

# **Исследования на уровне единичных молекул и их комплексов методами флуоресцентной микроскопии**

**Направление развивается более 10 лет**

**Основная идея – научиться пространственно изолировать, регистрировать и анализировать слабый сигнал от одной молекулы (одного комплекса)**

**с пространственным разрешением (2D и 3D распределение молекул)**

**с разрешением во времени (анализ процессов с участием молекулы)**

**с одновременной регистрацией сигнала в двух и более спектральных диапазонах (конформационные перестройки, взаимодействия молекул)**

# Исследования на уровне единичных молекул и их комплексов методами флуоресцентной микроскопии

Необходимо обеспечить:

- 1. наличие флуорофора в составе молекулы;*
- 2. наличие высокочувствительных систем детекции;*
- 3. согласование пространственного распределения флуоресцирующих молекул с разрешающей способностью оптического микроскопа*

Требования к флуорофору:

высокая яркость (экстинкция, квантовый выход флуоресценции);

высокая фотостабильность;

слабая чувствительность спектральных параметров к микроокружению;

эмиссия в красной области спектра

Системы детекции:

лавинные фотодиоды; высокочувствительные EM-CCD камеры с

глубоким охлаждением

Разрешающая способность оптического микроскопа:

Обычный:  $\Delta X = \Delta Y = 200$  нм,  $\Delta Z$  – не обеспечивает;

Конфокальный, многофотонный  $\Delta X = \Delta Y = 200$  нм,  $\Delta Z = 500$  нм;

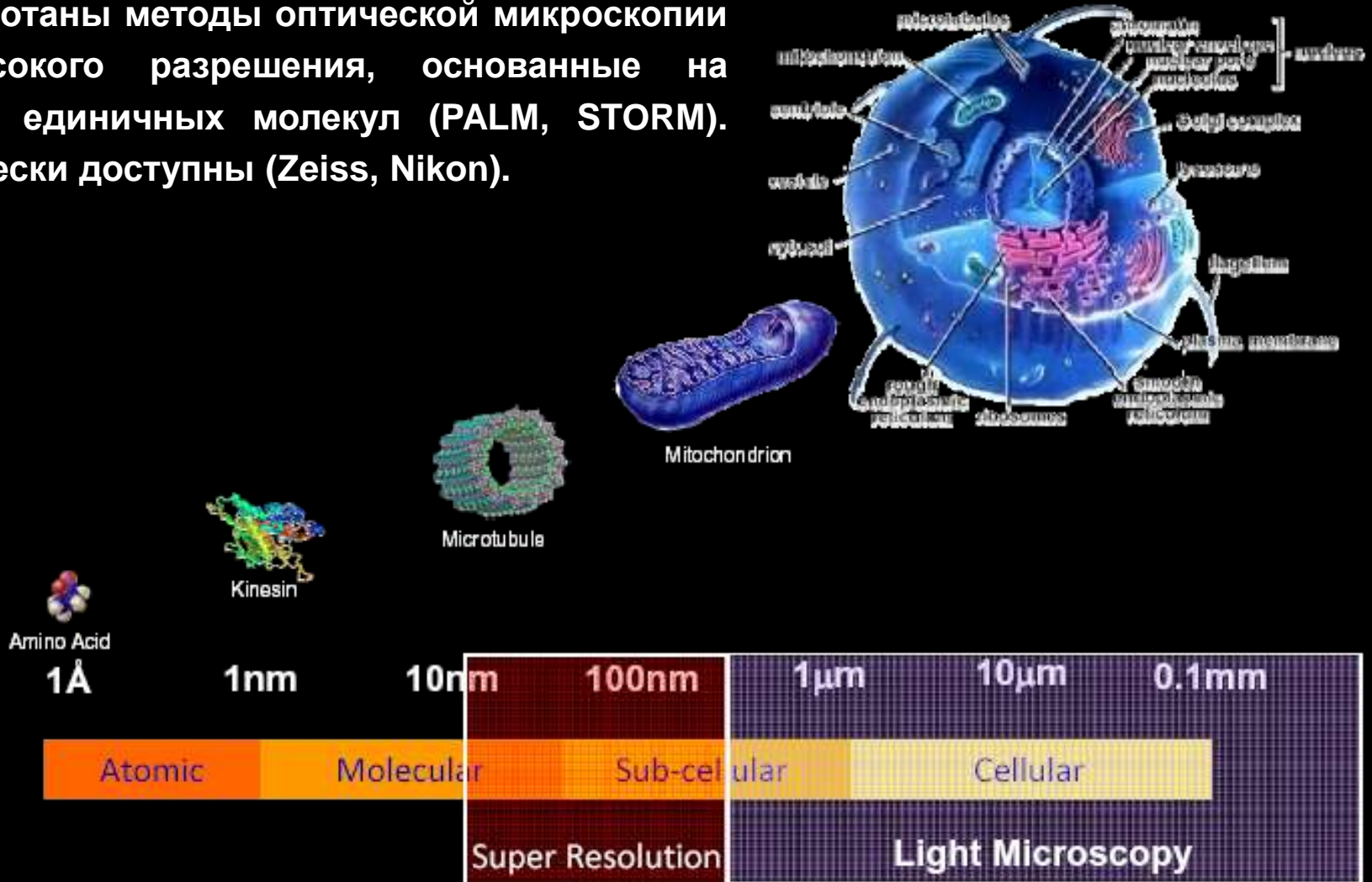
TIRF-микроскоп  $\Delta X = \Delta Y = 200$  нм,  $\Delta Z = 150$  нм.

Исследуемые молекулы должны располагаться на расстояниях больше  $2\Delta X$ ,  $2\Delta Y$ ,  $2\Delta Z$  друг от друга.

# Исследования на уровне единичных молекул и их комплексов методами флуоресцентной микроскопии

Результаты развития:

1. Разработаны методы оптической микроскопии сверхвысокого разрешения, основанные на детекции единичных молекул (PALM, STORM). Коммерчески доступны (Zeiss, Nikon).



# Stochastic Optical Reconstruction Microscopy **STORM**

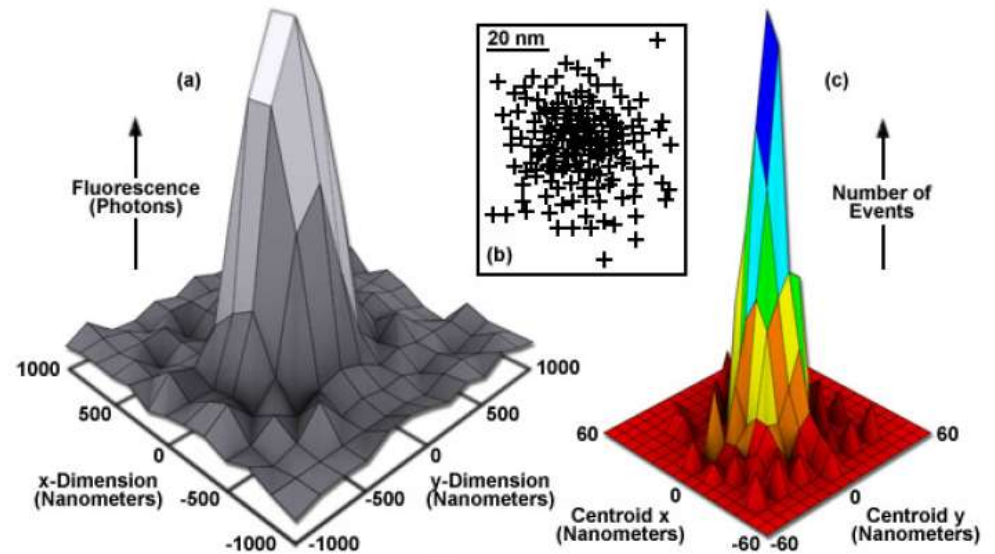
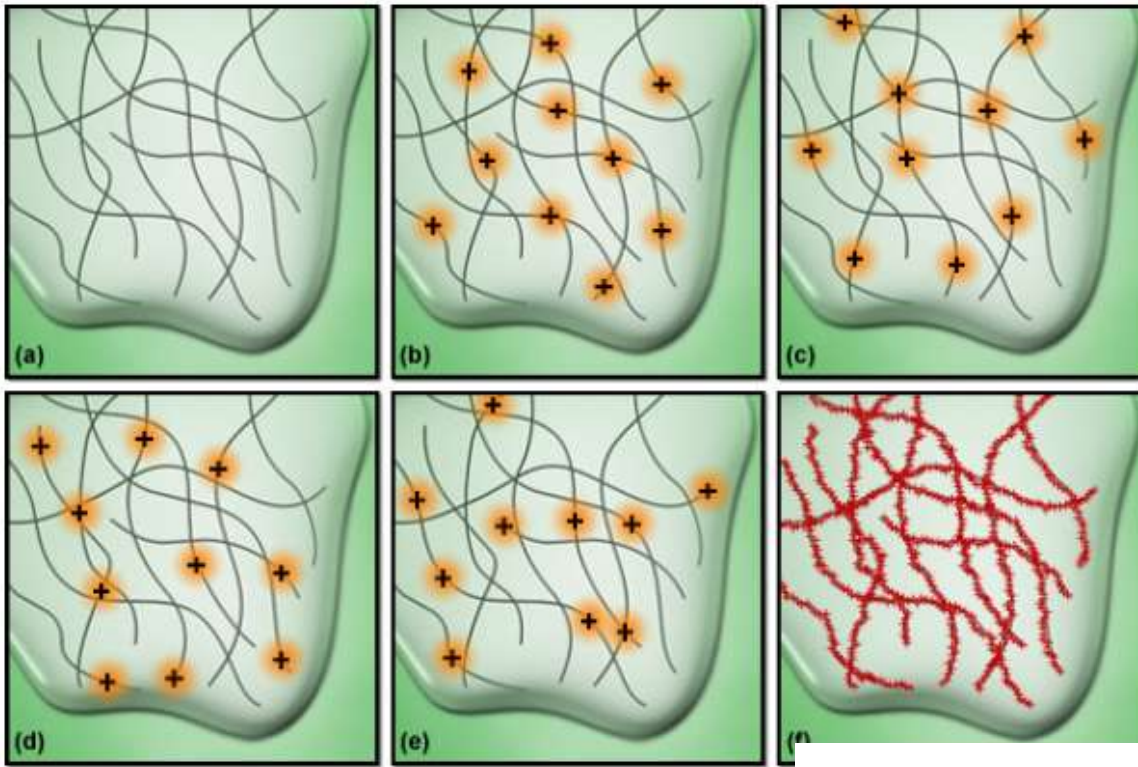
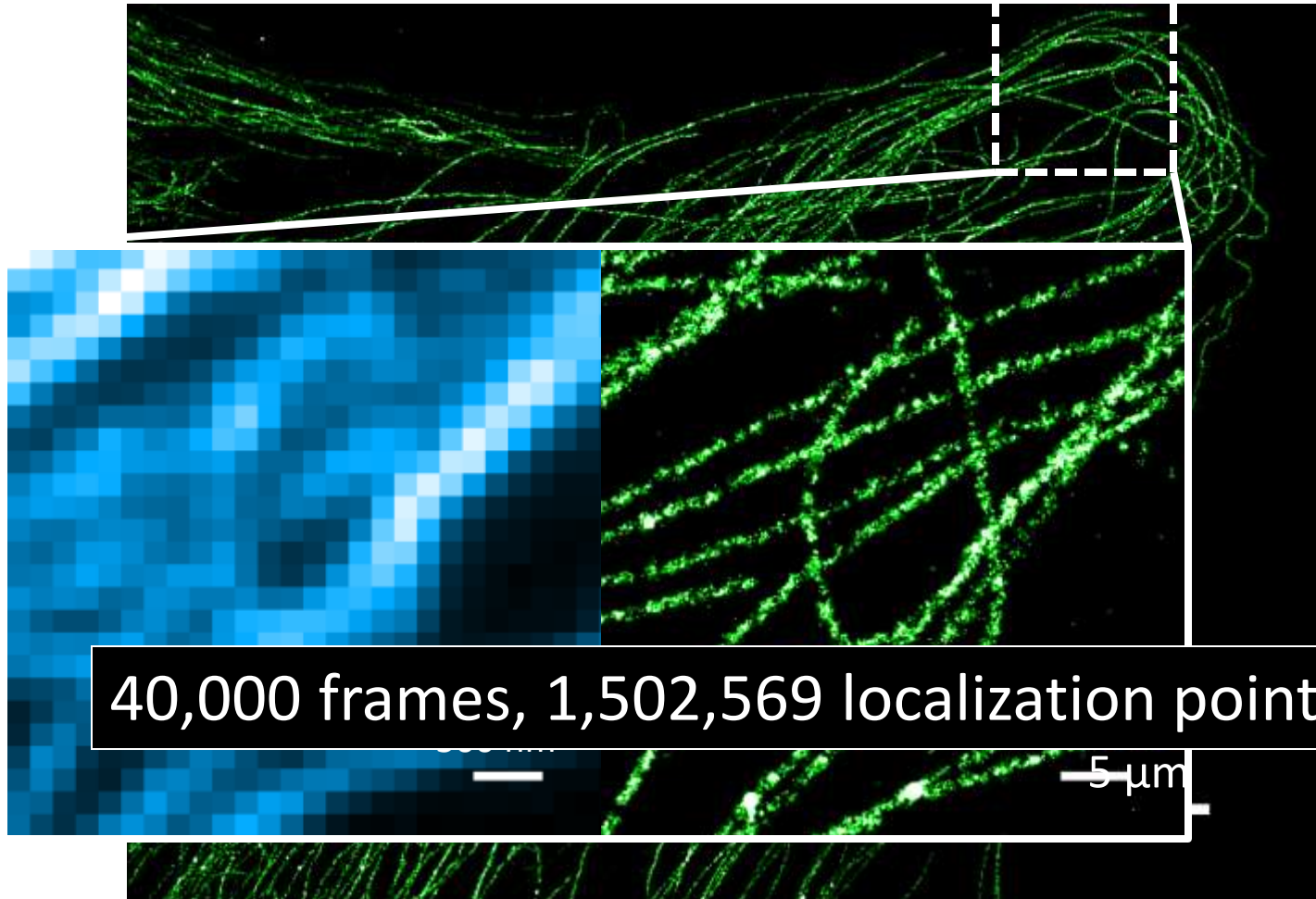


Figure 3

# STORM

A technique that creates a super-resolution image from a fixed sample labeled with photo-switchable dye pairs. It consists of many acquisition cycles and a post acquisition analysis cycle.





# Pointillism



A Sunday Afternoon on the island of La Grande Jatte – Georges-Pierre Seurat

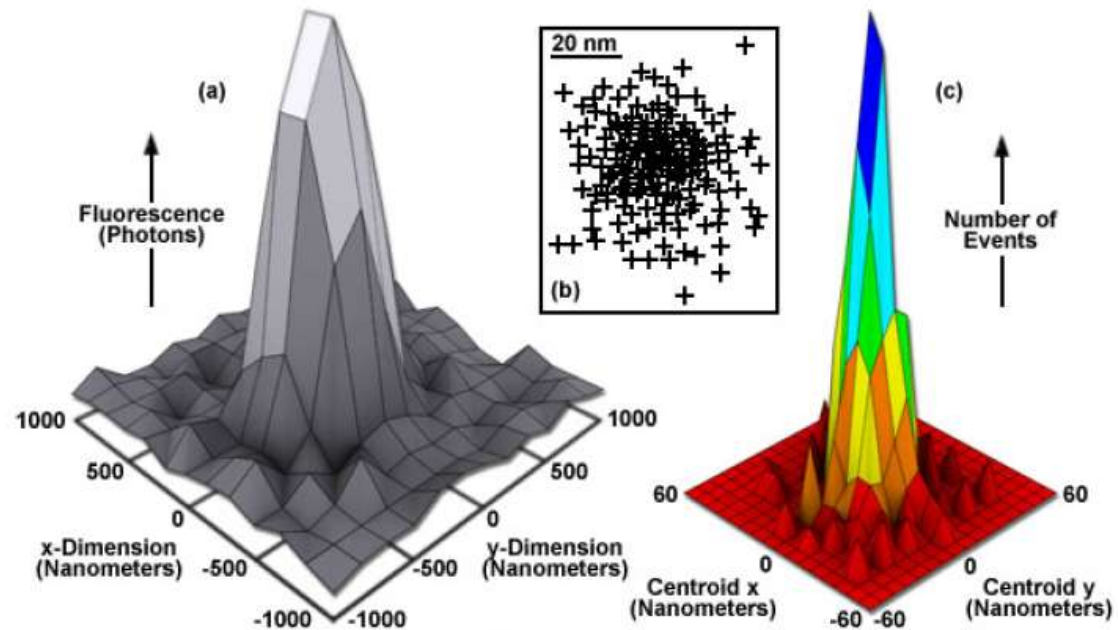
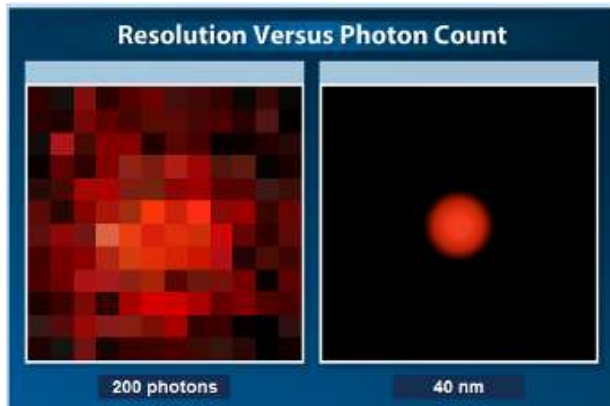
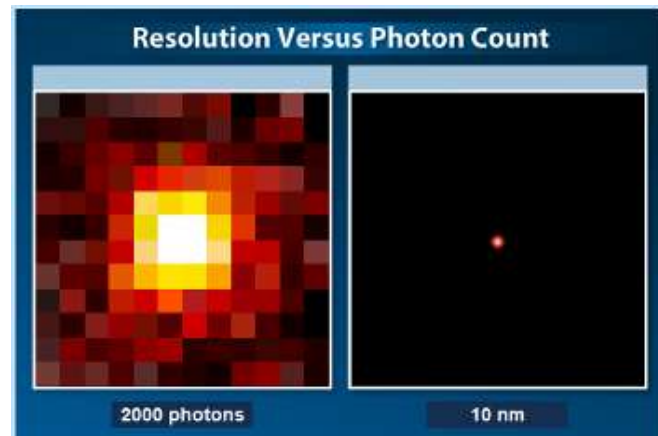
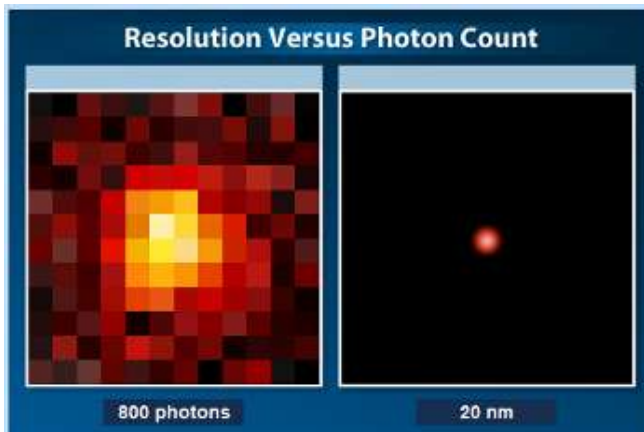


Figure 3

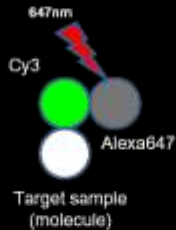


Localization accuracy ~20-30nm laterally  
and ~50nm in Z

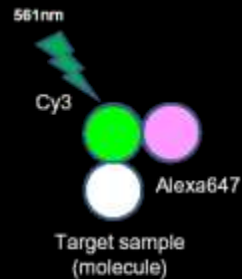


Nikon

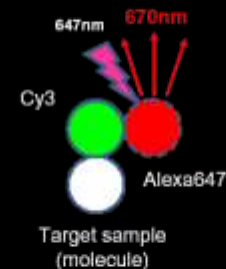
Step 1 ) Inactivate reporter molecule by irradiation of 647nm



Step 2: Excite "Activator" to activate "Reporter" molecule.



Step 3 : Excite "Reporter" and emission light is captured by camera.



