

Fluorescenční mikroskop

Fluorescenční mikroskop je optický mikroskop využívající fluorescenci k zobrazení organických i anorganických struktur. První fluorescenční mikroskop byl zkonstruován kolem roku 1911 Carlem Reichertem.



Fluorescenční mikroskop Olympus BX61

Ve fluorescenční mikroskopii se využívá kratších vlnových délek v oblasti UV záření, kdy látka absorbuje ultrafialové paprsky a emituje viditelné světlo delších vlnových délek, které je pak pozorovatelné světelným mikroskopem. Dochází k ozáření atomu, kde za normálních okolností obíhají elektrony kolem jádra ve vrstvách (orbitalech) s určitou energetickou hladinou. Při UV záření elektrony absorbují energii a jsou vybuzeny (excitovány) do vyšší energetické hladiny. Elektrony jsou na vyšší energetické hladině nestabilní a vracejí se zpět do základního stavu. Přesun elektronu z vyšší energetické hladiny do nižší je doprovázen vyzářením fotonu.

Struktura a funkce mikroskopu

Zdrojem záření většinou bývá vysokotlaká rtuťová výbojka. Křemenná trubice v sobě ukrývá malé množství rtuti a inertního plynu. V intervalu 356–546 nm vydá největší množství energie. Výkon výbojek bývá různý, používají se výbojky s výkonem 50, 100 a 200 W. Excitační záření projde nejdříve excitačním filtrem. Tento filtr dovolí prostupu světla jen o výše zmíněné vlnové délce. Zabraňuje prostupu světla o vlnových délkách záření emitovaného (fluorescenčního), to by vyvolalo nežádoucí barevné pozadí. Dále světlo dopadá na dichroické zrcadlo, nastavené v úhlu 45°.

Epifluorescenční mikroskop



Fluorescenční mikroskop AMG Evos fl s LCD displejem místo okuláru

Záření se odráží a prochází přes objektiv na vyšetřovaný vzorek. Ve vzorku vyvolají excitaci elektronů a následné vyzáření světla. Emitované záření má větší vlnovou délku a šíří se všemi směry. Díky imerznímu objektivu a oleji prochází jen část z něj a dále dopadá rovněž na dichroické zrcadlo. Toto zrcadlo odstraňuje nežádoucí excitační záření o vysoké intenzitě (nebezpečné pro oko, zhodnocení pozorování) a propouští emitované záření. Celková účinnost oddělení excitačního a emitovaného záření dichroickým zrcadlem je více jak 80 %. ^[1] Emitované záření dále prochází bariérovým filtrem. Ten propouští jenom emitované záření v délce podle používaného fluorochromu, kratší vlnové délky zastaví. Dále pak můžeme pozorovat fluorescenční záření okulárem a nebo snímat ho kamerou.

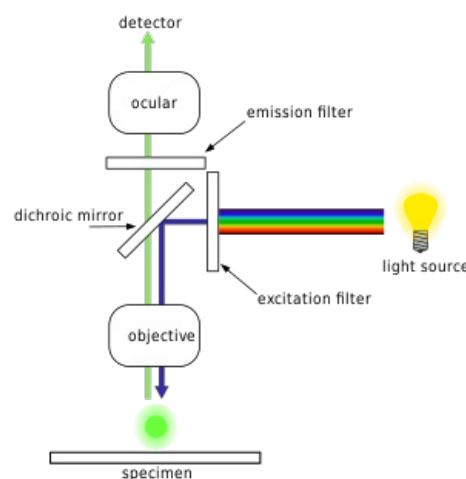


Schéma fluorescenčního mikroskopu

Transmisní fluorescenční mikroskop

Používá se také v laboratořích, ale má jiné uspořádání. Zdroj záření je umístěn stejně jako u klasického mikroskopu pod preparátem. Zvláště uspořádaný zástinný kondenzor pak propustí světlo tak, aby na vzorek dopadalo z boku. Nebezpečné excitační světlo pak letí mimo objektiv a objektivem prochází jen světlo emitované. Epifluorescenční typ mikroskopu je v současnosti více oblíbený než transmisní typ. ^[2]

Primární fluorescence (autofluorescence, přirozená fluorescence)

Tento typ fluorescence se vyskytuje pouze v některých buňkách (především v rostlinných buňkách, pletivech) a intenzita fluorescence nebývá příliš silná. V oblasti UV záření je vázána především na proteiny/aminokyseliny – tryptofan, fenylalanin, tyrosin a v oblasti viditelného světla na redukované formy NADH, NADPH, vitamin A, chlorofyl, cytochromy, hemoglobin, myoglobin.

Sekundární fluorescence

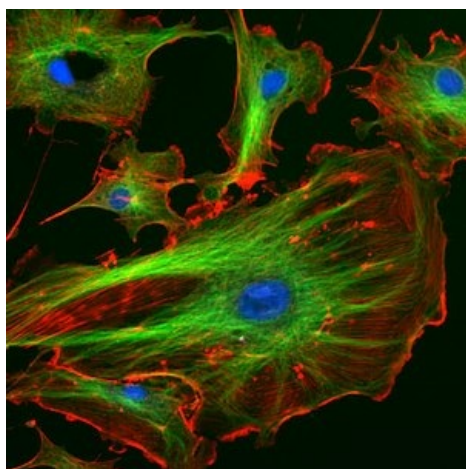
Tento typ spočívá v nanesení fluorescenční látky (fluorochromu) na zkoumané struktury, která nám je po ozáření umožní zobrazit. Mezi známé fluorochromy pro vizualizaci nukleových kyselin patří např. akridinová oranž, ethidium bromid nebo DAPI (4', 6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid). Dále FITC (fluorescein-5-isothiokyanát), TRIC, Texas Red.

Mezi velmi používané markery řadíme i zelený fluorescenční protein GFP (green fluorescent protein), který byl izolován z mořské řasy *Aequorea victoria* a díky němu můžeme sledovat označené struktury v buňce. Kromě zeleného fluorescenčního proteinu jsou dnes k dispozici také jeho žlutá a modrozelená varianta a nepříbuzný červený fluorescenční protein.

Využití

Fluorescenční mikroskopie nám jak první umožnila vizualizovat struktury cytoskeletu eukaryontních buněk, využívá se v imunohistologii, imunocytoologii a imunocytochemii. V buněčné biologii je hojně využíván k identifikaci složek cytoskeletu, buněčných organel nebo ke sledování biochemických dějů. V mikrobiologii se využívá fluorescenční mikroskop k identifikaci různých bakteriálních rodů. V cytogenetice se využívá metoda FISH (in situ hybridizace), kdy pomocí fluorescenčně značené DNA (RNA) sondy detekujeme určité vybrané úseky DNA či chromozomů a můžeme diagnostikovat např. chromozomální aberace, mikrolece, mikroskopické zlomy apod..

Galerie obrázků



Buňka. Jádro modré (DAPI), mikrotubuly zelené (FITC), mikrofilamenta červeně (TRITC)

Odkazy

Reference

1. KOČÁREK, Eduard a Martin PÁNEK. *Klinická cytogenetika I : úvod do klinické cytogenetiky*. 2. vydání. Praha : Karolinum, 2010. 134 s. ISBN 978-80-246-1880-7.
2. HAMPL, Vladimír, et al. *Fluorescenční mikroskopie* [online]. Poslední revize 4.10.2012, [cit. 2013-02-05]. <<http://web.natur.cuni.cz/~parazit/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencni.htm>>.

Použitá literatura

- VYMĚTALOVÁ, Veronika. *Biologie pro biomedicínské inženýrství. I. díl*. 1. vydání. Praha : Česká technika - nakladatelství ČVUT, 2008. ISBN 978-80-01-04013-3.