

Metoda Live/Dead aneb využití fluorescenční mikroskopie v bioaugmentační praxi

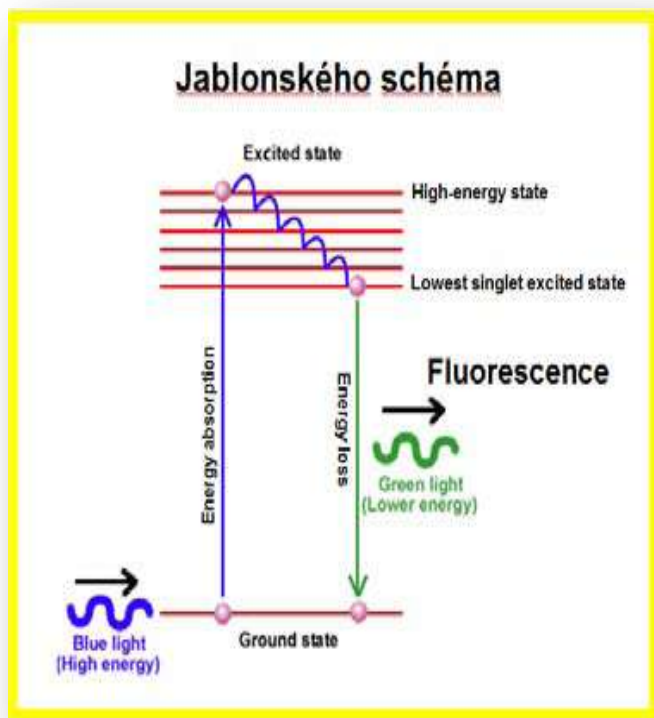
Juraj Grígel
Inovativní sanační technologie ve
výzkumu a praxi



Co je to vlastně ta fluorescence ?

Některé látky (fluorofory) jsou po ozáření světlem schopny absorbovat světlo určité vlnové délky a následně vyzařovat světlo o delší vlnové délce

$\lambda_{\text{emit}} > \lambda_{\text{excit}}$ (=Stokeovo pravidlo)



- molekula absorbuje světlo o vysoké energii (modré)
- energie molekuly se zvýší
- část energie je pohlcena molekulou (vlnovka)
- molekula vyzařuje světlo o nižší energii (zelené)

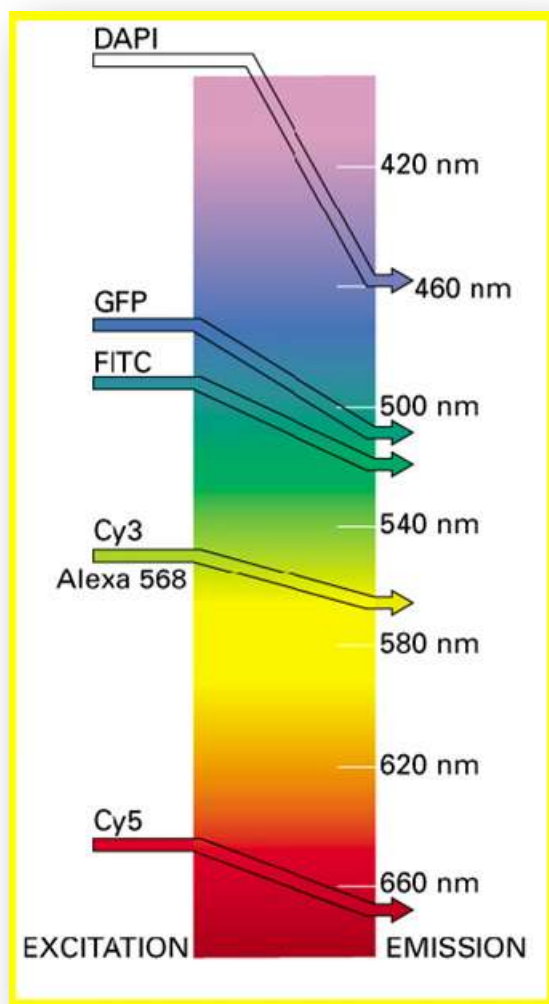
Využití fluorescence

Zejména v buněčné biologii a molekulární genetice

- specifické označování molekul v tkáni (bílkoviny, lipidy, sacharidy)
- zviditelnění některých buněčných struktur (jádro, cytoskelet)
- nalezení určitých sekvencí nukleotidů v DNA a RNA

Fluorofory

- ✓ **Autofluorescence** - např. chlorofyl, celulóza, keratin a jiné
- ✓ **Fluorescenční barvení** - užívá se ke zviditelnění molekul a buněk , které nejsou schopny autofluorescence
 - fluorory se vážou přímo na DNA např. DAPI
 - kovalentní vazba na určitou specifickou buněčnou strukturu např. FISH sonda
 - protilátky značené fluoroforem např. FITC
 - připojení fluoroforu ke genetické informaci kódující konkrétní bílkovinu z.b. GFP



DAPI- interkaluje do struktury DNA a RNA (modře)

GFP- zelený fluorescenční protein

FITC- fluorescein isothiokyanát vhodný zejména pro kovalenci s protilátkami

Fluorescein - vyzařuje zelené světlo

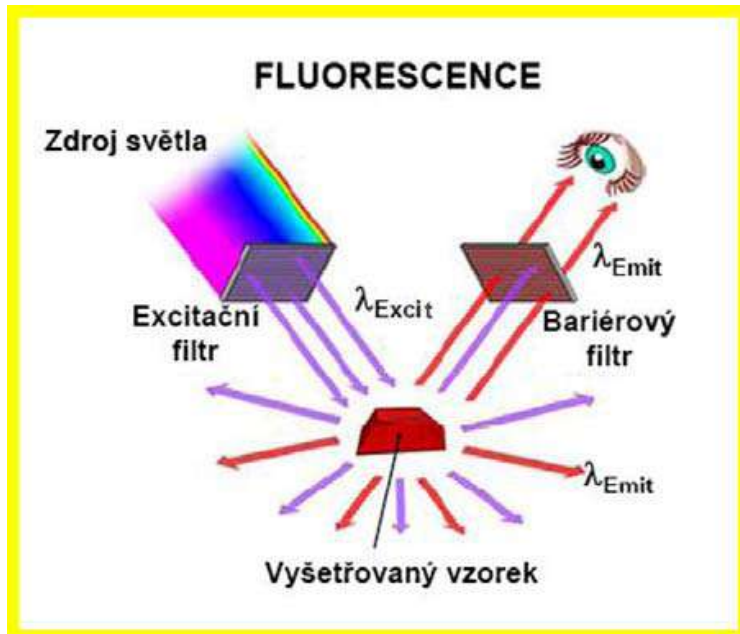
Cy3, Cy5 a Alexa 568- fluorofory vyvinuté speciálně pro fluorescenční mikroskopii

Chemická specifikace fluorescenčních barviv

- velké molekuly s velkým počtem elektronů schopných po excitaci vracet se do nižší energetické hladiny
- nejčastěji se jedná o aromatické heterocyklické sloučeniny s elektrony konjugovanými v tzv. plochých racích nad a pod rovinou ploché molekuly

Fluorescenční mikroskop-princip

- je podobný klasickému mikroskopu ovšem doplněný o silný zdroj světla



Excitační filtr

- mezi zdrojem světla a vzorkem
- umožňuje excitovat jednotlivé fluorofory o vybraných vlnových délkách

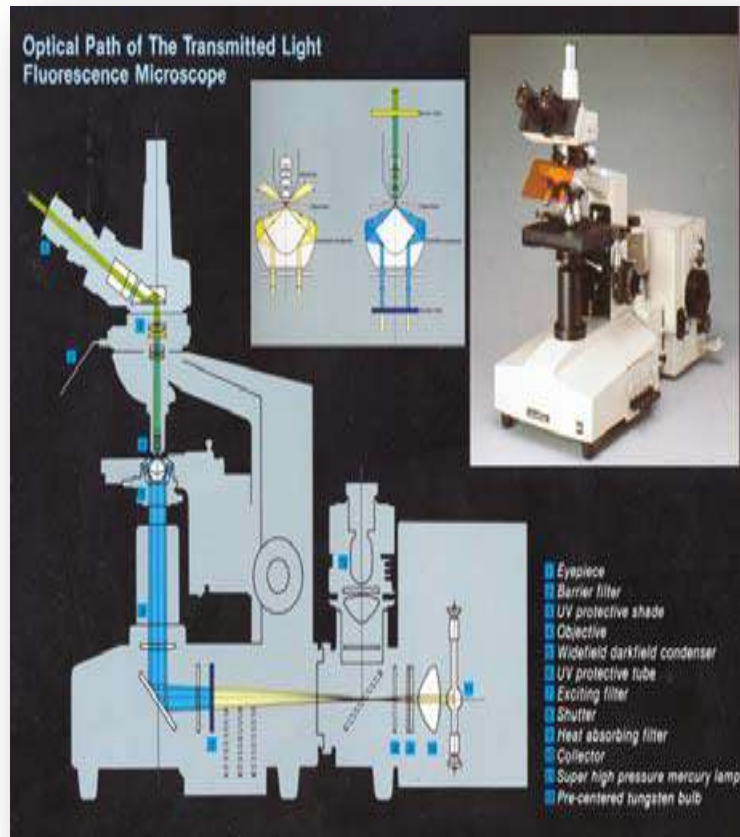
Bariérový (emisní) filtr

- mezi vzorkem a okulárem
- do okuláru proniká pouze pozitivní na černém pozadí.

Je možné použít více než jeden typ barviček v jednom vzorku zpravidla se používají 2 až 3 (FISH sondy, Live/Dead)

Typy fluorescenčních mikroskopů

- trans-fluorescenční (Transmission light fluorescent microscope)



- osvětlení z druhé strany než je objektiv
- světlo prochází excitačním filtrem na preparát dopadá od spodu. tzv. **zástinový kondenzor** odráží světlo tak , že dopadá na preparát zboku a excitační světlo tak prochází mimo objektiv -> do objektivu se dostane pouze emitovaná fluorescence
- není příliš rozšířen, vyšší pořizovací náklady.

- epi-fluorescenční (Reflected light fluorescent microscope)



- osvětlení vzorku přes objektiv
- emisní světlo se vrací zpět do objektivu a proto je nutné použít dichroické zrcadlo, které odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní do okuláru
- častěji užívaný typ (i v EPS)

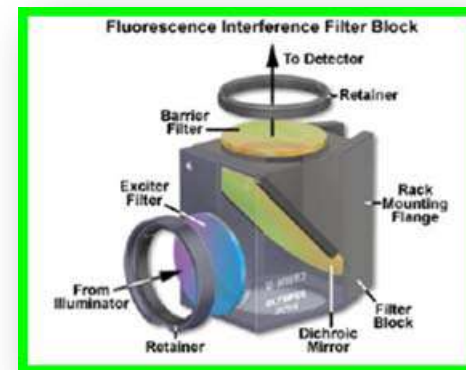
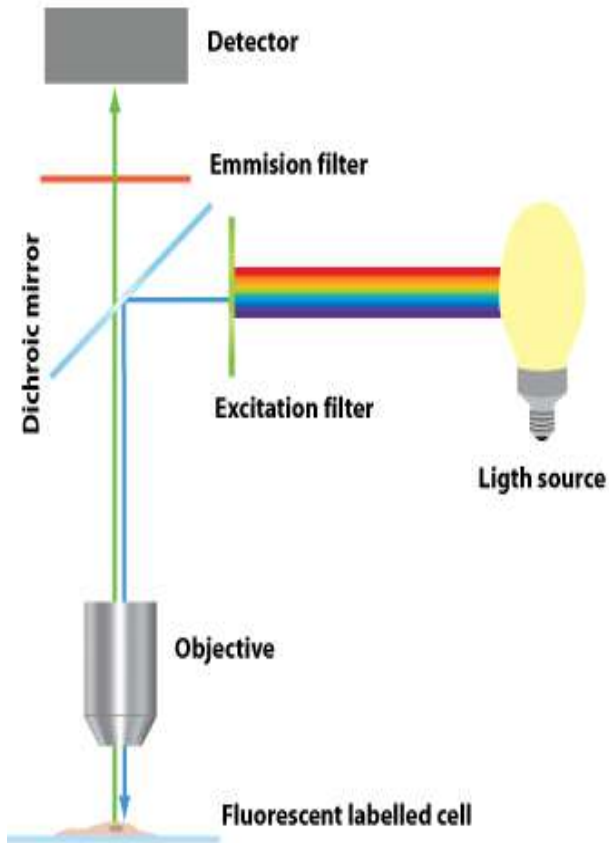


Schéma epi-fluorescenčního mikroskopu



- **osvětlení**-rtuťová výbojka (UV + viditelné světlo)
- **excitační filtr**
- **dichroické zrcadlo**
 - odráží světlo kratší než určitá vlnová délka a propouští delší než tato délka
 - pomáhá odstranit nežádoucí světlo
- **objektiv + vzorek**
- **emisní filtr**
- **detektor + software** pro obrazovou analýzu a její následné zpracování jak kvalitativně tak kvantitativně (NIS, Lucia, Analysis a pod)

Co je to Live/Dead ?

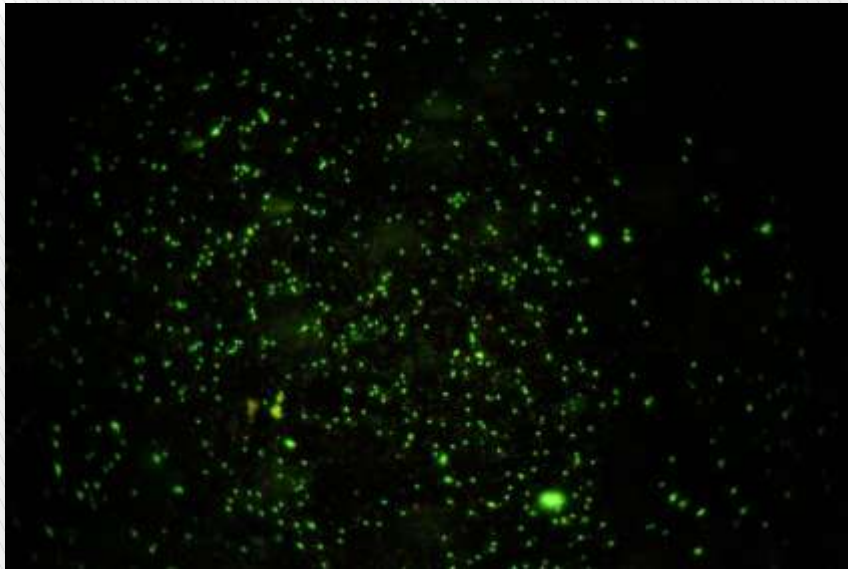
Je fluorescenční mikroskopická technika na principu fluorescenčních sond jež se navazují na specifické buněčné organely jako jsou buněčné membrány, vakuoly a jádra a závislosti na fyziologickém stavu se na ně buď navazují nebo ne.

Například u bakterií se využívá kombinace dvou barviv nukleových kyselin, kdy zelené barvivo má schopnost pronikat jak porušenými tak neporušenými membránami a červené proniká pouze porušenými membránami.

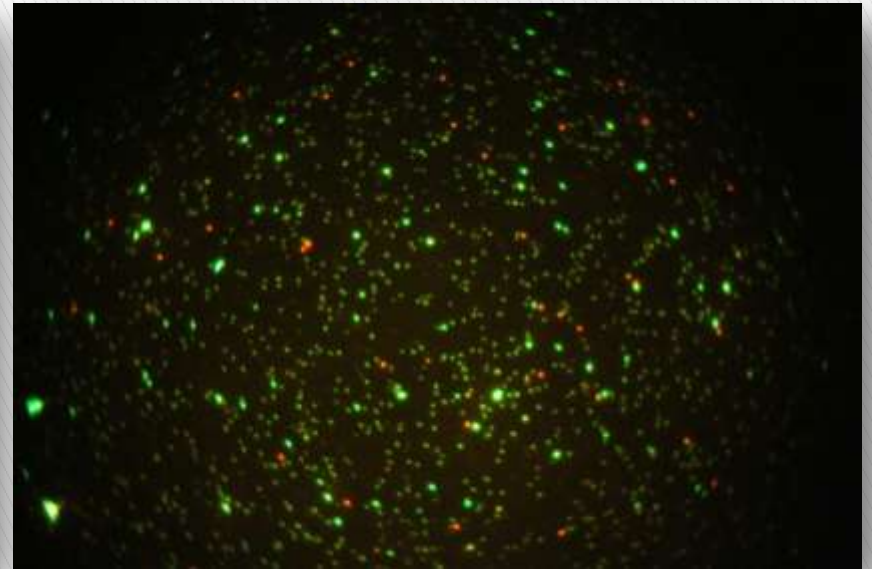
Praktické využití této metody

- Pomocí této techniky je možné velmi rychle a efektivně zhodnotit kvalitu inokula, které hodláme aplikovat na lokalitě.
- Můžeme se důkladně obeznámit ze schopností dané kultury využívat polutant jako C-zdroj.
- Sledovat procesy hladovění buněk a adaptace na polutant

Hladovění buněk

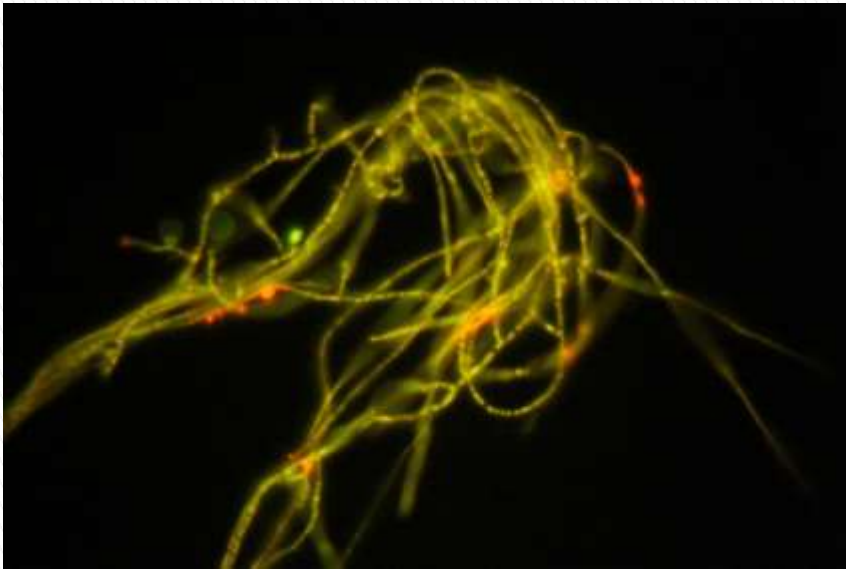


Hladovka 1 den

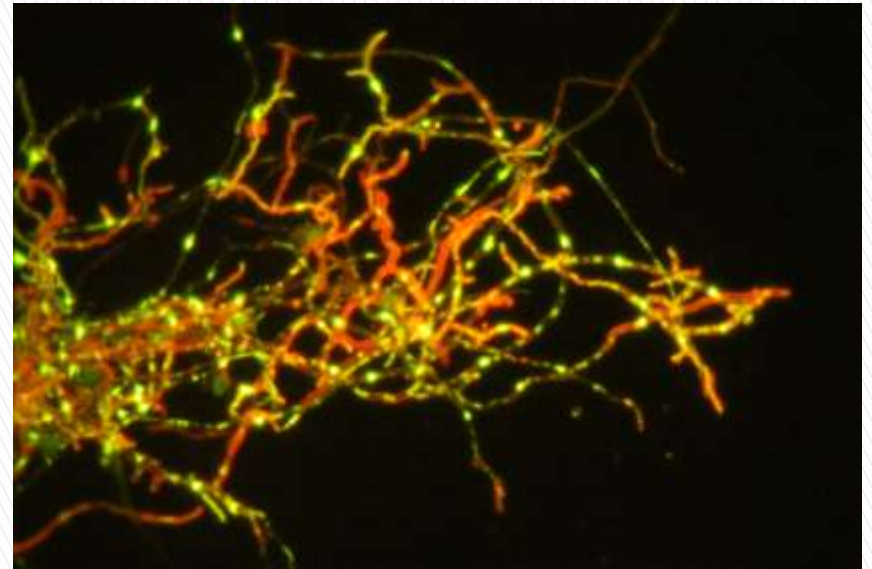


Hladovka 5 den

Live/Dead u kvasinek



Yarrowia lipolytica



Lipomyces starkeyi

Děkuji za pozornost



EPS
biotechnologie