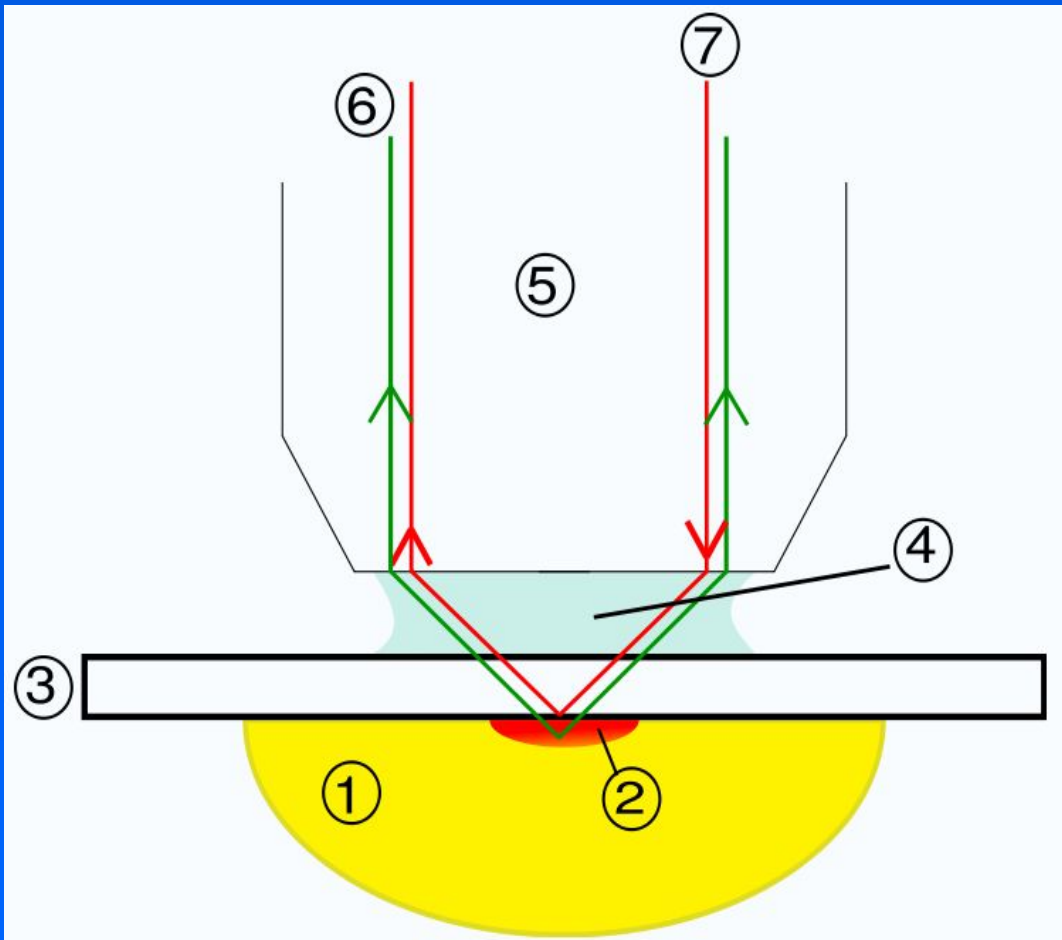


Лекция 6

TIRF, FRET

Микроскопия одиночных молекул

Флуоресценция в условиях полного внутреннего отражения (TIRF)



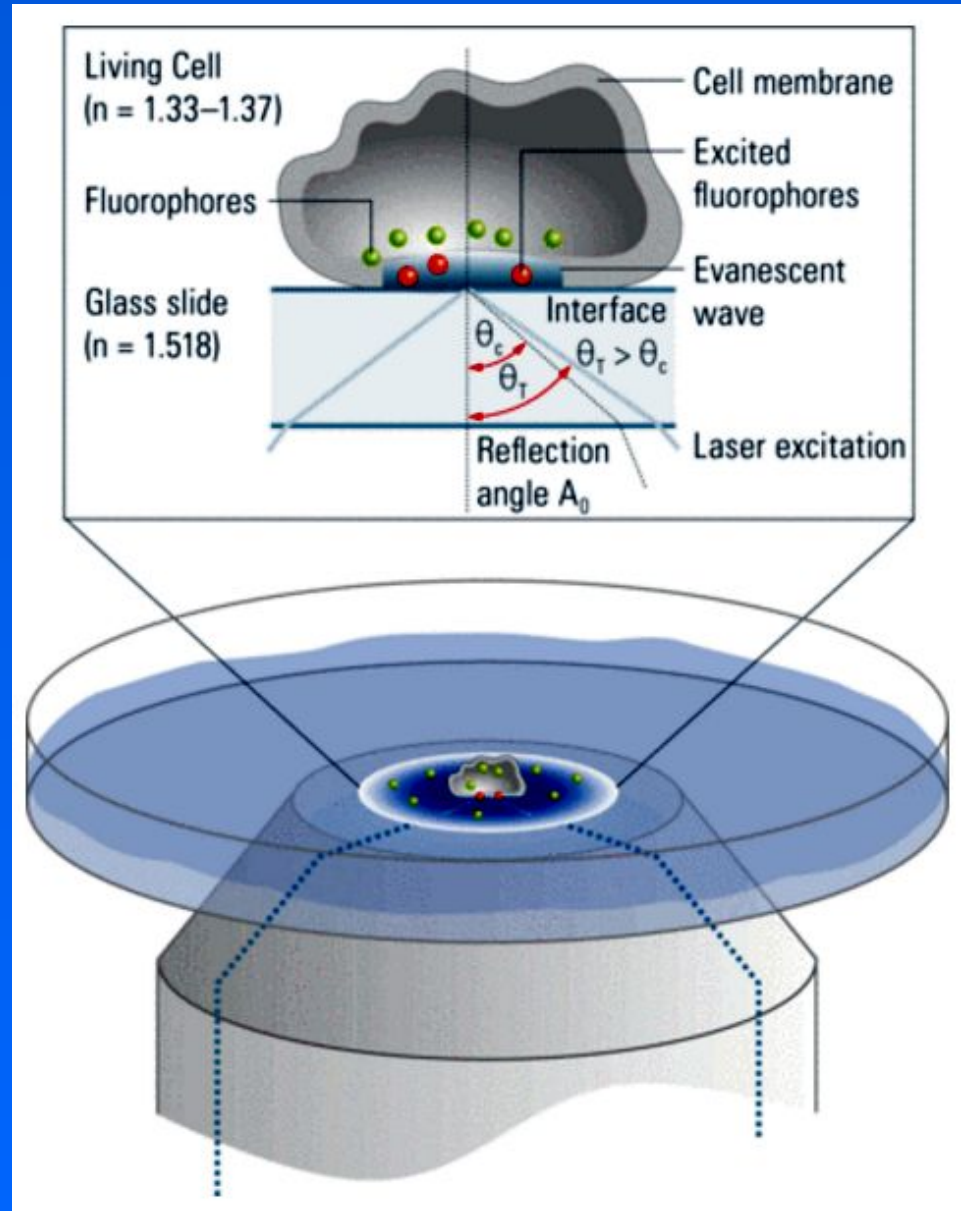
- 1 – объект в водной среде
- 2 – затухающая волна
- 3 – покровное стекло
- 4 – иммерсионное масло
- 5 – объектив с $NA > 1.4$
- 6 – свет флуоресценции
- 7 – возбуждающий свет

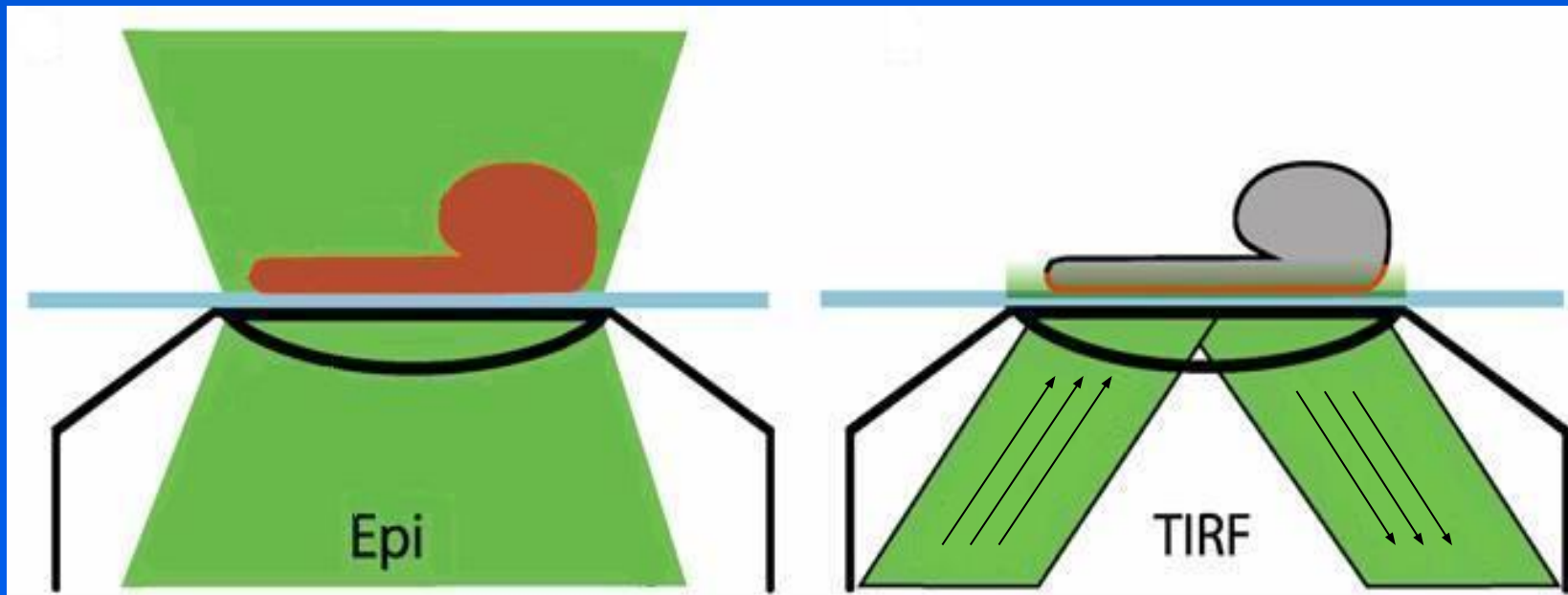
Принцип TIRF микроскопии

Критический угол:

$$\theta = \arcsin(n_1/n_2),$$

где n_1 – показатель преломления среды,
 среды,
 n_2 – показатель преломления иммерсии





