

Шановні колеги! У рубриці „Методология научных исследований” редакція продовжує публікацію матеріалів, що пов’язані з найважливішими аспектами наукової і навчальної діяльності: організаційно-методичним забезпеченням періодичних наукових видань, загальними принципами біостатистичного та математичного супроводження досліджень, а також оригінальними методичними підходами вітчизняних і зарубіжних морфологів.

О.В. Градов

Институт Химической
Физики им. Н.Н. Семенова
РАН,
г. Москва, Российская
Федерация

Надійшла: 15.08.2018
Прийнята: 20.09.2018

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.3.146-150>

УДК: 620.187+621.385.833.2+681.723.28+681.7.077.5+535.514+535.525

ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ КОРРЕЛЯЦИОННАЯ ЭЛЕКТРОННО-ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ (PCLEM). ПЕРВОЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ

© Morphologia. – 2018. – Т. 12, № 3. – С. 146-150.

© О.В. Градов (ORCID 0000-0001-5118-6261), 2018

✉ neurobiophys@gmail.com

Gradov O.V. Towards Polarizing Correlative Light-Electron Microscopy (PCLEM).

ABSTRACT. The Polarizing Correlative Light-Electron Microscopy (PCLEM) accessory (for TESLA BS-300 scanning electron microscope with goniometric stage) is proposed. Such accessories may be used not only in classical scanning electron microscopy chambers, but also in ESEM-like DIY-setups (Environmental Scanning Electron Microscopy).

Key words: CLEM; ESEM; five-axis Feodorov stage; polarization microscope; goniometric stage for electron microscope.

Citation:

Gradov OV. [Towards Polarizing Correlative Light-Electron Microscopy (PCLEM)]. Morphologia. 2018;12(3):146-50. Russian. DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.3.146-150>.

Введение

Технология корреляционной световой и электронной микроскопии (Correlative Light-Electron Microscopy (CLEM)) представляет собой сравнительно новый метод измерений на фиксированных ультратонких срезах и живых объектах [1-5]. В идеализированной форме, схематически, его можно представить, как способ установления колокализации маркеров и зон интереса (ROI) в электронном микроскопе с помощью вдвигаемой в его камеру (или к ней присоединенной с окна – при наличии соответствующей оптики) головки оптического микроскопа с установленной на ней цифровой камерой. Анализ колокализации в CLEM в настоящее время выполняется только для узкого ряда промышленно выпускаемых методов и с помощью специализированного про-

граммного обеспечения [6,7]. Техническое развитие и диверсификация методов электронной микроскопии, оптической микроскопии и анализа / математико-морфологической обработки изображений к моменту внедрения CLEM было уже настолько продвинуто, что технических вопросов в области комбинаторики самых прогрессивных методов электронной и цифровой оптической микроскопии возникать не могло, что обеспечило практически некритическое восприятие подобных методов и чисто линейный, опирающийся на моду и наиболее «импактные» тренды, характер внедрений. В силу этого, роль электронного микроскопа в получении информации и измерениях свелась к визуализации (поскольку это – наиболее понятный и легко дешифруемый показатель для среднего пользова-

теля), а метки, номенклатура которых была сформирована в 2000-е гг., в период популярности флуоресцентной и, особо, конфокальной микроскопии, приобрели, в силу этого, чисто специфический иммуногистохимический и молекулярно-биологический характер. На английской странице «Википедии» по CLEM, следуя сайтам производителей, с недавних пор даётся определение CLEM: «combination of an optical microscope – usually a fluorescence microscope – with an electron microscope». Действительно, большинство статей по CLEM подразумевает микроинъекцию молекул для визуализации клеточных мишеней, что поясняется, в частности, в виде видеопротоколов [8], напоминающих аналогичные для конфокальной и флуоресцентной микроскопии.

Конкретные метки могут содержать атом / атомы металла (например, кадмия), что позволяет достигать синхронно контрастов карты электронной плотности и флуоресценции [9] (либо оптической плотности). Однако, в ряде случаев, часть протокола, относящаяся к метке, наиболее адекватна иммуноэлектронной микроскопии, разработанной десятилетия назад. Различные комбинации технологических и системотехнических приёмов и модулей, будучи нацеленными на улучшение качества и точности сигнала, а не на изменение дескрипторов анализа, увы, не приносят результатов, ожидаемых от метода пользователями-морфологами. Уже достигнут порог вокселя в 2 нм [10], ниже которого предмет биологического рассмотрения не имеет смысла (мембраны и мозаичные условно мембраномиметические бислои имеют толщины от 1-2 нм на слой до 20 нм в сечении; ширина двойной спирали ДНК – 2,2-2,4 нм). Проведены исследования на клетках растений в режиме обратного рассеяния пучка на системе CLEM со сканирующим электронным микроскопом [11]. В различных комбинациях совмещены криомикроскопия и микроскопия стандартных условиях с различной степенью вакуумирования камеры или допустимого напуска атмосферы (см., например, [12-14]).

В любых таких техниках всё же существует предел информативности, обусловленный биохимической селективностью той или иной метки, а также тривиальным подходом к инструментарию исследования – в силу чего он не всегда продвигает исследователя к цели, а зачастую порабощает его методике с заведомо известными критериями индикации (метки, их спектральные свойства, прямые и косвенные ограничения). В то время, как в биологической микроскопии общего профиля в течение последних полутора десятилетий идёт ожесточенные исследования и с ними связанные дискуссии о возможности физической визуализации без меток и маркеров (т.н. “label-free techniques”), CLEM, наобо-

рот, склоняется к флуоресцентным меткам, которые, по очевидным физико-химическим причинам, нарушают прижизненную структуру (либо реактивности к другим меткам) клеточного образца. Несмотря на то, что CLEM способна, причем – без конфокального оптического слайсинга и рендеринга, точно восстанавливать 3D рельеф объекта [15,16], восстанавливаются, по сути, только детали локализации метки, нанесенные на паттерн образцов, зарегистрированный вторым микроскопическим блоком. Возможности картирования иных физических свойств с установлением колокализации их с морфологией объекта – не существует в CLEM.

В связи с этим, целесообразно создание расширенных средств CLEM, способных, на базе известных приёмов микроскопии и оптического картирования, обеспечить нанесение на барельеф изображения, получаемый, условно, методом «А», карты физических свойств, детектируемых методом «Б». Одним из важнейших параметров биологического образца, с позиций оптической идентификации, является поляризация. В системах *in vitro* это может быть реализовано посредством известных методов поляриметрии, позволяющей отличить правовращающие и левовращающие молекулы (например, аминокислоты и сахара). Из-за суммирования, усреднения и интерференции подлежащих сигналов при поляризационной микроскопии *in vivo* это сделать сложнее. Однако поляризация может нести существенный набор биологически-релевантных и физико-химических дескрипторов, вследствие чего на данный момент нет альтернатив поляризационным исследованиям ряда морфологических (морфоструктурных) / морфодинамических феноменов. Однако все соответствующие этой группе явлений поляризационные дескрипторы не учитываются в современной CLEM.

Меж тем, круг подобных явлений достаточно широк, чтобы привести к разработке на элементарной технической базе XX века (к которой относятся первые «морфологические» реализации поляризационно-микроскопических принципов измерений) поляризационных и поляризационно-интерференционных насадок для CLEM. Примерами явлений, структур и реактивных феноменов такого рода, демонстрирующими разнообразие приложений этой техники, являются прецеденты поляризационно-микроскопического измерения мембран и гигантских везикулярных структур [17], включая анализ текучести мембран (последнее – на флуоресцентном / люминесцентном поляризационном микроскопе) и, вследствие этого, деформируемости мембранных цитологических структур [18]; исследования и измерений длины саркомера на мышечном препарате [19] и изменений свойств эластичных волокон с субмикроскопической прецизионностью [20,21], двулучепреломления клеточных струк-

тур и субклеточных компартментов [22] (в том числе – для сравнительной органеллографии, в отсутствие электронно-микроскопических средств исследования); нейробиохимических и иммуноморфологических методов детектирования, в частности, как элементарный пример данного подхода, анализ эффективности пероксидазной реакции в нейроморфохимии [23] (в тривиальном примере – пероксидаза хрена); идентификации и типирования структуры и поверхности отдельных видоспецифичных биоструктур, например – яиц паразитов [24].

Поэтому нашей группой были начаты опытно-конструкторские работы по адаптации методов поляризационной микроскопии для внедрения её в системы CLEM.

Материалы и результаты

Нами была использована поляризационная система с оптического тракта микроскопа Carl Zeiss Polmi с микрофотонасадкой (“Polmi A” mit Mikrofotografischer Einrichtung MF) с байонетным фиксатором, совместимым также с микропроекционной насадкой (“Polmi A” mit Mikroprojektionseinrichtung), за исключением серийных объективов – планахроматов в комплектации прибора. Данная насадка после создания переходника с байонета на резьбу устанавливалась в одно из боковых окон колонны микроскопа TESLA BS-300, на котором ранее были имплементированы протоколы многоугловых измерений с использованием на практике эквивалентных федоровскому и коноскопическому гониометрических столов. За счет этого достигалась возможность использования CLEM в режимах, свойственных ранее только минералогической поляризационной микроскопии. В качестве CMOS-регистратора сигнала использовалась модифицированная веб-камера с подключением по универсальной серийной шине. Изображение контакта резьбы с колонной стороны и модернизированной головки “Polmi A”, на конце которой закреплена камера, приведено на рис. 1.

Заключение

Таким образом, на базе элементарных физических принципов и устаревшей системы, с помощью которой в настоящее время невозможно извлечь эвристически-ценных новых данных, тем не менее, возможно создать гибридную аппаратную платформу, в системной логике которой общий пул данных будет обладать качественной новизной и иметь новый смысл, определяемый совмещением и корреляционным анализом отклика в поляризации и электронно-пучковой регистрации одновременно (в колокализации и синхронном анализе прямых метрологических данных – изображениях).

Перспективы дальнейших исследований

Предварительный анализ возможностей развития корреляционной микроскопии при внедре-

нии в неё технологий поляризационной оптики не ограничивается поляризационно-трансмиссионной микроскопией. По факту, для измерений оптически-плотных объектов с использованием электронного микроскопа рационально измерение также и эллиптической поляризации по принципам, подобным микроэллипсометрии, в том числе спектральной (в случае планарных призматических подложек возможно создание гибридных систем и GUI CLEM, адаптированных для проведения локальной спектроскопии SPR – поверхностного плазмонного резонанса – причём, металлизация интерфейса призмы и объекта, напыление металла на SEM-исследуемый объект и гибридная процедура будут эквивалентны) внутри колонны. Чипы, обеспечивающие безлинзовую ультрамикроскопию внутри колонн, также могут использоваться в микропроекционном режиме как регистраторы поляризационного сигнала. Возможно создание поляризационной корреляционной электронной / оптической криомикроскопии и поляризационной CLEM в контролируемых атмосферах и водных или иных жидкостных средах [25,26].



Рис. 1. Изображение контакта резьбы с колонной стороны и модернизированной головки “Polmi A”, на конце которой закреплена камера.

Acknowledgements

The work was financially supported by FASO (project 0082-2018-0006, registration code AAAA-A18-118020890097-1).

Литературные источники
References

1. van Rijnsoever C, Oorschot V, Klumperman J. Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nat Methods*. 2008;5(11):973-80. doi:10.1038/nmeth.1263.
2. Paez-Segala MG, Sun MG, Shtengel G, Viswanathan S, Baird MA, Macklin JJ, Patel R, Allen JR, Howe ES, Piszczek G, Hess HF, Davidson MW, Wang Y, Looger LL. Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM. *Nat Methods*. 2015;12(3):215-8.
3. Padman BS, Ramm G. Live-cell CLEM of subcellular targets: an optimized procedure for polymer-based imaging substrates. *Methods Cell Biol*. 2014;124:275-303. doi:10.1016/B978-0-12-801075-4.00013-6.
4. Padman BS, Bach M, Ramm G. An improved procedure for subcellular spatial alignment during live-cell CLEM. *PLoS One*. 2014;9(4):95967. doi:10.1371/journal.pone.0095967.
5. Haraguchi T, Osakada H, Koujin T. Live CLEM imaging to analyze nuclear structures at high resolution. *Methods Mol Biol*. 2015;1262:89-103. doi:10.1007/978-1-4939-2253-6_6.
6. Schorb M, Sieckmann F. Matrix MAPS—an intuitive software to acquire, analyze, and annotate light microscopy data for CLEM. *Methods Cell Biol*. 2017;140:321-33. doi:10.1016/bs.mcb.2017.03.012.
7. Heiligenstein X, Paul-Gilloteaux P, Raposo G, Salamero J. eC-CLEM: A multidimension, multimodel software to correlate intermodal images with a focus on light and electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2017;140:335-52. doi:10.1016/bs.mcb.2017.03.014.
8. Reddick LE, Alto NM. Correlative light and electron microscopy (CLEM) as a tool to visualize microinjected molecules and their eukaryotic sub-cellular targets. *J Vis Exp*. 2012;(63):3650. doi:10.3791/3650.
9. Yamanaka R, Hirasaka Y, Jin M, Yanagisawa H, Yasunaga T. Metallothionein labeling for CLEM method for identification of protein subunits. *Microscopy*. 2014;63(1):32. doi:10.1093/jmicro/dfu065.
10. Luckner M, Wanner G. Precise and economic FIB/SEM for CLEM: with 2 nm voxels through mitosis. *Histochem Cell Biol*. 2018;150(2):149-70. doi:10.1007/s00418-018-1681-x.
11. Rizzo NW, Duncan KE, Bourett TM, Howard RJ. Backscattered electron SEM imaging of resin sections from plant specimens: observation of histological to subcellular structure and CLEM. *J Microsc*. 2016;263(2):142-7. doi:10.1111/jmi.12373.
12. Marion J, Le Bars R, Satiat-Jeuemaitre B, Boulogne C. Optimizing CLEM protocols for plants: GMA embedding and cryosections as alternatives for preservation of GFP fluorescence in Arabidopsis roots. *J Struct Biol*. 2017;198(3):196-202. doi:10.1016/j.jsb.2017.03.008.
13. Ader NR, Kukulski W. triCLEM: Combining high-precision, room temperature CLEM with cryo-fluorescence microscopy to identify very rare events. *Methods Cell Biol*. 2017;140:303-20. doi:10.1016/bs.mcb.2017.03.009.
14. Li S, Ji G, Shi Y, Klausen LH, Niu T, Wang S, Huang X, Ding W, Zhang X, Dong M, Xu W, Sun F. High-vacuum optical platform for cryo-CLEM (HOPE): A new solution for non-integrated multiscale correlative light and electron microscopy. *J Struct Biol*. 2018;201(1):63-75. doi:10.1016/j.jsb.2017.11.002.
15. Romero-Brey I. 3D Electron Microscopy (EM) and Correlative Light Electron Microscopy (CLEM) Methods to Study Virus-Host Interactions. *Methods Mol Biol*. 2018;1836:213-36. doi:10.1007/978-1-4939-8678-1_11.
16. Booth DG, Beckett AJ, Molina O, Samejima I, Masumoto H, Kouprina N, Larionov V, Prior IA, Earnshaw WC. 3D-CLEM Reveals that a Major Portion of Mitotic Chromosomes Is Not Chromatin. *Mol Cell*. 2016;64(4):790-802. doi:10.1016/j.molcel.2016.10.009.
17. Khalid K, Noh MAM, Khan MN, Ishak R, Penney E, Chowdhury ZZ, Hamzah MH, Othman M. Giant vesicles (GV) in colloidal system under the optical polarization microscope (OPM). *Micron*. 2017;100:30-3. doi:10.1016/j.micron.2017.04.010.
18. Bruck A, Sahar E, Agmon E, Shinitzky M. Fluorescence polarization microscope for automatic screening of membrane fluidity of individual cells. *Appl Opt*. 1977;16(3):564-7. doi:10.1364/AO.16.000564.
19. Akazawa K, Okuno R, Hosono T. Sarcomere lengths of thick skeletal muscle specimens measured under an epi-illumination-type polarization microscope. *Front Med Biol Eng*. 2001;11(1):59-71.
20. Romhányi G. On the submicroscopic structure of the elastic fibres of the bovine ligamentum nuchae as revealed by the polarization microscope. *Acta Morphol Acad Sci Hung*. 1965;13(4):397-409.
21. Romhányi G. Submicroscopic structure of elastic fibres as observed in the polarization microscope. *Nature*. 1958;182(4640):929-30.
22. Shin IH, Shin SM, Kim DY. New, simple theory-based, accurate polarization microscope for birefringence imaging of biological cells. *J Biomed Opt*. 2010;15(1):016028. doi:10.1117/1.3327280.
23. Illing RB, Wässle H. Visualization of the HRP reaction product using the polarization microscope. *Neurosci Lett*. 1979;13(1):7-11.
24. Asakura S. Crystallographic studies on the

eggs of various human parasites. I. Observation with polarization microscope. *Tohoku J Exp Med.* 1956;64(2):105-15.

25. Gradov OV, Gradova MA. Methods of electron microscopy of biological and abiogenic structures in artificial gas atmospheres. *Surface Engineering and Applied Electrochemistry.*

2016;52(1):117–25.

26. Gradov OV, Gradova MA. Cryoelectron microscopy as a functional instrument for system biology, structural analysis and experimental manipulations with living cells. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine.* 2014;24(3):193–210.

Градов О.В. Поляризаційна кореляційна електронно-оптична мікроскопія (PCLEM). Перше попереднє повідомлення.

РЕФЕРАТ. Запропоновано конструкцію поляризаційної приставки для кореляційної електронної та оптичної мікроскопії (т.зв. CLEM) у вакуумній камері від скануючого електронного мікроскопа TESLA BS-300 з багатовісним гоніометричним столом, що заміщає столи типу Федорова (3-5-вісні) і спеціалізовані для коноскопічних поляризаційних вимірювань. Дана система може бути впроваджена також в ESEM - Environmental Scanning Electron Microscopy, тобто в камері з контрольованим середовищем / атмосферою.

Ключові слова: кореляційна електронна і світлова мікроскопія; скануюча електронна мікроскопія в контрольованих атмосферах; п'ятивісний столик Федорова на карданних передачах; поляризаційний мікроскоп; гоніометричний стіл електронного мікроскопа.

Градов О.В. Поляризационная корреляционная электронно-оптическая микроскопия (PCLEM). Первое предварительное сообщение.

РЕФЕРАТ. Предложена конструкция поляризационной приставки для корреляционной электронной и оптической микроскопии (т.н. CLEM) в вакуумной камере от сканирующего электронного микроскопа TESLA BS-300 с многоосным гониометрическим столом, замещающим столы типа Федорова (3-5-осные) и специализированные для коноскопических поляризационных измерений. Данная система может быть внедрена также в ESEM – Environmental Scanning Electron Microscopy, т.е. в камере с контролируемой средой / атмосферой.

Ключевые слова: корреляционная электронная и световая микроскопия; сканирующая электронная микроскопия в контролируемых атмосферах; пятиосный столик Федорова на карданых передачах; поляризационный микроскоп; гониометрический стол электронного микроскопа.