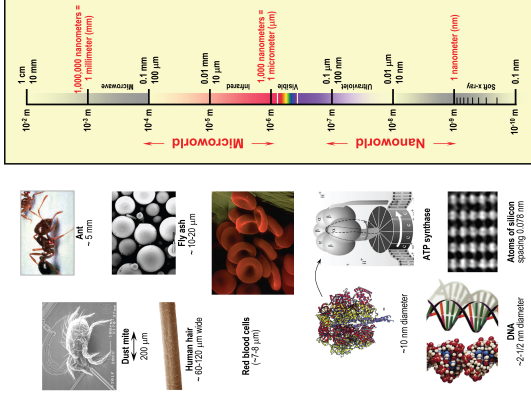


# Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem  
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

## Mekkora a dolgok?

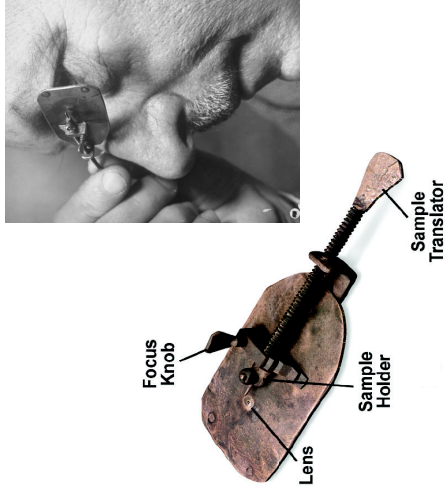


Hans Jansen és Zacharias Jansen  
1590-ben összetett mikroszkópot épít

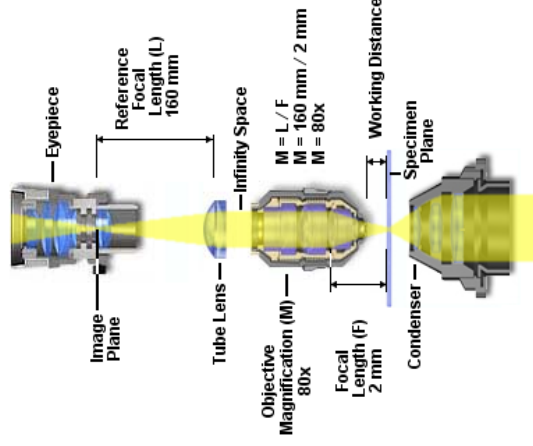
## A mikroszkópok legfontosabb típusai

- optikai mikroszkópok  
(Optical Microscope)
- elektron mikroszkópok  
(Electron Microscope)
- pásztázó mikroszkópok  
(Scanning Probe Microscope)

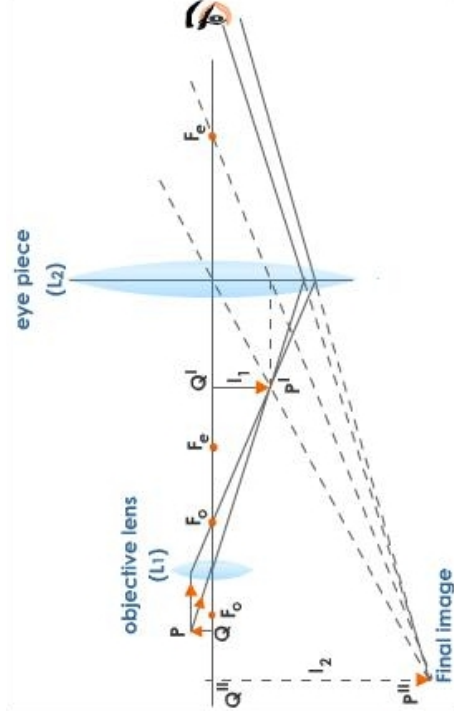
# Antoni van Leeuwenhoek (Thonis Philipszoon) 1632-1723 1674-ben egyszerű mikroszkópot készített



