

Методы современной микроскопии

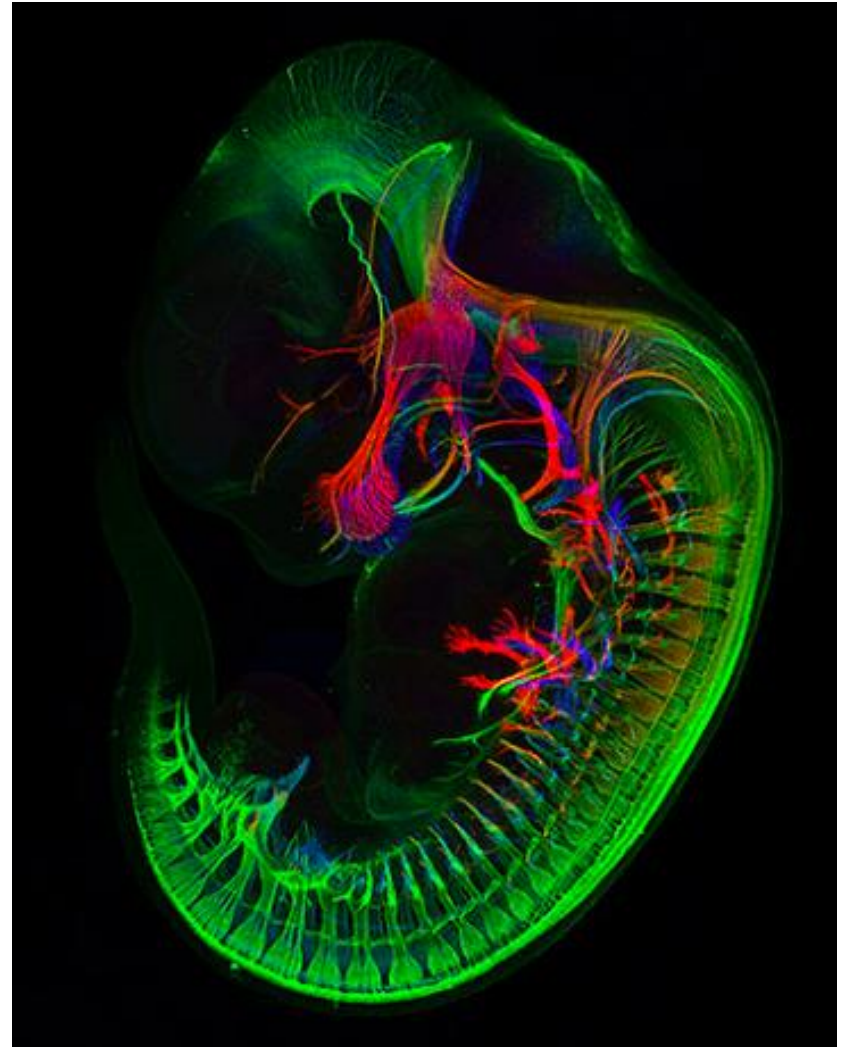
Лекция 4:

Флуоресцентная микроскопия.
Особенности, подготовка образцов

Масгутова Галина Андреевна

Флуоресцентная микроскопия

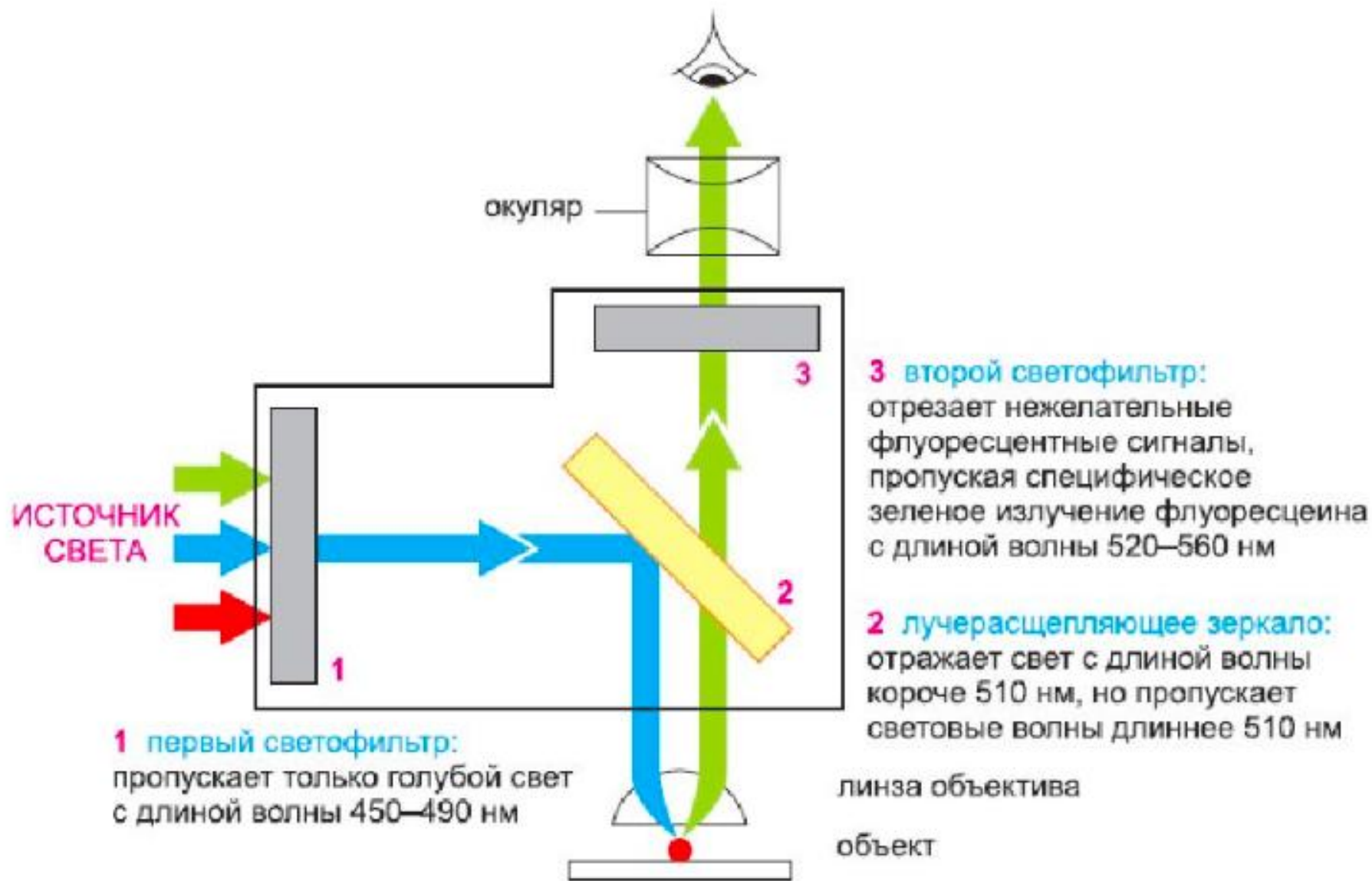
Флуоресцентная микроскопия представляет собой метод анализа различных биологических объектов за счет их способности излучать при облучении светом. Данное явление называется флуоресценцией, т.е. молекулы биологических образцов способны поглощать кванты возбуждающего излучения и переходить в электронно-возбужденное состояние (верхние энергетические уровни), а затем снова возвращаться в основное состояние (нижний энергетический уровень).



Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия. Явления флюоресценции заключаются в том, что атомы и молекулы ряда веществ, поглощая коротковолновые лучи, переходят в возбужденное состояние. Обратный переход из возбужденного состояния в нормальное происходит с испусканием света, но с большей длиной волны.

В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксеноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25-0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4-0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи). Длина световой волны флюоресценции всегда больше длины волны возбуждающего света, поэтому их разделяют с помощью светофильтров и изучают изображение объекта только в свете флюоресценции. Различают собственную, или первичную, и наведенную, или вторичную, флюоресценцию. Любая клетка живого организма обладает собственной флюоресценцией, однако она часто бывает чрезвычайно слабой.

Флуоресцентная микроскопия



аспекты, негативно влияющие на результаты измерений:

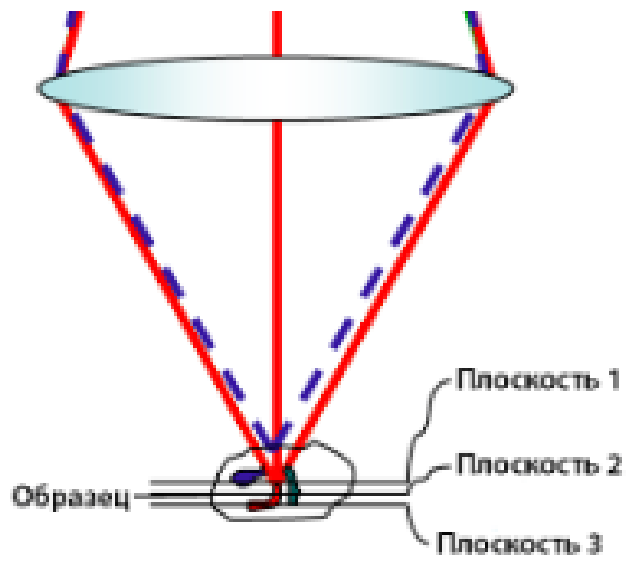


при использовании обычных оптических флуоресцентных микроскопов при исследовании достаточно «толстых» образцов помимо излучения от точки, находящейся в фокусе, приемник/оптическая система будет регистрировать и фоновое излучение от областей, находящихся вне фокальной плоскости объектива



биологический материал, как правило, сам по себе флуоресцирует крайне слабо

Данная проблема дала толчок развитию конфокальной флуоресцентной микроскопии и использованию специальных вспомогательных веществ (флюорофоры), отличающихся сильной флуоресценцией при облучении их светом. Таким образом, появилась возможность отсекалть фоновое излучение с помощью специальных диафрагм (пинхол), используемых в конфокальных микроскопах и получать специфически контрастную окраску и делать снимки с высоким разрешением многих внутриклеточных белковых структур.



Изображение плоскости 2, полученное с помощью обычного микроскопа

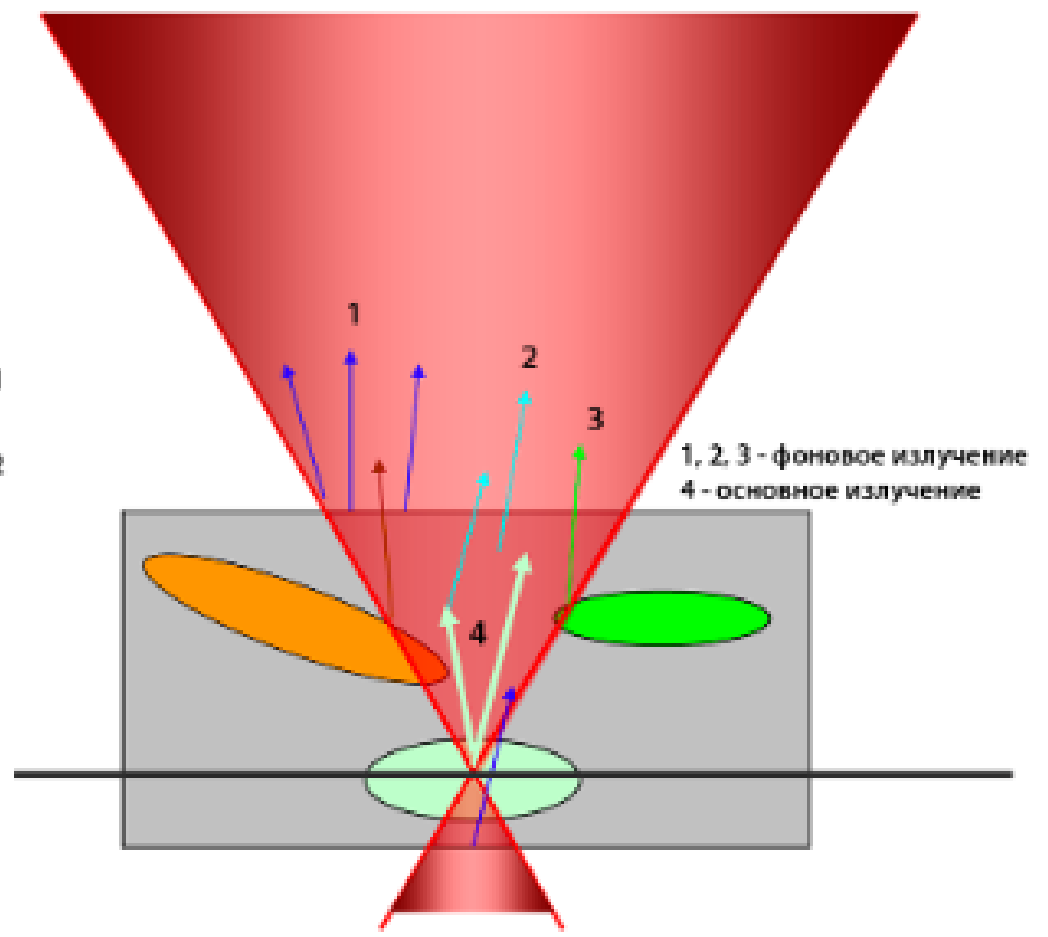
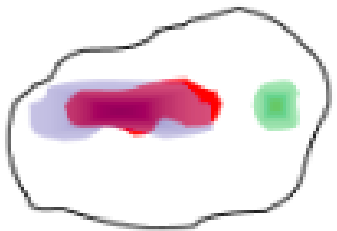


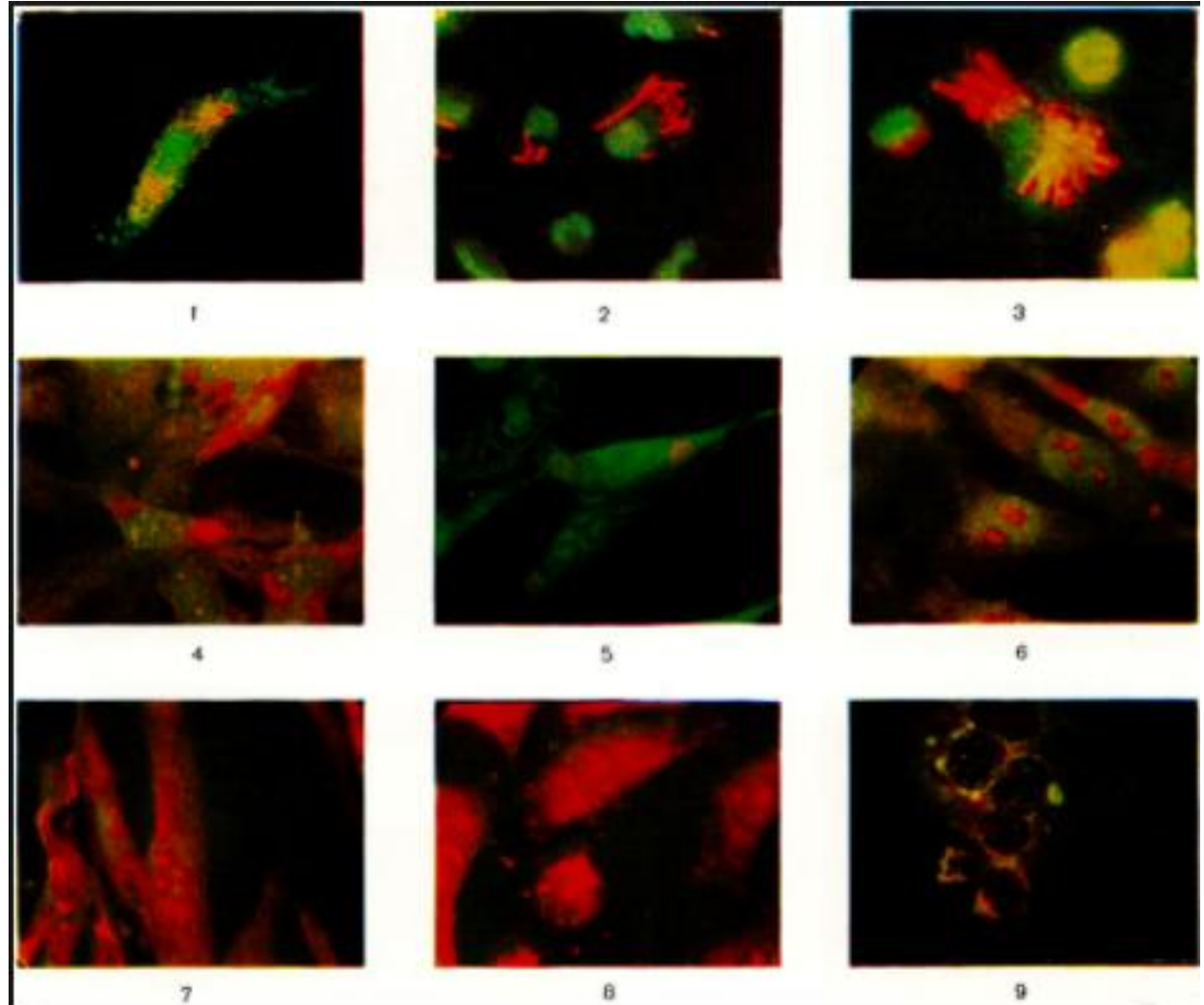
Схема обычного флуоресцентного микроскопа

 Возбуждающее излучение
 Регистрирующий сигнал



Флюоресцентная (люминесцентная) микроскопия

В флюоресцентном микроскопе в качестве источников света для возбуждения флюоресценции применяют ртутные или ксеноновые лампы сверхвысокого давления, обладающие высокой яркостью в области спектра 0,25-0,4 мкм (ближние ультрафиолетовые лучи) и 0,4-0,5 мкм (сине-фиолетовые лучи).



Флюоресценция / люминесценция

Первичная

Первичной флюоресценцией обладают серотонин, катехоламины (адреналин, норадреналин), содержащиеся в нервных, тучных и других клетках, после фиксации тканей в парах формальдегида при 60-80 °С (метод Фалька).

Вторичная

Вторичная флюоресценция возникает при обработке препаратов специальными красителями - флюорохромами.

Классификация флюоресценции (люминесценции)

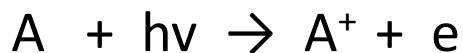
1. По длительности свечения

2. По способу возбуждения

3. По механизму свечения:

свечение дискретных центров – поглощающими и излучающими центрами являются одни и те же частицы (атомы, молекулы, ионы)

рекомбинационное свечение – процессы поглощения и излучения разделены во времени и в пространстве; в процессе возбуждения происходит разделение частицы вещества на две противоположно заряженные части; последующая их рекомбинация сопровождается выделением энергии



Виды люминесценции

флуоресценция ($\sim 10^{-8}$ с)

При флуоресценции молекула переходит в основное состояние из короткоживущего возбужденного состояния

Она наблюдается сразу же после поглощения света, быстро спадает и исчезает в результате столкновений излучающей молекулы с другими молекулами в растворе (тушение флуоресценции)

фосфоресценция ($> 10^{-6}$ с)

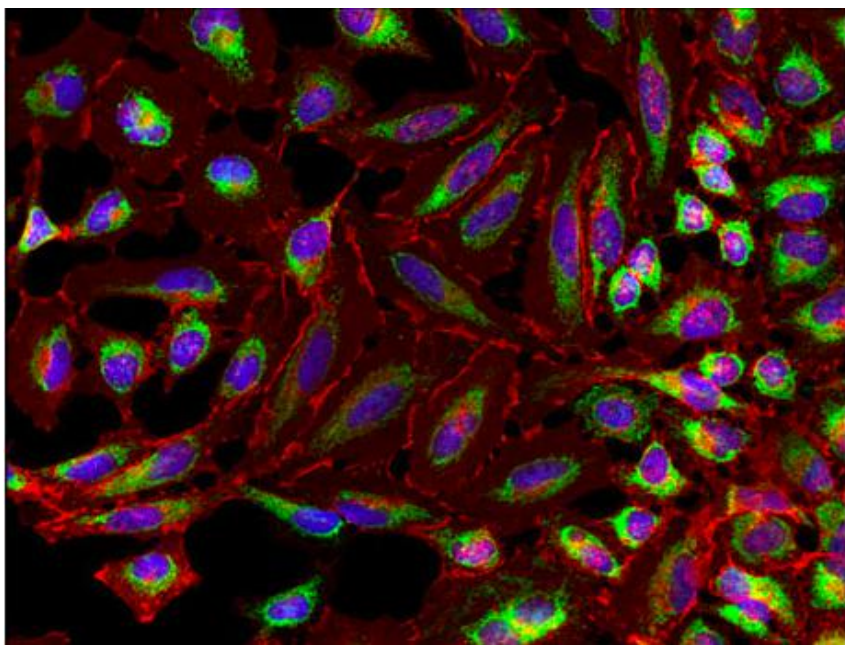
Фосфоресценция наблюдается при переходе молекулы в основное состояние из относительно долгоживущего возбужденного состояния, так что между поглощением и испусканием света может пройти относительно много времени

Для фосфоресценции характерны большая длина волны излучения, меньшая интенсивность и большее влияние матрицы

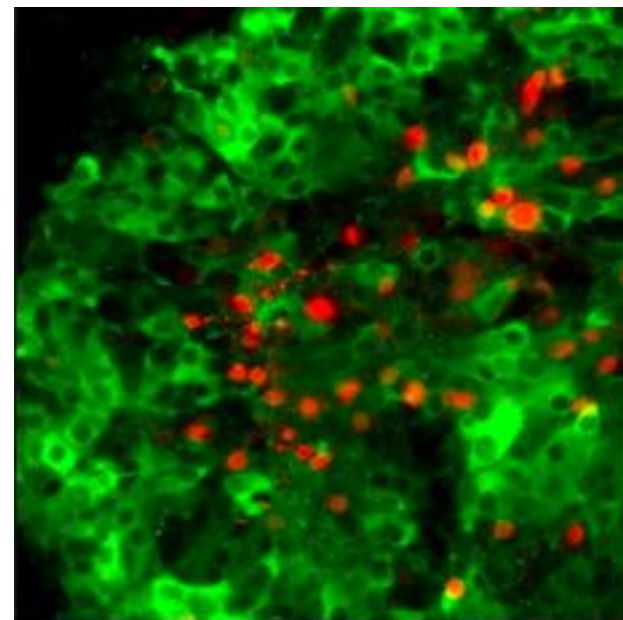
Флюоресценция возникает при
обработке препаратов специальными
красителями - флюорохромами

родамин

флюоресцеин



DAPI



акридин оранжевый

Существуют различные флюорохромы, которые специфически связываются с определенными макромолекулами (акридин оранжевый, родамин, флюоресцеин и др.). Например, при обработке препаратов чаще всего употребляется флюорохром акридиновый оранжевый. В этом случае ДНК и ее соединения в клетках имеют ярко-зеленое, а РНК и ее производные - ярко-красное свечение. Таким образом, спектральный состав излучения несет информацию о внутреннем строении объекта и его химическом составе. Вариант метода флюоресцентной микроскопии, при котором и возбуждение, и излучение флюоресценции происходят в ультрафиолетовой области спектра, получил название метода ультрафиолетовой флюоресцентной микроскопии.