

# Bi8920 Fluorescenční mikroskopie

## Princip fluorescence

RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

## Program přednášky:

- definice a princip fluorescence
- fluorochromy

# „Viditelné“ světlo

elektromagnetické vlnění o vlnové délce 400-700 nm  
duální povaha - vlnová i částicová

frekvence ( $f$ ) – počet kmitů za sekundu ( $4-8 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$  [Hz])

vlnová délka ( $\lambda$ ) – délka jednoho kmitu (400-700 nm)

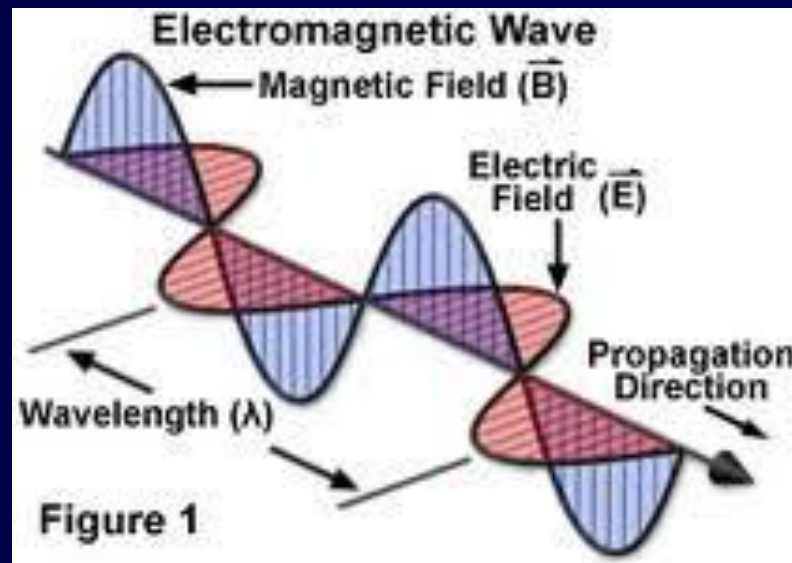
rychlost světla ( $c$ ) = konstantní ve vakuu ( $300.000 \text{ km} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Planckova konstanta  $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$

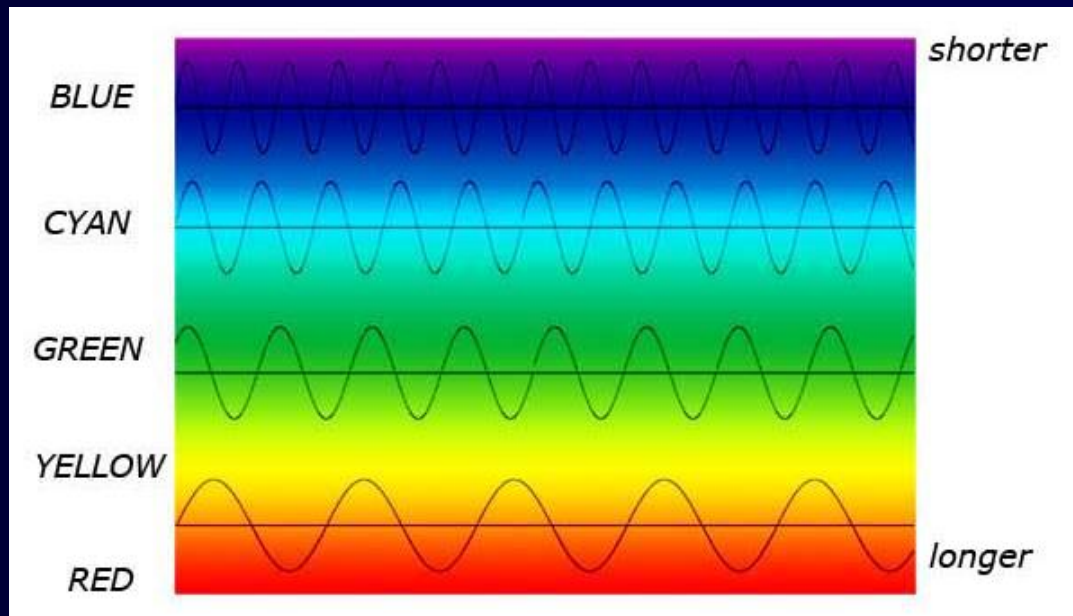
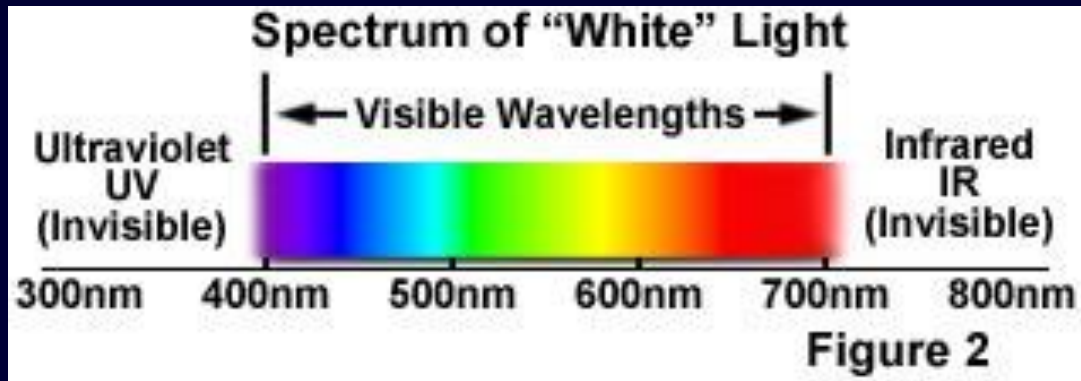
platí vztahy:

$$c = \lambda * f$$

$$E = h * f$$



# vlnová délka – barva světla



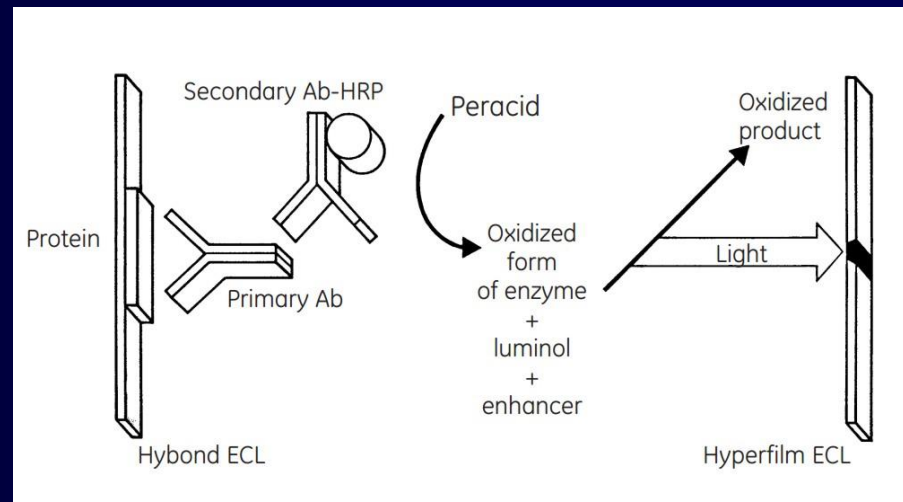
<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/wavebasics/index.html>

# LUMINISCENCE

jev při kterém vysílá látka do prostoru světlo

dělení dle indukce

– **chemiluminiscence** : vyvoláno chemickou reakcí  
např. oxidace luciferinu luciferázou u světlušky, ECL



# -Fotoluminiscence

záření je vyvoláno jiným zářením

a) fluorescence

b) fosforescence

fluorochrom =

fluorofor

látka schopná

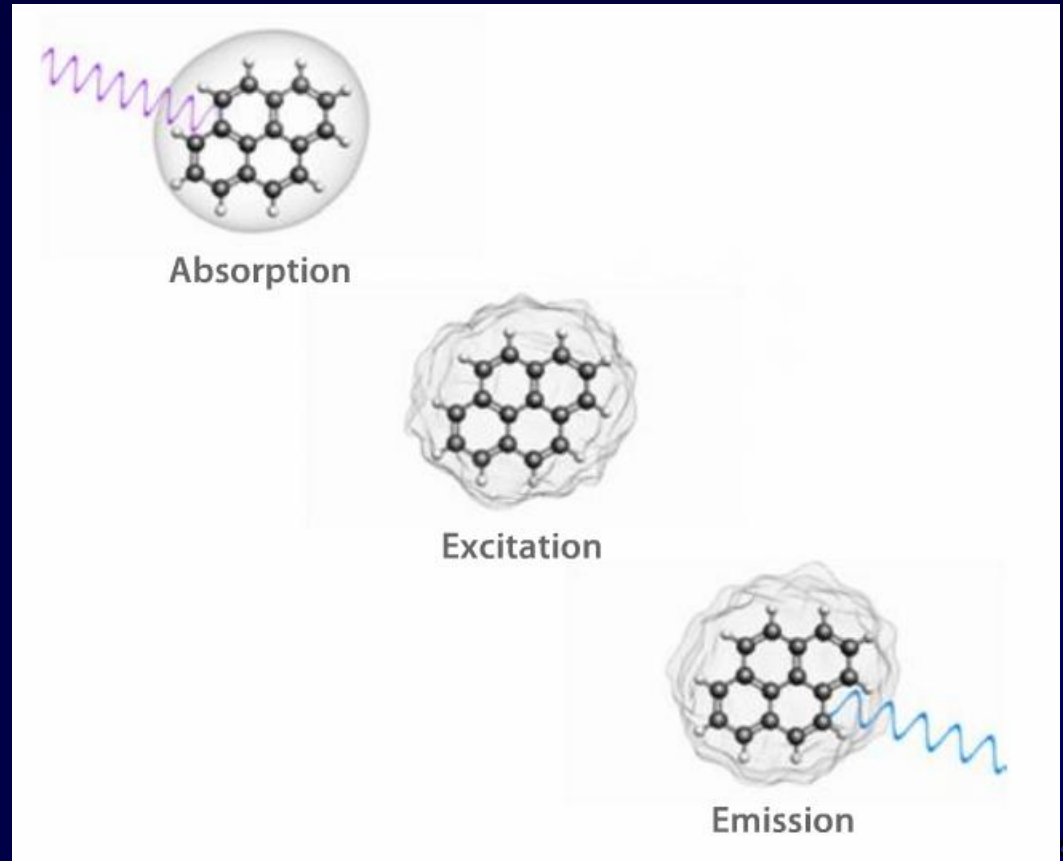
fluorescence

excitační záření

luminiscenci vyvolává

emisní záření

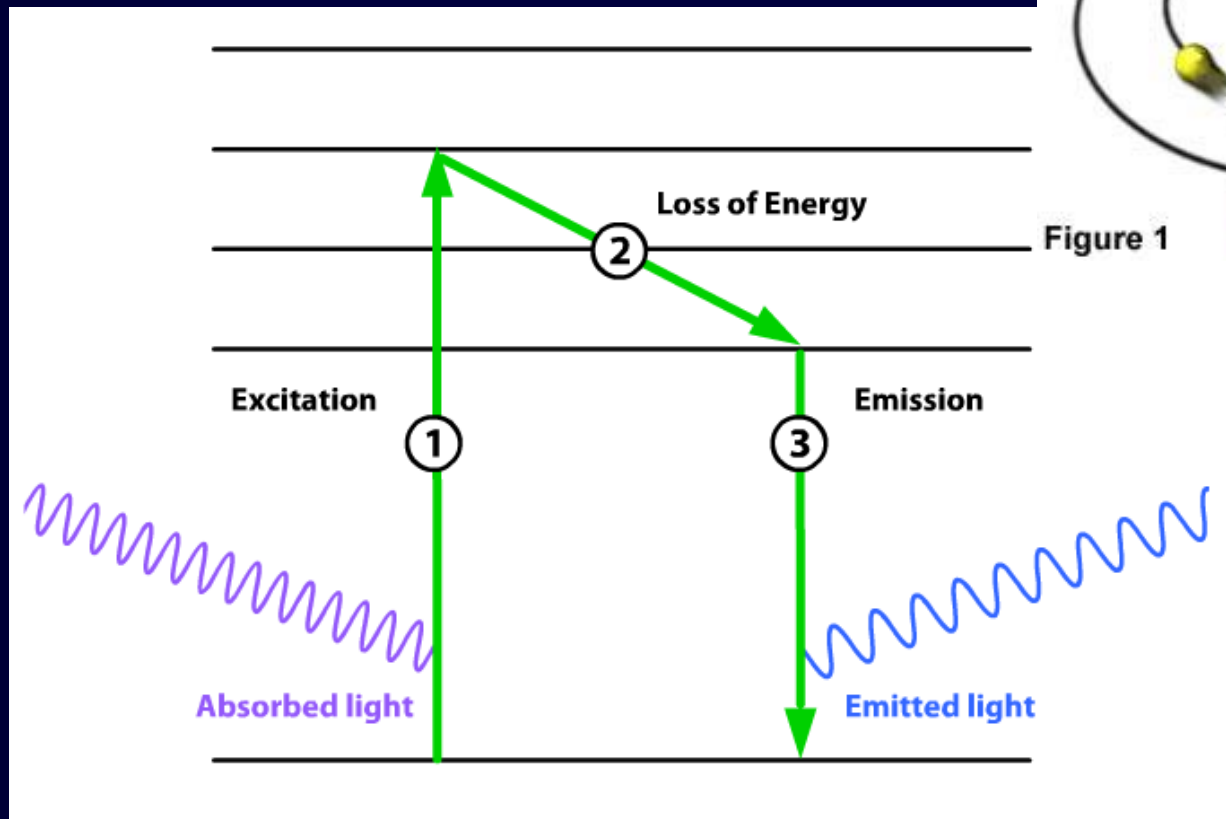
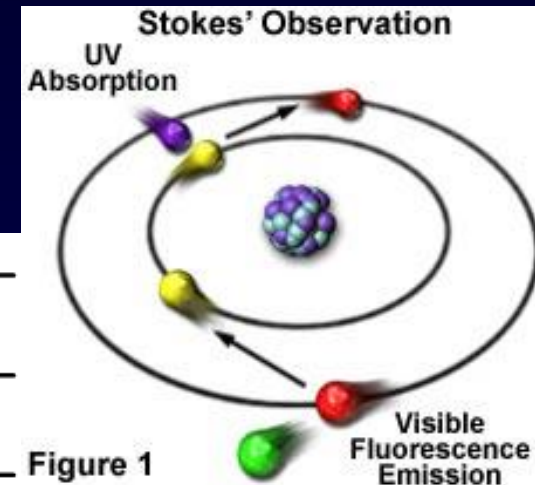
vysílané látkou



