

Введение в методы микроскопии в биологии.

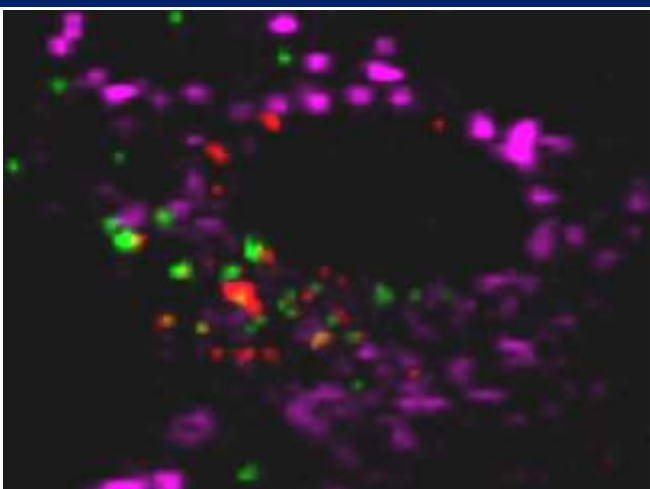
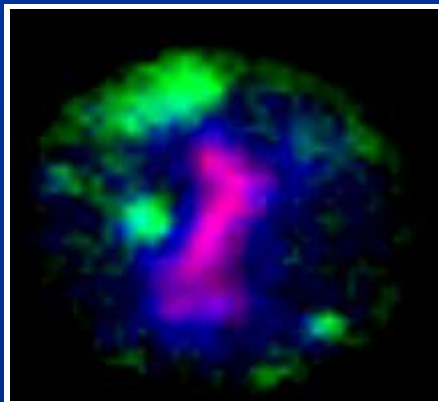
Оптическая микроскопия

Алексей Валерьевич Феофанов

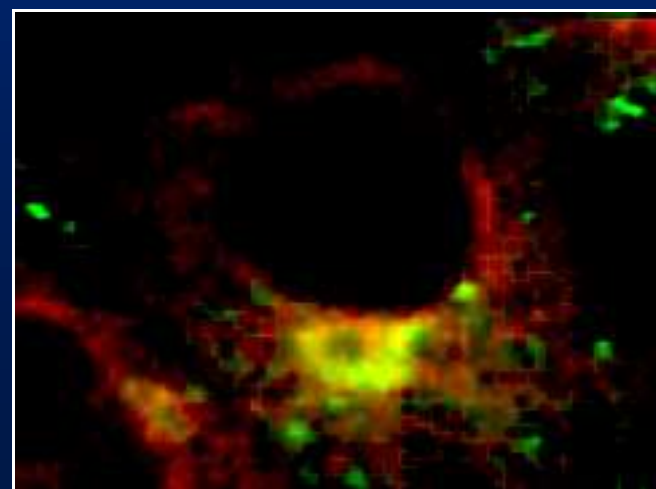
Кафедра биоинженерии

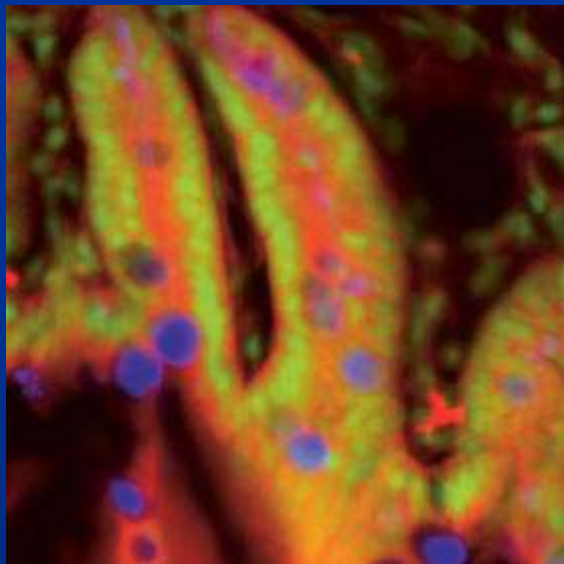
Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

