

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

Přednáška 3_2

Fluorescenční mikroskopie

Pavla Válová, 2018

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

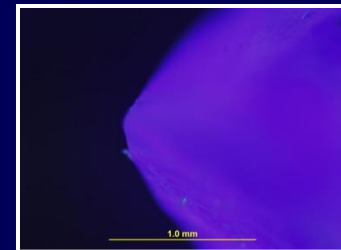
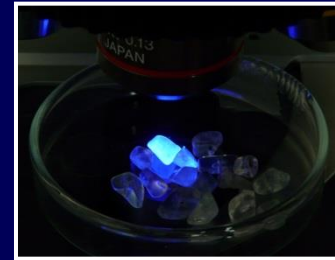
1911 - Carl Reichert

- 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

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).

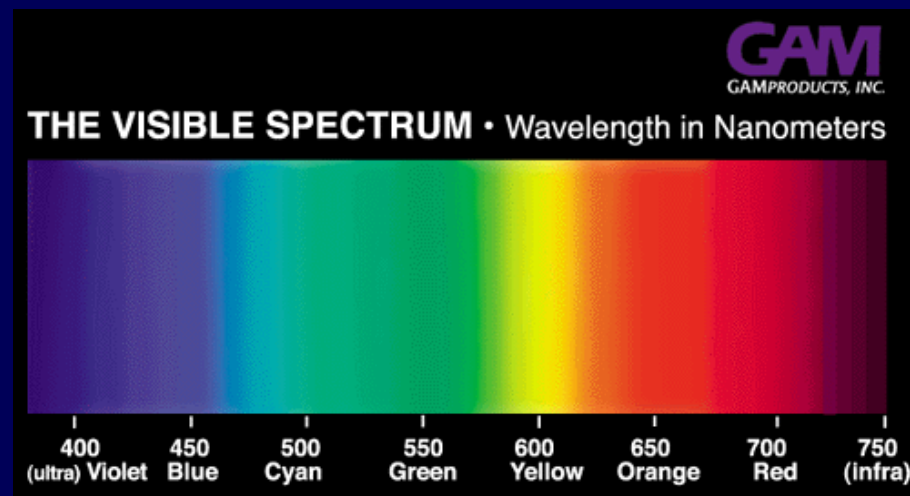
Záření je vysíláno ihned po vybuzení (excitaci) atomů nebo molekul a odeznívá během asi 10^{-8} sekundy

Spojité světelné spektrum

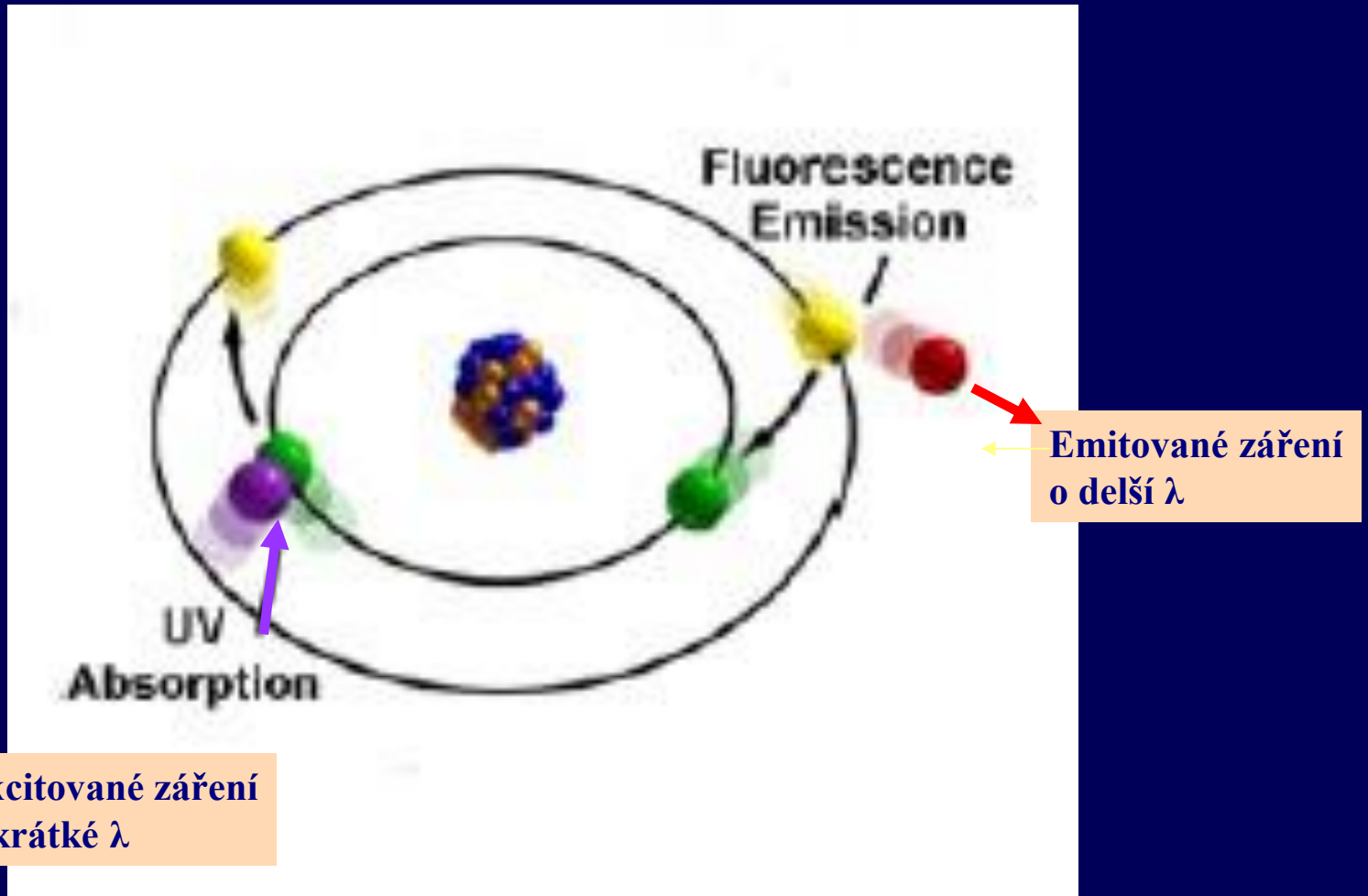
Sedm barev duhy a jejich vlnové délky

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)



Stokesovo* pozorování:



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

Jablonského* diagram

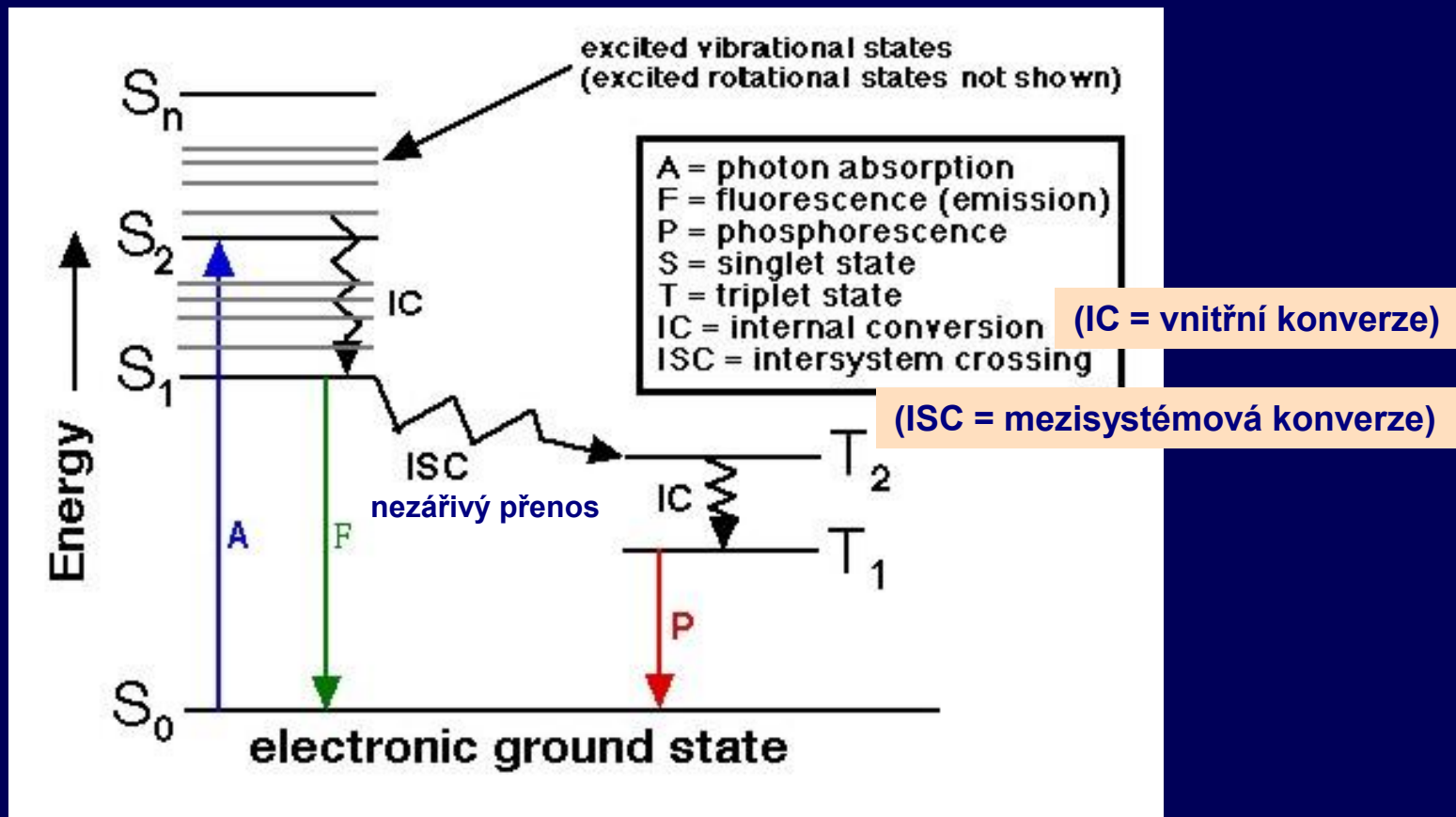


Schéma zářivých (F, P) a nezářivých přechodů (IC, ISC) mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu).

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/>

*Aleksander Jabłoński (1898-1980) – polský fyzik

Z hlediska zdroje fluorescence rozlišujeme:

primární fluorescence

(= autofluorescence, vlastní fluorescence, přirozená)

sekundární fluorescence

(= nevlastní fluorescence, indukovaná)

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

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

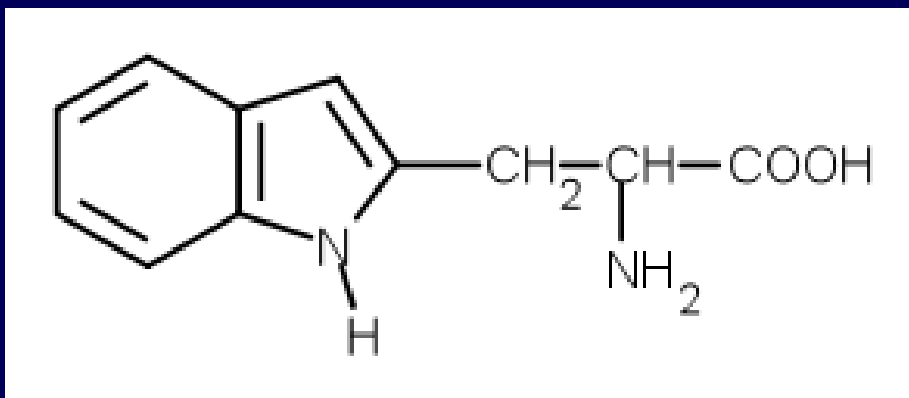
fluorescenční sondy – nekovalentní vazba (DAPI, EtB, PI)

Vlastní fluorescence bílkovin

Hlavní fluorofory v proteinech:

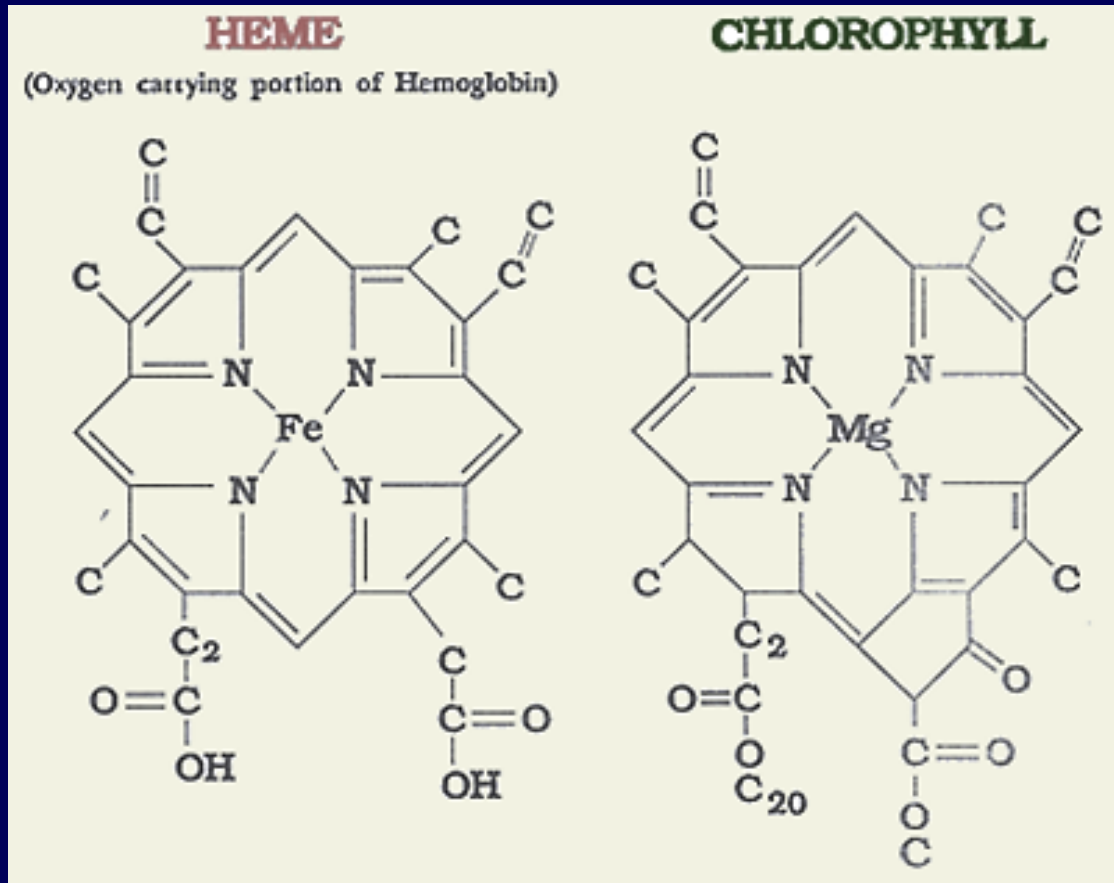
aromatické kyseliny

tryptofan (Try)
tyrosin (Tyr)
fenylalanin (Phe)



Tryptofan – excitace 295 nm, emise 354 nm

Autofluorescence

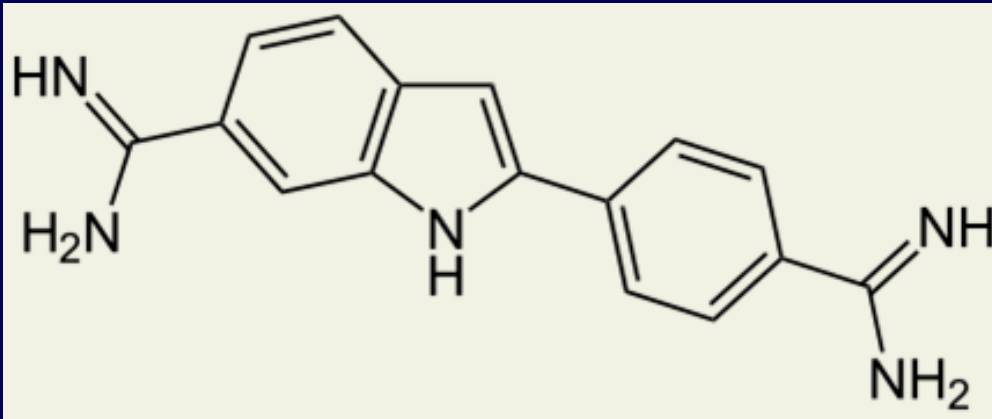


Chemická struktura fluoroforů:
aromatické sloučeniny s heterocykly s elektrony konjugovanými
v plochých “mracích” nad a pod rovinou ploché molekuly

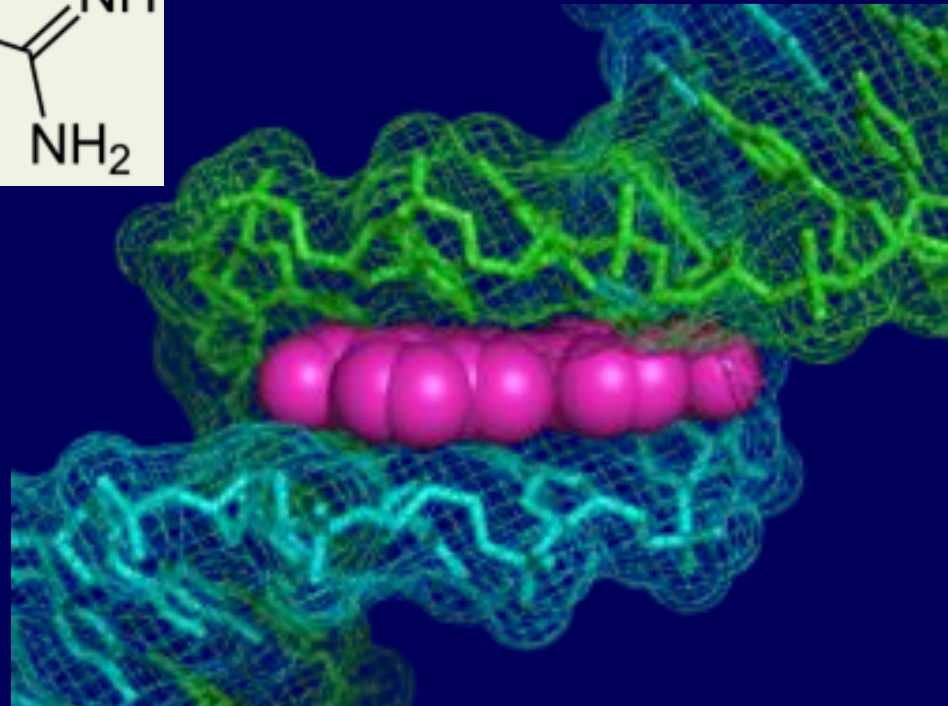
Nevlastní fluorofor DAPI

chemická struktura

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

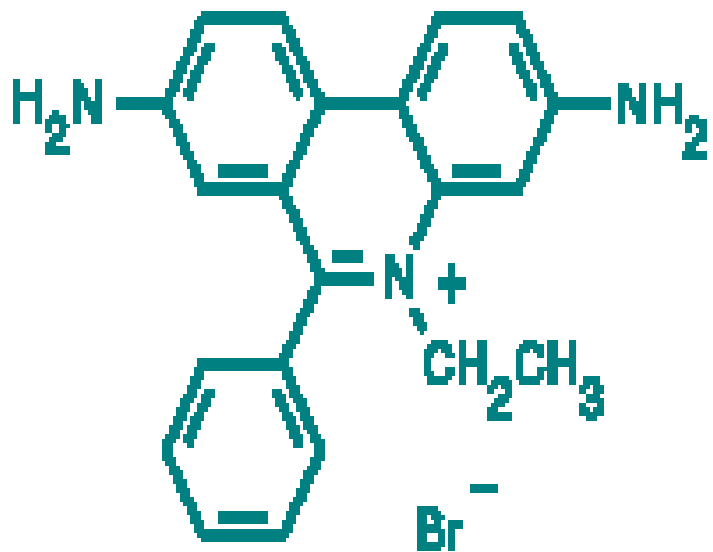


zabudování do DNA
struktury s A-T

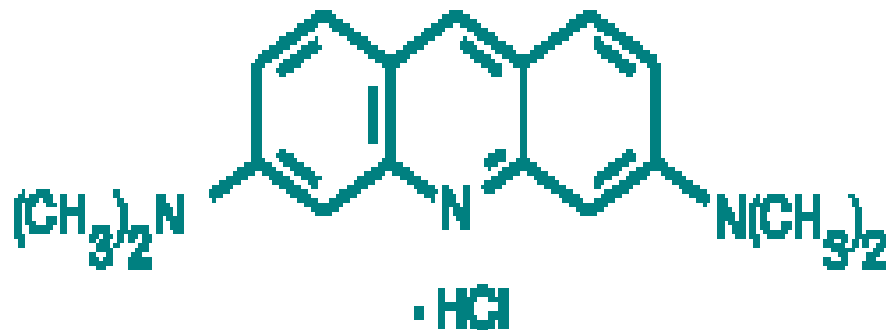


Chemická struktura fluorescenčních sloučenin:

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



ethidium bromid



akridinová oranž

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)

- v molekulární biologii:

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

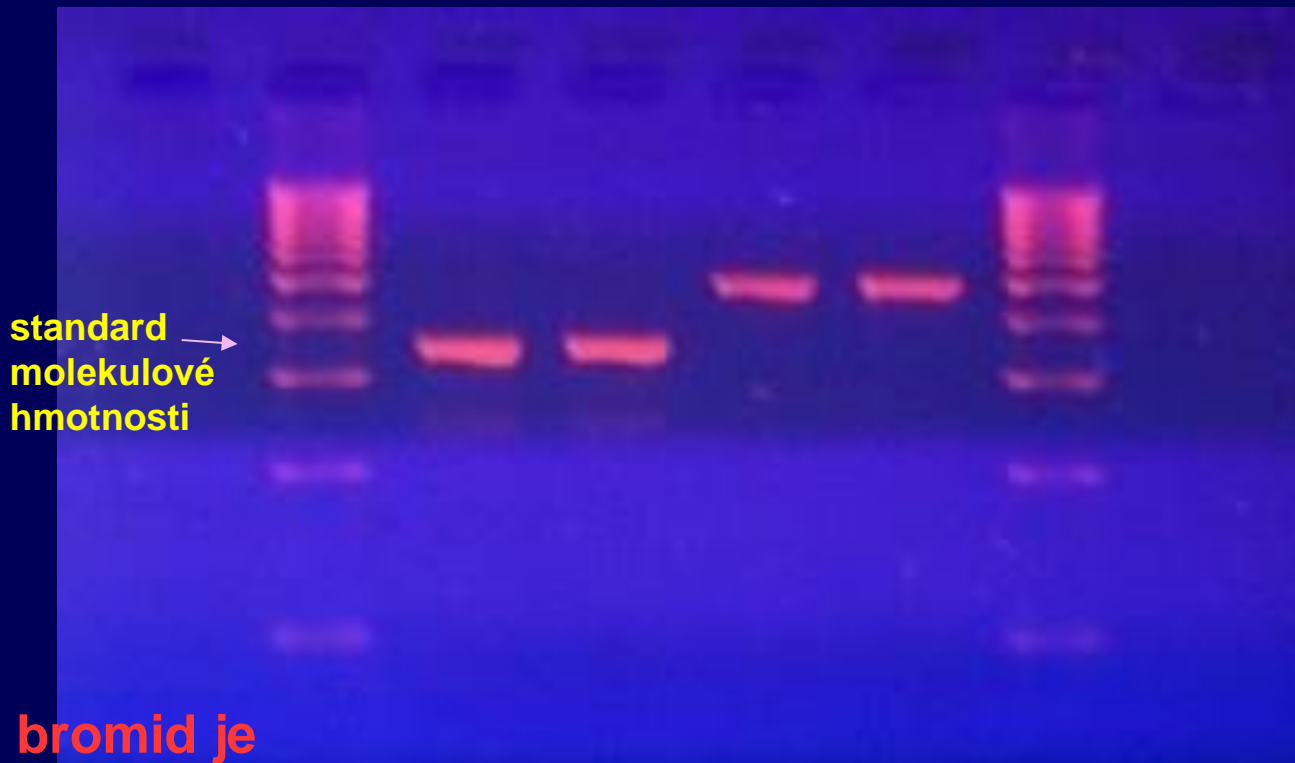
Hoechst 33258 (měření \underline{c} DNA ve fluorometru)

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

Molekulární majáky

Vizualizace produktů PCR* reakce horizontální elektroforézou v agarovém gelu

Fotografie pod UV prohlížečem: růžově svítící fluorescenční barvivo **ethidium bromid**, které se vmezeřilo do DNA.



standard
molekulové
hmotnosti →

POZOR!
Ethidium bromid je
silný mutagen !!!

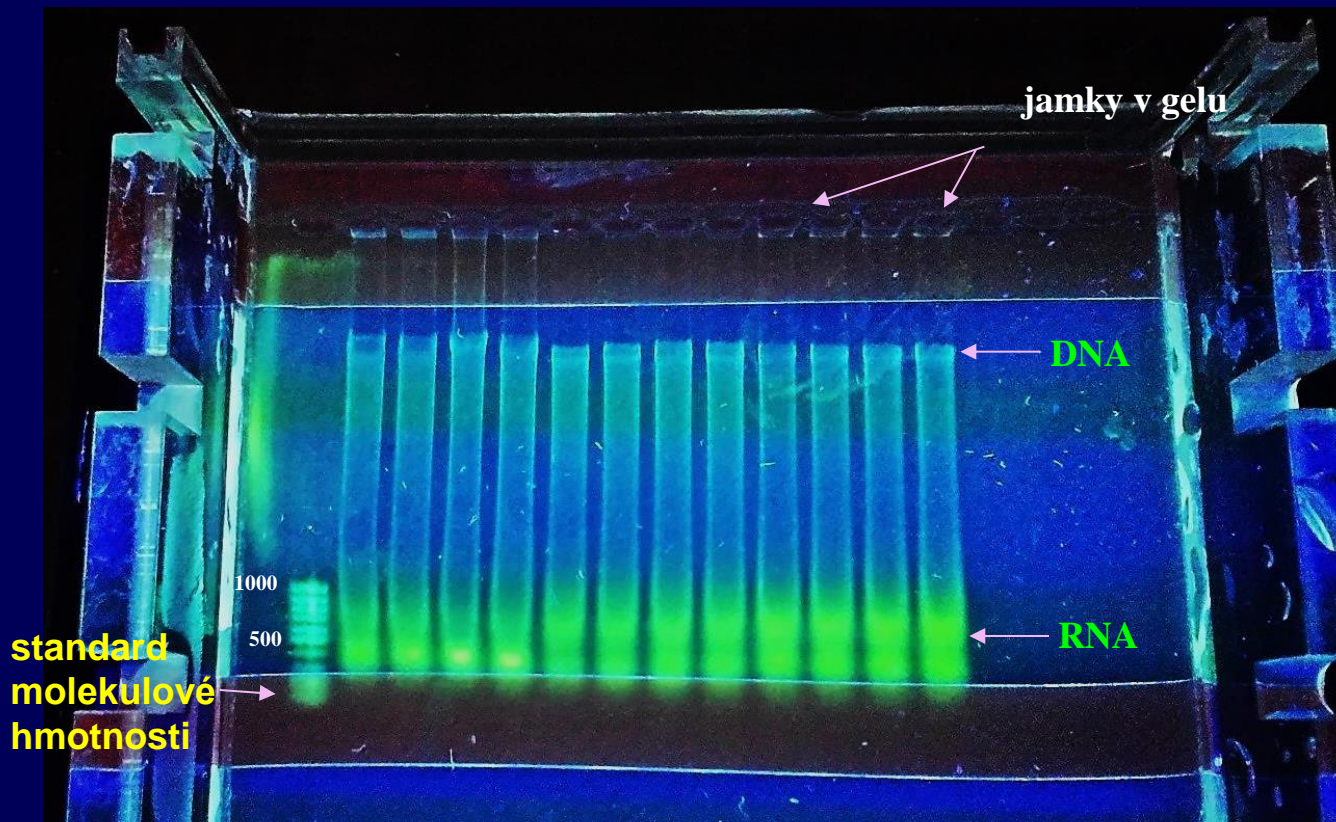
Foto google.cz

- excitace 545 nm (zelená)
- emise >605 (růžová)

* PCR – polymerázová řetězová reakce

Separace izolované DNA horizontální elektroforézou v agarovém gelu

Fotografie pod UV prohlížečem: zeleně svítící fluorescenční barvivo **GoodView**, které se navázalo na DNA a RNA.



- Excitace 268, 294 (UV); 491 nm (zelenomodrá)
- Emise 530-DNA (zelená)

Foto Zuzana Balová

POZOR!!! Sledovat pouze přes plexisklový kryt!

Separace izolované DNA horizontální elektroforézou v agarovém gelu

Černobílá fotografie pomocí transiluminátoru: svítící proužky fluorescenční barvivo **GoodView**, které se navázalo na DNA a RNA.

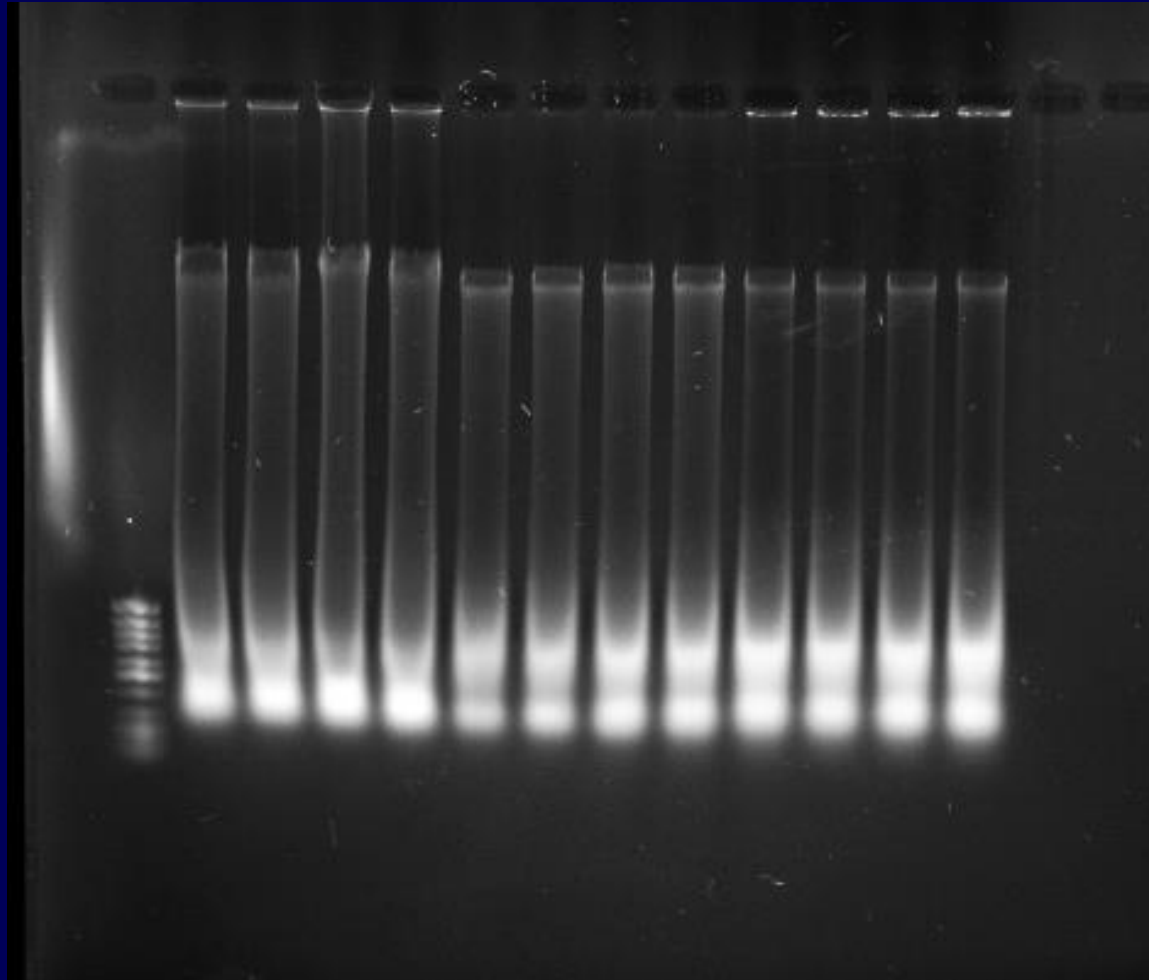


Foto Pavla Válová

- **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)

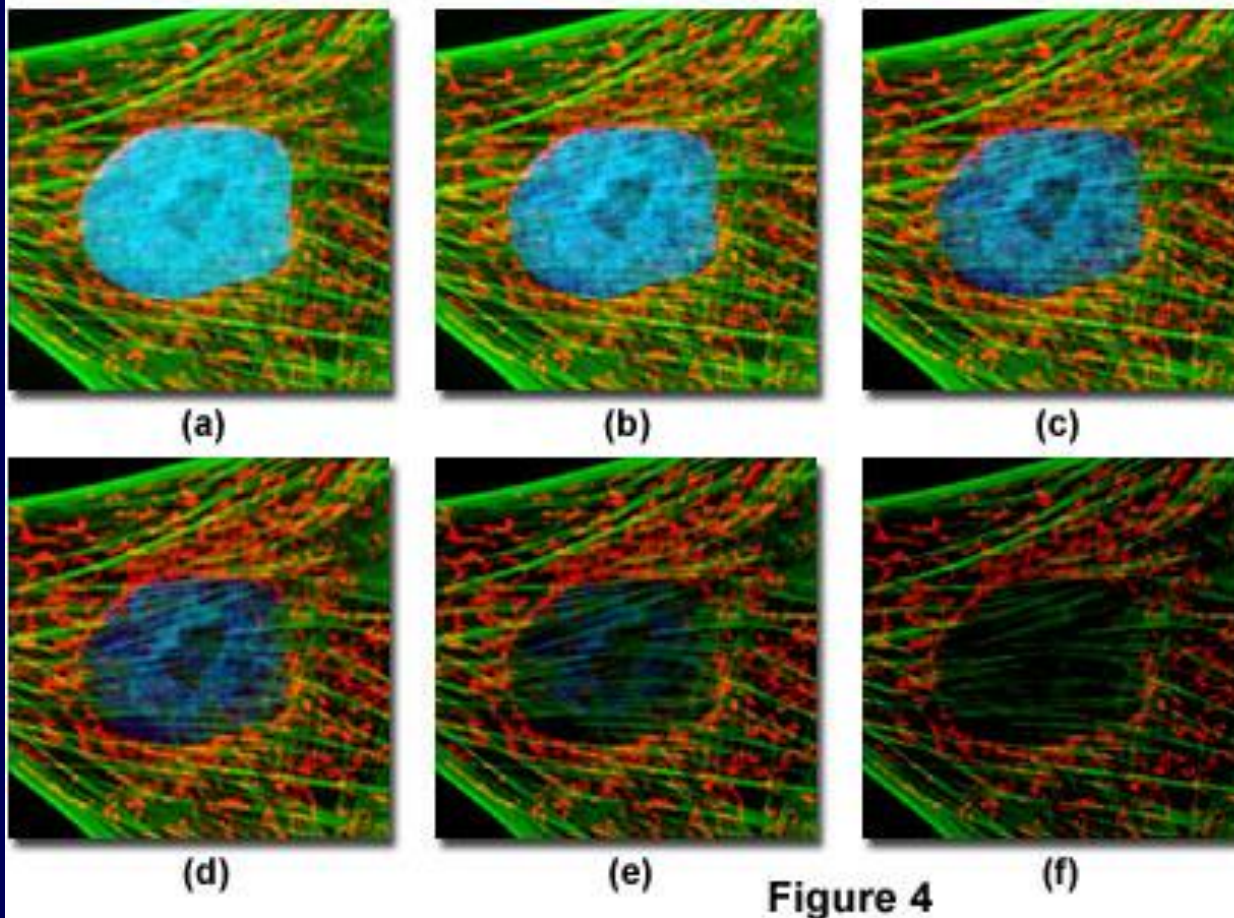
- **Nevýhoda:**

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 vybělování v zbarvených preparátech

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

Základní části fluorescenčního mikroskopu:

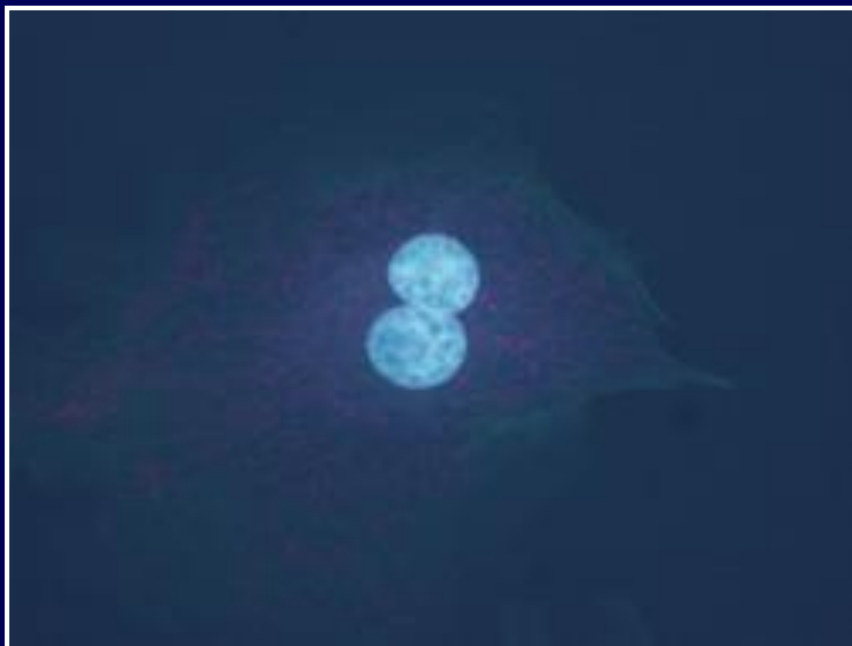
- **zdroj UV záření** (vysokotlaká rtuťová výbojka - pozor na zapínání a vypínání lampy; u moderních mikroskopů laser o určité vlnové délce
- **excitační (budící) filtry**
 - ze světelného zdroje selektivně vymezují záření o určité vlnové délce vhodné ke vzbuzení fluorescence
- **ochranné (uzavírající,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

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)

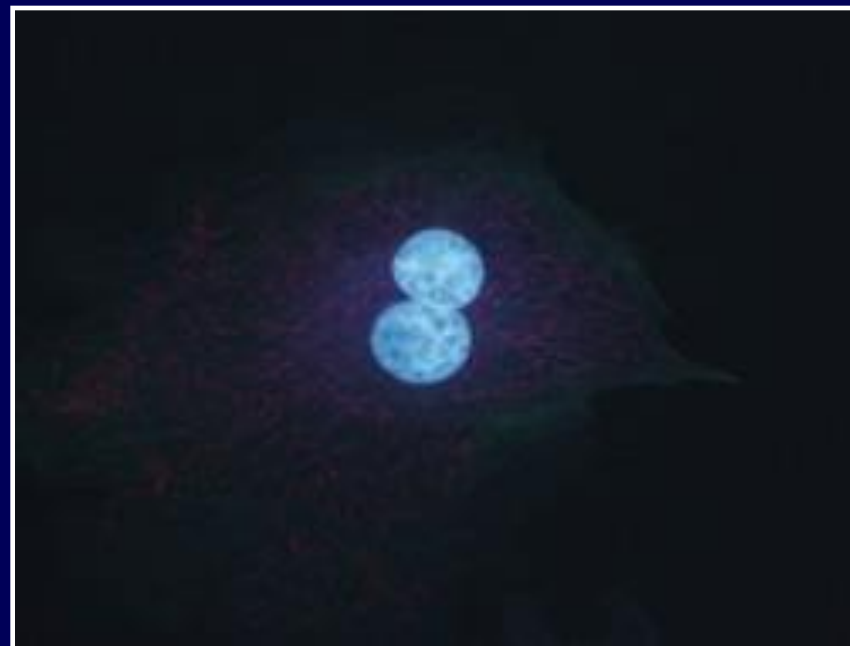
Transmisní fluorescence **x** epifluorescence

Použití imerzního oleje



Normální imerzní olej
n = 1, 516

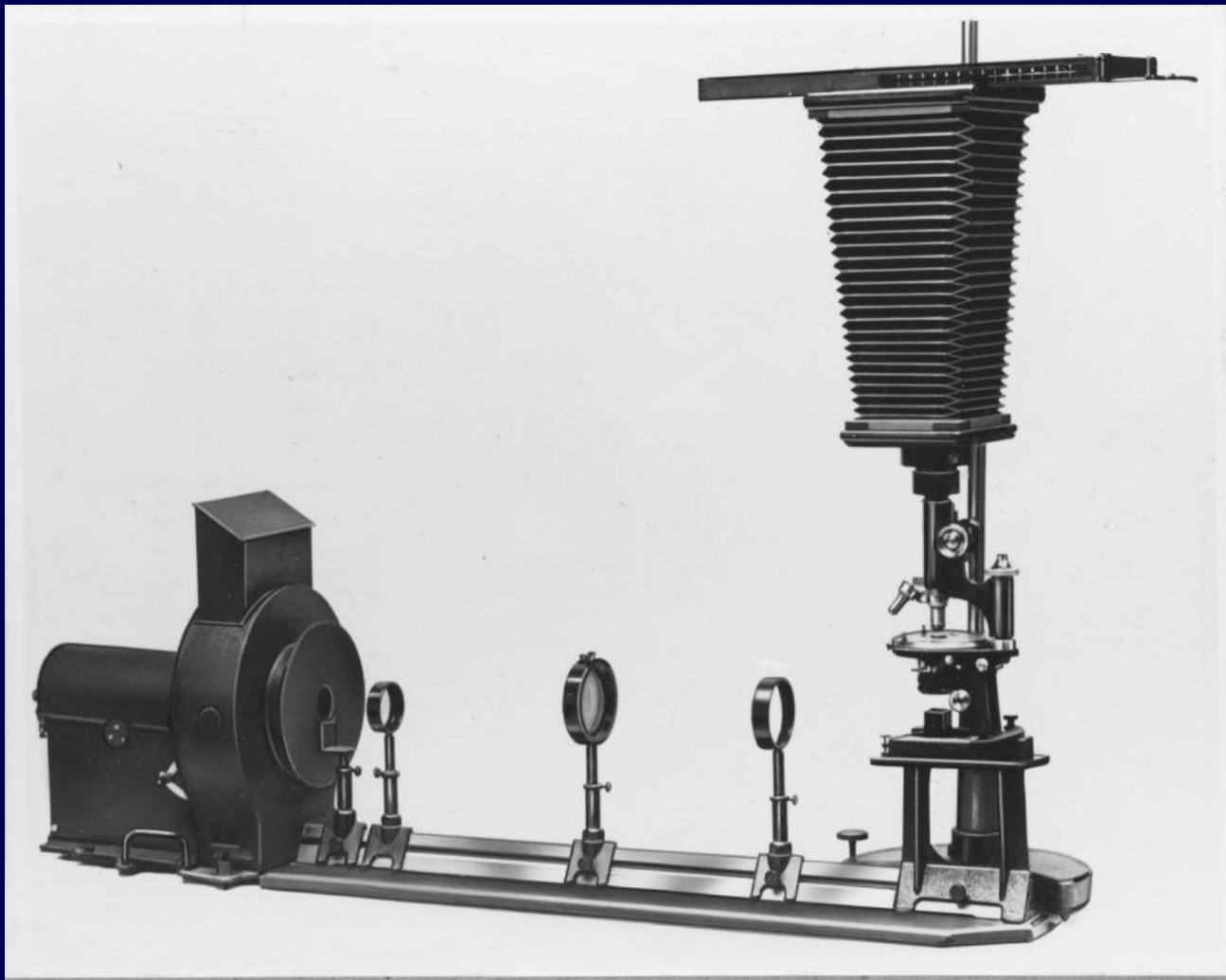
Autofluorescence !



Imerzní olej pro fluorescenci
n = 1,404

Autofluorescence omezena

První fluorescenční mikroskop



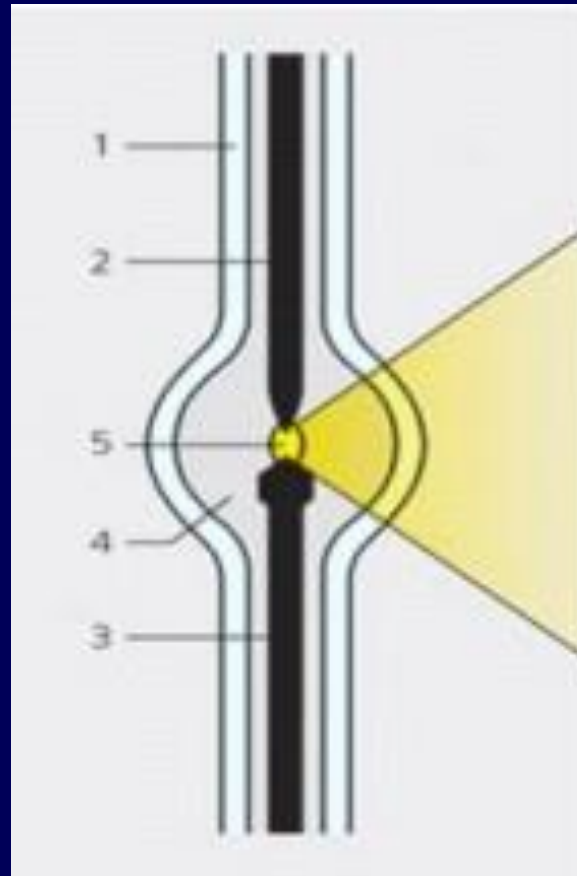


**Fluorescenční
mikroskop
BX60**

(epifluorescence)

s kamerou DP71

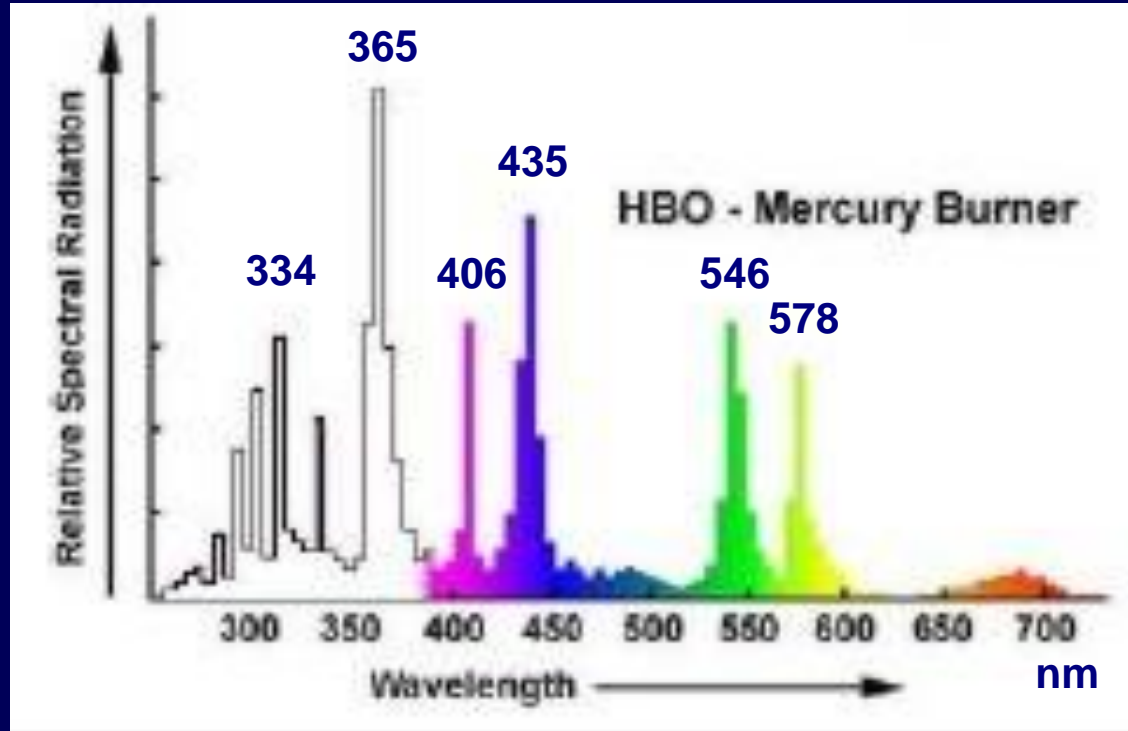
Zdroj světla



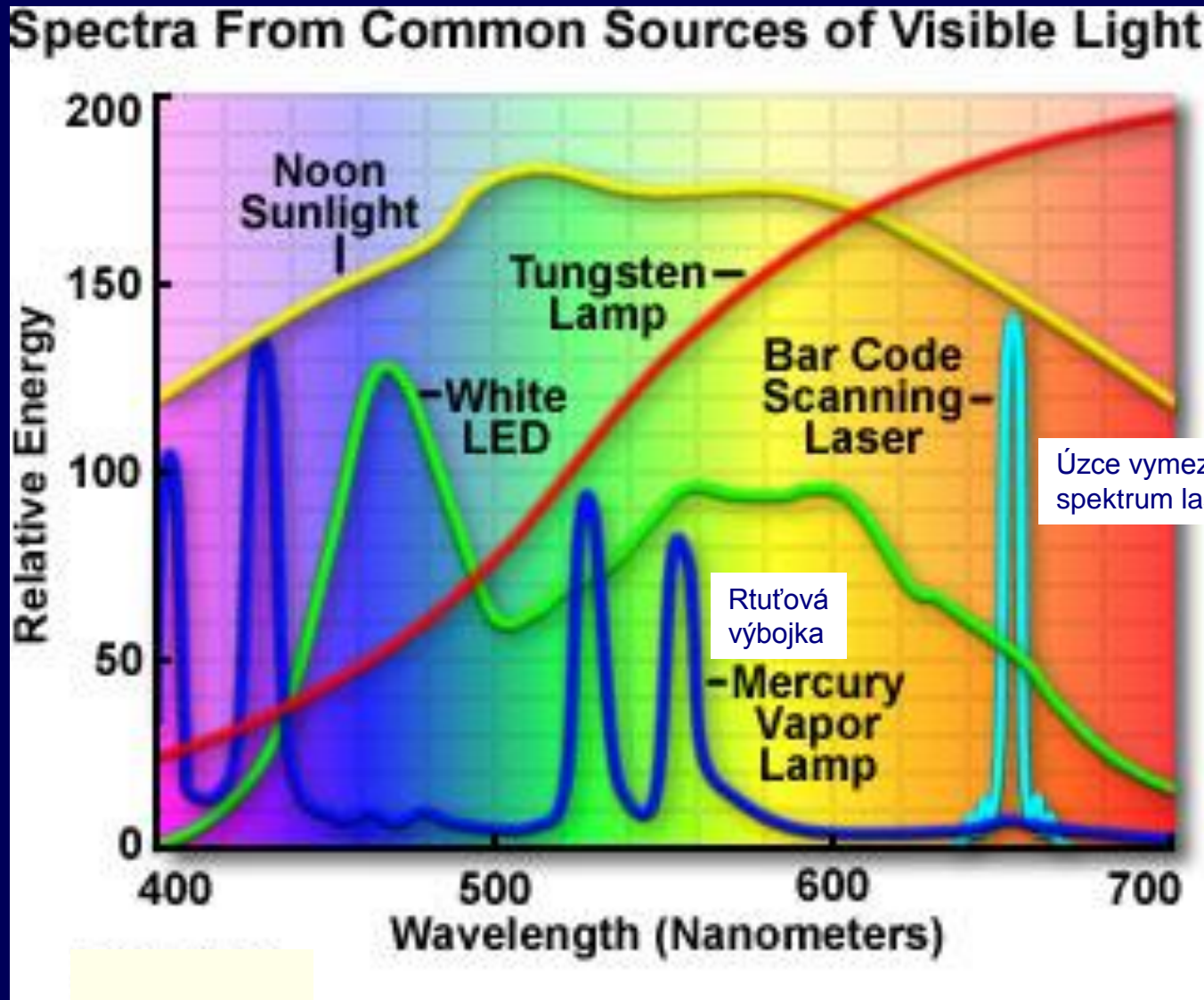
- 1 – vysokotlaké sklo
- 2 – katoda
- 3 – anoda
- 4 – komora
- 5 – světelný oblouk

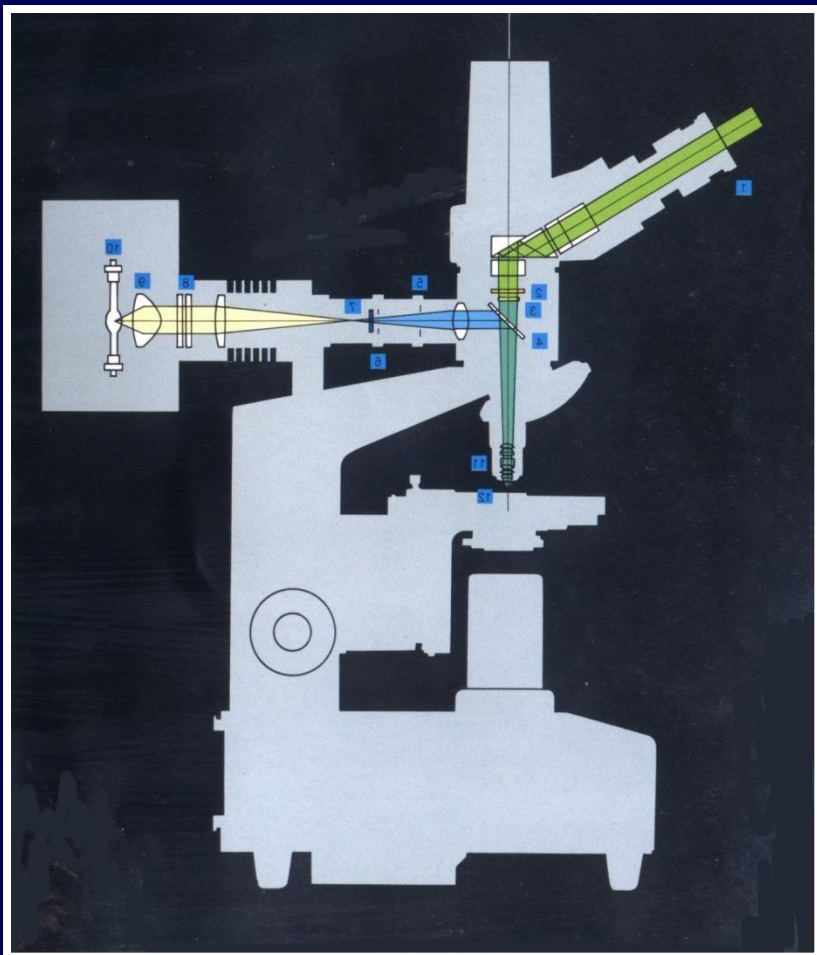
Vysokotlaká rtuťová výbojka (zapálení přes zdroj napájení)

