

Наука та інновації. 2009. Т. 5. № 2. С. 82–91.

Я.Б. Блюм, Я.О. Шеремет, Ю.А. Красиленко, А.І. Ємець

КОНФОКАЛЬНА МІКРОСКОПІЯ У ЦЕНТРИ КОРИСТУВАННЯ УНІКАЛЬНИМИ ПРИЛАДАМИ ПРИ ІНСТИТУТІ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА ГЕНОМІКИ НАНУ*



Показані можливості використання потенціалу конфокальної мікроскопії для біологічних та біомедичних досліджень у Центрі колективного користування коштовними приладами при Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН України. Розглянуто основні принципи конфокальної мікроскопії та історія її становлення. Охарактеризовано принцип роботи конфокального мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина) та продемонстровано його переваги. Наведені приклади використання можливостей конфокального мікроскопа фахівцями відділу геноміки та біотехнології Інституту харчової біотехнології та геноміки, а також інших наукових установ.

Ключові слова: Центр колективного користування коштовними приладами, конфокальна мікроскопія, мікроскоп LSM 510 META, клітинна біологія, біомедицина, біотехнологія, цитоскелет.

ВСТУП

У 2004 р. Національна академія наук України започаткувала програму забезпечення своїх наукових установ унікальними приладами, для того щоб не допустити відставання у розвитку сучасних напрямів фундаментальної науки та прикладних дисциплін. Зокрема, відсутність новітнього інфраструктурного забезпечення українських дослідницьких установ уповільнювала процес одержання передових знань у різних галузях сучасної біології.

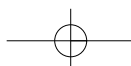
* Стаття підготовлена на основі матеріалів доповіді, виголошеної академіком Блюмом Я.Б. на Науковій конференції "Наукоємна продукція та технології. Технічне забезпечення науково-дослідних лабораторій", що відбулася в Києві у жовтні 2008 року у рамках Форуму "Комплексне забезпечення лабораторій в Україні".

© Я.Б. БЛЮМ, Я.О. ШЕРЕМЕТ, Ю.А. КРАСИЛЕНКО,
А.І. ЄМЕЦЬ, 2009

Реалізація цієї програми закупівель дала можливість уже в березні 2005 р. створити при установах Відділення загальної біології НАН України два Центри колективного користування коштовними приладами унікального обладнання (згідно з Розпорядженням № 104 Президії НАН України від 18 лютого 2005 р.). Одним із них став Центр колективного користування приладами (ЦККП) для геноміки та молекулярної біотехнології рослин ("Ген-тест") (керівник центру — канд. біол. наук В.І. Корховий) у складі відділу геноміки та біотехнології Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

На початку створення Центру були визначені головні напрямки його сервісної діяльності. Основні з них:

- ✦ клітинна біологія рослин, розроблення нових аспектів інженерії рослин;
- ✦ клітинна та генетична інженерія рослин;



- † геноміка рослин та біоінформатика;
- † методи детекції генетично модифікованого матеріалу;
- † розробка наукових засад біобезпеки.

У зв'язку з переходом відділу геноміки та біотехнології з Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України до Державної установи "Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України", створеної згідно з постановою Президії НАН України від 02.07.08 № 194 "Про перейменування Інституту харчової хімії і технології НАН України та його подальший розвиток", Центр також перейшов до вищезгаданої установи. Відповідно головним завданням Центру продовжує бути сприяння проведенню високотехнологічних експериментальних робіт у галузі клітинної біології, геноміки та біотехнології в Інституті харчової біотехнології та геноміки НАН України, надання кваліфікованих послуг вченим установ відділення загальної біології та інших відділень НАН України, а також розвиток співпраці НАН України з іншими науковими та освітніми закладами.

ЦККП Інституту харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України надає послуги в отриманні наукових результатів за допомогою п'яти сучасних приладів, у тому числі конфокального лазерного скануючого мікроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина). Цей мікроскоп було введено в експлуатацію на початку 2006 р., і на сьогодні він є найсучаснішим приладом не лише в системі установ Національної академії наук, але й інших науково-освітніх закладів України.

ЩО ТАКЕ КОНФОКАЛЬНА МІКРОСКОПІЯ?

Конфокальна мікроскопія — це сучасний метод і незамінний інструмент для візуалізації та дослідження внутрішньо- і позаклітинних структур та аналізу клітинних процесів у біологічних та біомедичних дослідженнях [1]. Характерними рисами, що вирізняють конфокальну лазерну скануючу мікроскопію з по-

між інших різновидів світлової мікроскопії, є її покращена просторова та часова роздільна здатність [2]; високий рівень контрастності зображень; можливість проведення мультиспектральних досліджень з розділенням сигналів від різноманітних флюорохромів; отримання тривимірного зображення об'єкту (так звана 3D-реконструкція); детальне дослідження визначеної ділянки препарату завдяки селективному опроміненню лазером [3]. Конфокальна мікроскопія дозволяє отримувати "оптичні зрізи" живих та фіксованих препаратів завтовшки до 100 мкм [4]. Зазвичай сучасні конфокальні скануючі мікроскопи обладнані трьома-п'ятьма лазерними системами, що контролюються акустично-оптичними фільтрами для точного регулювання довжини хвилі та інтенсивності лазерного випромінювання. Завдяки наявності фотопомножувачів із квантовою ефективністю в ультрафіолетовому діапазоні спектра такі мікроскопи дають можливість проводити дослідження у діапазоні 400÷759 нм [3, 4]. Фактично конфокальний мікроскоп спроможний виявити присутність окремої молекули [5]. Проте, незважаючи на покращену роздільну здатність конфокального мікроскопа, деталізація зображень, отриманих за допомогою електронного мікроскопа, чіткіша [6].

ІСТОРІЯ СТАНОВЛЕННЯ КОНФОКАЛЬНОЇ МІКРОСКОПІЇ

Первинна ідея конфокальної мікроскопії, запатентована у 1961 р., належить *М. Мінськи*, який всередині 1950-х рр. під час підготовки дисертаційної роботи у Гарвардському університеті зрозумів необхідність саме прижиттєвих досліджень нефіксованих препаратів нейронної сітки тканин мозку як таких, що максимально відтворюють дійсні процеси у тканинах мозку [7]. Проте на той час функціональна модель конфокального мікроскопа так і не була створена, оскільки не існувало відповідних джерел освітлення та програмного забезпечення для аналізу великих обсягів графічної інформації. Подальшого розвитку ідея

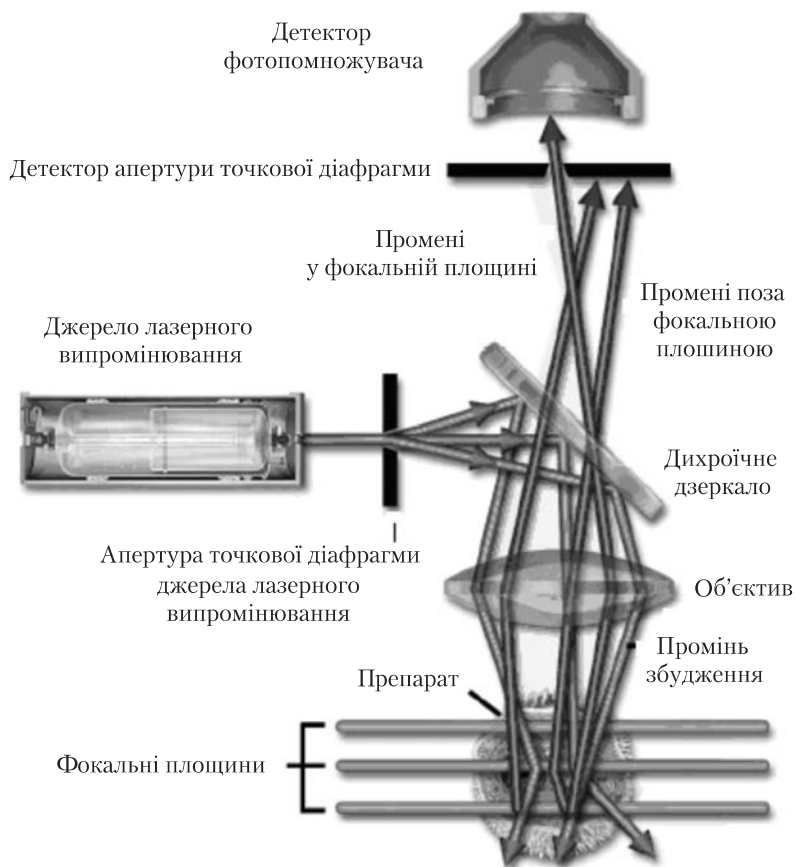


Рис. 1. Схематичне зображення проходження лазерних променів та принципові складові конфокального мікроскопа [4]

М. Мінськи набула у роботах Д.М. Еггера та М. Петрапа [4], які наприкінці 1960-х рр. вперше сконструювали багатопробеневиий конфокальний мікроскоп на основі оберального диска Ніпкова для досліджень *in vivo* немічених зрізів тканин мозку. Надалі Д. Еггер продовжив пошуки і у 1973 р. опублікував перші інформативні конфокальні зображення клітин [4]. Протягом 1970–80-х років інтерес до можливостей конфокальної мікроскопії зростає, відбувається посиленіи розвиток комп'ютерних та лазерних технологій, винайдення новітніх алгоритмів обробки цифрових зображень [4].

Ідеї М. Мінськи отримали практичне втілення у 1979 р., коли датський фізик Ф. Бракендорф розробив лазерний скануючий конфокальний мікроскоп, а К. Шернард сформулював основи теорії формування зображень

[4]. Т. Вільсон, Б. Амос і Д. Уайт у 1985 р. продемонстрували можливість використання конфокальної мікроскопії для дослідження флуоресцентних препаратів [8]. Перші комерційні прилади з'явилися у 1987 р. Протягом 1990-х рр. відбулося стрімке вдосконалення волоконної оптики, винайдення нових фізичних та хімічних методів просвітлення лінз, тонких діелектричних покриттів, детекторів із низьким рівнем шуму [1, 4], а "коеволуція" конфокальних мікроскопів та флуоресцентних барвників призвела до появи і вдосконалення чисельних синтетичних молекулярних маркерів та барвників природного походження, зокрема зеленого флуоресцентного білка (Green Fluorescent Protein – GFP) із медузи *Aequorea victoria* та його модифікованих аналогів – жовтого, червоного тощо [9].

ПРИНЦИП РОБОТИ КОНФОКАЛЬНОГО МІКРОСКОПА

Основний принцип конфокальної мікроскопії полягає в збігу фокальних площин мікроскопа (рис. 1) [4, 10, 11]. У об'єктива оптичного мікроскопа є дві площини — фокальна, де розміщується досліджуваний об'єкт, та співвідносна до неї конфокальна площина, куди об'єкт проектується. Ця проекція, зазвичай, і розглядається спостерігачем через окуляр. Точкова конфокальна діафрагма ("pinhole") розміщена в конфокальній площині так, що її проекція точно збігається з фокусом джерела монохроматичного випромінювання.

Принцип та схема роботи сучасного лазерного конфокального мікроскопа такі: когерентне світло, випромінюване лазером, проходить через отвори двох точкових діафрагм (перед джерелом випромінювання та перед детектором фотопомножувача). Оскільки лазерне випромінювання відбивається дихроїчним дзеркалом та сканується вздовж препарату у певній фокальній площині, вторинна флюоресценція повертається крізь препарат у тій самій фокальній площині та фокусується як конфокальна точка на детекторі апертури точкової діафрагми. При цьому діаметр точкової діафрагми контролює товщину оптичного зрізу, оскільки відсікає флюоресцентне світло, що виходить від об'єкта поза зоною фокальної площини. Таким чином формується певний "просторовий фільтр", що дає можливість знімати інформацію тільки в окремих тонких оптичних площинах зразка на відміну від традиційної люмінесцентної мікроскопії, яка забезпечує детектування флюоресценції з усієї освітленої (в тому числі позафокусної) частини зразка, створюючи при цьому неколікатне зображення з невисокою роздільною здатністю. Значна частина флюоресцентного випромінювання над і під фокальною площиною об'єктива не є конфокальною відносно точкової діафрагми (промені поза фокальною

площиною) і формує широкі диски Ейрі у площині апертури. Лише незначна кількість позафокусного флюоресцентного випромінювання проходить через апертуру точкової діафрагми, а решту периферійного світла фотопомножувач не реєструє, тому воно не відіграє суттєвої ролі у формуванні конфокального зображення.

Отже, спрощена схема отримання зображення за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа виглядає так: лазерний промінь сканує флюоресцентний зразок; надалі точкова діафрагма затримує "шумове" світло і на чутливий детектор потрапляє лише світло від досліджуваного об'єкта у фокусі. Отримані дані об'єднуються у зображення вже при обробці цифрових сигналів. Кінцеве зображення є тонким висококонтрастним оптичним зрізом зразка в площині XY з достатньо інформативною роздільною здатністю. Якщо фокусну площину зсувати відносно осі Z, то можна отримати тривимірне об'ємне зображення. Спеціальна система незалежних скануючих дзеркал, розташованих у взаємно перпендикулярних площинах, дає змогу переміщувати лазерний фокус у середині зразка в площині XY. Змінена таким чином в кожній точці (пікселі) інтенсивність флюоресценції надає можливість отримувати тонкий XY "оптичний зріз". Завдяки позиційному переміщенню зразка уздовж вісі Z з'являється можливість проводити крок за кроком пошарове Z-оптичне секціонування. Подальша комп'ютерна тривимірна обробка "оптичних зрізів" та їх реконструкція дає можливість отримати контрастне по всьому об'єму тривимірне флюоресцентне зображення досліджуваного об'єкта. За цими параметрами можна відтворити зображення будь-якого "оптичного зрізу" зразка, навіть вертикального у поперечних площинах XZ або YZ, що абсолютно не можливо для звичайної світлової мікроскопії.

КОНФОКАЛЬНИЙ ЛАЗЕРНИЙ СКАНУЮЧИЙ МІКРОСКОП Carl Zeiss LSM 510 META

Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп Carl Zeiss LSM 510 META призначений для кількісного обчислення та аналізу цифрових зображень (рис. 2), зокрема для визначення інтенсивності флюоресценції барвників, відстаней між окремими клітинними структурами, динаміки роботи іонних каналів [1, 10, 12]. Дана модель мікроскопа дає можливість швидко детектувати та обчислювати спектральні характеристики флюоресцентних барвників, піки емісії яких наближені один до одного, або є такими, що перекриваються [13, 14]. Програмне забезпечення Carl Zeiss надає можливості аналізувати ряд важливих параметрів (зокрема ступінь колокалізації мічених структур, концентрацію іонів за інтенсивністю флюоресценції); знімати множинні часові серії мультифлюоресцентних зображень; здійснювати три- і чотиривимірну реконструкцію об'єктів; анімувати серію "оптичних зрізів"; вимірювати просторові параметри; використовувати метод відновлення флюоресценції після фотовідбілювання (FRAP) для отримання кількісної та якісної інформації про кінетику внутрішньоклітинних транспортних процесів, а також метод флюоресцентного резонансно-

го переносу енергії (FRET) для дослідження міжмолекулярних та білок-білкових взаємодій [15].

Конфокальний мікроскоп LSM 510 META — це одна з останніх модифікацій лазерних *скануючих модулів* [14]. Основною його відмінністю від інших конфокальних мікроскопів спорідненого класу є заміна двох (з чотирьох) конфокальних одноканальних детекторів на один поліхроматичний 32-канальний META-детектор. Розкладене на спектральні складові емітоване світло після проходження через конфокальну діафрагму незалежно детектується у 32-х чутливих каналах. Відповідно кожна одиниця зображення, окрім тривимірних координат, має ще й інформацію про спектральний розподіл інтенсивності ("lambda stacks", λ -зрізи). Описана технологія отримала назву "*емісійного відбитка пальців*", оскільки вона дозволяє із високим ступенем вірогідності реєструвати кожен флюоресцентний компонент як окремий канал. Навіть у випадку незначного перекриття (накладання) спектрів емісії флюоресцентних барвників сканування зображення із використанням методу мультитрекінгу дає можливість одночасно використовувати кілька окремих лазерних ліній і відповідних каналів сканування з індивіду-



Рис. 2. Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META (Carl Zeiss, Німеччина)

альними точковими діафрагмами для отримання чіткого розділеного мультифлюоресцентного зображення.

Одночасне поєднання двох підходів — мультитрекінгу та "емісійної дактилоскопії" в моделі мікроскопа LSM 510 META — дає можливість повністю усунути проблему перекриття флюоресцентних спектрів при мультифлюоресцентному аналізі. Окрім описаного раніше 32-канального поліхроматичного META-детектора до складу скануючого модуля конфокального мікроскопа LSM 510 META входять ще META-компоненти з двома одноканальними детекторами. Скануюча роздільна здатність приладу становить від 4×1 до 2048×2048 пікселів, вільне скануюче обертання — 360° з кроком 1° , максимальне поле сканування — 18 мм у діагональному напрямку. Також мікроскоп надає можливості використовувати одночасно до 8-и каналів на 13×2 швидкостях. Модель LSM 510 може мати до 4-х незалежних конфокальних каналів з індивідуальними точковими діафрагмами (концепція "*multiple pinhole*"), що є важливим для дійсної конфокальної архітектури, оскільки товщина "оптичного зрізу" залежить від довжини хвилі флюоресцентного барвника і розміру точкової діафрагми. Існує потреба автоматичного налаштування розміру точкової діафрагми кожного з 32-х каналів для отримання серії "оптичних зрізів" мультифлюоресцентного зображення. Саме автоматизації встановлення потрібного розміру точкової діафрагми завдячує отримання високої просторової роздільної здатності при максимальній інтенсивності сигналу [13, 14].

До складу *лазерного модуля* приладу входять температурно-стабілізований акустично-оптичний регульований фільтр, спроможний миттєво і неперервно протягом мікросекундного інтервалу (<5 мксек) змінювати і контролювати інтенсивність випромінювання кожної з 6-и різних лазерних ліній від 0 до 100 %. За наявності акусто-оптичної системи площина сканування чи фотовідбілювання може мати

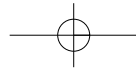
довільну геометричну форму і площину (функція Region of Interest). У мікроскопі наявні лазери видимого діапазону світла (VIS) (аргоновий — 458, 477, 488, 514 нм, гелій-неоновий — 543 нм, гелій-неоновий — 633 нм) та лазер ультрафіолетового діапазону (UV) (діодний — 405–430 нм) [13, 14].

Електронний модуль мікроскопа являє собою єдине DSP-управління мікроскопом, VIS та UV лазерними модулями, сканувальним модулем та іншими додатковими компонентами. Крім того, прилад укомплектовано системним блоком (2,8 GHz; 1024 MB DDR-SDRAM; 120 GB Hard disk 7200; CD-RW, DVD; NVIDIA Quadro 4/2xDVI 128 MB) і станцією з двома моніторами високої роздільної здатності [13, 14]. У мікроскопі LSM 510 META в моторизованому і керованому специфічним програмним забезпеченням *оптичному модулі* наявні об'єктиви EC Plan-Neofluar (10x/0.30, 20x/0.5, 40x/0.6 Korr, 40x/1.30 Oil DIC, 63x/0.75 Korr) та Plan-Apochromat (63x/1.4 Oil DIC) на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 200 M [13, 14].

ДОСЛІДЖЕННЯ, ВИКОНАНІ У ЦЕНТРІ КОЛЕКТИВНОГО КОРИСТУВАННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ЛАЗЕРНОГО СКАНУЮЧОГО КОНФОКАЛЬНОГО МІКРОСКОПА LSM 510 META

Як уже зазначалося вище, використання в дослідженнях гена GFP та його різних модифікацій, що поклало початок новій ері у вивченні структури та функцій живої клітини [9], дає можливість досліджувати складові живих клітин та різноманітні внутрішньоклітинні процеси, а також зміни структури різних тканин у реальному часі. Результати різноманітних експериментів, виконаних співробітниками відділу геноміки і біотехнології з використанням ліній рослин або їх клітин, що експресують GFP у поєднанні з різними білками рослин, наведені на рис. 3.

Так наприклад, нами була використана лінія модельної рослини *Arabidopsis thaliana*, яка експресує хімерний ген GFP, злитий з одним



Світ інновацій

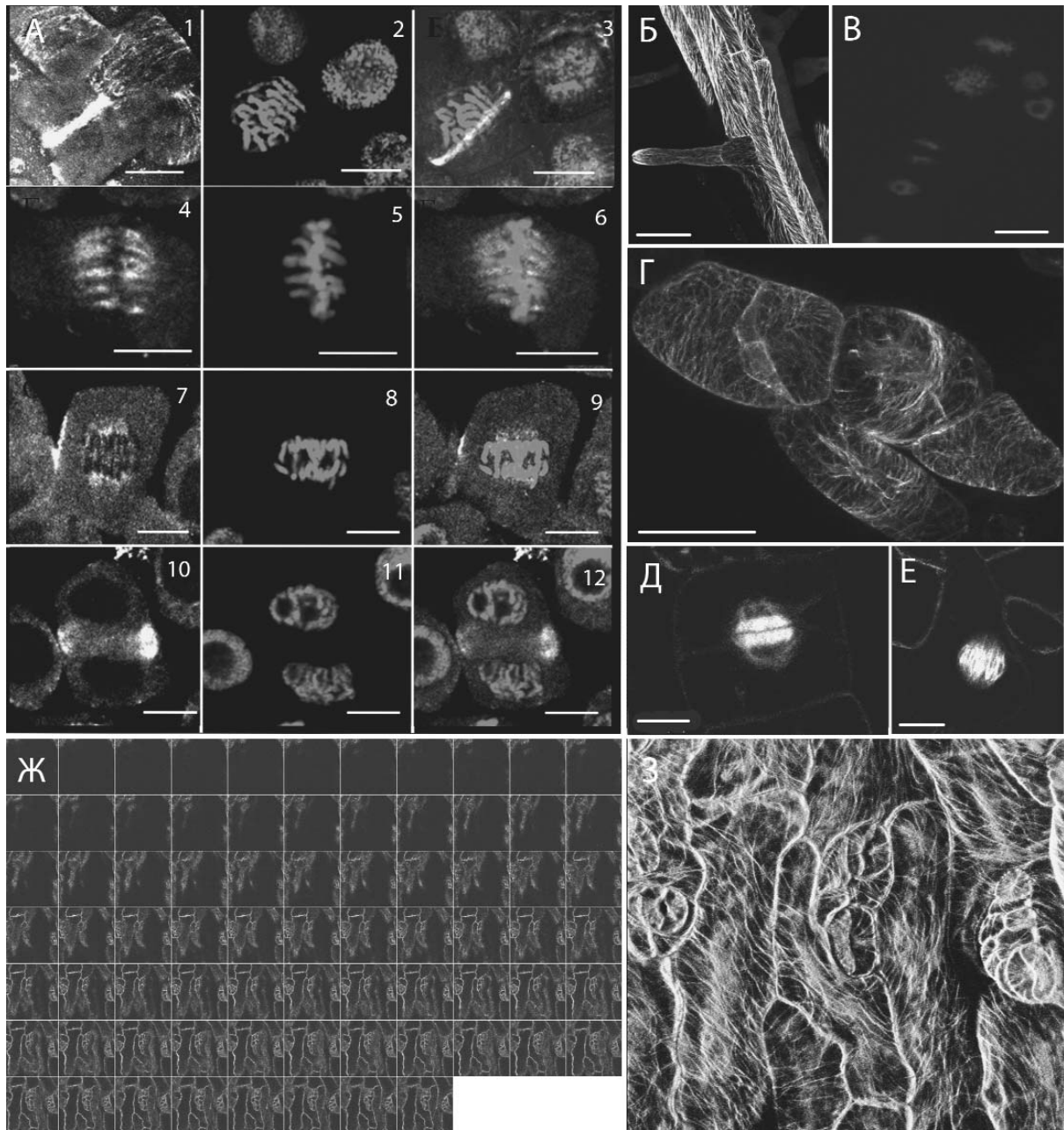
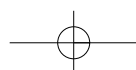


Рис. 3. Зображення біологічних об'єктів, отримані за допомогою мікроскопа LSM 510 META: *A* (1–12) — гамма-тубулін (FITC) та хромосоми (пропідіум йодид) у клітинах коренів мутантних рослин *Nicotiana sylvestris*; *B* — організація мікротрубочок *in vivo* у трихобластах та атрихобластах зони диференціації кореня *Arabidopsis thaliana* (GFP-MAP4); *B* — візуалізація структури хроматину за допомогою DAPI у клітинах *Nicotiana tabacum*; клітини суспензійної культури *Nicotiana tabacum* BY-2 (GFP-MBD) *in vivo*; *Г* — організація кортикальних мікротрубочок; *Д* — веретено поділу; *Е* — фрагмопласт; *Ж* — серія оптичних зрізів (*Z*-серія) продигових клітин листкової пластинки мутантної лінії *Arabidopsis thaliana* (GFP-TUA6) з інтервалом 0,3–0,5 мкм; *З* — тривимірна реконструкція отриманої *Z*-серії організації мікротрубочок у продигових клітинах листкової пластинки *Arabidopsis thaliana* (GFP-TUA6) за допомогою програмного забезпечення Image Axiovision (Carl Zeiss, Німеччина). Масштаб — 20 мкм.



із геном білку, асоційованого з мікротрубочками, що дає можливість візуалізувати такі найважливіші структури клітин, як мікротрубочки, які приймають участь у підтриманні архітектури будь-якої еукаріотичної клітини, поділі клітин, транспорті везикул і органел, а також у відповіді на фактори навколишнього середовища тощо. Одночасно ці структури є мішенями для ряду речовин, які проявляють протиракову, антипротозойну, антигельмінтну, протигрибкову та гербіцидну активність, тому їх дослідження має величезне значення для розвитку різних прикладних та фундаментальних напрямків біологічної та медичної наук.

З використанням вищезазначеної лінії *Ara-bidopsis* нами були проведені фундаментальні дослідження, пов'язані з вивченням функціонального значення ролі фосфорилування тубуліну (основного білка мікротрубочок) за залишками серину/треоніну та тирозину в рослинній клітині [16, 17], а також з'ясована роль фосфорилування тубуліну у формуванні механізмів холодостійкості рослинних клітин [18]. Нами також вивчалася функціональна роль процесів нітротирозилування мікротрубочок у клітинах і тканинах під дією оксиду азоту (NO) [19] та його роль у процесах формування стійкості до ультрафіолету В, дія якого здатна викликати виражену апоптотичну відповідь у рослинних клітинах (Литвин Д.І., Ємець А.І. та Блюм Я.Б.).

Разом з білоруськими колегами нами були отримані трансгенні лінії українських та білоруських сортів льону [20–22], котрі характеризуються різною стійкістю до полягання. Перенесений у такі рослини за допомогою генетичної трансформації химерний ген GFP-тубулін дає можливість вивчати кореляцію між особливостями організації мікротрубочок і локалізацією целюлозних фібрил, які безпосередньо приймають участь у формуванні механічної стійкості клітин стебла льону до полягання.

Нами також вивчався механізм дії фенілкарбаматних гербіцидів на клітини рослин [23,

24] та нових синтезованих сполук з класу динітроанілінів на мікротрубочки рослин (Ємець А.І., Ожередов С. П. та Блюм Я.Б.).

У рамках співпраці з науково-дослідними установами НАН України були проведені дослідження різного спрямування. Зокрема вивчалися особливості бактеріальної корозії, яка є наслідком діяльності мікроорганізмів, що утворюють біоплівку на різноманітних поверхнях (відділ загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України); візуалізація процесів накопичення кальцію в рослинних клітинах після обробки гербіцидами динітроанілінового ряду та їх композиціями з комерційними гербіцидами інших хімічних класів (Інститут фізіології рослин і генетики НАН України); накопичення алкалоїдів в калусній культурі лікарської рослини раувольфії зміїній *Rauwolfia serpentina* L. (відділ генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України); дослідження колокалізації білків в культурі клітин раку молочної залози (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України). Також були проведені роботи по дослідженню вдосконалення методів лабораторної діагностики вірусних інфекцій людини, зокрема дослідження особливості репродукції ряду ротавірусних інфекцій в культурі клітин K2 (Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика Міністерства охорони здоров'я України); аналіз трансформованих ліній льону-довгунця *Linum usitatissimum* L. на наявність експресії зеленого флюоресцентного білка в клітинах стебла (Інститут генетики та цитології НАН Білорусії); розробка нових технологій діагностики та лікування онкологічних захворювань, а саме дослідження метастазування у клітини сечового міхура та простати людини (Національний інститут раку Міністерства охорони здоров'я України).

Від 2009 р. Центр колективного користування, почавши функціонувати на базі Інституту харчової біотехнології та геноміки НАН

України, включився до роботи по вирішенню проблем, які стосуються біотехнології мікроорганізмів, обміну вторинних метаболітів рослин, а також розвитку нанобіотехнології.

ЛІТЕРАТУРА

1. Robert H.W. Confocal optical microscopy // Rep. Prog. Phys. — 1996. — 59. P. 427–471.
2. Rowland R.E., Nickless E.M. Confocal microscopy opens the door to 3-dimensional analysis of cells // Bioscene. — 2000. — 26(3). — P. 1–7.
3. Verveer P.J., Gemkow M.J., Jovin T.M. A comparison of image restoration approaches applied to three-dimensional confocal and wide-field fluorescence microscopy // J. Microscopy. — 1999. — 193. — P. 50–61.
4. Claxon N.S., Fellers T.J., Davidson M.W. Laser scanning confocal microscopy // Olympus Fluoview Resource Center. National High Magnetic Field Laboratory. Retrieved on 2007-07-25.
5. Peternam E.A.J., Sosa H., Moerner W.E. Single molecule spectroscopy and microscopy for biomedical motors // Ann. Rev. Phys. Chem. — 2004. — 55. — P. 79–96.
6. Pawley J. Fundamental limits in confocal microscopy, in J. B. Pawley (ed.) // Handbook of biological confocal microscopy, New York: Plenum Press. — 1995. — P. 19–37.
7. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscopy // Scanning. — 1988. — 10. — P. 128–138.
8. Amos W.B., White J.G. How the confocal laser scanning microscope entered biological research // Biol. Cell. — 2003. — 95. — P. 335–342.
9. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science. — 1994. — 263. — P. 802–805.
10. Confocal laser scanning microscopy: application in research and teaching, design, function. Methods // Microscopy from Carl Zeiss. 45-0039 e/04.05. — 2004. — P. 1–23.
11. Murray J. Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination methods, in R. D. Goldman and D. L. Spector (eds.) // Live Cell Imaging: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press. — 2005. — P. 239–280.
12. Wilhelm S., Grobler B., Gluch M., Haramut H. Confocal Laser Scanning Microscopy: Optical image formation and electronic signal processing // Jena, Germany: Carl Zeiss Advanced Imaging Microscopy. — 2003. — P. 258.
13. Wright S.J., Wright D.J. Introduction to confocal microscopy, in B. Matsumoto (ed.), Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. New York: Academic Press // Meth. Cell Biol. — 2002. — 70. — P. 1–85.
14. Carl Zeiss website on contrasting techniques in light microscopy: www.zeiss.de/contrasts.
15. Chen Y., Mills J.D., Periasamy A. Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM // Differentiation. — 2003. — 71. — P. 528–541.
16. Шеремет Я.А., Емец А.И., Вербелен Ж.-П., Блюм Я.Б. Влияние ингибитора протеинфосфатаз, оокадиновой кислоты, на морфологию корня *Arabidopsis thaliana* и организацию кортикальных микротрубочек в его клетках // Цитология и генетика. — 2009. — Т. 43, N 1. — С. 3–12.
17. Yemets A., Sheremet Ya., Vissenberg K., Van Orden J., Verbelen J.-P., Blume Ya.B. Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in *Arabidopsis* root cells // Cell Biol. Int. — 2008. — 32, N 6. — P. 630–637.
18. Шеремет Я.О., Емець А.І., Блюм Я.Б. З'ясування ролі фосфорилювання тубуліну по залишкам тирозину у формуванні механізмів холодостійкості рослинних клітин. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова — К.: Логос, 2008. — Т. 5. — С. 454–458.
19. Емець А.И., Красиленко Ю.А., Шеремет Я.А., Блюм Я.Б. Реорганизация микротрубочек как ответ на реализацию сигнальных каскадов оксида азота (II) в растительной клетке // Цитология и генетика. — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 3–12.
20. Баєр Г.Я., Баєр О.А., Шиша Е.Н., Лемеш В.А., Картель Н.А., Емець А.И., Блюм Я.Б. Визуалізація микротрубочек в клетках льна-долгунца с использованием химерного гена GFP-TUA6. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. — К.: Логос, 2008, Т. 5, С. 343–348.
21. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Емець А.И., Блюм Я.Б., Картель Н.А. Трансформация различных генотипов льна-долгунца с помощью *Agrobacterium tumefaciens*: предварительные результаты. Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. — К.: Логос, 2008. — Т. 5. — С. 268–273.
22. Емець А.И., Баєр Г.Я., Баєр О.А., Шиша Е.Н., Шеремет Я.А., Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Картель Н.А., Блюм Я.Б. Трансформация льна-долгунца химерным геном GFP-TUA6 для изучения роли микротрубочек в формировании устойчивости к полеганию. Геном рослин: Зб. наук. пр. V Міжн. конф. 13–16 жовтня 2008 р. / Південний біотех. Центр в рослинництві УААН. — Одеса, 2008. — С. 71–74.
23. Стельмах О.А., Емець А.И., Блюм Я.Б. Мутанты *Nicotiana glauca* L., устойчивые к изопропил-N-фенилкарбамату, обладают повышенной стабильностью

- ЦОМТов // Цитология и генетика. — 2007. — 41, № 6. — С. 3—10.
24. Yemets A., Stelmakh O., Blume Ya.B. Effects of the herbicide isopropyl-N-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action // Cell Biol. Int. — 2008. — 32, N 6. — P. 623—629.

*Я.Б. Блюм, Я.О. Шеремет,
Ю.А. Красиленко, А.И. Емец*

КОНФОКАЛЬНАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ЦЕНТРЕ КОЛЛЕКТИВНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ
УНИКАЛЬНЫМИ ПРИБОРАМИ
ПРИ ИНСТИТУТЕ ПИЩЕВОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ И ГЕНОМИКИ НАНУ

Показаны возможности использования потенциала конфокальной микроскопии для биологических и биомедицинских исследований в Центре коллективного пользования ценными приборами при Институте пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины. Рассмотрены основные принципы конфокальной микроскопии и история ее становления. Охарактеризован принцип работы конфокального микроскопа LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) и продемонстрированы его преимущества. Приведены примеры использования возможностей конфокального микроскопа специалистами отдела геномики и биотехнологии Института пищевой биотехнологии и геномики, а также других научных учреждений.

Ключевые слова: Центр коллективного пользования дорогостоящими приборами, конфокальная мик-

роскопия, микроскоп LSM 510 META, клеточная биология, биомедицина, биотехнология, цитоскелет.

*Ya.B. Blume, Ya.O. Sheremet,
Yu.A. Krasylenko, A.I. Yemets*

CONFOCAL MICROSCOPY IN THE CENTRE
OF COLLECTIVE EXPLOITATION
OF COST EXPENSIVE EQUIPMENT AT
THE INSTITUTE OF FOOD BIOTECHNOLOGY
AND GENOMICS OF NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES OF UKRAINE

The paper describes the possibilities for confocal microscopy usage in biological and biomedical investigations in the Centre of Collective Exploitation of Cost Expensive Equipment at the Institute of Food Biotechnology and Genomics of National Academy of Sciences of Ukraine. Main principles of confocal microscopy and history of its establishment are considered. Principle of confocal microscope LSM 510 META (Carl Zeiss, Germany) operation is characterized and its advantages for conducting of investigations in the fields of cell biology, genomics, biomedicine and biotechnology are described. The examples of confocal microscope application by staff of the Department of Genomics and Biotechnology of the Institute and other scientific organizations are presented.

Key words: Centre of Collective Exploitation of Cost Expensive Equipment, confocal microscopy, microscope LSM 510, cell biology, biomedicine, biotechnology, cytoskeleton.

Надійшла до редакції 14.01.09.