

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Петрова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России)  
*Отдел учебно-методической работы*

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Северо-Западный государственный  
медицинский университет имени И.И. Мечникова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России)  
*Кафедра онкологии*

**Артемьева Е. С., Артемьева А. С.  
Кушнарв В. А., Рогачев М. В.**

## **Флуоресцентные методы исследования, гибридизация *in situ***

*Учебное пособие*

Санкт-Петербург  
2021

УДК:616-006:543.426(07)

ББК:55.6я7

Артемьева Е. С., Артемьева А. С., Кушнарв В. А., Рогачев М. В. Флуоресцентные методы исследования, гибридизация *in situ*: учебное пособие для врачей и обучающихся в системе высшего и дополнительного профессионального образования. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2021. – 88 с.

ISBN 978-5-6045023-7-2

Рецензент: кандидат биологических наук А. Ф. Сайфитдинова, доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

В учебном пособии представлена методика исследования цитогенетических характеристик посредством флуоресцентной гибридизации *in situ* с коммерчески-доступными зондами. Перечислены ключевые моменты пробоподготовки, выбора материалов, реактивов и оборудования для адекватного распознавания флуоресцентных меток. Приведены особенности неспецифического связывания, наличие разного рода артефактов и возможности их учета при интерпретации результатов данного типа исследований.

Учебное пособие предназначено для врачей-патологоанатомов, врачей-онкологов, врачей-детских онкологов, научных сотрудников, участвующих в процессах изучения морфологии и физиологии, а также для обучающихся в системе высшего образования (аспирантура, ординатура, специалитет) и дополнительного профессионального образования (повышение квалификации, профессиональная переподготовка).

Утверждено  
в качестве учебного пособия  
Ученым советом ФГБУ «НМИЦ онкологии  
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России  
протокол № 5 от 30 марта 2021 г.

ISBN 978-5-6045023-7-2

© Артемьева Е. С. Коллектив авторов, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	5
Введение.....	8
Глава 1. История развития метода.....	10
1.1. Маркировка антигенов.....	10
1.2. Развитие методов детекции.....	11
1.3. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> .....	13
1.3.1. Подготовка цитологического или гистологического препарата.....	14
1.3.2. Предварительная обработка (если необходимо).....	15
1.3.3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация.....	16
1.3.4. Гибридизация.....	18
1.3.5. Постгибридизационные отмывки и детекция гаптенов... ..	19
1.3.6. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа.....	20
Глава 2. Флуоресцентная микроскопия.....	24
2.1. Люминофоры (флуорохромы).....	24
2.2. Стабильность люминофоров, фотохромизм и деграда- ция.....	28
2.3. Флуоресцентный микроскоп.....	30
2.4. Фильтры и их подбор.....	32
2.5. Автофлуоресценция.....	35
Глава 3. Пробоподготовка.....	37
3.1. Материалы и реактивы.....	37
3.2. Протокол флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	38
3.2.1. Детализованный протокол депарафинизации.....	38
3.2.2. Детализованный протокол демаскировки (предобра- ботки).....	39
3.2.3. Детализованный протокол нанесения зонда.....	40
3.2.4. Детализованный протокол пост-гибридизации и за- крепления.....	40
Глава 4. Оцифровка флуоресцентных препаратов.....	42
4.1. Особенности сканирующих микроскопов.....	43
4.1.1. Типы детекторов.....	43

4.1.2. Формирование, хранение и обработка цифровых изображений.....	44
4.2. Выбор усиления и экспозиции.....	46
Глава 5. Артефакты и способы их редуцирования.....	48
5.1. Размытые или разорванные границы ядер.....	48
5.2. Автофлуоресценция и неспецифическое окрашивание...	50
5.3. Отсутствие гибридационных сигналов.....	54
Контрольные вопросы.....	56
Тестовые задания.....	59
Список литературы.....	87

## Список сокращений

ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК	– инфракрасный спектральный диапазон
ЛУК	– ледяная уксусная кислота
мРНК	– матричная РНК
нм	– нанометр, мера измерения длины, $10^{-9}$ метра
ПЗС	– прибор с зарядовой связью, тип оптических детекторов (то же что и CCD)
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РНК	– рибонуклеиновая кислота
УФ	– ультрафиолетовый спектральный диапазон
Alexa 488 (633)	– активированные флуоресцеиновые красители
AMCA	– 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid
Cy5	– cyanine 3; 3,5; 5,5 (активированные эфиры цианина)
CCD	– англ. charge-coupled device (то же что и ПЗС)
CGH	– англ. comparative genomic hybridization (сравнительная геномная гибридизация)
CISS	– англ. chromosome in situ suppression (супрессионная гибридизация in situ)
DABCO	– 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (диазобисциклооктан)
DAPI	– 4',6-diamidino-2-phenylindole (диамидинофенилиндол)
DEAC	– 7-diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid
DiA	– 4-[4-(dihexadecylamino)styryl]-n-methylpyridinium iodide
DiD	– 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt
DiI	– 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiI; DiIC18(3))
DiO	– 3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate
DiR	– 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindotricarbocyanine iodide

- EWSR1 – англ. ewing sarcoma breakpoint region 1 (место разрыва длинного плеча 22 хромосомы при саркоме Юинга)
- F(ab')<sub>2</sub> – бивалентный антисвязывающий фрагмент иммуноглобулина
- FITC – fluorescein isothiocyanate (флуоресцеин изотиоцианата I гидрохлорид)
- GFP – англ. green fluorescent protein (зеленый флуоресцирующий белок)
- HER2 – англ. human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста, тип 2)
- FISH – англ. fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная гибридизация in situ)
- FM1-43 – n-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(4-(dibutylamino) styryl) pyridinium dibromide
- FM4-64 – n-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide
- In situ – лат. на месте
- JPEG – англ. joint photographic experts group, графический формат со сжатием
- Kaede – фотоактивируемый флуоресцентный белок, выделенный из каменистых кораллов, *Trachyphyllia geoffroyi*
- LisoTracker Red FM – ферментно-активируемый диметиламинный краситель
- MCB – англ. multi-color banding (многоцветное связывание)
- M-FISH – англ. multiplex fluorescence in situ hybridization (многоцветная флуоресцентная гибридизация in situ)
- MitoTracker Green FM – ферментно-активируемый краситель на основе бензоксазолия (benzoxazolium)
- N-myc – белок протоонкогена, также известный как basic helix-loop-helix protein 37 (bHLHe37), представляет собой белок, который у человека кодируется геном MYCN.
- PA-GFP – англ. photoactivated green fluorescent protein (фотоактивируемый зеленый флуоресцирующий белок)
- PBS – англ. phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

pH	– лат. pondus hydrogenii («вес водорода», водородный показатель)
PI	– propidium iodide (иодид пропидия, йодистый пропидий)
PNA	– англ. peptide nucleic acid (пептидная нуклеиновая кислота)
RAID	– англ. redundant array of independent disks (избыточный массив независимых дисков)
RGB	– аббревиатура английских слов red, green, blue (красный, зелёный, синий)
SKY	– англ. spectral karyotype (спектральное карิโอ-типирование)
SynaptoGreen C3	– активированный стириловый краситель
SynaptoRed C2	– активированный стириловый краситель
SSC	– англ. saline-sodium citrate buffer (стандартный солевонатриевый раствор)
Texas Red	– хлорангидрид сульфородамина 101
TIFF	– англ. tagged image file format, графический формат
TOTO1	– thiazole orange dimer (цианиновый краситель, димер тиазолового оранжевого)
TRITC	– тетраметилпродамин-5-изотиоцианат
TSA	– англ. tyramide signal amplification (усиление мечением тирамид)
W	– англ. Watt, единица измерения мощности

## Введение

Флуоресцентные методы исследований уже не назовешь новыми в области диагностики и тем более научных исследований молекулярно-генетических характеристик клеток.

Несмотря на то, что история развития этих методов перевалила за полвека, появляется все больше новых маркёров, которые выходят на рынок и находят место в рутинной диагностике.

А научные исследования в области генома выявляют новые гены и белки, поведение которых в процессе жизнедеятельности клетки представляет интерес как с точки зрения осуществления ее нормальных функций, так и с точки зрения развития патологий.

Описанная в данном пособии методология представляет собой серьезный инструмент, позволяющий врачу на светооптическом уровне отследить поведение целевых характеристик в контексте клеточной культуры или среза ткани.

Но, как и любой современный инструмент, требует от его использующего точного понимания принципов подготовки и съемки образцов.

Это необходимо для того, чтобы на этапе интерпретации учитывать особенности и ограничения метода, что особенно важно при использовании в диагностических или прогностических целях.

Большинство лабораторий, начинающих работать с флуоресцентными методами диагностики, обладают только информацией, которая указана производителями коммерческих зондов в стандартных протоколах окраски.

Однако сами протоколы подразумевают поэтапную обработку образцов, и на каждом из этих этапов есть нюансы, каждый из которых влияет на итоговый результат.

Таким образом, для того, чтобы в полной мере использовать данный метод на практике, лаборатория должна подобрать свои условия выполнения протокола и комплектацию оборудования.

Надеемся, данное пособие в этом поможет.



Собранные здесь сведения являются результатом опыта работы не только автора и его коллег, но и множества специалистов, которые отвечали на многочисленные вопросы по мере их возникновения.

Отдельная благодарность кандидату биологических наук Алсу Фаритовне Сайфитдиновой и другим сотрудникам Центра Коллективного Пользования «Хромас» Научного парка СПбГУ, показавших «узкие места» и то, насколько широко флуоресцентные методы применяются для исследования самых разнообразных биологических объектов.

# Глава 1.

## История развития метода

Специфическое связывание локализованных в клетках антигенов лежит в основе нашего иммунитета, и использование этого явления для связывания с тем или иным видом меток, которые мы можем отследить, положило начало целой линии методик, послуживших развитию современных представлений о биологических системах.

### 1.1. Маркировка антигенов

Основу заложила пионерская работа Albert H. Coons et al. [7], в которой была показана возможность обнаружения антигенов в тканях млекопитающих взаимодействием антиген-антитело с флуоресцентной визуализацией.

Дальнейшее развитие обуславливалось выбором методики меченая антител: радиоактивными изотопами с последующей визуализацией методами радиографии; ферментами в качестве хромофоров (красителей, цветовые отличия которых определяются глазом), заложившими основы иммуногистохимии (или иммуноцитохимии, в зависимости от объекта исследования); люминофорами и дальнейшим развитием флуоресцентной микроскопии.

Однако природа взаимодействия антиген-антитело носит преимущественно физический характер, и внедрение иммуногистохимических методов в диагностическую практику стало возможно только после того, как удалось разработать способы конъюгации молекул красителя с антителами без нарушения их иммунных свойств.

Следующий важный шаг в развитии технологий окраски был связан со способом получения моноклональных антител по гибридомной технологии.

В настоящее время исследователь может использовать не только высокоспецифичные аффинно очищенные моноклональные антитела вместо поликлональных антисывороток, но и  $F(ab')_2$ -фрагменты, состоящие из переменных частей легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Такие укороченные молекулы более специфично связываются с

мишенью на препарате и меньше подвержены деградации [2].

А в 1969 году J. G. Gall и M. Lou Pardue опубликовали ряд работ, показавших возможность маркировать специфические участки ДНК и мРНК на метафазных хромосомах и в интерфазных ядрах клеток посредством гибридизации *in situ* [8, 15]. В качестве зонда используются фрагменты нуклеиновых кислот или их аналоги, в состав которых включены репортерные молекулы.

## 1.2. Развитие методов детекции

Прорывным шагом совершенствования методик специфической окраски в 70-80-х годах XX века стало включение в состав таргетных зондов небольших молекул – гаптен, которые затем могут легко выявляться антителами или другими специфически взаимодействующими с ними молекулами, конъюгированными с различными видами меток.

Наиболее известные примеры такой специфической пары – это авидин из яичного белка и стрептавидин, выделенный из *Streptomyces avidinii*, которые обладают высоким сродством к биотину, а яд бледной поганки фаллоидин очень специфично распознает фибриллярный актин.

На сегодняшний день есть целый ряд таких гаптен: биотин, дигоксигенин, динитрофенол, эстрадиол, которые детектируются иммунохимическими методами, причем в силу их специфичности детекцию гаптен можно проводить одновременно, что позволяет при необходимости выявлять сразу несколько антигенов на одном препарате.

Таким образом, будучи по существу иммуногистохимическим окрашиванием, детекция может быть прямой, если антитела к использованным гаптенам непосредственно конъюгированы с флуорохромом, и непрямой, когда распознающие зонд иммуноглобулины требуют дополнительного этапа детекции антителами, конъюгированными с флуорохромами (рис. 1).

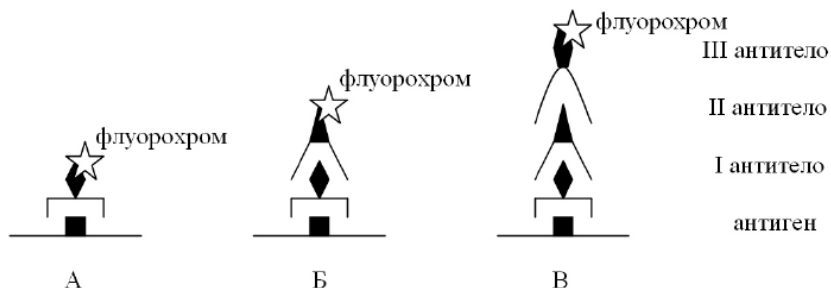


Рис. 1. Схемы экспериментов прямого (А) и непрямого (Б и В) методов детекции флуорохромов (приводится по [5]).

Суть непрямого метода в конъюгации вторичных антител с биотином, меченным ферментом или люминофором, выступающим в качестве связующего звена между комплексом антиген-первичное антитело и вторичное антитело-авидин (или стрептавидин-биотин-ферментным комплексом). Но главным преимуществом использования гаптенов стала возможность значительной амплификации сигнала репортерных молекул за счет создания нескольких уровней накопления красителя. Система на основе авидина, конъюгированного с флуорохромом, и биотинилированных антител к авидину позволяет проводить многократную амплификацию, используя только два вида конъюгатов (рис. 2).

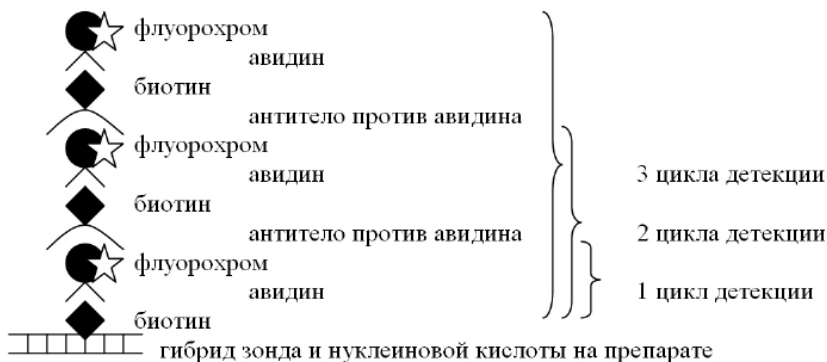


Рис. 2. Схема усиления сигнала в системе биотин-авидин (приводится по [5]).

Кроме того, дополнительное усиление сигнала происходит за счет способности авидина связывать сразу 4 молекулы биотина, что приводит к образованию сложных структур, содержащих множество флуорохромов. В иммуногистохимии в качестве фермента в биотинированных вторичных антителах с 1970-х годов используется пероксидаза хрена, значительно повысившая чувствительность реакции [17]. Тем не менее, даже усиленный иммунохимическими методами флуоресцентный сигнал позволяет локализовать последовательности не меньше 5000 пар нуклеотидов.

Когда возникла необходимость локализовать единичные копии уникальных последовательностей ДНК- или РНК-транскриптов, получили развитие новые методики усиления сигнала, например, с использованием меченых тирамид (TSA).

Таким образом, можно разделить множество имеющихся методик по двум критериям: по «мишени» исследования (белки, РНК- и ДНК-последовательности, участки генов, хромосомы) и по виду метки (радиоизотопы, хромофоры, люминофоры).

Предметом нашего интереса служат люминесцентные (флуоресцентные) метки, комплементарно связанные с целевыми участками РНК и ДНК посредством гибридизации *in situ*.

В зависимости же от объекта исследования это может быть супрессорная FISH (CISS), FISH на растянутых фибриллах, сравнительная геномная гибридизация (CGH), хромосомный пэйнтинг (Zoo-FISH), M-FISH (многоцветная FISH с зондами к отдельным хромосомам), межвидовое цветное сегментирование хромосом (Rx-FISH), спектральное кариотипирование (SKY), многоцветный бэндинг хромосом (MCB-FISH), 3D-FISH, а также FISH и CGH на микрочипах.

### **1.3. Флуоресцентная гибридизация *in situ***

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (англ. fluorescence *in situ* hybridization – FISH) – цитогенетический метод, который применяют для детекции и определения положения специфической последовательности ДНК на метафазных хромосомах или в интерфазных ядрах *in situ*.

FISH также применяют для выявления специфических мРНК в

образце ткани (пространственно-временные особенности экспрессии генов в клетках и тканях).

Разработанный J. G. Gall и M. Lou Pardue в 1969 г. [8] на основе свойства нуклеиновых кислот комплементарно спариваться, метод гибридизации *in situ* позволяет точно определить локализацию практически любой последовательности ДНК или РНК непосредственно в клетке или клеточном ядре, на метафазных хромосомах, растянутых хроматиновых фибриллах и микрочипах.

Сам метод многоэтапный, в зависимости от целей и объектов исследования длительность и условия выполнения каждой ступени могут варьироваться, но стоит выделить шаги, общие для всех протоколов:

1. Подготовка гистологического или цитологического препарата.
2. Предварительная обработка (если необходимо).
3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация.
4. Гибридизация.
5. Постгибридизационные отмывки и детекция гаптенов.
6. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа.

### **1.3.1. Подготовка цитологического или гистологического препарата**

Получение положительного результата в рассматриваемом методе зависит от сохранности нуклеиновых кислот на препарате.

Сохранность материала обеспечивает, в том числе, правильная обработка предметных стекол. Для давленных препаратов, мазков и спрэдов используют чистые обезжиренные стекла, отмытые в растворах детергентов и этаноле.

Для приготовления препаратов метафазных хромосом клеточную суспензию фиксируют в метанол-ЛУК (3:1), раскапывают на чистые охлажденные предметные стекла, но без последующего обжига в пламени горелки (как для дифференциального окрашивания флуоресцентными красителями).

Свежеприготовленные препараты хромосом, раскапанные на чи-

стые стекла без адгезивов (адгезивы имеют тенденцию провоцировать неспецифическое связывание зонда и автофлуоресцировать), могут отмываться в процессе предобработки или при отмывках, тогда как старые препараты практически не теряются.

При необходимости проведения срочной гибридизации препараты искусственно «состаривают» инкубированием в сухом виде от 2 час до 1 суток при 65°C.

Для гибридизации *in situ* в гистологии пригодны парафиновые срезы толщиной 4-10 мкм. Лучшей сохранности РНК удастся достичь при использовании замороженных срезов с последующей фиксацией, но в диагностической практике это не всегда возможно.

Фиксацию материала рекомендуется проводить в растворах на основе формалина и спиртов. При этом длительная фиксация в формалине затрудняет ферментативное удаление белков, маскирующих нуклеиновые кислоты из-за образования сшивок, что приводит к снижению эффективности гибридизации с зондом. Кроме того, при фиксации свыше 24 часов даже при 0°C РНК в тканях практически полностью деградирует. Локализацию транскриптов также лучше проводить сразу после приготовления препаратов во избежание деградации РНК.

Препараты для исследования ДНК можно хранить в высушенном виде при 4°C или при -20°C несколько месяцев.

### **1.3.2. Предварительная обработка (если необходимо)**

Необходимость предварительной обработки диктуется способом получения материала и, как упоминалось, условиями его фиксации.

Удаление белков, маскирующих нуклеиновые кислоты, существенно улучшает качество гибридизации на срезах тканей, монослойных клеток, препаратах митотических хромосом и интерфазных ядер. Для этой цели можно использовать пепсин, протеиназу К, а также некоторые специфические ферменты, необходимые, например, для переваривания хитина или целлюлозы (в зависимости от объекта исследования).

Например, трипсин расщепляет белки по карбоксильной группе лизина и аргинина. Пепсин имеет широкий спектр расщепления ами-

нокислотных последовательностей, но вероятность этого расщепления увеличивается в присутствии полипептидной цепи тирозина, фенилаланина и триптофана. Протеиназа К обладает широкой специфичностью, как правило, расщепляет пептидную связь, прилегающую к карбоксильной группе алифатических и ароматических аминокислот с заблокированными альфа-аминогруппами.

Все протеолитические ферменты также расщепляют специфические последовательности аминокислот в пептидных цепях обрабатываемых объектов, поэтому выбор протеаз необходимо осуществлять осторожно на основе использованного фиксатора и предмета исследования.

После проведения любых ферментативных предобработок препарат необходимо дополнительно зафиксировать. Это позволит не только сохранить морфологию и целостность материала, но и ингибирует работу ферментов.

### **1.3.3. Нанесение ДНК-зонда на препарат и последующая денатурация**

В качестве зонда в любой разновидности гибридизации *in situ* используются фрагменты нуклеиновых кислот, в состав которых включены репортерные молекулы. Прямое мечение осуществляется включением предшественников нуклеиновых кислот, непосредственно конъюгированных с флуорохромами.

Если речь идет о предшественниках, меченных гаптенами, антитела к которым непосредственно конъюгированы с флуорохромом, то это прямой метод детекции, о котором упоминалось ранее, и в этом случае после гибридизации и отмывок появляется стадия детекции соответствующих гаптенов.

Состав и размеры зондов варьируют в зависимости от целей эксперимента и особенностей метода.

Последовательность, комплементарная исследуемой, может быть представлена РНК, одно- и двунитевой ДНК, а также искусственным аналогом РНА, в котором молекула рибозы заменена коротким пептидом сходной пространственной организации. Длина зонда может колебаться от 20-40 и вплоть до 1000 пар нуклеотидов.



Каждый вариант имеет свои преимущества и недостатки.

Чаще всего в коммерческих реагентах используются двунитевые ДНК-зонды, устойчивые к внешним воздействиям, которые можно успешно метить различными способами. Они требуют обязательной денатурации перед использованием.

Недостатком ДНК-зондов является то, что они с трудом проникают внутрь толстых объектов, а, значит, для эффективной гибридизации необходима предобработка ферментами.

Однонитевые ДНК-зонды не требуют денатурации, но их получение возможно только методом ПЦР с праймером к антисмысловой цепи.

Эффективность такой реакции значительно ниже, поскольку количество продукта увеличивается в арифметической прогрессии, тогда как при использовании двух праймеров нарастание происходит в геометрической прогрессии.

Для приготовления гибридизационной смеси осажденный меченый зонд вместе с носителем растворяют в гибридизационном буфере, состав которого регламентирован производителем зонда. Надо понимать, что в состав буфера входит формамид – вещество, снижающее температуру денатурации нуклеиновых кислот.

Кроме температуры на процесс ренатурации оказывают влияние кислотность раствора и концентрация одновалентных катионов. Повышение рН до 10 и выше приводит к нарушению стабилизации дуплексов, что снижает эффективность гибридизации. Поэтому в основе гибридизационной смеси обычно лежит буферный раствор с рН 6,5-7,5.

Концентрация одновалентных катионов, таких как ионы натрия, оказывает еще более существенное влияние на стабилизацию гибридов.

Положительно заряженные катионы взаимодействуют с фосфатными группами нуклеиновых кислот, снижая электростатическое отталкивание двух комплементарных нитей. Поэтому увеличение концентрации солей одновалентных металлов увеличивает эффективность гибридизации.

Для того, чтобы гибридизационную смесь можно было нанести на препарат и заключить под покровное стекло, ее объем должен

быть не меньше 10 мкл для покровных стекол  $22 \times 22$  мм<sup>2</sup> и 20 мкл – для стекол  $22 \times 50$  мм<sup>2</sup>. В таком объеме трудно достичь концентрации зонда, эффективно образующего гибриды с молекулами на препарате.

Решить эту задачу позволяют вещества, связывающие воду и увеличивающие эффективную концентрацию зонда, такие как декстран сульфат с молекулярным весом выше 8000 (лучше 200000). Конечная концентрация декстран сульфата в гибридизационном буфере может составлять 5-10%.

### 1.3.4. Гибридизация

Гибридизация подразумевает частичную денатурацию нити ДНК в клетке и последующую ренатурацию комплементарных (таргетных) участков со специфической последовательностью зонда под действием температуры.

На препарат наносят зонд, закрывают покровным стеклом и заклеивают резиновым клеем, что создает своего рода микроклимат, предотвращает испарение и изменение свойств буфера, способное повлиять на эффективность связывания зонда.

Гибридизацию проводят при температуре 37-42°C во влажной камере в течение 1-2 суток. При более кратковременной инкубации снижается эффективность гибридизации, тогда как длительные эксперименты протяженностью более трех суток не показывают заметного усиления сигнала по сравнению с двухдневными гибридизациями, но при этом возрастает риск заражения бактериями и грибами.

После завершения инкубации препараты необходимо отмыть от молекул зонда, не вступивших в комплементарное взаимодействие с нуклеиновыми кислотами на препарате. Эффективность отмывок, так же, как и условий гибридизации, определяется температурой и концентрацией одновалентных катионов.

В случае необходимости температурный режим можно изменять добавлением формамида, поскольку его присутствие снижает температуру плавления дуплексов, причем увеличение содержания формамида на 2% приводит к уменьшению температуры денатурации на 1°C.

Концентрацию солей изменяют, варьируя кратность буферного раствора SSC в составе растворов для отмывки.

### **1.3.5. Постгибризационные отмывки и детекция гаптенов**

Последующую отмывку проводят в 2 сменах буфера без формамида, а ее эффективность можно регулировать температурой (42-65°C) и кратностью буфера ( $0,1 \times \text{SSC} - 2 \times \text{SSC}$ ). При проведении прямой гибридизации с зондами, непосредственно меченными флуорохромами, после отмывки препарат проводят по серии спиртов повышающихся концентраций, высушивают на воздухе, заключают в оптическую среду и исследуют под микроскопом.

В том случае, когда зонд требует иммунохимического выявления, его проводят сразу после отмывок, избегая высушивания препарата, так как это может ухудшить результат детекции.

После завершения детекции препарат рекомендуется провести по серии спиртов повышающихся концентраций и высушить на воздухе.

Это обеспечивает дополнительную фиксацию материала, подвергнувшегося обработке растворами детергента, а также удаляет разводы с препарата, которые могут ухудшить качество изображений.

Водные заключающие среды обычно представляют собой буферные растворы, использованные при окраске и отмывке препаратов.

В качестве незастывающих заключающих сред для флуоресцентной микроскопии могут быть использованы нефлуоресцирующее иммерсионное масло, жидкий парафин, глицерин разной концентрации, а также синтетические заключающие среды на основе полимеров (изобутилметакрилат, полистирол).

Часто окраску нуклеиновых кислот флуорохромами сочетают с другими методами.

Эту процедуру проводят после завершения всех манипуляций непосредственно перед заключением препарата.

Иногда удобно добавить краситель непосредственно в заключающую среду. Для этой цели подходят красители, слабо флуоресци-

рующие в водных растворах, такие как DAPI или PI, или димерные красители, такие как ТОГО-1, дающие яркий флуоресцентный сигнал только в том случае, если произошло взаимодействие молекулы красителя с нуклеиновой кислотой.

В нашей лаборатории используется заключающая среда с DAPI, чтобы выявить границы клеточных ядер.

### **1.3.6. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа**

При необходимости одновременной локализации на препарате нескольких последовательностей проводят гибридизацию с зондами, мечеными разными репортерными молекулами, детектируемыми различными флуорохромами.

Обычно для этого используют DAPI, FITC, TRITC, Cy5, спектры которых не перекрываются и позволяют применять их для одновременной FISH нескольких антигенов.

Планируя исследование, необходимо учесть, что для локализации трех последовательностей достаточно использовать две различные репортерные системы.

То есть первый зонд детектируется флуорохромом 1, второй зонд – флуорохромом 2, а третий зонд – одновременно флуорохромами 1 и 2.

Такой подход не только снижает стоимость исследования, но и позволяет получать более четкие результаты, поскольку увеличение числа флуорохромов приводит к тому, что возникает проблема частичного перекрывания спектров.

Число различных последовательностей, которые одновременно можно локализовать на препарате, равно  $2^n - 1$ , где  $n$  – число использованных флуорохромов.

Так, имея 3 репортерных молекулы, мы можем получить 7 различных зондов.

При наличии в комплектации микроскопа узкополосных фильтров можно использовать одновременно и большее количество зондов.

Так, использование пяти флуорохромов дает возможность со-

здать 31 независимый зонд.

Таким образом работает классическая схема M-FISH, позволяющая идентифицировать все хромосомы человека (рис. 3).

	Labelling Scheme				
	Aqua	Green	Orange	Red	Near Infrared
1					Yellow
2	Cyan				
3				Magenta	
4		Light Green			
5			Red		
6		Light Green			Yellow
7	Cyan				
8				Magenta	Yellow
9			Red		Yellow
10	Cyan	Light Green			
11		Light Green		Magenta	
12		Light Green	Red		
13	Cyan			Magenta	
14	Cyan		Red		
15			Red	Magenta	
16	Cyan	Light Green			Yellow
17		Light Green		Magenta	Yellow
18		Light Green	Red		Yellow
19	Cyan			Magenta	Yellow
20	Cyan		Red		Yellow
21			Red	Magenta	Yellow
22	Cyan	Light Green		Magenta	
X	Cyan	Light Green	Red		
Y	Cyan		Red	Magenta	

Рис. 3. Схема идентификации 24 хромосом человека посредством пяти спектрально разнесенных люминофоров (приводится по [10]).

В зависимости от имеющихся фильтров подбирают комбинацию с непересекающимися спектрами из таких вариантов как: AMCA; DEAC; FITC; Alexa 488; Cy3; TRITC; Cy3,5; Техасский красный; Alexa 633; Cy5; Cy5,5 и т.д. Все это названия флуорохромов, активно использующихся в коммерчески доступных зондах, спектральные характеристики которых можно узнать на общедоступных публичных ресурсах [9-11, 13-14].

То есть сам подход к использованию метода обуславливается

комплектацией флуоресцентного микроскопа световыми фильтрами определенных диапазонов, и подбор фильтров представляет собой отдельную задачу, на которой мы остановимся позже.

Суть анализа таргетных зондов сводится к тому, чтобы зафиксировать число, соотношение или взаиморасположение флуоресцентных сигналов (так называемые fusion и breakapart типы проб) от помеченных участков в пределах клетки, ядра или метафазной пластинки.

Какие именно участки чем помечены и как должны себя проявлять в норме или в случае патологии – вопросы подбора зонда на этапе планирования исследования, они должны быть четко оговорены в протоколах производителя зонда.

Зачастую речь идет о двух-трех флуорохромах, как правило с синей, зеленой и красной люминесценцией. Причем зондов, использующих одни и те же флуорохромы для решения различных задач, на рынке великое множество. Поэтому очень важно маркировать, какой зонд использовался для того или иного препарата, иначе, в случае путаницы, разобраться, какая именно специфическая последовательность помечена зеленым или красным сигналом – не представляется возможным.

Сложность анализа посредством обычного бинокулярного микроскопа заключается в необходимости переключаться между разными фильтрами для того, чтобы зафиксировать положение сигнала на препарате.

Отчасти ее решают комбинированные фильтры – позволяющие одновременно видеть сигналы определенной комбинации флуорохромов.

Если возбуждение и люминесценция люминофоров в достаточной мере разнесены по спектральному диапазону, такие фильтры пропускают необходимые спектральные порции света в разных «каналах».

Однако сигналы могут быть разными по размеру и интенсивности в зависимости от того, как прошла гибридизация разных компонентов зонда.

Используя микроскоп, исследователь может, помимо выбора фильтра, повлиять разве что на интенсивность источника возбужда-

ющего света, и то не всегда.

Кроме того, любой анализ подразумевает исследование экспрессии сигналов в пределах всего образца, а не отдельного поля зрения, и возможности микроскопа расширяет установка камеры со специальным программным обеспечением, позволяющим условно «сшивать» изображения, полученные через разные фильтры (или каналы комбинированного фильтра) в нескольких полях зрения, изменять контрастность итогового изображения и анализировать более полную картину.

Следующим логическим шагом развития флуоресцентной микроскопии стало появление современных сканирующих микроскопов, которые позволяют прецизионно настраивать условия интенсивности возбуждения и съемки каждого флуорохрома в своем канале за счет выбора настроек, в том числе усиления и экспозиции детектора, и сохранения в виде единого файла, к анализу которого исследователь может вернуться даже после того, как люминесцентные метки деградируют.

Более подробнее обо всем этом разберем в следующей главе.

## Глава 2. Флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентная микроскопия представляет собой разновидность световой микроскопии, в которой визуализируется не видимое глазом окрашивание, а свечение особых веществ – люминофоров (или флуорохромов).

Независимо от того, какой тип или конфигурация флуоресцентного микроскопа вам доступна, есть принципиально общие компоненты и закономерности, которые обуславливаются в первую очередь физическими особенностями люминофоров.

Именно с физических принципов люминесценции, того, какие вещества могут выступать в этом качестве и как могут изменяться со временем и условиями их оптические свойства, стоит начать.

### 2.1. Люминофоры (флуорохромы)

Если восприятие глазом цвета обусловлено спектральной областью *отражения и пропускания* красителя вкпе с чувствительностью к этой зоне спектра человеческого глаза (рис. 4), то люминесценция – это свойство вещества расходовать часть энергии *поглощенного* света на собственное излучение.

Спектральные кривые поглощения (и соответственно отражения/пропускания) каждого конкретного вещества обусловлены его молекулярной структурой – тем, какие атомы входят в его состав, типами и энергией химических и физических связей.

Факт поглощения энергии света переводит молекулярную структуру в электронно-возбужденное состояние, релаксация которого может происходить по широкому ряду сценариев, в том числе за счет эволюции (с потерей части энергии) в состояние, способное излучать свет.

За счет этого реализуется правило Стокса, согласно которому длина волны (величина, обратно пропорциональная энергии) люминесценции в большинстве случаев больше длины волны возбуждающего света, а интенсивность меньше [3].



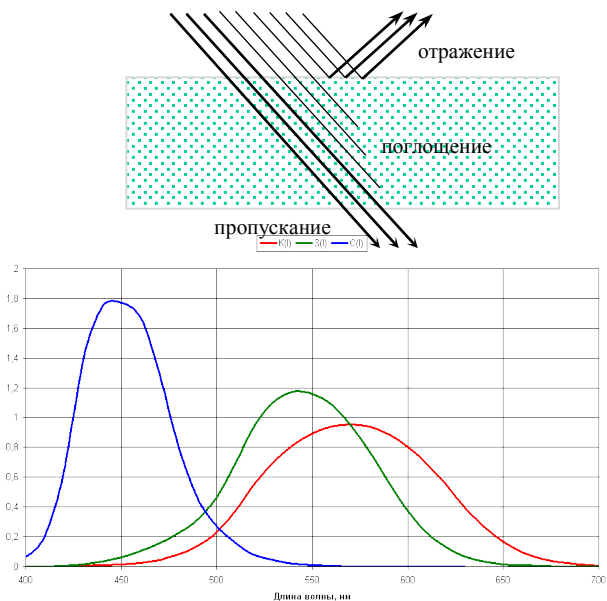


Рис. 4. Нормированная чувствительность колбочек человеческого глаза к спектральным областям отраженного света (приводится по [9]).

В зависимости от различных параметров, таких как время жизни возбужденного состояния и т.д., выделяют множество видов люминесценции.

Нас интересует разновидность, в которой переизлучение происходит за микросекунды и менее – так называемая флуоресценция, соответственно, способные к ней вещества, называют флуорохромами (рис. 5).

В силу упомянутых особенностей строения подавляющее большинство углеводородов, особенно ароматических, могут с той или иной эффективностью выступать в качестве флуорохромов в широком диапазоне видимого, УФ- и ближнего ИК-света.

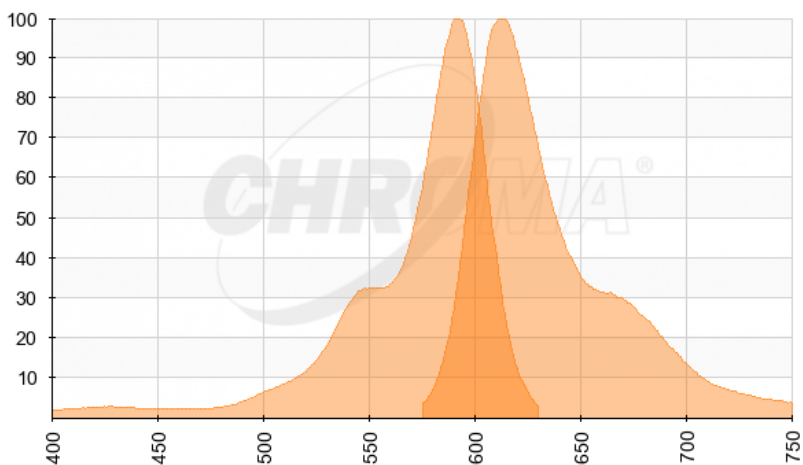


Рис. 5. Нормированные спектры поглощения (возбуждения) и люминесценции флуорохрома Texas Red, в зависимости от длины волны (нм) (приводится по [12]).

Наиболее интенсивная флуоресценция наблюдается тогда, когда происходит облучение светом с длиной волны, близкой к максимуму на кривой возбуждения. Тем не менее, перевести флуорохром в возбужденное состояние можно облучением светом, длина волны которого не соответствует его максимуму возбуждения, просто с меньшей эффективностью.

Интенсивность люминесценции также определяется особенностями внутренней конверсии энергии возбуждения и является индивидуальной характеристикой каждого флуорохрома.

То есть разные флуорохромы даже при поглощении света одинаковой интенсивности будут излучать свет разной интенсивности. Отношение между интенсивностью поглощаемого и испускаемого света называется квантовым выходом люминесценции [4].

Слабые флуорохромы, с низким квантовым выходом, испускают мало света по сравнению с уровнем поглощения.

Современные химически модифицированные флуорохромы нового поколения, как правило, обладают высоким квантовым выходом. Но даже небольшую разницу между этими характеристиками

стоит иметь в виду при анализе исследований с использованием комплексных зондов с двумя и более флуоресцентными метками.

Окраска флуоресцирующими красителями широко используется в патологической анатомии, гистологии, цитологии, молекулярной биологии и цитогенетике. Большинство рутинных методов основано на химических свойствах красителей. Многие флуорохромы обладают способностью растворяться в липидах тканей. Их использование позволяет локализовать мембранные структуры, кислые и нейтральные липиды и жировые капли в клетках.

Для этих целей используется целый ряд красителей, таких как судан черный, фосфин 3R, тиофлавин S, родамин B, 3,4-бензопирен, а также современные липофильные красители на основе аминостирилов, такие как FM1-43 (SynaptoGreen C3), FM4-64 (SynaptoRed C2), MDY-64, DiI, DiO, DiD, DiA, DiR. Благодаря своим химическим свойствам они позволяют водными растворами окрашивать на препаратах даже небольшие жировые включения, не нарушая их морфологию.

На интенсивность флуоресценции могут оказывать влияние изменения pH, присутствие даже в незначительных количествах сильных окислителей и солей тяжелых металлов, таких как ртуть или осмий.

Это происходит вследствие адаптации пространственной или зарядовой конфигурации молекулы красителя к внешним условиям за счет образования новых физических и/или химических связей, что влечет за собой соответствующие изменения эффективности внутренней конверсии в люминесцентное состояние.

Таким образом, красители могут модифицироваться под действием тех или иных ферментов с приобретением свойств флуорохромов, что также позволяет идентифицировать определенные клеточные структуры.

Так, MitoTracker Green FM позволяет локализовать митохондрии в живых клетках дрожжей, а LisoTracker Red FM начинает флуоресцировать в кислой среде после взаимодействия с ферментами лизосом. Такие красители не надо тщательно отмывать, поскольку в водной среде они не способны излучать свет.

Молекулы акридинового оранжевого по-разному взаимодей-

ствуют с однонитевыми и двунитевыми молекулами РНК и ДНК. В результате окрашивания двунитевые молекулы нуклеиновых кислот флуоресцируют зеленым светом, а однонитевые – красным.

А клонирование в 1962 г. зеленого флуоресцирующего белка (GFP) из светоизлучающего органа медузы *Aequorea victoria* [16] открыло новые возможности для использования флуоресцентной микроскопии за счет получения трансгенных клеток или даже некоторых организмов, несущих гибридные гены, в которых различные белки слиты с флуоресцирующим известным образом доменом, что позволило проводить прижизненные исследования.

Существование флуоресцентных белков с различными спектрами возбуждения и излучения позволяет исследовать синхронную динамику белков в клетке, а также белок-белковые взаимодействия.

## **2.2. Стабильность люминофоров, фотохромизм и деградация**

Со временем или в процессе освещения может происходить постепенное уменьшение интенсивности флуоресценции. Это явление связано с альтернативными сценариями релаксации электронновозбужденного состояния молекулы красителя. В зависимости от того, какие пути релаксации преобладают, мы можем наблюдать различное поведение оптических свойств флуорохрома.

Энергия возбужденного состояния может быть конвертирована в тепловые колебания (термоконверсия) или потрачена на образование или напротив – разрыв физических или химических связей. Это приводит к трансформации окружения или самой молекулы красителя: от незначительных, вроде физической адсорбции или изменения длины (энергии) химических связей, вплоть до разрушения красителя (фотодеградации).

Изменение окружения и свойств связей, как уже упоминалось, может изменять спектр и эффективность люминесценции. Например, некоторые разновидности флуоресцентных белков обладают способностью фотоактивироваться под действием света определенной длины волны. Наиболее известны среди них фотоактивируемая мутация GFP (PA-GFP) и белок Kaede.

После непродолжительного облучения фиолетовым светом 405-413 нм, интенсивность флуоресценции PA-GFP при облучении синим светом возрастает в 100 раз.

Способность флуоресцентных белков к фотоактивации также используется для исследования динамики изменения молекулярного состава внутриклеточных структур.

Фотоактивация белка Kaede имеет еще более наглядное проявление, поскольку после 1-3-секундного облучения светом с длиной волны 405 нм белок, который возбуждался синим (488 нм) и флуоресцировал зеленым светом (518 нм), начинает возбуждаться светом с длиной волны 543 нм и излучать красный свет (582 нм). Изменение спектральных свойств под действием облучения называется фотохромизмом [1].

Если мы говорим о деформации химических связей и, как следствие, «выцветании» флуорохрома, то это может происходить опосредованно – за счет энергии тепловых колебаний из-за температуры окружающей среды или термоконверсии возбуждающего света, или же напрямую за счет энергии возбуждения – это фотодеградация.

Степень фотодеградации зависит от интенсивности возбуждающего света и времени экспозиции. Но на деле все упомянутые процессы протекают одновременно с разной степенью интенсивности, поэтому необходимо рассматривать их в комплексе.

Скорость деградации флуорохрома в зависимости от температуры, освещения, наличия в растворе других флуорохромов, а также окислителей или солей тяжелых металлов говорит о его стабильности.

Современные флуорохромы деградируют значительно медленнее, чем те, которые использовались 10-15 лет назад. Тем не менее, проблема замедления снижения уровня флуоресценции весьма актуальна, поскольку она напрямую связана с возможностью получения качественного изображения исследуемого объекта.

Поэтому настоятельно рекомендуется готовые препараты хранить в темноте при низких температурах (4°C для водных заключающих сред и кратковременного хранения, -20°C для длительного хранения препаратов в средах на основе незастывающих компонентов).

В настоящее время многие фирмы, производящие различные реактивы, конъюгированные с флуорохромами, а также флуоресцентные красители, предлагают готовые заключающие среды с уже включенными в состав фотозащитными добавками.

Использование таких добавок как: DABCO, N-пропилгаллат, пара-фенилендиамин, может увеличить время стабильности флуорохромов в 15-30 раз.

### 2.3. Флуоресцентный микроскоп

В отличие от классической микроскопии светлого поля, когда исследователь видит свет от источника, расположенного за объектом наблюдения, и проходящий сквозь него – устройство флуоресцентного микроскопа строится по принципу темного поля (рис. 6).

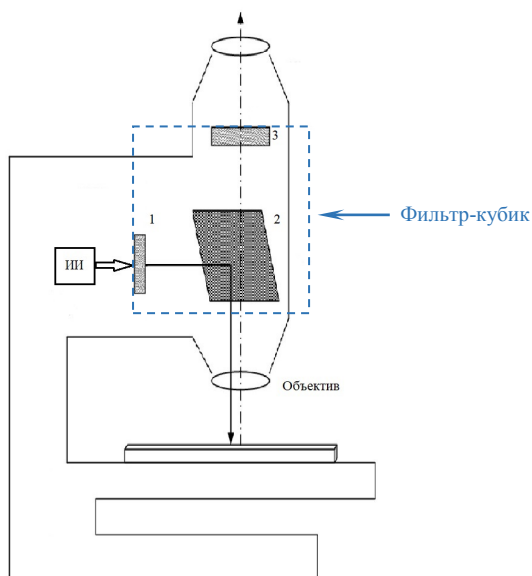


Рис. 6. Схема флуоресцентного микроскопа с освещением падающим светом (темное поле). ИИ – источник излучения; 1 – фильтр возбуждающего света; 2 – светоделительное зеркало; 3 – фильтр люминесценции (оригинальный рисунок).

В этом случае в качестве конденсора, собирающего свет на образце, выступает линза объектива и вместе с падающим светом световой пучок фокусируется с максимальной точностью. Правда, это накладывает определенные требования на качество объектива.

Поскольку интенсивность светового потока, проходящего через линзу в каждом направлении, пропорциональна квадрату апертуры, то суммарная интенсивность регистрируемого света зависит от величины апертуры объектива в четвертой степени. Поэтому для флуоресцентной микроскопии необходимо использовать специальные объективы, пропускающие свет любой длины волны, а также имеющие большие числовые значения апертуры.

Еще одним преимуществом освещения падающим светом является то, что не происходит рассеивание света при прохождении через более толстое предметное стекло.

Но покровное стекло обязательно надо тщательно очистить и лучше обезжирить спиртом перед использованием, чтобы удалить грязь и пыль, которые могут отражать свет и люминесцировать в ультрафиолетовом излучении.

При выборе покровных стекол предпочтение нужно отдавать тонким стеклам толщиной 100-170 мкм.

Использование тонких стекол сокращает потери флуоресцентного сигнала. Кроме того, объективы больших увеличений сконструированы таким образом, чтобы корректировать аберрации, вносимые стеклами толщиной до 170 мкм.

Другим важным элементом конструкции флуоресцентного микроскопа является источник излучения. Обычно в качестве источника света используются ртутные лампы различной мощности, спектр которых имеет равномерно распределенные пики высокой интенсивности в области от 300 до 700 нм, а также относительно сильное свечение между пиками. Такая лампа охватывает область спектра от УФ до ИК и может быть использована для возбуждения большинства флуорохромов.

Если для активизации флуорохрома требуется длинноволновый свет ИК-области спектра, микроскоп дополнительно комплектуют ксеноновой лампой.

Флуоресцентные микроскопы могут быть укомплектованы ртут-

ными лампами мощностью 50W, 100W, 200W.

Использование более мощной лампы позволяет возбудить с достаточной для детекции интенсивностью даже слабый (с малым квантовым выходом) флуорохром, но она значительно увеличивает скорость фотодеградации. В базовых моделях интенсивность поступающего от лампы светового потока можно регулировать с помощью диафрагмы, но это приводит к неравномерному освещению поля зрения.

Более современные микроскопы позволяют регулировать интенсивность света с помощью системы понижающих светофильтров, но при этом имеет место спектральная селективность – интенсивность на разных длинах волн снижается по-разному. Именно поэтому при работе с сильными флуорохромами, не требующими интенсивного облучения, целесообразнее работать на микроскопе, укомплектованном менее мощной лампой.

С другой стороны, все чаще современные установки комплектуют диодными лазерами, которые генерируют узкие интенсивные пики излучения, спектральное положение которых подбирается из огромного набора вариантов. Набором из 6-7 лазерных диодов легко можно воспроизвести основные пики спектра ртутной лампы, но при гораздо меньших энергозатратах можно получить гораздо более интенсивное и стабильное излучение. Причем интенсивность его регулируется изменением напряжения на диоде.

В любом случае, от того, какой источник излучения установлен на флуоресцентном микроскопе, зависит выбор конкретных флуорохромов и фильтров, посредством которых возможно анализировать флуоресценцию.

## **2.4. Фильтры и их подбор**

Качество изображения во флуоресцентной микроскопии обеспечивается в первую очередь за счет подбора флуорохромов и использования узкополосных светофильтров, пропускающих только свет, соответствующий спектральным полосам поглощения и испускания выбранных люминесцентных красителей.

Значительную роль играет качество оптики и сведение к мини-



муму рассеивания как возбуждающего, так и излучаемого света.

Благодаря правилу Стокса, о котором мы уже упоминали, световые потоки возбуждения и люминесценции можно эффективно разделять. Основным инструментом для этого служит светоделительное (или дихроматическое) зеркало (рис. 6).

Оно имеет специальное интерференционное покрытие, позволяющее отражать свет, длина волны которого меньше определенного значения, и пропускать излучение с большей длиной волны (рис. 7, черная кривая).

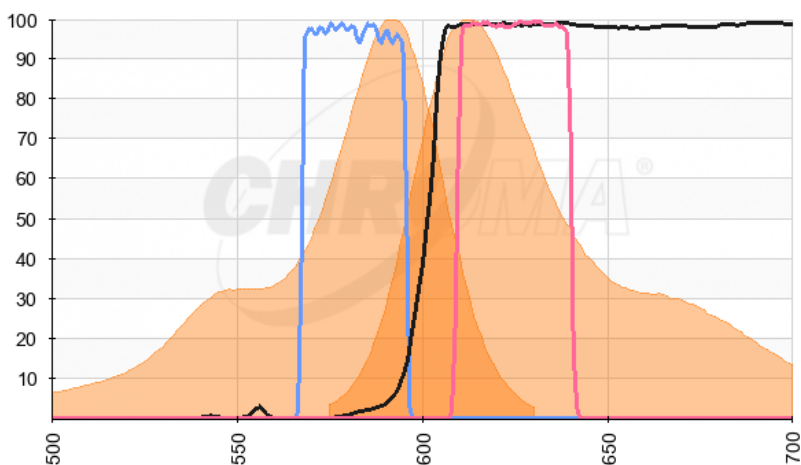


Рис. 7. Нормированные спектры возбуждения и люминесценции флуорохрома Texas Red и пропускания оптимального узкополосного фильтр-кубика, в зависимости от длины волны (нм) (приводится по [12]).

Узкополосный возбуждающий фильтр подбирают таким образом, чтобы он выделял из всего спектра лампы свет той длины волны, которая максимально эффективно поглощается флуорохромом на препарате. Использование узкополосного фильтра на пути люминесценции позволяет убрать фоновое свечение, отраженное от деталей микроскопа и препарата, что значительно увеличивает контрастность

изображения и четкость получаемых результатов.

Сближение в пространстве всех светофильтров позволило объединить их в единые модули – фильтр-блоки (в англоязычной и переводной литературе такие подобранные и зафиксированные сочетания фильтров часто называют кубиками), как это показано на рисунке 6.

В настоящее время подавляющее большинство флуоресцентных микроскопов самых разных производителей поддерживают установку и ротацию набора из одного или нескольких кубиков стандартизованного форм-фактора, что делает фильтр-кубики взаимозаменяемыми и расширяет возможности комплектации микроскопов.

Использование кубиков позволяет производить замену сразу всех фильтров по ходу световых лучей без смещения изображения или потери резкости. Это дало возможность использовать одновременно несколько флуорохромов, а затем с высокой точностью совмещать полученные изображения.

Таким образом, исследователю остается только позаботиться о соответствии спектров, используемых в работе флуорохромов, характеристикам тех фильтров, которыми укомплектован микроскоп (рис. 7).

Спектральные характеристики флуорохромов так же, как и спектры пропускания готовых фильтр-блоков доступны на сайтах или в документации производителей.

Однако подбор пары флуорохром-кубик по номинальным значениям не обязательно приводит к оптимальному результату. Это часто озадачивает тех, кто только начинает работать с флуоресцентными методиками.

Все дело в том, что спектральные характеристики флуорохрома определяются производителем зонда на основании его протокола окраски или гибридизации некоторых контрольных объектов. Если речь идет о внедрении коммерческого зонда в работу реальной лаборатории, то любой из ранее описанных нюансов этапов фиксации, нанесения, предобработки, качество и концентрации использованных реактивов, температура или длительность приводят к тому, что молекулы красителя на готовом препарате попадают в иные варианты микроокружения. При этом люминофор претерпевает варианты из-

менений в ходе обработки и формирования итоговых физических и химических связей, что, как уже отмечалось, влияет на его спектральные характеристики.

Речь не идет о кардинальных изменениях, но иногда их вполне достаточно, чтобы сигналы коммерческого зонда эффективнее выявлялись в фильтре, отличном от рекомендованного его производителем.

По данным проведенного Е. С. Артемьевой спектроскопического исследования даже один и тот же зонд, нанесенный по одинаковому протоколу на материал, изготовленный в одной лаборатории, но в разных условиях (например, разные по длительности протоколы проводки для биопсийного и операционного материала), может показывать спектральные сдвиги люминесценции на 5-10 нм.

Таким образом, для наиболее точного подбора комплектации флуоресцентного микроскопа можно порекомендовать выбирать фильтры эмпирическим путем, причем после отработки и оптимизации протокола на материале конкретной лаборатории.

## **2.5. Автофлуоресценция**

Использование узкополосных фильтров позволяет выделять конкретные участки спектров, соответствующие люминесценции целевого люминофора (конъюгированного с зондом), возбужденного на конкретных длинах волн.

Явлением автофлуоресценции, по сути, называют свечение в выделенном диапазоне всех иных имеющихся на препарате люминофоров, для которых выделенного возбуждающего света оказалось достаточно.

Многие структурные компоненты клеток, а также некоторые продукты метаболизма способны флуоресцировать в ответ на облучение светом определенной длины волны. Это могут быть каротиноиды, такие как витамин А, которые излучают зеленый свет в ответ на облучение ультрафиолетом.

Используя автофлуоресценцию, можно изучать распределение рибофлавина, тиамин, цероида, липофусцина, порфиринов, а также флуоресцирующих веществ, накапливаемых энтерохромаффинными

клетками.

Флуоресценцию многих аминов можно индуцировать фиксацией формалином, благодаря формированию кольцевых структур. Таким образом удается локализовать нейромедиаторы, такие как катехоламины и 5-гидрокситриптамин.

Способностью флуоресцировать обладают волокна коллагена и эластина, окружающие клетки соединительной ткани, а также белки клеточной стенки растений и грибов.

Если вспомнить, что так или иначе почти все сложные углеводы склонны люминесцировать в видимом диапазоне, не удивительно, что таких нецелевых люминофоров находится немало. Поскольку возбуждение для них чаще всего происходит неспецифически (вдали от индивидуальных пиков возбуждения), чаще всего речь идет о фоновом свечении малой интенсивности.

Однако автофлуоресценция становится проблемой, когда ее интенсивность сопоставима с флуоресценцией зонда и достоверно различить полезный сигнал на интенсивном фоне становится невозможно.

Отдельно стоит оговорить, что в такого рода ситуациях крайне тяжело отличить автофлуоресценцию от неспецифического связывания целевого флуорохрома.

## Глава 3. Пробоподготовка

Как уже отмечалось ранее, на любом из описанных этапов есть масса нюансов, вариация которых может повлиять на итоговый результат исследования. Например, поверхность препарата после демаскировки и нанесения зонда ни в коем случае нельзя высушивать, особенно до осуществления соответствующих отмывок. В тех участках, где препарат подсох, происходит неспецифическая адсорбция меченых нуклеотидов.

Или тот факт, что выбор фиксатора, главным образом, зависит от влияния того или иного реактива на антигенные свойства исследуемого белка.

Иными словами, при необходимости выявления некоторых видов антигенов придется следовать разным стратегиям фиксации препарата, если это возможно.

В этой главе приведен рецепт [6] флуоресцентной гибридизации, успешно отработанный на гистологических срезах для использования диагностических и прогностических коммерческих зондов в лаборатории морфологии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Однако не исключено, что для качественного использования этой методики в другой лаборатории придется подбирать условия протокола, обеспечивающие оптимальный результат для иных условий подготовки объектов исследования.

### 3.1. Материалы и реактивы

1) Ксилол:

– О-ксилол «чистый для анализа» – ТУ 2631-088-44493179-03; ГОСТ 9410-78 Ксилол нефтяной. Технические условия (с Изменениями N 1, 2, 3) ГОСТ 9410-78 Группа Б44.

2) Спирт этиловый.

3) Реагенты *in vitro* для определения хромосомных перестроек методом флуоресцентной гибридизации (FISH).

Буфер для демаскировки:

а) Pre-treatment Solution, MES-buffer concentrated 20×, Dako, Code K5731,

б) Heat Pretreatment Solution Citric, PT1 Zytolight,

в) 20×Saline-Sodium Citrate buffer (SSC) (3M NaCl, 0,3M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>).

Промывочный раствор:

а) Wash buffer, Tris/HCl, concentrated 20×, Dako,

б) SSC, WB1 Zytolight, Stringent Wash Buffer, concentrated 20×, Dako,

в) 10×Phosphate-Buffered Saline (PBS) (1,37M NaCl, 0,027M KCl, 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,018M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Пепсин (Pepsin Diluent, dilution buffer, pH2, concentrated 10×, Dako/ Pepsin Solution, ES1, Zytolight), 10% Пепсин/5,6M HCl.

Хлорид магния 4,9M MgCl<sub>2</sub>.

Флуоресцентный краситель (DAPI):

– Реагенты *in vitro* для определения хромосомных перестроек методом флуоресцентной гибридизации (FISH) – Регистрационное удостоверение на медицинское изделие ФСЗ 2011/09210 от 25 февраля 2011 г.

– Системы окраски иммуногистохимических и иммуноцитохимических препаратов универсальные Autostainer, Autostainer Plus с принадлежностями – Регистрационное удостоверение на медицинское изделие ФС 2005/1323 от 15 сентября 2005 г. по 15 сентября 2015 г.

4) Дистиллированная вода.

### **3.2. Протокол флуоресцентной гибридизации *in situ***

Рассмотрим этапы метода флуоресцентной гибридизации *in situ*.

#### **3.2.1. Детализованный протокол депарафинизации**

1. Поместите стекла в термостат (60°C) на 30 минут.
2. Перенесите стекла немедленно в свежий ксилол на 5 минут.
3. Повторите процедуру пункта 2 с новой порцией ксилола.

4. Поместите стекла в 96% этиловый спирт на 2 мин.
5. Поместите стекла в раствор 85% этилового спирта на 2 минуты.
6. Поместите стекла в раствор 70% этилового спирта на 2 минуты.
7. Промойте в дистиллированной воде.
8. Повторите процедуру пункта 7 с новой порцией дистиллированной воды.
9. Не давая стеклам высохнуть, сразу переместите стекла в буфер для демаскировки и перейти к протоколу демаскировки.

### **3.2.2. Детализованный протокол демаскировки (предобработки)**

1. Заполните контейнер достаточным количеством раствора для демаскировки так, чтобы раствор покрывал стекла, перенесите в термостат и установите температуру, равную 95-99°C.
2. Поместите стекла в кассетах в предварительно нагретый раствор для демаскировки (SSC), накройте контейнер крышкой и инкубируйте стекла в течение 15 минут после того, как вода достигнет необходимой температуры.
3. Извлеките контейнер из бани и охлаждайте содержимое при закрытой крышке в течение 20 минут при комнатной температуре.
4. Промойте в дистиллированной воде. Важно помнить, что при извлечении стекол из раствора они не должны высохнуть.
5. Повторите процедуру пункта 4 с новой порцией дистиллированной воды.
6. Не давая стеклам высохнуть, перейдите к предварительной ферментативной обработке реагентом Пепсин: нанесите 3-5 капель реагента и инкубируйте 5-15 мин при 37°C.
7. Промойте стекла в буферном растворе или раствором 1×PBS+1% ПФА+50mM MgCl<sub>2</sub>, 5 мин. Важно помнить, что при извлечении стекол из раствора они не должны высохнуть.
5. Повторите промывку дистиллированной водой, 1 мин.
9. Поместите стекла в раствор 70% этилового спирта на 1 минуту.

10. Поместите стекла в раствор 85% этилового спирта на 1 минуту.
11. Поместите стекла в раствор 96% этилового спирта на 1 минуту.
12. Высушите стекла при комнатной температуре.

### **3.2.3. Детализованный протокол нанесения зонда**

1. Нанесите 10 мкл ДНК-зонда в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.
2. Немедленно покройте место нанесения покровным стеклом размером 22 × 22 мм. Избегайте образования воздушных пузырьков под покровным стеклом.
3. Вдоль краев покровного стекла нанесите полимерный клей.
4. Поместите стекла в гибридайзер с программой нагрева (см. инструкцию к реактивам антители): для процесса денатурации 75°C в течение 5 мин, для процесса гибридизации – 37°C, 20 часов.

### **3.2.4. Детализованный протокол пост-гибридизации и закрепления**

1. Удалите полимерный клей и погрузите стекла в промывочный буферный раствор (2×SSC) до удаления покровных стекол при 37°C, 1-3 мин. Буферный раствор должен быть прогрет до погружения в него стекол.

В случае использования реагентов производителя Dako:

- заполните контейнер достаточным количеством промывочно-го цитратного буферного раствора так, чтобы раствор покрывал стекла.
  - перенесите в термостат и установите температуру, равную 69°C,
  - поместите стекла в кассетах в предварительно нагретый промывочный цитратный буферный раствор,
  - накройте контейнер крышкой и инкубируйте стекла в течение 10 минут.
2. Поместите стекла в кассетах в предварительно нагретый про-



мывочный цитратный буферный раствор, накройте контейнер крышкой и инкубируйте стекла в течение 5 минут при температуре 37°C.

3. Повторите процедуру пункта 2 с новой порцией подогретого до 37°C буферного раствора.

4. Поместите в 70% этиловый спирт на 1 мин.

7. Поместите стекла в раствор 85% этилового спирта на 1 минуту.

8. Поместите стекла в раствор 96% этилового спирта на 1 минуту.

9. Высушите стекла при комнатной температуре в темноте.

10. Нанесите 10 мкл раствора флуоресцентного красителя (DAPI) в центр анализируемой ткани, размещенной на предметном стекле.

2. Немедленно покройте место нанесения покровным стеклом размером 22 × 22 мм. Избегайте образования воздушных пузырьков под покровным стеклом.

3. Вдоль краев покровного стекла нанесите полимерный клей.

## Глава 4. Оцифровка флуоресцентных препаратов

Развитие технических возможностей всегда идет в ногу с задачами, которые исследователю необходимо решить, используя ту или иную методику.

Несмотря на то, что использование традиционных методов фотографии позволяет получать изображения с разрешением  $57000 \times 38000$  точек, с размером зерна от 0,2 до 2 мкм, исследователи все больше отдают предпочтение цифровым ПЗС-камерам.

Основное их преимущество состоит в том, что кристалл матрицы способен накапливать сигнал в течение некоторого времени, то есть получать изображение не только в реальном времени, но и в условиях продолжительной выдержки. Именно это позволяет эффективно использовать их в работе с флуоресценцией.

Кроме того, это позволяет сохранить результат и возвращаться к его анализу спустя продолжительное время, что без оцифровки затруднительно в силу неизбежного «выгорания» (деградации) люминофоров.

А также дает возможность анализировать большие подборки препаратов посредством флуоресцентных методов исследования.

В первой главе упоминались сложности, которые возникают в ходе анализа полученных препаратов, и тот факт, что для их разрешения возникла необходимость создавать изображения, позволяющие совмещать данные о сигналах, полученных через разные фильтры.

Это позволяет довольно точно анализировать колокализацию различных антигенов, а некоторые специализированные программы предлагают не только разные методы наложения и совмещения изображений из разных каналов, но и всевозможные способы математической фильтрации и усиления сигнала.

Но, как и любой инструмент получение и работа с цифровыми изображениями имеют свои особенности, которые необходимо понимать и учитывать.

## 4.1. Особенности сканирующих микроскопов

Если говорить о переводе картины распределения люминесцентного сигнала зонда в плоскости образца в цифровое изображение, то сначала необходимо разобраться с тем, как именно формирование этого изображения происходит, и какие типы приемников, помимо глаза, существуют и нам доступны.

### 4.1.1. Типы детекторов

На современном рынке доступна широкая линейка камер, которые можно устанавливать на любой микроскоп, чья конструкция это допускает (моно- и тринокулярные микроскопы, имеющие выделенные оптические пути для приемников).

Использование цветных камер предпочтительно в первую очередь для светлопольной микроскопии с применением цветных красителей и светофильтров, а также для флуоресцентной микроскопии с использованием комбинированных фильтров, позволяющих одновременно наблюдать флуоресценцию в разных спектральных зонах (каналах), о которых говорилось ранее.

Камеры различаются по способу получения цветного изображения, но в основе лежит принцип разделения видимого света на красную, зеленую и синюю составляющие (RGB-стандарт цветовой кодировки).

Чувствительность цветных камер всегда лежит только в области видимого света, что накладывает определенные ограничения. Кроме того, камеры, как и человеческий глаз, имеют спектральную селективность – неравномерную чувствительность к разным частям спектрального диапазона.

Люминесцентные фильтры зачастую пропускают свет только в узкой спектральной области (полосе или канале), поэтому при регистрации мы можем положить, что имеем дело с монохромным изображением. Черно-белые камеры позволяют в определенных (техническими характеристиками конкретной камеры) пределах регистрировать свечение любого цвета практически с одинаковой эффективностью, что делает их использование для флуоресцентной микроско-

пии более оправданным.

При этом, зная характеристики люминесцентного фильтра, полученному изображению всегда может быть присвоен цвет, соответствующий действительности или более удобный для анализа. В случае регистрации флуоресценции нескольких флуорохромов последовательно устанавливаются соответствующие комплекты фильтров, производится регистрация изображений и каждому из них присваивается соответствующий цвет. Такая техника получила название псевдоцветов.

#### **4.1.2. Формирование, хранение и обработка цифровых изображений**

Классический черно-белый детектор – это ПЗС (прибор с зарядовой связью, англ. charge-coupled device – CCD) матрица. Она представляет собой пластину, сформированную из расположенных матричным образом микродиодов. При попадании света на матрицу детектора контроллер передает в компьютер данные об интенсивности отдельных точек, имеющих координаты по осям X и Y.

Такие форматы записи графической информации называют растровыми.

Из многообразия существующих растровых форматов для флуоресцентных изображений лучше всего подходит TIFF, поскольку многослойный TIFF-формат позволяет сохранить в одном файле изображения, полученные с использованием разных фильтров. На экране монитора мы видим реконструкцию изображения по такому описанию с присвоением псевдоцвета изображениям, полученным в разных спектральных каналах.

Снимки флуоресцентного микропрепарата в высоком разрешении, сделанные в нескольких каналах, неизбежно формируют большой файл, занимающий огромное дисковое пространство. Что приводит нас к необходимости сжатия информации.

На сегодняшний день существует два основных подхода к сжатию графических данных: растровый и векторный, причем по каждому из них существует целый ассортимент стандартных протоколов. Выбор протокола сжатия и степени компрессии зависит от кон-

кретных ситуаций и задач, поскольку любая компрессия неизбежно ведет к частичной потере информации.

Векторные форматы описывают графическую информацию функциями и весьма выгодны при сохранении изображений, содержащих четкие кривые и цветовые градиенты. В результате изображения больших размеров могут быть описаны в одной строке и храниться в виде очень маленького файла.

Обычно векторная графика создается специальными программами или приложениями, которые подбирают оптимальные способы передачи рисунка, но попытка упаковки растрового изображения в векторный формат приведет к кардинальному искажению исходного изображения или формированию файла такого же или даже большего размера, что в данном случае не оправдано.

Наиболее подходящим вариантом сжатия можно назвать растровый формат JPEG, который описывает в одну строку все точки, имеющие одинаковые цветовые характеристики.

Степень сжатия в таком случае зависит от того, насколько сильно будут аппроксимированы до единого значения близкие по цветовым характеристикам точки. Это также приводит к частичной потере информации, однако, если выбрать максимальное качество, размер файла может уменьшиться очень незначительно.

Чаще всего созданием и формированием итоговых файлов занимается специализированное программное обеспечение, которое производители поставляют в комплекте с камерами.

Большинство современных программ предусматривают возможности сохранения информации об использованном объективе и комплекте фильтров, масштабе пикселя, номере препарата, объекте и методе исследования, а иногда даже аннотации и комментарии к отдельным зонам.

Напомню, что крайне важно отмечать в данных файла то, какой зонд использовался или перечень целевых антигенов, поскольку содержание изображения (сведения об использованных флуорохромах и фильтрах) не позволят вам, в случае утери, эту информацию восстановить.

Даже с использованием сжатия хранение оцифрованных копий микропрепаратов представляет собой отдельную проблему. Несмот-

ря на современный уровень развития компьютерных систем, накопителей и RAID-массивов некоторые лаборатории хранят цифровые файлы бессистемно, на отдельных носителях, что зачастую сводит на нет многие преимущества оцифровки.

Поэтому, планируя использовать описанный в данном пособии метод, советуем озаботиться выделением объема дата-хранилища, учитывающего масштабность ваших задач, и/или планируемую длительность накопления и хранения.

## **4.2. Выбор усиления и экспозиции**

Современные сканирующие системы, в силу наличия цифрового детектора, предлагают возможности регулировки таких параметров съемки, как усиление и экспозиция.

Способ усиления сигнала на детекторе обусловлен регулировкой уровня напряжения, подающегося на ПЗС-матрицу, за счет чего каждый элемент матрицы становится более чувствителен к интенсивности падающего на него света. Это может быть выгодно в случае съемки слабого (с малым квантовым выходом) флуорохрома, невозможности увеличить интенсивность возбуждающего излучения, слабой гибридизации или при съемке «состаренного» препарата, на котором успели пройти процессы деградации люминофора, о которых упоминалось ранее.

Надо иметь в виду, что изменение усиления с одинаковым успехом изменяет чувствительность матрицы и к нежелательному свечению – неспецифическому окрашиванию, автофлуоресценции, свечению контаминантов и заключающей среды.

Изменение экспозиции подразумевает установку времени накопления сигнала интенсивности на каждом элементе матрицы контроллером перед передачей информации компьютеру.

Этот способ также позволяет получать более контрастные изображения в случае вышеуказанных ситуаций с той лишь разницей, что позволяет усиливать сигнал более ярких объектов (например, точечно светящийся участок хромосомы) по сравнению с менее ярким фоновым свечением.

Однако у высокой экспозиции есть ряд недостатков – помимо

увеличения общего времени съемки (иногда значительно, поэтому не рекомендуется выставлять выдержку больше 250-300 мс), в присутствии ярко светящихся объектов вроде пыли или коллагеновых волокон их интенсивность также будет накапливаться и в некоторых случаях может мешать распознаванию полезных сигналов.

Сочетание этих двух подходов, как правило, позволяет опытному пользователю даже при наличии значительной разницы в свойствах флуорохромов или артефактов «вытянуть» полезные сигналы для каждого из них.

Некоторые конкретные рекомендации подробнее будут описаны в следующей главе.

## Глава 5.

### Артефакты и способы их редуцирования

С учетом перечисленных особенностей каждого из этапов изготовления флуоресцентного препарата не стоит удивляться тому, что каждое стекло под объективом выглядит непохожим на другие.

Здесь мы попробуем привести ряд наиболее часто встречающихся ситуаций, требующих от исследователя дополнительных действий. И перечислить возможности на такие ситуации повлиять.

#### 5.1. Размытые или разорванные границы ядер

Одна из самых очевидных и довольно часто встречающихся ситуаций – это когда на препарате можно наблюдать размытые или разорванные границы ядер (рис. 8а, б). Для визуализации ядерных мембран в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова используется краситель DAPI с люминесценцией в синей области спектра, который добавляют в заключающую среду.

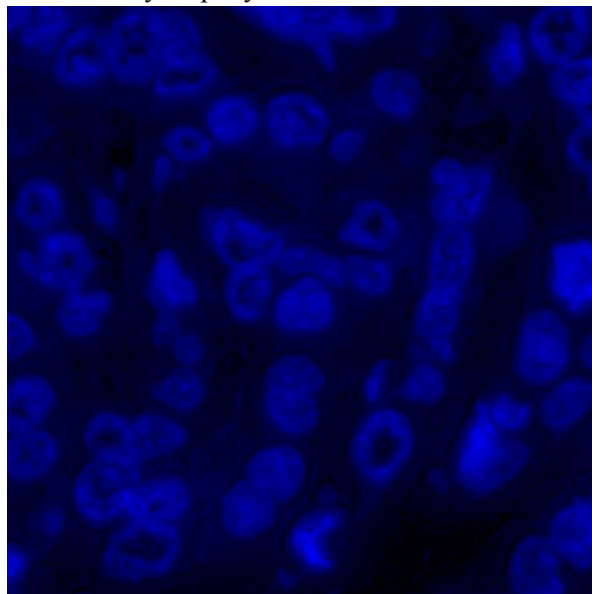


Рис. 8а. Изображение препарата с разрывами ядер в DAPI (оригинальный рисунок).



К анализу таких изображений следует относиться крайне осторожно. Частичное разрушение ядерной мембраны достигается предобработкой в случае использования ДНК-зондов, чтобы обеспечить их проникновение в ядро для дальнейшей гибридизации. Но если стенка оказывается практически разрушена препарат уже не дает информации о дислокации экспрессируемого зондом сигнала. Помимо того, что в ходе ферментной обработки часть целевых последовательностей также может быть разрушена.

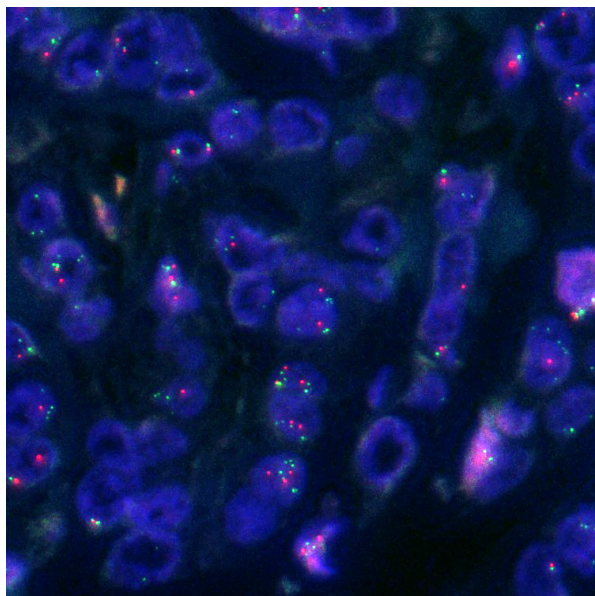


Рис. 8б. Изображение препарата с разрывами ядер, окрашенного зондом FISH HER2 (оригинальный рисунок).

Нельзя с уверенностью говорить о достоверном числе и соотношении сигналов в пределах ядра. Необходимо либо переделявать препарат, либо при анализе учитывать только клетки с явно видимыми границами ядра.

Такие препараты получают в силу флуктуаций толщины среза или условий действия ферментов и корректируются соответственно. Подробно об этапе предварительной обработки перед нанесением зонда написано в разделах 1.3 и 3.2.

Рекомендуем также обратить внимание на температурный режим окружающей среды во время предобработки. Активность ферментов может довольно ощутимо меняться с температурой.

## **5.2. Автофлуоресценция и неспецифическое окрашивание**

Ранее уже упоминалось, что отличить одно от другого крайне сложно. В общем случае, если на препарате наблюдается фоновое свечение – то имеют место оба явления в комплексе (рис. 9).

Как правило, наличие фонового свечения просто осложняет анализ, на достаточно большом образце почти всегда можно выбрать зону, где фон минимален, и исследователь может оценить результаты экспрессии полезных сигналов.

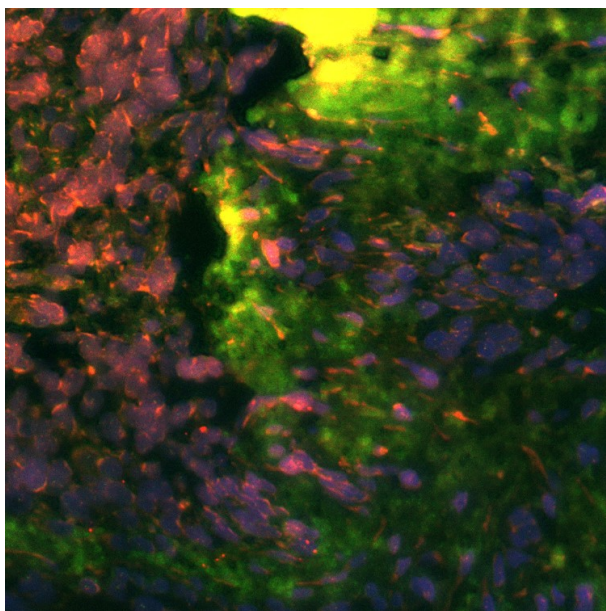


Рис. 9. Изображение препарата, окрашенного зондом FISH EWSR1 с автофлуоресценцией липофусцина (зеленый) и неспецифическим окрашиванием (красный) (оригинальный рисунок).

Например, на рисунке 9, несмотря на сильное фоновое окрашивание, справа наблюдается группа клеток с четко выраженными сигналами гибридизации. Причем в данной ситуации имеет смысл выставить большее усиление при съемке зеленых сигналов, что также увеличит автофлуоресценцию, но не помешает распознаванию сигнала зонда.

Для красных сигналов имеет место неспецифическое окрашивание, локализованное в том числе на мембране клеточных ядер, поэтому регуляцией усиления или экспозиции велика вероятность получить изображение, которое будет сложно интерпретировать. Здесь придется подыскать оптимальное сочетание условий съемки таким образом, чтобы можно было однозначно опознать точечные сигналы внутри ядра на фоне свечения его мембраны.

Иногда можно выделить свечение автофлуоресценции, если точно понимать, какие именно структуры склонны люминесцировать в том или ином спектральном диапазоне.

В качестве примера на рисунке 10 приведен пример автофлуоресценции структур жировой клетчатки молочной железы. Такого рода характерное свечение также можно наблюдать на препаратах печени, крови и кровеносных сосудов, нервных волокон.

Уменьшить уровень автофлуоресценции можно, если обработать образец перед нанесением зонда слабым окислителем – вроде слабого раствора перекиси водорода или перманганата калия, это может изменить молекулярную структуру нецелевых агентов, но также может снизить эффективность гибридизации.

Более безопасный способ – использовать эффект фотодегградации для нецелевых люминофоров.

Освещение образца ультрафиолетовым светом в течение нескольких минут перед нанесением зонда позволит снизить автофлуоресценцию в разы. Но если фоновое свечение на препарате осталось – велика вероятность, что вы имеете дело с неспецифическим окрашиванием.

При проведении гибридизации часто возникает риск неспецифических реакций. Это может происходить, потому что, как и в иммуногистохимии, разные белки могут иметь одинаковые или сходные эпитопы, распознающиеся зондами.

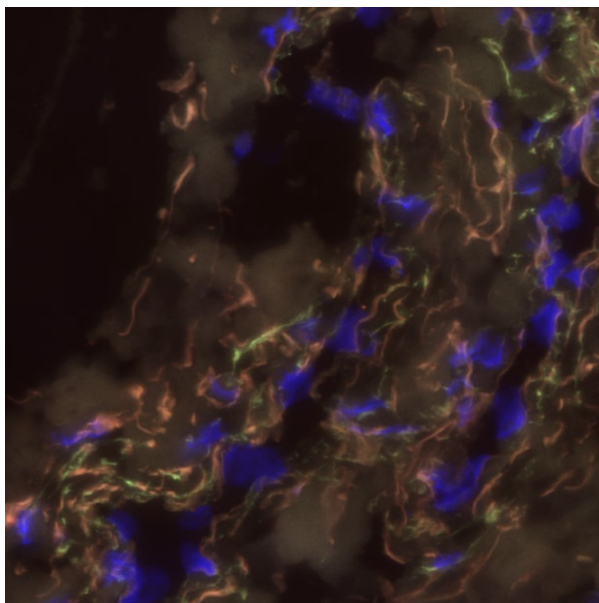


Рис. 10. Изображение жировой клетчатки, окрашенной зондом FISH HER2 с автофлуоресценцией липофусцина (зеленый) и коллагена (красный) (оригинальный рисунок).

Неспецифическая адсорбция антител может происходить также при использовании слишком высоких концентраций. Чтобы этого не происходило, необходимо провести серию пробных реакций на препаратах, содержащих исследуемый антиген, используя последовательные разведения зонда.

Разведение подбирают таким образом, чтобы неспецифическое окрашивание было минимально, в то время как специфическое было достаточно интенсивно.

Другая возможная причина – неправильная фиксация и хранение препарата.

К сожалению, невозможно порекомендовать один фиксатор для всех возможных реакций. Кратковременная фиксация всегда предпочтительнее, особенно это касается формалиновых фиксаций, поскольку при длительном хранении из-за возникновения в белковых молекулах поперечных сшивок появляется еще и сильная автофлуоресценция самих белков.

Кроме того, при нарушении условий хранения зонда (многократных размораживаниях и замораживаниях или на грани истечения регламентированного срока хранения) предшественники склонны агломерироваться или разрушаться, и в итоге начинают неспецифически оседать на препарате, как это показано на рисунке 11.

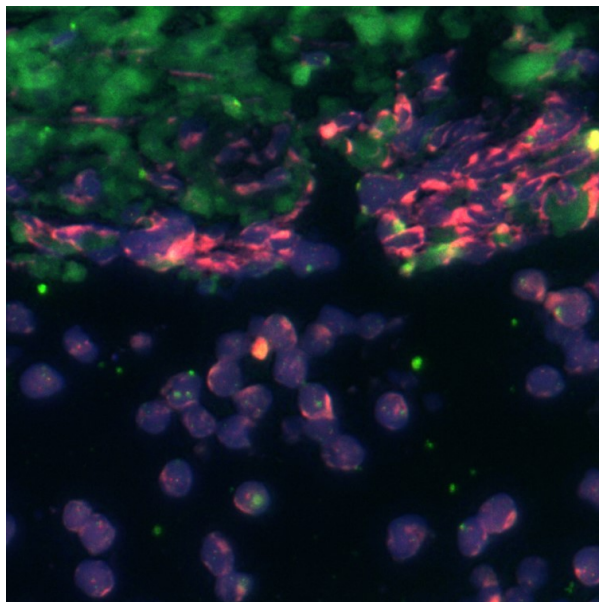


Рис. 11. Изображение препарата, окрашенного зондом FISH HER2 с сильным неспецифическим окрашиванием и агломератами (оригинальный рисунок).

В таких ситуациях часто свечение малых агломератов принимают за полезные сигналы.

Другой вариант, когда на фоне точно светящихся агломератов сигнал гибридизационных сигналов слаб или вовсе не виден.

Все это приводит к некорректной интерпретации результатов исследования.

Коммерческие зонды необходимо хранить согласно инструкции производителя. В идеале их можно размораживать только один раз, а после этого хранить непродолжительное время при 4°C. Поэтому, как правило, они уже продаются расфасованными на отдельные пор-

ции, достаточные для использования один или несколько раз. Иногда убрать агломераты помогает отдельная денатурация зонда до его нанесения на препарат.

### 5.3. Отсутствие гибридизационных сигналов

Наиболее серьезных действий требует ситуация, когда несмотря на возможности усиления и регулировки экспозиции, не удастся получить сигналы в пределах окрашенных ядер.

На рисунке 12 приведено изображение препарата, на котором не прошла гибридизация сигналов, либо прошла настолько слабо, что возможностей сканирующего микроскопа не хватило для получения содержательной картины.

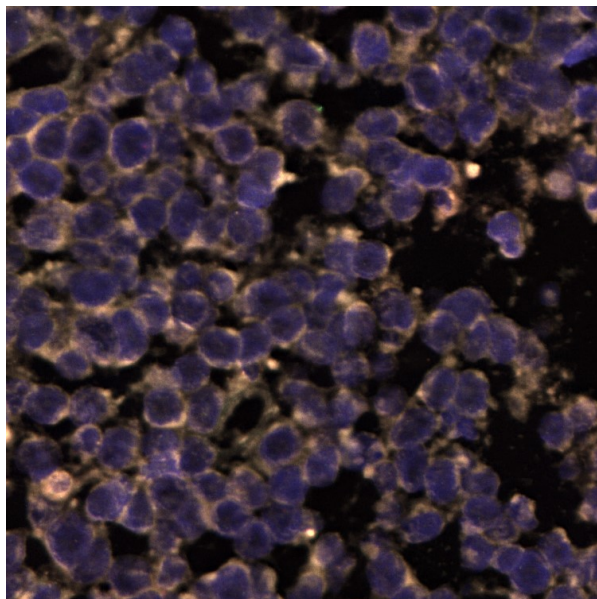


Рис. 12. Изображение препарата, окрашенного зондом FISH N-MYC без гибридизационных сигналов (оригинальный рисунок).

В этом случае необходимо переделать препарат, скорректировав условия гибридизации (см. раздел 1.3), но это может оказаться неэф-

фактивно, если отсутствие сигналов обусловлено режимом фиксации, и гибридизация не происходит в силу деградации антигенов, на которые нацелен зонд.

В некоторых случаях, если объект исследования имеет значительный объем или трудно пропитывается растворами, целесообразно перед нанесением зонда провести предгибридизацию с гибридным буфером того же состава, только без меченого зонда.

Как меру предосторожности потери (чрезмерной отмывки) сигналов можно порекомендовать смывать покровное стекло и проводить первую отмывку в буфере того же состава, что и гибридный, только подогретого на 5-10°C.

## Контрольные вопросы

1. Поглощение, отражение и пропускание света как базовые свойства красителя, их соотношение.
2. Что такое люминесценция, какие вещества могут выступать в качестве люминофоров.
3. Чем фосфоресценция отличается от люминесценции, флуорохромы от люминофоров.
4. Основные принципы выявления антигенов в биологических системах.
5. Способы выявления антигенов в биологических системах.
6. Типы флуоресцентных меток и маркеров.
7. Преимущества и недостатки флуоресцентных маркёров.
8. Методы усиления экспрессии маркёров. Роль гаптен и варианты их использования.
9. Что такое гибридизация, отличия метода от иммуногистохимии.
10. Основные типы цитогенетических нарушений и роль метода FISH для их выявления.
11. Какие объекты позволяет выявлять флуоресцентная гибридизация *in situ*.
12. Варианты FISH-зондов.
13. Необходимые условия для использования флуоресцентной гибридизации *in situ*.
14. Основные этапы изготовления препаратов с флуоресцентной гибридизацией *in situ*.
15. Роль фиксации и предобработки в эффективности метода.
16. Основные фиксаторы для ткани.
17. Типы зондов и особенности их использования.
18. Условия гибридизации и способы их регуляции.
19. Возможности сочетания различных методик.
20. Возможности одновременного выявления нескольких антигенов.
21. Спектральные кривые поглощения и люминесценции красителей.
22. Квантовый выход.



23. Какие факторы могут влиять на спектральные свойства люминесцентных красителей.
24. Возможные сценарии релаксации электронно-возбужденного состояния красителя.
25. Явление фотохромизма и варианты его применения.
26. Процесс деградации флуорохромов. Фотодеградация.
27. Понятие стабильности люминофора, чем обусловлено.
28. Флуоресцентные белки.
29. Основное отличие использования флуоресцентных белков от флуоресцентной гибридизации *in situ*.
30. Коммерческие флуорохромы, их основные отличия.
31. Критерии выбора флуорохромов для различных видов исследований.
32. Правило Стокса, разделение входного и выходного световых потоков.
33. Микроскопия светлого и темного полей, основные отличия.
34. Флуоресцентный микроскоп, варианты комплектации.
35. Фильтр-блоки или фильтр-кубики, устройство, принцип действия.
36. Комбинированные фильтры. Варианты использования.
37. Подбор сочетания флуорохром – фильтр-блок.
38. Недостатки визуального метода анализа готовых препаратов.
39. Возможности цифрового анализа готовых микропрепаратов
40. Способы съемки распределения флуоресцентного сигнала в плоскости образца.
41. Типы источников возбуждающего света, преимущества и недостатки.
42. Типы цифровых детекторов, преимущества и недостатки.
43. Преимущества оцифровки флуоресцентных препаратов.
44. Процесс цифровизации, растровый метод записи. Способы сжатия графической информации.
45. Какие данные можно сохранить при создании цифровой копии флуоресцентного препарата.
46. Методы оптимизации изображения. Регулировка условий съемки, обработка готовых изображений.

47. Возможность регулировки усиления детектора, принцип действия, преимущества и недостатки.

48. Возможность регулировки экспозиции, принцип действия, преимущества и недостатки.

49. Артефакты предобработки, причины возникновения и способы устранения.

50. Неспецифическое связывание. Возможные причины и способы предупреждения.

51. Явление автофлуоресценции. Типы люминофоров с неспецифическим возбуждением в видимой области.

52. Характерные структуры с сильной автофлуоресценцией.

53. Способы снижения автофлуоресценции препаратов.

54. Как отличить автофлуоресценцию от неспецифического окрашивания.

55. Особенности анализа препаратов с артефактами.

56. Как отличить зонд с истекшим сроком годности или нарушенными условиями хранения.

57. Значение FISH-исследования в онкологии.

58. Принципы подсчета сигналов на примере зонда к гену HER2 для определения амплификации в карциномах молочной железы.

59. Критерии выбора зоны гибридизации для анализа в зависимости от морфологии опухоли.

60. Требования к хранению и утилизации FISH-микропрепаратов.

## Тестовые задания

Инструкция: выберите один или несколько правильных ответов

1. Что можно использовать для выявления объектов интереса в пределах микроскопических биологических структур

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	люминофоры	+
б	ферменты	
в	хромофоры	+
г	радиоактивные изотопы	+

2. Для иммуногистохимического выявления антигенов могут использоваться

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	моноклональные антитела	+
б	фрагменты иммуноглобулинов, конъюгированные с гаптенами	+
в	поликлональные антисыворотки	+
г	фрагменты нуклеиновых кислот	

3. Поглощение – это

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	световой поток, падающий на образец, $\Phi_0$	
б	часть светового потока, прошедшая сквозь образец, $\Phi_t$	
в	часть светового потока, отраженная поверхностью образца, $\Phi_r$	
г	$\Phi_0 - (\Phi_t + \Phi_r)$	+

4. Восприятие человеком цвета красителя обусловлено

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	поглощением	
б	совокупностью отражения и пропускания	+
в	спектральной чувствительностью глаза	+

5. Электронно-возбужденное состояние – это

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	совокупность энергий физических и химических связей между атомами красителя	
б	энергетическое состояние молекулярной структуры после поглощения излучения	+
в	соотношение между энергией поглощаемого и испускаемого света	

6. Чем обусловлена люминесценция

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	внутренней конверсией энергии поглощения, изменяющей длину и энергию молекулярных связей	
б	pH, присутствием окислителей или солей тяжелых металлов	
в	наличием возможности конверсии энергии в излучающее электронно-возбужденное состояние	+

7. Что такое квантовый выход люминесценции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	спектральная область с максимальными значениями интенсивности люминесценции	
б	соотношение между энергией поглощаемого и испускаемого света	+
в	время жизни электронно-возбужденного состояния красителя	

8. Что такое флуоресценция

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	люминесценция органических красителей	
б	люминесценция, подчиняющаяся правилу Стокса	
в	люминесценция с временем жизни порядка или менее микросекунды	+

9. Какие люминофоры могут использоваться для исследования биологических объектов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	специально модифицированные флуорохромы с наиболее высокими квантовыми выходами	
б	флуоресцентные белки	+
в	сложные углеводороды с ароматическими кольцами в составе объектов	+
г	флуорохромы, растворимые в липидах без потери люминесцентных свойств	+

10. Правило Стокса гласит

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	длина волны люминесценции будет меньше длины волны возбуждения	
б	энергия испускаемого света будет меньше энергии поглощенного	+
в	интенсивность люминесценции будет больше интенсивности возбуждения	

11. С помощью какой специфической реакции выявляются белки в иммуногистохимии

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	реакции комплемента	
б	ПЦР	
в	реакции антиген-антитело	+

12. Прямой метод детекции отличается тем, что

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	антитела к антигенам непосредственно конъюгированы с меткой	+
б	антитела к антигенам конъюгированы с гаптенами, а антитела к гаптенам конъюгированы с меткой	
в	распознающие зонд иммуноглобулины требуют этапа детекции антителами, конъюгированными с меткой	

13. Кто впервые использовал в диагностике меченные флуоресцеином антитела

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	А. Кунс	+
б	Л. Стенберг	
в	С. Милстейн	
г	Дж. Галл	

14. Чем обусловлено применение гаптенс для детекции антигенов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	использование флуоресцентных маркёров	
б	амплификация уровня сигнала	+
в	выявление специфических последовательностей менее 5000 пар нуклеотидов	

15. Реакция антиген-антитело осуществляется за счет

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	изотопного обмена между химически связанными молекулами	
б	физической адсорбции пространственно-комплементарных частей иммуноглобулинов	+
в	комплементарного связывания определенных пар нуклеиновых кислот	

16. Последствия формалиновой фиксации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	деградация РНК	+
б	деградация ДНК	
в	образование поперечных метиленовых сшивок в белковых молекулах	+
г	затруднение удаления белков, маскирующих нуклеиновые кислоты	+
д	индуцирование автофлуоресценции аминов за счет образования кольцевых структур	+

17. Чем гибридизация *in situ* отличается от иммуногистохимии

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	использование флуоресцентных маркёров	
б	целевые объекты – ДНК и РНК последовательности	+
в	комплементарная сшивка целевых последовательностей с нуклеиновыми основаниями в составе зонда	+

18. Для каких методов исследования могут использоваться молекулы гаптен

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	иммуногистохимия	+
б	гибридизация <i>in situ</i>	+
в	радиоизотопная рентгенография	

19. Какие объекты выявляет гибридизация *in situ*

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	белки и транскрипты	+
б	эпитопы антигенов	
в	фибриллы хроматина	+
д	участки хромосом, гены	+

20. Что влияет на сохранность нуклеиновых кислот на препарате

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	рН реактивов, используемых для обработки	+
б	длительность фиксации	+
в	температура хранения	+
г	обработка поверхности предметного стекла	+

21. Возможные причины использования ферментной преобработки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	демаскировка нуклеиновых кислот после фиксации	+
б	использование ДНК-зондов	
в	толщина и плотность биоматериала, затрудняющие проникновение зонда	+
г	препарат растительного происхождения	

22. Укажите обязательные этапы гибридизации *in situ*

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	нанесение биоматериала на препарат	+
б	предварительная обработка (демаскировка)	
в	нанесение зонда	+
г	денатурация	
д	гибридизация	+
е	постгибридизационные отмывки	+
ж	детекция	
з	микроскопия	+

23. Почему не стоит использовать адгезивные стекла для подготовки препаратов для флуоресцентной гибридизации *in situ*

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	адгезивы обладают автофлуоресценцией	+
б	адгезивы предотвращают потерю образца при отмывках	
в	адгезивы могут провоцировать неспецифическое связывание зонда	+

24. Отметьте обязательные стадии процесса гибридизации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	денатурация зонда	
б	частичная денатурация ДНК-образца	+
в	ренатурация комплементарных участков с предшественником зонда	+



25. Какие из перечисленных веществ используются для опосредованного выявления и амплификации сигнала меток

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	биотин	+
б	флуоресцентные белки	
в	дигоксигенин	+
г	эстрадиол	+
д	катехоламины	
е	динитрофенол	+
ж	порфирины	

26. На каких типах образцов может быть реализован метод FISH

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	давленные препараты	+
б	мазки	+
в	спрэды	+
г	клеточные культуры и хромосомы	+
д	парафиновые гистологические срезы 4-10 мкм	+

27. Оптимальные условия фиксации препарата

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	в метанол-ЛУК (3:1)	
б	в растворах на основе формалина и спиртов не более 24 часов	
в	определяются типом образца и целью исследования	+

28. Какие вещества могут использоваться на этапе предобработки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	протеинкиназы разных типов	+
б	порфирины	
в	пепсин	+
г	дигоксигенин	

29. Из каких предпосылок следует выбирать ферменты для обработки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	только рекомендованные протоколом производителя зонда	
б	исходя из специфичности последовательностей аминокислот и пептидных цепей, на которые воздействует фермент	
в	исходя из типа образца и использованного фактора	+

30. Какие типы меченых предшественников могут быть использованы в качестве зонда FISH

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	РНК	+
б	однонитевая ДНК	+
в	двунитевая ДНК	+
г	флуоресцентный белок	
д	искусственный аналог ДНК с замещенной рибозой (PNA)	+

31. Какие условия гибридизации можно регулировать

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	никакие, необходимо максимально точно следовать протоколу производителя зонда	
б	длительность инкубации	+
в	температуру гибридизации	+
г	кратность буферного раствора	+
д	концентрацию зонда	+

32. Способы отличить автофлуоресценцию от неспецифического связывания

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	по цвету	
б	по интенсивности	
в	по цвету метки	
г	это невозможно	+

33. Какие компоненты входят в гибридизационную смесь

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	зонд	+
б	DAPI	
в	формамид	+
г	буферный солевой раствор с рН 6,5-7,5	+
д	декстран-сульфат	+

34. Возможные последствия неправильной фиксации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	образование сшивок, активирующих автофлуоресценцию	+
б	закрепление белков, маскирующих таргетные нуклеиновые кислоты и блокирующие гибридизацию	+
в	деградация РНК	+
г	необходимость ферментативной предобработки	

35. Из каких предпосылок выбирать длительность гибридизации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	согласно протоколу производителя зонда	+
б	в зависимости от толщины образца	
в	эмпирически, исходя из уровня экспрессии сигналов на препаратах конкретного типа	+

36. Что может «тушить» люминесценцию флуорохрома

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	изменение рН окружения	+
б	воздействие окислителей	+
в	возбуждающий свет высокой интенсивности	+
г	присутствие солей тяжелых металлов	+
д	температура окружающей среды	+

37. Что может активировать люминесценцию флуорохрома

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	изменение рН окружения	
б	образование кольцевых структур в органических молекулах	+
в	специфическое связывание с окружением	+
г	воздействие возбуждающего света при наличии фотохромизма	+

38. Что такое фотодеградация

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	комплекс причин, приводящих к разрушению флуорохрома	
б	изменение спектральных свойств под действием облучения	
в	разрушение молекулярной структуры флуорохрома за счет энергии возбуждающего света	+

39. Чем обусловлена стабильность люминофора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	интенсивностью возбуждающего света	
б	временем облучения (экспозиции)	
в	температурой окружающей среды	
г	комплексом причин, приводящих к снижению люминесценции	+

40. Что такое флуоресцентные белки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	флуорохромы, растворимые в липидах	
б	естественные компоненты биологических систем с известными люминесцентными свойствами	+
в	фотоактивируемые белки	

41. Для чего может служить автофлуоресценция

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	для локализации нейромедиаторов и модифицированных аминов	+
б	для выявления морфологии жировой и соединительной ткани	+
в	для выявления клеток крови и кровеносных сосудов	+
г	для выявления клеток растений	
д	для выявления клеток грибов	+

42. Что такое фотохромизм

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	комплекс причин, приводящих к разрушению флуорохрома	
б	изменение спектральных свойств под действием облучения	+
в	разрушение молекулярной структуры флуорохрома за счет энергии возбуждающего света	

43. Для чего могут использоваться флуоресцентные белки

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	для получения трансгенных клеток	
б	для исследования динамики белков и белок-белковых взаимодействий in vivo	+
в	для исследования динамики молекулярного состава внутриклеточных структур	

44. Что из перечисленного может служить источником излучения для исследования флуоресценции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	ртутная лампа	+
б	ксеноновая лампа	+
в	лампа накаливания	
г	лазерные светодиоды	+

45. Для чего можно использовать явление фотохромизма

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	для исследования динамики белков и белок-белковых взаимодействий <i>in vivo</i>	
б	для исследования динамики молекулярного состава внутриклеточных структур	+
в	для флуоресцентных исследований в широком временном диапазоне (без оглядки на стабильность флуорохрома)	+

46. Критерии выбора флуорохромов для исследования

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	наличие подходящего под спектральные характеристики возбуждения источника света в комплектации имеющегося микроскопа	+
б	наличие подходящих по спектральные характеристики фильтр-кубиков	+
в	количество целевых объектов для одновременного выявления	+
г	вероятность пересечения спектральных характеристик выбранных флуорохромов	+

47. Что такое микроскопия светлого поля

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	исследователь видит свет, прошедший сквозь образец	+
б	исследователь видит свет, отраженный поверхностью образца	
в	в качестве конденсора, собирающего свет, выступает объектив	

48. Что такое микроскопия темного поля

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	исследователь видит свет, прошедший сквозь образец	
б	исследователь видит свет, отраженный поверхностью образца	+
в	в качестве конденсора, собирающего свет, выступает объектив	

49. Что такое кубик-фильтр

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	фильтр кубической формы	
б	светоделительное (или дихроматическое) зеркало	
в	фильтры возбуждающего света и флуоресценции в соответствующей геометрической конфигурации	
г	конфигурация фильтров входящего и выходящего излучения с дихроматическим зеркалом в составе микроскопа, подлежащая замене без смещения изображения и потери резкости	+

50. Критерии выбора источника света для флуоресцентного микроскопа

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	интенсивность излучения, достаточная для возбуждения флуорохромов, которые планируется использовать	+
б	спектральная область, подходящая под флуорохромы и фильтры, которые планируется использовать	+
в	совместимость с системами понижающих светофильтров	
г	совместимость с характеристиками оптической системы микроскопа, объективов	+

51. Что такое комбинированный фильтр

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	светоделительное (или дихроматическое) зеркало	
б	фильтры возбуждающего света и флуоресценции в геометрической конфигурации, соответствующей ходу лучей в микроскопе	
в	фильтры возбуждающего света и флуоресценции, одновременно пропускающие несколько спектральных полос (каналов), если они в достаточной степени разнесены	+

52. Какой люминофор можно назвать «слабым»

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	быстро деградирует под воздействием излучения и температуры	
б	имеет низкое соотношение между испускаемым светом к поглощенному	+
в	обладает высоким квантовым выходом	

53. Что можно отнести к недостаткам визуального метода анализа флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	необходимость переключаться между разными фильтрами для оценки разных люминофоров	+
б	ограничение площади анализа полем зрения микроскопа	+
в	необходимость использования мощных ламп для выявления слабых люминофоров	
г	невозможность влиять на условия съемки люминофоров разной силы	+



54. Что такое спектральная селективность

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	относительная малая часть спектрального диапазона	
б	изменение интенсивности в зависимости от длины волны	
в	неравномерная чувствительность к разным частям спектрального диапазона	+

55. Что можно отнести к преимуществам использования лазерных диодов в качестве источника излучения

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	высокая интенсивность излучения	+
б	сильное свечение на протяжении всего спектрального диапазона	
в	возможность регулировки интенсивности не сужая зону освещения	+
г	стабильность уровня излучения по времени и спектральным характеристикам	+
д	меньшие энергозатраты	+

56. Что можно отнести к недостаткам использования лазерных диодов в качестве источника излучения

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	высокая интенсивность излучения	
б	узкие спектральные пики	
в	необходимость точной подборки под ограниченное число флуорохромов и фильтров, с нужными спектрами возбуждения	+

57. Что можно отнести к преимуществам использования цифровых детекторов для анализа флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	возможность сшивки изображений отдельных полей зрения в общую картину распределения флуоресцентных сигналов	+
б	возможность настройки условий съемки каждого флуорохрома в отдельности	+
в	возможность сохранить отснятый образец и вернуться к его анализу даже после выгорания флуоресцентных сигналов	+
г	возможность применять инструменты постобработки сохраненного изображения, изменять яркость/контрастность	+

58. Отметьте типы детекторов, которые используются для современного анализа флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	человеческий глаз	+
б	фотопленка	
в	цветные цифровые камеры	
г	CCD-детекторы	+

59. На какие микроскопы возможна установка цифрового детектора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	монокулярные	+
б	бинокулярные	
в	тринокулярные	+
г	микроскопы с выделенным оптическим путем для цифровой съемки	+

60. Что можно отнести к недостаткам использования цветных камер для исследования флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	спектральная селективность	+
б	использование комбинированных фильтров для одновременной регистрации разных флуорохромов	
в	ограниченность спектрального диапазона регистрации	+

61. Что можно отнести к преимуществам использования монохромных камер для исследования флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	использование узкополосных фильтров	+
б	регистрация в УФ, видимом и ближнем ИК-диапазонах	+
в	стабильная эффективность регистрации в разных спектральных областях	+
г	возможность использования псевдоцветов	+

62. Псевдоцвет – это

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	соответствие выделенной спектральной области цвету, видимому глазом	
б	цвета разных флуорохромов, одновременно наблюдаемых в разных каналах одного фильтра	
в	присвоение цветов сигналам, полученным монохромным детектором через разные фильтры	+

63. Что такое растровый метод записи графической информации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	запись функций, описывающих кривые и цветовые градиенты изображения	
б	запись в одну строку всех точек, имеющих одинаковые цветовые характеристики	
в	запись цвета отдельных точек по координатам X и Y	+

64. Что такое векторный метод записи графической информации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	запись функций, описывающих кривые и цветовые градиенты изображения	+
б	запись в одну строку всех точек, имеющих одинаковые цветовые характеристики	
в	запись цвета отдельных точек по координатам X и Y	

65. Какой метод сжатия данных предпочтительнее для хранения оцифрованных флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	PNG	
б	TIFF	
в	JPEG	+
г	BMP	
д	GIF	

66. Какой формат записи данных предпочтительнее для хранения оцифрованных флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	PNG	
б	TIFF	+
в	JPEG	
г	BMP	
д	GIF	

67. Какие дополнительные данные могут автоматически сохраняться в файлах оцифрованных флуоресцентных препаратов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	об использованном объективе	+
б	об использованных фильтрах	+
в	об использованном зонде и целевых объектах	
г	об условиях съемки	+
д	аннотации и комментарии	

68. Как регулируется усиление чувствительности детектора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	регулировкой интенсивности источника излучения	
б	регулировкой накопления сигнала контроллером перед передачей информации компьютеру	
в	регулировкой напряжения на матрице детектора	+

69. Как регулируется экспозиция детектора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	регулировкой интенсивности источника излучения	
б	регулировкой накопления сигнала контроллером перед передачей информации компьютеру	+
в	регулировкой напряжения на матрице детектора	

70. Что можно отнести к нежелательному свечению при анализе препаратов флуоресцентной гибридизации *in situ*

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	свечение конгломератов зонда	+
б	свечение комплементарно связанного зонда	
в	свечение неспецифически связанного зонда	+
г	автофлуоресценция	+

## 71. Возможные причины автофлуоресценции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	неправильная или избыточная фиксация	+
б	наличие компонентов, близких по структуре к комплементарной последовательности предшественника зонда	
в	некорректно подобранная или слишком широкая полоса пропускания фильтра возбуждающего света	+
г	переотраженный свет источника, попадающий на образец, минуя фильтр	+
д	наличие характерных молекулярных структур с сильной собственной люминесценцией	+

## 72. Возможные причины неспецифического связывания

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	неправильная или избыточная фиксация	+
б	наличие компонентов, близких по структуре к комплементарной последовательности предшественнику зонда	+
в	высушивание поверхности образца до завершения гибридизации и отмывок	+
г	избыточная концентрация зонда в гибридизационной смеси	+
д	наличие характерных молекулярных структур с сильной собственной люминесценцией	
е	несоблюдение условий хранения и истечение срока годности зонда	+

## 73. Возможные причины агрегации зонда

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	высушивание поверхности образца до завершения гибридизации и отмывок	
б	избыточная концентрация зонда в гибридизационной смеси	
в	несоблюдение условий хранения и истечение срока годности зонда	+

74. Отметьте структуры, обладающие сильной характерной автофлуоресценцией

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	кровь и кровеносные сосуды	+
б	жировая ткань	+
в	соединительная ткань	+
г	ткани легкого	
д	ткани печени	+
е	клетки мозга и нервных волокон	+

75. Способы снижения автофлуоресценции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	предварительная гибридизация образца с буфером без зонда	
б	обработка поверхности образца слабым окислителем перед нанесением зонда	+
в	облучение образца перед нанесением зонда до фотодеградации нецелевых люминофоров	+
г	предварительная обработка образца ферментами, расщепляющими белковые шивки	

76. Недостатки высокой экспозиции

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	усиливается свечение нежелательных сигналов: автофлуоресценции, неспецифического окрашивания, загрязнений	+
б	ускоряется фотодеградация люминофоров	
в	увеличивается общее время съемки образца	+

77. Недостатки высокой чувствительности детектора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	усиливается свечение нежелательных сигналов: автофлуоресценции, неспецифического окрашивания, загрязнений	+
б	ускоряется фотодеградация люминофоров	
в	увеличивается общее время съемки образца	

78. Почему нельзя допускать высушивание препарата на всех этапах гибридизации

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	возникновение в белковых молекулах поперечных сшивок	
б	неспецифическая адсорбция меченых нуклеотидов	+
в	возникает необходимость дополнительной стадии детекции флуорохромо	

79. Что может быть использовано в качестве незастывающих заключающих сред для препаратов, предназначенных для флуоресцентной микроскопии

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	нефлуоресцирующее иммерсионное масло	+
б	жидкий парафин	+
в	глицерин	+
г	DAPI	
д	синтетические полимеры (изобутилметакрилат, полистирол)	+

80. Возможно ли добавление красителя непосредственно в заключающую среду

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	да, при добавлении декстран сульфата	
б	да, если краситель флуоресцирует в водном растворе	+
в	нет, нельзя	

81. Сколько понадобится люминофоров для одновременного выявления 5 целевых объектов на образце методом флуоресцентной гибридизации *in situ*

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	пять	
б	три	+
в	четыре	
г	два	



82. Возможно ли, не имея маркировки, определить, какая последовательность каким сигналом помечена

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	да, если известно какие использовались люминофоры	
б	да, если известно какие использовались фильтры	
в	да, если известна номенклатура использованного зонда	+
г	да, если известен цвет метки	

83. Анализ материала проводится на площади препарата

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	в пределах нескольких полей зрения	
б	на площади всего образца	
в	в зависимости от целей исследования	+

84. Методика флуоресцентной микроскопии визуализирует

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	морфологию клеток и тканей	
б	распределение белков и антигенов	
в	распределение РНК- и ДНК-последовательностей, участков генов, хромосом	
г	свечение люминофоров/флуорохромов	+

85. Рекомендованные условия хранения готовых препаратов для замедления деградации флуорохромов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	в темноте	+
б	при 4°C	
в	при -20°C	
г	при низких температурах, в зависимости от состава заключающей среды	+

86. Для чего имеет смысл перед использованием очистить и обезжирить предметное стекло

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	уменьшить вероятность контаминации агентами с сильной автофлуоресценцией	+
б	уменьшить вероятность неспецифического связывания	+
в	увеличить долю проходящего света (прозрачность)	

87. Оптимальная толщина покровного стекла

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	менее 100 мкм	
б	100-170 мкм	+
в	более 170 мкм	

88. Имеет ли смысл использовать более мощную лампу при флуоресцентной микроскопии

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	нет, это значительно увеличит скорость фотодеградации	
б	да, это позволит возбудить даже слабый флуорохром	
в	зависит от целей планируемых исследований и имеющихся зондов	+

89. В связи с чем на препарате можно наблюдать размытые или разорванные границы ядер

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	неправильная или избыточная фиксация	
а	неравномерная толщины среза	+
б	избыточная предобработка ферментами	+
г	несоблюдение условий хранения и истечение срока годности зонда	

90. Узкополосные светофильтры – это

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	фильтр, пропускающий свет только в области максимума возбуждения люминофора	+
б	фильтр, пропускающий свет только в области максимума люминесценции люминофора	+
в	фильтр, пропускающий только свет с длиной волны больше порогового значения	
г	фильтры возбуждения, люминесценции и дихроматическое зеркало в определенной конфигурации	

91. Критерии подбора фильтров

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	форм-фактор, совместимый с конфигурацией микроскопа	+
б	соответствие спектральных полос используемых люминофоров спектрам пропускания фильтров по спецификациям производителей	
в	эмпирический подбор сочетания зонд-фильтры по наибольшей эффективности выявления сигналов	+

92. Из-за чего может не пройти гибридизация сигналов

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	неправильная или избыточная фиксация	+
а	избыточная толщина среза	+
б	недостаточная предобработка ферментами	+
г	несоблюдение условий хранения и истечение срока годности зонда	+
д	избыточная отмывка после гибридизации	+

93. Способы снижения вероятности неспецифического окрашивания

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	подбор условий фиксации для сохранения целостности и доступности для гибридизации целевых последовательностей	+
а	избегать высушивания поверхности образца до завершения гибридизации и отмывок	+
б	отдельная денатурация зонда перед нанесением на препарат	
г	подбор оптимальной концентрации зонда в гибридизационной смеси методом последовательных разведений	+
д	обработка поверхности образца слабым окислителем перед нанесением зонда	

94. Какие из перечисленных компонентов биологических систем обладают выраженными люминесцентными свойствами

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	рибофлавин	+
а	эластин	+
б	тиамин	+
г	цериол	+
д	модифицированные нейромедиаторы	+
е	коллаген	+
ж	порфирины	+
з	липофусцин	+

95. Что из перечисленного может быть использовано как защитная добавка для повышения стабильности люминофора

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	DABCO	+
а	N-пропилгаллат	+
б	декстран сульфат	
г	пара-фенилендиамин	+

96. Сколько понадобится люминофоров для одновременного выявления 15 целевых объектов на образце методом флуоресцентной гибридизации in situ

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	пять	
а	два	
б	четыре	+
г	три	

97. Кто впервые использовал свойство комплементарного связывания нуклеиновых кислот для выявления специфических последовательностей

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	А. Кунс	
б	Л. Стенберг	
в	С. Милстейн	
г	Дж. Галл	+

98. Какие образцы требуют «состаривания» перед предобработкой и отмывками

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	давленные препараты	
б	мазки	
в	спрэды	
г	клеточные культуры и хромосомы	+
д	парафиновые гистологические срезы толщиной 4-10 мкм	

99. Какую роль в гибридизационном буфере играет декстран-сульфат

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	снижает температуру плавления дуплексов	
б	увеличивает эффективную концентрацию зонда	+
в	стабилизирует гибридные связи	

100. В чем преимущества флуоресцентной гибридизации *in situ* как метода

Поле для выбора ответа	Варианты ответов	Поле для отметки правильного ответа (+)
а	точность выявления целевых объектов при правильном подборе предшественника зонда	+
б	выявление микроРНК	
в	возможность сочетать с другими методами маркировки	+
г	возможность значительной амплификации сигнала метки	
д	возможность точного разделения сигналов от разных меток на одном препарате	+

## Список литературы

1. Барачевский В. А., Лашков Г. И., Цехомский В. А. Фотохромизм и его применение. – Москва: Химия, 1977. – 280 с.
2. Иммуногистохимические методы: руководство / ed. by George L. Kumar, Lars Rudbeck: ДАКО / пер. с англ., под ред. Г. А. Франка и П. Г. Малькова. – М., 2011. – 224 с.
3. Ландсберг Г. С., Мандельштам Л. И. Новое явление при рассеянии света (предварительное сообщение) // Журнал Русского физ.-хим. об-ва. – 1928. – Т. 60. – С. 335.
4. Люминесцентный анализ / под ред. М. А. Константиновой-Шлезингер. – Москва: Физматлит, 1961. – 399 с
5. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов: учебно-методическое пособие. – 3-е изд. – Санкт-Петербург: Свое издательство, 2014. – 110 с.
6. Стандартная операционная процедура (СОП) ПАО\_Ф\_1, Окраска препаратов методом флуоресцентной in situ гибридизации в патологоанатомическом отделении. – Санкт-Петербург: НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2020. – 14 с.
7. Coons A. H., Creech H. J., Jones R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 1941. – Vol. 47. – P. 200.
8. Gall J. G., Pardue M. L., Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol. 63(2). – P. 378-383.
9. <https://donmp.ru/purkine-effekt-effekt-purkine-effekt-purkine/>
10. <https://metasystems-probes.com/en/probes/mfish/>
11. <https://www.fpbases.org/spectra/>
12. <https://www.chroma.com/>
13. <https://www.cytocell.com/>
14. <https://www.zytovision.com/products/zytolight>
15. Pardue M. L., Gall J. G., Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol. 64(2). – P. 600-604.
16. Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. Extraction, Purification

and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea // J. Cell. Comp. Physiol. – 1962. – Vol. 59. – P. 223-239.

17. Sternberger L. A., Hardy P. H., Cuculis J. J., Mayer H. G., The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry // J. Histochem. Cytochem. – 1970. – Vol. 18(5). – P. 315-333.

ISBN 978-5-6045023-7-2



9 785604 502372

Отпечатано в ООО «АРТЕК»,  
СПб, Университетская наб., д. 19  
E-mail: artek-1@mail.ru, т. 323-32-01  
Подписано в печать 02.07.21  
Формат 60x90/16. Печ. л. 5,5.  
Тираж 50 экз.