



Fluorescence

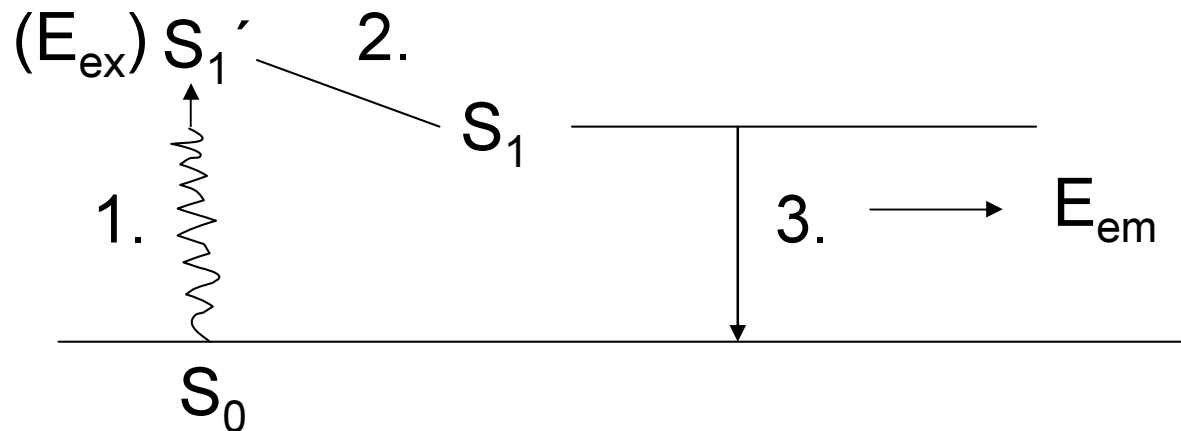
Fluorescence je jev, kdy látka absorbuje ultrafialové záření nebo viditelné světlo s krátkou vlnovou délkou a emituje viditelné světlo s delší vlnovou délkou než má světlo absorbované

Emitace světla není doprovázena tepelným zářením

Fluorescence

Třístupňový proces :

- 1. fáze - excitace (buzení viditelného záření)**
- 2. fáze - vlastní doba excitovaného stavu (nevratná přeměna části energie v jiné druhy)**
- 3. fáze - emise (vyzáření světla určité vlnové délky)**



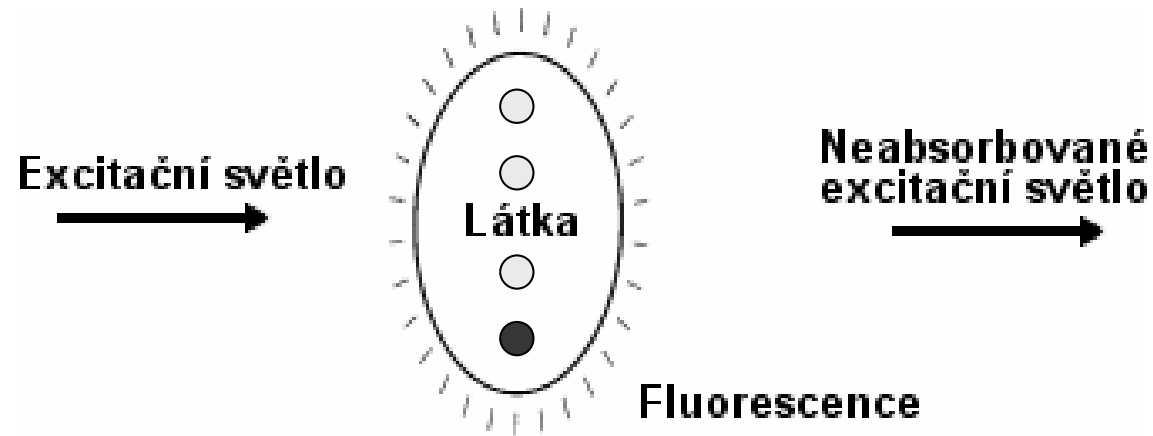
Energie excitovaného světla je větší než emitovaného ($E_{ex} > E_{em}$)

