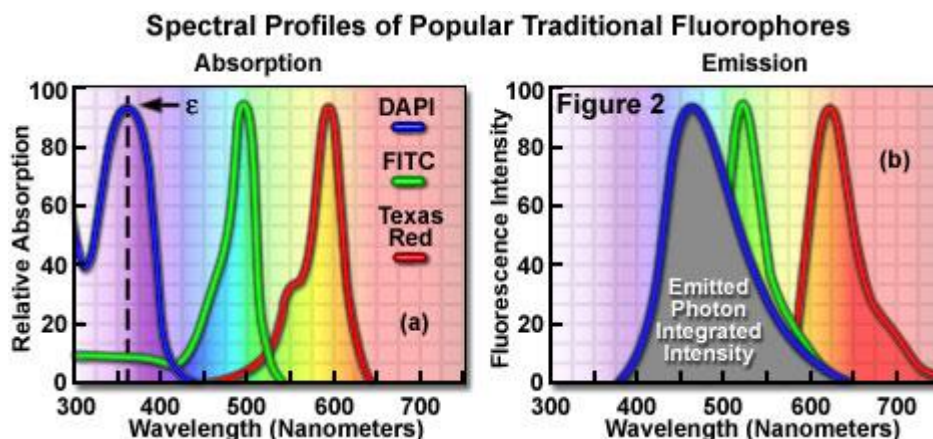


FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Autor: Ing. Roman Matějka, Ing. Jana Štěpanovská

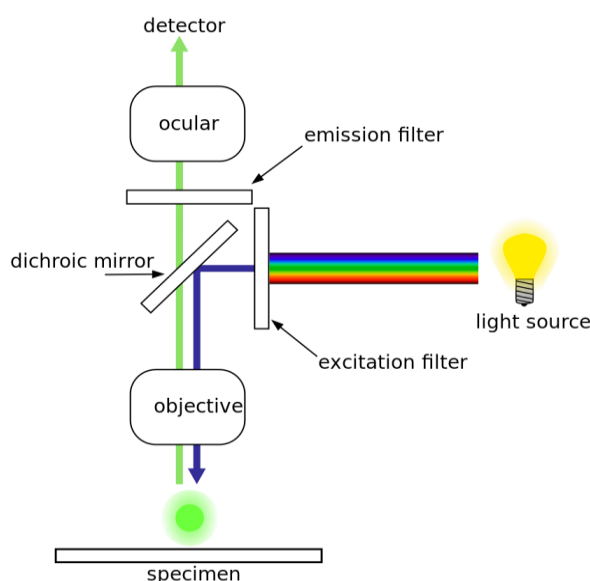
FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Fluorescence je jev, při kterém látka po absorpci kvanta excitačního elektromagnetického záření emituje záření určité vlnové délky (barvy) o delší vlnové délce (*Obrázek 1*). Jako zdroj excitačního záření se ve fluorescenční mikroskopii často používá rtuťová či xenonová výbojka emitující bílé světlo obsahující všechny vlnové délky včetně UV záření. Do průběhu světla je nejdříve zařazen excitační filtr separující z bílého světla námi požadovanou excitační část spektra, dále pak dichroické zrcátko odrážející excitační záření skrz objektiv na pozorovaný vzorek a propouštějící vzorkem emitované záření k emisnímu filtru, který zajišťuje, že pouze emitované světlo se dostane na detektor nebo do okuláru mikroskopu (*Obrázek 2*).



Obrázek 1 – příklad absorpčního a emisního spektra některých fluoroforů (zdroj: www.olympus-lifescience.com).

Návod na cvičení 2: Fluorescenční mikroskopie



Obrázek 2 – mechanismus fluorescenčního mikroskopu.

Pomocí fluorescenční mikroskopie můžeme znázornit morfologii celých buněk, buněčná jádra, jednotlivé proteinové struktury a další molekuly v buňce, mezibuněčnou hmotu. Z fluorescenčních obrázků můžeme kvantitativně hodnotit například plochu rozptřeni buněk na různých materiálech nebo intenzitu fluorescence dané struktury a tím usuzovat na míru proteinové exprese.

Fluorescenci dělíme na primární a sekundární. *Primární fluorescence* (autofluorescence) se vyznačuje schopností některých přirozeně se vyskytujících látek a struktur po absorpci světelného záření emitovat záření o delší vlnové délce. Autofluorescence je typická pro některé látky (chlorofyl, flavonoidy, některé alkaloidy), struktury (mitochondrie, kolagenní či elastinová vlákna) či tkáně (tuková tkáň, perikard).

