

# **Введение в методы микроскопии в биологии.**

## **Оптическая микроскопия**

**Алексей Валерьевич Феофанов**

**Кафедра биоинженерии**

**Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова**

**Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии  
биомолекул**

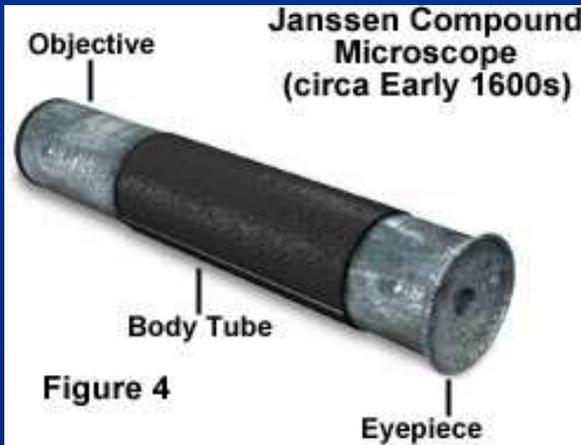
**ИБХ РАН**

**Лекция № 1**



## Из истории микроскопии

Первые микроскопы появились в конце 16 - начале 17 века



Имя изобретателя и дата изобретения микроскопа точно неизвестны

Возможно, что в ~ 1590 г микроскоп было изобретен в семейной мастерской голландских мастеров очков Ханса Янсена и его сына Захария Янсена

Известно, что Галилео Галилей представил публике свою модель сложного микроскопа в 1609 г

Возможный изобретатель микроскопа - Корнелий Дреббель. Он демонстрировал работающий микроскоп в 1619 г

## Из истории микроскопии

Термин «микроскоп» был предложен в 1625 г. членом Римской «Академии зорких» («Akademia dei lincei») И. Фабером (от *микро...* и греч. *skopéo* - смотрю).

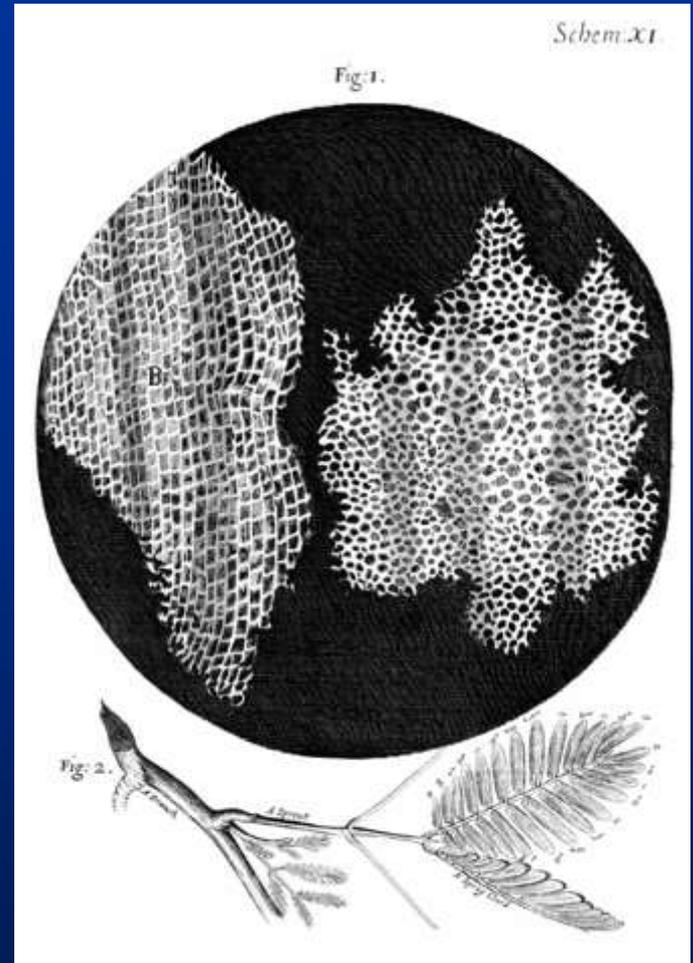
В качестве инструмента для научных исследований, в частности, в анатомической практике сложный микроскоп Галилея начали применять примерно с 1624-1625 г.

# Из истории микроскопии

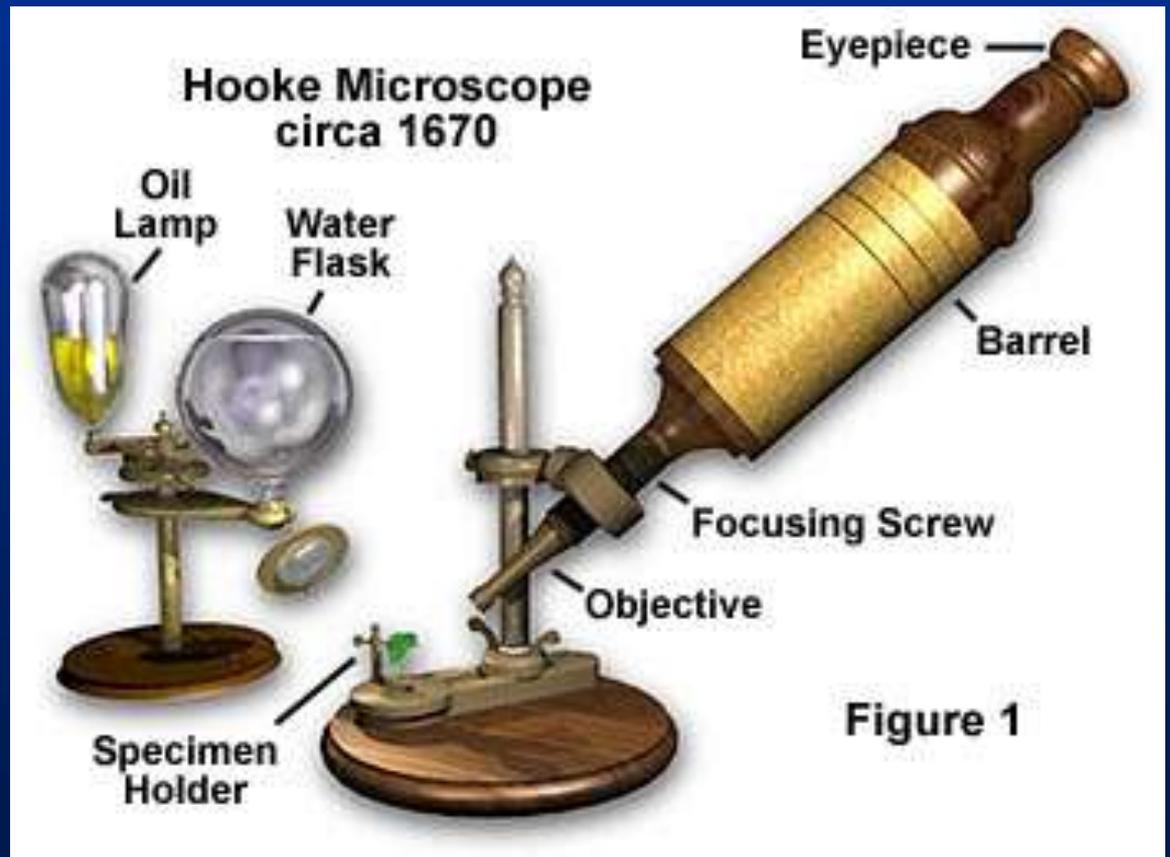
Наиболее ранние применения оптической микроскопии в биологических исследованиях - работы Роберта Гука (R. Hooke 1635-1703).



микроскоп Роберта Гука



первое микро- изображение растительных клеток (1665 г)  
Термин «клетка» (cell) – автор Р.Гук

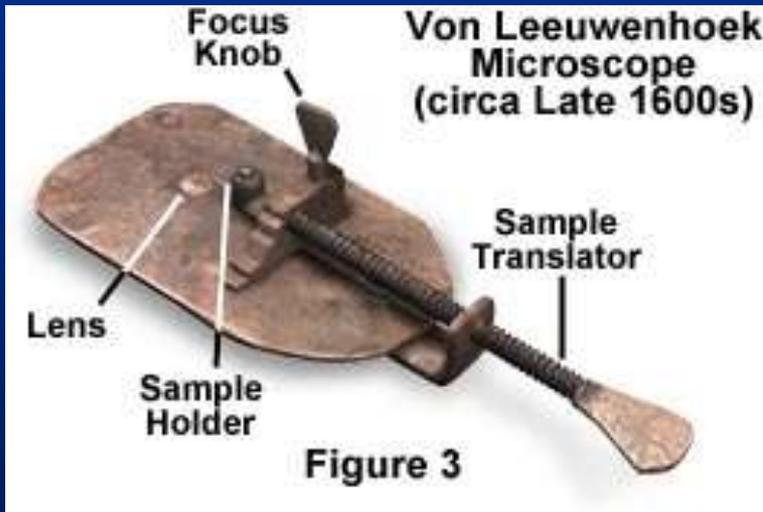


## Из истории микроскопии

**Антони ван Левенгук (A. van Leenwenhoek, 1632 - 1723)**

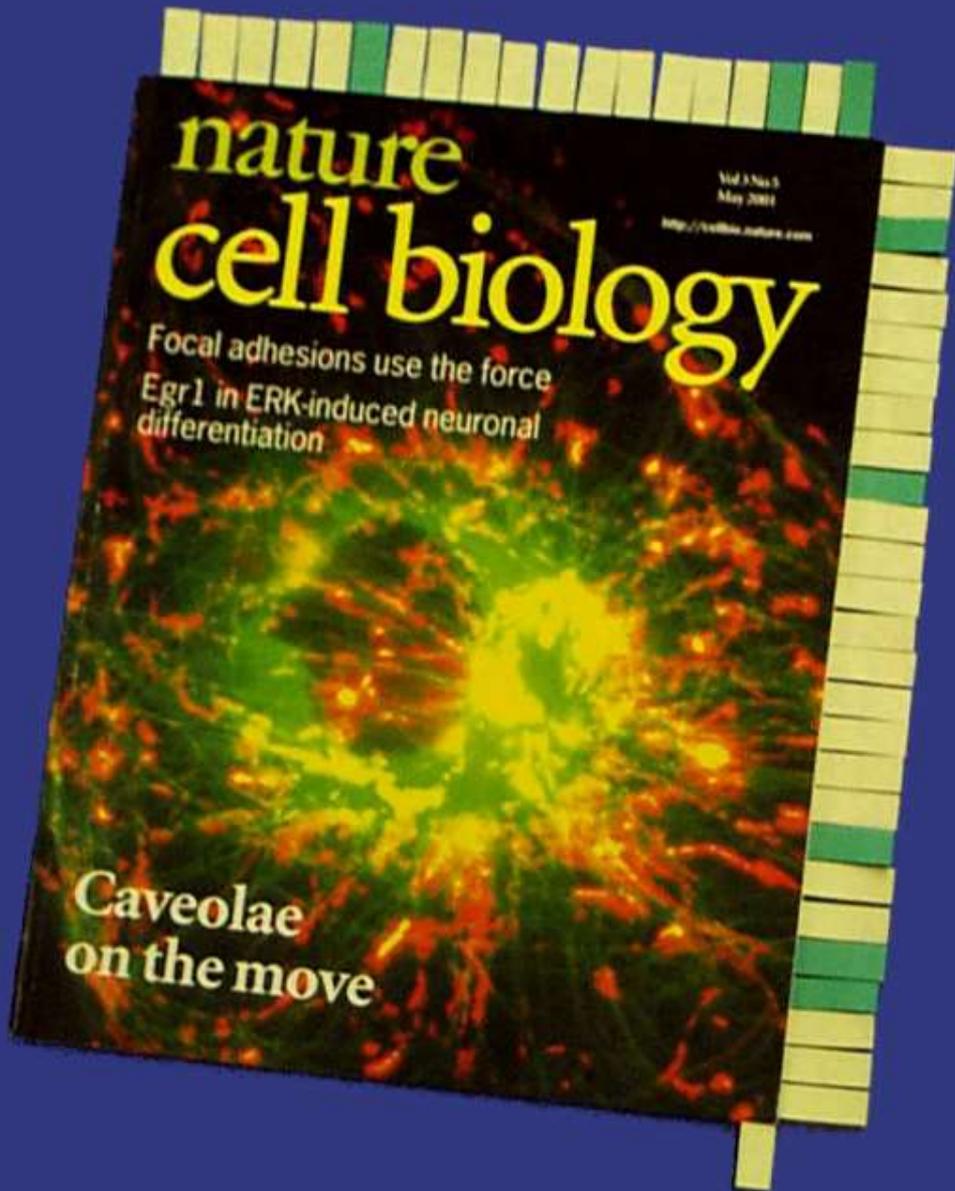
**научился изготавливать 300-кратные высококачественные линзы, используя микроскопию, первым зарисовал и описал**

**сперматозоиды,  
эритроциты,  
инфузории,  
строение глаз насекомых,  
мышечные волокна.**



**Левенгук считается открывателем микроорганизмов и пионером применения микроскопии в зоологии.**

# *Важность оптической микроскопии*



Оптическая  
микроскопия



Другие методы  
микроскопии

*From Nikon presentation*

# Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная оптическая микроскопия белого света
- Широкопольная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия
- Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная *микроспектроскопия*
- Флуоресцентная проточная цитометрия
- Многофотонная флуоресцентная микроскопия
- Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия
- Флуоресцентная микроскопия на основе эффекта полного внутреннего отражения
- Флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения (4-Пи микроскопия, STED-микроскопия на основе стимулированного обеднения эмиссии, N-SIM, N-STORM)
- Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул и их комплексов

## **Разнообразие методов оптической микроскопии**

### **Широкопольная оптическая микроскопия белого света**

**Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм**

**Аксиальное разрешение – нет**

#### **\* Окрашенные и/или контрастные объекты**

**Наблюдение объектов в проходящем свете**

**Наблюдение объектов в отраженном свете**

#### **\* Неокрашенные слабоконтрастные объекты**

**Поляризационная микроскопия**

**Темнопольная микроскопия**

**Фазовоконтрастная микроскопия**

**Микроскопия на основе дифференциального  
интерференционного контраста**



# Разнообразие методов оптической микроскопии

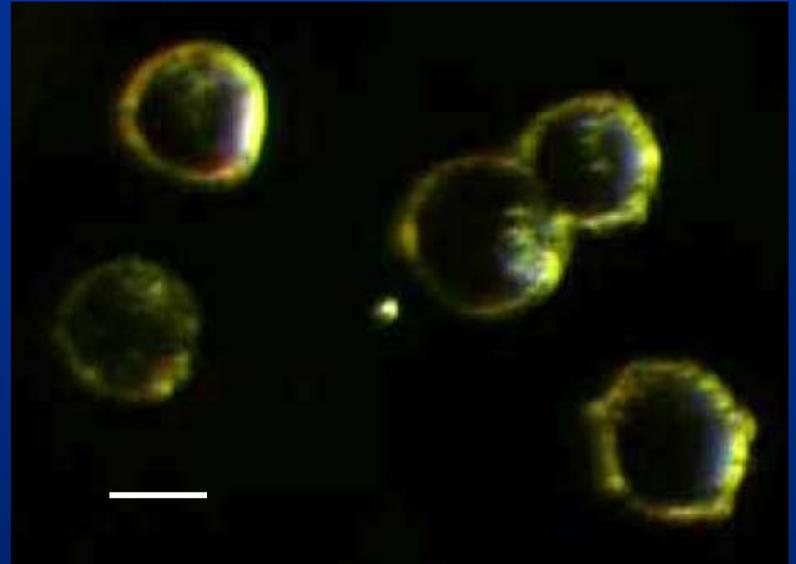
## Широкопольная оптическая микроскопия белого света

\* Неокрашенные слабоконтрастные объекты

## Темнопольная микроскопия

## Фазовоконтрастная микроскопия

## ДИК-микроскопия



# Разнообразие методов оптической микроскопии

## Широкопольная оптическая микроскопия белого света

\* Неокрашенные слабоконтрастные объекты

## Поляризационная микроскопия



**кристаллы  
витамина С**

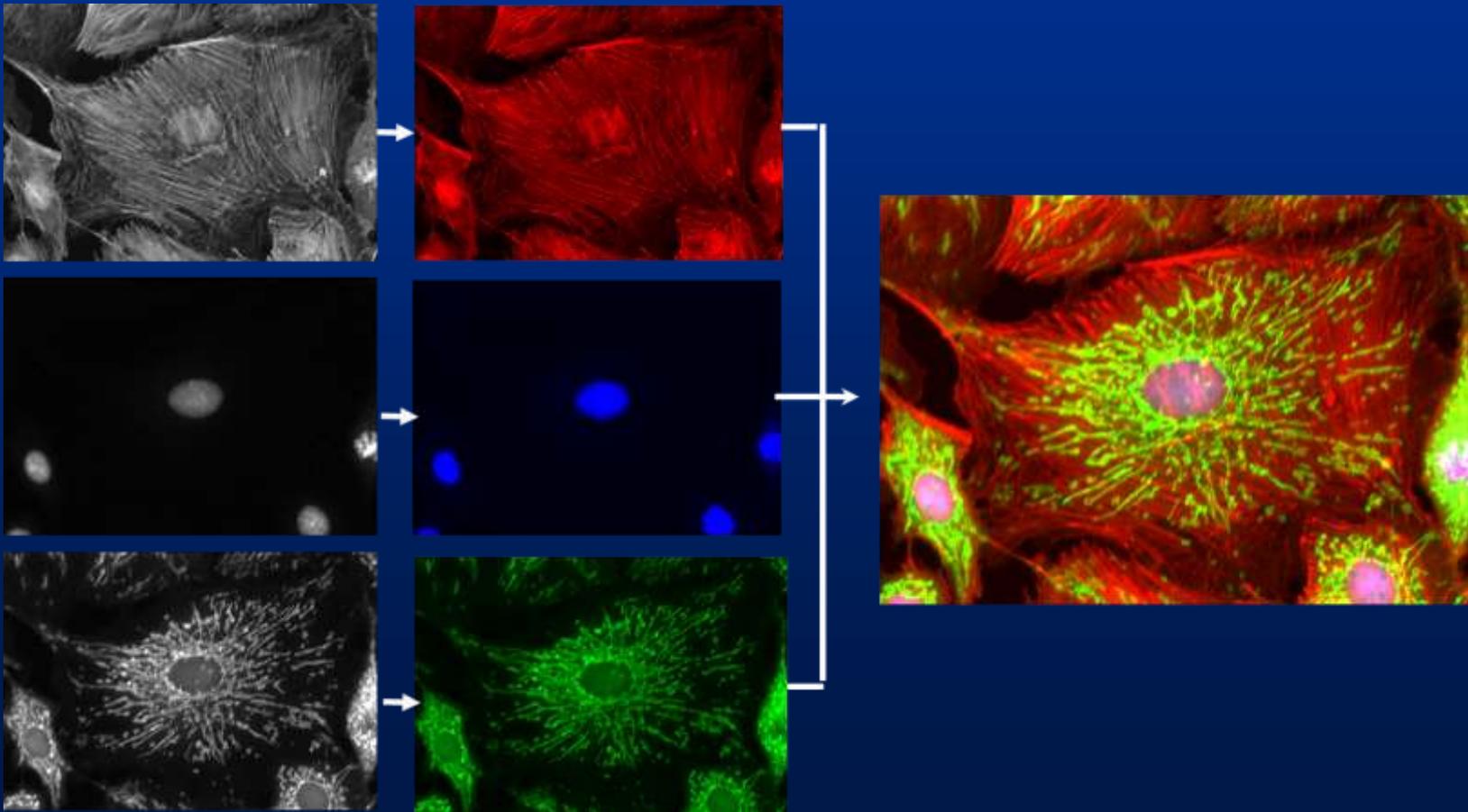
**амилоидные  
волокна**

# Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная флуоресцентная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – нет



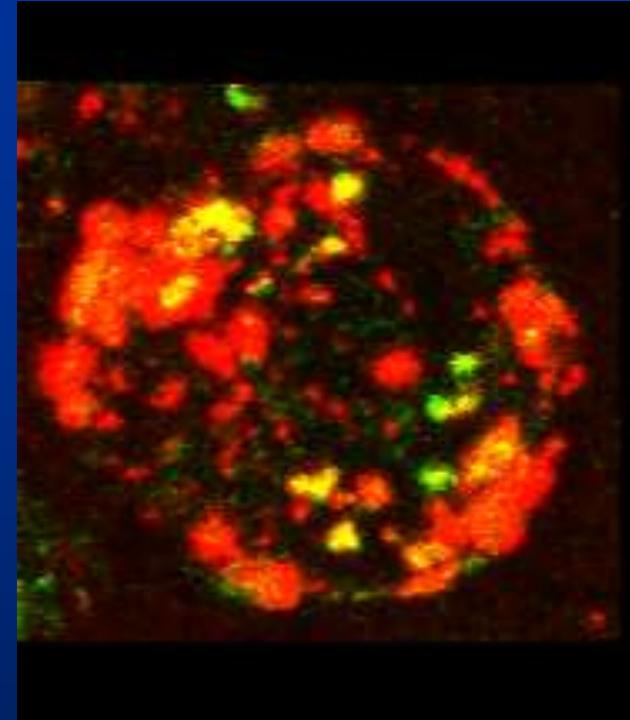
# Разнообразие методов оптической микроскопии

- **Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия**

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – 0,5 мкм

- **Метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP)**
- **Метод удаления флуоресценции при фотообесцвечивании (FLIP)**
- **Метод Фёрстеровского резонансного переноса энергии**



**Красный** - СТ2No

**Зеленый** – лизосомы

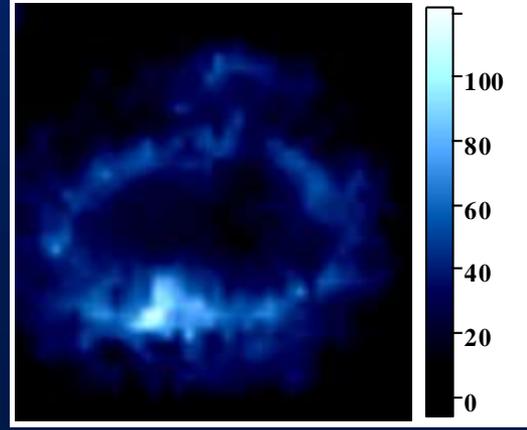
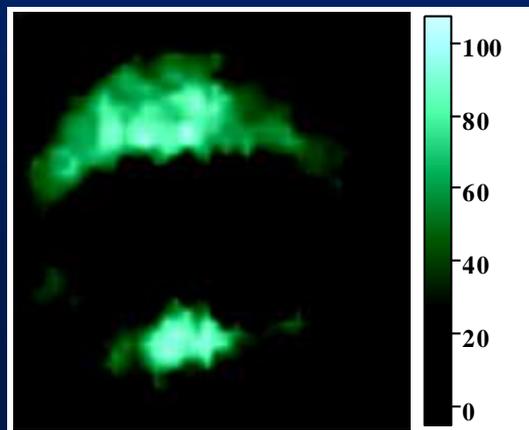
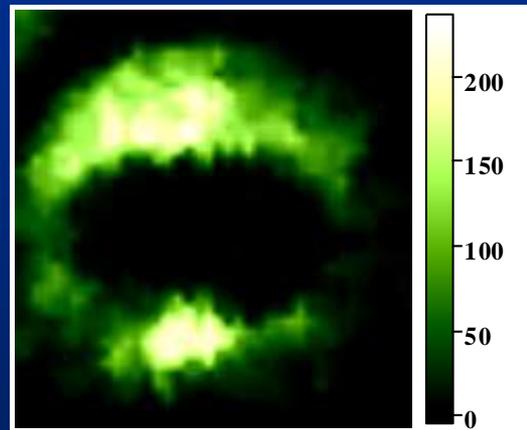
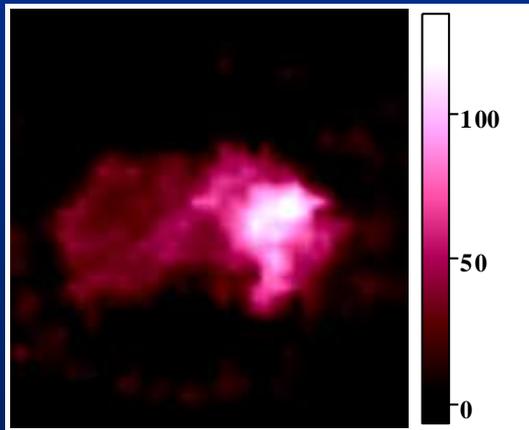
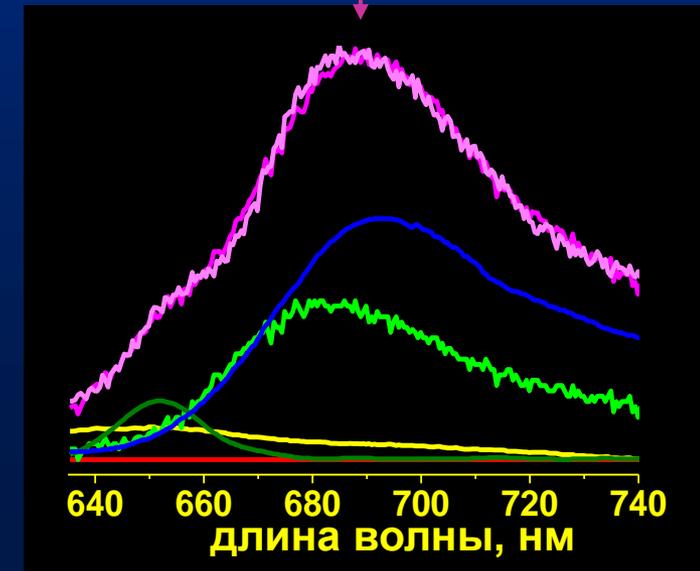
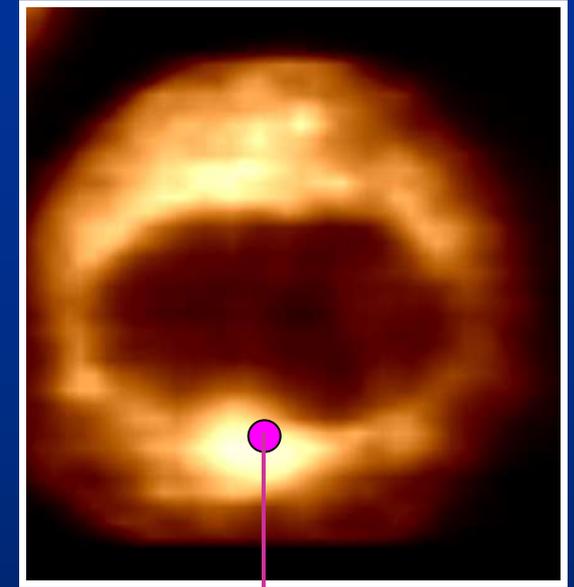
**Желтый** – локализация  
СТ2No в лизосомах

# Разнообразие методов оптической микроскопии

• Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная  
микроспектроскопия

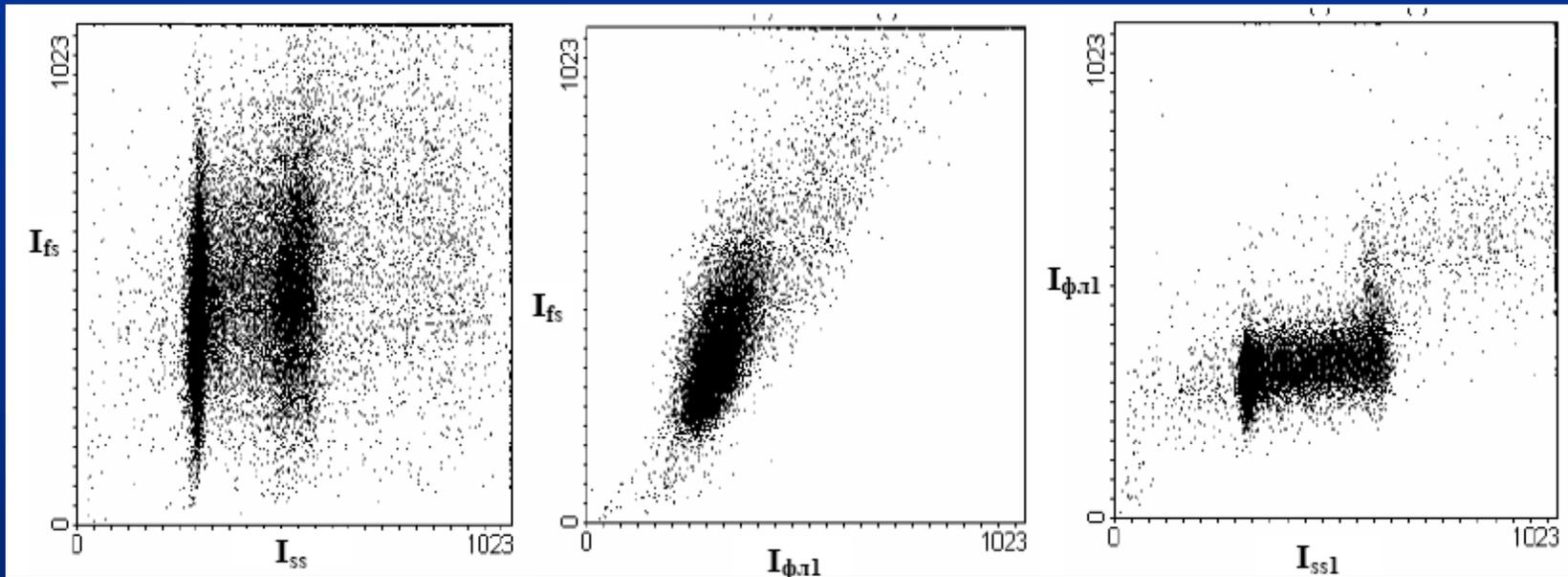
• Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

• Аксиальное разрешение – 0,5 мкм

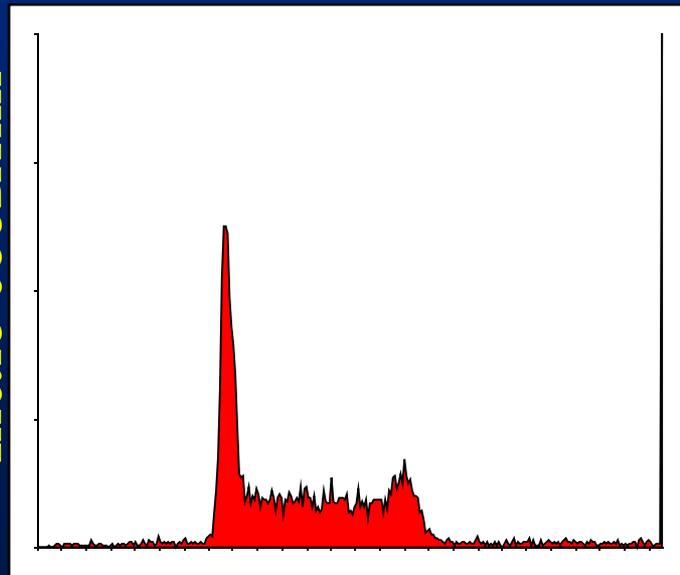


# Разнообразие методов оптической микроскопии

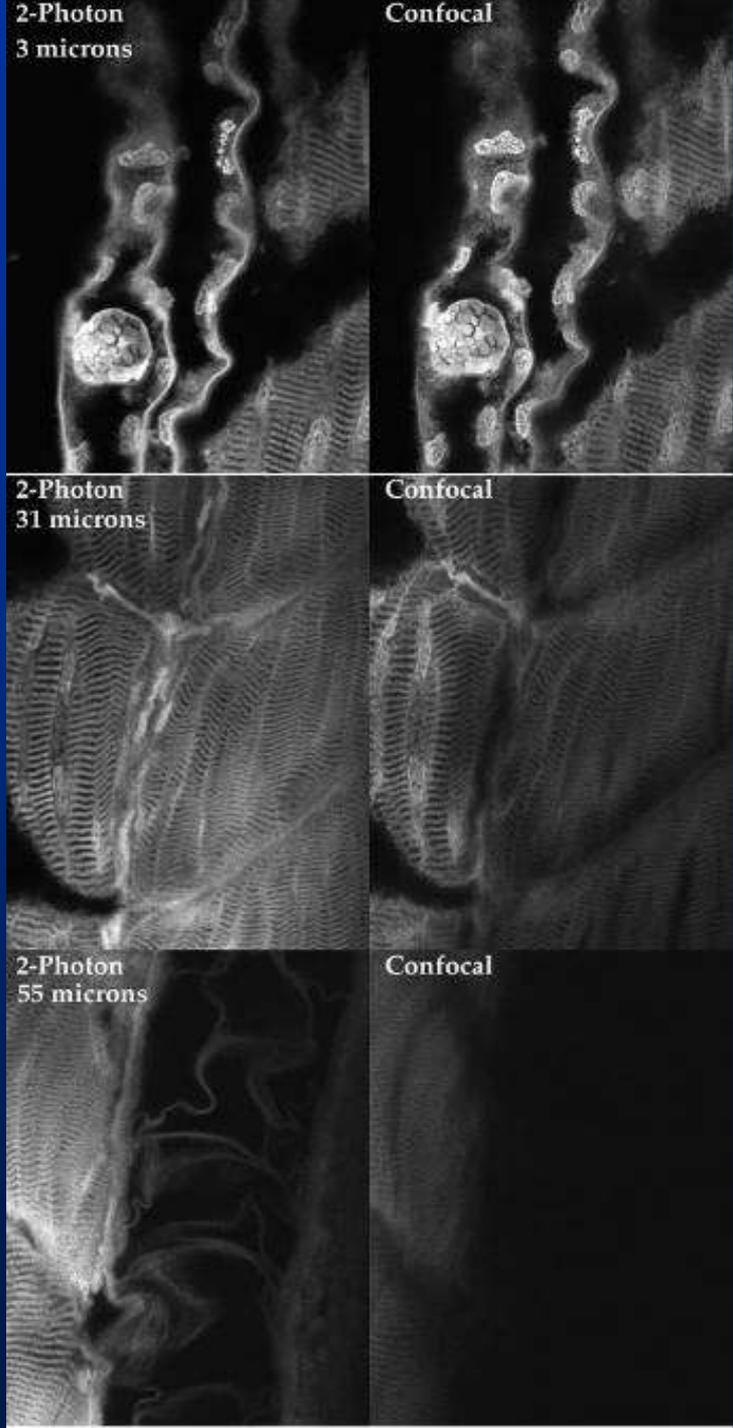
## • Флуоресцентная проточная цитометрия



Число событий



Интенсивность флуоресценции



# Разнообразие методов оптической микроскопии

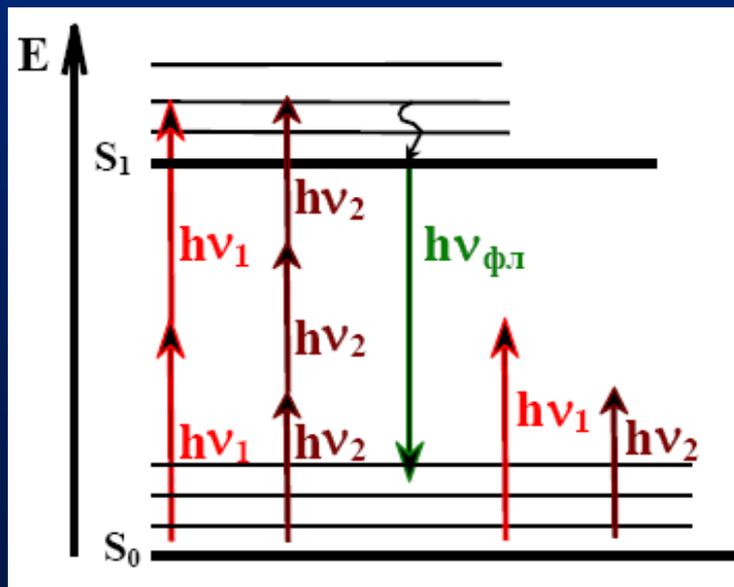
## Многофотонная флуоресцентная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта

– 0,25 мкм

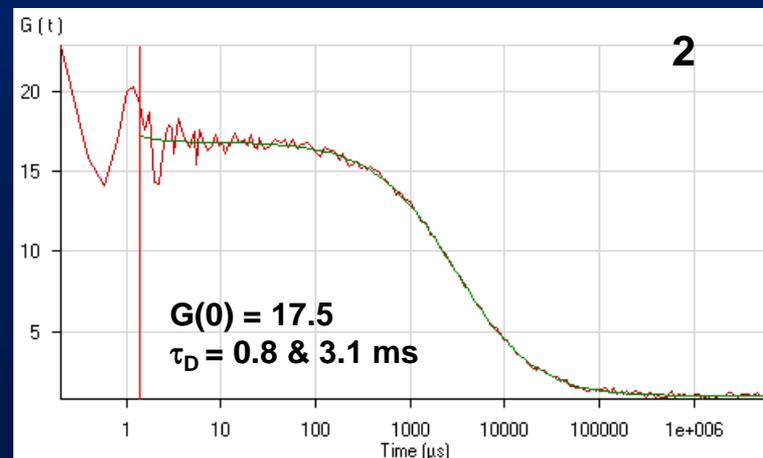
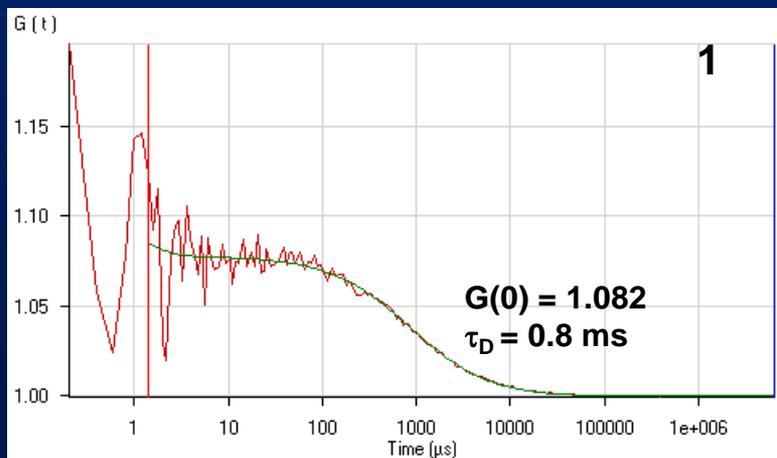
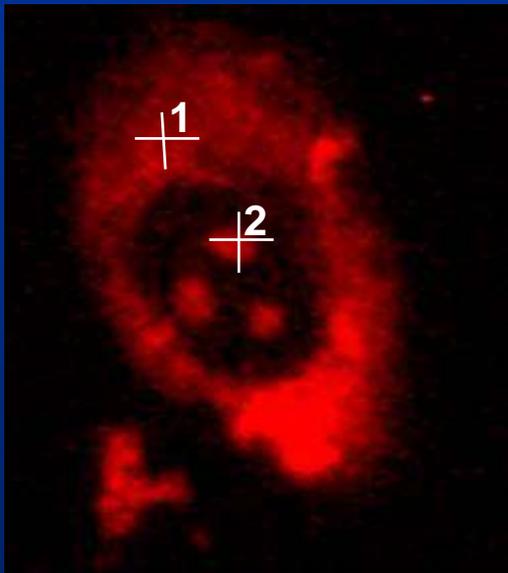
Аксиальное разрешение

– 0,6 мкм



# Разнообразие методов оптической микроскопии

## • Флуоресцентная корреляционная спектроскопия и микроскопия



# Разнообразие методов оптической микроскопии

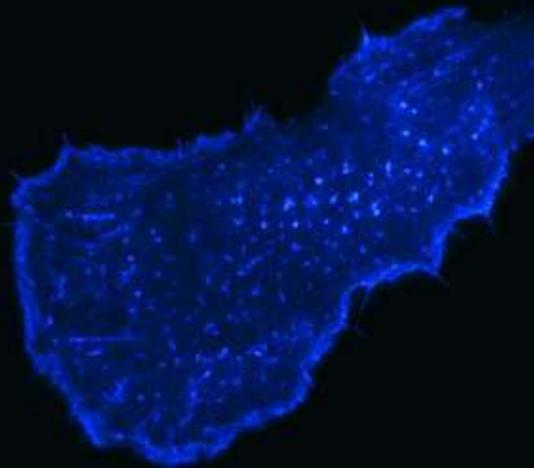
## Флуоресцентная микроскопия на основе эффекта полного внутреннего отражения

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

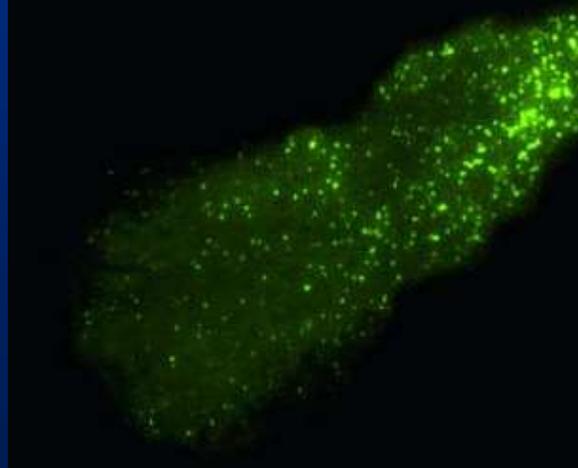
В аксиальном направлении –

«работает» оптический слой 0,1 мкм

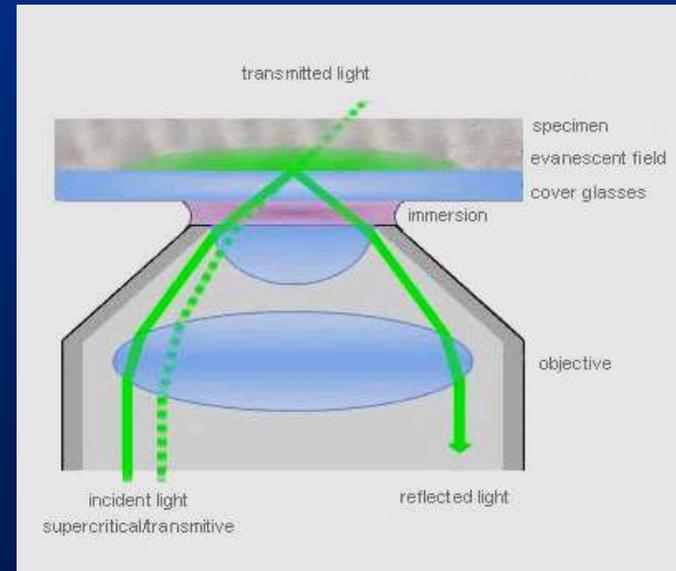
Клетки меланомы мыши В16



2. CFP-актин



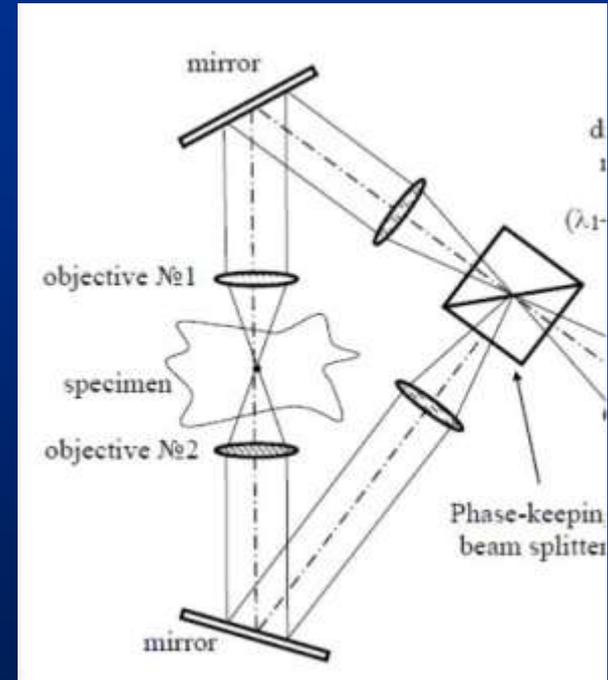
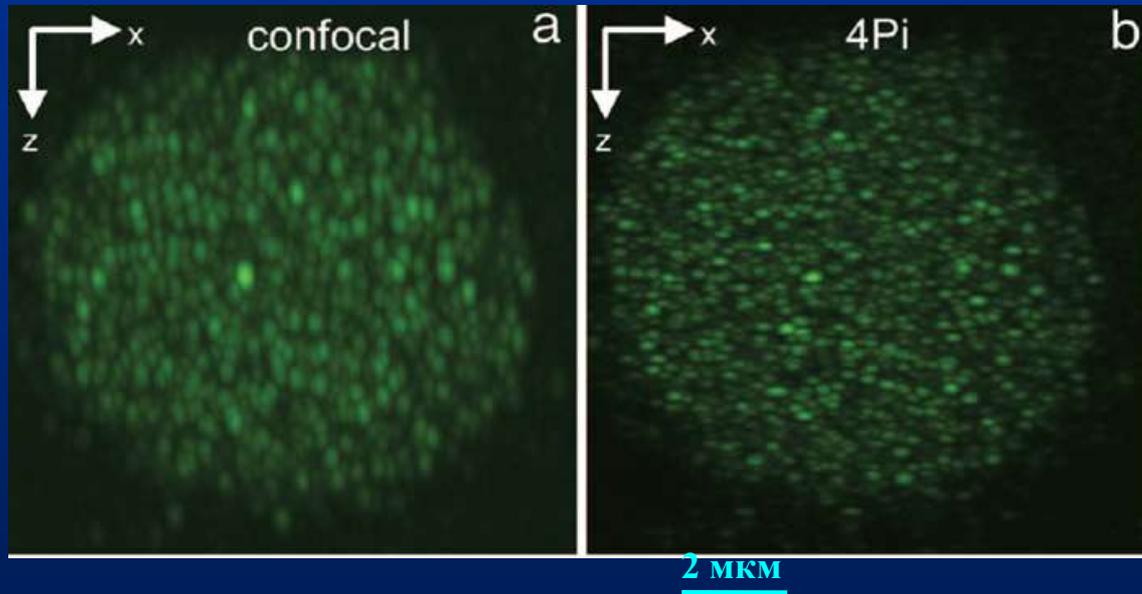
3. dsRed-клатрин



