



Мікроскопія. Частина 2.

Володимир ШВАДЧАК

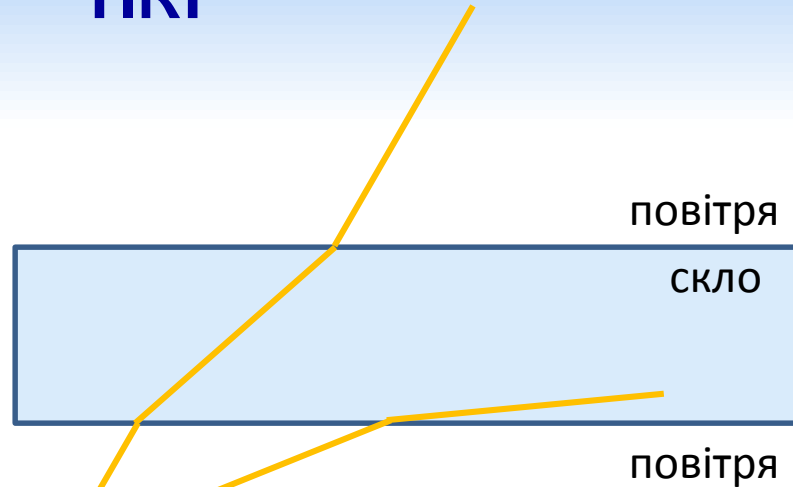
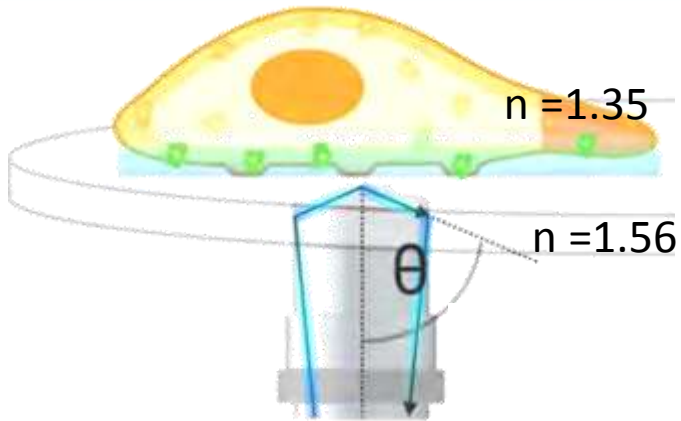
ПНУ

15-11-2022

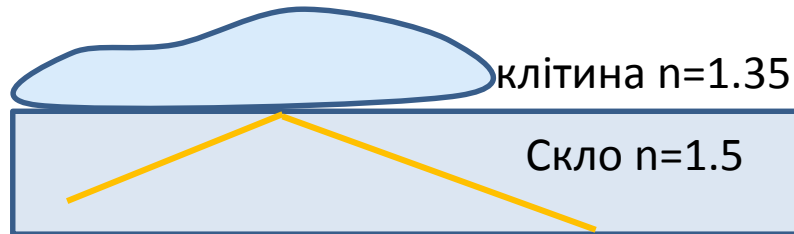
Зміст лекції

1. *TIRF*
2. *Детектування взаємодій : колокалізація*
3. *Детектування взаємодій: FRET*
4. *FLIM.*
5. *Дифракційний ліміт.*
6. *Методи отримання роздільної здатності кращої за 200нм*
7. *STORM.*
8. *STED.*

TIRF



$$\sin(\alpha)/\sin(\theta) = n_1/n_2$$



За рахунок повного внутрішнього відбивання (Total Internal Reflection) світло проникає тільки в нижню частину клітини

Хороший огляд по TIRF

<https://journals.biologists.com/jcs/article/123/21/3621/31390/Imaging-with-total-internal-reflection>

Відеолекція на тему TIRF

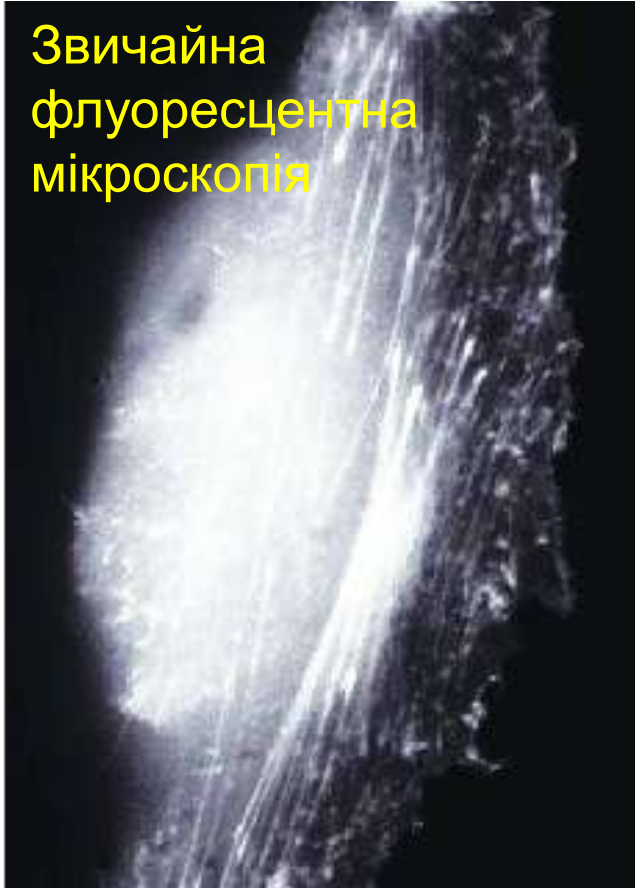
<https://www.youtube.com/watch?v=egmJlalDR48>

Приклади застосування на сайті Olympus

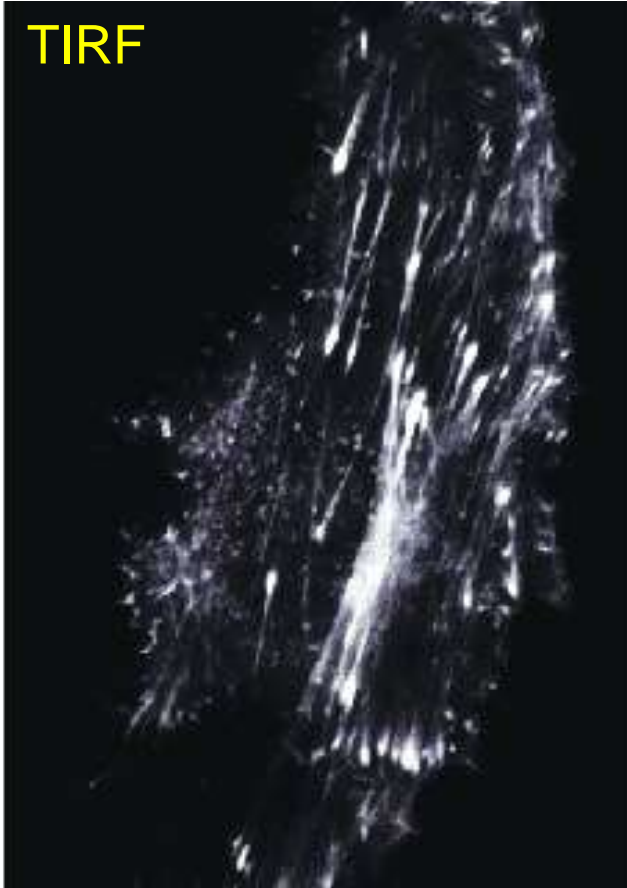
[https://www.olympus-lifescience.com/en/microscopes/inverted/ix83/celltirf1/#!cms\[focus\]=cmsContent1299](https://www.olympus-lifescience.com/en/microscopes/inverted/ix83/celltirf1/#!cms[focus]=cmsContent1299)

TIRF

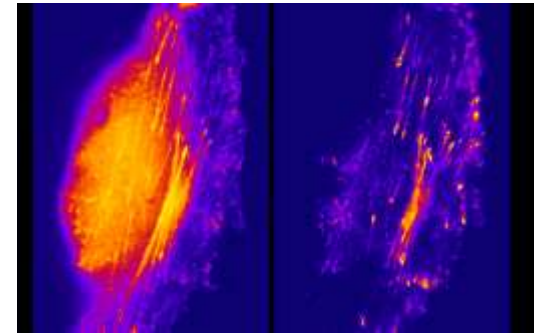
Звичайна
флуоресцентна
мікроскопія



TIRF



TIRF дозволяє
прибрати з зображення
все що лежить не біля
площини клітини
Дуже зручно для
отримання зображень
цитоскелету

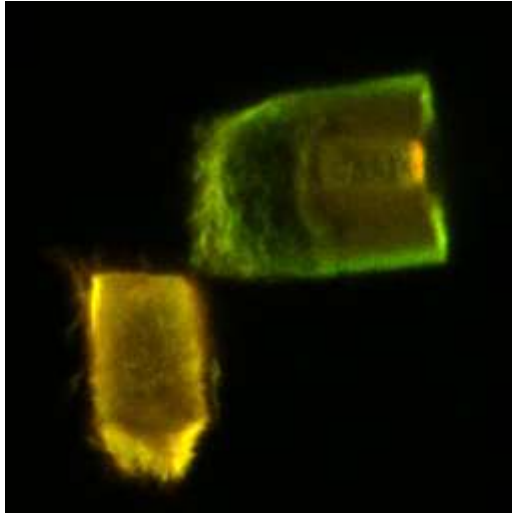


Детектування взаємодії: Колокалізація

ПротеїнА-488 - канал А

ПротеїнБ-555 - канал Б

Мікроскопія на двох каналах
(наприклад 488 і 555)

