



Supported by:

DAAD

Deutscher Akademischer Austauschdienst  
German Academic Exchange Service



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung



КАФЕДРА  
БІОХІМІЇ ТА  
БІОТЕХНОЛОГІЙ

# Сучасна флуоресцентна мікроскопія

---

Володимир ШВАДЧАК

ПНУ

31-05-2023

Онлайн-курс “Мікроскопія та інструментальні методи в біології”

# Зміст лекції

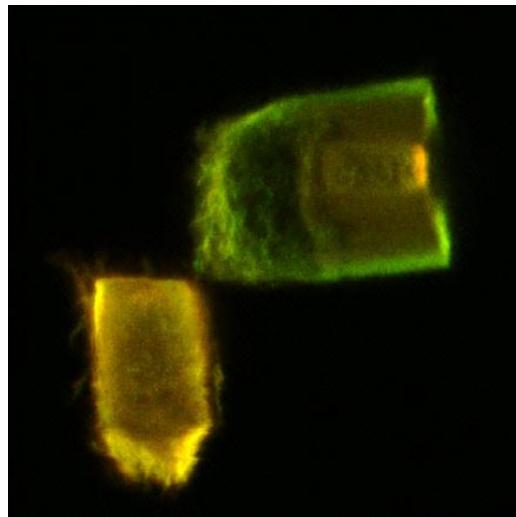
1. **Детектування взаємодій : колокалізація**
2. **Детектування взаємодій: FRET**
3. **FLIM**
4. **TIRF**
5. **Дифракційний ліміт. Методи отримання роздільної здатності кращої за 200нм**
6. **STORM**
7. **STED**

# Детектування взаємодії: Колокалізація

Якщо два протеїни взаємодіють то вони  
напевно знаходяться в одному місці

ПротеїнА-488 - канал А  
ПротеїнБ-555 - канал Б

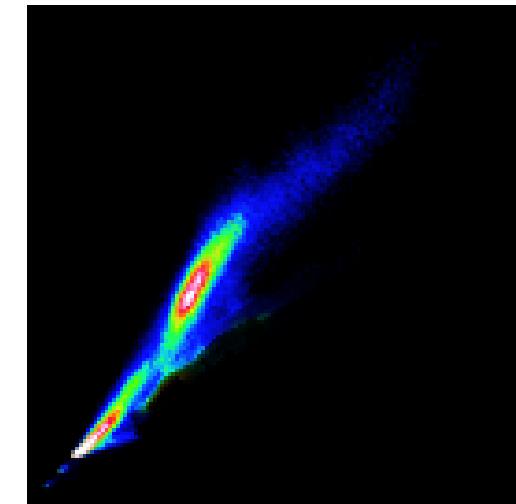
Мікроскопія на двох каналах  
(наприклад 488 і 555)



Рахуємо скільки  
пікселів з заданими  
інтенсивностями на  
обох каналах

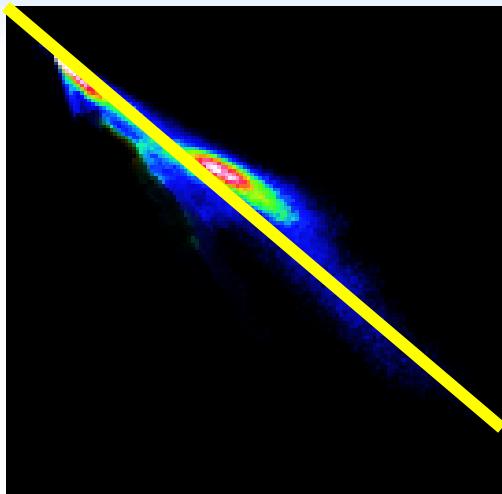


Канал Б

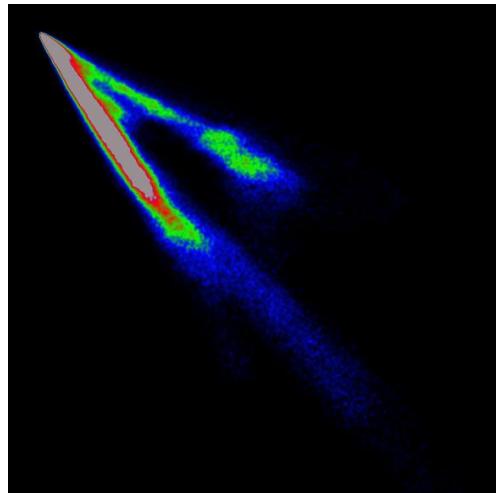


Канал А

# Детектування взаємодії: Колокалізація

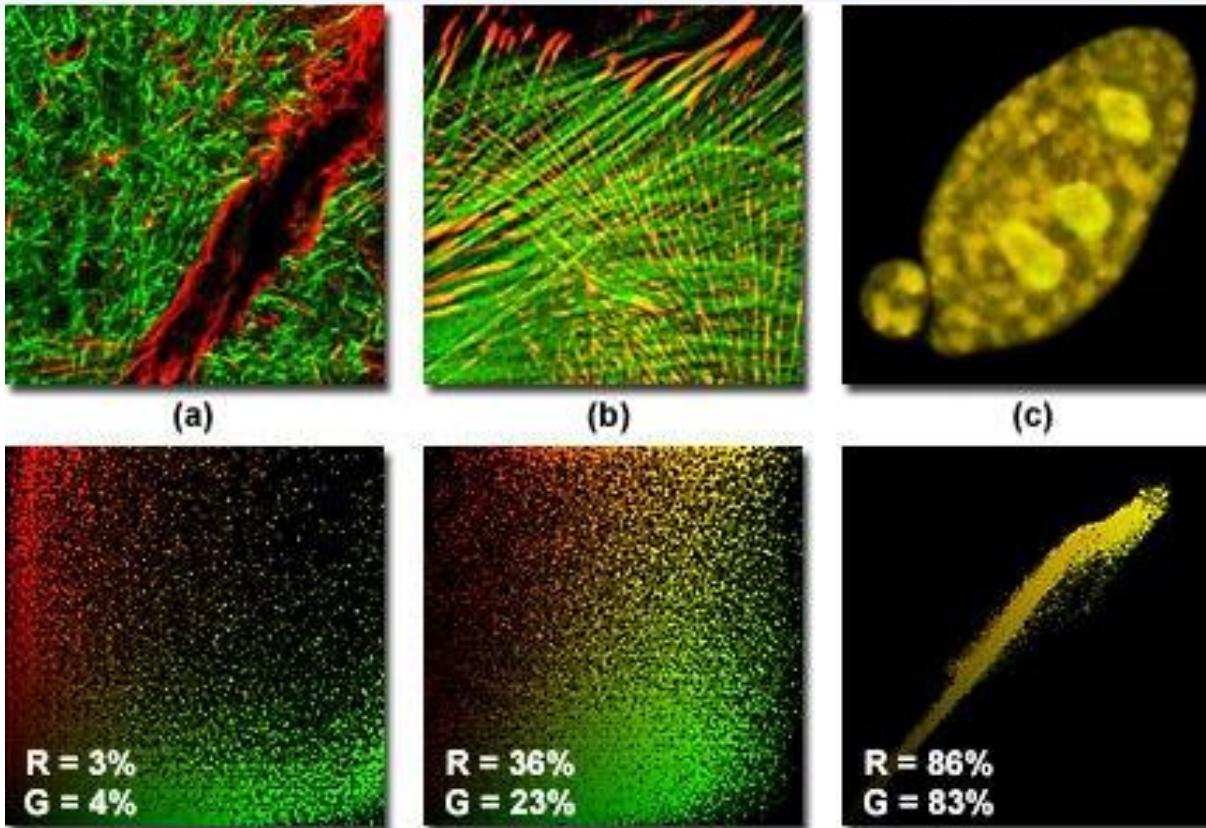


Є колокалізація – одна популяція комплексів зі сталим співвідношенням двох речовин



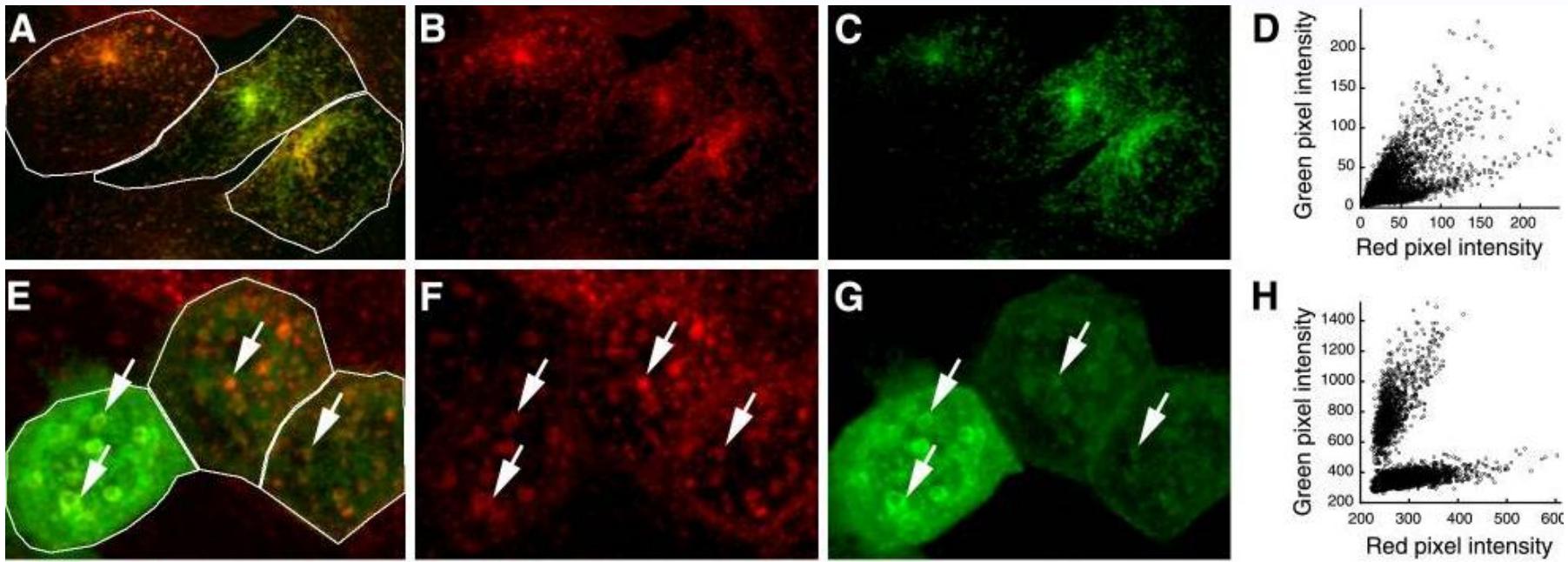
Немає колокалізації (две окремі популяції та сильне перекриття каналів)

# Детектування взаємодії: Колокалізація



<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/colocalization/>

# Детектування взаємодії: Колокалізація

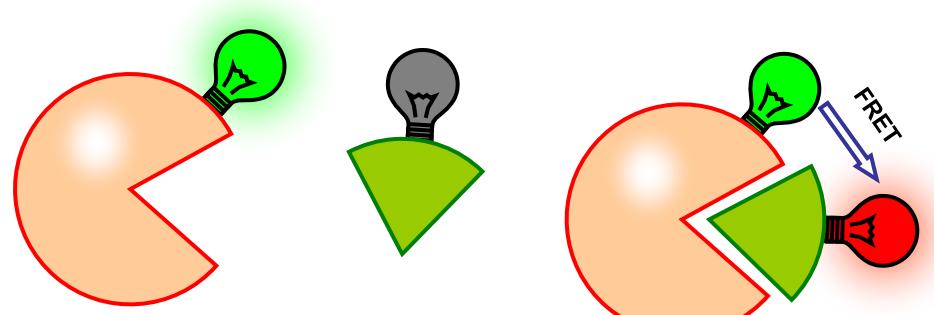


Колокалізацію логічно дивитися не по всьому зображення, а окремо по кожній з клітин

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3074624/>

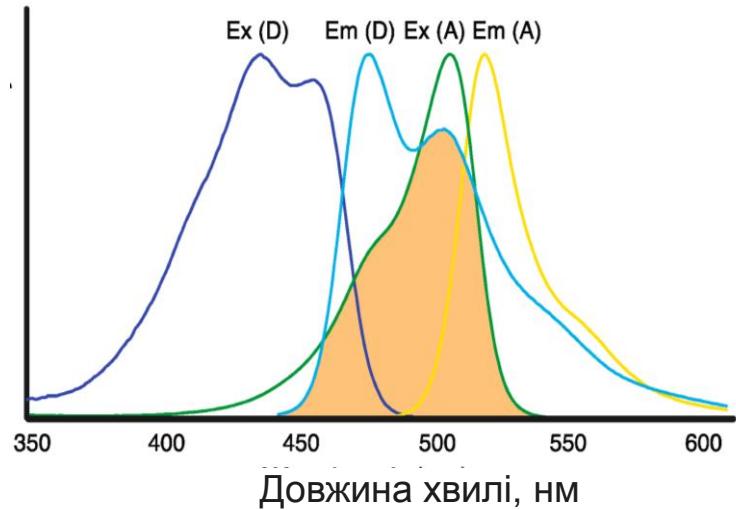
<https://www.med.unc.edu/microscopy/wp-content/uploads/sites/742/2018/06/Dr-Bob-on-Colocalization.pdf>

# Детектування взаємодії: FRET

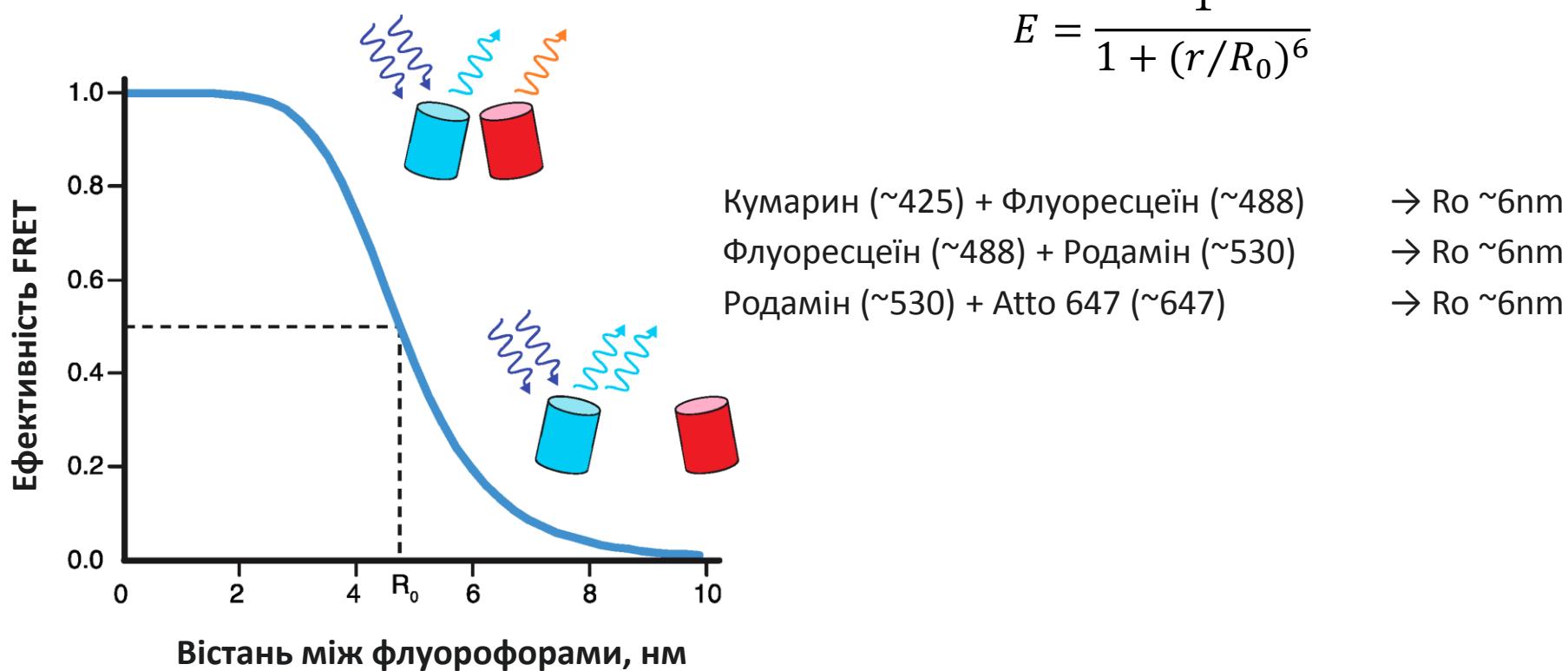


Förster resonance energy transfer

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



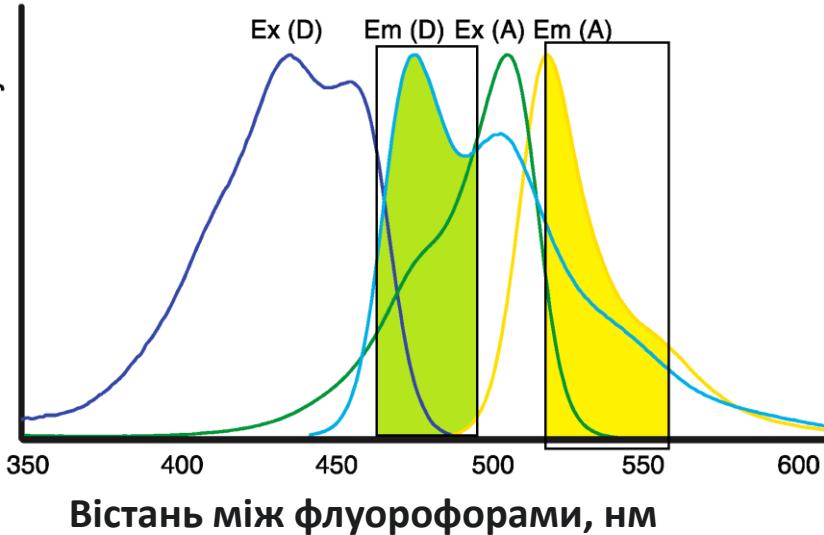
# Детектування взаємодії: FRET



Таблиця  $R_0$  для деяких пар барвників

[https://www.atto-tec.com/fileadmin/user\\_upload/Katalog\\_Flyer\\_Support/R\\_0 -Tabelle\\_2018\\_web.pdf](https://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/R_0 -Tabelle_2018_web.pdf)

# Детектування взаємодії: FRET



Два підходи до детектування:

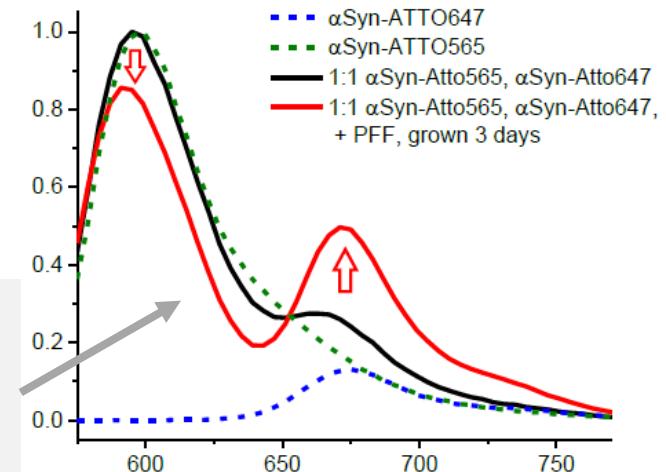
- 1 - записати окремо емісію донора і акцептора
- 2- записати зміну лайфтайму (часу життя збудженого стану) донора

Вимірювання окремо емісії донора і акцептора

**Переваги:** можна міряти на звичайному конфокальному мікроскопі якщо є два каналли на детекторі

**Недоліки:** перекривання сигналів

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



# Детектування взаємодії: FRET

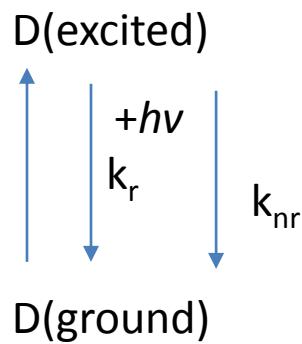
Вимірювання зміни часу життя збудженого стану донора (лайфтайми)

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

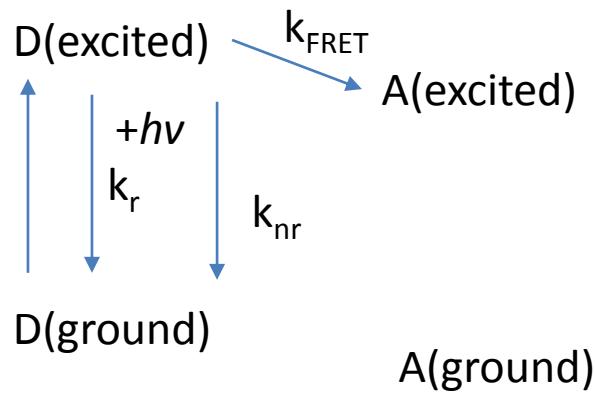
**Недоліки:** вимагає мікроскопів з блоком роботи з часом прильоту фотонів (дорого)

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

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



немає FRET



є FRET

# FLIM

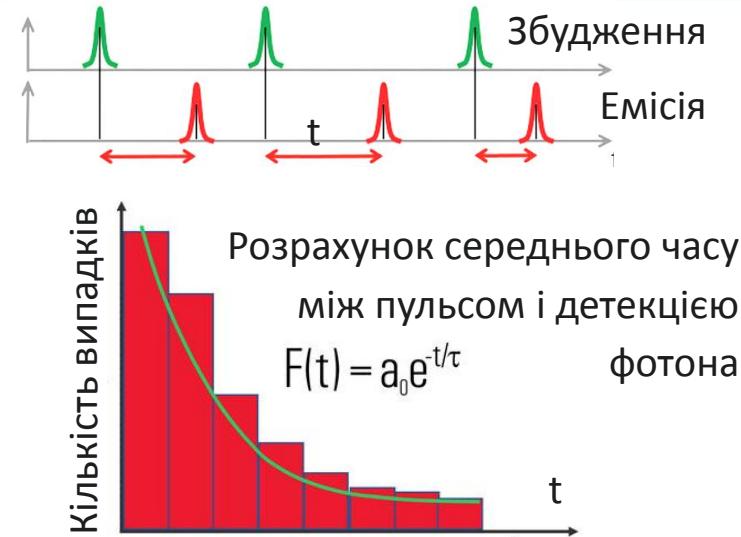
FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging -

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

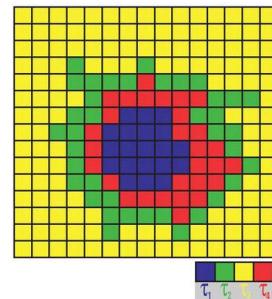
**Обладнання:** мікроскоп з пульсовим лазером, детектор з каналами наносекундної роздільності

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

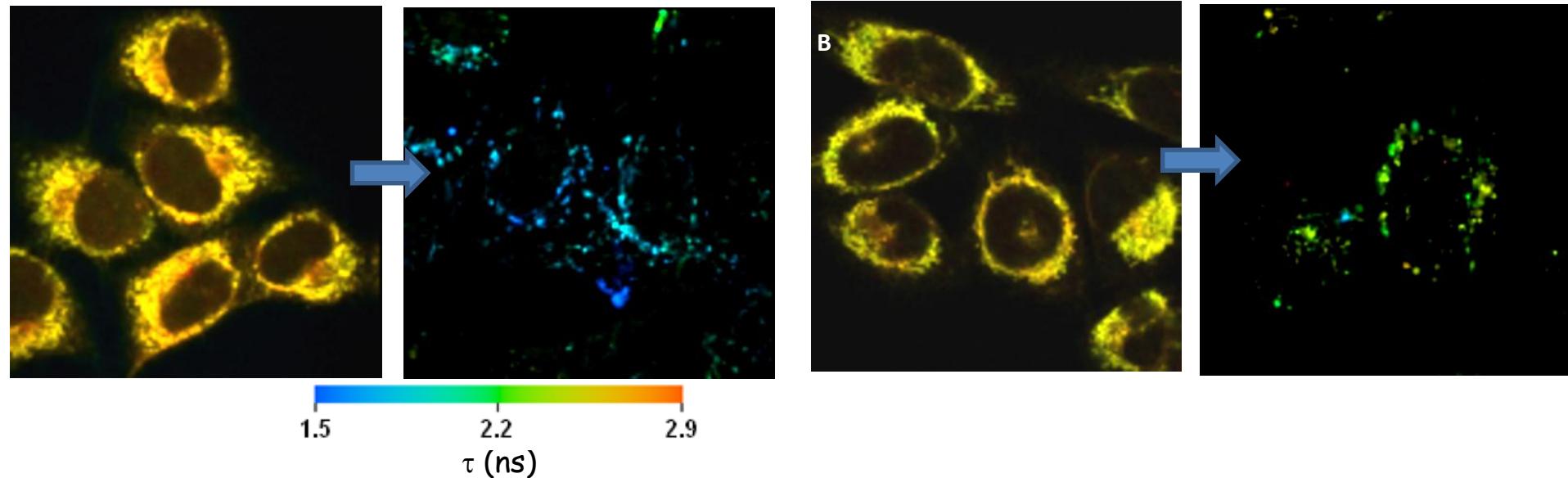


Потрібно десь 800 фотонів на піксель

Картинка в  
псевдокольорах

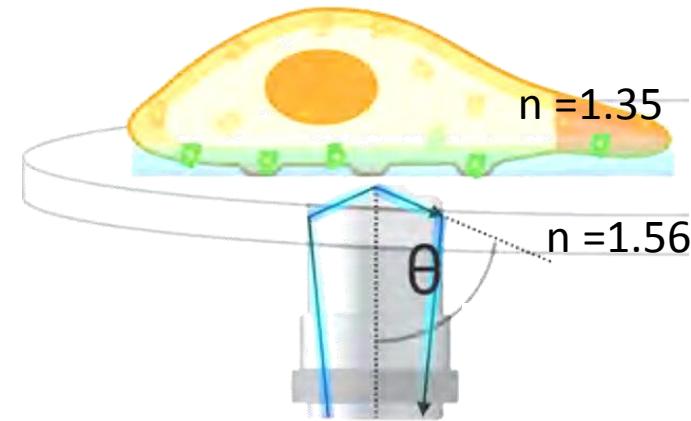


# FLIM



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

# TIRF



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

Хороший огляд по TIRF

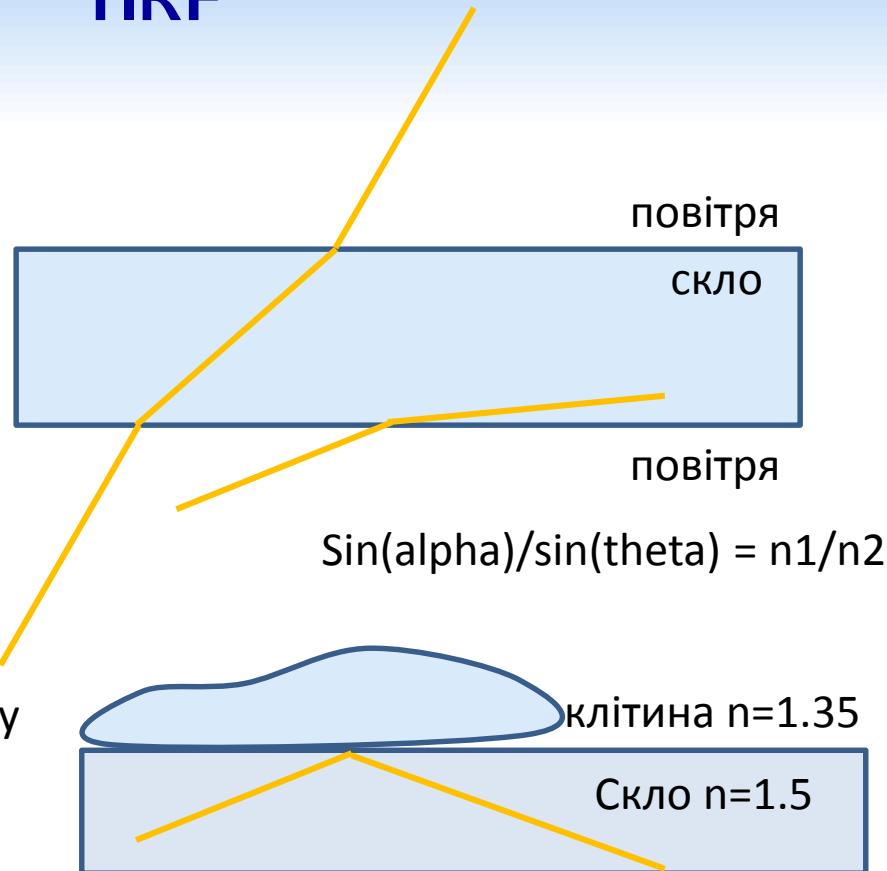
<https://journals.biologists.com/jcs/article/123/21/3621/31390/Imaging-with-total-internal-reflection>

Відеолекція на тему TIRF

<https://www.youtube.com/watch?v=egmJlaDR48>

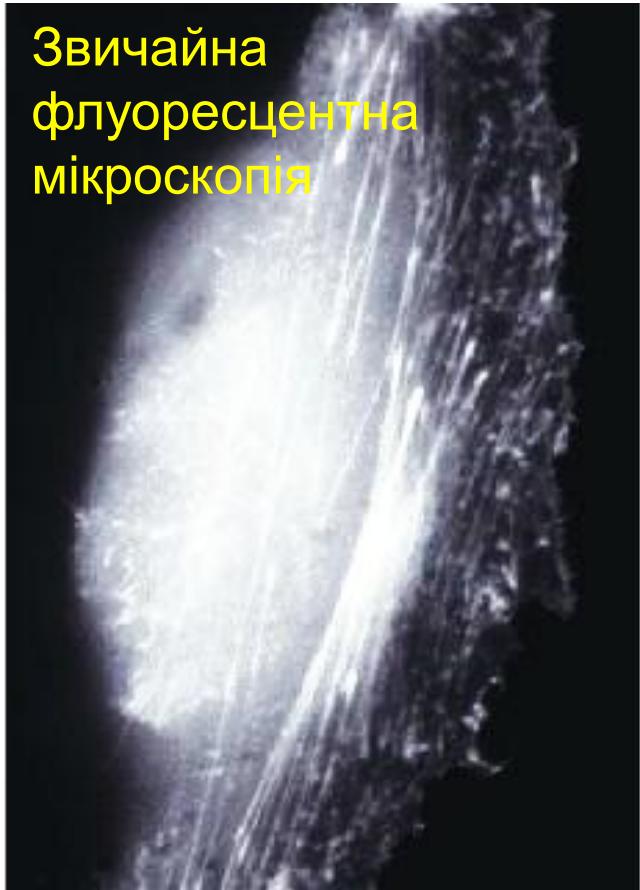
Приклади застосування на сайті Olympus

[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)

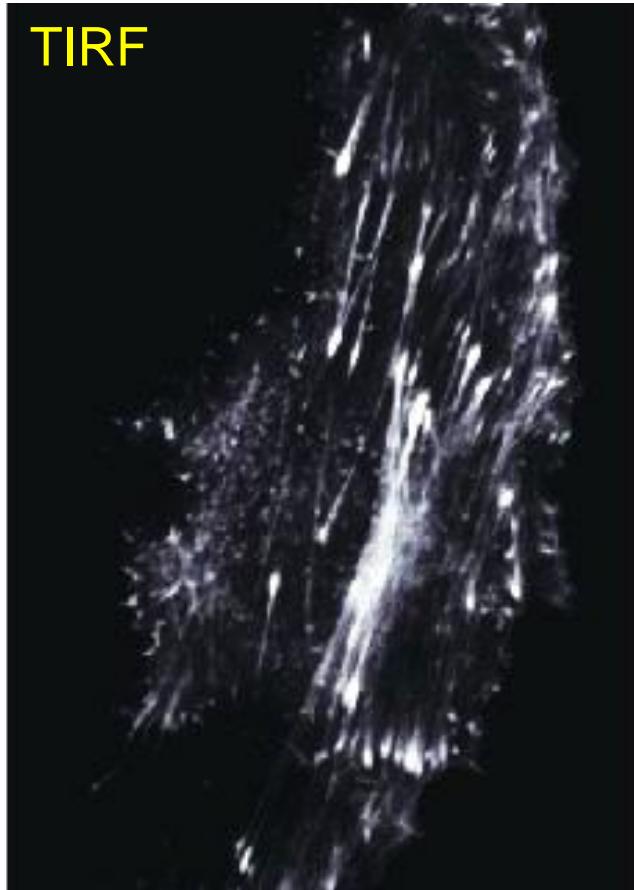


# TIRF

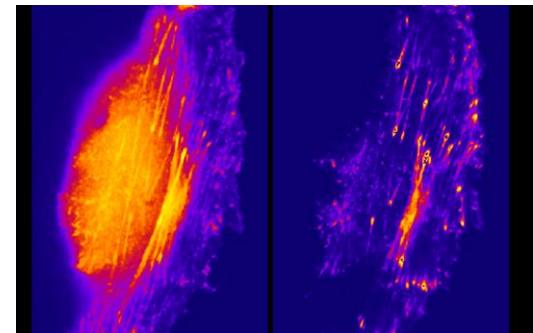
Звичайна  
флуоресцентна  
мікроскопія



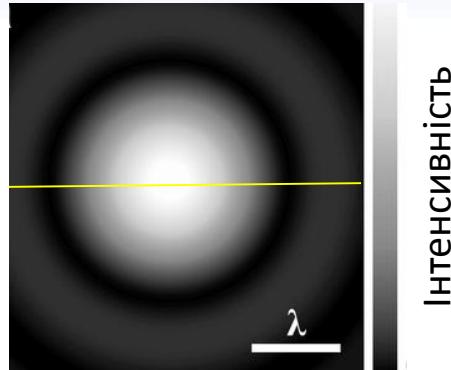
TIRF



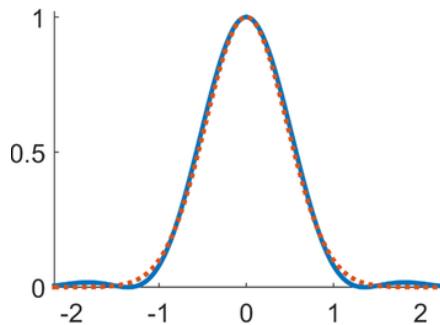
TIRF дозволяє  
прибрати з зображення  
все що лежить не біля  
площини клітини  
Дуже зручно для  
отримання зображень  
цитоскелету



# Дифракційний ліміт



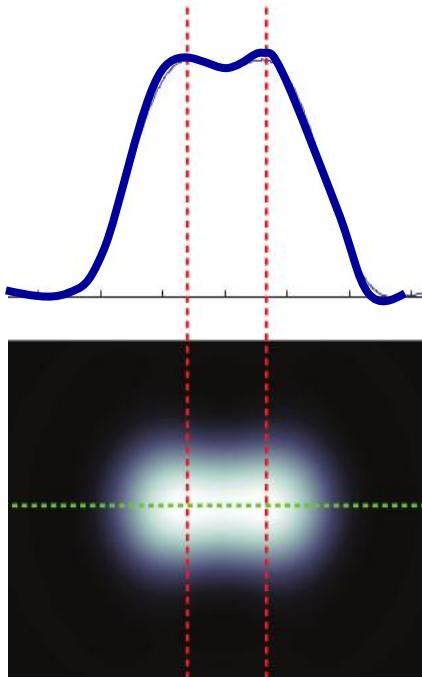
Точкове джерело світла (одиночний флуорофор) на мікроскопії дає пляму розміром близько довжини хвилі світла ( $\sim 400$  нм)



Переріз показує майже гаусівське розподілення інтенсивностей

\* Тому електронна мікроскопія має кращу роздільну здатність ніж світлова

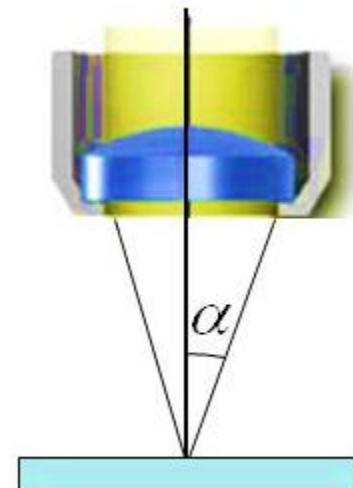
# Дифракційний ліміт



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

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.

