

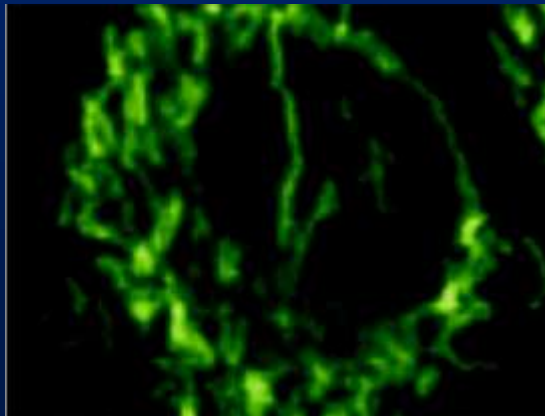
Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

Алексей Валерьевич Феофанов

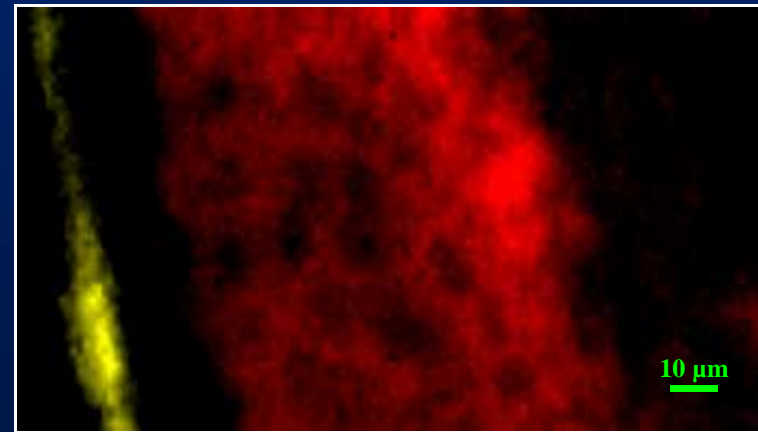
Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН*



Лекция № 5



Принцип многофотонного возбуждения флуоресценции

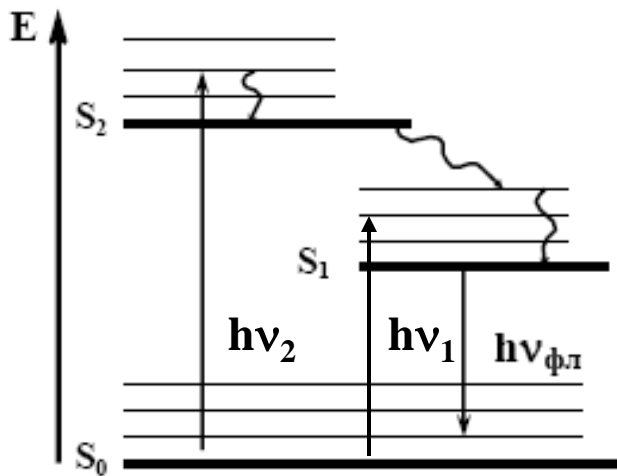
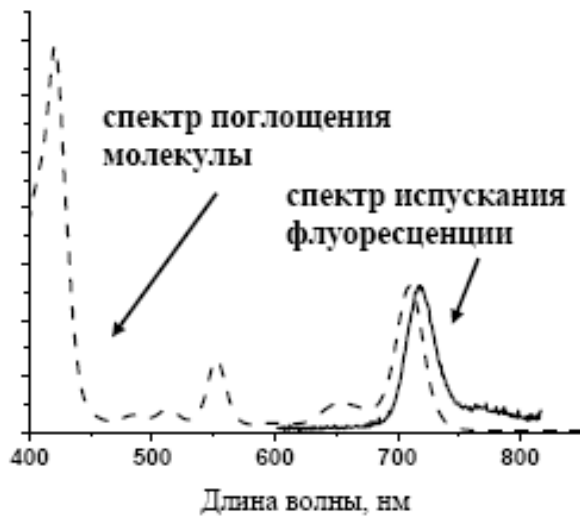
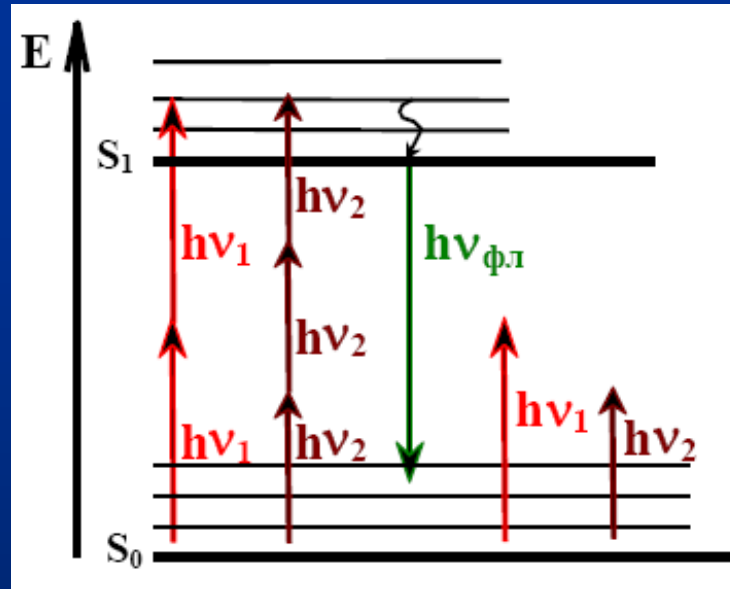


Диаграмма Яблонского, поясняющая эффект флуоресценции



Интенсивность флуоресценции при двухфотонном возбуждении (I_{2em})

$$I_{2em} \propto W^2 \times \sigma_2 \times A^4 / (\lambda^2 \times \nu \times \tau_{им}),$$

где W – средняя мощность лазера;

σ_2 сечение двухфотонного поглощения;

A - числовая апертура объектива;

λ - длина волны лазера;

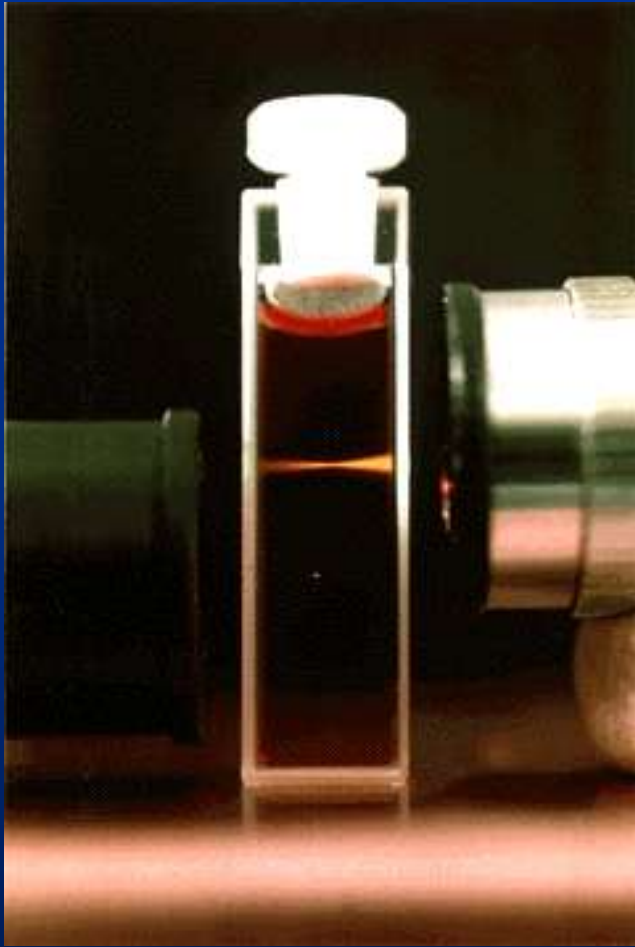
ν - частота следования импульсов;

