

## Vibrational and nonlinear optical bioimaging

A new advanced and highly sensitive approach of the imaging of protein crystals that is based on polarization-sensitive coherent anti-Stokes Raman scattering (P-CARS) has been successfully developed at FLNP on the base of the laser-scanning microspectrometer "CARS" with fast data acquisition and highly contrast vibrational imaging. Along with the vibrational imaging, SONICC (second order nonlinear imaging of chiral crystals) was also developed as a contrast imaging technology for identifying chiral crystals and relies on nonlinear second harmonic generation (SHG) techniques. In cooperation with the Moscow Institute of Physics and Technology and the Institute of Complex Sys-

tems: Structural Biochemistry (ICS-6), Research Centre Jülich, Germany, studies at FLNP were performed with in meso grown bacteriorhodopsin (bR) crystals (Fig.1) [1]. High three-dimensional (3D) resolution is achieved with two collinearly overlapped near infrared picosecond beams and a water-immersion objective with a high numerical aperture.

It's worth to mention, that serial crystallography at last generation X-ray synchrotron sources and free electron lasers enabled data collection with micrometer and even sub-micrometer size crystals, which have resulted in a remarkable progress in structural biology. However, imaging of small crystals, which although is highly demanded,

Fig. 1. Micrograph (a), Raman (b) and P-CARS (c), images of bR crystal

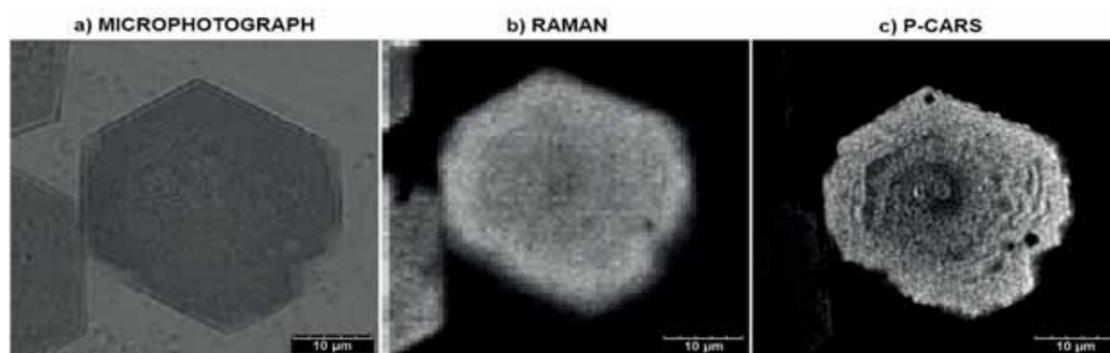


Рис. 1. Микрофотография (a), Раман (b) и поляризованный-КАРС (c) визуализация кристалла bR.

## Колебательная и нелинейно-оптическая биовизуализация

Новый перспективный и высокочувствительный подход к визуализации кристаллов белков, основанный на поляризационно-чувствительном когерентном антистоксовом комбинационном рассеянии света (P-CARS), успешно разработан в ЛНФ на базе лазерного сканирующего микроспектрометра «КАРС» с быстрым сбором данных и высококонтрастной колебательной визуализацией. Наряду с колебательной визуализацией, также была разработана методика для контрастной визуализации хиральных кристаллов на основе генерации второй гармоники (ГВГ) известная как SONICC — нелинейная визуализация второго порядка хиральных кристаллов. Исследования с использованием мезо-выращенных кристаллов бактериородопина бактериородопина (рис.1) были выполнены в ЛНФ в сотрудни-

честве с Московским физико-техническим институтом и Институтом сложных систем: структурной биохимии (ICS-6), исследовательского центра в Юлихе, Германия [1]. Высокое трехмерное (3D) разрешение достигается за счет двух коллинеарно перекрывающихся пикосекундных пучков ближнего инфракрасного диапазона и водно-иммерсионного объектива с высокой числовой апертурой.

Стоит отметить, что серийная кристаллография на источниках рентгеновского синхротронного излучения и лазерах на свободных электронах последнего поколения позволила сбор данных кристаллов микрометрового и даже суб-микрометрового размера, что привело к значительному прогрессу в структурной биологии. Однако, визуализация малых кристаллов, будучи

remains a challenge, especially in the case of membrane protein (MP) crystals. CARS microscopy provides an advanced nondestructive and label-free technique with high sensitivity and high lateral spatial resolution capable of spectrally-selective imaging of major types of macromolecules: proteins, lipids, nucleic acids, etc.

In the last few years, FLNP has also implemented another promising nonlinear imaging project SECARS — the combination of surface-enhanced Raman scattering (SERS) with coherent anti-Stokes Raman scattering aimed at highly contrast detection of organic molecules. Since the CARS signal quadratically increases with the intensity of the electromagnetic field, an electromagnetic field in a

SERS condition can further increase the CARS signal intensity. The very first experiments on SECARS imaging in Russia were realized at FLNP using various acids (MPBA, TNB) as Raman reporter molecules (Fig.2). The laser intensity limits for detecting reproducible SECARS spectra and corresponding high-contrast imaging were determined [2]. SERS and SECARS were successfully applied for selective detection of glycosylated human serum albumin (HSA) — a potential biomarker in diabetes.

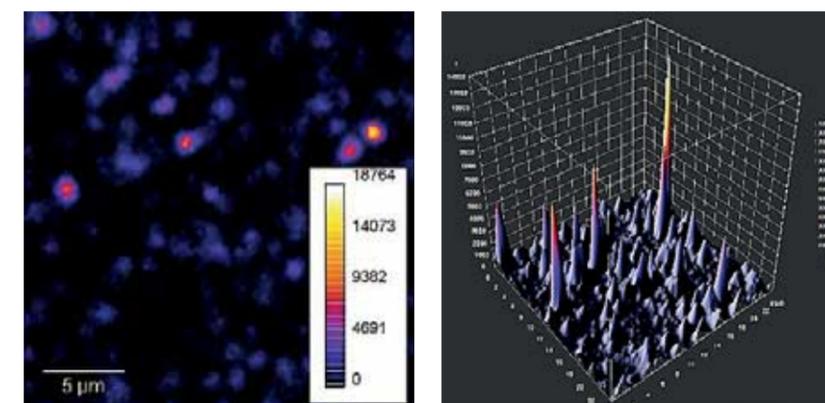
Bioimaging could draw together new research from across the life sciences showcasing innovations in cell imaging methodologies and image analysis techniques, and how these are put into practice.

Fig. 2

Highly-contrast SECARS resonant micro-image of TNB/Au-NPs conjugates.

Рис. 2

Высококонтрастное ГКАРС резонансное микроизображение конъюгатов TNB/Au-NP.



очень востребованной, остается проблемой, особенно для кристаллов мембранного белка (МБ). КАРС-микроскопия обеспечивает передовой неразрушающий и безмаркерный метод визуализации с высокой чувствительностью и высоким латеральным пространственным разрешением, позволяющий получать спектрально-селективные изображения основных типов макромолекул: белков, липидов, нуклеиновых кислот и т.д.

В последние несколько лет, в ЛНФ реализовал еще один многообещающий проект нелинейной визуализации ГКАРС — сочетание гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с когерентным антистоксовым рассеянием света, и, нацеленный на высококонтрастную регистрацию органических молекул. Поскольку КАРС сигнал квадратично растет с интенсивностью электромагнитного поля, то усиление электромагнит-

ного поля в условиях ГКР может еще больше увеличить интенсивность КАРС сигнала. Первые в России эксперименты по ГКАРС визуализации были реализованы в ЛНФ с использованием различных кислот (MPBA, TNB) в качестве молекул-репортеров (рис.2). Были определены пределы интенсивности лазера для обнаружения воспроизводимых ГКАРС спектров и соответствующих высококонтрастных изображений [2]. ГКР и ГКАРС были успешно для селективного обнаружения гликозилированного сывороточного альбумина человека (HSA) — потенциального биомаркера диабета.

Биовизуализация может объединить новые исследования из разных областей наук о жизни, демонстрирующие инновации в методологиях визуализации клеток и методах анализа изображений, а также способы их применения на практике.