Vlnové spektrum rtuťové výbojky



Spektra zdrojů světla pro mikroskopii





Epifluorescence – chod paprsků mikroskopem

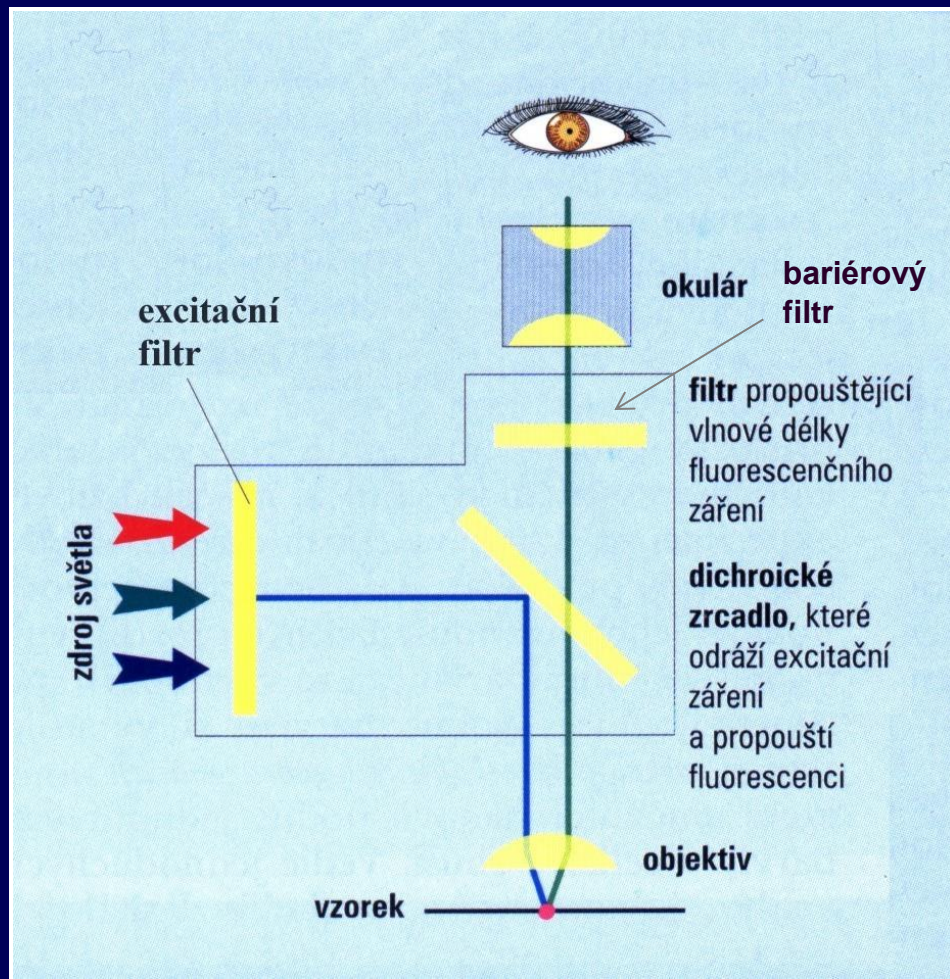
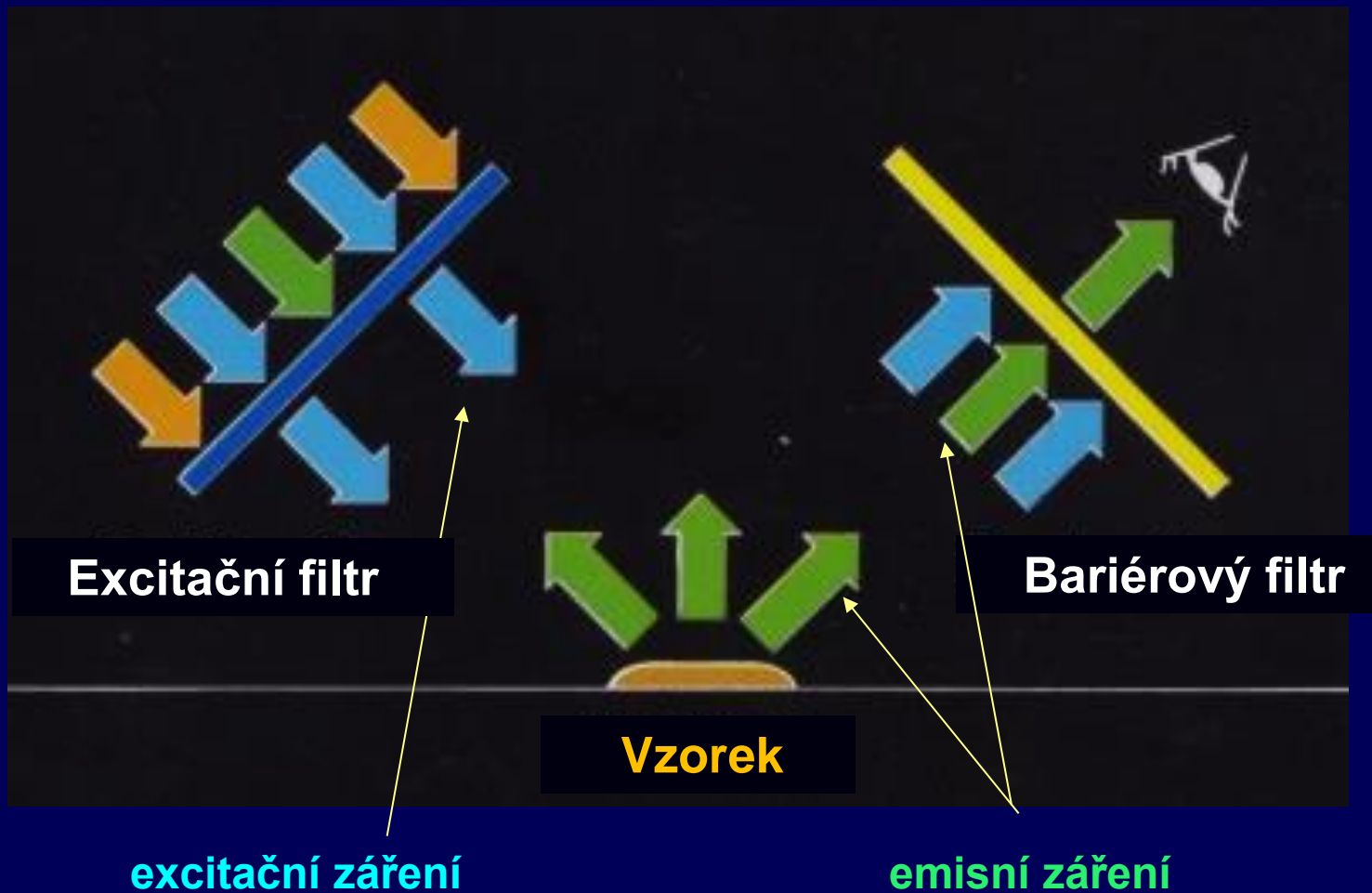


Schéma fluorescence

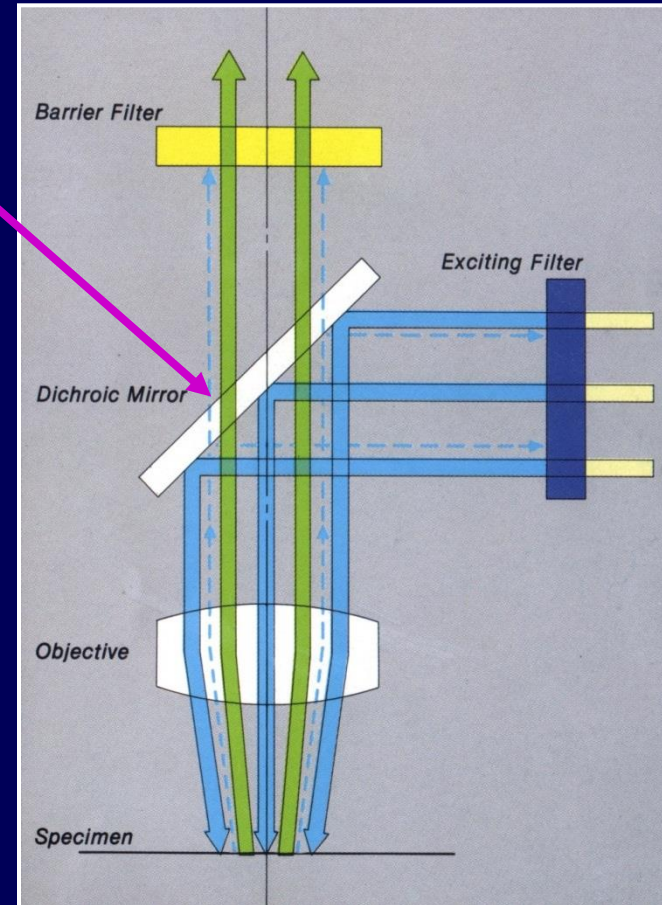
Funkce excitačního a bariérového filtru



Dichroické zrcadlo

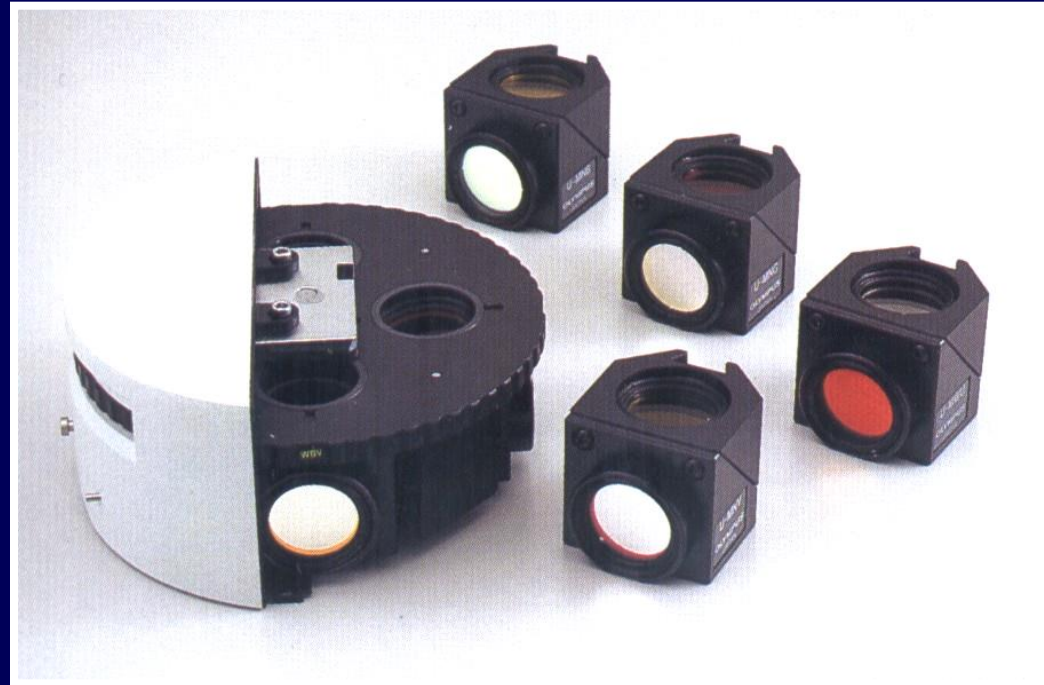
- při dopadu paprsků pod úhlem 45° odráží excitované světlo o kratší vlnové délce a naopak propouští emitované světlo o delší vlnové délce

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



Stavba fluorescenční kostky

Revolverový výměník

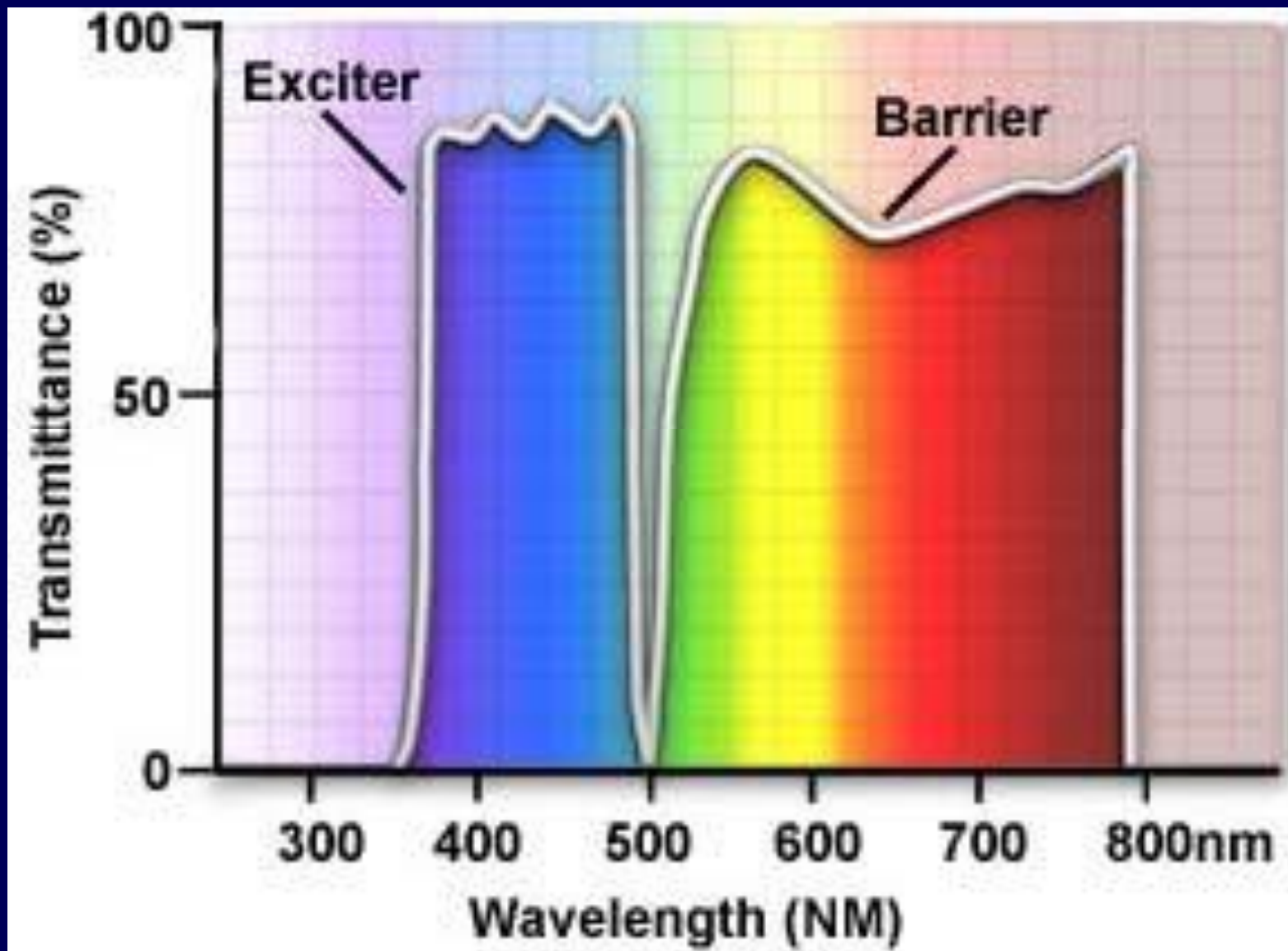


<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/blue/b2ec/b2ecindex.html>



destička z plexiskla
- ochrana pozorovatele

Umístění fluorescenčních kostek v mikroskopu



Propustnost (transmise) excitačního a bariérového filtru

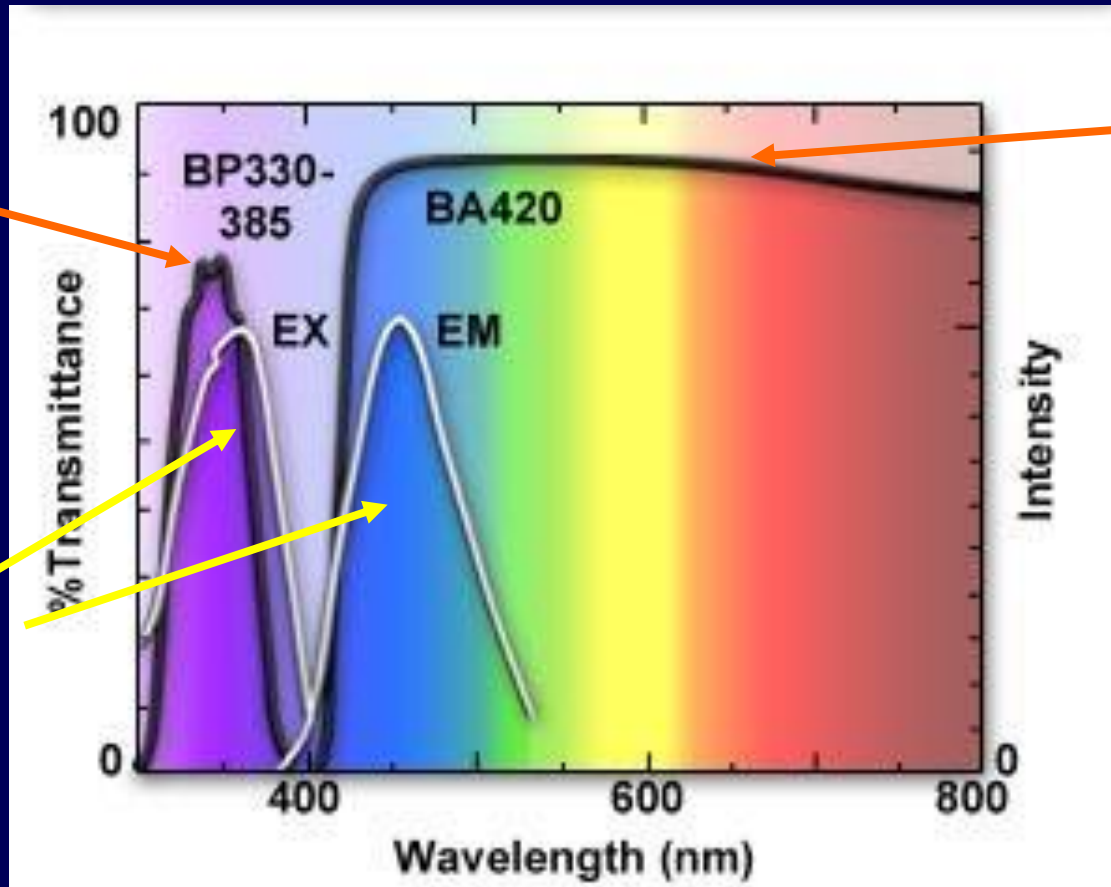
U – excitace (DAPI – WU kostka)

