

Nagyfelbontású mikroszkópos módszerek

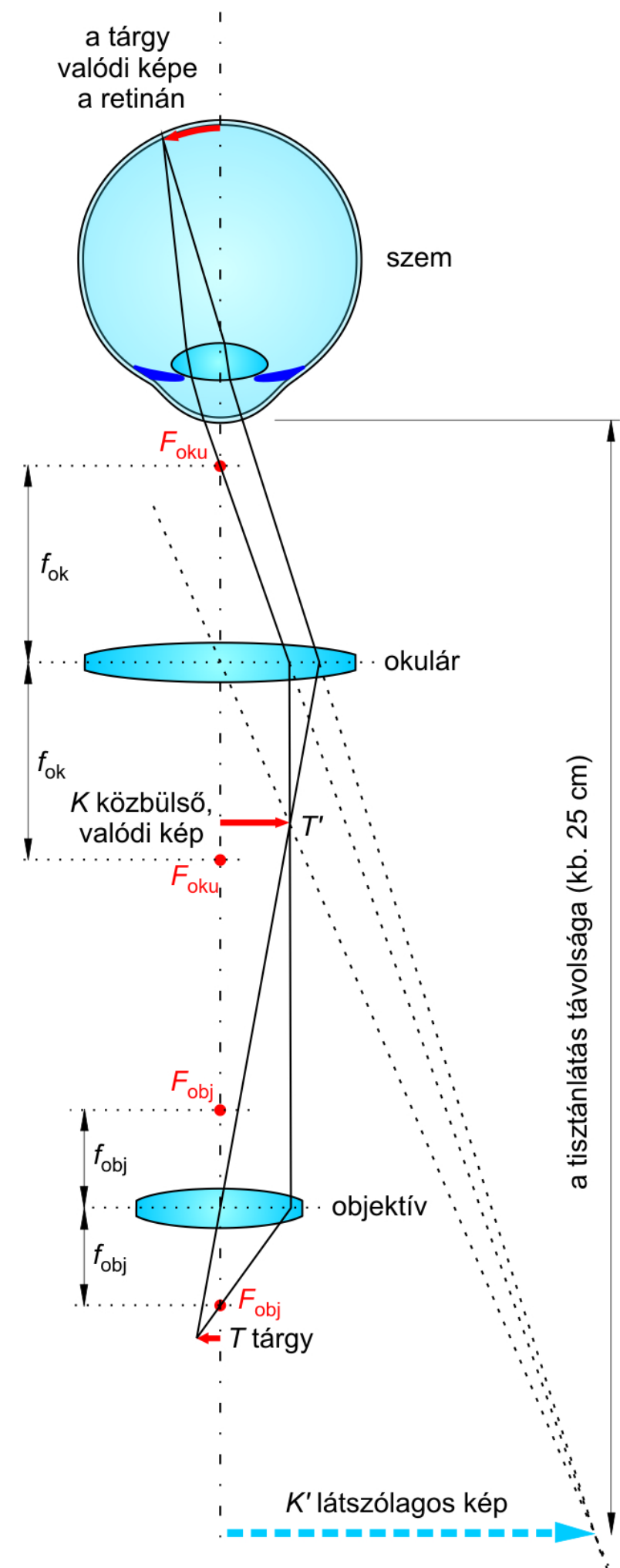
Egymolekula biofizika

Kellermayer Miklós

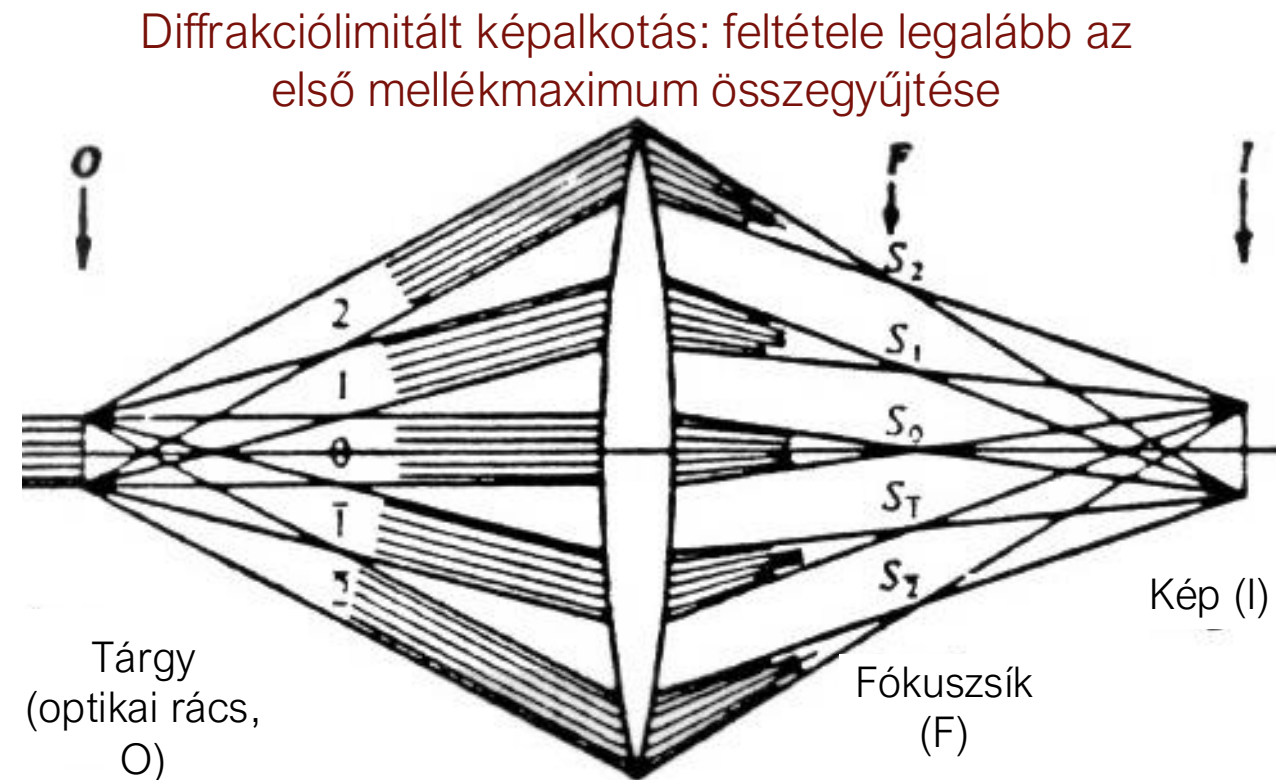
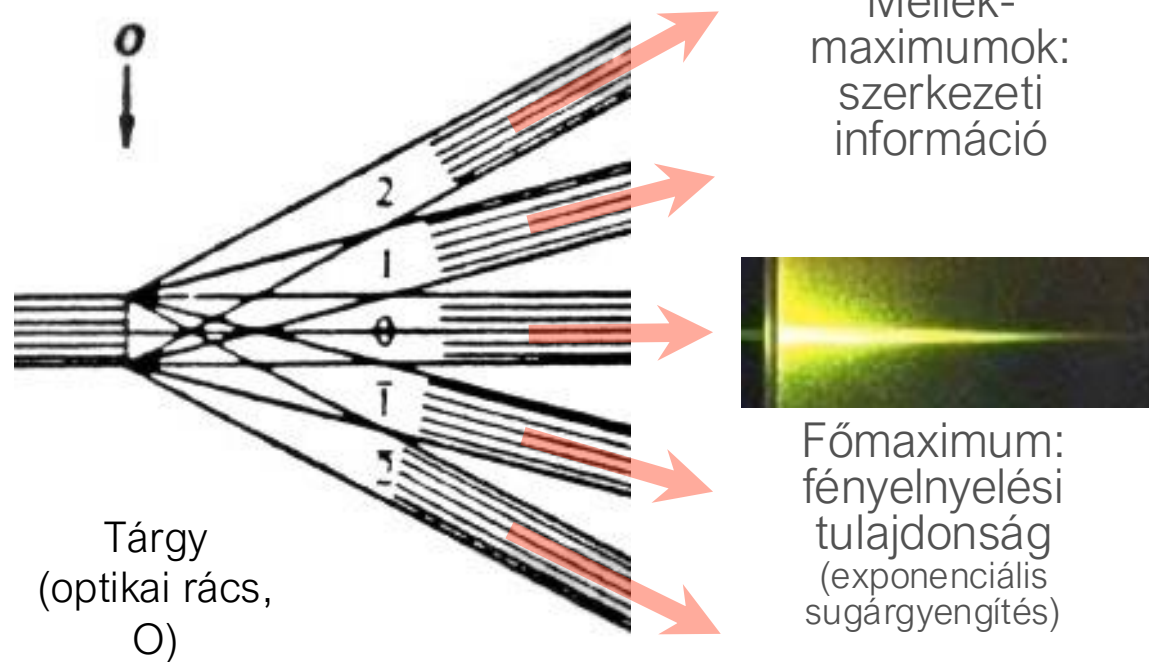
Semmelweis Egyetem
Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Képzalkotás