

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).

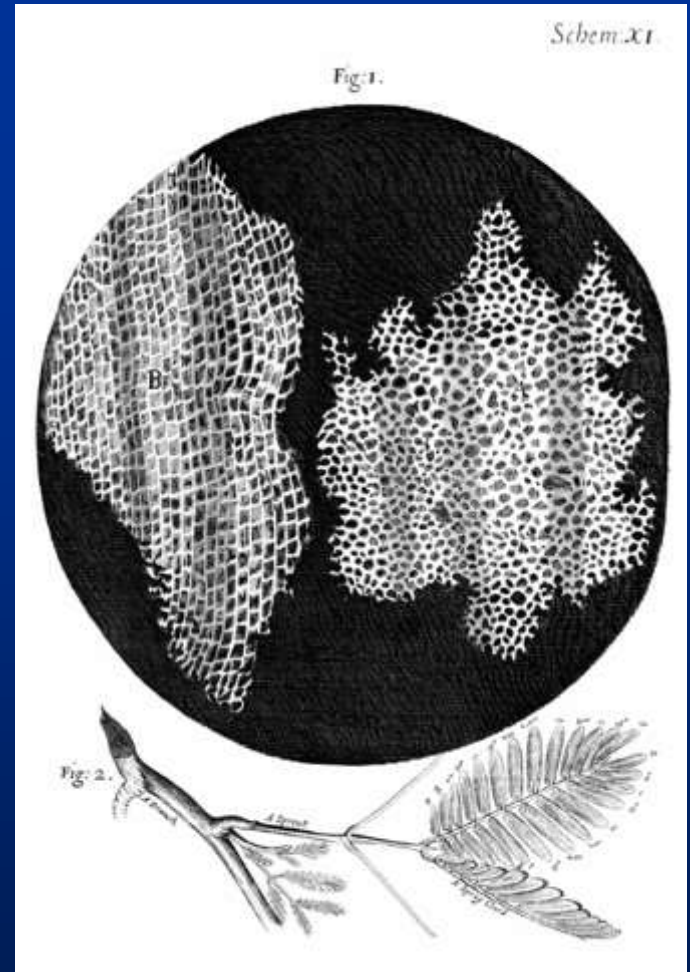
В качестве инструмента для научных исследований, в частности, в анатомической практике сложный микроскоп Галилея начали применять примерно с 1624-1625 г.

Из истории микроскопии

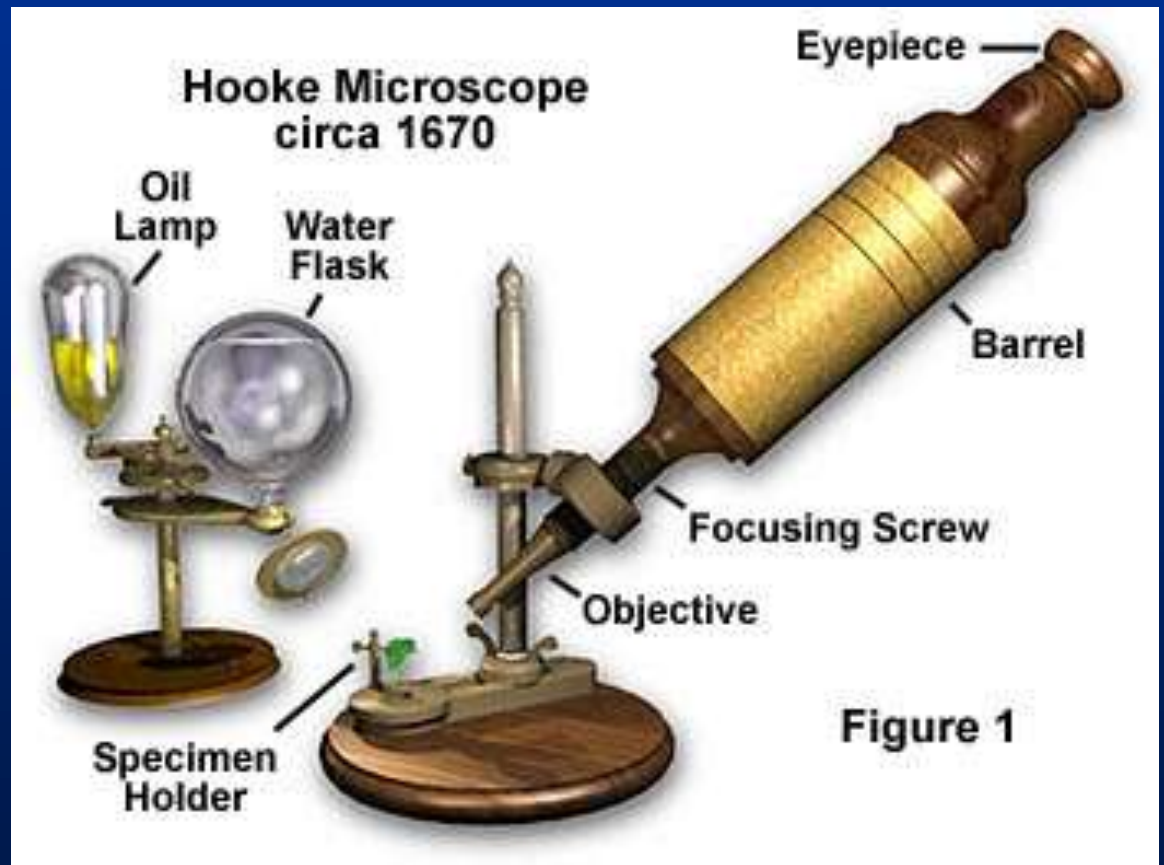
Наиболее ранние применения оптической микроскопии в биологических исследованиях - работы Роберта Гука (R. Hooke 1635-1703).



микроскоп Роберта Гука



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

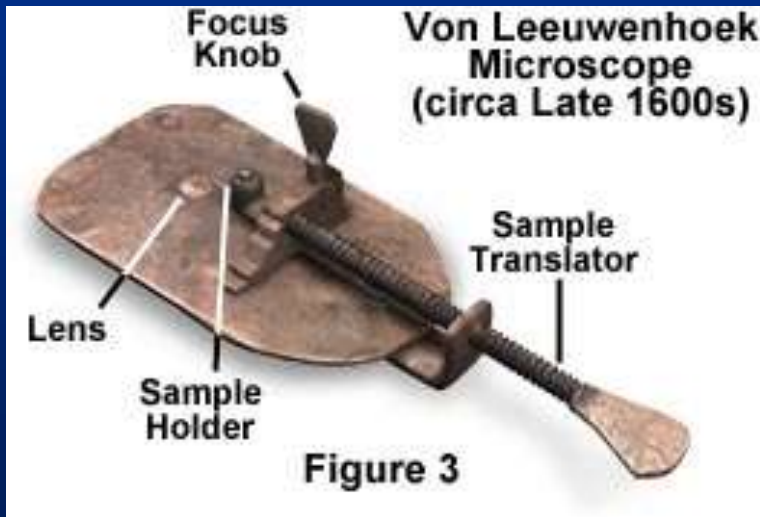


Из истории микроскопии

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

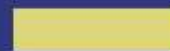
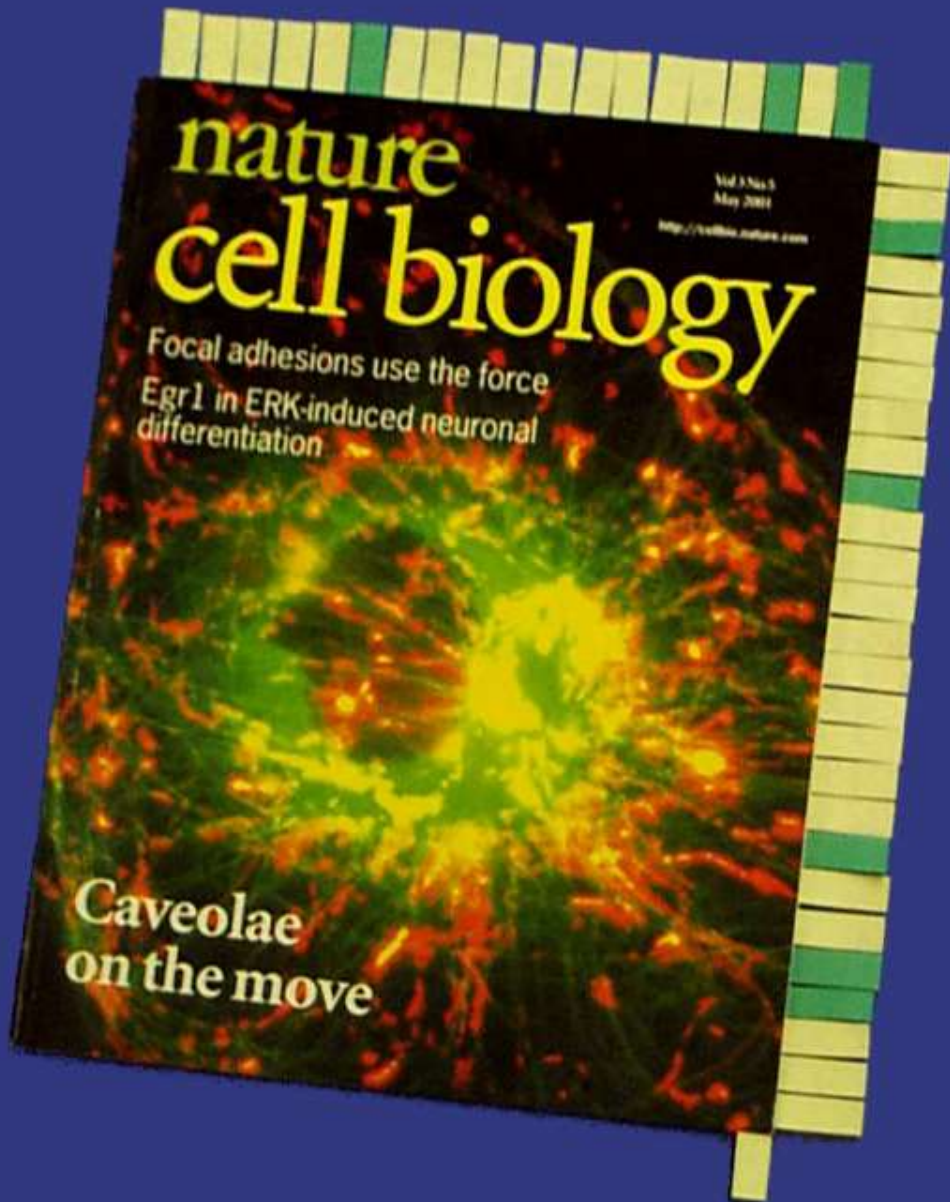
научился изготавливать 300-кратные высококачественные линзы, используя микроскопию, первым зарисовал и описал

**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

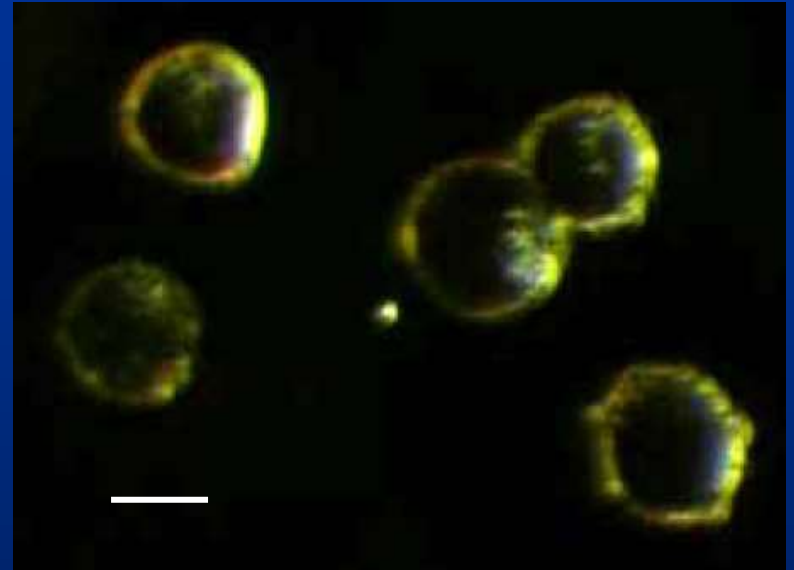
Широкопольная оптическая микроскопия белого света

* 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**

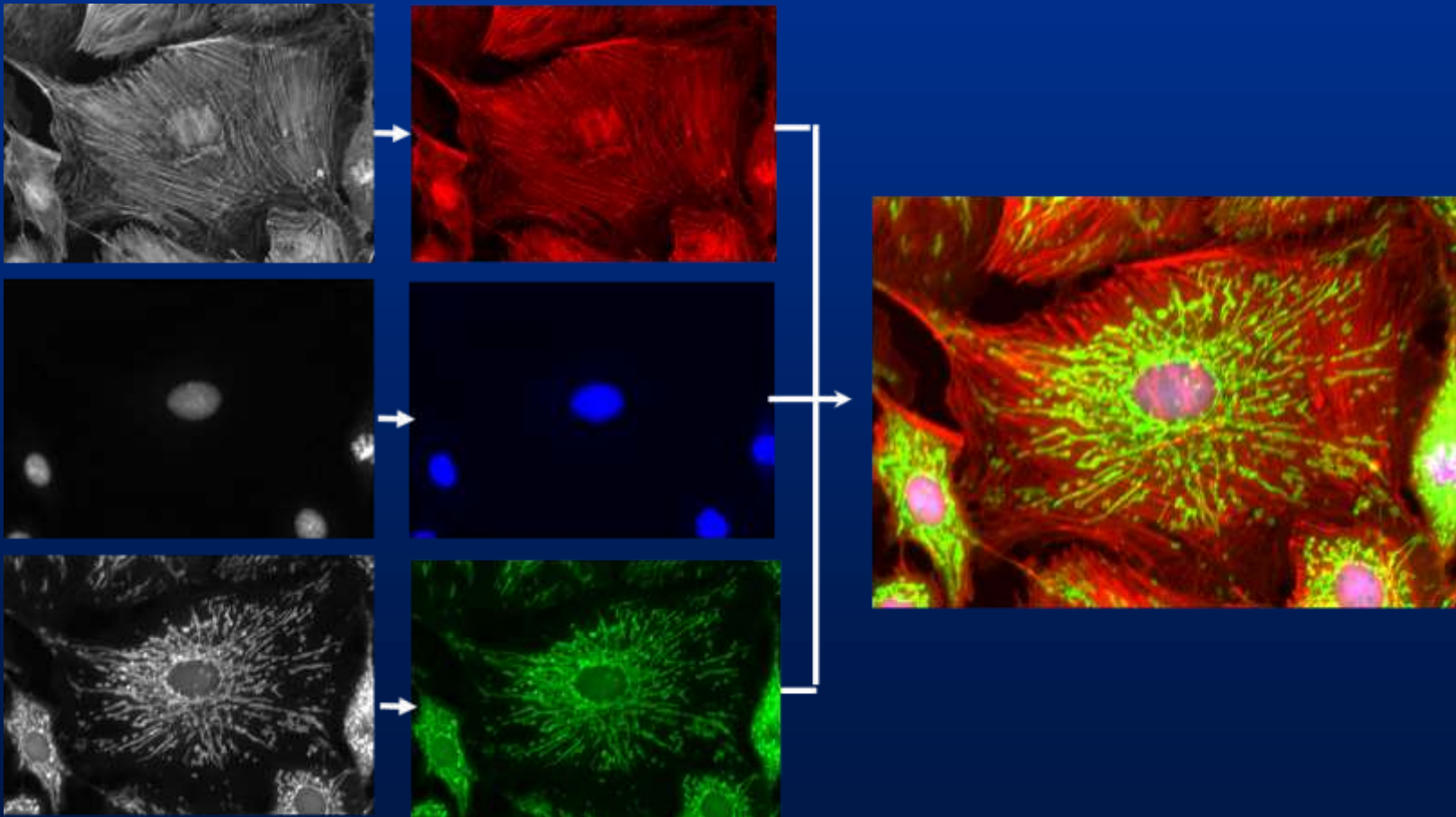
**амилоидные
волокна**

Разнообразие методов оптической микроскопии

- Широкопольная флуоресцентная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

Аксиальное разрешение – нет



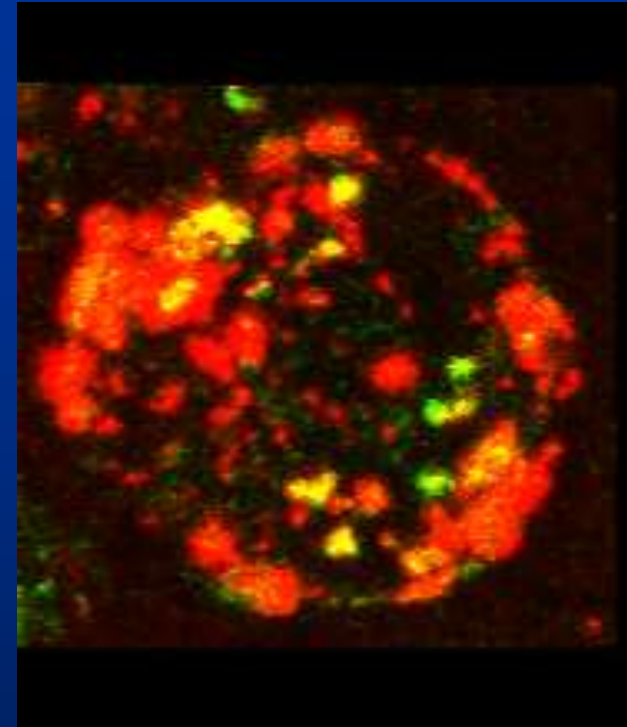
Разнообразие методов оптической микроскопии

- **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 - CT2No

Зеленый – лизосомы

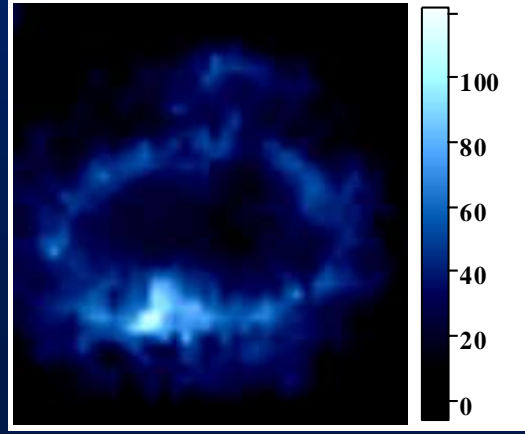
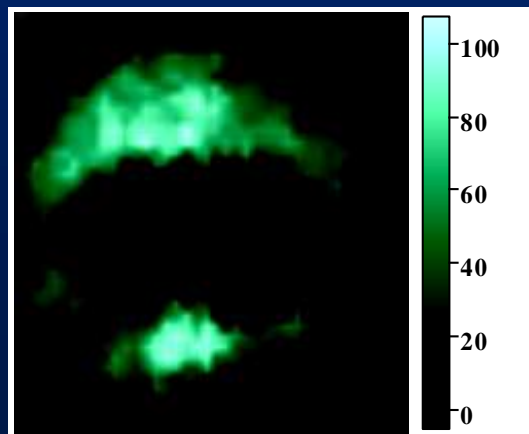
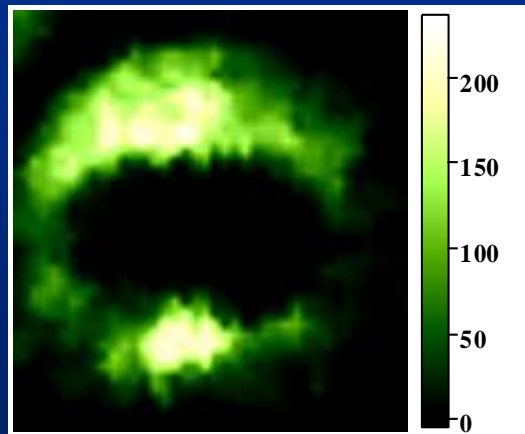
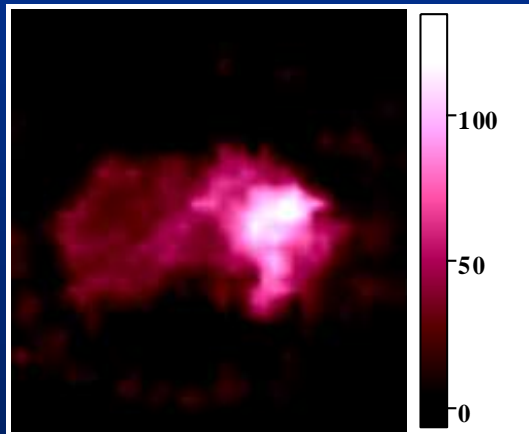
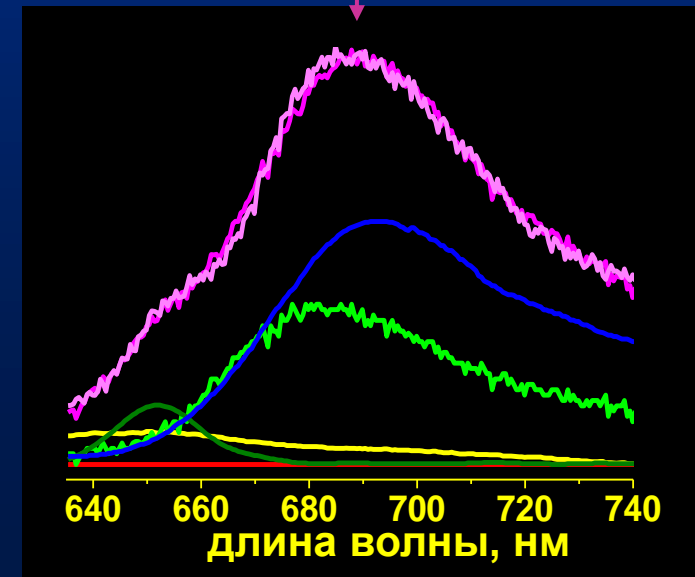
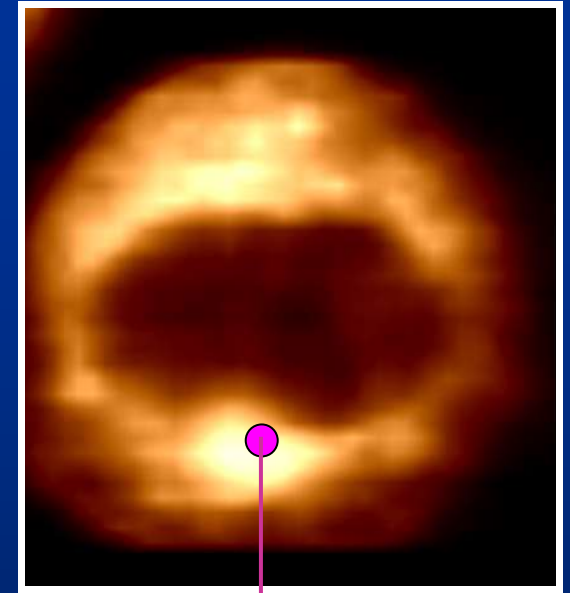
Желтый – локализация
CT2No в лизосомах