Vlnová délka excitovaného světla je menší než emitovaného ($\lambda_{ex} < \lambda_{em}$)

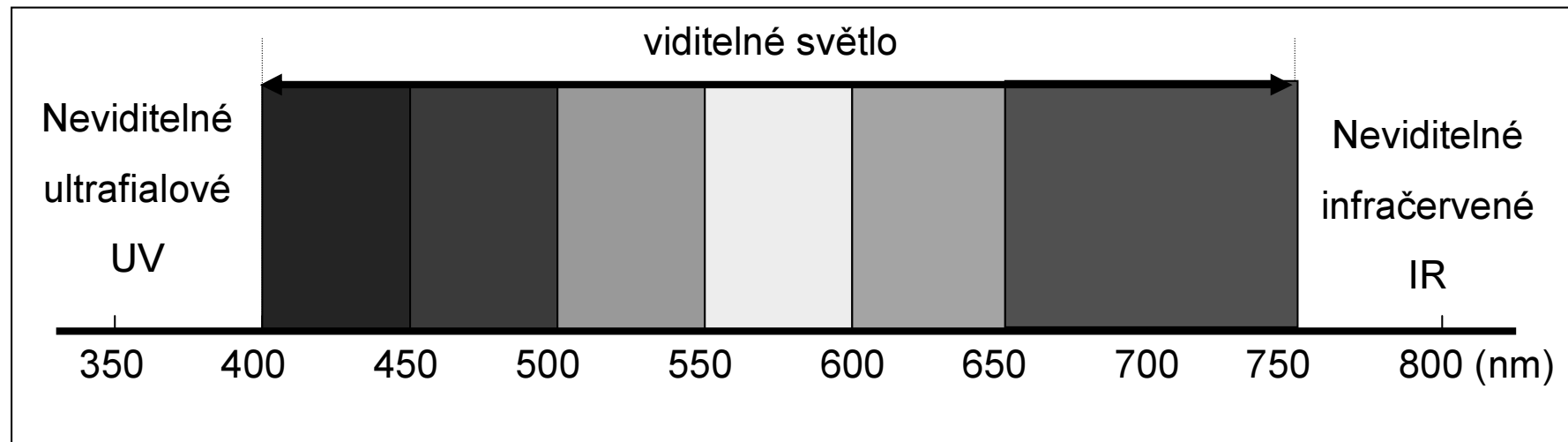
Fluorescence má některé typické vlastnosti. Některé z nich jsou obzvláště důležité pro fluorescenční mikroskopii.

- Aby látka emitovala fluorescenční světlo, musí světlo absorbovat.
- Vlnová délka fluorescenčního světla λ_{em} je obvykle větší, než vlnová délka excitačního světla λ_{ex} (Stokesův zákon).
 $\lambda_{ex} > \lambda_{em}$
Delší vlnová délka odpovídá menší energii světla. To znamená, že energie fluorescence je menší, než energie absorbovaného světla.
- Intenzita fluorescence je obecně mnohem menší, než intenzita excitačního světla.
- Fluorescenční světlo je emitováno všemi směry nezávisle na směru excitačního světla.
- Fluorescence postupně mizí.
- Každá látka má své charakteristické fluorescenční spektrum.

Každá látka má své charakteristické fluorescenční spektrum



Spektrum tzv. bílého světla



Fluorescenční mikroskop

V r. 1910 pozoroval Koehler při mikroskopování s ultrafialovým světlem fluorescenci mnoha objektů

První fluorescenční mikroskop s UV excitací vznikl v r. 1913, na jeho zkonstruování se podíleli Koehler, Reichert a Lehman

Fluorescenční mikroskopie:

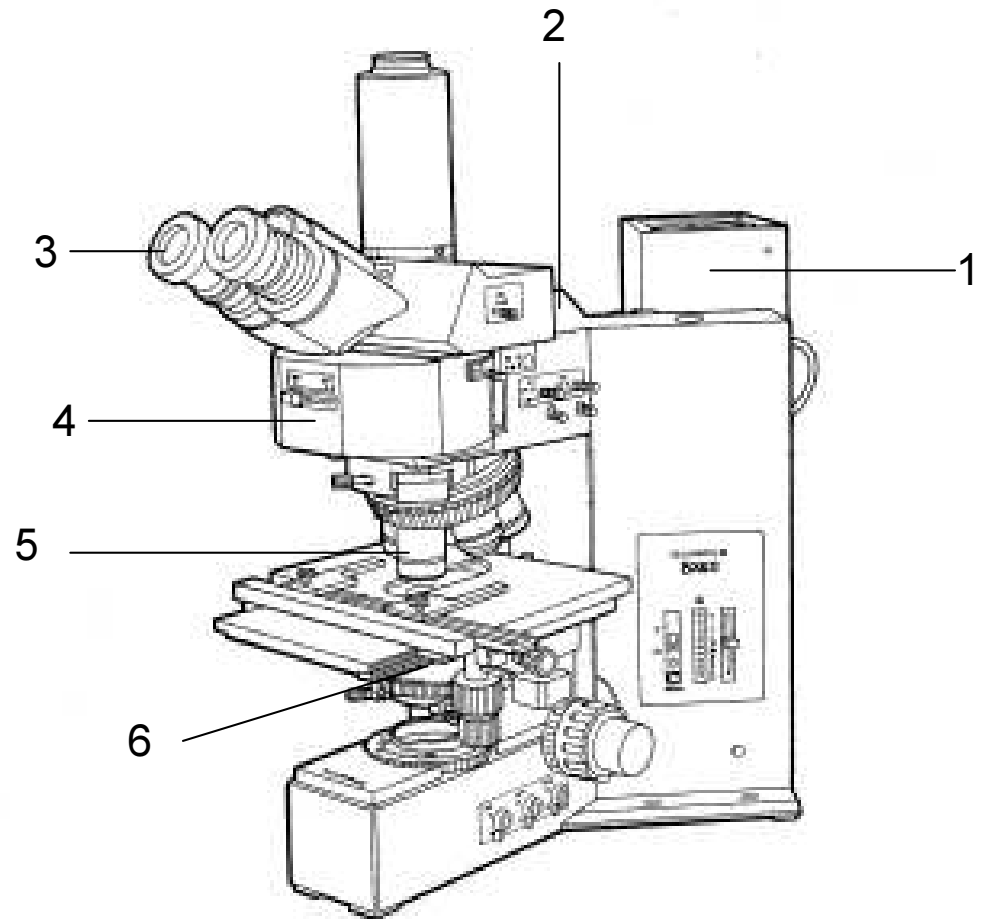
epifluorescence - pozorování v odraženém světle

diafluorescence - pozorování v procházejícím světle, která se v současné době téměř nepoužívá