az összetett fény-mikroszkópban

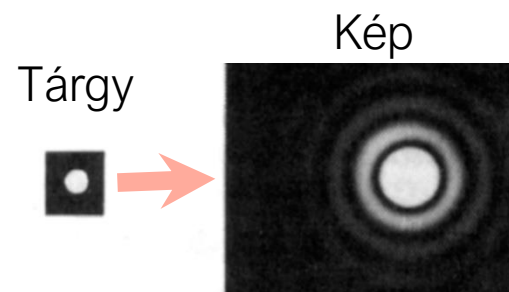
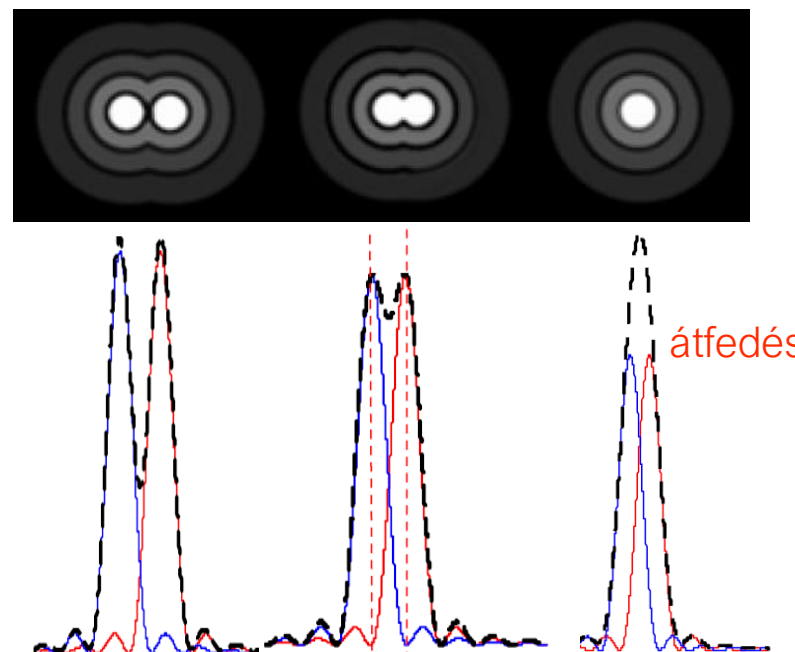
- Nagyított, fordított állású virtuális kép
- Leképezés feltétele: egy járulékos lencse (szemlencse) optikai útba helyezése



A fénymikroszkóp feloldóképeségét a hullámtulajdonság korlátozza



Rayleigh feltétel



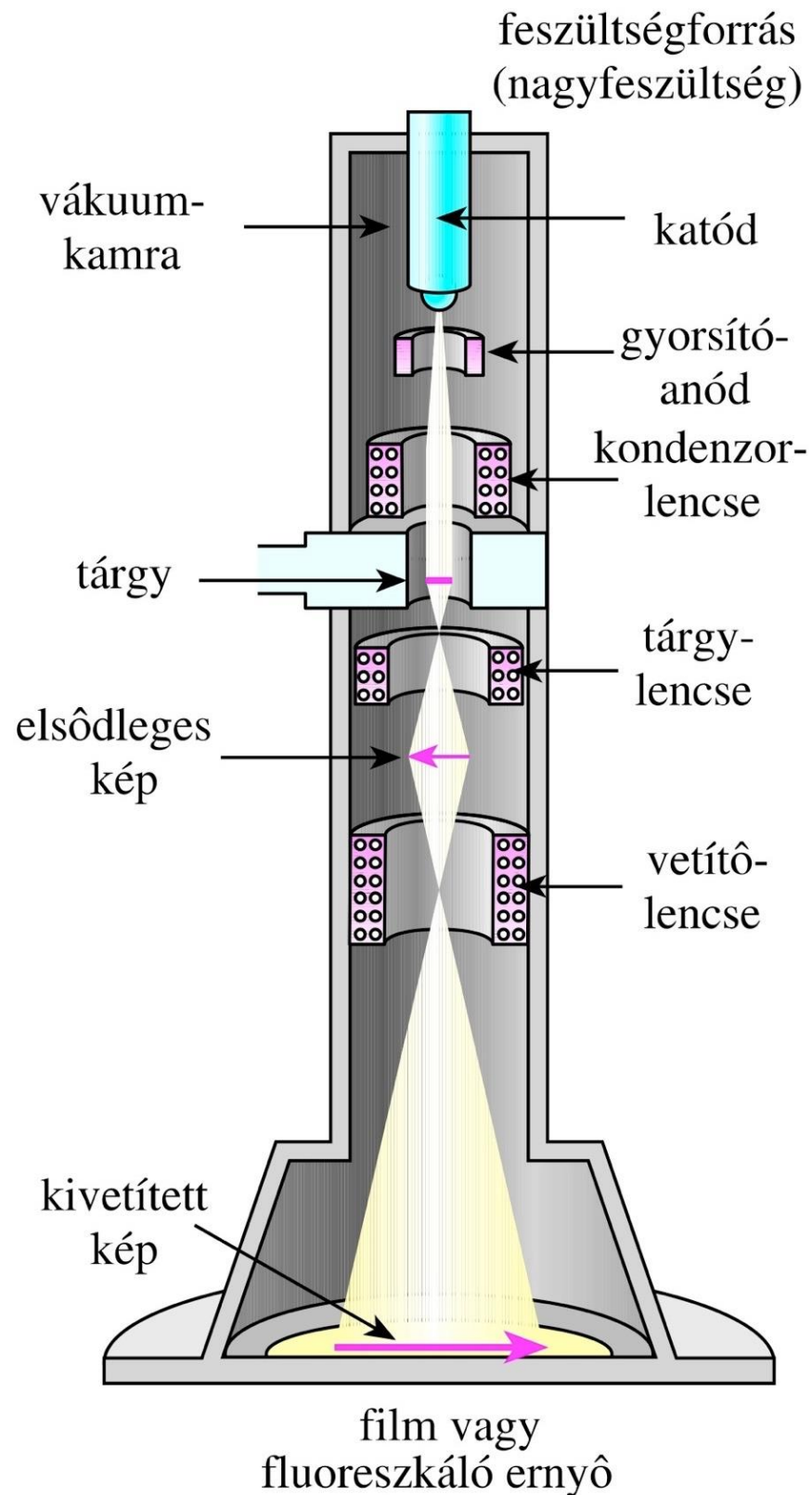
Diffrakció miatt: pontszerű tárgy képe elhajlási korong (Airy disk)

