

Fluorescenční mikroskopie je nepostradatelnou technikou pro zobrazování živých buněk. Jedním z hlavních omezení této metody je difrakcí světla limitované, relativně malé prostorové rozlišení, což je popsáno Abbeho difrakčním zákonem. V posledních letech se proto začaly rozvíjet techniky, které obcházejí difrakční limit za účelem zvýšení prostorového rozlišení. Jednou z těchto technik je dynamická saturační optická mikroskopie (DSOM), která je založena na prostorovém sledování kinetiky vratných přechodů mezi svítivými a nesvítivými stavy fluoroforů. Reverzibilní přechod do nesvítivého stavu může být pozorován např. u světlem přepínatelných fluorescenčních proteinů jako je Dronpa a z ní odvozené klony. Zmíněné proteiny opakovaně přecházejí mezi fluorescenčními a nefluorescenčními formami po ozáření modrým nebo ultrafialovým světlem. Tato práce se soustředí na získávání lépe rozlišených fluorescenčních obrazů na základě pozorování kinetiky přechodů v různých částech vzorku. Experimenty byly prováděny na kvasinkách exprimujících proteiny označené Dronpou. Nejdříve bylo ověřeno, zda v Dronpě dochází k přepínání mezi svítivými a nesvítivými stavy. Dále byl sledován vliv intenzity excitačního světla a změna excitační vlnové délky na rychlost přepínání a fotostabilita proteinu. Měření byla prováděna na různých časových škálách a s různými proteiny. Závěry z provedených pokusů umožnily optimalizaci experimentálních podmínek pro samotné zobrazování, díky čemuž se podařilo získat obraz vzorku s dvakrát větším prostorovým rozlišením oproti standardnímu konfokálnímu obrazu. Neméně důležité zjištění je, že kromě zvýšení prostorového rozlišení v ohniskové rovině metoda DSOM dokáže vylepšit kvalitu získaného obrazu rovněž odfiltrováním nežádoucí autofluorescence a fluorescenčního signálu pocházejícího mimo ohniskovou rovinu.