$\tau_{им}$ длительность импульса

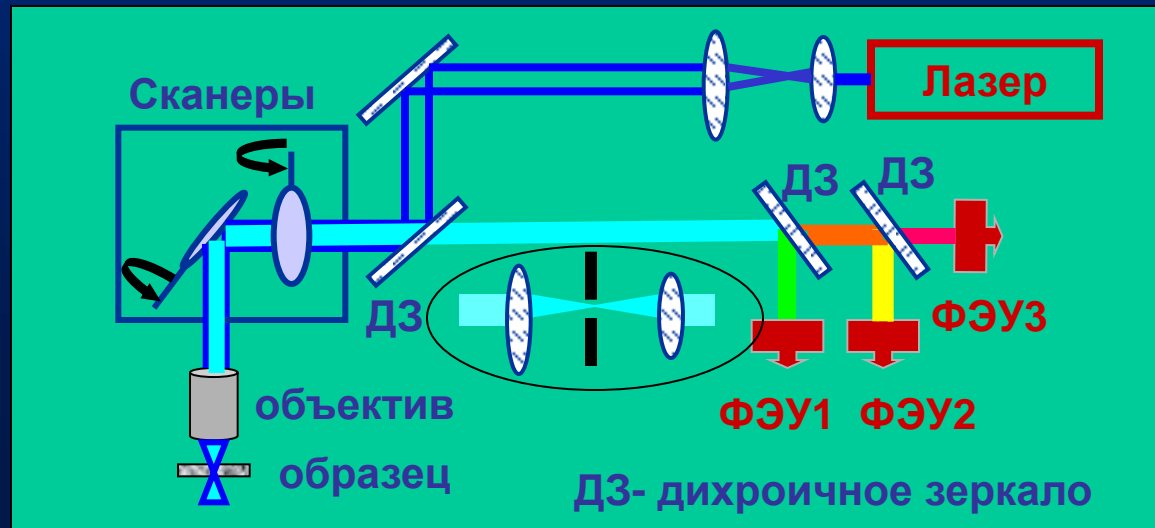
При трехфотонном возбуждении

$$I_{3em} \propto W^3$$

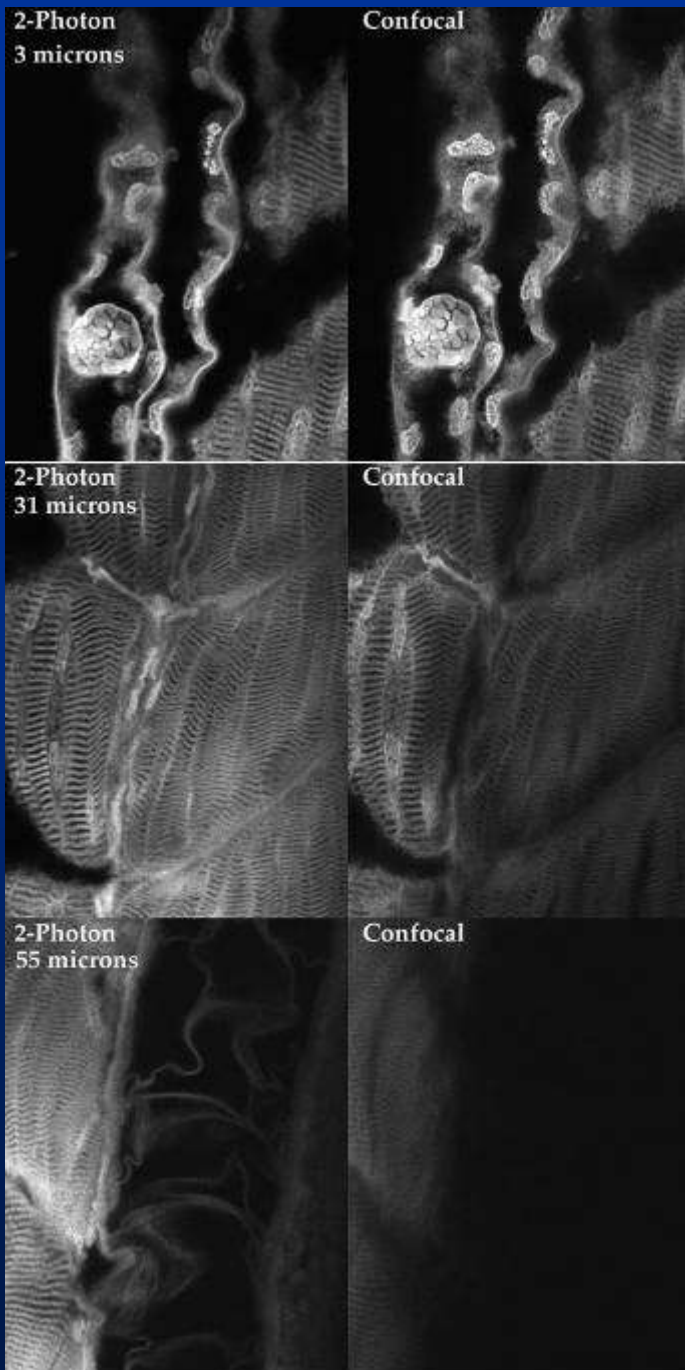
Преимущества двухфотонной микроскопии (ДФЛСМ)



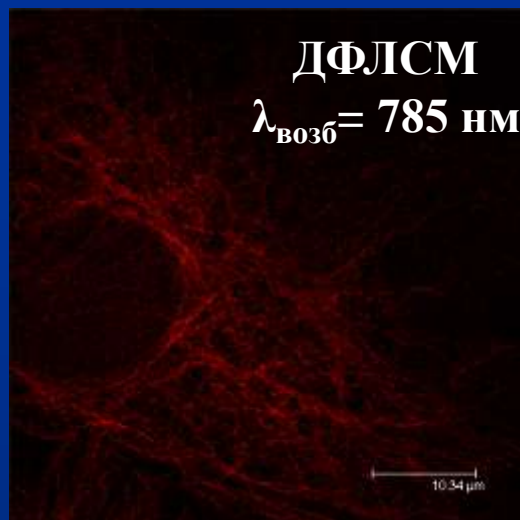
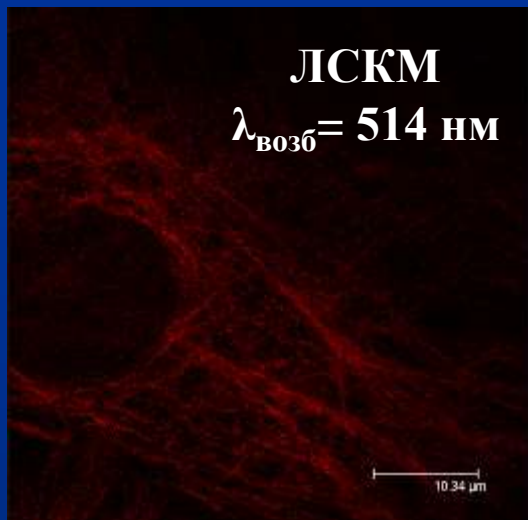
- Фотоиндуцированное повреждение образца и фотообесцвечивание флуорофора вне фокального объема сведены к минимуму
- Флуоресценция излучается только из фокального объема.
Упрощается оптическая схема прибора- нет необходимости в конфокальной диафрагме и ее настройке



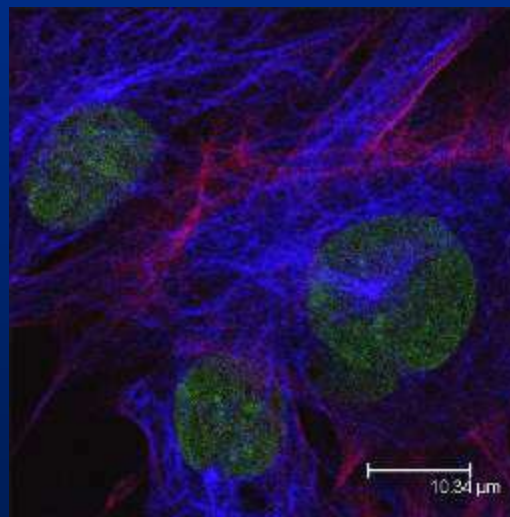
Преимущества двухфотонной микроскопии (ДФЛСМ)



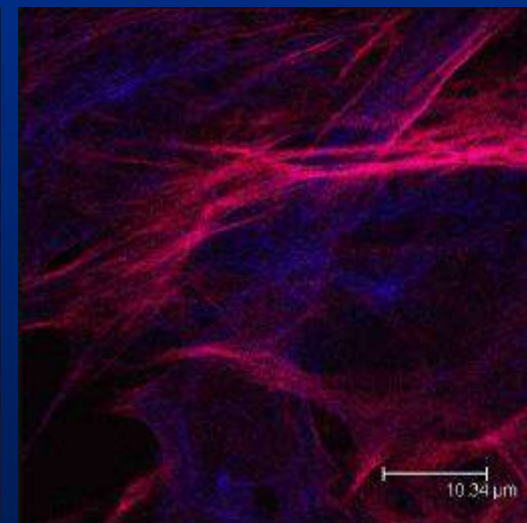
- Упрощается подавление упругого светорассеяния - длина волны лазера вынесена далеко за область эмиссии флуоресценции
- ДФЛСМ упрощает исследование толстых светорассеивающих и поглощающих образцов, обеспечивает субмикронное разрешение в изображениях, измеряемых с глубины образца в несколько сотен микрон.



**Спектр двухфотонного
 возбуждения
 флуоресценции красителей
 значительно шире,
 чем однофотонного**



**Актин, тубулин, ядро
 ДФЛСМ**
 $\lambda_{\text{возб}} = 785 \text{ нм}$



**Актин, тубулин
 ЛСКМ**
 $\lambda_{\text{возб}} = 514 \text{ нм}, 488 \text{ нм}$

Применения ДФЛСМ

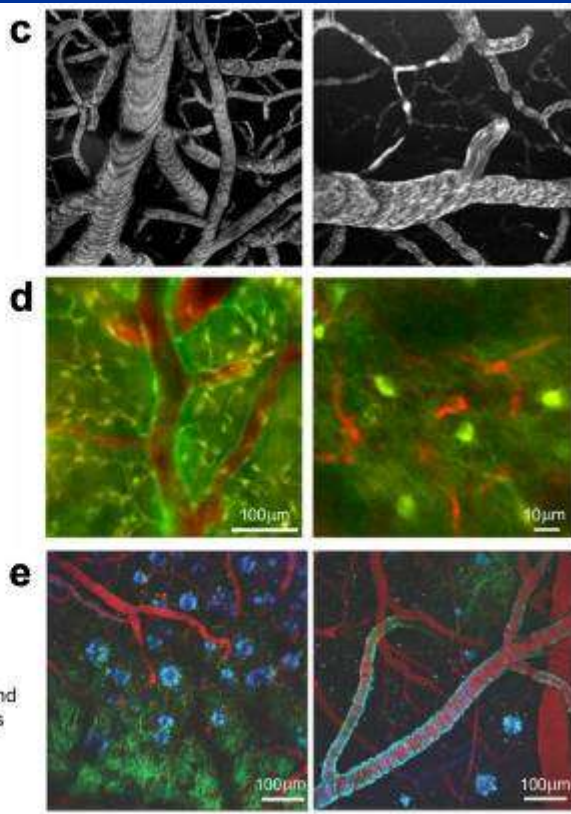
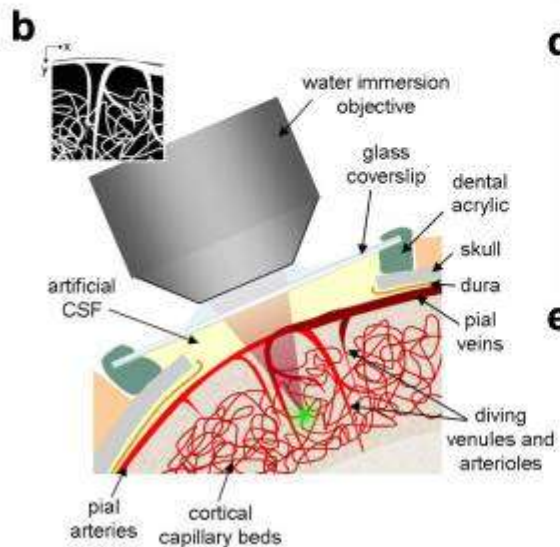
Анализ дву- и трехмерного распределения исследуемых флуоресцирующих молекул в глубоких слоях биологических объектов без нарушения их целостности и жизнеспособности.

Проведение исследований в динамике.

Изучение изменений концентрации в клетках свободных ионов кальция или магния с использованием флуоресцентных сенсоров-ионофоров, поглощающих свет в УФ диапазоне (350-380 нм).

Характерные примеры- исследования белков, тканей и органов в живых трансгенных организмах (эмбрионы, зародыши, животные) с использованием GFP-технологий.