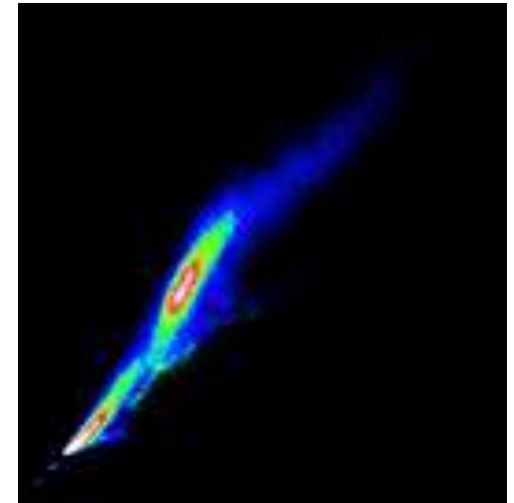


Рахуємо скільки
пікселів з заданими
інтенсивностями на
обох каналах



псевдозображення

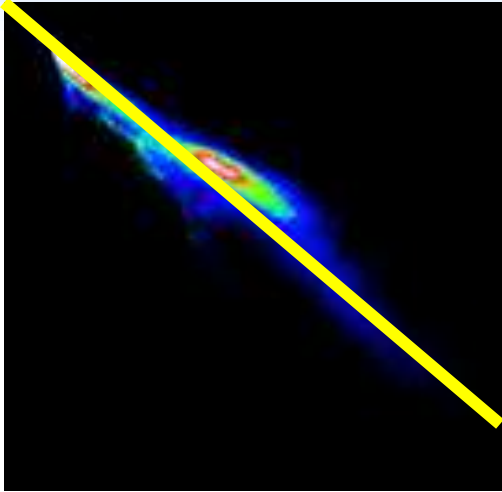
Канал Б



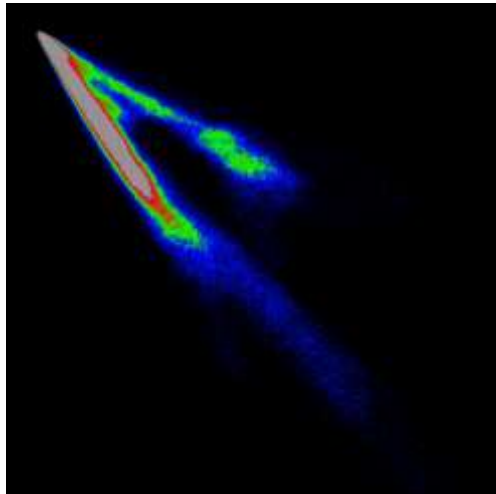
Канал А

Робота в ImageJ

Детектування взаємодії: Колокалізація



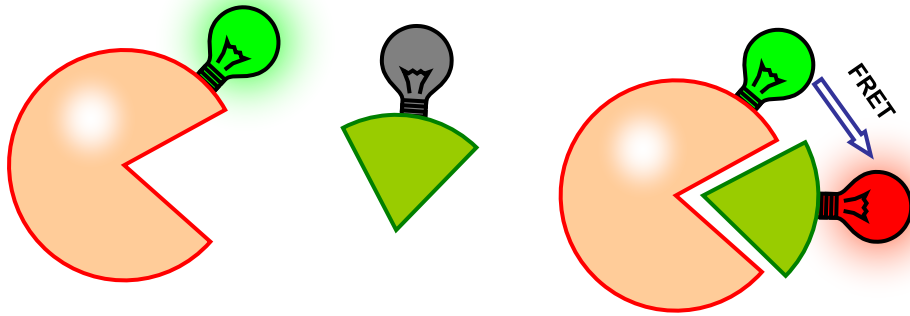
Є колокалізація – одна популяція комплексів зі сталим співвідношенням двох речовин



Немає колокалізації (дві окремі популяції та сильне перекриття каналів)

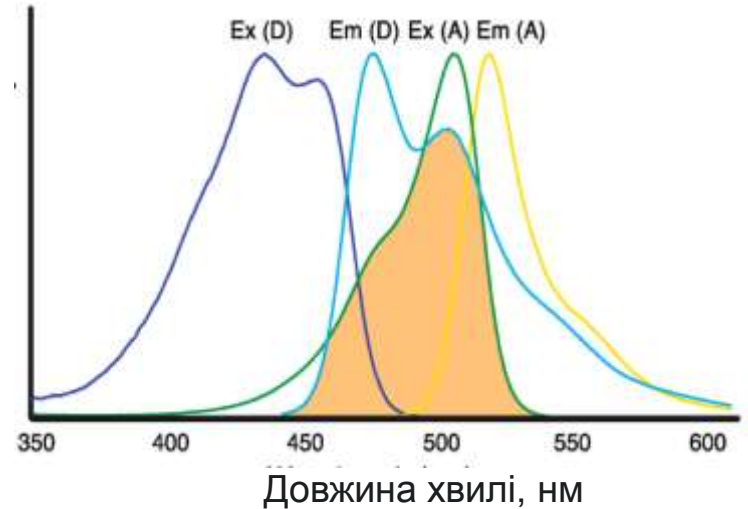
Робота в ImageJ
*дивитися додаткові файли на сайті

Детектування взаємодії: FRET

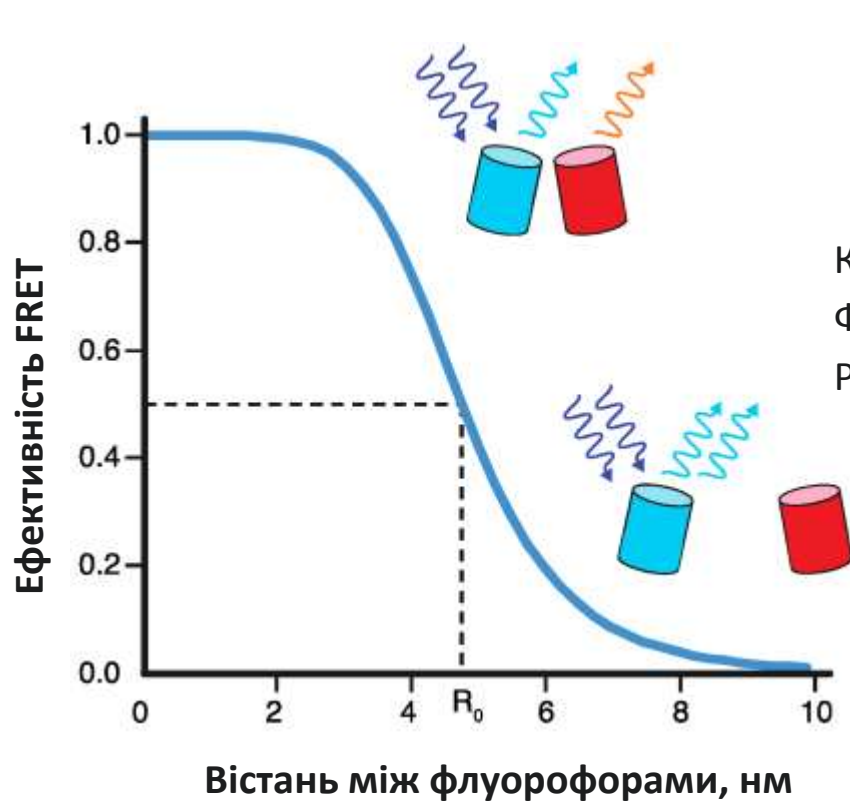


Förster resonance energy transfer

Якщо спектр емісії одного флуорофора (донора) перекривається з спектром абсорбції іншого (акцептора) і вони знаходяться близько (до 10нм один від одного), то при збудженні донора відбувається емісія акцептора



Детектування взаємодії: FRET



$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

Кумарин (~425) + Флуоресцеїн (~488)

Флуоресцеїн (~488) + Родамін (~530)

Родамін (~530) + Atto 647 (~647)

→ $R_0 \sim 6\text{nm}$

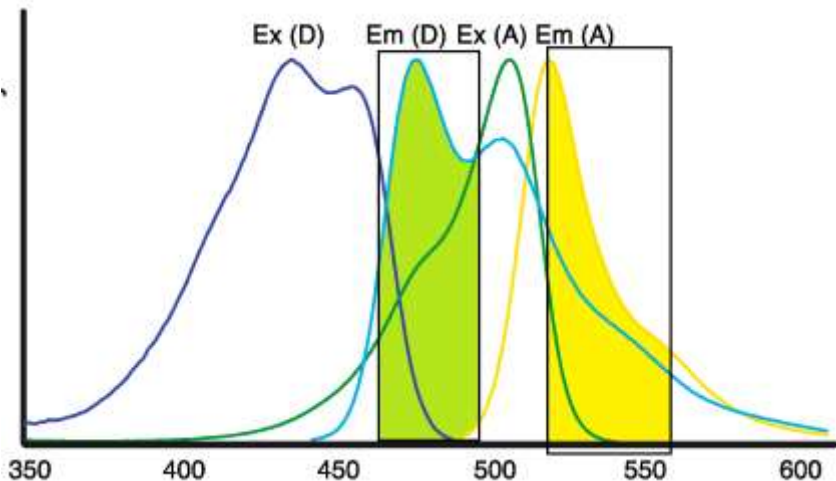
→ $R_0 \sim 6\text{nm}$

→ $R_0 \sim 6\text{nm}$

Таблиця R_0 для деяких пар барвників

https://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/R_0_Tabelle_2018_web.pdf

Детектування взаємодії: FRET



Вістань між флуорофорами, нм

Вимірювання окремо емісії донора і акцептора

Переваги: можна міряти на звичайному конфокальному

мікроскопі якщо є два канали на детекторі

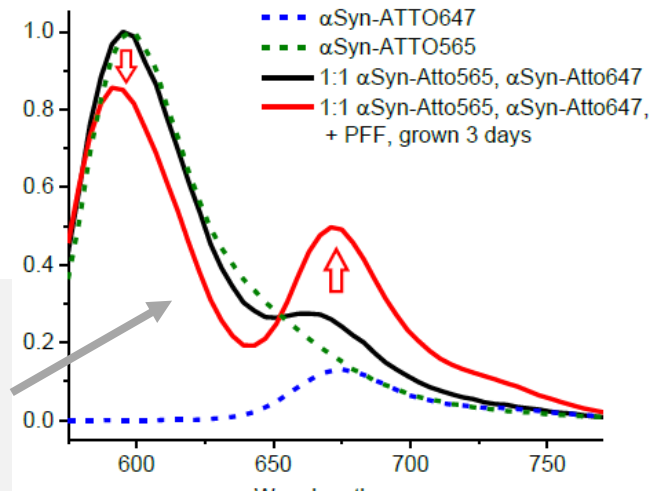
Недоліки: перекривання сигналів

Два підходи до детектування:

1 - записати окремо емісію донора і акцептора

2- записати зміну лайфтайму (часу життя

збудженого стану) донора



Перекривання сигналів особливо критичне коли донора більше, часто спектри виглядають так

Детектування взаємодії: FRET

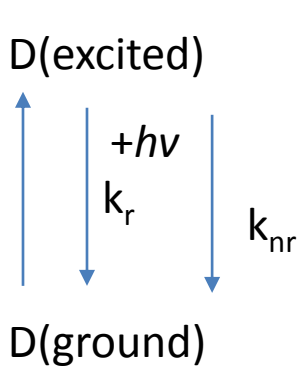
Вимірювання зміни часу життя збудженого стану донора (лайфтайми)

Переваги: дозволяє більш точні виміри, не залежить від перекривання емісії донора та акцептора

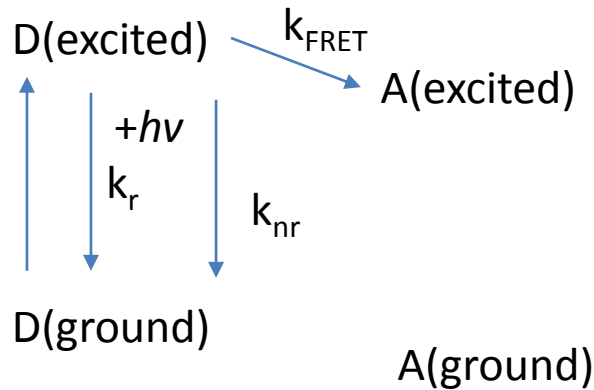
Недоліки: вимагає мікроскопів з блоком роботи з часом прильоту фотонів (дорого)

$$t = \frac{1}{k_{FRET} + k_r + k_{nr}}$$

$$t = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$



немає FRET



є FRET

FLIM

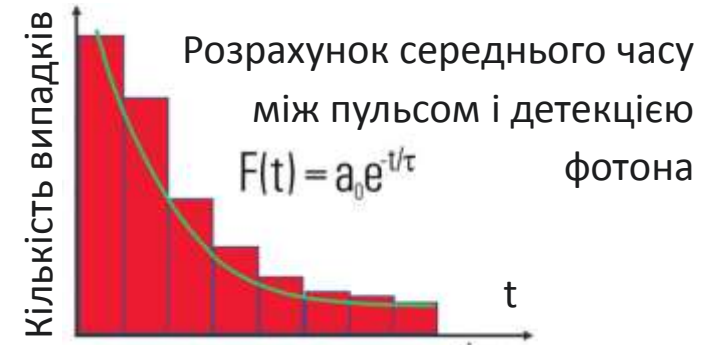
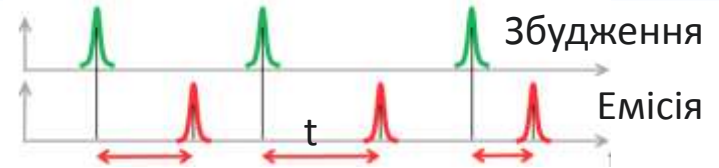
FLIM – **F**luorescence **L**ifetime **I**maging -

Мікроскопія коли в кожній точці зображення вимірюють середній час життя збудженого стану флуорофора (fluorescence lifetime)

Дозволяє гарно характеризувати FRET між флуорофорами, а також зміну оточення сольватохромних барвників – тобто вивчати оточення і взаємодії біомолекул в розрізі їх просторового розміщення в клітинах

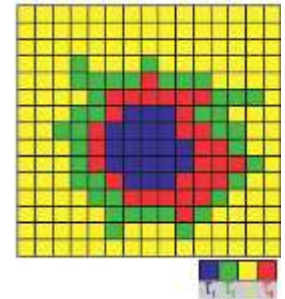
Обладнання: мікроскоп з пультим лазером, детектор з каналами наносекндної роздільності

<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescence-lifetime-based-imaging-gallery/>

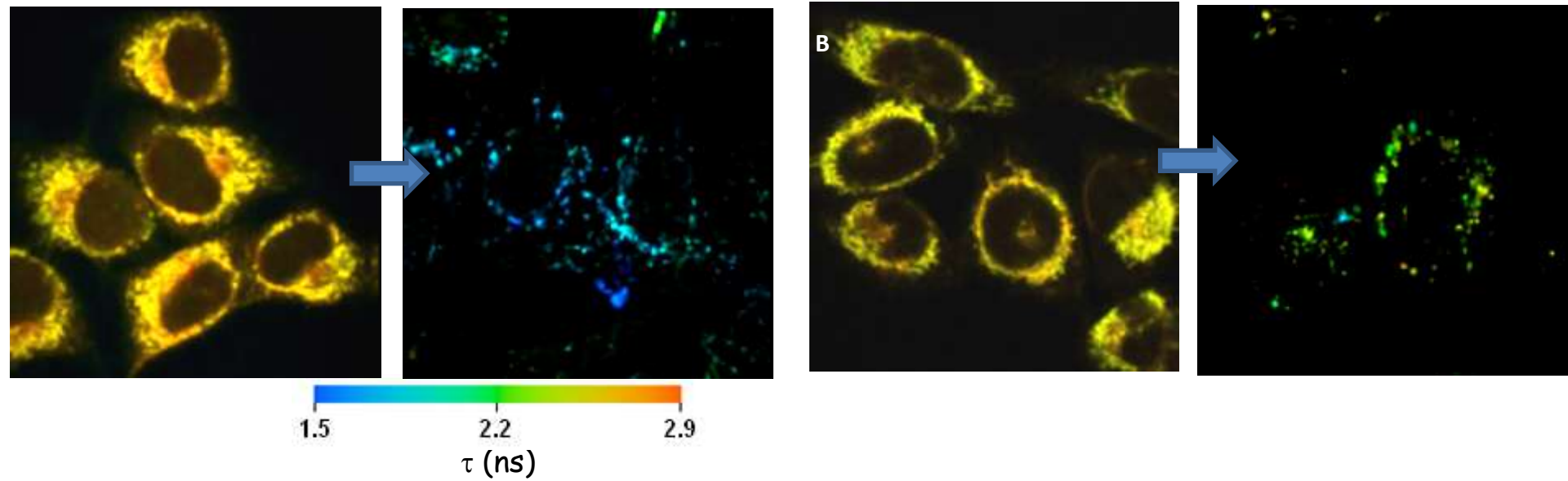


Потрібно десь 800 фотонів на піксель

Картинка в псевдокольорах

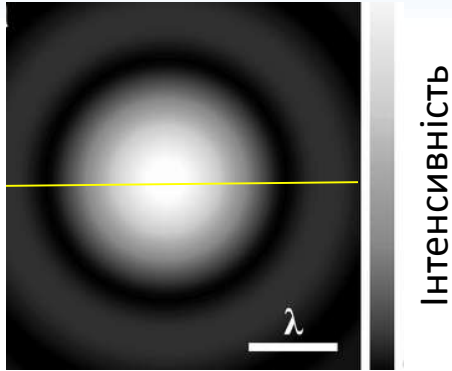


FLIM

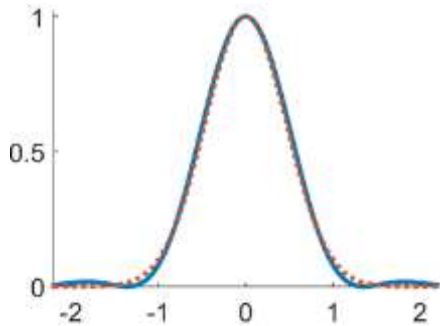


Приклад застосування FLIM для детекції агрегації протеїну VPR в клітинах. Агрегація викликає скорочення часу життя збудженого стану (холодніші кольори)

Дифракційний ліміт



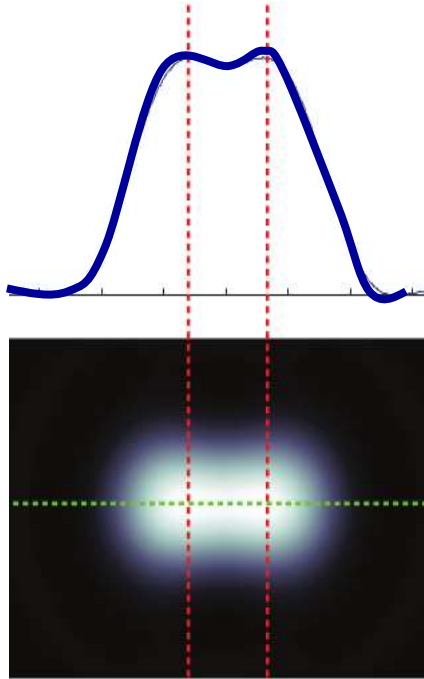
Точкове джерело світла (одиначний флуорофор) на мікроскопії дає пляму розміром близько довжини хвилі світла (~ 400 нм)



Переріз показує майже гаусівське розподілення інтенсивностей

* Тому електронна мікроскопія має кращу роздільну здатність ніж світлова

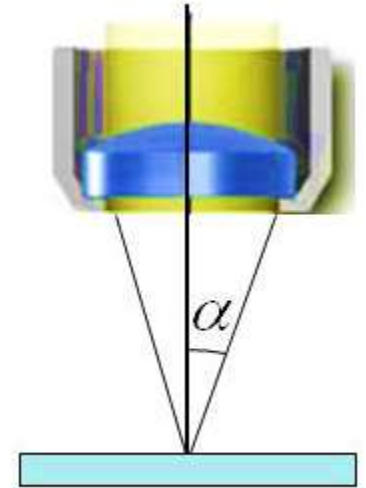
Дифракційний ліміт



Якщо відстань між двома об'єктами менша довжини хвилі світла то їх буде видно не як дві окремі точки а як спільну плям

Насправді роздільна здатність частково залежить і від числової апертури і від показника заломлення

$$\Delta x \cong \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$



Як обійти дифракційний ліміт?

Дифракційний ліміт – фундаментальна проблема пов'язана з кількістю інформації що може принести один фотон.

Щоб його обійти потрібно розрахувати позицію флуорофора використовуючи більше одного фотону

Хороша стаття з деталями STORM I STED

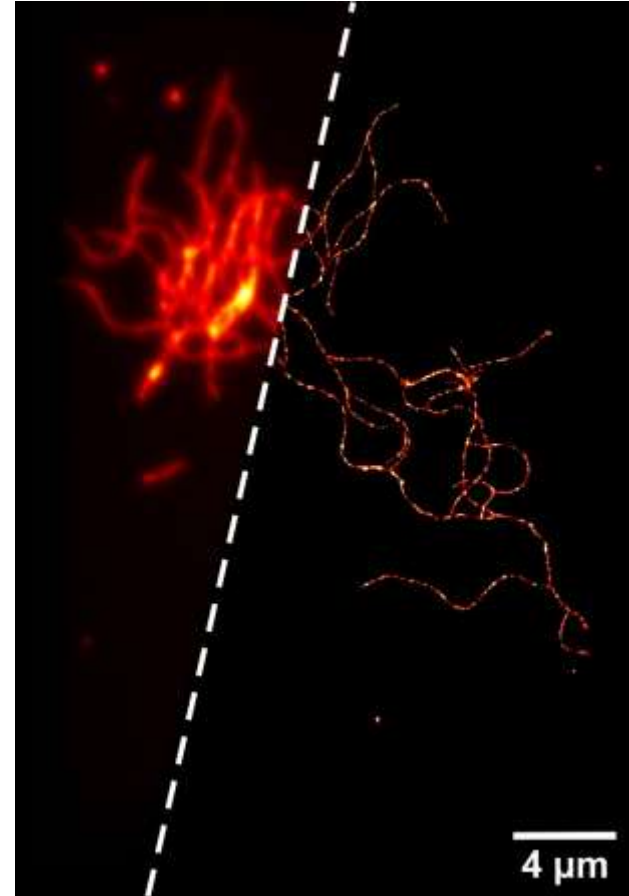
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.13257>

Типи мікроскопії з надчіткістю:

www.nature.com/articles/s41556-018-0251-8

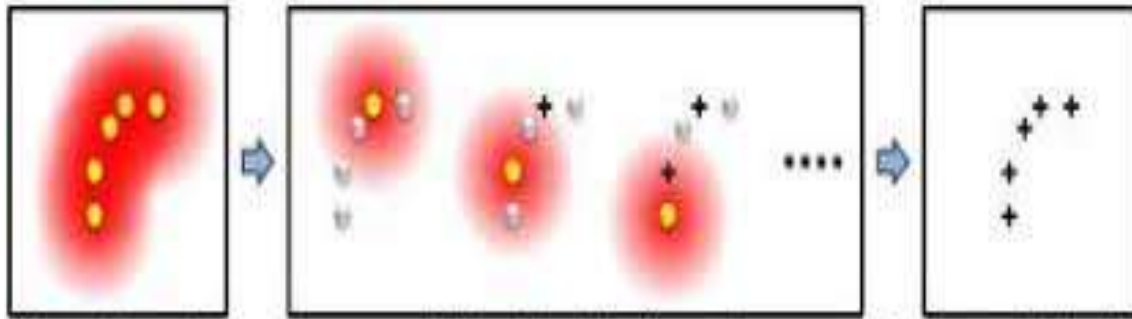
Відеолекція про мікроскопію з надчіткістю (superresolution microscopy) від Штефана Хеля, який згодом отримав Нобелівську премію

<https://www.youtube.com/watch?v=YyBGiZZSsIY>



STORM

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy -
Підхід коли позицію флуорофора розраховують
використовуючи усереднення центрів “розмитих
хмар” з багатьох фотонів



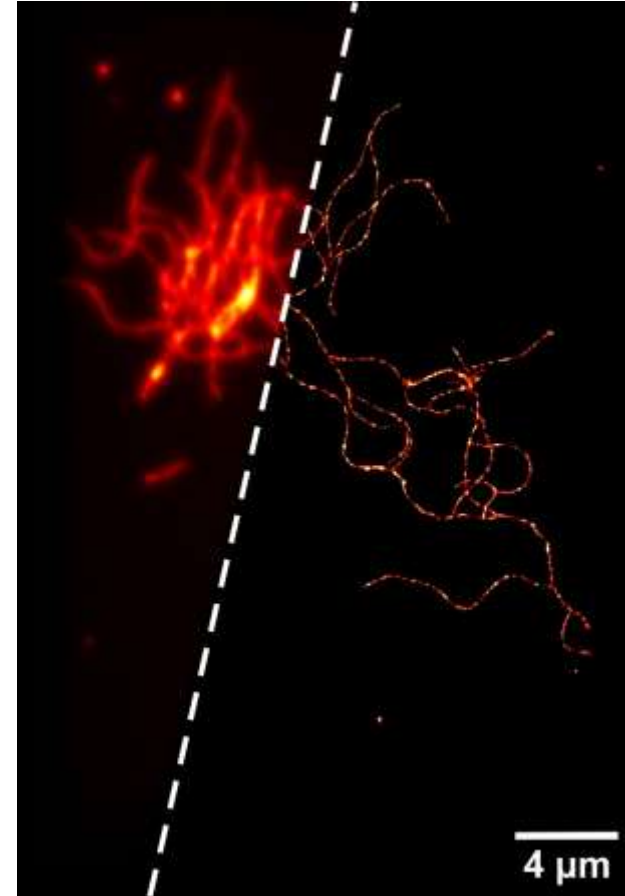
Стандартний спосіб
(всі флуорофори
зараз) – надто
близько, розмито

Флуорофори по черз –
достатньо далеко щоб
бачити дифракційні плями
окремих флуорофорів і
розрахувати їх центри

Сумарне
зображення
реконструйованих
центрів

Стандарне

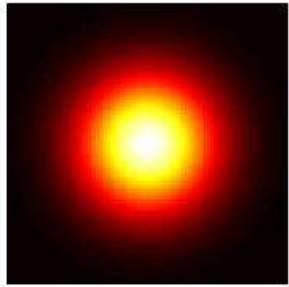
STORM



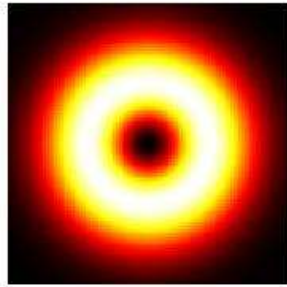
4 μm

STED

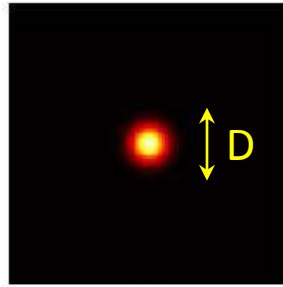
Stimulated Emission Depletion - Підхід коли йде паралельне опромінення світлом для збудження (стандартна хмарка) і для стимульованої емісії (бубликоподібна хмарка) – реально видиме світло йде позицій де було збудження а не було стимульованої емісії



Збудження

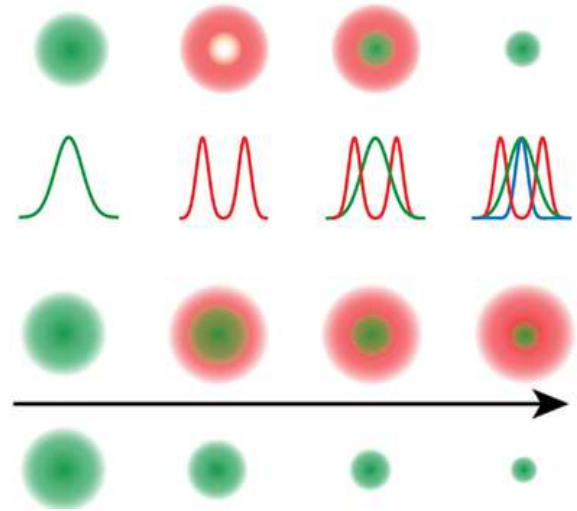


Стимульована емісія



Чиста емісія

$$D = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I}{I_{\text{sat}}}}}$$



Вища інтенсивність “бублика” стимульованої емісії → краща роздільна здатність, менша інтенсивність світла (повільніші виміри)