

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ПО ИЗМЕРЕНИЯМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ОДНОДЛИННОВОЛНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

© 2011 г. Ю. Н. Захаров, канд. физ.-мат. наук; А. В. Ершова, студент

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

E-mail: zhrv@rf.unn.ru

Рассматривается проблема получения достоверных количественных данных экспериментов при изучении функциональной активности клеток мозга методом флуоресцентной микроскопии с использованием специфических кальциевых красителей. Разработан метод определения концентрации ионов кальция по текущей интенсивности флуоресценции на одной длине волны исходя из протокола окрашивания и условий возбуждения, исключающий необходимость калибровки в каждом эксперименте.

Ключевые слова: спектроскопия, флуоресценция, флуоресцентная микроскопия, функциональный анализ, анализ клеток, биофотоника.

Коды OCIS: 170.6280, 170.2520, 170.2655, 170.1530, 170.3880

Поступила в редакцию 15.02.2011

Необычайно важная роль метаболизма ионов кальция в жизнедеятельности и функционировании живых организмов в целом и их нервной деятельности, в том числе в когнитивных процессах, вызвала необходимость разработки методов определения концентрации ионов кальция в клетках головного мозга. Одним из наиболее развитых и удобных методов визуализации ионов кальция применительно к нейробиологическим исследованиям является флуоресцентная микроскопия [1]. Метод основан на применении специфических красителей, изменяющих характер флуоресценции в присутствии специфичных этому красителю атомов, молекул или ионов, в данном случае – ионов кальция Ca^{2+} . В зависимости от концентрации Ca^{2+} может происходить изменение спектральной кривой излучения (так называемые двухдлинноволновые красители) или интенсивности флуоресценции при неизменной форме спектра (однодлинноволновые) [2]. Несмотря на широкое распространение этого метода исследование изменения концентрации ионов кальция (кальциевых осцилляций) проводится, как правило, на качественном уровне вследствие отсутствия надежных методов количественного анализа. Двухдлинноволновые красители, в принципе, позволяют однозначно вычислить концентрацию свободных ионов

кальция по отношению интенсивностей излучения красителя на двух различных длинах волн при постоянном возбуждении или по отношению интенсивностей излучения при изменении длины волны возбуждения [2]. Но спектр поглощения этих красителей лежит в ультрафиолетовой области, а ультрафиолетовая накачка вызывает сильную автофлуоресценцию белков, накладывающуюся на информационный спектр, искажая тем самым результаты измерений. Известная формула вычисления концентрации свободных ионов по излучению однодлинноволновых красителей [2] требует апостериорных измерений интенсивности флуоресценции при отсутствии ионов агента F_{\min} и при насыщении ими F_{\max} . Это не гарантирует идентичности условий измерения этих величин и текущей интенсивности F , что необходимо для работы формулы [2]. Однако можно получить расчетные соотношения, не требующие такой калибровки после каждого измерения F .

Интенсивность излучения F при наблюдении отдельной ячейки объема V , загруженной флуоресцентным красителем, определяется интенсивностью излучения лазера накачки I_0 , числом молекул красителя, коэффициентом поглощения красителя α , квантовым выходом красителя Q_F , числом фотонов, захва-

ченных оптической системой Φ (количество окрашенного материала, фактически видимого в объектив), и квантовой эффективностью детектора Q_D

$$F = \Phi Q_D Q_F \alpha I_0 n, \quad (1)$$

где n – молярное количество красителя, присутствующего в объеме V . Вводим постоянный фактор

$$S = \Phi Q_D Q_F \alpha I_0 \quad (2)$$

– интенсивность флуоресценции 1 мкМ индикатора. В случае кальциевого индикатора молярное количество n_f и n_b свободного и связанного с кальцием красителя нужно рассмотреть отдельно. Они отличаются своим квантовым выходом и поглощением, поэтому им соответствуют факторы S_f и S_b . Тогда

$$F = S_f n_f + S_b n_b. \quad (3)$$

С другой стороны, соотношение между концентрациями свободных ионов кальция $[Ca^{2+}]_i$ и красителя, свободного и связанного с ионизованным кальцием, зависит от константы диссоциации

$$K_d = \frac{n_f [Ca^{2+}]_i}{n_b}. \quad (4)$$

Учитывая, что общее количество красителя на единицу объема V

$$n_\Sigma = n_b + n_f, \quad (5)$$

выражаем через константу диссоциации (4) $[Ca^{2+}]_i$, умножаем числитель и знаменатель на разность факторов S_b и S_f и, подставляя их соответственно в числитель и знаменатель из выражения (3) с учетом соотношения (5), получаем

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{n_b (S_b - S_f)}{n_f (S_b - S_f)} = K_d \frac{F - S_f n_\Sigma}{S_b n_\Sigma - F}. \quad (6)$$

* * * * *

Таким образом получена формула, позволяющая вычислять концентрацию ионов кальция по измеряемой интенсивности флуоресценции, выраженной в тех же единицах (на 1 мкМ), что и факторы S_f и S_b , в которые входят характеристики оптической системы микроскопа и его фотодетектора Φ и Q_D – величины постоянные и известные для каждого конкретного прибора. Характеристики красителя α , Q_F и K_d также однозначно определяются видом и формой красителя и растворителем, а общую концентрацию красителя n_Σ в измеряемом объеме необходимо выбирать исходя из требуемого диапазона определяемой концентрации ионов кальция и проводить загрузку препарата красителем таким образом, чтобы обеспечить эту заданную величину. При загрузке полярной формы красителя через патч-пипетку это легко сделать, определив объем клетки. При использовании АМ-формы красителя [3] исходят из среднего размера клеток и их плотности, которые либо известны, или определяются отдельно для заданных объектов исследования.

В случае, когда необходимо определить общее количество ионов кальция, выделенное в результате какого-либо процесса, формула преобразуется за счет добавления к концентрации свободного кальция концентрации связанного (из соотношений (5) и (6))

$$[Ca^{2+}]_{total} = K_d \frac{F - S_f n_\Sigma}{S_b n_\Sigma - F} + \frac{F - S_f n_\Sigma}{S_b - S_f}. \quad (7)$$

Поскольку калибровки всех входящих в выражения (6) и (7) параметров известны из характеристик приборов и индикаторов или могут быть проведены при подготовке эксперимента, эти соотношения позволяют также проводить количественный мониторинг в масштабе реального времени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Handbook of biological confocal microscopy // Ed. by Pawley J.B. N.Y: Springer, 2006. 985 p.
2. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3440–3450.
3. Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition // Ed. by Jonson I., Spence M.T.Z. London: Paperback, 2010. 623 p.