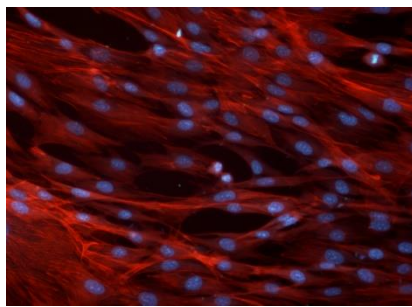
Za *sekundární fluorescence* označujeme stav, kdy původní nefluorescenční strukturu nejčastěji pomocí tzv. protilátek a dalších činidel s afinitou k určitým buněčným strukturám vizualizujeme látkou s fluorescenčními vlastnostmi (fluorofor).

Vizualizovat pomocí fluorescence barev můžeme i živé buňky, ale častěji volíme nejdříve předchozí fixaci buněk (popřípadě celých tkání), pro lepší trvanlivost, stálost morfologie buněk a zachování jednotlivých struktur. Mezi nejčastěji používaná fixační činidla patří např. 4% paraformaldehyd, 70% ethanol či methanol. Buněčná membrána s fosfolipidovou dvojrůstvou je za normálních okolností propustná pouze pro malé molekuly a protilátky proti jednotlivým strukturám uvnitř buňky tedy nemohou do buňky volně prostupovat. Aby bylo možné následně dopravit jednotlivé protilátky, je potřeba buněčnou membránu tzv. permeabilizovat. Při tomto procesu dochází k porušení lipidové dvojrůstvy látkami na bázi

Návod na cvičení 2: Fluorescenční mikroskopie

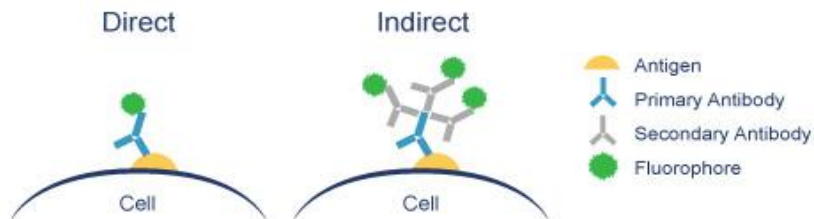
detergentů (např. Triton X-100). Variabilním krokem v procesu před samotným barvením je také možnost blokace nescifických vazeb protilátek na buněčné struktury, které barvit nechceme např. přidáním fetálního bovinního séra, bovinního albuminu nebo mléčného proteinu caseinu, což omezí přítomnost nescifického pozadí a zvýší kontrast obrazu.

Některé struktury v buňce můžeme značit přímo za použití fluoroforu. Jedná se například o fluorescenční barvy mající vaznost do oblasti dvoušroubovice DNA (DAPI, Hoechst). Pomocí těchto barev jsme tedy schopni získat informaci o počtu buněk, popřípadě zjistit výskyt vícejaderných buněk. Můžeme také využít vaznosti některých toxinů konjugovaných s flourofory na specifické struktury v buňce. Příkladem může být toxin faloidin z muchomůrky zelené, který má vaznost na F-aktinová vlákna cytoskeletu buněk (*Obrázek 3*).

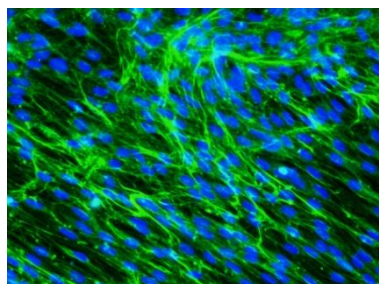


Obrázek 3 - fluorescenční barvení F-aktinu pomocí phalloidin-TRITC (červená) a buněčných jader pomocí Hoechst 33258 (modrá).

Fluorescenční barvení pomocí protilátek (imunofluorescenční barvení) dělíme na *přímé* a *nepřímé* (*Obrázek 4*). Výhodou je poměrně vysoká afinita k jednotlivým strukturám. *Přímým fluorescenčním barvením* rozumíme značení specifických struktur protilátkou už přímo konjugovanou s konkrétním fluoroforem (např. aktinová vlákna, intermediární filamenta, povrchové receptory, mezibuněčné kontakty). *Nepřímé fluorescenční barvení* je charakterizováno použitím primární protilátky proti zkoumané struktuře, které ale není konjugovaná s fluoroforem. Je tedy nutné následně aplikovat sekundární protilátku proti primární protilátce, tato sekundární protilátka je již vázaná s fluoroforem, a je tedy možné detekovat informaci o přítomnosti struktury pomocí metody fluorescenční mikroskopie. Zobrazované struktury jsou podobné jako u metod přímého fluorescenčního barvení, výhodou je možnost variabilně si zvolit sekundární protilátku s vhodným fluoroforem pro daný pokus. Je možné zobrazit i více proteinů najednou, ale je potřeba aby se primární protilátky lišily ve svém původu (např. jedna myší a jedna králičí) (*Obrázek 5*).



Obrázek 4 – znázornění metod přímé a nepřímé imunofluorescence



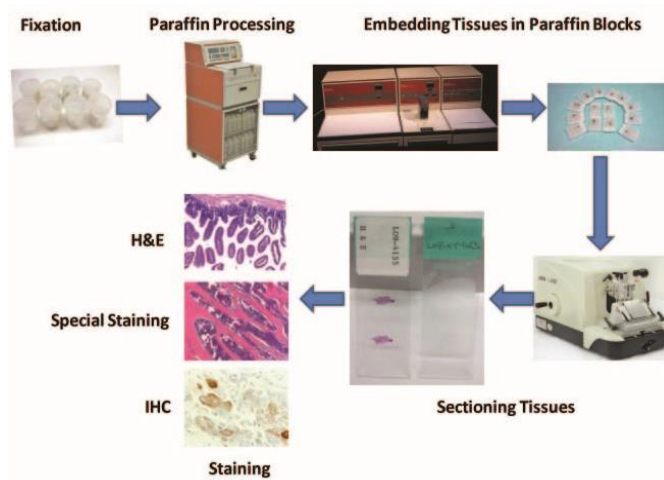
Obrázek 5 – imunofluorescenční barvení:

1. buňky Saos2: vinkulin (zelená), F-aktin (červená), jádra (modrá).
2. osteogenní diferenciací kmenových buněk: kolagen typu I (zelená), jádra (modrá).

ZOBRAZOVÁNÍ CELÝCH TKÁNÍ

Zpracování celé tkáně nám dává možnost prohlédnout jednotlivé vrstvy na průřezu např. cévy. Při metodách decelularizace můžeme pozorovat úspěšnost procesu odstranění buněk pomocí sledování buněčných jader. Při osazování tkáňových náhrad buňkami zase můžeme sledovat, zda buňky prostupují do všech vrstev napříč tkání či zda se drží jen na povrchu. Pro histologické zobrazení celých tkání se používá podobná fixace jako v případě fixace u fluorescenčního barvení. Následně je zafixovaná tkáň zapracována do parafinových bločků a nařezána na mikrotomu (řezy v řádu 1-50 um) (Obrázek 6). Popřípadě může být zpracována i nezafixovaná hluboce zmrazená tkáň na kryostatu. Dále mohou být jednotlivé řezy barveny histologickými barvenými na specifické struktury a pozorovány ve světelném mikroskopu. Fluorescenční barvení jednotlivých struktur je také možné.

Návod na cvičení 2: Fluorescenční mikroskopie



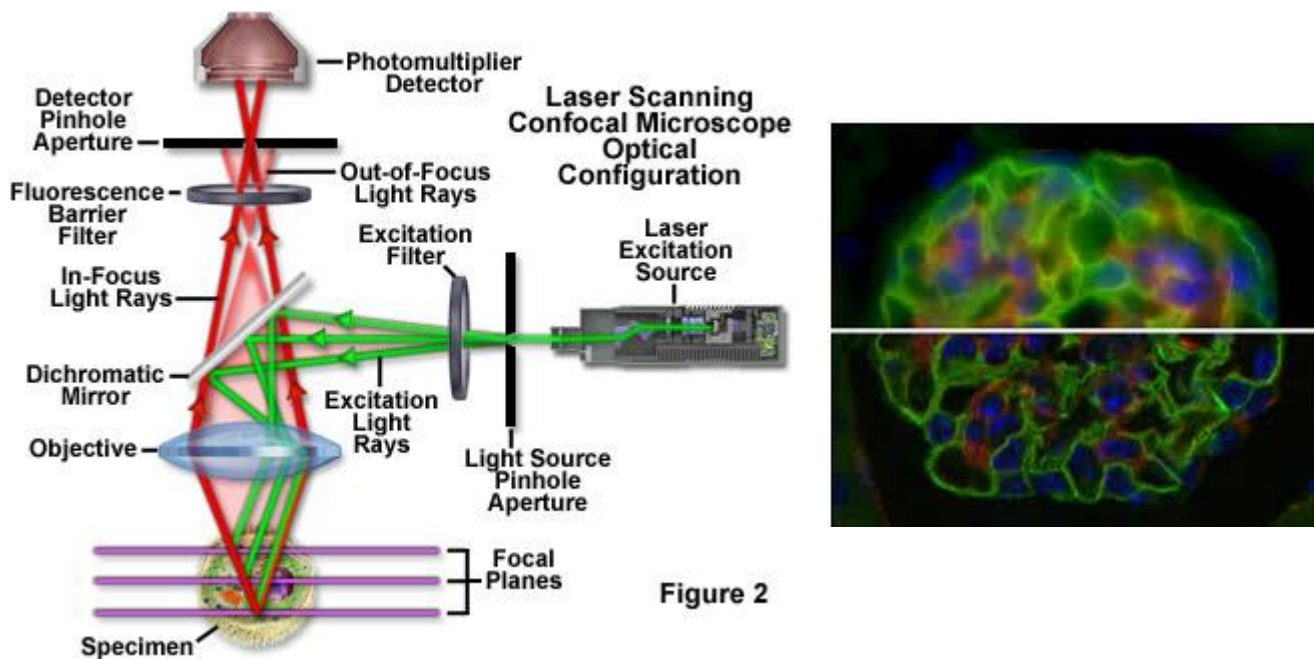
Obrázek 6 - proces fixace a dalšího zpracování tkáně.

