

Лекция 6

Моторизованный микроскоп

Съемка живых клеток

FRAP/FLIP и TIRF

Моторизованный микроскоп

Высокопроизводительная микроскопия предполагает использование моторизованного микроскопа. В полностью моторизованном микроскопе следующие основные функции управляются через компьютер:

Управление предметным столиком (X-Y-Z)

Управление затворами (shutters) для проходящего и падающего света.

Переключение кубиков светофильтров и/или управление колесами светофильтров (filterwheels).

Управление камерой.

Моторизованный столик



Управление по осям X и Y осуществляется с помощью сервомоторов (через джойстик). Точность перемещения – около 0.5 мкм. Диапазон регулировок: около 25 мм, специальные столики – до 100x100 мм (для планшетов).

Управление по оси Z – два варианта: сервомотор на микровинте или пьезоподача стола (специальный вкладыш) либо объектива (специальная оправа). Точность установки: сервомотор около 50 нм, пьезоподача – 1-2 нм. Диапазон регулировок: сервомотор – практически не ограничен (весь ход микровинта); пьезоподача – как правило, не более 200 мкм.

Работа моторизованного микроскопа

Для съемки нескольких полей зрения (чашка Петри, многолуночный планшет) производится настройка фокусировки в каждом поле и задается координата Z.

Для съемки фильма, кроме того, задаются следующие параметры: координаты поля зрения (X-Y) последовательность перехода между полями зрения, последовательность переключения режимов съемки (например, флуоресценция – DIC), экспозиция каждого кадра, интервалы между кадрами, общая продолжительность съемки по времени (или числу кадров для каждого поля зрения).

Производительность микроскопа ограничивается, в основном, скоростью перемещения столика в

X Y Z

Установка постоянной фокусировки

Две системы:

1. Через фокусировку камеры (максимальная резкость кадра).
2. Специальная система (perfect focus system etc.)

Система поддержания фокусировки, встроенная в микроскоп, значительно более эффективна, так как не требует предварительного включения света.

Она управляется с помощью специального инфракрасного лазера, луч которого отражается от границы раздела фаз (стекло – культуральная среда). Система запоминает настройки оператора и позволяет работать с фокусировкой в глубине препарата.

Однако система работает не со всеми объективами микроскопа.

Тестовый объект

Кожица лука, окрашенная DiO C₆(3) в концентрации около 0,5 мкг/мл (время окрашивания – 10-30 мин).

Окрашиваются ЭПР и митохондрии (ярко). Быстро движущийся по периферии клетки ЭПР является хорошим тестовым объектом для цейтраферной конфокальной съемки.

ФОТОТОКСИЧНОСТЬ И ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЕ

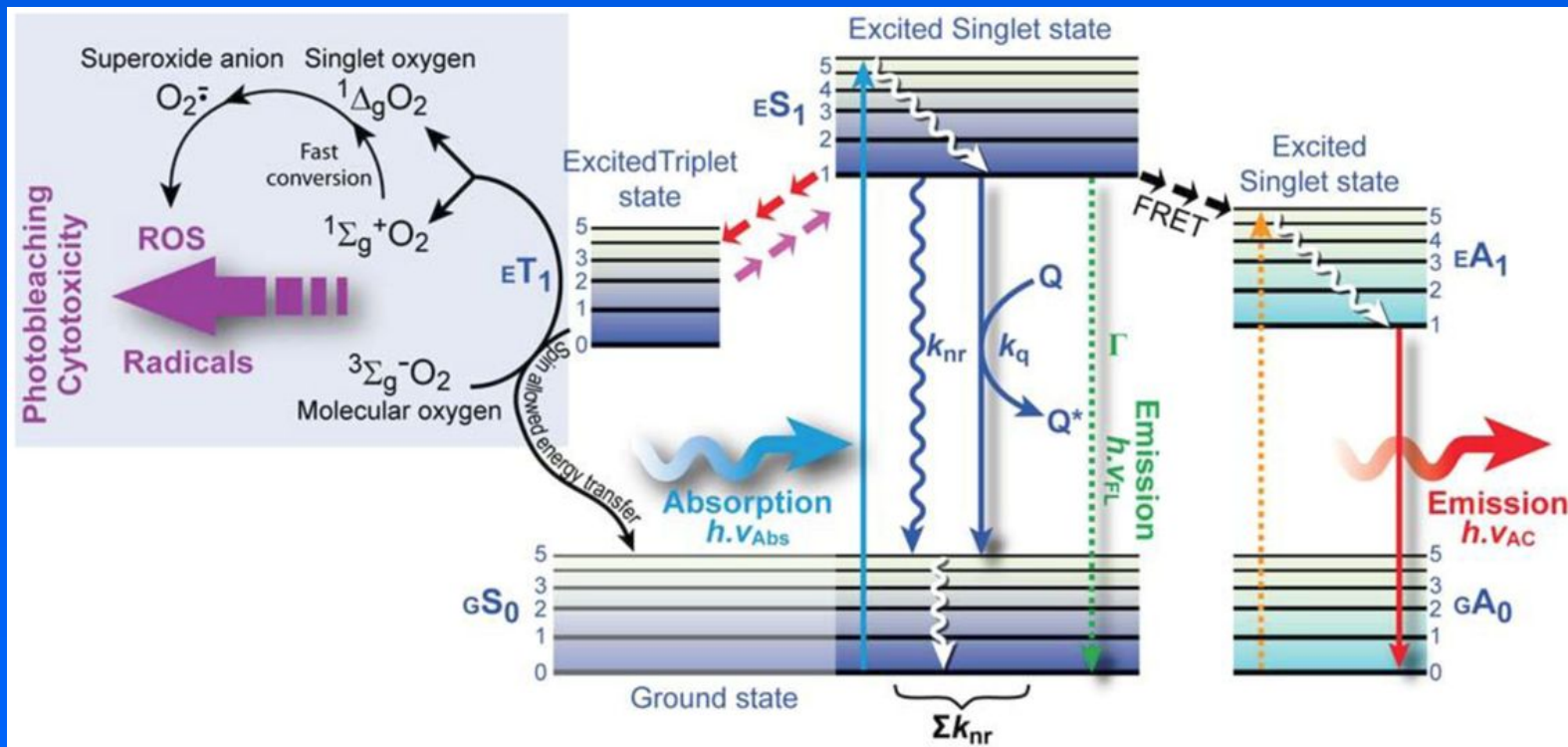
Фотообесцвечивание и фототоксичность представляют собой два разных ограничения флуоресцентной микроскопии живых клеток.

Фотообесцвечивание означает снижение яркости флуоресценции, что связано с выцветанием красителя. Выцветание красителей (и флуоресцентных белков) может иметь различные механизмы.

Фототоксичность означает нарушение клеточного метаболизма, которое связано с повреждением различных внутриклеточных структур и нарушением сигнальных процессов.

Фототоксичность имеет несколько причин. Основными причинами фотоповреждения клеток считается формирование активных форм кислорода (ROS - АФК) в виде синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), супероксид радикала ($^*\text{O}_2^-$), радикала гидроксила (OH^*) а также различных перекисей

ФОТОТОКСИЧНОСТЬ – ФОРМЫ АФК



Основные источники АФК в клетках

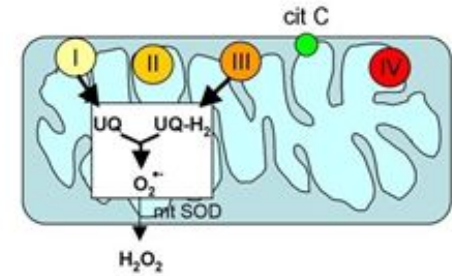
Около 95% кислорода в организме восстанавливается в митохондриях до воды, при этом обязательной стадией является образование гидроксильных ОН-групп, также относящихся к АФК, при участии фермента цитохром с-оксидазы. Остальные 5% кислорода в результате различных реакций превращаются непосредственно в АФК.

Защита клетки от АФК осуществляется несколькими антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксиредоксины) и низкомолекулярными антиоксидантами (витамин С, глутатион,

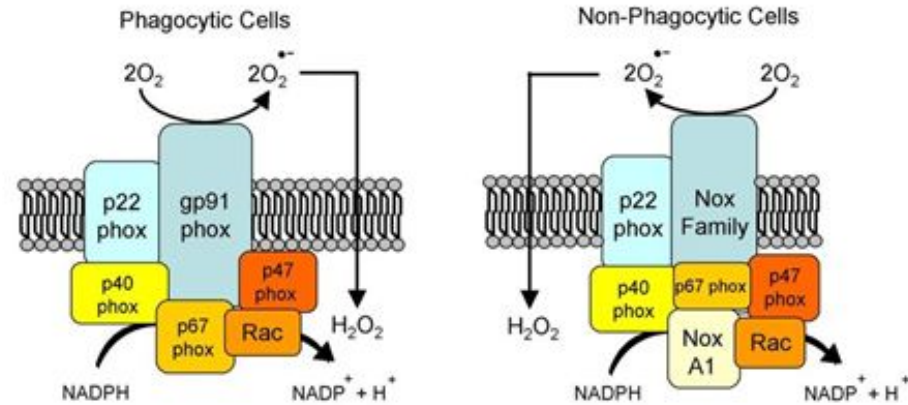
a) Mitochondria

Stimuli inducing increased mitochondrial generation of ROS:

- serum deprivation
- integrin signalling
- apoptosis
- TNF α
- hypoxia
- ceramide
- p53
- oncogenic Ras



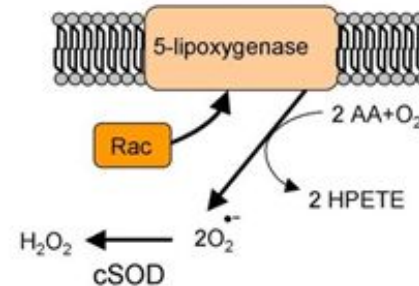
b) NADPH oxidase



Stimuli for activation of NADPH oxidase and 5-lipoxygenase

- integrin signalling
- growth factors
- cytokines/hormones
- immunological stimuli
- hypoxia
- oncogenic Ras

c) 5-lipoxygenase



Основные мишени фотоповреждения в клетках

1. Повреждение ДНК и РНК. Повреждение ДНК сразу активирует систему репарации.
2. Окисление полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах – повреждение мембран.
3. Окисление аминокислот в белках.
4. Инактивация ферментов в результате окисления их ко-факторов.

Степень фотоповреждения очень сильно зависит от используемого красителя.

Фотодинамическая терапия – эффект избирательного накопления красителей, генерирующих при облучении соответствующей длиной волны высокие дозы АФК.

Фотопротекция клеток

Для уменьшения фотообесцвечивания и снижения фототоксичности наиболее эффективным средством является фермент оксираза (Oxirase Inc.). Она добавляется в инкубационную среду в концентрации 0,3-1 ед./мл. Так же возможно использовать аскорбиновую кислоту (до 1 мг/мл), водорастворимые производные витамина Е (напр., Тролокс).

Оксираза при правильном использовании снижает парциальное давление кислорода в культуральной среде, по крайней мере, в 100 раз. При использовании оксиразы съемку необходимо вести в условиях, исключающих постоянное проникновение кислорода из воздуха – герметичная камера либо чашка Петри с культуральной средой, покрытая минеральным маслом.

Для уменьшения фототоксичности среда также не должна содержать красителей (феноловый красный) и витаминов и флавинов (добавки).

Фотообесцвечивание

Оксираза высокоэффективна при использовании низкомолекулярных органических красителей (Cy-3, Cy-5), но сравнительно малоэффективна при использовании флуоресцентных белков – они выцветают на основе других механизмов.

В целом фототоксичность для клеток максимальна при использовании флуоресцентных внутриядерных проб (гистоны и проч.), так как клетка максимально чувствительна к индуцируемым АФК повреждениям ДНК и в меньшей степени – к повреждениям цитоплазмы.

Поэтому для уменьшения фототоксичности целесообразно экранировать ядро в процессе наблюдения, если это позволяют условия эксперимента.

В частности, фототоксичность резко снижается при использовании метода TIRF.

Определение допустимой мощности излучения

Эффект фототоксичности уменьшается с ростом длины волны возбуждающего света (Горгидзе, Ошемкова, Воробьев, 1998). Поэтому при мечении живых клеток следует предпочесть метки с максимальной длиной волны возбуждения (RFP всегда лучше, чем EGFP).

Не существует стандартной оптимальной мощности.

Фоточувствительность клеток ко всем длинам волн резко повышается во время митоза. Для коротковолнового света фототоксичность может достигаться уже при мощности лазера в 150 нВт (0,15 мВт).

При стандартной работе с диском Нипкова допустимая мощность синего (488 нм) и зеленого (532-561 нм) лазеров, не вызывающих токсического эффекта в клетках культуры ткани, экспрессирующих, например, EGFP и RFP в течение 500 кадров (экспозиция 0,1-0,5 с) находится в диапазоне 0,5-10 мВт.

В качестве теста на фоточувствительность клетки целесообразно при выбранной мощности лазера запустить непрерывную съемку делящейся клетки.

Приложения флуоресцентной микроскопии к исследованию ЖИВЫХ КЛЕТОК

1. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) – анализ динамики восстановления флуоресценции после обесцвечивания. Обратный вариант – фотоактивация (caged fluorochrome) и динамика распространения флуоресценции.
2. TIRF (total internal reflection fluorescence) – возбуждение флуоресценции в условиях полного внутреннего отражения.
3. FRET – (Förster resonance energy transfer) – резонансный безизлучательный перенос энергии (эффект используется в тандемных красителях)

FRAP и FLIP

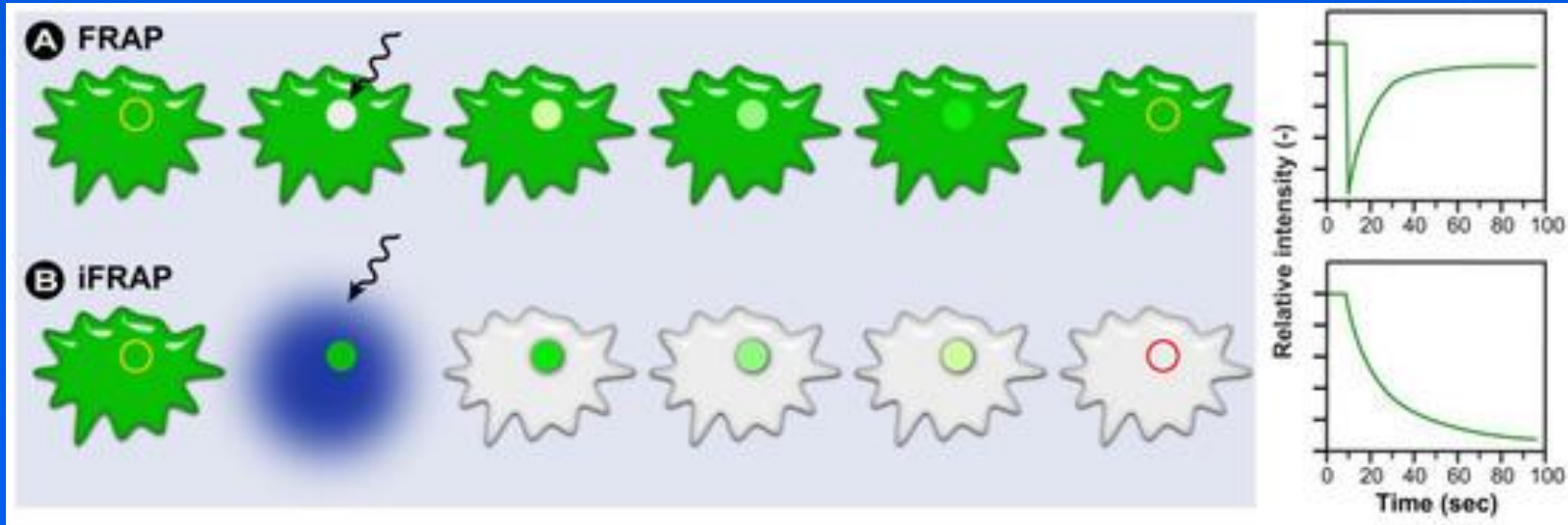
FRAP – динамические наблюдения внутри облученного района

FRAP (одномоментное облучение) – кинетика восстановления определенной области и подвижность молекул.

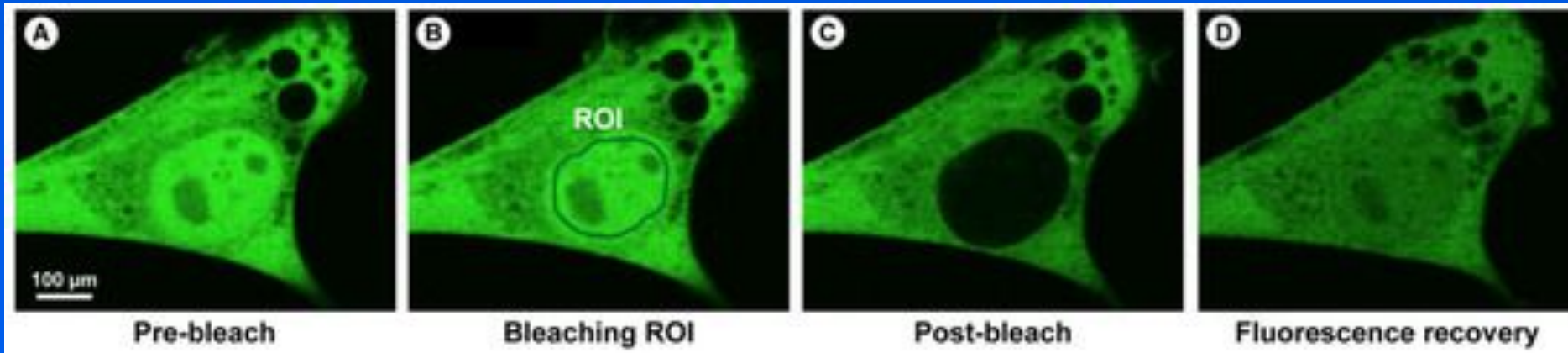
FLIP – наблюдения в районах за пределами облученной зоны.

FLIP (повторное или продолжительное облучение) – непрерывность органелл (АГ, ЭПР).

Методы FRAP и iFRAP

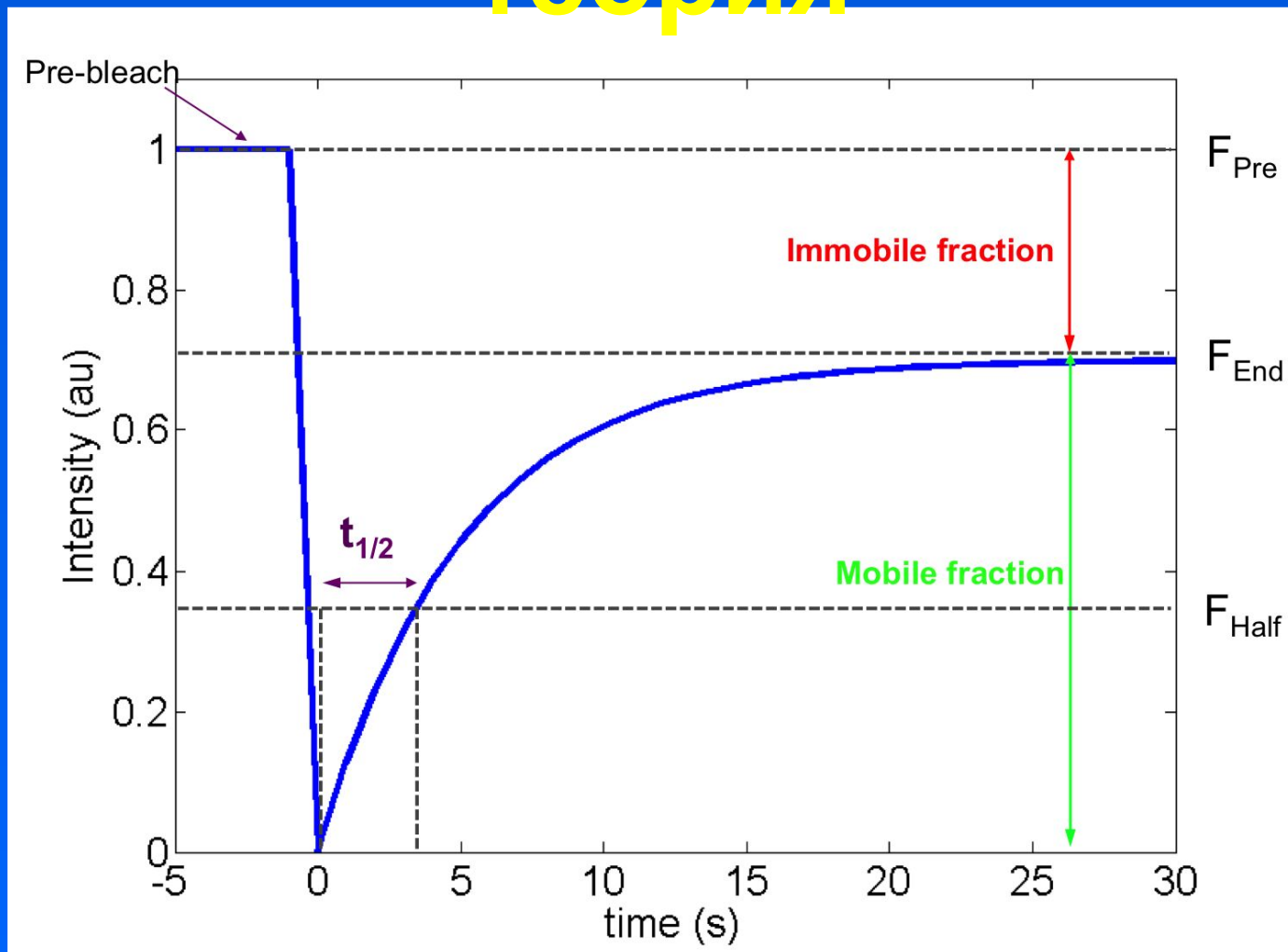


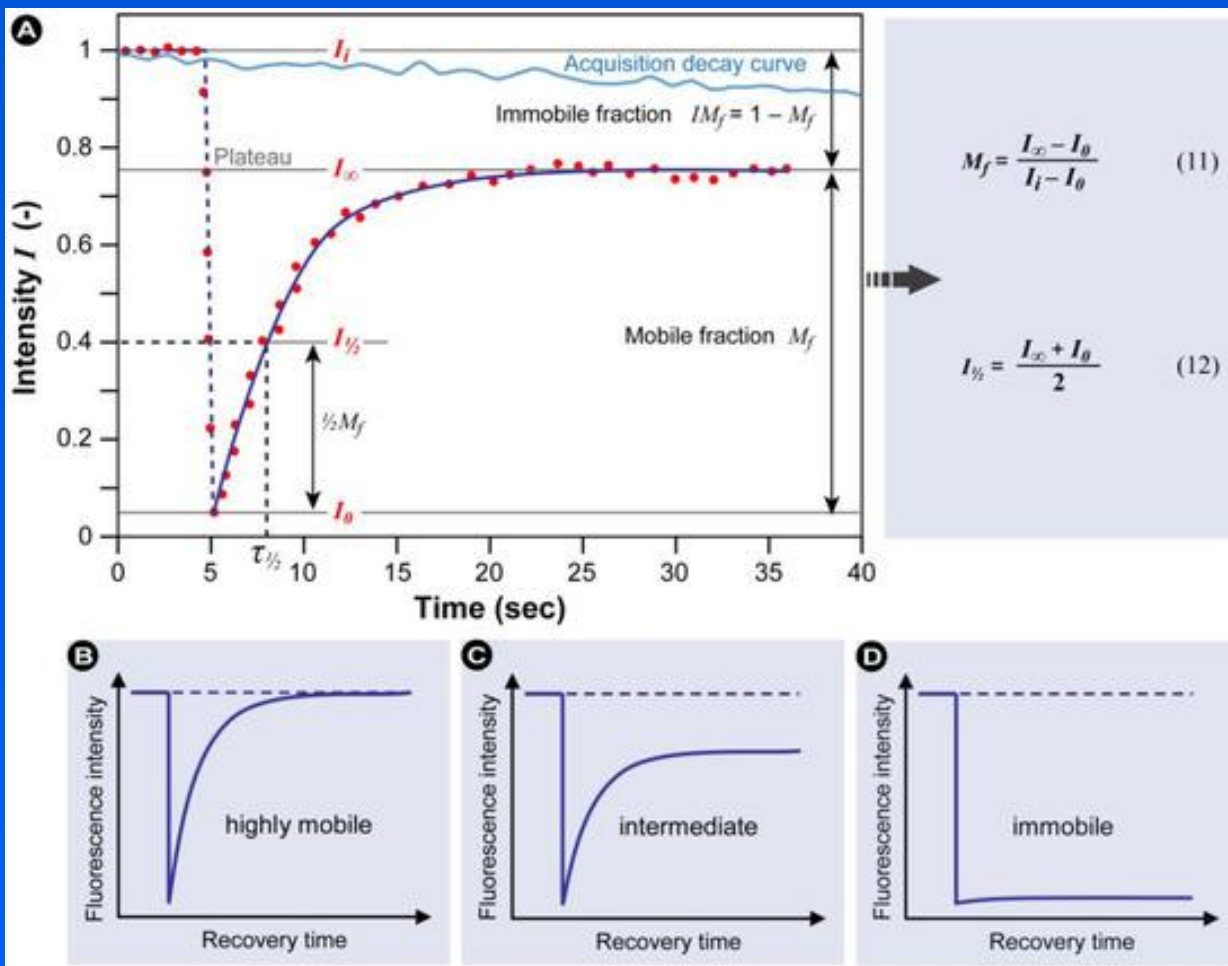
Пример – кинетика миозина III



Example of a FRAP experiment to show that monomeric GFP can pass the nuclear membrane. (A) Myoblast cell line (myo3) homogenously expressing GFP-Myosin III before bleaching. (B) A region of interest (ROI) is bleached with high intensity laser light. Directly after bleaching, the cell shows a dark area in which the fluorochromes were permanently damaged and thus no longer emit light (C). The fluorescence in the photobleached region recovers via replacement with intact fluorochrome molecules from the surrounding area (D). Note that the total amount of fluorescence has decreased during the experiment, because a substantial amount of fluorochromes were irreversibly damaged

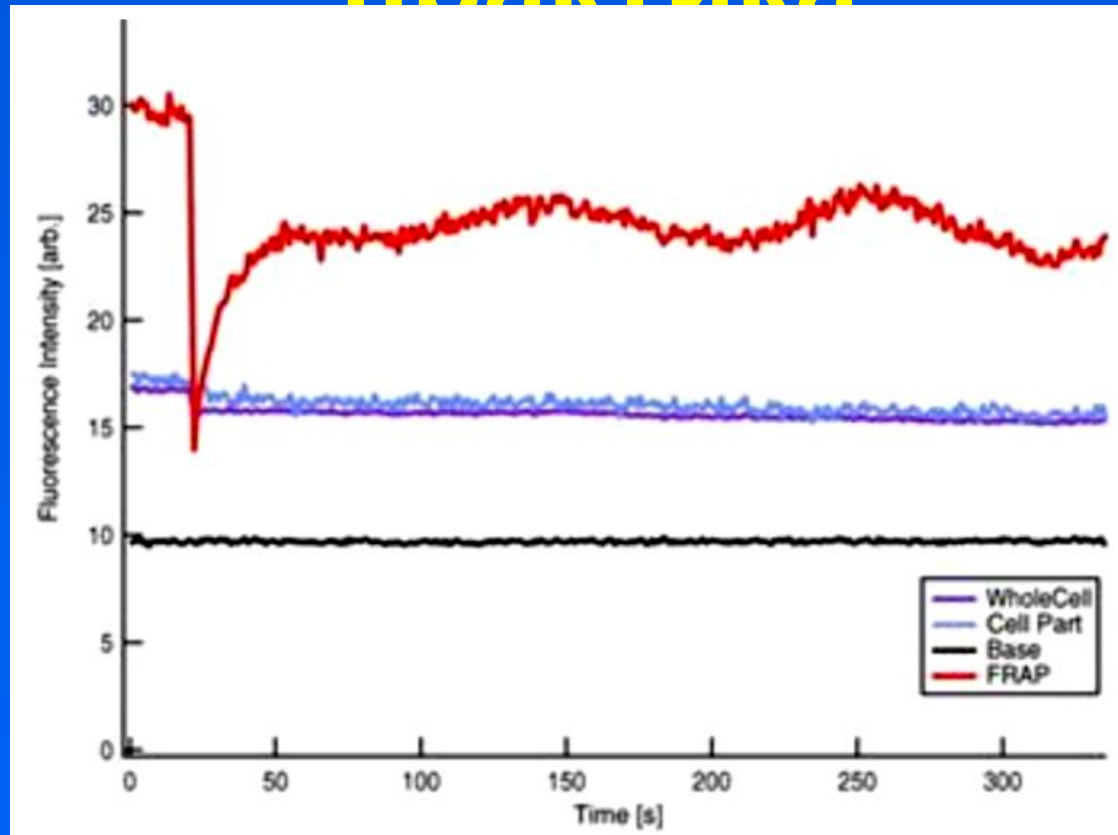
Анализ методом FRAP - теория





Anatomy of a typical FRAP curve. (A) From the initial (pre-bleach) fluorescence intensity (I_1), the signal drops to a particular low value (I_0) as the high intensity laser beam bleaches fluorochromes in the ROI. Over time the signal recovers from the post-bleach intensity (I_0) to a maximal plateau value (I_∞). (Light blue line: reference photobleaching curve to correct for fluorescence loss during data acquisition). The information from the recovery curve (from I_0 to I_∞) can be used to determine the diffusion constant and the binding dynamics of fluorescently labeled proteins.

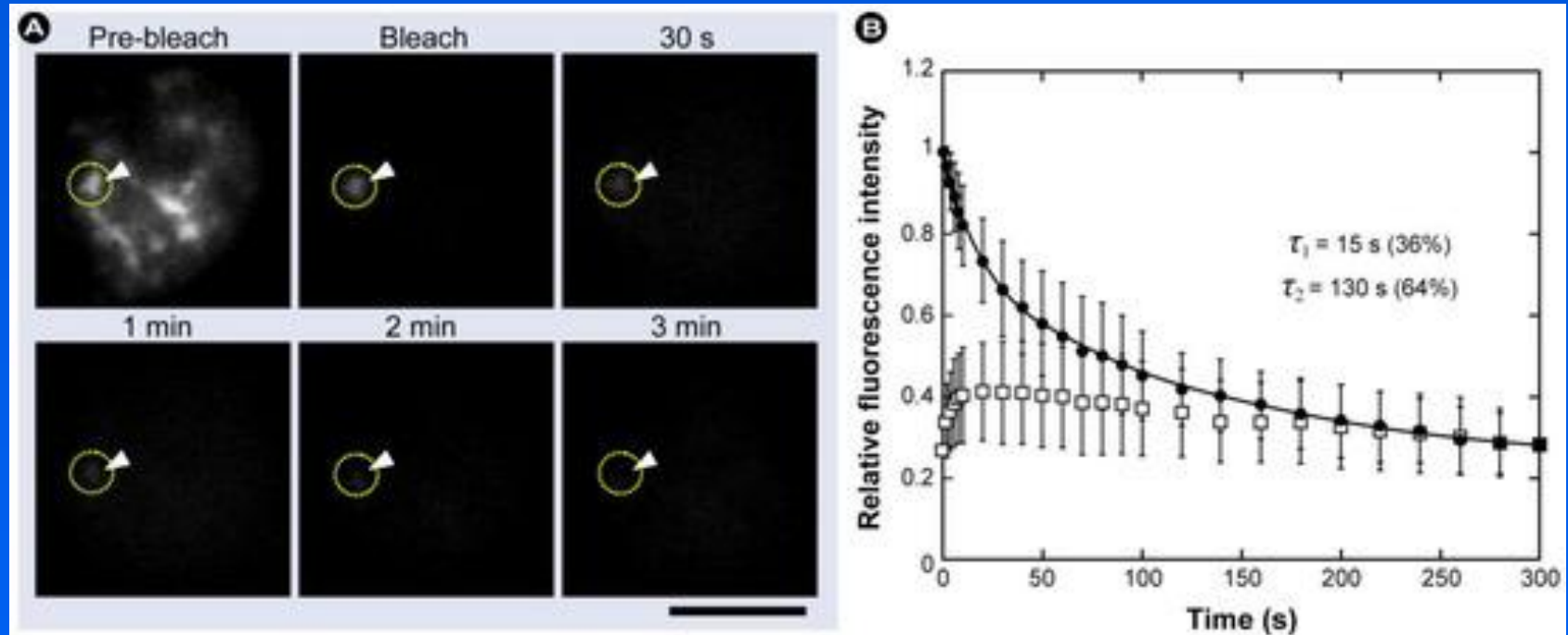
Анализ методом FRAP - практика



Для измерения желательно использовать четыре региона:

- (1) собственно ROI (красная линия),
- (2) референтный ROI (синяя линия);
- (3) базовый ROI, который находится вне клетки (иногда называемый фоном) (черная линия),
- (4) запись суммарного сигнала со всей клетки (средняя

Пример эксперимента iFRAP



(A) Fluorescence images of a Cos7 cell micro-injected with pre-mRNAs before and after photobleaching of the nucleus except for the speckles region (ROI) shown by the arrowheads and circle. Scale bar, 10 μm . (B) The changes in fluorescence intensity after photobleaching at time 0 at the speckles (closed circles) and in its adjacent photobleached nucleoplasm (open squares) was plotted as a function of time. The curve shows a rapid dissociation, followed by slow-dissociation from speckles and slightly increased fluorescence intensity at the adjacent nucleoplasm for about 10s after the photobleaching and then reaching a value similar to that of the speckles

Интерпретация данных, полученных методом FRAP

Кривая FRAP содержит две компоненты: восстановление флуоресценции в результате диффузии молекул внутрь облученного объема и снижение флуоресценции в результате обесцвечивания.

Поэтому основная поправка вводится на обесцвечивание.

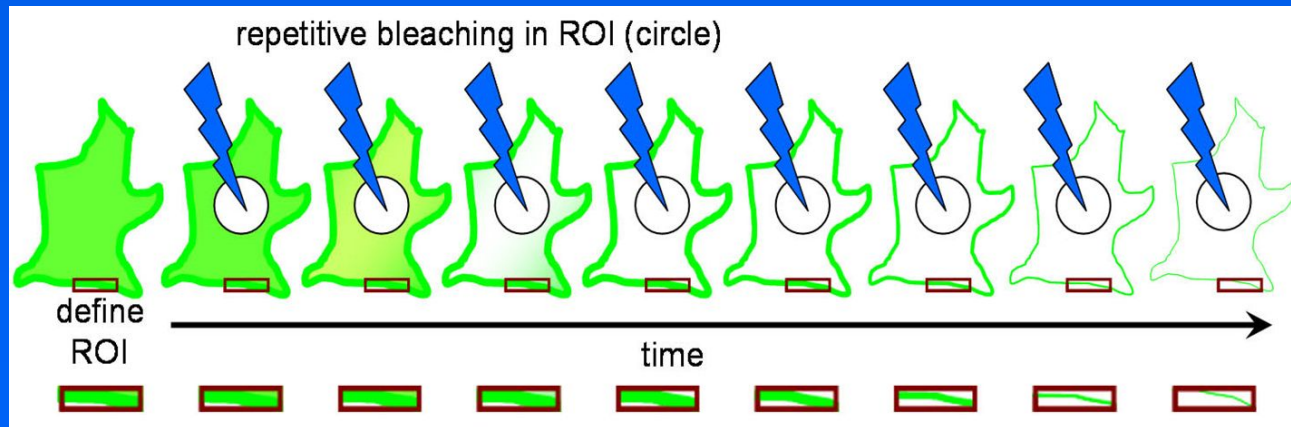
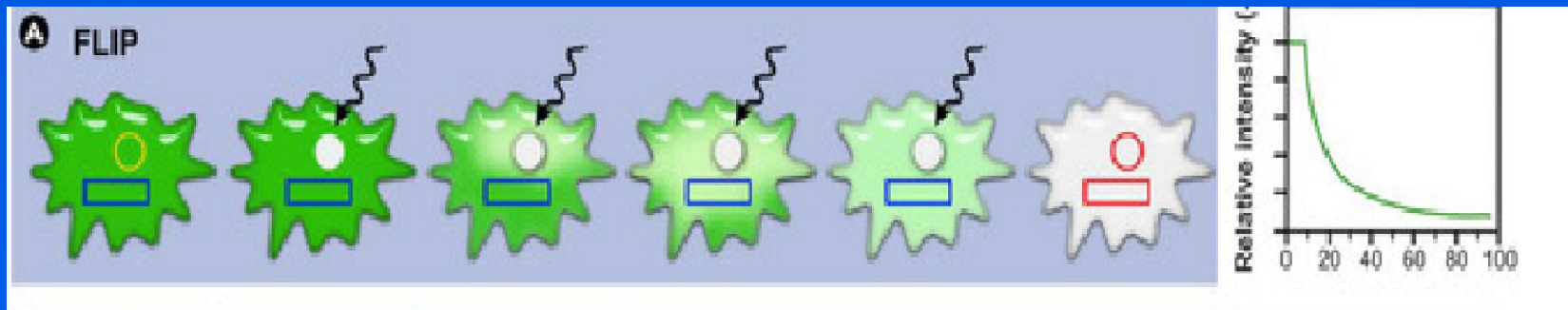
Его можно уменьшить, если увеличить интервалы времени при съемке.

Кроме того, значительные потери могут быть в том случае, когда облучается большая часть клетки.

Curve fitting.

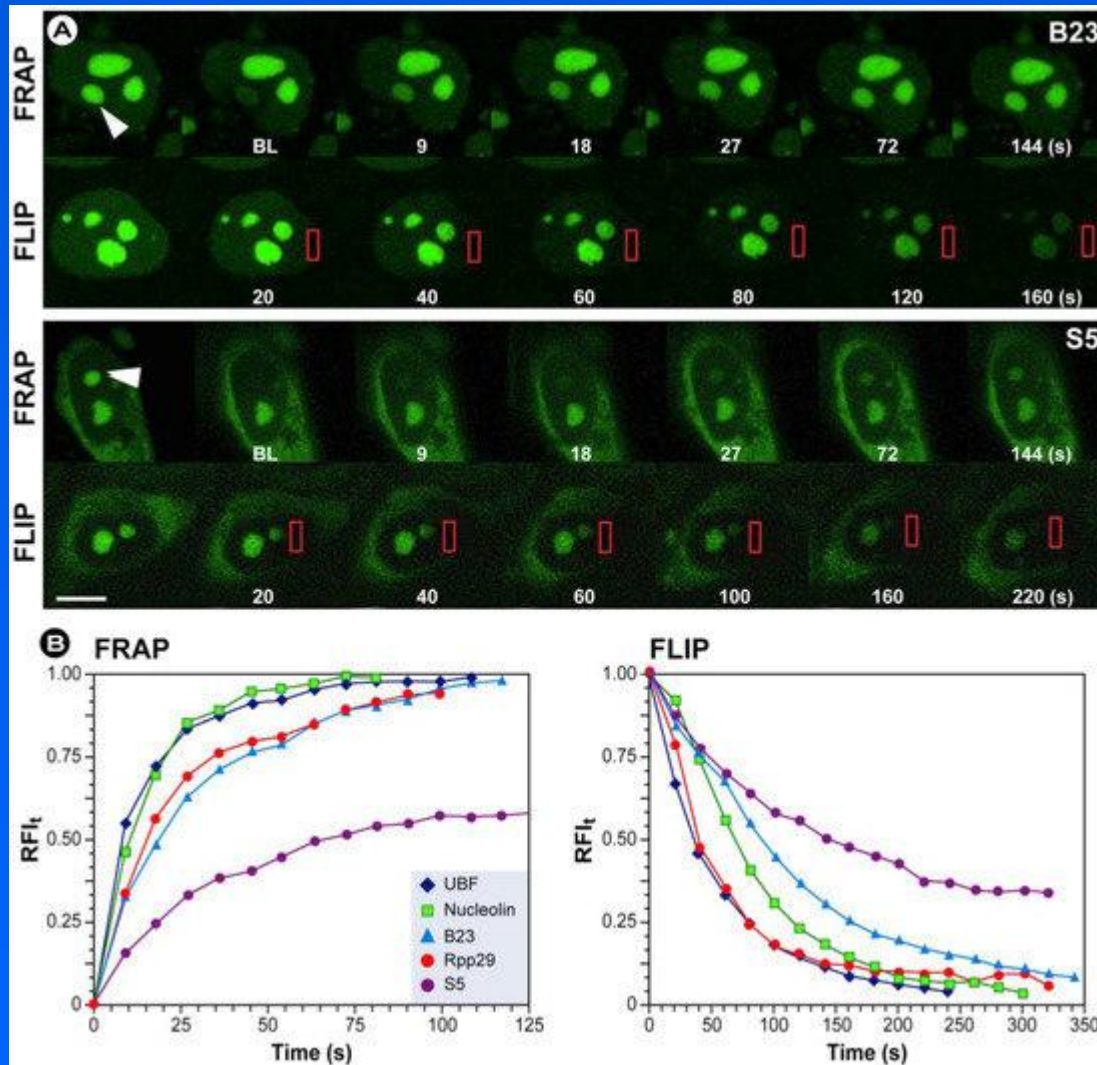
Построение кривых: моноэкспоненциальное или биэкспоненциальное.

FLIP – fluorescence loss in photobleaching

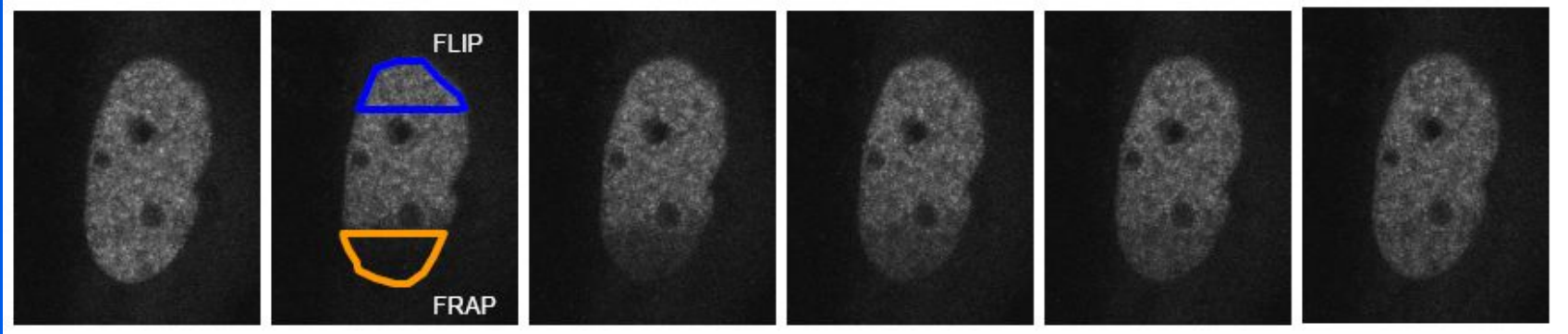


Метод FLIP используется для анализа связи между органеллами, ядерно-цитоплазматического транспорта и др.

Комбинирование FLIP и FRAP



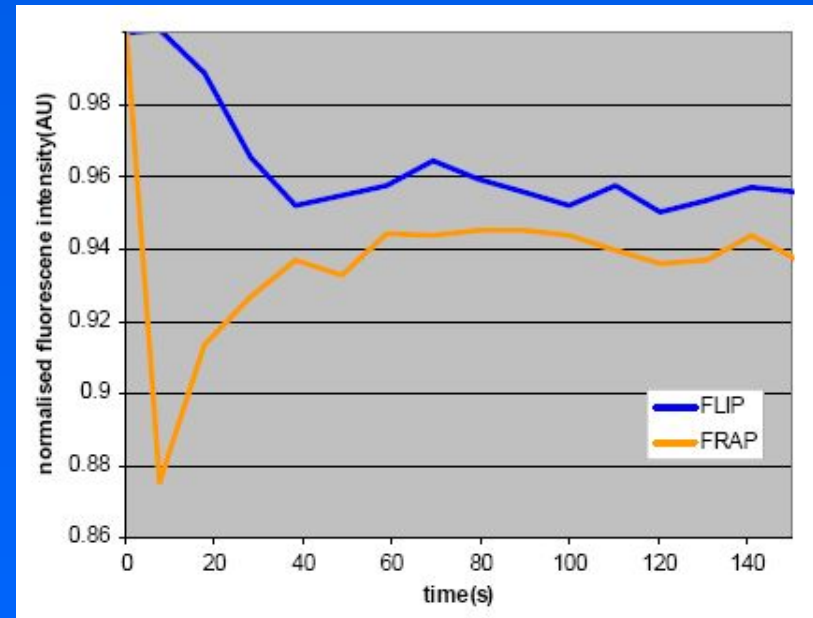
FLIP и FRAP



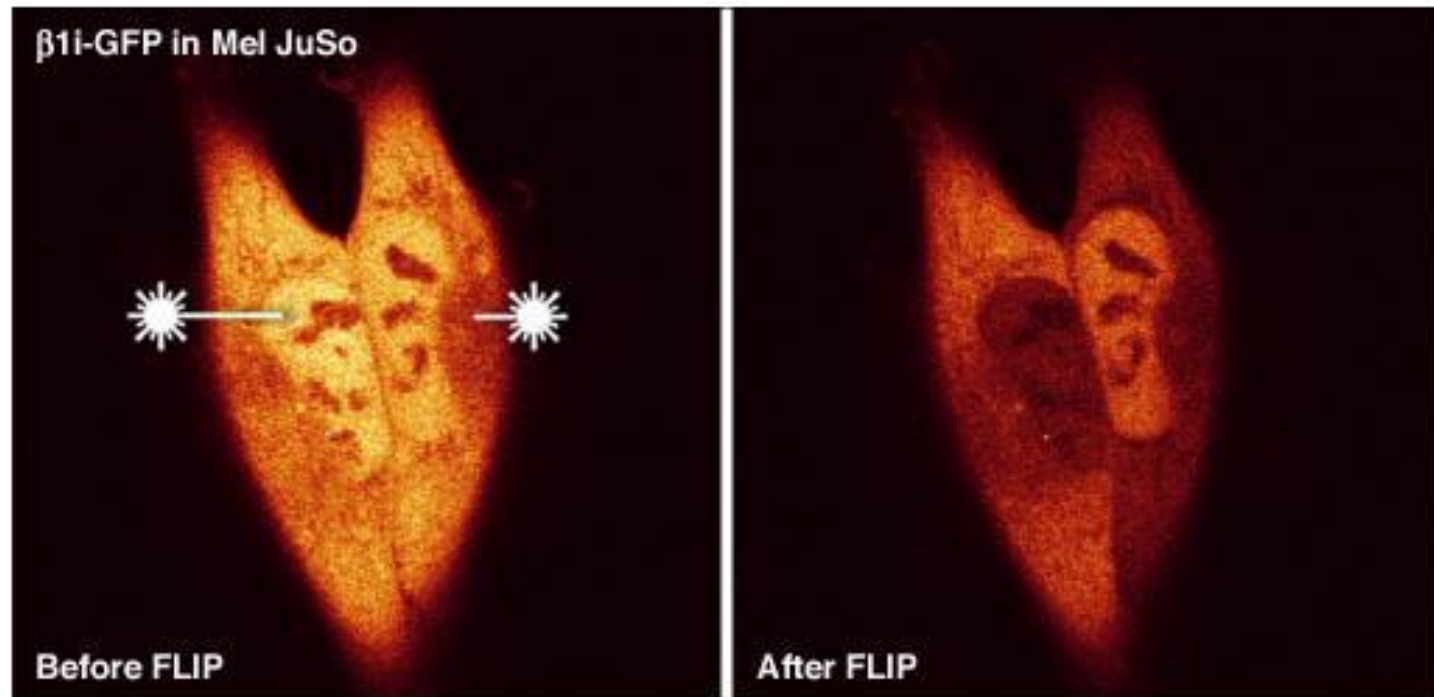
Пример для расчета FRAP и FLIP
- экспрессия GFP с
цитоплазматическим белком.

FLIP (продолжительное
облучение) – непрерывность
органелл (АГ).

FRAP (одномоментное
облучение) – кинетика
восстановления определенной
области



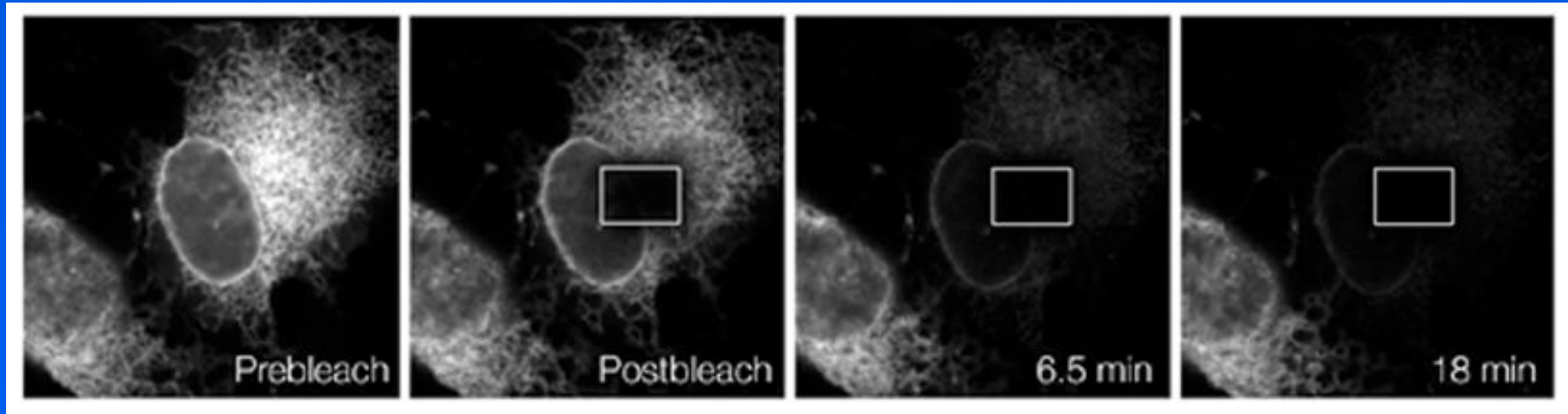
Приложение FLIP



Example FLIP experiment

These cells expressing the fluorescently tagged proteasome subunit were repeatedly bleached in either the cytosol or nucleus. Even after up to 180 minutes the fluorescence between nucleus and cytoplasm is not equalized, indicating that the proteasome is not diffusing between the two compartments.

Приложение FLIP



Продолжительное облучение одной и той же области флуоресцентно меченного ЭПР приводит к его полному выцветанию, что доказывает функциональное единство этой структуры.