

Fluorescent markers in microscopy: photophysical characteristics and applications in cell biology

Fluorescenčni označevalci v mikroskopiji: fotofizikalne značilnosti in uporaba v celični biologiji

Urban Bogataj*, Jasna Štrus, Nada Žnidaršič, Marko Krefc
Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, 1000 Ljubljana
*korespondenca: urban.bogataj@bf.uni-lj.si

Izvleček: V fluorescenčni mikroskopiji bioloških vzorcev je večinoma treba strukture v celicah in tkivih ustrezno označiti z različnimi fluorescenčnimi označevalci. Tri glavne skupine fluorescenčnih označevalcev so majhni organski fluorokromi, fluorescenčni proteini in kvantne pike. Fluorescenčni označevalci se razlikujejo po fotofizikalnih lastnostih in po specifičnosti za vezavo na izbrane tarčne sestavine v vzorcu. Za označevanje izbranih struktur je treba majhne organske fluorokrome in kvantne pike običajno konjugirati s tarčno specifičnimi makromolekulami. Za označevanje s fluorescenčnimi proteini v celice ali organizem vnesemo gen za fluorescenčni protein. Napomembnejše fotofizikalne lastnosti fluorescenčnih označevalcev so vzbujevalni in izsevni spektri, Stokesov zamik, ekstinkcijski koeficient in kvantni izkoristek. Za doseganje ločljivosti pod uklonsko omejitvijo se v zadnjem času izkoriščajo posebni fluorokromi, pri katerih je fluorescenco mogoče modulirati z osvetljevanjem s svetlobo določene valovne dolžine.

Ključne besede: organski fluorokromi, fluorescenčni proteini, kvantne pike, fluorescenčna mikroskopija, označevanje

Abstract: In the fluorescence microscopy of biological specimens the structures in cells and tissues usually need to be labelled with various fluorescent markers. The three main groups of fluorescent markers are small organic fluorochromes, fluorescent proteins and quantum dots. Fluorescent markers differ according to photophysical properties and binding specificity for the selected target structures in the sample. For the labelling of specific structures with small organic fluorochromes or quantum dots it is usually necessary to conjugate them with target specific macromolecules. For the labelling with fluorescent proteins it is necessary to introduce a fluorescent protein gene into the observed cells or organism. The most important photophysical properties of fluorescent markers are absorption and emission spectra, Stokes shift, extinction coefficient and quantum yield. Currently, various super-resolution fluorescent microscopy techniques exploit special fluorochromes that enable fluorescence modulation by specific wavelength illumination, to achieve the resolution below the diffraction limit.

Keywords: organic fluorochromes, fluorescent proteins, quantum dots, fluorescence microscopy, labelling

Uvod

Razvoj fluorescenčne mikroskopije je omogočil nove pristope za lokalizacijo posameznih celičnih komponent v fiksiranih in živih celicah, s čimer je fluorescenčna mikroskopija postala nepogrešljiva metoda v celični biologiji. V zadnjih desetletjih je bil dosežen velik preboj predvsem v povezavi z izboljšanjem ločljivosti fluorescenčne mikroskopije. Razvoj optičnih komponent mikroskopov in opreme za zajem in računalniško analizo slike je pripeljal do novih tehnik fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti, ki omogočajo prikaz struktur z ločljivostjo pod uklonsko omejitvijo (Hell in Wichmann 1994, Gustafsson 2000, Betzig in sod. 2006, Rust in sod. 2006). Ker je v fluorescenčni mikroskopiji za prikaz določene celične strukture potrebno označevanje te z določenim fluorescenčnim označevalcem, je bil poleg razvoja mikroskopov pomemben tudi razvoj že poznanih in novih fluorescenčnih označevalcev. Trenutno so v fluorescenčni mikroskopiji v uporabi tri glavne skupine fluorescenčnih označevalcev: majhni organski fluorokromi, fluorescenčni proteini in kvantne pike. Izmed vseh treh skupin fluorescenčnih označevalcev so najdlje v uporabi majhni organski fluorokromi. Na voljo je širok nabor teh molekul, vendar so večinoma derivati nekaj osnovnih heterocikličnih spojin (Lavis in Raines 2008, Terai in Nagano 2013). Fluorescenčni proteini so v glavnem derivati osnovnega zelenega fluorescenčnega proteina, ki je bil izoliran iz meduze vrste *Aequorea victoria* (Shimomura in sod. 1962, Tsien 1998). Kvantne pike pa so polprevodniški nanokristali s posebno lastnostjo, da je valovna dolžina oddane fluorescenčne svetlobe odvisna od njihove velikosti (Medintz in sod. 2005). Poleg drugih lastnosti, je za uporabnost fluorescenčnih snovi v mikroskopiji pomembno, da je označevanje z njimi specifično. Specifičnost označevanja s fluorescenčnimi proteini se zagotovi z vnosom gena za fuzijski protein, v katerem je fluorescenčni protein vezan na tarčni protein. Kljub temu je pred poskusi potrebno preveriti ali je fuzijski protein funkcionalen in ali se v celici nahaja na običajnem mestu za tarčni protein. Majhne organske fluorokrome in kvantne pike za specifično označevanje običajno konjugirajo z ustrežno makromolekulo, ki zagotovi specifičnost vezave na opazovano

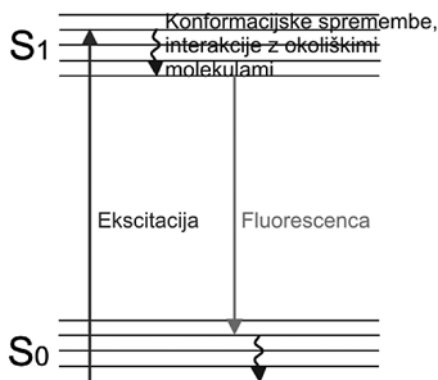
celično komponento. Vzoredno z razvojem različnih tehnik fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti poteka tudi razvoj fluorescenčnih snovi s posebnimi fotokemičnimi lastnostmi. Te tehnike namreč za doseganje ločljivosti pod uklonsko omejitvijo izkoriščajo specifične odzive fluorescenčnih snovi na osvetljevanje s svetlobo določene valovne dolžine, pogosto pri visoki intenziteti. Z modifikacijami tako poskušajo pridobiti fluorescenčne snovi, pri katerih lahko fluorescenca moduliramo z osvetljevanjem s svetlobo določene valovne dolžine (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Uno in sod. 2015).

Fluorescenca in z njo povezane lastnosti fluorescenčnih snovi

Za fluorescenčne molekule oziroma fluorokrome je značilen specifičen odziv na osvetljevanje. Zanje je značilen pojav fluorescenca pri katerem molekula absorbira svetlobo določene valovne dolžine in nato izseva svetlobo nižje energije, torej daljše valovne dolžine. V povezavi s fluorescenco imajo različne fluorescenčne snovi specifične fotofizikalne lastnosti. Dve ključni lastnosti sta vzbujevalni in izsevni spekter. Vzbujevalni spekter je območje valovnih dolžin, s katerimi lahko vzbudimo določeno fluorescenčno molekulo. Foton z ustrežno valovno dolžino lahko povzroči prehod zunanjega elektrona fluorescenčne molekule v orbitalo višje energije in s tem vzbudi fluorescenčno molekulo iz osnovnega stanja S_0 v vzbujeno stanje, npr. v S_1 (Sl. 1). Ker fluorescenčna molekula ob vzbujanju lahko preide na različne vibracijske nivoje stanja S_1 ali celo v višja vzbujena stanja, je določeno fluorescenčno molekulo mogoče vzbujati s svetlobo v določenem razponu valovnih dolžin. Od tega razpona, ki je odvisen od dovoljenih energijskih stanj, je odvisna širina vzbujevalnega spektra. Ob prehodu iz vzbujenega stanja S_1 nazaj v osnovno stanje S_0 fluorescenčna molekula odda foton z izsevno valovno dolžino. Izsevni spekter nam pove, katere valovne dolžine svetlobe lahko fluorescenčna molekula odda ob tem prehodu. Pred emisijo fluorescenčne svetlobe se del energije različnih vibracijskih nivojev vzbujenega stanja S_1 vedno sprosti zaradi konformacijskih sprememb znotraj fluorescenčne molekule in interakcij z okoliškimi molekulami.

Zato je izsevana valovna dolžina vedno daljša od vzbujevalne, profil izsevanega spektra pa je neodvisen od uporabljene vzbujevalne valovne dolžine. Kljub temu pa molekula ob sproščanju v osnovno stanje lahko preide na različne vibracijske nivoje osnovnega stanja S_0 . Zaradi tega ima tudi oddana svetloba valovne dolžine v določenem razponu, kar se odraža v širini izsevanega spektra (Murphy 2001, Lichtman in Conchello 2005, Johnson in Spence 2010). Razliko med vzbujevalno in izsevano valovno dolžino imenujemo Stokesov zamik. Fluorescenčne molekule se zelo razlikujejo po vrednosti Stokesovega zamika. Prednost fluorokromov z večjim Stokesovim zamikom je, da v fluorescenčnem mikroskopu lažje ločimo njihovo vzbujevalno in izsevano svetlobo. Intenziteta fluorescence določene fluorescenčne molekule je odvisna od njenega ekstinkcijskega

koeficienta in kvantnega izkoristka. Ekstinkcijski koeficient pove koliko svetlobe lahko fluorescenčna molekula absorbira pri določeni valovni dolžini vzbujevalne svetlobe. Kvantni izkoristek pa pove koliko fotonov lahko molekula odda s fluorescenco, če absorbira en foton (Murphy 2001, Lavis in Raines 2008, Johnson in Spence 2010). Pri uporabi fluorokromov je treba upoštevati tudi bledenje njihove fluorescence, ki je izguba fluorescence zaradi s fotoni povzročenih kemičnih poškodb in kovalentnih modifikacij molekul fluorokroma. Fotofizikalne lastnosti fluorokromov so odvisne tudi od kemijskega okolja v katerem je fluorokrom. Na fotofizikalne lastnosti tako vplivajo pH, ionska jakost, polarnost topila, koncentracija O_2 , prisotnost molekul, ki utišajo fluorescenco in drugi dejavniki (Murphy 2001).



Slika 1: Osnovna shema energijskih stanj molekule in prehodov elektronov med njimi. Ob vzbujanju fluorescence zunanji elektron molekule preide iz osnovnega stanja S_0 v vzbujeno stanje S_1 . Energija različnih vibracijskih nivojev stanja S_1 se porazgubi s konformacijskimi spremembami znotraj molekule in interakcijami z okoliškimi molekulami. Ob prehodu elektrona iz vzbujenega stanja S_1 nazaj v osnovno stanje S_0 molekula odda fluorescenčno svetlobo.

Figure 1: Basic scheme of the energy states of a molecule and electron transitions between them. During the excitation of fluorescence an outer electron of a molecule moves from the ground state S_0 to the excited state S_1 . Energy of different vibrational levels of state S_1 is dissipated through conformational changes within a molecule and interactions with surrounding molecules. During the transition from the excited state S_1 back to the ground state S_0 a molecule emits fluorescent light.

Majhni organski fluorokromi

Majhni organski fluorokromi so večinoma aromatske ali heterociklične spojine. Zaradi konjugiranih dvojnih vezi lahko že fotoni vidnega spektra elektromagnetnega valovanja z relativno

nizko energijo sprožijo njihov prehod v vzbujeno stanje. V splošnem velja, da več kot ima molekula konjugiranih dvojnih vezi, nižja energija je potrebna za vzbujanje fluorescence (Lichtman in Conchello 2005). Prvi identificirani organski fluorokrom je bil kinin sulfat, ki ob osvetljevanju z

ultravijolično svetlobo fluorescira modro. Kasneje so bili odkriti ali pridobljeni z modificiranjem obstoječih številni novi organski fluorokromi, ki lahko oddajajo fluorescenčno svetlobo drugih valovnih dolžin. Organski fluorokromi, ki so na voljo danes, pokrivajo praktično celoten vidni spekter elektromagnetnega valovanja. V fluorescenčni mikroskopiji so najpogosteje v uporabi različni derivati fluoresceina in rodamina, cianini ter barvila BODIPY (boron-dipyrromethene). Proizvajalci fluorescenčnih barvil ponujajo derivate teh osnovnih fluorescenčnih molekul z izboljšanimi lastnostmi pod različnimi imeni, ki predstavljajo njihove blagovne znamke. Takšen primer so na primer barvila Alexa Fluor® (Molecular Probes, Inc.) (Johnson in Spence 2010, Terai in Nagano 2013).

