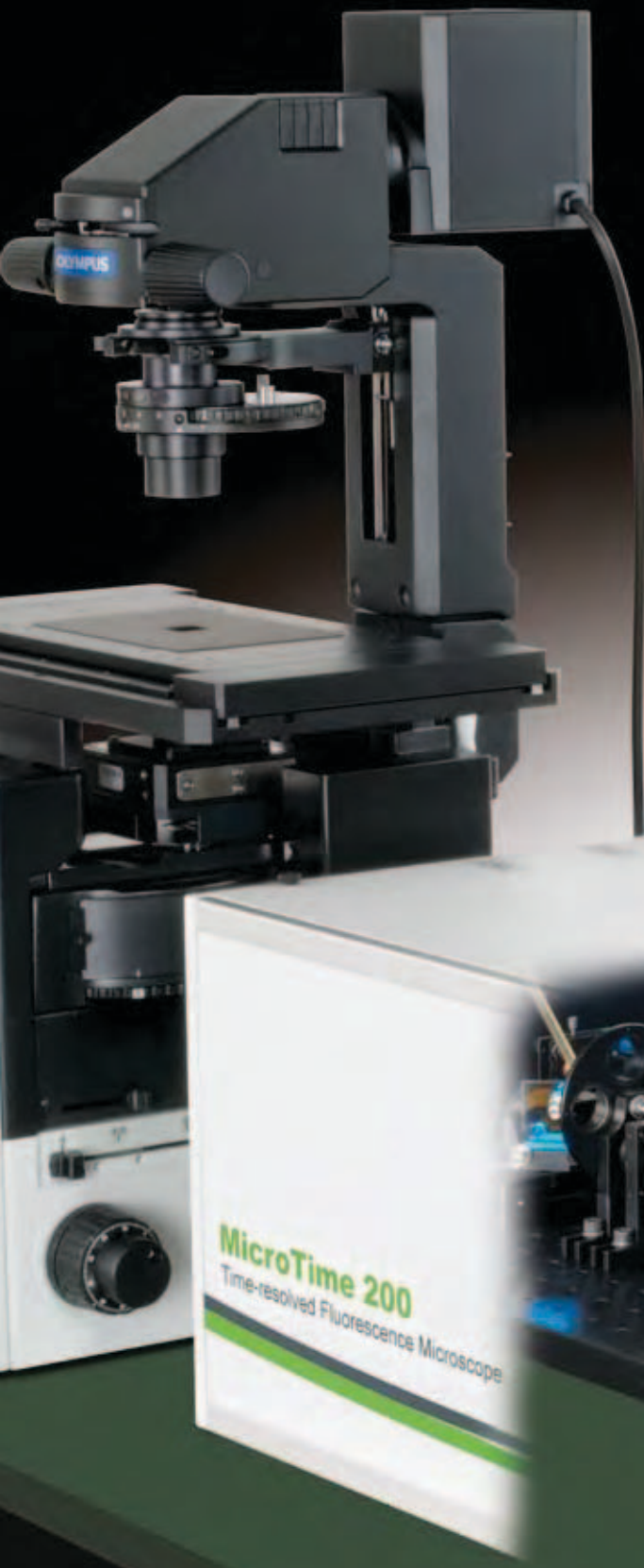
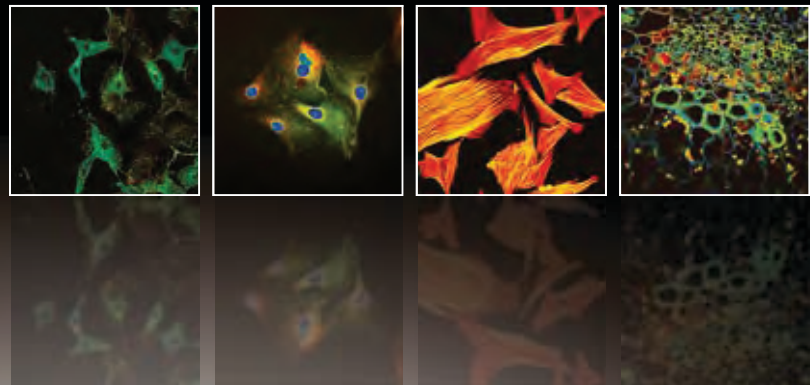




PICOQUANT

MicroTime 200

Универсальная платформа для
времяразрешенной конфокальной
микроскопии



Предисловие



Уважаемый исследователь,

Компания «PicoQuant» обладает большим опытом в области времяразрешенной спектроскопии и детекции единичных молекул. Наши пикосекундные диодные лазеры и электроника для подсчета фотонов присутствуют в более, чем тысяче рабочих систем по всему миру. Мы использовали весь свой опыт в этой области при разработке выдающейся микроскопической системы с чувствительностью на уровне одиночных молекул MicroTime 200. Присутствуя на рынке более 10 лет, система используется в ведущих исследовательских институтах и промышленных лабораториях во всем мире. Она постоянно развивается и дорабатывается для соответствия требованиям современных исследований.

Пожалуйста, обратитесь к нам, если вас заинтересовал этот прибор. Мы всегда готовы детально обсудить Ваши индивидуальные требования. Ваши потребности стимулируют наше развитие.

Телефон: + 49 (0) 30 6392 6929

Факс: + 49 (0) 30 6392 6561

Email: info@picoquant.com

www.picoquant.com

Обзор системы
Страницы 4 – 5

Методы и области применения
Страницы 6 – 7

Измерения по изображениям
Страницы 6 – 7

Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM)
Страницы 10 – 11

Резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET)
Страница 12

Сопоставление флуоресцентных паттернов
Страница 13

Точечные измерения
Страницы 14 – 15

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS)
Страницы 16 – 17

Принцип получения данных
Страницы 18 – 19

Программное обеспечение SymPhoTime 64
Страницы 20 – 23

Устройство прибора
Страницы 24 – 30

Дополнения к MicroTime 200
Страницы 31 – 32

Характеристики
Страница 33

PicoQuant для ученых
Страница 34

Обзор системы

Не имеющий аналогов времяразрешенный конфокальный микроскоп

MicroTime 200 – единственный на рынке прибор, сочетающий чувствительность на уровне единичных молекул, сверхвысокое временное разрешение, богатый функционал и простоту в использовании. Он создан как максимально универсальный инструмент для различных направлений современных исследований.

В настоящее время к функционалу аналитических приборов предъявляются высокие требования. Они должны быть мощными, гибкими и модульными, при этом простыми в использовании. Такой подход является одним из основополагающих принципов высокотехнологичного дизайна MicroTime 200 – все системы имеют индивидуальную конфигурацию чтобы соответствовать потребностям пользователя и всегда могут быть модифицированы.

Основные компоненты являются самостоятельными блоками, обеспечивающими одновременное возбуждение в широком волновом диапазоне, многоканальную детекцию фотонов с временным разрешением, а также 2D и 3D визуализацию с высоким разрешением.

Сканирование с высоким разрешением

2D и 3D сканирование с номинальной точностью позиционирования 1 нм позволяет выполнять исследования единичных молекул

Источники возбуждения

Пикосекундные импульсные диодные лазеры, охватывающие полный спектральный диапазон от 375 нм до 900 нм, а также альтернативные источники возбуждения (например, мультифотонный лазер)

Правосторонний порт специальной конструкции

Порт для конфокальной оптики спроектирован компанией PicoQuant

Комплексное программное обеспечение

Интуитивный пользовательский интерфейс с функциями расширенного анализа и экспорта для различных областей применения.

Пикосекундное временное разрешение

Временное разрешение для измерений времени жизни и корреляционных измерений вплоть до 1 пс

Открытый модульный и гибкий дизайн

Легкий доступ ко всем оптическим элементам и выходным портам, например, для подключения внешних устройств таких, как спектрографы

Полнофункциональный микроскоп

Все оставшиеся порты микроскопа свободны, например, для широкопольного освещения или флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (TIRF)

До четырех параллельных каналов детектирования

Конфокальная установка с использованием различных типов детекторов с различными вариантами деления луча

Фосфоресцентная опция

Возможность измерения времени жизни в диапазоне от пикосекунд до микросекунд

Простой доступ к главному оптическому блоку

Содержит все оптические элементы для направления лазера возбуждения на объектив, а флуоресцентного света – на детекторы. Оптимальная компоновка и конструкция оптических приборов позволяют легко перенастраивать и контролировать лазерный луч.



Методы и области применения

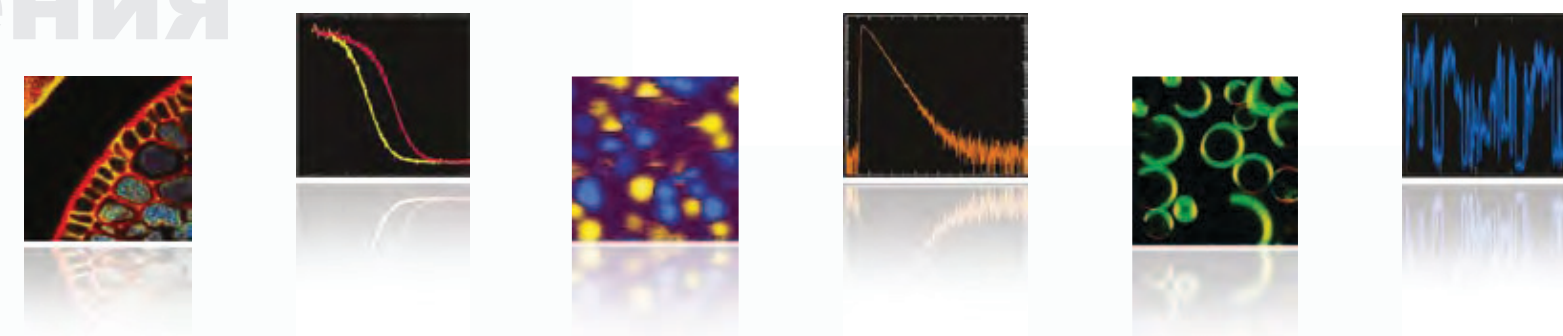
Максимальная гибкость для высокотехнологичных исследований

MicroTime 200 спроектирован как максимально универсальная платформа для выполнения множества прикладных задач. Его уникальный измерительный режим позволяет регистрировать практически все аспекты динамики флуоресценции, которые могут интересовать пользователя.

Проверенная временем концепция MicroTime 200 позволяет регулярно использовать его в разных областях исследования. С одной стороны, его открытая конструкция позволяет исследователям адаптировать систему к своим узкоспециализированным экспериментальным потребностям, хотя с другой стороны, благодаря своей исключительной простоте использования, он идеально подходит для выполнения регулярных аналитических задач. Аппаратное обеспечение прибора управляется мощной программой SymPhoTime 64. Удачно реализована концепция PicoQuant «Делаем сложную технику простой и доступной и обеспечиваем экспертов всеми необходимыми инструментами». Как следствие, MicroTime 200 можно найти в любых лабораториях, биологических, медицинских, химических и физических, где прибор используется для:

- Исследования единичных молекул
- Исследования материалов
- Разработки молекулярных сенсоров
- Исследования взаимодействий и конформаций
- Количественных микроскопических исследований
- Клеточной биологии
- Изучения фолдинга белков

Благодаря исключительно гибкому принципу измерений, доступно большое количество методов сбора и анализа данных, чтобы соответствовать требованиям такого широкого круга приложений. Наиболее примечательные примеры:



Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM)

- для различения флуорофоров со схожими спектрами
- для определения локальных параметров среды (например, pH)
- для определения концентраций кислорода, воды или ионов
- для дифференциации структур в толще тканей
- для исключения фоновой флуоресценции

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS)

- для определения подвижности молекул
- для наблюдения за молекулярным движением, агрегацией, ассоциацией, диссоциацией и конформационными изменениями
- для измерения низких молекулярных концентраций
- для изучения межклеточной динамики (диффузия, активный транспорт и т.д.)
- для определения стехиометрии комплексов
- для количественного выражения концентраций и силы взаимодействия (например, в живых клетках)

Резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET)

- для измерения меж- и внутримолекулярных расстояний
- для наблюдения молекулярных взаимодействий
- для контроля конформационных изменений молекул
- для определения параметров окружающей среды (например, pH) при помощи датчиков FRET

Измерения времени жизни флуоресценции

- для установления различий между эмиссией флуорофоров и автофлуоресценцией
- для определения числа флуоресцентных соединений (видов)
- для изучения фотофизики на уровне отдельных молекул

Анизотропия флуоресценции

- для изучения молекулярного движения, подвижности и симметрии
- для отслеживания конформационных изменений молекул
- для анализа топологии поверхности

Временная зависимость интенсивности флуоресценции

- для наблюдения за мерцанием единичных частиц
- для идентификации и анализа отдельных импульсов фотонов
- для оценки молекулярной яркости и стабильности
- для выявления фотодегradации флуоресценции

Одновременные FLIM и ACM

- для контроля изменений времени жизни флуоресценции в зависимости от расстояния до кантилевера ACM
- для съемки со сверхвысоким разрешением посредством взаимодействия кантилевера с флуорофором.
- для идентификации отдельных наночастиц
- для установления зависимости между механическими свойствами и флуоресценцией клетки

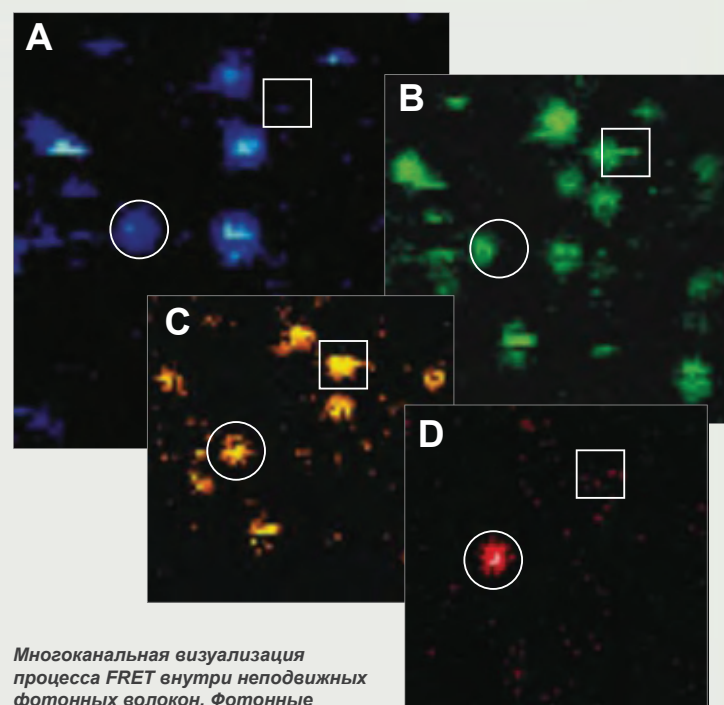


Измерения по изображениям

MicroTime 200 предназначен для экспериментов с 2-мерной и 3-мерной визуализацией, а так же для линейного сканирования с высоким разрешением. Классическая флуоресцентная съемка и визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM) выполняются с таким уровнем чувствительности, который позволяет осуществлять визуализацию даже одиночных молекул.

MicroTime 200 оснащен высокоточным пьезо-сканером для измерений по изображениям. Стандартный сканирующий столик имеет диапазон сканирования 80 мкм x 80 мкм с точностью позиционирования 1 нм.

Примеры



Многоканальная визуализация процесса FRET внутри неподвижных фотонных волокон. Фотонные волокна помечены пятью различными красителями с флуоресценцией в различных областях спектра. Один краситель возбуждают на 470 нм, и энергия постепенно переносится внутри волокна на другие красители за счет FRET. Изображения иллюстрируют результат одновременного измерения флуоресценции в четырех различных спектральных областях, соответствующих разным красителям в волокне. Хорошо видны различия процесса FRET: волокно, отмеченное кругом, видно на всех снимках, а волокно в прямоугольнике видно только на двух снимках. Это различие может быть связано с различной эффективностью процесса FRET или с неполным мечением волокна.

Данные предоставлены с разрешения Markus Sauer, University of Würzburg

Специальный обучаемый алгоритм корректирует неточности позиционирования при различных скоростях сканирования и обеспечивает сканирующий процесс без искажений и с высоким уровнем воспроизводимости. Обеспечивается выполнение как одно-, так и двунаправленного сканирования. Для съемки областей в сантиметровом диапазоне с нанометровой точностью позиционирования может быть поставлен опциональный широкодиапазонный сканирующий столик.

Особенностью MicroTime 200 является режим сканирования объективом, при котором объектив устанавливается на сканирующей площадке, а образец остается неподвижным. Это обеспечивает доступ к держателям образцов большего размера, например, криостатам, и позволяет добавить площадку ACM для одновременных исследований FLIM/ACM.

