



ФИЗИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ В БИОФИЗИКЕ

НЕЧИПУРЕНКО
ДМИТРИЙ ЮРЬЕВИЧ

ФИЗФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Лекция 1. Вступление	7
Цели курса	7
Ключевые блоки курса	8
NGS (next Generation Sequencing)	9
Induced Pluripotent Stem cells (PS cells)	10
Optogenetics	10
Genome Editing with Engineered Nucleases	11
CRISPR-Cas9	12
Перспективные методы	12
Лекция 2. Рентгеноструктурный анализ	14
Структура ДНК	14
Первая структура белка	15
Кристаллизация мембранных белков	20
Картина дифракции от белкового кристалла	25
Расчет электронной плотности в элементарной ячейке кристалла	26
Лекция 3. Кристалл и рентгеновское излучение	28
Открытие одной щели: вид картины дифракции	28
Оптика с точки зрения Фурье-подхода	30
Периодическая картина (дифракционная решетка)	30
Взаимодействие кристалла с рентгеновским излучением	31
Элементарная ячейка кристалла	32
Методы решения фазовой проблемы	34
Лекция 4. Решение фазовой проблемы	36
Однократное и многократное изоморфное замещение	36
Однократная и многократная аномальная дисперсия	37
Молекулярное замещение	40
Фемтосекундная нанокристаллография	44
Лекция 5. Нейтронография	49
Резюмирование предыдущих лекций:	49
Нейтронография	49
Взаимодействие нейтронов с веществом	50
Основные свойства рассеяния нейтронов ядрами:	51
Работа с нейтронографией	53
"Проблемный" гистидин	55
Взаимодействия в протеазе	55
Нанобиоинженерия	58

Оптическая система электронного микроскопа	61
Источники электронов	62
Виды электромагнитных линз	63
Аберрация	64
Особенности взаимодействия электронов с образцом	67
Фазовое контрастирование	68
Фазовое контрастирование в ЭМ	70
Анализ отдельных изображений	70
Лекция 7. Просвечивающая электронная микроскопия. Часть 2.	73
Классические методы увеличения контраста	73
Основные методы восстановления 3D структуры с помощью ЭМ	74
Сортировка по ориентациям и построение 3d-модели	75
Microcrystal electron diffraction (MicroED)	77
(Крио)электронная томография	78
Классическая электронная микроскопия тканей	78
Сравнение кристаллографии и крио-электронной микроскопии	80
Сканирующий электронный микроскоп	80
Контрасты в изображениях СЭМ	82
Излучающая область	84
Метод Монте-Карло	84
Классификация подходов в СЭМ	85
Регистрация вторичных электронов	85
Лекция 8. Масс-спектрометрия	88
Принцип работы масс-спектра	88
Типичный масс-спектр	89
Применение МС	92
Методы ионизации	92
Типы масс-анализаторов	96
Квадрупольный масс-фильтр	99
Ионные ловушки	100
Ионно-циклотронный резонанс	101
Изучение сворачивания белков с помощью масс-спектрометрии	103
Комплексные исследования	104
Лекция 9. Таргетный анализ протеома.	106
Методы фрагментирования ионов белковых молекул	106
Таргетный анализ протеома	109
Заключение	111
СуTOF: масс-цитометрия	112

Лекция 10. Флуоресцентная микроскопия. Часть 1.....	114
Флуоресценция.....	114
Диаграммы Яблонского	115
Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции	117
Базовые характеристики флуоресценции	117
Флуоресцентный микроскоп.....	118
Лекция 11. Флуоресцентная микроскопия. Часть 2.....	124
Сравнение конфокальной и широкополосной микроскопии.....	124
TIRF микроскопия - регистрация флуоресценции	126
Флуоресцентные красители	127
Наиболее важные параметры флуорофоров	130
Режимы работы в рамках классической микроскопии (FRAP, FLIM, FRET) ..	133
Лекция 12. Флуоресцентная микроскопия. Часть 3.....	141
Популярные FRET пары.....	141
TIRF + FRET: HIV reverse transcriptase dynamics during interaction with template	141
Силовая спектроскопия с помощью ДНК оригами при постоянной силе.....	145
FRET-based force sensor	147
Главные положительные особенности мультифотонной микроскопии	152
Мониторинг физиологических процессов в клетках и тканях	153
Конфокальный vs двухфотонный микроскоп:	154
Лекция 13. Микроскопия суперразрешения.....	156
Проблема в классической оптике	156
STED (stimulated emission depletion).....	157
Конечная формула преодоления дифракционного барьера:	159
Основные причины «мигания» флуоресцентных молекул:	163
3D STORM.....	168
Микроскопия световых «листов»	170
MINFLUX	171
Выводы об основных режимах.....	172
Лекция 14. Оптическая микроскопия. Работа в проходящем свете.	173
Работа в проходящем свете (общая информация)	173
Полезные интернет-ресурсы по теме.....	174
Работа микроскопа	174
Сопряжённые плоскости в оптической системе.....	175
Принципы освещения: настройка по Кёлеру	176
Метод тёмного поля	177
Метод фазового контраста.....	181

Метод дифференциально-интерференционного контраста	184
Метод IRM	188
Цифровая голографическая микроскопия.....	190

Лекция 1. Вступление

Среди научных публикаций методические работы цитируются лучше всего, но количество методов на много порядков меньше, чем кол-во направлений, существующих в науке. Это связано со множеством факторов. Например, мы не можем назвать результат научным, если он не был воспроизведен и принят научной общественностью. Поэтому важную роль в науке имеют определенные экспериментальные протоколы.

Цели курса

- Получить представление о принципах и ограничениях основных методов (структурной) биологии.
- Познакомиться с некоторыми открытиями, сделанными на основе этих методов.
- Познакомиться с прорывными методами, разработанными в последние годы.
- Проследить тенденции в развитии методов.
- Обмен полезной информацией.

Дополнительность методов исследования: Не существует идеального метода, который годится для любой задачи, поэтому мы подбираем конкретный метод в зависимости от того, что нам нужно. Для некоторых случаев (прим. – принцип дополнительности Бора: если точно хотим определить положение частицы, то ничего не сможем сказать про импульс.). В экспериментальных методах важен баланс.

Особенности и ограничения методов:

- Физика: пространственное и временное разрешение
- Биология: *in vivo* (при жизни), *ex vivo* (биологический объект отдельно от организма), *in vitro* (в пробирке)

Пример «крайних» случаев для биолога:

1. Рентгеноструктурный анализ – мы должны выделить белок в достаточном количестве, вырастить кристалл, облучить его рентгеновскими лучами и посмотреть структуру картину рассеяния. Это суперспециальная методика, очень далеко от *in vivo* – мы ничего не знаем про время, но все знаем про пространство. При этом на белки в кристаллах действуют дополнительные силы, поэтому не известно, насколько эксперимент отражает картину поведения белков в живом организме.
2. Прижизненная микроскопия. Например, мы можем заглянуть в мозг живой мыши и наблюдать, как будут активироваться нейроны. В такой ситуации сложно дойти до атомарного или молекулярного уровня.

Как правило, физики классифицируют методы по разделам физической науки, в которых они применяются. Однако любой метод есть совокупность идей и подходов из разных областей наук. Тем не менее выделим:

Неполная классификация физических методов: термодинамические, гидродинамические, рассеяние излучения, поглощение излучения (спектроскопия), электрохимические.

Календарь методов на «биомолекуле»: из 12 месяцев в рамках курса обсуждается структурная биология, микроскопия, протеоника. Также в календарь входят секвенирование нуклеиновых кислот, очистка молекул и разделение смесей, клеточные технологии, полимерная цепная реакция, нейробиология, проточная цитофлуориметрия, иммунологические технологии, «сухая» биология, генная инженерия.

Ключевые блоки курса

Часть 1.

- Рентгеноструктурный анализ – сложная комплексная методика, будет разобрана подробно.
- Нейтронография – как пример доп. метода к рентгеноструктурному анализу. Позволяет увидеть расположения атомов водорода, т.к. нейтроны прекрасно рассеиваются на них.
- Электронная микроскопия – подробно рассмотрим основные идеи и революционные новые принципы.
- Масс-спектрометрия.

Часть 2. Оптические методы

- Классическая и флуоресцентная микроскопия.
- Конфокальная и двухфотонная микроскопия.
- Методы суперразрешения (SRM – Super Resolution Microscopy).

Методы года по версии журнала *Nature methods*:

2007 – NGS (next Generation Sequencing)

2008 – STED microscopy (Stimulated Emission Depletion)

2009 – iPS cells (induced Pluripotent Stem cells)

2010 – Optogenetics

2011 – Genome Editing with Engineered Nucleases

2012 – Targeted Proteome Analysis

- 2013 – DNA&RNA sequencing of single cells
- 2014 – Light-Sheet fluorescence microscopy
- 2015 – Single-particle cryo-EM
- 2016 – Epitranscriptome analysis
- 2017 – Organoids, “Life happened in (at least) three dimensions
- 2018 – Imaging in freely behaving animals
- 2019 – Single-cell multimodal omics

NGS (next Generation Sequencing)

Секвенирование – это прочтение последовательности или структуры ДНК и РНК.

Идея метода: мы наблюдаем за работой ДНК полимеразы – ферментом, которая реплицирует молекулу ДНК. Молекула ДНК помещается в специальную лунку диаметров ~ 20 нм и закрепляется. Далее она облучается светом, длина волны которого много больше диаметра лунки, поэтому внутри лунки он экспоненциально затухает. Используются специальные синтетические нуклеотиды, к которым пришиты флуоресцентные метки с индивидуальной спектральной характеристикой. Освещая их, по цвету отраженного света можно определить, какой нуклеотид встраивается в данный момент времени. Процесс протекает при комнатной температуре. После встраивания флуоресцирующая молекула отсоединяется и быстро диффундирует от освещенной области (за время порядка 1 мкс, при том, что встраивается молекула за 100 мкс) по закону Эйнштейна: $\langle x^2 \rangle = 2Dt$, где x – расстояние, на которое проникает сквозь пластинку свет (порядка 100 нм).

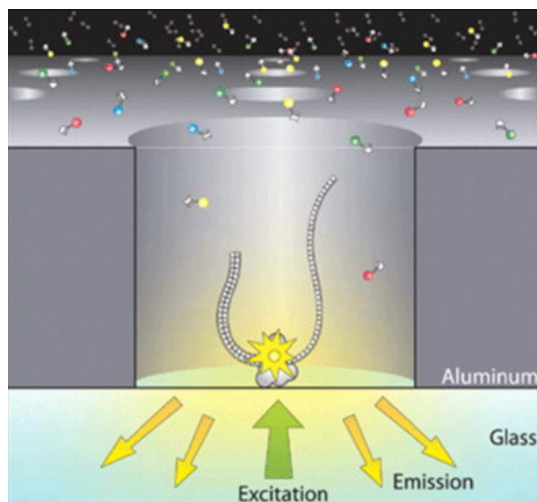


Рис. 1.1. Схема метода NGS.

Преимущества метода:

- Секвенируются отдельные молекулы ДНК, можно прочитать много нуклеотидов – около 6-8 kb (1kb ~ 1000 оснований).
- Метилирование ДНК.
- Точность одного прочтения 85% - это мало, однако один участок можно прочитать несколько раз, что увеличивает точность вплоть до 99,99%.

Induced Pluripotent Stem cells (PS cells)

Идея метода: берется соматическая клетка, имеющая ДНК (прим. фибробласт), и возвращается к состоянию, в котором она может дать начало целому организму, как например стволовые клетки. Мы также умеем активировать определенные гены в ядре клетки. Можно внести в клетку вирус, содержащий гены, которые являются регуляторами очень высокого уровня. Вирус встроится, гены будут экспрессировать, и клетка начнет видоизменяться.

Японский ученый Сinya Яманака получил Нобелевскую премию за 4 фактора (гена), позволяющие перепрограммировать соматическую клетку и получить т.н. индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Из одной такой клетки получилось вырастить целую мышь, здоровую и фертильную.

Текущие проблемы подхода:

- Очень низкий выход (от 0.01-0.1%) – лишь небольшая часть клеток будет обладать необходимыми свойствами.
- Баланс между эффективностью и риском перерождения клеток в раковые (p53).
- Неполное перепрограммирование – часть клеток обращаются не полностью и могут дать лишь ту клетку, из которой она получена.

Optogenetics

Идея метода: существует потенциал-чувствительный натриевый канал. Если открываем его, то натрий снаружи начинает заходить внутрь, и потенциал изменяется. Если процесс открытия чувствителен к потенциалу, то в ответ на изменение потенциала будет опять же меняться потенциал. Так по цепочке по аксону будет распространяться волна деполяризации. Такие каналы могут быть *светочувствительны*. Гены с таким каналом помещаются в вирус, который способен встраиваться в нервные клетки. Далее, используя свет различных цветов, можно как активировать (белок родопсин) и ингибировать нейрон (хлор). Это позволяет программировать различные процессы в живом организме.

Теоретически, такого же эффекта можно достичь с помощью электростимуляции, но она не такая точная и ее сложно сделать специфичной.

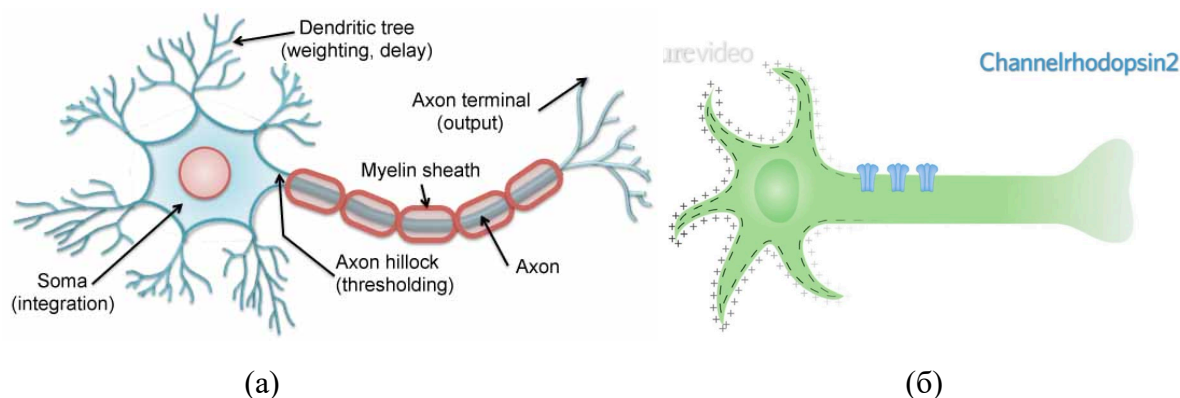


Рис. 1.2. (а) нервная клетка; (б) светочувствительный натриевый канал – белок родопсин.

Genome Editing with Engineered Nucleases

Идея метода: существуют молекулы нуклеаза, которые могут делать надрезы в молекулах ДНК. Классический метод: в месте разреза при репарации возникают ошибки, и, с некоторой вероятностью, возникнет та ошибка, которая нам нужна. Существуют ферменты с высокой специфичностью, например рестриктаза, которые могут резать последовательность только в определенных местах, но мы хотим резать в произвольном месте.

Так появились конструкции из белков, имеющих транскрипционный фактор, каждый из которых узнает определенный триплет в последовательности ДНК (см. рис.3а). Если скрепить несколько таких белков вместе, то получим конструкцию, узнающую только определенную последовательность в ДНК. Если присоединить к этой конструкции белков нуклеаза, то сможем сделать разрез последовательности в этом участке (см. рис. 3б).

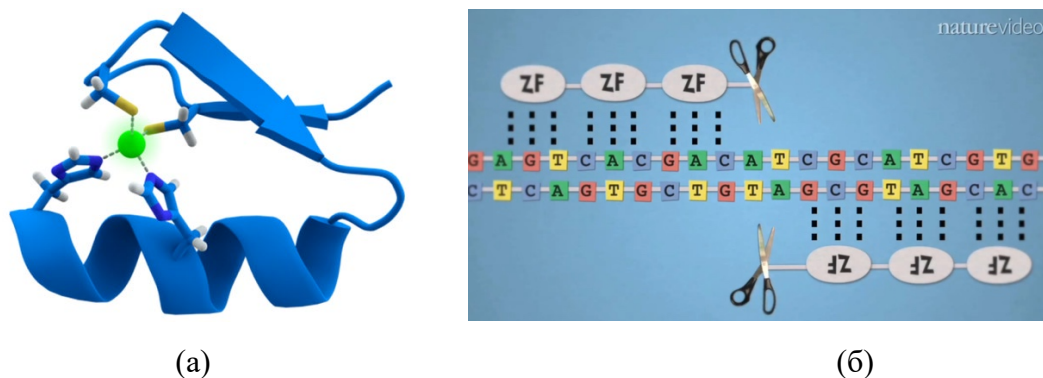


Рис. 1.3 (а) Белок «цинковый палец», его структурообразующим элементом является ион цинка, координирующий несколько аминокислотных остатков; (б) цинковые пальцы и нуклеаза.

Недостаток метода: в ДНК последовательности может существовать 64 различных триплета, а цинковых пальцев намного меньше. Возникает сложная задача создания

цинковых пальцев, узнающих не свою тройку, а необходимый триплет. Она до сих пор не решена.

Был найден транскрипционный фактор TALENs, который взаимодействует с одним нуклеотидом, однако в природе белки существуют не для каждого нуклеотида, например для тинина. Это возможно, например, с помощью гидрофобного эффекта.

CRISPR-Cas9

Идея метода: в биологии узнавание происходит по принципу комплементарности. Существует специальный белок, у которого есть молекулы РНК, комплементарные к определенному участку. Так бактерии в природе борются с вирусами. В настоящее время CRISPR-Cas9 активно используется в практической биологии.

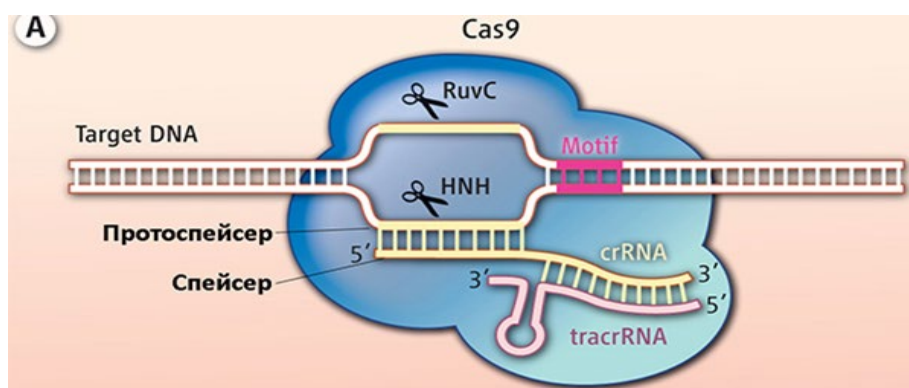


Рис. 1.4. Схема метода CRISPR-Cas9. Армейский нож бактериального иммунитета.

Перспективные методы

Structure via super-resolution

Оптические методы могут позволить изучать структуру биологических молекул. Было показано, что если охладить образец до температуры жидкого гелия и применить особые технологии анализа изображений, то можно понять, где в молекуле прикреплены флуорофоры с точностью до нескольких ангстрем.

The new XFELs

Идея метода: сделать супер яркий источник рентгеновского излучения, который обладает высокой степенью монохроматичности, чтобы получить картину дифракции рентгеновского излучения на отдельной молекуле. Для этого вспышка длительностью несколько фемтосекунд направляется на молекулу. Сначала рентгеновское излучение рассеивается на электронах, затем все электроны вылетают от ядер – происходит кулоновский взрыв. Пока взрыв не произошел, можно зафиксировать картину рассеивания. Такая установка в настоящее время существует в Мюнхене.

Биофизика упаковки ДНК в ядре

Идея метода: с помощью особых технологий, связанных с секвенированием, можно строить матрицы контактов в ядре – какие последовательности локализуются в ядре рядом друг с другом.

Используемые технологии: Hi-C, FISH, ChIP-Seq, Hi-ChIP, HCR&PCR, CRISPR-based new methods.

Важные случаи:

- В ядре существуют топологически ассоциированные домены (ТАДы) – достаточно протяженные области ДНК, находящиеся в среднем близко друг другу. Таким образом, ядро можно разделить на конечное число компартментов. С точки зрения физики непонятно, как это происходит.
- Фазовое разделение: в клетке есть органеллы, которые не содержат мембран, а вещество в них находится в жидком состоянии.

В настоящее время наиболее быстро развиваются *следующие подходы:*

1. Optical imaging.
2. Proteomics (mass-spectrometry).
3. Gene manipulation tools.
4. Sequencing, expression and epigenetic analysis.
5. Interactome analysis – получение информации о том, какие белки колокализуются в клетке.

Интересные примеры: секвенирование раковых клеток, различный геном у отдельных клеток мозга.

Лекция 2. Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ играет важную роль в биологии, хоть и начинает постепенно проигрывать электронной микроскопии. Нас будет интересовать структура макромолекул – в первую очередь белков и нуклеиновых кислот. Структуру необходимо знать, чтобы, например, синтезировать лекарства с конкретными свойствами.

Этап 1. Получение кристалла. Можно получить кристаллы белков, нуклеиновых кислот, мембранных белков, но сделать это невероятно сложно, поскольку для каждого белка нужно подобрать свои условия кристаллизации. Это физхимия, а физхимия – наука эмпирическая. Рост кристалла может занимать от нескольких дней до нескольких месяцев. Когда кристалл готов, все остальное – дело техники.

Этап 2. Облучение рентгеновскими лучами. Кристалл помещается под источник рентгеновского излучения, например синхротрон. Мощный пучок рентгеновских лучей рассеивается на кристалле, формируя дифракционную картину. Кристалл поворачивается, дифракционная картина записывается в память компьютера.

Этап 3. Решение обратной задачи и получение модели кристалла.

Структура ДНК

Восстановление структуры ДНК является важнейшим открытием рентгеноструктурного анализа. В 1953 г. Уотсон и Крик предложили модель двойной спирали (рис. 2.1а). Кристаллы и дифракционная картина были получены Розалиндой Франклин (рис. 2.1б). Предложенная структура ДНК решила несколько ключевых задач: объяснила, почему структура стабильна и как происходит репликация – по принципу комплементарности.

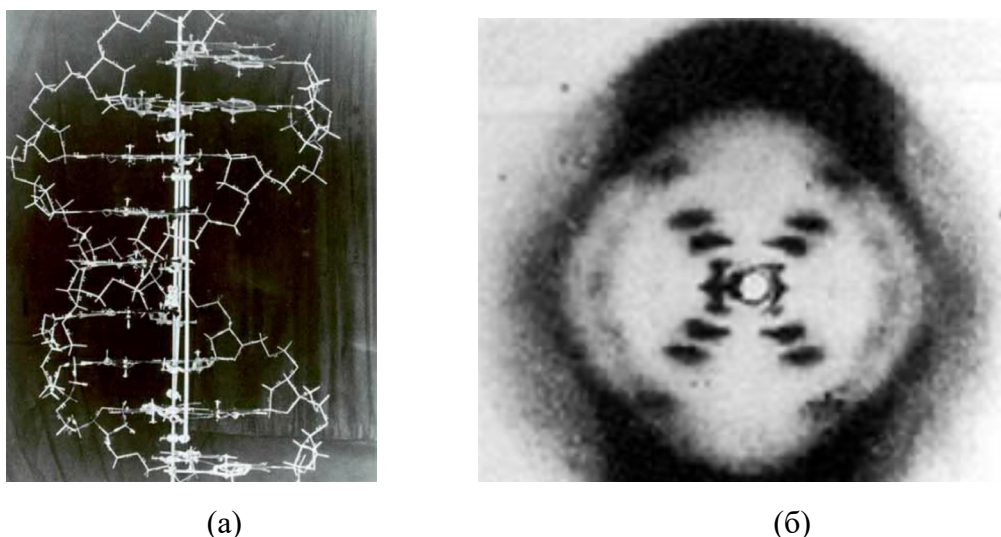


Рис. 2.1. (а) структура двойной спирали, предложенная Уотсом и Криком; (б) дифракционная картина рассеяния рентгеновских лучей на молекуле ДНК.

Комплементарность также позволяет получить радиус двойной спирали. В нуклеотидах выделяются пурины (аденин, гуанин) и пиримидины (цитозин, тимин), где размер пуринов всегда больше размера пиримидинов, а в молекуле одни всегда расположены напротив других. Это позволяет сделать вывод о постоянности ее радиуса. Локальные искажения в клетках репарируются ферментами.

Н.К. Кольцов в 20-х годы XX века предложил идею о том, как может происходить репликация на молекулярном уровне и как хранится и размножается генетическая информация – в основе жизни имеется принцип матричной репликации. Его натолкнула на мысль абстрактная идея о том, что между жизнью и ростом кристаллов, на самом деле, довольно много общего. Если отрезать от кристалла кусок и поместить его в насыщенный раствор, то он начнет разрастаться. Следовательно, поверхность кристалла является своеобразной матрицей, на которой молекулы будут собираться по матричному принципу, достраиваясь до определенной структуры.

Языком физиков, структура на рис. 2.1а есть не что иное, как аperiодический кристалл.

Литература:

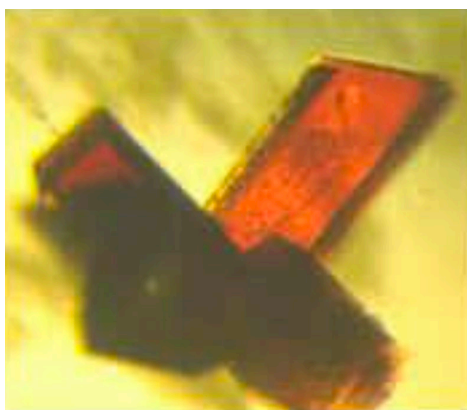
1. Э. Шредингер «Что такое жизнь с точки зрения физики?». Шредингер был вдохновлен опытами Тимофеева-Ресовского и Макса Дель-Брюка. Они ставили опыты с мухами дрозофилами, пытаясь понять сечение взаимодействия, которое приводит к закрепляющимся в популяции мутациям, и найти то, что изменяется в молекуле и приводит к этим мутациям. Они получили эффективную площадь, на которую должен попасть квант рентгеновского излучения для того, чтобы в молекуле что-то изменилось. Она оказалась равна нескольким квадратным ангстремам, что как раз соответствует одному нуклеотиду.
2. Уотсон «Двойная спираль». Об истории открытия структуры двойной спирали, много юмора.
3. Ф. Каменецкий «Век ДНК». Для всех, кто интересуется ДНК.

Л. Поллинг предлагал другую структуры строения ДНК: гидрофобные основания в ней были снаружи молекулы, а гидрофильные фосфаты внутри. Оказывается, что если приложить к молекуле ДНК большие механические напряжения, то она переходит в так называемую Р-форму – внутренние части молекулы «выворачиваются» наружу.

Первая структура белка

Была обнаружена Максом Перуцем в 1958 г. для белка миоглобина. Разрешение тогда было низкое, и определить конкретные атомы не представлялось возможным, но было понятно, что остов цепи в пространстве закручен в некую спираль (см рис. 2.2б).

Перуц продемонстрировал преобладание альфа-спиральной упаковки (75%). В составе 155 аминокислот, ~17 кДа.



(а)



(б)

Рис. 2.2 (а) кристаллы исследуемого белка миоглобина; (б) свернутая структура белка.

Упаковка белков в кристаллах обладает **определенной симметрией**:

В кристалле можно выделить элементарную ячейку. Весь кристалл можно получить транслируя эту элементарную ячейку по трем направлениям. Мы выделяем три вектора трансляции – a , b , c (см. рис. 2.3). Векторы, могут быть расположены под разными углами. В итоге получается семь вариантов – *сингония* кристалла.

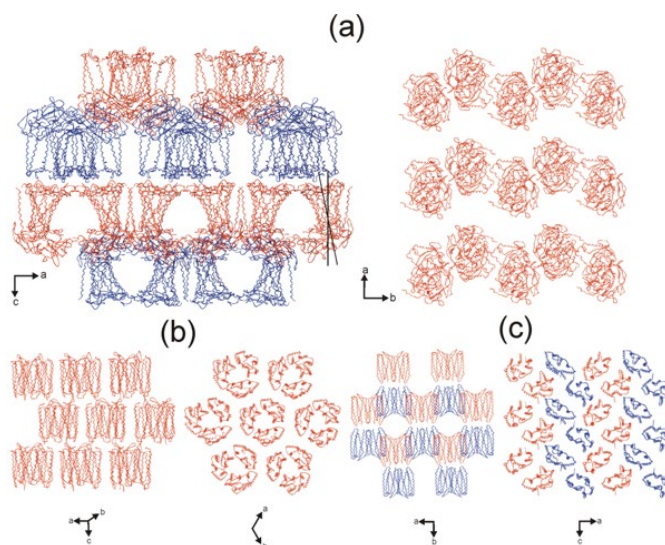


Рис. 2.3. Симметрии упаковки белков в кристаллах кристаллов.

Внутри ячейки может быть своя симметрия – *некристаллографическая*. Например, если какой-то белок является димером, то мы при повороте он переходит сам в себя.

Кристалл примерно на 50% состоит из воды, причем она находится, грубо говоря, в жидком состоянии. Регулярную структуру организует твердый «каркас» из белка. Молекулы белка могут диффундировать, а могут быть прикреплены к

гидрофильным группам белка – они проявляются на картине дифракции. В то же время структуру воды, находящейся в неупорядоченном состоянии, увидеть с помощью рентгеноструктурного анализа мы не сможем. Кристалл не распадается за счет наличия контактов – нековалентных (водородных) связей, солевых мостиков. Этих связей немного, а энергии стабилизации небольшие. Поэтому система довольно хрупкая, и получить кристалл достаточно сложно. В квазиравновесной ситуации $\Delta G \approx 0$, $\Delta H \approx T\Delta S$. Когда молекулы белка присоединяются к кристаллу, выигрыш в энтальпии (образование водородной связи) уравнивается проигрышем в энтропии (молекула теряет степени свободы). Эксперименты проводятся при температуре 4-20°C для снижения проигрыша по энтропии.

По консистенции белковый кристалл мягкий и напоминает сыр. Примеры см. на рис. 2.4.

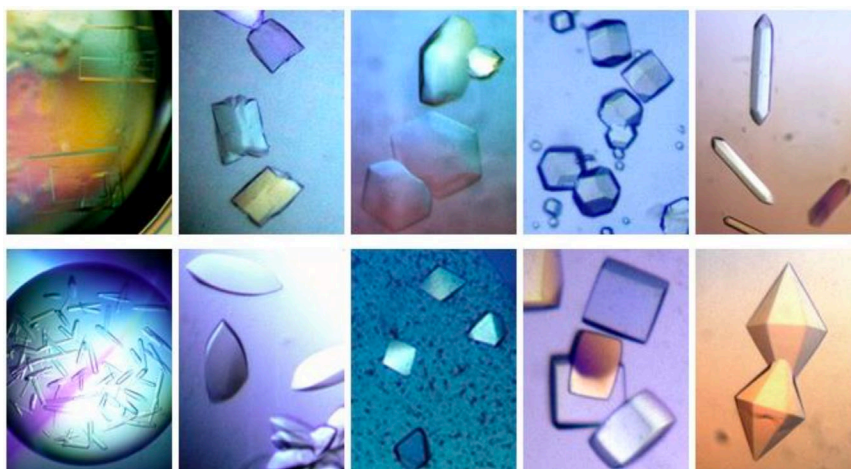


Рис. 2.4. Примеры белковых кристаллов.

Требования к процедуре кристаллизации:

- Нужно около 10 мг очищенного белка, т.к. для получения хорошей дифракционной картины необходимо получить достаточно большой кристалл, а также предварительно подобрать подходящие условия. Для этого используются бактериальные системы (прокариотические, эукариотические и даже археи). У эукариотических клеток многие белки гликозилируются, что не способствует кристаллизации, т.к. мешают пассивные сахаридные цепи. Поэтому их нужно либо как-то отрывать, либо использовать рекомбинантные белки. При этом форма белка *in vivo* может отличаться от того, что получают в рекомбинантном виде.
- Раствор должен быть гомогенным, т.к. изоформы белка и микрогетерогенности резко ухудшают рост кристаллов.
- Раствор в концентрации около 20 мг/мл.

- Подходящие условия проведения эксперимента (контролируемая температура, отсутствие вибраций и т.д.), т.к. процесс роста кристалла может занять дни, недели и даже месяцы.

Основные концепции кристаллизации

Как привести раствор к перенасыщенному состоянию?

- Изменение растворимости белка добавлением «преципитирующих (осаждающих) агентов»: солей, полиэтиленгликоли и т.п. Их главная цель – осадить воду.
- Контролируемым образом привести раствор белка к перенасыщению: добавление преципитирующих агентов, высушивание капли раствора, обмен буферными реагентами (диализ).
- Ждать и регулярно контролировать ход процесса под микроскопом.

На фазовой диаграмме (рис. 2.5а) мы можем двигаться по-разному, в зависимости от методов.

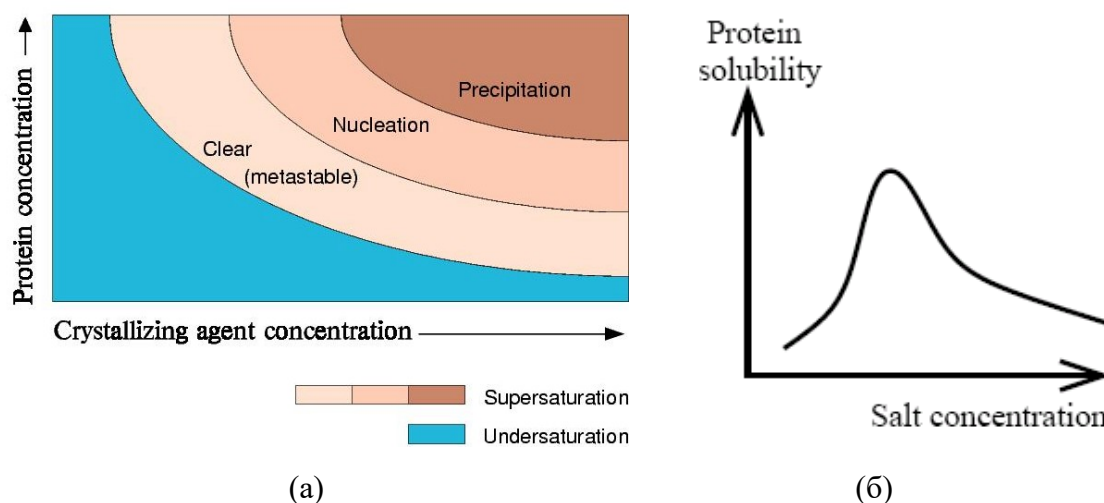


Рис. 2.5. (а) фазовая диаграмма кристаллизации белка; (б) эмпирическая зависимость растворимости белка от концентрации солей.

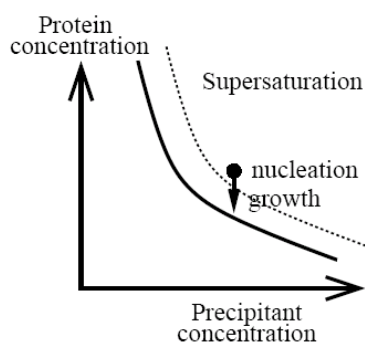
Факторы, влияющие на растворимость белка

- *pH* – изменение pH влияет на зарядовое состояние аминокислотных остатков (например, Asp, Glu, His, Arg), что приводит к изменению поверхностных зарядов и, как следствие, – к изменению взаимодействия макромолекулы с водным окружением.
- *Добавление солей* схожим образом влияет на растворимость (рис. 2.5б).
- *Полярные растворители* (например, полиэтиленгликоль (PEG)) связывают воду.

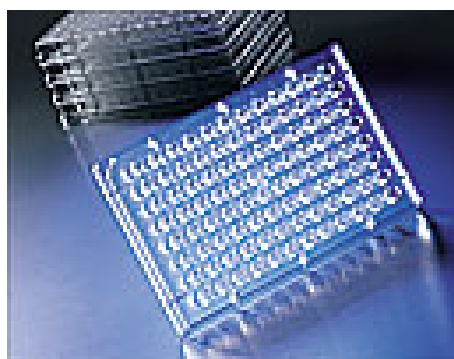
- *Температура* отвечает за изменение энтропийного фактора растворимости. Эксперименты проводятся при температуре 4-20°C для снижения проигрыша по энтропии.

Серийные эксперименты. На ранних этапах условия эксперимента подбираются перебором.

Раствор белка смешивается с преципитирующим агентом – прямое достижение перенасыщения. Простой метод: легко масштабируется до уровня 100 нанолитров за счет использования автоматов. Наблюдая образцы под микроскопом, можно выбрать оптимальные концентрации белка и преципиента для кристаллизации.



(a)

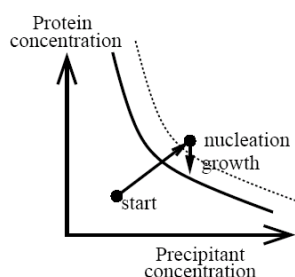


(б)

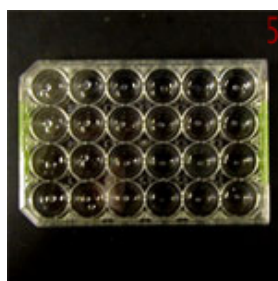
Рис. 2.6. (a) диаграмма соответствия области кристаллизации к концентрациям белка и осадителя, точкой отмечен момент зарождения кристалла; (б) множество образцов с различными концентрациями, изготовленные с помощью автоматов.

Диффузионные методы – самые широко распространенные. Например, метод диффузионной капли (рис. 2.7).

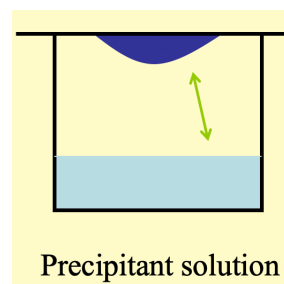
1. Раствор белка (~5 мкл) помещается в виде капли над буферным раствором с высокой концентрацией преципитирующего агента (рис. 2.7в)
2. Капля и буфер обмениваются агентом через диффузию в промежуточную среду (пар) (рис.2.7в).



(a)



(б)



(в)

Рис. 2.7. (а) Диаграмма соответствия области кристаллизации к концентрациям белка и осадителя для диффузионных методов, точкой отмечен момент зарождения кристалла; (б) пример размещения капель; (в) схема метода диффузионной капли.

Обычно такие эксперименты проводятся в лабораториях с контролируемой температурой в пределах 4-20°C.

Опытный экспериментатор по внешнему виду осадка (рис. 2.8) может определить, что следует изменить в условиях кристаллизации. Лучший возможный вариант показан на рис. 2.8в.

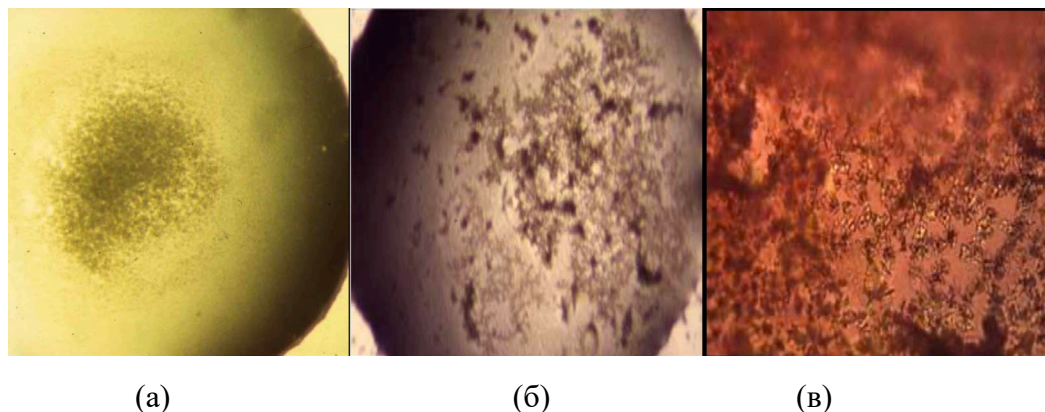


Рис. 2.8. Типы осаждения: (а) аморфное; (б) гетерогенное; (в) микрокристаллы.

Для синхротрона достаточно кристалла размером порядка 10 мкм. Небольшой размер, но много молекул!

Роботы для кристаллизации могут оперировать с каплями объемом 100 нанолитров. Преимущества их использования: более точные, чем человек; позволяют быстро сделать большее количество экспериментов по кристаллизации с тем же количеством белка.

Кристаллизация мембранных белков

Все приведенное выше относится к глобулярным белкам, которые растворимы в воде. Но самая большая проблема – это мембранные белки. Для их кристаллизации существует несколько технологий.

Способ 1: *добавление детергентов* – наиболее примитивная технология, работает редко. К привычной белку фазы (рис. 2.9а), когда белок находится в липидном бислое, добавляются детергенты, которые обволакивают гидрофобную часть молекулы (рис. 2.9б). Далее гидрофильные поверхности молекулы формируют регулярную структуру, т.е. мы получаем белки, покрытые детергентом. Надеемся, что регулярность контактов поможет сформировать структуру. Получить ее сложно, т.к. конфигурация контактов с детергентами может сильно меняться от молекулы к молекуле, однако иногда ее удается сделать.

Были разработаны липопептидные детергенты (LPD) (рис. 2.9с). У них есть гидрофильная пептидная связь (обозначена красным) и гидрофобная липидная. Такая «химера» с большей вероятностью может плотно и регулярно окружить белок, и шансов получить регулярную структуру намного больше.

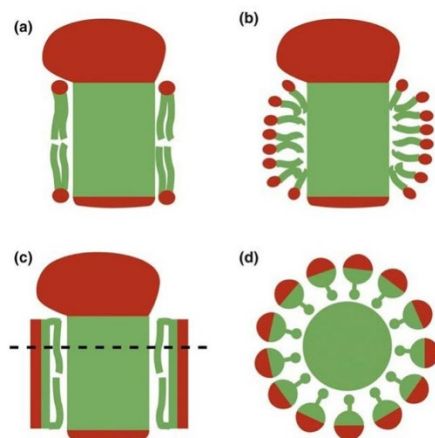


Рис. 2.9. Типы осаждения: (а) аморфное; (б) гетерогенное; (в) микрокристаллы.

Также используются липидные мезофазы, которые являются промежуточными между жидкостью и кристаллами («жидкий кристалл»). Если используются растворы детергентов, то в воде можно получить различные структуры (рис. 2.10а). В том числе на рис. 2.10б в верхней строчке – конфигурация, состоящая из круглых липидных слоев, сформировавших в воде хитрые пространственные структуры. Во второй строчке регулярная картина, которую уже можно назвать «жидким кристаллом». В эту систему можно внести мембранный белок, который встроится в слои и сформирует кристалл (рис. 2.11). Не до конца понятно, как происходит переход от края (липидная мезофаза) к центру (кристалл из мембранных белков). Если внутри мезофазы диффузия не затруднена, то белки в какой-то момент могут сформировать кристалл, состоящий из множества плоскостей, в которых белки формируют тесные контакты.

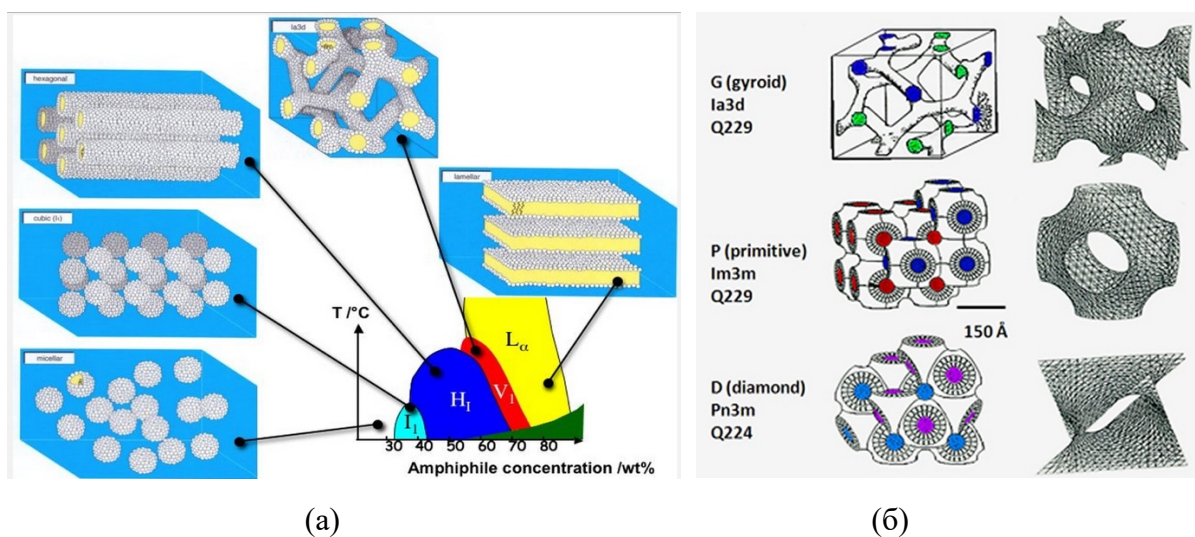


Рис. 2.10. (а) возможные структуры липидных мезофаз; (б) конфигурации липидных слоев.

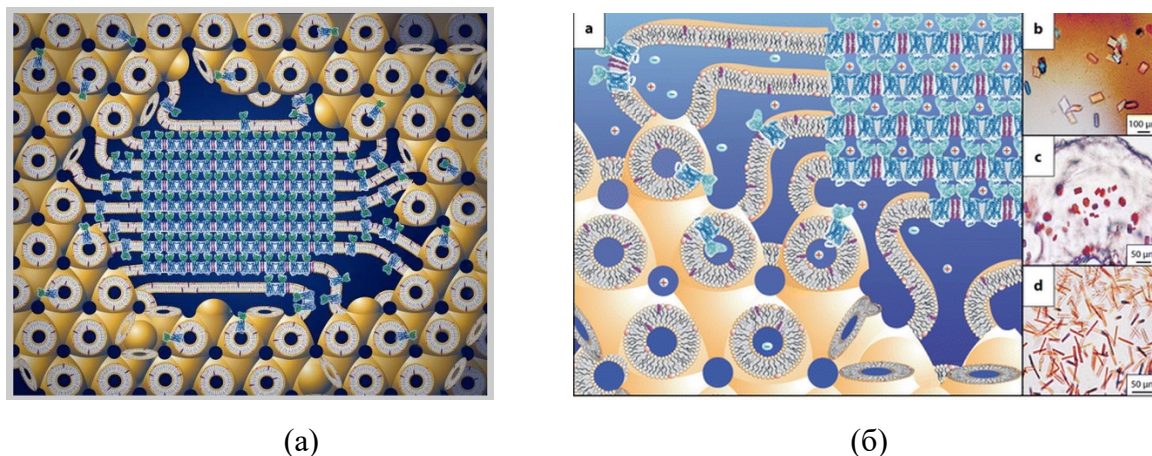


Рис. 2.11. (а) гипотетическая картинка, фиолетовым цветом обозначен детергент. (б) фрагмент перехода, про который мало что известно.

Фазовая диаграмма моноолеина

Работать с липидными мезофазами достаточно сложно. Как видно на фазовой диаграмме, фиолетовым обозначена наиболее часто используемая кубическая мезофаза. С ней необходимо смешать мембранный белок и рассчитывать на то, что при добавлении детергента будет формироваться структура на рис. 2.11. По консистенции мезофаза похожа на зубную пасту.

Lipidic Cubic Phase (LCP)

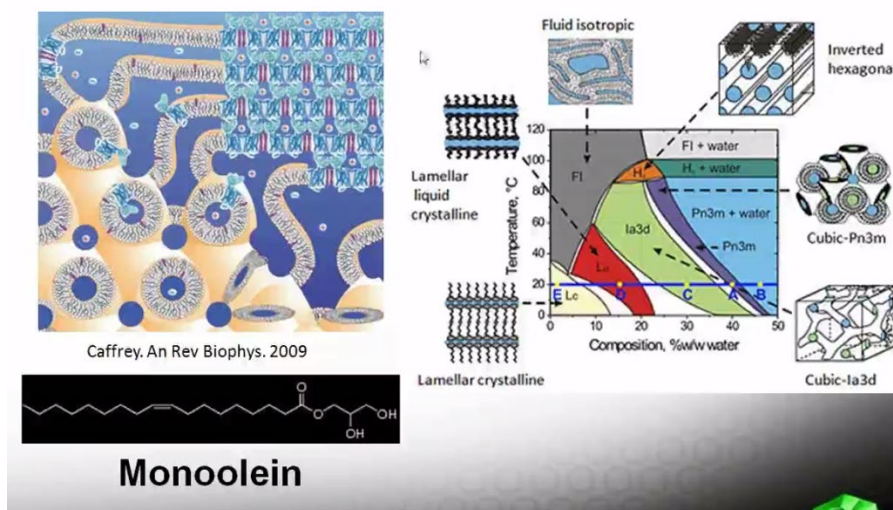


Рис. 2.12. Фазовая диаграмма моноолеина. По осям – температура и процентное содержание моноолеина в воде.

С помощью кубической мезофазы были кристаллизованы, например, галородопсин, ингибирующий сигнал света в оптогенетике и запускающий ионы хлора. Этот метод получил бурное развитие в последние годы.

Способ 2. При смешивании в определенной пропорции липидов и детергента формируются сэндвичеподобные структуры (рис.) – *бицеллы*. Если мы имеем набор бицелл, то можем смешать его с мембранным белком в смеси с детергентом. Белок при этом может сформироваться в «сэндвичи», за счет взаимодействия в них белковых молекул можно получить кристалл.

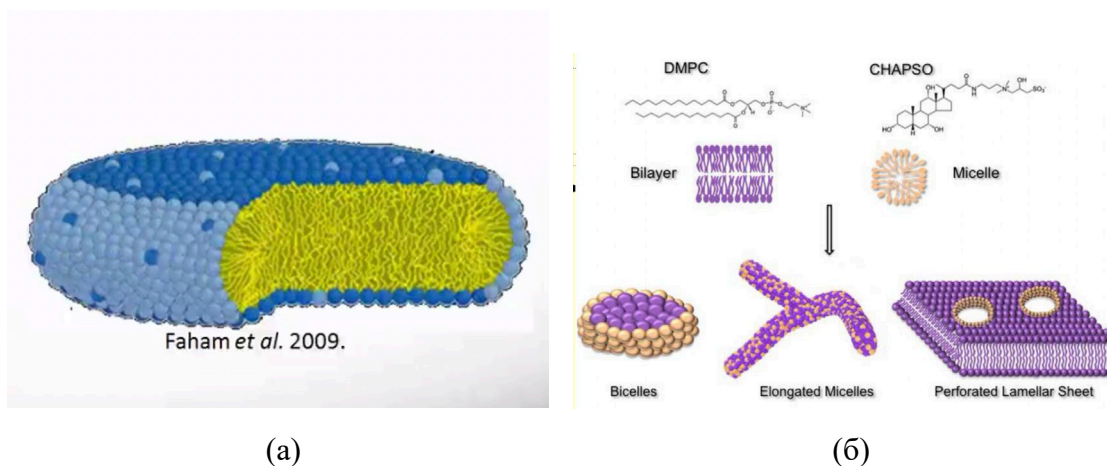


Рис. 2.13. (а) бицелла, липидная часть темно-синяя, по периметру расположен детергент; (б) формирование различных структур при смешении липида и детергента

Чаще всего используются смеси (рис. 2.13б), в качестве липида используется phosphatidylcholine DMPC, в качестве детергента CHAPSO, способные формировать бицеллы. Бицеллы формируются при определенных условиях и концентрациях. При высокой температуре и высоком содержании липидов формируются дырки в мембране (рис. 2.13б). Если детергента добавляется очень много, то формируются бицеллы.

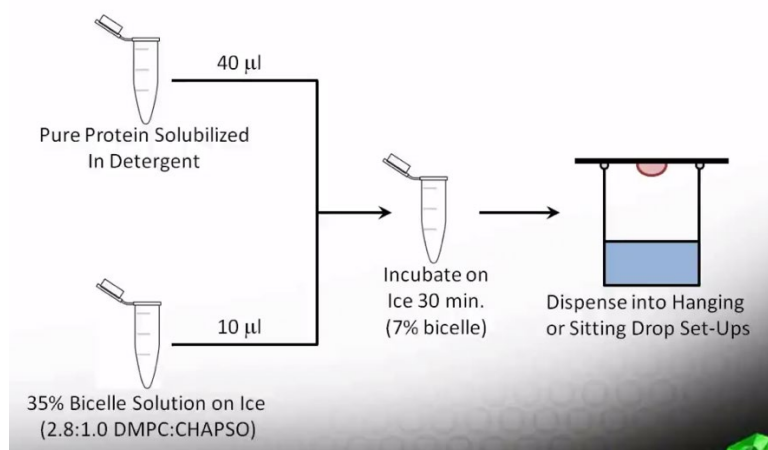


Рис. 2.14. Процесс кристаллизации мембранного белка с использованием бицелл.

Прелесть бицелл заключается в том, что не приходится переживать насчет хитрых методов вроде кубической мезофазы, а просто готовим смесь растворенного в детергенте мембранного белка и 35% раствор с бицеллами (рис. 2.14). Далее из смесь инкубируется, и применяется стандартный метод кристаллизации глобулярных белков (например, метод висящей капли).

High-End: рацемическая кристаллография белков

Что делать, если глобулярный белок не кристаллизуется?

90-е гг. XX в. Белки состоят из L-аминокислот, доступные операции симметрии в элементарной ячейке при этом ограничены хиральными (не содержат отражения 2-го рода в плоскости) группами симметрии. Что, если мы попробуем сделать зеркальную копию белка?

Сделаем рацемическую смесь белков – поровну L- и D-белков. Из общих геометрических соображений вариантов упаковки укладки становится намного больше. Предположение состоит в том, что кристаллизовать белок, имеющий зеркальную копию, намного проще. Уже в 2000-е годы стали доступны технологии чисто химического синтеза зеркальных белков (из D-аминокислот), что намного проще сделать для некоторых белков.

Сбор данных

Считаем, что мы научились делать кристалл. Сегодня используются синхротроны, в которых можно получать довольно яркие пучки рентгеновского излучения. Кристалл вращается для получения картины дифракции под разными углами падения с целью исследования «обратного пространства». Как правило, получают около 100 дифракционных изображений.

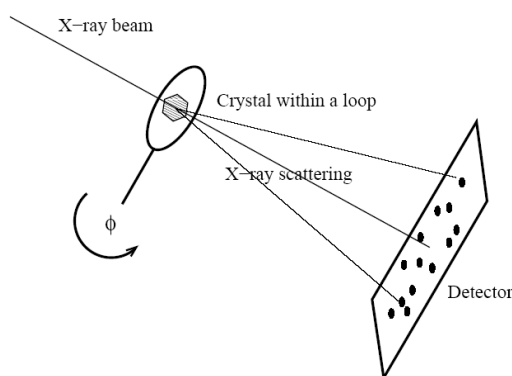


Рис. 2.15. Взаимодействие рентгеновского пучка с газом. Схема облучения образца.

Охлаждение кристаллов

Под действием интенсивного рентгеновского излучения в кристалле происходит ионизация атомов, и, как следствие, образование активных радикалов. Поэтому при

облучении кристалл разрушается. Охлаждение увеличивает время жизни кристалла за счет уменьшения коэффициента диффузии радикалов, а также скоростей химических реакций. Сейчас практически все данные получаются при охлаждении кристаллов до 100 К. При быстрой заморозке кристалл может стать мозаичным – то есть разбиться на много нанокристаллов, немного по-разному ориентированных. Это приводит к резкому ухудшению дифракционной картины, и, как следствие, – к уменьшению разрешения. Поэтому, перед заморозкой добавляется криопротектор: как правило, глицерол или полиэтиленгликоль (400). С кристаллами макромолекул – белков и нуклеиновых кислот работать удобно, т.к. вода находится в жидком состоянии, и ввести что-либо в кристалл легко.

Картина дифракции от белкового кристалла

Для дифракции характерно большое количество дифракционных максимумов, так как размер кристаллической ячейки составляет, как правил, от 30 до 300 ангстрем.

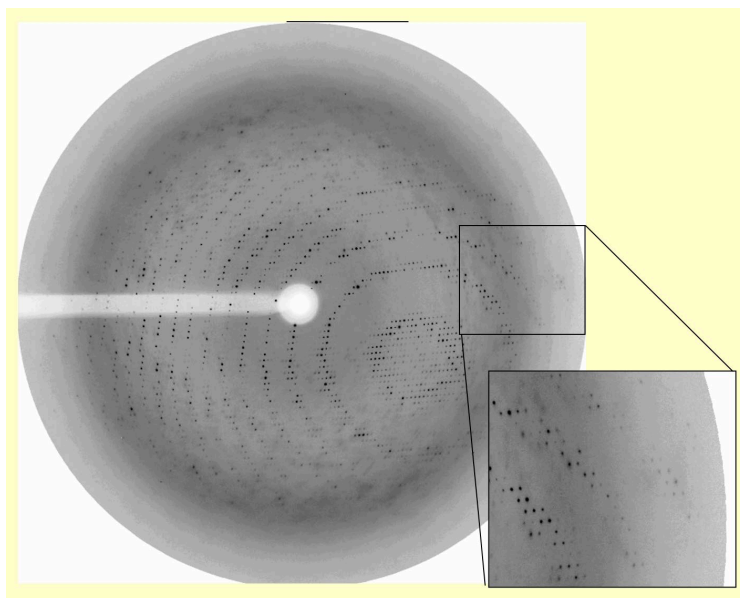


Рис. 2.16. Картина дифракции на белковом кристалле.

Можно ли сказать, глядя на рис. 2.16, от чего будет зависеть разрешение? Для этого необходимо знать максимальный угол дифракции. Направление на первый максимум определяется как:

$$\sin\alpha \approx \frac{\lambda}{\Delta x}, \quad (2.1)$$

где Δx – размер щели. Этот угол определяет качество получившейся модели.

Разрешение структуры:

- $> 3,5 \text{ \AA}$: различима только вторичная структура белка (нуклеиновой кислоты): альфа-спирали, бета-листы (двойная спираль).

- 2-3 Å (среднее) – видно большинство отдельных атомов, молекулы растворителя (вода и ионы).
- Около 2 Å – видны альтернативные конформации а. о. (сахарофосфатного остова)
- 1.6 Å – можно различить «отверстие» в электронной плотности ароматических колец.
- 1.1 Å – видны атомы водорода (хотя рассеяние происходит только на 1 электроне!). Например, рис. 2.16.

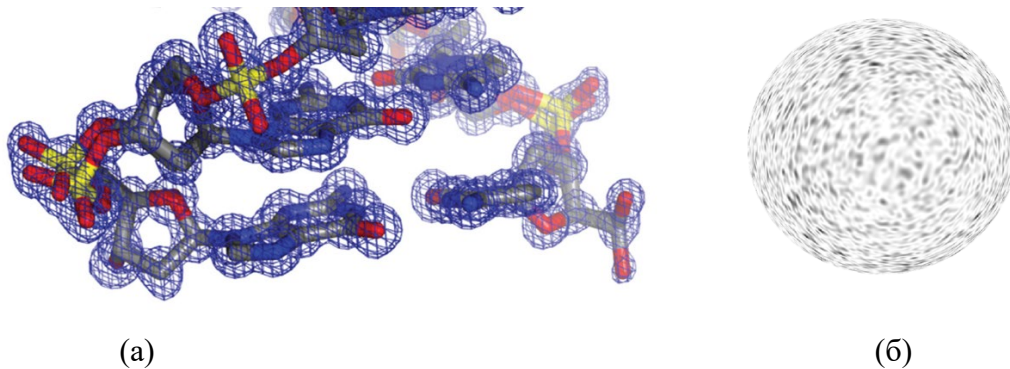


Рис. 2.17. (а) Структура ДНК. Сеткой показана поверхность одинаковой электронной плотности, находим ее, решая обратную задачу относительно картины дифракции. Отлично видно даже дезоксирибозу и сферические атомы. Параметры эксперимента: температура 113 К, 14 269 уникальных рефлексов, конечное разрешение 0.92 Å; (б) картина рассеяния на одной молекуле ДНК. Используем рентгеновский лазер на свободных электронах.

ДНК кристаллизуется в группу C2, речь идет о некристаллографической симметрии внутри ячейки – оси симметрии второго порядка.

Расчет электронной плотности в элементарной ячейке кристалла

Амплитуда суммарного рассеяния от ячейки:

$$E(\mathbf{Q}) = \int \rho(\mathbf{r}) * e^{i\mathbf{r}\mathbf{Q}} d^3\mathbf{r}. \quad (2.2)$$

Используя обратное Фурье-преобразование:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int E(\mathbf{Q}) * e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}} d^3\mathbf{Q}. \quad (2.3)$$

В действительности, берется конечная сумма по всем «рефлексам» (h,l,m):

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{hlm} E(\mathbf{Q}_{hlm}) e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}_{hlm}} = \sum_{hlm} |E_{hlm}| e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}_{hlm}} e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}_{hlm}}. \quad (2.4)$$

В эксперименте измеряется интенсивность рассеянного излучения:

$$I_{hlm} \propto |E_{hlm}(\mathbf{Q}_{hlm})|^2. \quad (2.5)$$

В случае, когда мы используем рентгеновское излучение, мы вынуждены работать с картиной дифракции. Мы не можем, как в микроскопе, просто получить увеличенное изображение, т.к. в настоящее время не существует собирающих линз для расходящихся рентгеновских лучей. При работе в режиме дифракции измеряется интенсивность, а не фазы волн. Математически электронная плотность получается из картины рассеяния только в том случае если мы знаем фазы рассеянных волн, интенсивностей недостаточно. Например, если вывести на экран два различных изображения А и В, от А как двумерную функцию взять интенсивность, а от В фазу, то, сделав обратное Фурье преобразование от такой комбинации, получим изображение В, но не А.

Проблема отсутствия экспериментальной информации о фазе рассеянной рентгеновской волны называется **фазовой проблемой**.

Лекция 3. Кристалл и рентгеновское излучение

Для кристаллизации молекул можно использовать уже полученные кристаллы молекул. Например, можем поместить кристалл антитела в насыщенный раствор антител другого типа и рассчитывать на то, что начнет формироваться как раз кристалл другого типа. Тот же самый метод можно применять к главному комплексу гистосовместимости. По сути, по матричной форме поверхности кристалла осуществлять его дальнейшую сборку по принципу комплементарности (например, ДНК).

Открытие одной щели: вид картины дифракции

Рассмотрим простейшую задачу: монохроматическая волна падает на экран с малым отверстием. Пространство за экраном условно разделяется несколько зон по мере удаления от экрана:

1. Зона геометрической оптики. Открыто огромное количество зон Френеля.
2. Зона Френеля: можем в центре получить минимум. Открыто промежуточное число зон Френеля.
3. Зона Фраунгофера. Открыта только одна зона Френеля – первая, т.е. считаем, что лучи, вышедшие из отверстия, собираются в точку. В рамках этой зоны описывается рассеяние синхротронного излучения на белковых кристаллах.

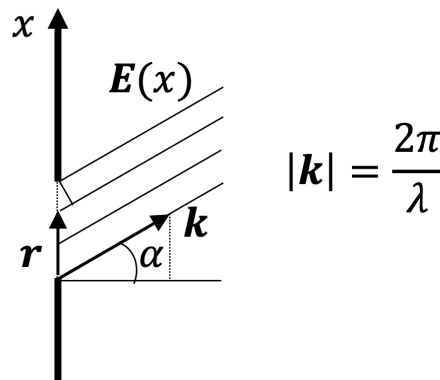


Рис. 3.1. Дифракция на щели.

С точки зрения математики, суммарная амплитуда:

$$E(\alpha) = \int_{-\infty}^{+\infty} E(x) * e^{ikr} dx, \quad (3.1)$$

где kr – произведение волнового вектора на оптическую разность хода. Нам интересно, разумеется, действительная часть от результата интегрирования.

Как связаны угол α и вектор k ? Если радиус-вектор сонаправлен с осью x , то:

$$kr = k_x x = k * \sin\alpha * x. \quad (3.2)$$

Мы будем использовать не углы, а *векторы рассеяния*.

Прямое пространство – когда мы говорим про радиус-вектор \mathbf{r} в области объекта, порождающего картину рассеяния. *Обратное пространство* – когда мы описываем амплитуду волн в зависимости от волнового вектора \mathbf{k} , т.е. направления, в котором волны распространяются.

Что мы увидим в области Фраунгофера на оси x_2 , если открыта одна щель? Картина дифракции по интенсивности будет описываться функцией sinc^2 , где максимумы будут спадать по закону $\frac{1}{x^2}$.

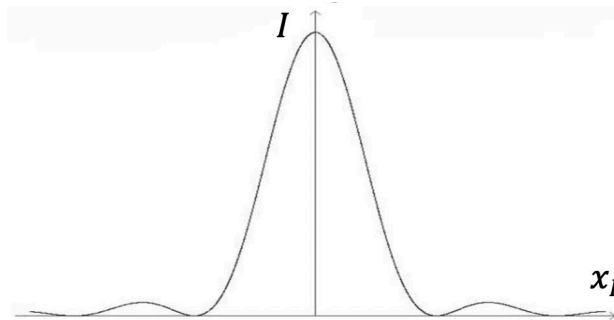


Рис. 3.2. Распределение интенсивности по оси x при дифракции на щели.

Разрешение

В математике картина дифракции описывается с точки зрения формализма, который похож на преобразование Фурье. Только в случае преобразования Фурье k_x пробегает все значения от минус бесконечности до бесконечности. А для дифракционной картины максимальное значение k_x достигается при $\alpha = 90^\circ$ и равно $k_x = 2\pi/\lambda$. При обратном Фурье преобразовании мы складываем все существующие гармоники с различным весом:

$$E(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} E(k_x) * e^{-ik_x x} dk_x. \quad (3.3)$$

Физика не позволяет нам сделать это точно, т.к. функция $E(k_x)$ определена в пределах от $-2\pi/\lambda$ до $2\pi/\lambda$, существует минимально возможный период по пространству, связанный с длиной волны.

Оптика с точки зрения Фурье-подхода

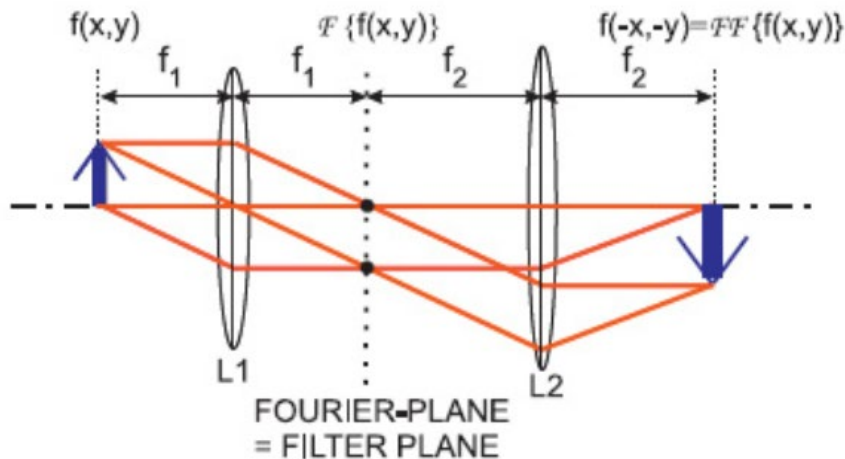


Рис. 3.3. Фокальная плоскость обозначена пунктирной линией.

Благодаря первой линзе, в ее фокальной плоскости соберутся все параллельные лучи от объекта. Вторая линза, в свою очередь, собирает этот волновой пакет в свою фокальную плоскость. Фактически, в первой фокальной плоскости происходит первое преобразование Фурье (но только по области, ограниченной размером линзы и длиной волны). Вторая линза делает еще одно аналогичное преобразование Фурье. Т.е. с точки зрения оптики конечная картина на рис. 3.3 является двойным Фурье-преобразованием изначального.

В случае, когда объект имеет небольшой размер (точка), со всех фокусов дифракции мы получим пятно, имеющее характерный размер порядка длины волны.

Периодическая картина (дифракционная решетка)

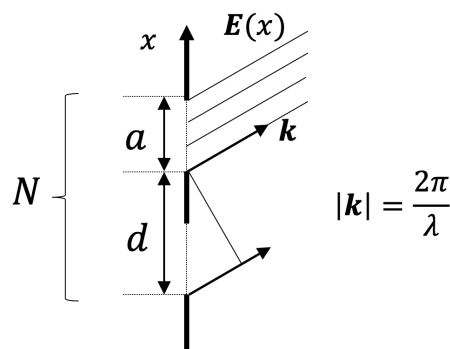


Рис. 3.4. Решетка с периодом d , количеством щелей N и шириной щели a .

Складываем амплитуды, описываемые формулой для E , для каждой щели. Набег фаз между этими амплитудами составляет $kdsina$. Максимум получается, если этот набег фаз удовлетворяет условию

$$kdsina = 2\pi. \quad (3.4)$$

Соответственно, полная амплитуда будет равняться:

$$E_{\text{полн}} = E(k_x)(1 + e^{k_x d} + e^{k_x 2d} + \dots). \quad (3.5)$$

Если удовлетворили условию (3.4), то происходит конструктивная интерференция. Тем не менее, для углов α , соответствующих (3.4), максимум не наблюдается, т.к. функция $E(k_x)$ в этой точке обращается в ноль. Следовательно, картина распределения интенсивности приобретает следующий вид:

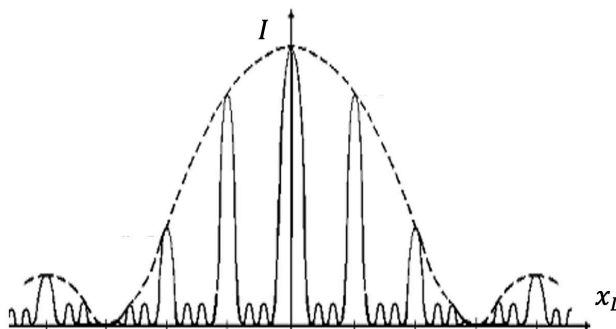


Рис. 3.5. Распределение интенсивности по оси x при дифракции на решетке.

Обращаем внимание, что значения в промежуточных максимумах в точности соответствуют значению огибающей.

Взаимодействие кристалла с рентгеновским излучением

Э/м волна падает на молекулу, состоящую из атомов. Как рентгеновское излучение будет взаимодействовать с одной заряженной частицей? С точки зрения классической физики, заряженная частица под действием периодического поля начнет двигаться в пространстве по гармоническому закону с частотой возбуждающей силы. Следовательно, возникнет Томсоновское рассеяние, или излучение заряда, на который падает э/м волна. Амплитуда при этом будет зависеть от направления.

Сечение взаимодействия можно оценить как:

$$\sigma \sim \left(\frac{ke^2}{mc^2} \right)^2 = r_0^2, \quad (3.6)$$

где r_0 – электрический радиус электрона (радиус сферы с зарядом, соответствующим заряду электрона, таким что его энергия равна mc^2). Это величина порядка 10^{-5} м, что близко к размеру ядра. Поэтому рентгеновское излучение на электронах рассеивается слабо, и для получения нормальной дифракционной картины необходимо иметь кристалл.

Т.к. масса протона на несколько порядков больше массы электрона, сечение взаимодействия для протона сильно меньше. Поэтому можно говорить о том, что рентгеновское излучение рассеивается *только* на электронах.

Комптоновское рассеяние

Если падающая волна и излученная имеют разную длину волны, то такое явление называется *Комптоновским рассеянием*, и не может быть объяснено классической физикой. Если считать что излучение – это поток частиц с каким-то импульсом, связанным с длиной волны, который передается электронам, импульс теряется, а длина волны станет выше.

При падении на кристалл комптоновское рассеяния происходит, но упругим и является некогерентным, поэтому оно порождает некий общий фон, а не четкую дифракционную картину.

События на уровне кристалла

Что, если взаимодействие происходит не с одним электроном, а с целым атомом?

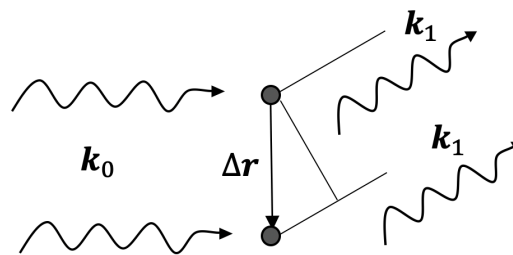


Рис. 3.6. Взаимодействие излучения с 2-мя атомами в кристалле.

Рассмотрим отдельные атомы (рис. 3.6) в трехмерном пространстве как аналог периодической решетки на рис. 3.4. Найдем их разность хода Δr :

$$\Delta r = (\mathbf{k}_1, \Delta \mathbf{r}) - (\mathbf{k}_0, \Delta \mathbf{r}) = (\mathbf{Q}, \Delta \mathbf{r}), \quad (3.7)$$

$$\mathbf{Q} = \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_0. \quad (3.8)$$

Вектор \mathbf{Q} называется вектором рассеяния. Если атомы разные, то вводится понятия атомного *форм-фактора*. От него зависит амплитуда – чем тяжелее атом, тем выше амплитуда рассеяния.

Элементарная ячейка кристалла

В элементарной ячейке кристалла содержатся тысячи атомов. В таком случае, *структурный фактор элементарной ячейки* (амплитуда рассеянного излучения для конкретного вектора рассеяния) будет:

$$F(\mathbf{Q}) = \sum_i f_i e^{i(\mathbf{Q}, \mathbf{r}_i)}. \quad (3.9)$$

Сумма берется по всем атомам, содержащимся в элементарной ячейке. Здесь f_i – это индивидуальный вес каждого атома, зависящий от количества в нем электронов. Примерная картина дифракции для одной элементарной ячейки изображена на

рис. 2.176. Соотношение интенсивностей для максимум и минимумов при рассмотрении полного кристалла не меняется!

Полная амплитуда рассеяния всего кристалла

Знаем, что у элементарной ячейки есть три параметра – не обязательно ортогональные векторы \mathbf{a} , \mathbf{b} и \mathbf{c} , которые сонаправлены с ребрами элементарной ячейки. По аналогии с оптикой можем выписать амплитуду рассеяния от всего кристалла:

$$F_{\text{полн}}(\mathbf{Q}) = F(\mathbf{Q}) \sum_{o,p,q} e^{i(\mathbf{Q},(o*\mathbf{a}+p*\mathbf{b}+q*\mathbf{c}))}, \quad (3.10)$$

где o, p, q – целые числа, характеризующие положение ячейки. Т.е., мы учитываем излучение от каждой ячейки, перебирая все возможные o, p, q .

В каких случаях будет **конструктивная интерференция**?

Чтобы заведомо получить максимум, необходимо выполнение следующих условий:

$$\begin{aligned} (\mathbf{Q}, \mathbf{a}) &= 2\pi * h \\ (\mathbf{Q}, \mathbf{b}) &= 2\pi * e \\ (\mathbf{Q}, \mathbf{c}) &= 2\pi * t \end{aligned} \quad (3.11)$$

где h, e, t – целые числа, которые называются *индексами Миллера*. Тогда в экспоненте всегда будет величина, кратная 2π , а следовательно, возникнет конструктивная интерференция. Каждая точка на рис 2.14 – это конкретный максимум, который соответствует конкретному набору трех индексов Миллера. Помним, что каждый \mathbf{Q} соответствует конкретному направляющему углу в пространстве.

Для конкретного направления структурные факторы (3.8) индексируется как $F(\mathbf{Q}_{hlm})$ или F_{hlm} . В эксперименте фактически определяется не сама $F(\mathbf{Q}_{hlm})$, а $|F(\mathbf{Q}_{hlm})|^2$, т.е. вся информация о фазе теряется.

Расчет электронной плотности в элементарной ячейке кристалла

Чаще всего для элементарной ячейки не пишется сумма атомных факторов рассеяния, а интегрируется электронная плотность, как в предыдущей лекции:

$$E(\mathbf{Q}) = \int \rho(\mathbf{r}) * e^{i\mathbf{r}\mathbf{Q}} d^3\mathbf{r}. \quad (3.12)$$

В эксперименте измеряются $|E_{hlm}|$ и далее подставляются в обратное преобразование Фурье:

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_{hlm} |E_{hlm}| e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}_{hlm}} e^{-i\mathbf{r}\mathbf{Q}_{hlm}}. \quad (3.13)$$

Как помним из лекции №2, при этом возникает *фазовая проблема*. Формально рассчитать сумму выше мы не можем.

Методы решения фазовой проблемы

1. Прямые методы:

- Фазовые соотношения.

Электронная плотность – это положительная и вещественная функция в пространстве. А если возьмем экспериментальной картины интенсивности, подставим случайные фазы и возьмем преобразование Фурье, то в общем случае получим комплексную функцию. Поэтому на фазы есть некоторые математические ограничения. Поэтому, если мы имеем достаточно много уравнений и не слишком много неизвестных, то для простых случаев можно попытаться подобрать фазы, удовлетворяющие уравнениям. Однако, сделать это можно только для самых простых случаев.

- Карты Паттерсона.

$$P(u, v, \omega) = \sum_{hlm} |F(\mathbf{Q}_{hlm})|^2 e^{-i(\mathbf{Q}_{hlm} \mathbf{R}(u,v,\omega))}, \quad (3.14)$$

$$\text{где } \mathbf{R}(u, v, \omega) = \int_V \rho(x, y, z) \rho(x + u, y + v, z + \omega). \quad (3.15)$$

- Автокорреляционная функция электронной плотности.

Пусть элементарная ячейка состоит из трех атомов. Тогда \mathbf{R} будет принимать ненулевое значение только тогда, когда u, v, ω соответствует положению расстоянию между двумя атомами (см. рис. 3.7)

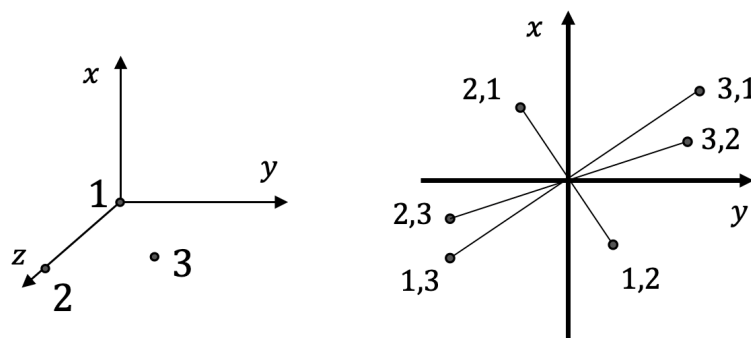


Рис. 3.7. Карта Паттерсона.

N атомов в системе порождают $N(N - 1)$ точек на карте Паттерсона. При большом количестве атомов решить обратную задачу по восстановлению расположения атомов очень сложно.

Для решения этой проблемы в систему вводятся тяжелые металлы. На карте Паттерсона они дают очень яркие пики в виду высокой электронной плотности. Это позволит определить, куда встроились атомы металла. На карте Паттерсона основаны все дальнейшие методы решения. Методы 2 и 3 основаны на введении тяжелых металлов.

2. Однократное и многократное изоморфное замещение

3. Однократная и многократная аномальная дисперсия

4. Молекулярное замещение

В левом верхнем углу рис 3.8 объект (котик), структуру которого мы хотим узнать. Справа от него картина на рассеяния (ч/б, т.к. только интенсивность). Пусть мы решили фазовую проблему для некоего объекта в правом верхнем углу (бесхвостый котик), то есть знаем и сам объект, и картину рассеяния с точностью до фаз.

Предположим, что у нас есть объект, который отличается от известного на некую величину, но мы не знаем, на какую конкретно (хвост). Возьмем фазы от известного объект и интенсивности от экспериментального объекта – появляется хвост (левый нижний угол). Далее следует процедура самосогласования.

Метод часто используется в настоящее время, т.к. в уже известно строение достаточно большого количества белков.

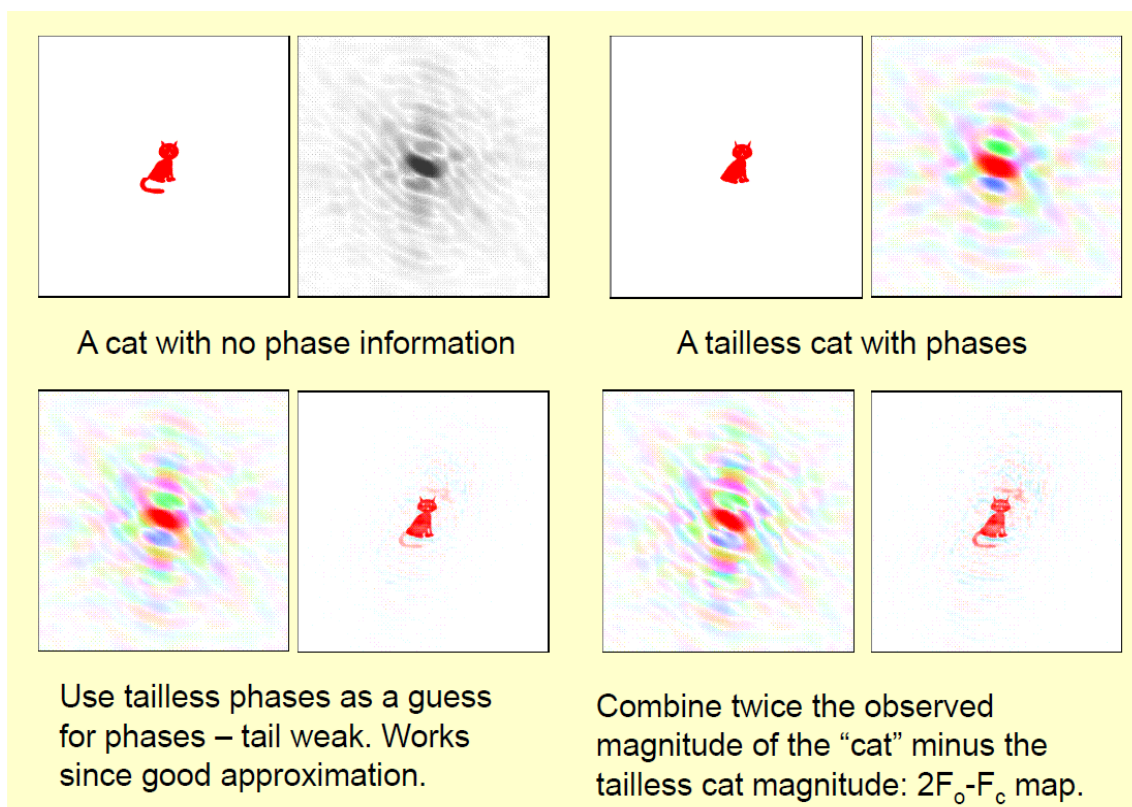


Рис. 3.8. Образец молекулярного замещения.

Лекция 4. Решение фазовой проблемы.

Перечень методов решения фазовой проблемы был описан в конце прошлой лекции.

Однократное и многократное изоморфное замещение

Метод основан на введении в структуру кристалла ионов тяжелых металлов (например, ртуть, свинец, платина). Пусть для изначального кристалла имеется набор величин $F_P(Q_{hlm})$:

$$F_P(Q_{hlm}) = |F_P(Q_{hlm})|e^{i\varphi_{hlm}}. \quad (4.1)$$

Этот белок помещается в раствор соли тяжелого металла. Если повезет, то ионы металла сформируют электростатические контакты с молекулой белка. После этого мы получаем новую картину рассеяния, для которой можем построить карту Паттерсона с ярко выраженными пиками, соответствующими межатомным расстояниям между встроившимся атомам металла. По этой карте можем восстановить расположение ионов металла (т.к. их небольшое количество), то есть решить фазовую проблему для F_M :

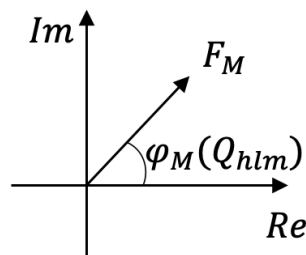


Рис. 4.1. Структурный фактор для атомов металла в комплексной плоскости.

Считаем, что белок никак не изменился, просто появились дополнительные ионы, не изменяя общей структуры (изоморфное замещение). Тогда для F_{P+M} можем записать:

$$F_{P+M}(Q_{hlm}) = F_P + F_M. \quad (4.2)$$

Тогда, т.к. мы знаем модуль (4.1), то можем построить F_P , который может лежать на окружности. Также мы экспериментально измерили F_{P+M} , которое лежит на своей окружности:

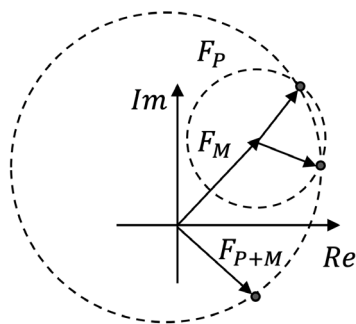


Рис. 4.2. Сложение структурных факторов для металла и изначального кристалла.

Окружности пересекаются в двух точках. Следовательно, для каждого структурного элемента есть два возможных варианта для фазы. Тогда вводим другие ионы металлов (*многократное замещение*), получаем новую картину дифракции, и решение становится однозначным.

Однократная и многократная аномальная дисперсия

Идея похожа на метод введения тяжелых металлов, но используется другой физический эффект. Метод основан на *аномальном рассеянии*. Когда мы находимся вдали от края поглощения, рассеянная волна сдвинута на 180 градусов относительно падающей. Если по длине волны мы находимся вблизи линии поглощения данного атома, то возникают различные эффекты, например, дополнительный сдвиг фазы при рассеянии. Это можно объяснить по-разному:

В рамках квантового подхода: происходит поглощение, а спустя некоторое время испускание кванта, имеющего ту же длину волны. Ввиду задержки возникает дополнительный набег фазы.

В рамках классических представлений: вблизи резонансных частот возникают изменения соотношения фаз.

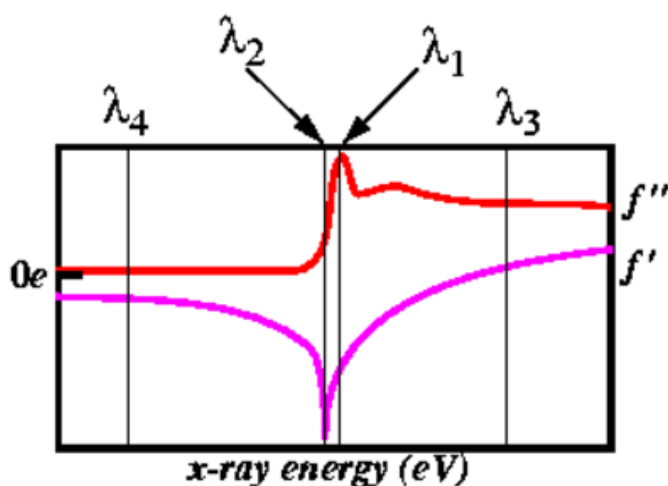


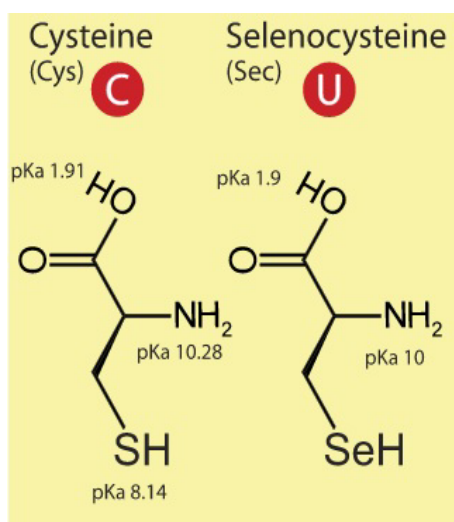
Рис. 4.3. Факторы аномального рассеяния

Когда мы рассматриваем атомный структурный фактор, мы раскладываем его на несколько компонент:

$$f = f^0 + f'(\lambda) + if''(\lambda). \quad (4.3)$$

Рассмотрим последний член, описывающий дополнительный набег фазы. В комплексной плоскости. Мы должны ввести в белок атомы, либо у которых резонансная частота близка (или какая-то линия поглощения) близка к длинам волн рентгеновского излучения (соответствуют межатомному расстоянию).

Существуют аминокислоты, которые умеют кодироваться: селеноцистеин (21-ая аминокислота, в средах с присутствием селена), селенометионин (за счет обмена между серой и селеном) – рис. 4.4.



6	C Углерод s^2p^2 12.0107	7	N Азот s^2p^3 14.0067	8	O Кислород s^2p^4 15.9994	9	F Фтор s^2p^5 18.9984
14	Si Кремний s^2p^2 28.0855	15	P Фосфор s^2p^3 30.9737	16	S Сера s^2p^4 32.065	17	Cl Хлор s^2p^5 35.453
32	Ge Германий s^2p^2 72.63	33	As Мышьяк s^2p^3 74.9216	34	Se Селен s^2p^4 78.96	35	Br Бром s^2p^5 79.904

Рис. 4.4. Пример способных кодироваться аминокислот: селен и селеноцистеин.

Если в изначальном белке есть цистеин или метионин, можно попытаться заменить их на селеноцистеин и селенометионин. Атомы селена можно далее использовать для аномальной дисперсии.

Идея подхода: нарушение симметрии картины рассеяния из-за фазового сдвига при аномальном рассеянии. Пары Фриделя (или пары Бюве):

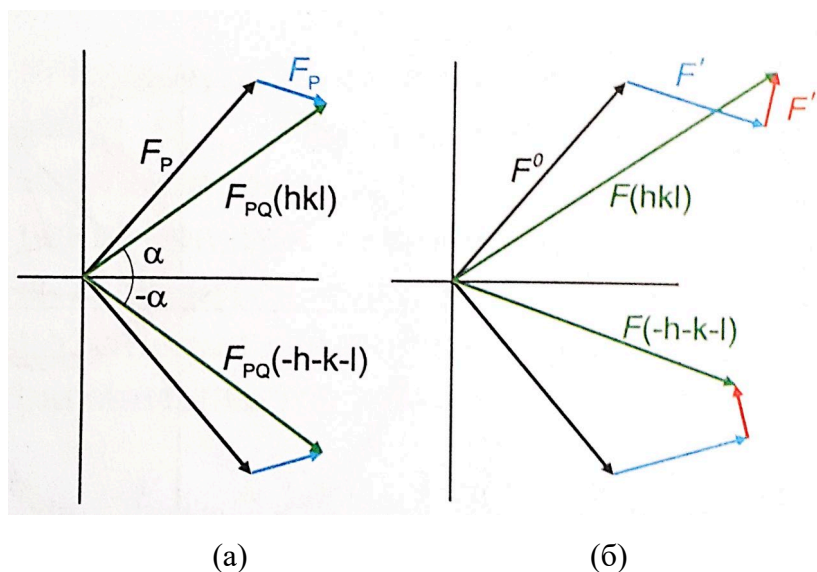


Рис. 4.5. (а) закон Фриделя; (б) влияние аномального рассеяния на $F(hkl)$ и $F(-h - k - l)$. Иллюстрация из книги «Методы молекулярной биофизики».

Вектор $F_{PQ}(-h - k - l)$ является комплексно-сопряженным к вектору $F_{PQ}(hkl)$. Вектор F_P соответствует рассеянию на белке без селена, или случаю, когда селен не дает аномального сигнала – то есть снимаем картину рассеяния по длине волны вдалеке от края поглощения. На синхротроне можно изменять длину волны, а следовательно, получать картину дифракции для нескольких длин волн. Вектор F_Q порождают атомы селена. По сути, мы разбиваем картину рассеяния, полученную с элементарной ячейки, не как раньше, на белок и тяжелые атомы металла, а на белок и атомы селена (как аналог тяжелого металла).

Когда нет аномального рассеяния, пары в верхней и нижней полуплоскости рис. 4.5 симметричны. Когда начинает работать последний член (4.3), атом генерирует волну, которая всегда больше по фазе, чем если бы мы находились вдали от края поглощения. Вблизи края поглощения (рис. 4.5б) F_P складывается из двух частей, синим – нормальная часть, а красным – часть, описывающая аномальную дисперсию и дополнительный набег фазы по 90 градусов.

Таким образом, нарушается симметрия в парах Фриделя, что как раз и используется в методе. В этом случае можно построить *разностную карту Паттерсона*, то есть разнице в интенсивности пар при отсутствии и наличии сигнала аномальной дисперсии. Когда аномальной дисперсии нет, пары идентичны. Когда аномальная дисперсия есть, с помощью разностной карты можно локализовать атомы селена, решив для них фазовую проблему.

Далее рассуждаем примерно так же, как в случае изоморфного замещения.

Преимущество метода аномальной дисперсии: можно снять дифракционную картину на нескольких длинах волн и получить различные разностные карты, поэтому

нет необходимости несколько раз вводить тяжелые металлы. В настоящее время на практике для решения фазовой проблемы в основном используется метод аномальной дисперсии.

Молекулярное замещение

Допустим, что белка с известной структурой (а также картиной рассеяния с интенсивностями и фазами) у нас нет.

Задача фолдинга белков

Вспомним про метод молекулярного замещения. Допустим, что белка с известной структурой (а также картиной рассеяния с интенсивностями и фазами) у нас нет. Необходимо получить хотя бы примерную модель экспериментального белка из неких соображений. В биофизике существует задача фолдинга белков: известна последовательность аминокислот, какая будет структура? В Общем случае задача не решена, хотя алгоритм решения с некоторыми ограничениями с помощью нейронной сетки был предложен Google в 2020 году.

В 2011 г. в журнале Nature выходит статья о том, как геймеры позволили решить задачу определения структуры белка с помощью игры Foldit. Идея такая: есть ретровирусная протеаза (не человеческий вирус, чем-то похож на ВИЧ), для которой никак не удавалось решить фазовую проблему из-за необычного мотива укладки. Геймеры должны были попытаться предсказать структуру, которую можно было бы использовать в качестве начального шаблона метода молекулярного замещения.

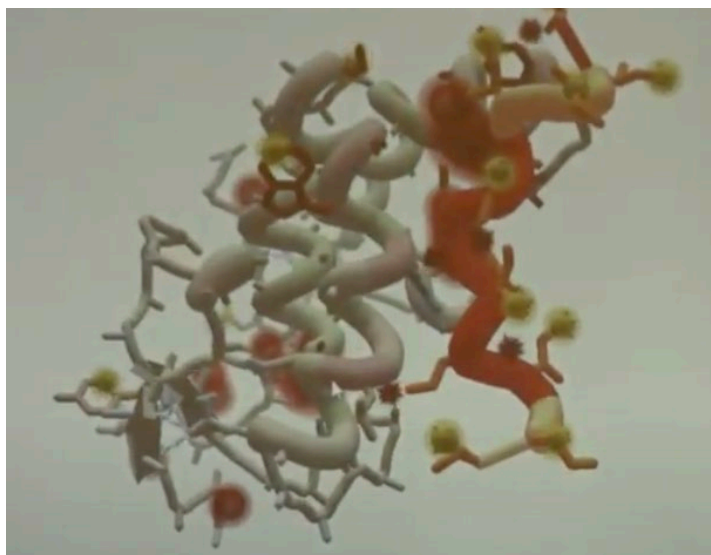


Рис. 4.6. Режим научных задач в игре Foldit.

В игре заложены правила, которые позволяют вычислять scoring-функцию. В этом есть некоторая физика: если какие-то молекулярные группы заложены очень близко, то мы накладываем штраф, т.к. атомы не могут пересекаться. Желтым цветом обозначаются ошибки: например, на рис. 4.6 желтым отмечена гидрофобная

аминокислота изолейцин, поэтому он не должен быть в растворителе. Красным обозначены слишком близкие расстояния между цепями или полости внутри белка, которых быть не должно.

В игре структуру можно изменять: вращать аминокислотные остатки и прочее. В любой момент можно запустить *процедуру градиентного спуска*: функция score, как энергия, описывает насколько выгодна построенная белковая конструкция. Можно математически оценить как система будет двигаться, если вычислить силы (градиент энергии). Рано или поздно энергия достигает локального минимума.

Для протеазы отобрали ряд вариантов с высоким score (низкой энергией). Далее смотрели, какие фазы порождают отобранные структуры, и подставляли полученные фазы в экспериментальные структуры, делая обратное Фурье преобразование. С использованием процедур само согласования удалось получить достаточно неплохую структуру белка.

Общая философия устройства решения обратной задачи

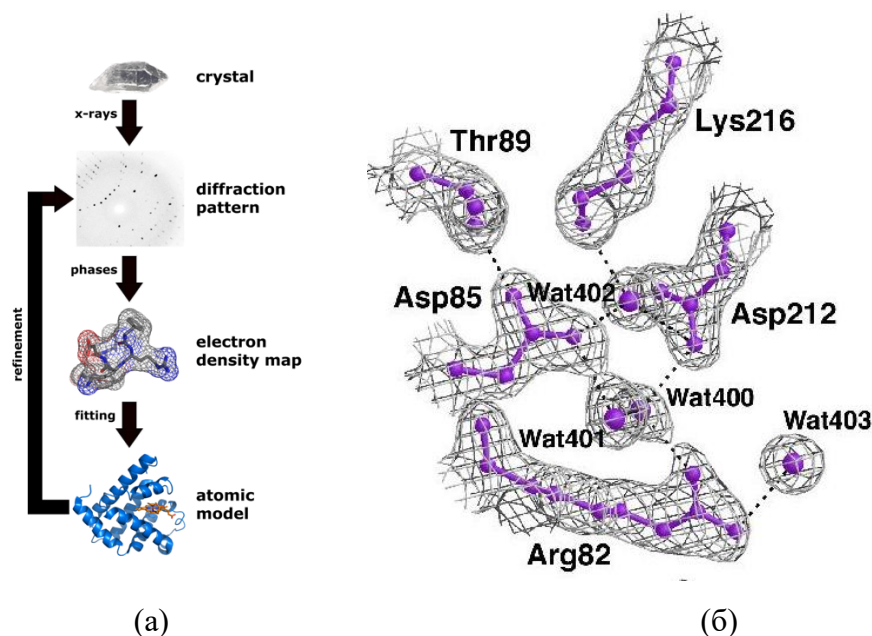


Рис. 4.7 (а) последовательность решения обратной задачи по восстановлению структуры белка. (б) пример карты электронной плотности.

После облучения кристалла, получения дифракционной картины и добавления фаз (рис. 4.7а), мы делается обратное Фурье-преобразование и получаем карту электронной плотности (рис. 4.7б). В нее нужно пытаться встроить атомарную модель. Из общих соображений об устройстве химических связей, а также известных данных об аминокислотном составе и молекулярной массе белка, по отдельным идентифицированным «хвостам» в карте электронной плотности можно провести фитинг атомной модели. Далее с помощью прямого преобразования Фурье от этой атомной модели получаем теоретическую картину рассеяния и сравнить ее с

экспериментальными данными. Далее следует согласование: берутся теоретические фазы и экспериментальные интенсивности для дифракционной картины, получается новая электронная плотность и т.д. Это происходит до тех пор, пока модель не начинает сходиться к конечному результату. Этот результат характеризуется двумя числами – **R-факторами**:

$$R = \frac{\sum_{hlm} \left| |F_{exp}(hlm)| - k|F_{theor}(hlm)| \right|}{\sum_{hlm} |F_{exp}(hlm)|}. \quad (4.4)$$

Эта величина характеризует то, насколько теоретическая модель близка к экспериментальным данным. Коэффициент k – это масштабный множитель, который подбирается так, чтобы в среднем F_{exp} и F_{theor} соответствовали друг другу.

Атомная модель содержит довольно много параметров: не только координаты каждого атома, но и *температурные B-факторы*. Если атом в пространстве движется, интенсивность рефлексов на дифракции падает, т.к. если рассматриваем дифракции. Как результат сложения волны от двух атомов, расположенных на большом расстоянии, то при подвижных атомах картина будет смазываться. Т.к. все атомы находятся в непрерывном тепловом движении, то атомарные факторы для них запишутся как:

$$f_i = f_0 e^{-B^2 q^2}, \quad (4.5)$$

где f_0 – атомарный фактор для нулевой температуры, а для заданной температуры возникает дополнительная зависимость от угла рассеяния. Атомарные факторы начинают уменьшаться, со скоростью, заданной коэффициентом $B[\text{м}]$ – температурный фактор, является параметром системы. Можно сказать, что эта величина характеризует среднее отклонение атомов из-за теплового движения от положения равновесия. В структуре разные атомы могут обладать разными отклонениями, т.к. средние отклонения зависят от массы (например, атом водорода легче и отклоняется на большие расстояния), а также от положения в белке или аминокислоте (то, что находится на поверхности будет в среднем испытывать более существенное движение, чем то, что внутри).

В результате, атомарная модель содержит не только координаты, но и характеристики подвижности атома (B -фактор). Если мы хотим подробно описать процесс теплового движения атома, то нужно учесть, что движения происходят не в гармоническом симметричном потенциале, а в некоторых выделенных направлениях (анизотропия). В таком случае на каждый атом приходится намного больше параметров, чем один B -фактор. Тогда из-за большого количества подгоняемых параметров структура в какой-то момент может стать переопределенной, R -фактор искусственно занижается. В таком случае процедура уточнения делается путем сравнения не со всей дифракционной картиной, а только с частью рефлексов. После

того, как достигли результата, будем считать R-фактор по «честным» рефлексам, которые не использовались при подгонке.

$$R_{free} = \frac{\sum_{hlm \in T} \sum_{hlm} \left| |F_{exp}(hlm)| - k|F_{theor}(hlm)| \right|}{\sum_{hlm \in T} |F_{exp}(hlm)|}, \quad (4.6)$$

где T – рефлексy, которые не использовались при уточнении модели. Такая величина считается более осмысленной, т.к. исключает возможность тонкой подгонки всех экспериментальных параметров и неверно подобранного результата.

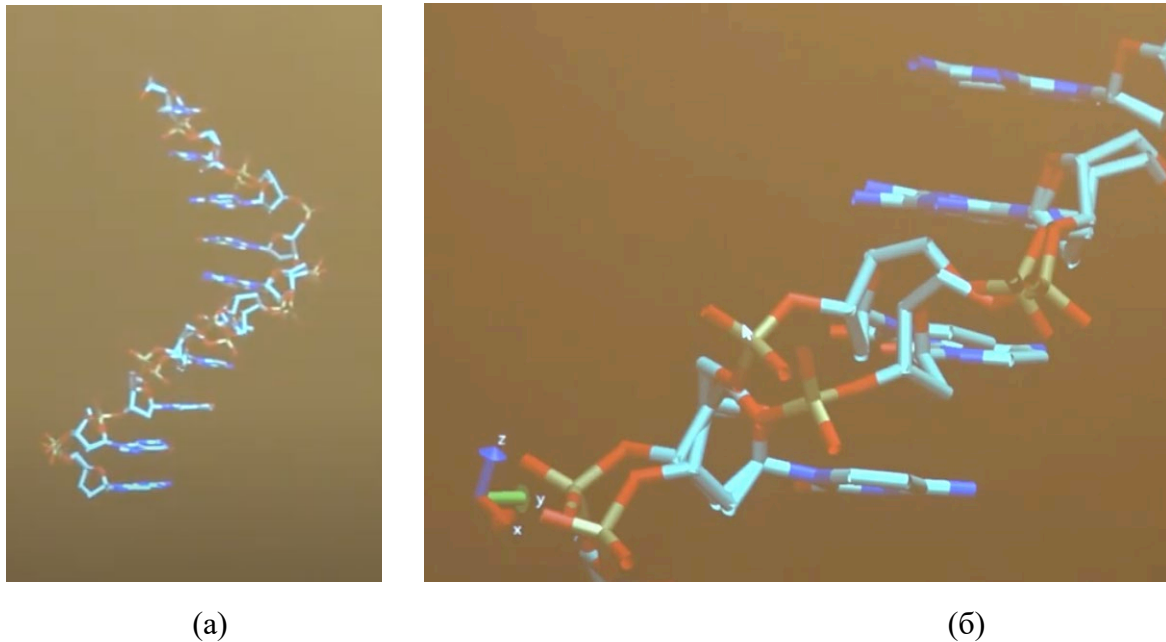


Рис. 4.8. Пример конкретной структуры ДНК, полученной в результате решения обратной задачи.

Особенности структуры на рис. 4.8:

- Изображена только одна цепь, т.к. структура обладает C2 симметрией, и все остальные части цепи могут быть получены из основной с помощью отражений, поворотов и т.д. Отсюда следует, что это последовательность должна быть палиндромом.
- Структура ДНК двоится, поскольку в разных ячейках могут быть отличные конформации. Поэтому их можно. Описать так, сложно в одних ячейках одна конформация, в других ячейках другая. С точки зрения электронной плотности это означает, что когда мы решили фазовую проблему и построили распределение плотности, видно, что иногда она раздваивается. Если разрешение очень высокое, то мы можем сказать с каким весом в какой конформации находится данная цепочка.

Известно также, что сахарофосфатный остов ДНК очень подвижен, а дезоксирибоза может легко переключаться между двумя конформациями, в результате чего остов может локально менять свою геометрию. Это необходимо при функционировании, но пока не очень понятно, как это упрощает узнавание конкретных белков.

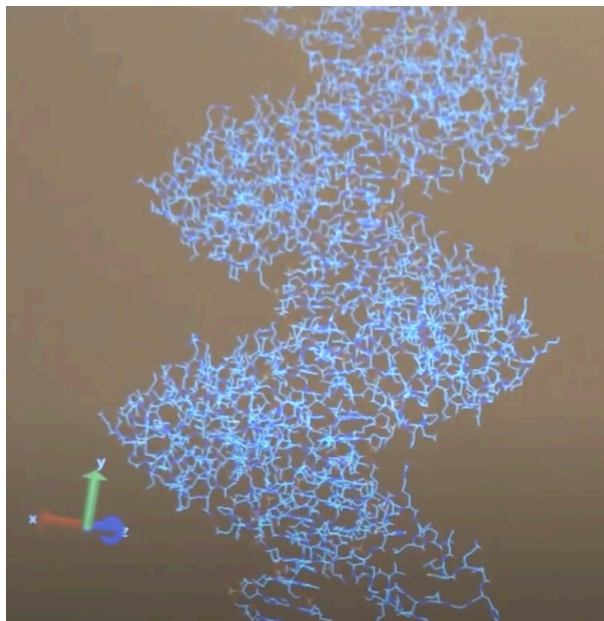


Рис. 4.9. ДНК-белковый комплекс.

На рис. 4.9. изображены белки, которые взаимодействуют с ДНК по широкой бороздке. Это TAL-белки (см. лекцию 1), которые способны взаимодействовать с конкретным основанием.

Механизм взаимодействия белка с основанием:

К широкому желобу белковая альфа-спираль прикрепляется под каким-то углом и формирует несколько контактов как с сахаро-фосфатным остовом, так и образуют водородные связи с основаниями. Способ присоединения для TAL-белков (на рис. 4.8б) – с помощью аспартата, находящегося на стыке двух белковых спиралей.

Фемтосекундная нанокристаллография (Femtosecond X-ray protein nanocrystallography)

В Стэнфорде на большом линейном ускорителе была сделана установка для того, чтобы для различных задач использовать супер-яркий рентгеновский источник. Это делается с помощью лазера на свободных электронах. На линейном ускорителе электроны ускоряются до больших энергии, далее они помещаются в область, в которой чередуется полярность мощных магнитов. Электрон начинает двигаться «змейкой» и испускать при этом рентгеновское излучение, которое направлено по ходу движения. Излучение начинает влиять на сами электроны, и в какой-то момент усиливается только определенная длина волны. За счет этого можно получать

катастрофически яркие (примерно в 10:6 раз ярче, чем в синхротроне) лазерные импульсы (рис. 4.10а)

Нам приходилось выращивать кристалл, поскольку рентгеновское излучение слабо взаимодействовало с электронами. В данном случае источник настолько яркий, что в выращивании кристалла нет необходимости, и в крайнем случае можно получить картину рассеяния всего с одной молекулы.

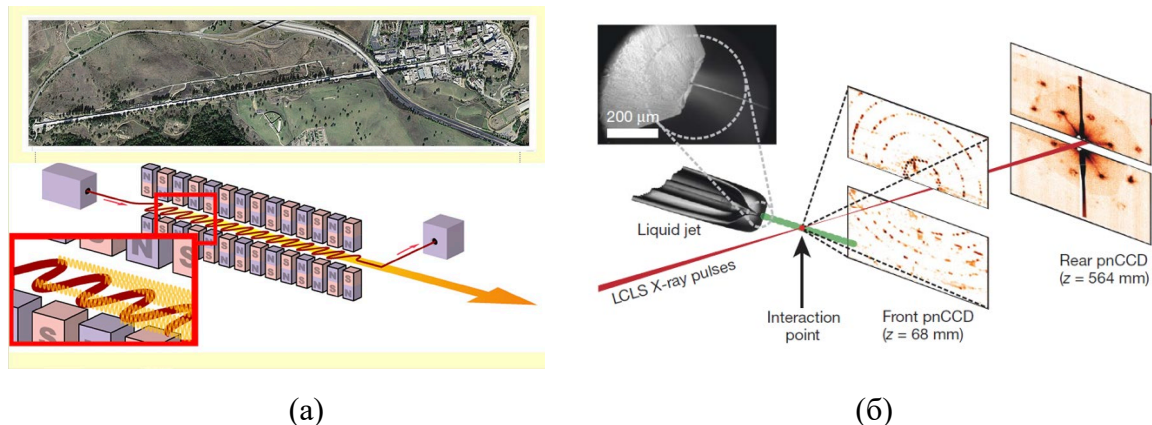


Рис. 4.10. (а) формирование мощного лазерного импульса в периодическом поле; (б) получение картины рассеяния мс помощью лазерного импульса.

Некоторый поток вещества помещается (см. рис. 4.10б) перпендикулярно вспышке рентгеновского излучения. В этой области во избежание взаимодействия рентгеновского излучения с воздухом находится высокий вакуум. Далее создается поток жидкости, в которой содержатся нужные нам вещества. Жидкость начинает быстро испаряться, но тем не менее в точке взаимодействия с рентгеновским излучением остаются необходимые белки. На рис. 4.10б использовались нанокристаллы фотосистемы с довольно большим количеством белков в большой концентрации. С каждой вспышкой получают фотографию, на которой видны рефлексы. Сложность заключается в том, что положение каждого нанокристалла в жидкой фазе нам не известно. В таком случае можно сделать огромное количества (сотни тысяч) фотографии и по ним восстанавливать, как был повернут кристалл. Далее можно восстановить электронную плотность с помощью стандартных процедур.

Первые структуры были получены с относительно невысоким разрешением ($\sim 9\text{Å}$), т.к. в Стэнфорде длина волны соответствует $\sim 8\text{Å}$. У современных источников (Гамбург) длина волны уже порядка 1Å , поэтому он идеально подходит для решения задач, связанных со структурой макромолекул.

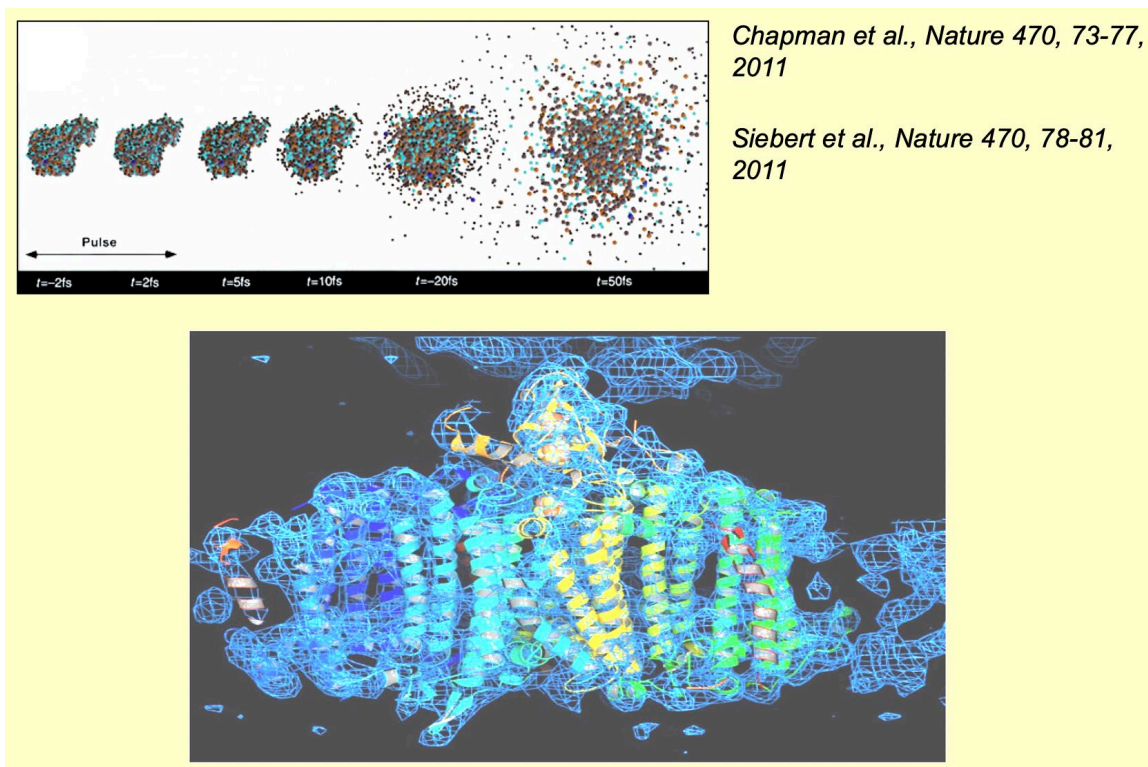


Рис. 4.11. Первые структуры XFEL.

А что если попытаться получить кристалл белковой молекулы *in vivo*? Прекрасный пример этого – инсулин в гранулах, производимых специальными клетками, его концентрация может быть настолько высокой, что формируется кристалл. Проблема *in vivo* кристаллизации заключается в небольшом размере кристаллов. Можно попытаться заразить клетку вирусом с очень сильным промоутером и белком, который необходимо экспрессировать. Остается подобрать концентрации и внешние параметры таким образом, чтобы получить микрокристалл для дальнейшего определения структуры вещества (рис. 4.12). Такой белок *котепсин* был получен в Гамбурге. Котепсин может вызывать сонную болезнь, эффективное лекарство от которой до сих пор не получено. Для белка известна структура активной формы, но нет вещества, которое было бы способно хорошо ингибировать эту молекулу. Было выдвинуто предположение, что эта молекула изначально неактивна, поэтому ингибировать необходимо эту неактивную форму. Для этой неактивной формы была продумана технология *in vivo* экспрессии с помощью бактериального вектора. Далее структура изучается с помощью лазера на свободных электронах, т.к. использование синхротрона в случае микрокристаллов требует длительного облучения, в результате которого кристалл разрушается. Таким образом, изучение котепсина потребовало объединения сразу двух мощных подходов: *in vivo* кристаллизации и быстрая фотография с помощью лазерного пучка.

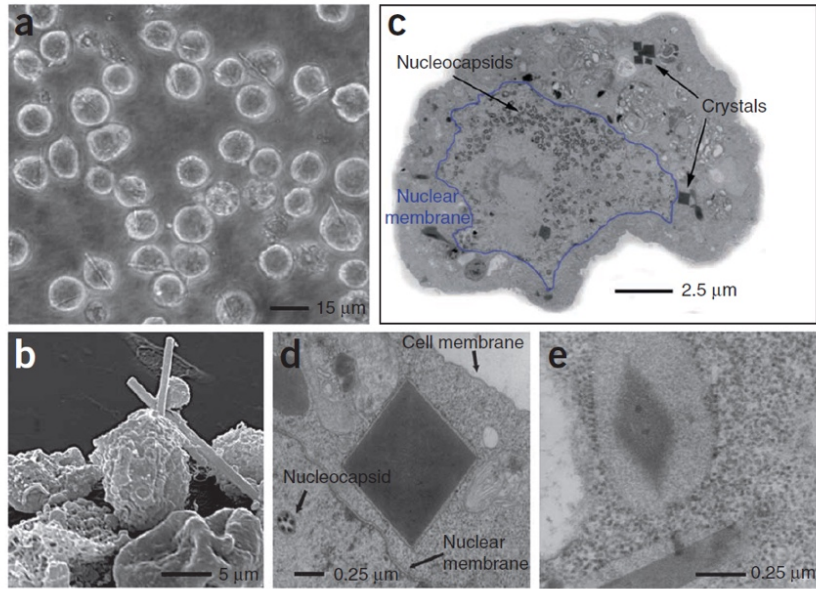


Рис. 4.12. Микрокристаллы *in vivo*.

Еще один из подходов, используемый в Гамбурге: липидную мезофазу с нанокристаллами выдавливают навстречу мощному лазерному пучку.

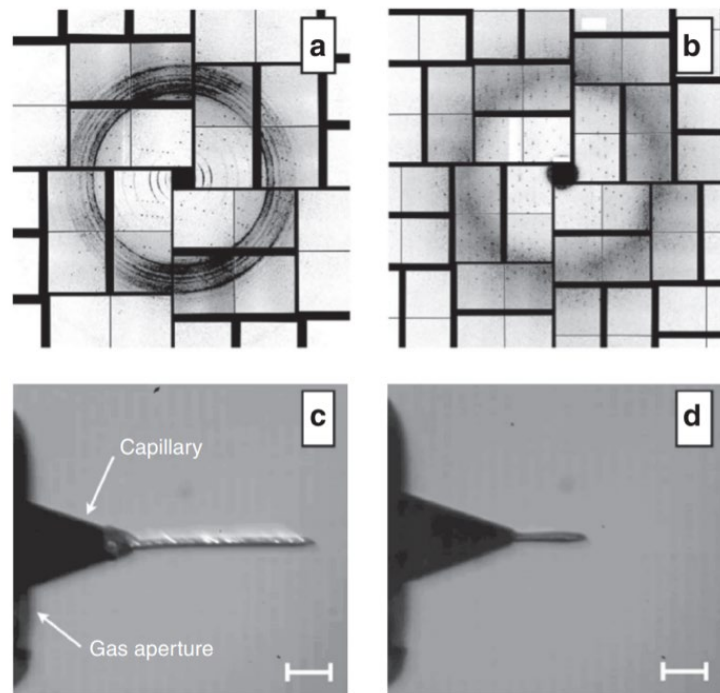


Рис. 4.13. Пример полученных изображений. Полная картина рассеяния складывается из отдельных кусков, которые соответствуют разным положением кристалла.

Какое вещество самое дорогое на Земле?

Самым дорогим веществом, не смотря на каламбур, является *антивещество*. Позитрон-эмитионная томография (ПЭТ): нестабильный изотоп в процессе распада приводит к формированию позитрона, который обладает огромной энергией, аннигилирует с электроном и порождает два гамма-кванта, разлетающихся в противоположных направлениях. Кольцо на рис. 4.14 измеряет задержку во времени между появлением на детекторе гамма-квантов. Зная задержку, можно определить положение источника с точностью до миллиметра.

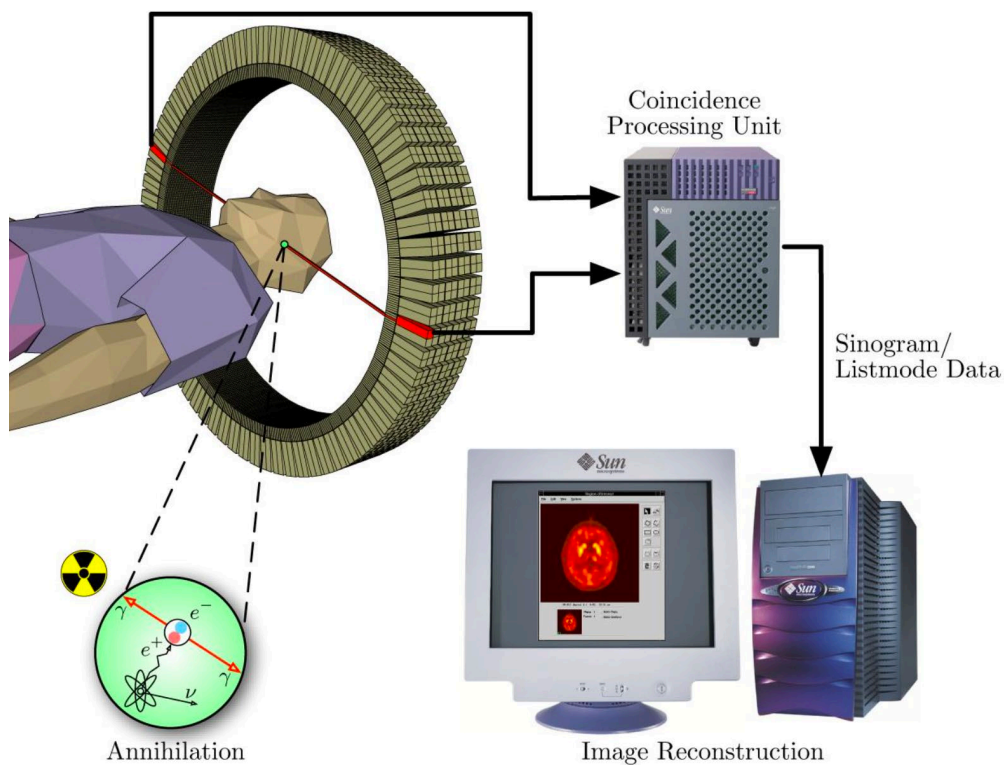


Рис. 4.14. Позитрон-эмитионная томография.

Лекция 5. Нейтронография.

Резюмирование предыдущих лекций:

Описание реального процесса рентгеноскопического анализа:

Этап 1. Подготовка. Получение большого количества очищенного белка в высокой концентрации, без примесей и не гликозилированный. В чашках Петри выращиваются колонии бактерий. С помощью процедуры элетропорации соответствующий ген вводится в бактерию, бактерии размножаются и помещаются в центрифугу для отделения бактерий от внеклеточной жидкости, полученное вязкое вещество обрабатывается ультразвуком для того, чтобы разрушить бактериальные стенки. Далее происходит ультрацентрифугирование для отделения белковой фракции от всего остального. С помощью хроматографии белок очищается.

Этап 2. Кристаллизация белка. Подбор необходимых условий для кристаллизации. Применяется метод висячей капли. Процесс кристаллизации наблюдается под микроскопом.

Этап 3. Получение картины рассеяния. Самый быстрый этап. Кристалл облучается рентгеновскими лучами. Решается обратная задача. Прежде, чем кристалл попадает на синхротрон, качество получаемой картины рассеяния оценивается на более слабых источниках. Основной европейский синхротрон находится в Гренобле. Кристалл устанавливается в специальную кабинку, быстро (со скоростью ~ 10000 К/с) замораживается с помощью охлаждающих паров за время много меньше секунды. Это необходимо для того, чтобы вода не сформировала кристалл. Далее происходит снятие картины рассеяния под различными углами в реальном времени. Параметры кристалла в настоящее время происходит автоматически.

Этап 4. Трехмерная структура. На некоторой итерации решается обратная задача и получается электронная плотность. Поэтапно формируется атомарная модель, которая является итоговым результатом.

Нейтронография

Нейтронография является дополнительным методом к рентгеноструктурному анализу, позволяющий получить информацию о положении атомов водорода. Это достаточно важно для биологии.

«Проблема водорода» в рентгеноструктурном анализе:

- Атомы водорода определяются только при ультравысоком разрешении $\sim 1\text{\AA}$ ($<1\%$ структур PDB). Т.к. рассеяние происходит на одном электроны, электронная плотность очень маленькая.
- Около 50 % атомов в структуре типичного белка – это атомы водорода
- Большинство могут быть определены из положения тяжелых атомов – но далеко не все. Например, основание в ДНК: NH_2 -группа, если знаем расположение

азота и углерода и sp^2 -гибридизацию, можно понять из общих химических соображений. Если это метильная группа, в которой возможно вращение, сказать точно нельзя. Но возможно множество ситуаций, в которых вообще нельзя сказать, в протонированной или нет форме находится аминокислотный остаток.

Возможность определения положения атомов водорода в структуре позволяет исследовать:

- 1) Состояние функциональных групп (протонированное состояние или нет).
- 2) Взаимодействие растворителя с белком (ДНК) – можно видеть положение и атомов кислорода, и атомов водорода тех молекул воды, которые находятся в первой гидратной оболочке, и соответственно делать вывод об их пространственной ориентации.
- 3) Взаимодействие субстрата с ферментом, его взаимодействие с лигандами.
- 4) Особенности динамики растворителя вблизи макромолекулы.
- 5) Механизм ферментативных реакций – и химикам, и биофизикам интересно, как белки могут ускорять протекание химических реакций.

Взаимодействие нейтронов с веществом

Для получения можно использовать деление изотопов урана. Получившиеся Нейтроны чаще всего обладают огромной энергией и малой длиной волны, поэтому слабо взаимодействуют с ядрами, и их необходимо замедлить/

Связь импульс с длиной волны:

$$\mathbf{p} = \hbar \mathbf{k}, \quad |\mathbf{k}| = \frac{2\pi}{\lambda}. \quad (5.1)$$

Если мы хотим работать с межатомными расстояниями, то требуется $\lambda \sim 1 \text{ \AA}$. Если предположить, что импульс и выражение для энергии можно использовать в нерелятивистском виде, то для того, чтобы оценить характерную температуру, необходимо вычислить следующее выражение:

$$\frac{p^2}{2m} \sim \frac{3}{2} kT. \quad (5.2)$$

Если рассматриваем длины волн 1 \AA , то температура согласно (5.2) примерно равна комнатной, поэтому такие нейтроны называются *тепловыми*. Для того, чтобы охладить нейтроны с энергией в несколько МэВ, используется тяжелая вода, при взаимодействии с которой энергия теряется.

Основные свойства рассеяния нейтронов ядрами:

- Близкое значение длины рассеяния для различных ядер (то есть отличия не на порядок – как в случае с рассеянием рентгеновского излучения). Даже для тепловых нейтронов взаимодействие с атомами очень слабое, сечение рассеяния: $\sigma \sim 10^{-28} \text{ м}^2$, длина рассеяния b , где $\sigma = 4\pi b^2$. Характерные величины приведены для упругого когерентного рассеяния нейтронов на ядрах. У нейтрона есть спин и магнитный момент, у многих ядер он тоже есть, поэтому за счет э/м изменений, а также поглотиться ядром – это некогерентное рассеяние, фон, с которым нужно бороться. Некогерентное взаимодействие нейтронов с протонами самое сильное – это проблема.
- Сечение взаимодействия может значительно измениться для изотопа данного химического элемента.
- Нейтроны намного слабее поглощаются веществом, чем X-лучи, поэтому время облучения можно значительно увеличить. Самый мощный источник нейтронов некоторое время назад обладал следующим потоком:

$$I_0 \sim 10^{12} \frac{\text{нейтронов}}{\text{м}^2 \text{с}}$$

Тогда полный поток по всем направлениям, данный одним рассеивающим центром:

$$I = I_0 \sigma \sim 10^{-16} \text{ нейтронов.}$$

Следовательно, на одном ядре рассеивается очень малое количество нейтронов (рис. 5.1), поэтому необходим кристалл больших размеров либо увеличенное время накопления.

Neutron coherent scattering lengths and incoherent scattering cross-sections of interest in biological materials.

Element	Isotope	Atomic number	Neutron incoherent cross-section (barns)	Neutron coherent scattering length (10^{-12} cm)
H	^1H	1	80.27	-0.374
	$^2\text{(D)}$		2.05	0.667
C	^{12}C	6	0.00	0.665
N	^{14}N	7	0.49	0.937
O	^{16}O	8	0.00	0.580
Mg	^{24}Mg	12	0.00	0.549
S	^{32}S	16	0.00	0.280
K	^{39}K	19	0.25	0.379
Mn	^{55}Mn	25	0.40	-0.375
Fe	^{56}Fe	26	0.00	1.012

Рис. 5.1. Сечение когерентного и некогерентного рассеяния. Единицы некогерентного рассеяния приведены в Барнах (для сечений рассеяния), $1 \text{ barn} = 10^{-28} \text{ м}^2$.

Откуда возникают минусы в последнем столбце рис. 5.1? Между волной, падающей на частицу, и рассеянной возможен фазовый сдвиг. Когда $b > 0$, то сдвиг составляет 180° . Когда $b < 0$, то сдвиг составляет 0° . Эти величины удобно представить в комплексной плоскости, где b представимо в виде $be^{i\varphi}$. Для некоторых ядер эта величина может быть комплексной из-за наличия поглощения, так что сдвиг между рассеянной и падающей волной может быть любым.

Т.к. фазы волн от водородов отличаются на π от других рассеянных волн, а водородов в молекуле около 50%, то может возникать эффект гашения интерферирующих волн. Это неудобно с точки зрения структуры. Для решения этой проблемы удобно использовать изотопы, например, дейтерий. На рис. 5.1 видно, что несмотря на то, что дейтерий близок по массе к водороду, длина рассеяния положительна.

Преимущества дейтерия над водородом:

- В 40 раз меньшее сечение некогерентного рассеяния.
- В 2 раза большая длина когерентного рассеяния.
- Отсутствие эффектов фазового гашения.

Данные рентгеноструктурного анализа свидетельствуют об отсутствии значимого влияния $H \rightarrow D$ замен на структуру кристаллов.

Чтобы заменить водород на дейтерий, можно:

- 1) Поместить бактерии, в которых выращиваются кристаллы, в тяжелую воду. Все атомы заменяются на дейтерий, получается четкая картина рассеяния.
- 2) Поместить кристалл в тяжелую воду, тогда со временем произойдет обмен. В тяжелой воде не pH , а pD . Заменяются только те протоны, которые являются мобильными.

Нейтроннография развивается не так активно, как рентгеноскопия. Это связано с тем, что требования к качеству кристаллов выше: необходимо использовать более крупные кристаллы в виду слабых источников, а мало-мальски мощных источников в мире очень мало.

Усовершенствования за последние годы

- Источники тепловых нейтронов стали на 2-3 порядка более интенсивными.
- Эффективные экспериментальные протоколы замен H на D (дейтерирования).
- Регистрация сигнала.

Как следствие – возможность наблюдения дифракции на кристаллах объемом около 0.1 нм^3 . (все же больших, чем нужно для рентгеноסקопии).

- Криогенная нейтронография.

Работа с нейтронографией

С точки зрения математики и физики очень похоже на рентгеноструктурный анализ: получается та же картина рассеяния, необходимо решить обратную задачу. Обычно к этому времени уже есть первичная атомарная модель, но без атома водорода. В таком случае отлично работают рассуждения для (кот с хвостом), т.к. мы можем использовать фазы, полученные в ходе рентгеноструктурного анализа, а интенсивности из нейтронографии, из картины «ядерной плотности». Делаем модель, строим прямое Фурье-преобразование, выполняем процедуру самосогласования.

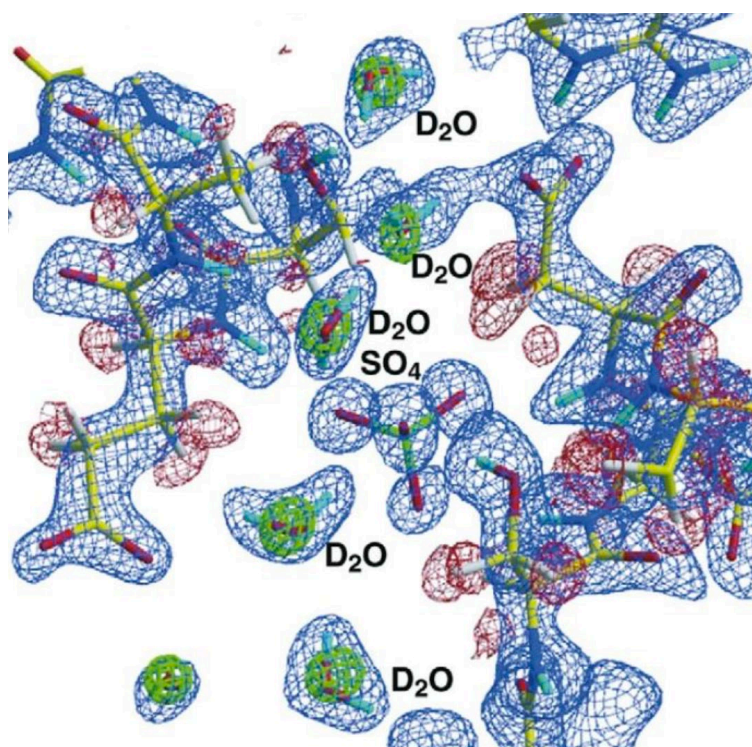


Рис. 5.2. Пример карты плотностей.

Красным цветом на рис. 5.2. изображены водороды на углероде (sp^3 -гибридизация углерода, тетраэдрическая геометрия). Эти водороды будут плохо замещаться, так как такая группа стабильна. Красный цвет также соответствует отрицательной длине рассеяния. Синим показаны водороды, которые заменились на дейтерий, их длина рассеяния положительная, поэтому они красятся в синий как и все остальные ядра. Таким образом, мы не только видим структуру, но и можем сказать какие группы насколько хорошо заменяются. Можно сделать вывод, что этот кристалл был получен помещением в тяжелую воду.

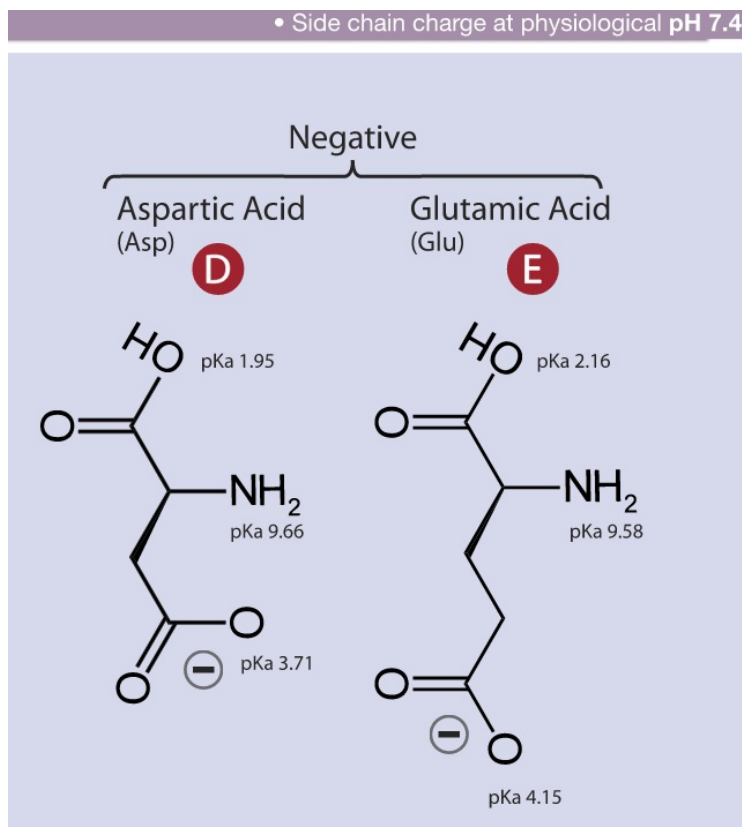


Рис. 5.3 Пример с вирусной протеазой.

Протеаза – это полностью симметричный димер, и в активном центре у нее есть 2 аспартата. Один из них принадлежит одной субъединице, а второй – другой. Т.е. это гомодимер, случай, когда субъединицы абсолютно одинаковые. Соответственно между аспартатами помещается либо субстрат, либо лекарственное соединение, которое пытается заблокировать работу протеазы (нарезку полипептидных цепочек). Судя по рис. 5.3, необходимо $pH = 3.71$ pKa, чтобы соотношение между заряженной и незаряженной формой равнялось единице. Т.е. если протонов недостаточно, то группа снизу отрицательно заряжена и депротонирована. Поэтому обычно на концах аспартата рисуют два отрицательных заряда. Данные pKa получаются путем титрования неконцентрированного раствора аминокислот (молекулы находятся далеко друг от друга). В случае, когда два отрицательно заряженных аспартата находятся близко друг к другу, потенциал вблизи них отрицательный. В результате pKa этих групп становится совсем другим, так как дополнительный потенциал меняет свободную энергию связывания. В результате, как было показано с помощью нейтронографии, симметрия нарушается: один из зарядов становится протонированным, а другой остается отрицательным.

Это важно, т.к. когда мы пытаемся понять, как будет проходить реакция гидролиза, нужно знать, где находятся атомы водорода. Если мы теоретически считаем энергии связывания, то необходимо знать все зарядовые конфигурации.

"Проблемный" гистидин

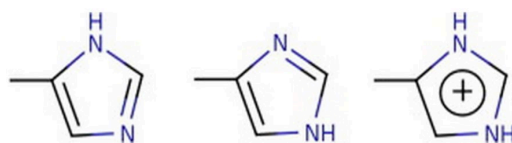


Рис. 5.4. Три возможных состояния протонирования для гистидина.

Гистидин – это уникальная аминокислота, поскольку для нее возможно несколько состояний, их pK_a близки к физиологическим. Гистидин часто используется в активных центрах ферментов, поскольку он может легко протонироваться и депротонироваться. Это удобно для катализа, потому что катализ часто происходит за счет переноса протонов и изменения конфигурации. Поэтому для ферментов важно знать, как в активном центре расположен гистидин.

Как происходит сбор данных:

Для структуры протеазы ВИЧ было получено разрешение 1.9 Å. Система поворачивается на 0.3 градуса каждые 6 часов, чтобы изучить общую картину рассеяния. Чтобы получить полную картину, сбор данных происходил 46 дней. При этом нейтроны поглощаются настолько слабо, что можно не переживать, что кристалл разрушится.

Взаимодействия в протеазе

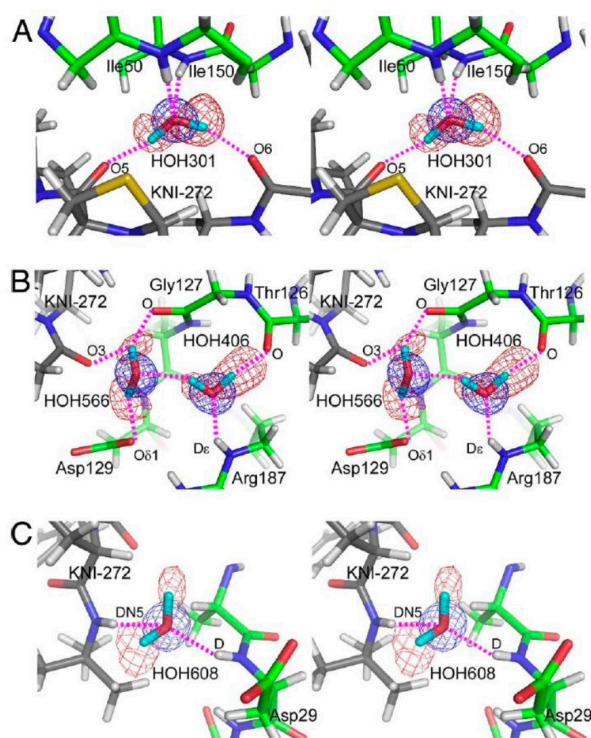


Рис. 5.5. Взаимодействия в протеазе.

Картинки, получаемые с помощью данных нейтронографии, позволяют также видеть, что происходит с водой в активном центре. В случае протеазы, вода тоже используется в процессе ферментативного катализа: вода отщепляется и присоединяется к одному из аспартатов, круговорот протонов сопряжен с процессом гидролиза (рис. 5.6). У полипептидной цепочки гидролизуется пептидная группа. Для этого, у молекулы аспартата можно отнять протон, в результате возникнет реактивный радикал. Промежуточная форма (интермедиат реакции) далее определённым образом разваливается. Барьер реакции (энергию промежуточной формы) можно уменьшить за счет расстановки зарядов в пространстве определенным образом. В этом идея механизма катализа для множества ферментов. При этом, если мы понимаем, как в пространстве устроено расположение, можно синтезировать такие аналоги, которые будут хорошо ингибировать. В интермедиате нельзя нарисовать нормальную химическую форму, т.к. протон одновременно принадлежит сразу нескольким химическим формам.

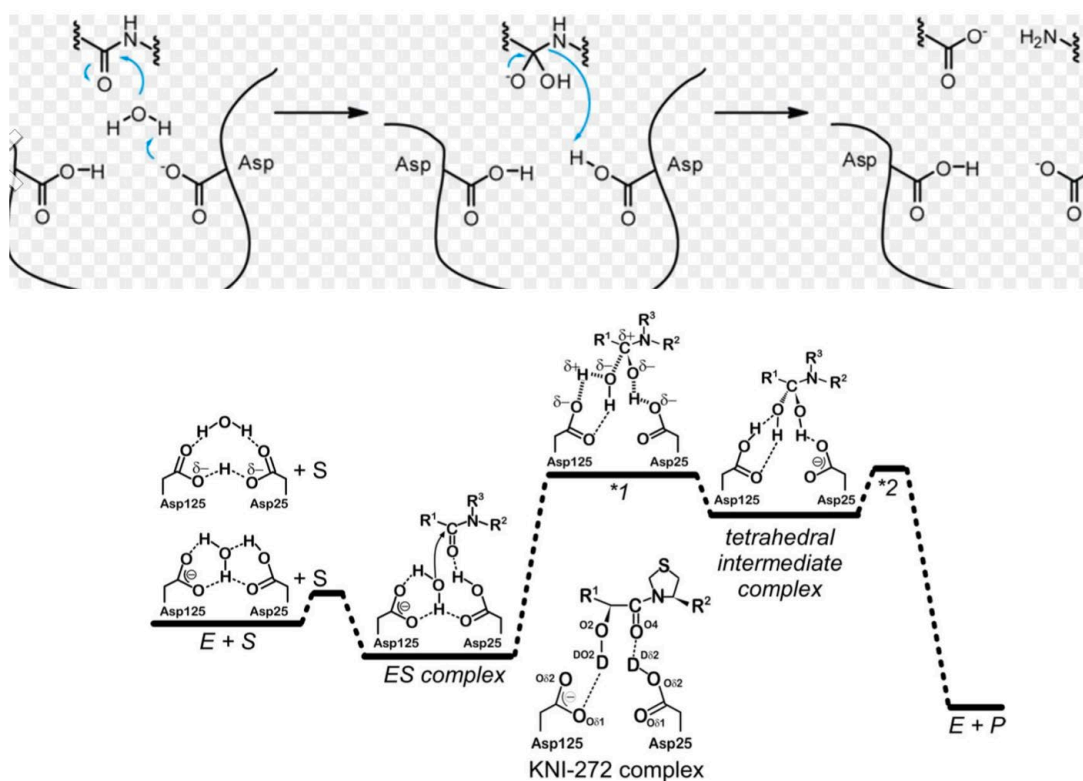
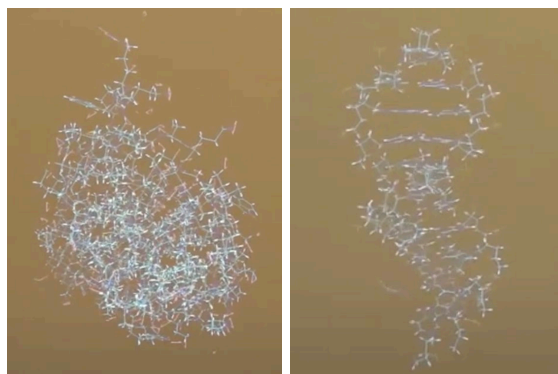


Рис. 5.6. Взаимодействия с водой в активном центре протеазы.

Модель протеазы

Видно (рис. 5.7), что в протеазе атомов намного больше, чем в ДНК. Белым обозначены атомы водорода, розовым – дейтерий. Они стали различимы благодаря нейтронографии.



(a)

(б)

Рис. 5.7. Модель протеазы, модель ДНК.

Лекция 6. Просвечивающая электронная микроскопия. Часть 1.

Нанобиоинженерия

Особенности электростатических взаимодействий в белке можно исследовать с помощью нейтронографии и рентгеноструктурного анализа: зная структуру белка, можем вносить в нее определённые изменения, и анализировать то, что будет происходить. Сегодня такие эксперименты называются *нанобиоинженерией*. Зная точно структуру белка и местонахождения аминокислотных остатков, эту структуру можно изменить.

В начале 2000-х годов были поставлены следующие эксперименты: есть белок, в его активном центре есть заряженные аминокислотные остатки, которые позволяют катализировать определенные реакции.

Что изменится в этой системе, если снести в структуру изменения? Например, внести вместо полярной, но нейтральной аминокислоты аспартат (в среднем -1 электронный заряд), который будет влиять на происходящее в активном центре. Может также внести положительный заряд, или, например, NH_3^+ (озон) с другой стороны и посмотреть, что будет происходить, и как можно описать это с помощью электростатики. В классической электростатике считается, что диэлектрическая проницаемость воды $\epsilon = 80$ (сильно полярный растворитель). В белке проницаемость связана с поляризуемостью молекулярных групп, обычно $\epsilon \approx 2 - 3$. Начнем вносить заряды и смотреть, что изменяется в активном центре.

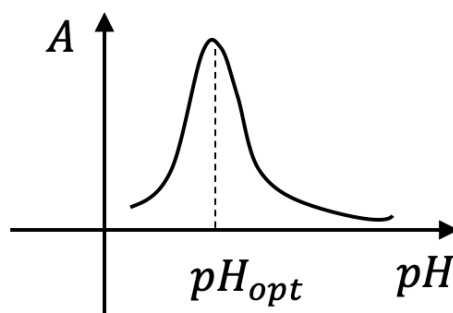


Рис. 6.1. График зависимости активности белка (скорости катализации реакции перехода субстрата в продукт) от pH

На рис. 6.1. pH_{opt} определяется зарядовым состоянием групп в активном центре. Если сильно менять pH, то заряженная форма может перейти в незаряженную, начнет сильно меняться скорость реакции.

Формулы из физхимии:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]}, \quad (6.1)$$

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A]}{[AH]}\right), \quad (6.2)$$

Отношение под логарифмом определяет то, насколько хорошо будет работать фермент. Если она начинает меняться, это означает, что равновесие сдвинулось, и активность фермента начинает работать неправильно, и смещаться относительно оптимума на рис. 6.1.

Начнем вносить заряды в молекулы и смотреть, как меняется pH_{opt} . Если вносим заряды, то в активном центре возникает дополнительное электростатическое поле, которое влияет на постоянную (6.1). Известно, что:

$$K_a \sim e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (6.3)$$

где показатель экспоненты – свободная энергия перехода протона из раствора в состояние нейтральной группы. Допустим, мы внесли некоторые заряды в структуру белка, и pH_{opt} увеличился. Имея в виду (6.3), и помня, что величина под логарифмом в (6.2) постоянная, можем записать:

$$\Delta pH_{opt} = \Delta pK_a. \quad (6.4)$$

Известно из (6.3), что константа K_a зависит от свободной энергии присоединения протона. Если создаем в структуре белка дополнительное поле, то свободная энергия протона в этом месте:

$$\Delta G = e\varphi, \quad (6.5)$$

где e – заряд протона, φ – электростатический потенциал в точке нахождения протона:

$$\varphi = \frac{kq}{r\epsilon_{ef}}. \quad (6.6)$$

Есть экспериментальные данные о том, как меняется ΔpH_{opt} , знаем что это изменение связано с изменением потенциала φ . Из эксперимента знаем r , т.к. мы все знаем про структуру белка из эксперимента. Таким образом может рассчитать ϵ_{ef} . Они находятся в пределах:

$$\epsilon_{ef} = 40 - 120. \quad (6.7)$$

Это неочевидно, т. к. мы ожидали промежуточные значения между диэлектрической проницаемостью воды и белка. Это объясняется электростатически с точки зрения поляризуемых слоев диэлектриков.

Литература: Д. Баданис, « $E = mc^2$. Биография самого знаменитого уравнения».

Просвечивающая электронная микроскопия

Эта лекция будет посвящена просвечивающей электронной микроскопии, которая значительно ближе к структурной биологии.

Типы электронных микроскопов:

- *Сканирующие электронные микроскопы.* Изучение поверхности образца и ее химического состава.
- *Просвечивающие электронные микроскопы.* Определение внутренней структуры образца. Его устройство похоже на оптический микроскоп. Когда используем электроны, можем влиять на электронные волны с помощью магнитных и электрических полей, поэтому возможно делать линзы. Если объект начинает рассеивать волны, то их далее можно собирать и получать увеличенное изображение напрямую (что невозможно делать в случае рентгеноструктурного анализа). Устройство классического трансмиссионного микроскопа показано на рис. 6.2.

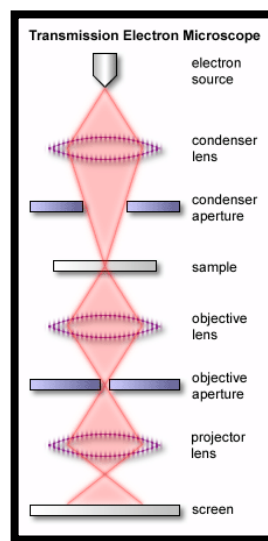


Рис. 6.2. Схема просвечивающего электронного микроскопа.

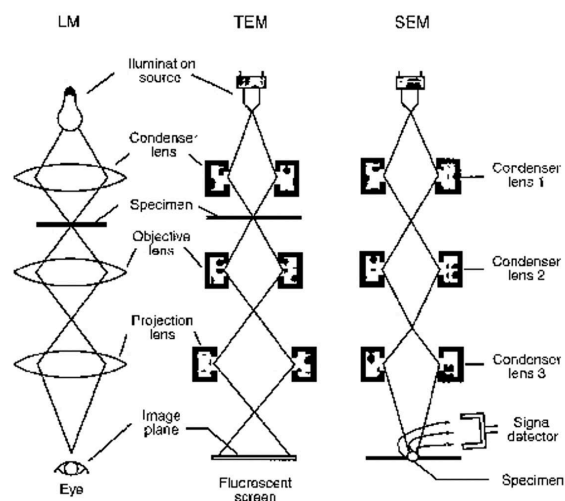


Рис. 6.3. Сравнение основных типов микроскопа – оптического и электронного (TEM – трансмиссионный, SEM – сканирующий).

В случаях для LM и TEM на рис. 6.3 излучение (свет или электроны) проходит через образец. В случае SEM пучок фокусируется на поверхность образца и детектирует вылетающие оттуда вторичные электроны. Далее сканируем поточечно образец и восстанавливаем картинку.

Длина волны электрона зависит от ускоряющего потенциала как:

$$\lambda = \frac{12.5}{\sqrt{U}}, \quad (6.8)$$

где U в Вольтах, длина волны – в ангстремах.

Отсюда следует, что длина волны электронов, ускоренных до 90 кэВ (характерное используемое напряжение), равна 0.04 А.

Почему реальная разрешающая способность электронной микроскопии на два порядка больше?

- 1) Нет линз, способных фокусировать электроны, рассеянные под большими углами: существующие электромагнитные линзы обладают существенно хроматической и сферической **абберациями**.
- 2) Нативные биологические частицы в ЭМ наблюдаются в виде нечетких бесструктурных пятен из-за **малости контраста**.
- 3) Из-за взаимодействия электронов с образцом для предотвращения его разрушения используются малые электронные дозы, что уменьшает **отношение сигнала к шуму**.

Основное различие между формированием изображения в экспериментах по дифракции и в электронном микроскопе состоит в том, что в последнем случае двумерное изображение можно наблюдать непосредственно.

Оптическая система электронного микроскопа

Четыре основные отличия ОМ от ЭМ (см. рис. 6.4):

- 1) Электроны сильно взаимодействуют с молекулами воздуха. Если сравнивать с рентгеном, сечение взаимодействия электронов с атомами: $\sigma_{эл} = 10^5 \sigma_{X-Ray}$. Поэтому в отличие от светового микроскопа образец в ЭМ всегда должен находиться в глубоком вакууме.
- 2) Увеличение в ЭМ может изменяться за счет изменения тока, текущего через электромагнитные линзы; в световом микроскопе увеличение для данной линзы постоянно.
- 3) В силу особенностей построения изображения сегодняшние электромагнитные линзы работают при очень маленькой апертуре (0.0005). Т.е., если в оптике мы ограничены длиной волны света, то в данном случае мы ограничены балансом между дифракцией и абберацией (сила оптической линзы зависит от угла

падения луча). Это влечет за собой практический предел разрешения около 4\AA , согласно формуле:

$$d = \frac{\lambda}{\sin\alpha}. \quad (6.9)$$

- 4) Аберрации в той или иной степени всегда присутствуют в электромагнитных линзах.

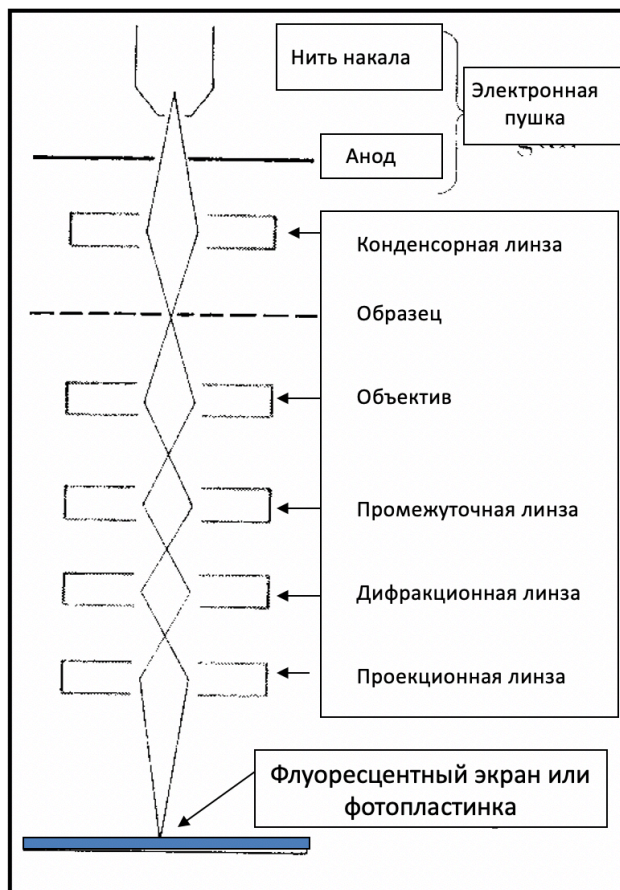


Рис. 6.4. Схема электронного микроскопа.

Источники электронов

1) *Термоионные* (рис. 6.5а). Из нагретого металла могут выходить электроны, распределение по скоростям которых сходно с распределением Максвелла. Чем выше температура, тем шире распределение. Для оптики разные скорости означают разные энергии и разные длины волн, что неудобно в силу наличия аберрации.

2) *Полевые* (рис. 6.5б). На острие подается потенциал в несколько кВ, за счет малой кривизны возникают огромные поля, и электроны срываются. Распределение по скоростям достаточно узкие.



Рис. 6.5. Источники электронов: (а) термоионные; (б) полевые.

Виды электромагнитных линз

1) **Магнитные линзы.** Катушки расположены в железном корпусе с особым разрезом, позволяющим создать определенные зависимости поперечной и продольной компонент магнитного поля для того, чтобы оптимальным образом фокусировать электроны.

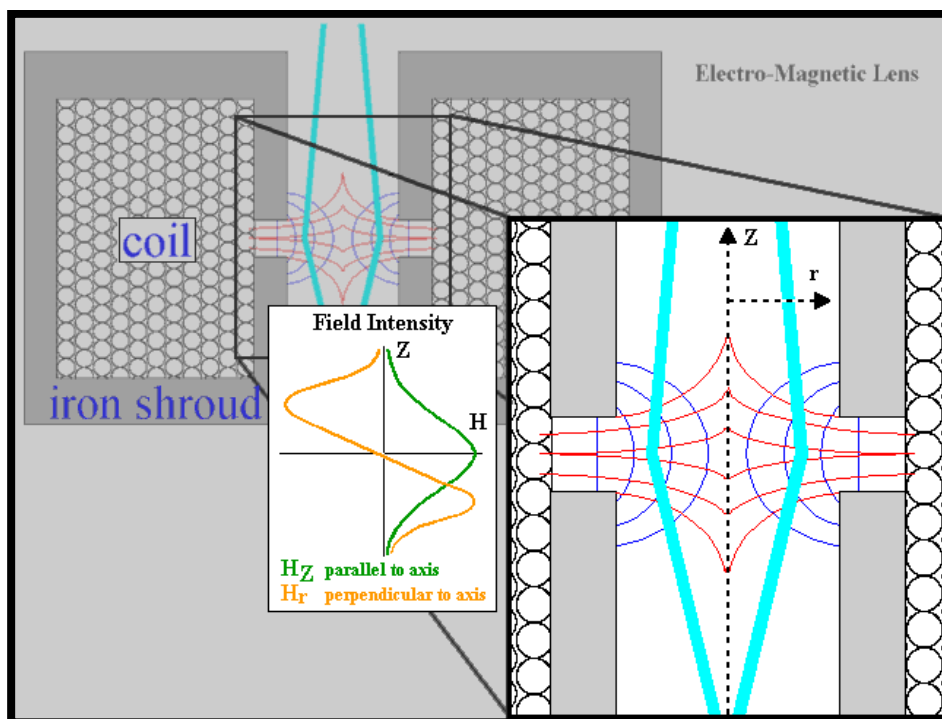


Рис. 6.6. Устройство магнитной линзы.

2) **Электростатические линзы.** Позволяют фокусировать пучок. Бывают в т. ч. рассеивающими. Необходим очень чистый и высокий вакуум в окружающей среде, чтобы избежать возникновения дуги на пластинах.

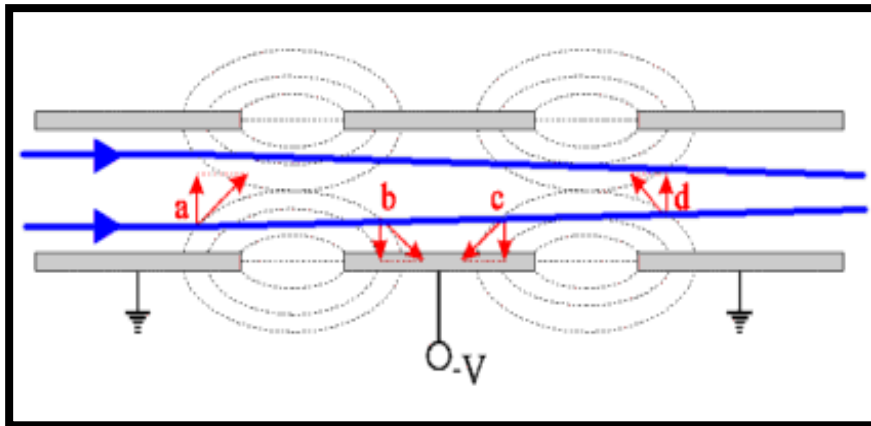


Рис. 6.7. Устройство электростатической линзы.

Аберрация

Аберрация – основная причина ухудшения качества изображения и потери разрешающей способности. В оптике из-за дисперсии синий свет фокусируется ближе, чем красный (см. рис. 6.8а). Физик должен знать, почему так!

В случае электронной линзы наоборот, электроны, обладающие большим импульсом, летят быстрее и фокусируются дальше (см. рис. 6.8б).

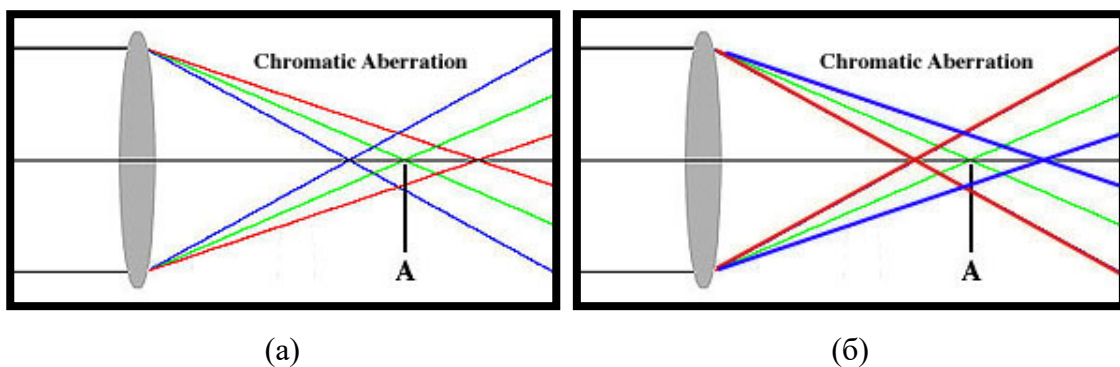


Рис. 6.8. Хроматическая аберрация (а) в классической микроскопии; (б) в электромагнитной.

Сферическая аберрация – основной враг для высокого разрешения. Электроны, которые летят далеко от оси линзы, собираются ближе, чем те, что летят по центру.

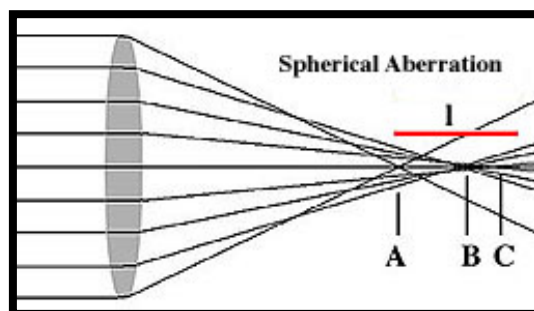


Рис. 6.9. Сферическая аберрация.

Методы борьбы с абберациями

1) *Апертура* – основной метод борьбы со сферической абберацией (рис. 6.10). При установке апертуры уменьшается варианты того, под каким углом прилетают электроны.

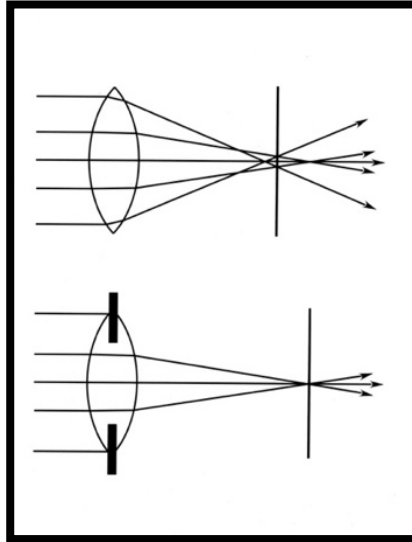


Рис. 6.10. Апертура.

Диаметр фокального пятна для сферической абберации:

$$d = c_S \alpha^3, \quad (6.10)$$

где c_S – стандартный в оптике коэффициент абберации (S – для сферической), α – угол падения.

Таким образом, появляются две противоположные зависимости: с одной стороны, согласно формуле (6.9) размер фокального пятна будет уменьшаться при увеличении пятна за счет дифракционных эффектов, а по формуле (6.10) он растет. Если приравнять два выражения, на пересечении зависимостей получим угол, оптимальный с точки зрения аббераций (~ 0.0001). Тогда, оптимальный угол можно найти как:

$$\frac{\lambda}{\alpha} = c_S \alpha^3 \Rightarrow \alpha_{opt} = \left(\frac{\lambda}{c_S}\right)^{\frac{1}{4}}. \quad (6.11)$$

Тогда, разрешение линзы равно:

$$d = c_S \left(\frac{\lambda}{c_S}\right)^{\frac{3}{4}} = (c_S)^{\frac{1}{4}} \lambda^{\frac{3}{4}}. \quad (6.12)$$

Для того, чтобы сильно изменить разрешение, необходимо *очень* сильно изменить коэффициент сферической абберации.

2) Компенсация aberrаций за счет комбинации линз

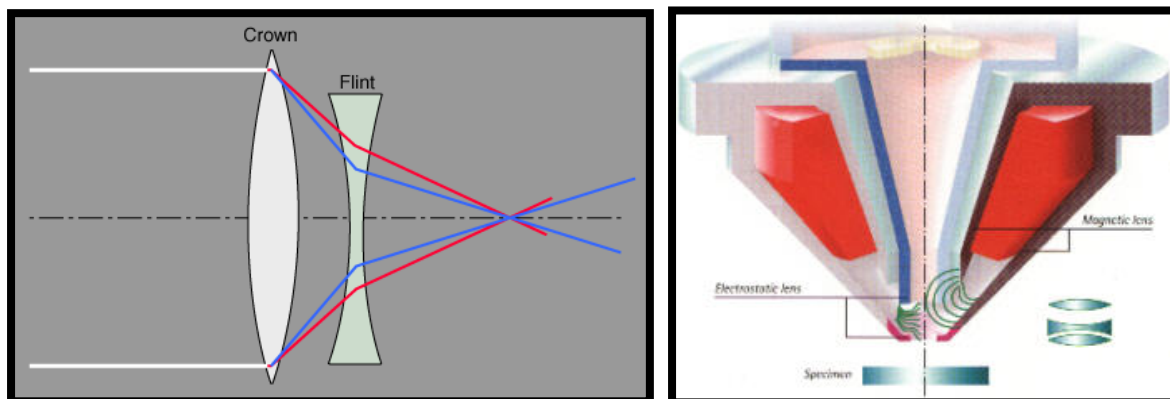


Рис. 6.11. Компенсация aberrаций для оптической системы (а), GEMINI линза для ЭМ системы (б).

В случае оптики (рис. 6.11а) используется пара линз – собирающая и рассеивающая, которые компенсируют хроматические aberrации друг друга. Аналог для электронов (рис.6.11б): собирающая магнитная и рассеивающая электростатическая линза дают уменьшение хроматической aberrации (рис. 6.12).

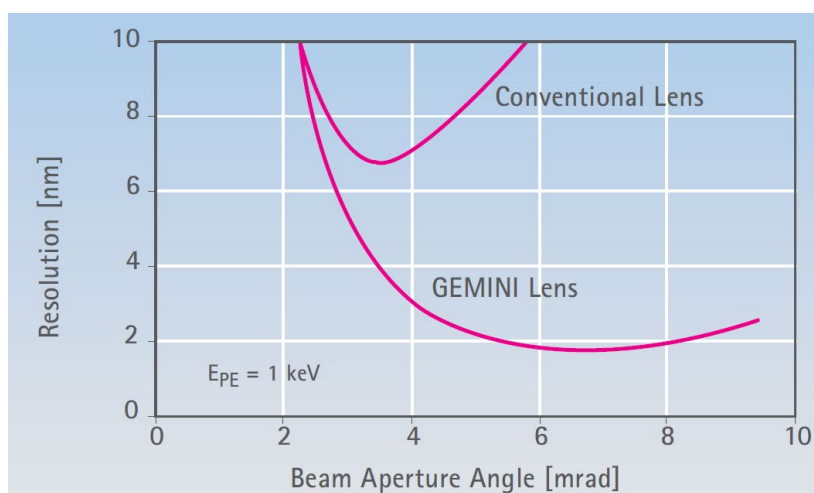


Рис. 6.12. Зависимость разрешения от апертуры для классических и GEMINI линз.

Взаимодействие быстрых электронов с атомами

- 1) *Отсутствие взаимодействия* – нерассеянные электроны.
- 2) *Упругое рассеяние* (без потери энергии), см. рис. 6.13 – информация о структуре. Масса системы достаточно большая, поэтому шанс того, что рассеяние произойдет без потери энергии достаточно высокий.
- 3) *Неупругое взаимодействие* – обмен энергией, образование вторичных электронов, рентгеновского излучения. Результат – ненужная химия,

разрушающая образец и ухудшение изображения вследствие повышения общего фона. Рассеянный электрон обладает другой энергией и длиной волны.

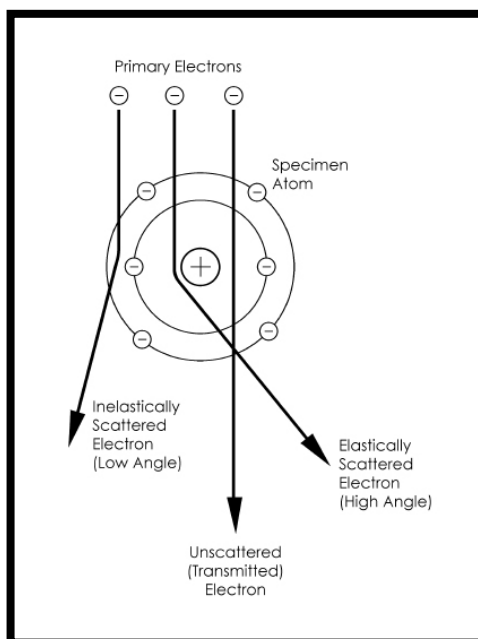


Рис. 6.13. Упругое рассеяние.

Особенности взаимодействия электронов с образцом

- (!) Сечение взаимодействия в 10^5 раз выше, чем для рентгеновских лучей, поэтому необходимо откачивать весь воздух.
- Для уменьшения повреждения образца и получения информации о его структуре используют тонкие срезы (от десятков до сотен нанометров).
- Криоэлектронная микроскопия позволяет существенно увеличить время облучения образца электронами, а также изучать макромолекулярные комплексы в их нативном состоянии.

Методы увеличения контраста в ПЭМ

За счет изменения конфигурации микроскопа:

1. *Контрастирование дефокусировкой* (аналог фазового контраста, но при дефокусировке падает разрешение).
2. *Фазовое контрастирование* за счет добавления фазовых пластинок на пути электронного пучка.

За счет изменения химического состава образца:

1. Негативный контраст.
2. Позитивный контраст.

Фазовое контрастирование

Пусть на стеклянной подложке внутри буфера расположена живая клетка. Т.к. внутри клетки есть области с различными показателями преломления, свет ней будет преломляться в результате возникновения дополнительного набега фазы. Если на клетку попадает плоская волна амплитудой E_0 , $E = E_0 e^{i\varphi(x,y)}$, то на выходе получим модулированный фазовым образом свет. Посмотрим изображение на матрице и увидим абсолютно равномерный фон, поскольку элементы матрицы измеряют интенсивность света $I \sim |E|^2 = |E_0 e^{i\varphi(x,y)}|^2 = |E_0|^2$. По сути, клетка является *фазовым объектом*, а мы регистрируем интенсивности.

Нобелевская премия по физике 1953 г., Ф. Цернике, «Метод фазового контраста» – способ превращения фазового контраста в *амплитудный*.

Свет при этом раскладывается на 2 компоненты: основную не рассеянную и рассеянную. Рассеянная при этом начинает распространяться под определенными углами. Т.е. если в разных местах объекта разная оптическая толщина, то свет начнёт отклоняться в разных направлениях, с точки зрения физики это можно назвать *дифракцией*.

На рис. 3.3 из прошлых лекций есть фокальная плоскость линзы, в которой генерируется Фурье образ первоначального поля, вторая линза делает второе Фурье-преобразование и формирует увеличенное изображение объекта. Как сделать так, чтобы в области увеличенного изображения был контраст?

Будем считать, что фазы $i\varphi(x,y)$ в $E = E_0 e^{i\varphi(x,y)}$ малы, т.е. изменение фаз от точки к точке в горизонтально плоскости очень небольшое – слабо рассеивающий объект. Тогда разложим в ряд:

$$E = E_0 e^{i\varphi(x,y)} \approx E = E_0 (1 + i\varphi(x,y) + \dots). \quad (6.13)$$

Для комплексной амплитуды в комплексной плоскости Аргана:

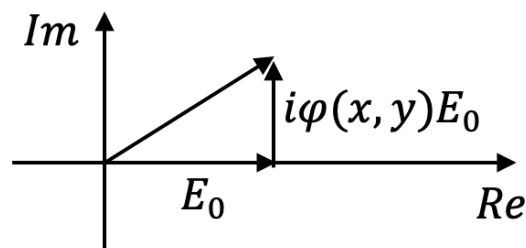


Рис. 6.14. Комплексная амплитуда электромагнитной волны.

Т.е. мы можем представить фронт в виде суммы начального, который остался неизменным, и комплексной добавки, описывающей рассеянный свет. Таким образом, чтобы получить амплитудную модуляцию, нужно повернуть вектор добавки. Тогда амплитуда будет зависеть от фазы $\varphi(x,y)$.

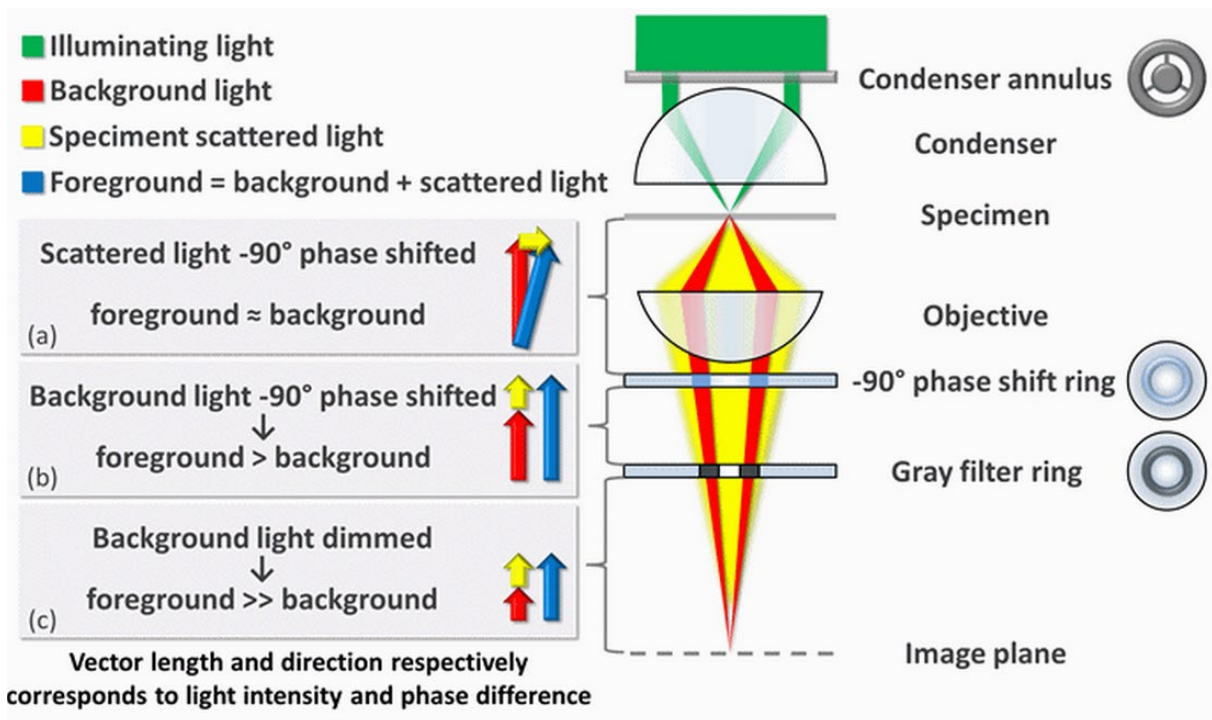


Рис. 6.15. Фазовое контрастирование.

Зеленым на рис. 6.15 показан проходящий свет, который освещает образец. Он падает на линзу под определёнными углами. Из рассеяния получаем желтую компоненту, основной свет E_0 отмечен красным. Когда свет находится в нефокусированном состоянии – есть желтый и красный пучки, на пути света ставится специальная фазовая пластинка $\lambda/4$. В данном случае рассеянный вектор становится синфазным с проходящим красным. Также для уменьшения фона на пути проходящего света ставится фильтрующее кольцо для уменьшения амплитуда E_0 . Далее свет фокусируется на плоскость, на которой получается изображение (рис.6.16).

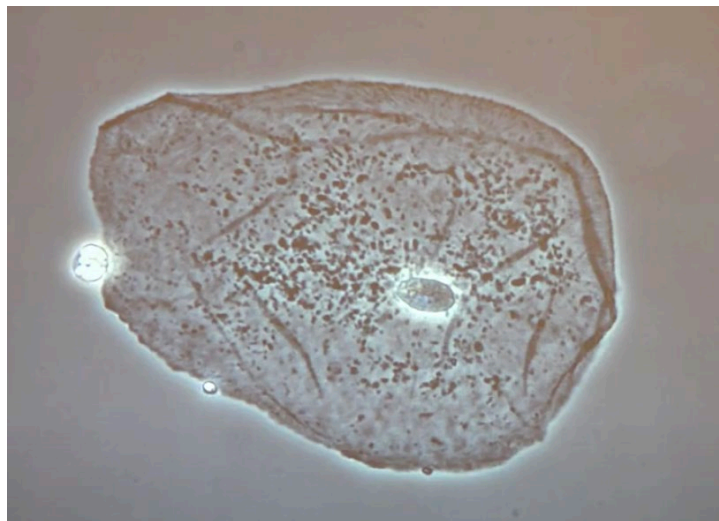


Рис. 6.16. Полученное изображение клетки.

Фазовое контрастирование в ЭМ

Аналогичный способ существует для электронной микроскопии – использование фазовой углеродной пластинки (см. рис. 6.17). Из углерода делается специальное тонкое колечко с отверстием порядка 1 микрона:

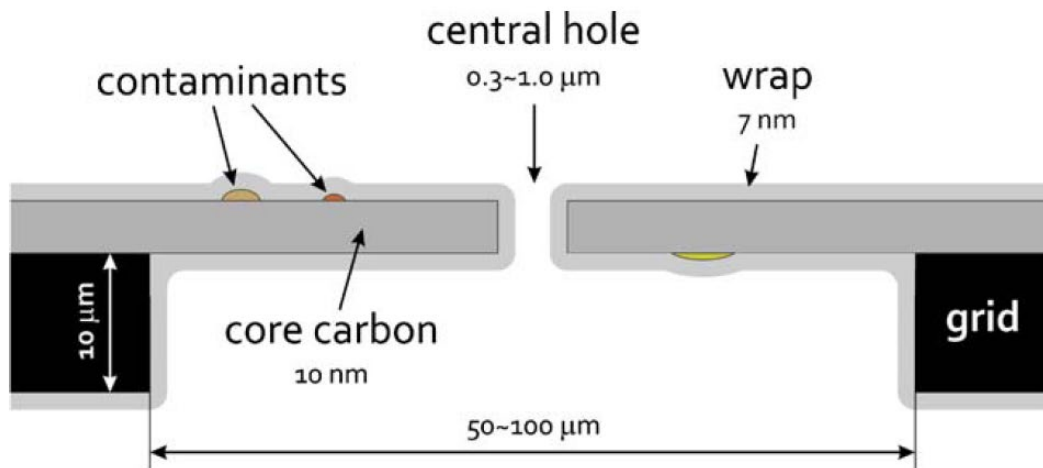


Рис. 6.17. Фазовая углеродная пластинка $\lambda/4$.

Полученные с помощью фазового контрастирования изображения ЭМ:

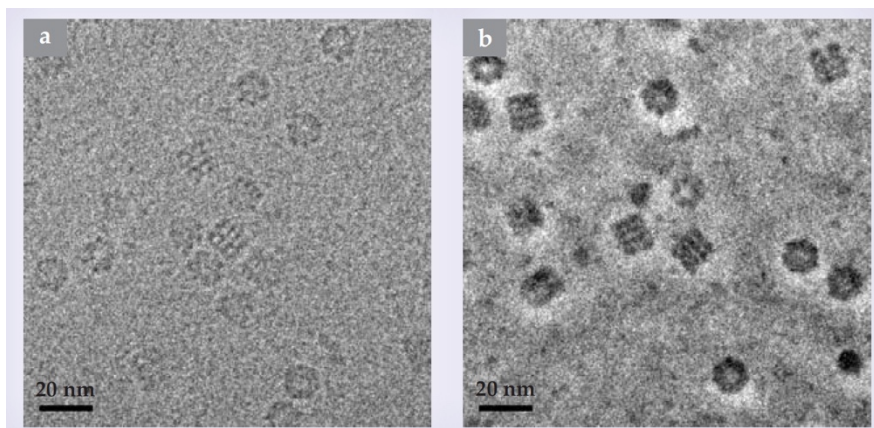


Рис. 6.18. (а) Дефокусировка (падение разрешения); (б) углеродная пластинка $\lambda/4$.

Анализ отдельных изображений

Как из рис. 6.18 получить структур с атомарным разрешением? Таких проекций очень много, на рис. 6.18 показан лишь маленький фрагмент отснятого. Таких молекул под разными углами может быть миллионы, и каждая картинка зашумлена. Их можно особым образом объединять для того, чтобы убрать шум. Возникает вопрос, какие картинки можно складывать? В настоящее время такие вопросы решаются алгоритмически с помощью специальных программ, анализирующих огромный массив данных, выделяя похожие изображения. Далее эти изображения усредняются по ансамблю:

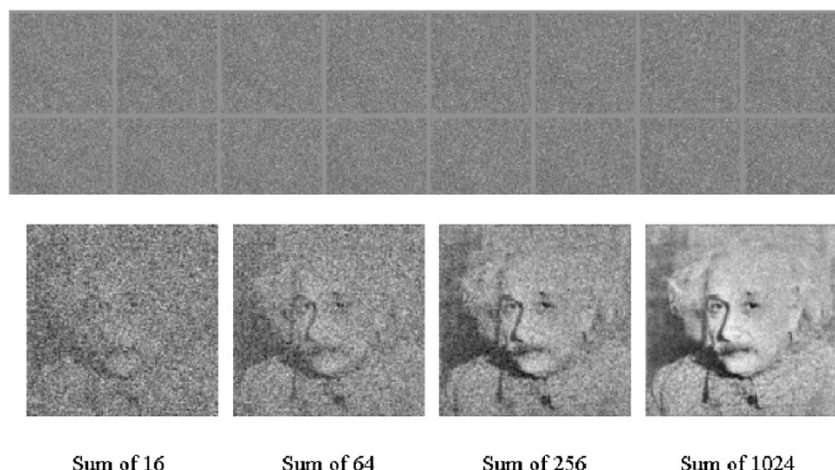


Рис. 6.19. Усреднение по ансамблю.

Single molecule Electron Microscopy

Чтобы разобраться в том как устроен объект на атомарном уровне, получаем чистый раствор с большим количеством идентичных объектов (как в рентгеноструктурном анализе). Современные алгоритмы способны классифицировать отдельные вещества, поэтому при исследовании белка дополнительно изучается структура примесей, которые в небольшом количестве остались в процессе выделения. Большая часть белков, определенных с помощью электронной микроскопии – это примесные белки.

Чтобы исследовать конкретный белок, его раствор наносится на специальную пластинку и быстро замораживается для того, чтобы вода не успела кристаллизоваться. Толщина слоя такова, что с большой вероятностью макромолекулы располагаются на поверхности в один слой. Все молекулы при этом случайно ориентированы. С помощью электронной микроскопии получается следующее изображение:

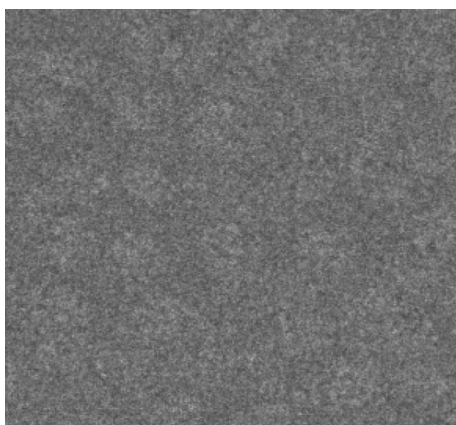


Рис. 6.20. Пример получаемого с помощью ЭМ изображения.

Так выглядят сырые данные, которые идут на вход современным программам. Важно показать, как это устроено. Раствор идентичных белков наносится на

специальную сетку (см рис. 6.21а), далее она помещается в жидкий этан – вода быстро замерзает. Таким образом, получается структура, где в отверстиях сетки находится замороженный слой воды с вкраплениями белков. Пример получаемого изображения на рис. 6.21б.

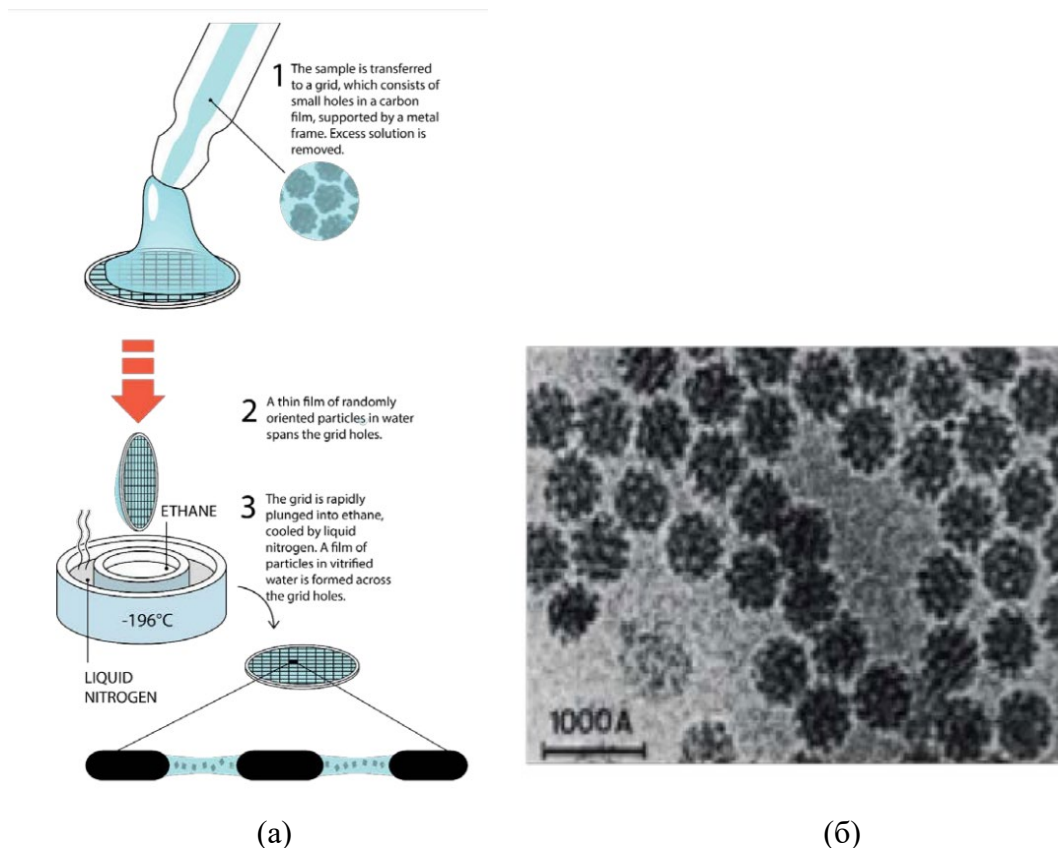


Рис. 6.21. (а) Процесс формирования образца для ЭМ; (б) пример полученного для такого образца изображения.

Можно оценить количество молекул в образце:

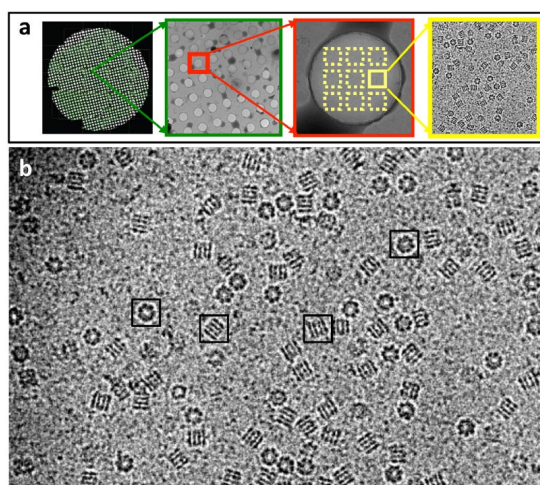


Рис. 6.22. Поэтапное увеличение сетки.

Лекция 7. Просвечивающая электронная микроскопия. Часть 2.

Контрастирование дефокусировкой – аналог фазового контраста, но при дефокусировке падает разрешение. Качественно идея похожа на фазовое контрастирование. Можно рассмотреть, как от точечного источника расходятся волны под разными направлениями, и что будет с фазами этих волн, если мы рассмотрим не фокальную плоскость, а плоскость на некотором расстоянии от нее. Волны, идущие под разными углами, в этой области имеют разную фазу. Поэтому, если перевернем картинку и будем считать, что сам объект находится с другой стороны линзы, и рассеянные волны выходят под большим углом, далее начинают собираться, и в исходной точке получаем изображение. Это означает, что в выбранной плоскости фактически есть задержка между волнами, которые идет под разными направлениями. Зависимость фазового набега от угла, под которым идет волна, согласно геометрии – параболическая. Поэтому чем больше угол, тем больше дополнительный набег фаз. Получается, что волны, идущие под разными углами, собираются в исходной области с разными фазами, и можно получить амплитудный контраст из фазового.

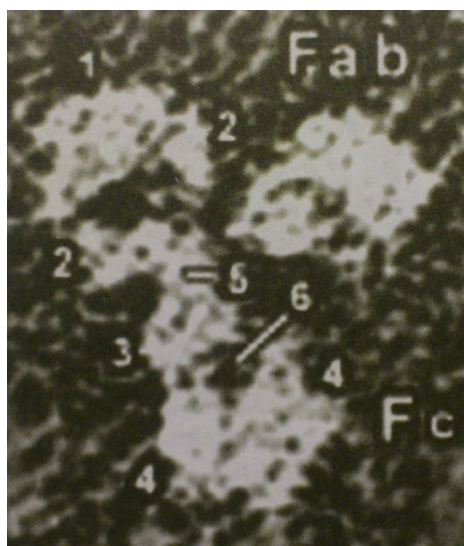
Идеальный вариант – поставить фазовую пластинку и, например, повернуть весь рассеянный свет на 90 градусов (рис. 6.15). В случае дефокусировки это делается нестрого, в зависимости от угла добавляем дополнительный набег фазы, поэтому возникает *контрастирование*. Оно хуже, чем идеальный фазовый контраст, а также падает разрешение. Дефокусировка позволяет получать изображение шаперонов в контрасте как на рис. 6.18а. Видно, насколько более контрастное изображение в случае использования фазовой пластинки (см рис. 6.18б). Минус фазового контраста заключается в возникновении белого «гало» вокруг объектив.

Эти методы используются в основном тогда, когда с контрастом большие проблемы из-за того, что параметры рассеяния образца не сильно отличаются для макромолекулы и воды в которой она находится.

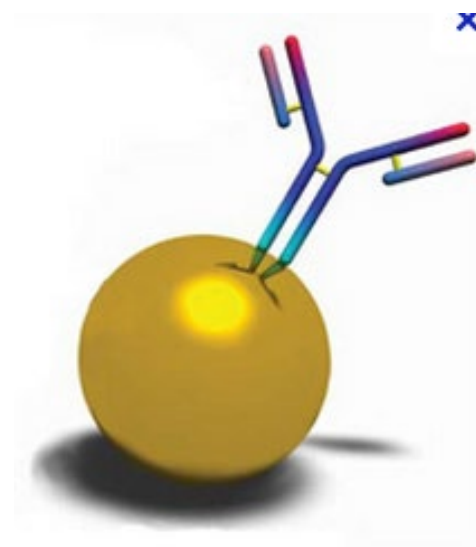
Классические методы увеличения контраста

Негативное контрастирование: добавление солей тяжелых металлов (например уранилацетата). Объект начинает быть четко виден (рис. 7.1) на фоне чёрного (раствора тяжелого металла). Хорошо виден контур объекта, но про его структуру сказать ничего нельзя. Такие подходы чаще всего не называют структурной биологией.

Возможно специфическое контрастирование определенных объектов за счет добавления комплексов антител с наночастицами золота. Наночастицы будут давать сильный сигнал, рассеяние электронов, антитело используется для того, чтобы *связалось* в необходимом месте. В живую клетку антитела не проходят. Разрешение при этом будет порядка размера интересующего объекта. Если нас интересует конкретный участок клетки, это называется *идентичностью*.



(a)



(б)

Рис. 7.1. Пример полученного изображения, белковое антитело (а); идея получения контрастирования за счет конъюгата антител с наночастицами золота для крупных молекул.

Если совместить негативное контрастирование с флуоресцентной микроскопией, мы будем знать, какой конкретный контур отвечает конкретным органеллам или белкам – из-за использования антител.

Основные методы восстановления 3D структуры с помощью ЭМ

- 1) Анализ дифракции на двумерном кристалле – работаем в дифракционном режиме и изучаем рефлексы (картину рассеяния) от двумерного кристалла. Двумерный, т.к. из-за взаимодействия электронов необходимы очень тонкие объекты.
- 2) Анализ проекций одиночных макромолекул (Single molecule Electron Microscopy) – восстановление трехмерной структуры из огромного количества зашумленных снимков.
- 3) Анализ дифракции на трехмерных микрокристаллах.
- 4) (Крио)электронная томография.

Пункты 2 и 3 являются революционными!

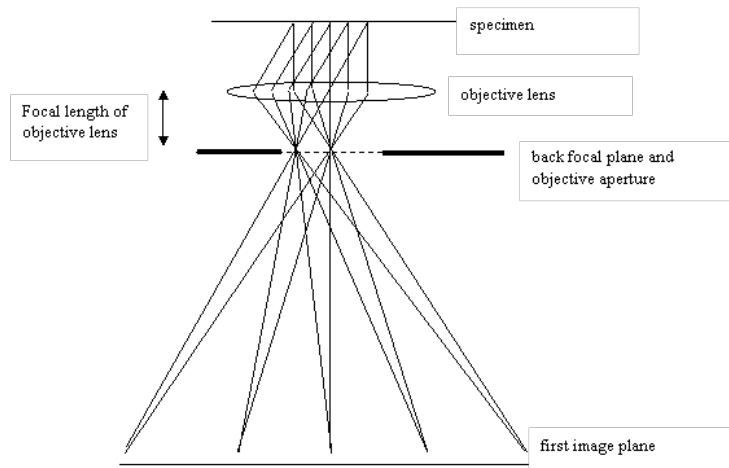


Рис.7.2. Фокусирование с помощью линзы.

Сортировка по ориентациям и построение 3d-модели

Есть трёхмерный объект, в разных местах случайным образом по-разному повернутый. Проекция его получены благодаря сложению множества идентичных картинок, и по ним необходимо восстановить трехмерную структуру.

В случае электрона, для описания волновых эффектов используется волновая функция. Пусть электронная волна ψ_0 падает на объект. Тогда результат на выходе:

$$\psi = \psi_0 e^{i\alpha(x,y)}. \quad (7.1)$$

Набег фаз $\alpha(x,y)$ в случае оптики определяется оптической длиной пути и неоднородностями по ходу распространения. В случае элетронной микроскопии:

$$\alpha(x,y) = A \int_0^h \varphi(x,y,z) dz, \quad (7.2)$$

где h – толщина водного слоя, ось z направлена перпендикулярно поверхности воды, $\varphi(x,y,z)$ – электростатический потенциал. Получим трехмерный образ для потенциала:

$$P(u,v,\omega) = \iiint \varphi(x,y,z) e^{i(ux+vy+\omega z)} dx dy dz, \quad (7.3)$$

$$P(u,v,0) = \iiint_{xy0}^h \varphi(x,y,z) e^{i(ux+vy)} dx dy dz. \quad (7.4)$$

Тогда сечение трехмерного Фуцрье-образа потенциала есть ничто иное, как образ:

$$P(u,v,0) = \iint_{xy} \alpha(x,y) e^{i(ux+vy)} dx dy. \quad (7.5)$$

Если мы используем фазовый контраст, то те интенсивности, что были измерены в эксперименте – это величины, которые связаны с $\alpha(x,y)$, т.к. мы превратили фазовую

модуляцию в амплитудную. Если мы берем Фурье образ от картинки на рис. 7.3, получаем сечение трехмерного образа потенциала определенной плоскостью. То есть имеем некоторый белок с фазовым потенциалом $\varphi(x, y, z)$ и сечение Фурье-образ этой величины $P(u, v, \omega)$ под неизвестным углом. Будем пытаться восстановить $P(u, v, \omega)$. Пространства (x, y, z) и (u, v, ω) связаны. Тогда если возьмем другую частицу, повернутую на некоторый угол. Она имеет уже другое сечение Фурье образа. В месте, где сечения пересекаются, возникают *общие линии* на разных проекциях:

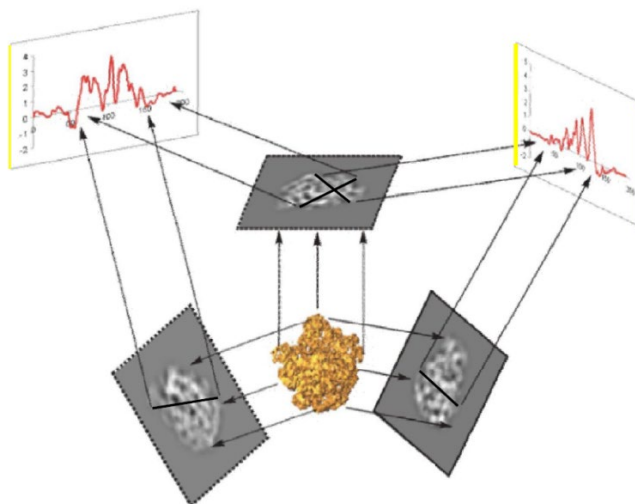


Рис. 7.3. Создание 3D модели с помощью нескольких проекций Фурье-преобразования.

Имея большое количество проекций (хотя бы три, чтобы в пространстве все было взаимно однозначно), можно с помощью компьютера определить, как они расположены в пространстве относительно друг друга. В итоге получается трехмерная картина, делаем от нее Фурье-преобразование и получаем искомую структуру (прим. рис. 7.4).

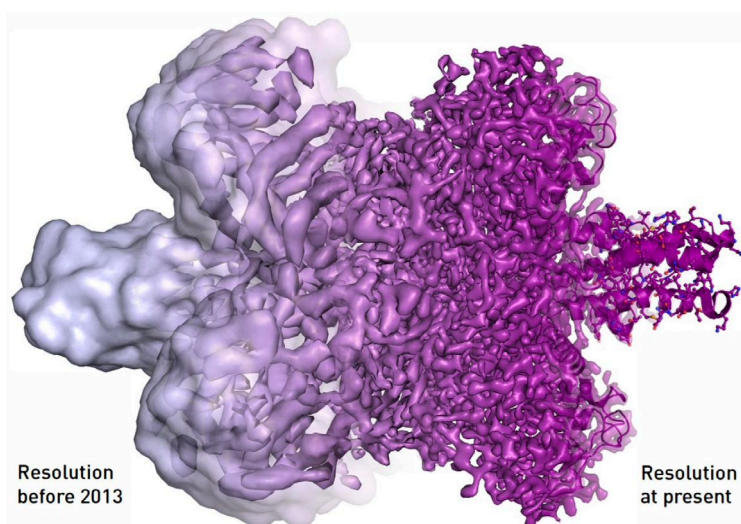


Рис. 7.4. Эволюция разрешения электронной микроскопии за последние годы (2013-2017).

Если белок может жить в нескольких конформациях, и они четко выражены, на основе анализа данных их можно наблюдать. Если мы понимаем, что объект может находиться в самых разных конформациях, например, из-за тепловых флуктуаций, то мы должны четко сформулировать, что мы понимаем под *структурой* белка.

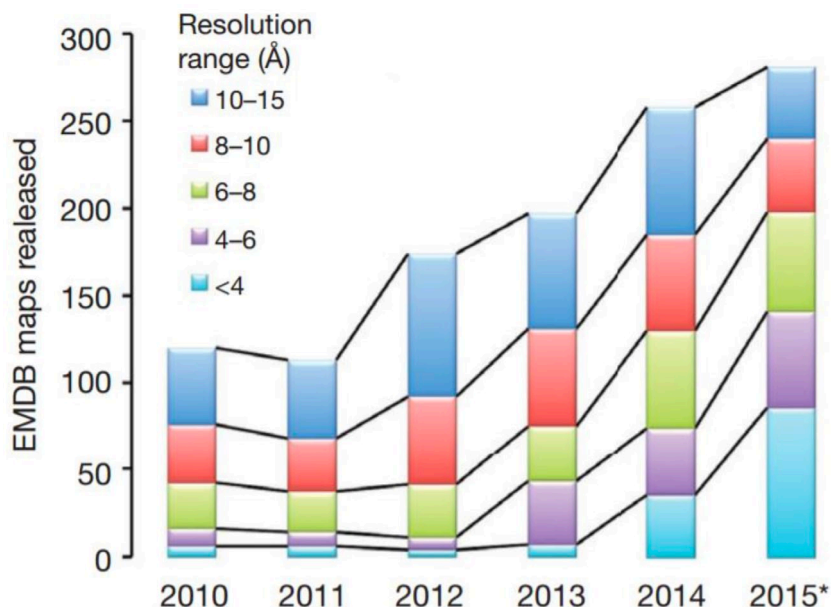


Рис. 7.5 Динамика изменения количества структур с различным разрешением.

Использование электронного микроскопа намного более практично, чем синхротрона, поэтому в настоящее время оно постепенно вытесняет рентгеноструктурный анализ.

Microcrystal electron diffraction (MicroED)

Как объединить преимущества дифракционного режима с преимуществом анализа проекции одиночных молекул?

Получить структуру низкомолекулярного вещества (в виде порошка, обычно скоплений вещества в кристаллической форме) невозможно с помощью рентгеноструктурного анализа, т.к. кристаллы слишком маленькие (около микрона). Тогда порошок растирается между двумя стеклами до размеров в среднем меньше микрона. Получившиеся кристаллы наносятся на подложку, в которой их можно изучать с помощью электронного микроскопа и анализировать в дифракционном режиме. Анализируется не прямое увеличенное электронно-оптическое изображение, картина рассеяния!

Подложка в электронном микроскопе может вращаться, таким образом можно смотреть, как меняется картина рассеяния в зависимости от угла наклона кристалла. В

некотором смысле, это аналог рентгеноструктурного анализа, поэтому можно использовать предназначенное для него ПО. Таким образом, возможно довольно быстро (около 15 минут) получить структуру исследуемого белка с разрешением меньше 1 А. Это революция в первую очередь в структурной химии.

(Крио)электронная томография

С помощью электронной томографии анализируются крупные макромолекулы или маленькие клетки (бактерии, бактериальные клетки, археи и т.д.). Размер исследуемых элементов 100нм-1 мкм.

В систему не вводится никаких дополнительных соединений, объект быстро замораживается, его можно наклонять. Вращение образца с шагом в 1-2 градуса на углы до 70 градусов позволяет получать массив проекций, необходимый для восстановления трехмерной структуры (рис. 7.6). Ограничение по максимальному углу поворота связано с тем, что эффективная толщина по мере наклона увеличивается, при том что объект и так достаточно толстый. В настоящее время разрешение томографии составляет около 5 нм.

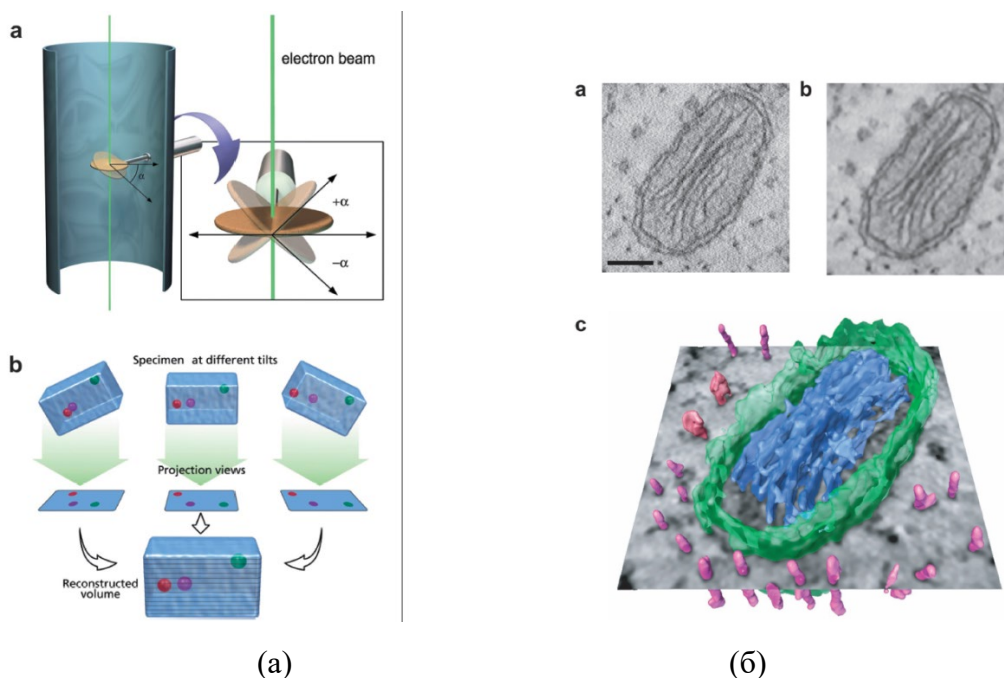


Рис. 7.6 (а) Схема электронной томографии; (б) Пример трехмерной реконструкции. Цветами обозначены различные органеллы.

Классическая электронная микроскопия тканей

Необходимо получить тонкие срезы изучаемых тканей, ввести в них контрастирующий агент (некоторые соединения тяжелых металлов), чтобы четко видеть структуру. Для того, чтобы нарезать образец, он должен быть негетерогенным,

иначе он может начать ломаться и деформироваться. Для получения тонких срезов используются специальные смолы.

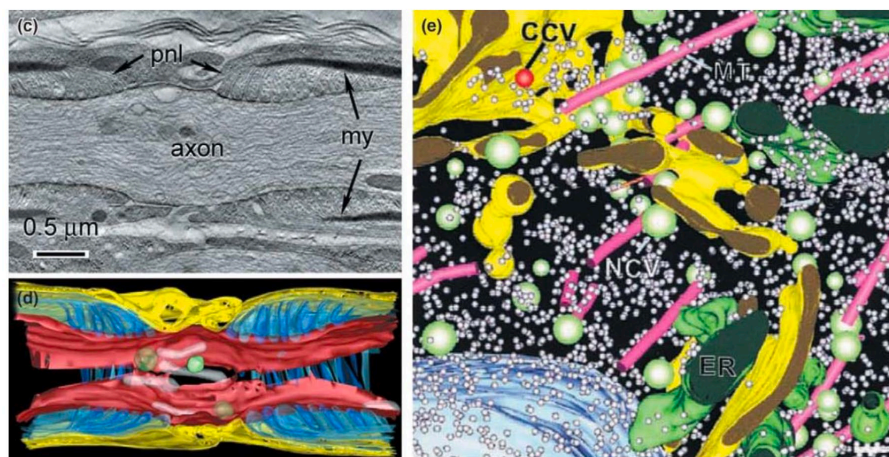


Рис. 7.7. Срезы различных тканей. Перехват Ранвье и внутренние органеллы клетки.

Изображения в классической ЭМ снимаются при нормальной температуре, но высоком вакууме. Имея большое количество изображений для отдельных срезов, биологи анализируют строение ткани.

Особенно много данных сегодня анализируется по контактам между нейронами (дендритные шипики, выросты), см .рис. 7.8. Они могут быть разной формы, в зависимости от нее эффективность динамического контакта меняется. Большая часть информации получается с помощью классической электронной микроскопии анализа среза.

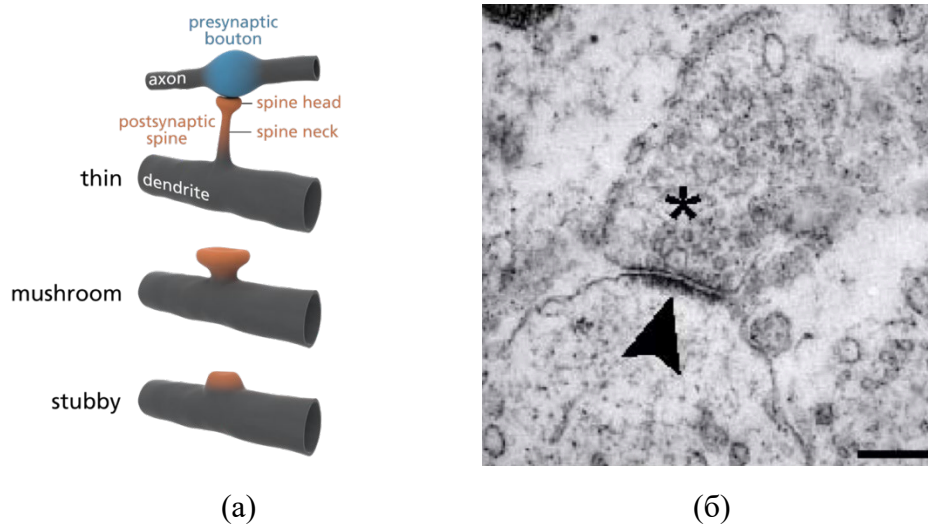


Рис. 7.8. Виды дендритных шипиков; Постсинаптическая плотность, синапс, в котором возникает контакт.

Сравнение кристаллографии и крио-электронной микроскопии

Сравним методы изучения структур макромолекул двумя разными способами:

	Рентгеновская кристаллография на одиночных кристаллах	Крио-электронная микроскопия на молекулах
• Число молекул в образце	$\sim 10^{15}$	$\sim 10^4$
• Эффективность рассеяния	очень низкая	<i>очень высокая</i>
• Падающий поток	очень высокий	<i>очень высокий</i>
• Реальное изображение	отсутствует	<i>двумерное</i>
• Радиационная опасность	<i>присутствует</i>	ярко выражена
• Контраст	<i>средний - высокий</i>	очень низкий

Сканирующий электронный микроскоп

Гибридный метод. Идея сканирующего режима – изучение потока вторичных процессов на поверхности образца. На поверхность попадает сфокусированный пучок электронов, которым необходимо куда-то стечь. Поэтому обычно на биологический образцы напыляется тонкий слой металла. Таким образом, говорить о структуре не приходится, мы можем наблюдать лишь топологию поверхности и ее форму.

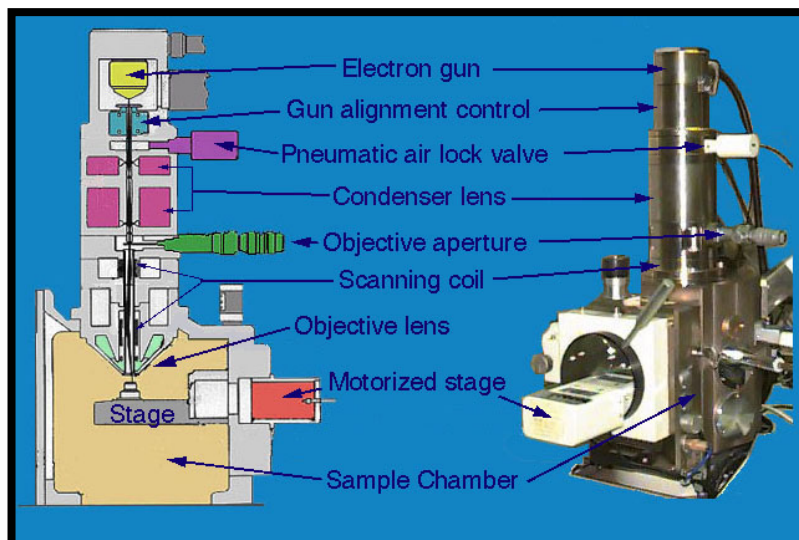


Рис. 7.9. Устройство сканирующего электронного микроскопа.

На выходе электронного микроскопа (рис. 7.9) получается сфокусированный слабо расходящийся пучок. Степень увеличения можно легко и быстро изменить, т.к. используются электромагнитные линзы.

Типы сигналов

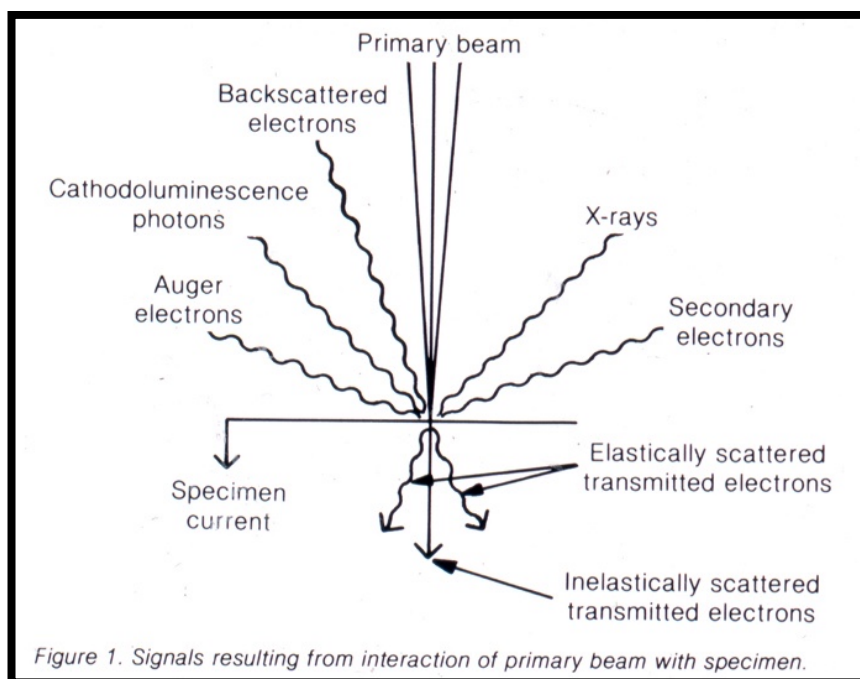


Рис. 7.10. Вторичные процессы в сканирующем электронном микроскопе.

- 1) Вторичные электроны, которые получаются при взаимодействии первичного пучка с электронами атомов в самом образце.

- 2) Характеристическое рентгеновское излучение. Если выбиваем электрон из внутренней части атома, то вскоре электрон из внешней оболочки перейдет на нижний уровень, при этом испустится соответствующий квант энергии.
- 3) Обрато рассеянные электроны – отраженный первичный пучок.
- 4) Катодолюминесцентные фотоны.
- 5) Auger электроны. Когда на место выбитого вторичного электрона приходит электрон с внешних оболочек, либо излучается квант э/м излучения, либо энергия передается другому электрону, который вылетит из атома – электрону Auger (рис 7.11). Они имеют характеристическую начальную кинетическую энергию, т.к. есть дискретность в атомарных уровнях энергии.

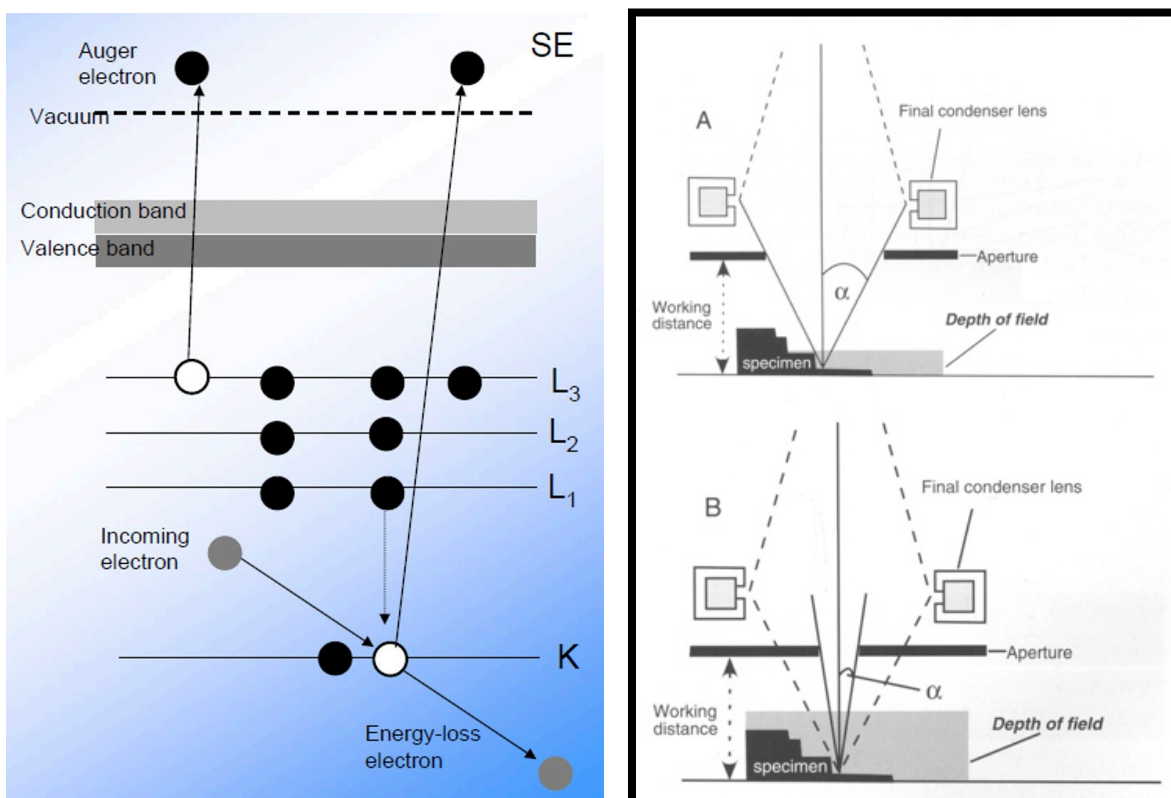


Рис. 7.11. Образование Auger электронов.

Глубина резкости обеспечивается использованием очень узконаправленного пучка, благодаря специальной апертуре (рис. 7.11). Уменьшение апертуры может увеличить глубину фокусировки (резкости).

Контрасты в изображениях СЭМ

Если на пути у вторичных электронов есть возвышенность (рис. 7.12а), они не попадают в детектор – это классический способ.

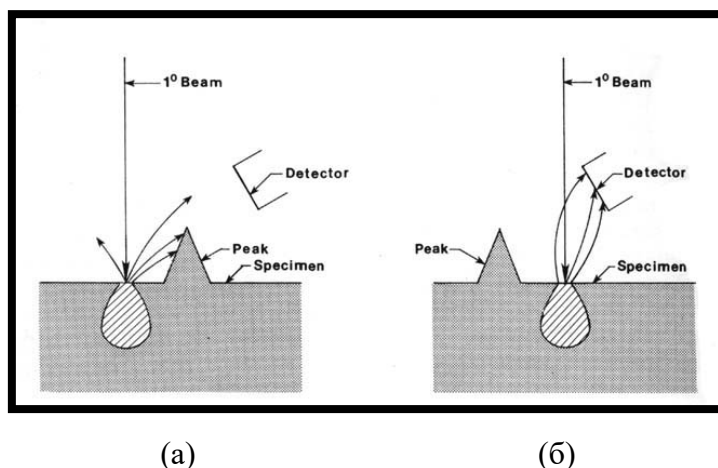


Рис. 7.12. Образование теней на изображении СЭМ.

Если светим непосредственно на склон: из разных частей области, порождающей сигнал, выходят разные сигналы, хотя есть некоторое распределение. Например, вторичные электроны выбиваются из всей толщи образца, поэтому если мы находимся рядом со склоном поднятия, сигнал вторичного рассеяния очень сильный (рис. 7.13). Вторичные электроны хорошо взаимодействуют с атомами, поэтому те, что порождаются глубоко внутри, выходят наружу не в полном составе.

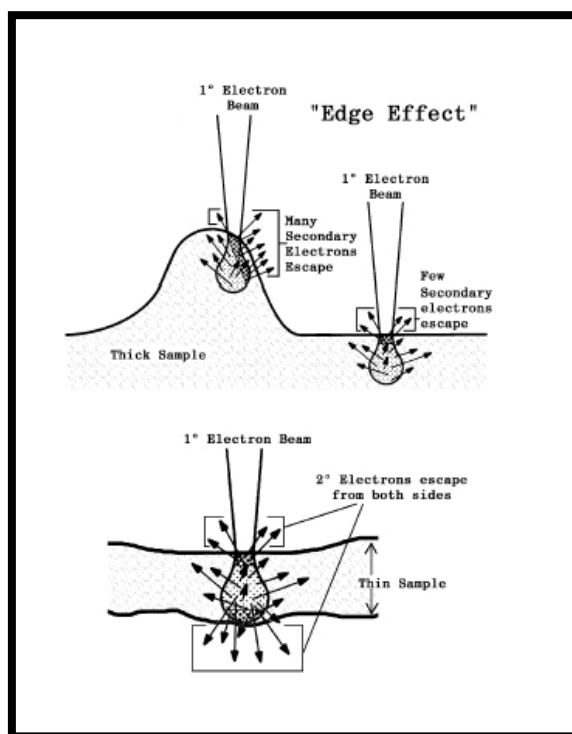


Рис. 7.13. Освещение поднятия в СЭМ.

То, как выглядит изображение, зависит также от того, где находится детектор. То, сколько он улавливает вторичных электронов зависит от положения поверхности относительно него (см. рис. 7.14).

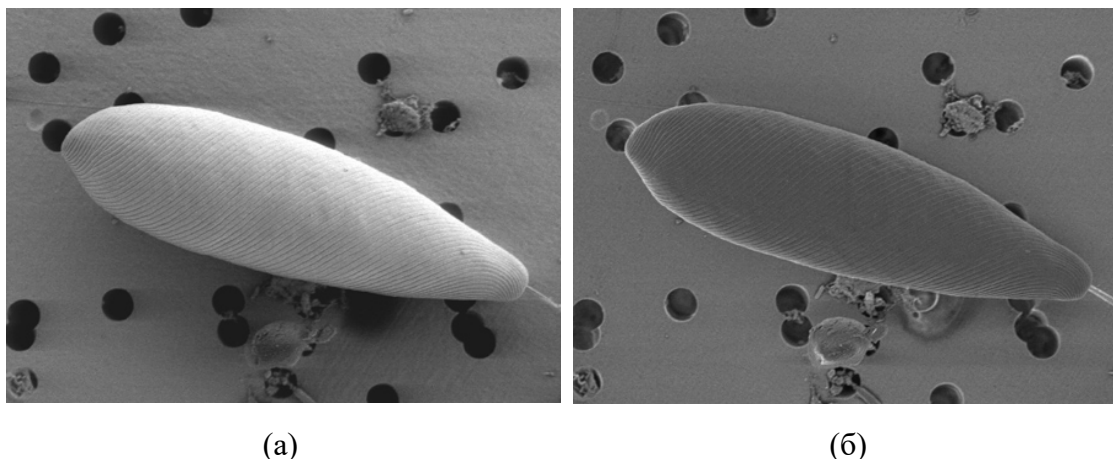


Рис. 7.14. Положение детектора: (а) осевое; (б) боковое.

Излучающая область

Размер порождающей сигнал области зависит от энергии электронов и от атомного номера образца. Соответственно, глубина проникновения будет тем больше, чем легче образец (рис. 7.15).

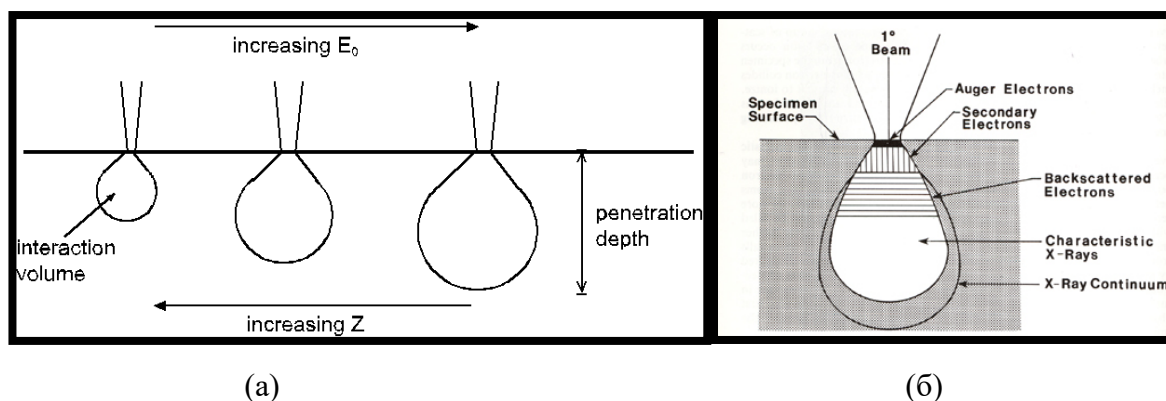


Рис. 7.15. (а) Размер излучающей области; (б) Области излучения вторичных сигналов.

Метод Монте-Карло

Некоторые процесс всегда реализуется с определенной долей вероятности. Делается большое количество симуляций и получается усредненное итоговое изображение.

Моделирование методом Монте-Карло включает следующие параметры:

- энергия светового пучка,
- сечение взаимодействий,
- длина свободного пробега,
- случайный фактор.

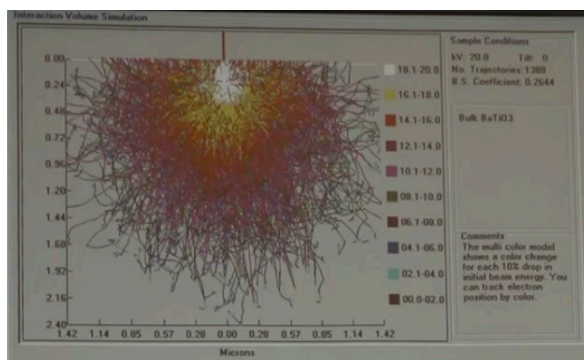


Рис. 7.16. Метод Монте-Карло. Траектории отдельных электронов.

Классификация подходов в СЭМ

Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM)

Позволяет получать изображение образцов при давлениях, близких к атмосферным.

PLA: pressure limiting aperture: делаем области с «градиентом» давления (рис. 7.17). В области с самым низким происходит ускорение электронов, далее промежуточная камера и последняя, в которой давление значительно выше (близко к атмосферному). Из каждой области постоянно откачивается воздух с помощью насосов. Образец нужно помещать близко к месту соединения камер, чтобы электронный пучок не слишком сильно рассеялся на атомах газа. На рис. 7.17б наличие области *skirt* как раз связано с этим рассеянием.

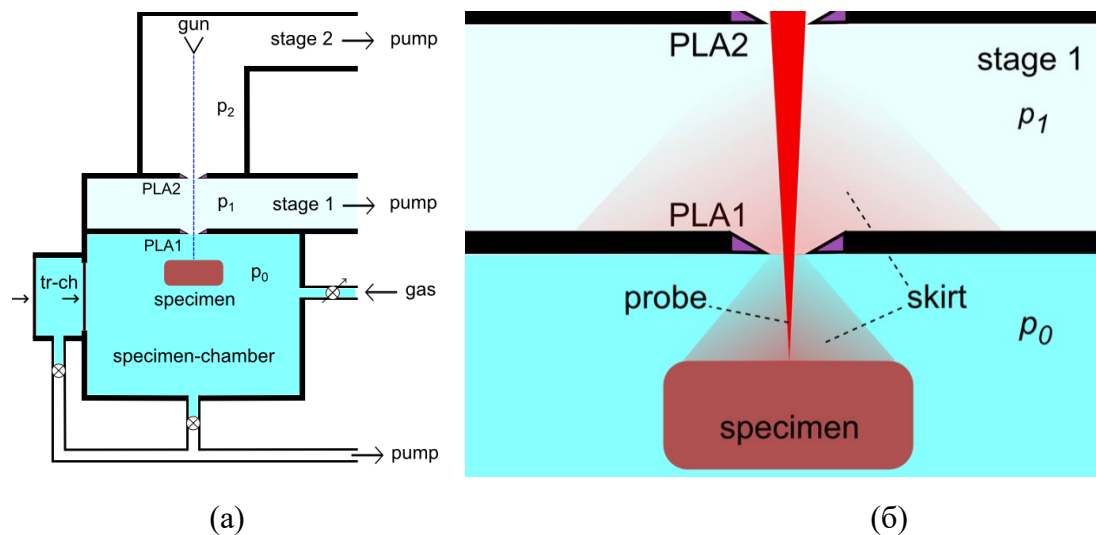


Рис. 7.17. (а) pressure limiting aperture; (б) размещение образца.

Регистрация вторичных электронов

Регистрация происходит с помощью детекторов, которые находятся между промежуточной и последней зоной и детектируют каскад событий, порождаемых

вторичными электронами после того, как они начинают взаимодействовать с воздухом. Как и в целом в СЭМ, можем менять область, на которой фокусируемся за счет движения образца в x, y области. При этом возможно получать изображение *живых клеток*.

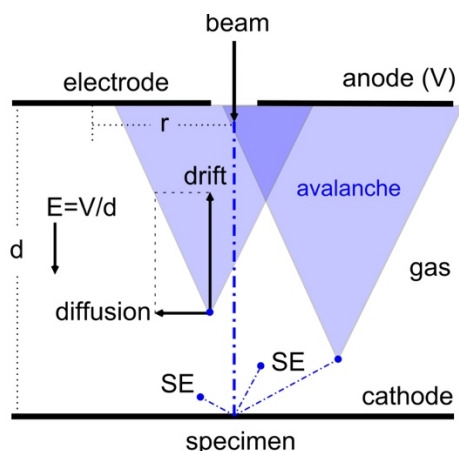


Рис. 7.18.

CLEM: Correlated light and electron microscopy

Возможно получать картинки, объединяя флуоресцентное изображение, которое даёт специфичность, и изображения электронного микроскопа, который дает высокое разрешение.

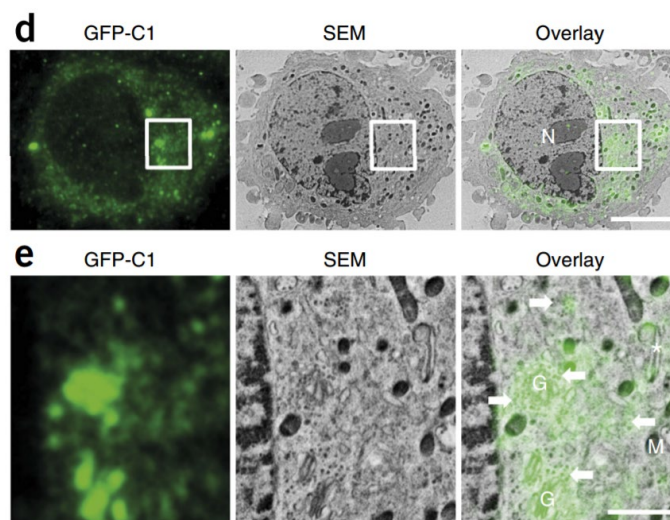


Рис. 7.19. CLEM: Correlated light and electron microscopy.

Focused ion beam scanning electron microscopy (FIB-SEM)

Способ изучения поверхности образца, в ходе которого поверхность контролируемым образом разрушается. На рис. 7.20 Focused Ion Beam (FIB) – фокусируемый пучок ионов направляется на образец (как правило, толстый

зафиксированный высушенный биологический), постепенно снимая часть поверхности. Сканирование поверхности проводится с помощью классического сканирующего ионного микроскопа (SEM).

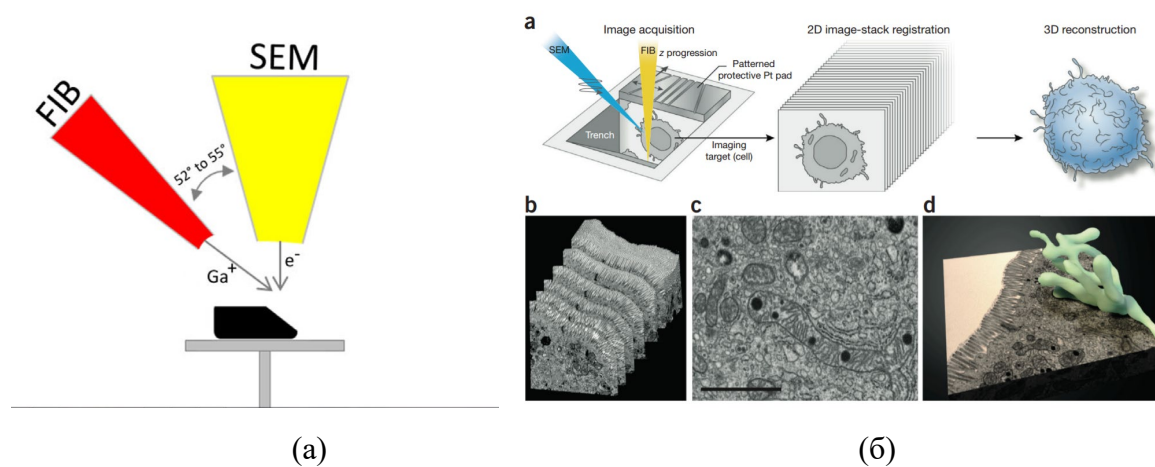


Рис. 7.20. (а) схема метода FIB-SEM; (б) полученная с помощью подхода структура клеток.

Лекция 8. Масс-спектрометрия.

Масс-спектрометрия связана с получением *масс-спектра*. Не путать с масс-спектроскопией!

Принцип работы масс-спека

Мы должны ионизировать образец для того, чтобы легко управлять получившимися ионами. Далее, в зависимости от конфигурации поля, можем детектировать ионы с различным соотношением масса/заряд, т.к. движение частиц в э/м полях определяется этим соотношением. Область масс-анализатора и детектора должна находиться в высоком вакууме для того, чтобы движение ионов не менялось в зависимости от наличия молекул газов. Тем не менее, иногда специальные газы используются, например, для разрушения ионов. Система детектирования и обработки необязательно находится под высоким вакуумом, но следует помнить, что она довольно часто требует специфических физических условий.

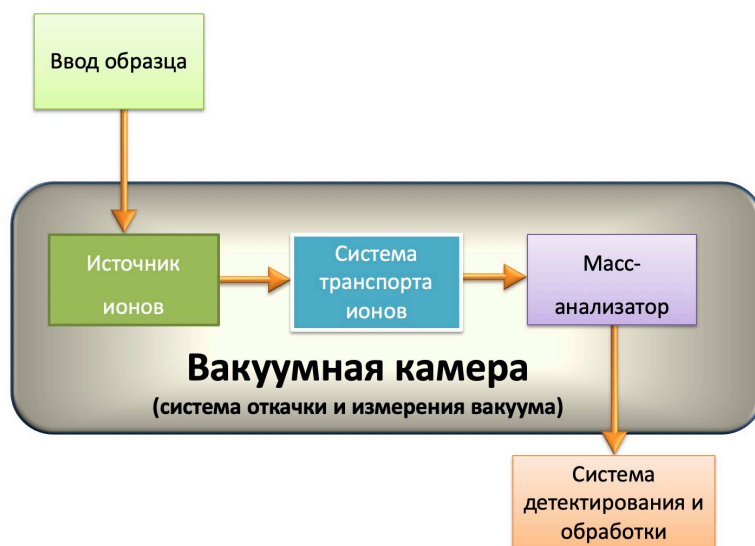
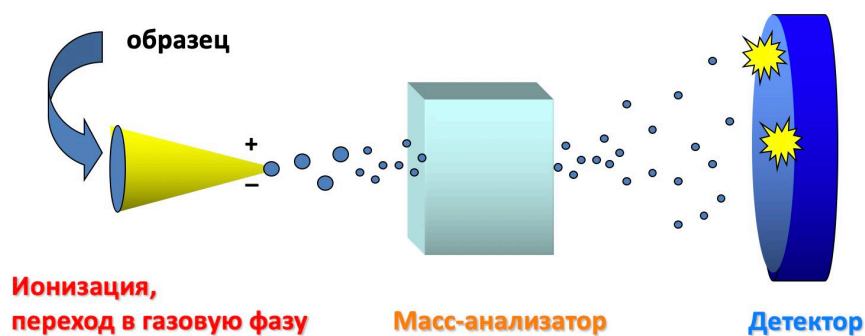


Рис. 8.1. Принцип работы масс-спека. Блок схема масс-спека.

Неумирающая классика – *магнитный секторный масс-спектрометр* (масс-спектрометр Астоновского типа) с ионным источником на основе электронного удара,

рис. 8.2. Есть некоторый газ, необходимо узнать массы объектов. Эти частицы необходимо ионизировать. Если газ находится при низкой температуре, то ионов в нем будет достаточно много (если это изначально нейтральный газ, а не плазма). Раньше для этого использовалась ионизация за счет электронного удара – в результате термоэлектронной эмиссии возникает перпендикулярный поток электронов, вещество взаимодействует с ними (в частности, ионизируется). Ионизированную молекулу можно ускорять в э/м полях, задавая круговое движение. На участке траектории ионов возникает сектор окружности, и, в зависимости от того, как расположен детектор, мы либо ловим частицы, либо нет. Это зависит от соотношения заряда к массе и скорости, заданной за счет разности потенциалов.

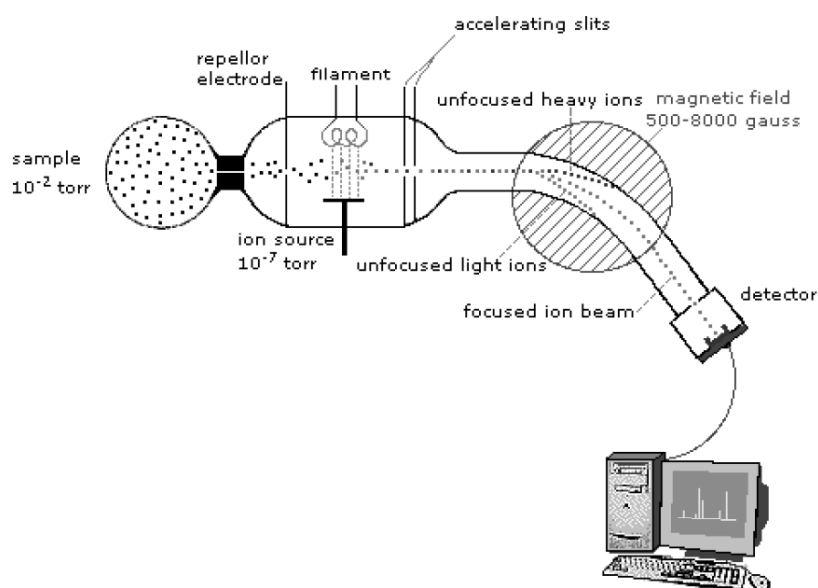


Рис. 8.2. масс-спектрометр Астеновского типа

Типичный масс-спектр

- Характеризуется «острыми» пиками, рис. 8.3.
- По оси X отложено отношение m/z для данного иона.
- По оси Y откладывается интенсивность сигнала, которая определяется количеством ионов (зависит от их способности к десорбции).

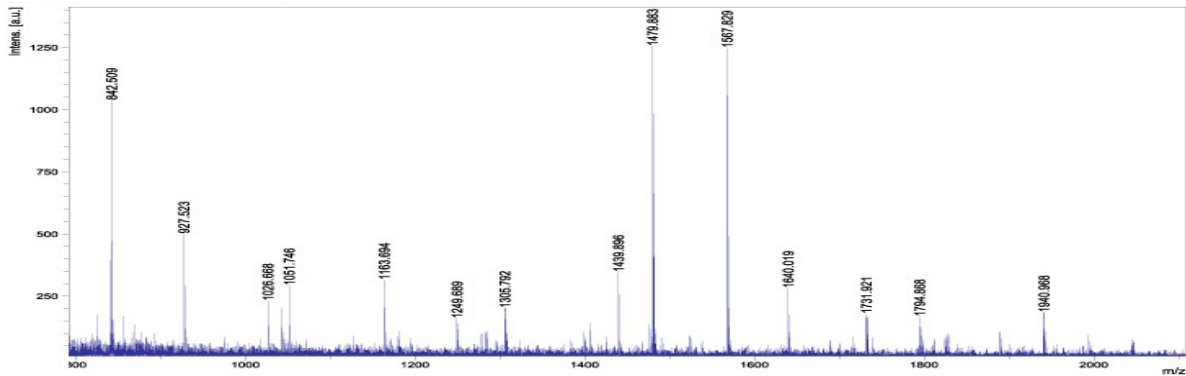


Рис. 8.3. типичный масс-спектр. По горизонтальной оси – m/z , по вертикальной – счетчик сигналов.

Единицы измерения атомных и молекулярных масс

- а.е.м. (атомные) = у.е. (углеродные): $1/12 \text{ }^{12}\text{C} = \text{Да}$ (Дальтон).
- $1 \text{ Th} = 1 \text{ Da}/z$ (Thomson) – используется в масс-спектрометрии, отношение массы к заряду.

Ключевые характеристики работы масс-спектрометра

- Разрешение.
- Чувствительность – характеризует количество молекул, необходимое для достоверного измерения сигнала (в настоящее время до десятков-сотен молекул).
- Динамический диапазон.
- Скорость получения спектра – чем больше разрешение, тем меньше скорость.

Разрешение масс-спектрометра

Критерий 10%: считаем два пика на рис. 8.4. разрешенными, если в области пересечения находится не более 10% площади. Ионы с массами m и $(m + \Delta m)$:

$$R = \frac{m}{\Delta m}. \quad (8.1)$$

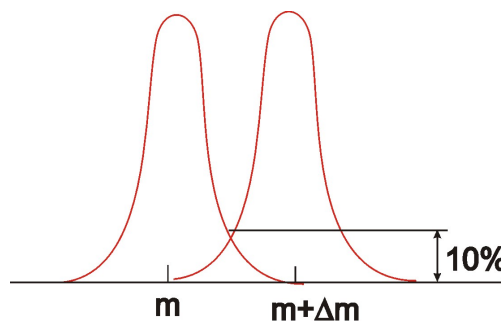


Рис. 8.4.

Высокое разрешение необходимо, чтобы отличать молекулы с близкими атомными массами, например:

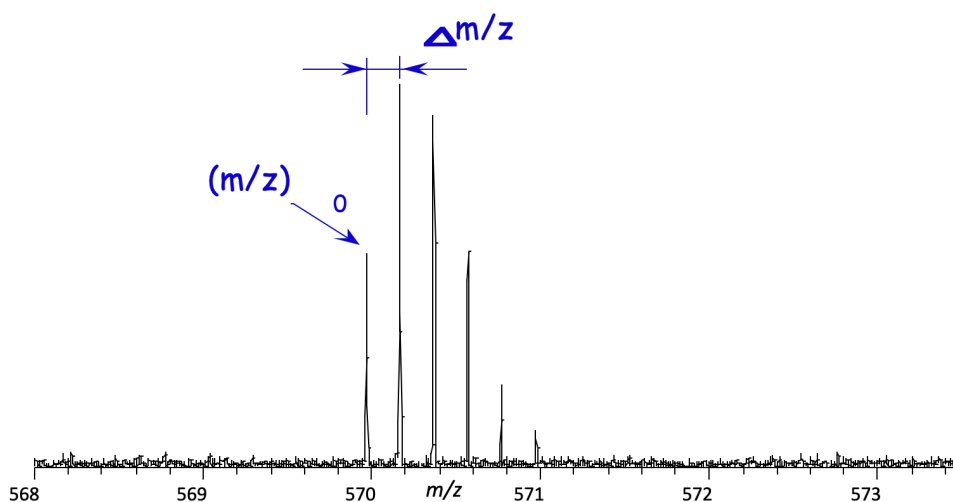
- $^{12}\text{C} = 12.00000000$ а.е.м.
- $^1\text{H} = 1.00782506$ а.е.м.
- $^{14}\text{N} = 14.00307407$ а.е.м.
- $^{16}\text{O} = 15.99491475$ а.е.м.

Азот (N_2), монооксид углерода (CO), этилен (C_2H_4):

- $\text{CO}: 27.994915$ а.е.м.
- $\text{N}_2: 28.006148$ а.е.м.
- $\text{C}_2\text{H}_4: 28.03300$ а.е.м.

Изотопное распределение

Существуют молекулы (например, углерод), для которых содержание стабильных изотопов достаточно высокое. Таким элементом является, например, углерод (рис. 8.5).



^{12}C	12.000000	98.93	Hydrogen	^1H	1.007825	99.9885
^{13}C	13.003355	1.07	Deuterium	^2H	2.014102	0.115
^{14}C	14.003242	*	Tritium	^3H	3.016049	*

Рис. 8.5. Изотопное распределение углерода.

Если разрешение очень высокое, а изучаемые молекулы богаты углеродом и представлены в большом количестве, то на масс-спектре увидим отдельные пики. Первый пик – это так называемые *моноизотопный пик*, когда все элементы в молекуле обладают самой меньшей из возможных масс. Если молекула большая, то этот пик

может быть достаточно маленьким. Пики распределяются по Пуассону, вид которого зависит от количества атомов.

Применение МС

- *Определение изотопного состава элементов:*

$$C^{12}:C^{13} = 99:1$$

$$Cl^{35}:Cl^{37} = 76:24 \text{ (35.5 а.е.м.)}$$

$$Br^{79}:Br^{81} = 51:49 \text{ (80 а.е.м.)}$$

- *Разделение изотопов;*

- *Точное определение масс:*

$$I^{127} \text{ (126.904 а.е.м.)}$$

$$53p+74n = 128.027 \text{ а.е.м.}$$

$$E_{св} = c^2D_{мя}; D_{мя}=1.152 \text{ а.е.м.}$$

- *Характеристики ядерных процессов: энергии распада ядер; сечения захвата;*
- *Определение геологического возраста по периоду полураспада ($Pb^{206}:Pb^{207}$);*
- *Специальное применение (детектор в различных системах);*
- *Определение состава вещества (органическая химия);*
- *Определение количественного состава смесей; определение энергий связи, химических и термодинамических характеристик;*
- *Определение массы больших молекул: ДНК, белки, сахара;*
- *Исследование структуры молекул и кинетики реакций;*
- *И многие другие !*

Методы ионизации

По мере увеличения молекулярной массы, которую можно ионизировать:

- *Электронная ионизация.*
- *Ионизация полем* – молекулы пролетают мимо области, в которой создано очень высокое электростатическое поле: создается острие с радиусом ~ 100 нм, на нее подается напряжение в 5 кВ. Возникшее поле будет зависеть от кривизны наконечника и величины поданного напряжения: если радиус мал, а напряжение велико, то пролетающую молекулу можно ионизировать за счет большого электростатического поля.
- *Бомбардировка быстрыми атомами (ББА)* – рис. 8.6, молекулярная масса до 5 кДа.

- *Плазменная десорбция* – рис. 8.6., молекулярная масса до 10 кДа.
- *Ионизация лазерной десорбцией при содействии матрицы (ИЛДМ = MALDI)* – рис. 8.6. Этот метод наиболее удобен для белков, возможно облучение вплоть молекулярных масс до 1000 кДа.
- *Ионизация электрораспылением.*

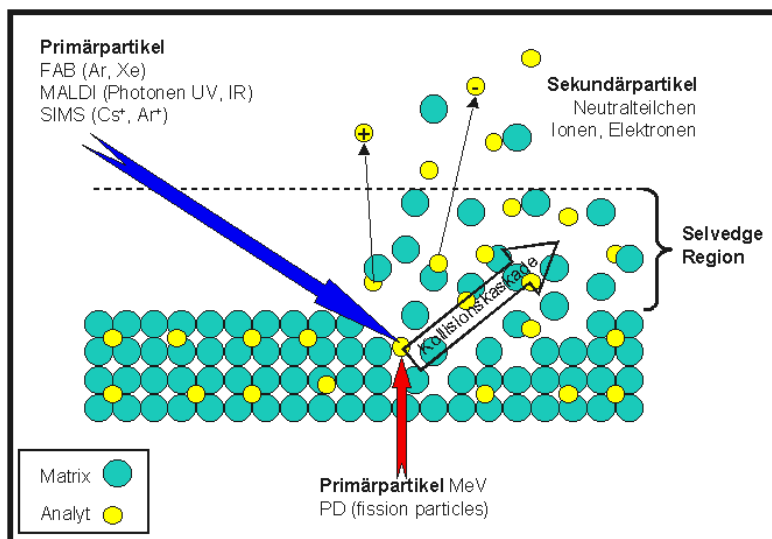


Рис. 8.6. Плазменная десорбция, ББА и ИЛДМ.

На рис. 8.6. образец находится в матрице (среде). На его поверхность направляем поток определенных частиц. Этими частицами являются, для разных методов:

1. **(ББА) Нейтралы** – атомы с большой энергией, выбивающие в газовую фазу большое кол-во молекул, часть из них будет ионизирована за счет большой энергии.
2. **(Плазменная десорбция) Заряженные ядра**, получившиеся благодаря ядерной реакции (например, распад Калифорния), можно измерить точное время реакции. Заряженные ядра после распада разлетаются в противоположные стороны. На пути частицы ставится фольга, на которую нанесен образец.
3. **(ИЛДМ) Фотоны** – используем лазерное излучение, поверхность образца быстро нагревается. Диапазон излучения: УФ (переходы электронов между уровнями энергии), ИК (возбуждение колебательного движения). За счет нагрева происходит десорбция.

ИЛДМ: импульсная ионизация

Чаще всего используются импульсные лазеры, т.к. необходимо быстро нагреть небольшую область пространства. В качестве матриц используются ароматические молекулы, для из облучения удобно использовать как УФ, так и ИК диапазон.

Используются *времяпролетные детекторы*, которые определяют соотношение масса/заряд по времени, за которое ион путешествует в области пространства, где нет других ионов.

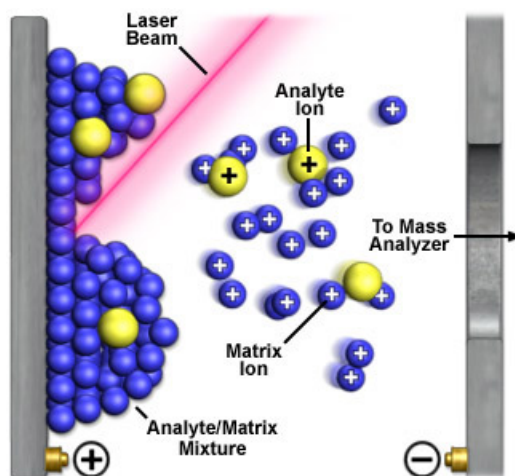


Рис. 8.7. Импульсная ионизация.

Ионизация электрораспылением (ЭСИ)

Вещество закачивается через капилляр с очень маленькой скоростью, к капилляру приложен положительный потенциал ~ 5 кВ. На выходе образуются заряженные капли, которые начинают быстро распадаться, стремясь понизить кулоновскую энергию, т.к. объемный заряд достаточно большой, – *возникает аэрозоль*. Капли каскадно уменьшаются по мере распространения, дополнительно подается газ, который увеличивает скорость испарения жидкости. В итоге получаем отдельные положительно заряженные макромолекулы.

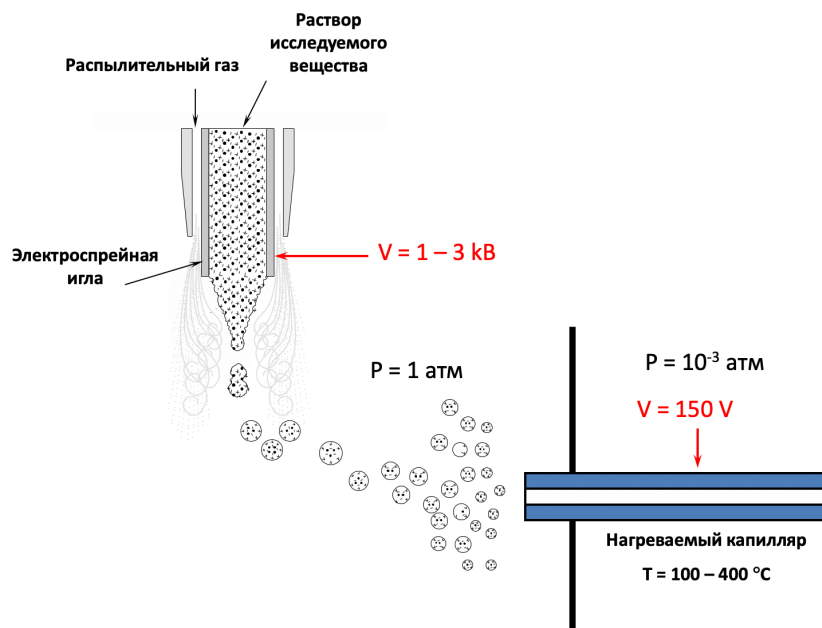


Рис. 8.8. Ионизация распылением.

Преимущества подхода:

1. Можно работать с большими макромолекулами, комплексами макромолекул, условно оценить константу диссоциации.
2. Можно получать высокозарядные ионы. Когда количество протонов большое, m/z может быть тоже малым. Поэтому даже с крупной молекулой удобно работать.



Рис. 8.9. Электроспрей

Всегда имеем некоторое *распределение* молекул по количеству протонов, т.к. процесс происходит при нормальной температуре. Масс-спектр, получаемый благодаря методу ионизации электрораспылением на рис. 8.10. Основные пики широкие у основания, поскольку в нем слились моноизотопный пики. Разность между пиками будет равна $1/z$.

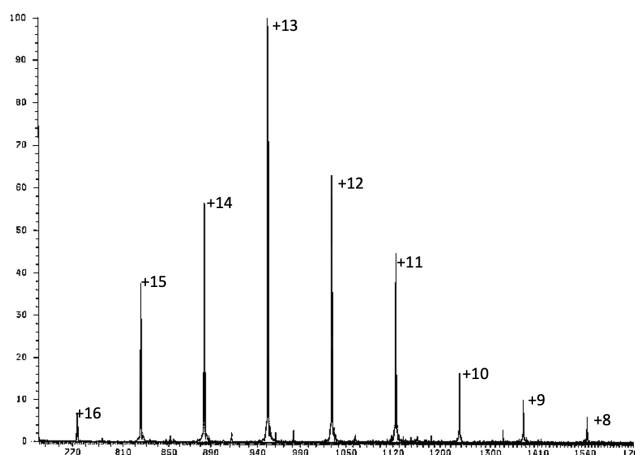


Рис. 8.10. Масс-спектр белка Cytochrome C, молекулярный вес 12300 Да.

Десорбционно-электроспрейная ионизация

Если капля попадает на поверхность жидкости, иногда она может отскочить. За счет этого явления можно использовать метод десорбционно-электроспрейной ионизации для того, чтобы раствор с заряженными каплями направлять на поверхность образца, где есть нужные молекулы. Заряженная капля попадает в жидкость, где есть макромолекулы и может уйти обратно, присоединив эти макромолекулы. Далее они распадаются и идут на вход масс-спектрометра для анализа (рис. 8.11).

Преимущество: если образец большой, его можно двигать и смотреть, как меняется масс-спектр на различных участках. Таким образом часто определяется белковый состав.

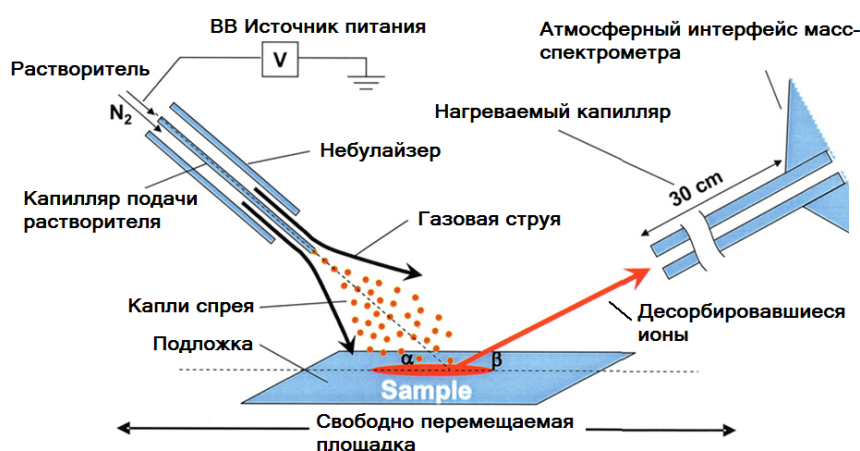


Рис. 8.11. Десорбционно-электроспрейная ионизация

Электроспрейная лазерно-десорбционная ионизация

Гибридный метод, в котором Электроспрейная ионизация используется вместе с лазерной ионизацией (если она не дает достаточное количество ионов).

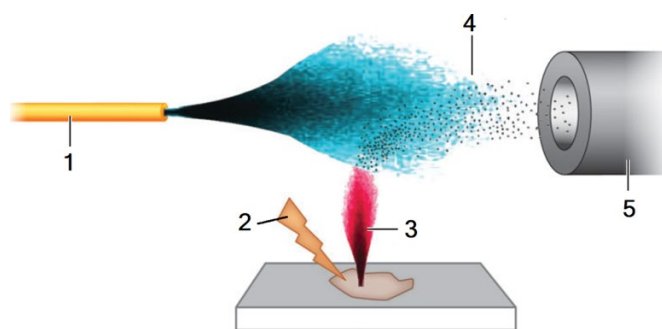


Рис. 8.12. Электроспрейная лазерно-десорбционная ионизация. 3 – факел, 4 – поток заряженных частиц.

Типы масс-анализаторов

- Секторные (классика).

- Квадрупольный масс-фильтр.
- Квадрупольная ионная ловушка.
- Ионно-циклотронно-резонансный (ЦИР).
- Время-пролетный.

Секторный MS

Вспомним закон Кулона:

$$m \frac{d\vec{v}}{dt} = qe\vec{E} + \frac{qe}{c} [\vec{v}\vec{H}], \quad (8.2)$$

$$\frac{1}{2}mv^2 = qU, \quad (8.3)$$

$$\frac{mv^2}{r} = qvB. \quad (8.4)$$

В зависимости от величины B магнитного поля получаются различные радиусы:

$$r = \frac{1}{B} \sqrt{\frac{2Um}{q}}, \quad (8.5)$$

где U – величина ускоряющего напряжения.

Масс-спектр можно далее получать несколькими способами, чаще всего меняется либо U , либо ток в электромагните. Таким образом к детектору (рис. 8.12) попадут частицы, которые удовлетворяют соотношению (8.5).

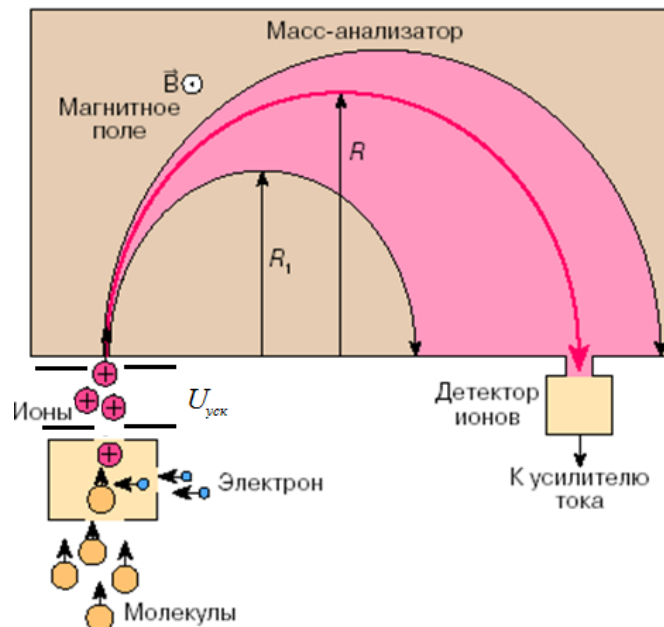


Рис. 8.12. Секторный MS.

Время-пролетный анализ

Ионы ускоряются с использованием некоторого напряжения, далее частицы летят в *рефлектрон*, который нужен, чтобы избавиться от распределения частиц по начальным скоростям.

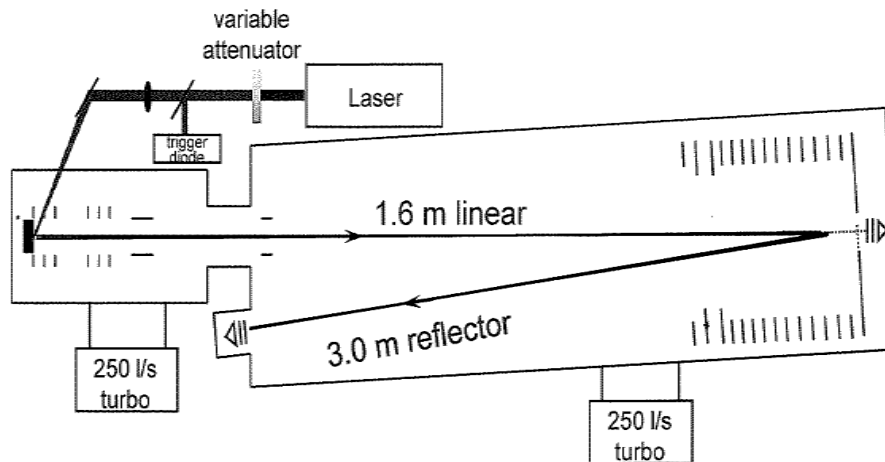


Рис. 8.13. Время-пролетный анализ.

Масс-спектральное уравнение:

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{L^2}. \quad (8.6)$$

где L – длина трубы, t – время путешествия частиц, V – разность потенциалов. Т.е., если есть распределение, будем иметь распределение $\frac{m}{z}$.

Как бороться с этим распределением? Б.А. Мамырин предложил следующий способ: на пути частиц помещается рефлектрон (рис. 8.14) – заряженная пластинка, создающая поле.

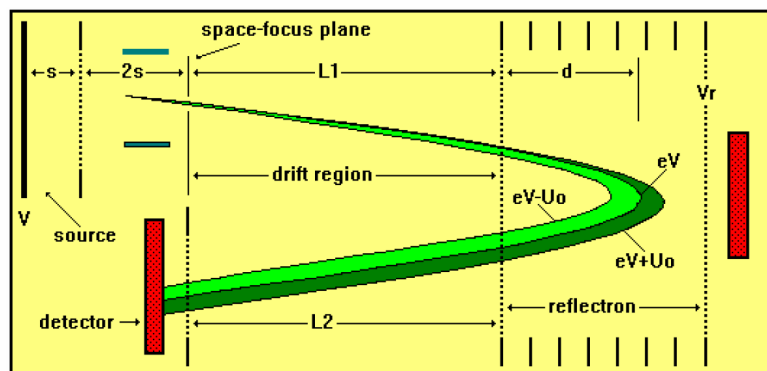


Рис. 8.14. Времяпролетный масс-спектрометр с рефлекторном.

Чем больше энергия частица, тем больше глубина d проникновения. Поэтому, несмотря на изначально большую скорость, на детектор они придут одновременно с более медленными:

$$t = \sqrt{\frac{m}{2eV}} [L_1 + L_2 + 4d]. \quad (8.7)$$

Это позволяет сильно поднять разрешение. Например, рис. 8.15, полученный после усреднения количество молекул после каждого лазерного импульса.

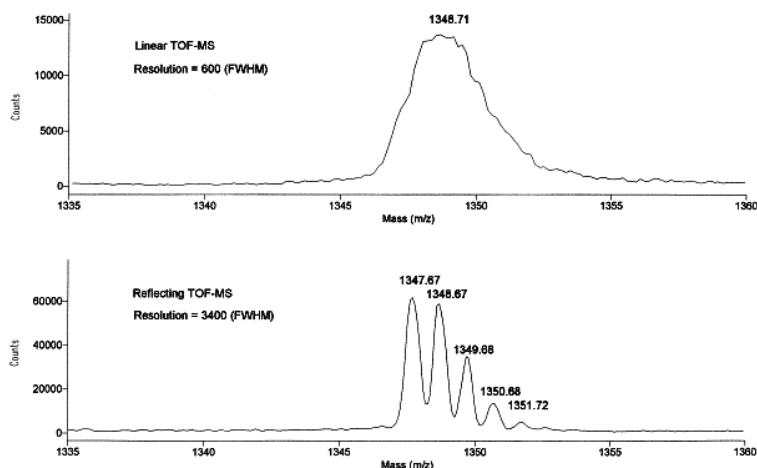


Рис. 8.15. Масс-спектр, полученный с помощью ИЛДМ в линейном режиме (сверху) и с использованием рефлектора (снизу).

Квадрупольный масс-фильтр

В составе несколько электродов, расположенных крест-накрест, квадруполь, 4 электрода, к которым приложено переменное напряжение. Частица, попадающие в фильтр, начинают двигаться по определенным траекториям (рис. 8.16). При этом стабильным движение является только при определенном m/z .

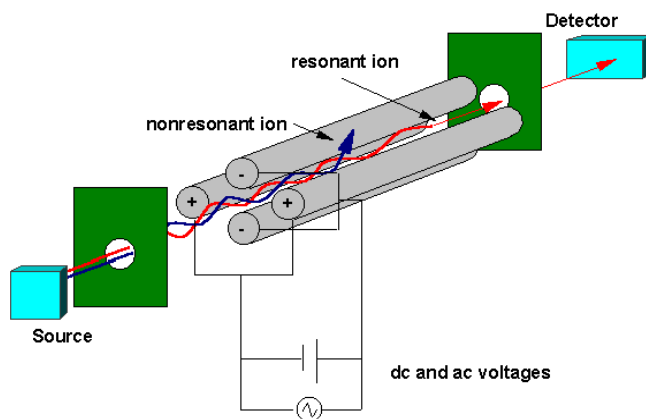


Рис. 8.16. Квадрупольный масс-фильтр.

Зачем нужно высокочастотное поле?

Если мы хотим создать область, в которой будет устойчивое равновесное состояние, необходимо рассмотреть экстремум потенциала.

$$\frac{\partial \Phi}{\partial x} = \frac{\partial \Phi}{\partial y} = \frac{\partial \Phi}{\partial z}. \quad (8.8)$$

Разложим потенциал в ряд:

$$\Phi = ax^2 + by^2 + cz^2 + \dots \quad (8.9)$$

Т.к. в объеме нет заряда, конфигурация поля должна удовлетворять уравнению Лапласа:

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial^2 x} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial^2 y} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial^2 z} = 0 \quad (8.10)$$

$$\Rightarrow a + b + c = 0. \quad (8.11)$$

Т. Ирншоу: малые колебания вблизи экстремума электростатического поля неустойчивы хотя бы в одном направлении.

В связи с этим, если мы хотим получить стационарную систему и заряды никуда не уходили, необходимо подавать переменное поле.

$$\Phi = (U + V \cos \Omega t) \frac{x^2 - y^2}{r_0^2}. \quad (8.12)$$

Почему используются квадрупольные поля? Возвращающая сила прямо пропорциональна смещению, т.е. система линейная. Поэтому частоты колебаний не зависят от амплитуды колебаний (энергии) и однозначно определяются удельной массой частиц.

Ионные ловушки

Потенциал приложен к внутренней части системы на рис. 8.17, обладающей специально подобранной геометрией. В систему подаются ионы, который начинают двигаться по окружности вокруг центрального заряженного электрода. За счет наличия кривизны ионы движутся по спиралям, причем возвратно. Частота этих аксиальных движений зависит от m/z .

Преимущество метода: снимаем потенциал, наведенный на внешней металлической части, который зависит от движущихся электронов, т.е. от времени. Если имеем длительную запись этого сигнала, можем сделать Фурье преобразование с большой точностью. Чем больше время накопления, тем лучше разрешение.

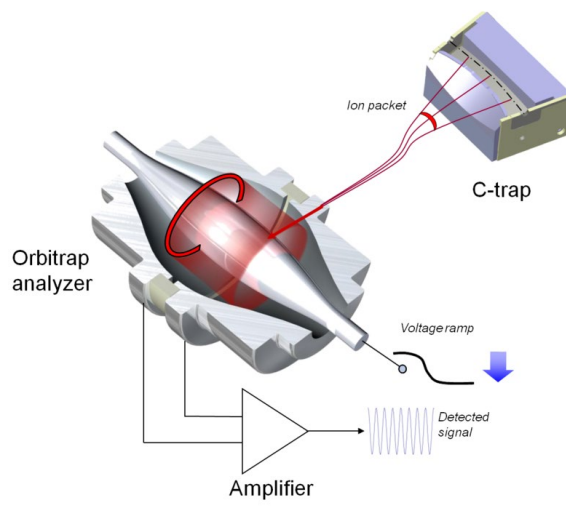


Рис. 8.17. Orbitrap analyzer.

Ионно-циклотронный резонанс

Идея схожа с ловушкой, но в данном случае вместо заряженного центрального электрода – направленное магнитное поле, в котором частицы начинают двигаться по окружности с циклотронной частотой, которая зависит от величины магнитного поля и m/z . При этом на внешних металлических электродах они создают токи, которые можно измерить. Проблема: необходимо стабилизировать движение, чтобы частицы не уходили в сторону. Для того, чтобы удерживать их на месте прикладывается напряжение. Также движение нужно синхронизировать, для чего используются импульсы э/м поля.

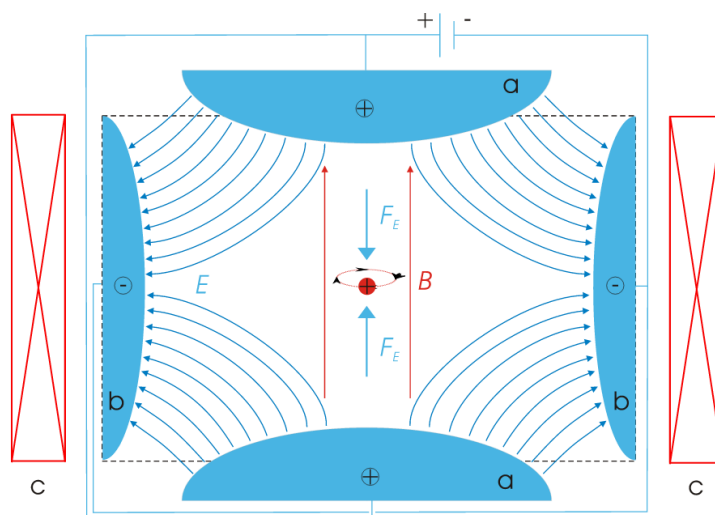


Рис. 8.18. Ионно-циклотронный резонанс

Е. Николаев предложил новый класс ионных ловушек Пеннинга для масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса, в которых электрические поля гармонизируются за счет усреднения потенциала при циклотронном движении ионов.

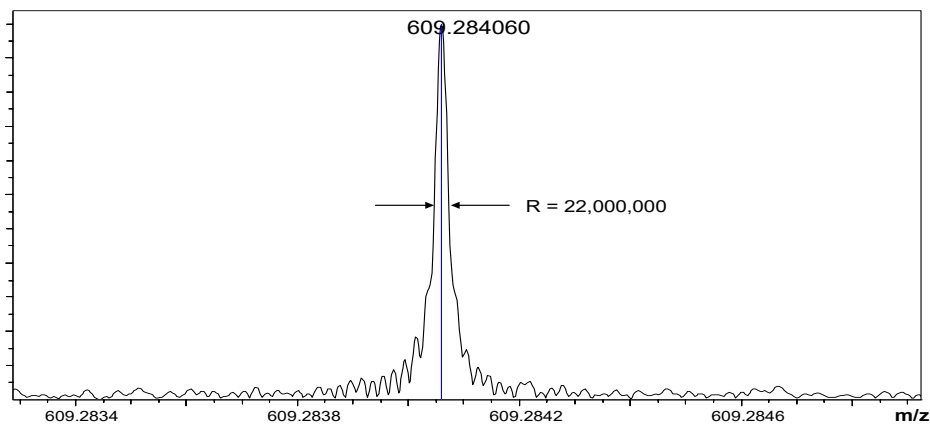


Рис. 8.19. Масс-спектр двухзарядного резерпина. Абсолютный мировой рекорд в масс-спектрометрии $R=22 \cdot 10^6$.

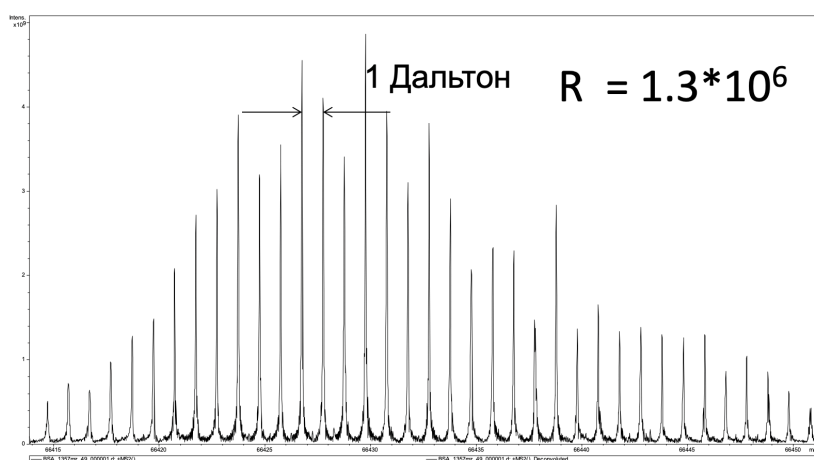


Рис. 8.20. BSA, Бычий альбумин, (66420 Да) изолирован $28+$ зарядный ион (магнит 7 Тесла).

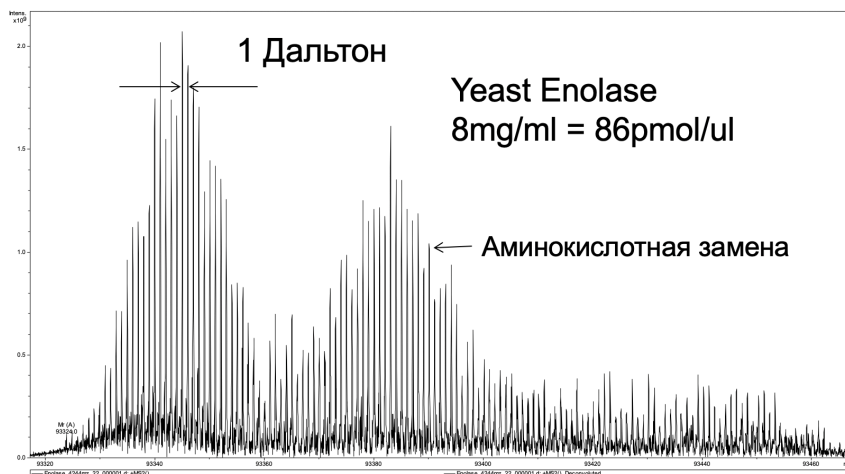


Рис. 8.21. Димер енолазы (93340 Да) изолирован $22+$ зарядный ион (магнит 7 Тесла).
Можно видеть аминокислотную замену.

Изучение сворачивания белков с помощью масс-спектрометрии

Используется электроионизация распылением. В зависимости от конформации белка распределение протонированных групп может быть разным, соответственно с разным масс-спектром. Если белок развернут, то все аминокислотные остатки доступны для взаимодействия с растворителем. Тогда те, что могут протонироваться и депротонироваться будут приходить в равновесие, поэтому спектр смещается в сторону малых m/z (рис. 8.22). Если белок свернут, то протонироваться могут только те остатки, что находятся на поверхности, тогда масс-спектр смещается вправо.

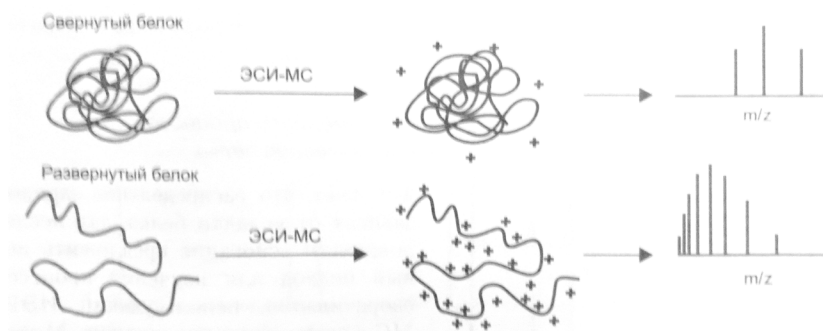


Рис. 8.22. Масс-спектр свернутых и развернутые белков.

До сих пор не очень хорошо понятно, как именно сворачивается и разворачивается белок. На рис. 8.23 для цитохрома С белок сверху находится в свернутом состоянии, а снизу – в развернутом. На рис. 8.23 значения рН для двух различных белков поэтапно увеличиваются, нас при этом интересуют не сами значения, а форма спектра.

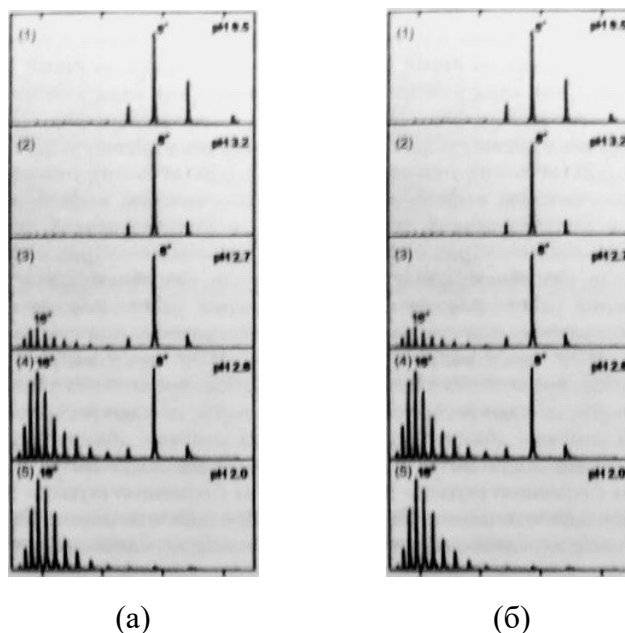


Рис. 8.23. Изменение спектра по мере уменьшения рН для (а) цитохрома С; (б) апо-миоглобина.

В промежуточном случае спектр представляется в виде суммы спектров развернутого и свернутого белка с какими-то коэффициентами A и B . Это означает, что в растворе белок присутствует только в двух состояниях – свернут либо развернут, промежуточные формы отсутствуют. Это говорит о высокой кооперативности процессов сворачивания.

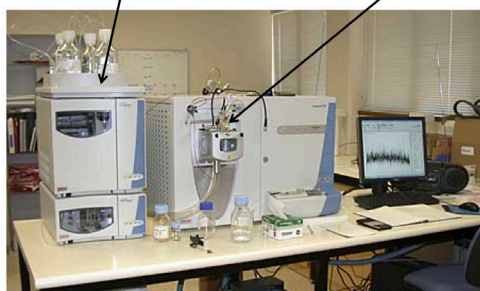
Не все белки такие: у некоторых есть *интермедиаты сворачивания* – когда белок свернут частично. Ярким примером такого белка является апо-миоглобин на рис. 8.22б. Для него спектр промежуточных состояний не представляется в виде суммы крайних состояний.

По графикам на рис. 8.23 можно определить количество интермедиатов сворачивания. Для этого необходимо понять, сколько есть базисных функций, на которые можно разложить спектры. Например, если их три, то интермедиат один.

Комплексные исследования

Сегодня масс-спектрометрические исследования проводятся в комплексе с другими подходами. Часто используется подход, в котором на выходе из жидкостного хроматографа располагается масс-спектрометр (рис. 8.24). Тогда можно автоматически выделить пик на выходе из хроматографа и отправить его на масс-спектрометр, при этом удобно использовать метод ионизации распылением.

Комплекс
жидкостной хроматограф + масс-спектрометр



(а)



(б)

Рис. 8.24. (а) Жидкостной хроматограф и масс-спектрометр; (б) установка с большим разрешением.

Тандемная масс-спектрометрия (MS/MS)

Имеется несколько масс-спектров, соединенных в тандем на рис. 8.25. Часто используется так называемый qqq-тандем: все фильтры квадрупольные.

Фильтр №1. Выделяется конкретная область в m/z , например, осколки белка. Чаще всего на вход подается раствор белка, дополнительно обработанный ферментами, которые режут белки на кусочки.

Фильтр №2. Камера столкновения, в которой происходит взаимодействие выделенный в фильтре № 1 кусочках с атомами газа, в результате чего они распадаются на еще более мелкие фрагменты.

Фильтр №3. Снимается спектр того, что получилось при диссоциации полосы, выделенной в первом фильтре, на начальные куски.

Преимущество заключается в том, что на выходе третьего фильтра можно видеть отдельные аминокислотные остатки и отделить некоторые последовательно, которые получаются в этом случае.

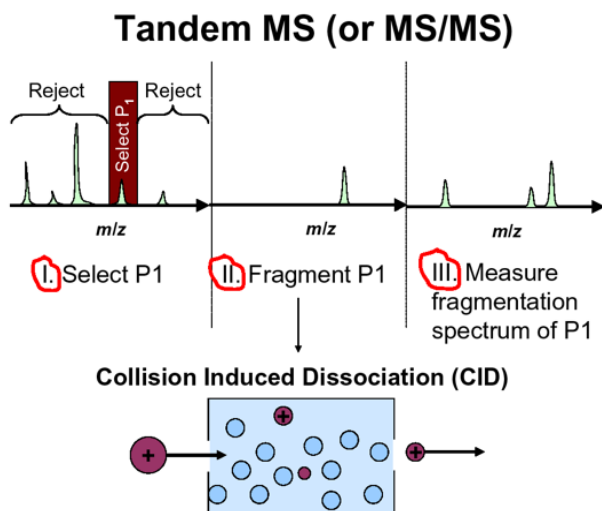


Рис. 8.25. Тандемная масс-спектрометрия.

Лекция 9. Таргетный анализ протеома.

Современная *протеомика* возникла благодаря тандемной масс спектрометрии (рис.8.23). Главная идея: изучаем не массы цельных белков, а пептиды, которые получают с помощью методов деградации белков. Протеомика начинается там, где мы начинаем работать со сложными многокомпонентными смесями. Например, берем клеточный экстракт и работаем с тем, что было внутри клетки. Это можно обработать ферментом (например, трипсином), который начнет нарезать белки на кусочки. Анализируя эти кусочки, можно понять, какие белки были изначально и в каком количестве.

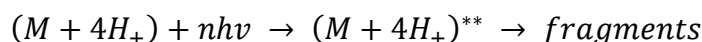
В настоящее время для суспензии клеток нет возможности быстро и полностью определить полностью все белки, которые есть внутри этих клеток, и их концентрации по самым разным причинам: белки бывают с низкими концентрациями, по-разному деградируются. Но на настоящий момент для отдельных этапов предложено решение.

Методы фрагментирования ионов белковых молекул

- Столкновительная диссоциация, *Collision-Induced Dissociation (SORI-CID)*.

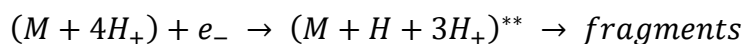


- Многофотонная ИК диссоциация, *Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD)*

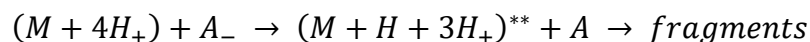


- Диссоциация при захвате медленных электронов,

Electron Capture Dissociation (ECD)



- Диссоциация при передаче электрона, *Electron Transfer Dissociation (ETD)*



Чаще всего в протеомике используется столкновительная диссоциация (см. рис. 8.23). Ионы белков или их фрагментов помещаются в столкновительную камеру, газ в которой начинает взаимодействовать с ионами и разрушать их на отдельные части. Далее массы этих частей анализируются с помощью другого масс-спектрометра.

Используется несколько последовательных этапов:

- 1) Суспензия с белками обрабатывается ферментами для получения пептидных фрагментов.
- 2) Фрагменты разделяются с помощью хроматографии, чтобы выделить из них определенные фракции, в каждой из которых содержатся фрагменты разных белков.

- 3) Полученные пептиды ионизируются в специальной камере с помощью одного из методов выше.
- 4) С помощью масс-анализатора рассчитывается спектр фрагментов для изучения их структуры.

В зависимости от используемого метода, расщепление происходит в разных местах пептида (рис. 9.1). Диссоциация, индуцированная соударениями, происходит от пептидной связи, формируются *b* и *y* ионы (остатки пептида слева и справа от черты). По такой же пептидной группе происходит многофотонная ИК фрагментация. При фрагментации при захвате электрона разрывается другая связь (*c* и *z*).

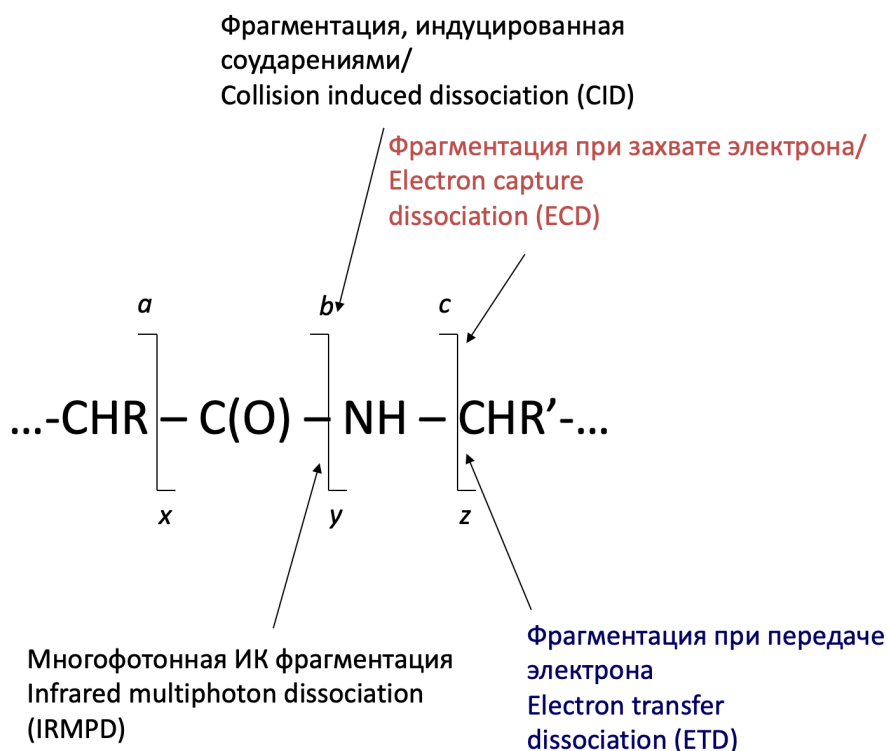


Рис. 9.1. Методы фрагментации пептидов.

Больше всего нас интересует фрагментация при столкновении с нейтралями. Как правило, это инертный газ при некоторой температуре, достаточной для того, чтобы при соударениях происходила диссоциация.

Спектр при дроблении с использованием столкновительно-индуцированной диссоциации.

При обработке трипсином (рис. 9.2) как правило получается огромное количество разных фрагментов, т.к. вариантов того, где может разорваться пептидная связь, достаточно много. В зависимости от места образования разрыва будем получать разные осколки.

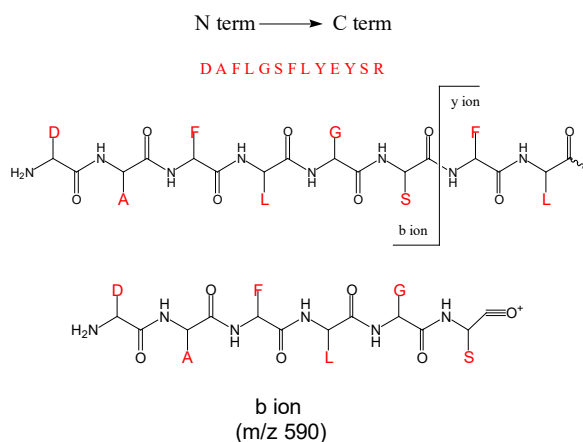


Рис. 9.2. Пептид, получаемый при обработке некоторого белка трипсином. Красным цветом показаны боковые радикалы.

На выходе получается спектр на рис. 9.3. Его можно интерпретировать: можно выбрать отдельные пики и увидеть, что разность между сигналами для них в точности соответствует определенным аминокислотным остаткам. Таким образом, по спектру можно восстановить всю последовательность. Например, последний пик: самое высокое соотношение m/z соответствует самой большой массе. Когда происходит разделение на два фрагмента по границе между S и R в последовательности (рис. 9.3), то разность между двумя последними пиками будет в точности соответствовать массе кусочка, который отваливается. Дальше аминокислотную последовательность можно восстановить по аналогии, поскольку мы знаем молекулярные массы отдельным аминокислотных остатков с высокой точностью.

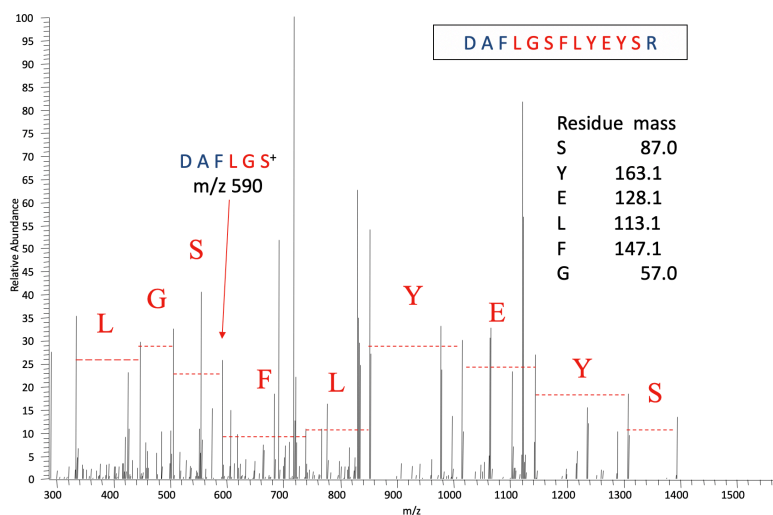


Рис. 9.3. MS-MS Spectrum.

Вопрос индексации расстояний между пиками, вообще говоря, нетривиальный. Сегодня это делается автоматически, с использованием специальных алгоритмов. Они принимают на вход данные с масс-спектрометра в цифровом формате, анализируют их

и сравнивают с уже описанными ранее спектрами, позволяя выделить последовательность аминокислот, из которой состоит первичная структура исследуемого пептида.

Если исследуется смесь пептидов, т.е. если на первом этапе тандемной масс-спектрометрии в выбранную область попадает их сразу несколько, то, вообще говоря, спектр будет более сложный, и его не получится интерпретировать сходу даже с помощью автоматических алгоритмов. Поэтому необходимо следить за тем, чтобы полученный спектр можно было интерпретировать однозначно.

Полученную аминокислотную последовательность можно найти в базах данных и определить, какому белку она принадлежит. 10 аминокислотных остатков для такой цели уже достаточно.

Таргетный анализ протеома

Был выбран методом года 2012 по версии журнала Nature methods (см. лекцию 1). Метод позволяет целенаправленно изучать интересующие нас белки. Сегодня в протеомике выделяют два способа работы с изначальными сложными растворами, содержащими большое количество белков (рис. 9.4)

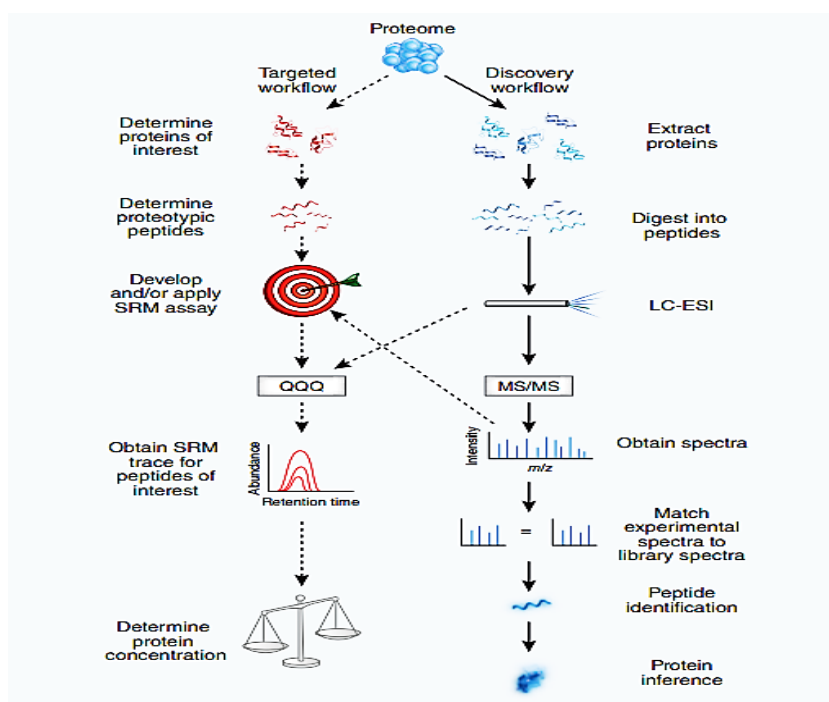


Рис. 9.4. Способы работы со сложными растворами белков.

Правый вариант на рис. 9.4 заточен на открытие новых или открытие модификаций уже описанных белков, в первую очередь посттрансляционных. Это работает следующим образом:

- 1) Имеем экстракт белков.
- 2) Перерабатываем его с помощью специальных ферментов (трипсин), разбивая белки на множество фрагментов.
- 3) Используем тандем жидкостной хроматографии с электрораспылением при помощи капилляра.
- 4) Результат отправляется на вход тандемной масс-спектрометрии. В конечном итоге получаем много спектров фрагментов.
- 5) Полученный конечный масс-спектр сравниваем с уже имеющимися базами данных и с теоретически возможными последовательностями, которые могут кодировать белок.
- 6) Более подробный анализ полученного белка и изначальной системы с экстрактом белка.

Левый вариант на рис. 9.4. – так называемый нацеленный поток. В данном случае мы пытаемся количественно определить наличие и концентрацию экстракте конкретного интересующего нас белка. Для этого все этапы анализа, а особенно масс-спектрометрическая часть нацеливается на то, чтобы количественно определять сигналы от конкретных пептидов. Мы знаем, какие конкретно пептиды могут получиться в том числе в результате анализа по алгоритму правой ветки, уже описанным в базах данных белкам. Имея информацию о строении белка, можно настроить все оборудование на выделение конкретного пептида и анализ его масс-спектра. Этот подход позволил вывести протеомику на новый уровень, позволяющий количественно характеризовать концентрацию конкретных белков в системе, что происходит, когда система меняется (активация, дифференциация клеток, изменение паттерной экспрессии определенных генов).

Глобальная идея (рис.9.5): используем электроспрейную ионизацию, получаем большое количество белковых пептидов, пропускаем их через три квадрупольных масс-фильтра, на выходе которого получаем изменяющийся во времени спектр. При этом можно за один раз получить спектр сразу нескольких белковых фрагментов.

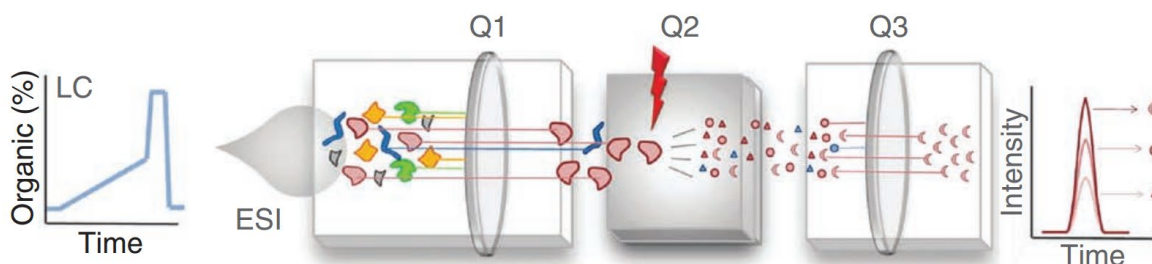
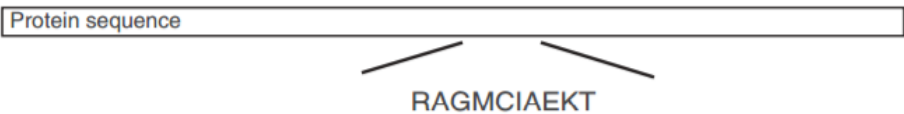


Рис. 9.5. Method of the Year 2012: Single and Multiple Reaction Monitoring (SRM & MRM).

Есть много задач, которые решаются до сих пор. Например, если мы знаем некоторый белок и хотим настроить все систему для работы с ним, как заранее предсказать на что проводить настройку?

Для белка есть этап обработки трипсином, этап хроматографии, ионизация фрагментов и этап диссоциации, который происходит в самом масс-спектрометре. То, какой ожидаемый спектр мы будем получать, глядя на последовательность аминокислот в белке, сказать заранее очень сложно, поскольку мы не знаем, на какие конкретно фрагменты распадутся белки в результате взаимодействия с трипсином. В таком случае помогают методы компьютерного анализа: существуют огромные базы данных того, какие белки на какие характерные пептиды преимущественно распадаются (рис. 9.6). Вероятность этого очень неоднородна, поэтому есть предпочтительные последовательности расщепления.



	Peptide sequence										Total	Average
	R	A	G	M	C	I	A	E	K	T		
Hydrophobic moment	10.0	0.00	0.00	1.90	0.17	1.20	0.00	3.00	5.70	1.50	21.97	2.44
Negative charge	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.00	0.11
Hydrophilicity	3.00	-0.50	0.00	-1.30	-1.00	-1.80	-0.50	3.00	3.00	-0.40	4.90	0.54
Beta sheet propensity	-0.40	-0.35	0.00	-0.46	-0.50	-0.60	-0.35	-0.40	-0.40	-0.48	3.46	0.38

Рис. 9.6. Отбор физико-химических характеристик пептидов для предсказания протеотипических пептидов.

В результате для каждой последовательности получаются числа из таблицы на рис. 9.6, которые можно сравнить с теми, которые чаще всего получаются в эксперименте. Таким образом можно попытаться построить предсказательную систему для характерных пептидов в масс-спектрометрическом анализе.

Заключение

Современные методы биологической масс-спектрометрии:

Масс-анализаторы:

- Квадрупольные ионные ловушки
- Времяпролетные (TOF)
- Масс-спектрометры с преобразованием Фурье (ИЦР ПФ, орбитальная ловушка)

Методы ионизации:

- **Электроспрей**
- MALDI
- ББА

Методы фрагментации ионов:

- **В столкновениях с нейтралями**
- При поглощении ИК излучения
- При захвате/передаче электрона

Жирным шрифтом выделены методы, наиболее часто использующиеся в науках о жизни.

СуТОФ: масс-цитометрия

Этот метод не относится к классической масс-спектрометрии. Часто стоит задача охарактеризовать клетки, которые находятся в некоторой суспензии. Например, сравниваем здоровую и опухоль ткани пациента. Для этого часто используются методы проточной цитометрии, флуоресцентно меченые антитела связываются с определенными поверхностными белками клетки. В зависимости от того, в каком состоянии находится клетка, получают разные кластеры дифференциации (CD), на каждый из которых можно выделить антитела и пришить к ним флуоресцентную метку. С помощью проточных цитометров мы можем анализировать сколько и каких антител находится на поверхности клетки и тем самым получать информацию о том, что клетка экспрессирует на поверхности.

Проблема проточной цитометрии в том, что чисто из-за оптических ограничений есть в лучшем случае оптические каналы, которые не пересекаются друг с другом. В результате несколько лет назад широкое распространение получила методика под названием масс-цитометрия. В ней вместо флуоресцентно меченых антител используются антитела с пришитыми специфичными изотопными метками. Затем делается не проточная цитометрия, где лазер светит перпендикулярно поток клеток, а анализируются масс спектры отдельных клеток (идентифицированных по изотопным меткам).

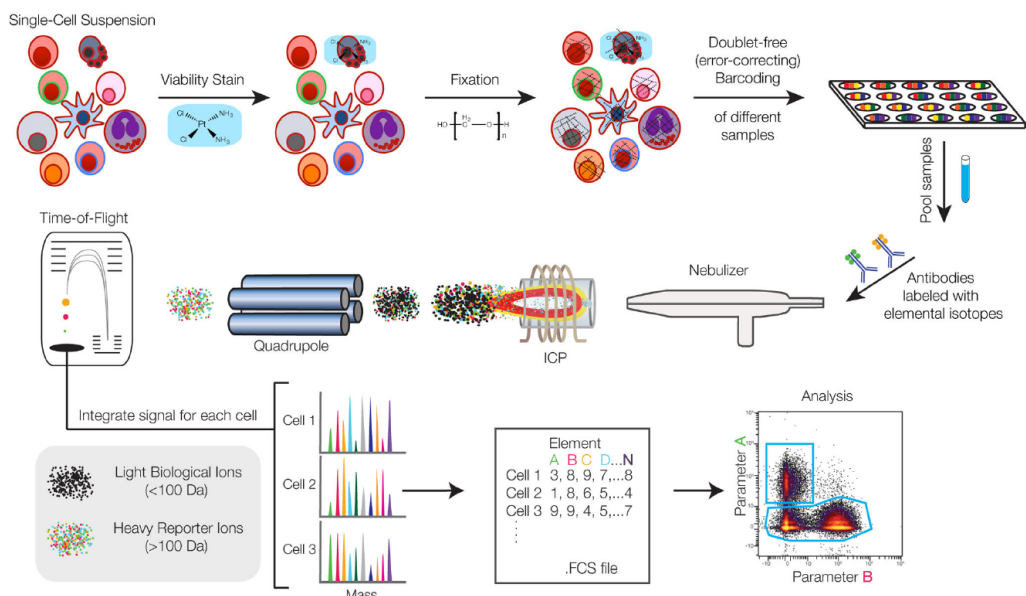


Рис. 9.7. Ключевые этапы CyTOF масс-цитометрии.

Ключевые этапы (рис. 9.7):

- 1) Необходимо пометить живые клетки, находящиеся в суспензии. Для того, чтобы связываться с богатыми фосфатиделсерином умирающими клетками и идентифицировать их используется соединение на основе платины.
- 2) Добавляется фиксатор, в результате которого возникают ковалентные сшивки между белками, которые более не меняются.
- 3) В систему добавляются антитела, содержащие изотопные метки (тяжелые металлы). Антитела начинают связываться с соответствующими антигенами на поверхности клетки.
- 4) Система отправляется на вход небулизатора (система, которая позволяет ионизировать вещество с помощью высокого потенциала).
- 5) Результат попадет на вход индуцированной связанной плазмы, в которой происходит быстрый распад клетки на отдельные малые фрагменты, которые можно анализировать с помощью квадрупольного момента.
- 6) Получается спектр, соответствующий отдельной клетке. В спектре можно выделить сигнал от определенных антител и сказать, сколько в штуках антител было на этой клетке.

Можем использовать десятки маркеров и получать информацию о том, сколько и каких белков было на поверхности клеток. Современная биформатика, которая занимается иммунотерапией рака, сильно зависит от таких подходов, которые позволяют получить не только об экспрессии белков в тканях, но и данные о присутствии маркеров на поверхности молекулы.

Лекция 10. Флуоресцентная микроскопия. Часть 1.

Оптические методы в настоящее время очень популярны в биологии и медицине и имеют огромное количество приложений. Поэтому мы начнем с общей лекции, посвященной флуоресцентным методам. Сегодня флуоресцентная микроскопия испытывает уже второе или третье рождение. Это связано, во-первых, с развитием биотехнологий и подходов, связанных с разработкой флуоресцентных красителей, специфичных антител, генетических конструкций, позволяющих делать флуоресцентные метки *in vivo*. Во-вторых, это связано с развитием технологий манипуляции светом – лазерные технологии, технологии детекции, современные светодиоды.

Основные способы возбуждения флуоресценции:

- 1) *Лазеры*. Узкополосные источники.
- 2) *Светодиоды*. Очень дешевы и просты в использовании, достаточно мощные.

Ранее также использовались ртутные лампы и фильтры.

Флуоресценция

Флуоресценция – процесс переизлучения, когда веществом поглощается квант света и дальше переизлучается квант другой, как правило большей длины волны. Все это происходит за счет активации некоторых молекул из-за внешнего излучения. Важно отличать от хемилюминесценции.

Хемилюминесценция – вещество переходит в возбужденное состояние (в терминах электронного возбуждения), далее возможна релаксация по разным путям, в том числе с помощью испускания света.



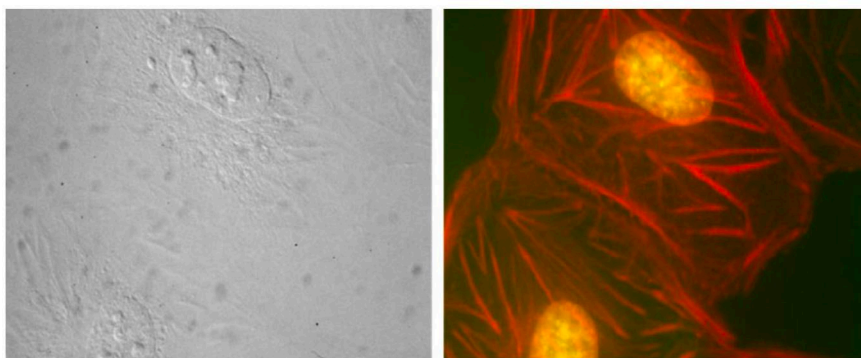
Рис. 10.1. Хемилюминесценция.

Причины широкого использования флуоресценции:

- **Высокая специфичность**. При визуализации с помощью флуоресценции (рис. 10.2) можно использовать специфические флуоресцентные маркеры, т.е. делать

так, чтобы прокрашивались только интересующие объекты. На рис. 10.2б прокрашены волокна актина и внутренняя структура ядра.

- *Высокая чувствительность.* Сегодня можно детектировать фотоны с помощью специальных камер – предел чувствительности с точки зрения физики.
- *Широкая область применимости.* Флуоресценцию можно использовать для самых разных задач, далее перечислены лишь некоторые из них:
 - *in vivo* наблюдение и отображение в реальном времени;
 - *Высокое и супер-разрешение* вплоть до нескольких нанометров (дифракционный барьер преодолен);
 - Не только получение изображений объектов, но и *изучение их в динамике*, можем следить за процессами как внутри клетки, так и снаружи: использовать флуоресценцию как сенсор pH, уровня Ca^{2+} , электрического потенциала, механических сил;
 - *Косвенные измерения* (детекция сигнала ФРЭД).



(а)

(б)

Рис. 10.2. Изображения живых клеток, полученные с помощью (а) дифференциально-интерференционного контраста (DIC), (б) флуоресценции в двух каналах.

Диаграммы Яблонского

Теоретически пояснить физику процесса флуоресценции удобно с помощью *диаграмм Яблонского* (рис. 10.3). Есть некоторая система (молекула-флуорофор), состоящая из атомов и имеющая некоторые электронные уровни энергии. На рис. 10.3а S_0 – основной уровень энергии, горизонтальные линии – колебательные уровни энергии, S_1 – первое возбужденное синглетное состояние для электронного возбуждения. Если облучаем молекулу с какой-то длиной волны, то может перебросить электроны в это возбуждённое состояние, при этом произойдет переход в состояние, соответствующее не только электронному возбуждению, но и колебательным движениям (за микросекунды). Если молекула находится в жидкости, то после возбуждения колебательные движения будут очень быстро релаксировать, т.к.

молекула будет передаваться соседним молекулам. Вибрационная релаксация происходит чаще всего безызлучательным образом буквально за пикосекунды, которые соответствуют характерным частотам движений. Флуоресценцией называется переход в основное состояние S_0 с испусканием кванта света, происходит за наносекунду – характерное время жизни возбужденного состояния.

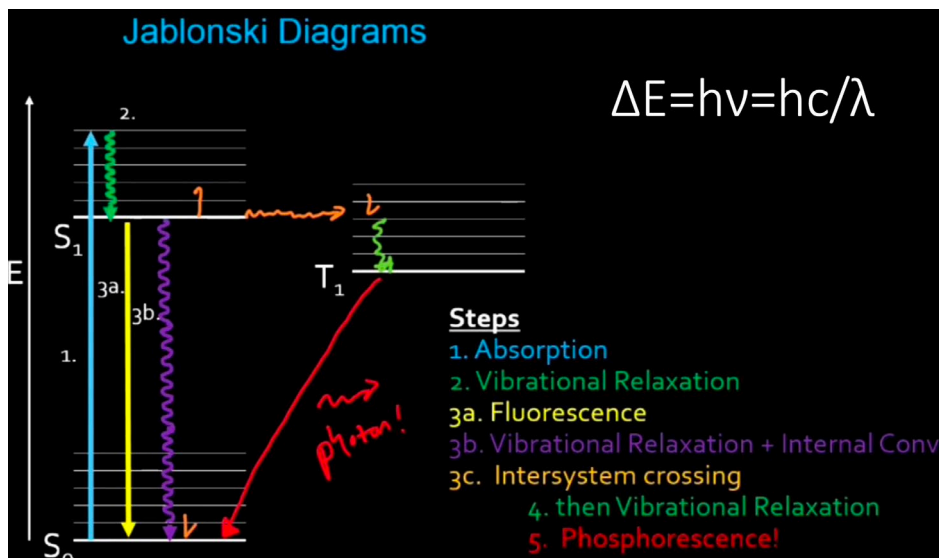


Рис. 10.3. Диаграмма Яблонского.

Дополнительные варианты: триплетный уровень энергии. Молекула может перейти в состояние, в котором спин электрона и системы меняется – триплетное состояние (в молекуле есть неспаренные электроны, полный спин равен единице). Этот процесс, вообще говоря, запрещен правилами отбора, но запрет снимается благодаря спин-орбитальному взаимодействию. Оно слабо, поэтому этот процесс маловероятен, в среднем на тысячу циклов возбуждения и обратной релаксации происходит один переход в триплетное состояние. Далее по аналогии с синглетным состоянием происходит релаксация. В триплетном состоянии молекула намного более реакционноспособна, она может вступать в химические реакции, в том числе с кислородом. Тогда спектр молекулы может существенно измениться, и обычных переходов уже не будет – молекула перестанет флуоресцировать. Этот процесс называется выгоранием, и как правило нежелателен. Также молекула может вернуться в основное состояние с испусканием фотона, такой переход также запрещен правилами отбора, поэтому время его жизни больше наносекунд. Этот процесс называется фосфоресценцией, он более тусклый, т.к. событие менее вероятно.

Молекула, в течение миллисекунд живущая в триплетном состоянии, будет выглядеть как темная до релаксации с испусканием фотона. Этот процесс называется обратимым тушением и активно используется в методах супер-разрешения.

Спектры поглощения и эмиссии флуоресценции

Если мы рассматриваем флуоресценцию, то правильно говорить не спектр поглощения, а спектр возбуждения флуоресценции, потому что этот спектр получают следующим образом: фиксируется длина волны, например, длина волны для максимума эмиссии (рис. 10.4). Если фиксируем детектор на уровне максимума и начинаем смотреть, как сигнал для такой длины волны зависит от длины волны возбуждающего света, получаем спектр возбуждения флуоресценции, который снимается именно таким образом. Этому спектру возбуждения соответствует спектр самой флуоресценции.

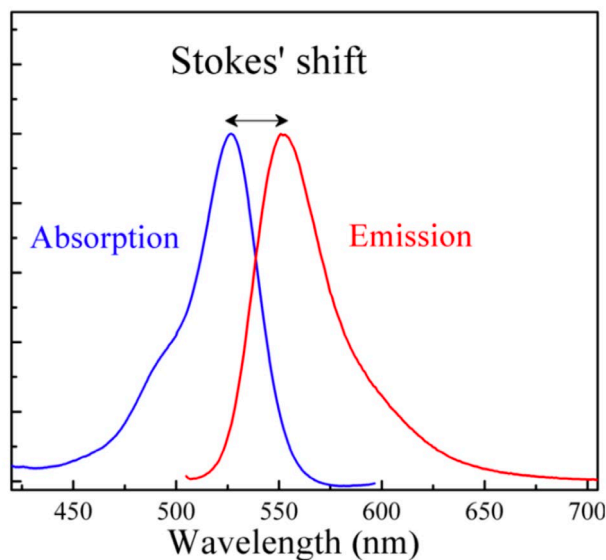


Рис. 10.4. Спектр поглощения и спектр эмиссии флуоресценции.

В большинстве случаев спектры сдвинуты друг относительно друга, эмиссионный спектр сдвинут в длинноволновую область. Это называется Стоксовым сдвигом. Необходимо уметь объяснять это с помощью диаграммы Яблонского. На рис. 10.3 процесс релаксации, а соответственно диссипации энергии, приводит к тому, что длина волны флуоресценции процесса $3b$ как правило больше, чем длина волны возбуждения (процесс 1). Ширина спектров объясняется тем, что уровней и соответственно вариантов перехода достаточно много, к тому же, уровни уширяются за счет различных взаимодействий.

Базовые характеристики флуоресценции

- 1) Интенсивность флуоресценции растет линейно с интенсивностью возбуждающего света. Не абсолютный закон, но, как правило, выполняется в рабочих режимах.
- 2) Флуоресценция происходит за наносекунды после процесс возбуждения молекулы (поглощения фотона).

- 3) В общем случае процесс излучения (эмиссии) может происходить по самым разным направлениям. Если молекула может двигаться, например, находится в жидкости и может диффундировать (трансляционно и вращательно). Процесс перехода из основного состояния в возбужденное описывается с помощью дипольного момента перехода:

$$\mathbf{d}_{0-1} = \langle \psi_{S_0} | e\mathbf{r} | \psi_{S_1} \rangle, \quad (10.1)$$

где ψ_{S_0} – волновая функция молекулы в состоянии синглета, \mathbf{r} – радиус вектор электрона, \mathbf{d}_{0-1} – дипольный момент для электронов. Дипольный момент перехода возникает из квантовой теории и позволяет понять то, как этот процесс устроен. Величина момента определяет так называемую силу осциллятора, если она высока, то процесс поглощения внешнего излучения будет происходить более эффективно. Вероятность поглощения будет увеличиваться с увеличением модуля дипольного момента. Т.к. дипольный момент – это вектор, молекулу можно представить в качестве диполя, который будет осциллировать с частотой, соответствующей разнице энергии состояний S_0 и S_1 . У дипольного излучения есть диаграмма направленности, с наибольшей вероятностью свет будет излучаться в направлении, перпендикулярном самой линии дипольного момента. Тогда, если бы молекула была изначально неподвижна, то после облучения мы могли бы получить флуоресценцию в заданных направлениях. Но, т.к. молекулы в растворе не только диффундируют, но и вращаются, в среднем флуоресценция происходит равновероятно во всех направлениях.

- 4) Эффективность флуоресценции и эмиссионный спектр зависит от молекулярного окружения. То, как энергия возбужденного состояния релаксирует, и сами спектры определяются тем, что находится вокруг молекулы. Если рядом с молекулой есть система, которая каким-то образом может принимать энергию возбуждения, то эта энергия может передаваться, эффективность флуоресценции будет меняться. Если меняем полярность растворителя, то в процессе возбуждения происходит некоторая перестройка молекулы, и меняется электронная плотность. Считать эти процессы достаточно сложно, особенно квантовую динамику, поэтому эксперимент в некотором смысле очень сильно опережает теорию.
- 5) При переходе в триплетное состояние молекула может «выключаться», это так называемое обратимое выключение. Также молекула может реагировать с каким-то веществом, чаще всего окисляться, и навсегда меняет свои свойства – такой процесс называется выгоранием и является необратимым.

Флуоресцентный микроскоп

1. Неинвертированный микроскоп

Рассмотрим самые простые варианты устройства. Все начиналось с простых неинвертированных микроскопов, когда объектив находится сверху. Ранее в качестве

источника света использовали ртутную лампу (рис. 10.5А). Для того, чтобы выделить нужную длину возбуждающей волны, используется excitation filter. Дихроическое зеркало отражает возбуждающую волну, которая попадет на объектив и далее на образец. После того, как молекул переходят в состояние возбуждения и начинают релаксировать, испуская в том числе кванты света. Излучение происходит во все стороны, в том числе и обратно (рис. 10.5В). Оно возвращается в объектив, проходит сквозь дихроическое зеркало, потому что мы специально подбираем его так чтобы оно отражало длину волны возбуждения и пропускала излучение. После зеркала ставится барьерный или эмиссионный фильтр, который дополнительно отсекает длину волны возбуждения и пропускает длину волны эмиссии. Эта система мала и локализована в так называемых флуоресцентных кубиках (рис. 10.6).

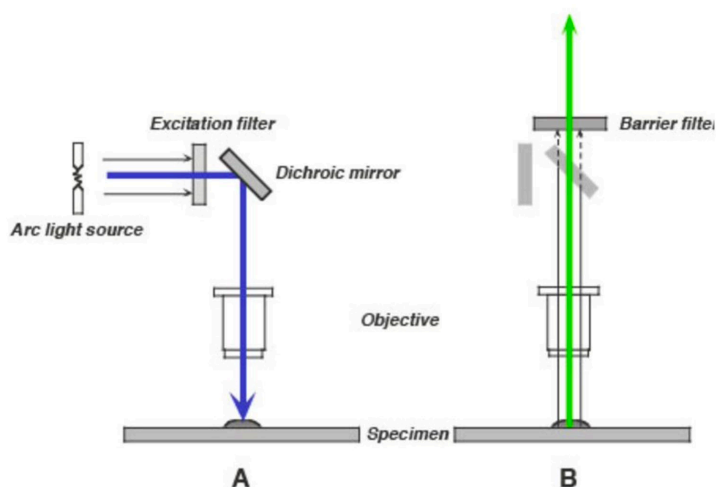


Рис. 10.5. Устройство флуоресцентного микроскопа: (А) возбуждение; (В) эмиссия.

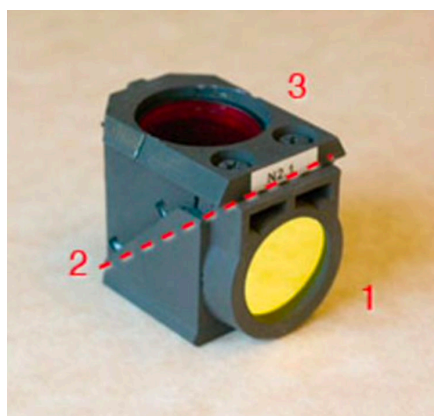


Рис. 10.6. Флуоресцентный кубик: 1 – фильтр для возбуждающего излучения, 2– дихроическое зеркало, 3 – эмиссионный фильтр.

Сегодня такая простая система продолжает использоваться, но чаще для других целей. Если мы, например, используем лазер, нам не нужен фильтр для возбуждений. Тем не менее барьерный фильтр все равно необходим.

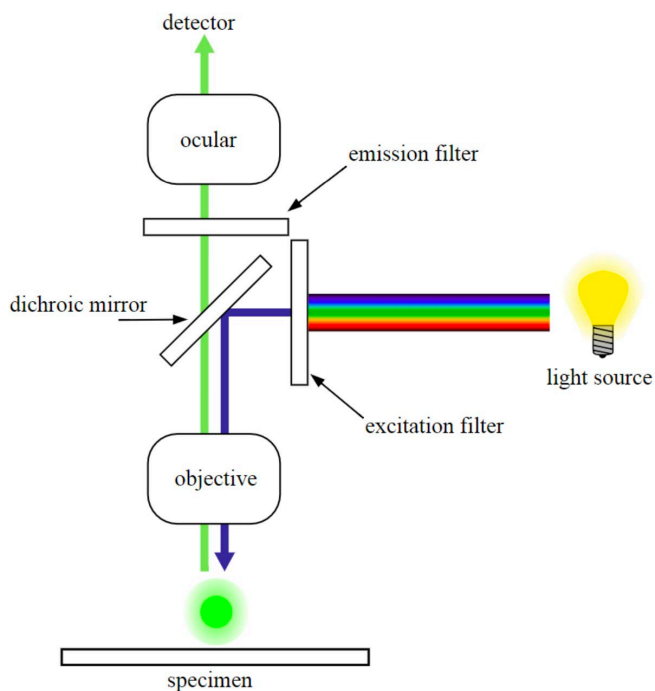


Рис. 10.7. Ходы лучей в флуоресцентном микроскопе.

II. Инвертированный микроскоп

Сегодня чаще всего флуоресцентный микроскопы являются инвертированными (рис. 10.8). Объектив расположен снизу, объектив находится в горизонтальной плоскости, сверху идет свет от обычного источника света (лампочки или светодиода) для того, чтобы увидеть изображение на просвет. Для изучения флуоресцентного изображения используется другой оптический путь, который чаще всего называется путем отраженного света.

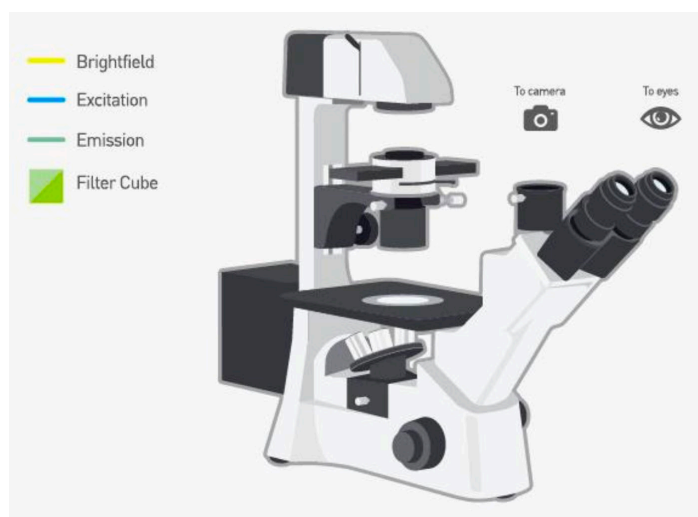


Рис. 10.8. Инвертированный флуоресцентный микроскоп.

На рис. 10.9 показаны спектры для конкретной системы. Синей линией обозначен спектр первого фильтра, который фильтрует возбуждающее излучение. Зеленой линией обозначен коэффициент прохождения в зависимости от длины волны для дихроического зеркала. Красным цветом показан эмиссионный спектр. На рисунке не хватает спектров падающего излучения: если это лазер, то он будет узким, а если светодиод – довольно широким.

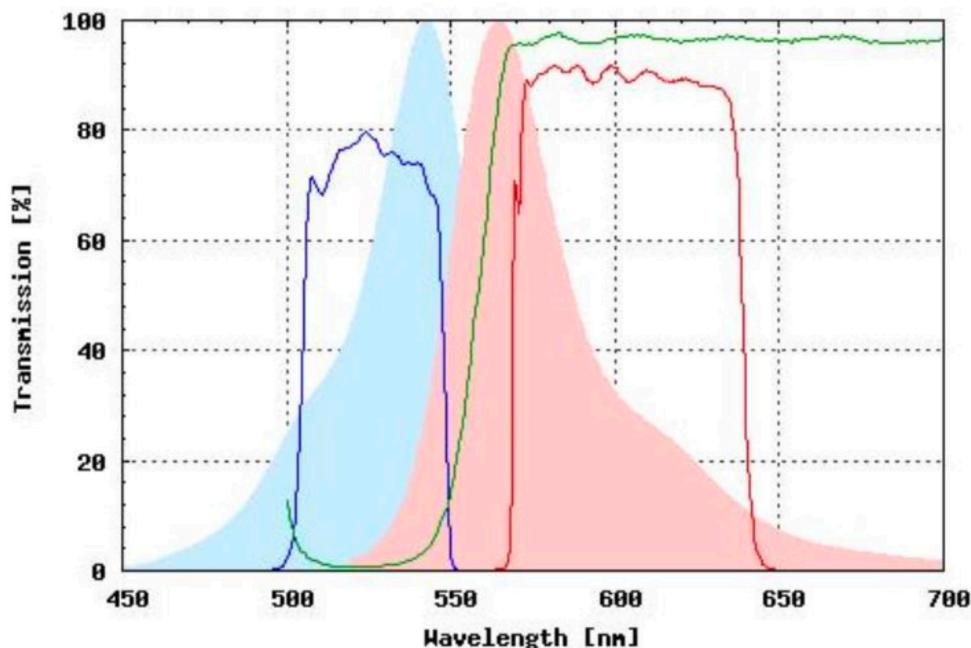


Рис. 10.9. Спектры различных фильтров

Подобрать систему фильтров, как на рис. 10.9 для конкретной молекулы – это довольно непростая задача, но сегодня это настолько развито, что известно несколько характерных каналов флуоресценции.

