

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ СВЕРХВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР

© 2019 г. А. Д. Ведяйкин^{1, 2, *}, М. А. Ходорковский¹, И. Е. Вишняков²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: misterkotlin@gmail.com

Поступила в редакцию 03.12.2018 г.

После доработки 20.12.2018 г.

Принята к публикации 20.12.2018 г.

Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения являются мощным инструментом для визуализации различных структур в клетках как эукариот, так и прокариот, в том числе в клетках, характеризующихся крайне малым размером. В последние годы разработано большое количество таких методов, что позволяет успешно решать различные задачи. В то же время, высокая техническая сложность их реализации по сравнению с традиционной световой микроскопией несколько сужает использование этого инструмента в клеточной биологии. В обзоре рассматриваются и сравниваются между собой основные разновидности методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, наиболее широко используемые в биологии. Кроме того, приведены примеры успешного применения описываемых методов с целью визуализации различных структур в клетке, в том числе результаты, полученные авторами данного обзора.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения, дифракционный предел, детерминистские методы, стохастические методы, визуализация структур в клетке

DOI: 10.1134/S0041377119050067

За последние 20 лет было разработано большое количество методов флуоресцентной микроскопии (ФМ) сверхвысокого разрешения (англ. super-resolution microscopy). Такие методы позволяют решить проблему дифракционного предела разрешения традиционной оптической микроскопии, обусловленную волновой природой света. Во второй половине XIX в. было показано, что изображение точечного источника света в оптическом приборе (например, в микроскопе или телескопе) будет иметь конечные размеры d (дифракционное пятно, обычно описыва-

емое функцией Эйри, оптическое разрешение), зависящие от длины волны λ и числовой апертуры NA оптического прибора в соответствии с формулой (1), впервые описанной Эрнстом Аббе (Lipson et al., 1995):

$$d = \lambda / (2NA). \quad (1)$$

Фундаментальный характер этой формулы, описывающей дифракционный предел, долгое время ограничивал возможности оптической микроскопии и не позволял получать разрешение лучше, чем примерно половина длины волны используемого света. Самые современные микроскопы, построенные по классической схеме, имеют разрешение не лучше 150 нм. Поэтому даже в относительно крупной эукариотической клетке многие структуры и органеллы не могут быть разрешены при помощи традиционной оптической микроскопии. Еще сильнее ограничены возможности традиционной микроскопии в плане визуализации структур в клетках бактерий, особенно таких маленьких, как, например, микоплазмы (класс Mollicutes) (Борхсениус и др., 2016). Неудивительно, что долгое время исследователи пытались обойти дифракционный предел (а следовательно увеличить разрешение) различными способами.

Принятые сокращения: БОМ — ближнепольная оптическая микроскопия, ФМ — флуоресцентная микроскопия, BALM — Binding Activated Localization Microscopy, CLEM — Correlated Light and Electron Microscopy, ExM — Expansion Microscopy, GSD — Ground State Depletion, MEF — Multi-Emitter Fitting, PAINT — Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, PALM — PhotoActivated Localization Microscopy, fPALM — fluorescence PALM, RESOLFT — REversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions, SIM — Structured Illumination Microscopy, SMI — Spatially Modulated Illumination, SMLM — Single-Molecule Localization Microscopy, SOFI — Super-resolution Optical Fluctuation Imaging, SPT — Single Particle Tracking, SRRF — Super-Resolution Radial Fluctuations, SSIM — Saturated Structured-Illumination Microscopy, STORM — Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, dSTORM — direct STORM, STED — Stimulated Emission Depletion, TIRF — Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy.