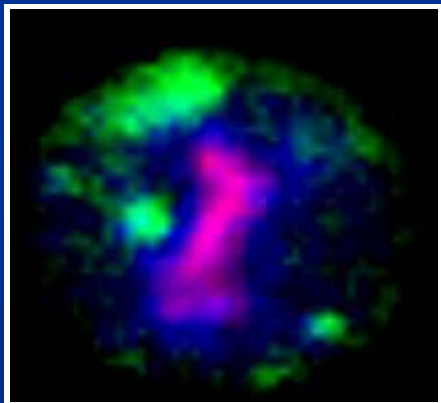


# Введение в методы микроскопии в биологии.

## Оптическая микроскопия

Алексей Валерьевич Феофанов



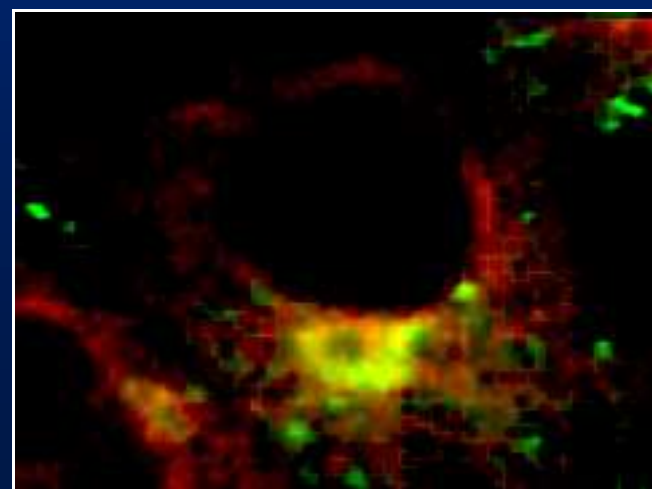
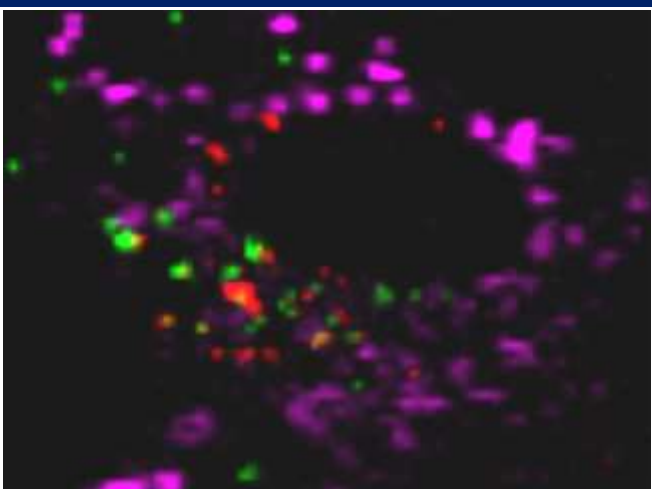
*Кафедра биоинженерии*

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

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии  
биомолекул*

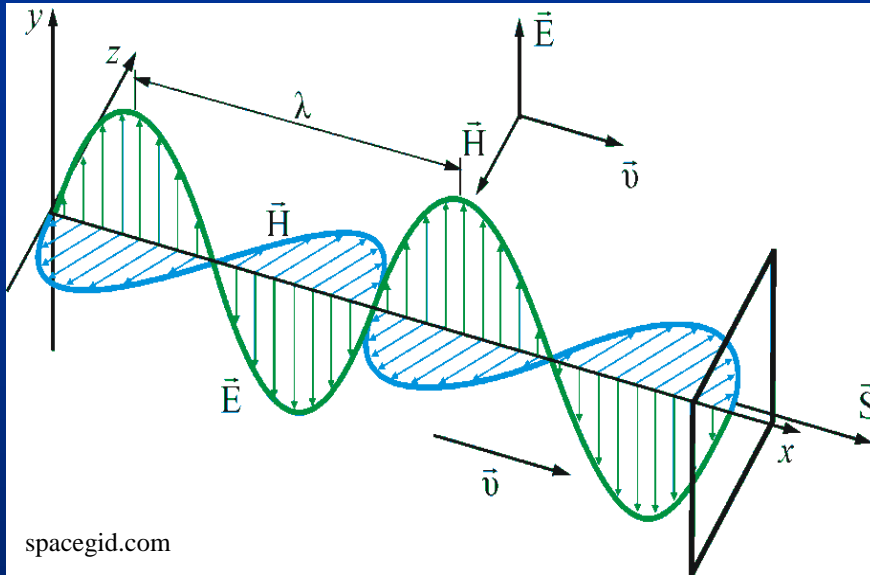
*ИБХ РАН*

Лекция № 3



Light is an electromagnetic wave or a flux of particles - photons

Wave – wavelength, oscillation period, oscillation frequency, polarization



$$E = E_0 \cos(\omega t - kx + \varphi)$$
$$\omega = 2\pi\nu = 2\pi c / \lambda$$

$\nu$  - frequency of light;  
 $\lambda$  - wavelength of light  
 $c$  – speed of light in vacuum  
 $c = 3 \times 10^8$  m/c

Intensity of light:  $I \sim E^2$

Photon (particle) - energy, zero mass

$$\Sigma_p = h\nu = hc / \lambda,$$

$h$  is Planck constant  $h = 6,6 \times 10^{-34}$  J $\times$ c,  $c$  – speed of light in vacuum  $c = 3 \times 10^8$  m/c.

Wave-particle dualism (Louis de Broglie):

wave properties explain the ability of light to diffraction and interference,

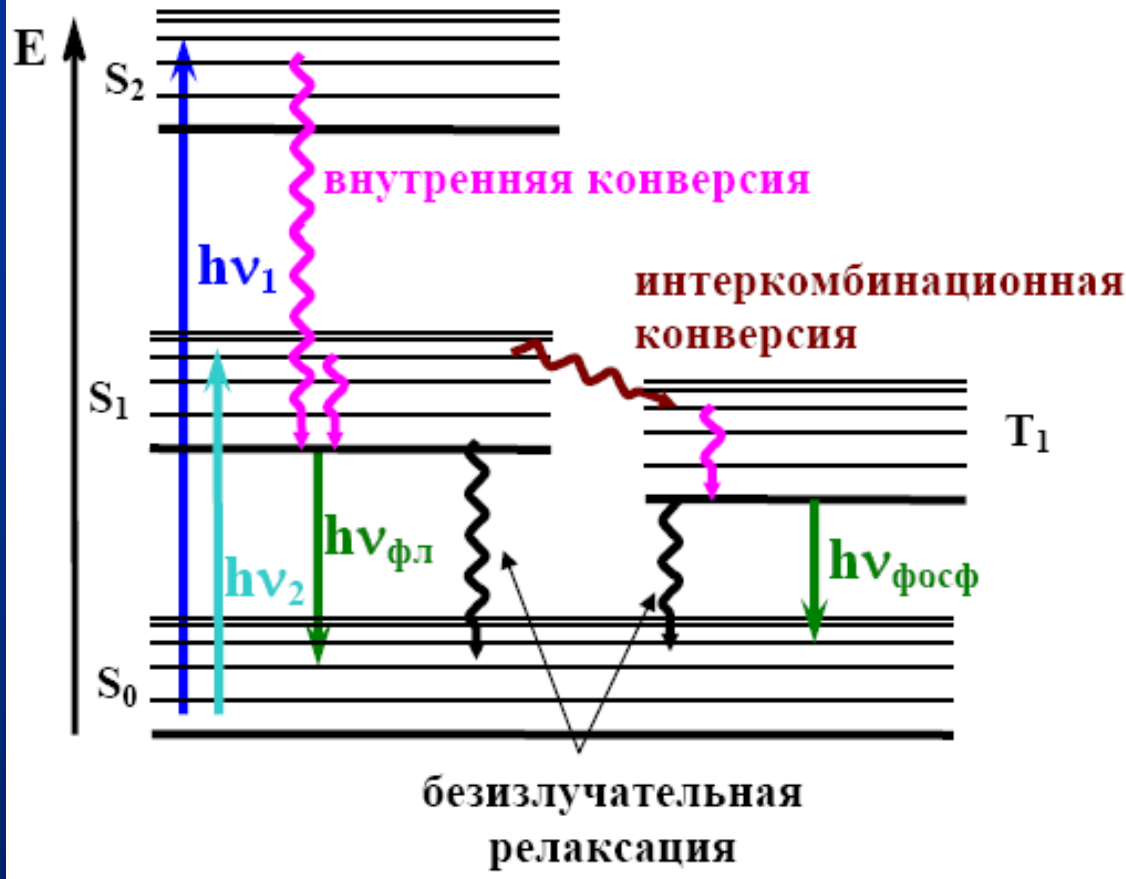
corpuscular properties explain the absorption of light and its emission.