Elizabeth Hillman
(Columbia University,
New York)



ДФЛСМ функционирования мозга *in vivo*

с) Система сосудов, с
флуоресцеин-декстраном после
внутривенного введения.
Темные пятна и полосы-
движение эритроцитов.

д) Зеленый - нейроны
(сенсор на кальций слева;
GFP справа); Красный -
сосуды с TexRed-декстраном

е) Мышиная модель болезни Альцгеймера. Синий- флуорофор, окрашивающий амилоидные белки; Зеленый- нейроны и дендритные клетки, экспрессирующие GFP; Красный- сосуды с TexRed-декстраном

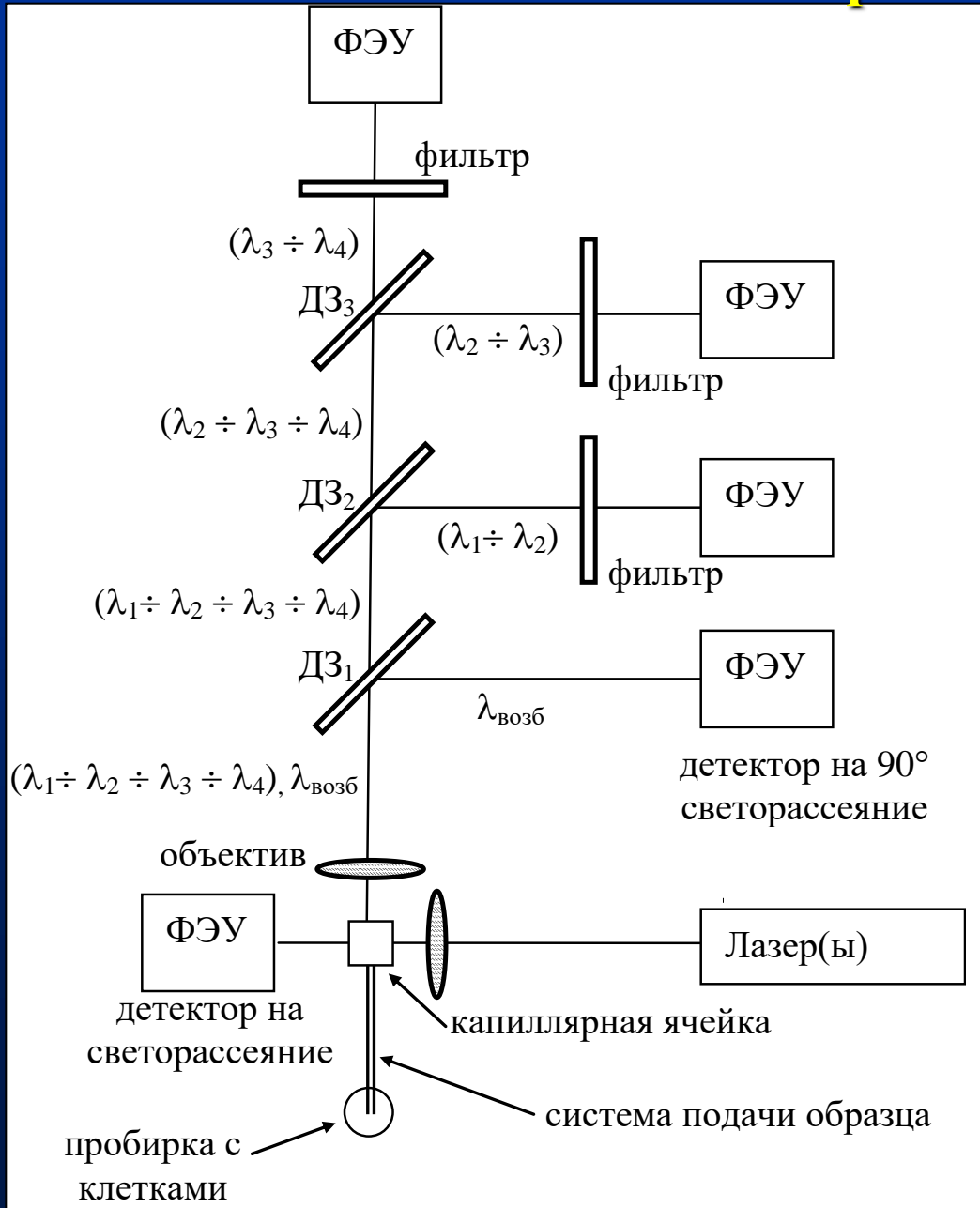
Величина максимальной глубины визуализации в основном определяется длиной рассеяния ткани $l_S^{(ex)}$, пиковой мощностью излучения накачки у поверхности образца P_0 , а также свойствами используемых флуоресцентных красителей и оптики, в частности, эффективностью сбора флуоресцентного сигнала $\Phi(z_{max})$. Формула (1) обобщает вышеизложенное, и в общем случае можно записать, что глубина визуализации пропорциональна выражению [12, 17]

$$z_{max} \propto l_S^{(ex)} \cdot \ln(P_0 \sqrt{\Phi(z_{max})}), \quad (1)$$

Из него видно, что большая глубина визуализации обычно достигается либо при использовании регенеративных усилителей (увеличение пиковой мощности P_0), либо с использованием более длинноволновых лазеров накачки (увеличение длины рассеяния $l_S^{(ex)}$, так как рассеяние Рэля на мелких неоднородностях имеет степенную зависимость от длины волны излучения $\sim 1/\lambda^4$). Логарифмическую зависимость в формуле можно объяснить поглощением излучения в образце. Мозг состоит на 75% из воды [18]. Двухфотонная микроскопия возможна из-за наличия окна пропускания воды для излучения в диапазоне 800 – 1200 нм. Экспериментальная измеренная [19] зависимость поглощения для воды от длины волны показана на рисунке 1 для диапазона 1400 – 2500 нм, и из нее видно, что есть два окна пропускания. Одно лежит в области от 1400 до 1850 нм, второе лежит в области 2200 нм.

Проточная цитометрия

Оптическая схема проточного цитометра



Прямое упругое рассеяние света ($1-10^\circ$) - размер клеток.

Боковое упругое рассеяние света (90°) - гранулярность клеток, соотношение ядро/цитоплазма.

ДЗ- дихроичное зеркало
ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

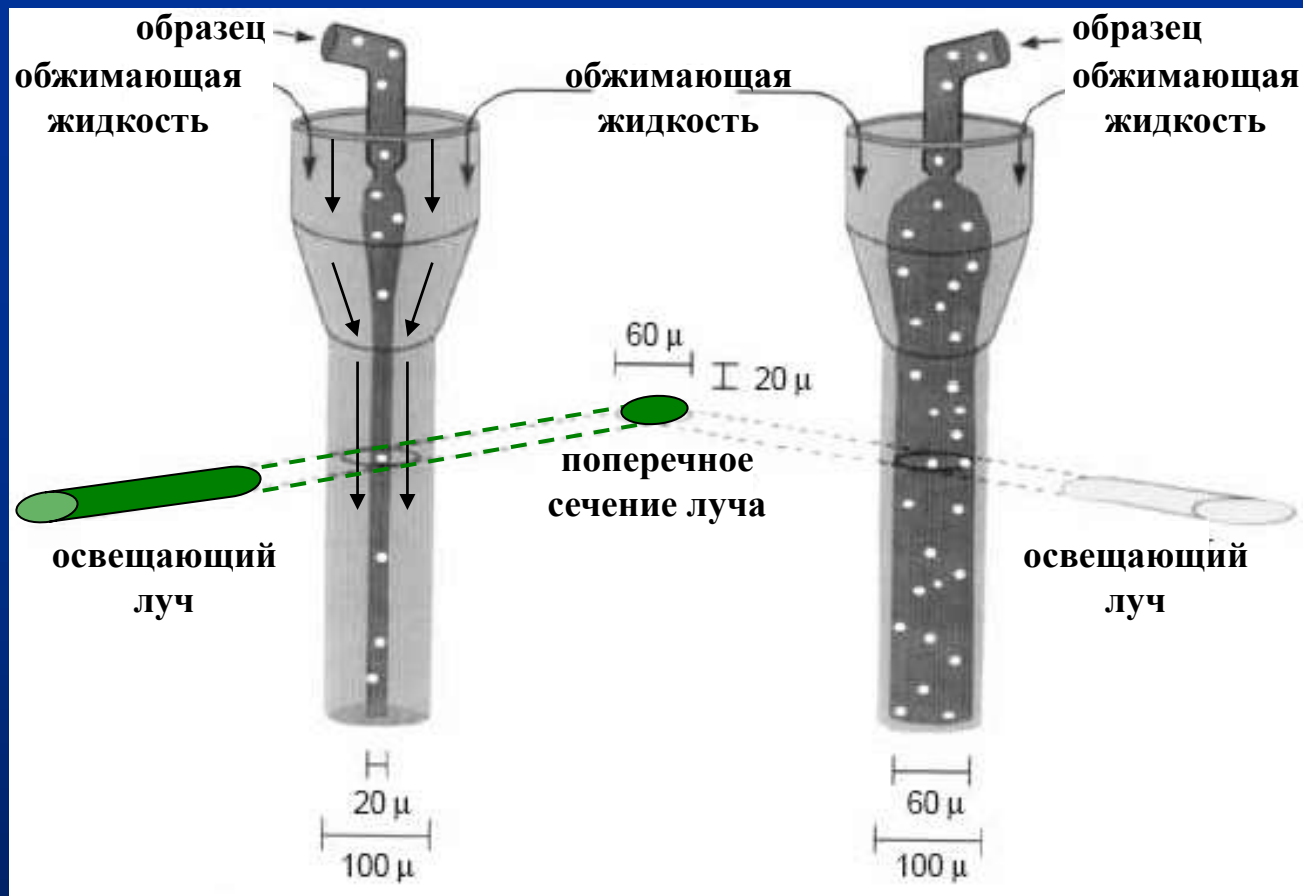
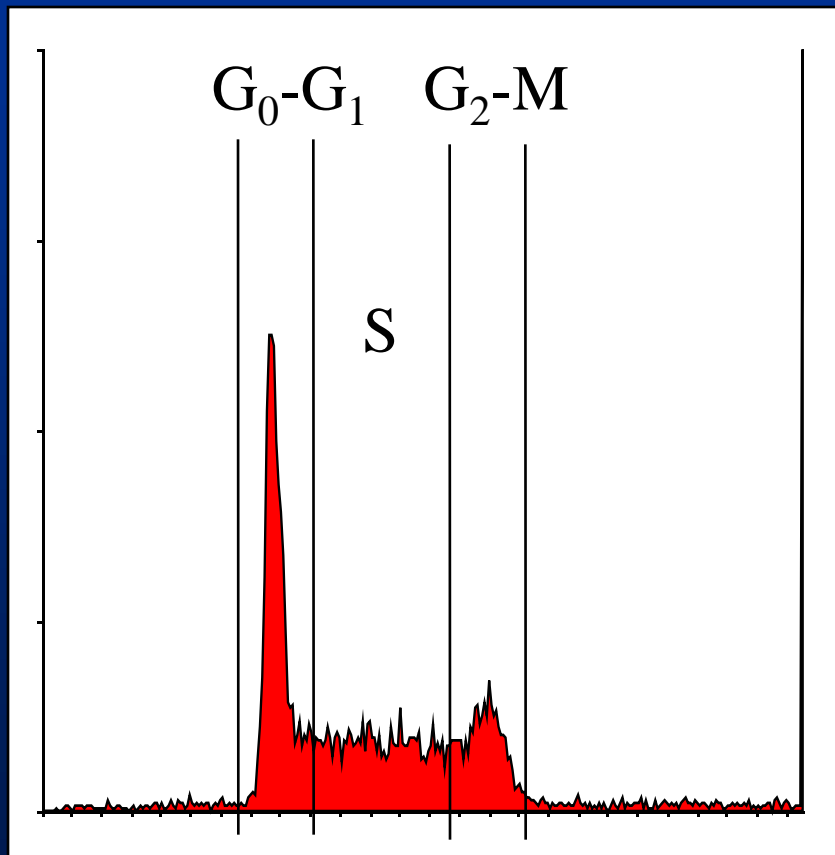


Схема устройства проточной ячейки. Справа: слишком высокое давление на образец приводит к уширению конечного диаметра потока, а следовательно, частицы могут попадать не в центр освещающего луча или освещаться не по одной.

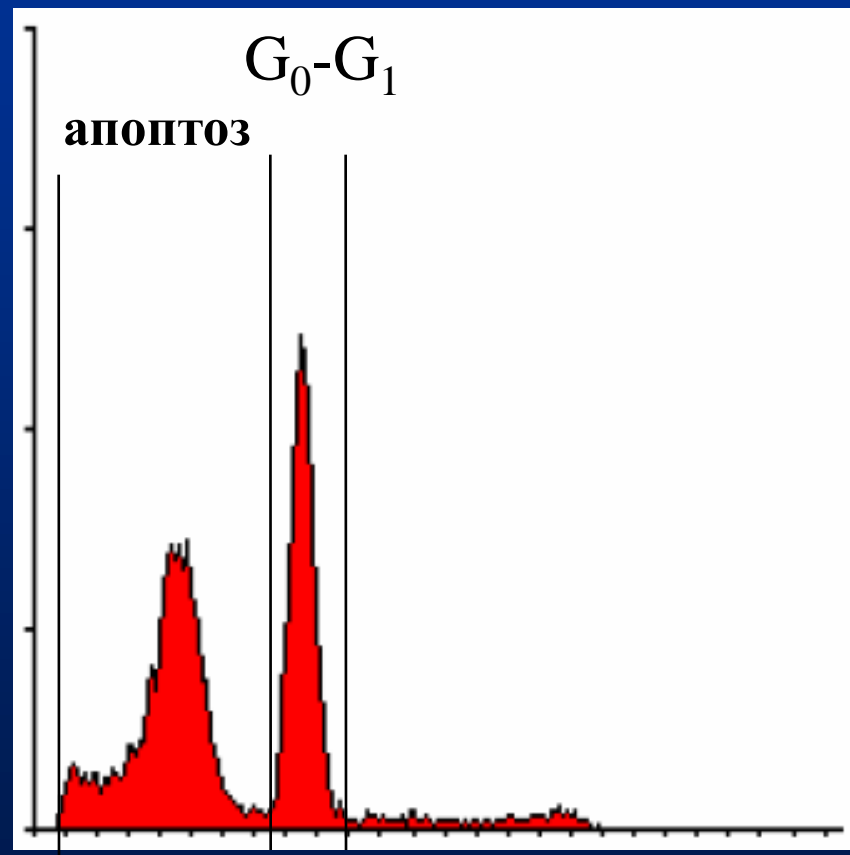
Распределение клеток по стадиям клеточного цикла (одномерная гистограмма)

Число событий



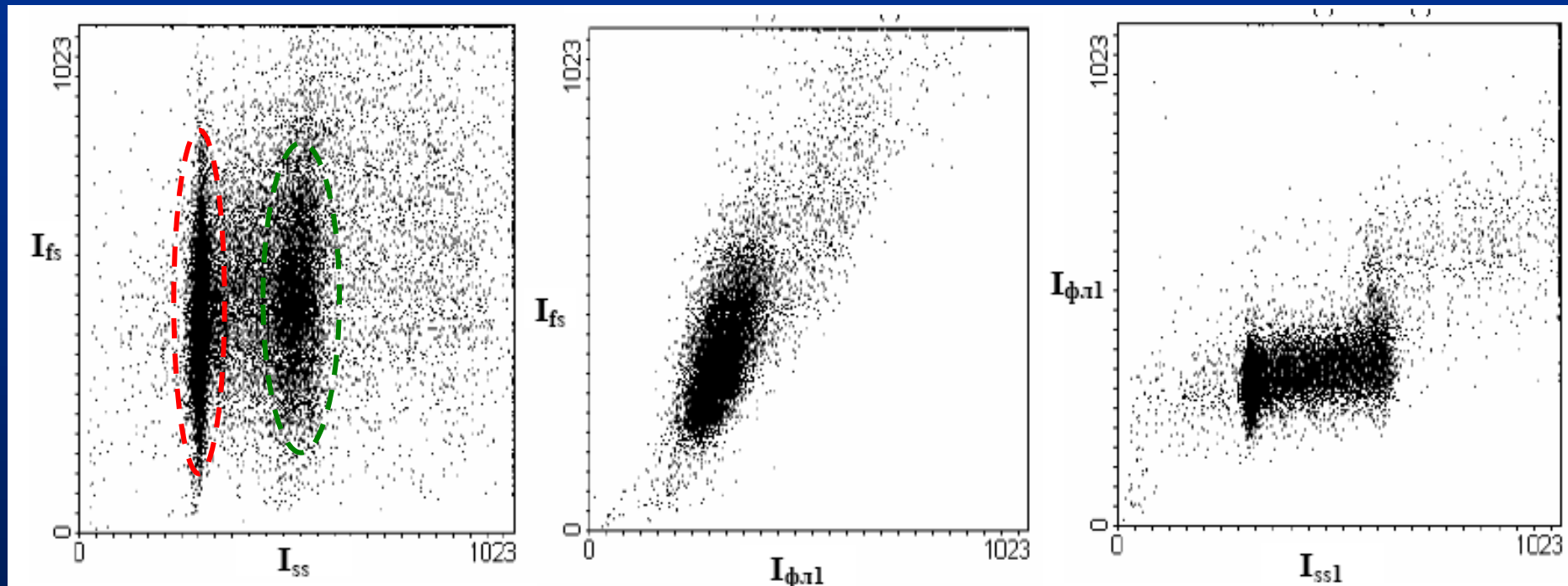
Интенсивность флуоресценции

Число событий



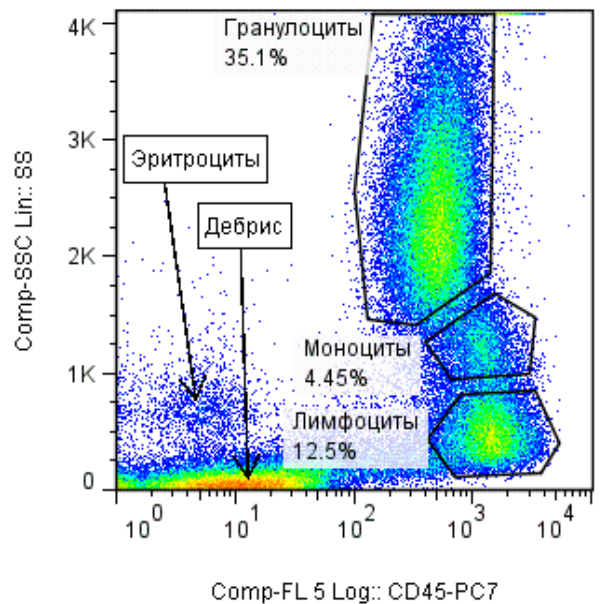
Интенсивность флуоресценции

Представление и анализ данных в проточной цитометрии

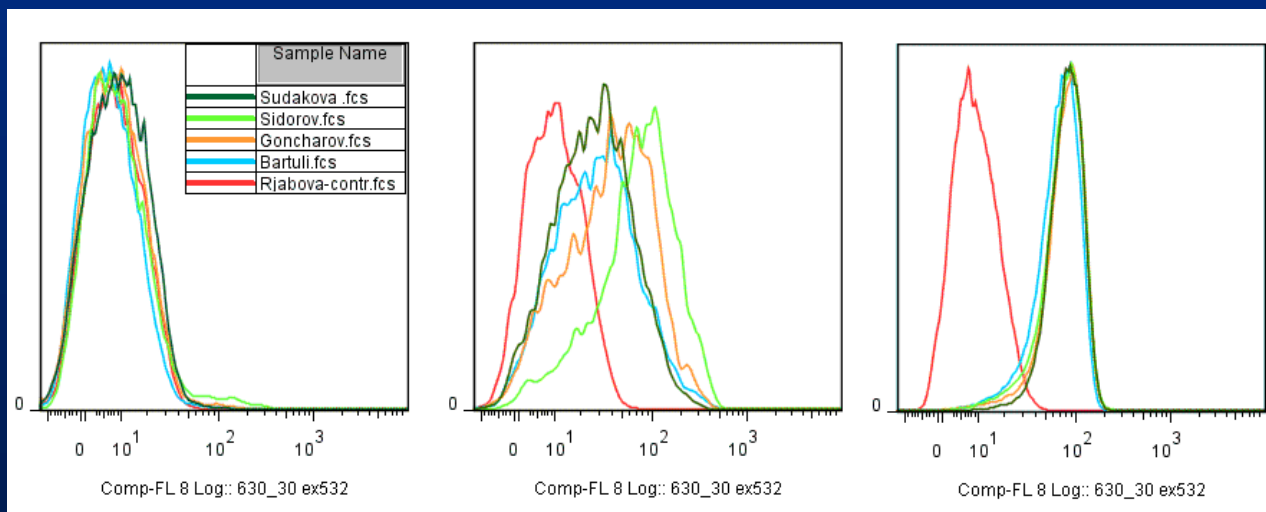


Пример цитограмм, построенных по трем измеренным параметрам I_{fs} , I_{ss} и $I_{\phi.л1}$. Каждая клетка отражена на цитограмме виде точки.

Исследование уровня экспрессии PPIX в ядерных клетках крови пациентов после введения препарата Аласенс



	Лимфоциты	Моноциты	Гранулоциты
Контроль	9	11	9
Среднее	10	55	76
SD	2	26	5

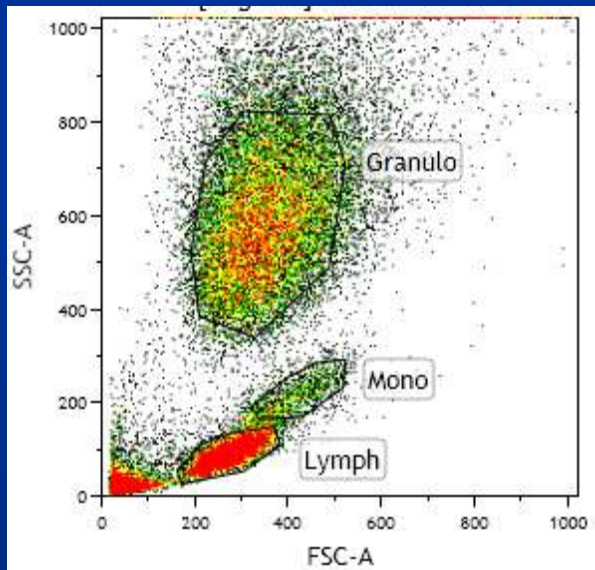


лимфоциты

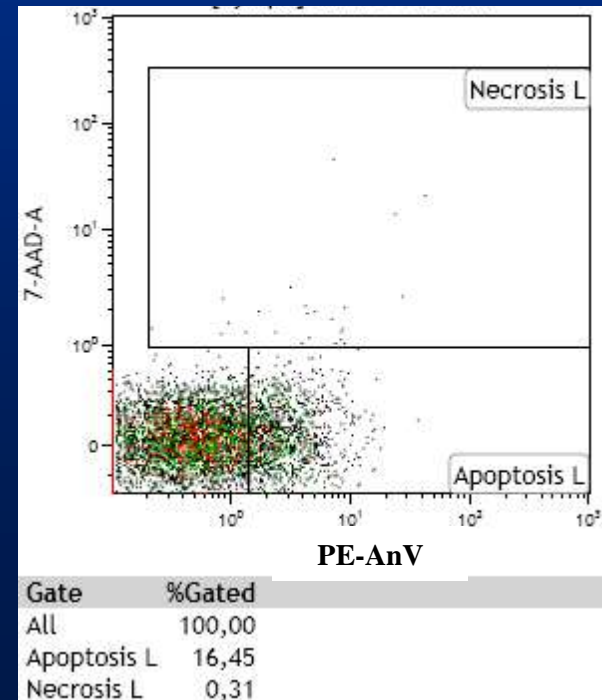
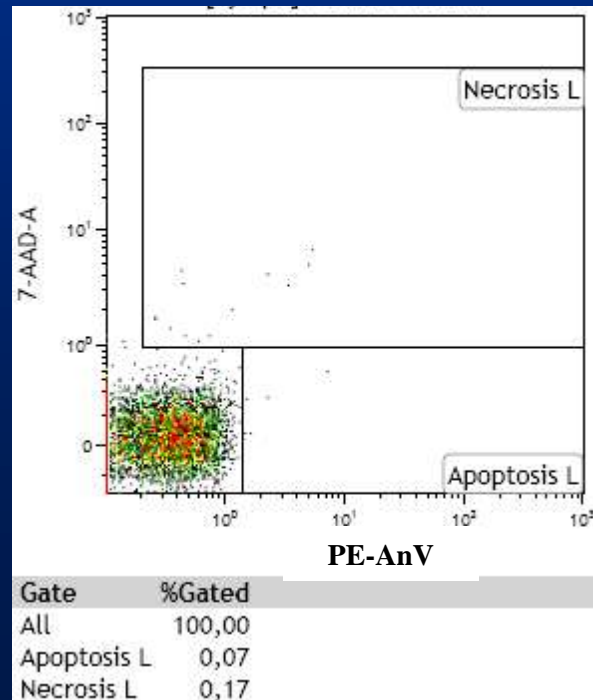
моноциты

гранулоциты

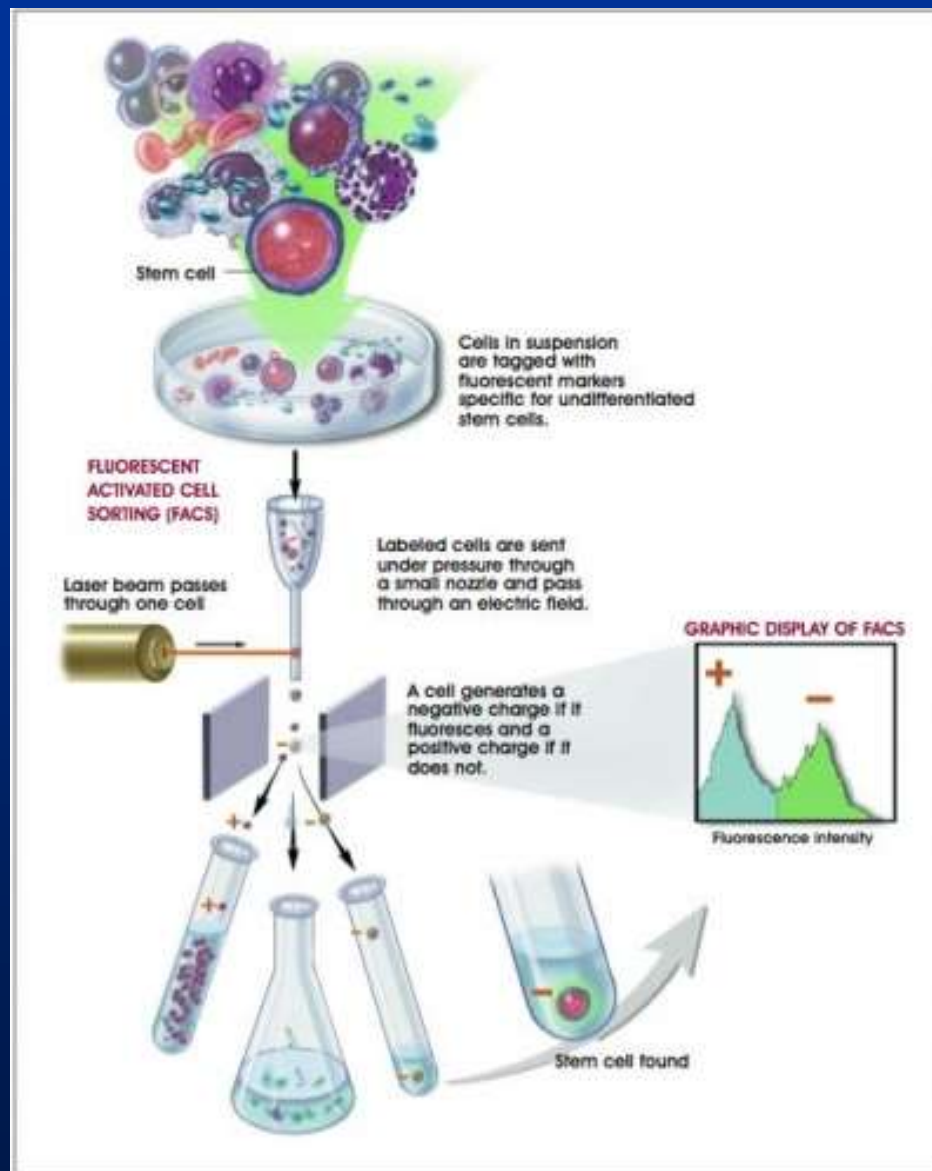
Исследование фотодинамического воздействия на ядерные клетки крови пациентов после введения препарата Аласенс



