

Микроскопия и микроспектроскопия биообъектов. Детекция наночастиц.

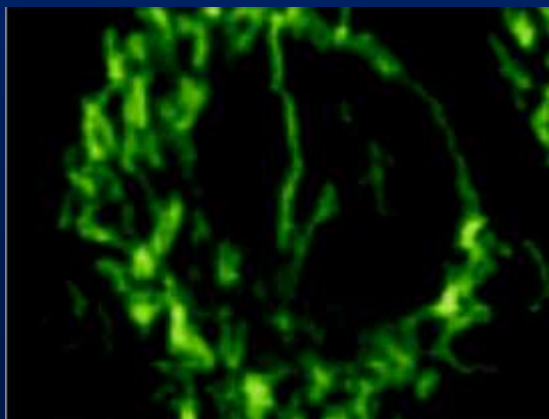
Алексей Валерьевич Феофанов

Кафедра биоинженерии

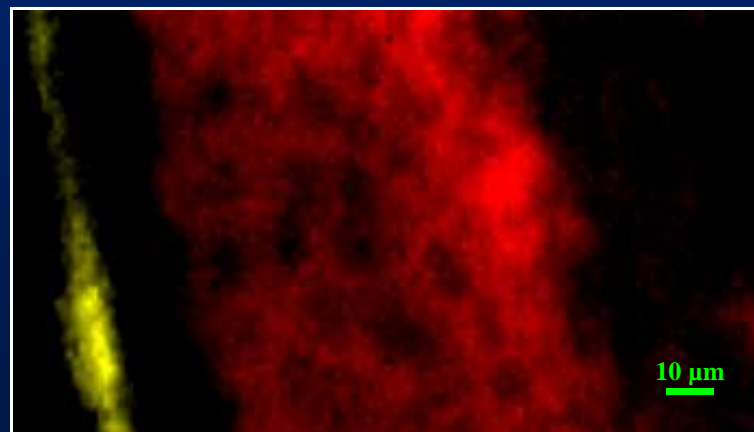
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул*

