

Министерство образования Республики Беларусь
Белорусский государственный университет
Биологический факультет
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

СОГЛАСОВАНО
Заведующий кафедрой
_____ Яковец О.Г.
«15» июня 2023 г.

СОГЛАСОВАНО
Декан факультета
_____ Демидчик В.В.
«23» июня 2023 г.

Флуоресцентный и люминисцентный биоимиджинг

Электронный учебно-методический комплекс для специальности:
1-31 80 01 «Биология», профилизация «Функциональная биология»

Регистрационный № 2.4.2-24/361

Авторы:

Мацкевич В.С., старший преподаватель,
Звонарёв С.Н., старший преподаватель

Рассмотрено и утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
19.10.2023 г., протокол № 2.

Минск 2023

УДК57.08(075.8)

М 368

Утверждено на заседании Научно-методического совета БГУ
Протокол № 2 от 19.10.2023 г.

Решение о депонировании вынес:
Совет биологического факультета
Протокол № 13 от 23.06.2023 г.

А в т о р ы :

Мацкевич Вера Сергеевна, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета БГУ,
Звонарёв Сергей Николаевич, старший преподаватель кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета БГУ.

Рецензенты:

кафедра общей биологии и ботаники, факультет естествознания, УО «Белорусский государственный педагогический университет им. М. Танка» (заведующий кафедрой Жукова И.И., к.с.-х.н., доцент),

Кабашникова Л.Ф., заведующая лабораторией прикладной биофизики и биохимии ГНУ «Института биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси», член-корр., д.б.н., доцент.

Мацкевич, В. С. Флуоресцентный и люминисцентный биоимиджинг : электронный учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 80 01 «Биология», профилизация «Функциональная биология» / В. С. Мацкевич, С. Н. Звонарёв ; БГУ, Биологический фак., Каф. клеточной биологии и биоинженерии растений. – Минск : БГУ, 2023. – 42 с. : ил. – Библиогр.: с. 42.

Электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) предназначен для студентов II степени высшего образования специальности: 1-31 80 01 «Биология», профилизация «Функциональная биология». Содержание ЭУМК посвящено формированию у студентов целостной системы знаний о биоимиджинге, современных подходах для визуализации живых систем *in vitro* и *in vivo*, основанных на явлениях флуоресценции и биолюминисценции.

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА.....	4
1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ.....	5
1.1. Введение в биоимиджинг.....	5
1.2. Флуоресцентный биоимиджинг	10
1.3. Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии.....	20
1.4. Биоллюминометрия	28
2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ	35
2.1. Примерная тематика практических занятий	35
2.2. Задания для самостоятельной работы.....	35
3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ	37
3.1. Перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов	37
3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов.....	37
3.3. Темы реферативных работ	38
3.4. Примерный перечень вопросов к зачету	39
4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ.....	40
4.1. Рекомендуемая литература	40
4.2. Электронные ресурсы.....	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	42

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Настоящий электронный учебно-методический комплекс (ЭУМК) включает материал для проведения занятий по учебной дисциплине «Флуоресцентный и люминисцентный биоимиджинг» для специальности 1-31 80 01 «Биология» профилизации «Функциональная биология». ЭУМК создан в соответствии с учебной программой УД-8731/уч, на основе ОСВО 1-31 80 01-2019 и учебного плана УВО № G 31-030/уч.

Учебная дисциплина «Флуоресцентный и люминисцентный биоимиджинг» относится к компоненту учреждения высшего образования учебного плана и входит в учебный модуль «Феномный анализ и биоимиджинг». Цель учебной дисциплины – сформировать у студентов целостную систему знаний о биоимиджинге, современных подходах для визуализации живых систем *in vitro* и *in vivo*, основанных на явлениях флуоресценции и биолюминесценции.

Целью ЭУМК является предоставление теоретической и методологической базы, а также других сведений, необходимых для успешного освоения учебной дисциплины «Флуоресцентный и люминисцентный биоимиджинг». ЭУМК охватывает теоретические основы и содержит описание методик по тематическим разделам: «Введение в биоимиджинг», «Флуоресцентный биоимиджинг», «Биолюминометрия».

В структуру ЭУМК входит:

- 1) теоретический раздел (содержит краткий конспект лекций);
- 2) практический раздел (включает задания для самостоятельного выполнения в рамках подготовки к практическим занятиям, а также тематику практических работ);
- 3) контроль самостоятельной работы студентов (содержит примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы обучающихся, темы рефератов, примерный перечень вопросов к зачету);
- 4) вспомогательный раздел (содержит списки основной и дополнительной литературы).

Работа с ЭУМК должна включать на первом этапе ознакомление с тематическим планом учебной дисциплины, представленным в учебной программе УВО. Информацию о тематике лекций и практических занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы можно получить из рабочего варианта учебной программы по учебной дисциплине. Для подготовки к практическим занятиям рекомендуется использовать материалы, представленные в теоретическом разделе ЭУМК, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы. В ходе подготовки к зачету целесообразно ознакомиться с требованиями к компетенциям по учебной дисциплине, изложенными в учебной программе УВО, а также перечнем вопросов к зачету, приведенным в настоящем ЭУМК. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе ЭУМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1.1. Введение в биоимиджинг

Вопросы:

1. Что такое имидж?
2. Почему имиджинг важен для медицины, биотехнологии, сельского хозяйства и пищевой промышленности?
3. Технологии, используемые для получения биоимиджей.

Имиджинг – это визуальное представление измеряемых свойств некоторого объекта или процесса. Термин «биоимиджинг» используется для описания имиджинга биологических объектов и материалов. Он является принципиальной задачей пищевой промышленности, сельского хозяйства, медицины, лесохозяйства, экологии и других отраслей промышленности.

Имиджинг включает в себя различные техники, начиная от простого получения фотографий в видимой области спектра до электромагнитной части спектра, т.е. получения Рентген, термальных и гиперспектральных изображений (таблица). В 1960-х гг. началось цифровое получение имиджей для исследования космоса, в начале 1970-х гг. имиджинг стал применяться в медицине, астронавтики и для дистанционного зондирования. В 1980-х гг. возрос интерес к биоимиджингу в сферах сельского хозяйства и пищевой промышленности. В настоящее время биоимиджинг стал неотъемлемой частью всех сфер деятельности человека, в первую очередь в связи с развитием компьютерных технологий и методов визуализации.

Для анализа биологических объектов традиционно используют различные методы микроскопии. За прошедшие годы было внесено множество усовершенствований, направленных на оптимизацию чувствительности подходов микроскопии и минимизацию возможных артефактов: улучшение подготовки образцов (например, протоколы фиксации), усовершенствование осветительных систем (например, использование рентгена и лазеров), модификация конструкции микроскопа (например, оптики); модернизация технологии обнаружения (например, квантового выхода и частоты кадров).

Основной прогресс в данной области – создание оптической микроскопии сверхвысокого разрешения (флуоресцентной микроскопии), которая в настоящее время позволяет отслеживать структурные детали с разрешением вплоть до макромолекулярного разрешения в живых клетках (Нобелевской премии по химии 2014 г.) или разработка методов криоэлектронной микроскопии высокого разрешения для определения трехмерных структур биомолекул в растворе (Нобелевская премия по химии 2017 г.). Важным также является использование клеточных (или клеточно-подобных) систем в качестве (био)инженерных инструментов. Наконец, комбинация различных считываний, таких как корреляционные записи изображений электронной и оптической микроскопии (или оптической микроскопии и сил электрических токов),

дополнительно увеличивает объем получаемой информации и, следовательно, чувствительность биоимиджинга.

Таблица – Параметры методов визуализации структуры биообъектов

№	Методы визуализации	Глубина изображения	Пространственное разрешение
1	Рентгеноскопия, рентгенография	не ограничена	1000–500 мкм, 100 мкм для костей и легких
2	Рентгеновская компьютерная томография	не ограничена	1500–500 мкм
3	Магнитно-резонансная томография	не ограничена	1000–500 мкм
4	Ультрасонография 3–6 МГц	до 20 см	500–300 мкм
	Ультрасонография 20–40 МГц	2–7 мм	110 мкм
5	Ядерный магнитный резонанс с использованием сильного магнитного поля	не ограничена	0 мкм
6	Конфокальная микроскопия	200–300 мкм	2–1 мкм
7	Оптическая когерентная томография	1,5–2,0 мм	15 мкм

Два направления биоимиджинга: 1) запись изображений, которые мы видим, например, для анализа и обработки данной информации потом; 2) получение изображений, которые мы не можем увидеть, но представленных в форме, которую мы можем интерпретировать (т.е. информация конвертируется в удобный для нас вид).

Биологическая визуализация – это сложная технология, и для ее получения требуется установка оборудования. Для каждого типа визуализации требуется разное оборудование, но основные компоненты в любой системе визуализации по существу одинаковы. Системы биоимиджинга состоят из следующих основных компонентов: камеры, освещения, средства захвата кадров, аппаратного и программного обеспечения для обработки изображений.

Камера – это основной компонент, который получает изображение биологического образца либо его части. Имеется большое разнообразие сенсоров, включая следующие: ССD-камера (камера ПЗС, прибор с зарядовой связью), рентгеновское излучение, компьютерная томография (КТ), ультразвук, магнитно-резонансная томография (МРТ) и др. Наиболее часто используемые сенсоры регистрируют такие параметры, как цвет, форма, размер, поверхностное строение.

Осветитель, или источник света. Хорошее освещение позволяет получить изображение высокого качества.

Дигитайзер (Фрейм-граббер, видеозахват) – это прибор, позволяющий перевести аналоговый сигнал камеры в цифровую форму.

Прибор для процессинга имиджей – при помощи арифметических и логических операций и программных обеспечений позволяет написать код для анализа изображений.

В биологических исследованиях и в медицине используется ряд технологий, используемые для получения биоимиджей. Наиболее распространенные среди них: рентген, компьютерная томография, сонография, светлопольная и флуоресцентная микроскопия.

Рентгеновское излучение – электромагнитные волны, энергия фотонов которых лежит на шкале электромагнитных волн между ультрафиолетовым излучением и гамма-излучением (от ~ 10 эВ до нескольких МэВ), что соответствует длинам волн от $\sim 10^3$ до $\sim 10^{-2}$ Å (от $\sim 10^2$ до $\sim 10^{-3}$ нм). Данный тип излучения был описан в 1885 г. немецким ученым Вильгельмом Конрадом Рентгеном в научной работе «О новом типе лучей», в 1901 г. за данное открытие ему была присуждена первая Нобелевская премия по физике.

У рентгеновских лучей имеется 2 важных свойства: они проникают через объекты и могут проявляться на пленке. На изображении темные участки – менее плотная ткань (легкие), светлые участки – более плотная ткань (кости). Также рентгеновские лучи способны вызывать у некоторых веществ свечение (флуоресценцию). В настоящее время данный метод широко используется в науке и медицинской диагностике, однако имеет ограничения: 2D, доза радиации.

Компьютерная томография (КТ) – метод неразрушающего послойного исследования внутреннего строения предмета, основанный на измерении и сложной компьютерной обработке разности ослабления рентгеновского излучения различными по плотности тканями. В 1979 г. его изобретатели Годфри Хаунсфилдом и Алланом Кормаком также были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. В отличие от рентгена КТ применяет цифровую геометрическую обработку данных, позволяющую создать трехмерное изображение (3D) после того, как сделано много плоских двумерных (2D) изображений вокруг единственной оси вращения.

В качестве контрастных веществ используют: 1) препараты бария (сейчас используют редко); 2) воздух или другой инертный газ (закись азота) используют для расправления складок слизистой оболочки кишечника, чтобы можно было провести исследования стенок органов (метод пневмосканирования); 3) водорастворимые или жирорастворимые йодсодержащие препараты (Омнипак, Ультравист, Урографин), задерживают рентгеновские лучи с помощью стабильно связанного йода, применяют для исследования мягких тканей, новообразований, сосудов. Основным недостатком КТ является то, что в основе этого метода лежит использование для исследования рентгеновского излучения, таким образом, остается опасность получения дозы облучения.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) – способ получения томографических изображений с использованием явления ядерного магнитного резонанса; метод основан на измерении электромагнитного отклика атомных ядер, чаще всего ядер атомов водорода (возбуждении их определенным сочетанием электромагнитных волн в постоянном магнитном поле высокой напряженности). В отличие от КТ, в МРТ не используется ионизирующее излучение, что позволяет многократно проводить исследование, вести динамическое наблюдение за течением без риска облучения. Как и у других методов исследования, у магнитно-резонансной томографии имеются свои недостатки, в первую очередь связанные с необходимостью исключать металлические объекты.

Ультразвуковое исследование (УЗИ), сонография – неинвазивное исследование организма с помощью ультразвуковых волн. Физическая основа УЗИ – пьезоэлектрический эффект. Достигнув границы двух сред с различным акустическим сопротивлением, пучок ультразвуковых волн претерпевает существенные изменения: одна его часть продолжает распространяться в новой среде, в той или иной степени поглощаясь ею, другая – отражается. Коэффициент отражения зависит от разности величин акустического сопротивления граничащих друг с другом тканей. Разрешающая способность современных ультразвуковых аппаратов может достигать долей мм. Чем выше частота звуковой волны, тем выше разрешающая способность ультразвукового датчика. В системах медицинской ультразвуковой диагностики обычно используют частоты от 2 до 29 МГц.

Оптический биоимиджинг – это быстрый, точный и относительно недорогой метод визуализации. В последнее время значительное внимание уделяется биологическим и биомедицинским исследованиям с использованием генетически кодируемых биомаркеров, испускающих детектируемое свечение, что позволяет осуществлять мониторинг широкого спектра процессов. В зависимости от природы свечения, которое лежит в основе метода, различают флуоресцентный и биолюминесцентный имиджинг.

В случае флуоресцентного биоимиджинга в качестве маркеров используются флуорофоры, которые вводятся в организм экзогенно (например, индоцианин зеленый) либо продуцируются самими клетками (например, GFP-меченные белки). Ограничения флуоресцентного имиджинга обусловлены прежде всего наличием собственной флуоресценции тканей, которая создает высокий фоновый сигнал, снижающий чувствительность метода. Современные методы флуоресцентного имиджинга включают микроскопию сверхвысокого разрешения, многофотонный имиджинг с временным разрешением, методы FLIM, CARS, STED, FCS, FRET для исследования молекулярных внутриклеточных процессов.

Примером биолюминесцентного имиджинга является детекция свечения в системе люцифераза-субстрат. При этом ДНК, кодирующую люциферазу,

встраивают в геном целевых клеток, а субстрат вводится системно. Реакции окисления субстрата ферментом люциферазой соответствующего субстрата сопровождается испусканием кванта света с определенной длиной волны. Поскольку собственная биолюминесценция тканей крайне мала, данный подход позволяет осуществлять высокочувствительное детектирование сигнала. Оптимизированная люцифераза светляка (Luc2) используется для исследования генной экспрессии, процессинга РНК и белок-белковых взаимодействий, активности клеточных рецепторов, запрограммированной клеточной гибели, развития первичных опухолевых узлов для детектирования метастазов и др.

Методы оптического биоимиджинга (сбора информации об объекте путем наблюдения и регистрации оптических изображений) позволяют осуществлять мониторинг большинства биологических процессов. Они занимают центральное место в научных исследованиях, медицине, биотехнологии. Так, например, флуоресцентные зонды широко используются в секвенировании ДНК одиночных клеток, сортировке флуоресцентно-активированных клеток (флуоресцентный сортинг), клеточной терапии и других областях исследований. Различные подходы биоимиджинга применяются при изучении молекулярно-клеточных механизмов реализации поведенческих, когнитивных, мнестических функций мозга, в частности, высокоинформативными методами являются конфокальная и многофотонная лазерная сканирующая микроскопия.

1.2. Флуоресцентный биоимиджинг

Вопросы:

1. Основы процессов возбуждения и испускания.
2. Устройство эпи-флуоресцентного микроскопа: флуоресцентные источники, фильтры, объективы, камеры.
3. Мультиокрашивание живых клеток с использованием флуоресцентных зондов и флуоресцентных белков.
4. Параметры визуализации флуоресцентных белков.

Флуоресценция – это физический процесс, при котором флуорофор кратковременно поглощает квант света с последующей быстрой эмиссией другого кванта, который имеет свойства, отличные от исходного (большей длины волны). Флуоресценцией обычно называют излучательный переход возбужденного состояния с самого нижнего синглетного колебательного уровня S_1 в основное состояние S_0 . Типичное время жизни такого возбужденного состояния составляет 10^{-11} – 10^{-6} с.

Впервые флуоресценция была описана в 1852 г. британским ученым Джорджем Стоком (эксперимент с плавиковым шпатом). Правило Стокса: длина волны флуоресцентного испускания всегда больше длины волны света возбуждения.

Первые исследования в XIX в. продемонстрировали флуоресценцию многих образцов (кристаллов, смол, лекарственного сырья, хлорофилла, витаминов и др.). 1930-е гг. – применение флуорофоров в биологических исследованиях, развитие флуоресцентной микроскопии. 1960 г. – Осаму Симомуро в Принстонском университете выделен вместе с другим светящимся белком экворином из медузы *Aequorea victoria* зеленый флуоресцентный белок (GFP). В 2008 г. Осаму Симомура, Мартин Чалфи и Роджер Тсьен получили Нобелевскую премию по химии за открытие и разработку зеленого флуоресцентного белка GFP.

Устройство флуоресцентного микроскопа представлено на рисунке 1. Флуоресцентный микроскоп строится на базе прямого или инвертированного лабораторного микроскопа добавлением флуоресцентных модулей: осветителя отраженного света, туррели флуоресцентных фильтр-кубов, специального источника света, и, опционально, план полу апохроматическими объективами (флуотарами), с расширенной спектральной пропускной характеристикой.



Рисунок 1 – Устройство флуоресцентного микроскопа

Многочастотный свет от дуговой лампы или другого источника, проходя через селективный светофильтр возбуждения, преобразуется в свет с определенной длиной волны, обычно из ультрафиолетового, синего или зеленого участков спектра. Пропущенный фильтром возбуждения поток отражается от поверхности дихроматического зеркала или светоделителя и, пройдя через объектив, освещает образец интенсивным светом. Если образец флуоресцирует, испускаемый свет, собираемый объективом, опять проходит через дихроичное зеркало, после чего фильтруется запирающим (или эмиссионным) фильтром, который блокирует свет на длинах волн возбуждения.

Флуоресцентные источники света (осветитель) должны обладать самым главным свойством: высокая пиковая мощность в каждой интересующей нас зоне спектра, включая ультрафиолет. Распространенными флуоресцентными источниками являются ртутные дуговые лампы НВО, металлогалоидные лампы, ксеноновые источники, лазеры и светодиоды. Наиболее распространены являются ртутные лампы мощностью от 50 до 200 ватт и ксеноновые лампы мощностью от 75 до 150 ватт. Эти лампы обычно питаются от внешнего источника постоянного тока, достаточного для того, чтобы зажечь дуговой разряд через ионизацию паров высокого давления и поддерживать его горение с минимальным мерцанием. Внешний источник питания лампы обычно снабжен таймером для отслеживания отработанных часов, шторкой (shutter) и контролером интенсивности освещения.

Ртутная лампа НВО – самый распространенный осветитель, используется как в рутинных лабораторных микроскопах, так и в высококачественных исследовательских системах, удобный и относительно недорогой осветитель, обладающий высокой мощностью. Максимум их интенсивности приходится на ближний ультрафиолет (отчетливые пики возникают на 313, 334, 365, 406, 435, 546 и 578 нм, на других длинах волн видимого спектра интенсивность стабильна, хотя и не так высока). Недосток – необходимость центровки лампы при установке и относительно короткий срок службы (от 100 до 300 ч в зависимости от модели).

Металлогалоидные флуоресцентные осветители: срок службы в 2000 ч, отсутствие необходимости юстировки, хорошие спектральные характеристики. Минус – стоит гораздо дороже ртутных ламп НВО.

Светодиодные источники света – самое перспективное направление из новых технологий в микроскопии, универсальные полупроводниковые осветители, которые обладают всеми функциями ламп накаливания и газоразрядных ламп, имея при этом возможность работать от батареек, а также низковольтных и недорогих импульсных блоков питания. Обладают меньшей мощностью чем ртутные и металлогалоидные осветители.

Лазеры: широко применяются в конфокальных системах, мощность лазеров огромна, спектральная характеристика представляющая полосу пропускания в узком диапазоне (1-2 нм), высокая производительность и срок службы. Преимущества – небольшой размер, малая расходимость пучка, высокая степень монохроматичности и высокая средняя светимость, основной недостаток – стоимость.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, КЛСМ – в качестве источника света используется лазер, также имеется точечная диафрагма (пинхол, pinhole), размещенная в плоскости изображения и ограничивающая поток фонового рассеянного света излучаемого не из фокальной плоскости объектива (обеспечивает четкость изображения).

Явление *двухфотонного возбуждения* возникает из-за одновременного поглощения двух фотонов в одном квантованном событии. Поскольку энергия фотона обратно пропорциональна его длине волны, два поглощенных фотона

должны иметь длину волны примерно вдвое больше, чем требуется для возбуждения одного фотона. Например, флуорофор, который обычно поглощает ультрафиолетовый свет (длина волны приблизительно 350 нм), может также возбуждаться двумя фотонами инфракрасного света (длина волны приблизительно 700 нм), если оба они одновременно достигают флуорофора.

Флуоресцентные фильтры задают область спектра возбуждающего пучка и область спектра, попадающую на детектор. Распространяясь вдоль осветителя перпендикулярно оптической оси микроскопа, возбуждающий свет проходит сквозь собирающие линзы, регулирующую и центрируемую апертурную диафрагму, а затем через регулирующую центрируемую полевую диафрагму. После этого свет попадает на фильтр возбуждения, где происходит отбор длин волн из требуемого интервала и блокирование остальных длин волн.

Отобранные длины волн достигают дихроичного светоделительного зеркала, являющегося специальным интерференционным фильтром, эффективно отражающим коротковолновый и эффективно пропускающим длинноволновый свет. Дихроичный светоделитель наклонен под углом 45 градусов по отношению к падающему на него возбуждающему свету и отражает его под углом 90 градусов через объектив оптической системы прямо на образец. Флуоресценция, испускаемая освещенным образцом, собирается объективом, выполняющим теперь уже свою обычную функцию, а именно формирование изображения. Поскольку испускаемые длины волн больше длин волн возбуждения, они проходят через дихроичное зеркало вверх к наблюдательным тубусам или электронному детектору.

Эффективность разделения и регистрации длин волн возбуждения и испускания достигается во флуоресцентной микроскопии правильным выбором светофильтров, блокирующих или, наоборот, пропускающих свет определенных длин волн в ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной области спектра. Контроль возбуждающего света производится в вертикальных флуоресцентных осветителях благодаря тому, что в их конструкции предусмотрено использование легко сменяемых фильтров (нейтральных и интерференционных светофильтров возбуждения), вставляемых на пути света к образцу и на обратном пути между образцом и тубусами наблюдения или системой приема сигнала

В принципе, существуют три основных категории фильтров: фильтры возбуждения (часто просто называемые возбудителями), запирающие (эмиссионные) фильтры и дихроичные светоделители (или дихроичные зеркала). Дихроичные светоделители являются специальными интерференционными фильтрами, предназначенными для отражения или пропускания света определенных длин волн, помещаемых на световом пути под углом 45 градусов. Запирающие фильтры изготавливаются на основе либо цветного стекла, либо интерференционных покрытий (либо их комбинации).

Для обозначения характеристик фильтров возбуждения применяется различная аббревиатура: ультрафиолетовое стекло – UG, синее стекло — BG;

на узкополосных фильтрах – КР (К от немецкого «kurz», что переводится как «короткий») или просто SP; интерференционные фильтры маркируются IF.

Сокращения и аббревиатуры для запирающих фильтров бывают следующими: LP или L для широкополосных фильтров, Y или GG для желтого (от немецкого «gelb» — «желтый») стекла, R или RG для красного стекла, OG или O для оранжевого стекла, K для щелевых фильтров (от немецкого «kante» — край), и BA для запирающих фильтров. Если в маркировке фильтра стоит число, как например BA515, оно обозначает длину волны (в нанометрах), на которой он имеет половину от максимального коэффициента пропускания.

Дихроичные светоделители также маркируются различными аббревиатурами: CBS обозначает хроматический светоделитель, DM — дихроичное зеркало, ТК — щелевой делитель (от немецкого «teiler kante»), FT — делитель цвета (от немецкого «farb teiler») и РКР — узкополосный отражатель.

Например, маркировка среднеполосного фильтра синего возбуждения Nikon B-2E дает нам следующую информацию. Первая буква в принадлежащей компании Nikon системе буквенно-цифровых обозначений указывает на область спектра возбуждения (например, UV, V, B, и G являются сокращениями от английских слов «ultraviolet» – ультрафиолетовый, «violet» - фиолетовый, «blue» - синий, и «green» – зеленый, соответственно). Число, следующее за кодировкой спектра возбуждения, обозначает ширину полосы пропускания фильтра возбуждения: 1 – соответствует узкополосному возбуждению, 2 – среднеполосному, и 3 – широкополосному возбуждению. И, наконец, одна или несколько букв, следующих за числом, соответствующим ширине полосы возбуждения, обозначают характеристики запирающего фильтра. Буква A указывает на стандартный широкополосный запирающий фильтр с самой низкой длиной волны отсечки, B обозначает широкополосный запирающий фильтр, имеющий более высокую волну отсечки. Обозначение E (от английского «enhanced» – усиленный) в полосовых эмиссионных фильтрах указывает на улучшенные характеристики в смысле сокращения интерференционного взаимодействия разделяемых сигналов. Обозначение E/C указывает на комбинацию мягких интерференционных покрытий, разработанных специально для работы с такими специфическими красителями (DAPI, FITC, TRITC и тexasский красный).

Объективы также имеют свою маркировку (рисунок 2). Разрешающая способность и яркость определяются числовой апертурой, которая является наиболее важным критерием при выборе объектива. Числовая апертура определяет количество света, проходящего через переднюю линзу, поэтому для количественного анализа изображений флуоресцентных белков следует выбирать максимально возможную числовую апертуру.



Рисунок 2 – Устройство объектива флуоресцентного микроскопа

Необходимо избегать чрезмерного увеличения при выборе объектива для наблюдения флуоресцентных белков (и, собственно говоря, других флуорофоров). Простым цифровым увеличением (трансфокацией) при формировании изображения на конфокальном микроскопе с объективом 40x можно получить снимок, эквивалентный по масштабу тому, который был получен с помощью объектива 100x. Разрешающая способность обоих объективов одинакова, поскольку равны их числовые апертуры.

Камеры для флуоресцентной микроскопии должны быть высокочувствительными и обладать достаточным разрешением для работы на объективах от 20x до 100x (обычно от 1 до 5 мегапикселей). Про необходимое разрешение микроскопных камер вы можете прочитать в соответствующей статье на нашем сайте. Чувствительность камеры, высокое соотношение сигнал/шум, хорошее охлаждение – первое на что стоит обращать внимание при выборе камеры для установки на флуоресцентный микроскоп. Флуоресцентные камеры часто черно-белые. Красочные флуоресцентные картинки получаются окрашиванием изображения в отдельных каналах в так называемые псевдоцвета. Это происходит в графическом редакторе, или в специальном программном обеспечении, решающем вопросы мультиканальной флуоресценции – объединения флуоресцентных изображений нескольких каналов в одно итоговое.

Флуорофор (или флуорохром, аналогично хромофору) – это флуоресцентное химическое соединение, которое может повторно излучать свет при возбуждении светом. Флуорофоры обычно содержат несколько комбинированных ароматических групп или плоских или циклических молекул с несколькими π-связями.

Одним из самых популярных флуорофоров является флуоресцеин, производное изотиоцианата FITC, реагирующее с амином. Данные

флуоресцентные красители широко применяются для маркировки антител, окрашивания нуклеиновых кислот, в тестах на жизнеспособность и т.д. Другие исторически распространенные флуорофоры представляют собой производные родамина (TRITC), кумарина и цианина. Современные флуорофоры, многие из которых являются запатентованными, имеют улучшенные свойства, являются более фотостабильными, яркими, стабильными в большем диапазоне условий (рН, температура и др.), чем традиционные красители со сравнимым возбуждением и излучением.

Флуоресцентные белки – важнейший инструмент в современных биологических исследованиях. В настоящее время имеется большая палитра флуоресцентных белков, которые могут выступать удобными генетически кодируемыми маркерами для анализа активности промоторов и прижизненной локализации клеток, клеточных органелл и белков по флуоресцентному сигналу.

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 нм (основной) и 475 нм (минорный) и пиком флуоресценции на 509 нм. Белок состоит из 238 аминокислот с молекулярной массой 26,9 кДа. Белок представляет собой типичную бета-складчатую структуру, формирующую «бочонок» или «цилиндр» из 11 поворотов первичной последовательности, внутри которого находится флуорофор. В гидрофобном окружении в центре зеленого флуоресцентного белка происходит реакция между карбоксильным углеродом в Сер-65 и азотом аминогруппы в Гли-67, которая приводит к образованию имидазолин-5-онового гетероциклического азотного кольца. Дальнейшее окисление ведет к объединению имидазолинового кольца с Тир-66 и созреванию флуоресцентной формы.

Для решения частных исследовательских задач и усовершенствования метода наблюдения флуоресценции в различных биологических системах на основе GFP был создан ряд других флуоресцентных белков. Первым шагом была оптимизация созревания белка для флуоресценции при температуре 37 °С. Созревание флуорофора исходного типа вполне эффективно при 28 °С, но увеличение температуры до 37 °С приводит к существенному ухудшению созревания и уменьшению флуоресценции. Мутация остатка фенилаланина в позиции 64 (Фен-64) в лейцин улучшает созревание белка для флуоресценции при 37 градусах, которая, по меньшей мере, не хуже наблюдаемой при 28 градусах. Максимум возбуждения зеленого флуоресцентного белка можно сдвинуть к 488 нм (в голубой диапазон) с помощью точечной мутации, заменяющей серин в позиции 65 на остаток треонина (S65T). Эта мутация присутствует в большинстве распространенных вариантов зеленого флуоресцентного белка, называемых усиленным GFP (EGFP), которые выпускаются серийно в широком диапазоне векторов. EGFP имеет более яркое свечение, единственным недостатком EGFP является слегка повышенная чувствительность к рН и некоторая тенденция к димеризации.

Желтый флуоресцентный белок был получен путем замены треонинового остатка 203 на тирозин, что привело к 20-нанометровому сдвигу в сторону длинных волн как спектра возбуждения, так и эмиссионного спектра. Дальнейшие усовершенствования привели к разработке усиленного желтого флуоресцентного белка (EYFP), который является одним из наиболее ярких и распространенных среди флуоресцентных белков. Будучи спаренным с усиленным голубым флуоресцентным белком (ECFP) или GFP2, усиленный желтый флуоресцентный белок также показал свою эффективность в экспериментах по переносу энергии. Однако, желтый флуоресцентный белок слишком чувствителен к кислым средам и теряет приблизительно половину своего свечения при pH 6,5. К тому же, EYFP оказался чувствителен к ионам хлорида и фотообесцвечивается гораздо быстрее зеленых флуоресцентных белков.

Синий и голубой варианты зеленого флуоресцентного белка получают прямой модификацией тирозинового остатка в позиции 66 (Тир-66) в исходном флуорофоре. Конверсия этой аминокислоты в гистидин приводит к синему свечению с максимумом на 450 нм, а конверсия в триптами́н — к основному пику флуоресценции на 480 нм с плечом на длине около 500 нм. Данные красители флуоресцируют весьма слабо, и для повышения эффективности укладки и общей яркости требуются вторичные мутации. Но даже с этими модификациями усиленные версии этого класса флуоресцентных белков (EBFP и ECFP) флуоресцируют лишь с 25-40-процентной яркостью в сравнении с EGFP. Среди усовершенствованных голубых флуоресцентных белков AmCyan1 (AmГолубой1) и усиленный голубой вариант, называемый Cerulean (Лазурный) оказались наиболее перспективными.

Спектр поглощения YFP довольно сильно пересекается со спектром флуоресценции CFP, поэтому эти два флуорофора используются для создания биосенсоров, в основе работы которых лежит явление Ферстеровского переноса энергии (FRET) — механизм переноса энергии между двумя хромофорами (от донора к акцептору), который происходит без промежуточного испускания фотонов и является результатом диполь-дипольного взаимодействия между донором и акцептором. Такие сенсоры используются для выявления определенных событий, происходящих в живых клетках. В частности, таким образом можно определять активность ферментов.

Как правило, молекула такого сенсора включает в себя 4 домена: 1) белок, являющийся носителем сенсора (это может быть практически любой белок); 2) флуорофор CFP; 3) домен, меняющий свою структуру в ответ на определенное воздействие (например, фосфорилирование); 4) флуорофор YFP.

При облучении такого сенсора лазером с длиной волны, возбуждающей только CFP (например, 440 нм — почти не возбуждает YFP, но сильно возбуждает CFP), можно наблюдать флуоресценцию обоих флуорофоров. После соответствующего воздействия на домен 3 происходит изменение структуры сенсора, в результате чего флуорофор YFP отдалается от CFP и эффективность Ферстеровского переноса падает (в зависимости от того, на

какое расстояние флуорофоры были отдалены друг от друга). В результате интенсивность флуоресценции CFP возрастает, а YFP — падает. Таким образом, по отношению флуоресценции YFP к флуоресценции CFP можно количественно оценить изменение конформации биосенсора.

Красные флуоресцентные белки были созданы на основе белка тропических рифовых кораллов *Discosoma striata* (дискосомы полосатой), поскольку создание мутантов из GFP медузы *Aequorea victoria* не увенчалось успехом за пределами желтого диапазона. Первым был получен DsRed (DsКрасный), имеющий максимум флуоресценции на 583 нм и два пика в спектре возбуждения: основной на 558 нм и другой на 500 нм. Данный белок имеет ряд проблем: созревание флуоресценции DsКрасного происходит медленно и проходит через стадию зеленого флуоресцентного свечения (артефакт), может быть токсичен, DsКрасный также является тетрамером и может образовывать в живых клетках большие белковые соединения.

На основе данного белка был создан DsRed2 (DsКрасный2), который несет в себе несколько мутаций в пептидно-аминном сайте терминации транскрипции, которые предотвращают формирование белковых групп и сокращают токсичность. К тому же, при этих модификациях сокращается время созревания флуорофора. Белок DsКрасный2 по-прежнему образует тетрамер, но более сочетаемый с GFP в экспериментах по мультиокрашиванию благодаря более быстрому созреванию. DsRed-Express (DsКрасный-Экспресс) обладает более быстрым созреванием: уже через 1 час после экспрессии, в сравнении с 6 часами для DsКрасного2 и 11 часами для DsКрасного. Для дрожжей разработан оптимизированный вариант — RedStar (Красная звезда), который тоже отличается ускоренным созреванием и повышенной яркостью.

Флуоресцентные белки достаточно универсальны и успешно применяются почти во всех биологических дисциплинах от микробиологии до системной физиологии. Используются в качестве репортерных молекул в изучении экспрессии генов в культивируемых клетках, тканях и живых организмах. В живых клетках флуоресцентные белки обычно применяются для наблюдения местоположения и динамики белков, органелл и других клеточных компартментов. Имеются различные методики гибридизации флуоресцентных белков и усиления их экспрессии в клетках млекопитающих и других системах. Основным средством доставки химерных генетических последовательностей флуоресцентных белков в клетки являются бактериальные плазмиды и вирусные векторы, полученные методами генной инженерии (рисунок 3).

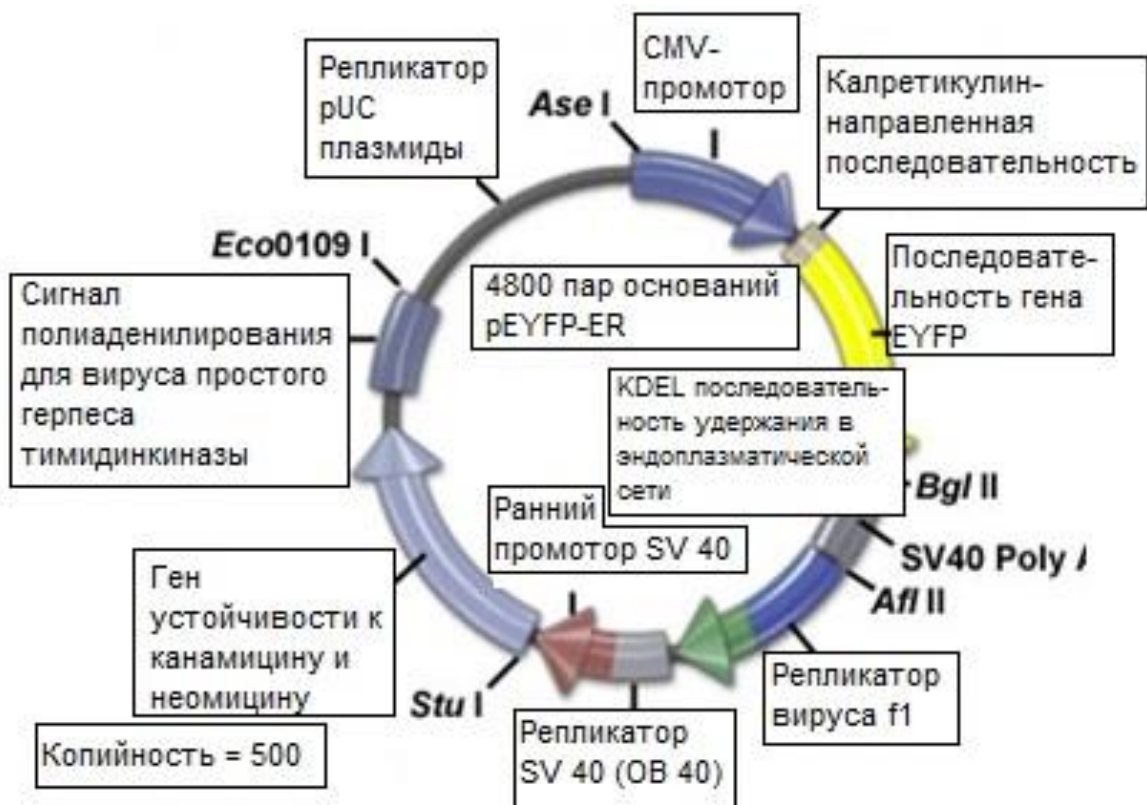


Рисунок 3 – Рестрикционный фермент и генетическая карта серийно выпускаемого деривата бактериальной плазмиды

Гены флуоресцентных белков могут быть введены в клетки млекопитающих и другие клетки с помощью соответствующих временных (72-96 ч) или стабильных векторов (обычно это плазмиды или вирусы). Базовая конфигурация плазмидного вектора, способного обеспечить перенос генов флуоресцентного белка, имеет несколько необходимых компонентов. Плазмиды должны содержать нуклеотидные последовательности прокариотной клетки, кодирующие начало репликации ДНК в бактерии, и ген устойчивости к антибиотику (челночными последовательностями, обеспечивают размножение и отбор плазмид в бактерии-хозяине для производства необходимого количества векторов для трансфекции в клетки млекопитающих). В дополнение, плазмиды должны содержать один или несколько эукариотических генетических элементов для управления началом транскрипции информационной РНК, сигнал полиаденилирования в клетках млекопитающих, интрон (необязательно) и ген для ко-селекции в клетках млекопитающих. Транскрипционные элементы необходимы для экспрессии представляющего интерес гибридного белка в клетке-хозяине млекопитающего, а селективным геном обычно является антибиотик, обеспечивающий устойчивость содержащих плазмиды клеток.

1.3. Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии

Вопросы:

1. Методы определения свободных радикалов.
2. Особенности детекции повреждений ДНК.
3. Метод ДНК-комет.

Свободные радикалы – это молекулы, содержащие один или несколько неспаренных электронов на внешней электронной оболочке. В биологических системах наиболее важными свободными радикалами являются активные формы кислорода, азота, карбонильные и алкильные радикалы. Активные формы кислорода (АФК) считаются одними из древнейших стрессоров на Земле. Термин АФК включает в себя вещества, содержащие один или более активированных атома кислорода, но не обязательно радикалы (например, H_2O_2 не радикал). Свободные радикалы – это любые химические соединения, которые существуют независимо и имеют один неспаренный электрон(ы). Некоторые свободные радикалы не имеют атома кислорода, например переходные металлы, углеродные радикалы. И АФК, и свободные радикалы содействуют развитию оксидативного стресса, окисляя различные соединения клетки.

Триpletный кислород (O_2) может потерять спиновое ограничение, акцептировав один электрон, например, при утечке электронов ЭТЦ растительной клетки или благодаря работе НАДФ-оксидазы. Это приводит к образованию $O_2^{\cdot-}$ (супероксид анион радикал, или просто супероксид), который более реактивный, чем O_2 . Период полураспада супероксида обычно составляет от 1 до 1000 мкс, что позволяет ему диффундировать только на несколько микрометров от места образования.

В зависимости от используемых средств и методов измерения, биосинтез $O_2^{\cdot-}$ варьируется в плане кинетики, продолжительности и интенсивности, и сопровождает реакцию растений на основные стрессоры, такие как засоление, засуха, гипо- и гипертермия, тяжелые металлы, УФ и др. $O_2^{\cdot-}$ образуется в течение нескольких секунд после воздействия стрессора или при добавлении гормона стресса, но иногда это занимает несколько часов, прежде чем можно наблюдать синтез $O_2^{\cdot-}$ на заметных уровнях. Количественное измерение $O_2^{\cdot-}$ не имеет смысла, поскольку эта молекула короткоживущая и образуется локально. Тысячи исследователей обнаружили, что происходит стресс-индуцируемое повышение активности супероксиддисмутазы, однако немногие из них реально занимались обнаружением биосинтеза $O_2^{\cdot-}$ в ответ на стресс. Ряд флуоресцентных (дигидрородамин 123, MitoSOX и др.), колориметрических (нитросиний тетразол) и люминесцентных (люминол, люсидженин, коэлентеразин и др.) зондов были использованы для обнаружения $O_2^{\cdot-}$. Тем не менее, эти красители не обладают исключительной специфичностью к $O_2^{\cdot-}$. Люсидженин, нитросиний тетразол и дигидрородамин в процессе окисления/восстановления сами генерируют $O_2^{\cdot-}$, что приводит к артефактам.

Сравнительно недавно было показано, что дигидроэтидиум (ДГЭ) является флуоресцентным зондом с высокой специфичностью к $O_2^{\cdot-}$ (рисунок 4).

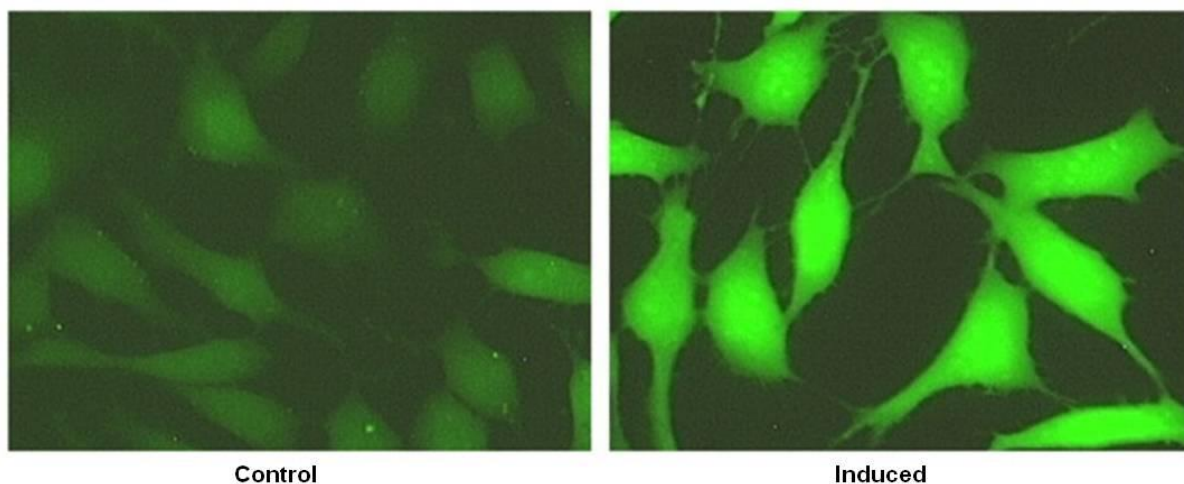


Рисунок 4 – Клетки НЕК 293 окрашенные дигидроэтидиумом в контрольных условиях (Control) и в состоянии оксидативного стресса (Induced)

ДГЭ взаимодействуя с $O_2^{\cdot-}$ формирует двухэлектрон окисленный продукт, в то время как другие ключевые АФК, такие как оксид азота, гидроксильный радикал, H_2O_2 , пероксинитрит и хлорноватистая кислота при окислении дигидроэтидиума не дают этого продукта. ДГЭ сейчас успешно используется для детекции $O_2^{\cdot-}$ при оксидативном стрессе, вызванном тяжелыми металлами в культуре клеток растений, корнях и листьях. Таким образом, дигидроэтидиум выглядит перспективным способом доказательства специфического формирования $O_2^{\cdot-}$ при стрессовых реакциях у растений. Единственной проблемой ДГЭ является его высокая нестабильность (быстрое разложение в водных растворах).

Метод ДНК-комет (Comet assay, электрофорез одиночных клеток) является наиболее широко используемым подходом для измерения повреждений ДНК в эукариотических клетках. Данный метод основан на движении ядерной ДНК в агарозном геле под действием электрического поля. Считается, что неповрежденная ДНК сохраняет высокоорганизованную ассоциацию с матриксными белками в ядре, и когда ДНК повреждена (химическими веществами или УФ-излучением), эта организация нарушается. Под действием электрического поля отдельные нити ДНК теряют свою компактную структуру и дрейфуют из ядра в агарозный гель. ДНК имеет общий отрицательный заряд и притягивается к положительно заряженному аноду. Неповрежденная ДНК не перемещается, тогда как поврежденная ДНК (более мелкие фрагменты) может свободно мигрировать от ядра. Простыми словами: количество ДНК, покидающая ядро, является мерой степени повреждения ДНК клетки. Чем ярче и длиннее хвост ДНК кометы, тем выше уровень повреждения ДНК в отдельной клетке (рисунок 5).

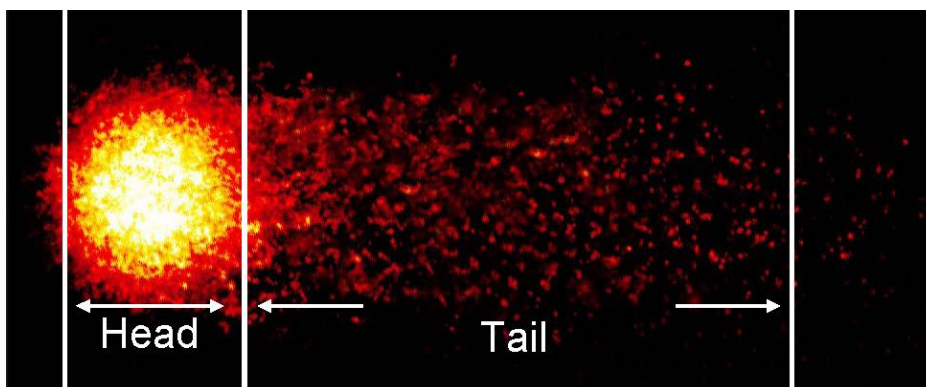


Рисунок 5 – Строение ДНК-кометы. Head – голова кометы (крупные неповрежденные фрагменты ДНК), Tail – хвост кометы (мелкие поврежденные фрагменты ДНК)

В настоящее время существует девять разновидностей методики ДНК-комет (кометный анализ) для детекции различных повреждений ДНК.

1. Щелочной кометный анализ. Используется для обнаружения однонитевых разрывов ДНК с диапазоном чувствительности от нескольких сотен до нескольких тысяч разрывов на клетку, что позволяет определять естественные и экспериментальные повреждения.

2. Нейтральный кометный анализ. Кометный анализ в нейтральных условиях позволяет обнаруживать двуцепочечные разрывы ДНК, которые считаются биологически значимыми радиационно-индуцированными поражениями.

3. Кометный анализ при рН 12,1. Анализ при рН 12,1–12,4 позволяет определять прямые одноцепочечные разрывы и одноцепочечные разрывы, связанные с сайтами неполной эксцизионной репарации и поперечными сшивками. При электрофорезе при рН выше 12,6 кроме указанных одноцепочечных разрывов детектируются одноцепочечные разрывы связанные со щелочлабильными участками ДНК.

4. Кометный анализ с ферментами репарации ДНК. При данном анализе иммобилизованные клетки обрабатываются ферментами, которые связываются с поврежденными участками ДНК, вызывают разрывы (одно- и двуцепочечные). Этот метод позволяет определять повреждения ДНК, не связанные напрямую с разрывами ДНК.

5. Бесклеточный кометный анализ. Является одной из модифицированных версий анализа комет, в котором на предметных стеклах иммобилизируются необработанные клетки, которые уже после этапа лизиса подвергаются воздействию тестируемых агентов, а затем обрабатываются в соответствии со стандартным протоколом анализа комет. Данный вариант методики позволяет максимально снизить влияние любых биологических событий, влияющих на образование и/или исчезновение разрывов ДНК.

6. Анализ комет-FISH. Анализ комет-FISH – это техника, которая позволяет обнаруживать повреждения и репарацию ДНК в определенных областях генов и хромосом. Данная техника сочетает в себе два хорошо зарекомендовавших себя метода: анализ ДНК-комет (гель-электрофорез

одиночных клеток) и флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). Comet-FISH применяется для обнаружения специфических разрывов в участках ДНК, имеющих значение для развития различных заболеваний, а также для изучения распределения повреждений ДНК и репарации в отдельных областях генома. Кроме того, с помощью Comet-FISH можно обнаружить модификации последовательности ДНК в отдельных клетках. В то время как результаты анализа комет сами по себе отражают только уровень общего повреждения ДНК, добавление метода FISH позволяет отнести исследуемые последовательности к поврежденной или неповрежденной части кометы (хвосту или голове соответственно).

7. Анализ ДНК-комет с маркировкой бромдезоксимуридином для обнаружения репликации ДНК. Мечение ДНК бромдезоксимуридином (BrdUrd) и иммулокализацией BrdUrd позволяет оценить репликативную целостность ДНК единичной клетки. Метод позволяет обнаружить наличие разрывов цепей в недавно реплицированных доменах ДНК, связанных с остановкой полимераза при их прохождении через повреждения, вызванные УФ-облучением или химическими веществами.

8. Обнаружение неполных сайтов эксцизионной репарации ДНК. В дополнение к непосредственно индуцированному разрыву цепи, также можно обнаружить процессы, которые вводят одноцепочечные разрывы в ДНК, такие как надрезы во время процессов эксцизионной репарации. Некоторые специфические классы повреждений оснований ДНК могут быть обнаружены с помощью кометного анализа в сочетании со специфическими для повреждения эндонуклеазами. Эти ферменты, нанесенные на предметные стекла в течение короткого времени после лизиса, разрезают ДНК в местах специфических изменений оснований и уже данные разрывы могут быть количественно оценены с помощью методики ДНК-комет.

9. Гало-анализ или неэлектрофоретический кометный анализ. Данная методика была разработана как более быстрая и простая альтернатива классическому кометному анализу и используется в первую очередь для предварительного скрининга для оценки потенциала повреждения ДНК химическими агентами. Гало-анализ основан на наблюдении, что фрагментированная ДНК из поврежденных клеток радиально отделяется от интактного хроматина после инкубацией в щелочном растворе, т. е. без длительной стадии лизиса, электрофореза и длительного анализа комет. Исключение этих этапов сокращает как общее время эксперимента, так и затраты на его проведение.

Классический вариант обнаружения одно- и двухцепочечных разрывов ДНК – нейтральный и щелочной кометный анализ. Для этого предметные стекла покрываются 0,8 % агарозой с температурой плавления 70-80 °С. Для этого предварительно очищенные предметные стекла помещаются в сосуды Коплина с расплавленной агарозой на 3 минуты. После, агароза удаляется с нижней стороны предметного стекла с помощью фильтровальной бумаги. Стекла покрытые агарозой высушиваются при температуре 20 °С в течение

24 ч. Непосредственно перед использованием стекла нагреваются до 30-40 °С на термоплитке. Для иммобилизации клеток на предметных стеклах используется свежеприготовленный раствор 0,7 % агарозы с низкой температурой плавления (не более 40 °С) в фосфатно-солевом буфере следующего состава (PBS) 10x на 1 л: NaCl 80 г, KCl 2 г, KН₂РO₄ 2,1 г, Na₂НРO₄ 3,9 г (рН = 7,4). Расплавленная агароза помещается в эппендорфы по 700 мкл (агароза не должна остывать ниже 40 °С). Свежезамороженный растительный материал (-80 °С) измельчается с помощью лезвия в небольшом количестве буфера PBS с добавлением 10 ммоль/л ЭДТА на льду. Полученную суспензию отфильтровывают в эппендорфы с помощью фильтра Partec (Германия) с размером ячеек 50 мкм. Затем, 80 мкл переносятся в эппендорфы с агарозой и аккуратно перемешиваются с помощью пипетирования. Если в работе используются животные клетки, то их суспензия сразу помещается в агарозу. Затем, на каждое предметное стекло наносят по 2 капли суспензии из агарозы и клеток в объеме 80 мкл. Капли сразу накрываются покровными стеклами. Предметные стекла помещаются в ледяную баню на 5-7 мин. После этого покровные стекла аккуратно снимаются, а предметные стекла, содержащие иммобилизованные клетки помещаются в буфер для лизиса следующего состава: 2,5 моль/л NaCl, 10 ммоль/л Трис-основание, 0,1 моль/л ЭДТА, 1 % лаурилсаркозинат натрия (рН = 10 (NaOH)). Лизис проводят в темноте при 20 °С в течение 1 ч.

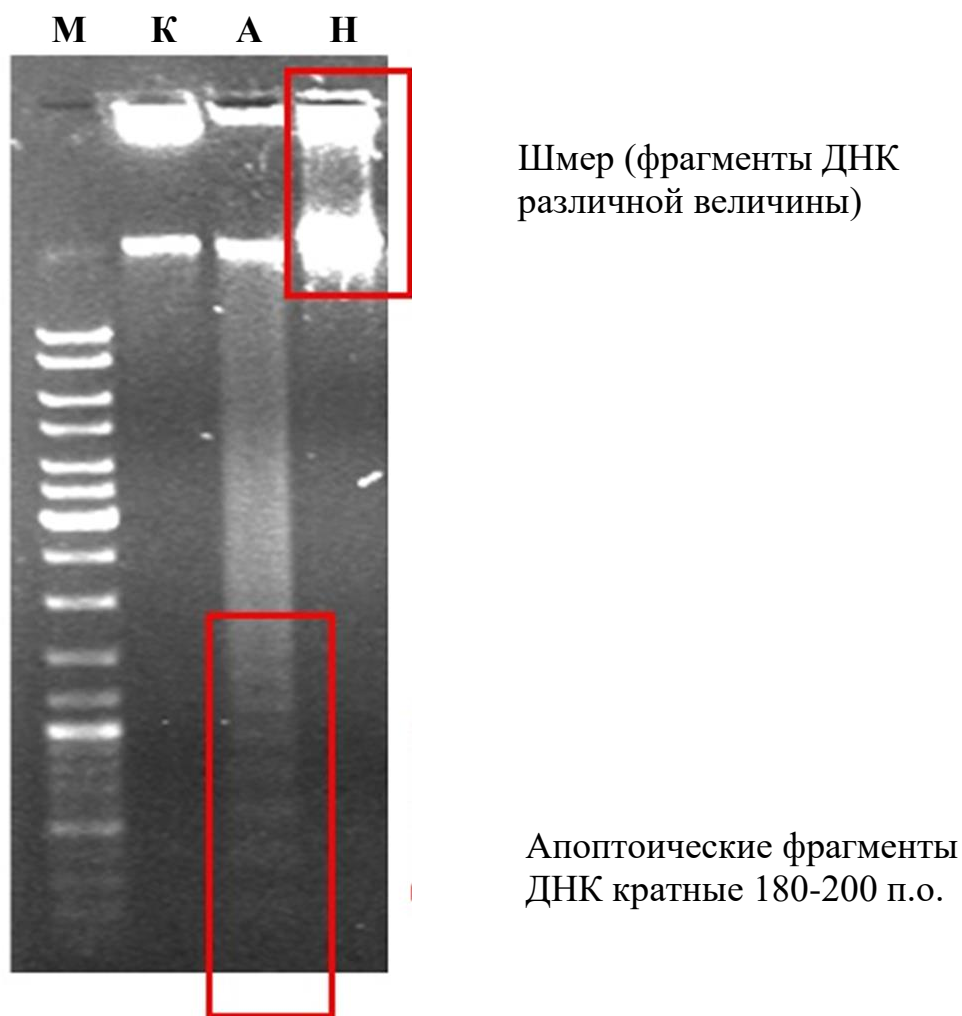
Для детекции одноцепочечных разрывов ДНК перед промывкой в буфере для лизиса предметные стекла помещаются в 0,3 моль/л NaOH и 5 ммоль/л ЭДТА. После лизиса стекла с иммобилизованными клетками помещаются в 1x трис- ацетатный буфер (ТА) 10x: 3 моль/л Na-ацетат, 1 моль/л Трис-основание (рН = 9 (уксусная кислота)) буфер на 15 мин для отмывки стекол от буфера для лизиса (детекция двухцепочечных разрывов). Лизис и последующие этапы до конца электрофореза проводятся в темноте. После отмывки стекла с клетками помещались в камеру для электрофореза в 1x ТА буфер. Время электрофореза зависит от размера генома клеток и для классического модельного растения *Arabidopsis thaliana* составляет 2 мин при напряжении 1 В/см (300 А).

После электрофореза стекла помещаются последовательно в 70 % и 96 % охлажденный этанол на 5 мин в каждый из растворов. Затем стекла высушиваются в течение 24 ч при температуре 20 °С. Непосредственно перед микроскопией каждый гель на стекле окрашивается красителем, связывающимся с ДНК.

ДНК-лэддеринг – метод детекции специфических повреждений ДНК основанный на наблюдении апоптотической фрагментации ДНК, после разделения с помощью гель-электрофореза (рисунок 6). Впервые он был описан в 1980 году Эндрю Уилли (*Andrew Wyllie*) из Медицинской школы Эдинбургского университета. Фрагменты ДНК также могут быть обнаружены в клетках, подвергшихся некрозу, но, когда эти фрагменты ДНК после

разделения подвергают гель-электрофорезу, четкой «лестницы» не наблюдается. Лестничная структура ДНК является отличительной чертой ДНК, расщепленной каспаз-активируемой ДНКазой – ключевым событием во время апоптоза. ДНКаза расщепляет геномную ДНК в межнуклеосомных линкерных областях, в результате чего образуются фрагменты ДНК, длина которых кратных 180–200 пар оснований. Разделение фрагментов с помощью электрофореза в агарозном геле и последующая визуализация позволяет обнаружить «лестницу» из фрагментов ДНК расщепленной во время апоптоза.

ДНК-лэддеринг можно использовать только для обнаружения апоптоза на поздних стадиях, когда происходит непосредственно процесс фрагментации ДНК. Чтобы повысить точность определения апоптотической фрагментации ДНК, наряду с ДНК-лэддерингом используются другие техники, например TUNEL.



**Рисунок 6 – Электрофоретическое разделение тотального ДНК клеток:
М – ДНК маркер, К – контроль, А – апоптоз, Н – некроз**

Метод TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) представляет собой технику обнаружения фрагментации ДНК путем мечения 3'-гидроксильных концов в двухцепочечных разрывах ДНК, образующихся во время апоптоза. Данный метод широко используется для идентификации и количественного определения клеток с апоптозом или для обнаружения большого количества разрывов ДНК в отдельных клетках. Анализ основан на использовании терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT), фермента, который катализирует присоединение дезоксирибонуклеотидов, меченных флуорохромом или другим маркером, к 3'-гидроксильным концам двуцепочечных разрывов ДНК. Он также может метить клетки, ДНК которых повреждена не в ходе апоптоза, а другими способами. Для анализа количества клеток с поврежденной ДНК с помощью метода TUNEL чаще всего используется световая микроскопия, хотя возможна сортировка клеток с помощью проточной цитометрии (рисунок 7).

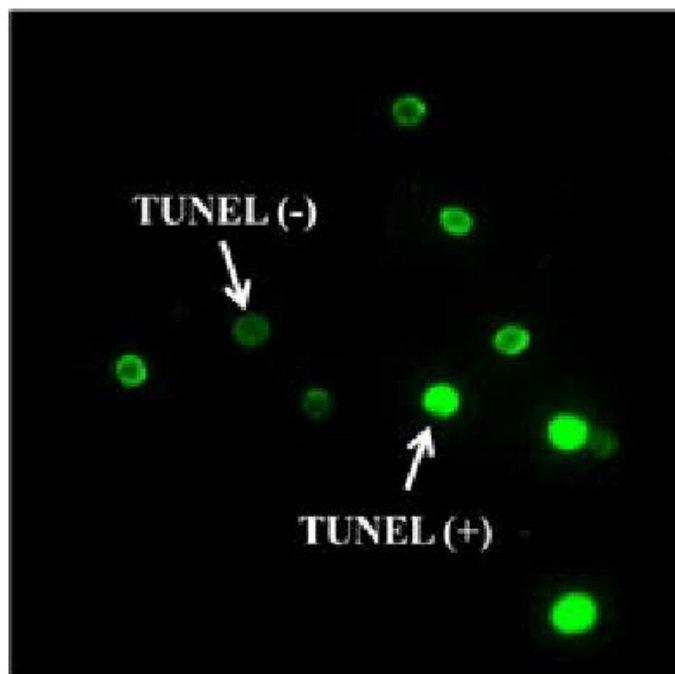


Рисунок 7 – Флуоресцентная микрофотография сперматозоидов с апоптоически поврежденной ДНК (ярко-зеленые, TUNEL (+)) и с нормальной ДНК (светло-зеленые, TUNEL (-)). Увеличение × 100

В качестве флуорохромов чаще всего используется нуклеотиды, конъюгированные с флуоресцентным зондом FITC, нуклеотиды, меченные биотином, которые затем связываются стрептавидином и обнаруживаются с использованием хромогенного субстрата пероксидазы хрена, такого как тетрагидрохлорид диаминобензидина, для получения коричневого цвета, а также нуклеотиды, меченные бромдигоксигенином который затем связывается антителом, специфичным для этой метки. Антитело метят либо флуоресцентным красителем, либо ферментом, таким как пероксидаза хрена, для хромогенного обнаружения. Протоколы анализа TUNEL, в которых

используется нуклеотид, непосредственно помеченный флуоресцентным красителем, быстрее, чем непрямые методы, в которых используются либо антитела, либо комплекс стрептавидин-биотин, поскольку они требуют меньше этапов окрашивания. Независимо от метода детекции повреждений ДНК, необходимо подобрать краситель, специфически реагирующий с ДНК и дающий стабильные результаты. В настоящее время существует множество красителей для детекции одно- и двуцепочечных молекул ДНК. Большинство из них являются флуоресцентными. Как правило это интеркалирующие красители различных поколений. Чаще всего применяются этидиум бромид, SYBR Green I, YO-PRO-1, SYBR® Gold, SYTO, BEBO, BOXTO и EvaGreen (рисунок 8).

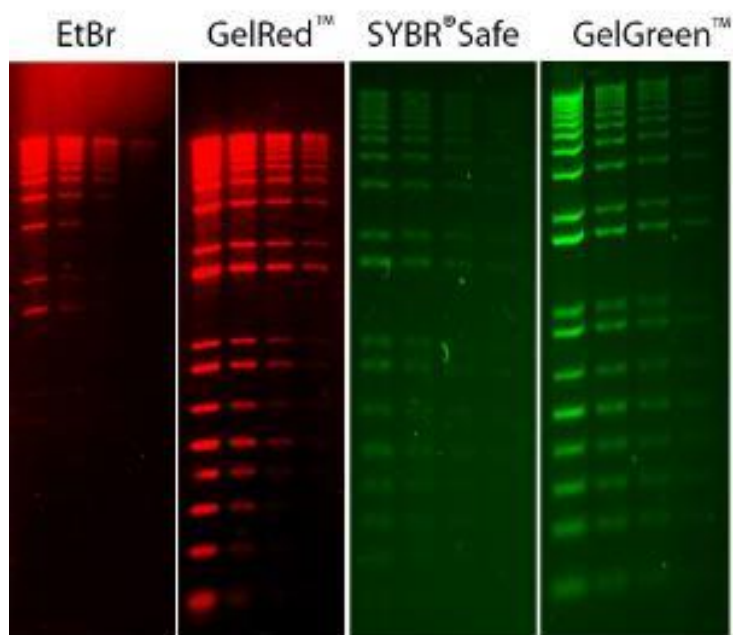


Рисунок 8 – Сравнение этидиум бромида (EtBr), GelRed™, SYBR® Safe, GelGreen™ при окрашивании 19% агарозного геля. Двукратные серийные разведения 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) загружали в количествах 200 нг, 100 нг, 50 нг и 25 мкг слева направо. Гели визуализировали с использованием трансиллюминатора с длиной волны 300 нм или 254 нм и фотографировали с помощью фильтра EtBr или SYBR в зависимости от варианта

Данные красители отличаются фоновой флуоресценцией, температурной стабильностью, различной степенью сродства к одно- и двуцепочечной ДНК, безопасностью использования. Выбор красителя зависит от метода исследования и используемого оборудования.

1.4. Билюминометрия

Вопросы:

1. Люминометрия в биологии.
2. Важнейшие примеры использования билюминесцентных зондов в биологии.
3. Применение люминола и люцигерина для тестирования генерации АФК.
4. Методика Ca^{2+} -эквириновой люминометрии.

Люминесценция – явление свечения вещества, возникающее в процессе преобразования поглощенной им энергии - в оптическое излучение. Данное свечение не вызвано непосредственно нагревом вещества. Механизм явления связан с тем, что под воздействием внутреннего или внешнего источника, в веществе возбуждаются атомы, молекулы или кристаллы, которые затем испускают фотоны.

Выделяют следующие виды люминесценции: фотолюминесценция, хемилюминесценция, электролюминесценция, механолюминесценция, радиолюминесценция, кристаллолюминесценция, термолюминесценция и др.

Фотолюминесценция – люминесценция, при которой в качестве источника энергии используется поглощение электромагнитного излучения (фотонов). Включает такие явления как: флуоресценция – быстрое (наносекундное) излучение фотонов при переходе электронов из возбужденного состояния в основное; фосфоресценция – медленное испускание света с большим периодом затухания (от миллисекунд до часов), которое объясняется необходимостью поворота спина и большой протяженностью возбужденного состояния.

Кристаллолюминесценция – испускание света в процессе кристаллизации, при котором твердые кристаллы осаждаются из раствора, расплава или, реже, осаждаются непосредственно из газа.

Электролюминесценция – люминесценция, при которой источником энергии выступает электрический ток, проходящий через вещество. Включает катодолюминесценцию – испускание света в результате удара электронов по люминесцентному материалу.

Механолюминесценция – в качестве источника энергии использует механическое воздействие на твердое тело. Включает такие виды как: триболлюминесценция – генерируется, когда связи в материале разрушаются, когда этот материал царапается, измельчается или трется; фрактолюминесценция – генерируется, когда связи в определенных кристаллах разрушаются из-за трещин; пьезолюминесценция – производится под действием давления на некоторые твердые вещества; сонолюминесценция – генерируется в результате взрыва пузырьков в жидкости при возбуждении звуком.

Радиолюминесценция наступает при бомбардировке ионизирующим излучением. Примером могут служить тритиевые лампы.

Термолюминесценция – переизлучение ранее поглощенной энергии при нагревании вещества.

Хемилюминесценция – в качестве источника энергии выступает химическая реакция. Различают 2 типа хемилюминесценции: биолюминесценция – биохимические реакции в живых организмах (рисунок 9); электрохемилюминесценция – в результате электрохимических реакций.



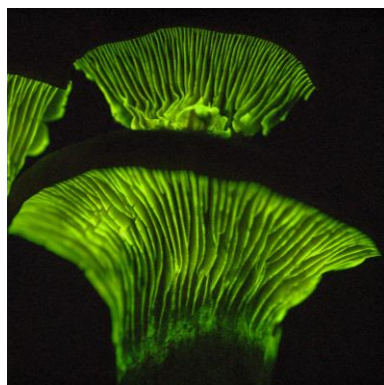
Lampyrus noctiluca



Photinus pyralis



Phengodidae Phrixothrix



Omphalotus subilludens



Aequorea victoria



Хлорофилл



Mycena luxaeterna



Bufoceratias wedli



Motyxia sequoia

Рисунок 9 – Примеры биолюминесцирующих организмов

Биолюминесценция – хемилюминесцентный процесс, обусловленный ферментативным окислением субстратов-люциферин, катализируемых ферментами – люциферазами, в результате которого продукт окисления

образуется в возбужденном электронном состоянии, переход продукта окисления из возбужденного состояния в основное сопровождается излучением фотона в видимом спектральном диапазоне.

Способность живых организмов светиться, достигаемая самостоятельно или с помощью симбионтов. Светящиеся организмы обитают как в водной среде, так и на суше (рисунок 9).

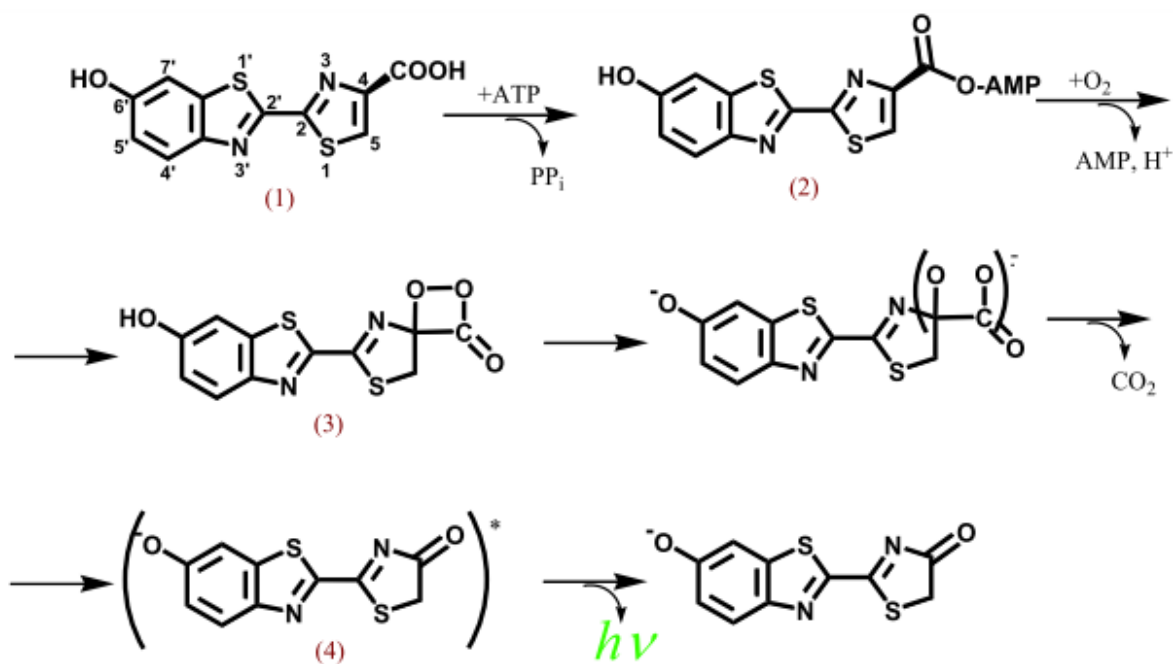
К водным всеядным организмам относятся многие панцирные и голые жгутиконосцы (ночесветки, радиолярии); медузы, гидроиды, сифонофоры, морские перья; из червей — немертина *Emplectonema*, многощетинковые черви сем. *Tomopteridae* и некоторые донные; ракообразные (ракушковые веслоногие, бокоплавы, мизиды, зуфаузиевые и десятиногие); голожаберные, килевогие и крылоногие, сверлящий двустворчатый моллюск *Pholas dactylus*, некоторые каракатицы и кальмары; среди иглокожих светятся многие офиуры и некоторые морские звезды, голотурии и морские лилии; ряд пелагических оболочников (сальны, аппендикулярии, пирсомы). Органы свечения есть также у многих рыб, особенно глубоководных.

Среди наземных организмов можно назвать светлячки, жук-щелкун кукухо, личинки грибных комариков (сем. *Ceroplatidae*), некоторые ногохвостки, многоножки, дождевые черви, светящиеся грибы.

Работа люциферин-люциферазной системы. Люцифераза – фермент, катализирующий окисление люциферина под действием O_2 в присутствии АТФ и Mg^{2+} . Данная реакция сопровождается излучением света видимой области спектра (540-600 нм). Состоит реакция из двух основных этапов – аденилирования и окисления, представленных на рисунке 10.

Применение люциферазы в методах анализа, основанных на детекции ее субстратов (АТФ и люциферин) в первую очередь включают в себя методы «быстрой микробиологии» – чувствительные и универсальные методы детекции бактерий на основе экспресс-определения ультрамалых количеств АТФ в образце. Данные методы используются для определения биологической загрязненности различных проб, тестирования антибиотиков и определения цитотоксичности.

Методы, основанные на детекции люциферина, предполагают использование производного люциферина, содержащего пептидную последовательность, распознаваемую протеазами, которые в нерасщепленной форме не являются субстратом люциферазы. В присутствии протеаз наблюдается селективное расщепление этого производного с образованием люциферина, способного вступать в биолюминесцентную реакцию. Эта группа методов используется в основном для анализа цитотоксичности и детекции живых и мертвых клеток в клеточных культурах. Живые клетки генерируют слабый фоновый сигнал. В случае повреждения клеток происходит высвобождение протеаз и, как следствие, увеличение биолюминесцентного сигнала.



1 – Фермент связывается с субстратом – люциферинном и АТФ; 2 – В тройном фермент-субстратном комплексе люциферин ковалентно взаимодействует с АТФ, и в результате образуются смешанный ангидрид карбоновой и фосфорной кислот – люциферил-аденилат и пиррофосфат; 3 – Люциферил-аденилат через ряд промежуточных стадий окисляется кислородом воздуха, превращаясь в циклический пероксид – диокситанон; 4 – Трансформация диокситанона приводит к образованию бирадикала, в результате декарбоксилирования которого образуется продукт реакции – оксилуциферин в синглетном электронно-возбужденном состоянии; 5 – Электронно-возбужденный оксилуциферин дезактивируется с излучением кванта света (синяя область спектра)

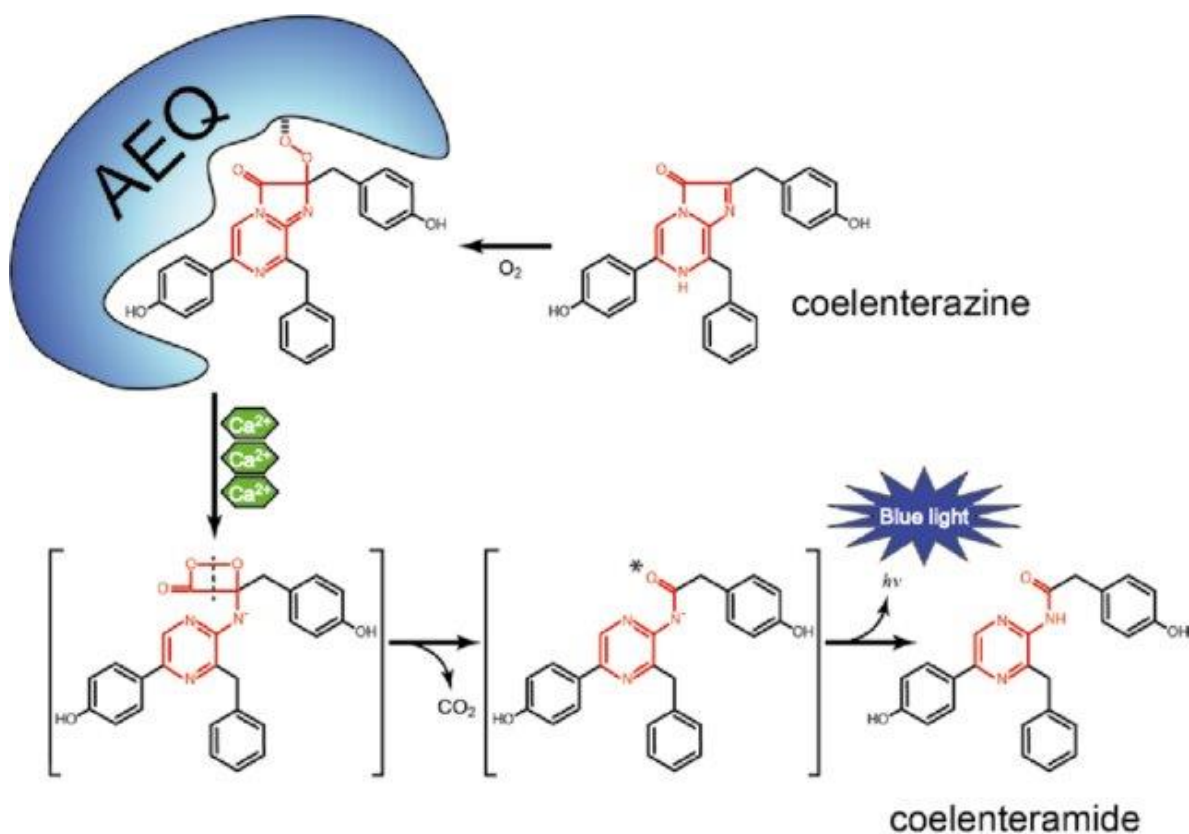
Рисунок 10 – Схема реакции окисления люциферина

Ca²⁺-зависимая генерация люминесценции экворинном. В настоящее время имеется ряд методов измерения цитоплазматической активности кальция ([Ca²⁺]_{цит.}), например, чувствительные к кальцию микроэлектроды, химические флуоресцентные красители и биосенсоры на основе люминесцентных или флуоресцентных индикаторов. При применении микроэлектродов и микроинъекций флуоресцентных красителей в биологии растений ученые зачастую сталкиваются с техническими проблемами, лимитируя исследование к анализу одной или небольшой группы клеток в образце ткани либо к использованию протопластов. В 1990х гг. были созданы трансгенные растения, содержащие кальций-активируемы фотобелок экворин, позволяющих исследовать индукцию Ca²⁺-сигнализации в клетках растений в ответ на различные стимулы: изменение температура, осмотический шок, механические воздействия, присутствие регуляторов и стрессоров.

Экворин – люминесцентный белок, выделенный из медузы *Aequoria victoria* (экворей) в 1962 г. Осаму Симомуро. Состоит из белковой части апоэкворина и простетической группы целентеразина (рисунок 11).

Апоэкворин представляет собой одну полипептидную цепь около 22 кДа. Восстановливаясь апоэкворин объединяется с низкомолекулярным люминофором – целентеразином в присутствии O_2 , в результате чего формируется активная форма фотобелка – экворин. Молекула экворина схожа по своей структуре с кальций-связывающим белком кальмодулином и обладает 3-мя связывающими кальций доменами EF (аналогичным четырем EF-доменам кальмодулина) и сайтом связывания для целентеразина и кислорода. Когда кальций связан, целентеразин окисляется до целентерамида, а белок претерпевает конформационные изменения, сопровождающиеся выделением углекислого газа и испусканием синего света с длиной волны 462 нм.

Следует отметить, что экворин является высокоселективным по отношению к Ca^{2+} , а также к Mg^{2+} и K^+ , однако Mg^{2+} и K^+ не вызывают люминесценции, но могут снижать чувствительность к Ca^{2+} . Это необходимо учитывать при дизайне экспериментов.

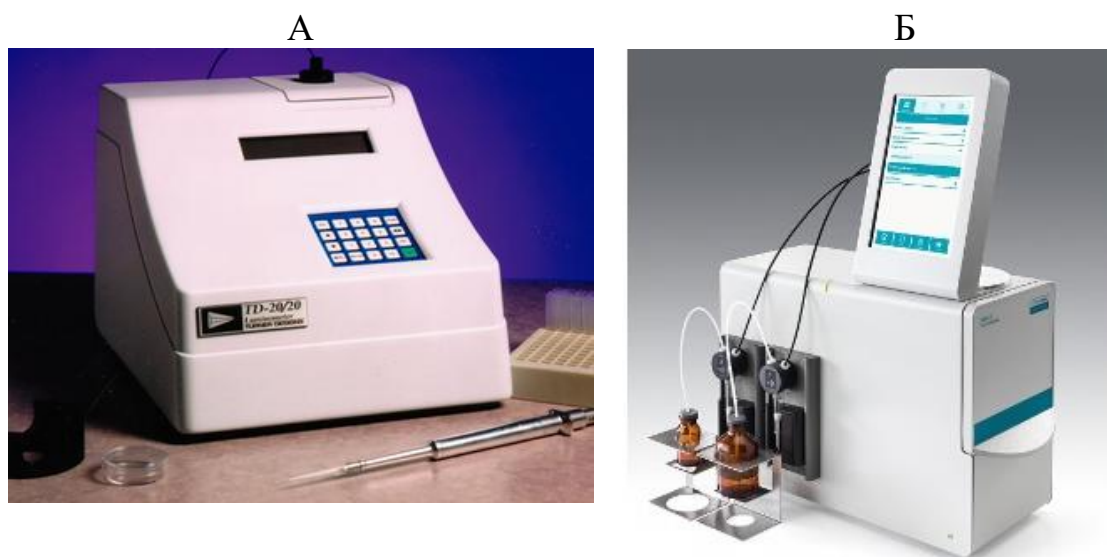


Апо-экворин превращается в активную форму – экворин (AEQ), путем восстановления люминофором коэленτεραзином в присутствии кислорода (O_2). При связывании трех молекул Ca^{2+} с соответствующими EF-руками на белке экворине коэленτεραзин окисляется и циклизуется с образованием промежуточного соединения диоксетанона с последующим конформационным изменением белка, сопровождающимся высвобождением диоксида углерода (CO_2) при производстве синглетно-возбужденного целентерамида (звездочка), который излучает синий свет ($h\nu \sim 470$ нм)

Рисунок 11 – Ca^{2+} -зависимая генерация света экворинном

Для измерения кривой высвечивания люминесценции используется установка – **люминометр**, на основе фотоэлектронного умножителя (**ФЭУ**). ФЭУ – это прибор для преобразования слабых световых сигналов в электрические. ФЭУ представляет собой фотоэлемент с многократным усилением, основанным на явлении вторичной электронной эмиссии. Он содержит фотокатод, систему ускоряющих электродов (динодов) и анод, расположенные внутри вакуумной колбы.

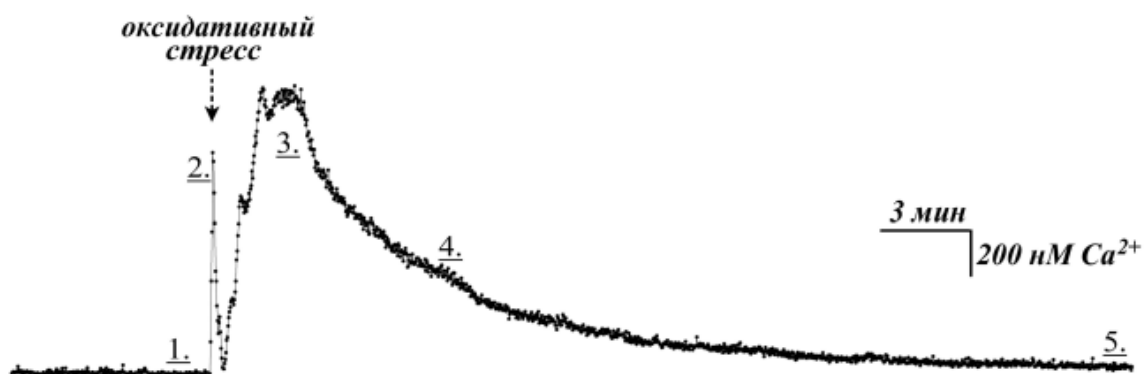
Люминометр – высокочувствительный прибор для регистрации биолюминесценции в видимой области спектра (слабых оптических свечений), возникающих в живых организмах в результате биохимических реакций (рисунок 12).



А – Turner BioSystems 20/20 – автоматизированный комплекс, который позволяет производить регистрацию сверхслабых световых сигналов; Б – Sirius 2 LB 9526 – люминометр, позволяющий измерять хемилюминесценцию образцов в нескольких типах пробирок и других форматах, включая стандартные люминесцентные пробирки (75 x 12 мм или 55 x 12 мм), микроцентрифужные пробирки, сцинтилляционные флаконы, чашки Петри диаметром 35 мм

Рисунок 12 – Хемилюминометры

В ходе проведения эксперимента на люминометри получают кривые, отражающие «временное повышение цитоплазматической активности Ca^{2+} » ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$), представленные на рисунке 13. $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит.}}$ крайне мала (около 100 нМ), но она может очень быстро (в течение секунд) возрасти при воздействии внешних факторов, достигая уровня в десятки раз выше исходного. Вход Ca^{2+} в цитоплазму происходит как из апопласта, так и из депо органелл. Это «пассивный» процесс, т.е. протекающий без затраты энергии, катализируемый катионными каналами плазматической мембраны и эндомембран.



1 – фаза покоя (базальный уровень $[Ca^{2+}]_{цит.}$ до стрессового воздействия; около 100 нМ); 2 – первичное непродолжительное «спайкообразное» увеличение $[Ca^{2+}]_{цит.}$ (обычный компонент Ca^{2+} -сигнала, связанный с активацией механочувствительных каналов); 3 – вторичное увеличение $[Ca^{2+}]_{цит.}$ (более продолжительное, имеет сложную форму и часто состоит из нескольких стадий); 4 – затухание Ca^{2+} -волны (связано с закрыванием катионных каналов и активацией систем устранения Ca^{2+} из цитоплазмы); 5 – возвращение на базальный уровень $[Ca^{2+}]_{цит.}$

Рисунок 13 – Фазы типичного временного хода повышения уровня $[Ca^{2+}]_{цит.}$ в ответ на окислительный стресс, измеренного при помощи Ca^{2+} -эквиновой люминесценции (растения арабидопсиса, конститутивно экспрессирующие экворин) Ca^{2+} -проницаемые каналы мембран клеток высших растений

Общепризнанно, что ионы кальция являются универсальным посредником между внешней средой и клеткой у всех известных больших таксономических групп эукариотических организмов. Кальций часто называют «основным» или «важнейшим» вторичным посредником. Уровень кальция выступает регулятором метаболических реакций, ионного гомеостаза, может изменять генную экспрессию генов, а также (в случае перенасыщения цитоплазмы Ca^{2+}) индуцировать развитие клеточной гибели.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

2.1. Примерная тематика практических занятий

Практическое занятие № 1. Проблемно-ориентированный эвристический кейс-семинар по системе пруф/диспруф (prove/disprove) на тему использования флуоресцентной микроскопии и КЛСМ в биологических 10 исследованиях; подбор флуоресцентных зондов (преимущества и недостатки PI, FDA, Evans Blue и SYTOX).

Студенты заранее разбиваются на подгруппы и готовят устные доклады (допускается использование мультимедийной презентации) по выбранной позиции (пруф/диспруф) в рамках исследуемого кейса. После презентаций проводится дискуссия, представители подгрупп задают оппонентам перекрестные вопросы, в конце дискуссии делаются общие выводы.

Практическое занятие № 2. Анализ образования одно- и двуцепочечных разрывов ДНК в клетках модельных растительных объектов в ответ на действие стрессоров.

Студенты знакомятся с протоколами анализа повреждений ДНК с использованием метода ДНК-комет. Экспериментальная часть включает в себя индукцию повреждения ДНК в эукариотических клетках, приготовление растворов, иммобилизация ядер на предметных стеклах, лизис, электрофорез, окраска ДНК флуоресцентным красителем, получение и анализ изображений ДНК-комет.

Практическое занятие № 3. Протестировать влияние различных стресс-факторов на уровень Ca^{2+} в цитоплазме с использованием растений *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., экспрессирующих экворин.

Практическое занятие включает в себя приготовление растворов, инкубирование эквориновой линии арабидопсиса в растворе целентеразина, регистрацию Ca^{2+} -сигнала в контрольных условиях и при добавлении стресс-растворов, анализ изменений цитоплазматической активности кальция.

2.2. Задания для самостоятельной работы

Задание 1. Просмотрите видео “Люминесценция и фосфоресценция”, производства канала GetAClass – Физика в опытах и экспериментах <https://www.youtube.com/watch?v=8R9k2LKU5J4>. Ответьте на следующие вопросы:

1. В чем принципиальное отличие люминесценции и фосфоресценции?
2. Что имеет большую длину волны: поглощенный или испускаемый пучок света?
3. В каких продуктах содержатся люминисцирующие частицы?

Задание 2. Просмотрите видео “Bioluminescence: Origins and Applications”, производства Sigma Documentaries <https://www.youtube.com/watch?v=dp637j-od9U>. Ответьте на следующие вопросы:

1. Какие функции выполняет билюминисценция у различных живых организмов?
2. Почему можно говорить, что билюминисценция появилась независимо несколько раз в различных организмах?
3. Кто из ученых занимался проблемой билюминисценции?
4. За какое открытие О. Симомуро была присуждена Нобелевская премия?
5. Как применяются флуоресцирующие белки в биологии и медицине?

Задание 3. Просмотрите видео “Introduction to the CometAssay®”, производства AMSBIO <https://www.youtube.com/watch?v=jFKNGZPRnSg>. Ответьте на следующие вопросы:

1. На чем основан принцип метода ДНК-комет?
2. Практическое применение метода ДНК-комет?
3. Перечислите основные этапы проведения исследования повреждений ДНК?
4. Для чего используется щелочной метод ДНК-комет?
5. От чего зависит длительность проведения электрофореза?

3. РАЗДЕЛ КОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

3.1. Перечень контрольных мероприятий управляемой самостоятельной работы студентов

Формой текущей аттестации по дисциплине «Флуоресцентный и люминесцентный биоимиджинг» учебным планом предусмотрен зачет. Для оценки профессиональных компетенций студентов используется следующий диагностический инструментарий: тестовый эвристический опрос на лекциях, контроль посещения аудиторных занятий и выполнения аудиторного графика; защита подготовленного студентом анализа научных статей с предоставлением аннотации в системе LMS Moodle; защита отчета о выполнении практической работы; - выполнение эвристических тестов в системе LMS Moodle.

Оценка за ответы на лекциях (опрос) и практических занятиях может включать в себя полноту ответа, наличие аргументов, примеров из практики и т.д. При оценивании доклада обращается внимание на: содержание и полноту раскрытия темы, структуру и последовательность изложения, источники и их интерпретацию, корректность оформления и т.д.

3.2. Примерный перечень заданий для управляемой самостоятельной работы студентов

Управляемая самостоятельная работа (консультационно-методическая поддержка и контроль) осуществляется преимущественно в дистанционной форме и обеспечивается средствами образовательного портала БГУ LMS Moodle (<https://edubio.bsu.by/course/view.php?id=773>). Объем часов на составление и размещение заданий, консультации и контроль, осуществляемые с использованием технологий дистанционного обучения, планируется в пределах учебных часов, отведенных на УСР.

Тема 2.1 Флуоресцентные зонды и их использование в биологии (2 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 2 ч). Физико-химические основы флуоресценции. Флуоресцентные белки, синтетические флуорофоры, техника биоконъюгации. Флуоресцентные зонды, 9 используемые для биовизуализации. Зеленые флуоресцентные белки (GFP) и другие виды генетически-кодируемых внутриклеточных зондов (YFP, RFP). Современные флуоресцентные микроскопы, их устройство, особенности работы и обслуживания. Эпифлуоресцентные микроскопические системы. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия и ее применение в биологических исследованиях. Анализ получаемых изображений, программные обеспечения, представление результатов. Использование флуоресцентных зондов для генетического и биохимического анализа. Ридеры, цитометры, секвенаторы, ПЦР-РВ. Пассивные референсные и репортерные красители, используемые для

проведения количественной ПЦР в реальном времени. Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 2.2 Методы анализа на основе флуоресцентной микроскопии (2 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 2 ч). Методы определения свободных радикалов, зонды на активные формы кислорода (DHE, DCF). Определение уровня кальция в живых клетках (Fura-2, Indo-1, Cameleon). Анализ генных экспрессий при помощи флуоресцентной микроскопии. Метод ДНК-комет: принцип метода, применение в биологии и медицине, особенности детекции различных повреждений ДНК, протоколы для обнаружения одно- и двухцепочечных разрывов. Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

Тема 3.2 Важнейшие примеры использования биолюминесцентных зондов в биологии: люциферин, экворин и др. системы (4 ч/ДО; внеаудиторный контроль – 4 ч). Люциферины: строение и типы. Работа люциферин-люциферазной системы и ее использование в биологии. Применение хемилюминометрических зондов для обнаружения АФК в живых системах (супероксидного-анионного радикала, перекиси водорода, гидроксильного радикала). Применение люминола и люцигенина для тестирования генерации АФК. Методика Ca^{2+} -эквориновой люминометрии. История открытия белка экворина и его структура. Ca^{2+} -зависимая генерация люминесценции экворинном. Форма контроля – тестирование (эвристические тесты) на образовательном портале LMS Moodle.

3.3. Темы реферативных работ

1. Понятие биоимиджинга, основные направления биоимиджинга.
2. Основные техники, используемые для визуализации живых систем *in vitro* и *in vivo*.
3. Принцип метода флуоресцентной микроскопии.
4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.
5. Характеристика зеленого флуоресцентного белка (GFP) медузы *Aequorea victoria*.
6. Использование флуоресцентных зондов для генетического и биохимического анализа.
7. Флуоресцентные зонды на активные формы кислорода.
8. Подбор флуоресцентных зондов.
9. Сравнительный анализ флуоресцентных красителей на жизнеспособность PI, FDA, Evans Blue и SYTOX.
10. Тестирование жизнеспособности клеток при помощи флуоресцентной микроскопии.
11. Анализ генных экспрессий при помощи флуоресцентной микроскопии.

12. Метод ДНК-комет: принцип метода, применение в биологии и медицине.
13. Анализ образования одно- и двуцепочечных разрывов ДНК.
14. Биохемилюминесценция как одна из форм люминесценции.
15. Устройство и принцип работы люминометров.
16. Люциферины: строение и типы.
17. Применение люминола и люцигенина для тестирования генерации АФК.
18. История открытия белка экворина и его структура.
19. Детекция супероксидного-анионного радикала в живых системах при помощи метода люминометрического анализа.
20. Важнейшие примеры использования биолюминесцентных зондов в биологии.

3.4. Примерный перечень вопросов к зачету

1. Современные подходы для визуализации биологических объектов *in vivo*.
2. Физические и химические основы флуоресценции.
3. Флуоресцентные белки: GFP, YFP и RFP.
4. Дизайн синтетических флуорофоров, техника биоконъюгации.
5. Сравнительная характеристика флуоресцентной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.
6. Пассивные референсные и репортерные красители, используемые для проведения количественной ПЦР в реальном времени.
7. Повреждения ДНК в клетках и их детекция.
8. Особенности использования метода ДНК-комет на растительных объектах.
9. Основные параметры ДНК-комет, их значение и расчет.
10. Использование метода ДНК-комет в медицине.
11. Понятие о люминесценции и ее разновидностях.
12. Работа люциферин-люциферазной системы на примере светлячков.
13. Хемилюминометрические зонды для обнаружения супероксидного-анионного радикала в живых системах.
14. Хемилюминометрические зонды для обнаружения перекиси водорода в живых системах.
15. Хемилюминометрические зонды для обнаружения гидроксильного радикала.
16. Применение люминола для тестирования генерации АФК.
17. Применение люцигенина для тестирования генерации АФК.
18. История открытия белка экворина и его структура.
19. Ca^{2+} -зависимая генерация люминесценции экворинном.
20. Устройство и принцип работы люминометров.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

4.1. Рекомендуемая литература

Перечень основной литературы:

1. Клетки по Льюину / Реймонд Окс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2023. – 1057 с.
2. Гены по Льюину / Дж. Е. Кребс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2022. – 919 с.
3. Основы молекулярной биологии клетки / Б. Альбертс и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2018. – 768 с.
4. Основы биохимии Ленинджера / Д. Нельсон и др. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2022. – 434 с.
5. Левшин, Л.В., Салецкий, А.М. Люминесценция и ее измерение. – М.: МГУ, 2019. – 473 с.
6. Флуоресценция в биомедицинских исследованиях : учебное пособие / под общ. ред. А. В. Стрыгина. – Волгоград : Издательство ВолгГМУ, 2020. – 160 с.

Перечень дополнительной литературы:

1. Fluorescence microscopy: from principles to biological applications, 2 Edition. / Ed. U. Kubitscheck. – Wiley-VCH, 2013 – 495 p.
2. A computational image analysis glossary for biologists / H.K. Adrienne [et al.] // Development. – 2012. – Vol. 139. – P. 3071–3080.
3. Evaluation of DNA damage using single-cell gel electrophoresis (Comet Assay) / S. Nandhakumar [et al.] // J Pharmacol Pharmacother. – 2011. – Vol. 2. – P. 107–111.
4. Fluorescence and luminescence techniques to probe ion activities in living plant cells / M.D. Fricker [et al.] // Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. – Elsevier, 1999. – P. 569–596.
5. Halliwell, B. Free radicals in biology and medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. – Oxford, UK Oxford University Press, 2015. – 905 p.
6. Markova, S.V. Coelenterazine-dependent luciferases / S.V. Markova, E. S. Vysotski // Biochemistry. – 2015. – Vol. 80, № 6. – P. 714–732.
7. Molecular Cell Biology 8th edition / H. Lodish, et al. – New York: W.H. Freeman and Company, 2016. – 1150 p.
8. Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca²⁺ signals and efflux from cells via anion channels / M. Makavitskaya [et al.] // J. Exp. Bot. – 2018. – Vol. 69, № 14 – P. 3477–3489.
9. Salt stress triggers generation of oxygen free radicals and DNA breaks in *Physcomitrella patens* protonema / S. Zvanarou [et al.] // Environmental and Experimental. – 2020. – P. 104236.

10. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium / Knight M.R. [et al.] // Nature. – 1991. – Vol. 352. – P. 524–526.
11. Vysotski, E.S. Bioluminescence: basic and applied research.: introduction to the special issue on bioluminescence / E.S. Vysotski // Photochemistry and Photobiology. – 2017. – Vol. 93, № 2. – P. 387–388.
12. Введение в спектральный и люминесцентный анализ: Учеб.-метод. пособие / В.Г. Лещенко. – Мн.: БГМУ, 2002. – 37 с.
13. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы и хемилюминисценция / Ю.А. Владимиров, Е.В. Проскурина // Успехи биологической химии. – 2009. – Т. 49. – С. 341–388.
14. Лазерная конфокальная микроскопия: метод. указания / П.Е. Тимченко и др. – Самара: Изд-во Самар. гос. аэрокосм. ун-та, 2014. – 76 с.
15. Метод флуориметрии. Применение в фармацевтическом анализе : учебное пособие / А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск : ИГМУ, 2017. – 41 с.
16. Молекулярная биология клетки / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2017. – 256 с.
17. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений, 2-е изд. / под ред. Вл. В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. – М.: Бином. Лаборатория знаний, 2015. – 498 с.
18. Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии: Монография: В 2-х т.: Т. 1 / Под ред. А.И. Григорьева и Ю.А. Владимирова. – М.: МАКС Пресс, 2015. – 448 с.: ил.
19. Шарова Е. И. Антиоксиданты растений: учеб. пособие. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та. 2016. – 140 с.

4.2. Электронные ресурсы

1. Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине «Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине для специальности: 1-31 80 01 Биология профилизация Функциональная биология» для специальности: 1-31 80 01 «Биология» профилизация «Функциональная биология». Электронная библиотека БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/250560>. – Дата доступа: 01.04.2023.
2. Физиолого-биохимические основы биотехнологии растений : учеб.-метод. пособие. В 3 ч. Ч. 1 / В. С. Мацкевич, Д. А. Пржевальская, О. Г. Яковец. Электронная библиотека БГУ [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://elib.bsu.by/handle/123456789/275294>. – Дата доступа: 01.04.2023.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Анспок П. И. Микроудобрения. Л.: Агропромиздат, 1990. – 272 с.
2. Ингибирование роста и индукция запрограммированной клеточной гибели в корне *Helianthus annuus* L. под действием ионов никеля / В.С. Мацкевич, А.А. Шикер, С.Н. Звонарев, К.С. Лицкевич, О.А. Туровец, И.И. Смолич, А.И. Соколик, В.В. Демидчик // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2020. – Т. 1. – С. 11–19.
3. Флуоресцентная микроскопия (Часть 1) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://stormoff.ru/mediacenter/articles/article_92/ – Дата доступа: 01.04.2023.
3. Флуоресцентная микроскопия (Часть 2) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://stormoff.ru/mediacenter/articles/article_93/ – Дата доступа: 01.04.2023.
4. Eggeling, C. Advances in bioimaging – challenges and potentials / C. Eggeling // J. Phys. D: Appl. Phys. – 2018. – Vol. 51. – P. 04020.
5. Terai, T. Fluorescent probes for bioimaging applications / T. Terai, T. Nagano // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2008. – Vol. 12. – P. 515–21.
6. Билюминесцентный имиджинг опухолевых клеток *in vivo* / Н.В. Клементьева и др. // СТМ. – 2013. – Т. 5, №3. – С. 6–14.
7. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium / M. Knight [et al.] // Nature – 1991. – Vol. 352. – P. 524–526.
8. Tanaka, K. Aequorin luminescence-based functional calcium assay for heterotrimeric G-proteins in Arabidopsis / K. Tanaka // Methods Mol Biol. – 2013. – Vol. 1043. – P. 45–54.
9. Salt stress triggers generation of oxygen free radicals and DNA breaks in *Physcomitrella patens* protonema / S. Zvanarou [et al.] // Environmental and Experimental Botany. – 2020. – Vol. 180. – P. 104236.
10. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and *in vivo* genetic toxicology testing / R.R. Tice [et al.] // Environ. Mol. Mutagen. – 2000. – Vol. 35. – P. 206–221.
11. The comet assay: mechanisms and technical considerations / M. Klaude [et al.] // Mutation Research/DNA Repair. – 1996. – Vol. 363. – P. 89–96.
12. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells / P. Narendra [et al.] // Experimental Cell Research. – 1988. – Vol. 175. – P. 184–191.
13. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques / E.I. Cortés-Gutiérrez [et al.] // J. Biomed Biotechnol. – 2012. – Vol. 2012 – P. 385245.
14. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and *in vivo* / M.P. Murphy [et al.] // Nat Metab. – 2022. – Vol. 4. – P. 651–662.
15. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols / A. Collins [et al.] // Nat Protoc. – 2023. – Vol. 18. – P. 929–989.