



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Hana Kudrnová, KVOF MFF UK

Úloha 35

Fluorescenční mikroskop

Pracovní úkol:

1. Seznamte se s principem a základní obsluhou fluorescenčního mikroskopu v invertovaném uspořádání.
2. Připravte preparáty pro pozorování v procházejícím a v odraženém světle, preparát pro srovnání měření ve světlém a temném poli a preparát pro fluorescenční pozorování.
3. Proved'te pozorování vybraných preparátů pomocí fluorescenčního mikroskopu. Pro jednotlivé vzorky zvolte vhodné uspořádání mikroskopu, tj. stanovte zvětšení, odhadněte rozlišení a hloubku ostrosti. Měření jednoho vzorku proved'te při různých zvětšeních.
 1. Proved'te měření v procházejícím viditelném světle.
 2. Proved'te fluorescenční měření v odraženém světle.
4. Stejně preparáty pozorujte pomocí běžného optického mikroskopu. Proved'te s nimi obdobná měření jako v bodě 3.
 1. Proved'te měření v procházejícím světle ve světlém a temném poli.
 2. Proved'te měření v odraženém světle.
5. Srovnejte a diskutujte parametry obrazů vzniklých fluorescenčním a běžným optickým mikroskopem.

Základní vztahy a klíčová slova:

Fluorescence, fosforescence, Stokesův posun, fluorescenční barviva, zobrazení centrovanými optickými systémy, zvětšení, rozlišení, hloubka ostrosti, numerická apertura, optický mikroskop (OLYMPUS BX51/BX52), fluorescenční mikroskop (OLYMPUS IX73)

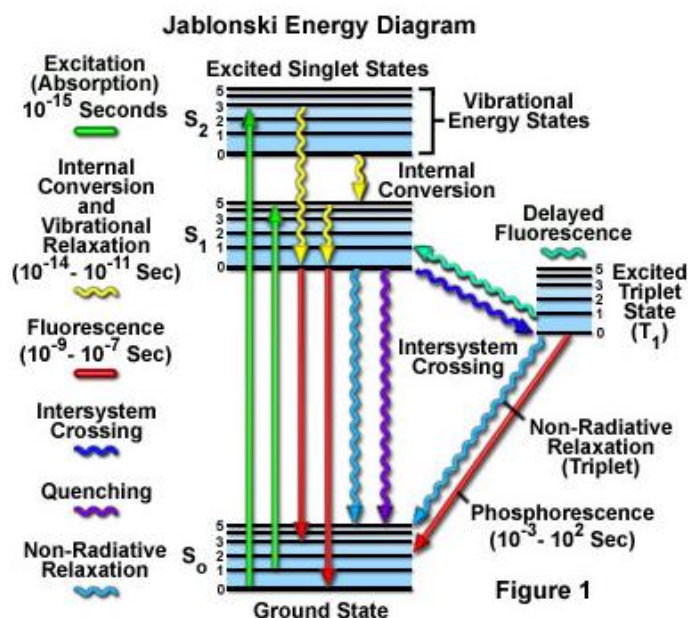


Fluorescenční mikroskopie

Úloha se zabývá metodou zobrazení založenou na principu fluorescence. Při tomto spontánním optickém jevu dochází k vyzařování světla vyvolané dopadajícím světlem.

Fluorescence nastává díky absorpci fotonu s dostatečnou energií látkou (tzv. fluoroforem), kdy dojde k vybuzení atomů nebo molekul do vyššího excitovaného stavu a následně k samovolné emisi fotonu při přechodu elektronů zpět na nižší hladinu. Vyvolávající záření se nazývá excitační a záření vysílané látkou emisní. Vlnová délka emisního záření je vždy delší než vlnová délka záření excitačního.

V případě fluorescence je emisní záření vysláno ihned po vybuzení (excitaci) atomů nebo molekul a odeznívá během asi 10^{-8} sekundy. Emise záření z excitovaného elektronového stavu nastává jedním či více spontánními energetickými přechody. Jev fosforescence je obdobný, ale emisní záření přetrvává i po zhasnutí excitačního záření. Je to proto, že při fosforescenci jsou elektrony v metastabilním stavu, tedy dostávají se na takové energetické hladiny, z nichž se nemohou snadno vrátit na základní hladinu. Interakce světla a molekul jsou obvykle znázorněny ve formě tzv. Jablonského diagramu – viz obr. 1.



Obr. 1 Jablonského diagram

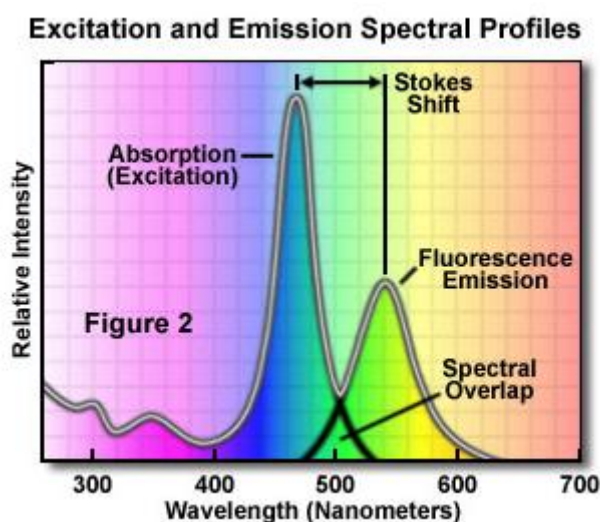
(převzato: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/jablonski/jabintro/>)

Z hlediska zdroje fluorescence rozlišujeme primární a sekundární fluorescenci. Při primární neboli vlastní fluorescenci je zdrojem přímo zkoumaná látka. Tento typ fluorescence, nazývaný též autofluorescence, se vyskytuje pouze v některých buňkách a intenzita signálu nebývá příliš silná. Autofluorescenci vykazují například chlorofyl, hemoglobin, cytochromy, vitamin A a jiné. Pro sekundární fluorescenci je třeba zkoumanou látku obarvit fluoreskujícím barvivem (fluorochromem). Mezi známé fluorochromy používané pro vizualizaci buněčných struktur patří například fluorescein, rhodamin, FITC, propidium jodid, DAPI a další.

Každý fluorochrom je charakterizován svým excitačním a emisním pásmem (viz obr. 2). Excitační pásmo ukazuje rozsah vlnových délek, které vedou k excitaci dané látky. Emisní pásmo ukazuje rozsah vlnových délek, při kterém dochází k emisi fluorescence. Jak excitační, tak emisní pásma mají svá maxima, což znamená, že pokud je fluorochrom ozářen světlem o

vlnové délce, která odpovídá maximu excitačního pásma, následná fluorescence nabývá maximální intenzity. Pokud je použita jiná vlnová délka, intenzita fluorescence je snížena. Rozdíl mezi vlnovými délkami emisního a excitačního maxima se nazývá Stokesův posun. Stokesův posun je důležitým faktorem při biologických experimentech. Pokud je Stokesův posun velmi malý, je obtížné odlišit emitované světlo od excitačního. Při “vícebarevných” experimentech s více fluorochromy, je třeba při výběru fluorochromů brát zřetel na možný překryv jejich spekter.

Pro popis fluorescence se dále zavádí tzv. extinkční koeficient, který vyjadřuje kvantitu absorbovaného světla o určité vlnové délce při dané koncentraci fluorochromu v látce. Kvantový výtěžek vyjadřuje efektivitu fluorescenční emise a je vyjádřen jako poměr emitovaných fotonů k fotonům absorbovaných (pohybuje se mezi 0-1). Životnost je doba, po kterou je molekula v excitovaném stavu, než dojde k emisi záření (obvykle 0,2 – 20 nanosekund).



Obr. 2 Ukázka absorpčně-emisního spektrálního diagramu typického fluorochromu

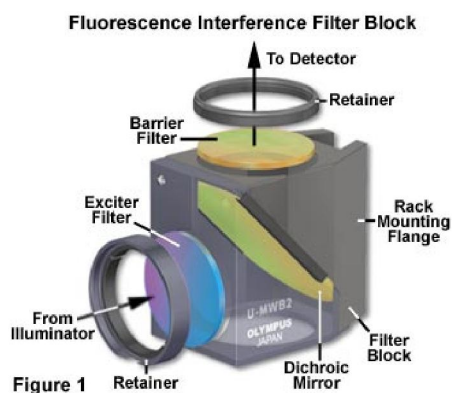
(převzato: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluoroexcitation/>)

Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop využívající fluorescenci k zobrazení organických i anorganických struktur. Výhodou fluorescenčních metod je velký kontrast zobrazení, specifickost různých fluorochromů na absorpci a emisi světla o určité vlnové délce, vysoká citlivost. Určitými nevýhodami jsou rychlé vysvicování fluorescence, životnost fluoroforů, které se rozkládají vlivem intenzivního záření a ztrácejí tak schopnost excitace a emise, nutnost minimalizace excitačního světla.

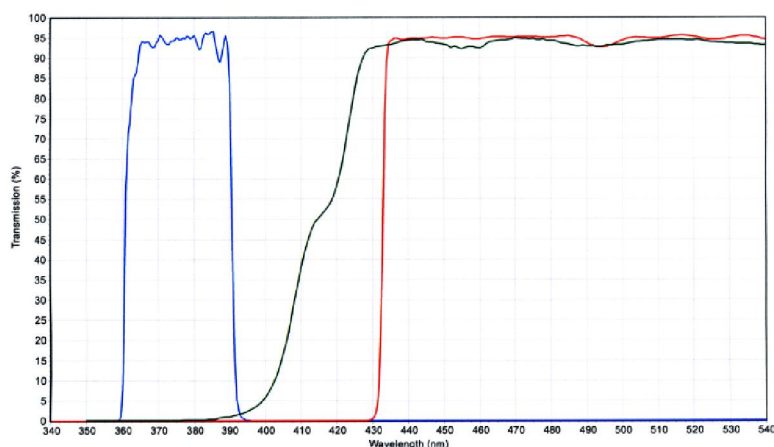
Základní části fluorescenčního mikroskopu jsou zdroj excitačního záření, excitační a ochranné (bariérové, emisní) filtry, vhodná optika pro UV záření (tj. např. křemenná nebo zrcadlová), dichroické zrcadlo, objektivy s co největší světelností (tj. s velkou NA).

Zdrojem excitačního záření bývá buď UV lampa (většinou rtuťová výbojka) a nebo světelný zdroj vhodných vlnových délek typu LED. Excitační záření projde nejdříve excitačním filtrem. Tento filtr ze světelného zdroje selektivně vymezí záření o vlnové délce vhodné pro konkrétní experiment. Světlo dopadá na vzorek přes dichroické zrcadlo nastavené v úhlu 45°. Záření emitované ze vzorku prochází objektivem a dichroickým zrcadlem přes emisní filtr do okuláru. Emisní bariérový filtr odfiltruje případné záření o vlnových délkách excitačního záření, které by vyvolalo nežádoucí pozadí. Zároveň je ochranným filtrem proti případnému UV záření. Součástí mikroskopu bývá také ochranný UV kryt. Kromě okuláru je mikroskop vybaven kamerou a vhodným SW pro zpracování obrazu.

Společná konstrukce filtrů a dichroického zrcadla je řešena tzv. kostkou (viz obr. 3), specifikovanou excitační a emisní vlnovou délkou a celkovou propustností. Mikroskopy bývají osazeny několika vhodnými kostkami umístěnými v karuselu pro jejich snadnou výměnu. Pro jednotlivý experiment je vhodná konkrétní kostka, vybraná podle vlastností fluorochromu (viz obr. 4).



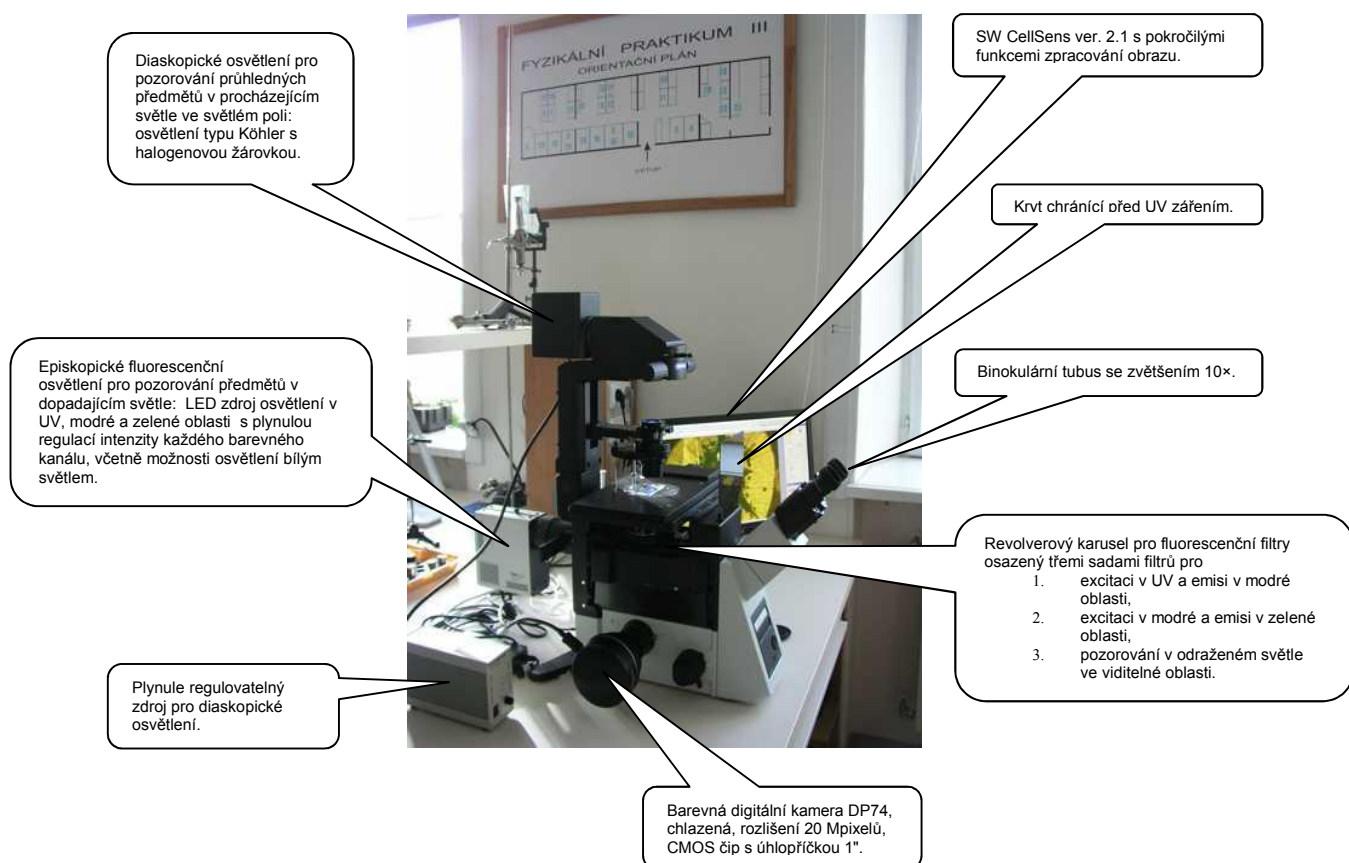
Obr. 3 Ukázka konstrukce filtrační kostky pro mikroskop Olympus
(převzato: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/filters/>)



Obr. 4 Specifikace filtrační kostky U-F19000 UV/DAPI
použité v sestavě mikroskopu IX73 v praktiku
(modře: propustnost excitačního filtru, červeně: propustnost emisního filtru, zeleně: propustnost dichroického zrcadla)

Pokyny k měření

Úloha bude probíhat na badatelském mikroskopu v invertním uspořádání OLYMPUS IX73 s vybavením pro fluorescenční měření v odraženém světle. Mikroskop umožňuje také pozorování v procházejícím světle a ve fázovém kontrastu. Součástí aparatury je barevná digitální kamera a software pro analýzu obrazu. Sestava aparatury je znázorněna pomocí obr. 5. Návod k obsluze mikroskopu je u úlohy. S obsluhou jednotlivých prvků seznámí studenta vyučující.



Obr. 5 Sestava mikroskopu IX73 v praktiku

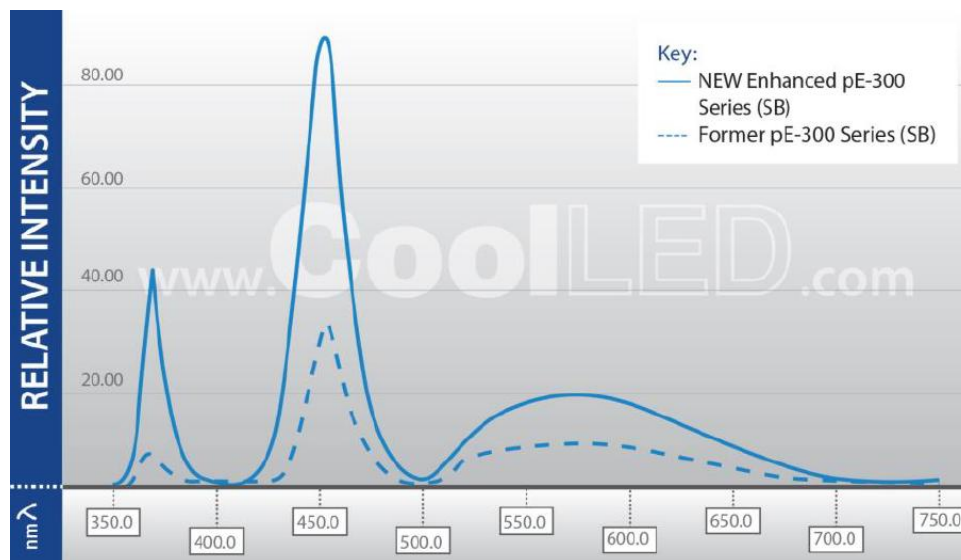
Parametry tří sad filtrů osazených v aparatuře jsou pro přehled uvedeny v tabulce 1 a umožňují dvě uspořádání fluorescenčního měření a dále měření ve viditelném světle.

Tab. 1 Osazení karuselu mikroskopu filtračními kostkami

sada	označení	pozice v karuselu	excitace	emise
1.	U-F19000 AT - UV/DAPI Longpass	2 (UW)	360 – 390 nm	od 435 nm
2.	U-F19002 AT – GFP/FITC Longpass	3 (GFP)	465 – 495 nm	od 520 nm
3.	U-FBFL Cube for reflected BF	4 (BF)		

Osvětlení pro fluorescenční měření je řešeno LED modulem CL-pE-300 (white LED illumination system). Tento světelný zdroj je složen ze tří LED, které lze odděleně ovládat, tj. je možné spojitě regulovat intenzitu světla jednotlivých složek emisního spektra zdroje (viz obr. 6). Ovládání je realizováno tlačítky označenými následovně: 1UV ovládá UV LED, která

má maximum intenzity na vlnové délce 365 nm, 3B ovládá modrou LED s maximem okolo 450 nm a 3GR zelenou LED, která svítí okolo 550 nm.



Obr. 6 Vyzařovací spektrum modulu CL-pE-300 (mikroskop je osazen novějším typem New Enhanced)

Pro měření v procházejícím světle je jako zdroj osvětlení použit modul se 100 W halogenovou žárovkou, jejíž intenzitu lze samozřejmě také regulovat.

Mikroskop je nyní osazen čtyřmi objektivy o zvětšení 4x, 10x, 40x a 100x, binokulárem o zvětšení 10x a barevnou kamerou DP74.