V fluorescenčni mikroskopiji lahko opazujemo naravno prisotne endogene organske fluorescenčne molekule (avtofluorescenca), ali pa opazovano strukturo v vzorcu označimo z neko sintetično fluorescenčno organsko molekulo (sekundarna fluorescenca) (Sl. 2). Če je v vzorcu s fluorokromi, ki fluorescirajo v različnih barvah, označenih več struktur, je mogoče posnete slike posameznih struktur sestaviti v skupno sliko (Dodatna Sl. 1). Na voljo so sintetični organski fluorokromi za različne načine uporabe. Prva skupina so fluorokromi, ki jih za uporabo konjugiramo s tarčno specifičnim ligandom, kar nam omogoča specifično lokalizacijo izbranih molekul v vzorcu. Druga skupina so fluorokromi, ki se specifično vežejo na nukleinske kisline. Tretja skupina so nekonjugirani fluorokromi, ki se lahko koncentrirajo v različnih organelih na podlagi fizioloških procesov in kemijskega okolja v določenem organelu. V četrto skupino spadajo fluorescenčne molekule, ki se uporabljajo kot senzorji za specifične ione.

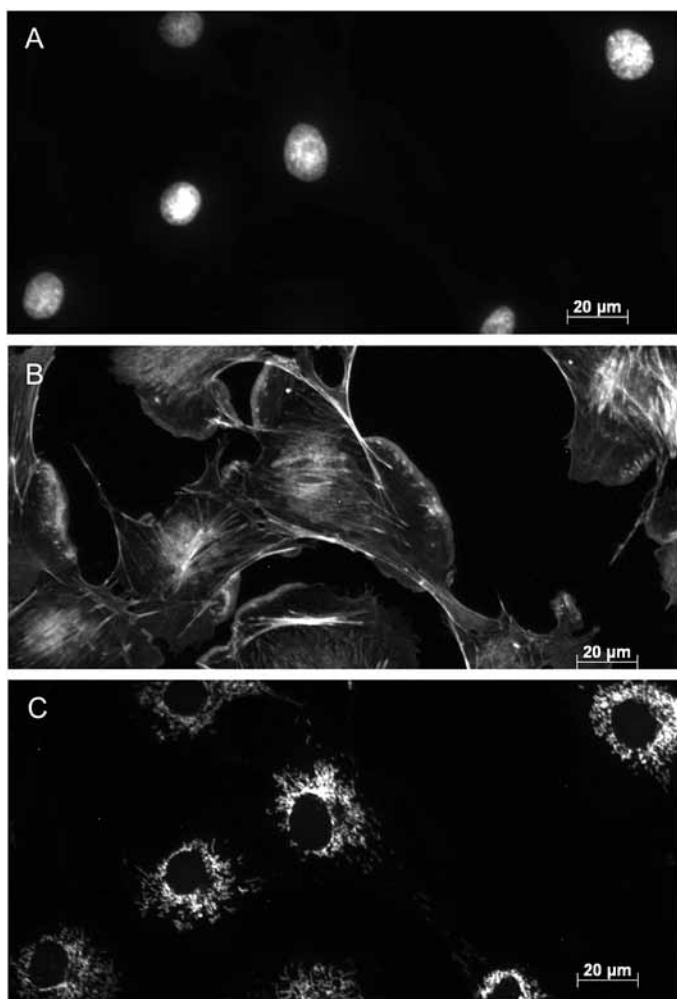
Endogene fluorescenčne organske molekule

Med fluorescenčne organske molekule, ki so v bioloških vzorcih naravno prisotne, spadajo med drugim aromatske aminokisline (fenilalanin, tirozin, triptofan), reducirani nikotinamidni kofaktorji (NADH, NADPH) in flavini. Za vzbujanje teh molekul je potrebna večinoma ultravijolična svetloba. Njihova fluorescenca je v območju med ultravijoličnim in zelenim delom vidnega spektra. Endogene fluorescenčne molekule so

vzrok za avtofluorescenca, ki v fluorescenčni mikroskopiji pogosto moti zajem signala iz fluorescenčno označenih struktur, ki jih opazujemo. Temu se lahko do določene mere izognemo, če za označevanje izberemo fluorescenčno barvilo, ki ima vzbujevalni in izsevani maksimum v rdečem delu vidnega spektra oziroma izven območja avtofluorescenca (Lavis in Raines 2008) ali pa na različne načine avtofluorescenca čim bolj zmanjšamo.

Majhni organski fluorokromi konjugirani s tarčno specifičnimi ligandi

Večina majhnih organskih fluorokromov v splošnem ne izkazuje specifičnosti za vezavo na določene komponente v biološkem vzorcu. Da lahko z njimi specifično označimo neko celično komponento jih je treba konjugirati z nekim tarčno specifičnim ligandom, običajno s protitelesom. Fluorescenčno označena protitelesa se nato uporabljajo v imunofluorescenčni mikroskopiji za označevanje specifičnih biomolekul v vzorcu. Na ta način se najpogosteje označujejo specifični proteini (Sl. 3). Druga možnost je konjugacija fluorescenčne molekule z enoverižno protismerno DNA za specifičen gen ali drugo nukleotidno zaporedje. Takšne fluorescenčno označene oligonukleotidne sonde so uporabne pri fluorescenčni *in situ* hibridizaciji (FISH), s katero lahko spremljamo gensko ekspresijo ali lokaliziramo specifičen gen na kromosomu ali v jedru (Suzuki in sod. 2007). Za konjugacijo s tarčno specifičnimi makromolekulami se izmed majhnih organskih fluorokromov najpogosteje uporabljajo različni derivati fluoresceina (Dodatna sl. 2A), kot je na primer fluorescein izotiocianat (FITC). Fluorescein absorbira modro svetlobo in fluorescira zeleno svetlobo. Težava pri njegovi uporabi je relativno hitro bledenje fluorescence in občutljivost na nizek pH (Lavis in Raines 2008, Johnson in Spence 2010). Poleg derivatov fluoresceina so za konjugacijo z makromolekulami pogosto v uporabi derivati rodamina, kot je na primer tetrametilrodamin (Dodatna sl. 2B) v obliki reaktivnega izotiocianata (TRITC) ali karboksilne kisline (TAMRA). Tetrametilrodamin absorbira zeleno svetlobo in fluorescira oranžno svetlobo.

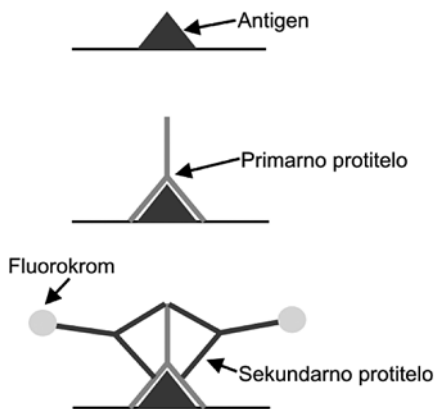


Slika 2: Primer fluorescenčnega označevanja celičnih jeder, citoskeleta in mitohondrijev v endotelnih celicah. **A** – S fluorescenčnim barvilom DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) označena jedra. DAPI se specifično veže na DNA. **B** – Aktinski filamenti označeni s fluorescenčnim barvilom Alexa Fluor® 488. Fluorescenčno barvilo je konjugirano s faloidinom, ki se specifično veže na aktinske filamente. **C** – Mitohondriji označeni z barvilom MitoTracker® Red CMXRos, ki se koncentrira v mitohondrijih. Celične komponente so označene na preparatu celic goveje pljučne arterije.

Figure 2: An example of the fluorescent labelling of cell nuclei, cytoskeleton and mitochondria in endothelial cells. **A** – Cell nuclei labelled with fluorescent dye DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), which specifically binds to the DNA. **B** – Actin filaments labelled with fluorescent dye Alexa Fluor® 488. Fluorescent dye is conjugated to phalloidin, which specifically binds to the actin filaments. **C** – Mitochondria labelled with fluorescent dye MitoTracker® Red CMXRos, which concentrates in the mitochondria. Cell components are labeled in the bovine lung artery cell specimen.

V primerjavi s fluoresceinom je bolj fotostabilen, njegova fluorescenca pa je neodvisna od pH (Lavis in Raines 2008, Johnson in Spence 2010). Za označevanje protiteles, nukleinskih kislin, lipidov in drugih bioloških molekul so pogosto v uporabi cianini, kot so na primer CyDye barvila. To so kationske molekule sestavljene iz dveh heterocikličnih podenot povezanih s poliensko verigo (Dodatna sl. 2D). Številka v imenu CyDye barvil nam pove število ogljikovih atomov v polienski verigi. S podaljševanjem polienske verige se absorpcijski in izsevni spekter pomikata proti daljšim valovnim dolžinam. Cy®3 tako absorbira zeleno svetlobo in fluorescira rumeno svetlobo, Cy®5 absorbira in fluorescira rdečo svetlobo, Cy®7 pa absorbira in fluorescira v bližini infrardečega dela elektromagnetnega spektra. V infrardečem delu spektra se izboljša zaznava signala zaradi manj avtofluorescence, vendar imajo cianini z dolgimi polienskimi verigami bistveno slabši kvantni izkoristek. Težava cianinov je njihova slaba fotostabilnost (Wang in sod. 2006, Lavis in Raines 2008). Kot nadomestna

barvila za nekatere starejše organske fluorokrome se uporabljajo barvila BODIPY. BODIPY FL (Dodatna sl. 2C) ima absorpcijski in izsevni spekter podoben fluoresceinu, BODIPY TMR pa tetrametilrodaminu. To so nepolarne lipofilne molekule, zaradi česar njihovi konjugati lažje vstopajo v celice kot konjugati organskih fluorokromov z nabojem (Johnson in Spence 2010). Relativno nova skupina majhnih organskih fluorokromov so barvila Alexa Fluor®. Po kemijski zgradbi so to različne molekule, ki so jih pridobili s sulfonacijo različnih organskih fluorokromov. Sulfonske skupine dajejo barvilom Alexa Fluor® negativen naboj, zaradi česar so bolj topna v vodi. Poleg tega so zelo fotostabilna s fluorescenco neodvisno od pH. Zaradi boljših lastnosti se pogosto uporabljajo kot alternativa starejšim fluorescenčnim barvilom. Alexa Fluor® 488 se tako lahko uporablja kot alternativa fluoresceinu, namesto barvila Cy®3 in tetrametilrodamina pa se lahko uporabljata barvili Alexa Fluor® 546 in Alexa Fluor® 555 (Wang in sod. 2006, Johnson in Spence 2010).



Slika 3: Shematski prikaz imunooznačevanja s specifičnimi primarnimi protitelesi in sekundarnimi protitelesi, ki so konjugirana z organskim fluorokromom. Na izbrani antigen se najprej vežejo zanj specifična primarna protitelesa. Vezana primarna protitelesa označimo s sekundarnimi protitelesi konjugiranimi s fluorokromom. Ker se na eno primarno protitelo lahko veže več sekundarnih ob tem pride do ojačenja signala.

Figure 3: Schematic visualization of immunolabeling with the organic fluorochrome conjugated secondary antibodies. First, the specific primary antibodies bind to selected antigen. Bound primary antibodies are labeled with fluorochrome conjugated secondary antibodies. The signal is amplified, because more than one secondary antibodies can bind to the primary antibody.

Fluorescenčna barvila za nukleinske kisline

Določeni majhni organski fluorokromi se specifično vežejo na nukleinske kisline. Vežava je lahko posledica vrivanja (interkalacije) fluorokromov med bazne pare nukleinskih kislin ali pa vežave v mali ali veliki žleb dvojne vijačnice DNA (Johnson in Spence 2010). Z vrivanjem med bazne pare se na nukleinske kisline vežejo etidijev bromid, etidijev homodimer, propidijev jodid in akridin oranžno. Etidijev bromid in propidijev jodid sta strukturno podobni molekuli, ki absorbirata zeleno in fluorescirata rdečo svetlobo. Ker ne moreta prehajati skozi celične membrane sta uporabni za označevanje mrtvih celic. Akridin oranžno lahko prehaja skozi celične membrane. Ob vezavi na DNA sta njegov absorpcijski in izsevni maksimum v zelenem delu vidnega spektra, ob vezavi na RNA pa je absorpcijski maksimum v modrem delu spektra, izsevni pa v rdečem. Poleg označevanja jeder je akridin oranžno uporabno za označevanje kompartmentov s kisló vsebino, kot so na primer lizosomi (Johnson in Spence 2010). Uporablja se tudi za lokalizacijo kislih sestavin zunajceličnih matriksov in je zelo primerno za barvanje različnih slojev kutikule členonožcev (Marlowe and Dillaman 1995). Barvilo DAPI in barvila Hoechst se vežejo v mali žleb dvojne vijačnice DNA. V fluorescenčni mikroskopiji se najpogosteje uporabljajo za označevanje celičnih jeder (Dodatna sl. 3). Barvila Hoechst lahko prehajajo skozi celične membrane in so tako uporabna za označevanje živih celic, medtem ko je DAPI primeren le za označevanje fiksiranih celic (Lavis in Raines 2008; Johnson in Spence 2010). DAPI fluorescira v modri barvi, za vzbujanje njegove fluorescence pa je potrebna UV svetloba. Označitev celičnih jeder z barvilom DAPI je pogosto uporabljena metoda za sledenje dinamike celic med embrionalnim razvojem (Sl. 4). Z označevanjem z barvilom DAPI dobimo podatke o številu in razporeditvi celičnih jeder v embriju, kar je posebej uporabno za spremljanje zgodnjih razvojnih faz embrionalnega razvoja nevretenčarskih in vretenčarskih organizmov (Milatović in sod. 2010, Sandell in sod. 2012, Mittman in Wolff 2012, Mittmann in sod. 2014). Barvila Hoechst podobno kot DAPI absorbirajo v UV delu spektra in fluorescirajo v modri barvi. Za razliko od barvila DAPI je fluorescenca barvil

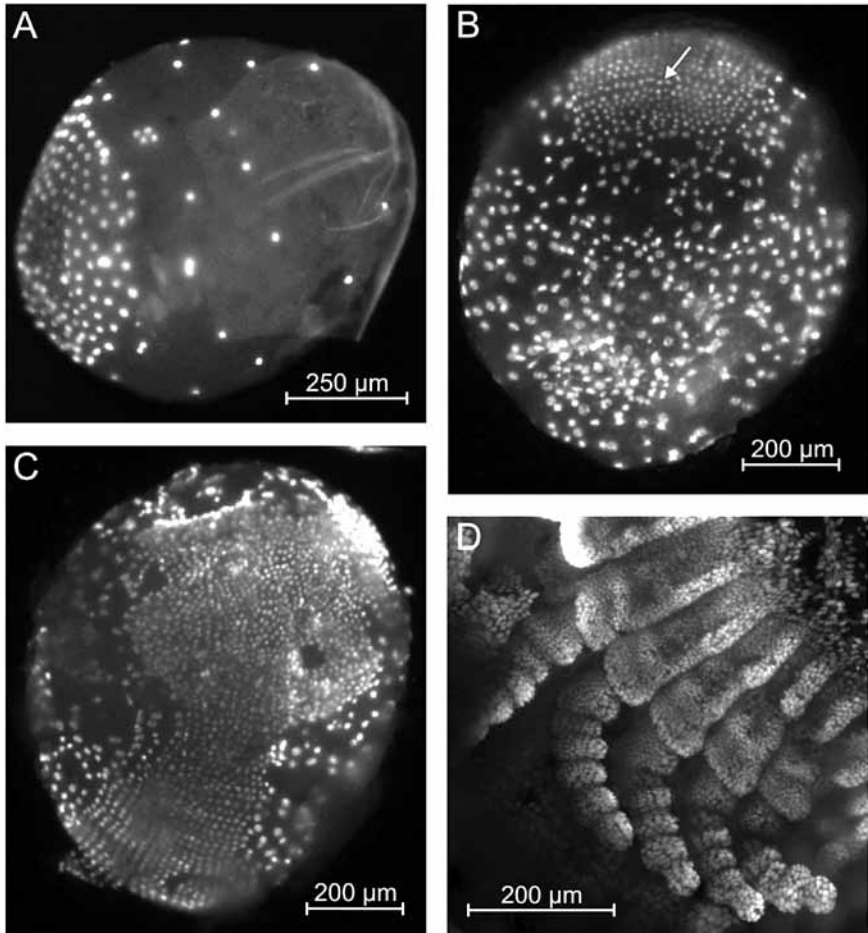
Hoechst utišana ob vezavi na DNA, ki vsebuje 5-bromo-2'-deoksiuridin, zaradi česar so uporabna in analizi celičnega cikla (Lavis in Raines 2008, Johnson in Spence 2010).

Nekonjugirani organski fluorokromi specifični za organele

Nekateri majhni organski fluorokromi se lahko koncentrirajo v specifičnih celičnih organelih. Z njimi je mogoče označevati npr. mitohondrije, lizosome, endoplazemski retikulum in Golgijev aparat. Vsi lahko prehajajo skozi celične membrane in vstopajo v celice. Tako za razliko od fluorescenčno označenih protiteles omogočajo označevanje celičnih organelov v živih celicah (Johnson in Spence 2010). Za označevanje mitohondrijev se uporabljata kationski barvili Rodamin 123 in tetrametilrodamin (Johnson in Spence 2010). Specifičen privzem določenih kationskih barvil v mitohondrije je odvisen od membranskega potenciala na mitohondrijskih membranah (Darzynkiewicz in sod. 1982). Težava pri uporabi teh barvil je v tem, da se ob fiksaciji sperejo iz celic. Namesto njih je mogoče uporabiti barvila MitoTracker®, ki vsebujejo reaktivno klorometilno skupino, s katero se kovalentno vežejo na tiolne skupine proteinov v mitohondrijskem matriksu. Obstajajo različna barvila MitoTracker®, ki fluorescirajo v različnih barvah od zelene do dolgovalovno rdeče (Johnson in Spence 2010). Za označevanje lizosomov se lahko uporablja kationsko barvilo akridin oranžno, vendar je njegova specifičnost slaba. Boljšo specifičnost imajo barvila LysoTracker®. To so različni organski fluorokromi vezani na šibko bazo. Njihova specifičnost temelji na protonaciji pri nizkem pH v lizosomih. Na voljo je več barvil LysoTracker, ki oddajajo fluorescenčno svetlobo različnih barv od modre do dolgovalovno rdeče (Johnson in Spence 2010). Endoplazemski retikulum je možno fluorescenčno označevati s kratko-verižnimi karbocianini, kot sta DiOC₆(3) in DiOC₃(3). To sta kationski lipofilni barvili, ki se vežeta na znotrajcelične membrane in sta uporabni za označevanje mitohondrijske membrane in membrane endoplazemskega retikuluma. Z vezavo barvil BODIPY FL in BODIPY TR na sulfonilureo so pridobili barvili ER-Tracker™ Green in ER-Tracker™ Red, ki imata večjo specifičnost za vezavo na endoplazemski retikulum in nista

strupeni za celice. Preko sulfoniluree se vežeta na receptorje za sulfonilureo povezane z od ATP odvisnimi K^+ kanali, ki so značilni za membrane endoplazemskega retikuluma. (Johnson in Spence 2010). Za označevanje Golgijevega aparata se

uporabljata barvili NBD C_6 ceramid in BODIPY FL C_5 ceramid. To sta organska fluorokroma vezana na molekulo ceramida, ki se aktivno transportirata v Golgijev aparat (Johnson in Spence 2010).



Slika 4: Prikaz uporabe fluorescenčnega barvila DAPI za označitev celičnih jeder v embrijih (*Porcellio scaber*). Vizualizacija razporeditve celičnih jeder v embrijih v različnih razvojnih fazah nam omogoča spremljanje nekaterih morfoloških vidikov embrionalnega razvoja. **A** – Večina jeder je agregiranih na enem polu embrija, v območju zarodnega diska. To je značilnost zgodnjih embrijev v fazi S2. **B** – Zgodnji embrij v fazi S3, vidna je ureditev ektoteloblastov v vrsto (puščica). **C** – Zgodnji embrij v fazi S5, v tej fazi poteka podaljševanje zarodnega pasu. **D** – Srednji embrij, vidna je segmentacija okončin in oblikovanje tergitov.

Figure 4: Demonstration of the fluorescent dye DAPI application to label cell nuclei in embryos (*Porcellio scaber*). Visualisation of the cell nuclei arrangement in embryos of different developmental stages allows us to track some of the morphological aspects of embryonic development. **A** – Most of the nuclei are aggregated at one pole of the embryo, in the area of germ disc. This is a characteristic of the early embryos in stage S2. **B** – Early embryo in stage S3, arrangement of the ectoteloblasts into a row (arrow) is visible. **C** – Early embryo in stage S5, during this stage the elongation of the germ band takes place. **D** – Mid embryo, the segmentation of appendages and the formation of tergites are visible.

Fluorescenčni senzorji za specifične ione

Organske fluorokrome, katerih spektralne lastnosti se spremenijo ob vezavi določenega iona, je mogoče uporabljati za spremljanje lokacije in koncentracije tega iona v celici. Lahko se spremeni intenziteta fluorescence, lahko pa ob vezavi pride do spremembe absorpcijskega ali izsevanega spektra. Za detekcijo kovinskih ionov so to večinoma fluorescenčne molekule, ki poleg fluorescenčnega dela vsebujejo še kelatorski del. Na kelatorski del se veže specifični kovinski ion, ob tem pa se spremenijo spektralne lastnosti molekule (Terai in Nagano 2013). Za detekcijo Ca^{2+} so na voljo številni fluorescenčni senzorji. Večina ima za vezavo kalcija kelatorsko skupino BAPTA (Dodatna sl. 2E), ki je bila razvita iz kelatorja EGTA. EGTA ima sicer visoko specifičnost za vezavo Ca^{2+} glede na Mg^{2+} , vendar ga je pri fiziološkem pH malo v neprotonirani obliki, ki lahko veže Ca^{2+} . S kemičnimi modifikacijami so razvili kelator BAPTA, ki dobro veže Ca^{2+} tudi pri fiziološkem pH in je neobčutljiv na manjše spremembe pH (Terai in Nagano 2013). Zaradi različnih fluorescenčnih delov v Ca^{2+} senzorjih obstaja širok nabor teh molekul, ki lahko absorbirajo in fluorescirajo svetlobo različnih valovnih dolžin. Ob vezavi Ca^{2+} se pri nekaterih fluorescenčnih senzorjih, kot so na primer fura-2, indo-1 in Fura Red, spremenijo absorpcijski in izsevni spektri. Pri drugih, kot so na primer fluo-3, fluo-4, rhod-2, Calcium Orange in Calcium Crimson, pa se poveča intenziteta fluorescence (Johnson in Spence 2010). Za detekcijo K^+ se uporabljata fluorescenčna senzorja PBFI in TAC-Red, za detekcijo Na^+ senzorji SBFI, CoroNa Green in CoroNa Red (Terai in Nagano 2013), za lokalizacijo Zn^{2+} pa na primer indikatorji TSQ, Zinquin (Dodatna sl. 4), ZnAF-2, FluoZin-3, FuraZin, RhodZin-3 (Zalewski in sod. 1994, Snitsarev in sod. 2001, Kikuchi in sod. 2004, Kay 2005, Nowakovski in sod. 2015). Prvi odkriti fluorescenčni senzor za Zn^{2+} je bil TSQ. Njegov derivat Zinquin lahko prehaja skozi celične membrane in je uporaben za vizualizacijo Zn^{2+} v živih celicah (Kikuchi in sod. 2004, Kay 2005). Različni ZnAF senzorji, kot je na primer ZnAF-2, imajo za detekcijo Zn^{2+} kelatorsko skupino TPEN. Kelatorske skupine senzorjev FluoZin-3, FuraZin in RhodZin-3 so pridobili z modifikacijami kelatorja BAPTA.

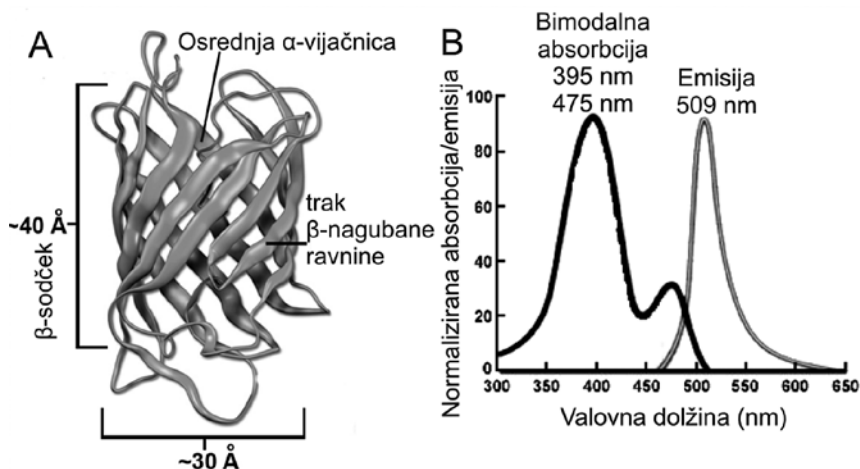
FluoZin-3 je zaradi velike občutljivosti uporaben za spremljanje sproščanja Zn^{2+} iz celic (Kikuchi in sod. 2004, Kay in sod. 2005).

Fluorescenčni proteini

Za razliko od sintetičnih organskih fluorokromov in kvantnih pik, kjer za označevanje uporabljamo določeno eksogeno fluorescenčno snov, pri fluorescenčnih proteinih za označevanje izkoriščamo endogeno izražen fluorescenčni protein. Gen zanj s pomočjo tehnik genskega inženiringa vnesemo v celico ali organizem. Vnos je mogoč v katerokoli celico ali organizem, saj za sintezo in zvijanje fluorescenčnih proteinov ter formiranje njihovega fluorofora niso potrebni specifični encimi ali kofaktorji. Da se vneseni gen lahko izraža, mora biti pod vplivom promotorja za izbrani specifični gen. Tako se fluorescenčni protein izraža skupaj z izbranim proteinom. Fluorescenčni protein je lahko tudi fizično vezan na tarčni protein, če je bil vnesen gen za fuzijski protein. S tem je zagotovljena specifičnost označevanja, zaradi česar fluorescenčnih proteinov ni treba konjugirati s tarčno specifičnimi makromolekulami. Označevanje s fluorescenčnimi proteini je tako manj invazivno, kar je njihova glavna prednost pri mikroskopiji živih bioloških vzorcev. Fluorescenčni proteini omogočajo vizualizacijo regulacije genske ekspresije pod vplivom promotorja tarčnega gena, označevanje tarčnih proteinov, opazovanje interakcij med proteini in spremljanje njihove dinamike (Chudakov in sod. 2005). Fluorescenčni proteini z različnimi absorpcijskimi in izsevanimi spektri ob uporabi ustreznih vzbujevalnih in zapornih filtrov omogočajo hkratno označevanje več struktur na istem vzorcu v različnih barvah. Občutljivost fluorescence nekaterih fluorescenčnih proteinov na pH in koncentracijo halidnih ionov je mogoče izkoriščati za spremljanje znotrajceličnega okolja. Za spremljanje znotrajceličnega okolja in encimskih aktivnosti so na voljo tudi senzorji, ki temeljijo na pojavu resonančnega prenosa energije s fluorescenco – FRET (fluorescence resonance energy transfer). Gre za prenos energije med donorjem in akceptorjem, ki poteka le na zelo kratke razdalje. Senzorji so običajno fuzijski proteini modrozelenega in rumenega fluorescenčnega

proteina. Običajno sta pri senzorjih za zaznavanje določene snovi v celici oba proteina dovolj blizu za pojav FRET le ob vezavi specifične snovi, pri senzorjih za proteazno aktivnost pa ob aktivnosti encima pride do ločitve obeh proteinov in prekinitve FRET med njima. Pojav FRET se izkorišča tudi za spremljanje interakcij med proteini. Za spremljanje dinamike proteinov je v uporabi tehnika FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Pri tej tehniki fluorescenco proteina na določenem področju najprej zbledimo z osvetljevanjem z visoko jakostjo vzbujevalne svetlobe in nato spremljamo, kako hitro se fluorescenca na tem področju spet pojavi, kar je odvisno od mobilnosti proteina (Johnson in Straight 2013). Osnova področja uporabe fluorescenčnih proteinov v fluorescenčni mikroskopiji je bilo odkritje zelenega fluorescenčnega proteina (green fluorescent protein: GFP) (Shimomura in sod. 1962), uspešen vnos in izražanje gena v celicah drugih organizmov (Chalfie in sod. 1994) in razvoj novih različic proteina z različnimi fotokemičnimi lastnostmi (Tsien 1998). Za te

dosežke so navedeni avtorji leta 2008 prejeli Nobelovo nagrado za kemijo (https://www.nobel-prize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/). Shimomura je GFP izoliral iz meduze *Aequorea victoria* in tudi identificiral njegov kromofor (Shimomura 1979), povzetek poteka raziskav je opisal v članku 'The discovery of aequorin and green fluorescent protein' (Shimomura 2005). Pri meduzi *A. victoria* GFP absorbira modro svetlobo, ki jo oddaja luminiscentni protein ekvorin, sam pa zato oddaja zeleno fluorescenčno svetlobo. Pri koralnjakih (Anthozoa) so kasneje odkrili fluorescenčne proteine, ki fluorescirajo pri daljših valovnih dolžinah (Chudakov in sod. 2005). Tridimenzionalna struktura GFP iz *A. victoria* je β -sodček iz 11 trakov β -nagubane ravnine, na sredini katerega je osrednja α -vijačnica (Sl. 5A). Osrednja α -vijačnica vsebuje fluorofor, ki fluorescira. Fluorofor ob prisotnosti kisika nastane s ciklizacijo aminokislinskih ostankov serina, tirozina in glicina na mestih od 65 do 67 (Tsien 1998, Shaner in sod. 2007). Spektralne lastnosti fluorescenčnih proteinov so v glavnem odvisne



Slika 5: Osnovni zeleni fluorescenčni protein GFP. **A** – Zgradba zelenega fluorescenčnega proteina. GFP je β -sodček z osrednjo α -vijačnico, ki vsebuje fluorofor (Priručje z dovoljenjem Company of Biologists: Journal of Cell Science (Shaner in sod. 2007)). **B** – Absorpcijski in izsevni spekter osnovnega zelenega fluorescenčnega proteina. Absorpcijski spekter ima dva vrhova pri 395 in 475 nm.

Figure 5: Original wild-type fluorescent protein GFP. **A** – Structure of the green fluorescent protein. GFP is a β -barrel with central α -helix, which bears the fluorophore (Adapted with permission from Company of Biologists: Journal of Cell Science (Shaner in sod. 2007)). **B** – Absorption and emission spectra of the original green fluorescent protein. Absorption spectrum has two peaks at 395 and 475 nm.

od teh treh aminokislinskih ostankov in od kemijskega okolja, ki obdaja osrednjo α -vijačnico in je odvisno od zgradbe β -sodčka (Shaner in sod. 2007, Stepanenko in sod. 2011). Z zamenjavami aminokislin na mestu kromofora in v β -sodčku, so tako pridobili širok nabor fluorescenčnih proteinov, ki pokrivajo širok del vidnega spektra elektromagnetnega valovanja. Poleg spreminjanja spektralnih lastnosti poskušajo z modifikacijami obstoječih fluorescenčnih proteinov povečati intenzivnost njihove fluorescence, izboljšati njihovo zvižanje in formiranje fluorofora pri 37 °C ter zmanjšati njihovo tendenco za dimerizacijo in oligomerizacijo (Zhang in sod. 2002, Lippincott-Schwartz in Patterson 2003, Shaner in sod. 2005, Shaner in sod. 2007). Predvsem pri rumenih fluorescenčnih proteinih poskušajo izboljšati fotostabilnost ter zmanjšati občutljivost na nizek pH in spremembe v koncentraciji kloridnih ionov (Zhang in sod. 2002, Shaner in sod. 2005). V zadnjem času poteka razvoj predvsem v smeri iskanja novih fluorescenčnih proteinov, pri katerih je z vzbujevalno svetlobo možno spreminjati njihove spektralne lastnosti. To so fotoaktivacijski fluorescenčni proteini, ki so uporabni predvsem pri tehnikah fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti, kot sta na primer PALM (photo-activation localization microscopy) (Betzig in sod. 2006) in STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) (Rust in sod. 2006). Druga smer trenutnega razvoja so fluorescenčni proteini, ki lahko oddajajo dolgovalovno rdečo fluorescenčno svetlobo. Ti so uporabni v mikroskopiji debelih vzorcev tkiv in dvo-fotonski mikroskopiji (Stepanenko in sod. 2011).

Fluorescenčni proteini iz meduze Aequorea victoria

Fluorescenčne proteine pridobljene z modifikacijami osnovnega zelenega fluorescenčnega proteina iz meduze *A. victoria* lahko glede na njihove spektralne lastnosti razdelimo v štiri skupine: zeleni fluorescenčni proteini, modri fluorescenčni proteini, modrozeleni fluorescenčni proteini in rumeni fluorescenčni proteini (Shaner in sod. 2007). Prednosti osnovnega zelenega fluorescenčnega proteina (GFP) sta dobra fotostabilnost in intenzivna fluorescence. Težavo pri uporabi predstavlja kompleksen absorpcijski spekter z dvema maksimumoma pri 395 in 475

nm (Sl. 5B). Dodatna težava je tendenca GFP-ja po združevanju v dimere (Tsien 1998). Izboljšani zeleni fluorescenčni protein (EGFP – enhanced green fluorescent protein) ima absorpcijski spekter z enim maksimumom in manjšo tendenco za dimerizacijo (Lippincott-Schwartz in Patterson 2003). Modri fluorescenčni proteini so bili pridobljeni z zamenjavo tirozina na mestu 66 s histidinom (Dodatna sl. 5A). Posledica je premik absorpcijskega in izsevanega spektra proti krajšim valovnim dolžinam v modro območje vidnega spektra. Težavi pri modrih fluorescenčnih proteinih sta nizka intenziteta fluorescence in njeno hitro bledenje (Lippincott-Schwartz in Patterson 2003). Absorpcijski in izsevni spektri modrozelenih fluorescenčnih proteinov se nahajajo med spektri zelenih in modrih fluorescenčnih proteinov. Pridobili so jih z zamenjavo tirozina na mestu 66 s triptofanom (Dodatna sl. 5B). V primerjavi z modrimi fluorescenčnimi proteini so svetlejši in bolj fotostabilni (Lippincott-Schwartz in Patterson 2003). Njihovi vzbujevalni in izsevni spektri so široki s po dvema maksimumoma (Tsien 1998, Shaner in sod. 2007). Modrozeleni fluorescenčni protein mTFP1 ima v fluoroforu na mestu 66 tirozin namesto triptofana. Njegova vzbujevalna in izsevna spektra sta v primerjavi z ostalimi modrozelenimi fluorescenčnimi proteini ožja in s po enim maksimumom. Modrozeleni fluorescenčni proteini se pogosto uporabljajo kot FRET donorji skupaj z rumenimi fluorescenčnimi proteini (Shaner in sod. 2007). Pri rumenih fluorescenčnih proteinih je premik absorpcijskega in izsevanega spektra proti daljšim valovnim dolžinam posledica zamenjave treonina na mestu 203 v β -sodčku blizu fluorofora s tirozinom (Dodatna sl. 5D). Zaradi interakcij med π -sistemoma fluorofora in tirozina je energija vzbujenega stanja nižja, posledično pa sta vzbujevalni in izsevni spekter premaknjena proti daljšim valovnim dolžinam (Tsien 1998). Fluorescenca rumenih fluorescenčnih proteinov je v primerjavi z drugimi fluorescenčnimi proteini ena od najsvetlejših, vendar precej odvisna od pH. Od rumenih fluorescenčnih proteinov je še vedno pogosto v uporabi EYFP (enhanced yellow fluorescent protein). Fluorescenca EYFP je močno odvisna od pH in je že pri vrednostih pod 7 močno utišana. To je lahko tudi prednost, saj se posledično lahko EYFP uporablja kot senzor za pH (Tsien 1998, Shaner in sod. 2007).

Fluorescenčni proteini ožigalkarjev iz skupine koralnjakov (*Cnidaria: Anthozoa*)

Poskusi, da bi iz fluorescenčnih proteinov iz vrste *A. victoria* pridobili fluorescenčne proteine z izsevanimi spektri v oranžnem in rdečem območju vidnega spektra, so bili večinoma neuspešni. Iz koral in morskih vetrnic iz skupine Anthozoa so izolirali nove fluorescenčne proteine, ki oddajajo oranžno in rdečo fluorescenco. Dva primera teh proteinov sta DsRed iz korale rodu *Discosoma* in HcRed iz morske vetrnice *Heteractis crispata* (Lippincott-Schwarz in Patterson 2003). Za večino oranžnih in rdečih fluorescenčnih proteinov je značilno, da med formiranjem njihovega fluorofora preidejo skozi vmesno stanje, v katerem fluorescirajo zeleno. Pri nekaterih rdečih fluorescenčnih proteinih pretvorba zelenega fluorofora v rdečega poteče avtomatično, pri drugih pa je za to potrebno osvetljevanje z UV svetlobo. Rdeča fluorescenca in potek formiranja fluorofora pri rdečih fluorescenčnih proteinih sta odvisna predvsem od aminokislinskega ostanka na mestu 65 (Verkhusha in Lukyanov 2004, Stepanenko in sod. 2011). Ker rdeča svetloba prodira globlje skozi tkiva, so ti fluorescenčni proteini uporabni v mikroskopiji debelih vzorcev. Uporaba rdečih fluorescenčnih proteinov je smiselna tudi zaradi manj avtofluorescence v rdečem območju vidnega spektra (Shaner in sod. 2007). Fluorescenčni protein DsRed fluorescira v oranžni barvi,

njegova uporabnost pa je omejena s počasnim formiranjem njegovega fluorofora, dolgotrajnim vmesnim zelenim stanjem in obvezno tetramerno obliko. Iz DsRed so pridobili prvi monomerni rdeči fluorescenčni protein mRFP, ki fluorescira v rdeči barvi. Iz proteina DsRed je bil pridobljen tudi fluorescenčni protein dTomato, ki je dimerni fluorescenčni protein z oranžno fluorescenco in velja za enega najsvetlejših rdečih fluorescenčnih proteinov (Shaner in sod. 2007). Iz fluorescenčnega protein mRFP so pridobili rdeča fluorescenčna proteina mCherry in mStrawberry. Fluorescenčni proteini mPlum, Katushka in mKate fluorescirajo dolgovalovno rdečo svetlobo (Shaner in sod. 2007).

Kvantne pike

Kvantne pike so polprevodniški nanokristali, velikosti od 1 do 10 nm. V mikroskopiji in drugih bioloških aplikacijah so uporabne zaradi svoje fluorescence. Posebnost kvantnih pik je, da je pri enaki sestavi valovna dolžina njihove fluorescence odvisna od njihove velikosti (Stanislavjevic 2015). V bioloških aplikacijah so najpogosteje v uporabi kvantne pike z jedrom iz CdSe, ki je obdano s tankim slojem ZnS (Sl. 6). Sloj ZnS zaščiti jedro pred oksidacijo, prepreči prehajanje kadmija in selena v okoliški medij in izboljša optične lastnosti kvantne pike. Kvantne pike z jedrom iz CdSe ali CdTe oddajajo fluorescenčno svetlobo vidnega



Slika 6: Zgradba kvantne pike. Kvantne pike za uporabo v fluorescenčni mikroskopiji so najpogosteje sestavljene iz jedra iz CdSe, ki fluorescira, sloja ZnS, ki prepreči prehajanje kadmija in selena v okoliški medij in izboljša optične lastnosti kvantne pike, ter organskega plašča, ki je potreben za topnost kvantnih pik v vodi in vezavo tarčno specifičnih makromolekul (Prirejeno z dovoljenjem Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Giepmans in sod. 2005)).

Figure 6: Quantum dot structure. Quantum dots used in fluorescence microscopy are most often composed of a CdSe core, which fluoresces, a layer of ZnS, which prevents leakage of cadmium and selenium into the surrounding medium and improves optical properties of a quantum dot, and an organic coat, which makes quantum dots water soluble and allows addition of the target specific macromolecules (Adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Giepmans et al. 2005)).

dela elektromagnetnega spektra. Obstajajo pa tudi kvantne pike sestavljene iz drugih elementov (ZnS, CdS, ZnSe, PbSe), ki fluorescirajo v UV in infrardečem delu elektromagnetnega spektra (Medintz in sod. 2005). Za uporabo v bioloških vzorcih je potrebno na plašč iz ZnS dodati še organske plašče, da so kvantne pike topne v vodnih raztopinah in da omogočimo vezavo tarčno specifičnih makromolekul na njihovo površino (Medintz in sod. 2005, Resch-Genger in sod. 2008, Johnson in Spence 2010). Zaradi dodatnih organskih plaščev in tarčno specifičnih makromolekul na površini je končna velikost kvantne pike pripravljena za označevanje okrog 20 nm, kar je bistveno več kot pri majhnih organskih fluorescenčnih molekulah in približno v rangu fluorescenčnih proteinov (Johnson in Spence 2010).

Do pojava fluorescence pri kvantni piki pride po absorpciji fotona, kar povzroči prehod elektrona iz valenčnega v prevodni pas. Pri tem nastane eksciton oziroma par elektronske vrzeli in elektrona. Kvantna pika lahko absorbira fotone različnih valovnih dolžin, katerih energija je višja od energijske vrzeli med valenčnim in prevodnim pasom. Posledica tega je širok absorpcijski spekter kvantnih pik. Nastali ekscitoni imajo različno visoko energijo in se sprostijo na nivo energijske vrzeli med valenčnim in prevodnim pasom. Ob ponovni združitvi elektrona in elektronske vrzeli pride do emisije fotona, ki ima energijo enako energijski vrzeli med valenčnim in prevodnim pasom. Vsi oddani fotoni imajo zato približno enako energijo. Posledica so ozki izsevni spektri kvantnih pik. Zaradi majhnosti kvantnih pik je par elektronske vrzeli in elektrona omejen na razdaljo manjšo od Bohrovega radija. Z manjšanjem premera kvantne pike je potrebna vse višja energija za omejitev ekscitona in posledično je višja tudi energija s fluorescenco oddanih fotonov. Z manjšanjem premera kvantne pike se tako krajša valovna dolžina fluorescenčne svetlobe, ki jo ta lahko oddaja (Johnson in Spence 2010).

Kvantne pike se po nekaterih spektralnih lastnostih bistveno razlikujejo od organskih fluorescenčnih molekul. Zaradi teh specifičnih lastnosti so za določene biološke aplikacije bolj uporabne kot organski fluorokromi. Za kvantne pike je značilen širok absorpcijski spekter, pri katerem je absorpcija večja pri krajših valovnih dolžinah. Njihovi izsevni spektri so ozki in odvisni

od velikosti kvantnih pik. Manjši kot je premer kvantne pike, krajša je valovna dolžina njene fluorescence (Dodatna sl. 6). Stokesovi zamiki med absorpcijskimi in izsevni spektri so veliki in so običajno med 300 in 400 nm. Zaradi teh lastnosti so kvantne pike zelo primerne za večbarvno označevanje vzorcev. Pri tem se za označevanje različnih struktur ali molekul uporabijo kvantne pike različnih velikosti. Fluorescence vseh kvantnih pik v zvorcu vzbujamo s svetlobo enotne valovne dolžine, kvantne pike različnih velikosti pa pri tem fluorescirajo v različnih barvah. Zaradi velikih Stokesovih zamikov ne pride do prekrivanja med vzbujevalno in fluorescenčno svetlobo. Ravno tako ni prekrivanja med fluorescenco različnih kvantnih pik zaradi njihovih ozkih izsevni spektrov (Resch-Genger in sod. 2008, Johnson in Spence 2010, Stanisavljevic in sod. 2015). V primerjavi z organskimi fluorokromi imajo kvantne pike od 10 do 100-krat višje ekstinkcijske koeficiente, njihovi kvantni izkoristki pa so primerljivi s tistimi pri organskih fluorescenčnih molekulah. Njihova fluorescence je tako načeloma intenzivnejša kot pri organskih fluorokromih. Kvantni izkoristki so visoki tudi pri kvantnih pikah, ki oddajajo fluorescenčno svetlobo v bližini infrardečega dela spektra, medtem ko so kvantni izkoristki organskih fluorokromov, ki fluorescirajo v tem delu spektra, načeloma nizki (Resch-Genger in sod. 2008, Johnson in Spence 2010, Stanisavljevic in sod. 2015). Zaradi intenzivne fluorescence kvantnih pik v območju dolgovalovne rdeče svetlobe in njihove učinkovite dvo-fotonske absorpcije so kvantne pike zelo primerne tudi za uporabo v mikroskopiji debelih vzorcev tkiv (Medintz in sod. 2005, Resch-Genger in sod. 2008). Poleg svetle fluorescence je za kvantne pike značilna tudi velika odpornost proti bleđenju fluorescence (Johnson in Spence 2010, Stanisavljevic in sod. 2015). To omogoča njihovo uporabo v tehnikah, ki zahtevajo dolgotrajno osvetljevanje vzorca (Medintz in sod. 2005), kot sta na primer sledenje endocitotskih procesov in spremljanje dinamike proteinov na celični površini (Jaiswal in sod. 2003). Kvantne pike lahko služijo tudi kot učinkoviti FRET donorji. S spreminjanjem velikosti kvantnih pik je namreč možno prilagoditi njihov izsevni spekter absorpcijskemu spektru FRET akceptorja (Medintz in sod. 2005, Johnson in Spence 2010). Kvantne pike so elektronsko goste, zato jih lahko dobro

razločimo tudi z elektronskim mikroskopom. To pa skupaj z njihovimi fluorescenčnimi lastnostmi omogoča uporabo v korelativni mikroskopiji, ko isti objekt ali dogodek v celici opazujemo tako s fluorescenčno kot z elektronsko mikroskopijo (Johnson in Spence 2010). Vnos kvantnih pik v žive celice je otežen zaradi njihove velikosti. Kvantne pike lahko vnesemo z mikroinjiciranjem, elektroporacijo ali z endocitozo, ki je nespecifična ali pa receptorso posredovana (Menditz in sod. 2005, Resch-Genger in sod. 2008). *In vivo* se tako kvantne pike na nivoju celic v glavnem uporabljajo za vizualizacijo in sledenje dinamike membranskih receptorjev in spremljanje endocitotskih procesov. Na nivoju celotnih organizmov se uporabljajo kot kontrastno sredstvo za vizualizacijo krvnožilnega in limfnega sistema, za sledenje s kvantnimi pikami napoljenih celic v organizmih in za vizualizacijo tumorjev (Jaiswal in sod. 2003, Smith in sod. 2008).

Fluorescenčne snovi v tehnikah fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti

V mikroskopiji je prostorska ločljivost zaradi uklona omejena na približno polovico valovne dolžine elektromagnetnega valovanja s katerim osvetljujemo preparat (Abbe 1873). Za vidno svetlobo je uklonska omejitev približno 200 nm. Pri opazovanju točkastega objekta s premerom pod uklonsko omejitvijo se ta vedno preslika v disk s končnim premerom enakim vrednosti uklonske omejitve. Pri tehnikah fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti se uklonski omejitvi lahko izognemo s pomočjo prostorske ali časovne modulacije prehajanja fluorokromov med njihovim svetlim in temnim stanjem. V grobem lahko te tehnike razdelimo v dve skupini: deterministične in stohastične tehnike (Hell 2007, Fernandez-Suarez in Ting 2008, Heilemann in sod. 2009, Huang in sod. 2009, Schermelleh in sod. 2010, Agrawal in sod. 2013, Uno in sod. 2015). Za razvoj super-ločljivostne fluorescenčne mikroskopije, za razvoj metod STED (Stimulated Emission Depletion, Mikroskopija z vzbujenim praznjenjem emisije) in PALM, je bila leta 2014 podeljena Nobelova nagrada za kemijo (https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/). Pri razvoju mikroskopije STED in pri njeni vpeljavi

v raziskave na področju celične fiziologije so sodelovali tudi raziskovalci iz Slovenije, prototip mikroskopa STED je nameščen na Medicinski fakulteti Univerze v Ljubljani (Jorgačevski in sod. 2011, Kreft in Jorgačevski 2014, Guček in sod. 2016).

Pri determinističnih tehnikah se uporablja prostorsko specifičen vzorec osvetljevanja, ki vzbuja fluorescenco celotnega nabora fluorescenčnih molekul na področju žarišča, a hkrati dopušča fluorescenco le molekulam v centru žarišča osvetljevanja, ki ima premer manjši od uklonske omejitve. Tak primer je tehnika STED, pri kateri vzorec osvetljujemo z dvema laserskima žarkoma visoke intenzitete. Vzbujujanju fluorescence z vzbujalnim žarkom nemudoma sledi osvetljevanje z žarkom STED, ki je v preseku obročaste oblike s točko ničelne intenzitete v sredini in visoko intenziteto na robu. Žarek STED molekule na robu osvetljevanja vrne iz vzbujenega nazaj v osnovno stanje preko stimulirane emisije. Zaradi tega fluorescirajo le molekule v zelo ozkem območju, kjer je intenziteta žarka STED zelo nizka, oz. skoraj enaka nič. Z vrstičnim pomikanjem po celotnem vzorcu je možno dobiti sliko z ločljivostjo nekaj deset nanometrov (Hell in Wichmann 1994, Klar in sod. 2000, Fernandez-Suarez in Ting 2008, Heilemann in sod. 2009, Huang in sod. 2009, Schermelleh in sod. 2010, Agrawal in sod. 2013, Uno in sod. 2015). Pri izbiri ustreznega fluorescenčnega označevalca v mikroskopiji STED je pomembno, da valovna dolžina laserja STED ne sovпада z vzbujalnim spektrom označevalca. V takšnem primeru bi namreč namesto stimulirane emisije prišlo do dodatnega vzbujanja fluorescence. Zaradi visokih jakosti predvsem žarka STED mora biti fluorescenčni označevalec tudi fotostabilen (Schermelleh in sod. 2010). Pri mikroskopiji STED se lahko uporabljajo običajni organski fluorokromi in fluorescenčni proteini, kot so na primer barvila ATTO in DY ter zeleni in rumeni fluorescenčni proteini. Kasneje so na podlagi tehnike STED razvili različne metode RESOLFT (Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions) pri katerih se uporabljajo takšni fluorokromi, ki lahko preklapljajo med fluorescenčnim in temnim stanjem. Pri tej tehniki fluorokromov izven žariščne točke ne utišamo s stimulirano emisijo, ampak jih preklapimo v njihovo temno stanje, za kar je potrebna bistveno nižja energija laserskega žarka.

Fluorokromi za RESOLFT morajo tako hitro in reverzibilno preklapljati med obema stanjema. Izmed fluorescenčnih proteinov so bili v teh tehnikah uspešno uporabljeni proteini FP595, Dronpa-3, rsEGFP, rsEGFP2, mGeos-X, Padron, Kohinoor in Dreiklang (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Heilemann in sod. 2009, Uno in sod. 2015).

Druga skupina tehnik fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti so stohastične tehnike. Pri teh tehnikah se ob istem času vzbuja fluorescenca zelo majhnega deleža molekul fluorokroma v vzorcu. Ker fluorescira zelo malo molekul, je možnost, da bi fluorescirali dve molekuli medsebojno oddaljeni manj od uklonske omejitve, zelo majhna. Za posamezne molekule se iz statistične razporeditve fotonov zajetih iz njih lahko natančno izračuna njihove pozicije. Na ta način se več tisočkrat ponovi vzbujanje zelo majhnega števila naključno razporejenih molekul fluorokroma in določevanje njihovih pozicij. Iz pridobljenih pozicij molekul je mogoče rekonstruirati celotno sliko z ločljivostjo nekaj nanometrov. Primeri stohastičnih tehnik fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti so PALM (Photo-Activated Localization Microscopy), FPALM (Fluorescence Photo-Activation Localization Microscopy) in STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Heilemann in sod. 2009, Huang in sod. 2009, Schermelleh in sod. 2010, Agrawal in sod. 2013, Uno in sod. 2015). Pri stohastičnih tehnikah je pomembno, da je možno na nek način nadzorovati, koliko molekul fluorokroma v vzorcu fluorescira hkrati. Za to se uporabljajo različni fluorokromi, ki jih je mogoče ireverzibilno fotoaktivirati ali reverzibilno preklapljati med njihovim fluorescenčnim in temnim stanjem. Ob tem mora biti stopnja bledenja fluorescence ali deaktivacije v ravnovesju s stopnjo aktivacije. Pod tem pogojem v vzorcu hkrati fluorescira le majhno število molekul fluorokroma (Fernandez-Suarez in Ting 2008). Za natančno lokalizacijo posameznih fluorescenčnih molekul mora biti iz njih možno zajeti dovolj fotonov, preden fluorescenca zbledi ali se deaktivira (Uno in sod. 2015). Prva skupina fluorescenčnih označevalcev za uporabo v stohastičnih tehnikah fluorescenčne mikroskopije super-ločljivost so fluorescenčni proteini, ki jih je s svetlobo določene valovne dolžine možno ireverzibilno fotoaktivirati. Takšni na

primer fluorescenčni proteini PA-GFP, PA-RFP1, PAmCherry1 in PATagRFP (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Uno in sod. 2015). Druga skupina so fluorescenčni proteini, ki ob osvetljevanju s svetlobo določene valovne dolžine ireverzibilno spremenijo barvo svoje fluorescence. Takšni so na primer fluorescenčni proteini PS-FP kaede, KikGR, mEosFP, Dendra2, PS-CFP2 in PSmOrange (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Uno in sod. 2015). Tretja skupina so fluorescenčni proteini, ki lahko reverzibilno preklaplajo med fluorescenčnim in temnim stanjem. Pri teh proteinih se fluorescenca aktivira z osvetljevanjem s svetlobo ene valovne dolžine in deaktivira z osvetljevanjem s svetlobo druge valovne dolžine. Fluorescenca ene molekule fluorescenčnega proteina je tako možno zajeti večkrat. Od teh fluorescenčnih proteinov so v stohastičnih tehnikah uporabni proteini FP595, Dronpa, rsEGFP, mGeosX in Dreiklang (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Uno in sod. 2015). Za označevanje se pri stohastičnih tehnikah uporabljajo tudi različni majhni organski fluorokromi. Določene izmed teh je možno ireverzibilno aktivirati. Pri teh je na fluorokrom vezana določena kemijska skupina s katero je utišana fluorescenca fluorokroma. Ob osvetljevanju z UV svetlobo se ta skupina odcepi od fluorokroma, ki prične fluorescirati. Nekateri majhni organski fluorokromi lahko reverzibilno preklaplajo med fluorescenčnim in temnim stanjem. Ob osvetljevanju Rodamina B z UV svetlobo ta prične prehodno svetlo fluorescirati. Po določenem času zaradi termičnih procesov preide nazaj v ne-fluorescenčno stanje (Fernandez-Suarez in Ting 2008, Uno in sod. 2015).

Zaključek

Ob širokem naboru fluorescenčnih označevalcev je pomembno, da znamo izbrati pravega za naš namen uporabe. V prvi vrsti je pri izbiri treba upoštevati vzbujevalne in izsevane spektre fluorescenčnega označevalca, ki ga želimo uporabiti. Ti morajo namreč ustrezati vzbujevalnim in zapornim filtrom oziroma vzbujevalnemu laserju fluorescenčnega mikroskopa, ki nam je na voljo. Spektralne lastnosti fluorokroma je treba upoštevati tudi glede na tkivo, ki ga želimo opazovati. Za označevanje na debelih vzorcih

tkiv z intenzivno avtofluorescenco so primernejše fluorescenčne snovi, ki absorbirajo in fluorescirajo svetlobo v rdečem delu vidnega spektra. Če na enem vzorcu hkrati označujemo več struktur v različnih barvah, se morajo spektri uporabljenih fluorokromov čim manj prekrivati. Zelo pomembna lastnost fluorokromov je tudi njihova fotostabilnost oziroma odpornost proti bledenju fluorescence. Fotostabilnost je pomembna predvsem pri aplikacijah, pri katerih zajem slike traja dlje časa, na primer pri zajemu optičnih rezin za 3D rekonstrukcije, oziroma pri katerih se uporabljajo visoke jakosti osvetljevanja, na primer pri tehniki STED. Pri izbiri ustreznega fluorokroma je zelo pomembno tudi ali opazujemo žive ali fiksirane preparate. Za označevanje živih preparatov so tako najprimernejši fluorescenčni proteini, medtem ko za označevanje fiksiranih preparatov njihova uporaba ni smiselna zaradi relativno težavnega vnosa njihovih genov v organizme. V zadnjem času v povezavi s tehnikami fluorescenčne mikroskopije super-ločljivosti na pomenu pridobivajo fluorokromi, ki jih je mogoče fotoaktivirati ali preklapljati med fluorescenčnim in temnim stanjem. Poleg različnih organskih fluorokromov se vse več uporabljajo tudi različni fluorescenčni anorganski nanodelci, kot so na primer kvantne pike. Te imajo posebej velik potencial v različnih tehnikah korelativne mikroskopije.

Summary

Fluorescence microscopy comprises a versatile array of techniques and is an essential method in cell biology research and applications. During the last decades great improvement in spatial and temporal resolution has been achieved with the development of fluorescence microscopes' optical components and equipment for computer image analysis. Simultaneously, various fluorescent markers has been developed, which enable specific labelling of structures and chemical compounds in cells and tissues. Fluorescent substances absorb light of specific wavelength, which elicits their transition into the excited state. During relaxation back to the ground state they emit light of a longer wavelength in a process called fluorescence. Fluorescence is characterized by the photophysical

properties of a fluorescent substance, including excitation and emission spectra, Stokes shift, extinction coefficient and quantum yield. In this article we review the photophysical properties and different applications of the three main groups of fluorescent markers used in fluorescence microscopy: small organic fluorochromes, fluorescent proteins and quantum dots. The final part of the article is dedicated to special fluorescent markers used in various super-resolution fluorescence microscopy techniques.

Small organic fluorochromes are most often aromatic or heterocyclic compounds. Some of them are endogenous to the biological samples and produce autofluorescence. Predominately small organic fluorochromes are used as fluorescent labels in different modes of application. Organic fluorochromes conjugated with target specific ligands such as antibodies or single strand anti-sense DNA are used in immunofluorescent labelling and fluorescence *in situ* hybridization, respectively. Some small organic fluorochromes specifically bind to nucleic acids and are often used to label cell nuclei. Various small organic fluorochromes concentrate in some cell organelles on the basis of physiological processes or chemical properties specific for such organelles. Small organic fluorochromes are used also as sensors for specific ions. Molecules of such fluorochromes usually contain a chelator moiety, which binds specific ions. This binding causes a change in the spectral properties of the fluorescent part of the molecule.

Labelling with fluorescent proteins employs endogenously expressed fluorescent protein, thus the labelling is less invasive and appropriate especially for imaging of the living systems. A gene for fluorescent protein can be introduced into a cell or organism, where it is expressed. No specific enzymes or cofactors are necessary for folding and fluorophore formation. Fluorescent proteins are used for visualization of selected protein expression, dynamics and localization within the cell and analysis of interactions between proteins. Most fluorescent proteins were acquired by mutagenesis of the wild-type green fluorescent protein isolated from a jellyfish *Aequorea victoria*. Blue, cyan and yellow fluorescent proteins were acquired by substitutions of the amino acid residues of fluorophore and in the β -barrel region

near fluorophore. Proteins that fluoresce in the orange and red part of the visible spectrum were isolated from various species of Anthozoa. Various modifications of fluorescent proteins are aimed to increase their brightness, improve their folding and fluorophore formation and reduce their tendency for dimerization and oligomerization.

Quantum dots are fluorescent semiconductor nanocrystals. A unique characteristic of quantum dots is the size-dependence of their emission wavelength. Quantum dots of smaller diameter fluoresce at shorter wavelengths and vice versa. In biological applications quantum dots with CdSe core and ZnS shell are the most common. The surface of quantum dots is covered by additional organic coats, which make them water soluble and allow conjugation of target specific macromolecules. Quantum dots have broad excitation spectra and narrow, size-dependent emission spectra. Thus quantum dots of different sizes are useful for the labelling of multiple structures in different colours in the same specimen. In comparison with the small organic fluorochromes quantum dots exhibit brighter fluorescence and superior photostability. They are also useful in correlative microscopy because of their electron density.

Super-resolution fluorescent microscopy techniques overcome the diffraction limit by spatial or temporal modulation of the fluorophores' transitions between their dark and bright states. In deterministic super-resolution techniques a spatially specific pattern of illumination is used to excite fluorescence of an ensemble of fluorescent molecules in the sample, but which at the same time allows only the molecules in the centre of illumination to fluoresce. Spot where the molecules are allowed to fluoresce has a diameter smaller than the diffraction limit and by scanning this spot across the sample a complete super-resolution im-

age is acquired. In STED (Stimulated Emission Depletion) microscopy molecules located out of the illumination centre are transferred back to the ground state by stimulated emission. This is accomplished by illumination with red-shifted STED beam of zero intensity at the focal centre and high intensity at the periphery. Fluorescent markers in STED microscopy are the usual small organic fluorochromes and fluorescent proteins. Still it is very important that their excitation spectra do not overlap with the wavelength of the STED beam, and that they are photostable because of the high intensity of STED beam. In RESOLFT (Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions) methods photoswitchable fluorescent markers are used. In contrast to the STED microscopy, fluorescent molecules are not quenched by stimulated emission, but switched to their dark state instead, which requires much lower laser intensities. In stochastic super-resolution techniques the exact locations of individual molecules are determined and merged into a complete super-resolution image. This requires that the images of individual molecules do not overlap. Temporal modulation of the fluorescent molecules is thus required that allows only a very low number of fluorescent molecules in the sample to fluoresce simultaneously at any given time. By the illumination with light of specific wavelength only a small fraction of all photoactivatable/photoswitchable fluorescent molecules in the sample are activated/switched on, their locations determined and then deactivated/switched off. The whole cycle is repeated a few thousand times, each time activating/switching on a random fraction of fluorescent molecules in the sample. The whole super-resolution image can be reconstructed from the acquired positions of all individual fluorescent molecules in the sample.

Avtorji fotografij

Slike 2A, 2B, 2C in Dodatna slika 1: Urban Bogataj in Nada Žnidaršič; Slike 4A, 4B, 4C in 4D: Maša Milatovič; Dodatna slika 3A: Polona Mrak; Dodatni sliki 3B in 4: Nada Žnidaršič.

Literatura

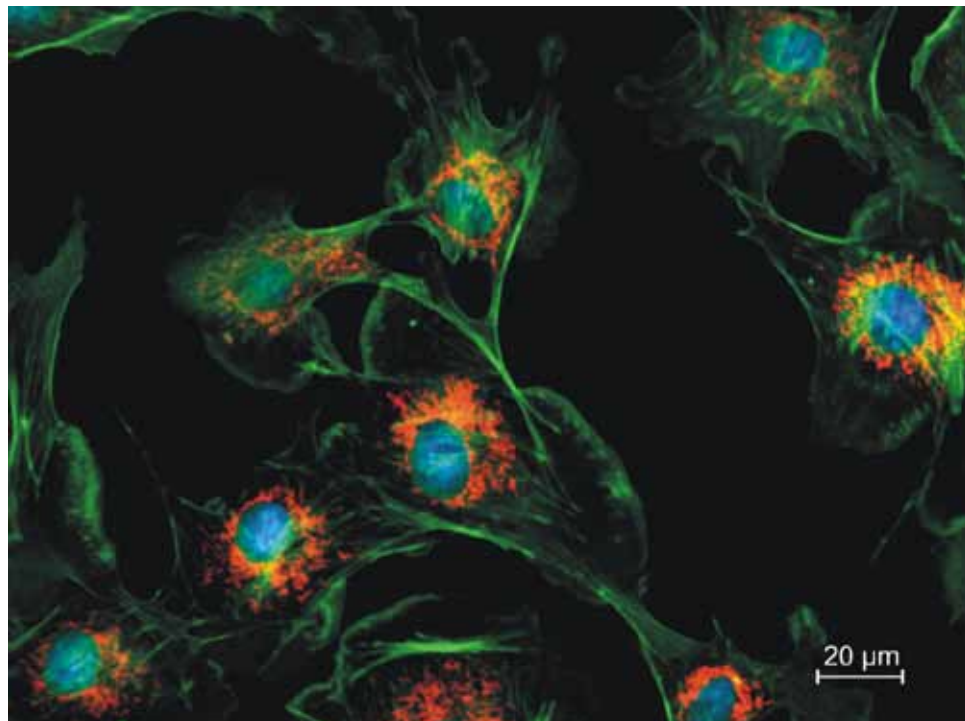
- Abbe, E., 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9, 413–418.
- Agrawal, U., Reilly, D.T., Schroeder, C.M., 2013. Zooming in on biological processes with fluorescence nanoscopy. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24(4), 646-653.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2015. *Molecular biology of the cell*, 6th Ed. Garland Science, New York, 1464 pp.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincot-Schwartz, J., Hess, H.F., 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 1642-1645.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., 2005. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends Biotechnol.*, 23(12), 605-613.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Staiano-Coico, L., Kapuscinski, J., Melamed, M.R., 1982. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res.*, 42(3), 799-806.
- Fernandez-Suarez, M., Ting, A.Y., 2008. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9(12), 929-943.
- Giepmans, B.N., Deerinck, T.J., Smarr, B.L., Jones, Y.Z., Ellisman, M.H., 2005. Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots. *Nat. Methods*, 2(10), 743-749.
- Guček, A., Jorgačevski, J., Singh, P., Geisler, C., Lisjak, M., Vardjan, N., Kreft, M., Egner, A., Zorec, R., 2016. Dominant negative SNARE peptides stabilize the fusion pore in a narrow, release-unproductive state. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73, 3719-3731.
- Gustafsson, M.G.L., 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.*, 198(2), 82-87.
- Heilemann, M., Dedecker, P., Hofkens, J., Sauer, M., 2009. Photoswitches: Key molecules for subdiffraction-resolution fluorescence imaging and molecular quantification. *Laser Photonics Rev.*, 3(1-2), 180-202.
- Hell, S.W., Wichmann, J., 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11), 780-782.
- Hell, S.W., 2007. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 316(5828), 1153-1158.
- Huang, B., Bates, M., Zhuang, X., 2009. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.*, 78, 993-1016.
- Jaiswal, J.K., Mattoussi, H., Mauro, J.M., Simon, S.M., 2003. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.*, 21(1), 47-51.
- Johnson, I.D., Spence, M.T.Z., 2010. *The molecular probes handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 11th Edition. Life Technologies Corporation. Carlsbad, CA, 1060 pp.
- Johnson, W.L., Straight, A.F., 2013. Fluorescent protein applications in microscopy. In: Sluder, G., Wolf, D.E. (eds.): *Methods in cell biology*, vol. 114. Elsevier Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 99-123.
- Jorgačevski, J., Potokar, M., Grilc, S., Kreft, M., Liu, W., Barclay, J.W., Bückers, J., Medda, R., Hell, S.W., Parpura, V., Burgoyne, R.D., Zorec, R., 2011. Munc18-1 tuning of vesicle merger and fusion pore properties. *J. Neurosci.*, 31(24), 9055-9066.
- Kay, A.R., 2005. A practical guide: Imaging zinc in brain slices. In: Yuste, R., Konnerth, A. (eds.): *Imaging in neuroscience and development. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 491-494.
- Kikuchi, K., Komatsu, K., Nagano, T., 2004. Zinc sensing for cellular application. *Curr Opin. Chem. Biol.*, 8(2), 182-191.

- Klar, T.A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A., Hell, S.W., 2000. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(15), 8206-8010.
- Kreft, M., Jorgačevski, J., 2014. Mikroskopija, ki presega meje optične ločljivosti. *Proteus*, 76, 9-10.
- Lavis, L.D., Raines, R.T., 2008. Bright ideas for chemical biology. *ASC Chem Biol*, 3(3), 142-155.
- Lichtman, J.W., Conchello, J.A., 2005. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2(12), 910-919.
- Lippincott-Schwarz, J., Patterson, G.H., 2003. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300(5616), 87-91.
- Marlowe, R.L., Dillaman, R.M., 1995. Acridine orange staining of decapod crustacean cuticle. *Invertebr. Biol.*, 114(1), 79-82.
- Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H., 2005. Quantum dots bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.*, 4(6), 435-446.
- Milatović, M., Kostanjšek, R., Štrus, J., 2010. Ontogenetic development of *Porcellio scaber*: staging based on microscopic anatomy. *J. Crustac Biol.*, 30(2), 225-235.
- Mittmann, B., Wolff, C., 2012. Embryonic development and staging of the cobweb spider *Parasteatoda tepidariorum* C. L. Koch, 1841 (syn.: *Achaearanea tepidariorum*; Araneomorphae; Theridiidae). *Dev. Genes Evol.*, 222(4), 189-216.
- Mittmann, B., Ungerer, P., Klann, M., Stollewerk, A., Wolff, C., 2014. Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. *Evodevo*, 5(1), doi: 10.1186/2041-9139-5-12.
- Murphy, D.B., 2001. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. Wiley-Liss, Inc., 368 pp.
- Nowakowski, A.B., Meeusen, J.W., Menden, H., Tomasiewicz, H., Petering, D.H., 2015. Chemical-biological properties of zinc sensors TSQ and Zinquin: Formation of sensor-Zn-protein adducts versus Zn(Sensor)₂ complexes. *Inorg. Chem.*, 54(24), 11637-11647.
- Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R., Nann, T., 2008. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods*, 5(9), 763-775.
- Rust, M.J., Bates, M., Zhuang, X., 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3(10), 793-795.
- Sandell, L.L., Kurosaka, H., Trainor, P.A., 2012. Whole mount nuclear fluorescent imaging: convenient documentation of embryo morphology. *Genesis*, 50(11), 844-850.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., Leonhardt, H., 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell. Biol.*, 190(2), 165-175.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., Tsien, R.Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 2(12), 905-909.
- Shaner, N.C., Patterson, G.H., Davidson, M.W., 2007. Advances in fluorescent protein technology. *J. Cell. Sci.*, 120(24), 4247-4260.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-239.
- Shimomura, O., 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.*, 217, 3-15.
- Smith, A.M., Duan, H., Mohs, A.M., Nie, S., 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60(11), 1226-1240.
- Snitsarev, V., Budde, T., Stricker, T.P., Cox, J.M., Krupa, D.J., Geng, L., Kay, A.R., 2001. Fluorescent detection of Zn²⁺-rich vesicles with Zinquin: Mechanism of action in lipid environments. *Biophys. J.*, 80(3), 1538-1546.
- Stanisavljevic, M., Krizkova, S., Vaculovicova, M., Kizek, R., Adam, V., 2015. Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their applications. *Biosens. Bioelectron.*, 74, 562-574.
- Stepanenko, O.V., Stepanenko, O.V., Shcherbakova, D.M., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K., Verkhusha, V.V., 2011. Modern fluorescent proteins: from chromophore formation to novel intracellular applications. *Biotechniques*, 51(5), 313-327.

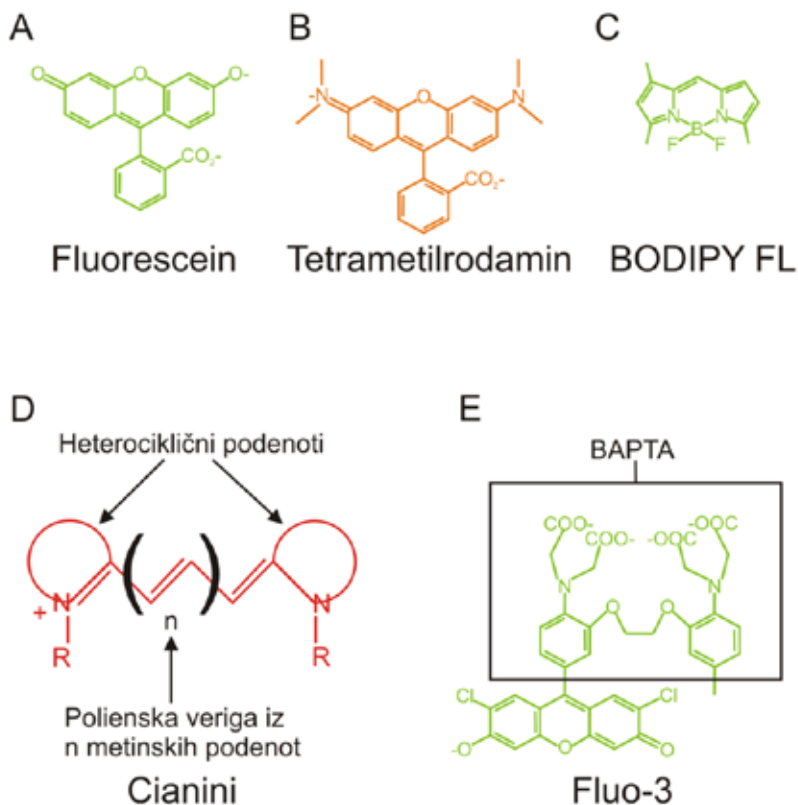
- Suzuki, T., Matsuzaki, T., Hagiwara, H., Aoki, T., Takata, K., 2007. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. *Acta Histochem. Cytochem.*, 40(5), 131-137.
- Terai, T., Nagano, T., 2013. Small-molecule fluorophores and fluorescent probes for bioimaging. *Pflugers. Arch.*, 465(3), 347-359.
- Tsien, R.Y., 1998. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-544.
- Uno, S.N., Tiwari, D.K., Kamiya, M., Arai, Y., Nagai, T., Urano, Y., 2015. A guide to use photocontrollable fluorescent proteins and synthetic smart fluorophores for nanoscopy. *Microscopy (Oxf)*, 64(4), 263-277.
- Verkhusha, V.V., Lukyanov, K.A., 2004. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat. Biotechnol.*, 22(3), 289-296.
- Wang, F., Tan, W.B., Zhang, Y., 2006. Luminescent nanomaterials for biological labelling. *Nanotechnology*, 17(1), R1-R13.
- Zalewski, P.D., Millard, S.H., Forbes, I.J., Kapaniris, O., Slavotinek, A., Betts, W.H., Ward, A.D., Lincoln, S.F., Mahadevan, I., 1994. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.*, 42(7), 877-884.
- Zhang, Y., Campbell, R.E., Ting, A.Y., Tsien, R.Y., 2002. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3(12), 906-918.

Dodatne slike

Supplementary figures



- Dodatna slika 1: Sestavljena slika fluorescenčno označenih celičnih jeder, aktinskega citoskeleta in mitohondrijev v endotelinih celicah. Sliko istega področja na preparatu smo zajeli trikrat, vsakič z ustrezno kombinacijo vzbujevalnih in zapornih filtrov za posamezen fluorokrom. Dobljene slike celičnih jeder, aktinskega citoskeleta in mitohondrijev smo v programu za obdelavo in analizo mikroskopskih slik (Fiji) sestavili v enotno sliko.
- Supplementary figure 1: Merged image of the fluorescently labelled cell nuclei, actin filaments and mitochondria in endothelial cells. The image of the same area in the sample was acquired three times, each time with the appropriate combination of excitation and emission filters for individual fluorochrome. Acquired images were merged with the software for processing and analysis of microscopic images (Fiji).

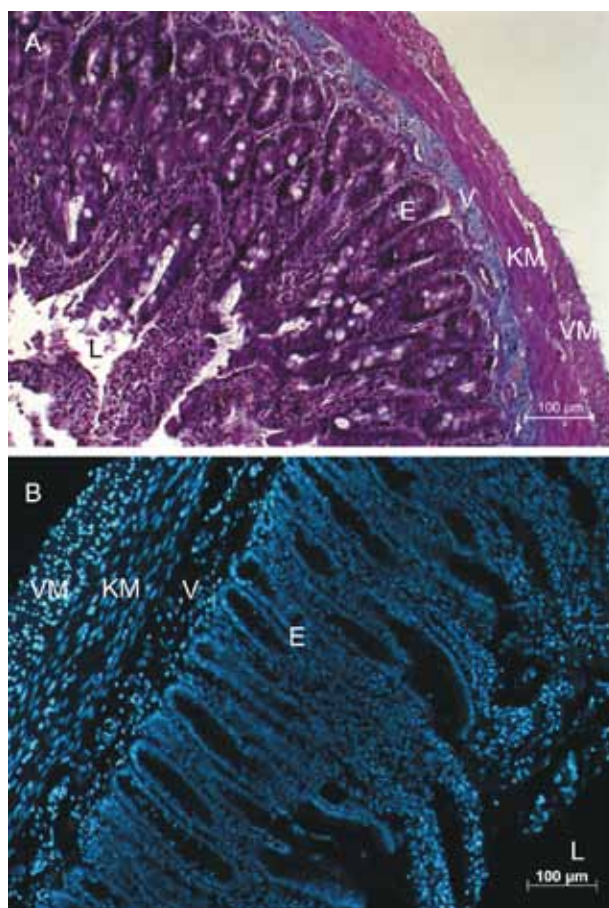


Dodatna slika 2:

Strukturne formule majhnih organskih fluorokromov. Majhni organski fluorokromi so večinoma heterociklične in aromatske molekule, ki vsebujejo konjugirane dvojne vezi. **A** – Strukturna formula fluoresceina. **B** – Strukturna formula tetrametilrodamina. **C** – Strukturna formula fluorescenčnega barvila BODIPY FL. **D** – Poenostavljena strukturna formula cianinov. **E** – Strukturna formula fluorescenčnega Ca^{2+} senzorja fluo-3 z označeno kelatorsko skupino BAPTA.

Supplementary figure 2:

Structure formulas of small organic fluorochromes. Small organic fluorochromes are mostly heterocyclic and aromatic molecules, which contain conjugated double bonds. **A** – Structural formula of fluorescein. **B** – Structural formula of tetramethylrhodamine. **C** – Structural formula of the fluorescent dye BODIPY FL. **D** – Simplified structural formula of cyanines. **E** – Structural formula of the fluorescent Ca^{2+} sensor fluo-3 with its chelator moiety BAPTA designated.

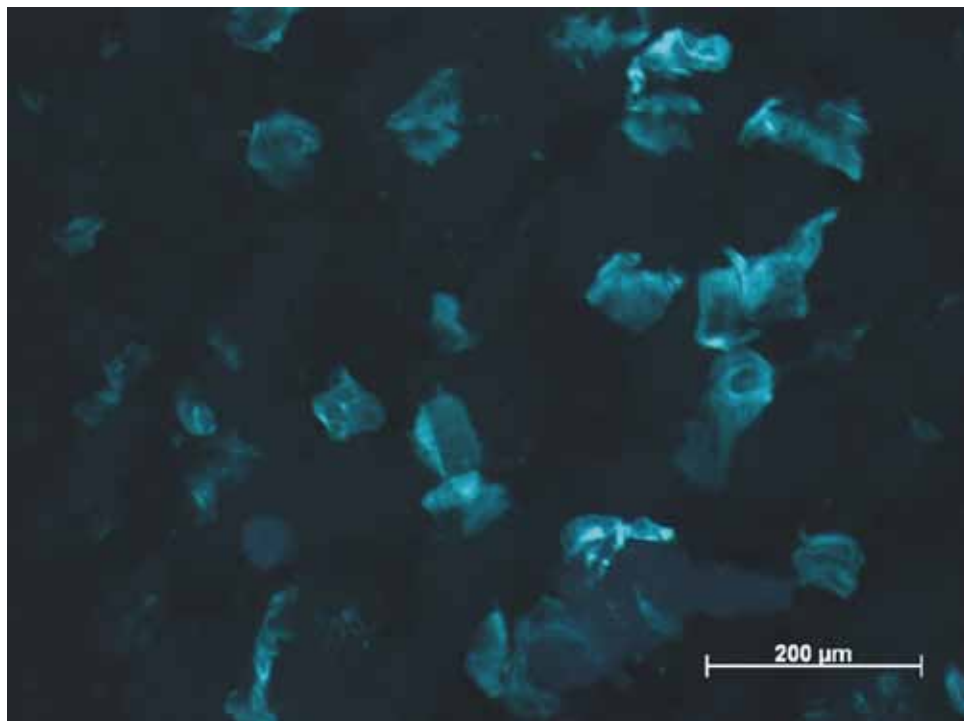


Dodatna slika 3:

Primerjava diferencialnega histološkega barvanja in uporabe barvila DAPI na rezinah istega vzorca (prečni prerez črevesa sesalca). Črevesno steno sestavljajo različna tkiva; epitelno tkivo (E) sluznice pokriva črevesne resice, podsluznica je predvsem iz vezivnega tkiva (V), mišično plast tvorita dva sloja: notranje krožno mišičje (KM) in zunanje vzdolžno mišičje (VM). L: lumen (svetlina) črevesa. **A** – Diferencialno Massonovo trikromno barvanje je predvsem primerno za razločevanje posameznih vrst tkiv v vzorcu in za prikaz splošne histološke zgradbe. Vezivno tkivo v črevesni steni je obarvano modro zaradi modrega obarvanja kolagena. Rdeče/vijolično sta obarvani epitelno in mišično tkivo. **B** – Fluorescenčno označena jedra celic z barvilom DAPI. Zelo razločno je vidna razporeditev in oblika jeder ter različna orientacija jeder v krožnem in vzdolžnem sloju mišič črevesne stene.

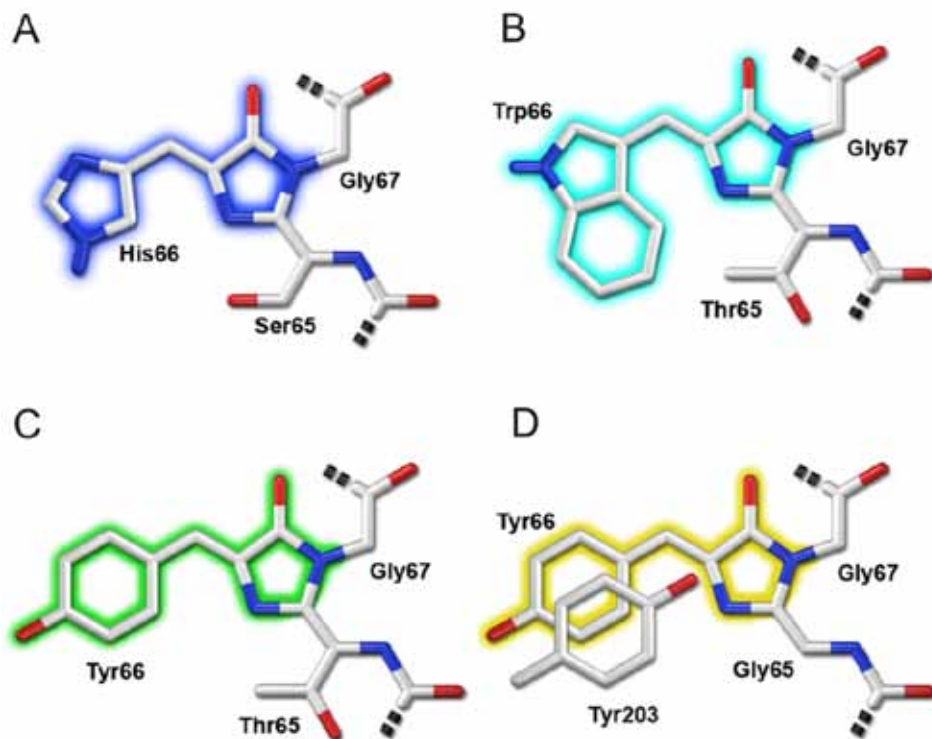
Supplementary figure 3:

A comparison of a differential histological staining and DAPI application on sections of the same specimen (cross section of mammalian intestine). Intestinal wall is composed of various tissues; epithelial tissue (E) of mucosa covers the intestinal villi, submucosa is mainly composed of connective tissue (V), muscular layer consists of inner circular muscles (KM) and outer longitudinal muscles (VM). L: intestinal lumen. **A** – Differential Masson's trichrome stain is useful to differentiate individual tissues in a sample and to visualize general histological structure. Connective tissue is stained blue because of the blue stained collagen. Epithelial and muscle tissues are stained red/violet. **B** – Fluorescently labelled cell nuclei with dye DAPI. The distribution and shape of nuclei is clearly distinguishable. In the circular and longitudinal muscle layers different orientations of nuclei are visible.



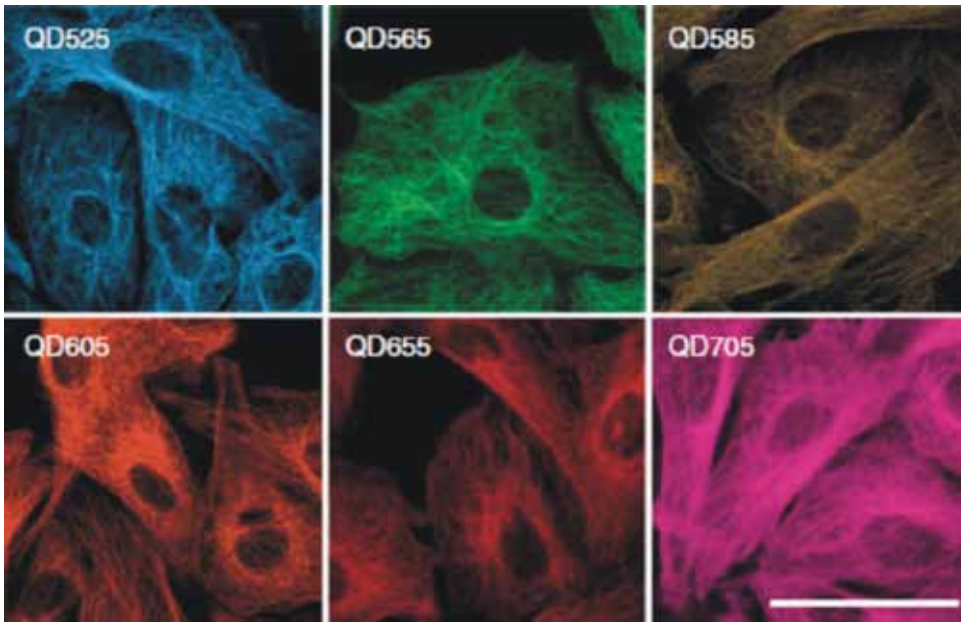
Dodatna Slika 4: Lokalizacija cinka v hepatopankreasnem tkivu (mečkanec) s fluorescenčnim označevalcem Zinquin. V tkivu so vidne fluorescenčno označene celice med nefluorescenčnimi, kar nakazuje, da vsaj nekatere celice vsebujejo veliko dostopnega cinka.

Supplementary figure 4: Zinquin staining of squashed hepatopancreatic tissue for labile zinc detection. Cells displaying intense fluorescent signal are interspersed among non-fluorescent cells, which suggests that at least certain cells in the tissue contain abundant pool of labile zinc.



Dodatna slika 5: Zgradba fluoroforov različnih proteinov. **A** – Fluorofor modrega fluorescenčnega proteina. **B** – Fluorofor modrozelenega fluorescenčnega proteina. **C** – Fluorofor zelenega fluorescenčnega proteina. **D** – Fluorofor rumenega fluorescenčnega proteina (Prirejeno z dovoljenjem Company of Biologists: Journal of Cell Science (Shaner in sod. 2007)).

Supplementary figure 5: Fluorophore structures of various fluorescent proteins. **A** – Blue fluorescent protein fluorophore. **B** – Cyan fluorescent protein fluorophore. **C** – Green fluorescent protein fluorophore. **D** – Yellow fluorescent protein fluorophore (Adapted with permission from Company of Biologists: Journal of Cell Science (Shaner in sod. 2007)).



Dodatna slika 6: Primer uporabe kvantnih pik v celični biologiji. Imunooznačevanje mikrotubulov fibroblastov v kulturi s kvantnimi pikami različnih velikosti. Mikrotubuli so označeni s primarnimi protitelesi proti α -tubulinu, sekundarnimi protitelesi konjugiranimi z biotinom in kvantnimi pikami konjugiranimi s streptavidinom. Fluorescenco QD525, QD565, QD585, QD605 in QD655 so vzbujali z dvo-fotonsko ekscitacijo pri 800 nm. Fluorescenco QD 705 so vzbujali z eno-fotonsko ekscitacijo pri 488 nm. Številke v imenih kvantnih pik poveje valovno dolžino njihove fluorescence (Prirejeno z dovoljenjem Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Giepmans in sod. 2005)).

Supplementary figure 6: Example of an application of quantum dots in cell biology. Immunolabeling of microtubules in cultured fibroblasts with quantum dots of different sizes. Microtubules are labelled with primary antibodies against the α -tubulin, biotin conjugated secondary antibodies and streptavidin conjugated quantum dots. For the excitation of fluorescence of QD525, QD565, QD585, QD605 and QD655 two-photon excitation at 800 nm was used. Fluorescence of QD 705 was excited with single-photon excitation at 488 nm. Numbers in the names of quantum dots corresponds to the wavelength of their fluorescence (Adapted with permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Methods (Giepmans et al. 2005)).