ИБХ РАН



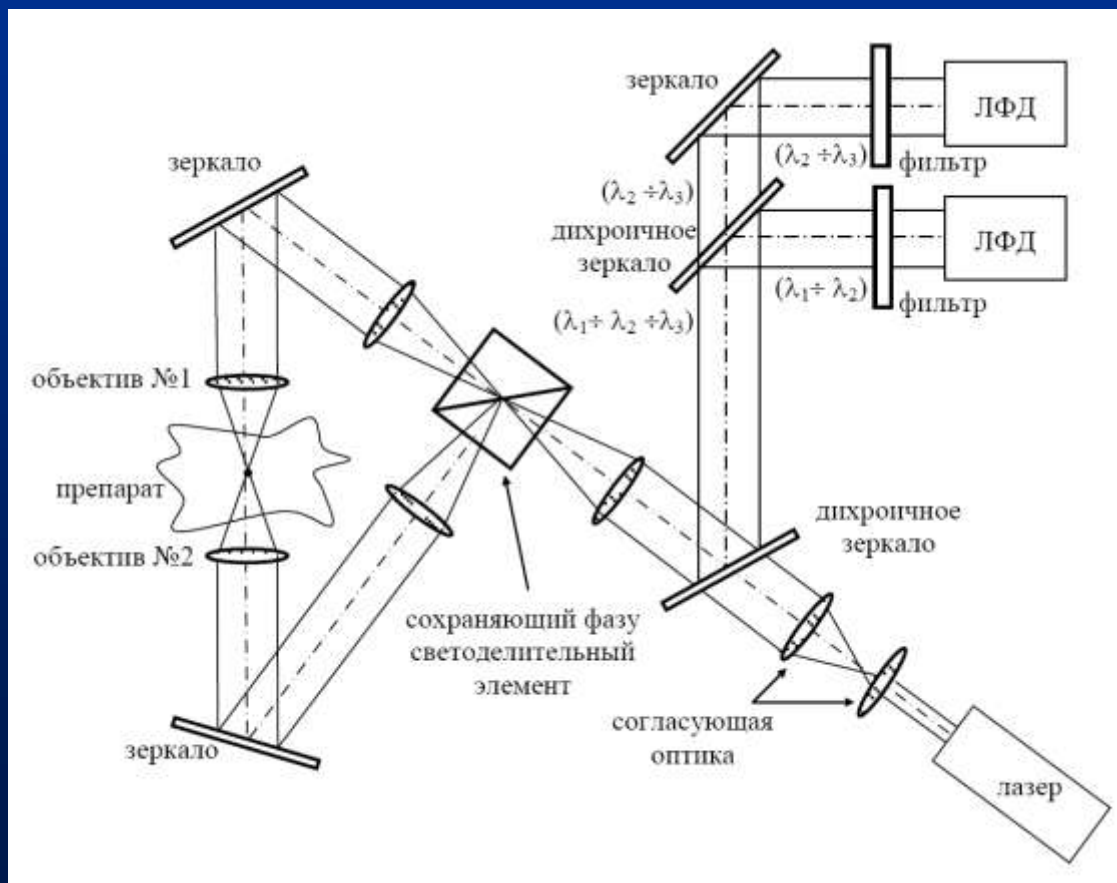
Лекция № 7



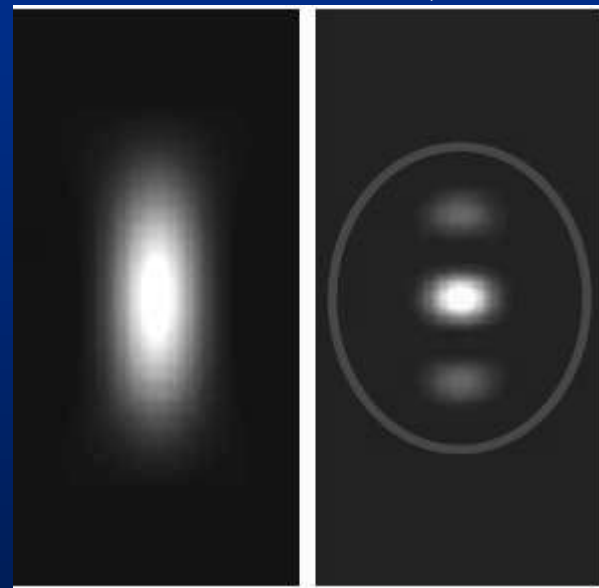
4Pi-микроскопия

новейший метод лазерной сканирующей микроскопии, использующий когерентное взаимодействие двух сферических световых волн, чтобы улучшить разрешение вдоль оптической оси объектива

Схема 4Pi-микроскопа



Распределение эффективной интенсивности лазерного пучка в фокусе объектива (осевое сечение XZ)

