

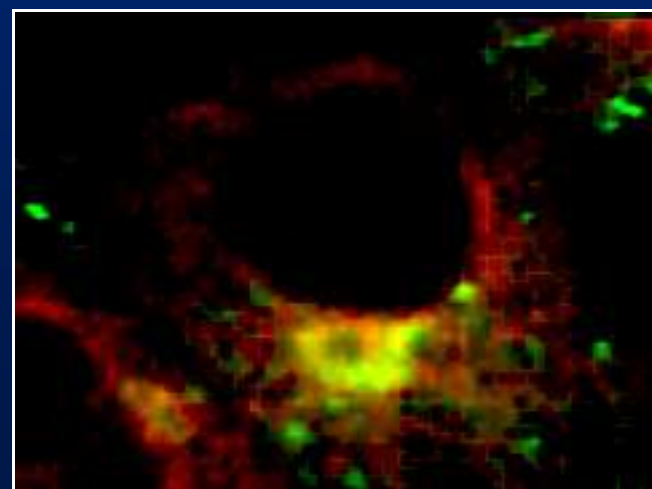
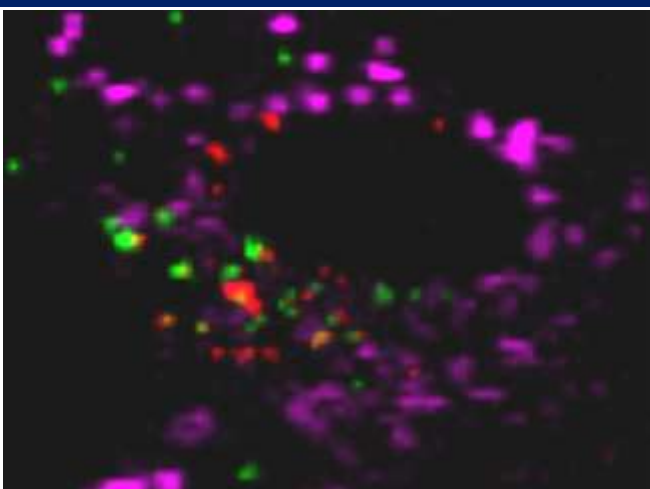
# Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

**Алексей Валерьевич Феофанов**

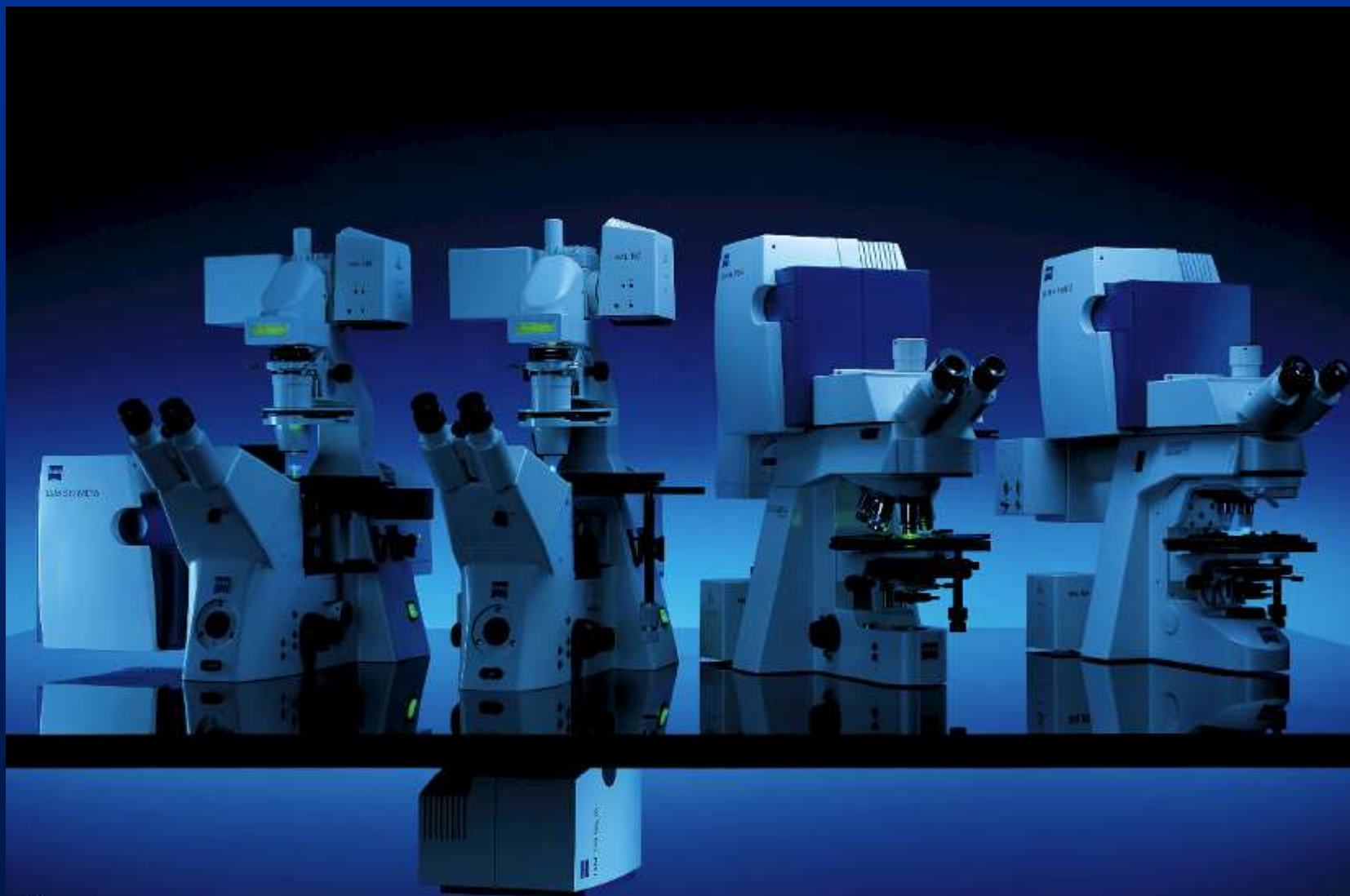
*Кафедра биоинженерии  
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова*

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии  
биомолекул  
ИБХ РАН*

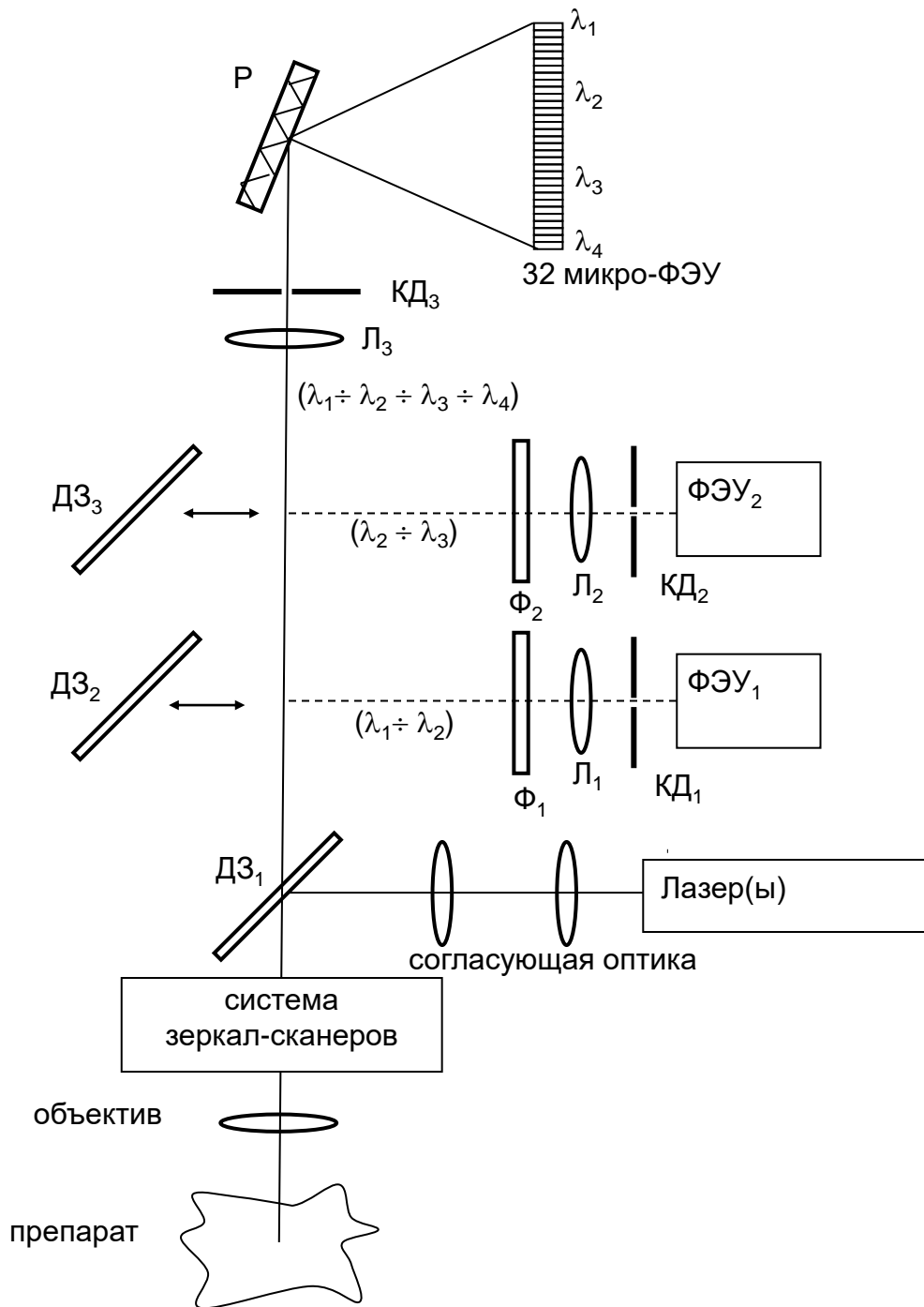
**Лекция № 2**



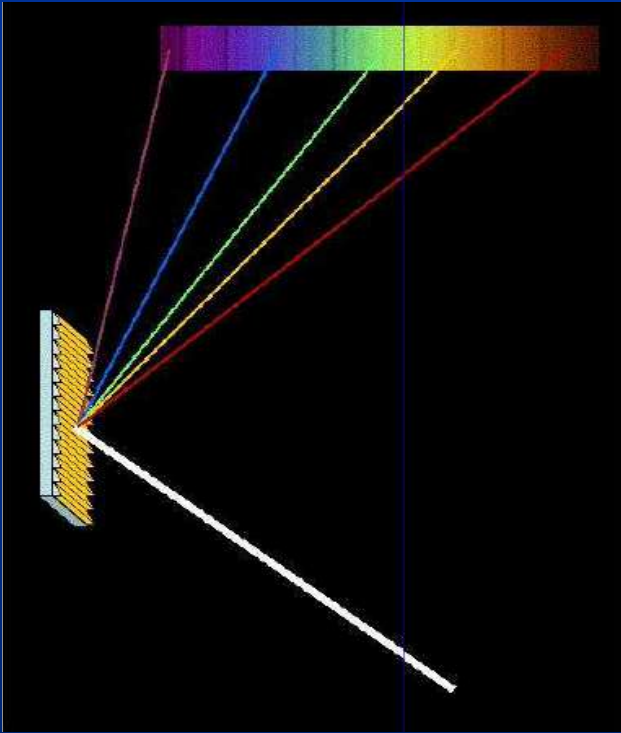
## Внешний вид конфокальных микроскопов фирмы ZEISS



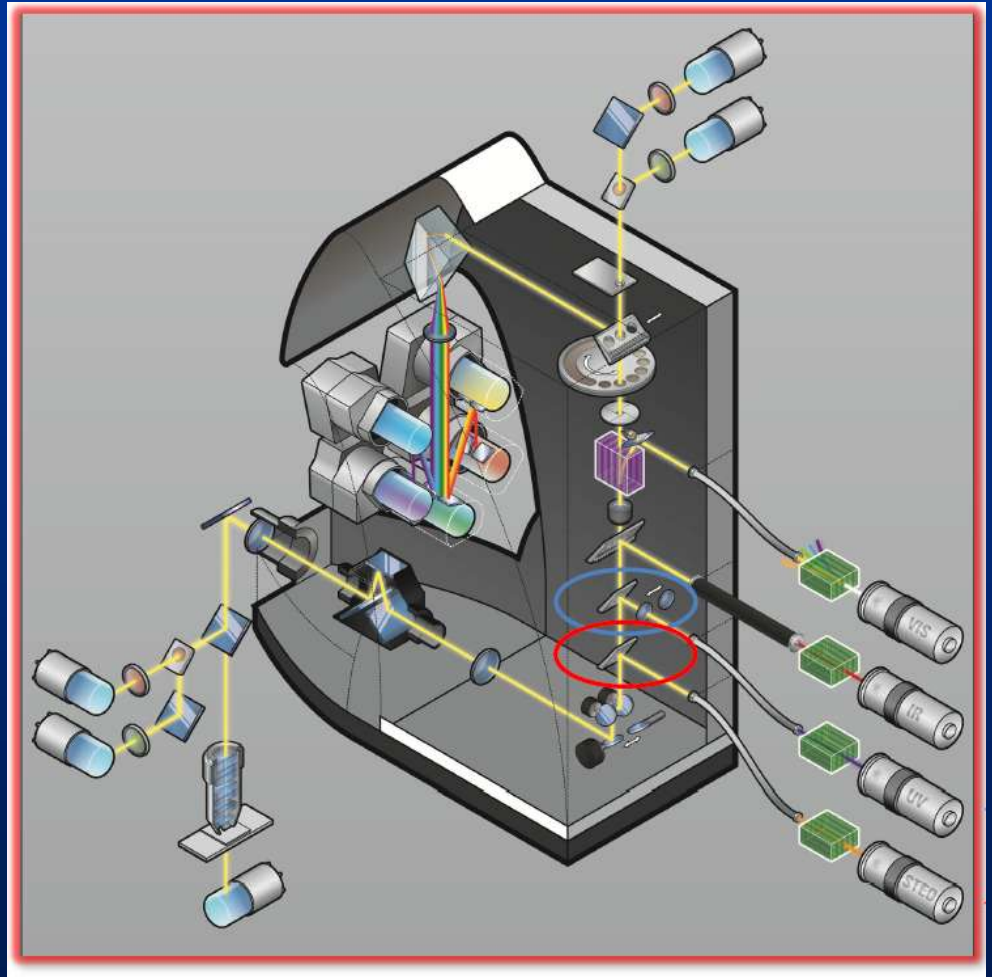
# Оптическая схема спектрального конфокального микроскопа фирмы Zeiss LSM510META

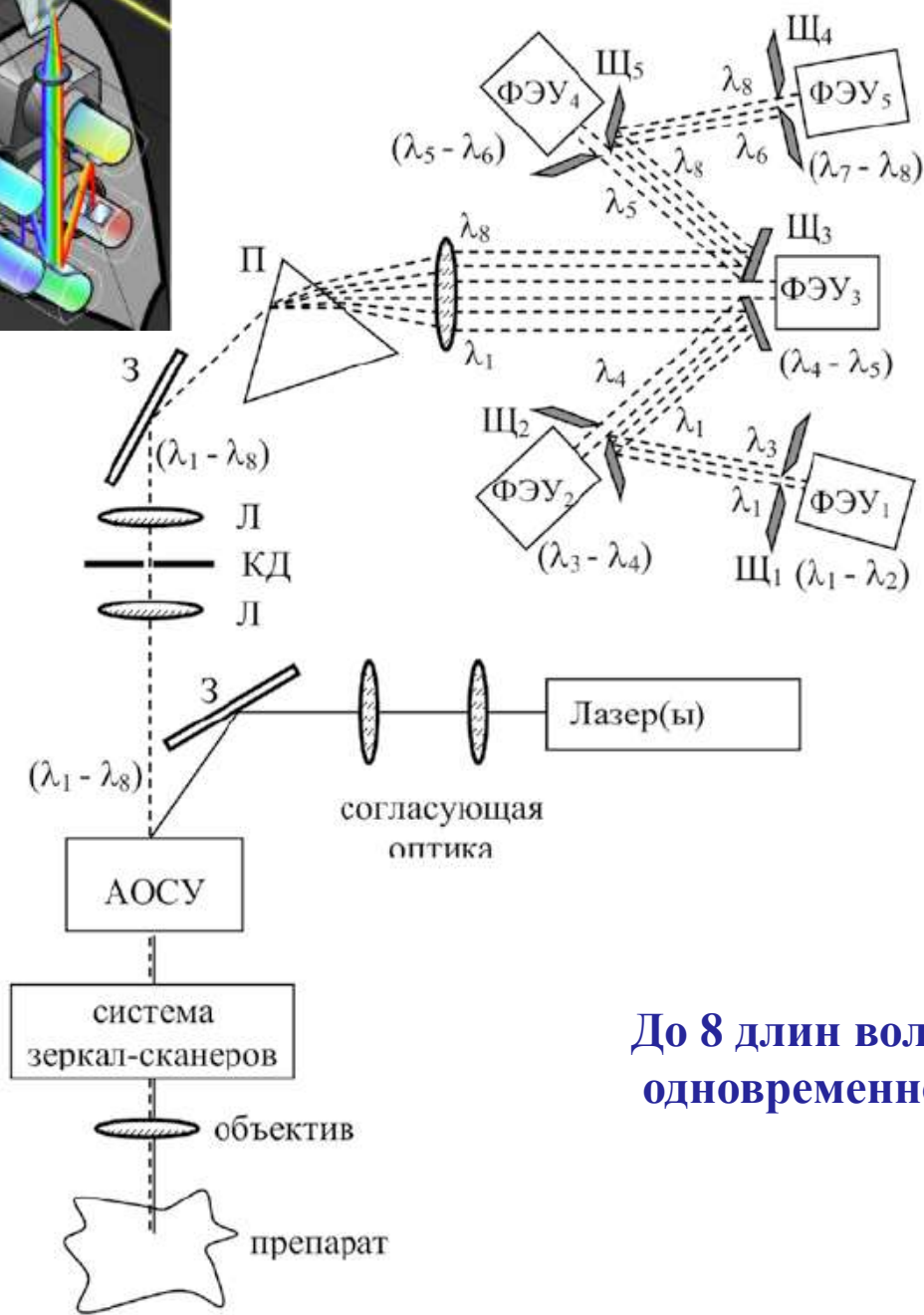
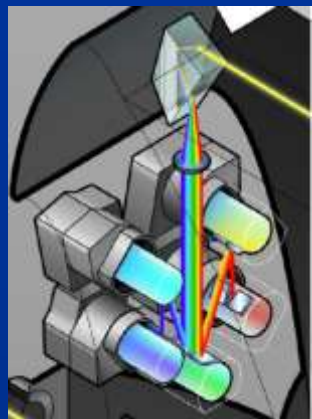


**A grating and a prism are two devices dispersing white light into spectrum**



# LEICA TCS SP8 (SP5) confocal microscopes

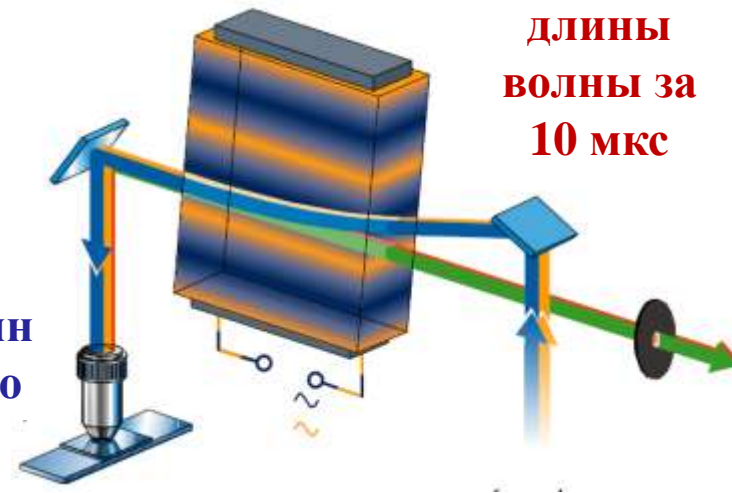




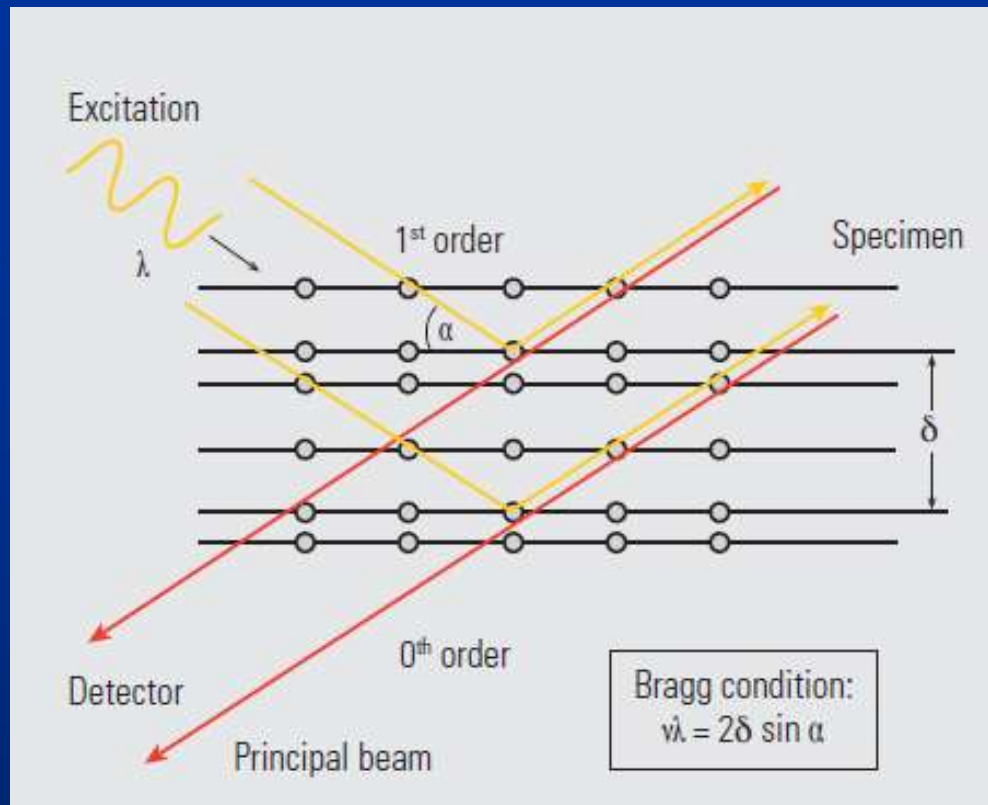
## Оптическая схема спектрального конфокального микроскопа фирмы Leica SP5 (SP8)

**Смена  
длины  
волны за  
10 мкс**

**До 8 длин волн  
одновременно**



**Акусто-оптическое  
светоделительное устройство**

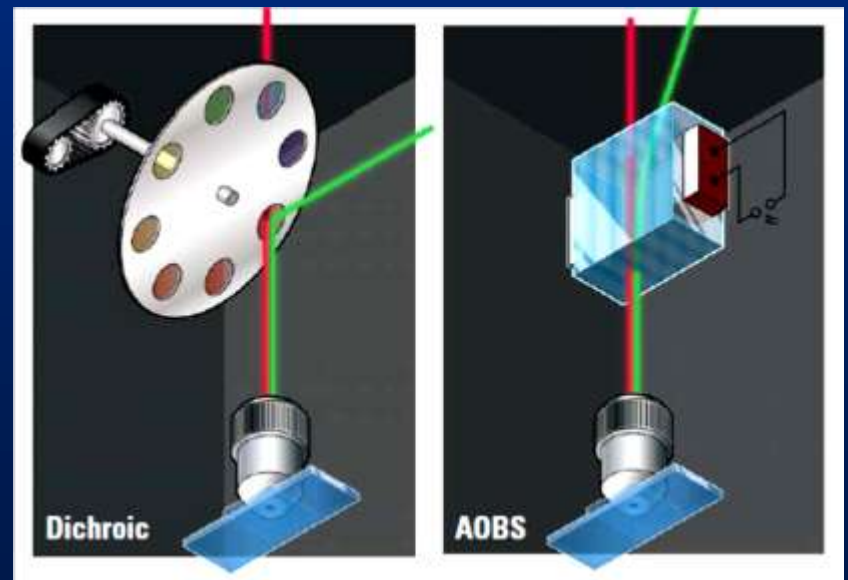
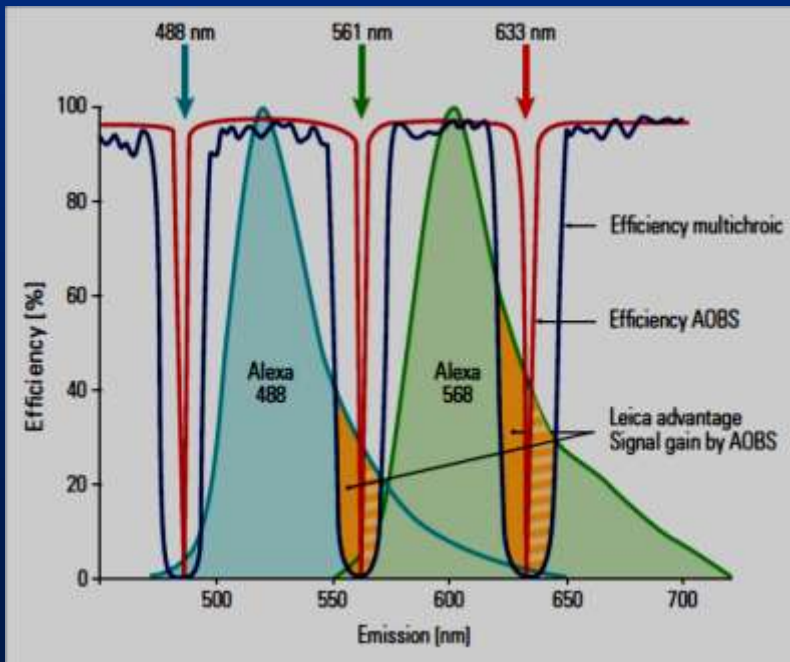
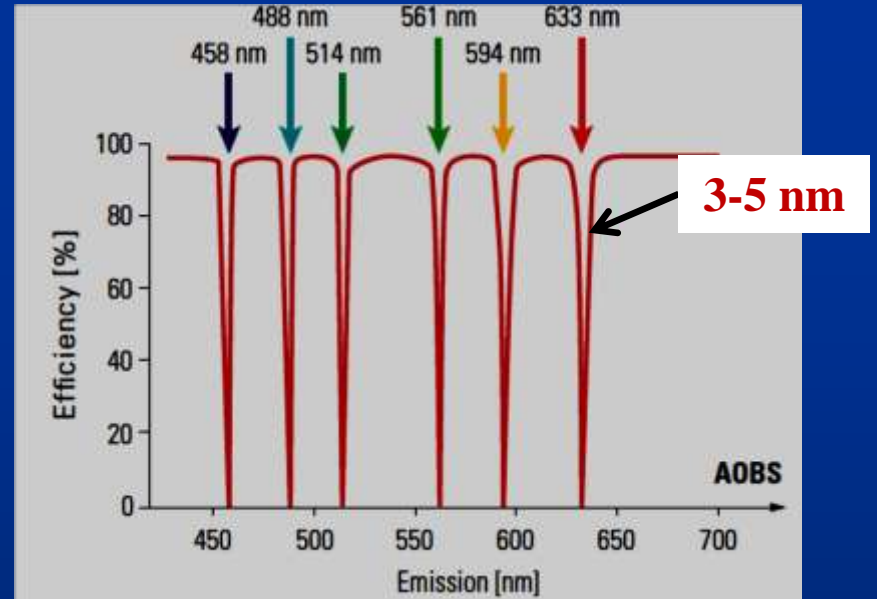
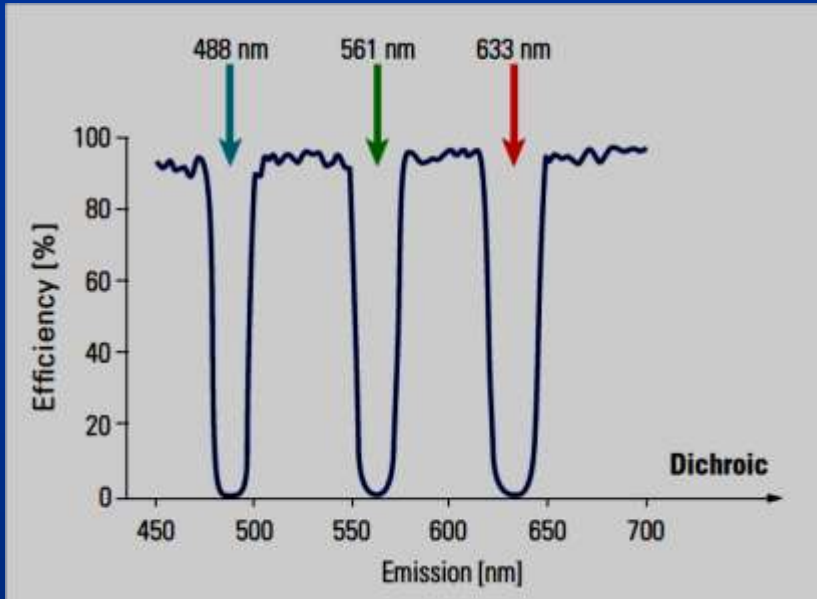


The incident angle, wavelength, and grid constant must fulfill the Bragg-condition.

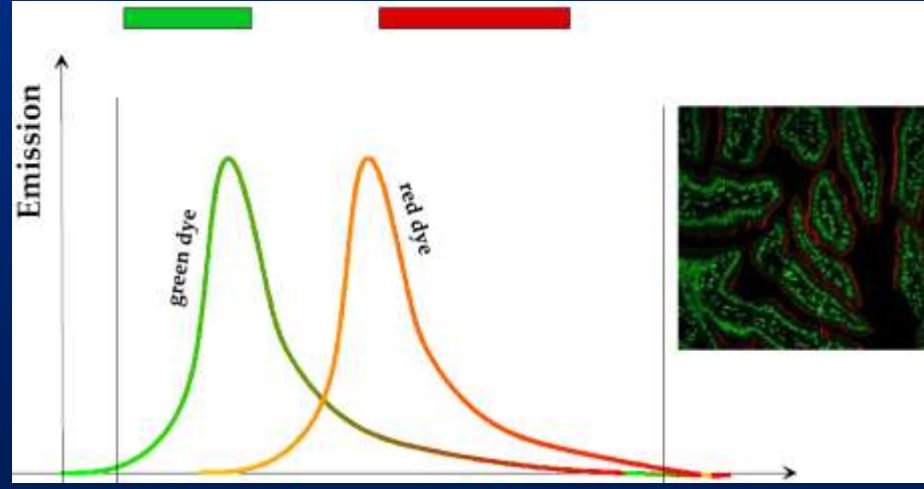
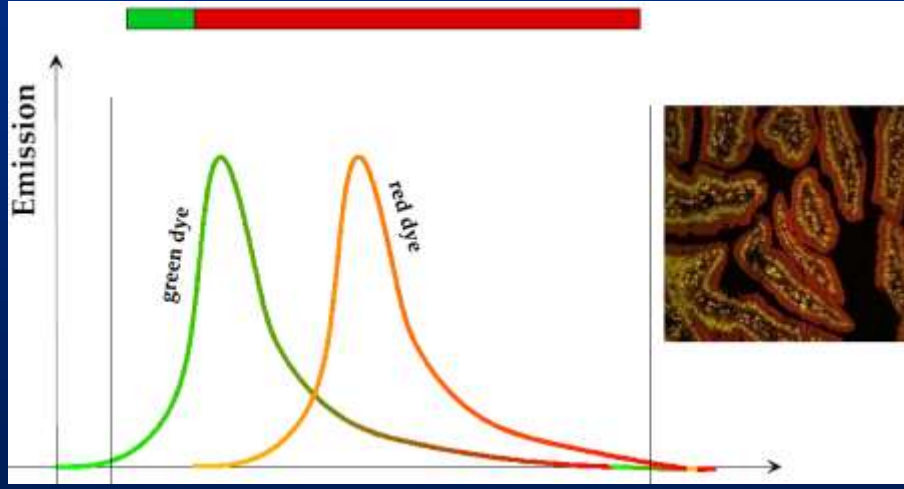
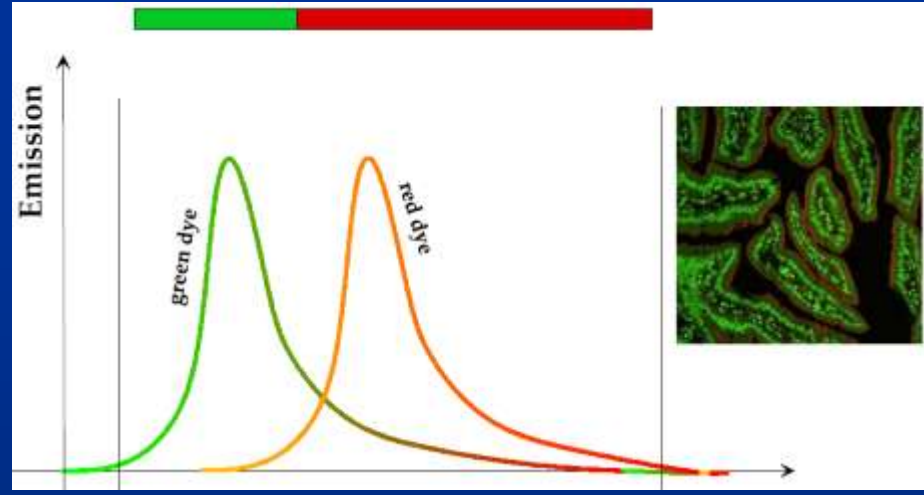
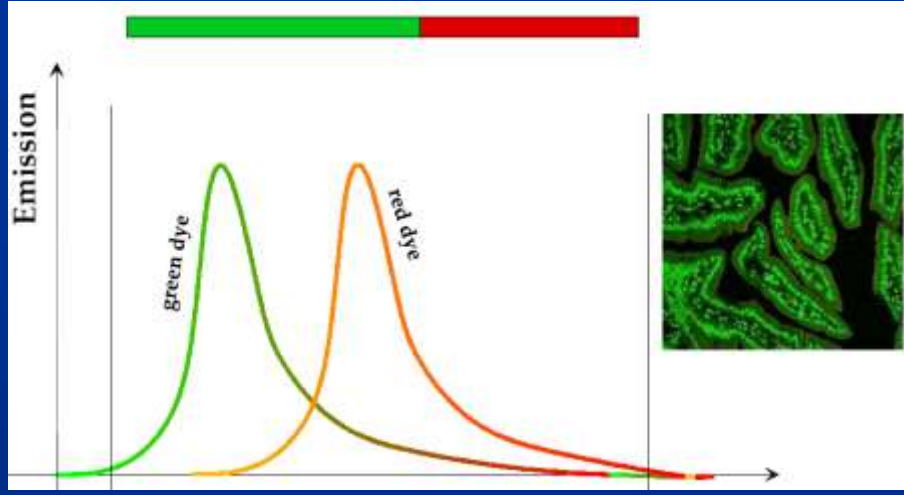
As the grid constant is tunable (with piezoelectric mechanical oscillations), any color can be merged with the optical axis.

The refractive index grid of the AOBS can accommodate several wavelengths simultaneously for multicolor excitation.

The emitted light is of different color, and so passes the crystal without being affected by the refractive index grid.

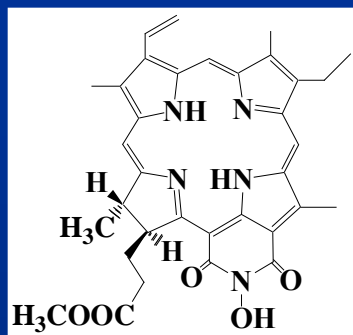




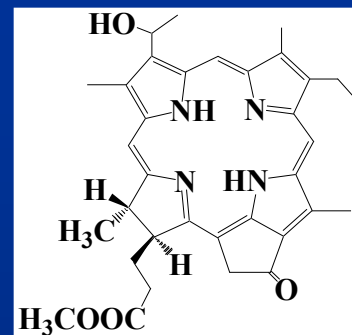


**Важнейшим преимуществом спектрального подхода в конфокальной микроскопии является возможность с помощью процедуры деконволюции спектров полностью разделить перекрывающиеся спектры флуорофоров и повысить тем самым надежность анализа**

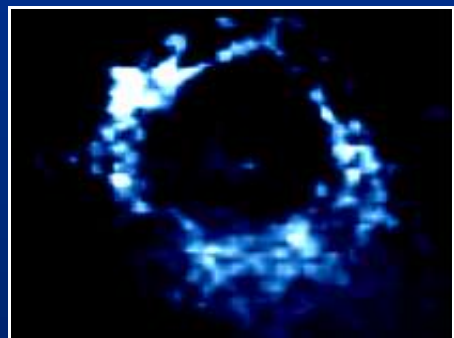
# Спектральный подход позволяет изучать внутриклеточное распределение нескольких соединений с перекрывающимися спектрами флуоресценции



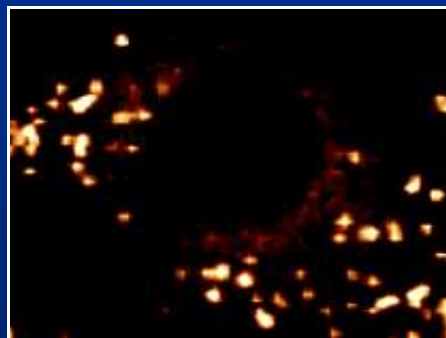
производное  
пирофеофорбида а  
(ПФ)



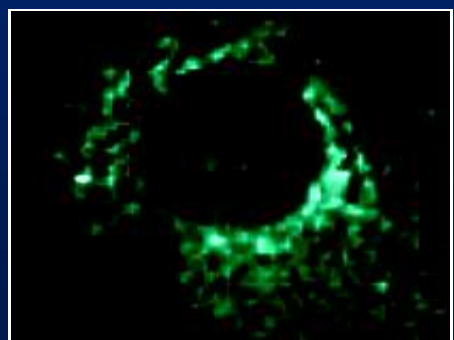
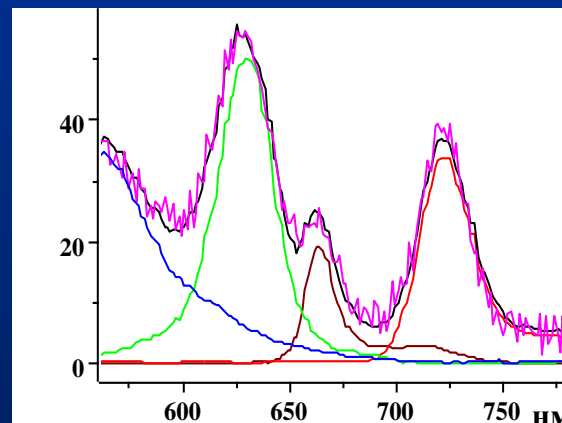
циклоимидное  
производное  
хлорина р6  
(ЦИХЛ)



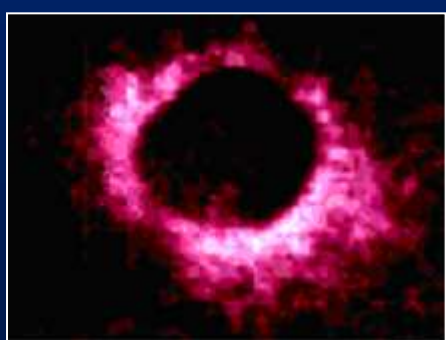
Родамин 6Ж  
митохондрии



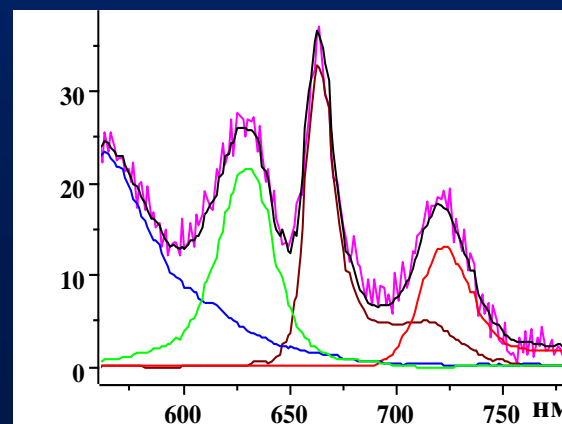
ПФ  
Липидные капли



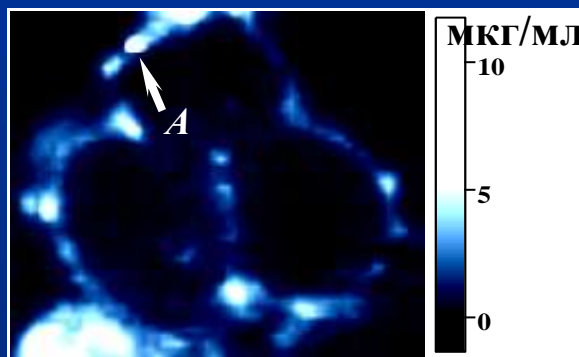
BODIPY-церамид  
Аппарат Гольджи



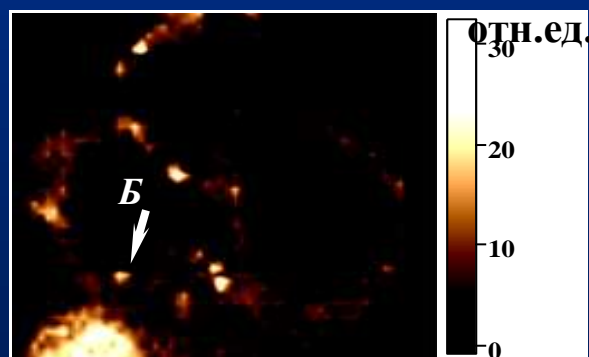
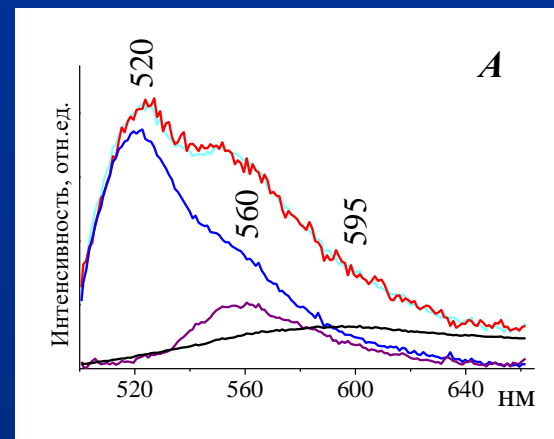
ЦИХЛ



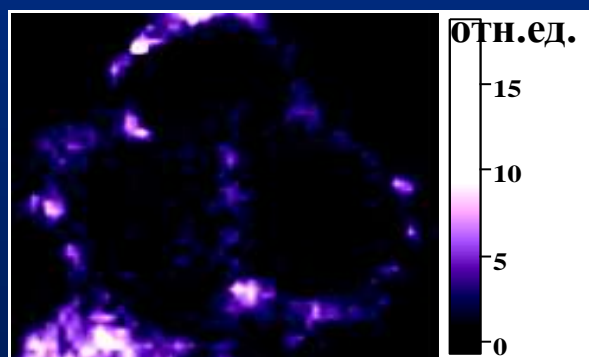
# Проблема собственной клеточной флуоресценции и ее решение с помощью спектрального подхода



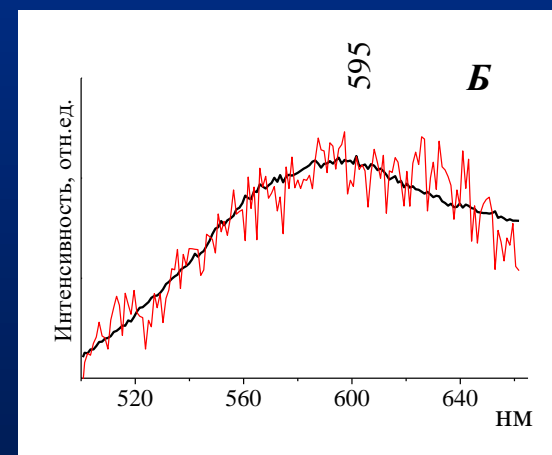
GlcNAc<sub>2</sub>-PAA-Flu



$\lambda_{\text{ем}}=560$  нм



$\lambda_{\text{ем}}=595$  нм



собственная клеточная флуоресценция

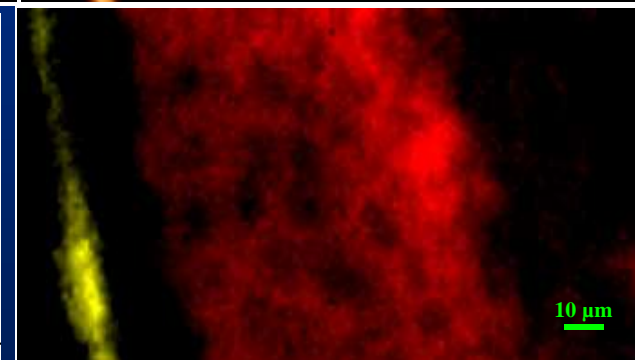
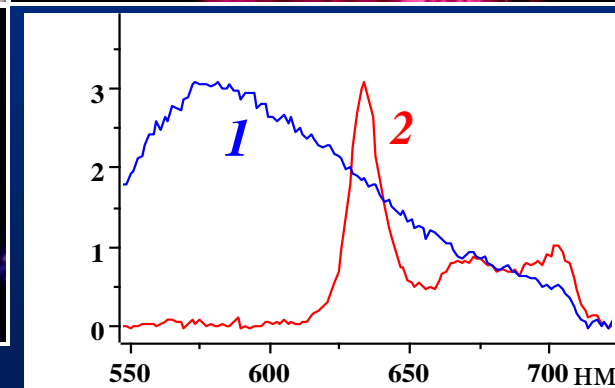
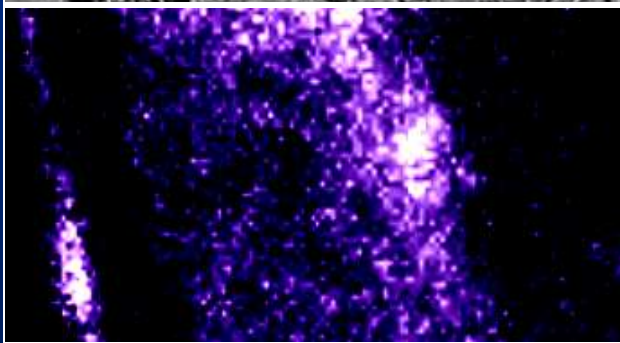
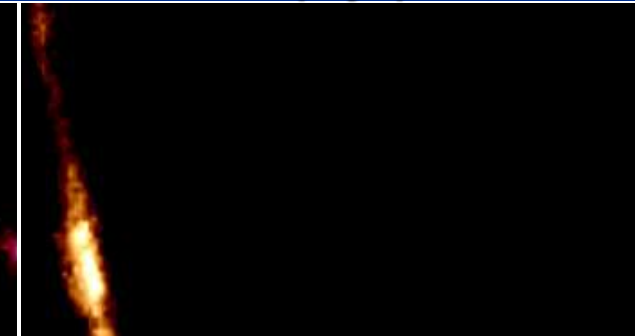
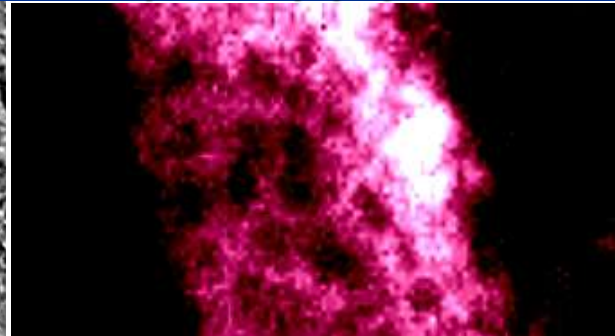
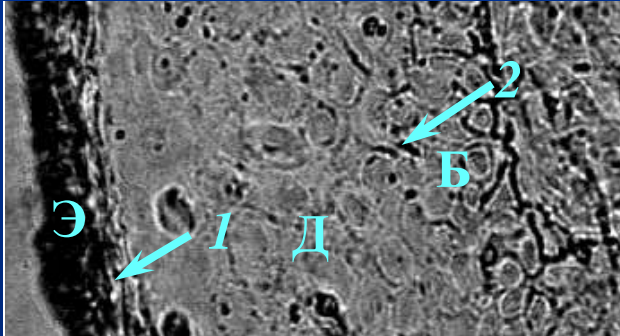
Распределение на мембране живых клеток OAT75 флуоресцентного зонда GlcNAc<sub>2</sub>-PAA-Flu на лектины

# Распределение АЛК-индуцированного протопорфирина IX в срезе ткани базалиомы человека после местного нанесения аминолевулиновой кислоты (АЛК) в виде мази

Изображение среза в проходящем белом свете

распределение протопорфирина IX

распределение эндогенной флуоресценции



распределение флуоресценции, измеренное с фильтром 610-660 нм

наложение изображений

Э – эпидермис; Д- дерма; Б – базалиома; толщина среза -10 мкм

# Leica SP8 с оптоволоконным лазером супер-непрерывного спектра (white-light laser; supercontinuum laser)

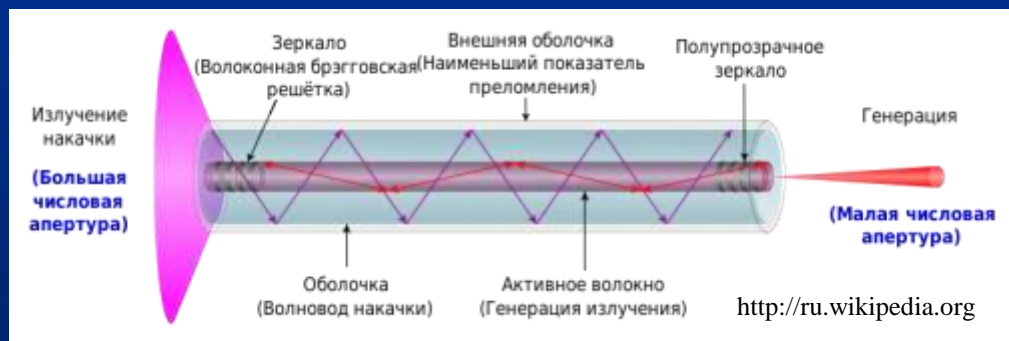
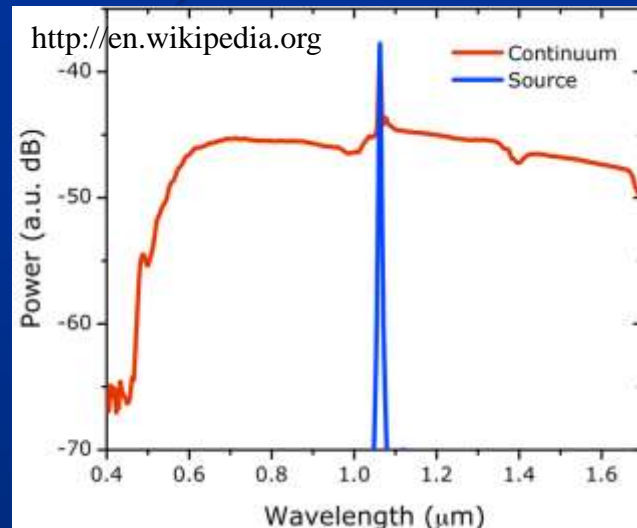
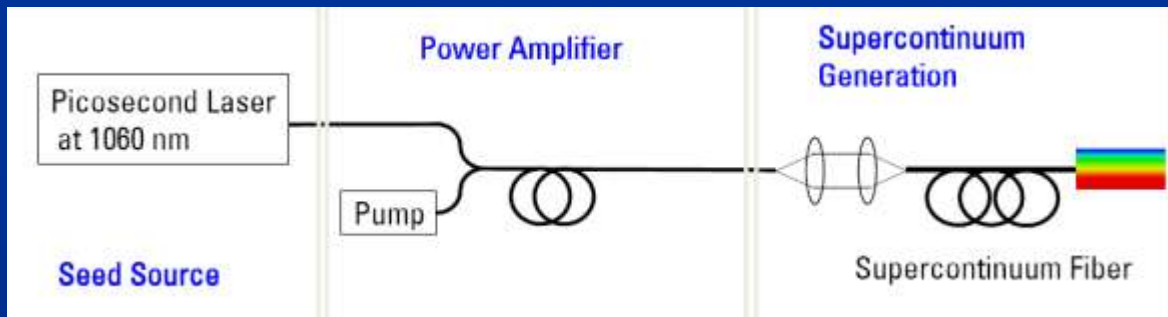
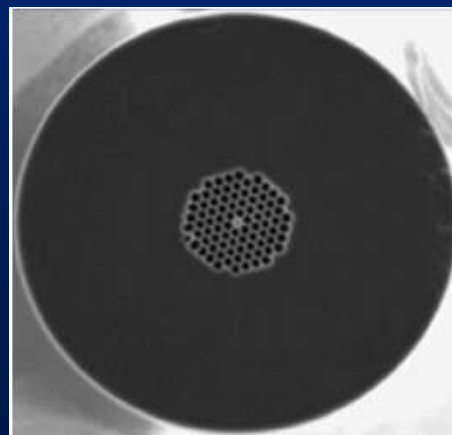
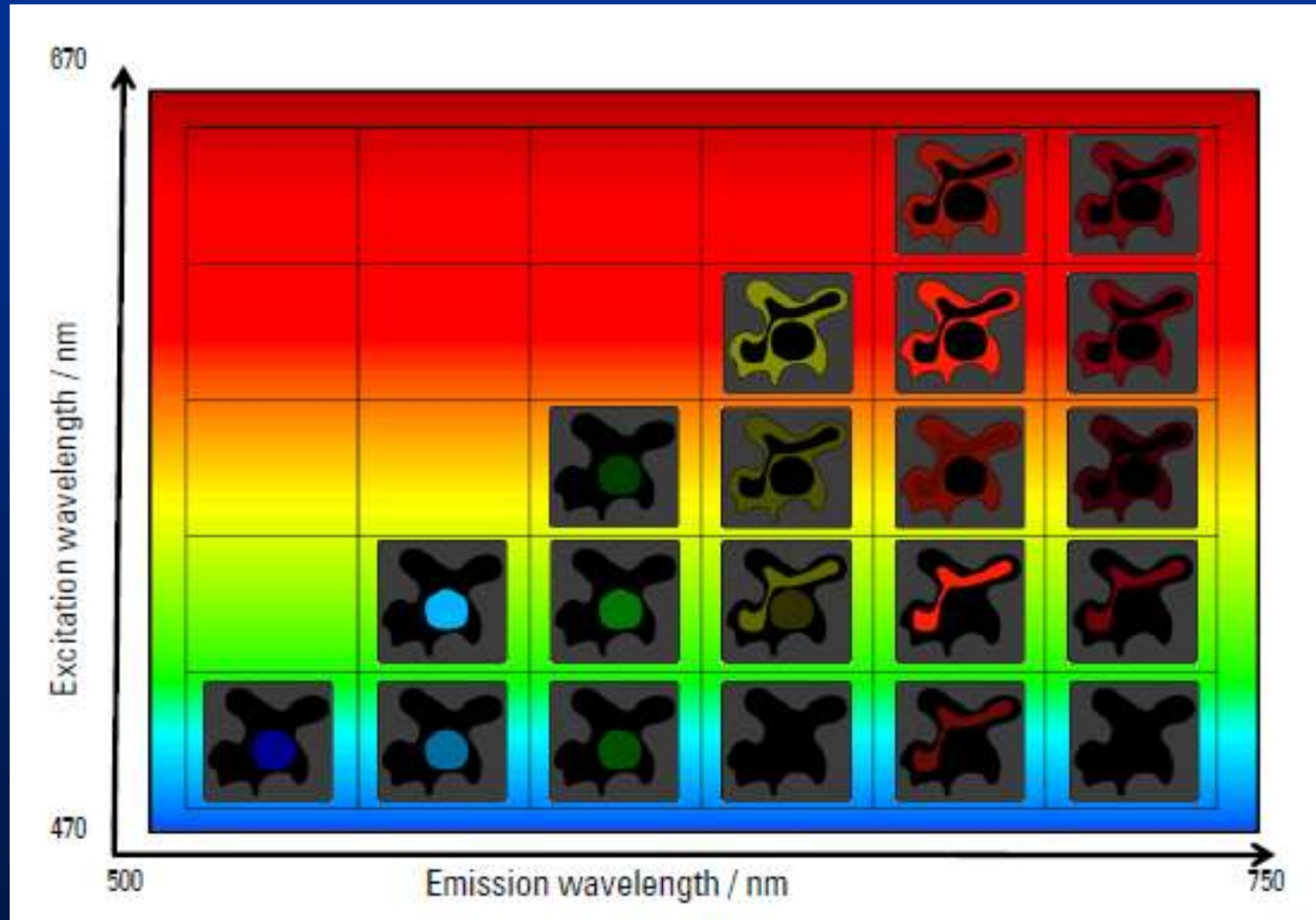


Схема накачки лазера в волокне с двойным покрытием

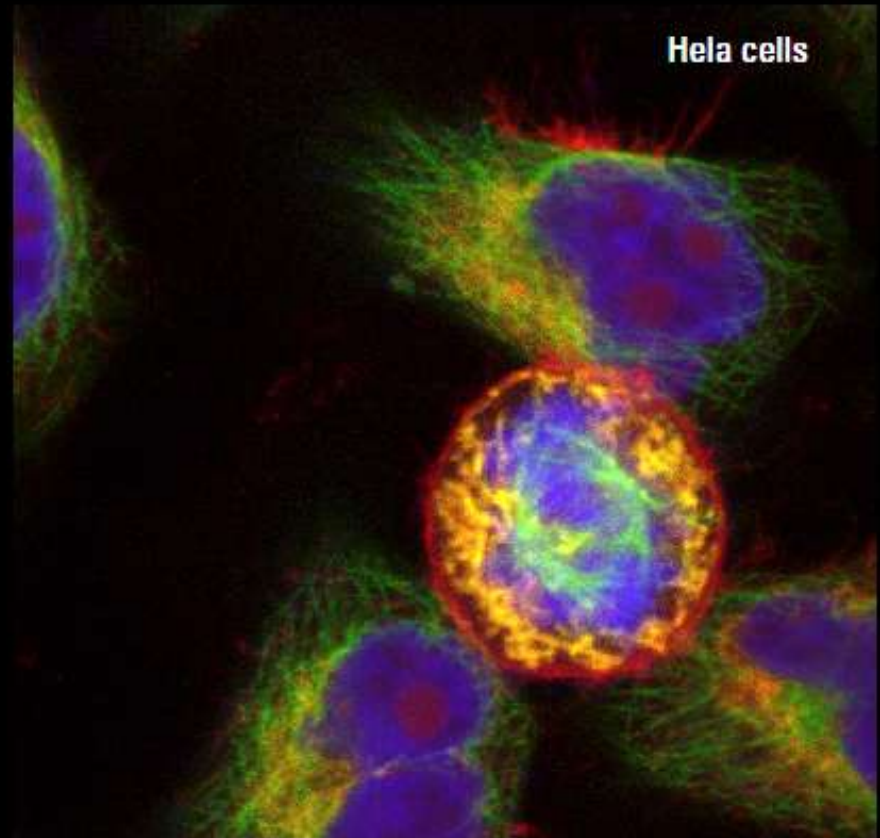
**Фотонно-кристаллическое  
оптическое волокно.  
Микроструктура образуется  
гексагонально упакованными  
воздушными каналами**



# Two dimensional (excitation and detection wavelengths) search for the most selective and bright detection of fluorophores



# High Quality Imaging – at New Wavelengths



|                                   | Excitation<br>[nm] | Emission<br>[nm] |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| Nuclei (DAPI)                     | 405                | 410-450          |
| Microtubules (Alexa 488)          | 495                | 500-540          |
| F-Actin (TRITC)                   | 548                | 555-590          |
| Mitochondria<br>(Mitotracker 590) | 600                | 608-800          |











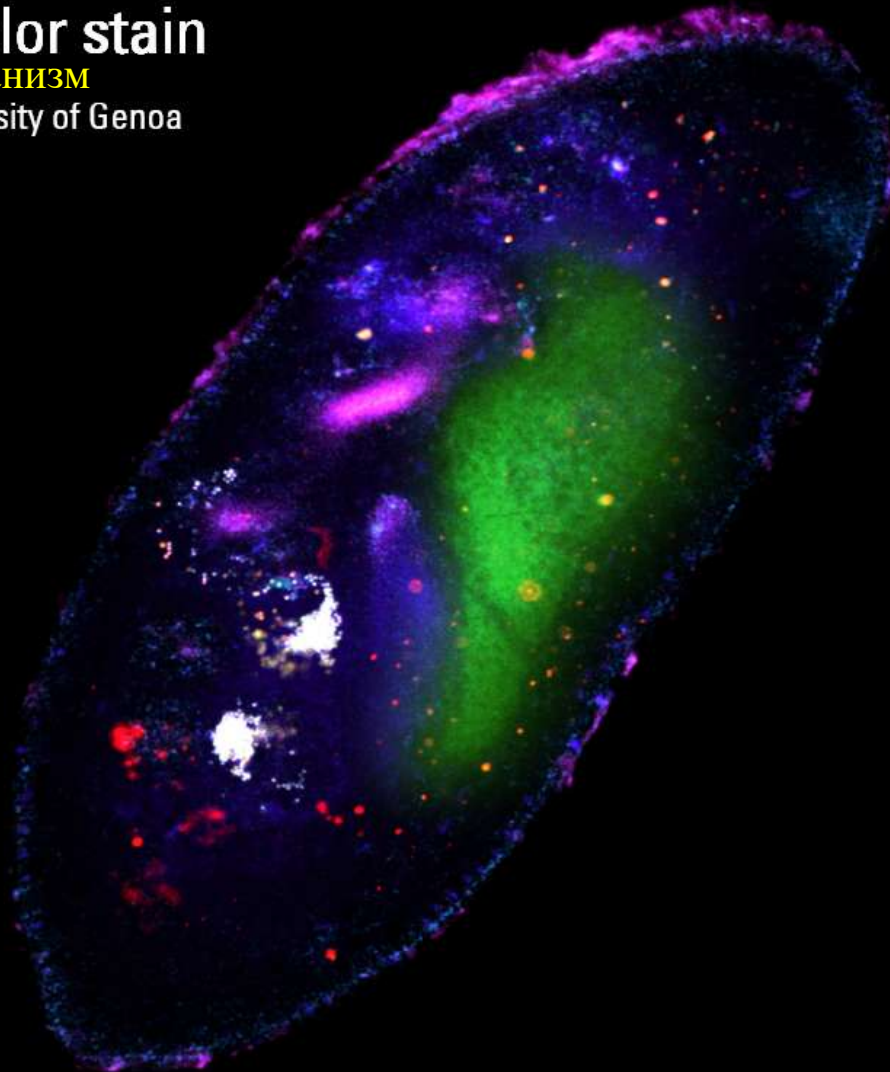
# Leica SP8: восьми-цветная конфокальная микроскопия с использованием оптоволоконного лазера супер-непрерывного спектра («белого» лазера)

## Paramecium spec : 8 color stain

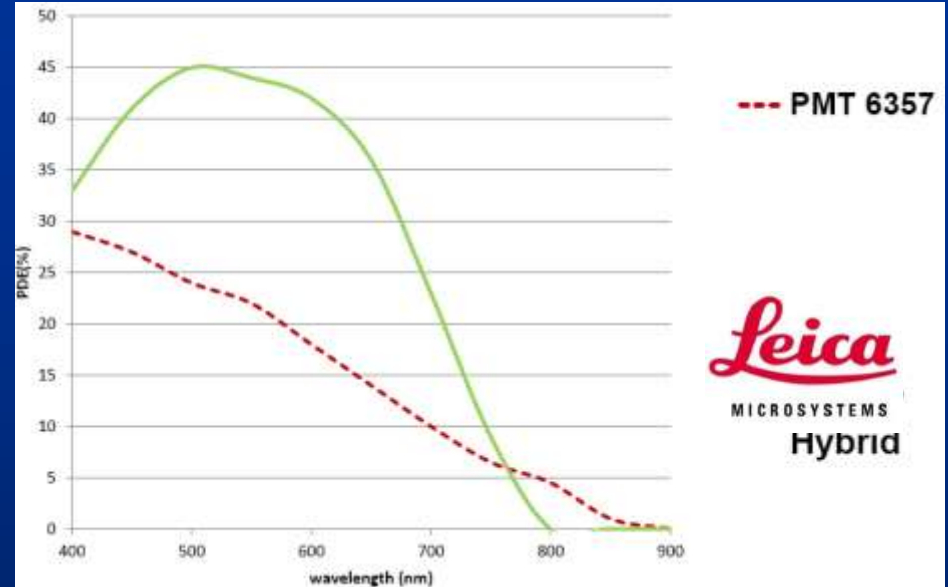
простейший одноклеточный организм

Courtesy : Alberto Diaspro, Ph.D. University of Genoa

|                                                                                     |                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|    | CY2, exc 491 nm, emis 499-505 nm<br>NMDA Receptors                     |
|    | Lp, exc 474 nm, 509-514 nm,<br>beads in vacuols                        |
|    | Acridine Orange, 484 nm, emis 520-532nm,<br>nucleus                    |
|    | Cy3, exc 551 nm, emis 555-575nm, Gaba-B-<br>R1 receptors               |
|   | TexasRed, exc 562 nm, emis 605-612 nm,<br>vacuoles and endosoms        |
|  | ALEXA 594, exc 594nm, emis 615-625nm,<br>nuclear and cellular membrane |
|  | ALEXA 633, exc 633nm, emis 655-665nm,<br>clathrine vesicles            |
|  | CY5, exc 640 nm, emis 661-675nm,<br>cilia                              |

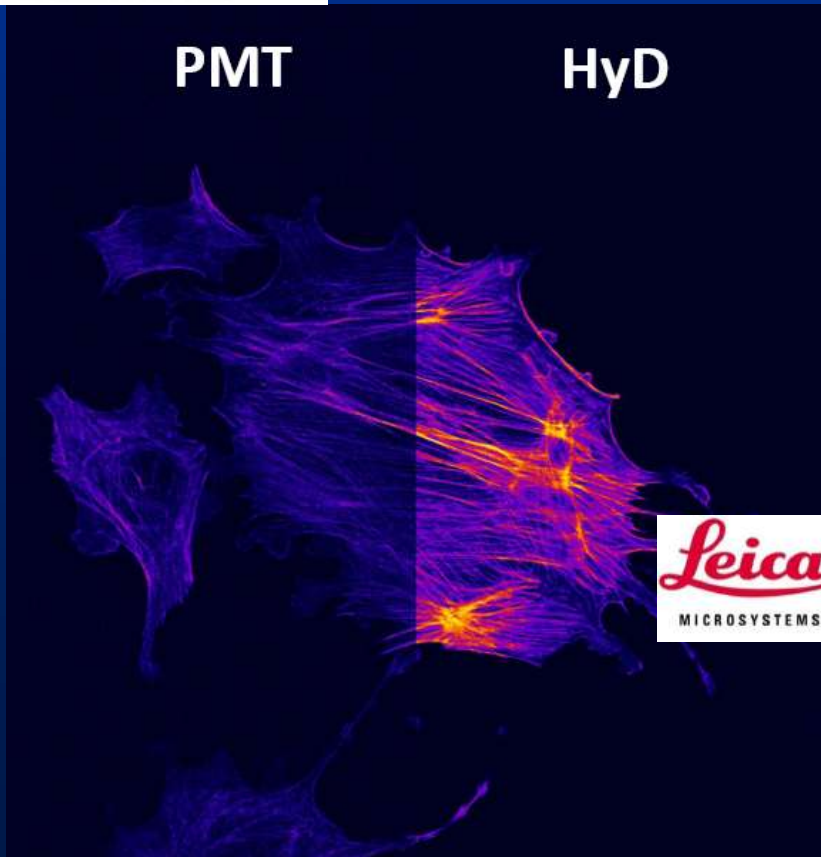


# Hybrid Gallium-Arsenide-Phosphide detector (GaAsP-detector)



PMT

HyD

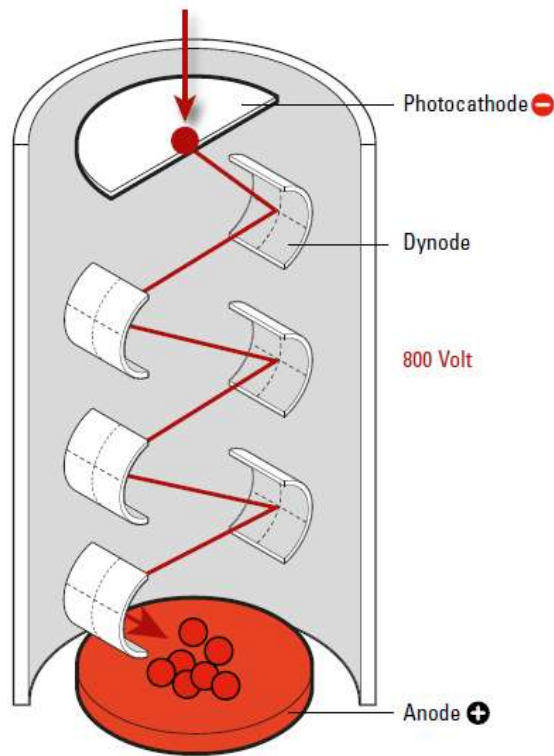


**Hybrid detector = PMT + APD**

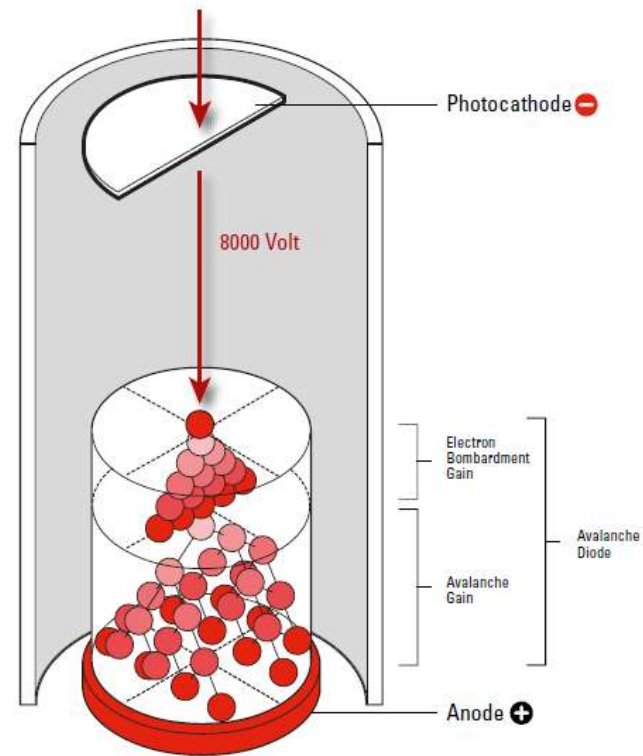
**PMT brings large dynamic range  
APD brings superior sensitivity**

# Hybrid detector= PMT+APD

PMT brings large dynamic range  
APD brings superior sensitivity



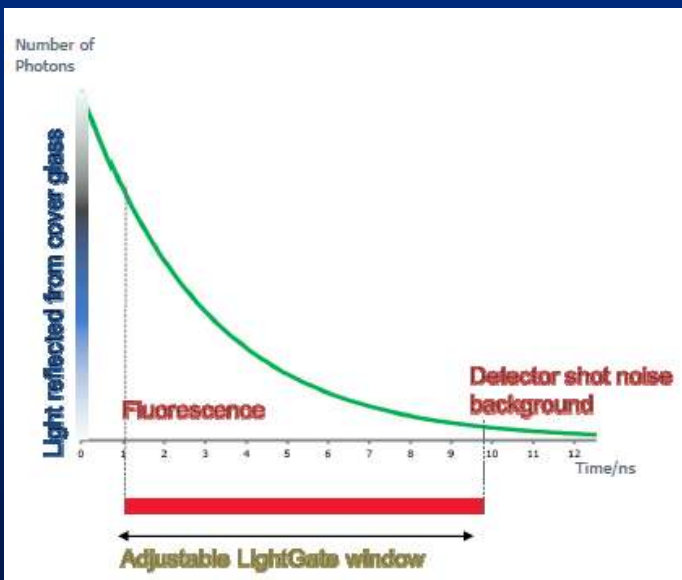
Principle of photomultiplier tube, which generates broad electrical pulses.



Principle of hybrid detector, which results in sharp electrical pulses.

# Gatable Hybrid detector

- Non-optical **removal of reflection light**
- Based on Time-gating mechanism
- Available with WLL and HyD only
- The WLL is a pulsed laser
  - Use time information to discriminate between **wanted** (fluorescence decay) and **non-wanted fluorescence** (reflection)

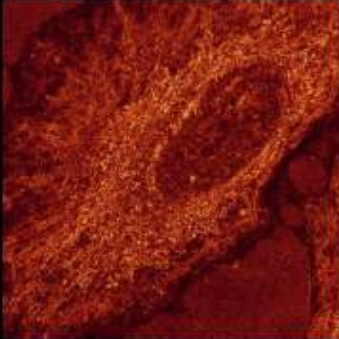


## Applications

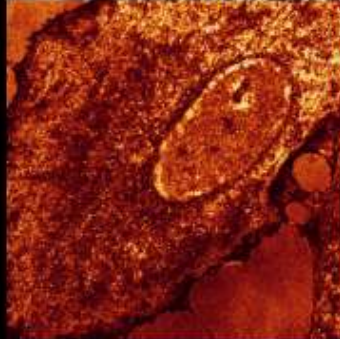
- **Removal** of non-wanted background
- **Enhancement** of image contrast
- **High SNR** even at “difficult” samples
  - Weak staining
  - Samples mounted on strongly reflective surfaces
  - Samples with intrinsic back scattering
  - Fluorescent dye with very short Stokes shift

# Removal of back scattered light

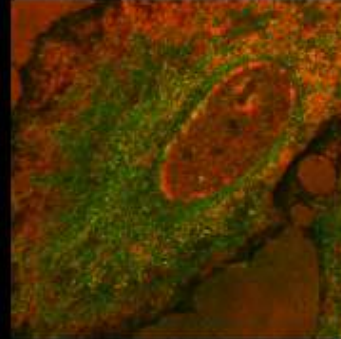
**Excitation:** 470 nm  
**Detection:** 465-490nm



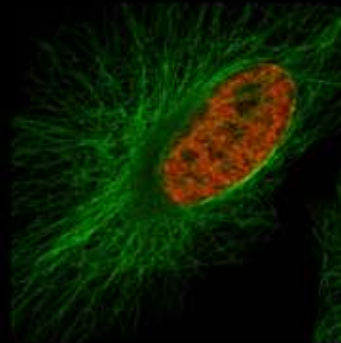
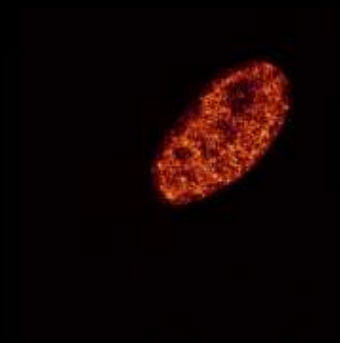
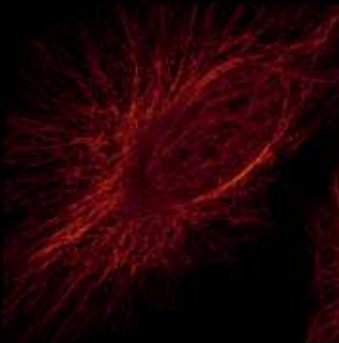
**Excitation:** 510 nm  
**Detection:** 495-540 nm



**Overlay**



**LightGate off**



**LightGate on**

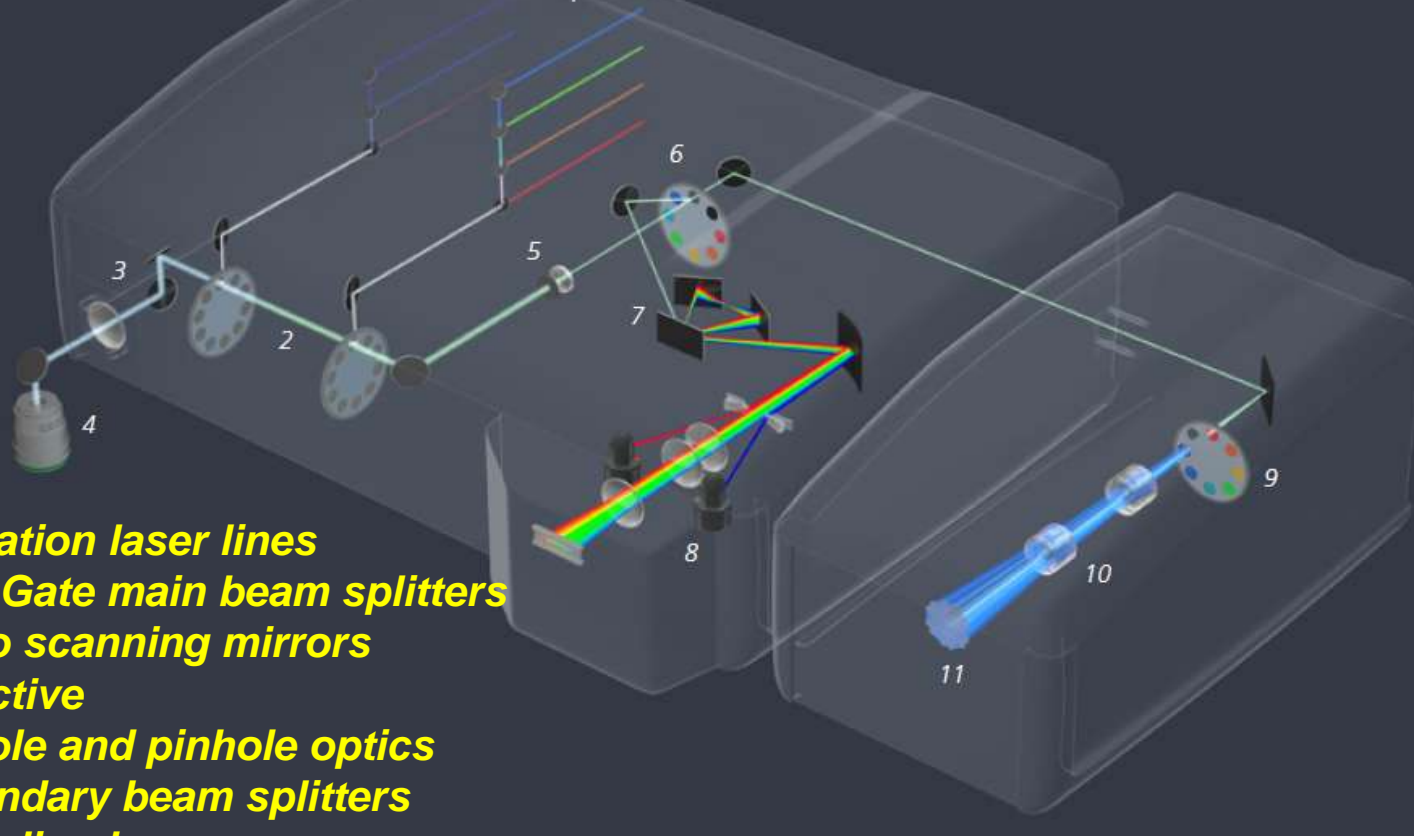
**Very helpful for live cell imaging!**

Sample: fixed HeLa cells, 1. tubulin stained with BD Horizon V-500, 2. nucleus stained with Chromeo 505, xy scan

**Confocal microscopes LSM710, LSM780,  
LSM800, LSM880 an LSM980 of  
Zeiss company (Germany)**



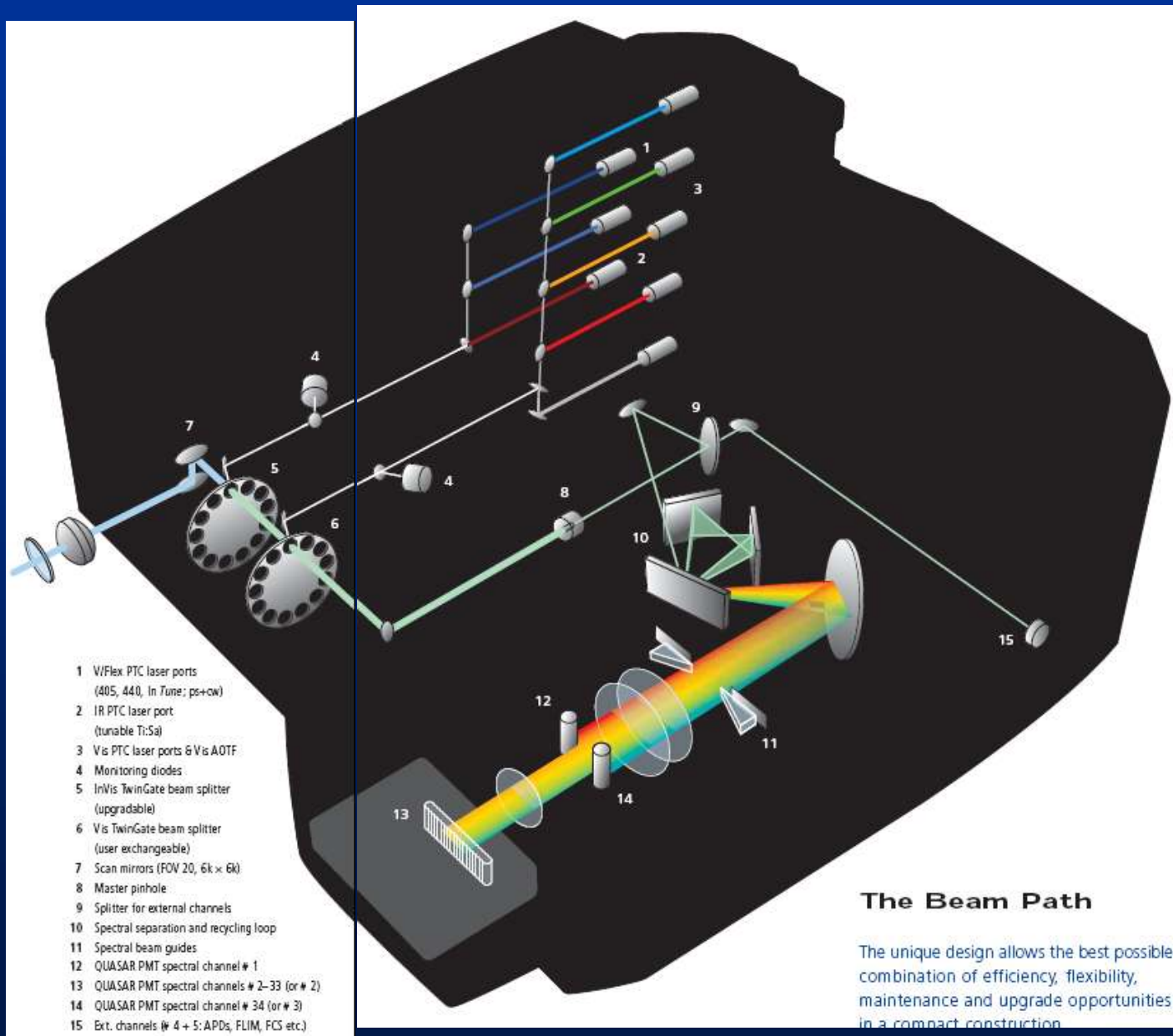
Минимум: 488, 543, 561, 639 нм  
дополнительно: 405, 445, 514, 594 нм



1. Excitation laser lines
2. Twin Gate main beam splitters
3. Galvo scanning mirrors
4. Objective
5. Pinhole and pinhole optics
6. Secondary beam splitters
7. Recycling loop
8. Quasar detection unit
9. Emission filters
10. Zoom optics
11. Airyscan detector

- до 4 длин волн возбуждения одновременно в одном скане;
- до 100 различных комбинаций длин волн лазеров;
- система детекции: 2 ФЭУ, 32 GaAsP детектора;
- уровень шума детекторов снижен в 3 раза;
- спектральное разрешение до 3 нм;
- продемонстрирована возможность регистрации до 10 красителей одновременно.

# Оптическая схема Zeiss LSM710



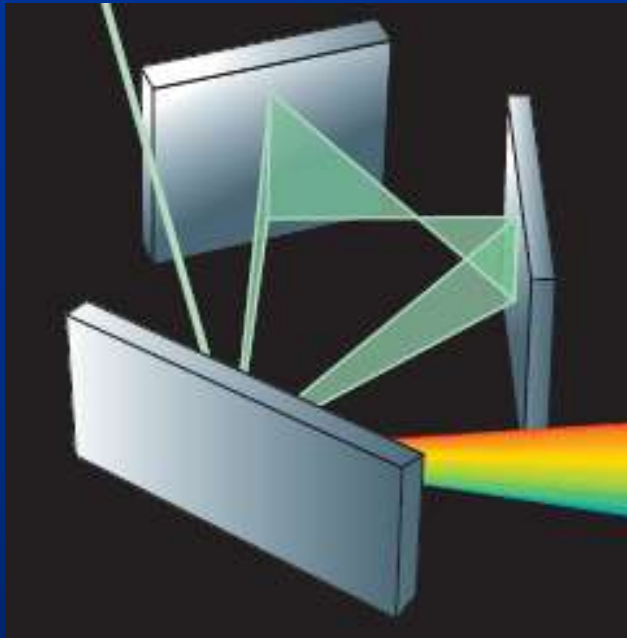
- 1 WFlex PTC laser ports (405, 440, In Tune; ps+ow)
- 2 IR PTC laser port (tunable Ti:Sa)
- 3 Vis PTC laser ports & Vis AOTF
- 4 Monitoring diodes
- 5 InVis TwinGate beam splitter (upgradable)
- 6 Vis TwinGate beam splitter (user exchangeable)
- 7 Scan mirrors (FOV 20, 6k x 6k)
- 8 Master pinhole
- 9 Splitter for external channels
- 10 Spectral separation and recycling loop
- 11 Spectral beam guides
- 12 QUASAR PMT spectral channel # 1
- 13 QUASAR PMT spectral channels # 2-33 (or # 2)
- 14 QUASAR PMT spectral channel # 34 (or # 3)
- 15 Ext. channels # 4 + 5: APDs, FLIM, FCS etc.)

## The Beam Path

The unique design allows the best possible combination of efficiency, flexibility, maintenance and upgrade opportunities in a compact construction.

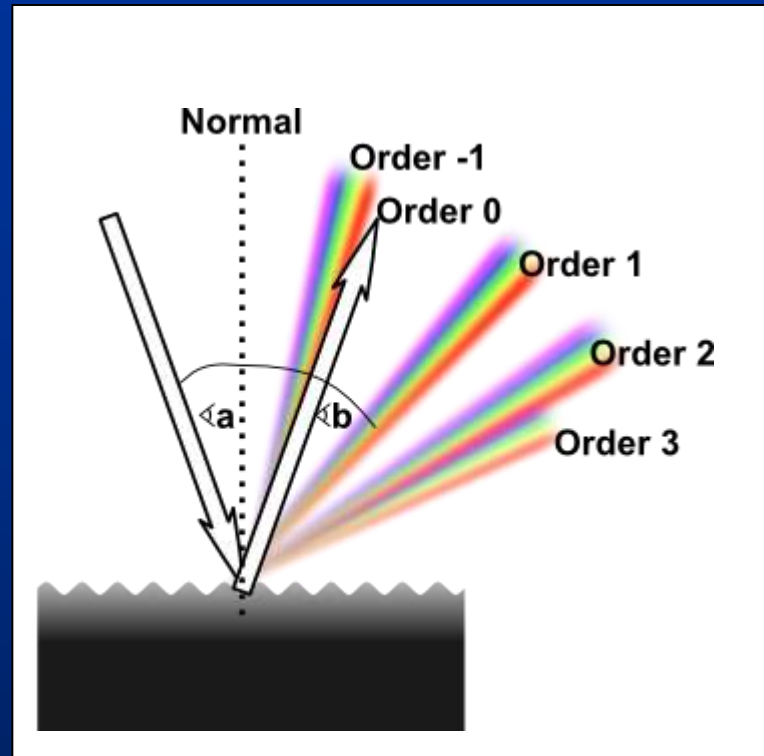


# Оригинальные решения в LSM710

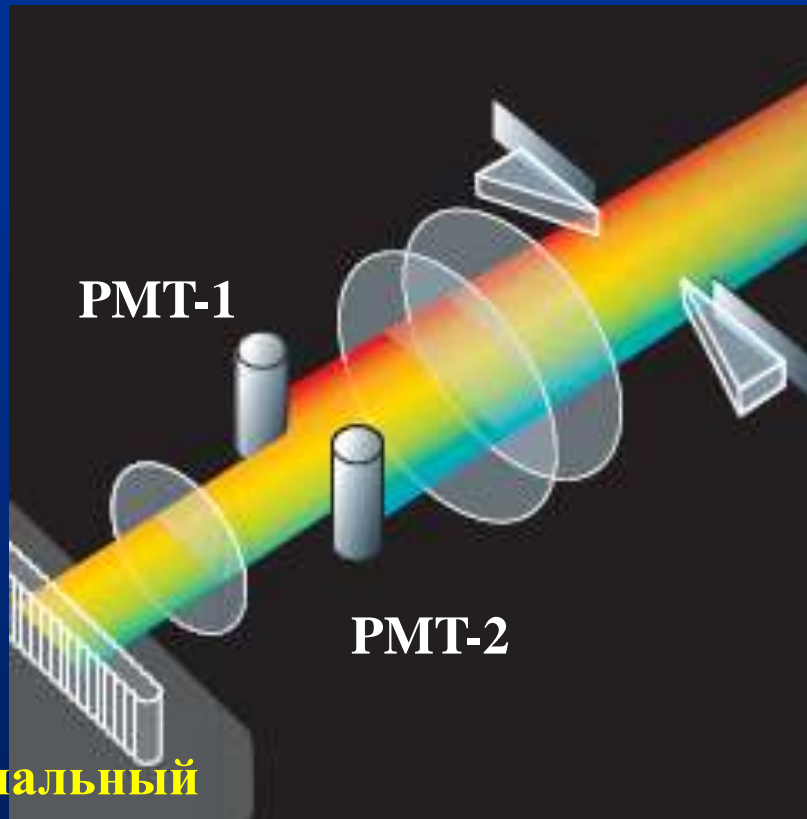


**The zero-order light  
reflected by the grating  
is re-directed into  
grating**

**+20% in intensity**



# Оригинальные решения в LSM710/780/980



**32-канальный  
GaAsP детектор**

**Спектральный  
подход к детекции  
сигнала**

Активное охлаждение GaAsP детектора и «красного» бокового ФЭУ - шум детекторов снижен в 3 раза

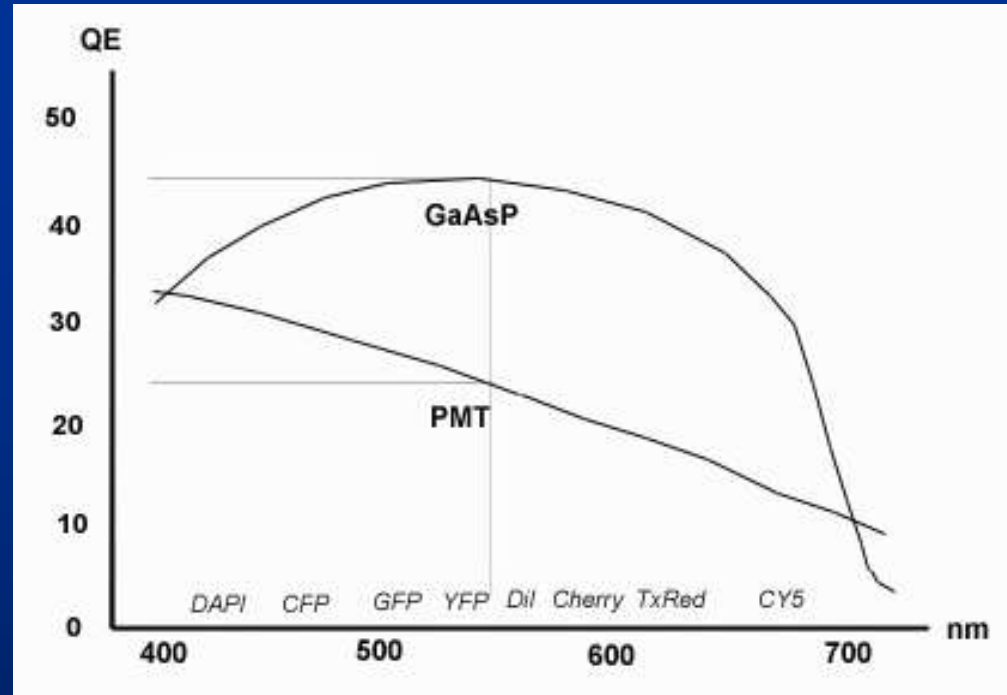
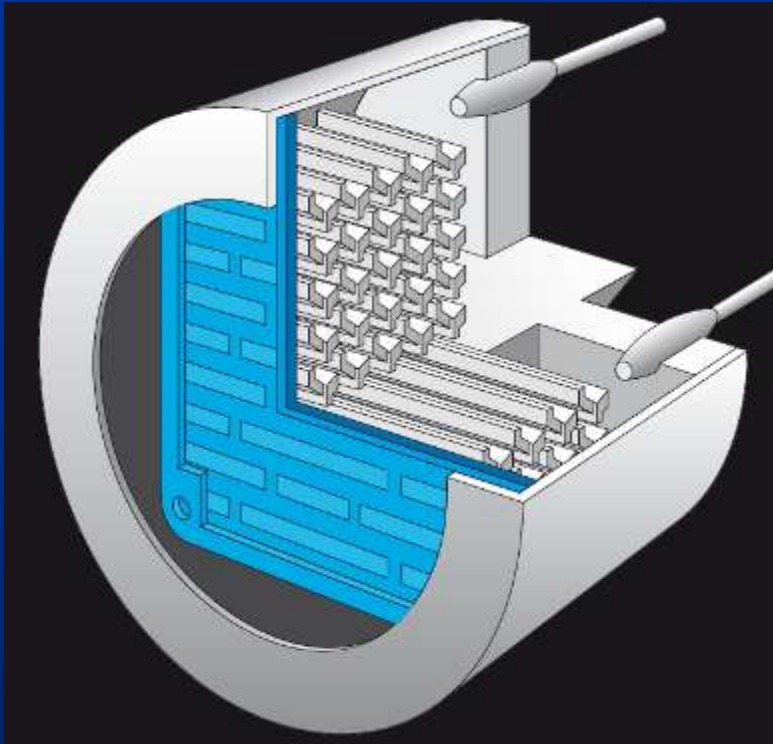
Визуализация в режиме счета фотонов для GaAsP детектора и «красного» бокового ФЭУ

До 10 каналов в *Channel Mode*

До 34 (32+2) каналов в спектральном режиме сканирования; спектральное разрешение до 3 нм

Получение полных спектральных данных (*lambda stack*) за один скан - параллельный тип сканирования!

# Полупроводниковый GaAsP-детектор

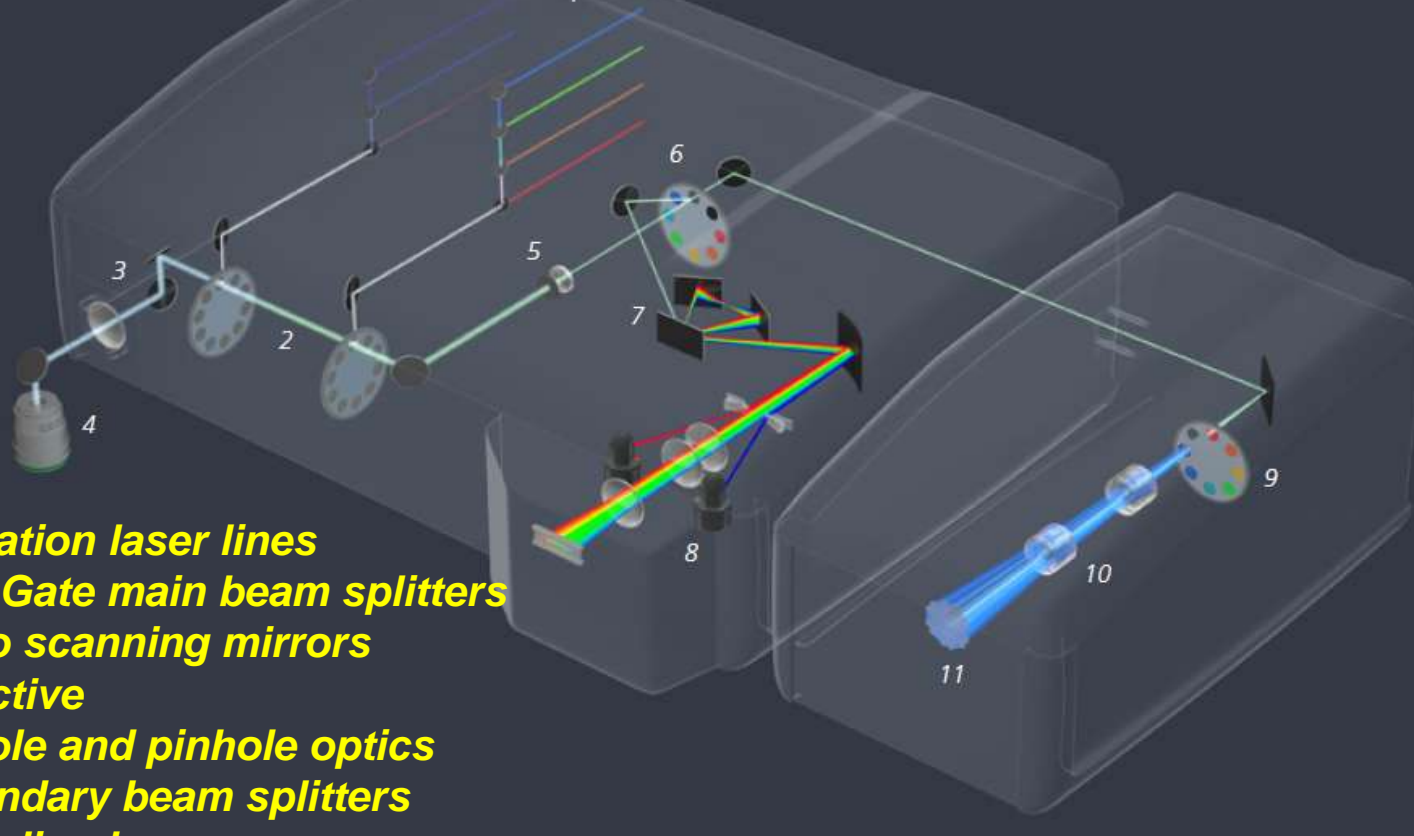


**GaAsP-детектор обладает улучшенной квантовой эффективностью в диапазоне 420-690 нм по сравнению с ФЭУ.**

GaAsP (Галлий-Арсенид-Фосфид) – полупроводниковый материал фотокатода с улучшенными характеристиками для преобразования фотонов в электросигналы

GaAsP детекторы могут работать и в интегральном режиме получения изображения и в режиме счета фотонов (дополнительные технологии FCS, FCCS)

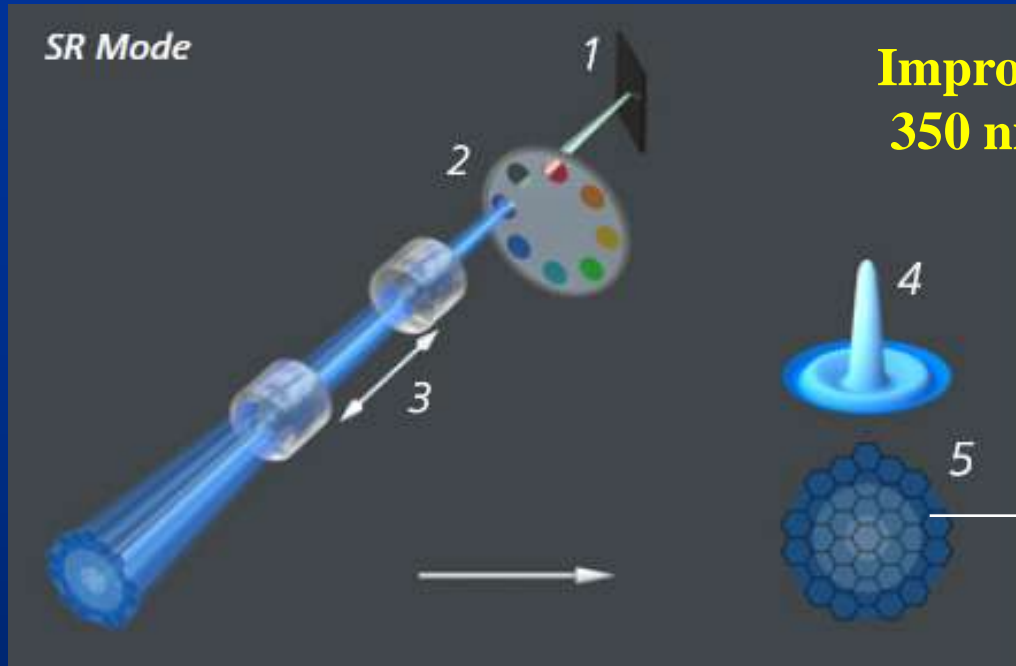
Минимум: 488, 543, 561, 639 нм  
дополнительно: 405, 445, 514, 594 нм



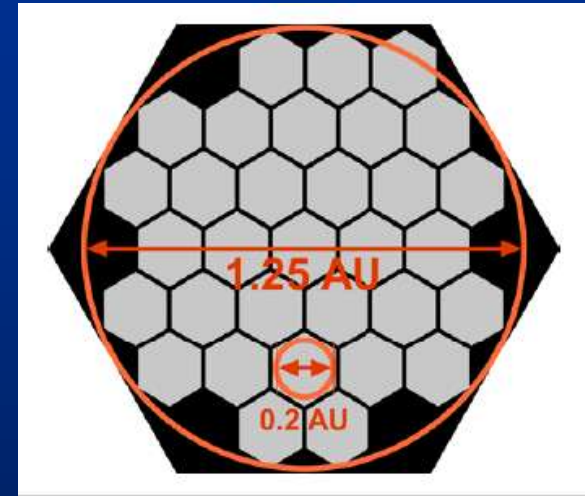
1. Excitation laser lines
2. Twin Gate main beam splitters
3. Galvo scanning mirrors
4. Objective
5. Pinhole and pinhole optics
6. Secondary beam splitters
7. Recycling loop
8. Quasar detection unit
9. Emission filters
10. Zoom optics
11. Airyscan detector

- до 4 длин волн возбуждения одновременно в одном скане;
- до 100 различных комбинаций длин волн лазеров;
- система детекции: 2 ФЭУ, 32 GaAsP детектора;
- уровень шума детекторов снижен в 3 раза;
- спектральное разрешение до 3 нм;
- продемонстрирована возможность регистрации до 10 красителей одновременно.

# Airy scan detector

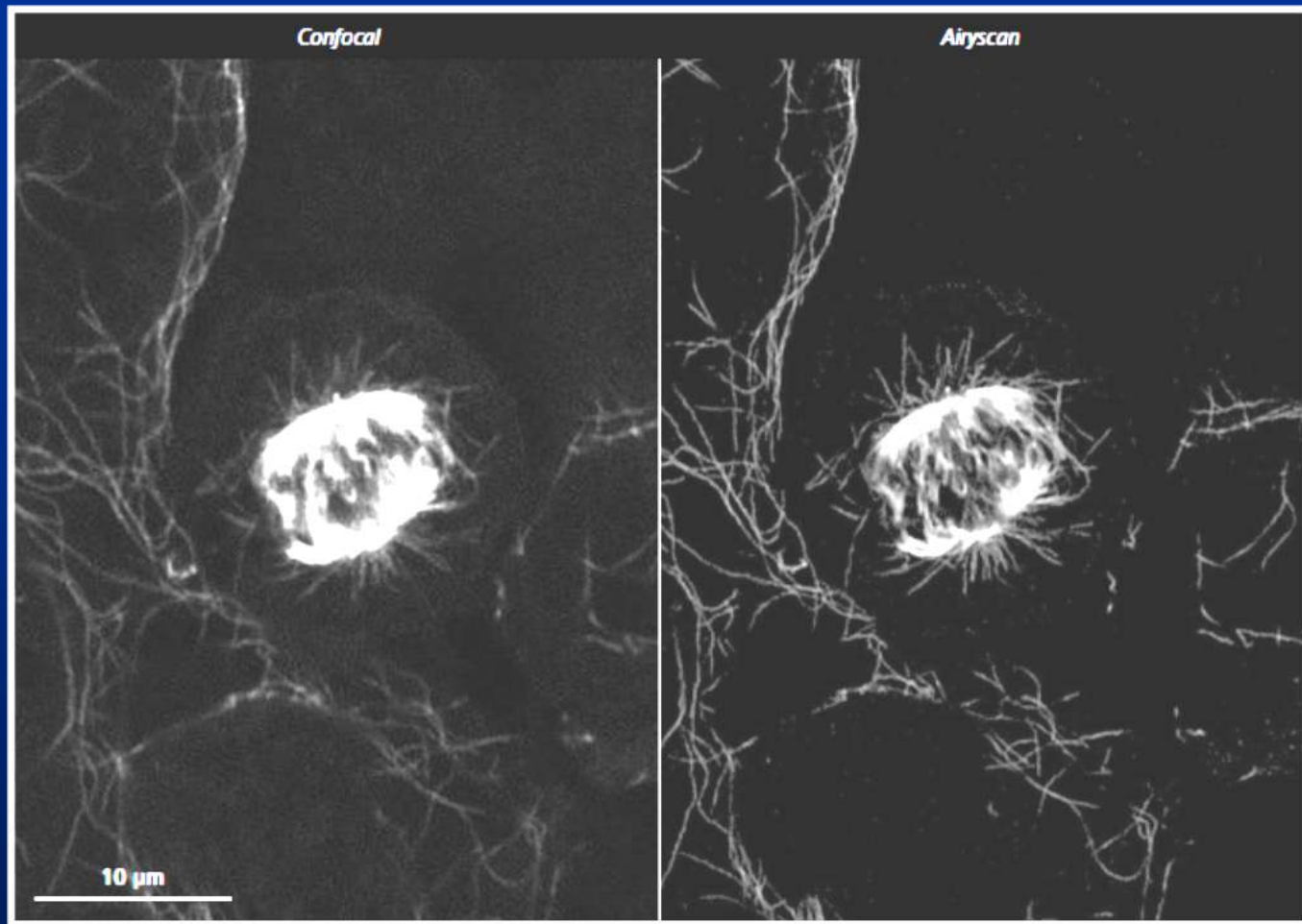


**Improvement of resolution to 120 nm (XY)  
350 nm (Z) at 488 nm excitation**



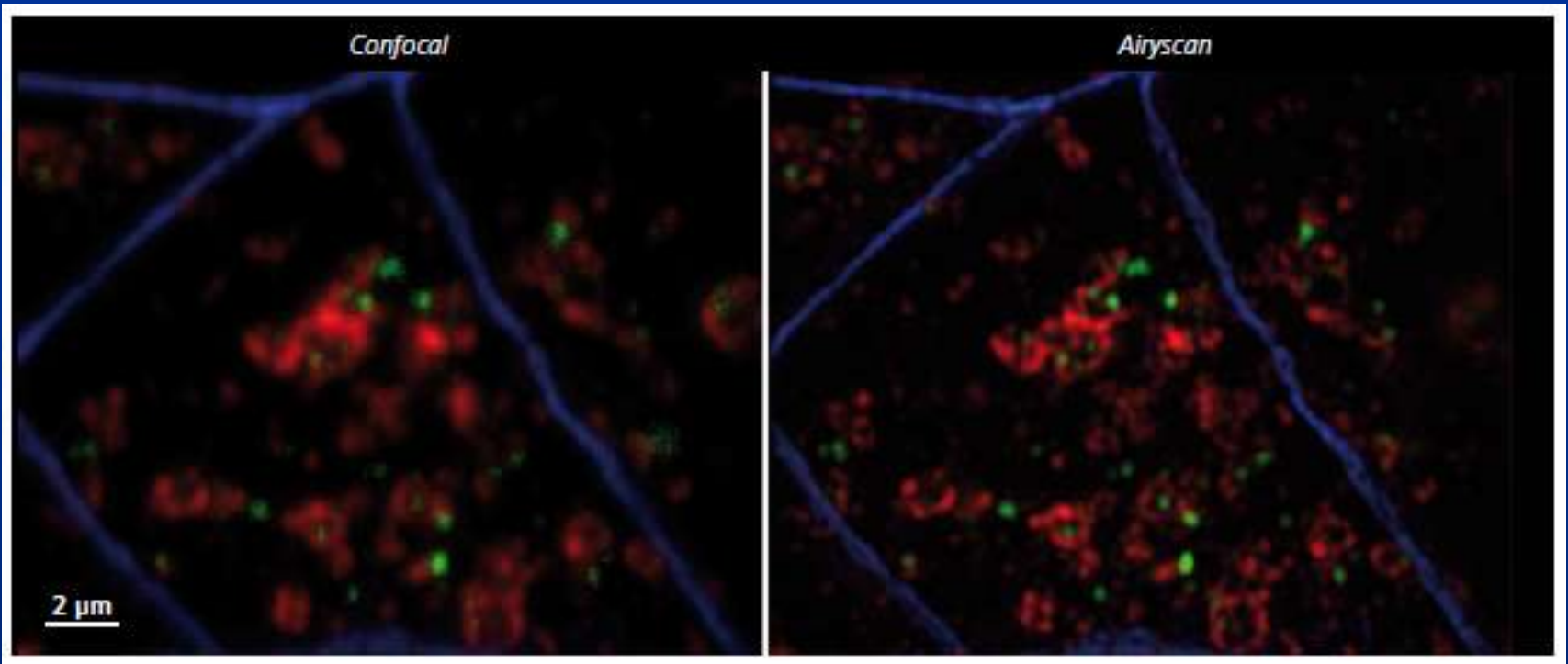
**Airyscan detector is positioned in a conjugate focal plane to the excitation spot and utilizes a zoom optic arrangement to project a defined number of Airy unit orders onto the detector to create an optical section.**

**Airyscan is a 32 channel area detector and collects a pinhole-plane image at every scan position**



**Mitotic cells stained for microtubules (Alexa 555).  
Microtubules are imaged at 488 nm using either GaAsP detector or  
Airyscan.**

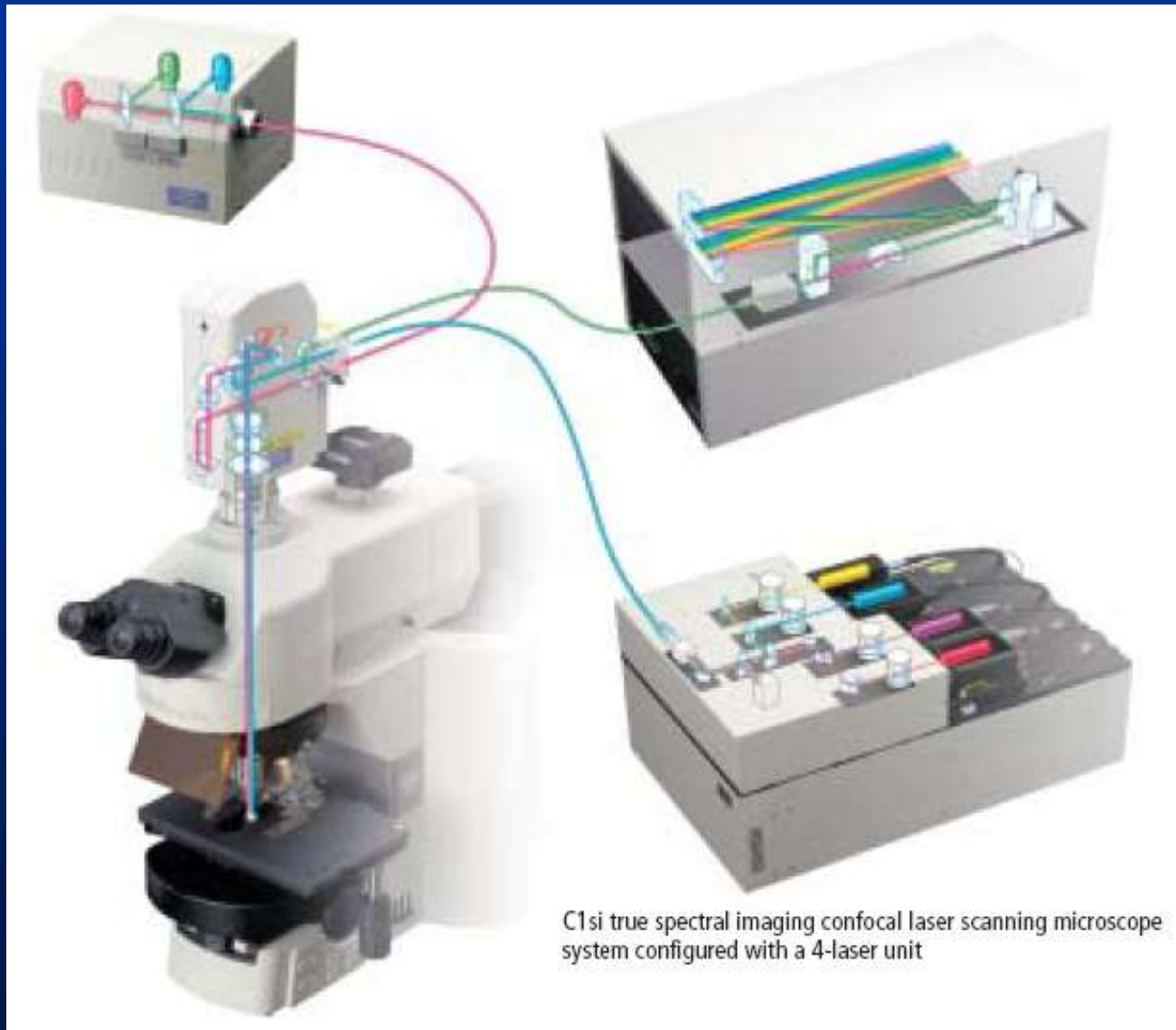
**Sample courtesy of P. O'Toole, University of York, UK**



**Human RPE cells, ZO1 (tight junction marker) in blue, photoreceptor outer segments stained with FITC in green, EEA1 (endosomal marker) in red.**

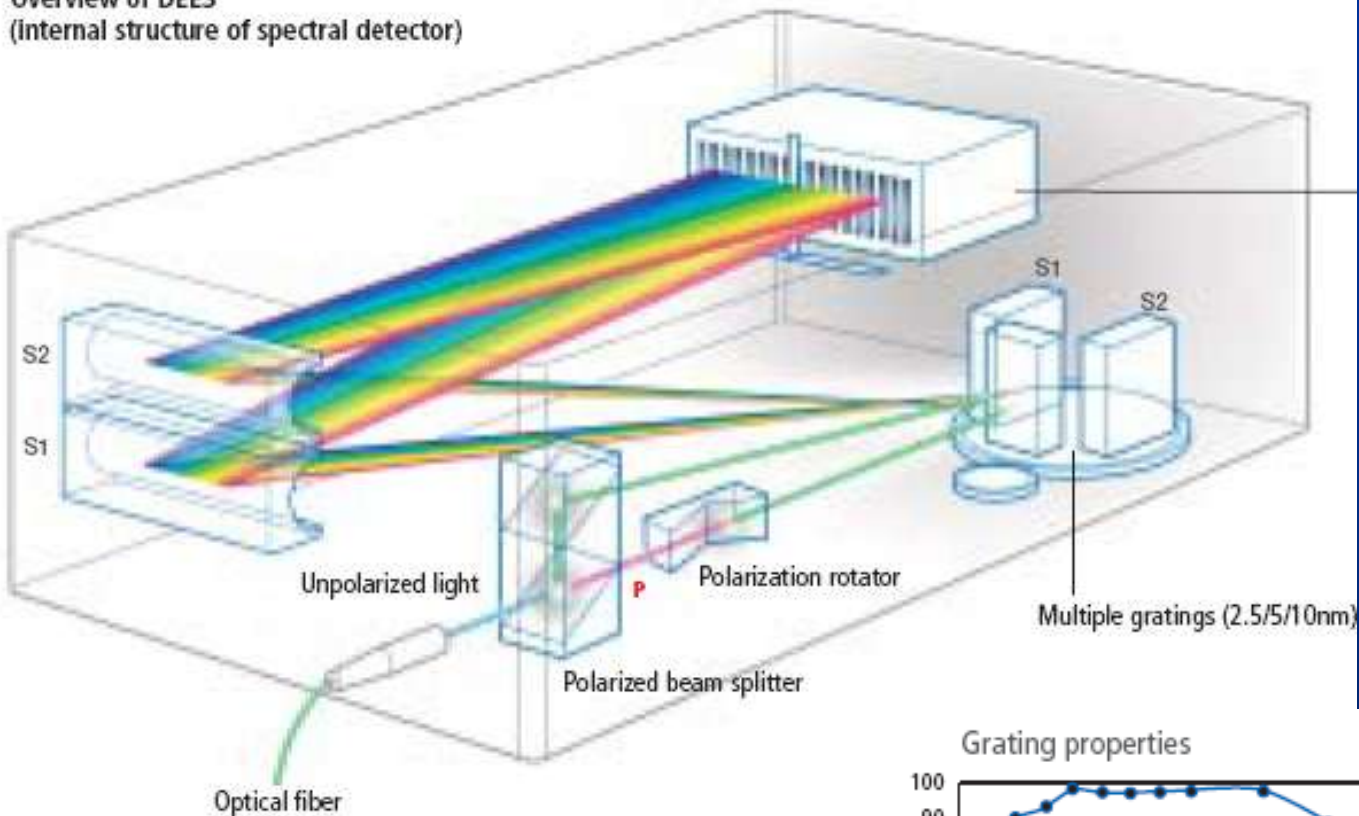
**Courtesy of S. Almewadar, CRTD, TU Dresden, Germany**

# Конфокальный микроскоп Nikon C1/A1





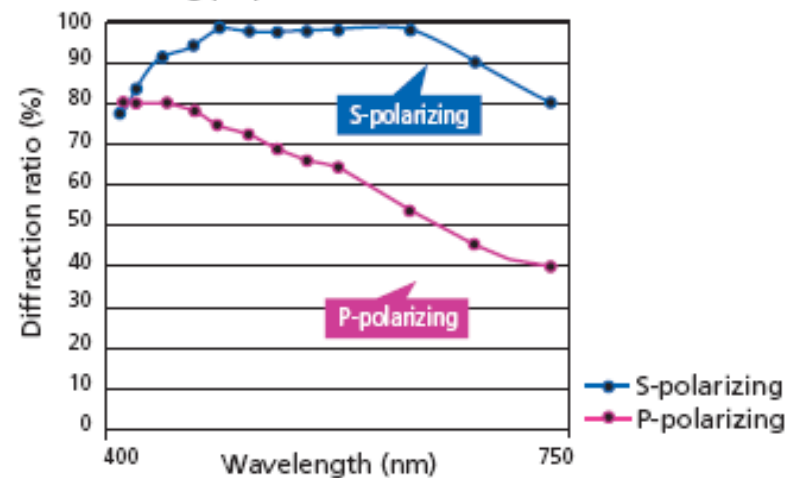
Overview of DEES  
(internal structure of spectral detector)



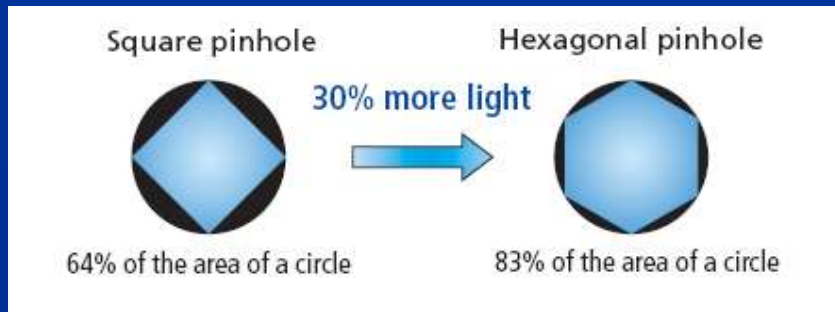
Мульти-анодный  
ФЭУ;  
32 канала

Модуль для  
спектральной детекции

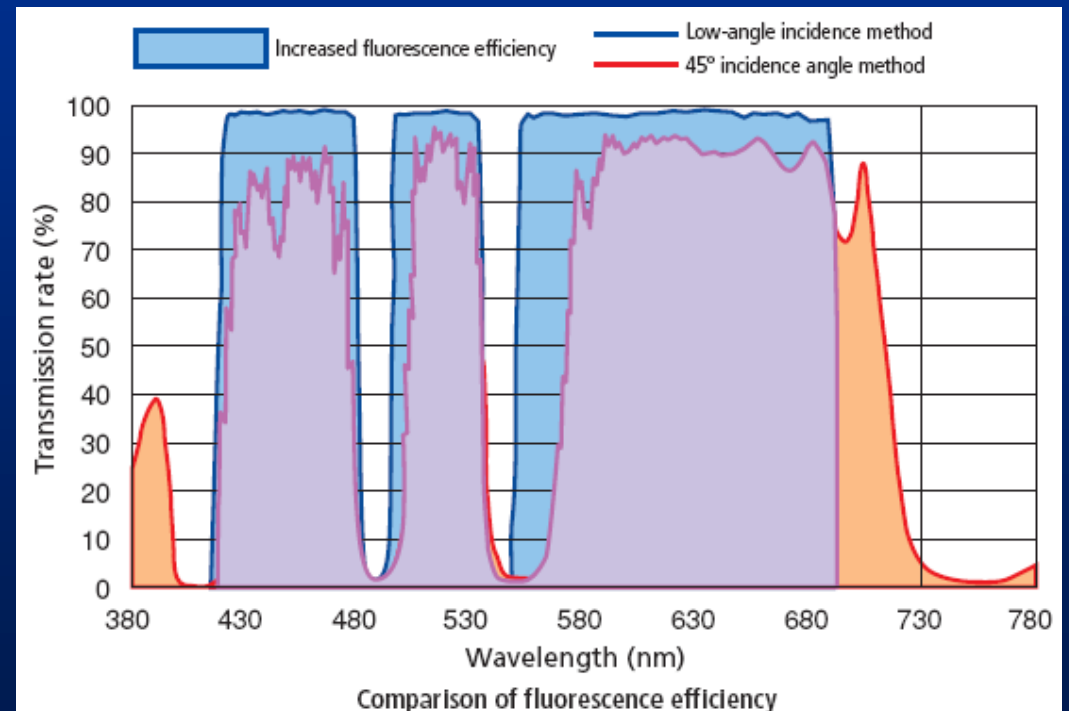
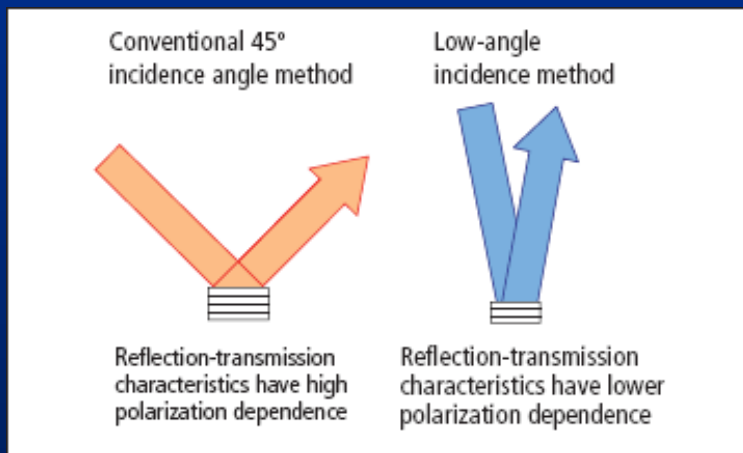
Grating properties



# Оригинальные решения Nikon

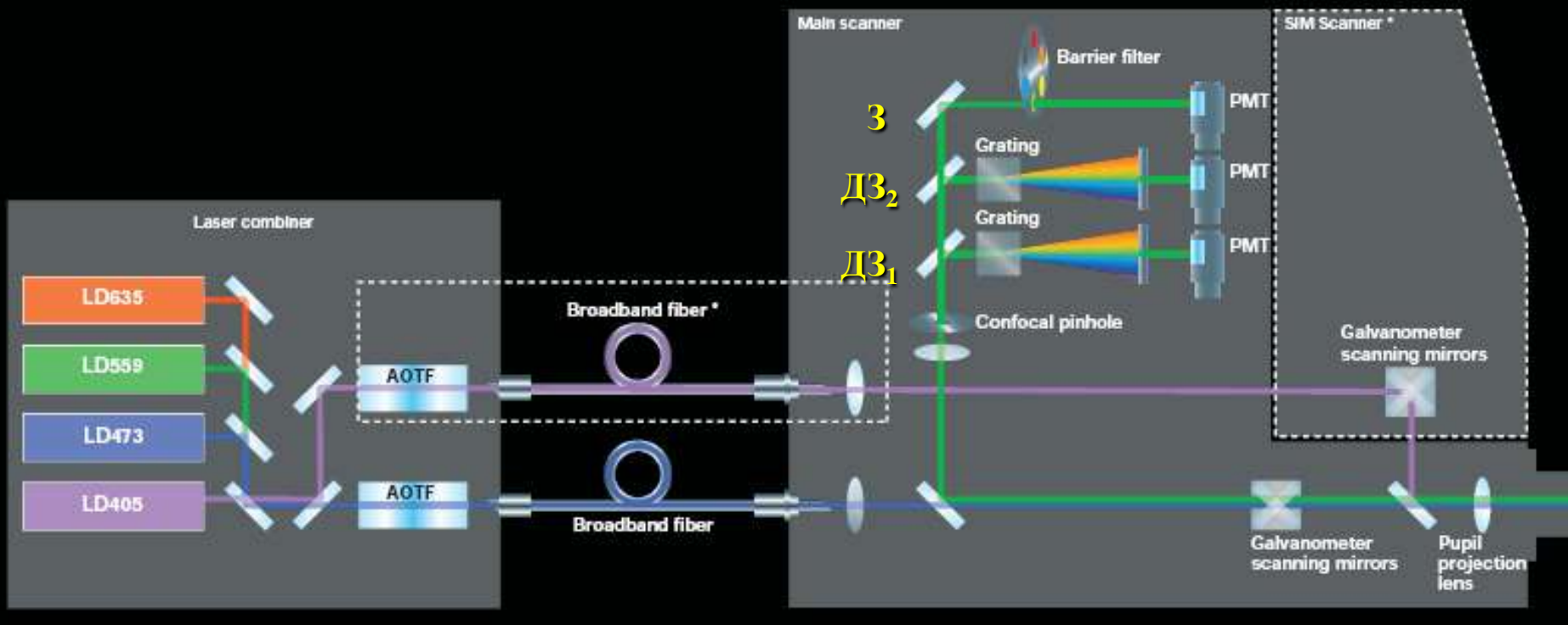


## Гексагональная конфокальная диафрагма



Дихроичные зеркала, работающие под небольшим углом падения света

# Конфокальный микроскоп Fluoview 1000 Olympus



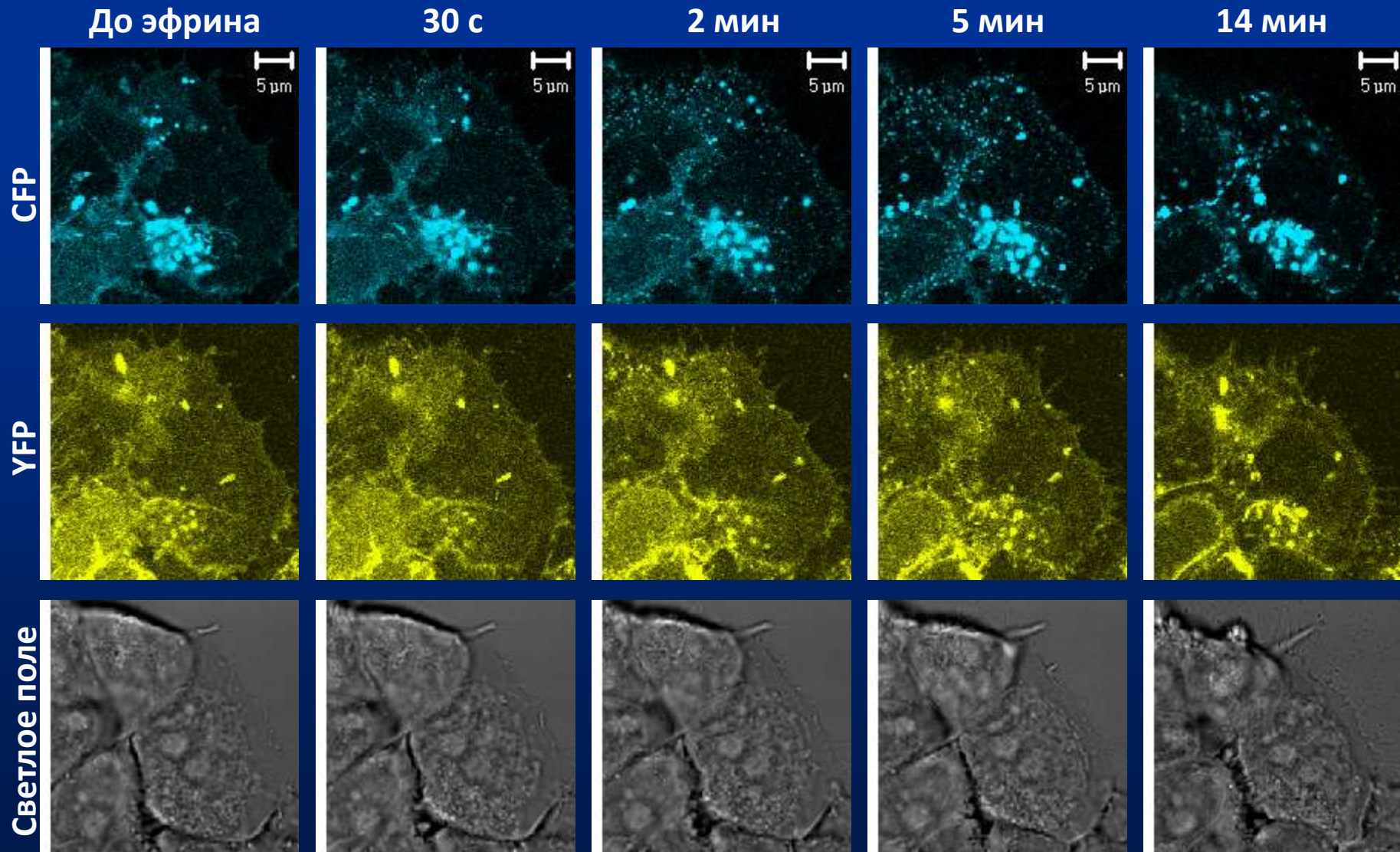
Tornado scanning



ROI (region of interest) scanning

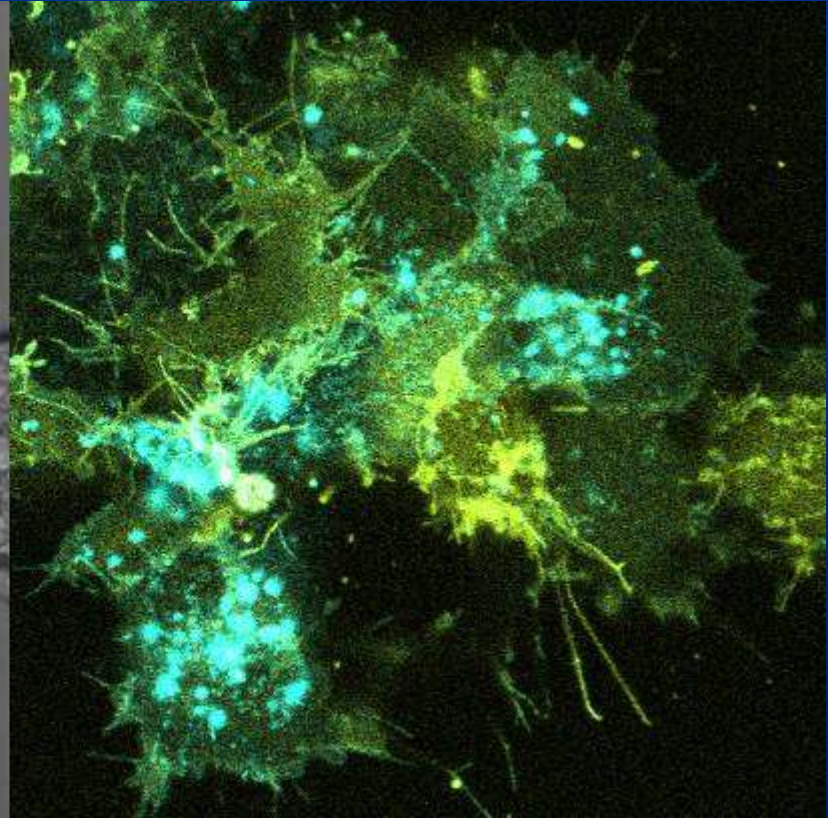
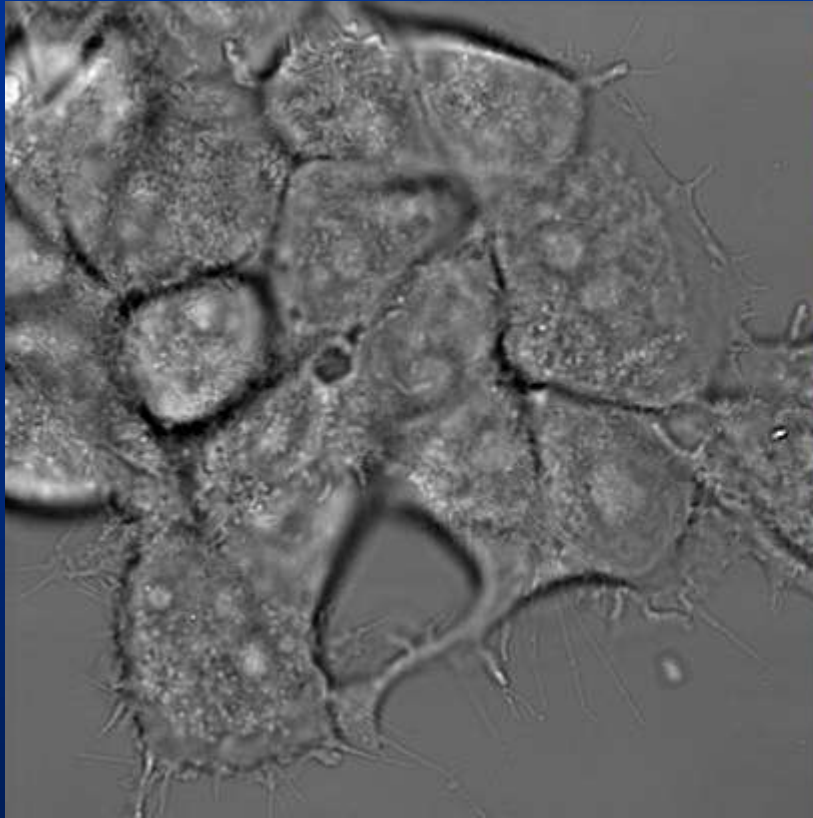


# Кластеризация EphA2-CFP и EphA2-YFP под действием ephrin-A3



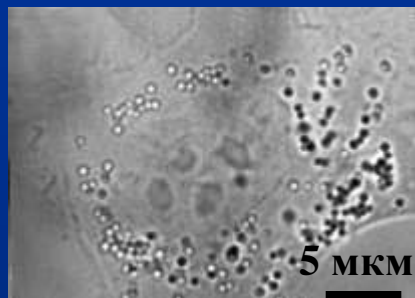
Прилегающую к субстрату (стеклу) мембрану клеток HEK293, экспрессирующих EphA2-CFP и EphA2-YFP, анализировали каждые 1,5 мин в течение 8 мин до и 17 мин после добавления димера эфрина А3 (1 мкг/мл)

# Кластеризация EphA2-CFP и EphA2-YFP под действием ephrin-A3

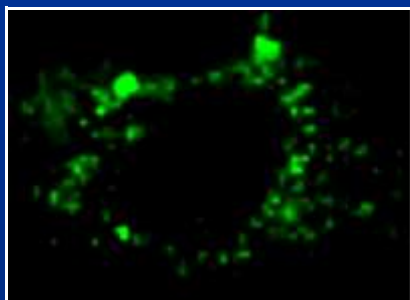


# Локализация родамин-меченного цитотоксина 3 из яда кобры *Naja kaouthia* (Rh-CT3Nk) в раковых клетках

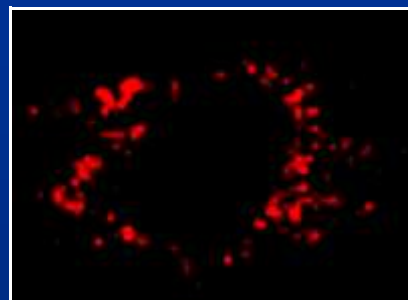
Живые клетки аденокарциномы легкого человека A549



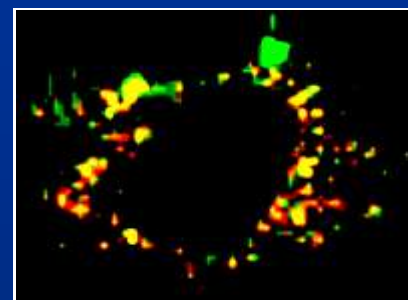
Видео изображение  
клетки



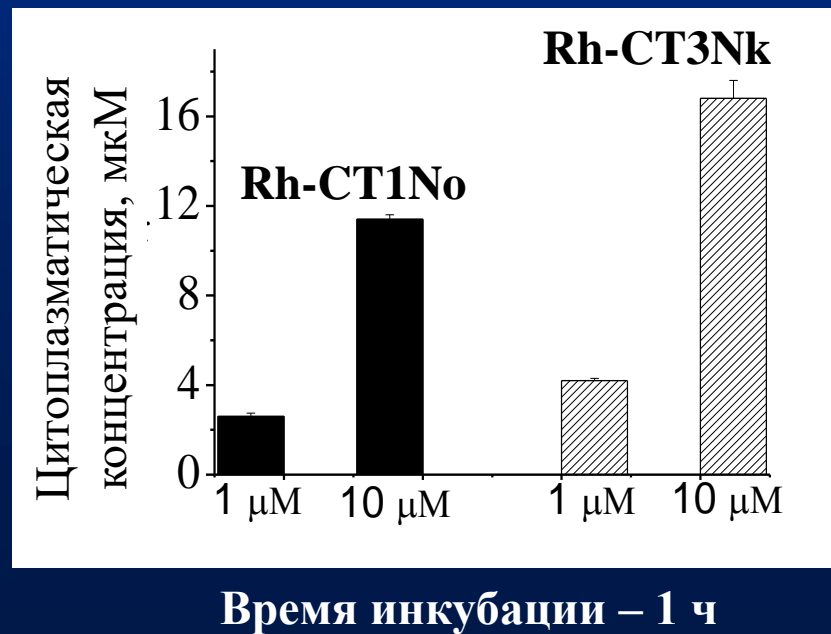
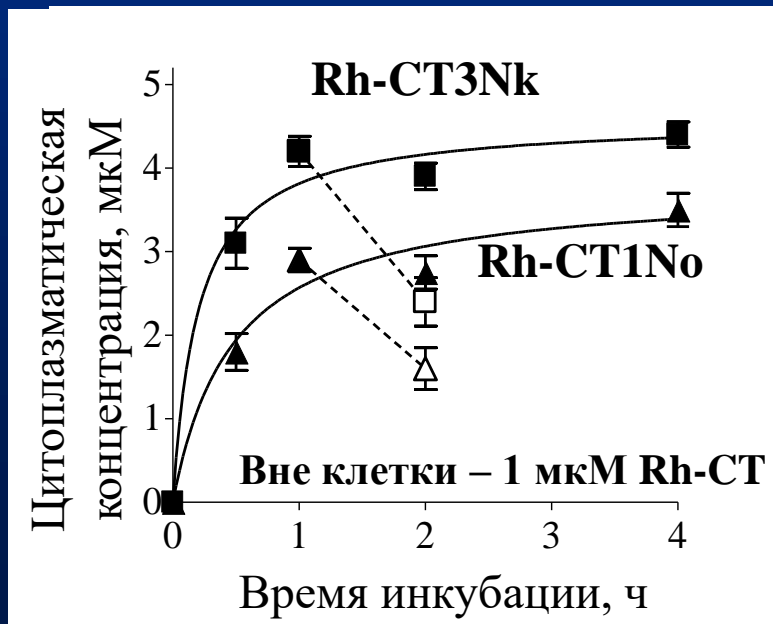
Rh-CT3Nk



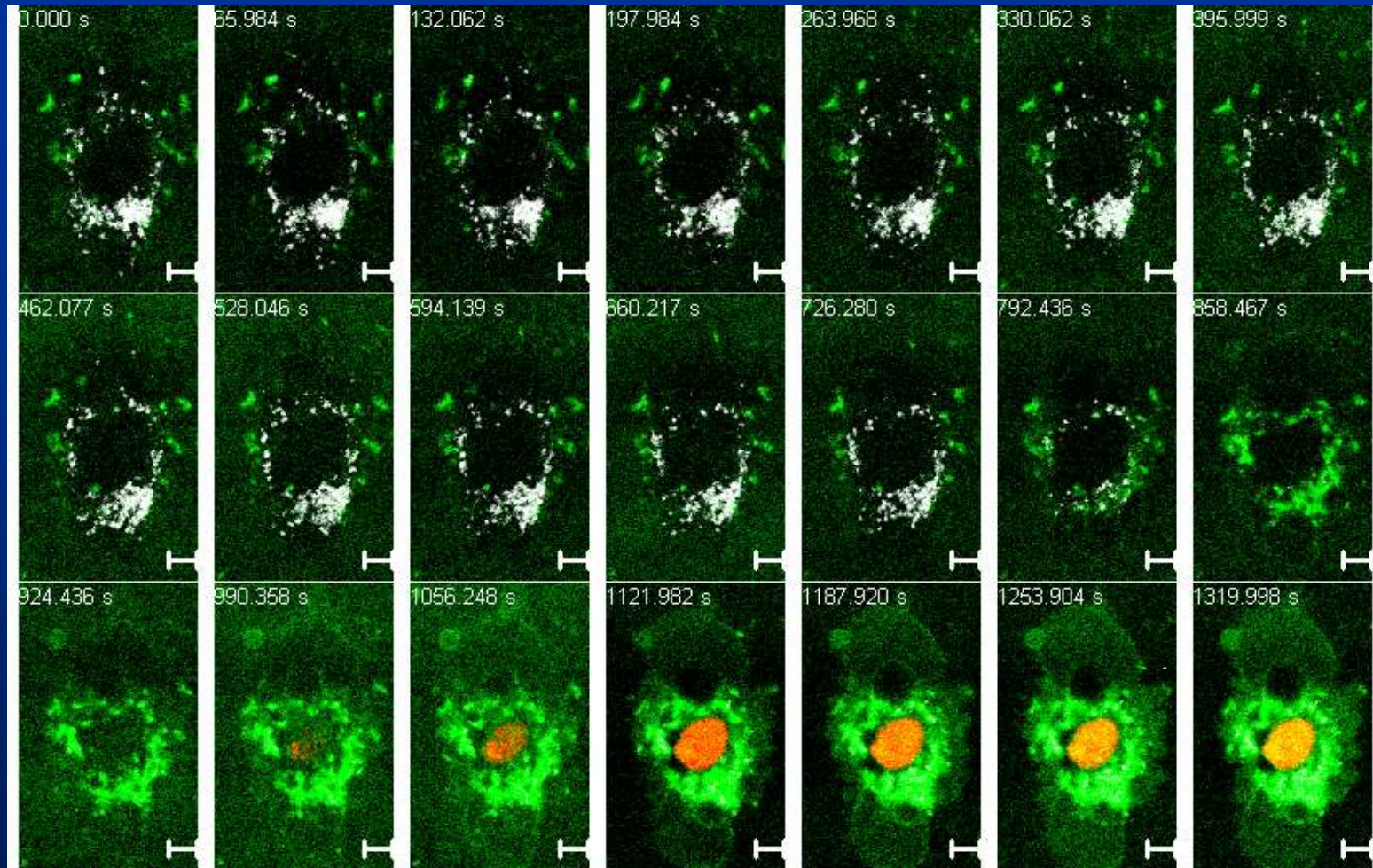
Лизосомы,  
Акридин оранжевый



Наложение  
изображений



# Перед гибелью клетки количество интактных лизосом уменьшается



Белый – лизосомы, окрашенные LysoTracker; **зеленый** – Rh-CT2No; **красный** – AIPcC8

## Механизм действия цитотоксинов из яда кобр меняется при высоких токсических концентрациях



Зеленый – Rh-CT2No

Синий – цитоплазматический индикатор интактной мембраны, BCECF

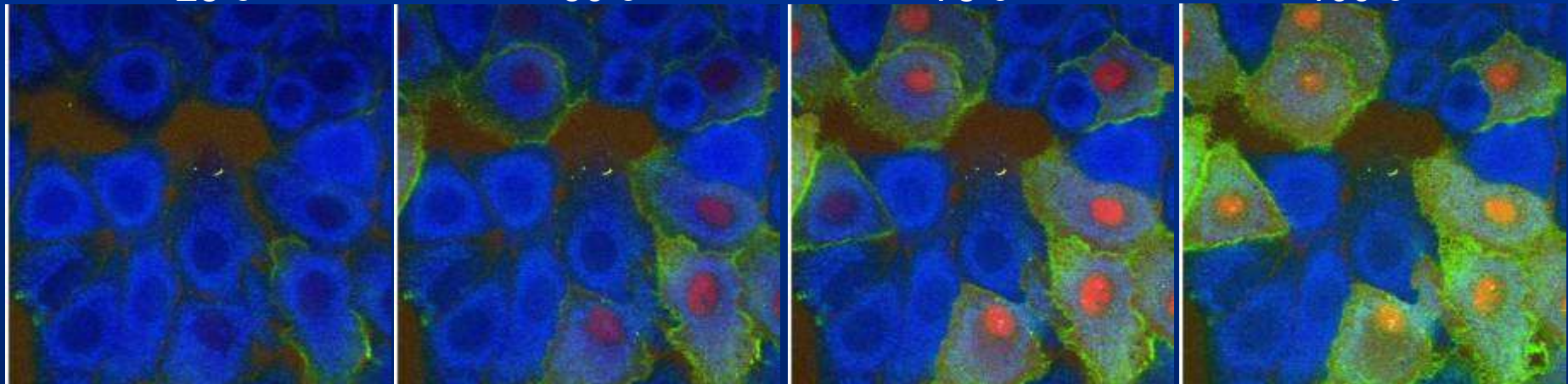
Красный – индикатор ядер мертвых клеток, AIPcS8

25 с

50 с

75 с

100 с

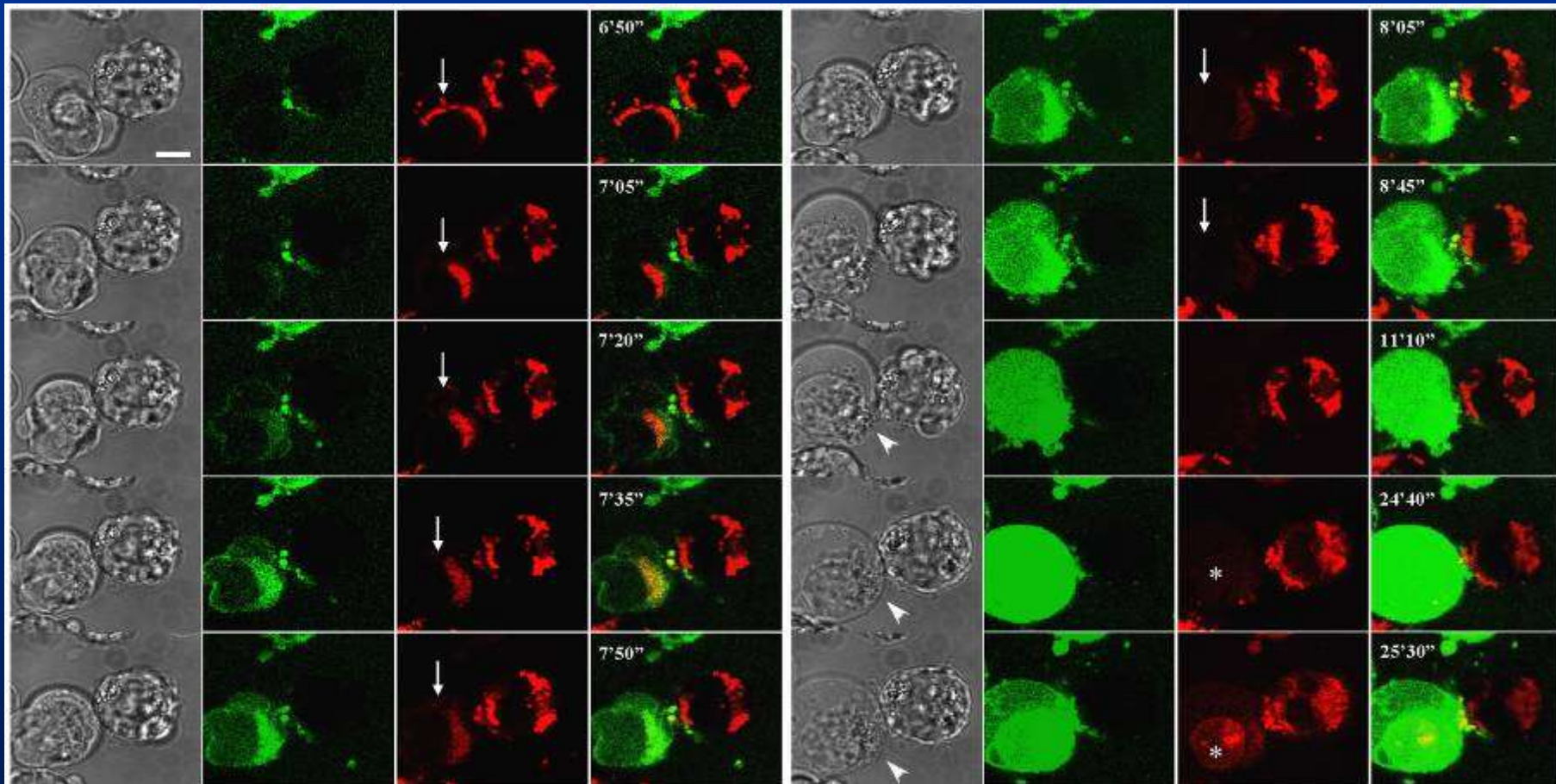


10 мкМ Rh-CT2No + 0,5 мкМ BCECF + 5 мкМ AIPcS8 (красный). Клетки A549

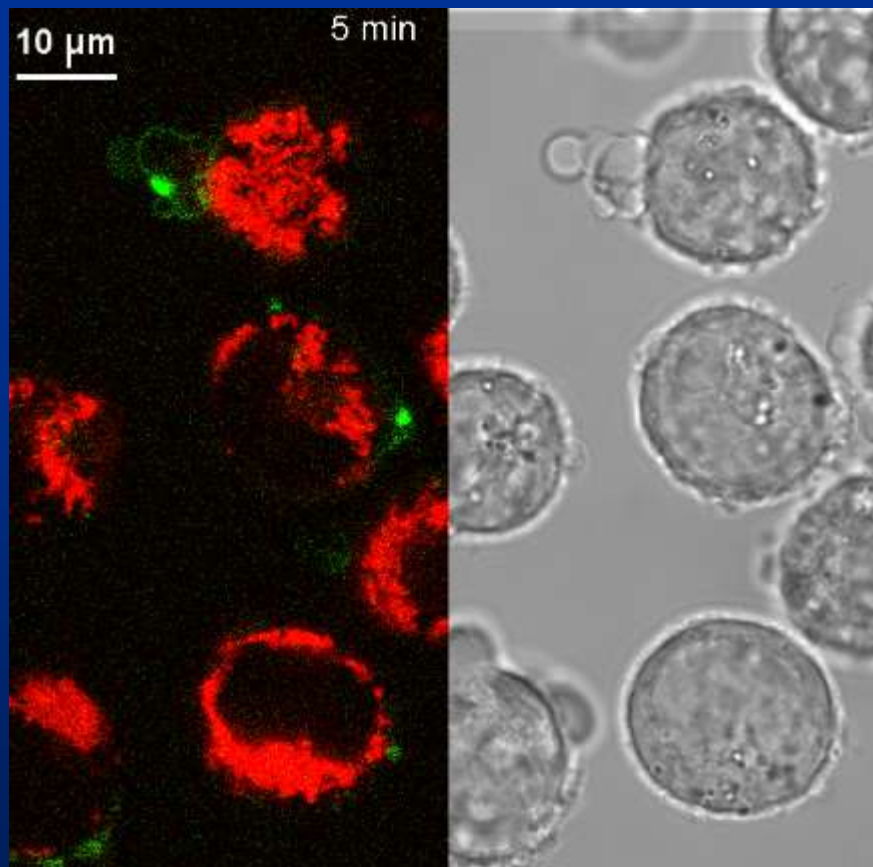
- При больших концентрациях цитотоксины связываются с плазматической мембраной
- Связывание обладает высокой положительной кооперативностью
- Резкое возрастание связывания приводит к пермиабиллизации мембраны и гибели клетки в течении 0,5-2 мин



# Падение потенциала митохондрий по мере накопления в них пептида латарцина Ltc2a



# Падение потенциала митохондрий в клетках K562 по мере накопления в них пептида латарцина Ltc1



**Зеленый** – флуоресцеин-меченный Ltc1; **красный** – Rh6G в митохондриях