Белорусский государственный университет

кафедра генетики

Современная микроскопия

С. В. Глушен

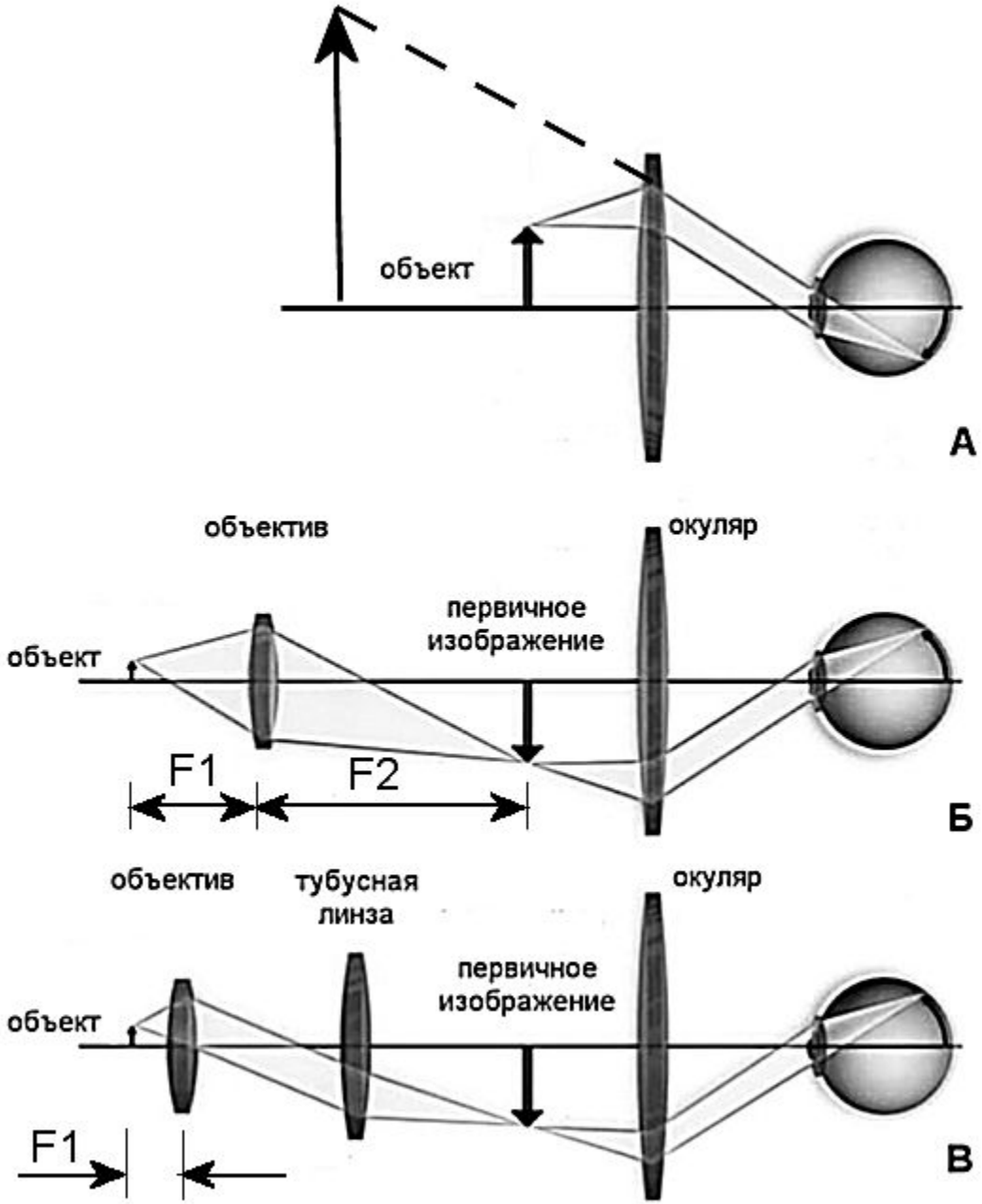
План лекции

- Теория микроскопа
- Методы светлого и темного поля
- Флуоресцентная микроскопия
- Конфокальная микроскопия
- Световая микроскопия высокого разрешения

Классификация методов микроскопии

Microscopy	Микроскопия	Физический принцип
Far field	дальнего поля	используется дифракция световых волн
Near field	ближнего поля	используются оптические свойства слабых стоячих волн, возникающих на границе раздела двух сред (evanescent waves)
Full field	полного поля, или голографическая	используются стоячие волны, формируемые лазером в пространстве

Геометрическая оптика



Увеличение лупы:
250/F

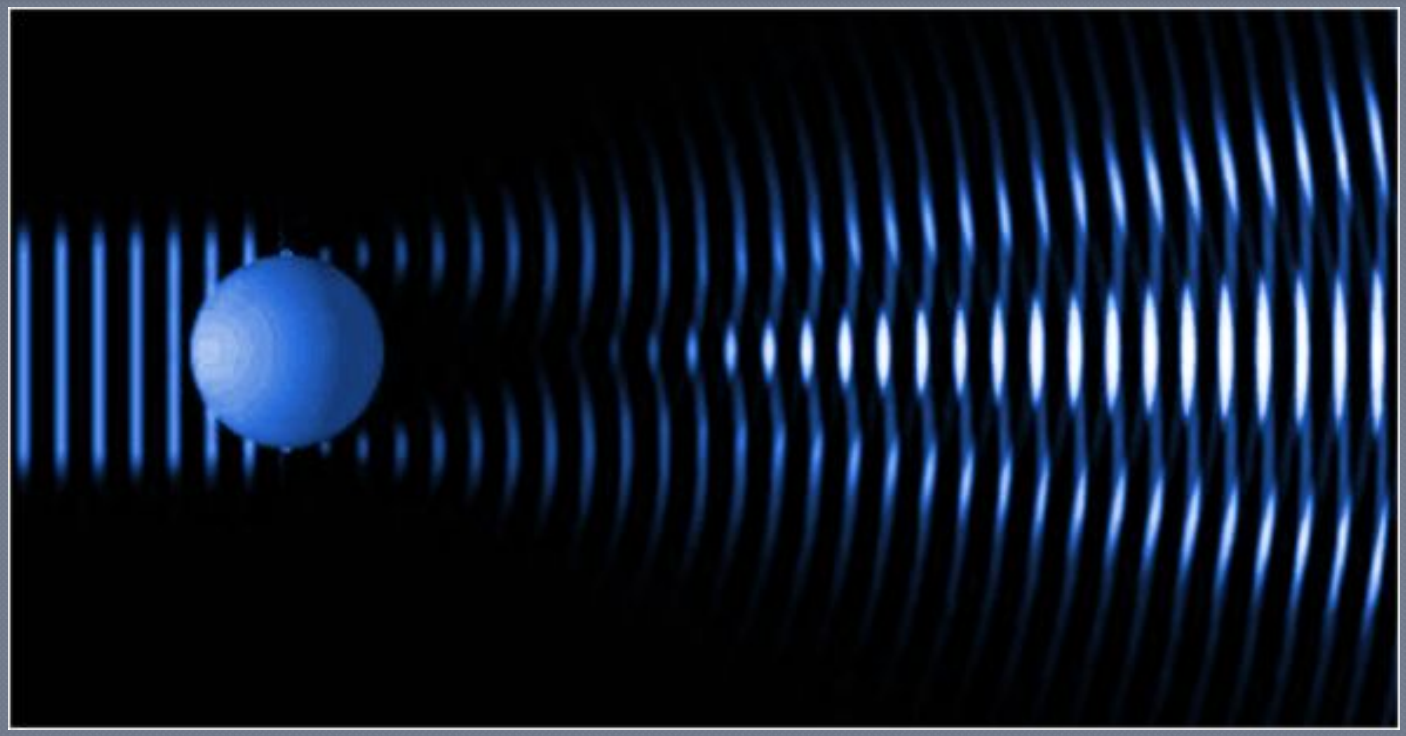
Увеличение 2К-микроскопа:
Моб*Мок

Увеличение 3К-микроскопа:
Моб*250/Fтл*Мок

Камера обскура

Пинхол-фотография

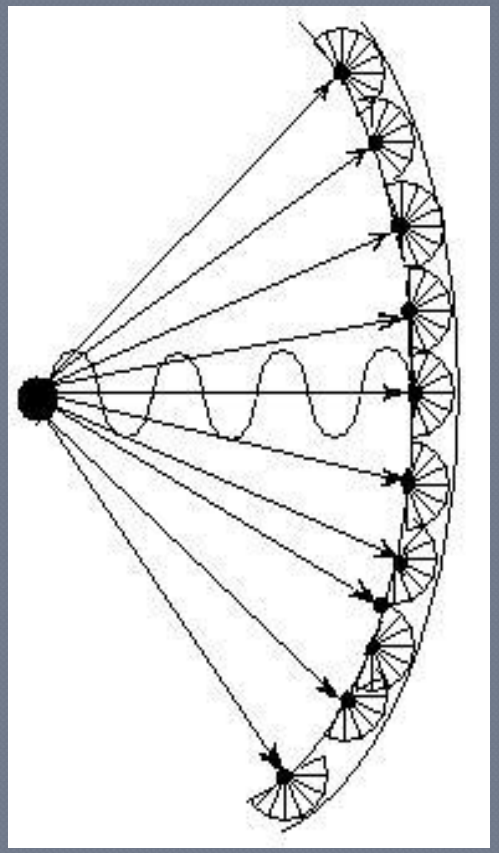
Интерференция и дифракция

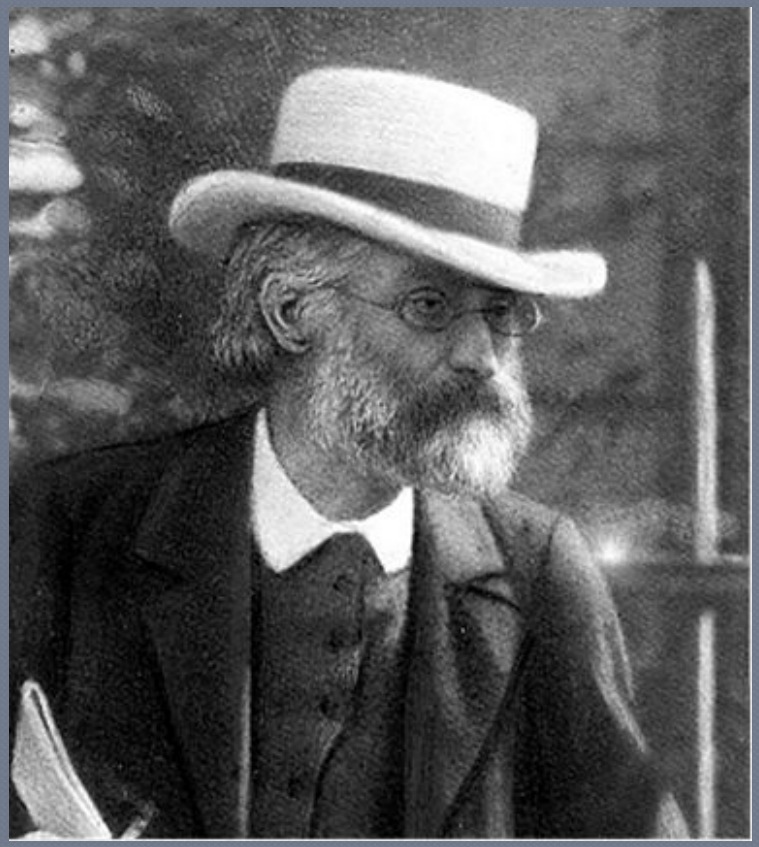


Дифракцией называется огибание волнами препятствий на их пути

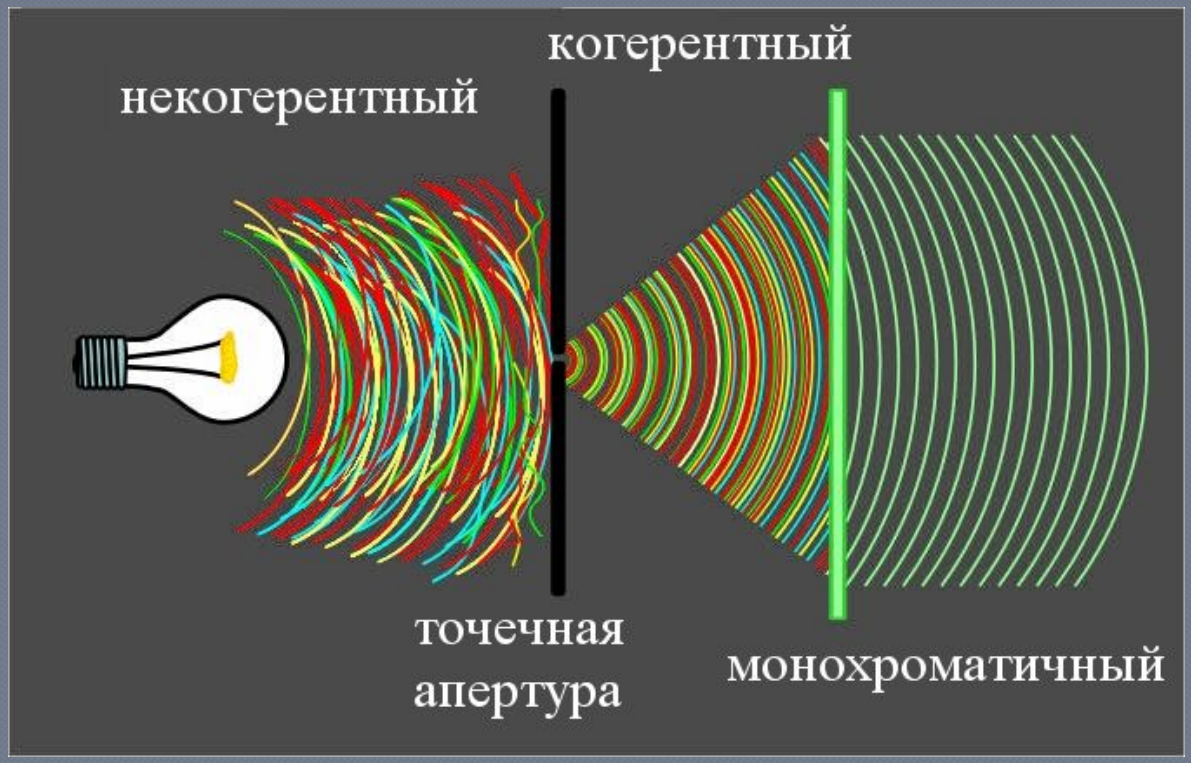
Дифракционная теория микроскопа Аббе

Принцип Гюйгенса-Френеля





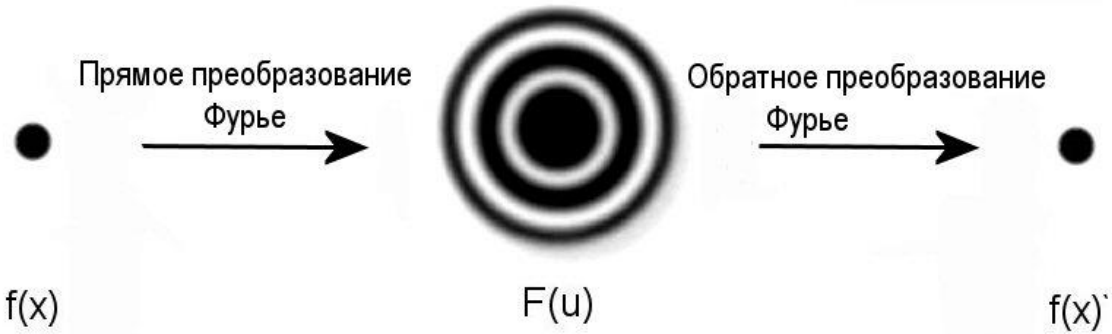
Когерентность и монохроматичность



Непременным условием интерференции волн является их когерентность – т.е. постоянство разности фаз

Теория микроскопа

Микроскоп – частично когерентный оптический процессор

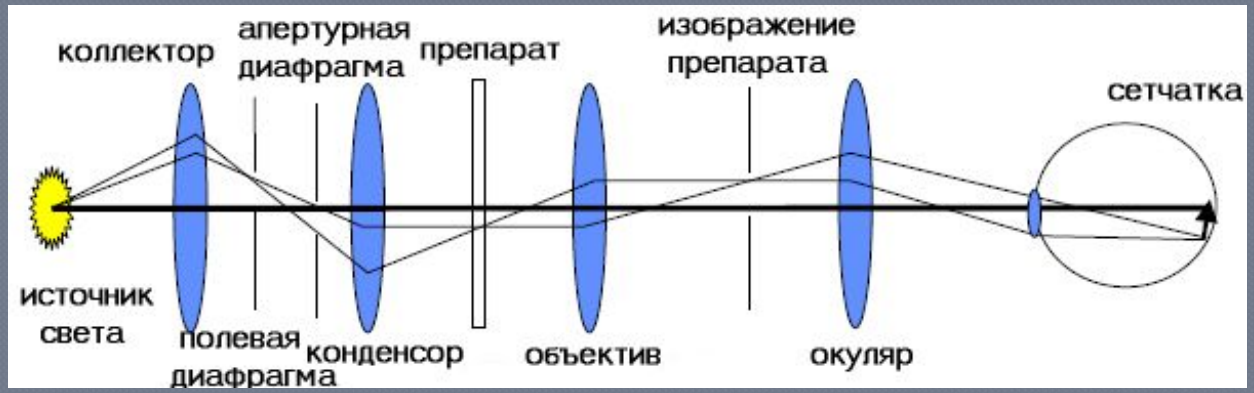


$$F(u) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)[\cos(2\pi xu) - i\sin(2\pi xu)]\,dx$$

$$f(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(u)[\cos(2\pi xu) + i\sin(2\pi xu)]\,du$$

Теория микроскопа

В микроскопе преобразование Фурье выполняют линзы, тогда как первоначально дифракционная картина формируется системой освещения



Условиями формирования дифракционной картины являются когерентность волны и ее длина, которая должна быть не более чем в два раза больше размеров микрообъекта. Для микроскопии наибольшее значение имеет закон масштаба преобразования Фурье, который гласит, что чем меньше размеры объекта, тем больше величина его дифракционной картины.

