



## **Cvičenie č. 4**

# **FLUORESCENČNÁ A KONFOKÁLNA MIKROSKOPIA**

# FLUORESCENČNÁ MIKROSKOPIA

- **fluorescenčná mikroskopia** → aplikácia optickej (svetelnej) mikroskopie  
→ na zobrazenie pozorovaného objektu využíva **fluorescenciu** alebo **fosforescenciu**
- **fluorescenčný mikroskop** → svetelný mikroskop prispôsobený na snímanie fluorescenčného signálu

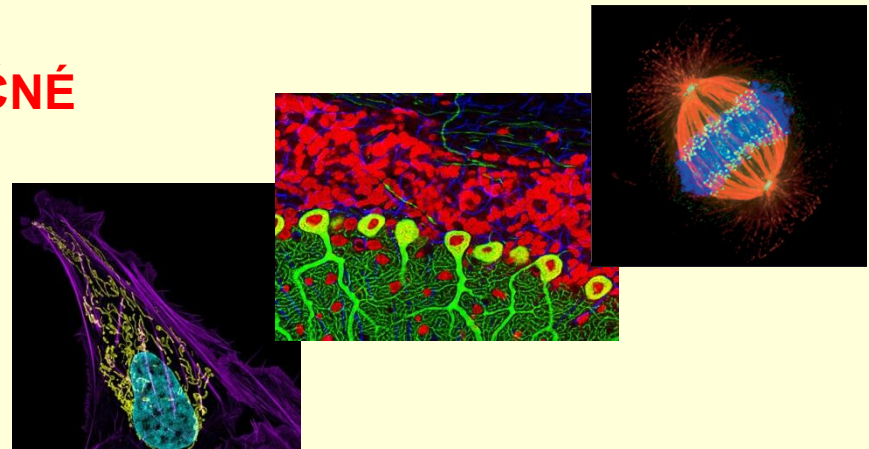


Typy mikroskopov:

- ➔ **FLUORESCENČNÉ = EPIFLUORESCENČNÉ**
- ➔ **KONFOKÁLNE**
- ➔ **SUPER-REZOLUČNÉ**

....

základná zostava je rovnaká



# FLUORESCENCIA A FOSFORENCIA

▪ formy **fotoluminiscencie** = samovoľné **žiarenie látok po ich ožiarení (osvetlení)**

→ podmienka  $\Rightarrow$  **pôsobenie elektromagnetického žiarenia**

→ priebeh: **ABSORBCIA FOTÓNA** (elektromagnetické žiarenie určitej  $\lambda$  a  $E$ )



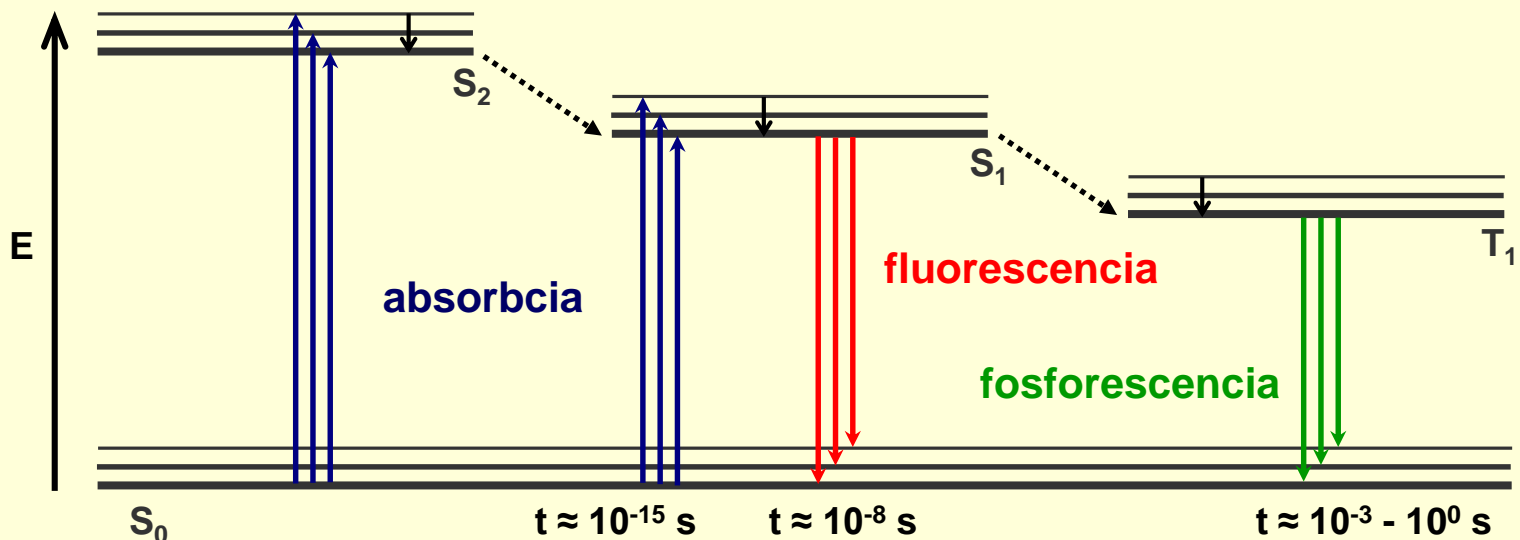
**EXCITÁCIA ELEKTRÓNOV ATÓMU** (vyššia energetická úroveň)



**NÁVRAT DO ZÁKLADNÉHO ENERGETICKÉHO STAVU  $\Rightarrow$**

**$\Rightarrow$  UVOĽNENIE  $E \Rightarrow$  EMISIA FOTÓNA = ŽIARENIE**

→ emitované žiarenie → väčšinou **vyššia  $\lambda$  a nižšia  $E$**  ako absorbované žiarenie



# FLUORESCENCIA A FOSFORENCIA

## FLUORESCENCIA

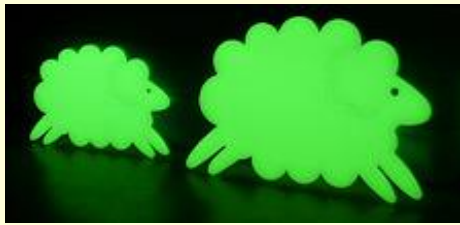


→ k emisii žiarenia dochádza okamžite po excitácii

(návrat  $e^-$  z excitovaného do základného stavu prebieha s minimálnym časovým posunom)

→ **zaniká okamžite** s odstránením zdroja excitácie (pod  $10^{-8}$  s)

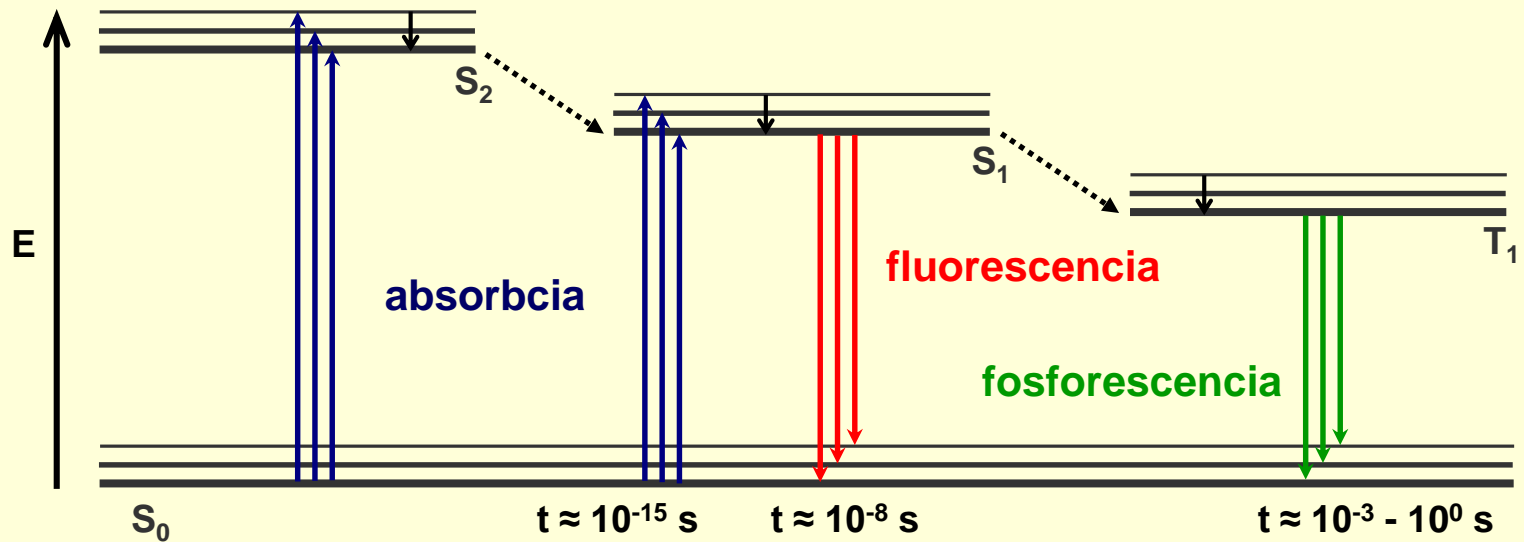
## FOSFORENCIA



→ k emisii žiarenia nedochádza okamžite po excitácii

(pri excitácii dochádza k zmene spinu  $e^-$  = nie je možný okamžitý návrat do základného stavu)