Legkisebb feloldott távolság (Abbé-képlet):

$$d = \frac{0.61\lambda}{n \sin\alpha}$$

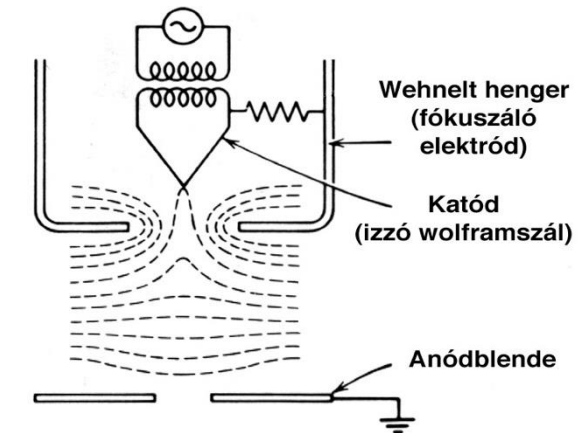
λ = hullámhossz
 n = közeg törésmutatója
 α = optikai tengely és legszélső nyaláb által bezárt szög

Elektronmikroszkóp



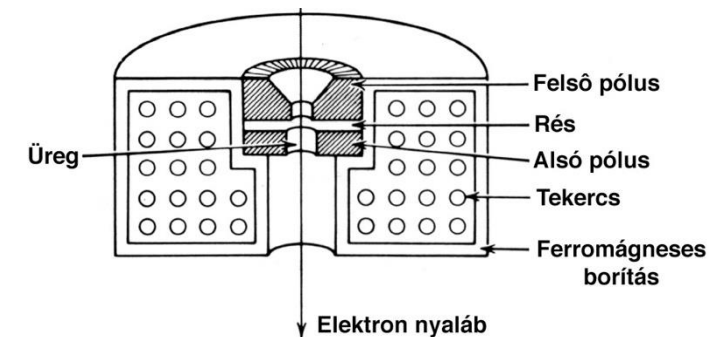
Transmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

Sugárforrás:
elektronágyú



Ernst Ruska
(Nobel-díj 1986)

Fókuszálás:
elektronnyaláb
kitérítése
mágnestlencsével



$$F = eBV_e \sin \alpha$$

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 $d \sim 0,005 \text{ nm}$ (=5 pm)

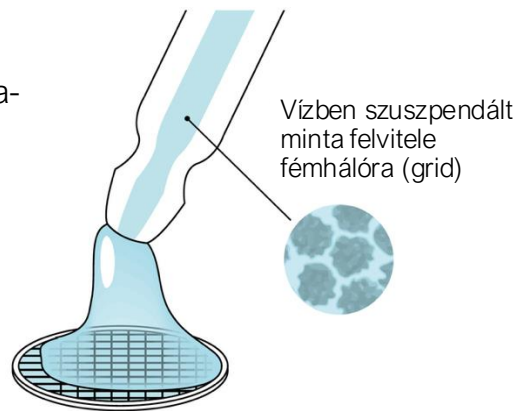
Kémiai Nobel-díj 2017: Krioelektron mikroszkópia



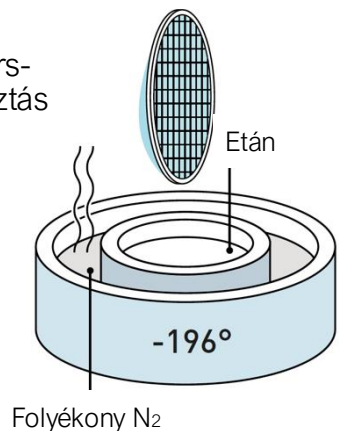
Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson

Mintapreparálás

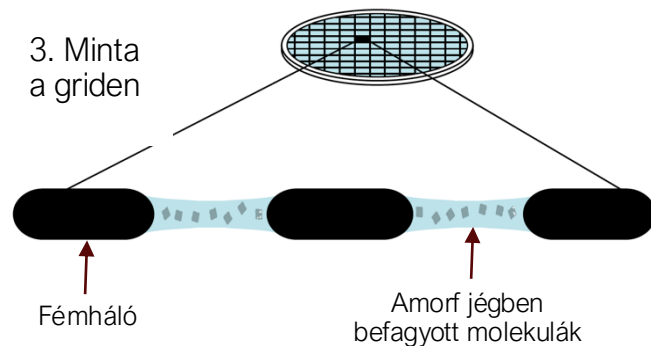
1. Minta-felvétel



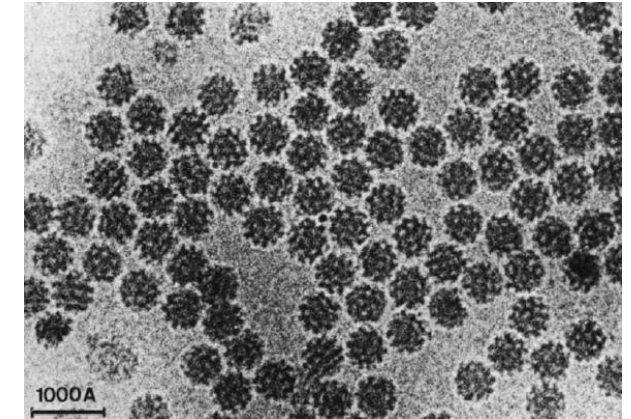
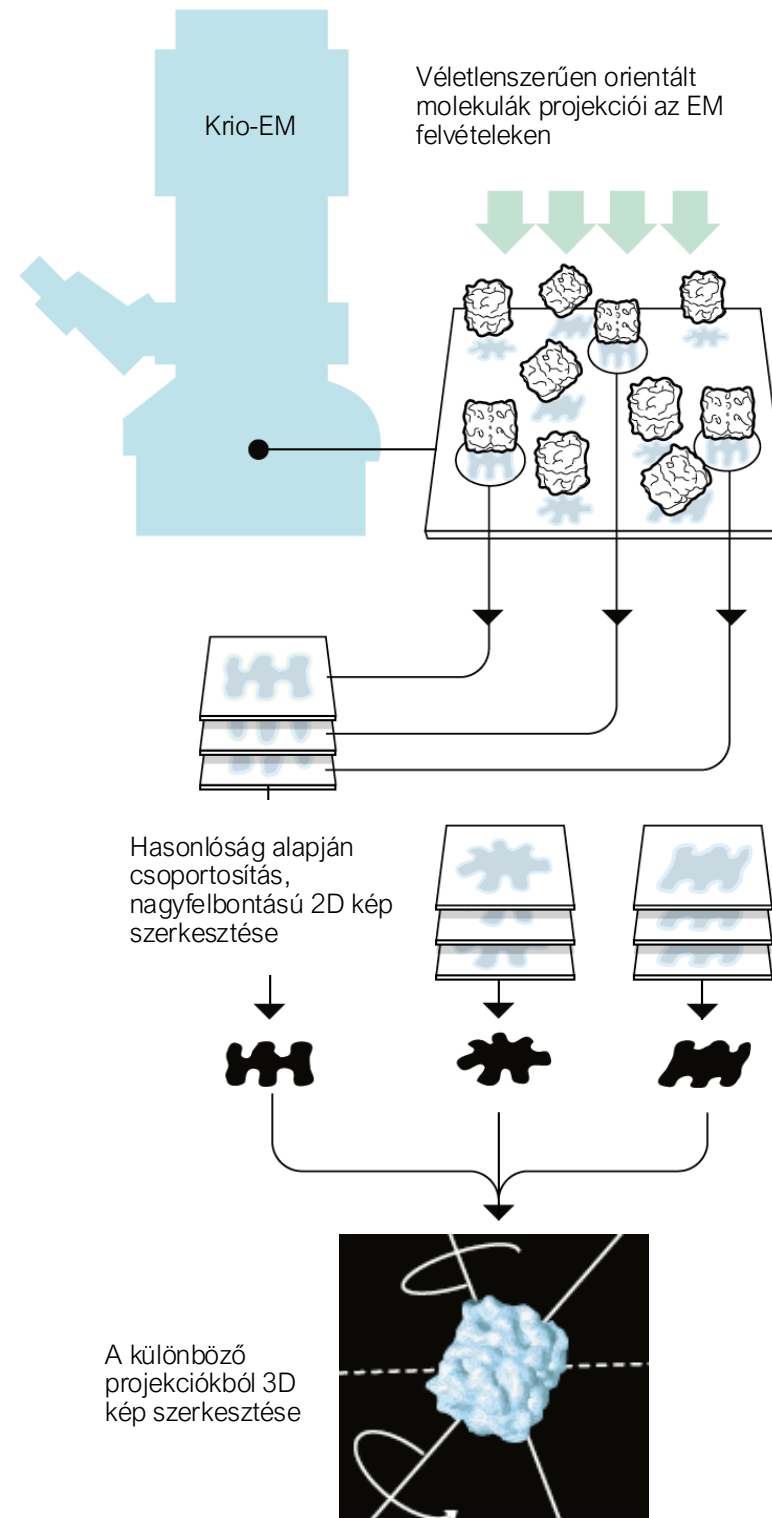
2. Gyors-fagyasztás