# Podstata fluorescence Jablonskiho diagram

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/fluorescence/exciteemit/index.html>

vyšší energetické hladiny



excitační  
záření

emisní  
záření

základní energetická hladina

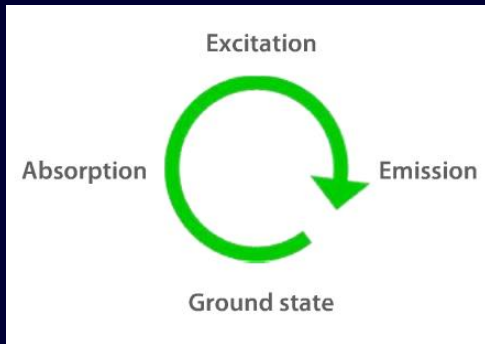


# Průběh fluorescence

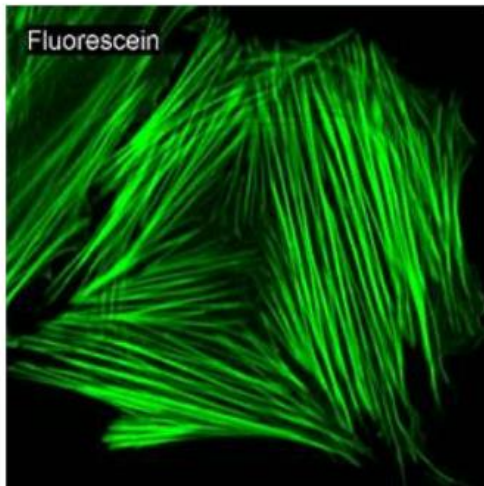
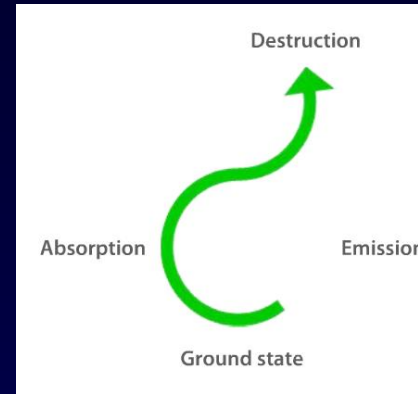
1. **excitace** elektronů fotony ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu  
trvání  $10^{-15}$  s
2. **excitovaný stav**  
pokles na nejnižší hladinu excitace (relaxace)  
ztráta energie ve formě tepla  
trvání  $10^{-14} - 10^{-11}$  s
3. **emise** světla => fluorescence  
trvání  $10^{-7} - 10^{-9}$  s = doba dohasínání



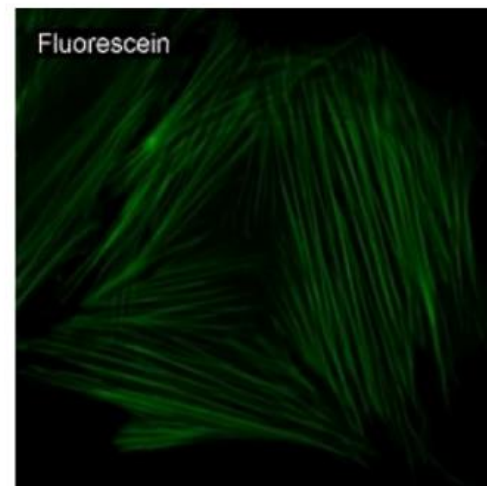
# recyklace



# photobleaching



Before



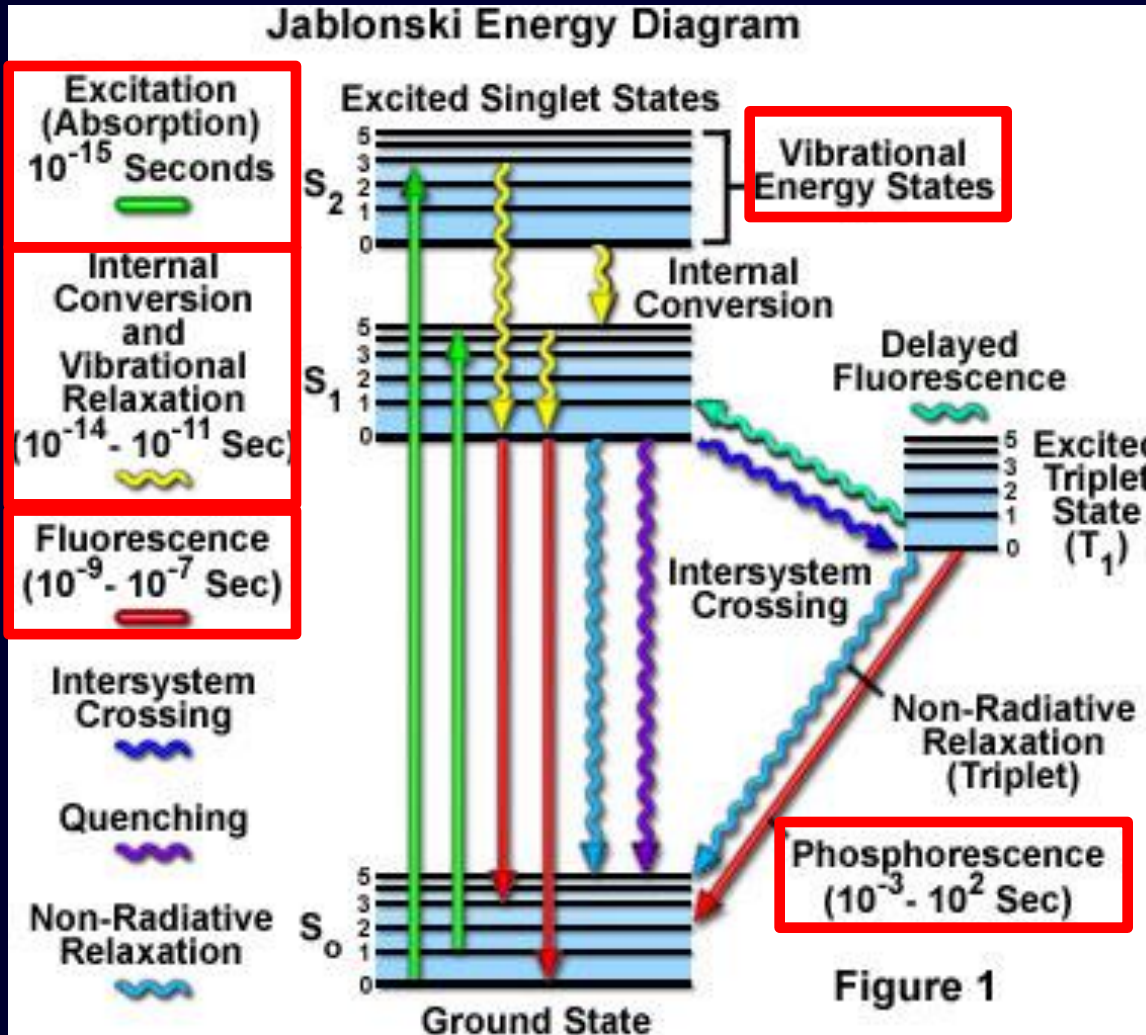
Photobleaching 13 sec

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/fluorescence/photobleaching/index.html>

## Princip fluorescence

<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/1Intro/player.html>

# Podstata fluorescence a fosforescence Jablonského diagram



fosforescence  
doba dohasínání  
 $10^{-3} - 10^2 \text{ s}$

## Jablonského diagram- zjednodušený

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/lightandcolor/index.html>

## Jablonského diagram

<http://olympus.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>



**Spin** je kvantová vlastnost elementárních částic - vnitřní moment hybnosti částice. Spiny částic přispívají k celkovému momentu hybnosti soustavy.

**excitovaný singletový stav**

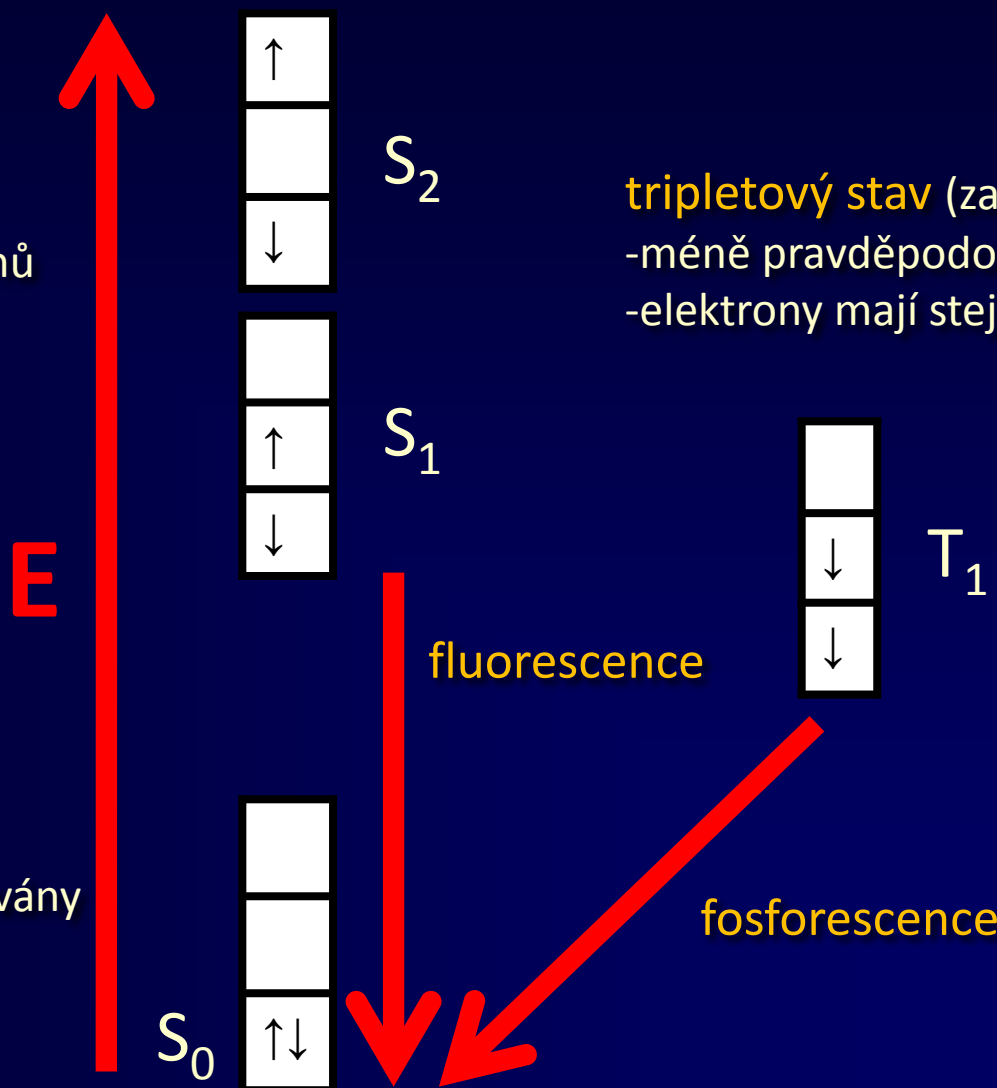
- elektrony obsazují vyšší energ. hladiny
- porušuje se párování elektronů na jednotlivých hladinách
- spin se při excitaci nemění