*Лаборатория оптической микроскопии и спектроскопии
биомолекул
ИБХ РАН*



Лекция № 4

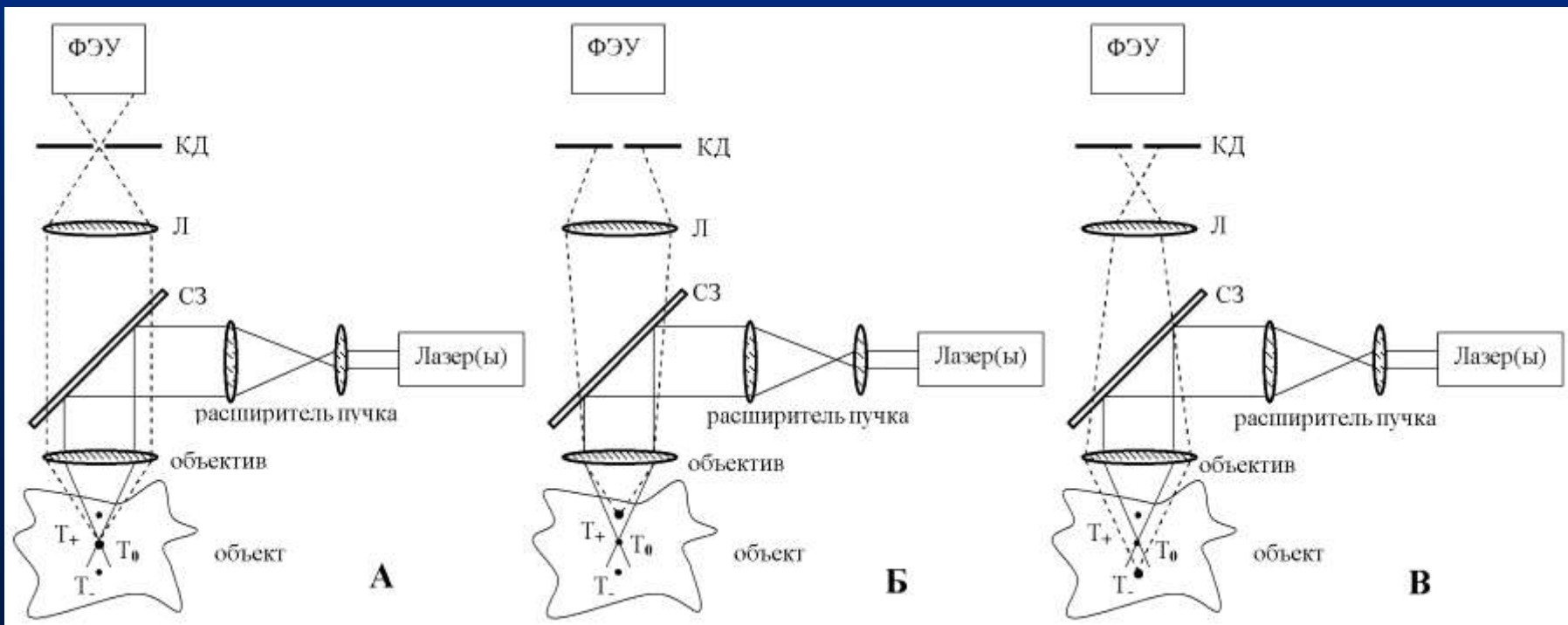




Оптическая схема конфокальной фильтрации сигнала



Изобретена в 1955
Проф. Мински



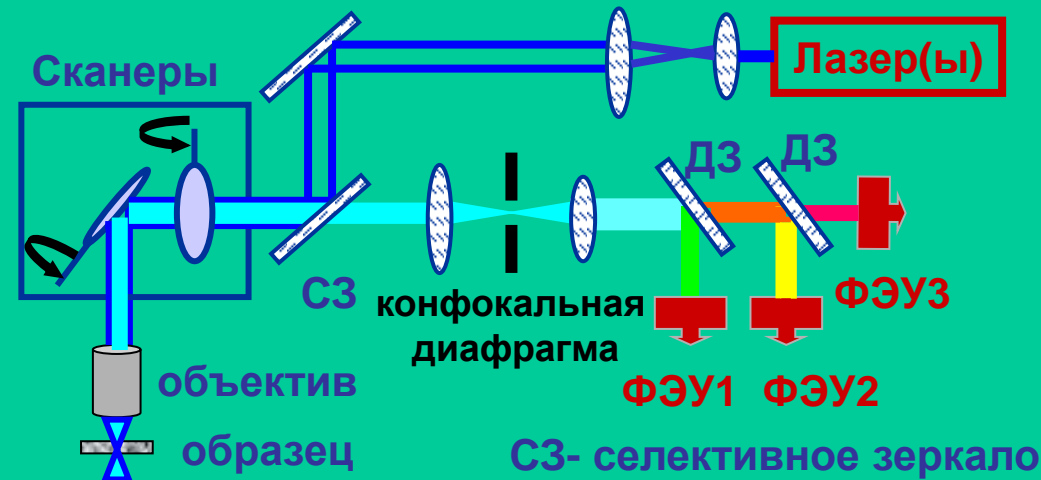


Схема лазерного сканирующего конфокального микроскопа

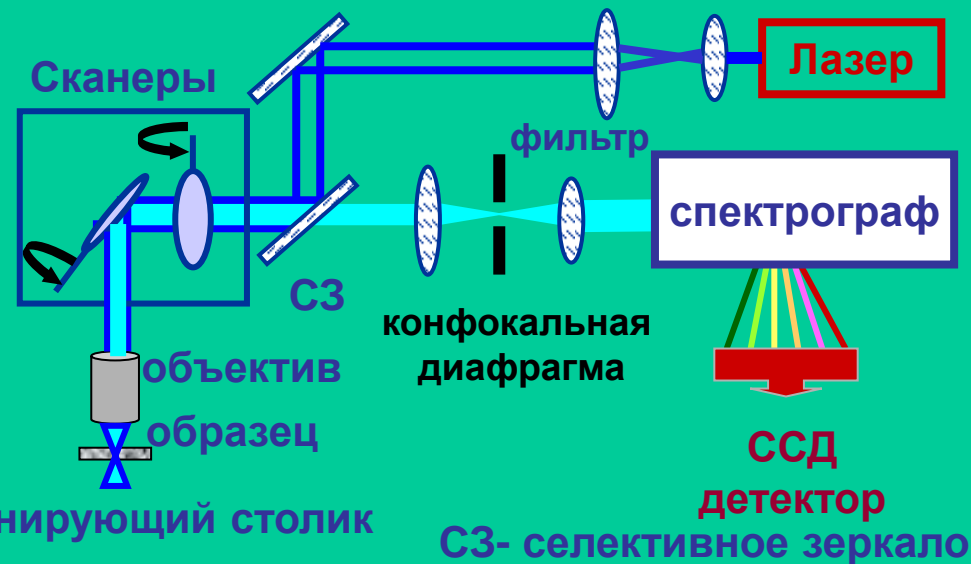
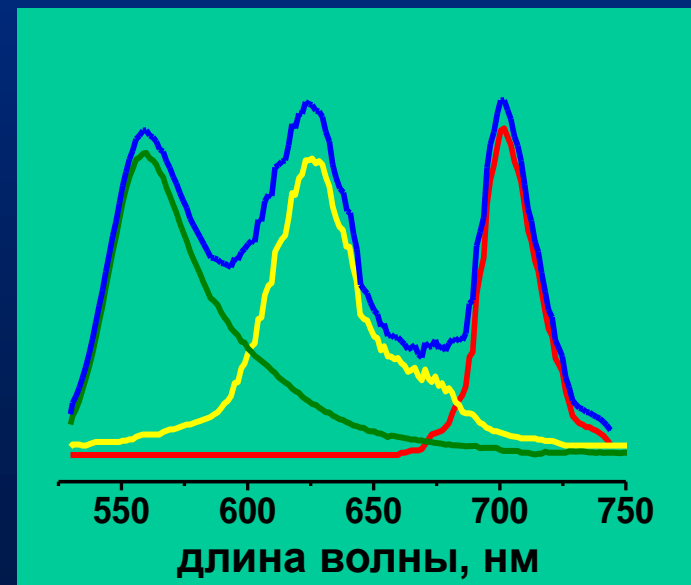
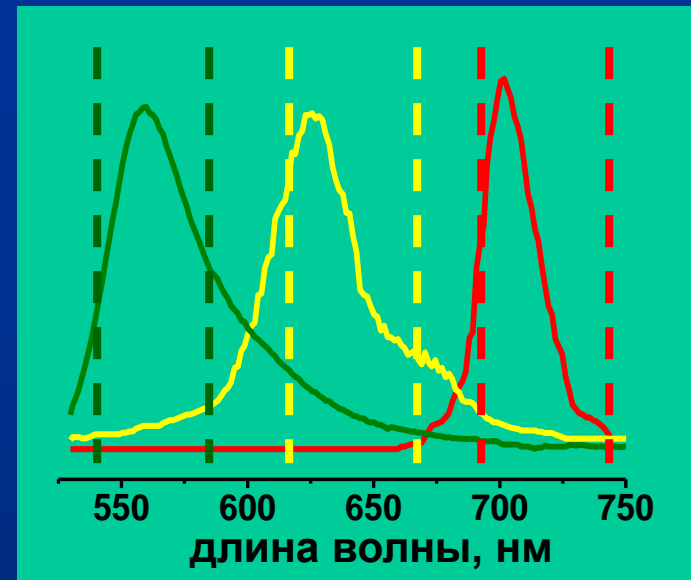
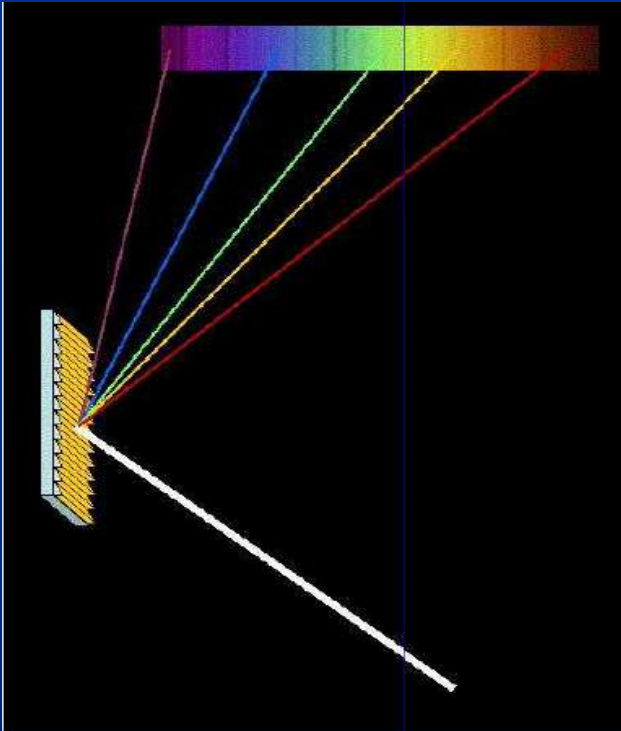


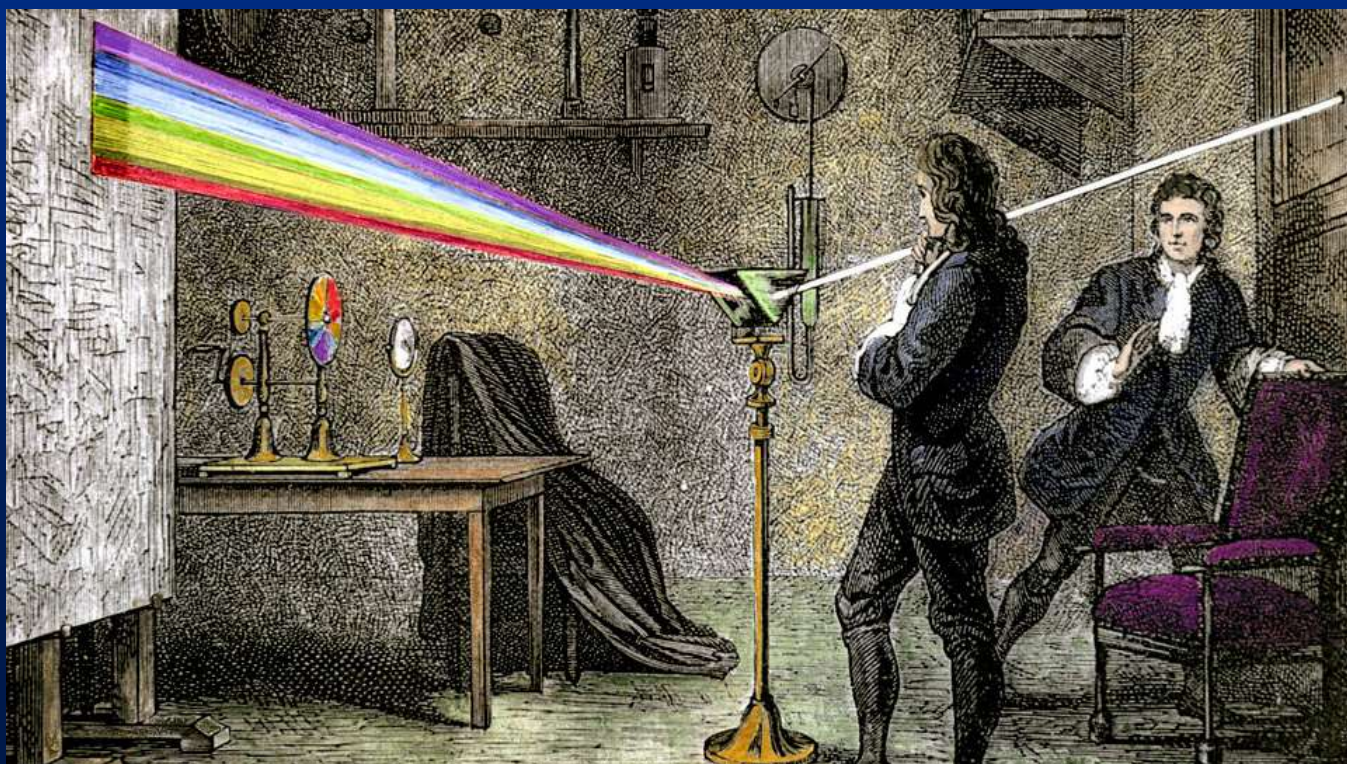
Схема лазерного сканирующего конфокального спектрального микроскопа



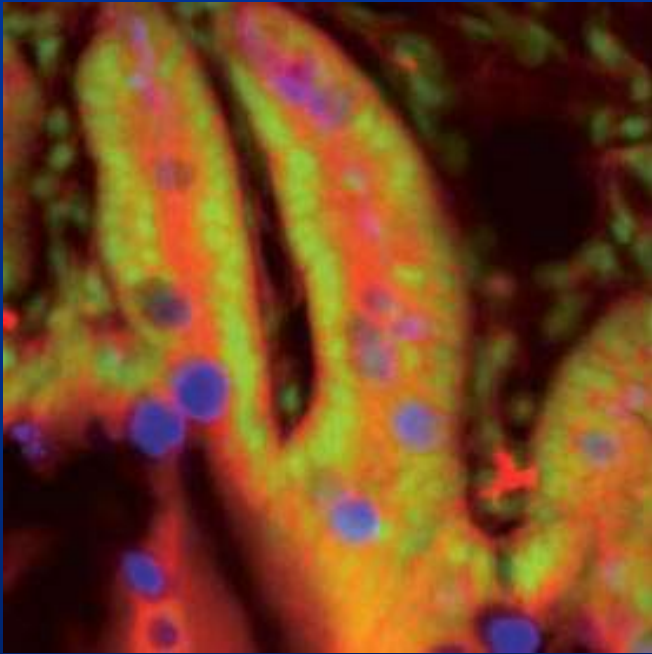
**Устройства для разложения
света в спектр:
периодическая решетка и
призма**



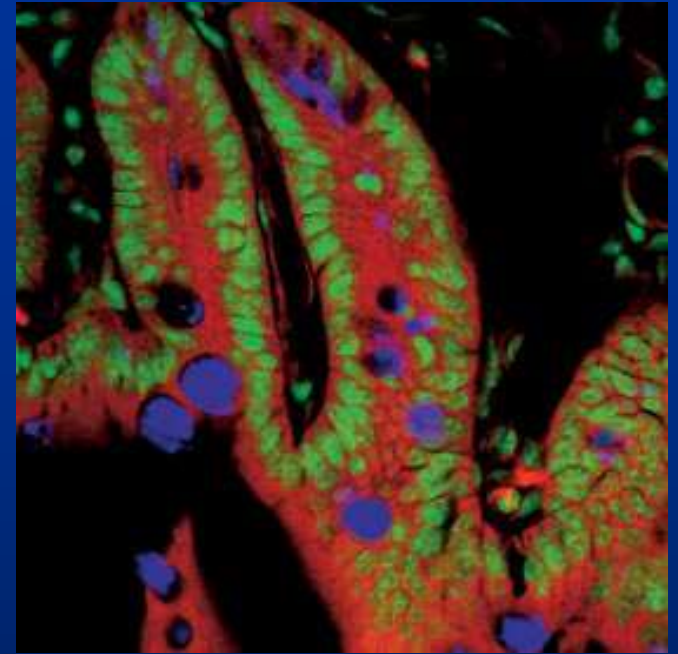
Разложение белого света в спектр Сэр Исаак Ньютон в 1676 г.



Сравнение свойств флуоресцентного и конфокального лазерного сканирующего микроскопов



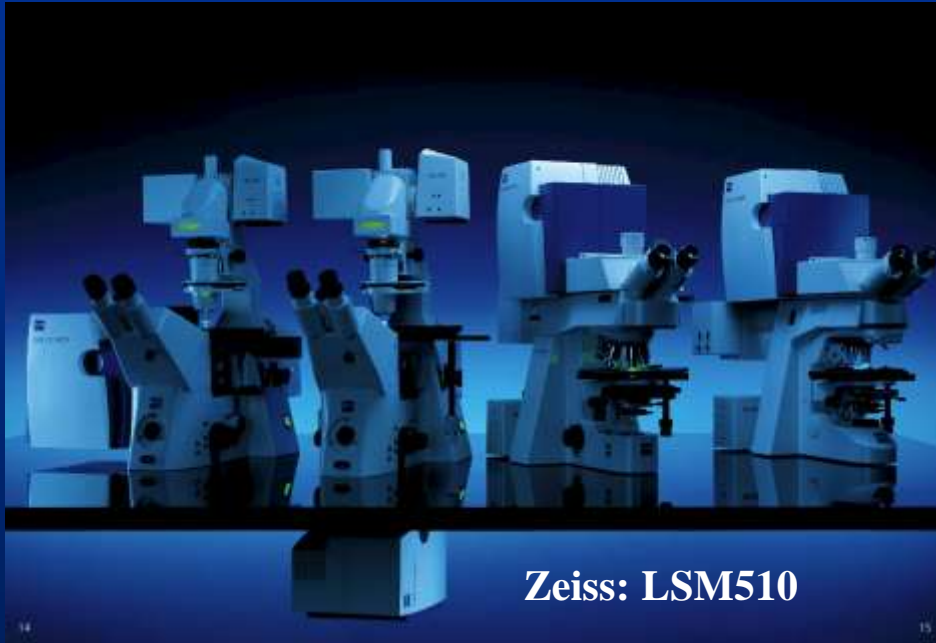
эпифлуоресцентное
изображение



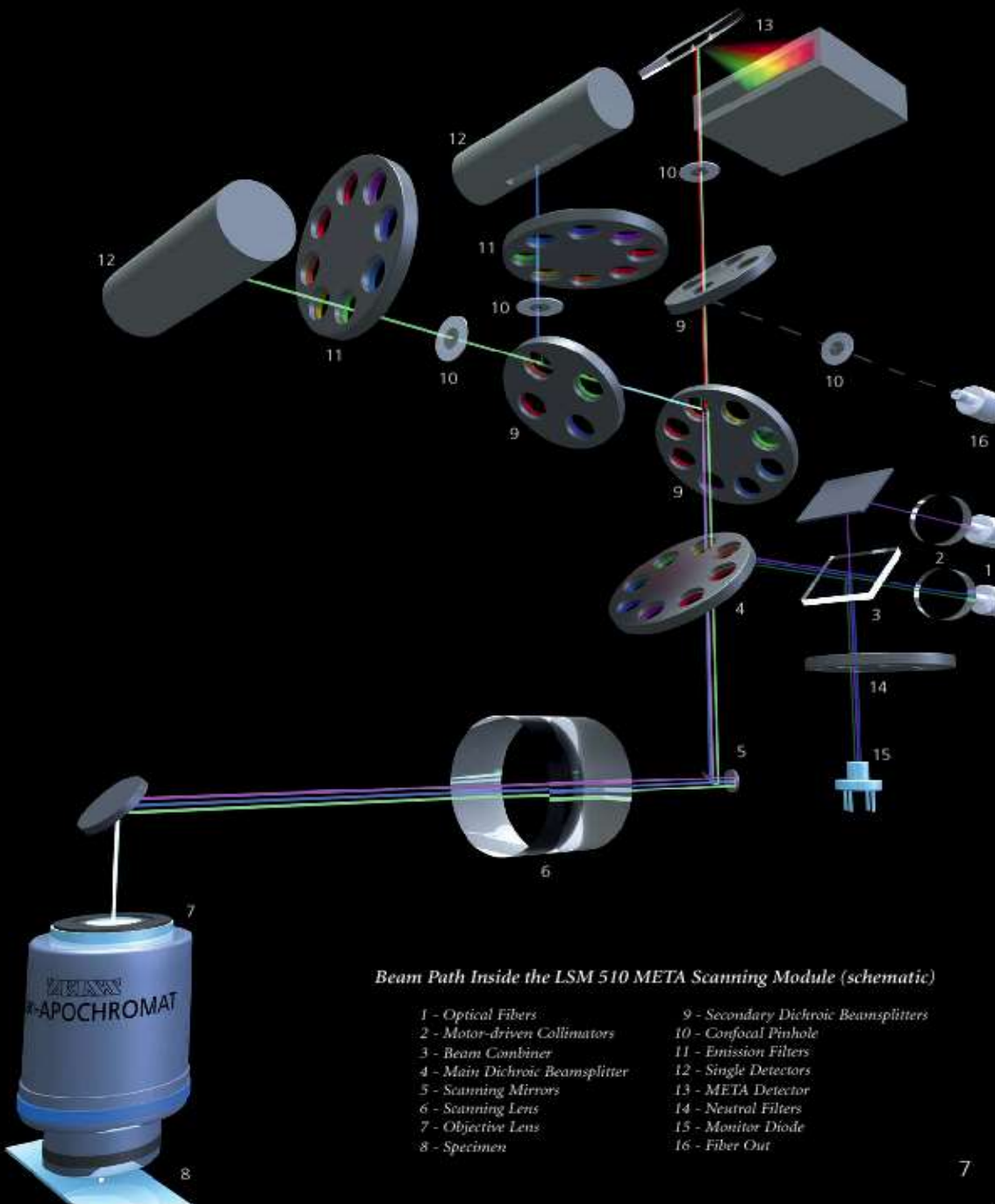
конфокальное
изображение

Толстый биологический образец окрашен тремя
флуорофорами

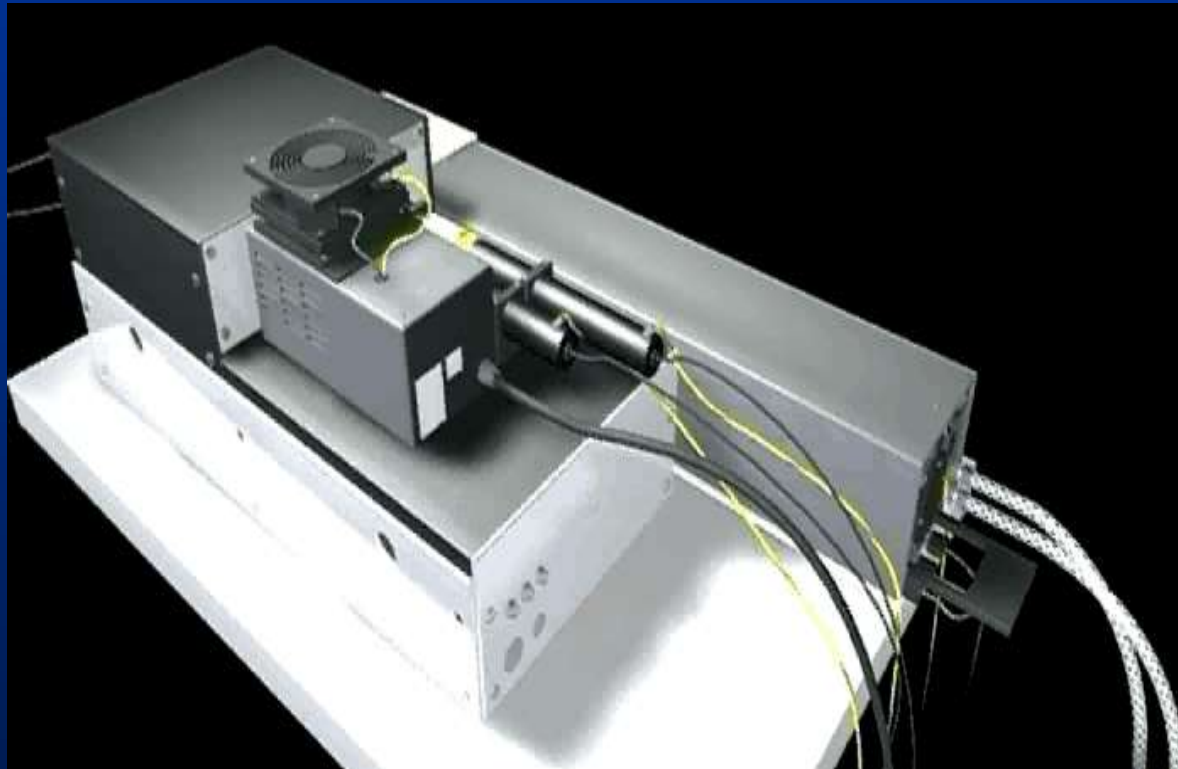
Внешний вид конфокальных микроскопов фирмы ZEISS



Принципиальная оптическая схема конфокального микроскопа



Принципиальная оптическая схема конфокального микроскопа фирмы ZEISS LSM510-Meta



Толщина оптического слоя $\Delta Z_{\text{сл}}$, от которого измеряется сигнал в конфокальном режиме

$$\Delta Z_{\text{сл}} = ([0,88 \times \lambda_{\text{фл}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5})]^2 + 2 \times n^2 \times \phi^2 / A^2)^{0,5},$$

где A - числовая апертура объектива, n — показатель преломления иммерсионной среды,

ϕ - эффективный диаметр конфокального отверстия, $\lambda_{\text{фл}}$ — характерная средняя длина волны.

$$\phi = D / \Gamma,$$

где D - диаметр конфокального отверстия в мкм, Γ - увеличение микроскопа между фокальной плоскостью объектива и сопряженной фокальной плоскостью, в которой расположена конфокальная диафрагма.

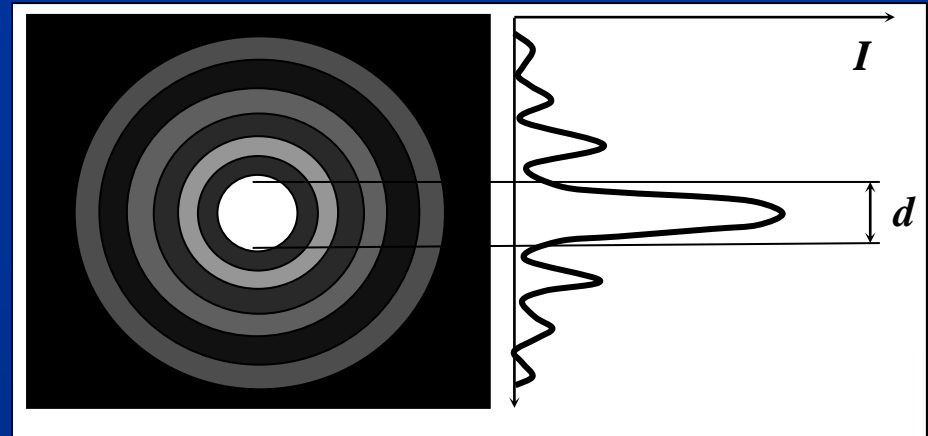
Разрешение конфокального микроскопа:

$$\Delta Z = 0,88 \times \lambda_{\text{в}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5}), \quad \Delta X = \Delta Y = 0,51 \times \lambda_{\text{в}} / A$$

ГДЕ $\lambda_{\text{в}}$ — длина волны возбуждения

На практике

$$\phi \sim d$$



d - диаметр диска Эри для данного объектива и длины волны при $A=1,3$; $n=1,5$; $\lambda_{\text{ср}}=0,5$ мкм обеспечивается разрешение:

$$\Delta X = \Delta Y = 0,22 \text{ мкм}, \Delta Z = 0,56 \text{ мкм},$$

а толщина оптического слоя, от которого измеряется сигнал

$$\Delta Z_{\text{сл}} = 1,06 \text{ мкм}.$$

При $\phi < 0,25 d$,

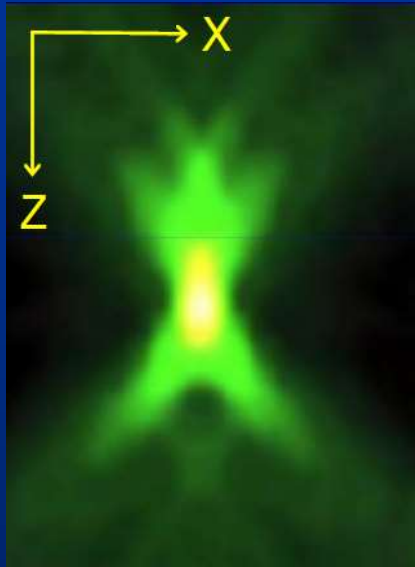
улучшается также и разрешение в плоскости XY сканируемого объекта.