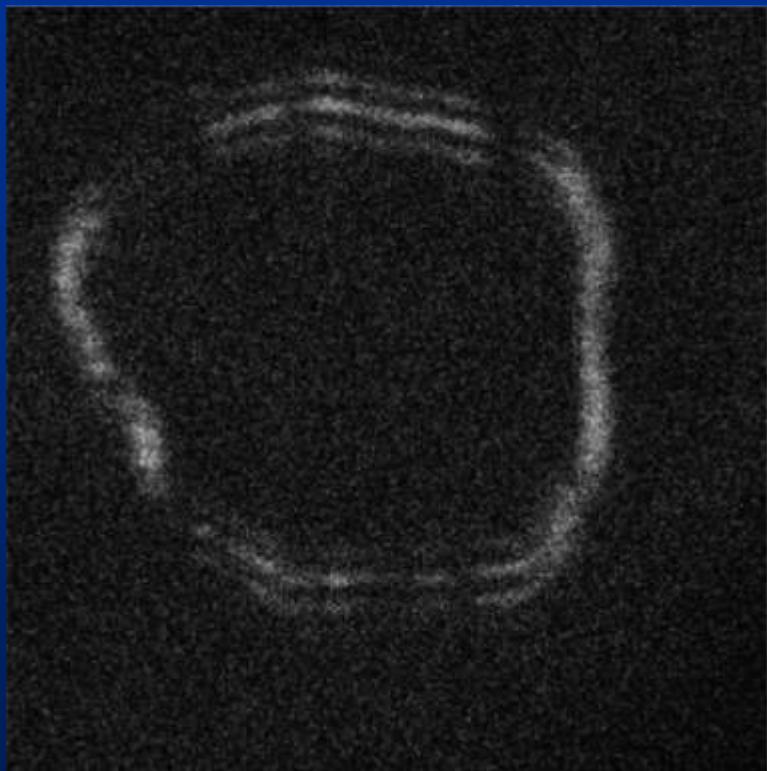


2-х фотонное
возбуждение

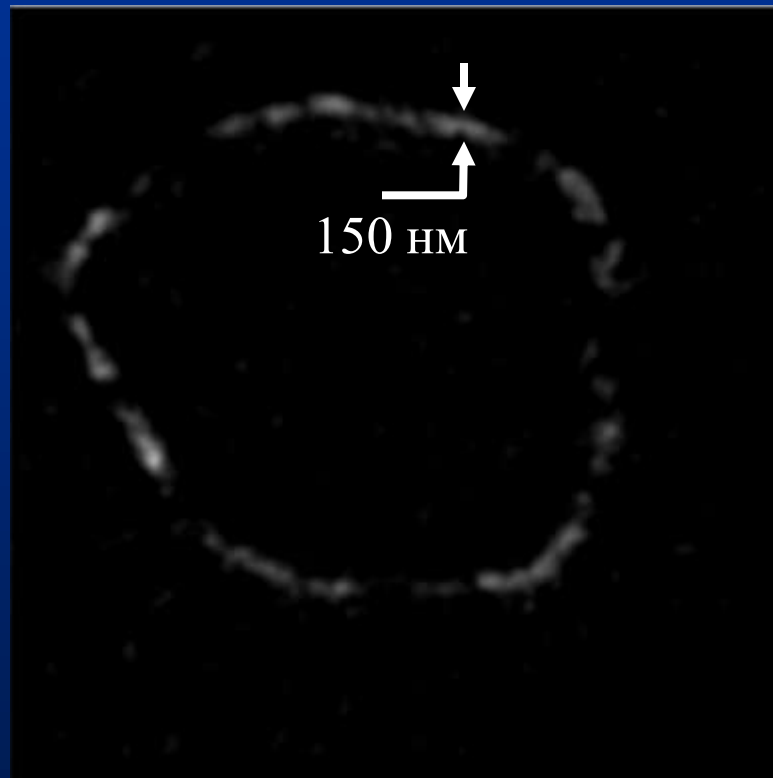
4Pi- возбуждение

$\Delta X = \Delta Y = 140$ нм; $\Delta Z = 110$ нм

Изображение оболочки ядра клетки измеренное в оптическом сечении XZ методом 4Pi-микроскопии.

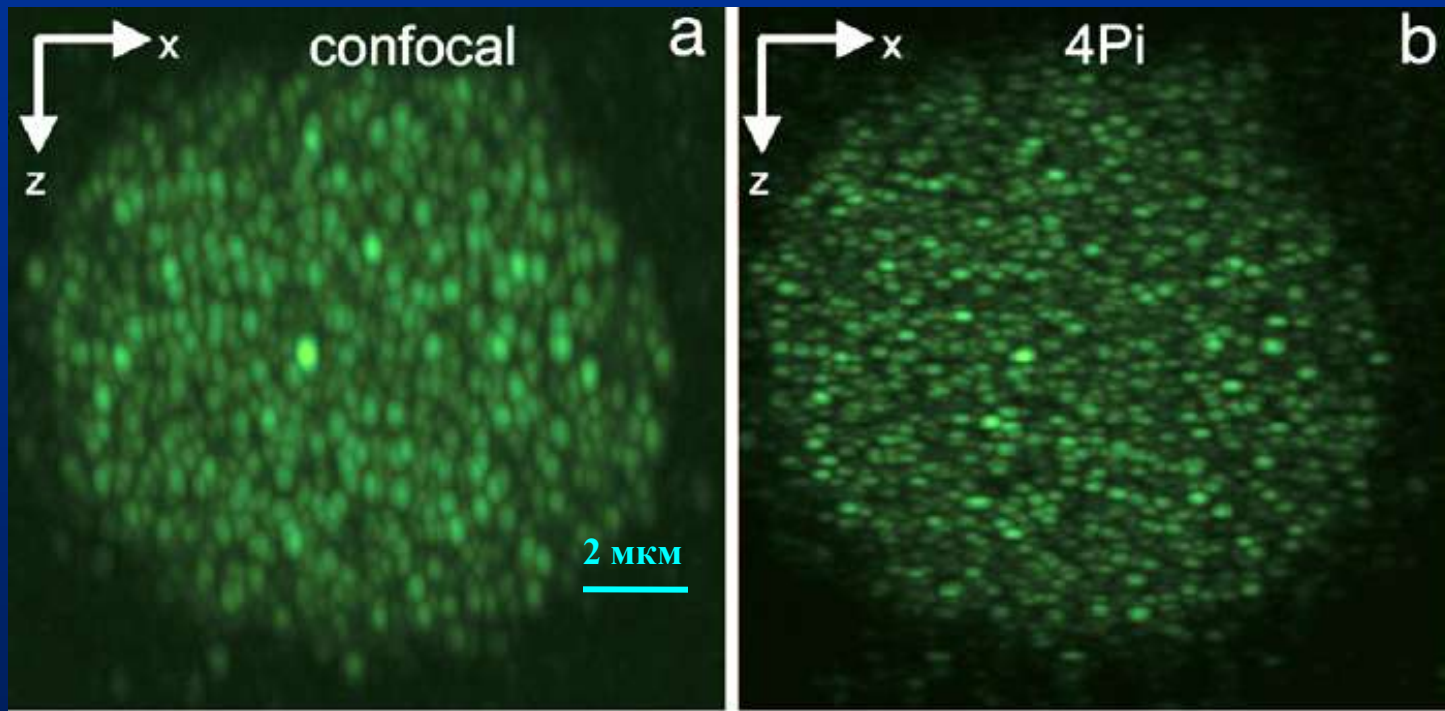


После измерения



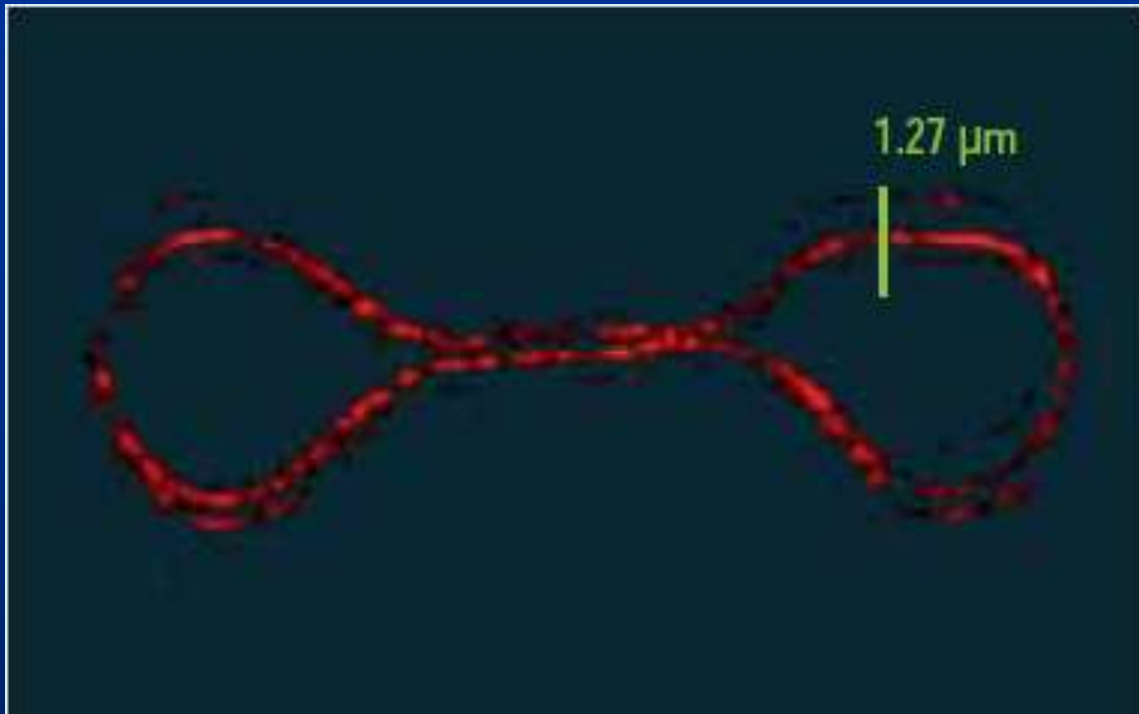
После измерения и обработки

Примеры измерений с использованием 4Pi-микроскопа



Распределение эндогенного гистона H2AX в ядре клетки человека. Показана проекция всех сканов вдоль оси Y на плоскость XZ (Bewersdorf et al., PNAS, 2006, 103, 18137–18142).

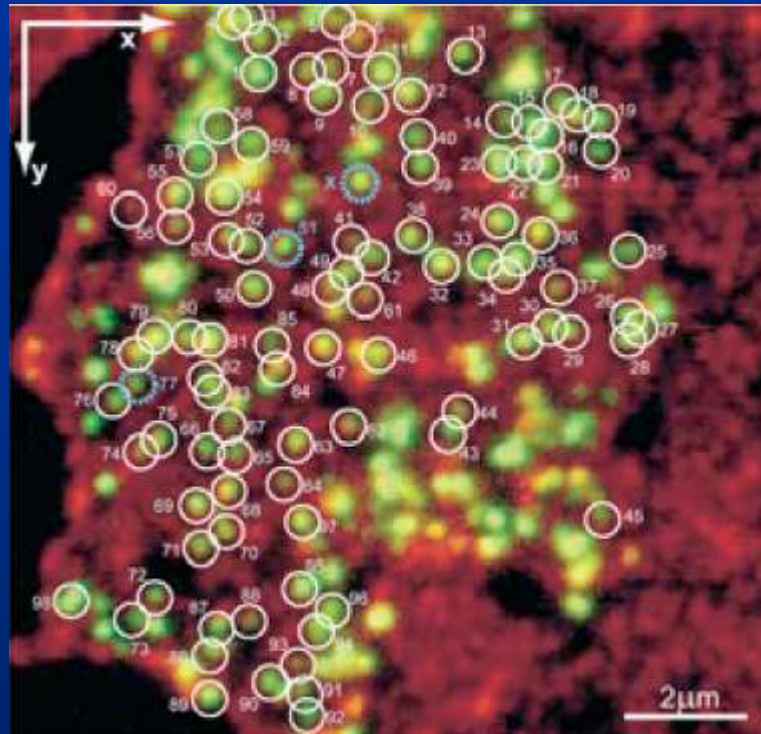
Примеры измерений с использованием 4Pi-микроскопа



Распределение флуоресцентно-меченных антител на мембране человеческого эритроцита в оптическом сечении XZ.

Четко виден просвет между мембранами, отстоящими друг от друга на 100 нм.

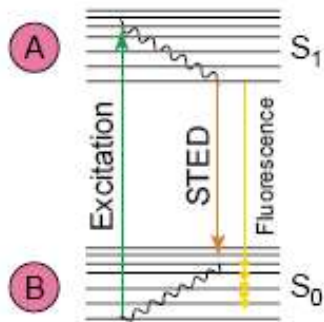
Примеры измерений с использованием 4Pi-микроскопа



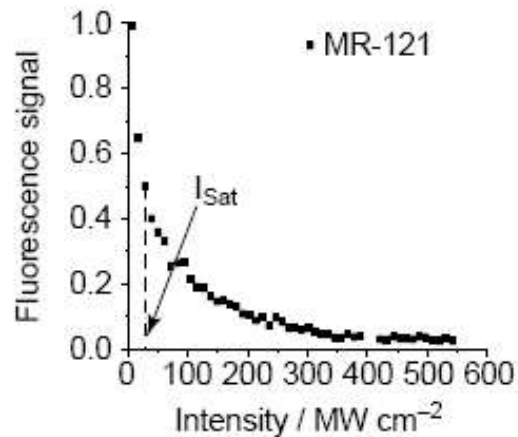
Секреторные гранулы нейроэндокринных клеток (PC12) на различных расстояниях от мембраны.
Метки – GFP и циановый 3.

