

# Chemische Feitelikheden

#344

Editie 86

juli 2018

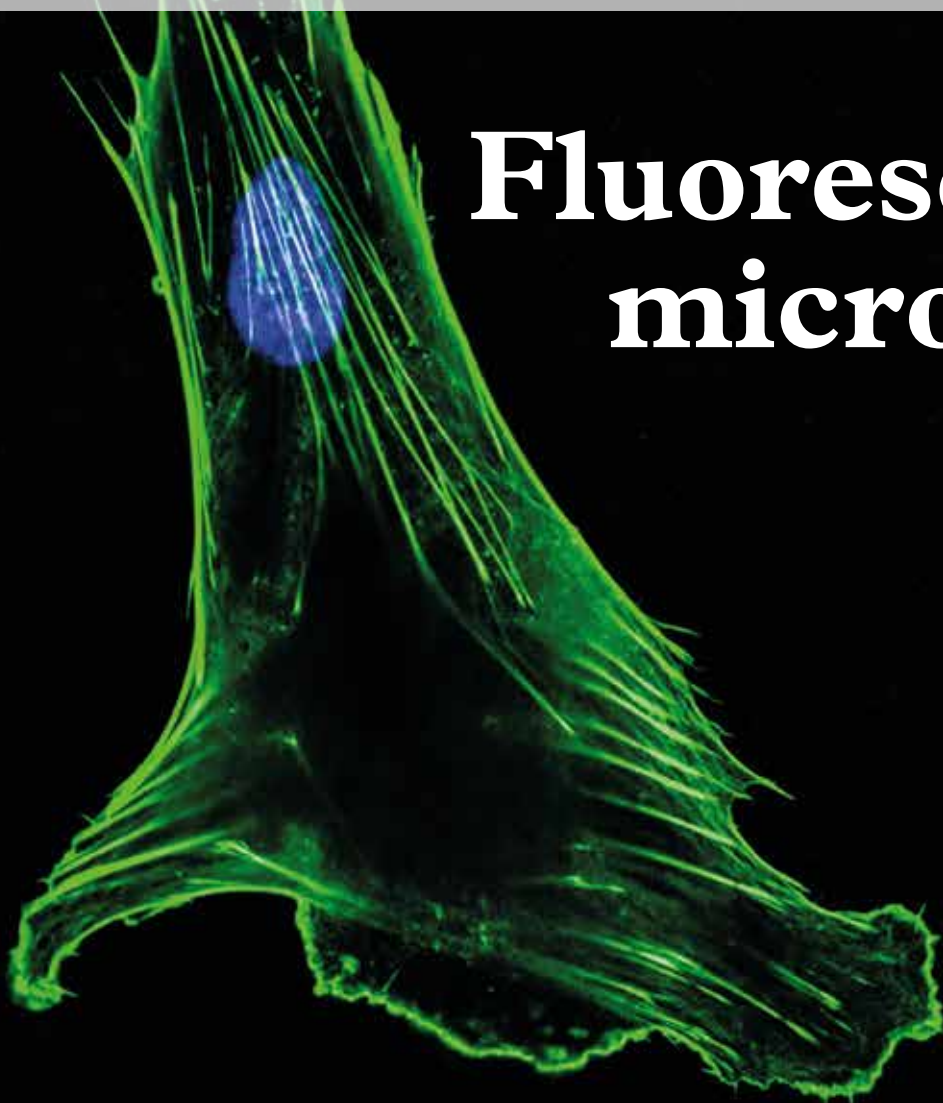
Harmen Kamminga

## Moleculen staan er gekleurd op

Met fluorescenciemicroscopie onderscheid je microscopische structuren in de cel of zelfs individuele moleculen van hun omgeving. Je vindt kankercellen in verder gezonde weefsels. Je gaat na of een erfelijke afwijking in een weefsel tot uitdrukking komt. Ook stel je vast of het immuunsysteem van een patiënt eigen weefsels markeert als vijandig. En je vergaart informatie over moleculaire interacties aan en onder het oppervlak van anorganische moleculen, polymeren of (koolstof)nanostructuren. Kortom, in biomedische laboratoria is fluorescenciemicroscopie

inmiddels een even onmisbare als geautomatiseerde standaardtechniek, deels uitvoerbaar op handzame benchtop-apparaten. Achter die eenvoud schuilen geavanceerde optische technologie, supersnelle en hypergevoelige digitale camera's en slimme beeldbewerking. Onderzoek dat individuele moleculen met een zeer hoge resolutie zichtbaar maakte via fluorescenciemicroscopie, was goed voor een Nobelprijs voor de Scheikunde. Inmiddels combineren onderzoekers fluorescenciemicroscopie met elektronenmicroscopie om nóg verder in te zoomen.

## Fluorescenciemicroscopie



# Moleculen staan er

*Moleculaire en celbiologie, biomedische wetenschappen en materiaalwetenschappen zijn zonder fluorescentiemicroscopie nauwelijks meer voorstelbaar. Je zou bijna vergeten dat die standaardtechniek alleen mogelijk werd door een bijzondere combinatie van geavanceerde optica, lasers, digitale beeldvorming en fluorescerende kleurstoffen aan antilichamen.*

