

# Микроскопия

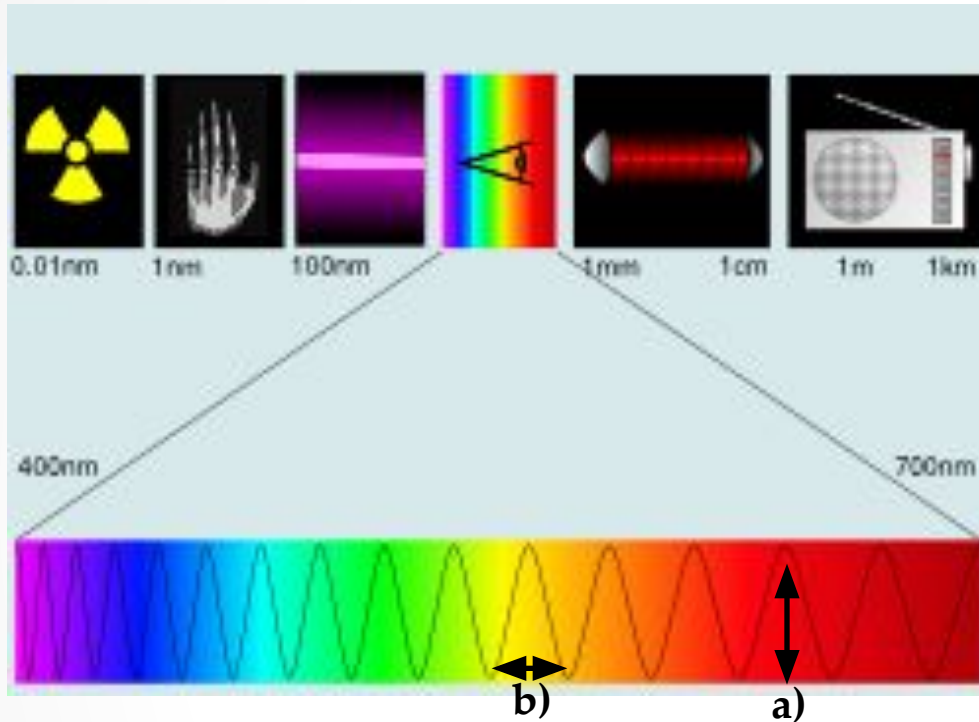
Стройлова Юлия Юрьевна  
с.н.с. лаборатории  
молекулярной и клеточной  
биологии Института  
молекулярной медицины

# История

- Первый прибор типа микроскопа был построен около 1590 г. Нидерландскими мастерами братьями Янсенами. С 1610 г. начинается быстрое совершенствование микроскопов.
- Роберт ГУК (1635-1703) - Разносторонний ученый и изобретатель. В 1665 году опубликовал труд «Микрография». Рассматривая тонкий срез пробки под микроскопом, обнаружил множество мелких ячеек и назвал их "клетками".



# Что такое свет?



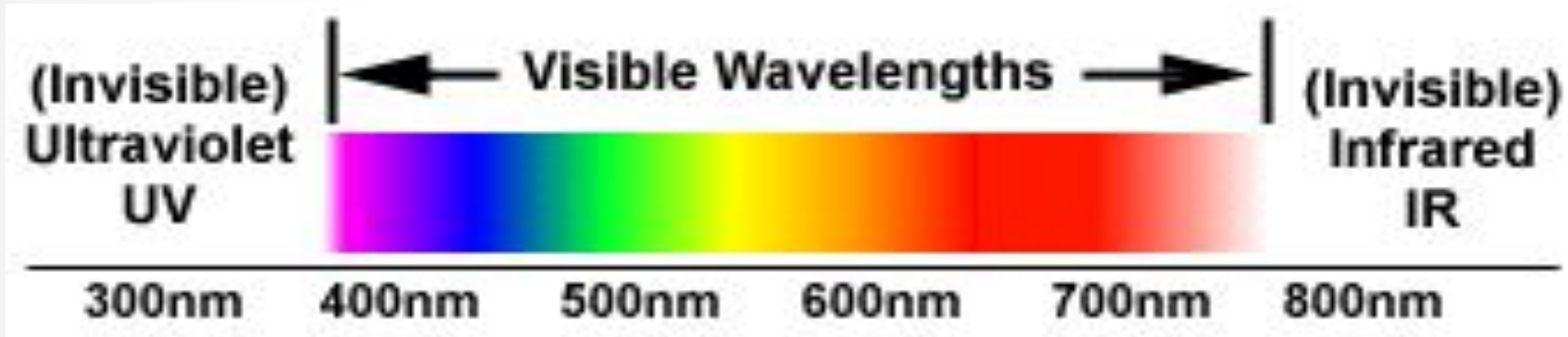
Light is electromagnetic radiation. What we usually describe as light is only the visible spectrum of this radiation with wavelengths between 400nm and 700nm.

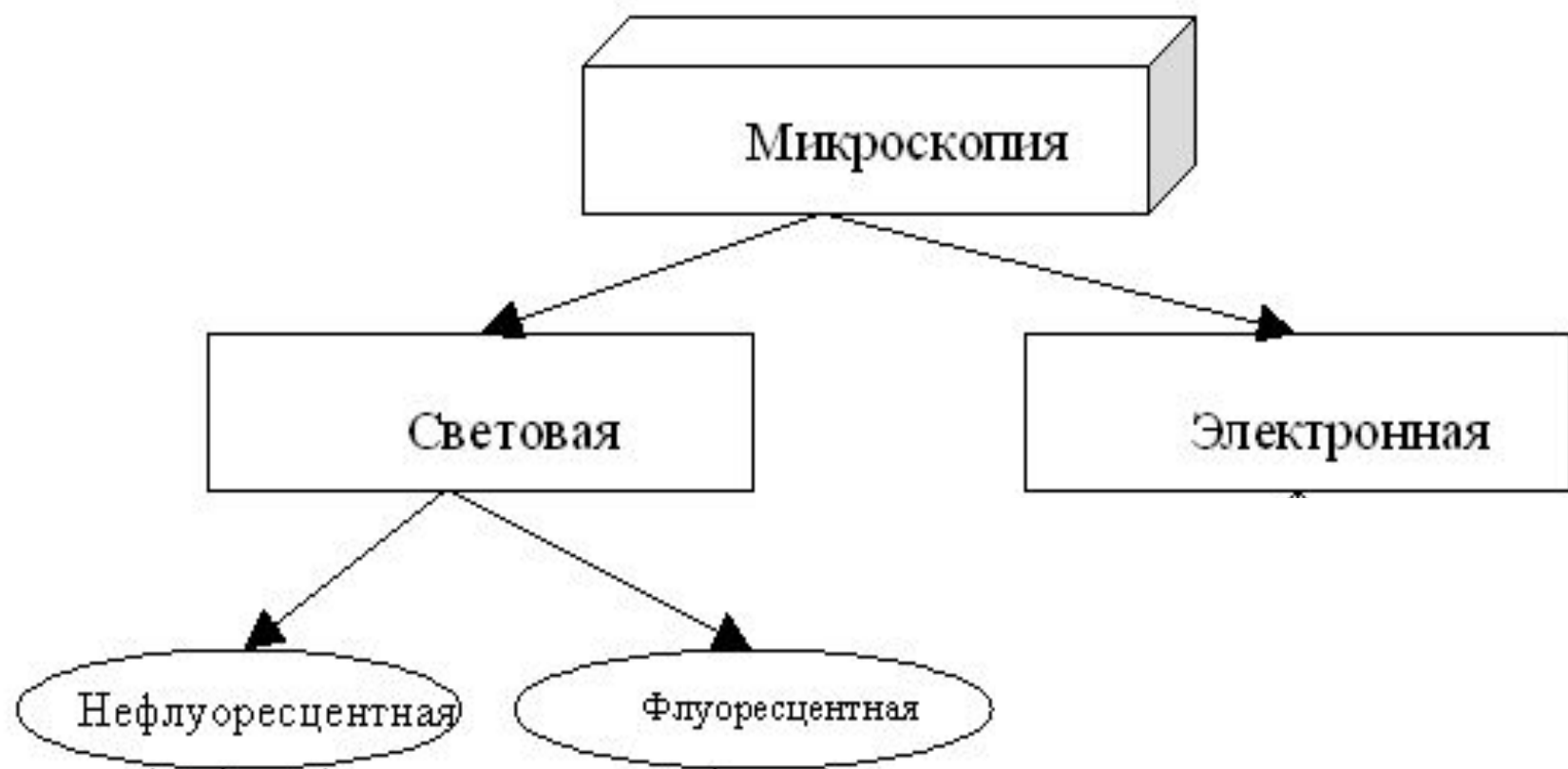
The elementary particle that defines light is the photon.

There are 3 basic dimensions of light

- a) Intensity (amplitude) which is related to the perception of brightness
- b) Frequency (wavelength), perceived as colour
- c) Polarization (angle of vibration) which is not or weakly perceptible to humans

# Видимая область спектра





Большинство клеток имеет диаметр от 1 до 100 мкм в диаметре, их можно наблюдать в световой микроскоп, также можно и большие органеллы: ядро, хлоропласты, митохондрии.

Главная характеристика микроскопа – его разрешающая способность, т.е. способность микроскопа различать объекты, находящиеся около друг друга на небольшом расстоянии. Это свойство является даже более важным чем увеличение. Изображение может быть увеличено как угодно (например, проектированием на большой экран), но такое увеличение не приводит к возрастанию наблюдаемого уровня детализации.

Предел разрешения светового микроскопа приблизительно 0.2 мкм. Два объекта разделенные менее чем на это расстояние, будут смотреться как одна картинка.

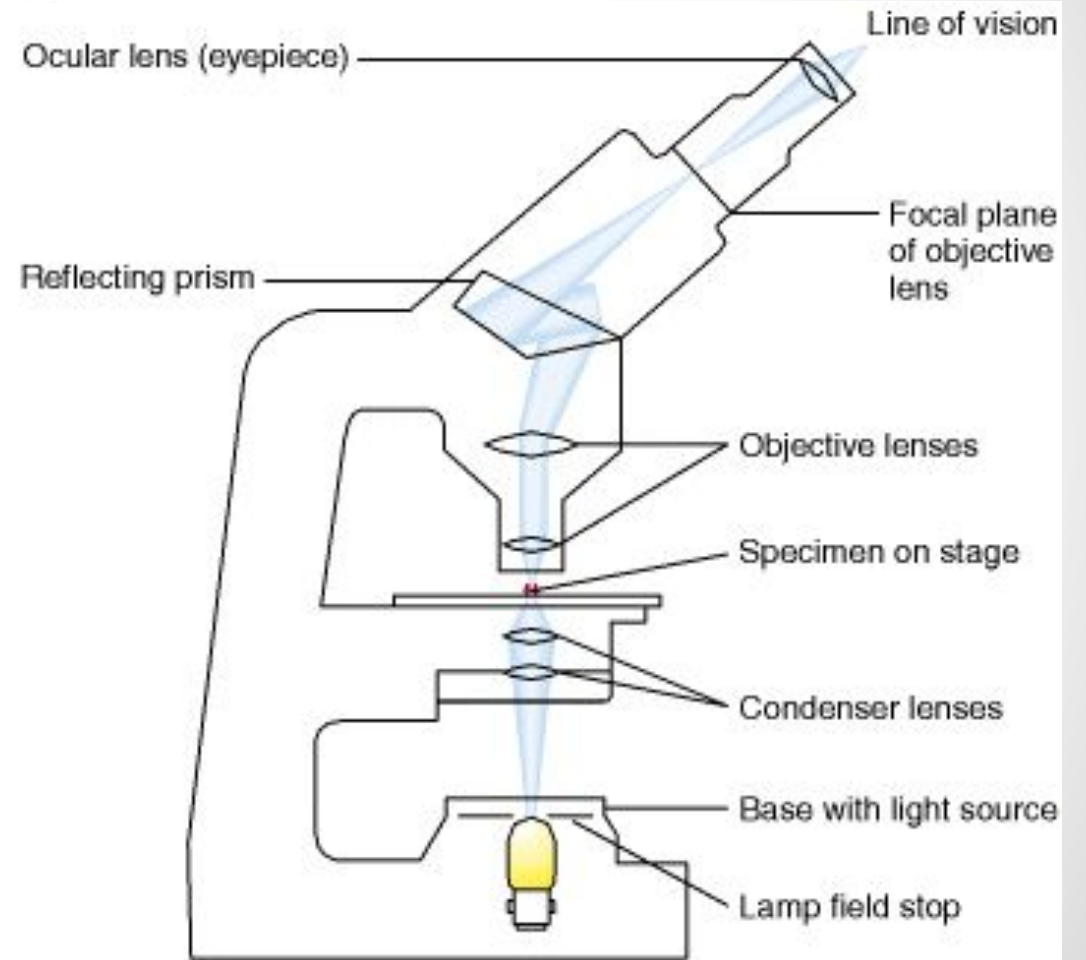
# Imaging Techniques

<b>Technique</b>	<b>Image Formed By</b>	<b>Lowest Resolvable Unit</b>	<b>Approx Lower Limit</b>
Optical Microscopy	Light Rays	Microns ( $\mu\text{m}$ )	1 $\mu\text{m}$ (monochromatic light)
Confocal Microscopy	Coherent Light Source (Laser)	Microns ( $\mu\text{m}$ )	.1 $\mu\text{m}$ (X-Y Direction)
Transmission Electron Microscopy (TEM)	Electrons	Angstroms ( $\text{\AA}$ )	2 $\text{\AA}$ (high resolution TEM)
Scanning Electron Microscopy (SEM)	Electrons	Nanometers (nm) to Angstroms ( $\text{\AA}$ )	10 nm (100 $\text{\AA}$ )
Atomic Force & Scanning Tunneling Microscopies (AFM/STM)	Molecular Mechanical Probes	Angstroms ( $\text{\AA}$ )	40 $\text{\AA}$ (theoretical)

# Световая микроскопия

**светлопольная** микроскопия, которую чаще всего называют просто микроскопия;

**темнопольная** микроскопия; - фазово-контрастная микроскопия в темном или светлом поле (позитивный или негативный фазовый контраст);





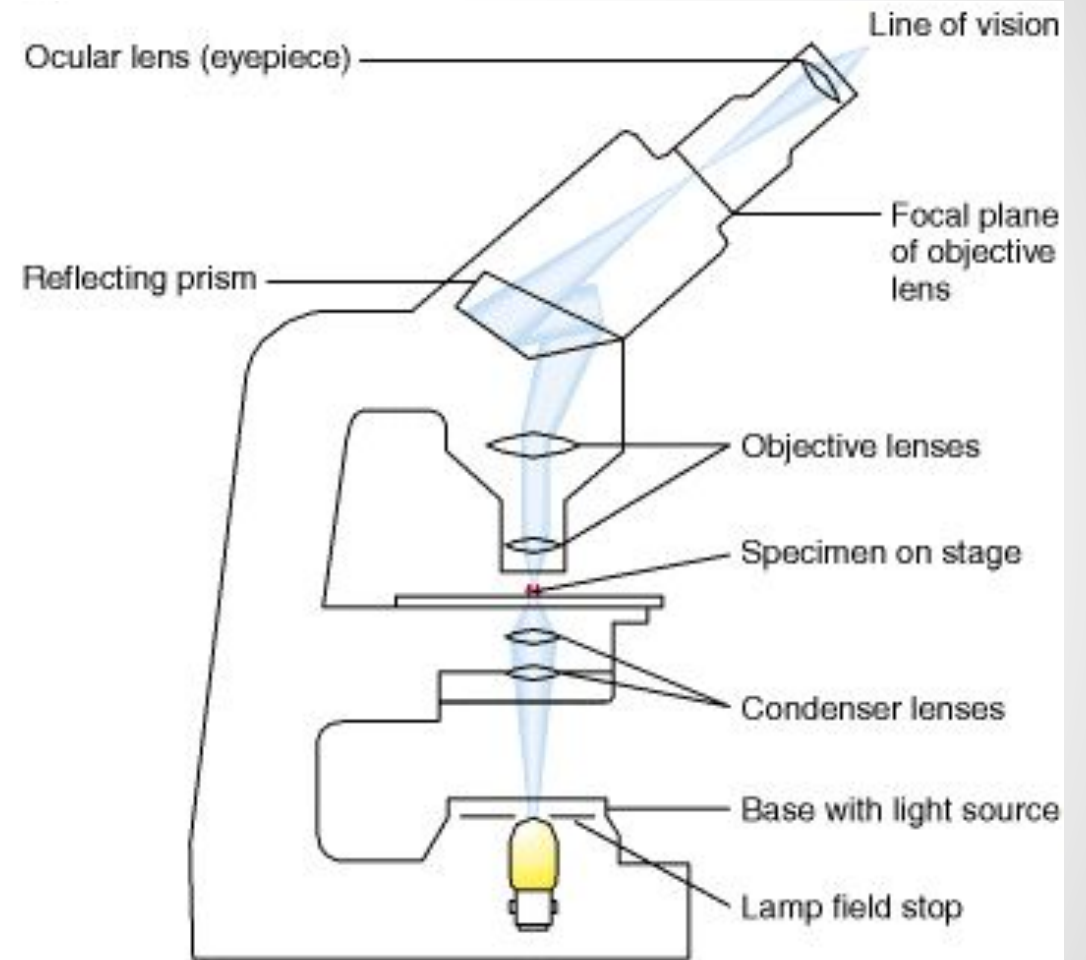
# Светлопольная микроскопия

При светлопольной микроскопии или микроскопии в светлом поле изображение формируется под воздействием прямого светового потока прямо проходящего через изучаемый объект.

Получаемое изображение - **темное на светлом поле**.

Данный метод позволяет хорошо различить структуру и детали изучаемого объекта, если он состоит из частей с разной оптической плотностью (эритроциты, лейкоциты). Для этого метода не нужны специальные дополнительные устройства.

Основной недостаток – низкий контраст изображения.

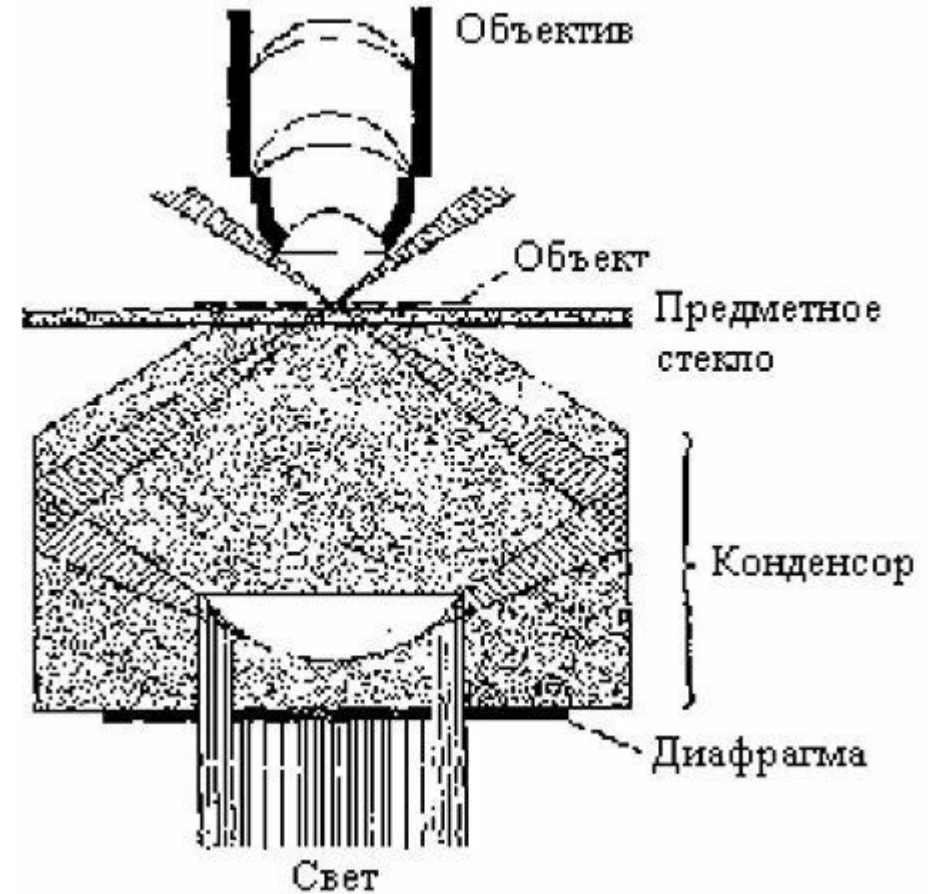


# Темнопольная микроскопия

Микроскопия в темном поле зрения основана на следующем принципе - лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя: поле зрения остается темным, а объект на его фоне оказывается светящимся. Это достигается с помощью специального конденсора (параболоид) или обычного конденсора, прикрытого в центре кружком черной бумаги.

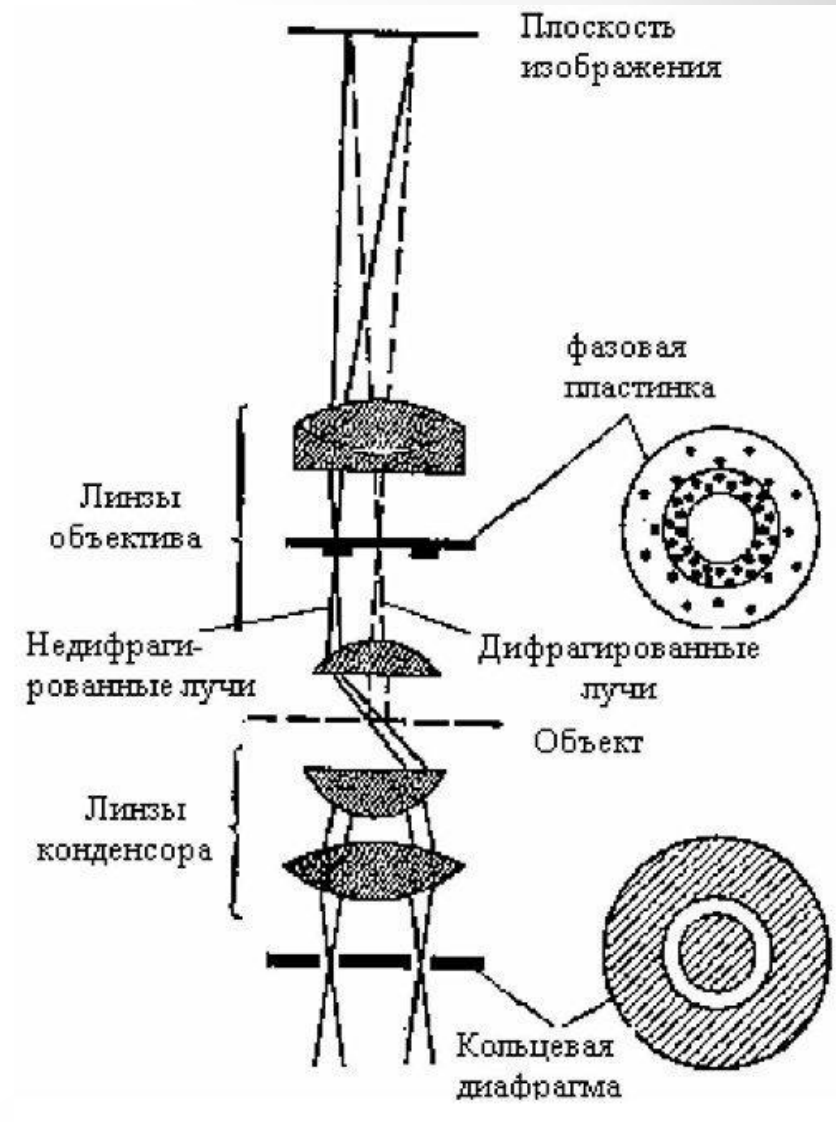
Прямые лучи от осветителя в объектив не попадают. Объекты при темнопольной микроскопии выглядят **ярко светящимися на темном фоне.**

При использовании этого метода хорошо различимы мелкие объекты, но детали и структура крупных объектов (от 2-3 мкм) практически не различимы, так как виден только светящийся контур. Для темнопольной микроскопии нужен темнопольный конденсор.

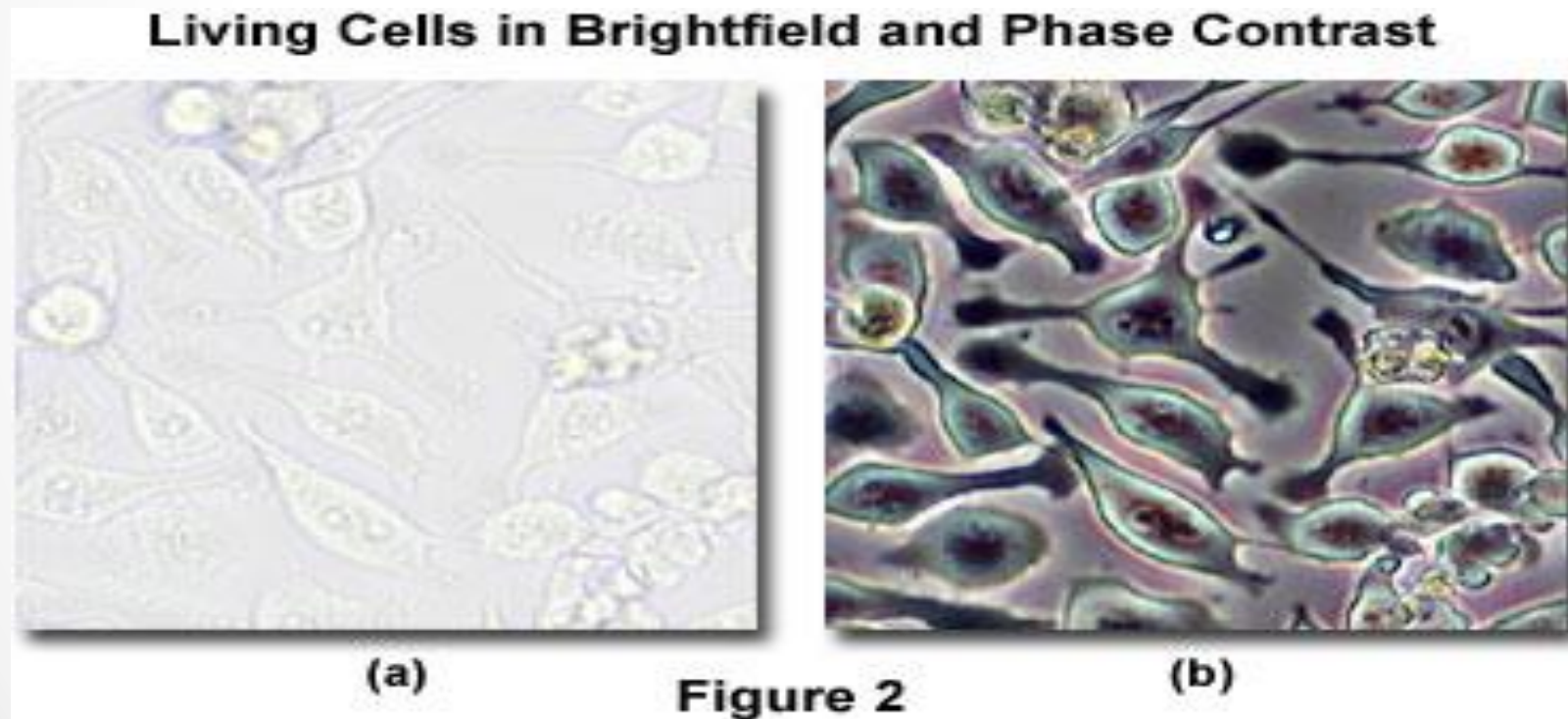


# Фазово-контрастная микроскопия

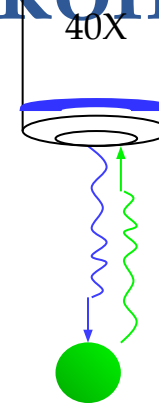
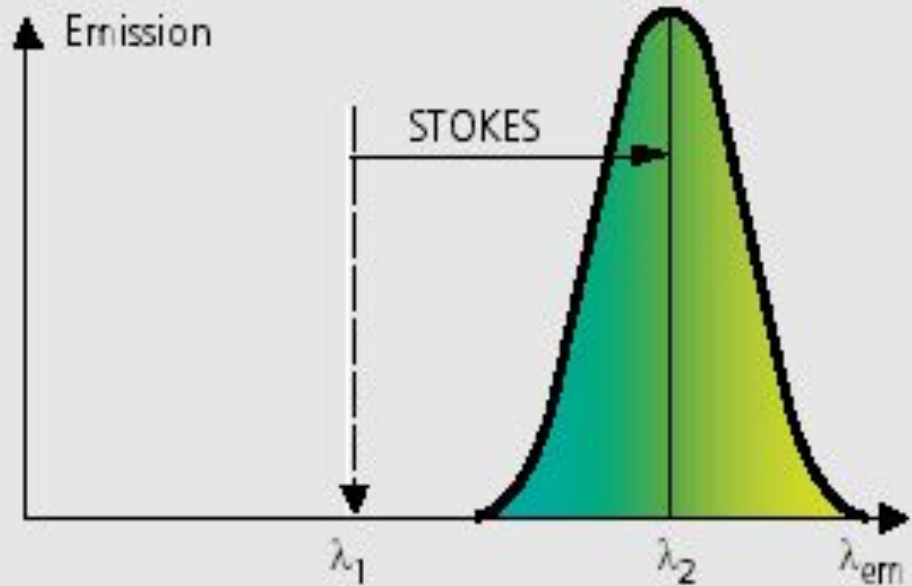
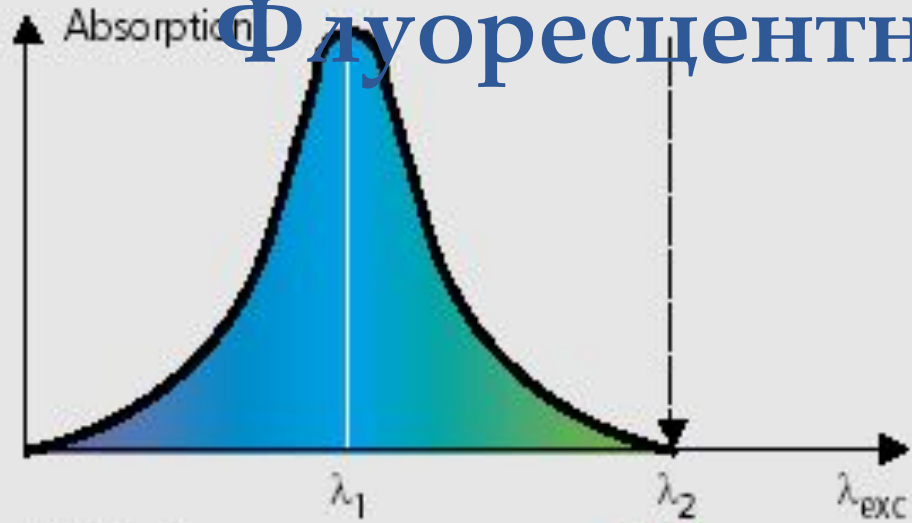
- При прохождении пучка света через неокрашенный объект изменяется лишь фаза колебания световой волны, что не воспринимается человеческим глазом.
- Чтобы изображение стало контрастным, необходимо превратить фазовые изменения световой волны в видимые амплитудные.
- Это достигается с помощью фазово-контрастного конденсора и фазового объектива.



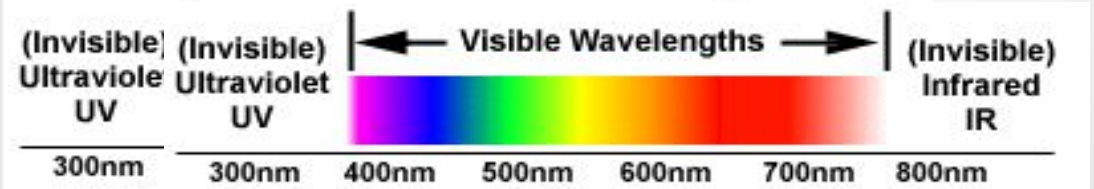
Фазово-контрастная микроскопия значительно повышает контрастность объекта и используется для изучения нативных препаратов.



# Флуоресцентная микроскопия

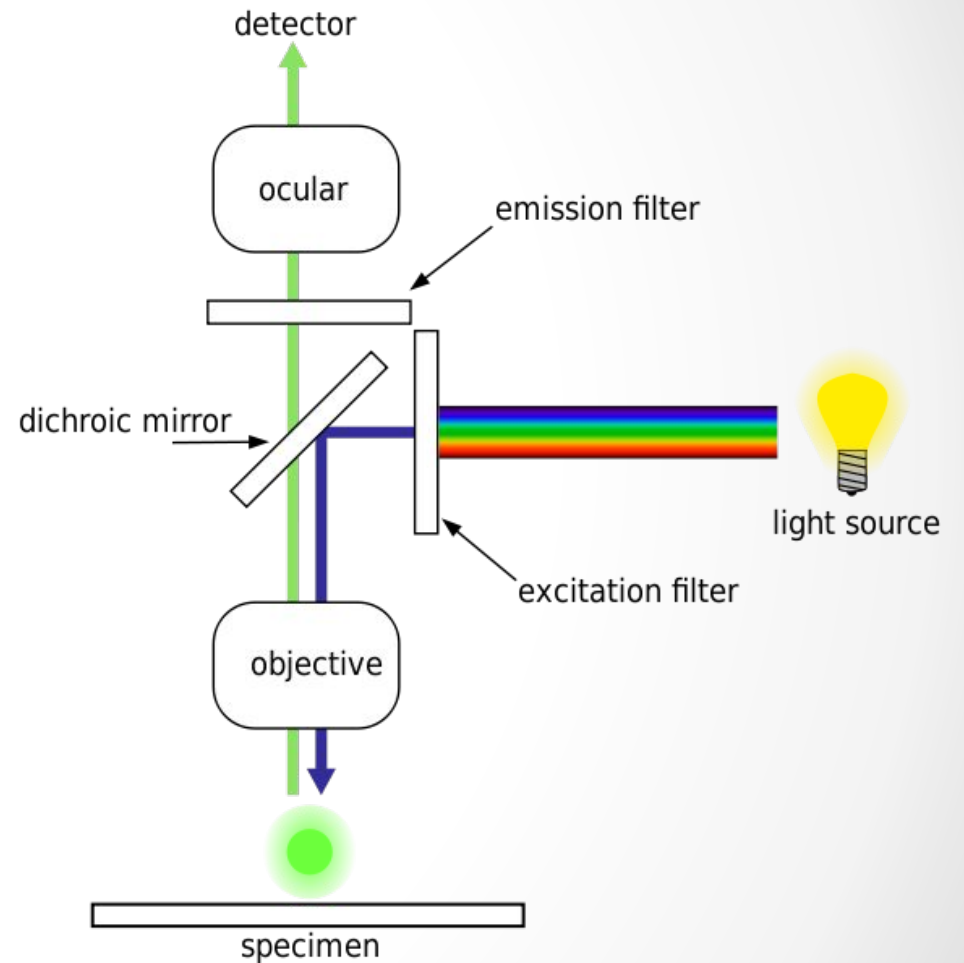


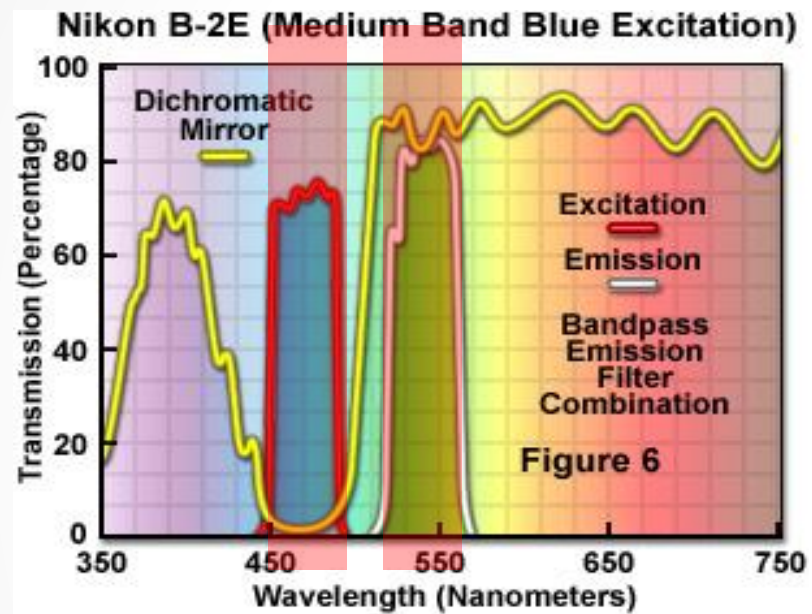
Stokes shift



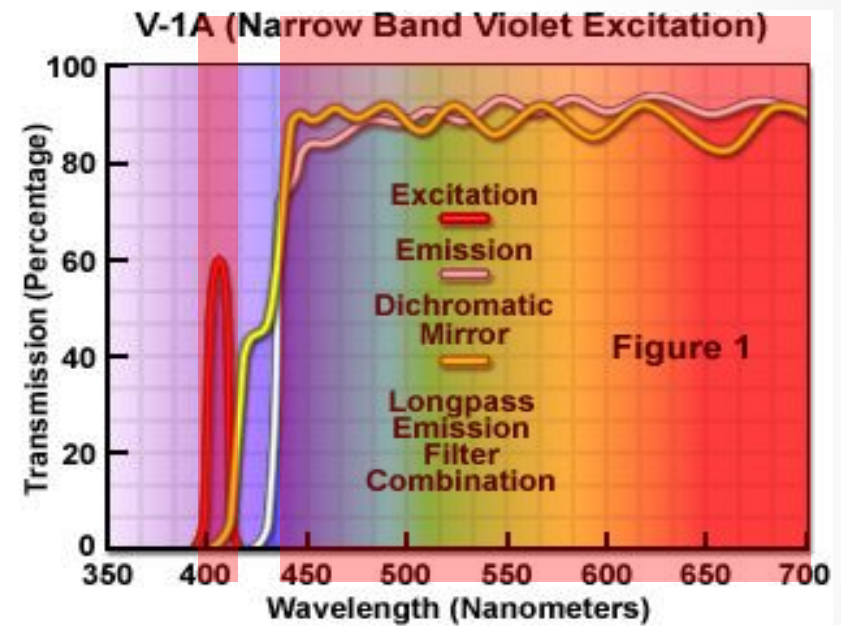
# Флуоресцентная микроскопия

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых веществ под влиянием падающего на них света испускать лучи с другой (обычно большей) длиной волны (флюоресцировать). Такие вещества называют флюорохромами (акридиновый желтый, родамин и др.). Объект, обработанный флюорохромом, при освещении ультрафиолетовыми лучами приобретает яркий цвет в темном поле зрения.

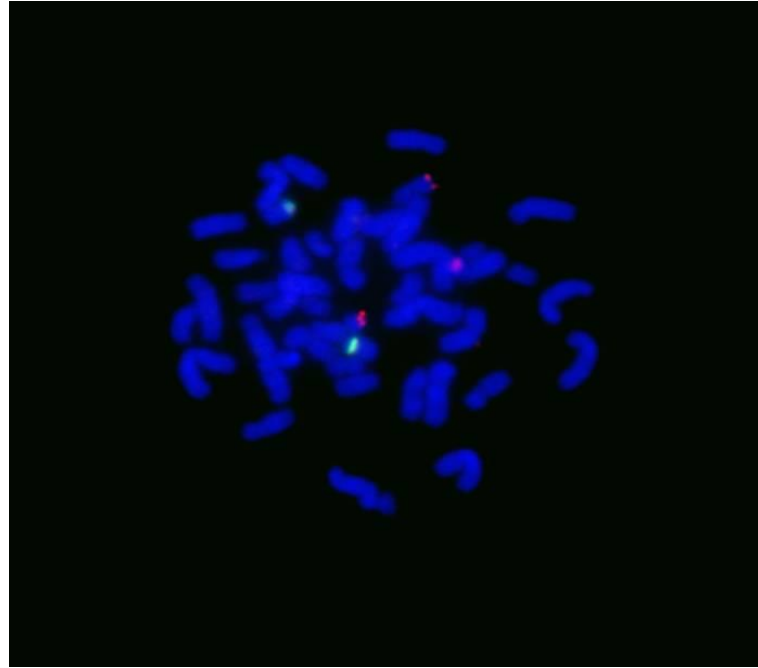
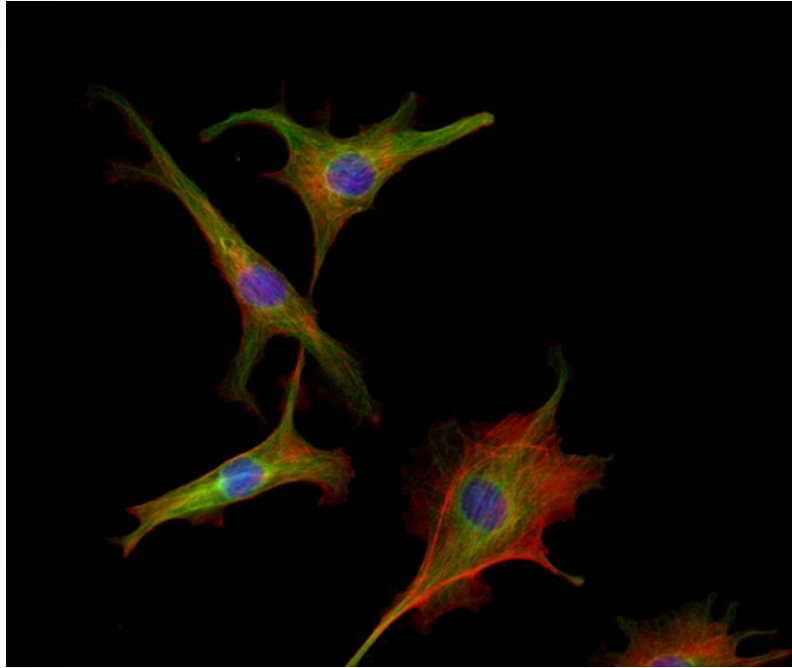




Bandpass emission filter



Longpass emission filter



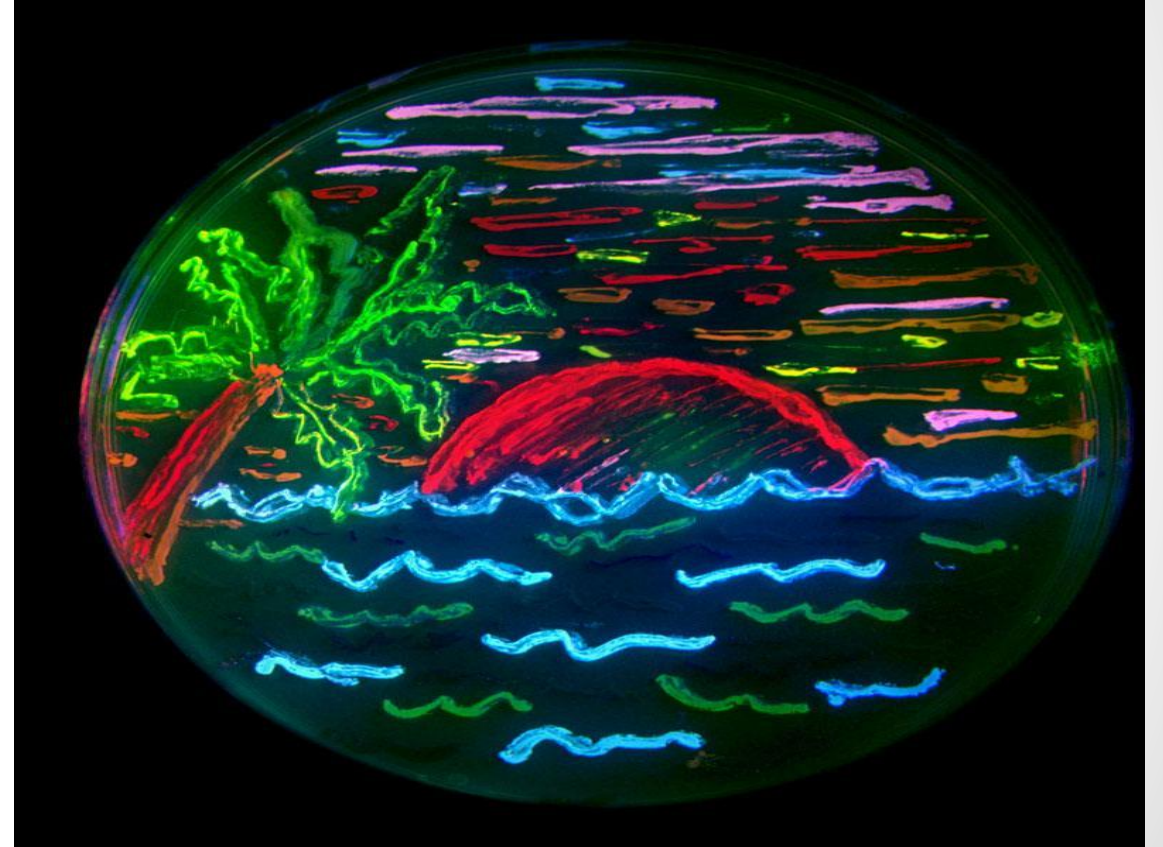


# Green Fluorescent Protein (GFP)

Class of proteins that naturally fluoresce

First isolated from the jellyfish  
238 amino acid long protein that naturally fluoresces green (509 nm) in the presence of blue (488 nm) light

Through genetic engineering, scientists have artificially engineered many variations of GFP



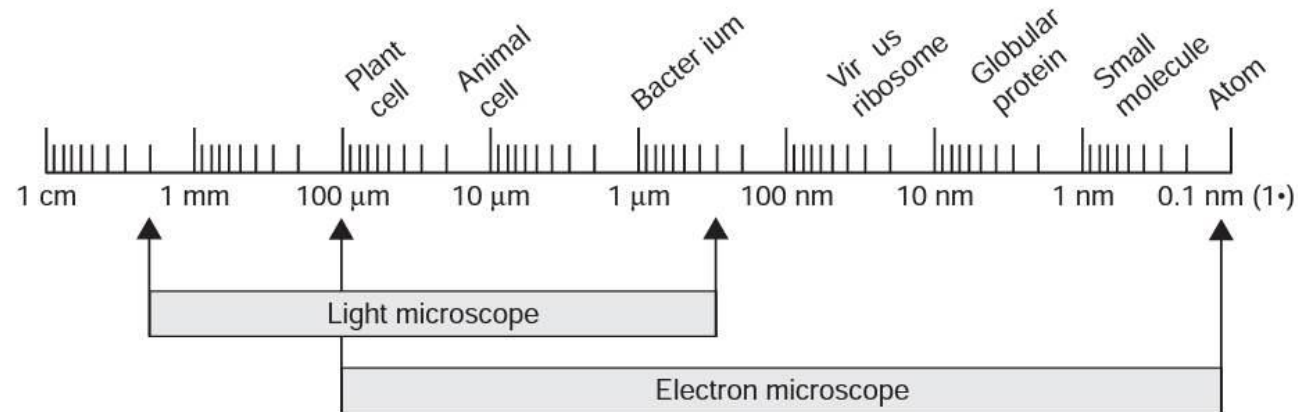
# Электронная микроскопия

Возможности оптических микроскопов ограничены слишком большой длиной волны видимого света (6000 Å). Объекты, размеры которых меньше этой величины, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа.

В электронном микроскопе вместо световых волн используются электронные лучи, обладающие чрезвычайно малой длиной волны и высокой разрешающей способностью

1 Å (ангстрем) =  
0,1 [нм](#)

# Intro to Electron Microscopy



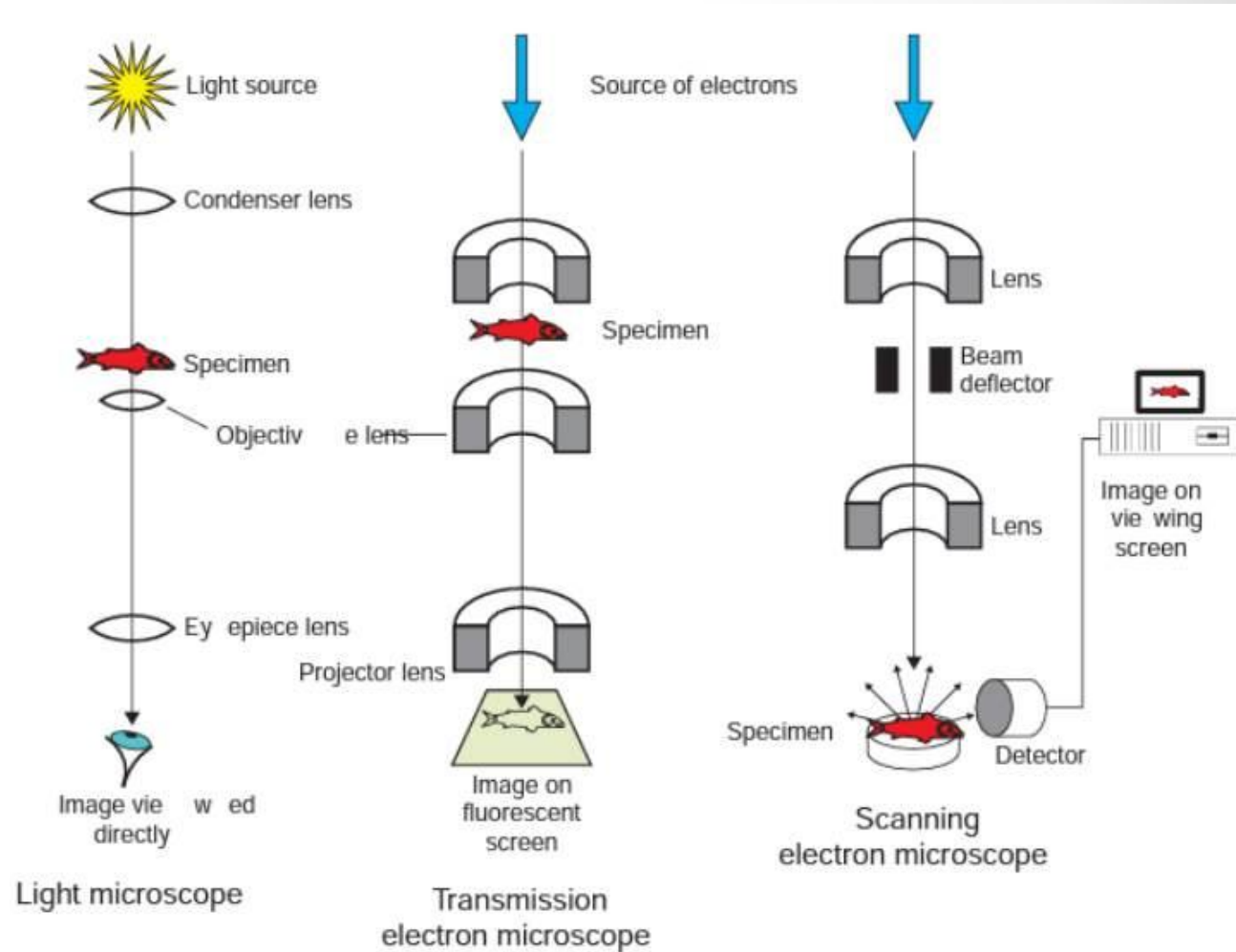
- Similar to optical microscopy except with electrons rather than photons
- Used to image samples with a resolution of 10 Å
  - Can image many different structural geometries
- Mostly limited by radiation damage from the electron beam

# Некоторые модели электронного микроскопа



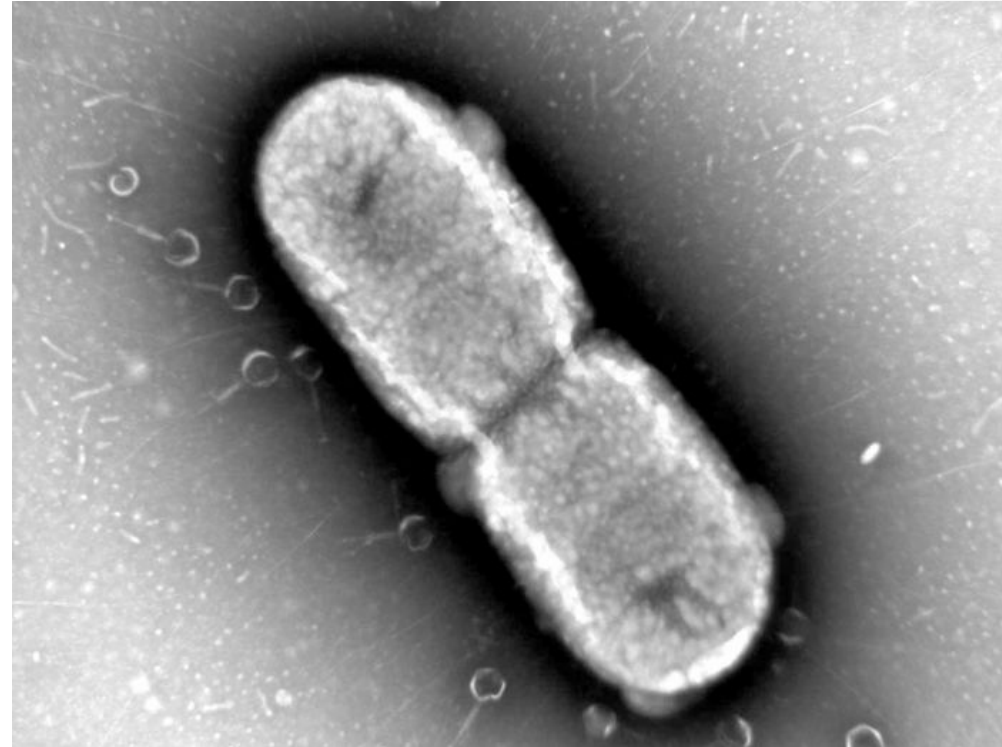
# Пропускающая и сканирующая Электронная микроскопия (TEM и SEM)

- Transmission Electron Microscope
  - Phase contrast Image is formed by the interference between electrons that passed through the sample and ones that did not
- Scanning Electron Microscope
  - Electron beam is scanned across the sample
  - The reemitted electrons are measured in order to form the image

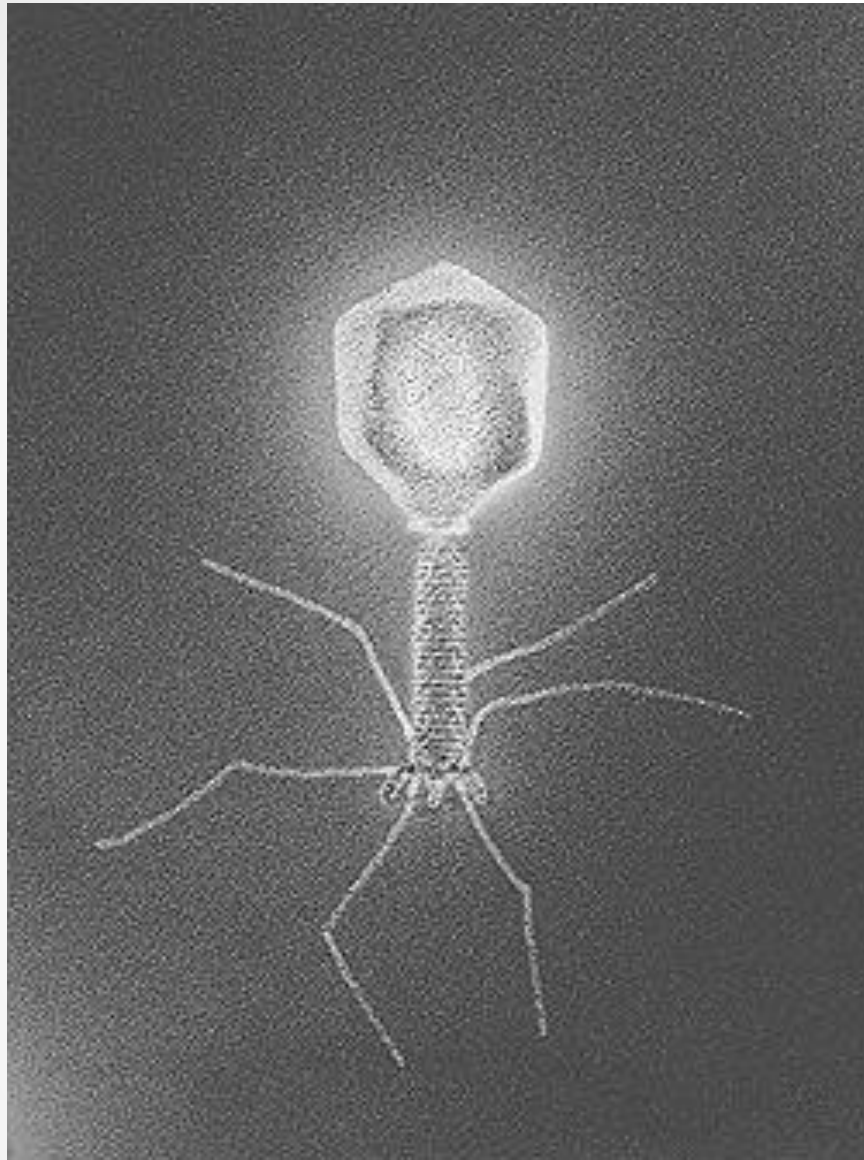


# Negative Staining

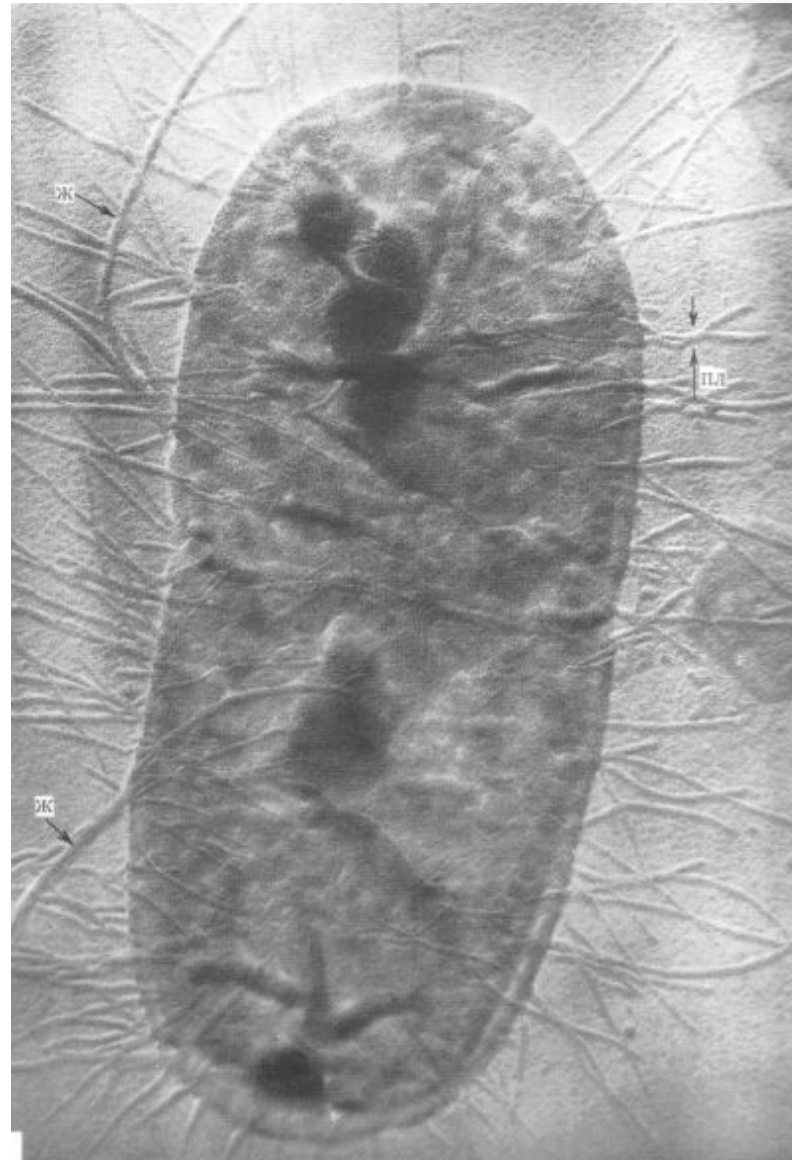
- Biological samples are often imaged using negative staining
- The elements of biological molecules do not interact strongly with the electron beam
- Instead they are seated in a material that does and then the negative space of the sample is imaged in this material



<http://www.izw-berlin.de/electron-microscopy.html>

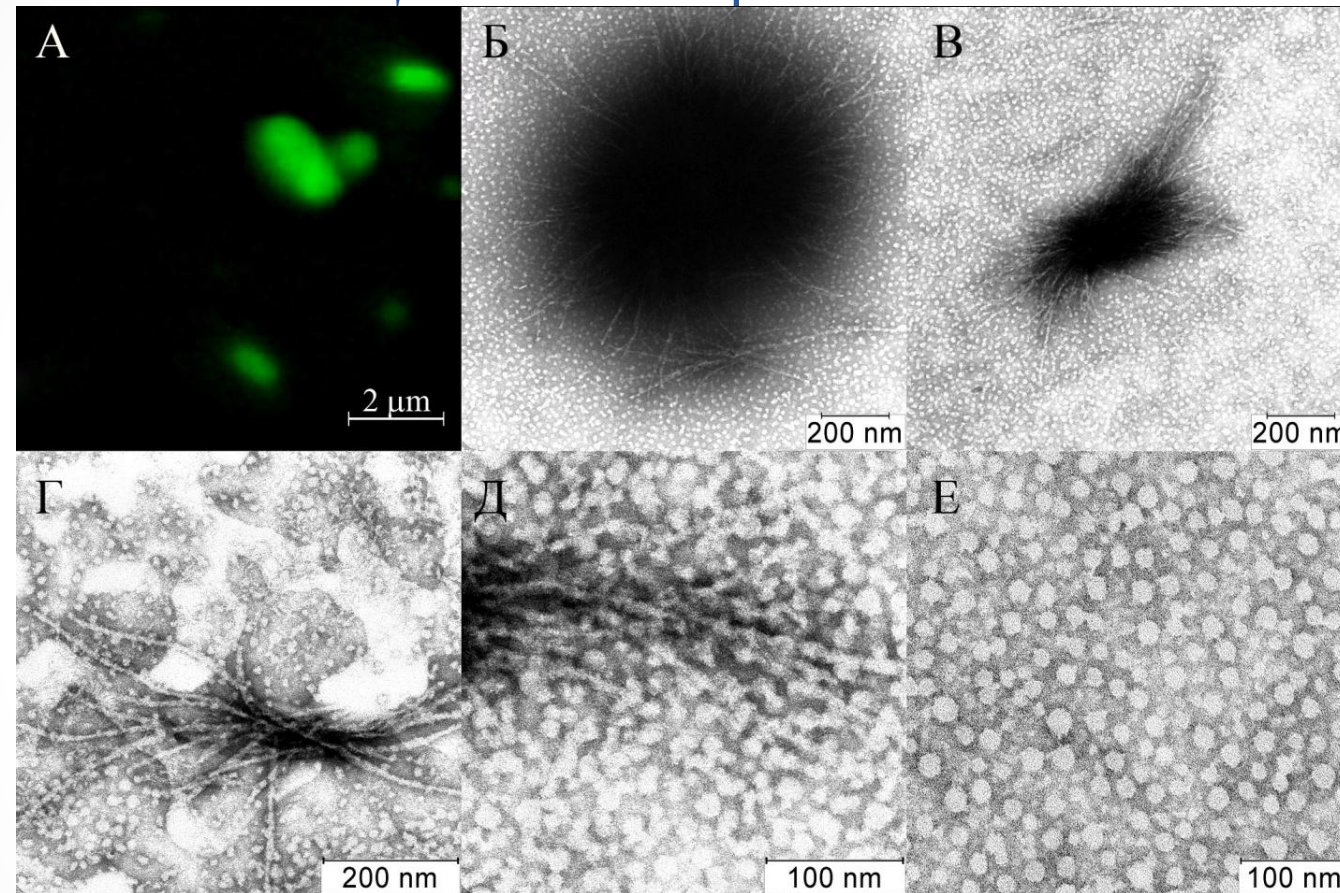


Размер бактериофага T7 – примерно, 100 нм



Размер кишечной палочки (*Escherichia coli*, *E. coli*) – 0,4–0,8 x 1–3 мкм.

## гомоцистеинилированного κ-казеина



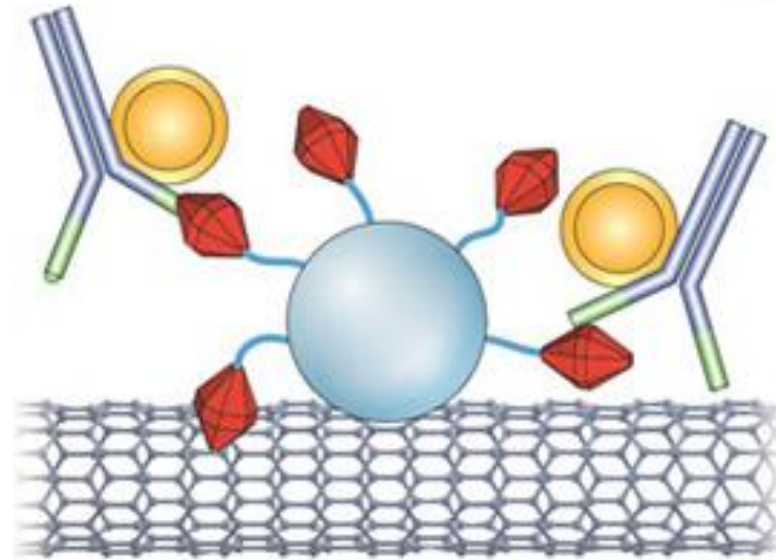
Флуоресцентная (**A**) и электронная (**Б-Е**) микроскопия  
гомоцистеинилированного κ-казеина после 24-часовой реакции с  
гомоцистеинтиолактоном при 37°C.

**A-Д** - гомоцистеинилированные препараты, **Е** - контрольный препарат.



# Immunochemical Applications

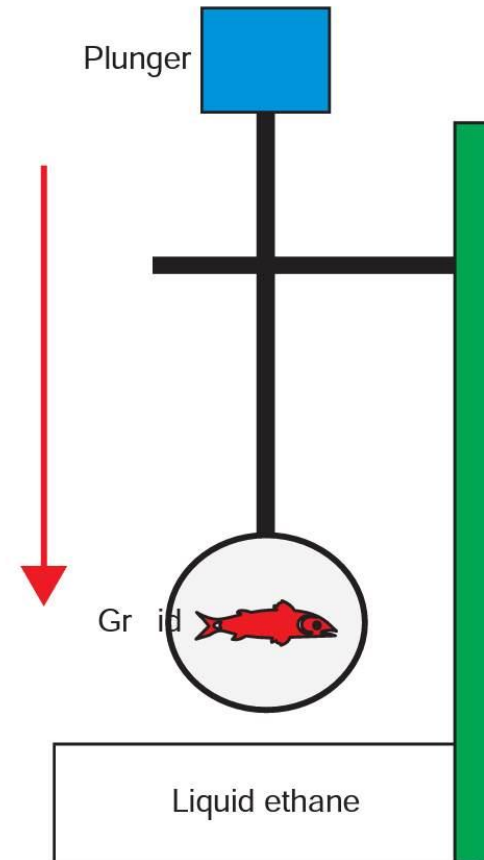
- It is very easy to image gold clusters with EM due to gold's properties
- Thus the use of gold labeled antibodies is particularly helpful in immunochemistry
- Labeled antibodies will bind to their antigen
- EM can then be used to identify the location of antibodies and by extension the antigens



<http://www.nano.org.uk/news/images/imageL1282120449.jpg>

# Cryo-Microscopy

- Samples are often frozen in order to preserve the structure against radiation damage from the electron beam
- In order to not damage the structure when freezing, the sample is flash frozen
  - If ice crystals were allowed to form they would damage the sample
- Samples are typically dunked into liquid ethane or propane ( $\sim 11^\circ \text{K}$ )

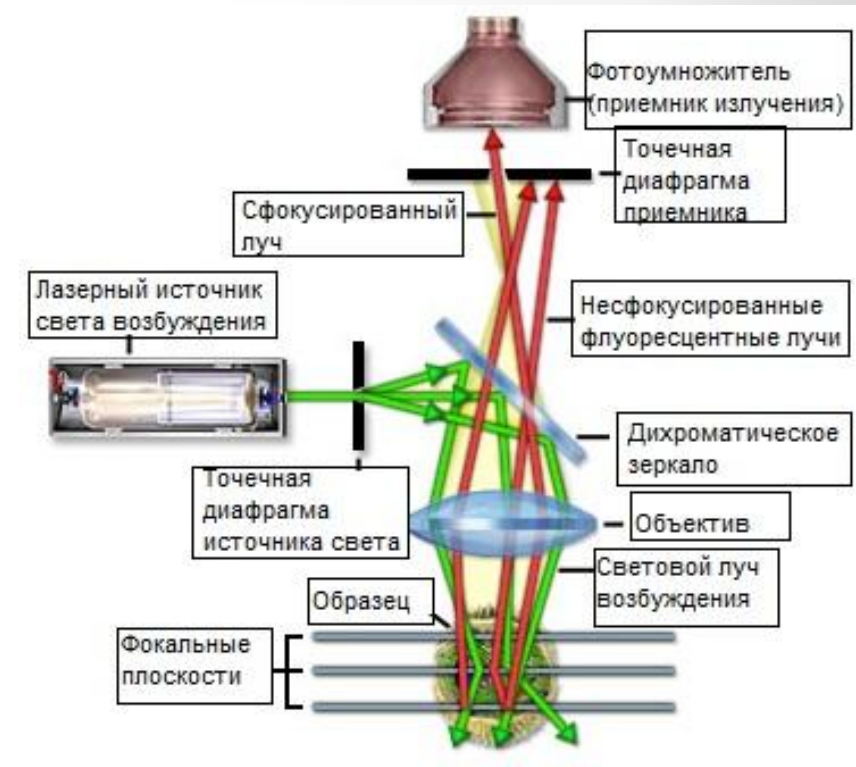


# Конфокальная микроскопия

- Конфокальная микроскопия – это один из методов оптической микроскопии, который обладает существенным контрастом по сравнению с обычными классическими микроскопами. Отличительной особенностью данного метода является использование диафрагмы, способной отсекалть поток фонового рассеянного света.
- В конфокальном микроскопе в каждый момент времени происходит регистрация изображения одной точки объекта. Полноценное изображение получается за счет сканирования передвижения образца или перестройки оптической системы. После объективной линзы расположена диафрагма небольшого размера так, чтобы свет, испускаемый исследуемой точкой, проходил через нее и регистрировался, а свет, исходящий от других точек, задерживался диафрагмой.
- Описанный метод исследования позволяет изучать внутреннюю структуру различных клеток. С его помощью можно идентифицировать отдельные молекулы и структуры клетки, микроорганизмы, а также динамические процессы, протекающие в клетках.

# Конфокальная микроскопия

- возможность получать **трехмерное** субмикронное расширение объектов, а также значительно расширилась возможность проведения неразрушающего анализа прозрачных образцов. Благодаря использованию в указанных микроскопах в качестве источников света лазеров, достигается повышение их разрешающей способности.
- По сравнению с ксеновыми или ртутными лампами **лазеры** отличаются существенными преимуществами, так как обладают способностью монохроматичности, а также высокой параллельности испускаемого пучка света.
- Конфокальная микроскопия позволяет получать улучшенное разрешение вдоль оси Z.
- Специальные программы, которыми оснащены конфокальные микроскопы, позволяют из серии оптических срезов создавать объемные изображения объектов, а также рассматривать их под разными углами зрения.
- Применение мультиспектрального лазерного сканирующего конфокального микроскопа дает возможность изучать колоколлизацию в клетке различных веществ.
- Мультиспектральный режим позволяет проводить на конфокальном микроскопе исследования по методу FISH.



## Compatible Lasers, Wavelengths, and Dyes

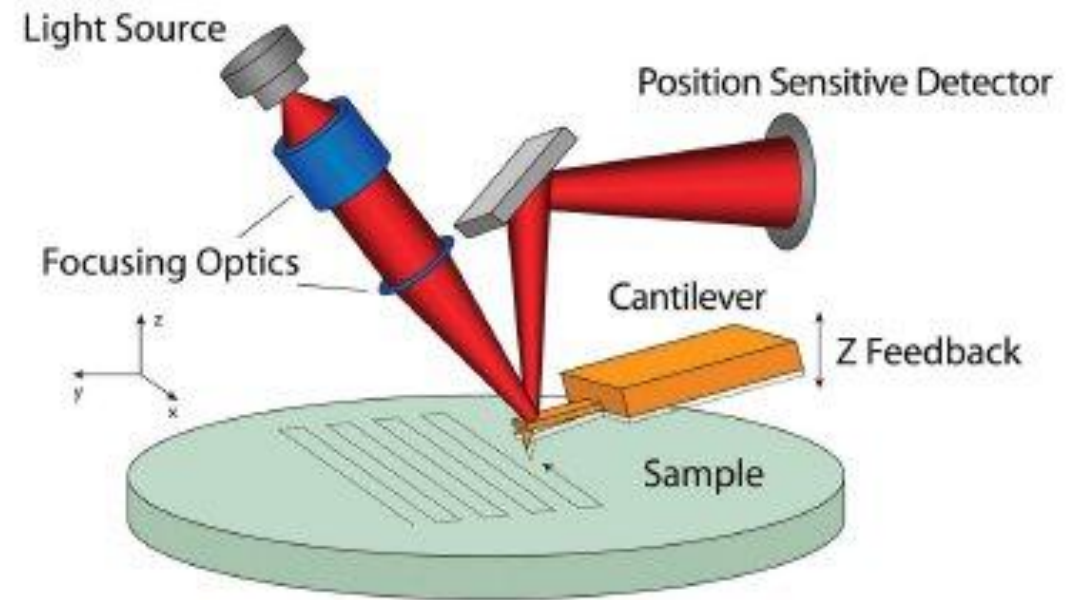
Fluorescence Dyes	<b>DAPI, Hoechst 33542</b>	<b>FITC, Fluo-3, GFP, Cy-2, Alexa Fluor 488, BODIPY, Calcium Green, Acridine Orange, BCECF, Oregon Green</b>	<b>TRITC (Rhodamine), Cy-3, PI, DsRed, Alexa 546, Alexa 568, BOBO-3, Calcium Orange, DiI, Mitotracker Orange, DS Red</b>
Laser	<b>408nm</b>	<b>488nm</b>	<b>543nm</b>
Detector	<b>Blue</b>	<b>Green</b>	<b>Red</b>



- Микрофотография мышиноного эмбриона возрастом около десяти с половиной дней после оплодотворения. Эмбрион окрашен флуоресцентным маркером, выявляющим клетки предшественники нервной ткани, затем ткани эмбриона были обработаны так чтобы сделать их прозрачными. Изображение построено из серии плоскостных срезов, для того чтобы сделать виртуальную объемную модель эмбриона

# Атомно-силовая микроскопия

- Оптическая система измеряет отклонения зонда, сканирующего поверхность
- Между атомами зонда и образца действуют силы  $10^{-11} - 10^{-6}$  Н (при зазоре примерно  $1 \text{ \AA}$ ).



Unrestricted Optical Access from Below the Sample Plane

# Атомно – силовой микроскоп

Потенциальная энергия взаимодействия атомов

**Притяжение атомов**

**Отталкивание атомов**

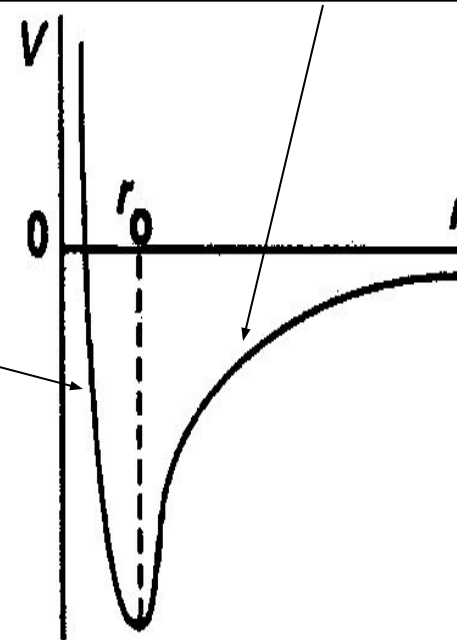


Figure 9.8. Potential energy diagram for the interaction of two atoms



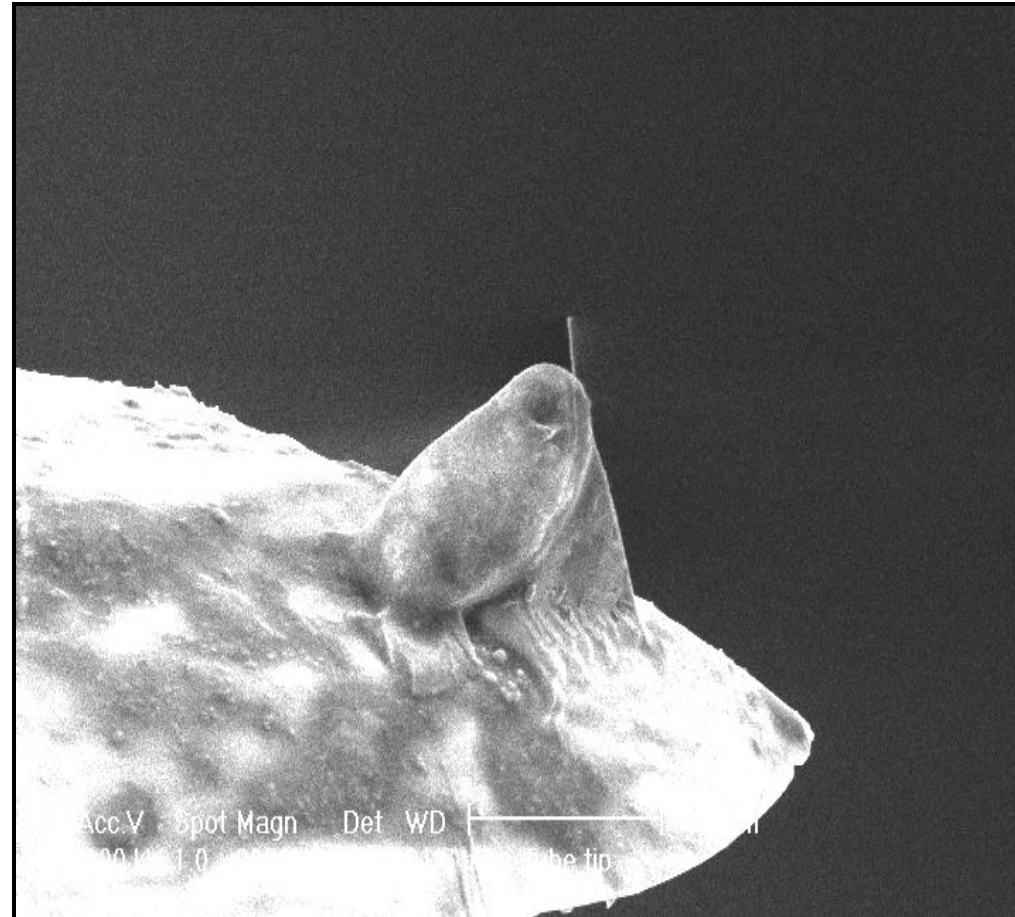
Зонд атомно –

СИЛОВОГО

микроскопа

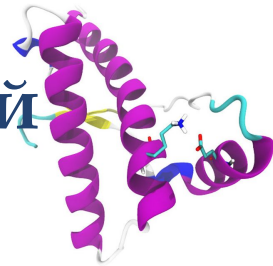
из углеродных

нанотрубок



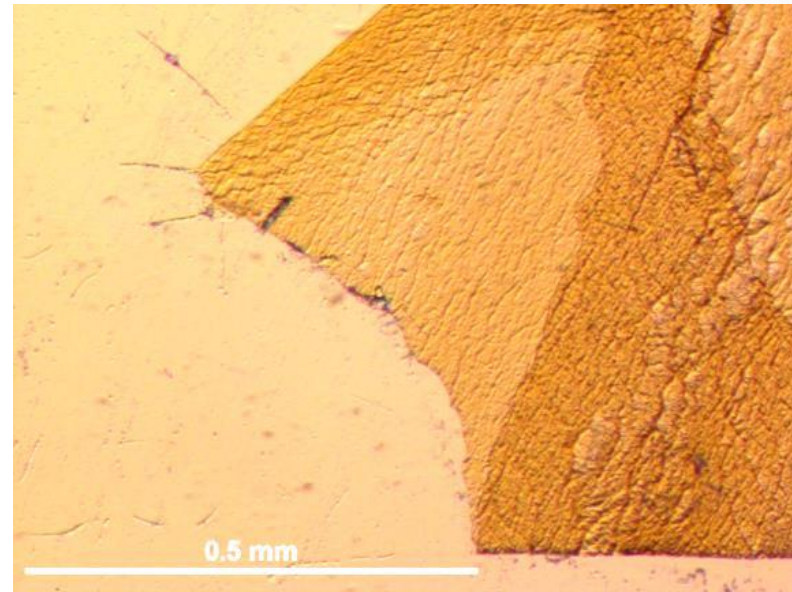
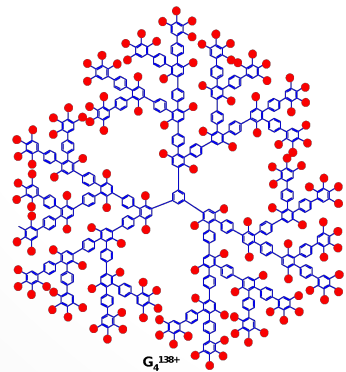
Дендример 4 поколения способен к самоорганизации в плоские нанопленки при нагревании с белками

Прионный белок



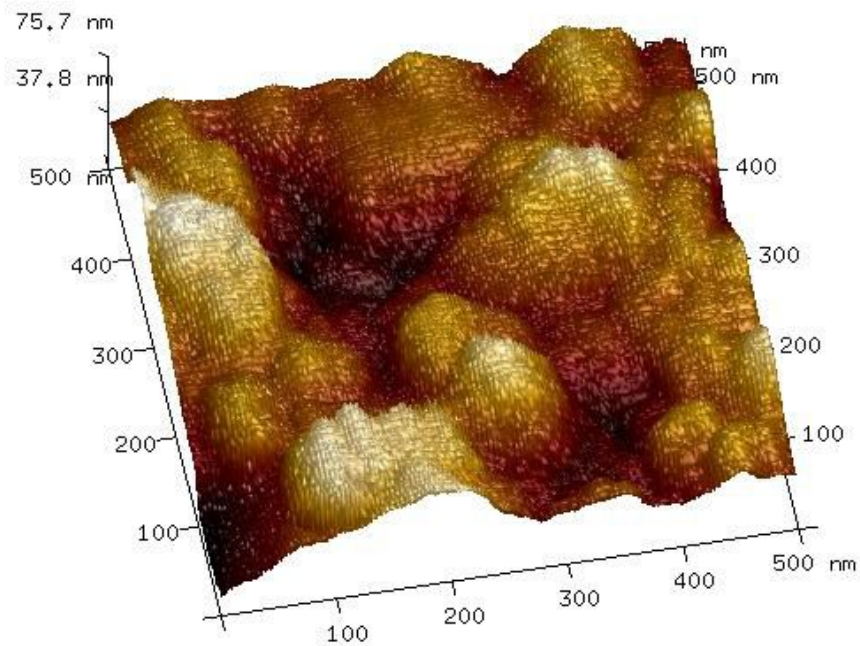
65°C

G4

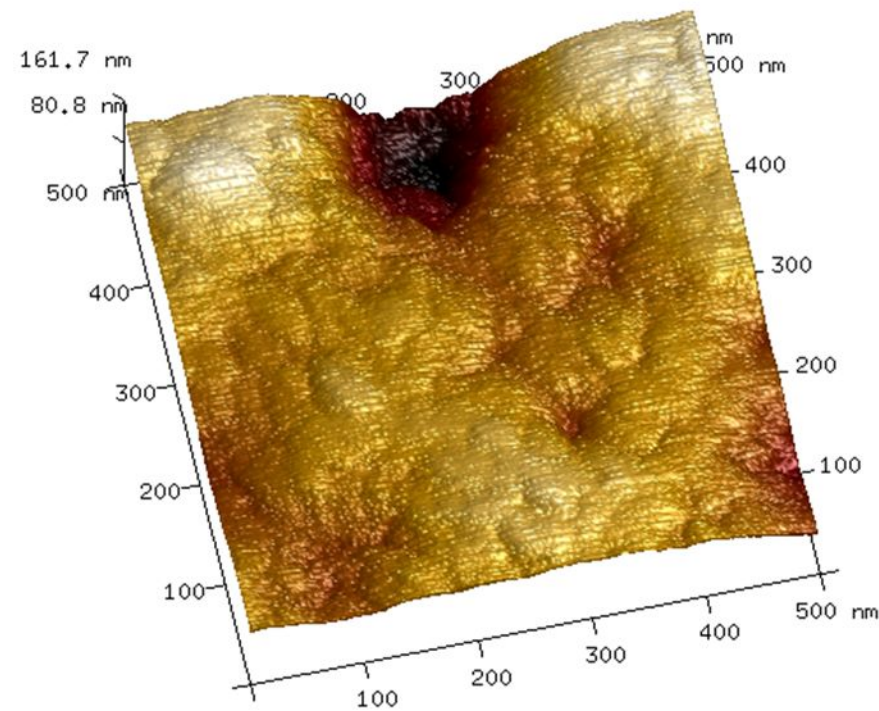


# Структура поверхности (по данным АСМ)

**Альфа-лактальбумин**

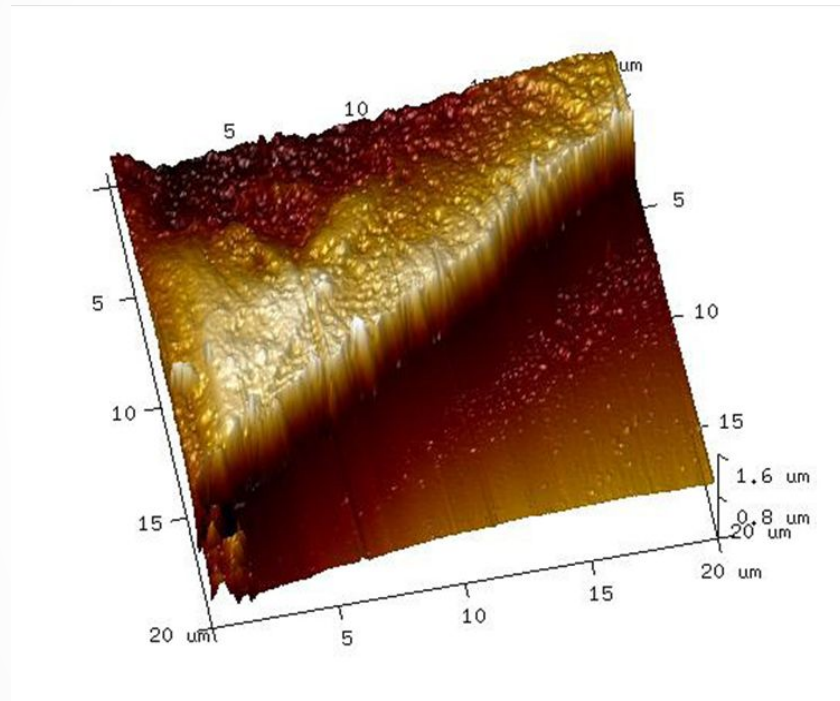


**Каппа-казеин**



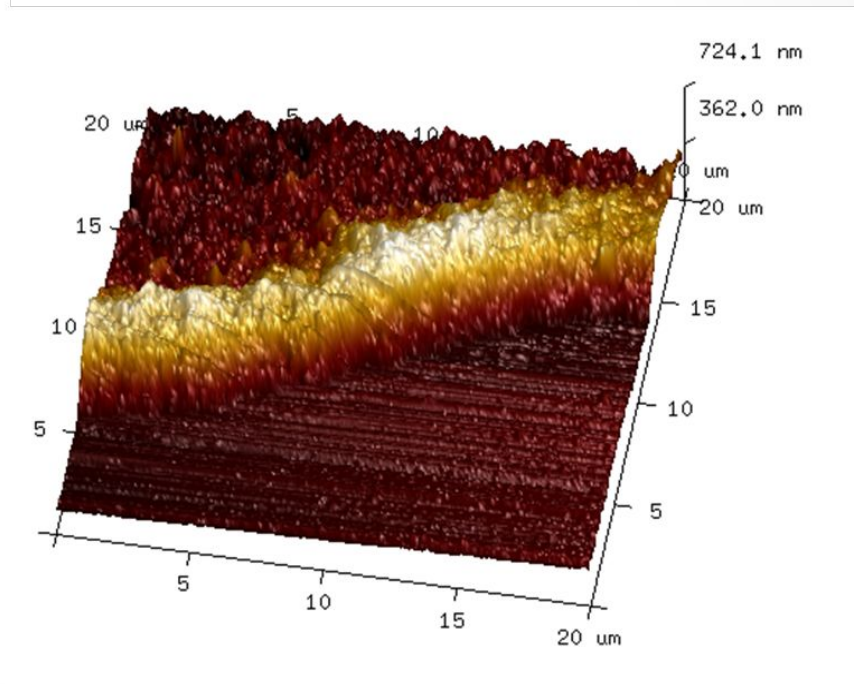
# Определение толщины пленки с помощью АСМ

**Альфа-лактальбумин (14 кДа)**



**≈ 700 нм**

**Каппа-казеин (19 кДа)**



**≈ 400 нм**

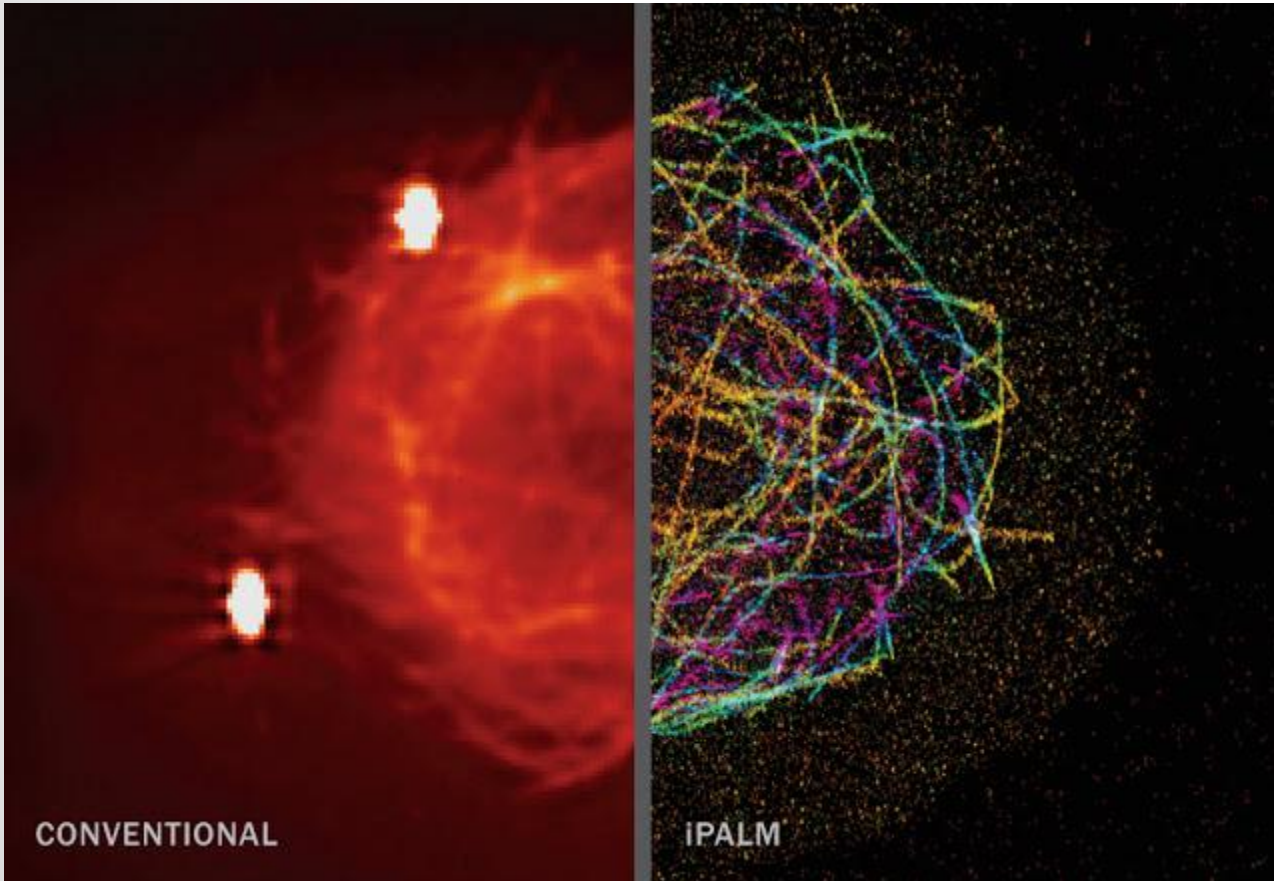
# Суперфлуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения

- Нобелевская премия по химии присуждена за суперфлуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения
- Нобелевская премия в области химии 2014 года присуждена Штефану Хеллю (Германия), Уильяму Мернеру (США) и Эрику Бетцигу (США) за вклад в развитие флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения.

# Суперфлуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения

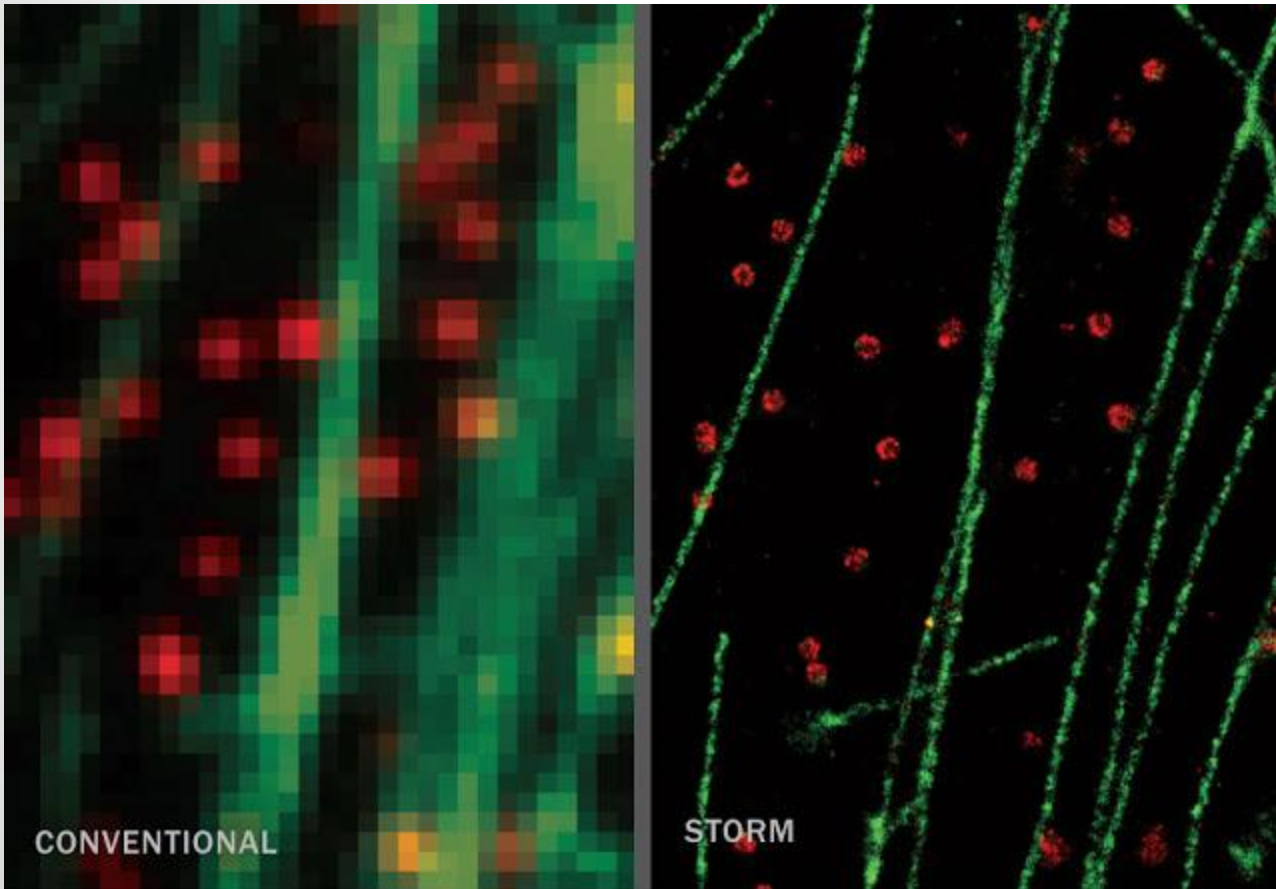
- W. Moerner впервые в мире смог детектировать отдельную флуоресцирующую молекулу. Это было сделано в IBM's Almaden Research Center in San Jose, Calif. Затем, работая в University of California, San Diego Moerner открыл возможность включения и выключения по команде одного из вариантов GFP. При возбуждении светом с длиной волны 488-nm GFP выгорал и не мог быть задействован снова. Но Moerner обнаружил что облучение светом с длиной волны 405-nm реактивировало белок, и он мог снова возбуждаться светом с длиной волны 488-nm .
- Eric Betzig заложил основы для микроскопии одиночных молекул, разработав механизм, позволяющий как бы «включать» и «выключать» флуоресцентное свечение каждой молекулы.
- Такие фотовключаемые белки стали основой для PhotoActivated Localization Microscopy (PALM), разработанной в 2006 году Eric Betzig совместно с Harald Hess.
- Оригинальная установка было собрана прямо в жилой комнате Harald
- Hess.

# PALM (~10–55 nm)



- Photoactivated localization microscopy incorporates into a sample special fluorescent proteins that can be toggled between on and off states when hit with a particular wavelength of light. This allows researchers to illuminate a subset of molecules in a sample and eliminate overlapping fluorescence that would blur details if everything in the sample was lit up at once. iPALM (interferometric PALM) provides images in 3-D.

# STORM (~20–55 nm)



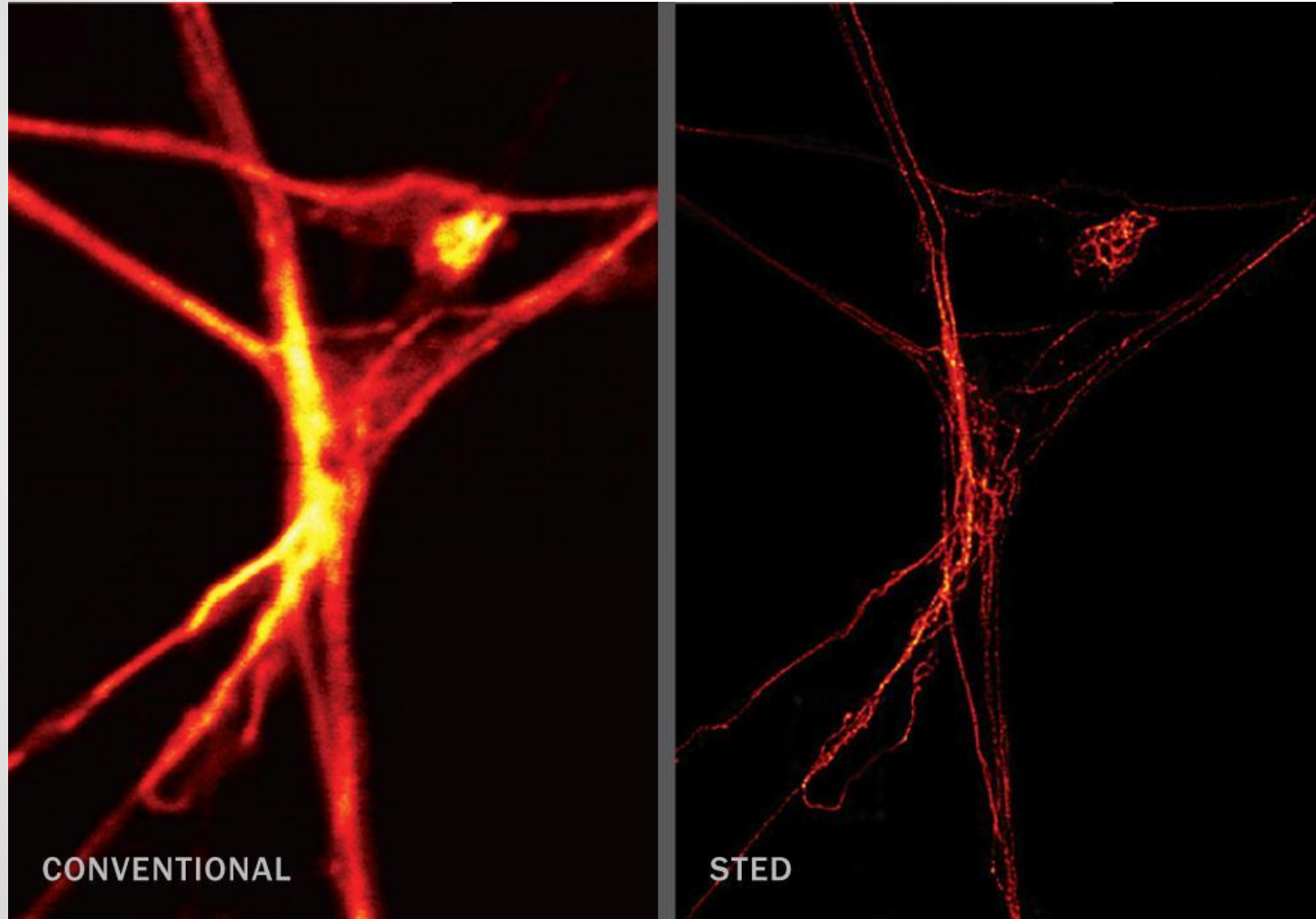
- Stochastic optical reconstruction microscopy, developed around the same time as PALM, also relies on fluorescent tags that can be switched on and off. In STORM's case, the tags can be dyes or proteins. Using dyes may require an extra step, but they can be switched on and off more quickly and don't burn out as fast as fluorescent proteins. Dyes can also be attached to genetic material.



# STED (~30–70 nm)

- Stefan Hell. Разработанный им метод—Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy — имеет принципиальные отличия.
- При использовании STED microscopy один лазерный луч стимулирует флуоресценцию флуорохрома, тогда как другой перекрывающий его лазерный луч с тороидальным сечением выключает флуоресценции везде за исключением наноразмерного объема, позволяя при сканировании образца построить изображение с наноразмерным разрешением.
- Этот метод сверхразрешающей флуоресцентной спектроскопии улучшает латеральное разрешение, но практически не меняет разрешение по оси Z.

# STED (~30–70 nm)



- When a focused light beam hits a fluorescent-tagged specimen, it generates a blurry halo. With stimulated emission depletion microscopy (STED), a second laser shines a doughnut-shaped beam of light that turns off the excited molecules in the halo. This provides a sharper view that, when scanned across the sample, produces a super-resolution image.
- STED: R. Medda, D. Wildanger, L. Kastrup and S.W. Hell/Max Planck Institute