LASEROVÁ SKENOVACÍ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE

Technika laserové skenovací konfokální mikroskopie poskytuje vyšší rozlišovací schopnost v porovnání s klasickou fluorescenční mikroskopií. Umožňuje nasnímat vzorek v jednotlivých rovinách, a pak sumovat daný obraz do projekce maximální intenzity nebo konstrukci trojrozměrného zobrazení. Základním rozdílem mezi obyčejným tzv. widefield fluorescenčním mikroskopem a mikroskopem konfokálním je přítomnost clony s tzv. pinhole v optické dráze excitačního a emisního světla za zdrojem excitačního záření, resp. před detektorem. Tato pinhole dovoluje zaměřit excitační záření do bodu v ohniskové rovině a zároveň snímat emisi pouze z této roviny vzorku. Emise, která není v pozorované rovině vzorku se ve widefield mikroskopii dostává na detektor a tvoří neostré pozadí obrazu. V konfokální mikroskopii toto záření neprochází skrz pinhole na detektor, a je tedy odstíněno, čímž je dosaženo ostřejšího obrazu s vyšším rozlišením. K excitaci je dnes často využíván laserový paprsek, který je zaměřen do bodu, jehož průměr odpovídá rozlišovací mezi (Obrázek 7).

Laserovou konfokální mikroskopií nejčastěji zobrazujeme 3D scaffoldy či biologické tkáňové náhrady osazené buňkami vizualizované pomocí fluorescenčního barvení. Určitou nevýhodou konfokální mikroskopie je nízká intenzita emitovaného světla procházejícího na detektor. Proto se pro excitaci používají silné zdroje záření jako lasery, čímž se dosahuje maximální excitace v ohnisku. Nevýhodou této metody je také vyšší pořizovací cena.

Návod na cvičení 2: Fluorescenční mikroskopie



Obrázek 7 – schéma konfokálního mikroskopu; porovnání zobrazení vzorku pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie

ZADÁNÍ

Cílem cvičení je fluorescentní zobrazení tkáňové kultury se zvýrazněním jader a cytoskeletu a jejich následná vizualizace na fluorescenčním mikroskopu.

PŘÍSTROJE:

- Laminární box
- CO2 inkubátor
- Invertovaný mikroskop s fázovým kontrastem a fluorescencí
- Zařízení na přípravu ultračisté vody
- Centrifuga

DALŠÍ POMŮCKY:

- Testovaný biomateriál
- Kultivační medium
- Buněčná kultura - nasazená na šesti jamkové kultivační desce (6-well) v cca 60% konfluenci
- Sterilní nádoba pro přípravu eluátu
- Fixační činidlo na buňky (70% etanol / 4%paraformaldehyd)
- Fluorescenční barva na aktin (fluorescenčně značený phalloidin)
- Fluorescenční barva na jádra (DAPI/hoechst)
- 10% roztok Tritonu X-100 v qH₂O
- Sterilní qH₂O
- Sterilní PBS
- Sterilní pinzeta

FLUORESCENČNÍ BARVENÍ:

1. Do eppendorfky nebo centrifugační zkumavky (dle počtu barvených jamiček) si připravíme PBS, do kterého přidáme Hoechst 33258 (ředění 1:200) a phalloidin-TRITC (ředění 1:1000). *(Do každé jamky se bude později přidávat 400 µl takto ředěných fluorescenčních barev).* !Pozor, zbytečně nevystavovat fluorescenční barvy světlu!
2. Opatrně odsajeme PBS do kádinky
3. Do jamiček přidáme 400 µl PBS s Hoechst 33258 (1:200) a s phalloidin-TRITC (1:1000)
4. Zabalíme destičku do hliníkové fólie, abychom zamezili degradaci fluorescenčních barev
5. Inkubujeme 60 min při pokojové teplotě
6. Odsajeme PBS s fluorescenčními barvami do kádinky
7. Do jamek přidáme 400 µl PBS

Zdroje: Direct vs indirect immunofluorescence. Abcam. (2023, October 21). <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>, Olympus Microscopy. Olympus. (n.d.). <https://www.olympus-lifescience.com/en/>, vlastní archiv autora