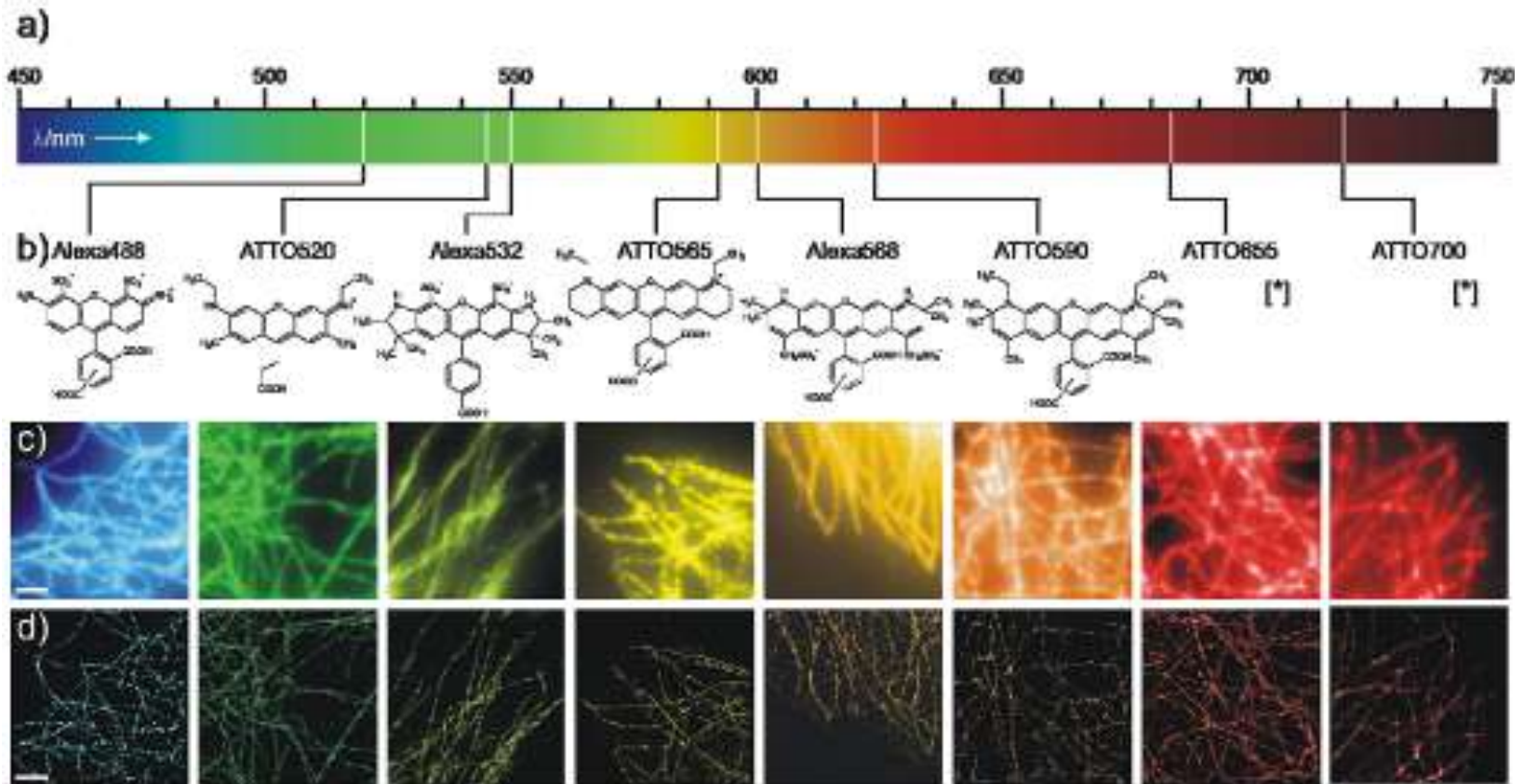
... Repeat these procedures to reconstruct image

Uses **Photo-Switchable** fluorescent dye pairs to stochastically switch on Reporters through many cycles. **Activators** and **Reporters**



# 20 nm optical resolution with standard fluorophores

Heilemann et al. (2009)



And thus the native hue of resolution (Shakespear, Hamlet)

# The number of photons makes the difference!

Nikon

Dyes

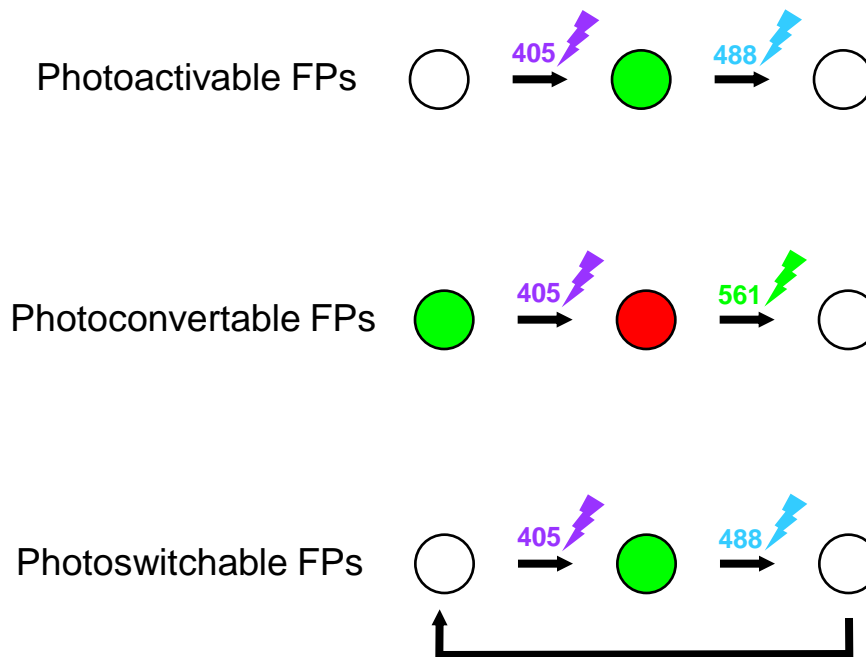
FPs

Fluorophore		Activation wavelength (nm)	Before activation		After activation		Reversible
			Ex (nm)	Em (nm)	Ex (nm)	Em (nm)	
Cyanine dyes	Cy5 & Alexa 647	350–570 <sup>e</sup>	NF		647	665	Yes
	Cy5.5				674	692	
	Cy7				746	773	
Photochromic rhodamine	SRA545	375	NF		Green	545	Yes <sup>f</sup>
	SRA552					552	
	SRA577					577	
	SRA617					617	
Caged dyes	Caged fluorescein	< 405	NF		497	516	No
	Caged Q-rhodamine				545	575	
Cyan/dark-to-green FP	PA-GFP	405	400	517	504	517	No
	PS-CFP2		400	468	490	511	
Green-to-red FP	Kaede	405	508	518	572	582	No
	EosFP	405	505	516	569	581	
	Dendra2	405–488	490	507	553	573	
Dark-to-red FP	PAmCherry	405	NF		564	595	No
Reversible FP	Dronpa	405	NF		503	518	Yes
	Dronpa2				486	513	
	Dronpa3				487	514	
	rsFastLime				496	518	
	bsDronpa				460	504	
	EYFP	405	NF		513	527	

# Samples for localization microscopy

## Fluorescent proteins suitable for PAL-M

PAL-M relies on fluorochromes that can be either photoactivated, photoconverted or reversibly photoswitched (e.g. certain fluorescent proteins).



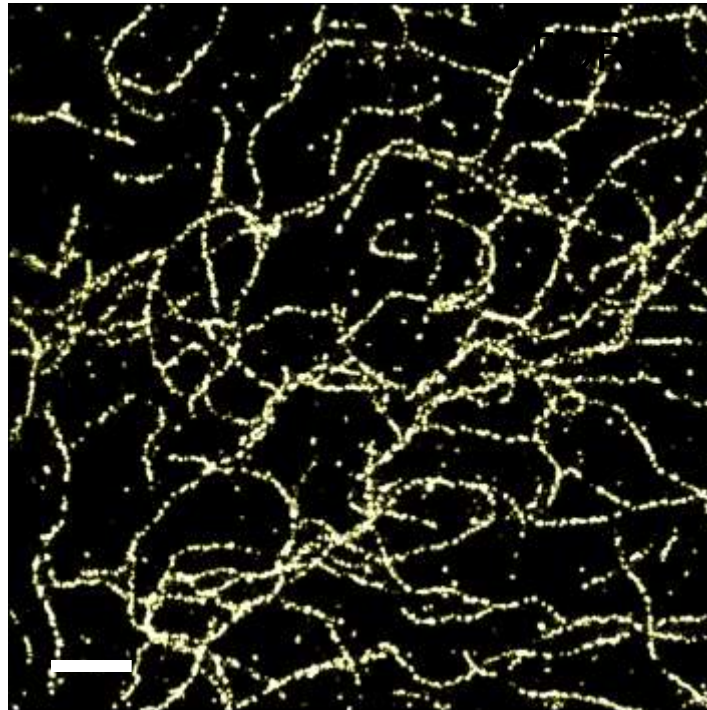
Dendra		1 (2006)
Dronpa		2 (2004)
EosFP		3 (2004)
Kaede		4 (2002)
KFP1		5 (2003)
KikGR		6 (2005)
Padron		7 (2008)
PA-GFP		8 (2002)
PA-mCherry		9 (2009)
PA-mRFP1-1		10 (2005)
PS-CFP2		11 (2004)
rsCherry		12 (2008)
rsCherryRev		12 (2008)
rsFastLime		13 (2007)



Conventional

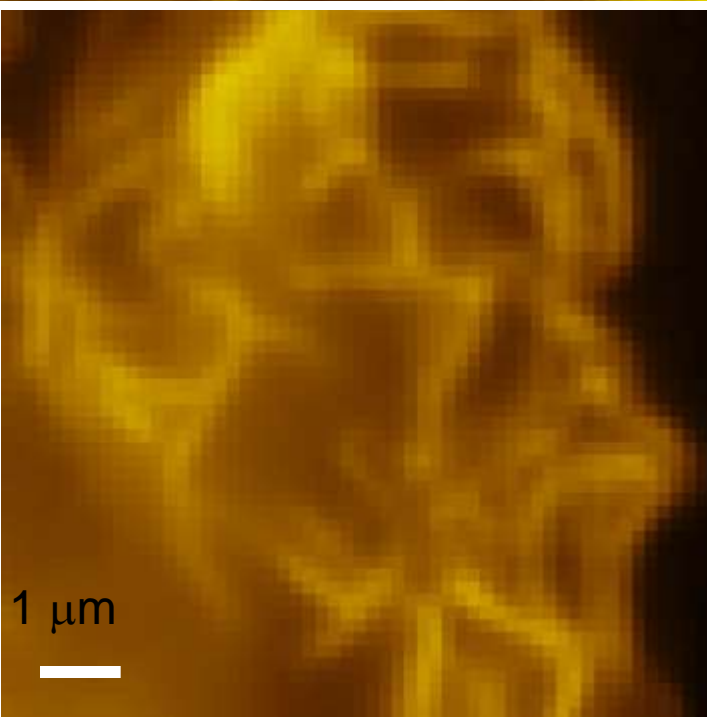
1  $\mu\text{m}$

Vimentin

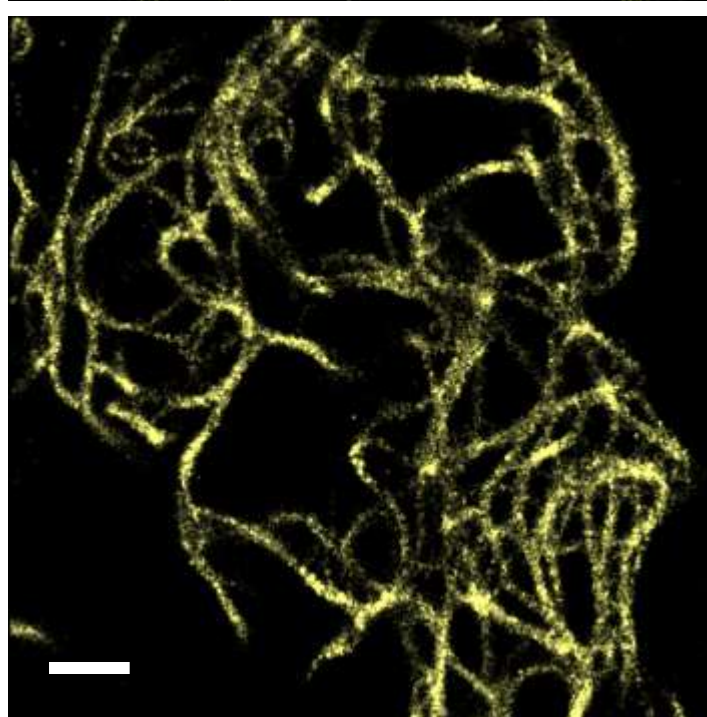


Cy5/Alexa 647

~6000  
photons/cycle



1  $\mu\text{m}$

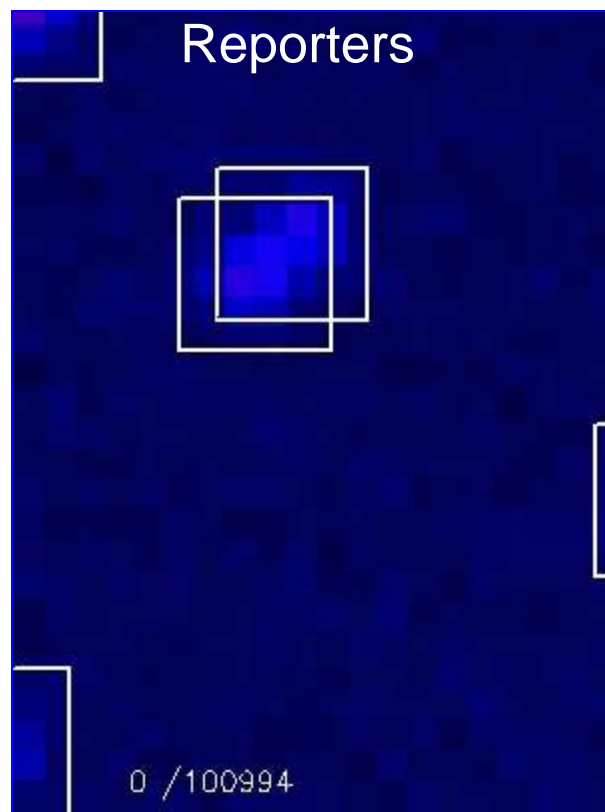
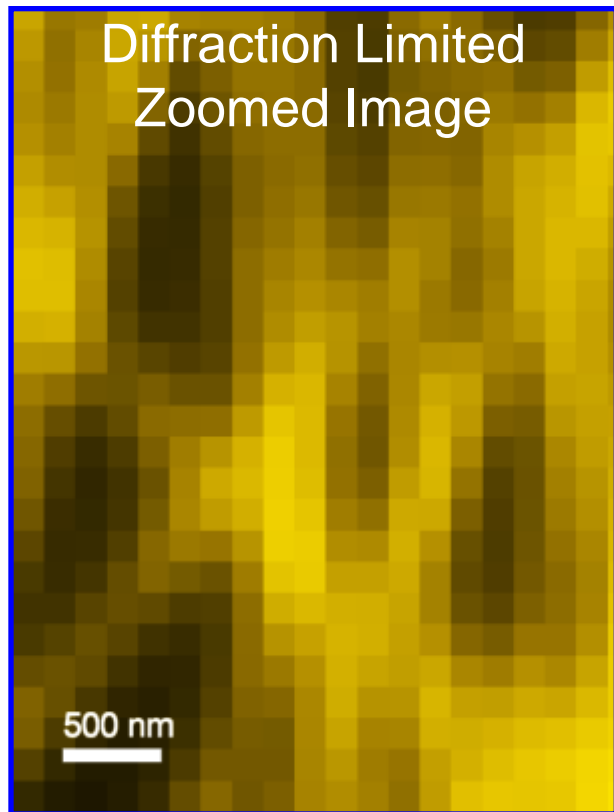
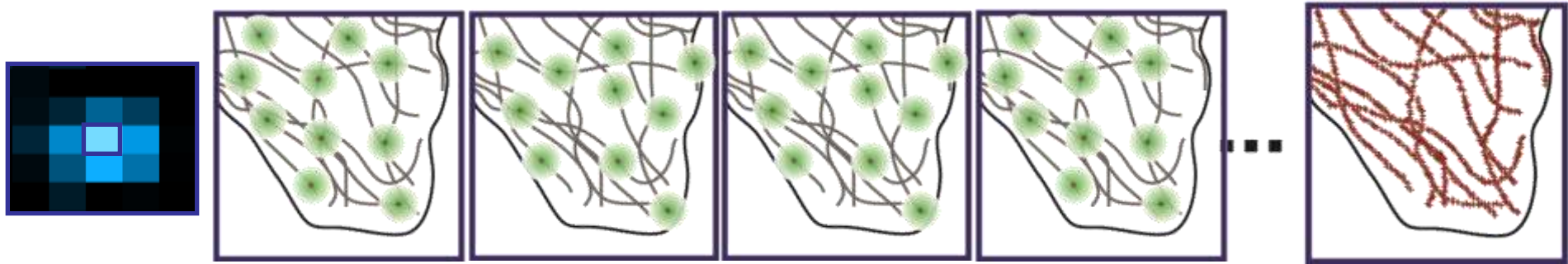


EosFP

~1000  
photons/cycle

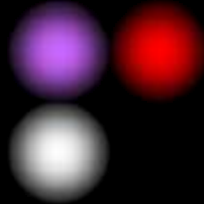


# Stochastic Reconstruction



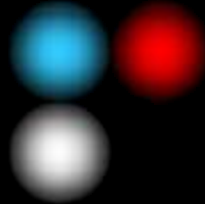
Alexa405

Alexa647



CY2

Alexa647



CY3

Alexa647



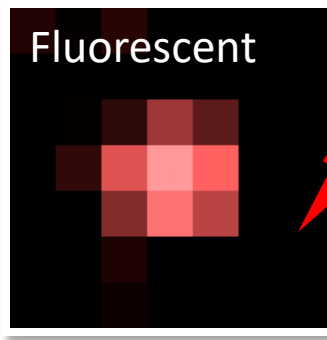
3 kinds of "Activator" and 1 kind of "Reporter" are available.

Alexa405 - Alexa647 Compound

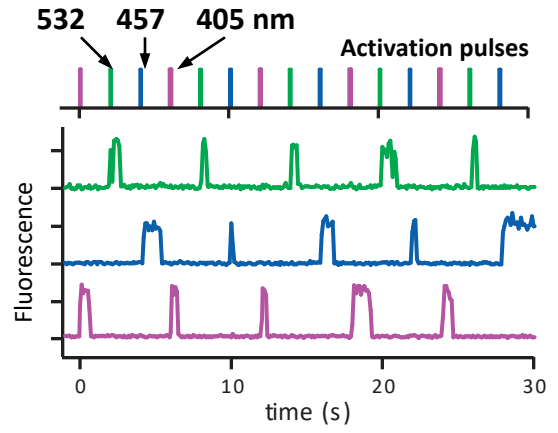
CY2 - Alexa647 Compound

CY3 - Alexa647 Compound

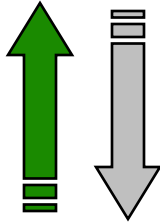
# N-STORM IS MULTI COLOUR!



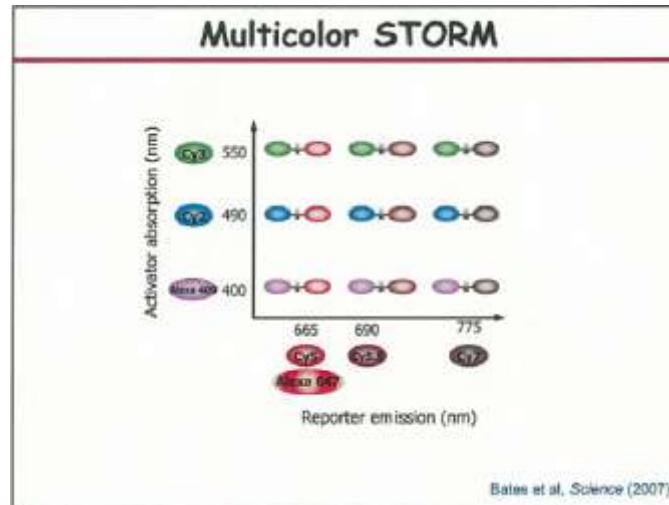
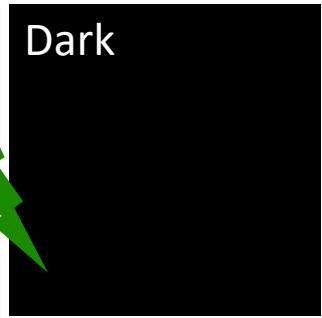
650 nm



photoactivation



Deactivation

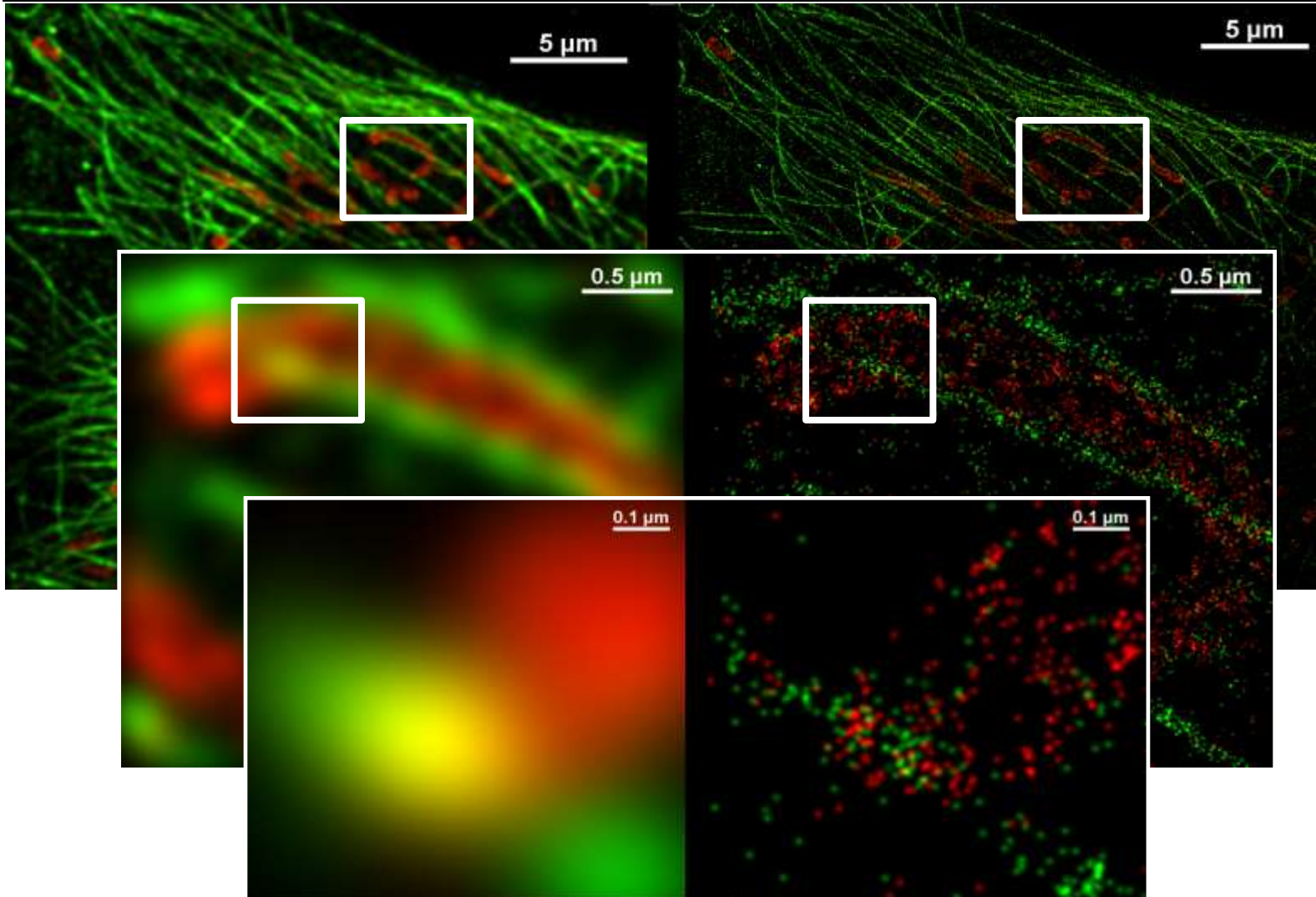


Note: 9 dye pair combinations currently available

# N-STORM 10x resolution increase

Confocal  
resolution 200 nm

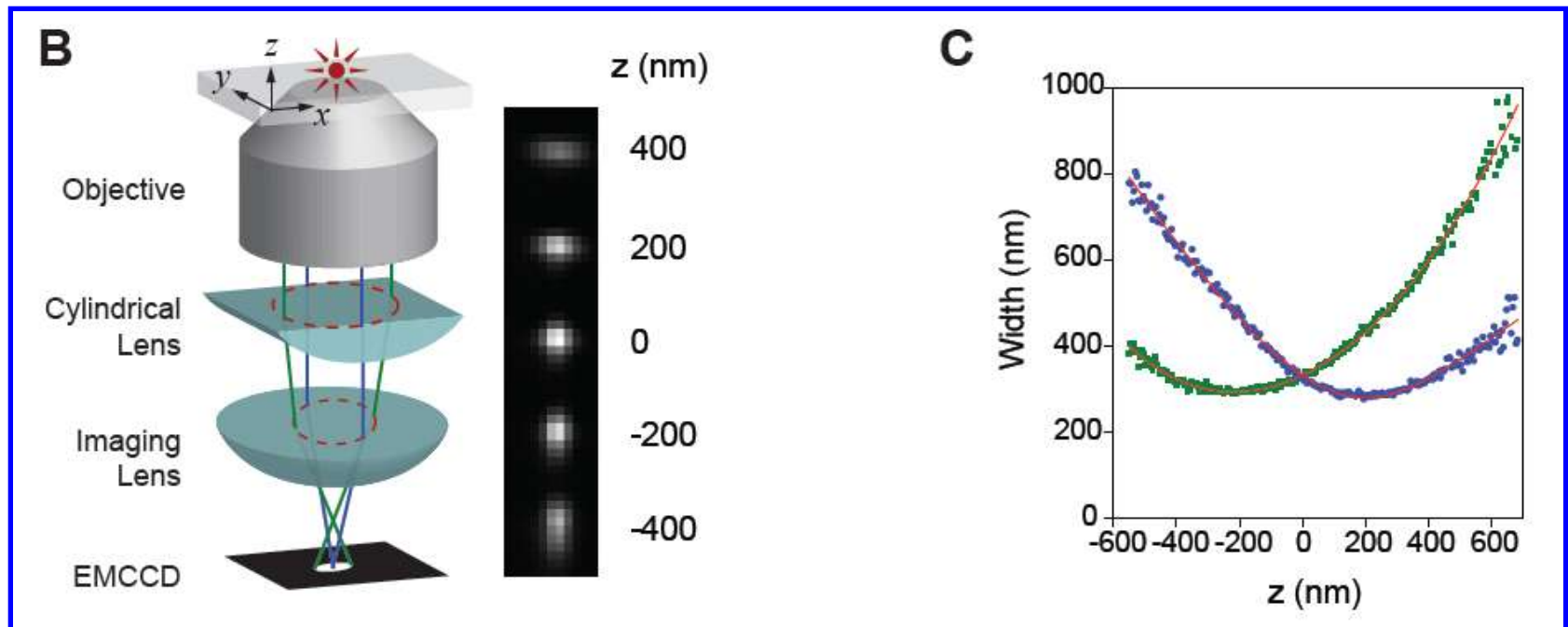
STORM  
resolution ~ 20 nm



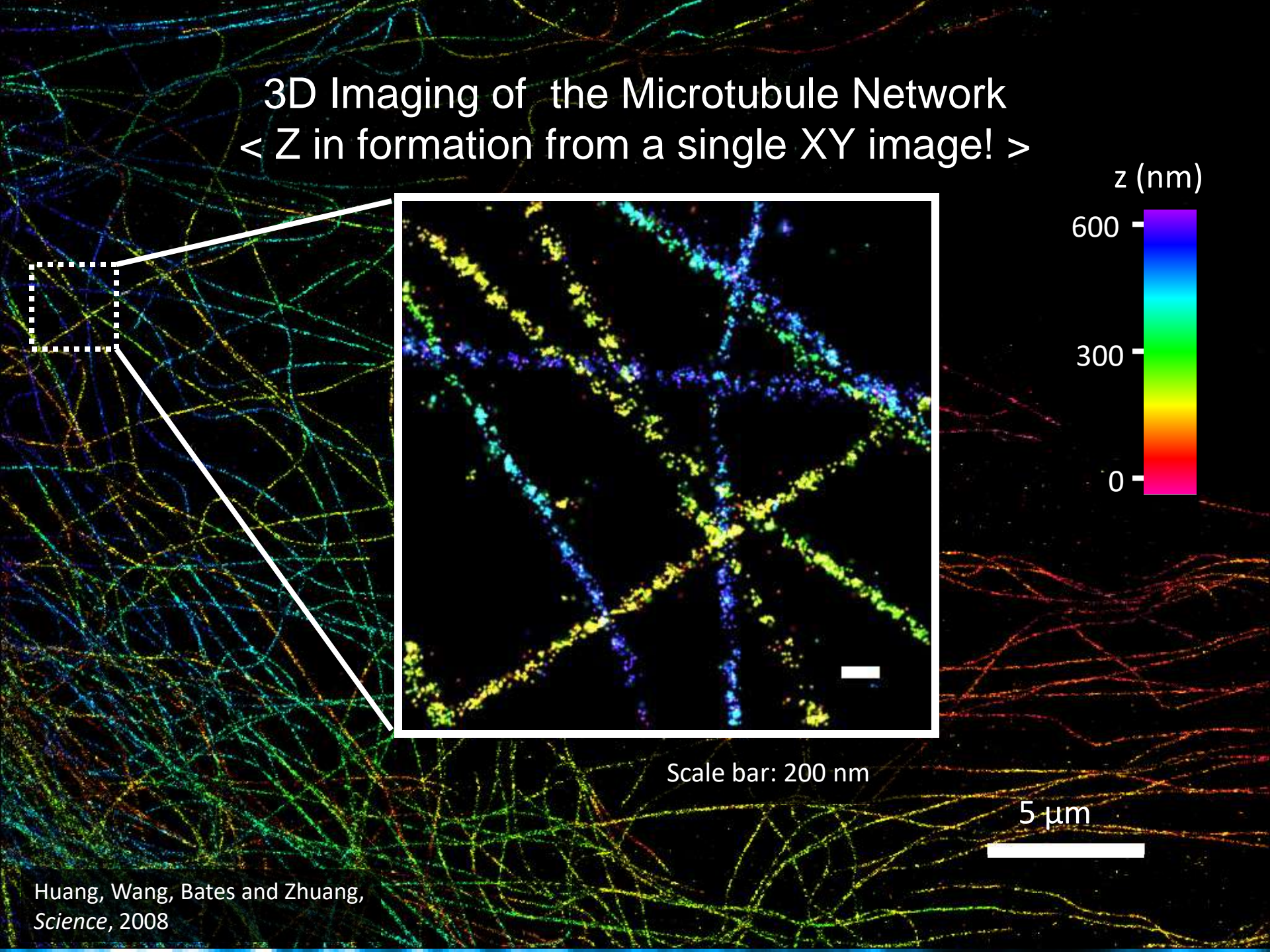


# 3D STORM Module

- Cylindrical lens between the microscope and EMCCD camera introduces an elliptical distortion that increases depending on how much the molecules are above or below the plane of focus.
- Typical resolution in Z is improved to  $\sim 50\text{nm}$  within  $\sim \pm 500\text{nm}$



# 3D Imaging of the Microtubule Network < Z information from a single XY image >



z (nm)

600

300

0

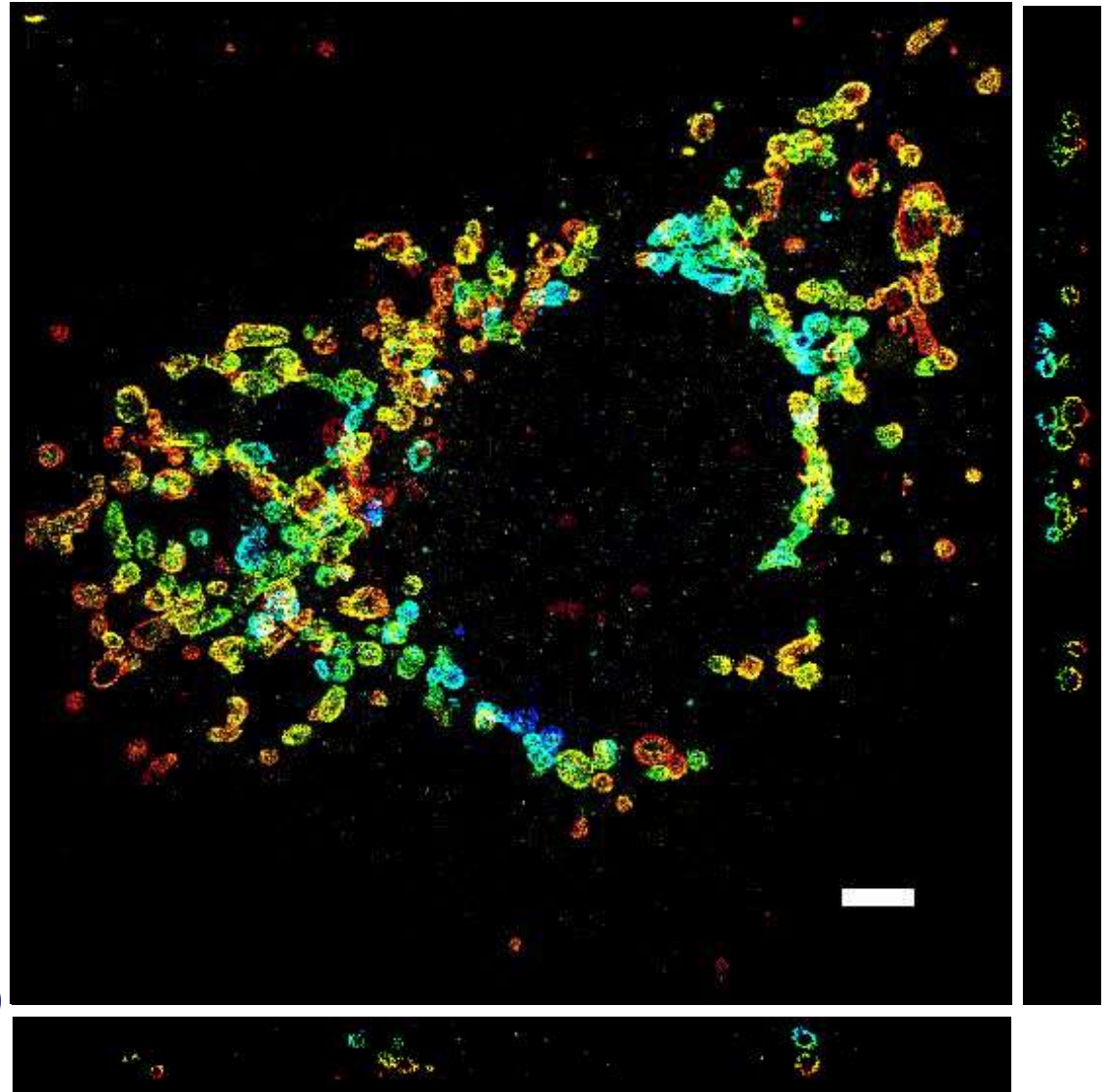
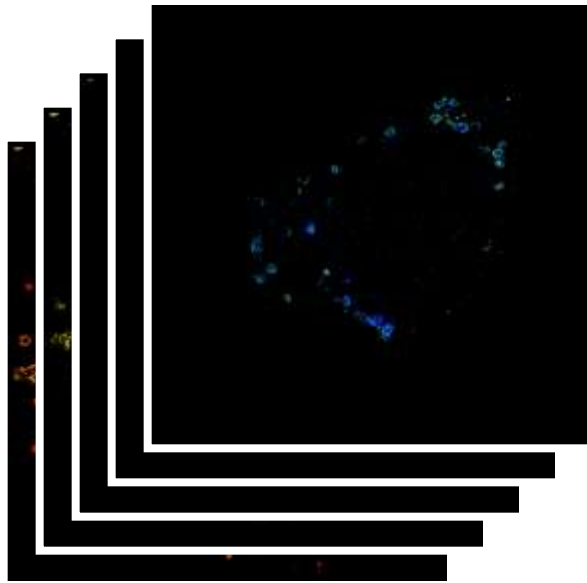
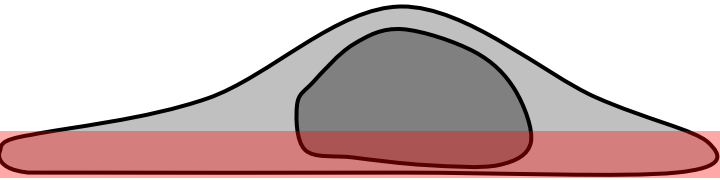
Scale bar: 200 nm

5 μm



# Whole cell 3D STORM

Mitochondria



Huang, Jones et al, *Nat. Meth.* (2008)

# Nikon N-STORM

NIKON CORPORATION  
Instruments Company





# ELYRA / LSM 780

The Superresolution Platform from Carl Zeiss

NIKON CORPORATION  
Instruments Company