Анализ гибели клеток в субпопуляции лимфоцитов



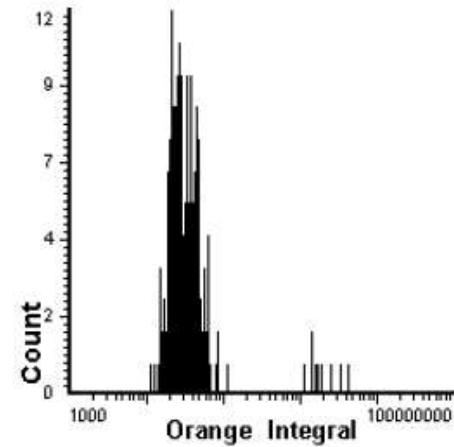
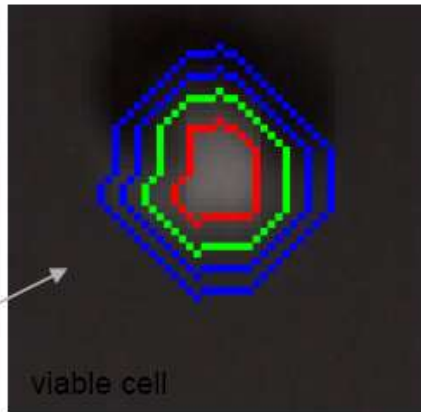
Принцип флуоресцентной сортировки клеток



Лазерная сканирующая цитометрия

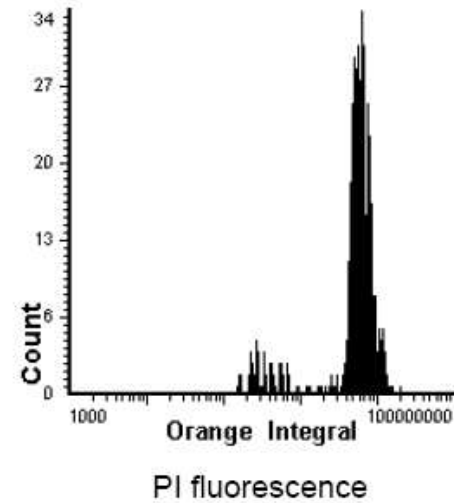
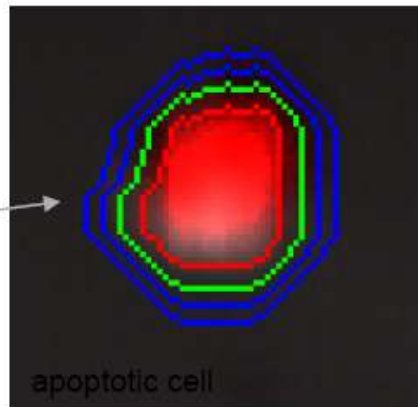
Scan field
mouse EL4 cells
no treatment

labeled with PI



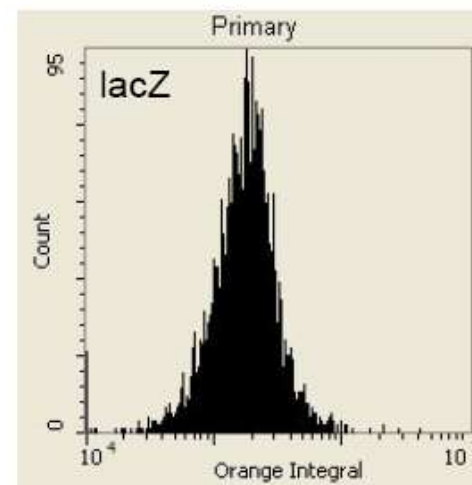
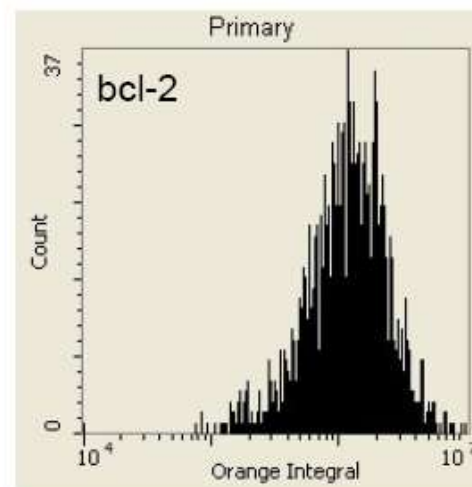
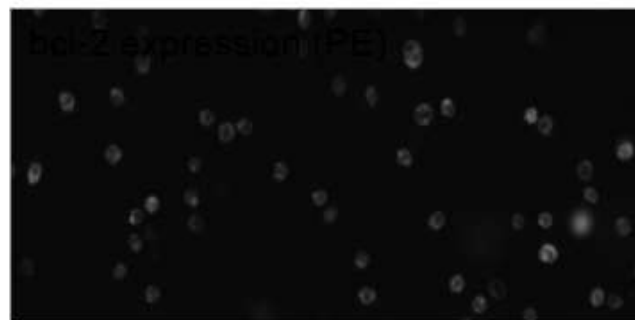
Scan field
mouse EL4 cells
quercetin 16 h

labeled with PI



Bcl-2 expression analysis on the iCys

L1210 cells stably transfected with bcl-2 or lacZ empty vector, and labeled with PE-anti-bcl-2. Thresholding on Sytox Blue cell-permeable DNA binding dye



PE-bcl-2