

Современные методы
молекулярной генетики и
клеточной биологии

Анализ транскриптома с использованием
современных технологий «секвенирования
следующего поколения»

Жуков В.А., Жернаков А.И., Борисов А.Ю., Тихонович И.А.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Общие положения и область применения	7
2. Нормативные ссылки	8
3. Требования к технике безопасности.....	8
4. Использование методов «секвенирования нового поколения» для изучения транскриптомного профиля	9
4.1. Платформы секвенирования.....	10
4.2. Отбор биологического материала.....	11
4.3. Выделение РНК	12
4.4. Приготовление библиотек для секвенирования	12
4.5. Анализ данных при изучении экспрессии микроРНК.....	14
4.6. Анализ данных при изучении экспрессии экспрессии мРНК... ..	18
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	21
ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ.....	22

ВВЕДЕНИЕ

Бобовые растения, ввиду своей высокой и разносторонней симбиотической активности, в наибольшей степени отвечают требованиям современной концепции адаптивного земледелия (Celik et al., 2004; Oldroyd, Downie, 2008). В связи с этим в нашей стране ведется научная работа, направленная на разработку методов создания наиболее эффективных растительно-микробных систем бобовых, при функционировании которых максимально реализуется потенциал продуктивности растения (Борисов и др., 2011). Одним из ключевых подходов является научно-обоснованная селекция сортов культурных бобовых, характеризующихся наибольшей урожайностью при образовании симбиозов с полезными почвенными микроорганизмами. Для облегчения селекции таких сортов необходимо знание о функционировании системы симбиотических генов растения, обеспечивающих развитие симбиозов.

При установлении симбиозов между растением и полезными почвенными микроорганизмами происходит образование надорганизменной системы, характеризующейся метаболической и генетической интеграцией (Tikhonovich, Provorov, 2009; Борисов и др., 2011). Скоординированная работа генов растения и симбиотических микроорганизмов имеет результатом обмен метаболитами между симбионтами (растение предоставляет микроорганизмам фотосинтаты, получая в обмен связанный азот, труднодоступный фосфор, рост-стимулирующие вещества (например, ауксины) и т.п., в зависимости от типа образуемого симбиоза). Геном

растения играет в этих процессах ведущую роль (Provorov, Vorobyov, 2009; Борисов и др., 2011).

В лаборатории Генетики растительно-микробных взаимодействий ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии с 1990-х годов проводятся исследования генетического контроля растительно-микробных взаимодействий на примере системы *Pisum sativum* L. (горох посевной) – *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Интенсивный фенотипический анализ мутантов гороха с нарушениями развития различных стадий симбиоза позволил выявить основные гены, контролирующие эти процессы у гороха посевного (Borisov et al., 1992; Tsyganov et al., 1998; Voroshilova et al., 2001; Tsyganov et al., 2002; также см. обзоры Борисов и др., 2007; Борисов и др., 2011). Вовлечение в исследования модельных бобовых растений – люцерны слабоусеченной *Medicago truncatula* Gaertn. и лядвенца японского *Lotus japonicus* (Regel.) K.Larsen, – а также развитие методик молекулярной биологии дали возможность проводить клонирование и секвенирование симбиотических генов гороха посевного. Первый симбиотический ген гороха посевного – *Sym35* – был клонирован в 2000 году (Borisov et al., 2003) в сотрудничестве с лабораторией Генной экспрессии Университета Орхуса (Дания). В дальнейшем были выявлены последовательности затронутых мутациями симбиотических генов, принимающих участие в рецепции сигнальных молекул клубеньковых бактерий (*Sym37*), в развитии инфекционного процесса при азотфиксирующем и арбускулярно-микоризном симбиозе (*Sym33*) и органогенезе клубенька (*Coch*) (Zhukov et al., 2008; Ovchinnikova et al., 2011; Couzigou et al., 2012).

За последние несколько лет был совершен прорыв в области секвенирования геномов растений, что оказалось возможным благодаря широкому распространению технологий «next generation sequencing», или «секвенирование следующего поколения» (Imelfort, Edwards, 2009; Edwards, Batley, 2010; Metzker ML. 2010). Основными используемыми платформами являются Illumina Genome Analyzer (Illumina-GA) и Roche Genome Sequencer FLX (GS-FLX) (Mardis, 2008; Shendure, Ji, 2008). Применение данной технологии открывает перспективы широкомасштабного анализа генетических процессов, в том числе у немодельных видов растений (таких как горох, фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.), соя (*Glycine max* (L.) Merr.) и др.), путем секвенирования транскриптома, то есть последовательностей РНК, соответствующих экспрессирующимся генам (Garg et al., 2011; Smykal et al., 2012). Такой подход делает возможным исследование геномных ресурсов любых (в том числе неизученных или малоизученных) видов растений посредством анализа тысяч последовательностей генов, и, кроме того, может быть использован для исследования дифференциальной экспрессии генов, вовлеченных в различные биологические процессы. При этом масштабность производимых исследований позволяет анализировать огромное количество генов (сравнимое с анализом экспрессии генов на микрочипах), а также выявлять регуляторные РНК, например, микроРНК (Devers et al. 2011). Кроме того, стоимость методик «секвенирования нового поколения» постоянно снижается, что является их дополнительным преимуществом и делает их все более привлекательными для использования (Mardis, 2011).

В настоящем издании описаны современные методы функционального анализа генетической системы гороха (*Pisum sativum* L.), контролирующей взаимодействие с полезными почвенными микроорганизмами. Такой анализ, основанный на использовании «секвенирования следующего поколения» для изучения транскрипционных изменений в симбиотических тканях растения, позволяет осуществить переход с «генного» на «геномный» уровень исследований и построить схему «межорганизменной генной сети», отражающей генетическую интеграцию партнеров по симбиозу. Применение этих подходов призвано способствовать увеличению объема знаний о функционировании системы симбиотических генов растения, выявлению основных закономерностей развития азотфиксирующих клубеньков и облегчению селекции сортов гороха и других бобовых растений, отвечающих требованиям современного адаптивного растениеводства.

1. Общие положения и область применения

В настоящем издании приведены методы анализа дифференциальной экспрессии генов гороха (*Pisum sativum* L.) при взаимодействии с полезными почвенными микроорганизмами, сочетающие подходы транскриптомики и биоинформатики. Описанные методы были проверены на растительном материале в лаборатории генетики растительно-микробных взаимодействий ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии в 2012 - 2013 гг.

Издание предназначено для использования в научно-исследовательских институтах сотрудниками, имеющими достаточный опыт в базовых процедурах молекулярной биологии, а также обладающими навыками работы в области вычислительной биологии.

Описанные методы могут применяться в ходе изучения экспрессии генов и микроРНК у видов растений, для которых имеется ограниченное количество данных об организации генома и транскриптома. Описанные в настоящем издании подходы подразумевают проведение «секвенирования следующего поколения» на современных приборах типа Illumina Genome Analyzer, HiSeq и MiSeq и последующий анализ методами биоинформатики с использованием различных баз данных и компьютерных программ, находящихся в свободном доступе в сети Интернет.

2. Нормативные ссылки

СанПиН 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений».

ГОСТ 12.0.005-84 «Система стандартов безопасности труда. Метрологическое обеспечение в области безопасности труда».

ГН 2.2.5.2536-09 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны».

3. Требования к технике безопасности

Работа организуется в соответствии с нормативными документами СанПиН 2.2.4.548-96, ГОСТ 12.0.005-84 и ГН 2.2.5.2536-09. Следует особо отметить необходимость особых предосторожностей при работе со следующими объектами:

- **Бромистый этидий** – вредность (обусловленная мутагенностью) данного реактива требует работы в перчатках.
- **Источники ультрафиолета**, используемые в трансиллюминаторах, опасны для глаз и кожи лица, требуют работы в защитных масках.

Информация о технике безопасности при использовании коммерческих наборов для выделения РНК, синтеза кДНК и пр., представлена в руководствах по использованию этих наборов.

4. Использование методов «секвенирования нового поколения» для изучения транскриптомного профиля

Использование технологий секвенирования нового поколения для изучения транскриптома можно использовать, как для изучения разнообразия возможных вариантов транскриптов, так и для сравнительной оценки транскриптомных профилей различных биологических образцов (например, в популяционных или эволюционных исследованиях, или при изучении влияния различных факторов). В зависимости от целей исследований следует определить стратегию, касающуюся отбора материала, выбора платформы

секвенирования, приготовления библиотек и анализа получаемых данных.

4.1. Платформы секвенирования

Наиболее подходящими для изучения транскриптома платформа являются: GS FLX+ (Roche/454 Life Sciences) и линейка секвенаторов HiSeq, HiScan, MiSeq (Illumina). В настоящий момент GS FLX+ позволяет получить за один запуск прибора до 1 миллиона «ридов» (от англ. to read) длиной до 1000 п.о. Технология HiSeq, благодаря методу секвенирования парных ридов (Paired-end Sequencing), позволяет получать более миллиарда ридов суммарной длиной до 300 (2x150) п.о. Секвенатор MiSeq до 50 миллионов ридов длиной до 600 (2x300) п.о.

Существуют методики приготовления кДНК-библиотек, содержащих: малые некодирующие РНК, транскрибируемые РНК, объединенные библиотеки. В зависимости от спектра типов РНК представляющих интерес следует выбирать платформу секвенирования. Так длина микроРНК практически не превышает 24-25 нуклеотидов, таким образом, исходя из средней длины прочтения прибора, для их анализа идеально подходят секвенаторы Illumina (см. таблицу). Использование для этих целей высокопроизводительных секвенаторов 454 Life Sciences со средней длиной прочтения более 600 нуклеотидов представляется нецелесообразным. Данная технология больше подходит для изучения возможных вариантов транскриптов, в случаях, когда для изучаемого организма не известен

и не аннотирован геном. Другое применение секвенаторов 454 Life Sciences это изучение альтернативного сплайсинга транскриптов.

4.2. Отбор биологического материала

Экспрессия генов явление очень пластичное и крайне чувствительное к внешним воздействиям. Уровень экспрессии отдельных генов может значительно различаться в разных зонах одной ткани и органа, находится в значительной зависимости от вегетативной стадии, физических и биологических воздействий и даже времени суток (циркадные ритмы). В то время как при изучении разнообразия возможных транскриптов не так важны внешние условия, при оценке разницы в профилях экспрессии следует уделять особое внимание поддержанию соответствующих экспериментальных условий и выбора растений для анализа. Кроме того, при изучении разницы транскрипционных профилей, для получения достоверных данных, следует предусмотреть использование биологических и/или технических повторностей. Многие статистические модели анализа дифференциальной экспрессии генов требует наличие повторностей.

Наиболее распространенным и надежным способом сохранения «состояния» и предотвращения разрушения и фрагментации РНК в биологических образцах является их мгновенная заморозка в жидком азоте. В то же время, хорошие результаты показывает использование коммерчески-доступных стабилизирующих РНК буферных растворов, например RNeasy (Qiagen, Германия) TRIzol (Life Technologies, ...). Кроме того, подобные РНК-стабилизирующие растворы можно приготовить в лаборатории (De Wit, Pespeni et al. 2012).

4.3. Выделение РНК

Для выделения транскрибуемых РНК вполне подойдут стандартные методы выделения, включающие осаждение LiCl, или коммерчески доступные наборы для выделения с использованием спин-колонок. Однако при использовании данных методов теряются молекулы РНК длиной менее 200 п.о. Если исследование направлено на изучение малых РНК следует использовать специализированные наборы для выделения, например miRNeasy kit (Qiagen, Германия), NucleoSpin miRNA kit (Macherey-Nagel, Германия).

Нужную фракцию РНК (в зависимости от используемой технологии секвенирования) отбирают путем электрофоретического разделения тотальной выделенной РНК, например в полиакриламидном геле или с использованием технологий капиллярного электрофореза. Важным этапом анализа является оценка качества выделенной РНК, эти данные рекомендуется включать в конечный отчет или публикацию.

4.4. Приготовление библиотек для секвенирования

Большинство платформ секвенирования нового поколения требует перевод молекул РНК в ДНК. В зависимости от целей исследования и выбранной платформы и технологии можно использовать различные подходы создания кДНК-библиотек. Пригодные для секвенирования библиотеки характеризуются по следующим основным признакам:

Направление секвенирования:

- Однонаправленное (stranded) секвенирование (смысловая / антисмысловая цепь)

- Двухнаправленное секвенирование

Область секвенирования:

- Случайные фрагменты
- Концевые участки

Структура фрагментов:

- Непрерывная
- Спаренные концы (Mate Pairing)

Спектр представленных типов РНК:

- малые некодирующие РНК
- транскрибируемые РНК
- комбинированные библиотеки

Значительная часть выделяемой РНК (до 80%) представляет собой рибосомальную РНК (рРНК). В отличие от рРНК матричная РНК (мРНК) эукариот характеризуется наличием поли-А хвоста на 3'-конце. Одним вариантом является синтез смысловой цепи кДНК с использованием праймеров, содержащих поли-Т хвост на 5'-конце и один из адаптеров, необходимых для секвенирования на 3'-конце. Для синтеза антисмысловой цепи кДНК используют праймеры, содержащие случайные гексамерные последовательности. Комбинация адаптеров для секвенирования, соединенных с поли-Т хвостом и случайными гексамерными олигонуклеотидами, позволяет контролировать направление, в котором будет проходить секвенирование.

Описанный выше вариант позволяет избавиться от всех нетранслируемых РНК, однако если требуется удалить рРНК, например, для получения комбинированной библиотеки некодирующих рибосомальных РНК и транслируемых РНК, или фрагментарного секвенирования, требуются методы удаления рРНК. Для эукариотических образцов на рынке представлены специализированные наборы для удаления рРНК, основанные на использовании зондов, специфичных для консервативных участков рРНК, например для растений RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (Invitrogen) и Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Plant Leaf) и Ribo-Zero™ rRNA Removal Kits (Plant Seed/Root) (Illumina).

Компания Illumina производит наборы для производства различных вариантов библиотек (<http://www.illumina.com/applications/sequencing/rna.ilmn>), в том числе и для секвенирования с использованием технологий Roche/454 Life Sciences (<http://www.epibio.com/applications/rna-sequencing>).

4.5. Анализ данных при изучении экспрессии микроРНК

МикроРНК – это малые некодирующие РНК размером 18-24 нуклеотида, регулирующие экспрессию генов растения в ходе самых различных биологических процессов (развитие, метаболизм, стрессовые реакции, в том числе защитные, и пр.) (Mallory, Vaucheret, 2006). МикроРНК способствуют расщеплению определенных мРНК (или ингибируют трансляцию с них), связываясь с транскриптами комплементарно, тем самым регулируя уровень экспрессии определенных генов-мишеней. Первые растительные микроРНК были

открыты у арабидопсиса в 2002 году, и с тех пор объем знаний о них стремительно возрастает (Reinhart et al., 2002). Существует база данных miRBase, в которой накапливаются данные о микроРНК различных организмов, включая вирусы, и которая насчитывает на текущий момент (версия 20, выпуск июнь 2013 г.) 24521 микроРНК более 200 организмов (<http://www.mirbase.org>). Бобовые растения представлены в базе miRBase довольно широко, однако для гороха посевного пока не описано ни одной последовательности микроРНК.

Исследования структуры и разнообразия микроРНК значительно ускорились после распространения методов «секвенирования нового поколения», которые позволяют анализировать миллионы последовательностей микроРНК, включая редкие изоформы, специфичные для конкретных видов растений или животных, специфичные для конкретных тканей, и т.п. (Kozomara, Griffiths-Jones, 2011). Наиболее подходящей платформой для изучения микроРНК является Illumina, эксплуатирующая технологию «секвенирования путем синтеза» (sequencing by synthesis, SBS), благодаря ее высокой производительности (миллионы и даже миллиарды последовательностей за один запуск прибора). В настоящем издании описан пример работы с данными, полученными на приборе Illumina Genome Analyzer II X, при секвенировании микроРНК из корней и клубеньков гороха посевного.

Первым этапом анализа данных, получаемых при секвенировании, является удаление последовательностей адаптерных молекул, а также фрагментов недостаточной длины (<18 нуклеотидов в случае микроРНК) и низкого качества (не соответствующие

требованию «параметр Q – quality – не менее 30 для более чем 80% нуклеотидов последовательности»). Затем необходимо удалить из рассмотрения последовательности, не относящиеся к микроРНК (фрагменты последовательностей рРНК и тРНК, другие малые РНК). Для этого нужно провести сравнение по алгоритму BLAST с базами данных, где представлены неcodирующие РНК (например, Rfam, <http://rfam.sanger.ac.uk/>). Следующим этапом работы является идентификация консервативных микроРНК среди секвенированных последовательностей («чтений»), для чего необходимо сравнить их с базой данных miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>), также с помощью алгоритма BLAST. Как показывает практика, популяции микроРНК из корней и клубеньков растений гороха посевного (для которого отсутствуют последовательности микроРНК в базе данных miRBase) содержат значительное количество консервативных микроРНК, которые можно детектировать путем такого сравнения. Тот же подход (сравнение по алгоритму BLAST с набором микроРНК из miRBase) можно использовать и на следующем этапе, для поиска изоформ консервативных микроРНК: в таком случае необходимо изменить параметры поиска, задав возможность несовпадения 1-3 нуклеотидов и возможность варьирования по длине на 1-3 нуклеотида.

После идентификации консервативных микроРНК и их изоформ среди секвенированных последовательностей необходимо провести поиск новых микроРНК. Для выполнения данной задачи подходит пакет программ miRDeep, в модификации для анализа растительных микроРНК miRDeep-P (<http://faculty.virginia.edu/lilab/miRDP/>) (Yang,

Li, 2011). С использованием данного пакета программ можно детектировать новые микроРНК и их изоформы, отличающиеся по последовательности, в данных «секвенирования следующего поколения», на основании сравнения результатов секвенирования («чтений») с базами данных последовательностей EST (expressed sequence tags), информации о геноме и транскриптоме изучаемого вида растений, и т. п.

После выявления консервативных и новых микроРНК необходимо провести оценку их уровня экспрессии в различных пробах. Один из возможных подходов состоит в нормализации количества «чтений», соответствующих конкретной микроРНК, относительно общего числа «чтений», полученных для данной пробы, и последующего попарного сравнения нормализованных значений для анализируемых микроРНК (Wang et al., 2011). Такой «цифровой анализ экспрессии» подходит для микроРНК с относительно высоким уровнем экспрессии. Рекомендуется последующее подтверждение обнаруженных закономерностей экспрессии при помощи «ПЦР в реальном времени».

Последним этапом исследования микроРНК такого объекта как горох посевной является поиск генов-мишеней действия этих микроРНК. Для этого рекомендуется использовать программу psRNATarget (Dai, Zhao, 2011), доступную по адресу <http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>. Данная программа адаптирована для анализа данных «секвенирования нового поколения», полученных при работе с растительным материалом (в

ней учтены особенности узнавания транскриптов-мишеней микроРНК растений, отличающиеся от микроРНК животных).

4.6. Анализ данных при изучении экспрессии экспрессии мРНК.

В зависимости от используемой платформы секвенирования, за один запуск могут быть получены данные размером, превосходящим несколько десятков гигабайт. Анализ данного такого размера требует соответствующих вычислительных мощностей.

Необработанные данные секвенирования (сырые данные) содержат множество ошибок, и перед непосредственным их анализом следует провести их первоначальную обработку - такие процедуры, как удаление последовательностей адаптеров, сортировка по идентифицирующим последовательностям, оценка качества секвенирования и отсев ридов сомнительного качества. Данные процедуры можно осуществить с помощью различных программных средств. Мы рекомендуем использовать приложение FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), работающая в среде Java. Программа обладает графическим интерфейсом и удобна для визуализации данных.

Классический подход анализа транскриптомного профиля включает (i) соотнесение полученных «ридов» (от англ. read) с транскриптами, характерными для исследуемого организма и (ii) количественная оценка числа получаемых ридов. В случае модельных видов, первая задача решается относительно просто – выравнившие полученных видов на последовательности генома или непосредственно на последовательности в транскриптов. Имеется

множество алайнеров (программ для выравнивания ДНК-последовательностей), которые эффективно решают данную задачу, даже в случае секвенирования фрагментов спаренных концов (Mate Pairs) и парного прочтения (Paired-end Sequencing, Illumina). Например BOWTIE2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) или TOPHAT (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>).

В отношении гороха данный подход применим лишь частично. В настоящий момент данные о геноме гороха малочисленны. В базе данных GenBank (NCBI) размещено менее 900 полноразмерных последовательностей кДНК генов гороха и, в общей сложности, около 100 000 последовательностей, ассоциированных с горохом, большинство из которых являются фрагментами мРНК или отдельными фрагментами геномных библиотек и не аннотированы до уровня гена. Кроме того в открытом доступе имеются результаты двух работ, связанные с изучением транскриптома гороха: Franssen et al. 2011 и Kaur et al. 2012. В данных работах проведено секвенирование нескольких транскриптомных библиотек гороха, полученные риды выровнены DE NOVO (друг относительно друга без использования референсной последовательности) и, таким образом составлен список вероятных транскриптов гороха. Данный список можно использовать как отправную точку при анализе получаемых данных секвенирования мРНК.

Следующий важный этап анализа данных – выявления транскриптов, чья экспрессия в сравниваемых образцах различается. До сих пор нет модели и алгоритма, полностью удовлетворяющего

исследователей. Одной из проблем является нормализация получаемых данных: 1) практически невозможно добиться одинакового покрытия транскриптома в разных пробах и как правило они различаются в 1,5 – 5 раз; 2) среди двух генов, имеющих одинаковый уровень экспрессии, для гена, имеющего транскрипт большой длины, следует ожидать большего числа детектированных фрагментов, чем для транскрипта меньшей длины. Программные пакеты, позволяющие провести оценку дифференциальной экспрессии, появляются и совершенствуются постоянно. Мы рекомендуем пробовать различные подходы для оценки экспрессии. Например `edgeR` (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/edgeR.html>), основанный на биномиальной модели экспрессии и TSPM (<http://www.stat.purdue.edu/~doerge/software/TSPM.R>).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Описанные в настоящем издании методы могут быть использованы для изучения экспрессии генов и микроРНК у видов растений, для которых имеется ограниченное количество данных об организации генома и транскриптома. Среди бобовых растений к таким видам относятся горох посевной (*Pisum sativum* L.), фасоль обыкновенная (*Phaseolus vulgaris* L.), бобы (*Vicia faba* L.), нут (*Cicer arietinum* L.), и др., имеющие высокую сельскохозяйственную ценность. Изучение процессов развития и функционирования симбиозов гороха посевного (и других бобовых растений) с полезными почвенными микроорганизмами с использованием подходов транскриптомими и биоинформатики, получение знания о тонкой регуляции генных сетей, контролирующих развитие симбиозов у этих объектов, представляются весьма важными как для фундаментальной науки, так и для прикладных аспектов – селекционной работы и современной практики растениеводства. В ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии ведется работа по совершенствованию методов анализа экспрессии генов и микроРНК гороха посевного при формировании взаимовыгодных растительно-микробных взаимодействий. Результаты этой работы будут отражены в будущих публикациях и обновлениях.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ

1. Borisov A.Y., Madsen L.H., Tsyganov V.E., Umehara Y., Voroshilova V.A., Batagov A.O., Sandal N., Frederiksen A., Schauser L., Ellis N., Tikhonovich I.A., Stougaard J. The *Sym35* gene required for root nodule development in *Pisum sativum* is an orthologue of *Nin* from *Lotus japonicus* // Plant Physiology. 2003. V. 131. P. 1009-1017.
2. Borisov A.Y., Morzhina E.V., Kulikova O.A., Tchetskova S.A., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. New symbiotic mutants of pea (*Pisum sativum* L.) affecting either nodule initiation and symbiosome development // Symbiosis. 1992. V.14. P. 297-313.
3. Celik I., Ortas I., Kilic S. Effects of compost, mycorrhiza manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxeret soil. // Soil and Tillage Research. 2004. V. 78. N. 1. P. 59-67.
4. Couzigou J.M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K.S., Putterill J., Hofer J., Borisov A.Y., Ratet P. *NODULE ROOT* and *COCHLEATA* maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* *BLADE-ON-PETIOLE* genes // Plant Cell. 2012. V. 24. N. 11. P. 4498-4510.
5. Dai X., Zhao P.X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39(Web Server issue):W155-159.
6. De Wit, P., M. H. Pespeni, et al. "The simple fool's guide to population genomics via RNA-Seq: an introduction to high-throughput sequencing data analysis. // Mol Ecol Resour. 2012) V. 12(6). P.1058-1067.
7. Devers E.A., Branscheid A., May P., Krajinski F. Stars and symbiosis: microRNA- and microRNA*-mediated transcript cleavage involved in arbuscular mycorrhizal symbiosis // Plant Physiol. 2011. V. 156. N. 4. P. 1990-2010.
8. Edwards D., Batley J. Plant genome sequencing: applications for crop improvement // Plant Biotechnol J. 2010. V. 8. N. 1. P. 2-9.
9. Franssen, S., R. Shrestha, et al. Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing // BMC Genomics. 2011. V. 12(1):227.
10. Garg R., Patel R.K., Jhanwar S., Priya P., Bhattacharjee A., Yadav G., Bhatia S., Chattopadhyay D., Tyagi A.K., Jain M. Gene

- discovery and tissue-specific transcriptome analysis in chickpea with massively parallel pyrosequencing and web resource development // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. N. 4. P. 1661-1678.
11. Imelfort M., Edwards D. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies // *Brief Bioinform.* 2009. V. 10. N. 6. P. 609-618.
 12. Kaur, S., L. Pembleton, et al. Transcriptome sequencing of field pea and faba bean for discovery and validation of SSR genetic markers // *BMC Genomics.* 2012. V. 13(1): 104.
 13. Kozomara A., Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39 (Database issue): D152-157.
 14. Mallory A.C, Vaucheret H. Functions of microRNAs and related small RNAs in plants // *Nat. Genet.* 2006. V. 38. Suppl:S31-36.
 15. Mardis E.R. A decade's perspective on DNA sequencing technology // *Nature.* 2011. V. 470. N. 7333. P. 198-203.
 16. Mardis E.R. Next-generation DNA sequencing methods // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008. V. 9. P. 387-402.
 17. Metzker M.L. Sequencing technologies - the next generation // *Nat Rev Genet.* 2010. V. 11. N. 1. P. 31-46.
 18. Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. // *Annu Rev Plant Biol.* 2008. V. 59. N. 519-546.
 19. Ovchinnikova E., Journet E.P., Chabaud M., Cosson V., Ratet P., Duc G., Fedorova E., Liu W., den Camp R.O., Zhukov V., Tikhonovich I., Borisov A., Bisseling T., Limpens E. *IPD3* controls the formation of nitrogen-fixing symbiosomes in pea and *Medicago* Spp. // *Mol Plant Microbe Interact.* 2011. V. 24. N. 11. P. 1333-1344.
 20. Provorov N.A., Vorobyov N.I. Host plant as an organizer of microbial evolution in the beneficial symbioses // *Phytochem Rev.* 2009. V. 8. P. 519-534.
 21. Reinhart B.J., Weinstein E.G., Rhoades M.W., Bartel B., Bartel D.P. MicroRNAs in plants // *Genes Dev.* 2002. V. 16. N. 13. P. 1616-1626.
 22. Shendure J., Ji H. Next-generation DNA sequencing // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. N. 10. P. 1135-1145.
 23. Smykal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C.J., Ellis N.T.H., Flavell A.J., Ford R., Hybl M., Macas J., Neumann P., McPhee K.E.,

- Redden R.J., Rubiales D., Weller J.L., Warkentin T.D. Pea (*Pisum sativum* L.) in the genomic era // *Agronomy*. 2012. V. 2. P. 74-115.
24. Tikhonovich I.A., Provorov N.A. From plant–microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration // *Ann Appl Biol*. 2009. V.154. N.3. P. 341-335.
25. Tsyganov V.E., Morzhina E.V., Stefanov S.Y., Borisov A.Y., Lebsky V.K., Tikhonovich I.A. 1998. The pea (*Pisum sativum* L.) genes *sym33* and *sym40* control infection thread formation and root nodule function // *Mol Gen Genet*. V. 259. N.5. P. 491-503.
26. Tsyganov V.E., Voroshilova V.A., Priefer U.B., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Genetic dissection of the initiation of the infection process and nodule tissue development in the *Rhizobium*-pea (*Pisum sativum* L.) symbiosis. // *Annals of Botany*. 2002. V. 89. N. 4. P. 357-366.
27. Voroshilova V.A., Boesten B., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Priefer U.B. Effect of mutations in *Pisum sativum* L. genes (*sym13*, *sym31*, *sym33*, *sym40*) blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001. V. 14. N. 4. P. 471-476.
28. Wang T., Chen L., Zhao M., Tian Q., Zhang W.-H. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing // *BMC Genomics*. 2011. V. 12. P. 367.
29. Yang X., Li L. miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plant // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. N. 18. P. 2614-2615.
30. Zhukov V.A., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., and Stougaard J. The pea *Sym37* receptor kinase gene controls infection thread initiation and nodule development // *Mol Plant-Microbe Interact*. 2008. V. 21. N. 12. P. 1600-1608.
31. Борисов А.Ю., Васильчиков А.Г., Ворошилова В.А., Данилова Т.Н., Жернаков А.И., Жуков В.А., Королева Т.А., Кузнецова Е.В., Мадсен Л., Мофетт М., Наумкина Т.С., Неманкин Т.А., Павлова З.Б., Петрова Н.Э., Пинаев А.Г., Радутюу С., Розов С.М., Соловов И.И., Стоугаард Й., Топунов А.Ф., Уиден Н.Ф., Цыганов В.Е., Штарк О.Ю., Тихонович И.А. Регуляторные гены гороха посевного (*Pisum sativum* L.), контролирующие развитие

азотфиксирующих клубеньков и арбускулярной микоризы: фундаментальные и прикладные аспекты. // Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 3. С. 265-271.

32. Борисов А.Ю., Штарк О.Ю., Жуков В.А., Неманкин Т.А., Наумкина Т.С., Пинаев А.Г., Ахтемова Г.А., Ворошилова В.А., Овчинникова Е.С., Рычагова Т.С., Цыганов В.Е., Жернаков А.И., Кузнецова Е.В., Гришина О.А., Сулима А.С., Федорина Я.В., Чеботарь В.К., Бисселинг Т., Лемансо Ф., Джианиназзи-Пирсон В., Ратэ П., Санхуан Х., Стоугаард Й., Берг Г., Макфи К., Эллис Н., Тихонович И.А. Взаимодействие бобовых с полезными почвенными микроорганизмами: от генов растений к сортам // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 3. С. 41-47.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Демченко К.Н., Китаева А.Б., Цыганов В.Е.

Оглавление

Введение.....	28
1. Общие положения и область применения	28
2. Нормативные ссылки	29
3. Принцип метода лазерной сканирующей микроскопии.....	30
4. Требования к технике безопасности.....	37
5. Необходимое оборудование, материалы, реактивы.....	40
6. Выращивание растений и получение симбиотических клубеньков	42
7. Подготовка растительного материала к конфокальной микроскопии	43
7.1. Методы фиксации растительного материала.....	43
7.2. Получение срезов с использованием ротационного микротомы с вибрирующим лезвием	45
7.3. Получение срезов с использованием автоматического ротационного микротомы в заливочных средах воск Сидмана и Technovit7100.....	46
7.3. Методы окраски срезов, визуализация структуры симбионтов	48
8. Анализ материала с использование лазерной сканирующей микроскопии	49
Рекомендуемая авторами литература	64
Список использованной литературы	65

Введение

Оптическая микроскопия уже более 300 лет находит все более разнообразное и широкое применение. Создание флуоресцентных микроскопов позволило на фоне огромного числа разнообразных молекул избирательно наблюдать флуоресцирующие, и стимулировало развитие новых методов для изучения структуры и функции клеток. Изобретение конфокальной системы фильтрации сигнала обеспечило измерение флуоресцентных сигналов с трёхмерным субмикронным разрешением и существенно расширило возможности неразрушающего анализа прозрачных образцов. Еще два изобретения 20 века - лазер и компьютер - послужили мощным стимулом для бурного развития новых методов лазерной флуоресцентной микроскопии: лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ), микроспектроскопии, многофотонной микроскопии, микроскопии на основе измерения времени жизни флуоресценции, микроскопии с применением эффекта полного внутреннего отражения и 4Pi микроскопии. Несмотря на значительное усложнение техники измерений и обработки результатов, новые методы получили широкое распространение. Развитие генной инженерии, протеомики, биотехнологии, современной фармацевтики и биомедицины способствовало быстрому внедрению новых методов оптической микроскопии.

1. Общие положения и область применения

Настоящее издание содержит методы подготовки растительного материала симбиотических азотфиксирующих клубеньков для изучения внутриклеточных процессов развития растительно-микробных взаимоотношений с применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Все описанные методы были проверены на образцах ризобиальных клубеньков гороха (*Pisum*

sativum) и актиноризных клубеньках *Datisca glomerata*. Не смотря на высокое разнообразие азотфиксирующих структур у растений, как травянистых, так и древесных, данные методические подходы могут быть с успехом применены.

Методические указания предназначены для использования прежде всего в научно-исследовательских институтах сотрудниками, имеющими достаточный опыт в базовых процедурах флуоресцентной микроскопии, а также клеточной биологии.

Методические указания могут применяться в работах по оценке развития симбиотического интерфейса у мутантных и трансгенных растений. Используемые в описанных методах подходы основаны на применении методов, позволяющих значительно экономить рабочее время и повышающих стандартизацию получаемых результатов.

2. Нормативные ссылки

ГОСТ 28489-90 Микроскопы световые. Термины и определения.

ГОСТ 8074-82 Микроскопы инструментальные. Типы, основные параметры и размеры. Технические требования

ГОСТ Р 12.1.009-2009. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Термины и определения.

ГОСТ Р 50723-94 Лазерная безопасность. Общие требования безопасности при разработке и эксплуатации лазерных изделий

ГОСТ Р МЭК 60825-1-2009 Безопасность лазерной аппаратуры. Настоящий стандарт идентичен международному стандарту МЭК 60825-1:2007 «Безопасность лазерной аппаратуры Часть 1. Классификация оборудования, требования и руководство для потребителей» (IEC 60825-1:2007 «Safety of laser products - Part 1: Equipment classification, requirements and user's guide»).

3. Принцип метода лазерной сканирующей микроскопии

Конфокальная флуоресцентная микроскопия отличается от обычной флуоресцентной микроскопии, в первую очередь, улучшенным разрешением вдоль оптической оси объектива (ось Z), которое достигается за счет использования принципа конфокальной фильтрации флуоресценции, излучаемой образцом. Рис. 1 поясняет этот принцип. Если в обычных флуоресцентных микроскопах в качестве источника света, возбуждающего флуоресценцию, используется ртутная или ксеноновая лампа, то в конфокальных микроскопах – это лазер (Рис. 1). Преимущество лазеров по сравнению с ламповыми источниками света - это монохроматичность генерируемого света (ширина линии генерации значительно меньше 1 нм) и малая расходимость (высокая параллельность) пучка света. Монохроматичность возбуждающего флуоресценцию света дает возможность расширить спектральный диапазон регистрируемой флуоресценции и улучшить подавление светорассеяния на длине волны возбуждения. Лазер обладает уникальными свойствами — когерентностью (постоянство фаз волн во времени), монохроматичностью (волны одной определённой и строго постоянной частоты), и за счет этих свойств достигается возможность высочайшей плотности мощности излучения. Например, когерентность лазерного луча позволяет сфокусировать его в точку. Малая расходимость пучка света способствует более эффективной работе оптической системы микроскопа, уменьшает число бликов, связанных с отклонением света от расчетного оптического пути, улучшает точность фокусировки пучка света и уменьшает объем, в который можно сфокусировать свет на образце. Луч лазера заводится на образец через объектив с использованием, так называемого, дихроичного зеркала. Специальное многослойное напыление из диэлектрических материалов обеспечивает высокоэффективное отражение света на длине волны генерации лазера и почти 100% пропускание света в остальном спектральном диапазоне. На образце лазер освещает не все поле зрения, как в ламповом флуоресцентном

микроскопе, а фокусируется в точку. Флуоресцентное излучение, возбуждаемое лазером, собирается тем же объективом. СЗ отражает рассеянный образцом лазерный свет, пропуская через себя к системе детекции (фотоэлектронный умножитель, ФЭУ) флуоресцентное излучение, очищенное от паразитного светорассеяния. Очевидно, что лазерный луч возбуждает флуоресценцию во всех слоях образца, через которые он проходит (Рис. 1).

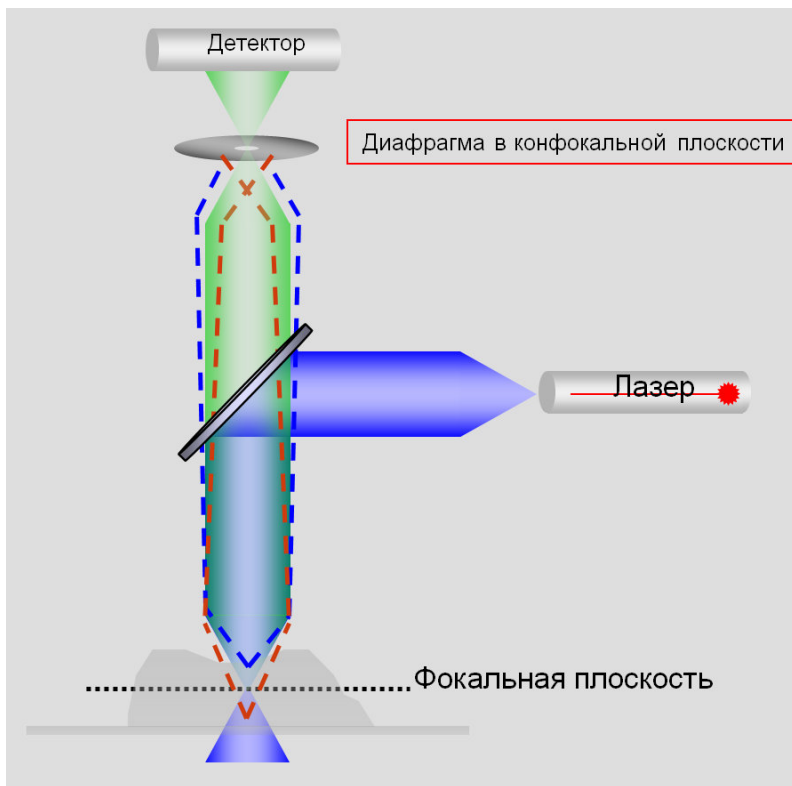


Рисунок 1. Принцип конфокальной фильтрации сигнала.

Луч лазера с помощью дихроичного зеркала направляется в объектив микроскопа и фокусируется в точку в глубине исследуемого объекта. Флуоресценция, излучаемая из этой точки (прерывистая линия), собирается объективом и фокусируется линзой в сопряженной фокальной плоскости объектива, проходя через отверстие в конфокальной диафрагме к фотоэлектронному умножителю (детектор) Флуоресценция, излучаемая из точек выше и ниже

фокальной плоскости ограничена плоскостью конфокальной диафрагмы и на детектор не попадает. Тем самым обеспечивается подавление флуоресценции, испускаемой из точек образца, расположенных выше и ниже фокуса объектива, и улучшается разрешение вдоль оптической оси объектива.

Флуоресценция, излучаемая слоями, расположенными выше и ниже фокальной плоскости, если она попадает на ФЭУ, регистрируется вместе с основным сигналом из фокуса объектива и ухудшает разрешение оптической системы. Чтобы улучшить разрешение, используется конфокальная диафрагма, которая помещается в сопряженной фокальной плоскости объектива, точнее, в той плоскости, где микроскоп фокусирует флуоресценцию, собранную из фокуса объектива (Рис. 1). Через диафрагму проходит только та флуоресценция, которая излучается из небольшого объема вблизи фокуса лазерного луча под объективом. Флуоресценция, испускаемая слоями выше и ниже фокуса, оказывается дефокусированной на конфокальной диафрагме и через нее к ФЭУ не проникает. Диаметр конфокальной диафрагмы D , как правило, можно варьировать, изменяя тем самым толщину оптического слоя $\Delta Z_{\text{сл}}$ вблизи фокуса объектива, от которого измеряется сигнал.

Оценить $\Delta Z_{\text{сл}}$ можно по формуле:

$$\Delta Z_{\text{сл}} = ([0,88 \times \lambda_{\text{фл}} / (n - (n^2 - A^2)^{0,5})]^2 + 2 \times n^2 \times (D/\Gamma)^2 / A^2)^{0,5},$$

где $\lambda_{\text{фл}}$ – длина волны испускания флуоресценции, A – числовая апертура объектива, n — показатель преломления иммерсионной среды между объективом и покровным стеклом препарата, Γ – увеличение оптической системы микроскопа между фокальной плоскостью объектива и сопряженной фокальной плоскостью, в которой расположена конфокальная диафрагма.

Очевидно, что чем больше числовая апертура объектива, тем меньше $\Delta Z_{\text{сл}}$. Наибольшей апертурой обладают иммерсионные объективы. Именно они используются для ЛСКМ высокого разрешения.

Уменьшение D уменьшает $\Delta Z_{\text{сл}}$, но при этом снижается и интенсивность флуоресценции, которую диафрагма пропускает к ФЭУ. При исследовании биологических объектов интенсивность флуоресценции, как правило, не очень велика, что вынуждает искать компромисс между диаметром диафрагмы (т.е. $\Delta Z_{\text{сл}}$) и отношением сигнал/шум в конфокальных изображениях. Типичная для реального эксперимента величина $\Delta Z_{\text{сл}}$ (при $A=1,3$, $n=1,5$, $\lambda_{\text{ср}}=0,5$ мкм, $\lambda_{\text{фл}}=0,54$ мкм) составляет 1,06 мкм.

В этих условиях разрешение ЛСКМ в плоскости объекта XY остается таким же, как у обычного флуоресцентного микроскопа [5]:

$$\Delta X = \Delta Y = 0,51 \times \lambda_{\text{фл}} / A.$$

При $A=1,3$ и $\lambda_{\text{фл}}=0,54$ мкм разрешение составляет 0,22 мкм.

Если интенсивность флуоресценции позволяет уменьшить D еще в 4-5 раз, то появляется возможность улучшить также и разрешение в плоскости XY сканируемого объекта [5]. В этом случае ЛСКМ обеспечивает разрешение $\Delta X = \Delta Y = 0,14$ мкм, $\Delta Z_{\text{сл}} = 0,45$ мкм.

Поскольку конфокальная система фильтрации сигнала позволяет исследователю регистрировать сигнал, испускаемый только из фокальной плоскости, то, перестраивая фокус объектива, можно, не нарушая целостности исследуемого объекта, измерить распределение флуоресценции в любом оптическом сечении вдоль оси Z . Исследуемый препарат должен быть достаточно прозрачным, чтобы свет мог проникнуть на заданную глубину. Но даже для прозрачных препаратов эффекты светорассеяния, поглощения возбуждающего света и репоглощения испускаемой флуоресценции ограничивают возможности ЛСКМ глубиной порядка 100 мкм от поверхности сканируемого объекта.

Перестройка фокуса объектива по оси Z достигается вертикальным перемещением объектива или предметного столика. Детальная серия изображений оптических сечений XY , измеренных с небольшим шагом по оси Z , дает исследователю информацию о трёхмерном распределении флуорофоров в изучаемом объекте. Эта

серия доступна для анализа в виде двумерных изображений в сечениях XY, ZX и YZ, в виде наложения проекций всех сечений вдоль оси Z на плоскость XY или в виде трёхмерной модели распределения интенсивностей, которую можно вращать вокруг любой оси на экране компьютера.

Исследования методом ЛСКМ могут проводиться на фиксированных и живых клетках, на тонких срезах тканей растительного и животного происхождения, и даже на небольших организмах.

ЛСКМ является многомерной микроскопией: трёхмерный массив данных XYZ формируется при регистрации пространственного распределения флуорофора; повторные измерения трёхмерного распределения во времени дают четырёхмерный массив данных XYZt. Дополнительные возможности и соответственно еще одно, пятое, измерение появляются при использовании спектрального подхода к анализу сигналов флуоресценции.

Методы конфокальной микроскопии

Основное применение конфокальной микроскопии в биомедицинских исследованиях – получение флуоресцентных изображений живых или фиксированных клеток, тонких срезов тканей или небольших организмов, предварительно окрашенных одним или несколькими флуоресцентными красителями.

Простейшим составным элементом для всех описанных ниже методов является конфокальное флуоресцентное изображение объекта в плоскости ху.

При проведении эксперимента следует помнить, что клетки и ткани содержат эндогенные флуорохромы, которые могут послужить причиной аутофлуоресценции. Например, клетки растений содержат хлорофилл, флуоресцирующий в красной области спектра. В области 330–350 нм могут флуоресцировать белки, благодаря содержащимся в них ароматическим аминокислотам, окисленные флавопротеины флуоресцируют в области 510–570 нм, витамины и некоторые продукты метаболизма (каротиноиды, пиридоксали) – в области 450–

580 нм. Для определения вклада собственной флуоресценции необходимо получить в идентичных экспериментальных условиях изображение контрольного неокрашенного образца.

Мультиканальная конфокальная микроскопия с использованием различных флуорохромов позволяет получить изображение нескольких красителей в одном образце. Наиболее интересным применением этого метода является изучение солокализации флуорохромов. Например, при исследовании локализации флуорохрома в клетке образец окрашивают одновременно исследуемым флуорохромом и селективной меткой для каких-либо органелл. Затем получают изображение каждого флуорохрома в плоскости $x-y$ и накладывают их друг на друга. Интерес представляет солокализация сигналов в различных каналах, т.е. элементы изображения, в которых присутствует сигнал обоих флуорохромов. Существуют количественные методики, позволяющие рассчитать коэффициенты солокализации, на основе которых делают вывод о локализации флуорохрома в тех или иных клеточных органеллах.

Основной проблемой мультиканальной конфокальной микроскопии является перекрывание сигналов флуорохромов. Не всегда можно подобрать красители, флуоресцирующие в разных областях спектра, либо возбуждаемые разными лазерами, поэтому часто сигналы флуорохромов невозможно разделить лишь с помощью фильтров для селекции сигнала. Одним из решений является математическая коррекция, когда определяют вклад каждого флуорохрома в канал другого флуорохрома, а затем этот вклад вычитается. Другим решением проблемы перекрывания сигналов является их разделение на основе различий в спектрах флуоресценции красителей. В программном обеспечении LAS AF это осуществляется при помощи функции Dye Separation.

3D конфокальная микроскопия

Поскольку конфокальная система фильтрации сигнала позволяет исследователю регистрировать сигнал, испускаемый только из фокальной плоскости, то, перестраивая фокус объектива можно, не

нарушая целостности исследуемого объекта, измерить распределение флуоресценции в любом оптическом сечении вдоль оси Z.

Имея серию оптических срезов, полученных с одинаковым интервалом по оси z (z-серия), можно реконструировать объемное 3D изображение, позволяющее получить информацию о пространственной структуре объекта. Качество и точность этой информации зависит от толщины оптического среза и расстояния между соседними срезами. Оптимальным условием является перекрывание оптических срезов на 50% и более. При исследовании поверхности образца мы настоятельно рекомендуем увеличить число оптических срезов в 2-3 раза от «оптимального».

Временная серия (Time-серия)

Исследование динамических процессов, развивающихся во времени – очень важная область исследования живых объектов. Интерес к этой области возрос с появлением современных конфокальных микроскопов, позволяющих зафиксировать изменения, происходящие за секунды и даже микросекунды. Для длительных экспериментов на живых объектах существуют специальные инкубаторы, поддерживающие необходимую температуру, содержание CO₂ и кислорода, которые монтируются прямо на микроскоп.

Компьютерное управление позволяет очень легко запрограммировать прибор для получения серии двумерных изображений или даже z-серий через определенные интервалы времени. Добавление к пространственным 3D изображениям четвертого параметра – времени, дает четырехмерный массив данных $xyzzt$.

С использованием time-серии можно проводить качественные и количественные измерения. Например, изучать развитие эффекта токсического агента или лекарственного препарата и изменения, происходящие при этом в клетке. Можно наблюдать за движением клеточных органелл, например, митохондрий или хлоропластов, изучать влияние внешних факторов на это движение. Часто внешние факторы вызывают изменения в трансмембранном транспорте ионов,

такие процессы также можно визуализировать при помощи конфокальной микроскопии.

Спектральный анализ, λ - сканирование

Если вместо измерения интегральной по полосе пропускания фильтра интенсивности флуоресценции разложить собранный от образца сигнал в спектр, то конфокальная микроскопия приобретает возможность идентификации регистрируемых сигналов и анализа состояния исследуемых флуорофоров по криволинейным особенностям их спектров. Метод, основанный на измерении полных спектров флуоресценции под микроскопом, получил название микроспектрофлуориметрии.

Этот метод используется при разделении сигналов флуорохромов, флуоресцирующих в одной области, но отличающихся по форме спектра. Имея спектр флуоресценции красителя, можно выделить из интегральной спектральной картины нужный сигнал, чего не всегда можно добиться с помощью оптических фильтров. Сравнивая спектр внутриклеточной флуоресценции со спектрами в модельных системах можно судить о биологическом окружении флуорофора.

4. Требования к технике безопасности

Лазерные сканирующие микроскопы LSM 510 или LSM 710/780 (Carl Zeiss), включая дополнительные устройства, а также совместимую продукцию других производителей, могут быть использованы только по назначению и с учетом методик, описанных в настоящих методических указаниях. Для безопасной работы с конфокальным микроскопом необходимо всестороннее знание системы и аппаратных средств.

Прежде, чем приступить к работе с LSM 510 или LSM 710/780, внимательно изучите инструкции и все публикации, связанные с этой системой! Существует возможность получения дополнительной информации по аппаратной конфигурации и о расширении

возможностей стандартной системы непосредственно от производителя и по сервисной горячей линии.

LSM 510 или LSM 710/780 спроектированы, созданы и протестированы в строгом соответствии со стандартами DIN EN 61010-1 (IEC-международная электротехническая комиссия 1010-1) “Требования безопасности для работы с измерительными аппаратами, системами управления и лабораторными приборами” и DIN EN 60825-1 (IEC публикация 825-1) “Безопасность лазерного оборудования” и с учетом инструкций CSA (Федеративных штатов Америки) и UL (лаборатория по технике безопасности США).

Так как управление работой системы осуществляется через меню компьютера, Вам следует ознакомиться с принципами операционной системы и графической среды пользователя Windows XP (Microsoft). Соответствующие руководства поставляются вместе с программами.

В соответствии с инструкциями Всемирной организации здравоохранения ООН, LSM 510 – устройство, относящееся к классу 3В эксплуатационной опасности лазера. Должны быть соблюдены рекомендации WHO, связанные со здоровьем и производственной защитой при эксплуатации лазерных устройств. Оператор, управляющий прибором, должен также соблюдать все инструкции, предписанные по технике безопасности.

Инструкция по охране труда при работе на лазерных сканирующих конфокальных микроскопах

Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп (далее – прибор) является оптико-электронным устройством для исследования биологических объектов методами световой микроскопии. Он состоит из следующих основных узлов:

1. Световой микроскоп со сканирующей насадкой.
2. Компьютер.
3. Блок лазеров.

Основными неблагоприятными факторами воздействия на человека являются высокоинтенсивное световое излучение и работа с компьютером. Фирмами-изготовителями предприняты меры,

исключающие попадание прямого излучения в глаза. Приборы снабжены различными защитными устройствами и блокировками. Неукоснительно соблюдать инструкцию по эксплуатации и руководство оператора.

Во избежание попадания лазерного излучения в глаза **запрещается снимать крышки приборов, отвинчивать световоды, отключать блокировки, устанавливать на предметный столик объекты**, не предназначенные для исследований на лазерных сканирующих конфокальных микроскопах.

К работе на приборе допускаются сотрудники, ознакомившиеся с настоящей инструкцией и правилами работы на конфокальных микроскопах, под наблюдением лиц, ответственных за их эксплуатацию.

Не допускаются к работе лица моложе 18 лет, беременные и кормящие женщины и лица, не прошедшие предварительный медицинский осмотр.

Общая продолжительность работы на приборе с перерывом на отдых 15 мин – не более 4-х часов.

Действия до начала работы:

1. Осмотреть прибор и проверить подключение сетевых кабелей, световодов, наличие защитных кожухов и крышек.
2. Проверить наличие инструкции по эксплуатации и руководства оператора.
3. Для уменьшения нагрузки на зрение освещение помещения полностью не выключать, при необходимости использовать источники местного освещения.

Действия во время работы:

1. Включение и настройка прибора производится лицами, ответственными за его эксплуатацию согласно инструкции. **Пользователям запрещается производить самостоятельное включение и выключение прибора** (за исключением аварийных ситуаций, см. ниже)
2. При работе также необходимо пользоваться руководством оператора.

3. Во избежание попадания отраженного лазерного луча в глаза смена объективов, фильтров, установка препаратов на предметный столик допускаются только при выключенном сканировании.
4. Не смотреть в окуляры и на предметный столик микроскопа при включенном сканировании.

Действия в аварийных ситуациях:

1. При возникновении подозрительных звуков (треск, хлопок) или дыма немедленно выключить прибор, проветрить помещение, сообщить об этом ответственному за эксплуатацию.
2. При внезапном отключении электроэнергии выключить общий выключатель прибора. Источник бесперебойного питания (ИБП) обеспечивает работу компьютера и охлаждение лазера в течение нескольких минут. За это время необходимо сохранить данные и закрыть программу. ИБП отключать не ранее, чем через 5 мин. Сообщить об отключении прибора ответственному за эксплуатацию.

Действия после работы:

1. Сообщить об окончании работы, а также обо всех замеченных сбоях и неисправностях ответственному за эксплуатацию прибора.
2. Записать время работы и свою фамилию в журнал учета.
3. При ухудшении зрения или общего самочувствия после работы на приборе незамедлительно обратиться к врачу.

5. Необходимое оборудование, материалы, реактивы

Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 510 META NLO. Carl Zeiss, Германия.

Микроскопия живых и фиксированных объектов, прижизненные наблюдения. Укомплектован мультилинейным аргоновым и гелий-неоновыми (543 и 633 нм) лазерами, а также компактным фемтосекундным перестраиваемым Ti:Sap лазером «CHAMELEON» (Coherent, США). Специальное программное обеспечение для

микроскопов LSM510 Версия 4.2., включая модули для объемной (3D) реконструкции, качественной и количественной морфометрической обработки объемного изображения.

Стереоскопический люминесцентный микроскоп SteREO Lumar.V12. Carl Zeiss, Германия.

Используется для неразрушающего отбора трансформантов по свечению флуоресцентного репортерного белка (GFP и др.). Снабжен системой документации изображения на основе специализированной микроскопической цифровой камеры AxioCam MRc5, сервером графической обработки Celsius R650 (Fujitsu Siemens) и мультимодульным программным обеспечением AxioVision (Carl Zeiss).

Стереомикроскоп Stemi-2000 CS. Carl Zeiss, Германия.

Оснащен системой высокопроизводительных осветителей проходящего и падающего света, документацией изображения (AxioCam MRc5) и мультимодульным программным обеспечением AxioVision (Carl Zeiss).

Автоматический прецизионный ротационный микротом Microm HM-360 в комплекте со стереомикроскопом Stemi-2000. Microm International GmbH, Германия.

Используется для приготовления срезов растительного материала в различных заливочных средах: парафины, полиэтиленгликоли, синтетические смолы.

Автоматический прецизионный микротом с вибрирующим лезвием Microm HM-650V в комплекте со стереомикроскопом Stemi-2000. Microm International GmbH, Германия.

Используется для получения толстых (40–100 мкм) срезов живых или фиксированных растительных объектов.

Лабораторный генератор гранулированного льда Scotsman AF 80 WS. Scotsman Ice Systems, США.

Центрифуга настольная с функцией охлаждения Эппендорф 5415R. Eppendorf, Германия.

Центрифуга настольная Minispin. Eppendorf AG, Германия.

Настольный автоклав Certoclav CV-EL, Certoclav, Австрия.

Аналитические весы CP-64 Competence. Sartorius AG, Германия.

pH-метр pH-211. Hanna Instruments, Германия.

Мешалка магнитная с подогревом RET basic. ICA, Германия.

Ламинарный шкаф ВЛ-12-1300. ЗАО «Сампо», Санкт-Петербург.

Программируемый инкубатор GFL 3032. GFLmbH, Burgwegel, Германия.

Климатическая камера для роста растений Sanyo MLR-351H. Sanyo, Япония.

Термостаты-инкубаторы INE 300 с электронным контролем температуры. Memmert, Германия.

6. Выращивание растений и получение симбиотических клубеньков

Условия культивирования бактериальных штаммов

Культура Rhizobium leguminosarum bv. viceae (rlv 3841)

Среда со стрептомицином ТУ (Beringer, 1974):

триптон - 5 г/л;

дрожжевой экстракт - 3 г/л;

CaCl₂ - 0,5 г/л;

агар - 15 г/л; pH= 6,8.

После автоклавирования добавить стерильный (филтрация через фильтр с порами 0.22 мкм) раствор стрептомицина до концентрации 600 мкг/мл.

Ризобии высадить на чашки Петри со средой ТУ и культивировать в термостате при температуре 28°С двое суток.

Полученные культуры можно хранить в холодильнике при температуре +4°С.

Условия выращивания растений

Семена гороха стерилизовать концентрированной серной кислотой в течение 30 мин. при комнатной температуре, после чего десятикратно промыть стерильной водой. Приготовить водную суспензию бактерий (разведение 10⁸-10⁹ кл/мл) по 1мл на семя непосредственно перед посадкой в пластиковые горшки, вмещающие 200 г стерильного вермикулита (фракция 1-5 мм). Высадить семена в стерильный вермикулит. В каждый сосуд добавить по 100 мл безазотного минерального питательного раствора FP (Fahraeus, 1957). Растения выращивать в фитокомнате в режиме день/ночь 16/8 ч, 21/19 °С, относительной влажности 65%, освещенности 38000 люкс. Полив растений – фильтрованной водой каждые 3 дня.

7. Подготовка растительного материала к конфокальной микроскопии

7.1. Методы фиксации растительного материала

Фиксация материала с глутар-формальдегидом (Vitha, Baluska et al., 1997; Stumpe, Gobel et al., 2006)

3% paraformaldehyde, 0.5% GA in 1/3 MTSB buffer with 0.2% Tween 20 and 0.2% Triton-X-100, 10% DMSO, pH 6.8

Данный метод фиксации подходит для общеморфологического изучения и для анализа динамики цитоскелета с его выявлением с помощью иммунолокализации.

Приготовление формалина:

10 г. порошка параформальдегида растворяем в 100 мл. дистиллированной воды при нагревании на водяной бане при 60-70 °С, постоянно встряхивая и помешивая, когда раствор станет однородно слегка мутным в него добавляют 1-2 капли 1N NaOH до просветления раствора. Обычно это занимает от 1 часа до 2 часов.

Буфер MTSB (pH 6.9):

50 mM пиперазин-N,N'-бис(2-этансернистая) кислота

5mM MgSO₄*7H₂O

5mM ЭГТА

Фиксатор:

Раствор фиксатора приготавливается из соотношения:

1/3MTSB buffer ca.	39 мл
10% формалин	15 мл
25% глютаровый альдегид	1 мл
0.2% Tween 20	100 мкл
0.2% Triton-X-100	100 мкл
DMSO	5 мл
до	50 ml

pH приготовленного фиксатора должен быть 6,8-7,0.

Tween-20, Triton-X-100 и DMSO добавляются для эффективного пропитывания клубеньков.

В этот фиксатор опускают симбиотические клубеньки целиком, но не более 5 мм в диаметре. Симбиотические клубеньки актиноризных растений могут быть предварительно освобождены от наружной перидермы тонким пинцетом или же разрезаны вдоль. Из этого материала удалить воздух насосом Комовского, поместив флаконы с образцами в фиксаторе в эксикатор и откачав до уровня вакуума – 1 атм на 5 мин. Необходимо повторить эту процедуру 3-4 раза.

Продолжительность фиксации – на ночь (16 ч) в холодильнике при +4 °С.

Фиксация с метанолом

Для использования окраски клеточных стенок симбиотических клубеньков с Конго красным необходимо использовать метанол в качестве основного фиксирующего агента. Данный тип фиксации также можно комбинировать с иммунолокализацией.

Фиксатор:

Раствор фиксатора приготавливается из соотношения:

Состав:	Общий объем смеси 100 мл
PIPES, 50 мМ pH 6.9	1,51 г
EGTA, 5 мМ	1 мл (0,5 М маточный раствор)
MgSO ₄ 5 мМ	0,123 г

Бычий сывороточный альбумин BSA 1%	1 г
Nonidet 0.1% (NP 40) аналог Tween 20	100 мкл
DMSO 3%	3 мл
метанол 3%	3 мл

Условия фиксации, как в предыдущем разделе.
Продолжительность фиксации – 2-3 ч при комнатной температуре.

7.2. Получение срезов с использованием ротационного микротом с вибрирующим лезвием

Для получения толстых срезов применяется микротом с вибрирующим лезвием. Клубеньки поместить в резиновые формы, залить теплым 5% раствором агарозы. Тотчас препаративной иглой произвести ориентировку клубенька – параллельно дну формы. Дождаться полной полимеризации (остывания) агарозы и извлечь блок из формы. Блок фиксируется на держателе образца с помощью секундного клея (Момент или аналоги).



Держатель образца с наклеенным блоком поместить в ванну для резки. И только затем установить на микротом с вибрирующим лезвием. Заполнить ванну дистиллированной водой.

Установить оптимальные параметры резки:
толщина среза – 60 мкм (можно увеличить до 80 мкм),
амплитуда – 0,6 мм,
частота – 80,
скорость резки – 10.

Собрать полученные срезы пластиковой пипеткой или пинцетом пластиковую чашку Петри диаметром до 5 см.

7.3. Получение срезов с использованием автоматического ротационного микротомы в заливочных средах воск Сидмана и Technovit7100

Обезвоживание растительного материала

Обезвоживание кончиков корней провести в последовательных сменах этанола постепенно повышающейся концентрации от 20% до 96% (шаг 10% от стадии 20% до стадии 90%), абсолютном этаноле I, абсолютном этаноле II. В 20% этаноле -20 мин, в 30%-30 мин, в 40%-40 мин, начиная с 50% этанола - по 1 часу.

Перенос в заключающую среду

Воск Сидмана

Пропитывание растительного материала воском Сидмана провести путём последовательных смен раствора воска Сидмана в этаноле следующих концентраций – 10%, 20%, 35%, 50%, 65%, 80%, 100% I, 100% II. Каждая стадия (до концентрации 100%) – 2 часа при температуре 37⁰С. В 100% воске Сидмана I образцы должны находиться 18 часов, в 100% воске Сидмана II – 2 смены по 2 часа.

Материал перенести в резиновые формы (Sigma) со 100% воском Сидмана, тотчас ориентировать параллельно продольным сторонам форм, а затем охладить путём помещения резиновой формы на хладоэлемент (ТермоКонт МК) до полимеризации заключающей среды.

Гистосмола Техновит 7100

Пропитывание растительного материала гистологической смолой Technovit7100 (далее – Техновит7100) провести путём последовательных смен следующих концентраций раствора преполимеризованного Техновита7100 (100 мл 100% Техновита7100 смешивали с 1 г агента полимеризации I) в этаноле– 15%, 30%, 40%, 60%, 80%, 100% I, 100% II. Каждая стадия (до концентрации 100%) – 2 часа, при комнатной температуре, при покачивании 50 об/мин. В 100% Техновите7100 I и II образцы должны находиться не менее 18 часов при температуре 4⁰С.

Для полимеризации смолы к 2 мл преполимеризованному 100% Техновиту7100 добавить 133 мкл агента полимеризации II (из набора). Материал перенести в пластиковые формы. Добавить пластиковой пипеткой подготовленную смесь смолы и тотчас ориентировать клубеньки параллельно продольным сторонам форм. Формы закрыть плёнкой для предотвращения доступа кислорода. Полимеризовать при комнатной температуре до полного затвердения заключающей среды от 2 до 16 ч. Блоки с образцами в смоле извлечь из форм, наклеить на деревянные держатели с помощью двухкомпонентного эпоксидного клея Поксипол.

Приготовление серийных срезов в воске Стивмана

Серийные срезы приготавливают на автоматическом ротационном микротоме НМ 360 (Microm, Германия) с использованием одноразовых ножей 35SEC-p (Microm, Германия). Ризобиальные и актиноризные клубеньки необходимо разрезать продольно и поперечно, толщина серийных срезов составляла 16 мкм для последующей иммунлокализации цитоскелета. Срезы наклеить на предметные стёкла, покрытые силаном (3-аминопропил-триэтоксисилан, Fluka) и альбумином (яичным белком). Срезы смонтировать на стекле путем расправления на водной подушке, которую тотчас удаляли. Для полного расправления срезов воду необходимо подогреть до 30⁰С. Препараты подсушивают в течение 18 ч при комнатной температуре (23⁰С).

Приготовление срезов в гистологической смоле Техновит 7100

Клубеньки, заключенные в смолу разрезали на микротоме, толщина продольных срезов составляла 7 мкм, поперечных – 10 мкм. Срезы были приготовлены на автоматическом ротационном микротоме НМ 360 Microm (Германия) с использованием твердосплавного ножа из карбида вольфрама. Чтобы добиться серии срезов, срезы поочередно выкладывали на водную подушку на предметных стеклах SuperFrost. Затем водную подушку удаляли, а срезы закрепляли на стекле путём подсушивания при +40⁰С.

7.3. Методы окраски срезов, визуализация структуры симбионтов

Иммуноферментная окраска

Удаление заливочной среды воск Сидмана проводится путем трехкратной обработки стекол в 97%-ном этаноле в течение 10 мин, с последующими 10 мин обработками 90%-ным этанолом в PBS, 50%-ным этанолом в PBS, PBS и завершающей инкубацией в MTBS в течение 30 мин.

Для блокирования неспецифического связывания первичных антител стекла со срезами материала инкубируют 1 ч в TBS с 5%-ным бычьим сывороточным альбумином (BSA; Sigma-Aldrich), с добавлением 0,05% азида натрия, при комнатной температуре в специальной емкости. Стекла вытаскивают и раскладывают срезами вверх во влажной камере. На срезы наносят 50-60 мкл первичных моноклональных антитела к α -тубулину (Sigma-Aldrich, клон DM1A) (разбавление 1:200 в 1%-ном BSA) и инкубируют в течение ночи (8-12 ч) при +4°C во влажной камере, помещенной в холодильник. На следующий день – после трехкратной по 10 мин промывки срезов в TBS (50мМ TrisHCl, 150мМ NaCl, pH 7,5), их инкубируют 1 ч при комнатной температуре с вторичными козьими антителами к мышинному гамма-глобулину, конъюгированными с Alexa-Fluor, Sigma-Aldrich) разбавленными 1:200 в 1%-ном BSA. Стекла со срезами 4-5 раз промывают в течение 10 мин в буфере TBS и окрашивают для визуализации ядер и клубеньковых бактерий йодидом пропидия (0,5 мкг/мл в течение 7 мин), далее срезы снова дважды промывают 10 мин в буфере TBS. Срезы помещали в заключающую среду ProLong Gold® antifade reagent (Invitrogen): на предметное стекло со срезами нанести 60 мкл ProLong Gold и закрыть покровным стеклом 24*50 мм.

Окраска клеточных стенок бактерии Frankia WGA-Oregon Green

Маточный раствор WGA-Oregon Green (Invitrogen – # W7024) – 1 мг/мл.

Развести в соотношении 1:50 в 1% BSA в буфере MTSB.

Окрашивать в течение 1 ч. Промыть буфером трижды по 10 мин.

Окраска клеточных стенок актиноризных клубеньков Конго красным

Приготовить раствор 0.01% Конго красный (Congo Red, Fluka #75768) на буфере MTSB с добавлением 1% бычьего сывороточного альбумина.

Окрашивать в течение 30-40 мин. Промыть буфером трижды по 10 мин.

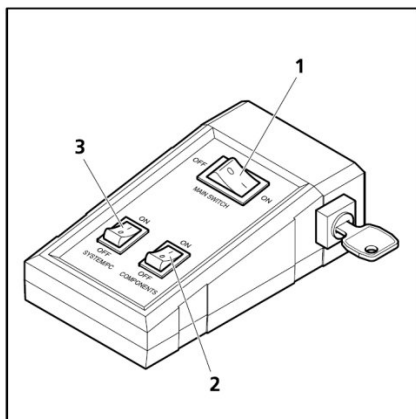
8. Анализ материала с использованием лазерной сканирующей микроскопии

Включение прибора, начало работы



Перед включением необходимо убедиться, что на предметном столике отсутствует препарат и объектив отведен от столика!

Система **LSM510** включается переключателем ON/OFF на системном блоке. При этом подается питание все компоненты системы, компьютер выполняет начальную загрузку. Микроскоп включается кнопкой на электронном блоке, начинается инициализация микроскопа. Прежде чем запускать программное обеспечение, необходимо убедиться, что инициализация микроскопа закончилась.



- 1 Main switch ON/OFF
- 2 COMPONENTS switch ON/OFF
- 3 SYSTEM PC switch ON/OFF

Рисунок 2. Блок управления питанием.

Запуск программного обеспечения

На рабочем столе компьютера необходимо выбрать значок



и провести выбор запуска **Start System/ Image Processing**

Начало работы происходит как на обычном флуоресцентном микроскопе:

- на покровное стекло подготовленного образца нанести капельку иммерсионной жидкости, поместить образец на предметный столик (убедитесь, что образец размещен надежно и правильно);

- в режиме проходящего света **Ocular** (Transmitted Light / Bright Field – Проходящий свет/Яркое поле) настроить фокусировку, выбрать область образца для исследования;

- включить ртутную лампу, прогреть в течение 15 мин, установить регулятор мощности (яркости свечения) лампы в минимальное положение;

- перейти из режима проходящего света в режим флуоресценции “Отраженный Свет”);
- выбрать кубик, соответствующий присутствующему в образце красителю (см. табл. 1);
- открыть затворы **Shutter** (затвор есть как в лампе, так и в микроскопе);
- увеличить мощность лампы, наблюдать в окуляры флуоресценцию образца.

Чтобы избежать обесцвечивания биологического образца, время облучения и мощность лампы должны быть минимальными.

Включение лазеров

После полной загрузки системы Аргоновый мультилинейный лазер необходимо активировать. На этом этапе происходит включение лазеров и установление интенсивности.

- Щелкнуть на кнопке Laser в Acquire вспомогательной инструментальной панели Main меню.
- Появится окно Laser Control (управление лазером) со списком имеющихся лазеров. В зависимости от набора лазеров в вашей системе ваш экран может отличаться от представленного на рисунке.
- Подведите курсор мыши к тому лазеру, длина волны которого возбуждает люминесценцию специальных красителей, использованных для обозначения образца.
- В случае, если необходим аргоновый лазер или UV лазер (Enterprise), щелкните сначала на кнопке Standby (режим ожидания).
- В строке Status (состояние) появляется Warming up (разогрев).
- Через две минуты, когда фаза разогрева закончится, появляется сообщение о готовности Ready.
- Затем щелкнуть на кнопке On.
- Лазер включен.
- Используйте полосу прокрутки Output [%] для установки интенсивности до 50%.
- Для лазера HeNe щелкайте прямо на кнопке On.
- Закройте окно кнопкой Close.

- Для проведения прецизионных измерений система должна прогреваться в течение 2 часов.
- В зависимости от набора лазеров в вашей системе ваш экран может отличаться от представленного на рисунке.

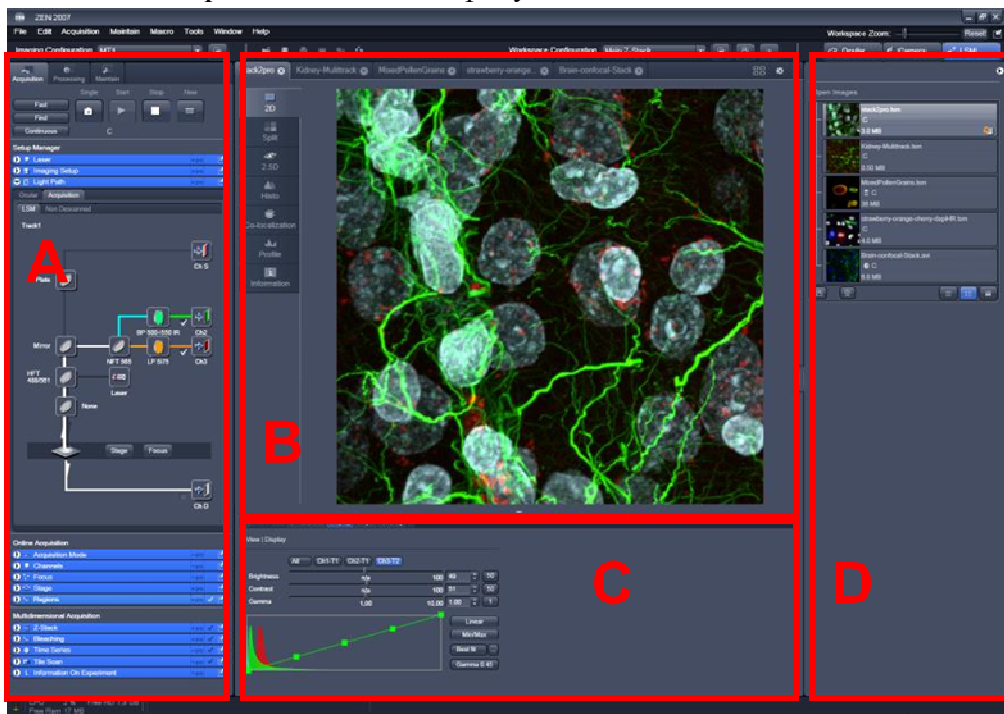


Рисунок 3. Программный интерфейс.

- A. Tool area (область инструментов)
- B. Image container (область изображения)
- C. View control panel (область управления изображением)
- D. File handling area (область управления файлами)

Регулировка траектории луча

На этом этапе производится точное определение параметров траектории луча, используя предписанный Track Configuration (конфигурация траектории)

- Щелкнуть на кнопке Config в Acquire вспомогательной инструментальной панели Main меню.

- Окно Configuration Control (управление конфигурацией) появится на экране. Ваш экран может отличаться от представленного на рисунке.

- Щелкнуть на кнопке Single Track (отдельный путь), если она еще не была активирована.

- Щелкнуть на кнопке Config в окне Configuration Control.

- Окно Track Configuration (конфигурация трека) появится на экране.

В окне Track Configuration доступны хранящиеся в памяти стандартные конфигурации (треки), которые можно использовать для быстрого и легкого получения изображения.

Все установки выбранных стандартных конфигураций такие, как траектория луча, возбуждаемая длина волны и интенсивность, АОТФ (акустооптический перестраиваемый фильтр) затухание, увеличение, смещение и величины глубины данных загружаются программным обеспечением и выводятся на экран в соответствующих окнах и панелях. Окно Track Configuration закрывается автоматически.

Сканирование изображения

На этом этапе производится точное определение параметров и исполнение процедуры получения изображения.

- Щелкнуть на кнопке Scan в Acquire вспомогательной инструментальной панели Main меню.

- Окно Scan Control (управление сканированием) появится на экране.

Микроскоп должен быть в режиме LSM (нажмите кнопку LSM и сдвиньте соответствующий движок на консоли микроскопа в положение LSM).

С правой стороны окна Scan Control появятся различные кнопки.

Мы будем использовать следующие кнопки сканирования: Find (найти), Single (единственный), Cont.(непрерывное сканирование), Stop.

- Для сканирования двухкоординатного (XY изображения) щелкнуть на кнопке Frame (кадр).
- Щелкните на кнопке Find с правой стороны окна Scan Control.
 - Создается двухкоординатное изображение (XY изображения) с автоматически сгенерированными установками яркости и контрастности.
- Образец с двумя метками (FITC, Rhod) с определенными каналами легче рассматривать на расщепленном экране, где все каналы расположены рядом друг с другом. В окне Image Display вы можете переключать между изображением в ху или Split ху.

Теперь сканированное изображение можно оптимизировать в отношении контрастности, яркости и конфокальности.

Действуйте следующим образом для оптимизации изображения:

- Щелкнуть на кнопке Channels (каналы) в окне Scan Control.
 - В окне Scan Control отображены панели Channel Settings (установки для канала) и Excitation of Track (...) -активация канала (...).
- Нажать кнопку Cont. (непрерывное сканирование) с правой стороны окна. Это начнет процесс непрерывного получения изображения, которое может быть прервано нажатием кнопки Stop.
- Под панелью Channel Settings высвечены все кнопки для каждого канала, который вы настраиваете. Щелкнуть кнопку Ch1 (канал 1 или трек 1), если, например, вы хотите отрегулировать первое изображение, выведенное на экран в окне расщепленного режима (split mode).

- Используйте движок Pinhole (микроотверстие), чтобы установить диаметр.
- Выбранный диаметр микроотверстия должен быть достаточно мал, чтобы обеспечить возможность установки детекторного усиления и достаточную информацию об изображении. 1 Эйри - это достаточная величина для получения конфокального XY –изображения (воспользуйтесь кнопкой 1).
- Если требуется, опять отрегулируйте размер микроотверстия (см. меню Main, вспомогательная панель Maintain, кнопка Pinhole).
- Используйте движок Detector Gain (детекторное усиление) для регулировки контрастности и яркости изображения. Это очень чувствительная настройка. Можно попробовать выполнять настройку, используя правую и левую кнопки со стрелками вместо передвижения движка. Используйте Shift и Ctrl ключи для перехода на грубую и плавную настройку.
- Для регулировки заднего плана используется Ampl.Offset (амплитудное смещение).
- Можно также пытаться настраивать микроскоп путем ручной фокусировки. Иногда вы будете выяснять, что существуют другие фокальные плоскости внутри образца, которые ярче, и поэтому детекторное усиление нужно будет уменьшить.
- После оптимизации данного канала вы можете переключиться на другой канал, необходимый для работы, и повторить оптимизацию.
- Как только все каналы оптимизированы, щелкните на кнопке Stop.
- Для дальнейшего улучшения качества изображения можно замедлить скорость сканирования, давая возможность большему количеству фотонов попадать на детектор или применять метод усредненного изображения для устранения случайного шума, а также используя комбинацию того и другого. Такие настройки выполняются выбором вкладки Mode в окне Scan Control.
- Установить Scan Speed (скорость сканирования) в панели Speed (скорость).

- Выбрать Line (строка) или Frame (кадр) в окне списка Mode , среднее или сумма в Method (метод) и число Number средних в панели Depth, Scan Direction&Scan Average (глубина, направление сканирования и среднее сканирования), соответственно, рассматривая ваше изображение. Установка среднего из 16 (Number 16) должно улучшить соотношение сигнал/ помеха разительным образом, однако скорость получения изображения замедлится.
- Когда процесс оптимизации изображения будет закончен, щелкните на кнопке Single для генерирования единственного изображения образца.
- Если ваш образец чувствителен к обесцвечиванию светом, можно ослабить лазерное излучение щелчком на кнопке Channels в окне Scan Control.

В нижней части окна есть возможность установить мощность лазера в % (Transmission [%]) для каждой волны возбуждения. Вероятно, вам придется увеличить Detector Gain (усиление детектора) при уменьшении мощности лазера. Эта установка управляет пропускной способностью AOTF (акустооптических перестраиваемых фильтров).



Постарайтесь использовать настолько низкую интенсивность лазерного света, насколько это возможно, чтобы предотвратить обесцвечивание образца. Для этого следует увеличить усиление детектора до величины приблизительно 800 V.

Прежде чем приступить к сканированию изображения необходимо установить некоторые параметры.

Настройка спектральных каналов

- во вкладке **Acquire** выбрать панель **Beam Path**;
- активировать лазеры кнопкой **Visible**;
- выбрать линию возбуждения (для удобства выбора линии возбуждения и диапазона детекции в программе записаны спектры

некоторых флуоресцентных красителей), установить мощность (для начала разумно выбрать 15-20%);

- установить соответствующий выбранному лазеру beam splitter (405/532 или 488/635);

- установить диапазон детекции (доступный диапазон 430 – 750 нм);

(необходимо, чтобы расстояние от линии возбуждения до левой границы области детекции было не менее 5 нм! – чтобы избежать интерференции от отраженного света);

- установить **Gain** (усиление детектора) примерно 500.

Параметры сканирования - вкладка Acquisition

- выбрать режим сканирования **Acquisition Mode – Frame**;

- установить формат изображения **Frame Size** 512×512, скорость сканирования **Speed** 6;

- нажать кнопку **Live** – начнется предварительное непрерывное сканирование, при этом на образце будет виден лазерный лучик;

- для окончания предварительного сканирования нажать кнопку **Stop**.

Система LSM 510 позволяет записывать последовательно до 8-ми каналов. На вкладке **Beam Path** можно добавлять необходимое число каналов и настраивать каждый канал по отдельности.

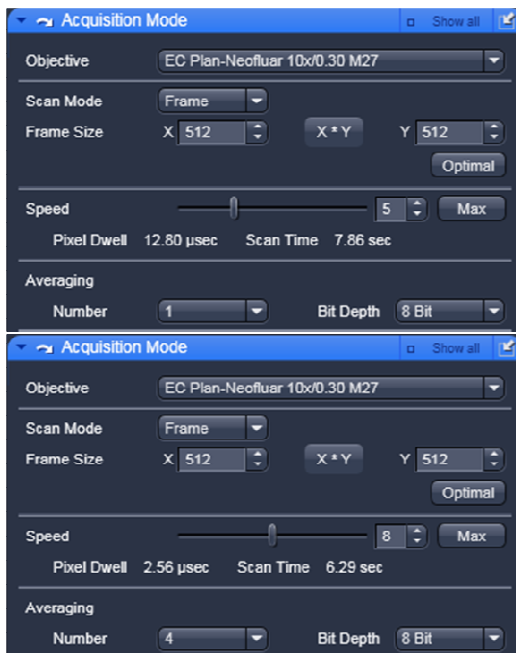


Рисунок 4. Меню Acquisition Mode

Оптимизация изображения

В процессе предварительного сканирования изображение можно оптимизировать в отношении яркости, контрастности и конфокальности. Для этого удобно перевести изображение в псевдоцвета (панель инструментов с левой стороны окна). При этом пиксели, интенсивность которых выходит за верхний предел динамического диапазона детектора будут окрашены синим (зашкал), а пиксели, имеющие значение 0 – зеленым. Нужно, чтобы интенсивность всех пикселей была в пределах динамического диапазона детектора, т.е. на изображении были лишь единичные синие и зеленые пиксели.

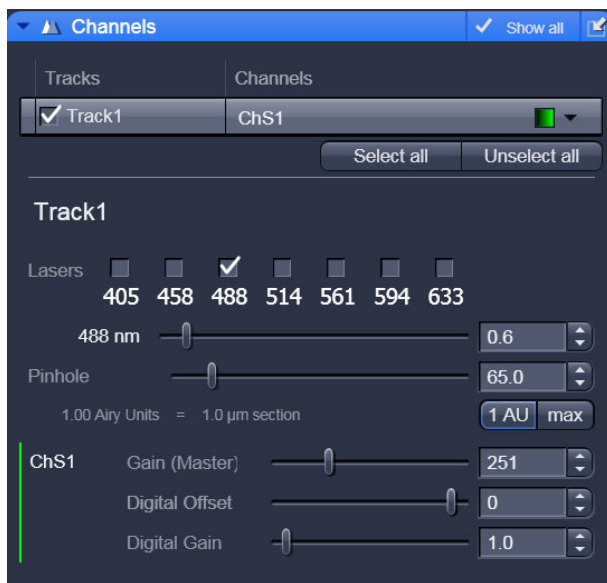


Рисунок 5. Меню Channels (Каналы)

Gain (Master Gain) отвечает за интенсивность, яркость изображения. Рекомендуется использовать настолько низкую интенсивность лазерного излучения, насколько это возможно, чтобы предотвратить обесцвечивание образца. Для этого придется увеличить усиление детектора (Gain). Эта установка управляет пропускной способностью АОФ. Следует учитывать, что при увеличении Gain уменьшается соотношение сигнал/шум. **Offset** позволяет установить контрастность, уровень интенсивности, ниже которого пикселям присваивается значение 0.

Pinhole – конфокальная диафрагма, роль которой – улучшить разрешение микроскопа вдоль оптической оси объектива (оси Z). Уменьшение диаметра конфокальной диафрагмы уменьшает ΔZ , но при этом снижается и интенсивность сигнала, который диафрагма пропускает к ФЭУ, а, следовательно, увеличивается соотношение сигнал/шум. Следует помнить, что диафрагма с отверстием меньше размера пятна Эйри просто приводит к потере интенсивности и никак не влияет на разрешение вдоль оси Z. Диафрагма размером в одно

пятно Эйри позволяет по максимуму использовать разрешающую способность объективной линзы.

Рис. 3. Зависимость разрешения микроскопа и соотношения сигнал/шум от размера конфокальной диафрагмы.

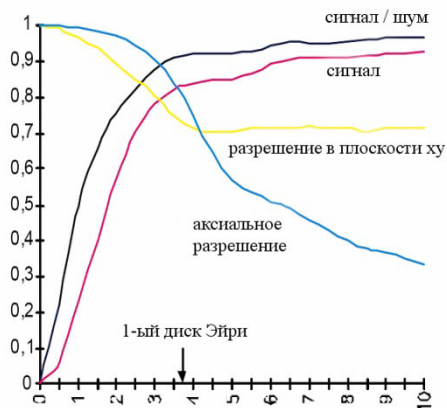


Рисунок 6. Зависимость разрешения микроскопа и соотношения сигнал/шум от размера конфокальной диафрагмы.

Zoom – электронное увеличение ($1\times \div 16\times$ с шагом 0,1).

Чем больше **format** и **zoom**, тем меньше размеры пикселей и расстояние между ними, т.е. с большей точностью отслеживаются детали изображения. При увеличении размеров пикселей происходит потеря в разрешении конфокального микроскопа; при уменьшении их размеров разрешение с определенного момента не увеличивается, но могут появиться структуры на изображении, которых на самом деле нет. Кроме того, в этом случае возрастает плотность энергии лазерного излучения на препарате, что может привести к его выгоранию.

Для дальнейшего улучшения качества изображения можно замедлить скорость сканирования **Scan speed** (доступны значения 400, 600 и 800 Гц), давая возможность большему количеству фотонов попадать на детектор (при 400 Гц система будет сканировать 400

линий за 1с) и применять метод усредненного изображения **Frame Average** для устранения случайного шума.

После того, как все необходимые параметры сканирования установлены нажать кнопку **Start** для записи окончательного изображения.

Сканирование изображения образца в проходящем свете

Помимо флуоресцентного конфокального изображения можно получить соответствующее ему изображение образца в проходящем свете. Для этого во вкладке **Beam Path** нужно включить канал **Transmission Channel** в одном из имеющихся спектральных каналов, или добавить отдельный канал для проходящего света. Активировать детектор для проходящего света, поставив галочку

В меню настроек канала проходящего света доступны следующие методы контрастирования: светлое поле (BF), темное поле (DF), фазовый контраст (PH), дифференциально-интерференционный контраст (DIC), наблюдение в поляризованном свете (Pol). При выборе того или иного метода микроскоп автоматически конфигурирует всю необходимую оптику.

Аналогично флуоресцентным каналам, яркость и контрастность видимого канала настраивают при помощи **Gain** и **Offset**.

Сканирование по оси Z

Для настройки параметров сканирования по z во вкладке **Acquisition** выбираем панель **Z-Stack**. Для начала нужно установить положение начальной и конечной плоскости, передвигая колесиком мышки плоскость внутри кубика (см. рис. 7), при этом удобно использовать режим предварительного сканирования. Затем, если в настройках **Z-Stack** выбрать функцию *system optimized* программа сама рассчитает толщину оптического среза, при которой можно получить максимальное разрешение при выбранном объективе. Однако это теоретически полученное значение заведомо превышает разрешающую способность, а время сканирования значительно

увеличивается. Оптимальный размер оптического среза при использовании объективов с числовой апертурой 1,15 и 1,3 составляет примерно 0,5 и 0,3 мкм соответственно.

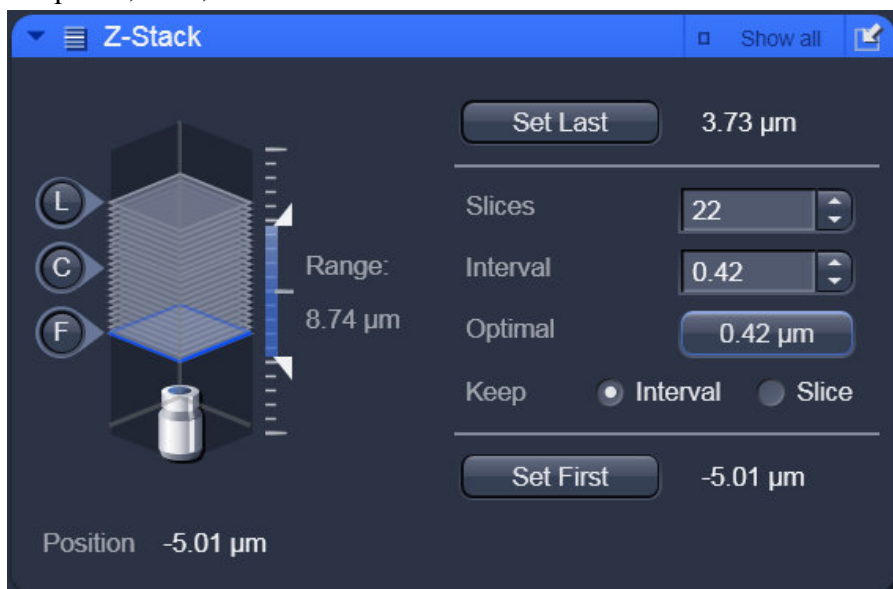


Рисунок 5. Меню Сканирование по оси Z.

Спектральный режим, λ-сканирование

Полный спектральный массив данных регистрируется путем проведения серии повторных сканирований выбранного оптического сечения образца с последовательным сдвигом щели вдоль спектра. Ширина щели регулируется, и она выполняет функцию фильтров, перестраиваемых по ширине и диапазону длин волн пропускания. Предельное спектральное разрешение этого прибора составляет 5 нм.

Чтобы перейти в режим λ-сканирования, во вкладке **Acquisition** выбираем режим сканирования **Acquisition Mode** – хуλ.

В панели **Beam Path** настраиваем спектральный канал:

- проверить, что лазеры активны (кнопка **Visible**);
- выбрать линию возбуждения, установить мощность;

- установить нейтральный фильтр, **TL [%] 30/70**, уменьшающий интенсивность излучения (на 70%) без изменения относительного спектрального распределения;

- установить диапазон детекции;

(необходимо, чтобы расстояние от линии возбуждения до левой границы области детекции было не менее 5 нм! – чтобы избежать интерференции от отраженного света);

- в режиме предварительного сканирования передвигая курсор вдоль диапазона детекции найти предполагаемый максимум спектра испускания;

- установить **Gain** и **Offset**;

- нажать кнопку **Start**.

Сохранение результатов эксперимента

- на диске **C** в папке *Users* создать свою директорию;

- во вкладке **Acquire** выбрать **Experiments**;

- каждую стопку изображений (z-stack) необходимо сохранить как отдельный эксперимент, для этого в меню **File** выбрать **New experiment**;

- щелкая правой кнопкой мыши на каждом эксперименте, выбрать *Export as...*;

- изображения рекомендуется сохранять в формате Tiff;

- примерный размер файлов:

512 × 512 × 1 канал = 350 KB,

1024 × 1024 × 2 канала = 2,1 MB,

1024 × 1024 × 3 канала × 50 срезов = 160 MB.

Выключение прибора

- отвести объектив от образца, убрать образец с предметного столика, мягкой салфеткой удалить с объектива остатки иммерсионной жидкости;

- выключить лазеры поворотом ключа

после выключения лазеров должно пройти 5-10 мин до выключения питания, чтобы система могла охладиться;

- выключить микроскоп;
- выключить ртутную лампу;
- выйти из программы LAS AF;
- записать полученные изображения на CD-диск или другой носитель;
- завершить работу компьютера;
- отключить питание выключателем ON/OFF.

Рекомендуемая авторами литература

- Amos B. (2000): Lessons from the history of light microscopy. *Nat Cell Biol.* 2(8), E151-2.
- Wilson T., Sheppard C. (1984): Theory and practice of scanning optical microscopy. Academic Press, London.
- Diaspro A. (2001): Confocal and two-photon microscopy : foundations, applications, and advances. Wiley-Liss, New York.
- Pawley JB. (2006): Handbook of Biological Confocal Microscopy, 3rd edition, Plenum-Springer, New York.
- Hawkes PW., Spence JCH. (2006): Science of Microscopy, Springer, New York.
- Masters BR. (2006): Confocal Microscopy And Multiphoton Excitation Microscopy: The Genesis of Live Cell Imaging, SPIE Press Monograph Vol. PM161, USA.
- Hell SW. (2003): Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol.* 21, 1347.
- Jares-Erijman EA., Jovin TM. (2003): *Nat Biotechnol.* 21(11), 1387.
- Tsien RY. (2006): Breeding molecules to spy on cells. *Harvey Lect.* 2003-2004, 99, 77.
- Tsien RY. (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* 67, 509.
- Pozzan T. (1997): Protein-protein interactions. Calcium turns turquoise into gold. *Nature.* 388, 834
- Diaspro A. (2006): Shine on ... proteins. *Microsc Res Tech.* 69(3),149

- Periasamy A. (2000): *Methods in Cellular Imaging*, Oxford University Press, New York.
- Becker W. (2005): *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*, Springer, Berlin.
- Periasamy A., Day RN. (2006): *Molecular Imaging : FRET Microscopy and Spectroscopy*, An American Physiological Society Book, USA.

Список использованной литературы

- Beringer J.E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 1974. 84(1): 188-198.
- Fahraeus G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *J. Gen. Microbiol.* 1957. 16(2): 374-381.
- Stumpe M., Gobel C., Demchenko K., Hoffmann M., Klosgen R.B., Pawlowski K., Feussner I. Identification of an allene oxide synthase (CYP74C) that leads to formation of alpha-ketols from 9-hydroperoxides of linoleic and linolenic acid in below-ground organs of potato. *Plant Journal.* 2006. 47(6): 883-896.
- Vitha S., Baluska F., Mews M., Volkman D. Immunofluorescence detection of F-actin on low melting point wax sections from plant tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1997. 45(1): 89-95.