Основные типы освещения системы

- Широкопольный тип (эпифлуоресценция) – рис. 10.10а. Классический вариант, имеющий много недостатков. Основной заключается в том, что флуоресценция возбуждается сразу в огромном количестве молекул, и все они будут давать фоновый сигнал.
- Фокусированный тип (конфокальный микроскоп, мультифотонное возбуждение) – рис. 10.10б. Параллельный пучок фокусируется объективом в фокальной плоскости в отдельную точку, поэтому флуоресцентная будет возбуждаться преимущественно в этой области.
- Облучение в режиме полного внутреннего отражения – рис. 10.10с. Свет подается на границу раздела так, чтобы он полностью отражался, то есть падать под углом больше, чем критический угол полного внутреннего отражения. Внутри образца при этом будет возникать исчезающее поле, амплитуда которого

экспоненциально затухает с глубиной в толще образца. Характерная длина проникновения составляет от половины до четверти длины волны – 100-200 нм. Вектор Умова-Пойнтинга при этом равен нулю., тем не менее молекулы флуоресцируют. Это удобно для того, чтобы не видеть фонового излучения в толще. Это так называемый режим TERF (Total Internal Reflection).

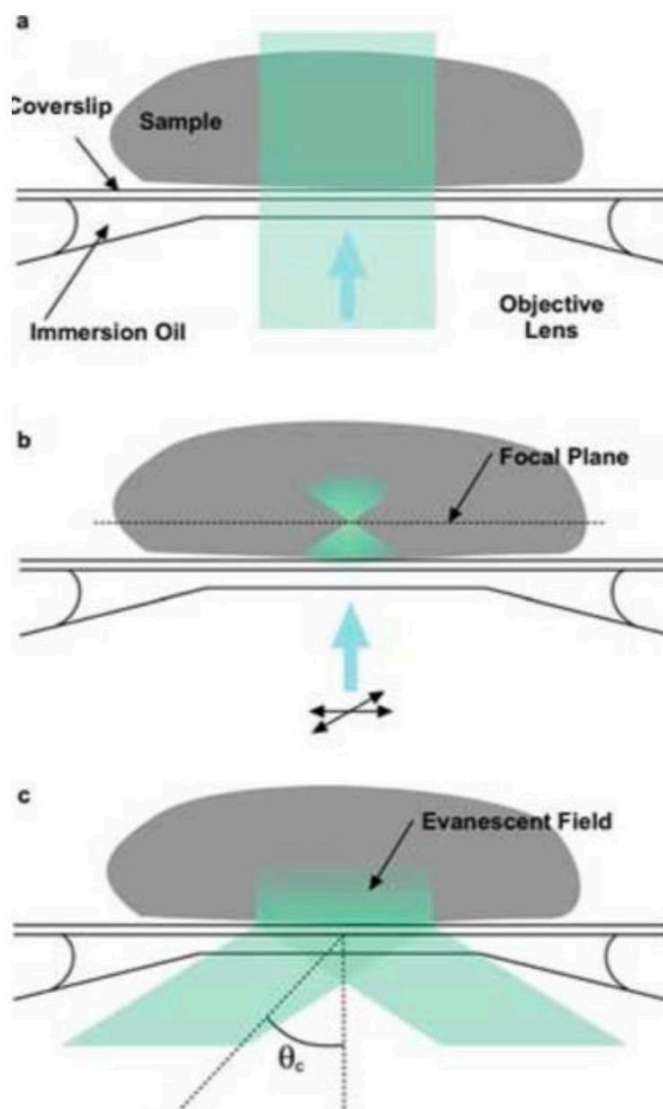


Рис. 10.10. Типы освещения образца.

III. Микроскопия световых листов

С помощью цилиндрической линзы формируется тонкий световой лист (рис. 10.11) толщиной около 0.5 мкм. Этот оптический лист условно «разрезает», т.е. проходит сквозь образец и возбуждает флуоресценцию. Объектив располагается под прямым углом к этому листу, что позволяет наблюдать с его помощью все флуоресценцию.

Этот подход позволяет очень быстро, например, сканировать образец по толщине: просто меняя положение листа и получая полную картинку флуоресценции в данном оптическом срезе.



Рис. 10.11. Light Sheet Microscopy.

Лекция 11. Флуоресцентная микроскопия. Часть 2.

Сравнение конфокальной и широкополосной микроскопии

Если используем широкий пучок, то происходит наложение сигналов с самых разных слоев, даже с тех, что находятся не в фокусе. В результате получаются размытые изображения (рис. 11.1), если сигнал достаточно широкий по сравнению с глубиной резкости нашего объектива.

Для того же самого объекта в конфокальном режиме хорошо видны два канала флуоресценции (разные длины волн) и граница. Если делаем тонкий конфокальный оптический срез, то хорошо видная структура в заданном сечении.

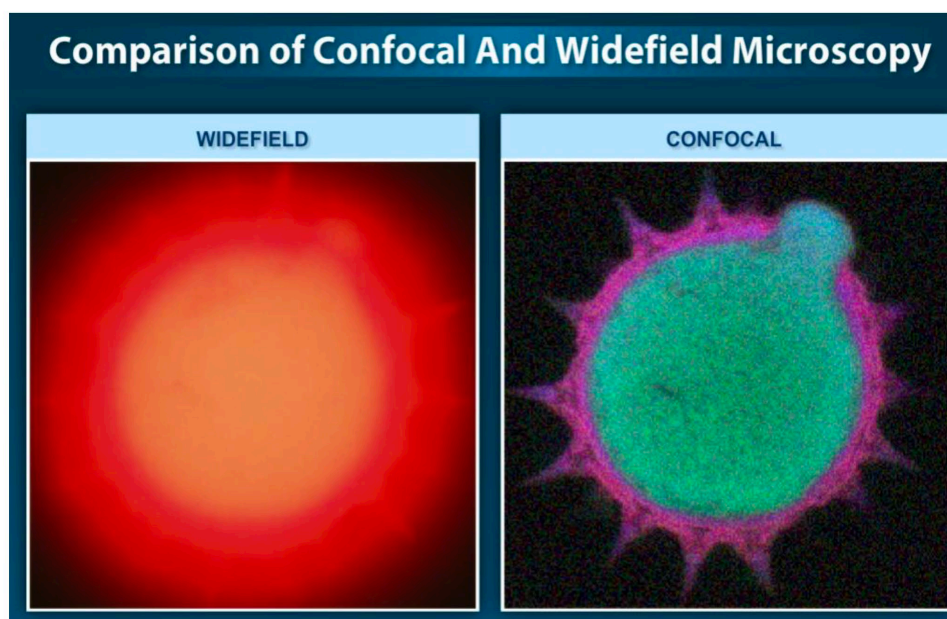


Рис. 11.1. Сравнение конфокальной и широкопольной микроскопии.

Тем не менее, есть задачи, для которых не обязательно использовать конфокальный режим. Например, если толщина клетки порядка 1 мкм или меньше, то конфокальную микроскопию использовать совершенно не обязательно, можно ограничиться эпифлуоресцентными изображениями.

На рис. 11.2 изображены тромбоциты, покрашенные мипокрином, которая заходит в плотные гранулы и прокрашивает их. В случае использования DIC изображения в канале на просвет видны контуры этих клеток (рис. 11.2б), в случае флуоресцентного изображения внутри клеток видны точки (рис. 11.2а) – гранулы, которые далее могут секретироваться. Если посмотреть, то будет видно в реальном времени, как после добавления в систему активатора, приводящего к тому, что клетка начинает выбрасывать плотные гранулы, эти гранулы начинают гаснуть, а их общее количество начинает уменьшаться. Можно наблюдать, как происходит этот процесс у

различных клеток. Например, тромбоцит всегда выбрасывает гранулы группами, а не по одной.

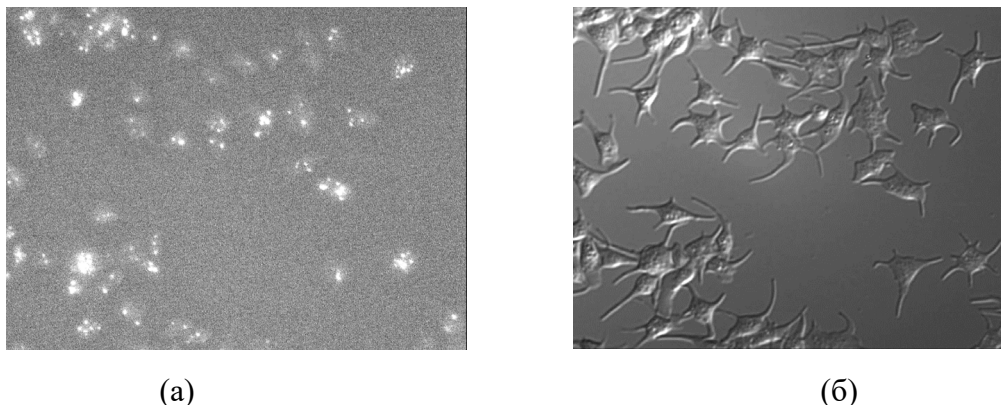


Рис. 11.2. Тромбоциты, окрашенные мипокрином: (а) флуоресцентное изображение; (б) DIC изображение (дифференциальный интерференционный контраст)

Конфокальные сечения и срезы

На рис. 11.3 видны агрегаты из клеток, которые формируют тромб. Для получения тромбов кровь пропускается через специальную систему, где есть активаторы тромбообразования. В зеленом канале показана флуоресценция отдельных клеток. Краска заходит в том числе в митохондрии тромбоцитов и прокрашивает не контура клеток, а их внутренние части. Конфокальный срез получен на определенной высоте над поверхностью, где происходит образование тромба. Если менять положение объектива по главной оптической оси z , перпендикулярной плоскости среза, то сможем получать изображения на разных высотах агрегата. На рис. 11.3 как раз показана обработка таких изображений – множества двумерных картинок на разных плоскостях.

Эти циклы могут повторяться много раз. Зная высоту, картинки можно объединить: первый ползунок – канал флуоресценции, второй – высота, третий – момент времени. Следует помнить, что цвет выбран искусственно, камеры не являются чувствительными к цвету! Можно посмотреть, как сечение меняется во времени по мере того, как тромб растет в реальном времени.

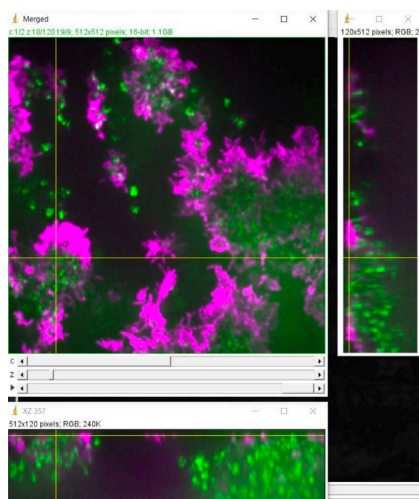


Рис. 11.3. Конфокальный срез агрегатов тромбоцитов. Справа показана плоскость z .

TIRF микроскопия - регистрация флуоресценции

На рис. 11.4 видно, как от поверхности воды отражается объект, в данном случае – морская черепаха. Несмотря на неровную поверхность воды, можно наблюдать такое явление: если свет идет к поверхности под достаточно большим углом падения, то происходит полное внутреннее отражение, если свет распространяется из более оптически плотной среды (вода) на границу с менее плотной средой (воздух).



Рис. 11.4. Явление полного внутреннего отражения.

В TIRF микроскопии система облучается под углом (рис. 10.10), при этом возникает экспоненциально спадающая световая волна, и флуоресценция возбуждается только в приповерхностном слое. Тогда в непосредственной близости от стекла можем посмотреть, как взаимодействуют молекулы белков с молекулой, иммобилизованной на поверхности (например, ДНК).

С помощью этого метода была показана замечательная с точки зрения биологии картина того, как белки могут взаимодействовать с молекулой ДНК. Существует задача определения физики поиска белками определенных сайтов на молекуле ДНК. В частности, важной задачей таких молекул, как транскрипционные факторы, является

задача узнать определенное место на поверхности молекулы ДНК – так называемый *промоутерный участок* и запустить процесс транскрипции. Клетка имеет длину в несколько метров и хитро уложена в трехмерном пространстве, поэтому задача, вообще говоря, достаточно сложна.

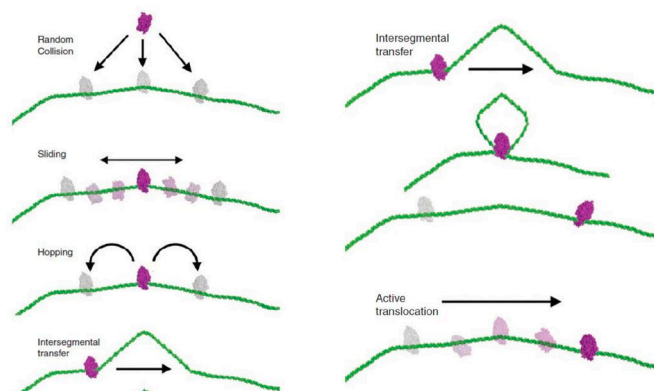


Рис. 11.5. Способы диффузии белка вдоль молекулы ДНК

Решение было таким: молекула ДНК использует не поиск в трехмерном пространстве путем случайного броунирования, а путешествует вдоль молекулы (случайно или направленно), т.е. размерность поиска снижается. Получается одномерная диффузия вдоль молекулы ДНК (см рис. 11.5). Оказывается, большинство белков перемещается таким образом, что было показано именно с помощью TIRF-микроскопии (рис 11.6). Было видно, что молекула долго находится вдоль поверхностного слоя и движется вдоль линии.

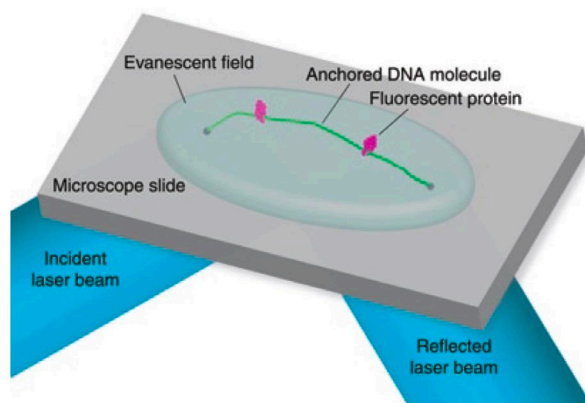


Рис. 11.6. DNA-protein interaction: TIRF insight.

Флуоресцентные красители

На сегодняшний день существует множество видов флуоресцентных красителей, например, на рис. 11.7. Специфичность можно получить, если, например, молекула накапливается в определенных гранулах клетки. Для мипокрина (рис. 11.2) оказалось, что в тромбоците в плотных гранулах достаточно кислый pH, и если молекула туда

заходит, то протонируется, и скорость выхода наружу становится меньше. К сожалению, молекулы сами по себе редко накапливаются в отдельных областях клетки.

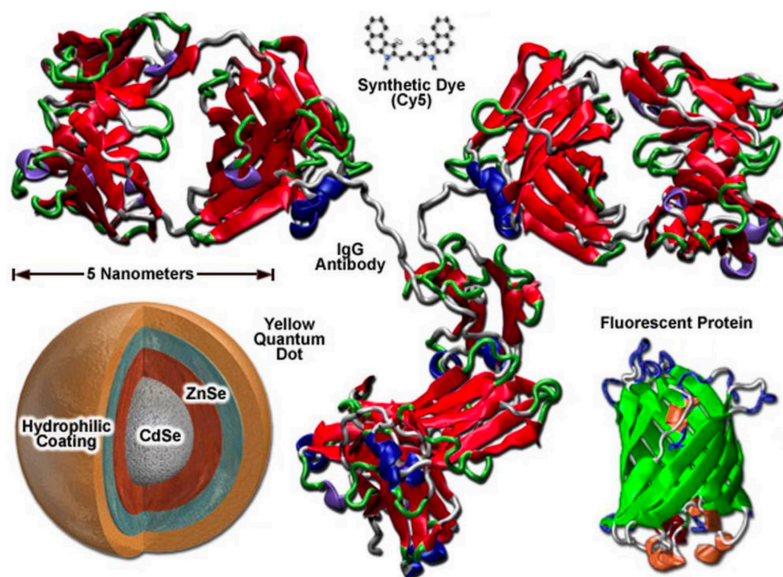


Рис. 11.7. Меченое флуоресцентной меткой антитело, флуоресцентный белок.

Решение: химически пришить флуоресцентную молекулу к какому-нибудь белку, который будет давать специфичность, например антителу к определенному интересующему белку (рис.11.7). Меченые антитела добавляют в систему и смотрят, где они накапливаются, что позволяет сделать вывод о местоположении самого белка. Ограничение: для живой клетки можно визуализировать только поверхностные белки, т.к. огромное антитело не пройдет через клеточную мембрану.

Решения при необходимости исследовать внутреннюю структуру живой клетки:

1) Использование флуоресцентных белков – GFP (green fluorescent protein), рис. 11.7. За счет химической реакции происходит преобразование обычного аминокислотного остатка во флуоресцирующий. Внутри белка находится флуорофор, окруженный каркасом из бета-слоев. С помощью генных манипуляций можно внести в клетку ген, содержащий не только интересующий белок, но и ген зеленого флуоресцентного белка через некоторый линкер (рис. 11.8). В итоге внутри клетки к белку будет приделан зеленый флуоресцирующий белок, и станет видно, где расположен белок, как меняется его динамика, экспрессируется или нет и т.д. Если линкер, соединяющий основной белок и GFP, достаточно длинный, то наличие дополнительного флуоресцентного белка не произведет значительных изменений в молекуле.

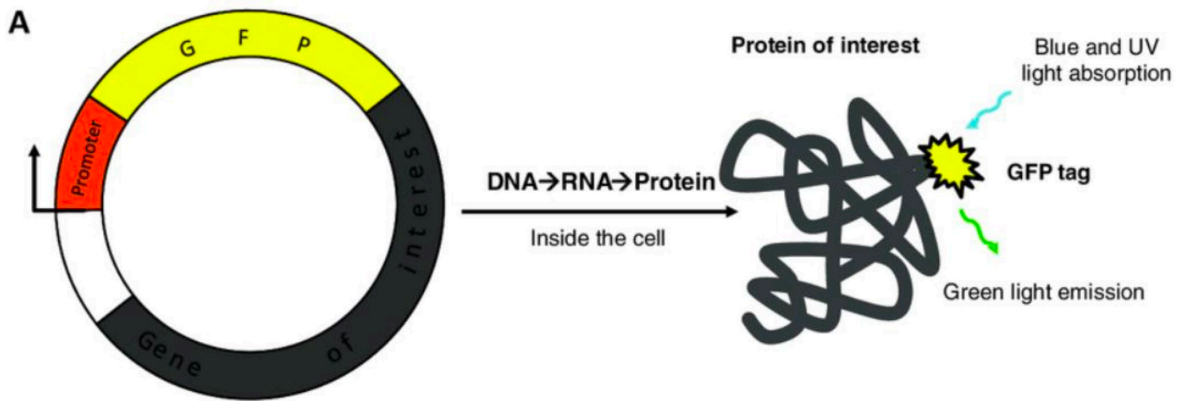


Рис. 11.8 GFP-tag https://www.researchgate.net/figure/Fluorescence-labeling-using-the-GFP-tags-the-most-common-genetic-method-increasing-the_fig3_286220224

2) *SNAP-tag*, *CLIP-tag*. Прикрепляем специальный фермент, катализирующий реакцию соединения бензил-гуанина, с флуоресцентной меткой к белку (рис. 11.9). Фермент пришивается ковалентно, высвобождается гуанин, и получается система, где метка пришта к белку. Преимущество: синтетические флуорофоры намного более стабильны, чем быстро выгорающий в условиях живой клетки GFP.

3) *Квантовые точки* (рис. 11.7). Делаются из многослойных систем (рис.11.7), поскольку флуоресцирующие соединения достаточно токсичны для живых организмов, поэтому необходимо как-то обезопасить это. Существуют способы добиться специфичности флуоресценции, но все же подход используется реже других.

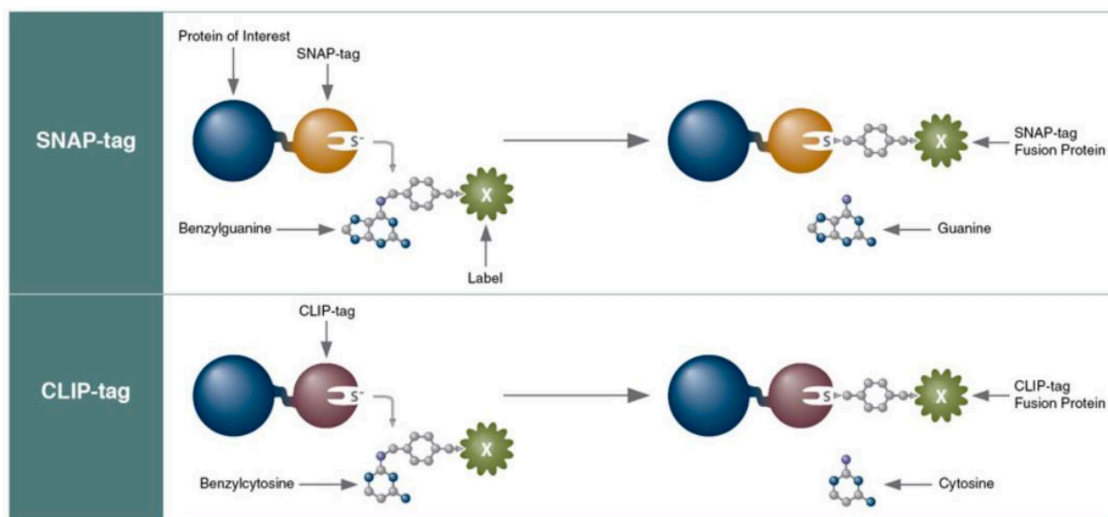


Рис. 11.9 SNAP & CLIP-tags <https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/snap-tag-technologies-novel-tools-to-study-protein-function>

Наиболее важные параметры флуорофоров

- *Спектральные характеристики:* максимум возбуждения флуоресценции, максимум эмиссии.
- *Яркость.* Произведение эффективности поглощения на квантовый выход флуоресценции:

$$B = \varepsilon^{fl} \varphi, \quad \text{где } \varphi = \frac{N^{fl}}{N^{abs}}. \quad (11.1)$$

В классическом случае величина (11.1) меньше единицы.

- *Фотостабильность* (рис. 11.10) – фактически, среднее число циклов возбуждения флуоресценции до того, как молекула необратимо «испортится», ее спектральные параметры изменятся слишком сильно, и молекулу перестанет быть видно.
- *Время жизни флуоресценции.*

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

Рис. 11.10. Стабильность для ключевых типов флуоресцентных систем: число циклов до выгорания.

На рис. 11.10 маркер клеточной смерти Annexin V был конъюгирован флуорофором AlexaFluor647 (647 нм – длина волны максимума флуоресценции). По мере того, как растет тромб, клетки начинают выходить наружу на поверхность тромба, а сигнал становится все менее и менее ярким.

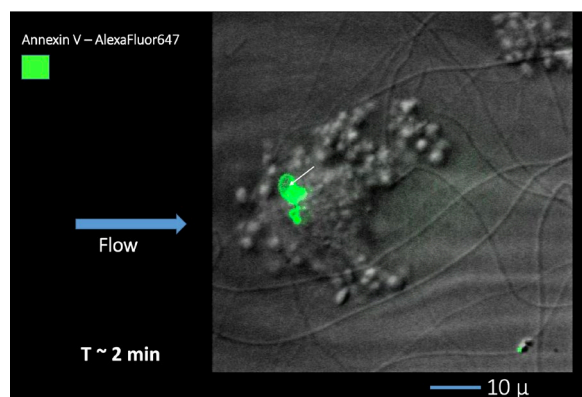


Рис. 11.11. Умирающие клетки внутри тромба.

Для некоторых задач выгорание может оказывать положительное влияние, например можно наблюдать вновь прибывающие тромбоциты, проанализировать скорость движения отдельной клетки и контракции – уплотнения сгустка.

Синтетические флуорофоры

Существует множество типов и разновидностей, подбираемых в зависимости от необходимых длин волн возбуждения. Наиболее часто используются:

- Семейство цианинов – Cy5, Cy3 (рис. 11.12b);
- Семейство флуорофоров – Alexa Flour 488 (рис. 11.12a);

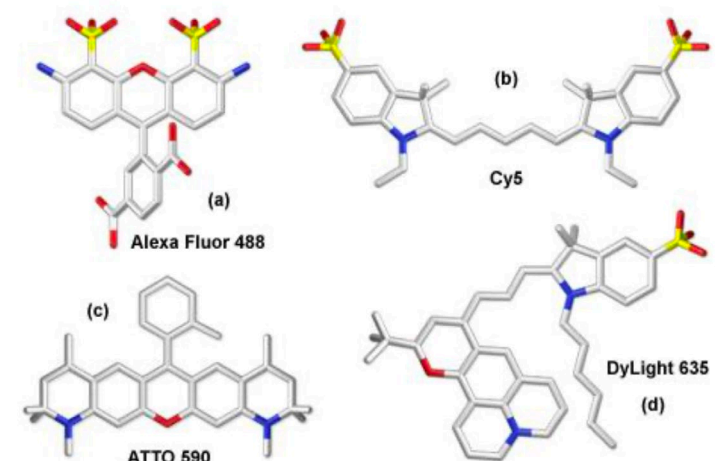


Рис. 11.12 Синтетические флуорофоры.

Зеленый флуоресцентный белок

Если разрезать «бочонок» на рис. 11.13, видна альфа-спираль и формирующийся в определенном месте флуорофор, вокруг всего желтые бета-слои. В настоящее время существует множество вариантов белков, которые сильно отличаются от «дикого» типа, изначального обнаруженного в медузе (рис. 11.13б). В ней есть белок аквариан, в котором возможно окисление люциферина (синим цветом) – широкого класса молекул, которые могут переводиться в возбуждённое состояние другими молекулами люциферазами (АТФ + кислород). Акварин перебрасывает молекулу в возбужденное состояние за счет химической реакции. Возбуждения переносится на молекулу GFP, и энергия возбуждения высвобождается дальше в молекуле с помощью зеленого света.

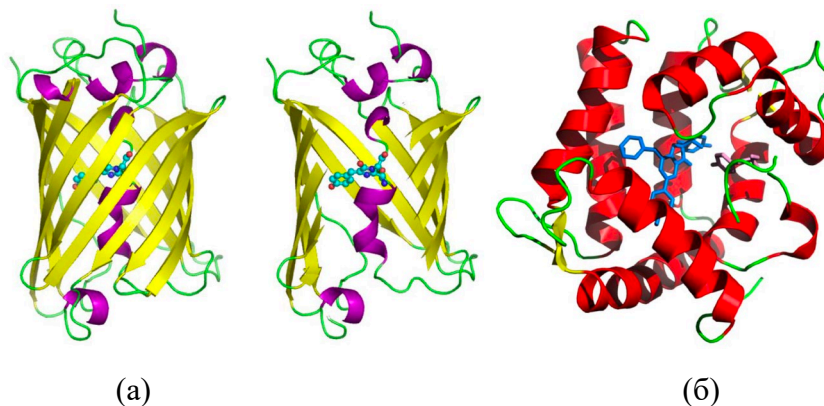


Рис. 11.13. (а) GFP: CFP, YFP etc. (б) Aequorin.

Зеленые флуоресцентные красители можно использовать в качестве так называемых зондов. Например, кальциевый зонд позволяет определять концентрацию кальция в цитозоле клетки. Для определенных молекул, если они связываются с кальцием, их спектральные характеристики довольно сильно меняются. Тогда, определяя интенсивность флуоресценции при возбуждении определенной длины волны, можно посмотреть, сколько свободного кальция находится внутри клеток.

Медуза, из которых был получен GFP, живут довольно глубоко при достаточном высоком давлении. На рис. 11.14а показан спектр дикого типа зеленого флуоресцентного белка. Р. Тьен сделал одну аминокислотную замену в 65 позиции, что сильно изменило спектр флуоресценции. Молекула стала более фотостабильна, выход флуоресценции при атмосферном давлении вырос, пропал второй пик для спектра поглощения, приблизив максимум возбуждения флуоресценции к 484 нм, что соответствует классической варианту флуорисцина.

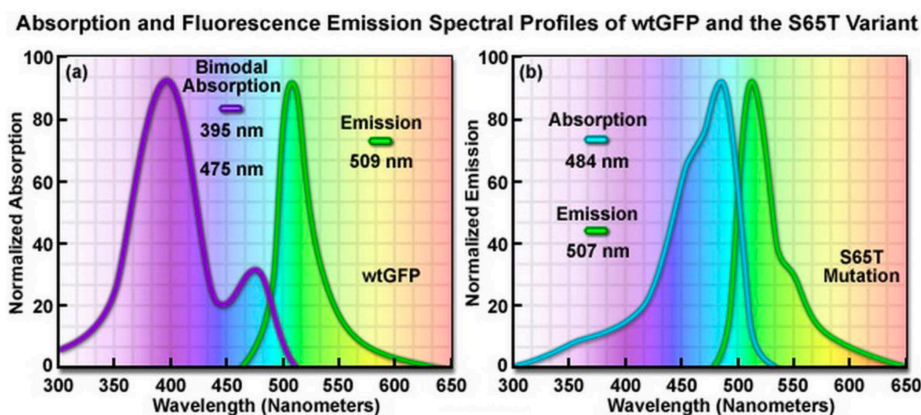


Рис. 11.14. Спектр (а) wtGFP, (б) S65T mutant.

За счет замен удалось создать огромное количество белков. Например, изображение на рис. 11.15 получено только с помощью разных флуоресцентных белков.

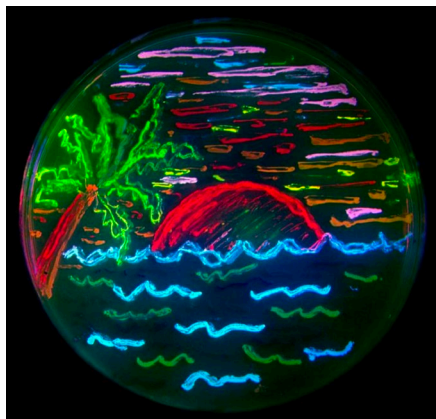


Рис. 11.15. разнообразие флуоресцентных белков.

В 2008 г. М. Chalfie, Roger Y. Tsien, Shimomura Osamu были награждены Нобелевской премией за работы с флуоресцентными белками.

В 2011 г. в Nature Photonics была опубликована статья о том, как можно сделать лазер на основе одной клетки, в которой находится GFP (рис. 11.16). Возможно использовать раствор с GFP в качестве активной среды, которую можно накачать до состояния, в котором возможно усиление и режим генерации. В спектре видна узкие пики, которые зависят от параметра резонатора.

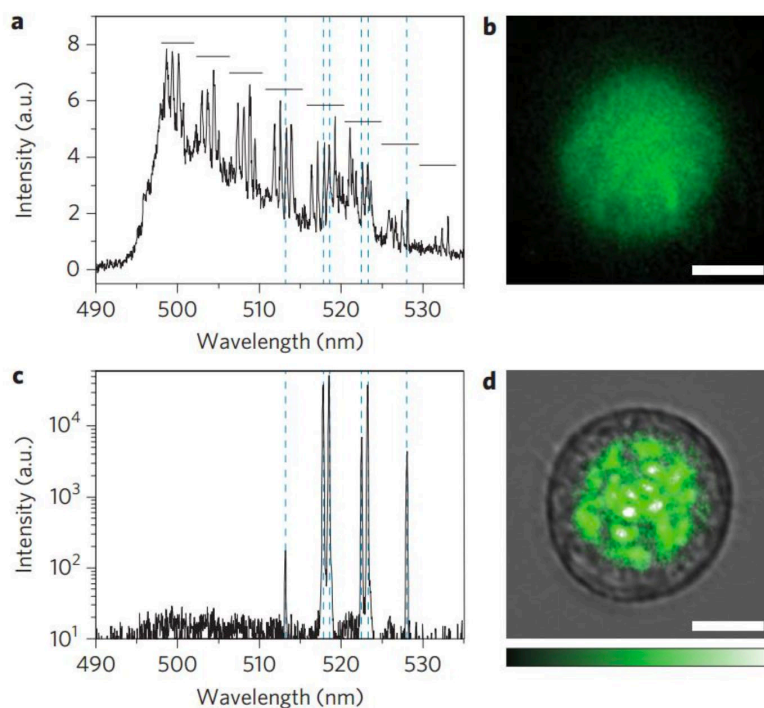


Рис. 11.16. GFP laser within the single cell. Gather, M.C. and Yun, S.H., 2011. Single-cell biological lasers. Nature Photonics, 5(7), p.406.

Режимы работы в рамках классической микроскопии (FRAP, FLIM, FRET)

Классические методы использования флуоресценции:

*Fluorescence Recovery After Photobleaching = FRAP (восстановление флуоресценции после фототушения)

*Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy = FLIM (получение изображения за счет измерения времени жизни флуоресценции).

*Förster Resonance Energy Transfer = FRET (резонансный перенос энергии)

I. FRAP

Если есть возможность в каком-то месте быстро перевести молекулы в состояние, когда они светятся, молекулы вообще говоря подвижны, и в этой области может происходить обмен молекул на те, что мы не потушили, то, измеряя кинетику флуоресценции можно определить мобильность молекул и их коэффициент диффузии. На рис. 11.17 показано изображение, полученное с помощью конфокального сканирующего микроскопа. Использовался флуоресцентный белок, который с помощью биоинженерных технологий был конъюгирован определенным белком, локализующимся в ядре клетки. С помощью увеличения интенсивности лазера, который освещает эту область, можно погасить светящееся пятно. Через 32 секунды погасшая область восстанавливается практически к тому состоянию, что было изначально. График изменения флуоресценции после тушения описывается перевернутой экспонентой, т.е. выходит на насыщение. Время половины восстановления пропорционально коэффициенту диффузии, т.к. восстановление флуоресценции происходит за счет диффузии: не потушенные молекулы из окружения проникают внутрь. Это происходит медленно, так как зависит от размера области.

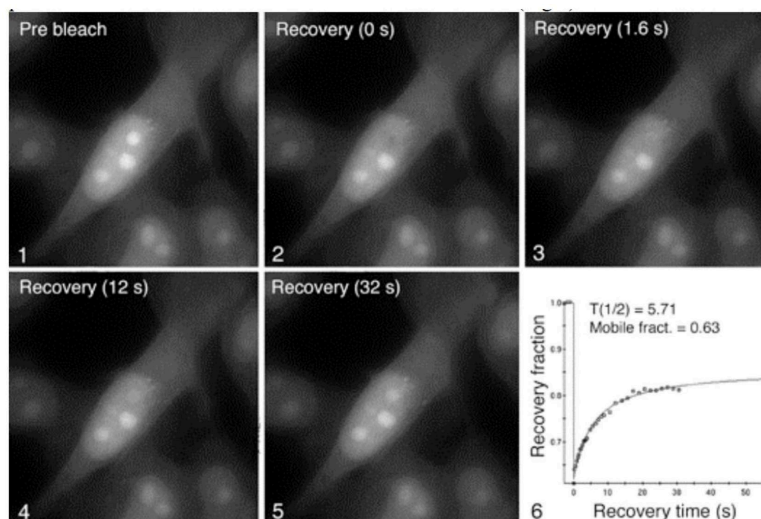


Рис. 11.17. Фототушение и измерение скорости восстановления.

FRAP используется для того, чтобы в том числе подбирать условия для кристаллизации мембранных белков с помощью липидных кубических мезофаз (см. рис. 2.12). Необходимо подобрать состав мезофазной смеси так, чтобы молекулы могли диффундировать в области, иначе белки никогда не начнут формировать кристалл в

новой фракции. Можно, подготавливая систему, светить на нее лазером, мерить времена восстановления флуоресценции для того, чтобы выяснить, когда диффузия достаточно интенсивна для формирования кристалла.

II. FLIM

Построение изображения с помощью процедуры измерения времени жизни флуоресценции. Молекула за счет поглощения переводится в возбужденное состояние не только с точки зрения электронного состояния, но и движения атомов. Далее за пикосекунды происходит релаксация в основное состояние электронного возбуждения, энергия чаще всего рассеивается в виде тепла. Далее, в основное состояние молекула может перейти либо с испусканием кванта света – флуоресценция, либо без излучения (non radiative transfer). Характерное время, за которое происходит процесс – порядка наносекунд. Тогда, если в каком-то объёме находятся молекулы, который были переведены в возбужденное электронное состояние, для них можно записать уравнение:

$$\frac{dN^*}{dt} = -(k_1 + k_2)N^*, \quad (11.2)$$

где N^* – количество молекул в возбужденном состоянии, k_1 – скорость перехода в основное состояние за счет флуоресценции, k_2 – скорость переходов, не являющихся излучательными. Решение уравнения (11.2):

$$N^* = N_0^* e^{-t(k_1+k_2)}. \quad (11.3)$$

Тогда время жизни флуоресценции:

$$\tau = \frac{1}{k_1 + k_2}. \quad (11.4)$$

Время τ составляет несколько наносекунд. Время жизни флуоресценции зависит от большого количества процессов, происходящих вокруг молекулы: концентрации солей, pH среды, наличия рядом молекулы, которая может принять энергию на себя и уменьшить тем самым время жизни. Поэтому, измеряя время жизни можно получать самую разную информацию: о локальном микроокружении молекулы, порождающее сигнал флуоресценции и наличии соседей, которые могут взять эту энергию на себя.

С помощью измерения времени флуоресценции можно разделить две молекулы с одинаковыми спектральными характеристиками, которые отличаются в плане молекулярного строения. Их нельзя разделить с точки зрения флуоресценции, т.к. сигнал просто складывается. Но, если их времена жизни флуоресценции разные, то, измеряя сигнал флуоресценции по (11.2):

$$I_f \sim k_1 N^*. \quad (11.5)$$

Если подробно посмотреть кинетику сигнала, то в случае, когда есть молекулы с разными временами жизни, в сигнале будут две экспоненты с разными решениями. Это

можно использовать для того, чтобы, например, определить соотношения концентрации разных веществ.

Детекция флуоресценции

Как измерить процесс спадания сигнала флуоресценции, происходящий на очень малых временах (наносекундах)? Многие показанные раньше изображения (прим. рис. 11.11) были получены с помощью камер, являющимися матрицами – CCD (Charge Couple Device) камера. Снятие изображения происходит достаточно медленно – в лучшем случае за миллисекунды, которые на 6 порядков отличаются от наносекунд.

Для решения проблемы можно использовать технологию *фотоумножителей* – приборов, которые работают с чрезвычайно высокой скоростью в режиме счета отдельных электронов. При этом необходимо сделать так, чтобы весь поток излучения от образца попадал на вход фотоумножительной трубки, т.к. мы интегрируем весь сигнал от образца и при этом с очень высокой скоростью можем снимать, как меняется общее количество фотонов во времени.

Для измерения времени жизни флуоресценции необходимо возбудить флуоресценцию мгновенно, а не освещать молекулу постоянно. Для этого используются *импульсные лазеры*. У большинства коммерческих импульсных лазеров интервалы между импульсами соответствуют ~10 наносекунд. Можно подать импульс, длительностью в 10-100 пикосекунд, на рис. 11.19 снизу зеленым цветом показано, как меняется интенсивность вспышки импульсного лазера. Сразу после начинаем измерять сигнал флуоресценции, который описывается экспоненциальной функцией, если есть только одна молекула, порождающая сигнал. Если оказывается, что сигнал с учетом степеней свободы описывается двумя экспонентами лучше, чем одной, то сигнал порождают два объекта с различными временами жизни флуоресценции.

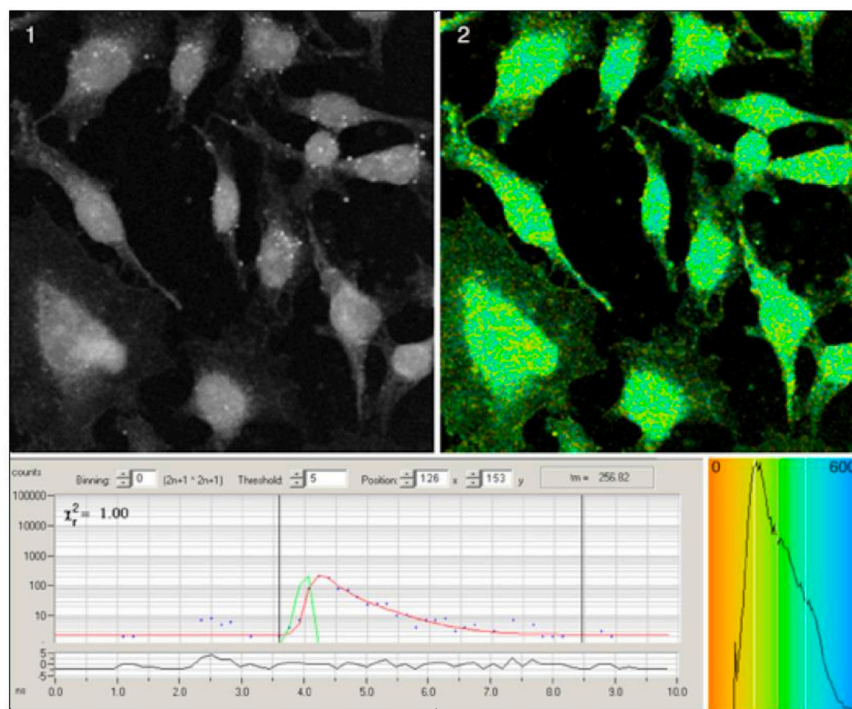


Рис. 11.19. FLIM.

Сигнал состоит из последовательности точек, которые снимаются каждые несколько десятков пикосекунд. Соответственно, на каждую точку изображения будем фокусировать пучок и настроим систему так, что весь свет флуоресценции попадает на фотомножительную трубку. Если длительность импульса 10 наносекунд, то всю процедуру необходимо повторить несколько раз, каждый раз измеряя время жизни флуоресценции посредством фитинга с некоторой ошибкой. Таким образом можно получить изображение флуоресценции слева на рис 11.19, и компьютерное изображение в режиме цветовой карты, где в каждой точке посчитано время жизни флуоресценции (рис. 11.19, справа). На ней видно, что в клетке есть зоны, в которых у молекулы время жизни флуоресценции увеличено, а есть зоны, где время жизни значительно меньше – возможно энергия куда-то мигрирует. На получение такой картинки уходит достаточно много времени, поэтому необходимо соблюдать баланс между пространственным разрешением и временным. (для измерения времени жизни).

III. FRET

Подход основан на Ферстеровском резонансном переносе энергии: если молекула переходит в возбужденное состояние, и рядом оказывается другая молекула со своим спектром и структурой уровней, которая может принять себе эту энергию, то далее она может флуоресцировать вместо первоначально возбуждённой (см. рис. 11.20).

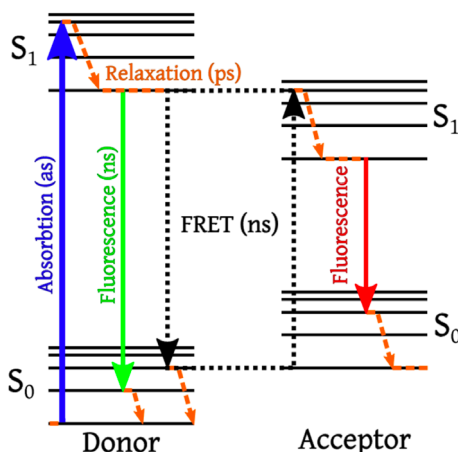


Рис. 11.20. Структура уровней FRET.

На рис. 11.21 это показано в виде двух молекул: голубой флуоресцентный белок CFP и желтый флуоресцентный белок YFP. Если белки оказываются достаточно друг от друга, то возбужденный синий белок будет просто флуоресцировать со своим квантовым выходом. Если молекулы находятся близко друг к другу, то становится возможным резонансный перенос энергии. Соответственно, молекулы возбуждаются с помощью длины волны синего света, а свечение будет желтого цвета. Таким образом, можно сделать вывод о том, находятся ли молекулы близко друг к другу. FRET реализуется на расстояниях меньше 10 нанометров, поэтому по наличию флуоресценции в канале акцептора можно косвенно сделать вывод о расстоянии между молекулами, которое сильно меньше длины волны света. В этом смысле можно преодолеть дифракционный барьер.

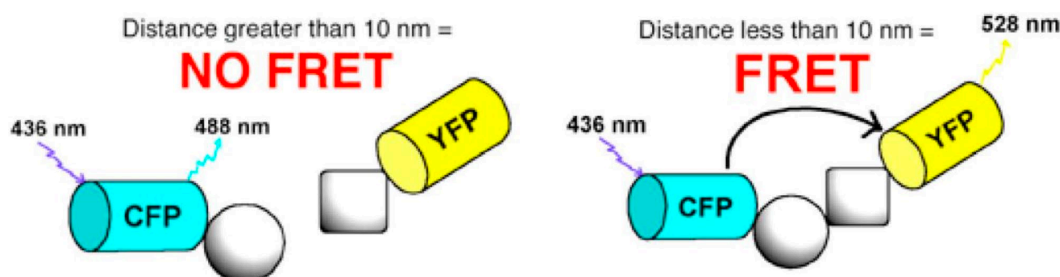


Рис. 11.21. FRET.

Особенности FRET:

- Сильная зависимость от расстояния между молекулами (эффективность передачи $\sim 1/R^6$). С точки зрения физики, механизм переноса – это диполь-дипольное взаимодействие. Оно очень быстро спадает с расстоянием (именно поэтому характерное расстояние порядка 10 нм).
- Зависит от спектрального перекрытия для спектров эмиссии донора и возбуждения акцептора, они должны совпадать.

- Зависит от относительной ориентации пары молекул. В зависимости от ориентации диполей в рамках классической физики один диполь соответствует дипольному моменту перехода. Этот диполь создает вокруг себя некоторое поле, которое индуцирует дипольный момент в другой молекуле. В зависимости от того, как ориентированы молекулы по отношению к дипольным моментам переходов, перенос энергии может происходить более или менее эффективно. Это связано с тем, что в направлении на вторую молекулы поле диполя может быть невелико.
- Безызлучательный перенос! Перенос происходит по механизму «виртуального фотона».

Основные способы регистрации FRET:

- FLIM-FRET – измерение времени жизни флуоресценции донора. Если оно начинает уменьшаться, то есть молекула, забирающая энергию.
- Фототушение акцептора (Acceptor photobleaching) – можно дать вспышку облучения, которая изменит спектральные характеристики акцептора, и он больше не сможет принимать энергию по механизму FRET. Тогда флуоресценция донора увеличится.
- Прямое измерение FRET сигнала в канале акцептора флуоресценции. В основном используется этот метод.

Фототушение акцептора:

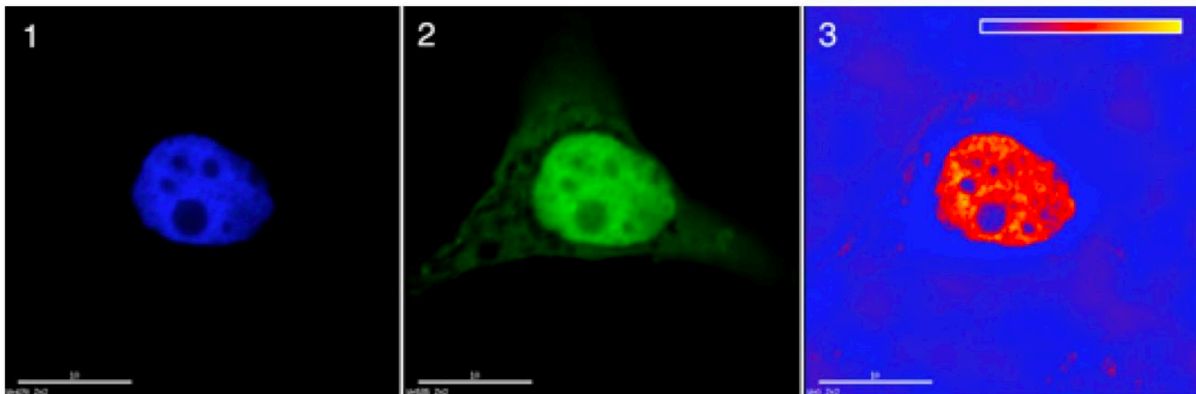
- Измерение флуоресценции в канале донора.
- Фотообесцвечивание акцептора с использованием соответствующего импульса света.
- Повторение измерения флуоресценции в донорском канале.
- *Недостатки:* фотоповреждения, наличие FRAP (восстановление концентрации акцептора), наличие акцепторного сигнала.

Прямое измерение FRET с помощью канала акцептора. Для того, чтобы аккуратно убедиться в том, что снимается именно сигнал FRET, нужно сделать три образца:

1. Образец, в котором есть только донор, для того, чтобы изучить и определить интенсивность флуоресценции в таком случае (рис. 11.22а).
2. Образец, в котором есть только акцептор (рис. 11.22б). Знаем, что акцептор может возбуждаться при возбуждении донора. Из-за того, что спектры имеют ширину, сложно сделать так, чтобы интенсивность флуоресценции была связана исключительно с FRET – всегда будет фоновый сигнал из-за акцептора возбуждения напрямую.

3. Образец, где есть и донор, и акцептор (рис. 11.22в). Возбуждаем флуоресценцию в канале донора снимаем флуоресценцию в канале акцептора.

Тогда, чтобы получить сигнал FRET, вычитаем из третьего рисунка первый и второй. Так получаем все фоновые сигналы, и в таком случае интенсивность флуоресценции объясняется именно наличием донора и акцептора.



(a)

(б)

(в)

Рис. 11.22. Измерение FRET с помощью акцепторного канала.

Интенсивность FRET можно пересчитать в среднее расстояние между молекулами в соответствующих областях пространства.

Лекция 12. Флуоресцентная микроскопия. Часть 3.

Популярные FRET пары

Среди популярных FRET пар можно выделить краски *цианины* Cy3 и Cy5 (рис. 12.1). Cy3 выступает в качестве донора энергии и сдвинут в длинноволновую область, Cy5 является акцептором. Квантовый выход у Cy3 в PBS буфере довольно низкий, у Cy5 он значительно выше. Освещаем Cy3, используя свет, близкий к зеленому, и снимаем сигнал флуоресценции в области 650+ нанометров. Этот сигнал обеспечивается именно флуоресценцией тех молекул Cy5, которые находятся достаточно близко к молекуле Cy3, чтобы происходила миграция энергии, и был возможен переход.

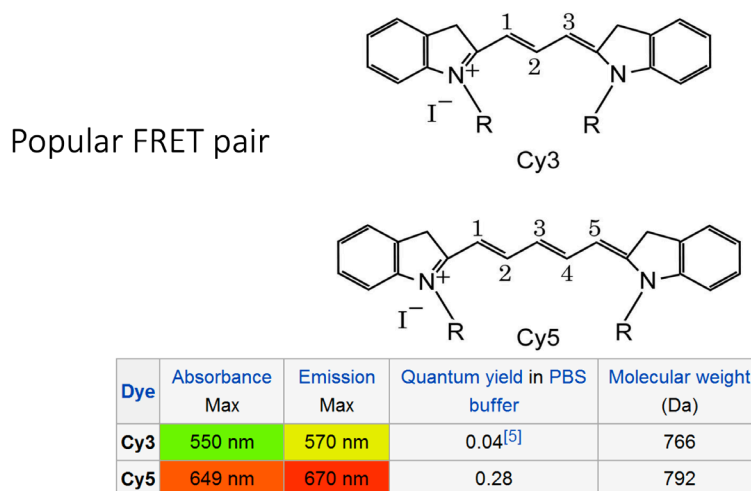


Рис. 12.1 Характеристики цианинов Cy3 и Cy5.

TIRF + FRET: HIV reverse transcriptase dynamics during interaction with template

Применения метода FRET позволяет решать такие задачи, как изучение динамики отдельных макромолекул в режиме реального времени и динамика взаимодействий этих макромолекул друг с другом. В работе используется такая молекулярная машина, как обратная транскриптаза вируса иммунодефицита человека. Сегодня про его устройство, регуляцию жизненного цикла и ключевые ферменты известно довольно много. ВИЧ, будучи ретровирусом, использует процесс обратной транскрипции, его генетический материал хранится в молекуле ДНК. Для того, чтобы встроиться в геном клетки хозяина, чаще всего это иммунные клетки организма, необходимо перевести молекулу ДНК в молекулу РНК, т.е. осуществить процесс обратной транскрипции. На протяжении многих лет это считалось невозможным, но на настоящий момент известно, что даже в здоровой клетке процессы транскрипции могут играть довольно важную роль.

Естественным субстратом фермента являются нуклеиновые кислоты. Процесс создания молекулы ДНК из молекулы РНК довольно нетривиально. Например,

необходимо сделать двухцепочечную молекулу ДНК из одной цепи РНК. Оказывается, у фермента есть два каталитических сайта:

1. F site, который отвечает за реакцию полимеризации, т.е. синтеза ДНК по шаблону: в качестве шаблона выступает либо РНК, либо ДНК – вторая достраивается по принципу комплементарности, имея в качестве шаблона молекулу ДНК. На рис. 12.2 есть область, обозначаемая как F из-за сходства с человеческой ладонью: fingers – пальцы, thumb – большой палец, palm – ладонь. За счет движения «большого пальца», придерживаясь «ладонью» молекула может двигаться, достраивая комплементарную цепочку.

2. H site, отвечающий за область, в которой имеется активность РНК. Этот сайт способен гидролизовать фосфодиэфирные связи рибонуклеиновых кислот. Эта машина может либо достраивать, т.е. копировать, либо деградировать разрушая шаблон.

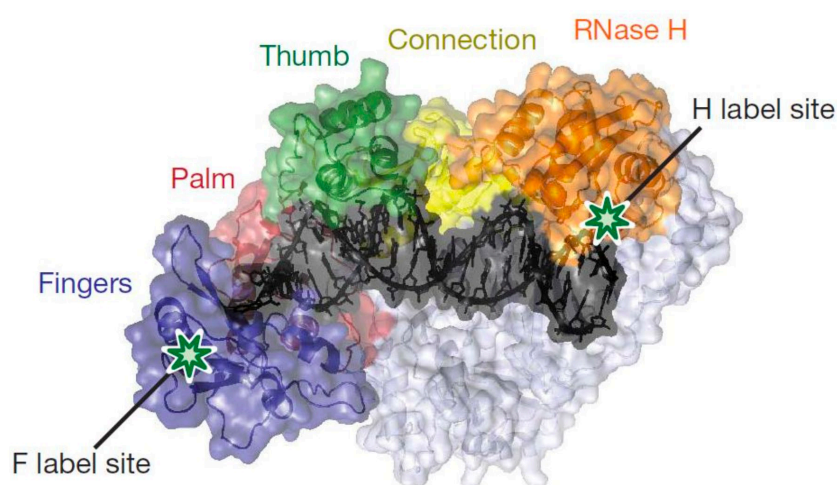


Рис. 12.2. Состав фермента обратной транскриптазы ВИЧ.

Люди давно пытаются понять, как эти процессы происходят в реальности: может ли молекула менять посадку, перепрыгивать, сколько есть вариантов взаимодействия с субстратом, и как это зависит от его состава (РНК+ДНК, ДНК+ДНК). Исследовать процесс необходимо для получения средства борьбы с ВИЧ, и ингибиторы работы этого фермента являются самым широким классом современных ретровирусных препаратов. Эти молекулы часто являются аналогом естественных нуклеозидов, которые, встраиваясь в цепочку, приводят к тому, что дальше синтез происходить не может. К сожалению, очень быстро возникают мутантные формы вируса, которые обходят эти нуклеотиды, выбирая естественные субстраты, возникает лекарственная устойчивость. Вопрос синтеза вещества, мешающего работе вируса, остается открытым.

FRET можно использовать для исследования машины вируса и ее взаимодействия с ее естественными субстратами. Для этого делается два типа ферментов с помощью отдельной технологии, позволяющей создать флуоресцентную

метку в определенном месте молекулы. В настоящее время эта задача решения с помощью методов биохимии. Можно получить ферменты двух типов: у одних флуоресцентная метка находится близи пальцев, где будет происходить синтез, а у других она будет располагаться там, где находится сайт РНК активности.

Далее необходимо продумать эксперимент так, чтобы можно было сделать вывод о конформации, т.е. о том, как садится молекула на свой субстрат. Для этого мы работаем в режиме TIRF (рис. 12.3): сверху падает свет под достаточно большим углом, возникает исчезающее поле, способное возбуждать флуоресценцию лишь в пограничном слое.

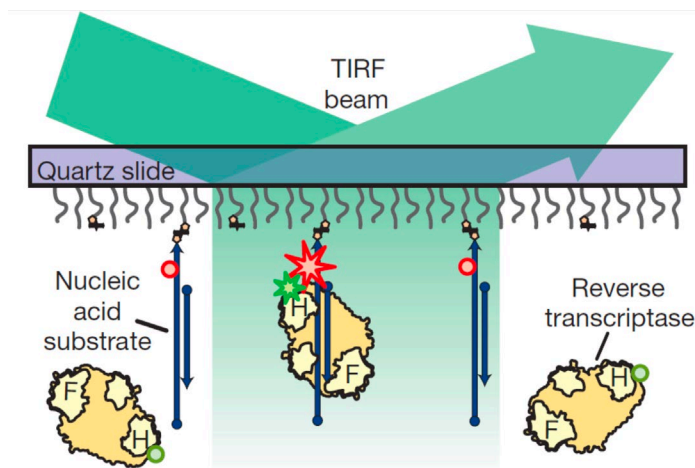


Рис. 12.3. Метод TIRF для исследования молекулы ВИЧ (Abbondanzieri, E.A., Bokinsky, G., Rausch, J.W., Zhang, J.X., Le Grice, S.F. and Zhuang, X., 2008. *Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. Nature*, 453(7192), p.184.).

Необходимо поместить флуоресцентную метку акцептор (краску у Cy5) на молекулу шаблона, т.е. нуклеиновых кислот, с которыми будет взаимодействовать фермент. Далее, по наличию или отсутствию сигнала FRET можно сделать вывод о том, насколько близко находится тот или иной сайт к соответствующей флуоресцентной метке, а следовательно, и о конформации молекулы по отношению к этому субстрату.

Метки можно делать в разных местах (рис. 12.4). Более короткая цепочка – это праймер, т.е. затравка, на которую садится фермент, пытаясь далее ее достраивать. Более длинная цепочка – основной шаблон, по которому происходит синтез комплементарной цепи (удлинение или пролонгация праймера).

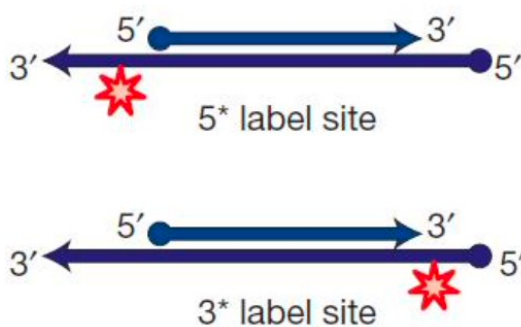


Рис. 12.4. Различные варианты расставления меток на ферменте.

На рис. 12.5 видно, что если облучать молекулу зеленым светом, в какой-то момент можно видеть сигнал флуоресценции (красным цветом). Если мы детектируем его, то можем сделать вывод о том, что близко к молекуле флуорофора Су5 находится молекула Су3. Соответственно, в зависимости от того, находится молекула на F или на H части фермента, можно сделать вывод о том, в какой конформации сейчас находится молекула на субстрате. Получается 4 комбинации: 2 варианта для фермента 2 варианта места, плюс ДНК или РНК находится в этой области (чем является праймер).

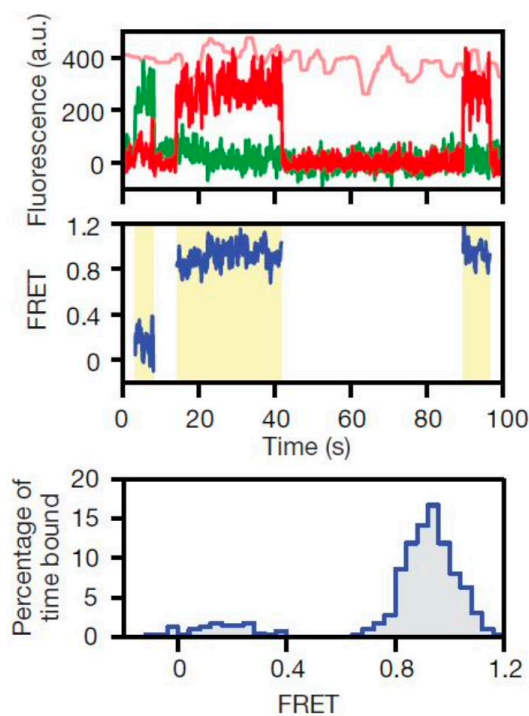


Рис. 12.5. FRET для фермента.

Исследователи изучали, в каких конформациях преимущественно находится эта молекула в зависимости от того, что используется в качестве праймера. На рис. 12.6 изображен классический случай, когда молекула работает в режиме достраивания цепочки праймером. Т.е. нуклеотиды достраиваются с -3' конца, поэтому полимеразный домен F находится с той же стороны. Если красная метка находилась

там же, где и домен с донором, получается зарегистрировать сигнал FRET. Он часто откладывается в виде гистограмм в виде распределения сигнала интенсивности, где уровень сигнала. 1 – это максимальный, 0 – это минимальный. Если его горб виден в области высоких значений, то эти молекулы находятся близко, и можно сделать вывод о конформации. Если акцептор находится вблизи F, а молекула находится в таком же состоянии по отношению к субстрату, то сигнала FRET не будет, а гистограмма будет сдвинута в область малых значений (рис. 12.6b). Если метка и акцептор находятся со стороны F, то ожидается высокий сигнал (рис. 12.6e).

Таким образом, в зависимости от положения красок, мы будем регистрировать разные сигналы FRET, такой анализ позволил сделать вывод об устройстве молекулы. Она способна перепрыгивать с одной конформации на другую и менять активность – достраивать, перевернуться, расщеплять. Частота перепрыгивания зависит от того, конкретной последовательности ДНК или РНК.

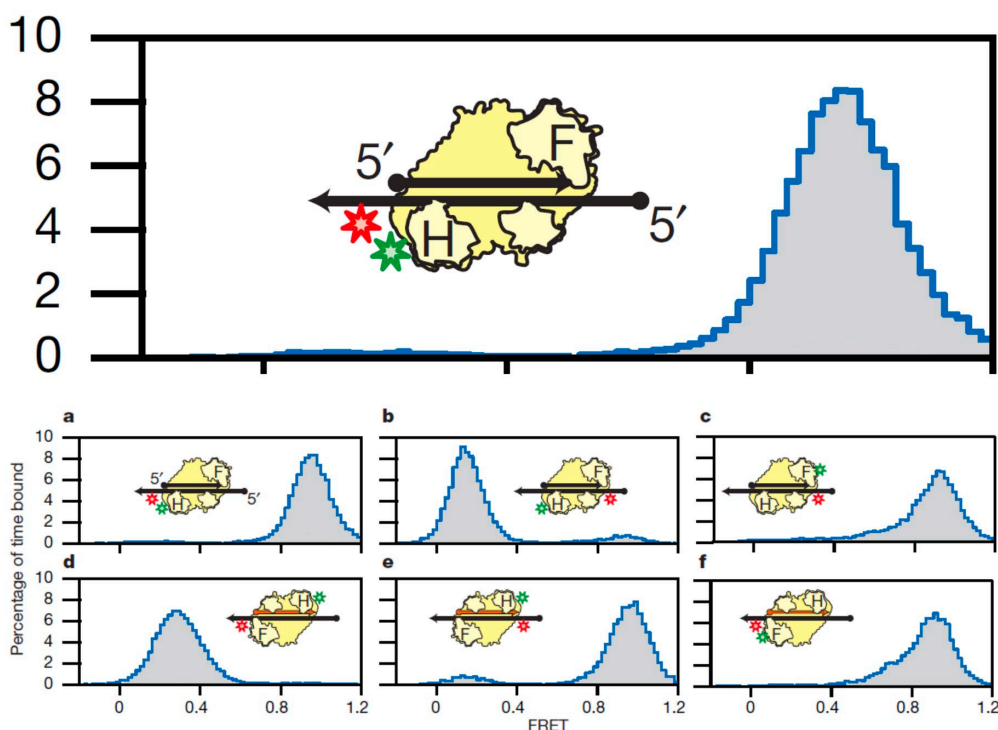


Рис. 12.6. Гистограммы для различных посадок флуоресцентной метки и акцептора.

Силовая спектроскопия с помощью ДНК оригами при постоянной силе

О методе была опубликована статья «Molecular force spectroscopy with DNA origami-based nanoscopic force clamp» (Nickels P.C., etc.). Он позволяет выделить силовые характеристики по сигналу FRET. Силовая спектроскопия делается с помощью лазерного пинцета. Его проблема – это очень низкая серийность. В каждый момент времени можно регистрировать сигнал только от одной молекулы, но для статистического изучения большого количества молекул необходимо ставить огромное количество экспериментов.

Новый метод предлагает генерировать силу не за счет лазерного пинцета, а за счет ДНК оригами – из двуспиральных молекул ДНК можно делать трехмерные конструкции. На рис. 12.7В в «тисках» продета цепочка ДНК, внутри этой молекулы есть интересующий нас объект, который ковалентным образом необходимо пришить в нитке. За счет тепловых флуктуаций полимер стремится коллапсировать. Пусть имеется молекула, которую можно вытянуть, но при этом недостаточно жесткая, чтобы сохранять форму (рис. 12.7А). Если ее отпустить при конечной температуре, то за счет тепловых флуктуаций она начнет случайным образом сворачиваться и флуктуировать – возникнет энтропийная жесткость. Для того, чтобы распрямить этот случайно свернутый клубок, необходимо совершить некоторую работу, идущую на уменьшение энтропии молекулы в тепловой системе. Это происходит потому, что при уменьшении расстояния между концами молекулы уменьшается число возможных микросостояний, которые реализуют данное макросостояние. Из-за необходимости прикладывать силу для растяжения молекулы жесткость получила название *энтропийной жесткости*. Чем больше длина полимера, тем меньше энтропийная жесткость и силы, которые тянут молекулу. Соответственно, если молекула практически полностью вытянута, то и сила будет больше с обеих сторон (рис. 12.7В).

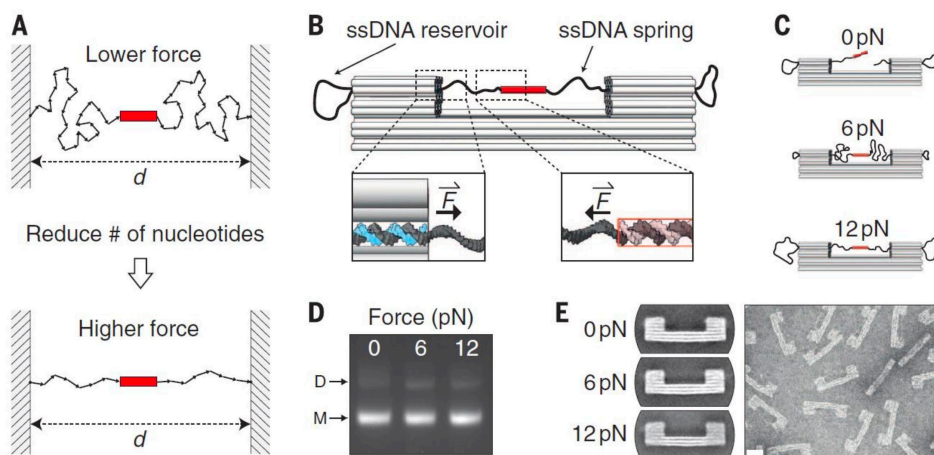


Рис. 12.7. Объединение FRET и биоинженерии.

Мы, по сути, сконструировали объект, который генерирует постоянное усилие само по себе. Регистрация протекающих процессов при этом осуществляется с помощью FRET. На рис. 12.7Е показаны электронно-микроскопические изображения «тисков» на подложке, внутри каждого из которых может быть молекула, испытывающая растягивающее усилие.

Разместим молекулу ДНК, содержащую специальную последовательность TATA-box, которая в генах часто играет роль промотора – узнается транскрипционными факторами, в ней собирается молекулярные машины РНК полимеразы и запускается процесс транскрипции. TATA-box узнается связывающим белком TBP (TATA binding protein), который индуцирует в молекуле довольно

сильный изгиб. Тогда, устанавливая FRET акцептор и FRET донор и облучая систему светом, мы сможем увидеть, что cFRET происходит только когда происходит острый изгиб. Можно оценить, как вероятность этого изгиба будет зависеть от приложенной силы.

На рис. 12.7D показано, как в зависимости от приложенной силы меняется сигнал FRET. Экспериментальная кривая выделена черным, красным – фитирование результатов. В области нулевых сил кривая имеет ярко выраженную двугорбую форму, поскольку молекулы находятся либо в вытянутой конформации, либо в сжатой (в таком случае есть сигнал FRET). По мере увеличения вероятность нахождения в изогнутом состоянии при большом сигнале FRET становится все меньше. По соотношению этих двух популяций можно посчитать вероятность изгиба и то, как она зависит от силы. Зависимость на рис. 12.7E соответствует экспоненциальной зависимости вероятности от силы, что неплохо описывается с помощью закона Бела. В данном случае величина, которая является экспериментальным параметром, имеет большую неопределенность.

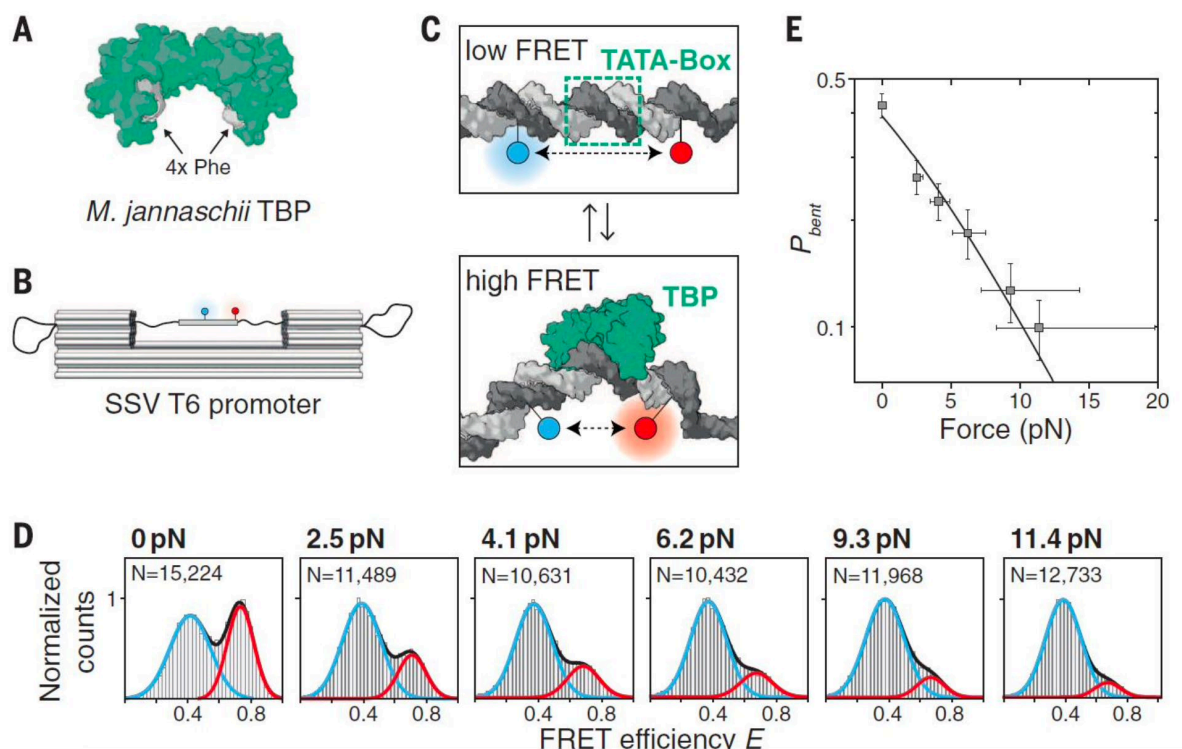


Рис. 12.8. Применение ДНК оригами для метода FRET.

FRET-based force sensor

Можно создать молекулярный сенсор силы с помощью технологий, связанных с использованием FRET, флуоресцентных меток, и специальных ДНК конструкций (рис. 12.9b). В них возникает вторичная структура (шпилька), которая может расплетаться, если к ней приложена достаточно большая сила. При этом переход

довольно кооперативный: На зависимости вероятность раскрытия от силы (рис. 12.9a) видно, что резкий рост вероятности происходит в достаточно низком диапазоне и определяется GC составом в этой области. Чем больше GC пар, тем сложнее расплести молекулы. Меняя состав, можно менять характерную силу, при которой происходит раскрытие. Его можно использовать для регистрации сигнала флуоресценции. Если FRET пара находится в непосредственной близости друг к другу, то донор флуоресцирует слабо при близком расположении акцептора.

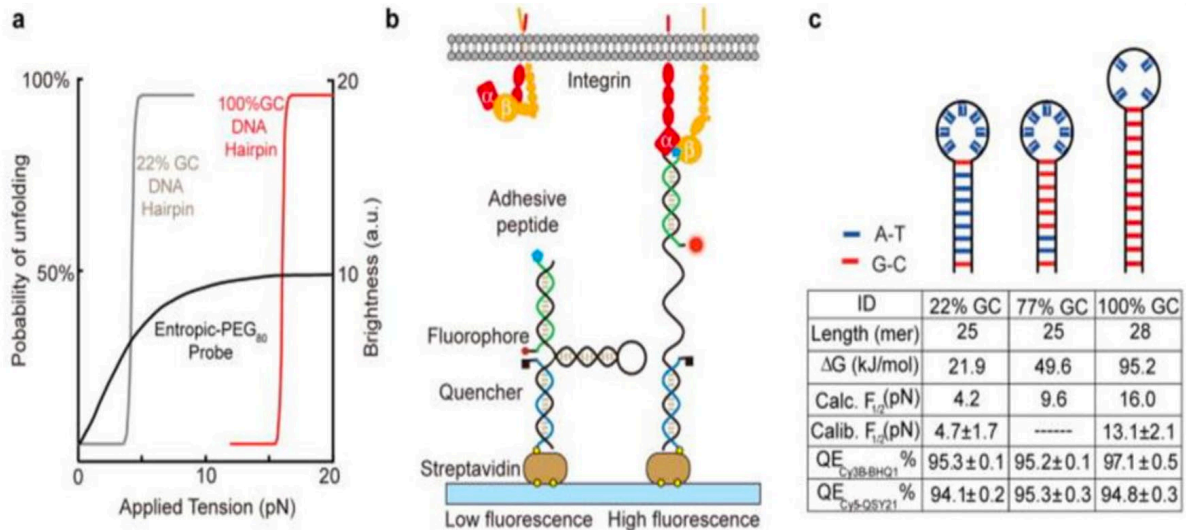


Рис. 12.9. FRET-based force sensor.

На этой конструкции можно разместить пептид, который будет взаимодействовать с интегринами на поверхности клетки. По мере того, как клетка взаимодействует с субстратом, мы сможем увидеть, где локализуются внутренние и другие силы натяжения. Если сила превышает некоторую заранее известную критическую величину, то сигнал флуоресценции резко возрастает. Это возможно увидеть с помощью сенсора на рис. 12.9.

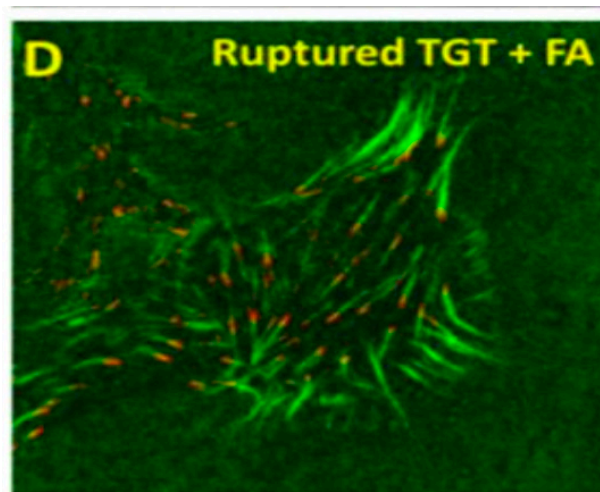


Рис. 12.10. Изображение локальных сил на основе FRET-based force sensor.

Показан сигнал флуоресценции в режиме DIC от клетки, которая взаимодействует с некоторой плоской поверхностью в большом количестве сенсоров. На рисунке хорошо видны области больших сил, так называемые участки stress fibers. Таким образом, метод позволяет изучать локальные силы в отдельных молекулах с помощью таких оптических явлений, как Ферстеровский резонансный перенос энергии.

Режимы возбуждения флуоресценции

Основные режимы возбуждения (см. рис. 10.10):

- Широкопольный тип (эпифлуоресценция).
- Фокусированный тип (конфокальный микроскоп, мультифотонное возбуждение).
- Облучение в режиме полного внутреннего отражения

В случае конфокального освещения работает несколько идей. Возбуждать флуоресценцию необходимо сфокусированным в фокальной плоскости светом. В зависимости от параметров оптической системы можно сфокусироваться в небольшое пятно, которое все же не может быть меньше половины длины волны из-за явления дифракции. Молекулы вблизи фокального пятна тоже будут возбуждаться, но в меньшей степени, и будут давать фоновый сигнал.

Тем не менее, конфокальная микроскопия позволяет отсеивать фоновый сигнал за счет конфокальных апертур. Эта апертура ставится на пути к детектору (рис. 12.11), которая отсекает весь свет, идущий не из фокуса (это так называемая сопряженная с плоскостью объекта плоскость). Свет, который идет от источников вне фокальной плоскости дефокусируется (обозначен пунктиром) и не проходит через апертуру.

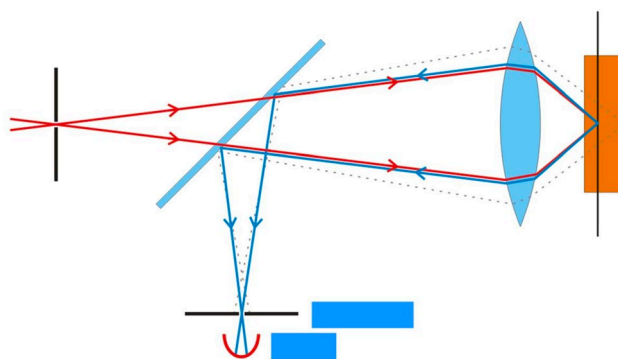


Рис. 12.11. Использование конфокальной апертуры.

Вообще говоря, необходимо сканировать отдельные точки системы для получения полного изображения. Поэтому, нужно понимать, что конфокальная микроскопия идейно довольно сильно отличается от классической эпифлуоресцентной микроскопии.

Выделяют две группы флуоресцентных микроскопов:

1. *Лазерные сканирующие конфокальные микроскопы.* Используется лазерный луч (красным цветом на рис. 12.11), возбуждающий излучение. Далее регистрируется, излучение, приходящее от объекта, отсекая весь лишний свет. В этом режиме с помощью специальных систем дефлекторов можно поточечно сканировать образец, в каждом месте измеряя в итоге именно интенсивность сигнала. Это делается с помощью хитрых систем, которые содержат не классические регистрирующие камеры CCD, а фотодетектор, который регистрирует полный поток приходящего света.
2. *Микроскопы, основанные на вращающихся дисках.* В данном случае используется не фотодетектор с полным потоком, а классическую матрицу со множеством ячеек, каждая из которых – пиксель на изображении (рис. 12.12). Для получения поточечного изображения система разделяет свет на отдельные сфокусированные пучки с помощью первого колеса с микролинзами. Сопряженное с ними, есть второе колесо с апертурами. Когда сфокусированный свет попадает на образец, возбуждается флуоресценция, далее свет возвращается и проходит через конфокальную апертуру. Тогда, даже если какие-то молекулы не в фокусе возбудились, за счет апертуры вклад интенсивности от них будет минимальным. Получившиеся пучки через систему линз и отдельные фильтры попадают на матрицу. Таким образом, если диск вращается, мы сможем получать много точек из разных мест образца.

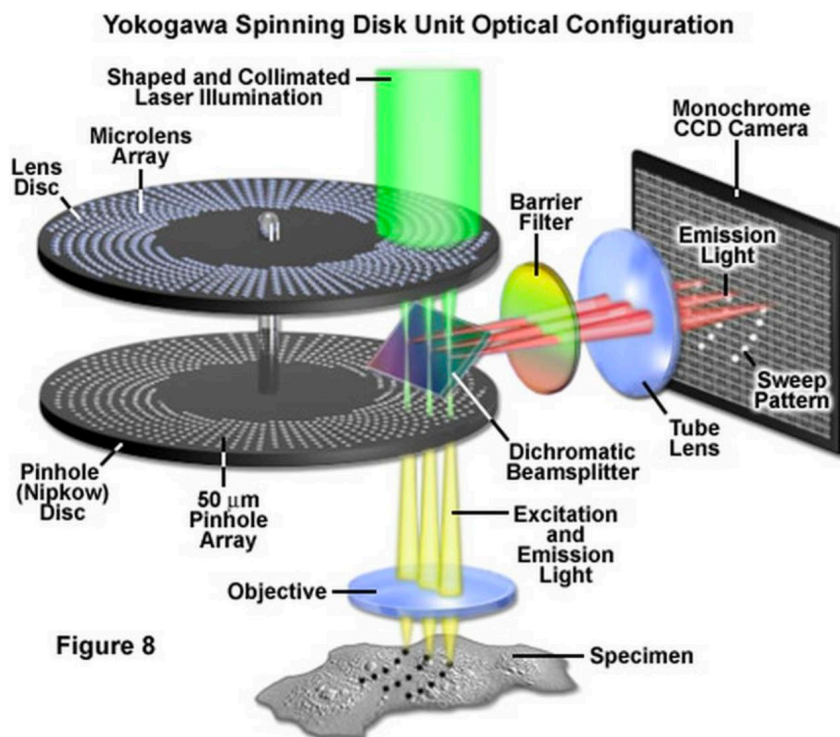


Рис. 12.12. Микроскоп на вращающихся дисках.

На рис. 12.13а изображение клетки, полученное при вращающемся диске, т.е. при некоторой выдержке (десятки миллисекунд) в случае для конфокальной микроскопии. За то время диск прокручивается несколько раз, давая усредненную картинку.

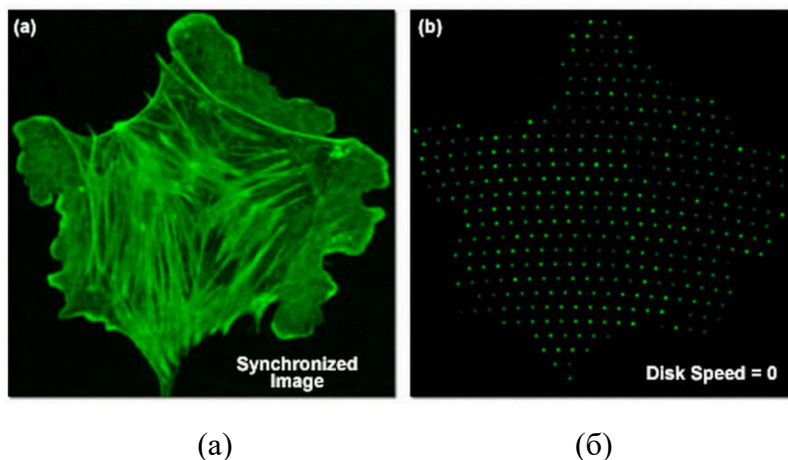


Рис. 12.13. Несинхронизированный захват изображения в памяти вращающегося диска.

Основная идея выглядит следующим образом:

1. Использование точечного освещения образца и дополнительной апертуры для устранения света от источников, расположенных не в фокусе объектива.
2. Пошаговое сканирование образца позволяет воссоздать трехмерную картину распределения интенсивности флуоресценции.
3. Использование апертуры, отсекающей «лишний» свет ведет к падению сигнала и, как следствие, необходимости в интенсивных источниках и длительной экспозиции.

До этого были рассмотрены положительные т.н. классические случаи, положительный Стоксов сдвиг (т.е. флуоресценция и длина ее волны больше длины волны света, который возбуждает эту флуоресценцию). Помимо этого, также существуют случаи, когда регистрируемое излучение по длине волны меньше излучения возбуждающего, к этому приводят следующие физические явления:

1. Многофотонное поглощение: нелинейный оптический эффект, связанный с тем, что перевести молекулу в возбужденное состояние можно не только с помощью одного кванта, который будет соответствовать разности энергетических уровней, но с помощью двух квантов, но которые будут поглощены одновременно. Если поглощается два кванта, для чего необходима чрезвычайно высокая плотность излучения, то может произойти переход на двухфотонное возбужденное состояние (рис.12.14). В мультифотонной микроскопии ультракороткий лазерный импульс (~100 фемтосекунд) при фокусировки

приводит к интенсивности поля, достаточной для мультифотонного возбуждения.

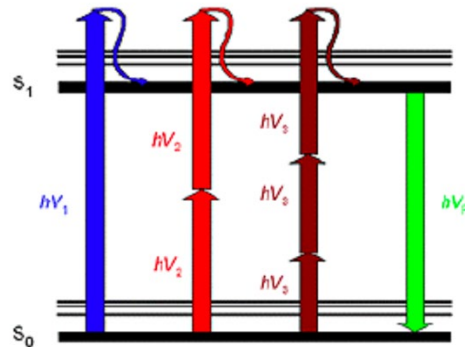


Рис 12.14. Мультифотонное возбуждение

2. Генерация второй гармоники: если объект обладает нелинейными оптическими характеристиками (например, диэлектрическая проницаемость зависит от напряженности поля: $\epsilon = \epsilon_1(1 + \lambda|\vec{E}|)$), можно зарегистрировать сигнал второй гармоники (при наличии достаточно интенсивного излучения, попадающего на сам объект). Это оптика, связанная не с поглощением, но с тем, как распространяется излучение в веществе.
3. Ап-конвертирующие вещества/ап-конверсия: при постоянном облучении вещества возбуждающим светом (при этом существует несколько молекул, и конфигурация их электронных уровней устроена так, что возможны каскадные переходы) возникает состояние сильного возбуждения. Возвращаясь из этого состояния в основное, будет порождаться фотон с длиной волны меньше, чем первоначально возбуждающее излучение.

Главные положительные особенности мультифотонной микроскопии

1. Высокое разрешение
2. Большая глубина проникновения (почти 1 мм): для того, чтобы возбудить молекулу, требующую в норме 400 нм, в двухфотонном поглощении можно использовать длину волны 800 нм (ближний ИК-диапазон). Ближний ИК-диапазон предпочтителен, так как поглощается и рассеивается довольно слабо, поэтому, если необходимо возбудить флуоресценцию в толще рассеивающего образца (т.к. рассеивание возрастает с уменьшением длины волны), то переход на более длинные волны сильно уменьшает рассеивание и позволяет сфокусироваться на образце.
3. Уменьшение фотоповреждения образца: чем больше длина волны, тем меньше поглощение, соответственно энергии в системе будет меньше.

Вероятность поглощения

Вероятность двухфотонного поглощения зависит квадратично от интенсивности излучения:

Одного фотона $\sim I$

Двух фотонов $\sim I^2$

Трех фотонов $\sim I^3$

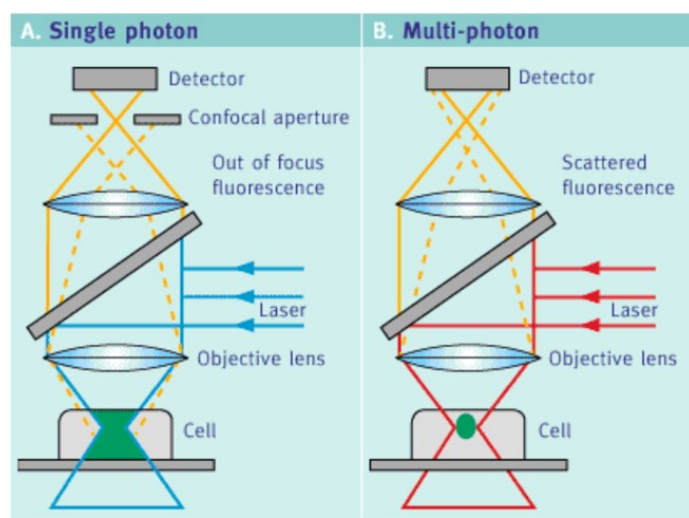
Локализованная флуоресценция

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

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 (рис 12.15).



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

Рис 12.14. Отличия мультифотонной микроскопии.

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 флуорисцина (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 Ca^{2+}

Изменение концентрации 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.

На сегодняшний момент, данное преимущество отошло на второй план, так как было создано большое количество кальциевых сенсоров, возбуждаемых разнообразными цветами.

Конфокальный vs двухфотонный микроскоп:

1. Импульсные лазеры, необходимые для мультифотонного возбуждения, намного дороже, чем лазеры непрерывного режима, используемые в конфокальной микроскопии

2. Для тонких объектов – таких, как отдельные клетки, однофотонные конфокальные микроскопы дают более высокое разрешение из-за меньшей длины волны света
3. С другой стороны - в рассеивающей ткани более четкое оптическое секционирование, достигаемое при помощи двухфотонного микроскопа, приводит к более высокому пространственному разрешению

Микроскопия, основанная на генерации второй гармоники (SHIM)

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

Глубина проникновения поля

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

$$E_T = E_0 e^{-\kappa z} e^{i(kx - \omega t)} \quad (12.1)$$

$$\kappa = \frac{\omega}{c} \sqrt{(n_1 \sin(\theta_1))^2 - n_2^2} \quad (12.2)$$

$$k = \frac{\omega n_1}{c} \sin(\theta_1) \quad (12.3)$$

Лекция 13. Микроскопия суперразрешения.

Оптические методы приобретают все большую значимость в биологических исследованиях, возможность преодолеть дифракционный барьер также влияет на то, какие методы наиболее активно развиваются.

Тем не менее, пока ни к каким значимым открытиям супер-разрешение в биологии не привело, так как нишу изображений со сверхвысоким разрешением (детали на уровне НМ, десятков НМ и меньше) занимала электронная микроскопия, не позволяющая исследовать объекты прижизненно.

Возможность увидеть вещи в динамике, прижизненно и специфично, открывает новые перспективы, но пока, несмотря на развитость этих подходов, никаких значимых открытий эти методики также не принесли.

Проблема в классической оптике

Предел в классической микроскопии связан с тем, что даже точечный объект будет выглядеть как достаточно размытое пятно. Это связано с дифракцией и с ограниченностью длиной волны: даже в случае, когда будет собран весь свет, исходящий из источника, явление дифракции будет приводить к тому, что точечный источник порождает довольно широкое изображение с характерными размерами порядка длины волны. Поэтому если существует достаточно много объектов и они все рядом, то они будут накладываться, что не позволит сделать выводы о расположении этих объектов.

Так, возникает формула дифракционного предела в классической микроскопии (минимальное расстояние, на котором мы можем различить два объекта определяется длиной волны относительно показателя преломления и удвоенного синуса апертурного угла. В данном случае апертурный угол обеспечивается углом расходимости пучка перед объективом):

$$(\delta x_{min}, \delta y_{max}) = \Delta_{min} = \frac{\lambda}{2n}, \quad (13.1)$$

$$\delta z_{min} \approx \frac{\lambda}{2n(\sin \alpha)^2}. \quad (13.2)$$

Так, мы работаем в режиме максимального увеличения (использование стократных объективов). У нас есть покровное стеклышко, объектив, иммерсионное масло, чтобы этот относительный показатель преломления увеличивать максимальным образом, и некоторый объект, флуорофор. При использовании достаточно большого увеличения, все расстояния соответственно маленькие и угол α близок к 90° и при этом все равно все определяется длиной волны. Так, рассматриваемая проблема приводит к тому, что в классической микроскопии преодолеть дифракционный барьер не получается.

По оси Z разрешение отражает то, как будет выглядеть точечный источник в области, где формируется изображение (оно может формироваться на матрице камеры, либо на сетчатке при использовании окуляра). Так, данное изображение (под ним подразумевается конечный объект, характерные размеры которого определены формулой *point-spread function* (функция рассеивания точки/источника)) будет представлять собой вытянутую точку в плоскости XY (фокальная плоскость объектива) и на оси Z (оптическая ось микроскопа).

Ключевые подходы для решения задачи:

1. STED
2. PALM, STORM
3. SIM
4. MINFLUX

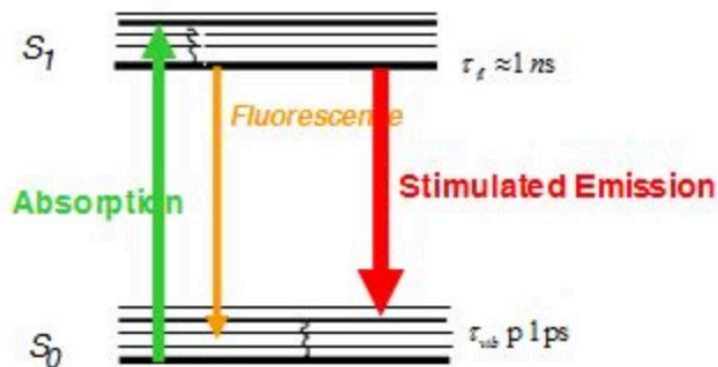


Рис. 13.1. Действие метода STED.

STED (stimulated emission depletion)

Микроскопия, основанная на явлении вынужденного высвобождения/эмиссии. Пусть существует одна точка/один флуорофор и получено изображение. Если известна суммарная интенсивность пятна, то становится возможным соотнести это с уже имеющейся информацией и определить количество находящихся в области флуорофоров. Соответственно информация о суммарной интенсивности может быть очень полезна.

При наличии большого количество точек невозможно точно определить, в каком месте сколько флуорофоров, однако если сделать возможным, чтобы в определенный момент времени флуоресцировала только очень маленькая область пространства, суммарный сигнал интенсивности будет снят и можно будет говорить о конкретном количестве флуорофоров непосредственно в рассматриваемой области. Иными словами, возникает задача сделать так, что в какой-то области пространства флуоресцировала только небольшая часть молекул, а дальше собрать весь световой

поток из этой области и сделать вывод о количестве находящихся в ней флуоресцирующих объектов.

Для этого следует все флуорофоры перевести в возбужденное состояние за счет первого импульса света. Далее все лишние флуорофоры, которые нас не интересуют, мы попытаемся вернуть в основное состояние следующим импульсом света. На этом вынужденном излучении света работает огромное количество современных технологий, в том числе лазер: если в какой-то среде есть большое количество молекул, которые находятся в возбужденном состоянии, и дальше через эту область проходит излучение с чистотой, соответствующей энергетической разности уровня, то эти молекулы будут вынуждены переходить в основное состояние, причем длина волны будет соответствовать длине волны света, проходящего через среду.

Следовательно, явление используется для того, чтобы все возбужденные молекулы вернуть в основное состояние и оставить в возбужденном только часть молекул, находящихся в какой-то определенной области.

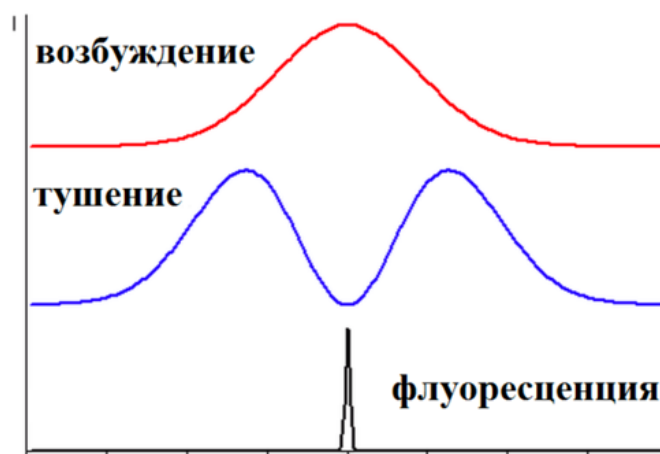
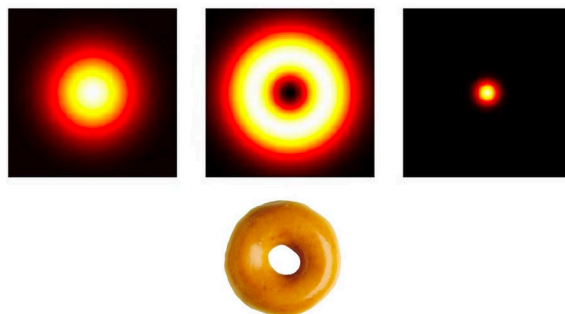


Рис. 13.2. Импульсы, применяемые в STED.

Первый импульс, используемый в STED (рис. 13.2.), - возбуждение: при фокусе излучения в точке из-за дифракции невозможно получить возбуждение именно в точке – все равно, при фокусе света (попадании на объектив параллельного пучка) будет возбуждаться большое количество молекул, так как само пятно возбуждения большое. Далее применяется второй импульс, индуцирующий вынужденную эмиссию (импульс STED). Это приводит к тому, что все молекулы, находящиеся в определенных областях пространства, перейдут в основное состояние и не будут флуоресцировать, в то время как оставит флуоресцировать молекулы в центре дополнительного импульса.

Так, первый импульс будет иметь форму, отличную от второго, так как интенсивность света, приводящего молекулы в основное состояние, будет равна 0 только посередине (doughnut-shaped mode). После этого импульса молекулы

флуоресцируют только посередине, но, при построении изображения, также будут иметь размытый вид (рис.13.3.).



Doughnut-shaped mode

Рис. 13.3. Doughnut-shaped mode.

Теперь, сняв интенсивность суммарного сигнала, можно сказать, сколько молекул (примерное суммарное количество флуорофоров) находилось в какой-то определенной области по сравнению с какими-то точками пространства.

После выполнения процедуры (возбуждение–импульс STED–детекция флуоресцентного сигнала в режиме съема полного потока света) можно сдвинуть всю систему в соседнюю точку и сфокусироваться на новой области. Так как область пространства, продолжающая флуоресцировать, маленькая, осуществлять смещение можно на небольшой пространственный шаг. Эта методика требует импульсных лазеров (и их синхронизации), быстрого фотодетектора, который сможет определять суммарный поток света с достаточно большой скоростью. Выполняется на основе классического конфокального микроскопа, работающего в режиме сканирования.

Конечная формула преодоления дифракционного барьера:

$$\Delta r \cong \frac{\lambda}{2NA \sqrt{1 + \frac{I}{I_s}}}, \tag{13.3}$$

$NA = \text{Numerical Aperture.}$

$I(s)$ – интенсивность насыщающего сигнала, (такая интенсивность импульса STED, при котором половина молекул возвращается в основное состояние). Чем больше интенсивность импульса STED, тем меньше размер области, в которой молекулы останутся флуоресцировать. Следует помнить, что реальные образцы (реальные молекулы) могут выгорать, поэтому неограниченное увеличение интенсивности невозможно).

Ключевые этапы STED:

1. Фокусировка возбуждающего пучка в определенную область пространства (как в классическом конфокальном микроскопе).
2. Практически мгновенная (после первого пучка) фокусировка второго импульса, приводящего в вынужденной эмиссии.
3. Детекция сигнала флуоресценции от молекул, оставшихся в возбужденном состоянии после второго импульса (фотоумножитель).
4. Смещение фокусировки на соседнюю область пространства – получение данных из соседней «точки» => сканирование нужной области пространства с определенным шагом.

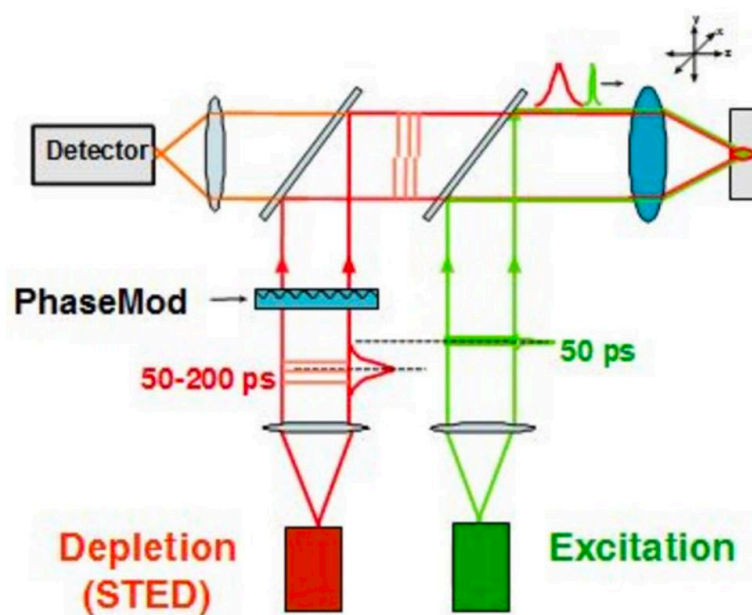


Рис. 13.4. Схема работы установки.

Рис. 13.4 отражает схему работы рассматриваемой установки. Первый лазер, импульсный, дает возбуждение. Сама ширина импульса порядка 50 пс. Разность по времени между возбуждающим импульсом и импульсом STED составляет 50-200 пс. На пути гауссова пучка стоит фазомодулирующая пластинка. Далее происходит фокусировка на образец и при помощи детектора замеряется суммарная флуоресценция, исходящая из точки пространства.

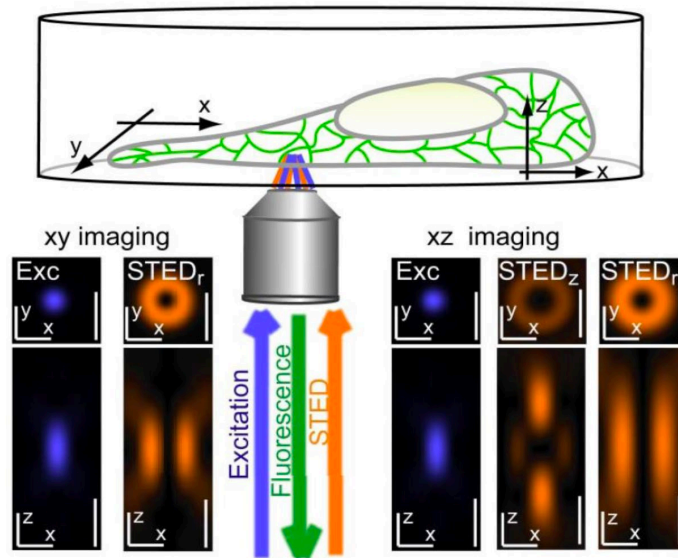


Рис. 13.5 Пример использования STED и дополнительного импульса STED на реальной клетке.

Следует знать, что существует два режима: исследование в плоскости XY при помощи STED и использование дополнительного импульса STED, при желании увеличения разрешения также по оси Z (в этом случае, флуорофоры, возбужденные выше/ниже фокальной плоскости также гаснут).

Примеры для актина, меченного зеленым флуоресцентным белком:

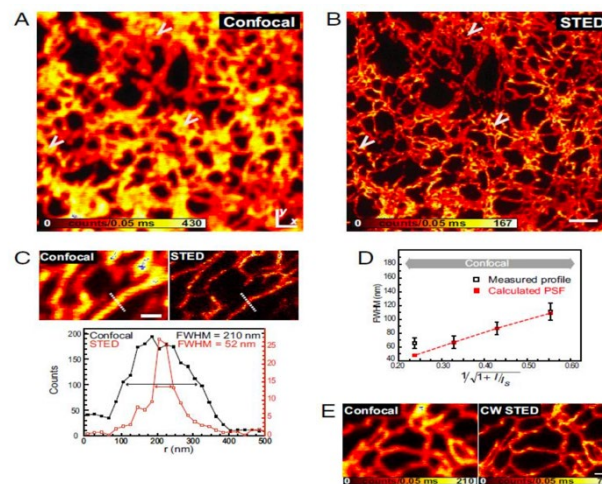


Рис. 13.6а. Примеры использования STED для актина, меченного зеленым флуоресцентным белком.

* плюс подхода: возможность работы с живыми образцами, получение картины в динамике.

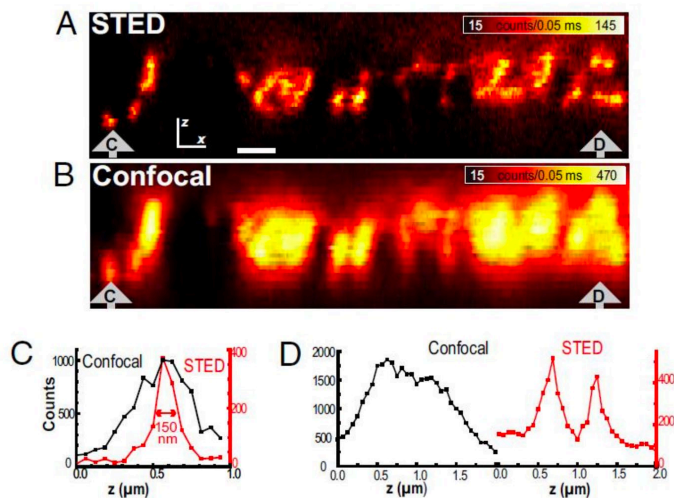


Рис. 13.66. Примеры использования STED для актина, меченного зеленым флуоресцентным белком по оси Z.

PALM (Photoactivated Localization Microscopy) – микроскопия локализации, основанная на активации флуоресцентных белков.

STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) – стохастическая оптическая реконструкция.

Основное требование, применяемое к подходу, – зафиксированный образец.

Среди преимуществ подхода: высокая специфичность. В электронной микроскопии со этим значительно хуже.

Идеи подхода:

1. Отдельно «стоящий» флуорофор можно локализовать с высокой точностью ($SEM \sim 1/N^{0.5}$)
2. Нужно сделать так, чтобы в каждый момент времени «работающие» флуорофоры находились достаточно далеко друг от друга – чтобы их положение можно было локализовать с высокой точностью
3. Если флуорофоры могут обратимо выключаться, то можно добиться (в конечном итоге) локализации каждого флуорофора с супер-разрешением

Один из рассматриваемых подходов использует процесс управляемого переключения флуорофоров (для этого нужны пары флуорофоров), другой использует явление спонтанного перехода в темное состояние (для этого нужен только один флуорофор). Под переходом в темное состояние (когда молекула перестает флуоресцировать) подразумевается обратимый процесс, по окончании которого

молекула вернется в нормальное состояние и будет иметь возможность возбуждаться и порождать сигнал флуоресценции.

Основные этапы:

1. Чередование импульсов активации и деактивации флуорофоров.
2. Статистический анализ распределения числа фотонов для локализации отдельных флуорофоров.



Рис. 13.7. Процесс применения подхода PALM/STORM.

Если в каждый момент времени светится небольшая часть молекул, которые находятся далеко друг от друга, каждую можно статистически вероятно четко локализовать при помощи алгоритма (рис. 13.7b). Далее, в следующий момент времени светятся уже другие молекулы, которые будут определены относительно собственного места (рис. 13.7c) и такая процедура будет выполнена большое количество раз (рис.13.7d,e), что в итоге приведет к получению достаточно четкого компьютерного изображения.

Основные причины «мигания» флуоресцентных молекул:

1. Переход в триплетные состояния
2. Обратимые переходы в альтернативные химические состояния (фотоиндуцированный перенос электрона => формирование радикал-аниона или радикал-катиона)
3. Фотохромный эффект: обратимые химические модификации, изомеризация

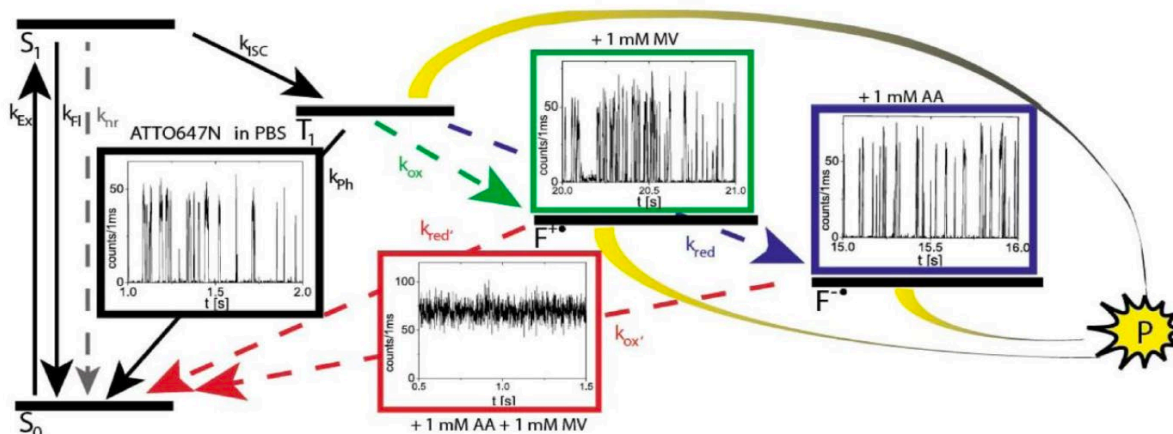


Рис. 13.8. Явление нестабильной флуоресценции.

Нестабильная флуоресценция может происходить по двум основным причинам:

1. Переход из синглета в триплетное состояние: пока молекула живет здесь (а здесь триплетное состояние живет достаточно долго, так как возврат в основное состояние запрещен правилами отбора, и только спин-орбитальное слабое воздействие снимает запрет, поэтому за какие-то времена, значительно большие, чем времена флуоресценции, эта молекула может вернуться в основное состояние и опять стать видимой, то есть получит возможность быть возбужденной—будет возвращаться в основное состояние и порождать сигнал флуоресценции).
2. Формирование радикал-анионов или радикал-катионов: при этом также есть возможность вернуться в основное состояние, но из всех трех состояний, которые условно являются обратимыми, возможен переход в состояние уже перманентного фото-тушения (p =photo bleaching), иными словами, происходит некоторая химическая реакция (например, окисление, - взаимодействие с молекулярным кислородом), в процессе которой так сильно понижается свободная энергия, что обратная реакция настолько медленная, что вероятность возвращения молекулы в обратное состояние очень мала. Так, эти переходы в состояние окисленное можно рассматривать как необратимые.

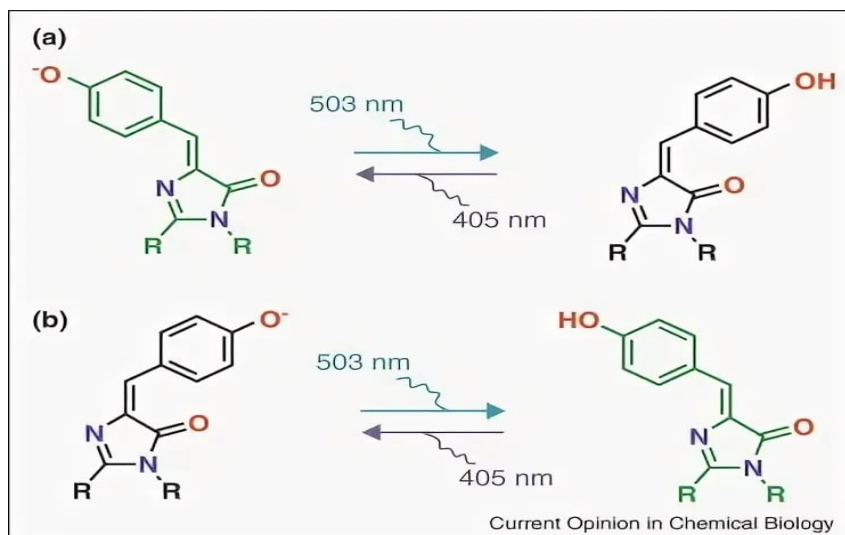


Рис. 13.9. Цис-транс изомеризация флуоресцентной молекулы.

Фотохромный эффект на примере цис-транс изомеризации флуоресцентной молекулы (рис. 13.9), находящейся в сердце GFP – зеленого флуоресцентного белка. Так, переход в другое состояние (и изменение спектра) группы происходит вокруг торсионного угла (а). При этом такой переход наиболее вероятен при облучении волны длиной 503 нм. Обратный переход вероятен при использовании длины волны 405 нм, что говорит о сдвиге спектра возбуждения молекулы в коротковолновую область. Так, рассматривая флуоресцентные белки, можно говорить о возможности управления включением/выключением флуорофоров при помощи света.

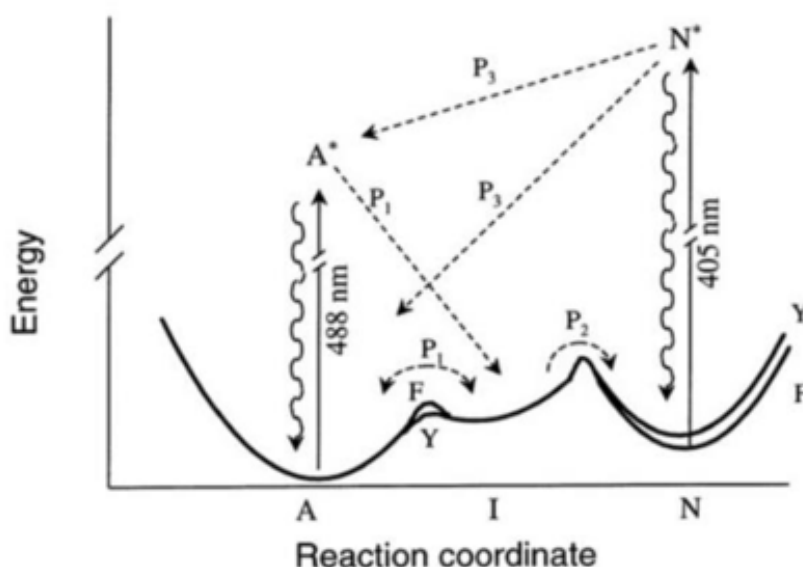


Рис. 13.10. Поведение *mutGFP*.

На графике (рис.13.10) зависимости энергии от условной координаты реакции (в данном случае, под этим можно рассматривать торсионный угол) видно, что состояние

А выражено А и состояние В представлено через N. Так, при использовании волны длиной 488 НМ, происходит перевод молекулы в возбужденное состояние (A^*). Далее она релаксирует в некое промежуточное состояние и может перейти в состояние, при котором происходит самоизомеризация (N). Для возвращения молекулы в ее основное состояние необходимо возбуждать ее длиной волны 405 НМ (N^*), откуда она может по-разному вернуться в конфигурацию с привычным торсионным углом (A).

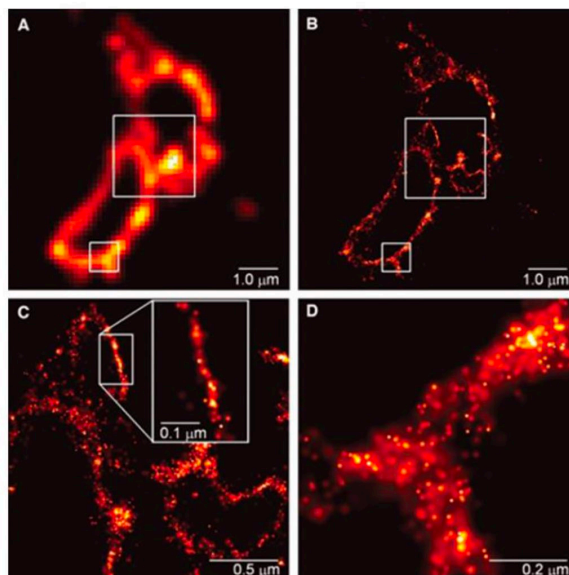


Рис 13.11. Примеры изображений, восстановленных с помощью оптической реконструкции.

На рис 13.11а изображен пример картинки, полученные при применении флуоресцентного режима, b – при применении режима стохастической оптической реконструкции, на рисунках с,d – области, увеличенные в пространстве. На последнем изображении запечатленные точки – это максимум функции вероятности локализации этих флуорофоров.

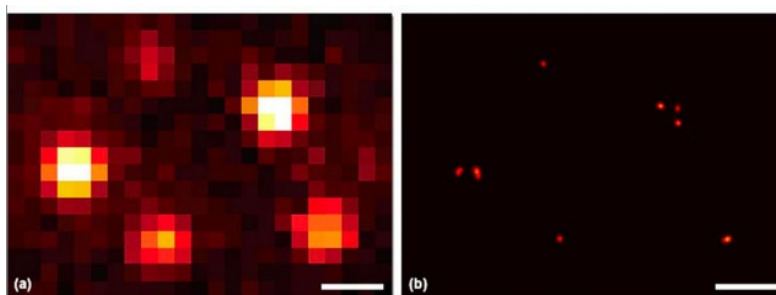


Рис 13.12. Оптическая локализация традиционно неразрешимых молекул.

На рис.13.12.а – изображение, полученное на матрице в режиме флуоресценции. b – изображение, полученное с помощью STORM.

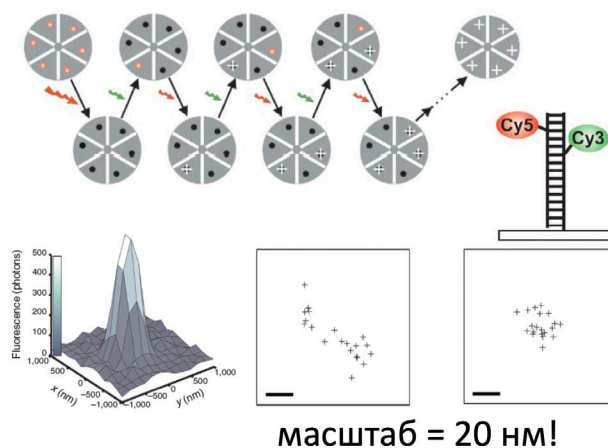


Рис. 13.13. Процесс применения переключателей Cy3, Cy5

Помимо использования управления переключением для флуоресцентных белков (метод PALM) можно также использовать в качестве переключателей пары Cy3, Cy5. Так, с помощью света можно управлять тем, флуоресцирует или нет молекула Cy5. Это управляется тем, как происходит возбуждение молекулы Cy3 (в т. ч. при помощи ферстеровского переноса энергии). Так, при помощи красного света шесть флуорофоров переводятся в темное состояние (обратимый переход). Далее, при помощи зеленого света происходит включение какого-то из этих флуорофоров (часть молекул Cy3 переходит в возбужденное состояние и дальше они могут повлиять на молекулу Cy5 так, что она дальше снова сможет флуоресцировать). Так, один свет – управляющий, а другой служит для того, чтобы возбуждать флуоресценцию и дальше ее детектировать с помощью камеры. Далее импульсы чередуются, поочередно возбуждая молекулы. В итоге, при помощи статистических методов (функция распределения вероятности локализации) размечается положение каждого флуорофора.

При этом, если рассмотреть отдельную такую точку и собрать образец на обычной микроскопической установке (даже при фиксации образца и его охлаждении), будет возникать эффект дрейфа. Уменьшить его на данный момент можно широким количеством способов, как алгоритмических, так и механических. Для фиксированного образца получается изображение, приведенное на рис. 13.14, где на фоне попиксельно отмечено в эпифлуоресценции то, как выглядит изображение, а зеленые элементы – математическая стохастическая реконструкция, полученная по большому количеству разных изображений.

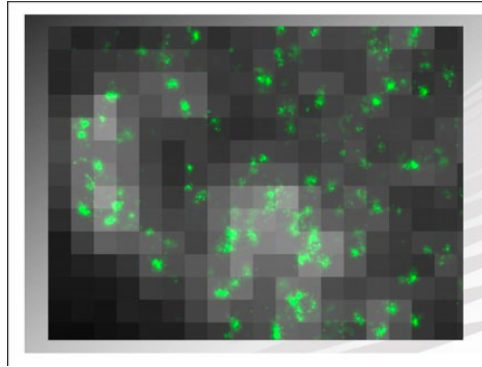


Рис. 13.14. Изображение, полученное на основе применения метода переключателей Cy3, Cy5.

Ошибка определения положения флуорофора после устранения дрейфа

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{S_i^2 + \frac{a^2}{12}}{N}\right) * \left(\frac{16}{9} + \frac{8\pi S_i^2 b^2}{a^2 N}\right)}. \quad (13.4)$$

Так, при $N = 1000$, $\sigma \sim 10$ нм

При локализации двух переключателей Cy3, Cy5 на расстоянии 46 нм в ДНК, можно получить следующие изображения (рис.13.15).

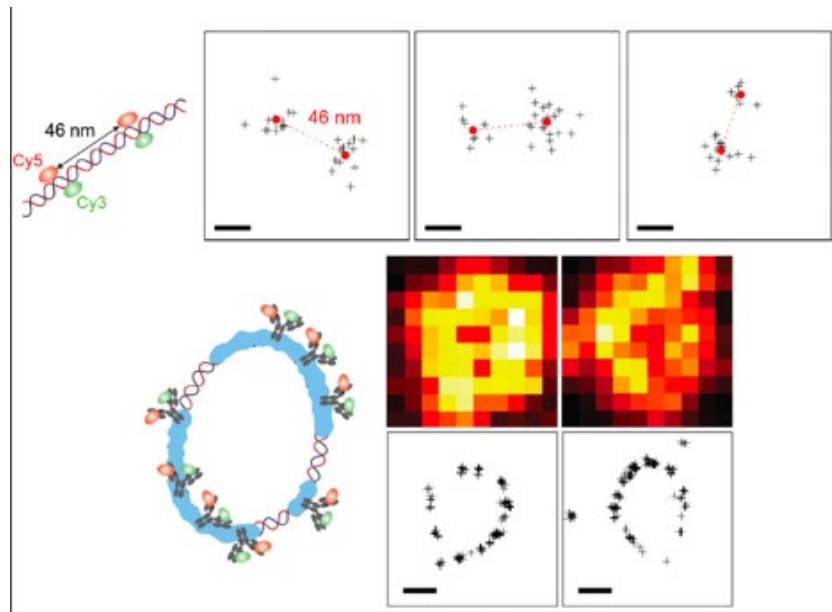


Рис. 13.15. Применение метода переключателей Cy3, Cy5 в ДНК

3D STORM

Технология, которая позволяет восстанавливать то, на какой высоте находится молекула над фокальной плоскостью. Для этого используется цилиндрическая линза (так, функция рассеивания точки PSF будет деформироваться в зависимости от того,

выше или ниже мы фокальной плоскости). Так, при нахождении ниже фокуса, Гауссиана начинает деформироваться по оси y (сжиматься), если выше – по оси x . По этому коэффициенту деформации можно восстановить то, на какой высоте находится молекула.

Доводя технологию до предела, можно локализовать флуорофоры на отдельном белке и определить их размещение. Для этого не только зафиксировать образец, но и понизить его температуру достаточно сильно.

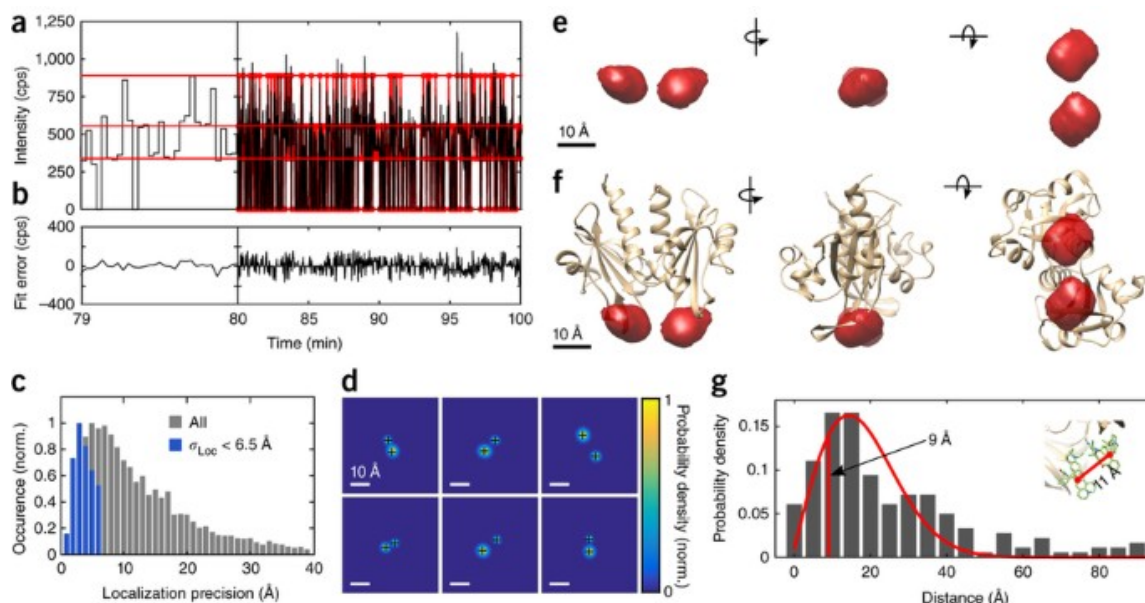


Рис. 13.16. Процесс применения идеального STORM, опубликованный в *Nat.Methods*, 2017.

Берем белок, пришиваем димер и к его N концу пришиваем два флуорофора (рис.13.16f). Далее замораживаем раствор белков и при помощи метода STORM рассматриваем, как в разных белках расположены пятнышки (d). Далее, при помощи методов, используемых в электронной микроскопии (метод проекции) получаются трехмерные изображения (e) расположения объектов в пространстве. На диаграмме (a) показано, как во времени меняется интенсивность сигнала отдельной молекулы.

Основные особенности метода:

1. Требуется фиксации образца
2. Не требует импульсных лазеров
3. Не требует ухищрений
4. Крайне важны компьютерные алгоритмы обработки изображений и дальнейшее построение изображения

SIM (structural illumination microscopy) – микроскопия структурированного освещения.

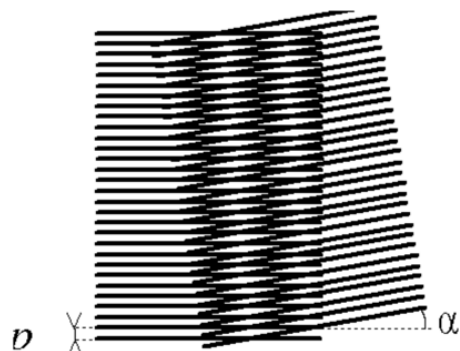


Рис. 13.17. Муаров узор.

Муаров узор (рис. 13.17) возникает при наложении двух решеток с отличающимся периодом (оптическое выражение биений в механике).

Основная идея: облучение молекул светом, который определенным образом модулирован (его интенсивность меняется подобно решетке). Если облучаемый образец имеет некоторый собственный период, то картина интенсивности может выглядеть достаточно сложно, возникать муаровы узоры.

Микроскопия световых «листов»

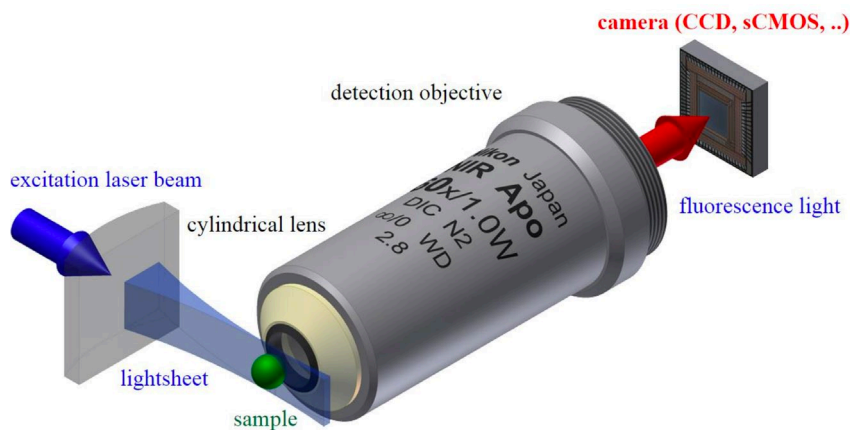


Рис. 13.18. Метод действия световых «листов».

Возбуждение флуоресценции в некоторой плоскости за счет света, на пути которого стоит цилиндрическая линза (рис. 13.18). Соответственно, формируется световой лист, и дальше можно при помощи объектива, расположенного перед прямым углом, детектировать картинку флуоресценции в определенной плоскости. На текущий момент достичь супер-разрешения можно благодаря тому, что световой лист можно сделать с интересной пространственной архитектурой излучения и в дальнейшем, при использовании определенных интересных алгоритмов, восстанавливать картину изображения с очень высоким разрешением.

MINFLUX

Метод дает возможность определить положение флуорофора с точностью до одного или нескольких ангстремов, не получив от него ни одного фотона. Для этого используется технология, напоминающая GPS.

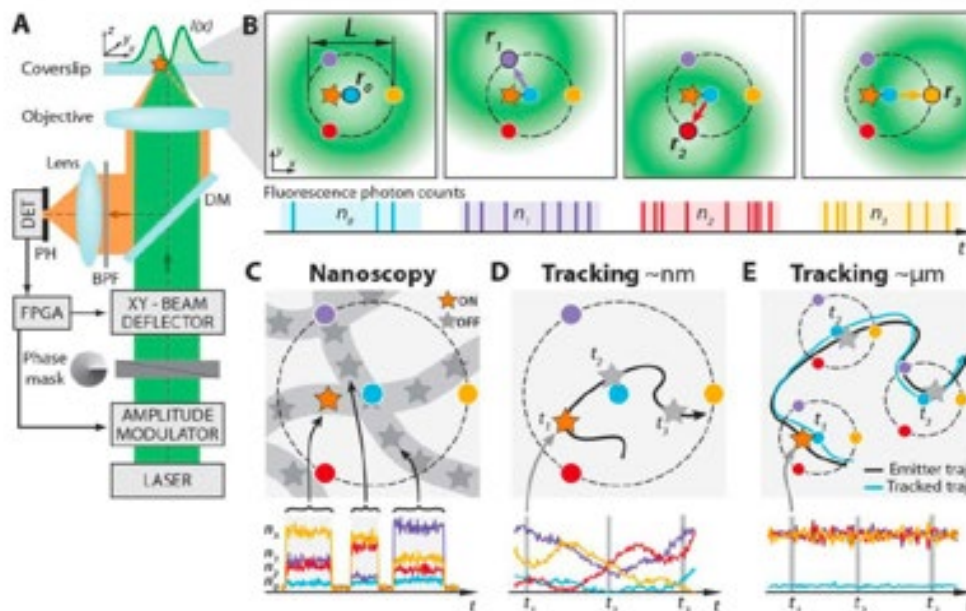


Рис. 13.19. Использование метода MINFLUX.

Основная идея: допустим, у нас есть молекула (звездочка). Далее мы будем освещать ее пучком, но фокусировать его в четырех разных точках очень быстро (кружки). Далее мы будем считать, сколько фотонов прилетает каждый раз от самой молекулы, и решать обратную задачу: зная, сколько фотонов прилетает каждый раз и при этом зная, куда мы светили, можно восстановить местоположение самой молекулы за счет математических приемов. Если мы получили большое количество фотонов при освещении, это значит, что молекула находится где-то на краю окружности.

Режимы работы:

- 1) Молекула находится на месте (зафиксирована), и мы хотим с высокой точностью определить ее положение. Тогда можно посветить четыре раза и восстановить ее положение, затем сместить оптическую систему и убедиться, что она действительно находится в центре. (B)

Если молекула двигается, то за счет диффузии молекула начинает постоянно куда-то уходить, и нужно за ней «успевать». Достичь этого можно через:

- 2) Наноскопия (C): светим и снимаем сигналы флуоресценции. Также, молекула может перейти в состояние, когда она не светится, и количество ее фотонов будет равно нулю, то есть молекула будет «мигать», но не будет гаснуть

достаточно долго, потому что мы всегда работаем в режиме минимального количества фотонов (так строим всю эту систему, что молекула в принципе слабо светит и дает малое количество фотонов).

- 3) *Трэкинг* (D): сама оптическая система не двигается, двигается только молекула, и мы во времени видим, как меняются числа фотонов на детекторе в зависимости от того, куда мы фокусируем излучения. Далее восстанавливаем положение молекулы в течении времени, измерив достаточное количество фотонов. Лазер светит постоянно, но какое-то время в одно место, затем в другую, в третью точку и в центр. Достаточно высокая частота смены точек. Следует с очень высокой точностью определять числа фотонов: для этого используется детектор. Расстояние между точками маленькое и молекула, если диффундирует быстро, то она очень быстро улетит из этой области, поэтому нужно отслеживать ее положение и переносить всю эту систему за этой молекулой. Для этого используется технология программируемых карт, которые на месте решают задачу, выдают решение в модуль управление лазером, и дефлектор отклоняет пучок туда, куда это нужно.

Когда излучение генерируемого света по длине волны оказывается меньше возбуждаемого света:

1. Мультифотонное поглощение
2. Генерация второй гармоники
3. Ап-конверсия фотонная

Выводы об основных режимах

1. Первый позволяет работать с живыми клетками, но требует импульсных лазеров и синхронизации. Сложный технически.
2. Второй: необходима фиксация образца, но никаких наворотов нет, нужна обычная камера с матрицей и серьезные компьютерные алгоритмы обработки информации.
3. Третий технически не очень сложный и чрезвычайно красивый. Требуется программируемой платы для того, чтобы быстро можно было отслеживать положение и следить за ней, как она перемещается.

Лекция 14. Оптическая микроскопия. Работа в проходящем свете.

Работа в проходящем свете (общая информация)

Поговорим о классической микроскопии, о работе в проходящем свете. Это традиционная методика, которая сегодня продолжает использоваться. В ряде случаев намного проще быстро получить изображение в проходящем свете, чем с помощью добавления флуоресцентных веществ.

Если говорить о микроскопии в проходящем свете, то, в зависимости от объекта, могут возникнуть сложности при попытке просто посветить и посмотреть в режиме обычной проходящей волны света. Дело в том, что когда мы работаем с живыми клетками или любыми другими прозрачными образцами, возникает сложность с контрастом.

При рассмотрении электронной микроскопии мы говорим о том, как можно увеличивать контраст. В процессе мы столкнулись с тем, что при падении электромагнитной волны на объект (рис. 14.1) можно сказать как будет себя вести фаза волны в заданный момент времени в зависимости от того, какую точку мы рассматриваем.

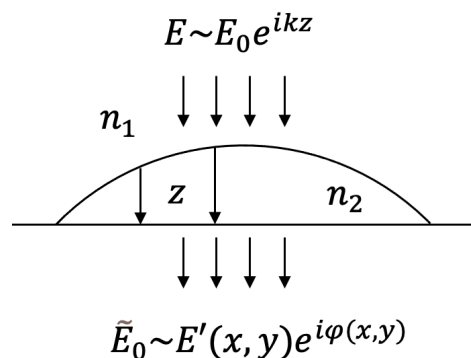


Рис. 14.1. Падение электромагнитной волны на прозрачный образец. (x, y) – это перпендикулярная плоскость.

Если среда однородная, то на входе мы имеем определенный волновой вектор, и фаза меняется по синусоидальному закону $E \sim E_0 e^{ikz}$. Если волна проходит через прозрачный образец, то на выходе сформируется поле \vec{E}_0 . В каждой точке будет происходить некоторый набег фазы, в зависимости от того, через какие объекты проходила электромагнитная волна. В простейшем случае, если мы имеем среду с показателем преломления n_1 и среду с показателем преломления n_2 , то в зависимости от того, сколько электромагнитная волна проходит по толщине z , у волн на выходе будут разные фазы.

В итоге при формировании изображения либо с помощью камеры, либо с помощью сетчатки нашего глаза измеряем интенсивность итоговой волны. В таком случае, если нет модуляции по x, y , связанной с поглощением (объект прозрачный), то

$E'(x, y)$ будет постоянной, и интенсивность не будет меняться от точки к точке. Поэтому сегодня для увеличения контраста изображения имеются разные методы.

Полезные интернет-ресурсы по теме:

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>

<https://www.olimpus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/virtual/dic/>

Работа микроскопа

Работу микроскопа можно описать в терминах Фурье-оптики. Рассмотрим геометрическую оптику (рис. 14.2): есть объект, есть линзы, есть два параллельных луча.

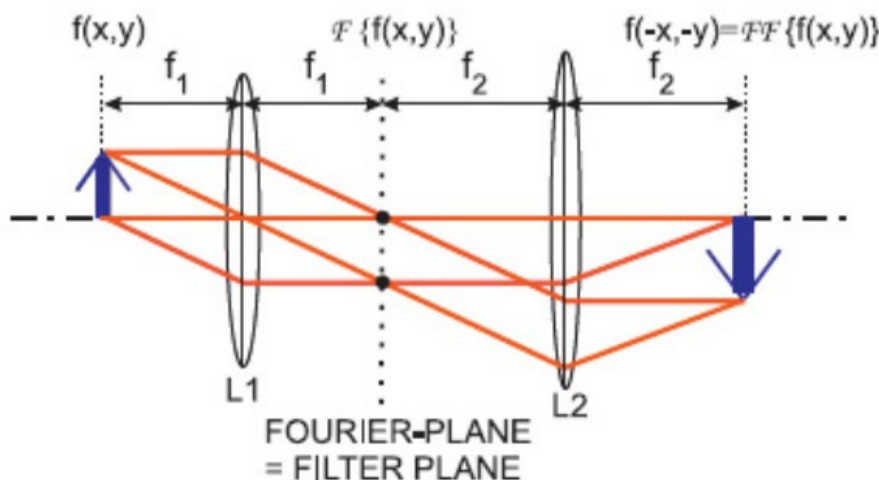


Рис. 14.2. Фокальная плоскость обозначена пунктирной линией.

С точки зрения классической оптики мы знаем, что линза будет собирать параллельные лучи на конечном расстоянии в некоторой фокальной плоскости. С точки зрения теории дифракции, при отсутствии линз лучи будут интерферировать условно на бесконечности. Чем дальше мы рассматриваем этот объект, тем в меньшей степени для какой-то точки будет разность хода между его двумя различными точками. Поэтому вдалеке мы говорим про формирование картины, или дифракции Фраунгофера. За счет того как распространяется свет, мы можем описать эту картину вдалеке как Фурье-образ поля, которое находится в области объекта.

Линза здесь собирает эти лучи в конечном месте, в своей фокальной плоскости. Получается, что Фурье-образ формируется на каком-то конечном расстоянии от объектива. Дальше эти волны продолжают распространяться, и фактически происходит второе Фурье-преобразование. Увеличенное или уменьшенное изображение, которое получается в конце, можно описать как двойной Фурье-образ от исходного объекта.

У нас есть представление о том, что мы имеем в разных плоскостях системы свет в фокусированном и де-фокусированном состоянии, или же что в каких-то областях в плоскости математически мы можем описать это как Фурье-образ от поля, которое находится в другой плоскости. Это нам полезно для того, чтобы понять как формируется изображение в таких сложных оптических системах как микроскоп.

Сопряжённые плоскости в оптической системе

В классическом световом микроскопе (режим проходящего света) выделяют четыре главных плоскости 1-го типа, так называемые **апертурные** сопряженные плоскости, а также четыре плоскости, в которых формируется изображение, так называемые **сопряженные** плоскости самого изображения (рис. 14.3).

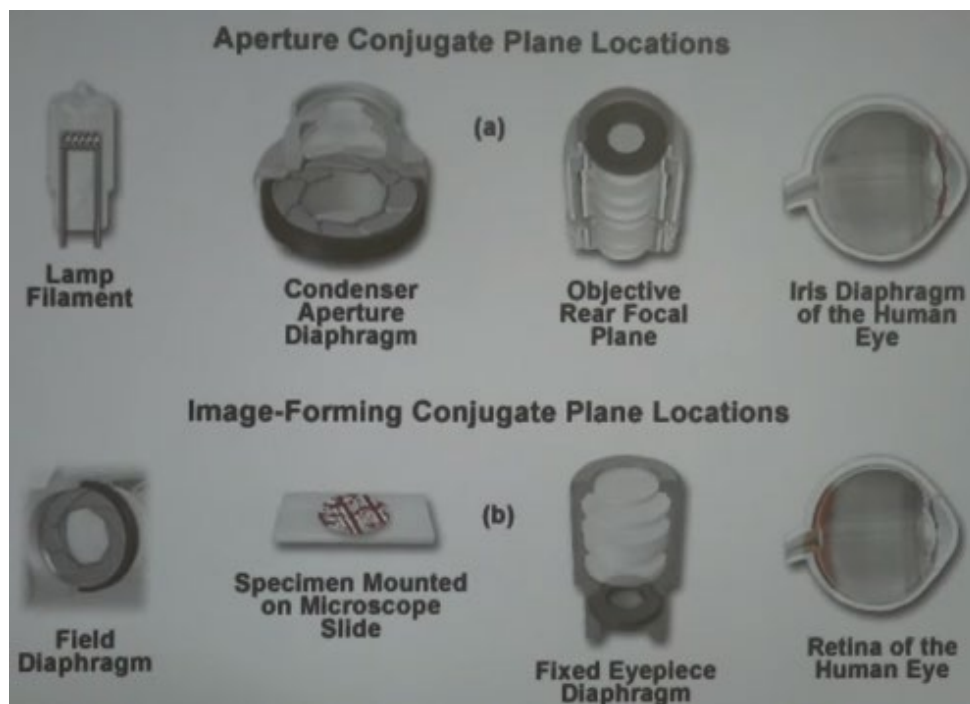


Рис. 14.3. Сопряженные плоскости оптической системы.

Апертурные плоскости (рис. 14.3а) - это плоскости, в которых свет находится в де-фокусированном состоянии. К ним относятся:

1. Нить накала
2. Апертуры конденсора
3. Задняя фокальная плоскость объектива
4. Диафрагма зрачка

Когда мы смотрим на изображение в проходящем свете, нити накала не видно. С этим связана настройка по Кёлеру.

Сопряженные плоскости (рис. 14.3 b) – это плоскости, в которых мы имеем изображение в фокусе. К ним относятся:

1. Полевая диафрагма
2. Образец
3. Диафрагма, фиксированная в окуляре
4. Сетчатка глаза (ретин)

Вместо сетчатки глаза может быть матрица камеры, производящей пространственную съёмку.

Принципы освещения: настройка по Кёлеру

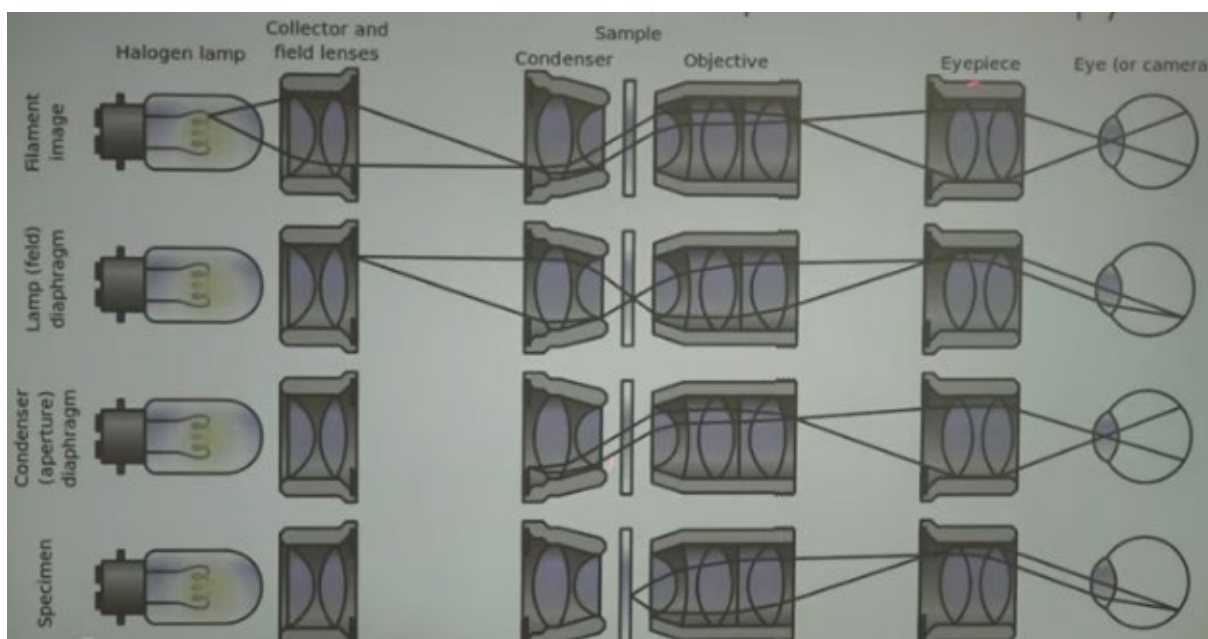


Рис. 14.4. Принципы освещения: настройка по Кёлеру. В микроскопе оптическая ось расположена вертикально, на изображении оси показаны горизонтально.

Рассмотрим порядок расположения элементов на оси микроскопа (рис. 14.4). Сначала идёт нить накала лампы, затем коллектор, который собирает свет от лампы, затем конденсор, сам образец, объектив, окуляр (здесь может быть какая-то дополнительная линза, если свет попадает на камеру) и глаз (или камера). Мы в данном случае будем рассматривать окуляр и глаз.

В верхнем ряду (**Filament image**) показаны сопряженные апертурные плоскости. Для них находятся в фокусе:

- Нить накала
- Плоскость на входе конденсора (апертура конденсора)
- Задняя плоскость объектива

- Ирисовая диафрагма самого зрачка

В области образца мы видим, что свет, который испускают различные точки нитей накала, находится в де-фокусированном виде. Это важно, так как образец здесь освещается широким пучком света.

Во втором ряду (**Lamp (feld) diaphragm**) мы можем посмотреть на альтернативное семейство плоскостей:

1. Диафрагма коллектора (полевая диафрагма)
2. Точки самого образца
3. Апертура окуляра на входе
4. Изображение на сетчатке глаза

И в первом, и во втором варианте мы видим по 4 плоскости, они являются **сопряженными** друг другу.

В чем заключается настройка освещения по Кёлеру?

В микроскопе подвижной частью является конденсор, он может перемещаться вдоль оптической оси. Нам нужно сделать так, чтобы на образец свет попадал в максимально де-фокусированном виде. Проверяется это таким способом: мы должны сузить полевую диафрагму, чтобы её видеть либо глазом, либо в камеру. Обычно настройка производится с помощью глаз, так как поле, которое мы видим глазом, больше, чем поле которое попадает на матрицу камеры.

Далее необходимо, чтобы точки, находящиеся в плоскости изображения объекта, и полевая диафрагма одновременно находилась в фокусе. Для этого мы объектив поддвигаем так, чтобы в фокусе были определённые участки изображения (объекта), которые нас интересуют. Затем конденсор мы должны подвинуть так, чтобы увидеть в фокусе полевую диафрагму. Тогда получится, что все плоскости выстроены правильно, и свет будет попадать на образец в максимально де-фокусированном виде.

Метод тёмного поля

Разберём ключевые методы получения контрастных изображений. Первый метод самый простой – метод *тёмного поля* (рис. 14.5). В большинстве случаев, даже при рассмотрении объектов, которые кажутся на первый взгляд прозрачными, из-за различных неоднородностей в показателях преломления у нас возникает рассеянный свет. Мы можем это использовать для того, чтобы наблюдать тёмнополюную картинку.



Рис. 14.5. Метод тёмного поля.

Идея метода тёмного поля: мы отсекаем практически весь свет, который проходит через образец. Свет от источника (Light Source) проходит через специальную центральную апертуру (Central Aperture), которая приводит к тому, что свет через конденсор (Condenser) попадает на наш образец (specimen) – формируется световой конус, который под углом освещает образец.

Основной проходящий свет не попадает на сам объектив и идёт мимо за счёт того, что у объектива есть апертура. Но свет, который рассеивается на образце, то есть свет, который дифрагировал, в итоге попадает на объектив и формирует изображение (Dark Field Image). В данном случае на фото слева мы видим те объекты, которые рассеивали свет и не видим основное поле, которое вызывало процесс рассеивания.

Из приложений можно выделить *цифровую капилляроскопию*.

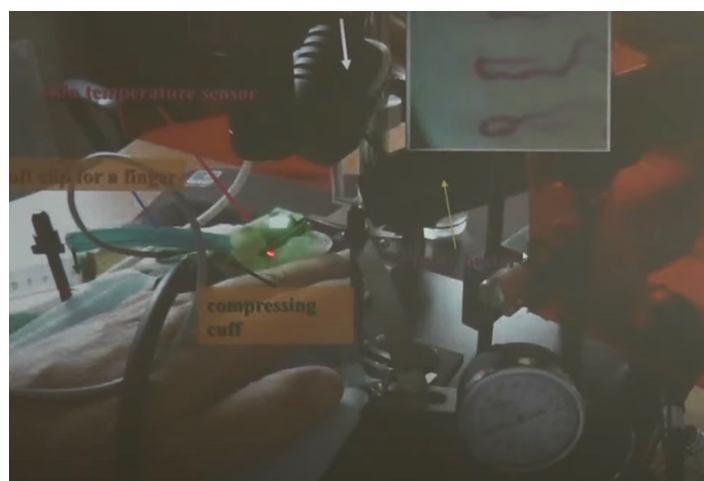


Рис. 14.6. Юрий Ильич Гурфинкель: возможности цифровой оптической капилляроскопии в клинической практике <http://nosh.msu.ru/photronics-seminar>.

Гурфинкель Ю. И. занимается цифровой капилляроскопией и добился интересных результатов (рис. 14.6). Идея в том, чтобы рассматривать сосуды, находящиеся на ногтевом ложе пальцев рук (часто именно на безымянном пальце). Рассматривается область, которая называется *эпонихий*. Это отличительная область, в которой капилляры находятся вдоль горизонтальной поверхности. Чаще всего капилляры резко разворачиваются, когда подходят к поверхности кожи.

Как устроена эта система: палец закреплен, есть освещение под углом (на фото показано белой стрелкой), используется зелёный светодиод. Далее рассеянный свет попадает через объектив на камеру, которая получает увеличенное изображение. На обработанной картинке мы можем увидеть в цвете как выглядят капилляры (рис. 14.7).



Рис. 14.7. Примеры капиллярного кровотока здорового человека 74 лет.

Такая установка позволяет детектировать в режиме реального времени не только форму этих капилляров, но и то, как по ним течёт кровь, видеть какие-то нарушения, если они есть (иногда видны области, где происходила локальная кровопотеря). Ещё можно видеть как различные крупные клетки, скорее всего иммунные, перемещаются по этим сосудам.

На рис. 14.7 справа эта же область с капиллярами показана в увеличенном виде. Таким образом, мы можем у живого человека наблюдать микроциркуляцию, как на кончике пальца происходит движение кровяных клеток по маленьким сосудам. И можем даже измерить скорость этого капиллярного кровотока, различные параметры этих сосудов. На фото пример капиллярного кровотока здорового человека 74 лет. По морфологии видно, что капилляры находятся в хорошем состоянии, можно измерить параметры кровотока.

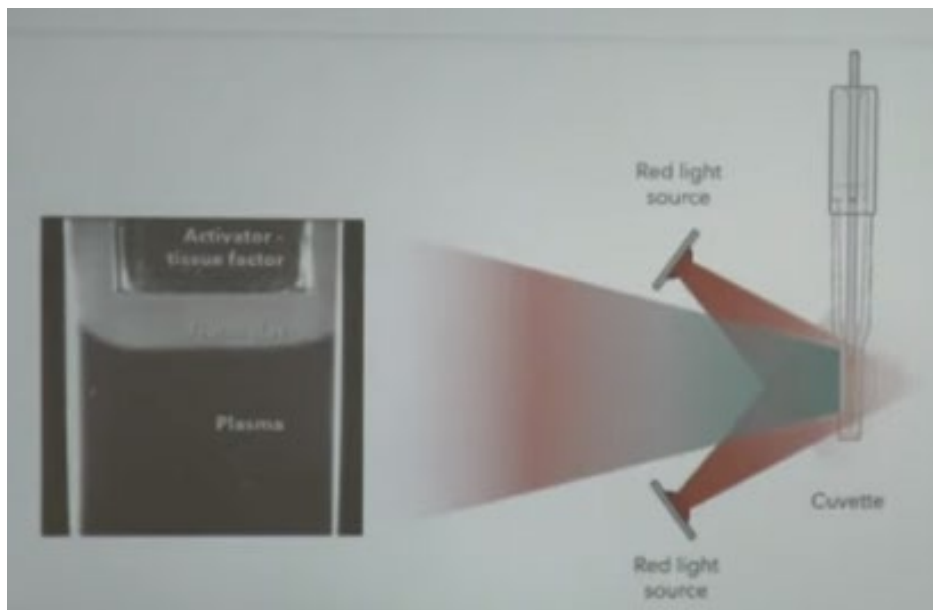


Рис. 14.8. Trombodynamics ®.

Другой способ применения – это детекция в режиме реального времени процессов, связанных с полимеризацией (рис 14.8). Ярким примером является полимеризация *фибрина*. Это процесс, который происходит в результате ответа организма на повреждение сосуда. Запускается каскад реакций, который приводит к тому, что растворённый и растворимый фибриноген, которого очень много в плазме крови, конвертируется ферментом *тромбином* в *фибрин*. Фибрин в свою очередь начинает агрегировать и формировать вытянутые протофибрины. В итоге возникает фибриновая сеть – фактически, плазма локально переходит в другое агрегатное состояние, то есть формируется гель.

Сама сетка относительно неподвижна и занимает небольшой объём, но при этом воде (растворителю) достаточно сложно протекать через эту систему, поэтому она имеет желеобразную структуру. Оптически это очень хорошо видно, так как такая область будет хорошо рассеивать оптическое излучение. В случае на рис. 14.8 показан принцип: есть вставка с активатором, нанесен тканевый фактор, который активирует формирование фибриновой сети. Процесс полимеризации распространяется в пространстве, и можно увидеть как растёт сгусток, так как эта область сильно рассеивает свет, и мы видим ее как область с большим сигналом. Справа подаётся освещение (в данном случае используется красный светодиод), детектируемый свет идёт под прямым углом к самой камере. Это будет именно рассеянный свет, поэтому видно как в режиме реального времени растёт сгусток (рис. 14.9).

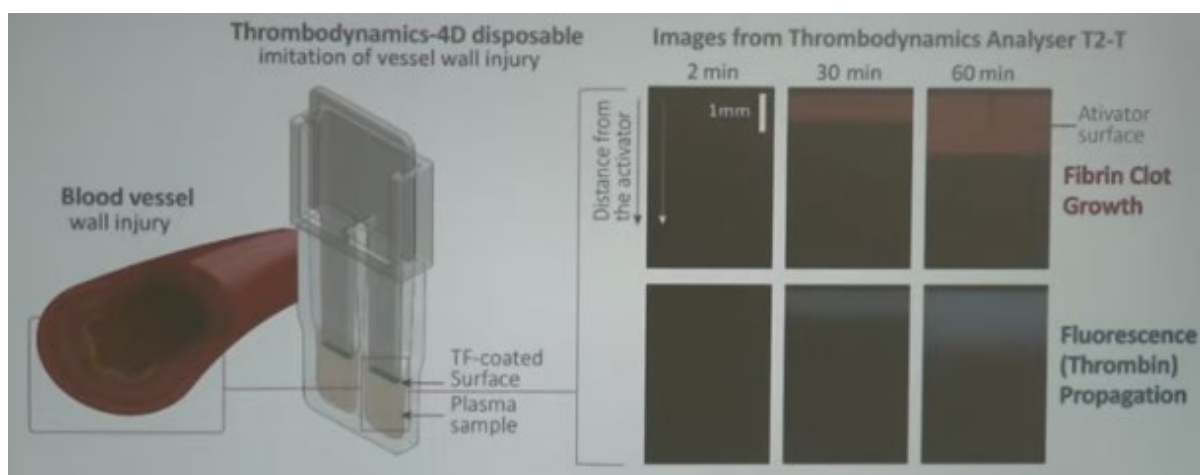


Рис. 14.9. Trombodynamics-4D disposable, imitation of vessel wall injury.

Метод сегодня используется в клинической практике. Он показал чувствительность к состоянию системы свёртываемости крови, к приёму различных коагулянтов. Скорость роста сгустка оказалась чрезвычайно чувствительной, и с её помощью можно оценивать состояние гемостаза. Особенно хорошо видна гиперкоагуляция, когда человек склонен к тромбозам. Сегодня это особенно полезно в контексте пандемии, так как у многих пациентов, несмотря на гепаринотерапию, возникают тромбозы.

Метод фазового контраста

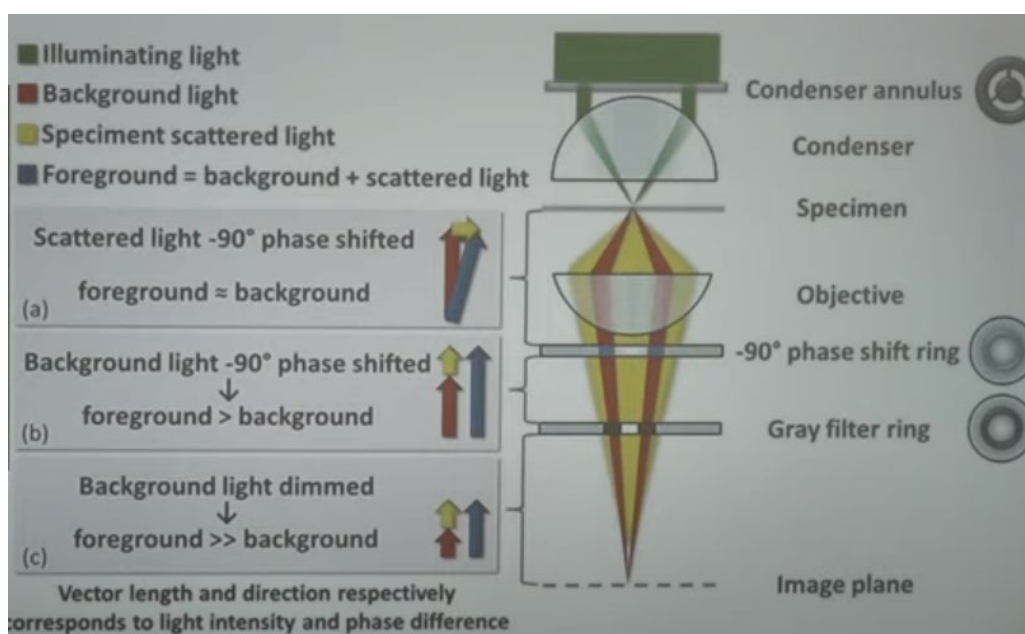


Рис. 14.10. Метод фазового контраста.

Про этот метод мы говорили в разделе курса электронной микроскопии, когда рассматривали способы увеличения контраста. В электронной микроскопии используется два ключевых подхода.

Первый – это метод фокусировки и дефокусировки. Кстати, если в классической оптике объект прозрачный, и у нас нет каких-то хитрых методов типа фазового контраста, то мы можем усилить контраст изменением положения объектива (немного дефокусировать). Это явление связано с тем, что фактически при дефокусировке возникают дополнительные преобразования фаз волн, которые идут под различными углами. Для того, чтобы лучше это понять, достаточно рассмотреть, как работает сам метод фазового контраста.

Идея заключается в том, что свет, который идет сквозь образец (рис. 14.1), претерпевает какие-то изменения. Свет, который идет, например, через разные области образца с различными показателями преломления, дальше будет распространяться под различными углами. Если $E'(x, y)$ – константа и нет никакого поглощения, то у нас будет чисто фазовая модуляция по $\varphi(x, y)$. Её можно конвертировать в амплитудную, если для света, который идёт под большими углами (дифрагированного), мы будем дополнительно менять фазу так, чтобы эти лучи сложились с основным проходящим светом не под углом 90° , как это происходит изначально, а под углом либо 180° , либо 0° – в общем, чтобы эти волны складывались в фазе. Это возникает потому, что фазовые модуляции, как правило, от точки к точке меняются слабо, и мы можем представить поле в виде:

$$E'(x, y)e^{i\varphi(x, y)} \approx E'(x, y)(1 + i\varphi(x, y))$$

Таким образом, есть основная волна $E'(x, y)$ и мнимая добавка $iE'(x, y)\varphi(x, y)$. Суммарное поле на комплексной диаграмме можно представить в виде суммы двух волн:

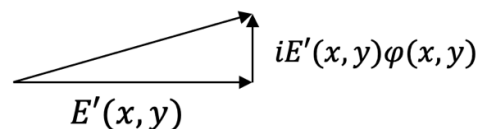


Рис. 14.11. Модулированное по фазе поле на комплексной диаграмме.

На рис. 14.10 свет, который рассеивается, показан желтым цветом, а основной проходящий свет, который не претерпевает никаких изменений, показан красным.

Идея заключается в том, что мы можем с помощью фазовой пластинки повернуть основной проходящий свет. На рис. 14.10 изображена пластинка $\lambda/4$, которая поворачивает «жёлтый» свет на 90° относительно «красного», то есть рассеянный свет относительно проходящего без возмущений основного излучения. Дальше амплитуду основного фонового сигнала (foreground) можно уменьшить для того, чтобы амплитуды «красного» и рассеянного «жёлтого» света были соотносимы друг с другом по величине.

В данном случае мы проводим более хитрые манипуляции, чем в методе тёмного поля – там мы просто отсекали «красное» излучение просто пытались

посмотреть как выглядит рассеянная «жёлтая» часть. В методе фазового контраста же мы оставляем весь свет: и рассеянный, и проходящий, но дополнительно меняем соотношение между их амплитудами и фазами для того, чтобы возникла амплитудная модуляция.

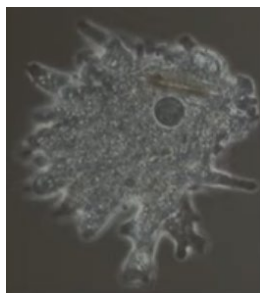


Рис. 14.12. Пример изображения, полученного методом фазового контраста.

Если в методе тёмного поля фон был чёрный, и мы видели объекты, которые рассеивают, то в данном случае какой-то фон все-таки остается есть (рис.14.12). Но зато есть модуляция фаз, которая превращается в изменения интенсивности от точки к точке.

В качестве примера можно рассмотреть то, как это используется в работах по изучению тромбообразования в потоках крови. В нашей группе мы в режиме реального времени наблюдаем как формируются агрегаты из тромбоцитов. С помощью метода фазового контраста мы можем определять положение тромбов, в том числе их высоту – мы можем либо видеть эти тромбы, либо, если мы поместим объектив достаточно высоко, тромбоциты будут не в фокусе. Такая информация оказывается достаточно полезной: можно посмотреть как в режиме реального времени меняется высота тромба по мере того как проходит время (рис. 14.13).

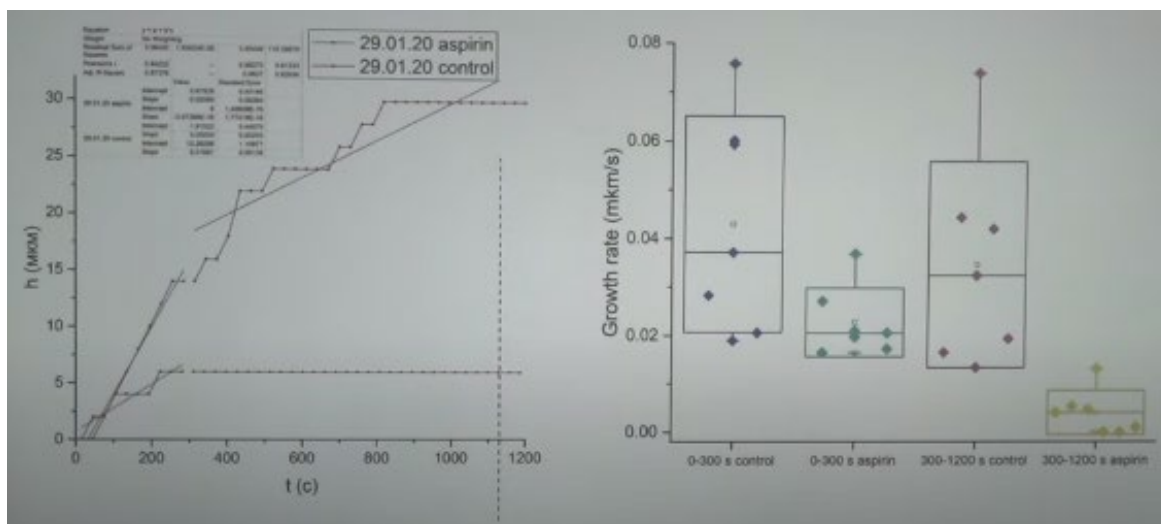


Рис. 14.13. Чувствительность к аспирину. Слева показана зависимость высоты тромба h от времени t , справа – скорости роста тромба от времени для крови с добавлением аспирина и без.

Можно посмотреть (рис. 14.13), как на процессы роста тромбов влияет, например, аспирин. Справа показано сравнение того, как идет тромбообразование в обычной крови и крови с добавлением аспирина. Видно, что аспирин очень сильно влияет на скорость роста тромба. Интересно, что где-то через 5 минут рост тромба практически полностью останавливается. Мы видим, что тромб практически вообще перестает расти, хоть в начале он растёт примерно с той же скоростью, что и без добавления аспирина.

Это конкретные результаты, которые можно получить с помощью оптики, изучая тромбообразование в условиях потока крови.

Метод дифференциально-интерференционного контраста

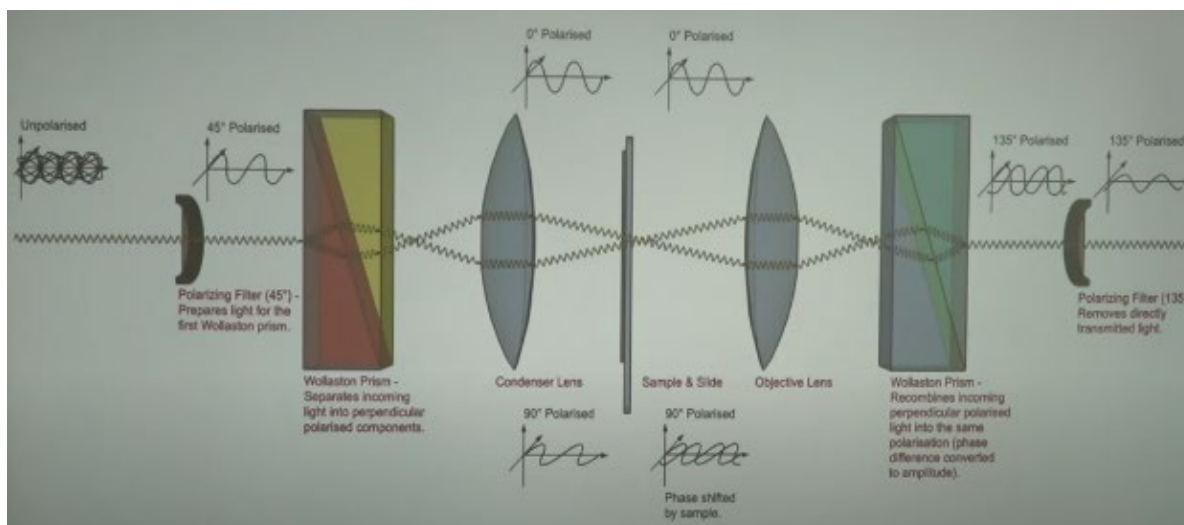


Рис. 14.14. Дифференциально-интерференционный контраст (DIC).

Метод дифференциально-интерференционного контраста очень активно применяется в настоящее время. Главная идея метода заключается в том, что мы разделяем свет на два пучка с различными поляризациями. В итоге эти пучки сводятся вместе, и мы позволяем им друг с другом интерферировать, потому что поворачиваем плоскость поляризации.

Попробуем разобраться в сути того, что здесь происходит. Во-первых, свет мы должны изначально поляризовать, для этого используются специальные поляризаторы. На выходе мы имеем плоско-поляризованный свет, который дальше попадает на специальную Волластоновскую призму (бывают еще призмы Номарски). Это две специальные призмы определённого кристалла, который обладает двулучепреломлением. При попадании на эту систему луч разделяется на два. Из курса оптики мы помним, что там может возникнуть обыкновенный и необыкновенный луч: у них разные плоскости поляризации, они распространяются под углом 90° друг к другу. Дальше мы разводим в пространстве эти два пучка, и на образец они попадают с некоторым сдвигом. Это делается для того, чтобы получить дифференциацию в

пространстве. После этого мы собираем излучение, направляем его на другую Волластоновскую призму и получаем на выходе уже 1 пучок. При этом мы повернули плоскость поляризации, две волны на выходе становятся направленными и могут интерферировать друг с другом. В конце ставится поляризатор, чтобы выделить какую-то определенную компоненту поляризации, т. к. в общем случае на выходе возникает эллиптически поляризованный свет. Таким образом, мы будем наблюдать сдвиг фазы между волнами для объекта, у которого от точки к точке меняется оптическая разность хода. Это проявится в финальном изображении в картинке интерференции.

Основная идея: разводим лучи, дифференцируем в пространстве, собираем, даём возможность изображению интерферировать и получаем картинку.

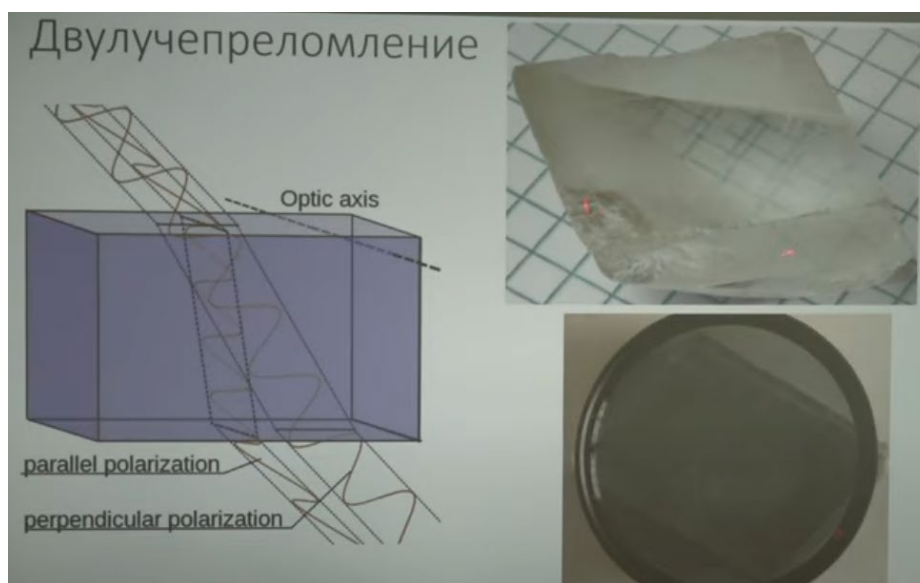


Рис. 14.14. Двулучепреломление.

Для примера показан кристалл кальцит (рис. 14.14). Видно, как двоится изображение на заднем плане, потому что возникло два пучка с различными поляризациями (обыкновенная волна и необыкновенная), которые в итоге идут под различными углами.

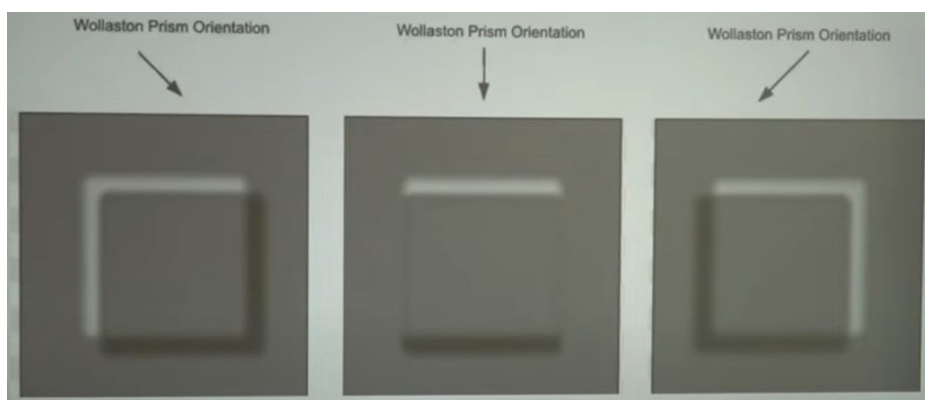


Рис. 14.15. Дифференцирование по пространству с помощью Волластоновский призмы.

В зависимости от того, как мы ориентируем ось Волластоновской призмы, получаем дифференцирование по пространству в разных направлениях (рис.14.15). Фактически дифференцируется оптическая разность хода. На рис. 14.15 на поверхности лежит стеклянный кубик. В первом случае, один пучок идет сбоку от него, а второй, разведённый, идёт непосредственно через кубик с другим показателем преломления. Поэтому, когда мы сводим эти два пучка и позволяем им интерферировать друг с другом, мы видим очень яркую границу – конструктивную интерференцию между волнами. Соответственно, со стороны противоположной стенки кубика на схеме разность хода будет иметь обратный знак, поэтому фактически интенсивность оказывается меньше, чем в первом случае. Сверху у кубика плоская часть, поэтому оптические разности хода одинаковые и интерференции нет, мы видим это как серый сигнал. Для того чтобы хорошо с этим разобраться, нужно подробно рассмотреть все компоненты, особенно то, что происходит на последнем этапе – выделении определённой компоненты с помощью поляризатора.

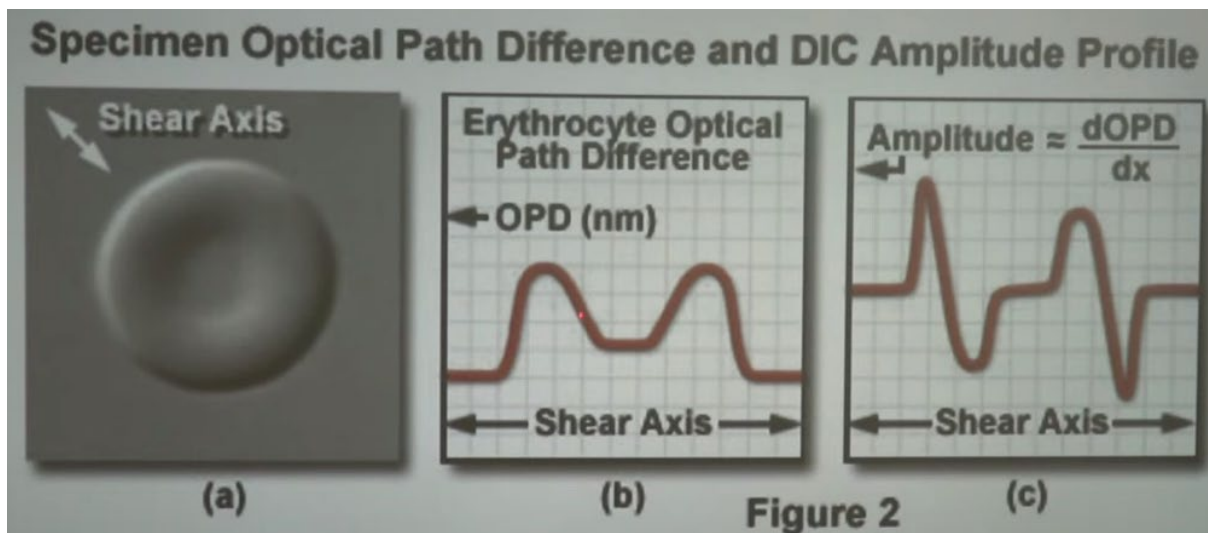


Рис. 14.16. Specimen Optical Path Difference and DIC Amplitude Profile.

На рис 14.16 показан пример более сложного объекта – клетка, которая лежит на поверхности. Если это однородная клетка, то для эритроцита оптическая разность хода будет меняться вдоль оси – увеличиваться, падать и вновь расти из-за особенностей рельефа эритроцита. В случае, когда мы делаем дифференциально-интерференционный контраст, амплитуда получается пропорциональной производной от оптической плотности по соответствующей координате, вдоль которой мы располагаем ось Волластоновской призмы (рис 14.16а). В принципе, имея такое изображение, можно с помощью интенсивности излучения попытаться восстановить то, как меняется оптическая плотность. Следовательно, если образец оптически однородный, то можно даже восстановить рельеф вот его поверхности.



Рис. 14.17. Изображение клетки, полученное с помощью метода дифференциально-интерференционного контраста.

На рис. 14.17 пример изображения одноклеточного организма, амёбы. Очень хорошо видны даже маленькие детали: сколько у неё внутри разных органелл, везикул.



Рис. 14.18. Изображение тромбоцитов, полученное с помощью метода дифференциально-интерференционного контраста.

В нашей группе мы используем метод дифференциально-интерференционного контраста для получения изображений отдельных тромбоцитов (рис. 14.18 справа), находящихся на фибриногене. Используя *мепакрин* (вещество, которое накапливается в определённых гранулах тромбоцитов) и изучая его флуоресцентный канал, мы можем видеть отдельные гранулы и соотносить это с тем, как выглядит сама клетка.

На рис. 14.18 слева видно, что помимо этих гранул мепакрин также светится в областях между гранулами. Для того чтобы аккуратно посчитать полное содержание мепакрина в клетке, нам нужно чётко знать её форму. Ее можно построить с помощью изображения, полученного в проходящем свете, в данном конкретном случае с помощью дифференциально-интерференционного контраста. Это получается, когда объединяются и флуоресцентное изображение, и метод дифференциально-интерференционного контраста.

Метод IRM

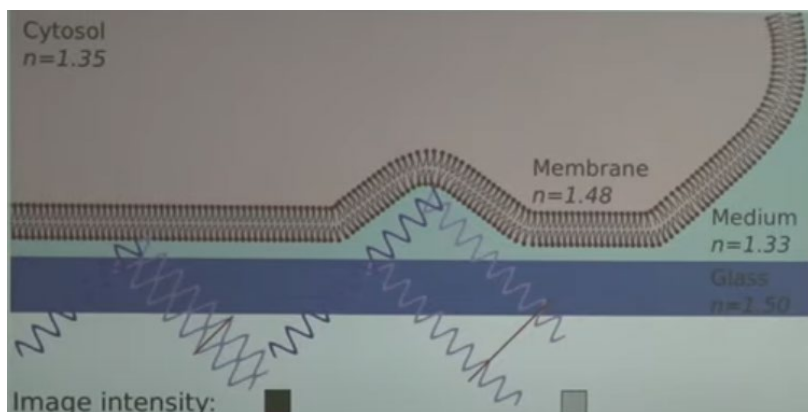


Рис. 14.19. Interference reflection microscopy.

IRM – это микроскопия, основанная на интерференции отражённого света. Мы можем наблюдать интерференцию между отражёнными от различных плоскостей волнами. Это используется в первую очередь для изучения клеток, которые расположены на поверхности, чаще всего это поверхность стекла.

На рис. 14.19 видна мембрана клетки (липидный бислой), свет, который идёт со стороны объектива через покровное стёклышко толщиной в 150 мк. В данном случае мы говорим об инвертированном микроскопе – клетка находится на горизонтальной поверхности, покровное стёклышко и объектив находятся снизу. Эта методика целиком работает в отраженном свете, мы не используем проходящий свет, идущий сверху в случае инвертированного микроскопа, а располагаем источник света снизу со стороны объектива. Дальше свет распространяется и может отражаться от различных плоскостей раздела сред. Первая плоскость – это иммерсионное масло стёклышка. Его показатель преломления в некоторых случаях может быть похожим на стекло, в некоторых может отличаться, но в данном случае на этой границе мы не рассматриваем интерференцию. Мы рассматриваем отражение от границы раздела между стеклом и средой, в которой находится клетка. Второе отражение происходит от границы раздела между средой и самой мембраной, у них довольно сильно отличаются показатели преломления, а помним, что коэффициент отражения определённым образом зависит от разности показателей преломления.

Две отраженные волны будут интерферировать друг с другом. В зависимости от расстояния, будем иметь либо деструктивную интерференцию (тогда точка получается тёмной), либо иметь конструктивную интерференцию, если эти волны будут находиться на определённом расстоянии от поверхности границы раздела между средой и стеклом.

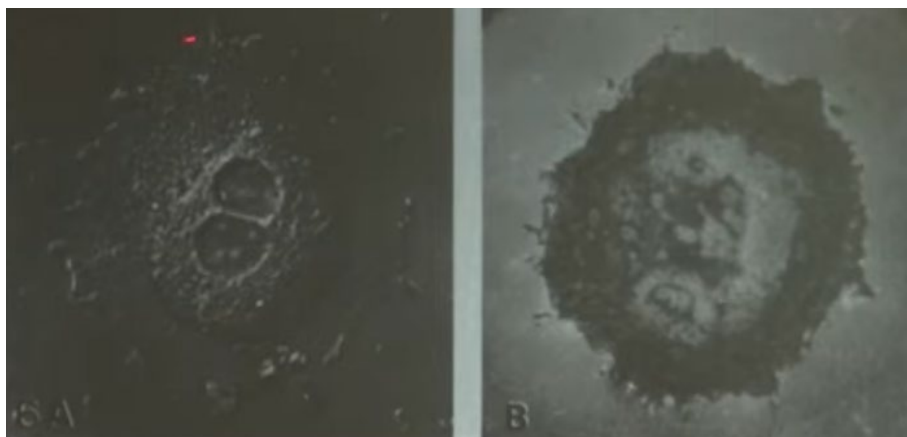


Рис. 14.20. Гепатоцит крысы, живая клетка.

На рис. 14.20 мы видим здесь сравнение между изображением, полученным методом дифференциально-интерференционного контраста (слева) и изображением, полученным в режиме IRM (справа), то есть когда мы работаем целиком в отражённом свете, но при этом не используем никаких флуоресцентных красителей. Мы можем наблюдать, как в зависимости от места клетки фактически меняется расстояние между мембраной и стеклянной поверхностью. Видно, что чем ближе к поверхности стекла мембрана, тем меньше интенсивность, адгезия происходит в большей степени на периферии.

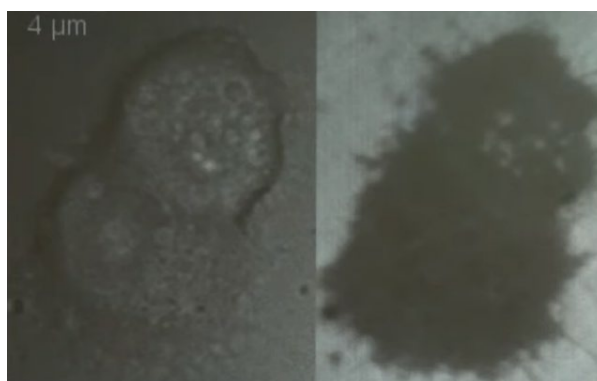


Рис. 14.21. Хромаффинные клетки.

Другой вариант использования этого метода – это изучение секреции гранул. В данном случае используются **хромаффинные клетки**. Слева изображение на рис. 14.21 полученное, скорее всего, с помощью дифференциально-интерференционного контраста. Справа изображение, полученное с помощью IRM. Можно очень хорошо видеть в виде белых пятен, процесс секреции, или **экзоцитоза**, когда мембраны внутренних везикул сливаются с плазматической мембраной клеткой.

Для методики IRM нужны: поляризованный свет, монохроматический источник, подведенный со стороны объектива. Это хорошо сочетается с флуоресцентной микроскопией, когда мы подводим, например, лазерный луч. Дальше нам надо сделать так, чтобы он не полностью фокусировался в фокальной плоскости, как в случае с

конфокальной микроскопией, а скорее был в режиме ближе к широкопольному освещению. В таком случае получается, что мы работаем только в режиме отражённого света с квазимонохроматическим источником и поляризуем этот свет на входе. Дальше перед камерой тоже ставится поляризатор для того, чтобы отсечь всё рассеянное излучение. Дальше от самой клетки, от различных границ может также происходить рассеяние света. Если мы хотим посмотреть именно интерференцию отражённого от границы раздела света, то ставим поляризатор, чтобы убрать всё ненужное фоновое рассеянное излучение.

Цифровая голографическая микроскопия

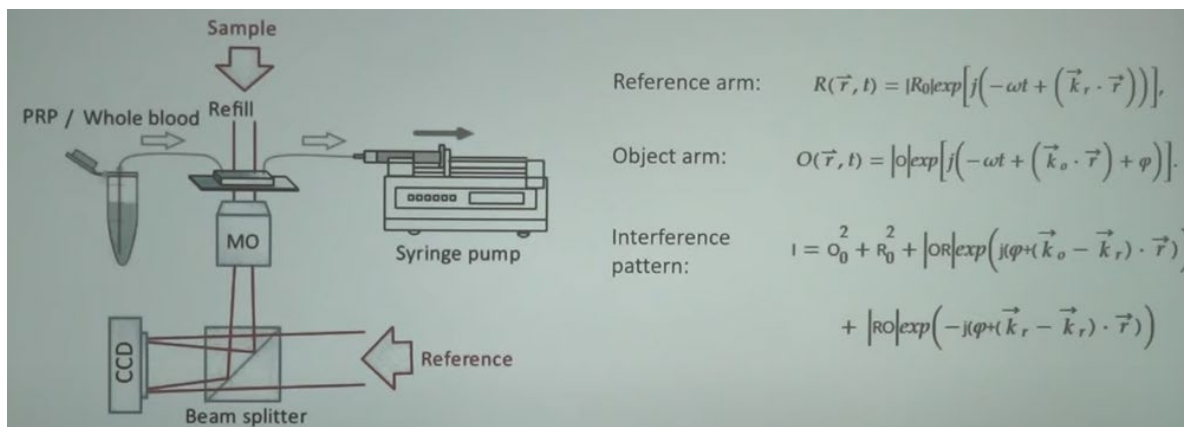


Рис. 14.22. Digital holographic microscopy. Label-free multimodal quantitative imaging flow assay for intrathrombus formation in vitro, *Biophysycal Journal*, 2021.

В методе **цифровой голографической микроскопии** (рис. 14.22) также используется монохроматическое излучение. Этот метод позволяет извлечь из образца важную количественную информацию. Презентация на рис. 14.22 взята от австралийских коллег, которые предложили этот метод для изучения процесса тромбообразования в условиях потока крови. В данном случае мы смотрим на интерференцию двух пучков: опорного пучка квазимонохроматического света (reference arm), и пучка, который прошёл через образец (object arm), в нем возникает дополнительный набег фазы. Дальше мы сводим их и наблюдаем картину интерференции. В результате интерференции возникает слагаемое, которое зависит от набег фазы.

На выходе данного метода мы имеем сложную картину интерференции двух пучков (рис.14.23а). Для того, чтобы вытащить фазы, делается преобразование Фурье (FFT) и обратное преобразование Фурье (IFFT), после чего получается более аккуратная картина (рис.14.23d). Из нее можно восстановить то, как меняется фаза в зависимости от X и Y (рис.14.23е). Дальше, если мы считаем, что объектом является однородная среда с каким-то своим показателем преломления, то мы можем связать получившийся набег фазы с высотой образца в определённой точке XY и получить изображения того, как выглядят объекты в пространстве X, Y и Z (рис.14.23g, f).

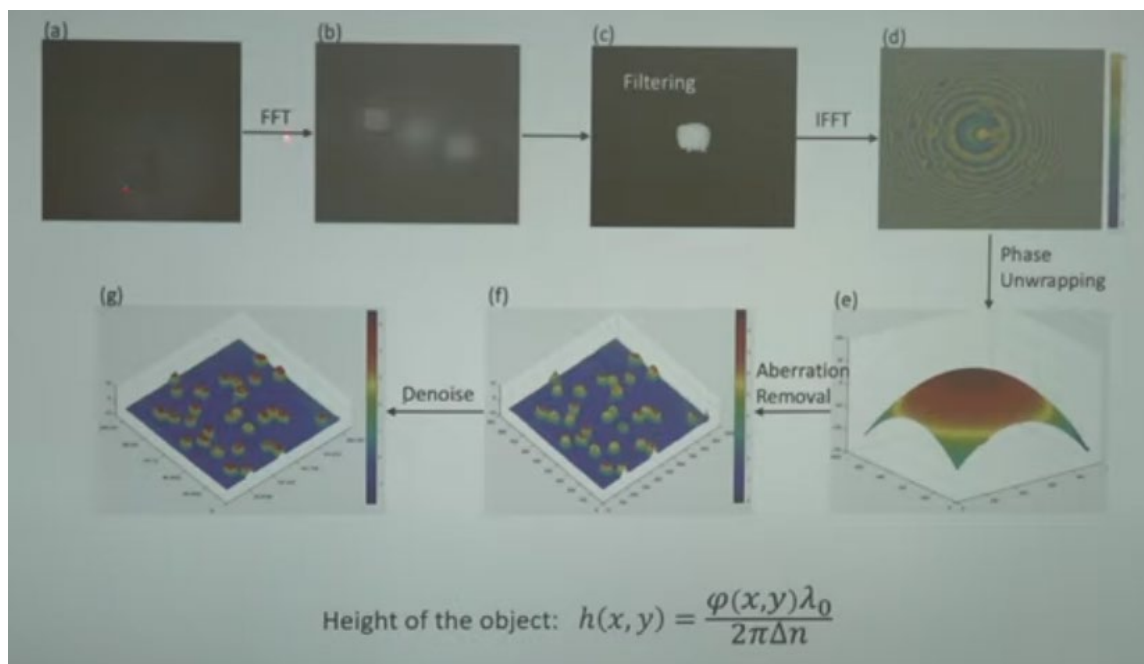


Рис. 14.23. Phase reconstruction.

На рис. 14.24 показано, как получается карта высот тромба в режиме реального времени в процессе того, как кровь прокачивается через систему с коллагеном, который инициирует тромбообразование.

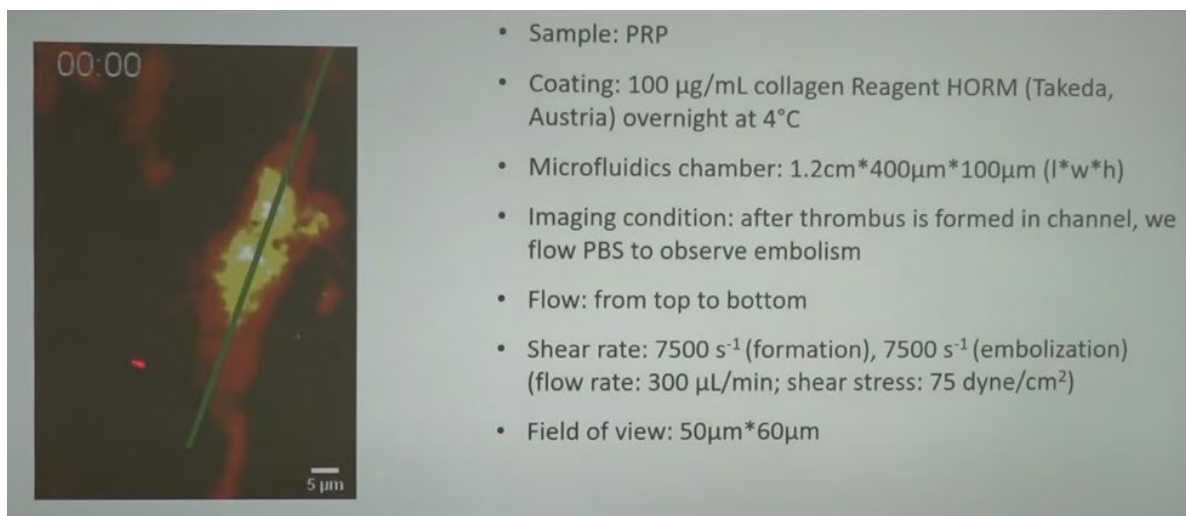


Рис. 14.24. Heightmap during thrombus embolization. More videos:

https://drive.google.com/drive/folders/19FMkd6GYyFRR8geNqWBHxz8ffP5_bAf3?usp=sharing

Методика позволяет использовать не флуоресцентные красители, а лазерное излучение, которое проходит через образец и дальше интерферирует с тем же излучением, но которое через образец не проходит. Метод цифровой голографической микроскопии удобен для определения формы и распределения высот объекта в случае,

если они однородны. Но важно понимать, что в действительности тромб – не среда с постоянным показателем преломления, он содержит (неоднородные!) тромбоциты с одним показателем преломления и плазму с другим, поэтому важно уметь теоретически описывать его.

Таким образом, мы рассмотрели ключевые подходы для контрастирования, извлечения фазовой информации из сложных объектов с помощью разных методов, которые применяются сегодня.





ФИЗИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