

Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

Алексей Валерьевич Феофанов

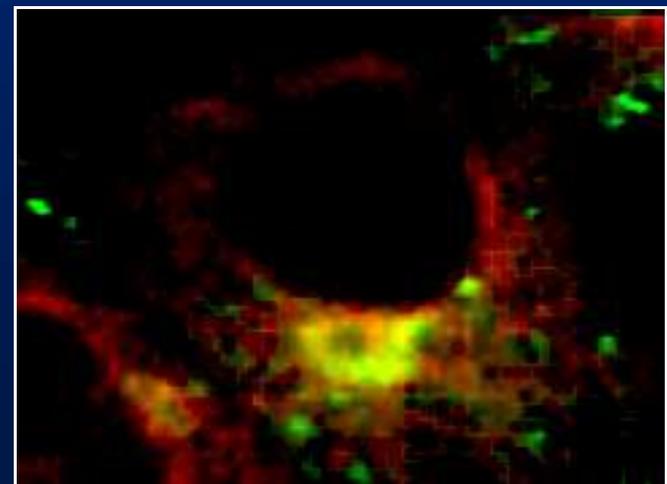
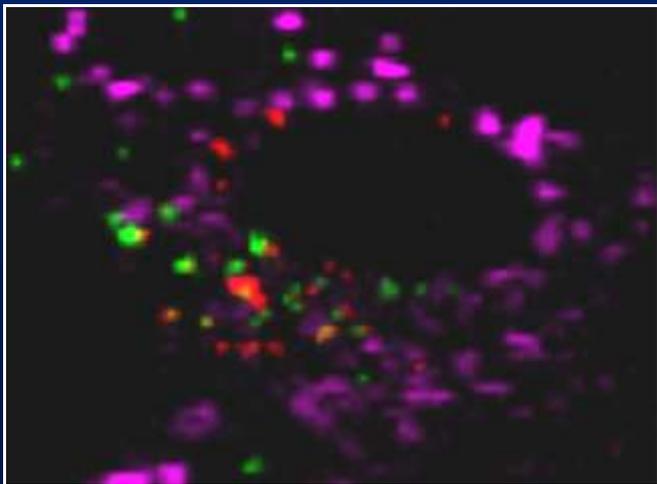
Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул*

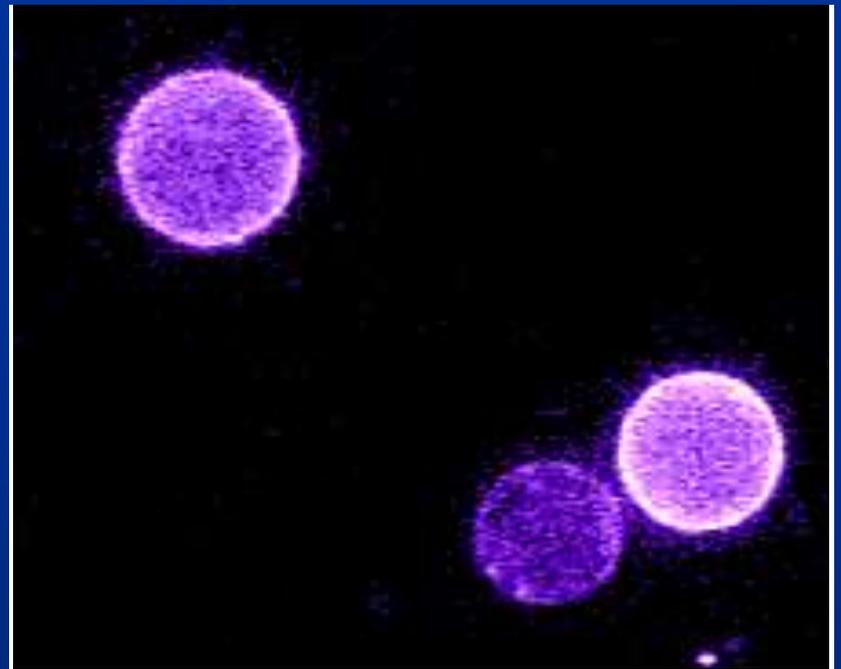
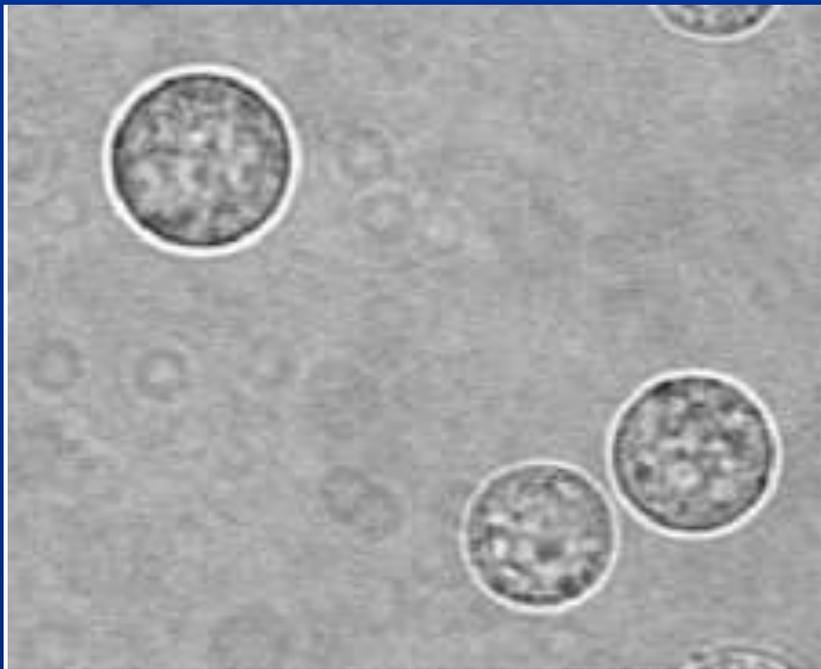
ИБХ РАН

Лекция № 4



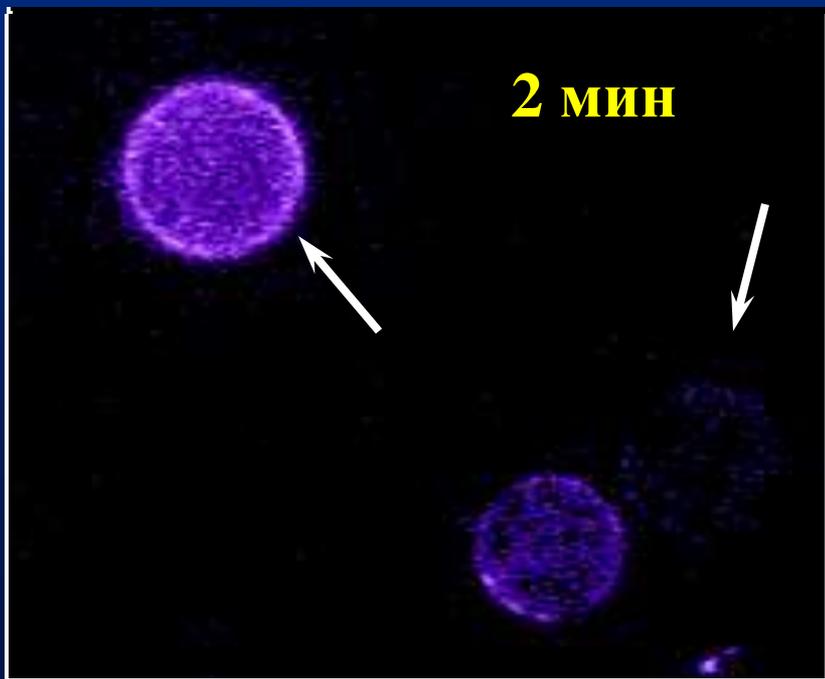
Метод FRAP (fluorescence recovery after photobleaching, или восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания)