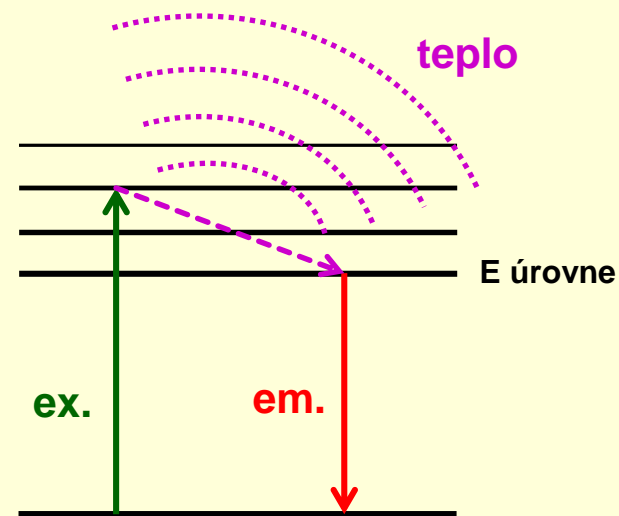
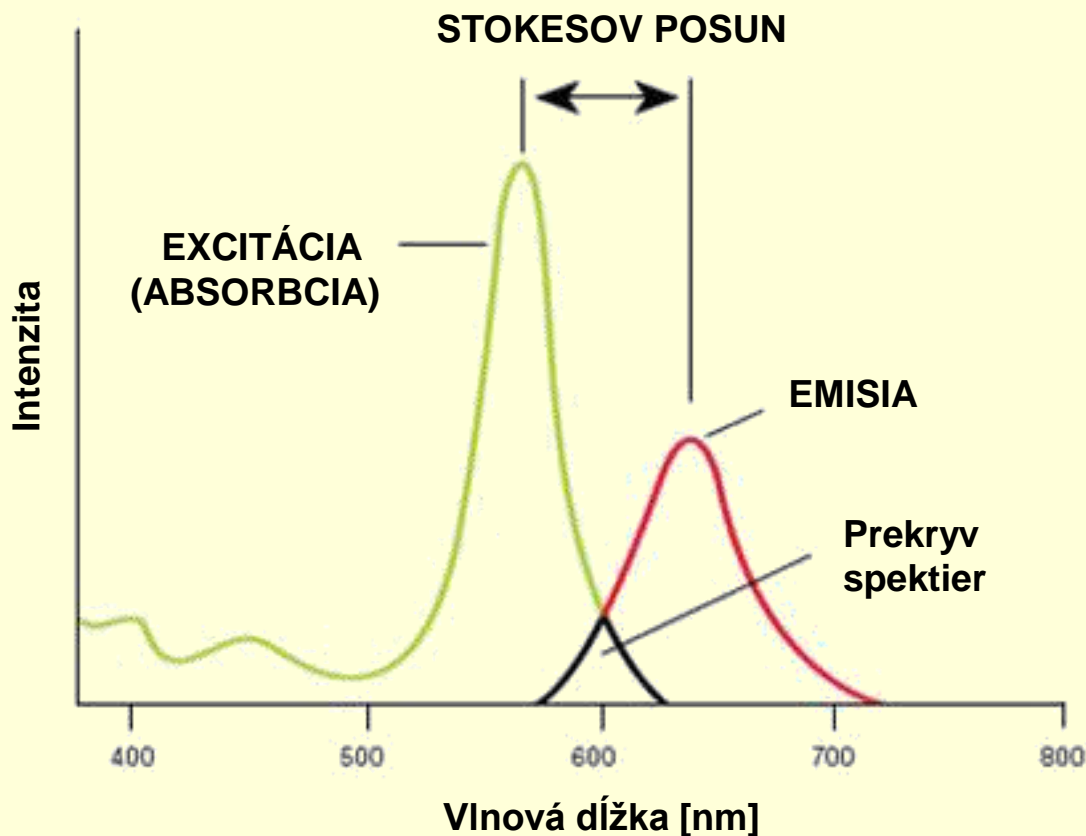
→ **nezaniká** s odstránením zdroja excitácie → **dlhší dosvit**  
(nad  $10^{-8}$  s až niekoľko minút, hodín, dní)



# STOKESOV POSUN

$\lambda$  emitovaného žiarenia  $>$   $\lambda$  excitačného žiarenia

Stokesov posun ➡ rozdiel (posun) medzi  $\lambda$  excitačného maxima a  $\lambda$  emisného maxima fluorochrómu



$$E(\text{em.}) < E(\text{ex.})$$



$$\lambda(\text{em.}) > \lambda(\text{ex.})$$

# FLUOROCHRÓMY

- **fluorochrómy (fluorofóry)** → látky **excitovateľné svetlom určitej  $\lambda$** , ktoré sú **schopné pri návrate do základného stavu emitovať žiarenie vyššej  $\lambda$**
- fluorescencia fluorochrómov:
  - ➔ **autofluorescencia** → emisia svetla molekulami, ktoré sú súčasťou vnútrobunkových štruktúr a organel  
→ NAD(P)H, chlorofyl, kolagén, tyrozín, tryptofán, melanín, . . .
  - ➔ **fluorescencia syntetických farbív** → emisia svetla syntetickými látkami, ktoré sa viažu na bunkové štruktúry, organely a makromolekuly

FLUOROCHROME	EX.	EM.	APPLICATION
Indo-1 (unbound)	335	490	Calcium Flux
Indo-1 (Bound to Calcium)	335	405	Calcium Flux
Hoechst 33342	350	470	DNA Analysis
DAPI	359	468	DNA Analysis
Alexa350	350	442	Phenotyping
PerCP	470	670	Phenotyping
R-Phycoerythrin	480	578	Phenotyping
Green Fluorescent Protein (GFP)	488	510	Reporter molecule
YO-PRO-1	488	510	Apoptosis analysis
Fluorescein diacetate	488	530	Cell viability
Alexa488	488	530	Phenotyping
Sytox Green	488	530	DNA Analysis
SNARF-1	488	530-640	pH measurement
Fluo-3	488	530	Calcium flux
dsRED	488	588	Reporter molecule

FLUOROCHROME	EX.	EM.	APPLICATION
PE-Cy5 (TriColor, Cychrome)	488	670	Phenotyping
PE-Cy7	488	670	Phenotyping
Propidium Iodide	495	637	DNA Analysis
Rhodamine 123	515	525	Membrane potential
Yellow Fluorescent Protein (YFP)	519	534	Reporter molecule
LDS-751	543	712	Nucleated cell detection
7-Aminoactinomycin D	546	655	DNA analysis
Alexa 546	546	573	Phenotyping
Cy3	550	565	Phenotyping
CMXRos (Mitotracker Red)	560	610	Mitochondrial membrane potential
Texas Red	596	615	Phenotyping
TO-PRO-3	643	661	DNA Analysis
Alexa 647	647	667	Phenotyping
APC-Cy7	647	774	Phenotyping
Allophycocyanin (APC)	650	660	Phenotyping



# PRINCÍP FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

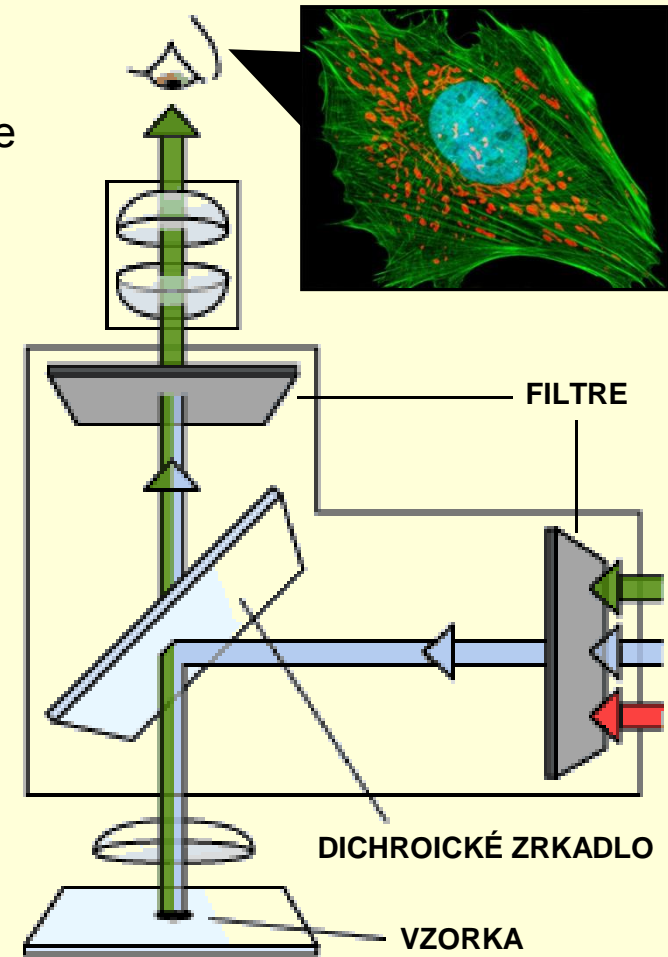
1. **vzorka** → **osvetlenie svetlom špecifickej  $\lambda$** 
  - **excitačný filter** = prepúšťa excitačné žiarenie určitej  $\lambda$
  - **dichroické zrkadlo** = odráža excitačné žiarenie ku vzorke
2. **fluorochróm** → **absorbacia fotónov a následná excitácia**
3. **fluorochróm** → **návrat do základného stavu**



## **EMISIA SVETLA (vyššia $\lambda$ )**

- emitované žiarenie = fluorescencia ➔ **iná farba** a **nižšia intenzita** ako excitačné žiarenie
4. **detektor / ľudské oko** → **detekcia emitovaného žiarenia (fluorescencie)**  
(excitačné žiarenie nie je detekované)
    - **dichroické zrkadlo, emisný filter** = neprepúšťa excitačné žiarenie

➔ zachytáva sa iba fluorescencia vzorky ➔ vzniká veľmi **KONTRASTNÝ OBRAZ** = **= oblasti fluorescenčného signálu na tmavom pozadí**



# FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

## ZLOŽENIE:

1. Základné **mechanické**, **optické** aj **osvetľovacie časti** svetelného mikroskopu:

- ➡ M → statív, tubus, stolček, krížový vodič, makro– a mikroskrutka, revolverový menič
- ➡ O → **epifluorescenčné** objektívy, okuláre
- ➡ S → kondenzor, zdroj svetla





# FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

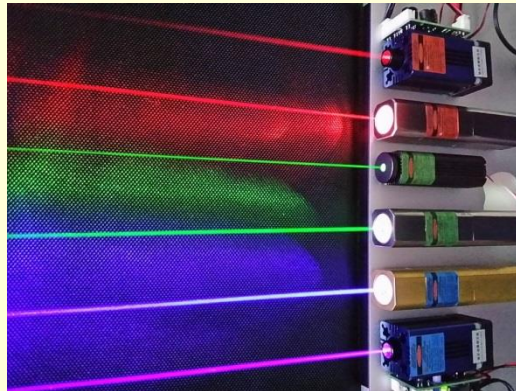
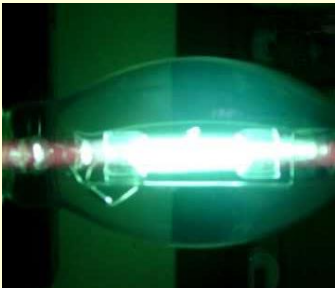
## ZLOŽENIE:

1. Základné **mechanické**, **optické** aj **osvetľovacie časti** svetelného mikroskopu:

- ➔ M → statív, tubus, stolček, krížový vodič, makro– a mikroskrutka, revolverový menič
- ➔ O → **epifluorescenčné** objektívy, okuláre
- ➔ S → kondenzor, zdroj svetla

2. **Zdroje svetla**

- ➔ **silný**, aby bolo možné odfiltrovať nežiaduce vlnové dĺžky a svetlo bolo stále **dostatočne silné na excitáciu flourochrómu**
- ➔ **výbojky** (ortuťová, xenónová), **lasere** (argónový, hélium-neónový), **LED diódy**



# FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

## ZLOŽENIE:

1. Základné **mechanické**, **optické** aj **osvetľovacie časti** svetelného mikroskopu:

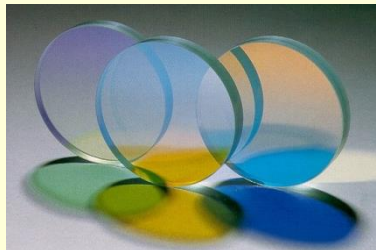
- ➔ M → statív, tubus, stolček, krížový vodič, makro– a mikroskrutka, revolverový menič
- ➔ O → **epifluorescenčné** objektívy, okuláre
- ➔ S → kondenzor, zdroj svetla

2. **Zdroje svetla**

- ➔ **silný**, aby bolo možné odfiltrovať nežiaduce vlnové dĺžky a svetlo bolo stále **dostatočne silné na excitáciu flourochrómu**
- ➔ **výbojky** (ortuťová, xenónová), **lasere** (argónový, hélium-neónový), **LED diódy**

3. **Filtre a zrkadlá**

- ➔ **prepúšťajú alebo odrážajú svetlo so špecifickými vlastnosťami ( $\lambda$ )**
- ➔ **dichroické zrkadlá** → odrážajú žiarenie s nižšou  $\lambda$  a prepúšťajú žiarenie s vyššou  $\lambda$  = **oddeľujú excitačné žiarenie od emitovaného (fluorescencia)**
- ➔ **excitačné filtre** → prepúšťajú excitačné svetlo zo zdroja so špecifickou  $\lambda$
- ➔ **emisné filtre** → neprepúšťajú nežiaduce svetlo prichádzajúce zo vzorky



# FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

## ZLOŽENIE:

1. Základné **mechanické**, **optické** aj **osvetľovacie časti** svetelného mikroskopu:

- ➔ M → statív, tubus, stolček, krížový vodič, makro– a mikroskrutka, revolverový menič
- ➔ O → **epifluorescenčné** objektívy, okuláre
- ➔ S → kondenzor, zdroj svetla

2. **Zdroje svetla**

- ➔ **silný**, aby bolo možné odfiltrovať nežiaduce vlnové dĺžky a svetlo bolo stále **dostatočne silné na excitáciu flourochrómu**
- ➔ **výbojky** (ortuťová, xenónová), **lasere** (argónový, hélium-neónový), **LED diódy**