**Люминесценция – это эффект испускания кванта света при релаксации молекулы из возбужденного в основное электронное состояние.**



**Люминесценция = Флуоресценция + Фосфоресценция**

## Основы эффекта люминесценции



### Характерные времена

Поглощение кванта (возбуждение флуорофора) -

$10^{-15}$  сек

Внутренняя конверсия и колебательная релаксация -

$10^{-14}$  -  $10^{-11}$  сек

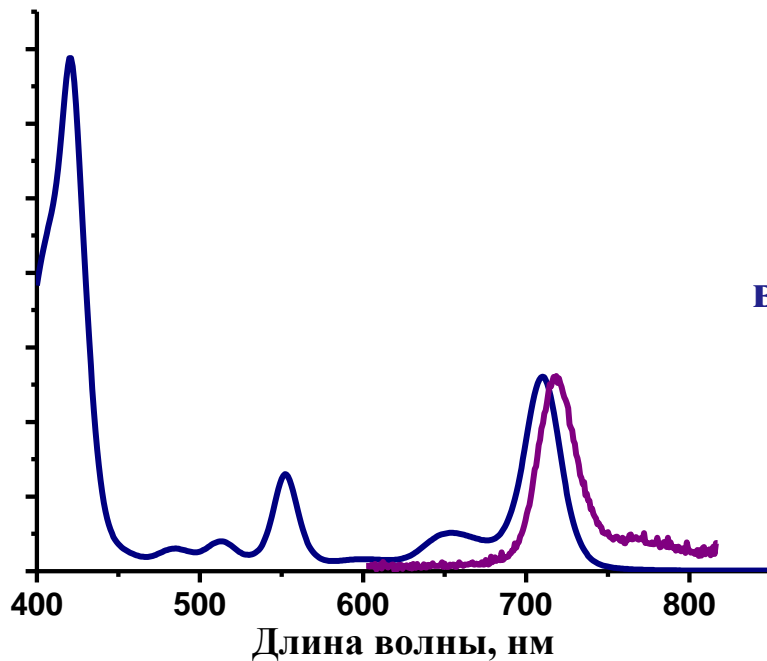
Флуоресценция -

$10^{-9}$  -  $10^{-7}$  сек

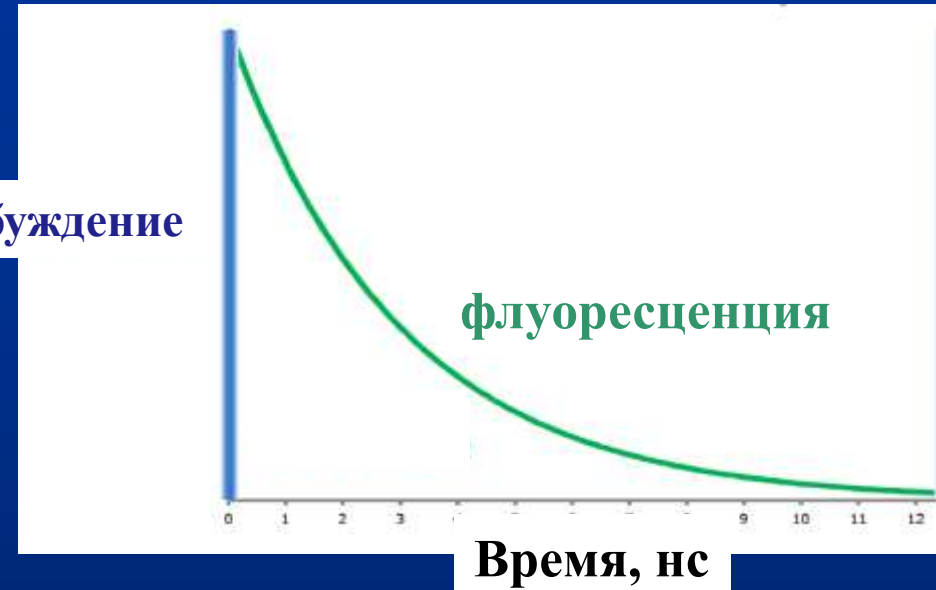
Фосфоресценция -

$10^{-3}$  -  $10^2$  сек

# Флуоресценция молекул



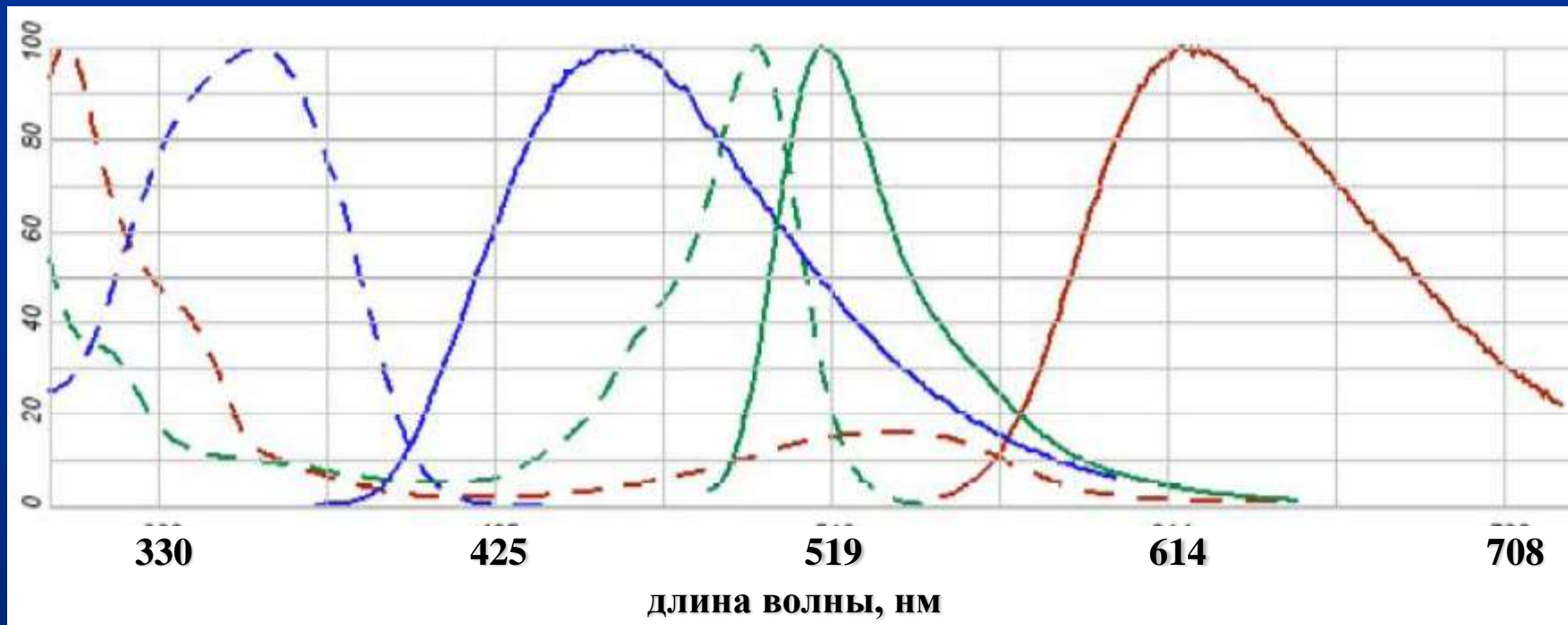
возбуждение



флуоресценция

