

Ćwiczenie 12

Pokazy analizy materiału dowodowego przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego.



I. Cel ćwiczenia

Zapoznanie się z budową i zasadą działania mikroskopu fluorescencyjnego.

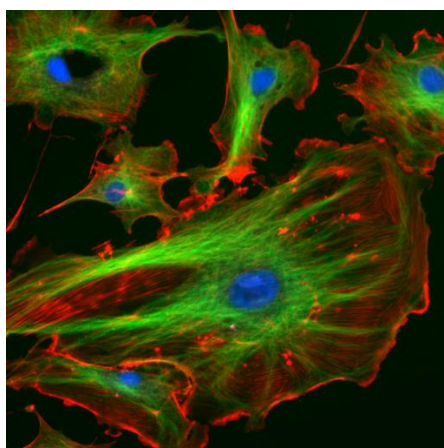
II. Wstęp teoretyczny

Mikroskop fluorescencyjny to mikroskop świetlny, którego działanie oparte jest na zjawisku fluorescencji (*fluorescencja - rodzaj fotoluminescencji, polegający na emisji fotonu wskutek powrotu cząsteczki z singletowego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, patrz instrukcja nr 9*). Fluorofory zawarte w analizowanych próbkach mogą być pochodzenia naturalnego (np. celuloza, chlorofil), jak również mogą być sztucznie wprowadzane do preparatów celem specyficznej wizualizacji określonych struktur sub-komórkowych lub niektórych procesów fizjologicznych. W tym drugim przypadku, wykorzystuje się m.in.:

- fluorofory wykazujące powinowactwo do określonych organelli
- fluorofory, których właściwości fluorescencyjne zależą od parametrów mikrośrodowiska, np.: pH lub stężenia jonów wapnia
- fluorofory sprzężone z substancjami wykazującymi specyficzne powinowactwo do określonych białek
- fluorofory związane z przeciwciałami, które bezpośrednio lub pośrednio wiążą się z określonymi antygenami;
- białka fluorescencyjne;
- fluorofory zdolne do przenikania przez błony komórkowe obrazujące komunikację międzykomórkową.

Przykładowymi fluoroforami używanymi w mikroskopii fluorescencyjnej są: Acridine Orange, DAPI, Fluoresceine, Rhodamine 123, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 488, Texas Red, DiOC, Błękit aniliny.

Uzyskiwany w mikroskopie fluorescencyjnym jest niejako negatywem obrazu z typowego mikroskopu świetlnego: na ciemnym tle uwidaczniają się świecące (fluoryzujące) struktury komórkowe i tkankowe.



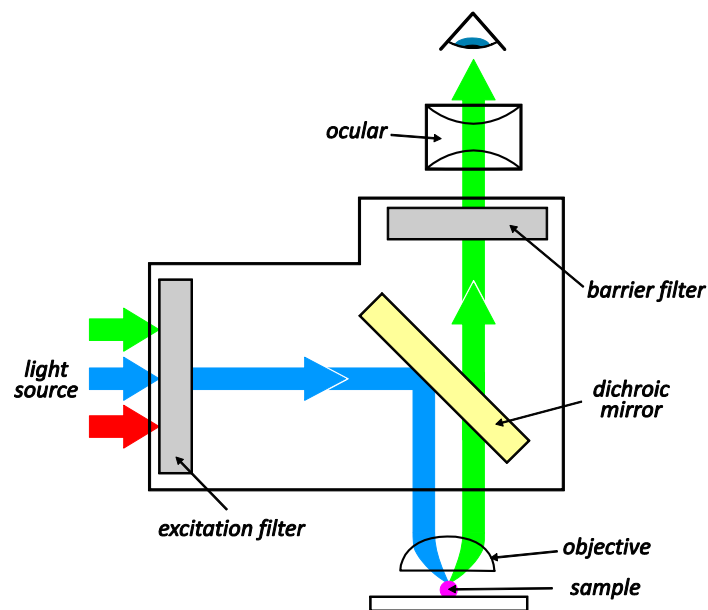
Zdjęcie 1.

