

ХРОНИКА

СЕМИНАР «СОВРЕМЕННЫЕ КОНФОКАЛЬНЫЕ МИКРОСКОПЫ ФИРМЫ LEICA И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОЛОГИИ»

18—19 мая 2006 г. в Институте цитологии РАН состоялся региональный семинар «Современные конфокальные микроскопы фирмы Leica и их применение в биологии», организованный институтом совместно с фирмой Leica Microsystems. Семинар вызвал большой интерес среди научных работников Санкт-Петербурга. На нем присутствовало около 100 человек из 25 научно-исследовательских институтов, академий и университетов. Были даже гости из Москвы.

Интерес к этому мероприятию был вызван тем, что в настоящее время конфокальная микроскопия широко используется в биологии и медицине. Это обстоятельство подчеркнули в своем вступительном слове директор Института цитологии РАН **В. Н. Парфенов** и коммерческий директор представительства Leica Microsystems в России **Д. А. Лавров**. На семинаре фирма представила свои новые разработки — лазерные сканирующие конфокальные микроскопы Leica TCS SP5 и Leica TCS SPE.

Доклад на эту тему сделала **Сюзанна Либбе** (Susanne Liebe), специалист фирмы Leica из Германии. TCS SP5 вобрал в себя самые последние достижения, например тандемный сканер, включающий в себя как обычный, так и резонансный сканер, позволяющий получать до 25 кадров (512×512) в 1 с. Спектральный пятиканальный фотоприемник, акустооптический делитель луча (AOBS), заменяющий набор традиционных дихроичных зеркал и позволяющий быстро перестраивать прибор на несколько спектральных линий, высокоэффективные малогабаритные лазерные источники света — вот далеко не полный набор инноваций. Leica TCS SPE — это упрощенный вариант TCS SP 5, в нем отсутствуют некоторые узлы (AOBS, резонансный сканер), имеется только один спектральный приемный канал, но зато прибор имеет небольшие габариты и относительно низкую стоимость. Значительно переработано программное обеспечение, оно стало проще и удобнее в эксплуатации.

Во второй части семинара выступили пользователи конфокальных микроскопов с рассказом о своих исследованиях и об опыте применения приборов фирмы Leica.

Г. И. Штейн (Институт цитологии РАН) сделал сообщение на тему «Разрешающая способность конфокального микроскопа: эволюция представлений», в котором рассказал об этой важнейшей характеристике микроскопа и о том, как изменялись со временем методики ее оценки. Лазерный сканирующий конфокальный микроскоп — прибор оптико-электронный, поэтому существует как оптическая, так и «электронная» разрешающая способность. Он также является многофункциональным устройством, поэтому можно говорить о пространственной, спектральной и временной разрешающей способно-

сти, которые тесно связаны между собой. Докладчик рассказал также о новых идеях, направленных на улучшение разрешающей способности конфокальных микроскопов: о 4-пи и STED (stimulated emission depletion) конфокальной микроскопии.

С. М. Антонов (Институт эволюционной физиологии и биохимии РАН) рассказал о применении конфокального микроскопа Leica TCS SL для анализа процессов в живых клетках и тканях. Такие эксперименты предъявляют определенные требования как к специальной оснастке, так и к объекту исследования. Оптимальными для работы являются изолированные клетки, культуры клеток и срезы тканей. Обязательным является перфузирование объекта исследования. Могут использоваться прижизненные флуоресцентные красители на свободный Ca^{2+} , рН мембранный потенциал и т. д., а также их различные комбинации. Ведение флуорохромов осуществляется с помощью микроэлектрода и с использованием их мембранно-проникающих форм. Конфокальная микроскопия открывает новые возможности одновременного мониторинга многих внутриклеточных процессов, внутриклеточного трафика пептидов и колокализации функционально значимых макромолекул.

Р. П. Костюченко (Кафедра эмбриологии С.-Петербургского государственного университета) сделал доклад на тему: «Конфокальная микроскопия в изучении сегментации, регенерации и закладки зоны роста у полихет». В этой работе на живых объектах он использовал метод 4D конфокальной микроскопии (т. е. сочетание трехмерной реконструкции с изменениями во времени). В результате было установлено, что у полихет *Nereis virens* и *Platynereis dumerilii* формирование сегментов тела личинки происходит прежде всего при участии дочерних клеток собственно эктобластов, а несегментированные части тела, такие как перистомииум и пигидальная и предпигидальная области, образуются за счет клеток-потомков первых двух делений бластомера 2d и первого деления протелобластов. Это в свою очередь снимает главное возражение Т. Д. Андерсона (Anderson, 1966, 1973) против первичной гетерономности сегментов (Ivanoff, 1928; Иванов, 1944), так как есть основания полагать, что материл зоны роста формируется не за счет резидуальных телобластов, а клеток — ранних продуктов первого соматобласта.

И. С. Степанова (Институт цитологии РАН) выступила с сообщением «Использование конфокального микроскопа Leica TCS SL для анализа ооцитов домового сверчка *Acheta domesticus* после тройного флуоресцентного окрашивания», которое было посвящено исследованию организации и молекулярного состава ядерных до-

менов диплотенных ооцитов домового сверчка — телец Кахала (ТК) и кластеров интерхроматинных гранул. Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Leica TSC SL был использован для иммуноморфологической характеристики и идентификации ядерных доменов, имеющих сложную морфологическую организацию; для анализа их взаимосвязи, динамики и положения в трехмерной структуре ядра ооцита; для исследования распределения и выявления колокализации молекулярных компонентов ядерных доменов. Обнаружено специфическое связывание с матриксом ТК флуоресцентно меченной U7 мяРНК через 12 ч после микроинъекции этой РНК в ооплазму. В матриксе ТК выявлены колокализация коилина, белков-коактиваторов транскрипции СВР/p300, транскрипционного фактора TFIIID, «зрелых» мяРНК, мажорного ядрышкового белка фибрилларина, а также в низких концентрациях — SR-белок SC35. Возможности конфокальной микроскопии позволили провести тройное иммунофлуоресцентное окрашивание ядер ооцитов с помощью пар соответствующих антител и ДНК-специфического флуорохрома TO-PRO-3, что дало возможность не только выявлять антигенный состав изучаемых ядерных структур, но на тех же препаратах проследить их пространственную взаимосвязь с хроматином.

А. А. Евстапов (Институт аналитического приборостроения РАН) сделал доклад на тему: «Лазерная конфокальная микроскопия: исследования микрофлюидных процессов», в котором рассказал о работах по созданию и развитию микрофлюидных чипов (МФЧ) и устройств, ориентированных в основном на применение в аналитической технике. Можно выделить три основных направления работ: изготовление и контроль МФЧ и микроструктур; изучение процессов в микро- и наноструктурах, включая математическое моделирование; создание, отработка и применение новых технологических и аналитических методик.

Одним из перспективных полимерных материалов для микрофлюидики является полиимид. В Институте аналитического приборостроения РАН были получены результаты, свидетельствующие о возможности получения микроканалов и других структур в полиимиде. Для контроля процесса изготовления была использована лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Изучение процессов в МФЧ (массопереноса веществ, физико-химических взаимодействий, воздействий физических полей на потоки, частицы и биологические объекты) — другое важнейшее направление исследова-

ний в этом институте. При этом уникальную информацию о динамике поведения потоков и частиц в каналах микроципа можно получить также с помощью лазерной конфокальной микроскопии. Новым направлением является исследование взаимодействия потоков и частиц с наноструктурами. Работы в этом перспективном и многообещающем направлении ведутся с участием Физико-технического РАН им. А. Ф. Иоффе.

М. Г. Самсонова (С.-Петербургский государственный технический университет) рассказала о методе создания пространственно-временного атласа экспрессии генов. Конфокальная микроскопия является мощным методом выявления экспрессии генов в процессе развития в отдельных клетках эмбриона. Наличие таких данных является необходимым условием для расшифровки молекулярных механизмов эмбриогенеза, в особенности начальных этапов этого процесса. В докладе было рассказано о методе получения данных об экспрессии генов на примере системы детерминации сегментов у плодовой мушки-дрозофилы, что позволит расшифровать молекулярные механизмы этого процесса. Важным этапом работы является создание количественного атласа экспрессии генов сегментации на клеточном уровне.

Разработанный метод включает в себя процедуры сегментации изображений, удаления фонового сигнала, автоматического определения возраста эмбриона по картине экспрессии генов сегментации, регистрации и усреднения данных. Созданный пространственный атлас экспрессии генов организован в виде базы данных FlyEx и доступен по адресам: <http://urchin.spbcas.ru> и <http://fly-exams.sunysb.edu/flyex>. Полученные количественные данные стали эталонными и широко используются исследователями при изучении механизмов сегментации и детерминации клеток, а также для разработки новых методов моделирования биологических объектов.

Помимо докладов 19 мая состоялась практическая демонстрация конфокального микроскопа Leica TCS SPE, на которую приглашались участники семинара со своими препаратами. Для этой демонстрации фирма Leica специально привезла и смонтировала прибор в Институте цитологии РАН. Демонстрация также вызвала большой интерес у биологов.

По высказываниям участников семинара, он прошел интересно и полезно и следовало бы такие семинары проводить регулярно раз в 2 года, а материалы семинаров предложено размещать на новом сайте www.confocal.ru.

© Г. И. Штейн

WORKSHOP: «MODERN CONFOCAL MICROSCOPES „LEICA“ AND THEIR APPLICATION IN BIOLOGY»

G. I. Stein