**základní singletový stav**

- všechny elektrony jsou spárovány
- mají opačný spin
- velikost  $+1/2, -1/2$

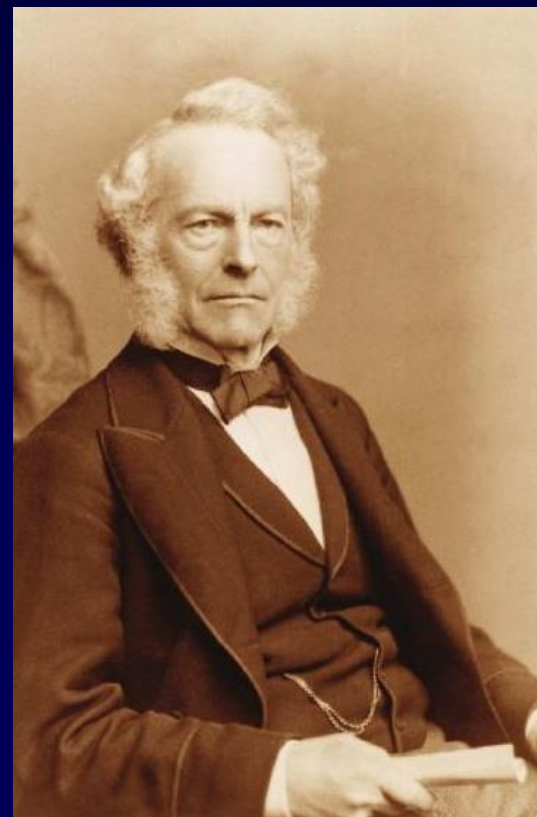
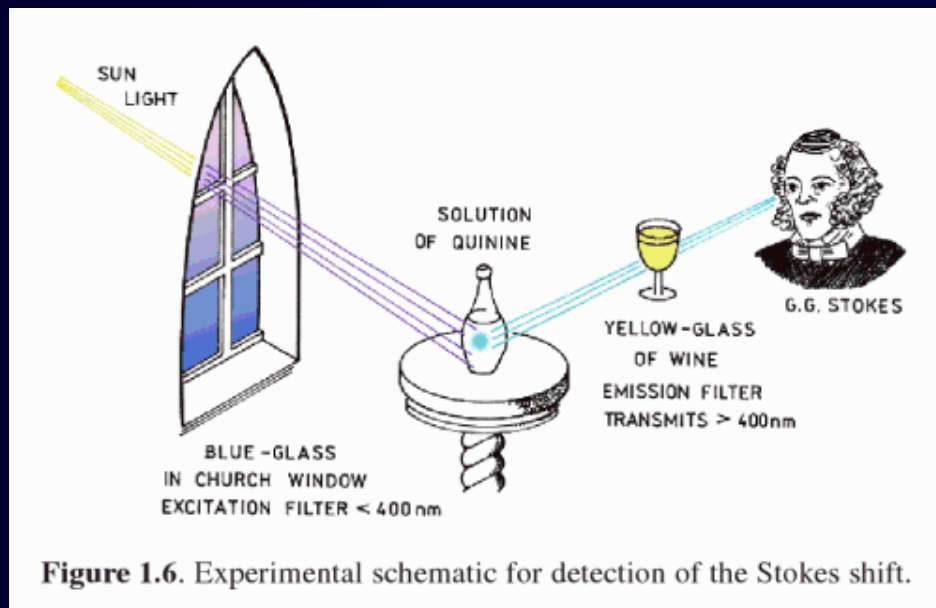
**tripletový stav (zakázaný)**

- méně pravděpodobný
- elektrony mají stejný spin



# Stokesův posun

- V rámci relaxace v excitovaných stavech dochází ke ztrátě energie
- Energie excitujícího světla je větší než emitovaného ( $E_{ex} > E_{em}$ )
- Vlnová délka excitujícího světla je menší než emitovaného ( $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ )



Sir G.G. Stokes



*On the Change of Refrangibility of Light. By G. G. Stokes, M.A., F.R.S., Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the University of Cambridge. Phil. Trans. Royal Society of London (1852) pp. 463-562. Received May 11, — Read May 27, 1852.*

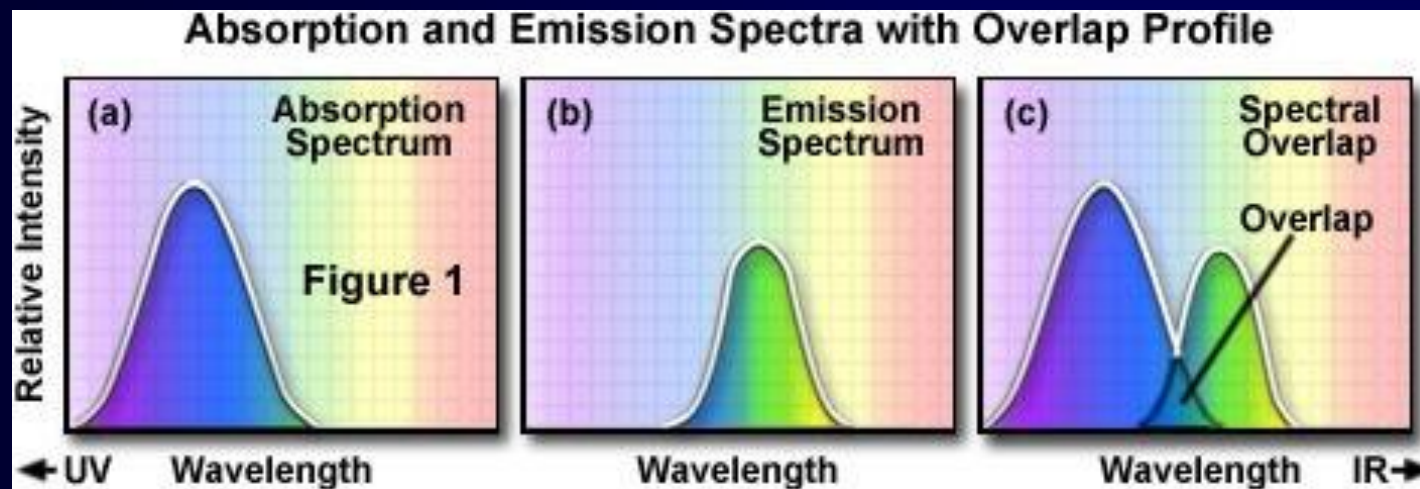


## Absorbční (excitační) spektrum

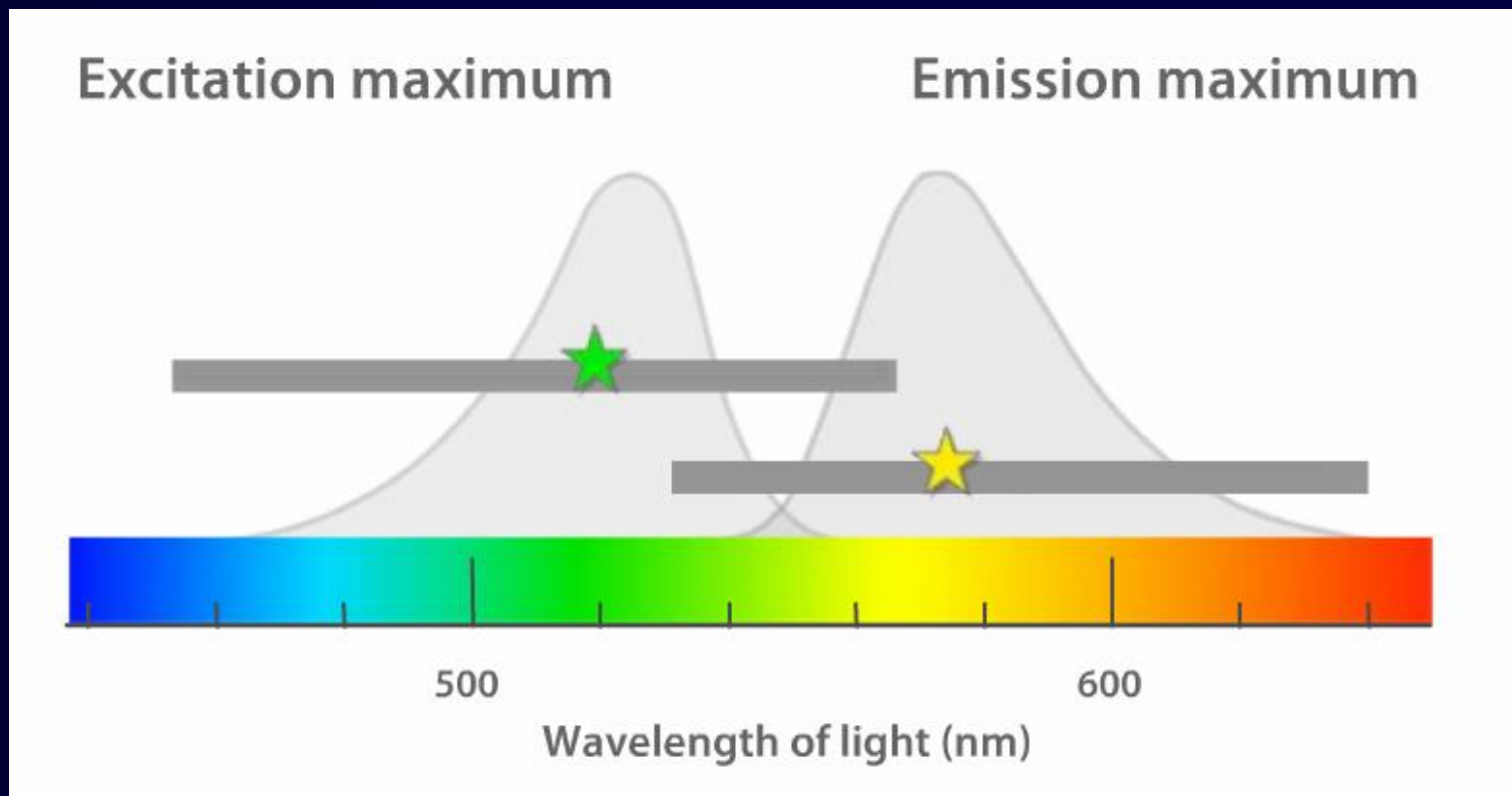
závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce  
(měřeno při konstantní emisní vlnové délce)

## Emisní spektrum

závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při  
konstantní vlnové délce excitace



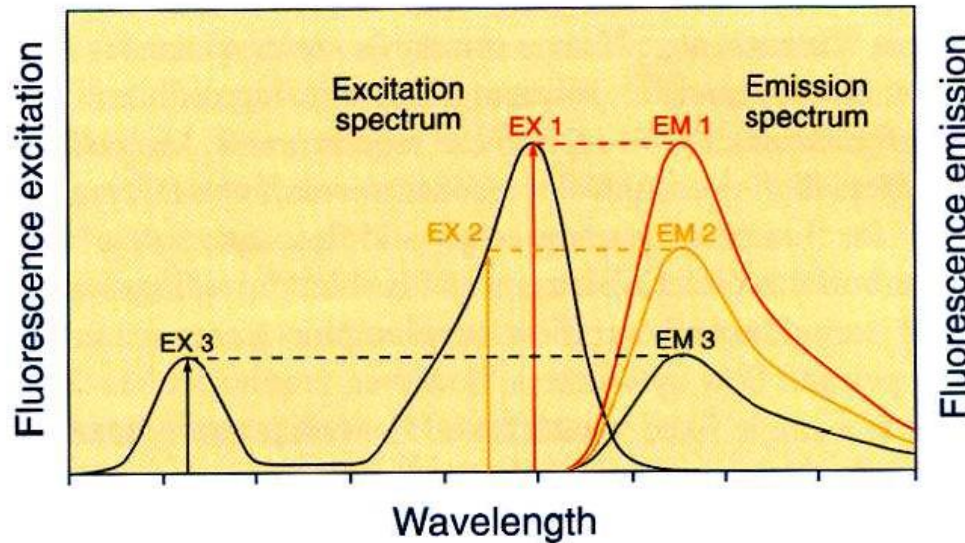
- obě spektra mají své maxima
- excitační maximum
- emisní maximum
- vzdálenost mezi nimi – Stokesův posun





## Emisní spektrum určitého fluorochromu

- je nezávislé na vlnové délce excitace
- emise z nejnižšího excitovaného stavu ( $S_1$ )
- mění se pouze intenzita fluorescence
- intenzita emisního spektra odpovídá amplitudě excitace



*Figure 2. Excitation of a fluorophore at three different wavelengths (EX 1, EX 2, EX 3) does not change the emission profile but does produce variations in fluorescence emission intensity (EM 1, EM 2, EM 3) that correspond to the amplitude of the excitation spectrum.*

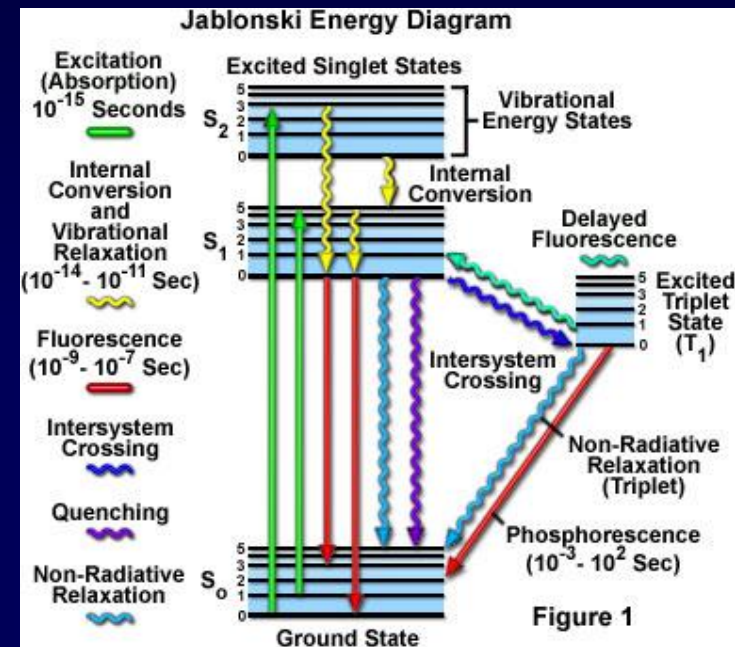
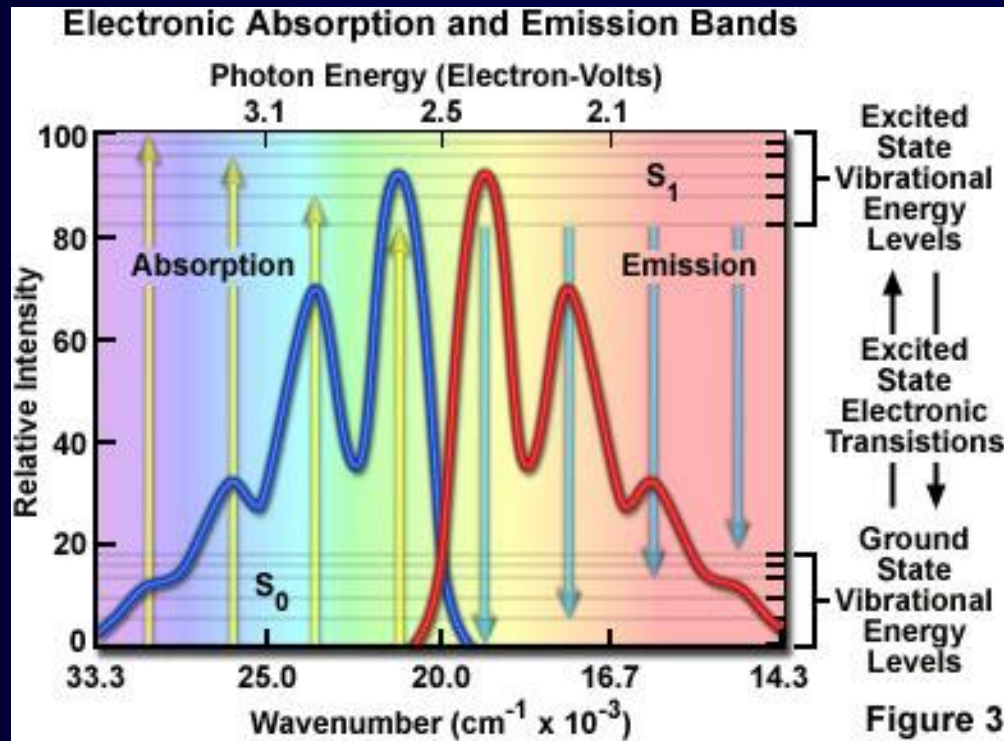


Figure 1

# Symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

- struktura vibračních hladin základního i excitovaných stavů je stejná
- absorpce (excitace) a emise do odpovídajících hladin nastává se stejnou pravděpodobností
- absorpční a emisní spektra zrcadlově symetrická



## Excitační a emisní spektrum

<http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/tutorials/2Spectra/player.html>

## Molární extinkční koeficient (molární absorptivita)

- vyjadřuje míru schopnosti látky absorbovat světlo

### Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

- A – absorbance (bez jednotek)
- $\varepsilon$  – molární extinkční koeficient ( $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- c – molární koncentrace ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
- l – dráha (cm)

## Kvantový výtěžek fluorescence (Quantum Yield = QY)

$$QY = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

- vyjadřuje míru schopnosti excitačního vlnění vyvolat fluorescenci
- maximálně = 1 (teoreticky; energetické ztráty)



# Standards pro určení kvantového výtěžku fluorescence

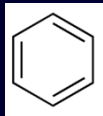
Quantum Yield [Q.Y.] Standards	Q.Y. [%]	Conditions for Q.Y. Measurement	Excitation [nm]
Cy3	4	PBS	540
Cy5	27	PBS	620
Cresyl Violet	53	Methanol	580
Fluorescein	95	0.1 M NaOH, 22°C	496
POPOP	97	Cyclohexane	300
Quinine Sulfate	58	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 22°C	350
Rhodamine 101	100	Ethanol	450
Rhodamine 6G	95	Water	488
Rhodamine B	31	Water	514
Tryptophan	13	Water, 20°C	280
L-Tyrosine	14	Water	275

# fluorochrom = fluorofor

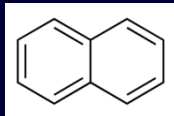
## látka schopná fluorescence

- často obsahuje polycyklické nenasycené sloučeniny a atomy (s více elektrony – např. P, S)
- čím více benzenových jader, tím více roste absorpční maximum

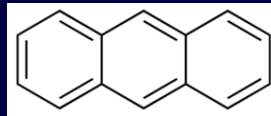
benzen  
262 nm



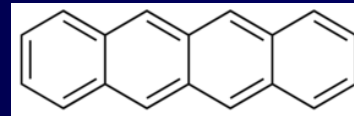
naftalen  
272 nm



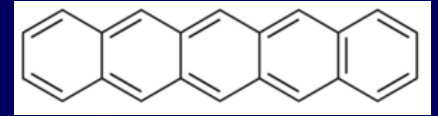
antracen  
375nm



tetracen  
475nm



pentacen  
580nm



# Skupiny fluoroforů

## Vlastní (vnitřní) fluorescence

Přirozeně se vyskytující fluorofory  
aminokyseliny, kofaktory enzymů, chlorofyl,  
green fluorescent protein..

## Nevlastní (vnější) fluorescence

Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné  
struktury - **sondy**

DNA, buněčná stěna, plazmatická membrána...  
mitochondriální aktivita - respirační vzplanutí, pH indikátory,  
membránový potenciál..

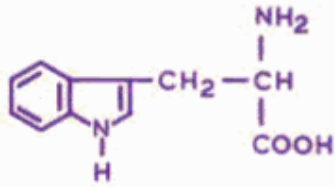
Nepřímá vazba fluorochromu – **značky**

navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové  
kyseliny, phalloidin..

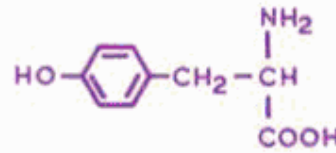




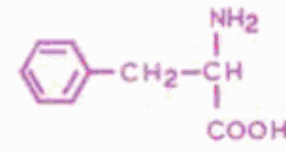
# Přirozeně se vyskytující fluorofory - aminokyseliny



Tryptophan



Tyrosine



Phenylalanine

hlavní zdroj fluorescence proteinů v UV spektru

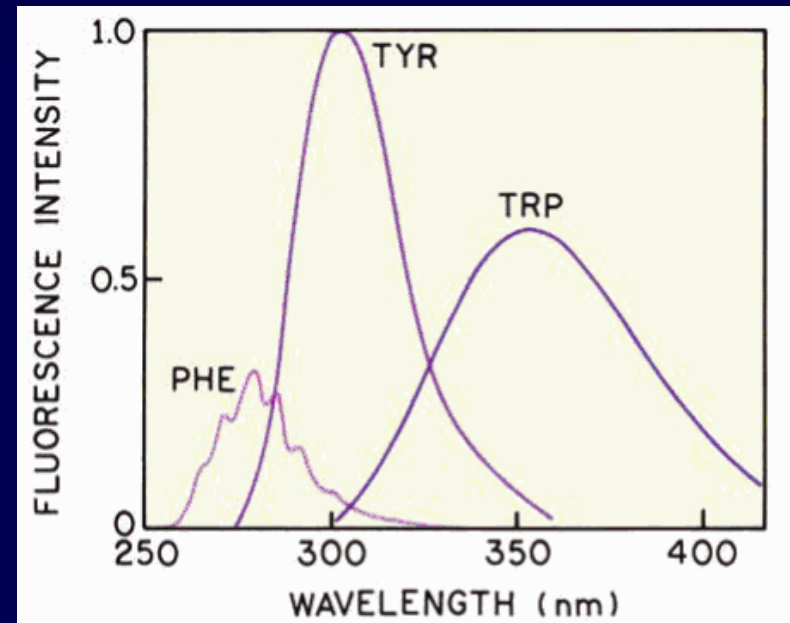
-indolová skupina Trp

Trp v sekvencích jen 1%

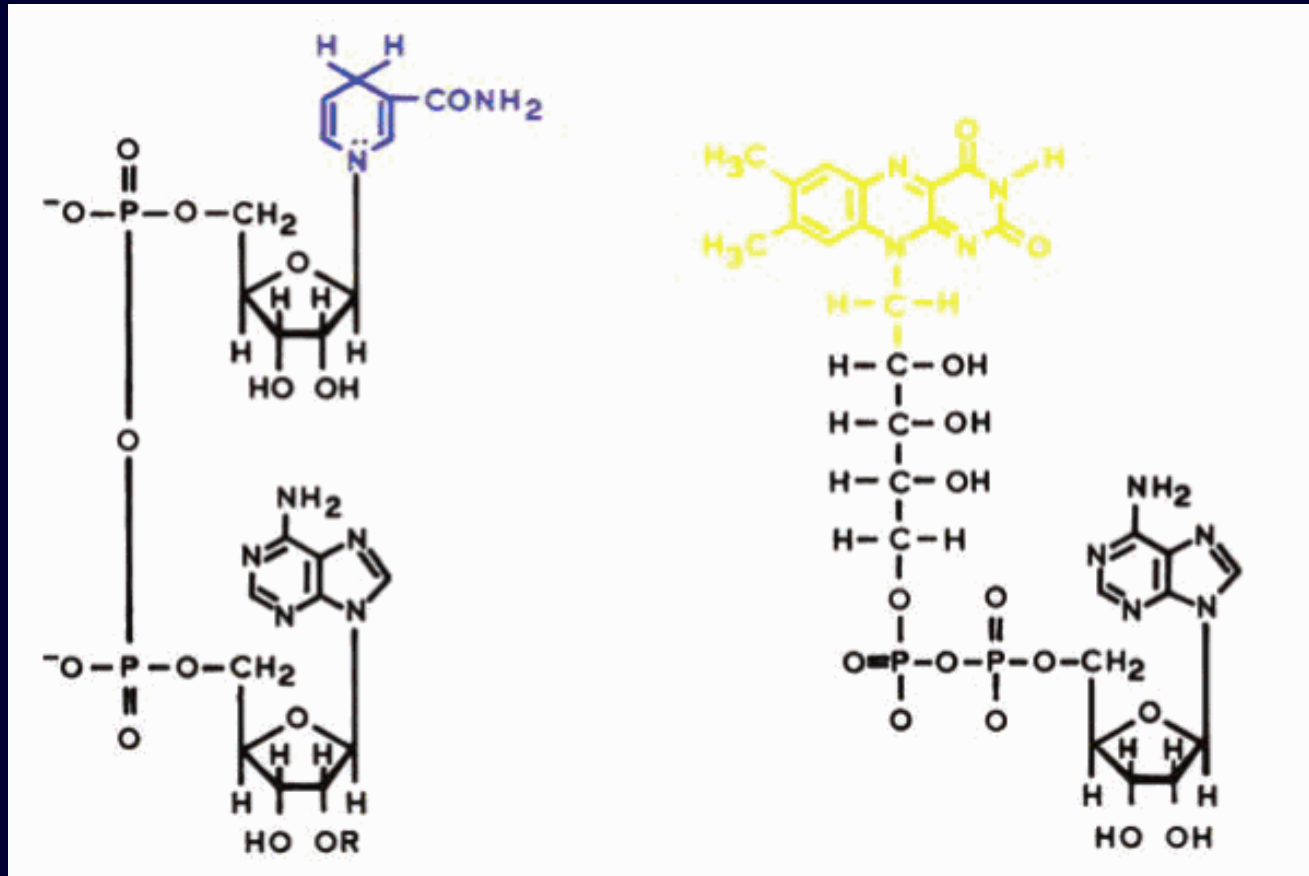
metabolicky náročná syntéza

Table 2: fluorescent properties of some amino acids

amino acid	Lifetime (Nanoseconds)	Excitation		Emission	
		Wavelength	Molar absorptivity	Wavelength	Quantum yield
Tryptophan	2.6	280	5,600	348	0.20
Tyrosine	3.6	274	1,400	303	0.14
Phenylalanine	6.4	257	200	282	0.04



# Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

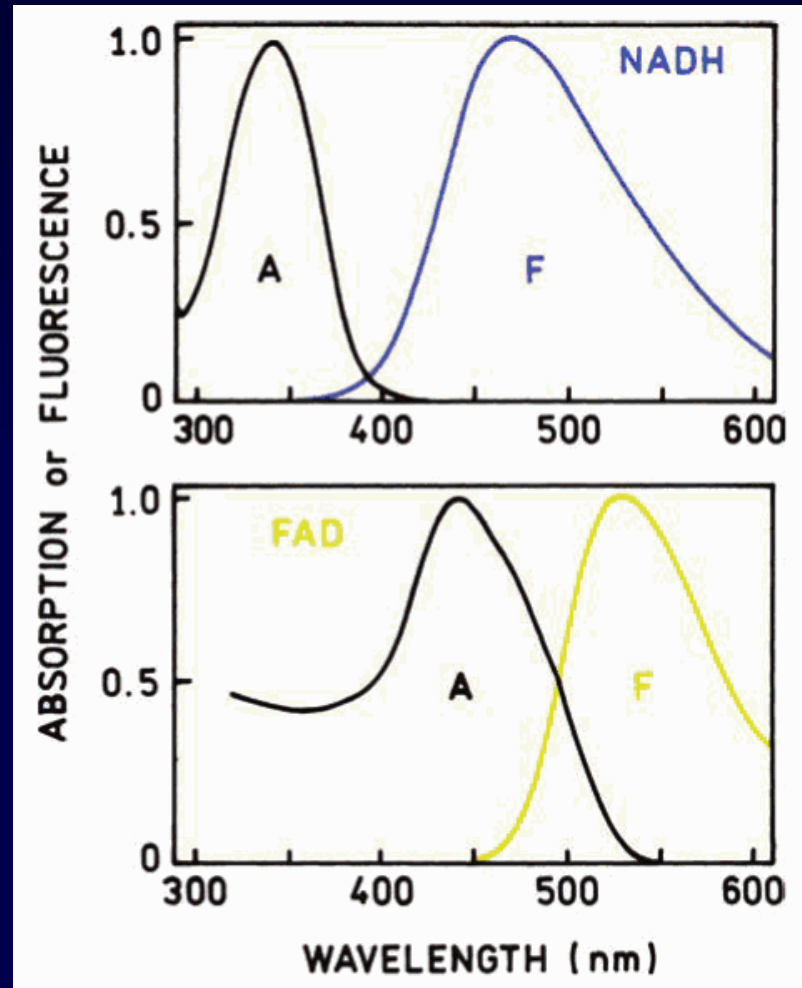
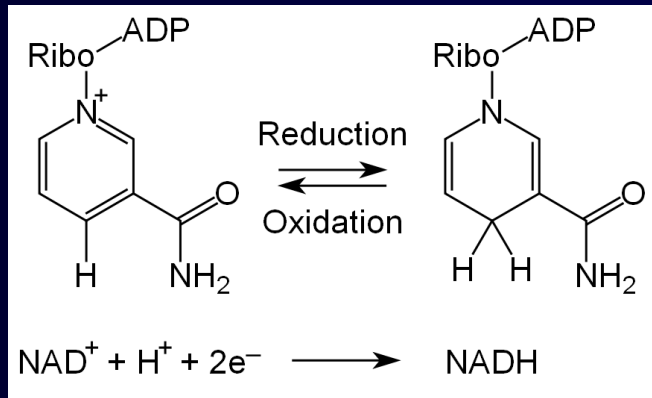


Nikotinamid adenin  
dinukleotid (NADH)

Flavin adenin  
dinukleotid (FAD)

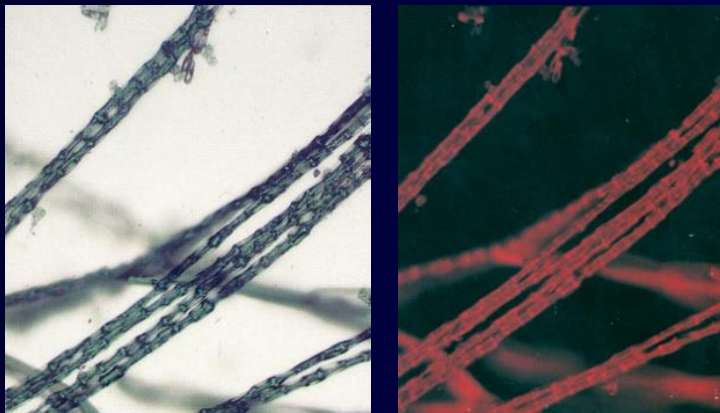
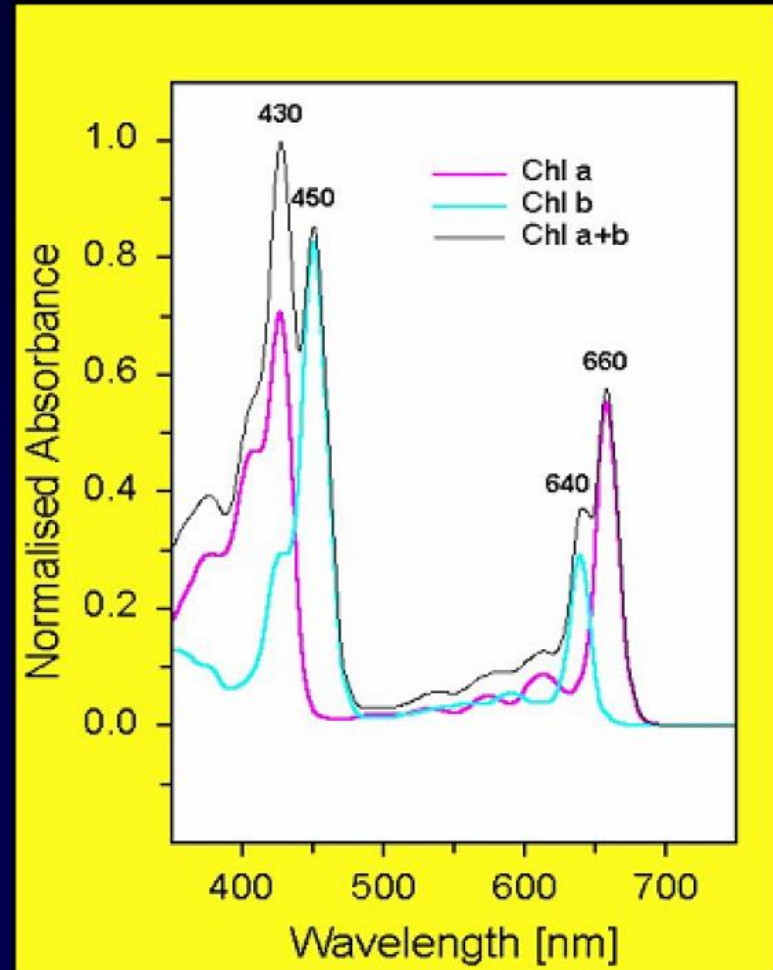
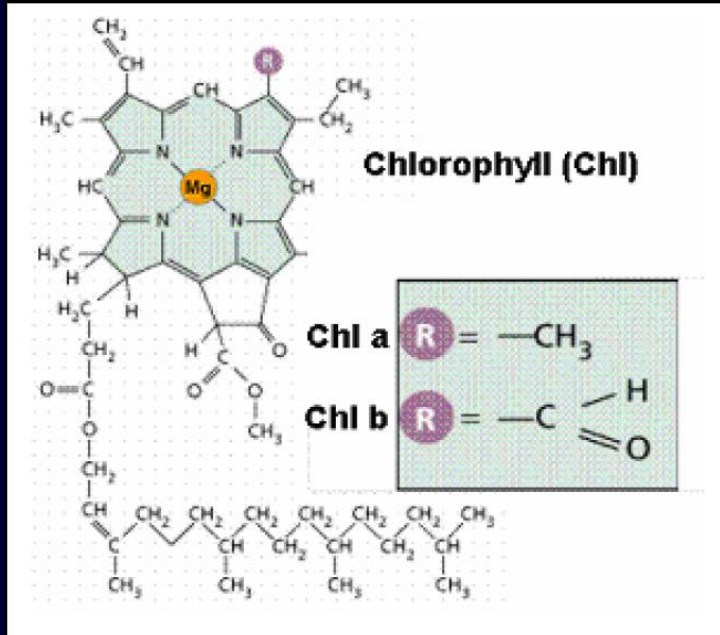
# Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

- $\text{NAD}^+$  není fluorescenční
- fluorochrom = redukovaný nikotinamidový ring



# Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

- porfyrinové jádro + Mg

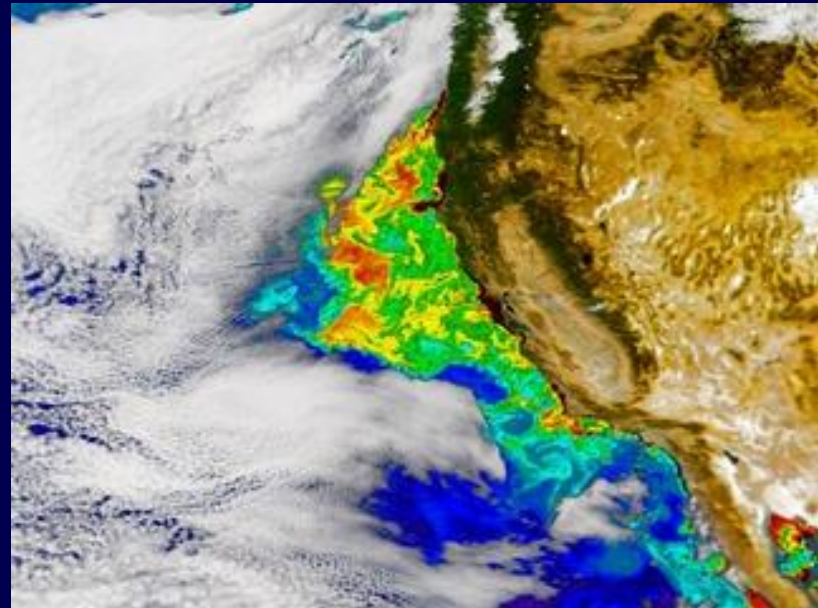
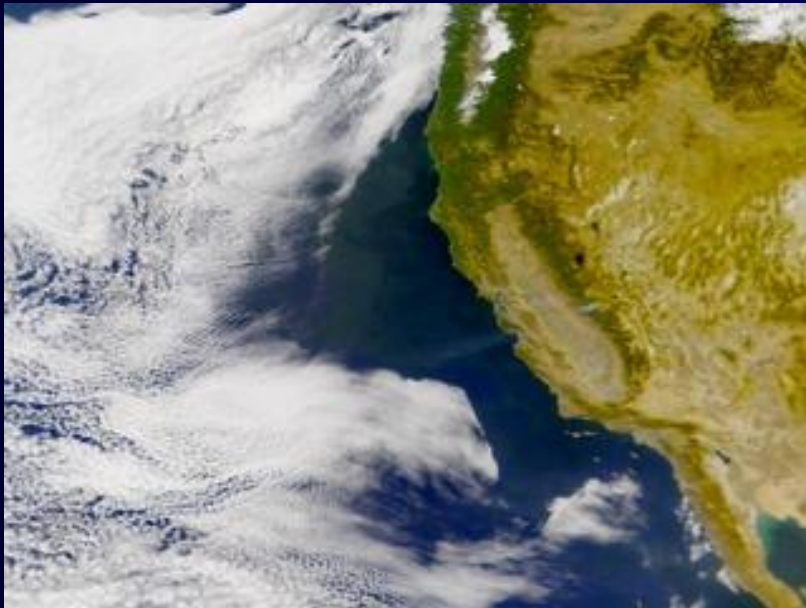
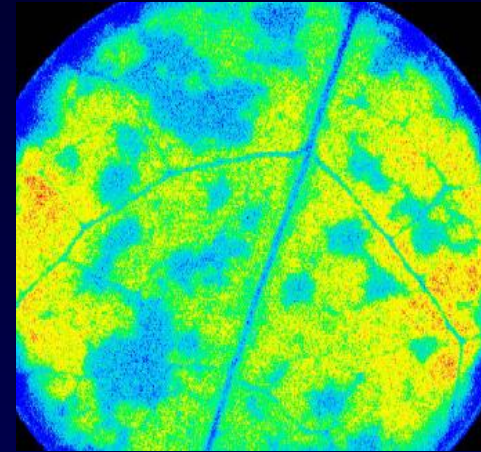


Stokesův posun až 200nm

# Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

využití:

- hodnocení výskytu fytoplanktonu ve vodě
- studium fotosyntézy
- fyziologický stav rostlin - stres



## Nevlastní (vnější) fluorescence

Nepřímá vazba fluorochromu – ZNAČKY

značky jsou vázány k molekulám (proteiny, peptidy, oligonukleotidy..) **kovalentní vazbou**