Разнообразие методов оптической микроскопии

• Флуоресцентная лазерная сканирующая конфокальная
микроспектроскопия

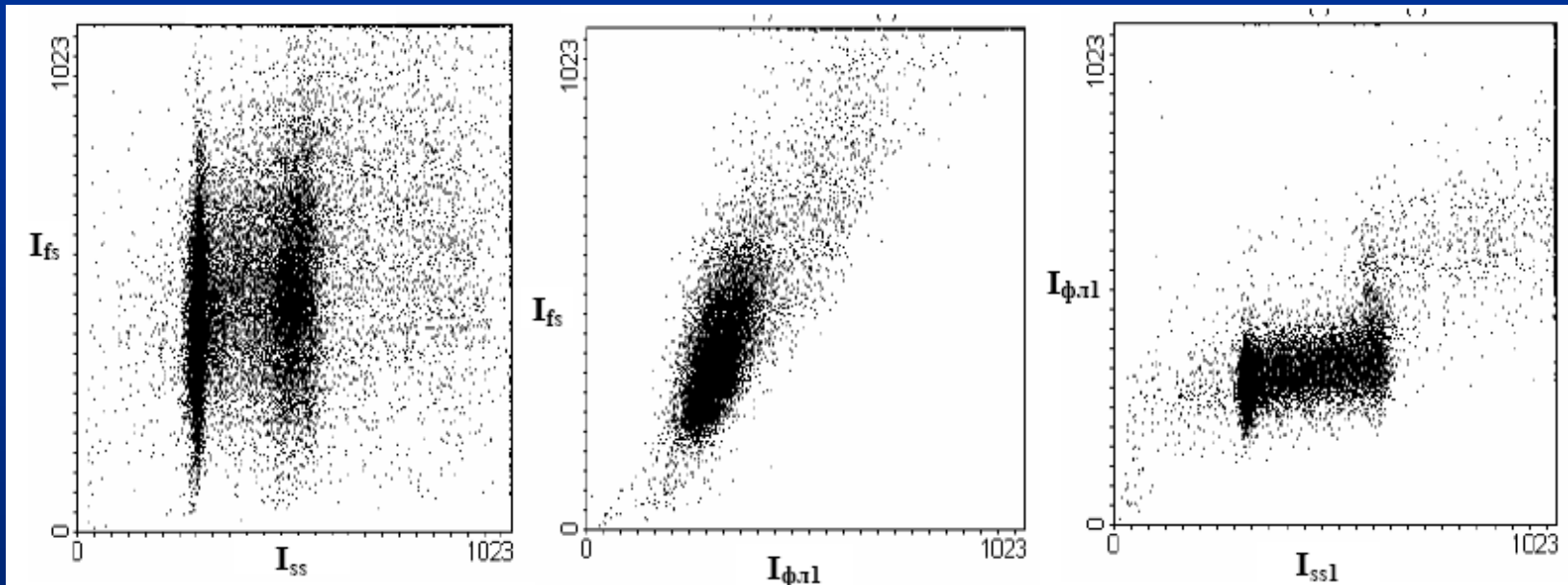
• Разрешение в плоскости объекта – 0,2 мкм

• Аксиальное разрешение – 0,5 мкм

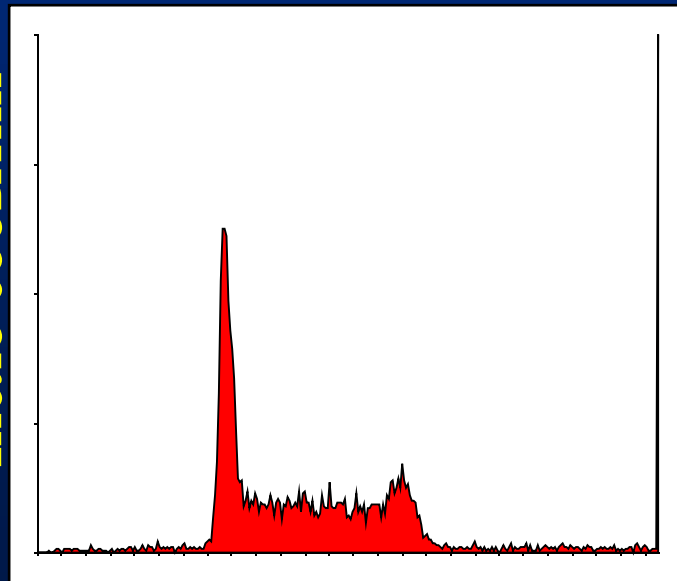


Разнообразие методов оптической микроскопии

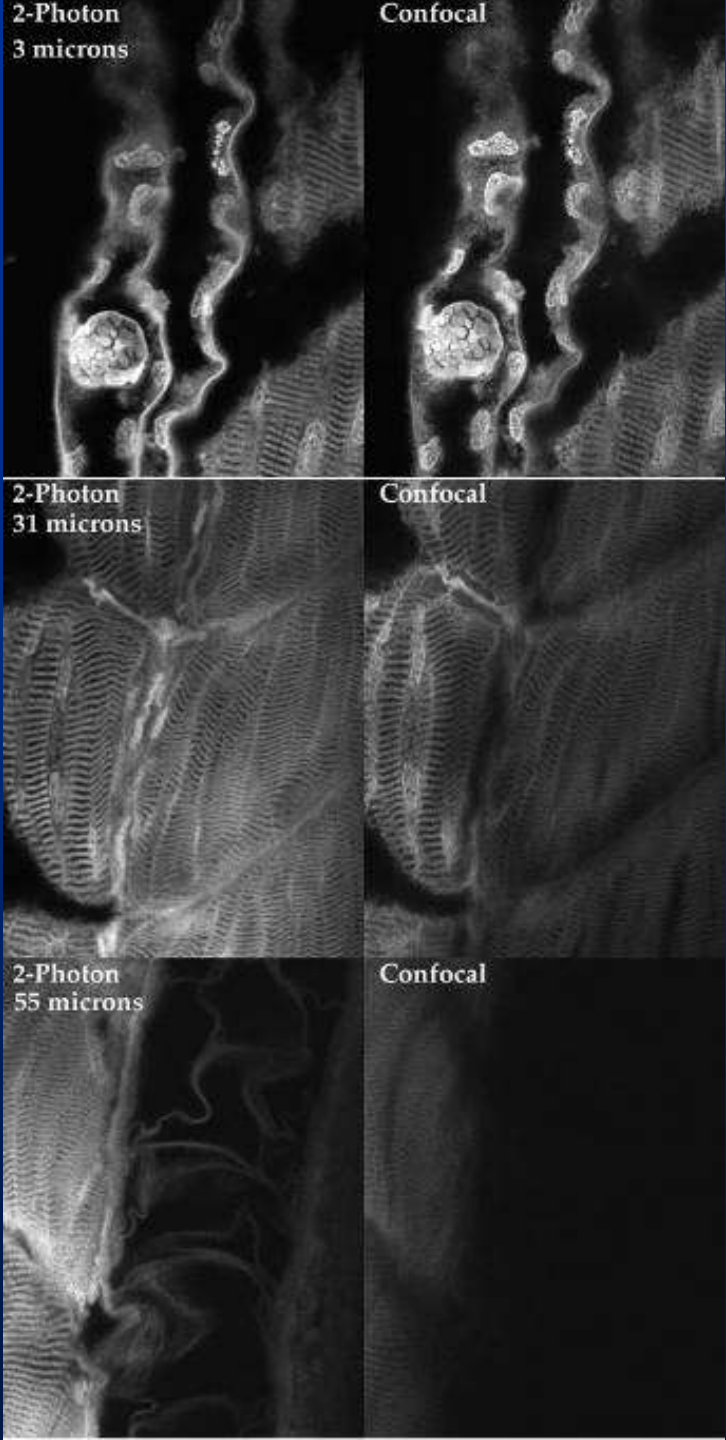
• Флуоресцентная проточная цитометрия



Число событий



Интенсивность флуоресценции



Разнообразие методов оптической микроскопии

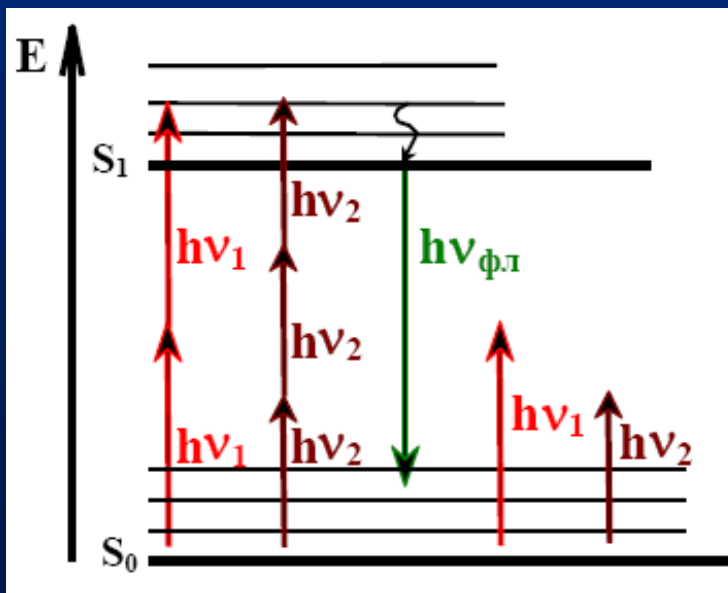
Многофотонная флуоресцентная микроскопия

Разрешение в плоскости объекта

– 0,25 мкм

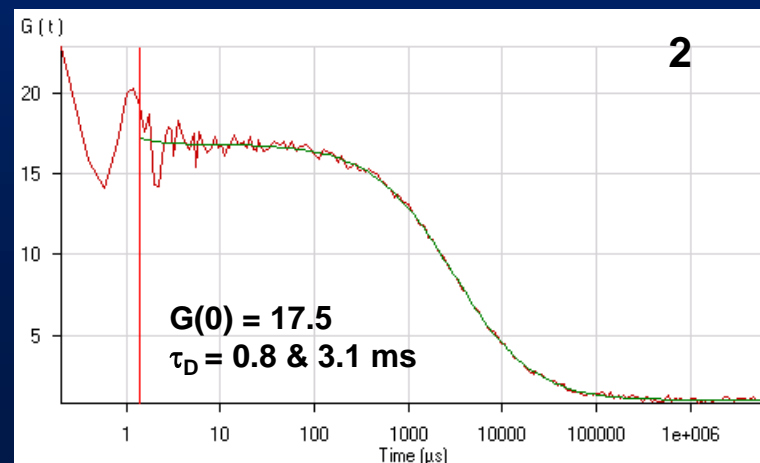
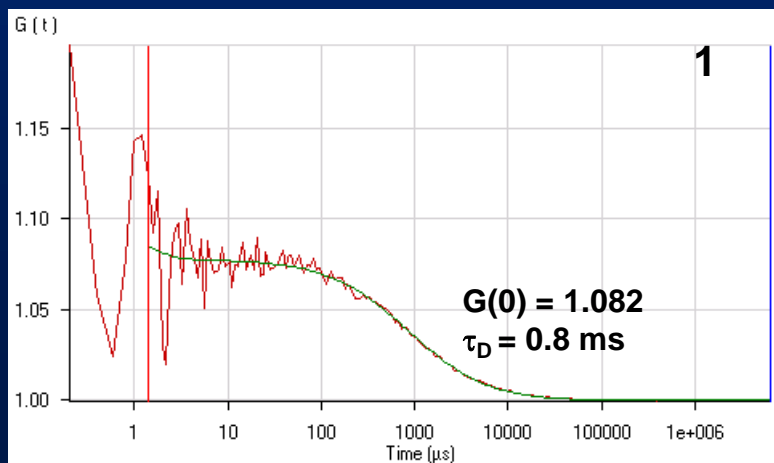
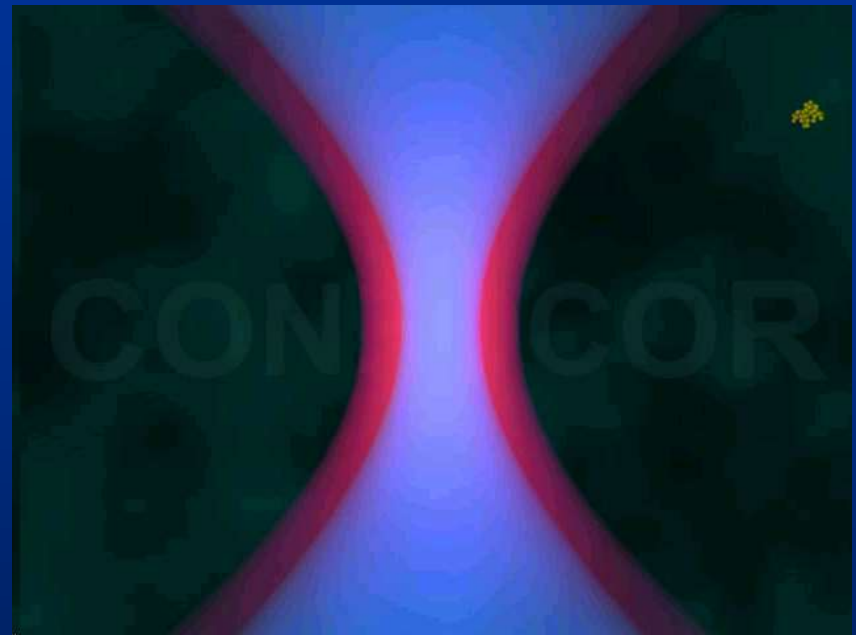
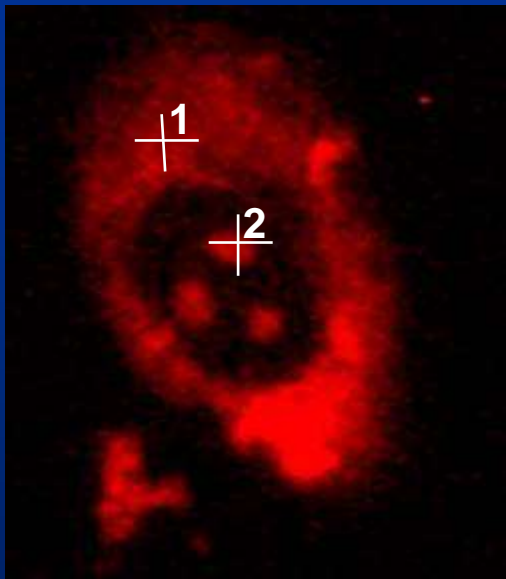
Аксиальное разрешение

– 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

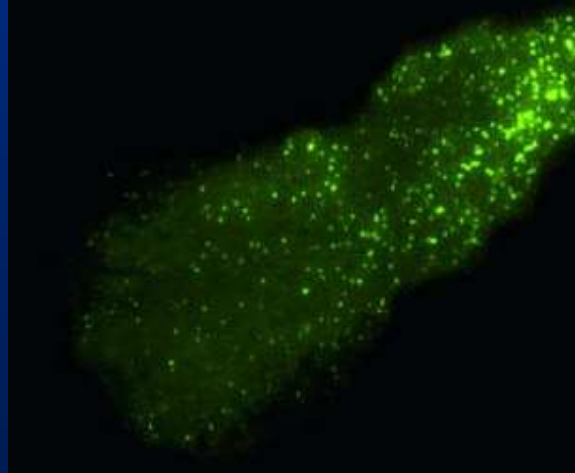
В аксиальном направлении –

«работает» оптический слой 0,1 мкм

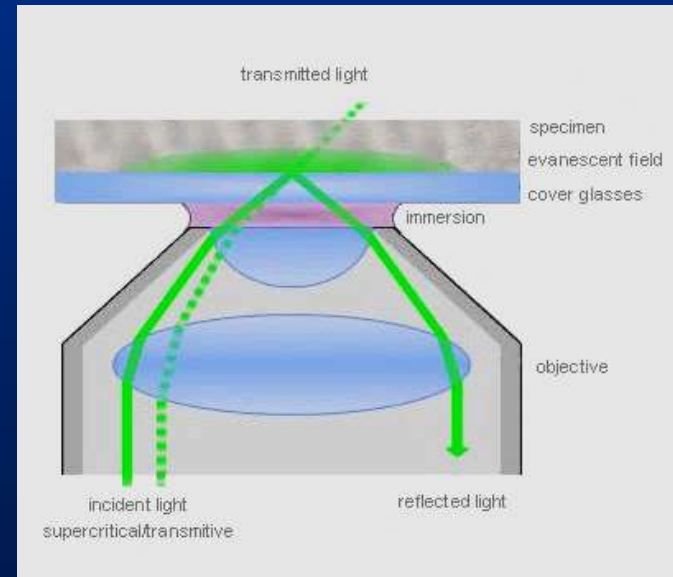
Клетки меланомы мыши В16



2. CFP-актин



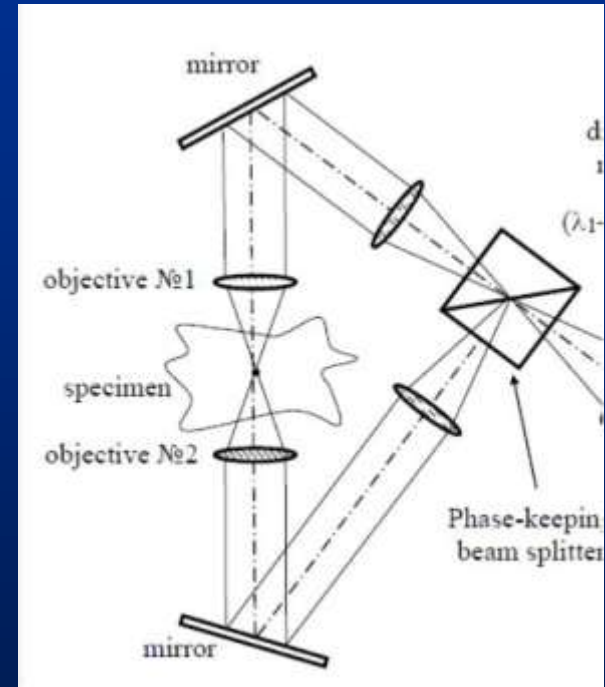
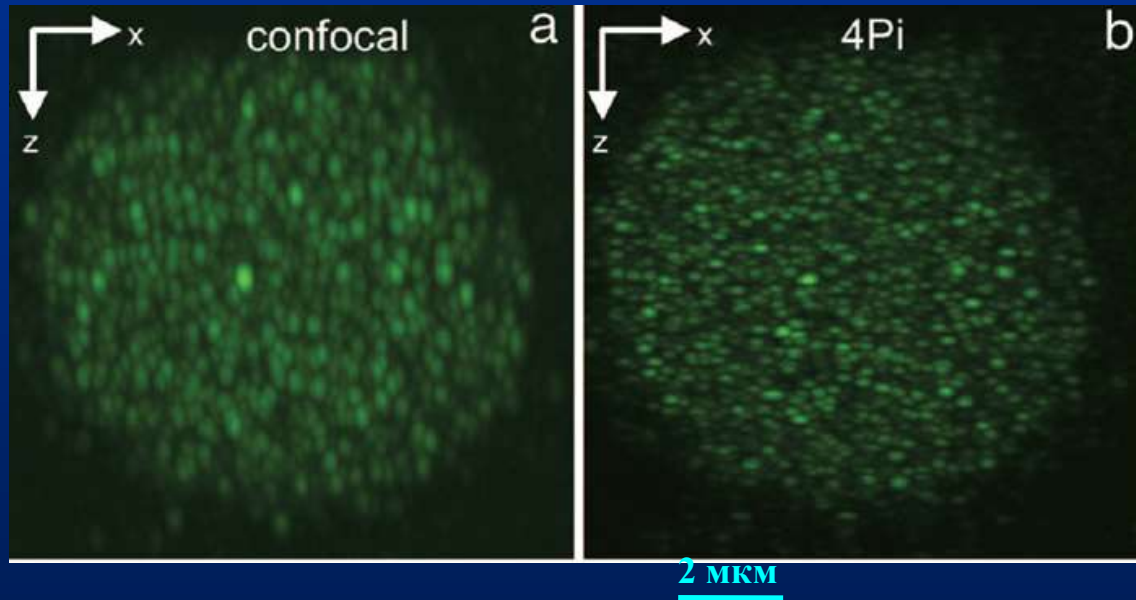
3. dsRed-клатрин



Разнообразие методов оптической микроскопии

4-Пи микроскопия сверхвысокого разрешения

Пространственное разрешение – 100 нм

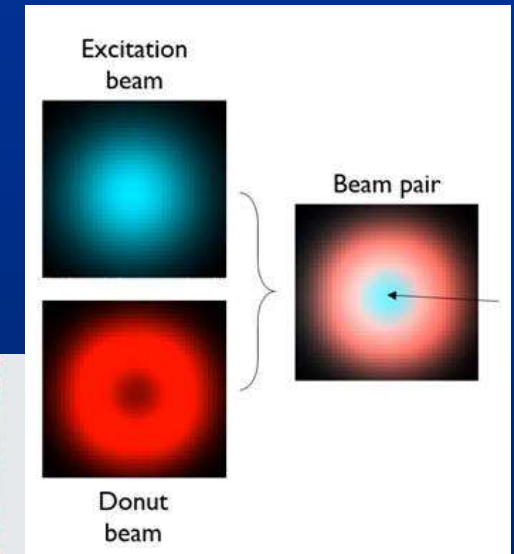
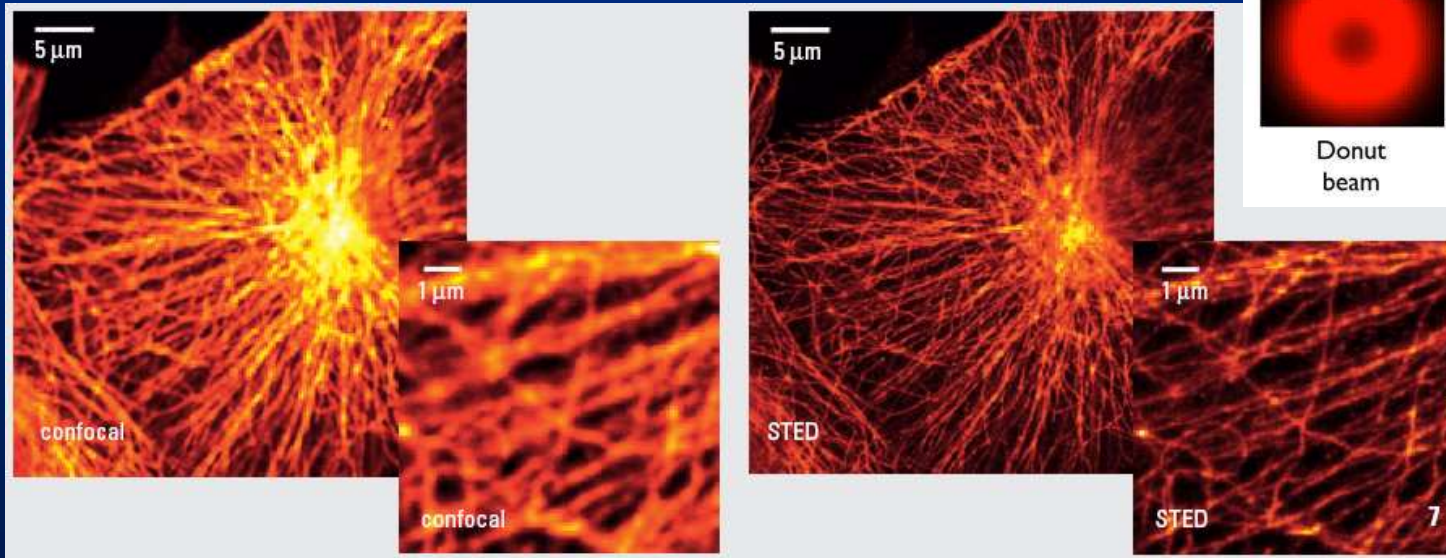


Распределение эндогенного гистона H2AX в ядре клетки человека.
Показана проекция всех сканов вдоль оси Y на плоскость XZ
(Bewersdorf et al., PNAS, 2006, 103, 18137–18142).

Разнообразие методов оптической микроскопии

STED-Микроскопия на основе стимулированного обеднения эмиссии

Пространственное разрешение – 10-30 нм



Конфокальная микроскопия

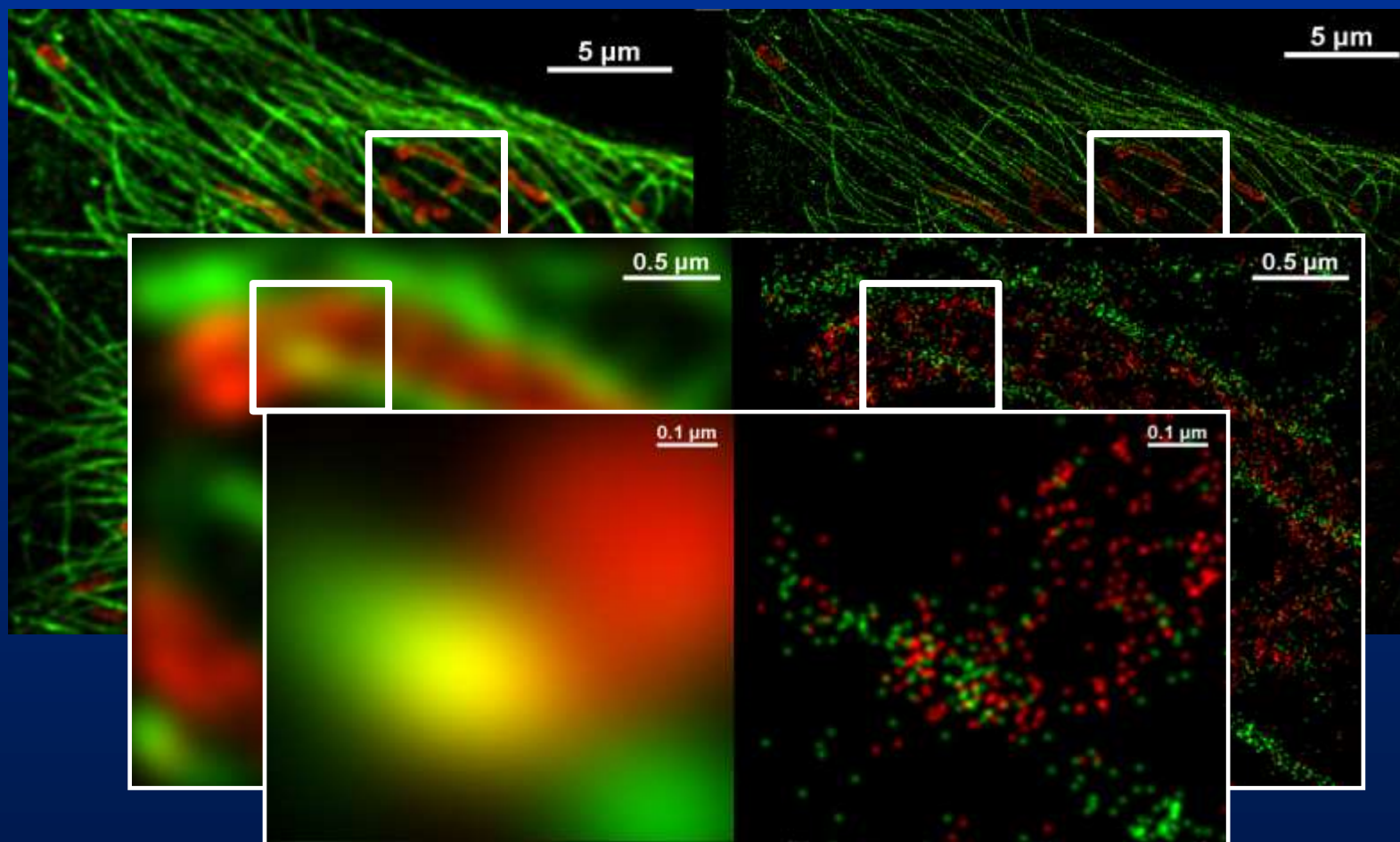
STED-микроскопия

Сеть микротрубочек в клетке

N-STORM - 10-кратное улучшение разрешения

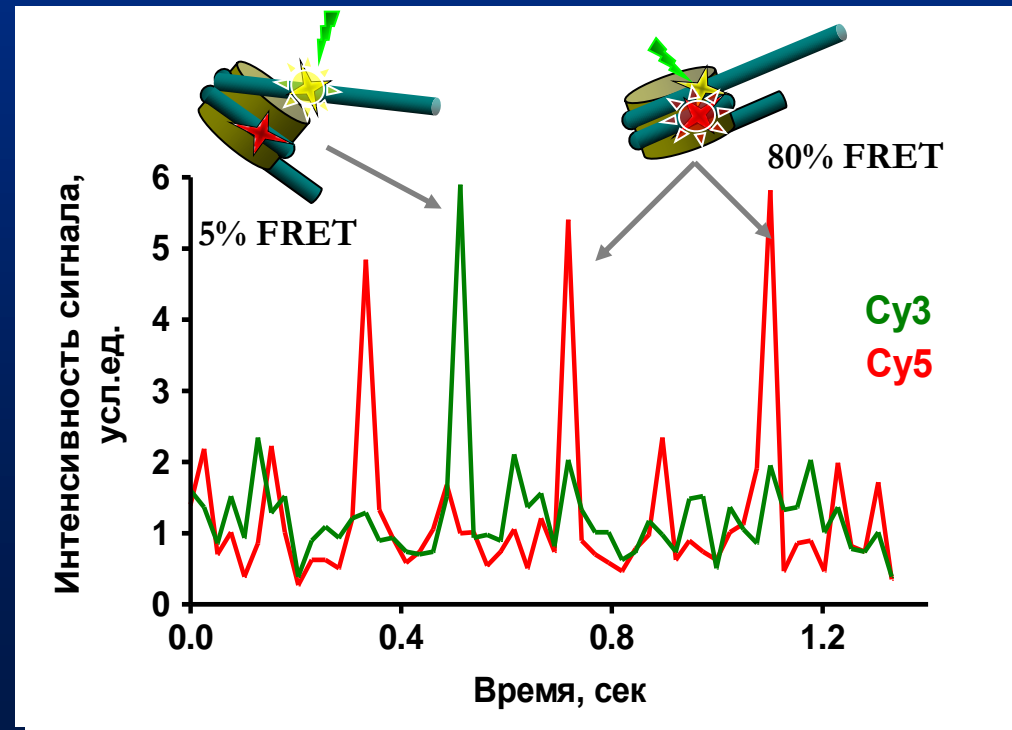
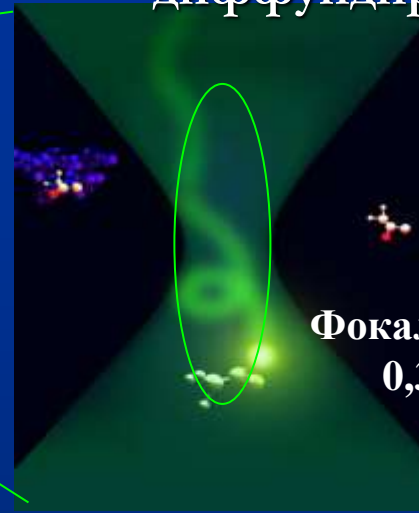
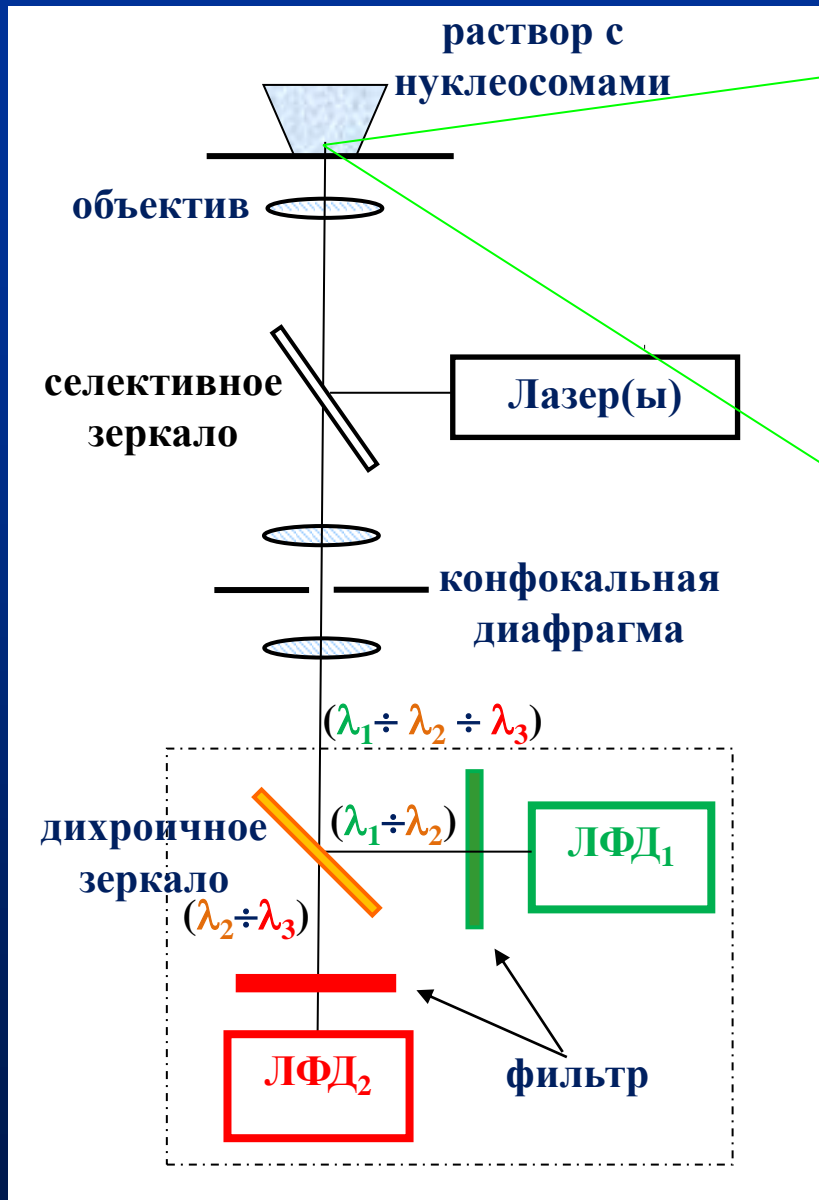
конфокальное
разрешение 200 нм

STORM
разрешение ~ 20 нм

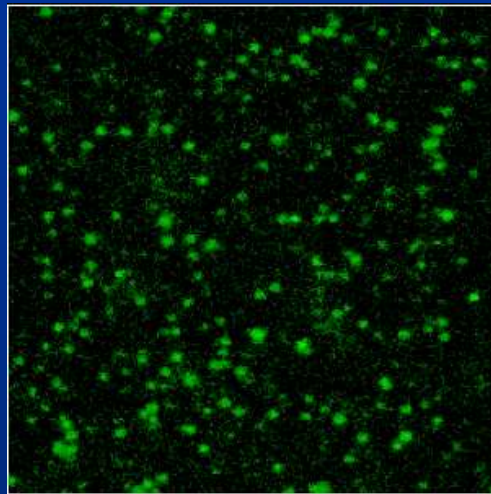
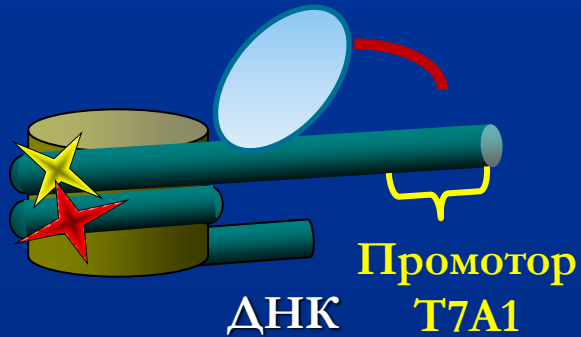


Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

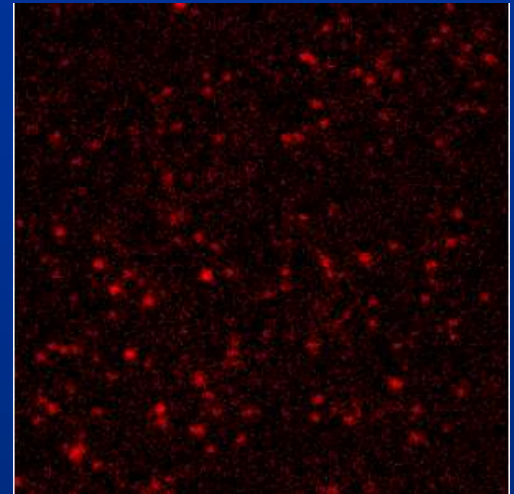
Изучение одиночных диффундирующих нуклеосом



Анализ иммобилизованных «дистальных» нуклеосом РНК-полимераза



Сигнал Cy3



Сигнал Cy5

