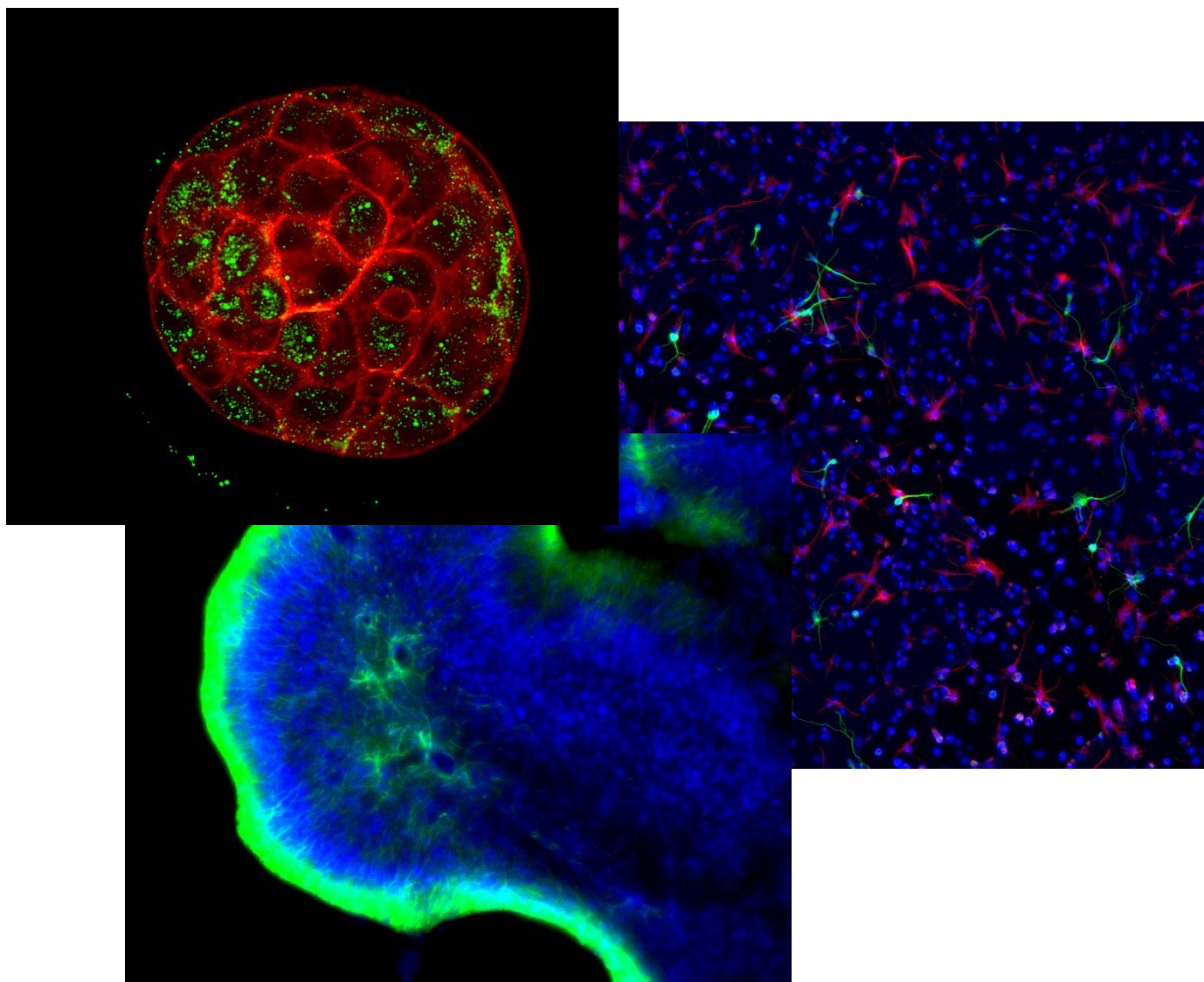


Základy fluorescenční mikroskopie

Pavel Ostašov



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

**MS
MT**
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

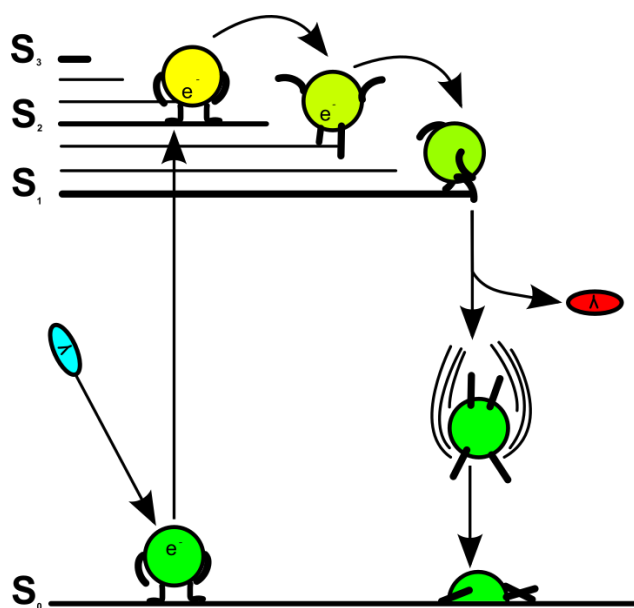
Vytvořeno v rámci projektu OP VVV Zvýšení kvality vzdělávání na UK a jeho relevance pro potřeby trhu práce CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362

Úvod

Úvodem je třeba si přiznat, že v současnosti se v histopatologické praxi fluorescence využívá minimálně, s výjimkou *in situ* hybridizací. Přesto má smysl se fluorescencí a fluorescenční mikroskopií zabývat ať již z důvodu jejího využití pro *in situ* hybridizace, ve výzkumu, ale i pro pochopení dalších technik založených na fluorescenci jako je například buněčná cytometrie a v neposlední řadě i pro rozšíření možných technik pro dosažení zadaného cíle. Cílem této práce je rychle seznámit studenty s pojmem fluorescence, fluorofory a fluorescenční a konfokální mikroskopie a ukázat některé problémy na které je možné při snímání a pozorování fluorescenčně značených vzorků narazit.

Co je to fluorescence

Pro další postup je potřeba nejdříve definovat co rozumíme pod pojmem fluorescence. Fluorescence je jedním z typů luminiscence. Luminiscence může být definována jako spontánní (samovolné) záření obvykle pevných nebo kapalných látek, které vzniká jako přebytek záření tělesa nad úroveň jeho tepelného záření v dané spektrální oblasti při dané teplotě, přitom toto záření má určitou dobu doznívání, tedy trvá i po skončení budícího účinku, což pro běžnou představu moc nepomůže. Jednodušší definicí by mohlo být, že luminiscence je světelná emise, která není pouhým tepelným vyzářováním tělesa. Tedy světlo žhnoucí ocelové koule není příkladem luminiscence, ale například světlo světlušky již ano. Někdy se také v souvislosti s luminiscencí mluví o studeném světle. Pod luminiscencí se řadí například triboluminiscence (záblesky při rozbíjení kostek cukru v temné místnosti), bioluminiscence (již zmíněné světlušky), elektroluminiscence (staré obrazovky ve 20. století), radioluminiscence (svítící značky na některých hodinkách buzené beta částicemi z tricia) nebo fosforescence a fluorescence. Ve všech případech jde o přeměnu dodané energie (mechanické, chemické, elektrické ale ne tepelné) na záření. V případě fosforescence a fluorescence je energie dodána ve formě záření, kterou těleso absorbuje a opět vyzáří. Z vnějšího pohledu je hlavní rozdíl mezi fosforescencí a fluorescencí rozdíl v době, která uplyne mezi přijetím energie a jejím vyzářením. Zatímco u fosforescence je tato doba 10^{-4} s až po několik dní, čehož se využívá například u různých svítících nálepek, u fluorescence, která nás zajímá, je tato doba v rozmezí 10^{-9} s (nanosekund). V praxi to znamená, že fluorescence zhasne téměř ihned po vypnutí zdroje záření. Látky, které mají tuto schopnost označujeme jako fluorofory. Tyto fluorofory jsou nejčastěji malé organické molekuly, proteiny nebo i krystaly (to všechno jsou ta výše zmiňovaná tělesa). Nicméně je nezbytné si



Obrázek 1. Jablonského diagram

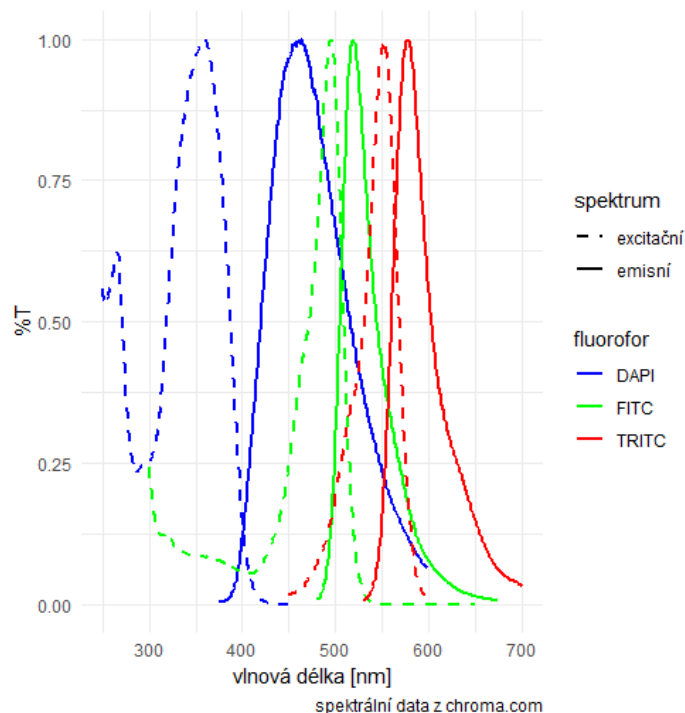
uvědomit, že se nejedná jenom o syntetické látky, ale fluorescenci mají i molekuly, které se běžně v těle nachází, jako jsou tryptofan, NADH, hem, kolagen nebo vitamín A.

A co přesně se v případě fluorescence děje? Základem je, že se fluorofor vybudí (excituje) světlem o kratší vlnové délce, které absorbuje a díky tomu začne emitovat světlo o delší vlnové délce. Tomuto rozdílu vlnových délek mezi absorbovaným a emitovaným světlem se říká Stokesův posun a hraje důležitou roli ve všech fluorescenčních metodách. Jeho existence vyplývá z mechanismů fluorescence, jak jsou naznačeny na obrázku 1, což je tzv. Jablonského diagram. Molekula fluoroforu se nejdříve nachází v klidu (základním singletovém stavu – S_0). Pokud

dojde k zachycení fotonu o energii stejné nebo vyšší, než je rozdíl energií mezi základním (S_0) a prvním excitovaným (S_1) singletovým stavem, dojde k přesunu elektronu na vyšší energetickou hladinu ($S_1, S_2, S_3...$ podle energie fotonu a stavu fluoroforu). Energie nezbytná pro přechod do S_1 je také ovlivněna prostředím fluoroforu, a proto může být pro každou molekulu fluoroforu trochu jiná. Tato část procesu určuje, jak vypadá excitační spektrum fluoroforu neboli jakými vlnovými délkami je možné vybudit fluorescenci fluoroforu a jak efektivní toto buzení bude. Elektron pak ztrácí energii nezářivými přechody (změna konformace molekuly, změny v dipólu molekuly...) dokud jeho energie neklesne na hladinu S_1 , odkud spadne zpět do základního stavu S_0 a vyzáří při tom foton. Tato část rozhoduje o průběhu emisního spektra. Ačkoliv by se z Jablonského diagramu mohlo zdát, že emitované světlo bude mít jednu vlnovou délku, protože rozdíl energetických hladin je stejný, není tomu tak. Vlivem prostředí a vnitřních procesů je výsledkem kontinuum takzvané emisní spektrum. To udává, s jakou intenzitou daný fluorofor emituje v příslušné vlnové délce.

Fluorofory a jejich vlastnosti

Základními vlastnostmi každého fluoroforu jsou excitační a emisní spektrum a téměř vždy určující pro rozhodnutí který fluorofor použít. Na obrázku je uveden příklad excitačních a emisních spekter tří fluoroforů: DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), který je nejčastěji používanou barvou pro barvení buněčných jader, FITC (fluorescein isothiokyanát), což je nejstarší fluorofor využívaní ve fluorescenční mikroskopii a TRITC (rhodamin isothiokyanát), což je třetí do trojice. Jak je z obrázku patrné, maxima excitačních spekter a maxima emisních spekter jsou od sebe poměrně vzdálená. To je nezbytné, pokud chceme tyto fluorofory využít pro pozorování několika různých znaků v rámci jednoho preparátu, což téměř vždy chceme. Samozřejmě v některých případech má samotná tkáň poměrně silnou fluorescenci (neboli autofluorescenci) ať již přirozeně jako tkáň s vysokým podílem kolagenu nebo v důsledku fixace jako v případě FFPE vzorků ledvin nebo sleziny. V takových případech je opět potřeba najít fluorofory, jejichž excitační, a hlavně emisní spektra se nebudou překrývat s autofluorescencí tkáň. To jsou často fluorofory s emisí v tmavě červené (far-red) až infračervené oblasti jako například Alexa Fluor 647, Cy 5 a podobně.



Obrázek 2. Excitační a emisní spektra DAPI, FITC a TRITC

Dalšími vlastnostmi, které by mohly rozhodovat o použití daného fluoroforu jsou například kvantový výtěžek (quantum yield), který říká, jaká je efektivita převodu excitačního záření na emisní, molární absorpční koeficient, který říká, jak moc daný fluorofor pohlcuje záření o dané vlnové délce a fotostabilita. Ve všech případech je více lépe, ale perfektní fluorofor nejspíše neexistuje a v mnoha případech dané informace nejsou běžně k nalezení.

V praxi rozhodování omezuji především věci jako komerční dostupnost tedy například konjugátů daného fluoroforu s požadovanou protilátkou nebo dostupnost kitu s daným fluoroforem, vhodnost

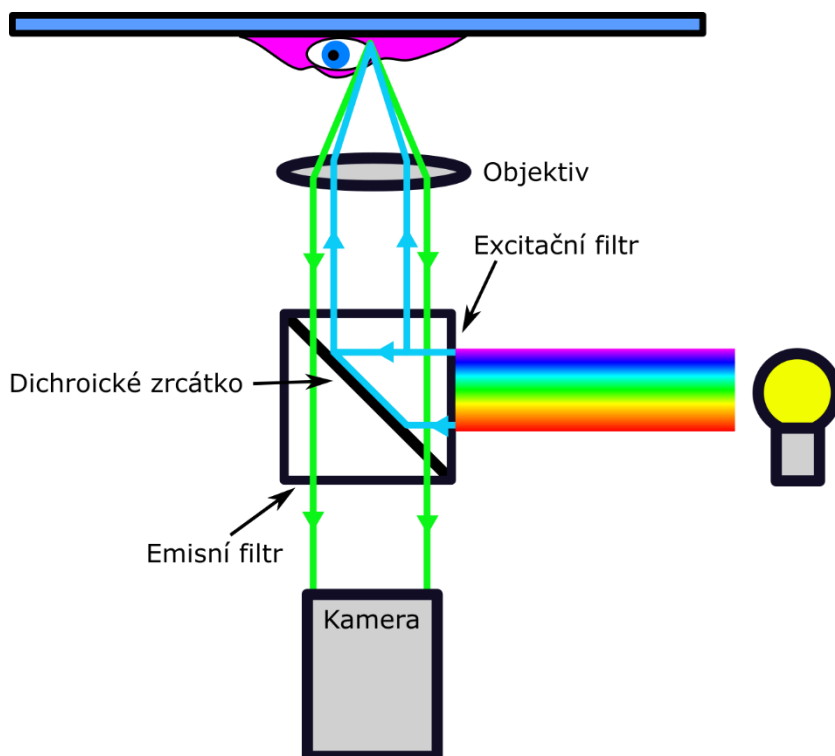
fluoroforu pro danou aplikaci například zda daný fluorofor prochází buněčnou membránou a u některých fluoroforů i cena.

Jednoduše shrnuto o volbě fluoroforu tedy nakonec téměř vždy rozhoduje, jaké kombinace excitačních a emisních filtrů jsou dostupné v mikroskopu, který máme k dispozici a komerční dostupnost fluoroforu.

Fluorescenční mikroskop

V základu odpovídá fluorescenční mikroskop normálnímu mikroskopu pro procházející světlo, nicméně na rozdíl od něj je vzorek osvětlován z objektivu, jak je vidět na obrázku, a nikoliv z kondenzoru. Světlo ze světelného zdroje, což může být xenonová oblouková lampa, rtuťová výbojka, výkonné LED nebo i lasery prochází excitačním filtrem, který propouští jen excitační vlnové délky je na dichroickém zrcátku odraženo do objektivu a dále do vzorku. Ve vzorku dojde k excitaci fluoroforu a emitované světlo je opět zachyceno objektivem a směřováno do detektoru. Projde dichroickým zrcátkem, to totiž odráží vlnové délky excitačního světla (a kratší) zatímco ostatní propouští. Poté emisním filtrem projde jenom ta část vlnových délek, které odpovídají emisi fluoroforu a je zachycena detektorem. Excitační filtr, emisní filtr a dichroické zrcátko se většinou v mikroskopu nacházejí ve „filtrkostkách“, tedy kostce, která obsahuje tyto tři komponenty optimalizované pro specifický fluorofor. Tedy jedna filtrkostka pro DAPI, druhá pro FITC atd. Samozřejmě spektrálně podobné fluorofory mohou používat jednu a tu samou kostku. Tyto kostky jsou v mikroskopu většinou umístěny v karuselu, aby se usnadnilo jejich přepínání a v motorizovaných mikroskopech je samozřejmě jejich přepínání automatizováno.

Nicméně jak z popisu vyplývá s každou kostkou lze zachytit většinou jen jednu barvu a pro jinou barvu se musí přepnout na jinou kostku (i když nemohou zatajit existenci kostek, které umožňují snímat až 4 fluorofory najednou za cenu horšího obrazu nebo větší ztráty signálu). Přestože výsledné obrázky se pak většinou prezentují v barvě, používají se především monochromatické (černobílé)



Obrázek 3. Schéma fluorescenčního mikroskopu

kamery a výsledný obrázek se pak složí z jednotlivých černobílých. Důvodem je jednak omezení na snímání pouze jedné barvy dané filtrkostkou, ale také především jejich vyšší citlivost monochromatických kamer na světlo oproti barevným kamerám. Pro zaznamenání obrazu z fluorescenčního mikroskopu se používají CCD nebo CMOS kamery. V každém případě je nutné si uvědomit, že na rozdíl od mikroskopie v průchozím světle je intenzita světla, které detekujeme je velmi nízká a často se jedná jen o jednotky fotonů na obrazový

bod a filtry na snímačích barevných kamer výrazně zvyšují ztráty již tak slabého signálu ze vzorku.

Od slabého signálu vzorku se odvíjí i další komplikace, při analýze fluorescenčního signálu. Hlavní z nich je šum kamery. Zatímco v průchozím světle šum kamery příliš často neřešíme v rámci fluorescenční mikroskopie se s ním potkáme poměrně pravidelně, především pokud je náš specifický signál slabý, ať už v důsledku nízké koncentrace antigenu, či specifík fluoroforu.

Nejčastěji je fluorescenční mikroskop vybaven 3-4 filtrkostkami, tedy připraven pro snímání 3-4 fluoroforů. Téměř vždy jsou přítomny filtry pro snímání fluoroforů jejichž spektrální charakteristiky odpovídají DAPI a FITC. Pro další vlnové délky bývají přítomny filtry pro snímání TRITC nebo Texas Red v oranžové oblasti a někdy pak pro Alexa 633, Alexa 647 nebo Cy5. Samozřejmě možností je vždy více a je tedy nezbytné zjistit jaké kombinace se na mikroskopu, který máme k dispozici skutečně nacházejí.

Konfokální mikroskop

Za normálních okolností je obraz ve fluorescenčním mikroskopu degradován světlem vycházejícím z míst nad a pod rovinou ostrosti. Pokud by se podařilo odfiltrout světlo z těchto rovin, které dopadá na detektor, výrazně by se zvýšila kvalita obrazu. A to je právě princip konfokální mikroskopie. Odstínění světla z rovin nad a pod rovinou zaostření se dosahuje tím, že vzorek je ozařován bodovým zdrojem (prakticky vždy se jedná o laser) a emitované světlo pak prochází před detektorem malou clonkou tzv. pinhole. Ta umožní projít pouze světlu přímo z roviny zaostření my tak dostaneme dobře zaostřený bod, a to ve všech třech směrech. Problémem je, že jediný bod nám toho o preparátu mnoho neřekne. Proto je potřeba skenování vzorku ve 2D, čímž dostaneme síť bodů, ze kterých potom počítač sestaví výsledný obraz. Konfokální mikroskopie je tudíž závislá na využití počítače, protože v okuláru nic neuvidíme, umožňuje ovšem získat obrazy vzorku s vysokým kontrastem a vytvoření 3D rekonstrukcí vzorku. Pokud chceme získat 3D rekonstrukci je nezbytné nasnímat vzorek ve více rovinách, čímž dostaneme sérii takzvaných optických řezů, které mohou být naskládány tak, aby vytvořily 3D obraz vzorku. Konfokální mikroskopie má však i některé nevýhody a tou hlavní je velká ztráta signálu při průchodu světla pinhole. Přestože se z tohoto důvodu používají speciální detektory s vysokou citlivostí jako jsou fotonásobiče a lavinové fotodiody i tak je často potřeba osvětlit vzorek s vysokou intenzitou nebo použít relativně dlouhou dobu osvitů, což vede k degradaci fluoroforu a ztrátě fluorescenčního signálu.

Příprava fluorescenčních preparátů

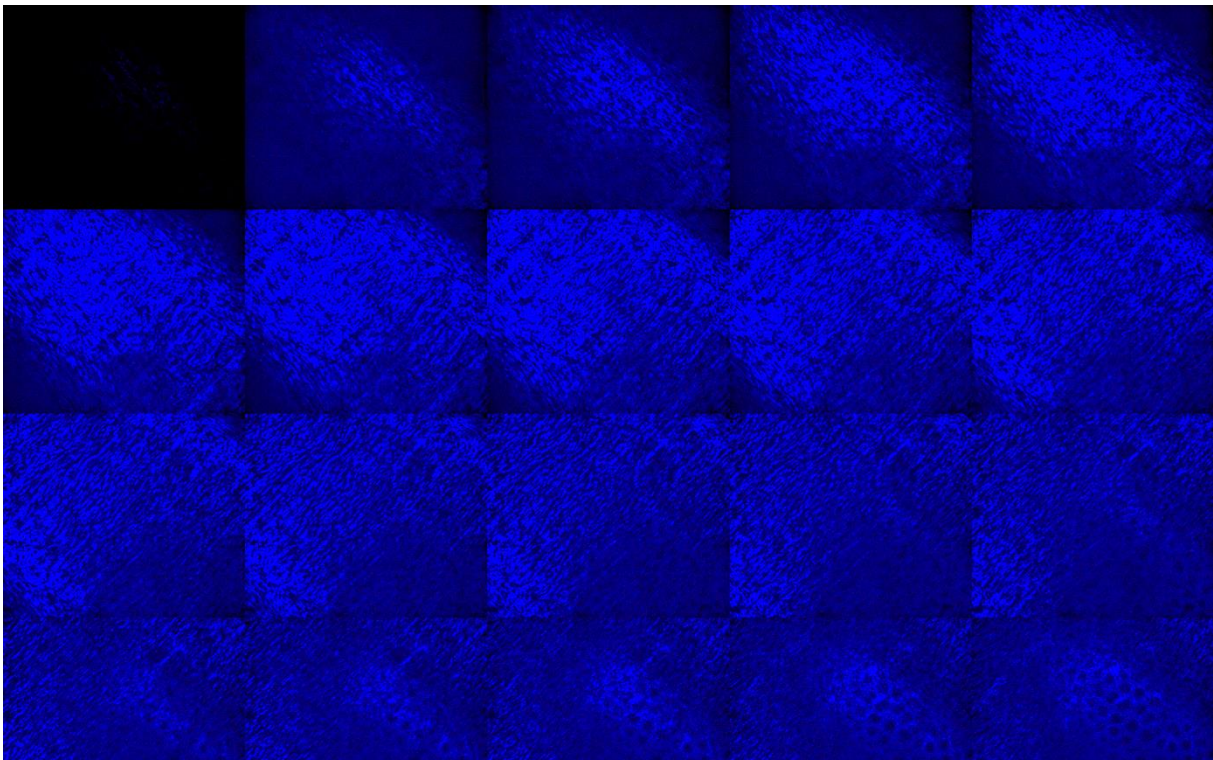
Zatímco v případě procházejícího světla je řada přehledných barvení jako například Hematoxylin/Eosin nebo zelený trichrom v případě fluorescence se tato příliš nepoužívají a téměř vždy se jedná o specifická barvení. Nicméně se téměř vždy využívá barvení jader buněk pro základní orientaci. Je zvykem pro toto barvení využívat fluorofory emitující v modré části spektra jako jsou například DAPI, nebo Hoechst 33342, pokud je to možné. Tyto dva fluorofory mají téměř identické spektrální vlastnosti a jejich použití se řídí spíše tím, zda se jedná o fixovaný preparát (DAPI) nebo živé buňky (Hoechst 33342), protože DAPI téměř neprochází přes neporušenou buněčnou membránu. Druhým fluoroforem je nejčastěji fluorofor emitující v zelené části spektra. To je dáno jednak historicky, kdy prvním rozšířeným fluoroforem byl FITC, který emituje v této vlnové délce a také tím, že lidské oko je k zelené nejcitlivější. Postupný vývoj tak začal právě s FITCem a dnes je k dispozici velmi mnoho fluoroforů s podobnou spektrální charakteristikou (například Alexa Fluor 488, Atto488, Cy2, Oregon Green, GFP a další) a téměř všechny mikroskopy jsou vybaveny filtry pro snímání těchto fluorochromů. Navíc i velká část kamer a dalších detektorů má nejvyšší citlivost právě v zelené oblasti. Proto může být výhodné použít právě fluorofory se zelenou emisí pro detekci

důležitých znaků, pokud to charakter vzorku umožní. Nevýhodou fluorochromů v modré a zelené oblasti je totiž možná přítomnost autofluorescence v této oblasti, především při excitaci v oblasti UV oblasti a fialové.

Základní pravidlo při přípravě fluorescenčních preparátů je nevystavovat fluorofory světlu. Fluorofory by měly být vždy uchovávány mimo přímé světlo a preparáty samotné pak také. Během přípravy preparátu by mělo být opět minimalizováno vystavení fluoroforů světlu, ale neznamená to nutnost pracovat potmě nicméně přímé polední sluneční světlo kvalitě preparátů příliš neprospěje. Spíše jde o to zkrátit co nejvíce dobu manipulace s preparáty a během například inkubace se sekundárními protilátkami uchovávat preparáty v temnu.

Pro detekci specifických proteinů se používají především barvení pomocí protilátek. Jejich použití ve fluorescenční mikroskopii se řídí stejnými pravidly a postupy jako v případě imunohistochemie. Nicméně při přípravě a analýze fluorescenčních preparátů je nezbytné mít na paměti několik specifík. Je vždy nezbytné připravit jak fluorescenčně označený vzorek, tak i vzorek, který je zpracovaný stejným postupem, ale s vynecháním primární protilátky. Přestože toto pravidlo pro vytvoření negativní kontroly by mělo platit i ve standardní imunohistochemii, v případě fluorescenčního barvení je ještě důležitější vzhledem k citlivosti metody. Jak je vidět na obrázku, i buňky negativní kontroly vykazují detekovatelnou úroveň fluorescence, nicméně tato je dána jednak autofluorescencí buněk jako takových, tak i nespecifickou vazbou protilátek. Bez této kontroly by pak nebylo možné posoudit, zda dané barvení opravdu odpovídá specifickému signálu.

Jak je zmíněno výše je možné s pomocí fluorescenční mikroskopie snímat optické řezy ze vzorku, a to až do hloubky několika desítek mikrometrů, zatímco mikroskopie v průchozím světle je omezena silou preparátu jen na několik mikrometrů. Nicméně v mnoha případech by bylo užitečné moci prozkoumat celé preparáty například celé embryo, či část mozku. Normální vzorek ale obsahuje množství molekul, které rozptylují světlo a omezují tak maximální užitečnou tloušťku preparátu, jako jsou lipidy nebo i samotná voda. Odstranit tato omezení se snaží projasňovací



Obrázek 4. Optické řezy stěnou myšního střeva z konfokálního mikroskopu

techniky jako jsou například Clarity, 3DISCO nebo ScaleA2. Přestože se jejich přístup liší (například Clarity spočívá v navázání proteinů do akrylamidového gelu a odmytí všech lipidů, zatímco 3DISCO a ScaleA2 především mění refrakční index tkání a nahrazují velkou část vody v nich obsažených) ve výsledku umožňují dosáhnout optických řezů až do hloubky několika milimetrů, což už umožňuje analýzu celých tkání a orgánů jako například na obrázku dole, kde je vidět série optických řezů stěnou myšního střeva o celkové tloušťce 700 μm .

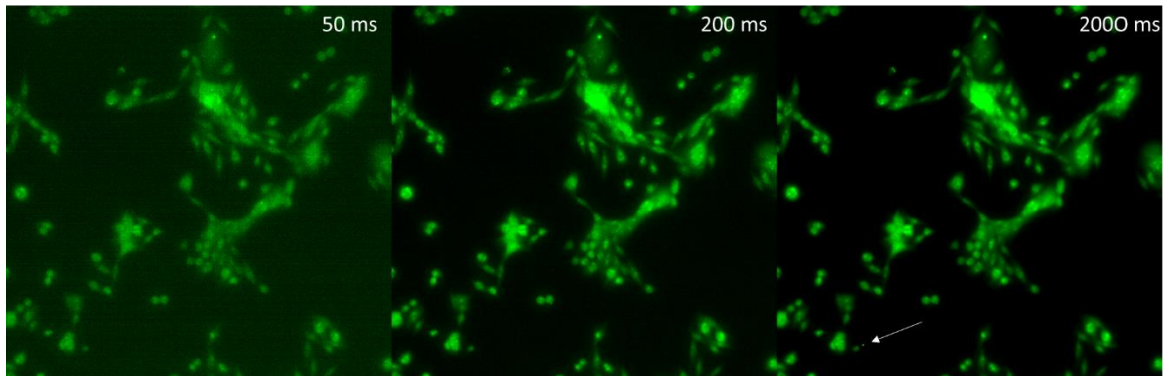
Stejně jako u standardních histologických barvení, lze připravit i „trvalé“ fluorescenčně značené preparáty. Nicméně na rozdíl od histologických preparátů se jejich trvalost nepohybuje v desetiletích, a to ze dvou důvodů. Tím prvním je nutnost používat montovací média na bázi vody. Tato média často obsahují glycerol nebo Mowiol. Při přípravě standardních histologických preparátů se vzorek po obarvení opět odvodní a zalije do montovacího média často na organické bázi. Jenže tato média mají vysokou autofluorescenci, která přehluší slabou specifickou fluorescenci, která nás zajímá a řada fluoroforů mění v nepolárním prostředí fluorescenční vlastnosti nebo přestane svítit vůbec. U vodných médií tento problém není, nicméně přes veškerou snahu u nich často dochází k vysychání a degradaci vzorku. Druhým důvodem je citlivost fluoroforů na kyslík. Schopnost fluorescence je u fluoroforů většinou dána jejich chemickou strukturou, kterou ještě navíc často tvoří aromatické cykly. Ty jsou relativně snadno napadány vzdušným kyslíkem, dochází k jejich oxidaci, změně struktury a ztrátě fluorescence. Fluorescenční preparáty, tak postupně ztrácí na intenzitě až dojde k úplné ztrátě specifické fluorescence. Nicméně je potřeba dodat, že s vývojem nových montovacích médií je dnes možné uchovat fluorescenční vzorky v dobrém stavu po mnoho měsíců. Ale je zde ještě jeden problém, a to poškozování fluoroforů během pozorování.

Histologické preparáty ve standardním barvení je možné pozorovat pod mikroskopem dlouhé hodiny bez významné ztráty kvality. U fluorescenčních preparátů tomu tak bohužel není, protože se u nich vyskytuje jev známý jako fotobělení (fotobleaching). Ten vzniká v důsledku excitace elektronů fluoroforu do excitovaného singletního stavu a následnému narušení kovalentních vazeb v molekule nebo reakcí s molekulami v okolí, často kyslíkem. Odolnost vůči fotobělení se u každého fluoroforu liší a moderní fluorofory (např. Alexa Fluor 488, Atto 488 a další) jsou vůči němu často už výrazně odolnější než původní fluorofory (FITC). Dalšími parametry ovlivňujícími fotobělení jsou však intenzita excitačního světla a montovací médium. Vysoká intenzita excitačního světla samozřejmě zvyšuje intenzitu emisního světla produkovaného fluorofory ve vzorku, zároveň však značně urychluje jejich degradaci. Montovací médium naopak může tuto degradaci zpomalit, pokud obsahuje antioxidanty (např. propyl gallate), což je většina nyní komerčně dostupných montovacích médií. Fotobělení bývá problémem hlavně při velkých zvětšeních (excitační světlo je zaostřeno do malého objemu) a v konfokální mikroskopii, jak je uvedeno výše. Největší překážkou pak představuje pro kvantifikaci intenzity signálu, protože v extrémním případě může dojít ke značnému poklesu intenzity fluorescence mezi zaostřením vzorku a vyfocením obrazu.

Snímání

Kvalitu výsledného obrazu ovlivňuje mnoho parametrů ať již kvalita preparátu, postup při barvení preparátu a samozřejmě parametry snímání. Mezi ty patří kvalita objektivů v mikroskopu, kvalita fluorescenčních filtrů nebo kamera, nicméně tyto parametry se stanovují většinou jen jednou při nákupu mikroskopu a během snímání s nimi již mnoho neuděláme. Při snímání máme v zásadě tři hlavní parametry (kromě volby odpovídající filtrkostky), kterými můžeme ovlivnit výsledný obraz. Jsou to: expoziční čas, intenzita excitačního světla a někdy zesílení (gain) signálu z detektoru, což u konfokálního mikroskopu může být fotonásobič u fluorescenčního mikroskopu to bude kamera. Každý detektor má svou vlastní úroveň šumu. To znamená, že i když na něj nedopadá žádné světlo vychází z něj signál jako by nějaké světlo dopadalo. Tudíž čím slabší je náš specifický signál, tím více se

bude ztrácet v tomto šumu, jak je vidět na obrázku číslo 5. Možností, jak toho dosáhnout je několik. První je prodloužení expozičního času. Protože šum se objevuje náhodně, zatímco signál přicházející z našeho vzorku pochází stále ze stejného místa a se stejnou intenzitou, při dostatečně dlouhé době snímání bude průměrná intenzita signálu ze vzorku podstatně vyšší než intenzity způsobené šumem a díky tomu náš signál dobře uvidíme. Velmi dlouhé expozice mohou však vést k zahřívání čipu a projevení vad, které každý čip má jako jsou například tak zvané hot-pixely. Většinou ničemu nevadí, ale například při měření intenzity fluorescence by mohly zkreslovat výsledky a je dobré vést jejich přítomnost v patrnosti. Nicméně pokud je signál na našem vzorku slabý, ani delší expozice nemusí pomoci, ale zvýšení intenzity excitačního světla může pomoci. Jak delší expozice, tak i vysoká intenzita excitačního světla mohou vést k fotobělení vzorku a je tak potřeba najít rovnováhu mezi dobou expozice, intenzitou excitačního světla a případným poškozením vzorku. Dalším zmiňovaným parametrem je pak zesílení neboli gain. V nastaveních kamery mikroskopu se vyskytuje poměrně často a určuje míru zesílení signálu z kamery. Tudíž pokud je signál ze vzorku slabý, lze nastavit vyšší gain, ale kromě signálu ze vzorku dojde i k zesílení šumu kamery. Tudíž je pak nezbytné opět najít rovnováhu mezi gainem, expozicí a intenzitou excitačního světla.



Obrázek 5. Vliv délky expozice na výsledný obraz. Fluorescenčně značené buňky vyfocené s různou délkou expozice. Šipka ukazuje hot-pixel