



# FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

na gymnáziu Pierra de Coubertina v Táboře

# Co je fluorescence

**Fluorescence** je jev spočívající v tom, že některé látky (fluorofory) **po ozáření** (excitaci) světlem určité vlnové délky  $\lambda_{\text{excit}}$  **vyzařují** (emitují) světlo jiné vlnové délky  $\lambda_{\text{emit}}$

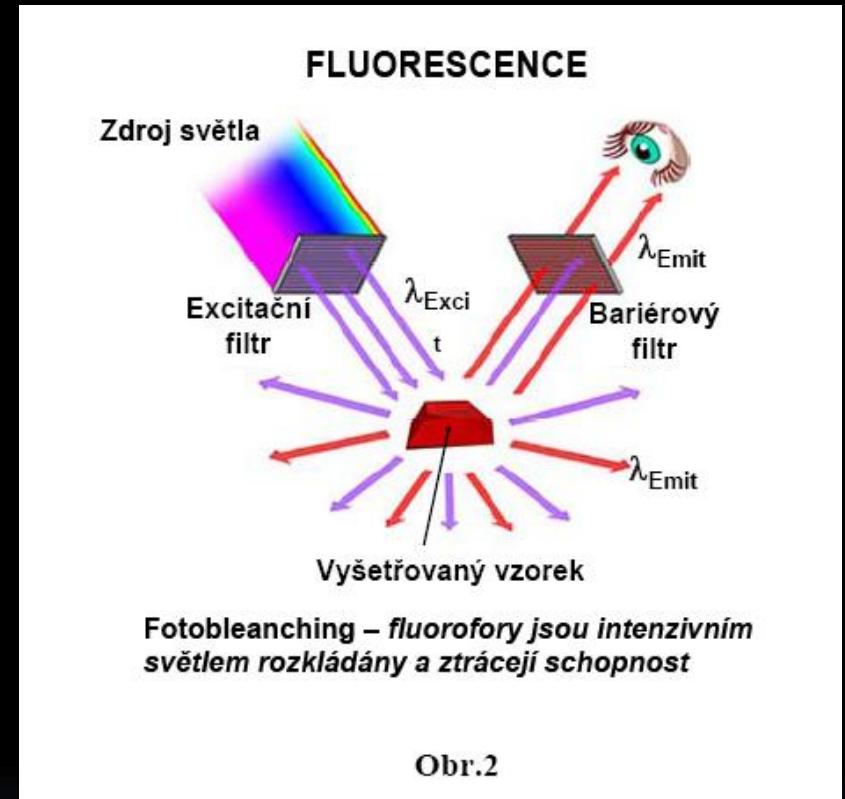
$$\lambda_{\text{emit}} > \lambda_{\text{excit}}$$

Např. chlorofyl při ozáření modrým světlem emituje světlo červené.

**Autofluorescence** – např. celulóza, chlorofyl, keratin aj.

**Fluorescenční barvení** – užívá se ke zviditelnění molekul a buněk, které nemají autofluorescenci.

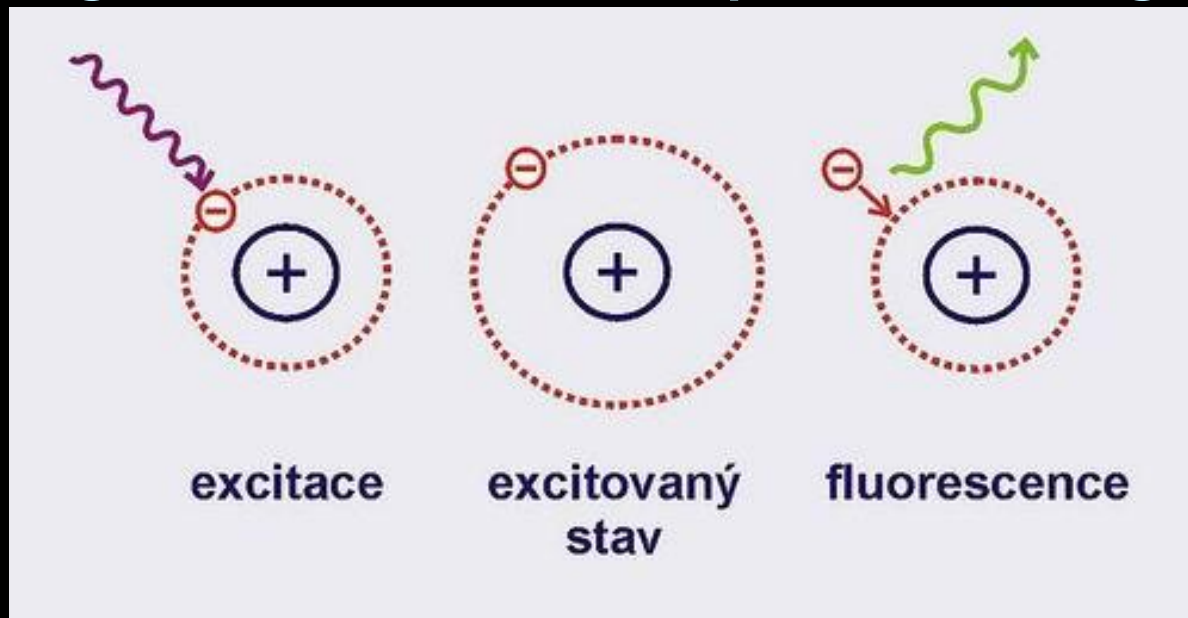
**Fluorescenční barvivo** je barvivo, jehož molekuly jsou schopny fluorescence. např. akridinová oranž.



Na obrázku je ukázán princip optických přístrojů využívajících fluorescence světla. Ze zdroje světla je pomocí tzv. excitačního filtru propuštěno pouze světlo určité vlnové délky  $\lambda_{\text{Excit}}$ , které dopadá na vyšetřovaný vzorek. Zde dochází k fluorescence, přičemž vzorek emituje světlo o vlnové délce  $\lambda_{\text{emit}} > \lambda_{\text{excit}}$ . Pomocí tzv. bariérového filtru je do oka pozorovatele propuštěno jen světlo emitované vzorkem a oko vidí jen ty části vzorku, které emitují světlo o vlnové délce  $\lambda_{\text{emit}}$ .

Zdroj: <http://www.mikroskop-mikroskopy.cz/fluorescence/>

# Pro zájemce trochu podrobněji...



Jev fluorescence je založen na tom, že **fotony, které tvoří světlo, nesou určitou energii, kterou mohou předat elektronům v různých molekulách**. Při tomto předání energie dochází k tzv. excitaci elektronů - tyto se **přesouvají do vyšší energetické hladiny**. Prakticky to znamená, že se pohybují kolem jádra molekuly ve větší vzdálenosti (ve vyšším orbitalu). Tento stav ale není stabilní - **elektron obsahuje energii "navíc" a ta má tendenci se zase uvolnit**, když je elektron "přitažen" jádrem molekuly opět na nižší energetickou hladinu (do nižšího orbitalu). **Energie se opět uvolní v podobě fotonu**, který je vyzářen (emise). Děj shrnuje schéma nahoře. Protože při každé přeměně energie dochází ke ztrátám - část energie se uvolní do prostředí v podobě tepla (konkrétně v podobě tepelných pohybů molekul), **obsahuje vyzářený foton menší množství energie**.