# Разнообразие методов оптической микроскопии

## 4-Пи микроскопия сверхвысокого разрешения

Пространственное разрешение – 100 нм

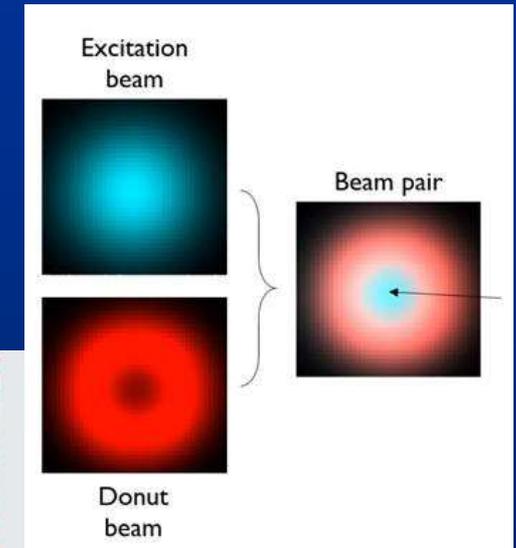
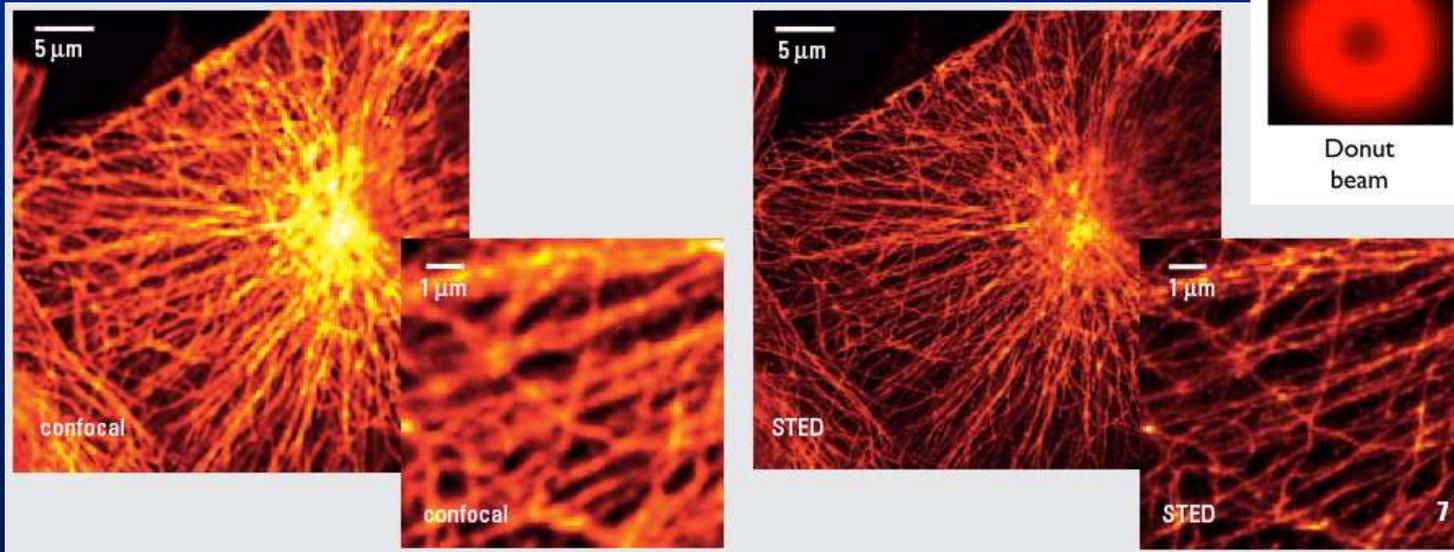


Распределение эндогенного гистона H2AX в ядре клетки человека. Показана проекция всех сканов вдоль оси Y на плоскость XZ (Bewersdorf et al., PNAS, 2006, 103, 18137–18142).

# Разнообразие методов оптической микроскопии

## STED-Микроскопия на основе стимулированного обеднения эмиссии

Пространственное разрешение – 10-30 нм



Конфокальная микроскопия

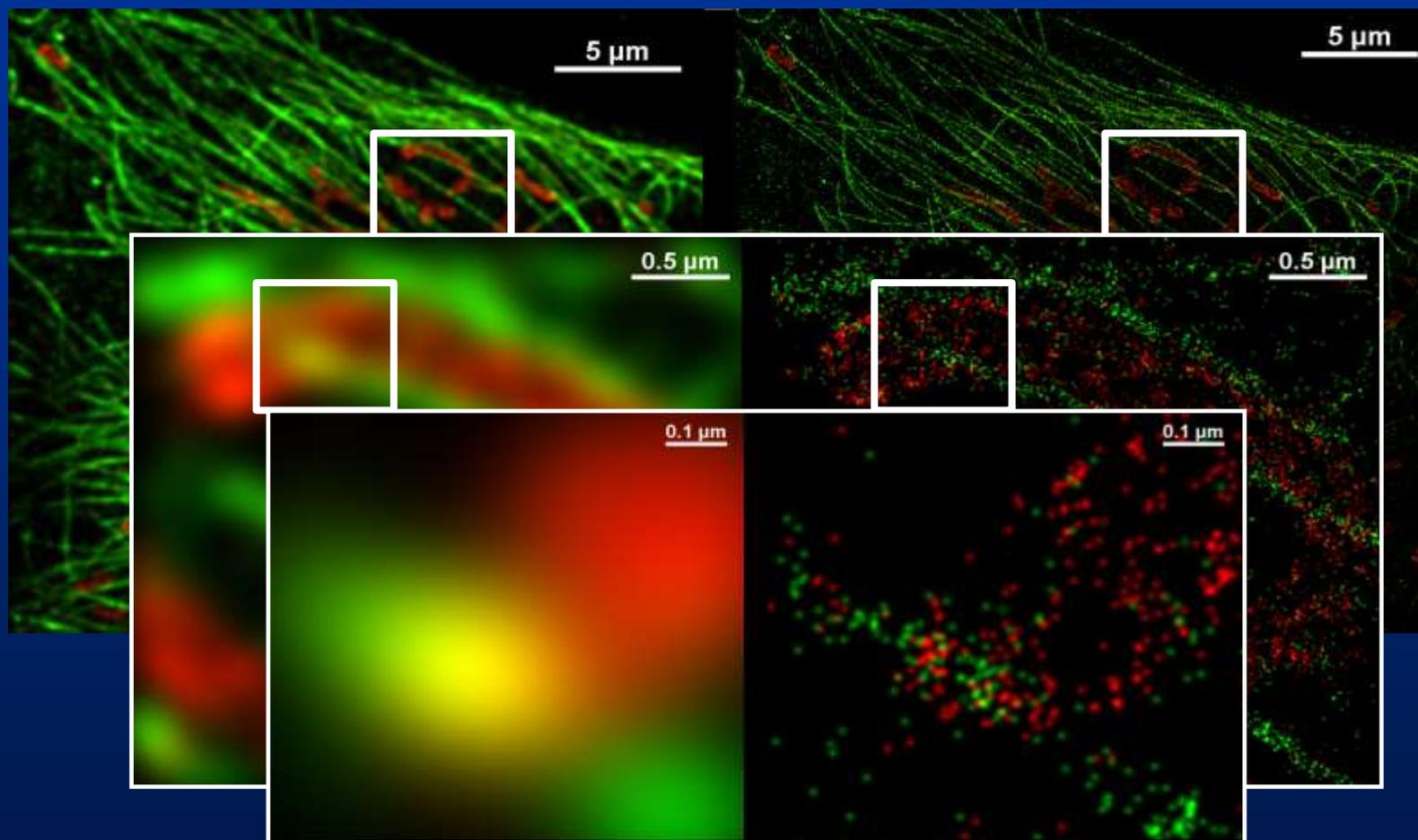
STED-микроскопия

Сеть микротрубочек в клетке

# N-STORM - 10-кратное улучшение разрешения

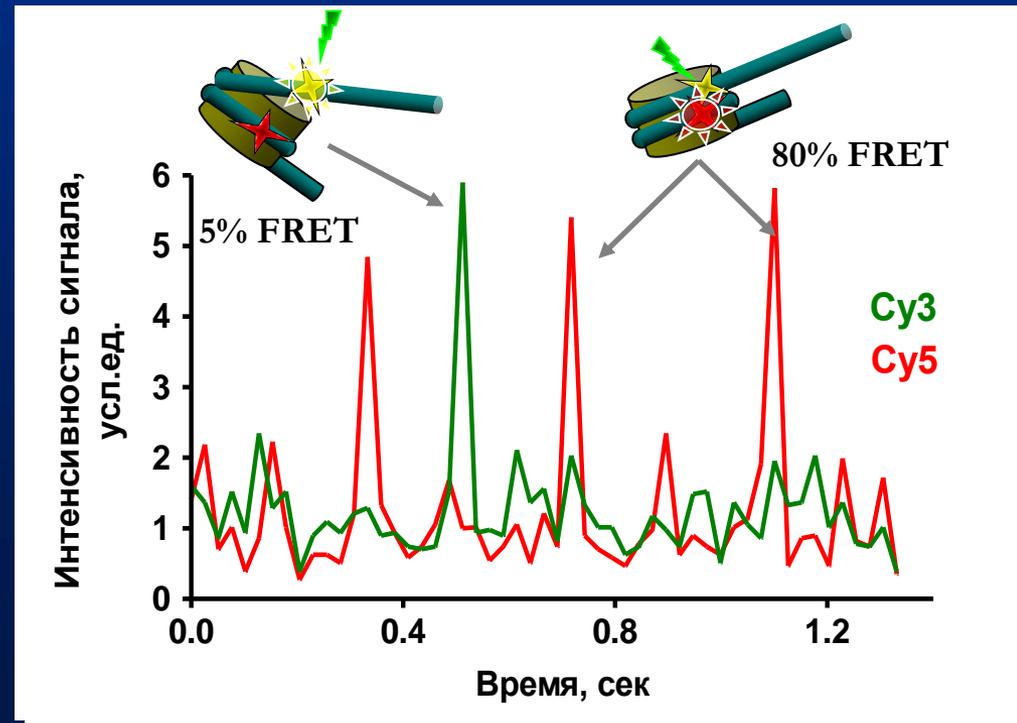
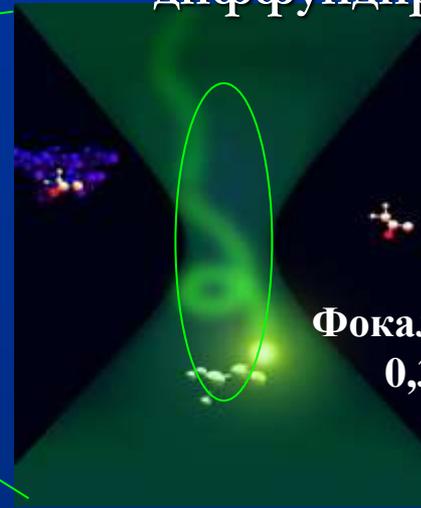
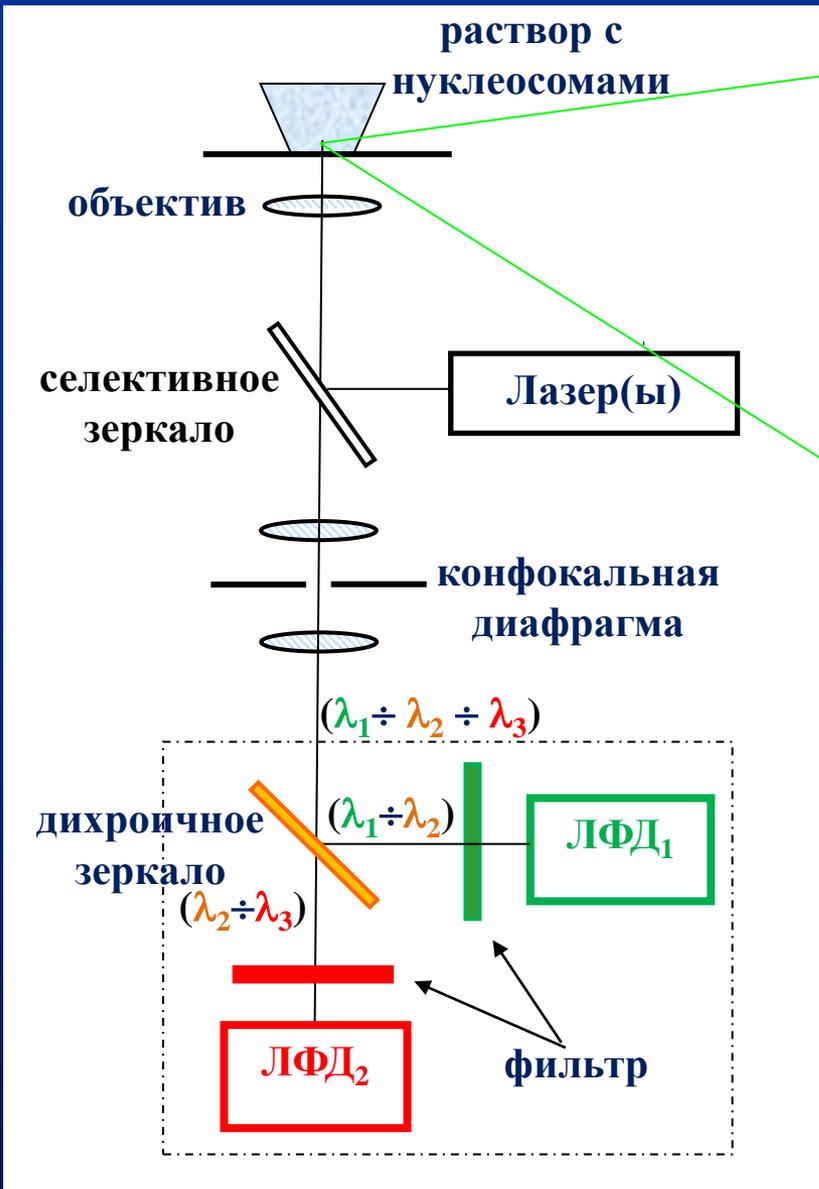
конфокальное  
разрешение 200 нм

STORM  
разрешение ~ 20 нм

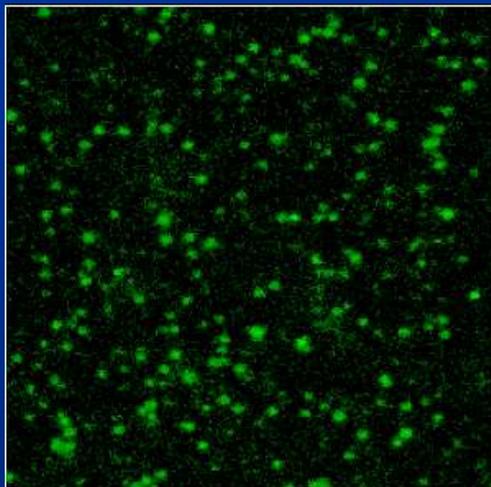
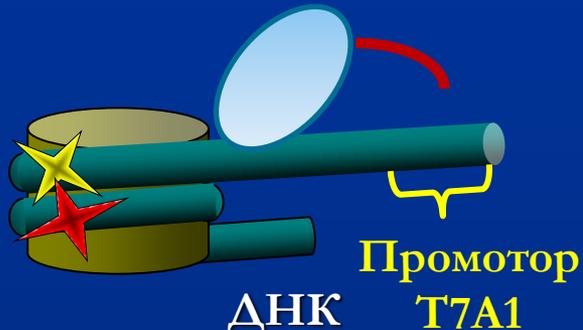


Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

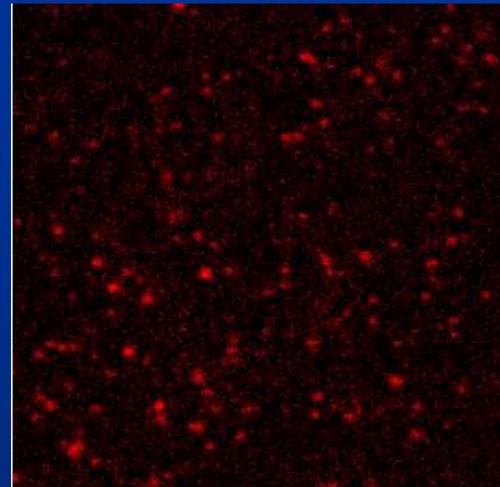
# Изучение одиночных диффундирующих нуклеосом



# Анализ иммобилизованных «дистальных» нуклеосом РНК-полимераза



Сигнал Cy3



Сигнал Cy5

