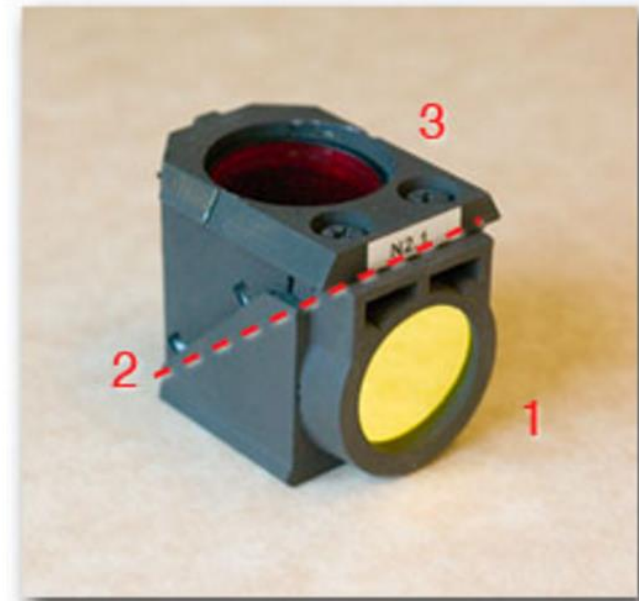
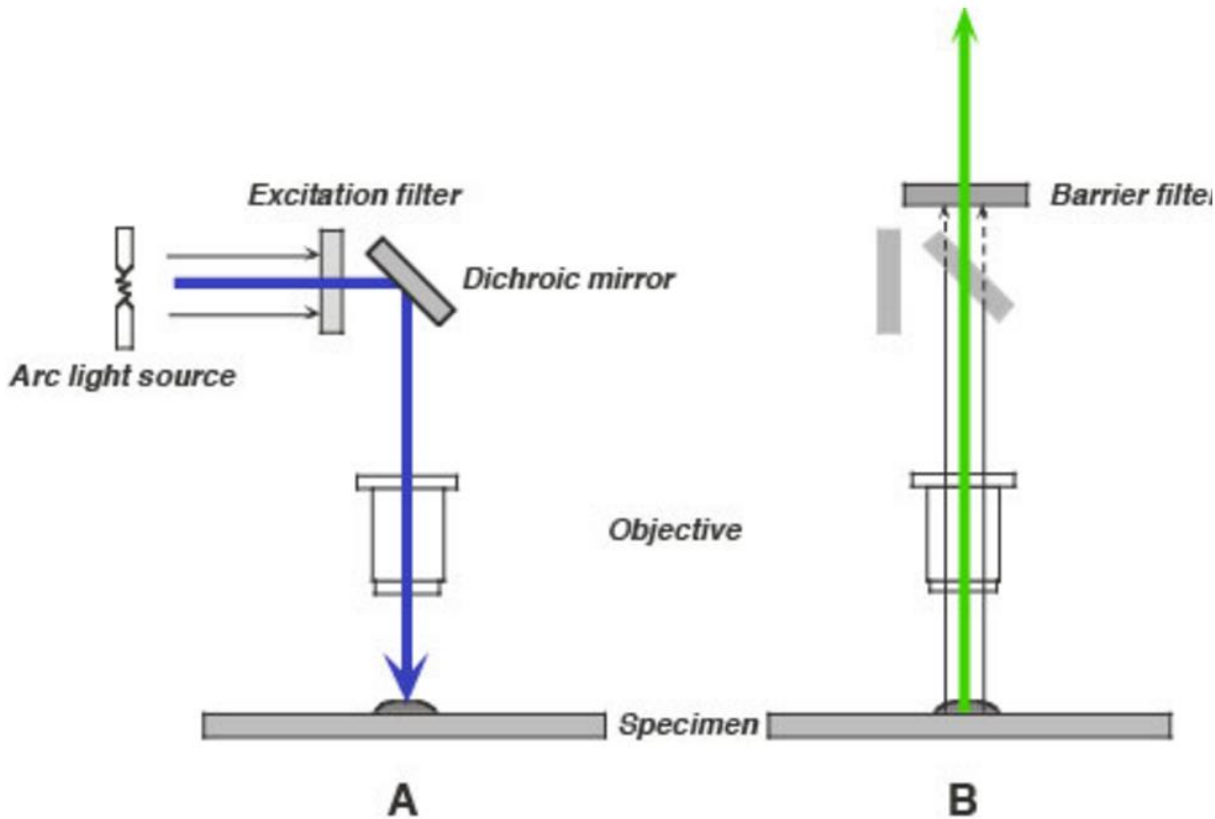


# Флуоресцентная микроскопия

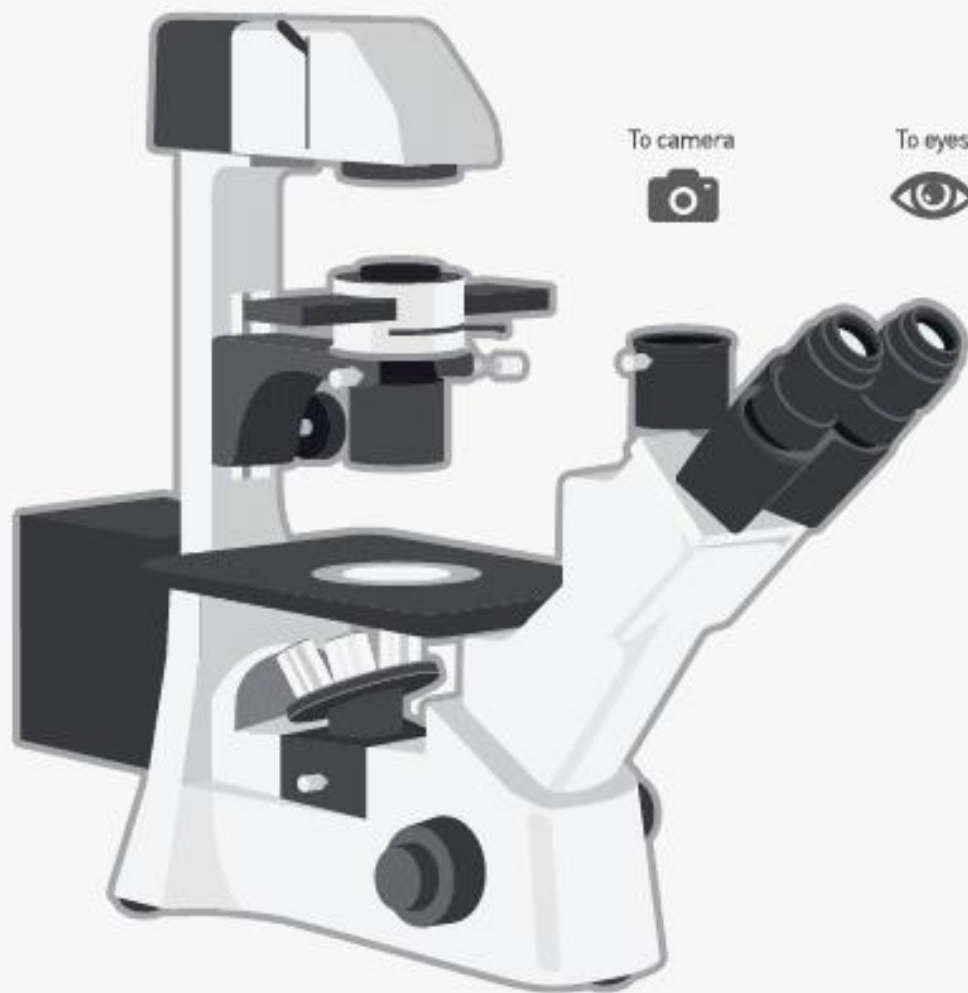
## 1) Эпифлуоресцентная микроскопия (широкопольная флуоресцентная микроскопия, widefield)



Fluorescent filter cube.

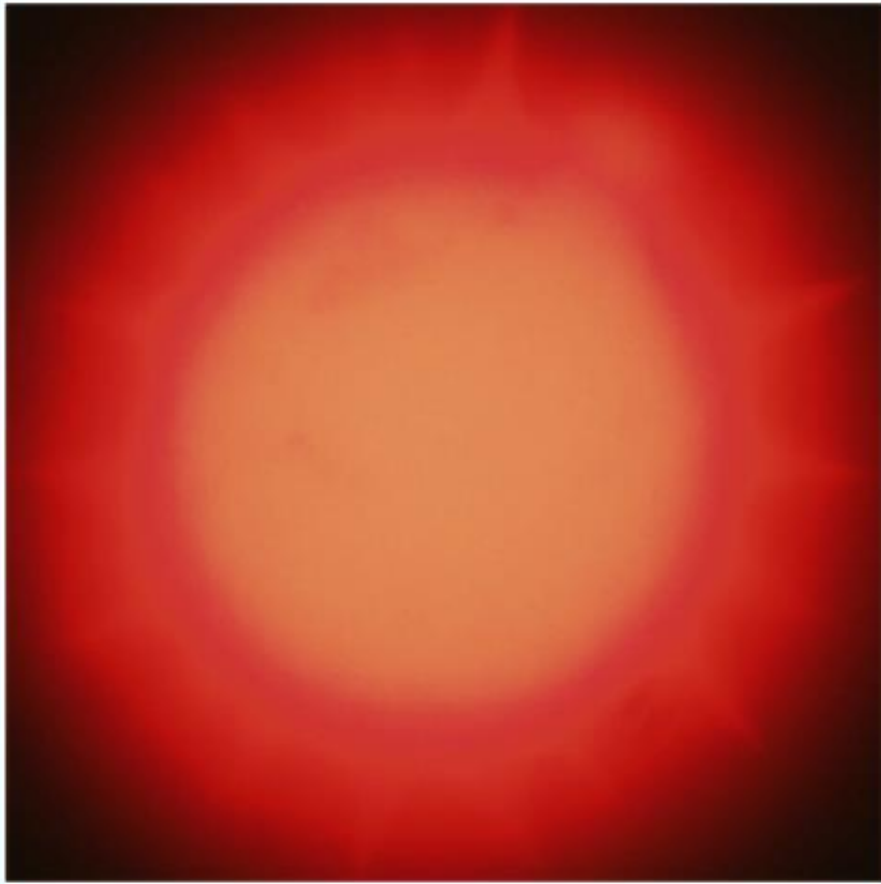
- 1: Ex filter
- 2: Dichroic mirror
- 3: Em (barrier) filter

- Brightfield
- Excitation
- Emission
- Filter Cube

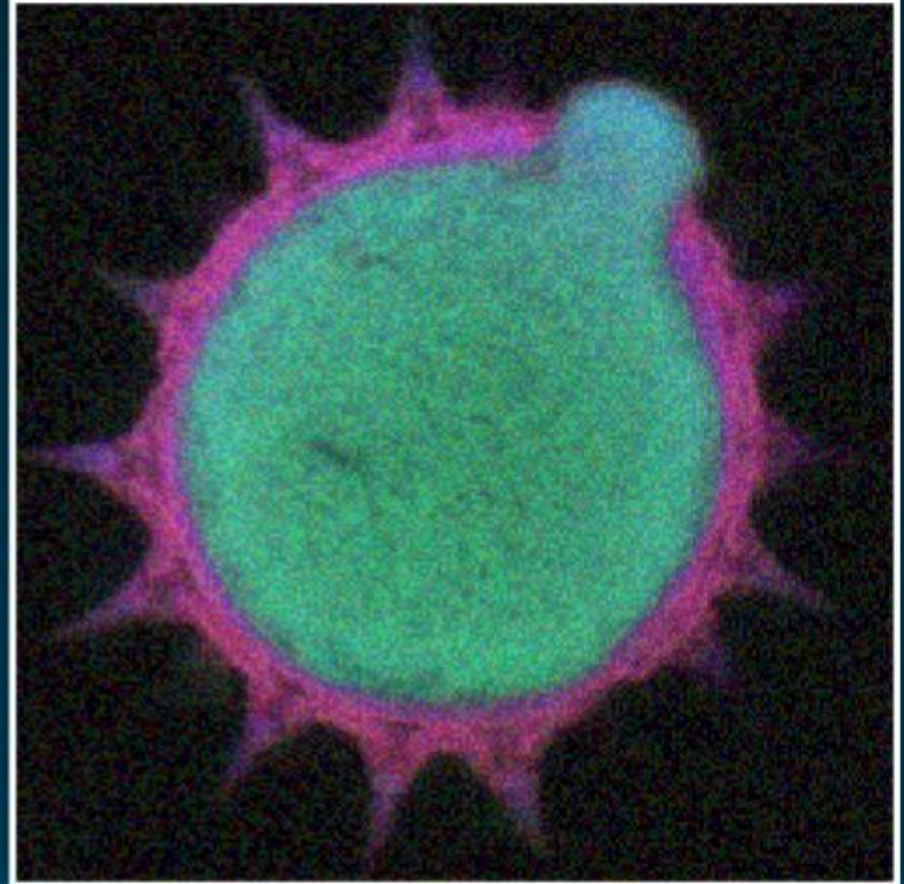


# Comparison of Confocal And Widefield Microscopy

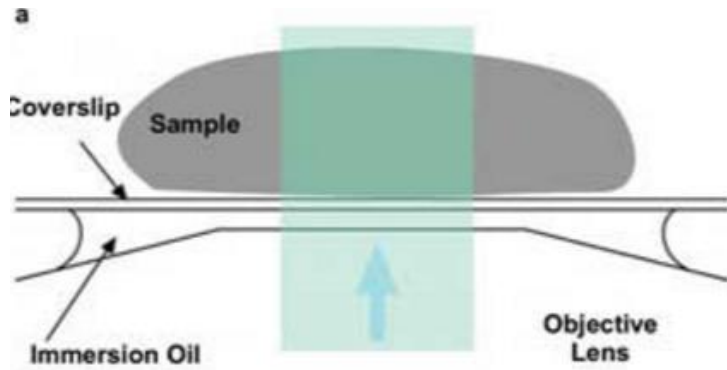
WIDEFIELD



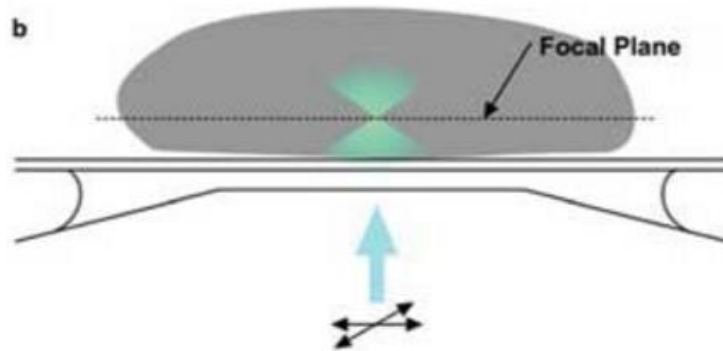
CONFOCAL



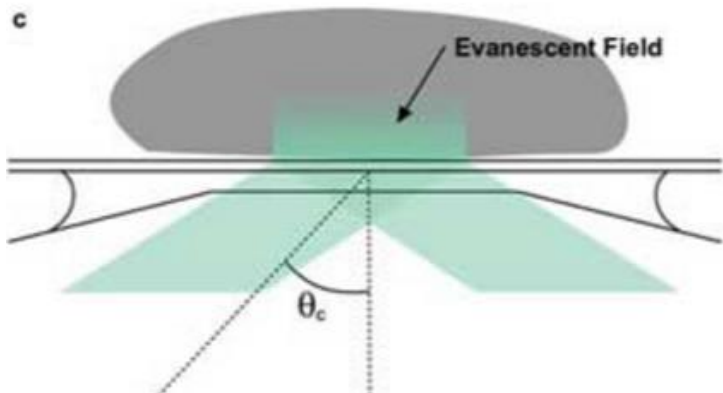
# Режимы возбуждения флуоресценции



- Широкопольный (эпифлуоресценция)

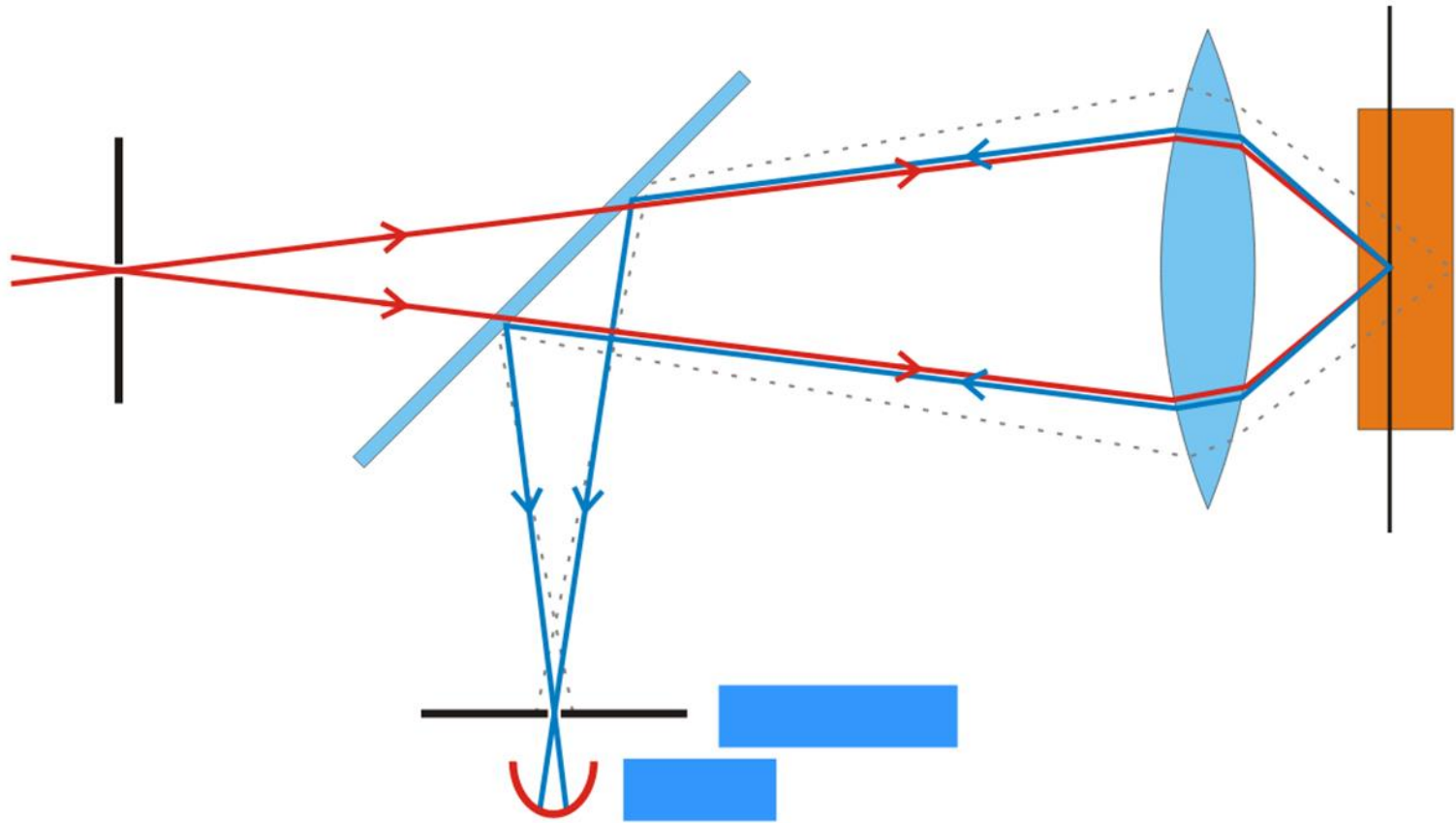


- Конфокальный



- TIRF - режим

## 2) Конфокальная микроскопия



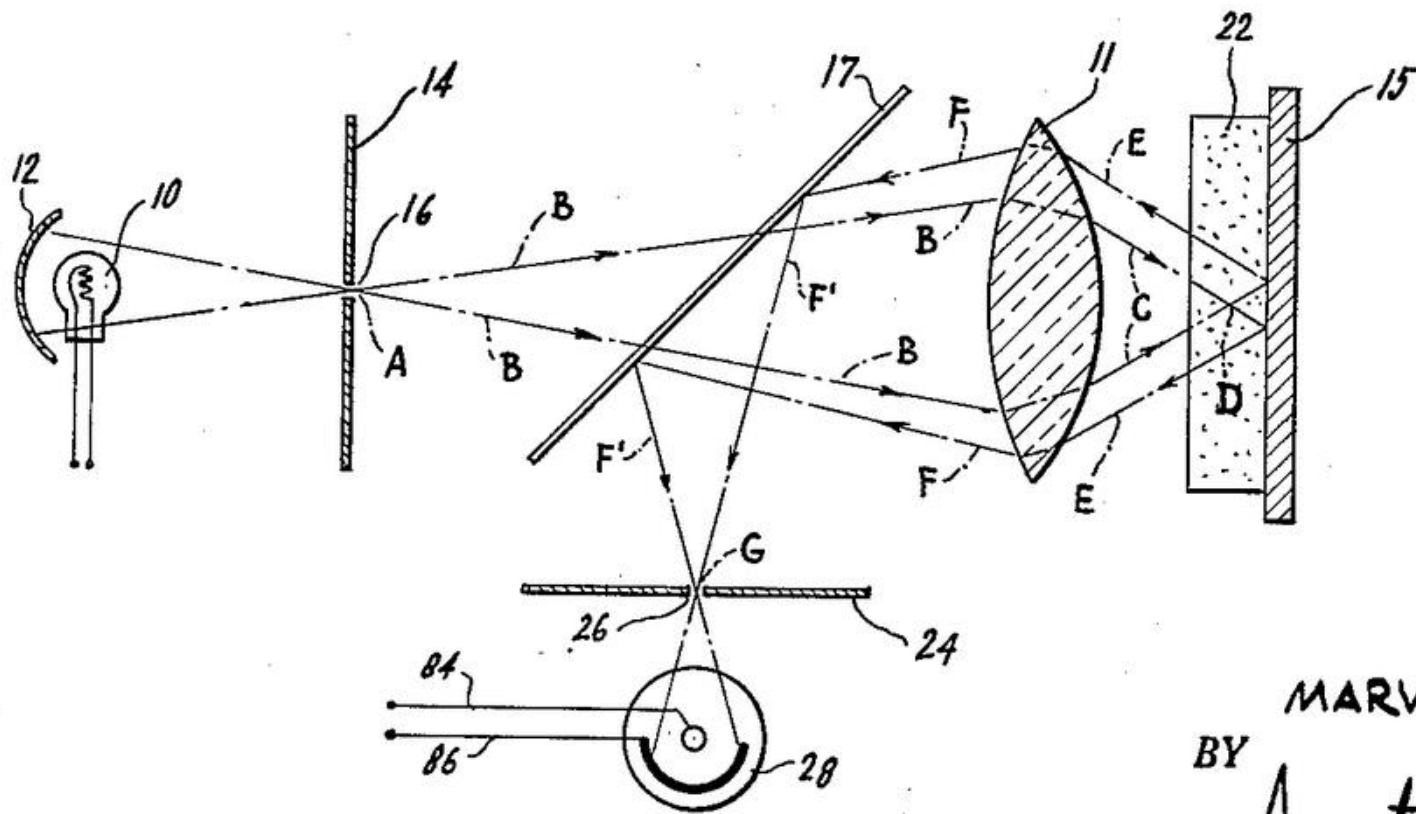


FIG. 3.

INVENTOR.  
 MARVIN MINSKY  
 BY *Amster & Levy*  
 ATTORNEYS

## Yokogawa Spinning Disk Unit Optical Configuration

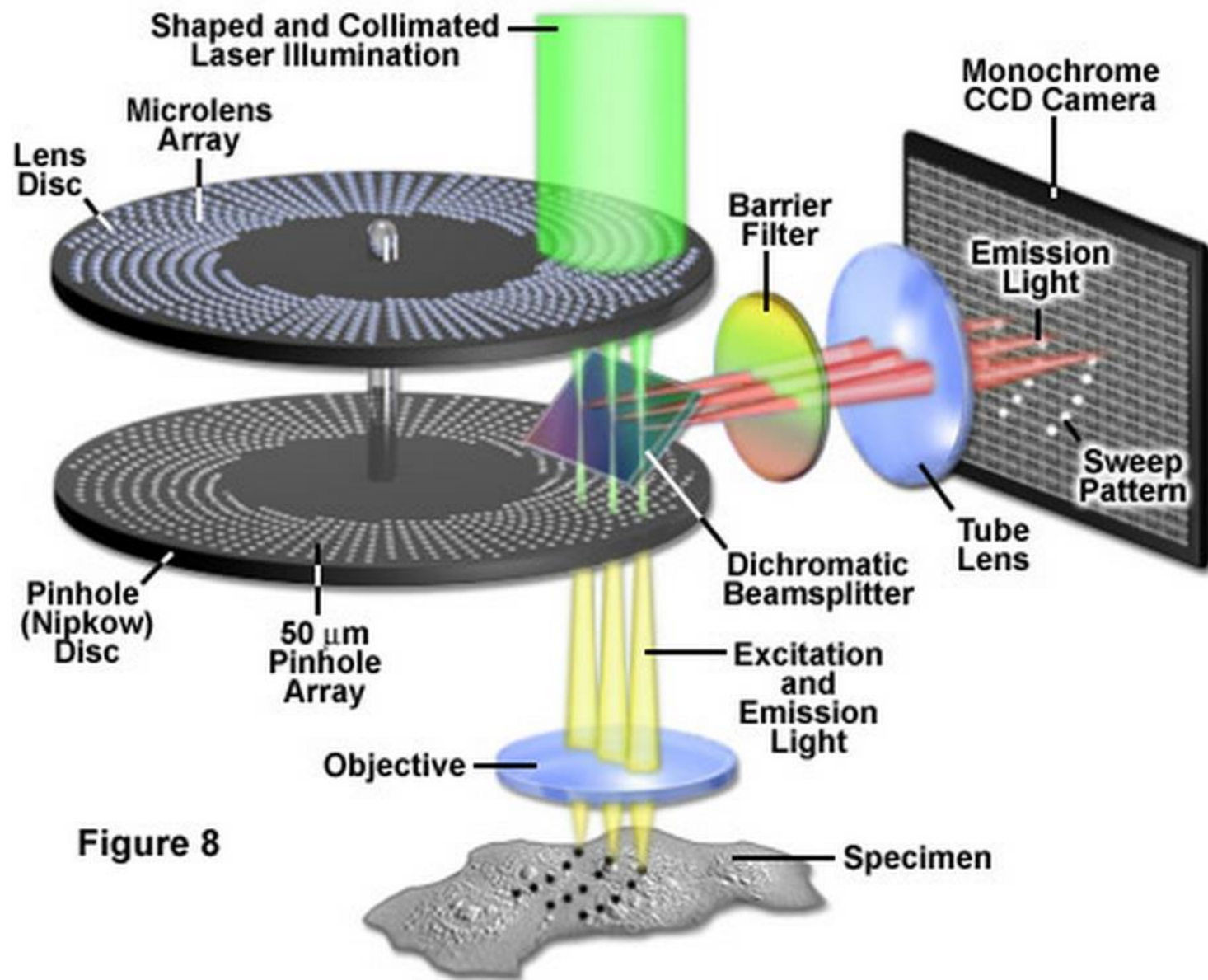
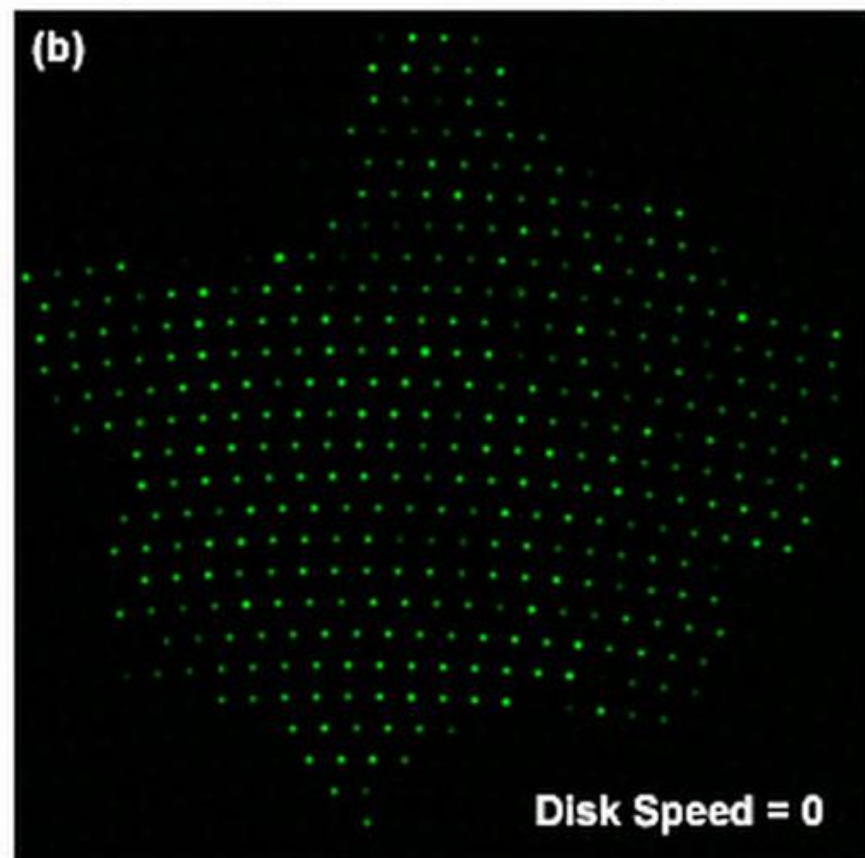
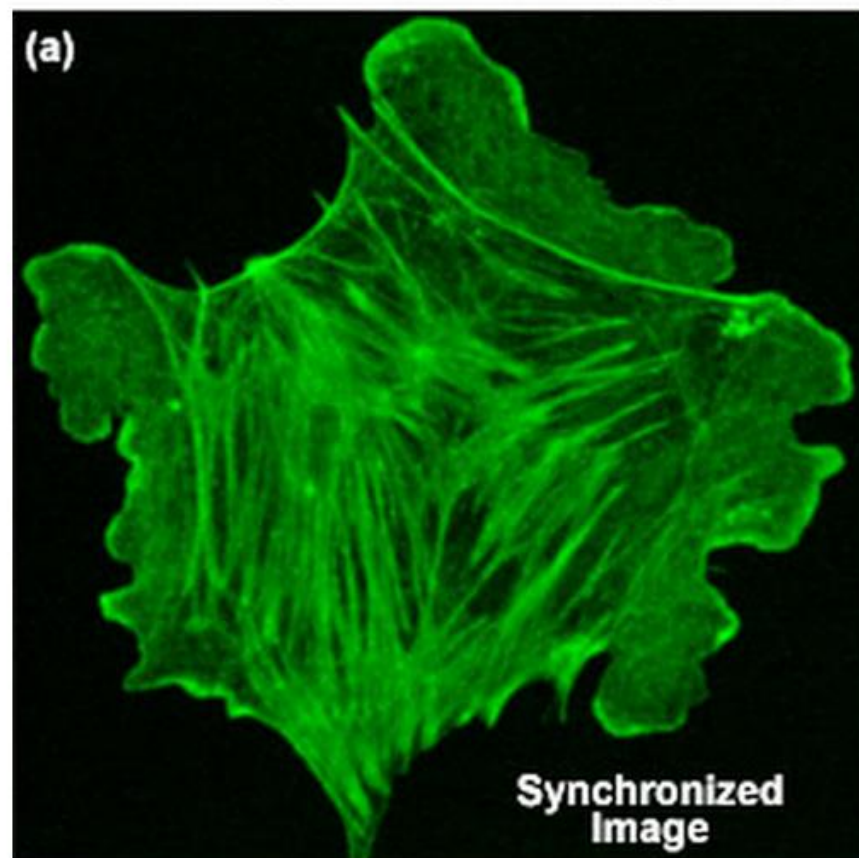


Figure 8

## Unsynchronized Image Capture in Spinning Disk Microscopy





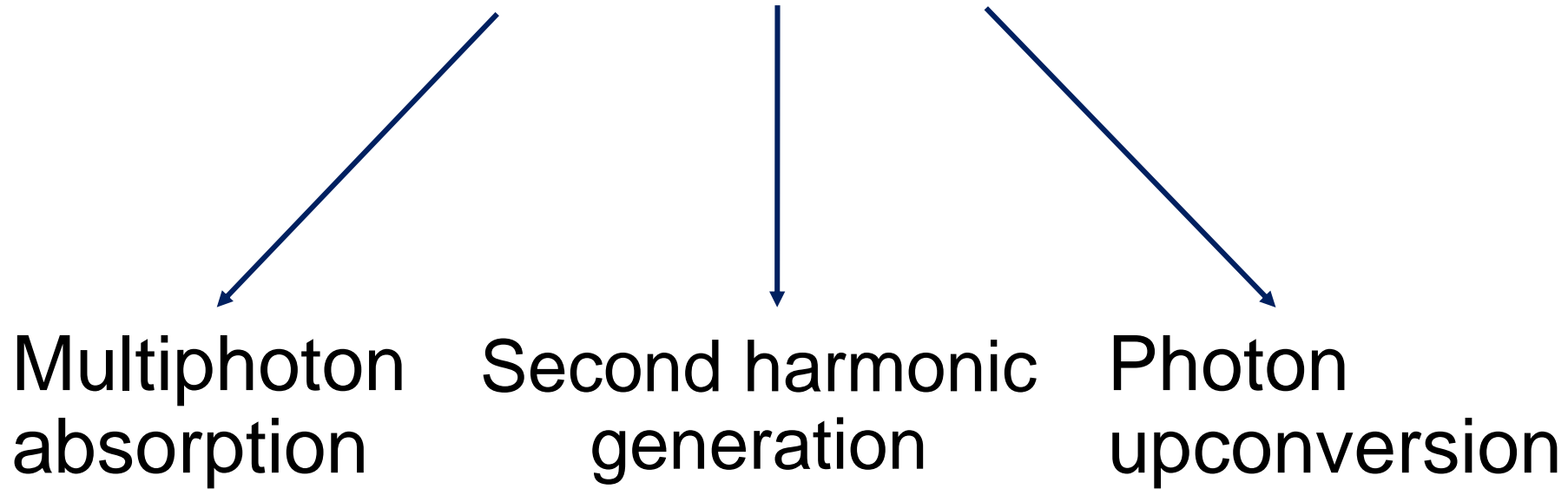
## Основная идея:

Использование точечного освещения образца и дополнительной апертуры для устранения света от источников, расположенных не в фокусе объектива.

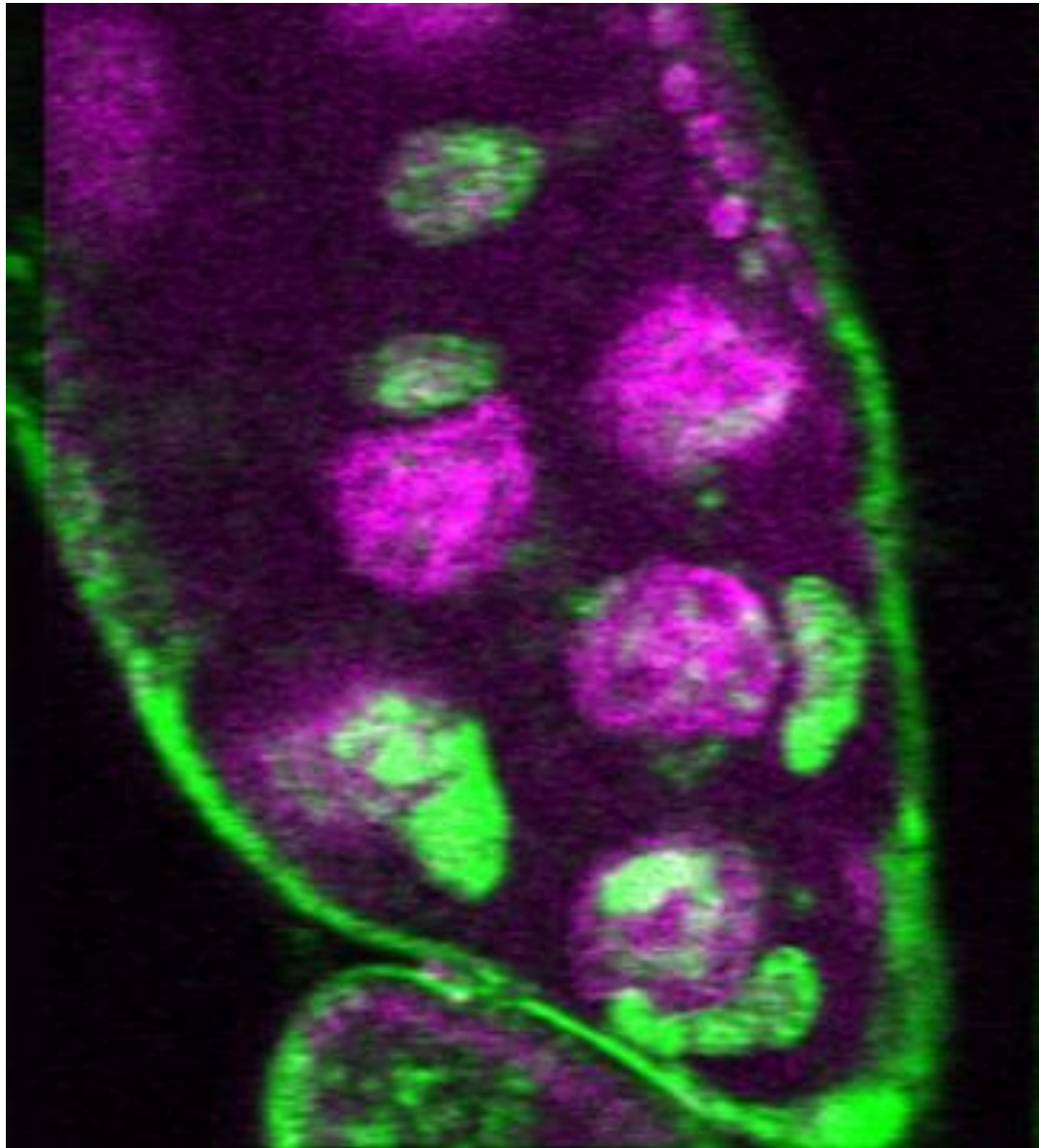
Пошаговое сканирование образца позволяет воссоздать трехмерную картину распределения интенсивности флуоресценции.

Использование апертуры, отсекающей «лишний» свет ведет к падению сигнала и, как следствие, необходимости в интенсивных источниках и длительной экспозиции.

When the wavelength of generated light is less than wavelength of excitation light

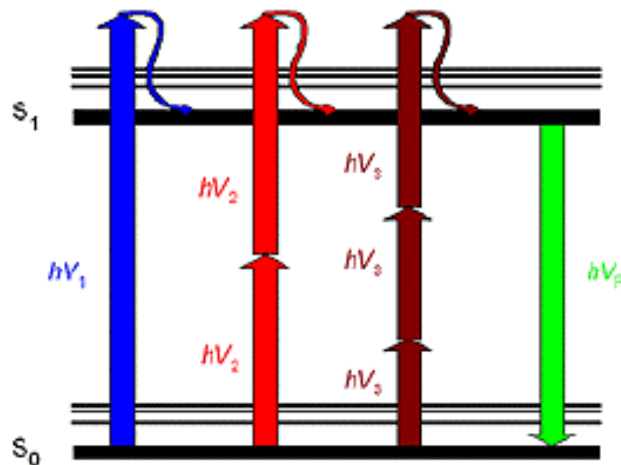


# Мультифотонная микроскопия



- Положительные особенности:
  - Высокое разрешение
  - Большая глубина проникновения ( почти 1 мм)
  - Уменьшение фотоповреждения образца

# Мультифотонное возбуждение



*В мультифотонной микроскопии ультракороткий лазерный импульс (~100 фемтосекунд) при фокусировке приводит к интенсивности поля, достаточной для мультифотонного возбуждения.*

# Вероятность поглощения

Вероятность двухфотонного поглощения зависит квадратично от интенсивности излучения:

**Вероятность поглощения:**

**Одного фотона  $\sim I$**

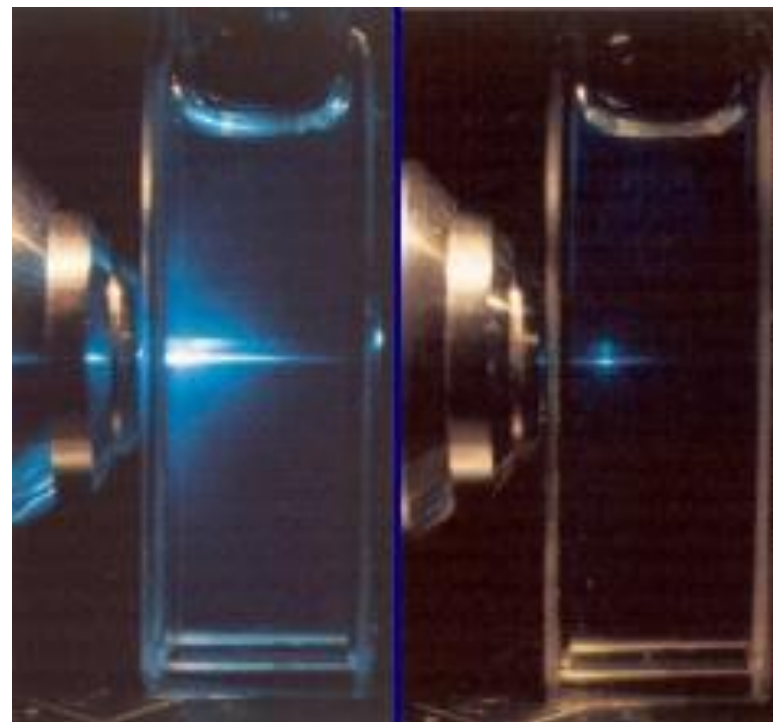
**Двух фотонов  $\sim I^2$**

**Трех фотонов  $\sim I^3$**

# Локализованная флуоресценция

- Локализация позволяет увеличить пространственное разрешение

При использовании двухфотонного возбуждения флуоресценция наблюдается исключительно в областях, находящихся в фокусе объектива, так как только в этой области интенсивность падающего излучения достаточна для эффективного возбуждения флюорофоров

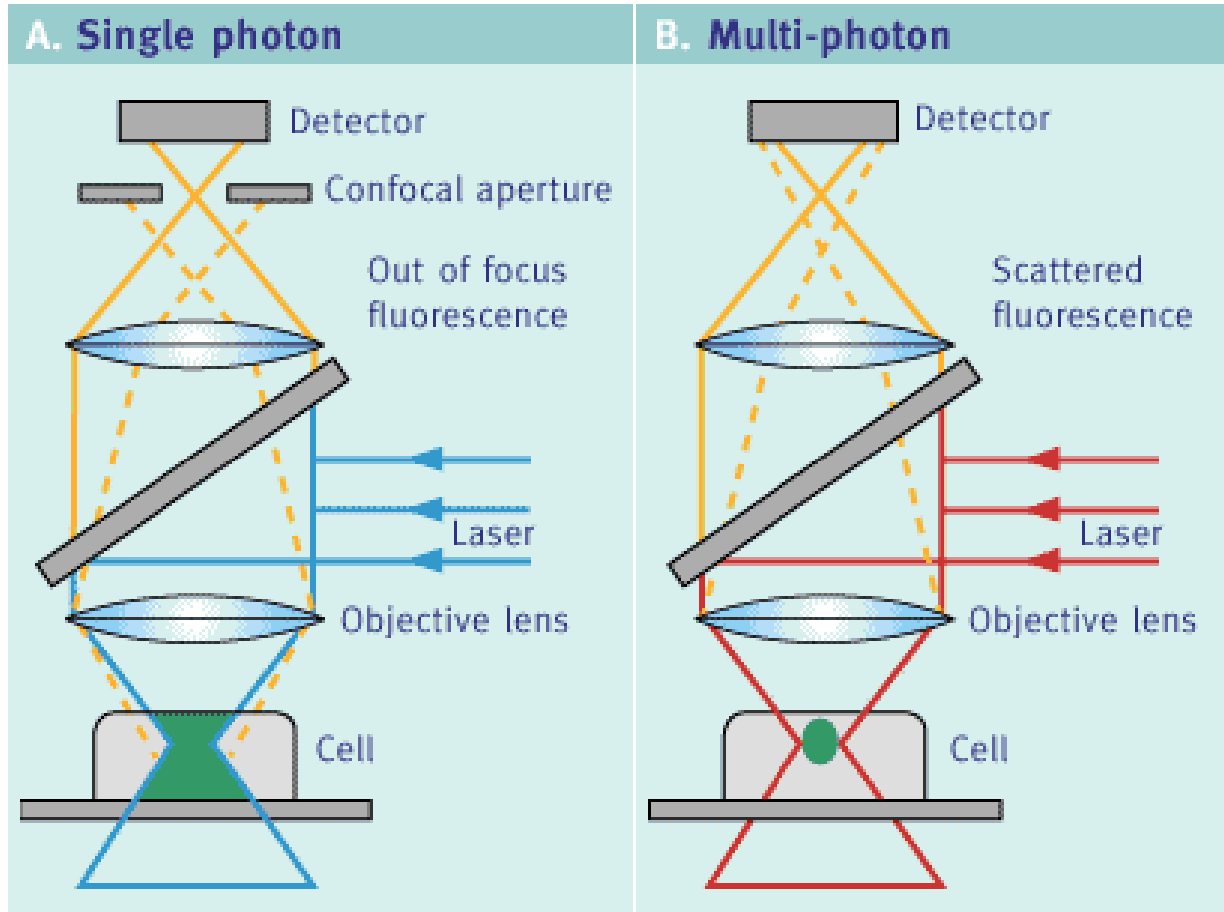


1-photon

2-photon

# Устранение конфокальной апертуры

Мультифотонное возбуждение устраняет необходимость в конфокальной апертуре, так как весь сигнал флуоресценции исходит из фокуса объектива. Также отметим меньшее рассеяние возбуждающего сигнала.

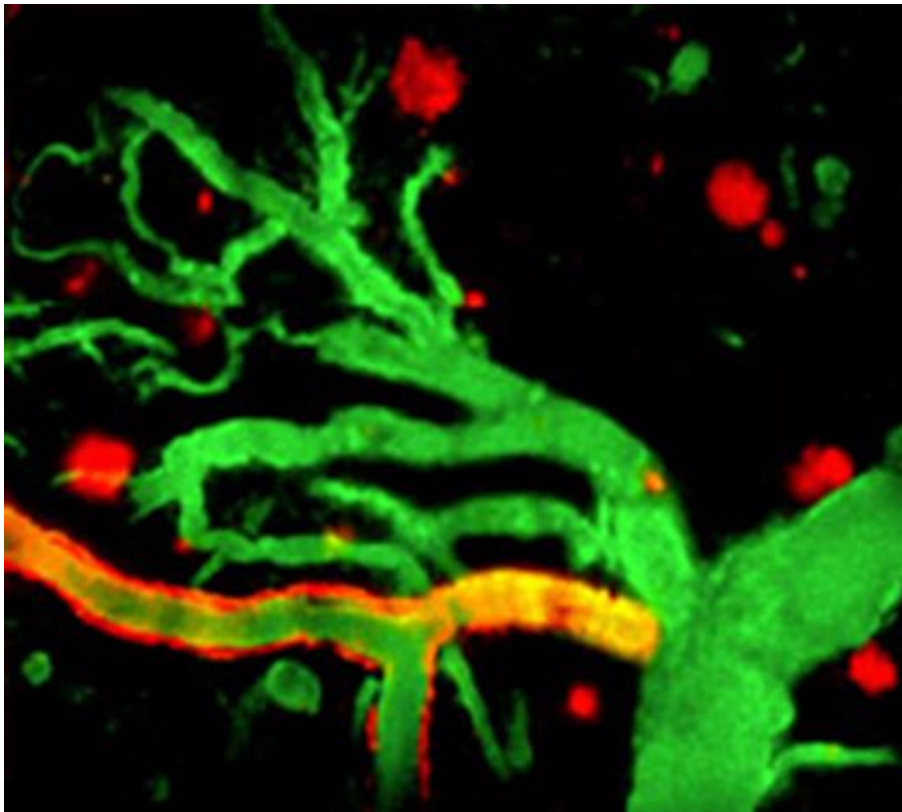


(A) confocal laser scanning microscopy (CLSM) and (B) multi-photon excitation microscopy (MPEM).



# Мониторинг физиологических процессов в клетках и тканях

Уменьшение фотоповреждения образца позволяет дольше исследовать биологические объекты и наблюдать в режиме реального времени такие процессы, как деление клеток, развитие эмбриона и т.п.



Ангиопатия, выявляемая при помощи тиофлавина S (красный цвет – амилоидные бляшки). Флуоресцентная ангиограмма получена введением флуоресцеина (зеленый цвет – сосуды)

Реальный размер изображаемой области около 600 микрон, глубина фокусировки – около 200 микрон

# Максимальное проникновение вглубь биологических объектов

Мультфотонная микроскопия позволяет получать изображения на глубине до 800 микрон за счет следующих характеристик:

1. ИК излучение глубже проникает в образец, чем более коротковолновый свет, который рассеивается сильнее;
2. Четкая локализация флуоресценции
3. Флуоресценция регистрируется напрямую, без введения дополнительных апертур

# Широкий спектр возбуждения



Использование Титан-Сапфирового импульсного лазера позволяет варьировать длину волны возбуждающего излучения от 650 до 1100 нм.

Это делает мультфотонную микроскопию более гибкой техникой и позволяет использовать ее для регистрации необычных флуоресцентных зондов с длиной волны возбуждающего света, лежащей в области ближнего ультрафиолета (такие флюорофоры часто используются для визуализации ДНК и РНК).

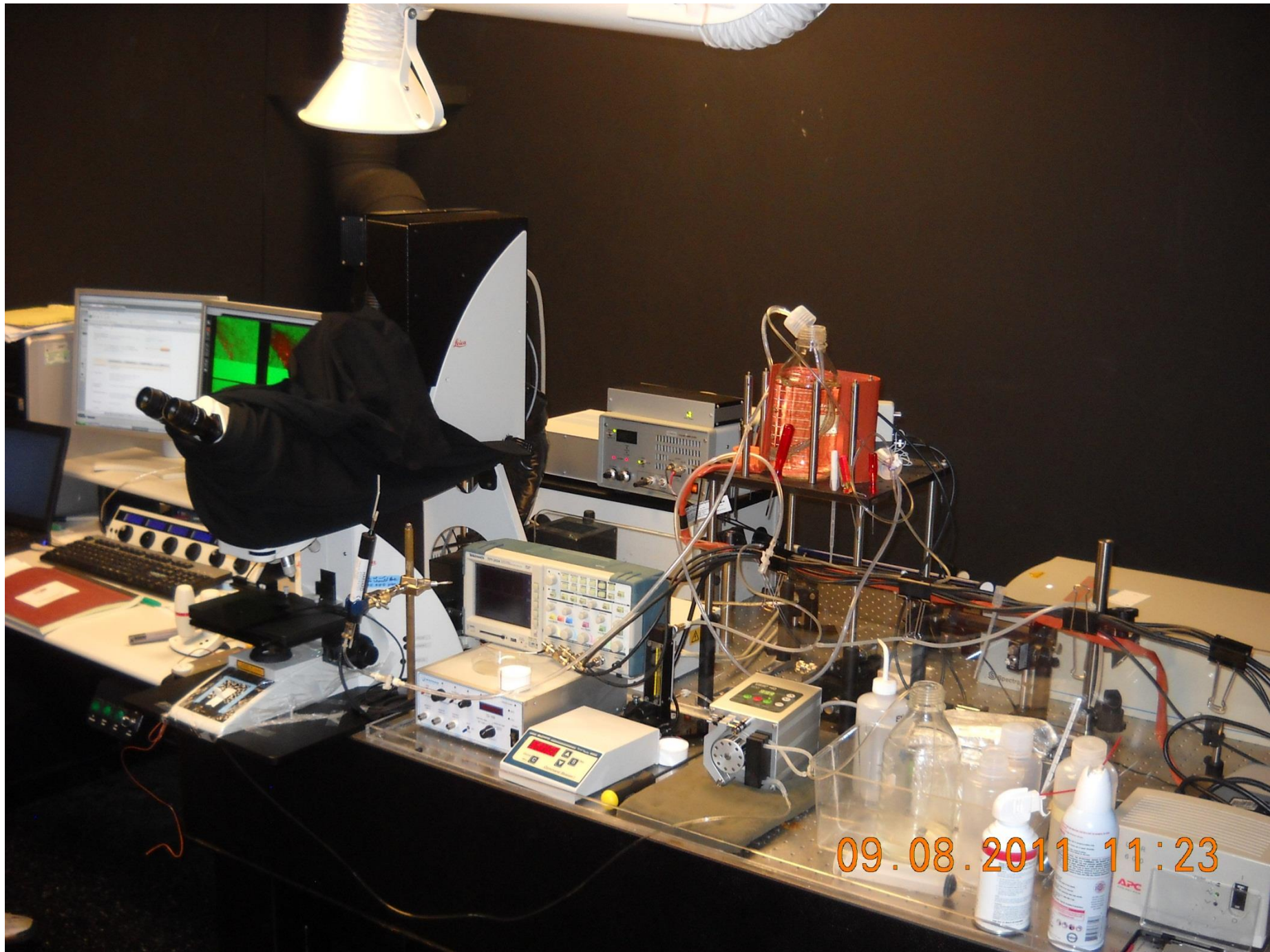
Так как возбуждение двухфотонное, то для визуализации не требуется облучение ультрафиолетом, обладающим сильным фоторазрушительным действием.

# Визуализация динамики концентрации $\text{Ca}^{2+}$

Изменение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  влияет на флуоресцентные свойства чувствительных зондов-флюорофоров, спектр поглощения которых лежит в ультрафиолетовой области. Эти соединения также могут эффективно возбуждаться двухфотонным поглощением ИК-света – намного менее разрушительным, чем прямое однофотонное возбуждение.

# Конфокальный vs двухфотонный микроскоп:

- Импульсные лазеры, необходимые для мультифотонного возбуждения, намного дороже, чем лазеры непрерывного режима, используемые в конфокальной микроскопии.
- Для тонких объектов – таких, как отдельные клетки, однофотонные конфокальные микроскопы дают более высокое разрешение из-за меньшей длины волны света.
- С другой стороны - в рассеивающей ткани более четкое оптическое секционирование, достигаемое при помощи двухфотонного микроскопа, приводит к более высокому пространственному разрешению

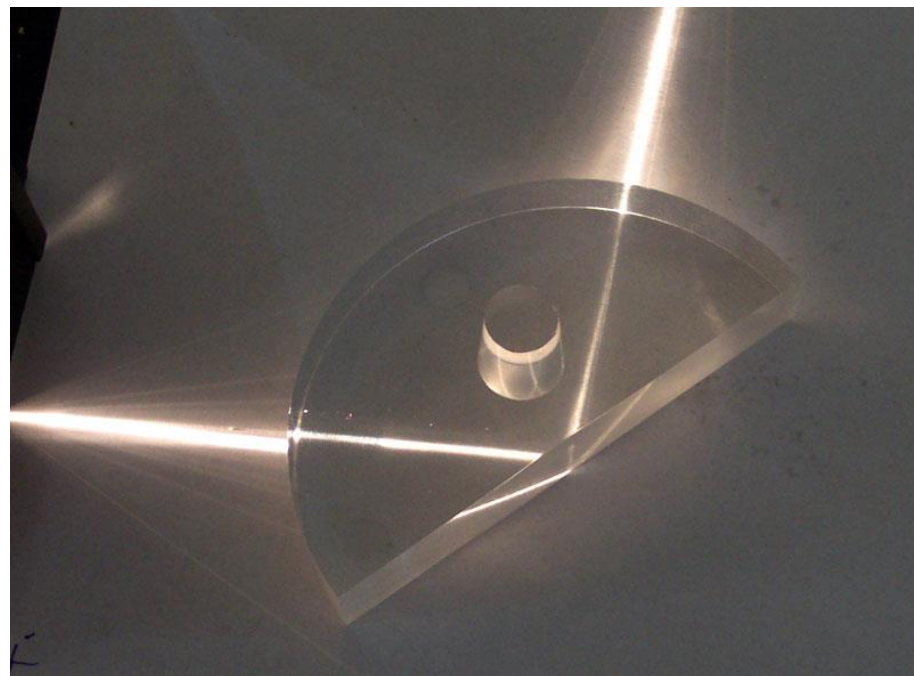
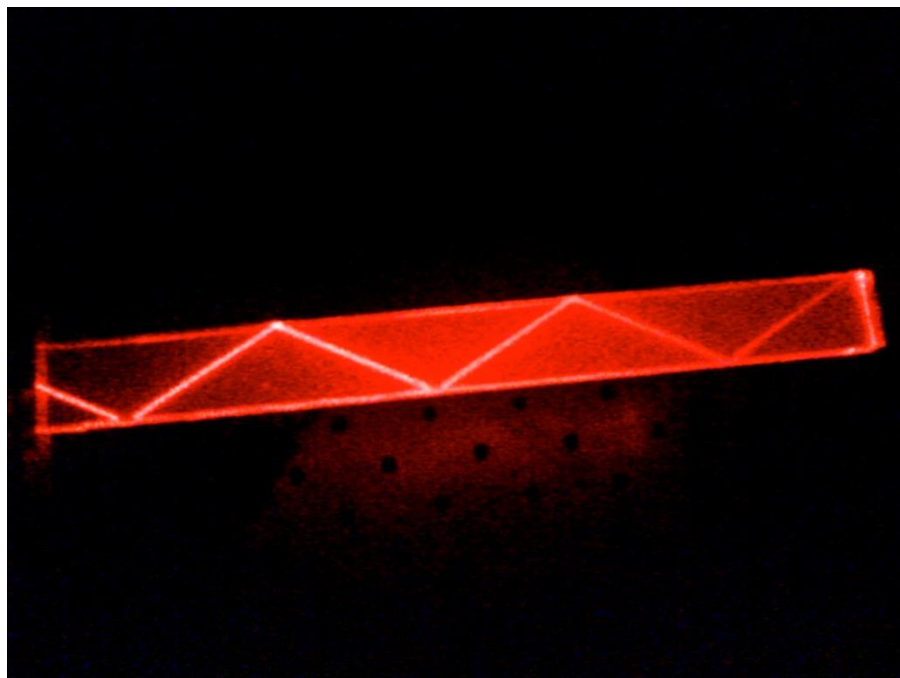


09.08.2011 11:23

# Микроскопия, основанная на генерации второй гармоники (SHIM)

- Не происходит фотоактивации молекул -> эффекты фототоксичности снижены
- Не нужно меток – многие биомакромолекул дают сигнал сами по себе (коллаген, микротрубочки и мышечный миозин)
- Благодаря использованию света ближнего ик – диапазона, глубже проникающего в исследуемый объект, можно получать 3д – изображения областей, генерирующих сигнал второй гармоники.

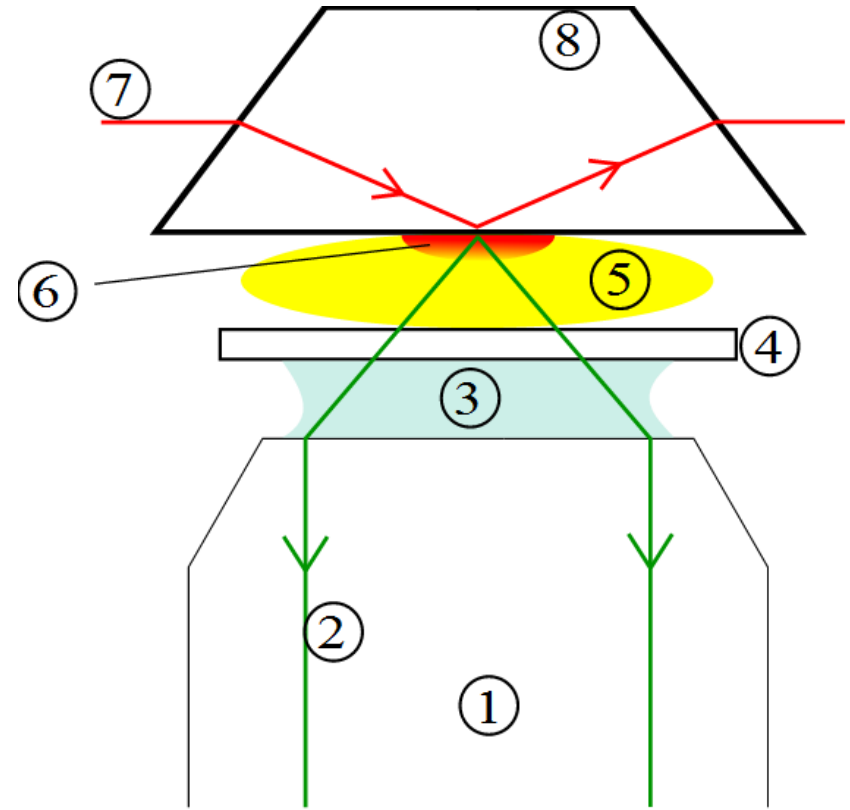
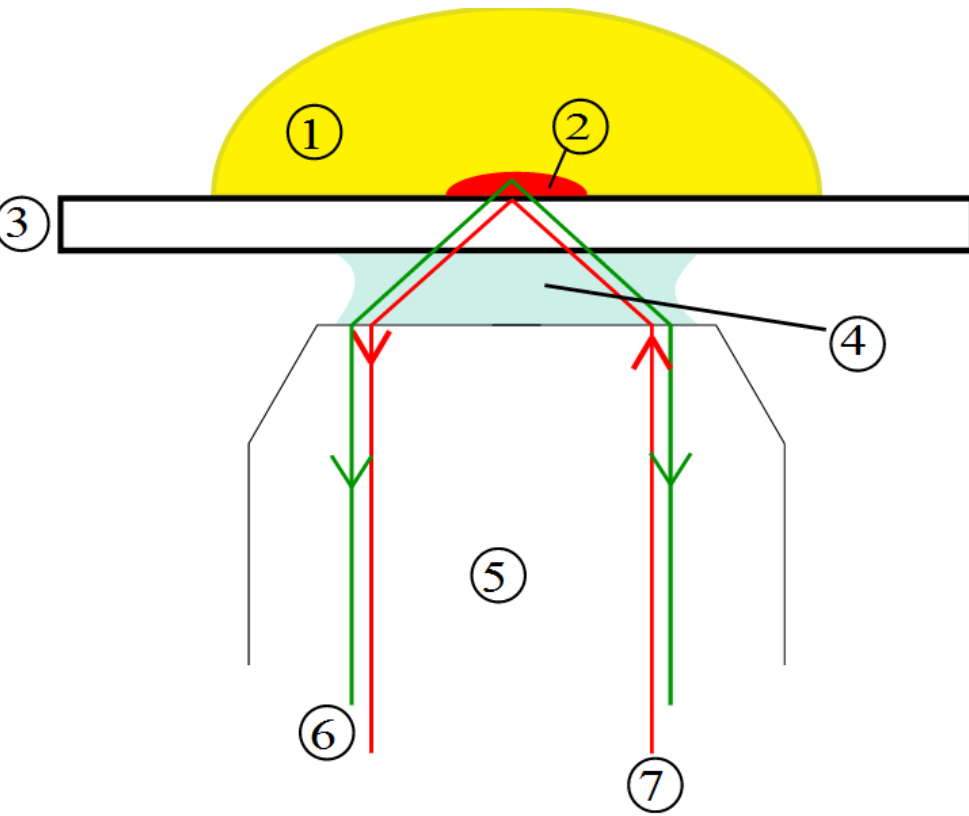
# Микроскопия полного внутреннего отражения Total internal reflection fluorescence microscope TIRF, TIRFM







# Принцип работы



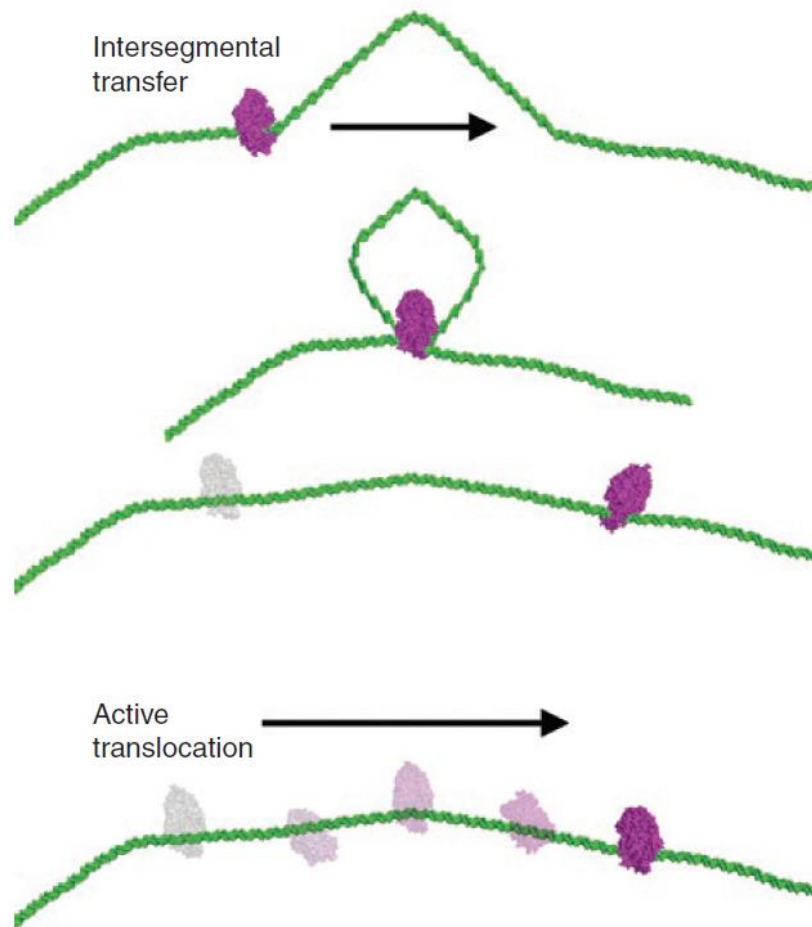
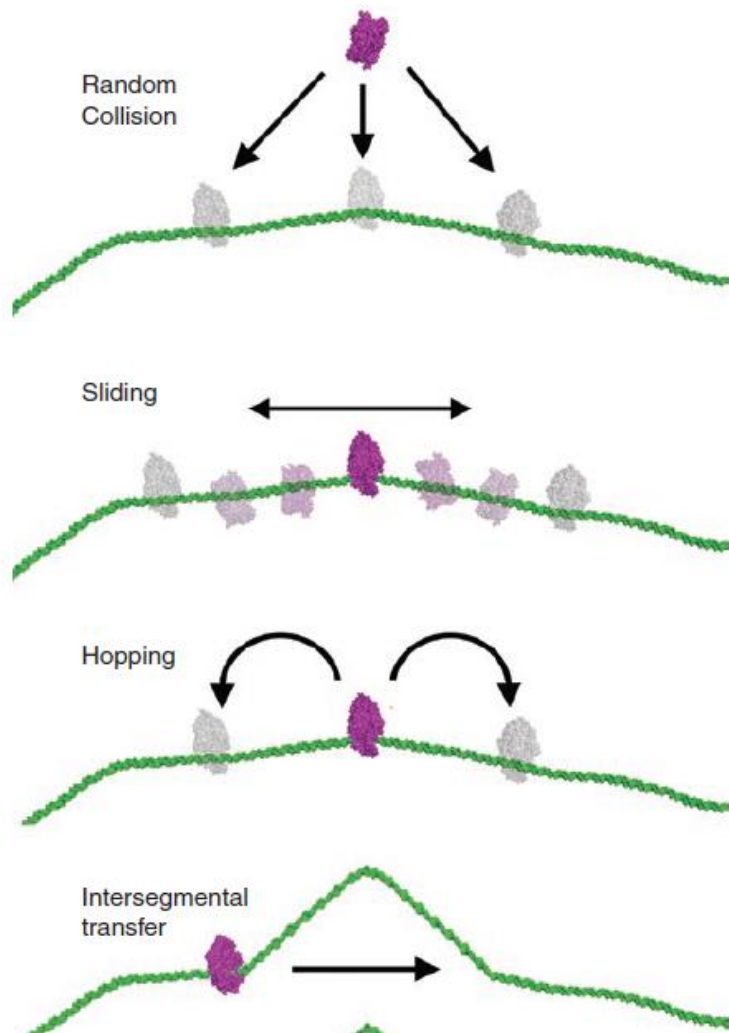
# Глубина проникновения поля

- Поле, экспоненциально спадая, проникает на глубину порядка 100-200 нм

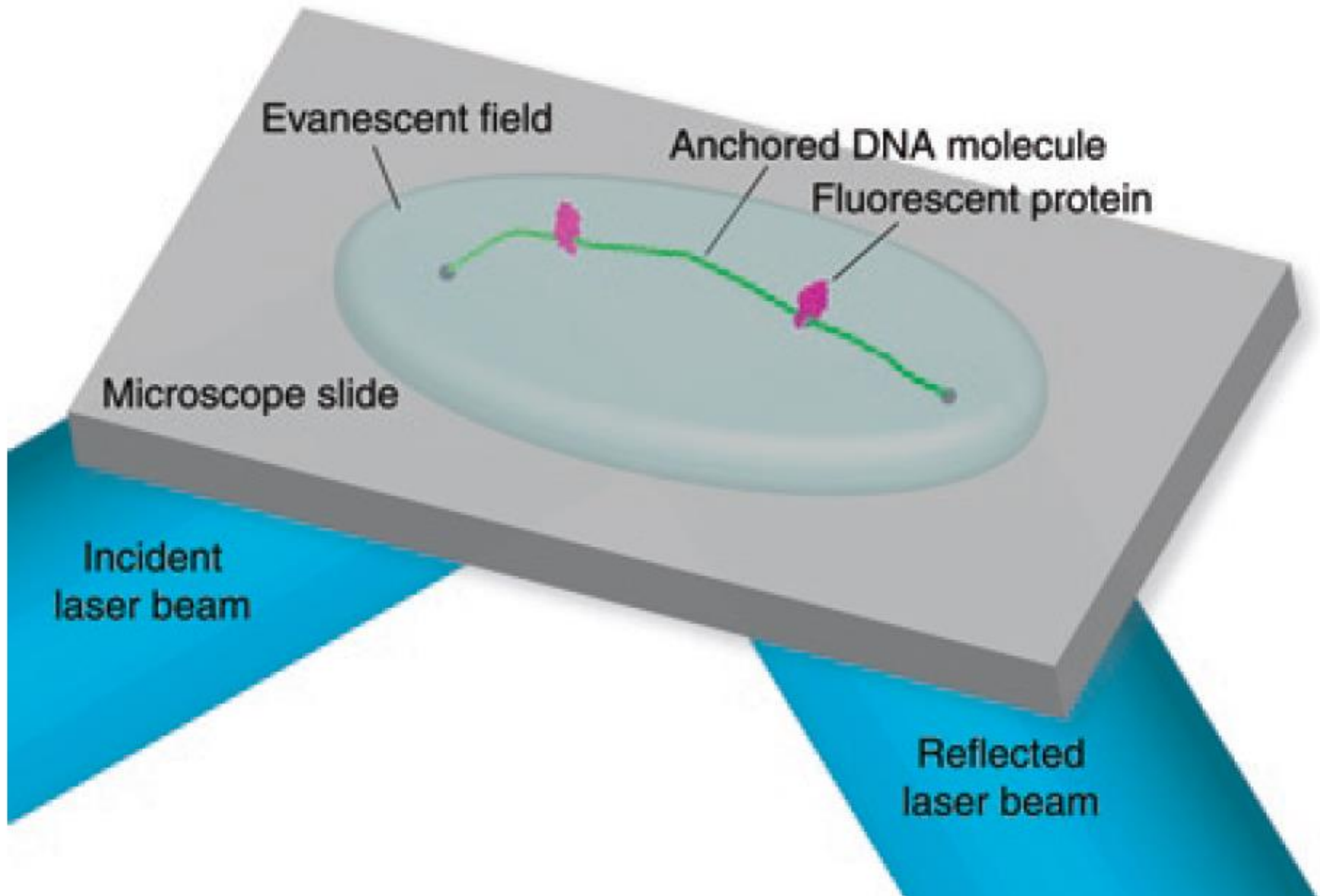
$$\mathbf{E}_T = \mathbf{E}_0 e^{-\kappa z} e^{i(kx - \omega t)}$$

$$\kappa = \frac{\omega}{c} \sqrt{(n_1 \sin(\theta_I))^2 - n_2^2}$$

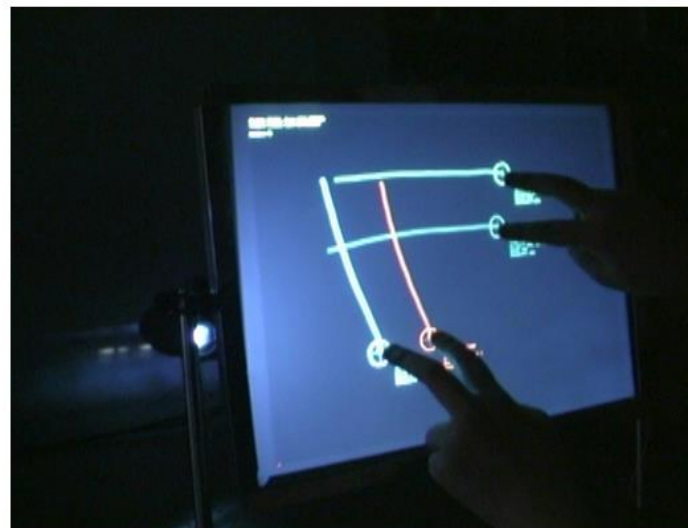
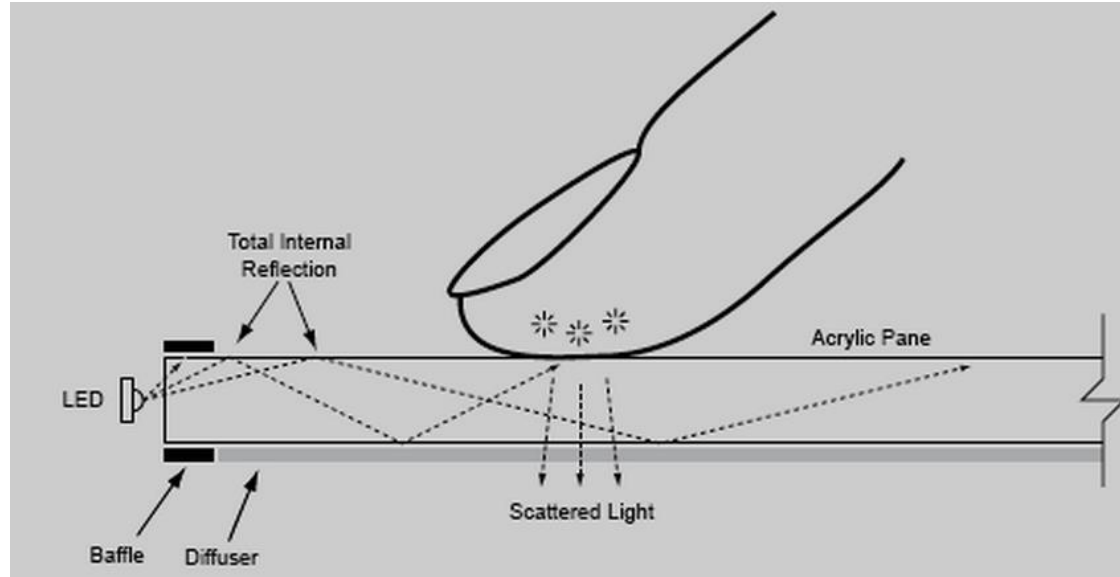
# Изучение динамики взаимодействия белков с ДНК при помощи TIRF микроскопа



# Идея эксперимента

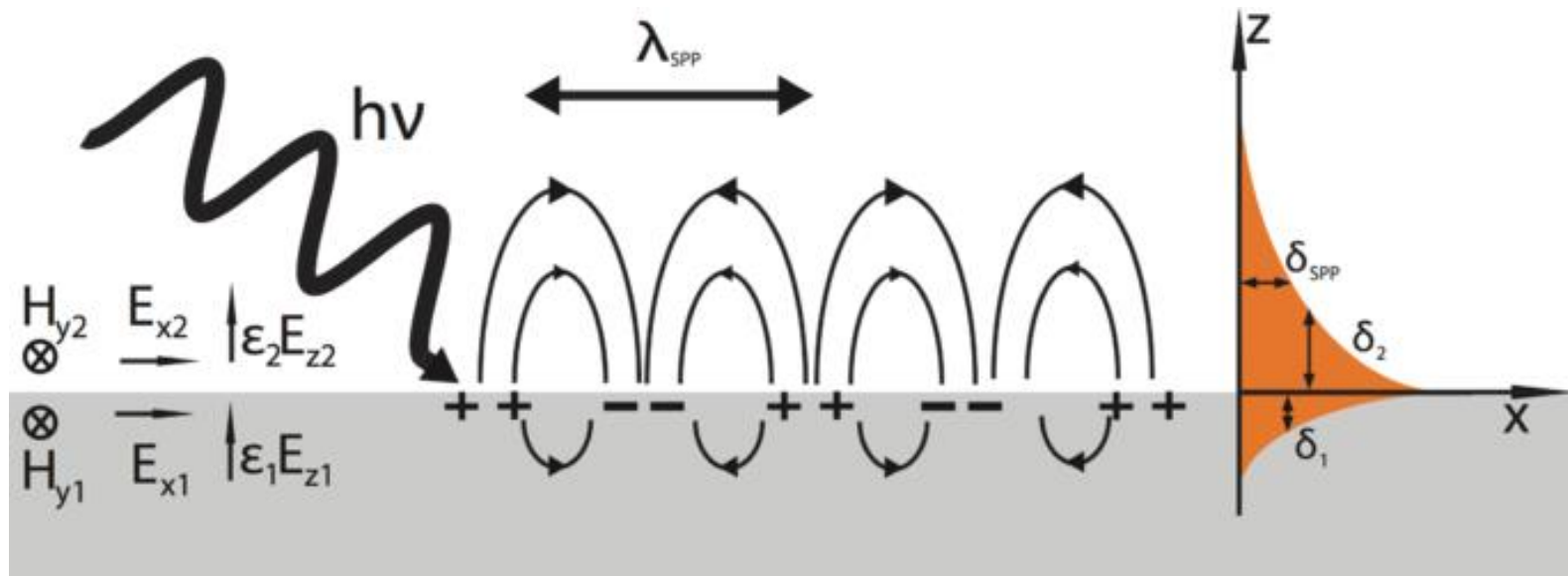


# Явление нарушенного полного внутреннего отражения (FTIR)

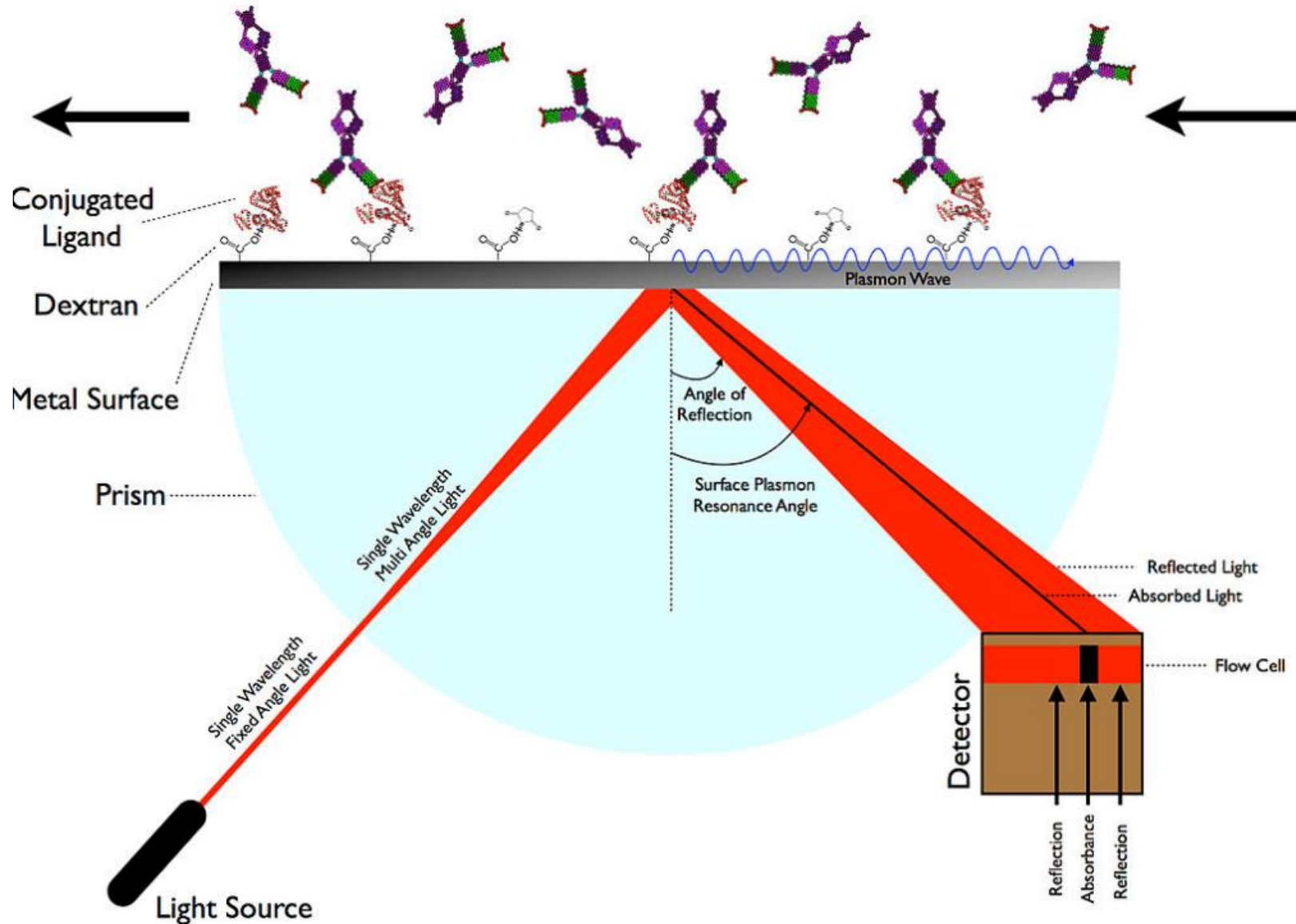


# Плазмон

- Плазмон – это квазичастица, отвечающая квантованию плазменных колебаний, которые представляют собой коллективные колебания свободного электронного газа.