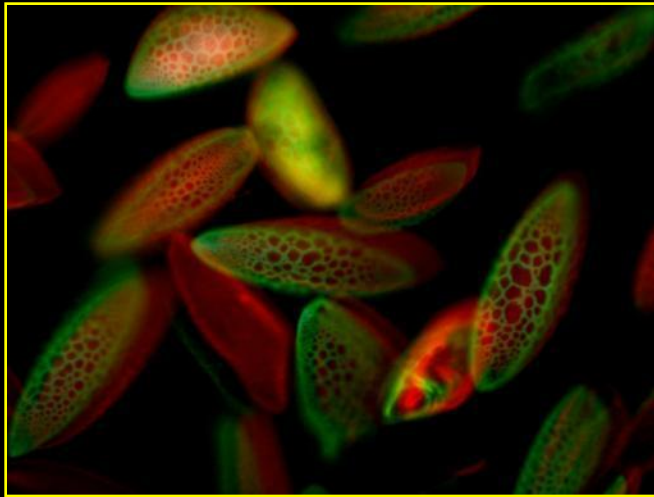
Protože světlo má vlnovou povahu, je vlnová délka vyzářeného (emitovaného) světla delší, než vlnová délka světla, které fluorescenci vybudilo (excitovalo).

Fotony (světlo) kratší vlnové délky totiž obsahují více energie - délka vlny je kratší a fotony kmitají rychleji, nesou tedy více energie.

Pohlčení a vyzáření jednoho fotonu ovšem není běžným okem ani mikroskopem pozorovatelné. **Fluorescenční barviva** jsou proto velké molekuly, obsahující velké množství elektronů, které lze snadno a koordinovaně excitovat a které se také rychle vracejí zpět do nižší energetické hladiny. Jako fluorescenční barviva se proto nejčastěji používají **aromatické sloučeniny a heterocykly** s elektrony konjugovanými v plochých "mracích" nad a pod rovinou ploché molekuly.

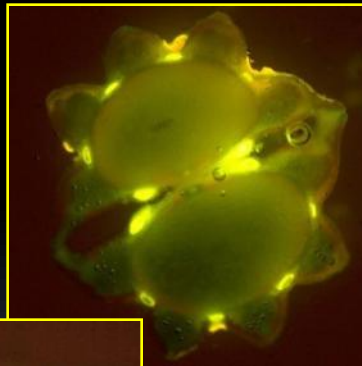
Zdroj: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Fluorescenci%20barvivo.htm>

# Zapůjčený fluorescenční mikroskop



## Olympus CX21 s LED Fluorescent Illuminator

Pozn. výrazně levnější varianta  
fluorescenčního mikroskopu kde je na  
místo tradiční ho zdroje světla –  
rtuťové výbojky použita LED dioda



<http://www.olympus.cz/microscopy>

# Jak jsme se k fluorescenčnímu mikroskopu dostali...

- Prezentace fluorescenčního mikroskopu středoškolským učitelům biologie na týdnu biologie v rámci Otevřené vědy v Nových Hradech – možnost zapůjčení mikroskopu na SŠ
- Zapůjčovatelem mikroskopu je **Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**
- Mikroskop byl pořízen **z prostředků MŠMT**, v rámci grantu, jehož řešitelem byla katedra buněčné biologie PŘF UK

# K čemu je dobrá fluorescenční mikroskopie

Nejširší užití v buněčné biologii a molekulární genetice:

- Nalézání specifických molekul (bílkovin, lipidů, sacharidů)
- Zviditelnění některých buněčných struktur (jádra, cytoskelet)
- Nalezení určitých sekvencí nukleotidů v DNA či RNA

aj.

Výrazný posun ve fluorescenční mikroskopii živých buněk přinesl objev tzv. GFP (green fluorescent protein)

- Zelený protein mořské medúzy rodu *Aequorea*
- Izolace genu pro tento protein z jejího genomu
- Genovými manipulacemi je tento gen vnášen do jiných organismů a umožňuje „značkování“ buněk, molekul, struktur a díky tomu je možné pozorovat osud těchto struktur v buňce či těle, jejich zapojení do buněčných činností a tělesných funkcí organismu



# Nobelova cena za chemii 2008

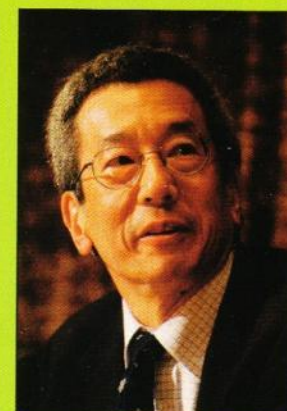
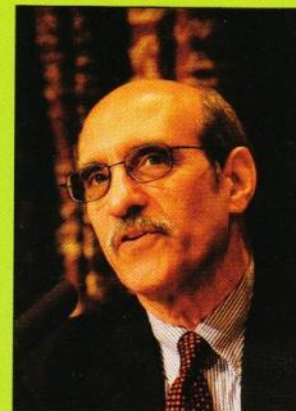
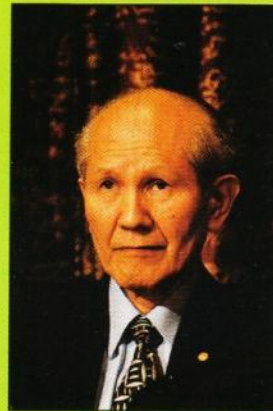
V souvislosti s objevením a využitím  
**GFP**

**O. Shimomura** – objev proteinu u medúzy

**M. Chalfie** – detekce genu, genové manipulace, využití proteinu jako markeru („značkovače“) v genetických výzkumech

**R.Y. Tsien** – vylepšení proteinu a rozšíření škály (drobnými úpravami vytvořil celou barevnou škálu značkovacích fluorescenčních proteinů)

Zdroj: Doc. Jan Černý: Zelený fluorescenční protein, Vesmír 4/2009



**OSAMU SHIMOMURA** (\*27. ŘÍJNA 1928 VE FUKUCHIYAMĚ)

Japonský organický chemik a mořský biolog. Přežil výbuch atomové bomby v Nagasaki, se svou rodinou žil 20 km od epicentra. Vystudoval místní farmaceutickou fakultu a jako první vědecké téma řešil mechanismus luminescence korýše *Vargula hilgendorffii*. Jeho práce zaujala profesora Franka Johnsona z Princetonské univerzity, jemuž se podařilo získat Shimomuru v roce 1960 do svého týmu. Zde se začal věnovat medúze *Aequorea victoria*, která skrývala velice využitelné tajemství, jehož odhalení bylo po téměř 50 letech oceněno Nobelovou cenou.

**MARTIN CHALFIE** (\*1. ÚNORA 1947 V CHICAGU)

Absolvoval biochemii na Harvardově univerzitě. Mj. je skvělý plavec. Po absolutoriu vystřídal několik dočasných zaměstnání, například prodával oblečení v rodinné firmě, a poté nastoupil na postdoktorandský pobyt do Laboratoře molekulární biologie Sydneyho Brennera v britské Cambridži, kde studoval hmatové neurony hádátka obecného (*Caenorhabditis elegans*). V roce 1982 přesídlil na Kolumbovu univerzitu v New Yorku, kde ve studiu *C. elegans* pokračoval. Jeho práce „Zelený fluorescenční protein jako marker genové exprese“ patří mezi 20 nejcitovanějších publikací z molekulární biologie a genetiky.