## “Végtelenre korrigált” optika



# Összetett mikroszkóp optikai útja

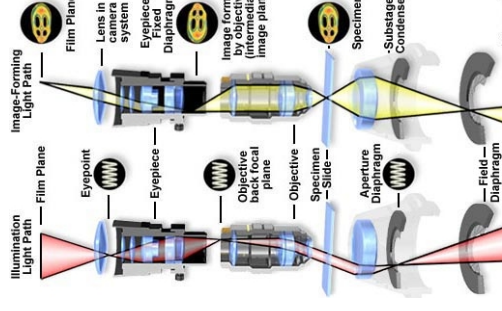


## Köhler megvilágítás

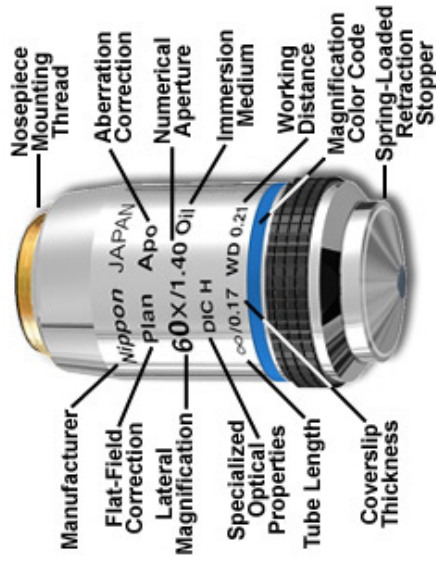


August Köhler  
(1866-1948)

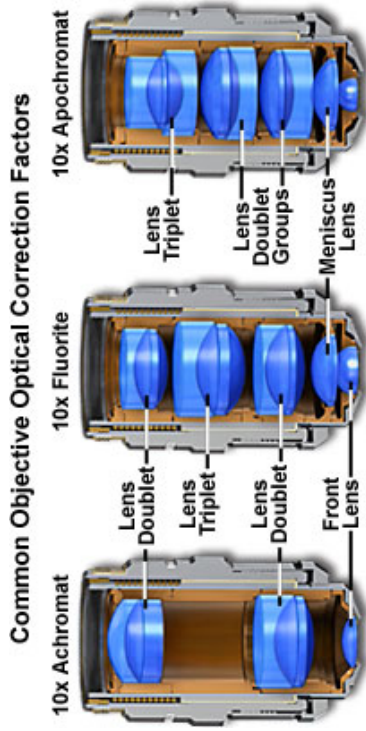
1893-ban találta fel August Köhler a Carl Zeiss műveknél.