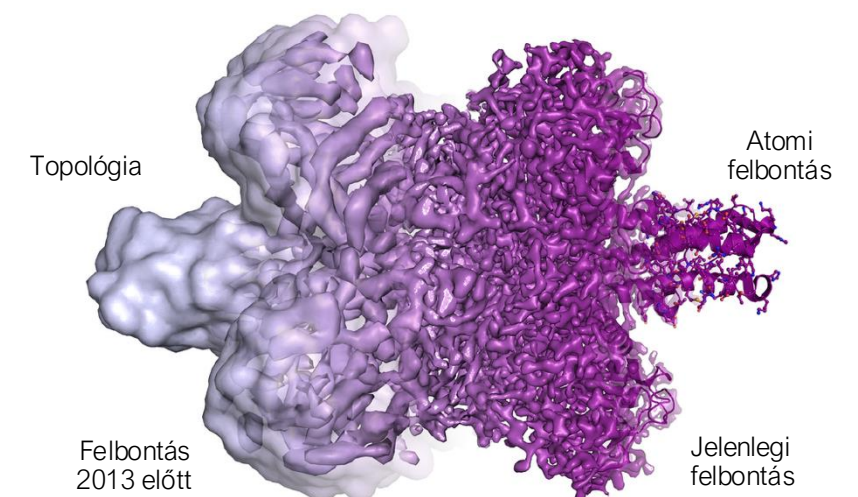
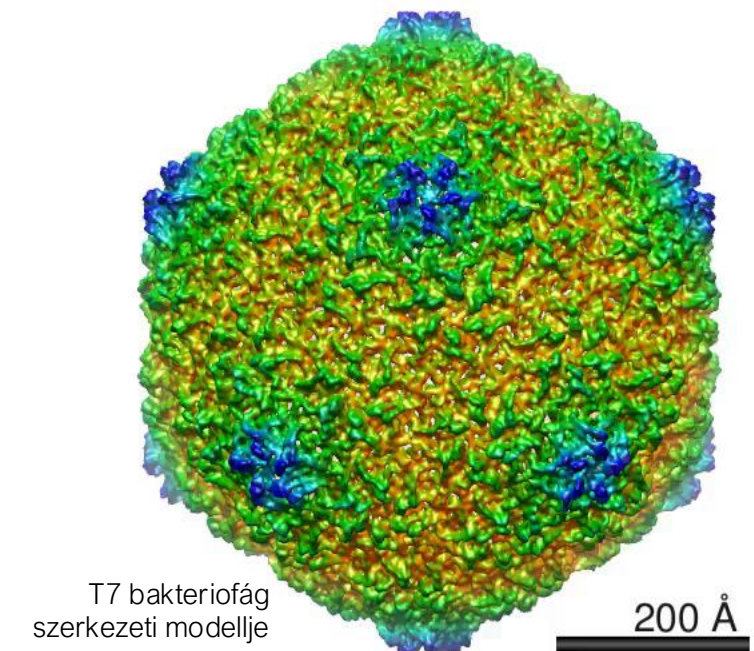
3. Minta a griden



Krio-EM felvétel és képrekonstrukció



Első krioelektron mikroszkópos felvétel vírusokról (Dubochet, 1984)



Szűrőfelbontású mikroszkópia

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



George Seurat: Vasárnap délután Grand Jatte szigetén

Adatgyűjtési
folyamat

(d) Bekapcsolt fluorofórok 3

(e) Bekapcsolt fluorofórok 4

(f) Pozíciókból számított kép

(b) 500 nm

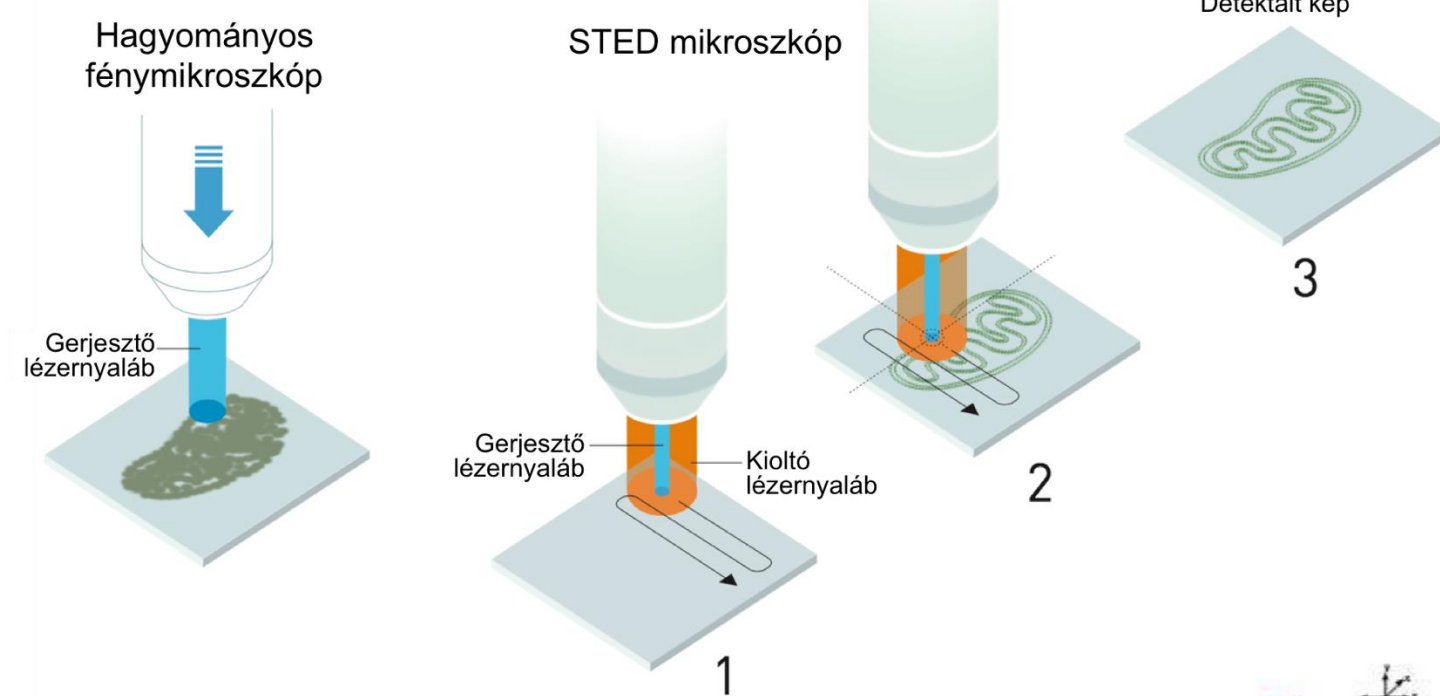
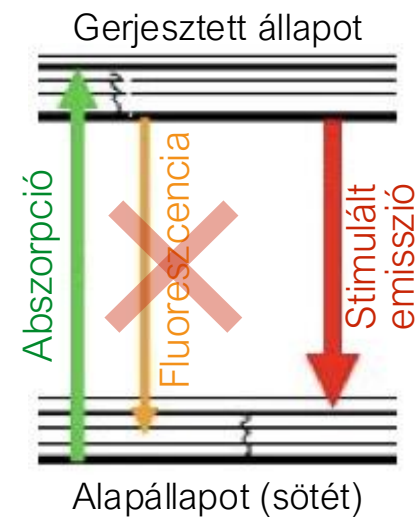
(d) 500 nm

Mikrotubuláris
rendszer

STED mikroszkópia (STimulated Emission Depletion)



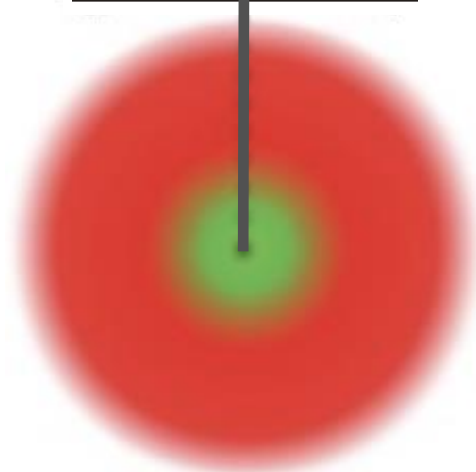
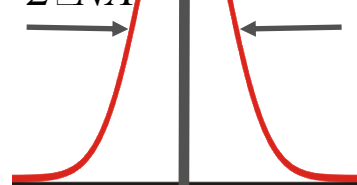
Stefan Hell
(Nobel-díj 2014)



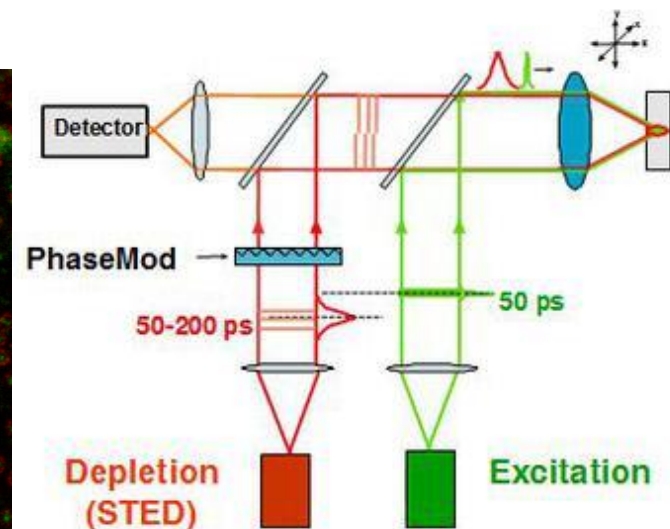
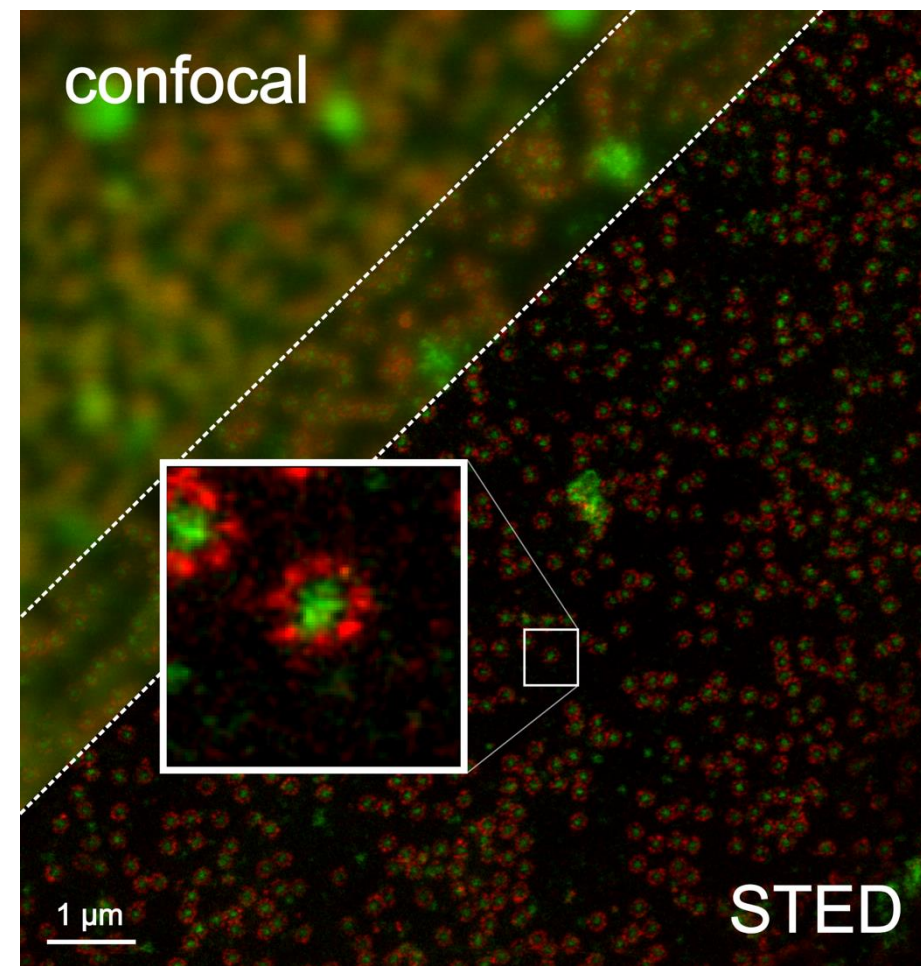
Hell: $d = \frac{\lambda}{2 \text{NA} \sqrt{1 + I/I_s}}$



