

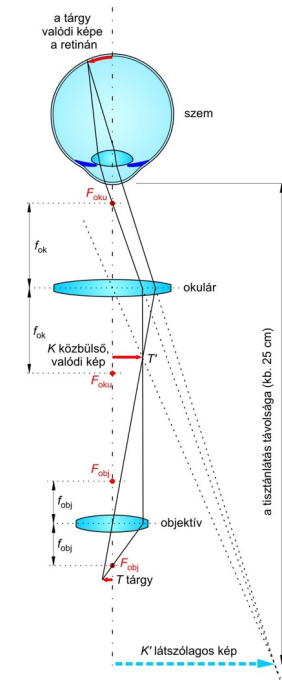
Nagyfelbontású mikroszkópos módszerek Egymolekula biofizika

Kellermayer Miklós

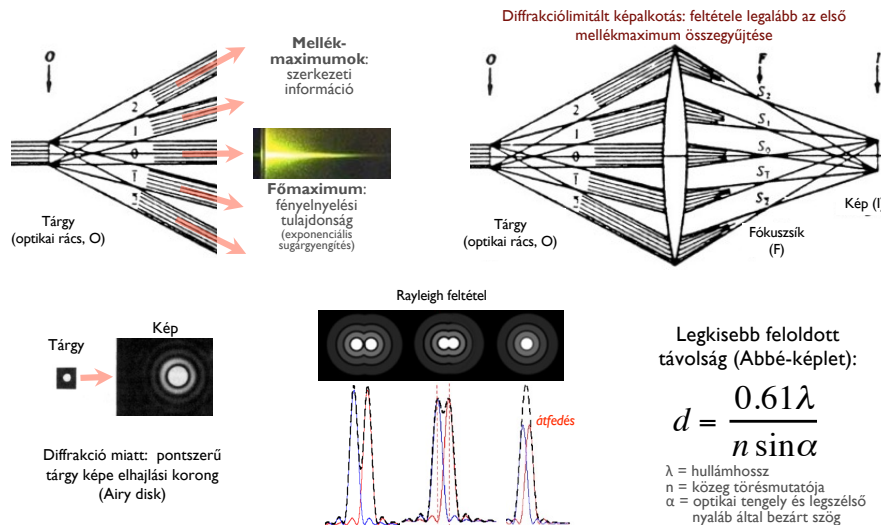
Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Képkotás az összetett fény- mikroszkópban

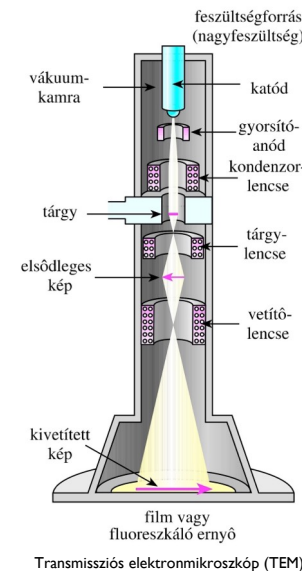
- Nagyított, fordított állású virtuális kép
- Leképezés feltétele: egy járulékos lencse (szemlencse) optikai útba helyezése



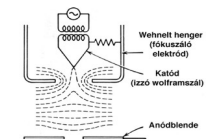
A fénymikroszkóp feloldóképességét a hullámtulajdonság korlátozza



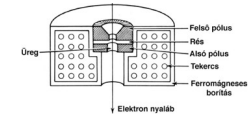
Elektronmikroszkóp



Sugárforrás:
elektronágyú



Fókuszálás:
elektronnyaláb
kitérítése
mágneslencsével



$$F = eBV_e \sin \alpha$$

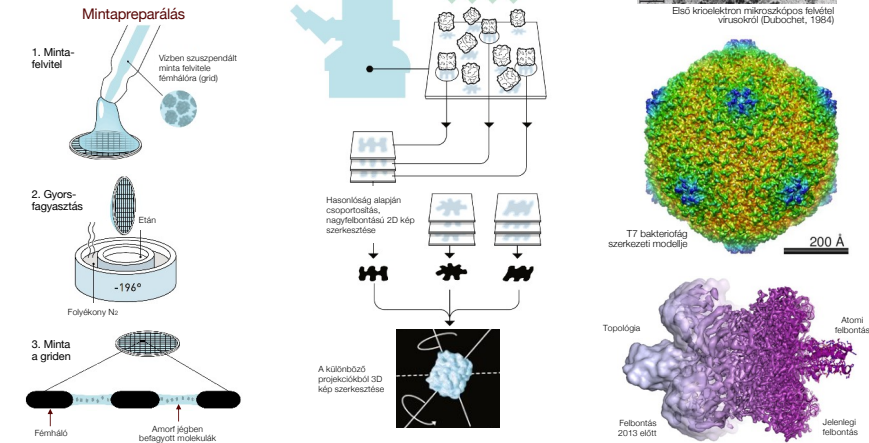
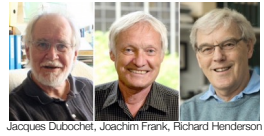
F =elektronra ható erő; e =elektron töltése;
 B =mágneses térerő; V_e =elektron sebessége; α =optikai
 tengely és a mágneses tér iránya által bezárt szög

Feloldóképesség: $d = \frac{\lambda}{\alpha}$

d =legkisebb feloldott távolság
 λ =de Broglie hullámhossz
 α =optikai tengely és a mágneses tér
 iránya által bezárt szög

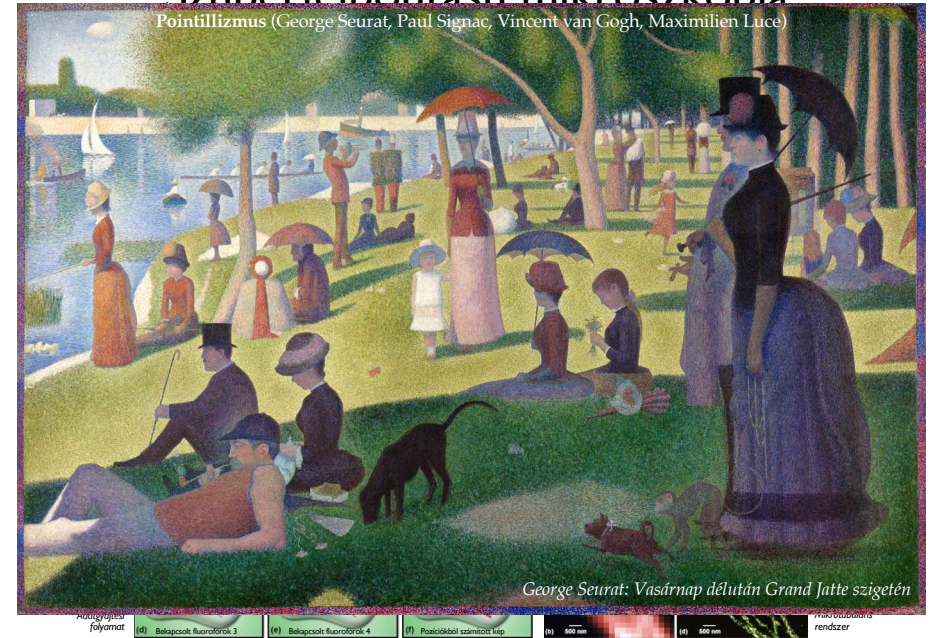
de Broglie hullámhossz alapján elméleti $d \sim 0,005 \text{ nm}$ ($\approx 5 \text{ pm}$)

Kémiai Nobel-díj 2017: Krioelektron mikroszkópia

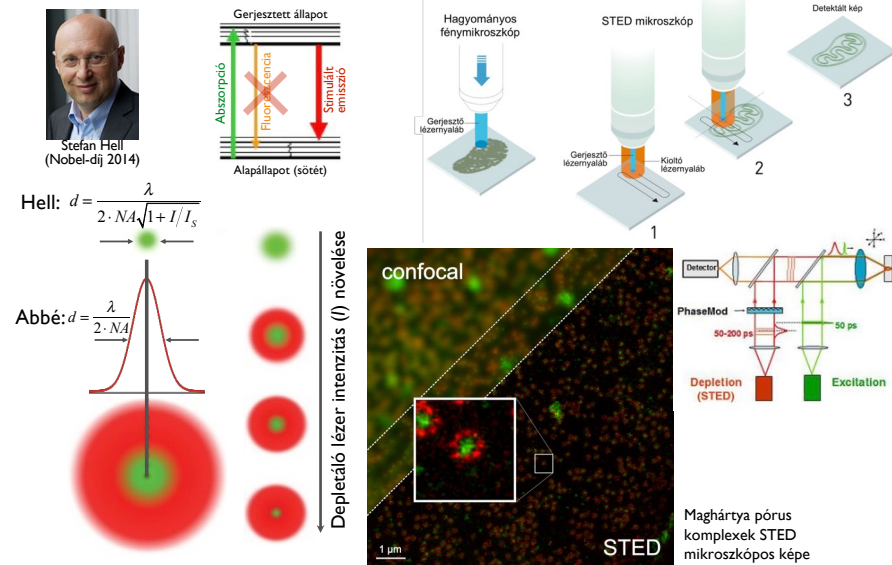


Szuperfelhontású mikroszkópia

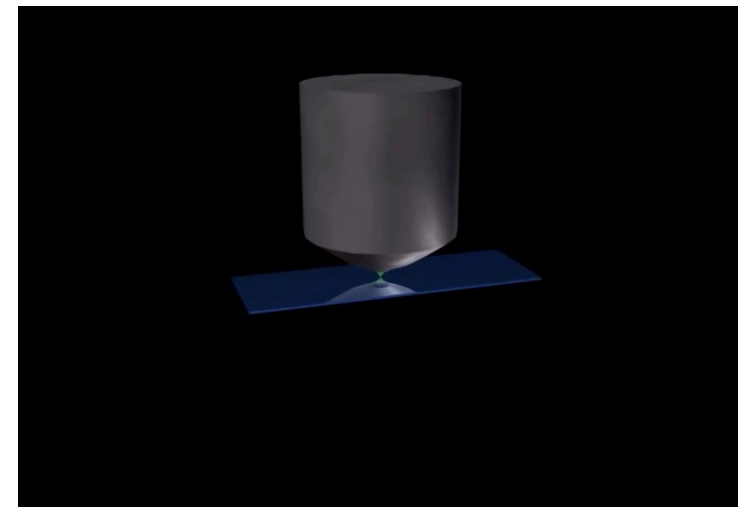
Pointillizmus (George Seurat, Paul Signac, Vincent van Gogh, Maximilien Luce)