- **основан на необратимом «выжигании» (светоиндуцированном обесцвечивании) флуорофоров в исследуемом микрообъеме образца с помощью светового потока большой мощности и последующем анализе кинетики восстановления флуоресценции в этом объеме за счет диффузии флуорофоров из соседних областей образца.**
- **позволяет изучать подвижность флуоресцентно-меченных молекул и их комплексов в живых клетках, оценивать скорость диффузии молекул на плазматической мембране, в цитоплазме и ядре клетки.**



Метод FRAP

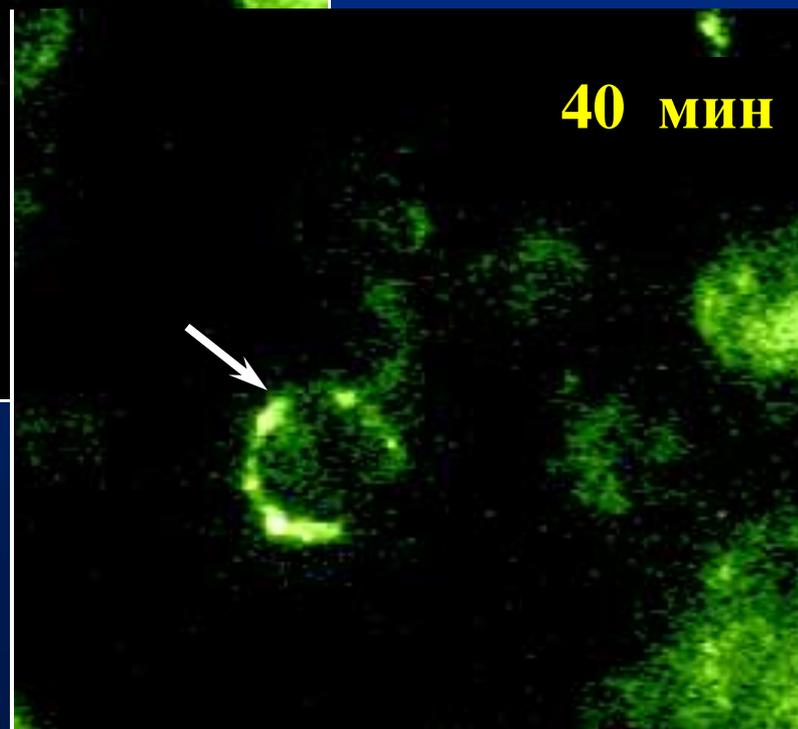
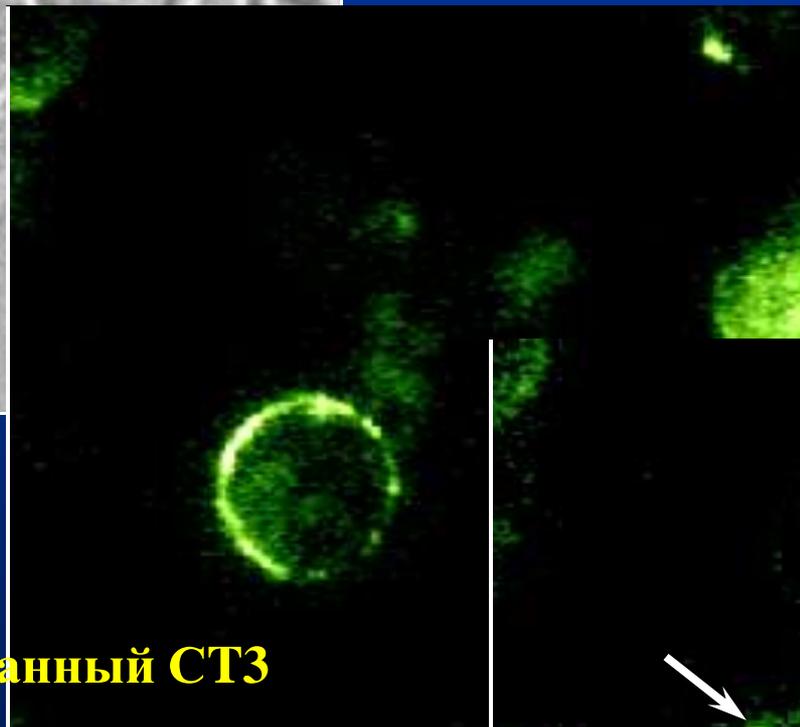
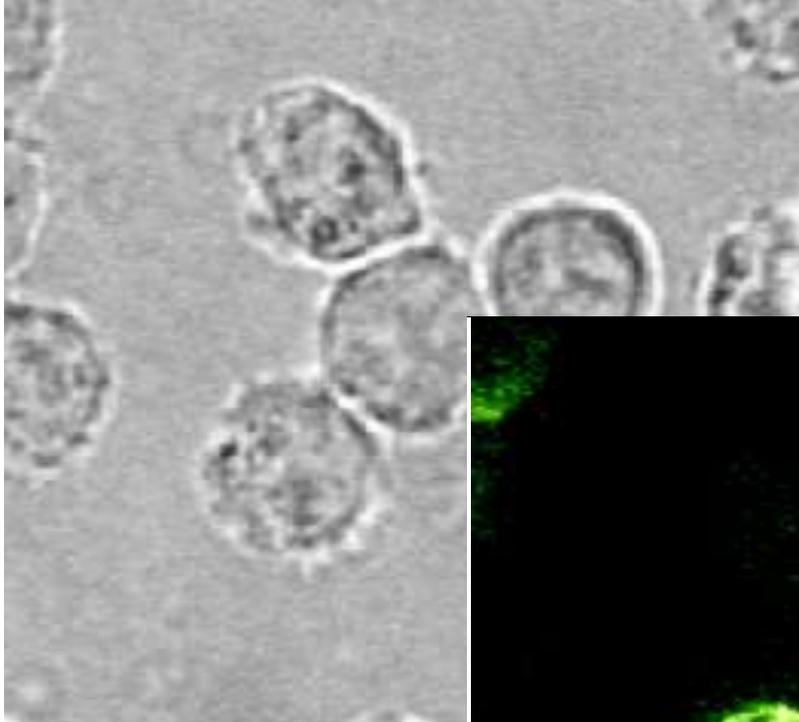
Оценка способности аннексина V к диффузии по мембране клеток WENI



Вывод:

комплекс аннексин-фосфатидилсерин способен к быстрой латеральной диффузии по мембране

FRAP: Особенности связывания СТЗ Naja Kaouthia на мембране клеток HL60



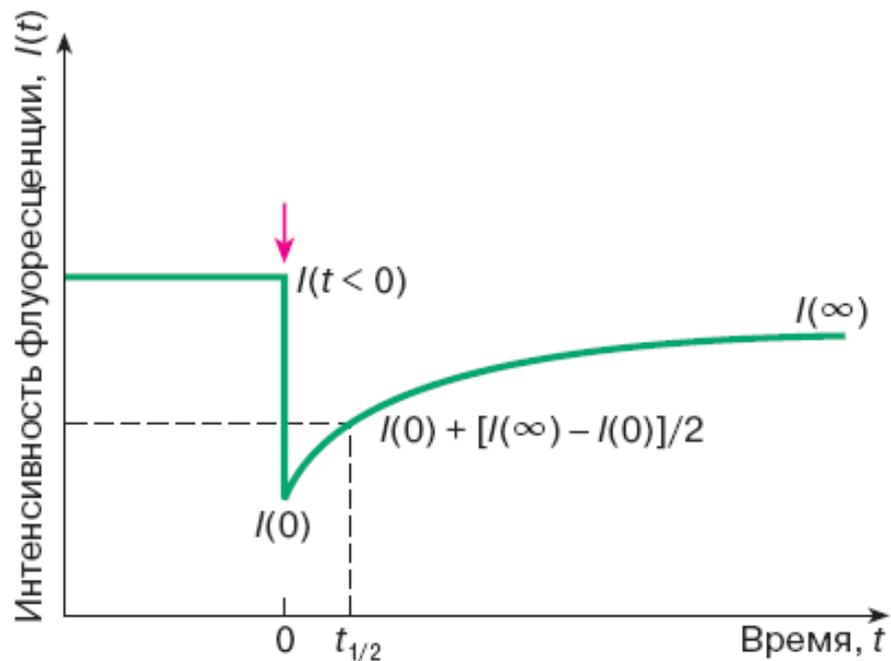
Выводы:

Мембранно-связанный СТЗ

не диссоциирует в течение 1 ч

жестко связан на мембране

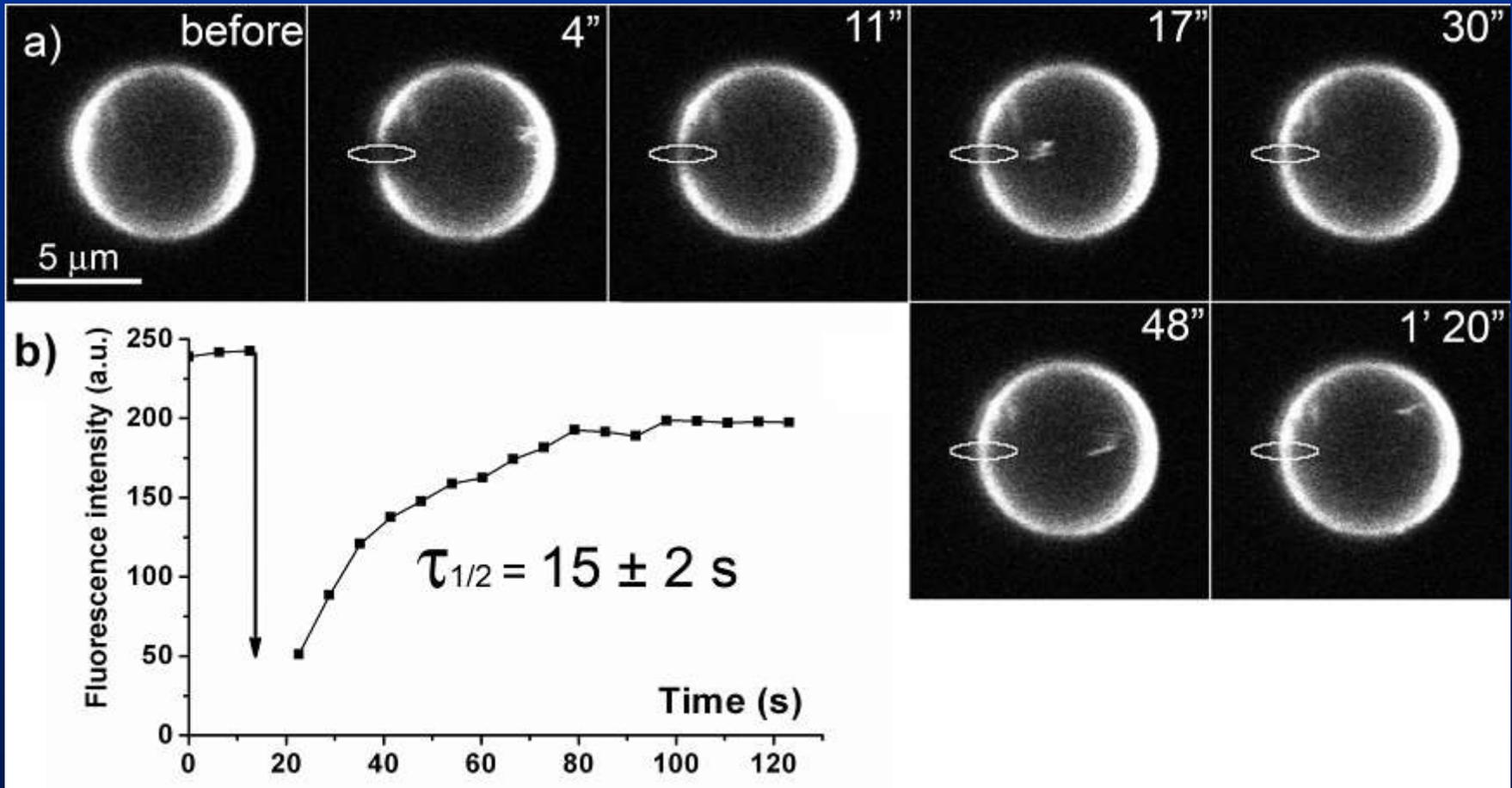
**неспособен к латеральной
диффузии**



$$D_L = \frac{w^2}{4t_{1/2}} \gamma_D,$$

где w – радиус отбеливаемого участка, а γ_D – рассчитываемая константа, зависящая от профиля луча и степени фотоотбеливания. Отсюда, зная время полувосстановления $t_{1/2}$, можно вычислить D_L и таким образом количественно охарактеризовать подвижность белков в мембране живой клетки.

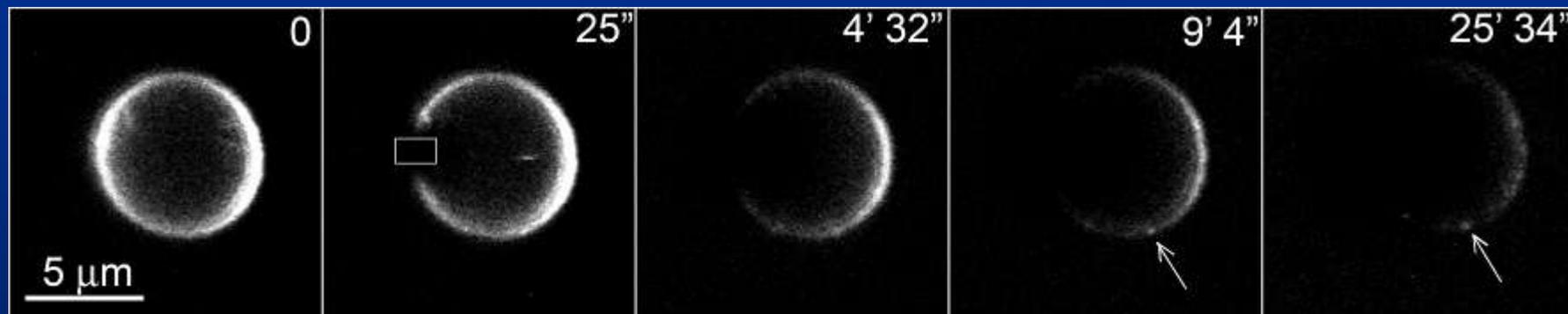
FRAP: исследование подвижности мембранолитического пептида латарцина Ltc1 на мембране эритроцита



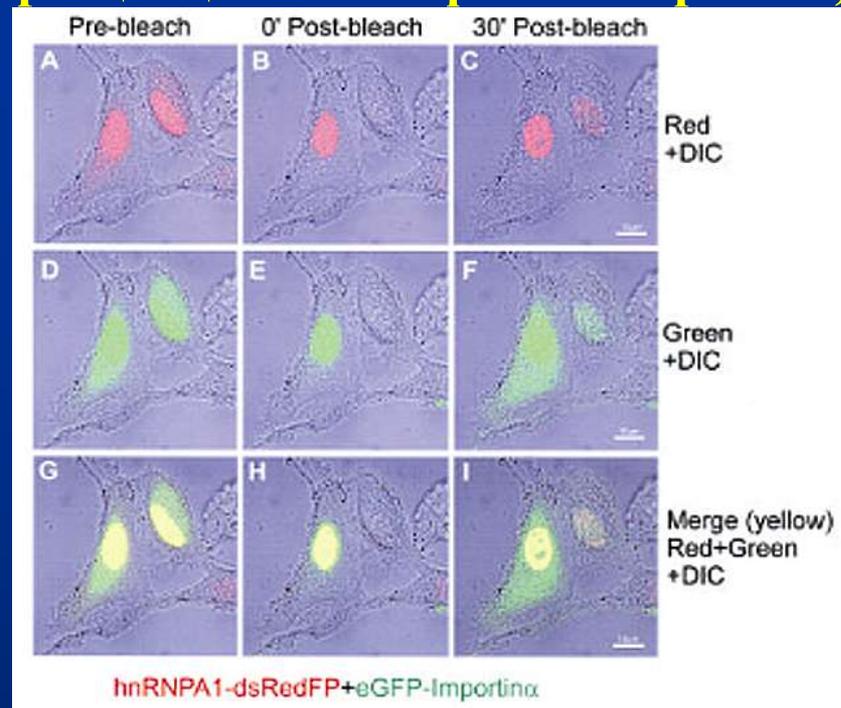
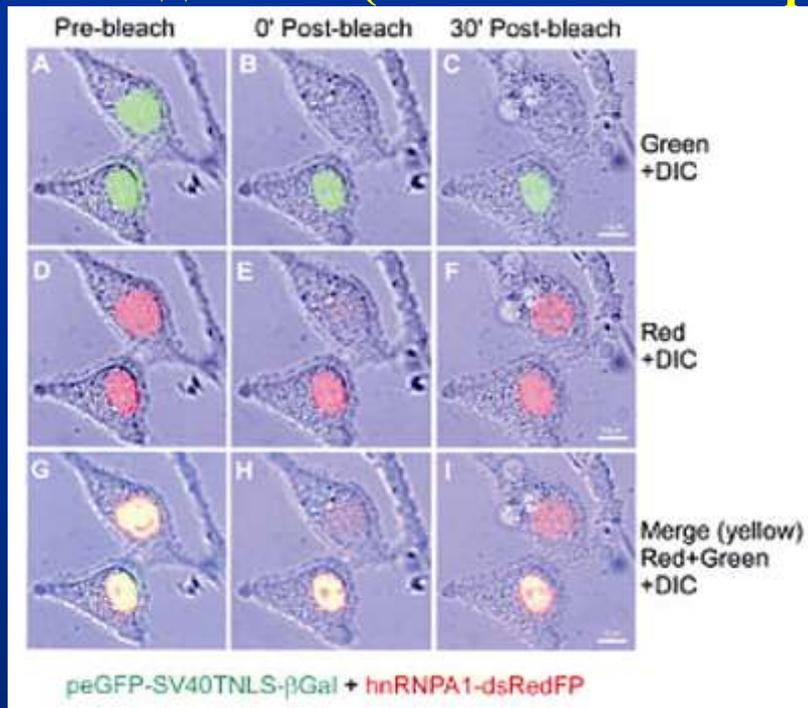
Метод FLIP (fluorescence loss in photobleaching, или потеря флуоресценции при фотообесцвечивании).

- основан на фотообесцвечивании флуорофоров в одной области образца и наблюдении за изменением флуоресценции в соседней области.**
- позволяет изучать подвижность флуоресцентно-меченных молекул и их комплексов в живых клетках, оценивать скорость диффузии молекул на плазматической мембране, в цитоплазме и ядре клетки**
- позволяет выявлять наличие и локализацию иммобилизованных флуоресцентно-меченных молекул и их комплексов в живых клетках.**

FLIP: выявление мембранолитического пептида латарцина Ltc1 иммобилизованного на мембране эритроцита



Метод FRAP (восстановление флуоресценции после фотовыгорания)



Описание эксперимента

1. трансфекция клеток соответствующими плазмидами химерных белков;
2. слияние клеток- две клетки имеют общую цитоплазму;
3. ингибирование дальнейшего синтеза белков циклогексимидом;
4. фотовыжигание флуорофоров обеих клеток за исключением донорного ядра (488 и 543 нм);
5. конфокальное сканирование: два конфокальных канала (зеленый и красный) + канал в проходящем свете с использованием метода DIC;

peGFP-SV40TNLS-βGal - химера; GFP-пептид с сигналом ядерной локализации- β-галактозидаза – из ядра не выходит

hnRNPA1-dsRedFP- химера; курсирующий (ядро-цитоплазма- ядро) hnRNPA1-белок и RedFP

eGFP-Importinα- исследуемая химера, GFP-импортин α.

С помощью методов FRAP и FLIP решаются следующие задачи:

- **исследование способности тех или иных белков или других флуоресцентно меченых молекул свободно перемещаться в пределах цитоплазмы, ядра, мембраны клетки;**
- **изучение направления транспорта белков между органоидами клетки;**
- **изменение подвижности белков или других флуоресцентно меченых молекул в результате лиганд-рецепторных взаимодействий;**
- **выявление образования комплексов флуоресцентно-меченных молекул с немечеными по изменению скорости диффузии первых.**

Преимущество конфокальной микроскопии - позволяет ограничить и контролировать объем образца, из которого регистрируется сигнал, что повышает точность измерений и расчетов с использованием методов FRAP и FLIP.

Программные модули для экспериментов FRAP и FLIP

- Измеряется конфокальное изображение, интересующей области образца. Курсорами рисуются области, в которых необходимо фотообесцветить флуорофоры. Форма областей произвольна. Число областей от одной до нескольких. Расположение - произвольно в пределах поля зрения объектива.**
- Выбирается режим обесцвечивания: длина волны лазера, мощность лазера, длительность облучения и количество повторных облучений выбранных зон.**
- Выбираются условия сканирования в режиме измерения изображений: число повторных измерений до и после фотообесцвечивания и временные промежутки между ними.**
- Используя серию записанных изображений, строят зависимости изменения интенсивности флуоресценции от времени в любой области изображения и проводят их математический анализ.**

Метод FRET – fluorescence resonance energy transfer флуоресцентный резонансный перенос энергии

в отсутствие переноса



в случае переноса



Описывается теорией Фёрстера на основе представлений о взаимодействии D^* и A по типу диполь – индуцированный диполь.

Вероятность переноса энергии W зависит от:

(i) ориентации дипольных моментов излучения донора и поглощения акцептора

Диполи перпендикулярны – переноса нет. Направление моментов совпадает с направлением радиус-вектора, соединяющего D^ и A – перенос энергии максимален.*

(ii) степени перекрытия спектра флуоресценции донора и поглощения акцептора

(iii) расстояния R между D^* и A

$$W(R) = 1 / (1 + (R/R_0)^6),$$

где R_0 – «радиус Фёрстера», расстояние, соответствующее $W=0,5$.

$$R_0 \approx 2-5 \text{ нм.}$$

Метод FRET - флуоресцентный резонансный перенос энергии

Применение:

разработка специализированных сенсоров;
выявление связывания двух разных молекул в клетках на расстояниях до 10 нм – «полное» совпадение внутриклеточной локализации.

Измерение FRET на клетках с применением конфокального лазерного сканирующего микроскопа:

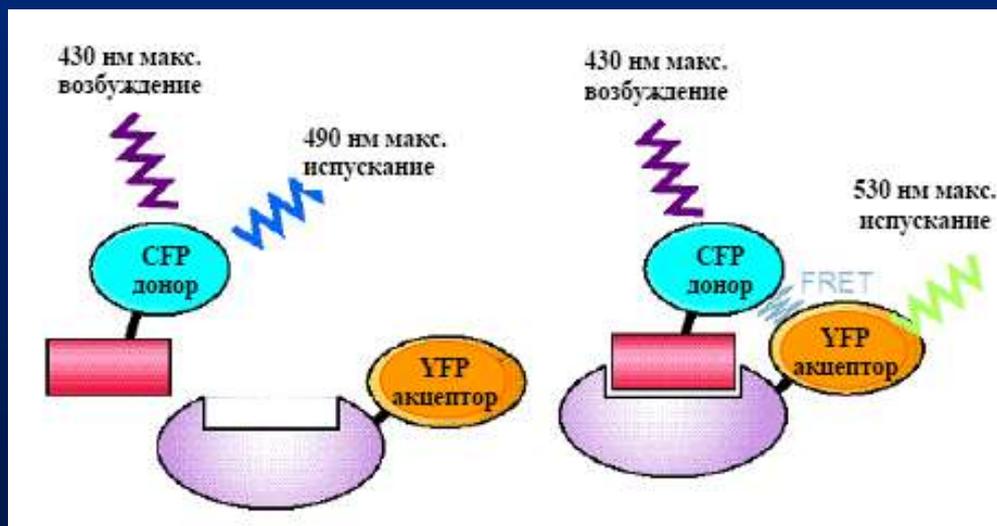
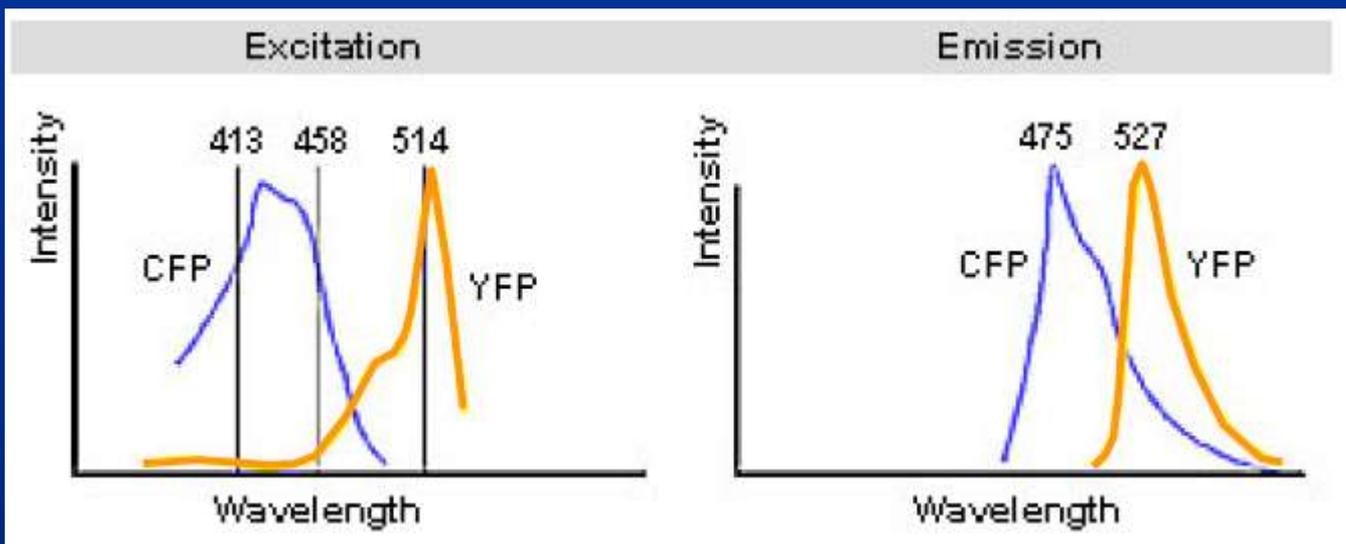
измерение FRET с помощью фильтров

используются три конфигурации фильтров для детекции сигнала донора, сигнала акцептора и FRET- сигнала (возбуждение донора, эмиссия акцептора)

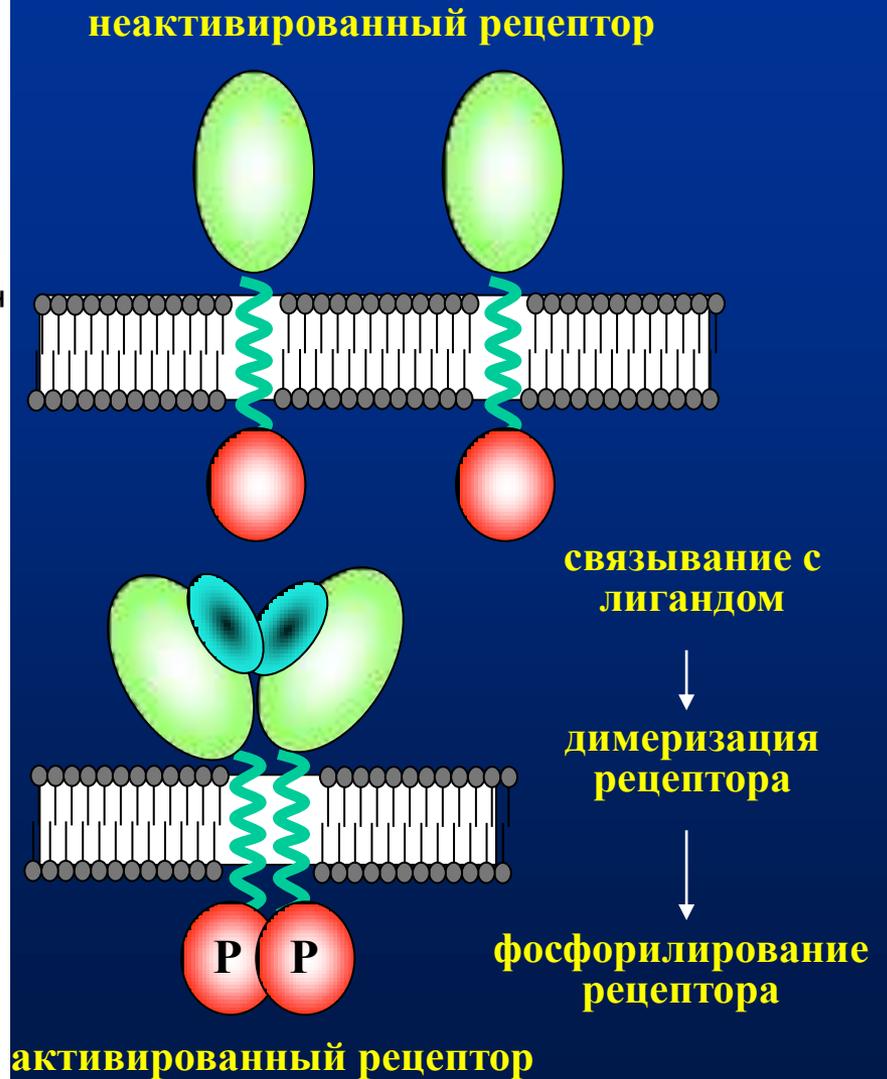
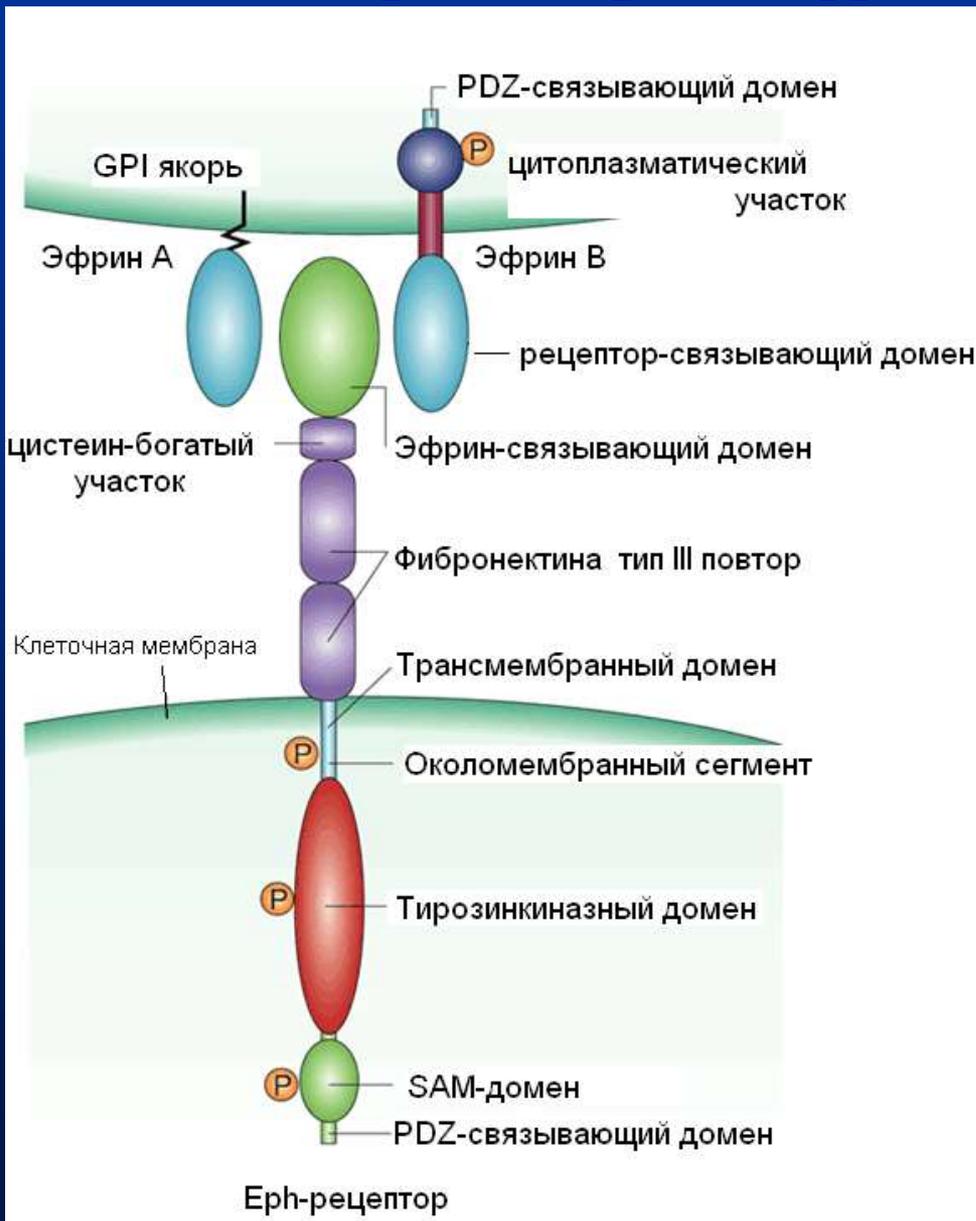
измерение FRET с помощью фотовыжигания акцептора

сравниваются сигналы при возбуждении донора и детекции эмиссии акцептора до и после фотовыжигания акцептора.

Метод FRET: флуоресцентный резонансный перенос энергии между CFP и YFP



Система на основе клеток эукариот с тирозинкиназными рецепторами эфринов (Eph-рецепторы)



Образование димеров EphA2-CFP/EphA2-YFP в присутствии эфрина-А3. Метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET)

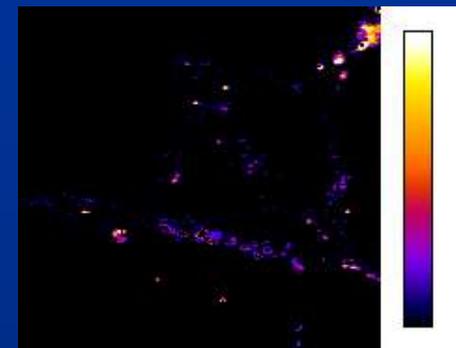
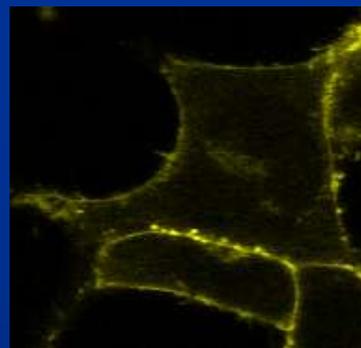
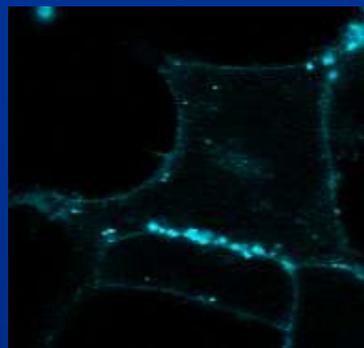
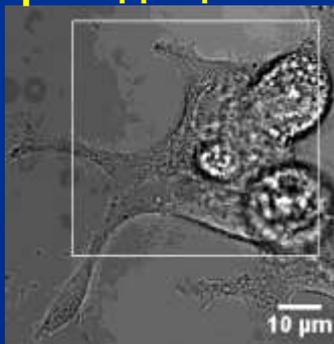
Проходящий свет

CFP

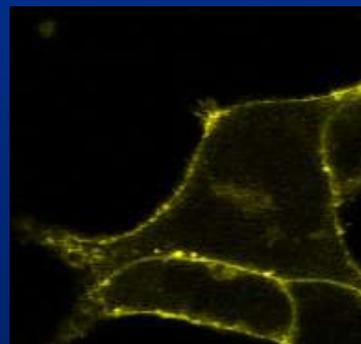
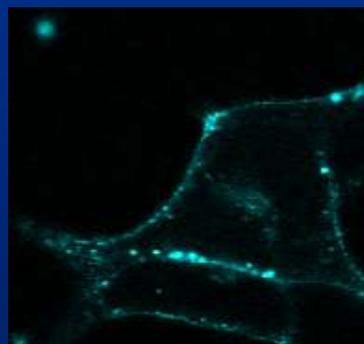
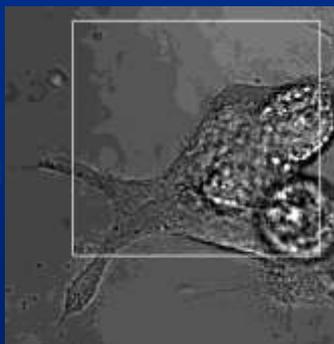
YFP

FRET

Без лиганда

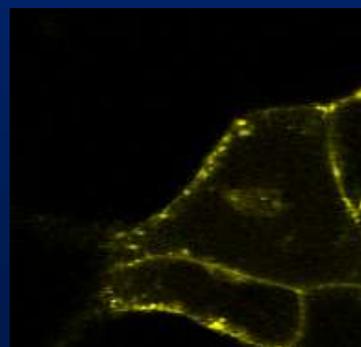
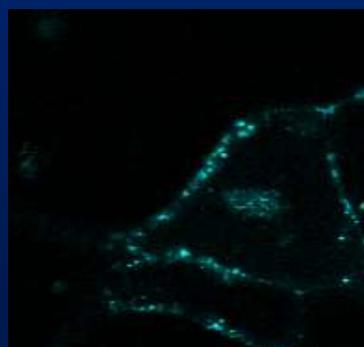
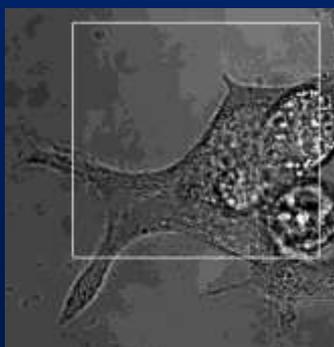


+ эфрин-А3
через 7 мин



Усиление сигнала
FRET на мембране

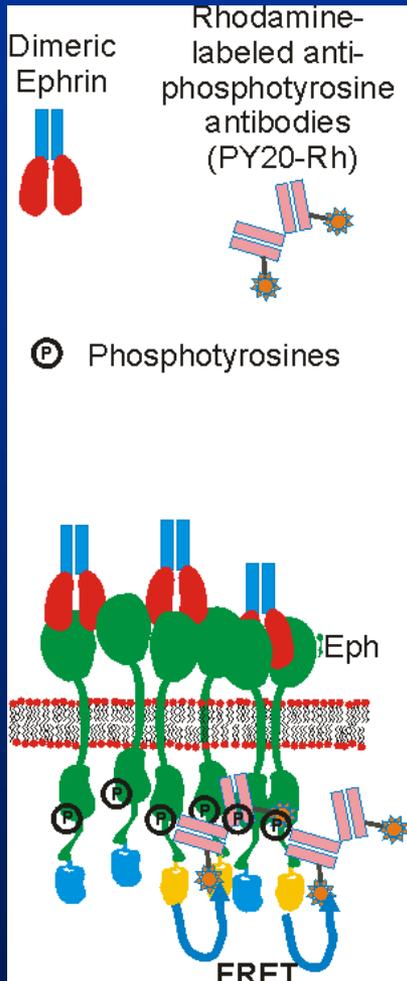
+ эфрин-А3
через 30 мин



FRET в ранних
примембранных
везикулах

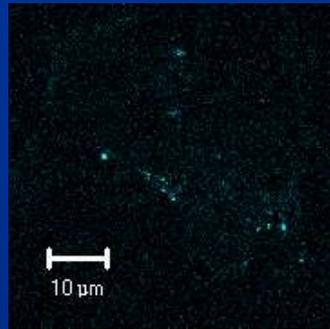
Распределение рецепторов в экваториальном оптическом сечении клеток HEK293, экспрессирующих EphA2-CFP и EphA2-YFP, до и после внесения лиганда Ephrin-A3 (4 мкг/мл).
Панель FRET: усиленная флуоресценция YFP при возбуждении CFP.

Регистрация фосфорилирования EphA2 после стимуляции лигандом

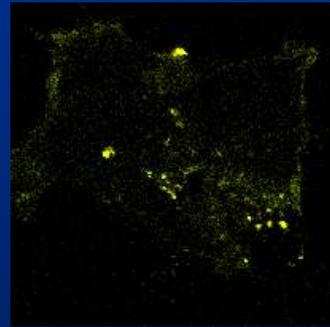


Без стимуляции
+PY20-Rh

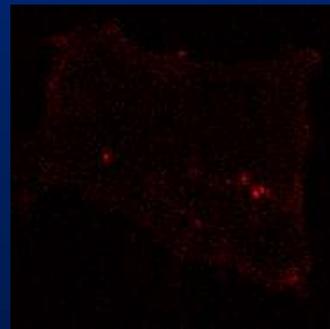
CFP



YFP

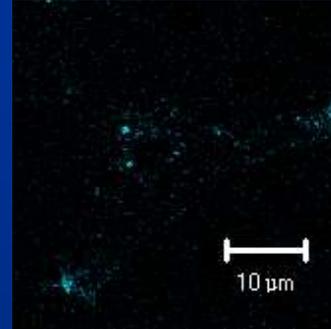


PY20-Rh

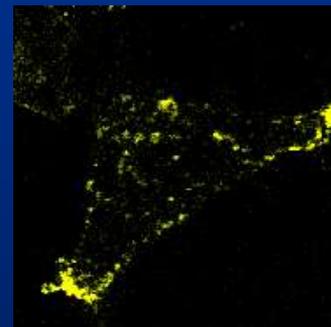


+ 4 мкг/мл Ephrin-A3 × 5 мин
-PY20-Rh

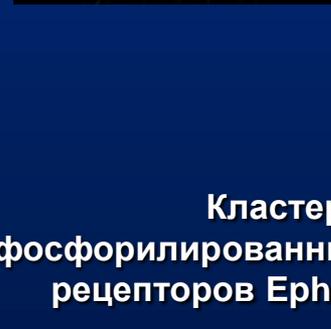
CFP



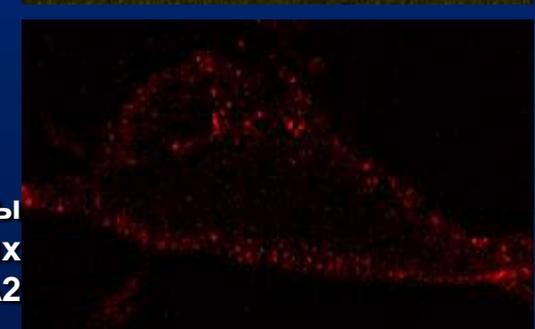
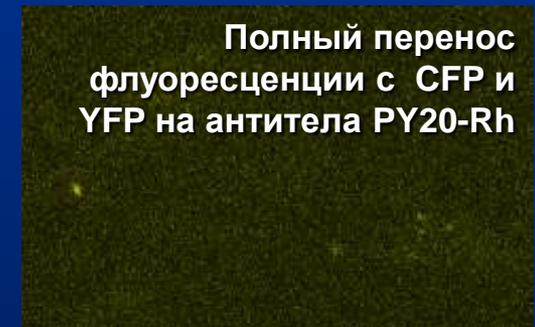
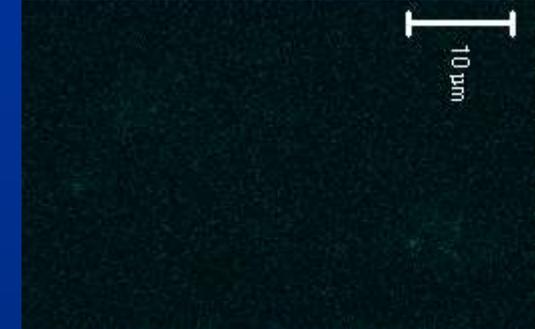
YFP



PY20-Rh



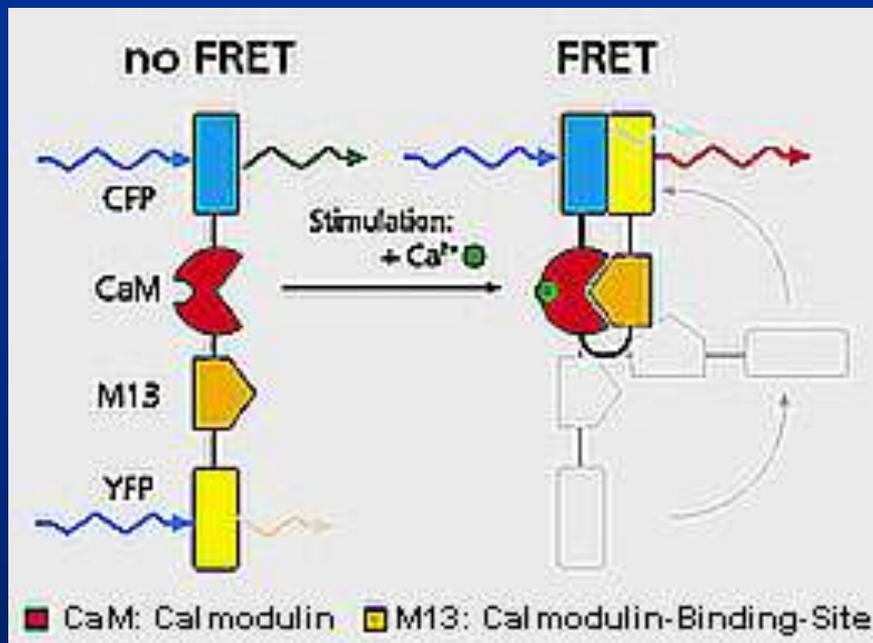
Кластеры
фосфорилированных
рецепторов EphA2



Полный перенос
флуоресценции с CFP и
YFP на антитела PY20-Rh

Клетки HEK293 с EphA2-CFP и EphA2-YFP фиксированы, пермеабелизованы и окрашены родамин-мечеными антителами на фосфотирозин (PY20-Rh) до и через 5 мин после стимуляции лигандом эфрин-А3 (4 мкг/мл). Изображения получены от базальной мембраны клеток.

Метод FRET: желтый хамелеон 2 (YC2) - внутренний Ca^{2+} - сенсор реагирует на концентрацию кальция в окружающей среде



CaM- кальмодулин

белок M13 - центр связывания кальмодулина

A. Miyawaki, RIKEN, Wako, Japan

Клетки могут быть трансфицированы с YC2 и будут синтезировать Ca^{2+} - сенсор