# Поверхностный плазмонный резонанс





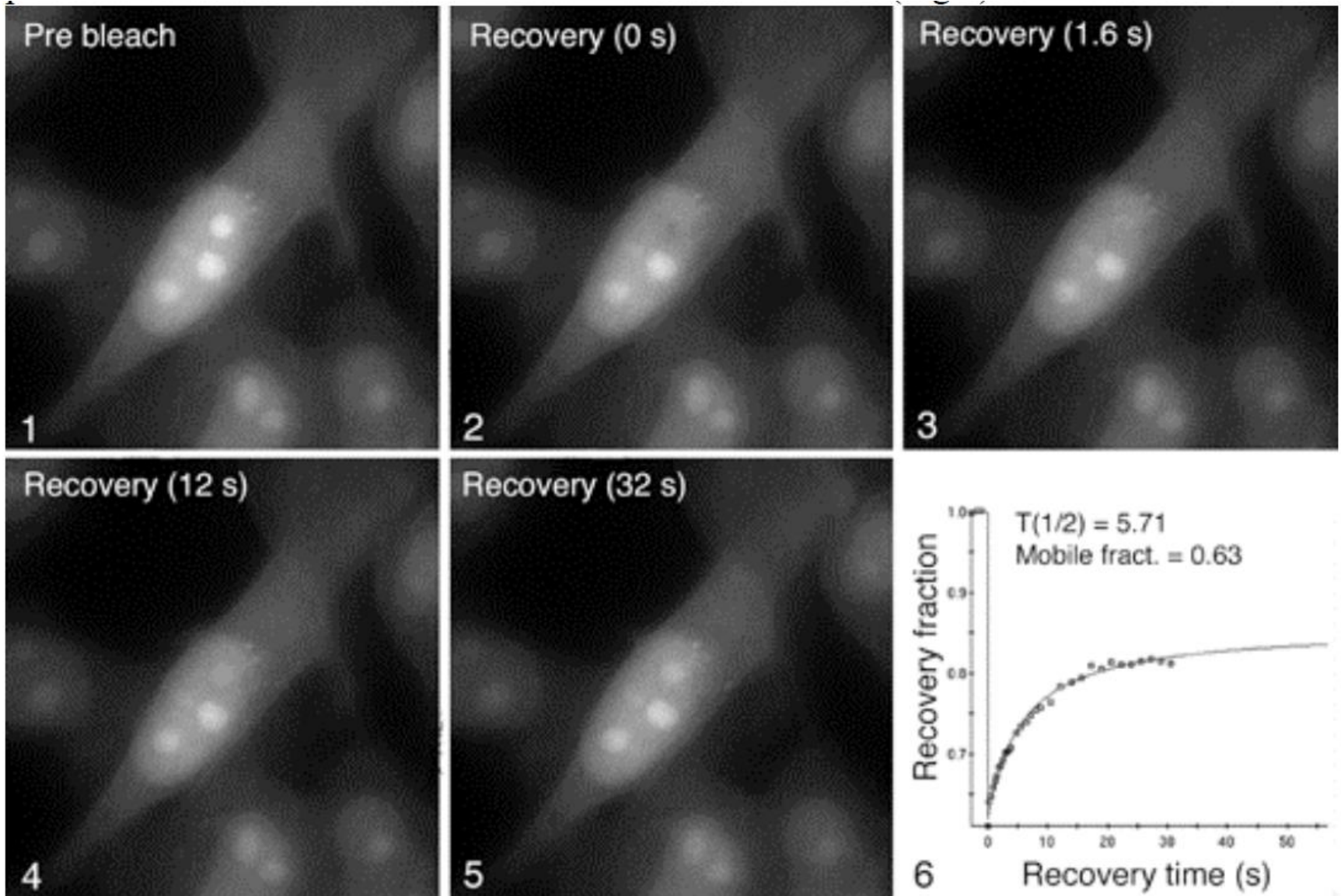
# FRAP, FLIM, FRET

**\*Fluorescence Recovery After Photobleaching  
= FRAP**

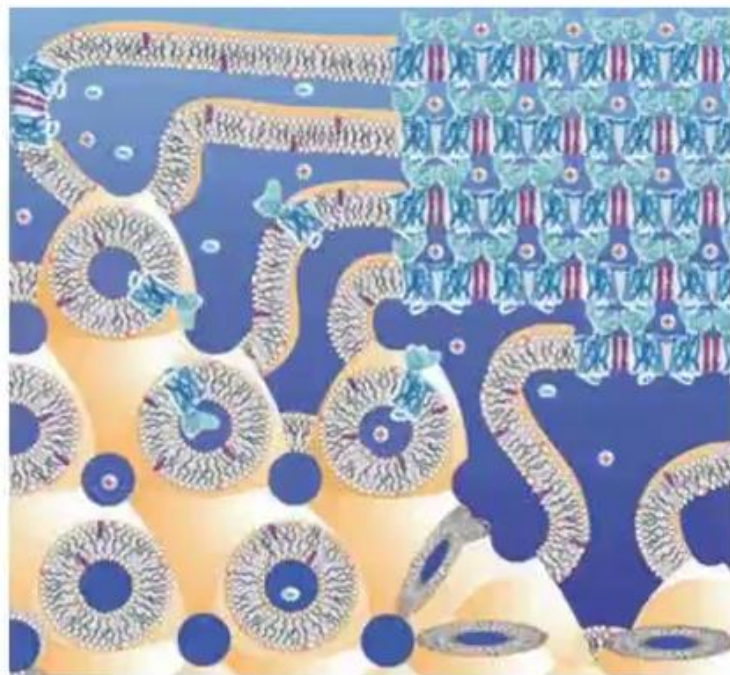
**\*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy  
= FLIM**

**\*Förster Resonance Energy Transfer  
= FRET**

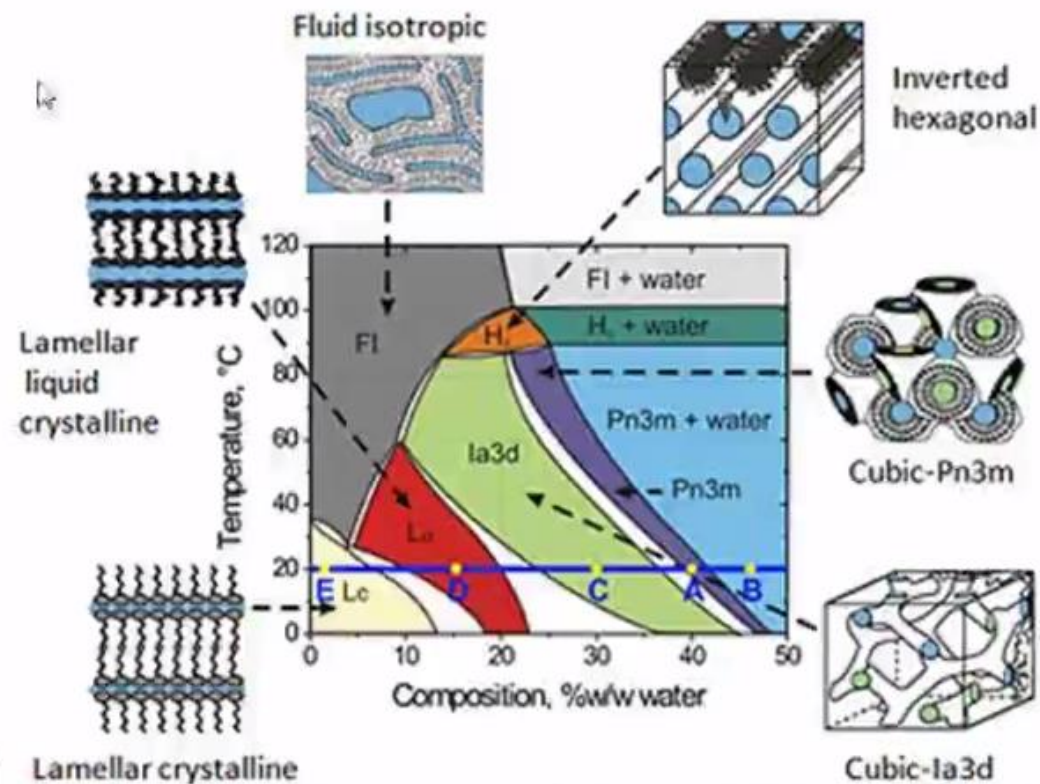
# FRAP



# Lipidic Cubic Phase (LCP)

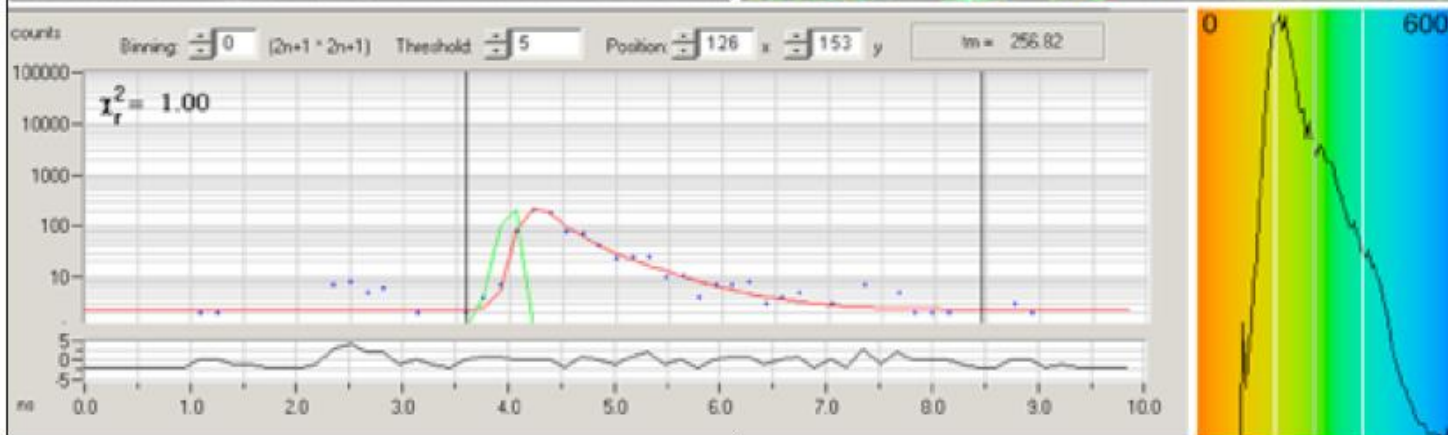
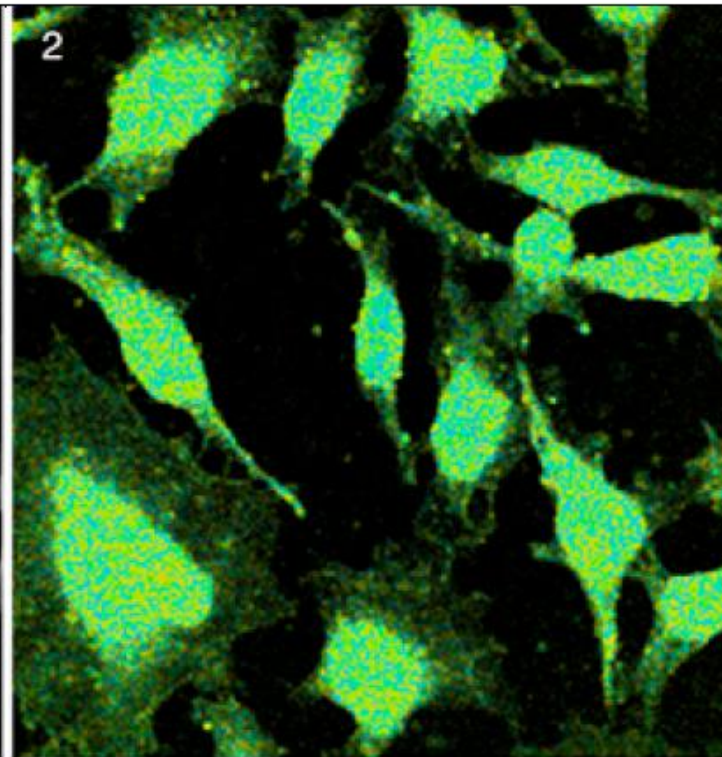
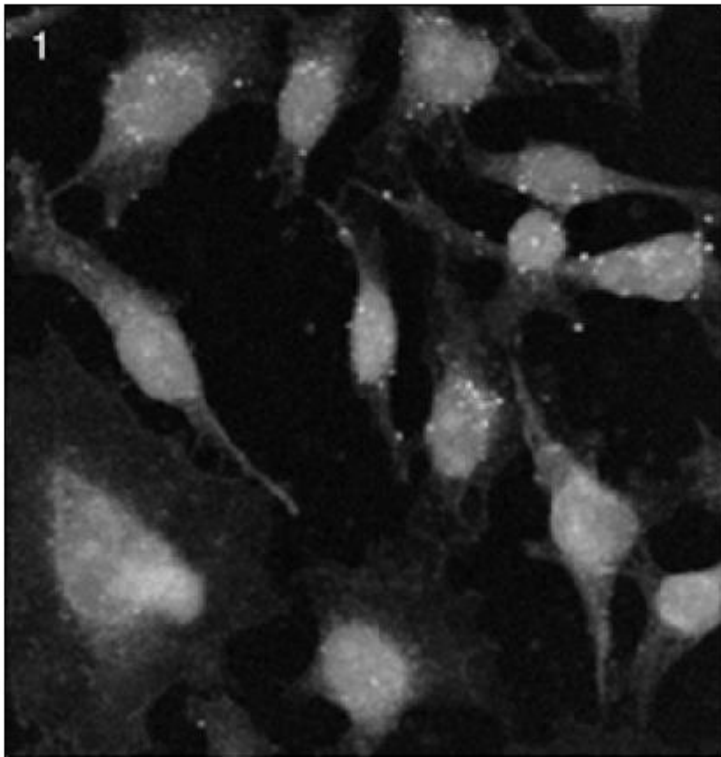


Caffrey. An Rev Biophys. 2009



## Monoolein

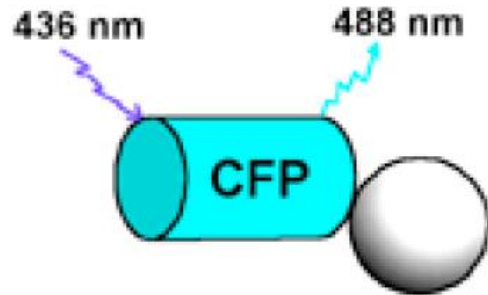
# FLIM



# FRET

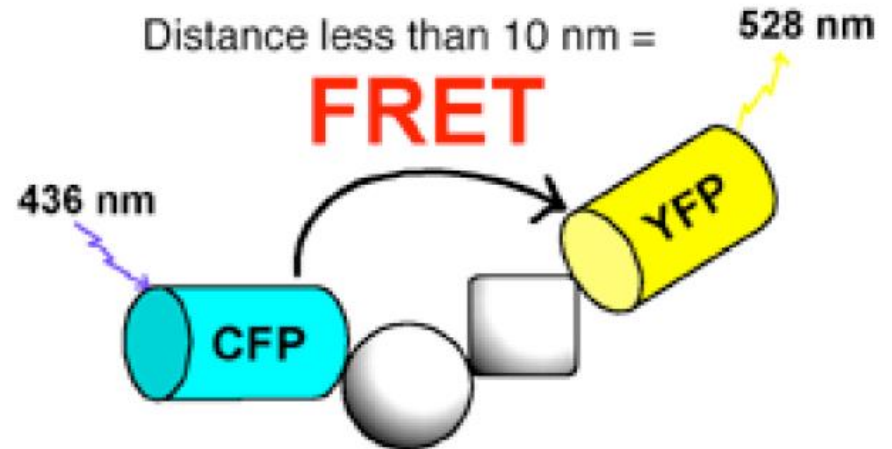
Distance greater than 10 nm =

**NO FRET**



Distance less than 10 nm =

**FRET**



# Методы регистрации

- ***FLIM-FRET***
- ***Фототушение акцептора***
- ***Измерение флуоресценции за счет переноса энергии***

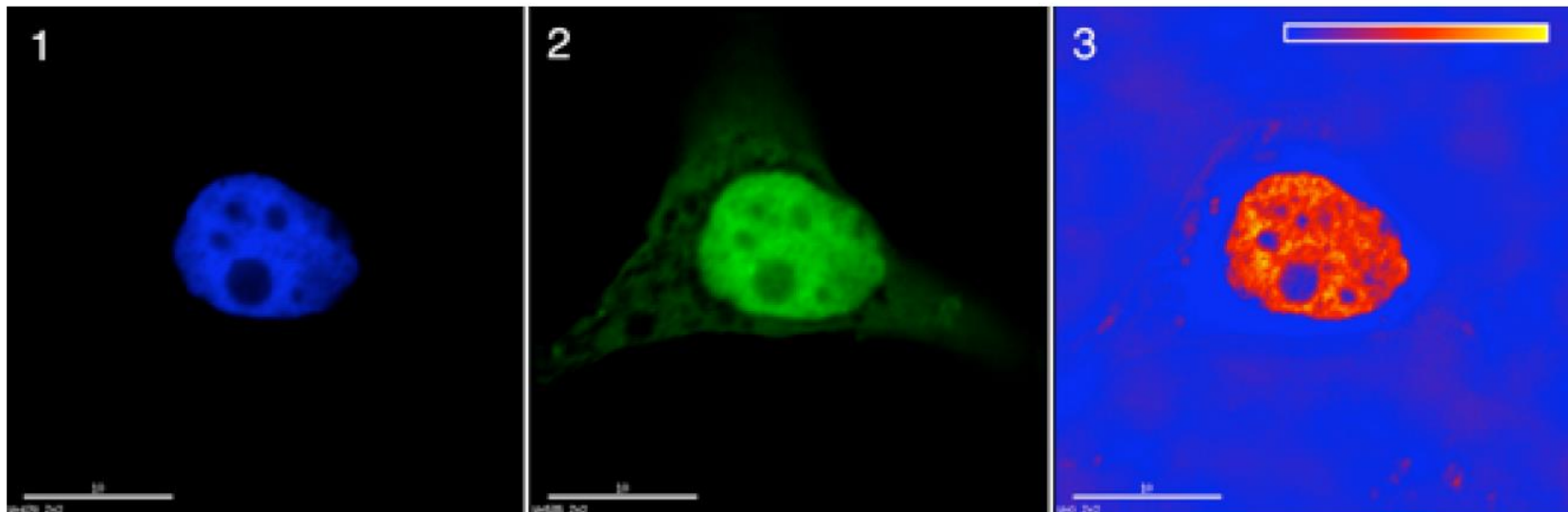
# FLIM-FRET

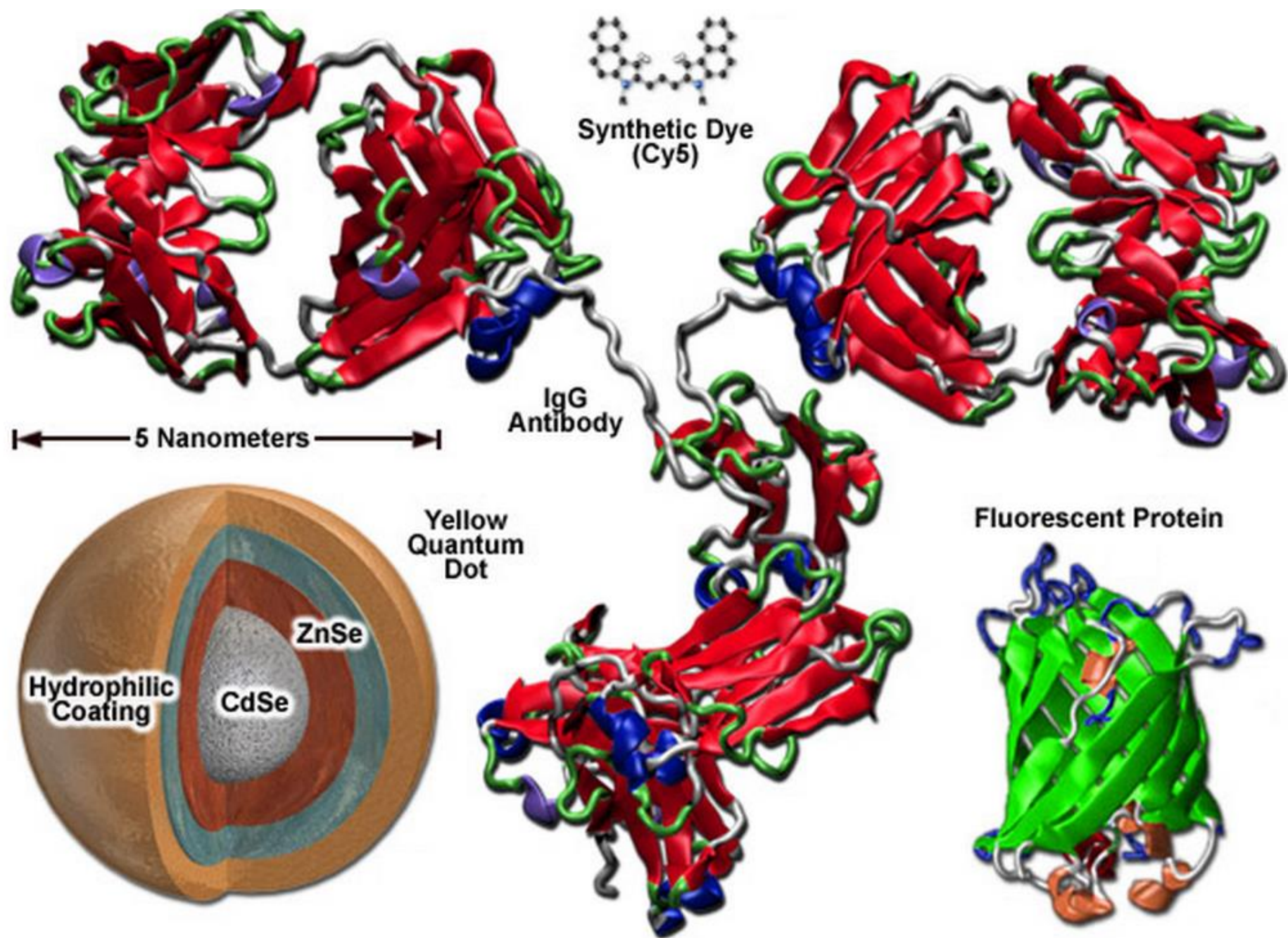
# Фототушение акцептора

- Измерение флуоресценции в канале донора
- Необратимое фототушение акцептора
- Повторное измерение интенсивности флуоресценции в канале донора
- Недостатки: повреждения, наличие FRAP *in vivo*, наличие сигнала от акцептора



# *Измерение флуоресценции за счет переноса энергии*

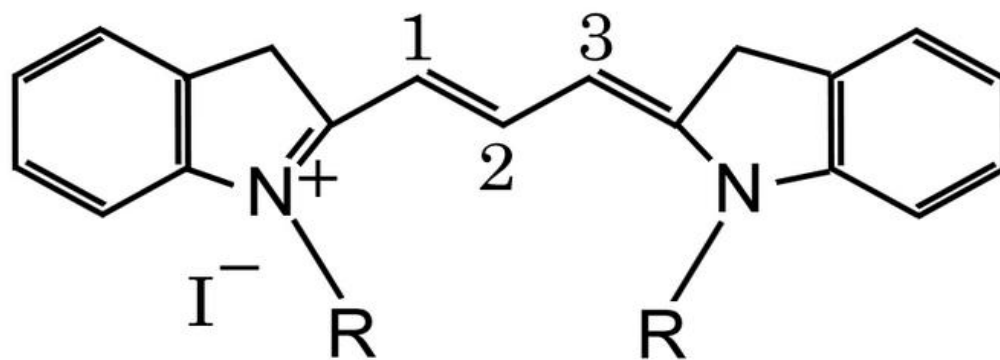




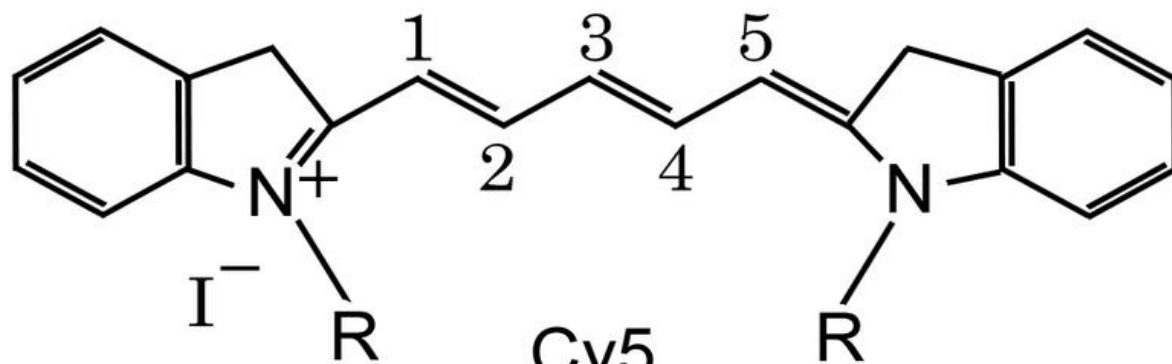
# Характеристики флюорофоров

Green fluorescent protein:	$10^4$ - $10^5$ ;	0.1-1 s
Typical organic dye:	$10^5$ - $10^6$ ;	1-10 s
CdSe/ZnS Quantum dot:	$10^8$ ;	> 1000 s

# Цианины



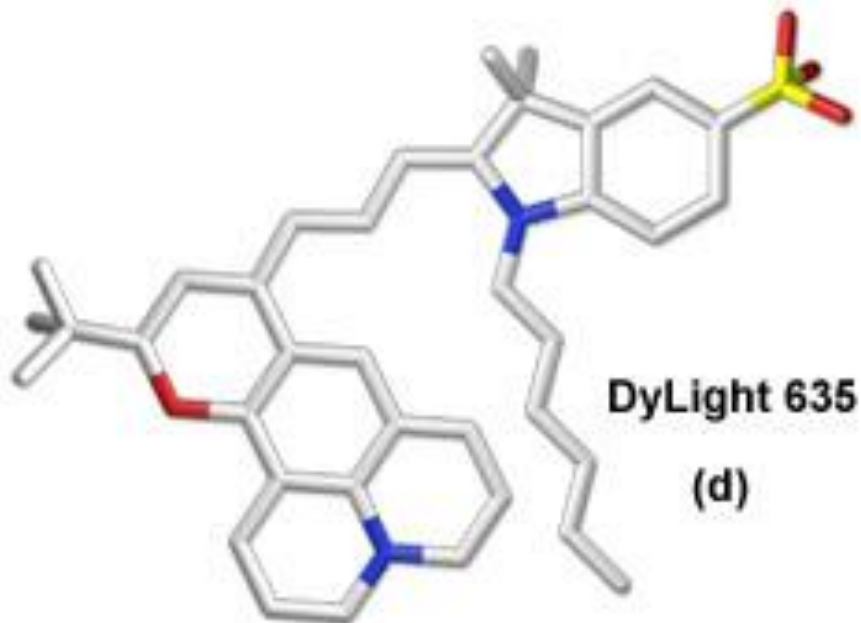
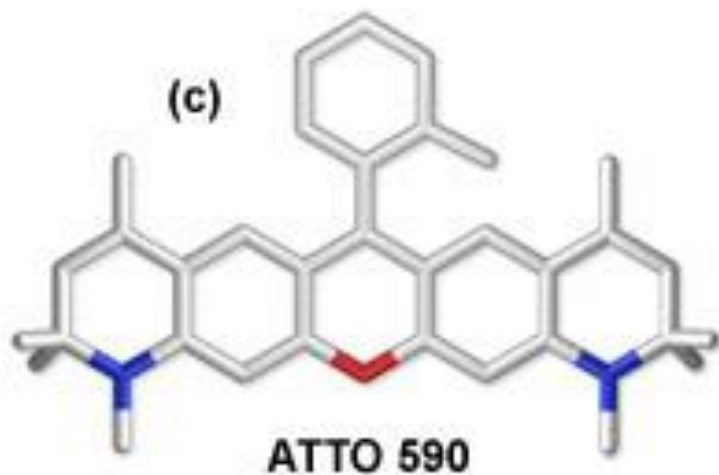
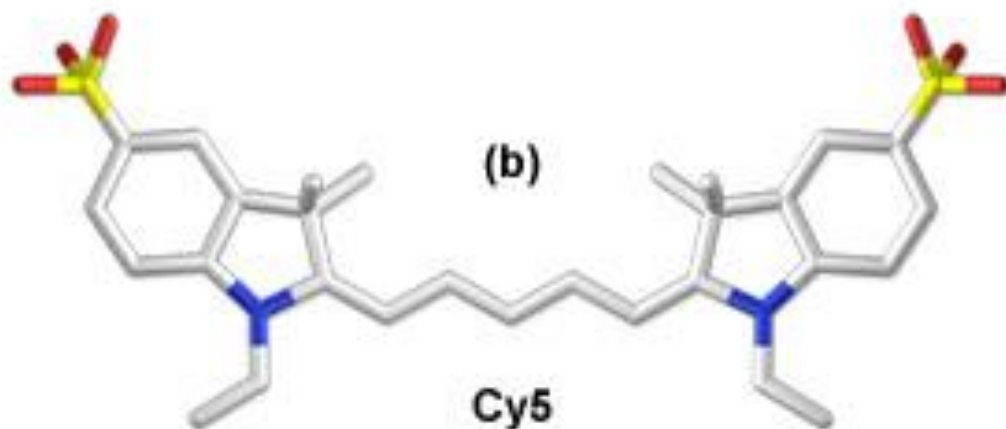
Cy3



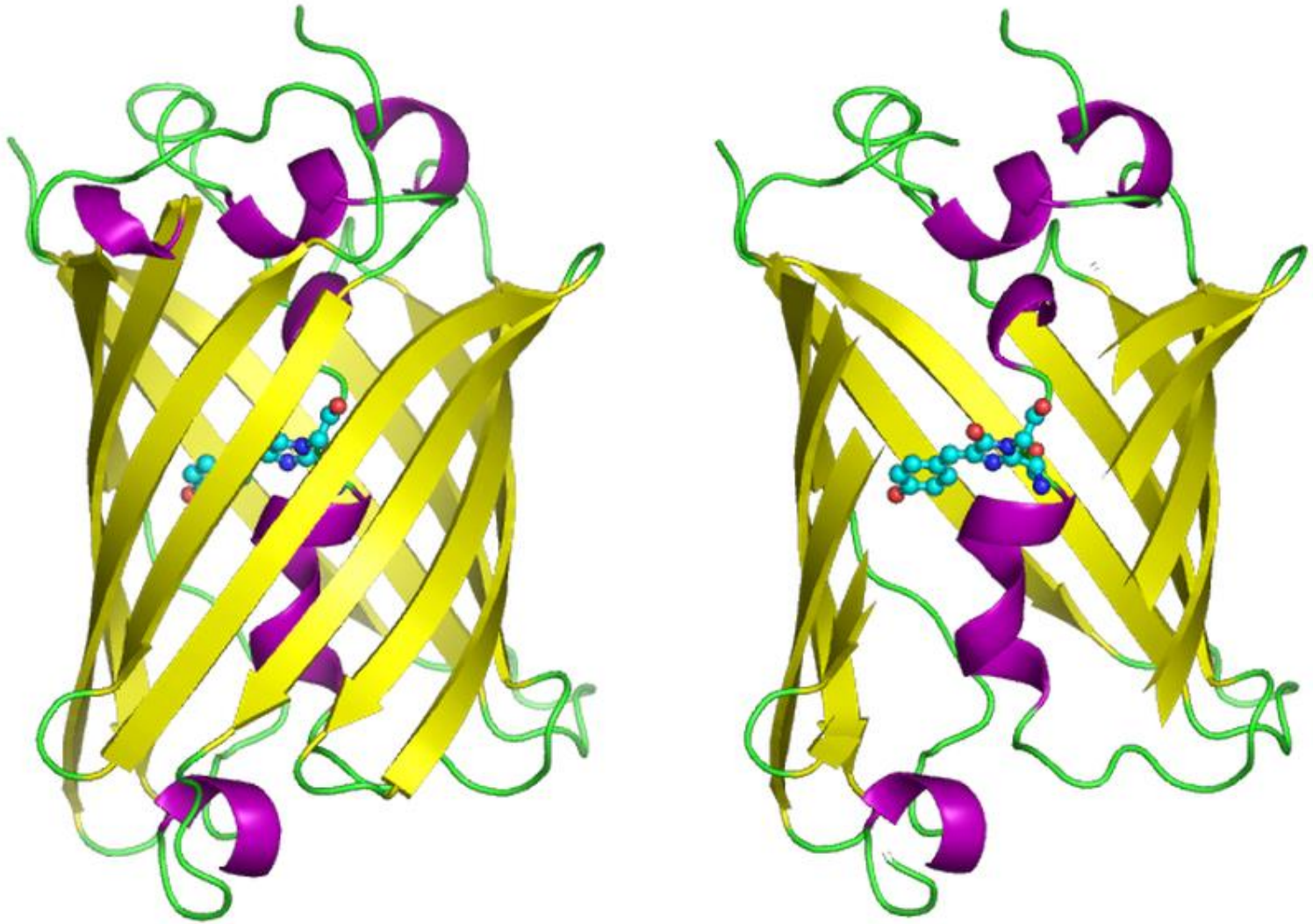
Cy5

Dye	Absorbance Max	Emission Max	Quantum yield in PBS buffer	Molecular weight (Da)
Cy3	550 nm	570 nm	0.04 <sup>[5]</sup>	766
Cy5	649 nm	670 nm	0.28	792

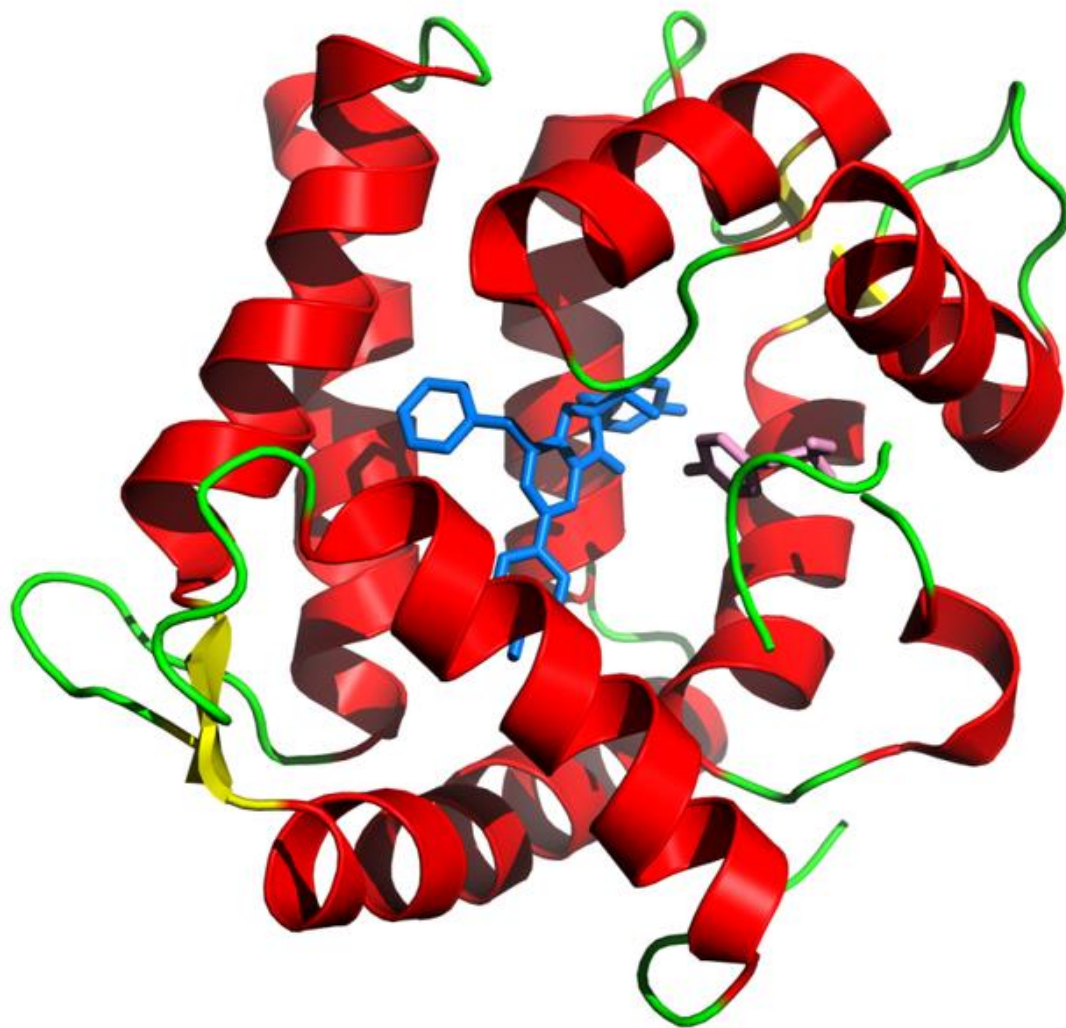
# Синтетические флюорофоры



# GFP: CFP, YFP etc



# Экворин



целентеразин

# Спектры поглощения и излучения wtGFP и S65T мутанта

Absorption and Fluorescence Emission Spectral Profiles of wtGFP and the S65T Variant

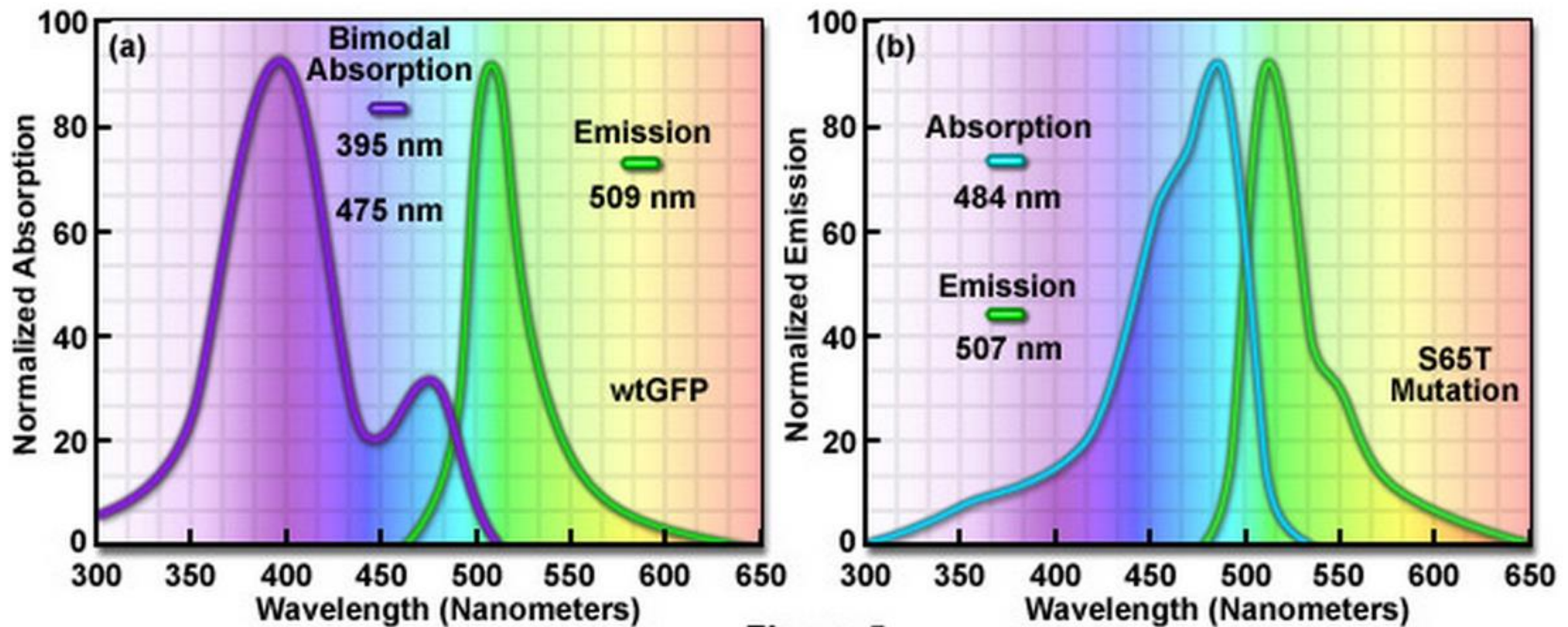
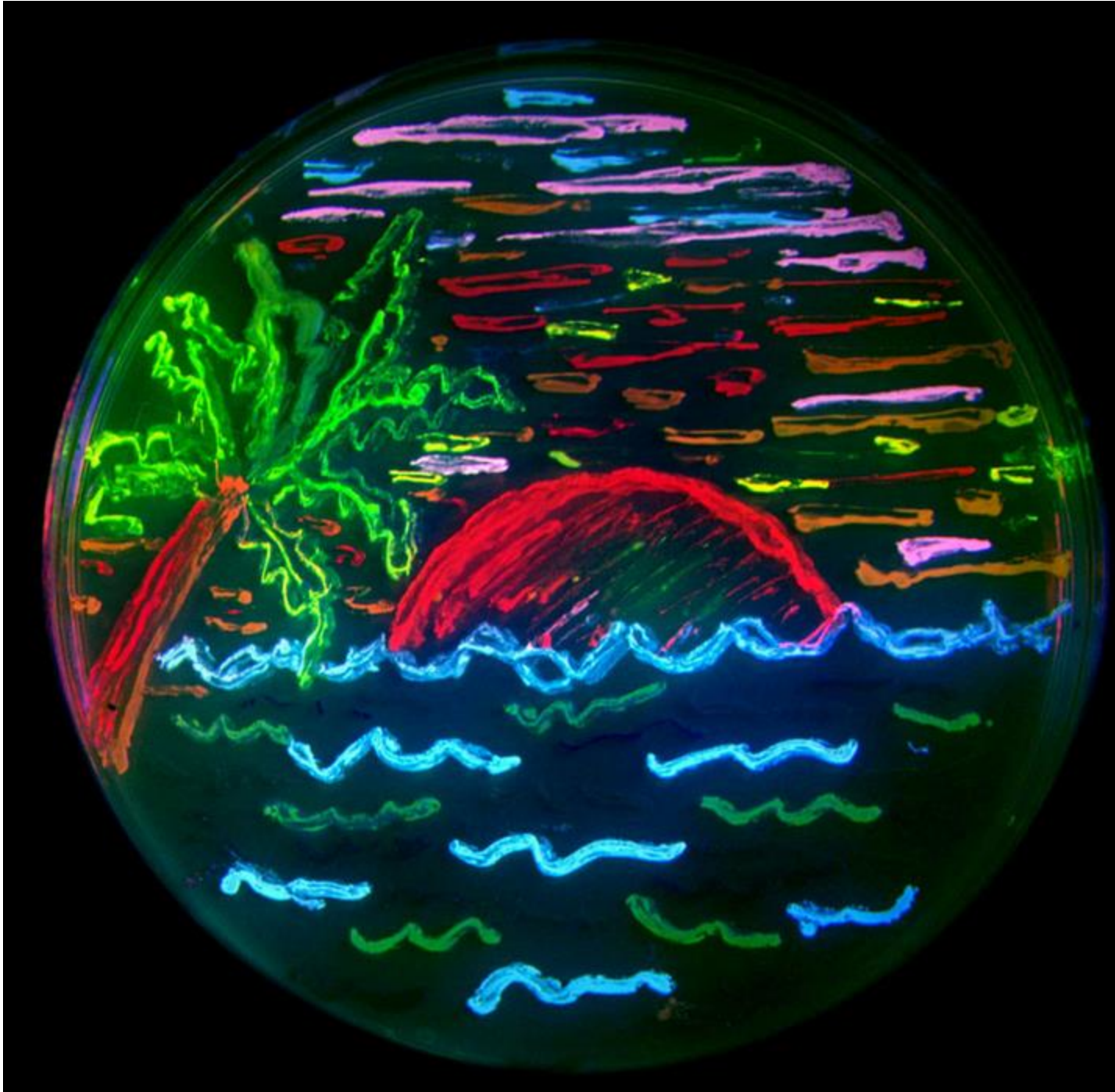
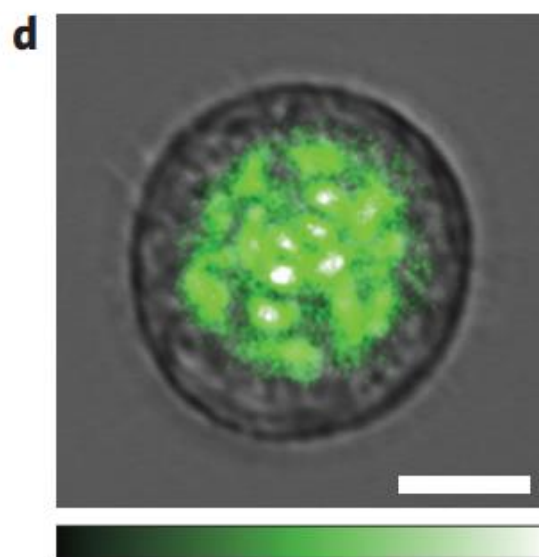
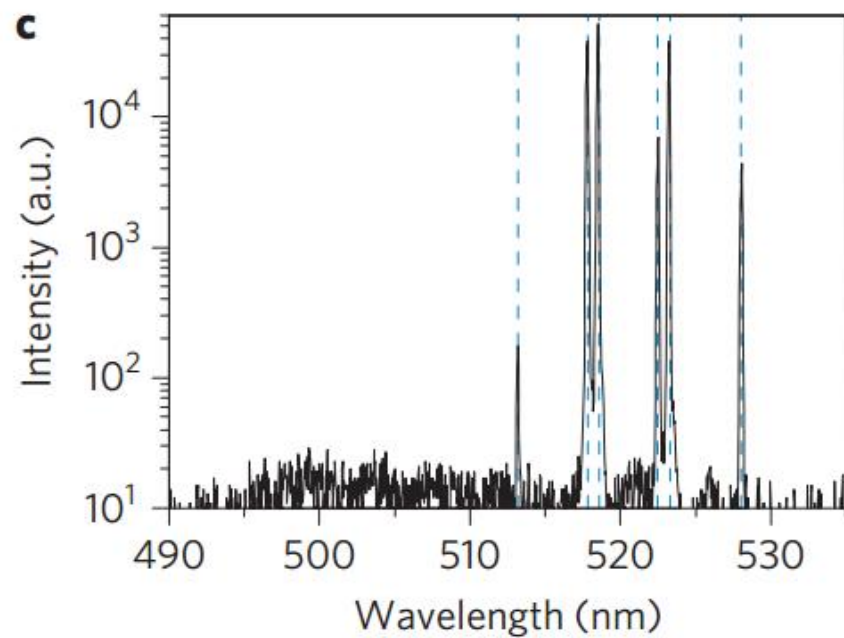
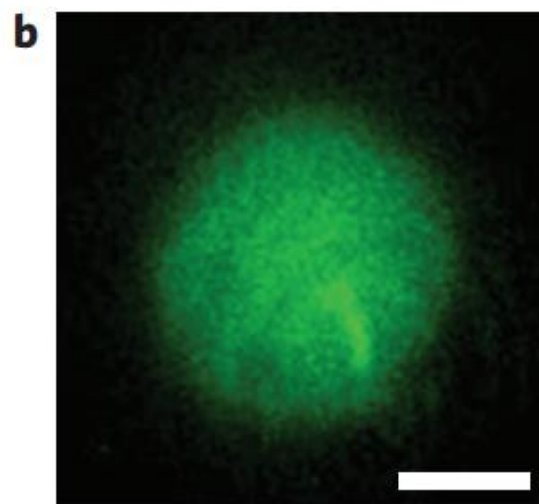
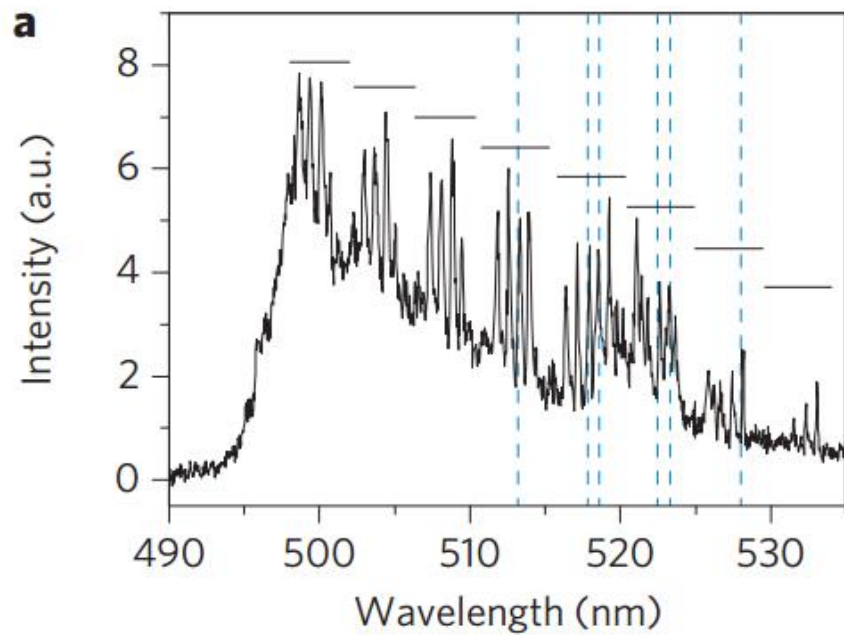


Figure 5

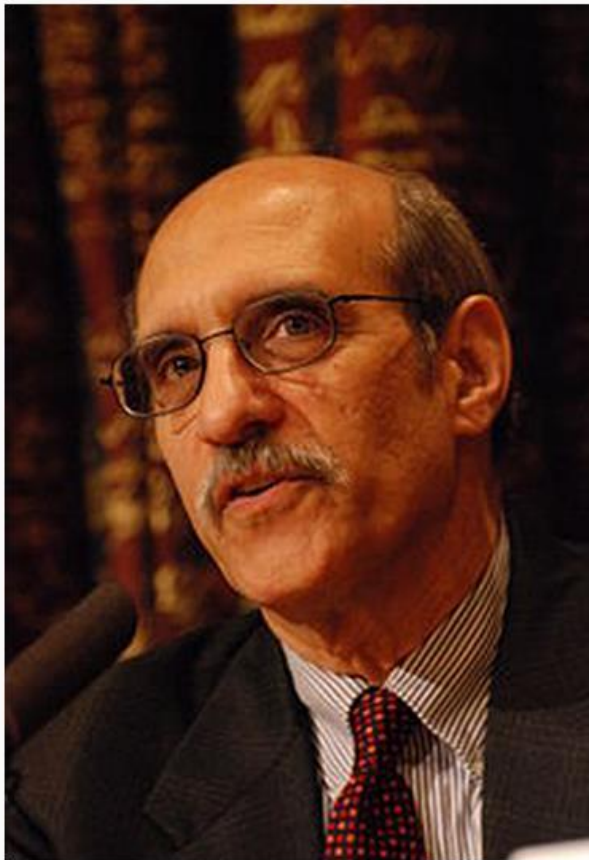






# GFP: нобелевская премия 2008

**Martin Chalfie**



**Roger Y. Tsien**  
錢永健



下村 脩  
**Shimomura Osamu**

