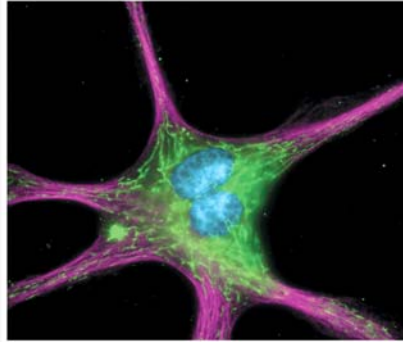


## ***Fluorescenční Mikroskopie***



**Co je to fluorescence  
Fluorescenční Mikroskopie  
Fluorescenční korelační spektroskopie**

## ***Co to je fluorescence?***

Barva = elektromagnetické záření o různé energii

⇒ barva se dá charakterizovat vlnovou délkou  $\lambda$  (veličina  
nepřímo úměrná energii)

Příklad:



fialová ~ 380 nm



modrá ~ 420 nm



zelená ~ 510 nm

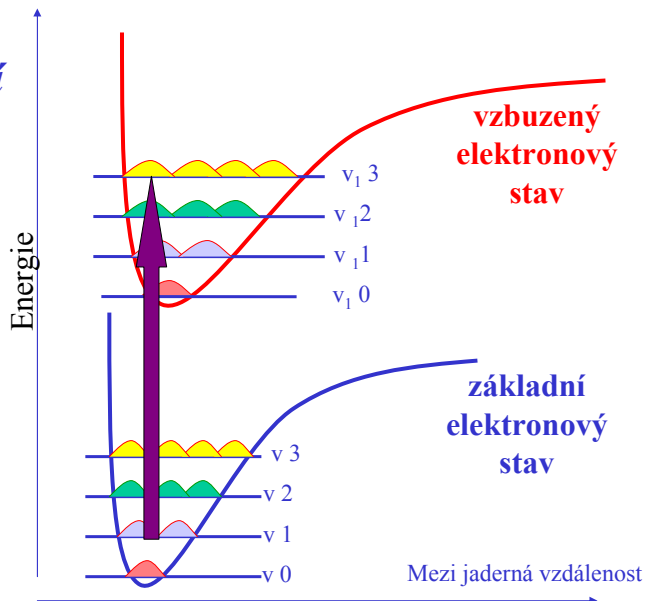


červená ~ 630 nm

## Co to je fluorescence?

### Absorpce záření

2 hlavní příspěvky:  
část energie  
využitá na  
vybuzení elektronu  
+ část na vibrační  
energii



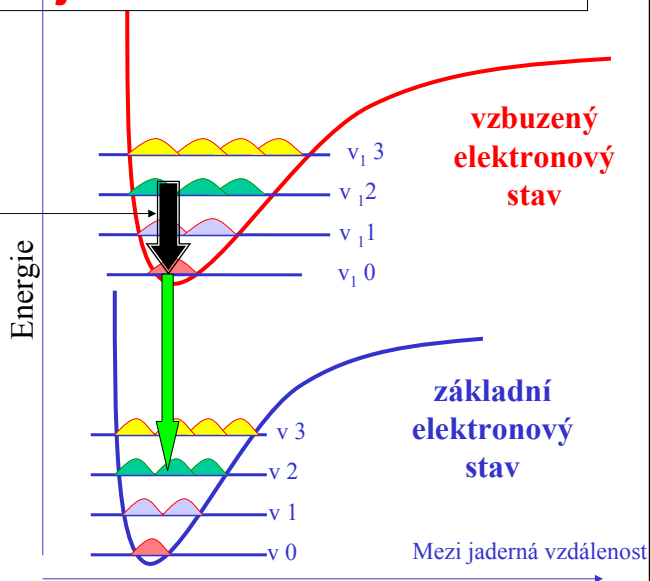
## Co to je fluorescence?

### Fluorescence

vibrační energie =  
pohlčena okolím

zbytek energie  
může být vyzářen  
jako foton =  
**fluorescence**

má však *nižší energii*  
než záření budící  
(*vyšší vlnová délka*)



## Co to je fluorescence?

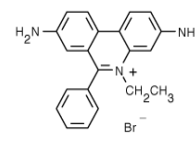
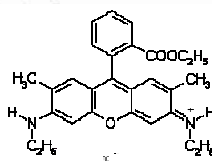
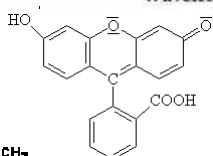
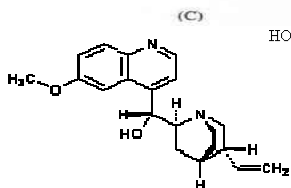
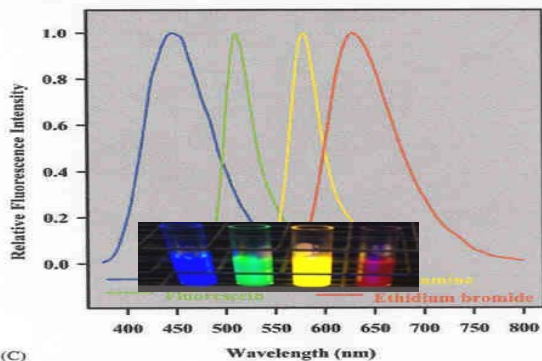
Excitační záření  
(370 nm)



410 nm  600 nm

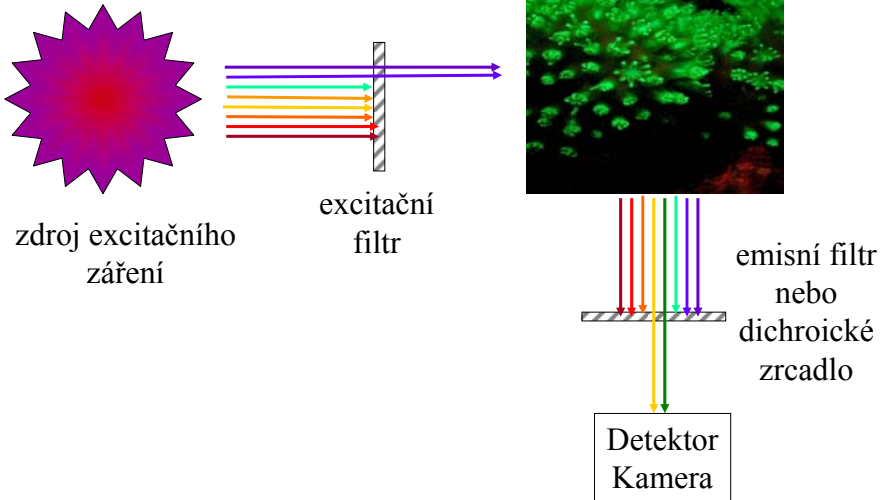
## Fluorescenční sondy (barviva)

ne všechny látky fluoreskují ve viditelné oblasti, pro fluorescenci je  
nutná přítomnost konjugovaných dvojných vazeb



## Jak měříme fluorescenci

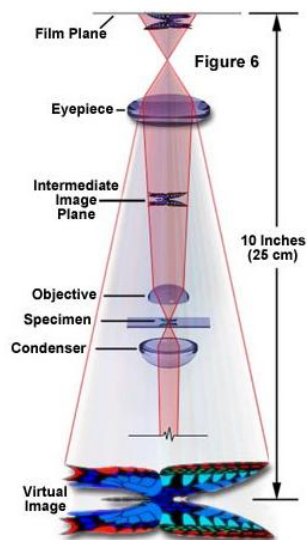
stačí oddělit budící excitační záření od emitovaného fluorescenčního záření: pomocí monochromátorů nebo optických filtrů



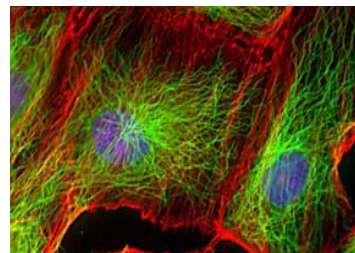
## Fluorescenční mikroskopie:

Objekt zájmu je zobrazen jako zvětšený obraz obdobným způsobem jako na klasickém mikroskopu.

Sledujeme ale fluorescenční intenzitu v každém bodě



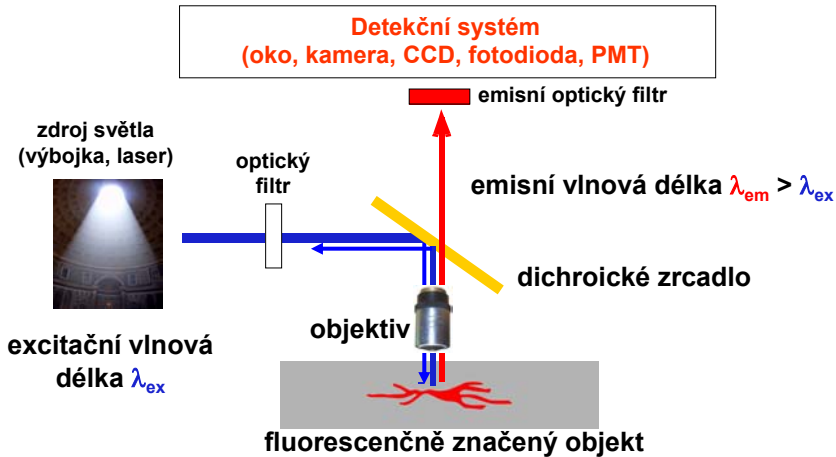
Výsledek:



## Schéma fluorescenčního mikroskopu

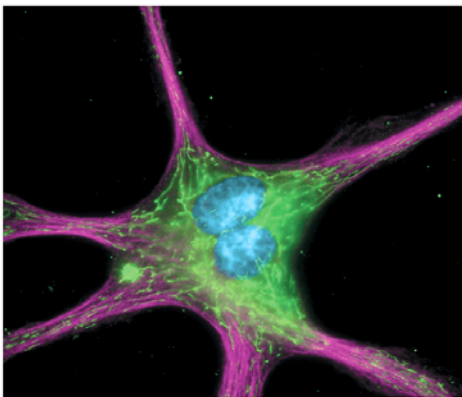
Využití posuvu vlnové délky fluorescence oproti excitaci

$$\lambda_{em} > \lambda_{ex}$$



## Proč fluorescenční mikroskopie?

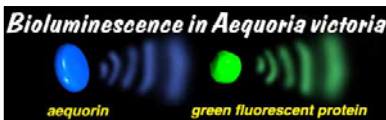
- Velmi citlivá (nanomolární koncentrace)
- Poměrně šetrná ke zkoumaným objektům – možná práce s živými organismy a buňkami
- specifická (ve viditelné oblasti emitují pouze látky obsahující chromofory) – většinou je třeba vzorek fluorescenčně označit



Příklad:

Cytoskeleton (protilátka tubulinu značená Alexou 647)  
Mitochondrie (streptavidin-Alexa488)  
Jádro (Hoechst DNA - interkalátor)

## *Fluorescenční proteiny specifické značení jednoho druhu molekul:*



Po vybuzení  
modrým světlem  
= **zelená  
fluorescence**



Proteiny: obecně  
nevykazují  
fluorescenci

Vyjimka je GFP =  
protein izolovaný z  
meduzy

## *Využití fluorescenčních proteinů:*

známe genovou sekvenci pro GFP => můžeme ho  
vložit do genetické výbavy jakéholiv organismu:

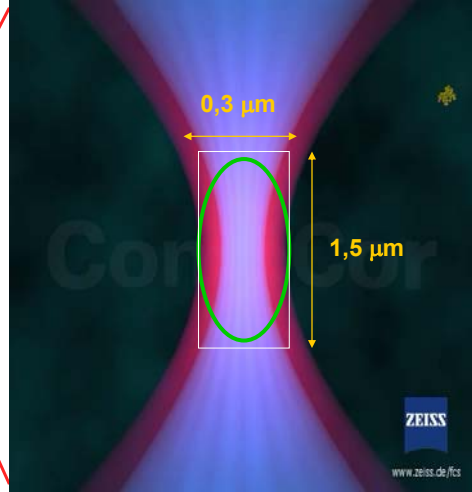
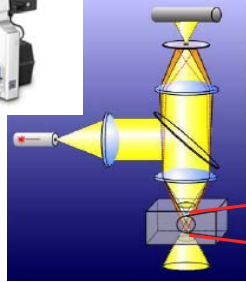


můžeme vložit genovou sekvenci GFP do genové sekvence  
jiného proteinu → můžeme pomocí fluorescence sledovat  
selektivně *pouze jeden druh* proteinu v celém organismu!!!!

## Fluorescenční korelační spektroskopie

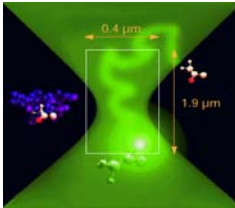


- konfokální mikroskop s vysoce zaostřeným laserovým paprskem

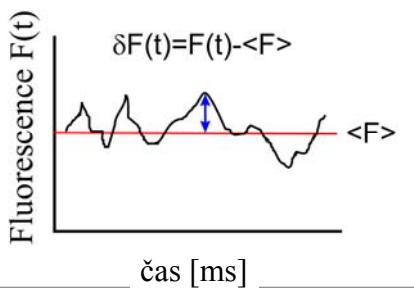


## Fluorescenční korelační spektroskopie:

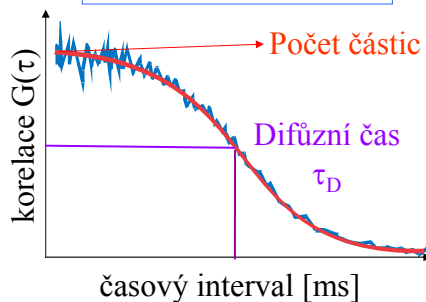
- metoda, která umožňuje získat informace o *pohyblivosti molekul*



- průměrně pouze jedna molekula v ozářeném objemu
- analýzou fluktuací fluorescenčního signálu v čase mohou zjistit, jak dlouho se molekula zdrží v ozářeném objemu

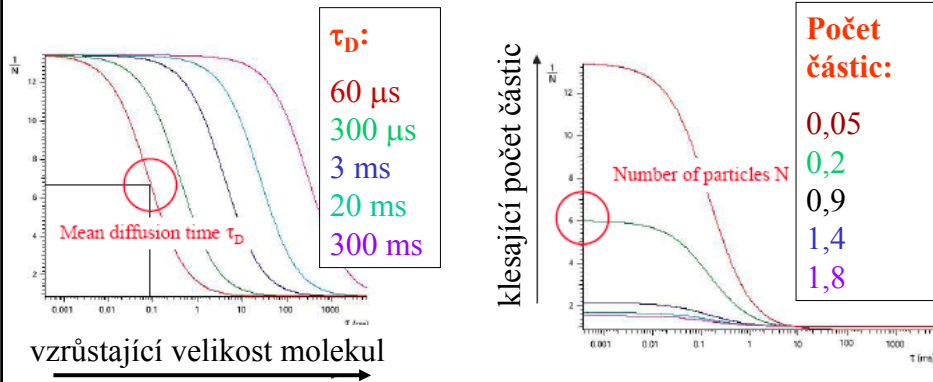


### Autokorelační křivka



## *Fluorescenční korelační spektroskopie:*

- informace o pohyblivosti (velikosti) molekul
- informace o počtu částic (o koncentraci)



*Děkuji moc za Vaši pozornost*