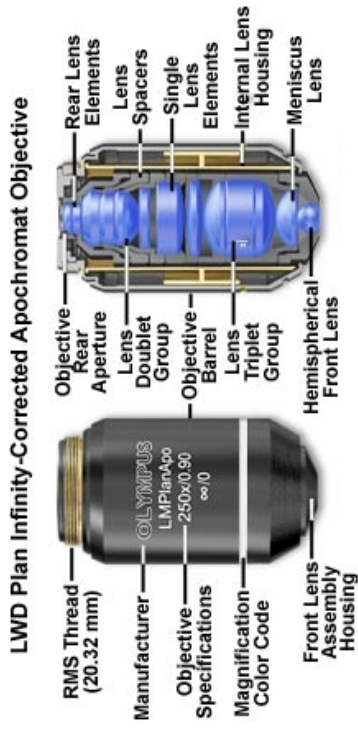
## Mikroszkóp objektív lencsék



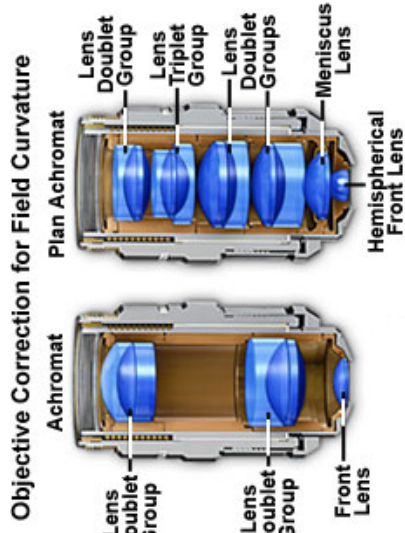
## Színkorrekció



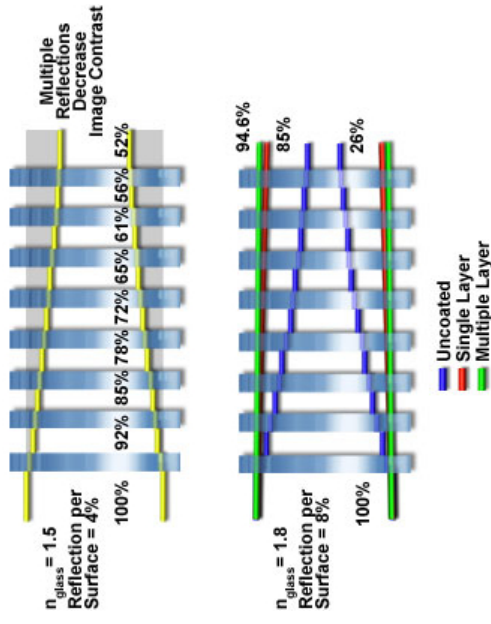
## Mikroszkóp objektívek felépítése



## Plánkorrekció



## Fényvisszaverődés a felszíneken



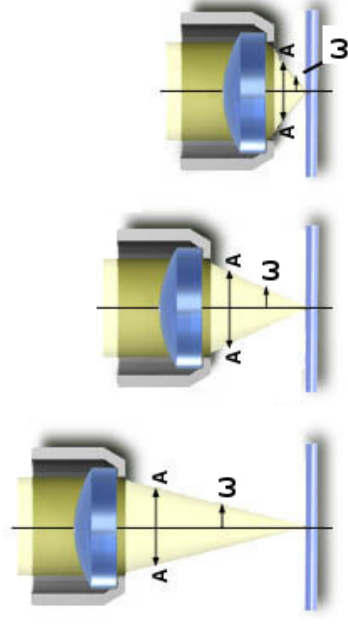
## Point Spread Function (PSF)

A PSF a mikroszkóp átviteli függvénye.

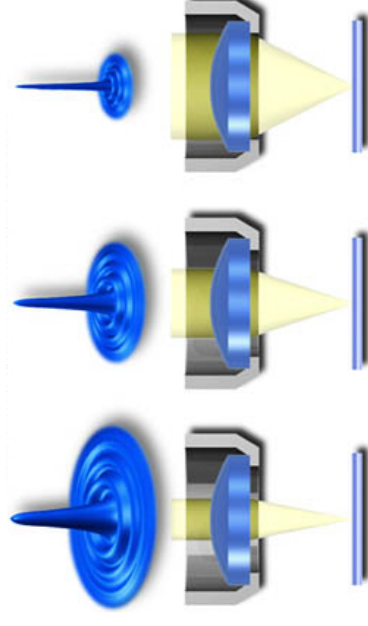
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

Az objektív segítségével egy térrészbe lehet a fényt fókuszálni, nem egy pontba.

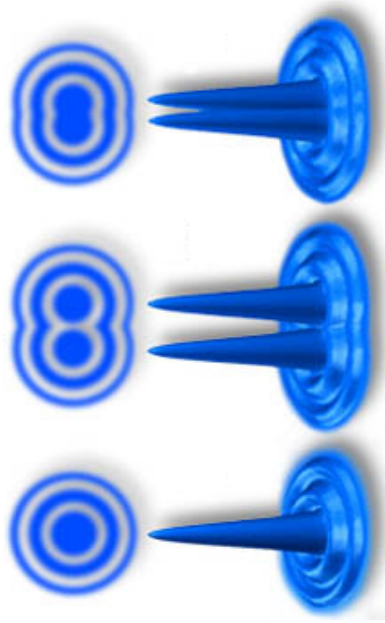
## Numerikus apertúra



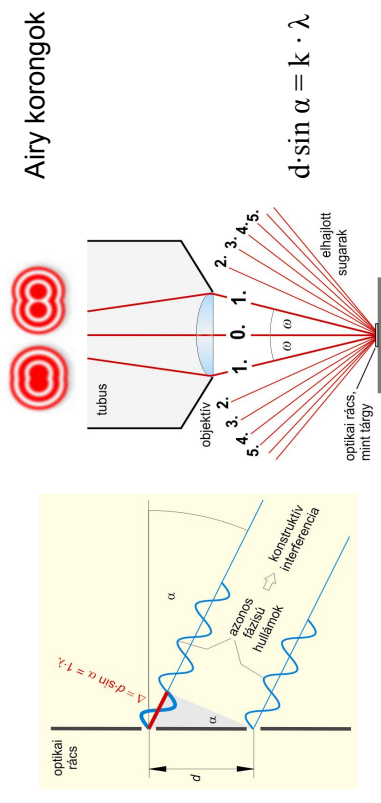
## A numerikus apertúra hatása a PSF-re



## A fény hullámtermészetének hatása a képre



## A fény hullámtermészetének hatása a képre



## Abbe elv

A mikroszkópban akkor és csak akkor tudunk feloldani két tárgypontot, ha az elhajlott fényhullámból a főmaximumon kívül legalább az első rendben elhajlott fény is részt vesz a képalkotásban.

## Abbe összefüggés

$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin \omega)$$

Hallgatolagos feltevések:

- a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet
- a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képfoltokat ad.

# Ernst Karl Abbe (1840-1905)



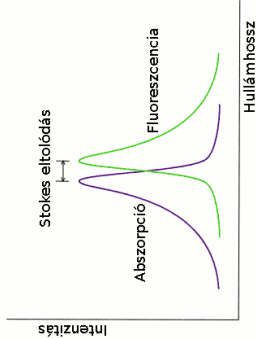
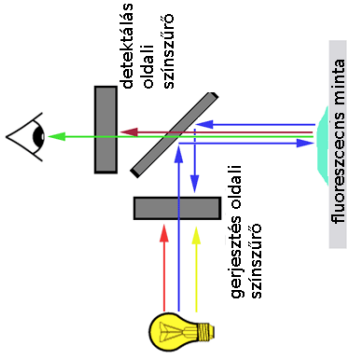
Fizikus és társadalomreformer

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

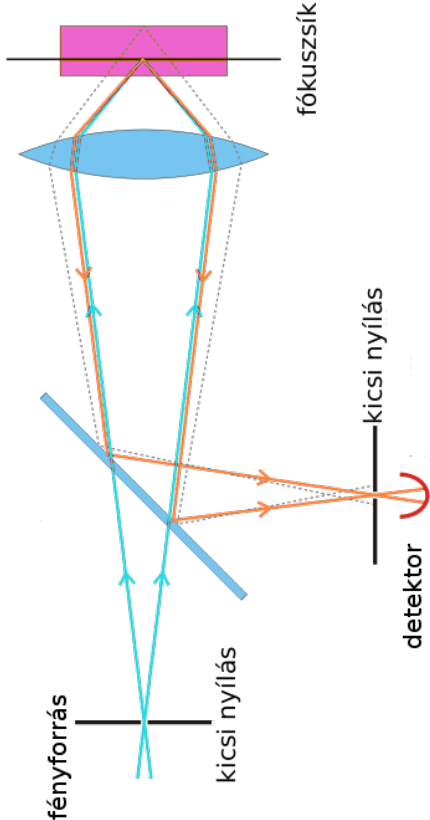
# Objektívek numerikus apertúrája

Magnification	Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (oil)	n/a	n/a	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90

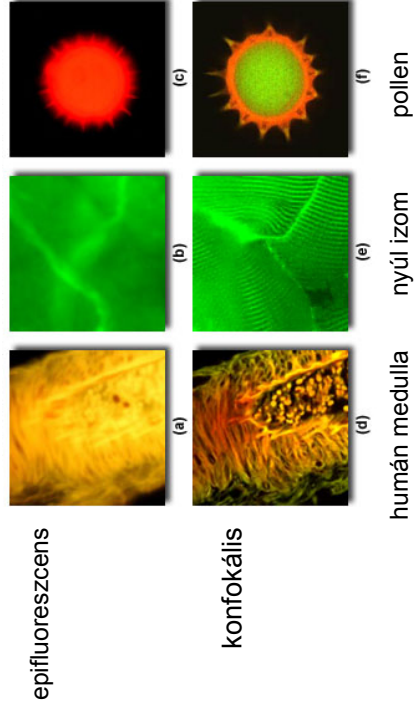
# Fluoreszcencia mikroszkóp



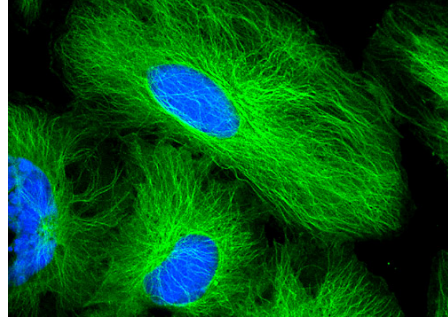
# A konfokális fluoreszcencia mikroszkóp működése



## Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

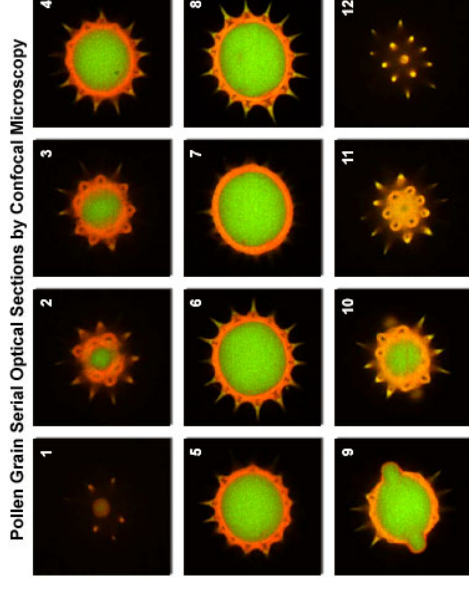


## Konfokális mikroszkóp

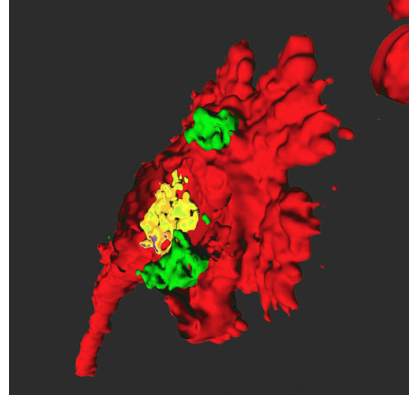


Tubulin mikrotubulusok  
rekombináns tubulint kifejező  
sejtekben.

## Térbeli szeletelés

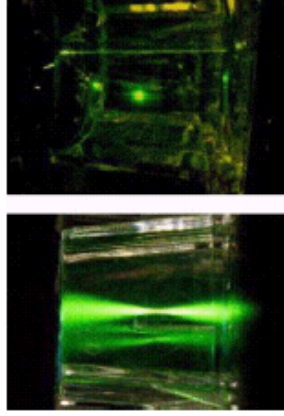
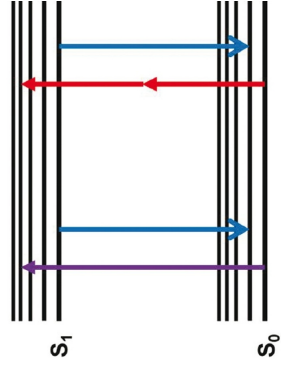


## Konfokális mikroszkóp

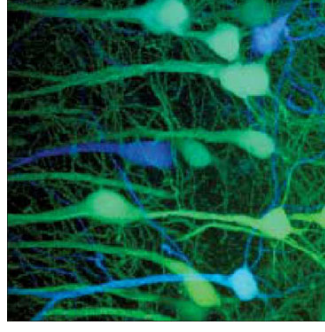


Dendritikus sejt pollen  
szemcséket takarít el.  
Konfokális mikroszkópi  
technikával készített 3D kép.

## A kétfotonos mikroszkóp működési elve

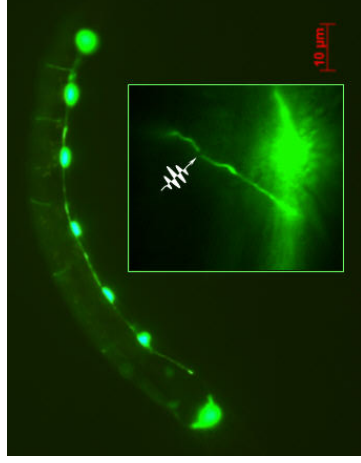


## Kétfotonos mikroszkópia



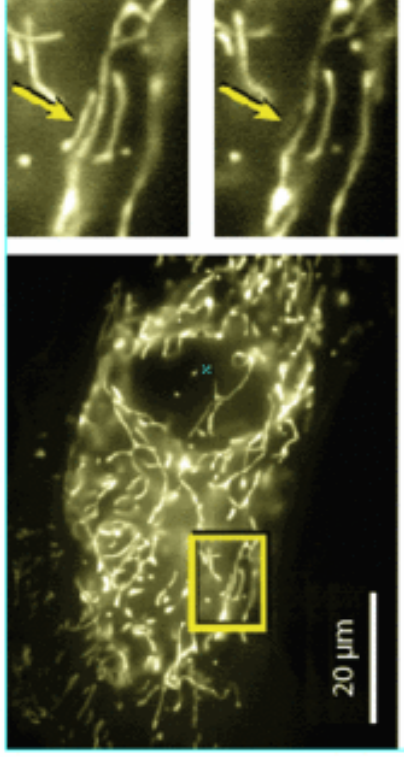
Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező transzgenikus egerek vizuális kortexének kétfotonos mikroszkóppal készült képe.

## Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Caenorhabditis elegans 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

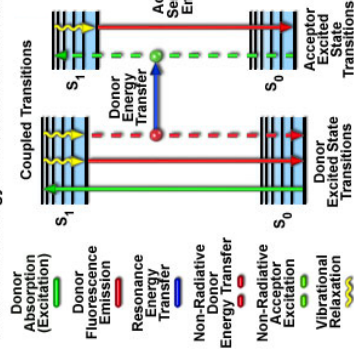
## Egyedi sejtek fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Egyetlen mitokondrium elpusztítása élő szarvasmarha epithelialis sejten

## FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

Resonance Energy Transfer Jablonski Diagram

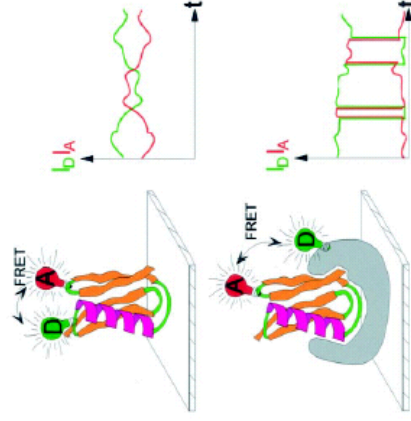


Az energiatranszfer hatásfoka:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

Ahol  $R_0$  a festékpárra jellemző állandó,  $r$  a festékek közötti távolság.

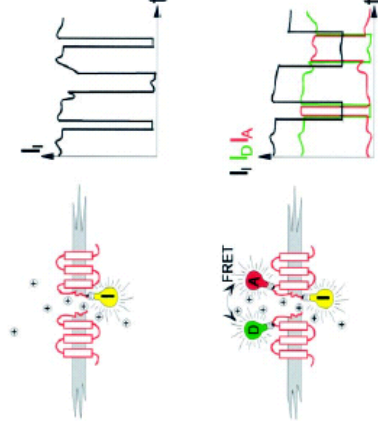
## FRET alkalmazások: távolságmérés



Molekulán belüli konformációs változások

Asszociáció és disszociáció

## Fluoreszcens indikátorok



Ioncsatorna működése a helyi ionkoncentráció mérése alapján

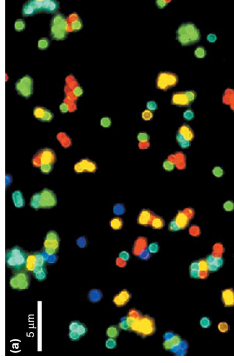
Ionkoncentráció és konformációs változások együttes mérése

## Az ideális fluorofór

- kicsi
- hidrofíli
- a látható tartományban nyel el és emittál
- nagy Stokes eltolódás
- specifikus kötődés (biotin/avidin, His-tag/Ni, antitest/antigén, NH<sub>2</sub>, SH)
- fényes (abszorpció\*fluoreszcencia határfok)
- nem, vagy lassan ég ki
- nem csinál fotokémiai reakciókat
- nem pislog

## Fluoreszcens kvantumpöttyök

(a) CdSe-ből ZnS borítással készült kvantumpöttyök fluoreszcenciamikroszkópos képe



A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emitted fluoreszcencia színét.

(b) tíz eltérő méretű, ezért elérő színben fluoreszkáló CdSe/ZnS kvantumpötty



## Fluoreszcens fehérjék

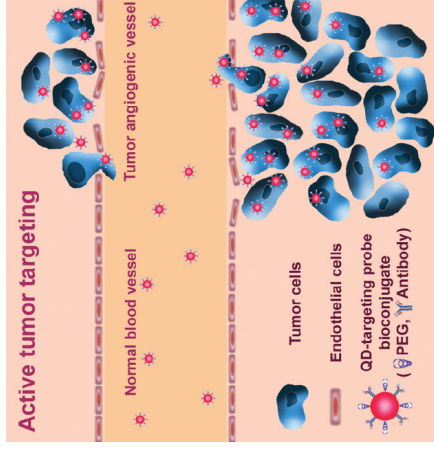


Aequorea victoria  
(medúza)



Acropora millepora  
(korall)

## Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



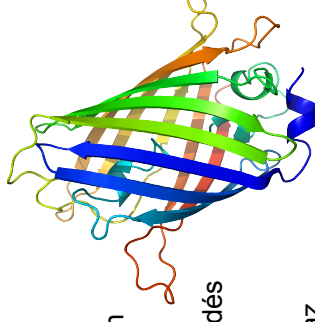
## GFP (Green Fluorescent Protein)

2008. évi kémiai Nobel díj

Osamu Shimomura – a '60 as években izolálta és elkezdte tanulmányozni

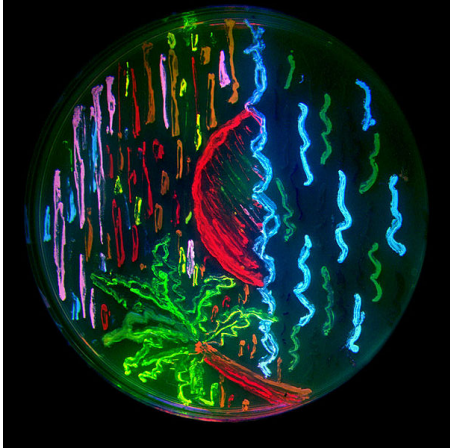
Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

Roger Y. Tsien – 1995-ben előállított az első javított változatot



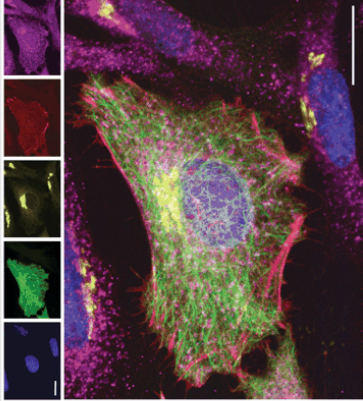
A fluoreszcens fehérjék sokfélesége

A képet teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal festették.



Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

Excitation (nm) (2 photon)	488	422	568	637
Fluorescence (nm)	505	452	640	660
Fluorophore	ODP	ODP	Ruby	Qy5
Targeting	genetic	genetic	genetic	genetic
Target	actin	actin	actin	actin
Structure	actin	actin	actin	actin



Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20 µm hosszú.