**proteiny** – vazba na aminové ( $\text{NH}_2$ -), thiolové (SH-) skupiny nebo histidinové řetězce

**požadavky**

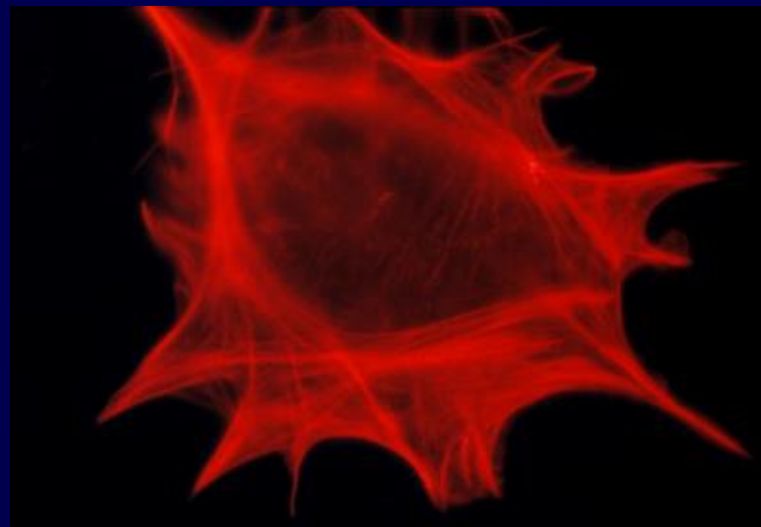
- vysoká intenzita fluorescence
- stabilita při ozařování
- minimální vliv na biologické vlastnosti vzorku

# Rhodaminy

- historicky nejpoužívanější fluorescenční značky
- převážně na protilátky
- ve formě derivátů
- vysoký kvantový výtěžek 0,3-0,8
- photobleaching

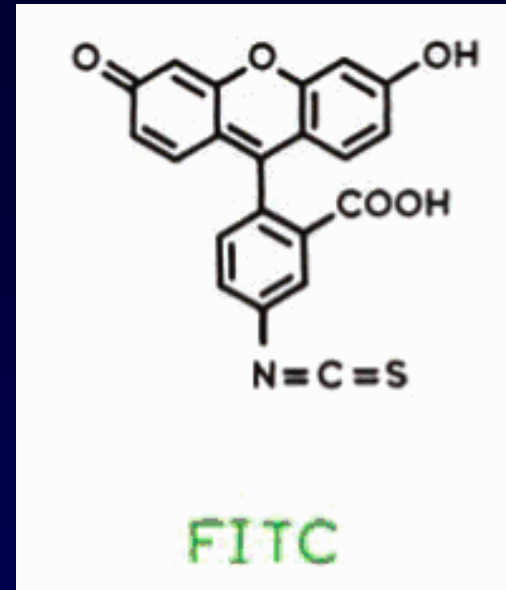
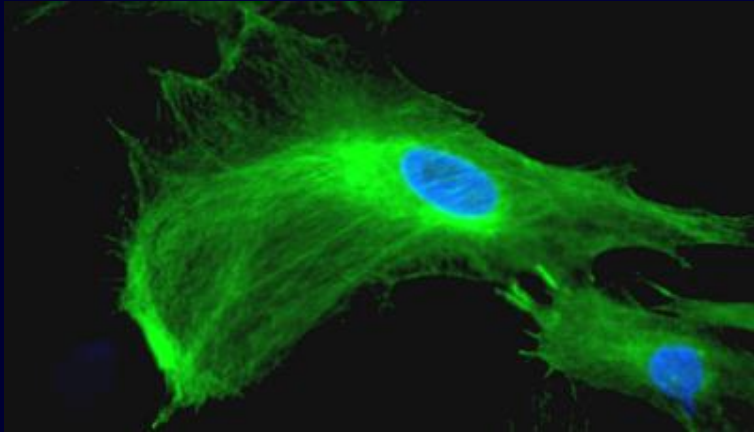
## tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)

ex. – 541nm, em. – 572nm



# Fluorescein isothiocyanate (FITC)

ex. - 495 nm, em. - 521 nm

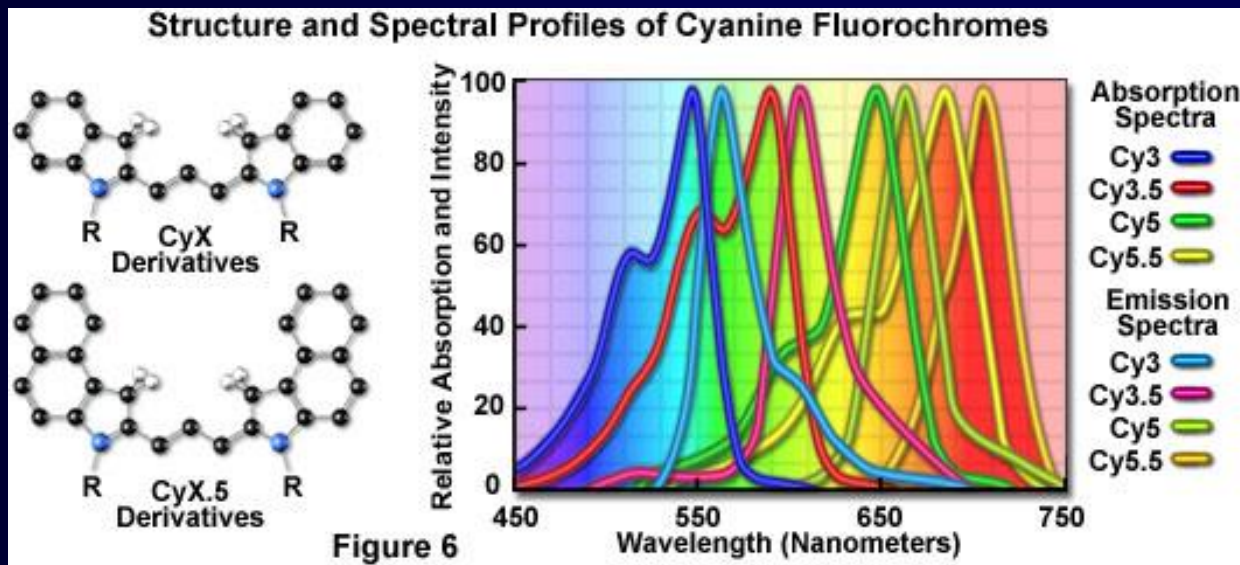


Chicago river  
St. Patrick's Day  
fluorescein



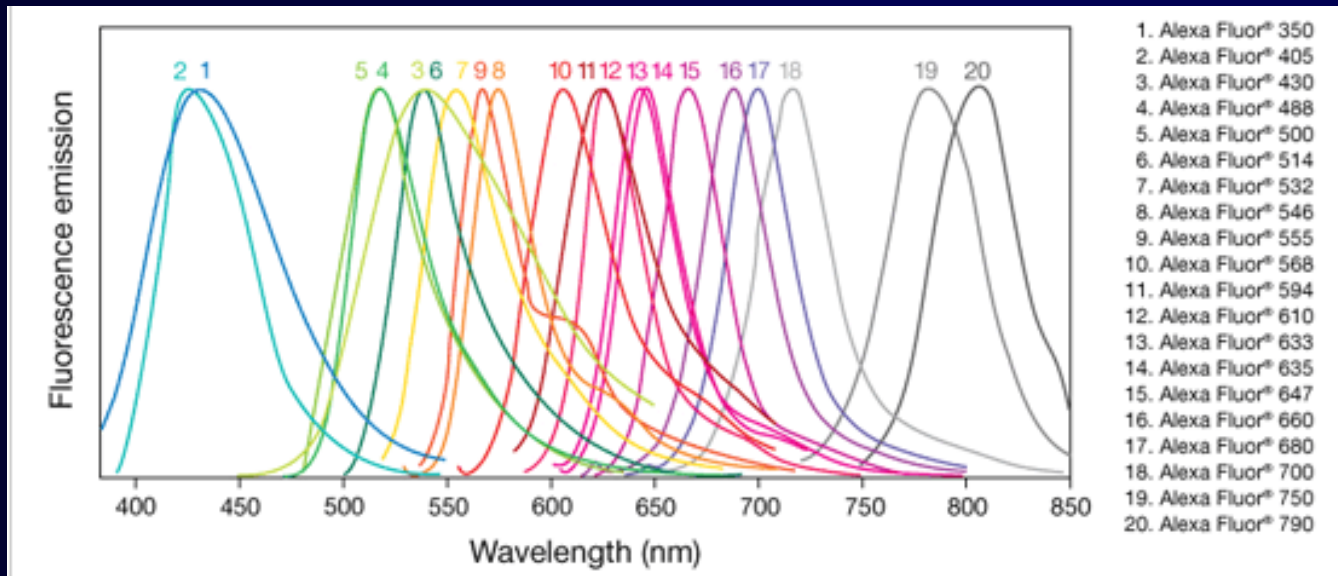
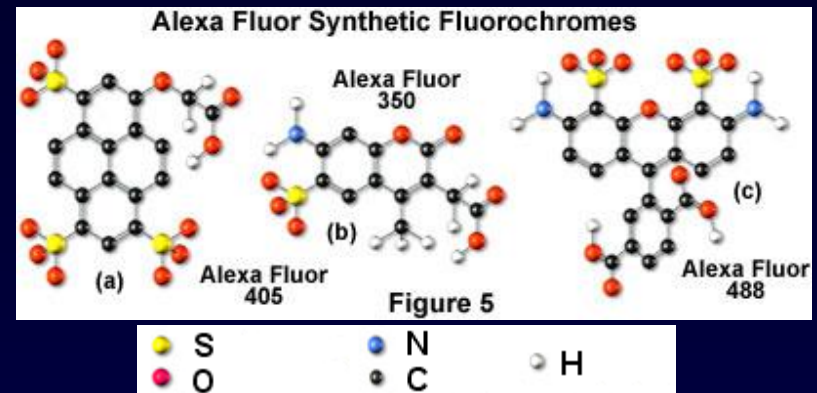
# Cy značky (Cyanine dyes)

- zástupci Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7
- částečně nasycené heterocykly + další aromatická jádra
- ex. a em. spektra podobná klasickým fluoroforům
- kratší Stokesův posun (~30nm)
- fotostabilní
- vyšší kvantový výtěžek



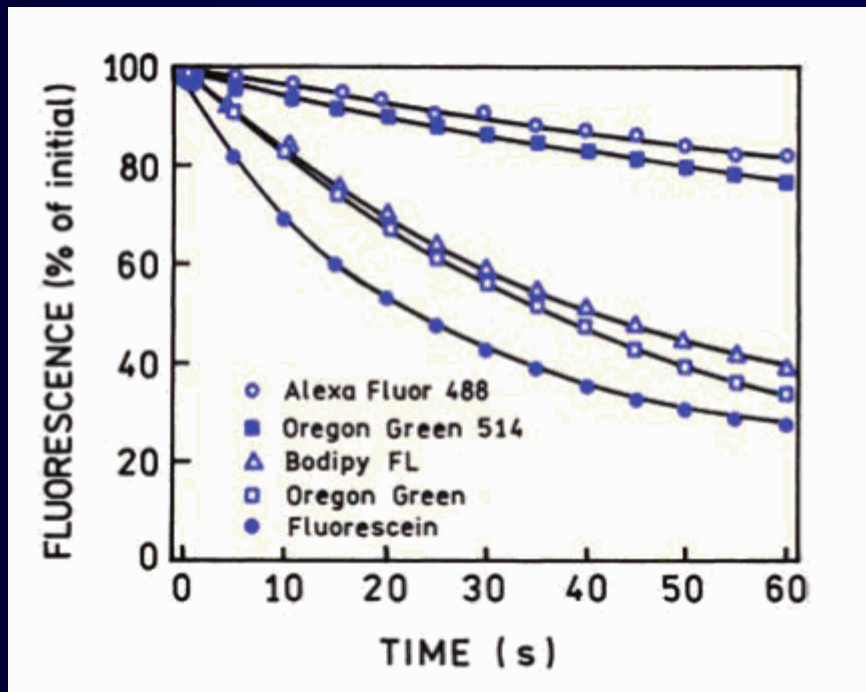
# Alexa Fluor Dyes (Molecular Probes)

- sulfonovaný derivát rhodaminu
- vyšší kvantový výtěžek ~ svítivost
- zesílená fotostabilita (↓ photobleaching)
- pH stabilita
- dlouhodobě stabilní
- využití – živé buňky, tkáňové řezy, fixované preparáty
- velký výběr rozsahu ex. a em. maxim
- od UV po near-infrared oblast
- označení podle vlnové délky zdroje excitačního záření



## Fotostabilita fluorochromů

- každý fluorofor podléhá vysvícení v průběhu souvislého osvětlení
- ve FM silná intenzita dopadajícího záření
- nejstabilnější – značky Alexa
- není znám princip předpovědi stability dle struktury



# Quantum dots

- fluorofory (značky) = po absorpci fotonů emitují světlo o větší vlnové délce
- anorganické nanokrystaly
- velikost 10-20nm (GFP 4,2 x 2,4 nm)

složení:

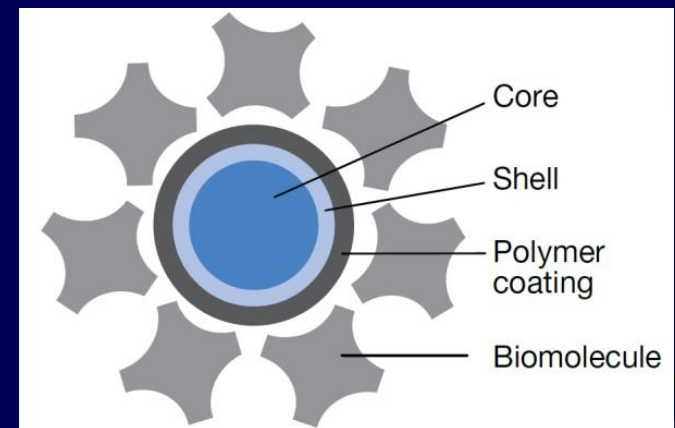
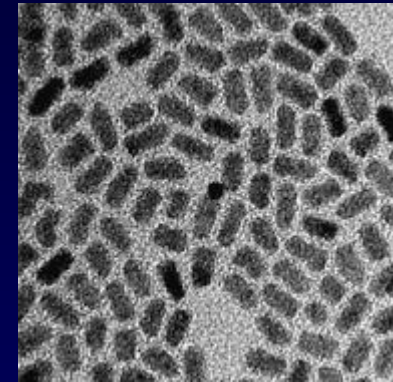
**jádro:** několik 100x-1000x molekul

polovodičového materiálu (Cd, Se, Te)

**obal:** polovodič (ZnS), stabilizuje jádro, zlepšuje optické a fyzikální vlastnosti

**plášť:** amfifilní polymer, umožňuje vazbu dalších molekul

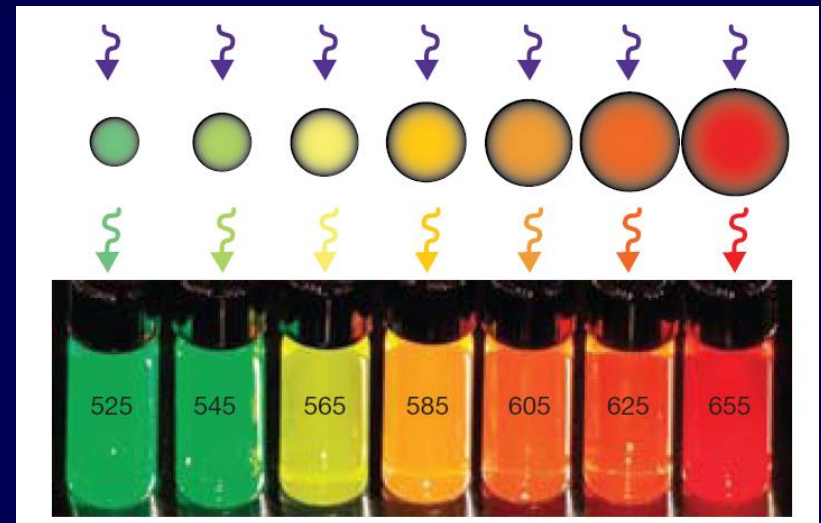
**vnější plášť:** polyethylene glycol (PEG) – snižuje nespecifickou vazbu



# Quantum dots

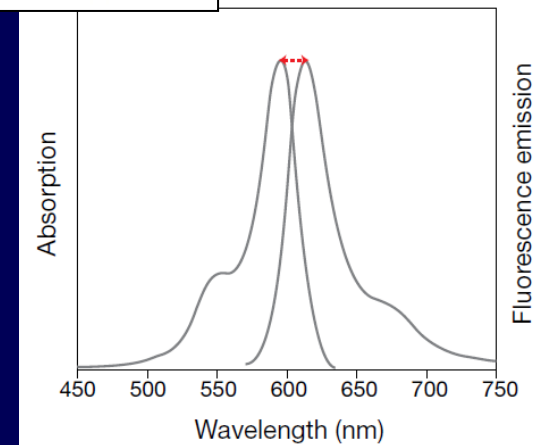
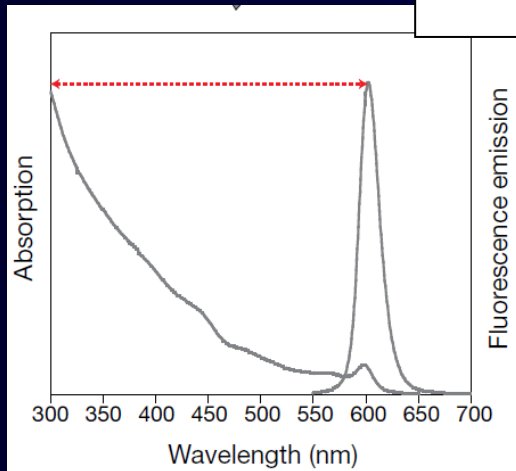
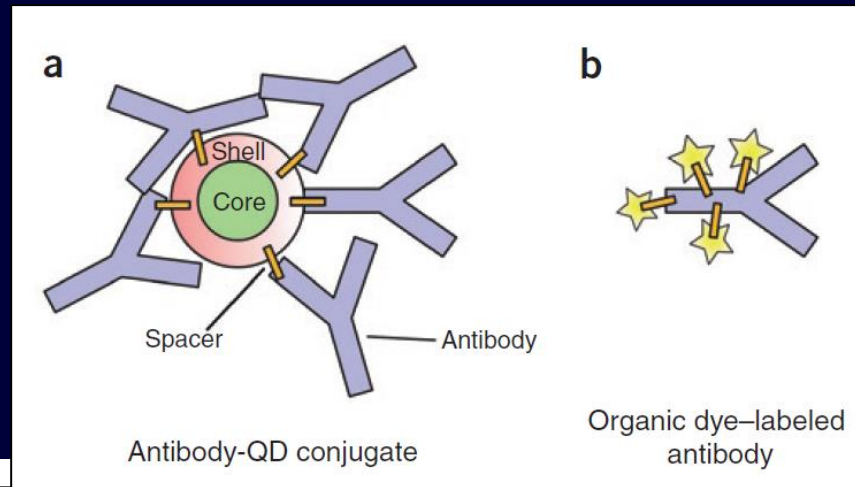
## Vlastnosti:

- vlnová délka emise závisí na velikosti částice
- umožňují vícebarevnou detekci jedním excitačním zdrojem
- možnost konjugace s primárními i sekundárními protilátkami nebo streptavidinem
- více molekul IgG na jednu částici
- vyšší jas než klasické fluorofory
- násobně vyšší stabilita
- velký Stokesův shift



# Quantum dots

- vazba na protilátku – srovnání s „klasickým“ konjugátem



# Nevlastní (vnější) fluorescence

Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury – **SONDY**

- ke struktuře se **váží nekovalentně**
- po vazbě často mění fluorescenční vlastnosti
- zesílení fluorescence

## nejčastější použití

- buněčné membrány
- nukleové kyseliny
- buněčná stěna (calcofluor, primulin)
- **Fluorescenční indikátory**  
změna fluorescence (spektra nebo intenzity) v závislosti na určité látce – prvek, pH, ROS...

# Mebránové fluorescenční sondy

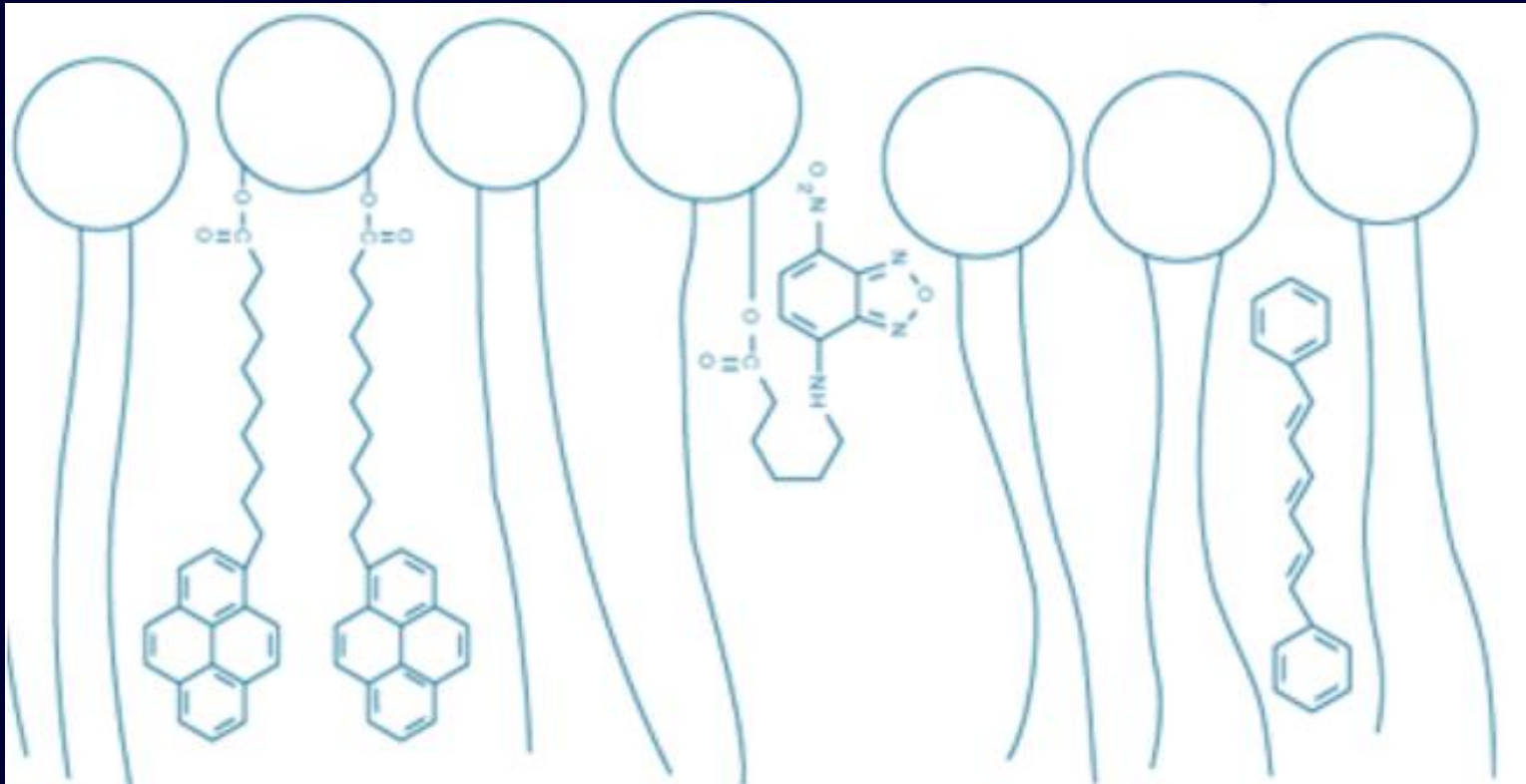
- membrány nejsou samy o sobě fluorescenční
- vazba sond na nepolární uhlovodíkové řetězce MK
- **studium**
  - transportu přes membránu
  - transport lipidů v buňkách
  - přenos signálů zprostředkovaný lipidy
  - interakce léčiv s membránou
- **rozdělení**
  - a) fluorescenční analogy přirozených lipidů
  - a) malé amfifilní a lipofilní organické fluorofory





# Mebránové fluorescenční sondy

Příklady a umístění fluorescenčních lipidových sond v membráně



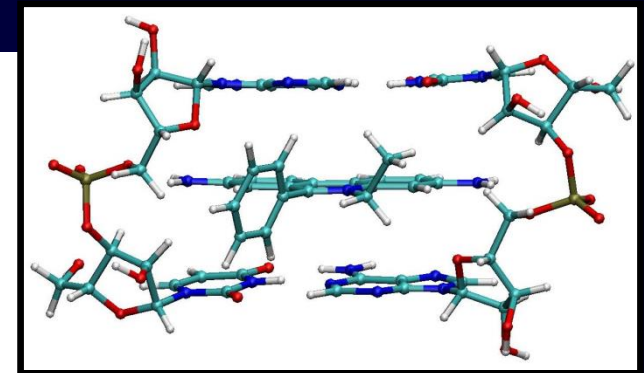
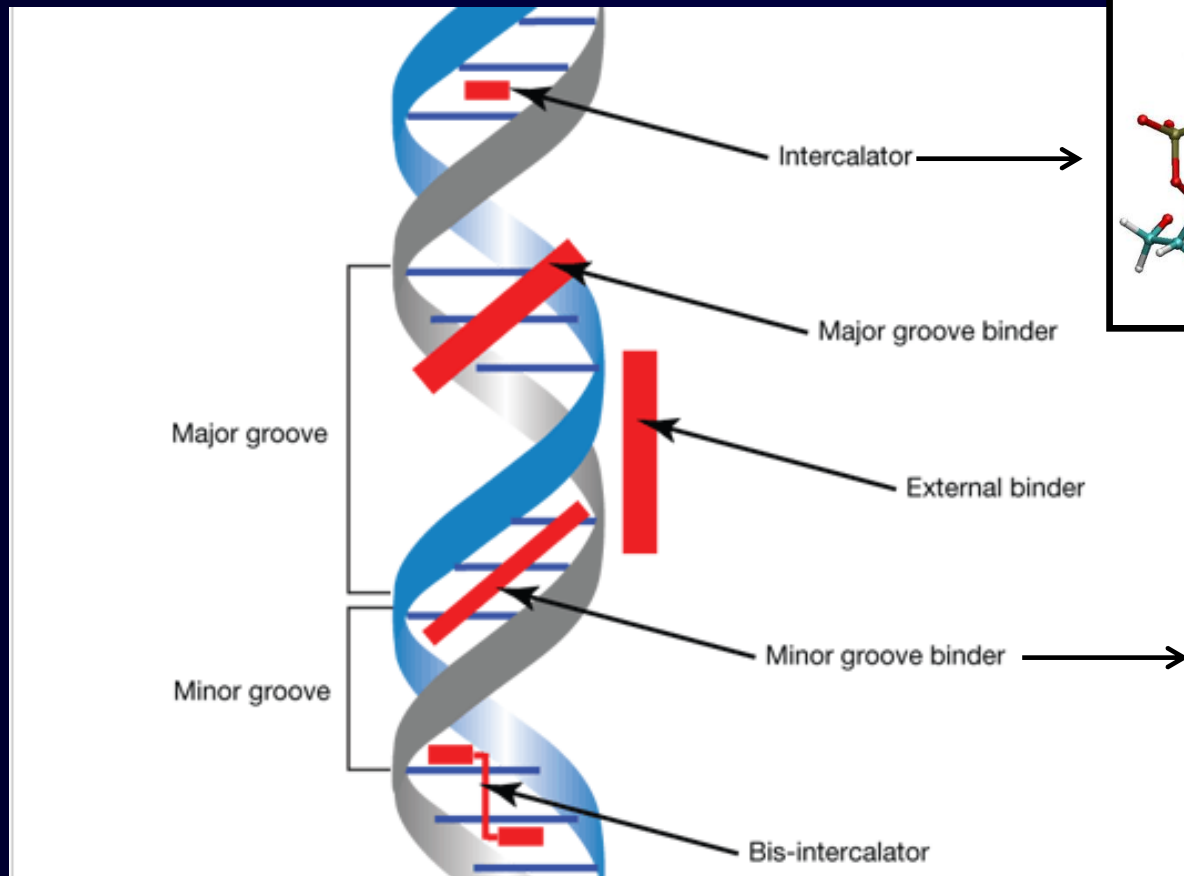
bis-pyren-PC

NBD-C<sub>6</sub>-HPC

DPH

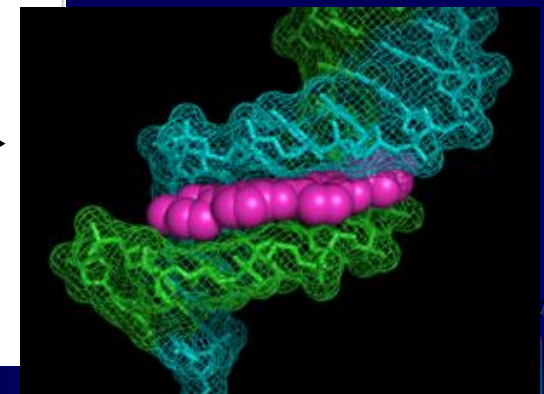
# Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

- nukleotidy ani NK nemají schopnost fluorescence
- vazba sond na různá místa

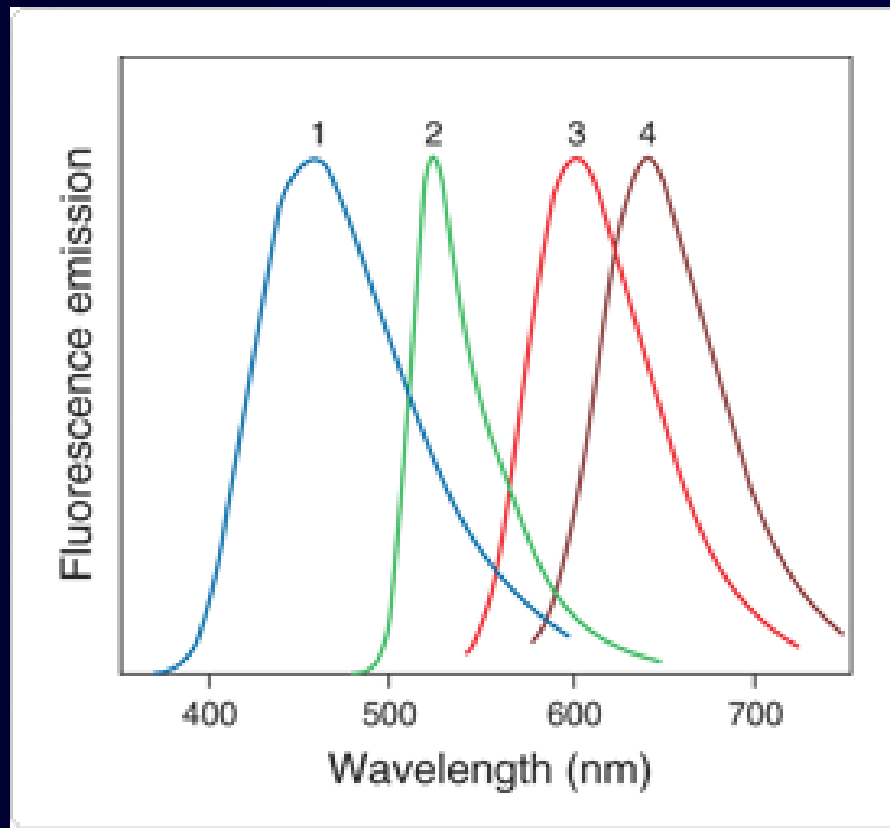


ethidium bromide

Hoechst 33258



- interkalační sondy - ethidium bromide, propidium iodide, 7-AAD (aminoactinomycin D)
- vazba do malého žlábků – DAPI, Hoechst dyes (33342, 33258)
- ostatní – akridinová oranž (DNA) akridinová oranž (RNA)

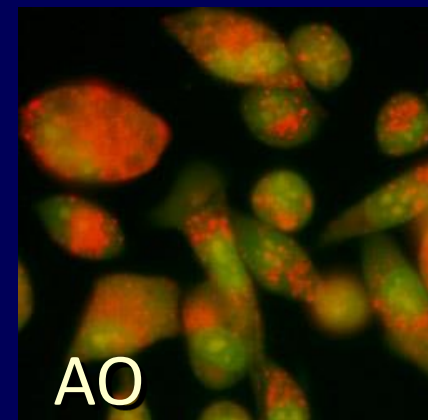
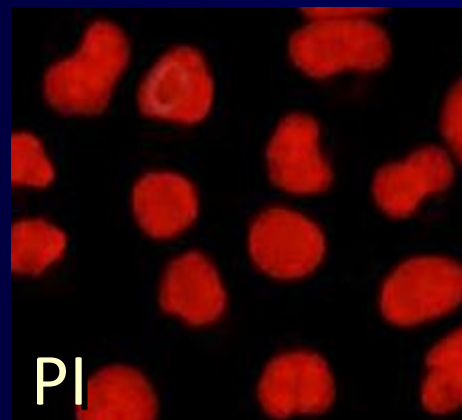


Normalizovaná fluorescenční emisní spektra DNA sond

- 1) Hoechst 33258 (~DAPI)
- 2) acridine orange
- 3) ethidium bromide
- 4) 7-aminoactinomycin D

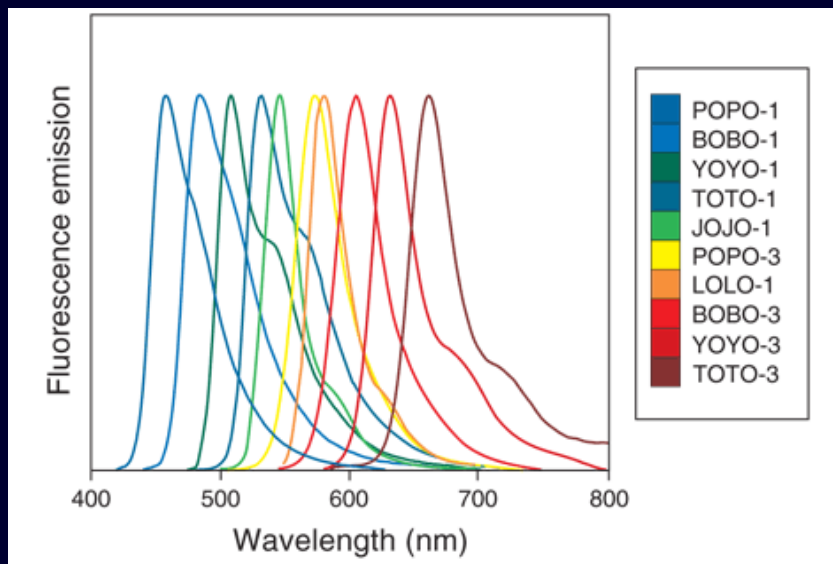
# Fluorescenční sondy pro nukleové kyseliny

fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	použití
<b>Akridinová oranž (DNA)</b>	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
<b>Akridinová oranž (RNA)</b>	460	650	
<b>Ethidium bromid</b>	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
<b>Propidium jodid</b>	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
<b>DAPI</b>	358	461	částečně prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
<b>Hoechst 33342</b>	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...

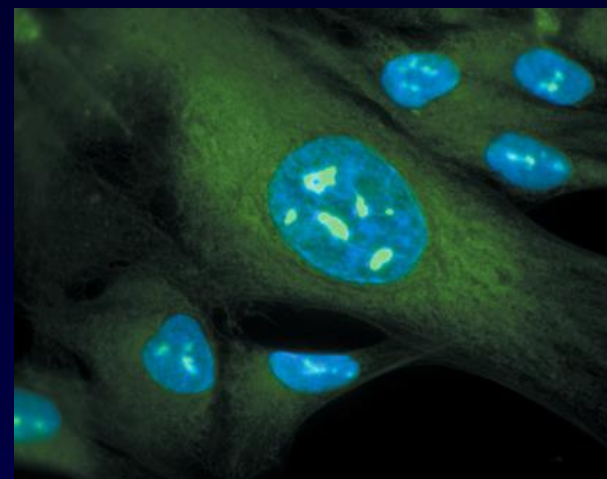


## cyaninové sondy (Molecular Probes)

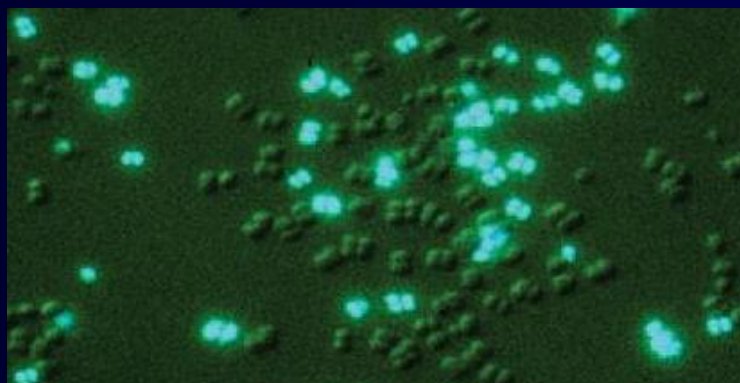
- nízká vnitřní fluorescence (QY=0,01) bez vazby na NK
- po vazbě na NK 1000x zvýšená intenzita (QY=0,9)
- vysoká afinita pro NK
- minimální vazba na ostatní biopolymery
- široký rozsah emisních maxim
  
- dělení dle propustnosti pl. membrány
- neprostupující: TOTO family, TO-PRO family, SYTOX
- prostupující : SYTO (RNA i DNA specificita)



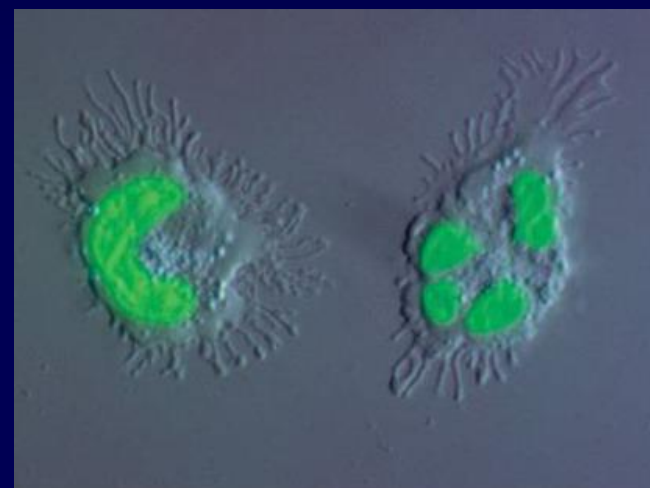
emisní spektra skupiny TOTO



linie MRC-5, RNA  
SYTO® RNaselect™



směs živých a mrtvých bakterií,  
DNA, SYTOX® Blue



lidský neutrofil, DNA,  
SYTO® 13

