

Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц. (1 курс магистратуры)

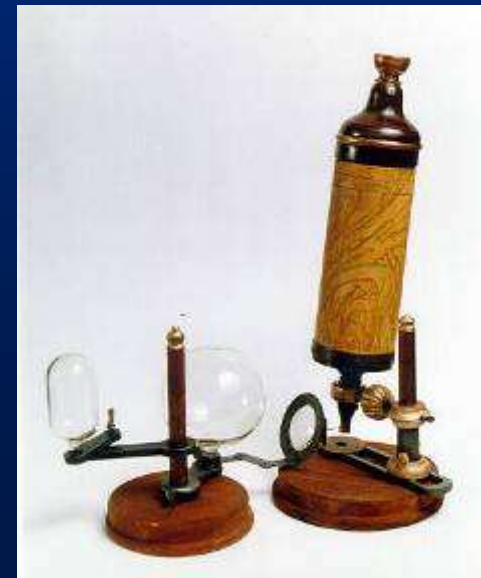


**Алексей Валерьевич Феофанов
Кафедра биоинженерии**

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН**

Лекция № 1

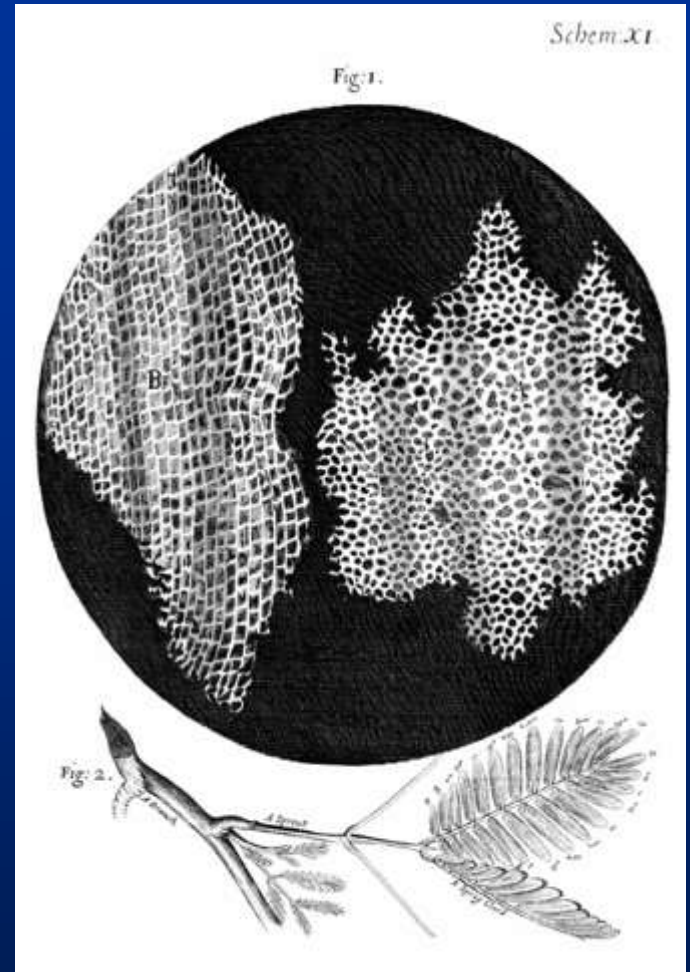


Из истории микроскопии

Наиболее ранние применения оптической микроскопии в биологических исследованиях - работы Роберта Гука (R. Hooke 1635-1703).

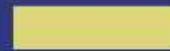
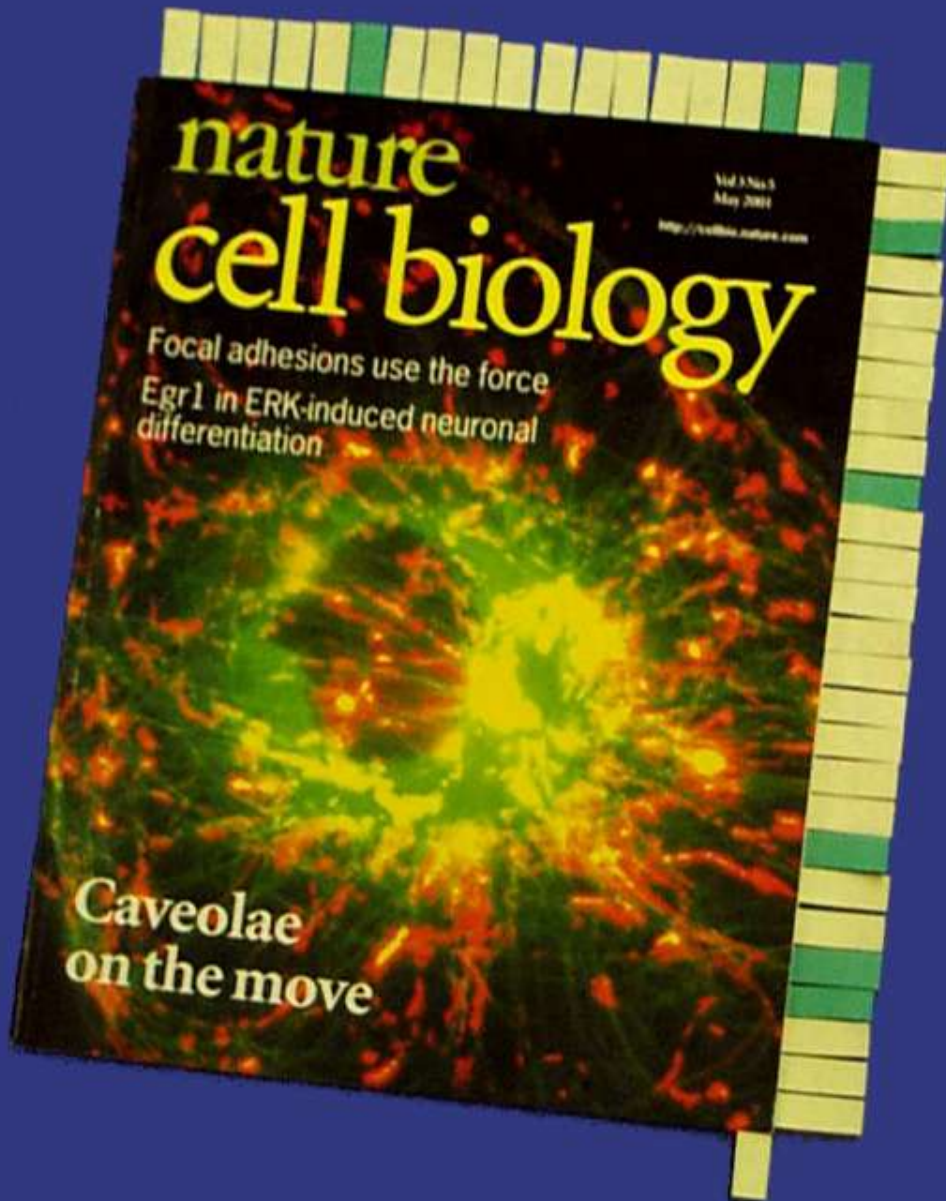


микроскоп Роберта Гука



первое микро- изображение растительных клеток (1665 г)
Термин «клетка» (cell) – автор Р.Гук

Важность оптической микроскопии



Оптическая
микроскопия



Другие методы
микроскопии

From Nikon presentation

Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная оптическая микроскопия белого света
- Широкопольная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная *микроспектроскопия*
- Флуоресцентная проточная цитометрия
- Многофотонная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия
- Флуоресцентная микроскопия на основе эффекта полного внутреннего отражения
- Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения (4-Пи микроскопия, STED-микроскопия на основе стимулированного обеднения эмиссии, N-SIM, N-STORM)
- Микроскопия одиночных молекул и их комплексов

Разнообразие методов оптической микроскопии

Широкопольная оптическая микроскопия белого света

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – нет

*** Окрашенные и/или контрастные объекты**

Наблюдение объектов в проходящем свете

Наблюдение объектов в отраженном свете

*** Неокрашенные слабоконтрастные объекты**

Темнопольная микроскопия

Фазовоконтрастная микроскопия

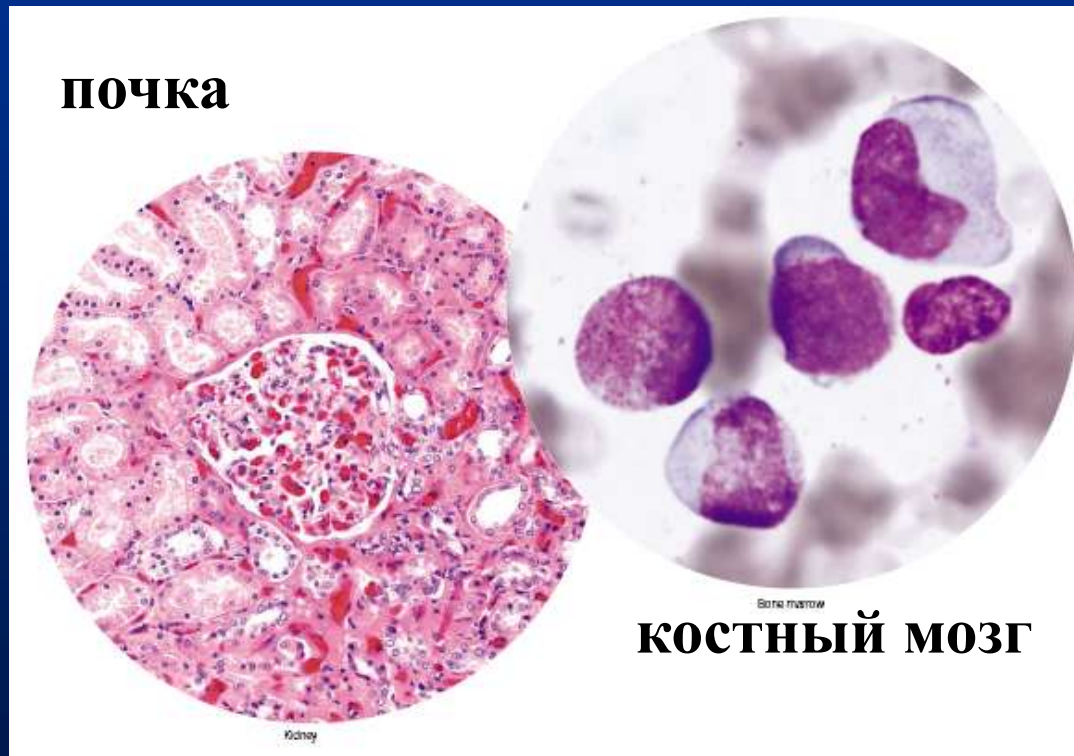
**Микроскопия на основе дифференциального
интерференционного контраста**

Разнообразие методов оптической микроскопии

Широкопольная оптическая микроскопия белого света

* Окрашенные и/или контрастные объекты

Наблюдение объектов в проходящем свете



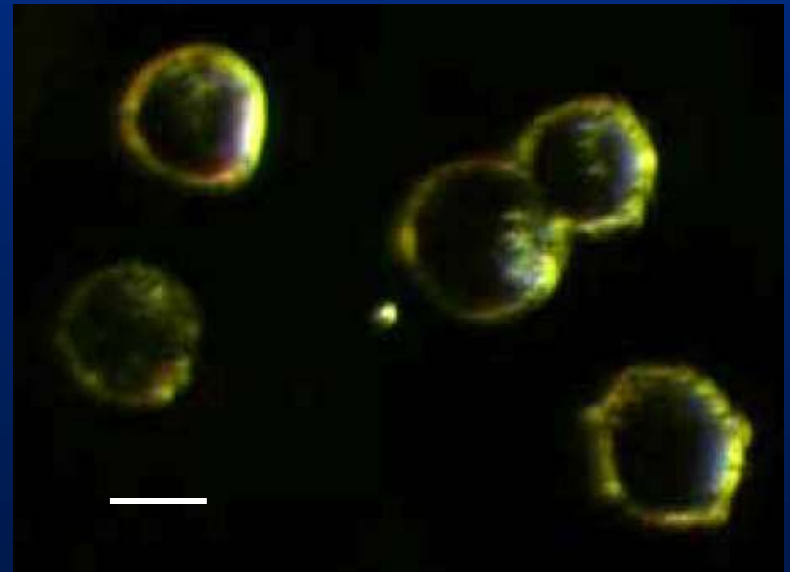
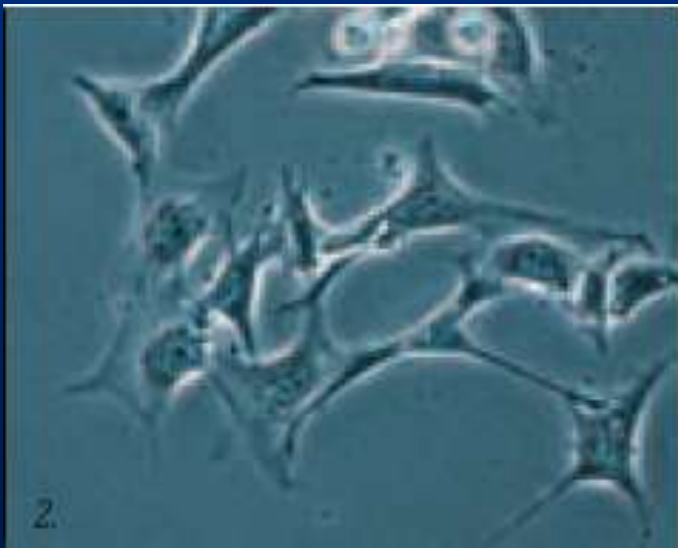
Разнообразие методов оптической микроскопии

Широкопольная оптическая микроскопия белого света

* Неокрашенные слабоконтрастные объекты

Темнопольная микроскопия

Фазовоконтрастная микроскопия

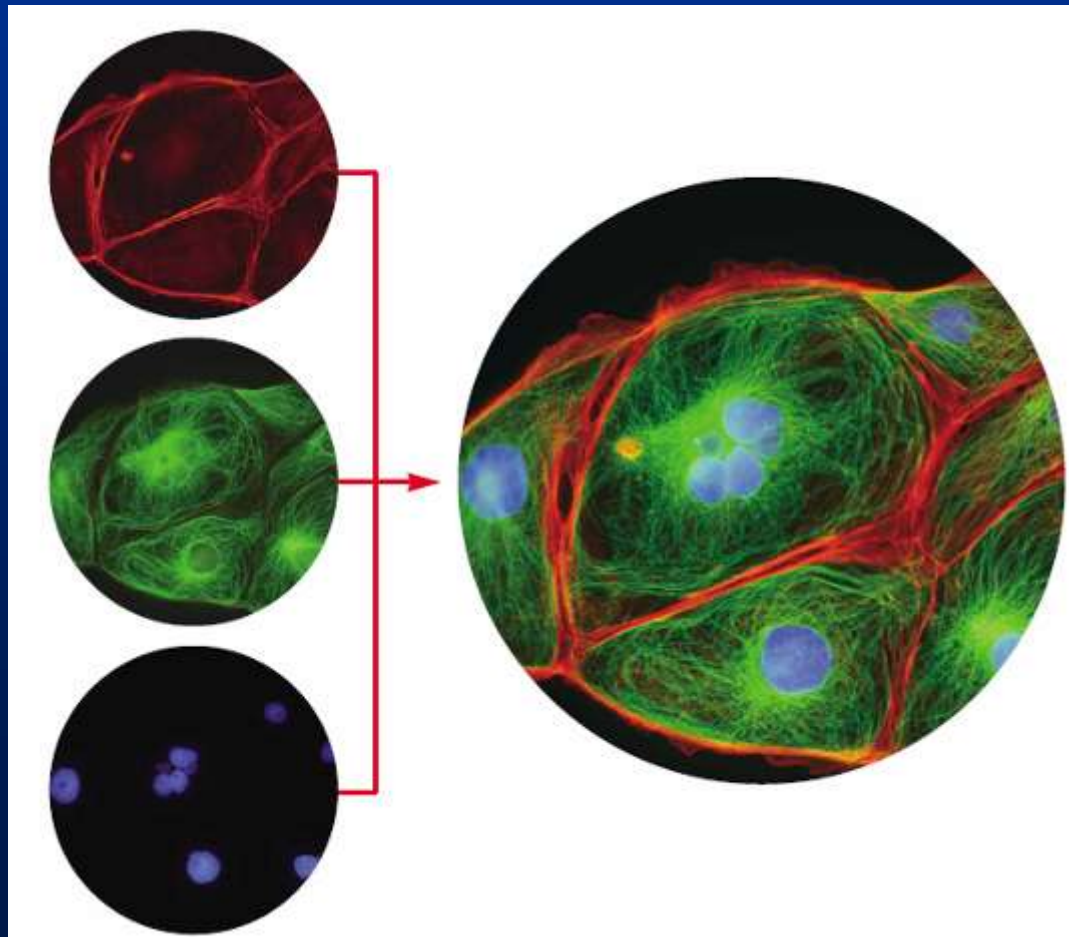


Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная флуоресцентная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – нет

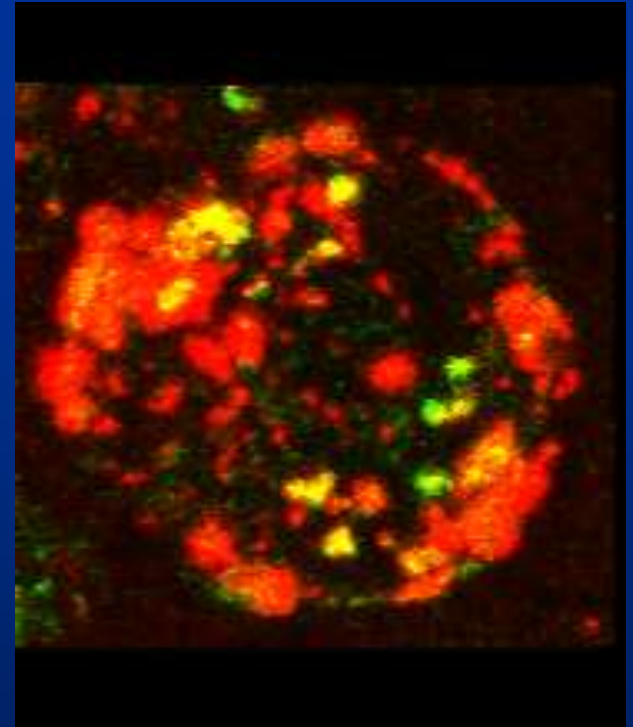


Разнообразие методов оптической микроскопии

- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – 0,5 мкм

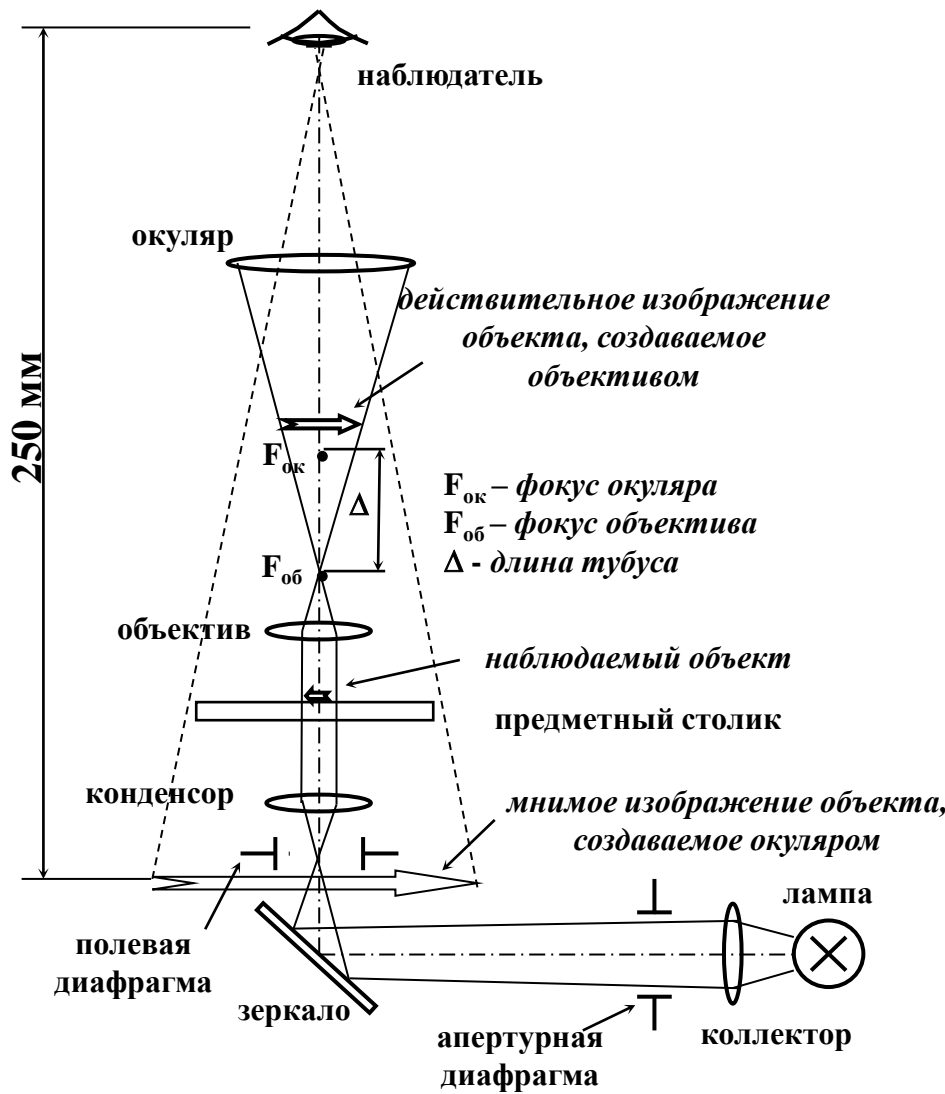


Красный - токсин СТ2No

Зеленый – лизосомы

Желтый – локализация
СТ2No в лизосомах

Увеличение микроскопа



Общее увеличение микроскопа

$$\Gamma = \beta \times \Gamma_{\text{ок}} \quad \Gamma = 28 \div 1500$$

Линейное увеличение объектива:

$$\beta = \Delta / f'_{\text{об}} \quad \beta = 4 \div 100$$

$f'_{\text{об}}$ — фокусное расстояние объектива;

Δ - оптическая длина тубуса

Угловое увеличение окуляра

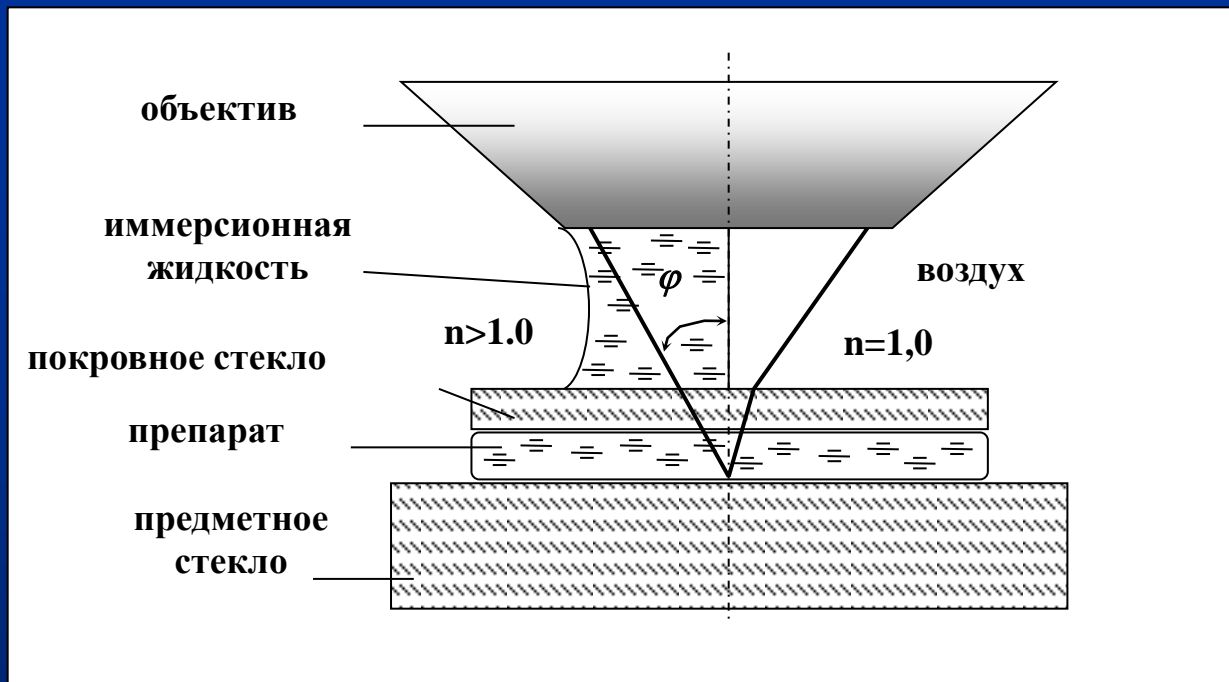
$$\Gamma_{\text{ок}} = 250 / f'_{\text{ок}} \quad \Gamma_{\text{ок}} = 7 \div 15$$

$f'_{\text{ок}}$ — фокусное расстояние окуляра

Полезное увеличение микроскопа:

$$\Gamma_{\text{пол}} = 1000 \times A$$

Числовая апертура объектива



числовая апертура $A = n \cdot \sin \varphi$

n — показатель преломления среды

φ — половина угла раствора светового пучка, попадающего в объектив из точки объекта.

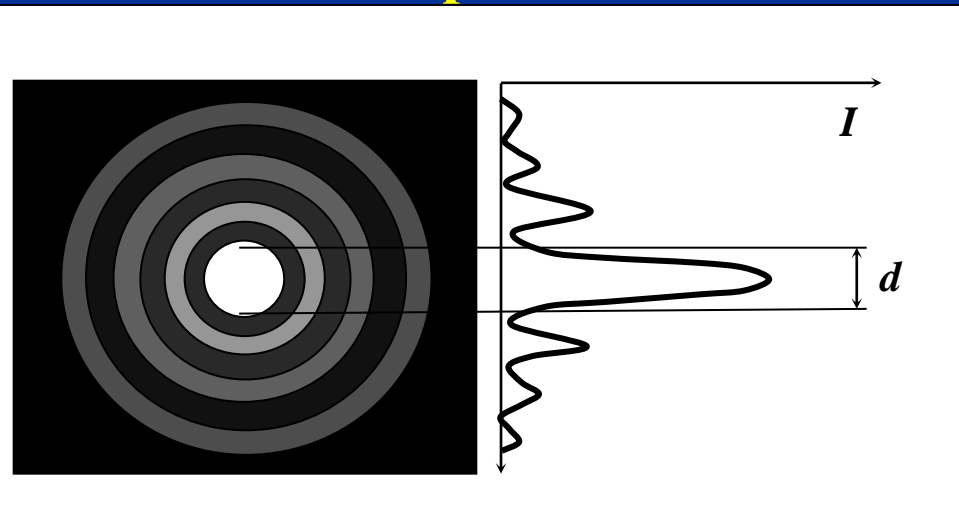
иммерсионные жидкости:

минеральное масло ($n=1,515$)

глицерин ($n=1,470$)

вода ($n=1,333$)

Разрешающая способность микроскопа



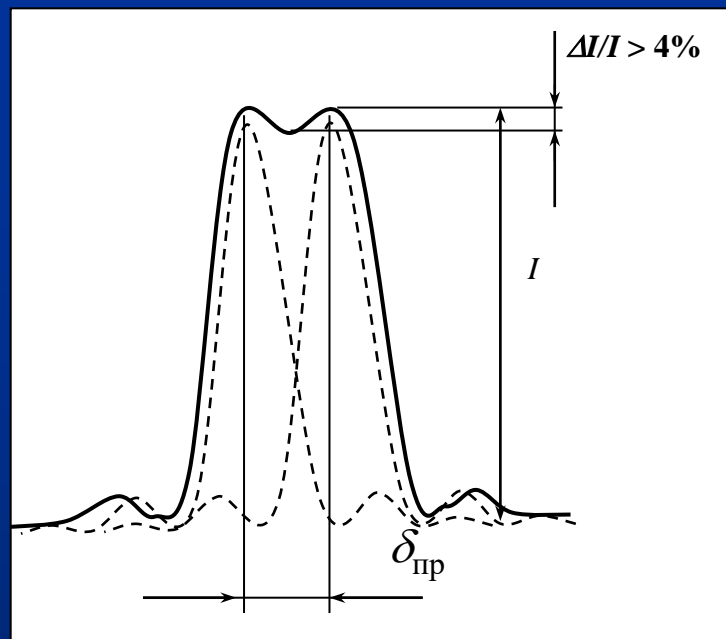
d – диаметр диска Эри

$$d = 1,22 \times \lambda / A,$$

λ - длина волны света, A —
числовая апертура объектива

$$A = A' = 1,3; \lambda = 0,5 \text{ мкм}$$

$$\delta_{\text{пр}} = 0,2 \text{ мкм}$$



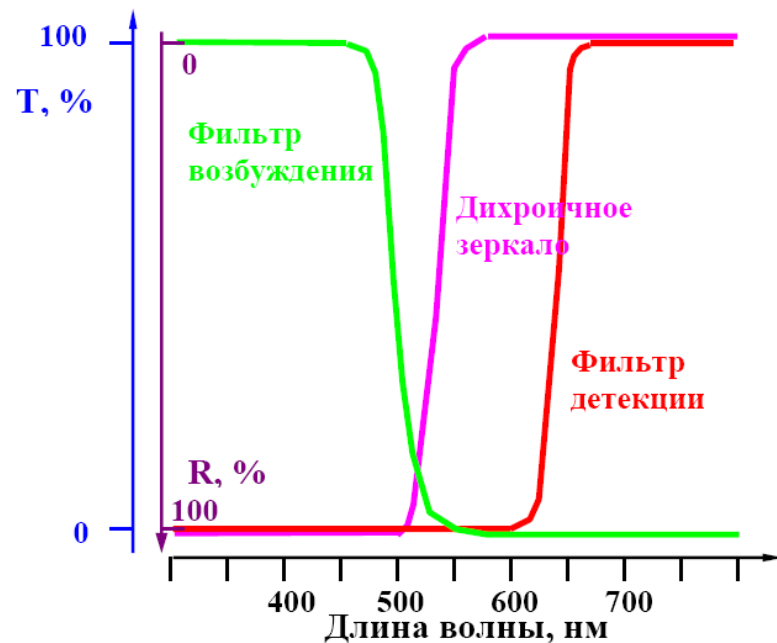
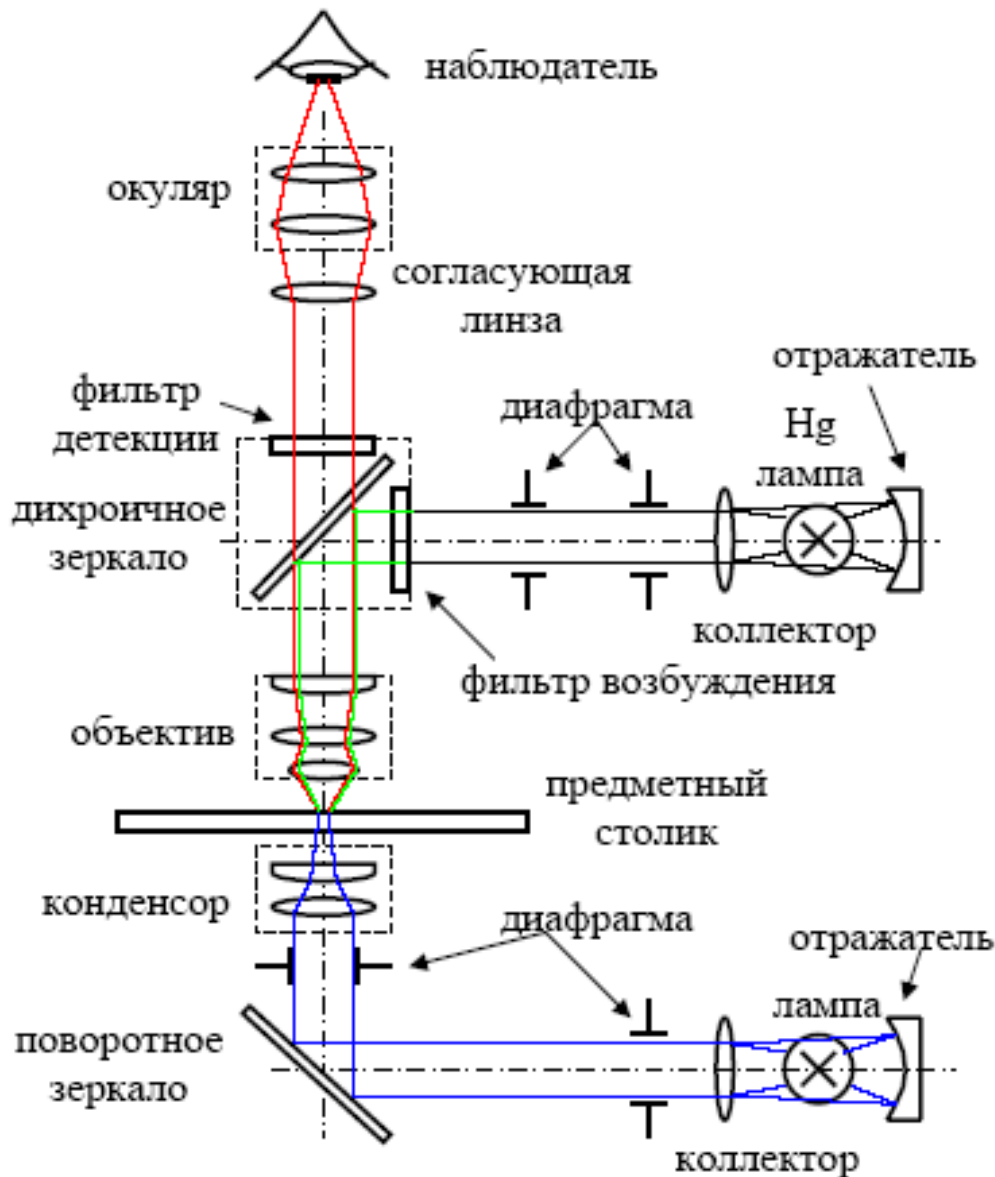
Предельное разрешение
микроскопа

$$\delta_{\text{пр}} = 0,42 \times d = 0,51 \times \lambda / A;$$

Теория Аббе: $\delta_{\text{пр}} = \lambda / (A + A')$,

A' — числовая апертура конденсора

Оптическая схема флуоресцентного микроскопа



Разрешение флуоресцентного микроскопа и яркость изображения

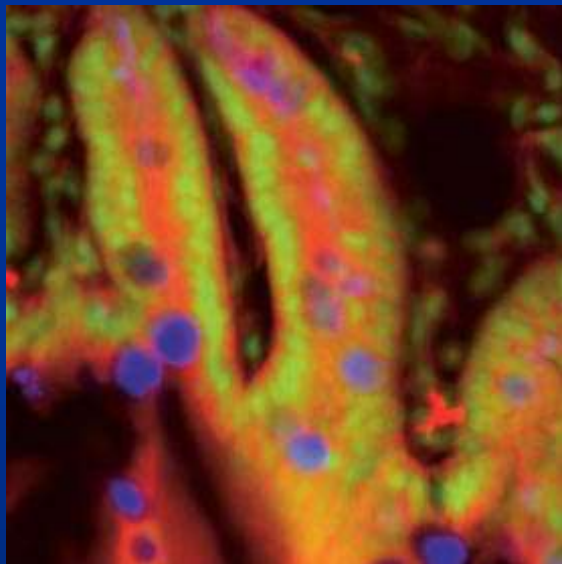
Предельное разрешение микроскопа

$$\delta_{\text{пр}} = 0,51 \times \lambda / A$$

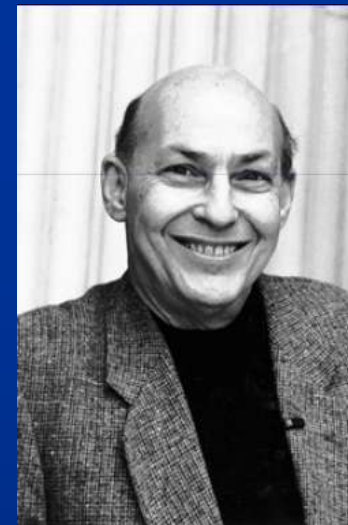
Яркость изображения (B) объекта при наблюдении в микроскоп

$$B \sim A^4 / \Gamma^2 ,$$

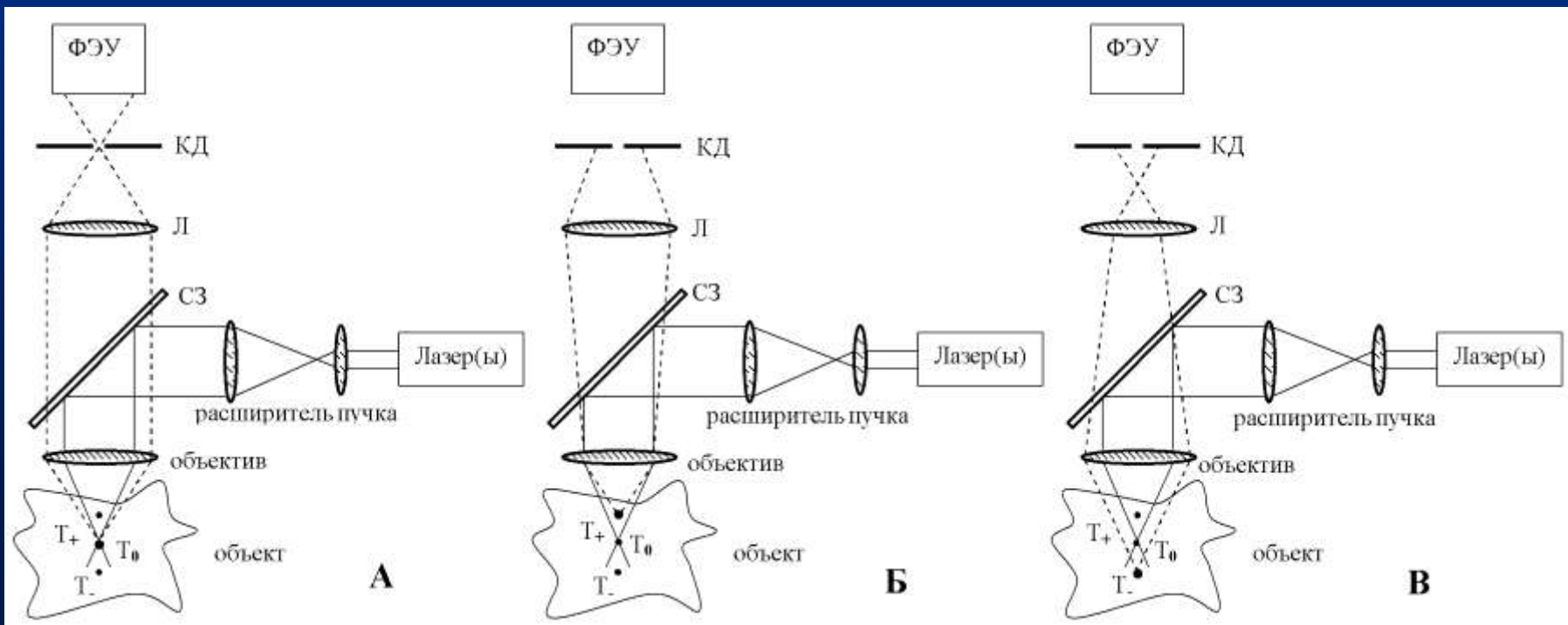
Γ - общее увеличение микроскопа



Оптическая схема конфокальной фильтрации сигнала



Изобретена в 1955
Проф. Мински



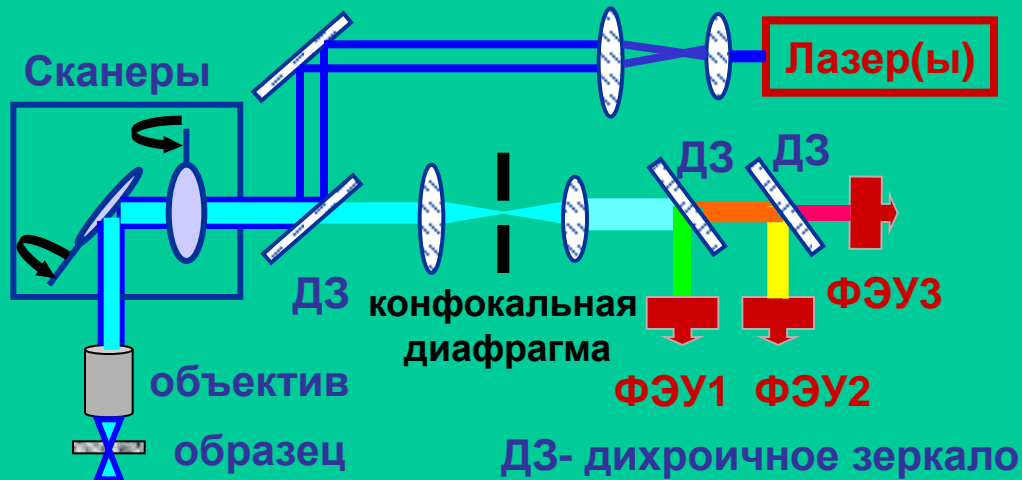


Схема лазерного сканирующего конфокального микроскопа

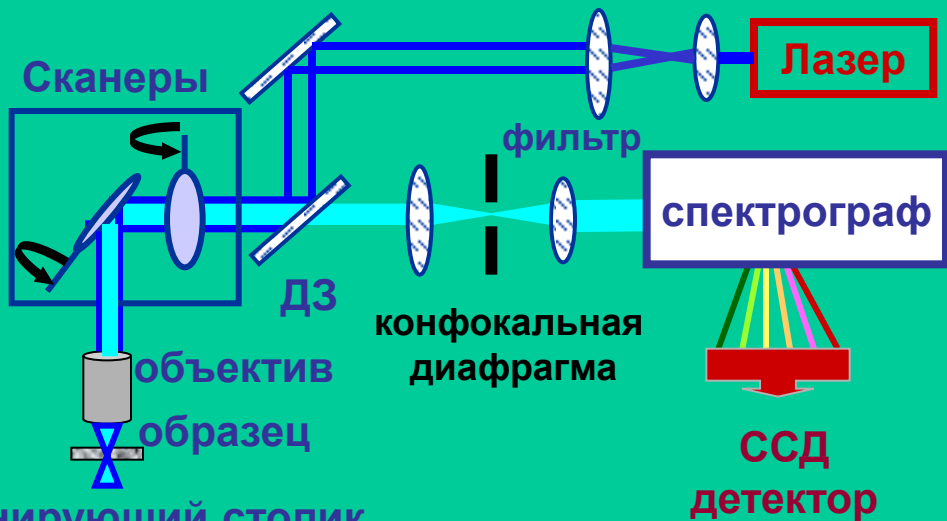
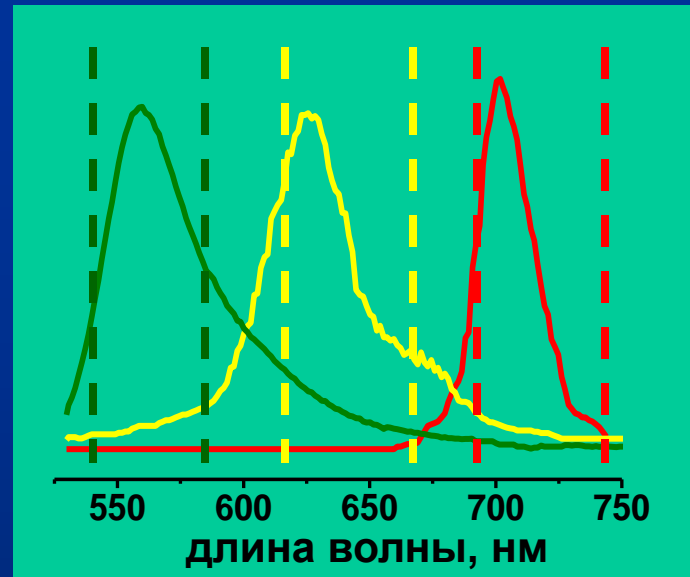
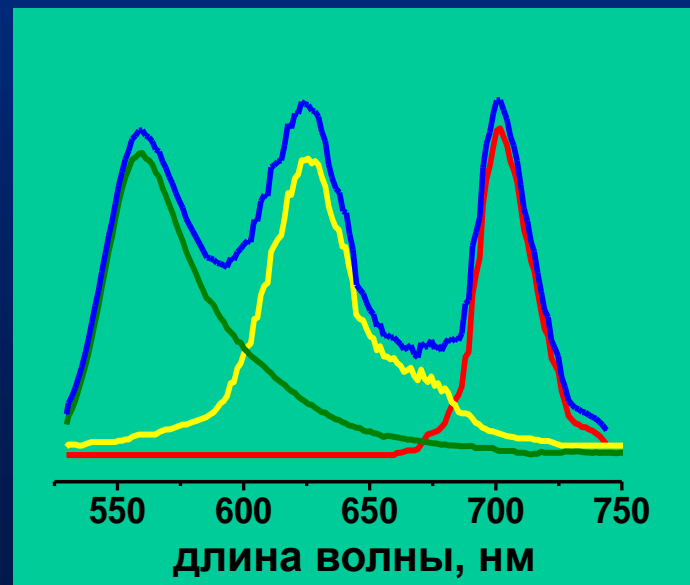
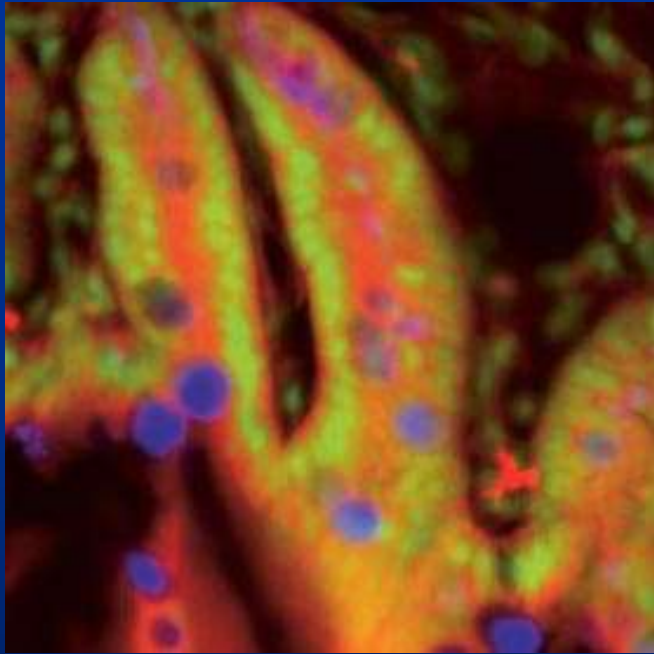


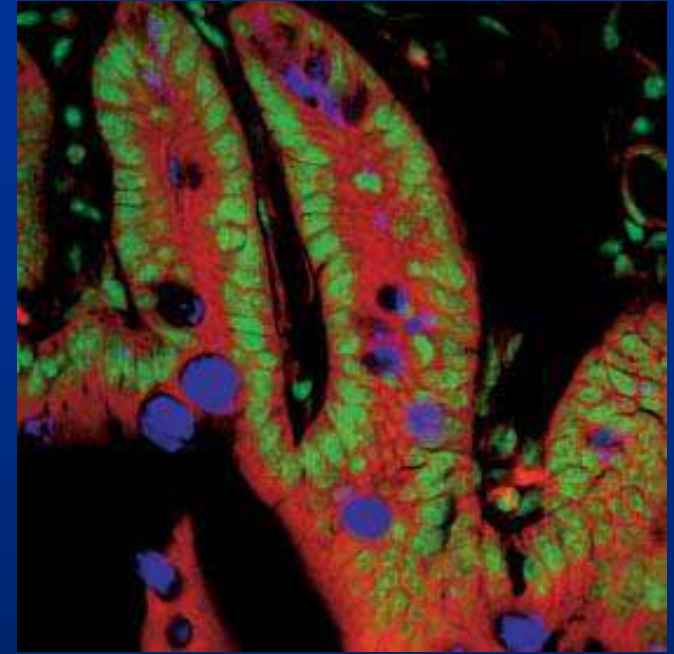
Схема лазерного сканирующего конфокального спектрального микроскопа



Сравнение свойств флуоресцентного и конфокального лазерного сканирующего микроскопов



**эпифлуоресцентное
изображение**



**конфокальное
изображение**

**Толстый биологический образец окрашен тремя
флуорофорами**

Толщина оптического слоя $\Delta Z_{\text{сл}}$, от которого измеряется сигнал в конфокальном режиме

$$\Delta Z_{\text{сл}} = ([0,88 \times \lambda_{\text{фл}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5})]^2 + 2 \times n^2 \times \phi^2 / A^2)^{0,5},$$

где A - числовая апертура объектива, n — показатель преломления иммерсионной среды,

ϕ - эффективный диаметр конфокального отверстия, $\lambda_{\text{фл}}$ — характерная средняя длина волны.

$$\phi = D / \Gamma ,$$

где D - диаметр конфокального отверстия в мкм, Γ - увеличение микроскопа между фокальной плоскостью объектива и сопряженной фокальной плоскостью, в которой расположена конфокальная диафрагма.

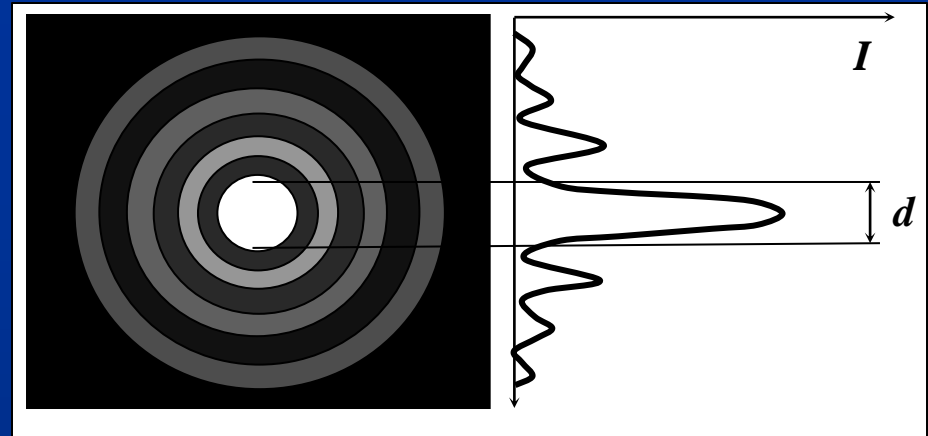
Разрешение конфокального микроскопа:

$$\Delta Z = 0,88 \times \lambda_{\text{в}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5}), \quad \Delta X = \Delta Y = 0,51 \times \lambda_{\text{в}} / A$$

ГДЕ $\lambda_{\text{в}}$ — длина волны возбуждения

На практике

$$\phi \sim d$$



d - диаметр диска Эри для данного объектива и длины волны при $A=1,3$; $n=1,5$; $\lambda_{cp}=0,5$ мкм обеспечивается разрешение:

$$\Delta X = \Delta Y = 0,22 \text{ мкм}, \Delta Z = 0,56 \text{ мкм},$$

а толщина оптического слоя, от которого измеряется сигнал

$$\Delta Z_{сл} = 1,06 \text{ мкм}.$$

При $\phi < 0,25 d$,

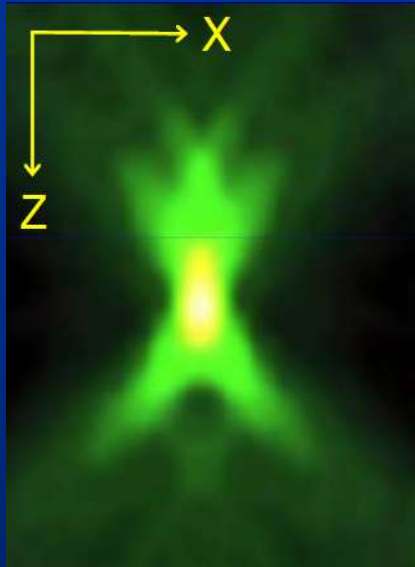
улучшается также и разрешение в плоскости $X Y$ сканируемого объекта.

В этом теоретическом случае:

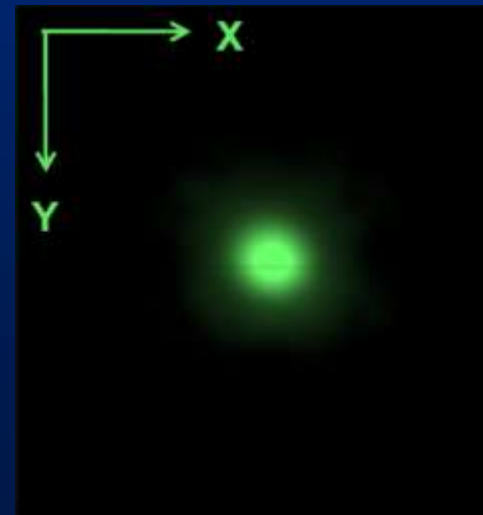
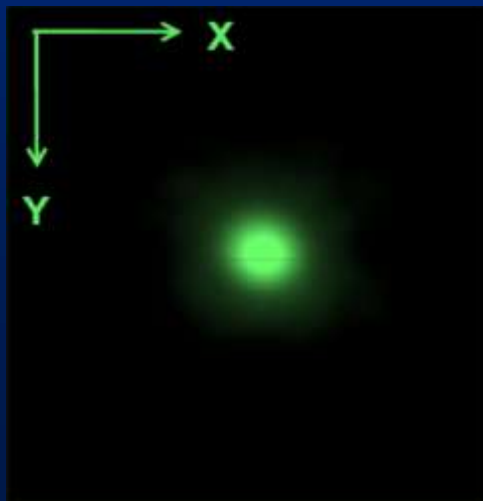
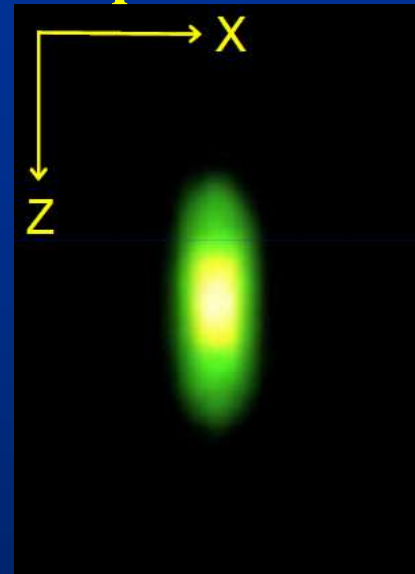
$$\Delta X = \Delta Y = 0,14 \text{ мкм}; \Delta Z = \Delta Z_{сл} = 0,45 \text{ мкм}.$$

Функция распределения точки в различных флуоресцентных микроскопах

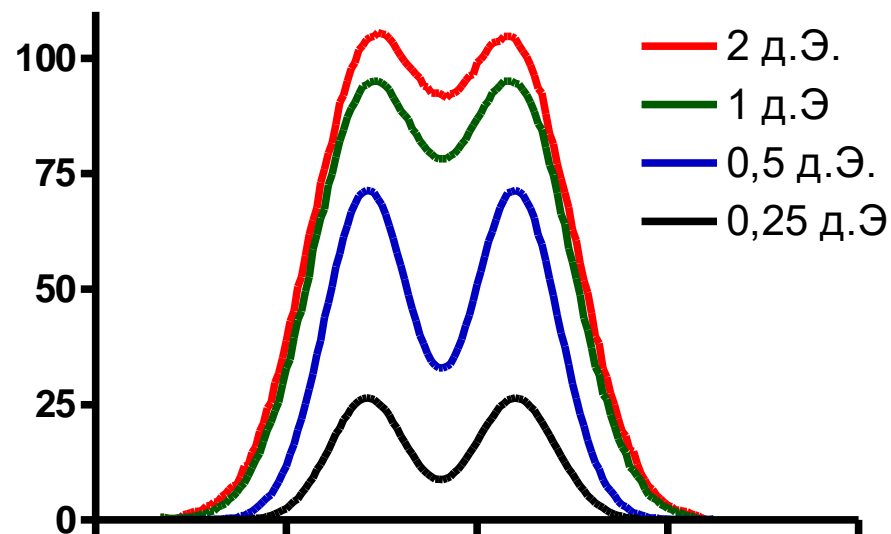
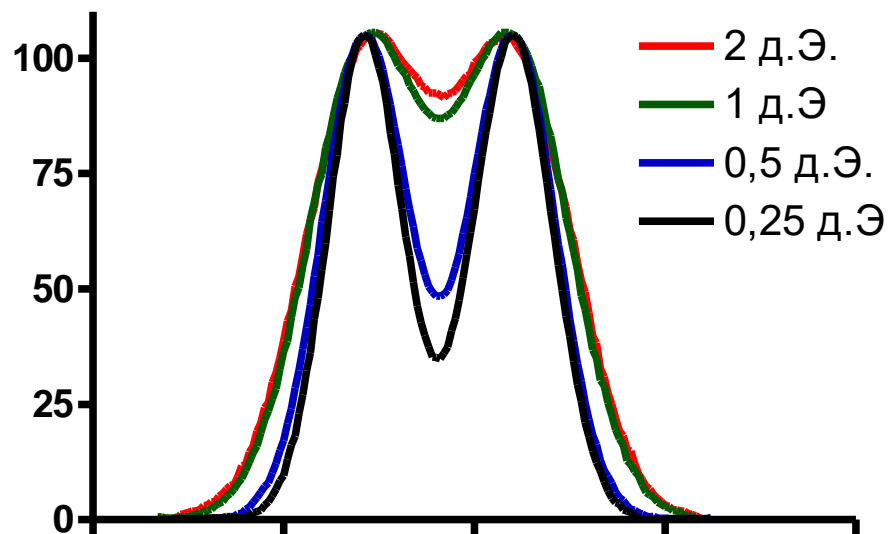
Широкопольный



Конфокальный

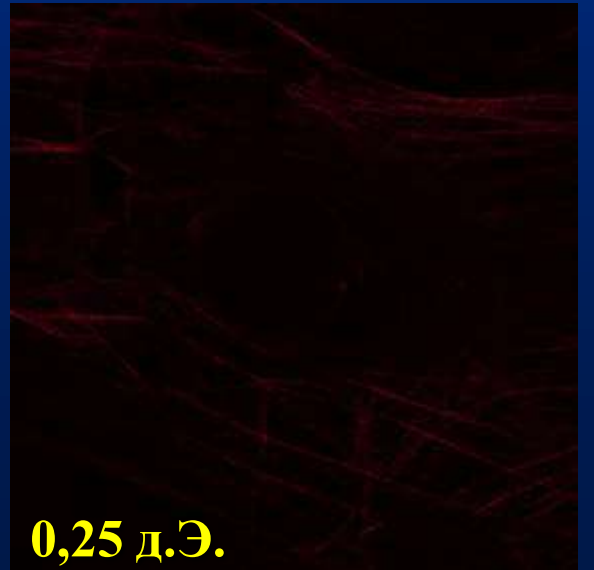
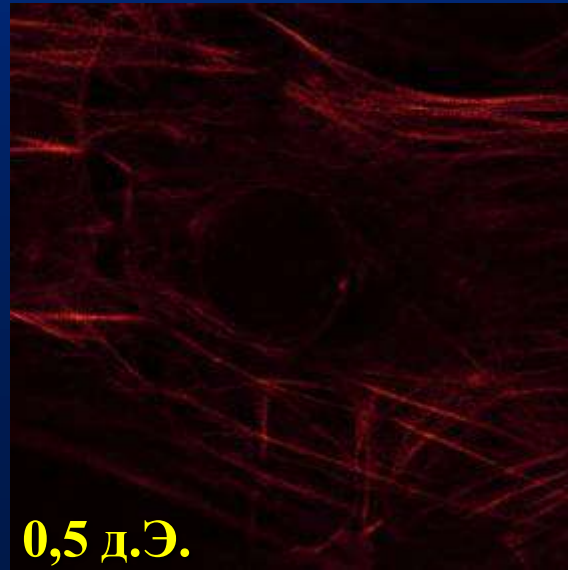
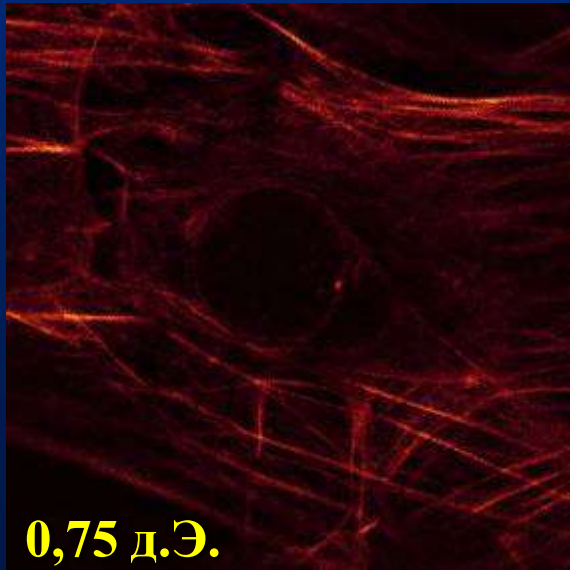
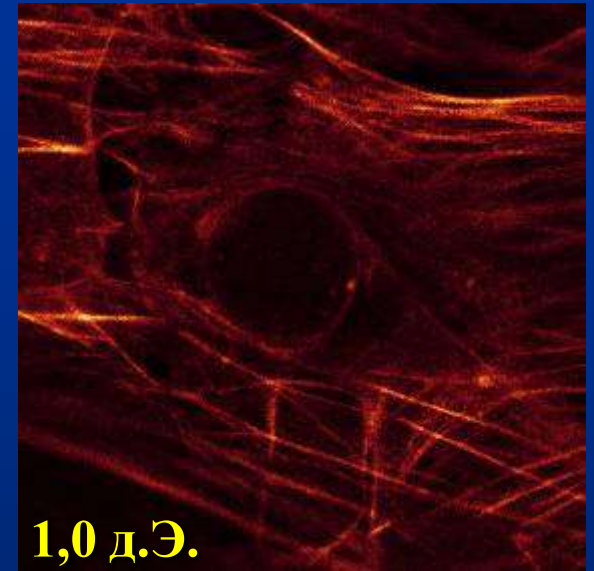
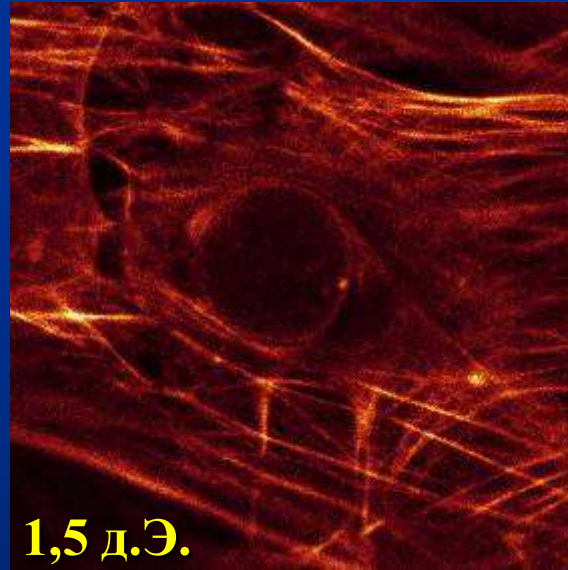
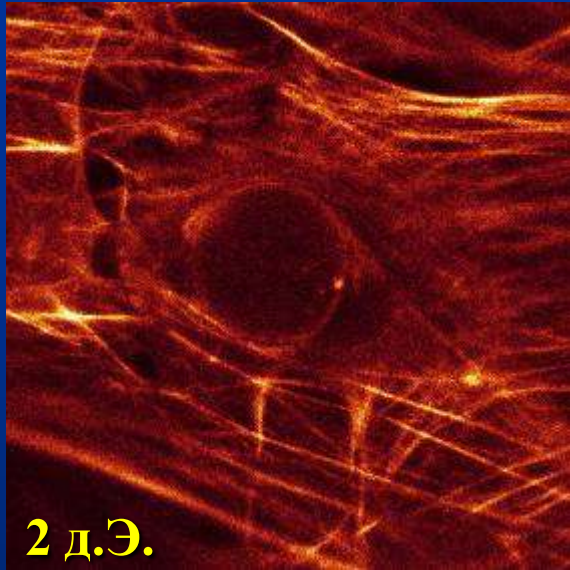


Влияние диаметра конфокальной диафрагмы на латеральное разрешение и интенсивность сигнала (результаты расчета)



Улучшение латерального разрешения достигается за счет значительной потери интенсивности сигнала

Влияние диаметра конфокальной диафрагмы на разрешение и интенсивность сигнала



Конфокальное трехмерное сканирование клетки



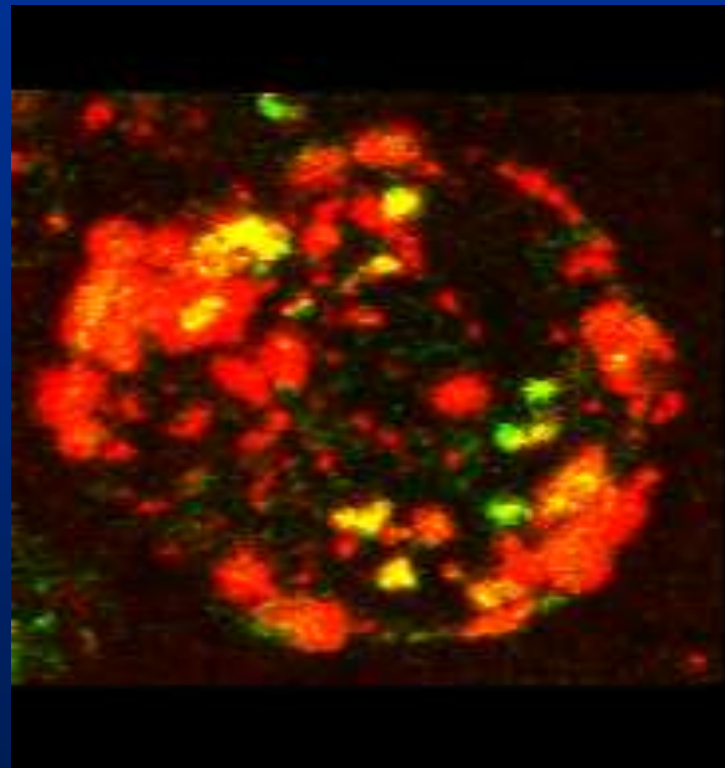
3D-распределение и локализация цитотоксина СТ2No в клетках HL60 при субцитотоксических концентрациях

Зеленый – лизосомы

LysoTracker Yellow

Желтый – локализация СТ2No

в лизосомах



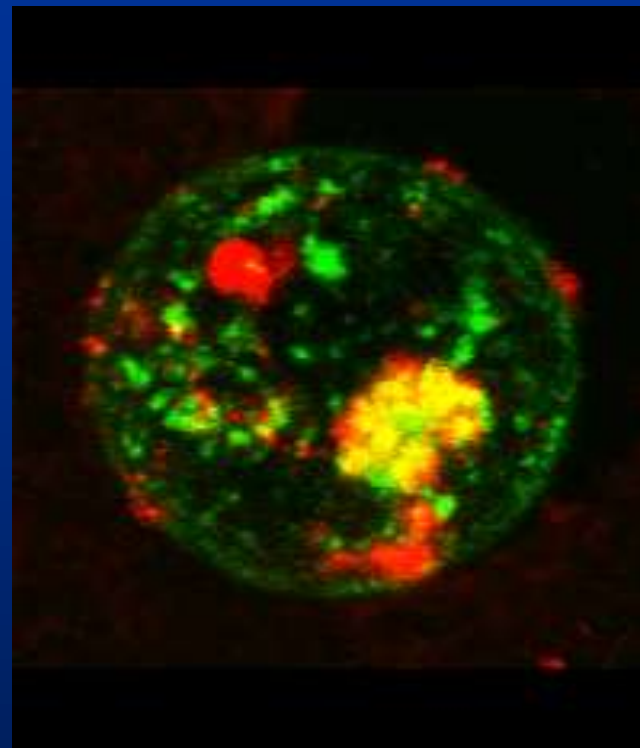
3D-распределение и локализация цитотоксина СТ2№ в клетках HL60 при субцитотоксических концентрациях

Красный - СТ2№

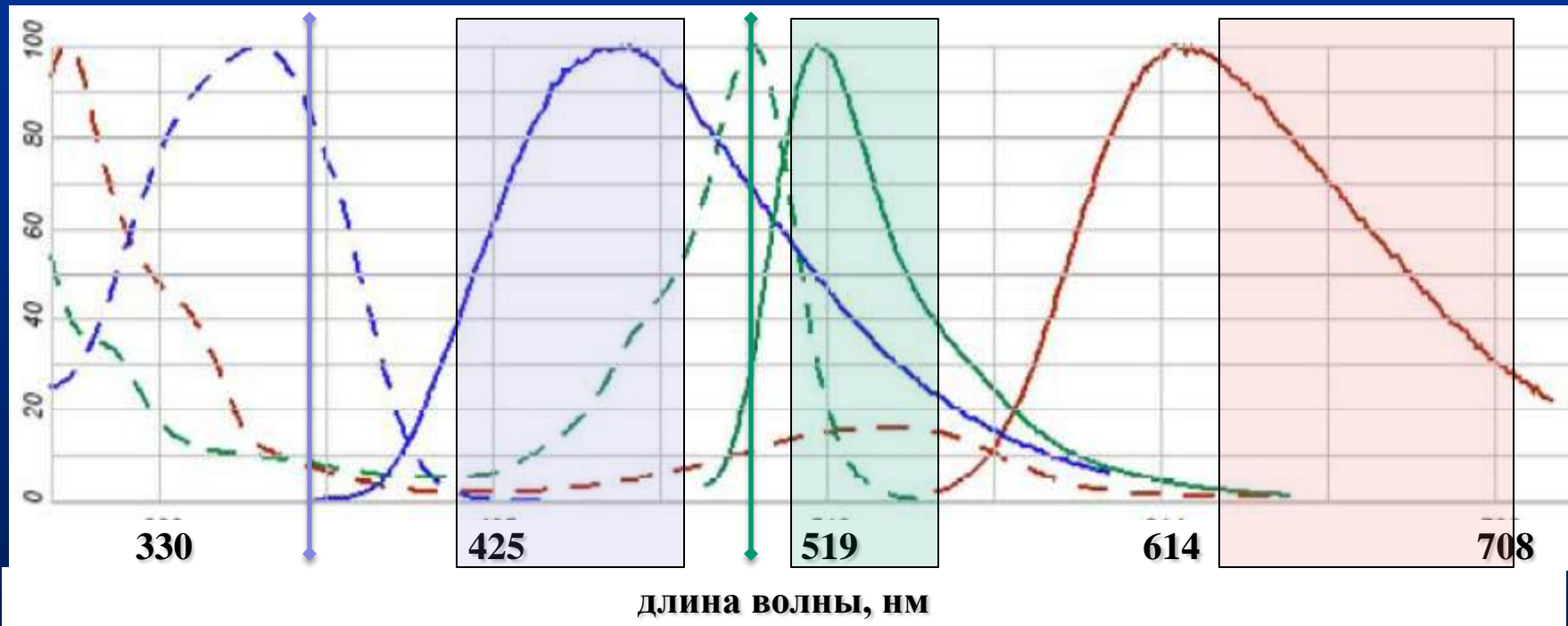
Зеленый– эндосомы

Трансферрин -OregonGreen

Жёлтый– локализация СТ2№
в эндосомах



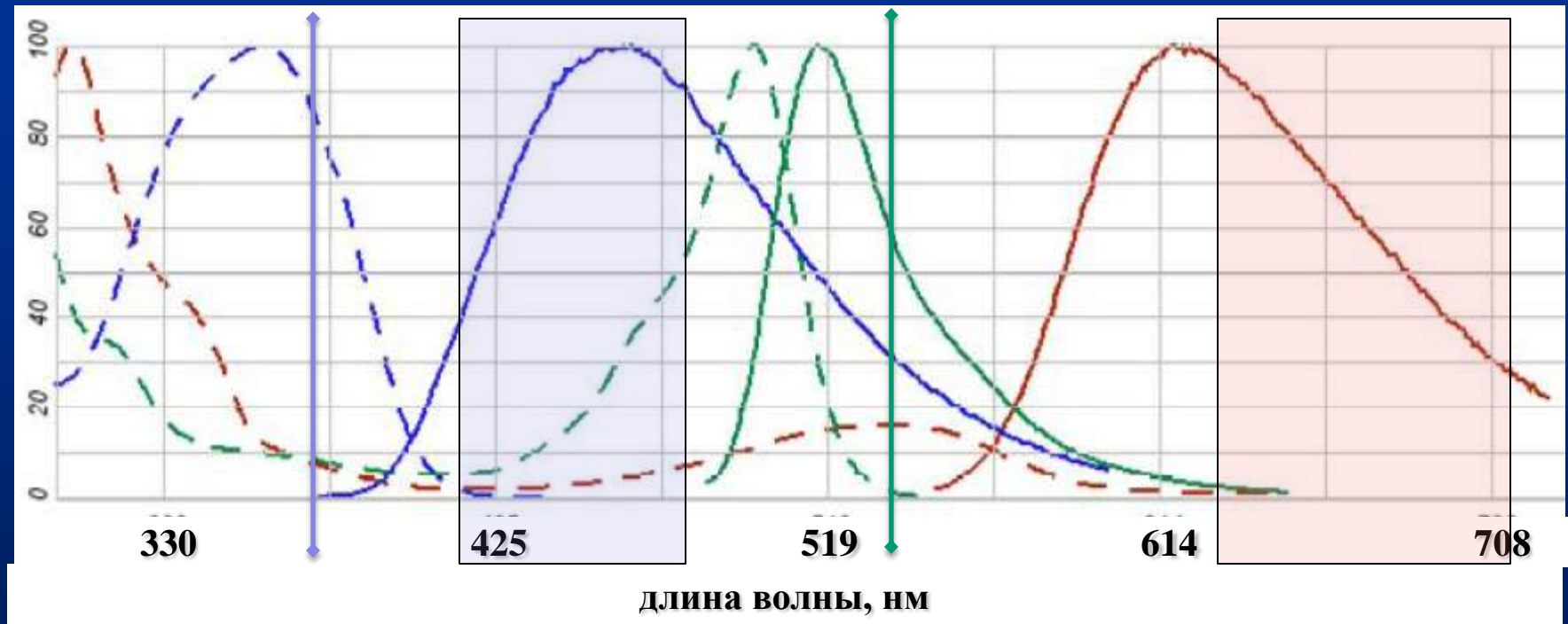
Режимы параллельной и последовательной регистрации изображений от образца окрашенного несколькими флуорофорами



Спектры флуоресценции молекул отличаются по положению максимума, форме и ширине

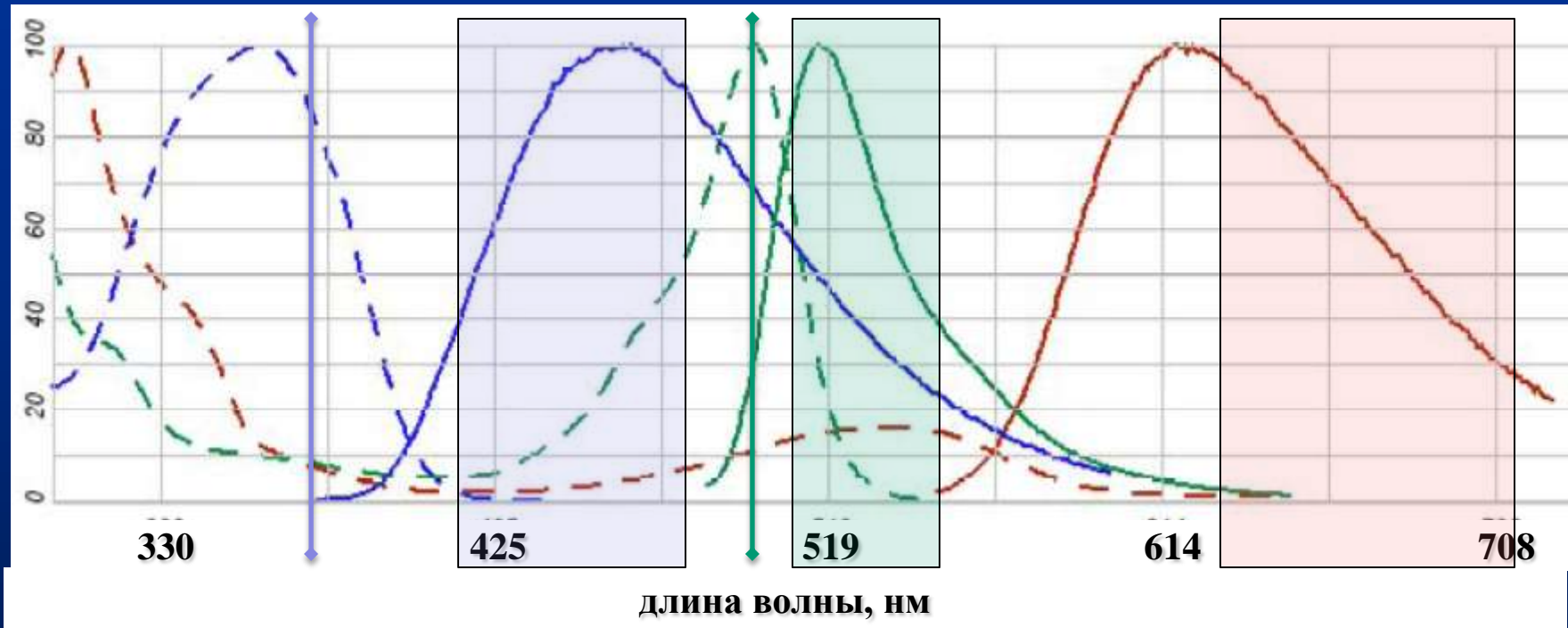
Спектры поглощения отличаются положением полос поглощения, что дает возможность избирательного возбуждения молекул

Режимы параллельной и последовательной регистрации изображений от образца окрашенного несколькими флуорофорами



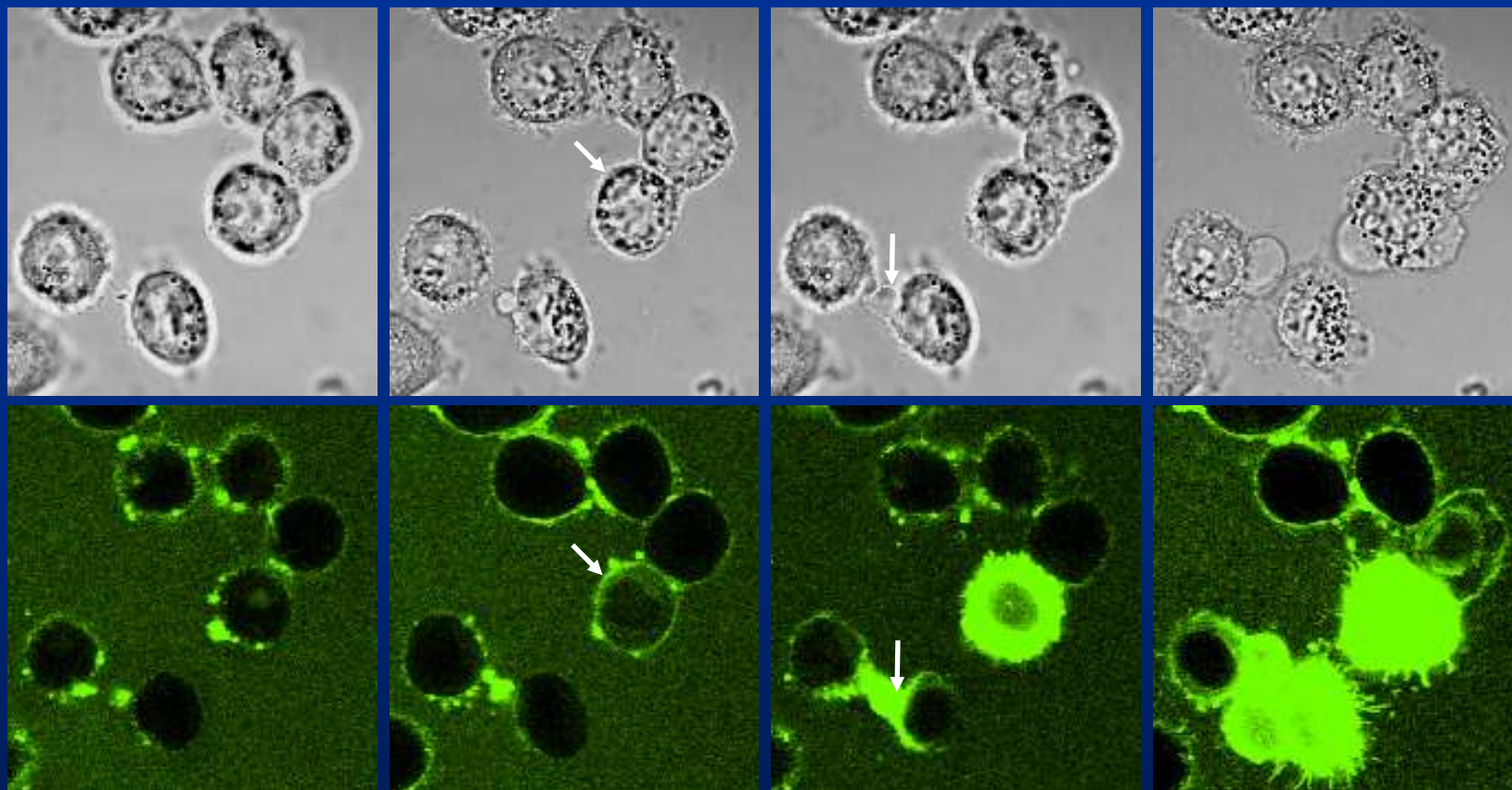
- Параллельная регистрация изображений:
спектры испускания флуорофоров перекрываются частично;
можно выбрать спектральные диапазоны, где перекрытие спектров минимально;
интенсивность сигнала в этих диапазонах достаточна для измерений.

Режимы параллельной и последовательной регистрации изображений от образца окрашенного несколькими флуорофорами



- Последовательная регистрация изображений: спектры испускания флуорофоров перекрываются значительно; не удастся выбрать спектральные диапазоны, где перекрытие спектров минимально, а интенсивность сигнала достаточна для измерений.

Взаимодействие антимикробного пептида латарцина-93 (La93) с раковыми клетками HeLa в реальном времени



0,3 мин

1,3 мин

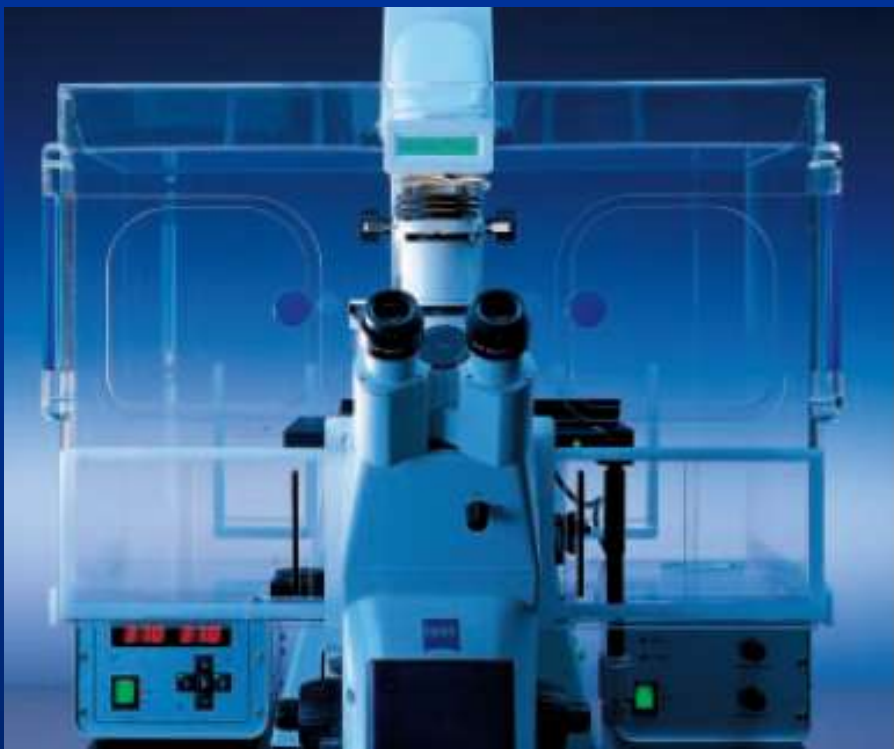
3 мин

9 мин

2 мкМ Rh-La93

La93 GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKH

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия



специальные инкубаторы поддерживают под микроскопом заданную температуру, содержание CO₂ и кислорода, обеспечивают возможность смены среды и проведения микроинъекций

Исследования методом ЛСКМ могут проводиться на:

- фиксированных клетках,**
- тонких срезах тканей растительного и животного происхождения**
- на живых клетках в культуре**
- небольших живых многоклеточных организмах.**

ЛСКМ- возможность измерения динамических и кинетических изменений в живых объектах

до 5 конфокальных изображений размером 512 × 512 точек за 1 сек.

профиль сигнала вдоль линии образца - каждые 0,3-0,6 мсек.