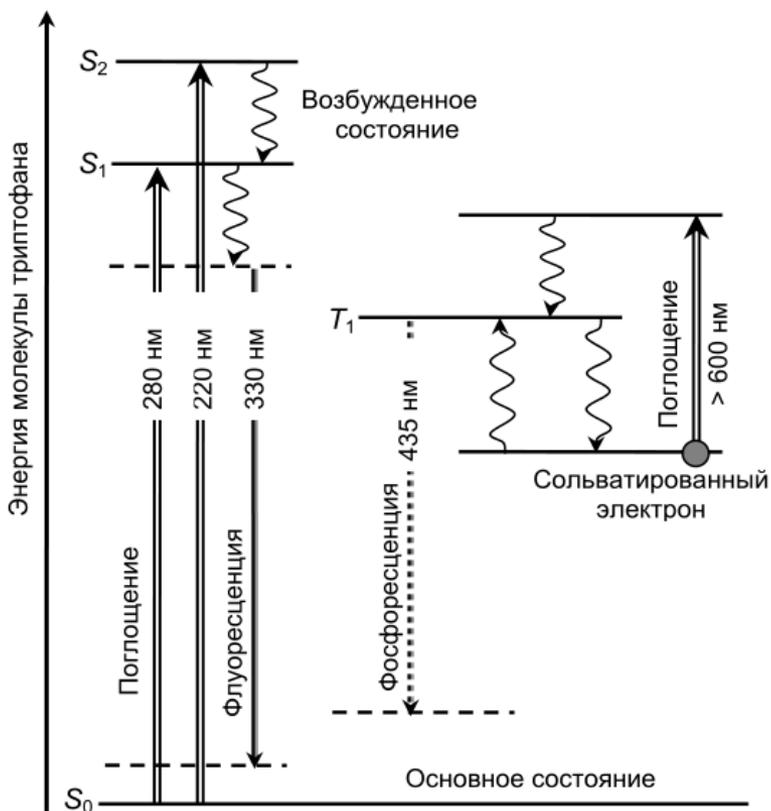


Природные флуорофоры

Большинство используемых в настоящее время природных флуорофоров можно отнести к одной из трех групп: аминокислоты, коферменты и пигменты.



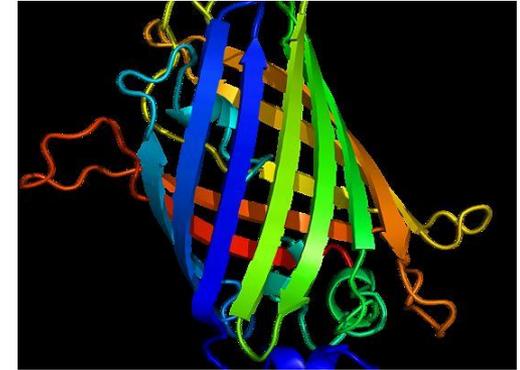
Электронные переходы в триптофане

Искусственные флуорофоры

Искусственные флуорофоры называют также флуоресцентными зондами и флуоресцентными метками. В первом случае флуорофор связывается с интересующей молекулой-мишенью нековалентными связями, во втором – ковалентными.

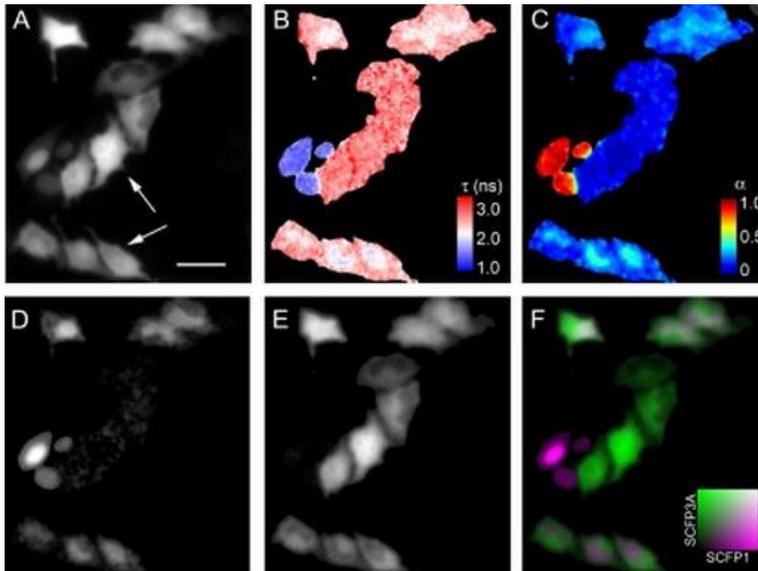
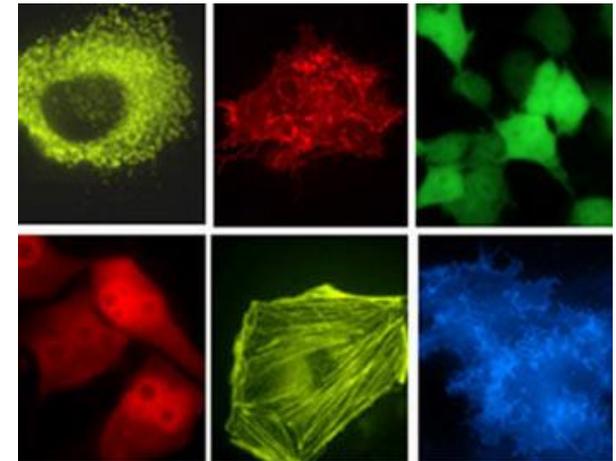
- Флуорофоры, связывающиеся с белком
- Гидрофобные мембранные зонды
- Длинноволновые зонды
- Для маркировки ДНК
- Химически чувствительные индикаторы
- Флуорогенные соединения
- Структурные аналоги биомолекул

Флуоресцентные белки



Главной особенностью флуоресцентных белков является способность формировать флуорофорную группу автокаталитически, без привлечения внешних кофакторов и ферментов.

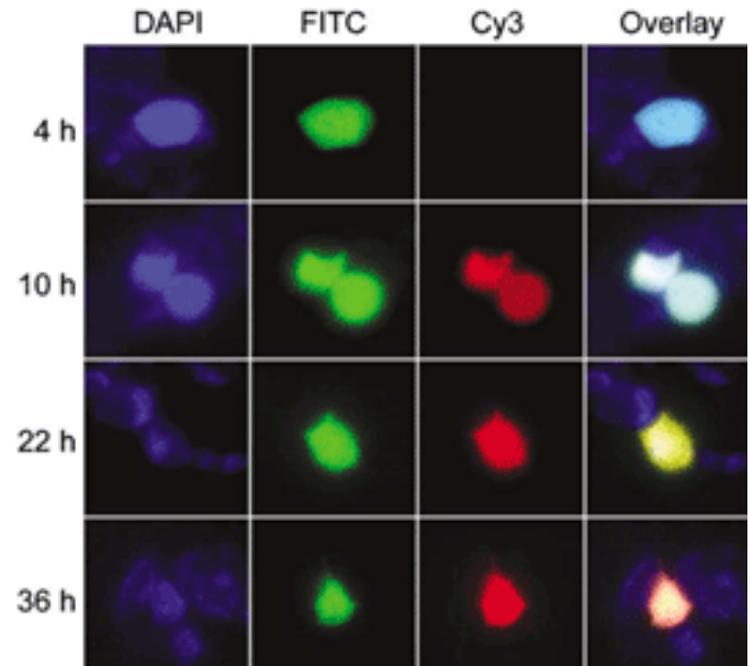
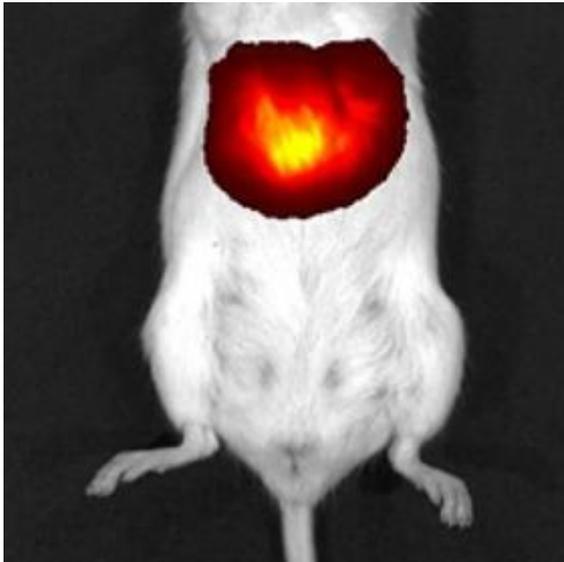
Белки SCFP1 и SCFP3A, отличающиеся временем жизни флуоресценции, в клетках HeLa. Стрелки указывают на клетки, которые нельзя различить по распределению флуоресценции. В. Карта времени жизни флуоресценции.



Визуализация различных процессов в этих организмах *in vivo* важна для таких задач как количественная и неинвазивная оценка роста и метастазирования опухоли, изучение экспрессии генов, отслеживание бактериальной инфекции и т.д.

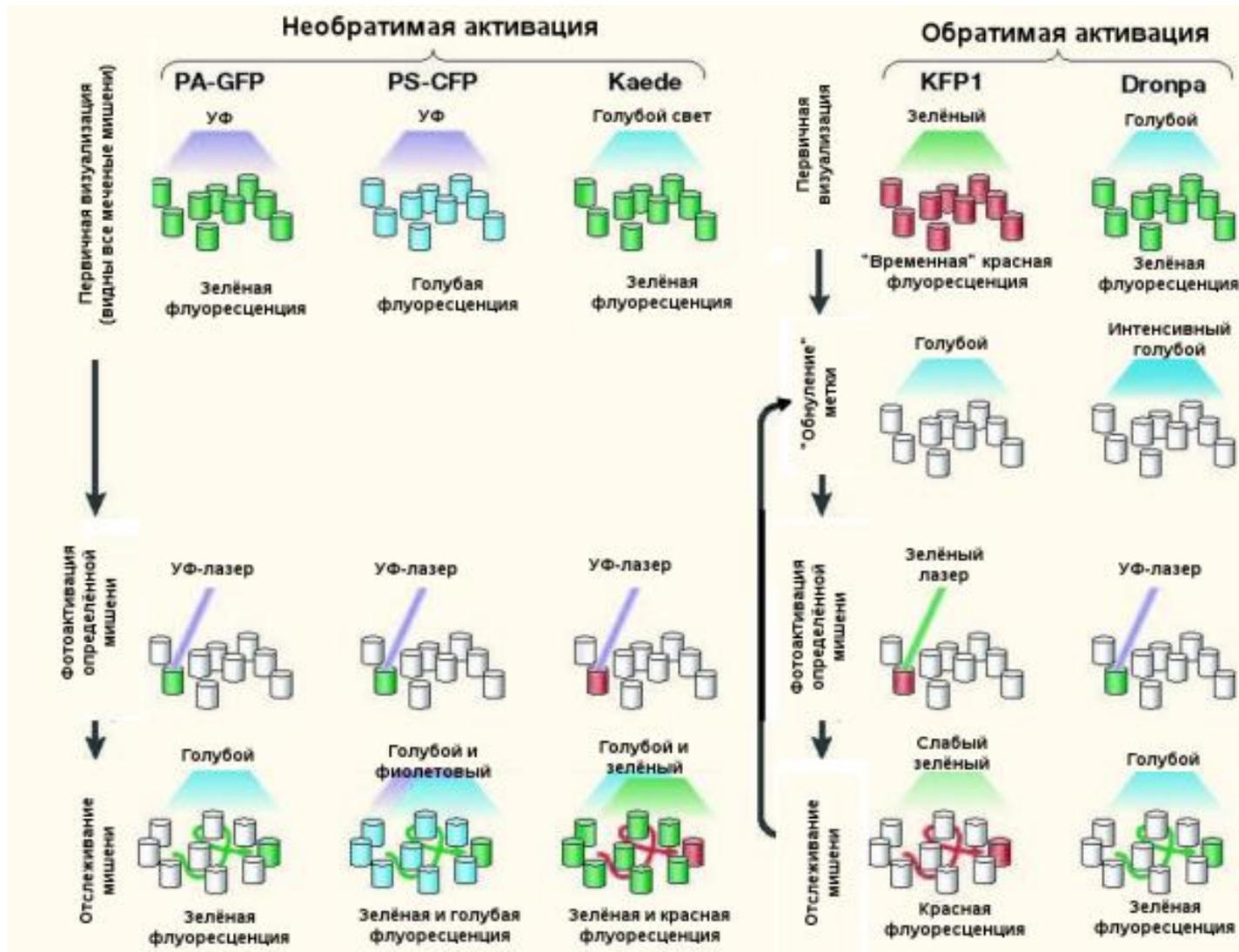
Флуоресцентные таймеры

Флуоресцентные таймеры — белки, которые меняют цвет флуоресценции в течение жизни, таким образом позволяя определить время их экспрессии в ретроспективе

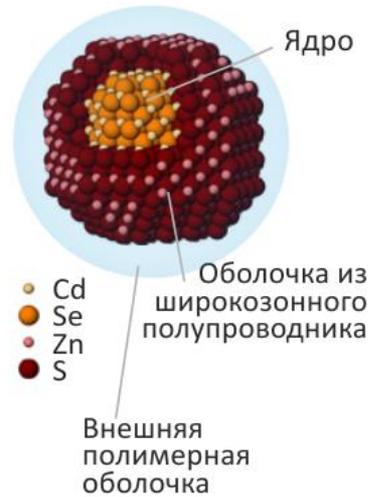
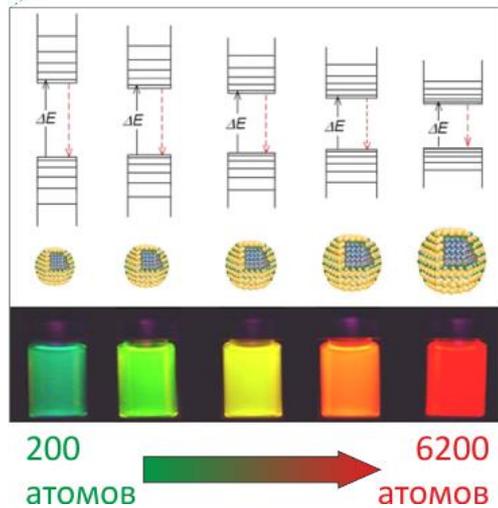
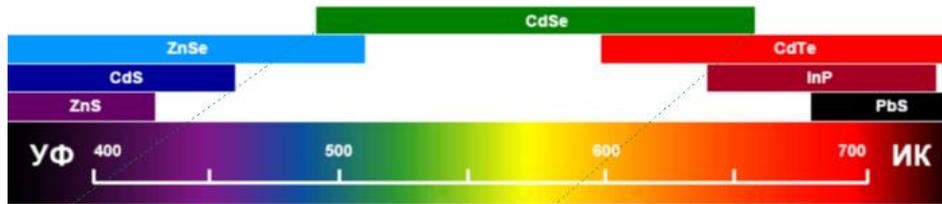


Визуализация цветов эмиссии флуоресцентного таймера DsRed-E5NA после индукции в системе Tet-On в человеческих клетках HEK293. В качестве контрольного белка использовали DAPI, а наблюдали за изменением соотношения зеленого к красному сигналам (каналы FITC и Cy3 соответственно)

Белки с обратной активацией



Квантовые точки

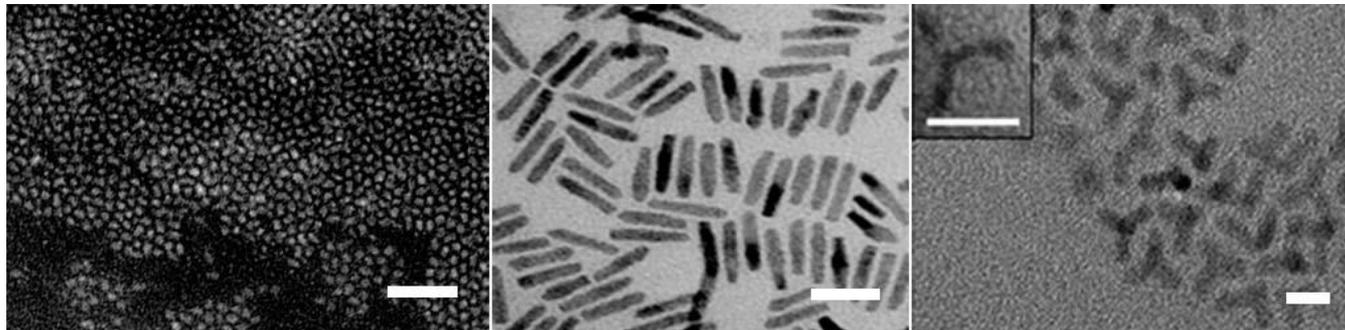


Диапазоны флуоресценции нанокристаллов, изготовленных из разных материалов.

CdSe квантовые точки разных размеров покрывают весь видимый диапазон 460–660 нм.

Схема стабилизированной квантовой точки, где «ядро» покрыто оболочкой из полупроводника и защитным слоем полимера.

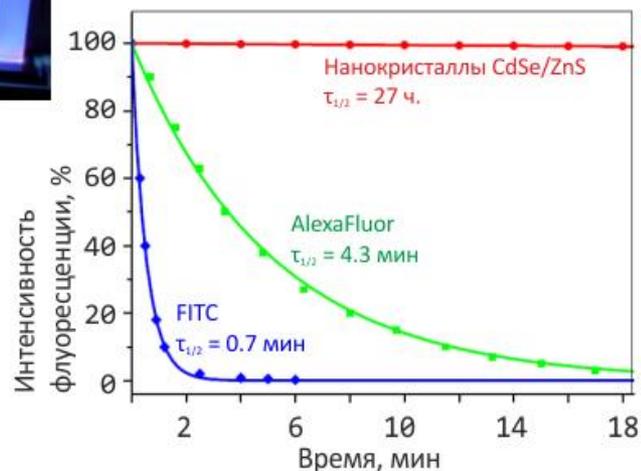
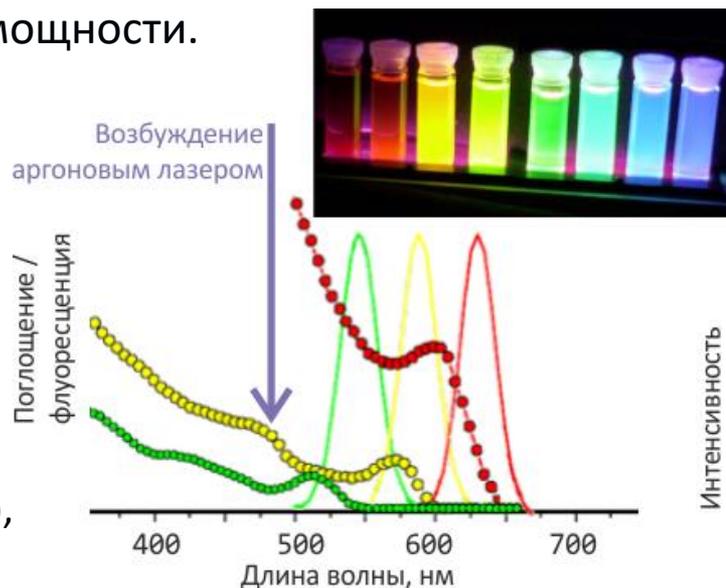
CdSe/ZnS нанокристаллы сферической формы (квантовые точки); стержневидной формы (квантовые стержни), в форме тетраподов. (Просвечивающая электронная микроскопия. Метка — 20 нм.)



Оптические свойства квантовых точек

- узкий симметричный пик флуоресценции (в отличие от органических красителей, для которых характерно наличие длинноволнового «хвоста»), положение которого регулируется выбором размера нанокристалла и его составом;
- широкая полоса возбуждения, что позволяет возбуждать нанокристаллы разных цветов одним источником излучения;
- высокая яркость флуоресценции, определяемая высоким значением экстинкции и высоким квантовым выходом (для нанокристаллов CdSe/ZnS — до 70%);
- уникально высокая фотостабильность, что позволяет использовать источники возбуждения высокой мощности.

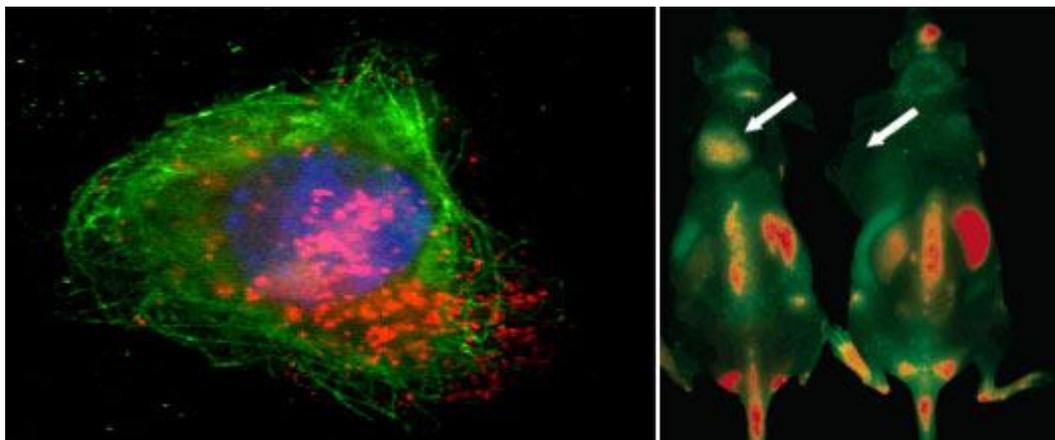
Стрелкой показано возбуждение аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Флуоресценция CdSe/ZnS нанокристаллов разных размеров (и, соответственно, цветов), возбуждаемых одним источником света (УФ-лампа).



Стабильность квантовых точек по сравнению с другими распространенными красителями, быстро разрушающимися под лучом ртутной лампы во флуоресцентном микроскопе.

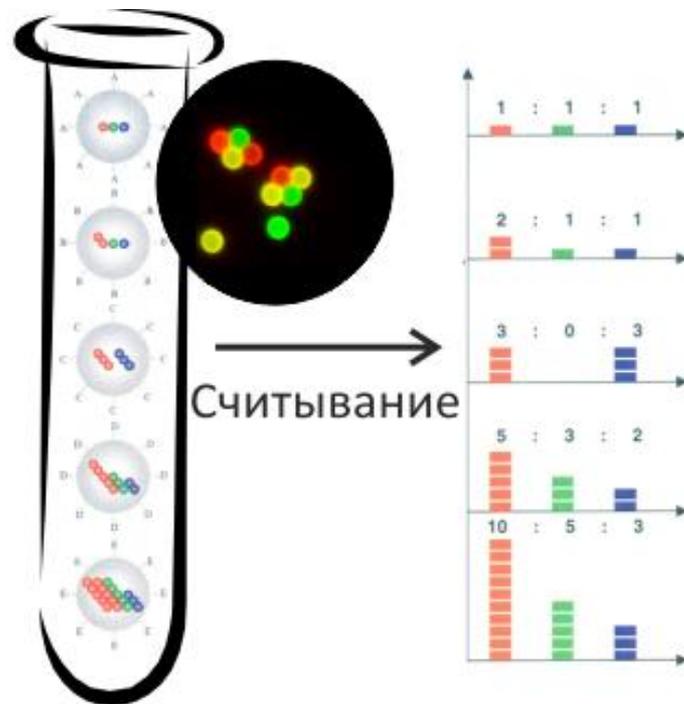
Оптические свойства квантовых точек

Нанокристаллы проникают и распределяются по объекту в соответствии со своими свойствами. Например, нанокристаллы разных размеров по-разному проникают сквозь биологические мембраны, а поскольку размер определяет цвет флуоресценции, разные области объекта оказываются окрашенными также по-разному



Распределения квантовых точек на фоне микроструктуры клеточного цитоскелета. Нанокристаллы остаются фотостабильными в клетках в течение как минимум 24 часов и не вызывают нарушений структуры и функции клеток. Накопление нанокристаллов.

«Жидкий микрочип», каждый элемент которого содержит заданные количества КТ определенных цветов. При n уровнях интенсивности флуоресценции и m цветах теоретическое количество кодируемых вариантов равно $n^m - 1$. Так, для 5–6 цветов и 6 уровней интенсивности это будет 10000–40000 вариантов.

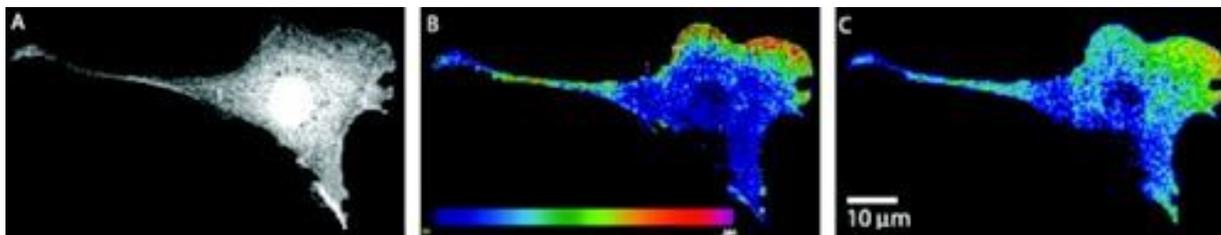
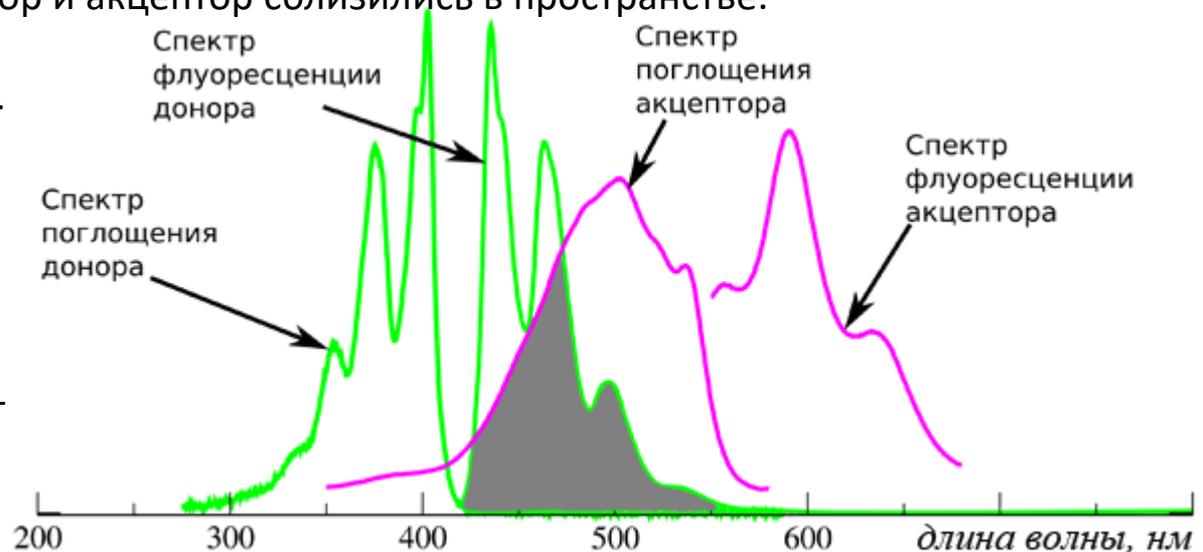


Резонансный перенос энергии между парой флуорофоров

- Перенос энергии возможен не для любых, а для строго определённых пар доноров и акцепторов.
- Расстояние, на котором происходит взаимодействие, значительно меньше длины волны излучения, которое испускает передатчик. Эффективность переноса энергии зависит от расстояния между флуорофорами; точнее, она обратно пропорциональна расстоянию в шестой степени ($\sim r^{-6}$).
- Явление переноса энергии позволяет частично обойти ограничение разрешения микроскопов: свечение появляется, если донор и акцептор сблизились в пространстве.

Главное требование к паре донор-акцептор — перекрытие спектров.

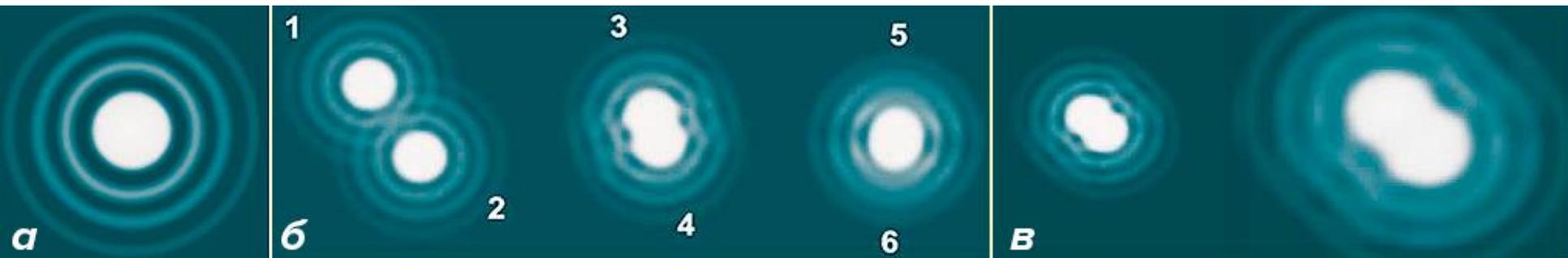
Донор должен испускать свет как раз тех длин волн, которые может поглотить акцептор. Перенос энергии, тем не менее, происходит без излучения фотона.



Взаимодействие двух белков внутри клетки. Красный цвет означает высокую эффективность переноса энергии, а синий — низкую.

Ограничение разрешения в микроскопии

Дифракционный предел рассчитывается по формуле $d = 0,61\lambda/N_A$, где $N_A = n\sin\alpha$ — нумерическая апертура объектива, n — коэффициент преломления среды, α — угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив (апертурный угол), λ — длина световой волны

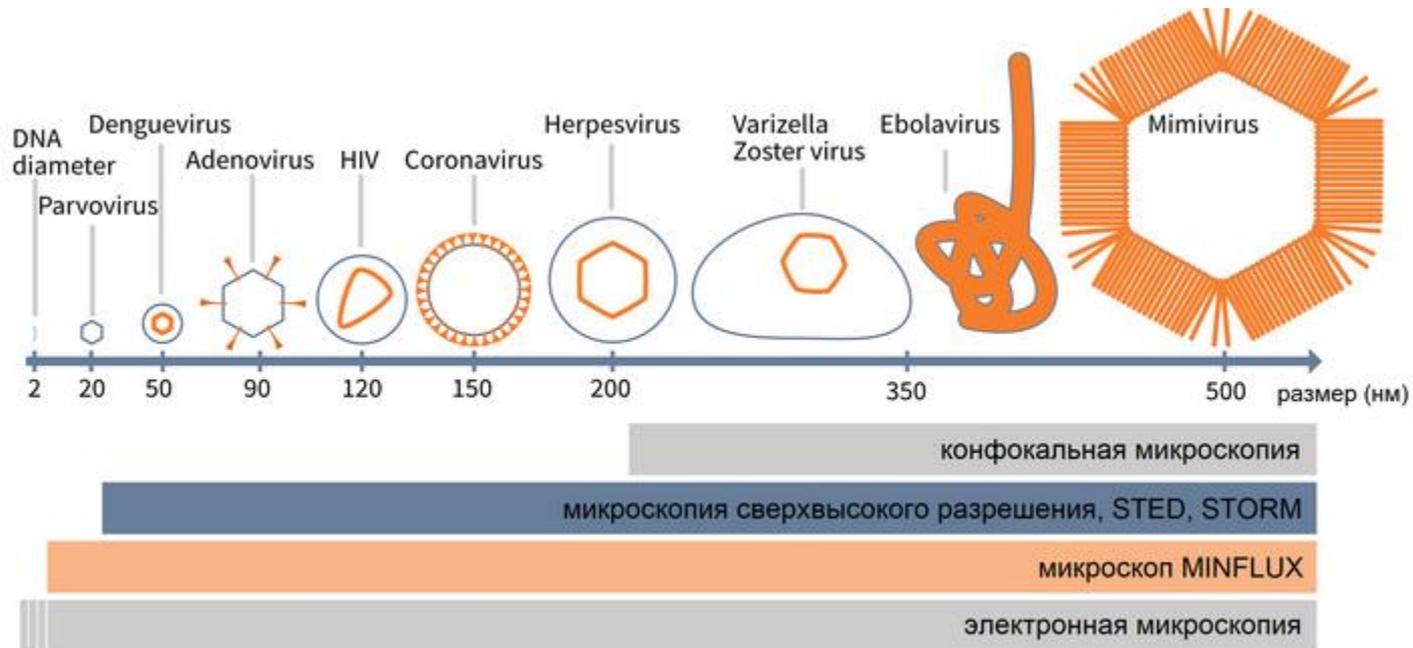


а — Изображение точечного источника света, сформированное оптической системой микроскопа.

б — Точечные источники света, расположенные на различном расстоянии друг от друга.

в — Изображения двух точечных источников света, полученные объективами с одинаковыми числовыми апертурами, но дающие различное увеличение.

Методы микроскопии сверхвысокого разрешения позволяют «преодолеть» дифракционный предел



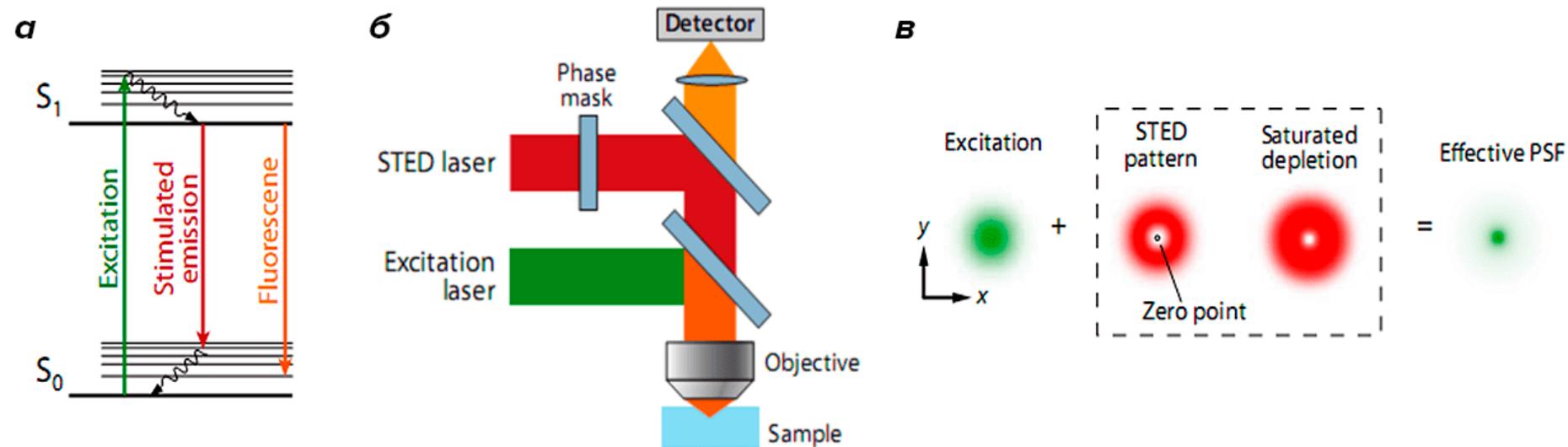
Сравнение различных размеров вирусных частиц с разрешением различных методов визуализации

PALM=Photoactivated Localization Microscopy

STORM=Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

Метод подавления спонтанного испускания

Перевод флуорофоров вокруг рабочей точки в темновое состояние.

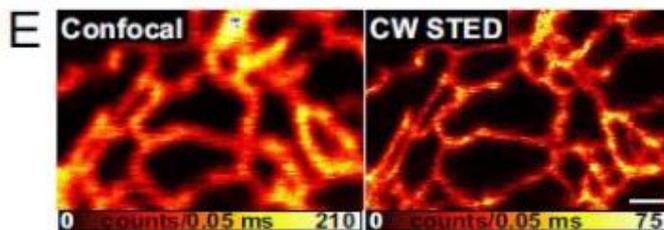
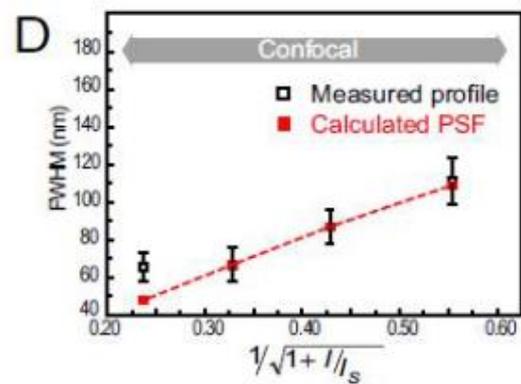
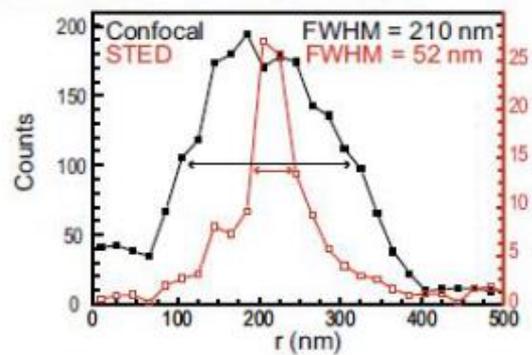
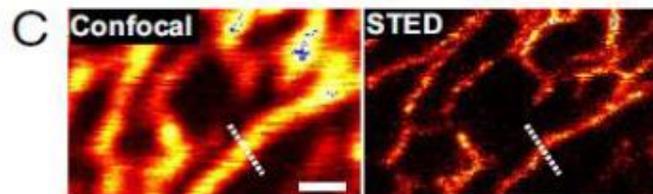
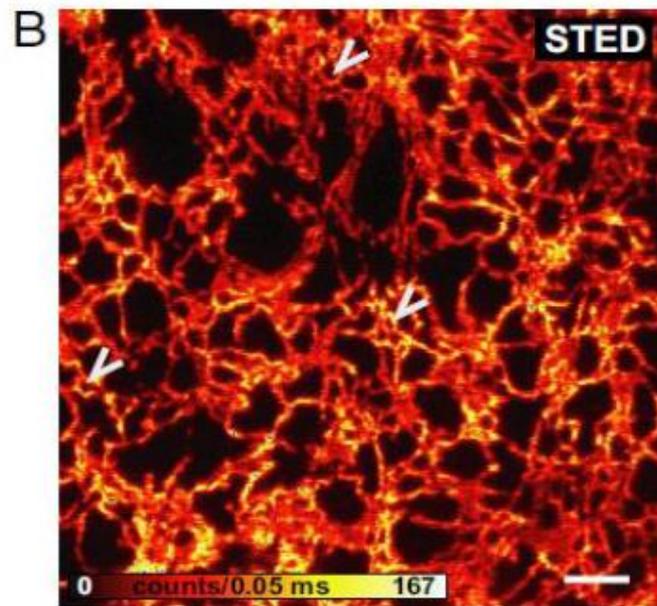
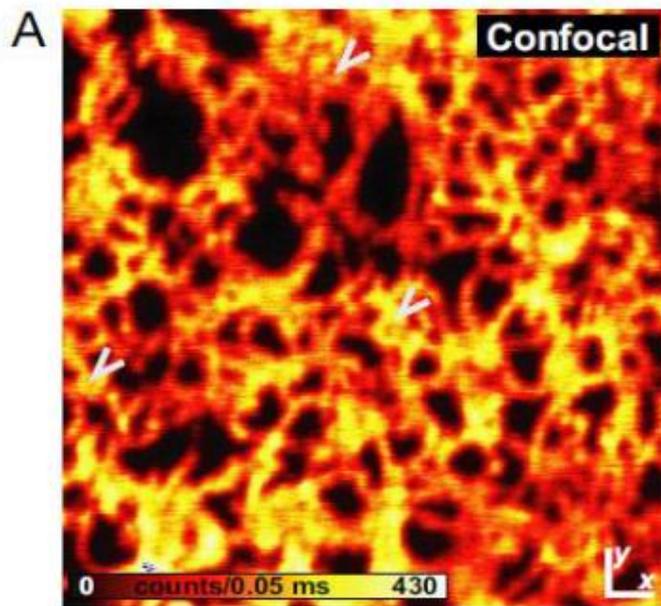


а — Процесс вынужденной и спонтанной эмиссии **б** — Схематическое изображение STED-микроскопа: свет от возбуждающего и STED-лазера одновременно фокусируются на одном участке образца. **в** — Распределение интенсивностей возбуждающего лазера и STED-лазера, который подавляет спонтанную флуоресценцию вокруг нулевой точки. В результате сужается функция рассеяния точки

Метод STED позволяет получить субдифракционное разрешение 10-100 нм

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \times \left(1 + \frac{I_{\max}}{I_{\text{sat}}}\right)^{1/2}}$$

где I_{\max} — применяемая интенсивность STED-лазера, I_{sat} — интенсивность, которая необходима для 50% вынужденной эмиссии



Метод последовательной активации флуорофоров

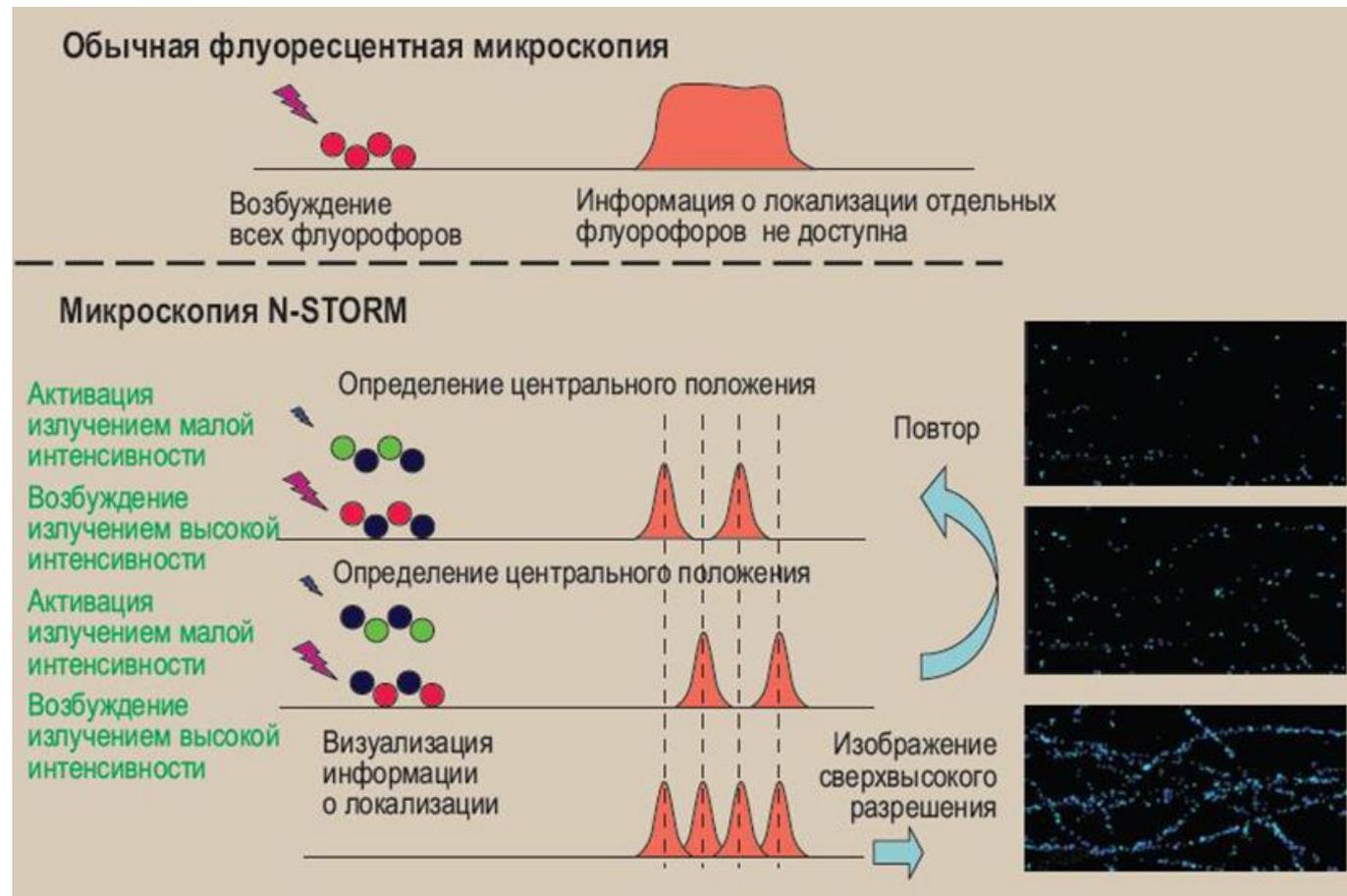
Использует последовательное возбуждение молекул флуорофоров, окрашивающих объект, таким образом, чтобы каждая молекула была представлена в качестве одного дифракционного пятна.

Такие повторяющиеся циклы импульсов позволяют определить положение всех молекул, что при наложении дает изображение с крайне высоким разрешением и точными координатами каждой молекулы флуорофора.

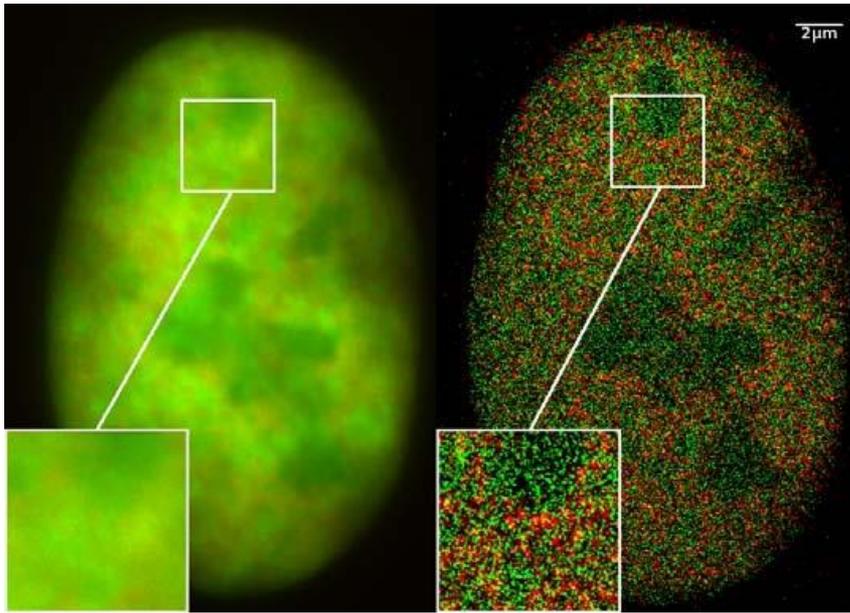
Используются переключаемые (photoswitchable) флуоресцентные красители

Разрешение метода Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, 'STORM' может достигать 20-30 нм в латеральном направлении и 50-60 в вертикальном

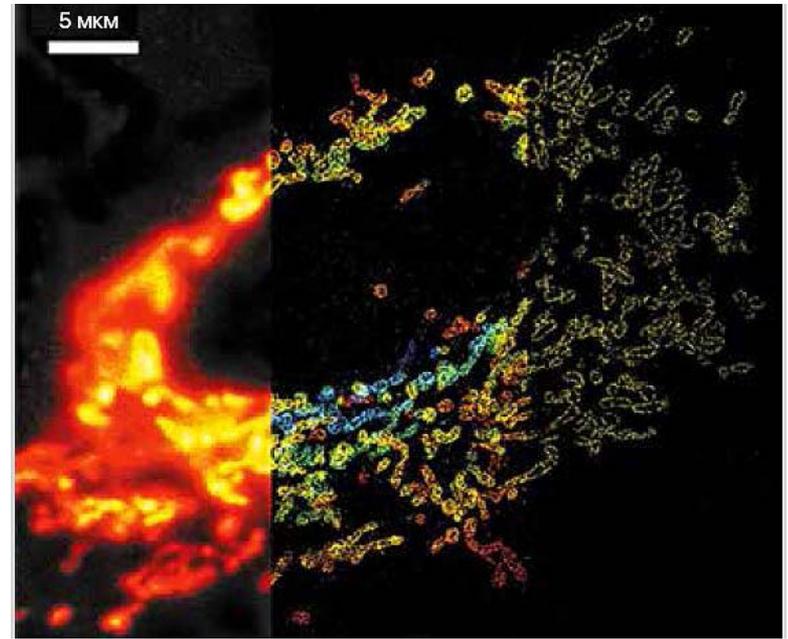
$$\Delta x = \frac{k_1}{N^{1/2}} + \frac{k_2 b}{N}$$



Примеры изображений



Изображение ядра раковой клетки, полученное с помощью флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (справа). При помощи зеленого и красного флуоресцентного белков локализовано около 1200 молекул.



Сравнение изображений митохондрий в клетках млекопитающих, полученных с помощью конфокального лазерного микроскопа и методом микроскопии со сверх разрешением STORM

Основные причины «мигания» флуоресцентных молекул

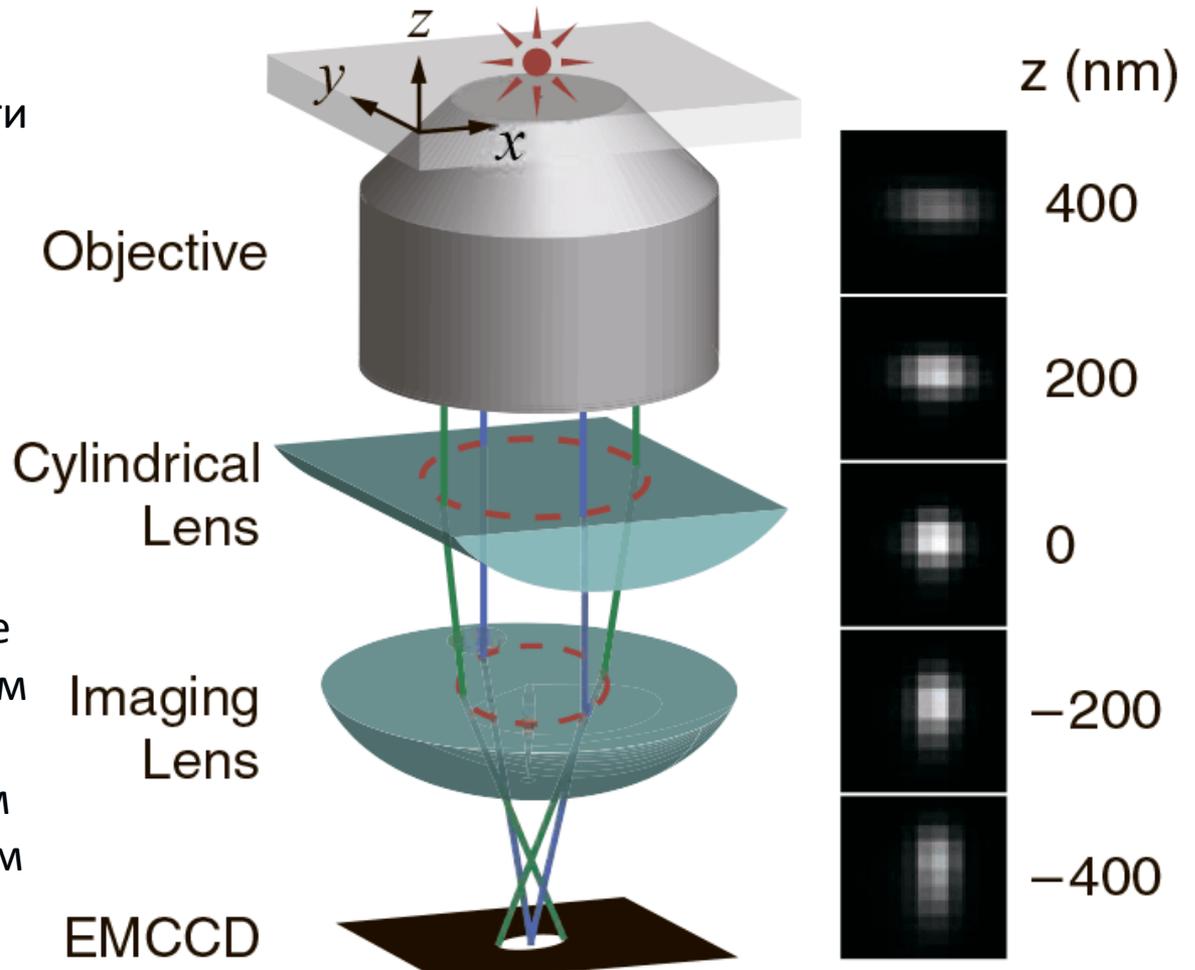
- 1) Переход в триплетные состояния
- 2) Обратимые переходы в альтернативные химические состояния (фотоиндуцированный перенос электрона -> формирование радикал-аниона или радикал-катиона)
- 3) Фотохромный эффект: обратимые химические модификации, изомеризация.

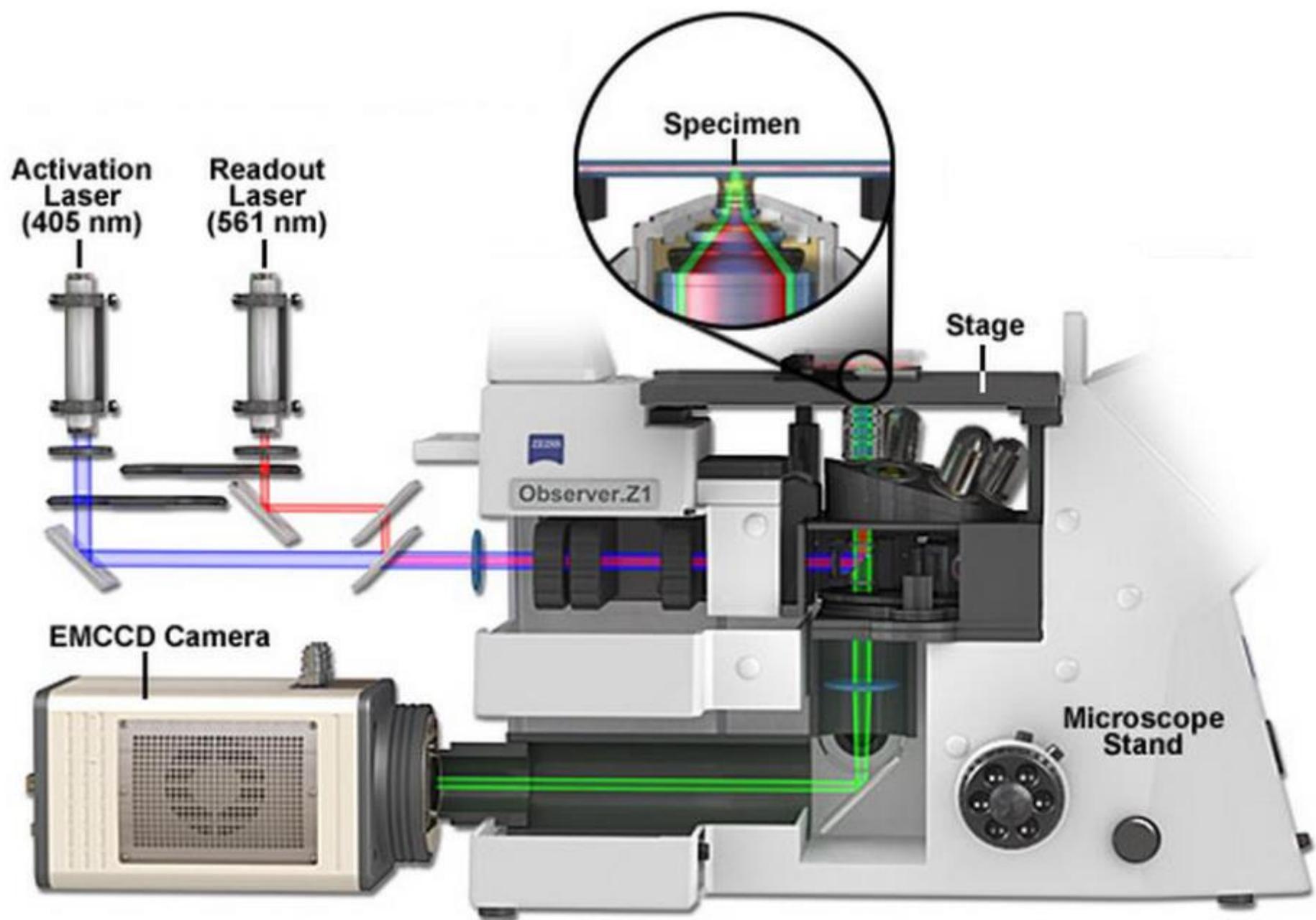
3D-STORM

Фокальные плоскости в направлениях X и Y немного отличаются.

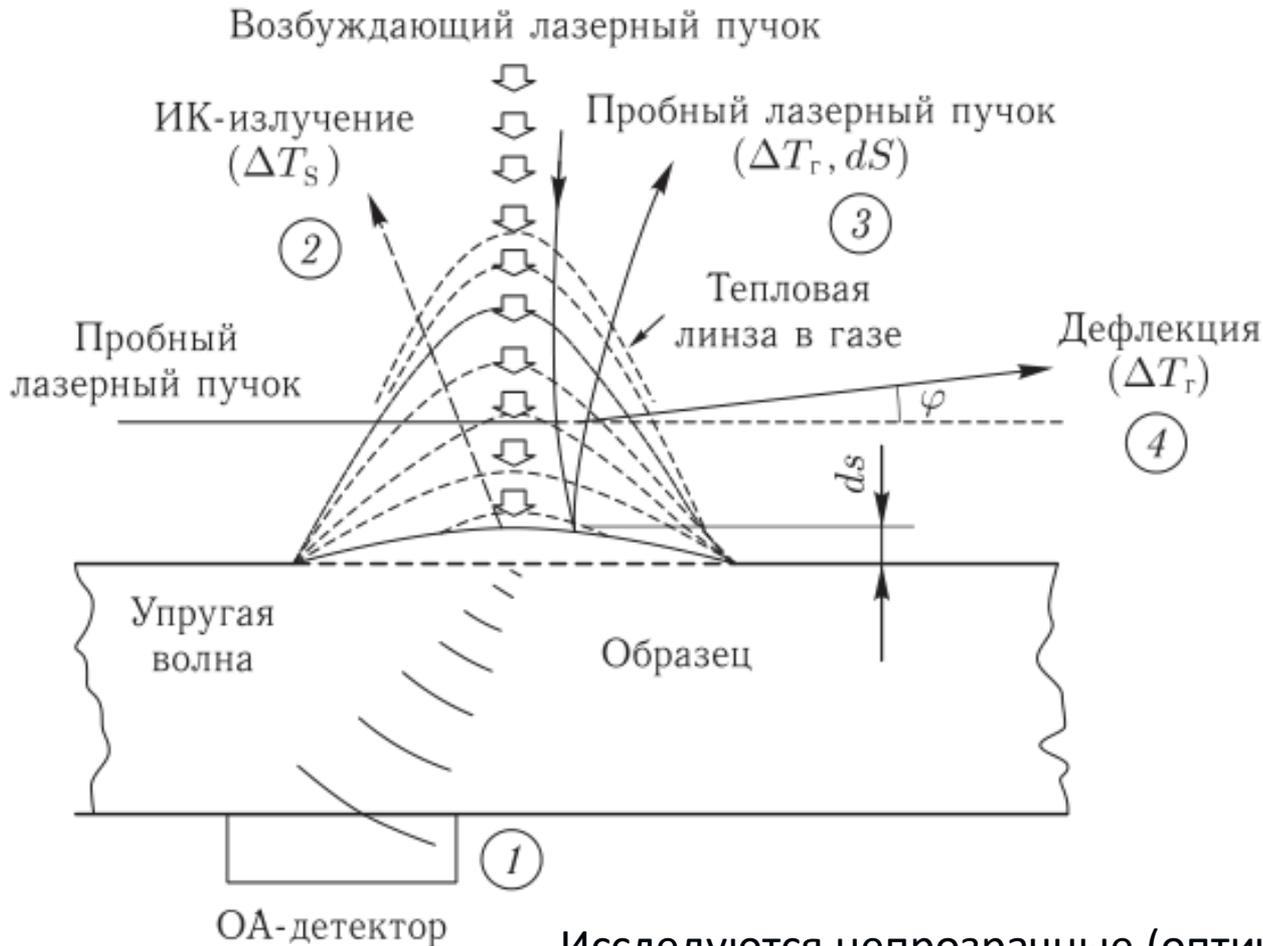
Таким образом, эллиптичность и ориентация изображения флуорофора зависит от его положения по оси Z.

Когда флуорофор находится в средней фокальной плоскости (примерно посередине между фокальными плоскостями для латеральных направлений X и Y), то функция рассеяния точки изодиаметрична (имеет одинаковую длину по осям X и Y). Когда флуорофор расположен выше фокальной плоскости, изображение более сфокусировано вдоль оси Y, чем оси X, поэтому оно выглядит не круглым, как в предыдущем случае, а овальным (вытянутым вдоль оси X).





Фотоакустическая спектроскопия



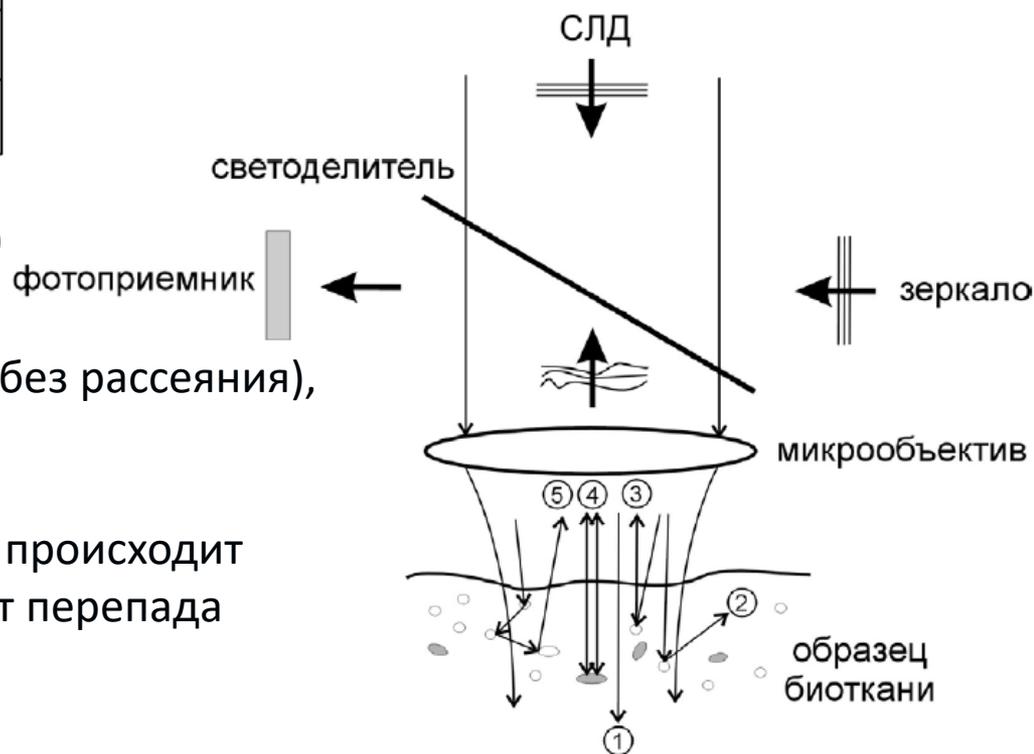
Исследуются непрозрачные (оптически плотные) и слабо флуоресцирующие объекты, контролируется протекание фотохимических и фотоэлектрических процессов

Оптическая томография

Оптическая когерентная томография (ОКТ) – высокоразрешающий метод получения изображения внутренней микроструктуры биотканей, основанный на интерферометрическом детектировании обратно рассеянного света ближнего инфракрасного (ИК) диапазона



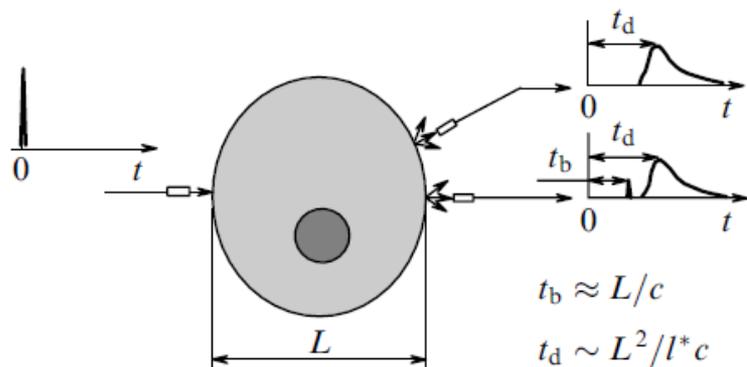
Типы рассеивающих взаимодействий света с биотканью



- 1 – баллистические фотоны (проходящие без рассеяния),
- 2 – рассеяние под большими углами,
- 3 – однократное рассеяние назад,
- 4 – отражение строго назад, при котором происходит искажение фазового фронта волны за счет перепада показателя преломления среды,
- 5 – рассеяние под малыми углами

Импульсная томография

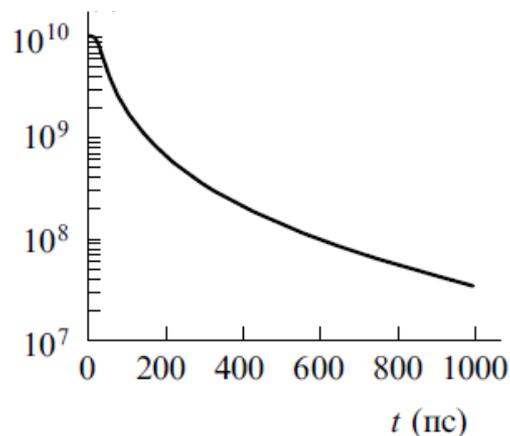
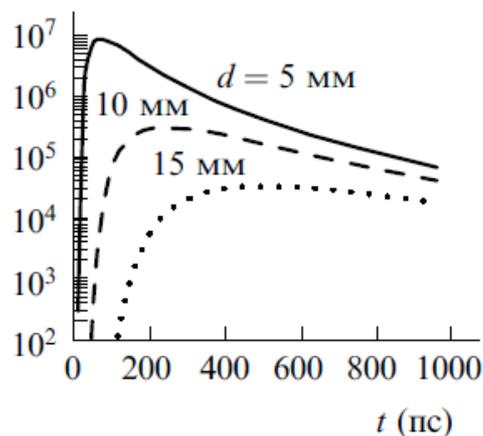
При детектировании излучения, прошедшего через объект в направлении зондирующего пучка, импульсу диффузно рассеянного излучения предшествует баллистический предвестник, обусловленный нерассеянной составляющей.



t_b и t_d — времена запаздывания баллистической и диффузной составляющих прошедшего излучения;

$$t_b \approx L/c$$

$$t_d \sim L^2/l^*c$$

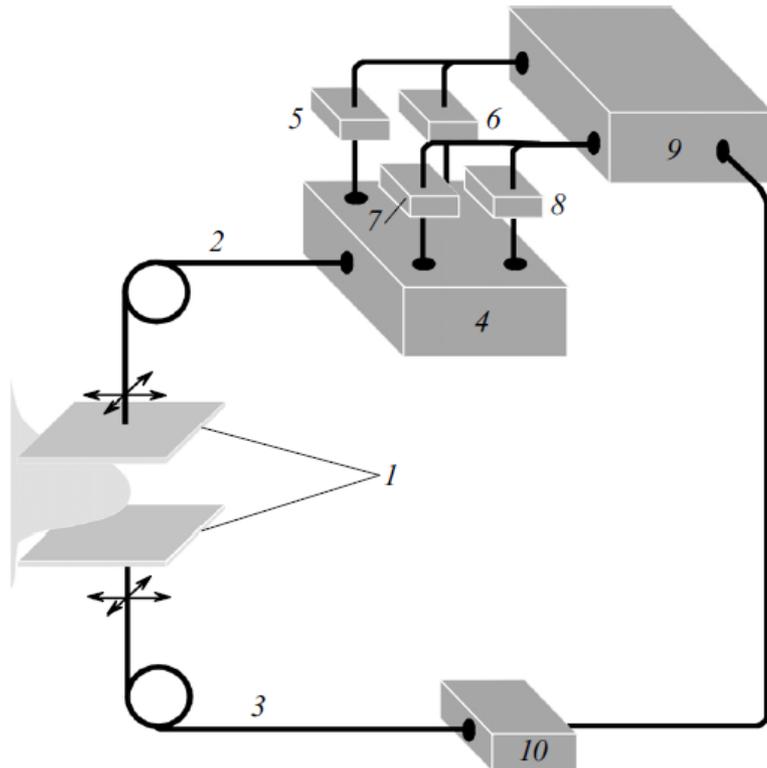


Формы импульсов диффузно отраженного излучения для модели зондирования рассеивающей среды локализованным источником при детектировании точечным детектором или со всей рассеивающей поверхности

В качестве источников излучения в импульсных системах применяются диодные лазеры, излучающие в диапазоне 600–1500 нм пикосекундные импульсы (~ 50 пс) при энергии порядка 10 пДж, твердотельные лазеры в режиме модуляции добротности, а также лазеры на красителях. Приемниками служат лавинные фотодиоды, ФЭУ

Модуляционная томография

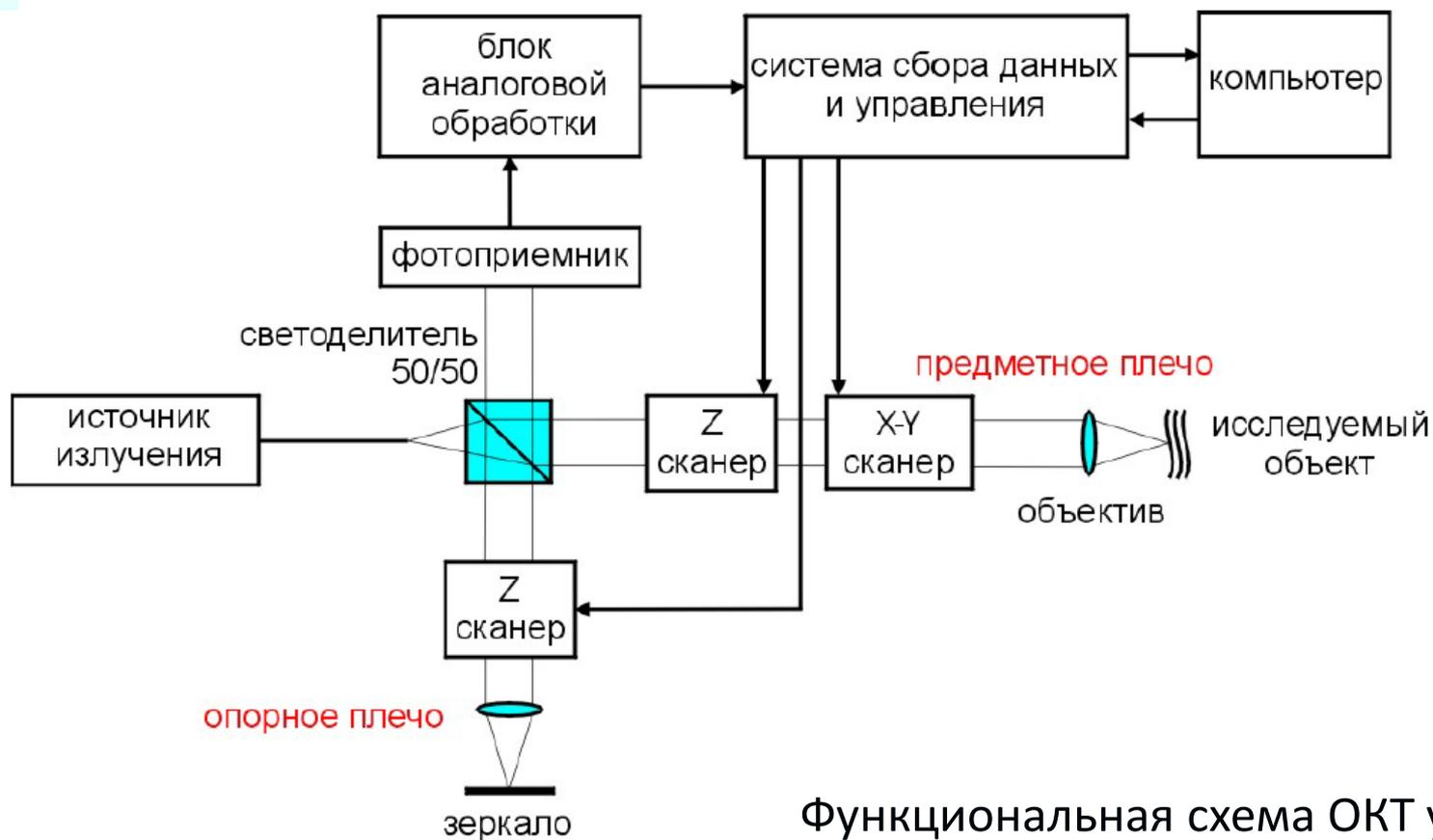
Метод основан на использовании СВЧ-модулированного зондирующего излучения и анализе амплитудно-частотных или амплитудно-фазовых характеристик рассеянного излучения для различных положений источника и приемника относительно объекта и называется частотным или фазовым методом.



1 – устройство фиксации объекта,
2, 3 – световоды передачи-приема,
4 – волоконно оптический
мультиплексор, 5-8 – набор лазерных
диодов,
9 – блок управления,
10 – ФЭУ

Оптическая когерентная томография

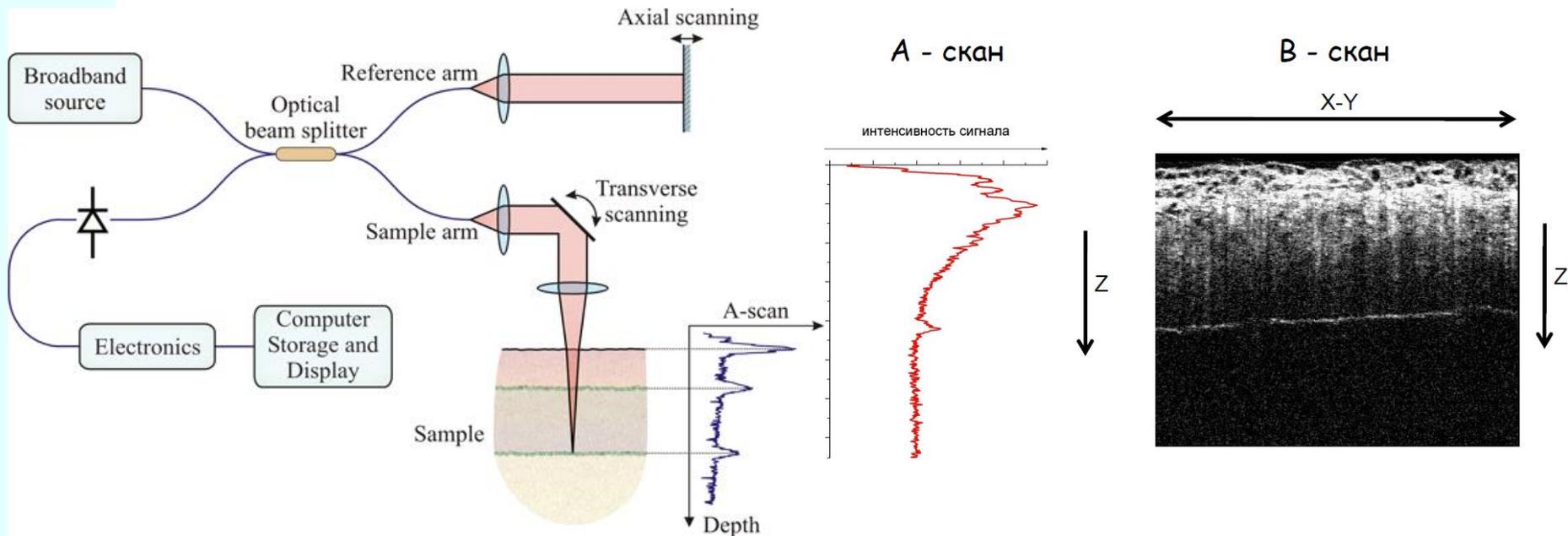
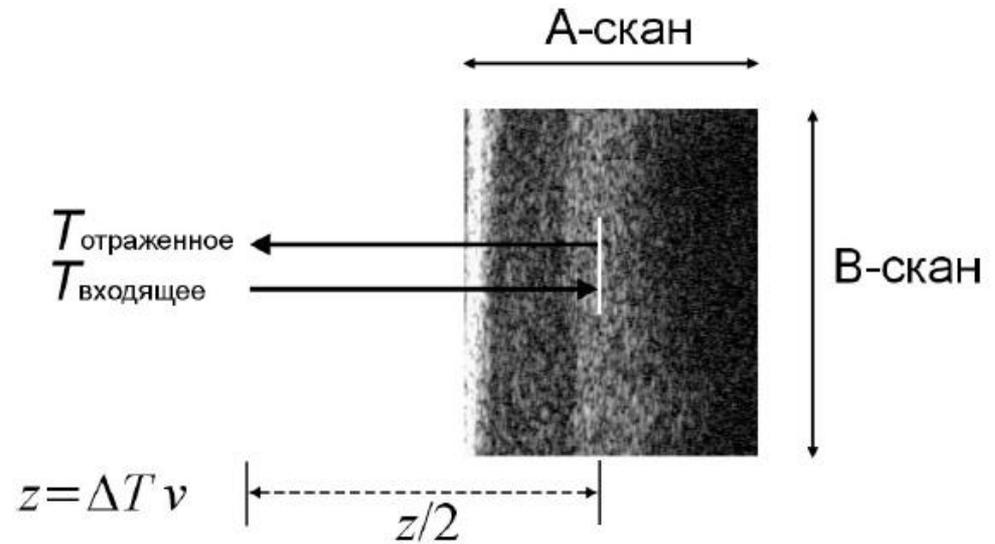
Оптическая когерентная томография (ОКТ) – высокоразрешающий метод получения изображения внутренней микроструктуры биотканей, основанный на интерферометрическом детектировании обратно рассеянного света ближнего инфракрасного (ИК) диапазона



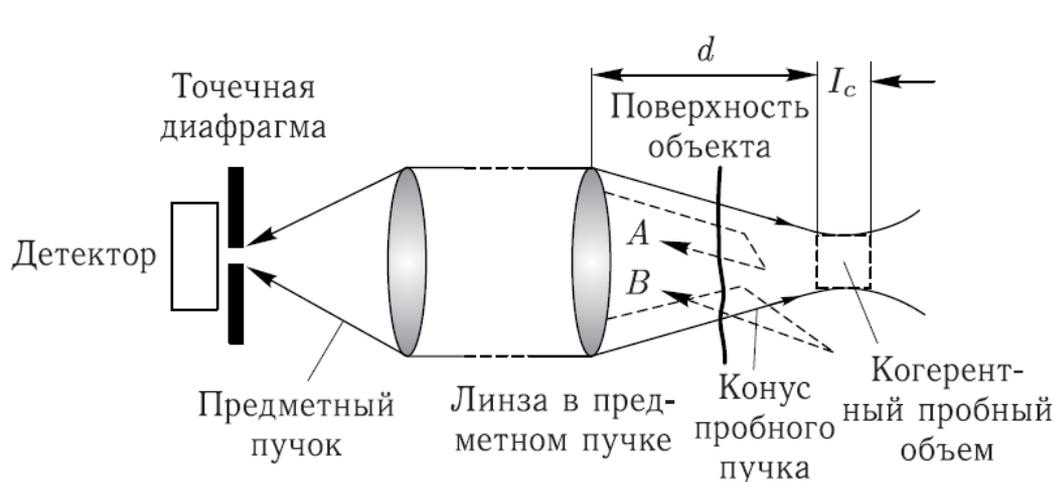
Функциональная схема ОКТ устройства

Формирование изображений ОКТ

Объединяя боковое сканирование и сканирование по глубине, ОКТ позволяет получить двумерное изображение в поперечном сечении микроструктуры ткани



Длина когерентности источника излучения определяет аксиальное (продольное) разрешение ОКТ, или разрешение по глубине, и характеризует размер наименьших объектов, различимых на изображении.



$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_c^2}{\Delta \lambda}$$

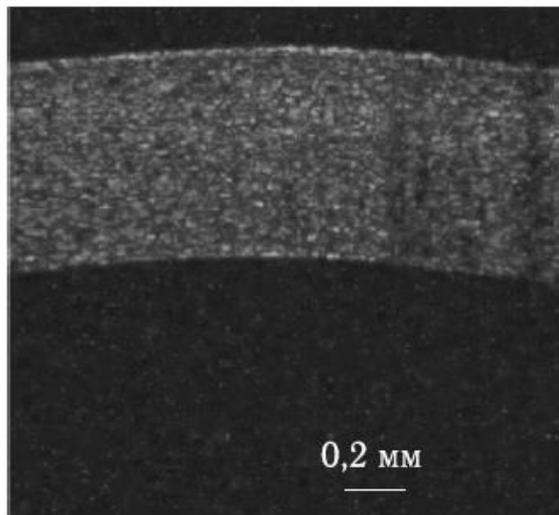
λ_c - длина волны,
 $\Delta \lambda$ - полуширина спектра излучения.

Продольное разрешение в стандартной ОКТ обычно составляет 10-15 мкм
 Боковое (поперечное, латеральное) разрешение определяется пространственной шириной или размером (фокусировкой) оптического пучка и может составлять от 1 до 20 мкм в перетяжке пучка

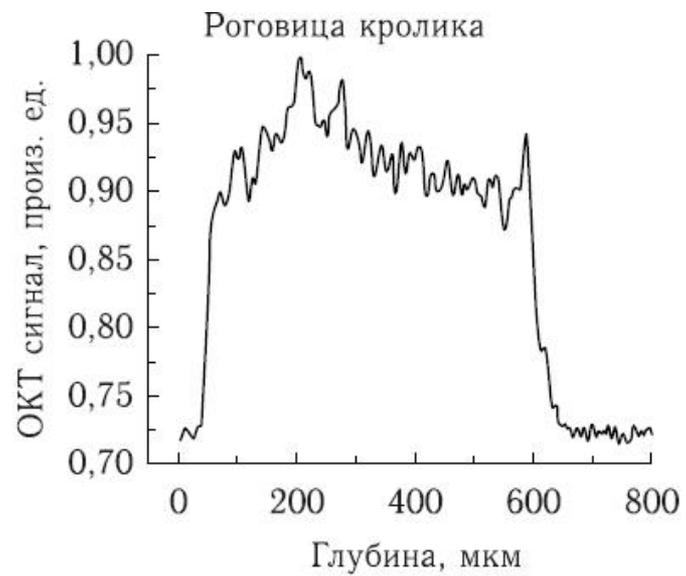
Глубина зондирования - 1-2 мм

Скорость сканирования - 400 А-сканов в секунду

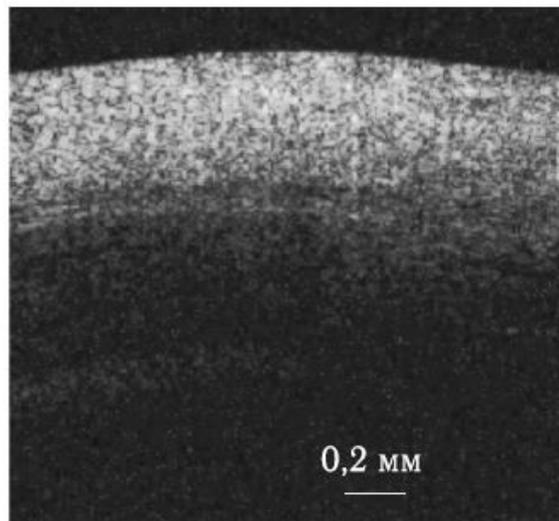
В качестве источников света используются непрерывные диодные излучатели (суперлюминисцентные диоды и лазеры в подпороговом режиме), импульсные, работающие в режиме периодической генерации ультракоротких импульсов.



a



б



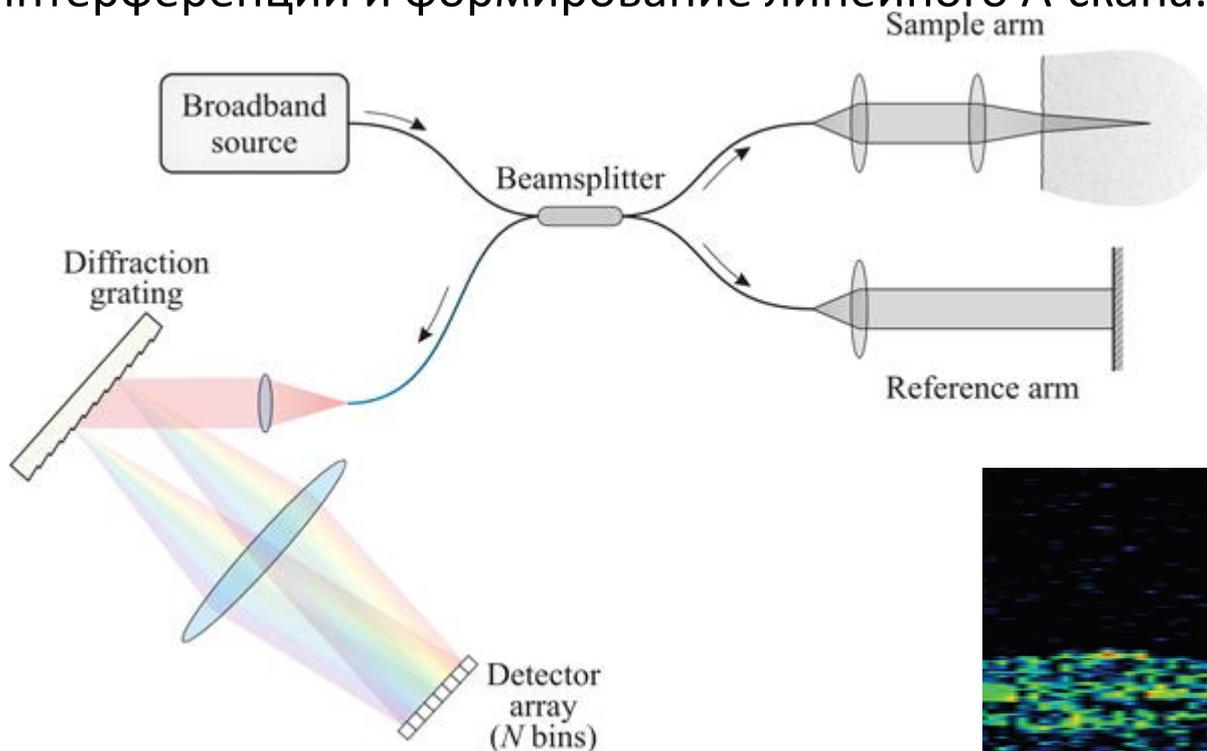
в



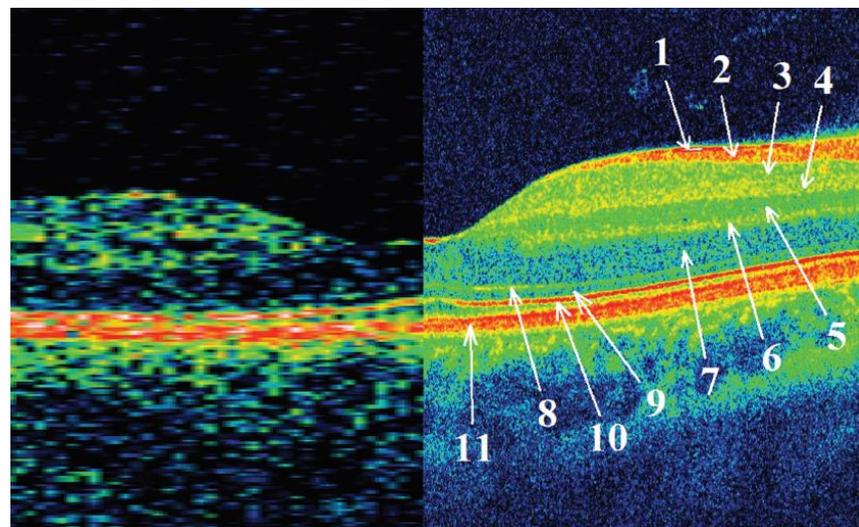
г

Спектральная ОКТ

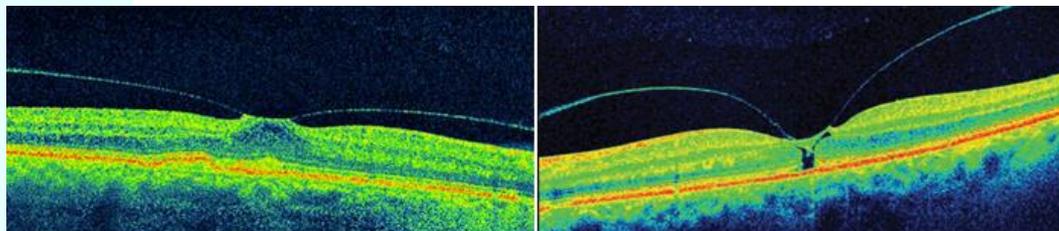
Проинтерферировавший луч раскладывается на спектральные составляющие, фиксируемые высокоскоростной CCD-камерой. С помощью математического преобразования Фурье происходит обработка полученного спектра интерференции и формирование линейного A-скана.



Линейный скан макулярной области сетчатки в норме на временном оптическом когерентном томографе (А) и спектральном томографе (Б)

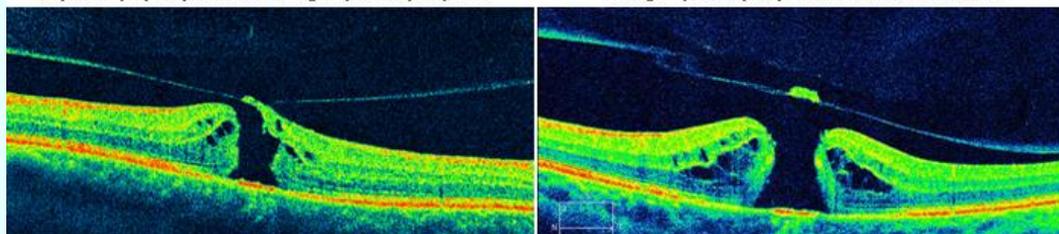


Оптическая томография



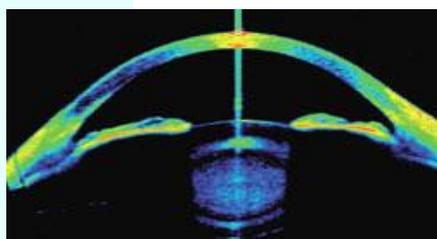
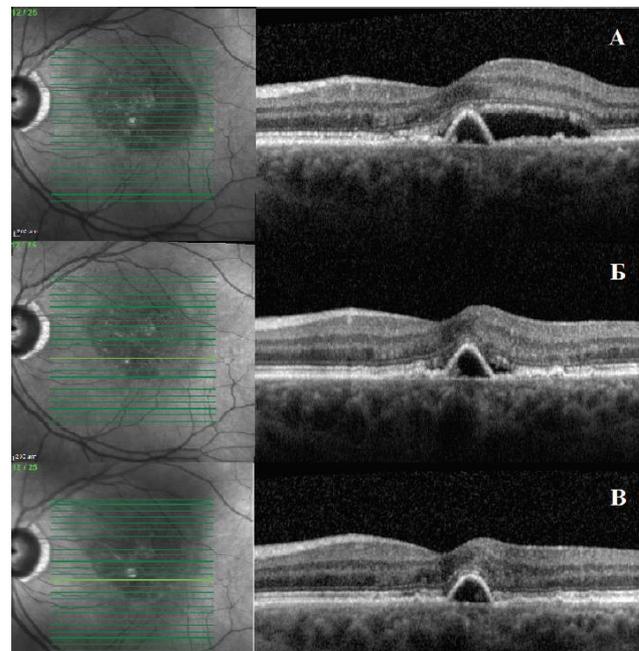
Угроза формирования макулярного разрыва

Макулярный разрыв сетчатки I стадии

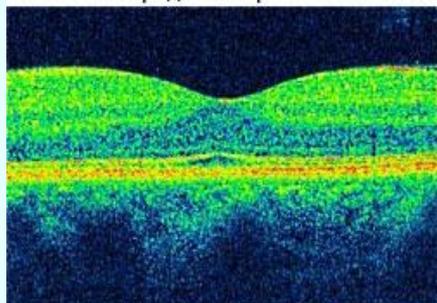


Сквозной макулярный разрыв II стадии

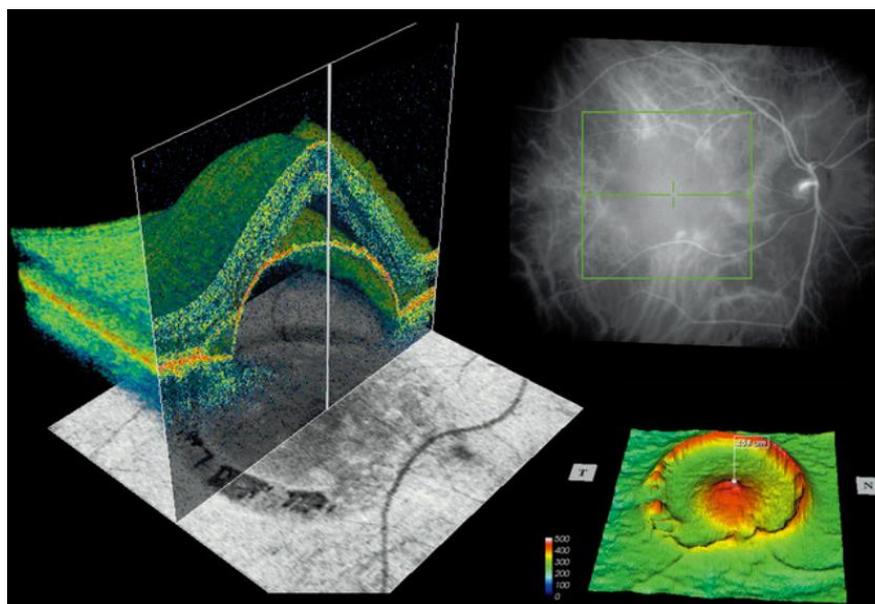
Макулярный разрыв III стадии



ОКТ переднего отрезка глаза



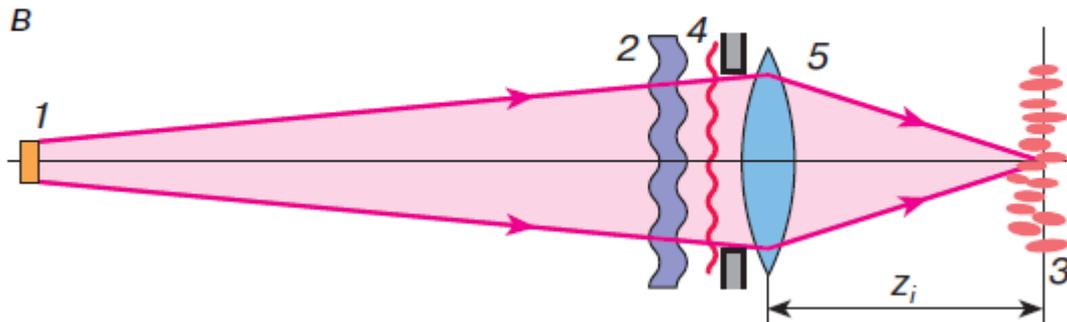
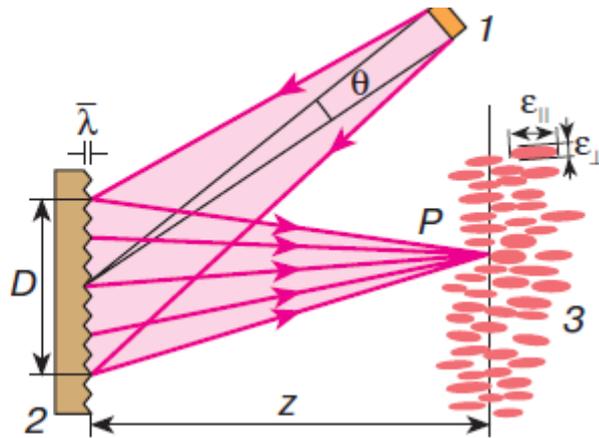
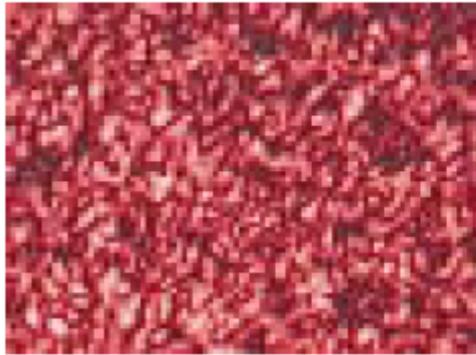
ОКТ сетчатки



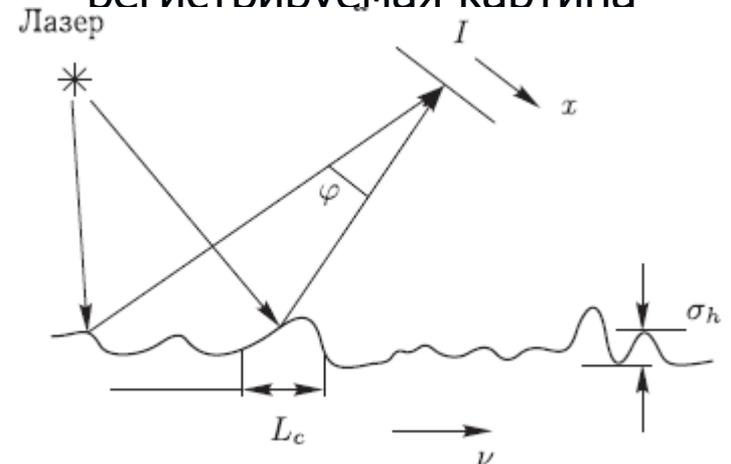
На фоне лечения наблюдается уменьшение отслойки нейроэпителия сетчатки.

Спекл-интерферометрия

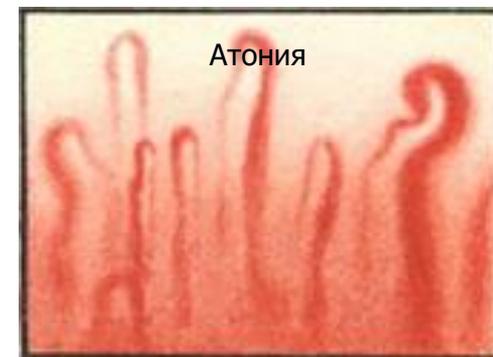
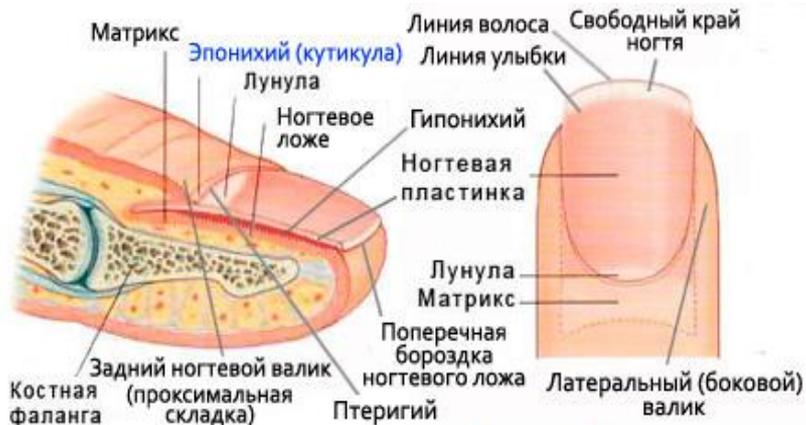
Статические и динамические спеклструктуры (поля) формируются в результате интерференции большого числа элементарных волн со случайными фазами, возникающими при отражении когерентного света от неподвижной или движущейся шероховатой поверхности биоткани или при его прохождении через рассеивающую свет биоткань.



Спекл-картина в поле дифракции лазерного луча на шероховатой поверхности, возможные схемы наблюдения спекл картин 1 – лазер, 2 – исследуемая поверхность, 3 – регистрируемая картина



Оптическая методика диагностики параметров циркуляции крови

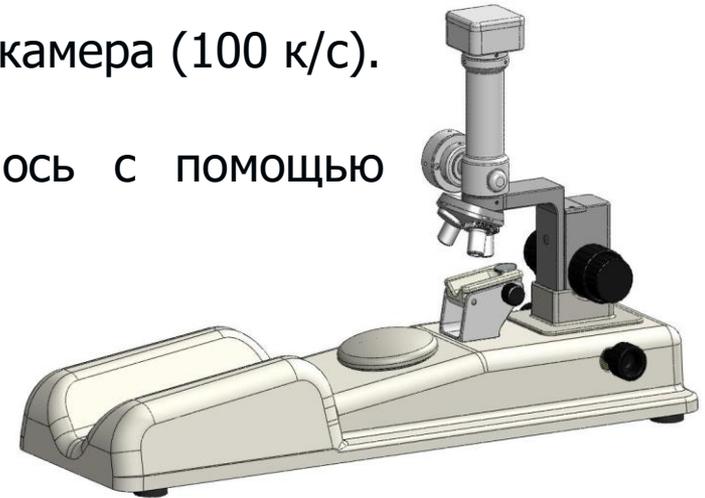


Объект наблюдения – ногтевая кутикула (эпонихий), образование с уникальным расположением капилляров. Сосуды проходят параллельно поверхности кожи на небольшой глубине, что позволяет исследовать их с различных сторон и различными методами.

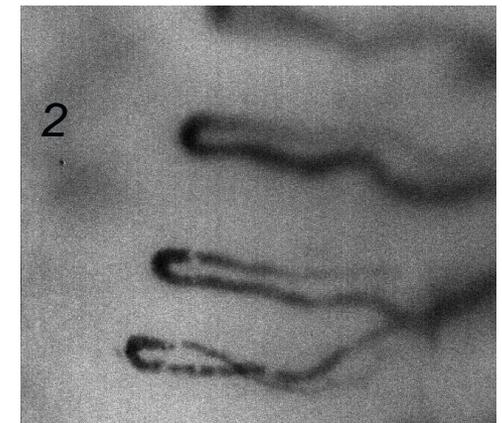
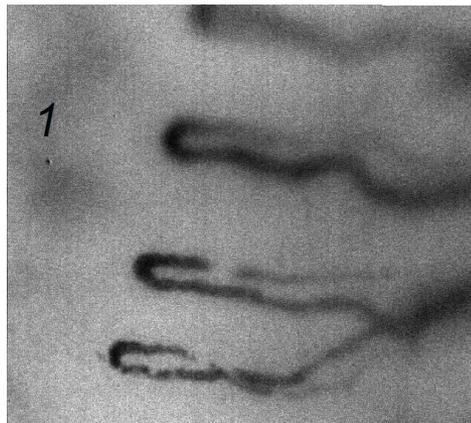
Оптическая методика диагностики параметров циркуляции крови

Для наблюдения использовалась быстрая видеокамера (100 к/с).

Освещение исследуемой области производилось с помощью светодиодных излучателей (520-540 нм).



*Характерное изображение
капилляров*



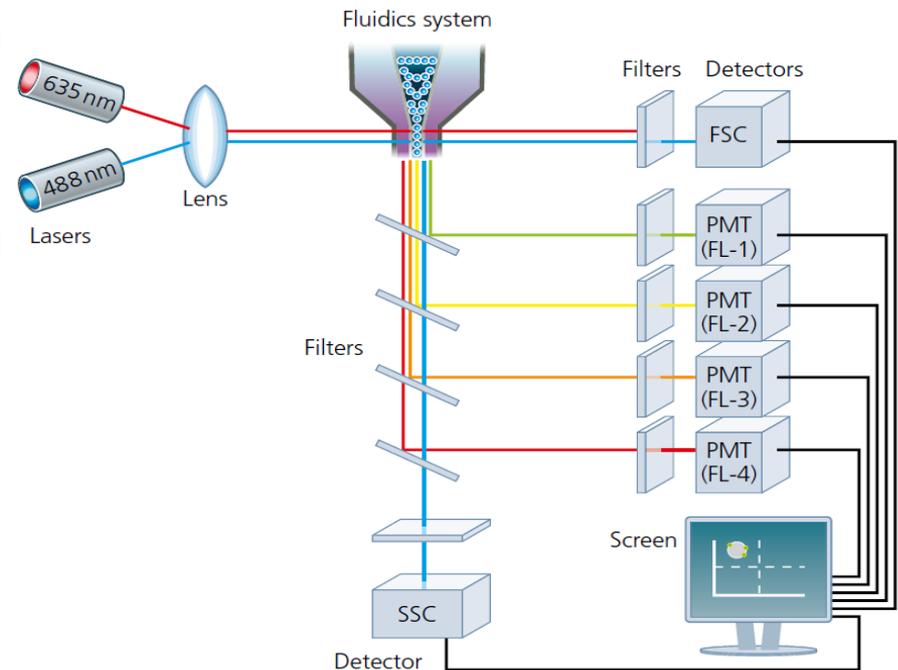
*Два кадра изображения капилляров,
выбранных из видеосъемки. Время между
кадрами 1 мс*

Проточная цитометрия

Проточная цитометрия — метод исследования дисперсных сред в режиме поштучного анализа элементов дисперсной фазы по сигналам светорассеяния и флуоресценции.

Применение:

- 1) Измерение свойств рассеяния и флуоресценции частиц
- 2) Подсчет клеток
- 3) Разделение "биологических и "небиологических" частиц
- 4) Разделение "живых" и "неживых" ча
- 5) Сортировка частиц/клеток
- 6) Получение изображений
- 7) Измерение редко-земельных металл



Проточная цитометрия