**ROGER YONCHIEN TSIEN** (\*1. ÚNORA 1952 V NEW YORKU)

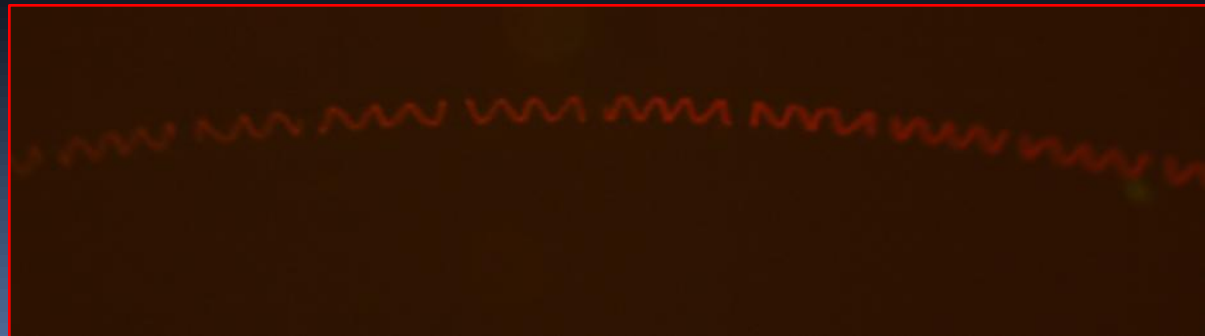
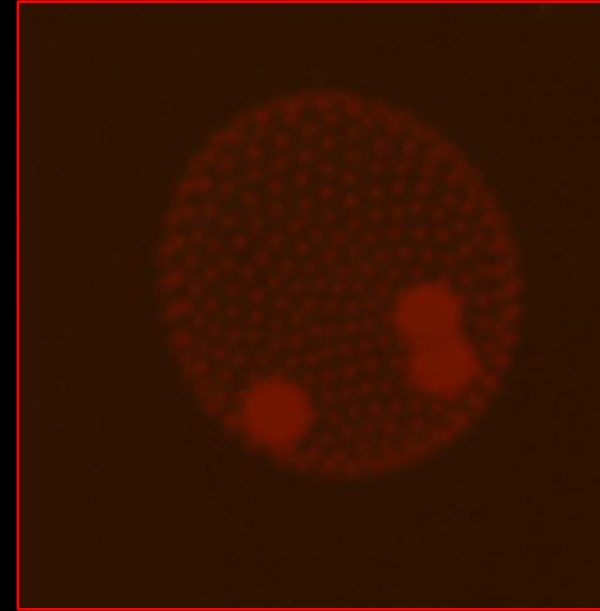
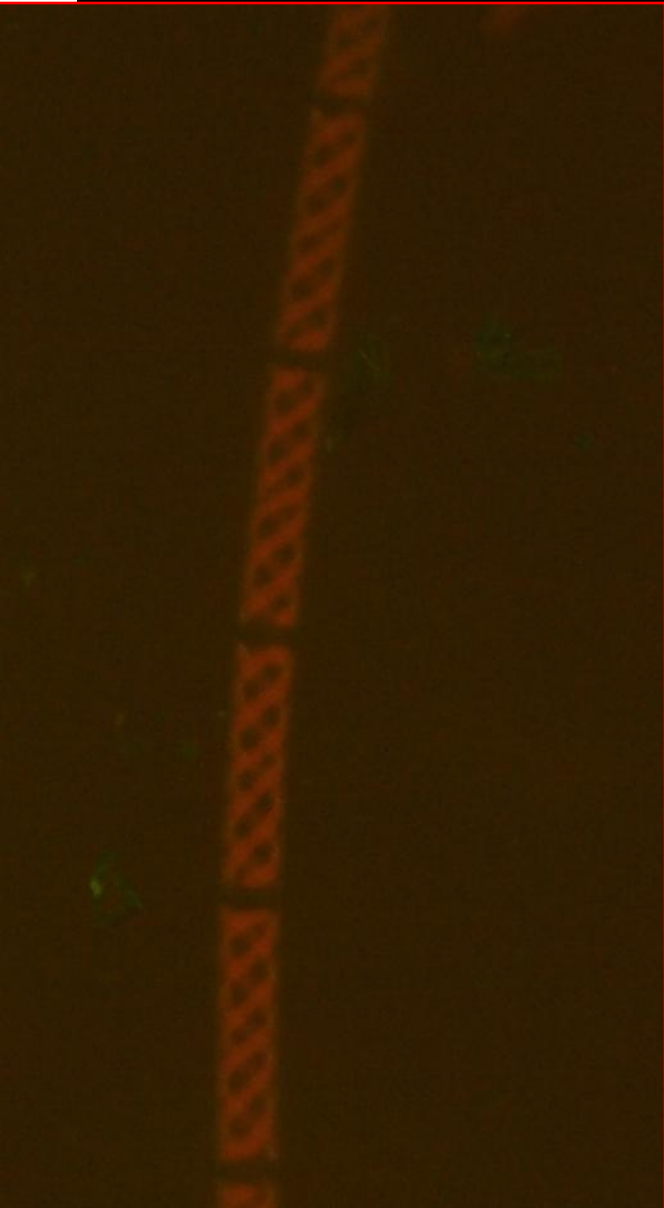
Americký biochemik, profesor na katedře chemie a biochemie Kalifornské univerzity v San Diegu. Je potomkem královské rodiny, která vládla v letech 907–960 malému pobřežnímu nezávislému království Wuyue, přesněji 34. vnukem krále Qian Liu. Pocházel z rodiny významných inženýrů, možná proto nazývá svou práci molekulárním inženýrstvím. Jako astmatické dítě trávil většinu času doma prováděním chemických experimentů. Roku 1972 absolvoval bakalářské studium na Harvardově univerzitě. Ve studiu pokračoval na Cambridžské univerzitě, kde získal Ph.D. v oboru fyziologie. Od roku 1989 působí na Kalifornské univerzitě v San Diegu.