Между режимами сканирования с перемещением образца и объектива можно легко переключаться. В отличие от гальванометрических сканеров, конфокальный объем (< 1 фемтолитр) не зависит от положения сканера и не искажается в процессе эксперимента в обоих режимах сканирования.

Высокоточное 3D сканирование

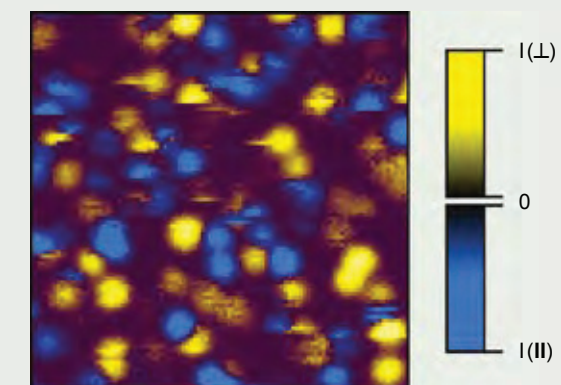
MicroTime 200 также может быть оснащен пьезоэлементом (PIFOC), который перемещает объектив вверх и вниз для получения 3-мерного изображения. В сочетании со сканирующим столиком он позволяет выполнять все виды 2-мерной визуализации (X/Y, X/Z, Y/Z), а также 3-мерную визуализацию (z-стэк). Такая функция упрощает фокусировку на единичной молекуле, и съемка структур с большой толщиной, например, клеток, становится возможной в определенных конфокальных плоскостях.

Оптимизированное светопропускание

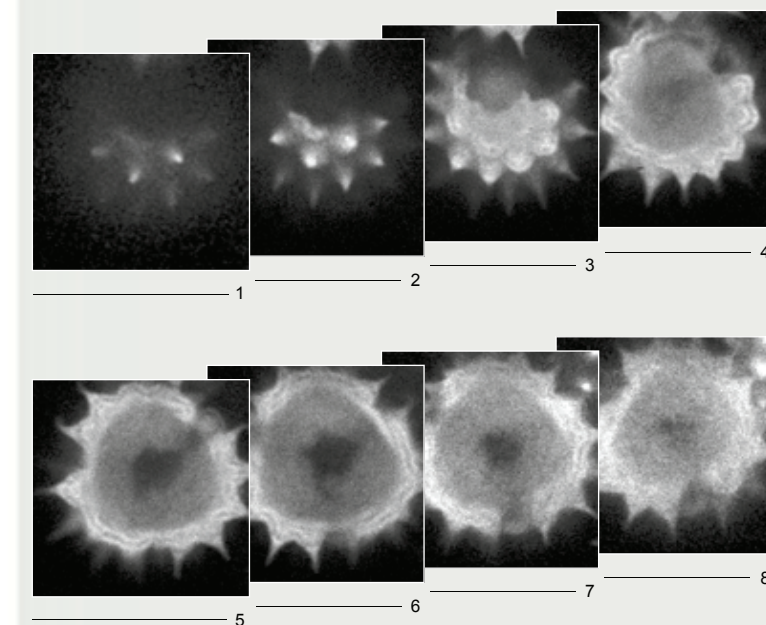
Конструкция MicroTime 200 позволяет использовать до четырех параллельных рабочих каналов для съемки в спектральном диапазоне от УФ до ИК. В процессе детекции свет разделяется спектрально или в соответствии со своей поляризацией, или даже двумя способами. Поскольку оптические элементы на всем оптическом пути подбираются для обеспечения максимального светопропускания, удается использовать минимальную интенсивность источника возбуждения. Это позволяет работать на низкой мощности лазера и устраняет проблемы, характерные для высокоинтенсивного излучения, например, обратное рассеяние и фотодegradацию.

Открытая и модульная конструкция MicroTime 200 делает доступными дополнительные режимы измерения. Например, для детектирования можно использовать возбуждение с полным внутренним отражением (TIRF) и конфокальную компоновку. Возможны так же опции для широкополной визуализации и комбинация с атомно-силовым микроскопом (ACM).

Примеры



Поляризационная флуоресценция изолированных единичных молекул Cy5 на стандартном стеклянном покровном стекле (размеры изображения 6 мкм x 6 мкм). Собранный флуоресцентный свет был разделен при помощи поляризационного куба-делителя луча с одновременным детектированием двумя детекторами SPAD. Изображение содержит все молекулы с преобладающей параллельной (желтая) или перпендикулярной (синяя) поляризацией эмиссии.



Оптические срезы: на изображении показан z-stack автофлуоресценции пыльцы маргаритки. Размер изображения 20 мкм x 20 мкм, расстояния между изображениями 2 мкм по оси z.



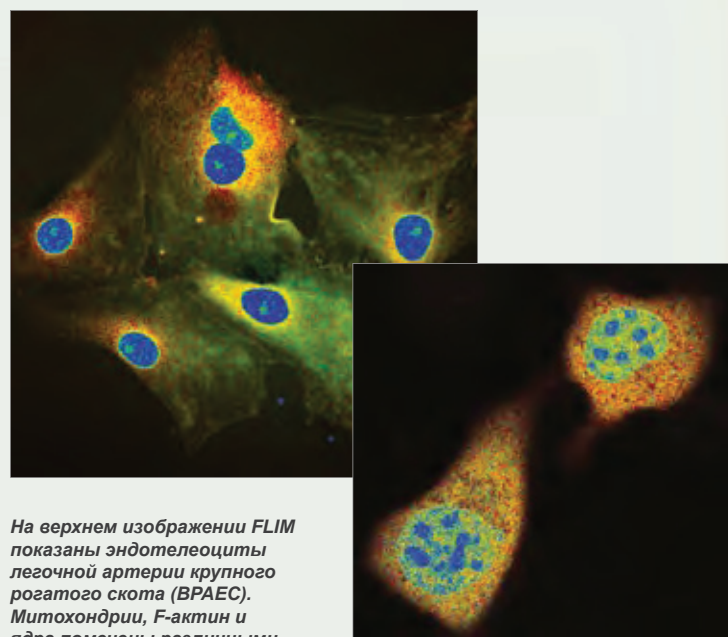
«The MicroTime 200 – идеальный инструмент для микроскопии FRET».

Zygmunt & Ignacy Gryczynski,
University of North Texas
Health Science Center

Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM)

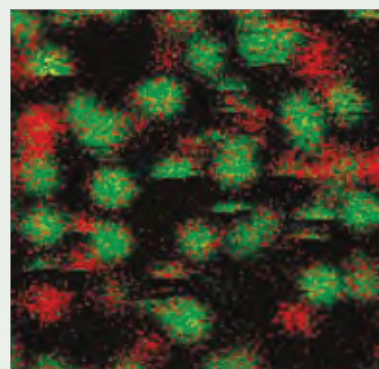
Визуализация времени жизни флуоресценции (FLIM) добавляет еще один показатель к традиционным методам визуализации на основе интенсивности. На FLIM не влияют колебания интенсивности флуоресценции, и этот метод позволяет различать флуорофоры со сходными эмиссионными спектрами (например, Atto655 и Cy5) и автофлуоресценцию. Этот метод может быть использован для измерения условий среды (например, значения pH), для определения концентраций ионов, для изучения внутриклеточной передачи сигнала или для установления различий между компонентами ткани.

Примеры



На верхнем изображении FLIM показаны эндотелиоциты легочной артерии крупного рогатого скота (ВРАЕС). Митохондрии, F-актин и ядра помечены различными красителями, которые легко различаются, т.к. имеют различные значения времени жизни (синий: 3 нс; красный: 6 нс). FLIM-FRET изображение справа демонстрирует взаимодействие участков белка в их естественной среде внутри живой клетки (синий: 2,2 нс; красный: 2,7 нс). Эта техника была использована для описания внутриядерного формирования димера для транскрипционного фактора C/EBP в живых клетках гипофиза мыши GHFT1-5.

Образец предоставлен с разрешения Ammasi Periasamy, Keck Center for Cellular Imaging, University of Virginia



Измерения FLIM единичных молекул Cy5, адсорбированных на покровном стекле. На основе различий в ориентации молекул, конформаций или взаимодействия со стеклянной поверхностью, можно выделить два вида источников излучения с различными значениями времени жизни (зеленый: 1,9 нс; красный: 0,9 нс). Видимые темные линии образовались по причине мерцания молекул Cy5.

FLIM можно рассматривать как пространственно – временной аналог многоцветного изображения, не имеющий присущих этому методу недостатков. В принципе, FLIM можно делать с использованием только одного детектора, что позволит избежать всех проблем, связанных с различными значениями эффективности детектирования на разных длинах волн, пропускания или хроматических aberrаций оптических элементов, исключая необходимость применения процедур смешивания и/или разделения спектров. Как следствие, повышается общее число флуорофоров, которыми можно пометить молекулы, поскольку появляется возможность одновременно разделять их не только по спектральным характеристикам, но и по времени жизни. Помимо этого, время жизни флуоресценции может быть использовано для получения информации о локальной среде флуорофора, можно измерить, например, pH или ионную концентрацию живых клеток.

Дополнение FRET методом FLIM

Измерения FLIM отлично дополняют исследования FRET. Использование времени жизни флуоресценции для анализа FRET позволяет избежать всех проблем, связанных с колебаниями интенсивности эмиссии.

При измерении FLIM-FRET, время жизни флуоресценции молекулы донора используется в качестве зонда. Перенос энергии акцептору приводит к снижению времени жизни (тушению) флуоресценции молекулы донора по сравнению с временем жизни отдельной молекулы. В отличие от FRET, в основе которого лежит измерение интенсивности, FLIM-FRET позволяет различать молекулы, демонстрирующие FRET в каждом пикселе изображения. В таких случаях полученная кинетическая кривая – это наложение двух кривых, соответствующих группам молекул с FRET и без. Более тщательный анализ полученных кривых даже дает соотношение между этими двумя популяциями.

FLIM с чувствительностью к единичным молекулам

Высочайшая чувствительность детектирования и точность сканирования MicroTime 200 позволяют использовать FLIM для изучения флуоресценции отдельных молекул. Как было отмечено ранее, время жизни позволяет обнаружить локальные изменения окружения по мельчайшему возможному зонду – единичной молекуле. Различия в индивидуальных значениях времени жизни и яркости можно использовать для отслеживания неоднородностей окружения и конкурирующих безызлучательных процессов. Подобный подход также позволяет, например, отслеживать конформационные изменения в молекулах, в частности процессы сворачивания белка.

«MicroTime 200 – просто супер-инструмент с точки зрения его оптической конструкции, электроники и программного обеспечения»

Joseph R. Lakowicz, Center for Fluorescence Spectroscopy, University of Maryland

Визуализация FLIM уже во время сбора данных

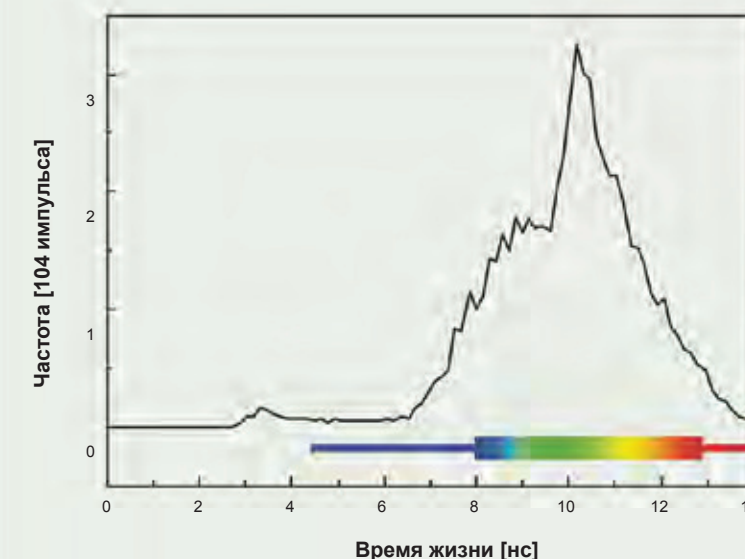
Превью в реальном времени на основе времени прихода флуоресцентного фотона отображается уже во время процесса сканирования («экспресс-FLIM») и позволяет выполнить быструю оценку качества изображения и контраста времени жизни. Для выполнения подробного анализа FLIM программа SymPhoTime 64 может подобрать многоэкспоненциальную функцию затухания для кинетической кривой в каждом пикселе изображения. Этот анализ доступен как для всего изображения, так и для произвольной области исследования внутри изображения.

Примеры



Изображения гепатоцитов клеток печени, окрашенных нитробензоксадиазолом с липидной связью. Время жизни их флуоресценции гасится водой. Изображение на основе интенсивности (слева) не позволяет установить различия между разными условиями, в которых находятся клетки, в то время как изображение FLIM (справа) показывает явные различия времен жизни флуоресценции, свидетельствующие о различных липидных составах внутри клеточных компартментов.

Распределение времени жизни



Распределение полученных значений времени жизни в верхнем правом изображении времени жизни флуоресценции. NBD с липидной связью показывает широкий диапазон значений времени жизни от приблизительно 8 нс до 12 нс, указывая на различные молекулярные среды флуоресцирующих молекул. Длительное время жизни (красный) обнаруживается на мембране клеток, в то время как цитоплазма имеет более короткое время жизни (зеленый), что свидетельствует о менее упорядоченном окружении. Значения самого короткого времени жизни (синий) обнаруживаются в вакуолях, в основном, из-за разрушения флуоресцентного липида и расщепления группировки NBD.

Данные предоставлены с разрешения Andreas Herrmann, Humboldt University Berlin, Germany

Резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET)

Резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET) – это безызлучательный процесс, в котором энергия от возбужденной молекулы (донора) передается ко второй молекуле (акцептору), что приводит к изменениям интенсивности флуоресценции и кинетики затухания флуоресценции двух хромофоров.

Эффективность переноса энергии зависит от расстояния между этими двумя молекулами. Эта методика используется для измерения внутри- и межмолекулярных расстояний в на-

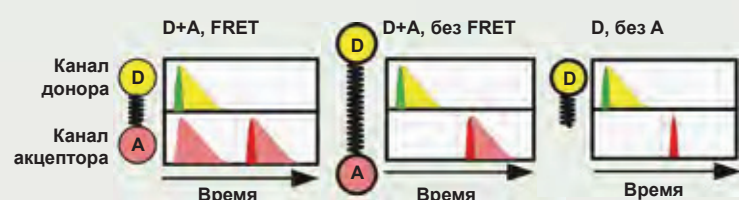
нометровом диапазоне и имеет целый ряд областей применения: FRET может использоваться для изучения молекулярных взаимодействий *in vivo*, кинетики сворачивания белков, замещения участков белков или активности ферментов. Метод подходит для исследования структуры фрагментов ДНК, транслокации генов между двумя хромосомами, обнаружения гибридизации нуклеиновых кислот и автоматического секвенирования ДНК.

Конструкция MicroTime 200 позволяет детально исследовать процессы FRET. Эмиссия от молекул акцептора и донора может быть измерена одновременно, и это позволяет выполнить анализ одновременно на основе интенсивности и времени жизни флуоресценции. Это открывает возможности для количественных исследований FRET между донорами и акцепторами, имеющими сильное перекрестное спектральное влияние, а также с участием неизлучающих акцепторов (например, гасителями).

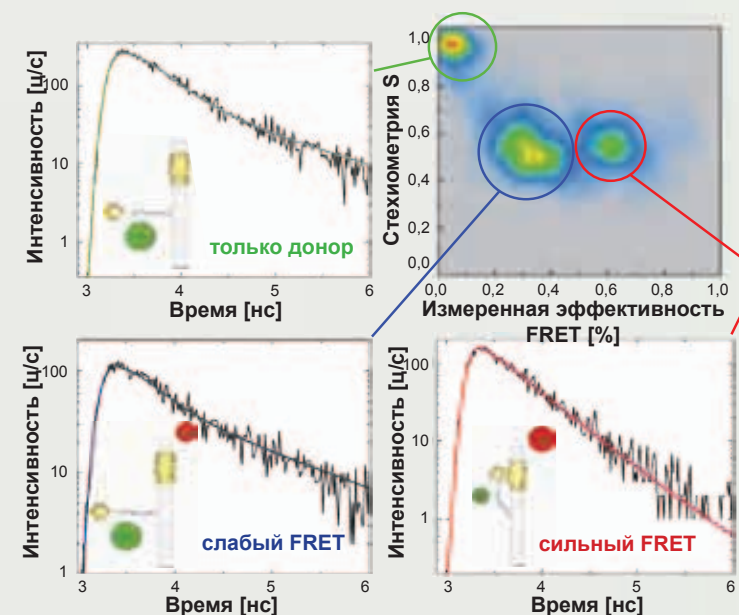
PIE для точных измерений FRET

Особенностью MicroTime 200 является способность выполнять и анализировать измерения, полученные сочетанием методов импульсно-чередующего возбуждения (PIE) и FRET. В этом особом режиме измерения непосредственное возбуждение молекулы акцептора происходит от второго лазерного импульса независимо от процесса FRET для подтверждения ее наличия. Эта технология позволяет отличить пару FRET с очень низкой эффективностью от молекулы-донора с отсутствующим акцептором и таким образом предотвратить появление дополнительного пика с низкой интенсивностью на гистограмме FRET. Дополнительная информация, полученная при помощи технологии PIE, позволяет определить молекулярные расстояния с очень высокой точностью. Программа SymPhoTime 64 полностью поддерживает анализ измерений PIE-FRET, а так же расчет диаграмм эффективности FRET и гистограммы расстояний донор – акцептор в единицах расстояний Фёрстера R_0 .

Примеры



В режиме импульсно-чередующего возбуждения два лазерных импульса используются последовательно для независимого возбуждения молекул донора и акцептора. Полученные спектры эмиссии флуоресценции могут быть использованы для распознавания молекул с FRET, молекул без FRET и отдельных молекул без акцепторов.



FRET анализ свободно диффундирующих РНК. Задачей эксперимента была локализация взаимодействий между отдельными элементами вторичной структуры РНК, в этом случае мотив GAAA tetraloop (метка Cy3, зеленая) и его соответствующая рецепторная область (метка Cy5, красная). Используя PIE, оказалось возможным рассчитать двухмерную диаграмму эффективности FRET как функцию стехиометрии, что легко позволяет выявлять субпопуляцию для дальнейшей оценки FRET.

Данные предоставлены с разрешения Julie Fiore and David Nesbitt, University of Boulder, USA

Сопоставление флуоресцентных паттернов

Сопоставление флуоресцентных паттернов является особым режимом анализа изображения, в котором типичные кинетические кривые флуорофоров используются в качестве «отпечатков пальцев» для разделения различных компонент времени жизни на FLIM изображении. Эта техника позволяет избежать проблем с образцами, время жизни которых нельзя описать моноэкспонентой, и позволяет аналитически определить время жизни флуоресценции без использования длительного подбора параметров фиттинга.

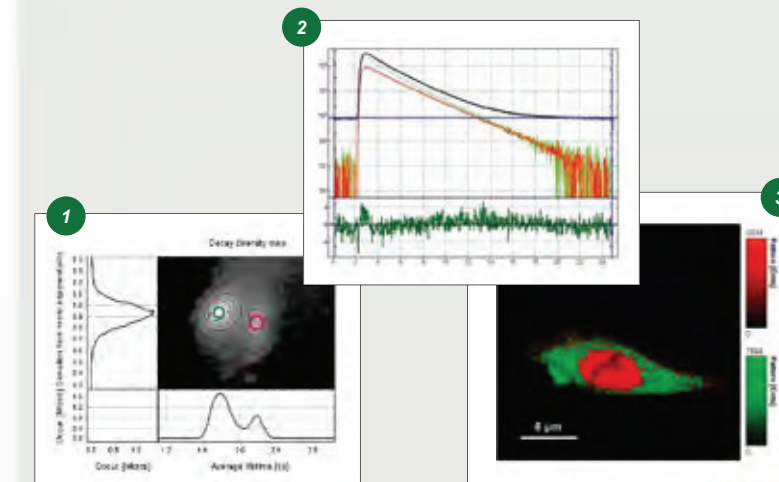
В некоторых приложениях необходимо разделить флуоресцентные компоненты в биологических образцах. В качестве примера можно привести мечение несколькими непересекающимися флуорофорами для дифференцировки типов клеток на основе внутренней флуоресценции белков для диагностики рака, исследование изменений окружения, устранение фонового сигнала или аутофлуоресценции, а также разделение участков образца, демонстрирующих или не демонстрирующих FRET. Обязательным условием для применения метода количественного FLIM является наличие моноэкспоненциального затухания всех составляющих. При этом подобное моноэкспоненциальное затухание не наблюдается у большинства красителей, исследуемых в биологических образцах. Разделение флуорофоров еще более усложняется тем, что многочисленные составляющие, например, фоновое свечение или аутофлуоресценция, часто влияют на результат измерения затухания флуоресценции.

Для устранения этих проблем можно применять технику сопоставления флуоресцентных паттернов. «Отпечатки пальцев» кривой затухания каждого флуорофора рассматриваются как паттерн и затем используется для попиксельного разложения полученного изображения в других заданных пользователем паттернах. Паттерны можно импортировать из контрольных измерений или определить на изображении при помощи так называемой карты различий затуханий ("Decay Diversity Map (DDM)"). DDM представляет собой двухмерную гистограмму, которая отображает среднее время жизни на оси x, на оси y отображается величина отклонения от моноэкспоненциального затухания. Паттерны можно определить без данных о точном времени жизни рассматриваемых флуорофоров. После определения паттернов используется простая процедура фиттинга для назначения модели каждому пикселю изображения. Погрешность фиттинга указывает, точно ли описывают выбранные паттерны кинетические кривые применительно к данному изображению.

В процессе анализа определяется интенсивность заданного пользователем паттерна для каждого пикселя изображения

FLIM и отображается распределение всех паттернов. Ввиду небольшого числа параметров фиттинга полученное изображение для каждого паттерна обладает высоким качеством, низким уровнем шума и позволяет выполнить четкое разделение всех исследуемых компонент. Естественно, все паттерны можно затем детально проанализировать с использованием многоэкспоненциального фиттинга времени жизни.

Примеры



Связь между N-WASP (метка GFP) и TOCA-1 (метка mRFP) внутри везикул клеток CHO. DDM (1) имеет два выраженных пика, соответствующих частично паттерну FRET (зеленый), а так же паттерну отсутствия FRET (красный). Популяция с FRET имеет более короткое время жизни и незначительно более высокие отклонения от моноэкспоненциального затухания, объясняемого тем, что затухание флуоресценции содержит совокупность функциональных пар FRET и только молекул - доноров или молекул, не имеющих FRET. Затухания времени жизни используются как модели для двух компонентов (2). В этом случае анализ сопоставления паттернов, выполненный для каждого пикселя, определяет распределение доли с FRET и доли без FRET. Полученное изображение (3) иллюстрирует, что FRET происходит внутри везикул, в то время как в ядре были обнаружены только свободные молекулы – доноры (N-WASP связанные с GFP). Это указывает на наличие отдельной связи nWASP с TOCA-1 внутри везикулы, но не в других клеточных областях.

Данные предоставлены с разрешения Sohail Ahmed and Thankiah Sudhakaran, Institute of Medical Biology, Singapore

Точечные измерения

Точечные измерения – это измерения в фиксированном объеме образца с использованием соответствующего стационарного сканера при сборе данных. Различные точки в образце могут быть выделены и исследованы подробнее. Типичными примерами применения являются флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS), резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET) и регистрация изменения интенсивности флуоресценции по времени.

Точечные измерения с MicroTime 200 происходят в конфокальном объеме, ограниченном дифракцией. Размер и форма конфокального объема (< 1 фемтолитра) совершенно не зависят от положения сканирующего объектива, что очень важно для количественного анализа. Тщательно подобранные оптические элементы обеспечивают очень хорошее перекрытие конфокального объема для различных длин волн возбуждения, что критически важно, например, для экспериментов с импульсно-чередующимся возбуждением (PIE). Отличное перекрытие имеет высокую воспроизводимость и может с легкостью контролироваться при помощи трехмерного сканирующего устройства MicroTime 200. Высокая чувствительность позволяет проводить время-разрешенные эксперименты с единичными молекулами с использованием до четырех кана-

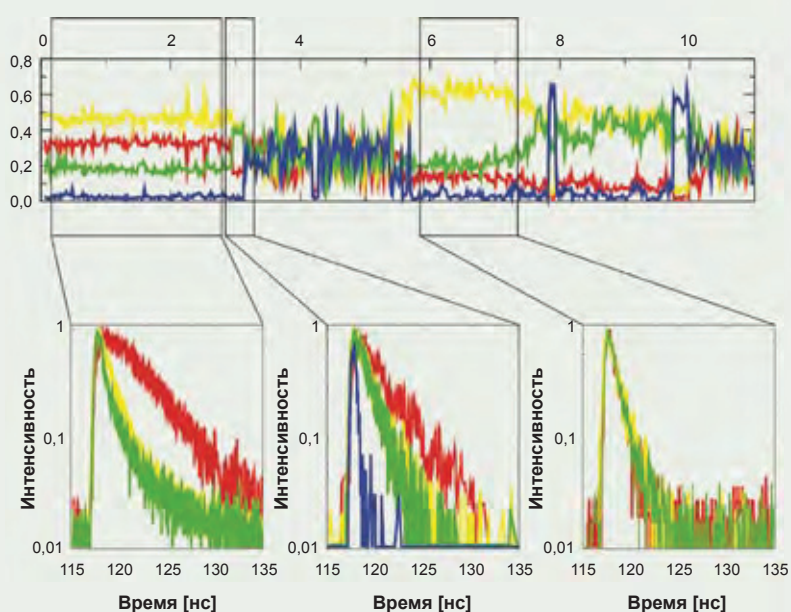
лов детектирования, например, для сбора данных с различными спектральными параметрами, измерения анизотропии или кросс-корреляционной спектроскопии.



«Без сомнения, лучший в своем классе прибор на рынке»

Benjamin Schuler, University of Zürich

Примеры

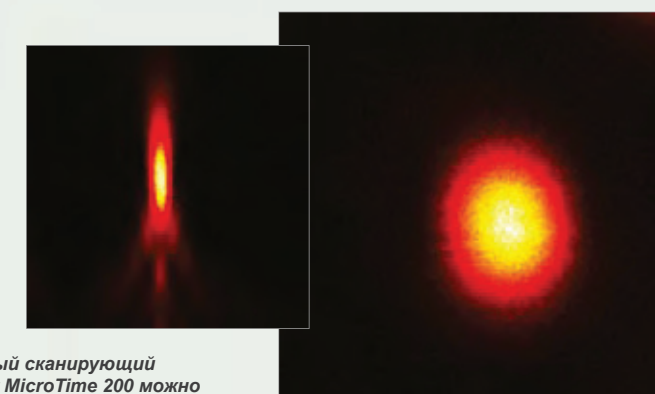


Регистрация изменения интенсивности флуоресценции по времени во время процесса FRET в неподвижном фотонном волокне. На фотонное волокно нанесены метки пятью различными красителями с флуоресценцией в разных спектральных областях. Один краситель возбуждают на 470 нм, и энергия постепенно переносится внутри волокна на другие красители за счет FRET. Флуоресценция одиночной проволоки контролируется четырьмя детекторами в четырех различных спектральных диапазонах с соответствующими оптическими сплиттерами. Изменение флуоресценции во времени и соответствующие гистограммы времени жизни иллюстрируют динамический характер процесса переноса энергии и могут быть использованы для детального изучения процессов FRET.

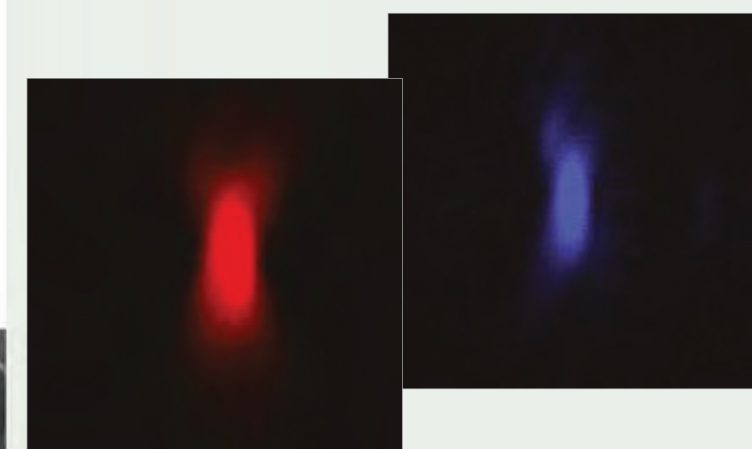
Данные предоставлены с разрешения Markus Sauer, University of Würzburg, Germany

Исключительная точность позиционирования

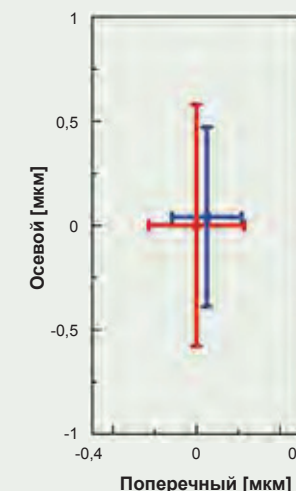
Сканирующий столик MicroTime 200 характеризуется очень высокой точностью позиционирования с номинальным разрешением в 1 нм. Положение площадки остается неизменным даже во время длительных измерений. Благодаря принципу сканирования объективом, траектория луча возбуждения и детектирования не искажается и не зависит от положения площадки сканирования. Это позволяет, например, получать в течение длительного времени регистрацию изменения интенсивности флуоресценции по времени даже для единичных молекул и проводить анализ флуктуаций интенсивности, спектральных характеристик и времени жизни. Кроме того, устройство проверки фокусировки позволяет легко идентифицировать характерные типы поверхности на образце (обычно, поверхность покровного стекла) на основе обратнорассеянного света возбуждения. Это облегчает поиск на поверхности образцов с малой толщиной, независимо от их флуоресценции, или позиционирование конфокального объема на определенном расстоянии от поверхности, что необходимо для количественных измерений FCS.



3-мерный сканирующий столик MicroTime 200 можно использовать для визуализации и количественного измерения конфокального объема (функция точечного распределения – PSF) с использованием нанометровых флуоресцентных бусин, что важно, например, для анализа измерений FCS. Показанные изображения были получены объективом 100x/NA1.4. На левом изображении показан скан x-z (размер изображения: 7,5 мкм x 7,5 мкм), а на правом изображении скан x-y (размер изображения: 1,7 мкм x 1,7 мкм) бусины диаметром 100 нм.



Измерение PSF объективом 60x/NA1.2 с водной иммерсией с различными значениями длины волны возбуждения. Визуализация конфокального объема была получена сканированием x-z с использованием бусин 100 нм, высушенных на покровном стекле, с возбуждением на 635 нм (левый снимок) и 470 нм (правый снимок). Размеры изображений 3,8 мкм x 3,8 мкм. Линии на правой диаграмме указывают значения полной ширины на полувысоте максимума (FWHM) распределений интенсивности. Значения FWHM ниже для возбуждения в голубом свете, поскольку длина волны в этом диапазоне короче. Диаграмма четко показывает очень хорошее перекрытие конфокальных объемов для обеих длин волн.



Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS)

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS) – это точный и универсальный метод, обладающий большим потенциалом во многих областях применения. Он может использоваться для измерения концентраций, для исследования поперечной и вращательной диффузии молекул, конформационной динамики, стехиометрии сложных молекул, а также молекулярных ассоциаций и диссоциаций, динамики ферментов и внутримолекулярной динамики *in vitro*, а также в живой клетке.

В классическом эксперименте FCS непрерывный возбуждающий свет фокусируется в одной точке образца, содержащей рассеивающие флуорофоры. Измеряемый объем имеет очень малый размер (порядка суб-фемтолитра) с целью детектирования в среднем флуоресцентной эмиссии только от одной молекулы (рис. А). Затем отслеживаются колебания интенсивности эмиссии, вызванные прохождением единичных молекул через возбужденный объем. Основным результатом подобного измерения является регистрация изменения интенсивности по времени, отражающая колебания интенсивности флуоресценции во временном интервале (рис. В).

Автокорреляция для визуализации динамики

Первым шагом анализа для FCS является применение автокорреляционной функции к полученной кривой изменения интенсивности по времени (рис. С). В сущности, автокорреляция сравнивает кривую изменения интенсивности с аналогичной копией, сдвинутой во времени. Полученная сигмоидальная кривая корреляции во временном интервале (время отставания) показывает высокую автокорреляцию для низких значений времени отставания, с падением относительно скорости рассеяния образца. Таким образом, она свидетельствует о возможности одного молекулярного источника происхождения флуоресцентных сигналов в интервале между двумя временными точками. По автокорреляционной кривой можно определить два значения: точка перегиба кривой соответствует времени диффузии флуорофора через оптический объем, в то время как отрезок, отсекаемый по оси y, обратно пропорционален числу измеряемых частиц (рис. D).

Вторым аналитическим шагом является подбор соответствующей биофизической модели для полученной функции автокорреляции, характеризующей источник колебаний. Это позволяет рассчитать количество флуорофоров в оптическом объеме и время диффузии через него. Определив оптический объем, можно вычислить концентрацию и коэффициент диффузии рассматриваемых молекул.

Кросс-корреляция для изучения связывания

Флуоресцентная кросс-корреляционная спектроскопия (FCCS) – широко используемая технология на основе FCS, измеряющая одновременное колебание сигнала, возникающее в двух различных флуорофорах с различными значениями длины волны эмиссии. Путем корреляции кривых изменения интенсивности двух отдельно помеченных молекул, связанных друг с другом, можно определить, что колебания их флуоресценции почти идентичны и имеют высокую амплитуду кросс-корреляции. Такой принцип двухцветной FCCS обычно применяется для изучения взаимодействий, позволяя получить количественную оценку степени связывания и получить информацию о кинетике связывания при низких концентрациях в растворе, а также в живых клетках. Таким образом, FCS и FCCS являются отличным инструментом для количественных измерений концентрации, молекулярной диффузии, изучения связывания и вращательной диффузии.

Корреляция времени жизни дает результаты без артефактов

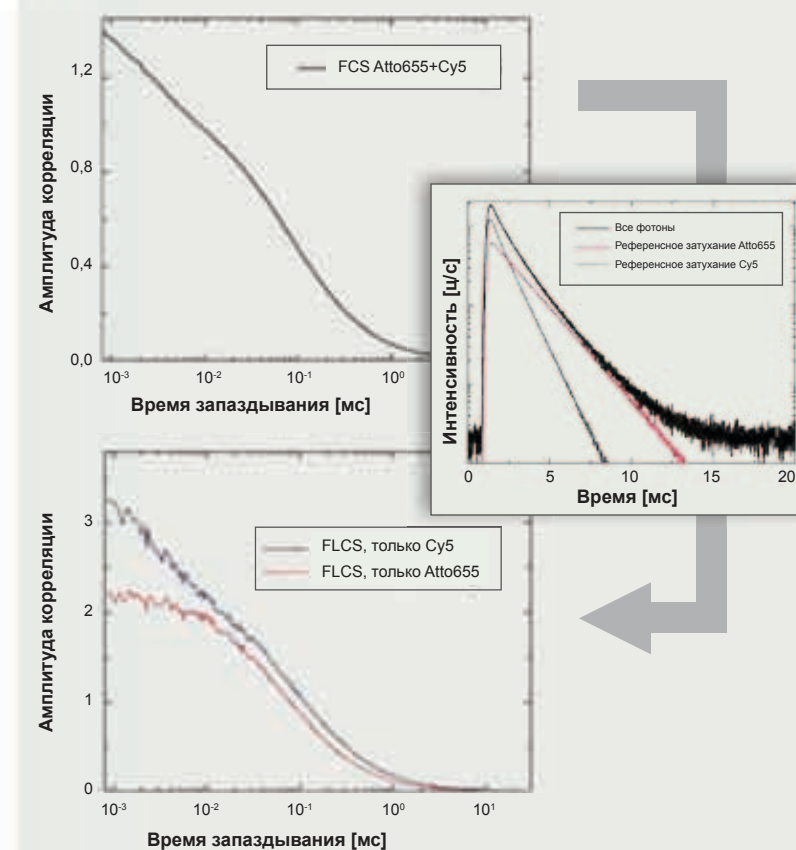
Одной из сложностей FCS является влияние таких факторов эксперимента, как фоновая флуоресценция, спектральное пропускание, рассеяние света или остаточные импульсы детектора. Этих проблем можно избежать при использовании передового метода FCS, реализованного в MicroTime 200: Времяразрешенная флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FLCS). Уникальная концепция сбора данных MicroTime 200 позволяет получить полную информацию о динамике фотонов во время измерения: абсолютное время прихода фотона относительно начала измерения, а также время прихода относительно лазерного импульса для получения информации о времени жизни. В традиционном анализе FCS используется только абсолютное время прихода. В FLCS информация о времени жизни флуоресценции, заключенная в измерительных данных, так же включена в аналитическую процедуру.

Алгоритм FLCS основан на статистическом разделении различных компонент сигнала на основании их времени жизни флуоресценции. Это позволяет, например, исключить влияние рассеянного или фонового света или разделить влияние FCS от двух красителей, измеряемых в смеси, на основе различных значений времени жизни их флуоресценции.

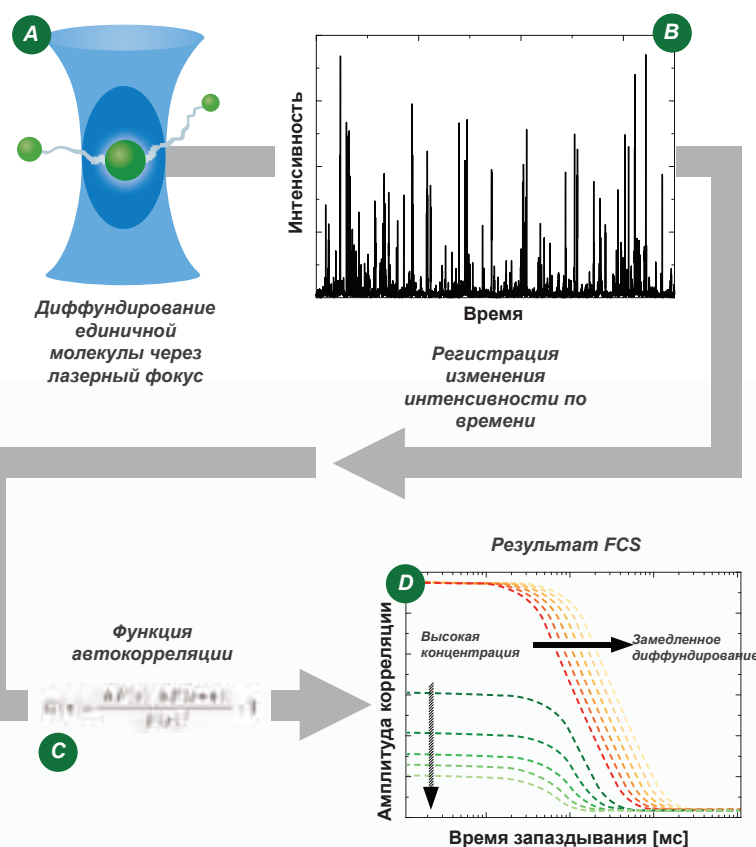
FCS (2fFCS) с двойным фокусом

MicroTime 200 предлагает еще более передовой метод, называемый FCS с двойным фокусом (2fFCS). В отличие от традиционного FCS, он позволяет измерять абсолютные коэффициенты диффузии красителей без сравнения с референсным образцом. Это реализуется за счет не одного, а двух лазерных фокусов со смещением по горизонтали и небольшим перекрытием с фиксированным расстоянием. Вместо оптического объема прибора, 2fFCS использует известное расстояние между двумя конфокальными объемами в качестве референса. Соответственно, этот метод не зависит от размера и формы конфокального объема. Он является устойчивым по отношению к таким распространенным артефактам измерений как, например, разница коэффициента преломления раствора образца и иммерсионной среды объектива, неравномерность толщины покровного стекла и особенно зависимость от оптического насыщения флуоресцентного красителя.

Примеры



FLCS позволяет распознать характеристики диффузии двух красителей в смеси на основании различного времени жизни их флуоресценции. В примере показана полученная кривая FCS раствора, содержащего Atto655 и молекулы Cy5 в водном буфере. Путем статистического анализа с учетом различных характеристик затухания красителей, можно построить отдельные кривые автокорреляции для Atto655 и Cy5. Как и предполагалось, увеличение амплитуды корреляции при времени запаздывания порядка мкс происходит только у Cy5 (мерцание цис-транс изомеризации).



Принцип сбора данных

Подсчет единичных фотонов с временным коррелированием (TCSPC)

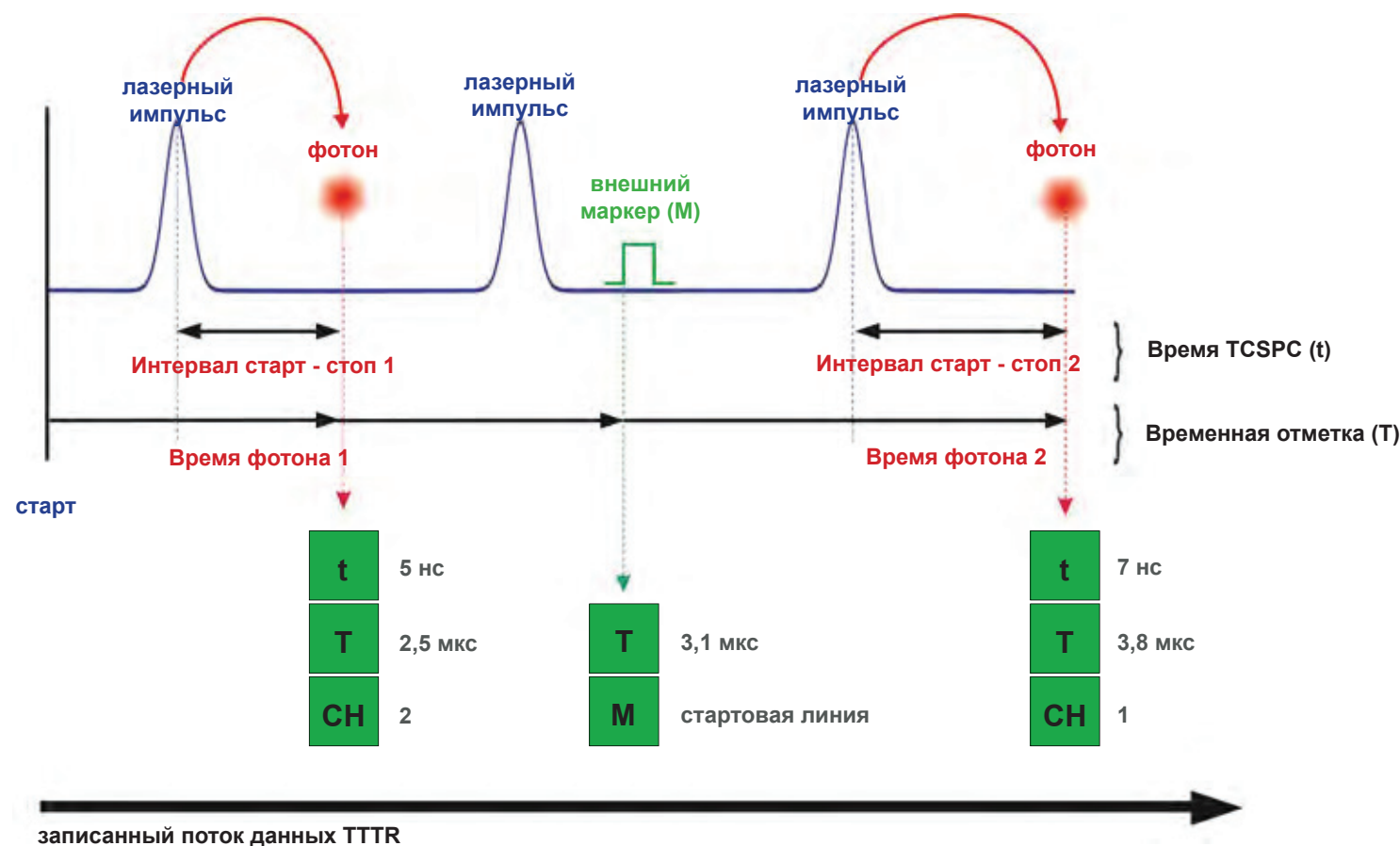
Подсчет единичных фотонов с временным коррелированием (TCSPC) является самым точным и чувствительным методом измерения времени жизни флуоресценции. TCSPC может быть использован для изучения эмиссионных свойств единичных молекул и позволяет вычислять время жизни флуоресценции до нескольких пикосекунд. Метод основан на точном измерении временного интервала между моментом возбуждения и приходом первого флуоресцентного фотона на детектор («время TCSPC»). Измерение временного интервала повторяется для нескольких миллионов фотонов для учета статистического характера флуоресцентной эмиссии, и все измеренные временные интервалы упорядочиваются в форме гистограммы. После этого возможен анализ этой ги-

стограммы для определения времени жизни флуоресценции и амплитуды сигнала.

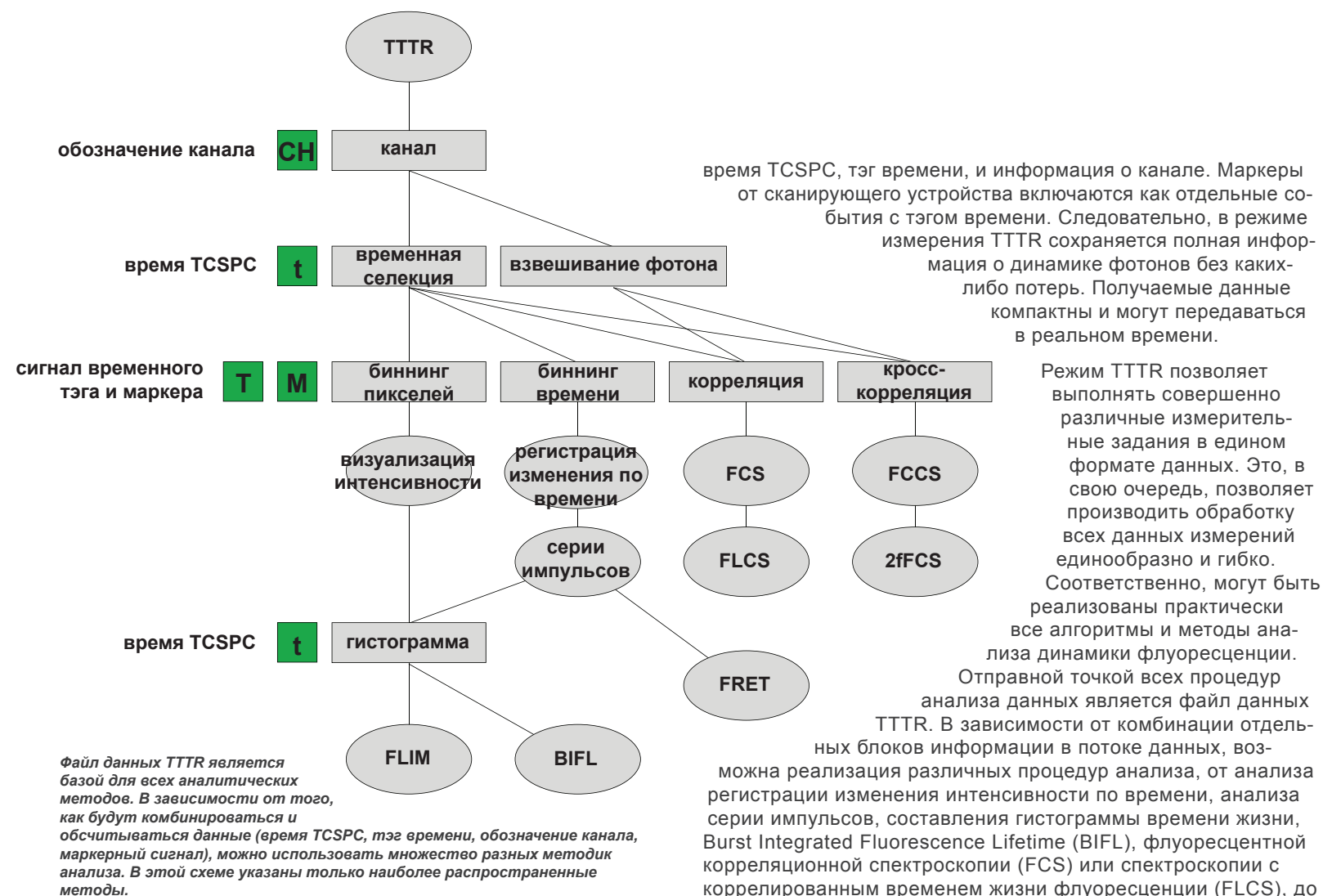
Электроника TCSPC PicoHarp 300, HydraHarp 400 и TimeHarp 260 от компании «PicoQuant» выходит за рамки простого построения гистограмм и использует режим сбора данных с временной привязкой и с временным разрешением (Time-Tagged Time-Resolved acquisition mode, TTTR), т.к. классический TCSPC не в состоянии, например, измерить колебания интенсивности флуоресценции (используемой для FCS) или синхронизировать получение данных сканирующим устройством для FLIM.

«The MicroTime 200 – это мощная и простая в использовании система с удобным программным обеспечением».

Andong Xia, Chinese Academy of Science, Beijing



Структура измерения с временной привязкой и временным разрешением (TTTR). Как и при классическом методе TCSPC, измеряется временной интервал между моментом возбуждения и приходом первого флуоресцентного фотона на детектор. Это время TCSPC (t) заносится в поток данных TTTR вместе с временной отметкой (T) и информацией о канале детектирования (CH). В поток данных для визуализации могут быть включены дополнительные сигналы синхронизации (маркеры, M).



Режим с временной привязкой и с временным разрешением (TTTR)

Основная идея режима с временной привязкой и с временным разрешением (TTTR) состоит в добавлении второй временной характеристики к каждому измеренному времени TCSPC. Данный «тэг времени» измеряется по абсолютной шкале и отражает время прихода каждого фотона относительно начала эксперимента. При многодетекторной конфигурации можно отдельно обрабатывать информацию о каждом канале, к примеру, какой детектор зарегистрировал фотон. Это используется в частности для FCCS и спектрального FLIM. Поток данных TTTR может быть еще более расширен с включением до четырех внешних сигналов синхронизации (маркеров), полученных от устройства визуализации, например, пьезо-сканера. Это позволяет производить 2D или 3D реконструкцию на основе данных TTTR, т.к. положение XYZ сканера можно определить в любой момент времени. Таким образом, поток данных TTTR состоит из фотонных событий с тремя отдельными блоками информации:

время TCSPC, тэг времени, и информация о канале. Маркеры от сканирующего устройства включаются как отдельные события с тэгом времени. Следовательно, в режиме измерения TTTR сохраняется полная информация о динамике фотонов без каких-либо потерь. Получаемые данные компактны и могут передаваться в реальном времени.

Режим TTTR позволяет выполнять совершенно различные измерительные задания в едином формате данных. Это, в свою очередь, позволяет производить обработку всех данных измерений единообразно и гибко. Соответственно, могут быть реализованы практически все алгоритмы и методы анализа динамики флуоресценции. Отправной точкой всех процедур анализа данных является файл данных TTTR. В зависимости от комбинации отдельных блоков информации в потоке данных, возможна реализация различных процедур анализа, от анализа регистрации изменения интенсивности по времени, анализа серии импульсов, составления гистограммы времени жизни, Burst Integrated Fluorescence Lifetime (BIFL), флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS) или спектроскопии с коррелированным временем жизни флуоресценции (FLCS), до визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM), резонансного переноса энергии Фёрстера (FRET), анизотропии и множество других.

Программное обеспечение

SymPhoTime 64 – симфония фотонов во времени

Программный пакет SymPhoTime 64 – это комплексное решение для сбора и анализа данных MicroTime 200. Четко структурированное рабочее пространство и мощные процедуры анализа позволяют пользователю сосредоточить свое внимание на данных и результатах, не отвлекаясь на обработку данных.

Расширенное управление компонентами системы

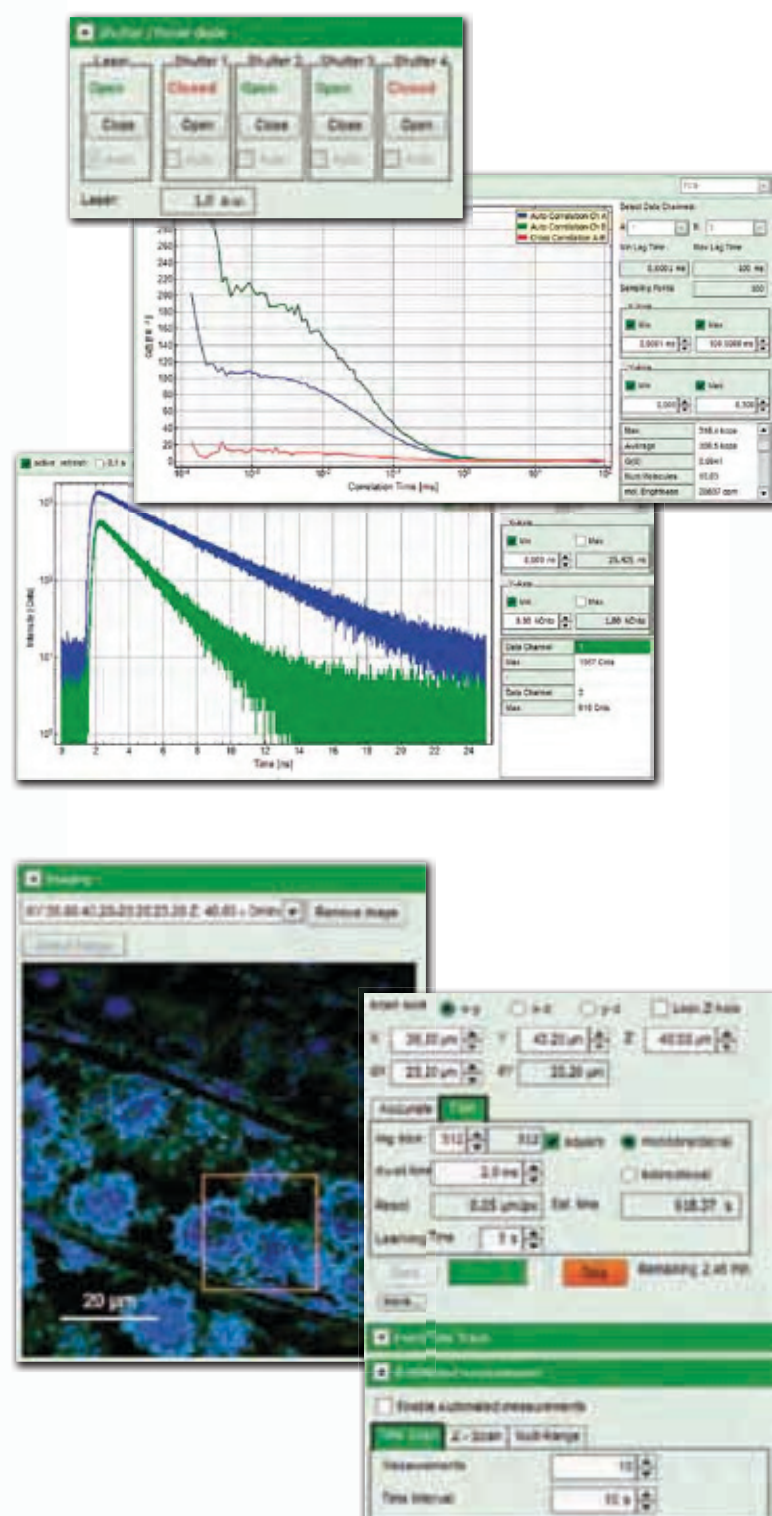
Программа SymPhoTime 64 управляет всеми компонентами MicroTime 200, например, пьезо-сканерами, видеокамерой, силовыми фотодиодами и всеми установленными затворами. Она поддерживает все имеющиеся блоки TCSPC PicoQuant: PicoHarp 300, HydraHarp 400, и TimeHarp 260. Через программу можно управлять такими настройками как ширина временных бинов или настройки дискриминатора входных каналов. Мощность лазера и частота повторов подключенных лазеров также можно контролировать посредством SymPhoTime 64.

Автоматизированные измерения

SymPhoTime 64 также поддерживает особые режимы измерения, например, Time Scan, при котором измерения повторяются с определенными временными интервалами с идентичными параметрами съемки. Второй режим сбора данных – это z-стэк, при котором положение объектива по оси z меняется для получения 3-мерного изображения.

Объемная визуализация в реальном времени

SymPhoTime 64 позволяет настроить отображение в реальном времени до четырех независимых окон превью в процессе съемки. К данным, вычисляемым в реальном времени, относятся экспресс-FLIM, регистрация изменения интенсивности по времени, гистограммы времени жизни, авто- или кросс-корреляция для FCS. Эта особенность позволяет быстро оценить качество данных или изменения свойств образца уже во время выполнения измерения. Она также позволяет скорректировать интенсивность сигнала и оптимизировать настройки. Все полученные превью сохраняются вместе с файлом необработанных данных в рабочем пространстве для последующего анализа.



Интуитивный сбор данных

Интерфейс для сбора данных характеризуется четкой и комплексной конфигурацией. SymPhoTime 64 имеет специализированный режим предварительного измерения («режим осциллографа» или «тестовый режим»), который позволяет получить точную настройку параметров системы и заданий сбора данных без фактического создания каки-либо измерительных данных. Интерфейс так же показывает изображения с камеры, которая мониторит фокальную плоскость. Изображение с камеры может быть использовано для позиционирования образца, а также для оценки качества фокусировки.

Интеллектуальное хранение данных

Другой важной особенностью программы SymPhoTime 64 является устройство системы хранения данных. Все файлы с данными измерений и сопутствующими результатами анализов хранятся в четко организованном рабочем пространстве, которое имеет привычную древовидную структуру папок на жестком диске. Взаимозависимости данных видны сразу же, а в журнале регистрации хранится информация обо всех выполненных измерительных и аналитических операциях. К каждому измерению и анализу можно добавить комментарий и таким образом отслеживать любую операцию. Все данные сохраняются автоматически, предотвращая потерю ценной информации. Дополнительно они могут быть экспортированы в стандартные форматы для последующего анализа любым другим ПО.

Комплексный аналитический инструмент

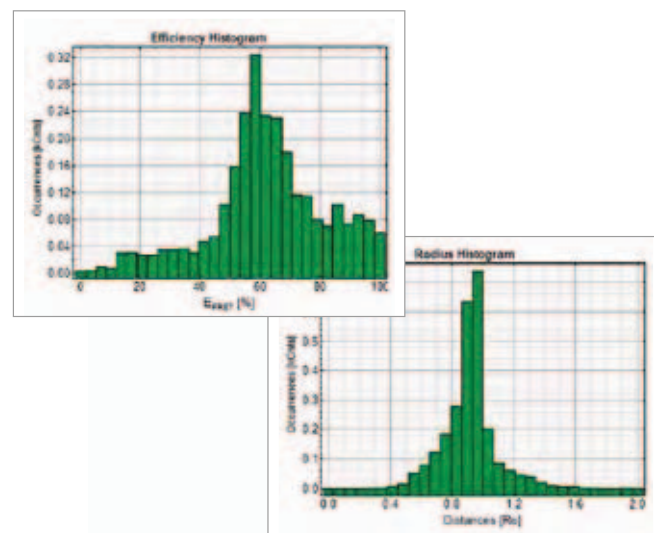
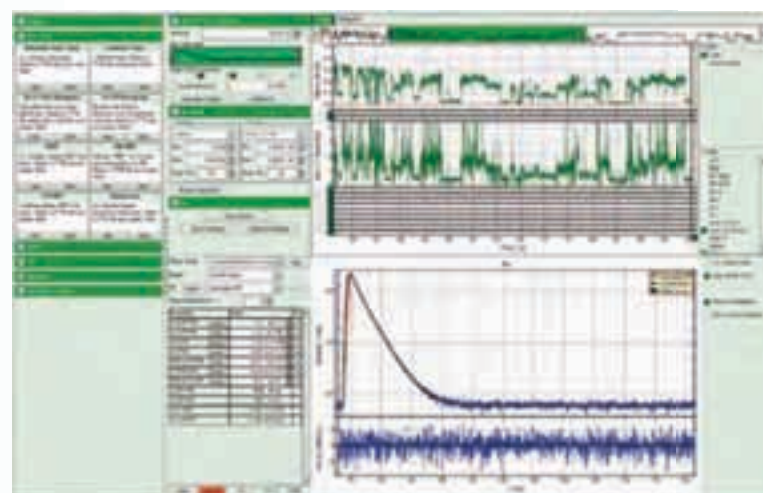
Программа SymPhoTime 64 предназначена для сопровождения пользователя по всем операциям в ходе выполнения отдельного анализа или измерительного процесса. Это реализовано за счет четко организованного графического пользовательского интерфейса (GUI) и специально адаптированных аналитических процедур для выполнения анализа регистрации изменения интенсивности флуоресценции по времени, FCS, (PIE-) FRET, анизотропии и гистограмм TCSPC – а также для измерений визуализации, например, FLIM с использованием до четырех каналов детектирования. Программа SymPhoTime 64 может быть дополнительно доработана при помощи интегрированного языка написания скриптов «STUPSLANG», который позволяет пользователю добавлять, например, дополнительные модели подбора, компоненты GUI или аналитические процедуры. Подробные руководства по анализу данных постоянно обновляются и предоставляются для использования.



Программное обеспечение

Регистрация изменения интенсивности по времени

Основным свойством SymPhoTime 64 является анализ регистрации изменения интенсивности флуоресценции по времени. Изменения интенсивности флуоресценции по времени отображают динамику флуоресценции и, благодаря режиму TTTR, могут быть проанализированы разными способами. SymPhoTime 64 имеет восемь специально настроенных пользовательских интерфейсов для наиболее распространенных процедур анализа изменений по времени, например изменений интенсивности по времени, изменений времени жизни, FRET, импульсно-чередующего возбуждения FRET (PIE-FRET) и анизотропии. Отдельные интерфейсы предусматривают наличие всех параметров и инструментов, необходимых для анализа конкретных данных. Например, интерфейс анализа флуктуаций времени жизни включает эффективный алгоритм подбора затухания и обеспечивает определение до пяти различных значений времени жизни флуоресценции. Программа поддерживает подбор конечных элементов и деконволюцию с использованием измеренных или рассчитанных функций отклика прибора (IRF). Все подборы сопровождаются сложным анализом ошибок на основе бутстрэп-метода.



Резонансный перенос энергии по Фёрстеру (FRET)

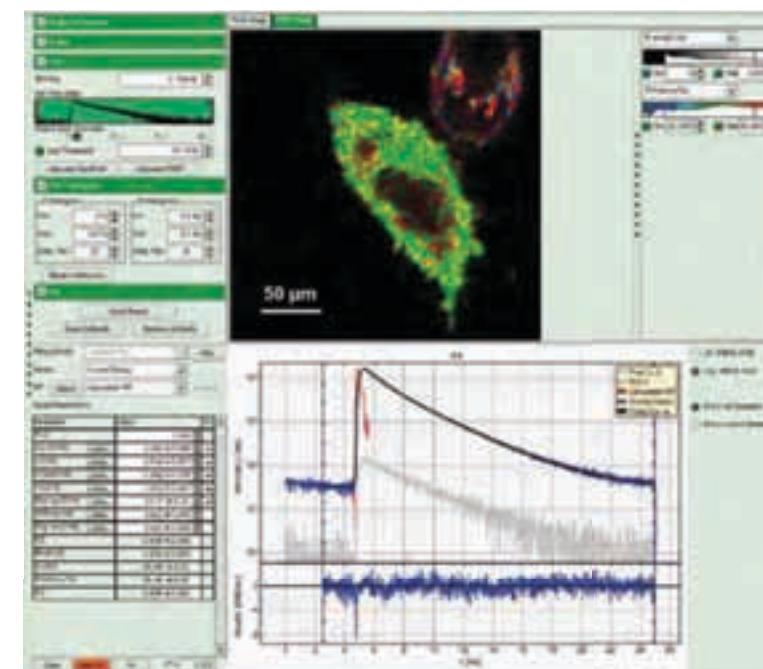
SymPhoTime 64 выполняет анализ измерений FRET и рассчитывает гистограмму эффективности FRET, а также гистограмму расстояний донор – акцептор в единицах расстояния Фёрстера. Пропускание, прямое возбуждение и различия в эффективности детектирования могут быть учтены. Также поддерживается специальный режим измерения импульсно-чередующего возбуждения (PIE), позволяющий выявить неполные пары FRET.

«MicroTime 200 сделал сложную технологию применимой для каждой лаборатории. Мы смогли опубликовать нашу первую научную работу в течение нескольких месяцев».

Kankan Bhattacharyya, Indian Association for the Cultivation of Science

Анализ изображений

С SymPhoTime 64 анализ (временноразрешенных) изображений стал еще проще и быстрее, чем когда-либо. Программа включает специально адаптированные интуитивно понятные интерфейсы для множества стандартных аналитических процедур от визуализации времени жизни флуоресценции (FLIM) до резонансного переноса энергии по Фёрстеру (FRET) и анизотропии. Для анализа FLIM программа SymPhoTime 64 предлагает специальную процедуру «экспресс FLIM», которая выдает предварительные результаты для оценки качества изображения или выбора области интереса (ROI) для более детального анализа. Затем детальный анализ FLIM выполняется на основе подбора экспоненциальной функции затухания для полученного затухания флуоресценции в каждом пикселе изображения.



Флуоресцентная корреляционная спектроскопия (FCS)

SymPhoTime 64 содержит один из самых быстрых программных корреляторов. Он поддерживает выполнение автокорреляции, кросс-корреляции, группового анализа FCS для больших объемов данных, корреляционной спектроскопии времени жизни флуоресценции (FLCS), а также полной корреляции. Так же предусмотрена базовая аналитическая процедура для измерений 2fFCS. Программный пакет имеет комплексный аналитический инструмент для применения различных уже входящих в состав определенных моделей FCS к корреляционным кривым. В то же время SymPhoTime 64 позволяет добавлять новые эмпирические функции, а также экспортировать все результаты для последующего анализа в автономном режиме.



Структура и компоненты системы

Модульная и гибкая система

Исключительная чувствительность и гибкость MicroTime 200 в сочетании с беспрецедентной простотой использования достигнуты благодаря уникальному сочетанию миниатюризованных и высокотехнологичных решений. Ключевыми технологиями являются надежные пикосекундные диодные лазеры PicoQuant и электроника коррелированного по времени подсчета единичных фотонов (TCSPC). Система, включающая конфокальную оптику, создана на основе последней разработки инвертированного микроскопа Olympus и дополнена технологией пьезо – сканирования и аксессуарами от ведущих производителей в этой отрасли.

Корпус микроскопа

MicroTime 200 создан на базе корпуса микроскопа IX 73 от компании «Olympus». Для областей, требующих высокой степени автоматизации, доступен полностью моторизованный IX 83. Микроскопы оборудованы блоком проходящего света и комплектом различных высокотехнологичных объективов. Доступен также целый ряд совместимых аксессуаров.

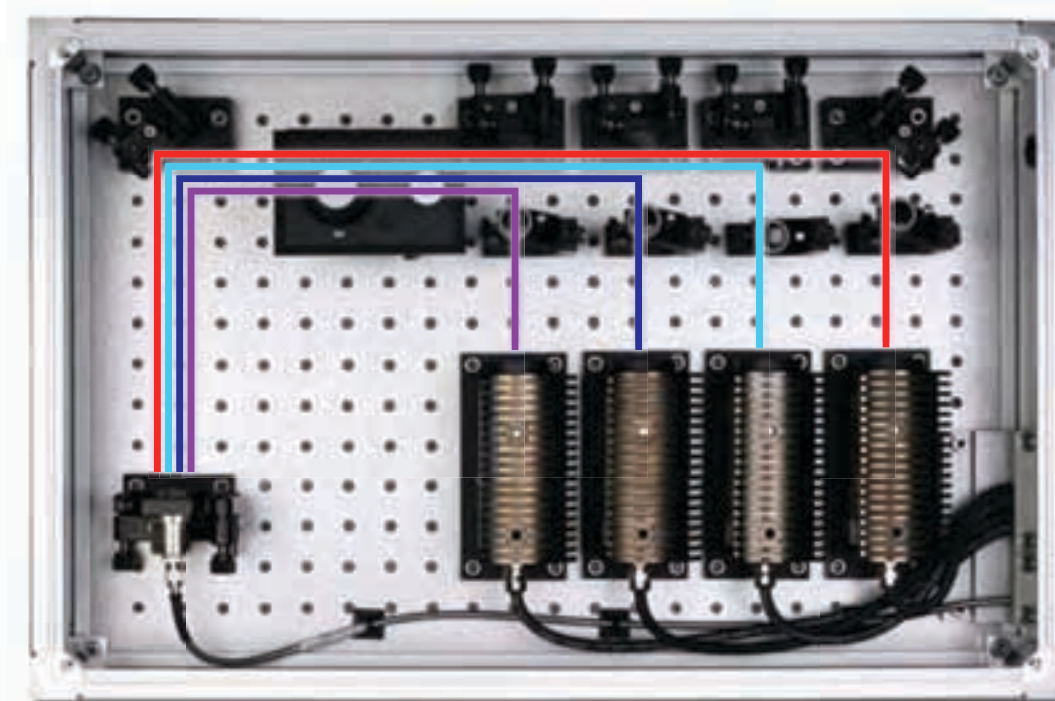
Конфокальный блок MicroTime 200, главный оптический блок (MOU), установлен на правый боковой порт. Порт имеет специальную конструкцию PicoQuant и включает подвижное 100 % зеркало для направления света эмиссии и возбуждения в микроскоп и возврата света. Два других порта микроскопа могут быть использованы, например, для широкопольного детектирования при помощи камеры CCD у порта слева. Поскольку положение зеркала не влияет на свет из порта на задней панели, это позволяет использовать полное внутреннее отражение (TIRF) для возбуждения, а конфокальный блок – для детектирования.

Система возбуждения

Система возбуждения состоит из компактных пикосекундных диодных лазеров, в диапазоне длин волн от 375 нм до 900 нм с шириной импульса до 50 пс. Выходная мощность и частота повторов всех лазеров могут регулироваться в зависимости от экспериментальных потребностей, превращая их в идеальные источники возбуждения для измерений времен жизни флуоресценции. Лазеры управляются специальным драйвером, который может быть как одно-, так и многоканальным, для выполнения многоцветных экспериментов и схем с импульсно-чередующим возбуждением (PIE).

Все лазерные головки заключены в лазерном блоке (LCU). Этот блок объединяет эмиссию лазеров в количестве до 5 штук в одномодовом волокне поляризации, которое соединено с главным оптическим блоком MicroTime 200. Лазерный блок позволяет корректировать интенсивность возбуждения и обеспечивает простую и гибкую смену лазеров.

Помимо использования импульсных диодных лазеров для возбуждения, MicroTime 200 может так же работать с другими внешними импульсными источниками света, например, титан – сапфировыми лазерами, твердотельными лазерами с синхронизацией мод и оптическими параметрическими осцилляторами. Эти лазеры подключаются к MicroTime 200 через отдельный порт для возбуждения. Простое интегрирование и отстройка пучка выполняются при помощи соединительного блока специальной конструкции.



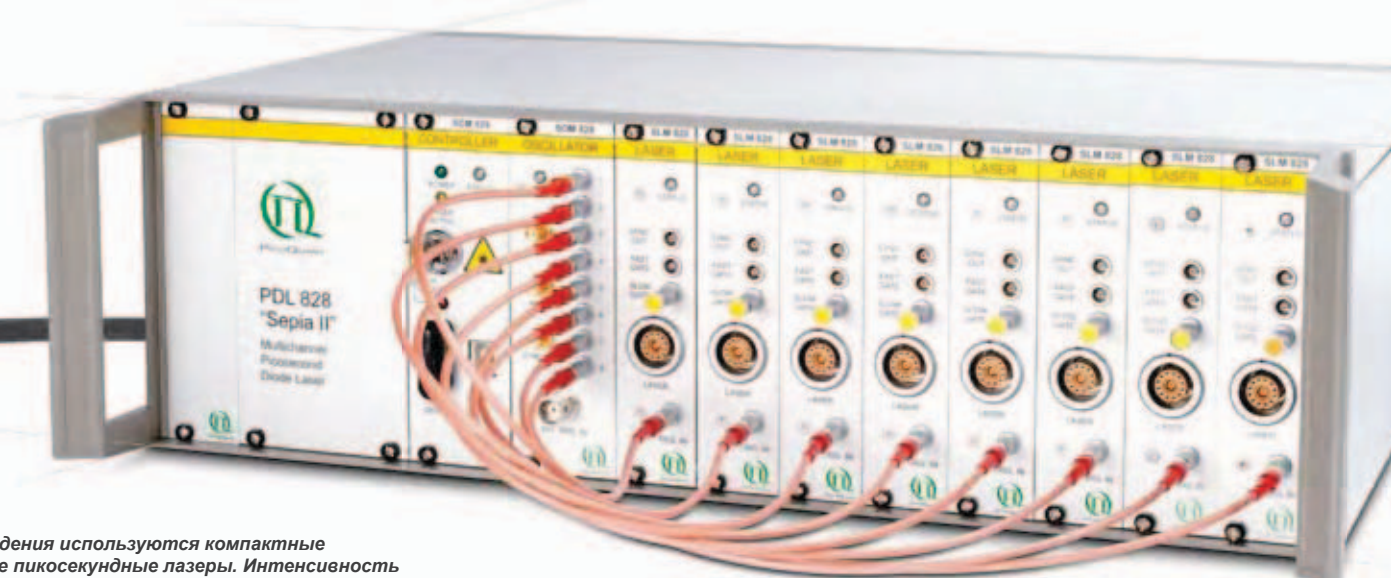
Блок лазеров (LCU) позволяет объединить до пяти лазеров в одном одномодовом волокне поляризации и упрощает изменения длины волны или процедуры одновременного возбуждения.



MicroTime 200 создан на базе последней модели инвертированного микроскопа от компании «Olympus». Свободные порты на микроскопе позволяют расширить и модифицировать систему для осуществления дополнительных измерительных задач.



Для возбуждения используются компактные импульсные пикосекундные лазеры. Интенсивность лазера и частота повторов удобно регулируются при помощи драйвера лазера. Возможно даже одновременное использование нескольких лазерных линий, если область применения предусматривает волновое уплотнение.



Структура и компоненты системы

Конфокальная система детектирования

MicroTime 200 использует принцип конфокальной микроскопии для сбора данных. В конфокальном микроскопе пинхол используется для отсекаания света вне фокуса, что позволяет детектировать объем меньше 1 фемтолитра. Пинхол и фокус возбуждения находятся в сопряженных плоскостях изображения микроскопа –

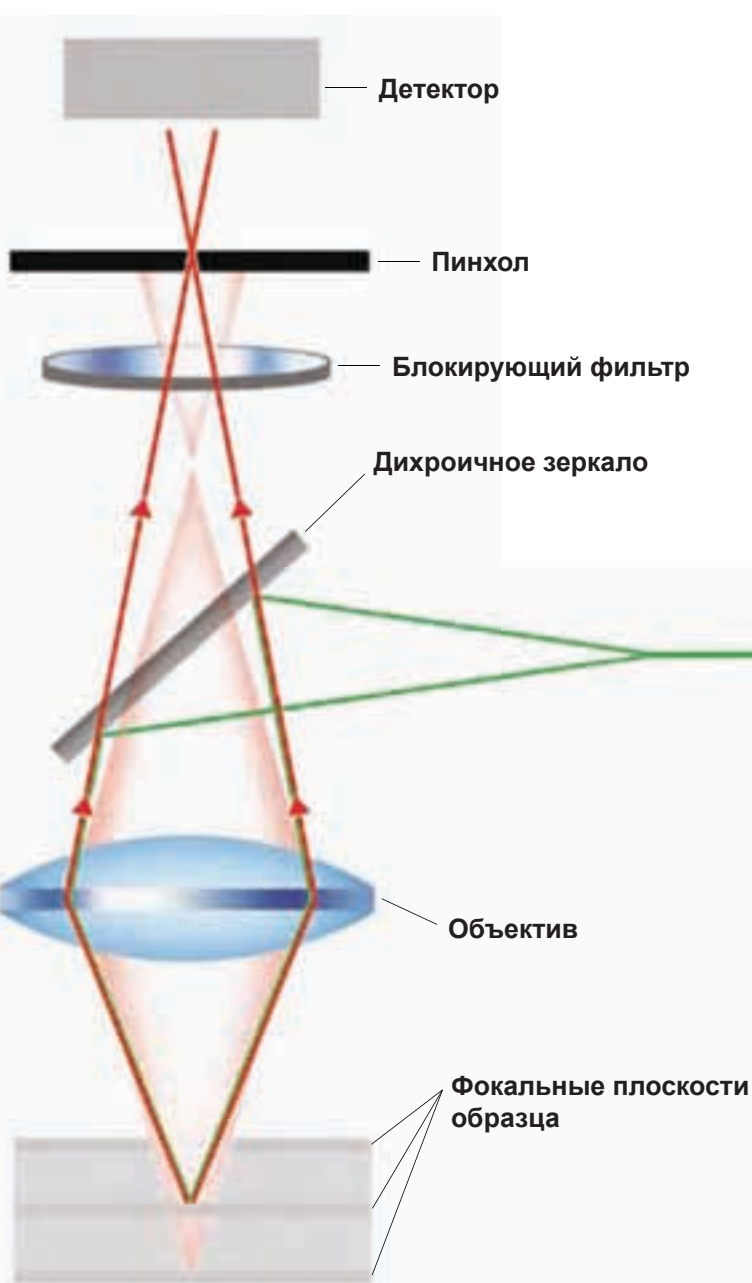
отсюда и происходит название «конфокальный». Используя конфокальные пинхолы различных размеров, можно оптимизировать толщину оптического среза для выбранного объектива и длины световой волны. Естественно, такая структура позволяет выполнять только «точечные» измерения – для получения изображения образец сканируется стационарным пучком света.

Конфокальная система детектирования MicroTime 200 заключена в главный оптический блок (МОУ). Компоновка МОУ позволяет пользователю при необходимости выполнить простую замену и регулировку всех оптических элементов. Все оптические элементы МОУ тщательно подобраны для обеспечения максимальной чувствительности, и их количество является минимально необходимым для получения чувствительности на уровне единичных молекул.

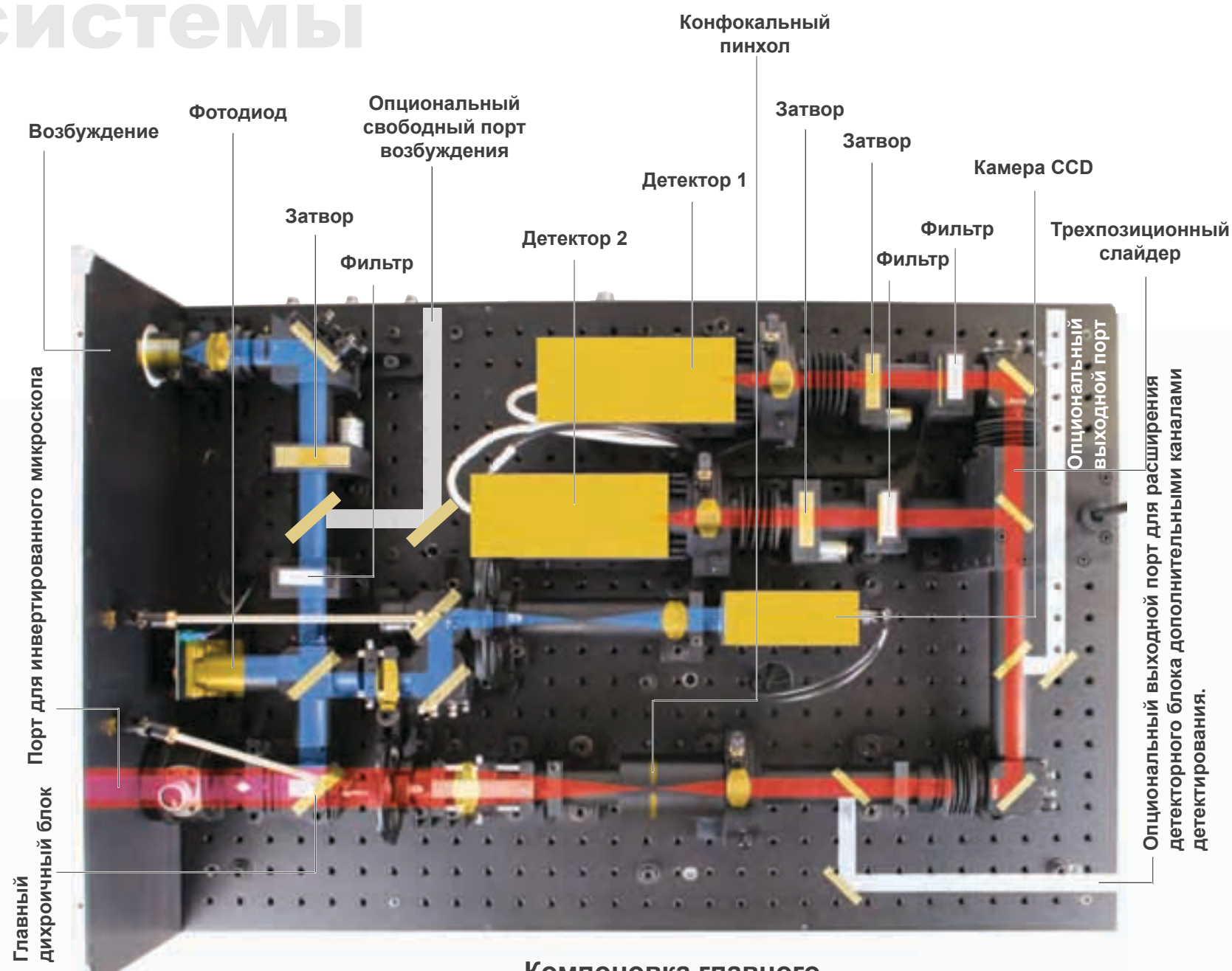
В МОУ аккумулируется лазерное излучение, которое идет от блока лазеров или свободных портов, в случае использования внешних источников возбуждения, например, титан-сапфировых лазеров для двухфотонных схем возбуждения. При прохождении луча в направлении образца часть излучения лазера направляется делителем пучка на фотодиод для интерактивного регулирования мощности возбуждения. Тот же делитель пучка направляет рассеянный и отраженный от поверхности образца свет на камеру CCD, которая используется для фокусировки и контроля качества пучка.

Регулируемое деление пучка

Дихроичный элемент толщиной 3 мм, установленный в съемном держателе внутри МОУ, разделяет флуоресценцию и рассеянный свет от возбуждения. Такие толстые дихроичные элементы были выбраны для повышения качества пучка и прочности; они так же позволяют легко изменить конфигурацию без трудоемких перенастроек. После дихроичного элемента флуоресцентный свет фокусируется на переключаемом пинhole и затем направляется на детекторы. Путь детектирования после пинхола содержит делитель пучка с 3-позиционным слайдером, для распределения светового луча между различными детекторами в зависимости от поляризации или длины волны. Для направления света на второй детекторный блок для одновременных четырехканальных измерений или на выходной порт для подключения, например, спектрометра, могут быть добавлены еще два опциональных делителя луча. Слайдер можно регулировать с внешней стороны МОУ, но отличная точность позиционирования исключает необходимость подобных регулировок. Делители пучка и эмиссионные фильтры перед детекторами имеют стандартные размеры и могут быть легко заменены.



Принцип конфокальной визуализации: Пинхол в промежуточной плоскости изображения обеспечивает попадание на детектор света только из фокальной плоскости, что позволяет получить изображения с разрешением, близким к дифракционному пределу.



Компоновка главного оптического блока

На пути пучка возбуждения, а также перед каждым детектором установлены электро-механические затворы для обеспечения безопасности – затворы могут управляться через ПО или вручную при помощи модуля дистанционного управления.

Структура и компоненты системы

Сканирование с высоким разрешением

MicroTime 200 оборудован специально разработанным предметным столиком с диапазоном 25 мм, обеспечивающим грубую корректировку положения образца. По умолчанию MicroTime 200 использует принцип сканирования при помощи объектива. В этом случае объектив с пьезо-сканером с очень высокой точностью позиционирования движется относительно неподвижного образца. Это является принципиальным и обязательным условием для измерений единичных молекул на поверхностях.

Подобная конфигурация сканера так же позволяет выполнять эксперименты, требующие свободного доступа к образцу, например, исследования пэтч – клэмп, приклад-

ные функции с использованием криостата или совмещенные измерения FLIM и AFM. 2-мерный пьезо-сканер от компании Physik Instrumente установлен в верхней части держателя объектива и имеет диапазон сканирования 80 мкм x 80 мкм с номинальной точностью позиционирования в 1 нм. Поскольку максимальное расстояние смещения объектива составляет 40 микрон в одну сторону, это практически не влияет на симметрию лазерного пучка, входящего в объектив. Опциональный z-пьезо-элемент перемещает объектив вверх и вниз (PIFOC) и позволяет выполнить 3-мерное сканирование с диапазоном сканирования 80 мкм (номинальная точность позиционирования: 1 нм). PIFOC и сканер объектива полностью управляются программным пакетом SymPhoTime 64. Как вариант, может использоваться сканер образца с перемещением образца в стационарном луче возбуждения, вместо сканирования при помощи объектива. Если необходим больший диапазон сканирования, можно установить широкополосный сканер, охватывающий диапазон до нескольких сантиметров с нанометровой точностью позиционирования.

Электроника TCSPC для сбора данных

Для MicroTime 200 предоставляются три самостоятельные системы сбора данных на основе метода подсчета единичных фотонов с временным коррелированием (TCSPC): HydraHarp 400, PicoHarp 300, TimeHarp 260. Все электронные устройства PicoQuant TCSPC работают в специальном режиме измерений с временной привязкой и с временным разрешением (TTTR), позволяющим использовать многочисленные аналитические методы MicroTime 200.

HydraHarp 400 – самостоятельная установка с высокоскоростным USB 3.0 соединением с компьютером. Она имеет временное разрешение 1 пс и до восьми автономных каналов детектирования. Это позволяет выполнять параллельные измерения с использованием нескольких детекторов для повышения скорости обработки данных и сокращения времени измерения.

Как и HydraHarp 400, PicoHarp 300 – это самостоятельная установка, которая подключается компьютеру высокоскоростным USB соединением. имеет временное разрешение 4 пс и осуществляет данные непосредственно в одном канале детектирования. При многоканальной компоновке имеет специальный блок мультиплексора, имеющий до трех каналов детектирования.

Регулируемый блок делителя пучка, встроенный в главный оптический блок, может содержать до двух различных дихроичных элементов или делителей пучка. Он управляется снаружи и позволяет настроить систему на выполнение текущего измерительного задания.

TimeHarp 260 - это PCI-экспресс-плата с двумя независимыми каналами детектирования. Она имеет временное разрешение в 25 пс и ультра-короткое мертвое время для высокой скорости обработки данных. При использовании для фосфоресценции панель может охватывать временной диапазон до нескольких секунд.

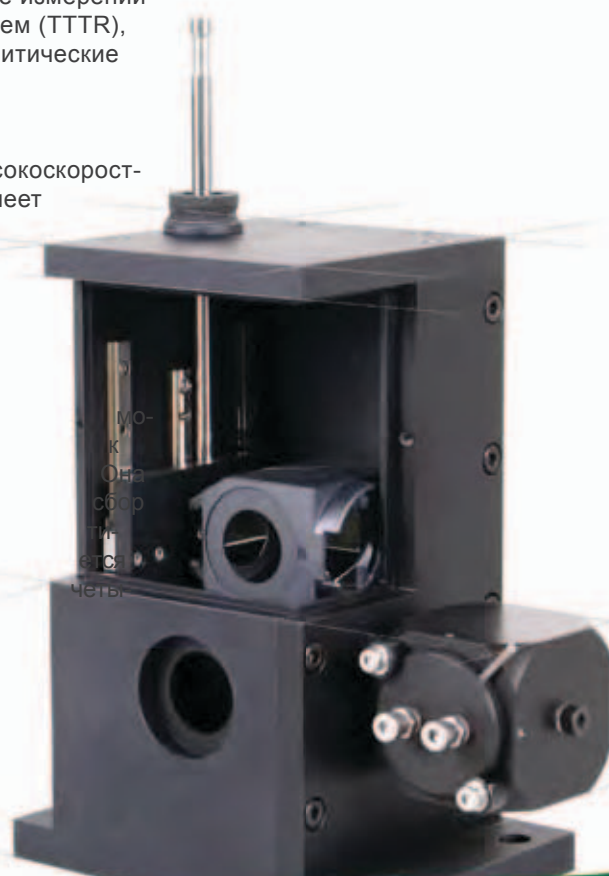
«Всего через несколько дней после установки мы во всем разобрались и уже проводили ультрасовременные измерения единичных молекул».

Thomas Huser, Department of Physics, University of Bielefeld



TimeHarp 260 – это компонент TCSPC выполненный в виде платы PCIe с ультракоротким мертвым временем. Благодаря расширенному диапазону до нескольких секунд, его можно использовать для изучения как флуоресценции, так и фосфоресценции.

HydraHarp 400 – самостоятельная система подсчета единичных фотонов с временным коррелированием с пикосекундным разрешением.

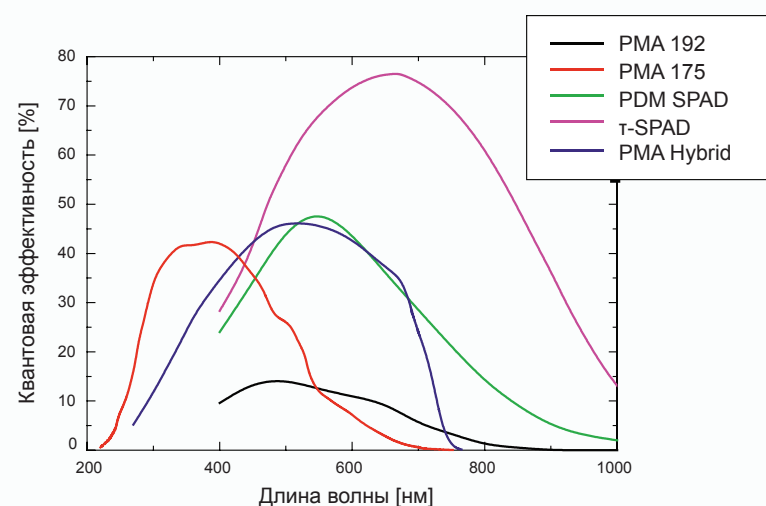


Компоненты системы

Детекторы, чувствительные к единичным фотонам

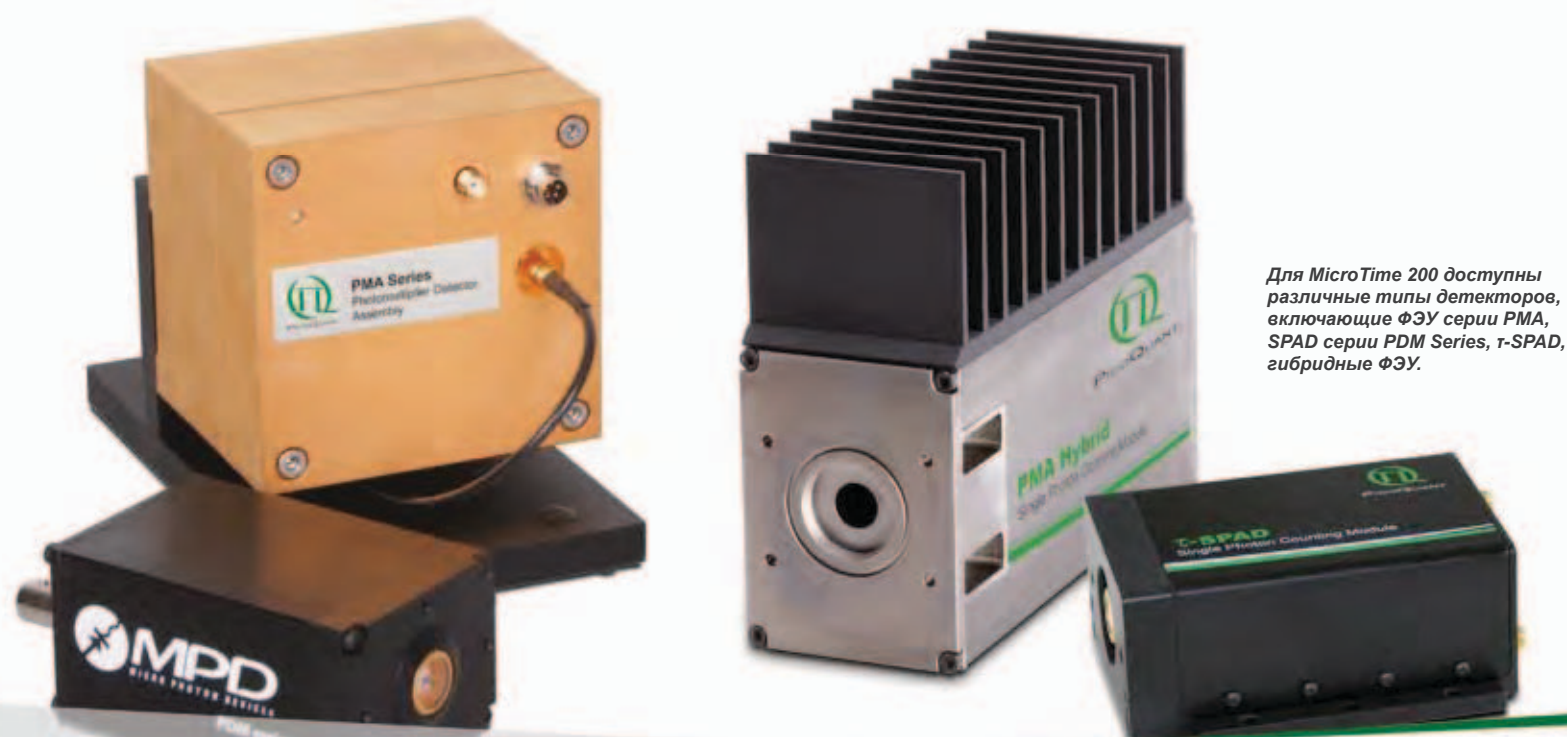
MicroTime 200 может быть оборудован различными типами детекторов в количестве до четырех штук. Каждый канал детектирования имеет собственный держатель фильтра и электромеханический затвор, который управляется ПО или вручную посредством модуля дистанционного управления. Доступные детекторы – однофотонные лавинные диоды (SPADs), фотоумножительные устройства (ФЭУ) или гибридные фотоумножительные устройства.

ФЭУ (серии PMA) являются экономичным вариантом для приложений на основе времени жизни, например, для FLIM. Их так же выбирают в качестве детекторов для работы в УФ области. Тем не менее, из-за своей невысокой эффективности детектирования в видимом диапазоне по сравнению с SPAD или гибридными ФЭУ, они не являются идеальными детекторами для изучения единичных молекул (например, флуоресцентная корреляционная спектроскопия). Для приложений, требующих очень чувствительного детектора, но умеренного временного разрешения, например, для флуоресцентной корреляционной спектроскопии, идеальным вариантом являются t-SPAD, т.к. они обладают квантовой эффективностью до 70 % в красной области спектра. При этом их временное разрешение лимитировано, что ограничивает их применение в областях с ультракороткими временами жизни. Для приложений, требующих очень высокого временного разрешения, следует использовать SPAD серии PDM или гибридный ФЭУ. Оба детектора обладают высокой чувствительностью в видимой области спектра и очень высокое временное разрешение. В зависимости от условий эксперимента и типа используемого детектора, разрешаемое время жизни может иметь величину до 10 пс.



Квантовая эффективность в зависимости от длины волны некоторых типов детекторов, поставляемых с MicroTime 200.

Поскольку каждый тип детектора имеет свои сильные и слабые стороны, пользователю необходимо выбрать детектор исходя из задач, будь то FLIM, FCS или изучение единичных молекул. Естественно, различные типы датчиков могут быть скомбинированы в одной системе для получения оптимальной гибкости.



Для MicroTime 200 доступны различные типы детекторов, включающие ФЭУ серии PMA, SPAD серии PDM Series, t-SPAD, гибридные ФЭУ.

Дополнения к MicroTime 200

Функционал MicroTime 200 может быть расширен за счет дополнительных блоков. Мы постоянно работаем над модернизацией и добавлением новых характеристик MicroTime 200 для того, чтобы оставаться на передовом рубеже науки. Пожелания исследователей всегда приветствуются и используются в новых разработках.

Возбуждение УФ для экспериментов с прямым детектированием

Множество молекул, начиная от ароматических низкомолекулярных соединений до больших биомолекул, можно детектировать по их собственной флуоресценции в дальнем УФ, т.к. они содержат соответствующие хромофорные группы. Белки, например, доступны в своей естественной форме, так как они включают в себя флуорофоры триптофан, тирозин и фенилаланин.

MicroTime 200 также подходит для проведения экспериментов в дальнем УФ, т.к. в нем используется пьезо-сканер с высоким разрешением и характеристиками, не зависящими от длины волны возбуждения. Это отличает его от гальванометрических сканеров, которые, как правило, не отражают УФ свет возбуждения.

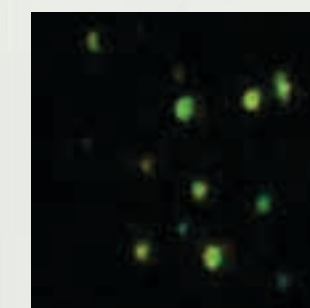
Эти три аминокислоты, однако, сравнительно редко встречаются в белках и в разной степени способствуют их УФ флуоресценции. Основной вклад вносит триптофан, который тоже обладает эмиссией и в высшей степени чувствителен к окружению. Соответственно, он часто используется для изучения структуры, фолдинга и функций белка. Для детекции этой флуоресценции, которая позволяет проводить эксперименты без использования флуоресцентных меток, MicroTime 200 был дополнен уникально чувствительной УФ-опцией.

Параллельное детектирование УФ и видимых областей спектра

УФ-опция предусматривает модификацию оптического пути MicroTime 200 для обеспечения возможности возбуждения флуоресценции на 266 нм и детектирования в УФ области. Для возбуждения флуоресценции в систему встраивается соответствующий УФ импульсный лазер с оптическими и электронными устройствами, позволяя регистрировать время жизни фотонов в УФ с пикосекундным разрешением.

MOU дополнительно оснащен кварцевой оптикой и высокотехнологичным кварцевым иммерсионным объективом для параллельного детектирования в видимой области и УФ. Флуоресцентный свет детектируется ультра-двухщелочным фотоэлектронным умножителем. Этот детектор имеет эффективность детектирования до 42 % на 350 нм, что, например, соответствует максимальному значению флуоресценции триптофана.

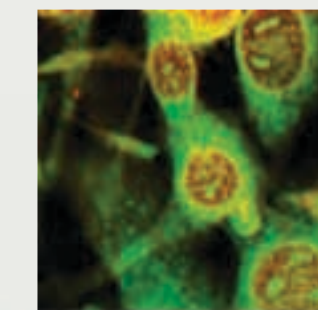
Примеры



0 нс Время жизни 7 нс

Измерения в ультрафиолетовом спектре позволяют использовать метод прямого детектирования FLIM с биологическими клетками. На примере показано изображение FLIM фиксированных клеток 3T3-L1, содержащих триптофан. Ядро, ядрышко и цитоплазма могут быть четко дифференцированы. Возбуждение образца было выполнено на 266 нм через специализированный кварцевый объектив, а флуоресценция образца была детектирована при помощи ультра-двухщелочного ФЭУ.

FLIM изображение шариков, покрытых стрептавидином (диаметр 500 нм, 1 стрептавидин содержит 24 триптофана), зафиксированных на покровном стекле. Размер изображения 13 мкм x 13 мкм. Возбуждение образца было выполнено на 266 нм через специализированный кварцевый объектив, а флуоресценция образца была детектирована при помощи ультра-двухщелочного ФЭУ.



2,3 нс Время жизни 3,5 нс

Образец предоставлен Astrid Tannert, University of Leipzig, Germany

Дополнения к MicroTime 200

MicroTime 200, объединенный с ACM

MicroTime 200 может быть так же совмещен с атомным силовым микроскопом (АСМ). Это уникальная комбинация двух взаимодополняющих методов в одном эксперименте. Первый служит для визуализации молекулярной динамики с разрешением, ограниченным дифракционным пределом, второй позволяет получить информацию о топографии с суб-нм разрешением. Помимо получения дополнительной информации о поверхности образца, можно использовать кантилевер АСМ для манипуляций с образцом в нанометровом диапазоне вплоть до уровня отдельных молекул. Комбинированная система MicroTime 200 АСМ позволяет методом FLIM изучать реакцию образца в ответ на контакт с кантилевером АСМ. Взаимодействие кантилевера с флуорофорами образца можно также исследовать и использовать для визуализации с высоким разрешением. Эта

уникальная комбинация АСМ/FLIM позволяет подойти к решению вопросов, на которые раньше не давала ответов ни одна методика.

Поддерживаются несколько моделей АСМ

На данный момент протестирована комбинация MicroTime 200 с тремя различными серийными АСМ:

- MFP-3D BIO от компании Asylum Research
- BioScope Catalyst от компании Bruker AXS
- NanoWizard3 от компании JPK Instruments

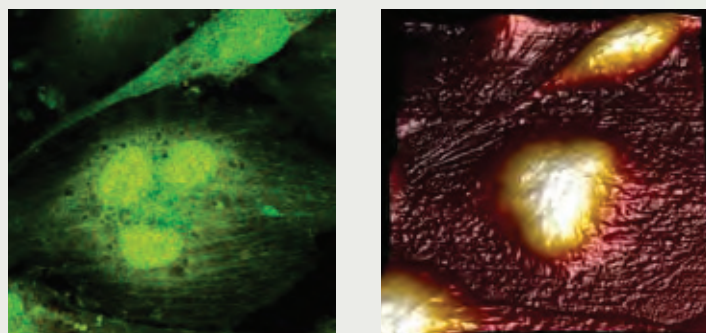
Получение синхронизированных записей АСМ и оптических изображений в пределах области образца обеспечивается за счет удобной регулировки положения кантилевера в конфокальном объеме и интегрирования маркеров положения системы сканирования АСМ в поток данных TTTR для цифровой сборки изображения.

Конфигурацию со сканирующим объективом целесообразно дополнить АСМ, т.к. объектив установлен на сканере и перемещается под неподвижным образцом. Соответственно, держатель образца АСМ со сканером АСМ и кантилевером с легкостью может быть установлен на штативе микроскопа Olympus IX 73.

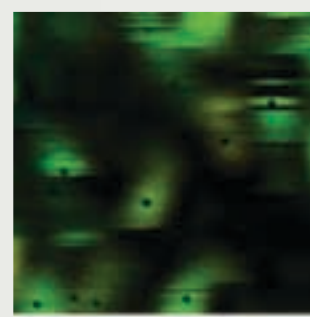
Исследования клеток и отдельных молекул

Диапазон применения комбинации АСМ и флуоресцентной микроскопии с временным разрешением охватывает исследования клеток и тканей, а также изучение отдельных молекул. Получаемая в результате измерений информация по клеткам включает топографию и механический отклик клетки на манипуляции с кантилевером (упругость). Другие прикладные задачи предусматривают, например, изучение отклика флуоресценции меченых белков на механическое воздействие кантилевера. Измерения единичных молекул позволяют выявить нанофотонные взаимодействия (с временным разрешением) между кантилевером АСМ и флуорофором, которое может быть, например, использовано для рамановской спектроскопии TERS и микроскопии со сверхвысоким разрешением.

Примеры



Синхронная съемка времени жизни флуоресценции и топографии фиксированных клеток глиобластомы, экспрессирующих флуоресцентный белок GFP при помощи MicroTime 200 в сочетании с BioScope Catalyst (Bruker, Madison, WI, USA).



Контакт острей АСМ с единичными флуорофорами может быть изучен и использован для визуализации флуоресценции со сверхвысоким разрешением с информацией о топографии. На изображении FLIM также показаны молекулы Atto655, просканированные кантилевером в середине возбужденного объема. Круглые темные пятна объясняются передачей энергии на кантилевер АСМ.

Образец предоставлен с разрешения Robert Ros, Arizona State University, Tempe, USA

1 нс Вре́мя жизни 7 нс

Характеристики

Система возбуждения

- Пикосекундные диодные лазеры (375 нм – 900 нм) с частотой повторов до 80 МГц внутри компактного блока лазеров.
- Одно- или многоканальный лазерный драйвер
- Опционально: возбуждение до 266 нм
- Опционально: внешний лазер (например, титан – сапфировый лазер)



Микроскоп

- Инвертированный микроскоп Olympus IX 73 или IX 83
- Правый порт специальной конструкции для конфокальной микроскопии
- Свободные левый порт и порт на задней панели (например, для широкопольной визуализации или TIRF)
- Предусмотрен блок проходящего света
- Специальный столик для ручного позиционирования образца с диапазоном 25 мм
- стандартный держатель образца для покровных стекол 20 мм x 20 мм
- Опционально: эпифлуоресцентное освещение, опционально: криостат для низкотемпературных измерений
- Опционально: комбинация с атомным силовым микроскопом (АСМ)

Объективы

- Безиммерсионные объективы с увеличением 20x и 40x (стандартные)
- Различные высокотехнологичные объективы (масляно-водяная иммерсия, с воздушным зазором, улучшенные для ИК/УФ, TIRF, или длиннофокусные объективы)

Сканирование

- Управляемое компьютером 2-мерное сканирование пьезо-объективом с диапазоном сканирования 80 мкм x 80 мкм с точностью позиционирования 1 нм
- PIFOC для 3-мерной визуализации, диапазон 80 мкм при номинальной точности позиционирования 1 нм
- Опционально: сканирование образца
- Опционально: столик сканирования большой площади с сантиметровым диапазоном

Главный оптический блок

- конфокальная установка детектирования в компактном корпусе с количеством параллельных каналов детектирования до 4 штук
- Специализированное высокотехнологичное дихроичное устройство с повышенной стабильностью
- Все оптические элементы являются легко доступными, регулируемые и заменяемыми.
- Камера CCD для диагностики пучка и фотодиод для измерений относительной мощности
- Настраиваемые делители пучка и выходные порты для подключения внешних устройств

Детекторы

- Однофотонные лавинные диоды (серия PDM, t-SPAD)
- Фотоумножительные электронные устройства (серия PMA), гибридные фотоумножители (серия PMA Hybrid)

Сбор данных

- На основе метода подсчета единичных фотонов с временным коррелированием (TCSPC) в уникальном режиме с временной привязкой и временным разрешением (TTTR)
- Одновременный сбор данных по каналам детектирования в количестве до 4 штук.

Программное обеспечение

- Простое в использовании и комплексное программное обеспечение для получения и анализа данных на базе Windows
- 1-, 2-, и 3-мерный сбор данных на основе универсального формата файлов TTTR
- Архивирование данных в рабочем пространстве, временной селектор для всех методов, функции экспорта данных, биннинг, подбор TCSPC (многоэкспоненциальное затухание (от 1 до 5 экспонент), подбор методом наименьших квадратов, подбор MLE, деконволюция IRF, подбор хвоста, анализ ошибок методом бутстрэп)
- Анализ точечного измерения: Подбор FCS, FCCS, FLCS, PIE-FCS, FCS (модели: диффузионные константы, триплетное состояние, конформационная, протонирование, функция рассеянной точки по Гауссу, анализ ошибок методом бутстрэп), калибровка FCS, корреляция антигруппировки/ совпадения, общая корреляция, мерцание (построение гистограмм для режимов вкл/выкл), гистограмма скорости импульсов (PCH), TCSPC с управляемой интенсивностью, отслеживание изменений времени жизни флуоресценции и интенсивности, гистограмма времени жизни, BIFL (комплексный анализ серии импульсов)
- Анализ изображений: FLIM, FLIM-FRET, FRET интенсивности, визуализация анизотропии, визуализация интенсивности флуоресценции (с временной синхронизацией), сопоставление изображений, область исследования (ROI)
- Язык написания сценариев ("STUPLANG") для пользовательских алгоритмов анализа, фиттинга и компонентов графического интерфейса.

Не все опции могут комбинироваться.

PicoQuant для ученых



Семинар по спектроскопии одиночных молекул собирает ведущих исследователей в этой области

Семинар по спектроскопии одиночных молекул

С 1995 года ученые компании PicoQuant проводят ежегодные семинары по «Спектроскопии одиночных молекул и сверхчувствительному анализу в области медико-биологических наук», собирающие крупнейших исследователей в этой области. По средству этого мероприятия мы стимулируем обмен знаниями и новыми идеями между экспертами в области спектроскопии одиночных молекул, интересующихся ученых из других областей и потенциальных пользователей биотехнологической индустрии.

Обучающие курсы «Флуоресценция с временным разрешением».

Для лучшего понимания принципов и пользы флуоресцентной времязрешенной спектроскопии и микроскопии компания PicoQuant проводит ежегодный курс "European Short Course on Principles and Applications of Time-resolved Fluorescence Spectroscopy" с 2003 года. В 2009 было организовано дополнительное мероприятие с фокусом на времязрешенную микроскопию и областях ее применения. Оба обучающих курса предназначены для лиц, желающих получить глубокие знания по принципам флуоресцентной спектроскопии и микроскопии, а также их применениям в области LifeScience. Курс состоит из лекций и практических занятий на приборах.

Прикладная лаборатория

Мы приглашаем ученых посетить наши прикладные лаборатории PicoQuant и увидеть MicroTime 200 в работе или выполнить контрольные измерения на собственных образцах. Мы гарантируем быстрое и квалифицированное понимание ваших научных задач и предоставим решение, которое поможет вам в вашей будущей исследовательской работе. Конечно же, вся другая наша продукция, включая времязрешенные флуоресцентные спектрометры, так же предоставляются для ознакомления.



PicoQuant GmbH

Группа компаний PicoQuant была учреждена в 1996 для разработки надежных, компактных и простых в использовании контрольно-измерительных приборов и систем с временным разрешением. Начиная с апреля 2008 реализация продукции и поддержка заказчиков в Северной Америке осуществляется компанией PicoQuant Photonics North America Inc.

Сегодня компания PicoQuant является лидером в области производства импульсных диодных лазеров, систем сбора данных с временным разрешением, подсчета единичных фотонов и флуоресцентных приборов. Наши приборы используются во всем мире. Они помогают в подготовке научных публикаций для высокорейтинговых научных журналов и разрабатывать производственные процессы для промышленного производства мирового уровня. Область прикладного применения, начавшаяся с традиционного детектирования флуоресценции с временным разрешением в биоаналитике, непрерывно расширяется и включает контроль качества полупроводников, формирование диффузного оптического изображения, обработку квантовых данных, тестирование оптических детекторов и телекоммуникации.

Благодаря нашей простой в использовании продукции исследователи могут теперь сосредоточиться на своих задачах в области биологии, медицины, экологии или химии, не нуждаясь в глубоких знаниях по физике, электронике или оптике.

Мы предлагаем передовые технологии.

Наша цель – предложить по разумной цене научным сообществам и производственным отраслям современную технологию, которая была совместно разработана и апробирована известными исследователями. Мы успешно объединили свои усилия со всеми крупными компаниями в области конфокальной микроскопии для разработки специального оборудования, позволяющего проводить исследования флуоресценции с временным разрешением на их промышленных лазерных сканирующих микроскопах. Реализуя эту концепцию, мы находимся в постоянном поиске новых задач. PicoQuant специально поощряет заявки от производителей оборудования на свою продукцию, особенно, для таких областей применения, где технологии с использованием временного разрешения ранее считались слишком дорогостоящими и трудоемкими.



Более 18 лет исследований и разработок

Более, чем 20 лет исследований, несколько тысяч реализованных установок и сотрудничество с международными экспертами в специальных прикладных областях, в совокупности, создает базу для новых выдающихся разработок, стимулом для которых являются потребности и ожидания наших заказчиков. Мы приглашаем вас посетить наш веб-сайт или напрямую обратиться к нашим специалистам по продукции и ее прикладному применению для обсуждения ваших конкретных потребностей. И конечно же, мы всегда рады видеть вас в наших прикладных лабораториях во время вашего визита в Германию.

Издано: PicoQuant GmbH, Rudower Chaussee 29 (IGZ), 12489 Berlin • Август 2014
 Редакция и производство: Pink Lemon Werbeagentur Tina Stundner, Berlin
 Печать: dhs, Berlin • Фотографии: PicoQuant GmbH

Указанные здесь фирменные названия, торговые марки являются собственностью соответствующих компаний.

Расширенные технические характеристики

Объективы				
Стандартные	PL 20x PlanAchromat, NA 0.4, безиммерсионный, 400-750 нм PL 40x PlanAchromat, NA 0.65, безиммерсионный, 400-750 нм			
Оptionальные	UPLSAPO 60x PlanApochromat, NA 1.2, водная иммерсия, 400-900 нм UPLSAPO 100x PlanApochromat, NA 1.4, масляная иммерсия, 400-850 нм PLAPO 100x PlanApochromat, NA 1.49, масляная иммерсия, 400-950 нм Прочие объективы с масляной иммерсией, апохроматической коррекцией, с воздушным зазором, адаптированные для ИК / УФ или длиннофокусные, TIRF			
Детекторы				
Тип*	SPAD (серия PDM)	PMA Hybrid - 40	SPAD (SPCM-AQRH)	
Спектральный диапазон	400 - 1000 нм	300 - 720 нм	400 - 1000 нм	
Темновая скорость счета (при 20 °С, стандартное значение)	< 250 ц/с	< 700 ц/с	< 100 ц/с	
Квантовая эффективность	50 % на 550 нм	45 % на 500 нм	> 70 % на 700 нм	
Получение данных				
Тип	PicoHarp 300	HydraHarp 400	TimeHarp 260 PICO	TimeHarp 260 NANO
Временное разрешение (ширина бина)	4 пс	1 пс	25 пс	1 нс
Мертвое время	< 95 нс	< 80 нс	< 25 нс	< 1 нс
Рабочая среда				
Требования к системе (рекомендованные)	Quad-core CPU > 3 ГГц, RAM >= 4 Гб, Windows™ 7/8			
Требования к источнику питания	От 110 до 230 В, 50/60 Гц			
Габариты (ш * г * в)				
Лазерный блок	600 мм * 400 мм * 200 мм (без драйвера лазера)			
Микроскоп и главный оптический блок	1150 мм * 600 мм (2 канала детектирования)			
19" электронный рэк (стандартный) столик	600 * 550 * 900 мм Максимальное расстояние между блоками 1,5 м. Рекомендуется обеспечить зону 0,5 м для возможности доступа со всех сторон.			
* по запросу предоставляются другие типы установок.				

Вся изложенная информация является достоверной по имеющимся у нас сведениям. Тем не менее, мы не несем ответственности за возможные неточности или упущения. Технические характеристики и внешний вид могут быть изменены без уведомления. Торговые марки или фирменные названия использованы для разъяснения и обозначения в интересах владельца, без намерения ущемления прав.
Последнее обновление: апрель 2015.



PicoQuant GmbH
Рудовер шоссе 29 (IGZ)
12489 Берлин
Германия
Телефон: +49-(0)30-6392-6929
Факс: +49-(0)30-6392-6561
info@picoquant.com
<http://www.picoquant.com>