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



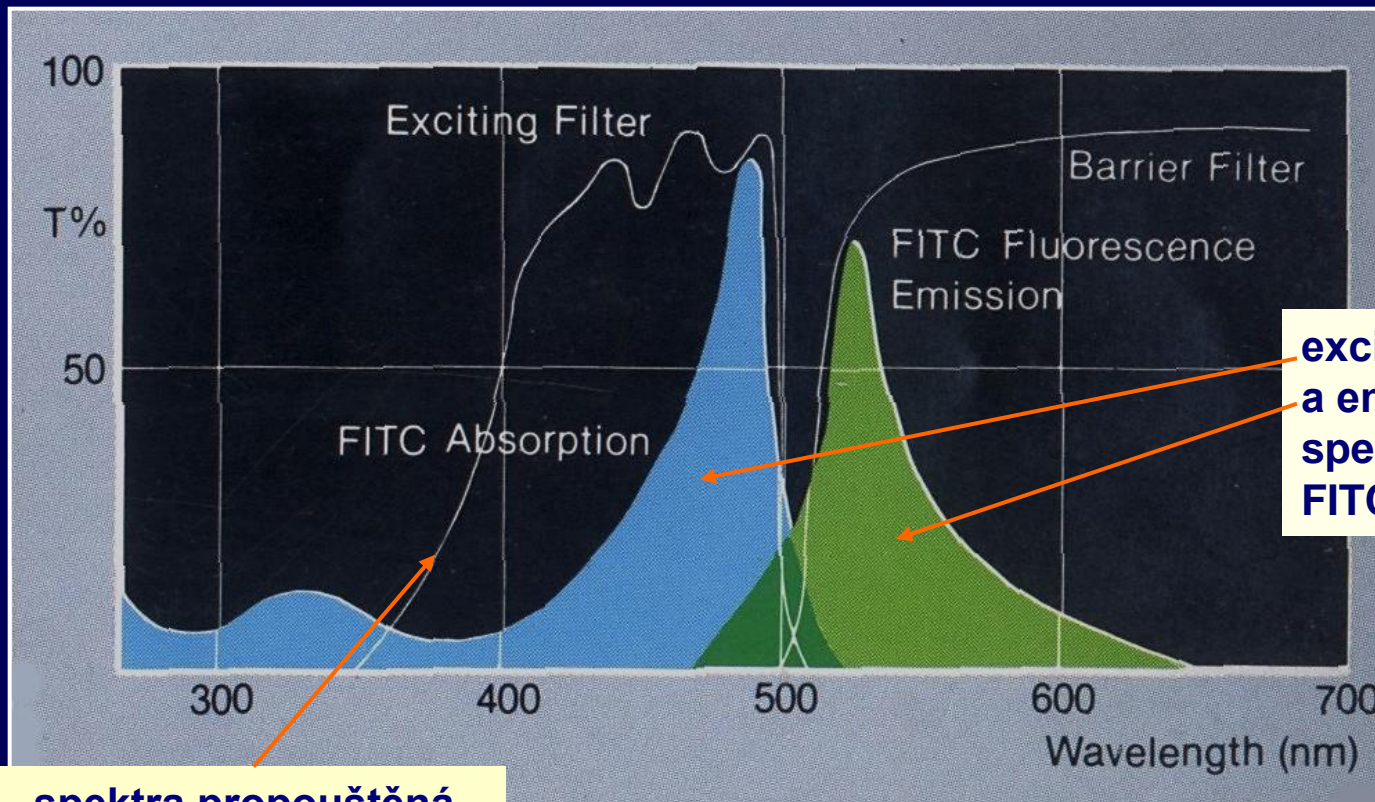
BA420
bariérový
filtr

**Příklad excitačního (modrá barva)
a emisního spektra (zelená)**

fluorochromu FITC (WB kostka – B excitace)

FITC (Fluorescein-isothiokyanát)

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



**excitační
a emisní
spektrum
FITC**

**bílé čáry – spektra propouštěná
excitačním a bariérovým filtrem**

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

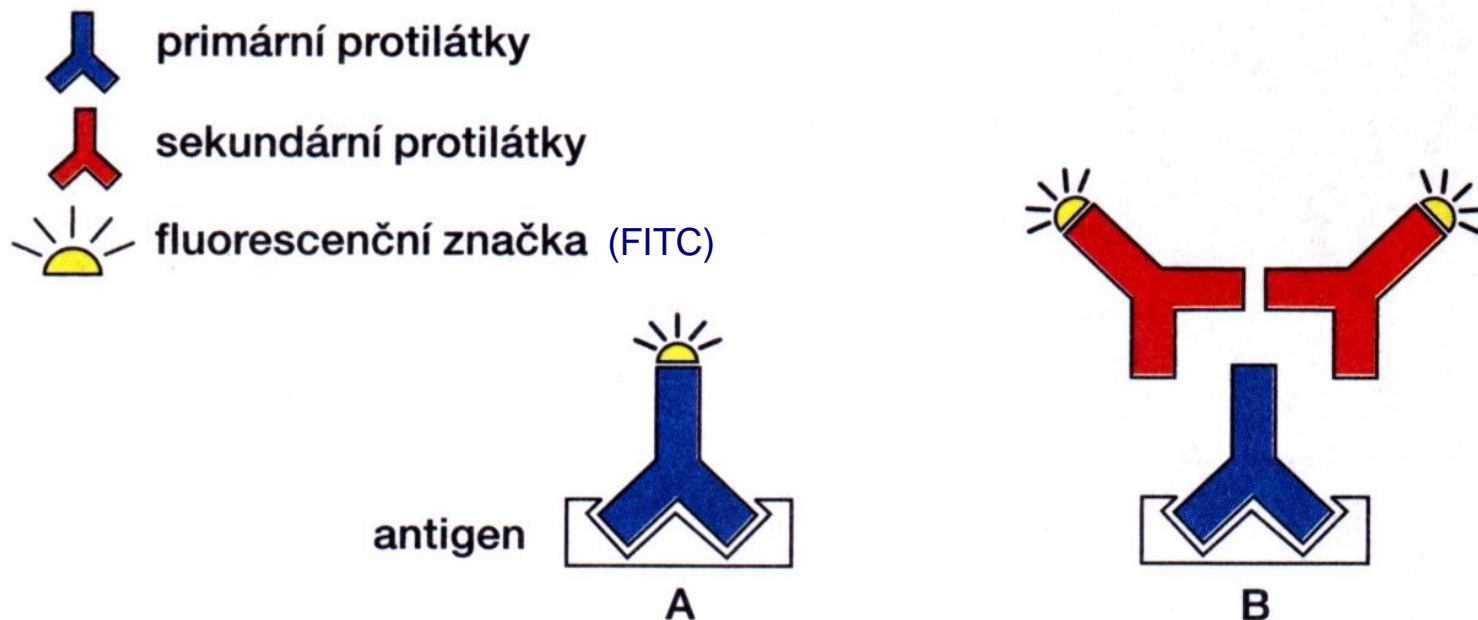
■ Princip:

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

■ Využití imunofluorescence:

- 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 erythematodes aj.)
- HLA typizace (= Hlavní histokompatibilní systém)
- vizualizace buněčných struktur (např. cytoskeletu)
- detekce nádorově změněných buněk

Autofluorescence

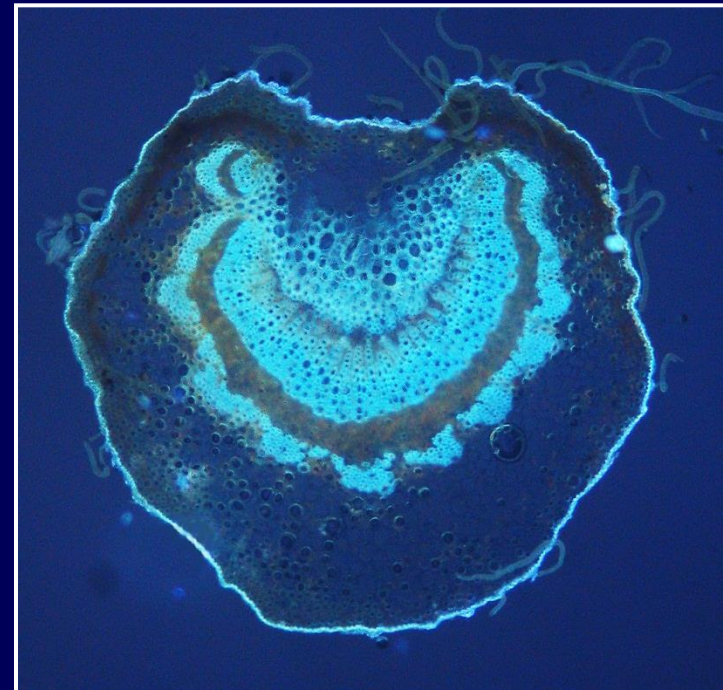
- příčný řez řapíkem jabloně

Kostka WB



Z = 40x

Kostka WU

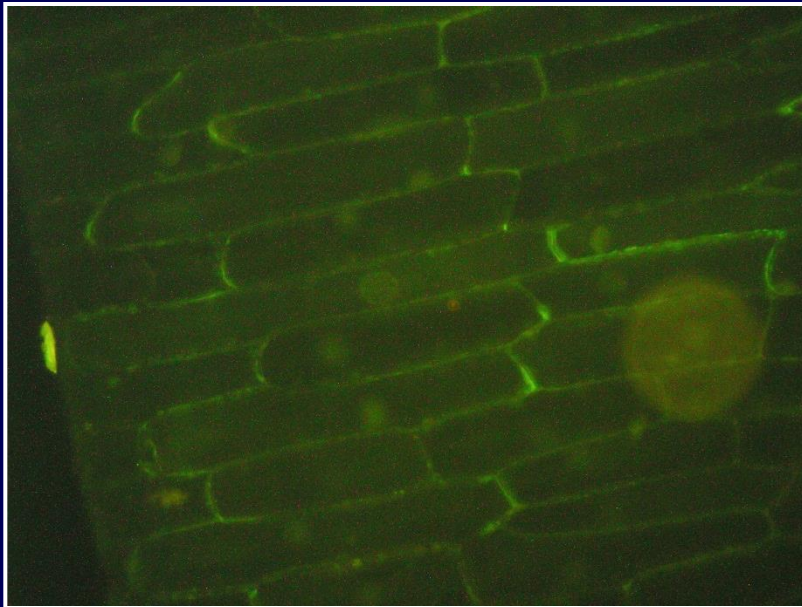


Z = 40x

Barvení DAPI

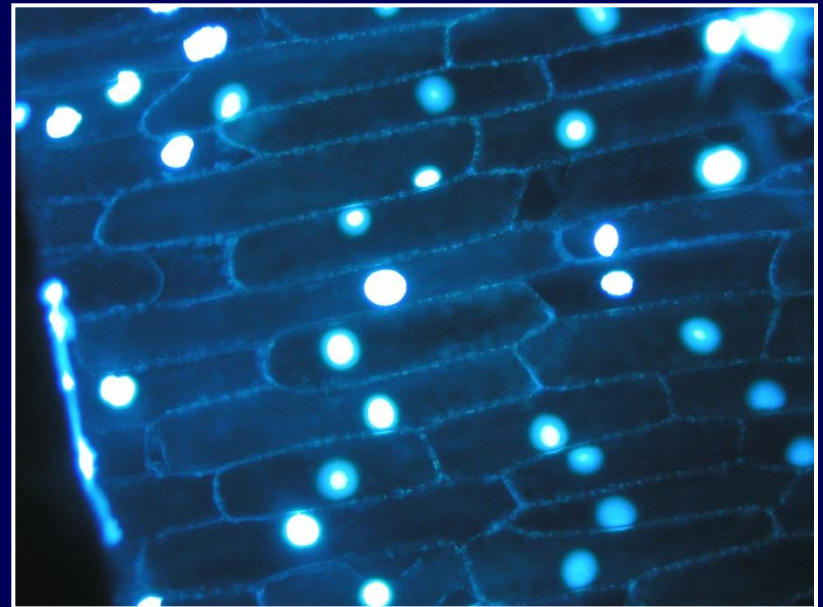
- jádra pokožkových buněk u cibule

Kostka WB



Z = 200x

Kostka WU

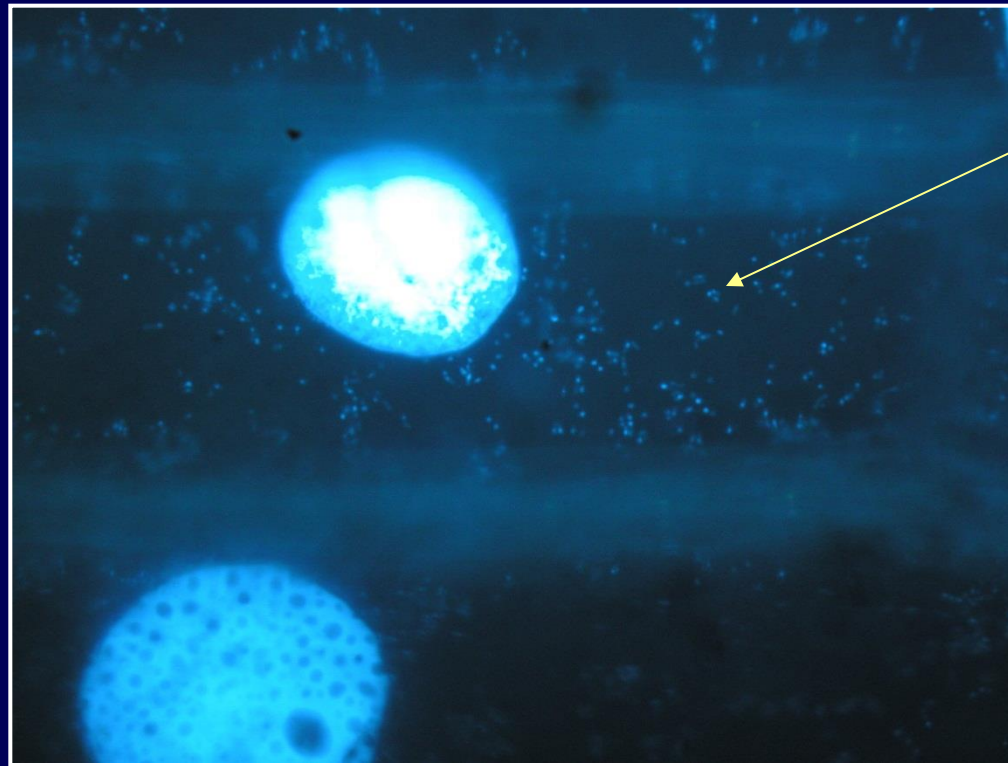


Z = 200x

Sekundární fluorescence barvení DAPI

- jádra pokožkových buněk u cibule

Fluorescenční
kostka WU



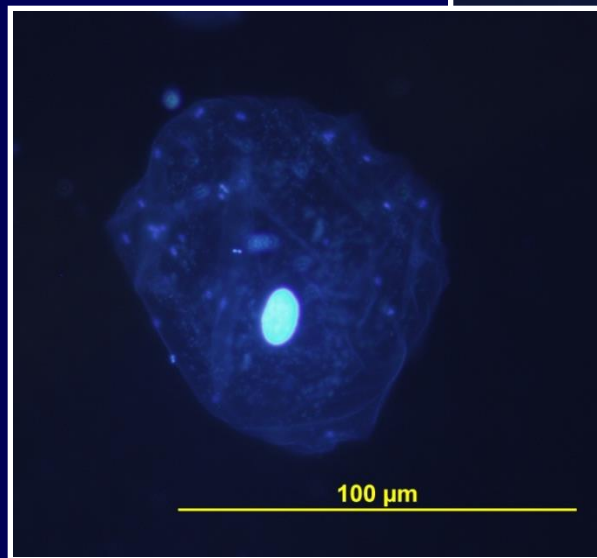
Z = 1 000x, imerze; foto Pavla Válová

Sekundární fluorescence barvení DAPI

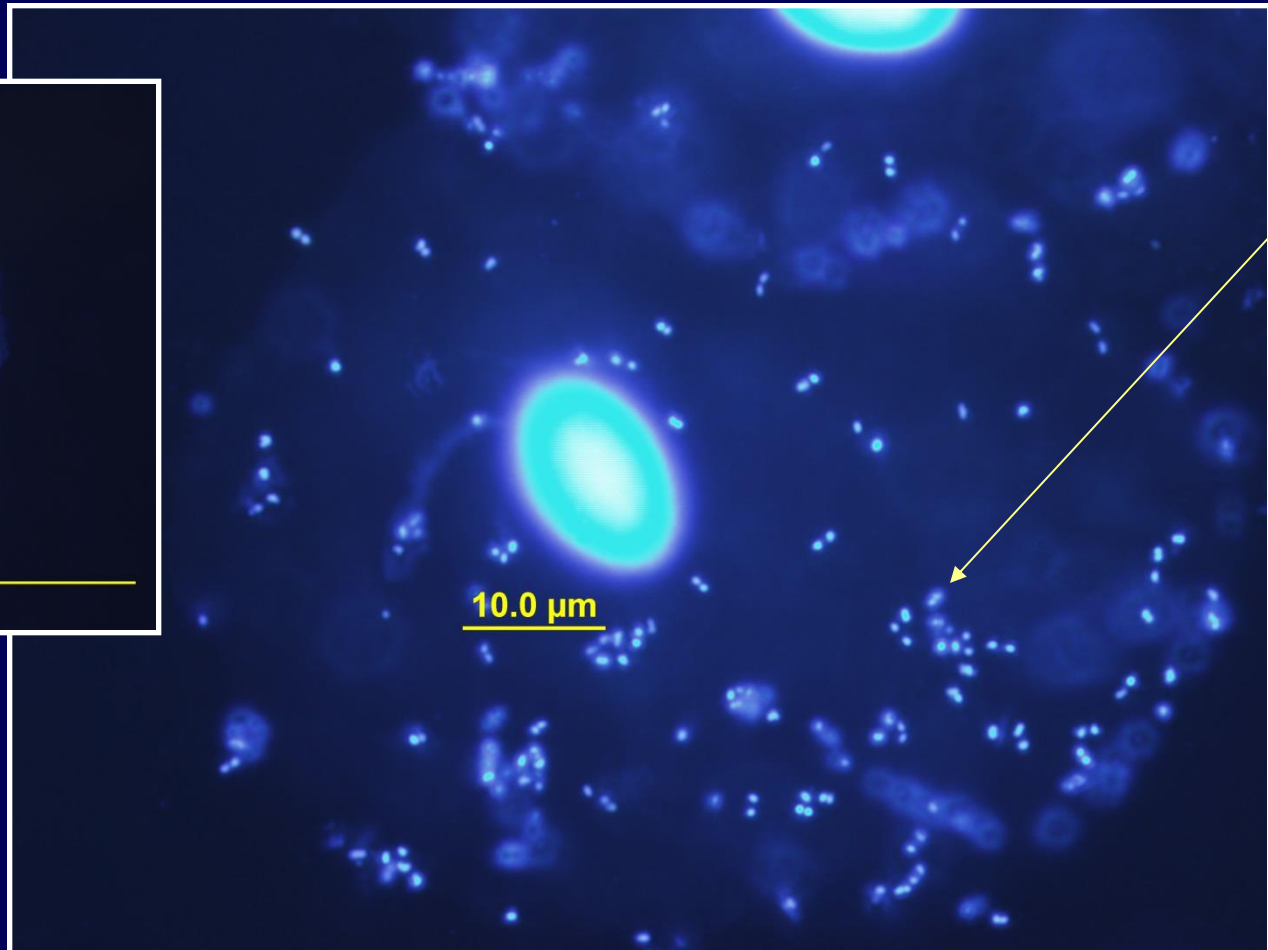
- buňka bukální sliznice (jádro, + ???)



Světlé pole



Z = 400x



???

Z = 1 000x, imerze; foto Pavla Válová

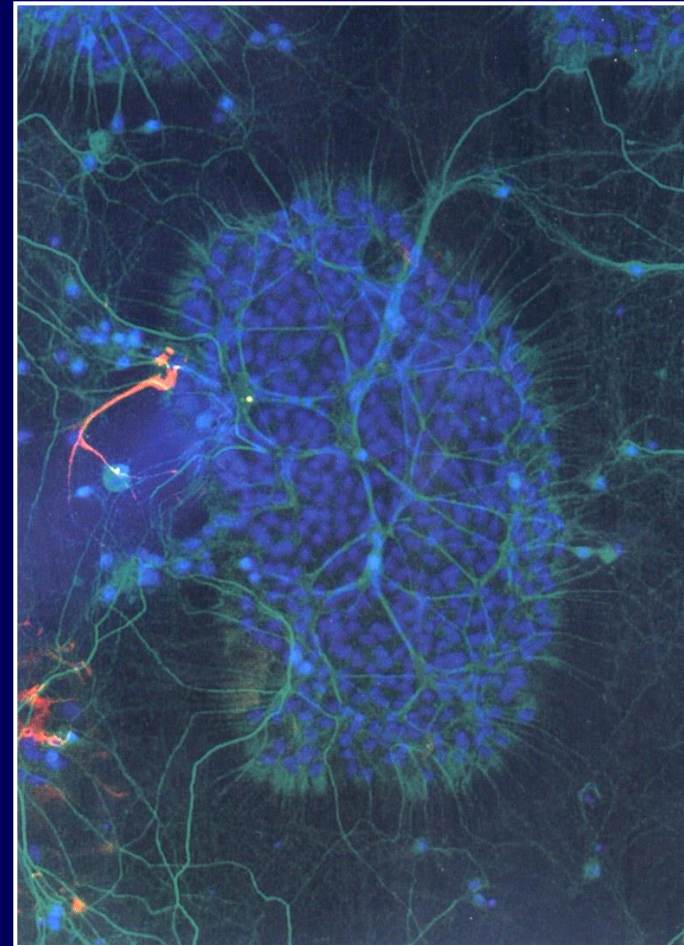
Vícenásobné barvení:

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

modře – jádra (DAPI)

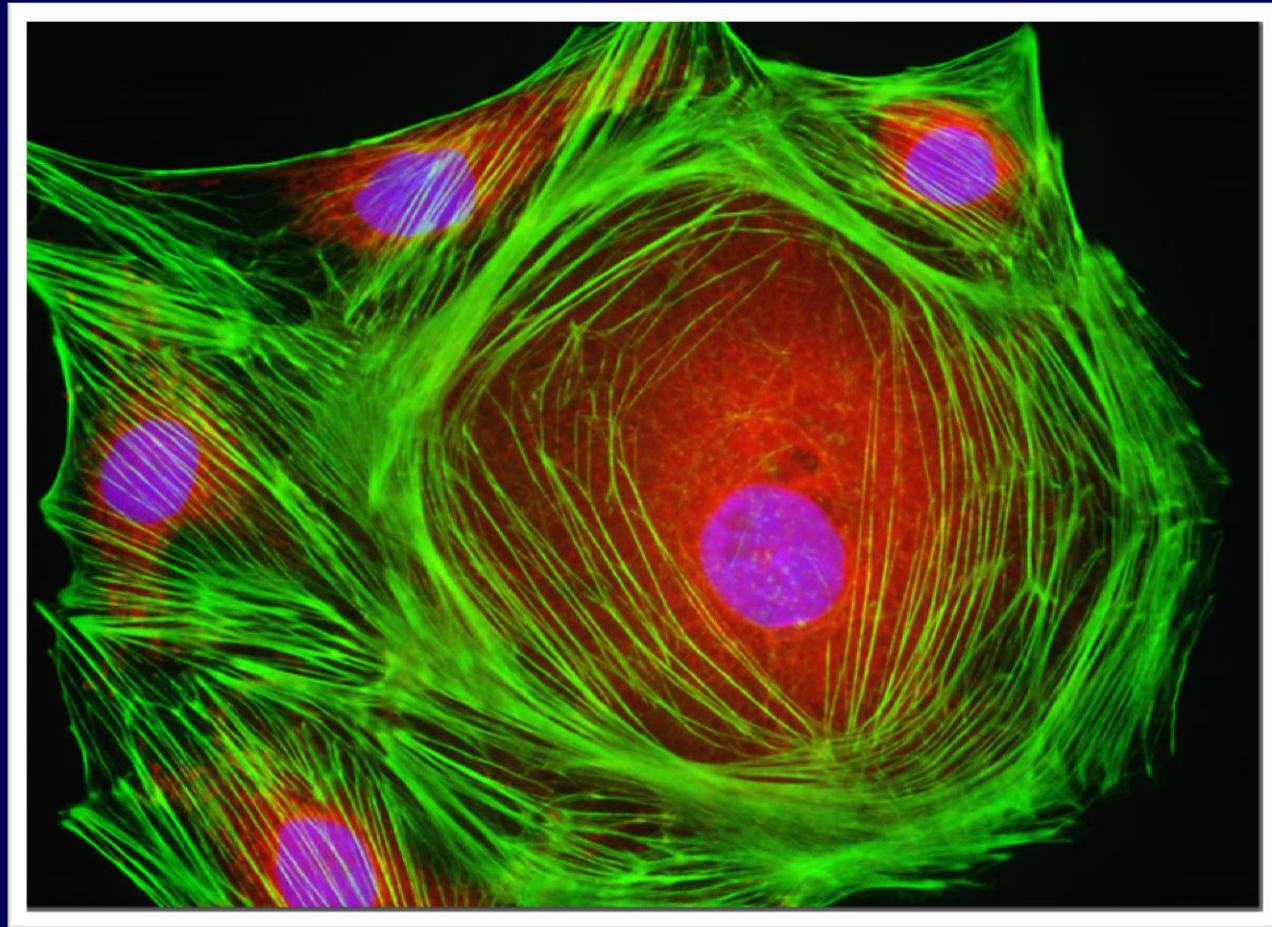
zeleně – neurofilamenta (Cy3)

červeně – gliové buňky (Cy5)



Buňky hipokampu
(část mozku)

Vícenásobné barvení

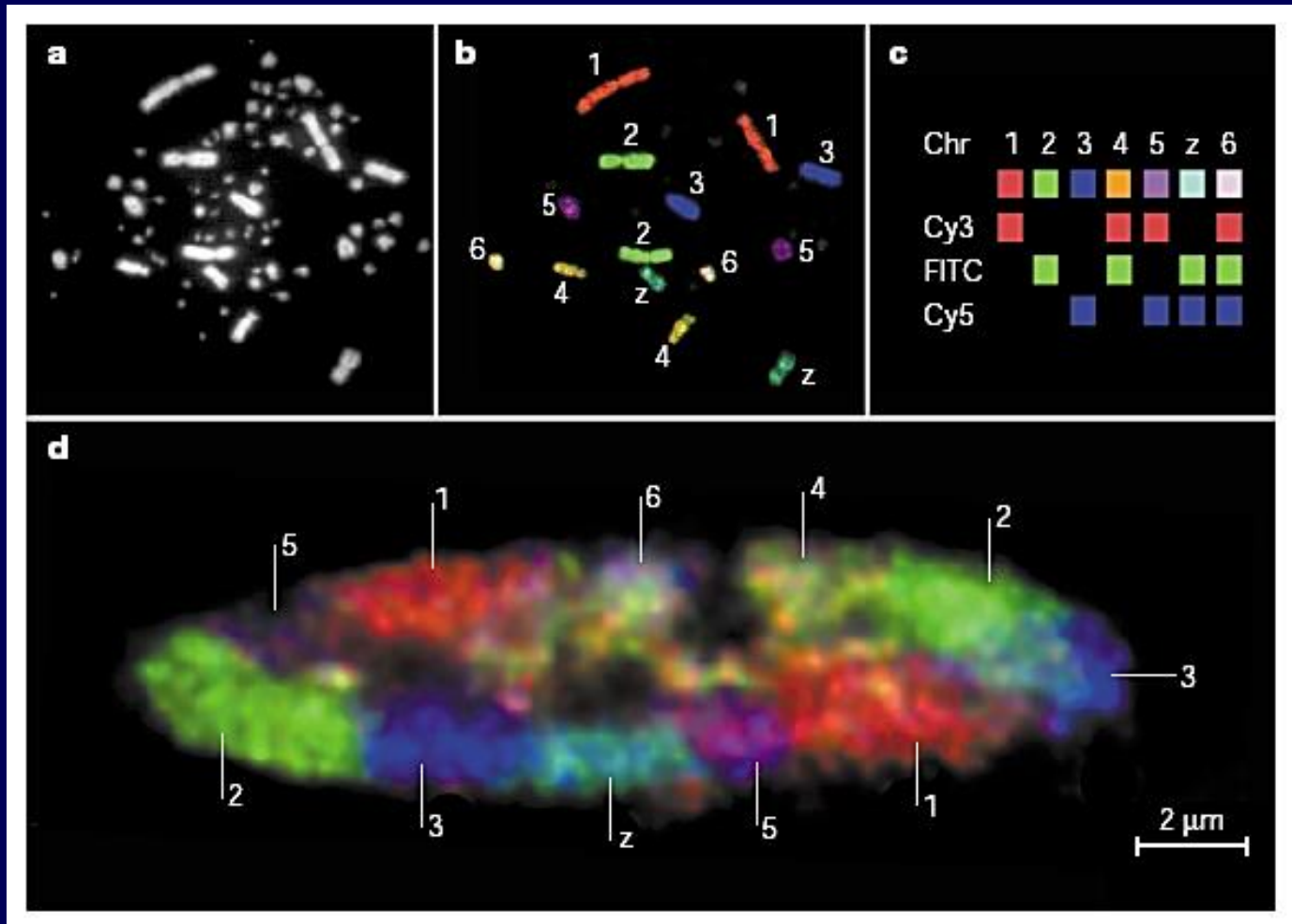


**Buňky ledvin samce tarbíkomyši zbarvené fluorochromy
Texas Red, Alexa Fluor 488 a DAPI**

Zdroj:

<https://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/ptk2/ptk2cellsexlarge3.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)

- nebo při **zkoumání vlivu inhibice proteinu na chování buňky**

- 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 **GFP**.

- Příklad fluorescenční značky:

GFP

(Green Fluorescent Protein)

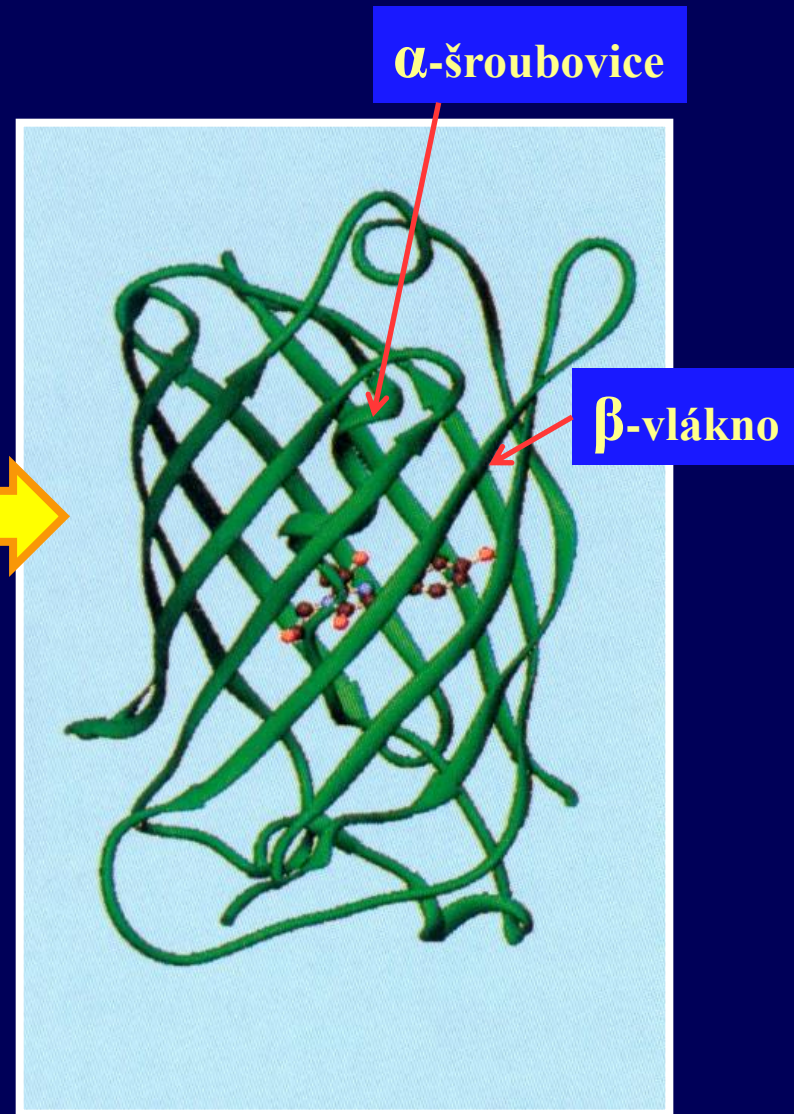
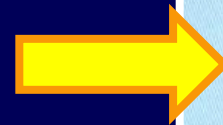
Soudkový tvar molekuly GFP

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

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

Fluorochrom GFP je heterocyklická
sloučenina

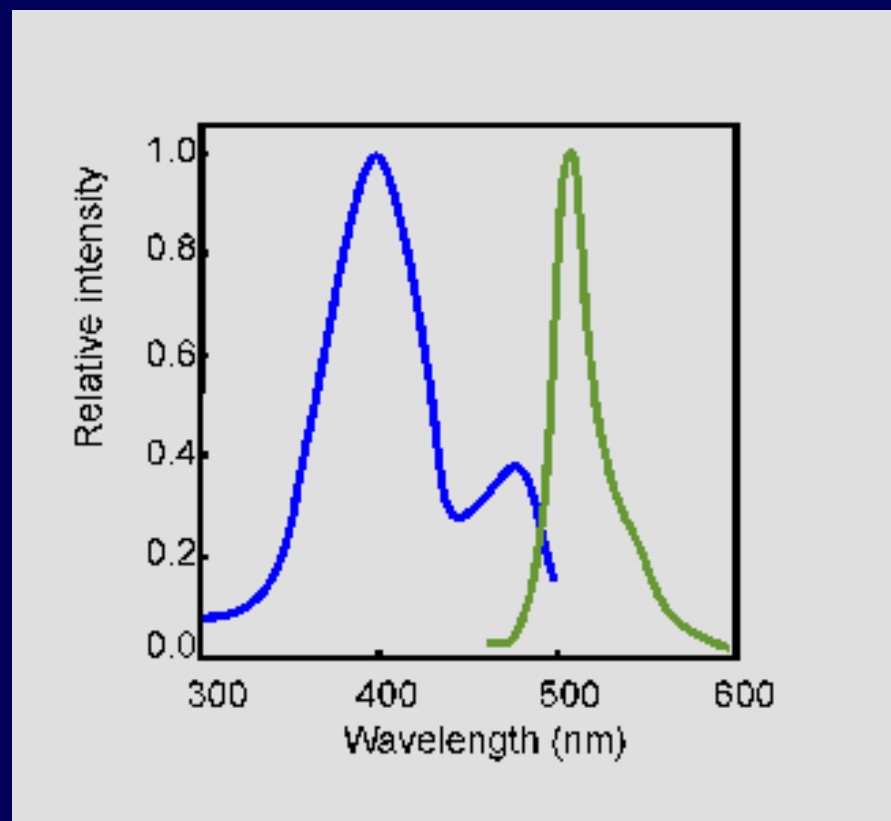
p-hydroxybenzyliden-imidazilonin





GFP

Excitační a emisní spektrum



- izolace svítícího proteinu

původně z medúzy pohárkovky
(*Aequorea victoria*)

EX: 400 nm; EM: 505 nm

- „divoký“ GFP po osvětlení **modrým světlem (400 nm)** **zeleně (505 nm)** fluoreskuje
- na volné konce molekuly GFP lze peptidickou vazbou připojit jiné bílkoviny, jejichž umístění sledujeme po ozáření modrým světlem

Barevné varianty: **YFP** – žlutá, **CFP** – modrozelená

- GFP i z kopinatce
- další značky z mořských korálů (viz červeně fluoreskující zebřičky, tzv. GloFish)

Nobelova cena 2008 za chemii za objev zelené fluoreskující bílkoviny (GFP)



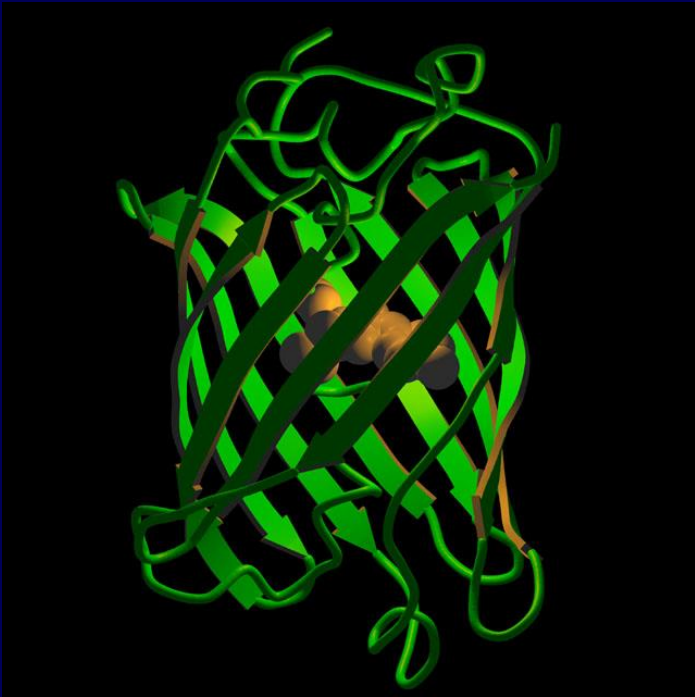
Osamu Shimomura – první izoloval svítící bílkovinu z medúzy (1962)

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

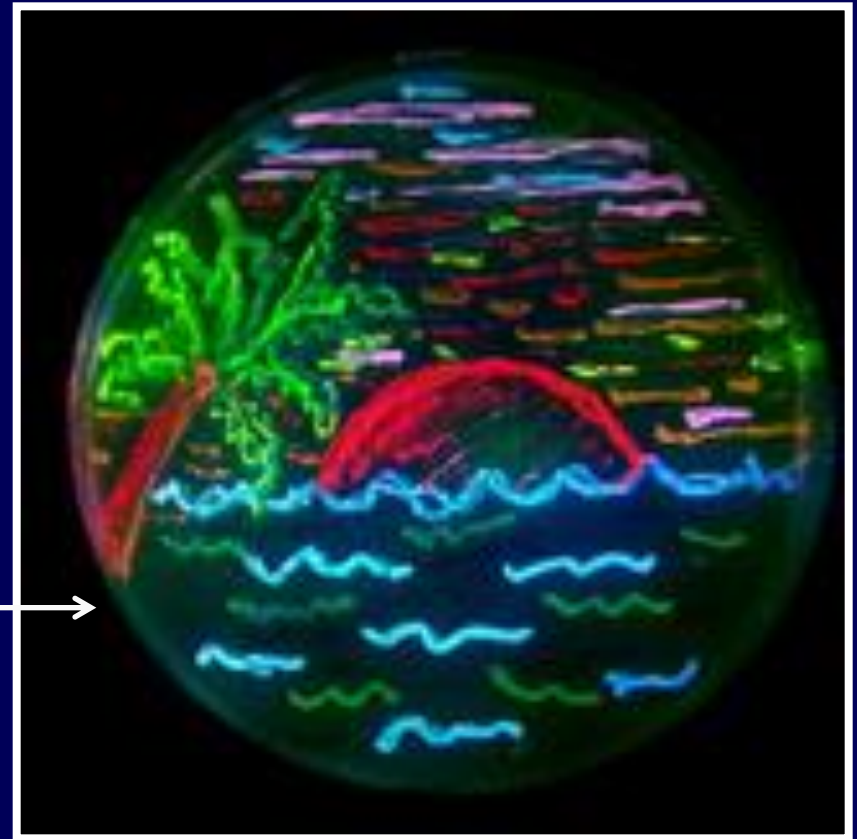
Roger Y. Tsien - objasnil fluorescenční mechanismus GFP a různými modifikacemi rozšířil škálu barev (excitační a emisní spektra)

„San Diego beach scene“

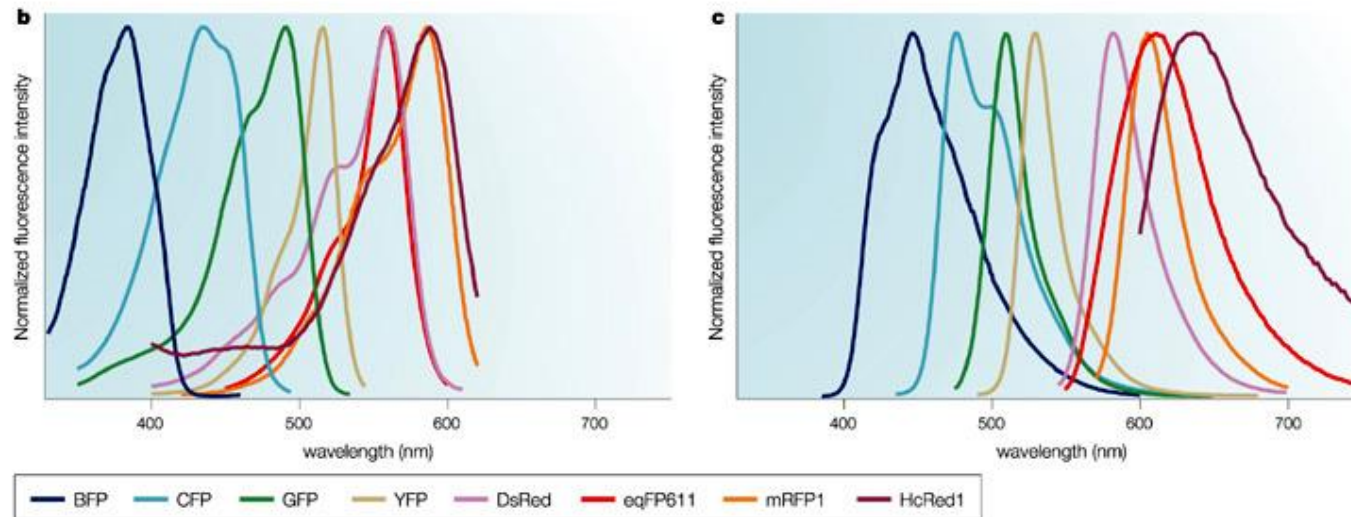
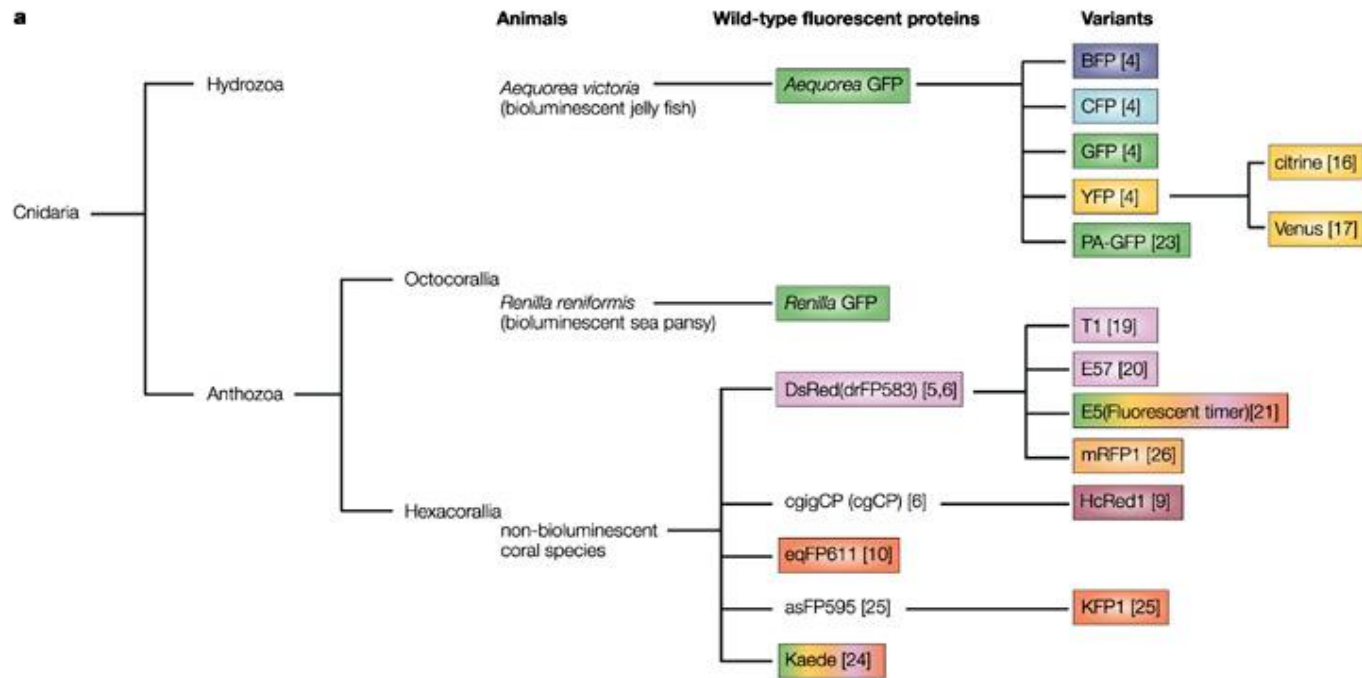
- nakresleno na agarové plotně
živými koloniemi bakterií
s 8 různými barvami fluorescenčního proteinu



Různé barvy
fluorescenčního
proteinu



- Barevná škála GFP



GFP - využití v molekulární biologii a biochemii:

- reportérový gen pro vizualizaci exprese proteinů
- on-line sledování *in vivo* trafficking
- testování lokalizace a kolokalizace různých proteinů
- sledování dynamiky proteinů a organel *in vivo*
- transport mezi organelami
- purifikace proteinů a pohyb buněk
- Flow cytometrie



GloFish (zebřičky – Danio pruhované, *Danio rerio*)

viz článek Jaroslava Petra: <http://www.osel.cz/2534-glofish.html>

Některé ze specializovaných fluorescenčních metod:

- Polarizovaná fluorescenční mikroskopie
- Vybělení fluorescence (fotodegradace)
 - FRAP, FLIP
- Fotoaktivace fluorescence
- Nezářivý přenos excitační energie – FRET
- Metoda dohasínání fluorescence – FLIM
- Metoda „signálních majáků“ (Molecular beacons)
- TaqMan hydrolyzační sondy
- Totální odraz excitačního záření - TIRFM

■ Polarizovaná fluorescenční mikroskopie

- pozorujeme lipofilní sondy (především difenylhexatrien) zabudované do buněčných membrán

Využití:

- ke sledování místních rozdílů v uspořádání membránových lipidů

■ Vybělení fluorescence - FRAP

(Fluorescence Recovery After Photobleaching)

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

Postup:

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

Využití:

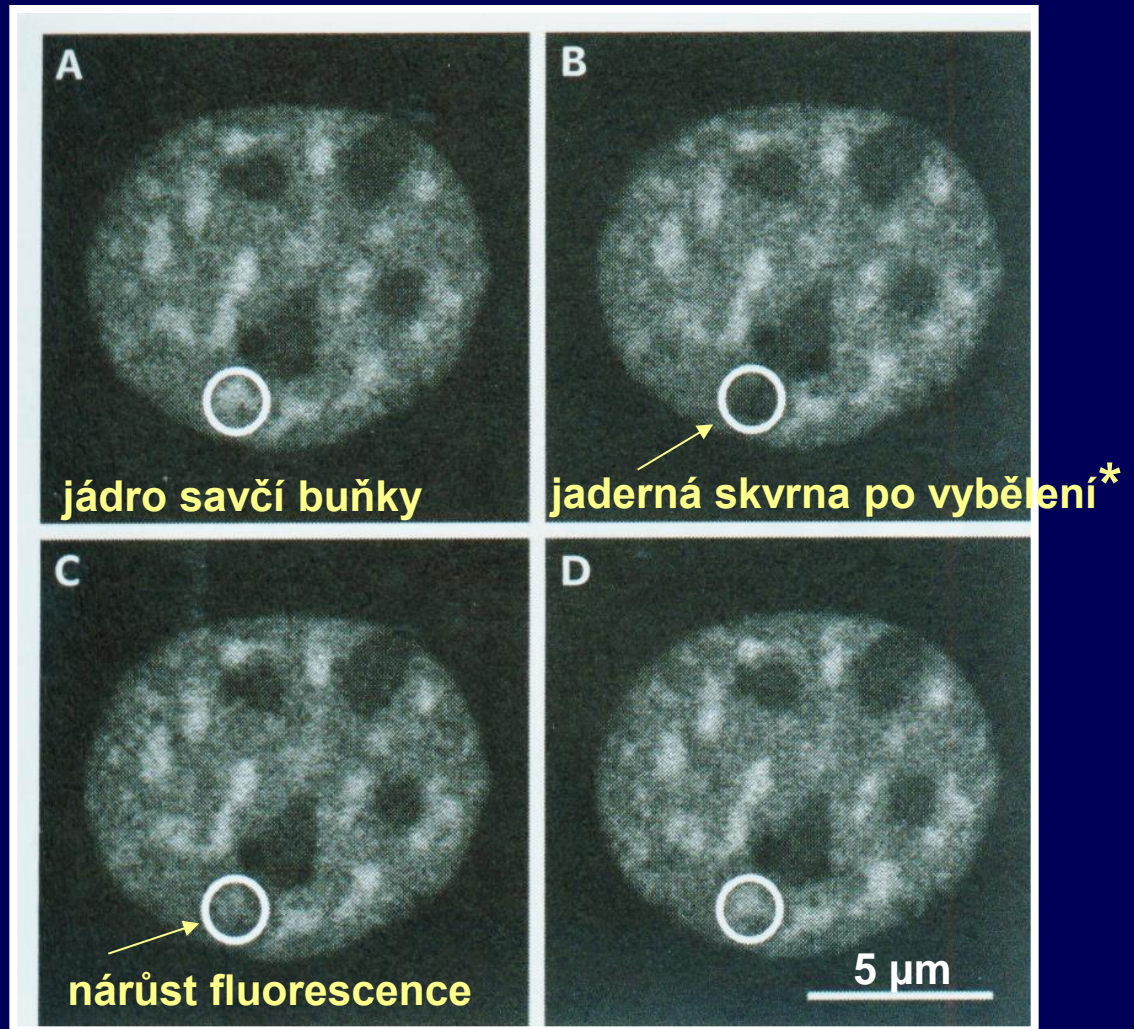
sledování intenzity a rychlosti pohybů molekul proteinů označených pomocí GFP

■ Vybělení fluorescence

FRAP

- příklad

Analýza pohybu jednoho ze sestřihových faktorů nahromaděného v jaderné skvrně



Vesmír 83

○ - sledovaná oblast

* - osvětlení oblasti sledované buňky intenzivním laserovým pulzem vlnové délky odpovídající λ GFP

■ Vybělení fluorescence

FLIP

(Fluorescence Loss Induced by Photobleaching)

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

■ Fotoaktivace fluorescence

- fotoaktivovatelná varianta GFP

PA-GFP

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

Využití: sledování pohybu molekul

- mezi buňkami v tkáních
- mezi jednotlivými strukturami v rámci jedné buňky

(zjišťujeme dobu přepisu genu; nebo dobu, za kterou je možno daný enzym znovu použít)

Viz i využití i v superrezoluční lokalizační mikroskopii

■ **Nezářivý přenos excitační energie**

FRET

(Fluorescence /Förster Resonance Energy Transfer)

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

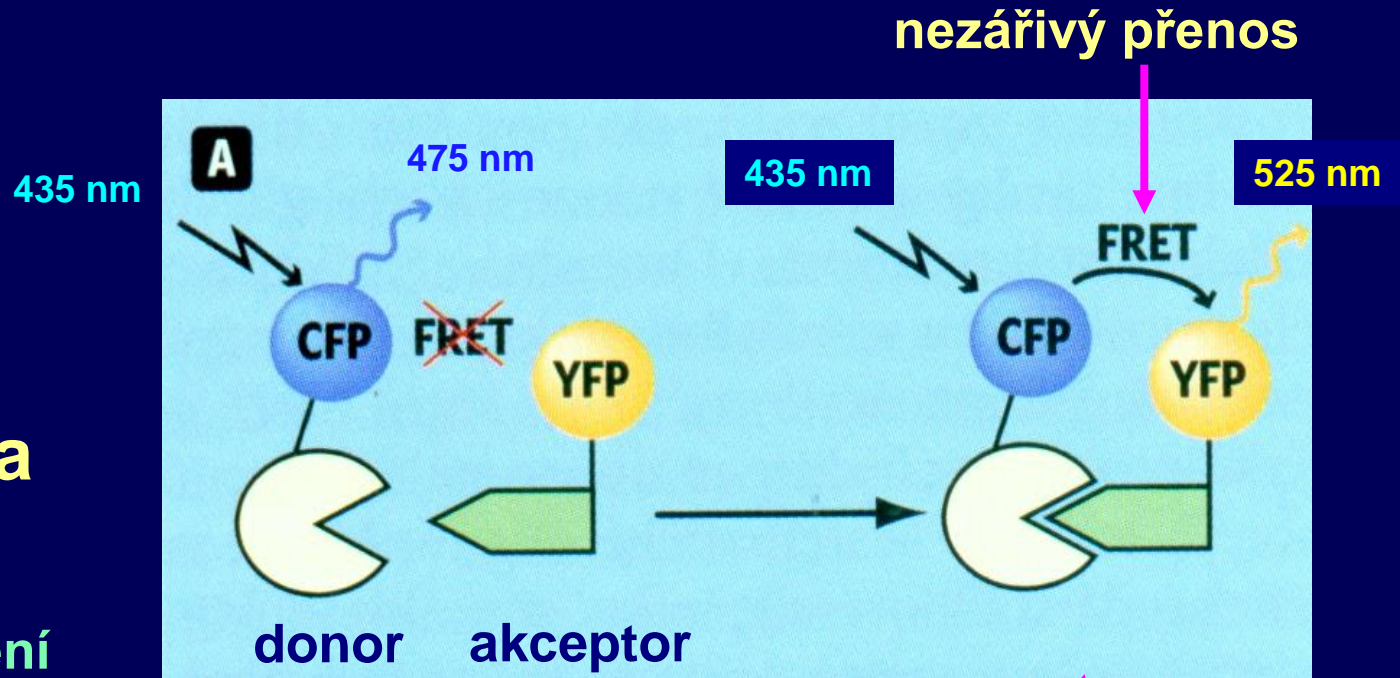
Využití:

- **zkoumání prostorového rozložení membránových receptorů**
- **sledování interakcí mezi proteiny**

FRET

- schéma

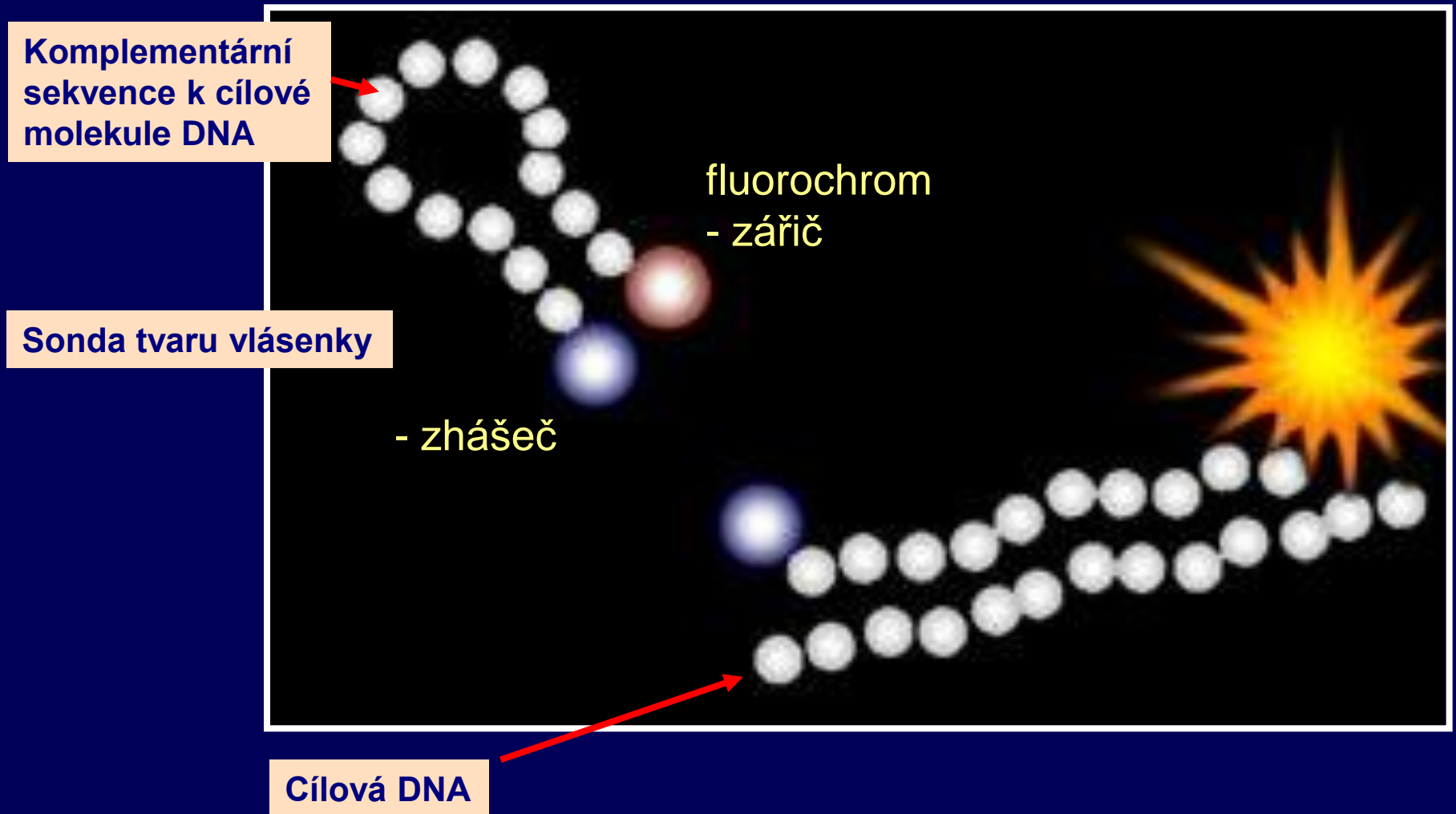
- přímé měření



vzdálenost donoru
a akceptoru
je větší než 10 nm

vzdálenost donoru
a akceptoru 5 nm

Molecular beacons (= signální majáky)



Molecular beacons

(= signální majáky; signální ohně)

Princip:

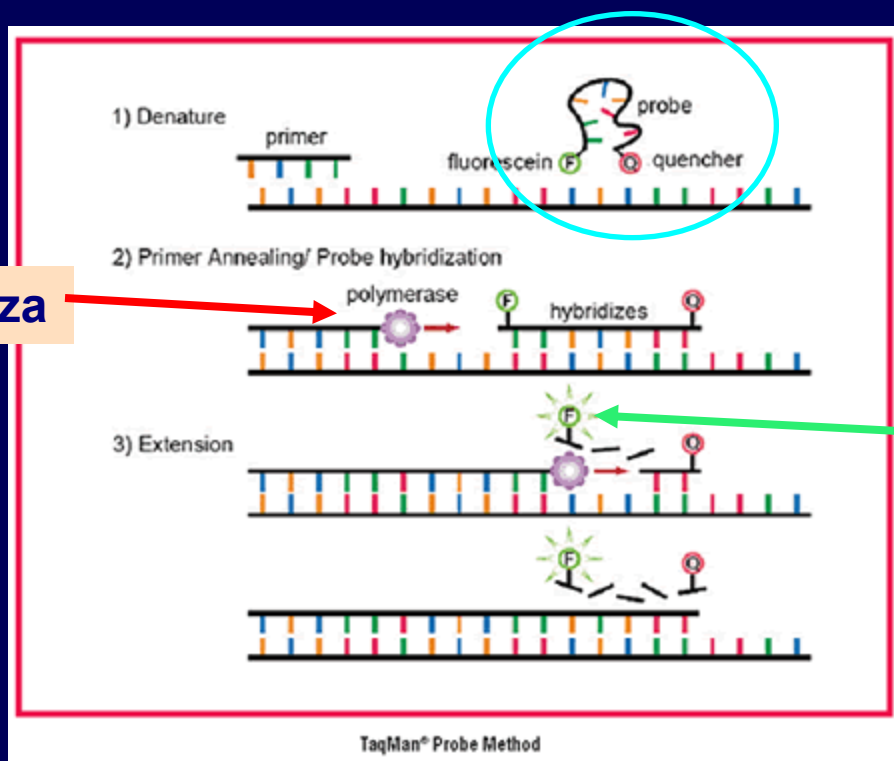
- speciální typ sond tvaru vlásenky, které jsou v původním stavu neaktivní a které mají na jednom konci sondy navázané molekuly zářiče (emitoru) a na druhém zhášeče
- po navázání na cílovou molekulu nukleové kyseliny se od sebe molekuly zářiče a zhášeče oddálí, a výsledkem je pak emise záření

Hydrolyzační sonda - TaqMan sonda

- olionukleotid s teplotou tání o 10 °C vyšší než mají primery;
na 5' konci je fluorescenční značka - **reporter**,
na 3' konci zhášec - **quencher**

QPCR
reakce
(real-time
PCR)

Taq DNA-polymeráza



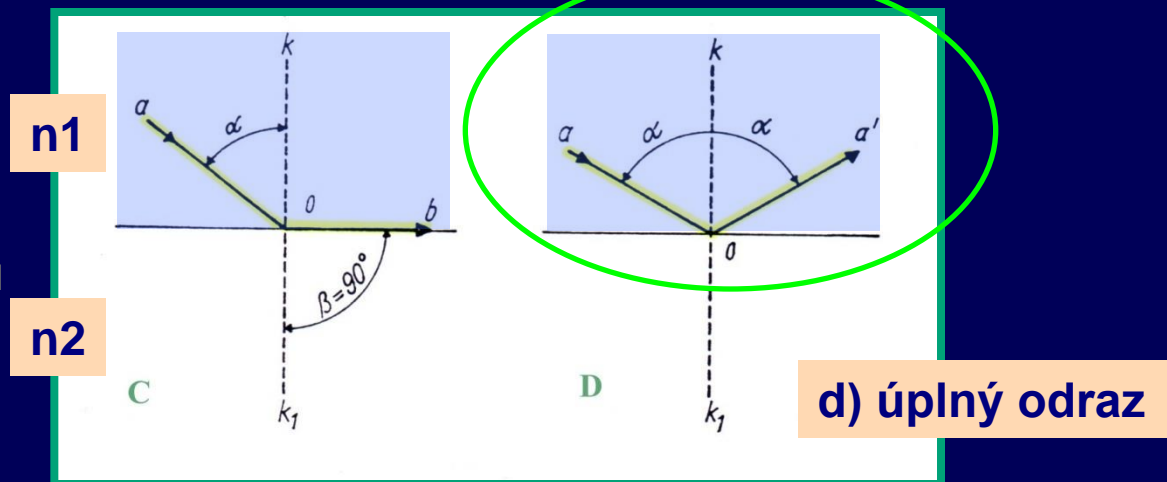
registrace záření

■ Totální odraz excitačního záření **TIRFM (TIRF)**

(Total Internal Reflection Fluorescence
Microscopy)

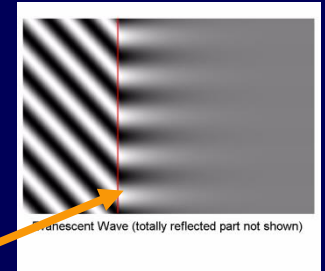
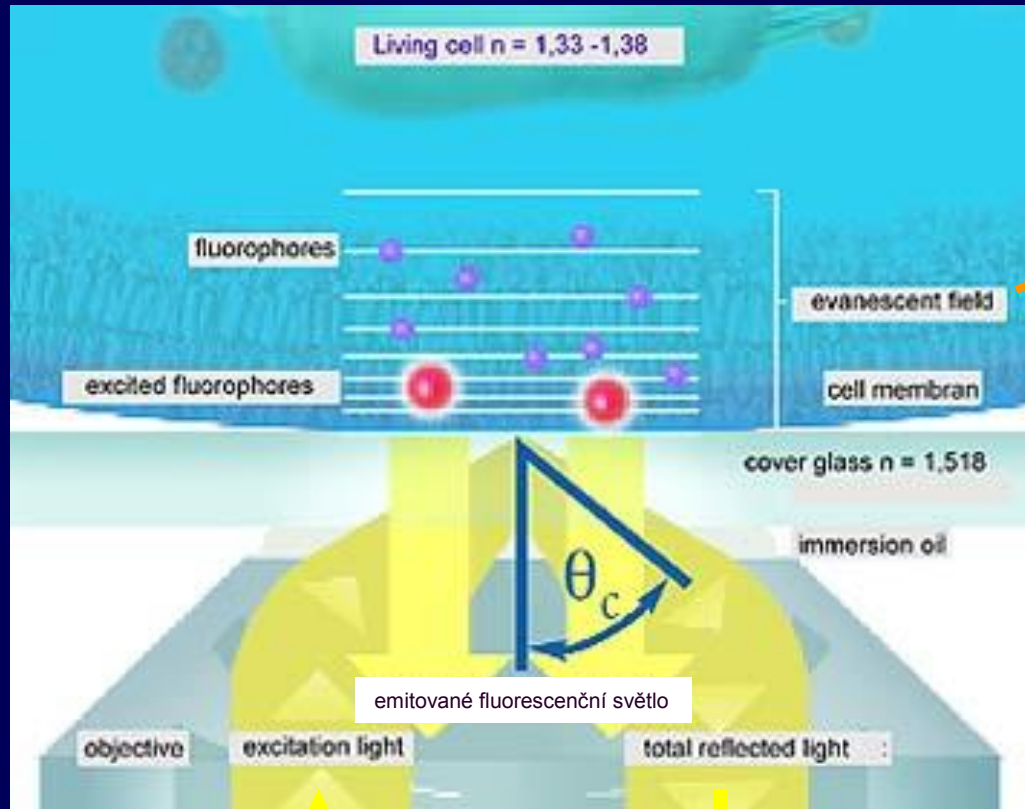
- pro pozorování fluorescence jednotlivých molekul v povrchové vrstvě na rozhraní dvou prostředí

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



Pazourek, 1975.

TIRFM - schéma



preparát

krycí sklo

speciální
objektiv
o NA = 1,6

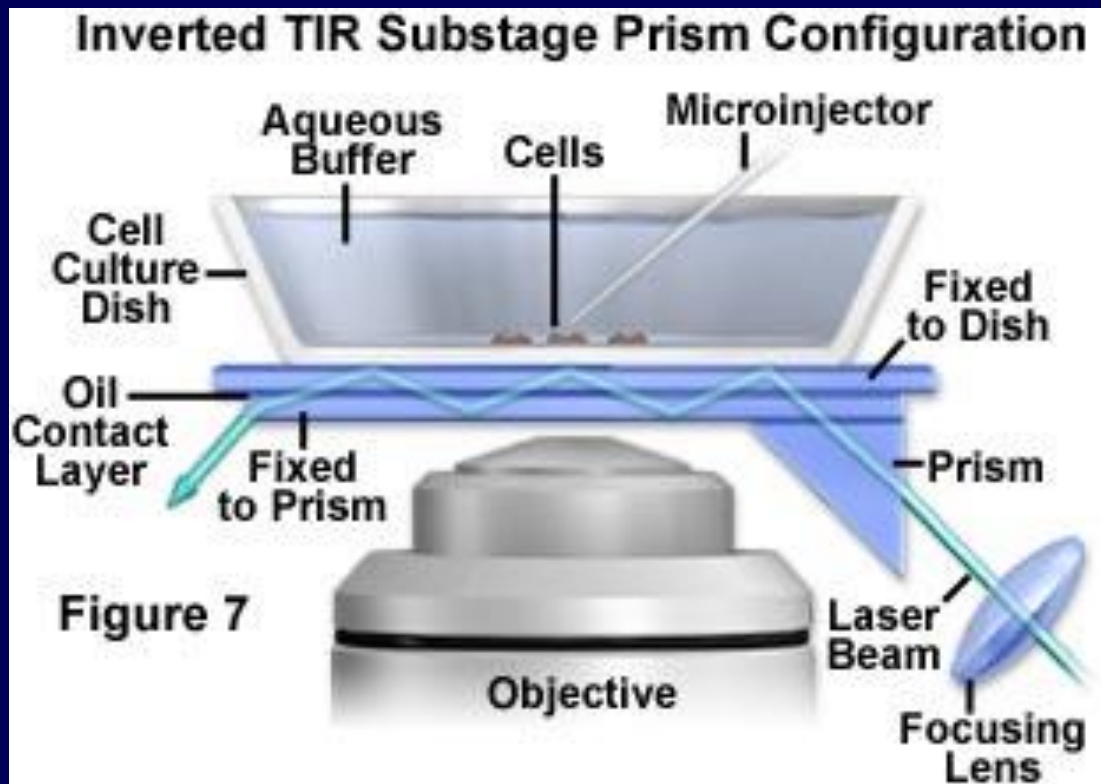
intenzivní
zdroj světla

hloubka průniku
paprsků evanescentní
vlnou
100 - 200 nm



Evanescentní vlna vzniká na hranici prostředí, do něž periodická vlna nemůže proniknout. Její intenzita exponenciálně klesá se vzdáleností od místa vzniku a její dosah tak je obvykle nejvíce v řádu stovek nanometrů.

https://www.nikoninstruments.com/cz_CZ/Vyrobky/Optika-a-objektivy/Objektivy-Apochromat/Serie-CFI-Apochromat-TIRF



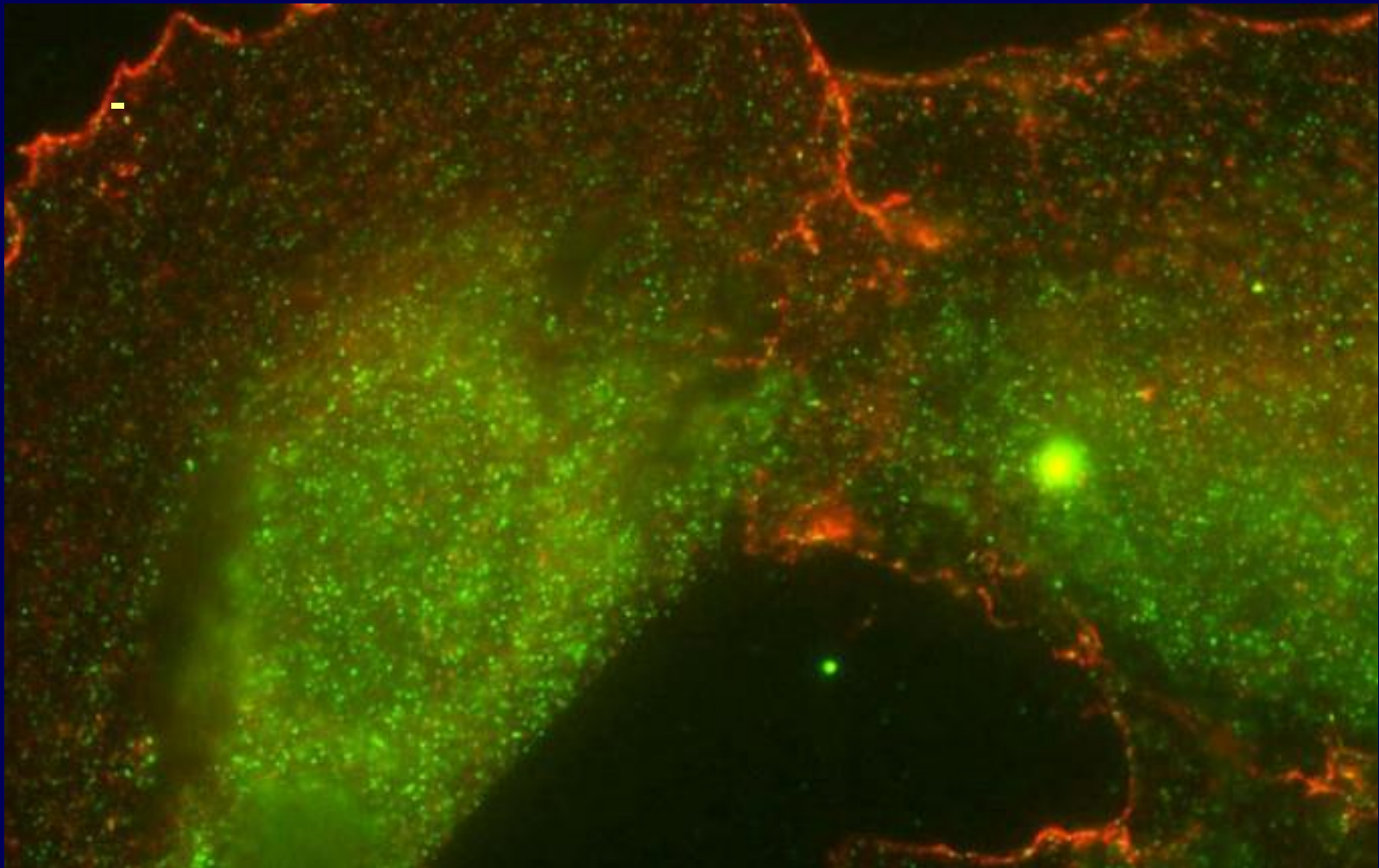
laserový paprsek

Výhoda TIRFM:

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

<https://www.olympus-lifescience.com/de/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfconfiguration/>

TIRFM



http://www.olympus.cz/microscopy/en/microscopy/systems/tirf_imaging_1.jsp

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.lf1.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>