Теория микроскопа

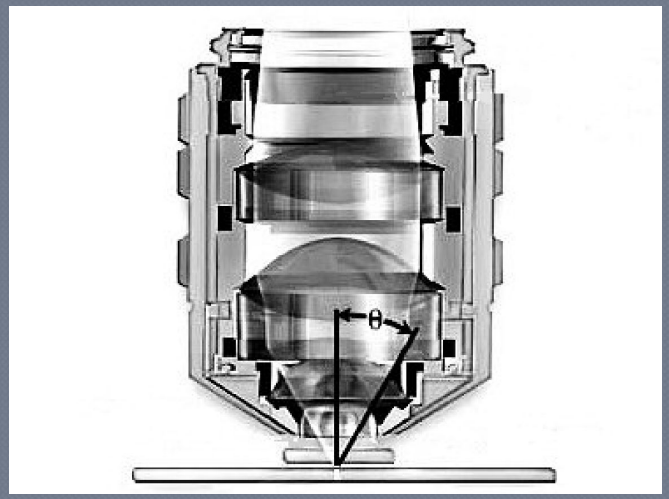
Разрешающая способность объектива

Оптическое разрешение есть минимальное расстояние между двумя точками изображения, пока они еще видны раздельно

Формула Аббе

Номинальное разрешение объектива

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n * \sin \alpha}$$



где λ – длина волны света;

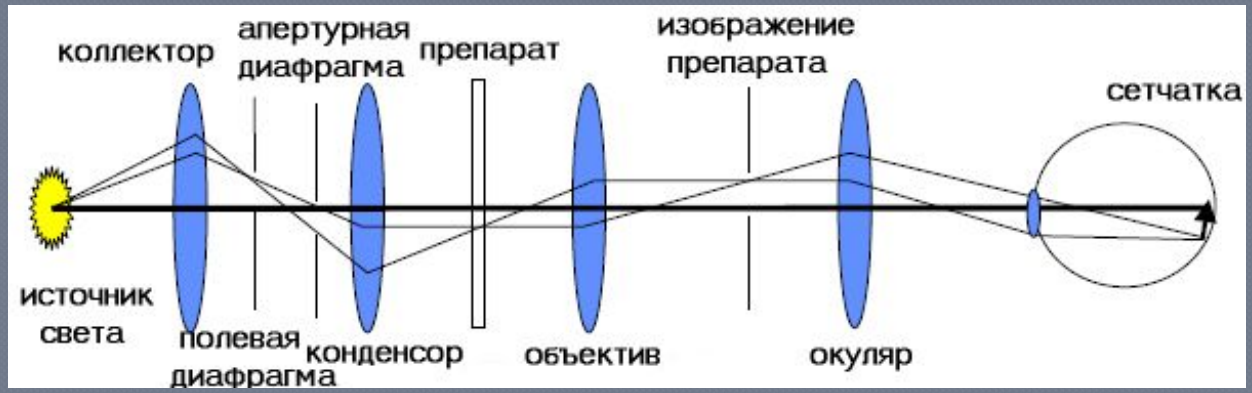
n – показатель преломления среды ;

α – половина угла раскрытия объектива

Знаменатель формулы есть численная апертура объектива NA

съемка живых клеток
плоское поле
флюоритовое
стекло
увеличение/апертура
дифференциально-
интерференционный
контраст
коррекция на
бесконечность
толщина покровного
стекла 0 или 0.19-0.15 мм
настройка на толщину
покровного стекла
выбор типа иммерсии
ZEISS
LCI Plan- NEOFLUAR
63x /1,3 DIC Imm Korr
∞/0,19-0,15
Glyc
W

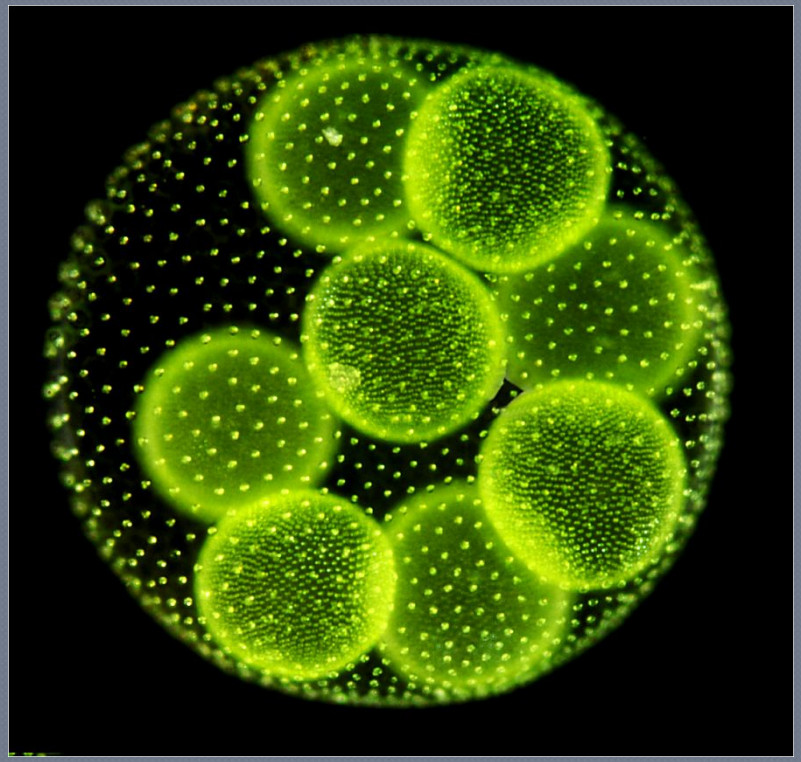
Настройка микроскопа по Кёлеру



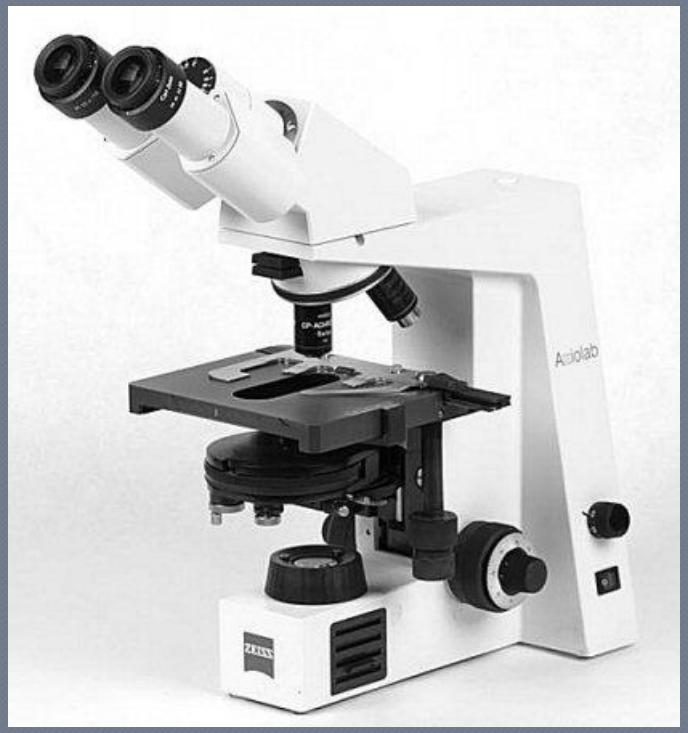
- определить положение полевой и апертурной диафрагмы. Установить объектив с малым увеличением (но не менее 8х).
- Полностью открыть обе диафрагмы. Установить на контрастный препарат и сфокусироваться на него.
- Закрыть полевую диафрагму и, передвигая конденсор по высоте, добиться ее резкого изображения.
- Открыть полевую диафрагму до границы поля зрения.
- Вынуть окуляр и совместить апертурную диафрагму в конденсоре с входным отверстием объектива. Вернуть окуляр на место.

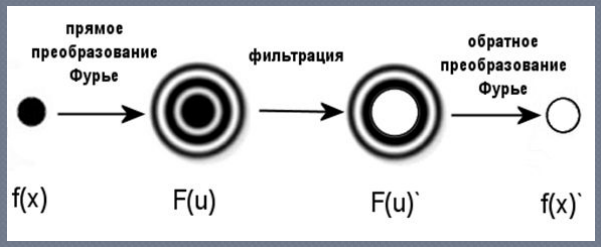
Метод светлого поля: 3D-фото *Vinca rosea*

Метод тёмного поля



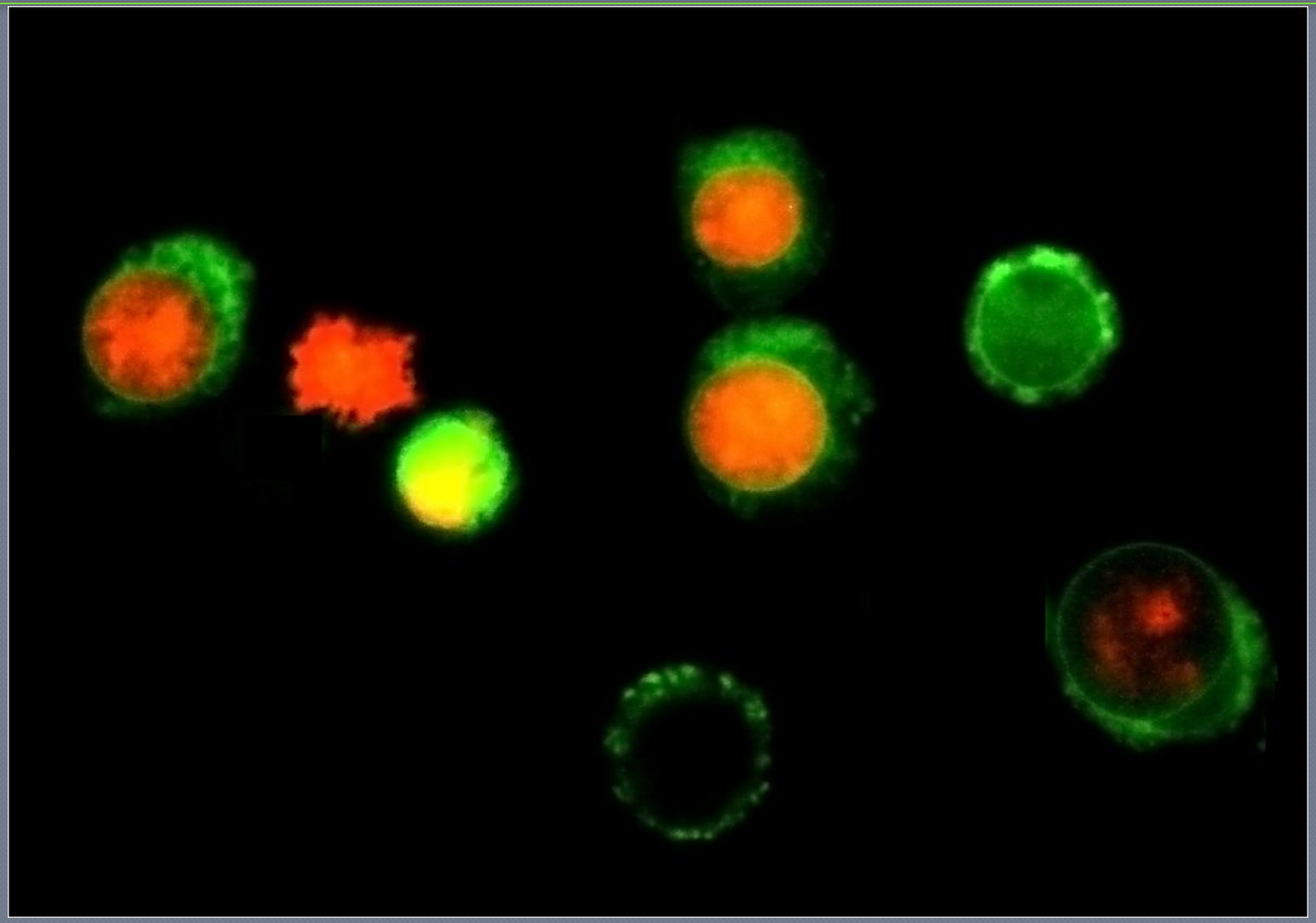
Volvox aureus





Флуоресцентная микроскопия

Katsumi 1 : R123+EB



Флуоресцентная микроскопия

Квантовая механика флуоресценции

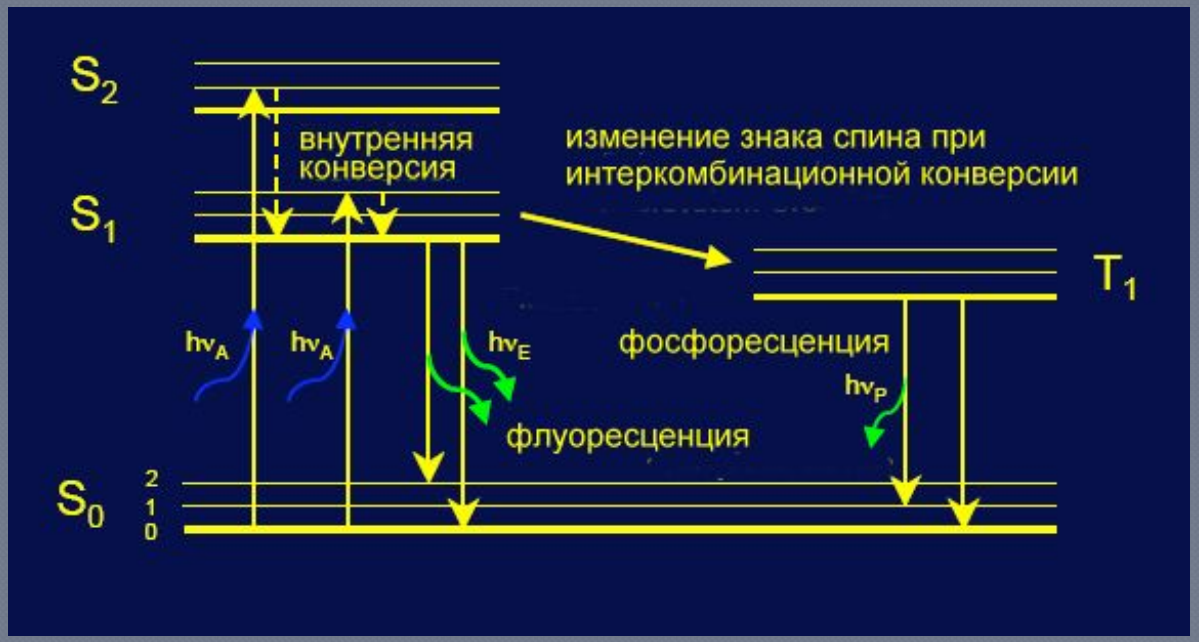


Диаграмма Яблонского

S0 – основной энергетический уровень молекулы;

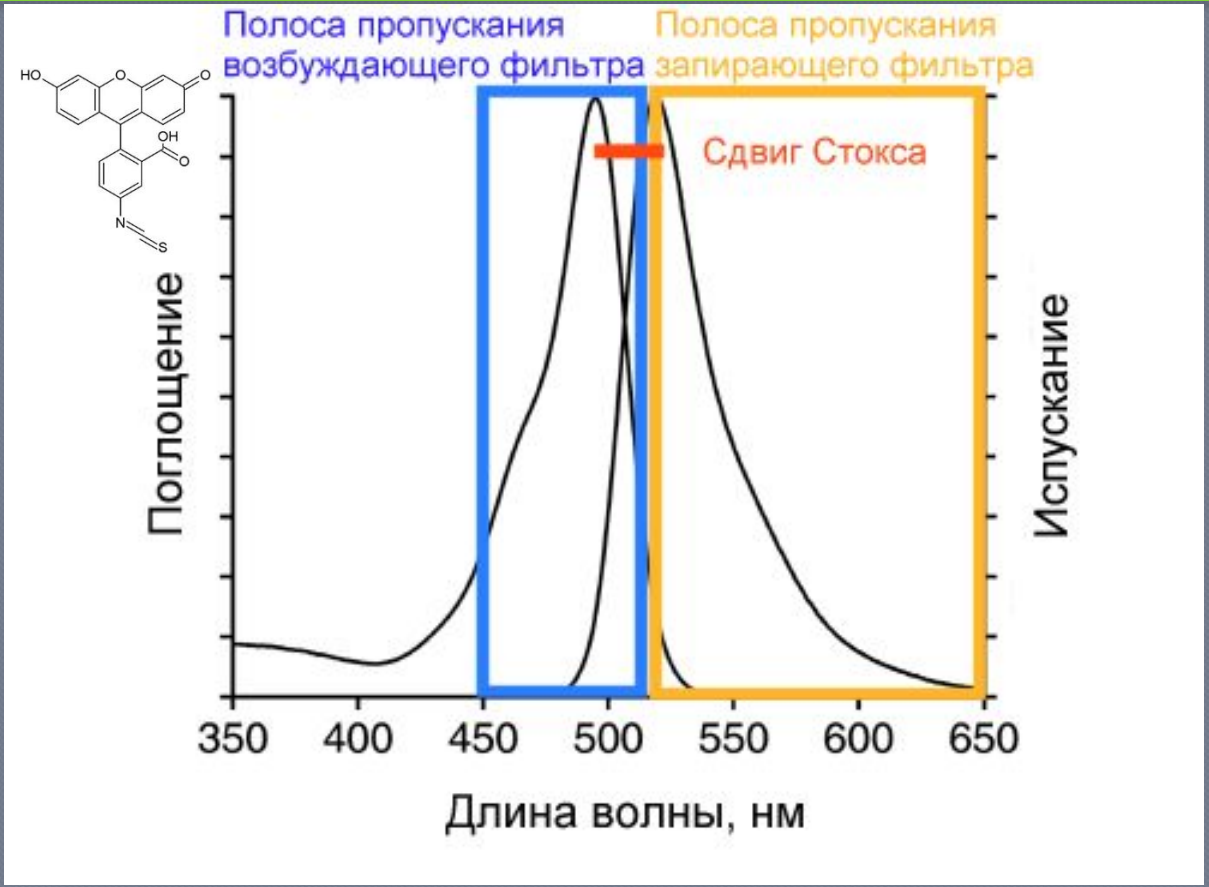
S1 – излучательный энергетический уровень возбужденного состояния;

S2 – безызлучательный энергетический уровень возбужденного состояния;

T1 – триплетный уровень

Флуоресцентная микроскопия

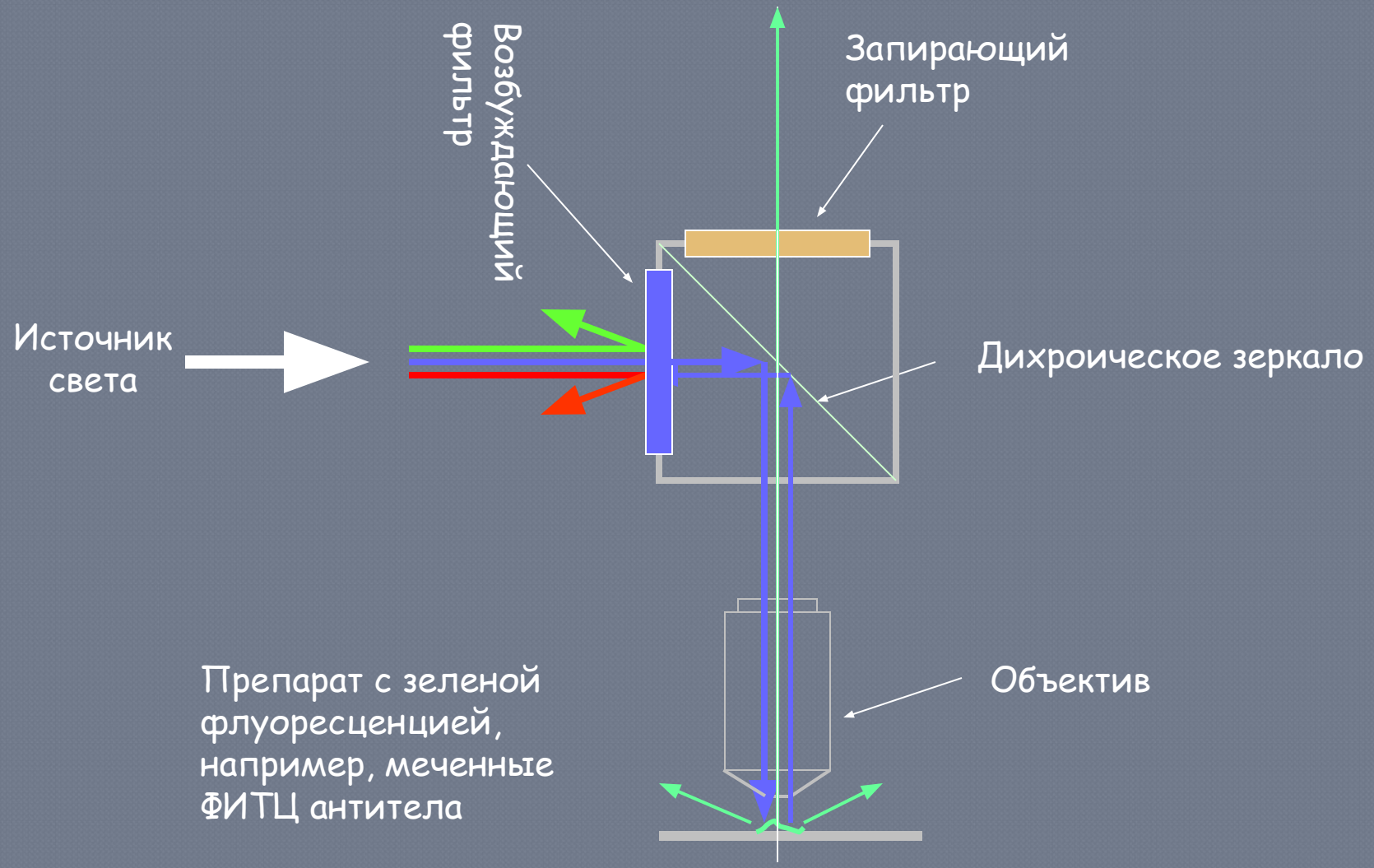
Спектры поглощения и излучения флуорохрома



Спектры возбуждения и испускания FITC (флуоресцеин-изотиоцианата)

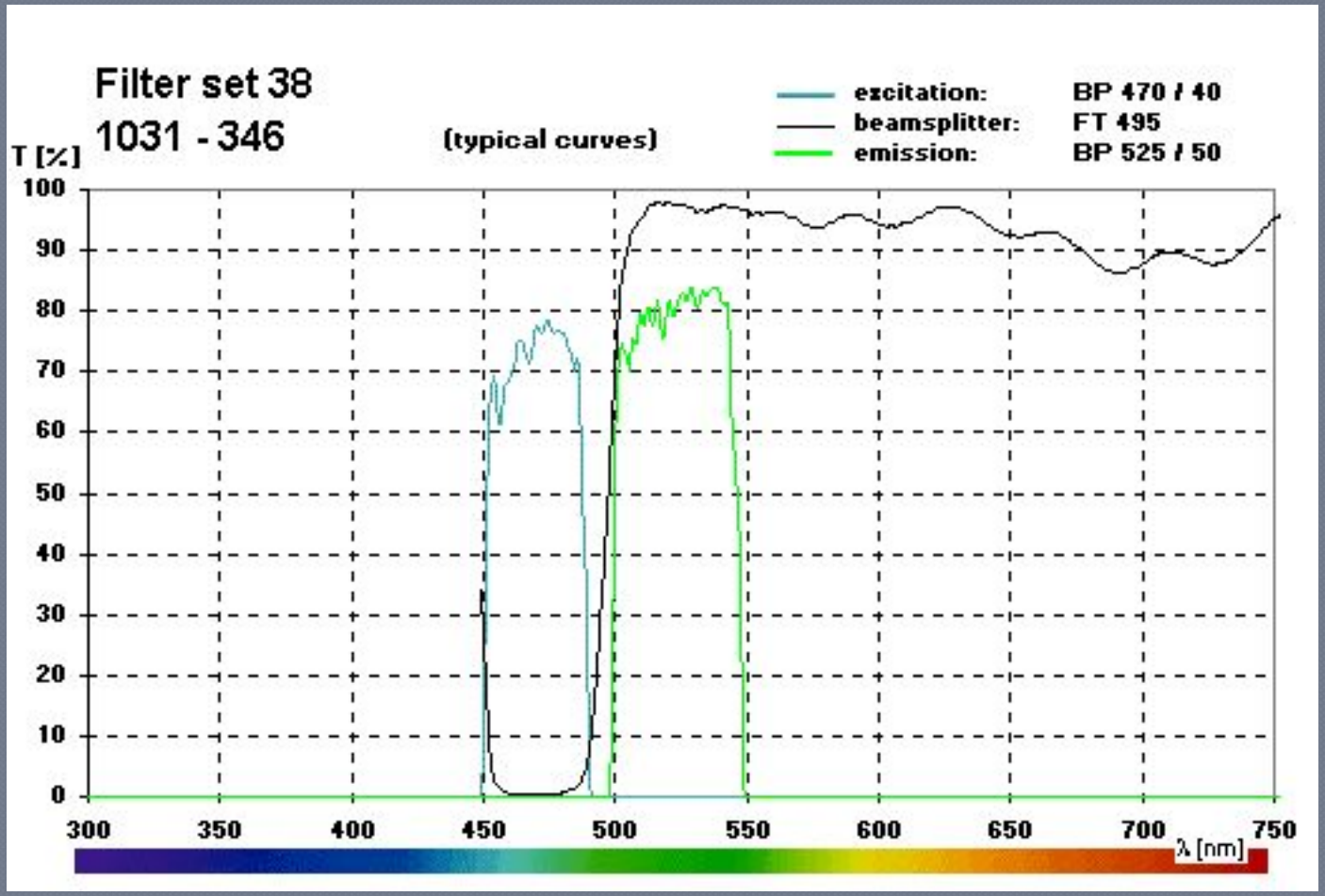
Флуоресцентная микроскопия

Эпифлуоресцентная схема Брумберга и Крыловой



Флуоресцентная микроскопия

Наборы фильтров для флуорохромов



Набор фильтров для FITC

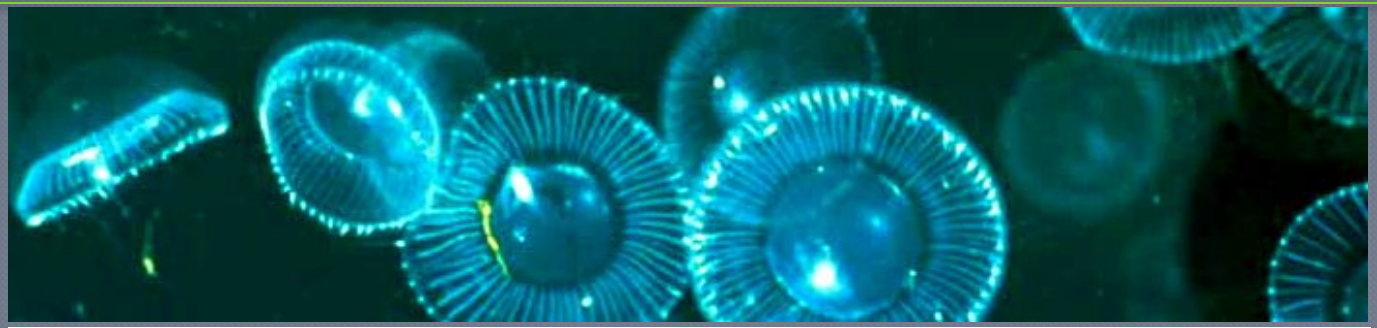
Флуоресцентная микроскопия

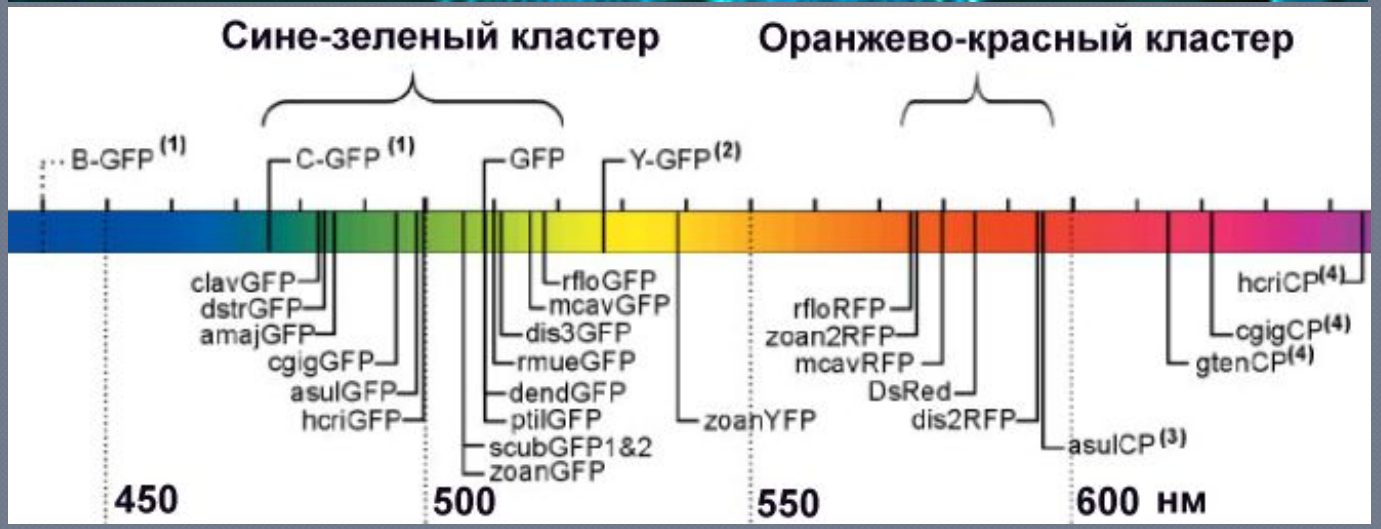
Фотофизические свойства флуорохромов

Флуорохром	Excitation, λmax, nm	Emission λmax, nm	Extinction, $M^{-1}cm^{-1}$	QY	Bright-ness	Мишень
FITC	490	525	90000	0.35	31.50	антитела
TRITC	540	580	67000	0.35	23.45	антитела
Alexa Fluor 488	495	519	71000	0.94	66.70	антитела
Alexa Fluor 532	532	553	81000	0.80	64.80	антитела
Acridine Orange	490	530/640	27000	0.20	5.40	ДНК/РНК
Ethidium Bromide	510	595	27000	0.35	9.45	ДНК
Propidium Iodide	536	617	27000	0.12	3.24	ДНК
7-AAD	555	565	25000	0.07	1.75	ДНК
DAPI	359	461	24000	0.34	9.18	ДНК
Hoechst 33342	352	461	45000	0.38	17.48	ДНК
Hoechst 33258	365	480	40000	0.42	19.32	ДНК
GFP	475	510	30000	0.80	24.00	белки
QD 605	350-450	605	1450000	0.40	580.0	любая

Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцирующие белки вместо флуорохромов

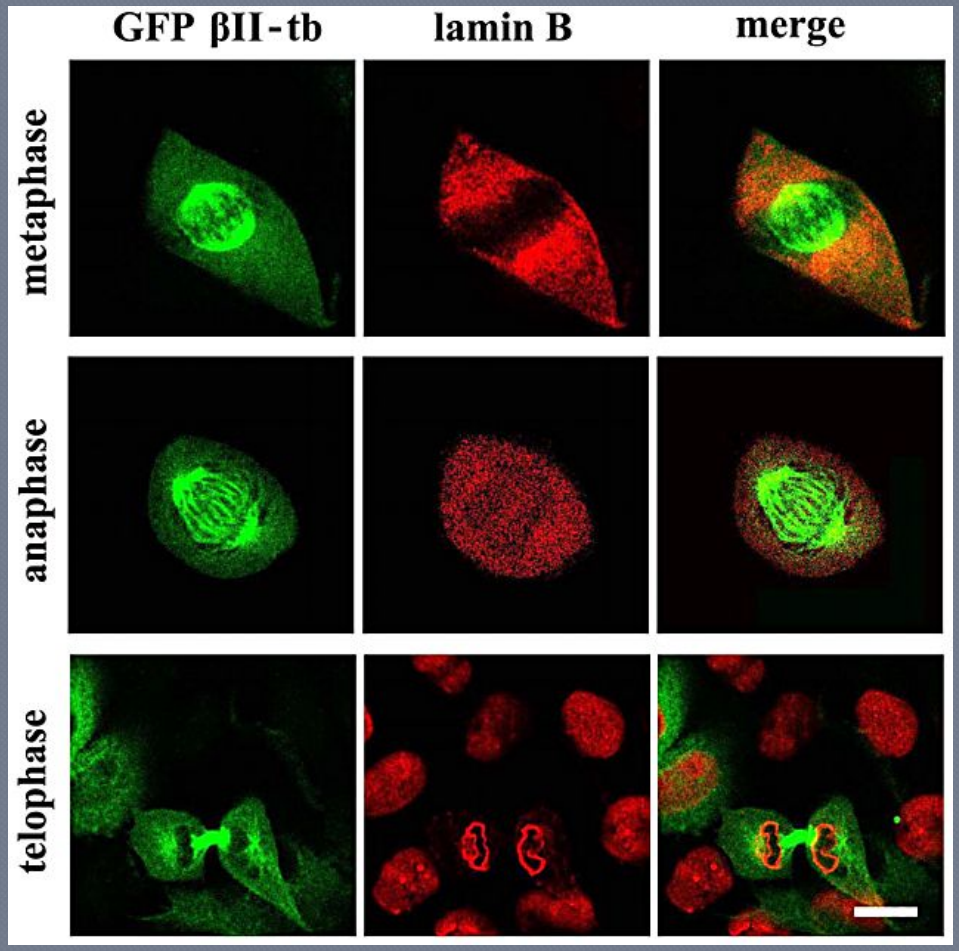




Медуза *Aequorea victoria*, из которой был выделен GFP.
Распределение флуоресцирующих белков по спектру.