# Naše pozorování – 4.9. – 18. 9. 2009

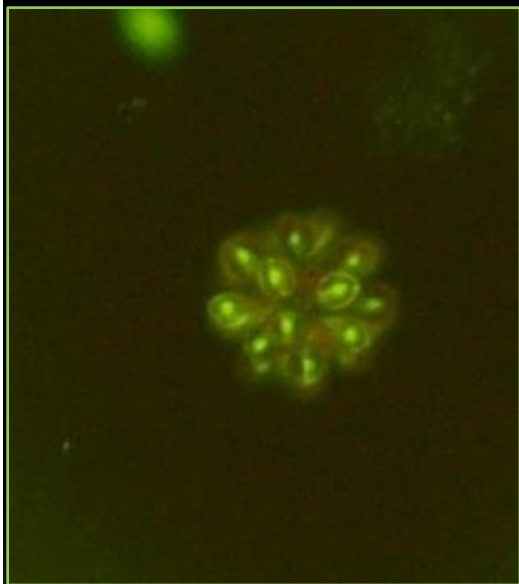




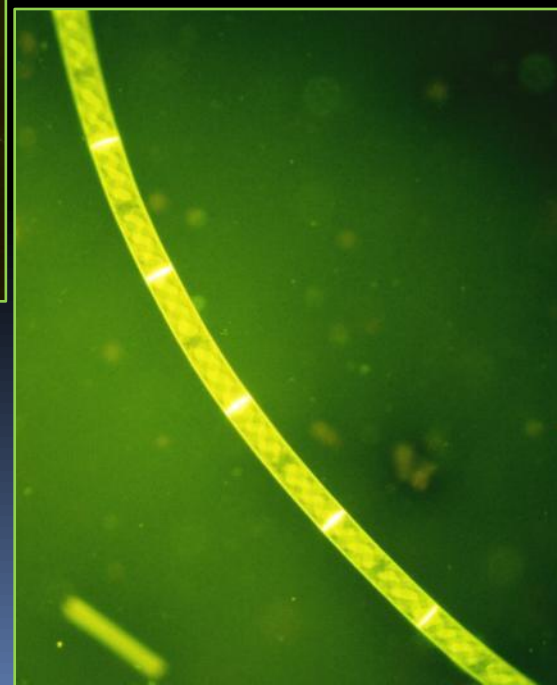
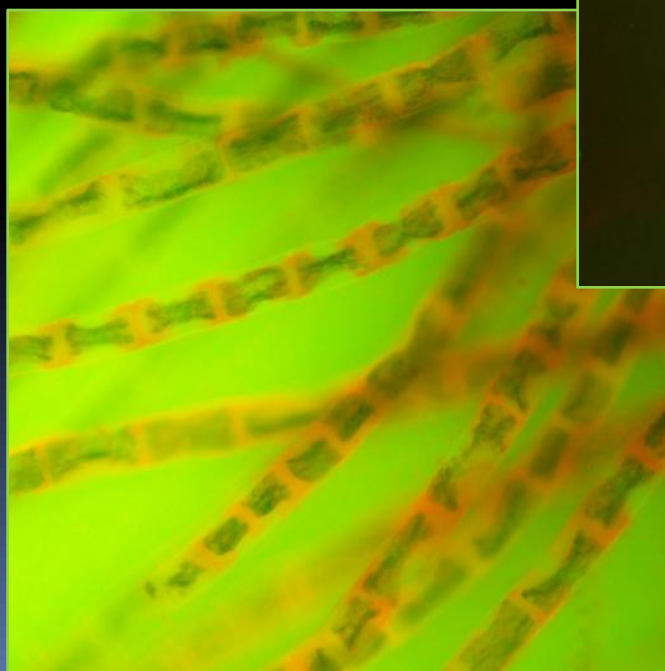
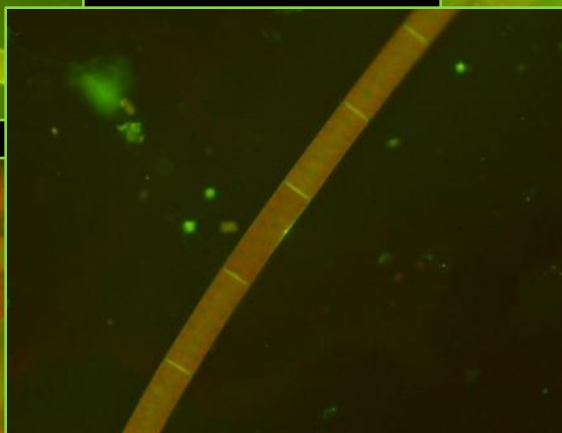
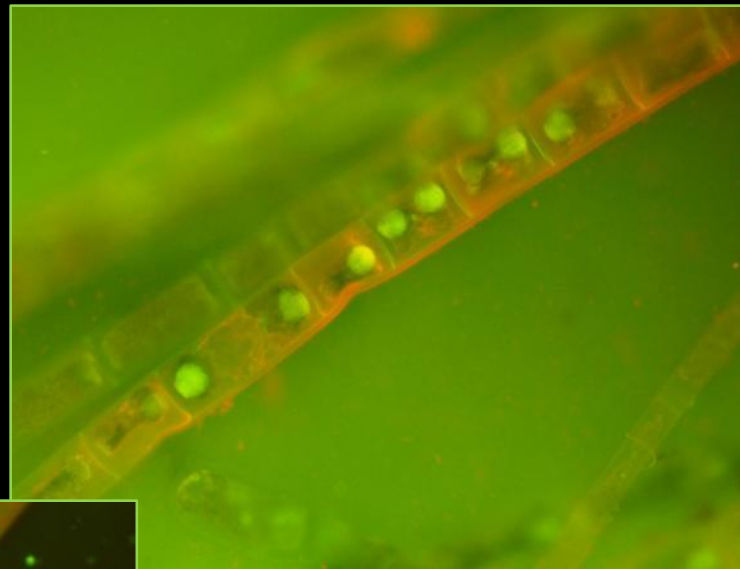
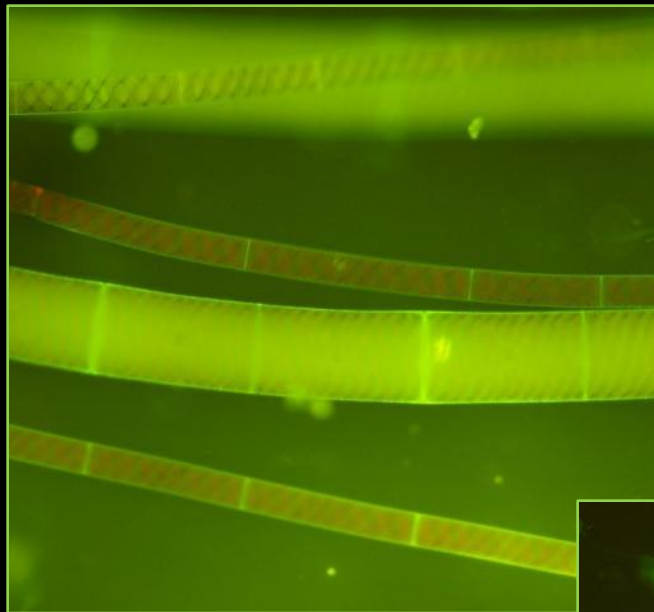
# Zelené řasy – autofluorescence



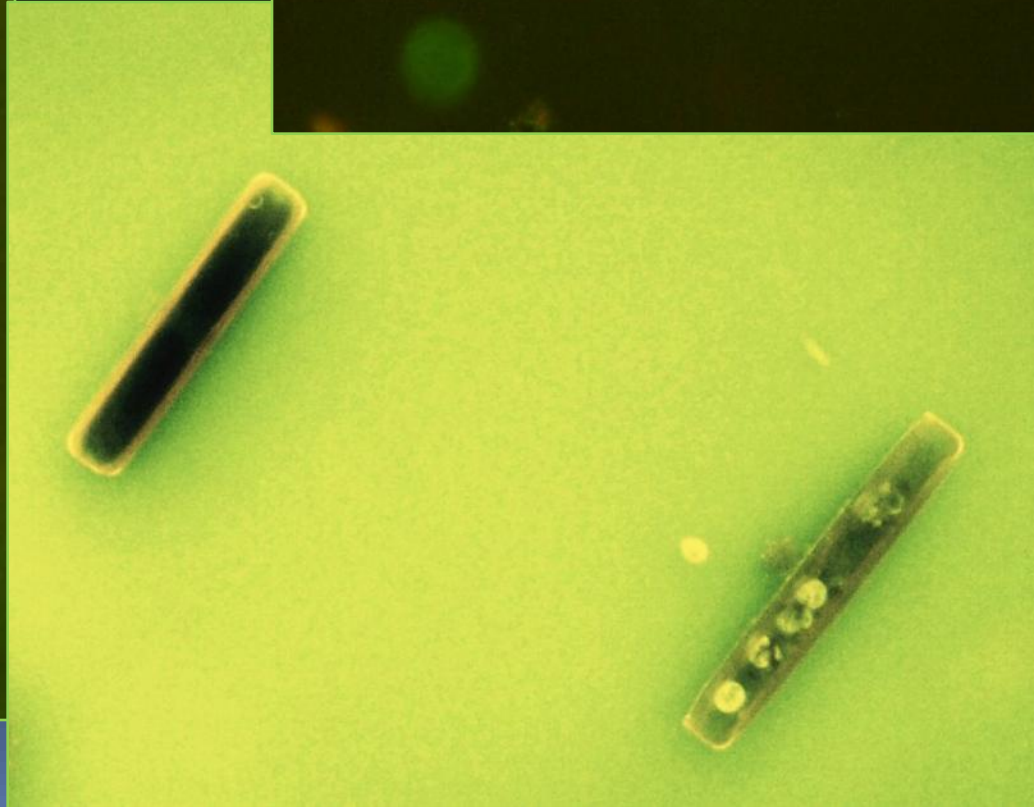
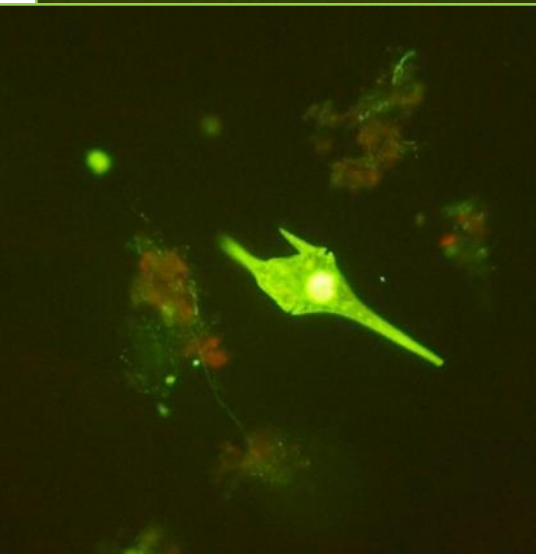
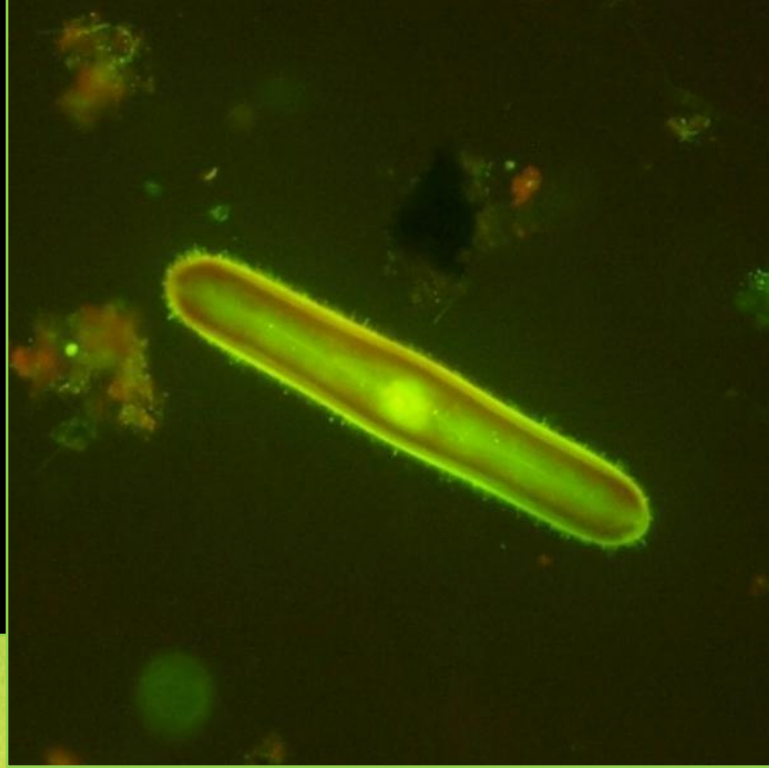
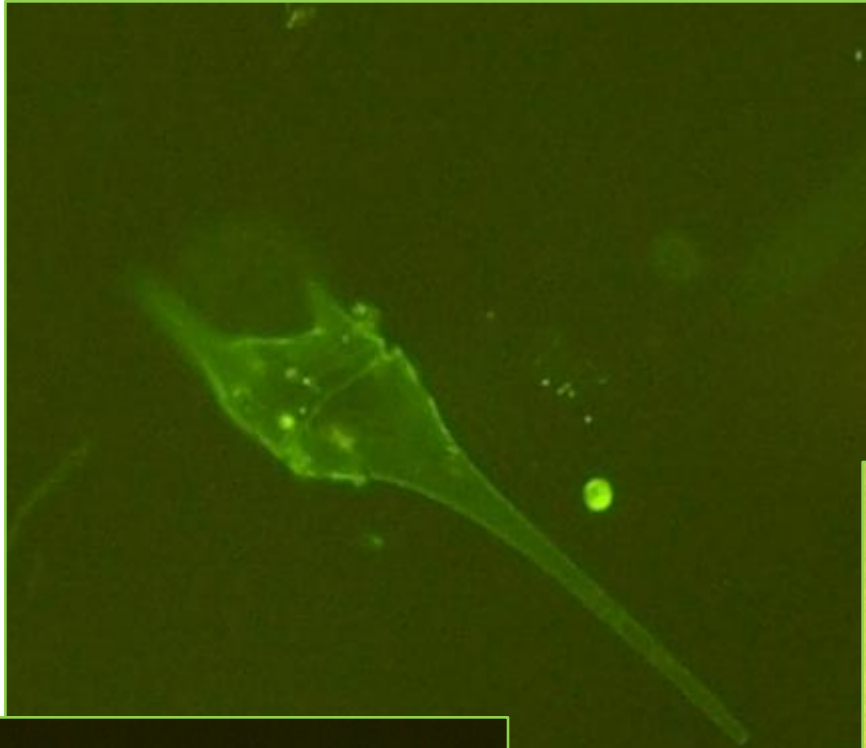
# Zelené řasy – barvení akridinová oranž