Źródło: Endothelial cells under the fluorescence microscope. (Nuclei are stained blue with DAPI, microtubules are marked green by an antibody bound to FITC and actin filaments are labeled red with phalloidin bound to TRITC. Bovine pulmonary artery endothelial (BPAE) cells. Photo: (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:FluorescentCells.jpg>)

W metodzie tej oświetla się preparat np.: od strony obiektywu światłem o długości fali wywołującej fluorescencję barwnika, a obserwuje preparat przy długości fali odpowiadającej silnej fluorescencji. Jako źródło światła w mikroskopach fluorescencyjnych używa się wysokociśnieniowych lamp rtęciowych, ksenonowych, lamp halogenowych oraz światła laserowego. Do ochrony przed przegrzewaniem mikroskopu i preparatów stosuje się filtry ciepłne, które pochłaniają promieniowanie czerwone i podczerwone. Ponieważ lampy np.: ksenonowa mają ciągłe widmo emisji świetlnej w budowie mikroskopu znajdują się również filtry „wzbudzające” tzn. przepuszczające tylko taką długość fali jaka jest potrzebna do wzbudzenia fluorescencji w badanym preparacie. Należy również pamiętać, że badania w UV wymagają użycia optyki kwarcowej na drodze światła wzbudzającego. Zwyczajne szkło silnie pochłania nadfiolet i nie nadaje się do tego celu. Ważne jest również zjawisko autofluorescencji. Niektóre składniki samych komórek wzbudzone światłem o określonej długości fali emitują światło widzialne (chlorofil, lignina). Gdy to zjawisko przeszkadza w określonej obserwacji stosuje się tzw. wygaszacze (np.: błękit toluidyny) i wygasza niepotrzebną fluorescencję. Autofluorescencja może zmieniać się z pH środowiska lub zastosowanej długości światła wzbudzającego co dodatkowo może utrudnić pomiar. Zdarzają

się również fluorofory rozpadające się pod wpływem naświetlania (np.: flavin mononucleotide), dlatego preparaty do analizy zazwyczaj przechowuje się w ciemności, w niskiej temperaturze lub stosuje się specjalne bufony czy środki zamykające.

We współczesnych mikroskopach fluorescencyjnych najczęściej światło wzbudzające kierowane jest na preparat poprzez obiektyw. Światło emitowane z preparatu zbierane jest przez obiektyw i po przejściu przez zestaw filtrów kierowane jest do okularu. Obserwacje można prowadzić oświetlając preparat od dołu (oświetlenie typu dia) lub od góry przez obiektyw (oświetlenie typu epi)



Źródło: A. Kałużny, *Mikroskopia fluorescencyjna w badaniach struktury i funkcji komórek*, Kraków, 2011, zmienione

Rysunek 2.

III. Literatura

1. J.A.Litwin, M. Gajda, „Podstawy technik mikroskopowych”, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, 2011.
2. I. Sołtyszewski, P. Polak – „Badania kryminalistyczne”, Wyd. UMW. Olsztyn, 2007.
3. M. Pluta, *Mikroskopia optyczna*, PWN, Warszawa, 1980.
4. E. U. Kurczyńska, D. Borowska-Wykręt, *Mikroskopia świetlna w badaniach komórki roślinnej*, PWN, 2007.
5. M. Wędzony, *Mikroskopia fluorescencyjna dla botaników*, Kraków, 1996.
6. P. Schville and E. Haustein, *Fluorescence correlation spectroscopy, an introduction to its concepts and applications*, Biophysics Textbook Online (BTOL), 1–33, 2004.
7. A. Kałużny, *Mikroskopia fluorescencyjna w badaniach struktury i funkcji komórek*, Kraków, 2011.
8. J. Dobrucki, *Skaningowa, fluorescencyjna mikroskopia konfokalna*. *Mikrobiologia Medycyna*, 34-38, 1996
9. <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/>
10. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/>
11. <https://www.microscopyu.com/digital-imaging>

IV. Zagadnienia do opracowania

1. Natura promieniowania elektromagnetycznego – światło.
2. Zjawisko fluorescencji barwników.
3. Optyka geometryczna:
 - prawo odbicia i załamania światła;
 - odwzorowanie przez soczewkę cienką: bieg promieni, powiększenie, położenie obrazu;
 - aberracje (wady) soczewek.
4. Optyka falowa:
 - dyfrakcja światła.
5. Układ optyczny oka.

6. Budowa i zasada działania mikroskopu fluorescencyjnego (Proszę zwrócić uwagę na rodzaje i parametry obiektywów: immersja, powiększenie, apertura numeryczna, odległość robocza).
7. Zdolność rozdzielcza układów optycznych. Kryterium Rayleigha rozdzielczości dwupunktowej.
8. Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie fluorescencyjnym.