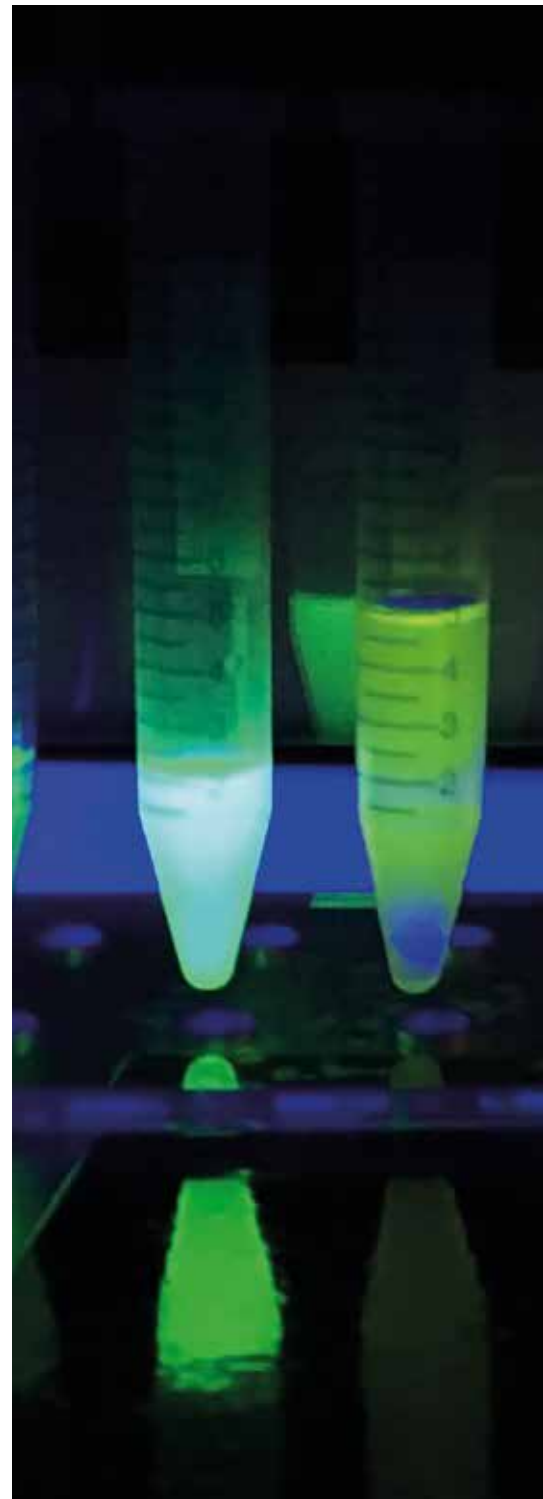
**D**e meeste Nederlanders maken op de middelbare school bij het vak biologie kennis met de microscoop. Objecten en oppervlakken die voor het blote oog verborgen blijven, zelf kunnen aanschouwen is voor velen nog net zo fascinerend als dat het voor zeventiende-eeuwse pioniers als Swammerdam en Van Leeuwenhoek moet zijn geweest. Vertrouwd als we in onze huidige hoogtechnologische beeldcultuur zijn met geavanceerde microscopische beelden, is het moeilijk voor te stellen hoe de biologische, chemische en fysische wetenschappen er zonder kennis van de microscopische wereld zou hebben uitgezien. Van celbiologie, biochemie en life sciences zou nauwelijks sprake zijn geweest.

Toch kent de lichtmicroscopie zoals je die op de middelbare school leert belangrijke beperkingen. Met een lichtmicroscopie zijn alleen objecten die licht sterk absorberen of breken goed zichtbaar te maken. En het kleine kun je niet ongelimiteerd in beeld brengen. De golflengte van het zichtbare licht dat door de microscoop in onze ogen valt, begrenst de resolutie van de microscoop. Bij vergrotingen boven de grofweg 1.500 keer lukt het met zichtbaar licht niet goed meer om verschillende punten van een microscopisch object los van elkaar te zien; de zogenoemde diffractielimiet. Dat beperkt de microscopische waarnemingen die je aan bijvoorbeeld levende cellen kunt doen enorm. De meeste cel-

inhoud en interne structuren van cellen zijn doorschijnend en kleurloos. Om het contrast in cellen te vergroten, experimenteerden onderzoekers sinds de tweede helft van de negentiende eeuw daarom onder meer met natuurlijke en later ook synthetische kleurstoffen. Door de kleurstof, zuurgraad en andere omstandigheden slim te kiezen, lukte het microscopisten geleidelijk beter om verschillende celtypen, structuren in cellen en aanwezige stoffen selectief te kleuren. De meeste kleuringen doden echter de cellen en fixeren structuren op soms onnatuurlijke wijze, met kunstmatige beelden, artefacten, als gevolg.

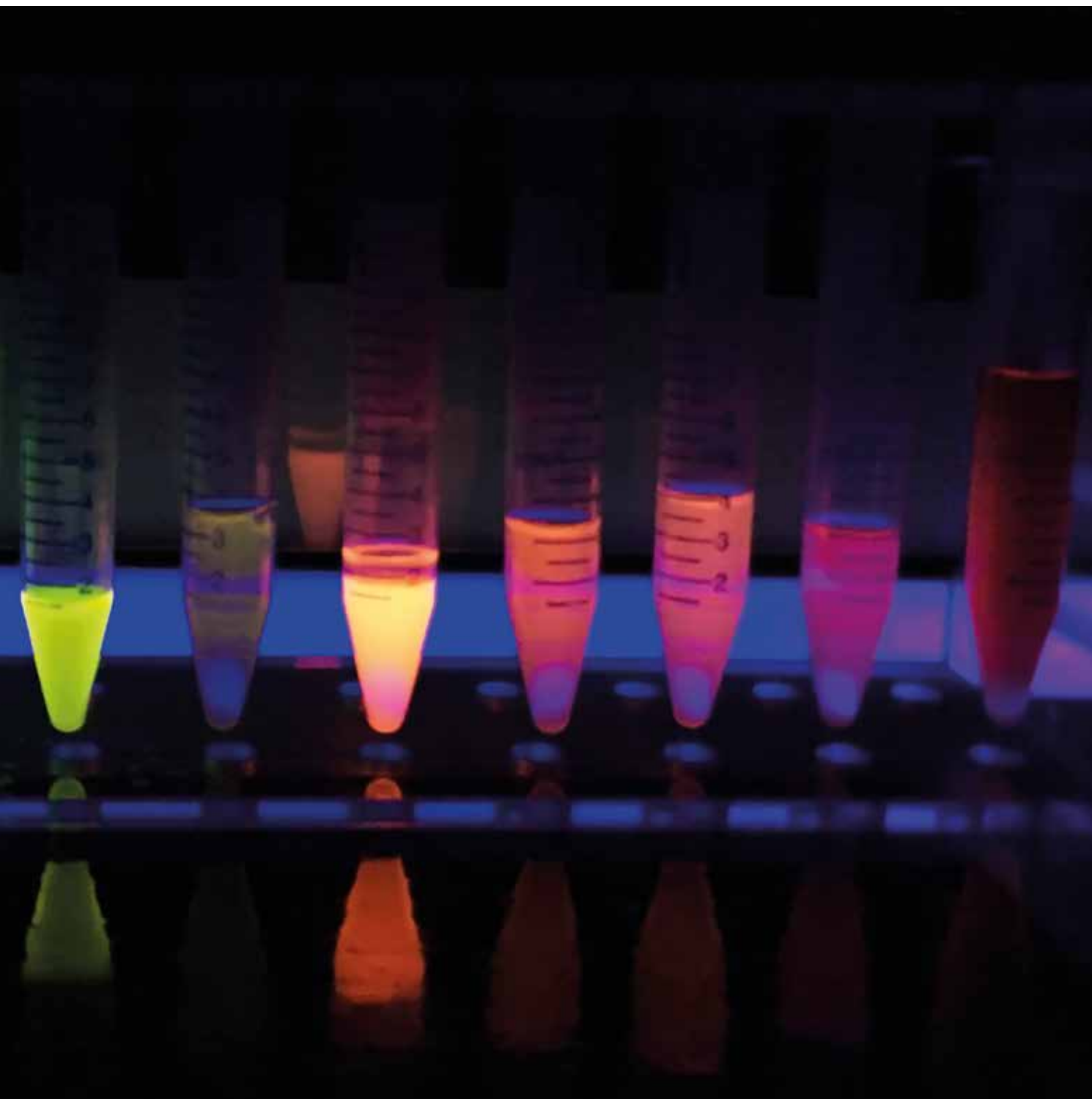
## Beperkingen omzeilen

Fluorescentiemicroscopie heeft ervoor gezorgd dat we de beperkingen van lichtmicroscopie in belangrijke mate konden omzeilen. Dat stond overigens bepaald niet bij voorbaat vast. De ontwikkelaar van de eerste fluorescentiemicroscopie leek aanvankelijk zelf niet heel overtuigd van de meerwaarde van zijn nieuwste vinding. 'Ob und wieweit das Fluoreszenzmikroskop im besondern und die Lumineszenzenmikroskop im allgemeinen einem Möglichkeit der Erweiterung der Mikroskopischen Abbildungsgebietes in sich schliessen, muss die Zukunft lehren', schreef de 32-jarige Oskar Heimstädt in het artikel in het *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und Mikroskopische Technik*, waarin hij in 1911 de bouw van de eerste fluorescentiemicroscopie beschreef.



In de moleculaire biologie zijn fluorescerende stoffjes als maken. Dit stelt ze in staat om verschillende structuren in

# gekleurd op



gereedschap inmiddels onmisbaar. Met subtiële aanpassingen in de DNA-volgorde van de eiwitten die fluoresceren, is het onderzoekers gelukt allerlei kleuren te cellen tegelijk in beeld te brengen (zie ook de afbeelding op de achterkant).

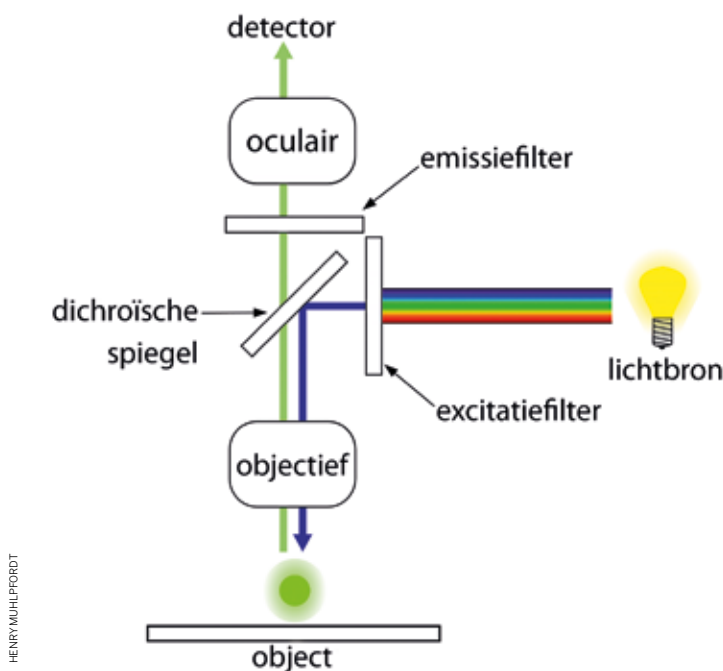
### ► Fluorescentie

Interactie tussen materie en elektromagnetische straling kan leiden tot het verschijnsel fluorescentie. Fluorescentie treedt op wanneer een materiaal straling absorbeert met een zodanige energie dat bepaalde elektronen in de materie 'aangeslagen' raken naar een instabiel, hoger energieniveau. Een deel van de opgenomen energie wordt bij terugkeer van het elektron naar de aanvankelijke 'grondtoestand' omgezet in bewegingsenergie (vibratie). Het resterende deel kan in de vorm van elektromagnetische straling worden uitgezonden. Door de lagere energie heeft de straling die zo wordt uitgezonden een hogere golflengte ( $E = h \cdot c / \lambda$ ; waarin  $E$  de energie van het foton is,  $h$  de constante van Planck,  $c$  de lichtsnelheid en  $\lambda$  de golflengte).

Organische moleculen met een heterocyclische bouw of een oneven afwisseling van enkele en dubbele bindingen (geconjugeerde systemen) zijn veelal goed in staat om fotonen te absorberen. Vaak zijn dit fotonen met een energie die overeenkomt met golflengtes in het gebied van uv-licht. In de aangeslagen toestand verdelen elektronen uit de dubbele bindingen zich opnieuw over het molecuul. Bij terugkeer in de grondtoestand treedt fluorescentie op, meestal in het voor mensen zichtbare deel van het spectrum.

Enkele jaren eerder hadden de makers van de eerste uv-microscopen ontdekt dat sommige objecten als zij door een specifieke golflengte uv worden beschenen (excitatie), reageren met het uitzenden van licht met langere golflengtes (emissie). De uv-microscopisten vonden die fluorescentie vooral hinderlijk, omdat het de beelden verstoortte die het uittrekkende uv-licht op de fotografische film maakte. Heimstädt bedacht dat wanneer je juist het voor de ogen schadelijke uv weg filterde, je de overblijvende fluorescentie met een verder normale microscoop rechtstreeks kon waarnemen.

Hoewel het nut van het kunnen waarnemen van deze 'autofluorescentie' aanvankelijk gering leek, duurde het maar drie jaar tot de Tsjechische tyfus-onderzoeker



HENRY MULHENDERT

Fluorescentiemicroscopen zijn in de ruime eeuw van hun bestaan snel geavanceerder geworden en dus ook ingewikkelder eenduidig te beschrijven. Toch is het principe van de fluorescentiemicroscoop niet moeilijk te begrijpen als je een 'gewone' lichtmicroscoop in gedachten neemt. Net als bij elke andere lichtmicroscoop leg je bij de fluorescentiemicroscoop je sample onder een samenstel van lenzen dat het objectief vormt. Bij een gewone microscoop zorgt meestal doorvallende of soms opvallende belichting van het object dat het oog of een camera, de detector, via objectief en een tweede samenstel van lenzen, het oculair, een microscopisch beeld van het object krijgt.

Onderzoekers gebruiken veelal gasontladinglampen of lasers als lichtbron. Daarbij is ook de golflengte van het invallende licht van belang, omdat die bepaalt of en in welke mate de fluorescerende kleurstoffen aangeslagen raken. Om fluorescentie met golflengtes in het zichtbare deel van het licht spectrum te krijgen, moet het invallende licht sowieso een korte golflengte hebben. In de praktijk is dit meestal uv-licht.

Speciale excitatiefilters zorgen ervoor dat het licht dat op het object valt precies de gewenste golflengte heeft om te zorgen voor fluorescentie. Uiteindelijk laat de dichroïsche spiegel alleen het fluorescerende signaal door naar het oculair en de detector.

Stanislaus von Prowazek op het lumineuze idee kwam om te proberen de zichtbaarheid van objecten te vergroten door ze te kleuren met de eerste chemisch gesynthetiseerde fluorescerende kleurstof: fluoresceïne.

### Fluorescerende kleurstoffen

De combinatie van microscopie en fluorescerende kleurstoffen bleek succesvol en leidde tot de synthese van een lange reeks organische fluorescente kleurstoffen.

Vooral uit heterocyclische moleculen zoals acridines en fenantridines, fluoronen, oxazines, rhodamines en ook polymethines (langgerekte koolstofketens met een oneven aantal koolstofgroepen die om en om met enkele en dubbele bindingen met elkaar verbonden zijn) zijn tientallen fluorescerende kleurstoffen ontwikkeld die onderzoekers tot op de dag van vandaag gebruiken.

Verscheidende kleurstoffen hebben uiteen-

lopende eigenschappen wat betreft hun excitatie- en emissiespectrum en de mate waarin zij binden aan bepaalde stoffen of structuren in cellen. Zo bindt het molecuul DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindool) goed in de kleine groeve van DNA en RNA, waar het violette fluorescentie geeft. FITC daarentegen, het isocyanaat van fluoresceïne, plakt goed aan aminogroepen en thiolgroepen van eiwitten en geeft een groene fluorescentie. Slim gebruik van kleurstoffen leverde steeds betere, meer gedetailleerde beelden op van structuren en hun bewegingen in de cel.

Ook de fluorescentiemicroscopen zelf werden steeds beter. Door vernuftig gebruik van filters lukte het Duitse wetenschappers in 1929 om het invallende licht dat aanleiding geeft tot fluorescentie, de excitatie, niet meer door het object heen te stralen, maar het via het objectief óp het object te laten vallen. Dit maakte fluorescentiemicroscopie van slecht doorlatende objecten



mogelijk en zorgde ervoor dat de emissie van fluorescentie veel beter waarneembaar werd. Door het precieze werk met filters bleef die epifluorescentiemicroscopie lang een specialistisch ambacht.

De toepassing van bundelsplitters in de vorm van dichroïsche spiegels veranderde dat. De invallende lichtstraal gelijktijdig richten en zeer specifiek laten terugkaatsen van alleen de gewenste golflengte van fluorescentie werd hiermee een stuk gemakkelijker. De Nederlandse wetenschapper Bas Ploem ontwikkelde die techniek aan het eind van de jaren zestig, toen in het Westen nog niet bekend was dat de Russische wetenschappers Brumberg en Krylova in 1953 iets soortgelijks hadden beschreven.

### Confocale microscopie

Een andere grote verbetering aan de fluorescentiemicroscopie volgde in 1957, met het eerste octrooi op een confocale microscoop voor de Amerikaanse wiskundige en uitvinder Marvin Minsky. Tot dan toe hadden fluorescentiemicroscopen last van het feit dat je het gehele te onderzoeken object belicht en dat dus ook gaat fluoresceren, terwijl alleen de informatie uit het kleine gebied waarop is scherp gesteld relevant is voor de beeldvorming. Minsky en opvolgers bedachten en perfectioneerden de techniek om alleen precies dat ene interessante punt te belichten met een laser. Door de rest van het object niet meer gelijktijdig te belichten, treedt daar ook geen fluorescentie meer op, zodat de fluorescerende achtergrondruis veel minder is. De confocale belichting verbeterde de optische resolutie sterk. Je kon voortaan objecten zo klein als ongeveer 250 nm in beeld brengen. Door het veel kleinere belichte oppervlak neemt de intensiteit van het fluorescente signaal wel af, wat langere belichtingstijden en gevoeliger detectoren noodzakelijk maakte. Zo zorgden fysici voor steeds betere microscopen en chemici voor bruikbare fluorescerende kleurstoffen. Maar ook de biologie droeg bij aan de verdere ontwikkeling van de fluorescentiemicroscopie.

### Immunofluorescentie

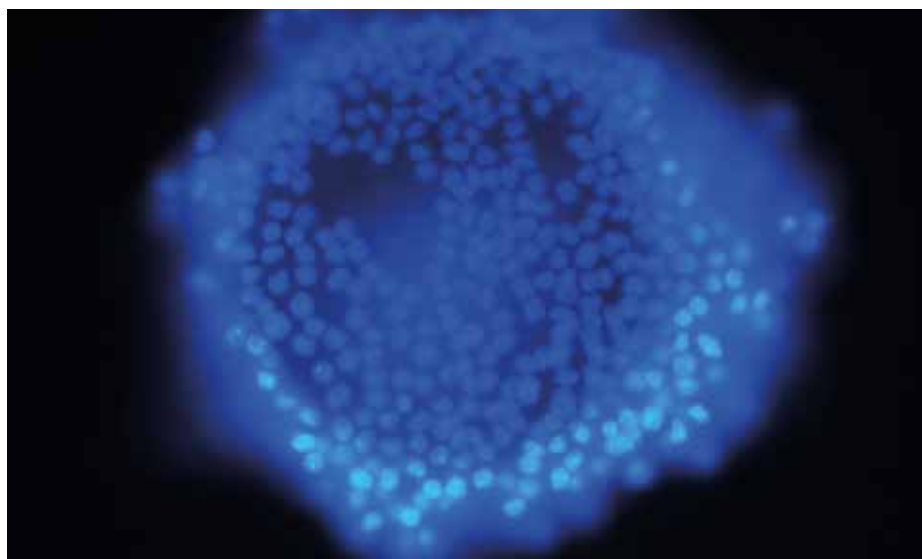
De Amerikaanse patholoog Albert Coons wilde in 1939 bij het bestuderen van een ontstekingsreactie in hartweefsel graag vaststellen om welk type immuuncellen het ging. Hij bedacht dat het goed zou zijn om antilichamen te merken die aan antigenen

van een bepaald celtype zouden binden. Met behulp van zulke gemarkeerde antilichamen hoopte hij de betreffende cellen onder de microscoop terug te vinden. Samen met organisch chemicus Louis Fieser (die tegelijk werkte aan de ontwikkeling van synthetisch napalm) slaagde Coons erin om het fluorescente molecuul anthraceen-isocynaat te koppelen aan beschikbare antilichamen opgewekt tegen *Pneumococcus*-bacteriën. Dat was een hele uitdaging, omdat over de bouw van antilichamen, behalve dan dat het eiwitmoleculen waren, begin jaren veertig weinig bekend was. Toch lukte het om met de fluorescent gemaakte antilichamen pneumokokken daadwerkelijk zichtbaar te maken onder een fluorescentiemicroscopie. Dit resultaat zette Coons en collega's ertoe aan allerlei fluoroforen te koppelen aan steeds meer beschikbare antilichamen. Ook omdat het eerste anthraceen-isocynaat bij nader inzien niet de meest gelukkige keuze bleek, aangezien de golflengte van de fluorescentie overlapt met de autofluorescentie van menselijke weefsels. Omdat je in principe tegen allerlei moleculen specifiek antilichamen kunt maken en je die nu fluorescent kon labelen, hielp de immunohistochemie van Coons en zijn vakgenoten de fluorescentiemicroscopie aan een zeer specifieke kleuringsmethode. Op zijn beurt droeg de fluorescentiemicroscopie sterk bij aan de verdere vergroting van de kennis van de immunologie en de moleculaire biologie.

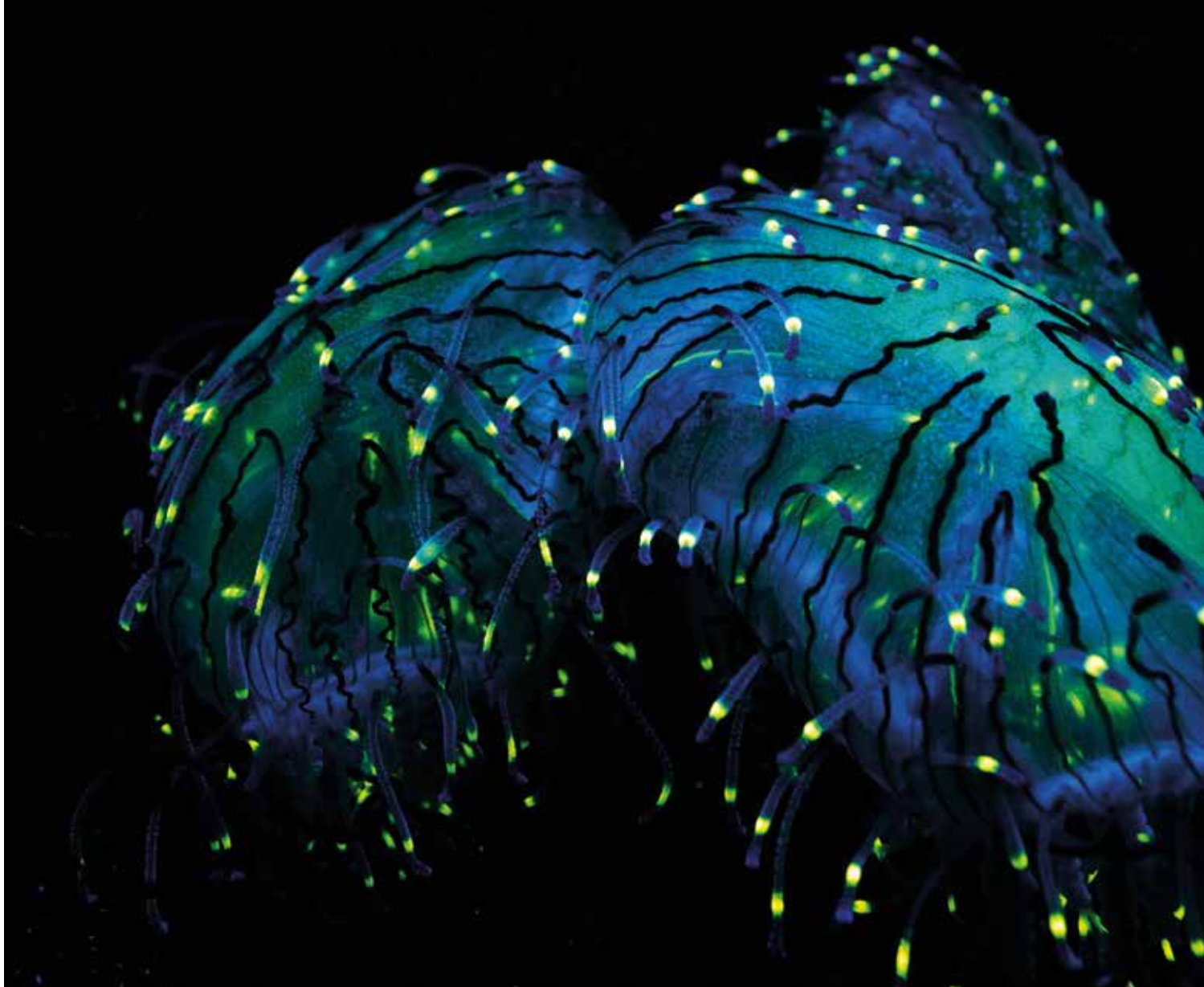
Een veelgebruikte methode in de moleculaire biologie gaat tegenwoordig uit van *in-direct labeling*. Grote biotechbedrijven leveren standaard-antilichamen met daaraan een fluorescerende stof gekoppeld. Die secundaire antilichamen binden aan andere antilichamen van een bepaalde diersoort. Met de microscoop kun je via de fluorescerende secundaire antilichamen die primaire antilichamen opsporen. In de betreffende diersoort, bijvoorbeeld in konijnen, kun je vervolgens ongelabelde, primaire antilichamen tegen het gewenste antigeen opwekken. Door het te onderzoeken object met een mengsel van primaire en secundaire antilichamen te bewerken, kun je het fluorescerende standaardlabel uit de fabriek via de tussenschakel van het specifieke primaire antilichaam koppelen aan het te onderzoeken molecuul.

### In-situhybridisatie

Vanaf het begin van de jaren tachtig lukte het biomedische onderzoekers ook om synthetische DNA-fragmenten te voorzien van fluorescente labels. Nu konden ze fluorescentiemicroscopie eveneens gebruiken om vast te stellen of de DNA-*probes* bonden aan specifieke, complementaire DNA sequenties in het chromosomale DNA. Die *fluorescent in situ hybridization* (FISH) gebruiken ze nu veel om genetische afwijkingen of ontspoorde kankercellen op te sporen. Ook kan FISH helpen bepalen welke soort ziekteverwekker een bepaalde infectie veroorzaakt of welke microbes er



Een eikel van een varken, omringd door veel kleinere granulosa-cellen. De blauwe kleur is afkomstig van DAPI, een fluorescerende stof die precies in de groeve van een DNA-helix past en daardoor cellkernen kleurt.



Veel zeedieren hebben een vorm van bioluminescentie, dat een rol speelt bij de meeste basale gedragingen: het vangen van prooien, het afschrikken van belagers en

zoal deel uitmaken van bijvoorbeeld een levensgemeenschap in een biofilm, bodem of darm. Daarnaast pas je FISH toe om verwantschap vast te stellen tussen verschillende (soorten) organismes en om biologische stambomen op te stellen. Synthetische fluorescerende moleculen plakken aan antilichamen en nucleïnezuuren zorgde voor een sterke vergroting van de biologische toepassing van fluorescentiemicroscopie. Dat je fluorescentiemicroscopie vandaag de dag ook kunt inzetten om de expressie van genen en de lokalisatie van eiwitten in levende organismes te bepalen, komt door een nog nauwere verbinding van fluorescentie en levende systemen via de moleculaire genetica.

## Bioluminescentie

Veel levensvormen beschikken over kleine, veelal heterocyclische moleculen die met behulp van enzymen kunnen oxideren en de energie die daarbij vrijkomt uitzenden als licht. Bekende voorbeelden van bioluminescerende organismes zijn vuurvliegjes. Ook bepaalde andere insecten, sommige

zwammen, veel bacteriën en naar schatting zo'n 90 % van de diepzeedieren zijn in staat tot bioluminescentie. Biotechnologen verfijnen al decennia methodes om die natuurlijke eigenschap ook voor onderzoekdoeleinden nuttig in te zetten. Diverse luciferines (kleurstofmoleculen) en luciferases (de enzymen die helpen bij de luminescentie) worden fabrieksmatig geproduceerd.

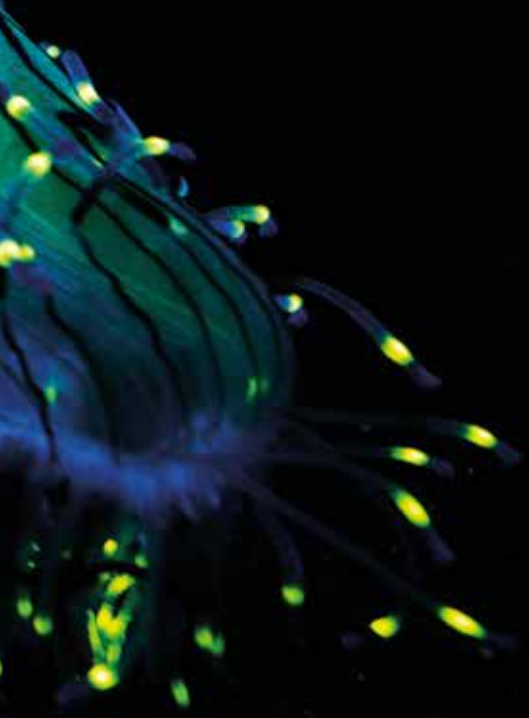
De grote doorbraak kwam toen wetenschappers erin slaagden een fluorescerend eiwit tot expressie te brengen in andere organismes (zie kader 'Cilindrisch kwallenlampje'). In 1994 beschreef de onderzoeksgroep van de Amerikaanse neurobioloog Martin Chalfie hoe je de genetische code van *green fluorescent protein* (GFP) uit een kwal tot expressie brengt in de bacterie *Escherichia coli* en het aaltje *Chaenorhabditis elegans*. Die publicatie toonde aan dat het mogelijk was om in levende cellen van zowel prokaryoten als eukaryoten genproducten te detecteren en te volgen door hun expressie kunstmatig te koppelen aan de expressie van fluoresce-

rende eiwitten zoals GFP. Dit type fluorescerende eiwitten was efficiënt in gebruik, omdat het geen uitwendig substraat of de toevoeging van bijvoorbeeld een cofactor nodig had om te fluoresceren.

GFP en afgeleide fluorescerende eiwitten leidden een nieuw tijdperk in voor de fluorescentiemicroscopie en hebben sindsdien een enorme bijdrage geleverd aan het begrip van de moleculaire processen in levende cellen. Omdat de fluorescerende eiwitten veel minder giftig zijn voor levende cellen dan de eerder gebruikte synthetische, kleine fluorescerende moleculen, werd fluorescentiemicroscopie aan levende cellen mogelijk, waarbij je de expressie van een of meerdere eiwitten in de tijd kunt volgen. Pioniers Chalfie, Tsien en biochemicus Osamu Shimomura die in 1962 als eerste GFP isoleerden, kregen voor hun bijdrage aan de wetenschap in 2008 samen de Nobelprijs voor de Scheikunde.

## Superresolutie

Met fluorescerende fusie-eiwitten en confocale laser-scanning-fluorescentiemicro-



de paring.

### ► Cilindrisch kwallenlampje

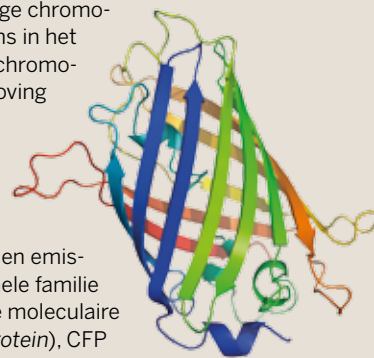
Voor de celbiologie en de moleculaire biologie is de toepassing van fluorescerende eiwitten bij de fluorescentiemicroscopie van een nauwelijks te overschatten belang. Het eerste fluorescerende eiwit dat zo is ingezet, is GFP (*green fluorescent protein*). Dat fluoresceert helder groen (golflengte 509 nm) als je het beschijnt met ultraviolet licht (395 nm).

In 1962 is het compacte GFP-eiwit geïsoleerd uit vele duizenden kwalletjes van de soort *Aequorea victoria*, gevangen langs de kust van Californië en onderzocht door biochemicus Osamu Shimomura. Bij de kwalletjes speelt het eiwit een rol in de bioluminescentie, een eigenschap die de meeste zeedieren bezitten.

Moleculair bioloog Douglas Prasher beschreef in 1992 de DNA-sequentie van het GFP-gen, dat codeert voor een eiwit van 238 aminozuren. Prasher zag ook als eerste een rol voor GFP als *tracer*-molecuul. Zijn onderzoeksfinanciering stopte echter en het was Martin Chalfie die het GFP-gen als eerste met succes tot expressie bracht in een bacterie en een aaltje. Wonderlijk genoeg bleek het GFP-molecuul in beide organismen correct gevouwen en fluoresceerde het bij kamertemperatuur, zonder daar verder nog substraat of kwallen-cofactoren voor nodig te hebben.

In 1996 is de kristalstructuur van GFP-eiwit opgehelderd. Dat bleek een bijzondere structuur te hebben: elf  $\beta$ -strengen vormen samen een beschermende cilinder om een  $\alpha$ -helix waarvan aminozuurresiduen 65, 66 en 67 (serine, dehydrotyrosine, glycine) samen een ringvormige chromofoor vormen, onder invloed van andere zijketens in het eiwitmolecuul. De  $\beta$ -cilinder houdt water bij de chromofoor vandaan en voorkomt zo vroegtijdige uitdoving van de fluorescentie.

Puntmutaties in het GFP-eiwit blijken te kunnen zorgen voor een sterke toename van de fluorescentie, wat leidt tot onder meer EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), maar ook tot verandering van de golflengtes van excitatie en emissie. Dit resulteerde in de ontwikkeling van een hele familie fluorescerende eiwitten als gereedschap voor de moleculaire biologie, waaronder YFP (*yellow fluorescent protein*), CFP (*cyan fluorescent protein*), RFP (*red fluorescent protein*) en BFP (*blue fluorescent protein*), die je ook kunt combineren.



scopie lukte het biologen en medici steeds beter om de locatie en de beweging van diverse grotere celstructuren zoals vesikels in de cel in driedimensionale beelden zichtbaar te maken. De diffractielimiet voor lichtmicroscopie maakte echter dat onzichtbaar bleef waar in de cel individuele (eiwit)moleculen zich precies bevinden, hoe een enkel molecuul beweegt en hoe het met andere moleculen interacties aangaat. Dat veranderde toen aan het eind van de jaren tachtig de Duitse natuurkundige Stefan Hell op het idee kwam om gelijktijdig twee lasers te gebruiken. Eentje om fluorescerende moleculen in het object aan te slaan, de andere om ze weer uit te doven, uitgezonderd een zeer klein gecentreerd gebied. Hell bouwde daarbij voort op werk aan *single molecule spectroscopy* van de Amerikaanse natuurkundige William Moerner.

Door de zeer puntsgewijze fluorescentie, kun je op nanometerschaal de precieze locatie van een molecuul bepalen, ook als zij dichter bij elkaar liggen dan de diffractielimiet van 200 nm. Het nadeel was dat de

*stimulated emission depletion* van Hell alleen goed werkte bij temperaturen in de buurt van het absolute nulpunt. In 1993 ontwikkelde de Amerikaanse natuurkundige Eric Betzig een versie die ook bij kamertemperatuur goed werkte. In 2014 ontvingen Moerner, Hell en Betzig samen de Nobelprijs voor de Scheikunde voor de ontwikkeling van de superresolutie fluorescentiemicroscopie die van microscopie in feite nanoscopie maakte en waarmee wetenschappers nu de bewegingen van individuele moleculen in levende cellen kunnen volgen.

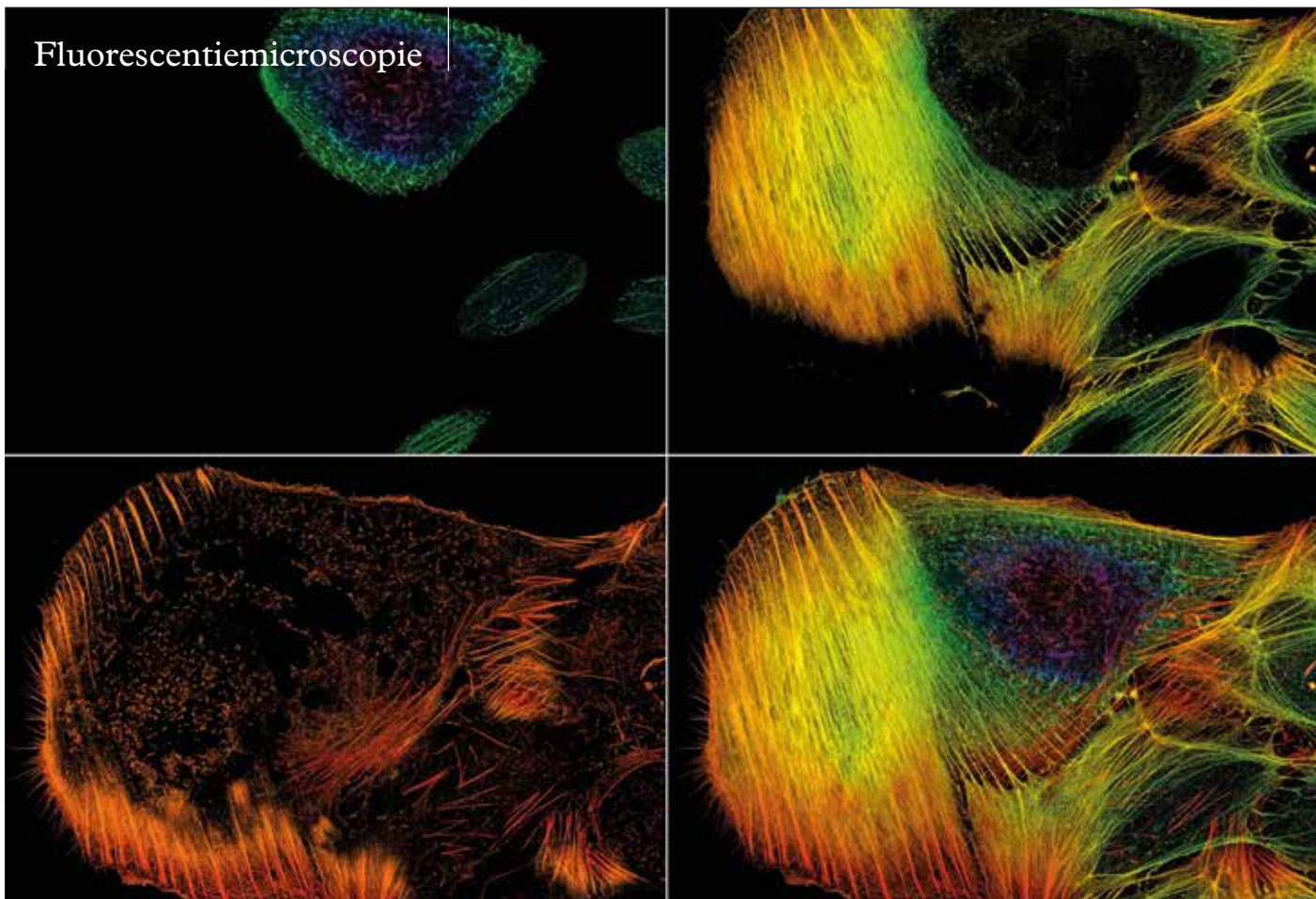
### Preciezer focussen

Met het toenemen van de kennis van de nanobiologie bleef de laatste jaren ook de vraag naar steeds meer geavanceerde beeldvormende technieken stijgen. De lichtbundels die fluorescerende moleculen aanslaan worden in steeds preciezere puntjes en laagjes gefocust, waarna slimme software uit de hiermee nauwkeurig gescande doorsnedes indrukwekkende 3D-beelden en filmpjes weet te genereren.

De toekomst lijkt nu aan apparatuur die verschillende microscopische en spectroscopische opnamemogelijkheden in zich verenigt. Natuurkundigen werken inmiddels aan en met systemen die waarnemen in gebied van de lichtmicroscopie via de superresolutie nanoscopie tot en met elektronenmicroscopie met elkaar kunnen combineren. Hoewel die systemen nog altijd werken met fluorescerende labels en de principes van de fluorescentiemicroscopie, staat die nieuwste generatie beeldvormende apparatuur inmiddels ver af van de algemeen bekende middelbare-schoolmicroscopen. Wellicht zullen die krachtige hulpmiddelen in de 21ste eeuw een revolutie in de moleculaire biologie ontketenen die vergelijkbaar is met de effecten van de lichtmicroscopie na de zeventiende eeuw op gebieden als histologie, celbiologie en fysiologie. Tussen die beide revoluties staat dan de fluorescentiemicroscopie, waarin veel natuurkundige, scheikundige en moleculair biologische kennis en kunde samenkwam. ●



## Fluorescentiemicroscopie



Deze foto van een botkankercel genaamd U<sub>2</sub>OS toont de kracht van fluorescentiemicroscopie. Door fluorescerende labels van verschillende kleur te koppelen aan eiwitten die op een specifieke plaats in de cel voorkomen, kun je iets te weten komen over de locatie van het eiwit waarin je geïnteresseerd bent. In de foto rechtsonder zijn de afzonderlijke foto's over elkaar heen gelegd.

### Voor op school:

1. Omschrijf in je eigen woorden het verschijnsel fluorescentie. Gebruik hierbij de woorden 'aangeslagen toestand' en 'grondtoestand'.
2. Wat betekent 'geconjugeerde systemen' in de koolstofchemie?
3. Leg uit of er in stoffen als buta-1,3-diëen, hexa-1,3,5-triëen en benzeen sprake is van een geconjugerd systeem.
4. Omschrijf in je eigen woorden wat bedoeld wordt met de diffractielimiet van een lichtmicroscop.
5. Fluoresceïne is een dizuur. Leg dit uit aan de hand van de structuurformule van fluoresceïne (zoek die zelf op via bijvoorbeeld Wikipedia).
6. Het massaspectrum van fluoresceïne (zie <https://massbank.eu/MassBank/jsp/RecordDisplay.jsp?id=JP009560&dsn=Funatsu>) vertoont een piek bij m/z waarde 76. Leg uit om welk molecuulfragment het hier gaat.
7. In het infraroodspectrum van fluoresceïne komt een scherpe band voor in het adsorptiegebied rond de 1.600 cm<sup>-1</sup>. Die wordt veroorzaakt door een groep die in het molecuul veelvuldig voorkomt. Leg uit aan de hand van BINAS-tabel 39C uit over welke groep het hier gaat.

### Meer weten?

- [www.youtube.com/watch?v=E-goSpv7gj8](http://www.youtube.com/watch?v=E-goSpv7gj8), een introducerend filmpje van de Heriot Watt University in Edinburgh, Schotland.
- [www.microscopyu.com](http://www.microscopyu.com), een uitgebreide, gedegen en up-to-date Engelstalige bron voor allerlei achtergronden en toepassingen van microscopie, inclusief fluorescentiemicroscopie.
- [www.nature.com/collections/ptjzfbkwv](http://www.nature.com/collections/ptjzfbkwv), een goed overzicht van de ontwikkeling van de diverse vormen van lichtmicroscopie door de tijd.

### Editie

#### Fluorescentiemicroscopie

editie 86 | nummer 344 | juli 2018

[www.chemischefeitelijkheden.nl](http://www.chemischefeitelijkheden.nl)

**Coverbeeld:** fluorescentiemicroscopie levert niet alleen veel nieuwe inzichten op, maar ook fraaie plaatjes (credit: iStock/Nicola Ferrari)

### Colofon

#### Over Chemische Feitelijkheden

Chemische Feitelijkheden is een actuele encyclopedie over moleculen, mensen, materialen en milieu. Het is een losbladige uitgave van de KNCV en verschijnt driemaal per jaar met in totaal tien onderwerpen.

## KNCV

#### Redactie

dr. Erwin Boutsma (hoofdredacteur), drs. Franny Scholte (eindredacteur),  
Harmen Kamminga (tekst), Henk Ubbels (vragen en correctie)

#### Vormgeving & Opmaak

Marije van de Linde/Content Innovators

#### Uitgever

Roeland Dobbelaer, Vakbladen.com  
Postbus 19949, 2500 CX Den Haag

#### Abonnementen

MijnTijdschrift.com  
088-2266626

[chemischefeitelijkheden@mijntijdschrift.com](mailto:chemischefeitelijkheden@mijntijdschrift.com)

Wij hanteren de opzegregels uit het verbintenissenrecht. Wij gaan ervan uit dat Chemische Feitelijkheden altijd wordt ontvangen uit hoofde van het beroep. Hierdoor wordt het abonnement automatisch met een jaar verlengd tenzij twee maanden vóór de einddatum een opzegging is ontvangen. Een abonnement op Chemische Feitelijkheden geeft via de website toegang tot tien nieuwe edities per jaar en het totale online archief. Daarnaast ontvangen abonnees in drie zendingen per jaar de losbladige edities.

#### Tarieven (2018)

Voor particulieren: online toegang met inlogcode en papieren editie (inclusief verzamelmap) kost € 87,75\*; leden van de KNCV, KVCV en NVON krijgen € 10 korting.

Voor bedrijven en (onderwijs)instellingen: onbeperkt toegang tot de digitale edities op basis van IP-adres en papieren editie in drievoud (inclusief verzamelmappen) kost € 262,50\*.

Losse nummers kosten € 9,95\* per stuk en zijn te bestellen bij Abonnementenland.

\*Bij betaling per acceptgiro wordt € 2,95 administratiekosten in rekening gebracht.