В этом теоретическом случае:

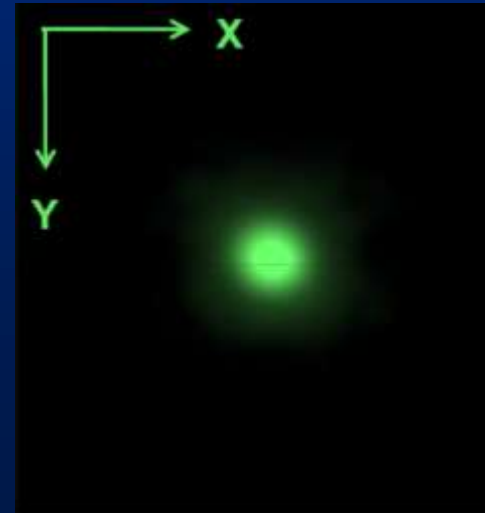
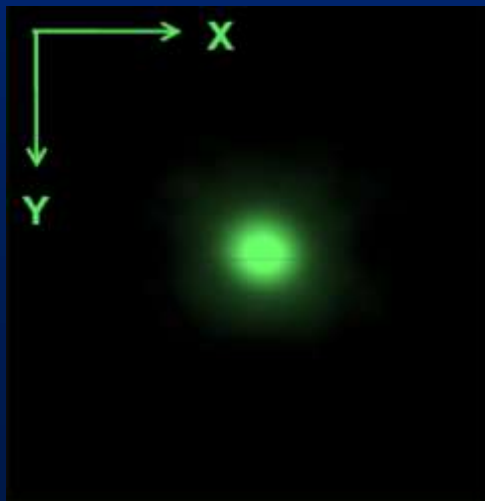
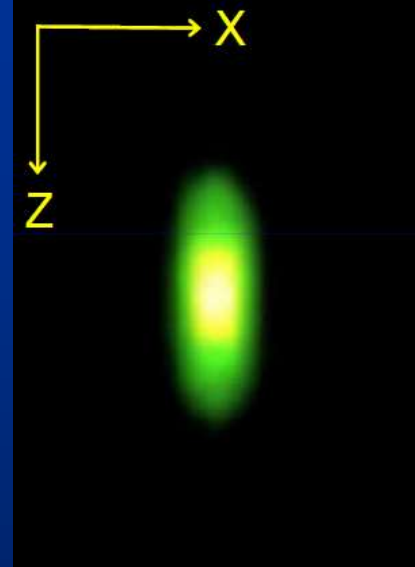
$$\Delta X = \Delta Y = 0,14 \text{ мкм}; \Delta Z = \Delta Z_{\text{сл}} = 0,45 \text{ мкм}.$$

Функция распределения точки в различных флуоресцентных микроскопах

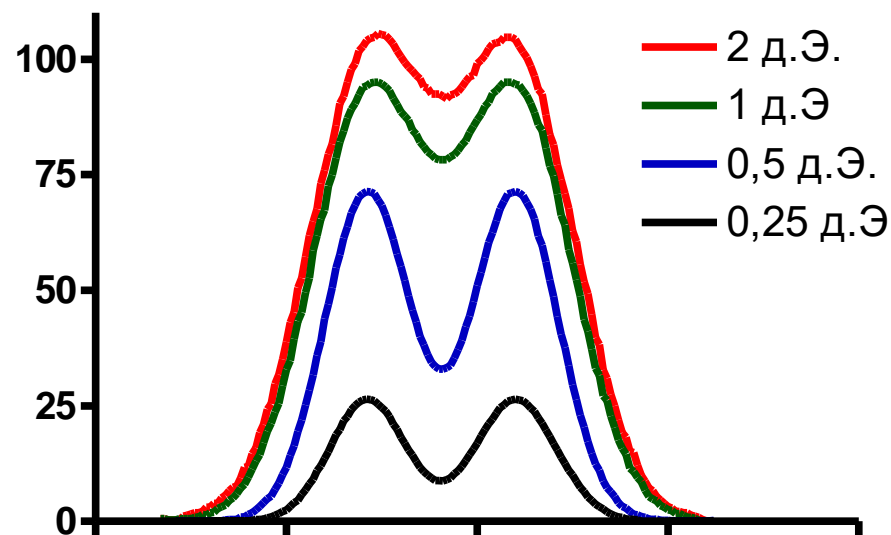
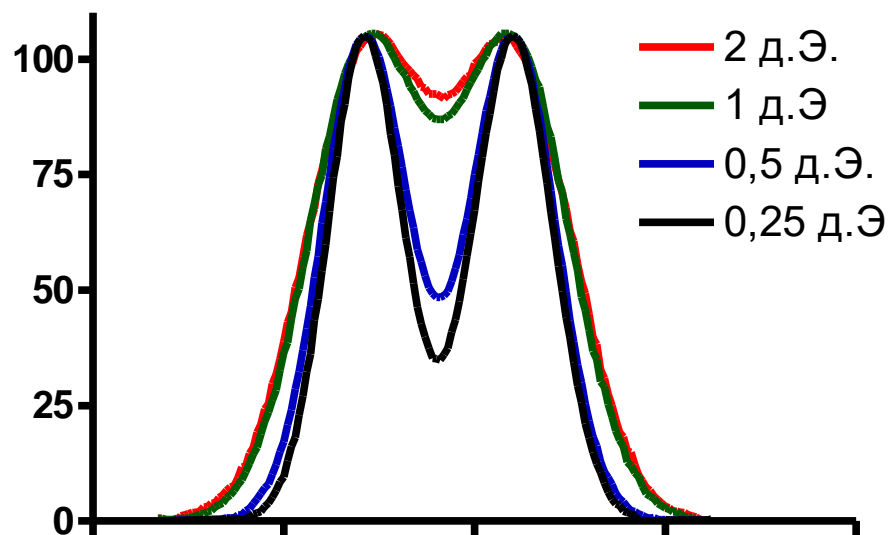
Широкопольный



Конфокальный

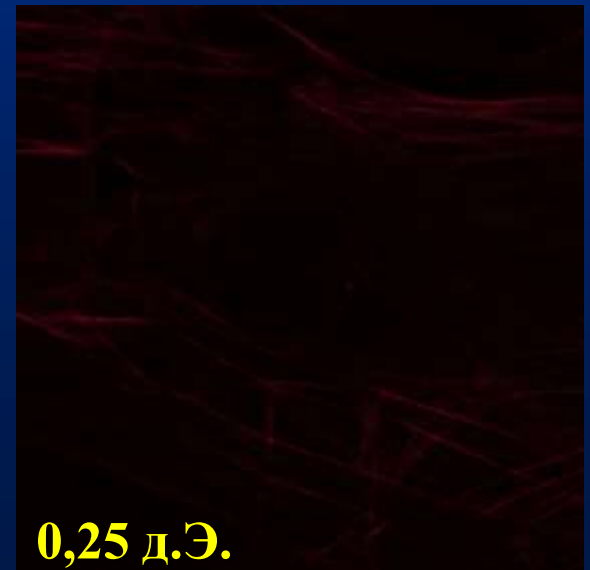
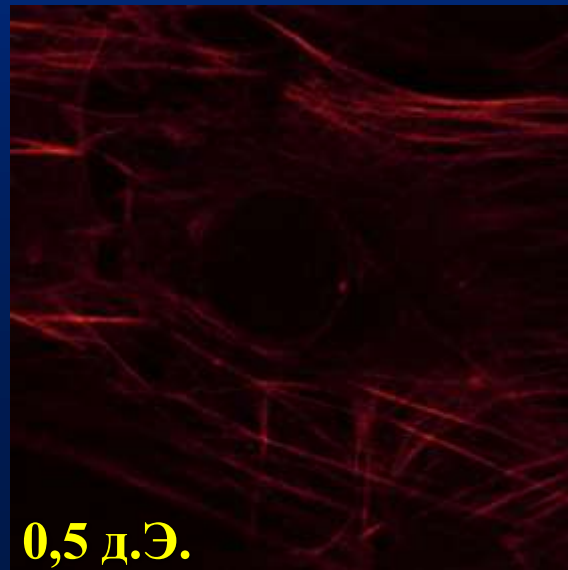
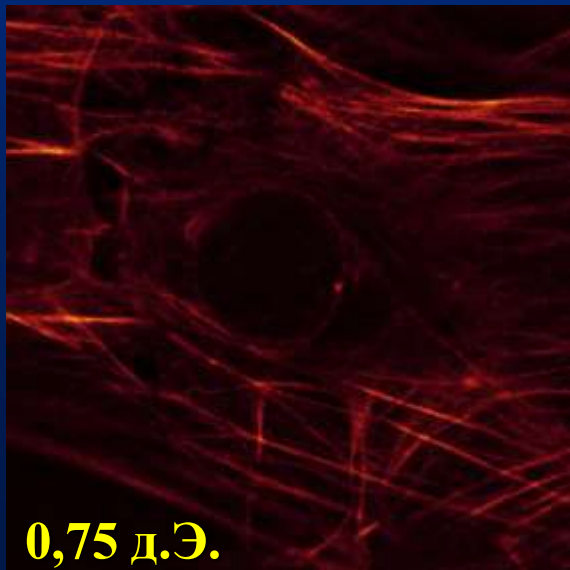
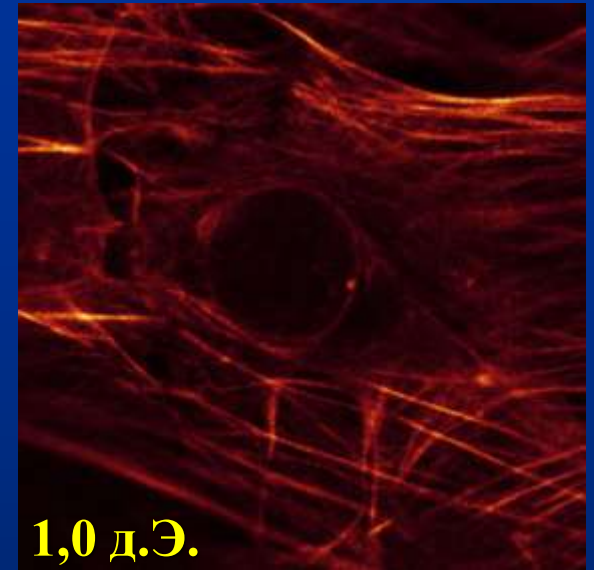
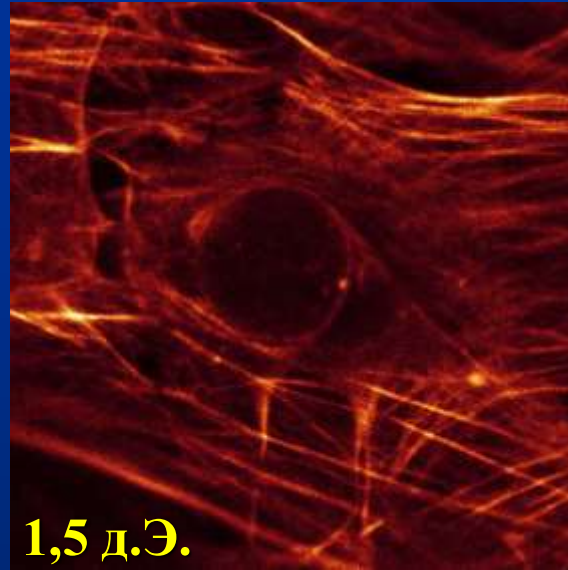
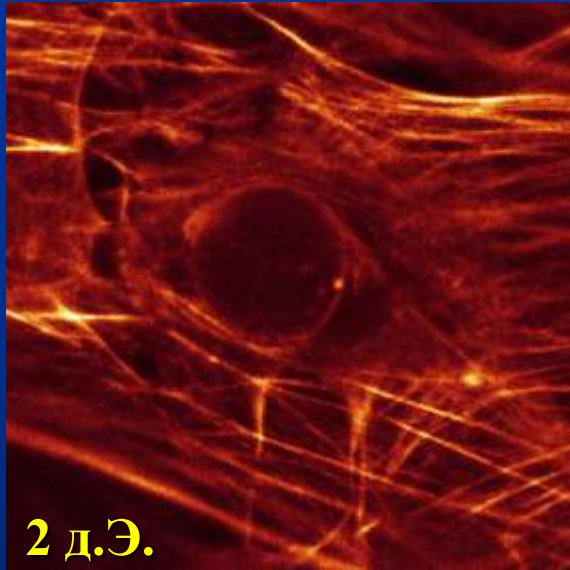