3. **Filtre a zrkadlá**

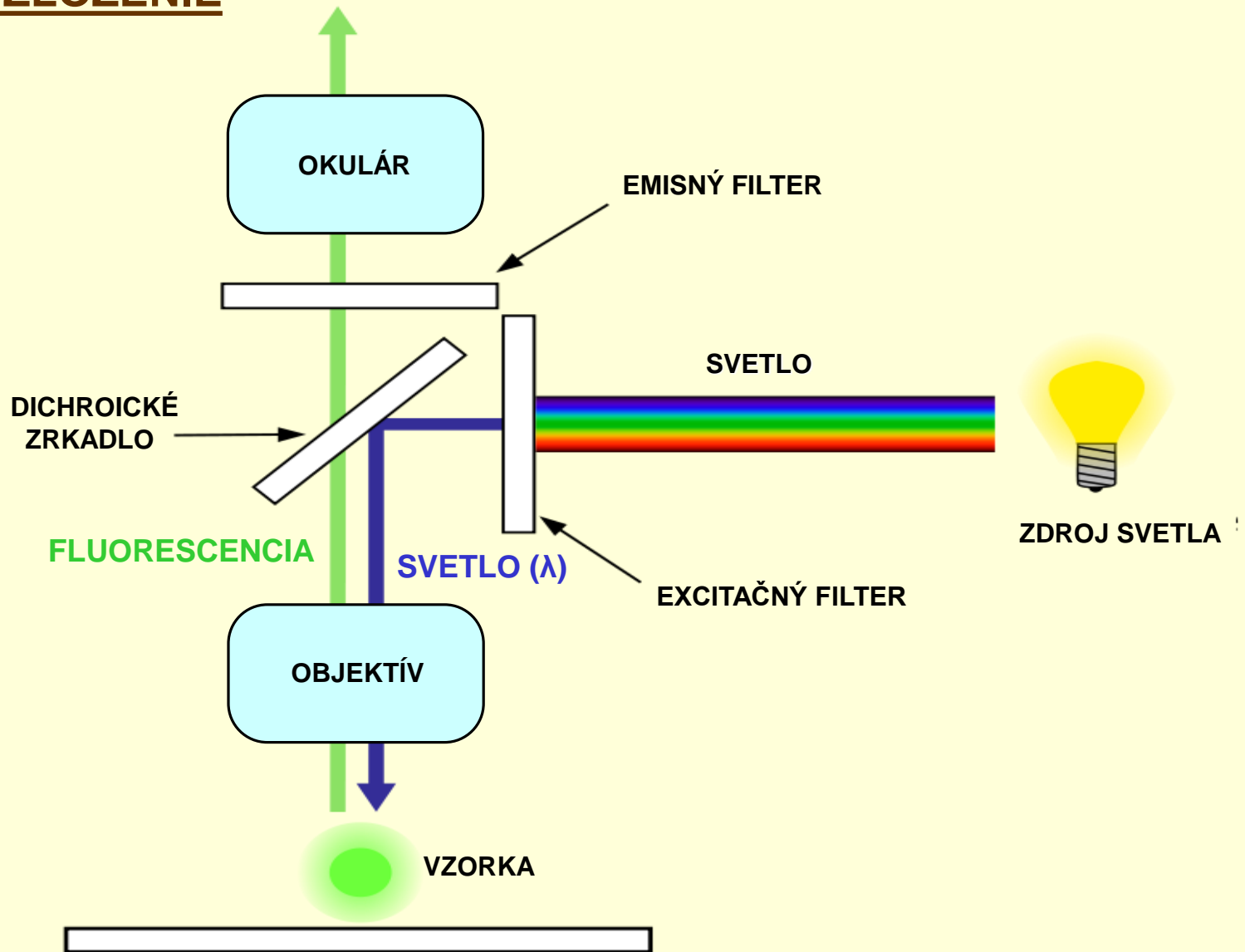
- ➔ **prepúšťajú alebo odrážajú svetlo so špecifickými vlastnosťami ( $\lambda$ )**
- ➔ **dichroické zrkadlá** → odrážajú žiarenie s nižšou  $\lambda$  a prepúšťajú žiarenie s vyššou  $\lambda$  = **oddeľujú excitačné žiarenie od emitovaného (fluorescencia)**
- ➔ **excitačné filtre** → prepúšťajú excitačné svetlo zo zdroja so špecifickou  $\lambda$
- ➔ **emisné filtre** → neprepúšťajú nežiaduce svetlo prichádzajúce zo vzorky

4. **Detektory**

- ➔ **fotonásobiče** → zosilňujú prichádzajúci signál
- ➔ **CCD kamery, fotoaparáty** → zachytávajú prichádzajúci signál

# FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

## PRINCÍP A ZLOŽENIE

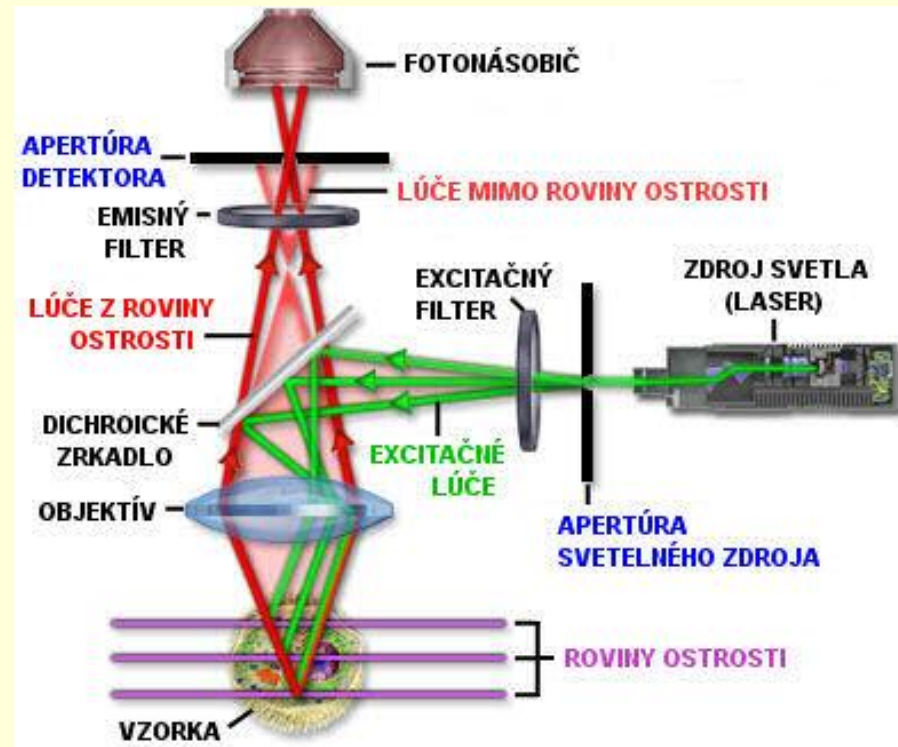
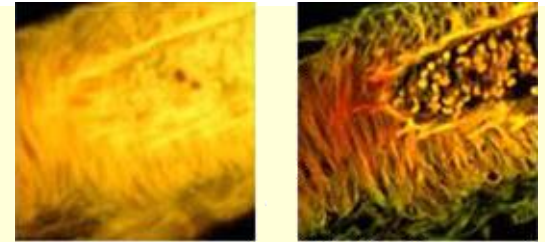
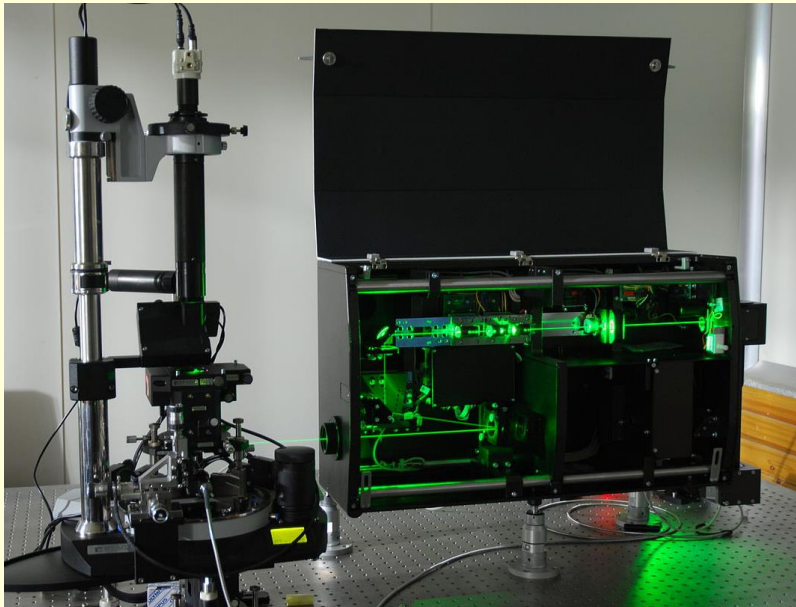


# KONFOKÁLNY MIKROSKOP

- **konfokálna mikroskopia** → aplikácia svetelnej a fluorescenčnej mikroskopie
  - ➔ vyššia rozlišovacia schopnosť
  - ➔ lepšie kontrastné zobrazenie

## ZLOŽENIE KONFOKÁLNEHO MIKROSKOPU:

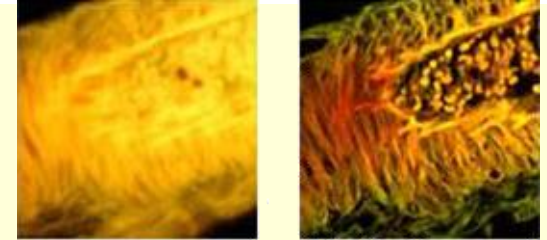
- základné zloženie → ako epifluorescenčný mikroskop
- zdroj svetla → **väčšinou lasere**





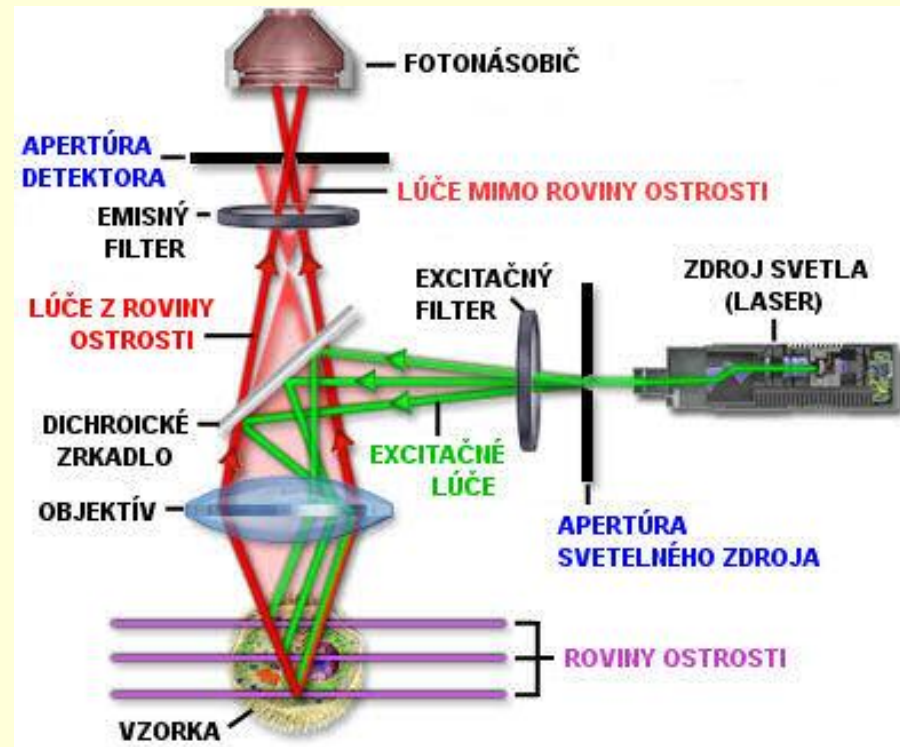
# KONFOKÁLNY MIKROSKOP

- **konfokálna mikroskopia** → aplikácia svetelnej a fluorescenčnej mikroskopie
  - ➔ vyššia rozlišovacia schopnosť
  - ➔ lepšie kontrastné zobrazenie



## ZLOŽENIE KONFOKÁLNEHO MIKROSKOPU:

- základné zloženie → ako epifluorescenčný mikroskop
- zdroj svetla → **väčšinou lasere**
- **apertúry:**
  - ➔ **apertúra svetelného zdroja** →  
→ eliminuje posuny a zmeny svetelného lúča a koncentruje zväzok lúčov na vzorku
  - ➔ **apertúra detektora („pinhole“)** →  
→ prepúšťa iba fluorescenciu emitovanú z fokálnej roviny  
→ lúče emitované z iných rovín sú platničkou zachytávané = neprechádzajú do detektora





# KONFOKÁLNY MIKROSKOP

## LASERE

**hélium-neónový** ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ )

HeNe 633

**hélium-neónový** ( $\lambda = 594 \text{ nm}$ )

HeNe 594

**DPSS** (diode-pumped solid-state) ( $\lambda = 561 \text{ nm}$ )

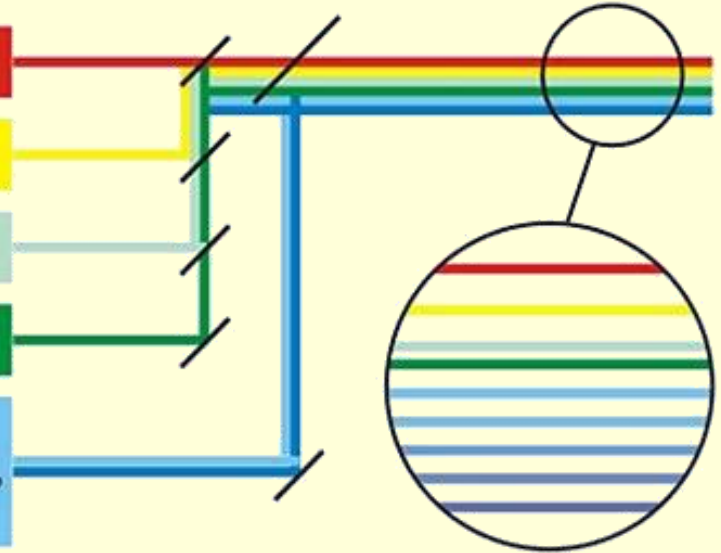
DPSS 561

**hélium-neónový** ( $\lambda = 543 \text{ nm}$ )

HeNe 543

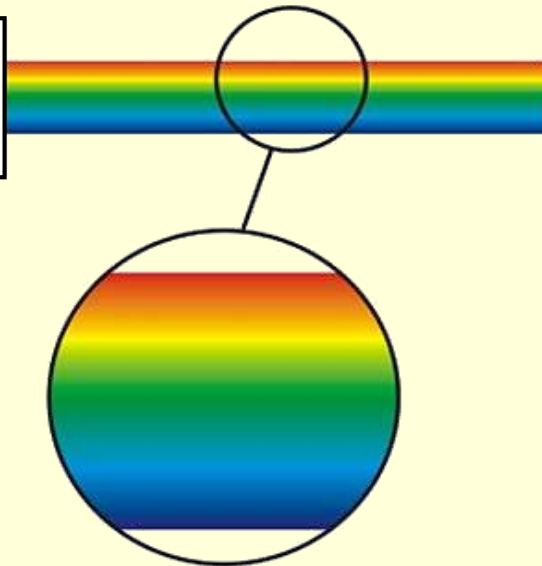
**argónový** ( $\lambda = 458 \text{ nm}, 476 \text{ nm}, 488 \text{ nm}, 496 \text{ nm}, 514 \text{ nm}$ )

Ar laser  
458, 476, 488,  
496, 514



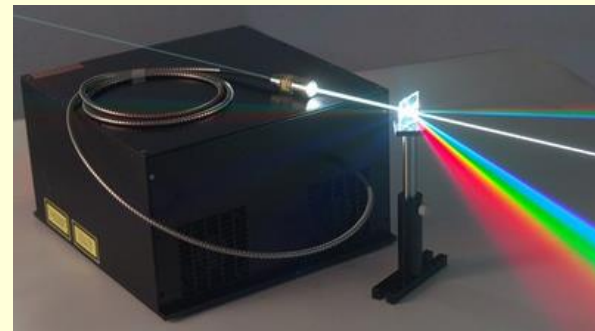
**Biely laser**

470 – 670 nm



**zahŕňa celé spektrum farieb bieleho svetla** ➔

➔ svetlo o špecifickej  $\lambda$  sa získava vhodnou kombináciou filtrov a dichroických zrkadiel



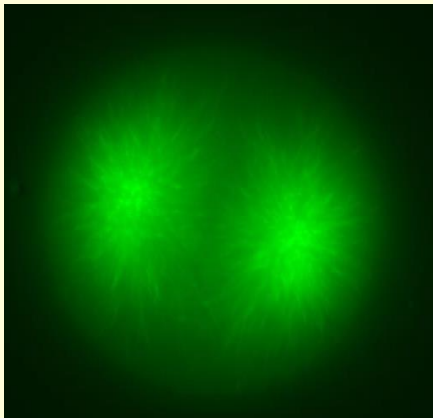
# FLUORESCENČNÝ vs. KONFOKÁLNY MIKROSKOP

## FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

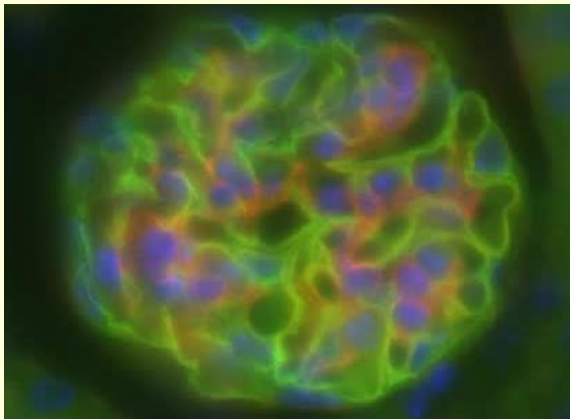
**zachytávanie** aj fluorescencie pozadia  
a úrovni nad a pod fokálnou rovinou



**nižšie rozlíšenie a kontrast obrazu**



mikrotubuly



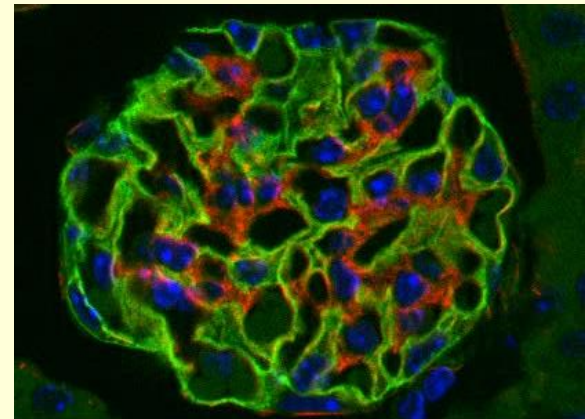
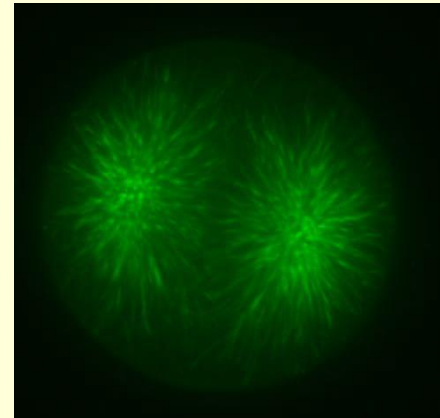
rez obličkou  
myši

## KONFOKÁLNY MIKROSKOP

**eliminácia** fluorescencie pozadia  
a úrovni nad a pod fokálnou rovinou



**vyššie rozlíšenie a kontrast obrazu**



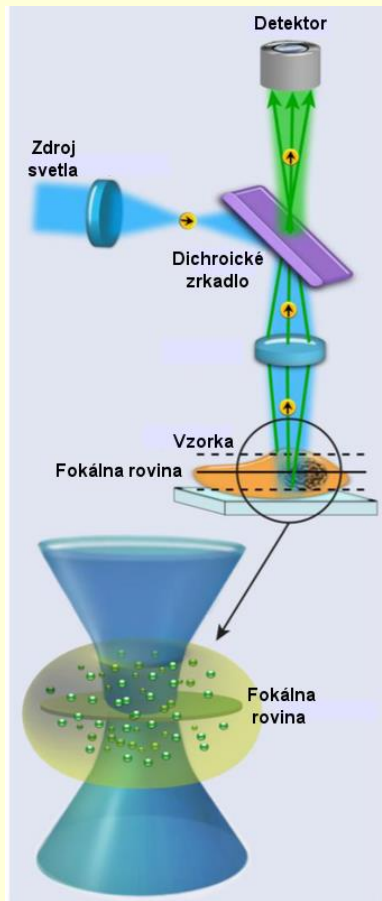
# FLUORESCENČNÝ vs. KONFOKÁLNY MIKROSKOP

## FLUORESCENČNÝ MIKROSKOP

**zachytávanie** aj fluorescence pozadia  
a úrovni nad a pod fokálnou rovinou



**nižšie rozlíšenie a kontrast obrazu**

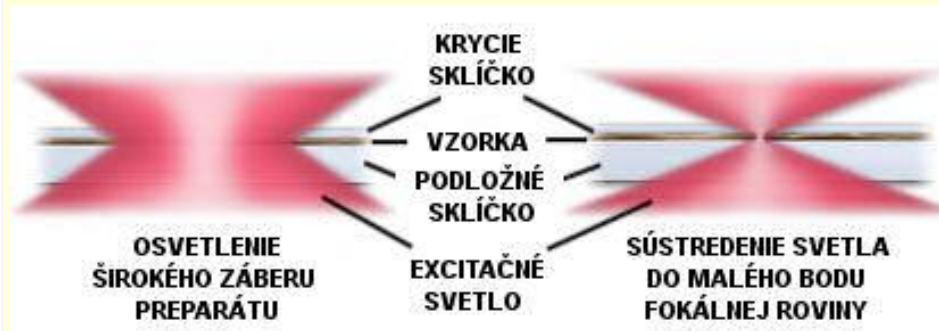
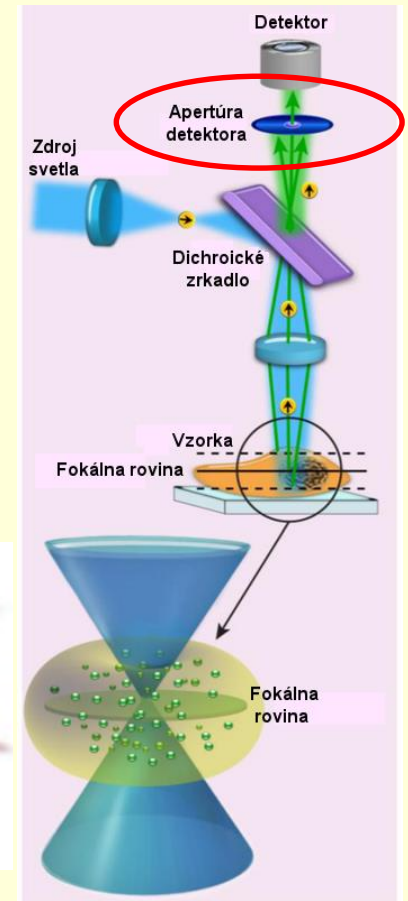


## KONFOKÁLNY MIKROSKOP

**eliminácia** fluorescence pozadia  
a úrovni nad a pod fokálnou rovinou

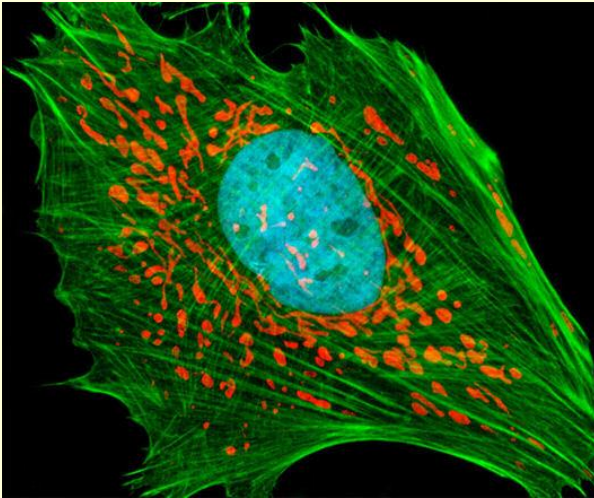


**vyššie rozlíšenie a kontrast obrazu**



# APLIKÁCIE FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

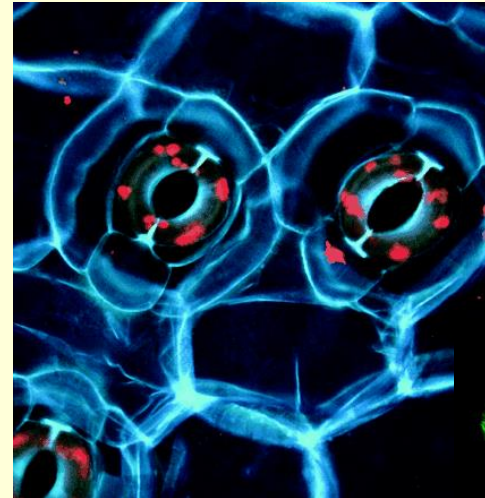
➔ zobrazovanie detailov, organel a štruktúr buniek



jadro

mitochondrie

mikrotubuly



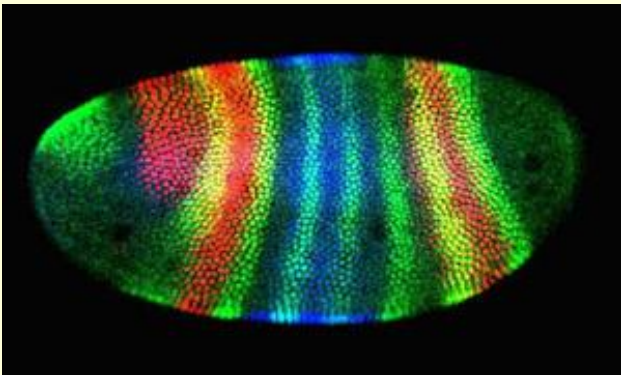
bunková stena

chloroplasty

mikrotubuly



➔ detekcia lokalizácie a kolokalizácie molekúl v bunkách  
(DNA, RNA, enzýmy, signálne proteíny, ...)



