

АННОТАЦИЯ
итоговая
научно-исследовательской работы

Государственный контракт с Роснаукой:	от «08» июня 2009 г. № 02.518.11.7140
Шифр контракта:	«2009-07-1.8-00-04-038»
Тема работы:	Проведение исследований в области живых систем с использованием лазерно-оптической системы для анализа функционирования трехмерных наносистем входящей в состав уникальной комплексной установки для исследования динамики нанобиомашин» (шифр УСУ «Лазерный пинцет»)
Цель работы:	Проведение исследований в области цитологии и клеточной инженерии путем развития методов флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (ФМСР) на базе уникальной установки «Лазерный пинцет». Проведение исследований и обеспечение научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ, проводимых организациями Российской Федерации, с предоставлением возможности использования методов научных исследований, разработанных или освоенных для уникальной установки, стенда (УСУ). Развитие материально-технической базы УСУ «Лазерный пинцет» путем дооснащения имеющихся специализированных комплексов (лабораторий), приобретаемым научным оборудованием для обеспечения и развития исследований в форме коллективного пользования.
Приоритетное направление развития науки и техники	Живые системы
Критическая технология	Клеточные технологии Нанотехнологии и наноматериалы Технологии биоинженерии
Период выполнения контракта за счет бюджетных средств	С «08» июня 2009 г. по «30» ноября 2010 г.
Всего этапов	4

Номер и наименование завершеного этапа	4
Срок завершения работ за счет внебюджетных средств	нет
Период поставок, установленный контрактом	нет
Исполнитель:	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет», г.Санкт-Петербург
Ключевые слова:	Уникальная установка, лазерный пинцет, флюоресцентная микроскопия, клеточные структуры, биотехнология, биоинженерия, наномолекулы, научные приборы, диагностика, характеристика, наноматериалы

1 Актуальность проекта

В последние годы, появился ряд крайне подходов к созданию эффективных технологий связанных с флюоресцентной микроскопией направленных на изучение поведения отдельных молекул (Nature methods, vol.5, no.6, June 2008, p.529; Science 319, 810–813 (2008)). К ним относятся следующие:

1) FIONA - fluorescent imaging with nanometer accuracy. Специальное математическое обеспечение и высокочувствительная видеокамера позволяют благодаря вычислению положения объекта по свертке его изображения с шаблонным, позволяют повысить точность на 2 порядка и регистрировать смещение отдельных флюоресцирующих молекул или иных объектов с точностью до 1 – 2 нм (при этом средний размер молекулы белка – около 10-15 нм).

2) TIRF - total internal reflection fluorescence. Флюоресцентный метод, при котором возбуждающе излучение подается на объект под углом полного внутреннего отражения. При этом излучение проникает в объект в небольшой слой в несколько нанометров и позволяет получить изображение флюоресцирующих молекул, находящихся только в этом нанометровом слое.

3) FRET – photoresonance energy transfer. Фоторезонансный перенос энергии. Возбуждающе излучение подается на одну флюоресцентно меченую молекулу, а измеряется излучение от другой, меченой по-другому. При этом благодаря переносу энергии, это излучение будет присутствовать в той или иной степени, и зависеть от взаимного положения и ориентации двух молекул находящихся друг рядом с другом.

4) Методы лазерной фотодеструкции и фотообесцвечивания. Флуоресцентно меченые молекулы могут выводиться из наблюдения или разрушаться прицельно, если их облучать интенсивно лазером в длине волны поглощения краски в зависимости от мощности лазера и выбранных условий.

5) Технология PALM – photoactivation localization microscopy, где используются флюорофоры имеющие фотоактивированное состояние в которое они переводятся одним источником света и затем излучением от других источников света с разными длинами волн могут возбуждаться либо в излучательное либо в основное состояние флюорофора. Используя последовательность активирующих, гасящих и возбуждающих импульсов света можно добиться возможности регистрации флюоресценции от единичной молекулы флюорофора, что дает возможность после математической обработки сигнала получить пространственное разрешение порядка 20-30 микрон. В рамках последней технологии может быть реализована возможность получения также изображения в 3D пространстве.

Во всех перечисленных методах флюоресцентной микроскопии существует целый ряд нерешенных проблем, в связи с чем создание коммерческих приборов ни одной из ведущих западных приборостроительных фирм пока не реализовано.

Разработка аналогичных подходов в РФ пока не ведется в связи с отсутствием необходимой экспериментальной базы.

Целью настоящего проекта является создание метода флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения используя подходы разрабатываемые в PALM технологии. Перспектива реализации предлагаемого подхода для достижения цели работы основана на возможностях использования УСУ «Лазерный пинцет», которая была закуплена и установлена в СПбГПУ в рамках ФЦП «Развитие nanoиндустрии в РФ на 2008-2010 годы». Технические характеристики УСУ позволяют манипулировать объектами с точностью до одного - двух ангстрем и измерять силы в сотые доли пиконьютона. Столь высокое пространственное разрешение дает возможность оперировать с отдельными молекулами.

2. Разработанная продукция

2.1 Номенклатура продукции, разработанной в рамках проекта

Перечень разработанной научно-технической продукции:

- отчет о патентных исследованиях по методам флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения;
- способ введения флюоресцирующих компонентов в исследуемые объекты обеспечивающий заданное среднее расстояние между ними;
- методика, обеспечивающая возможность регистрации света от одной молекулы флюорофора;
- метод исследования биологических объектов с использованием ФМСП на УСУ «Лазерный пинцет»;
- экспериментальные данные исследования клеточных структур полученных с помощью разработанного метода на УСУ «Лазерный пинцет»;

- модернизированная стендовая лазерно-оптическая установка для анализа функционирования трехмерных наносистем входящая в состав уникальной установки для исследования динамики нанобиомашин.

2.2 Характеристика разработанной продукции

Характеристики (параметры), определяющие конкурентоспособность	Ед. изм.	Наименование продукции и по проекту	Наименование аналога 1, предприятие-изготовитель, страна, год ввода на рынок	Наименование аналога 2, предприятие-изготовитель, страна, год ввода на рынок
Назначение – оптическая визуализация биологических объектов на клеточном уровне со сверхвысоким разрешением		Развитие методов флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (ФМСР) на базе уникальной установки «Лазерный пинцет».	UN&PALM Zeiss (Германия) 2009	TSC STED Leica (Германия) 2009
Эксплуатационные характеристики – пространственное разрешение должно быть не хуже 30 нанометров	нм		Эксплуатационные характеристики – пространственное 30 нанометров	Эксплуатационные характеристики – пространственное 100 нанометров

НИР выполнялась с использованием современной материально-технической базы и методик и обеспечила получение актуальных результатов.

В результате выполненной НИР:

2.2.1. Разработаны методы, дополняющие возможности УСУ «Лазерный пинцет», регистрировать изменение положения нанообъектов с точностью +/- 1 нанометр, и обеспечивающие:

- пространственное разрешение в фиксированных клеточных образцах в режиме флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения не хуже 30 нанометров

- соотношение сигнал/шум при регистрации света от одной молекулы флюорофора не менее 2:1 при среднем расстоянии между флюоресцирующими компонентами более 200 нанометров

2.2.2. Обеспечены мероприятия по оснащению данной уникальной

установки дополнительным оборудованием для повышения эффективности работы.

2.2.3. Созданы условия для достижения высоких показателей использования («загрузки») дорогостоящего оборудования, входящего в состав УСУ, в учебном и научном процессах

2.3 Форма коммерциализации результатов проекта

Исследования с использованием УСУ обеспечивает получение новых знаний в области: биологии (биофизика, цитология), биотехнологии (клеточная инженерия, молекулярная биология и др.), биоинженерии.

3 Области и масштабы использования полученных результатов.

Результаты проведенных НИР могут быть использованы для проведения опытно-конструкторских и опытно-технологических работ, направленных на создание новых нанобиотехнологий, и могут быть востребованы в таких исследовательских организациях как: Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Гематологический научный центр РАМН, Институт Цитологии РАН, НИИ Онкологии Росздрава, что обеспечит повышение качества эксперимента за счет использования комплексных методов исследований, достоверности полученных результатов и сокращения сроков выполнения НИР.

4 Ход выполнения проекта

В рамках поставленных целей в ходе выполнения НИР:

- выполнены исследования, направленные на разработку методической базы необходимой для реализации методов флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения;
- выполнены исследования механизмов позволяющие получать оптические изображения биологических объектов в 3D пространстве с разрешением, превышающим дифракционный предел
- разработаны методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения на базе уникальной установки «Лазерный пинцет»
- исследованы *in vitro* с помощью разработанного метода ФМСП образцов клеточных структур с пространственным разрешением порядка 30 нанометров

Для проведения этих работ в соответствие с календарным планом был проведен анализ литературы по методам субдифракционной оптической микроскопии и выбраны направления исследований в рамках настоящего НИР. В результате выполнения этих исследований были разработаны способы введения флуоресцирующих компонентов в исследуемые объекты обеспечивающие заданное расстояние между ними; разработана методика обеспечивающая регистрацию света от одной молекулы флуорофора, разработаны методы исследования биологических объектов с использованием ФМСП на УСУ «Лазерный пинцет» и проведены

экспериментальные исследования клеточных структур полученных с помощью разработанного метода ФМСР на этой установке. Для реализации поставленных целей НИР была проведена модернизация стендовой лазерно-оптической установки для анализа функционирования трехмерных наносистем входящая в состав уникальной установки для исследования динамики нанобиомашин «Лазерный пинцет».

В соответствие с заявленным были достигнуты технические характеристики НИР по пространственному разрешению в фиксированных клеточных образцах в режиме флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (не хуже 30 нанометров) и соотношению сигнал/шум при регистрации света от одной молекулы флюорофора не менее 2:1 при среднем расстоянии между флюоресцирующими компонентами более 200 нанометров. Доказательством достигнутого являются результаты микроскопического исследования образцов ДНК полученные с помощью ФМСР метода PALM, где получено разрешение менее 30 нанометров..

В результате проведенных работ впервые в России был реализован метод флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения PALM, который в сочетании с уникальными возможностями лазерного пинцета, позволяющего манипулировать суб-клеточными единицами внутри клетки и измерять интенсивность и динамику их взаимодействия на уровне долей пиконьютона, обеспечивает проведение фундаментальных и прикладных исследований в областях биологии, биотехнологии и биоинженерии с пространственным разрешением не хуже 30 нанометров.

С целью проведения исследований и обеспечение научно-исследовательских, опытно-конструкторских и технологических работ, проводимых организациями Российской Федерации, были оказаны услуги 7-ми организациям – пользователям УСУ в режиме коллективного пользования.

В рамках мероприятий по развитию материально-технической базы УСУ «Лазерный пинцет» путем дооснащения имеющихся специализированных комплексов (лабораторий), приобретаемым научным оборудованием для обеспечения и развития исследований в форме коллективного пользования, был закуплен набор оптических комплектующих и материалов, включающий в себя различные фильтры, зеркала и системы их фиксации и манипулирования.

Использование приобретенных комплектующих позволило:

- расширить возможности УСУ в части формирования второй оптической оси для создания дополнительной оптической ловушки;
- расширить возможности УСУ «Лазерный пинцет» и провести работы по модернизации УСУ, что позволило реализовать различные типы освещения в зависимости от типа объекта и решаемой задачи при использовании микроскопии сверхвысокого разрешения.

Практическим результатом работ может быть внедрение метода флюоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения PALM на современных оптических микроскопах, имеющихся в распоряжении научно-исследовательских организаций и медицинских учреждений, что позволит

существенно увеличить уровень исследований и диагностики клеточных структур и избежать при этом закупки необоснованно дорогих иностранных разработок в области оптической микроскопии.

Проведена технико-экономическая оценка рыночного потенциала полученных результатов

Полученные результаты полностью соответствуют требованиям государственного контракта, технического задания и календарного плана.

5 Показатели выполнения контракта

Показатель	2009 г.		2010 г.		Всего	
	план	факт	план	факт	план	факт
Объем финансирования, млн. руб. в том числе:	2,28	2,28	2,45	2,385	4,73	4,665
бюджетные средства, млн. руб.	2,28	2,28	2,45	2,385	4,73	4,665
внебюджетные средства, млн. руб.						
Объем продаж (выручки от реализации) новой и усовершенствованной высокотехнологичной продукции, произведенной в результате реализации проекта, млн. руб. в том числе НДС, млн. руб.	-		-		-	
в том числе объем экспорта новой и усовершенствованной высокотехнологичной продукции, произведенной в результате реализации проектов, млн. руб.	-		-		-	

Проректор по научной работе
ГОУ «СПбГПУ»

11 ноября 2010г.



А.И. Рудской

Руководитель работ по проекту
Старший научный сотрудник

С.В. Мурашов