STED mikroszkópia (STimulated Emission Depletion)



STED mikroszkópia



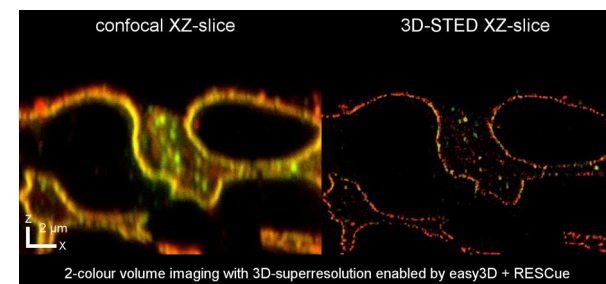
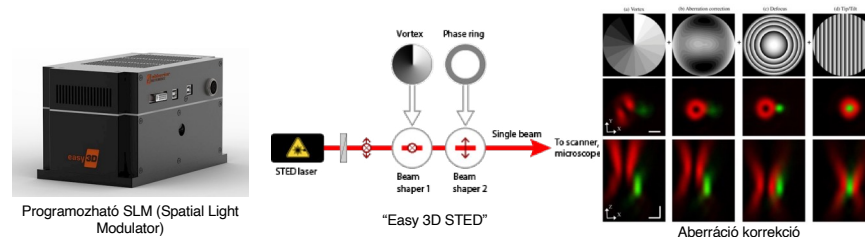
Jakub Chojnacki

RESCue STED

Probléma:
a fluorórra eső
intenzitás hatalmas
(~MW/cm²)

(Abberior Instruments)

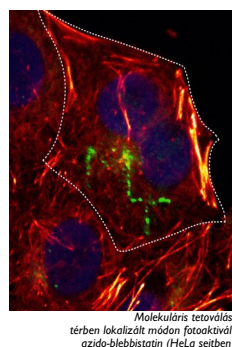
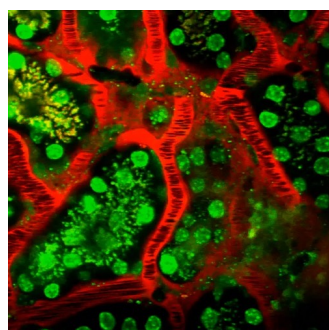
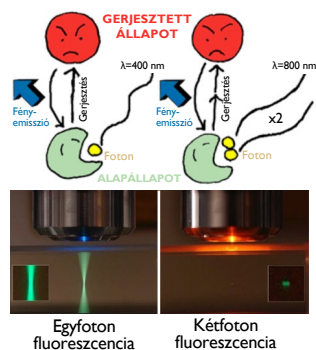
3D STED



Nephrin (vörös), Podocin (zöld) (Abberior Instruments)

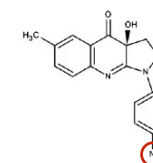
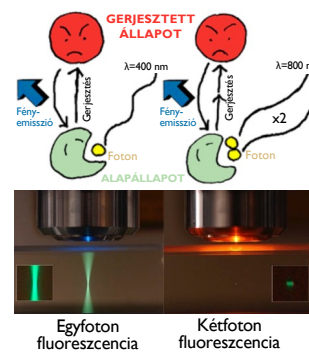
Multifoton mikroszkópia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közeli IR) hullámhosszú, rövid (fs) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm)
- Lokálisan aktivált fotokémiai reakciók lehetősége



Miozin II optofarmakológiai manipulálása

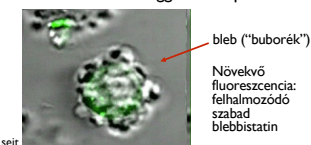
2P mikroszkópával: femtoliteres
térfogatban fotokémiai reakciót
indíthatunk



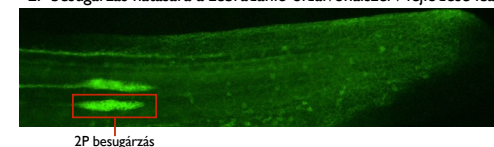
Blebbistatin:

- Miozin II specifikus inhibitor (ADP-P_i állapotban stabilizál)
- Excitáció-kontrakciót szétválasztja
- Azidált formája fényaktiválható, a szabad forma fluoreszkál

2P besugárzás hatására a miozin II-függő blebképződés leáll



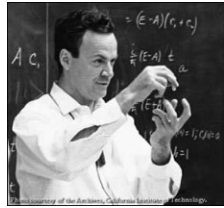
2P besugárzás hatására a zebradanio oldalvonalszerv fejlődése leáll



Képiró et al. Chem. Biol. 22, 548, 2015

Pásztázó tűszondás mikroszkópia (SPM) Atomi erőmikroszkóp (AFM)

A nanotudományok "álomműszerei"



Richard P. Feynman:
"There is plenty of room at the bottom"
1959. december 29.

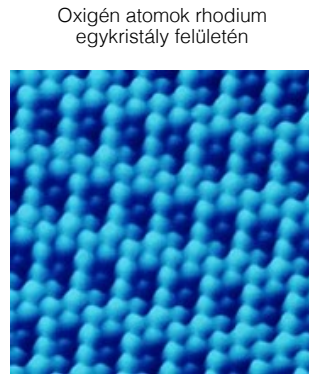


Gerd Binnig



Heinrich Rohrer

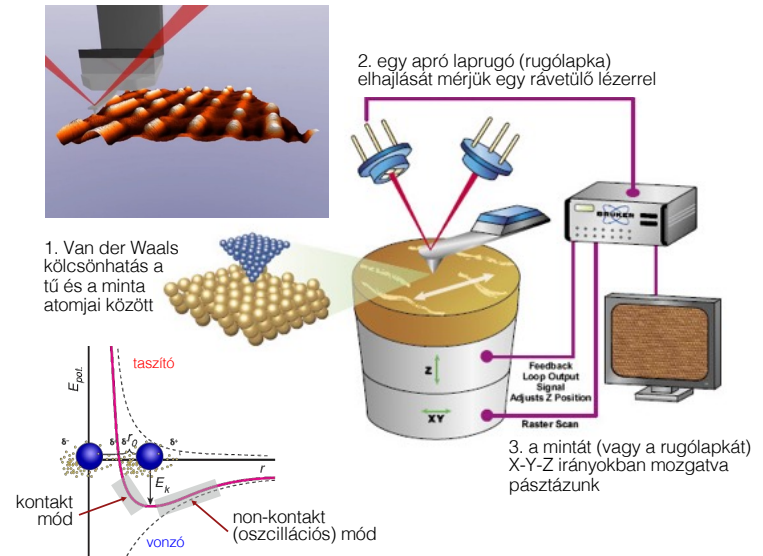
(Nobel-díj
1986)



Oxigén atomok rhodium
egy kristály felületén

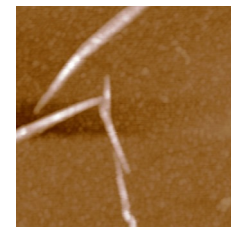
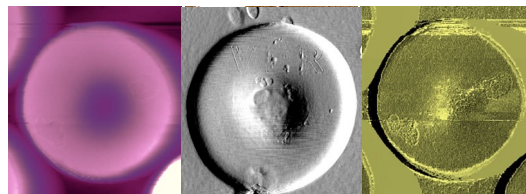
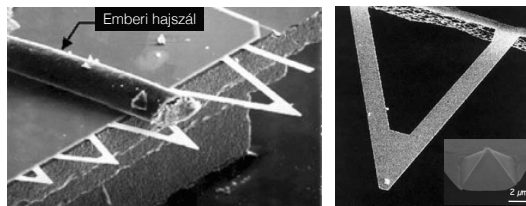
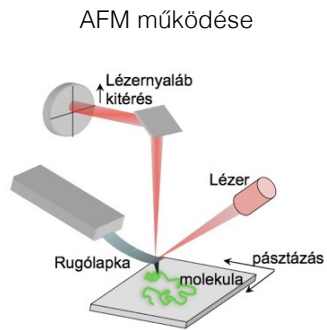
a "nanovilág" léptéke:
1 nanométer

Az atomi erőmikroszkóp (AFM)

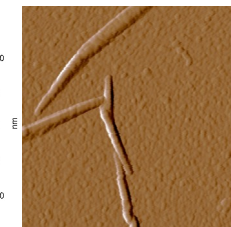


Atomi erőmikroszkóp (AFM)

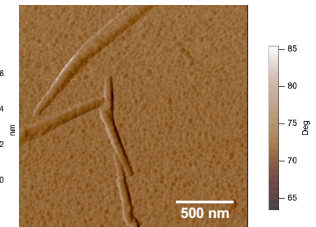
Kontrasztmechanizmusok



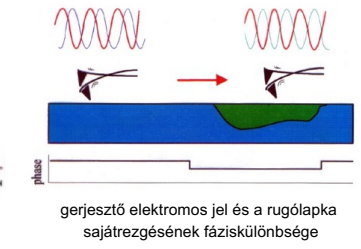
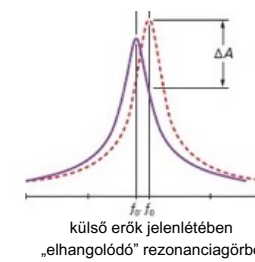
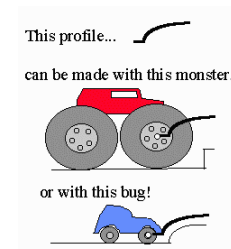
magasság kontraszt



amplitúdó kontraszt

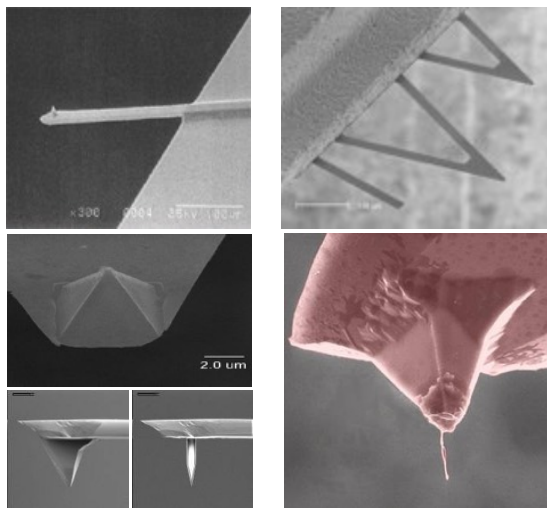


fázis kontraszt

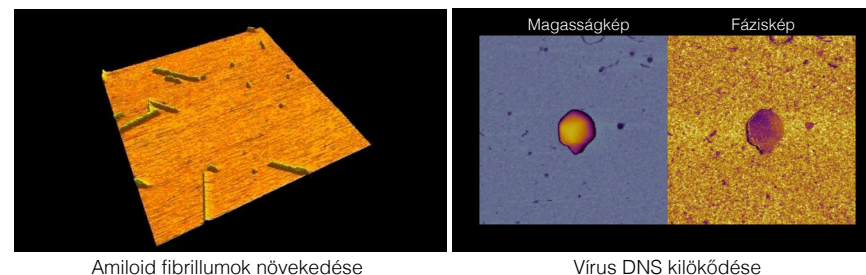
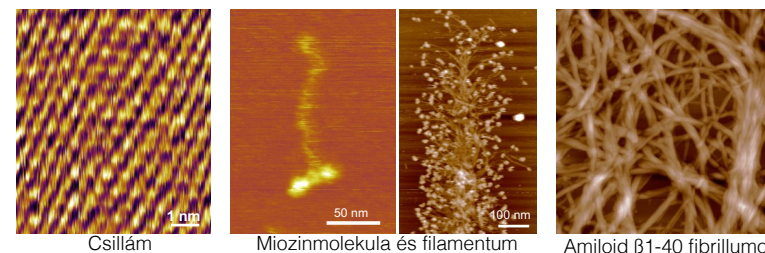


AFM Rugólapkák és tűk

Az AFM kép térbeli feloldóképességét a tű görbületi sugara határozza meg

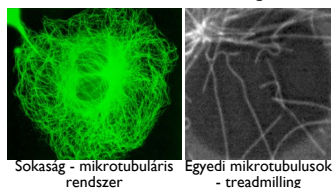


Atomok, molekulák, komplexek AFM képe

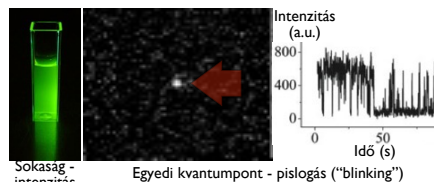


Molekulák - miért egyenként?

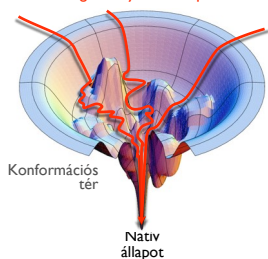
1. Egyéneket (tér- és időbeli trajektóriák) azonosíthatunk sokaságban



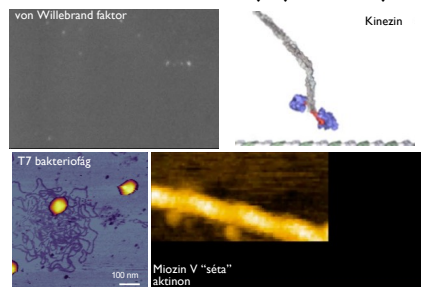
2. Sztochasztikus folyamatokat ismerhetünk meg



3. Párhuzamos útvonalakon zajló folyamatokat azonosíthatunk
Kigombolyodott állapot

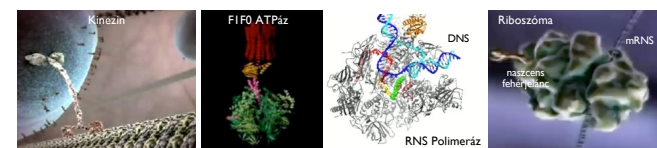


4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

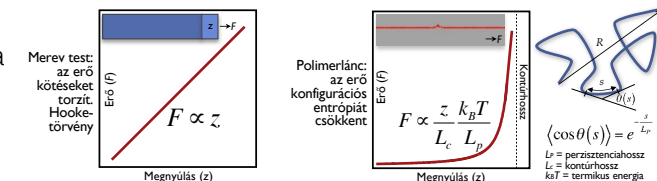


A mechanikai erő...

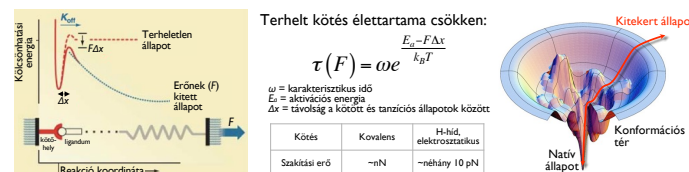
1) kifejlődik:



2) deformálja a szerkezetet:



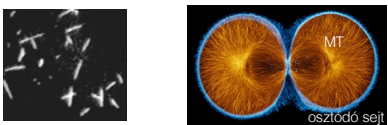
3) kötéseket szakít fel:



A polimerlánc egyensúlyi alakja és rugalmassága összefügg

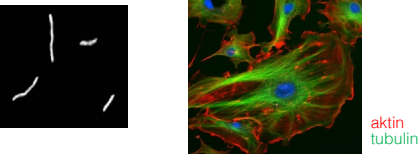
Merev lánc
 $l_p \gg L$

Mikrotubulus



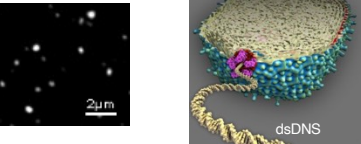
Szemiflexibilis lánc
 $l_p \approx L$

Mikrofilamentum



Flexibilis lánc
 $l_p \ll L$

DNS

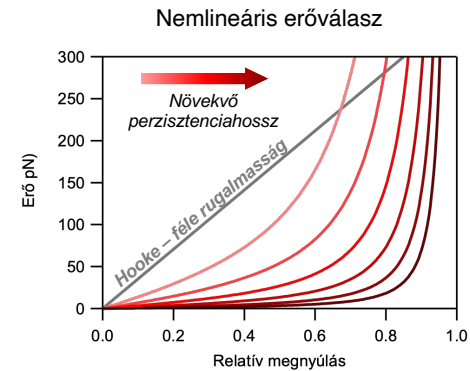


l_p = perzisztenciahossz
 L = kontúrhossz

A polimerlánc erővel kinyújtható

$$F \propto \frac{R}{L} \frac{k_B T}{l_p}$$

F = erő
 l_p = perzisztenciahossz
 k_B = Boltzmann állandó
 T = abszolút hőmérséklet
 L = kontúrhossz
 R = vég-vég hossz
 R/L = relatív megnyúlás



Gough-Joule effektus



Egyedi molekulák manipulálása

Laprugó módszerek:

(a) pulled glass micropipette

(b) microfabricated silicon cantilever

(c) laser beam deflection

Δx

reference beam

pedestal

cantilever bending = F/k

Δz

Mező alapú módszerek:

(d) photon field (optical tweezers)

latex bead

moveable micropipette

(e) flow field (Stokes drag)

(f) magnetic field (magnetic tweezers)

magnetic bead

Különleges mikroszkóp alkalmazás: lézercsipesz

Einstein: tömeg-energia ekvivalencia
 $E = mc^2$

Planck: sugárzási törvény
 $E = hf$

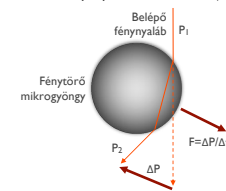
Maxwell: fény terjedési sebessége
 $c = \lambda f$



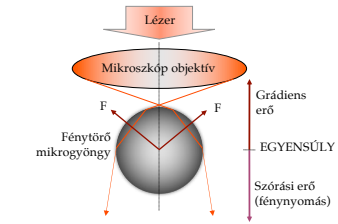
$$mc^2 = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

A foton impulzusa: $P = \frac{h}{\lambda}$

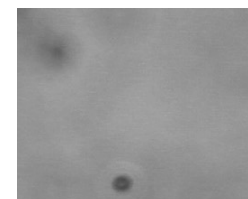
A refrakció fényimpulzus-változással (ΔP) jár:



Fénytörő részecskék "optikai erőkkel" megfoghatók:



Az optikai csipeszben a fotonok és a fénytörő részecske között **impulzuscsere** lép fel



3 μm átmérőjű latex (polisztiról) mikrogöngyök optikai csipeszben

Biomolekula manipulálás fénnel



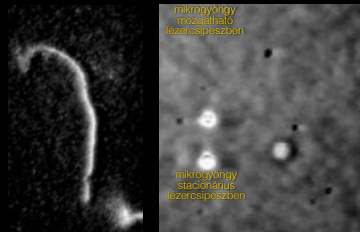
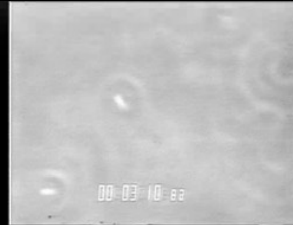
E. coli baktériumsejt

Aktin filamentum

Fáziskontraszt kép

DNS

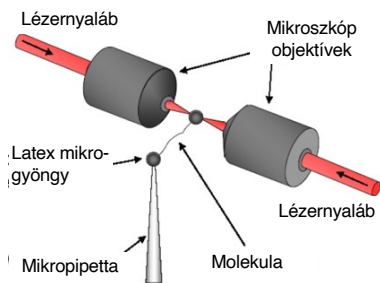
Fluoreszcencia kép



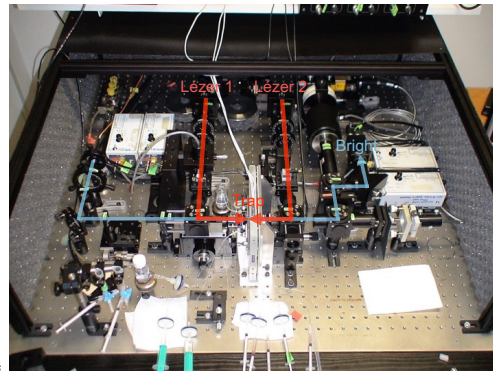
mikrogyöngy ~ 1 μ m

molekula ~ 10 nm

A lézercsipessel erőt is lehet mérni



Két lézersugaras optikai csipesz berendezés

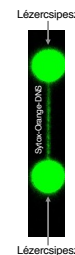
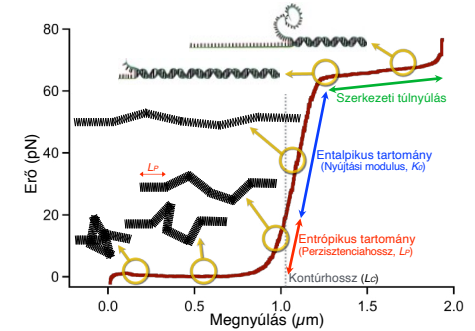
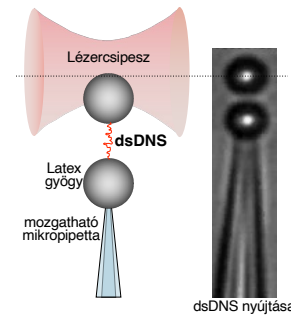


Erőkalibráció

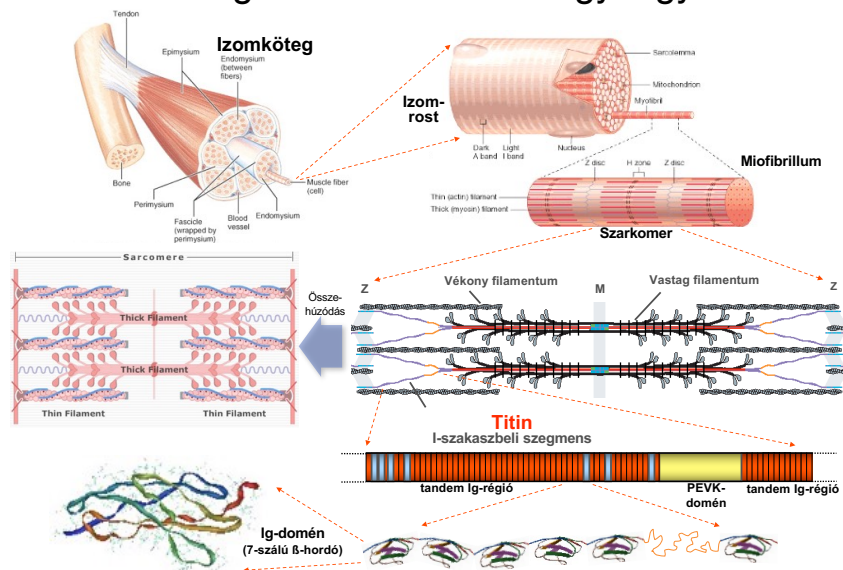
- Fényimpulzus-változás közvetlen megmérése
- Ismert erővel való kalibrálás (Stokes erő)
- Ekvipartíció tétele

MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

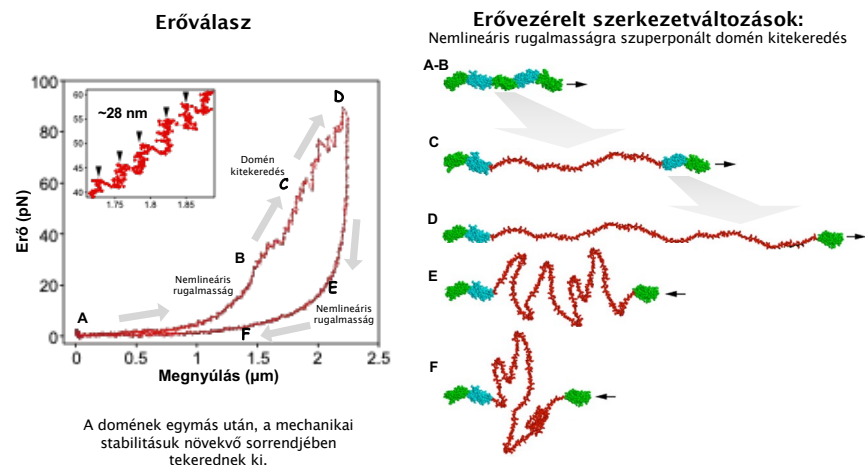
dsDNS mechanikai túlnyújtása



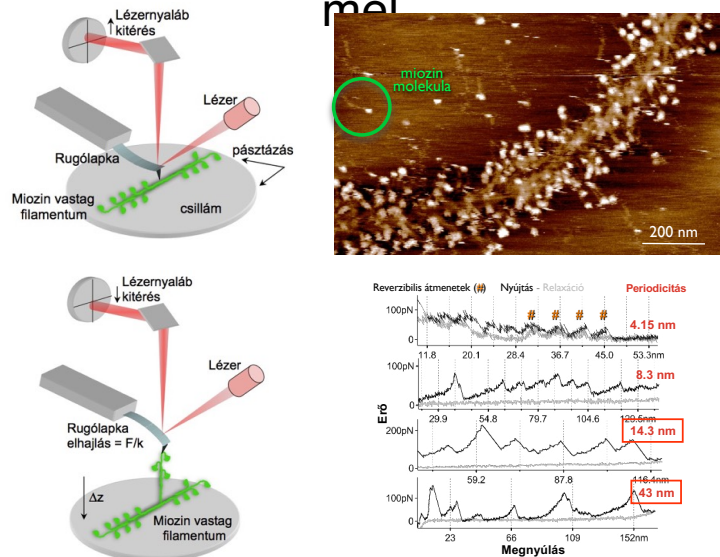
Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfűzér”



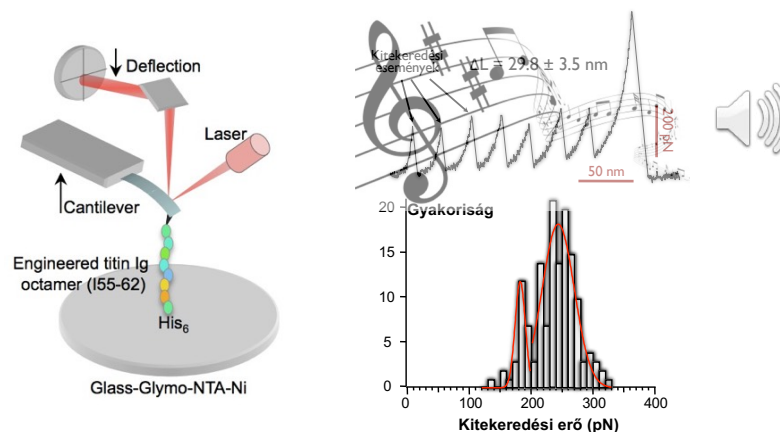
Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesszel



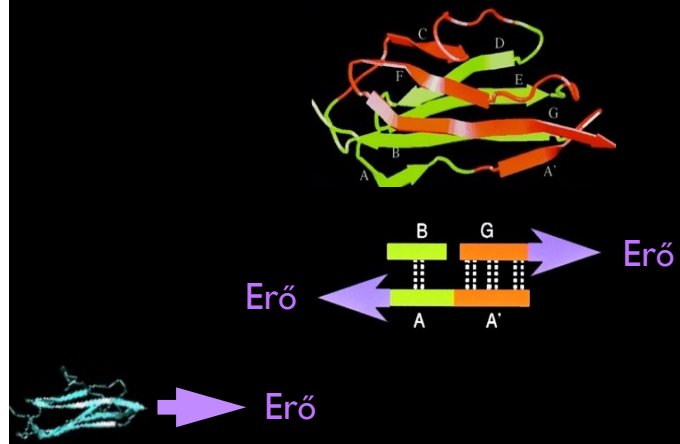
Molekulamanipulálás AFM-mel



Rekombináns titin fragmentum (Titin I55-62) nanomechanikája



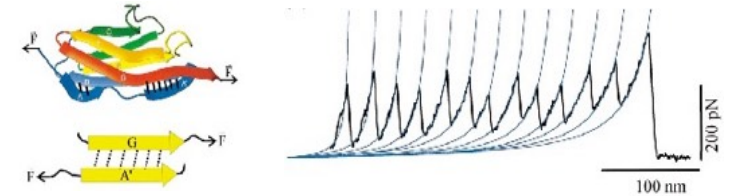
A titin doméneket párhuzamosan csatolt H-hidak stabilizálják



A mechanikai stabilitás biológiai logikája

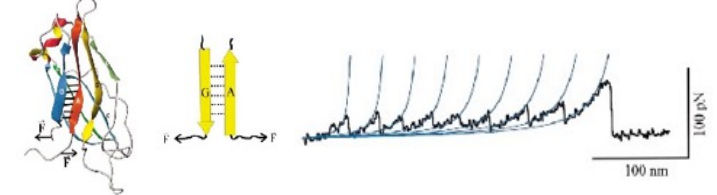
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kiterjedési erő



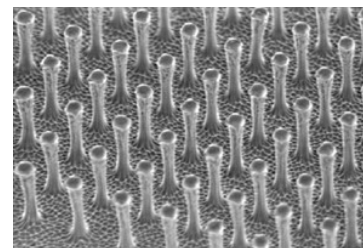
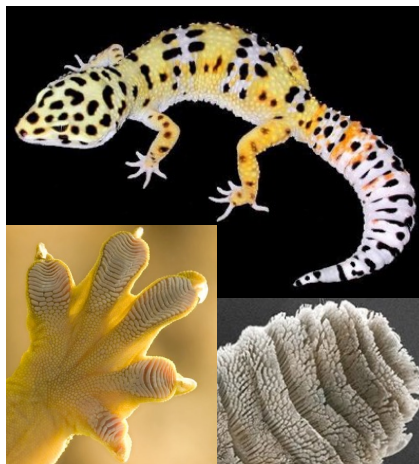
Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kiterjedési erő



Makroszkópikus mechanikai stabilitás

Effektív ragasztóanyag a párhuzamos csatolás elvén



Mesterséges gecko talp
Nanotechnológiával készítve

Gecko talp felületi tapadása:
Párhuzamosan csatolt Van
der Waals kötések a serték
és a felület között