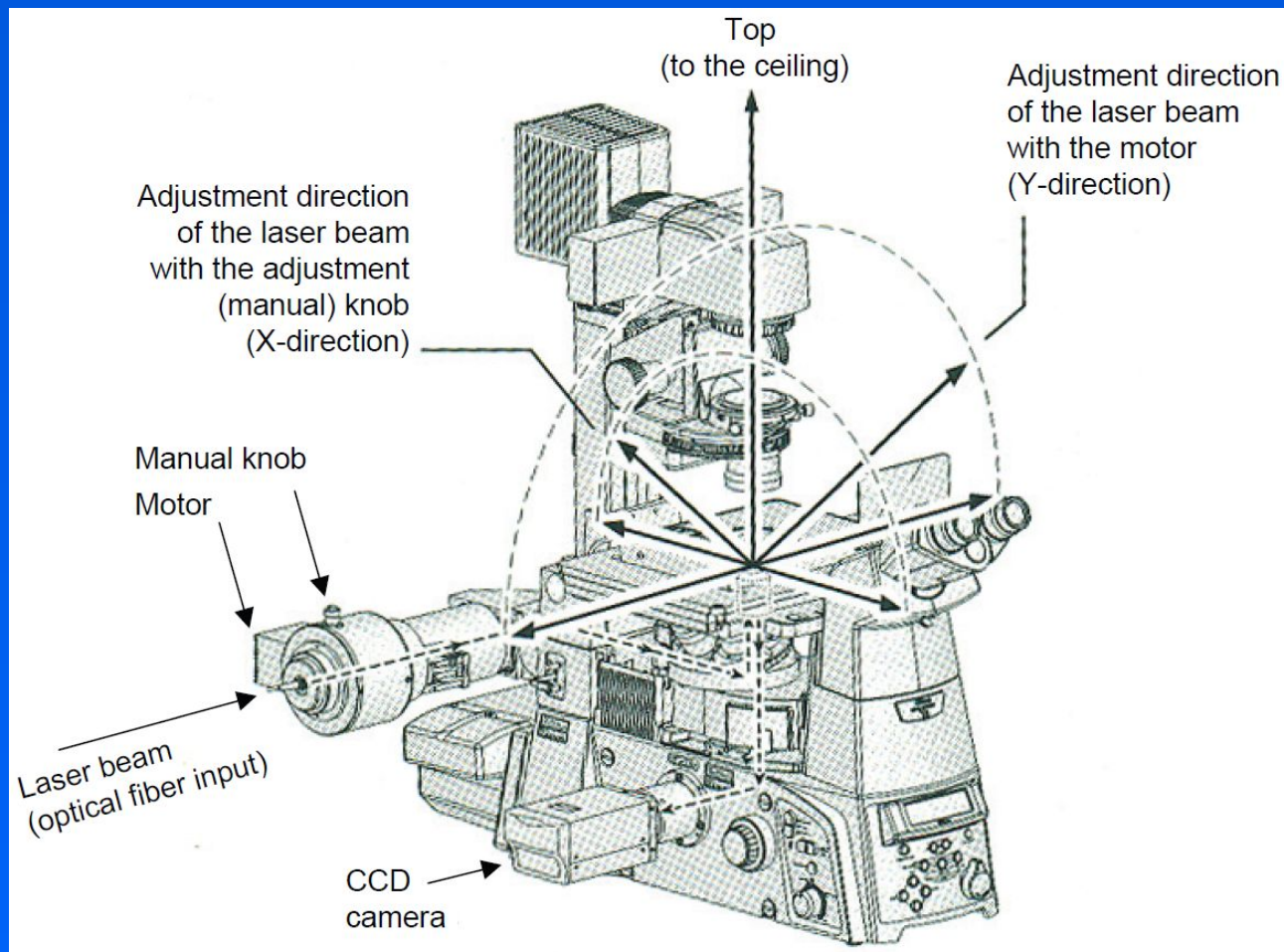
Для реализации метода TIRF требуются:

масляно иммерсионный объектив с большой числовой апертурой ($NA > 1,45$, желательно $NA > 1,48$)

система ввода наклонного лазерного пучка в микроскоп, позволяющая регулировать угол освещения объектива

Многие объективы для TIRF имеют систему коррекции для наблюдений при 37°C (т.к. изменяется при нагревании показатель преломления иммерсионного масла)

TIRF микроскоп – установка света



Установка света производится вручную или с помощью моторизованной системы сдвигом лазерного пучка относительно оптической оси объектива микроскопа. Контроль – по положению пятна на потолке или визуальный.

TIRF

При полном внутреннем отражении в среде, куда не проходит луч света, возникает затухающая волна (evanescent wave).

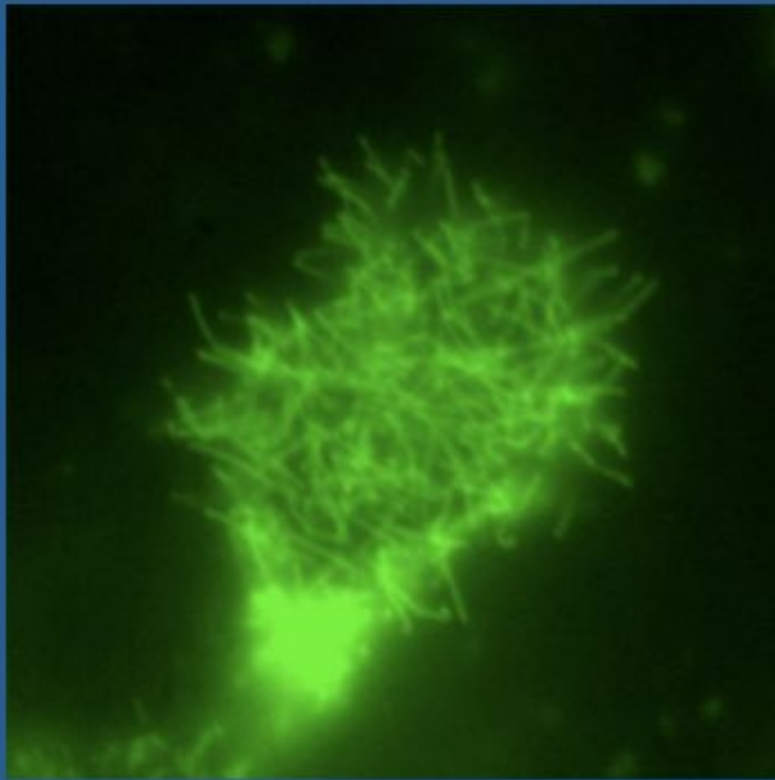
В результате возбуждение флуоресценции происходит на глубину от 60 до 100 нм (слабое возбуждение происходит на глубину до 150-200 нм).

Световая энергия не проникает глубоко внутрь клетки – поэтому возможно использование мощного лазера.

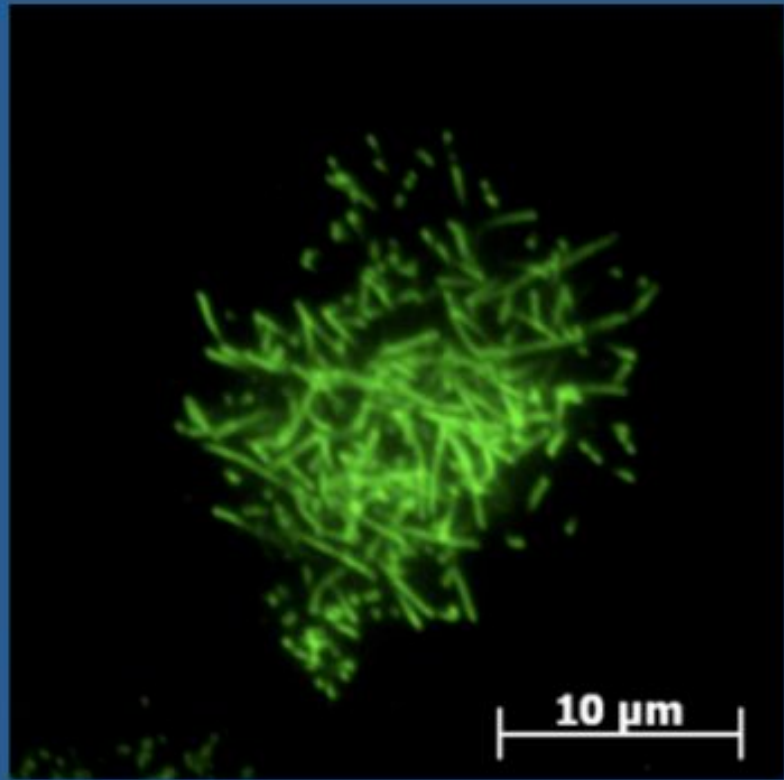
Эффективность возбуждения с помощью затухающей волны определяется разностью между показателем преломления среды ($n \sim 1,34$) и апертурой объектива ($NA > 1,40$), а также настройкой угла падения лазерного пучка.

Специальные объективы для TIRF (только масляная иммерсия) имеют увеличение $\times 60$ или $\times 100$ и числовую апертуру 1,45-1,57. Для регулируемого ввода лазерного пучка в микроскоп необходим дополнительный порт (помимо стандартного эпифосвещения) и дихроичное зеркало в ходе лучей.

Сравнение обычной и TIRF микроскопии



Cell viewed with
epi-fluorescence

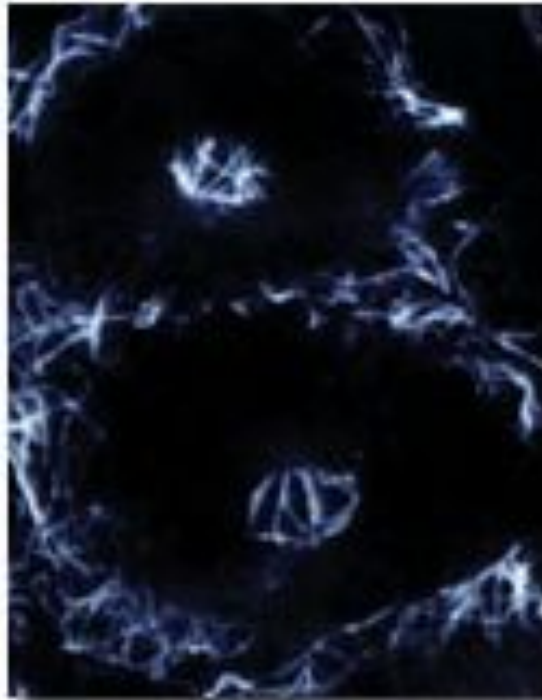


Cell viewed with
TIR-FM

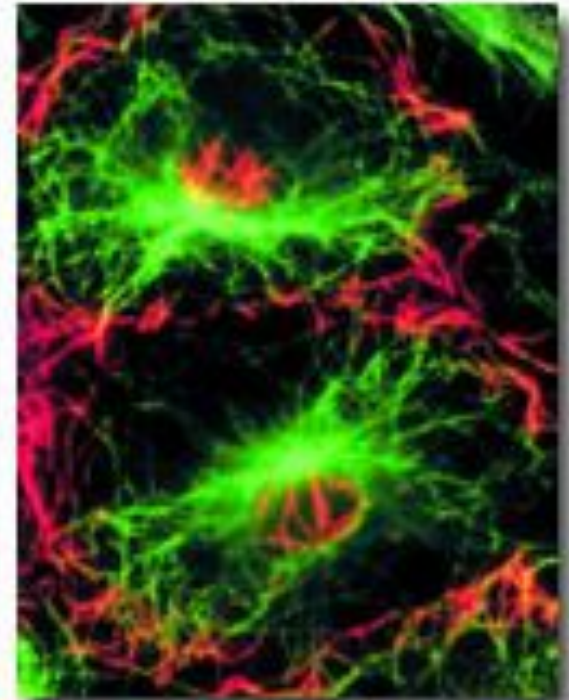
TIRF микроскопия микротрубочек



(a)



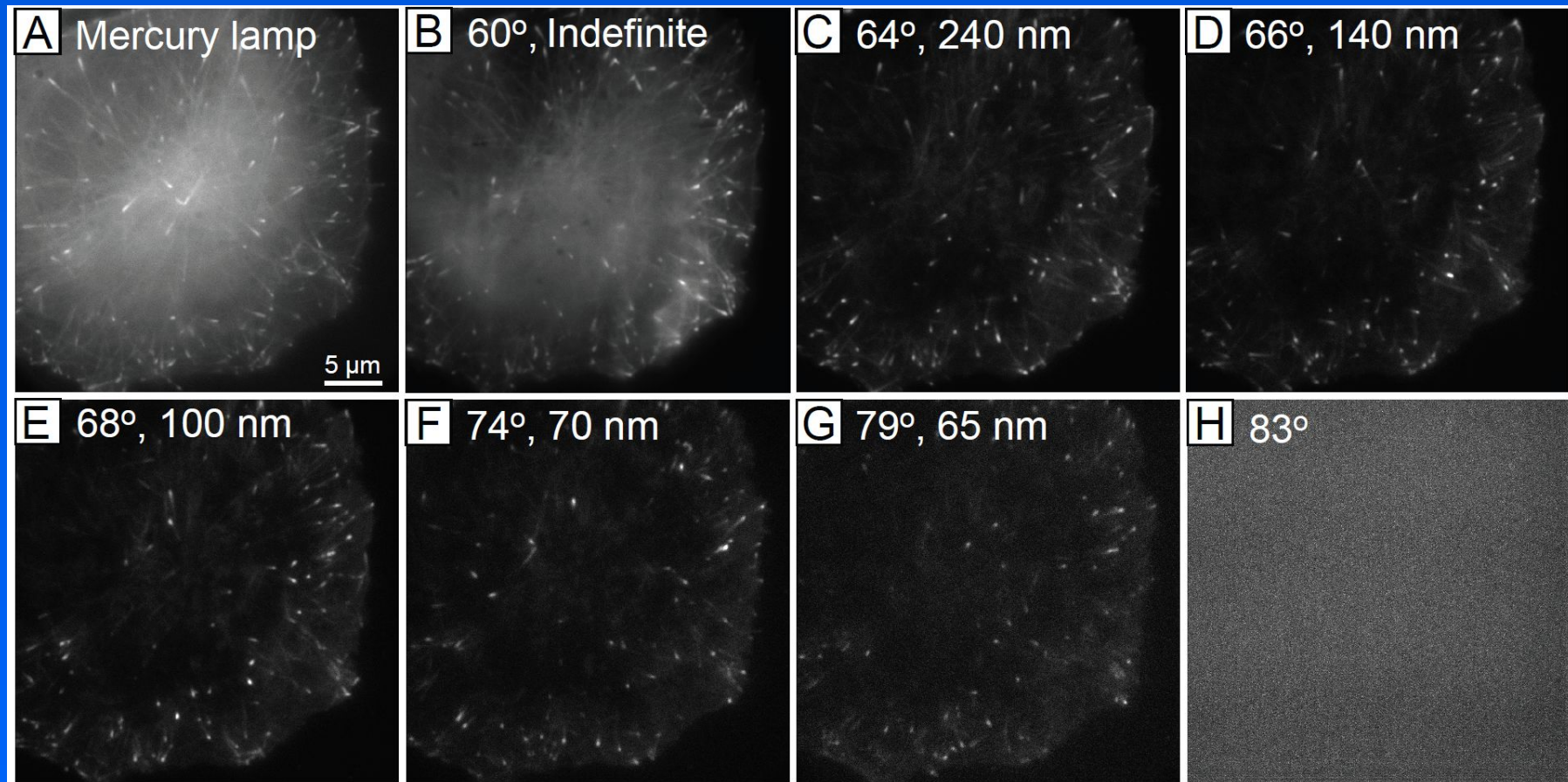
(b)



(c)

Флуоресценция микротрубочек. (a) – общая картина; (b) – TIRF картина; (c) – совмещение, показывающее какие части микротрубочек прилежат к нижней поверхности клетки.

Зависимость изображения от установки света



Угол полного внутреннего отражения (критический угол) для наблюдения живых клеток составляет около $63,5^\circ$. При увеличении угла затухание волнового фронта становится более быстрым.

TIRF микроскопия: преимущества и недостатки

Преимущества метода: возбуждение флуоресценции происходит в очень тонком слое, его толщина (50-80 нм) в несколько раз меньше, чем оптический срез в конфокальной микроскопии. Это дает преимущества для наблюдения мелких структур (микротрубочки, микрофиламенты и проч.).

Кроме того, уменьшается фотоповреждение живых клеток, и возрастает контраст для мелких структур. Создается возможность использовать мощные возбуждающие лазеры.

Недостатки:

- (1) можно работать только в узкой области, прилежащей к покровному стеклу – нельзя сделать объемного анализа.
- (2) неравномерность освещения поля зрения – TIRF предъявляет жесткие требования к покровному стеклу и его ориентации, а также к системе настройки лазера.

FRET – принцип

В 1948 г. Ферстер (Förster) описал явление безизлучательного резонансного переноса энергии между двумя молекулами флуорохромов, хромофоры которых находятся вблизи друг друга и ориентированы таким образом, что могут вступать в резонанс.

Механизм переноса энергии состоит в уменьшении продолжительности пребывания молекулы-донора в возбужденном состоянии (по сравнению со временем спонтанной эмиссии).

Эффективность переноса всегда меньше единицы (100%) и зависит от свойств молекул, расстояния между ними и времени жизни молекулы-донора в возбужденном состоянии (чем дольше, тем лучше).

Контроль переноса проводится путем обесцвечивания молекулы акцептора.

FRET (Ферстеровский резонансный перенос энергии)

Когда две молекулы флуорохромов расположены близко друг от друга и максимум эмиссии одной из них близок к максимуму поглощения другой, между ними может происходить передача энергии без высвечивания кванта света – резонансный перенос. Его эффективность сильно зависит от расстояния между группами флуорохромов $\sim R^{-6}$:

$$K_T = (1/\tau_D) \cdot [R_0/r]^6$$

Типичное расстояние эффективного переноса составляет 3-10 нм.

FRET – принцип

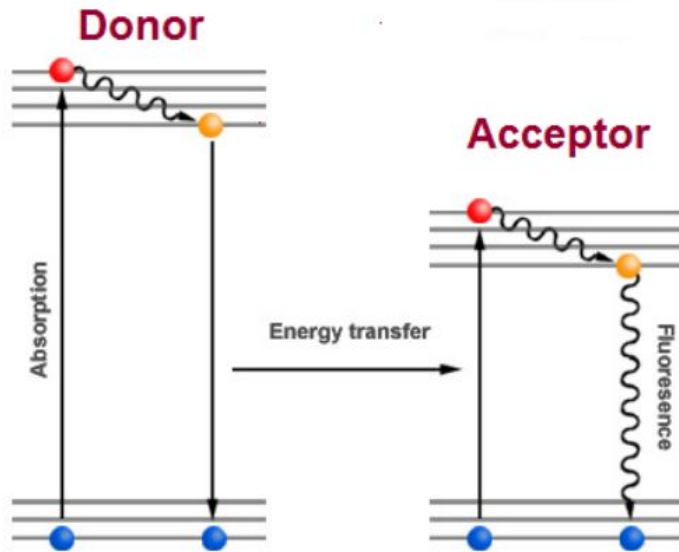


Figure 1: Jablonski diagram illustrating the FRET process.

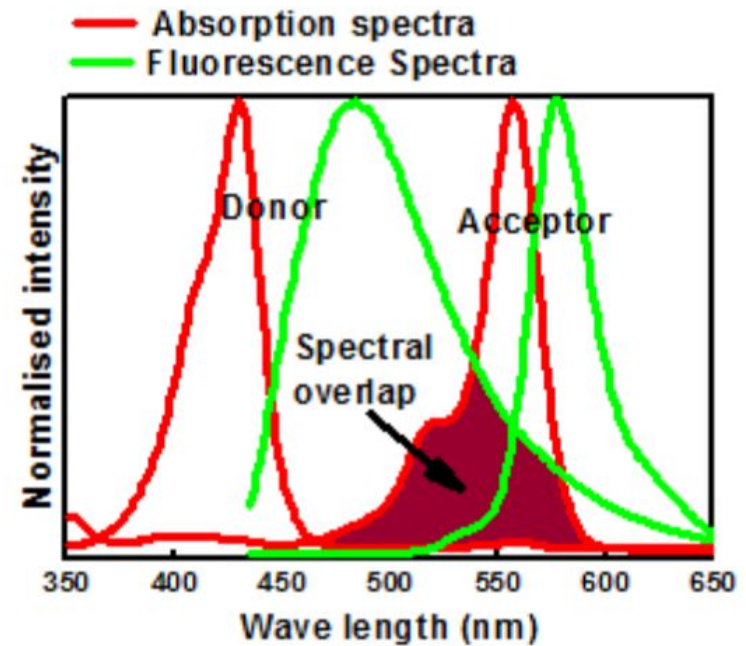
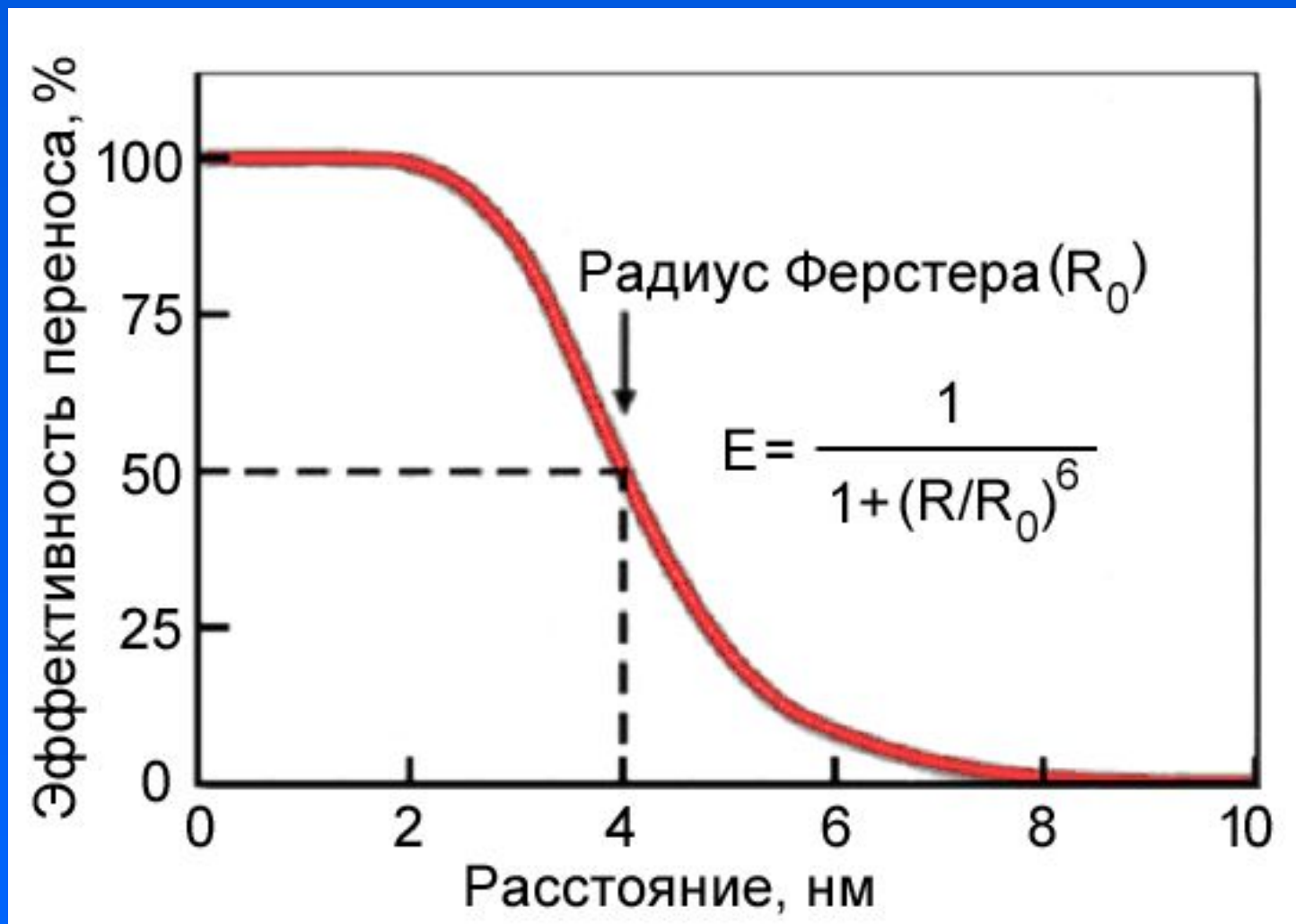


Figure 2: Absorption and fluorescence spectra of an ideal donor-acceptor pair. Brown coloured region is the spectral overlap between the fluorescence spectrum of donor and absorption spectrum of acceptor.

