

Lehrerfortbildung Nanobiotechnologie

Fluoreszenzmikroskopie und Probenpräparation

Dr. Martin Oberringer

**Abt. für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Homburg
Fachrichtung Experimentalphysik Saarbrücken**

03.04.03



Lehrerfortbildung Nanobiotechnologie

Fluoreszenzmikroskopie und Probenpräparation

- Begriffserklärungen
- Apparative Voraussetzungen
Aufbau
- Auflicht-Fluoreszenz-Anregung
Filteraufbau
Filtertypen
Fluorochrome/ Filtersätze
- Beispiele biologischer Anwendungen
- Immunfluoreszenz
Begriffserklärungen
Färbeprinzip
- Verwendete Antikörper
Spezifität
- Färbeprotokoll
- Auswertung
Mikroskopieren
Dokumentieren
Bildnachbearbeitung

Fluoreszenzmikroskopie

Begriffserklärungen

Lumineszenz: Unter Lumineszenz versteht man den Prozeß, bei dem durch unterschiedliche Vorgänge elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert wird.

Fluoreszenz: Die Lumineszenz endet unmittelbar nach Beendigung der Anregung.

Phosphoreszenz: Da die Lichtemission die Zeit der Einwirkung der Lichterregung überdauert, kommt es zum Nachleuchten.
(Zwischenstufe der Elektronen beim Übergang vom angeregten in den Grundzustand).

Fluoreszenzmikroskopie

Begriffserklärungen

Photolumineszenz: Durch die Anregung im UV-, IR- oder sichtbaren Bereich wird eine Lichtemission ausgelöst.

Chemolumineszenz: Energie der Reaktion wird als Lichtemission frei.

Biolumineszenz: (besondere Art der Chemolumineszenz) Emission nach enzymatische Reaktionen aus Flora und Fauna.

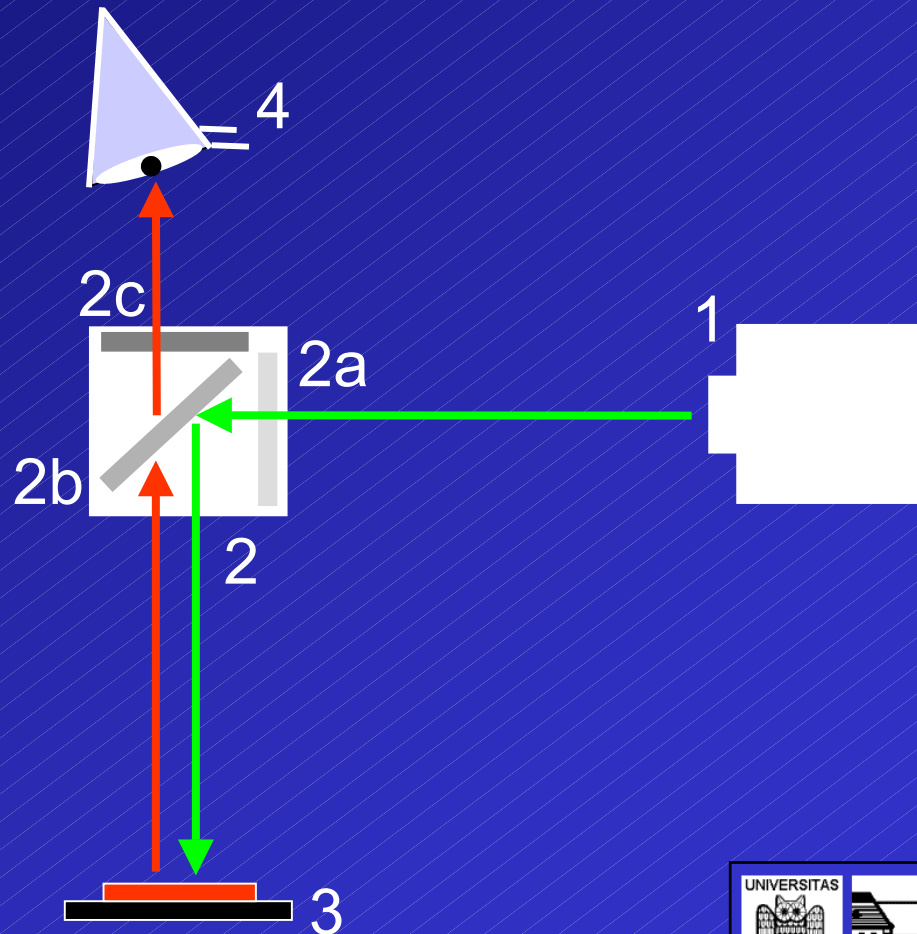
-andere: Tribolumineszenz, Kathodenlumineszenz, Radiolumineszenz

Fluoreszenzmikroskopie

Apparative Voraussetzungen/ Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

Strahlengang

- 1 Hg-Dampfhochdrucklampe
- 2 Filterwürfel
- 2a Anregungsfilter
- 2b Teilerspiegel
(dichroischer Spiegel)
- 2c Emissionsfilter
- 3 Fluoreszierende Probe
- 4 Betrachter/ Kamera



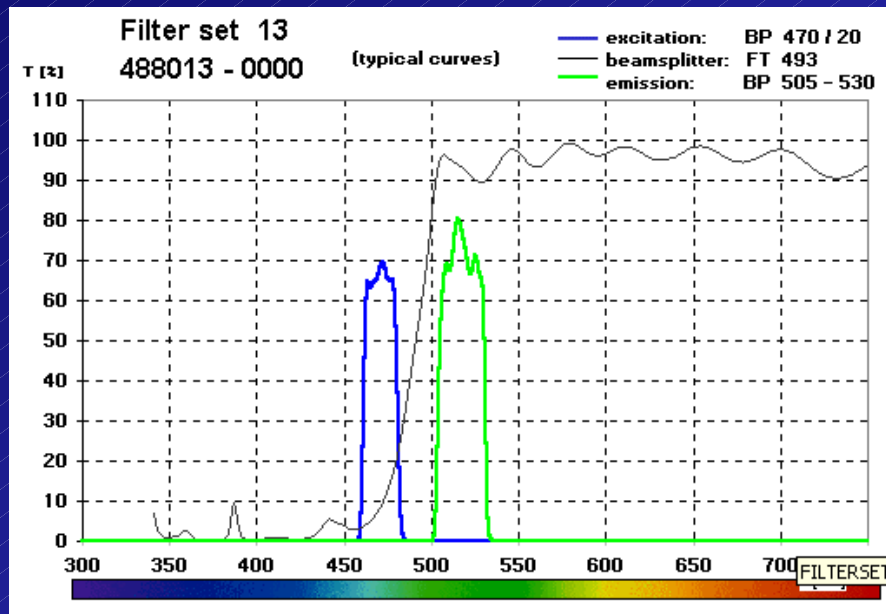
Fluoreszenzmikroskopie

Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

Filtertypen

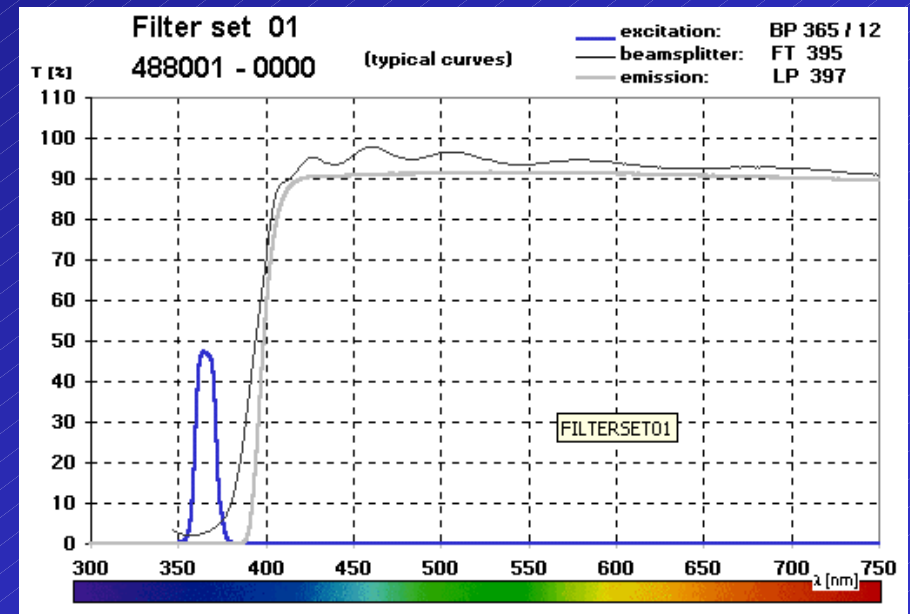
Bandpass

Fluoresceinisothiocyanat (488nm/ 525nm)
(FITC)



Longpass

DAPI (359nm/ 461nm)



Quelle: <http://www.zeiss.de>

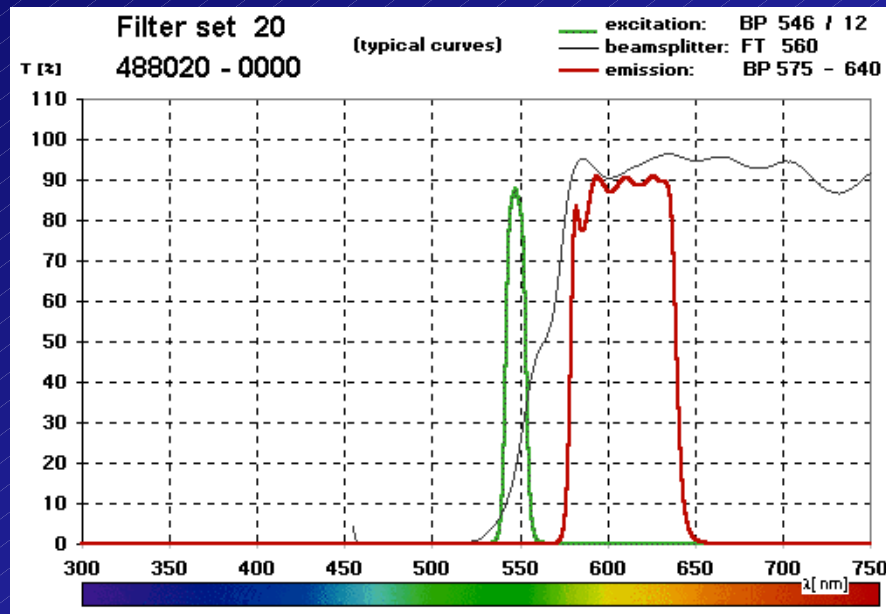
Fluoreszenzmikroskopie

Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

Fluorochrome/ Filtersätze

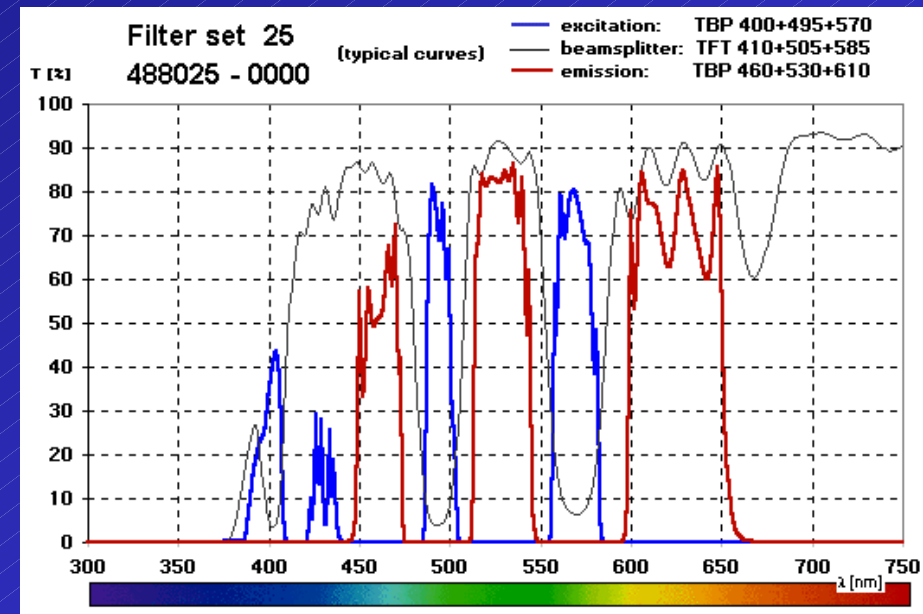
Bandpass

Cy3 (552nm/ 570nm)



Triple Bandpass

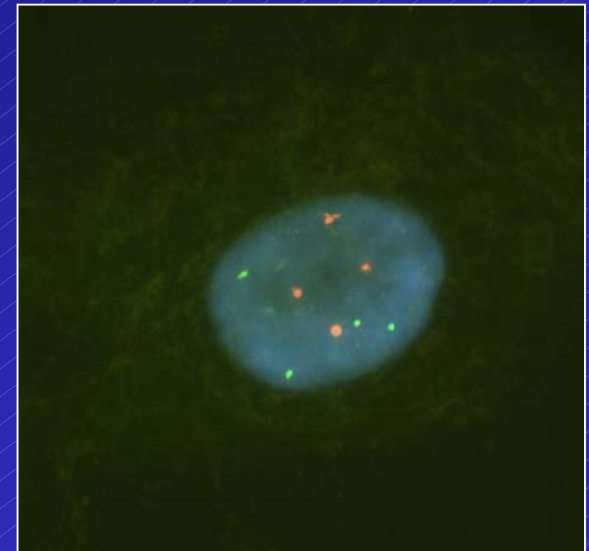
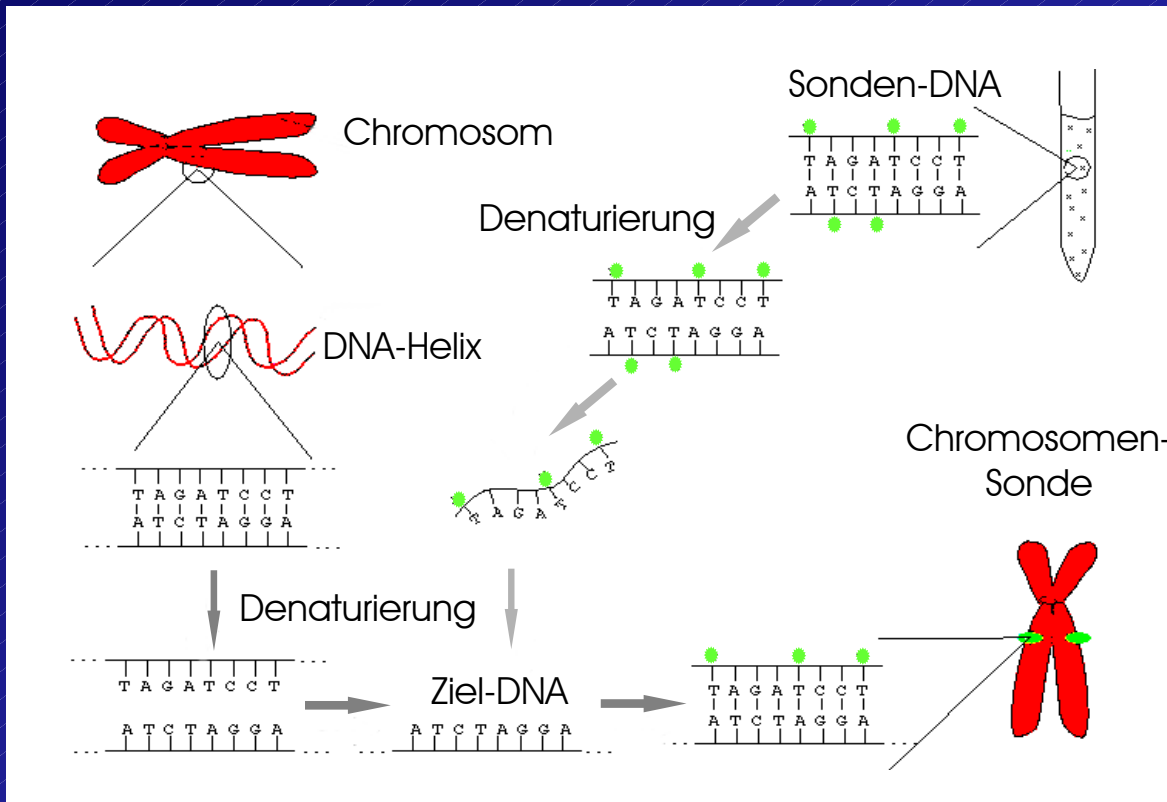
FITC, Cy3, DAPI



Quelle: <http://www.zeiss.de>

Fluoreszenzmikroskopie

Beispiele biologischer Anwendungen

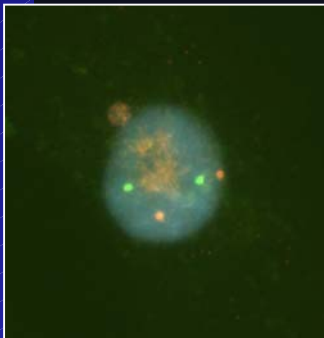
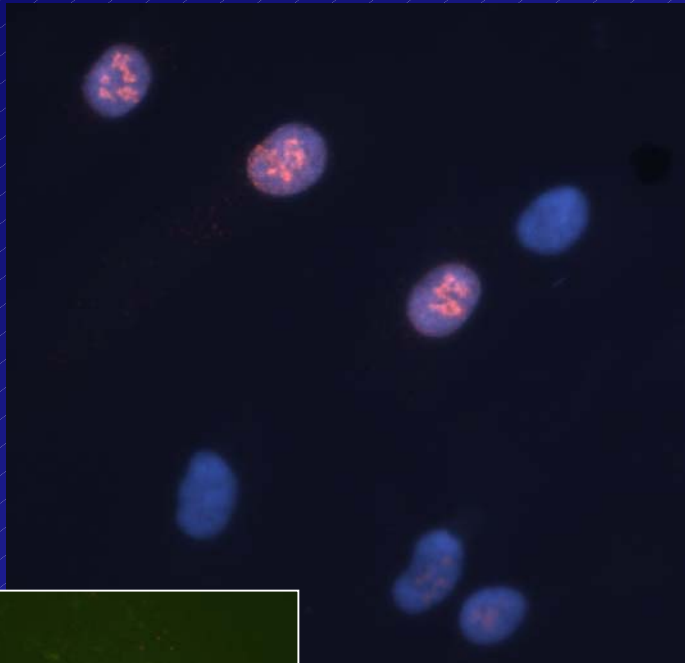


Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) mit Zentromersonden, Cy3 und FITC markiert, Kern-Gegenfärbung mit DAPI

Fluoreszenzmikroskopie

Beispiele biologischer Anwendungen

Immunfluoreszenzfärbung Mib-Ki67-Cy3 (+ FISH)



Immunfluoreszenzfärbung vWF-Cy3

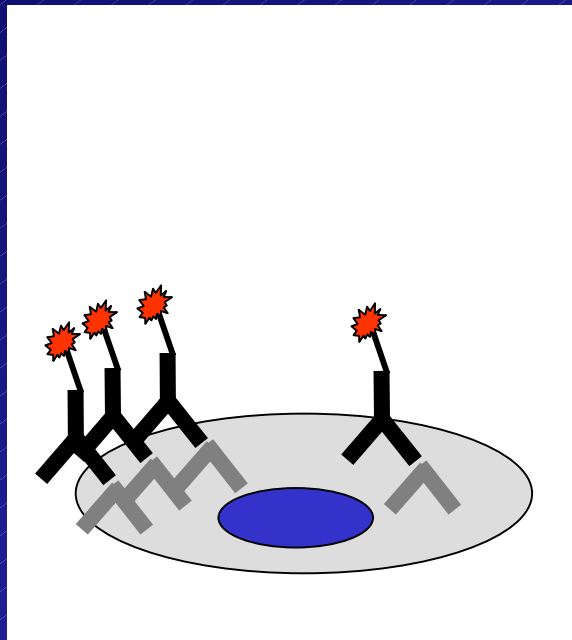


Probenpräparation

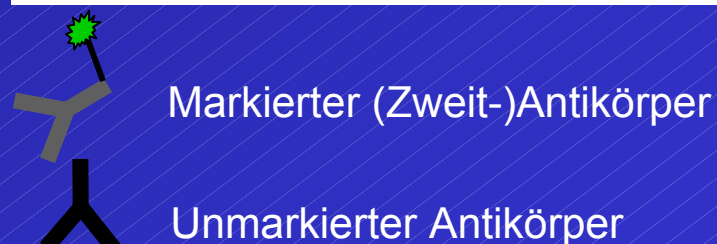
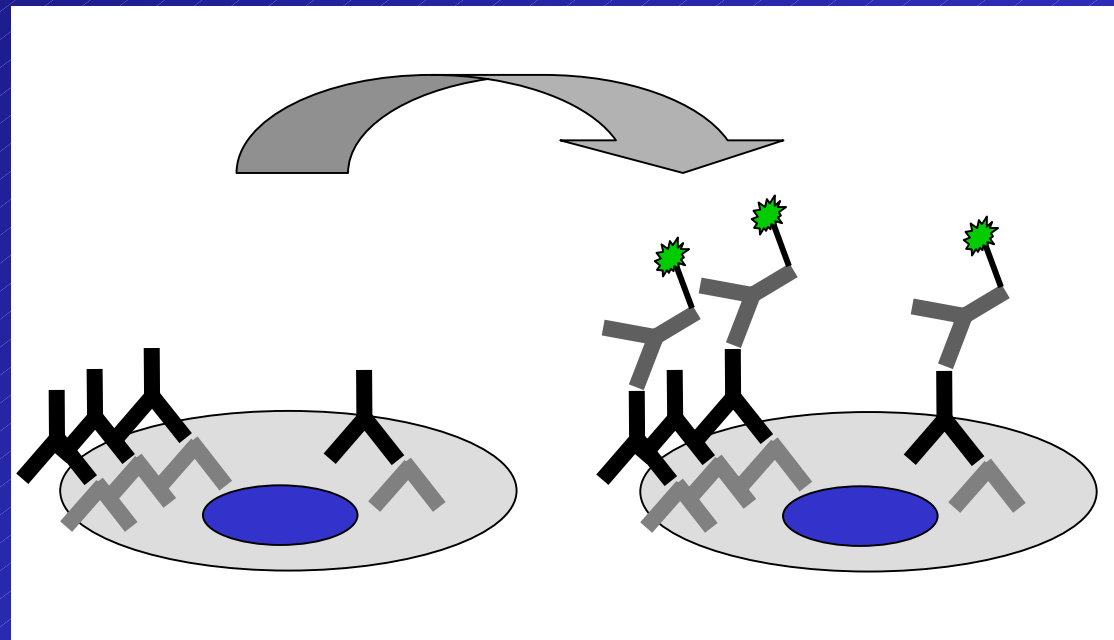
Immunfluoreszenz

Begriffserklärungen/ Färbeprinzip

Direkte Färbung



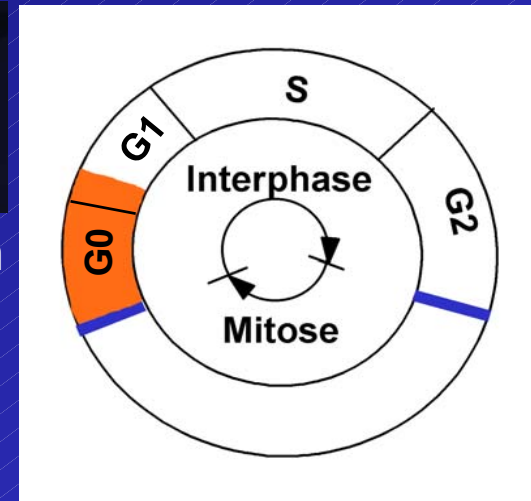
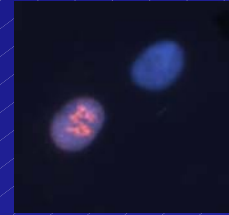
Indirekte Färbung



Probenpräparation Verwendete Antikörper

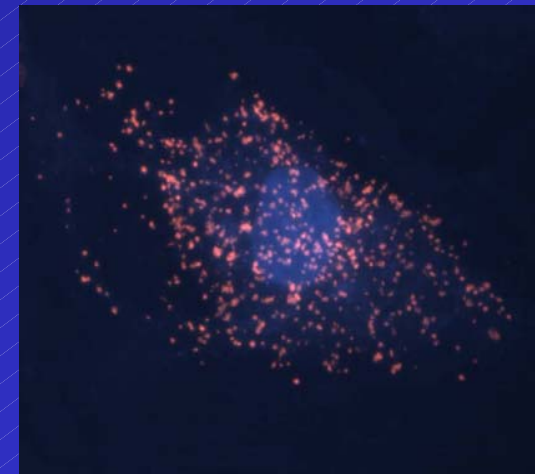
1. Ki67

- Im Zellkern
- Proliferationsassoziiertes Antigen
- In den Zellzyklusphasen späte G1 – Mitose
- Erlaubt die Identifikation von ruhenden und proliferierenden Zellen in Gewebeschnitten oder Zellkulturen



2. Von Willebrand Faktor (Faktor VIII related antigen)

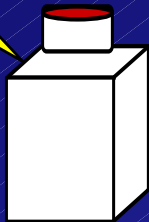
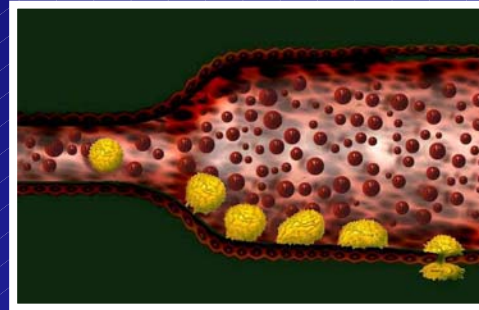
- Multimeres Glycoprotein
- Bindet andere Glycoproteine, Kollagen und Heparin
- Schutz von Faktor VIII vor unspezifischem Abbau
- Vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten
- Gespeichert in Weibel-Pallade-Körperchen
- Erlaubt die Charakterisierung vom Endothelzellen



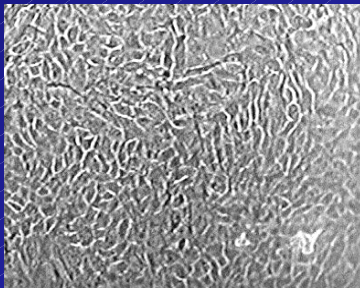
Probenpräparation Verwendete Zellen



Gewebestücke



Kollagenase-
Verdau



Kultivierung in
Quadriperm-Schalen

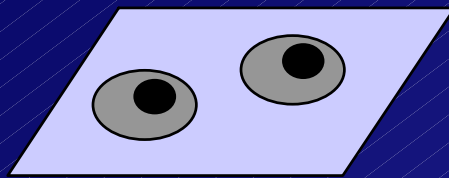


Zell-Fixierung

Immunfluoreszenz-
färbung

Probenpräparation

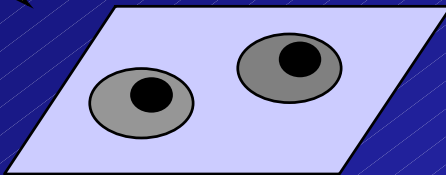
Färbeprotokoll Ki67



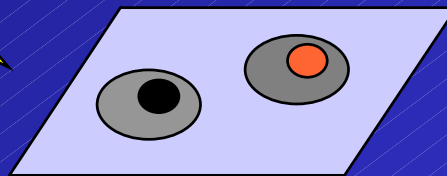
HDMEC



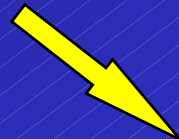
Primär-AK: Ki67 (Maus)



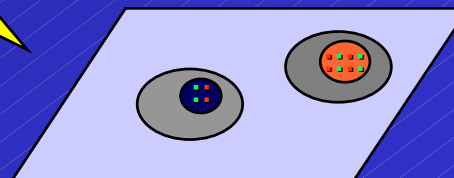
Sekundär-AK:
Ziege-anti-Maus-Cy3



Trocknen

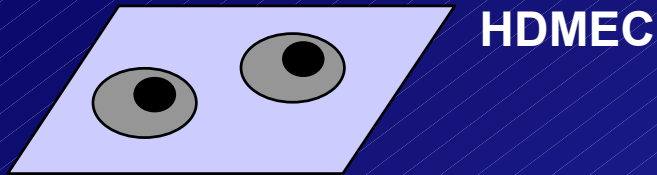


FISH und
Kern-Gegenfärbung



Probenpräparation

Färbeprotokoll vWF



Proben

Auswertung

Mikroskopieren



-Einführung

-Erklärung der Komponenten

-Präparate:

*Ki67-Cy3 mit FISH und
Kerngegenfärbung*

vWF-Cy3 mit Kerngegenfärbung

*-Auszählen der positiven Zellen und
Ermittlung des prozentualen Anteils*

-Auszählen der FISH-Signale

Proben

Auswertung

Dokumentieren

-Protokoll der Auswertung:
*Auszählen der positiven Zellen und
Ermittlung des prozentualen Anteils
Auszählen der FISH-Signale*

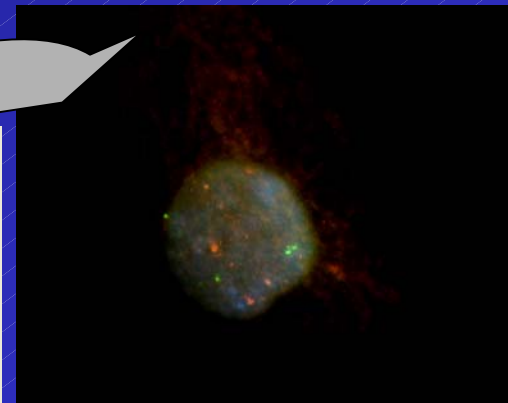
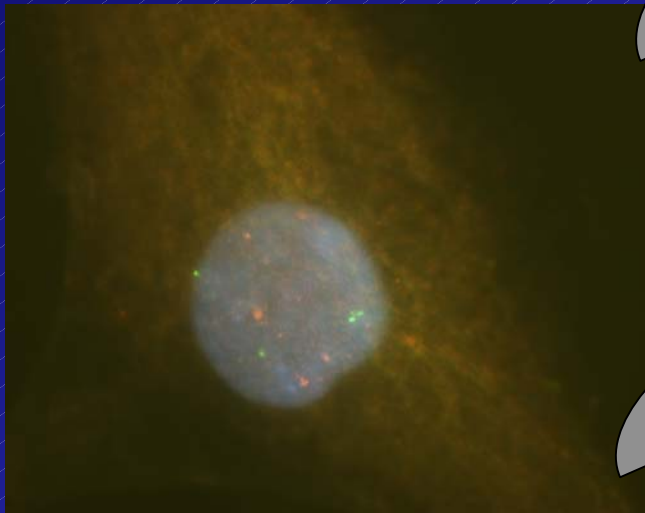
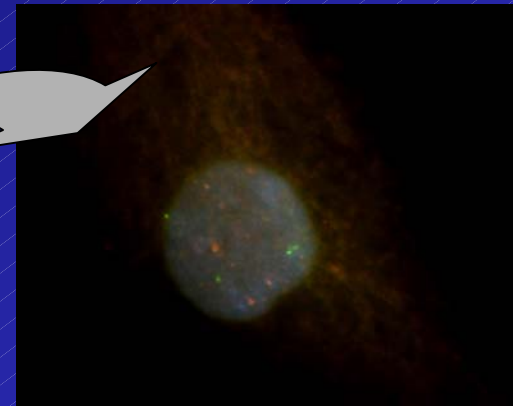
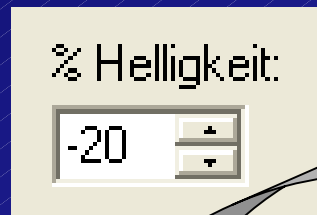
Ki67	Diploide	Polyploide
Positive		
Negative		

-Bilddaufnahme

Proben

Auswertung

Bildnachbearbeitung



Organisation/ Gruppeneinteilung

	Probenpräparation (Bohn) Container-Labor	Fluoreszenzmikroskopie (Oberringer) Container-Labor	Elektronenmikroskopie (Knittel) REM-Labor	Rastersondenmikroskopie (Englisch) AFM-/ SNOM-Labor
12.45h-13.30h	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
13.30h-14.15h	Gruppe II	Gruppe I	Gruppe IV	Gruppe III
14.15h-15.00h	Gruppe III	Gruppe IV	Gruppe I	Gruppe II
15.00h-15.45h	Gruppe IV	Gruppe III	Gruppe II	Gruppe I

Teilnehmer Gruppe I:

Teilnehmer Gruppe II:

Teilnehmer Gruppe III:

Teilnehmer Gruppe IV: