

# 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.

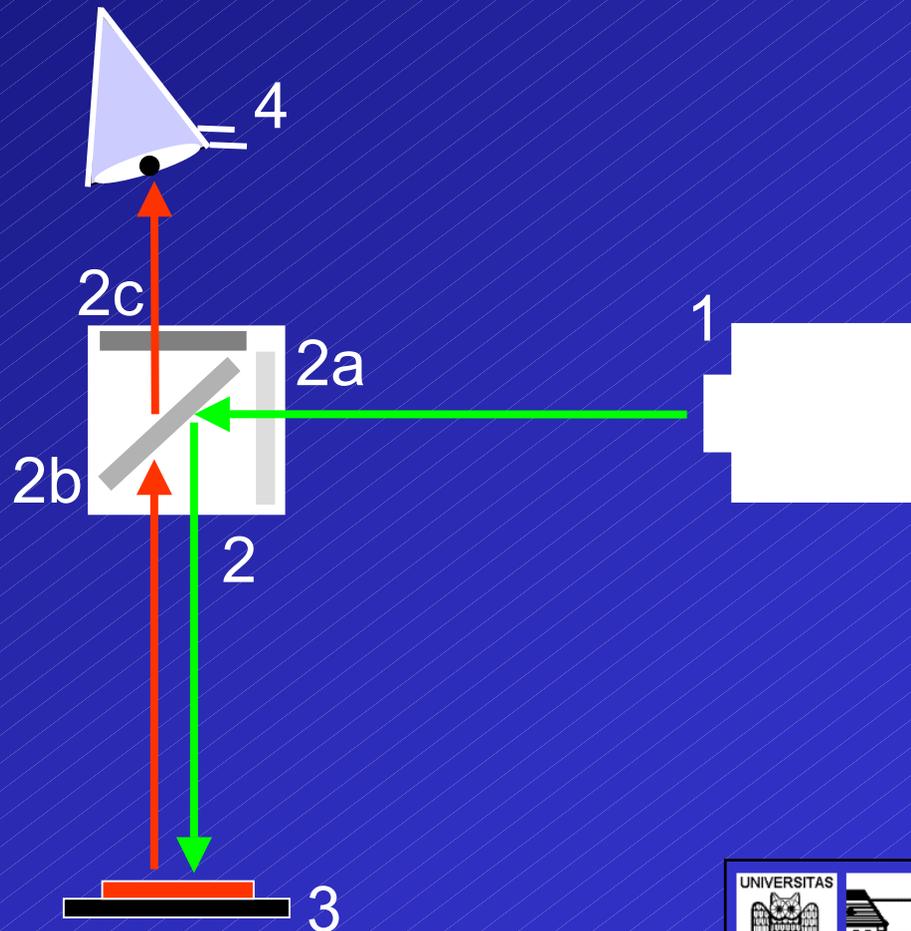
**-andere:** Tribolumineszenz, Kathodenlumineszenz, Radiolumineszenz

# 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



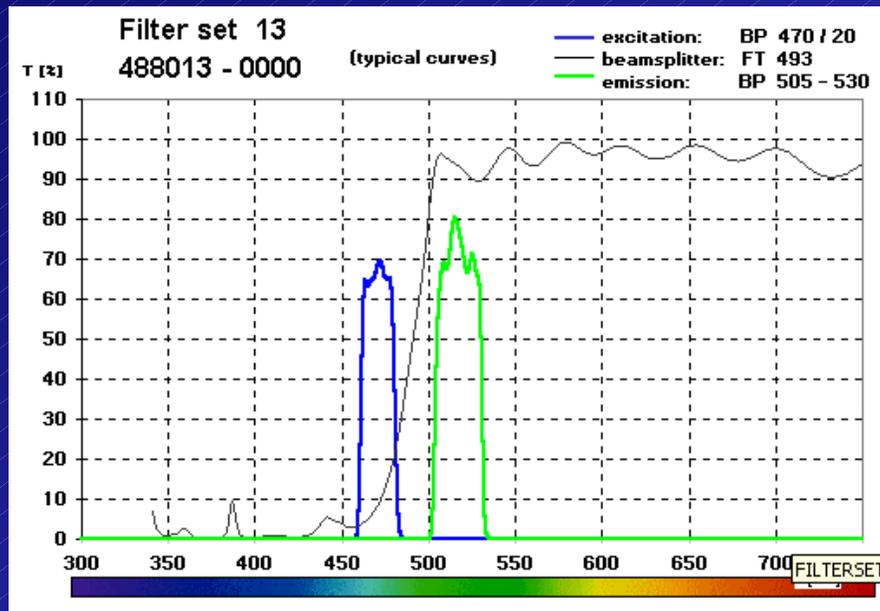
# Fluoreszenzmikroskopie

## Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

### Filtertypen

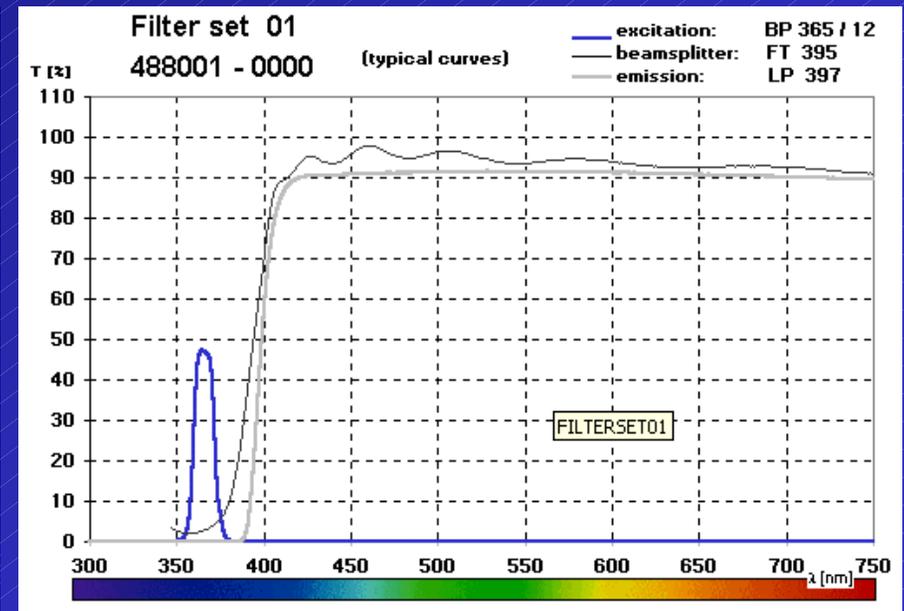
#### Bandpass

Fluoresceinisothiocyanat (488nm/ 525nm)  
(FITC)



#### Longpass

DAPI (359nm/ 461nm)



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

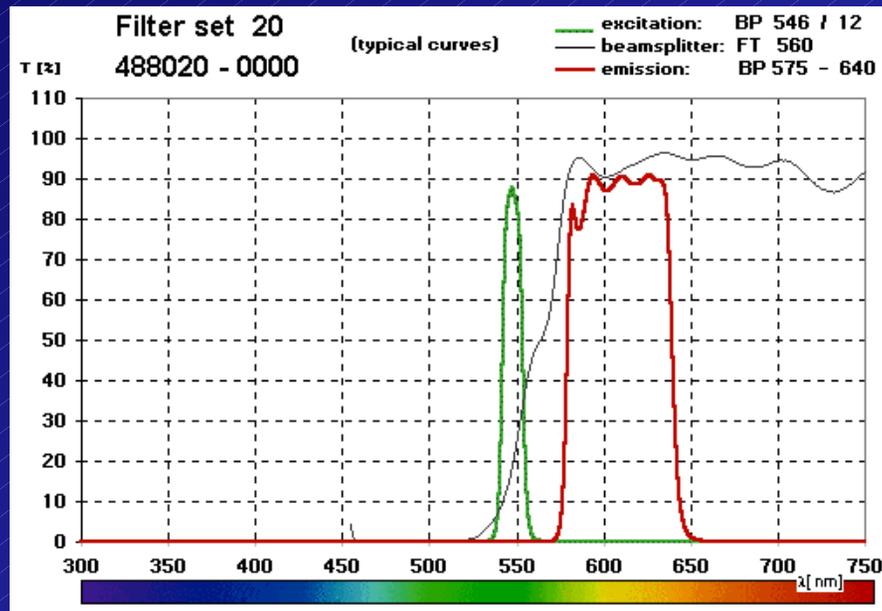
# Fluoreszenzmikroskopie

## Auflicht-Fluoreszenz-Anregung

### Fluorochrome/ Filtersätze

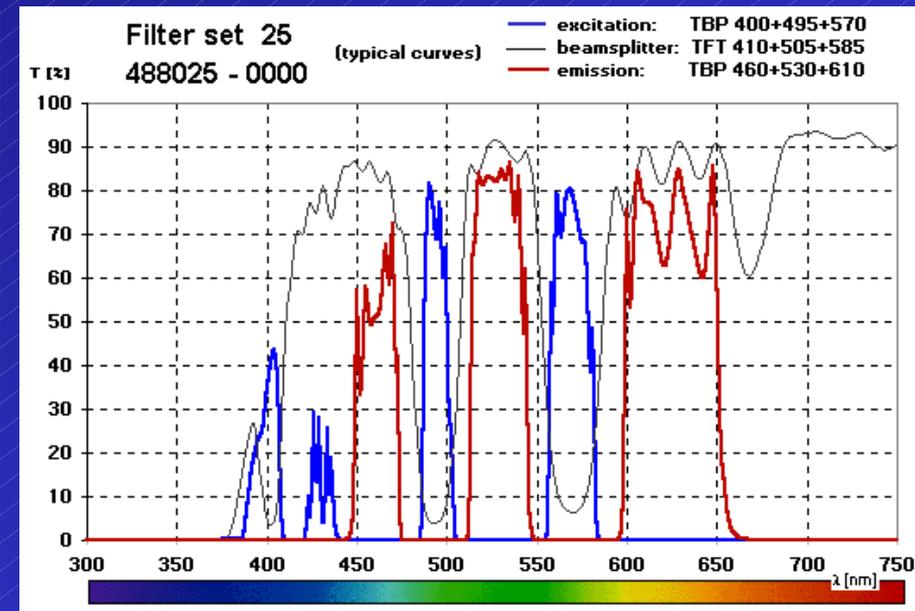
#### Bandpass

Cy3 (552nm/ 570nm)



#### Triple Bandpass

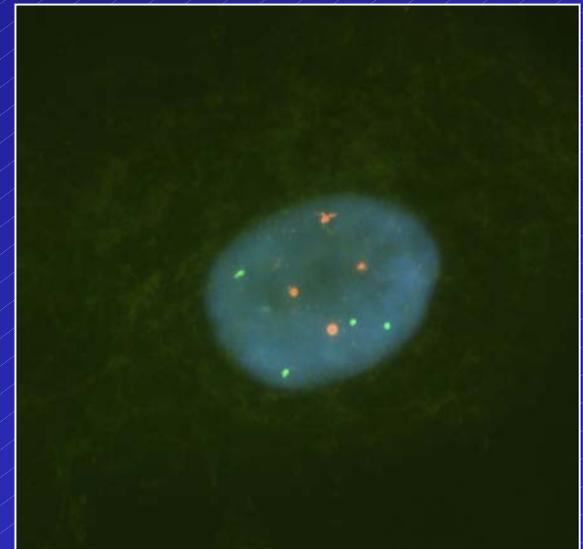
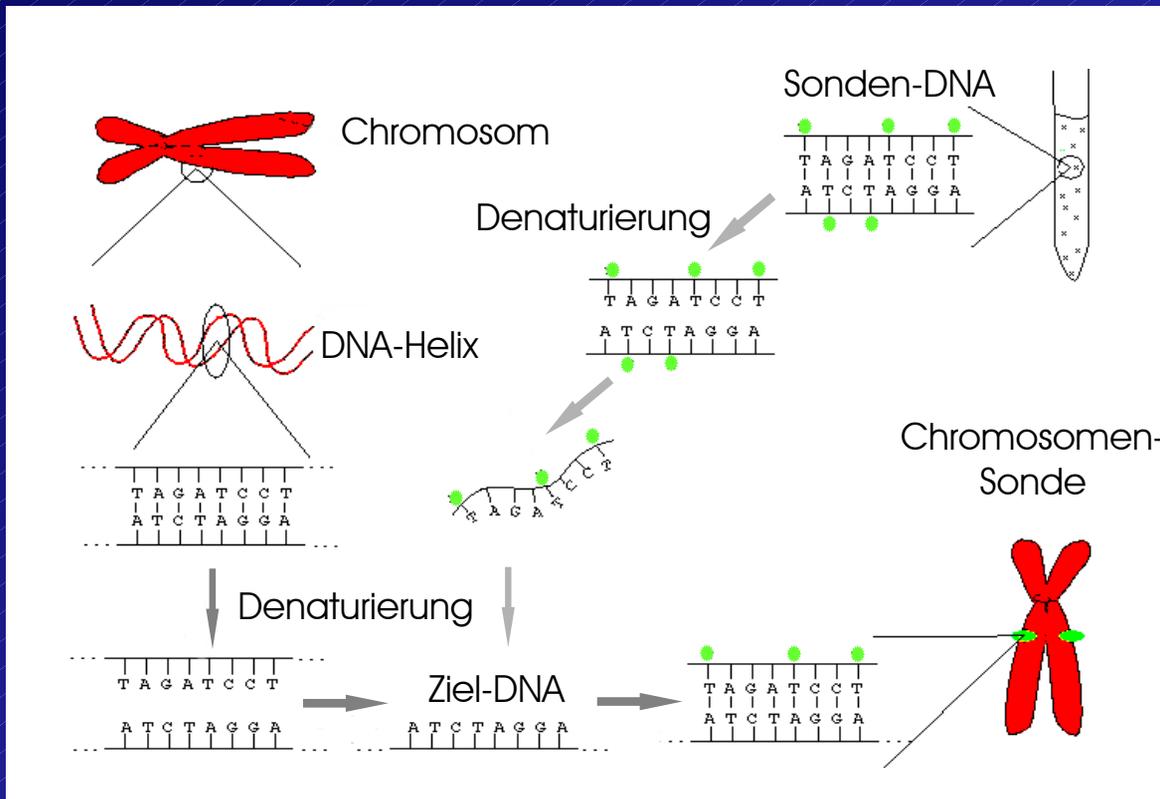
FITC, Cy3, DAPI



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

# Fluoreszenzmikroskopie

## Beispiele biologischer Anwendungen

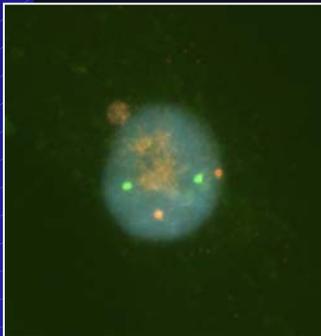
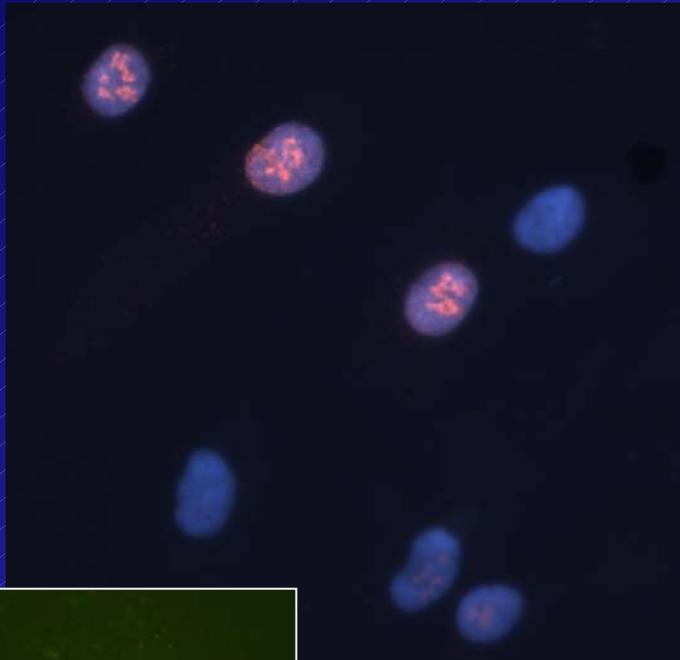


**Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) mit Zentromersonden, Cy3 und FITC markiert, Kern-Gegenfärbung mit DAPI**

# Fluoreszenzmikroskopie

## Beispiele biologischer Anwendungen

### Immunfluoreszenzfärbung Mib-Ki67-Cy3 (+ FISH)



### Immunfluoreszenzfärbung vWF-Cy3

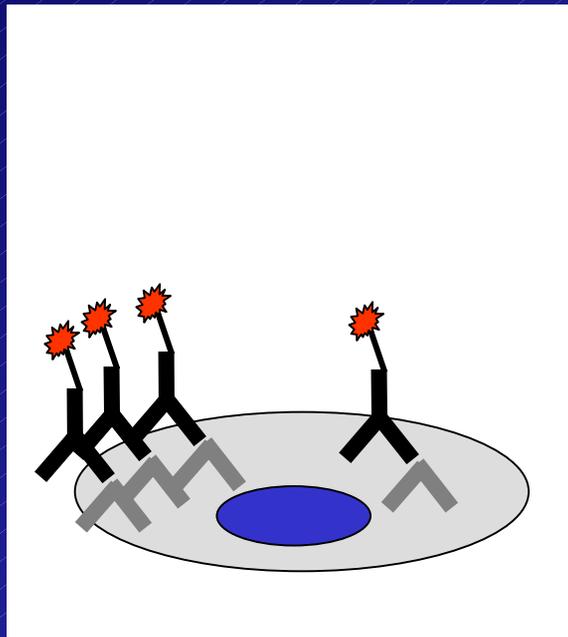


# Probenpräparation

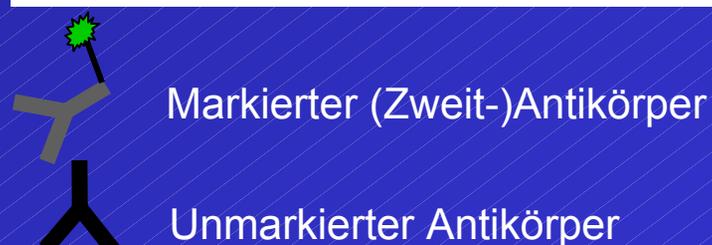
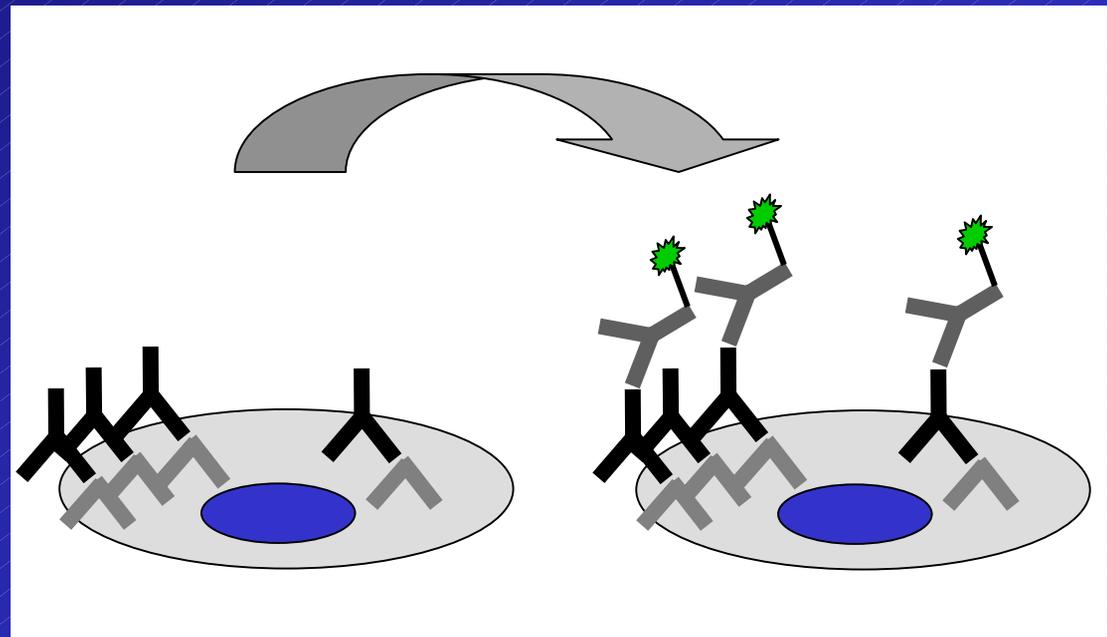
## Immunfluoreszenz

### Begriffserklärungen/ Färbeprinzip

#### Direkte Färbung



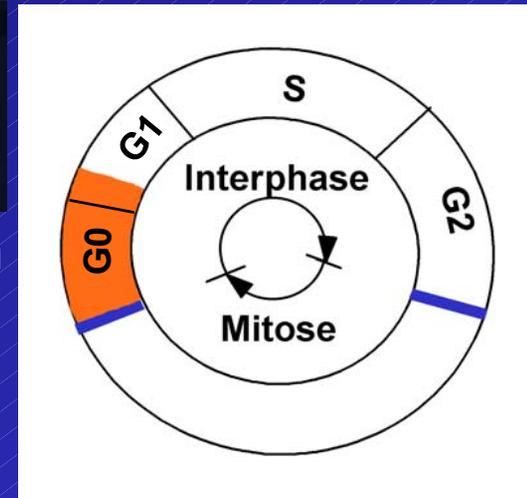
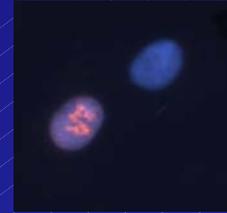
#### Indirekte Färbung



# Probenpräparation    Verwendete Antikörper

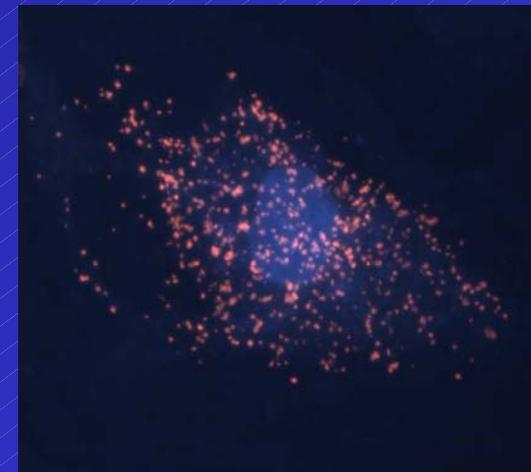
## 1. Ki67

- Im Zellkern
- Proliferationsassoziertes 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)

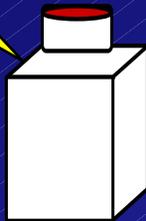
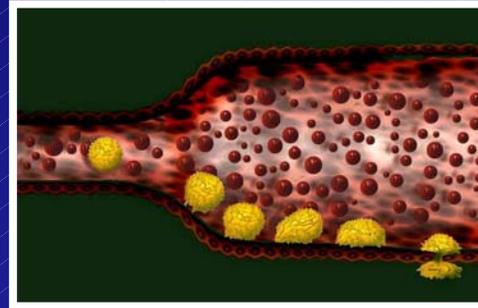
- Multimeres Glycoprotein
- Bindet andere Glycoproteine, Kollagen und Heparin
- Schutz von Faktor VIII vor unspezifischem Abbau
- Vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten
- Gespeichert in Weibel-Pallade-Körperchen
- Erlaubt die Charakterisierung vom Endothelzellen



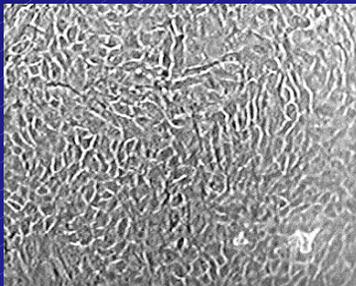
# Probenpräparation    Verwendete Zellen



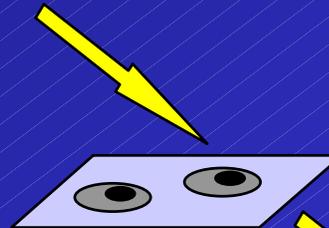
Gewebestücke



Kollagenase-  
Verdau



Kultivierung in  
Quadriperm-Schalen

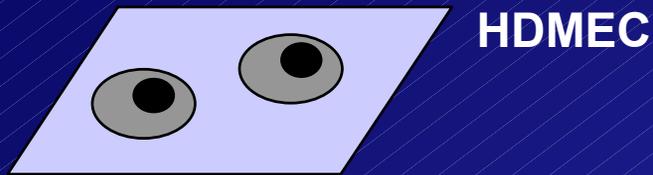


Zell-Fixierung

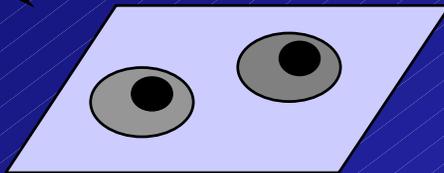
Immunfluoreszenz-  
färbung

# Probenpräparation

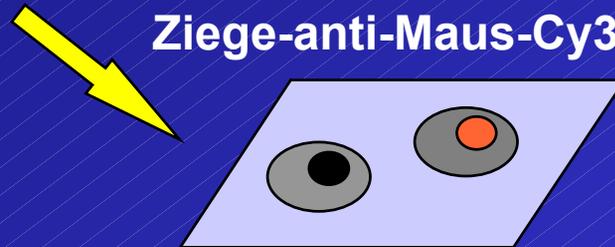
## Färbeprotokoll Ki67



Primär-AK: Ki67 (Maus)

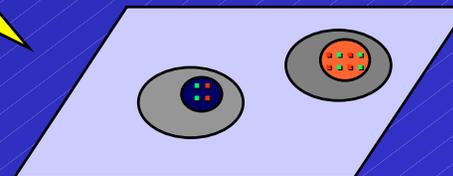


Sekundär-AK:  
Ziege-anti-Maus-Cy3



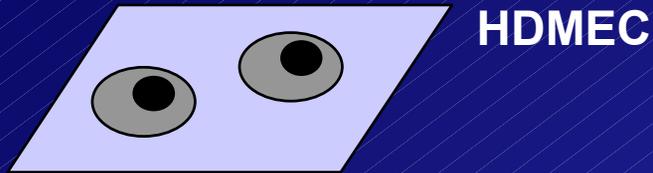
FISH und  
Kern-Gegenfärbung

Trocknen



# 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*

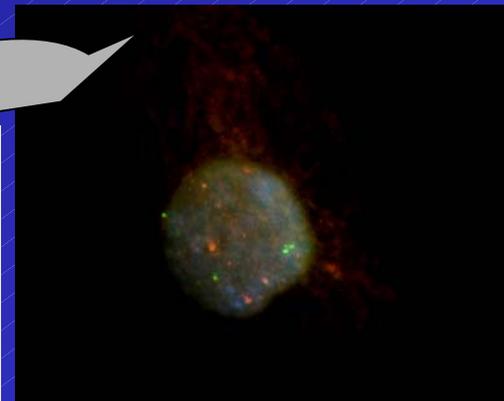
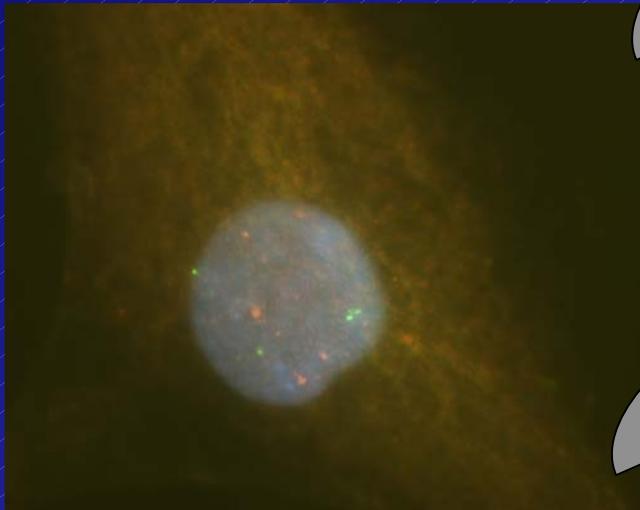
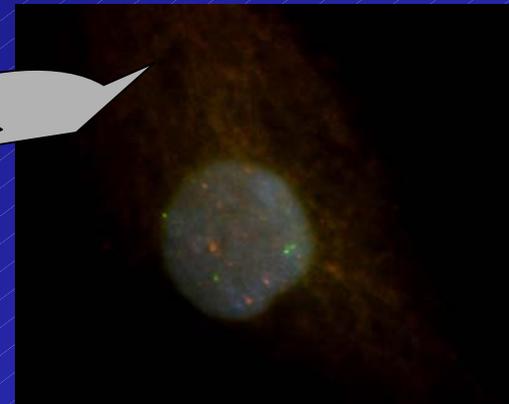
<b>Ki67</b>	Diploide	Polyploide
Positive		
Negative		

-Bilddaufnahme

# Proben

## Auswertung

### Bildnachbearbeitung



# Organisation/ Gruppeneinteilung

	<b>Probenpräparation</b> (Bohn) Container-Labor	<b>Fluoreszenzmikroskopie</b> (Oberringer) Container-Labor	<b>Elektronenmikroskopie</b> (Knittel) REM-Labor	<b>Rastersondenmikroskopie</b> (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: