

Inovace předmětu KBB/MIK

SVĚTELNÁ A ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Rozvoj a internacionalizace chemických
a biologických studijních programů na Univerzitě
Palackého v Olomouci

CZ.1.07/2.2.00/28.0066

Fluorescenční mikroskopie

U.13
JAPAN



Fluorescenční mikroskopie

Luminiscence – jev, kdy látka vysílá do prostoru světlo

- vyvolání chemickou reakcí – **chemiluminiscence**
- světlem – **fotoluminiscence**



- 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 λ , barva posunutá směrem k červenému konci spektra)

Fluorescenční mikroskopie

- historie

1910 - August Köhler

- pozorování fluorescence pomocí
ultrafialového spektra u mnoha preparátů

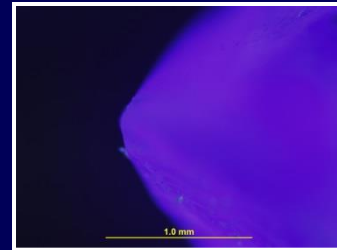
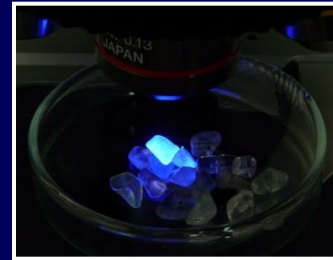
1911 - Carl Reichert

- název “fluorescence” od fluoritu (= kazivec)

1913 - první mikroskop s UV excitací

**1932 - Edward Singer – současná konstrukce
fluorescenčních mikroskopů**

UV - fluorit



Z = 50x

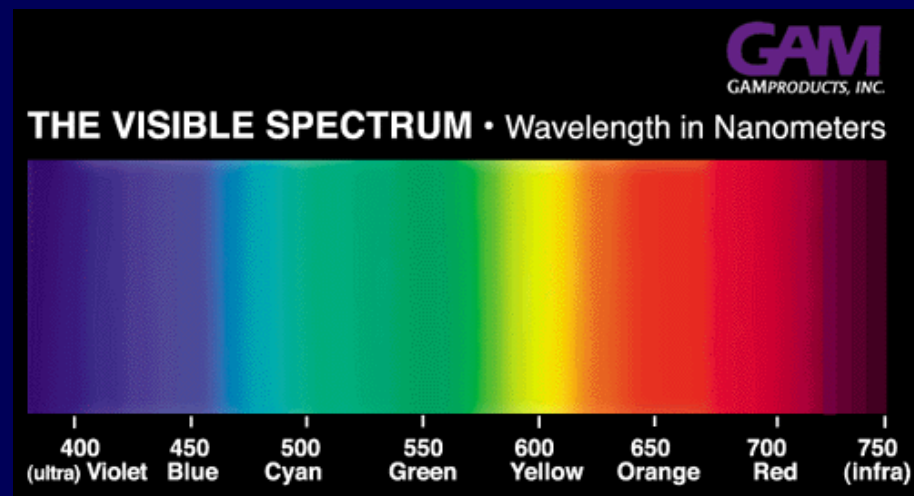
Foto P. Válová

Spojité světelné spektrum

Sedm barev duhy a jejich vlnové délky

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

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



Fluorescenční mikroskopie

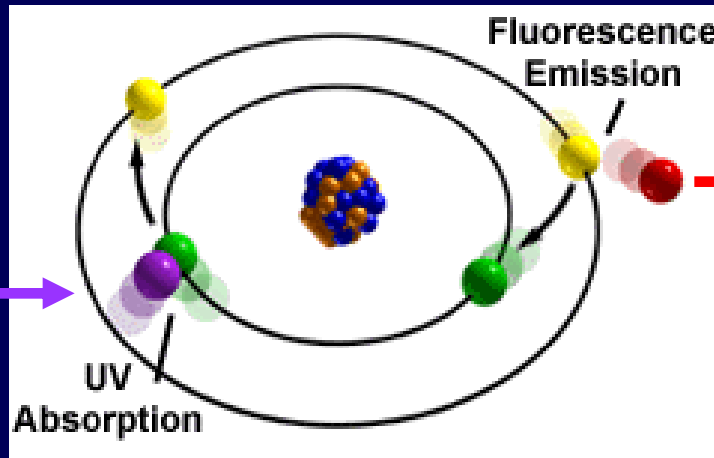
■ Princip fluorescence:

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

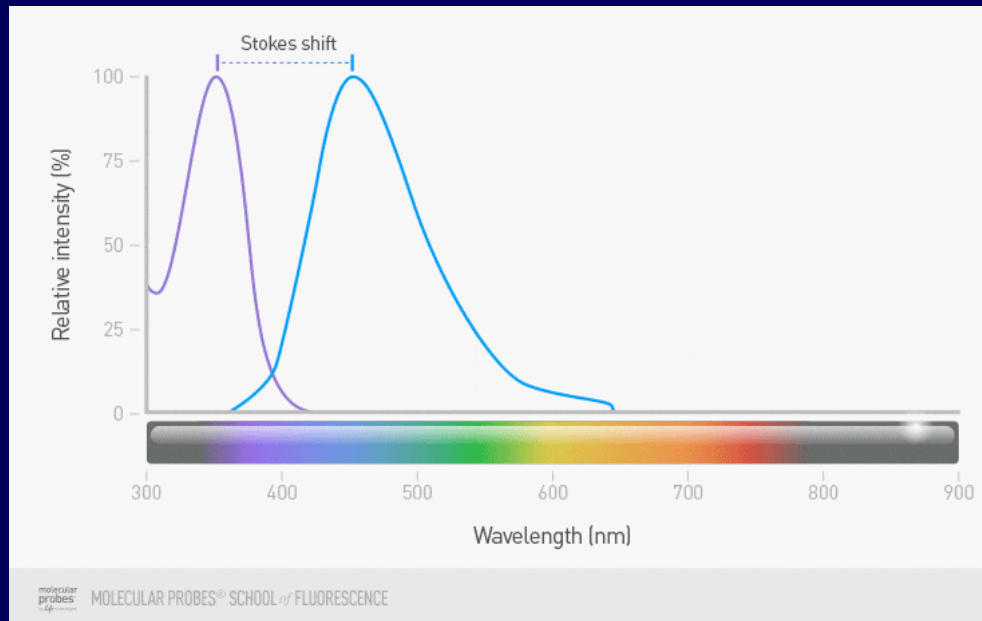
Záření je vysíláno ihned po vybuzení (excitaci) atomů nebo molekul a odeznívá během asi 10^{-8} sekundy

Stokesovo* pozorování:

Excitační záření
o kratší λ



Emitované záření
o delší λ



* George Stokes (1819-1903) - irský matematik, fyzik, politik a teolog

Z hlediska zdroje fluorescence rozlišujeme:

primární fluorescenci

(= autofluorescence, vlastní fluorescence, přirozená)

sekundární fluorescenci

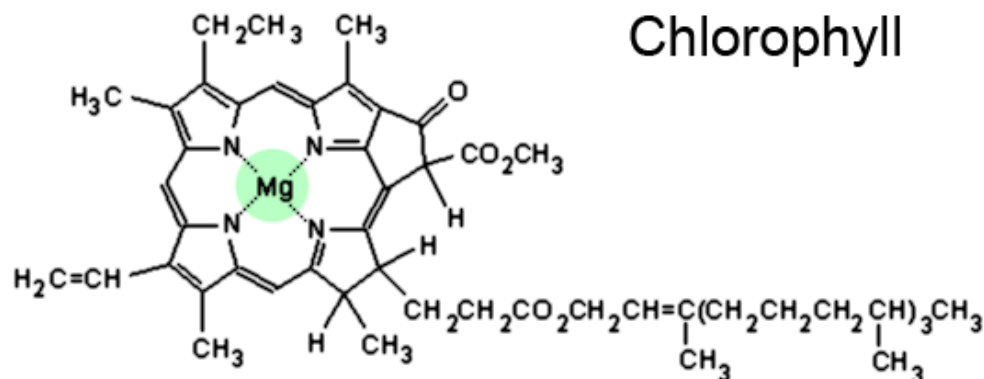
(= nevlastní fluorescence, indukovaná)

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

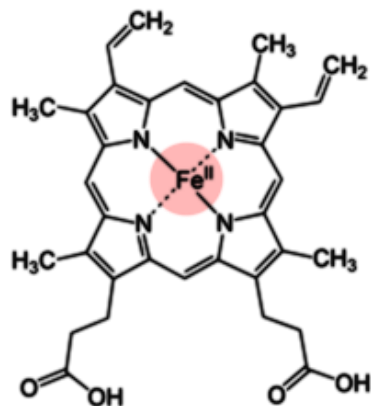
fluorescenční značky – vážou se na vzorek kovalentně (FITC, TRITC)

fluorescenční sondy – nekovalentní vazba (DAPI, EtB, PI)

Autofluorescence



Chlorophyll



Haemoglobin

Chemická struktura fluoroforů:
aromatické sloučeniny s heterocykly s elektrony konjugovanými
v plochých “mracích” nad a pod rovinou ploché molekuly

Autofluorescence

Vlastní fluorescence bílkovin

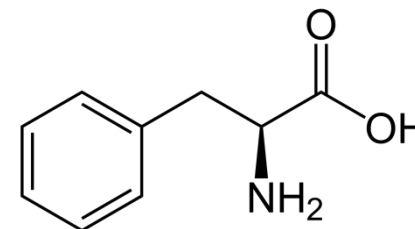
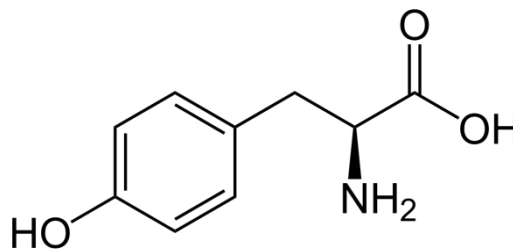
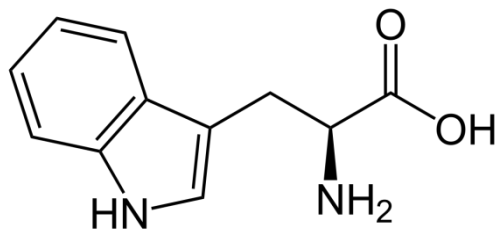
Hlavní fluorofory v proteinech:

aromatické aminokyseliny

tryptofan (Try)

tyrosin (Tyr)

fenylalanin (Phe)



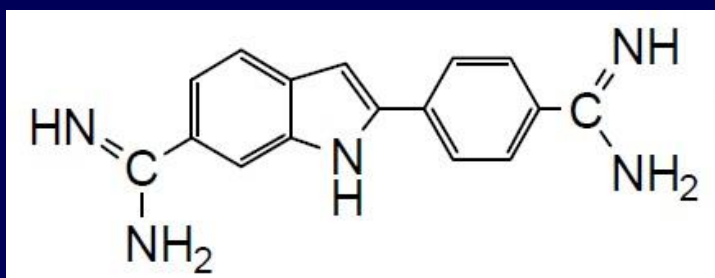
Tryptofan – excitace 295 nm, emise 354 nm

Sekundární fluorescence

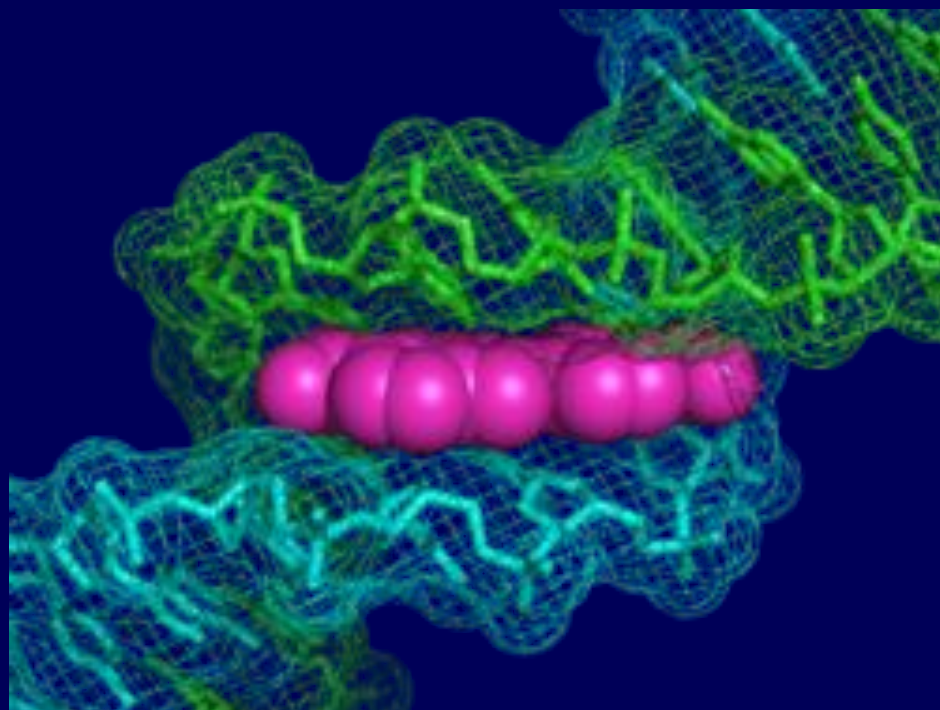
Fluorofor DAPI

chemická struktura

4',6-diamidino-2-phenylindole.HCl



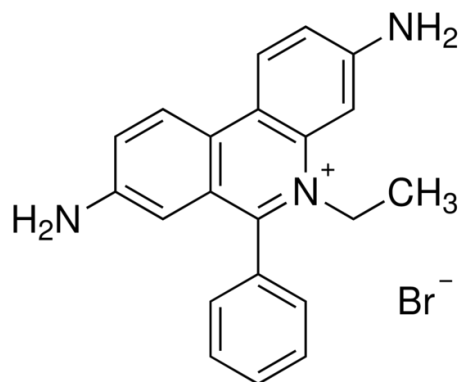
zabudování do DNA
struktury s A-T



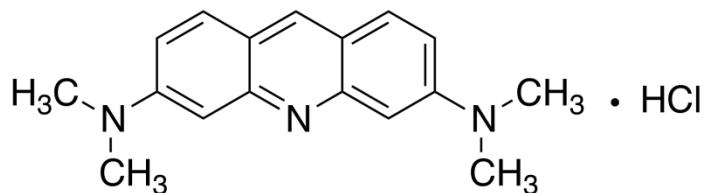
Chemická struktura fluorescenčních sloučenin:

- aromatické sloučeniny s tzv. konjugovanými elektrony
- větší množství elektronů sdílí stejný orbital
(nejlépe pro stejnou molekulu)

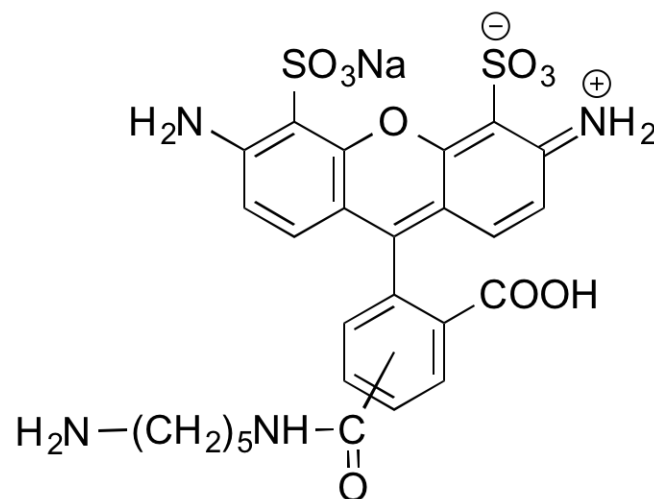
ethidium bromid



akridinová oranž



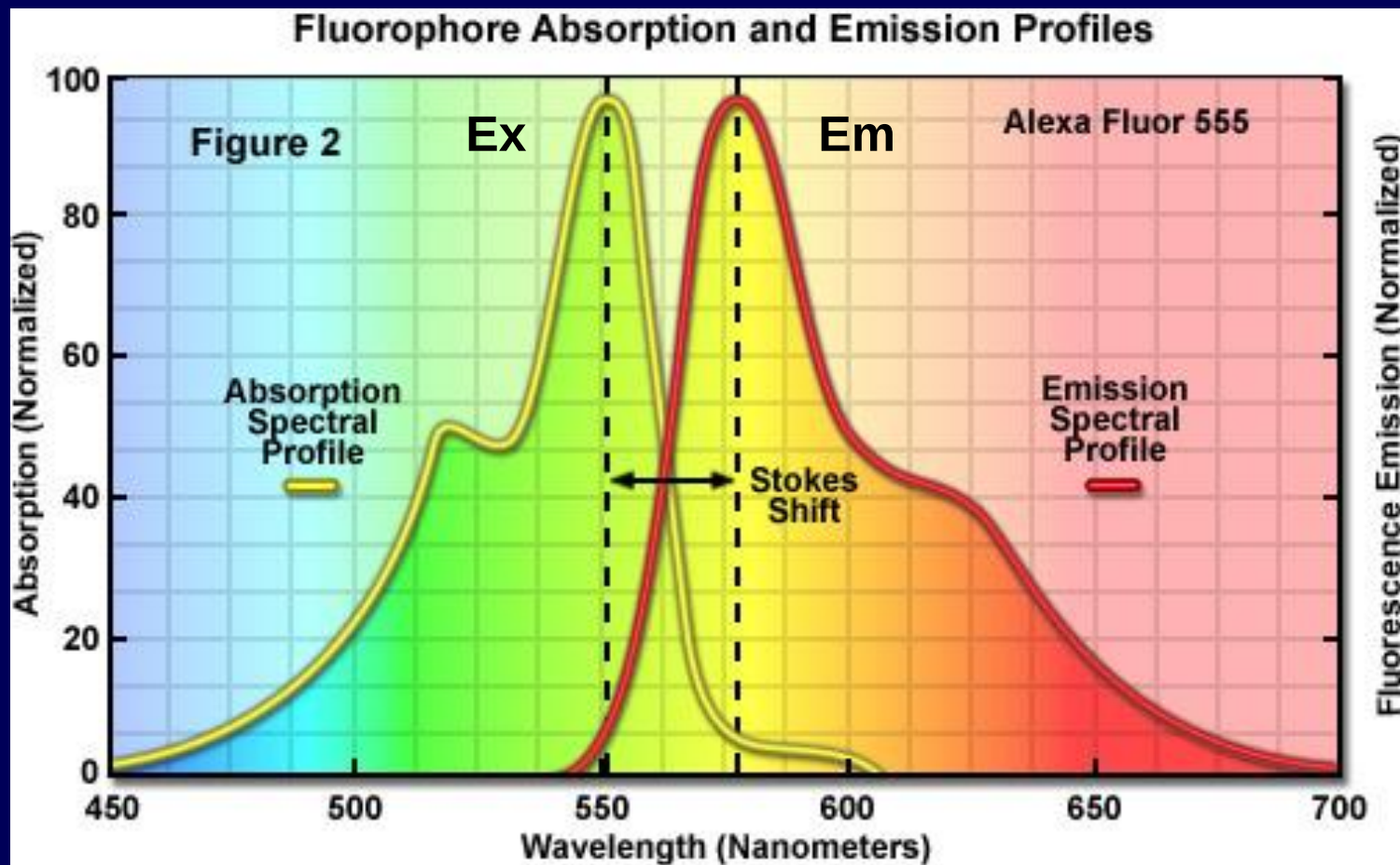
Alexa Fluor™ 488



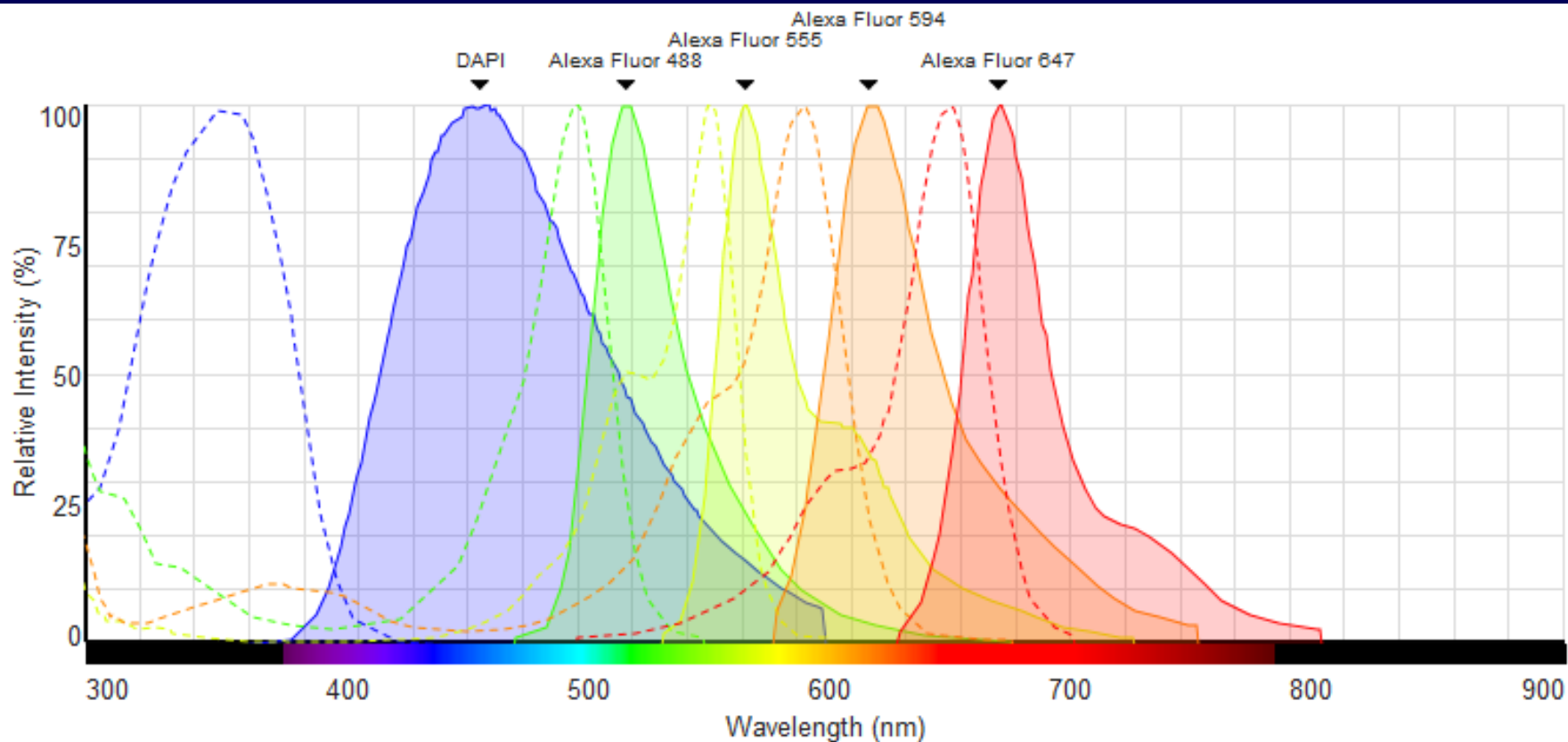
Excitace a emise fluoroforů

Ex – excitační spektrum

Em – emisní spektrum



Excitační a emisní spektra vybraných flouoroforů



Příklad fluorochromů používaných

- v buněčné biologii:

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

FDA (fluorescein diacetát; životnost)

FITC (fluorescein-isothiokyanát; imunofluorescence)

Akridinová oranž (DNA i RNA)

Alexa Fluor (konjugovány s protilátkami)

- v molekulární biologii:

Ethidium bromid } (PCR – zviditelnění PCR produktu)
GoodView }

Hoechst 33258 (měření ϵ DNA ve fluorometru)

SYBR Green }
TaqMan sondy } (qPCR – kvantitativní real-time PCR)

- **Výhoda fluorescenčních metod:**
 - **velký kontrast zobrazení**
 - **specifičnost** různých fluorochromů na absorpci a emisi světla o určité vlnové délce
 - **velký výběr sond**
 - **citlivost**
(možnost zachycení přítomnosti pouhých 50 molekul v 1 nl; nízká koncentrace barviva)

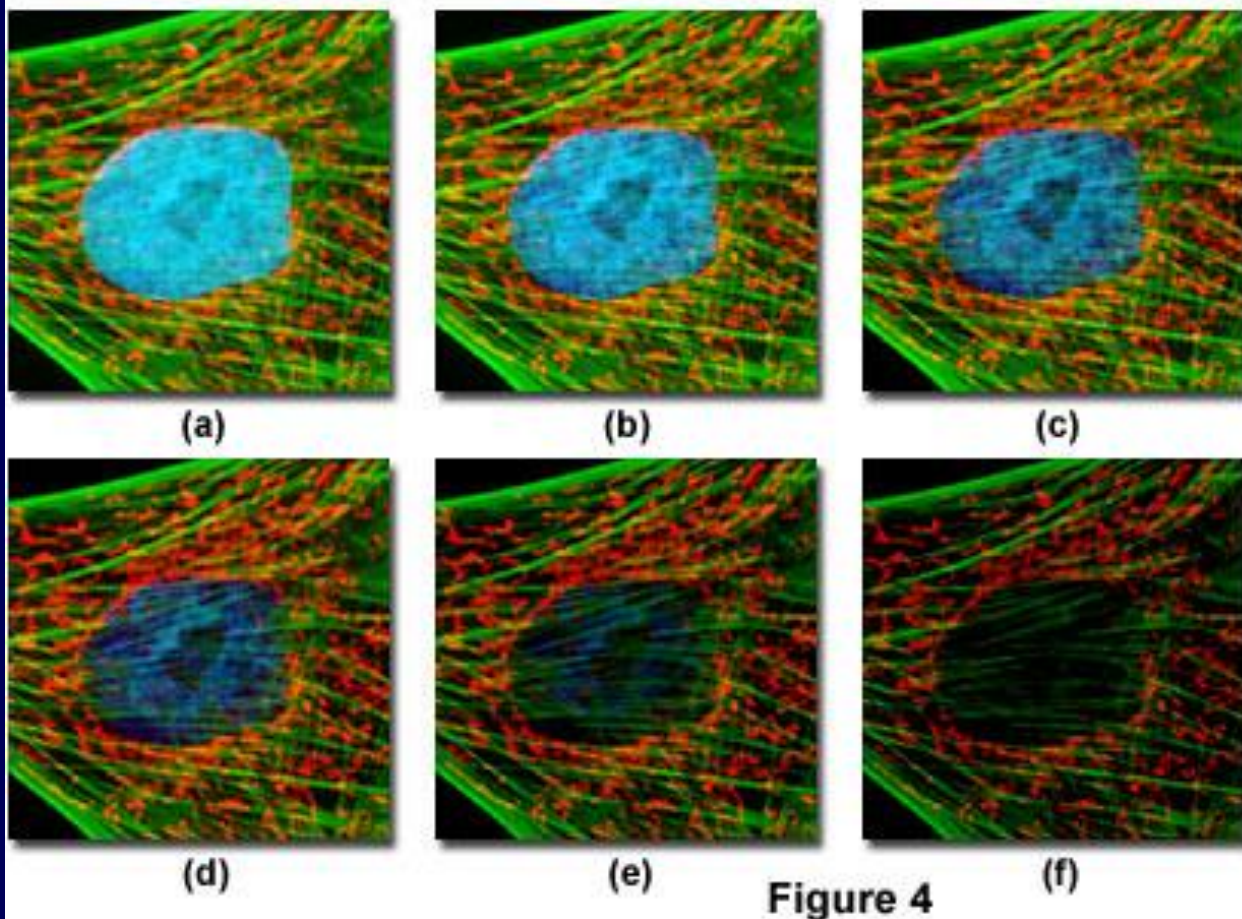
■ Nevýhoda:

rychlé vysvicování fluorescence (fotobleaching)*

- fluorofory se vlivem intenzivního záření rozkládají, a ztrácejí tak schopnost excitace a emise
- nutnost minimalizace působení excitačního světla

*(viz později využití vysvicování - např. metoda FRAP - Fluorescence recovery after photobleaching, STED - Stimulated Emission Depletion)

Photobleaching Rates in Multiply Stained Specimens



Míra vysvicování v zabarvených preparátech

Zdroj: <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>

Základní části fluorescenčního mikroskopu:

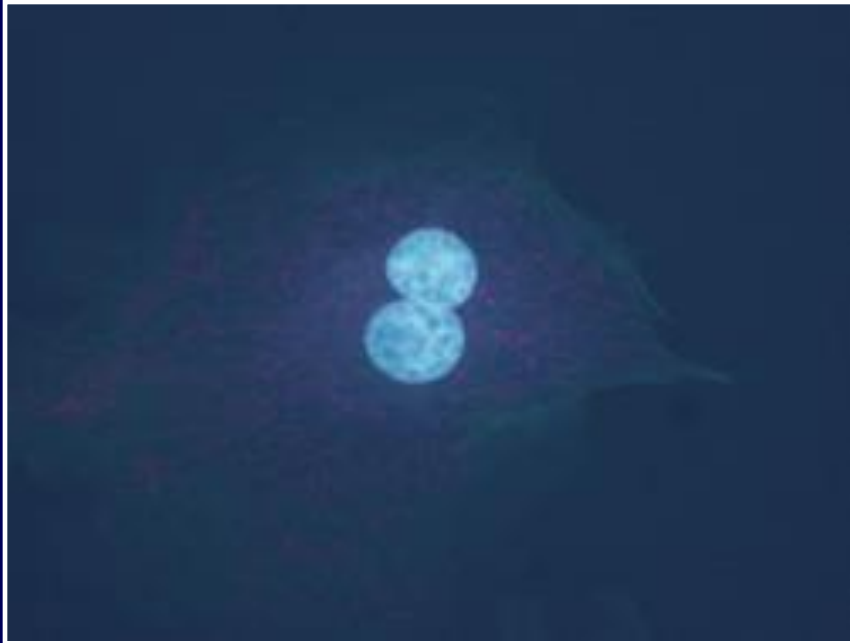
- **zdroj fluorescenčního záření**
 - vysokotlaká rtuťová výbojka; u moderních mikroskopů **dioda** anebo **laser** o určité vlnové délce
- **excitační (budící) filtry**
 - ze světelného zdroje selektivně vymezují záření o určité vlnové délce vhodné ke vzbuzení fluorescence
- **bariérové (ochranné, uzavírající, zábranné) filtry**
 - zadržují excitační světlo vnikající do okuláru a odstraňují tak záření škodlivé pro oko
 - odfiltrovávají nežádoucí světlo → tmavé pozadí

Základní části fluorescenčního mikroskopu:

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

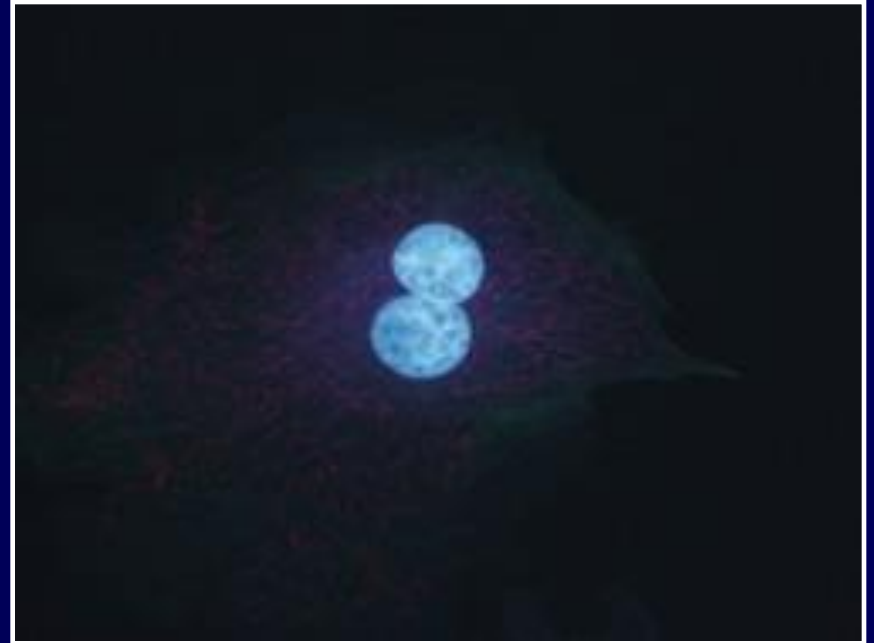
Transmisní fluorescence **x** epifluorescence

Použití imerzního oleje



Normální imerzní olej
n = 1, 516

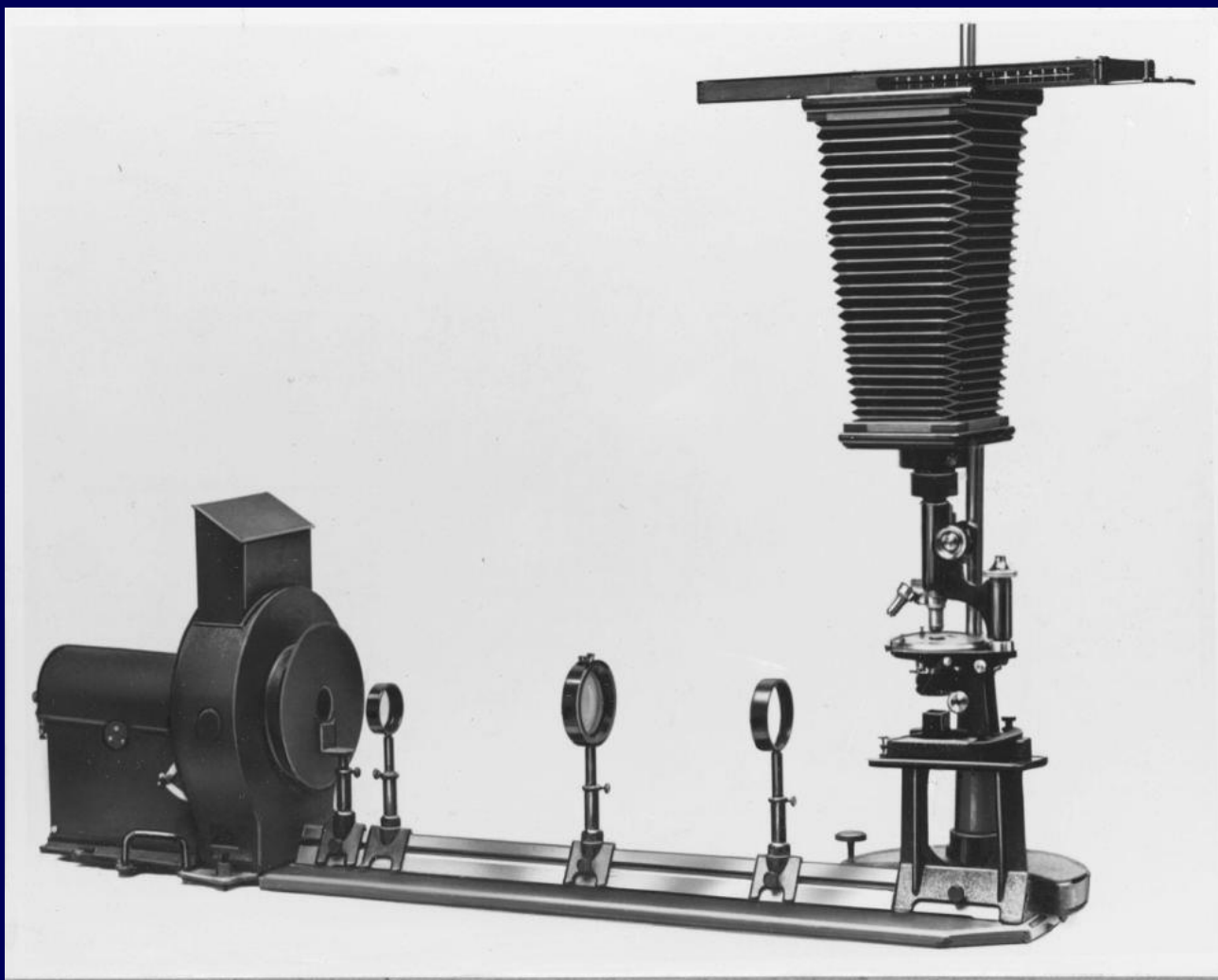
Autofluorescence !



Imerzní olej pro fluorescenci
n = 1,404

Autofluorescence omezena

První fluorescenční mikroskop

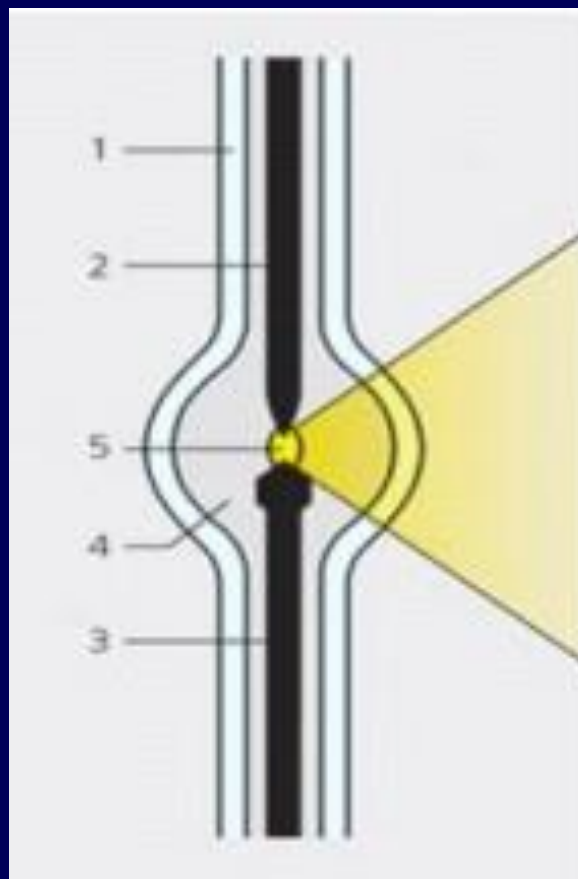




**Fluorescenční
mikroskop
BX60**
(epifluorescence)

s kamerou DP71

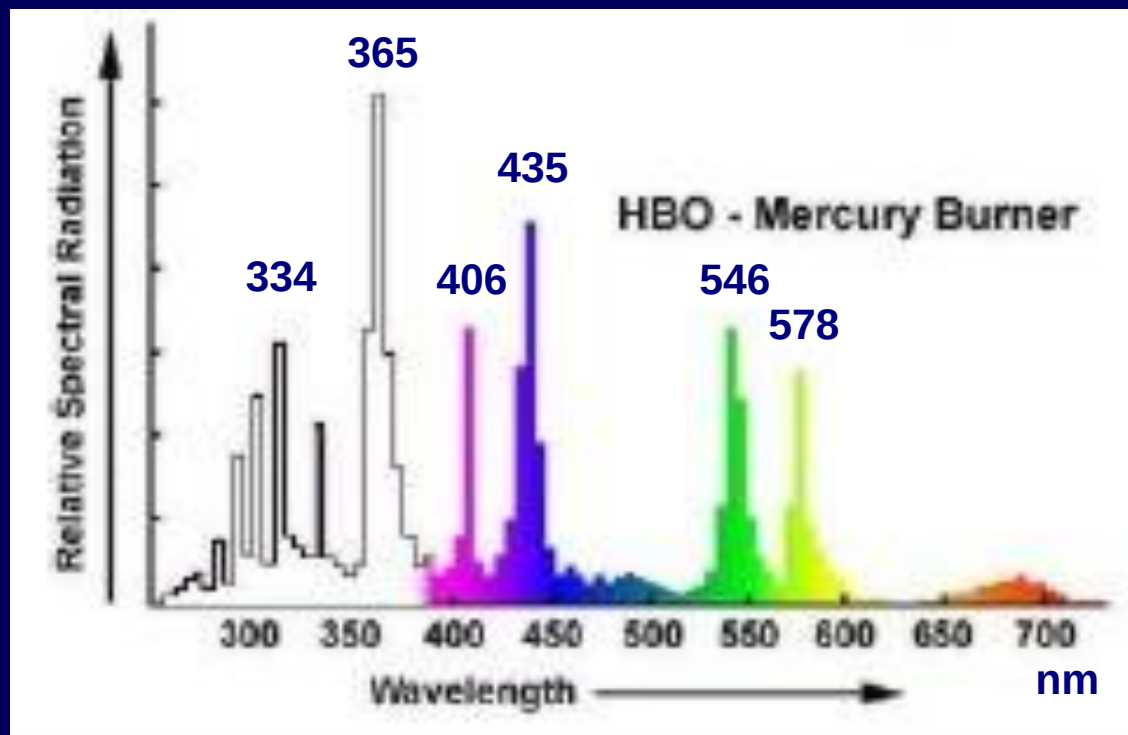
Zdroj světla

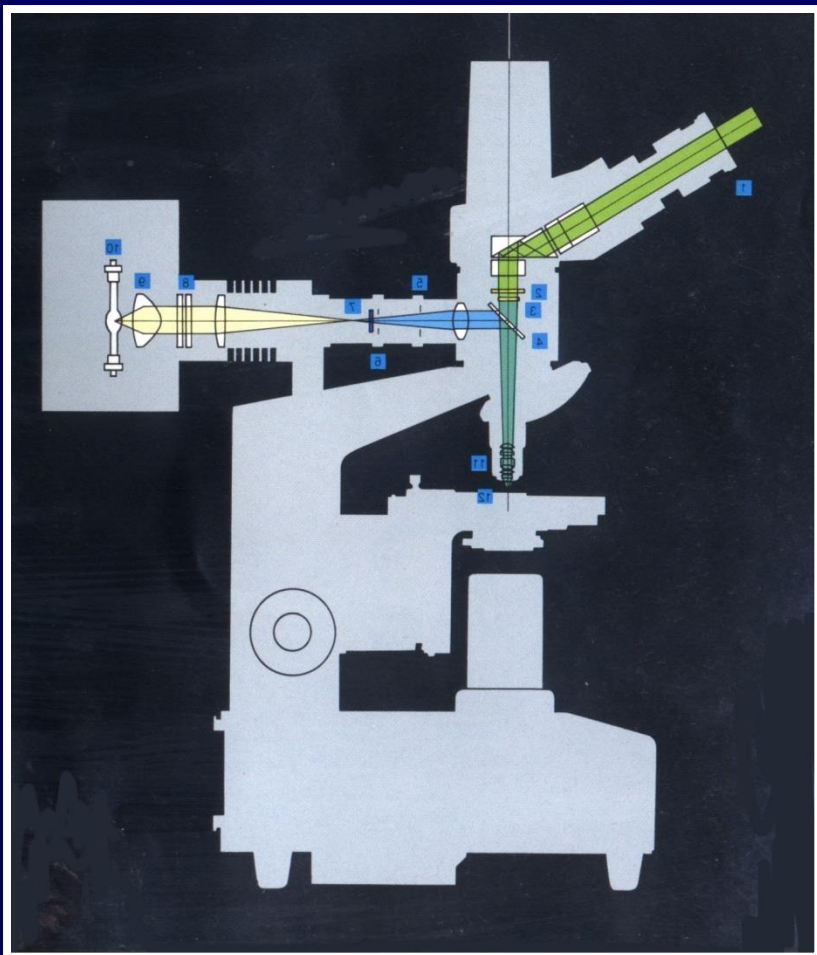


- 1 – vysokotlaké sklo
- 2 – katoda
- 3 – anoda
- 4 – komora
- 5 – světelný oblouk

Vysokotlaká rtuťová výbojka (zapálení přes zdroj napájení)

Vlnové spektrum rtuťové výbojky





Epifluorescence – chod paprsků mikroskopem

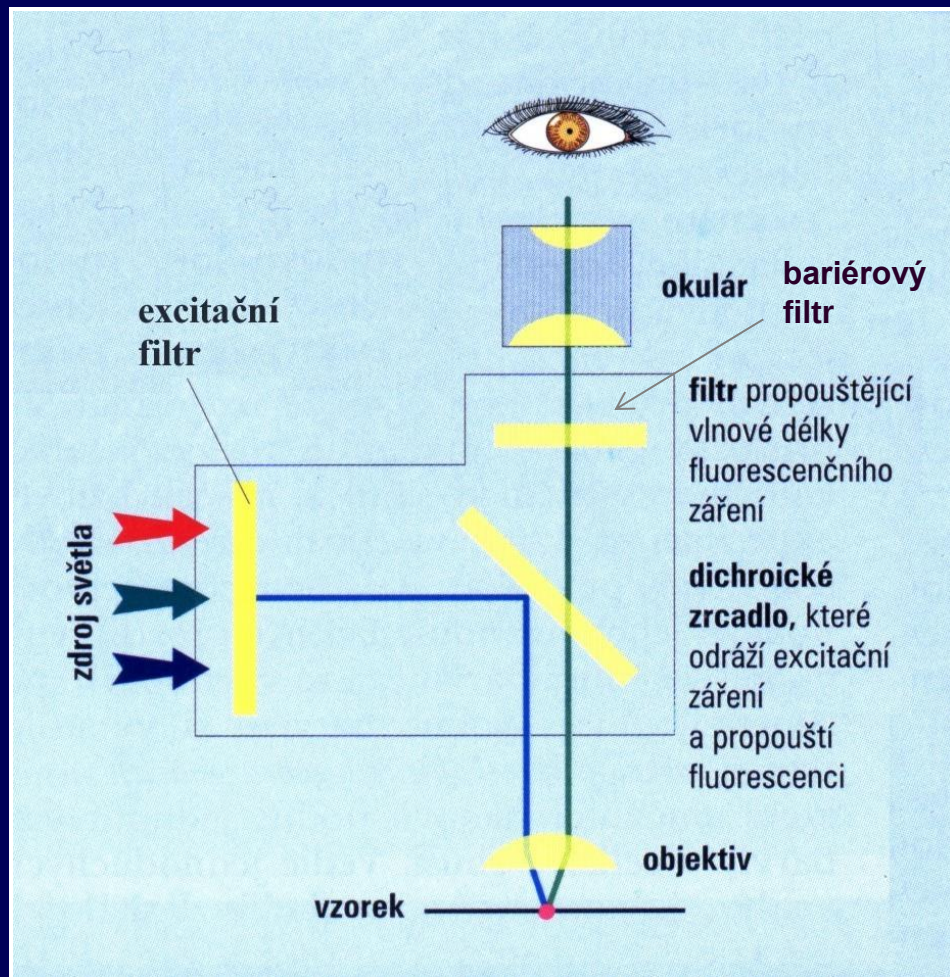
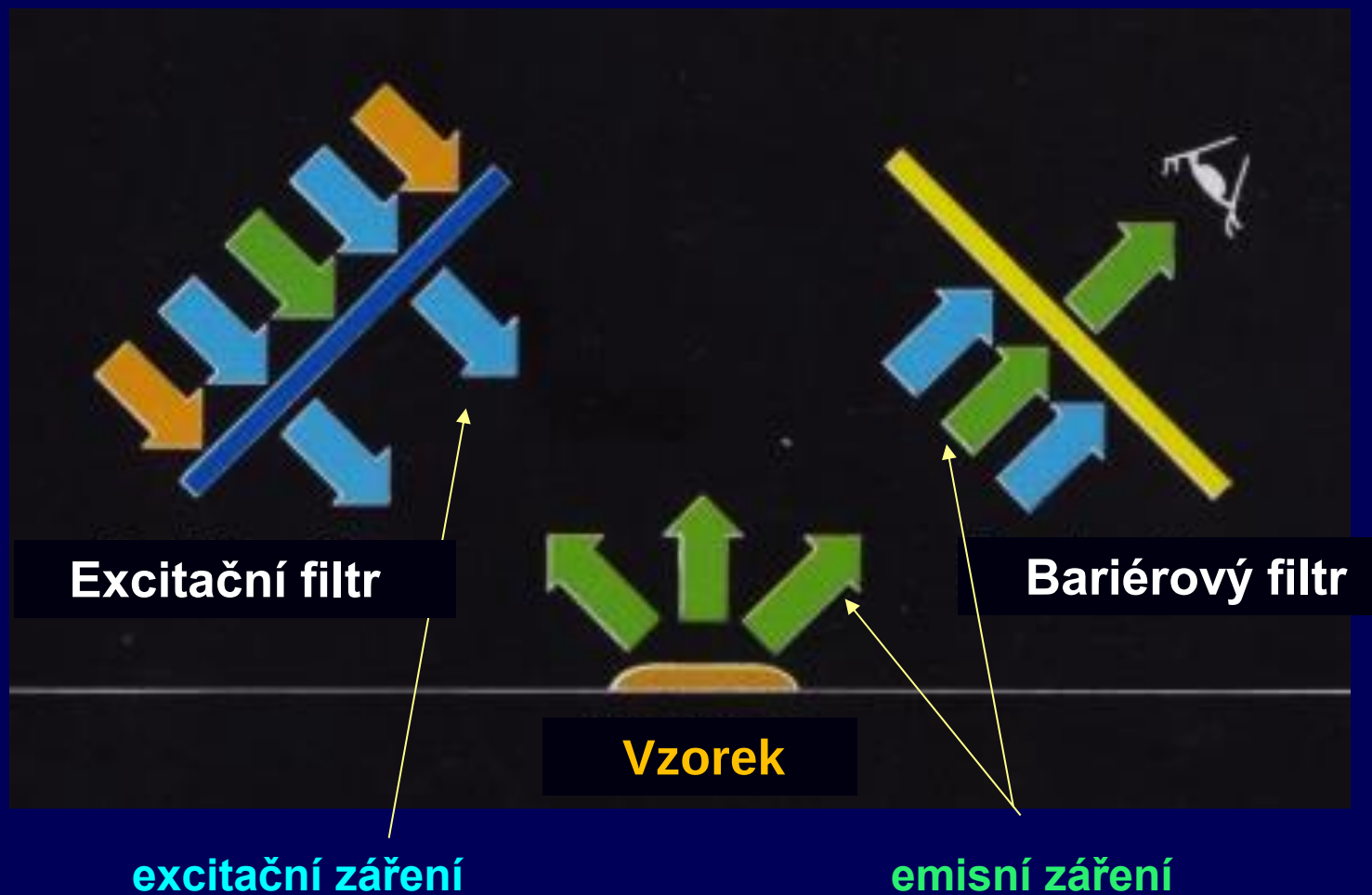


Schéma fluorescence

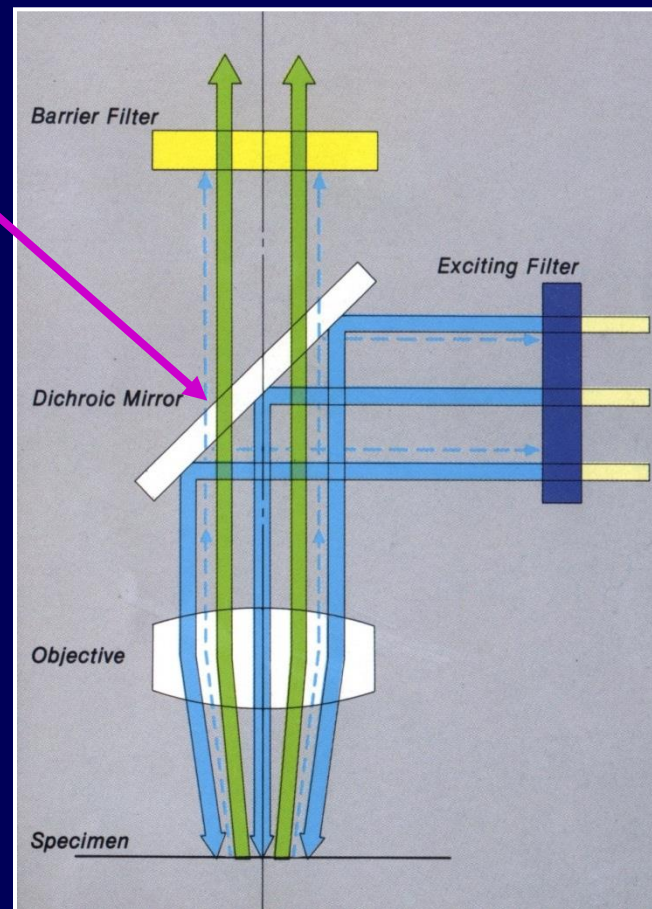
Funkce excitačního a bariérového filtru



Dichroické zrcadlo

- při dopadu paprsků pod úhlem 45° odráží excitační světlo o kratší vlnové délce a naopak propouští emitované světlo o delší vlnové délce

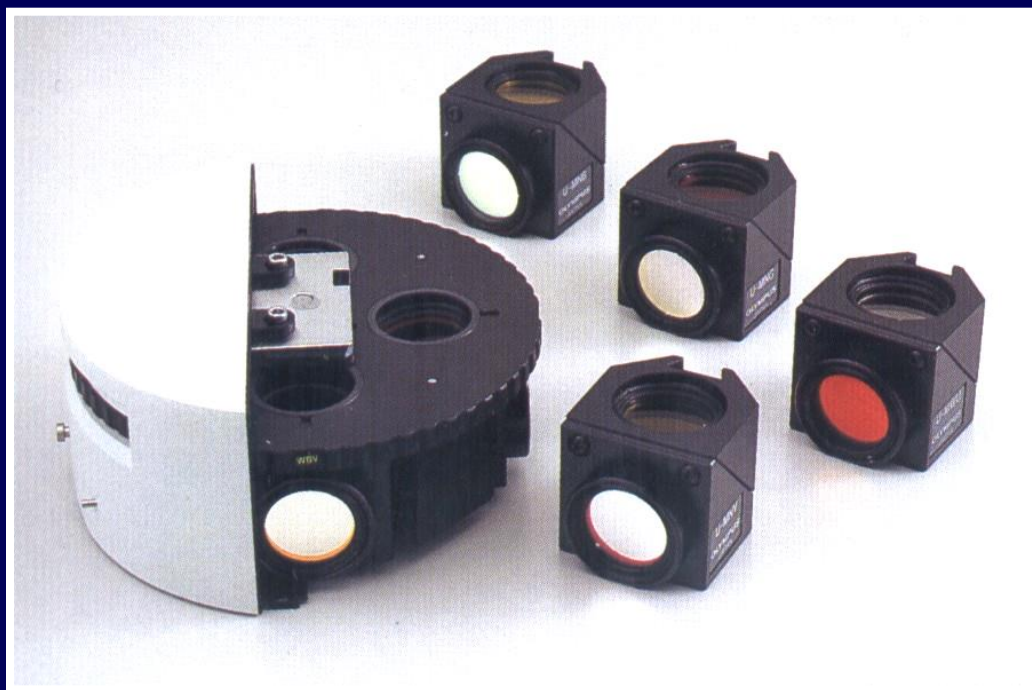
(zrcadlo je tvořeno deseti či více vrstvami dielektrického materiálu střídavě vysokého a nízkého indexu lomu)



Stavba fluorescenční kostky



Revolverový výměník

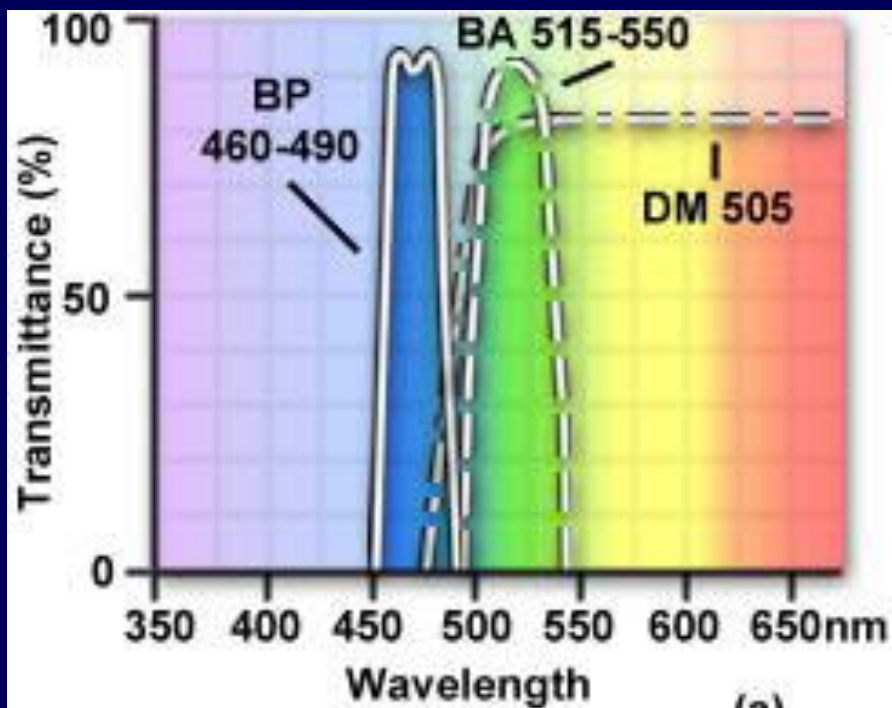


<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/blue/b2ec/b2ecindex.html>

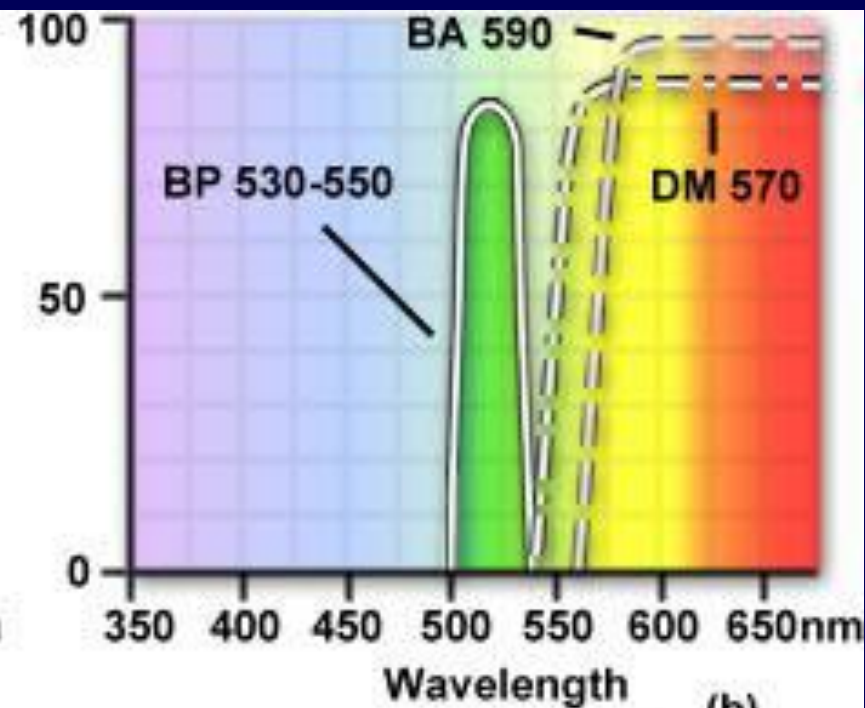


destička z plexiskla
- ochrana pozorovatele

Umístění fluorescenčních kostek v mikroskopu



(a)



(b)

Propustnost (transmise) excitačního a bariérového filtru

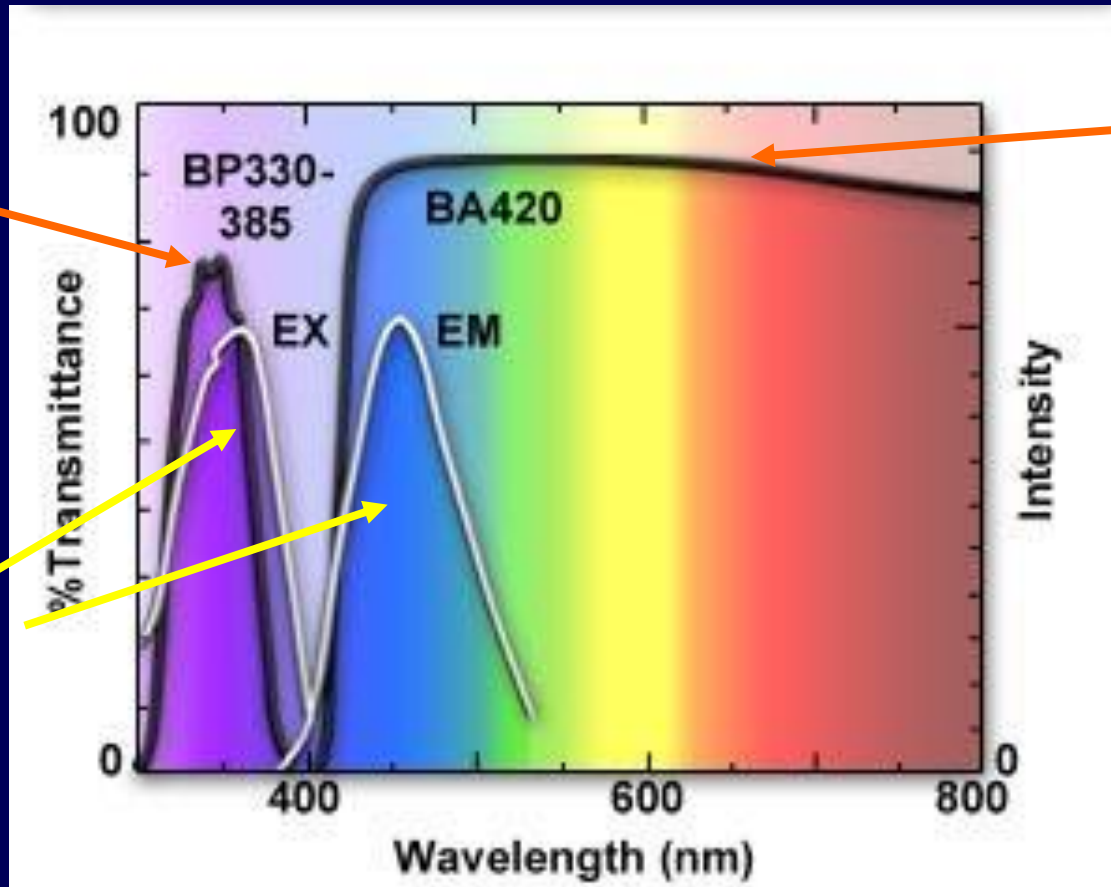
U – excitace (DAPI – WU kostka)

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

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

BP330-385
excitační
filtr

Ex - excitační
a Em - emisní
spektrum
DAPI



BA420
bariérový
filtr

Aplikace fluorescenčních technik při studiu buňky:

- kontrastování buněčných struktur v živých i fixovaných buňkách (NK, jádra, jadérka, chromozómy, organely, cytoskelet, buněčná stěna....)
- detekce specifických molekul (bílkovin, lipidů, sacharidů)
- detekce bakterií aj. patogenů (kvasinek, plísní, fytoplazem ...) v pletivech nebo tkáních, sputu, moči a likvoru
- rozlišení živých a neživých buněk - testy životaschopnosti buněk (fluorochrom fluorescein diacetát)
- - fluorescenční indikace pH
 - měření koncentrace intracelulárních iontů
 - monitorování membránového potenciálu
 - transport membránou
 - interakce léčiv s membránou, atd.
- imunofluorescenční techniky (viz dále) – lékařská diagnostika, imunologie, hematologie, genetika

<http://www1.lf1.cuni.cz/%7Ezfishar/fluorescence/>

Pokud nenajdeme vhodný fluorochrom pro přímou fluorescenci, použijeme imunofluorescenci

Imunofluorescence

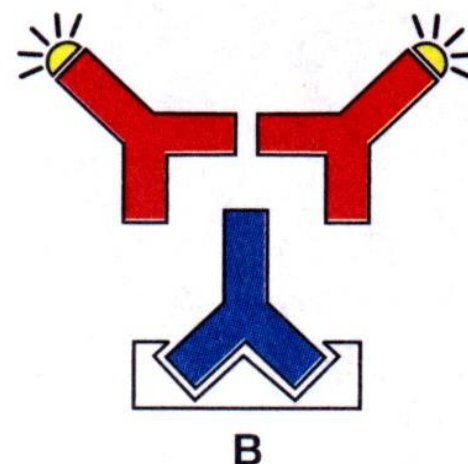
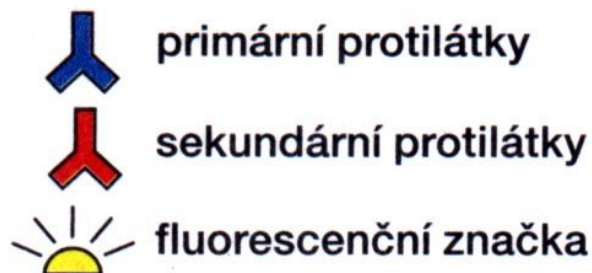
■ Princip:

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



Nepřímá imunofluorescence:

1. na primární protilátku se váže komerčně dodávaná sekundární protilátka konjugovaná s fluorochromem (nižší specifita oproti přímé imunofluorescenci)
2. na primární protilátku se váže biotin, na který se místo sekundární protilátky váže avidin (bazický glykoprotein) značený fluorochromem → jasná a ostrá fluorescence

■ Využití imunofluorescence:

- vizualizace buněčných struktur (např. cytoskeletu)
- detekce buněčných antigenů pomocí specifických protilátek
- detekce specifických antigenů a protilátek spojených s určitými chorobami (ve virologii: např. průkaz některých herpetických virů (Cytomegalovirus - CMV) pomocí fluorochromu FITC, detekce viru EBV, zjištění celiakie onemocnění - systémový lupus erythematosus aj.)
- HLA typizace (= Hlavní histokompatibilní systém)
- detekce nádorově změněných buněk

Autofluorescence

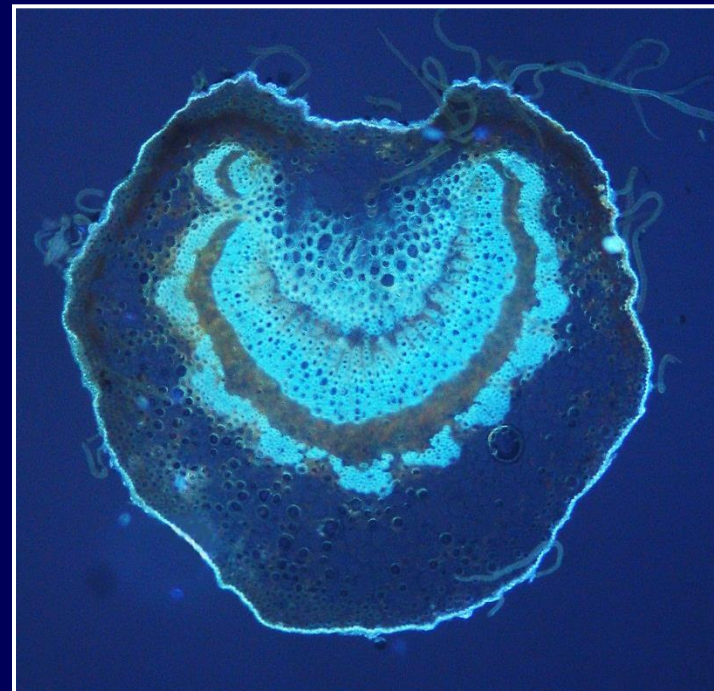
- příčný řez řapíkem jabloně

Kostka WB



Z = 40x

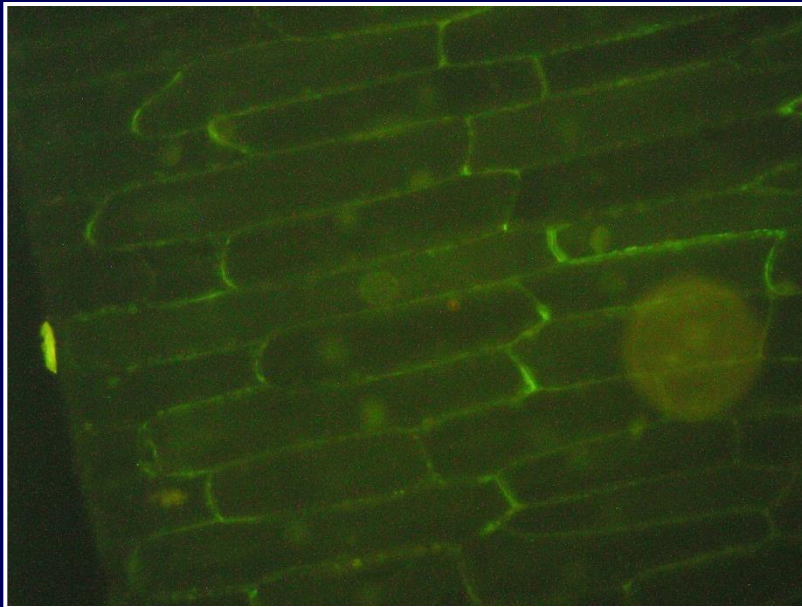
Kostka WU



Z = 40x

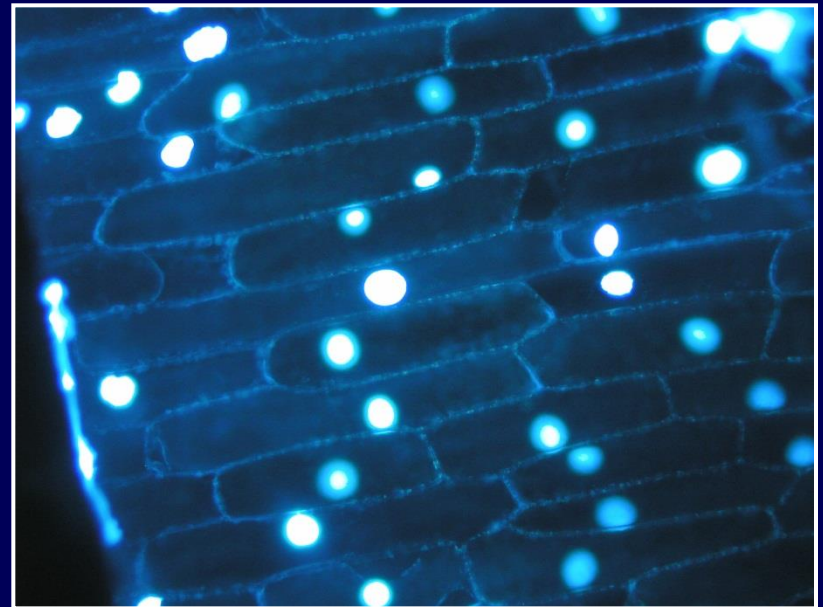
Sekundární fluorescence barvení DAPI - jádra pokožkových buněk u cibule

Kostka WB



Z = 200x

Kostka WU

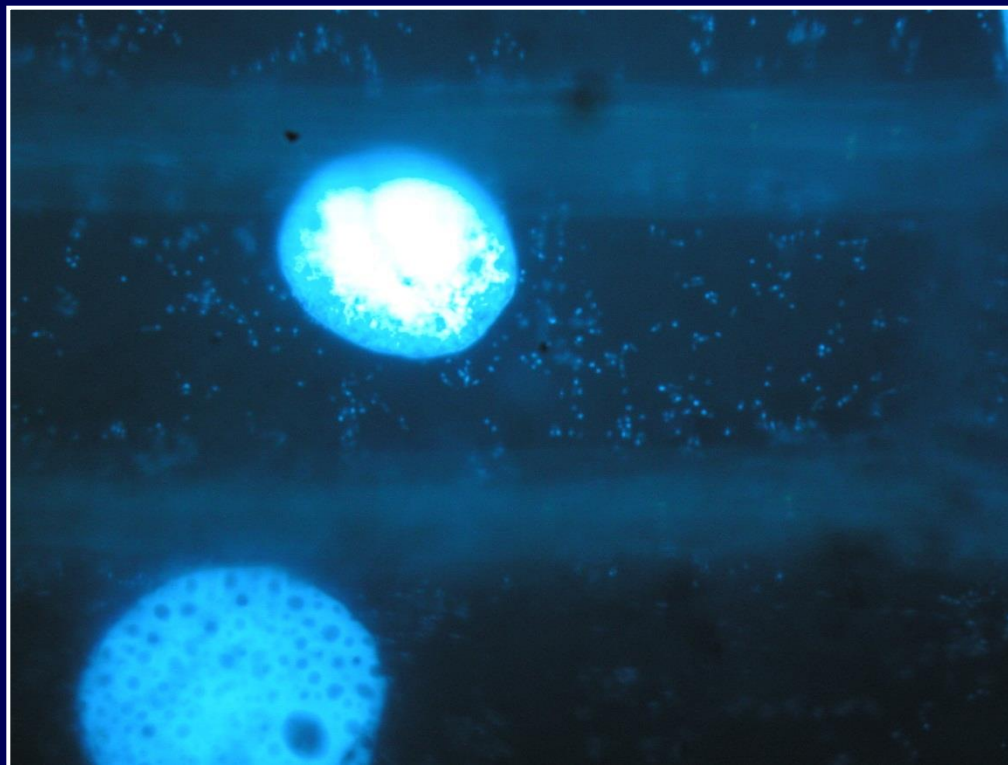


Z = 200x

Sekundární fluorescence barvení DAPI

- jádra pokožkových buněk u cibule

Fluorescenční
kostka WU

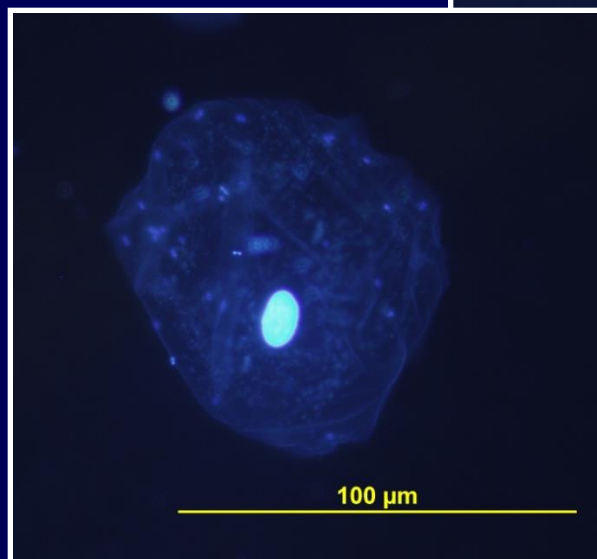


Z = 1 000x, imerze; foto Pavla Válová

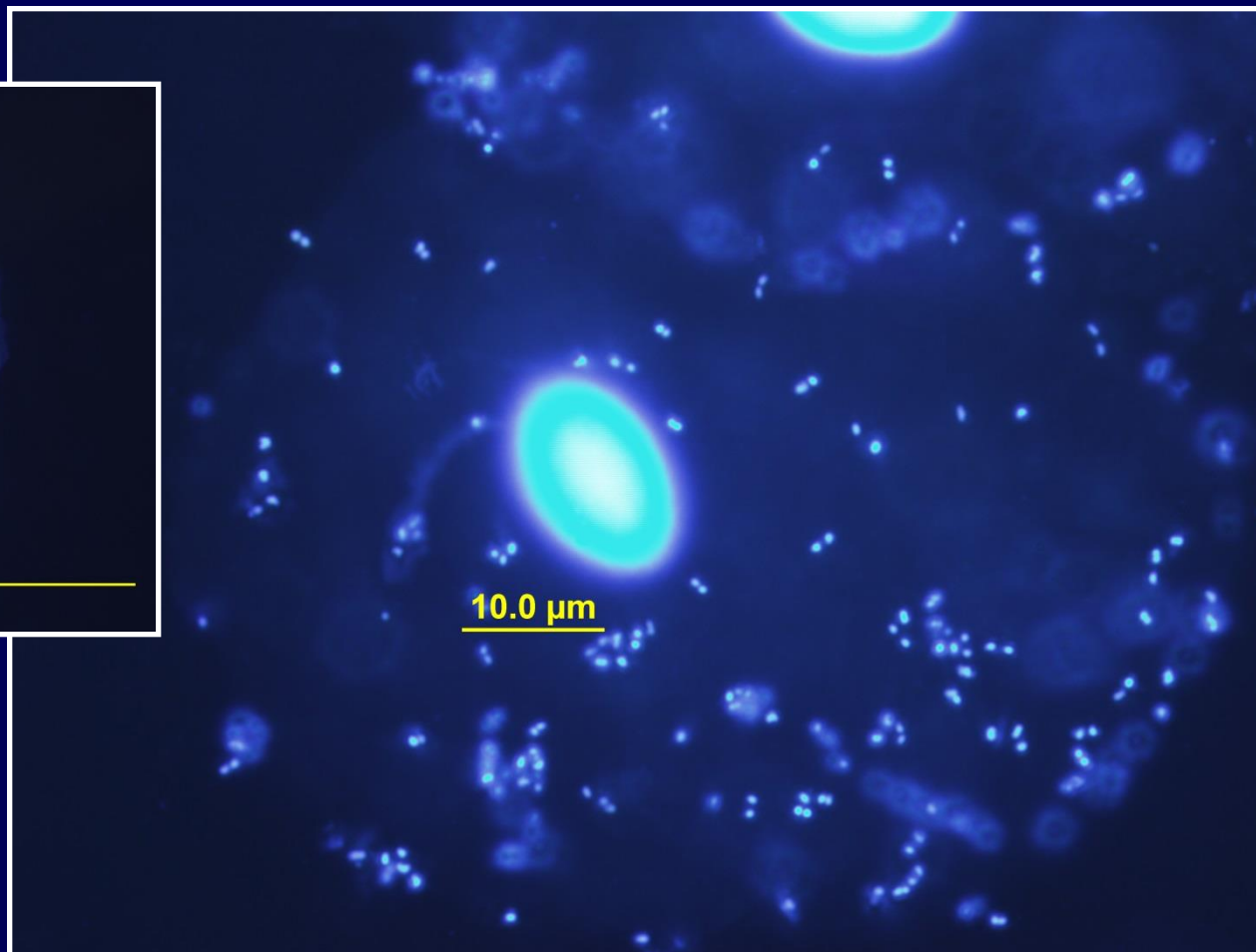
Sekundární fluorescence barvení DAPI - buňka bukové sliznice



Světlé pole



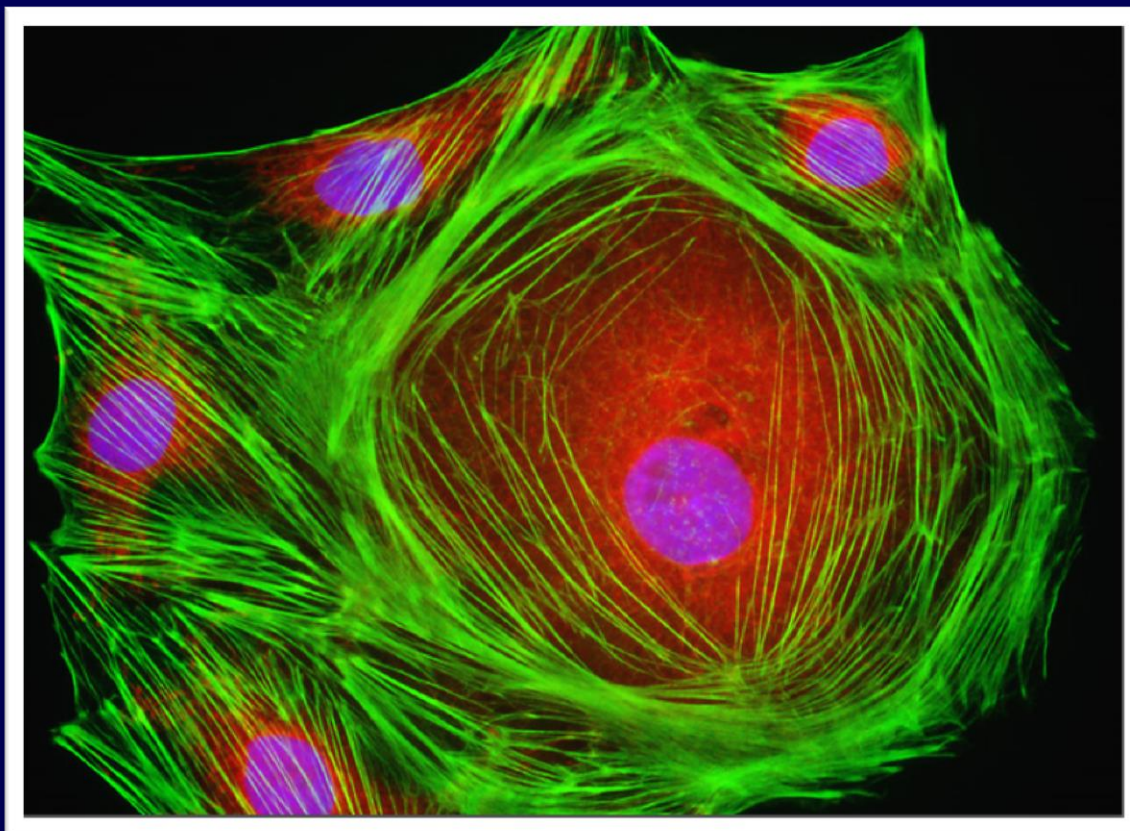
Z = 400x



Z = 1 000x, imerze; foto Pavla Válová

Vícenásobné barvení:

- v jednom experimentu označení různých receptorů pomocí rozdílných fluorescenčních barviv
- postupné snímání obrázků s různými fluorescenčními kostkami a dodatečné složení v počítači

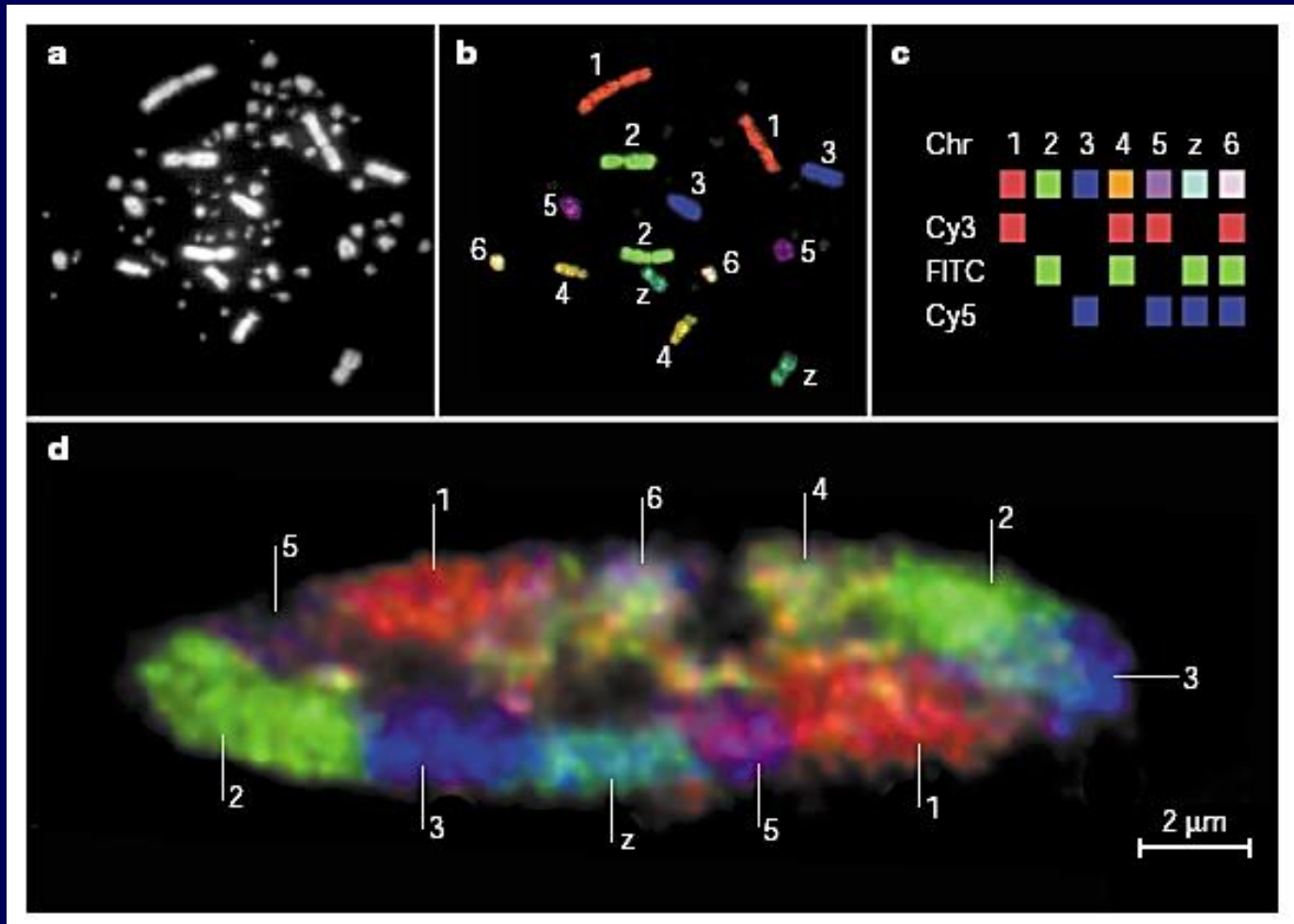


**Buňky ledvin zabarvené
fluorochromy
Texas Red, Alexa Fluor
488 a DAPI**

Zdroj:

[https://micro.magnet.fsu.edu/
primer/techniques/fluorescen
ce/gallery/cells/ptk2/ptk2cells
exlarge3.html](https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/ptk2/ptk2cells_exlarge3.html)

Využití vícenásobného fluorescenčního barvení k výzkumu chromozomových teritorií - **jádro buňky kuřete**



Spektrální karyotypizace chromozómů - Multicolor painting
(fluorescenční barvení - malovací sondy; M-FISH metoda)

- Navázáním specifických protilátek je výrazně ovlivněna funkce a chování proteinů

Použití imunofluorescence hlavně pro:

- **pozorování statického rozmístění proteinů** - především na zafixovaných (mrtvých) buňkách

(při použití protilátek v živých buňkách je nutné zajistit jejich zavedení do buněk, ke kterému se nejčastěji používá mikroinjekce)

- Za účelem **studia dynamického chování proteinů** byla vyvinuta technika, při které je buňka **geneticky pozměněna** tak, že **produkuje fluorescenční formu daného proteinu**. Tato technika využívá vlastností fluorescenčních proteinů (např. **GFP**).

Fluorescenční značky - GFP

- Příklad fluorescenční značky:

GFP

(Green Fluorescent Protein)

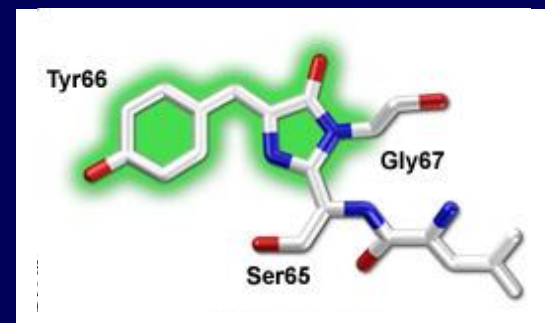
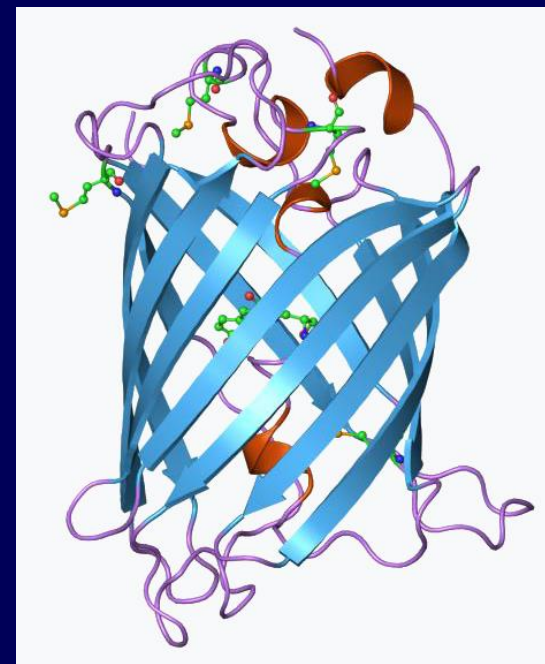
Soudkovitý tvar molekuly GFP

(barel o velikosti cca 4,2 nm x cca 4,2 nm)

- **238 aminokyselin**
- **uvnitř je skupina tří aminokyselin**
(SYG – **s**erin, **t**yrosin, **g**lycin)



Fluorochromem GFP je heterocyklická
sloučenina -
p-hydroxybenzyliden-imidazilonin

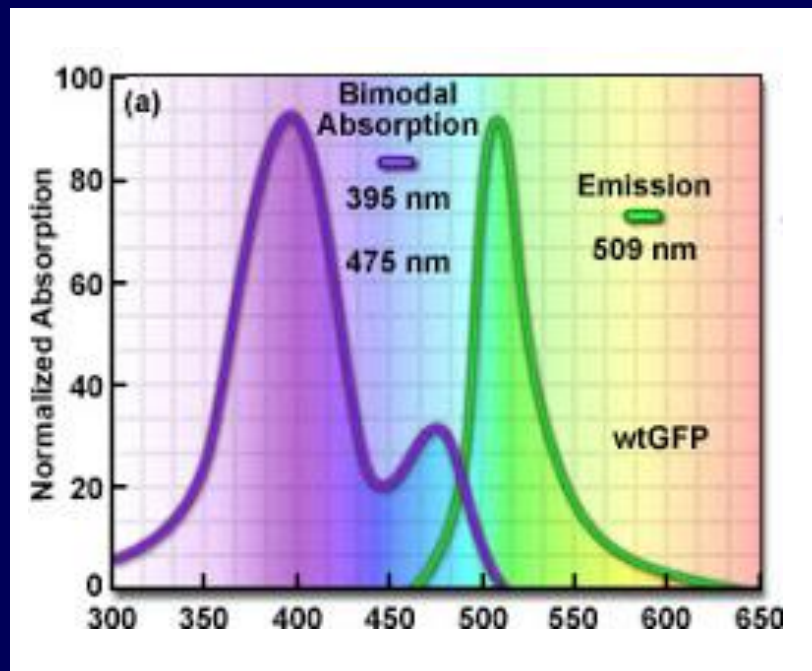




- izolace svítícího proteinu původně z medúzy pohárkovky (*Aequorea victoria*)

GFP

Excitační a emisní spektrum



EX: 395, 475 nm

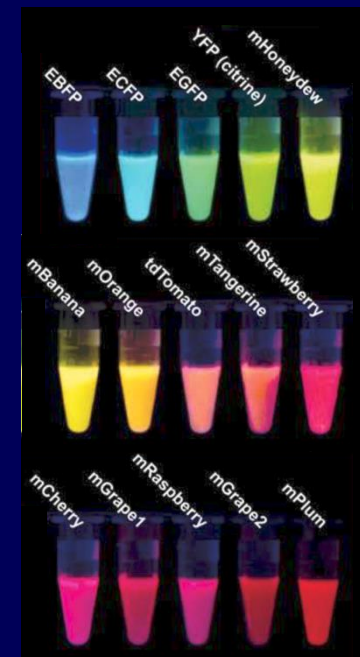
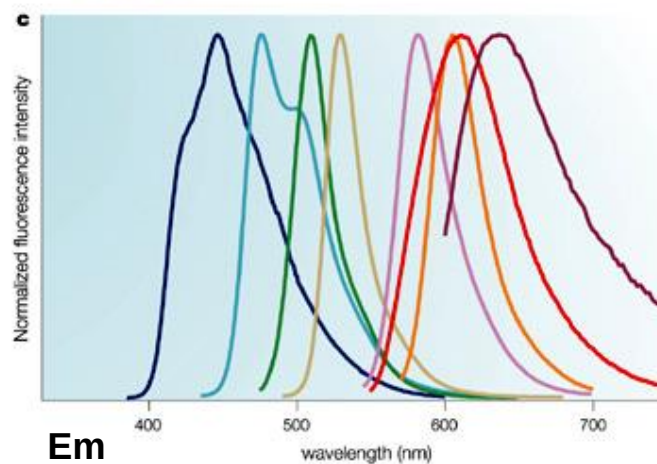
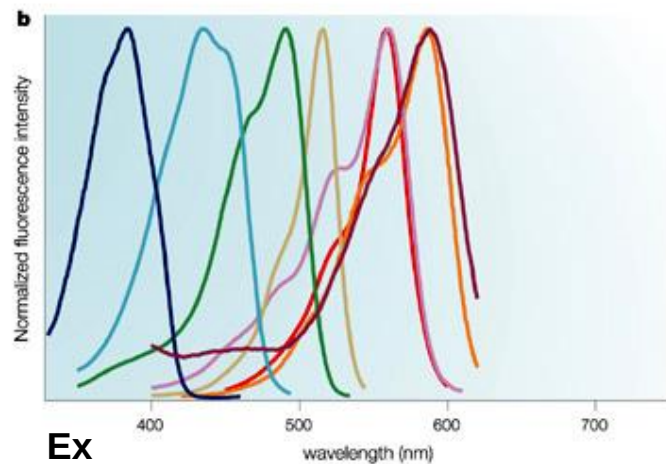
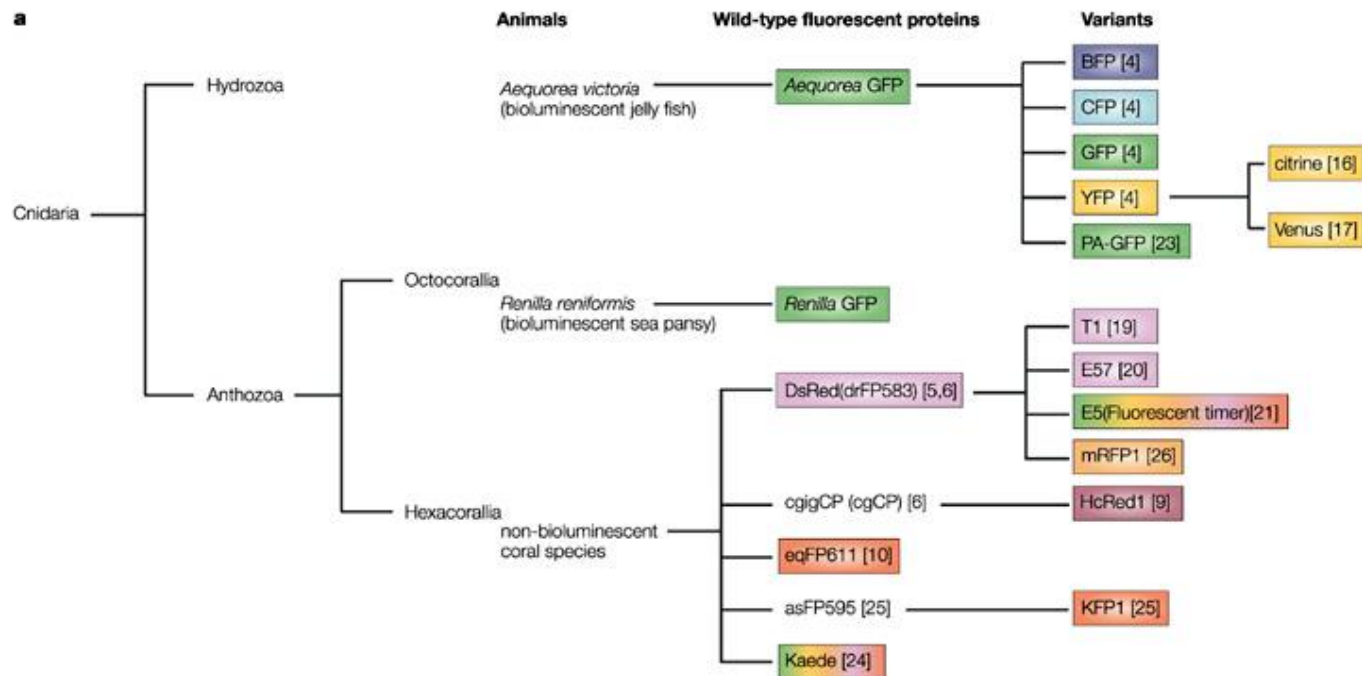
EM: 509 nm

- „divoký (wild type)“ wtGFP – dvě excitační maxima (395 a 475 nm). Modifikace wtGFP – posun hlavního maxima do modré oblasti, po osvětlení **modrým** světlem (488 nm) fluoreskuje **zeleně** (509 nm)

Barevné varianty: **YFP** – žlutá (yellow), **CFP** – modrozelená (cyan), **RFP** – červená (red)

- izolace a využití fluorescenčních proteinů i z jiných organismů

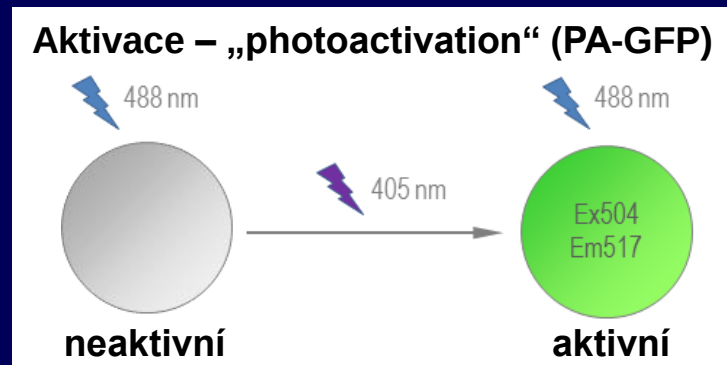
Použití: DNA studovaného proteinu lze geneticky modifikovat tak, aby se po translaci na konci molekuly nacházel připojen fluorescenční protein – jeho lokalizaci pak můžeme sledovat po ozáření světlem příslušné vlnové délky



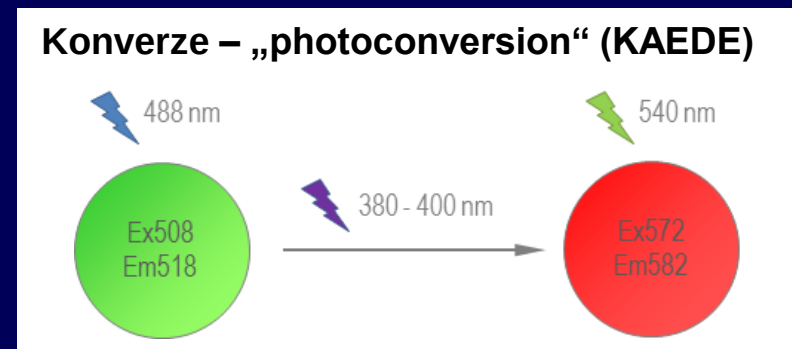
Barevná škála fluorescenčních proteinů

Fotoaktivovatelná varianta GFP (PA-GFP)

- PA-GFP – modifikovaná varianta GFP. Svítí až po aktivaci laserem o krátké λ (400-420 nm), čímž se změní struktura molekuly PA-GFP, a tím se aktivuje schopnost fluorescence v oblasti zeleného světla



- další způsoby aktivace fluorescenčních proteinů



GFP (fluorescenční proteiny) – využití

- reportér pro studium exprese genů
- sledování lokalizace a kolokalizace různých proteinů
- sledování dynamiky proteinů a organel *in vivo*
- sledování transportních procesů (trafficking) *in vivo* v reálném čase
- superrozlišovací mikroskopie (PA-GFP)
- purifikace proteinů
- flow cytometrie

Nobelova cena 2008 za chemii

objev zeleného fluorescenčního proteinu (GFP)



Osamu Shimomura – první izoloval svítící bílkovinu z medúzy (1962)

Martin Chalfie – první praktické sledování proteinů v organismech pomocí GFP (značení neuronů pro hmatové receptory)

Roger Y. Tsien - objasnil fluorescenční mechanismus GFP a různými modifikacemi rozšířil škálu barev (excitační a emisní spektra)

Některé ze specializovaných fluorescenčních metod:

- Vybělení fluorescence (fotodegradace)
 - FRAP, FLIP
 - Nezářivý přenos excitační energie – FRET
 - Totální odraz excitačního záření – TIRF
-
- široké uplatnění fluorescenčních proteinů, ale využívají se i vhodná fluorescenční barviva
 - důležitý silný zdroj záření – laser

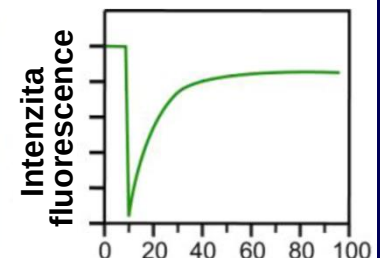
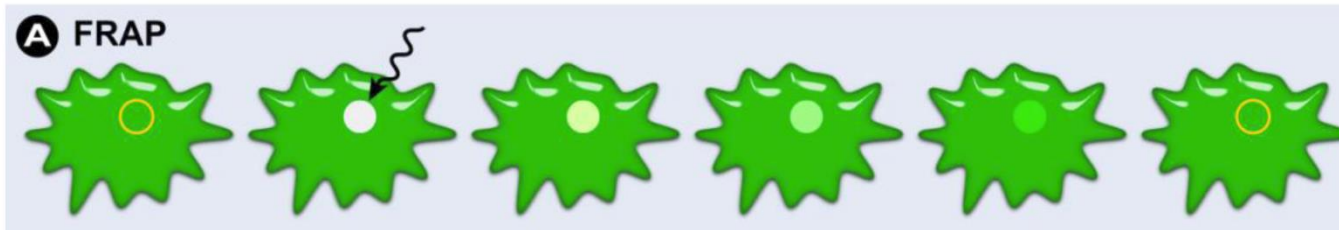
Vybělení fluorescence – FRAP

(Fluorescence Recovery After Photobleaching)

- sledujeme opětovný nárůst fluorescence ve „vyběleném“ objemu po ozáření laserem

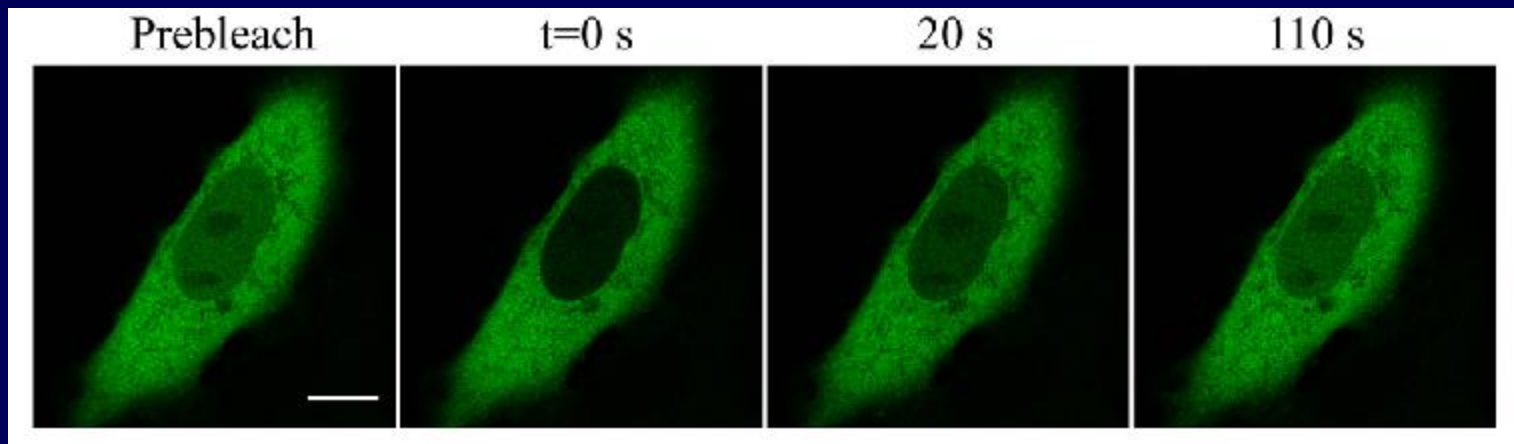
Princip:

- osvětlení oblasti sledované buňky intenzivním laserovým pulzem vlnové délky odpovídající excitační vlnové délce GFP
- molekuly proteinu s GFP v dané oblasti ztratí schopnost fluoreskovat („vybělení“ oblasti)
- molekuly mimo oblast ozáření pronikají do této „vybělené“ oblasti



Vybělení fluorescence FRAP

- příklad



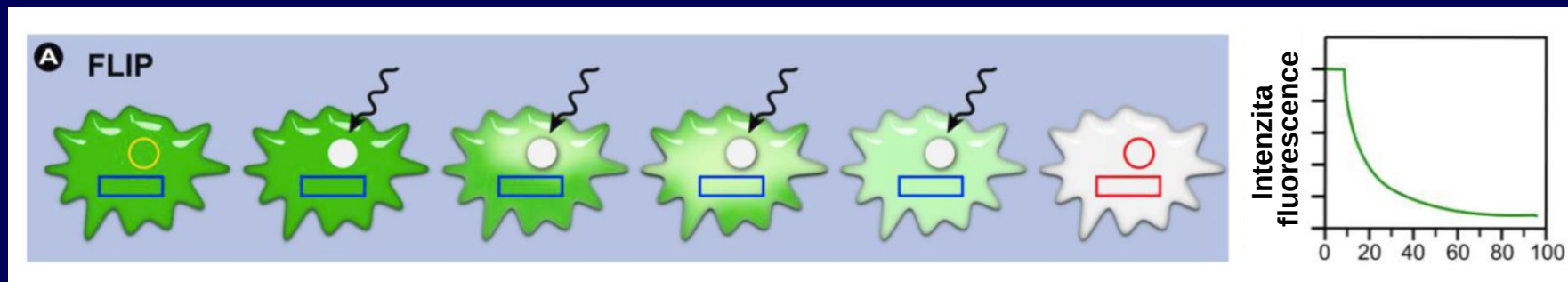
Cardarelli *et al.* (2012) *J. Biol. Chem.*, 287: 5554-5561

Analýza pohybu jaderného exportního signálního proteinu (NES) po vybělení jádra buňky

Vybělení fluorescence – FLIP

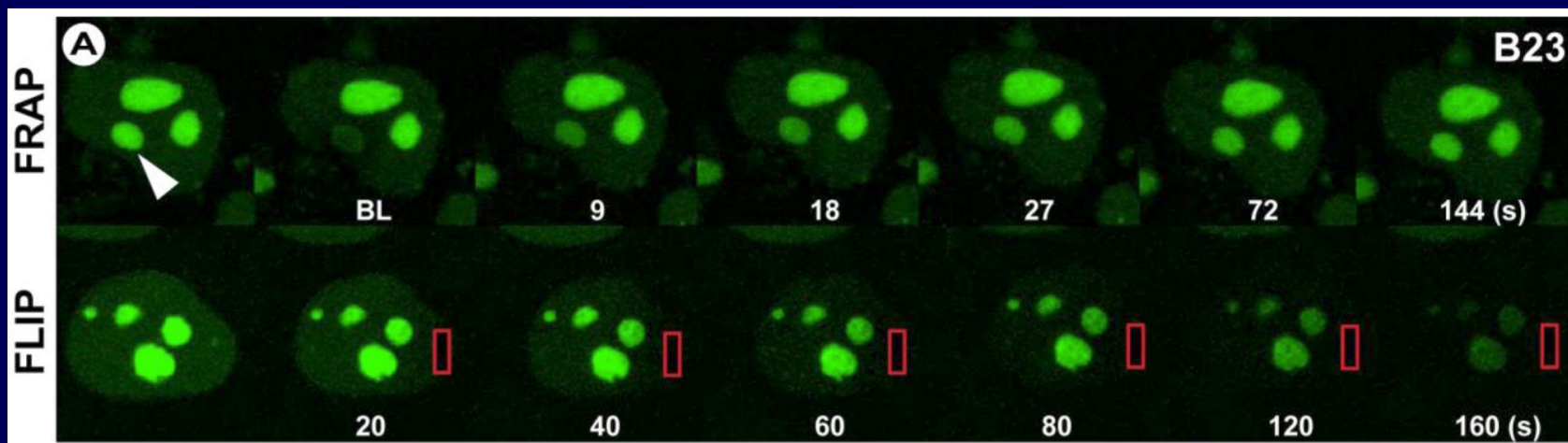
(Fluorescence Loss Induced by Photobleaching)

- sledujeme úbytek fluorescence mimo „vybělený“ objem po opakovaném ozařování intenzivním laserovým pulzem



Ishikawa-Ankerhold *et al.* (2012) *Molecules*, 17: 4047-4132

Vybělení fluorescence FRAP vs. FLIP



Ishikawa-Ankerhold *et al.* (2012) *Molecules*, 17: 4047-4132

Využití:

sledování intenzity a rychlosti pohybů molekul proteinů označených pomocí GFP

Nezářivý přenos excitační energie – FRET

(Förster Resonance Energy Transfer)

- přenos energie fluorescenční rezonancí mezi dvěma vhodnými fluorochromy nacházející se v příhodné vzdálenosti (cca 5 nm)

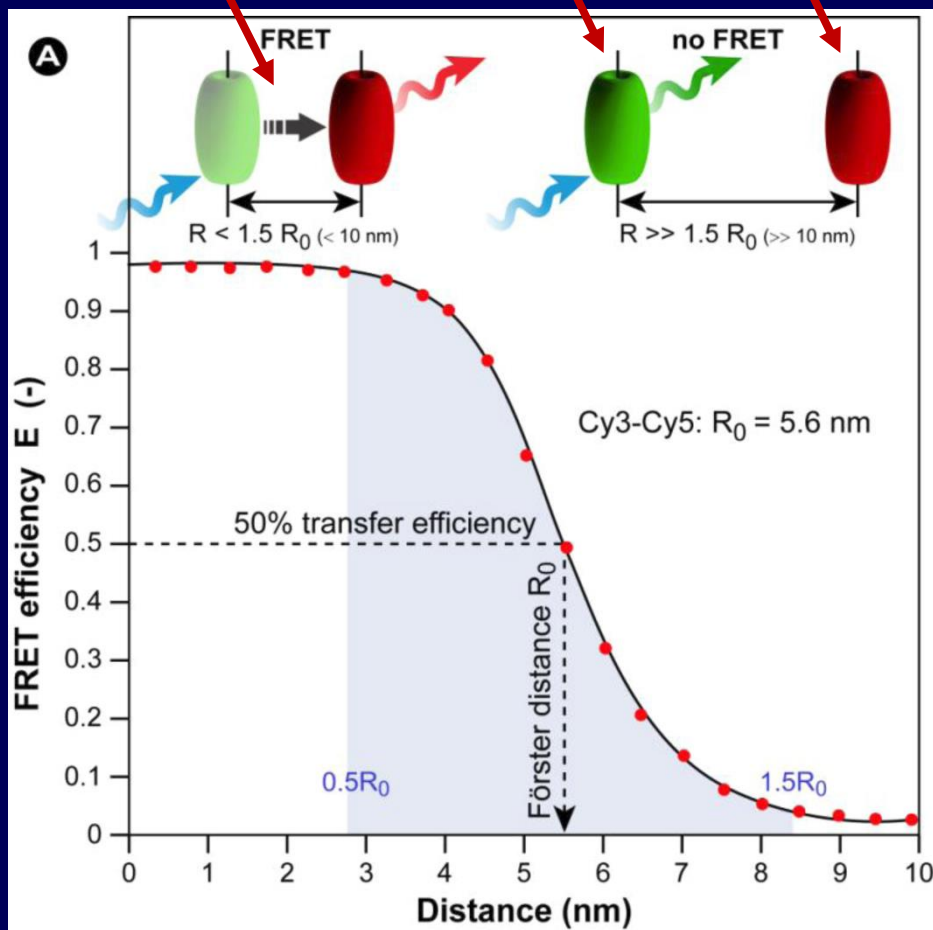
Využití:

- sledování interakcí mezi proteiny
- zkoumání prostorového rozložení a konformace proteinů
- zkoumání degradace proteinů

Nezářivý přenos excitační energie FRET

Princip: Em donoru ~ Ex akceptoru

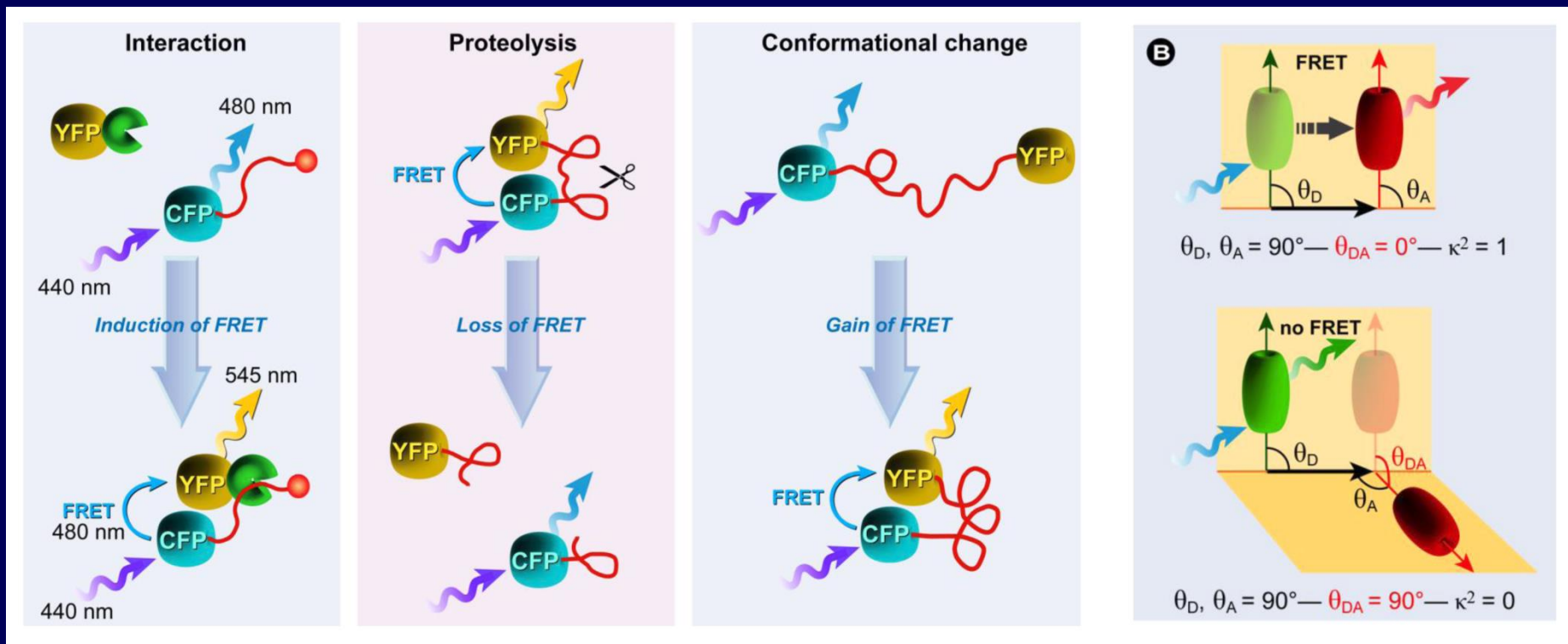
nezářivý přenos donor akceptor



Ishikawa-Ankerhold
et al. (2012)
Molecules, 17: 4047-
4132

Nezářivý přenos excitační energie FRET

Využití:

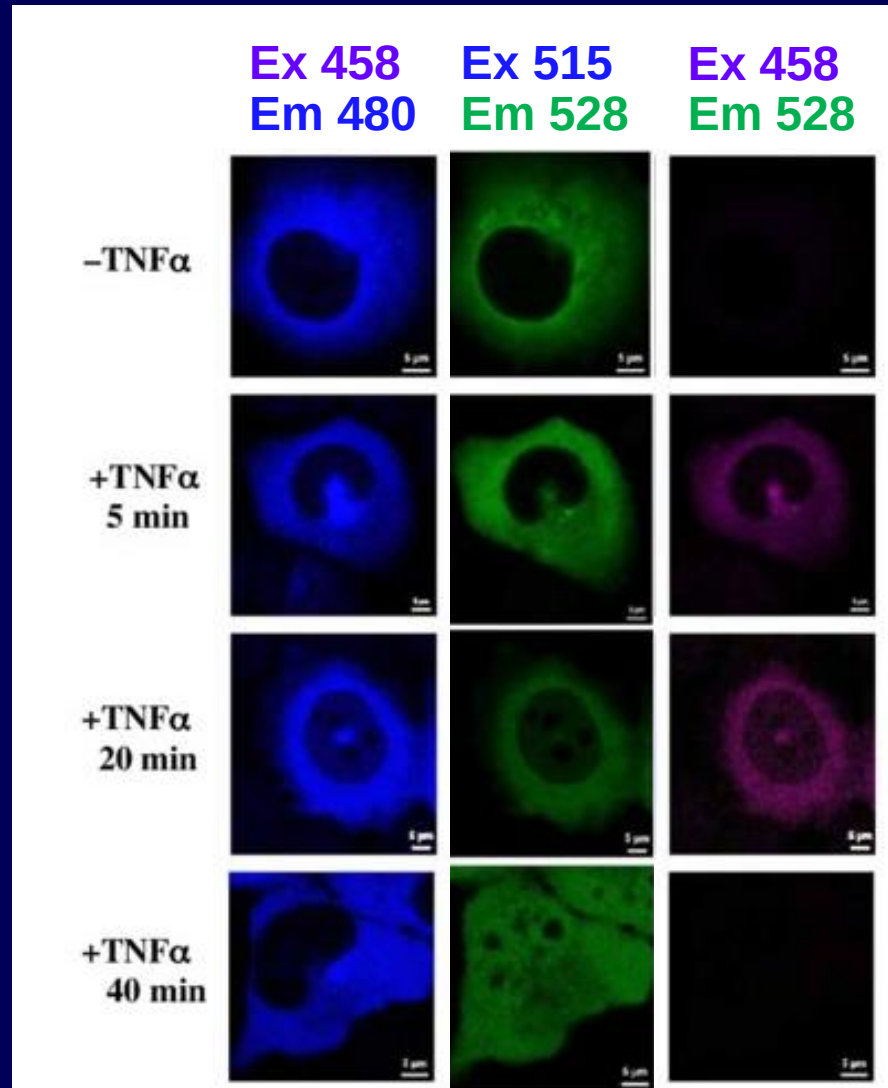


Ishikawa-Ankerhold *et al.* (2012) *Molecules*, 17: 4047-4132

Nezářivý přenos excitační energie FRET

- příklad:

Interakce JLP
„scaffolding“
proteinu (modrý)
a NF- κ B (zelený)
v perinukleárním
prostoru buňky po
působení TNF α



←
artifciálně
přirazena
barva
←

Lee *et al.* (2019)
Science Advances, 5,
no. 8, eaav0318

Totální odraz excitačního záření – TIRF

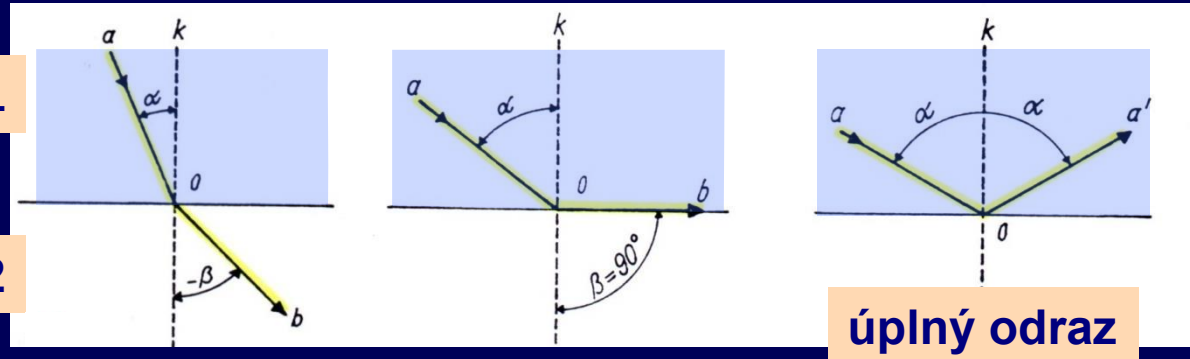
(Total Internal Reflection Fluorescence)

- pro pozorování fluorescence jednotlivých molekul
v povrchové vrstvě na rozhraní dvou prostředí

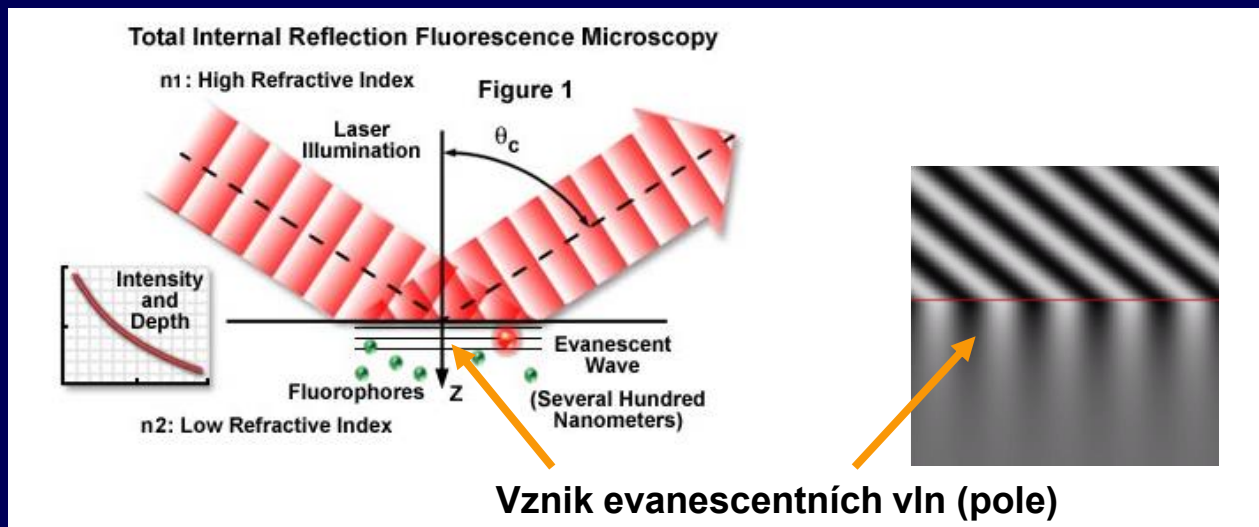
Lom a odraz světla na
rozhraní dvou prostředí
s odlišným indexem
lomu (n_1 je větší než n_2)

n_1

n_2



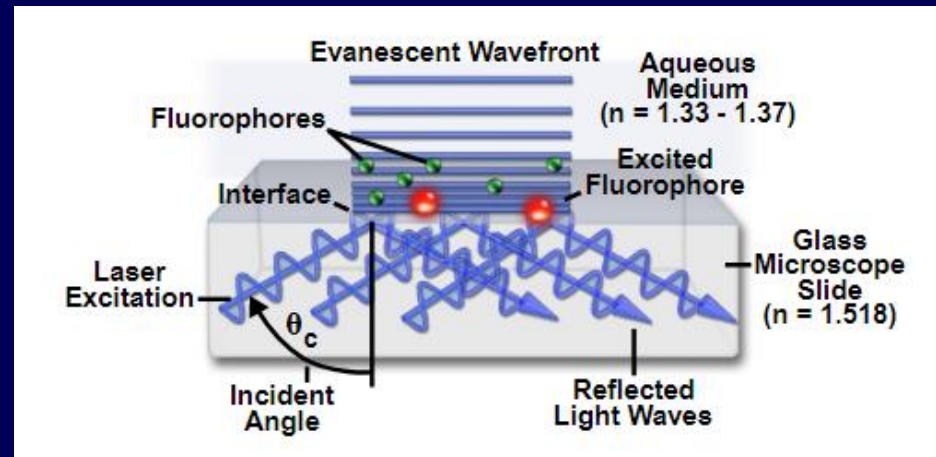
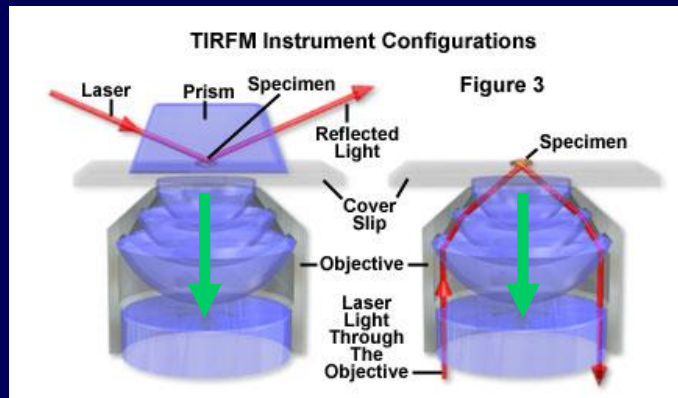
úplný odraz



Hloubka průniku
paprsků evanescentní
vlnou 100 – 200 nm

Totální odraz excitačního záření TIRF

Princip: **evanescentní vlna** vzniká na hranici prostředí, do něž periodická vlna nemůže proniknout. Evanescentní vlny následně excitují fluorochromy. Excitace je možná do vzdálenosti nejvíce několik stovek nanometrů od místa vzniku evanescentních vln (exponenciální pokles intenzity).

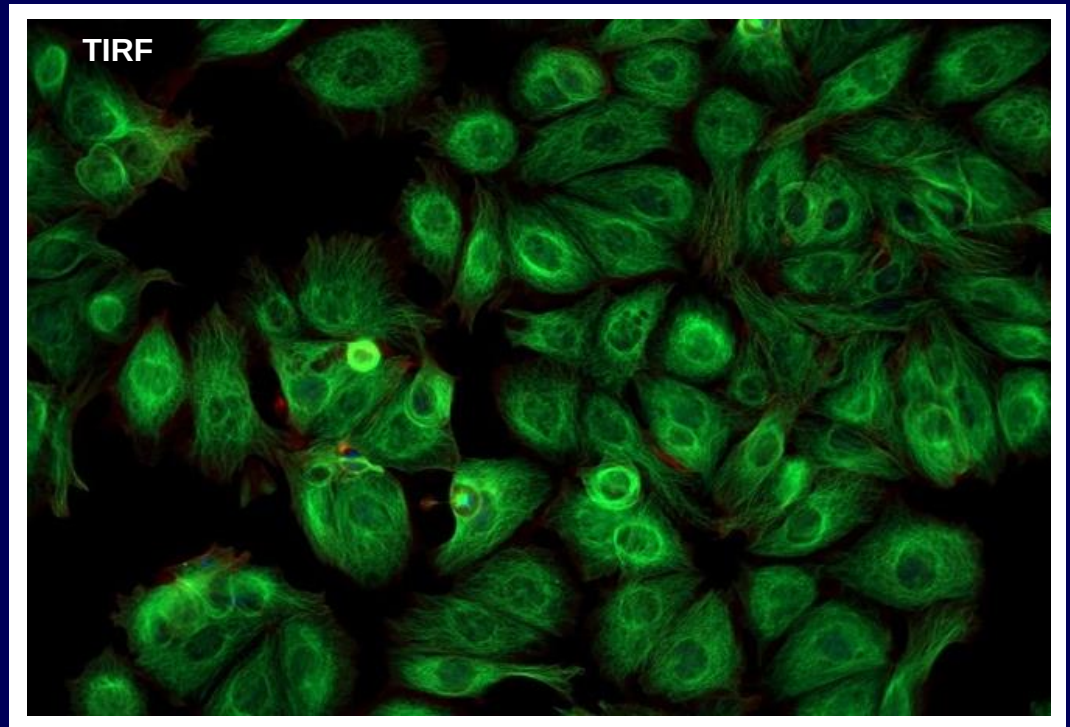
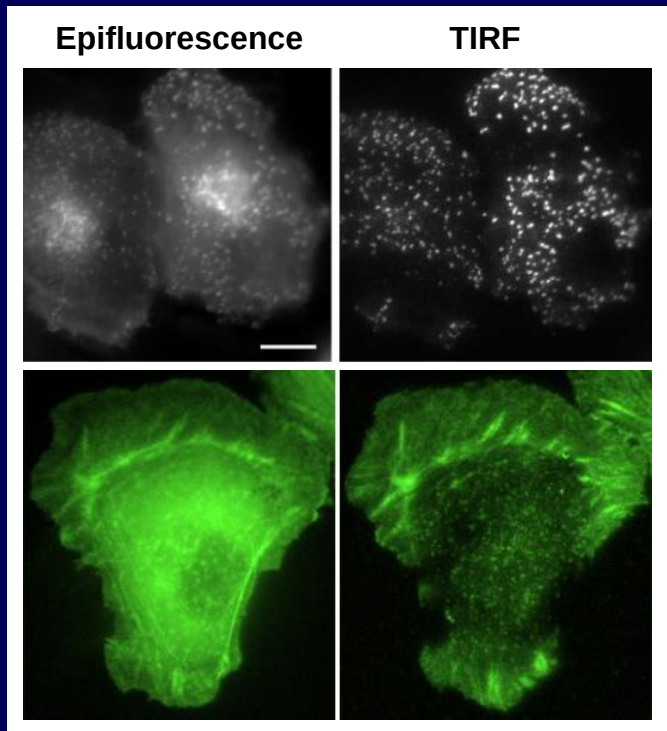


- speciální objektivy s vysokou NA ($\geq 1,6$)
- intenzivní zdroj světla (laser)

Totální odraz excitačního záření TIRF

Výhody: obraz vykazuje velmi vysoký kontrast s minimálním šumem způsobeným fluorescencí pozadí (u fluorochromů dál od povrchu nedochází k excitaci)

Nevýhody: pozorování omezeno na povrchovou vrstvu



<https://www.photometrics.com/learn/single-molecule-microscopy/tirf-microscopy>

<http://cammer.net/historical/aif/instructions/tirf/index.htm>

[https://www.news-medical.net/life-sciences/Total-Internal-Reflection-Fluorescence-\(TIRF\)-Microscopy-Applications.aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Total-Internal-Reflection-Fluorescence-(TIRF)-Microscopy-Applications.aspx)

Literatura k fluorescenci

Murphy D.B., Davidson, M.W. (2013): Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging. Willey-Blackwell. Published 2013 by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

Randy O., Wayne, R.O. (2014): Light and Video Microscopy.
Second Edition, Hardcover.

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/fluorhome.html>

Fišar: <http://www1.f1.cuni.cz/%7Ezfišar/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>

<http://www.zeiss.de/C12567BE0045ACF1/?Open>

<http://natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/>

Bednář, J., Staněk D., Malínský J., Koberna K., Raška I.:

Dnešní mikroskopie v biomedicíně. Vesmír 83, 581-585, 2004.

Černý, J.: Zelený fluorescenční protein. Vesmír 88: 228-231, 2009.

Sehadová, Hana: Fluorescenční a konfokální mikroskopie. Biologické centrum AVČR, České Budějovice, 2011.

- <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescencni-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>