Embryo drozofily

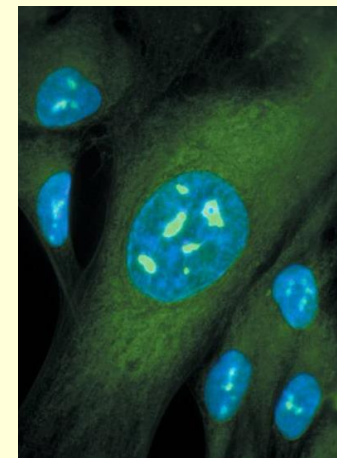
proteíny:

hairy

Kruppel

giant

kolokalizácia hairy a Kruppel



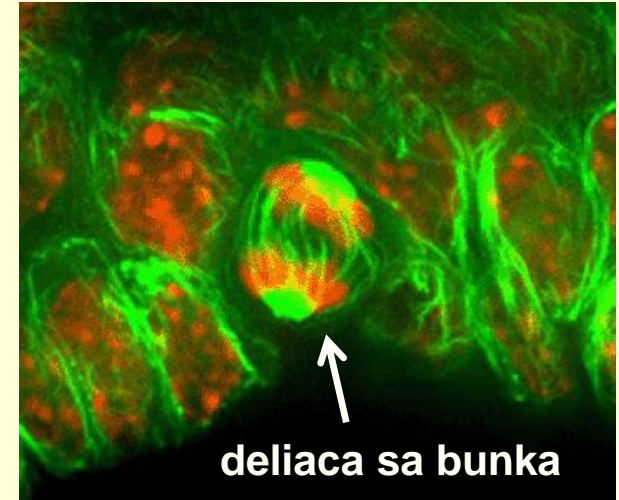
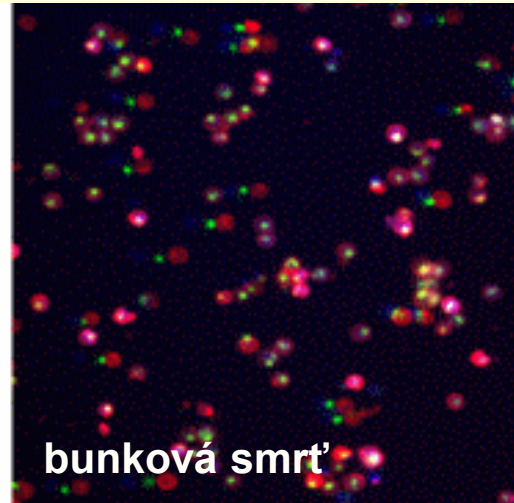
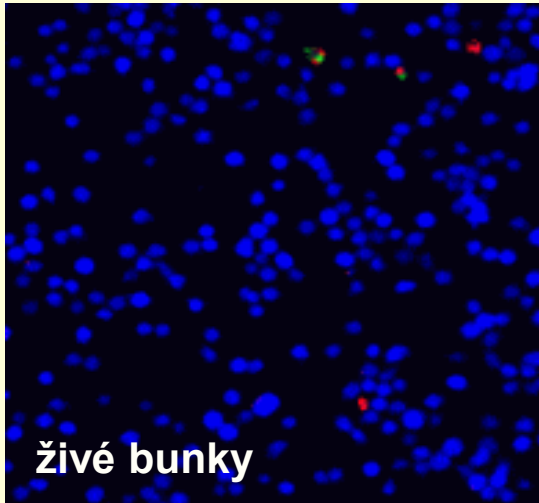
DNA

RNA

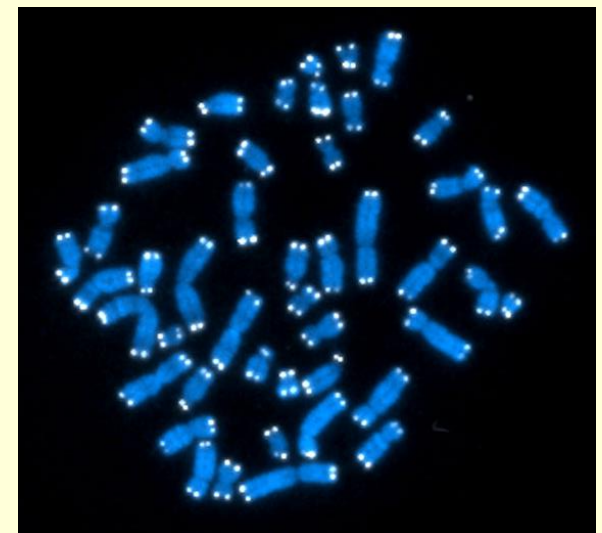
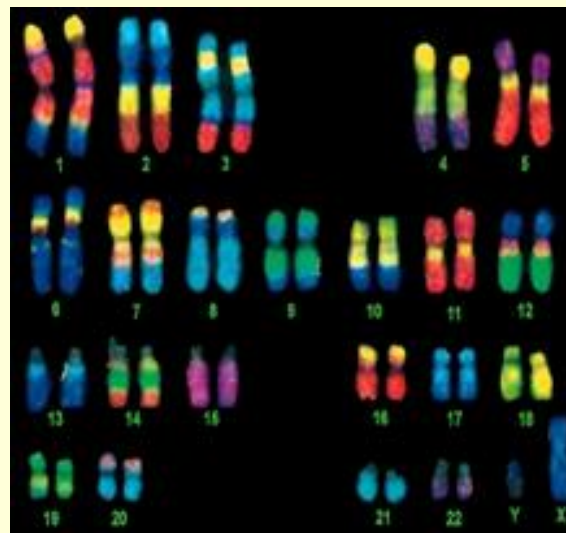
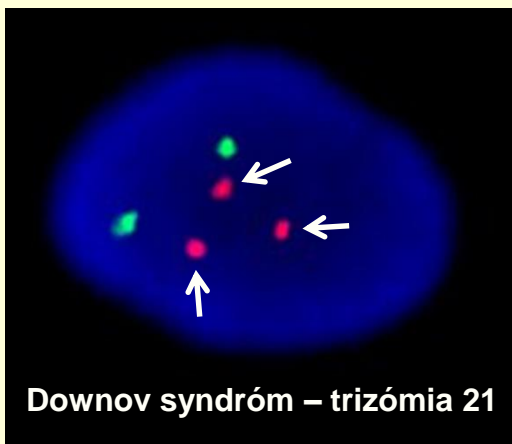


