

## №5 ДӘРІСТІҢ ҚЫСҚАША МАЗМҰНЫ

### Дәріс 5 Люминесцентті микроскопия.

**Дәрістің мақсаты:** Дәрісте люминесцентті микроскопияның биологиялық нанообъектілерді зерттеуде қолданылу әдістемесі, жұмыс жасау принципі бойынша толық қарастырылады.

Люминесценция – это способность вещества испускать излучение при воздействии на него внешней энергии (энергии возбуждения).

Излучение люминесценции – это избыток излучения, превышающий тепловое излучение вещества, которое возникает при данной температуре. Длительность излучения люминесценции значительно превышает период световых волн. Излучение люминесценции зависит от природы вещества (объекта) и характеризуется: спектральным распределением плотности лучистого потока, т. е. шириной спектральной полосы пропускания, величинами коэффициента излучения и максимальной длиной волны, при которой происходит излучение; выходом люминесценции, т. е. отношением излучаемой энергии к поглощенной, на который влияет степень тушения излучения, зависящая от структуры вещества и от внешних условий; временем затухания.

Фотолюминесценция – это свечение объектов, возникающее в результате поглощенной ими лучистой энергии. Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (300–400 нм), либо синевфиолетовыми. В обоих случаях возникает свечение в цветовой гамме всего или большей части видимого спектра. Спектр флуоресценции остается неизменным при любой длине волны возбуждающего излучения. Этот вид люминесценции носит название наведенной (вторичной) в отличие от первичной – собственной флуоресценции, нередко проявляемой витаминами, многими пигментами, некоторыми жировыми веществами и антибиотиками, встречающимися в живых организмах, некоторыми продуктами нормального и патологического обмена.

Фотолюминесценцию условно подразделяют на:

**флуоресценцию**, то есть свечение со временем затухания, не превышающим 10–8 секунд;

**фосфоресценцию**, которая продолжается более длительное время после прекращения возбуждения.

Флуорохромы – красители, не вызывающие сильной окраски объектов в обычном свете, но флуоресцирующие при облучении ультрафиолетовыми лучами. Из синтетических флуорохромов наилучшие результаты дают акридин оранжевый, корифосфин, примулин, родамин, ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат), которые обычно применяют в виде слабых водных растворов.

Для выявления кислотоустойчивых микобактерий применяют метод люминесцентной микроскопии, называемый флуорохромированием. Метод флуорохромирования почти не отличается от общеизвестных методов окрашивания анилиновыми красителями, хотя и требует обычно меньшего времени (доли минуты). Для люминесцентных методов исследования большую роль играет обработка препарата специальными реактивами – флуорохромами. Отдельные молекулы вещества обладают способностью на короткое время поглощать свет, а затем испускать его в другой длине волны, как правило, сдвинутой в сторону красного света (закон Стокса<sup>1</sup>), превышая длину волны поглощаемого света возбуждения на 20–50 нм. Различные флуорохромы (маркеры) обладают в зависимости от вида совершенно определенными спектрами поглощения, зависящими от внутреннего строения флуоресцирующих молекул, а иногда и от их окружения. Поглощается не каждый фотон облучающего света, а лишь некоторая их часть. Кроме того, не все захваченные фотоны снова излучают свет. Хорошие маркирующие вещества имеют высокий «квантовый выход», характеризующий соотношение между испущенными и поглощенными фотонами. Этот эффект является очень полезным для микроскопии. Маркированный таким образом препарат освещается возбуждающим выделенным, например, синим светом и наблюдается уже в свете, сформированном с помощью запирающего светофильтра, не пропускающего полностью, например, длинноволновый зеленый, желтый и красный свет. В случае, когда объект не окрашен специальными красителями, ультрафиолетовый свет, проходя через объектив и попадая на препарат, поглощается молекулярными структурами объекта и остается невидимым или почти невидимым для человеческого глаза. Таким образом, маркированные структуры, например – части клеточной структуры, высвечиваются зеленым светом на темном фоне (рис. 1).

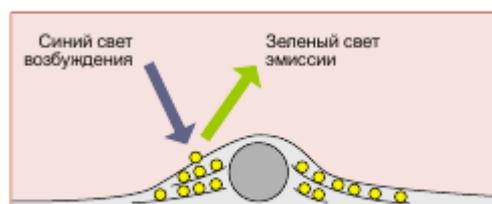


Рис. 1 Схема свечения маркеров

**Люминесцентная микроскопия.** Метод основан на наблюдении светящихся микроскопических объектов на общем темном фоне препарата. По сравнению с методом световой микроскопии в проходящем свете он обладает рядом преимуществ: высокая степень контрастности цветных светящихся объектов на темном фоне, значительно большая площадь просматриваемого поля зрения за счет использования меньших увеличений микроскопа, экономия времени и др.