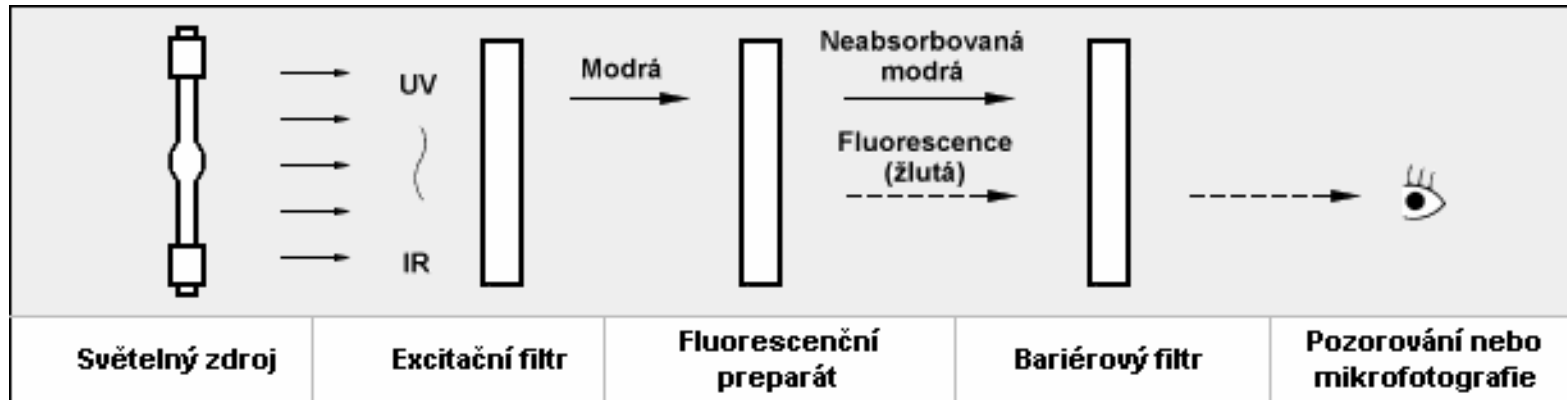
Nyní pod pojmem fluorescence rozumíme výhradně pozorování odraženého fluorescenčního světla.

Schéma fluorescenčního mikroskopu

- 1- schránka s výbojkou
- 2 - iluminátor
- 3 - okulár
- 4 - kazeta na kostky s filtry
- 5 - objektiv
- 6 - univerzální kondenzor



Zoologická mikrotechnika - FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

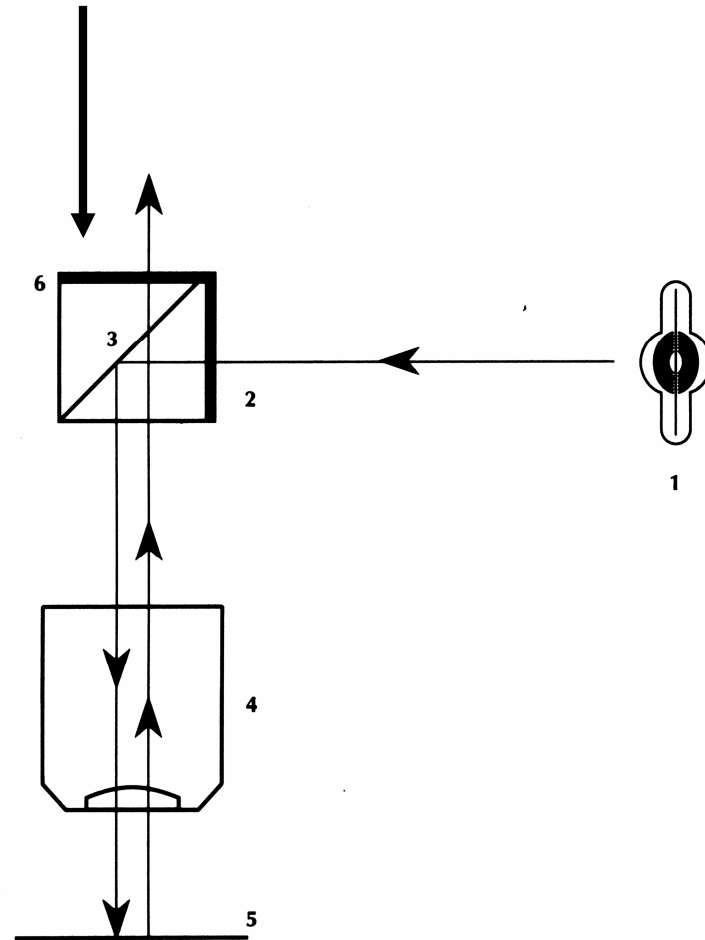


- Světelný zdroj: Ze světelného zdroje vychází světlo s různými vlnovými délkami od UV po IR.
- Excitační filtr: Tento filtr propouští pouze světlo, které je potřebné k fluorescenci vzorku, především s kratší vlnovou délkou. Ostatní světlo pohlcuje.
- Fluorescenční preparát: Vzorky, které reagují na dopadající světlo fluorescencí (většinou po přidání barviva - fluorochromu).
- Dichroické zrcátko: Slouží k oddělení excitačního a fluorescenčního (emitovaného) světla.
- Bariérový filtr: Tento filtr pohlcuje všechno excitační světlo, které nebylo použito k excitaci a propouští pouze fluorescenční světlo. Navíc je možné z fluorescenčního spektra nechat projít pouze jeho část.

Schéma principu fluorescenční mikroskopie

1. Rtuťová výbojka
2. Excitační filtr
3. Dichroické zrcátko
4. Objektiv
5. Preparát
6. Bariérový filtr

Kostka s filtry a zrcátkem



Světelný zdroj:

- musí emitovat dostatečně intenzivní světlo o blízkých ultrafialových vlnových délek

1. Vysokotlaké rtuťové výbojky - v trubici z křemenného skla je malé množství inertního plynu a rtuti.
2. Xenonová výbojka - oproti rtuťové výbojce má spojitě spektrum od ultrafialových délek po blízké infračervené vlnové délky. V oblasti viditelného světla se tato výbojka blíží přírodnímu dennímu světlu.
3. Halogenové žárovky - využívají rozžhavené wolframové vlákno, jsou známé u běžných mikroskopů. Lze použít u těch fluorescenčních aplikací, kde není potřeba zdroj ultrafialového světla.

Filtry:

- k excitaci se používá pouze část ze spektra světelného zdroje a k pozorování fluorescence se používá část fluorescenčního spektra; proto hrají filtry ve fluorescenční mikroskopii tak důležitou roli

1. Interferenční filtry

Lze je vyrábět pomocí vakuovaného napařování. Tyto filtry využívají k filtraci různých vlnových délek interferenci světla na rozhraní vrstev s různými indexy lomu (dichroické zrcadlo, excitační filtr).

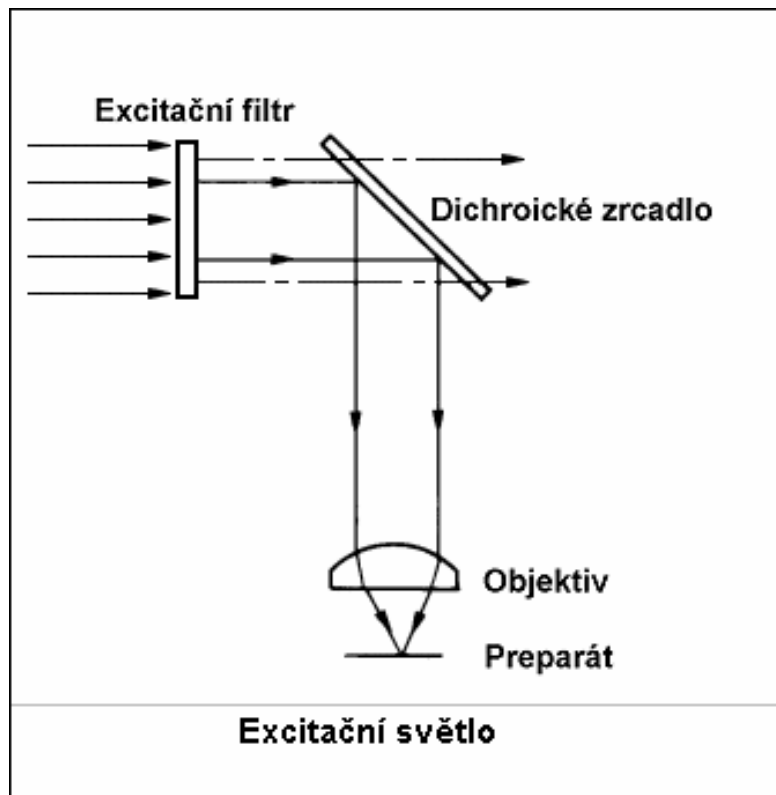
2. Filtry z barevného skla -

Tento typ filtrů se vyrábí přidáním pigmentu do skla. Tyto filtry jsou díky absorpci světla propustné pouze pro část spektra (bariérový filtr).

Kombinací zmíněných typů filtrů se ve fluorescenční mikroskopii dosáhne požadovaných vlastností systému filtrů

Oddělení excitačního a fluorescenčního světla pomocí dichroického zrcadla

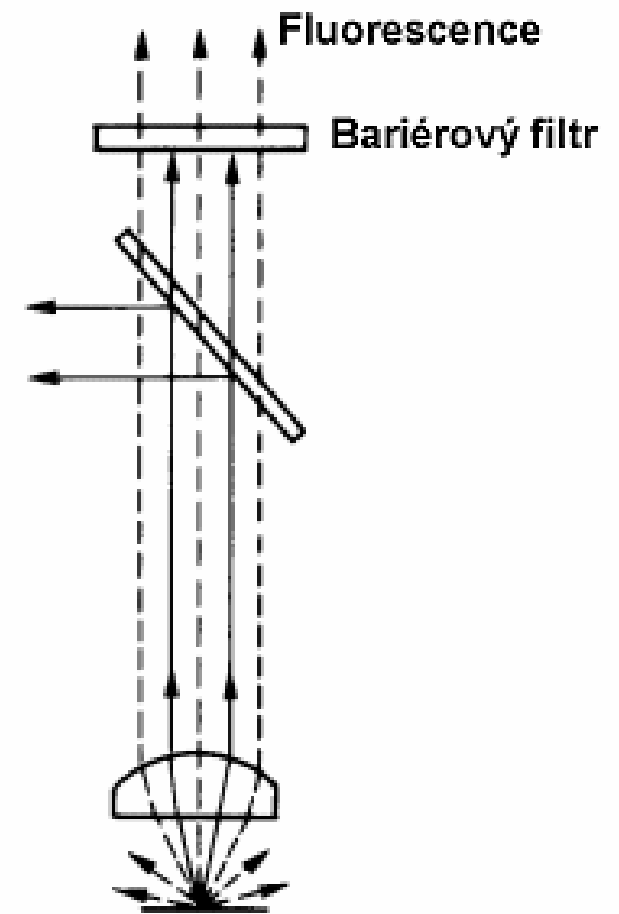
Dichroické zrcadlo je druh interferenčního filtru a umístí-li se do optické dráhy v úhlu 45° , kratší vlnové délky odráží a delší jím prochází.



Hlavní předností dichroického zrcátka je velká efektivita oddělení excitačního a fluorescenčního světla. Účinnost odrazu excitačního světla je více než 90 % a účinnost průchodu fluorescenčního světla je také větší než 90%. Celková účinnost oddělení je tedy větší než 80%.

K úplnému oddělení excitačního a fluorescenčního světla je v reálných systémech nutné přidání bariérového filtru, a to z následujících důvodů:

- část excitačního světla se odráží od povrchu čoček a povrchu vzorku
- velká část excitačního světla je sice odražena směrem ke zdroji, ale dichroickým zrcadlem projde část světla, které má vlnovou délku, pro kterou je dichroické zrcadlo propustné



Separace excitačního světla a fluorescence

Fluorescenční metody

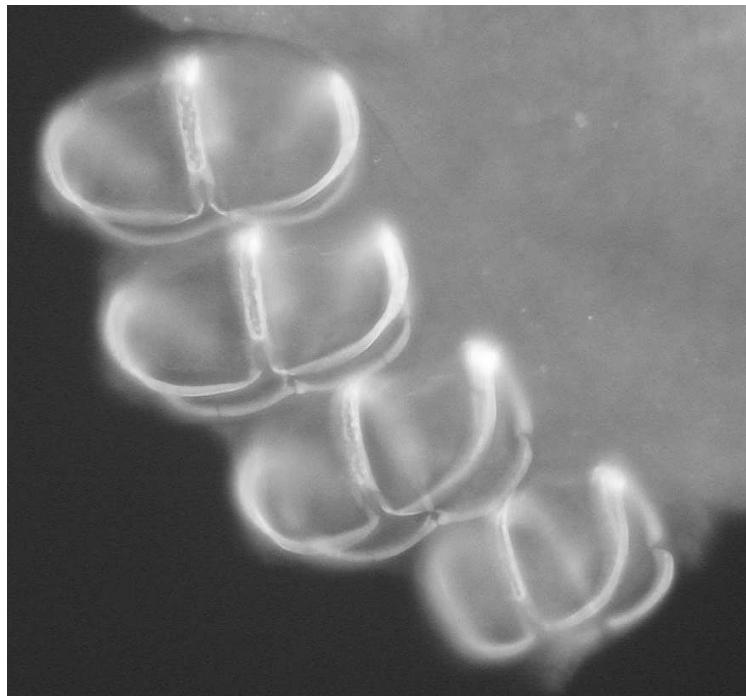
Fluorescence nastává u molekul

(ne všechny biologické objekty takové sloučeniny obsahují, např. chlorofyl, jiným je musíme dodávat specifickým barvením. Excitační světlo je pak pohlcované barvou.

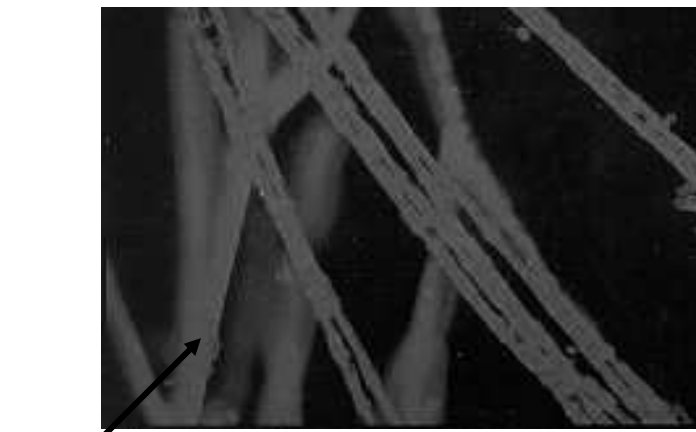
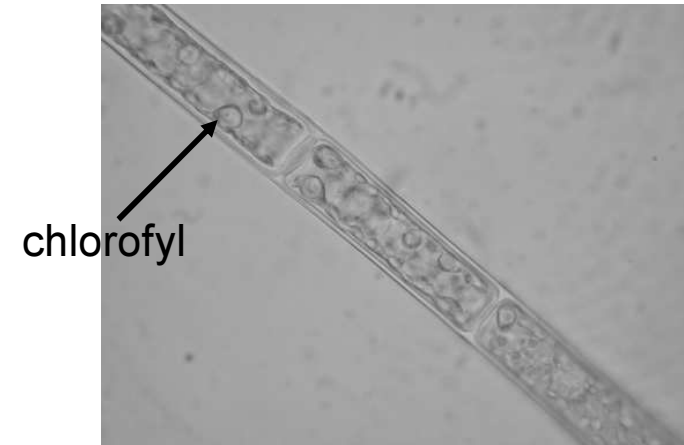
1. Autofluorescence
2. Sekundární fluorescence
3. Imunofluorescence

1. Pozorování autofluorescence (bez použití barviva)

Celá řada látek fluoreskuje po ozáření UV světlem (některé tkáně, buňky a jejich integrální složky - pigmenty, chlorofyl).



← Příchytné svorky (skleroproteinové)
žaberního parazita kaprovitých ryb
Paradiplazoon homoion (Monogenea)



chlorofyl

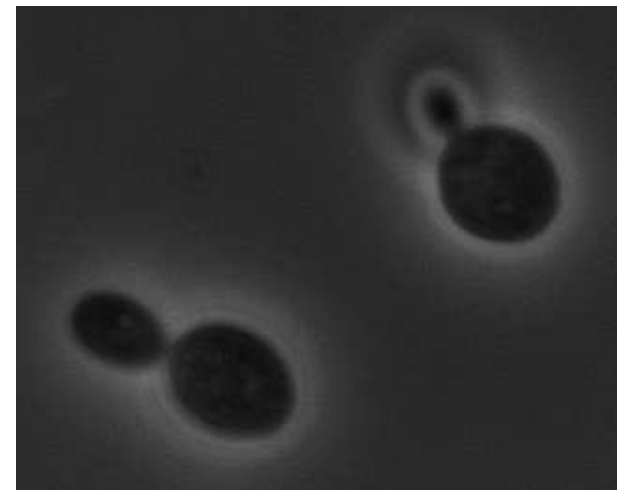
2. Pozorování sekundární fluorescence (metoda chemického barvení)

Pozorování fluorescenčního světla generovaného fluorochromem (=próba, fluoreskující barvivo), kterým se obarví látka bez vlastní fluorescence (proteiny, uhlohydráty). Pokud se obarví pouze objekty, které chcete pozorovat, lze je pozorovat odděleně od tkáně a ostatních buněk.

Aplikace: vizualizace buněčných jader, chromozómů, cytoskeletu, buněčných stěn atd.



Chromozomy fluoreskující díky propidium jodid

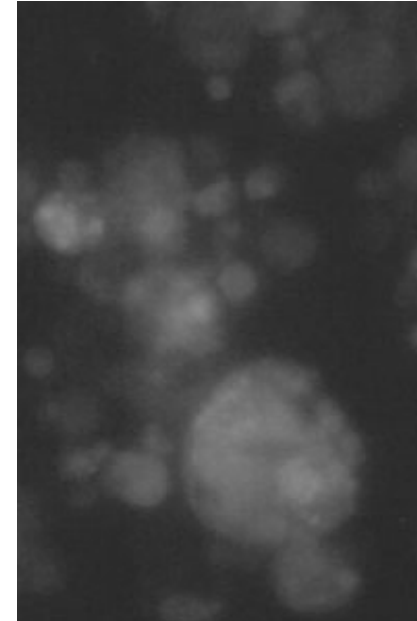


Barvení DAPI jádra kvasinky
Saccharomyces cerevisiae

3. Fluorescenční barvení protilátek (imunofluorescence)

Molekuly protilátky, označené navázaným fluorochromem, se váží s molekulami specifickým buněčným antigenů za vzniku komplexů (antigen+ protilátky + fluorochrom)

Vizualizace specifických antigenů, provázejících určité choroby, jejichž množství respektive přítomnost se studuje po reakci antigen/protilátka



Nepřímá imunofluorescence Zeleně (FITC) fluoreskují buněčné struktury pozitivní na antigen prokazovaný protilátkou 2E12 (apoptotické buňky). Červeně fluoreskují buňky, do nichž porušenou buněčnou membránou proniklo fluorescenční barvivo propidium jodid, který se váže na buněčnou DNA. Toto barvivo neproniká membránou živých buněk a barví pouze buňky v pozdní fázi apoptózy a buňky nekrotické. Na obrázku jsou zviditelněné apoptotické buňky a apoptotická tělíčka, které se barví zeleně, dále buňky nekrotické barvící se červeně a též buňky v pozdní fázi apoptózy barvící se oběma fluorochromy.

Příklady fluochromů:

1. Skupina - nekovalentně se váží přímo na určité struktury v buňce -
např. DNA
 - akridinová oranž, propidium jodid, ethidium bromid, DAPI
2. Skupina - váží se např. na protilátku a přes ni na určitou buňku
 - Texas Red, FITC (fluorescein isothiokyanát),
TRITC, (tetramethylrhodamin isothiokyanát)

Při fluorescenční mikroskopii je nutno používat podložní skla, krycí skla, uzavírací médium a imerzní olej bez primární fluorescence, tzn. že v použitém excitačním záření samy nefluoreskují