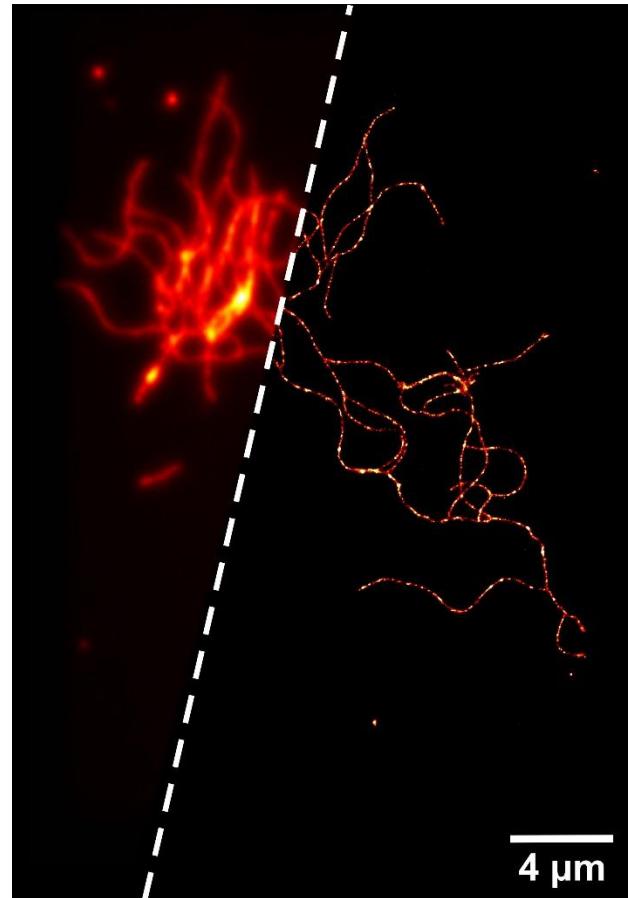
Щоб його обійти потрібно розрахувати позицію флуорофора використовуючи більше одного фотону

Хороша стаття з деталями STORM і STED  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.13257>

Типи мікроскопії з надчіткістю, коли який використовувати:

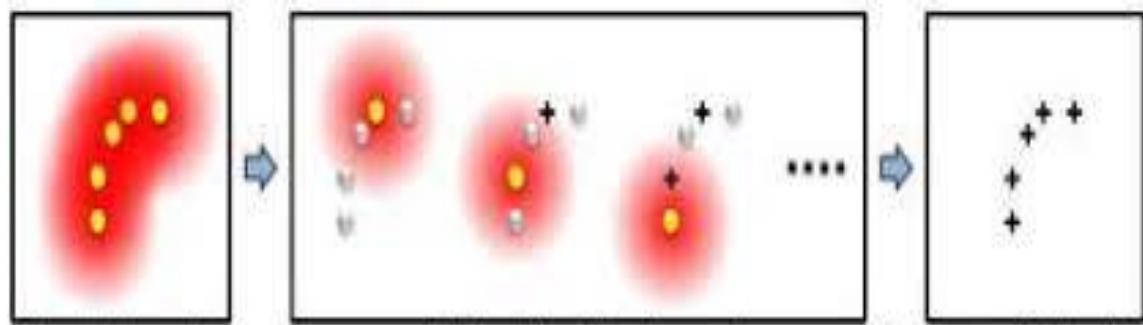
[www.nature.com/articles/s41556-018-0251-8](http://www.nature.com/articles/s41556-018-0251-8)

Відеолекція про мікроскопію з надчіткістю (superresolution microscopy) від Штефана Хеля, який згодом отримав Нобелівську премію  
<https://www.youtube.com/watch?v=YyBGiZZSsIY>

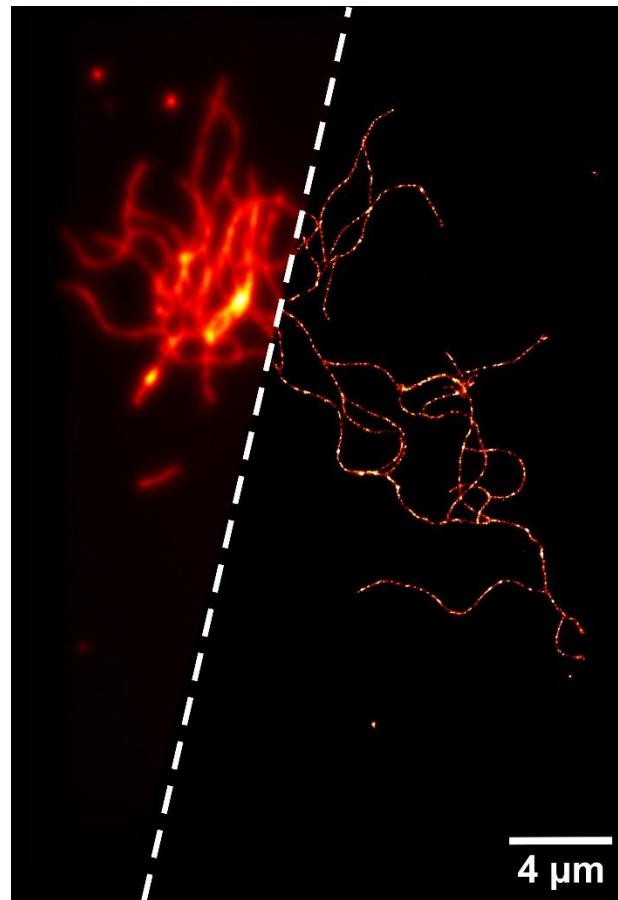


# STORM

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

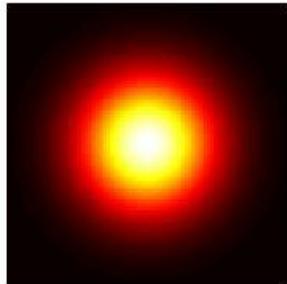


Стандарне      STORM

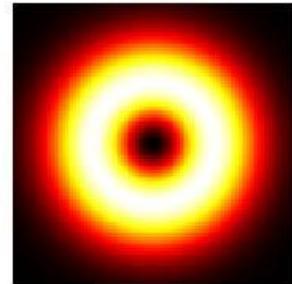


# STED

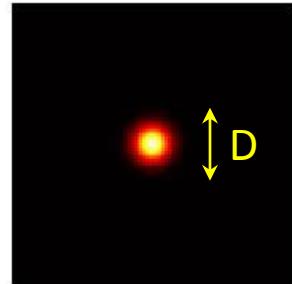
Stimulated Emission Depletion - Підхід коли йде паралельне опромінення світлом для збудження (стандартна хмарка) і для стимульованої емісії (бубликоподібна хмарка) – реально видиме світло йде позицій де було збудження а не було стимульованої емісії



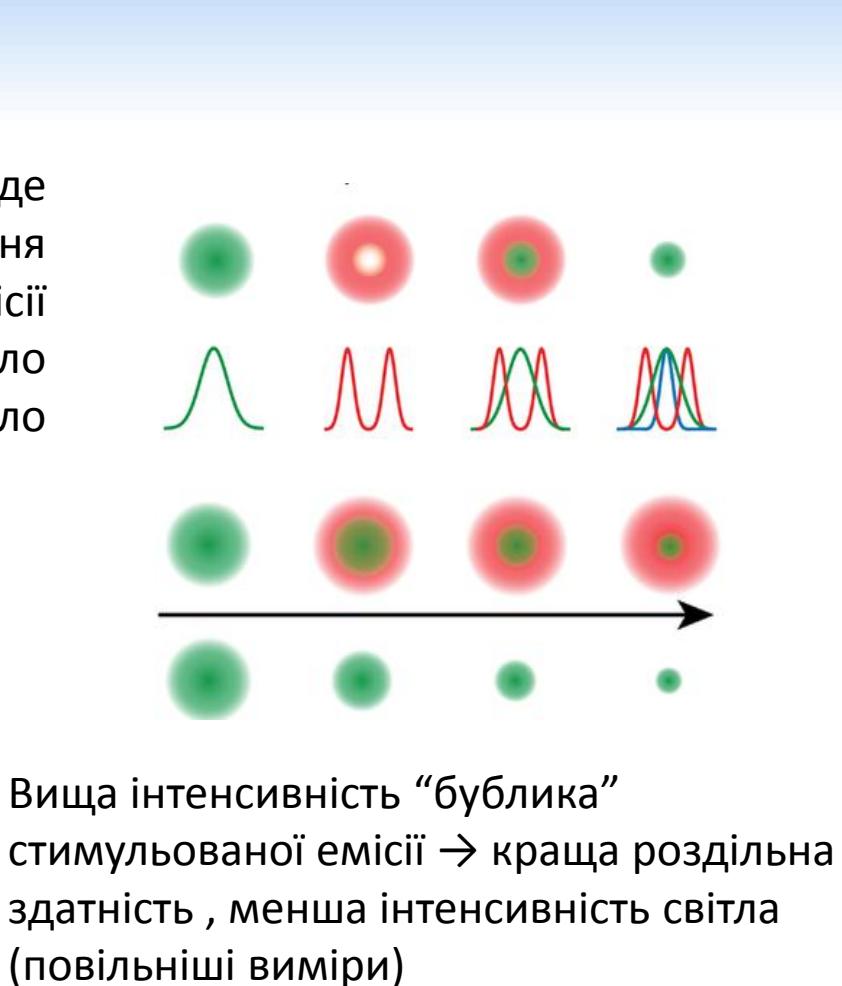
Збудження



Стимульована емісія



↑  
D

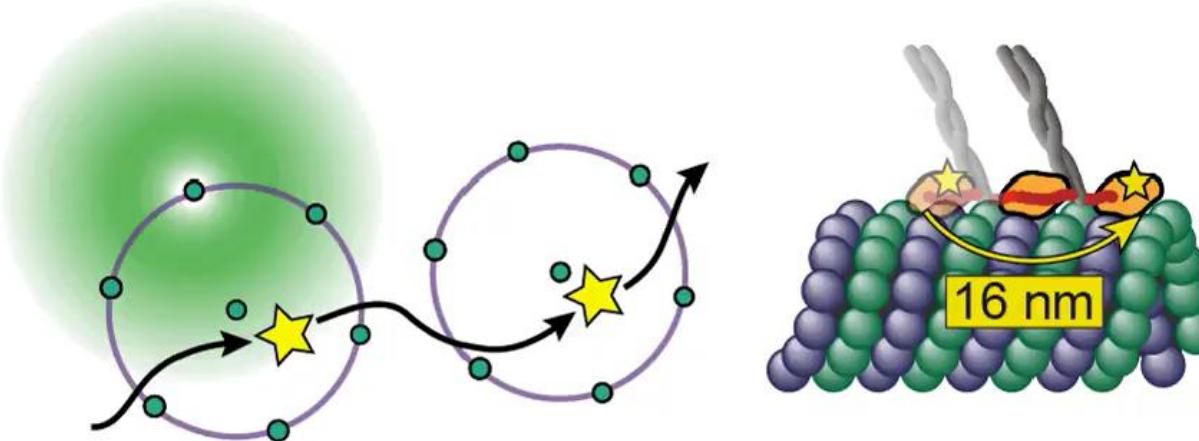


Вища інтенсивність “бублика”  
стимульованої емісії → краща роздільна  
здатність , менша інтенсивність світла  
(повільніші виміри)

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

# Блимання/MIMFLUX

## Live cell tracking of kinesin with MINFLUX



0 ms

10 nm

<https://twitter.com/JonasRies/status/1634131896836685831>

Jonas Ries, Science, 2023 <https://www.science.org/doi/10.1126/science.adc2676>

# Блимання/MIMFLUX