Для эффективного переноса две молекулы должны входить в резонанс, и спектр эмиссии донора должен перекрываться со спектром возбуждения акцептора.

Эффективность переноса

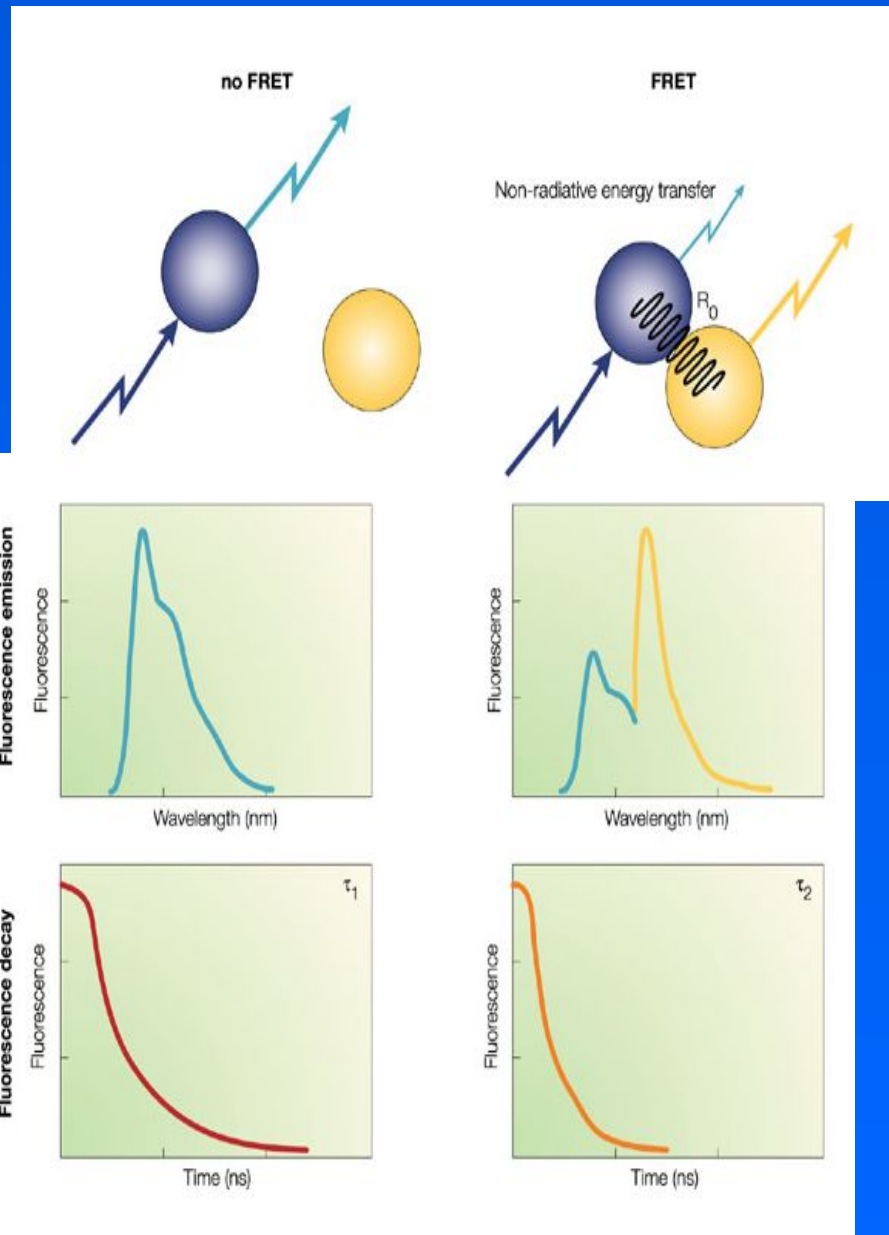


FRET

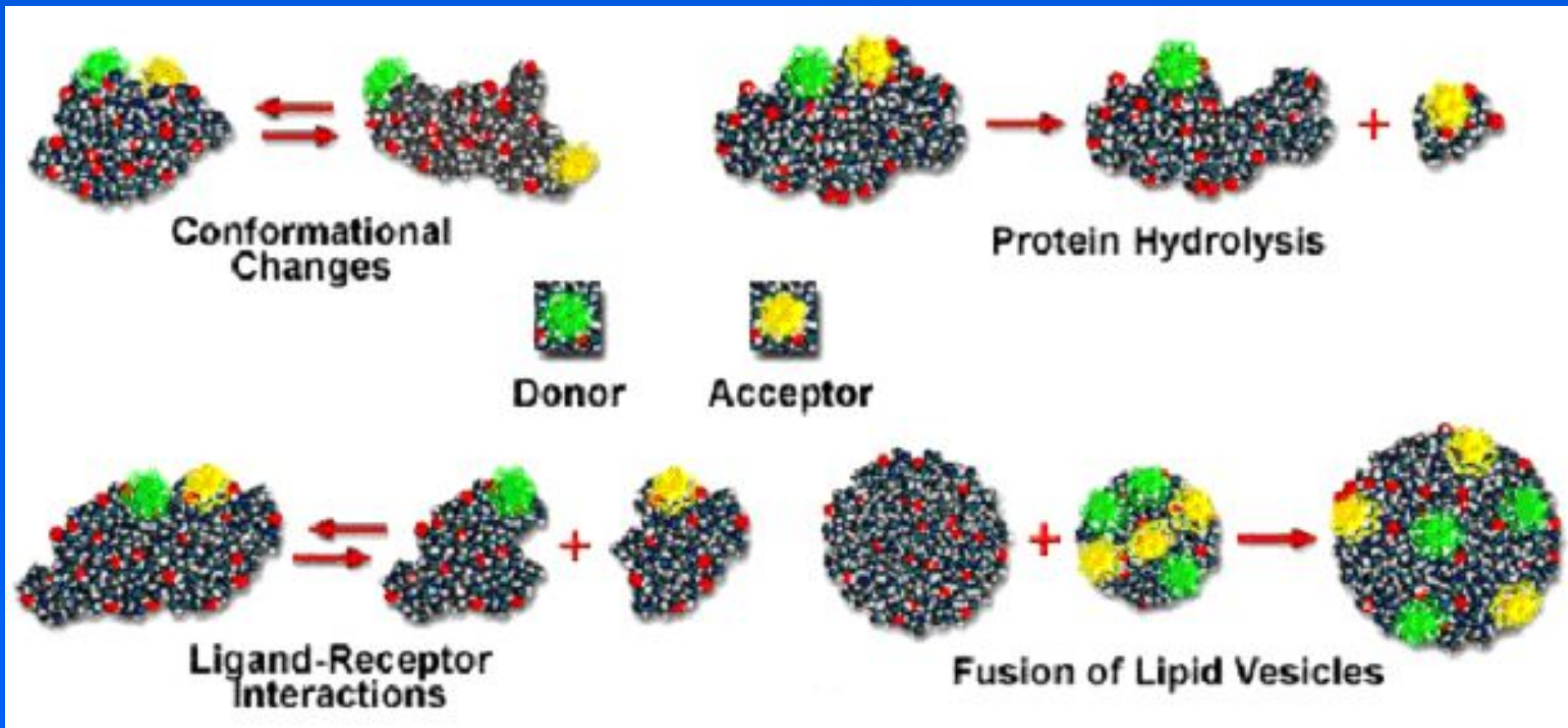
FRET это конкурентный процесс переноса энергии

Эмиссия молекулы донора и время ее жизни в возбужденном состоянии снижаются

Эмиссия акцептора возрастает



Приложения FRET



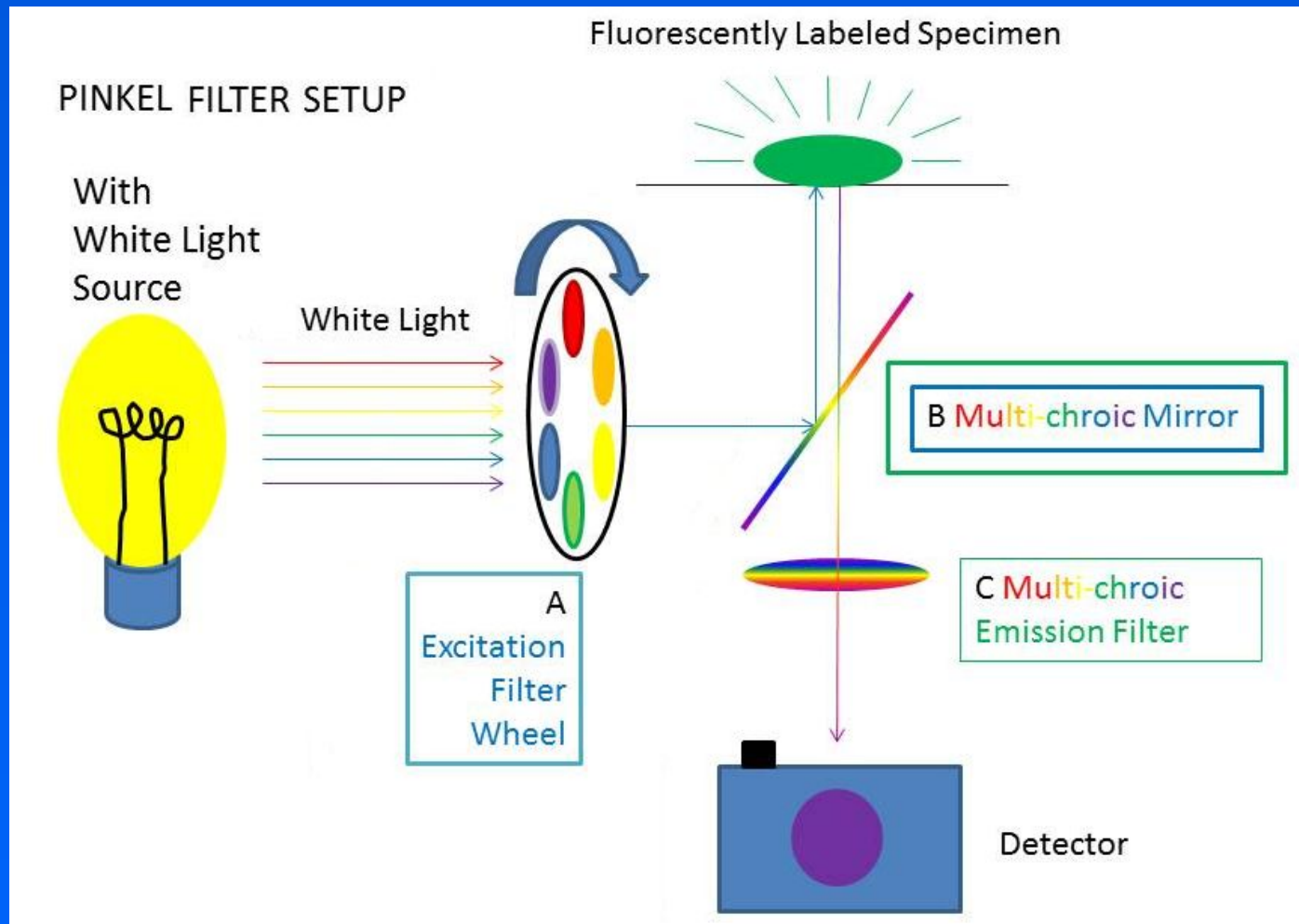
Наилучшая пара флуоресцентных белков – BFP/YFP

Как наблюдать FRET?

Стандартные кубики с
однополосными светофильтрами
для этого явно недостаточны.

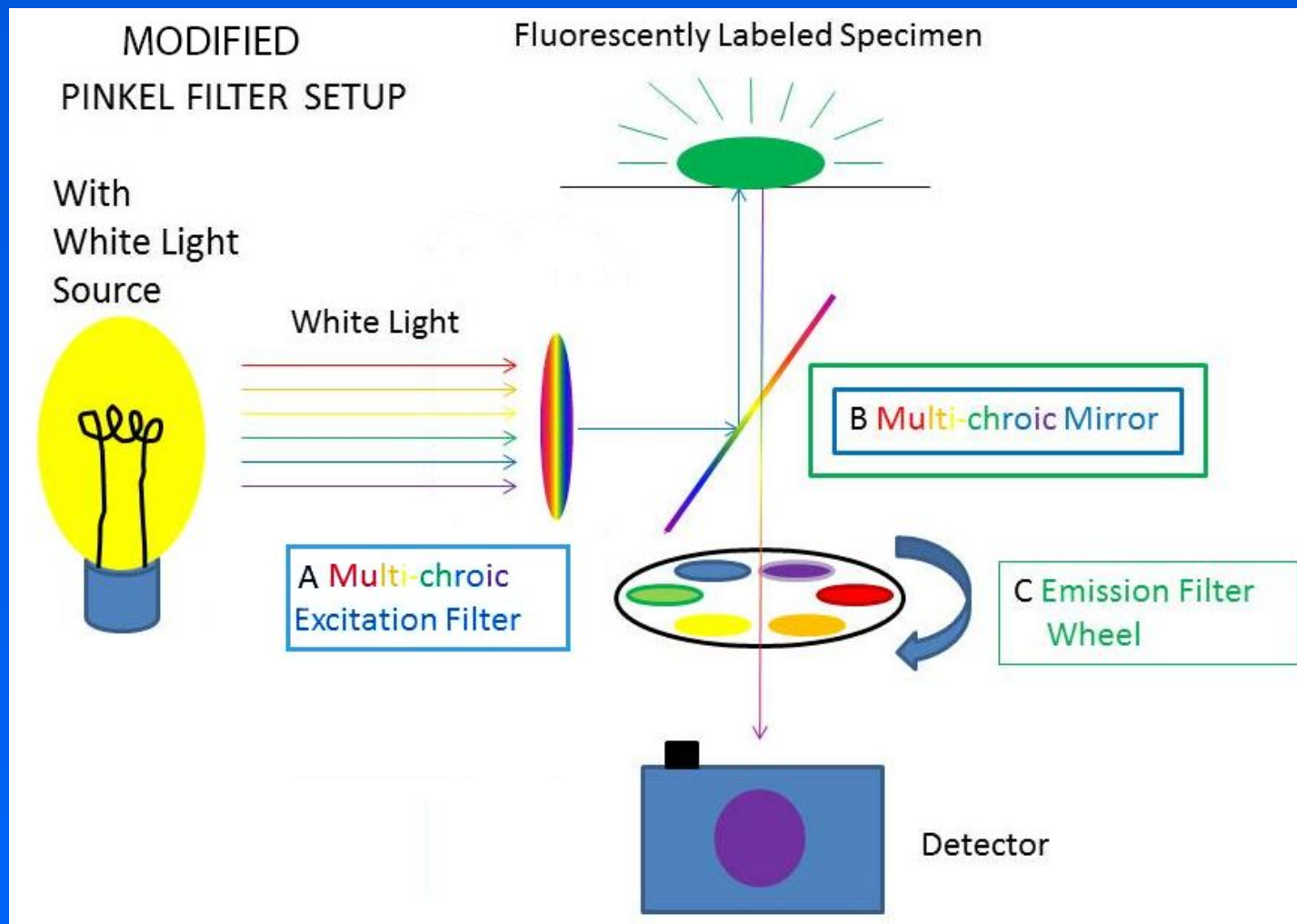
Поэтому систему флуоресцентного
микроскопа приходится
модернизировать.

Набор фильтров Пинкеля



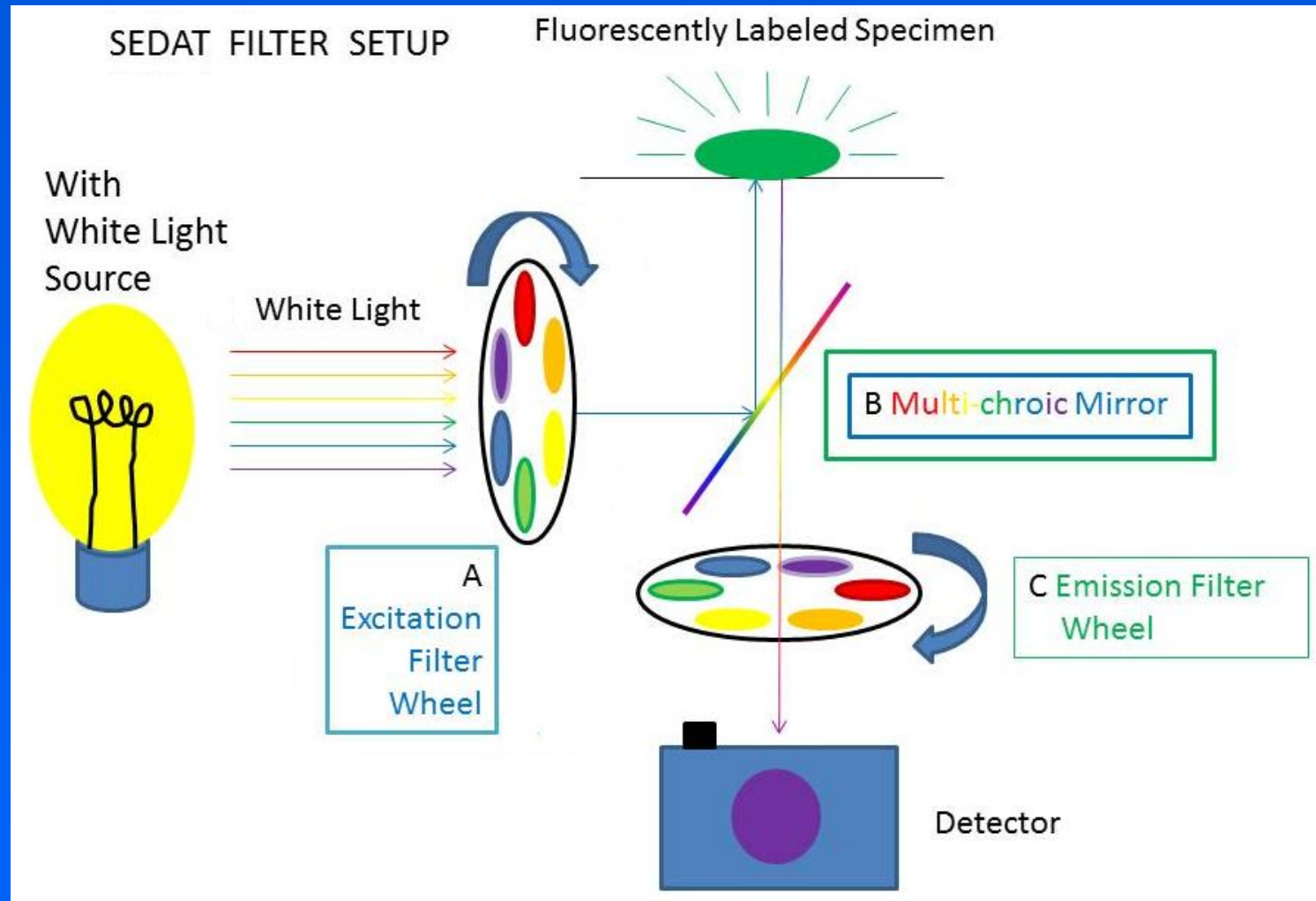
В кубе устанавливается два многополосных фильтра (зеркало и запирающий фильтр) и перед кубом ставится колесо возбуждающих светофильтров.

Набор фильтров Пинкеля 2



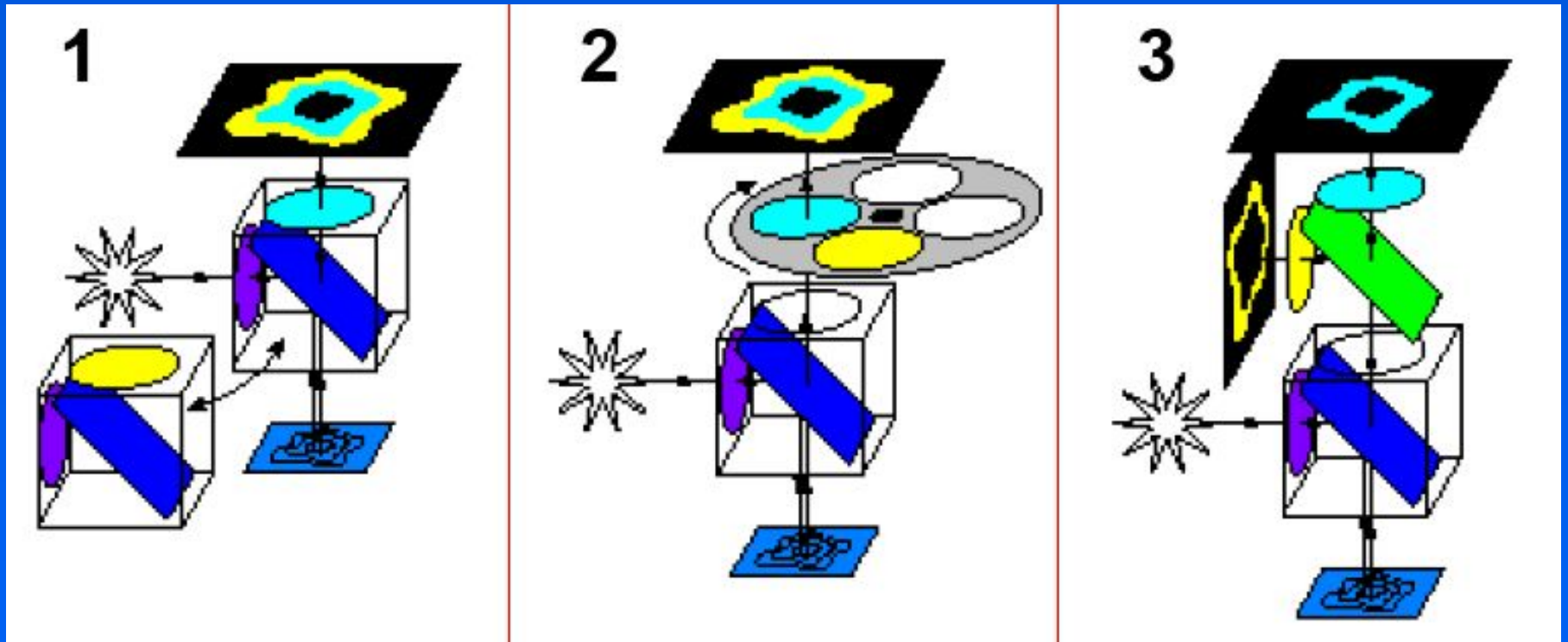
В кубе устанавливается два многополосных фильтра (возбуждающий фильтр и зеркало), и позади куба ставится колесо запирающих светофильтров.

Набор фильтров Седата



В кубе устанавливается один многополосный фильтр (дихроичное зеркало), а впереди и позади куба ставятся два колеса светофильтров (возбуждающих и запирающих).

Выявление FRET



Способ 1. Обесцвечивание акцептора (переключение двух кубиков).

Способ 2. Использование кубика со сменными запирающими фильтрами или использование набора Пинкеля (Pinkel filterset).

Способ 3. Последовательное использование двух зеркал для одновременной регистрации сигналов от донора и акцептора (требует специальной конструкции микроскопа или приставки).

Светоделитель Hamamatsu

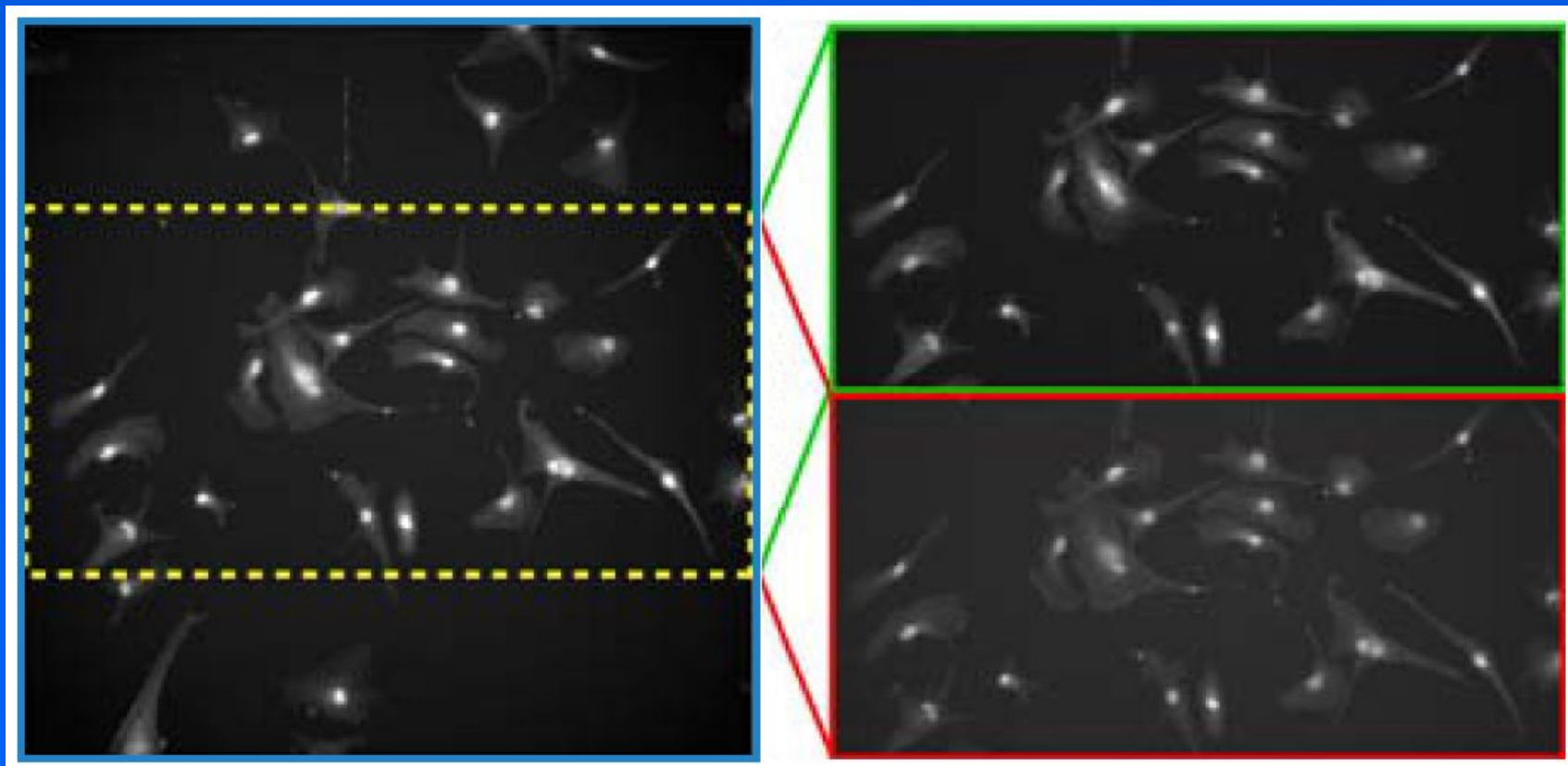


Общий вид устройства

Слева – вход в порт микроскопа

Справа – выход на камеру

Формирование изображения с помощью светоделителя



Слева – полный чип (светоделитель выключен).

Справа – светоделитель включен, два изображения проецируются на половинки чипа в разных каналах.

Измерение FRET

1. Эмиссия акцептора (перенос присутствует).

Возбуждается молекула донора (например, GFP при 488 нм или BFP при 445 нм), а регистрируется флуоресценция другого белка (RFP при 610 нм или YFP при 530 нм). Необходим контроль на затекание спектра возбуждения!

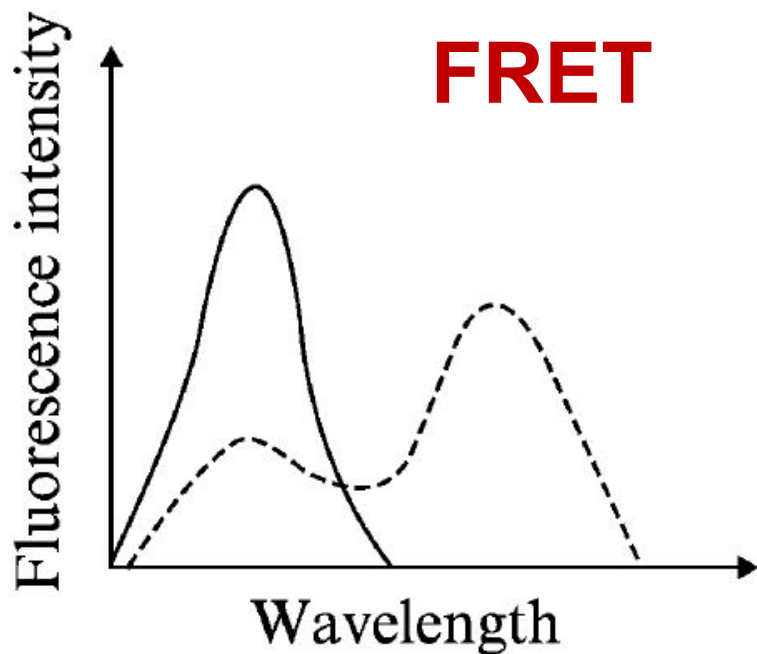
2. Эмиссия донора после обесцвечивания акцептора (перенос выключается).

Сначала измеряется эмиссия донора при его возбуждении, затем интенсивным длинноволновым светом обесцвечивается акцептор. После этого вновь определяется эмиссия донора – она должна возрасти!

Измерение FRET

Steady state

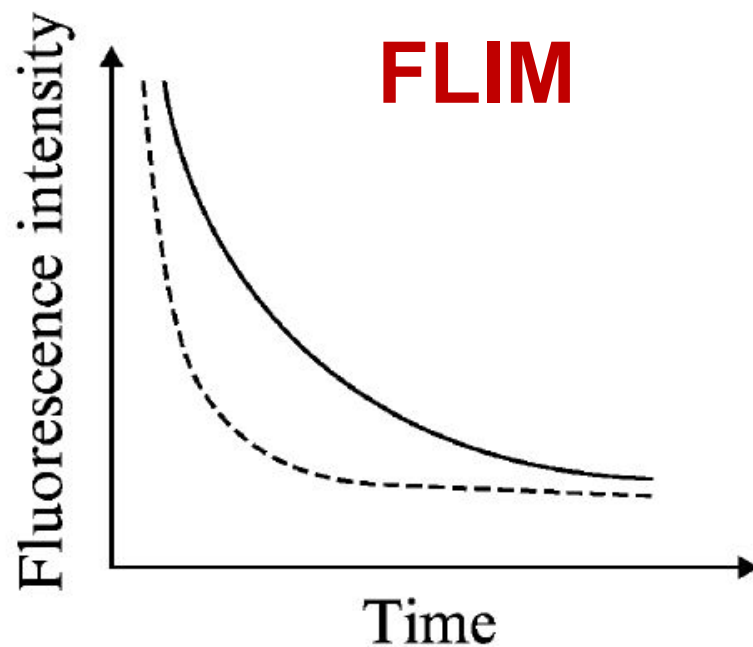
FRET



$$E_t = 1 - \frac{F_{D,A}}{F_{D,U}}$$

Lifetime

FLIM



$$E_t = \frac{\tau_{D,A}}{\tau_{D,U}}$$

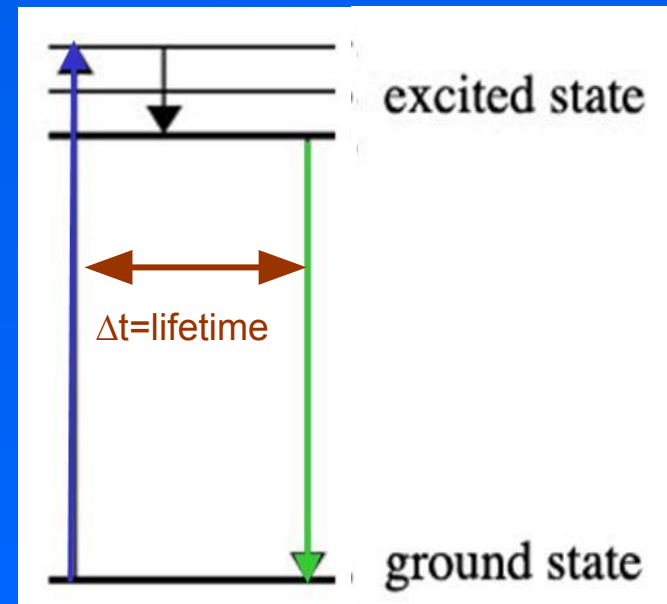
1. Эмиссия донора снижается а акцептора растет.
2. Уменьшается время жизни донора в возбужденном состоянии.

Измерение времени затухания флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy - FLIM)

Измеряется время жизни молекулы в возбужденном состоянии (задержка между возбуждением и испусканием)

Каждый краситель имеет уникальное среднее время жизни, которое может изменяться в зависимости от окружения:

- ✓ Ion concentration
- ✓ Oxygen concentration
- ✓ pH
- ✓ Protein-protein interactions



Измерение FLIM

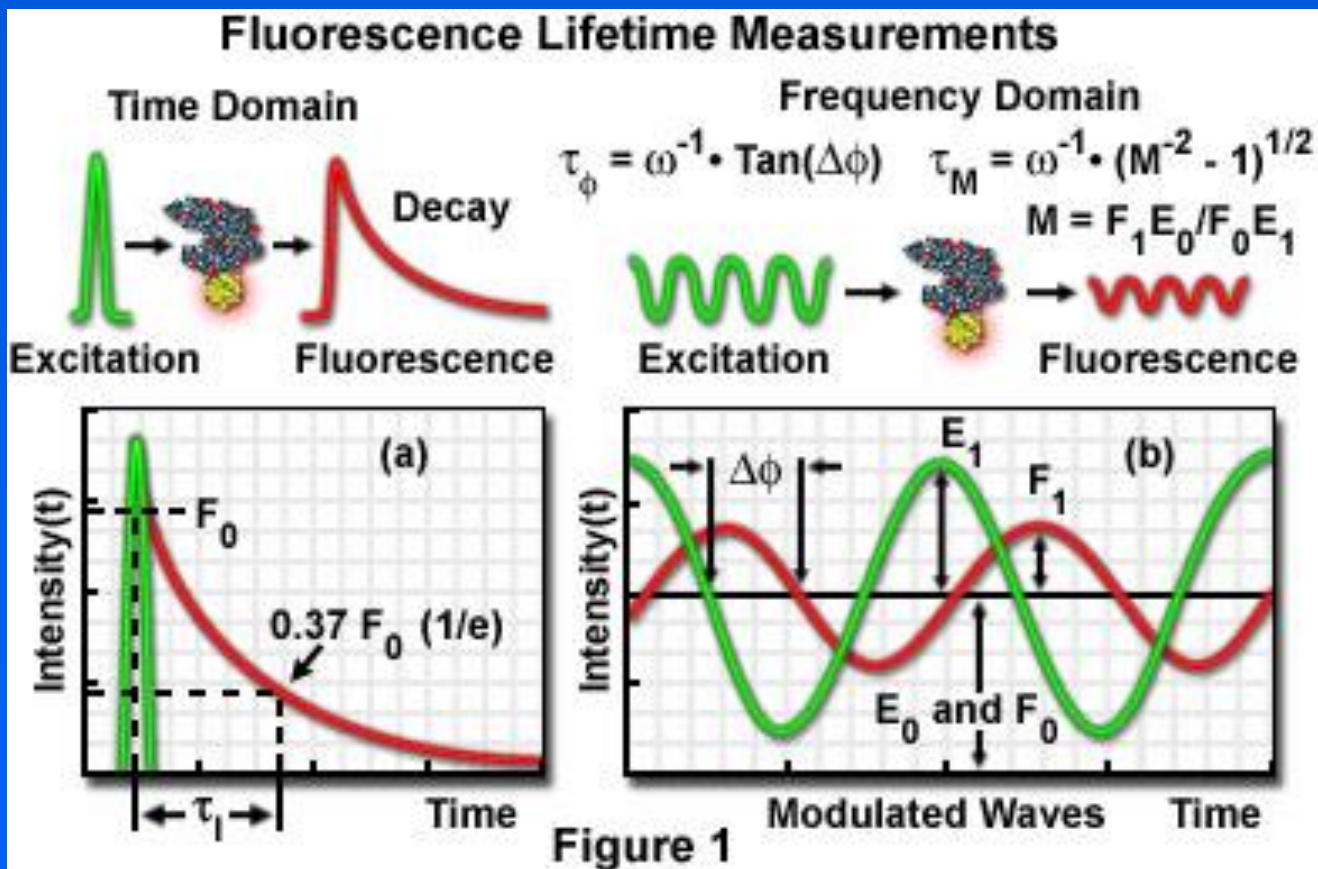
Лазер с очень короткими импульсами (единицы пикосекунд) возбуждает флуоресценцию.

Одновременно индуцируется запись сигнала на ФЭУ (с задержкой в доли наносекунды, то есть сотни пикосекунд).

Следующий импульс лазера останавливает запись, которая возобновляется после окончания импульса.

Для получения надежной кривой процесс повторяется многократно и данные усредняются (exponential curve fitting).

FLIM – принцип метода



Time-domain FLIM и Frequency-domain FLIM. В первом случае измеряется затухание флуоресценции во времени (1-20 пс), во втором случае устанавливается высокоскоростной модулятор (1-200 мегагерц), который позволяет измерять величину флуоресценции в заданные отрезки времени.

Конфигурация для FLIM – двух- и однофотонный микроскоп

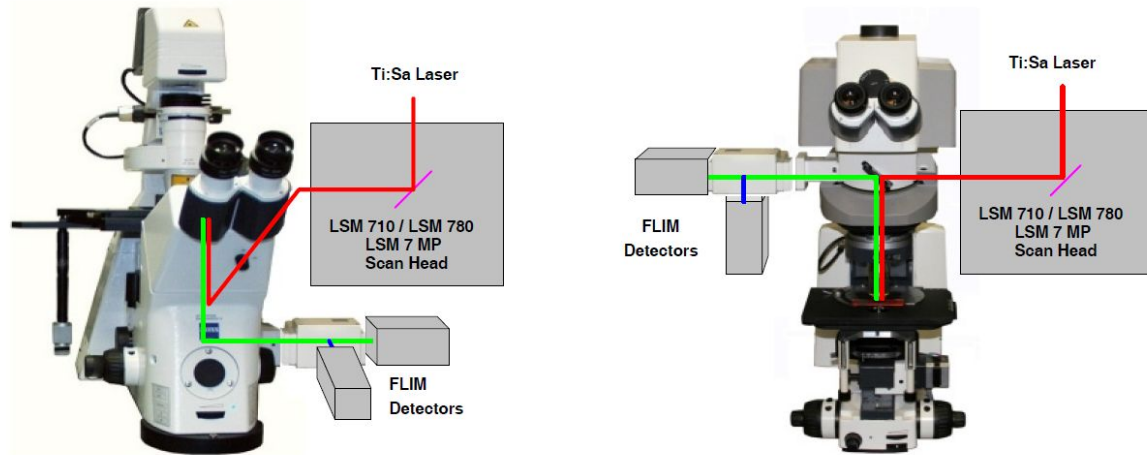


Fig. 2: Optical configuration of FLIM for multiphoton microscopes. Inverted (left) and upright versions (right). The FLIM detectors are connected to the non-descanned port of the microscope.

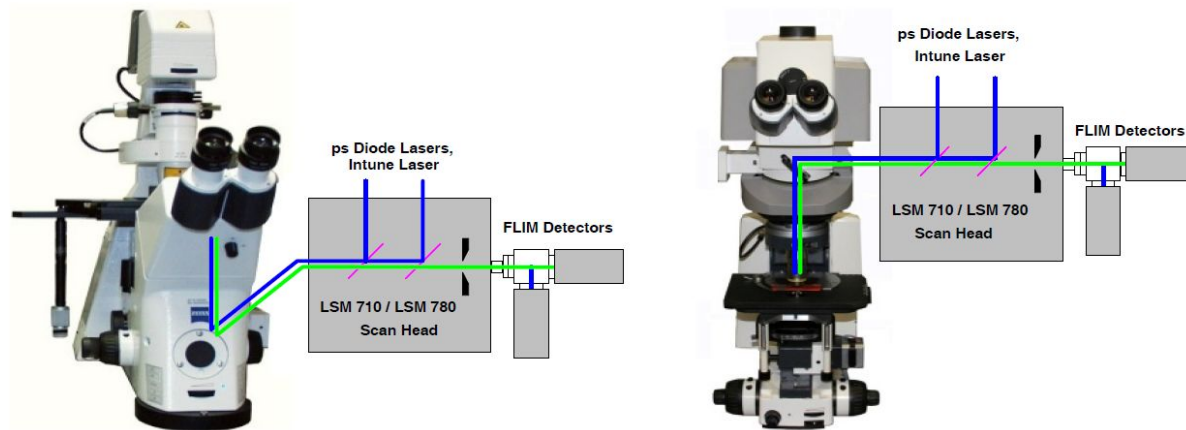


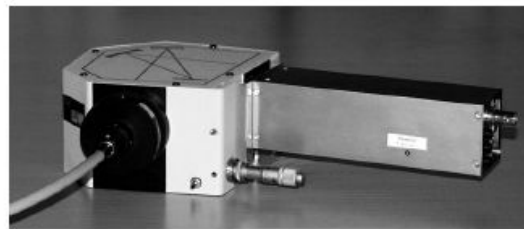
Fig. 3: Optical configuration of FLIM for one-photon (confocal) microscopes. Inverted (left) and upright versions (right). The FLIM detectors are connected to the confocal output port of the scan head.

Конфигурация FLIM для определения многих длин волн

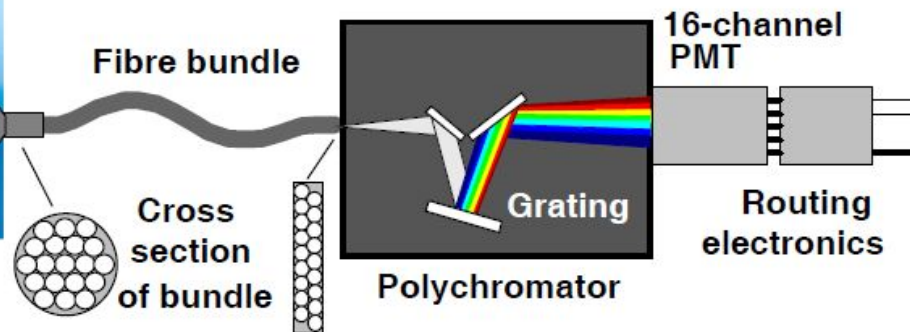
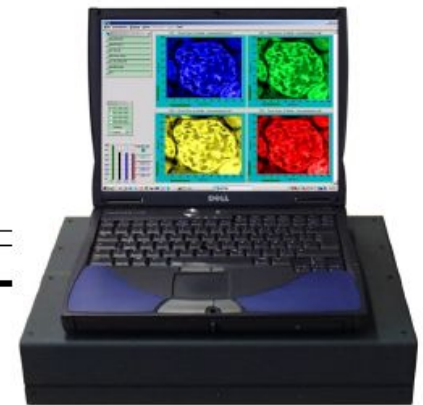
Zeiss LSM 710 NLO



bh MW-FLIM GaAsP detector assembly



Standard
bh Simple-Tau 150
TCSPC System

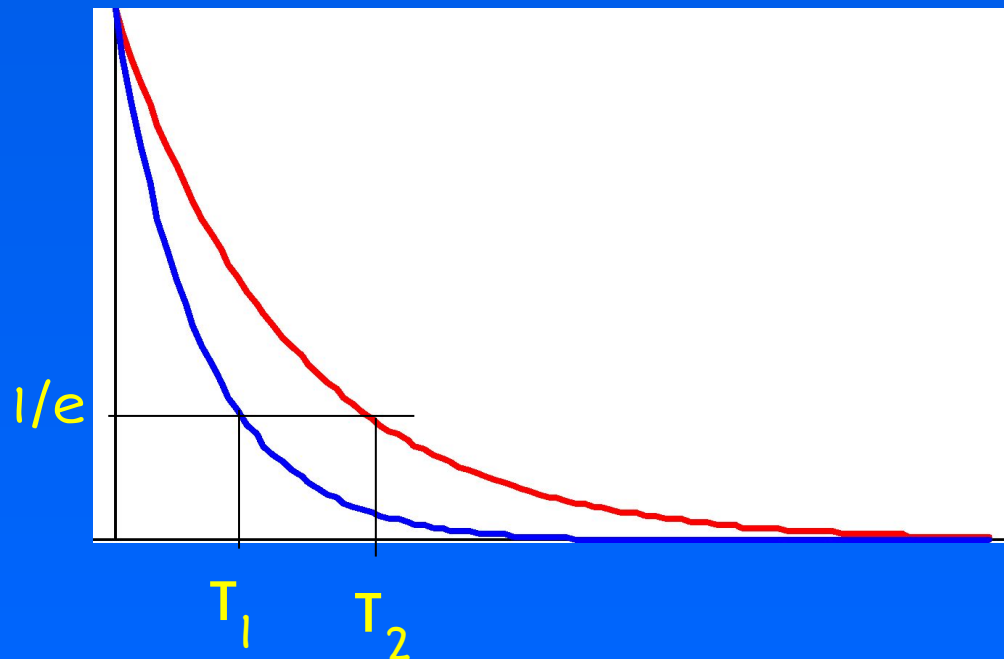


Сигнал разбивается 16-канальным детектором, каждый детектор записывает отдельный канал в компьютер

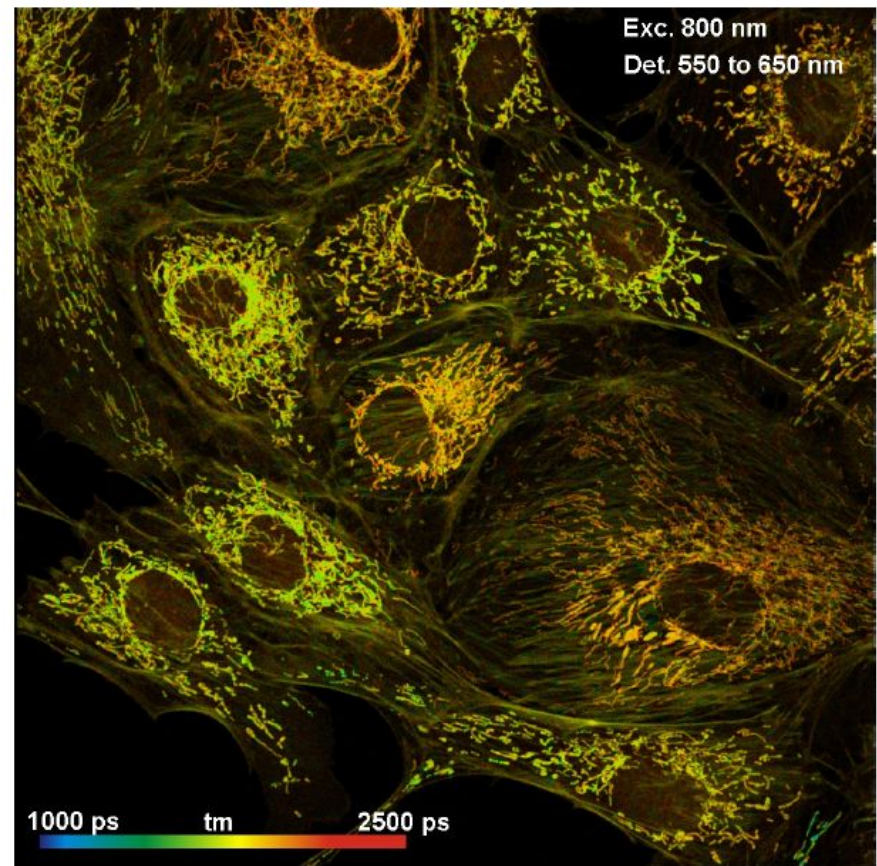
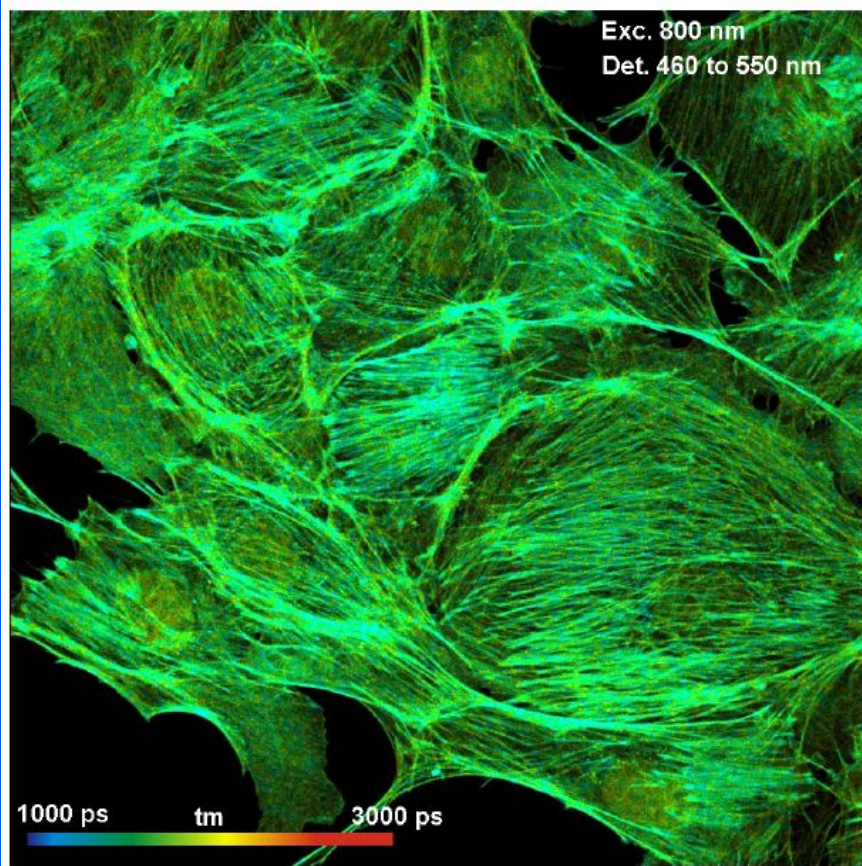
Поскольку метод FLIM определяет время жизни, а не интенсивность флуоресценции, то он дает возможности:

- Различить флуорофоры со сходным спектром.
- Анализировать толстые препараты.

Время жизни = 37% ($1/e$) от всех возбужденных молекул продолжают флуоресцировать

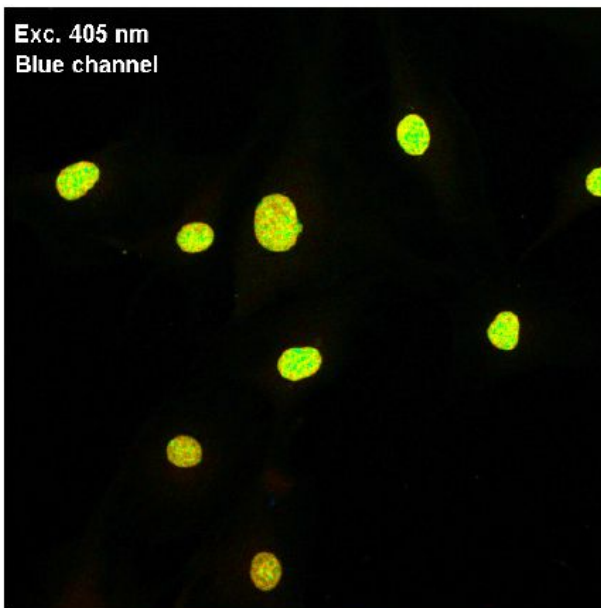


Генерация изображений с помощью FLIM

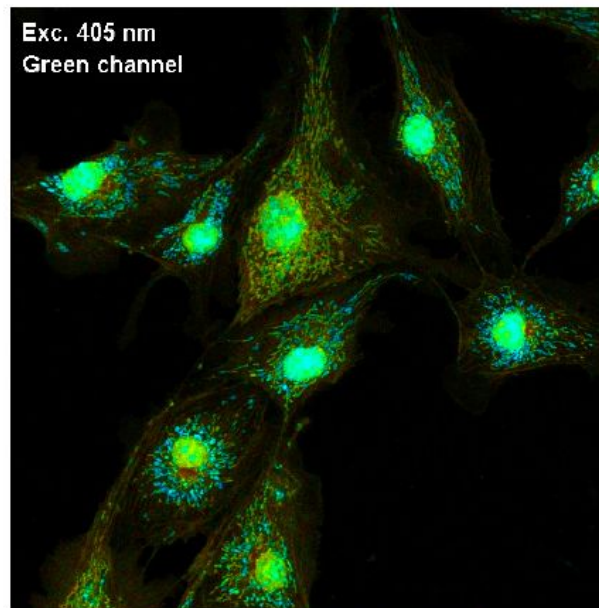


Dual-channel detection. BPAE cells stained with Alexa 488 phalloidin and Mito Tracker Red.
Left: 460 nm to 550 nm. Right: 550 nm to 650 nm.

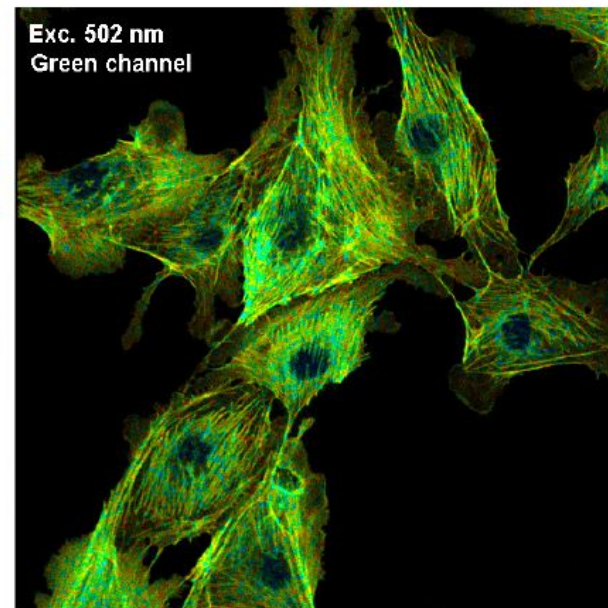
Генерация изображений с помощью FLIM



tm 1 ns  2 ns



1.3 ns  3 ns



1.5 ns  2.5 ns

FLIM by PIE, Zeiss LSM 710 Intune laser ('green laser') and 405 nm ps diode laser ('blue laser'). Images recorded by the two parallel SPC-150 TCSPC modules of the FLIM system.

Сочетание двух лазеров дает возможность использовать три канала флуоресценции

Лазеры для FLIM

Двухфотонная система – титан-сапфировый лазер (фемптосекундное возбуждение, продолжительность импульса - 10^{-13} с)

Однофотонная система – пикосекундный диодный лазер (продолжительность импульса - 10^{-12} с) или перестраиваемый "белый" лазер

Области применения FLIM

Определяется кинетика затухания сигнала, а не его спектр. Изменения кинетики отражают изменение условий существования флуорохрома в клетке (рН; концентрация ионов кальция, гидрофильное/гидрофобное окружение зондов (перестройка белковых молекул)

Анализ автофлуоресценции (НАД-Н, ФАД). НАД-Н флуоресцирует в восстановленном состоянии и гаснет при окислении, ФАД – наоборот, флуоресцирует в окисленном состоянии. Их баланс указывает на работу электрон-транспортной цепи.

Более точный анализ FRET – он производится по изменению времени затухания флуоресценции.