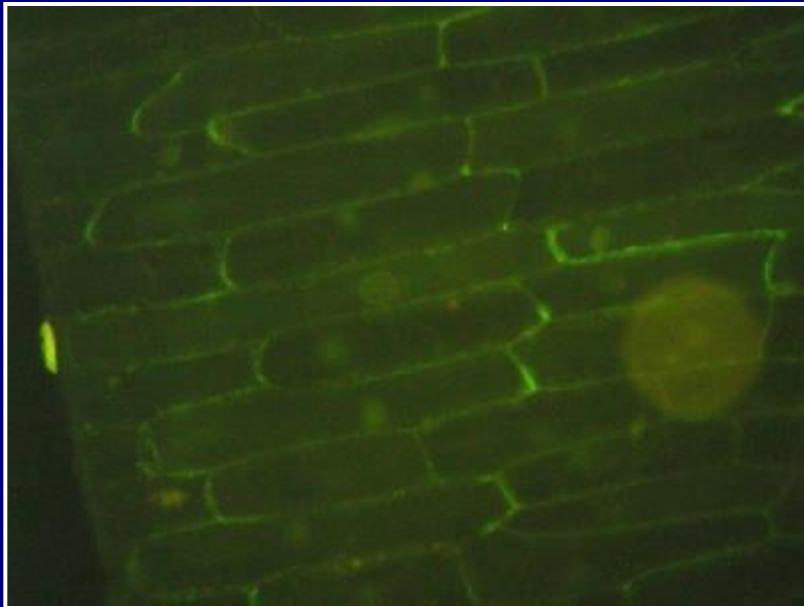
foto Pavla Válová



**Detail sklerenchymatické pochvy u příčného řezu řapíku jabloně**  
- silně ztloustlé buňky s ochrannou funkcí.  
Fluorescenční kostka WB; Z = 400x.

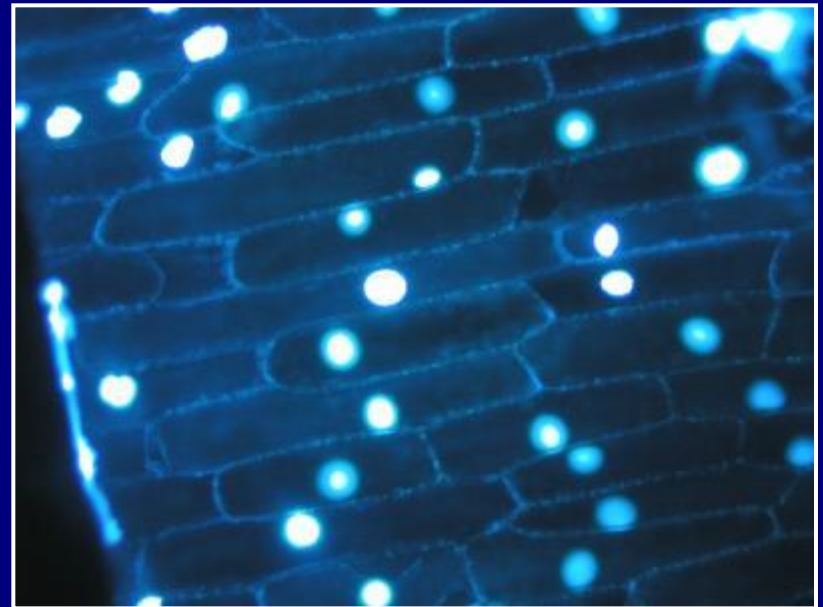
# Sekundární fluorescence barvení DAPI - jádra pokožkových buněk u cibule

Hranol WB



Z = 200x

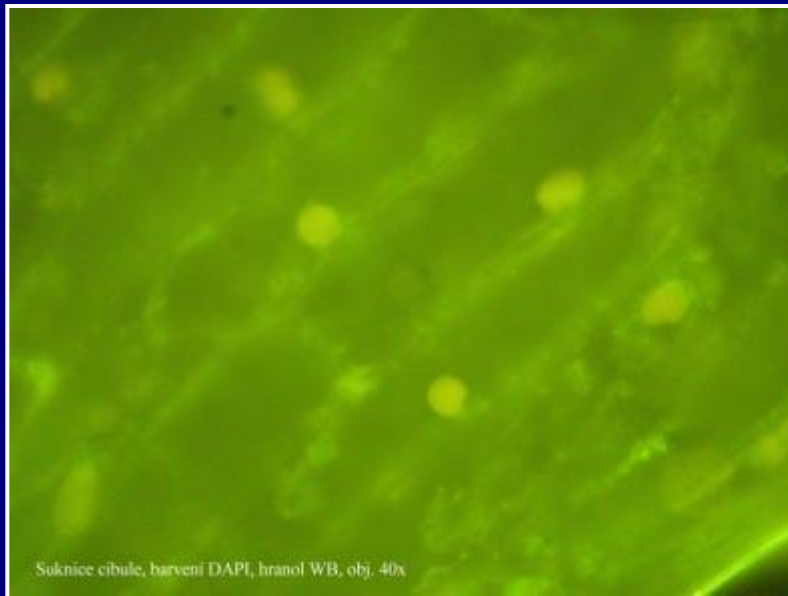
Hranol WU



Z = 200x

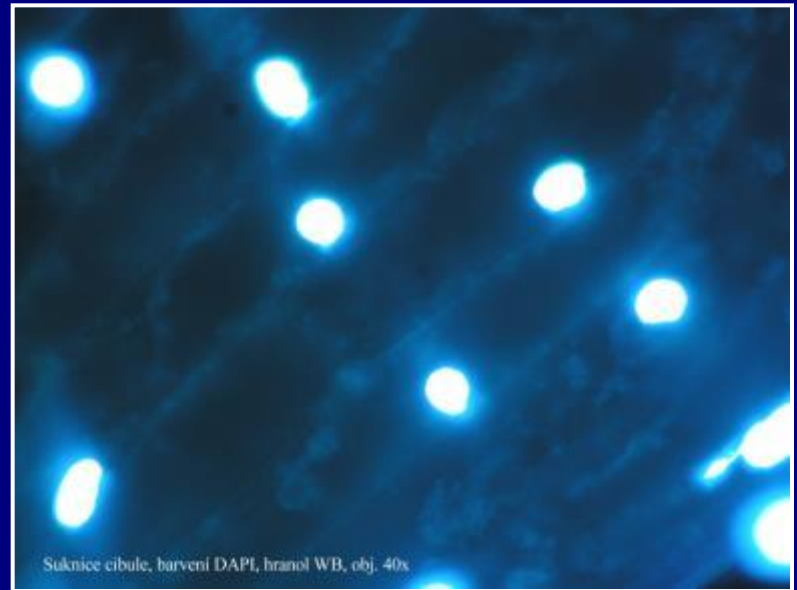
# Sekundární fluorescence barvení DAPI - jádra pokožkových buněk u cibule

Hranol WB



**Z = 400x**

Hranol WU

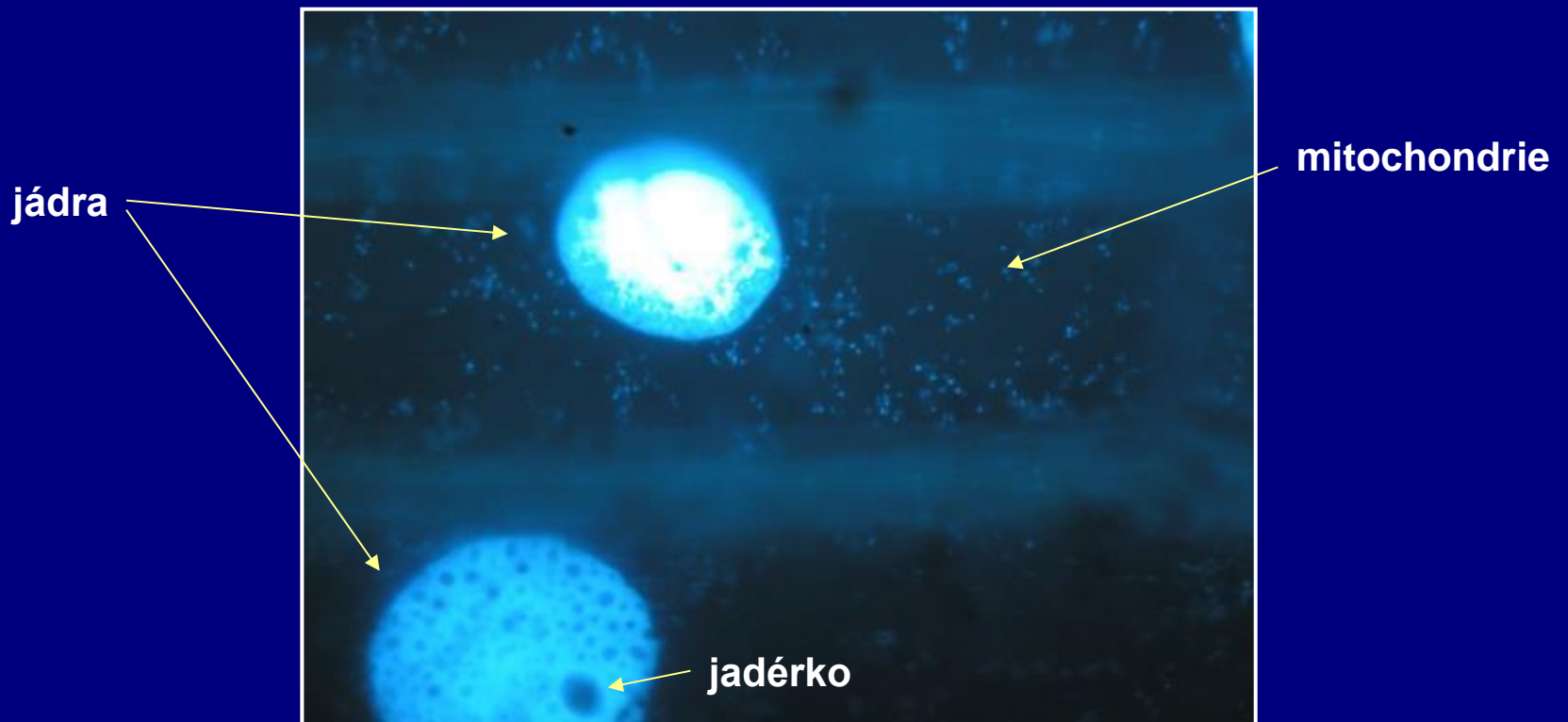


**Z = 400x**

# Sekundární fluorescence barvení DAPI

- jádra pokožkových buněk u cibule

Hranol WU

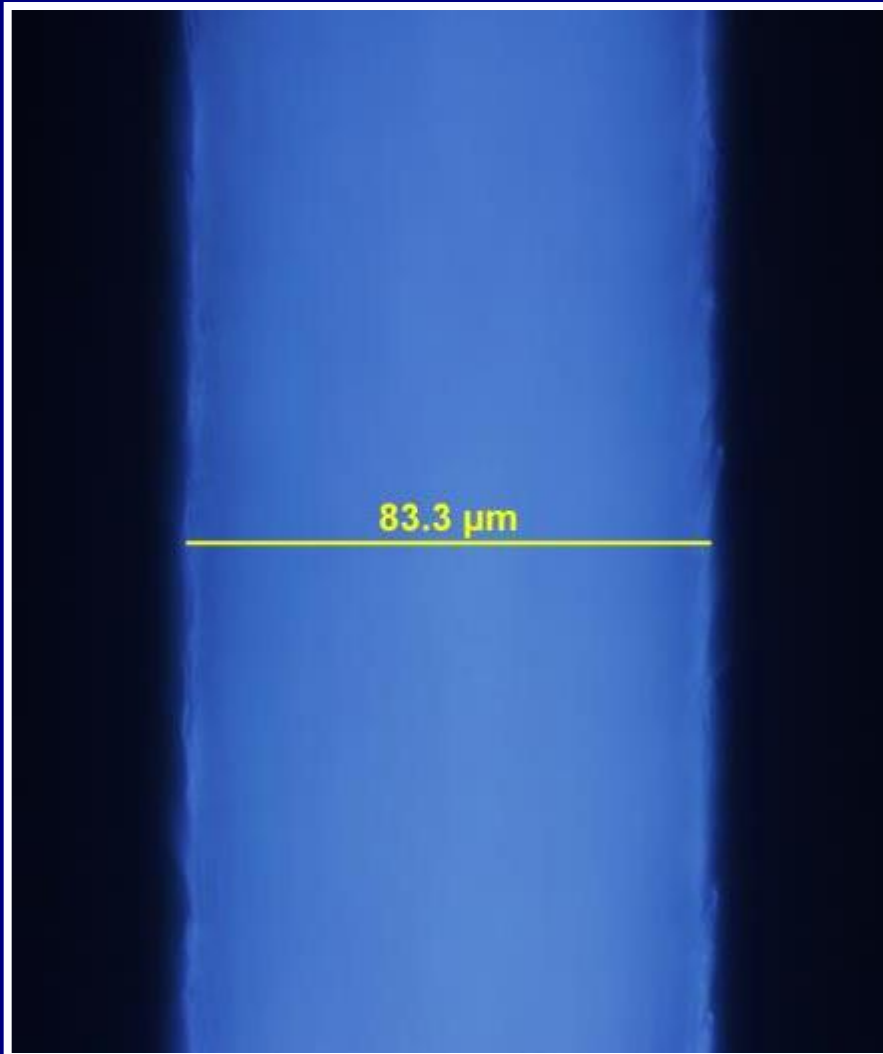


Z = 1 000x, imerze

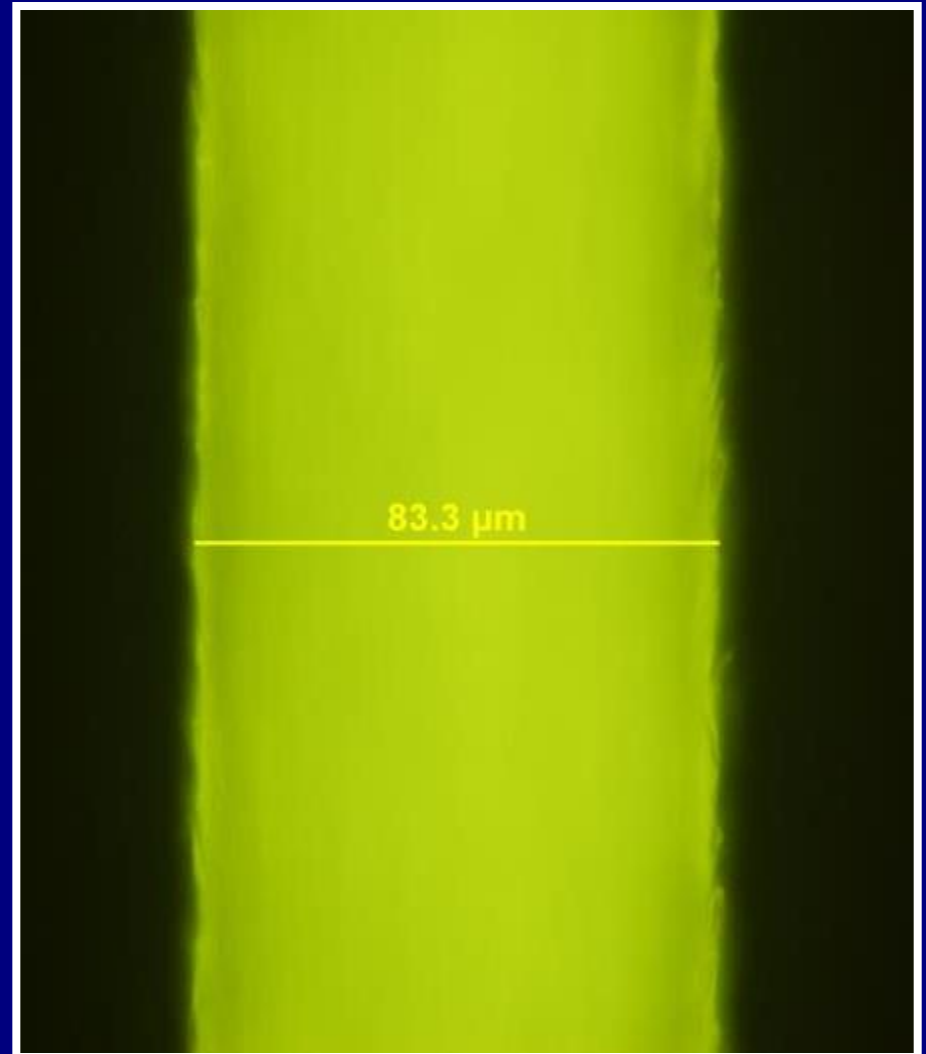
foto Pavla Válová

# Autofluorescence vlasu

Fluorescenční kostka WU



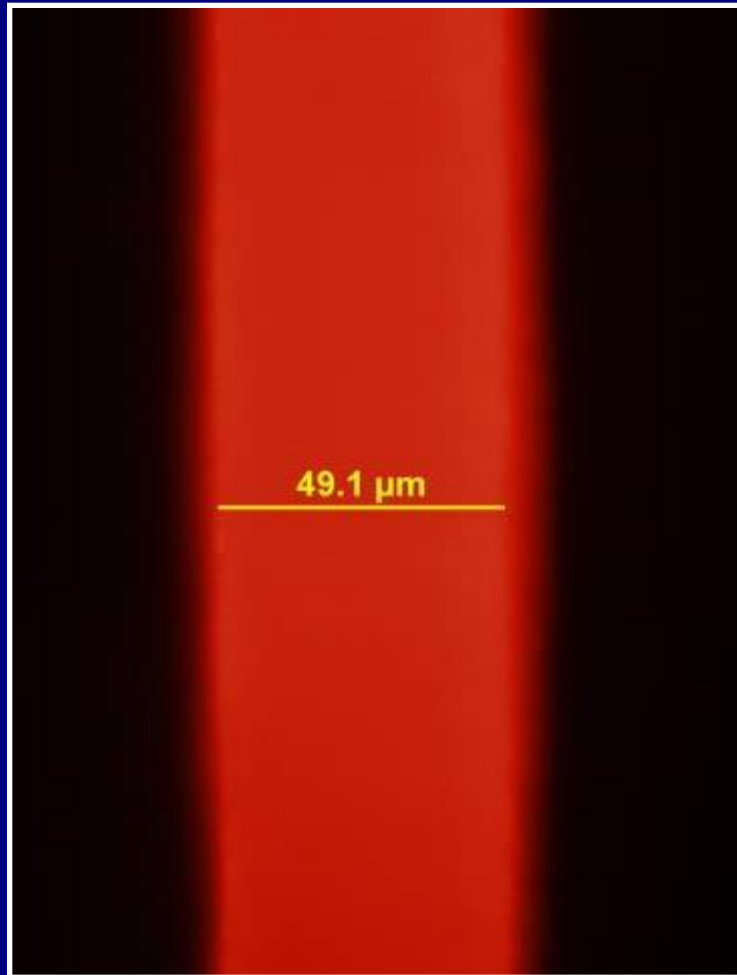
Fluorescenční kostka WB





# Autofluorescence vlasu

## Fluorescenční kostka WG



Z: 400x

Foto Pavla Válová

## Vlas v SEM

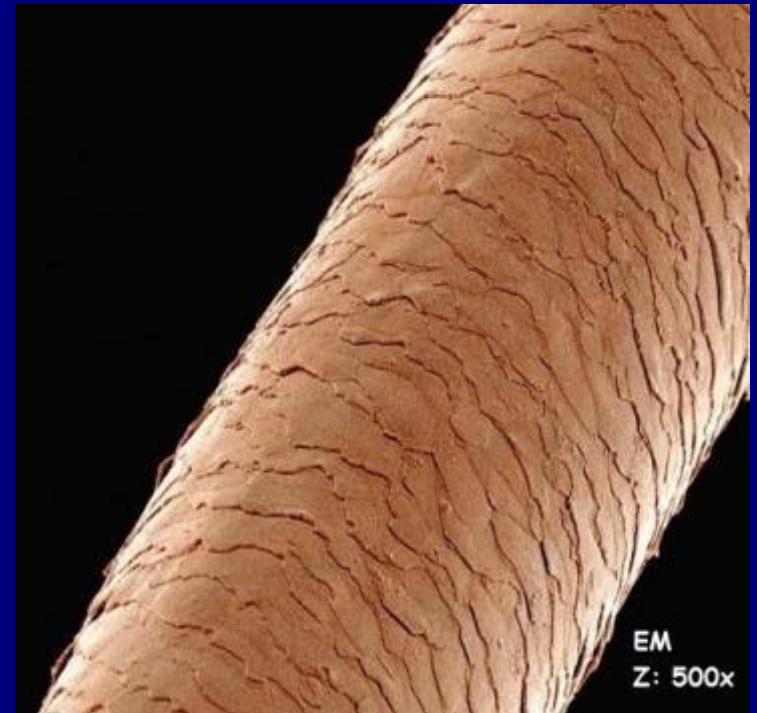


Foto google