

Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

Алексей Валерьевич Феофанов

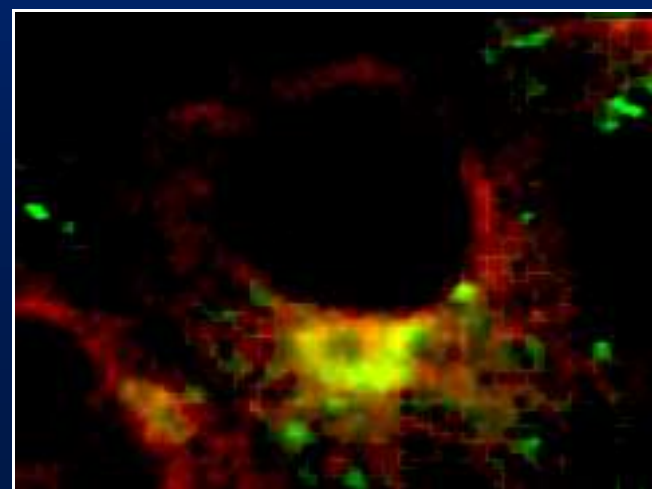
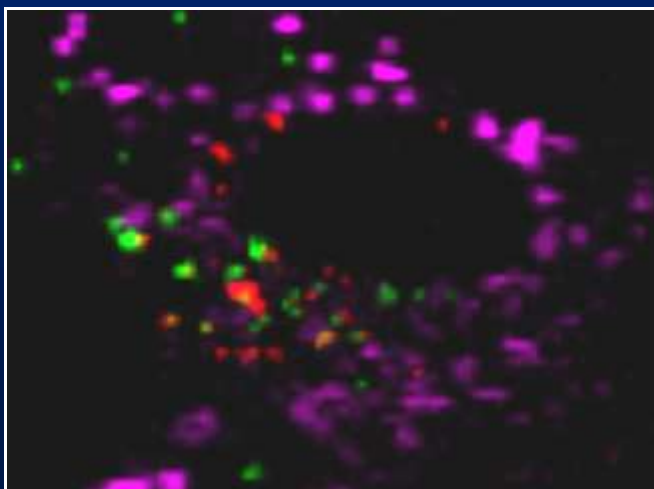
Кафедра биоинженерии

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул**

ИБХ РАН

Лекция № 6



Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия

анализирует флуктуации интенсивности флуоресценции в микро-объеме образца

Анализируемый объем

$$V = 1 \text{ фемтолитр} = 10^{-15} \text{ л} = 1 \text{ мкм}^3$$

Прибор - конфокальный микроскоп с высокочувствительной системой детекции (константа интегрирования сигнала ≈ 1 мс).

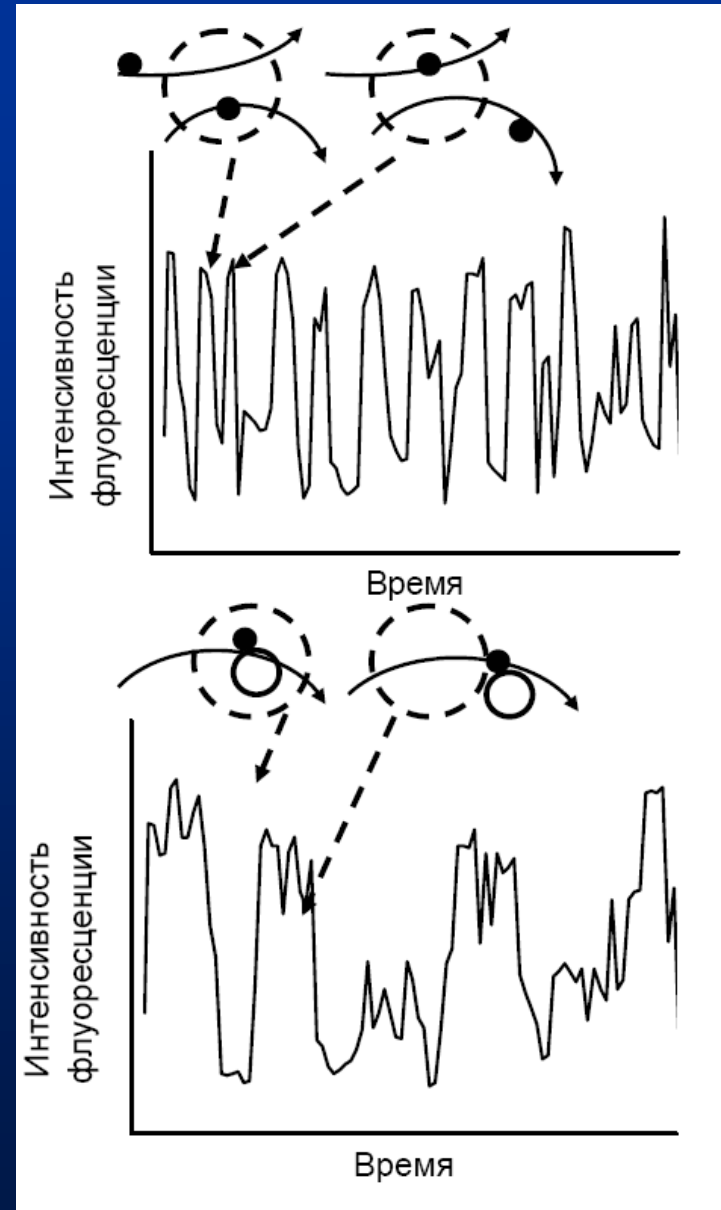
Флуктуации интенсивности отражают:

- (1) изменение числа молекул в анализируемом объеме,
- (2) изменение квантового выхода флуоресценции молекул в этом объеме

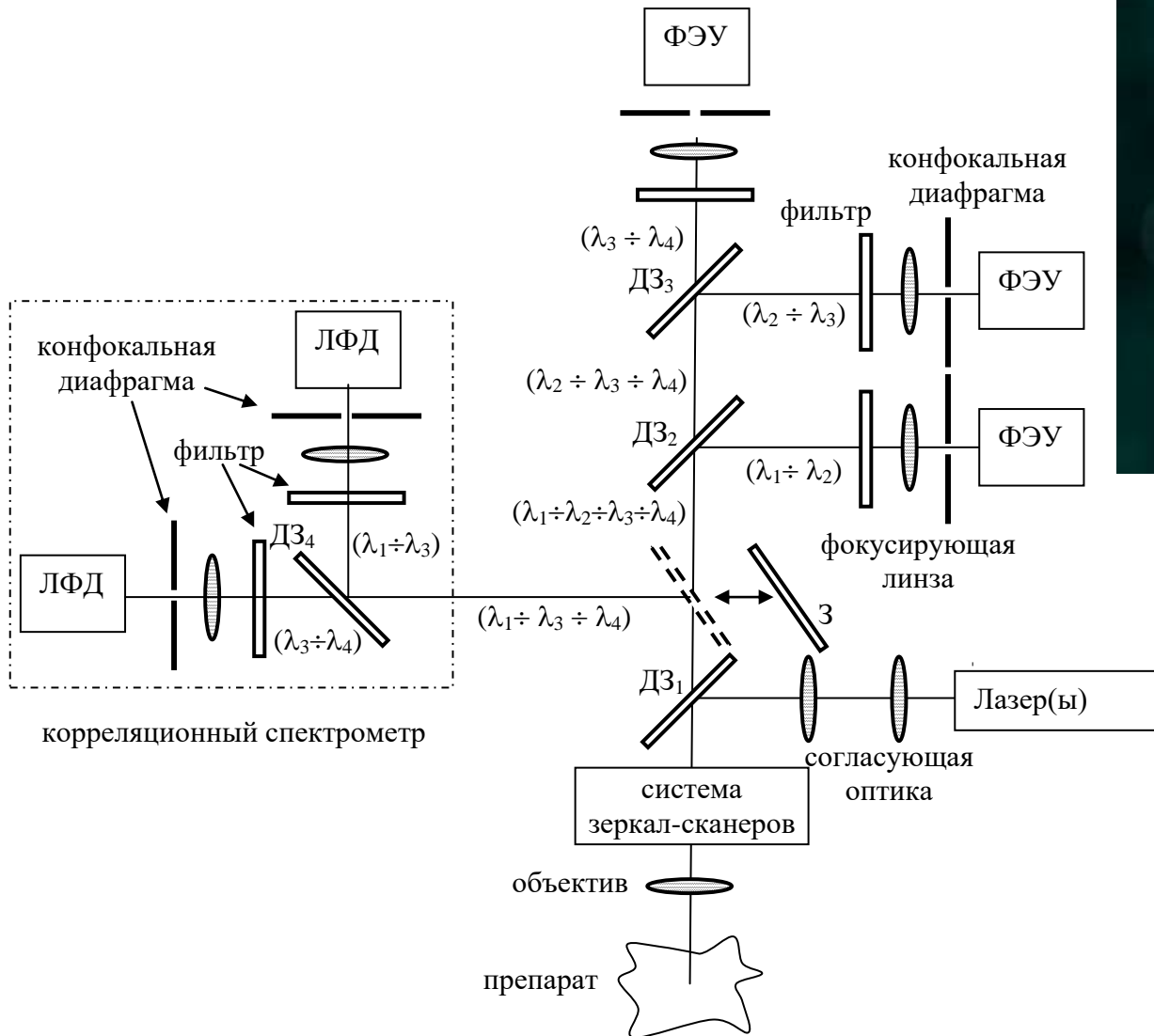
Количество молекул – 3 молекулы в 1 мкм^3

$C \approx 5 \text{ нмоль/л}$

Шкала времени – $10 \text{ с} \div 5 \text{ мин}$



Принципиальная схема конфокального лазерного сканирующего микроскопа с модулем для корреляционной спектроскопии



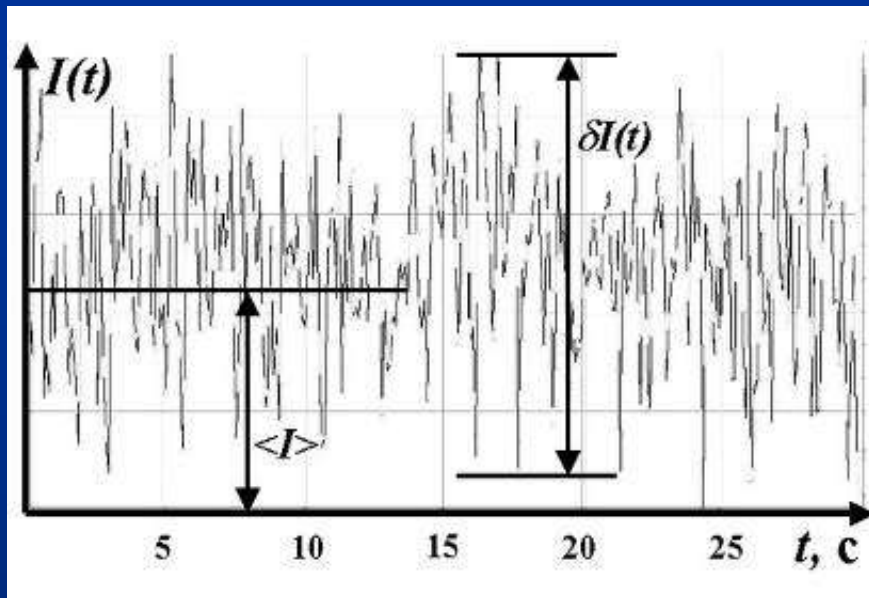
ДЗ – дихроичное зеркало
З – перемещаемое зеркало
ЛФД – лавинный фотодиод
ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия

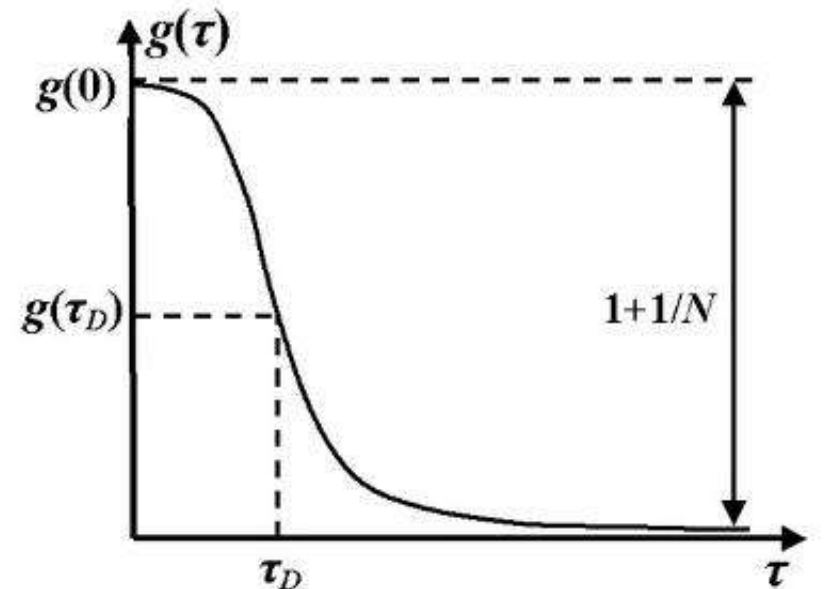


Внешний вид конфокального микроскопа LSM-510 (Zeiss) с модулем для корреляционной спектроскопии (блок слева - с надписью ConfoCor 2)

Корреляционная функция флуктуаций флуоресценции



флуктуации интенсивности флуоресценции, как функция времени измерения.



нормализованная автокорреляционная функция $g(\tau)$,

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} (2T)^{-1} \int_{-T}^T I(t) I(t + \tau) dt = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle$$

$$I(t) = \langle I \rangle + \delta I(t)$$

$$G(\tau) = \langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle + \langle I \rangle^2$$

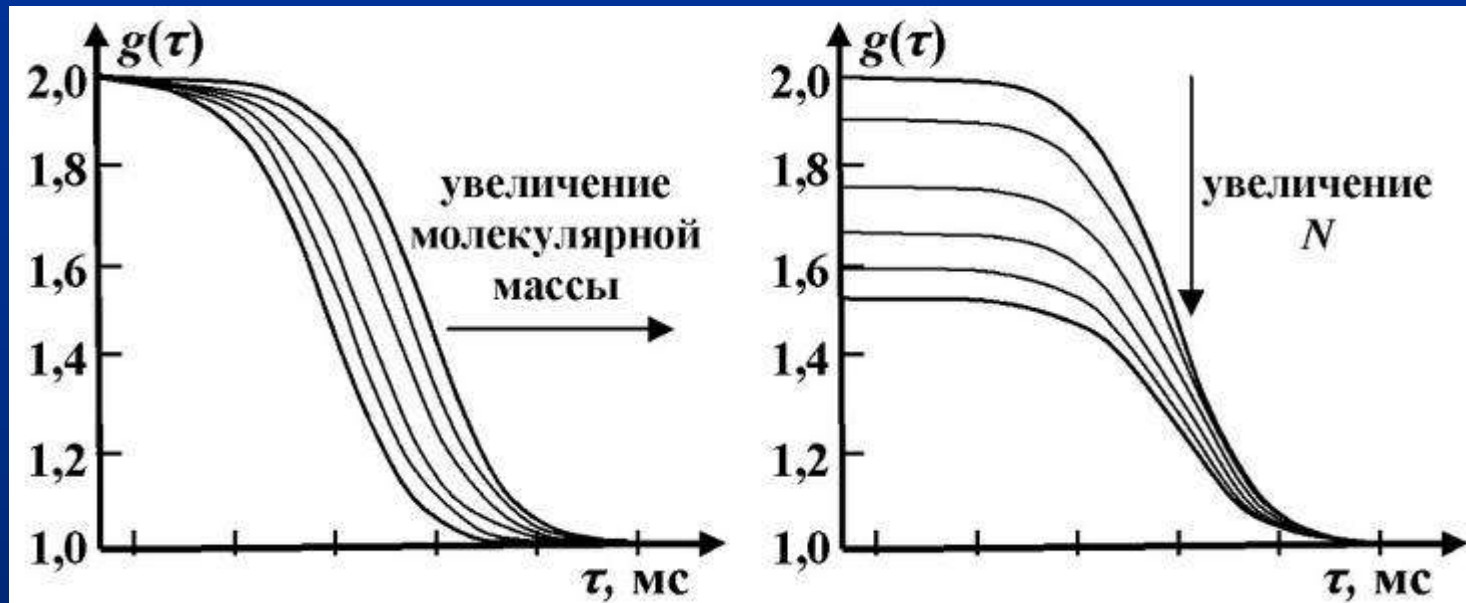
$$g(\tau) = G(\tau) / \langle I \rangle^2 = 1 + \langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle / \langle I \rangle^2$$

и далее

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D} S^2}}$$

- где S – отношение длин главных осей эллипса ω_x/ω_z в изображении точки, полученном с помощью конфокального микроскопа при ее сканировании в плоскости XZ ($\omega_x=\omega_y$).
- τ_D – величина, которая определяется при анализе $g(\tau)$.
- τ_D – это эффективное время диффузии молекулы через фокальный объем.
- При $S=1$ τ_D равно времени корреляции, при котором нормализованная корреляционная функция затухает в 2 раза.

Изменение вида корреляционной функции при увеличении концентрации молекул и увеличении массы молекулы



$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_D} S^2}}$$

Ограничение на выбор флуорофора:
не подходят красители с высокой вероятностью синглет-триплетного переноса энергии

Анализ автокорреляционной функции дает:

1. концентрацию
2. скорость диффузии молекул
3. кинетику реакций/ взаимодействий молекул

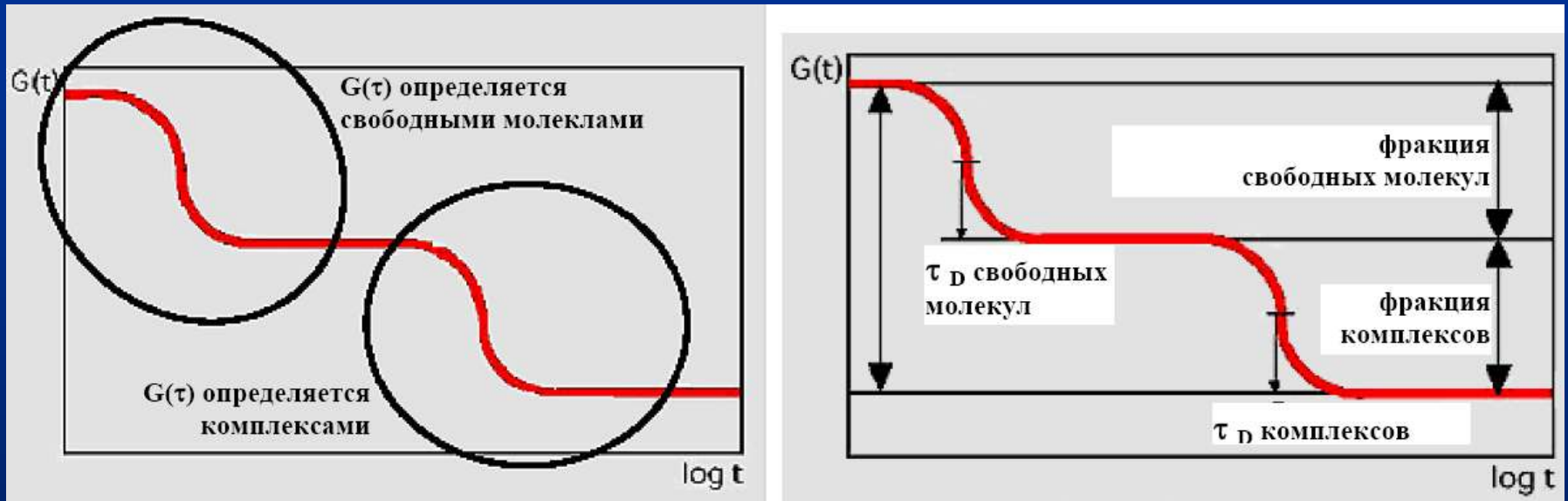
Зная эффективное время диффузии молекулы через фокальный объем и диаметр этого фокального объема, можно рассчитать коэффициент диффузии D , определить гидродинамический радиус молекулы r и ее массу m :

$$D = kT / (6\pi\eta r) = \omega_x^2 / (4\tau_D),$$

$$r^3 = 3m / (4\pi \rho N_A),$$

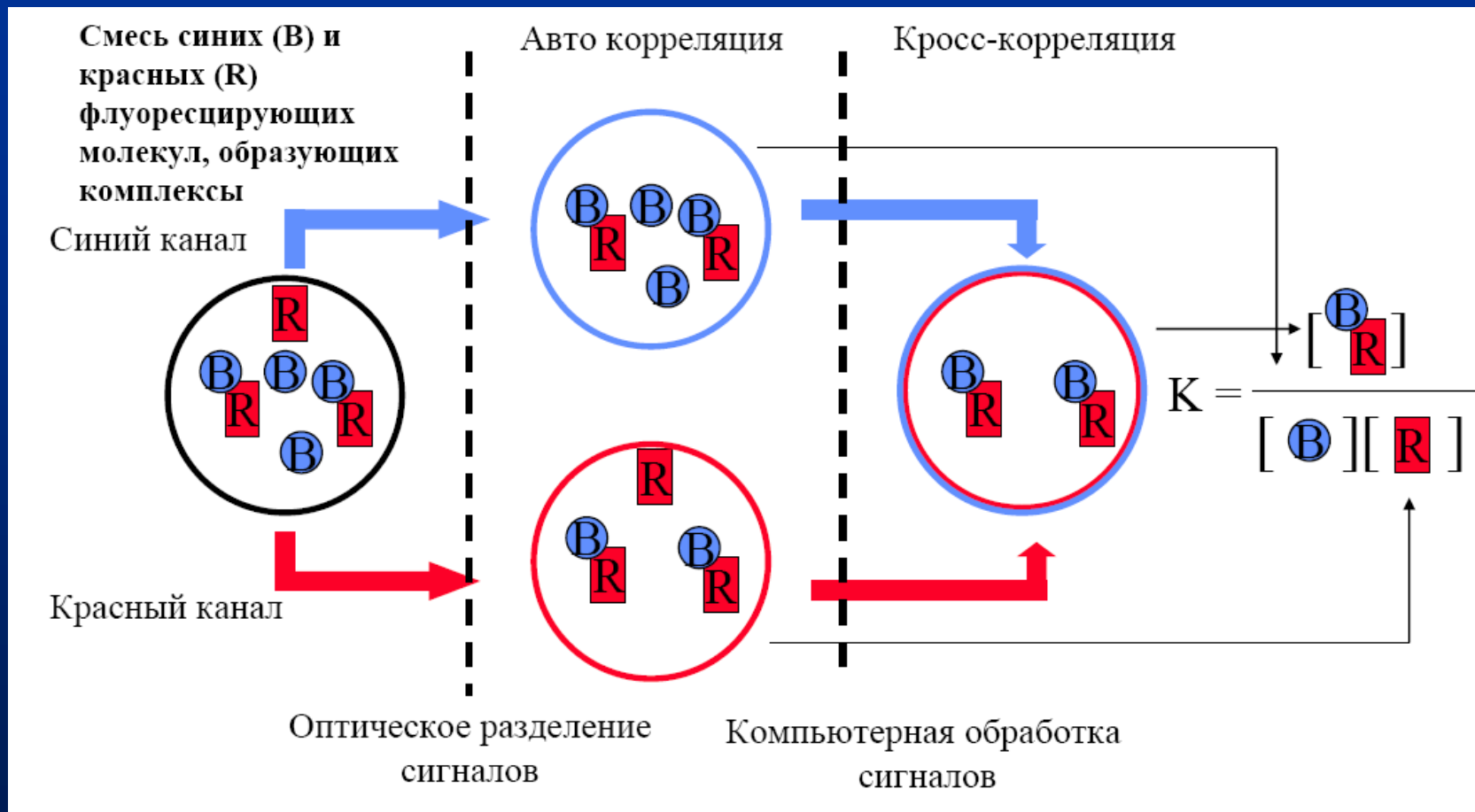
где D – коэффициент диффузии, k - константа Больцмана, T - абсолютная температура, η - вязкость среды, r - гидродинамический радиус молекулы, m - молекулярный вес, N_A - число Авогадро, ρ - средняя плотность молекулы (1,2 г/см³ для глобулярного белка).

Определение доли свободных и связанных (комплексов) молекул с использованием корреляционной функции



- Вид корреляционной функции смеси свободных и связанных молекул, когда их масса значительно отличается

Принцип кросс-корреляционного анализа во флуоресцентной корреляционной спектроскопии



Области применения флуоресцентной корреляционной спектроскопии и микроскопии

- **Исследование лиганд-рецепторных, белок-ДНК, белок-липидных взаимодействий;**
- **Анализ образования комплексов молекулами в растворах и в клетках;**
- **Исследование кинетики гибридизации ДНК**
- **Анализ активности ферментов и скорости ферментативных реакций.**
- **Исследование процессов ассоциации/диссоциации мультисубъединичных белков, белковых комплексов (рецепторов, ионных каналов и т.д.).**
- **Анализ агрегации молекул (например, агрегации прионов)**
- **Анализ подвижности молекул в цитоплазме, ядре, на мембране клеток.**
- **Анализ механизмов транспорта молекул в клетки**

Эффект полного внутреннего отражения



Закон Снелла:

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

Критический угол:

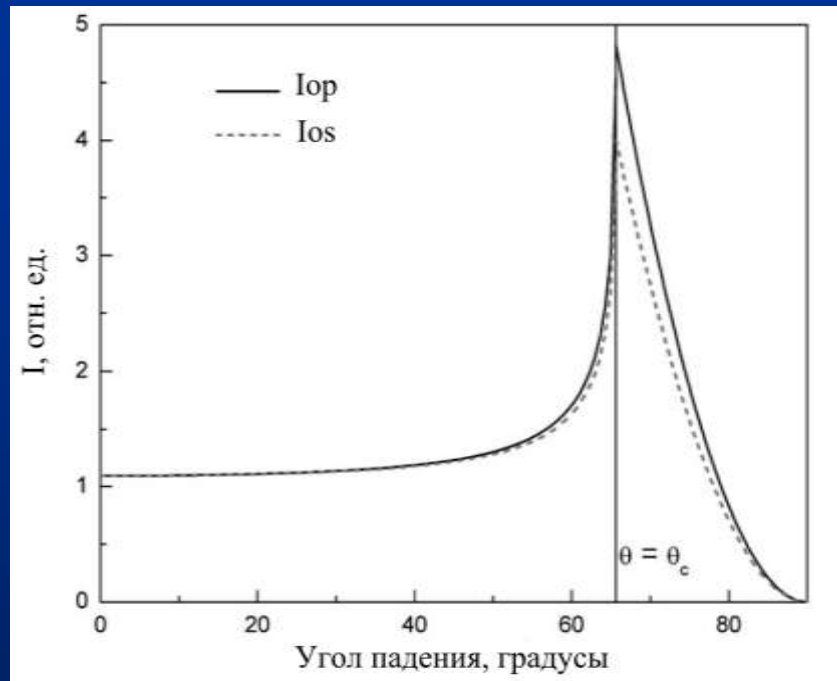
$$\theta_K = \arcsin(n_2/n_1),$$

Глубина проникновения поверхностной световой волны во вторую среду



Интенсивность нормальной составляющей
поверхностной волны:

$$I(z) = I(0)e^{-z/h}$$

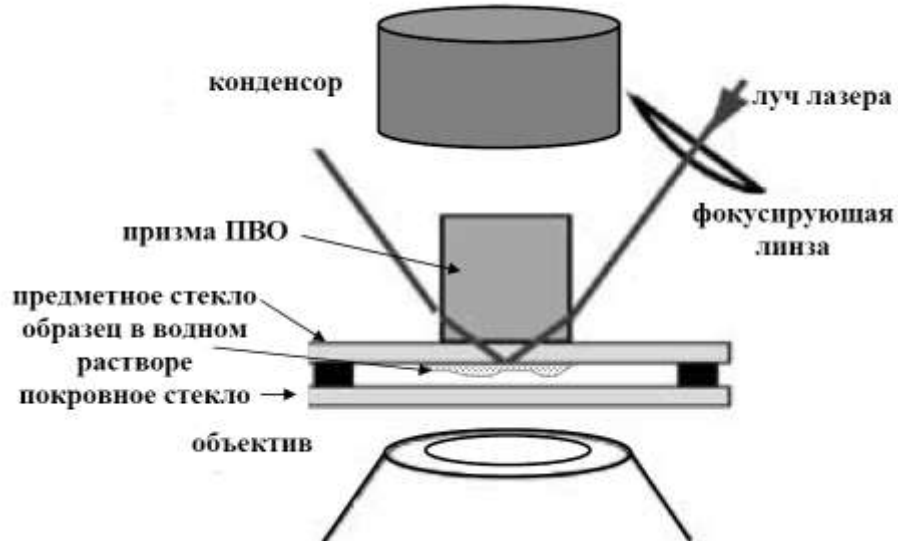


Глубина проникновения волны во вторую среду (воду):

$$h = \lambda / 4\pi (n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2)^{1/2}$$

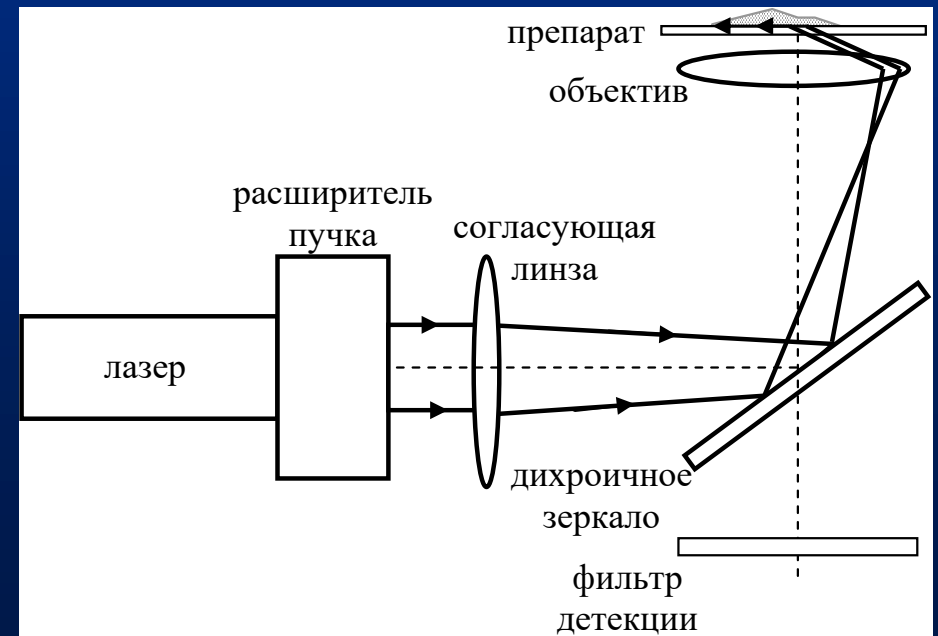
$$h \approx 140 \text{ нм}$$

Способы реализации метода TIRF



на основе призмы полного внутреннего отражения (ПВО) и инвертированного микроскопа

с помощью объектива на основе инвертированного микроскопа



Экспериментальная оценка глубины проникновения волны в образец

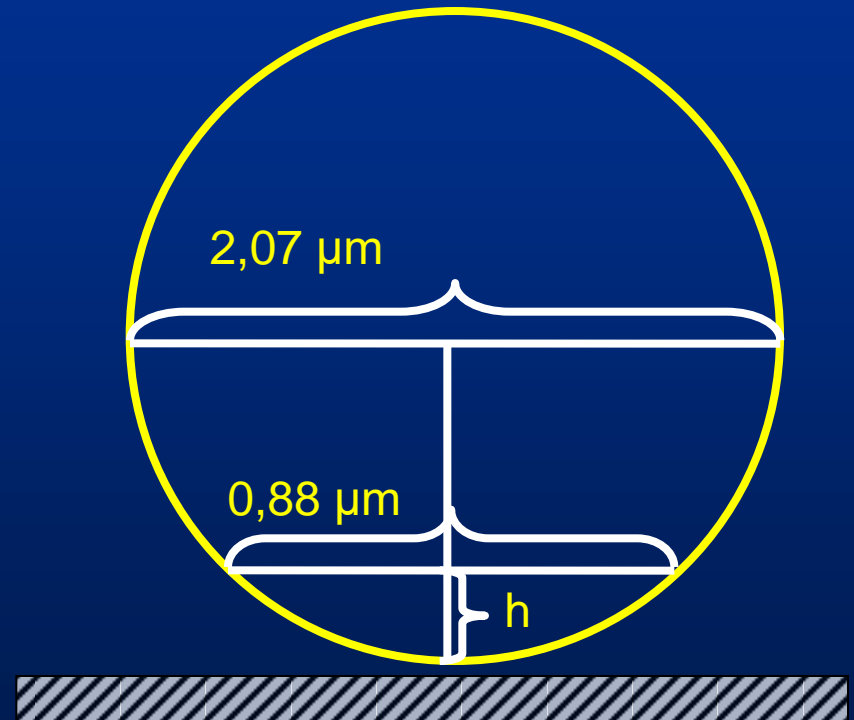
Флуоресцентные шарики диаметром 2 мкм



режим
эпифлуоресценции



режим TIRF



$h \approx 98 \text{ нм}$

TIRF-микроскопия и флуоресцентная микроскопия

Липидные капли в COS клетках, окрашенные нильским красным



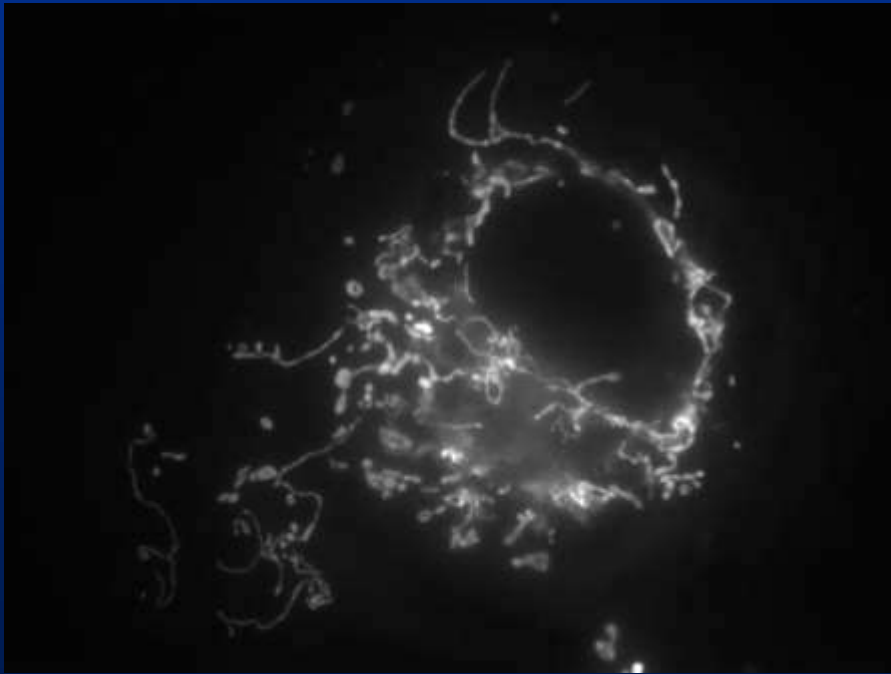
флуоресцентная
микроскопия



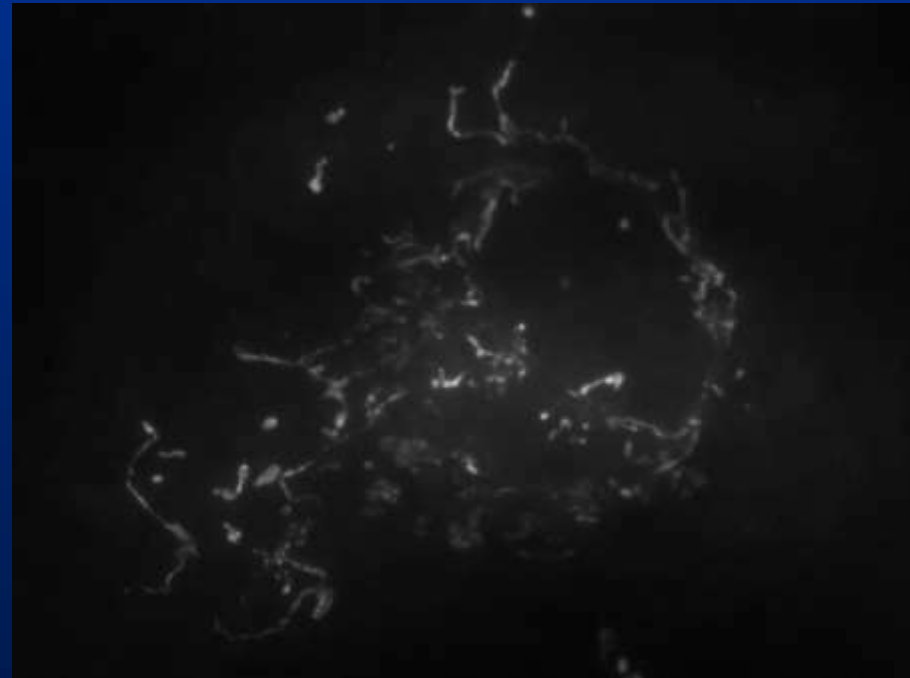
режим TIRF

TIRF-микроскопия и флуоресцентная микроскопия

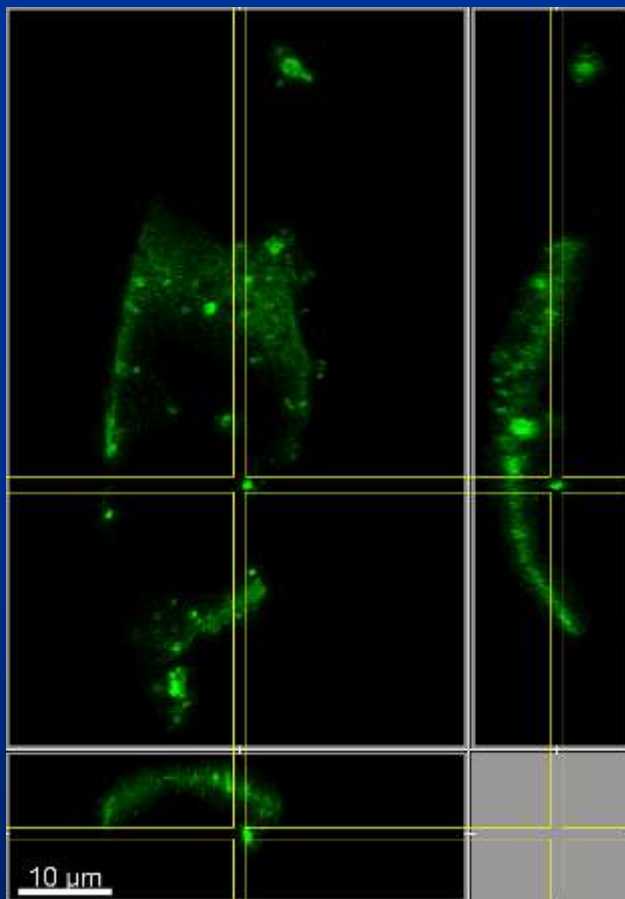
Митохондрии в Cos клетках, окрашенные родамином 123



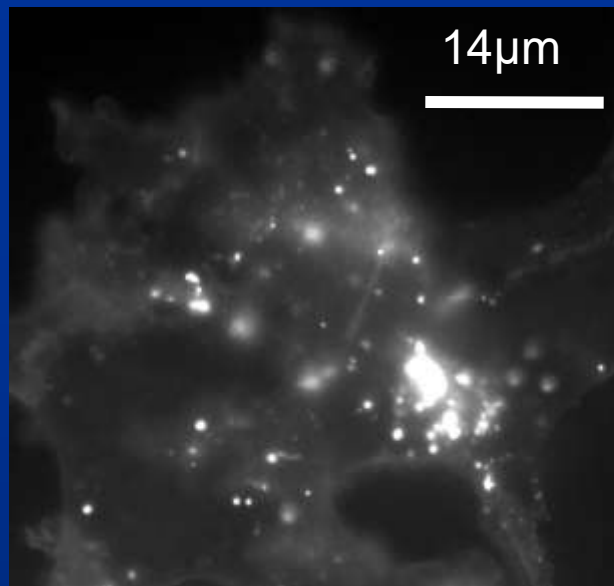
режим эпифлуоресценции



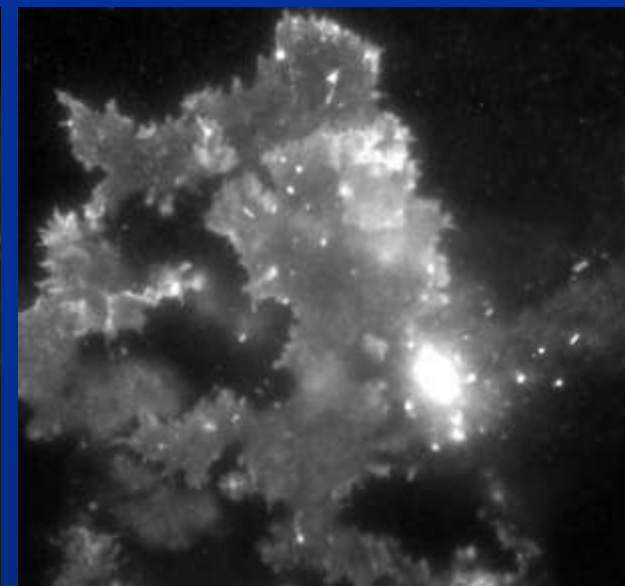
режим TIRF



Конфокальная
микроскопия



Флуоресцентная
микроскопия



режим TIRF

В случае TIRF сигнал регистрируется только с мембраны клетки, находящейся в контакте со стеклянной подложкой

Клетки COS, экспрессирующие CFP-EphA2

Метод ФМПВО находит применение в следующих исследованиях

- изучение областей контактов между клетками и субстратом, изучение изменения способности клеток к адгезии под влиянием различных факторов и состава субстрата;
- изучение структуры цитоплазматических волокон в областях, прилегающих к мембране клетки, и их сборки под действием различных факторов;
- исследование флуоресценции единичных молекул, адсорбированных на поверхности;
- отслеживание движения секреторных гранул в примембранной области и их экзоцитоза;
- изучение распределения белков и клеточных рецепторов на мембране клеток. В комбинации с методами восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания или флуоресцентной корреляционной спектроскопии метод ФМПВО позволяет изучать подвижность рецепторов на мембране и кинетики связывания белков с мембранами;
- изучение искусственных мембран;
- изучение движения клеток на субстрате. При этом возникает уникальная возможность исследовать появление и исчезновение контактов между клеткой и субстратом в процессе ее движения;
- разработка и применение поверхностных биосенсоров, в том числе и с использованием нанотехнологий;
- изучение мембранных ионных каналов.