Метод STED (stimulated emission depletion или стимулированное истощение эмиссии)

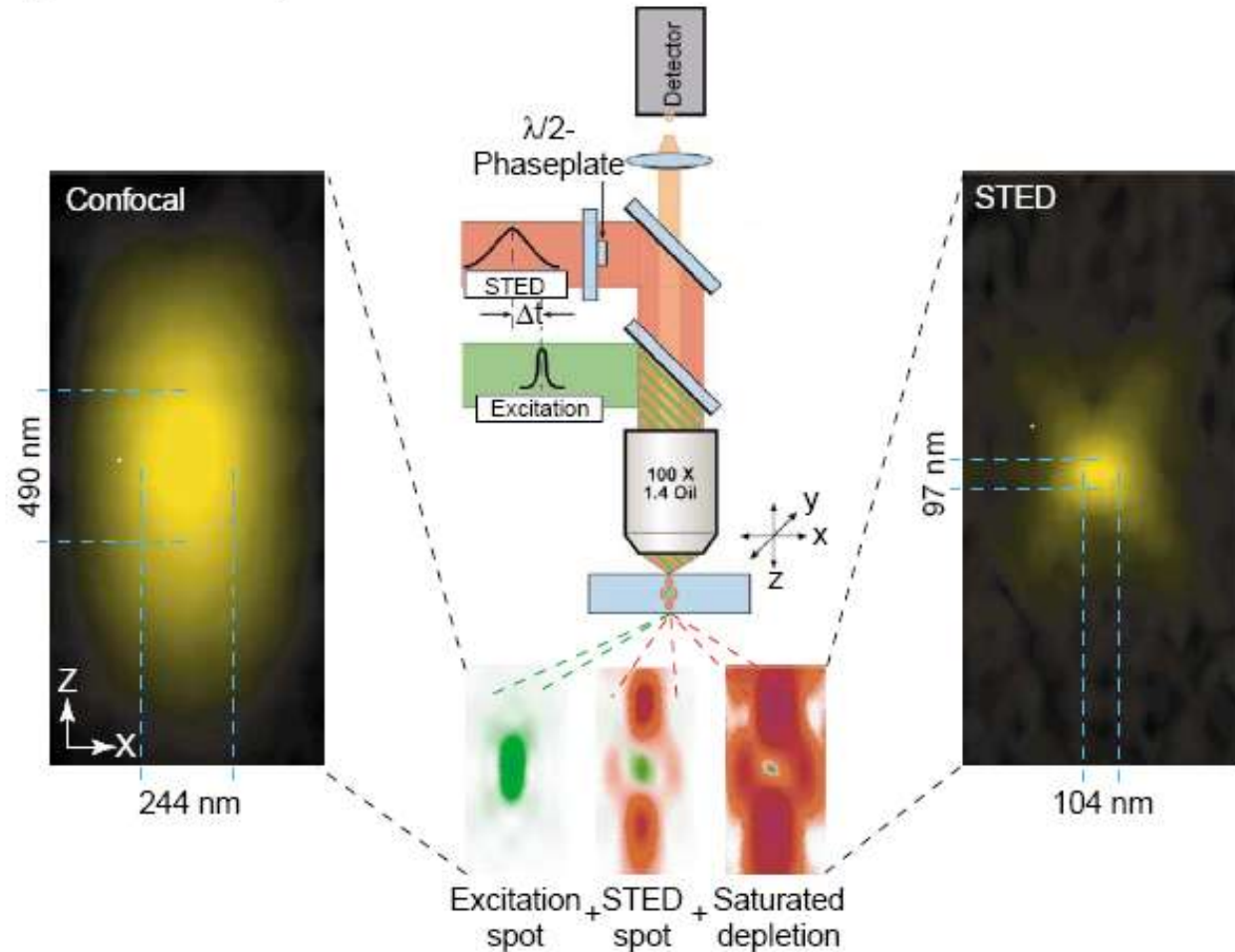
(a) STED principle



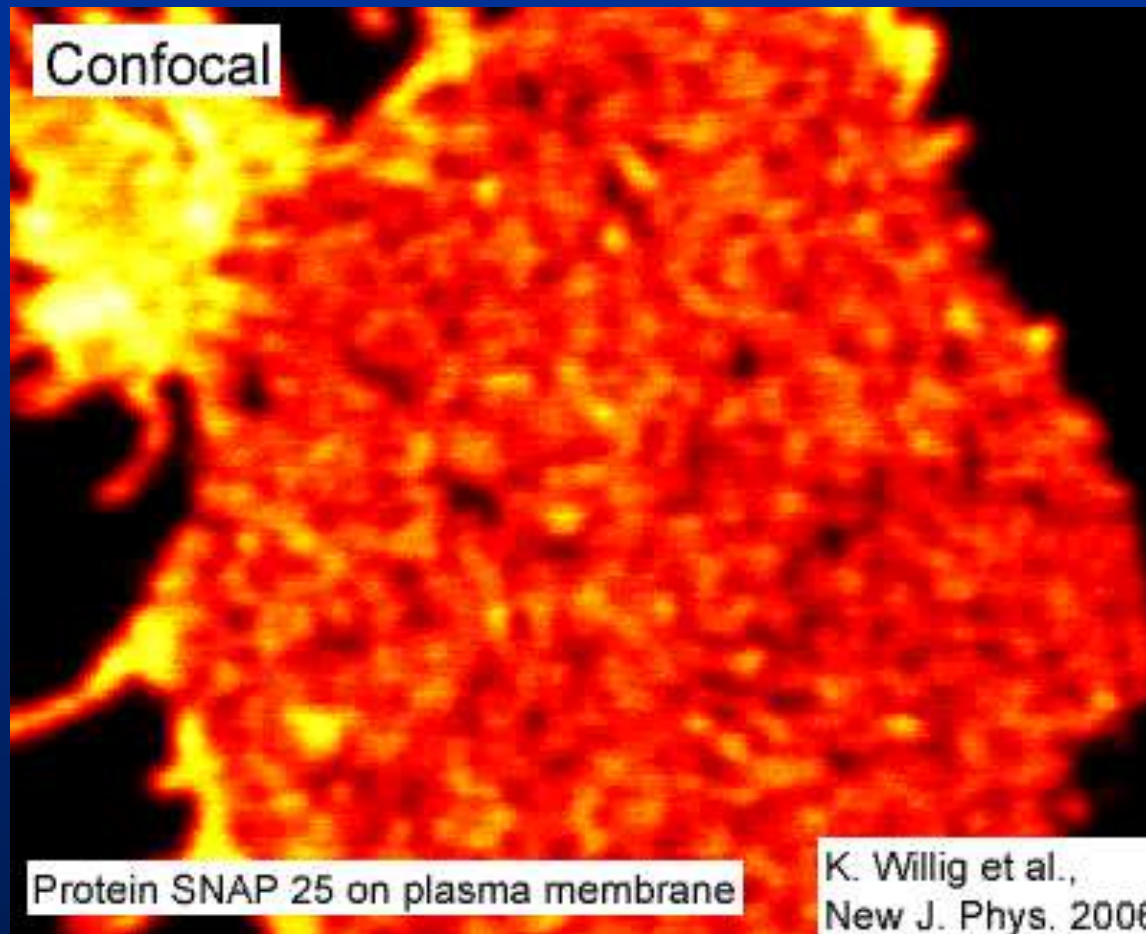
(b) Saturated depletion of state A



(c) STED microscope



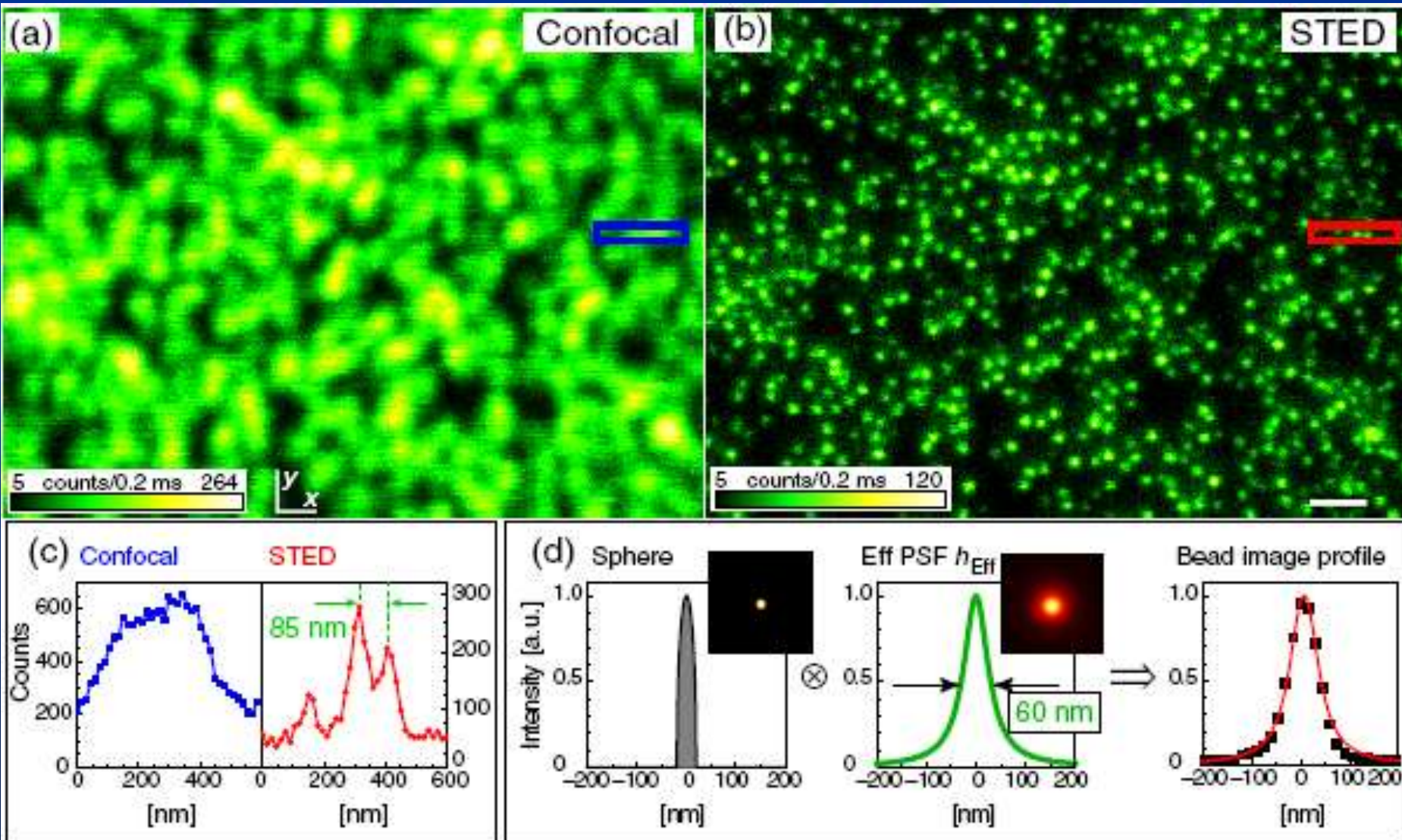
Метод стимулированного истощения эмиссии (stimulated emission depletion, STED)



Professor S.W. Hell

Department of NanoBiophotonics, Max Planck Institute for
Biophysical Chemistry, Göttingen, Germany

Метод стимулированного истощения эмиссии (stimulated emission depletion, STED)



Изображения 40 нм флуоресцирующих наночастиц

Willig et al. *New Journal of Physics* 8 (2006) 106

Области применения 4Pi- и STED микроскопии

в биологии и биомедицине:

- не повреждающие исследования живых (или фиксированных) клеток;
- изучение трехмерного клеточного распределения, транспорта и взаимодействий молекул (например, белков, ДНК, антибиотиков и т.п.);
- наноструктурные исследования клеточных органоидов (например, структурной организации клеточного ядра и динамических изменений в этой структуре под действием различных модуляторов);
- изучение клеточной мембраны (например, распределения рецепторов на мембране клеток и анализ лиганд-рецепторных взаимодействий);
- качественно новый уровень исследований микрообъектов с характерными размерами 1-5 мкм, таких как бактерии.

в исследованиях наноструктур и наноматериалов:

- изучение пространственной организации наноструктур в объеме и на подложках;
- изучение процессов ассоциации и диссоциации наноструктур;
- наноструктурный анализ прозрачных и полупрозрачных пленок из композитных материалов.

Опубликованные исследования с применением 4Pi- и STED микроскопии

- анализ архитектуры клеточных структур, включая трехмерную структуру аппарата Гольджи, митохондрий, организацию системы актиновых волокон и тубулиновых микротрубочек;**
- анализ распределения и со-локализации ряда сигнальных белков в нейрональных клетках, белков в ядре клеток;**
- изучение распределения и размера кластеров, формируемых рецепторами на мембране клеток;**
- изучение нанодоменной организации клеточных мембран;**
- исследование транспортных везикул в клетках.**