## Спектральные параметры, используемые во флуоресцентном анализе

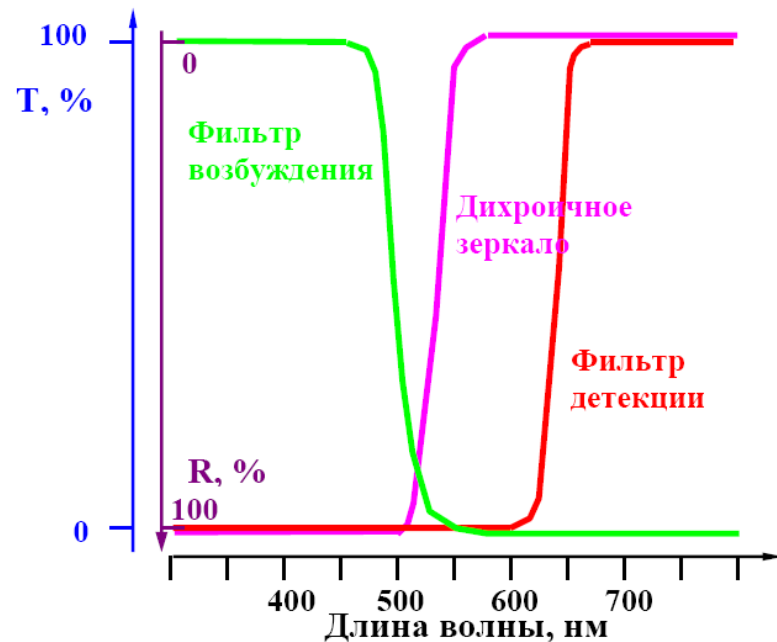
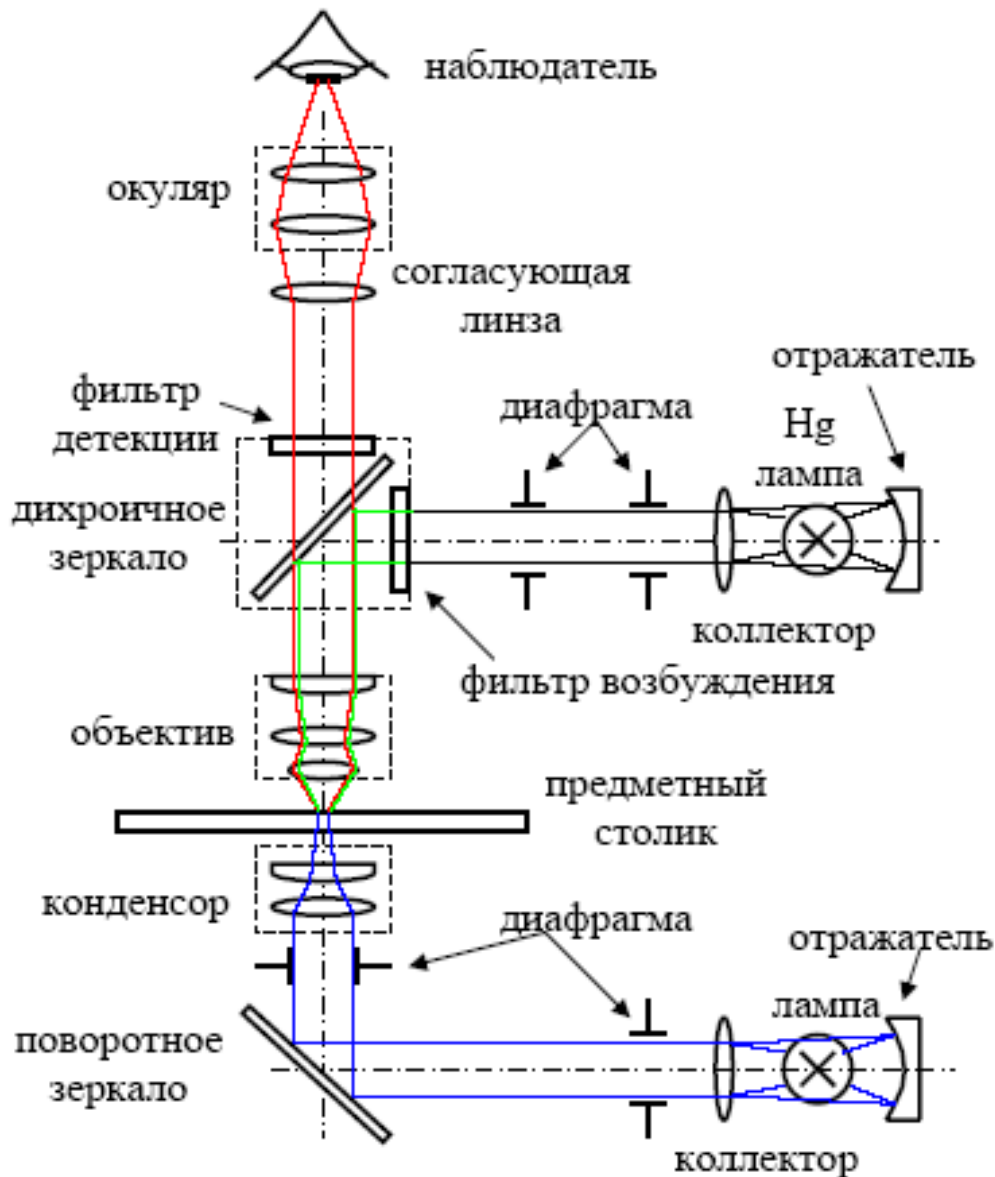
1. Интенсивность флуоресценции – наличие и относительная концентрация флуорофора.
2. Форма спектра и положение максимума – идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий
3. Время жизни флуоресценции - идентификация флуорофора, анализ его микроокружения и взаимодействий



**Спектры флуоресценции молекул отличаются по положению максимума, форме и ширине**

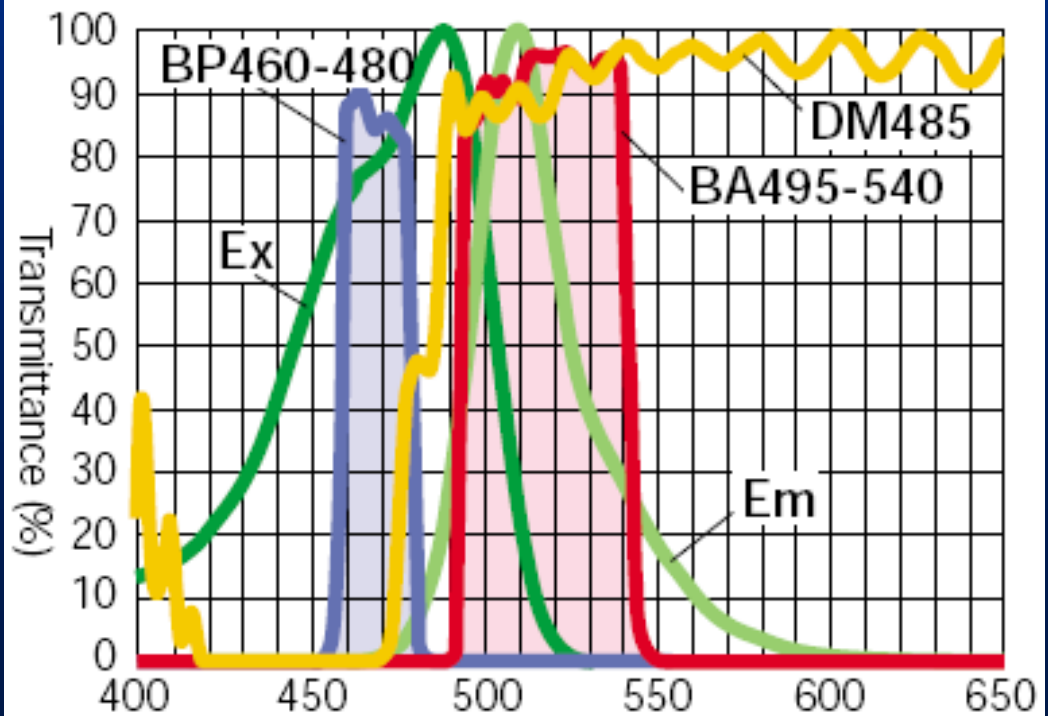
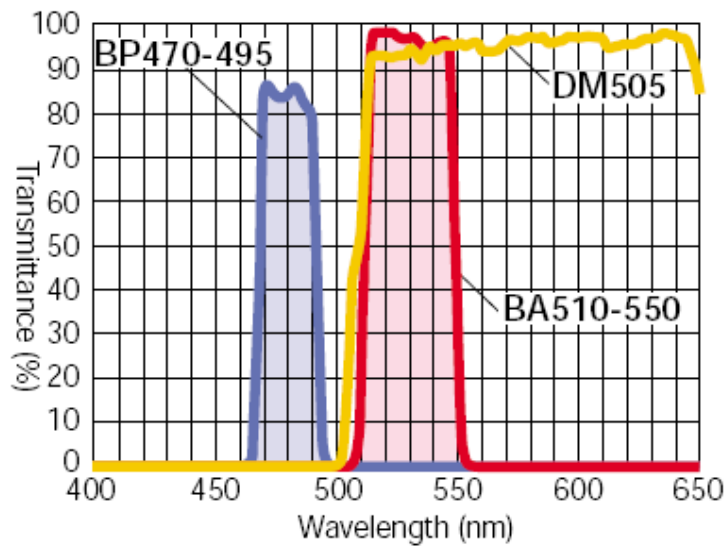
**Спектры поглощения отличаются положением полос поглощения, что дает возможность избирательного возбуждения молекул**

# Оптическая схема флуоресцентного микроскопа



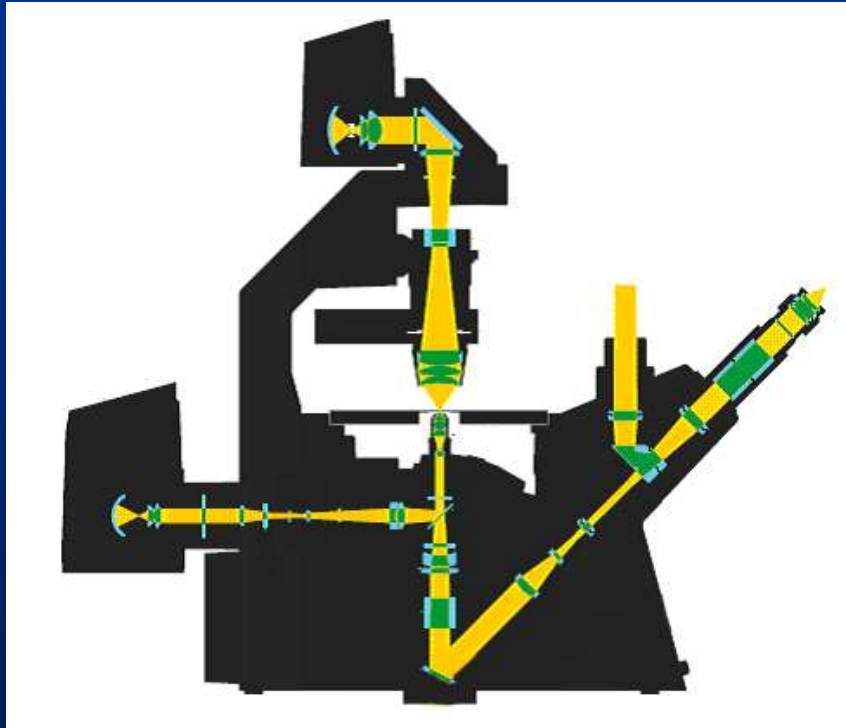


### U-MNIBA3

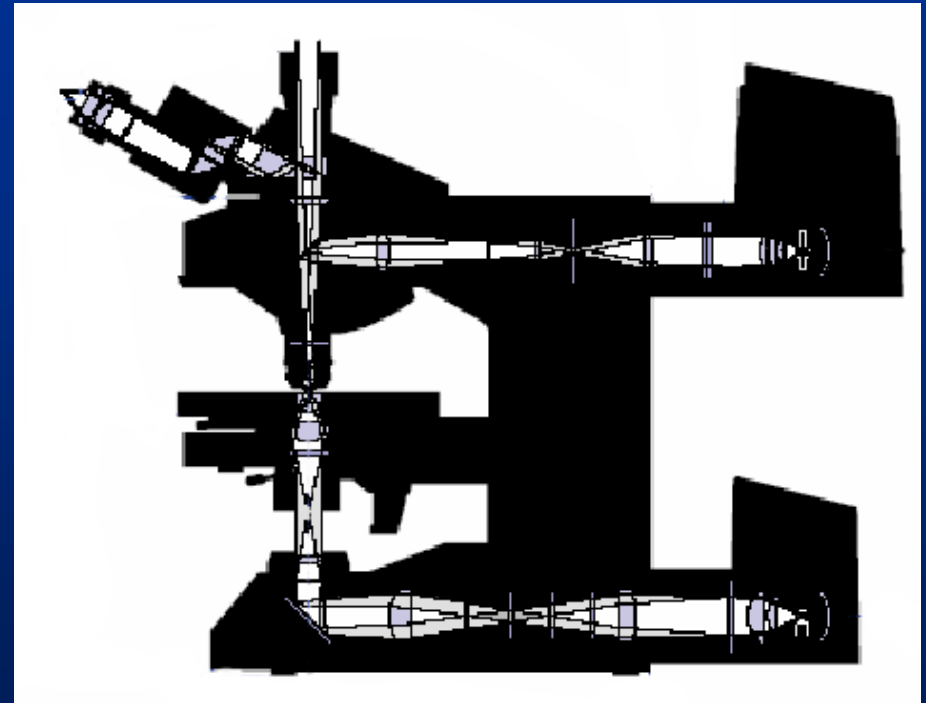




# Ход лучей и устройство флуоресцентных микроскопов



**инвертированный**



**прямой**

# Разрешение флуоресцентного микроскопа и яркость изображения

Предельное разрешение микроскопа

$$\delta_{\text{пр}} = 0,51 \times \lambda_{\text{фл}} / A$$

Яркость изображения ( $B$ ) объекта при наблюдении в микроскоп

$$B \sim A^4 / \Gamma^2 ,$$

$\Gamma$  - общее увеличение микроскопа

## **Флуоресцирующие биологически-активные соединения**

**Предметом изучения флуоресцентной микроскопии могут быть биологически-активные соединения, которые сами по себе обладают флуоресценцией**

**примеры: токсичные ксенобиотики, антибиотики, противоопухолевые агенты, фотосенсибилизаторы**

**Флуоресцентная микроскопия изучает:**

- способность ксенобиотиков проникать в клетки,**
- механизмы клеточного транспорта и метаболизма,**
- особенности внутриклеточного распределения,**
- мишени и механизмы их действия.**

**Соединения с лекарственным действием:**

**сравнительный анализ свойств новых производных, изучение структурно-функциональных взаимосвязей, направленный поиск наиболее активных соединений.**

## Собственные клеточные флуорофоры

**Во всех клетках имеются собственные флуорофоры. Они несут полезную информацию о метаболизме клетки, о функциональном состоянии отдельных клеточных органелл и ферментных систем, но могут создавать помехи при исследовании флуоресцентных биологически активных соединений**

- *белки* – флуоресценция ароматических аминокислот; возбуждение – 280 нм; испускание - максимум 330-350 нм; преобладает сигнал триптофанов.
- *восстановленные никотинадениндинуклеотид, никотинадениндинуклеотид-фосфат (NADH, NADPH)*; возбуждение – 260 и 340 нм; испускание - 465--480 нм
- *окисленные флавопротеины* в составе простетических групп содержат производные рибофлавина – *флавиномононуклеотид и флавинаденинди-нуклеотид*; возбуждение –450 нм; испускание - максимум 520--530 нм
- *каротиноиды* (витамин А- испускание 480 нм);
- *пигменты старения* (липофуцин и др. - испускание 560 нм); *пигменты растений и водорослей* : хлорофиллы и фикобилины (испускание 572- 660 нм);
- *порфирины* (испускание- 580-640 нм)

# Общая классификация флуорофоров и флуоресцентно-меченных молекул для прижизненного окрашивания органоидов и клеточных структур

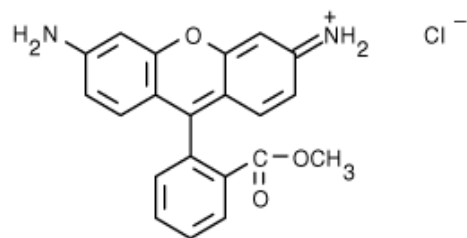
## 1. Красители, избирательно (контрастно) накапливающиеся в органоидах

Примеры: родамин 123 – митохондрии; нейтральный красный – лизосомы; Хёхст, DAPI – ядро; нильский красный – липидные капли.

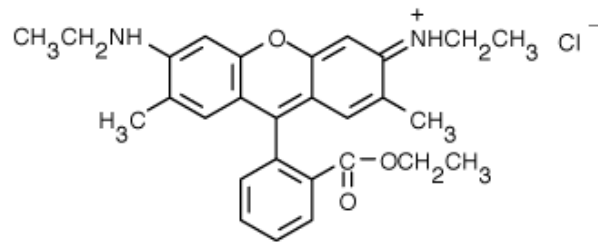
## 2. Флуоресцентно-меченные (ФМ) молекулы, избирательно (контрастно) накапливающиеся в органоидах

Примеры: ФМ-церамид- аппарат Гольджи; ФМ-трансферрин – эндосомы; ФМ-антитела к мембранным белкам – плазматическая мембрана.

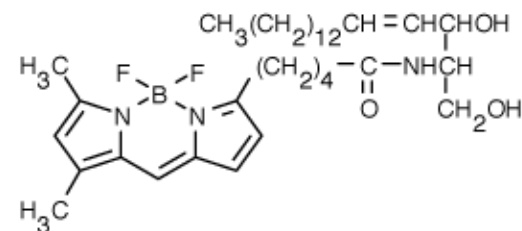
## 3. Плазмиды, кодирующие GFP-конъюгированные белки со специфической локализацией в клетках.



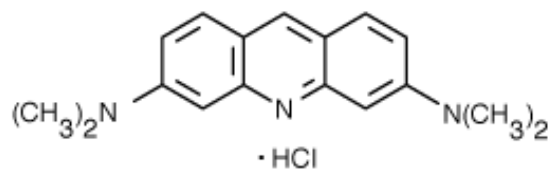
**родамин 123**



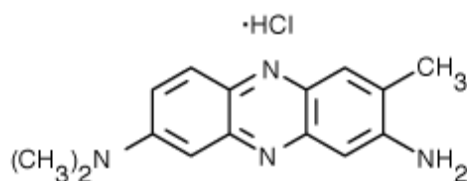
**родамин 6Ж**



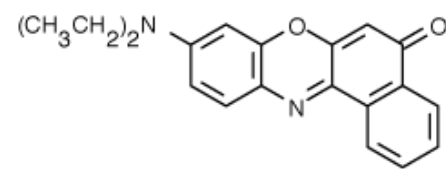
**BODIPY-C5-церамид**



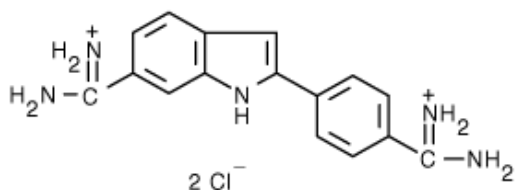
**Акридиновый  
оранжевый**



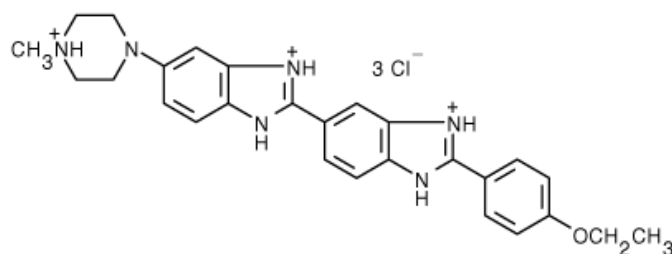
**нейтральный  
красный**



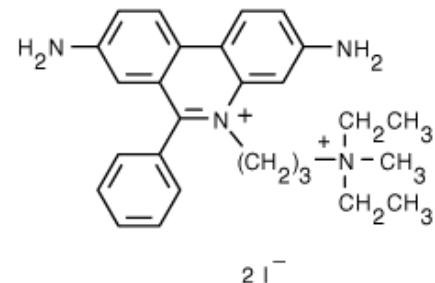
**нильский  
красный**



**ДАПИ**

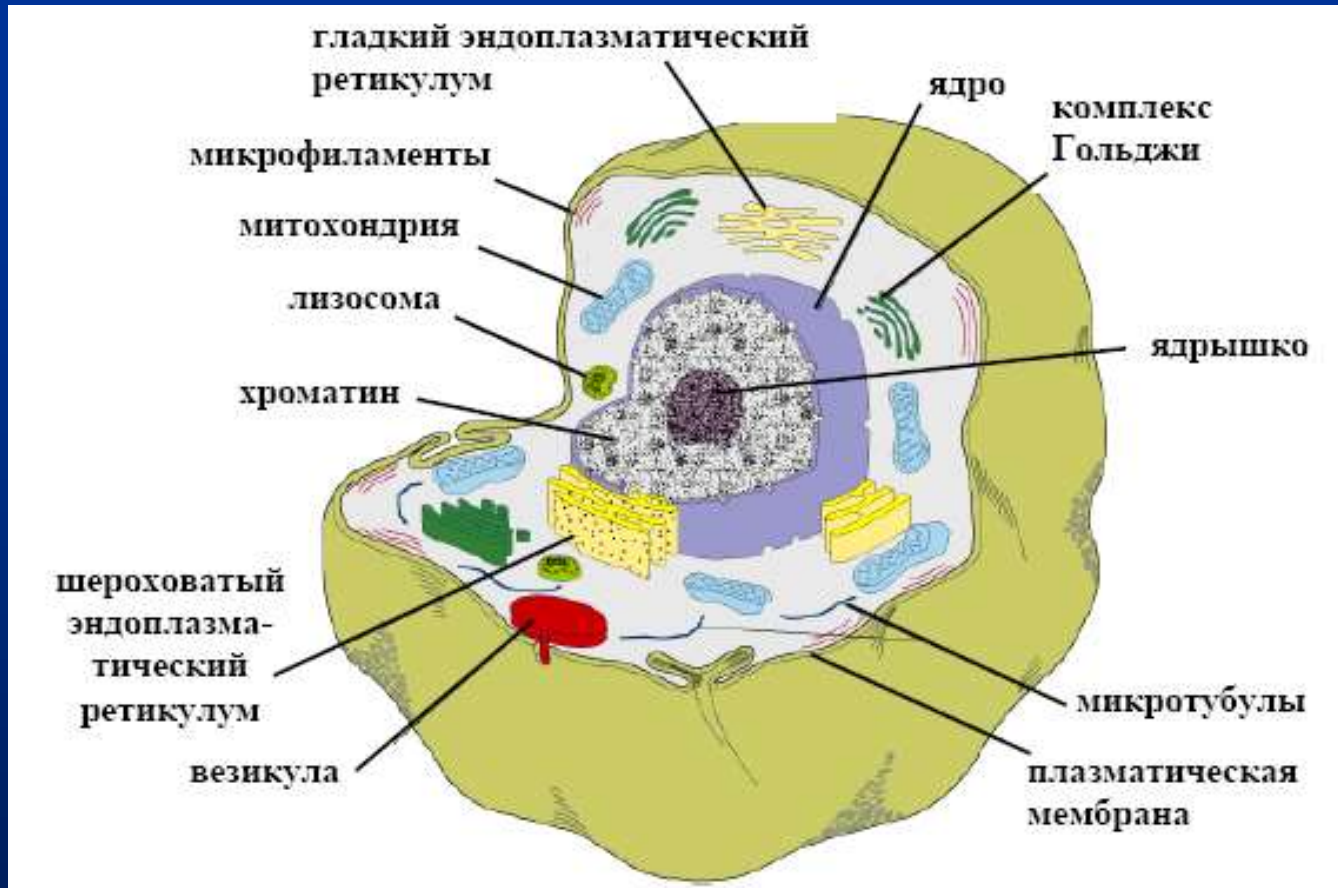


**хёхст 33342**



**йодистый  
пропидий**

# Органоиды и клеточные структуры, доступные для прижизненного окрашивания флуорофорами и ФМ молекулами



компоненты плазматической мембраны, фагосомы, эндосомы, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, липидные капли, митохондрии, ядро, ядрышко; теоретически любая структура с помощью GFP-конъюгированных белков, экспрессирующихся в клетке.



# Прижизненное окрашивание клеточных структур и органоидов флуоресцентными зондами

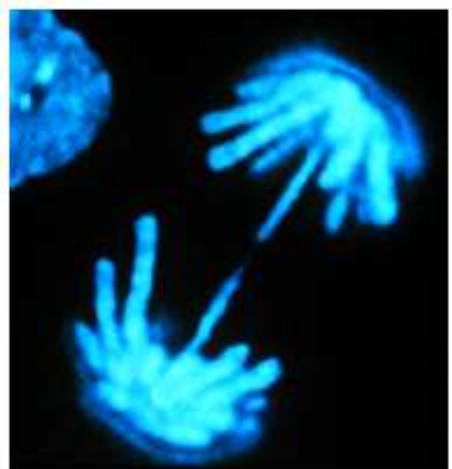
CC(C)(C)CCCCCCCCCCCCCC=CC(O)Nc1c(F)c(F)n2c(C)c(C)c3c2n1C=CN3

**VODIPY-церамид**

эксимеры VODIPY-церамид

мономеры VODIPY-церамид

селективное окрашивание комплекса Гольджи, зондом VODIPY-церамид

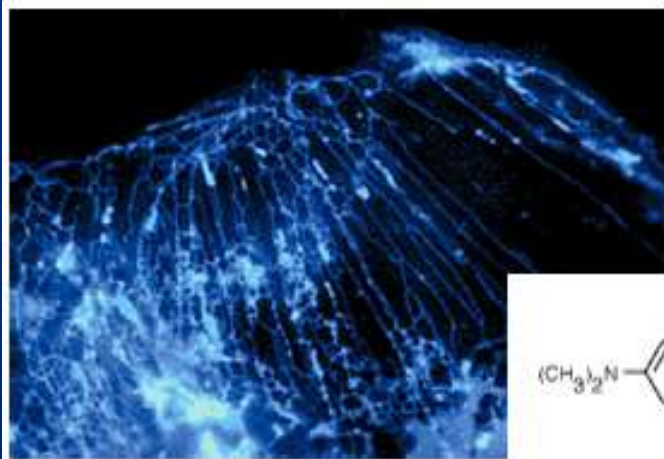


NC(=O)c1ccc(cc1)-c2c[nH]c3cc(N(=[NH2+])C(=O)N)ccc32.[Cl-].[Cl-]

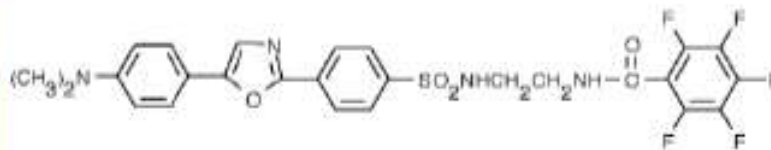
**2 Cl<sup>-</sup>**

окрашивание хроматина на поздней стадии митоза с помощью DAPI

# Прижизненное окрашивание клеточных структур и органоидов флуоресцентными зондами

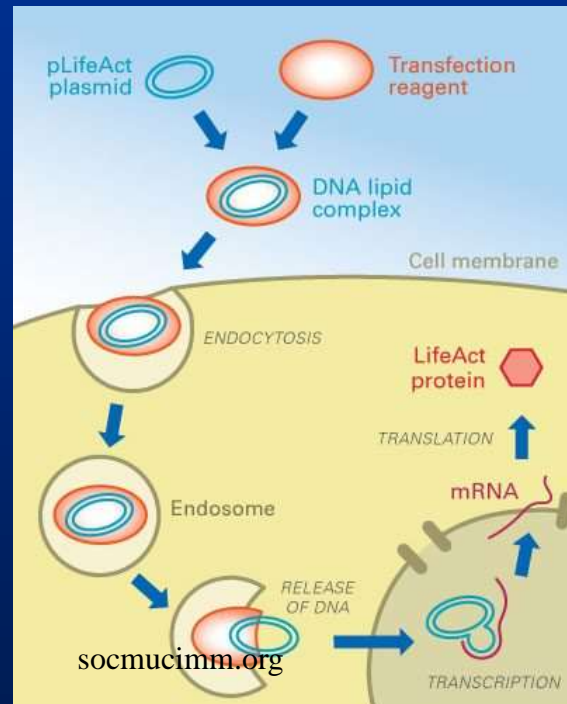
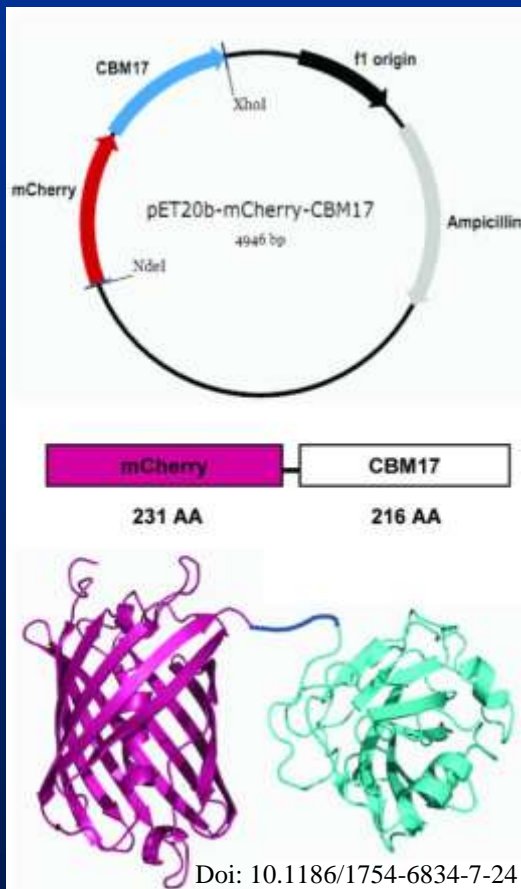


эндотелиальные клетки легочной  
артерии быка  
эндоплазматический ретикулум,  
ER-Tracker Blue-White



# Green fluorescent protein

## Applications of chimeras GFP-protein X

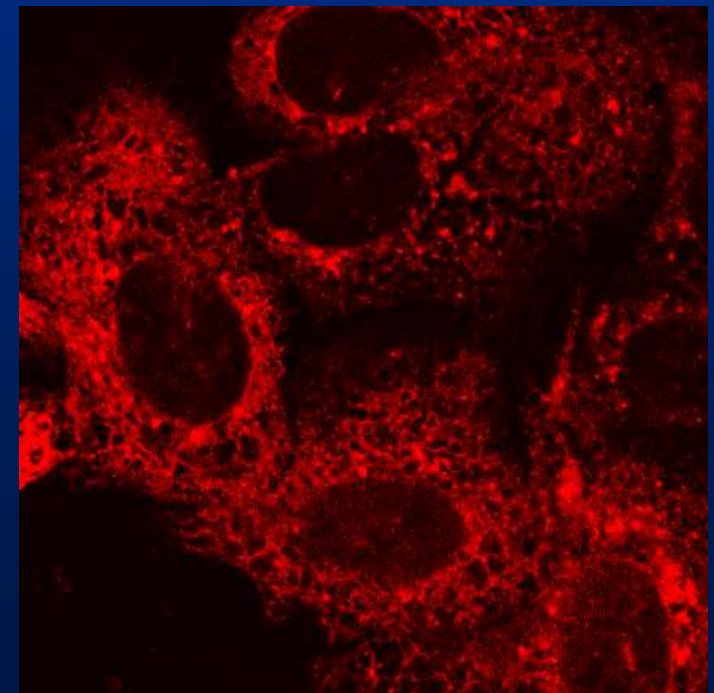


Живые клетки HEK293

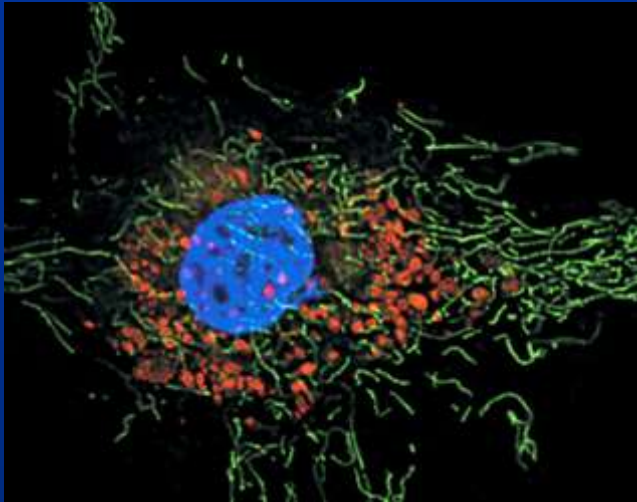
Эндоплазматический ретикулум

трансфекция с FusionRed-  
ER вектором

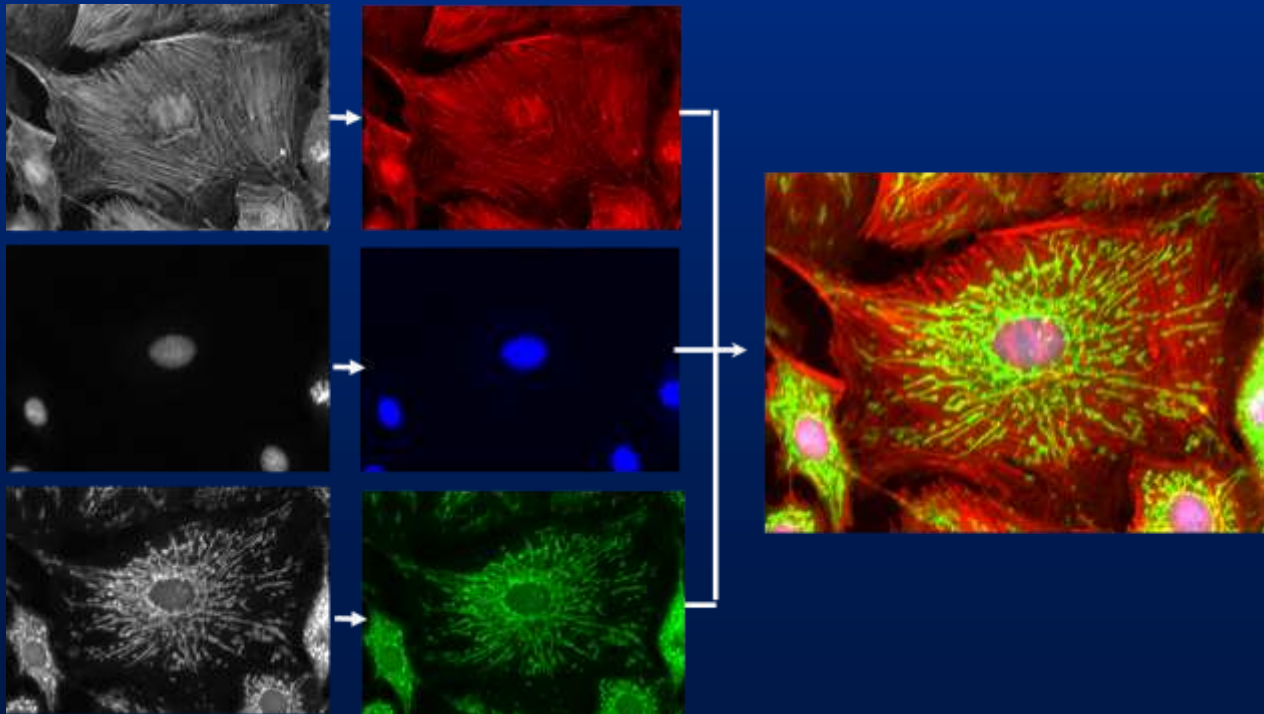
ER-вектор: calreticulin ER  
targeting signal and KDEL peptide



# Прижизненное окрашивание клеточных структур и органоидов флуоресцентными зондами

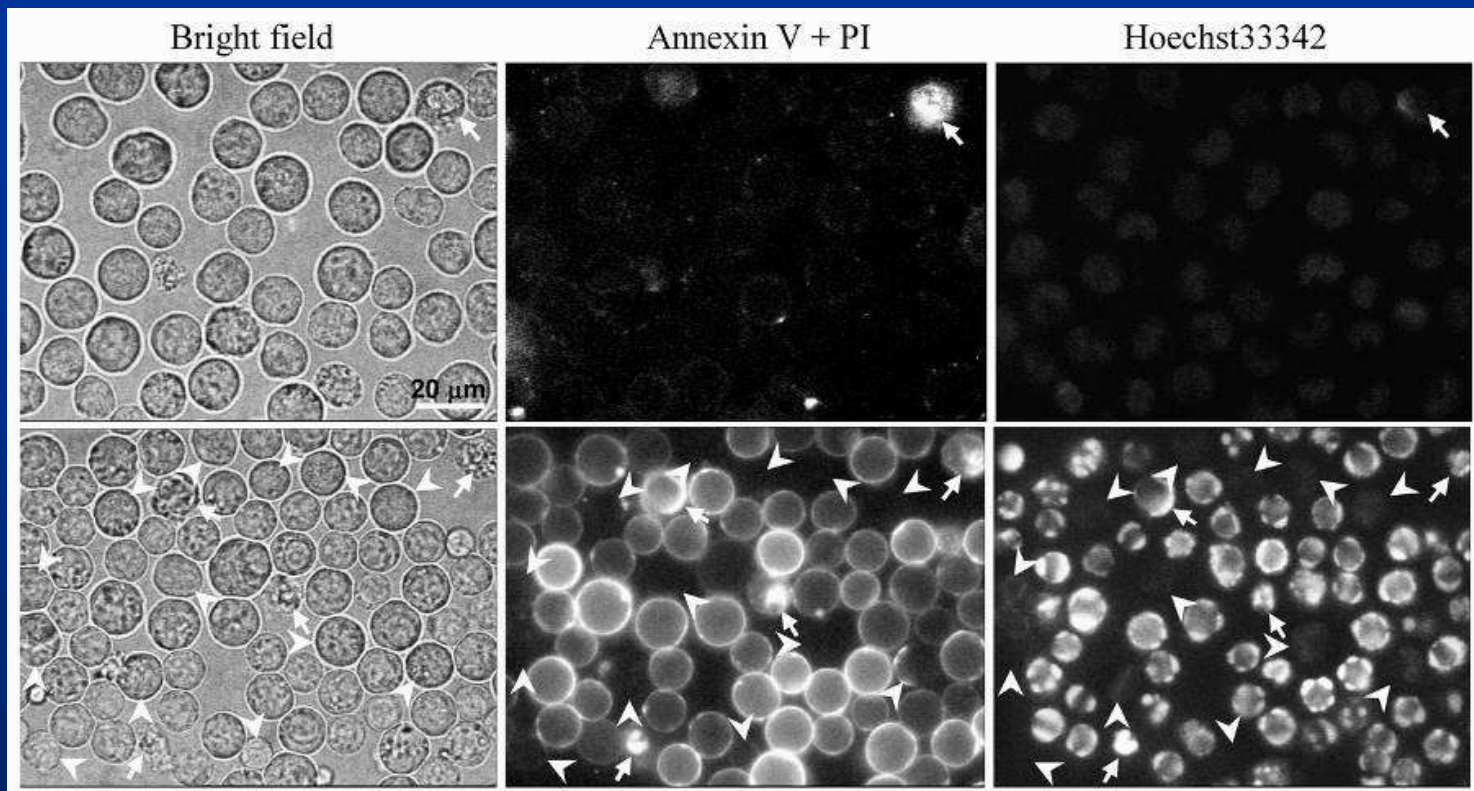


Живая эндотелиальная клетка легочной артерии быка.  
Флуоресцентными зондами окрашены  
ядро (синий), лизосомы (красный) и  
митохондрии (зеленый)





# Флуоресцентная микроскопия применительно к анализу типа клеточной гибели



# **Флуоресцентная микроскопия позволяет контрастировать и наблюдать многие органоиды и клеточные структуры в *фиксированных* клетках**

Для этого используют:

- многие из красителей, избирательно (контрастно) накапливающиеся в органоидах;
- ФМ-молекулы (особенно, ФМ-антитела);
- GFP-конъюгированные белки, экспрессированные в клетках до фиксации.

**Важно: при исследовании *фиксированных* клеток велика вероятность получения артефактных результатов из-за искажений, вызванных процедурой химической фиксации клеток.**

# Молекулярные инструменты для измерения концентрации свободных ионов в клетках: флуоресцентные индикаторы ионов

Существуют флуоресцентные индикаторы на  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$

## Классификация индикаторов

По способности проникать в клетки:

проникающие и

непроникающие через мембрану

По способу детекции:

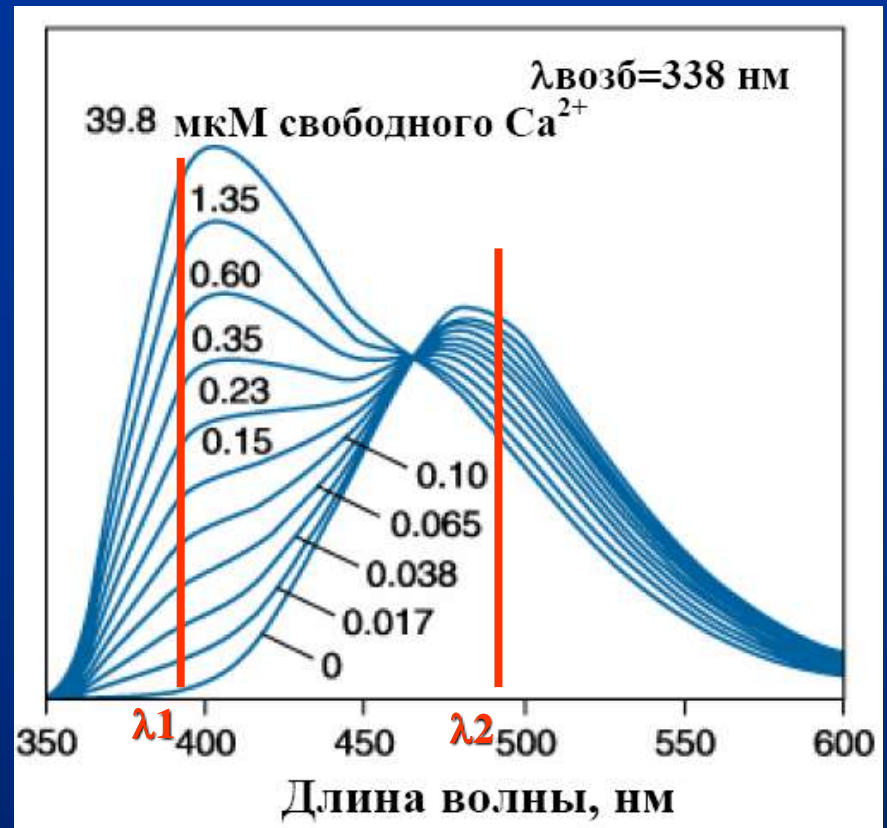
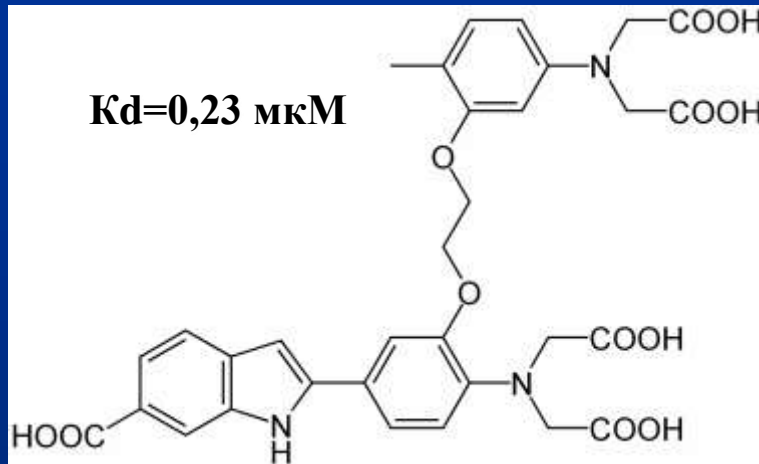
рационаметрические

по изменению интенсивности свечения





# Ратиометрический индикатор свободного кальция: Индо-1



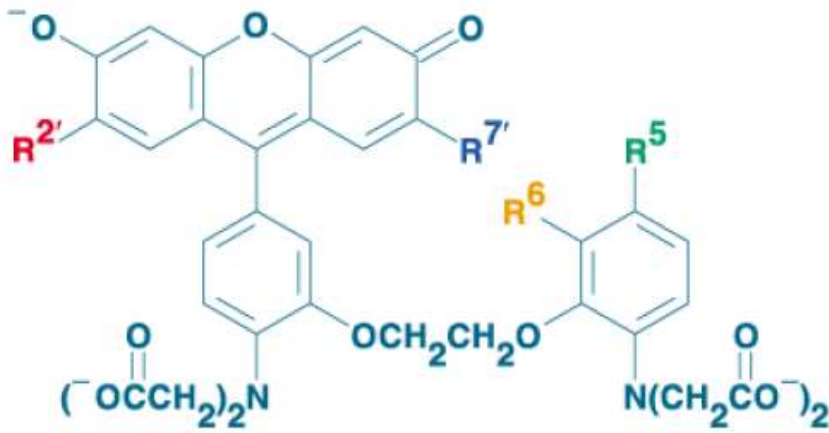
Распределение свободного кальция в нейроне



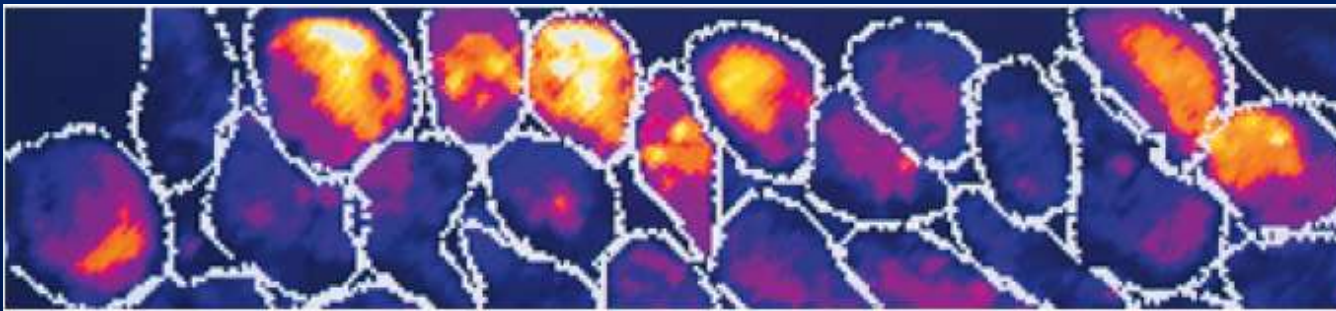
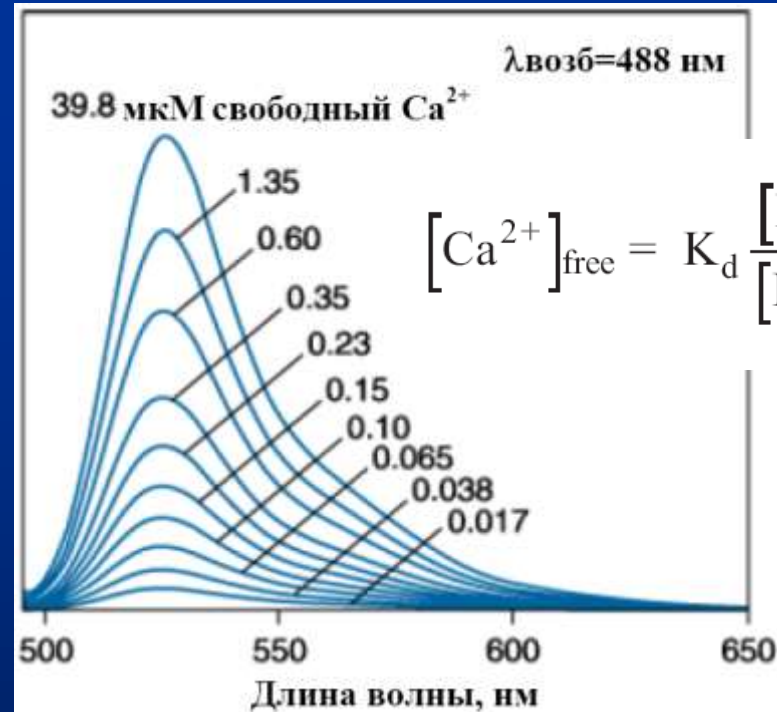
$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d Q \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)}$$

$$R = I(\lambda_1)/I(\lambda_2); Q = I_{\min}(\lambda_2)/I_{\max}(\lambda_2)$$

## Индикатор кальция – fluo3 и его производные



Indicator	$K_d(\text{Ca}^{2+})$	$R^{2'}$	$R^{7'}$	$R^5$	$R^6$
Fluo-3	0.39 $\mu\text{M}$	Cl	Cl	$\text{CH}_3$	H
Fluo-4	0.35 $\mu\text{M}$	F	F	$\text{CH}_3$	H
Fluo-5F	2.3 $\mu\text{M}$	F	F	F	H
Fluo-5N	90 $\mu\text{M}$	F	F	$\text{NO}_2$	H
Fluo-4FF	9.7 $\mu\text{M}$	F	F	F	F



Спонтанные флуктуации  
внутриклеточного кальция в  
развивающихся нейронах



Интенсивность флуоресценции

Концентрация ионов кальция →

Kd

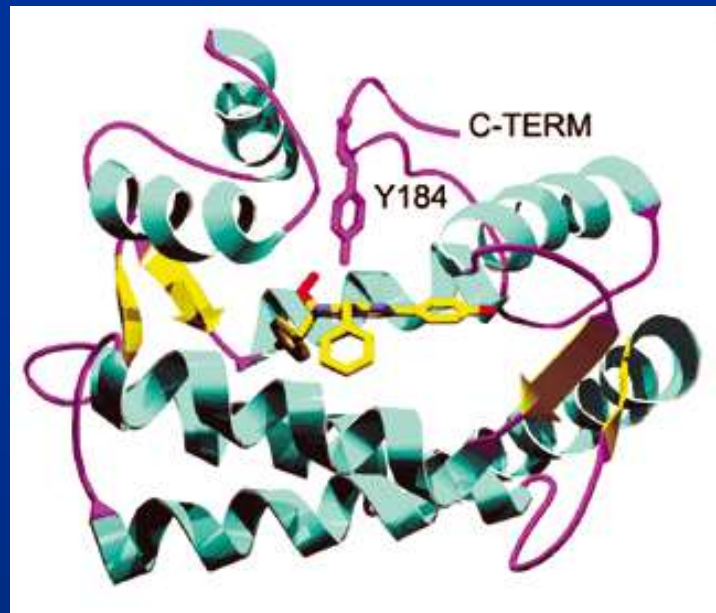
**Экворин, белок из медузы эквореи  
(*Aequorea victoria*), –  
хемилюминесцентный индикатор  
кальция**

**22 кДа, 189 а.о.**

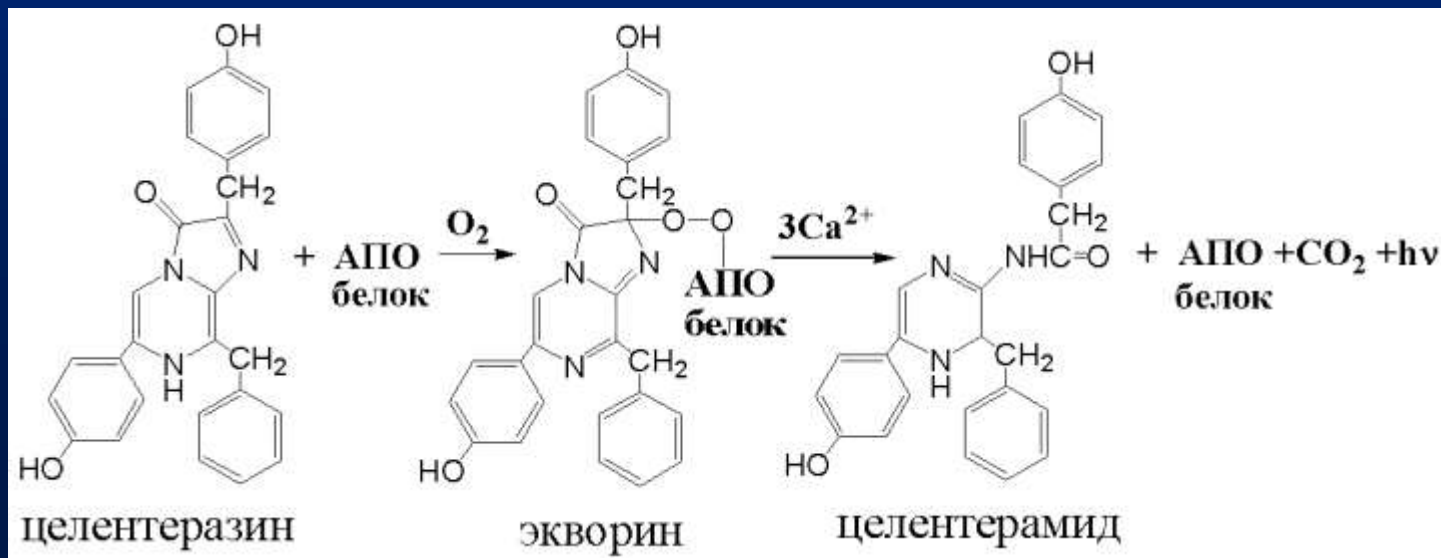
**Простетическая группа-  
целентеразин.**

**Люминесцирует – 469 нм.**

**Позволяет измерять свободный  $\text{Ca}^{2+}$   
в диапазоне 0,1 -100 мкМ**



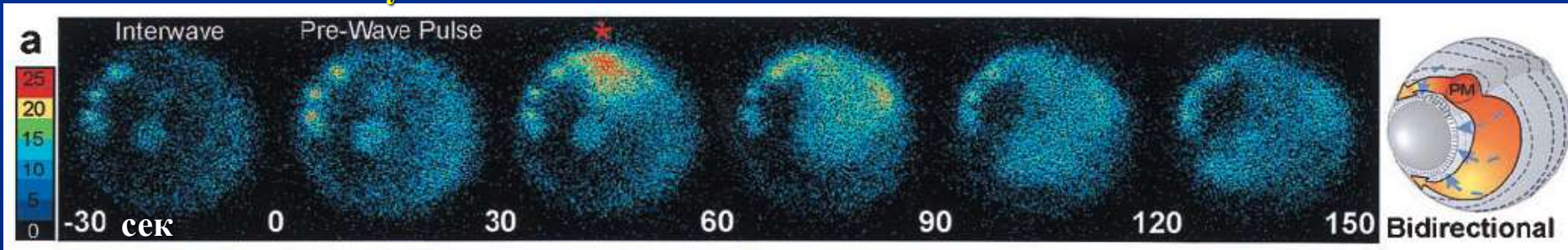
**Структура комплекса  
экворин-целентеразин**





# Исследование кальциевых волн в гастреле эмбриона рыбки-зебры

между волнами предволновой импульс



Рекомбинантный экворин в комплексе с целентеразином введен в эмбрион с помощью микроинъекции.