# Zelené řasy – barvení akridinová oranž

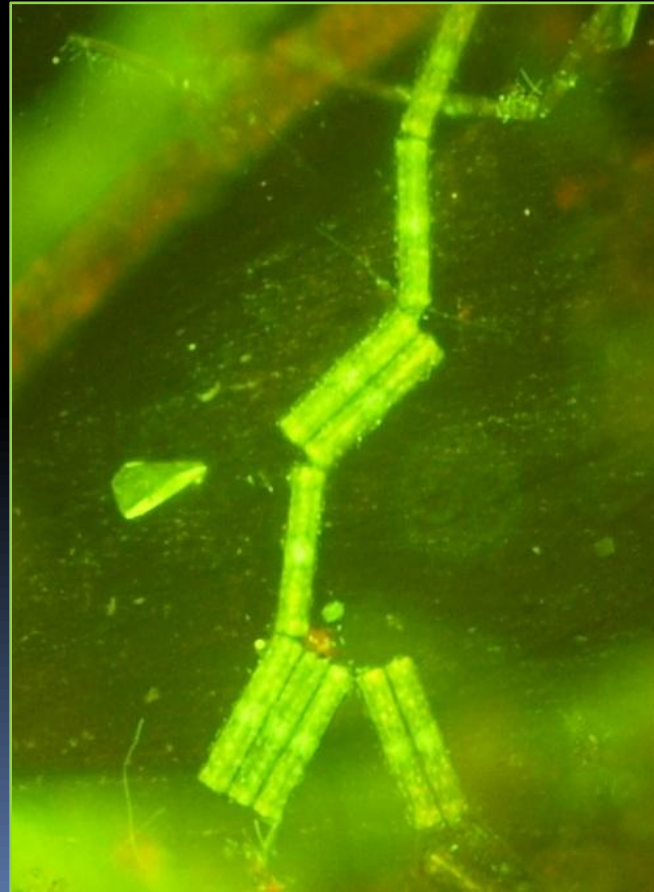
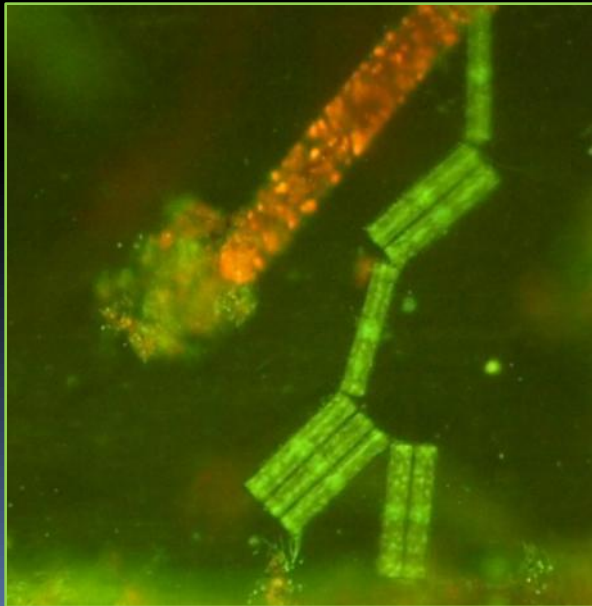
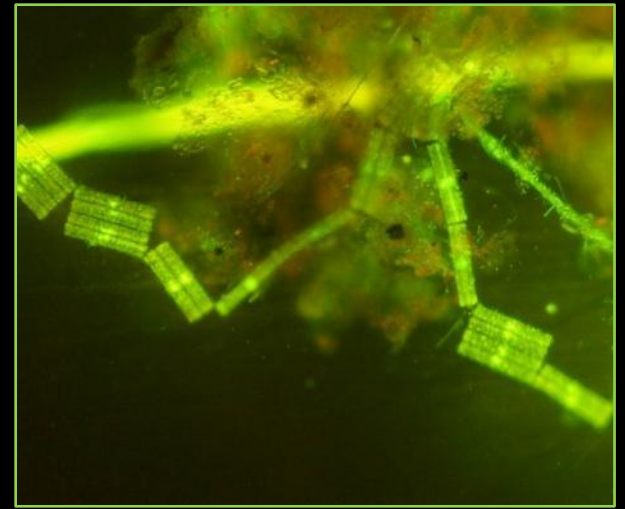
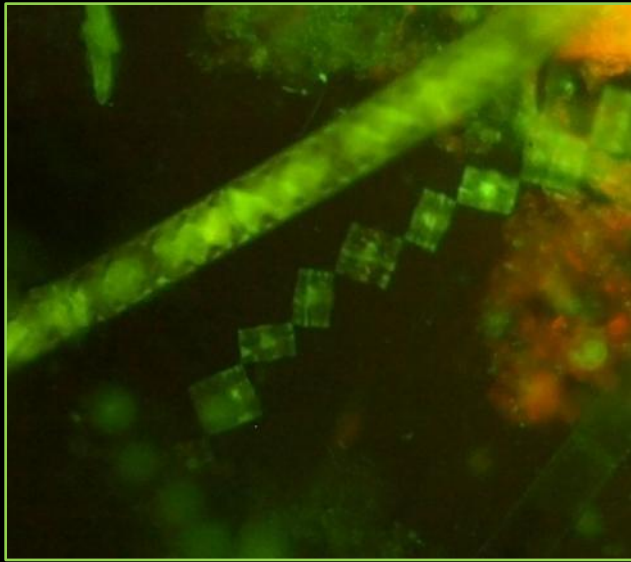


# Obrněnky, rozsivky

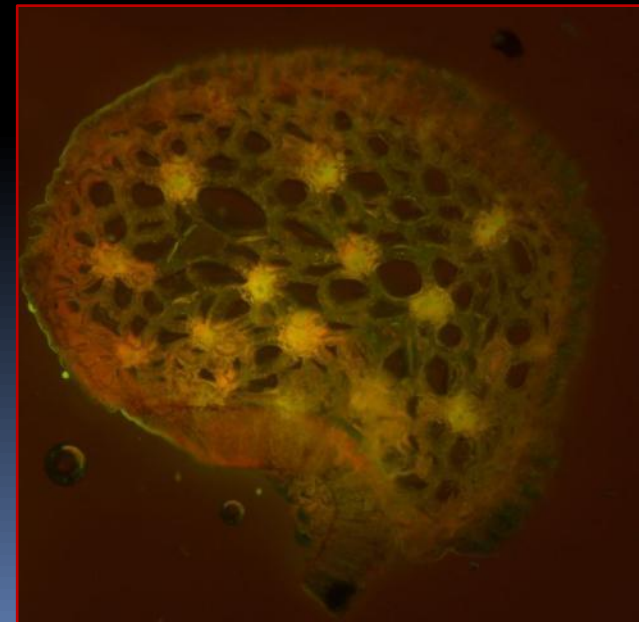
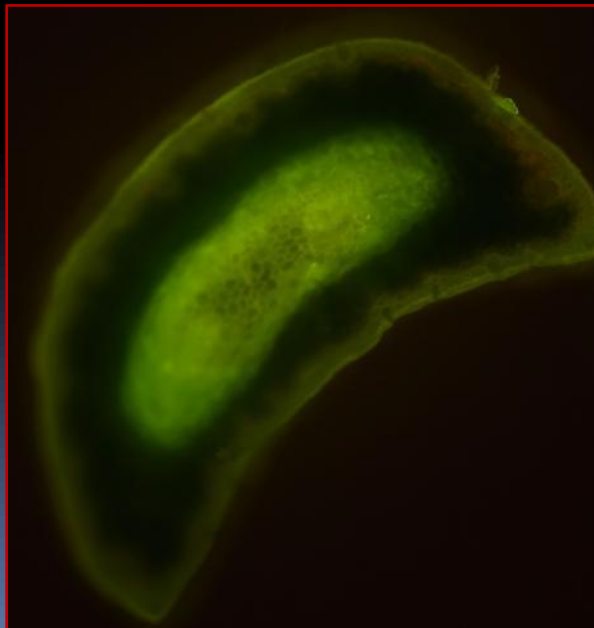
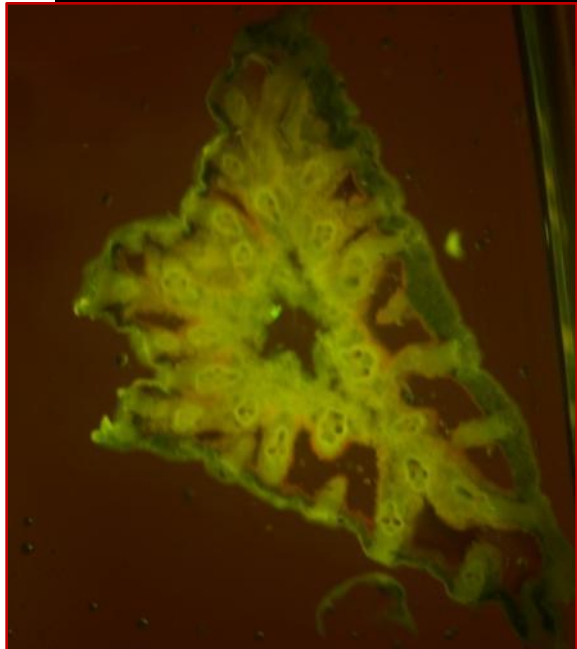
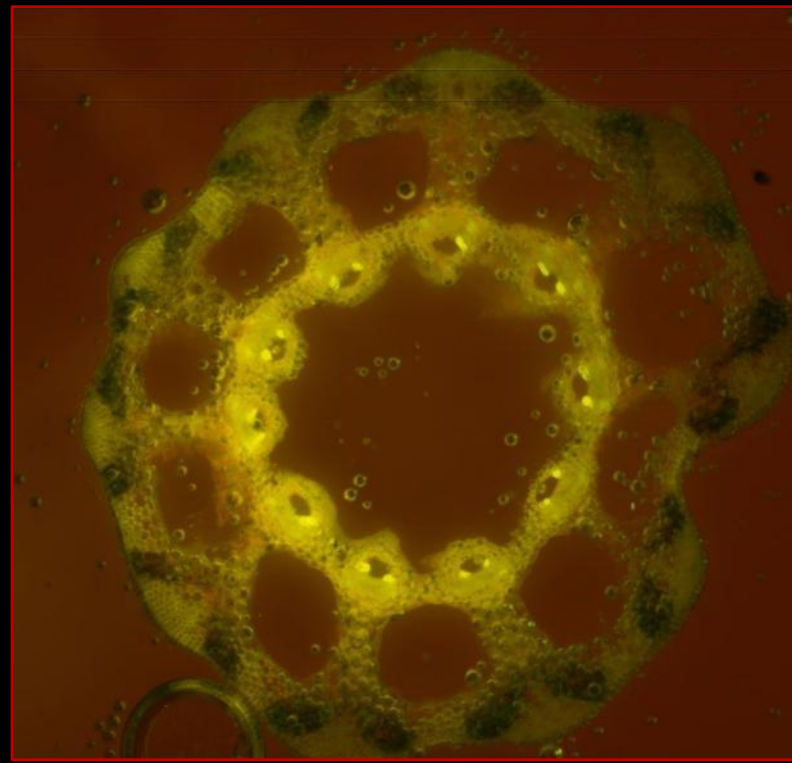
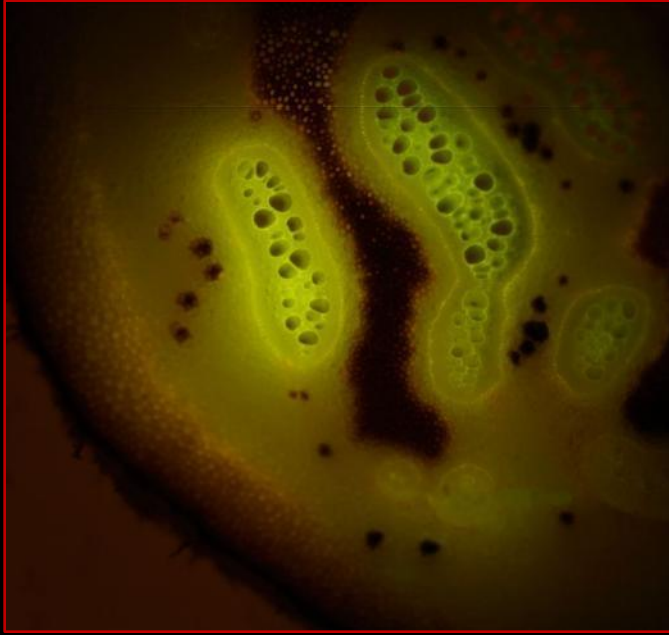




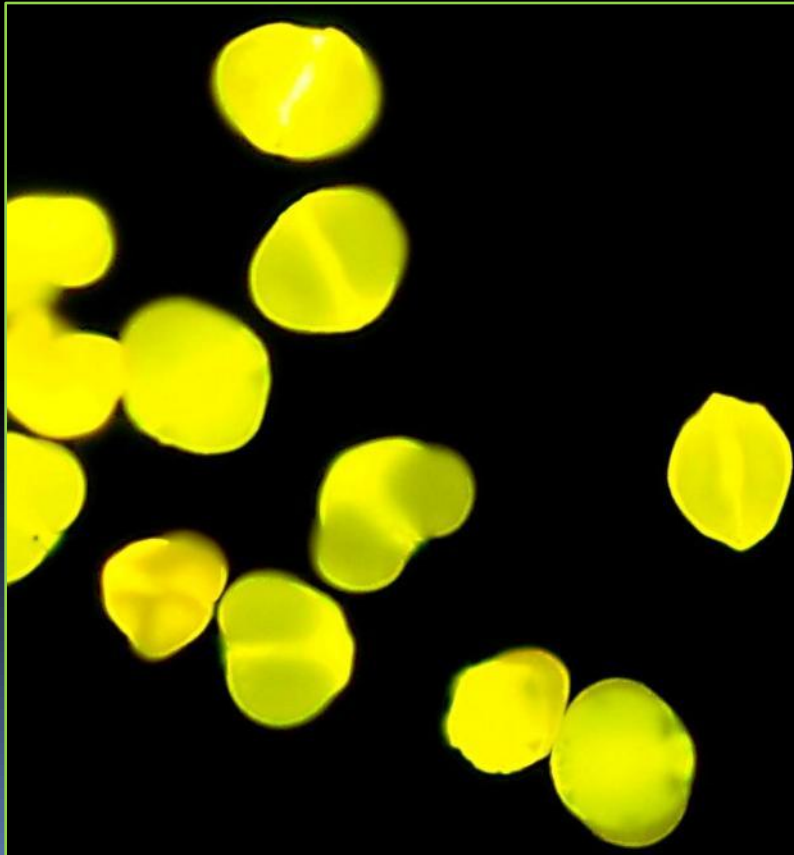
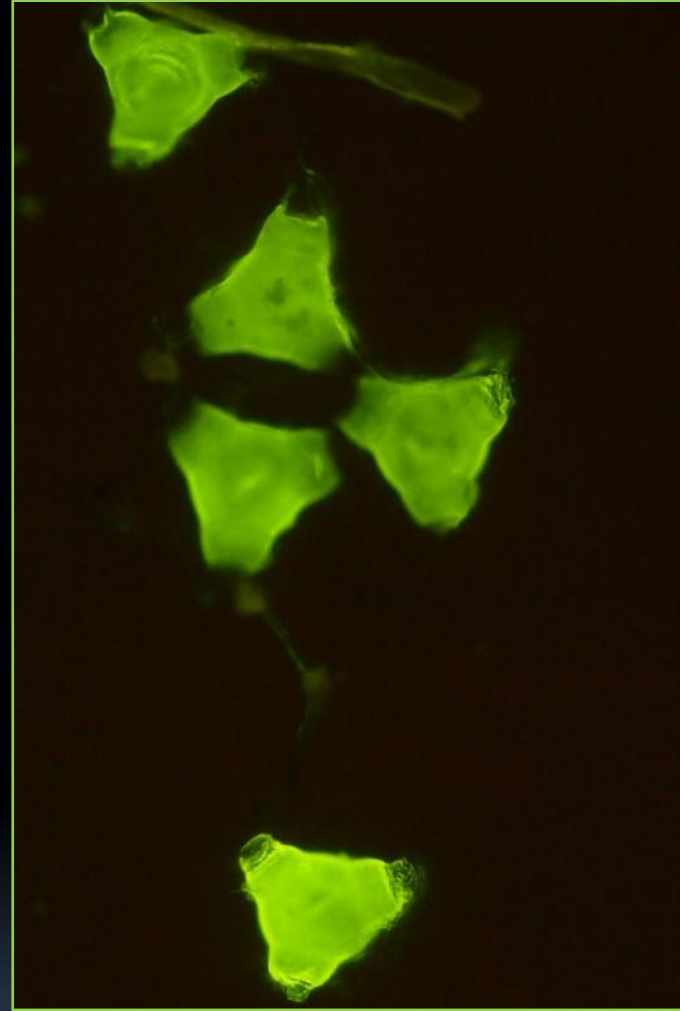
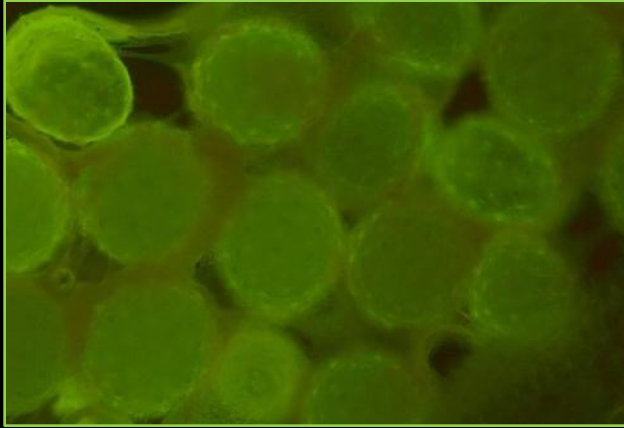
# Rozsivky



# Řezy - autofluorescence

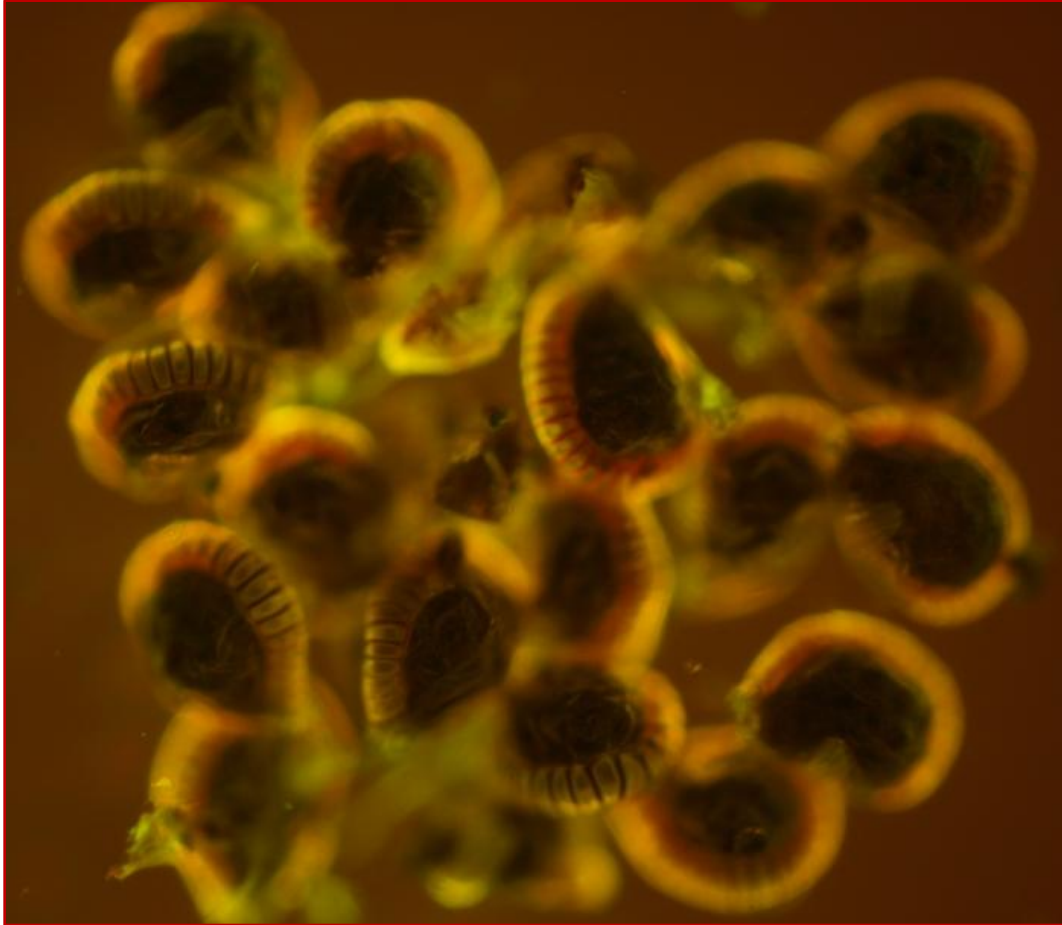


# Pylová zrna- autofluorescence



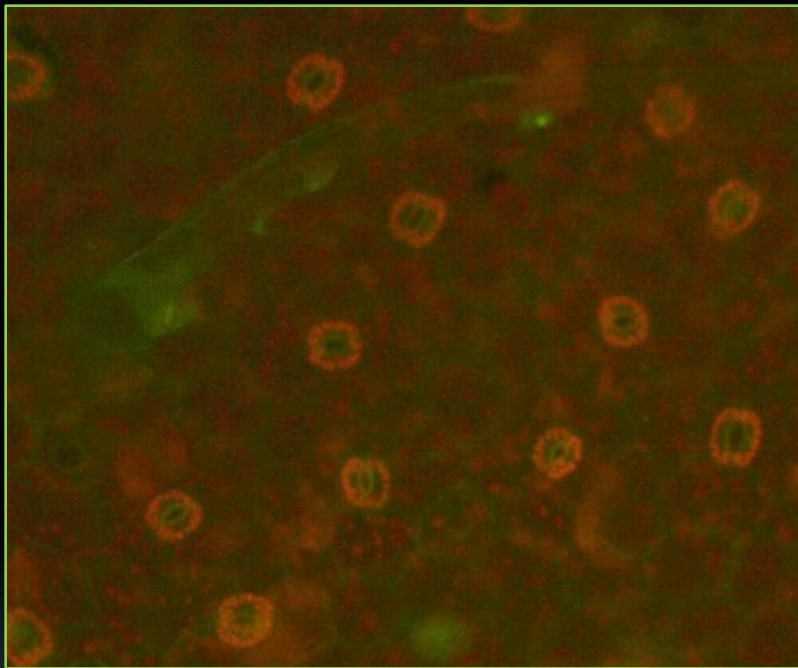


# Výtrusnice, prašník- autofluorescence





# Pokožka pelargonie; lístek mechu



# Hmyz - autofluorescence