V. Zestaw przyrządów.

1. Mikroskop fluorescencyjny Olympus IX73, zestaw komputerowy.
2. Próbkki, materiał dowodowy.

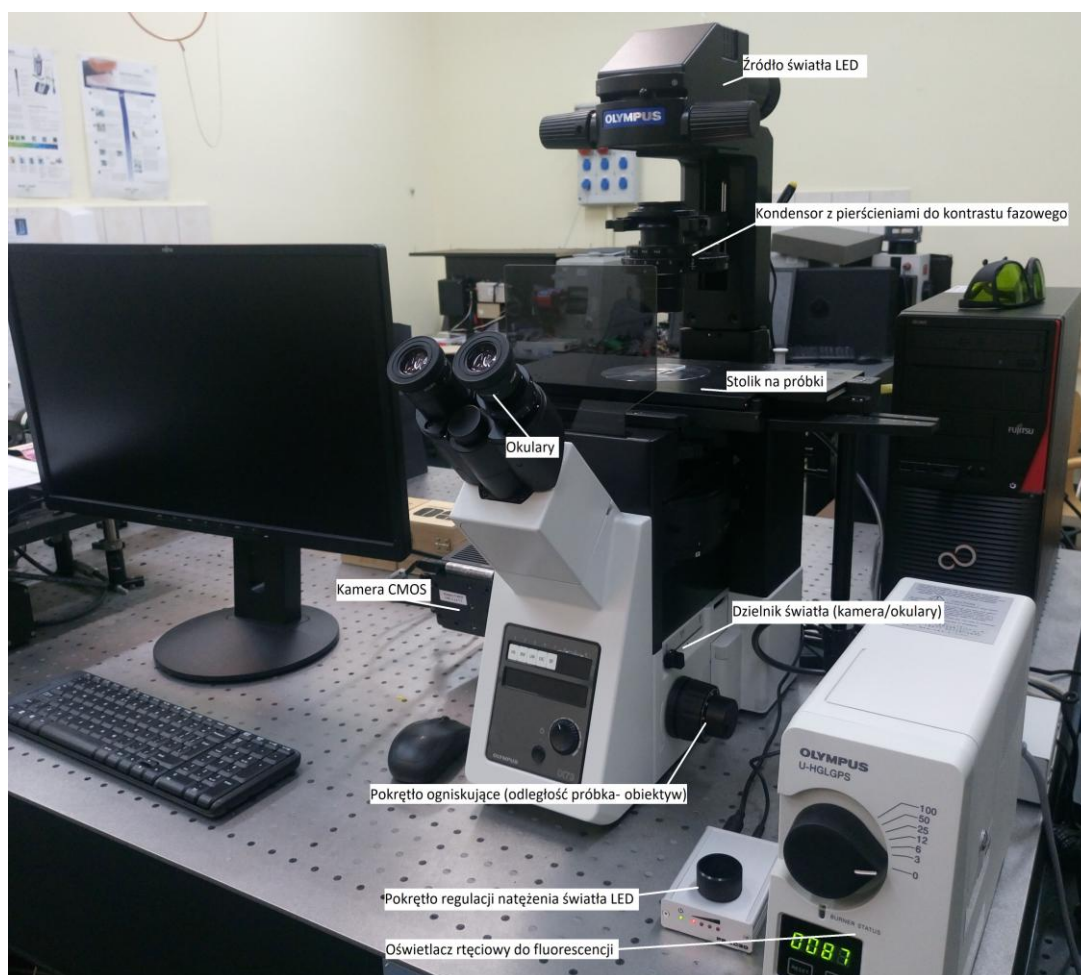
VI. Wykonanie doświadczenia i opracowanie wyników

1. Zapoznaj się z działaniem mikroskopu optycznego Olympus IX73 razem z prowadzącym zajęcia.
2. Wykonaj zdjęcia próbek wybranych przez prowadzących zajęcia.
3. Przeanalizuj otrzymane wyniki zgodnie z sugestiami prowadzącego.

Dodatek B

Instrukcja obsługi stanowiska z mikroskopem fluorescencyjnym

Mikroskop Olympus IX73 jest odwróconym mikroskopem świetlnym. Baza mikroskopu to jego główna część, do której dołączane są wszystkie inne istotne elementy takie jak okular, obiektywy, przysłony czy filtry. Słowo „odwrócony” oznacza że obiektywy skierowane do góry. Mikroskop jest przystosowany do obserwacji w trybach światła przechodzącego oraz odbitego (**w tym fluorescencja i kontrast fazowy**). Budowa mikroskopu:

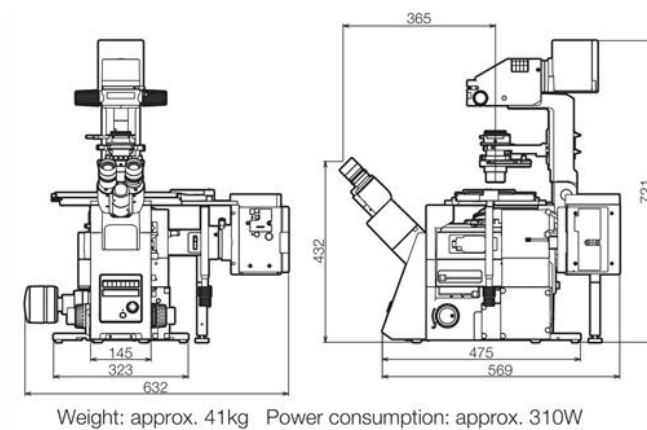


Zdjęcie 3.

Parametry techniczne



Zdjęcie 4.



Rysunek 5.

Obiektywy:



Zdjęcie 6.

Obiektywy zamocowane są na obrotowej kodowanej karuzeli.

1. Obiektyw Fluorytowy Universal Plan Fluorite 10x, przystosowany do obserwacji metodą kontrastu fazowego, Odległość czołowa 10mm, apertura numeryczna 0.3
2. Obiektyw Fluorytowy przystosowany do obserwacji metodą kontrastu fazowego , apertura numeryczna 0.7, wyposażony w pokrętkę regulacji grubości szkiełka nakrywkowego 0 – 1.6mm
3. Obiektyw Apochromatyczny, 60x typu Plan Apochromat ,odległość robocza=0.15mm, obiektyw imersyjny (olejowy).

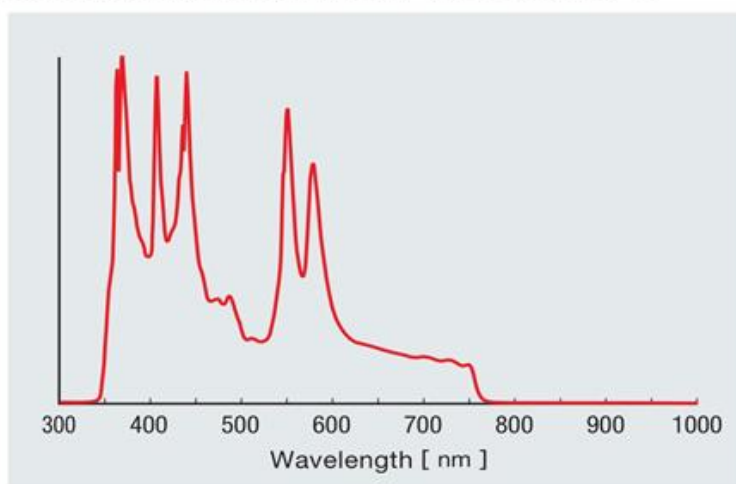


Zdjęcie 7.

Źródła światła (załącznik 1):

1. LED 30W (do obserwacji w trybie światła przechodzącego (kontrast fazowy i jasne pole).
2. Palnik rtęciowy 130 W o czasie pracy palnika 2000 h. Światło doprowadzone jest do bazy mikroskopu za pośrednictwem światłowodu o zakresie transmisji 340-800nm. Natężenie oświetlenia regulowane 7 – pozycyjnym pokrętkiem).

Spectral characteristics of the U-HGLGPS



Wykres 8.

Kamera CMOS Hamamatsu Orca Flash 4.0 V3, monochromatyczna z podwyższoną wydajnością kwantową (82% peak QE: @560 nm), o rozdzielczości 4Mpix, chłodzona ogniwami Peltiera, rozdzielczość bitowa: 16 Bit. (więcej w załączniku nr 2).



Zdjęcie 9.

Filtry Fluorescencyjne

Kostki filtrowe określają warunki wzbudzenia oraz obserwacji fluorescencji. Kostka składa się z 2 filtrów (wzbudzający i emisyjny) oraz z lustra dichroicznego.

Mikroskop IX73 wyposażony jest w 3 kostki:

Tabela 1.

#	Nazwa handlowa	Wzbudzenie [nm]	Dichroic [nm]	Obserwacja [nm]
1	U-FWU	340-390	410	420
2	U-FVN	400-410	455	460
3	U-FBW	460-495	505	510

Podziękowania: Mikroskop fluorescencyjny Olympus IX73 został zakupiony w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2015/17/B/ST5/03143 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki