

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ И ШКОЛЫ

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ МОРФОЛОГИИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ЭКСПАНСИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2020 г. Е. И. Пчицкая^{1,*}, К. З. Деревцова², А. В. Раковская¹, И. Б. Безпрозванный¹

¹ Санкт-Петербургский Политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: katrincreative@yandex.ru

DOI: 10.31857/S004445292007219X

Методы флуоресцентной микроскопии сверх-высокого разрешения STED или SMLM позволяют изучать морфологию ультраструктур и органелл клетки, визуализация которых ранее была ограничена дифракционным пределом конфокального микроскопа. Однако, реализация этих методов остается технически сложной и дорогостоящей. Недавно разработанный метод экспансионной микроскопии (Proexpansion Microscopy, ProExM) позволяет улучшить разрешение конфокального микроскопа за счет увеличения размеров исследуемого образца до 4х раз. В экспансионной микроскопии флуоресцентно-меченые антитела и экспрессирующиеся в клетке флуоресцентные белки, присутствующие в исследуемом образце, закрепляются на геле, после чего производится его физическое анизотропное расширение. Достоинством метода является то, что получаемые образцы оптически прозрачны. Это позволяет получать изображения с высоким разрешением глубоко в тканях на обычных флуоресцентных микроскопах, на расстояниях, ограниченных только рабочим расстоянием объектива. Недостатком метода является

снижение интенсивности свечения в расширенных образцах. Цель работы — адаптация методики ProExM для визуализации морфологии нейронов в тканях мозга трансгенных мышей, экспрессирующих белок GFP в отдельных нейронах (Thy1-GFP line M, Jackson Laboratory). Фиксированные срезы мозга окрашивались первичными антителами к белку GFP и вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa Fluor 488, для усиления интенсивности свечения. Для обеспечения сшивки белковых молекул образца с гелем срезы обрабатывались метакриловой кислотой n-гидроксисукцинимид эфира (MA-NHS), и заключались в гель. После обработки протеиназной К гель последовательно расширялся в воде 3 раза. С помощью proExM удалось добиться увеличения структуры нейронов в 3.5 раза, что позволило визуализировать мельчайшие детали их морфологии, включая дендритные шипики. Экспансионная микроскопия является перспективным методом для исследования ультраструктуры нейронов.

Финансирование работы: РФФИ 20-45-01004.

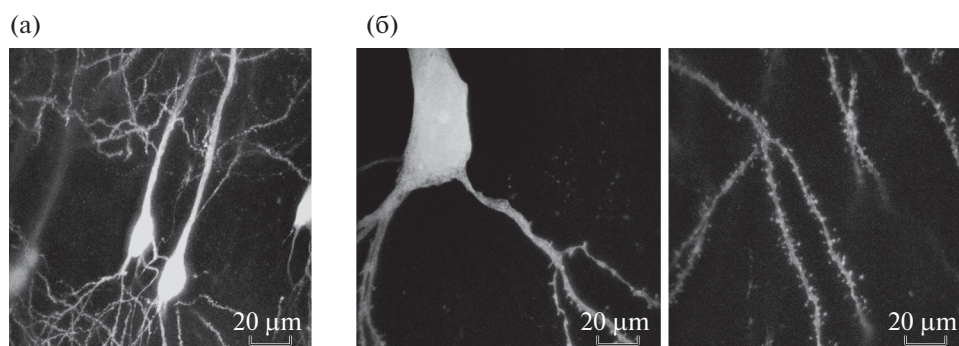


Рис. 1. Конфокальные изображения нейронов CA1 области гиппокампа до (а) и после (б) применения метода proExM размером 1024×1024 пикселей, с разрешением 0.149 пиксела/мкм и шагом по оси $z = 2$ мкм получены на микроскопе Thorlabs с $60\times$ увеличением. Длина масштабного отрезка 20 мкм.