

УДК 576.08
И53

Рецензент:

Иванов Игорь Николаевич — доктор медицинских наук,
профессор кафедры судебной медицины ГБОУ ВПО СЗГМУ
им. И. И. Мечникова

Иммуноцитохимия и конфокальная микроскопия /
И53 Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Е. А. Колос, Е. Г. Сухорукова
[и др.]. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2018. — 103 с.
ISBN 978-5-299-00982-8

В данной книге изложены результаты научных исследований членов авторского коллектива, относящиеся к разработке новых методов иммуноцитохимии и их адаптации для использования в конфокальной микроскопии. В главах 4 и 5 представлены детальные и выверенные протоколы иммуноцитохимических реакций, позволяющие легко освоить практические приемы подготовки препаратов для современных методов многомаркерной микроскопии (флуоресцентной микроскопии, конфокальной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения).

В приложении приводятся сведения об антителах к цитоспецифическим и функциональным маркерам, которые позволяют эффективно выявлять исследуемые антигены с использованием как иммунопероксидазных, так и флуоресцентных методик.

Настоящее научное издание в первую очередь предназначено для исследователей, применяющих в своей работе различные способы микроскопии, основанные на использовании эффекта флуоресценции, и будет полезно для всех специалистов, желающих освоить современные высокотехнологичные методы микроскопического анализа, применяемые в биологии и медицине.

УДК 576.08

ISBN 978-5-299-00982-8

© ООО «Издательство „СпецЛит“», 2018

Коллектив авторов:

Коржевский Дмитрий Эдуардович — доктор медицинских наук, профессор РАН, заведующий лабораторией функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Кирик Ольга Викторовна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Колос Елена Андреевна — младший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Сухорукова Елена Геннадьевна — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Алексеева Ольга Сергеевна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»; ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии дыхания ИЭФБ РАН;

Гусельникова Валерия Владимировна — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной морфологии центральной и периферической нервной системы отдела общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ»;

Карпенко Марина Николаевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейробиологии интегративных функций мозга физиологического отдела им. И. П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ»;

Меркульева Наталья Сергеевна — кандидат биологических наук, заведующая лабораторией нейроморфологии ИФ РАН;

Шкорбатова Полина Юрьевна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ИФ РАН;

Михалкин Александр Александрович — младший научный сотрудник лаборатории нейроморфологии ИФ РАН.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Условные сокращения	6
Предисловие	7
Глава 1. Современные методы микроскопии, основанные на использовании эффекта флуоресценции (М. Н. Карпенко)	8
1.1. Флуоресценция и флуоресцентная микроскопия	8
1.2. Конфокальная микроскопия	10
1.3. Преимущества технологии «Airyscan»	11
1.4. Мультифотонная микроскопия	12
1.5. Микроскопия сверхвысокого разрешения	14
<i>Литература</i>	17
Глава 2. Флуорохромы, применяемые при проведении иммуноцитохимических исследований (Е. А. Колос, Д. Э. Коржевский)	20
2.1. Органические флуоресцентные красители, используемые для конъюгации с антителами и стрептавидином	21
2.2. Полупроводниковые нанокристаллы — квантовые точки	25
2.3. Флуоресцентные красители, которые используют при иммуноцитохимическом исследовании для окраски ядер клеток	26
2.4. Флуоресцентная окраска хроматофильной субстанции ...	30
<i>Литература</i>	31
Глава 3. Техника иммуноцитохимического исследования, адаптированная для использования в конфокальной микроскопии (Д. Э. Коржевский, Е. А. Колос, О. В. Кирик)	33
3.1. Начальные этапы обработки материала	34
3.2. Постановка иммуноцитохимических реакций	39
3.3. Блокирование эффекта автофлуоресценции	45
3.4. Заключение препарата	46
<i>Литература</i>	48
Глава 4. Правила и примеры создания иммуноцитохимических протоколов для конфокальной микроскопии (Д. Э. Коржевский, О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова, О. С. Алексеева, В. В. Гусельникова)	51

4.1. Реакция на фактор Виллебранда для выявления телец Вейбеля — Паладе	52
4.2. Реакция на белки GFAP и глутаминсинтетазу для выявления астроцитов и олигодендроцитов	60
4.3. Реакция на кальбиндин для выявления тонкой структуры отростков клеток Пуркинье	66
4.4. Двойная иммуноцитохимическая реакция на кальбиндин и GFAP	69
4.5. Реакция на белок Iba-1 для выявления клеток микроглии у кролика	71
4.6. Реакция на триптазу для выявления тучных клеток человека	76
<i>Литература</i>	81
Глава 5. Белки нейрофиламентов и практическое использование антител SMI-32 при выявлении нейронов (Н. С. Меркульева, П. Ю. Шкорбатова, А. А. Михалкин)	89
<i>Литература</i>	95
Приложение. Сведения об антителах, применяемых в иммуноцитохимических исследованиях	99

УСЛОВНЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- ТК – тучные клетки
ФВ – фактор Виллебранда
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ФЭУ – фотоэлектронный умножитель
7-ААД – 7-аминоактиномицин D
ДАВ – 3'3-диаминобензидин
ДАВСО – 1,4-дiazобикаклооктан
ДАPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол
ЕВ – этидий бромистый
FITC – флуоресцеин изотиоцианат (fluorescein 5-isothiocyanate)
Iba-1 – Ionized calcium Binding Adaptor molecule 1
NPG – пропиленгаллат
PALM – фотоактивируемая локализационная микроскопия (photoactivated localization microscopy)
PI – пропидий йодистый
PPD – П-фенилендиамин
Quantum Dots (QD) – квантовые точки
RI – показатель преломления
SR-SIM – Super resolution structured illumination microscopy
SSIM – Saturated structured illumination microscopy
STED – Stimulated Emission Depletion
TRITC – тетраметилродамин-5-(6)-изотиоцианат

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы при проведении морфологических исследований в биологии и медицине стали широко использоваться современные высокотехнологичные приборы (конфокальные и мультифотонные микроскопы, системы сверхвысокого разрешения), которые при сочетании с новыми иммуноцитохимическими подходами позволяют перейти на качественно новый уровень анализа клеточных и тканевых структур, недоступный ранее. Постоянное усложнение приборной базы и совершенствование соответствующего программного обеспечения приводят к возникновению определенных трудностей у специалистов, владеющих только классическими приемами микроскопии. Переход от методов иммуногистохимии, использующих иммунопероксидазную реакцию для визуализации связавшихся с тканевыми антигенами первичных антител, к методам флуоресцентной микроскопии, использующих иную методологию, требует разъяснения ее базовых принципов. Наиболее удачно это можно сделать на конкретных примерах, являющихся продуктом научного исследования, результаты которого все-сторонне проанализированы. Именно такие примеры и представлены в настоящей книге. Они являются плодом многолетних исследований сотрудников нескольких научных коллективов, являющихся авторами данного издания.

Технической базой для реализации большинства представленных протоколов и иллюстраций, помещенных на вкладышах, послужил комплекс оборудования и программного обеспечения, разработанный фирмой Zeiss (Германия). Эти исследования выполнены в Институте экспериментальной медицины (ФБГНУ «ИЭМ»). Часть исследований, относящихся к использованию микроскопии сверхвысокого разрешения, выполнены на приборном комплексе сверхвысокого разрешения Nikon N-SIM/N-STORM в «Nikon Center of Excellence» в отделе электронной микроскопии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова (Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского (работы на данном приборе осуществляются при поддержке Программы развития МГУ (ПНР 5.13)).

Авторы выражают благодарность заведующему отделом электронной микроскопии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова доктору биологических наук И. И. Кирееву за помощь в проведении микроскопии с использованием системы Nikon N-SIM/N-STORM.

Д. Э. Коржевский

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ МИКРОСКОПИИ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПОЛЬЗОВАНИИ ЭФФЕКТА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

В данной главе в краткой форме объясняются основные принципы, позволяющие использовать эффект флуоресценции в микроскопии, и рассказывается об особенностях новых методов микроскопии — конфокальной микроскопии, мультифотонной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения, основанной на использовании эффекта флуоресценции.

1.1. Флуоресценция и флуоресцентная микроскопия

Флуоресценция — это физическое явление, заключающееся в способности некоторых веществ (флуорохромов) после поглощения света с одной длиной волны излучать свет с другой длиной волны. По сути, явление флуоресценции обусловлено тем, что при облучении молекулы флуорохрома светом определенной длины волны ее электроны способны переходить на более высокий энергетический уровень. Это состояние флуорохрома не является стабильным. В результате часть полученной энергии расходуется в виде тепла, а часть уходит на излучение фотона, энергия которого меньше, чем энергия поглощенного фотона. Под спектром испускания (эмиссии) флуорохрома понимают зависимость интенсивности испускания от длины волны при фиксированной длине волны возбуждения. Согласно правилу Стокса длина волны испускаемого света всегда больше, чем длина волны поглощаемого или, другими словами, максимум спектра излучения сдвинут по отношению к максимуму спектра поглощения в сторону более длинных волн (в «красную» сторону видимого спектра). С физическими основами описанных выше процессов более подробно можно ознакомиться в книге Р. Фейнмана (Фейнман Р., 2011).

Каждый флуорохром характеризуется определенным спектром поглощения и испускания. Например, один из самых широко используемых в медико-биологических исследованиях флуорохром FITC (fluorescein 5-isothiocyanate) в водной среде имеет $\lambda_{\text{max поглощения}} = 495 \text{ нм}$, а $\lambda_{\text{max испускания}} = 519 \text{ нм}$ (зеленый свет). Характеристики различных флуорохромов и особенности их применения в микроскопии биологических образцов представлены в следующей главе и в других изданиях (Коржевский Д. Э. [и др.], 2014; Liu J. [et al.], 2013).

Явление флуоресценции было использовано для визуализации микроскопических биологических объектов еще в начале XX в., в том числе и для объектов, не обладающих собственной флуоресценцией, но выявляющихся благодаря флуоресценции флуорохромов, которые с этими объектами могут специфически связываться. Основными компонентами флуоресцентных и конфокальных микроскопов являются источники возбуждающего света и детекторы флуоресцентного сигнала. Согласно правилу Стокса для возбуждения флуоресценции (исключая мультифотонный вариант) используется свет более короткой длины волны, чем ожидаемая флуоресценция.

В настоящее время в качестве источника возбуждающего света обычно используются диоды и лазеры. Преимущества лазеров заключаются в высокой степени монохроматичности, и поэтому необходимость применения возбуждающих светофильтров пропадает. Но если для визуализации объекта требуется использовать флуорохромы, возбуждающиеся на разных длинах волн, необходимо применять несколько лазеров или использовать перенастраиваемый лазер, длина волны излучения которого может варьировать в спектральном диапазоне с достаточно широкими пределами (так называемый белый лазер). Это приводит к значительному удорожанию оборудования. Преимущества светодиодных ламп состоят в отсутствии необходимости юстировки (в отличие от ранее широко использовавшихся ртутных и ксеноновых ламп), возможности регулирования яркости светодиода, равномерном распределении интенсивности освещения, длительном сроке службы (около 100 тыс. часов) и относительно низкой энергозатратности. Например, Carl Zeiss уже несколько последних лет предлагает в модульной конструкции Axio Scope свободно комплектуемый осветитель с возможностью применения до четырех светодиодных модулей и опционной установкой системы Colibri, отличающейся высокоточной настройкой интенсивности свечения и гибкостью комбинирования различных длин волн, а также микросекундным временем включения, что необходимо при исследовании динамических процессов. Если же конструктивно требуется использование фильтра возбуждающего света (в случае использования в качестве источников возбуждения ртутных или ксеноновых ламп), то он подбирается таким образом, чтобы из спектра лампы выделялся свет той длины волны, которая максимально эффективно поглощается флуорохромом. Запирающий фильтр выбирают в соответствии с фильтром возбуждающего света. Подробнее с описанием устройства фильтров можно ознакомиться в книге Д. Э. Коржевского [и др.] (2014).

Детектирование флуоресцентного сигнала производится с помощью фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) и цифровой видеокамеры.

Высокий коэффициент усиления ФЭУ позволяет получить на выходе легко регистрируемый сигнал. Разрешение и качество итогового изображения определяются параметрами ССD-камеры. Например, цветная камера АХЮСАМ НRc (512 color) (Carl Zeiss) для флуоресцентного микроскопа имеет разрешение до 12 мегапикселей (4164×3120) и скорость передачи информации 12 кадров в секунду. При длительных экспозициях (до 600 с) сенсорные элементы камеры могут нагреваться, что приводит к появлению шумов, поэтому камера дополнительно снабжена термоэлектрическими преобразователями — элементами Пельтье.

Основное преимущество флуоресцентной микроскопии — значительное повышение контрастности изображения за счет специфического мечения образца, позволяющего изучать биологические объекты прижизненно в режиме реального времени. Использование двух и более флуорохромов в качестве детектирующей системы дает еще одно весомое преимущество — возможность одновременного изучения нескольких объектов или их частей. Главный недостаток флуоресцентной микроскопии — те же физические ограничения, что и для обычной оптической микроскопии. Из-за дифракции света (способности огибать преграды) точка микроскопического изображения визуализируется в виде светового пятна, окруженного дифракционными кольцами (узор Эйри). Поэтому если объекты находятся близко друг к другу (на расстоянии меньшем чем 200 нм — предел Аббе), различить их невозможно.

1.2. Конфокальная микроскопия

Улучшить разрешение вдоль оптической оси объектива удалось за счет использования принципа конфокальной фильтрации флуоресценции, основанного на описанном ниже принципе. Излучение, испускаемое лазером, попадает на светоделитель, который отражает возбуждающий свет, направляя его на систему зеркал, позволяющих изменять направление луча во взаимно перпендикулярных плоскостях, обеспечивая высокоэффективное отражение на длине волны генерации лазера и почти 100 % пропускание света в остальном спектральном диапазоне. Далее свет через объектив фокусируется в определенной точке образца, возбуждая флуоресценцию. При этом лазерный луч возбуждает флуоресценцию во всех слоях образца, через которые он проходит. Флуоресцентное излучение собирается объективом и возвращается на светоделитель, затем проходит сквозь него, попадая на эмиссионные фильтры. При необходимости многоканальной регистрации (например, при использовании нескольких флуорохромов) возможно дополнительное деление флуоресцентного сигнала на со-

ставляющие с помощью светоделителей и фильтров эмиссии. Собранный из определенной точки образца свет фокусируется в плоскости конфокальной диафрагмы (pinhole), попадает на детектор и оцифровывается. При этом свет, исходящий из областей выше или ниже плоскости фокуса, не проходит через диафрагму. Затем с помощью системы зеркал луч возбуждающего света направляется на соседнюю точку в образце. Процесс повторяется. Так, точка за точкой, формируется изображение (в горизонтальной и/или вертикальной плоскости). Варьируя диаметр конфокальной диафрагмы, можно изменять толщину оптического слоя, от которого измеряется сигнал. Однако при уменьшении диаметра конфокальной диафрагмы (а, следовательно, и уменьшении толщины оптического слоя) снижается и интенсивность флуоресценции, которую диафрагма пропускает к детектору. В связи с этим приходится искать компромисс между диаметром диафрагмы и отношением сигнал/шум. Если установить диаметр конфокальной диафрагмы равным диаметру центрального пятна дифракционной картины точечного объекта (диска Эйри), то можно избежать попадания в объектив света от дифракционных колец. Применяя такую технологию, можно повысить разрешающую способность примерно в 1,4 раза по сравнению с обычными оптическими микроскопами, и это приведет к заметному улучшению четкости изображения. Дальнейшее увеличение контрастности с применением данной технологии уже затруднительно из-за снижения соотношения сигнал/шум. Аксиальное разрешение конфокального микроскопа также зависит от диаметра диафрагмы. Чем меньше диаметр диафрагмы, тем меньше толщина слоя, с которого регистрируется сигнал, следовательно, лучше аксиальное разрешение. С более детальным описанием принципиальной схемы конфокального микроскопа и устройства работы его модулей можно ознакомиться в следующих работах: Nair V. J. [et al.], 2012; Tovey S. C. [et al.], 2005; Chen J. T. [et al.], 2004.

Таким образом, используя метод конфокальной микроскопии, можно получать изображения с более высоким разрешением с сохранением возможности одновременного детектирования сигнала от нескольких флуорохромов прижизненно и в режиме реального времени.

1.3. Преимущества технологии «Airyscan»

Повысить разрешающую способность конфокального микроскопа, не прибегая к использованию особых физико-химических эффектов, позволяет новая технология «Airyscan», запатентованная фирмой Zeiss (Германия). В модуле Airyscan производства Carl Zeiss используется несколько иной принцип детекции сигнала, чем в стандартном

модуле детекции конфокального микроскопа. Вместо фильтрации света с помощью одиночной точечной диафрагмы (для одного пикселя) 32-канальный матричный детектор собирает свет одновременно со всей площади рисунка Эйри. Центральный детекторный элемент (точечная диафрагма) расположен на оптической оси и с его помощью создается классическое конфокальное изображение. Все остальные элементы детектора смещены относительно оптической оси. Каждый из этих элементов функционирует как отдельная точечная диафрагма с известной, но смещенной относительно оптической оси пространственной координатой. Поэтому и изображение, создаваемое на каждом детекторе, будет различным, смещенным в пространстве. Поскольку координаты каждого элемента известны, существует возможность виртуального смещения и нормализации изображения относительно оптической оси, что приводит к 1,5-кратному увеличению разрешающей способности без потери чувствительности. В данном модуле реализована возможность параллельной детекции сигнала от четырех пикселей (по оси абсцисс), что приводит к 4-кратному увеличению скорости сканирования и дает возможность получать высокоразрешенные изображения со скоростью до 19 кадров в секунду при размерах изображения 512×512 пикселей или до 27 кадров в секунду при размерах 480×480 пикселей (Weisshart K., 2014).

1.4. Мультифотонная микроскопия

Еще одно ограничение в использовании классического конфокального микроскопа связано с необходимостью применения в качестве источников света лазерного излучения ультрафиолетового или коротковолнового видимого диапазона, которое разрушительно для живых клеток. Эта проблема была преодолена с введением в практику мультифотонных микроскопов, устройство которых основано на следующем физическом явлении.

Как уже было отмечено выше, наиболее интенсивной флуоресценции флуорохрома можно добиться, облучая его светом с длиной волны, близкой к максимуму поглощения, однако возможно перевести флуорофор в возбужденное состояние, облучая его светом с длиной волны, отличной от максимума поглощения, например используя два или три длинноволновых фотона. С увеличением плотности мощности света возрастает вероятность поглощения атомом флуорохрома одновременно двух и более фотонов, после чего атом излучает фотон большей энергии, чем при однофотонном поглощении. Поэтому в качестве подсветки можно использовать излучение инфракрасного диапазона. В современных мультифотонных микроскопах высокая плотность мощности светового пучка обеспечивается за счет фокуси-

ровки лазерного излучения, а также благодаря уменьшению длительности лазерного импульса. Для этой цели применяются фемтосекундные лазеры с длительностью импульса около 10^{-13} с (100 фемтосекунд) и частотой порядка 100 МГц. Использование такой системы (при невысокой ее мощности) позволяет получить сигнал с малым уровнем фоновых шумов, достичь большей глубины проникновения в ткани при малой степени повреждения клеток. Кроме этого, за счет отсутствия возбуждения и выцветания флуорохромов вне фокального объема отсутствует необходимость установки конфокальной диафрагмы (Svoboda K., Yasuda R., 2006). В качестве примера можно привести комплекс лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss серии LSM-880 NLO (Non Linear Optic), который снабжен короткоимпульсным фемтосекундным инфракрасным лазером с перестраиваемым диапазоном (680–1080 нм). Использование этой системы позволяет получить глубину проникновения в ткани до 1 мм и осуществлять непрерывный мониторинг объекта в течение нескольких часов благодаря низкой цитотоксичности инфракрасного излучения и снижению клеточного повреждения фотоиндуцированными процессами.

Одним из вариантов мультифотонной микроскопии является микроскопия с использованием второй гармоники (Second-harmonic imaging microscopy — SHIM). Метод генерации второй гармоники основан на нелинейном оптическом явлении, суть которого заключается в преобразовании средой двух фотонов с частотой ω в один фотон с частотой 2ω . Это означает, что помимо света на частоте лазера из среды выходит свет на удвоенной частоте — вторая гармоника. Генерация второй гармоники обусловлена рассеянием света в среде и возможна при действии поляризованного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона. Вероятность двухфотонного возбуждения растет пропорционально квадрату интенсивности возбуждающего света, поэтому при двухфотонном возбуждении достигается большее, по сравнению с конфокальной микроскопией, разрешение, так как флуоресценция возбуждается в объеме порядка 10^{-12} см³. Кроме этого, при реализации данного метода не требуется установка диафрагмы, поэтому увеличивается и число фотонов, собираемых приемником, а за счет возможности изменения фокусировки лазера данная методика позволяет получать трехмерные изображения клеток и тканей. Однако не все биологические образцы могут генерировать вторую гармонику. Классическим объектом для этого вида микроскопии является роговица глаза, которая преимущественно состоит из плотно упакованных коллагеновых волокон — источника генерации второй гармоники (Helmchen F. [et al.], 2005; Kaminer I. [et al.], 2013).

1.5. Микроскопия сверхвысокого разрешения

Следующий научный прорыв в области микроскопии связан с разработкой метода микроскопии на основе подавления спонтанного испускания или STED-микроскопии (Stimulated Emission Depletion Microscopy). Метод заключается в одновременном применении двух лазеров: излучение, испускаемое первым лазером, вызывает флуоресценцию молекул, а излучение второго с длиной волны больше, чем максимум флуоресценции (STED-лазер), — подавляет эмиссию флуорохромов, расположенных вне центра возбуждения. Для реализации этого эффекта необходимо, чтобы пространственное распределение интенсивности излучения STED-лазера представляло собой «кольцо». В итоге регистрируется свечение только от молекул флуорофора, расположенных в центре дифракционного пятна. Полное изображение формируется из отдельных точек (элементарных изображений) путем поточечного сканирования объекта (Chéreau R. [et al.], 2015; Turkowyd B. [et al.], 2016). Разрешающая способность такой системы зависит от мощности STED-лазера и теоретически не имеет предела. Однако за счет фотоповреждающего действия излучения высокой энергии на практике удается достичь пространственного разрешения в 30–70 нм, а временного — от миллисекунд до секунд. За разработку данного метода немецкому ученому Штефану Хеллю была присуждена Нобелевская премия.

Применение STED-микроскопии позволило наблюдать за перестройкой актин-спектринового цитоскелета клетки, коллапсом конусов роста нейритов, процессом деполимеризации нитей актина при дегенерации нейронов (Li C. [et al.], 2018; Unsain N. [et al.], 2018). Из недостатков метода можно выделить необходимость использования исключительно фотостабильных флуорохромов.

Преодолеть дифракционный предел также можно с помощью технологии высокоразрешающего структурированного освещения (SR-SIM — Super resolution structured illumination microscopy). Для реализации этого метода на поверхность стекла путем напыления наносят металлическую решетку. Затем стекло помещается в плоскость диафрагмы микроскопа. Возбуждающее излучение не проходит через решетку, и она становится видимой совместно с объектом — в плоскости объекта видны темные линии. При применении двух или более решеток или при наложении изображений, полученных при перемещении одной решетки, возникает явление, называемое муаровым эффектом — появление контрастных интерференционных полос. При этом чем меньше шаг перемещения решетки, тем больше расстояние между муаровыми полосами. Этот эффект позволяет получить многократное увеличение ширины шага сдвига решетки. Шаг за шагом, изменяя положение решетки, можно воссоздать исходную структуру объекта.

С помощью данного метода можно достичь пространственного разрешения в 80–120 нм, а временного — от миллисекунд до секунд, при этом ограничения на используемые флуорохромы отсутствуют, данный метод может быть применен к архивным образцам.

Данный метод реализован в системе визуализации для сверхвысокого разрешения серии ELYRA Carl Zeiss в модификации ELIRA S.1, совместимой с конфокальными микроскопами LSM 710- и 880-серий. Облучение образца осуществляется твердотельным лазером с диодной накачкой (DPSS — Diode-pumped solid-state laser), характеризующимся высокой эффективностью и компактностью. В данном модуле доступны четыре лазерные линии (405, 488, 561 и 642 нм), что позволяет получать четырехцветное изображение, а также реализована возможность высокоточного выбора размера поля зрения для получения изображения относительно крупных объектов или увеличения плотности энергии лазера для более эффективной фотоактивации в малом объеме (максимальное поле зрения — $79,60 \times 79,44$ мкм). Кроме этого, преимущество системы заключается в автоматическом подборе решеток для обеспечения оптимального разрешения при выбранной длине волны и увеличении. Модуль позволяет достичь латерального разрешения в 120 нм и аксиального — в 300 нм.

Существенным недостатком SIM-микроскопии является необходимость анализа большого набора муаровых изображений, поэтому, даже при использовании мощных вычислительных ресурсов, на изображении могут возникать артефакты. Однако модуль ELYRA снабжен многоканальной системой получения данных и оснащен алгоритмом коррекции аберраций.

Совместное применение технологии конфокальной лазерной микроскопии в сочетании с 3D-SIM позволило визуализировать распределение РНК-полимеразы в интерфазном ядре (Schubert V., Weisshart K., 2015); исследовать скелет отдельных дендритов (Sawada K. [et al.], 2018), структуру фокальных комплексов адгезии (Wang Q. [et al.], 2018), структуру хроматина и ядерной поры (Sardo L. [et al.], 2017; Kraus F. [et al.], 2017).

В суперсовременных SIM-системах кроме муарового эффекта используется нелинейный фотоэффект (способность флуорохромов к нелинейному возрастанию эмиссии в зависимости от интенсивности облучения). Такая технология получила название микроскопии насыщенного структурированного освещения (SSIM — Saturated structured illumination microscopy). Пространственное разрешение такой системы около 45 нм, временное — от миллисекунд до секунд. Однако для реализации метода необходимо применение лазеров высокой мощности, поэтому метод не применим для анализа живых объектов (Willems K. [et al.], 2017).

Преодолеть дифракционный предел можно с помощью еще одного приема — стохастической оптической реконструкции (STORM — Stochastic Optical Reconstruction Microscopy). В этом методе изображение реконструируется путем определения локализации одиночного флуорохрома в двух- или трехмерном пространстве. Для этого с помощью излучения малой мощности возбуждается небольшое количество молекул флуорохрома. Каждая молекула флуорохрома визуализируется как отдельное дифракционное пятно. Для реализации данного метода, как правило, используют небольшие синтетические флуорохромы. Объединение данных, полученных при многократной случайной последовательной активации флуорохромов, позволяет определить положение всех молекул флуорохрома в образце и добиться разрешения в 20 нм. Если же интенсивность облучающего света удастся подобрать таким образом, что активированные флуорохромы находятся на расстоянии примерно 200 нм, то положение каждого флуорохрома можно определить с точностью до 1 нм. Для STORM-микроскопии предпочтительно использование ярких флуорохромов с высоким коэффициентом экстинкции и квантовым выходом (Fernández-Suárez M., Ting A. Y., 2008). Техника STORM оказалась эффективным инструментом для анализа молекулярной архитектуры субклеточных структур в образцах тканей. Например, при помощи STORM-технологии была реконструирована трехмерная структура синапса (Dani A. [et al.], 2010); определено положение отдельных молекул в K^+ -каналах М-типа, Ca^{2+} -каналах L-типа и TRPV-1 каналов (Zhang J. [et al.], 2016). В последние годы для компенсации искажения изображения STORM-микроскопия была дополнена адаптивной оптической системой (АО — adaptive optics). В состав такой системы включают датчики волнового фронта (позволяют оценивать профиль волнового фронта) и корректоры волнового фронта (с их помощью осуществляется коррекция оптических аберраций), что позволяет дополнительно повысить разрешающий предел микроскопа. Основные приемы реализации этого метода описаны в D. Yue [et al.] (2018).

Еще одним вариантом микроскопии одиночных молекул является фотоактивируемая локализационная микроскопия (PALM — photoactivated localization microscopy) и флуоресцентная фотоактивируемая локализационная микроскопия (FPALM — fluorescence photoactivation localization microscopy). Данная группа методов базируется на том же принципе, что и STORM, отличия заключаются лишь в типах используемых флуоресцентных меток — фотоактивируемых и фотопереключаемых белков. Пространственное разрешение таких систем составляет 10–40 нм. За разработку метода PALM в 2014 г. американцы Эрик Бетциг и Уильям Мернер получили Нобелевскую премию по химии.

Один из примеров реализации технологии PALM — система ELYRA P. 1 с модулем 3D-PALM Carl Zeiss, совместимая с конфокальными микроскопами LSM серий 710 и 880. С помощью этой системы можно длительное время производить трехмерную визуализацию образца с латеральным разрешением 20 нм, а аксиальным — 50 нм, что позволяет увидеть субклеточные структуры. В такой конфигурации максимальное поле зрения — $51,1 \times 51,1$ мкм, а скорость захвата изображения 27 кадров в секунду (512×512 пикселей). Также Carl Zeiss разработана гибкая система ELYRA PS.1 — единая платформа оптики, электроники и программного обеспечения для микроскопии сверхвысокого разрешения технологии SIM, PALM и лазерной широкопольной микроскопии с возможностью переключения с одного метода на другой на любом этапе проведения эксперимента.

Микроскопия одиночных молекул продолжает развиваться. Среди новейших методов можно выделить локализационную микроскопию, основанную на процессах обесцвечивания и блинкинга (Bleaching/blinking assisted localization microscopy — BaLM) и обобщенный принцип сверхразрешающей микроскопии одиночных молекул с фотообесцвечиванием (Generalized single-molecule high-resolution imaging with photobleaching — gSHRIMP). Принцип данных методов состоит в использовании эффекта фотообесцвечивания и позволяет добиться разрешения 30–50 нм. Например, применив метод BaLM, удалось получить структуру хромосом бактерий, а за счет улучшения временного разрешения стало возможным наблюдать за перемещением табулин-ассоциированного белка EB3 вдоль микротрубочек (Klementieva N. V. [et al.], 2017).

Литература

Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. [и др.]. Молекулярная морфология. Методы флуоресцентной и конфокальной лазерной микроскопии. — СПб.: СпецЛит, 2014. — 111 с.

Фейнман Р. Фейнмановские лекции по физике. Т. 3: Излучение. Волны. Кванты. — Изд. 6-е, суц. испр. — М.: УРСС: Издательский дом ЛИБРОКОМ, 2011. — 264 с.

Chen J. T., Chen R. M., Lin Y. L. [et al.]. Confocal laser scanning microscopy: I. An overview of principle and practice in biomedical research // Acta Anaesthesiol. Taiwan. — 2004. — Vol. 42. — № 1. — P. 33–40.

Chéreau R., Tønnesen J., Nägerl U. V. STED microscopy for nanoscale imaging in living brain slices // Methods. — 2015 — Vol. 88. — P. 57–66.

Dani A., Huang B., Bergan J. [et al.]. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain // Neuron. — 2010. — Vol. 68. — № 5. — P. 843–56.

Fernández-Suárez M., Ting A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. — 2008. — Vol. 9. — P. 929–943.

- Helmchen F., Denk W.* Deep tissue two-photon microscopy // *Nat. Methods.* — 2005. — Vol. 2. — P. 932–940.
- Kaminer I., Nemirovsky J., Segev M.* Optimizing 3 Dmultiphoton fluorescence microscopy // *Opt. Lett.* — 2013. — Vol. 38. — № 19. — P. 3945–3948.
- Klementieva N. V., Pavlikov A. I., Moiseev A. A.* [et al.]. Intrinsic blinking of red fluorescent proteins for super-resolution microscopy // *Chem. Commun.* — 2017. — Vol. 53. — № 5. — P. 949–951.
- Kraus F., Miron E., Demmerle J.* [et al.]. Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures // *Nat. Protoc.* — 2017. — Vol. 12. — № 5. — P. 1011–1028.
- Li C., Liu S., Wang W.* [et al.]. Recent research on stimulated emission depletion microscopy for reducing photobleaching // *J. Microsc.* — 2018. — doi: 10.1111/jmi.12698. [Epub ahead of print].
- Liu J., Liu C., He W.* Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells // *Curr. Org. Chem.* — 2013. — Vol. 17. — P. 564–579.
- Nair B. J., Sivakumar T. T., Joseph A. P.* [et al.]. Confocal microscopy // *Health Sciences.* — 2012. — Vol. 1. — № 3 : JS004A. — P. 1–6.
- Sardo L., Lin A., Khakhina S.* [et al.]. Real-time visualization of chromatin modification in isolated nuclei // *J. Cell. Sci.* — 2017. — Vol. 130. — № 17. — P. 2926–2940.
- Sawada K., Kawakami R., Shigemoto R.* [et al.]. Super-resolution structural analysis of dendritic spines using three-dimensional structured illumination microscopy in cleared mouse brain slices // *Eur. J. Neurosci.* — 2018 — Vol. 47. — № 9. — P. 1033–1042.
- Schubert V., Weisshart K.* Abundance and distribution of RNA polymerase II in Arabidopsis interphase nuclei // *J. Exp. Bot.* — 2015. — Vol. 66. — № 6. — P. 1687–1698.
- Svoboda K., Yasuda R.* Principles of twophoton excitation microscopy and its applications to neuroscience // *Neuron.* — 2006. — Vol. 50. — № 6. — P. 823–839.
- Tovey S. C., Brighton P. J., Willars G. B.* Confocal microscopy: theory and applications for cellular signaling // *Methods Mol. Biol.* — 2005. — Vol. 312. — P. 57–85.
- Turkowsky B., Virant D., Endesfelder U.* From single molecules to life: microscopy at the nanoscale // *Anal Bioanal Chem.* — 2016. — Vol. 408. — № 25. — P. 6885–6911.
- Unsain N., Bordenave M. D., Martinez G. F.* [et al.]. Remodeling of the Actin/Spectrin Membrane-associated Periodic Skeleton, Growth Cone Collapse and F-Actin Decrease during Axonal Degeneration // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8. — № 3007. — P. 1–16.
- Wang Q., Delcorde J., Tang T.* [et al.]. Regulation of IL-1 signaling through control of focal adhesion assembly // *FASEB J.* — 2018. — doi: 10.1096/fj.201700966R. [Epub ahead of print].
- Weisshart K.* The Basic Principle of Airyscanning // *Technology Note.* — 2014.

Willems K., Van Meervelt V., Wloka C. Single-molecule nanopore enzymology // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* — 2017. — Vol. 372. — № 1726. — pii: 20160230.

Yue D., Nie H., Li Y. Fast correction approach for wavefront sensorless adaptive optics based on a linear phase diversity technique // *Appl. Opt.* — 2018. — Vol. 57. — № 7. — P. 1650–1656.

Zhang J., Carver C. M., Choveau F. S. [et al.]. Clustering and Functional Coupling of Diverse Ion Channels and Signaling Proteins Revealed by Super-resolution STORM Microscopy in Neurons // *Neuron.* — 2016. — Vol. 92. — № 2. — P. 461–478.

ФЛУОРОХРОМЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В современных морфологических исследованиях в случае использования флуоресцентной микроскопии и конфокальной лазерной микроскопии для окрашивания препаратов применяют различные флуоресцентные красители. При проведении иммуноцитохимических исследований связавшиеся с клеточными и тканевыми антигенами антитела выявляются благодаря присоединению флуоресцентной метки. Флуоресцирующие вещества, используемые в качестве флуоресцентной метки, которая конъюгируется с нефлуоресцирующими молекулами (нуклеотидами, пептидами, антителами), а также флуоресцентные красители принято называть флуорохромами. Флуоресцентные красители и другие флуорохромы способны расходовать часть энергии поглощенного излучения на флуоресценцию при возвращении из возбужденного состояния в стабильное. Каждый флуорохром обладает индивидуальным спектром излучения и поглощения, наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается при облучении красителя светом с длиной волны, близкой к характерному для него максимуму поглощения.

Флуоресцентные красители применяются для выявления биологических макромолекул (белки, нуклеиновые кислоты) или определенных органелл клетки, таких как митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, а также для выявления клеточного ядра. Для окраски живых объектов применяются такие красители, которые могут проникать в живые клетки, не вызывая их повреждения. Часть существующих красителей (не проникающих в живые клетки либо токсичных для них) используется только для окраски фиксированных биологических объектов. Другие флуоресцирующие вещества (флуоресцентные индикаторы) используются для мониторинга динамических процессов в живых клетках (определение концентрации неорганических ионов, рН, активных форм кислорода или мембранного потенциала). Флуоресцентные красители также широко применяются при определении целостности клеток, при изучении эндо- и экзоцитоза, текучести мембран, межклеточной коммуникации и ферментативной активности клеток. Флуорохромы, взаимодействующие с нуклеотидами, нашли широкое применение в области молекулярной генетики и при проведении цитогенетических исследований.

Использование конфокальной лазерной микроскопии для изучения объектов, подвергнутых окраске флуоресцентными красителями, дает возможность определять локализацию специфических молекул и органелл с высокой точностью. Сочетание нескольких красителей и флуоресцентных меток с различными параметрами излучения позволяет проводить двойную, тройную (и более) маркировку с целью обнаружения нескольких молекулярных компонентов в одном образце.

Некоторые низкомолекулярные органические красители проявляют сродство к определенным биомолекулам и клеточным органеллам. Это явление используется для селективной флуоресцентной окраски. Так, например, амилоидные структуры флуоресцируют при взаимодействии с тиофлавидами (Коржевский Д. Э. [и др.], 2013). Флуоресцентный краситель нильский красный (Nile Red) используется для определения локализации нейтральных липидных включений в клетках. Nile Red имеет яркую флуоресценцию в неполярных средах (максимумы возбуждения/излучения 552/636 нм). Красители BODIPY также используются при окраске нейтральных липидов. Отложения солей кальция в костях, хрящах и минерализованных опухолях при взаимодействии с тетрациклином проявляют желтую флуоресценцию. Для окраски митохондрий клетки инкубируют с красителями Mitotracker, которые пассивно диффундируют через плазматическую мембрану и накапливаются в митохондриях живых клеток. Помимо митохондриальных маркеров синтезированы также красители LysoTracker, выявляющие лизосомы. Краситель DiOC6 применяется для селективного окрашивания эндоплазматической сети. С аналогичной целью используют соединения из группы ER-Tracker.

2.1. Органические флуоресцентные красители, используемые для конъюгации с антителами и стрептавидином

Для иммунофлуоресцентного окрашивания применяют целый ряд разнообразных флуорохромов, среди которых наиболее широко известными и доступными являются красители FITC и TRITC. Флуоресцеин изотиоцианат (FITC) представляет собой органический флуоресцентный краситель, который часто используется в иммунофлуоресцентных протоколах. FITC применяется в соединении с различными антителами и стрептавидином. Он обладает зеленой флуоресценцией (максимумы возбуждения/излучения красителя — 495/519 нм). Максимум излучения может быть достигнут при облучении красителя аргоновым (488 нм) лазером.

Другим общеизвестным флуорохромом, применяемым в морфологических исследованиях, является TRITC (тетраметилродамин-5-(6)-изоотиоцианат). В отличие от FITC, TRITC имеет максимум возбуждения в зеленой области спектра (550 нм), максимум излучения — 573 нм (желтая область спектра). Для возбуждения флуоресценции красителя возможно применение аргонового лазера (514 нм), твердотельного Nd-YAG лазера (532 нм), криптонового лазера (568 нм) и гелий-неонового лазера (543 нм).

В связи с низкой фотостабильностью данных красителей были синтезированы новые вещества со сходными спектральными характеристиками и большей устойчивостью к свету (Alexa 488 и DyLight 488, BODIPY FL, Cy2 и Cy3). Зеленый флуоресцентный краситель BODIPY FL обладает спектральными характеристиками, аналогичными FITC. Максимумы возбуждения/излучения флуорохрома BODIPY FL составляют 503/512 нм. Для возбуждения флуоресценции при конфокальной микроскопии обычно применяют аргоновый лазер (488 нм). Красители группы BODIPY проявляют уникальные гидрофобные свойства, что делает их высокоэффективными при окрашивании липидов, мембран и других липофильных соединений. Производителем предлагаются конъюгаты красителя BODIPY FL с различными антителами, пептидами, белками, трэйсерами. Кроме того, доступны реакционно-способные красители и наборы для маркировки белков, которые позволят создавать собственные протеиновые конъюгаты или зонды. Сведения о конъюгатах охарактеризованных флуорохромов представлены на сайтах ряда производителей:

<http://www.abcam.com/products?keywords=FITC>

<http://www.abcam.com/products?keywords=TRITC>

<https://www.thermofisher.com/antibody/secondary/query/fitc>

<https://www.thermofisher.com/antibody/secondary/query/tritc>

<https://www.thermofisher.com/search/results?query=bodipy>.

Конъюгаты флуорохрома Rhodamine Red-X (RRX) имеют максимум возбуждения при 570 нм и максимум эмиссии при 590 нм. RRX — флуоресцентный краситель, возбуждаемый криптоновым лазером 568 нм. Обычно для двойного маркирования TRITC применяется совместно с FITC. Однако лучшее разделение цветов достигается в случае применения RRX или Alexa Fluor 594. При проведении многоцветного иммунофлуоресцентного окрашивания гистологических препаратов для конфокальной микроскопии Rhodamine Red-X часто применяют совместно с DyLight 405, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647. При использовании таких флуорохромов для возбуждения флуоресценции необходим криптоновый/аргоновый лазер (488, 568, 647 нм) или диодный лазер (405 нм). Rhodamine Red-X имеет хорошее цветовое разделение от DyLight 405 и Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 647, что

позволяет добиться эффективной 4-цветной визуализации изучаемых маркеров. Также флуорохром RRX полезен в экспериментах, требующих тройной маркировки совместно с Cy2 и Cy5, поскольку максимум излучения Rhodamine Red X лежит между максимумами Cy2 и Cy5, и его спектр почти не перекрывается этими красителями. Конъюгаты флуорохрома представлены следующими производителями:

<https://www.thermofisher.com/>

<https://www.jacksonimmuno.com/>

При иммунофлуоресцентных методах исследования также применяются несольфированные цианиновые красители Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 и Cy7.5. Все они могут быть связаны с белками (антителами) через их реакционно-способные группы. Данная группа красителей доступна в форме конъюгатов с широким спектром вторичных антигенов и конъюгатов со стрептавидином. Представленные на рынке цианиновые флуорохромы имеют высокую фотостабильность с интенсивной флуоресценцией. Они хорошо флуоресцируют в диапазоне pH от 3 до 10 и позволяют проводить иммунофлуоресцентное выявление антигенов тканей как в большей части видимой области спектра, так и в пределах инфракрасной области. Эти красители имеют узкие неперекрывающиеся спектры возбуждения и флуоресценции, позволяющие производить эффективное разделение при многоцветном иммунофлуоресцентном окрашивании тканей. Конъюгаты Cy2 и Cy5 в гидрофобных средах по стабильности и интенсивности флуоресценции превосходят конъюгаты с Alexa Fluor.

Конъюгаты Cy2 имеют максимум возбуждения при 492 нм и флуоресцируют в зеленой области видимого спектра с пиком 510 нм. Облучение красителя производят 488 нм аргоновым лазером. Схожий спектр излучения имеет часто применяющийся при конфокальной микроскопии краситель FITC (520 нм). Однако конъюгаты с Cy2 более фотостабильны и менее чувствительны к изменениям pH, чем FITC. Несмотря на высокие характеристики данного флуорохрома, выбор конъюгатов Cy2 с различными антителами достаточно ограничен.

Флуоресценция **конъюгатов Cy3** возбуждается желто-зеленым светом с длиной волны 550 нм и пиковой эмиссией 570 нм (желтая область спектра). При облучении красителя возможно применение различных лазеров: аргонового (514 или 528 нм), при этом флуоресценция достигает 50 % от максимального значения пиковой эмиссии; гелий-неонового (543 нм) или ртутной лампы (546 нм), при этом флуоресценция доходит до 75 % от максимума.

Конъюгаты Cy3 имеют более яркую флуоресценцию и являются более фотостабильными по сравнению с другими близкими по спектральным характеристикам оранжево-красными флуоресцентными красителями (например, TRITC). Кроме того, фоновая флуоресценция

при применении соединений $Cy3$ минимальна. Конъюгаты $Cy3$ являются яркими и фотостабильными как в водной среде, так и в неполярных средах.

Конъюгаты $Cy5$ имеют максимум возбуждения при 650 нм и пик флуоресценции около 670 нм (красный) (Колос Е. А. [и др.], 2016). Около 98 % от максимума флуоресценции может быть достигнуто при использовании криптон-аргонового лазера (647 нм) и 63 % от максимума с гелий-неоновым лазером (633 нм). Однако $Cy5$ в водных средах проявляет менее интенсивную флуоресценцию, чем Alexa Fluor 647. Производители представляют ограниченный выбор $Cy5$ -конъюгатов.

Кроме того, на рынке представлены **конъюгаты $Cy3.5$** . Максимумы возбуждения/излучения красителя составляют 581/596 нм.

Конъюгаты $Cy5.5$, $Cy7$ флуоресцируют в дальней красной и инфракрасной областях спектра. Максимумы возбуждения/излучения для этих флуорохромов составляют 675/694 и 743/767 нм соответственно. Производители предлагают широкий ряд конъюгатов стрептавидина и антител с цианиновыми красителями группы Cy . С особенностями реагентов, обладающих различной эмиссией, можно ознакомиться на следующих сайтах производителей:

<http://www.abcam.com/products?keywords=Cy2>

<http://www.abcam.com/products?keywords=Cy3>

<http://www.abcam.com/products?keywords=Cy5>

[http://www.abcam.com/products?keywords=Cy3 %2C5](http://www.abcam.com/products?keywords=Cy3%2C5)

[http://www.abcam.com/products?keywords=Cy5 %2C5](http://www.abcam.com/products?keywords=Cy5%2C5)

<http://www.abcam.com/products?keywords=Cy7>

<https://rockland-inc.com/>

<https://www.avivasysbio.com/>

<https://www.jacksonimmuno.com/>

<https://www.thermofisher.com/>

При иммунофлуоресцентном окрашивании гистологических препаратов нередко применяются конъюгаты вторичных антител с красителями группы Alexa Fluor. Производители предлагают большое разнообразие флуорохромов Alexa Fluor и их конъюгатов, обладающих излучением в широком диапазоне длин волн (УФ-, видимой и ближней ИК-области) при отсутствии спектрального перекрытия, что позволяет использовать их для многоцветной иммунофлуоресцентной окраски. Конъюгаты с этими красителями превосходят другие флуорохромы сходного диапазона спектра по яркости и стабильности флуоресценции, интенсивность их излучения остается высокой в широком диапазоне pH, также они обладают хорошей растворимостью в воде. Спектральные характеристики красителей Alexa Fluor часто подобны другим флуорохромам. Так, спектр Alexa Fluor 555 сходен

со спектром красителя Cy3, а Alexa Fluor 647 похож по спектральным характеристикам на Cy5. Однако конъюгаты красителей Alexa Fluor обладают более интенсивной и устойчивой флуоресценцией в водных средах. Конъюгаты с различными красителями группы Alexa Fluor представлены на сайте производителя:

<https://www.thermofisher.com/>

Для проведения многоцветного иммунофлуоресцентного окрашивания также эффективно применяются конъюгаты Brilliant Violet, разработанные BioLegend и Sirigen. Эти флуорохромы являются новым классом реагентов, имеющим максимум поглощения в области излучения фиолетового диодного лазера (405 нм) и различными максимумами излучения (421, 510, 570, 603, 645, 711, 785 нм). Наиболее востребованным для иммунофлуоресцентной окраски гистологических препаратов при конфокальной микроскопии является Brilliant Violet 421. При проведении окраски тканей в синей области спектра данный краситель обладает рядом преимуществ по сравнению с обычно используемыми DyLight 405 и Alexa Fluor 350. При использовании данных флуорохромов может проявляться высокая фоновая флуоресценция при низкой интенсивности излучения красителя. Конъюгаты Brilliant Violet 421, обладая высокой чувствительностью, фотостабильностью и эффективностью в широком диапазоне pH, позволяют избежать усиления автофлуоресценции фона и проявляют большую интенсивность излучения. Кроме того, прямые конъюгаты Brilliant Violet 421 позволяют достичь достаточно высокого уровня сигнала без применения вторичных антител или дополнительных амплификационных методов. Наиболее известные флуорохромы из этой группы представлены на сайте производителя:

<https://www.biolegend.com/brilliantviolet>.

Свойства красителей из группы Brilliant Violet обеспечивают возможность замены другой группы флуоресцентных маркеров — квантовых точек, которые часто использовались в многомаркерных иммуноцитохимических исследованиях для получения многоцветной эмиссии с использованием только одного ультрафиолетового лазера для ее возбуждения.

2.2. Полупроводниковые нанокристаллы — квантовые точки

Квантовые точки (Quantum Dots, QD) имеют размеры от 1,5 до 40 нм. Это неорганические флуоресцентные нанокристаллы. Квантовые точки могут быть образованы металлическими или полупроводниковыми материалами. Наиболее широко используются QD с кристаллическими ядрами, образованными селенидом кадмия и теллуридом кадмия,

покрытыми оболочкой из сульфида цинка. В последнее время растет интерес к квантовым точкам с ближним инфракрасным излучением, таким как CdSe/ZnS, которые покрыты слоем оксида триоктилфосфина, а также QD, образованным арсенидом индия и сульфидом свинца. Для придания водорастворимости на квантовые точки наносят гидрофильное покрытие — слой модифицированного полиэтиленгликоля (Murgia M. J. [et al.], 2005). Также QD конъюгируют с антителами и стрептавидином.

Квантовые точки резистентны к выцветанию и обладают высокой стабильностью. Флуоресцентные зонды на основе QD имеют широкий диапазон поглощения (от ближнего ультрафиолета до дальнего красного) с максимумом в области 350 нм и узкие полосы излучения, зависящие от размера частиц. Наиболее эффективные QD имеют диаметр ядра около 6 нм (Воробьев И. А. [и др.], 2011). Для CdSe диапазон размеров частиц, при которых наблюдается флуоресценция, колеблется от 1,5 до 12 нм. Так, при увеличении размеров ядра CdSe спектр излучения смещается из зеленой в красную область спектра (Воробьев И. А. [и др.], 2011). Большой сдвиг Стокса (более 100 нм) и фотостабильность квантовых точек дают возможность отслеживать метку в течение нескольких дней в живых тканях. Основным недостатком QD является мерцание, которое устраняется подбором соответствующей оболочки (Олейников В. А., 2011). Квантовые точки применяются в микроскопии, 3D-лазерной конфокальной реконструкции, проточной цитометрии и в экспериментах *in vivo*. При иммуноцитохимических исследованиях возможно применение простых конъюгатов квантовых точек с антителами, однако чаще применяются конъюгаты QD со стрептавидином (Коржевский Д. Э. [и др.], 2010).

Несмотря на высокий квантовый выход и другие очевидные преимущества квантовых точек, их применение в иммуноцитохимических исследованиях до настоящего времени не стало повсеместным. Это можно объяснить рядом причин, из которых наиболее существенные — неустойчивость (агрегация) конъюгатов при длительном хранении реактива и невозможность длительного сохранения флуоресценции в изготовленных препаратах, которые остаются пригодными для анализа только в течение нескольких дней.

2.3. Флуоресцентные красители, которые используют при иммуноцитохимическом исследовании для окраски ядер клеток

При проведении иммуноцитохимического исследования с использованием методов конфокальной микроскопии для облегчения идентификации клеточных элементов различных тканей производят до-

полнительную окраску препаратов с применением одного из красителей, связывающихся либо с ДНК (селективно), либо с ДНК и РНК (не селективно). При выборе ядерного красителя стараются подобрать его так, чтобы длина волны эмиссии этого красителя существенно отличалась от длины волны эмиссии флуорохрома (флуорохромов), используемого при постановке иммуноцитохимической реакции. Многоцветная иммунофлуоресцентная окраска препаратов с одновременным выявлением ядер клеток дает возможность изучения пространственного расположения органелл, транспорта молекул, изменений функционального состояния клетки (размеры ядра и ядрышка, состояние хроматина), взаимоотношений структур цитоплазмы и ядра, процессов митоза, апоптоза, изменений структуры хроматина (Zheng L. [et al.], 2007; Maninová M. [et al.], 2016).

При конфокальной микроскопии ядерную ДНК наиболее часто окрашивают DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолом) или Hoechst 33342, которые обладают схожими спектральными характеристиками и селективностью к двухцепочной ДНК. Оба красителя являются интеркалирующими и связываются с малой бороздкой в двухцепочной ДНК. Однако Hoechst 33342 обладает лучшей способностью проникать через цитоплазматическую мембрану и поэтому наиболее часто используется для окрашивания ядер в живых клетках.

DAPI специфически связывается с ДНК и обладает синей флуоресценцией. Максимум поглощения/излучения красителя — 358/461 нм. DAPI связывается с малой бороздкой ДНК (внешнесвязывающийся лиганд) в области участков молекулы, богатых АТ-нуклеотидами. Связывание DAPI с двухцепочной ДНК приводит к 20-кратному усилению флуоресценции (Chazotte B., 2011). DAPI также может связываться с РНК в области АУ-последовательностей, максимум флуоресценции при этом перемещается в область 500 нм. Квантовый выход при таком взаимодействии гораздо ниже, чем при связывании с ДНК. Таким образом, в отличие от некоторых других красителей, которые связываются как с ДНК, так и с РНК, DAPI не требует предварительного удаления РНК из окрашиваемых препаратов. При проведении конфокальной микроскопии флуоресценцию DAPI необходимо возбуждать ультрафиолетовым аргоновым лазером (360 нм) или мультифотонным (фемтосекундным пульсирующим) лазером (716 нм). Диодный лазер (405 нм), которым обычно комплектуются бюджетные варианты конфокальных микроскопов, для этих целей непригоден. В этом случае вместо DAPI используют другие флуоресцентные красители. Их выбор в настоящее время достаточно широк. Данный флуоресцентный ядерный краситель имеется у большинства поставщиков флуорохромов.

Красители группы Hoechst являются ДНК-селективными, проникающими через цитоплазматическую мембрану красителями. Они

взаимодействуют с малой бороздкой молекулы ДНК преимущественно в АТ-богатых зонах спирали (Loontjens F. G. [et al.], 1990), избирательны к двухцепочной ДНК в присутствии одноцепочной ДНК (Kricka L. J. [et al.], 2009). При связывании с нуклеиновой кислотой они проявляют ярко-синюю флуоресценцию. Максимумы возбуждения/излучения красителя для Hoechst 33258, Hoechst 33342 и Hoechst 33580 составляют 352/461, 350/461 и 392/440 нм соответственно. При конфокальной микроскопии препаратов, окрашенных с использованием красителей Hoechst, применяют ультрафиолетовый лазер (350, 364 нм). Hoechst 33342 легче проникает через цитоплазматическую мембрану, чем Hoechst 33258 и Hoechst 34580 (Chen A. Y. [et al.], 1993). Hoechst 33258 и Hoechst 33342 имеют гораздо более высокий квантовый выход флуоресценции при pH 5, чем при pH 8. Данные ядерные красители представлены на рынке несколькими производителями:

<http://www.abcam.com/products?keywords=Hoechst+>

<https://www.sigmaaldrich.com/>.

Для выявления нуклеиновых кислот в фиксированных образцах клеток и тканей применяется цианиновый краситель SYTOX Green, обладающий высоким сродством к нуклеиновым кислотам и легко проникающий в клетки с нарушенной цитоплазматической мембраной. Он представляет собой флуоресцирующий в зеленом диапазоне цианиновый краситель, малоселективный к какой-либо нуклеотидной последовательности. Максимумы возбуждения/излучения красителя составляют 504/523 нм. Для возбуждения флуоресценции применяют аргонный лазер (488 нм). Важной особенностью SYTOX Green является его высокая избирательность к связыванию молекул ДНК и отсутствие взаимодействия с цитоплазматической РНК. Достаточно высокая стабильность обуславливает выбор данного красителя для применения в конфокальной микроскопии фиксированных препаратов (Сырцова М. А. [и др.], 2014; Matsuzaki T. [et al.], 1997; Suzuki T. [et al.], 1998). Некоторые производители цианинового красителя SYTOX Green имеют следующие адреса:

<http://www.thermofisher.com/>

<https://www.sigmaaldrich.com/>

Фенантридиновые красители йодистый пропидий (PI) и бромистый этидий (EB) представляют собой классические непроникающие ядерные красители с оранжево-красной флуоресценцией. Несмотря на то что молярный коэффициент поглощения (экстинкции) PI является относительно низким, краситель имеет достаточно большой сдвиг Стокса, что дает возможность одновременного обнаружения ядерной ДНК и антител, связанных с флуоресцентной меткой, при облучении только одним лазером (488 нм). Таким образом, данный флуорохром может успешно применяться при многоцветной иммунофлуоресцент-

ной окраске (Сырцова М. А. [и др.], 2014). При связывании красителя с нуклеиновыми кислотами его флуоресценция возрастает в 20–30 раз. Поскольку область связывания Р1 с молекулой НК лежит в области нуклеотидной пары гуанин-цитозин (Suzuki T. [et al.], 1997), то краситель также способен связываться с РНК. Следует учитывать необходимость применения РНК-азы при исследовании образцов, фиксированных в параформальдегиде, формалине или глутаральдегиде. При исследовании объектов, фиксированных в смеси метанол/уксусная кислота, применение РНК-азы, как правило, не требуется. ЕВ также является неизбирательным красителем НК, взаимодействует как с молекулами РНК, так и с ДНК. Максимумы возбуждения/излучения красителей пропидия йодида и этидия бромидом составляют 493, 535/617 и 520/605 нм соответственно. Для возбуждения флуоресценции пропидия йодида обычно применяют гелий-неоновый (543 нм) или аргоновый лазеры (488 нм), для препаратов, окрашенных этидием бромидом, – аргоновый лазер (514 нм).

Указанные фенантридиновые красители доступны для заказа у Abcam:

<http://www.abcam.com/products?keywords=Ethidium+bromide>

<http://www.abcam.com/products?keywords=Propidium+iodide>

Еще один ядерный краситель, флуоресцирующий в красном диапазоне, который успешно применяется в конфокальной микроскопии – 7-аминоактиномицин D (7-AAD). 7-AAD – флуоресцентный интеркалятор, избирательно взаимодействующий с ГЦ-нуклеотидной парой (Никитин С. М. [и др.], 1981) преимущественно в области расплетенных участков ДНК. Максимумы возбуждения/излучения флуорохрома составляют 548/648 нм. Для активации флуоресценции оптимально применять твердотельный Nd-YAG лазер (532 нм) и твердотельный/диодный лазер (561 нм). Данный флуорохром плохо проникает через мембраны живых клеток (Битехтина М. А. [и др.], 2008). 7-AAD не обладает избирательностью по отношению к молекулам ДНК, однако исследования, проведенные с применением этого флуорохрома, не сообщают о присутствии цитоплазматической флуоресценции, что может объясняться экстракцией РНК при пробоподготовке. Таким образом, ядерный краситель 7-AAD может быть использован для окраски ядер клеток, не вызывая проблем с разделением сигналов при совместном многоцветном иммунофлуоресцентном выявлении цитоплазматических антигенов (Сырцова М. А. [и др.], 2014). Данный краситель представлен на следующем сайте производителя:

<https://www.sigmaaldrich.com/>

Красители группы TO-PRO представляют собой мономерные непроницающие через цитоплазматическую мембрану соединения. Спектры их излучения соответствуют видимой и ближней инфракрасной

области спектра. Наиболее востребованным при конфокальной микроскопии является флуоресцентный краситель TO-PRO-3 с максимумами возбуждения/излучения 642/661 нм. Оптимальными лазерами для возбуждения флуоресценции красителя являются гелий-неоновый (633 нм) или криптоновый лазер (647 нм). Информация о производителе представлена по следующему адресу:

<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/T3605>.

2.4. Флуоресцентная окраска хроматофильной субстанции

Кроме подкраски ядер исследуемых тканей, в конфокальной микроскопии применяются и другие методы окраски, не относящиеся к группе иммуноцитохимических. Они могут иметь самостоятельное диагностическое значение (выявление амилоида (Gusel'nikova V. [et al.], 2018), флуоресцентная гистохимия металлов (Коржевский Д. Э. [и др.], 2016)) либо использоваться для окраски ядра и цитоплазматических структур (например, окраска по Ниссля). Их можно использовать отдельно либо сочетать с иммунофлуоресцентным выявлением тканевых антигенов.

При обычной нейрогистологической окраске по Ниссля наряду с окраской ядер клеток выявляется хроматофильная субстанция нейронов. В поврежденных или регенерирующих нейронах хроматофильная субстанция (вещество Ниссля) перераспределяется, что может служить маркером функционального состояния клетки. Для выявления вещества Ниссля применяют различные красители. При световой микроскопии препаратов используют толуидиновый синий, крезиловый фиолетовый, метиленовый синий, сафранин. Предложены и флуоресцентные красители, используемые для идентификации вещества Ниссля при проведении конфокальной микроскопии. Эти флуорохромы обладают широким спектром флуоресценции и могут применяться как для индивидуального окрашивания нейронов, так и в комбинации с иммунофлуоресцентным выявлением специфических маркеров. В настоящее время доступны следующие красители: голубой краситель NeuroTrace 435/455, красные NeuroTrace 530/615 и 640/660, зеленый NeuroTrace 500/525, желтый NeuroTrace 515/535. Флуорохромы данной группы обладают высокой интенсивностью флуоресценции. С особенностями применения красителей группы NeuroTrace можно ознакомиться на сайте производителя:

<https://www.thermofisher.com/>

Простейшим заменителем флуоресцентных красителей группы NeuroTrace может служить обычный гистологический краситель — крезиловый фиолетовый, который широко используется при прове-

дении классических нейрогистологических окрасок. При этом рекомендуется применять 0,0001 % водный раствор красителя (Alvarez-Buylla A. [et al.], 1990), тогда как при обычной (нефлуоресцентной) окраске по Ниссли используют 1 % раствор крезилового фиолетового. Флуоресценция этого красителя развивается в красном диапазоне видимого света (максимум эмиссии — 630 нм) при возбуждении сине-зеленым и зеленым светом (например, с помощью лазеров 488, 543 и 561 нм). Пример флуоресцентной окраски крезильным фиолетовым нейрона черного вещества головного мозга человека представлен на рис. 1 (см. цв. вкл.).

Литература

Битехтина М. А., Векшин Н. Л. 7-Аминоактиномицин как флуоресцентный зонд на расплетание и денатурацию ДНК // *Биоорганическая химия.* — 2008. — Т. 34. — № 6. — С. 781.

Воробьев И. А., Рафаловская-Орловская Е. П., Гладких А. А. [и др.]. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в микроскопии и цитометрии // *Цитология.* — 2011. — Т. 53. — № 5. — С. 392–403.

Колос Е. А., Коржевский Д. Э. Неоднородность реакции на холинацетилтрансферазу в холинергических нейронах // *Нейрохимия.* — 2016. — Т. 33. — № 1. — С. 56–62.

Коржевский Д. Э., Гилеровиц Е. Г., Кирик О. В. [и др.]. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии / под ред. Д. Э. Коржевского. — СПб.: СпецЛит, 2013. — 127 с.

Коржевский Д. Э., Кирик О. В., Сухорукова Е. Г. [и др.]. Применение полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) в иммуноцитохимических исследованиях // *Морфология.* — 2010. — Т. 137. — № 3. — С. 71–75.

Коржевский Д. Э., Колос Е. А., Карпенко М. Н. [и др.]. Гистохимическое определение металлов / под ред. Д. Э. Коржевского. — СПб.: СпецЛит, 2016. — 63 с.

Никитин С. М., Гроховский С. Л., Жузе А. Л. [и др.]. Лиганды, обладающие сродством к определенным или последовательностям оснований ДНК // *Биоорганическая химия.* — 1981. — Т. 7. — № 4. — С. 542–551.

Олейников В. А. Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) в белковых биочипах // *Биоорганическая химия.* — 2011. — Т. 37. — № 2. — С. 171–189.

Сырцова М. А., Колос Е. А., Снегова В. А., Гусельникова В. В. Применение различных флуоресцентных красителей для окраски ядер клеток в фиксированном биологическом материале // *Медицинский академический журнал.* — 2014. — Т. 14. — № 2. — С. 34–39.

Alvarez-Buylla A., Ling C. Y., Kirn J. R. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain // *J. Neurosci. Methods.* — 1990. — Vol. 33. — P. 129–133.

- Chazotte B.* Labeling nuclear DNA using DAPI // Cold Spring Harb. Protoc. — 2011. — № 1. — doi: 10.1101/pdb.prot5556.
- Chen A. Y., Yu C., Gatto B.* [et al.]. DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — № 17. — P. 8131–8135.
- Gusel'nikova V., Antimonova O., Fedorova E.* [et al.]. Fluorescent characterization of amyloid deposits in the kidneys of mdx mice // European J. Histochem. — 2018. — Vol. 62. — № 2. — P. 3–6.
- Kricka L. J., Fortina P.* Analytical ancestry: “Firsts” in fluorescent labeling of nucleosides, nucleotides, and nucleic acids // Clinical Chemistry. — 2009. — Vol. 55. — № 4. — P. 670–683.
- Loontjens F. G., Regenfuss P., Zechel A.* [et al.]. Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities // Biochemistry. — 1990. — № 29. — P. 9029–9039.
- Maninová M., Vomastek T.* Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts // FEBS J. — 2016. — Vol. 283. — № 20. — P. 3676–3693.
- Matsuzaki T., Suzuki T., Fujikura K., Takata K.* Nuclear staining for laser confocal microscopy // Acta Histochem. Cytochem. — 1997. — Vol. 30. — P. 309–314.
- Murcia M. J., Naumann C. A.* Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles // Nanotechnologies for Life Sciences; ed. S. S. R. Kumar. — Wiley-VCH: Weinheim, 2005. — P. 1–40.
- Suzuki T., Fujikura K., Higashiyama T.* [et al.]. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy // J. Histochem. Cytochem. — 1997. — Vol. 45. — № 1. — P. 49–53.
- Suzuki T., Matsuzaki T., Takata K.* Fluorescence counter-staining of cell nuclear DNA for multi-color laser confocal microscopy // Acta. Histochem. Cytochem. — 1998. — Vol. 31. — № 4. — P. 297–301.
- Zheng L., Schwartz C., Magidson V.* [et al.]. The spindle pole bodies facilitate nuclear envelope division during closed mitosis in fission yeast // PLoS Biol. — 2007. — Vol. 5. — № 7: e170. — doi.org/10.1371/journal.pbio.0050170.