Влияние диаметра конфокальной диафрагмы на латеральное разрешение и интенсивность сигнала (результаты расчета)

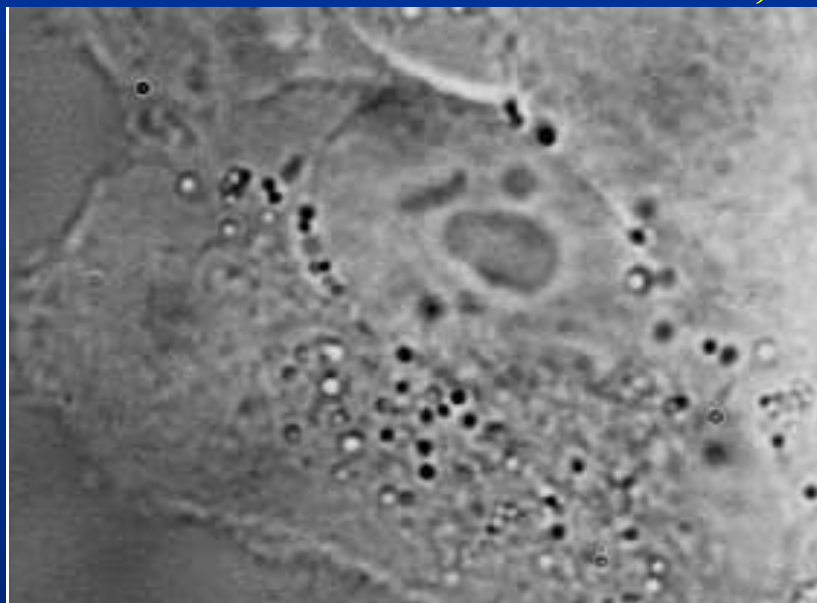


Улучшение латерального разрешения достигается за счет значительной потери интенсивности сигнала

Влияние диаметра конфокальной диафрагмы на разрешение и интенсивность сигнала



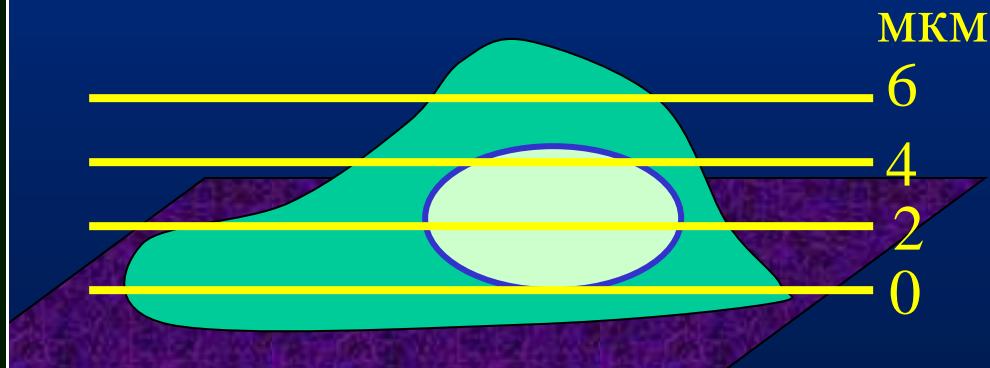
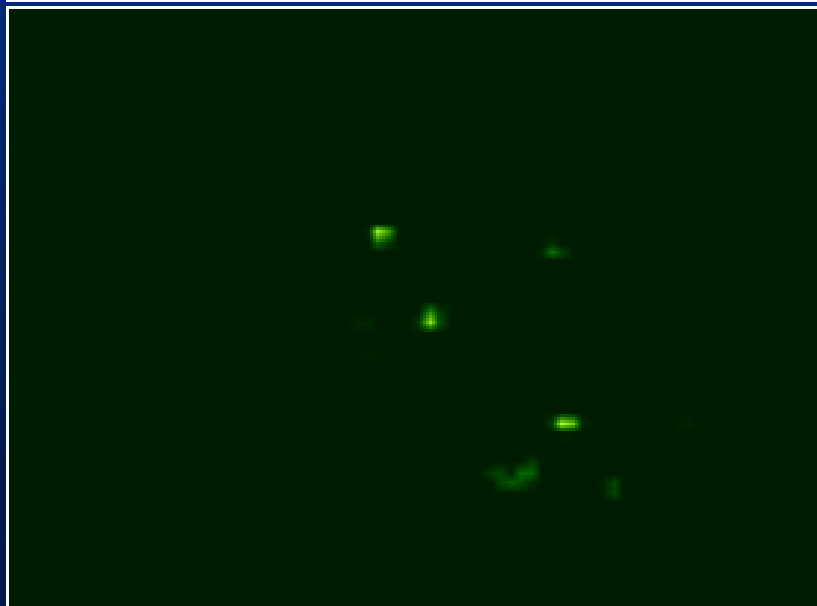
Распределение Rh-СТ2 *Naja oxiana* в клетках A549 аденокарциномы легкого человека, измеренное методом КЛСМ



1,2 мкМ Rh-СТ2 × 1 ч (без отмывки)

Локализация - цитоплазматическая

Распределение - гранулярное
(везикулярное)



Конфокальное трехмерное сканирование клетки

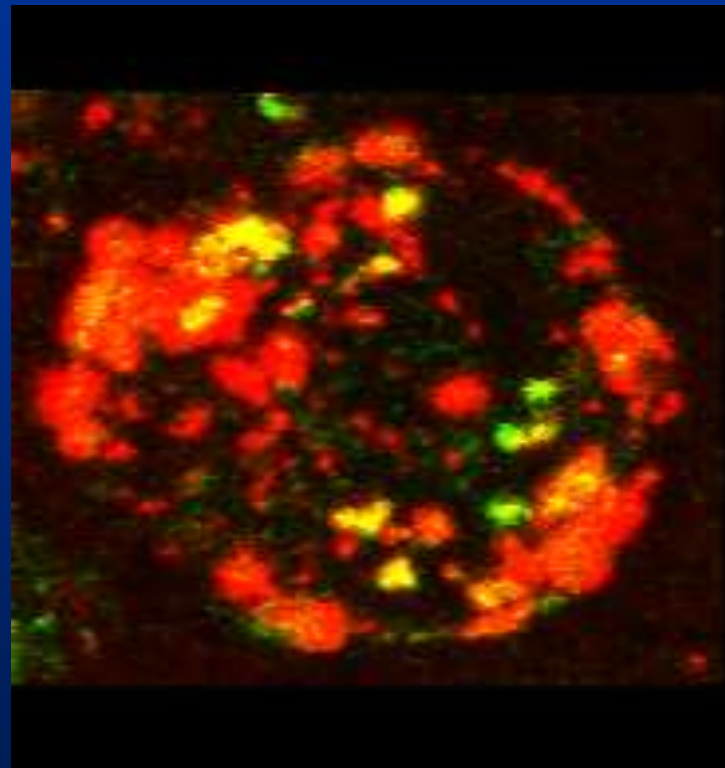


3D-распределение и локализация цитотоксина СТ2No в клетках HL60 при субцитотоксических концентрациях

Красный - СТ2No

Зеленый – лизосомы
LysoTracker Yellow

Желтый – локализация СТ2No
в лизосомах

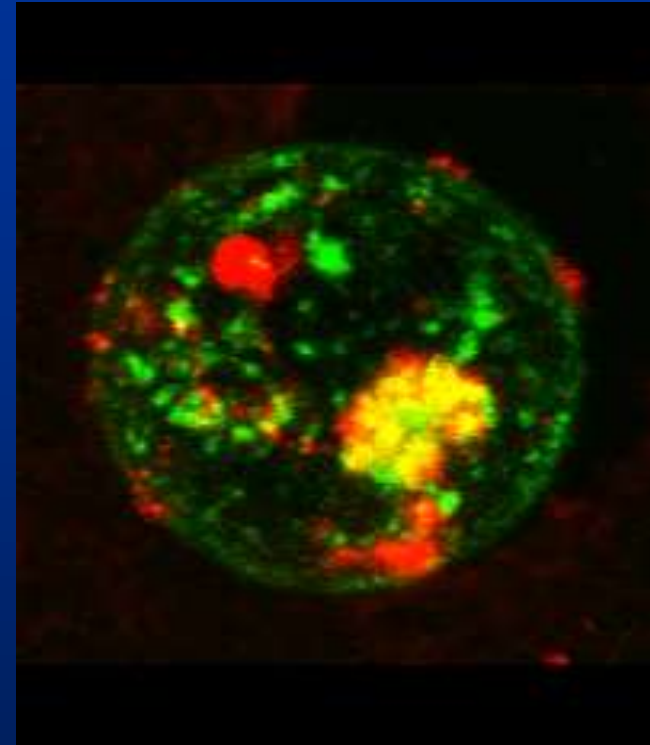


3D-распределение и локализация цитотоксина СТ2No в клетках HL60 при субцитотоксических концентрациях

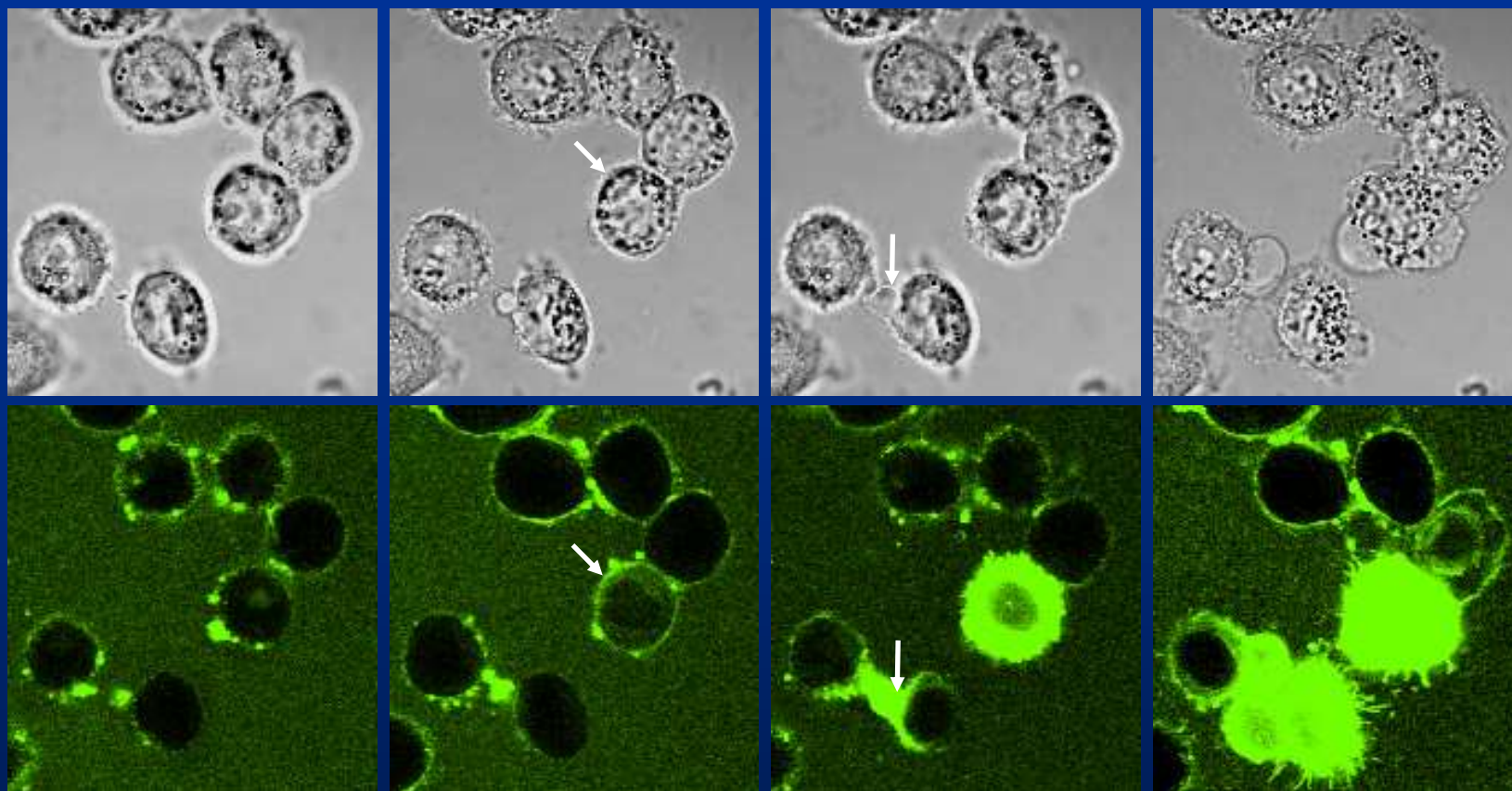
Красный - СТ2No

Зеленый – эндосомы
трансферрин-OregonGreen

Желтый – локализация СТ2No
в эндосомах



Взаимодействие антимикробного пептида латарцина-93 (La93) с раковыми клетками HeLa в реальном времени



0,3 мин

1,3 мин

3 мин

9 мин

2 мкМ Rh-La93

La93 GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKH

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия



специальные инкубаторы поддерживают под микроскопом заданную температуру, содержание CO₂ и кислорода, обеспечивают возможность смены среды и проведения микроинъекций

Исследования методом ЛСКМ могут проводиться на:

- фиксированных клетках,**
- тонких срезах тканей растительного и животного происхождения**
- на живых клетках в культуре**
- небольших живых многоклеточных организмах.**

ЛСКМ- возможность измерения динамических и кинетических изменений в живых объектах

до 5 конфокальных изображений размером 512 × 512 точек за 1 сек.

профиль сигнала вдоль линии образца - каждые 0,3-0,6 мсек.

«Микрокуветы» для исследований живых клеток под микроскопом



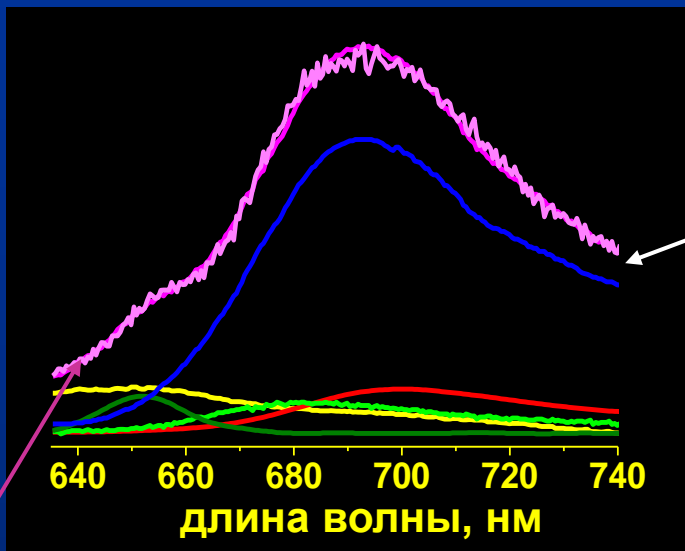
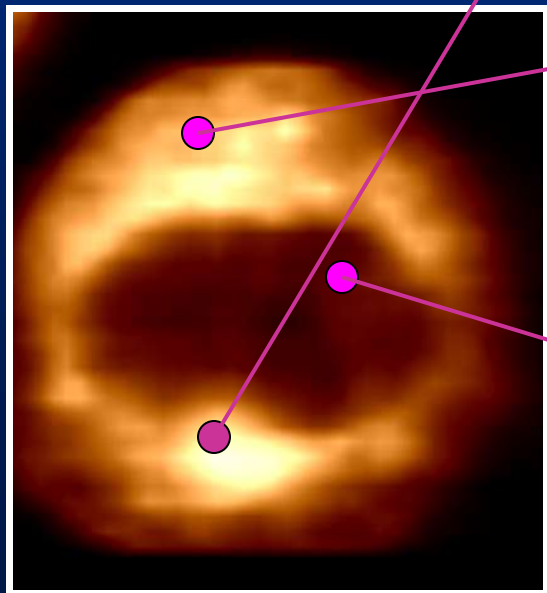
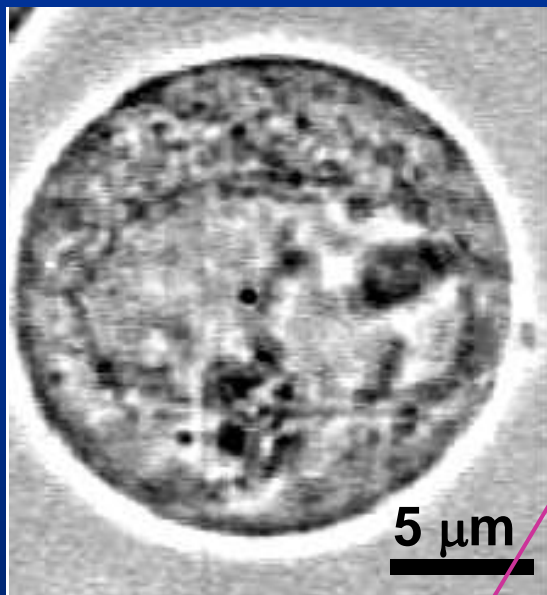
Lab-Tek (Nunc) chambered coverglasses



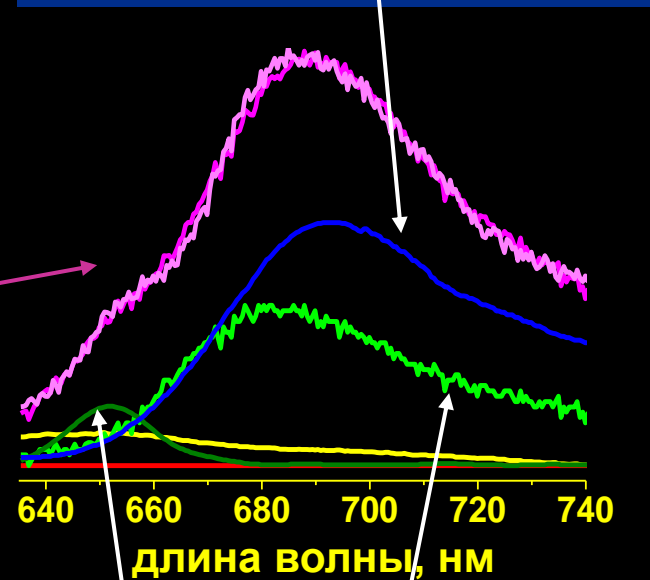
Greiner bio-one

Совместимы только с инвертированным микроскопом

Спектры из каждого микрообъема образца представляются в виде линейной суперпозиции модельных спектров

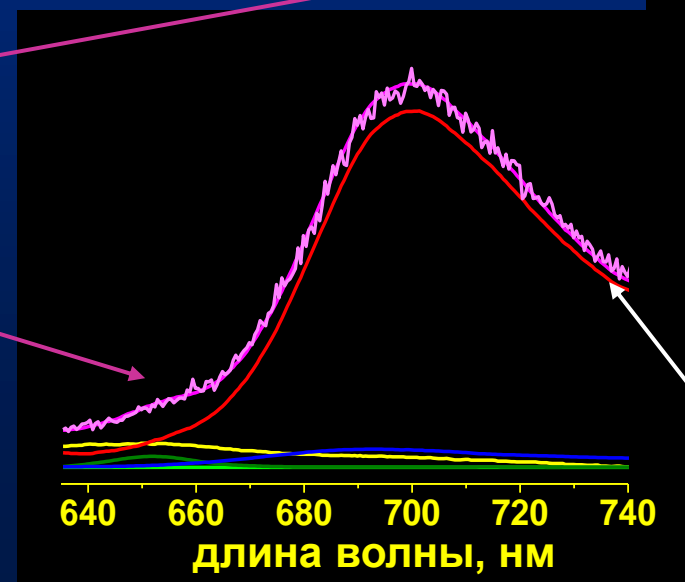


МИТО-гидрофоб.



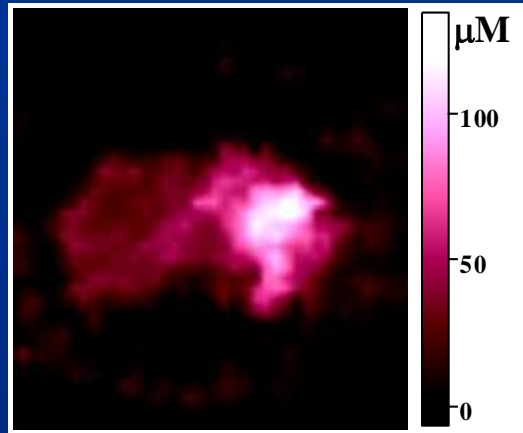
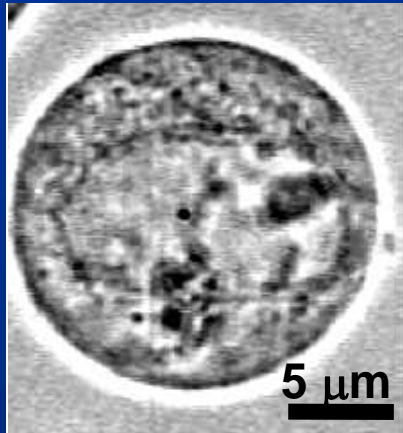
НХМ

МИТО-поляр.

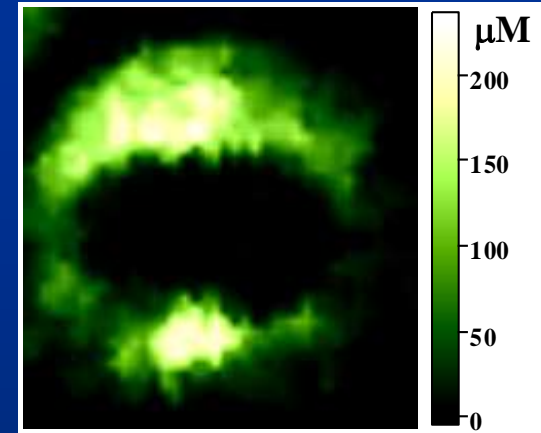


МИТО-ДНК

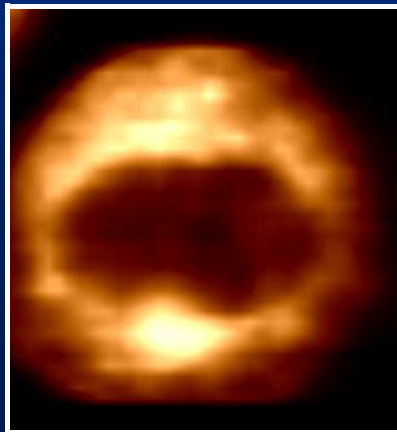
Спектральные изображения- количественные карты внутриклеточного распределения митоксантрона в различных состояниях и комплексах



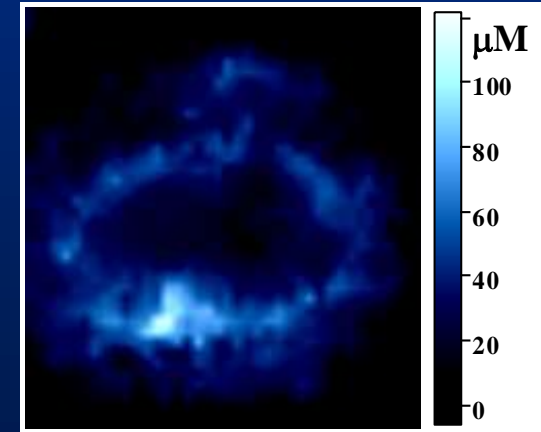
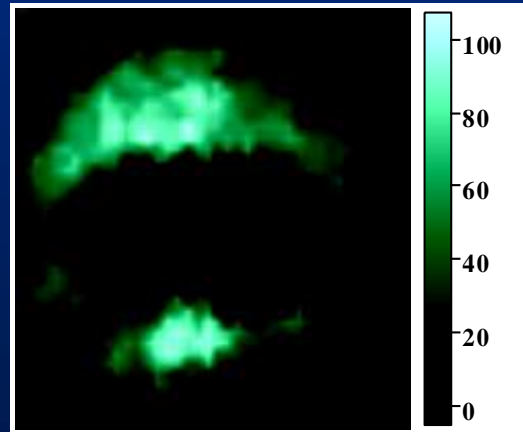
МИТО-ДНК



МИТО в полярном окру-
жении и в митохондриях



NQX
метаболит



МИТО в гидрофобном
окружении

Типы сканирования

