

ОГЛЯД МЕТОДІВ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ МІКРОСКОПІЇ НАДВИСОКОГО РОЗШИРЕННЯ

Вінницький національний технічний університет

Анотація

Методи флуоресцентної мікроскопії надвисокого розширення є потужним інструментом для візуалізації різних структур. В останні роки розроблено велику кількість таких методів, що дозволяє успішно вирішити різні завдання. У той же час висока технічна складність їх реалізації в порівнянні з традиційною світловою мікроскопією зменшує використання цього інструменту в клітинній біології. В огляді розглядаються і порівнюються між собою основні види методів флуоресцентної мікроскопії надвисокого розширення, найбільш широко використовувані в біології.

Ключові слова: Флуоресцентна мікроскопія надвисокого розширення, дифракційна межа, детерміністські методи, стохастичні методи

Abstract

Super-resolution microscopy techniques are a powerful tool for imaging various structures. In recent years, a large number of such methods have been developed, which allows you to successfully solve various tasks. At the same time, the high technical complexity of their implementation compared to traditional light microscopy reduces the use of this tool in cell biology. The review examines and compares the main types of ultra-high-resolution fluorescence microscopy methods that are most widely used in biology.

Keywords: Super-resolution microscopy, diffraction limit, deterministic methods, stochastic methods

За останні 20 років було розроблено велику кількість методів флуоресцентної мікроскопії (ФМ) надвисокого розширення. Такі методи дозволяють вирішити проблему дифракційного роздільної здатності традиційної оптичної мікроскопії, зумовлену хвильовою природою світла. У другій половині XIX в. було показано, що зображення точкового джерела світла в оптичному приладі (наприклад, у мікроскопі чи телескопі) матиме конечні розміри d (дифракційна пляма, зазвичай описується функцією Ейрі, оптичне розширення), що залежить від довжини хвилі L і числової апертури NA оптичного приладу відповідно до формули (1), вперше описаної Ернстом Аббе (Lipson et al., 1995):

$$d = \lambda / (2NA). \quad (1)$$

Фундаментальний характер цієї формули, описуючи дифракційну межу, тривалий час обмежував можливості оптичного мікроскопа і не дозволяв отримати розширення краще, ніж половина довжини хвилі використовуваного світла. Найсучасніші мікроскопи, побудовані за класичною схемою, мають розширення близько 150 нм. Тому навіть у відносно великій еукаріотичній клітці багато структур і органелів не можуть бути ідентифіковані за допомогою традиційної оптичної мікроскопії. Ще більш обмежені можливості традиційної мікроскопії в плані візуалізації структур у клітинах бактерій, особливо таких маленьких, як, наприклад, мікоплазми (клас Mollicutes) [1].

З наведеної вище формули очевидно, що збільшення роздільної здатності можна домогтися через зменшення довжини хвилі. Більшість використовуваних у біології флуорофорів є джерелами випромінювання, що відповідає видимій ділянці спектра. Наприклад, для зеленого флуоресцентного білка максимум спектра випускання припадає на довжини хвиль близько 500 нм [2]. З урахуванням

формули (1) при використанні об'єктива з найвищою з широко використовуваних числовою апертурою 1.49 отримуємо теоретичну межу роздільної здатності близько 170 нм. Перехід в ультрафіолетову область ускладнений у зв'язку зі згубністю такого випромінювання для клітини, а також із високим рівнем автофлуоресценції, що унеможливує візуалізацію живих об'єктів. Крім того, для відповідної ділянки спектра практично відсутні флуоресцентні мітки, що одразу позбавляє метод відомих переваг ФМ, таких як вибірковість та високий контраст.

Використання електронної мікроскопії (особливо методів криоелектронної томографії) дає змогу одержати високу роздільну здатність, порівнянну з розмірами деяких великих молекул, однак дослідження живих організмів такими методами неможливе. Можливості локалізації певних компонентів або біомолекул у клітині за допомогою цього методу обмежені. У таких випадках використовують метод імуоелектронної мікроскопії, який завдяки специфічній мітці дає змогу встановити, в якій ділянці клітини міститься досліджуваній антиген. Крім того, активно розвивається метод корелятивної світлової та електронної мікроскопії (CLEM, Correlated Light and Electron Microscopy), що дає змогу частково поєднати переваги зазначених методів [3].

Збільшення числової апертури теж дає змогу підвищити роздільну здатність, однак ці можливості обмежені максимальним теоретично досяжним тілесним кутом, що дорівнює 4π . Такі методи реабілізовані й досить широко використовуються, наприклад, метод 4π -мікроскопії [4]. Однак у зв'язку з високою технічною складністю цього методу в поєднанні з відносно низькою роздільною здатністю його не обговорюватимуть у цьому огляді. Крім того, ми не обговорюємо можливість змінювати показник заломлення, використовуючи різні імерсійні об'єктиви, однак для повноти картини згадати про саму таку можливість необхідно.

Досить давно, ще в 1928 р., було запропоновано метод близькопольної оптичної мікроскопії (БОМ), заснований на скануванні об'єкта за допомогою надзвичайно малої апертури з розмірами порядку кількох нанометрів. На практиці БОМ було реалізовано тільки в 1986 р. [5] Приблизно в цей самий час з'явилися такі широко відомі зондові методи, як атомно-силова мікроскопія і тунельна мікроскопія [6], але в цих варіантах немає оптичної системи і пов'язаних із нею дифракційних ефектів. Оскільки розміри апертури в БОМ, а також відстань від неї до об'єкта набагато менші за довжину світлової хвилі, дифракційна межа практично не позначається на досягнутій роздільній здатності; метод дає змогу досягти роздільної здатності порядку 10 нм. Незважаючи на високу роздільну здатність, метод БОМ не знайшов такого широкого застосування в біології, як методи широкопольної оптичної мікроскопії, тому що його використання обмежується візуалізацією поверхні, а візуалізація об'ємних структур практично неможлива.

Однак останнім часом було розроблено кілька методів ФМ, які дають змогу досягти відмінної просторової роздільної здатності, зберігаючи при цьому основні переваги флуоресцентної мікроскопії. Це призвело до справжнього прориву в царині біології клітини; у 2014 р. нові методи мікроскопії було відзначено Нобелівською премією з хімії [7]. Їх можна розбити на дві основні групи: детерміністські та стохастичні методи візуалізації. При цьому існує величезна кількість різновидів основних методів, які часто відрізняються один від одного лише назвами. Наприклад, до методу локалізаційної мікроскопії належать такі аббревіатури, як SMLM (Single-Molecule Localization Microscopy, найзагальніша аббревіатура, що охоплює всі різновиди методу), PALM (PhotoActivated Localization Microscopy), fPALM (fluorescence PALM), BALM (Binding Activated Localization Microscopy), STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy), dSTORM (direct STORM), SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging), PAINT (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) тощо. STED (STimulated Emission Depletion) також має споріднені методи, наприклад, GSD (Ground State Depletion), а також метод, що має найзагальнішу назву RESOLFT (REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions) [8]. Методу SIM (Structured Illumination Microscopy) споріднені методи SMI (Spatially Modulated Illumination), SSIM (Saturated Structured-Illumination Microscopy), що є комбінацією методів SIM і STED тощо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Heintzmann R., Huser T. 2017. Super-resolution structured illumination microscopy. *Chem. Rev.* 117: 13890–13908.
2. Hell S.W., Wichmann J. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Lett.* 19 : 780–782.
3. Hess S.T., Girirajan T.P., Mason M.D. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys. J.* 91 : 4258–4272.
4. Hoopmann P., Punge A., Barysch S.V., Westphal V., Bückers J., Opazo F., Bethani I., Lauterbach M.A., Hell S.W., Rizzoli S.O. 2010. Endosomal sorting of readily releasable synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107 : 19055–19060.
5. Horsington J., Turnbull L., Whitchurch C.B., Newsome T.P. 2012. Sub-viral imaging of vaccinia virus using super-resolution microscopy. *J. Virol. Methods.* 186 : 132–136.
6. Klar T.A., Hell S.W. 1999. Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy. *Optics Lett.* 24 : 954–956.
7. Kwon J., Hwang J., Park J., Han G.R., Han K.Y., Kim S.K. 2015. RESOLFT nanoscopy with photoswitchable organic fluorophores. *Sci. Rep.* 5 : 17804.
8. Legant W.R., Shao L., Grimm J.B., Brown T.A., Milkie D.E., Avants B.B., Lavis L.D., Betzig E. 2016. High density three-dimensional localization microscopy across large volumes. *Nature Methods.* 13 : 359–365.

Сидорук Олег Олександрович - аспірант гр 163-23а, кафедра біомедичної інженерії та оптико-електронних систем, Вінницький національний технічний університет, м. Вінниця.

Науковий керівник: **Коваль Леонід Григорович** - к.т.н., доцент, завідувач кафедри біомедичної інженерії та оптико-електронних систем, Вінницький національний технічний університет, м. Вінниця

Oleh Oleksandrovych Sydoruk - graduate student gr 163-23a, department of biomedical engineering and optical-electronic systems, Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia.

Supervisor: **Koval Leonid Hryhorovych** - Ph.D., Associate Professor, Head of the Department of Biomedical Engineering and Optical-Electronic Systems, Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia