



Получено: 17.10.2024 г. | Принято: 21.10.2024 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.428.433>

Научная статья

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ОПТИЧЕСКАЯ НАНОТОМОГРАФИЯ: ОБЪЕДИНЕНИЕ ТЕХНИК ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ И УЛЬТРАМИКРОТОМИИ

К.Е.Мочалов¹, д.ф.-м.н., ст. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-8157-9613

О.И.Агапова², к.б.н., ст. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-4507-1852

И.И.Агапов², д.б.н., зав. лаб., ORCID: 0000-0002-0273-4601

Д.С.Коржов^{1,3}, техник-лаборант, ORCID: 0009-0006-2626-1278

Д.О.Соловьев¹, к.б.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2590-4204

С.В.Сизова¹, к.х.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0003-0846-4670

М.С.Шестопалова^{1,3} инж.-иссл., ORCID: 0000-0001-6543-4289

В.А.Олейников^{1,3}, д.ф.-м.н., проф., зав. отд., ORCID: 0000-0003-4623-4913

А.Е.Ефимов², д.б.н., гл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-0769-301X / antefimov@gmail.com

Аннотация. Предложен метод 3D-TIRF-микроскопии, основанный на объединении методик ультрамикротомии и флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения поверхности образца после среза и позволяющий реконструировать трехмерную ультраструктуру объектов.

Ключевые слова: 3D-TIRF-микроскопия, трехмерная ультраструктура объектов

Для цитирования: К.Е. Мочалов, О.И. Агапова, И.И. Агапов, Д.С. Коржов, Д.О. Соловьев, С.В. Сизова, М.С. Шестопалова, В.А. Олейников, А.Е. Ефимов. Флуоресцентная оптическая нанотомография: объединение техник флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения и ультрамикротомии. НАНОИНДУСТРИЯ. 2024. Т. 17. № 7-8. С. 428-433. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.428.433>.

Received: 17.10.2024 | Accepted: 21.10.2024 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.428.433>

Original paper

FLUORESCENCE OPTICAL NANOTOMOGRAPHY: COMBINING THE TECHNIQUES OF TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE MICROSCOPY AND ULTRAMICROTOMY

К.Е.Мочалов¹, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics), Senior Researcher, ORCID: 0000-0001-8157-9613

О.И.Агапова², Cand. of Sci. (Biology), Senior Researcher, ORCID: 0000-0002-4507-1852

И.И.Агапов², Doct. of Sci. (Biology), Prof., Head of Laboratory, ORCID: 0000-0002-0273-4601

Д.С.Коржов^{1,3}, Technician, ORCID: 0009-0006-2626-1278

Д.О.Соловьев¹, Cand. of Sci. (Biology), Researcher, ORCID: 0000-0002-2590-4204

С.В.Сизова¹, Cand. of Sci. (Chemistry), Researcher, ORCID: 0000-0003-0846-4670

¹ Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва, Россия / Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

² Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И.Шумакова Минздрава России, Москва, Россия / Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ", Москва, Россия / National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia



M.S.Shestopalova^{1,3}, Engineer Researcher, ORCID: 0000-0001-6543-4289

V.A.Oleinikov^{1,3}, Doct. of Sci. (Physics and Mathematics),

Prof., Head of Department, ORCID: 0000-0003-4623-4913

A.E.Efimov², Doct. of Sci. (Biology), Chief Researcher, ORCID: 0000-0002-0769-301X / antefimov@gmail.com

Abstract. A method of 3D-TIRF microscopy is proposed, based on combination of ultramicrotomy and total internal reflection fluorescence microscopy techniques of the sample surface after cutting, which allows reconstructing the three-dimensional ultrastructure of objects.

Keywords: 3D-TIRF microscopy, three-dimensional ultrastructure of objects

For citation: K.E. Mochalov, O.I. Agapova, I.I. Agapov, D.S. Korzhov, D.O. Solovyeva, S.V. Sizova, M.S. Shestopalova, V.A. Oleinikov, A.E. Efimov. Fluorescence optical nanotomography: combining the techniques of total internal reflection fluorescence microscopy and ultramicrotomy. NANOINDUSTRY. 2024. Vol. 17. No. 7-8. PP. 428-433. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2024.17.7-8.428.433>.

ВВЕДЕНИЕ

Современные исследования и задачи в биомедицине, клеточной биологии и нанотехнологиях требуют постоянного усовершенствования и разработки новых методов микроскопии сверхвысокого разрешения. В настоящее время для трехмерной визуализации субклеточных процессов и структур применяются различные методы флуоресцентной и конфокальной микро- и наноскопии, однако предел разрешения, ограниченный дифракцией, во многих случаях не позволяет получить достаточно высокое разрешение для детальной визуализации исследуемых биологических структур [1, 2]. Аксиальное разрешение большинства существующих методик составляет несколько микрон, что существенно ниже по сравнению с их латеральным разрешением. Это препятствует возможности получения удовлетворительных трехмерных изображений ультраструктуры биологических образцов.

Одним из распространенных на данный момент способов достижения высокого аксиального разрешения является использование метода флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF, Total Internal Reflection Fluorescence microscopy), который нашел широкое применение в биологических исследованиях, позволяя получать достаточно детализированные и контрастные изображения [3, 4]. Пучок света в TIRF-микроскопии распространяется в направлении границы раздела сред, на поверхности которой в водной или воздушной среде находится тонкий слой образца. При падении плоской волны под сверхкритическим углом на границе разделов сред происходит возбуждение эванесцентной волны, возникающей в результате эффекта полного внутреннего отражения. Эванесцентная волна экспоненциально затухает, распространяясь в среде на глубину, обычно значительно меньшую длины волны

излучения [5]. Следовательно, затухающее поле способно возбуждать флуорофоры только в тонком слое вблизи поверхности, и значительно увеличить аксиальное разрешение флуоресцентных изображений, что и обуславливает применение метода TIRF в биологических *in vitro* исследованиях на протяжении двух последних десятилетий [3, 4, 6].

Однако TIRF-микроскопия имеет и свои недостатки, одним из них является ограничение толщины исследуемой области образца, которая не должна превышать 100–200 нм, что накладывает ограничения на спектр задач, решаемых с помощью данной методики. И на сегодняшний день TIRF используется в основном для визуализации процессов, ассоциированных с плазматической мембранный клетки, таких как процессы секреции и эндоцитоза [7, 8], изучение взаимодействия лиганд-рецептор на клеточной поверхности [9, 10], картирования цитоплазматической мембранны [11, 12] или контактов клетки с подложкой. При этом для изучения большинства биологических процессов и моделей требуется значительное увеличение предельной глубины реконструкции флуоресцентного изображения, что вызывает необходимость развития подходов, позволяющих производить протяженное вдоль оптической оси послойное сканирование с последующей реконструкцией массива 2D-данных в 3D-изображение.

В данной работе предложен подход для решения вышеуказанной проблемы, основанный на объединении методик ультрамикротомии (выполнение последовательности сверхтонких срезов образца) и TIRF, что дает возможность визуализации 3D-ультраструктуры объектов на основе результатов послойного TIRF-сканирования (томографии) образца в режиме и в рамках единой измерительной процедуры. Совмещение методик возможно за счет ключевой особенности: использования

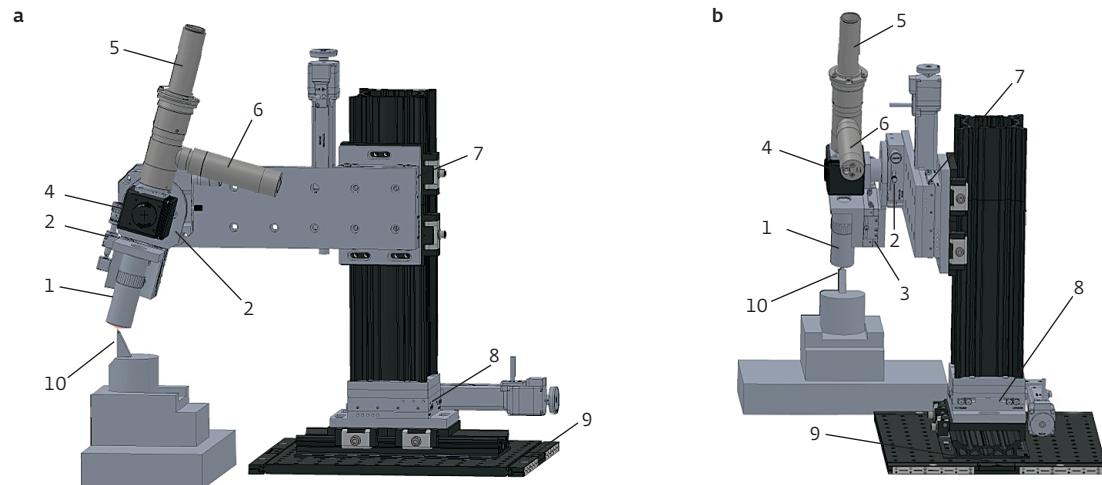


Рис.1. Модель специализированного прямого флуоресцентного микроскопа для реализации методики 3D-TIRF. а – вид сбоку; б – вид сзади. Обозначения: 1 – объектив, 2 – прецизионная угловая подвижка, 3 – прецизионная аксиальная микроподвижка для точной фокусировки, 4 – кубик с флуоресцентными фильтрами, 5 – тубусная линза, 6 – светодиод для освещения при работе в режиме яркого поля, 7 – прецизионная моторизованная подвижка микроскопа по вертикали, 8 – прецизионная моторизованная подвижка микроскопа по горизонтали ("вперед – назад"), 9 – установочная оптическая панель с прецизионной подвижкой по горизонтали ("вправо – влево"), 10 – алмазный нож ультрамикротома

Fig.1. Model of a specialized upright fluorescence microscope for implementing the 3D-TIRF technique. a – side view; b – back view. Designations: 1 – objective lens, 2 – precise angular positioner, 3 – axial micro-positioner for precise focusing, 4 – cube with fluorescent filters, 5 – tube lens, 6 – LED for illumination in bright field mode, 7 – precise motorized vertical microscope positioner, 8 – precise motorized horizontal microscope positioner ("forward – backward"), 9 – mounting optical panel with precise horizontal movement ("right – left"), 10 – diamond knife of the ultramicrotome

специализированного алмазного ножа ультрамикротома как для получения физических срезов, так и в качестве TIRF-призмы.

3D-TIRF-СИСТЕМА

Основная техническая задача для реализации методики 3D-TIRF состояла в разработке специализированного прямого оптического флуоресцентного микроскопа и системы его сопряжения с ультрамикротомом (см. рис.1). Исходя из результатов предварительных расчетов, геометрия и оптические свойства ножа ультрамикротома (рис.2, поз.1) позволяют проводить возбуждение и сбор оптического сигнала с помощью объектива с числовой апертурой 0.75 и рабочим отрезком 5.2 мм (Mitutoyo Plan Apo HR Infinity Corrected $\times 50$) (рис.2, поз.2). Возбуждающее излучение выходит из объектива и, проходя через внешнюю грань алмазного ножа, испытывает полное внутреннее отражение на его внутренней грани во всем угловом диапазоне падающих лучей. Таким образом, для данного объектива оказывается задействована вся его числовая апертура, что способствует повышению чувствительности флуоресцентной микроскопии и ее латерального разрешения. Условие полного внутреннего

отражения во всем угловом диапазоне падающих лучей также будет выполняться при варьировании положения оптической оси объектива в диапазоне от 0° (вертикальное расположение, рис.2) до 45° (перпендикулярно первой грани ножа). Возможность широкого варьирования угла наклона оптической оси объектива по отношению к внешней грани алмазной призмы в вертикальной плоскости является важным параметром данной системы, увеличивающим ее адаптируемость под различные экспериментальные условия.

Исследуемый образец располагается на сканирующем XYZ-пьезосканере (рис.2 поз. 3), закрепленном на подвижной консоли ультрамикротома таким образом, что одна из его координат (X) параллельна кромке алмазного ножа. Данный пьезосканер был создан ранее коллективом авторов в ходе работы по созданию уникальной научной установки (УНУ – <http://ckp-tf.ru/usu/486825/>) [13–15]. Использование XYZ-пьезосканера системы как в качестве сканирующего устройства, так и в качестве устройства подвода образца обеспечивает высокоточное совмещение поверхности образца с гранью алмазного ножа. Перемещение с нанометровой

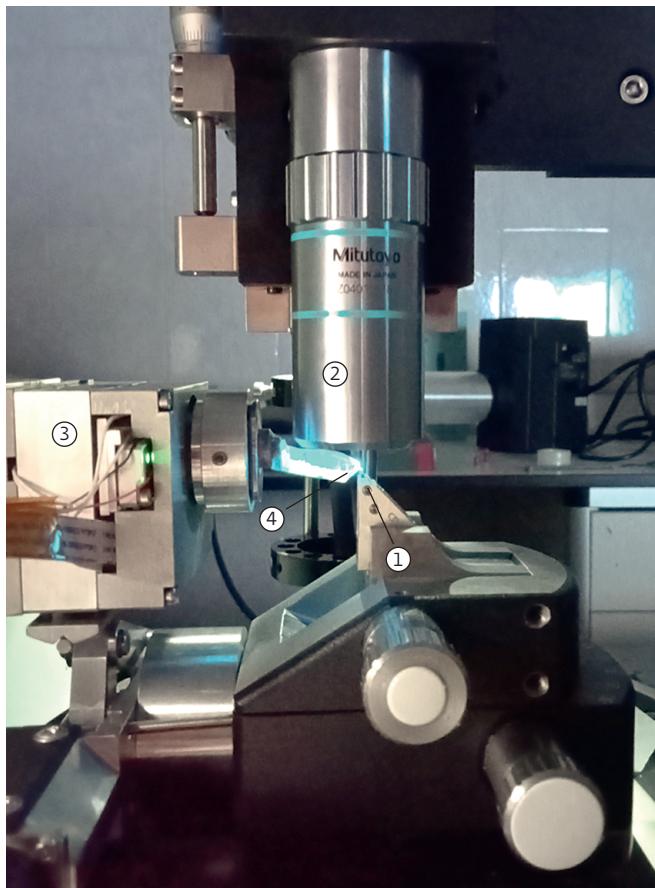


Рис.2. Экспериментальная установка для 3D-TIRF микроскопии: 1 – алмазный нож ультрамикротома, 2 – объектив флуоресцентного микроскопа, 3 – XYZ-пьезосканер, установленный на подвижной консоли ультрамикротома, 4 – образец

Fig.2. Experimental setup for 3D-TIRF microscopy: 1 – diamond knife of ultramicrotome, 2 – fluorescence microscope objective, 3 – XYZ-piezoscanner mounted on the movable arm of ultramicrotome, 4 – sample

точностью вдоль оси Z (перпендикулярно плоскости среза) позволяет зондировать экспоненциально затухающее поле, возбуждающее флуоресценцию (см. рис.3), с целью нахождения оптимальных соотношений между разрешением по глубине и интенсивностью TIRF-сигнала.

Для получения среза образца нож ультрамикротома должен располагаться под углом 2–10° к поверхности образца, что приводит к тому, что эффективное возбуждение TIRF возникает только в узкой полосе ("полоса контрастности") вблизи его кромки, где нож и образец находятся на наименьшем расстоянии друг от друга. Последовательность "полос контрастности", полученная при сканировании плоскости среза образца вдоль направления Y перпендикулярно кромке ножа, с использованием специального

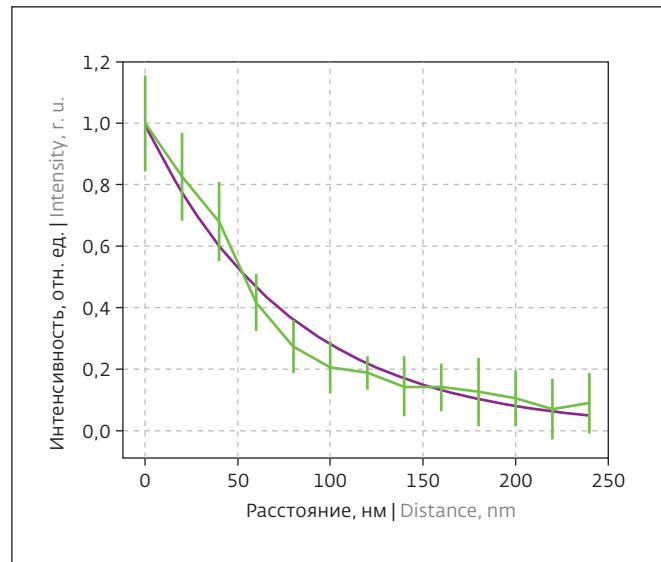


Рис.3. Сравнение экспериментальной (зеленый) и теоретической (фиолетовый) зависимостей интенсивности эманесцентных волн от расстояния от поверхности ножа по оси Z

Fig.3. Comparison of the experimental (green) and theoretical (purple) dependences of evanescent waves on the distance from the knife edge along the Z axis

программного обеспечения, написанного в среде Piton 3.8, складывается в его 2D-флуоресцентное изображение. Набор 2D-флуоресцентных изображений, полученных в результате последовательных срезов и сканирований вдоль оси Y, далее преобразуется с помощью программы ImagePro Plus 6.0 в трехмерное флуоресцентное изображение исследуемого образца.

МАТЕРИАЛЫ

В качестве тестового образца для практического исследования возможностей микроскопии 3D-TIRF были выбраны полистирольные микросфера (ПСМ) диаметром 5 мкм, поверхность которых покрыта монослоем полупроводниковых флуоресцентных квантовых точек (КТ) структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) с длиной волны испускаемой флуоресценции в районе 530 нм. Толщина флуоресцентного монослоя КТ соответствует их среднему диаметру порядка 7 нм. Таким образом можно считать, что исследуемым объектом является флуоресцентная сфера диаметром 5 мкм и бесконечно малой (относительно аксиального разрешения прибора) толщиной. Для проведения измерений массив ПСМ/КТ был залит в среду Ловикрил, позволяющую легко выполнять срезы ультрамикротомом и, соответственно, проводить их полную 3D-реконструкцию.

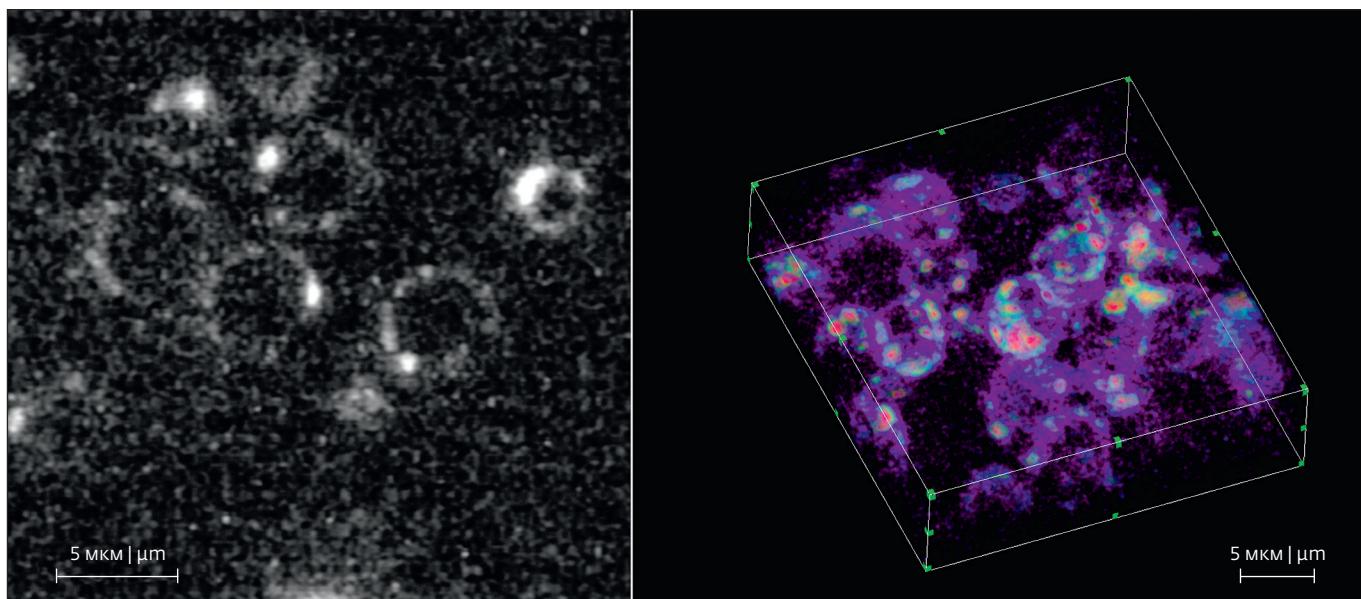


Рис.4. Левая панель: 2D-TIRF-изображение образца ПСМ с нанесенным оптически тонким (несколько нанометров) поверхностным слоем КТ структуры ядро/оболочка (CdSe/ZnS) с длиной волны испускаемой флуоресценции в районе 530 нм. Размер изображения $25,6 \times 25,6 \text{ мкм}$; правая панель – трехмерная реконструкция образца ПСМ/КТ на основе 33 последовательных 2D-TIRF-изображений, толщина среза 150 нм, объем реконструкции $25,6 \times 25,6 \times 4,95 \text{ мкм}$. Размерные отрезки – 5 мкм

Fig.4. Left panel: a 2D TIRF image of a sample of polystyrene microspheres (PSMs) with an optically thin (several nanometers) surface layer of CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QDs) fluorescing at a wavelength of about 530 nm. The image size is $25.6 \times 25.6 \mu\text{m}$. Right: a 3D reconstruction of the PSM–QD sample based on 33 sequential 2D TIRF images. The section thickness is 150 nm; the reconstruction size is $25.6 \times 25.6 \times 4.95 \mu\text{m}$. Scale bars, 5 μm

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первой задачей для валидации метода 3D-TIRF было сравнение теоретического и экспериментального распределений эванесцентного поля вдоль оси Z на образцах ПСМ/КТ, описанных выше. Для этого проводился срез экспериментального образца, после чего к плоскости среза подводилась кромка ножа ультрамикротома до появления отчетливой "полосы контрастности". Далее образец отводился от ножа с шагом в 10 нм и записывались флуоресцентные изображения образца в "полосе контрастности". Глубина проникновения поля оценивалась по относительной яркости изображений кластеров КТ на поверхности ПСМ. Теоретическая зависимость строилась для длины волны 436 нм, что соответствует одной из длин волн ртутной лампы, которой в дальнейшем проводилось возбуждение флуоресценции КТ. Сравнение этой зависимости и данных, полученных экспериментально, приведено на рис.3.

Из приведенных данных видно, что с точностью до погрешности измерений теоретическая и экспериментальная зависимости совпадают, что прежде всего говорит об адекватной работе созданной системы возбуждения/сбора флуоресценции в режиме TIRF. Кроме того, полученные экспериментальные зависимости в дальнейшем будут

использоваться для подбора параметров проведения эксперимента и интерпретации его результатов.

Далее была выполнена трехмерная реконструкция образцов ПСМ/КТ. Для этого было получено 33 последовательных 2D-TIRF с шагом ультрамикротомирования 150 нм. Каждое 2D-TIRF изображение было получено в результате последовательной интеграции 256 горизонтальных линий пикселов – "полосы контрастности" вблизи лезвия ножа, полученных при растровом сканировании образцом по оси Y с шагом 100 нм. На рис.4 (левая панель) показан пример одного из полученных интегрированных 2D-TIRF изображений. Получение каждого из изображений заняло около 40 с. Различимые на изображении круговые структуры соответствуют срезам отдельных микросфер, на поверхности которых находятся флуоресцирующие квантовые точки.

Серия полученных 2D-TIRF-изображений была обработана при помощи программного пакета ImagePro Plus 6.0 3DConstructor (Media Cybernetics, Inc., USA). Визуализация полученной трехмерной реконструкции представлена на рис.4 (правая панель). На ней различимы объекты сферической формы, полые внутри, что указывает на успешность трехмерной реконструкции с приемлемым аксиальным разрешением. Так же как и на 2D-изображении, можно



отметить, что флуоресцентные квантовые точки на поверхности распределены неравномерно, большинство из них находятся в кластерах размерами до нескольких сотен нанометров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый метод позволяет получать трехмерные TIRF-изображения с аксиальным разрешением лучше дифракционного предела – за счет детектирования флуоресценции, возбужденной экспоненциально затухающими волнами, возникающими при полном внутреннем отражении от ближайшей к образцу грани ножа. После получения оптического среза толщиной менее 100 нм, выполняется очередной физический сверхтонкий срез поверхности образца с помощью ультрамикротома. В результате многократного повторения данной процедуры, получается серия оптических срезов, на основе которой восстанавливается 3D-TIRF-изображение исследуемого объекта. Основным преимуществом описанного подхода является отсутствие принципиальных (за исключением общего времени проведения эксперимента) ограничений на количество выполняемых срезов, а значит, реконструкция изображения объектов происходит без потерь аксиального разрешения при теоретически не ограниченной глубине реконструкции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-14-00168).

ЛИТЕРАТУРА

1. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. Vol. 20. PP. 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
2. Finkenstaedt-Quinn S.A., Qiu T.A., Shin K., Haynes C.L. Super-resolution imaging for monitoring cytoskeleton dynamics, *Analyst*. 2016. Vol. 141. PP. 5674–5688. <https://doi.org/10.1039/C6AN00731G>
3. Axelrod D. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology, *Traffic*. 2001. Vol. 2. PP. 764–774. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21104.x>
4. Poulter N.S., Pitkeathly W.T.E., Smith P.J., Rapoport J.Z. The physical basis of total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy and its cellular applications, in: P. Verveer (Eds.), *Advanced Fluorescence Microscopy. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York. 2014. PP. 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2080-8_1
5. Martin-Fernandez M.L., Tynan C.J., Webb S.E.D. A ‘pocket guide’ to total internal reflection fluores-
- cence, *J. Microsc.* 2013. Vol. 252. PP. 16–22. <https://doi.org/10.1111/jmi.12070>
6. Mattheyses A.L., Simon S.M., Rapoport J.Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist, *J. Cell. Sci.* 2010. Vol. 123. PP. 3621–3628. <https://doi.org/10.1242/jcs.056218>
7. Stabley D.R., Oh T., Simon S.M., Mattheyses A.L., Salaita K. 2015. Real-time fluorescence imaging with 20 nm axial resolution, *Nat. Commun.* Vol. 6. P. 8307. <https://doi.org/10.1038/ncomms9307>
8. Trexler A.J., Sochacki K.A., Taraska J.W. Imaging the recruitment and loss of proteins and lipids at single sites of calcium-triggered exocytosis, *Mol. Cell.* 2016. Vol. 27. PP. 2423–2434. <https://doi.org/10.1093/mcb/E16-01-0057>
9. Allikalt A., Purkayastha N., Flad K., Schmidt M.F., Tabor A., Gmeiner P., Hübner P., Weikert D. Fluorescent ligands for dopamine D2/D3 receptors, *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10. P. 21842. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78827-9>
10. Tabor A., Möller D., Hübner Y., Kornhuber J., Gmeiner P. Visualization of ligand-induced dopamine D2S and D2L receptor internalization by TIRF microscopy, *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. P. 10894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11436-1>
11. Sankaran J., Wohland T. Fluorescence strategies for mapping cell membrane dynamics and structures, *APL Bioeng.* 2020. Vol. 4. P. 020901. <https://doi.org/10.1063/1.5143945>
12. Lukeš T., Glatzová D., Kvíčalová Z., Levet F., Benda A., Letschert S., Sauer M., Brdička T., Lasser T., Cebecauer M. Quantifying protein densities on cell membranes using super-resolution optical fluctuation imaging, *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8. P. 1731. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01857-x>
13. Efimov A.E., Agapov I.I., Agapova O.I., Oleinikov V.A., Mezin A.V., Molinari M., Nabiev I., Mochalov K.E. A novel design of a scanning probe microscope integrated with an ultramicrotome for serial block-face nanotomography, *Rev. Sci. Instrum.* 2017. Vol. 88. P. 023701. <https://doi.org/10.1063/1.4975202>
14. Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov A.E. An instrumental approach to combining confocal microscopy and 3D scanning probe nanotomography, *Ultramicroscopy*. 2017. Vol. 182. PP. 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.06.022>
15. Мочалов К., Чистяков А., Соловьева Д. и др. / Инструментальное объединение конфокальной микроспектроскопии и 3D-сканирующей зондовой нанотомографии // НАНОИНДУСТРИЯ. 2016. Т. 7. № 69. С. 60–71.