

ЦЕНТР КОЛЕКТИВНОГО КОРИСТУВАННЯ ПРИЛАДОМ

Лазерний Скануючий Мікроскоп LSM 510 META

Положення про Центр колективного користування

1. Створення Центру

1.1. Центр колективного користування приладом **Лазерний Скануючий Мікроскоп LSM 510 META** (далі – ЦККП LSM 510 META) НАН України створюється на базі Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України з метою найбільш раціонального використання унікального та коштовного наукового приладу імпортного виробництва, який неможливо або недоцільно придбати кожній науковій установі з централізованих коштів, спільних коштів груп установ та організацій, інших джерел фінансування НАН України.

1.2 Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України бере на себе зобов'язання забезпечити якісну та надійну роботу LSM 510 META, його необхідне фахове обслуговування, умови найкращого використання робочого часу в інтересах наукової спільноти НАН України, відсутність штучних обмежень у наданні послуг іншим науковим установам і організаціям НАН України.

2. Структура, головні завдання і організація роботи Центру

2.1. Центр колективного користування приладом LSM 510 META є надбанням Національної академії наук України. Мікроскоп перебуває на балансі Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України, в якому створюється Центр.

2.2. ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України входить до складу Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України як науковий підрозділ, підпорядкований безпосередньо дирекції Інституту, без статусу юридичної особи. ЦККП НАН України має власну назву "Центр LSM 510 МЕТА".

2.3. Головним завданням ЦККП LSM 510 МЕТА Інституту Проблем Кріобіології і Кріомедицини НАН України є надання науковцям НАН України можливості проводити дослідження на LSM 510 МЕТА, який обслуговуються кваліфікованим персоналом, здатним підтримувати обладнання у належному робочому стані та надавати консультативні послуги.

2.4. Загальне керівництво роботою ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України покладається на заступника директора з наукової роботи Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

2.5. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України не менше одного разу на рік звітує про роботу Центру перед Бюро Відділення МББЕКФ НАН України, до складу якого він входить, а також, у разі необхідності, перед Комісією з питань модернізації парку наукових приладів та обладнання НАН України (далі - Комісія). В загальному річному звіті дані про роботу ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України подаються установою НАН України окремим розділом в паперовому та електронному вигляді до Президії НАН України, Бюро відділення МББЕКФ НАН України, та до Комісії. Взяти до уваги, що типова структура такого розділу розробляється Комісією.

2.6. Бюро Відділення МББЕКФ НАН України в порядку контролю розглядає на своїх засіданнях питання роботи ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України ,

що діють при його установах. У випадку незадовільної роботи Центру відділення може у встановленому цим положенням порядку порушити питання про зміну базової наукової установи і передачу їй обладнання або закриття Центру.

3. Порядок надання послуг

3.1. Інформація про ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України (тип/марка наукового приладу/обладнання, що надається для колективного користування, його основні технічні характеристики та головні напрями досліджень, які можна здійснити на такому обладнанні) міститься на веб-сторінці Інституту www.cryo.org.ua/. Така сама інформація про всі ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України і їх базові установи в НАН України розміщується на веб-сторінці Президії НАН України.

3.2. Наукові установи та організації НАН України, які мають потребу в проведенні досліджень на науковому обладнанні ЦККП НАН України (далі - замовники), два рази на рік до 20 січня і до 20 червня подають у письмовому вигляді до Бюро Відділення БМББЕКФ свої заявки на кількість годин, строки та види досліджень, проведення яких потребує використання наукових приладів і обладнання ЦККП LSM 510 МЕТА.

3.3. Взяти до відома, що Бюро Відділення МББЕКФ НАН України за поданням директора Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, затверджує загальний розподіл між замовниками робочого часу, відведеного для колективного користування науковим обладнанням Центру.

3.4. Директор Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України своїм наказом, узгодженим з Бюро Відділення МББЕКФ, визначає графік роботи Центру та окремих наукових приладів/обладнання, встановлює необхідну кількість робочих змін на робочий день з урахуванням режиму

роботи наукової установи і потреб вчених НАН України у використанні наукових приладів/обладнання.

3.5. Для роботи в одну зміну (8 годин робочого часу) 3 години надається для потреб Інституту, 3 години надається безкоштовно для замовників - інших наукових установ та організацій НАН України, 2 години дозволяється надавати для платного використання обладнання Центру іншим установам, підприємствам та організаціям, які не перебувають у віданні НАН України, згідно з чинним законодавством. При роботі у дві зміни (12 годин робочого часу) встановлюється такий розподіл часу у пропорції 5:4:3. Використання часу роботи наукових приладів/обладнання реєструється в робочих журналах, форма заповнення яких встановлюється Комісією.

3.6. При плануванні використання часу роботи наукового приладу директор Інституту може застосовувати інші співвідношення використання робочого часу для власних потреб та платних послуг, однак час безкоштовного колективного користування науковими приладами Центру залишається незмінним, тобто 3 години при 8-годинному робочому дні і 4 години при 12-годинному робочому дні.

3.7. Платні послуги з використання наукового обладнання ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України для потреб інших замовників надаються згідно з чинним законодавством України.

3.8. Інституту забезпечує всі витрати, пов'язані з використанням наукового обладнання, наданого ЦККП НАН України.

4. Зміна базової наукової установи, закриття Центру

4.1. Взяти до відома, що у разі недотримання вимог даного типового Положення, неналежної організації роботи ЦККП LSM 510 МЕТА НАН

України з боку Інституту із забезпечення колективного користування обладнанням ЦККП LSM 510 МЕТА для потреб науковців НАН України або виникнення інших форс-мажорних обставин Бюро Відділення МББЕКФ НАН України подає Комісії пропозиції щодо передачі закріпленого за ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України обладнання іншій науковій установі НАН України з відповідною зміною назви Центру і місця його розташування.

4.2. Комісія розглядає пропозиції відділення МББЕКФ НАН України згідно з розділами 1 і 2 даного Положення, приймає рішення про зміну базової наукової установи або закриття ЦККП LSM 510 МЕТА НАН України і подає його на затвердження Президії НАН України.

Директор Інституту проблем
кріобіології і кріомедицини НАНУ,
академік НАН України

А.М. Гольцев

Лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META

Технічні характеристики прибору

Мікроскоп:

Obzerver.Z1 with Carl Zeiss Objectives

Серводвигун на постійному струмі з оптоелектронним керуванням

Мінімальний крок сканування по осі Z – 50 нм

Джерела світла:

Галогенна лампа HBO 100

Ртутна лампа

Лазерний модуль:

Аргоновий лазер: 30 мВт (458 нм, 477 нм, 488 нм, 514 нм, 514 нм)

Гелій-неоновий лазер: 5 мВт (633 нм)

Гелій-неоновий лазер: 1 мВт (543 нм)

Діодний лазер: 30 мВт (405 нм)

Об'єктиви:

5x/

10x/0,3

20x/

40x/0,6 Corr

40x/0,9 Corr

63x/1,4 Oil DIC

DIC контраст

Скануючий модуль LSM 510 META:

Сканери 2 гальванометричні сканери, що можуть рухатись незалежно один від одного

Швидкість сканування до 5 frames/sec (512 x 512 pixels)

Формат кадру Max 2048 x 2048 pixels

Поле зору 10 x 10 мм² з 5х об'єктивом

Електронне збільшення від 1x до 40x

Канали 2 конфокальні флуоресцентні канали

+ 1 META детектор

+ 1 канал прохідного світла;

можливість підключення зовнішнього детектора через оптико волоконний інтерфейс

Глибина кольору 12-біт для кожного каналу

Pinholes 4 отвори, що незалежно регулюються

Швидкість сканування до 1300 ліній/сек

Режими роботи:

Vis (візуально у видимому та УФ-світлі)

Camera (TV) (зображення у видимому та УФ-світлі) LSM (детектування флуоресценції зразка, викликаного збудженням лазерним опроміненням, у 4 незалежних каналах та побудова зображення об'єкта за флуоресцентною емісією)

Технології LSM:

Single Track

MultiTracking

Ratio

Lambda Mode

Time Series

3D View

Bleach Mode

Z-Stack

Kinetic

Ion Concentration

Unmix Spectra

Коротко про можливості мікроскопа:

Конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 510 META, що виробляється компанією Carl Zeiss, є найновішою модифікацією LSM-мікроскопів і має ряд незаперечних переваг, порівняно з аналогічними системами.

Перш за все, модель LSM 510 META дозволяє використовувати всі характерні для всієї серії LSM 510 функції:

- створення трьохвимірного (або чотирьохвимірного з урахуванням часової координати) зображення зразку з елементами об'ємної реконструкції, анімації та кількісного аналізу
- сканування методом мультитрекінгу, що дозволяє у випадку незначного перекривання емісійних спектрів флуоресцентних барвників, послідовно використовувати кілька лазерних ліній та відповідних детектуючих каналів для отримання чистого, розділеного на окремі компоненти, мультифлуоресцентного зображення
- використання поряд зі звичайним скануванням інших технологій (FRAP, FRET з кількісною оцінкою) для дослідження певної довільно вибраної ділянки досліджуваного зразка (ROI функція) будь-якої геометричної форми завдяки системі AOTF (акустооптичний плавнорегулюючий фільтр), яка дозволяє миттєво з кроком в 0,1% змінювати інтенсивність кожної лазерної лінії від 0 до 100%

Проте головною родзинкою LSM 510 META, її відмінною рисою, є наявність 32 каналного META-детектора. Пройшовши через конфокальну діафрагму, емісійний сигнал, попередньо розкладений на спектральні

компоненти, одночасно детектується у 32 незалежних високочутливих каналах. Таким чином, кожна точка, що сканується (піксель), окрім трьох координат несе також і інформацію про спектральний розподіл інтенсивності (Lambda Stack), що в подальшому дозволяє аналізувати мультифлуоресцентне зображення з високим ступенем розділення спектральних профілів на компоненти, незалежно від ступеня їх перекривання.

Функція незмішуваного лінійного розділення дозволяє піксел за пікселем прецизійно розділяти сумарний сигнал на складові та ідентифікувати спектр кожного флуоресцентного барвника окремо. В якості спектрів порівняння використовують індивідуальні емісійні спектри флуоресцентних маркерів (технологія “Емісійна дактилоскопія”).

Одночасне застосування в конфокальному мікроскопі LSM 510 META технологій мультитрекінгу та емісійної дактилоскопії дозволяє усунути проблему перекриття флуоресцентних емісійних спектрів при мультифлуоресцентному аналізі зображень.

Які завдання можна вирішити за допомогою конфокального мікроскопа

Однією з головних сфер застосування конфокального мікроскопа, що обумовлено його високою роздільною здатністю та контрастом, є дослідження структури клітин ті їх органодів, наприклад, цитоскелету, ядра, хромосом, або навіть локалізації в них окремих генів.

Конфокальну мікроскопію застосовують також для дослідження колокалізації в клітині двох чи більшої кількості речовин, наприклад, білків. Такі дослідження допомагають краще зрозуміти, чи існує між ними причинно-наслідковий зв'язок. Попередньо білки помічають антитілами з різними флуорохромами. З допомогою звичайного мікроскопа важко визначити, знаходяться вони поряд чи один під іншим. За допомогою

конфокальної мікроскопії це можна визначити. Зберігши у пам'яті комп'ютера серію оптичних зрізів, можна провести об'ємну реконструкцію зразка та отримати його тривимірне зображення, не використовуючи трудомістку методику виготовлення та фотографування серійних гістологічних зрізів.

Ще однією задачею для конфокальної мікроскопії є дослідження динамічних процесів, що відбуваються у живих клітинах. Наприклад, рух катіонів кальцію та інших речовин через клітинні мембрани. Це можна досліджувати на високошвидкісному конфокальному мікроскопі.

Новими перспективними напрямками у конфокальній мікроскопії є методики FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching – Відновлення флуоресценції після фотовипалювання) та FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) – Передача енергії за допомогою флуоресцентного резонансу. FRAP використовують для досліджень рухливості біоорганічних молекул шляхом ініціації фотохімічного розкладу флуорохрому у зоні опромінення та подальшого його роз'єднання з молекулами. Після випалювання молекули з флуорохромом з неопроміненої зони рухаються внаслідок дифузії в опромінену зону зразка. За часом наростання в ній флуоресценції можна робити висновок про рухливість молекул.

FRET застосовують для визначення відстані між молекулами різних типів, їх взаємодії та оточення. Молекули мітять двома флуорохромами зі спектром випромінювання донора, що перекривається спектром поглинання акцептора. В результаті резонансу між енергетичними рівнями енергія від донора передається до акцептора, що перебуває поряд на відстані порядку кількох нанометрів. Ймовірність резонансу залежить від відстані між молекулами, тому її можна вимірювати за допомогою конфокального мікроскопа, реєструючи енергію, що випромінюється акцептором у видимій області спектру.