Флуоресцентная микроскопия

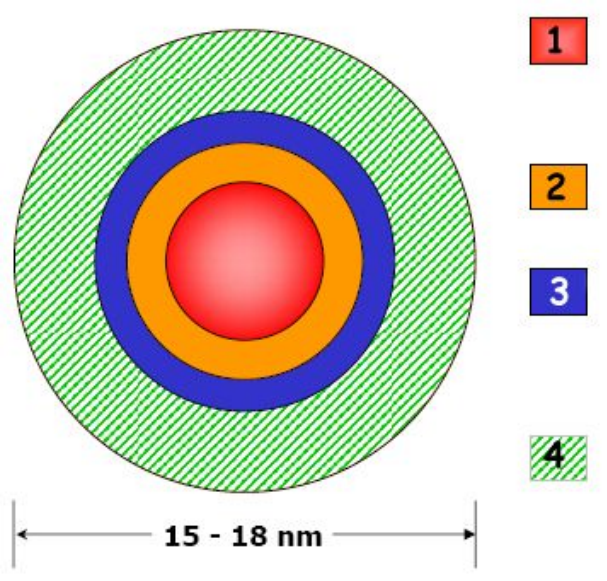
Применение флуоресцирующих белков

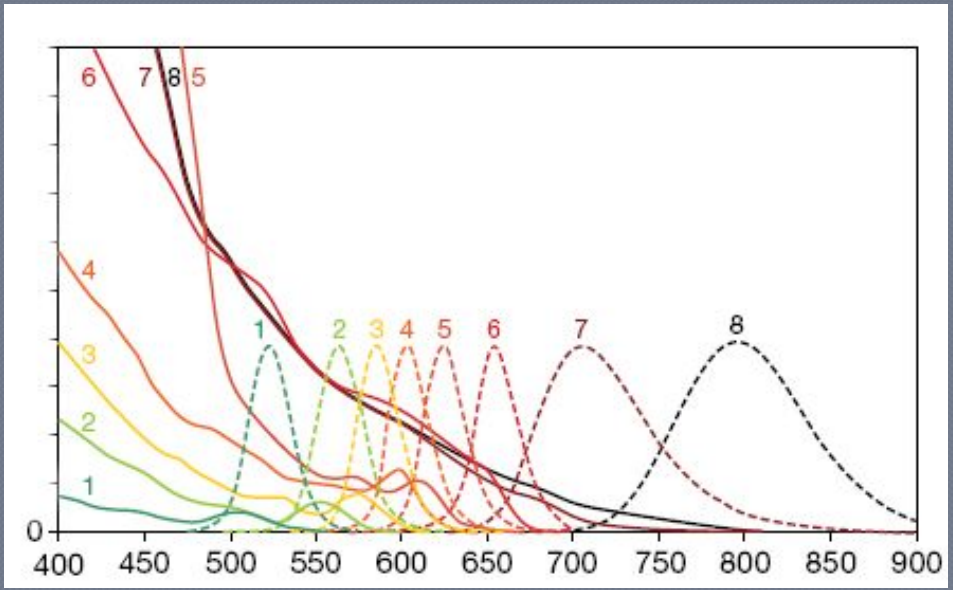


С помощью флуоресцирующих белков можно метить гены

Флуоресцентная микроскопия

Новый тип флуорохрома -– квантовые точки

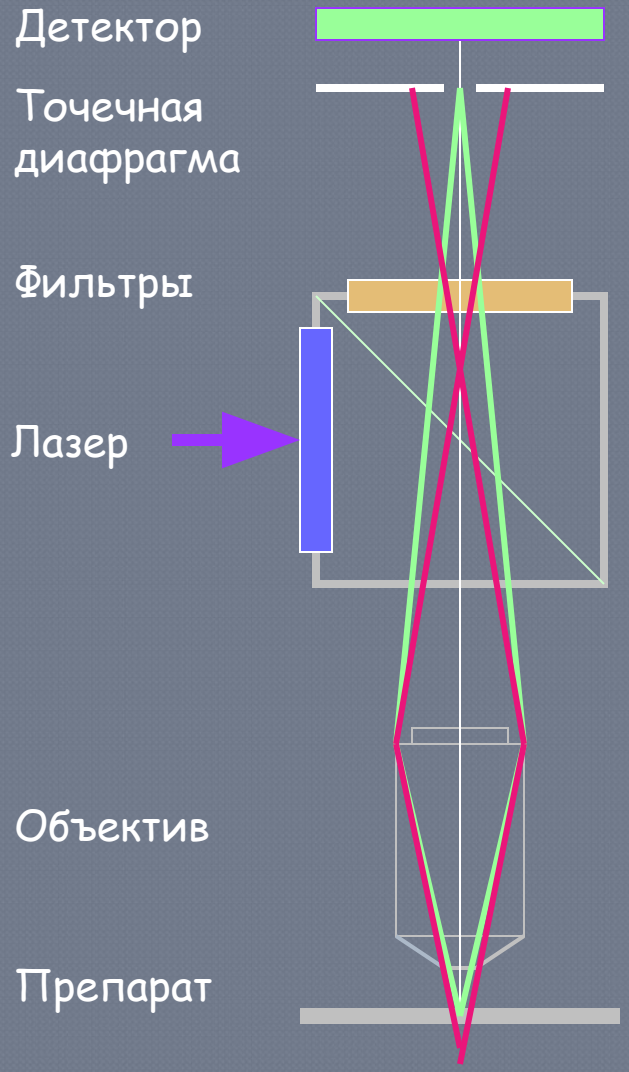


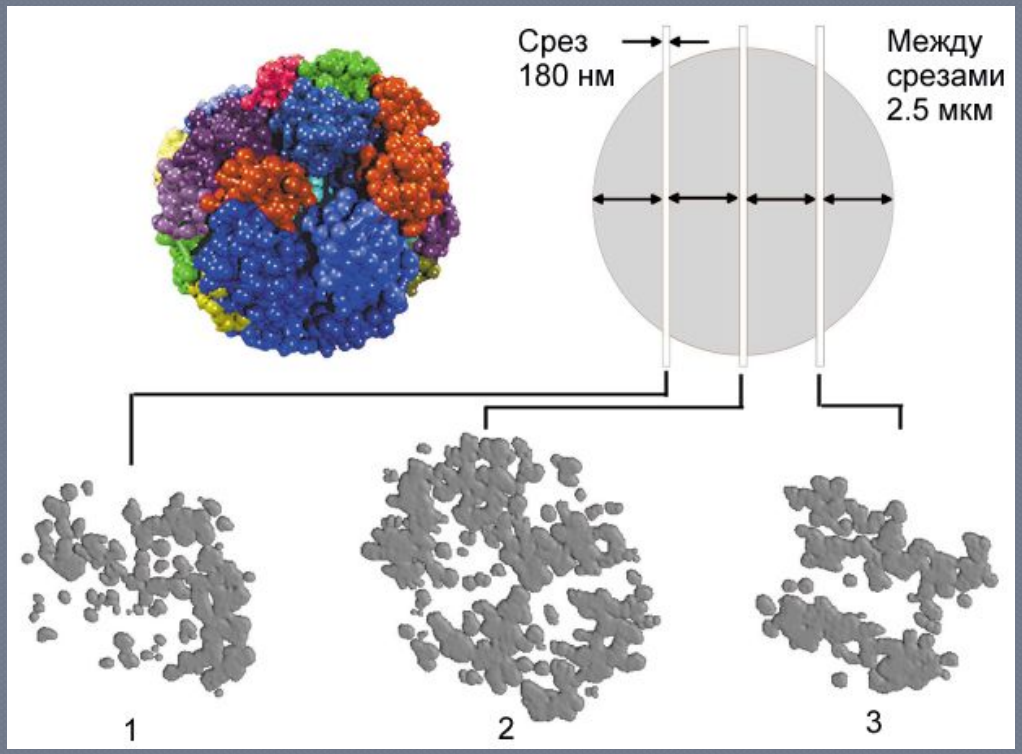


Структура квантовой точки: 1 – нанокристалл CdSe, который определяет цвет; 2 – слой ZnS для усиления яркости и стабильности; 3 – органический слой для растворимости в воде и конъюгации; 4 – слой биомолекул (антител, лигандов и рецепторов, олигонуклеотидов. Спектры поглощения и испускания QD. Главное преимущество QD – устойчивость к фотовыцветанию.

Конфокальная микроскопия

Как получить оптические срезы для 3D реконструкции





Трехмерная реконструкция клеточного ядра, на которой видно, что каждая хромосома занимает свою территорию (G.Kreth et al., 2000)

Световая микроскопия высокого разрешения

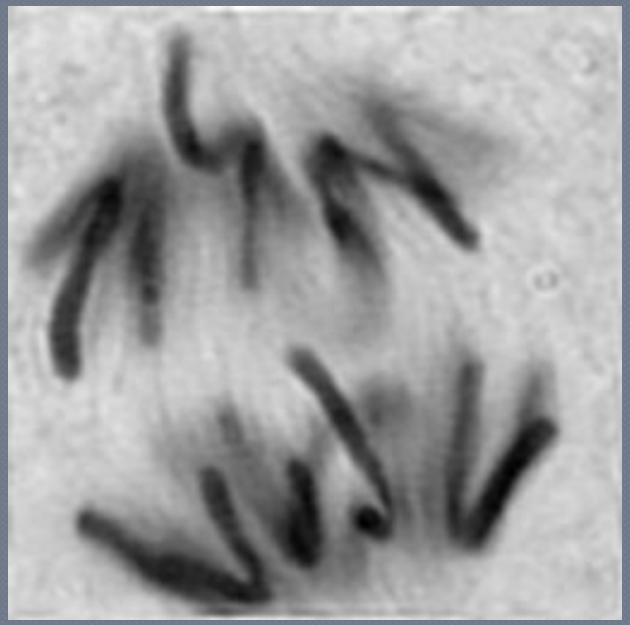
Обзор методов

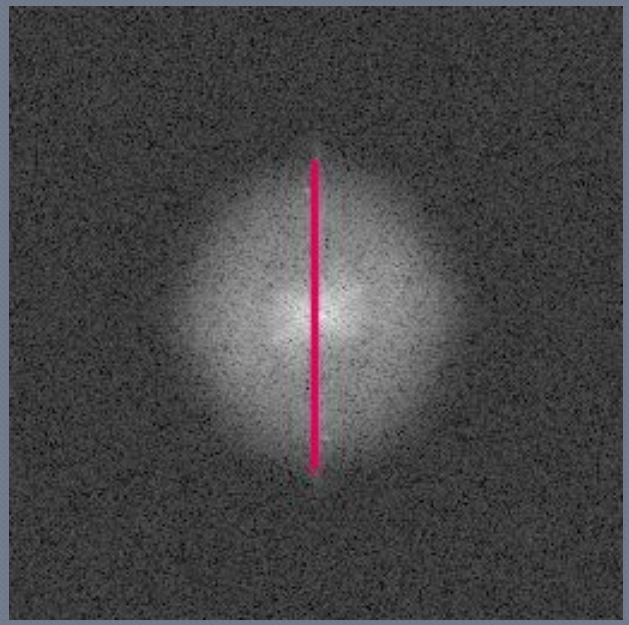
Акроним	*Полное название*	*Время разработки*	*Достигнутое разрешение*
STED	Stimulation Emission Depletion Microscopy	1994 - 1999	75 нм
GSD	Ground State Depletion	1995 - 2006	10 нм
SIM	Structured Illumination Microscopy	2002 - 2005	85 нм
RESOLFT	Reversible Saturable Optically Linear Fluorescence Transitions	2003 - 2005	50 нм
PALM	Photoactivated Localization Microscopy	2006 - 2010	20 - 50 нм
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy	2006 - 2008	20 – 30 нм

Теория микроскопа

Фактическое разрешение объектива

Чтобы измерить разрешение объектива, надо сделать снимок препарата и выполнить преобразование Фурье (например, с помощью программы ImageJ)

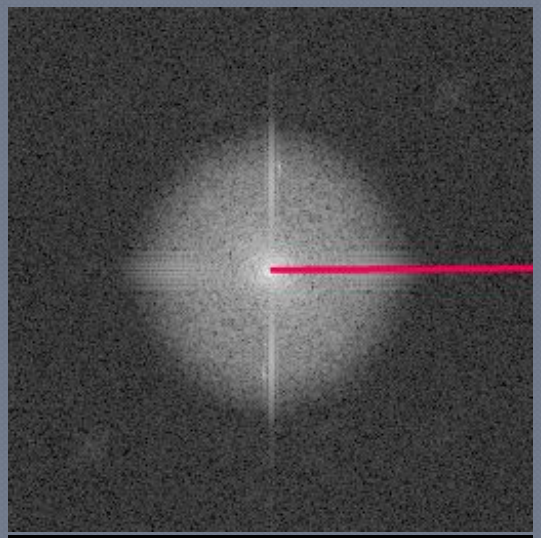


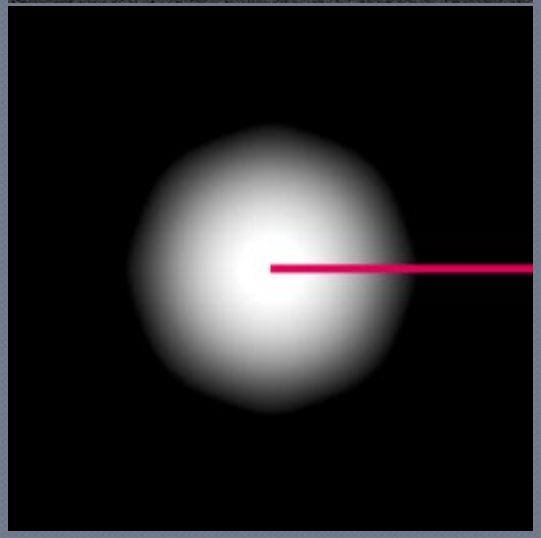


На Фурье-образе мы видим полосу пропускания микроскопа (OTF). По ней можно определить долю полезного сигнала (SNR, отношение “сигнал / шум”). Чтобы узнать реальное разрешение объектива, надо физический размер пикселя камеры , разделить на произведение увеличения объектива и SNR : Resolution = PixelSize / (ObjectiveMagnufication x SNR)

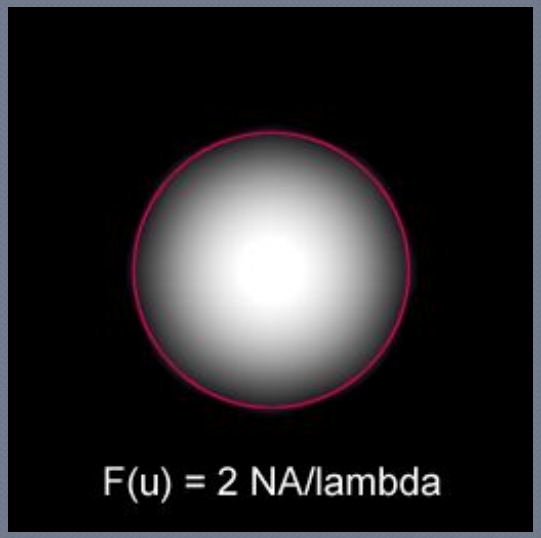
Теория микроскопа

Функция передачи контраста - MTF

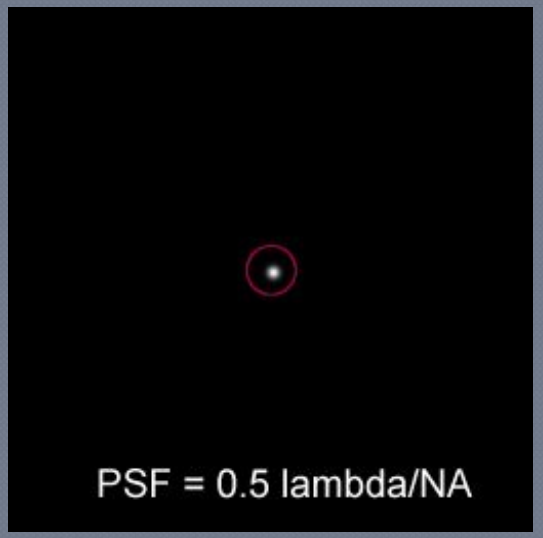




Световая микроскопия высокого разрешения



Преобразование Фурье



Функция передачи контраста - MTF

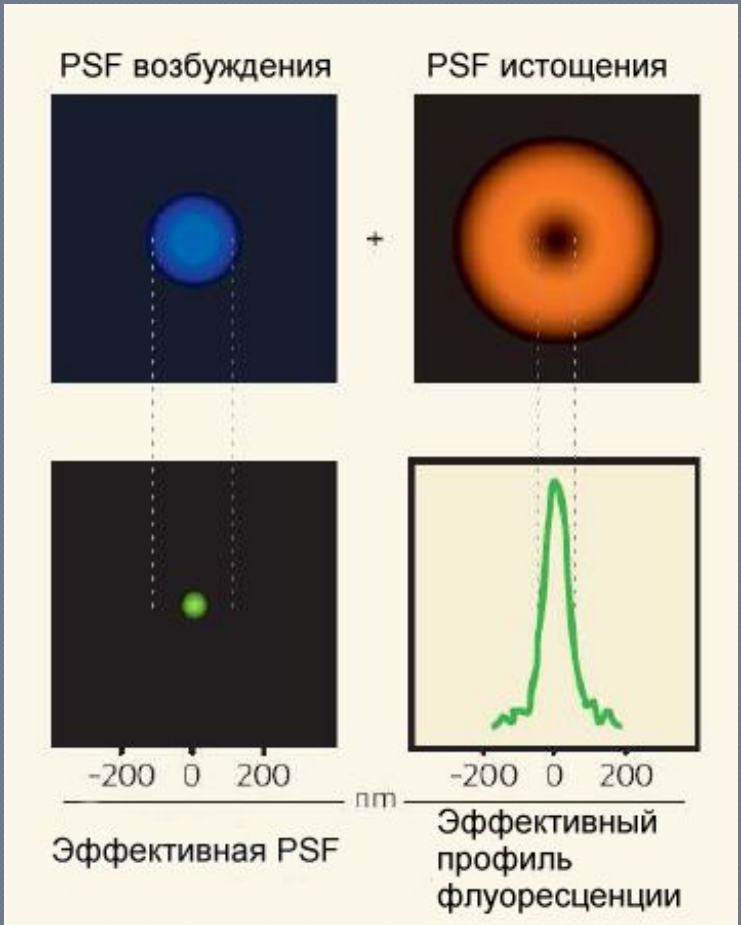
ция рассеяния точки - PSF

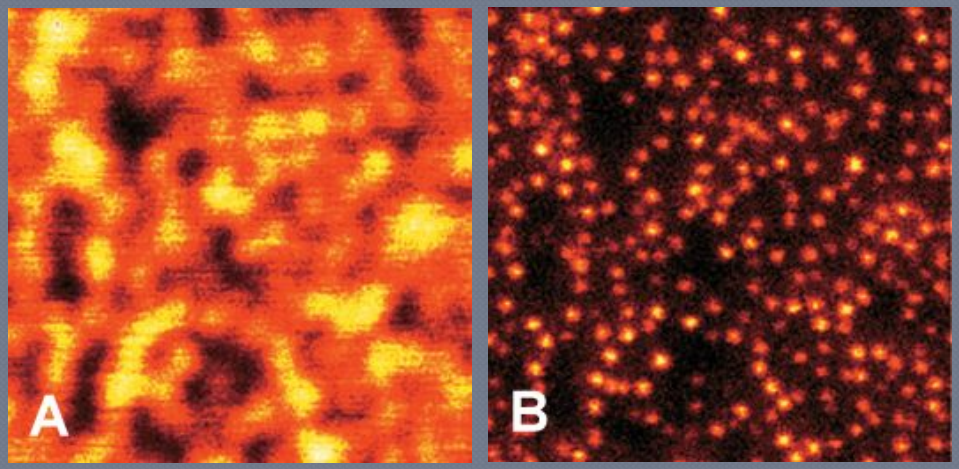
Функция рассеяния точки (PSF)

и является мерой разрешения микроскопа

Световая микроскопия высокого разрешения

Метод Stimulation Emission Depletion - STED



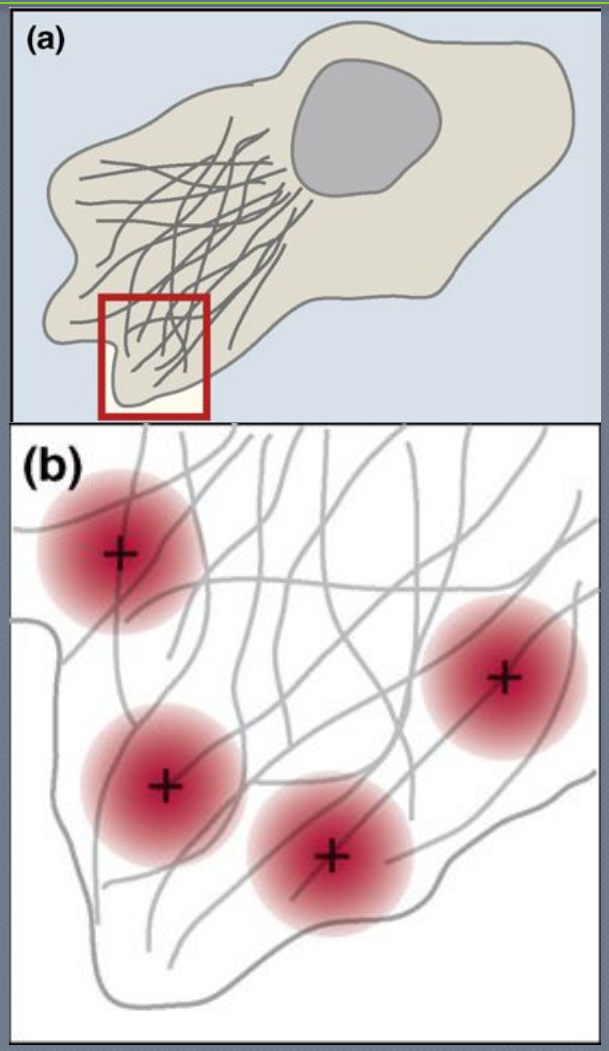


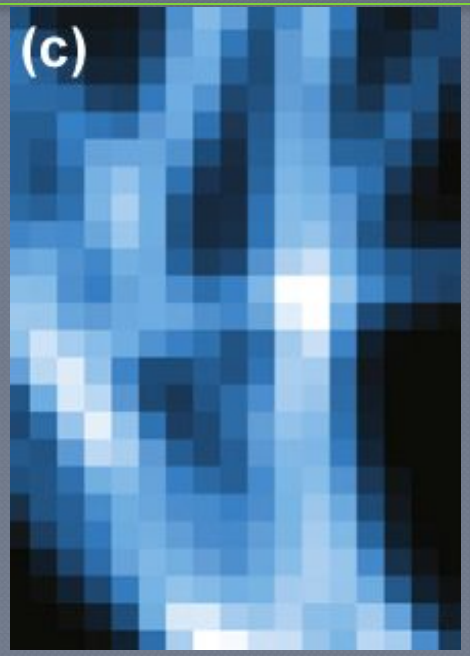
Изображения флуоресцирующих бус диамером 75 нм, полученные в конфокальном микроскопе (A) и методом STED (B) [S. W. Hell et al., 2005]

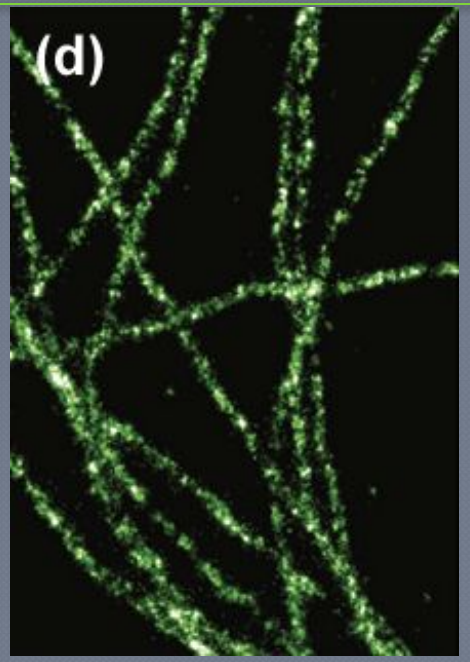
Принцип метода основан на инициациии преждевременной флуоресценции вторым лазером, луч которого имеет форму тора

Световая микроскопия высокого разрешения

Метод Photoactivated Localization Microscopy - PALM







Метод основан на том, что координаты центра флуоресцирующей молекулы можно определить с точностью s / sqrt(N), где s – st. dev. PSF, а N – число регистрируемых фотонов (G.Shtengel et al., 2008).

За разработку методов управления PSF светового микроскопа, что позволило преодолеть предел Аббе, **Нобелевская премия по химии за 2014 г**. была присуждена **Эрику Бетцигу**, **Стефану Хеллю** и **Уильяму Мёрнеру**

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