# APLIKÁCIE FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

➔ štúdium viability (životaschopnosti) a proliferácie buniek v rámci populácie

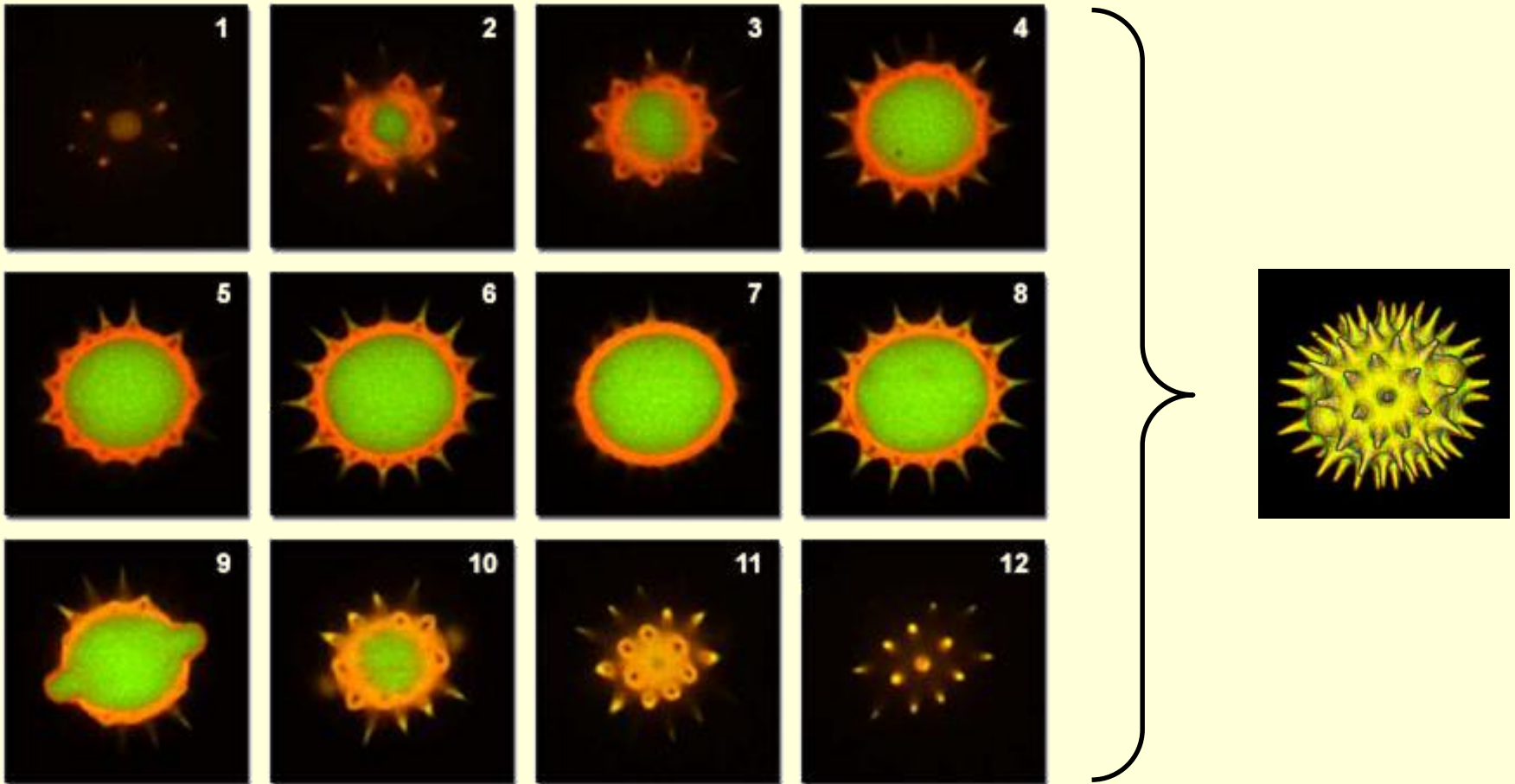


➔ mapovanie chromozómov a špecifických fragmentov / úsekov DNA (FISH)



# APLIKÁCIE FLUORESCENČNEJ MIKROSKOPIE

- ➔ priestorové (3D) zobrazovanie pomocou konfokálneho mikroskopu  
(„skenovanie“ pozorovaného objektu po vrstvách a skladanie 3D obrazu pomocou softwaru)



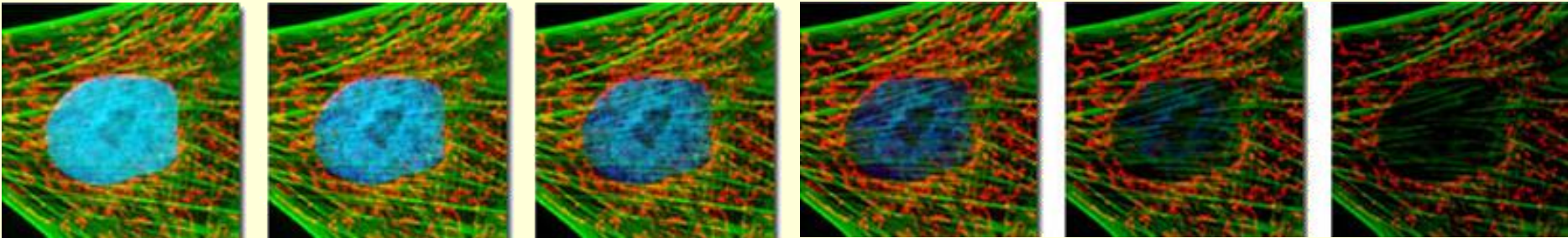


# VYSVECOVANIE FLUOROCHRÓMU

- **vysvecovanie (vyblednutie) fluorochrómu = „photobleaching“** → postupná **strata** schopnosti fluorochrómu emitovať žiarenie



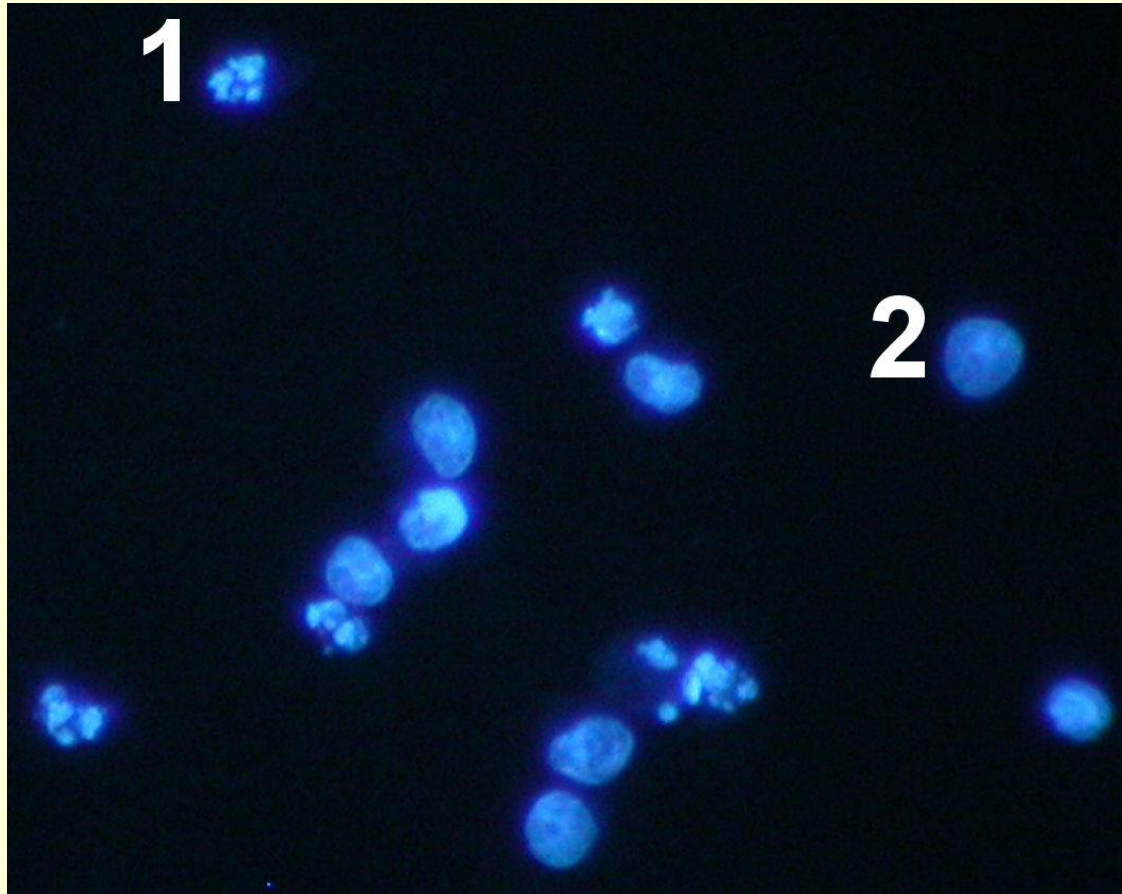
**pokles intenzity fluorescence fluorochrómu**



- spôsobené fotochemickou zmenou fluorochrómu ➡ **„zničenie“ fluorochrómu pôsobením excitačného svetla:**
  - ➡ nešpecifické reakcie
  - ➡ štiepenie kovalentných väzieb
- **SHUTTER** → manuálna kontrola prístupu excitačného svetla ku vzorke

# PRAKTICKÁ UKÁŽKA

## Forma bunkovej smrti určená na základe morfológie jadra



fluorochróm → **DAPI**  
(4',6-diamidino-2-phenylindole)

→  $\text{max}_{\text{ex}}$  – 350 nm;  $\text{max}_{\text{em}}$  – 470 nm

→ vysokoafinitná väzba na **DNA**  
nízkoafinitná väzba na **RNA**

1 – apoptotická bunka  
(umierajúca bunka)

2 – živá bunka

Nádorová bunková línia → **HT-29** (adenokarcinóm hrubého čreva)

(foto: Jendželovský, 2008, ©)