Abbé: $d = \frac{\lambda}{2 \text{NA}}$

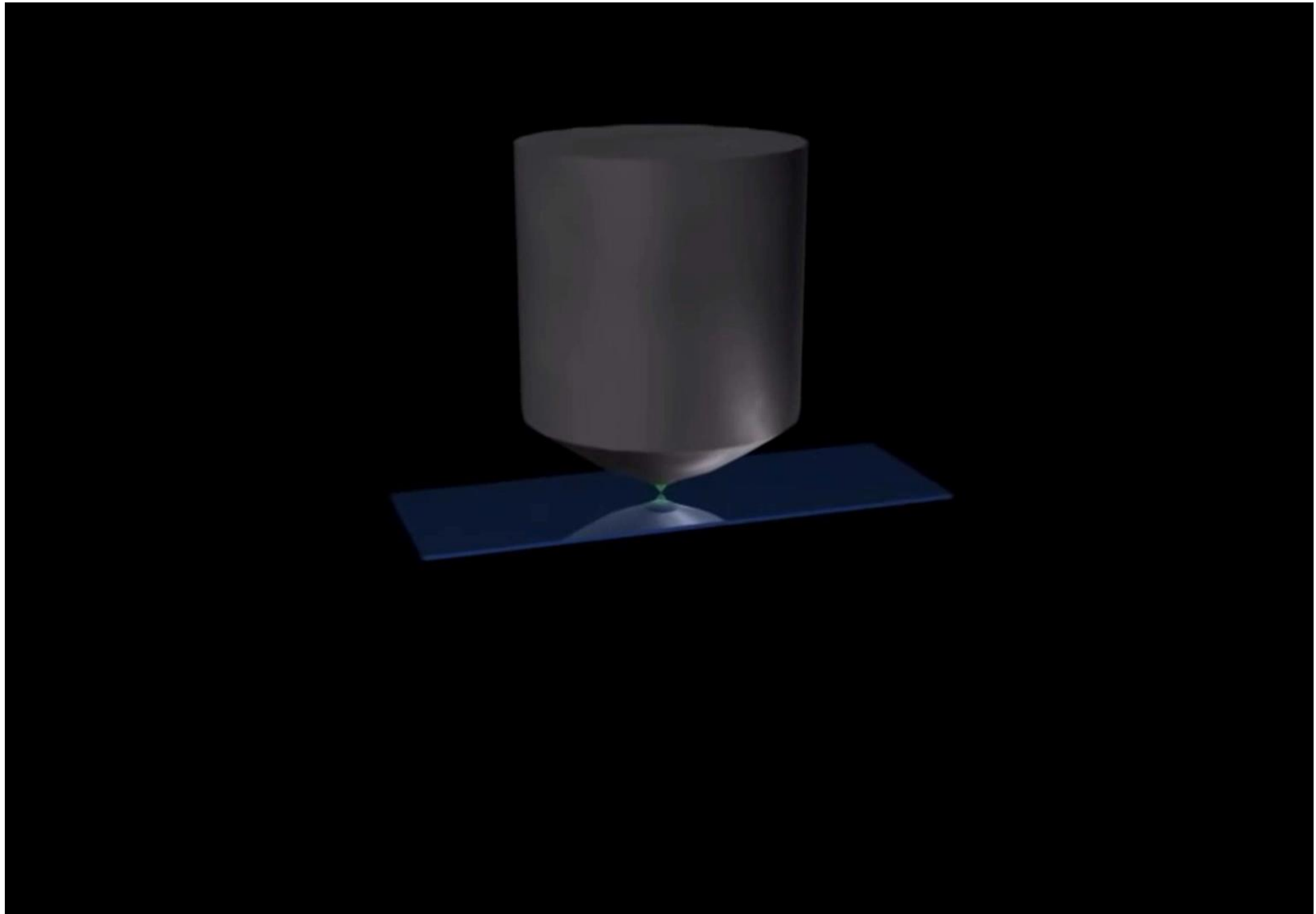


Depletáló lézer intenzitás (I) növelése



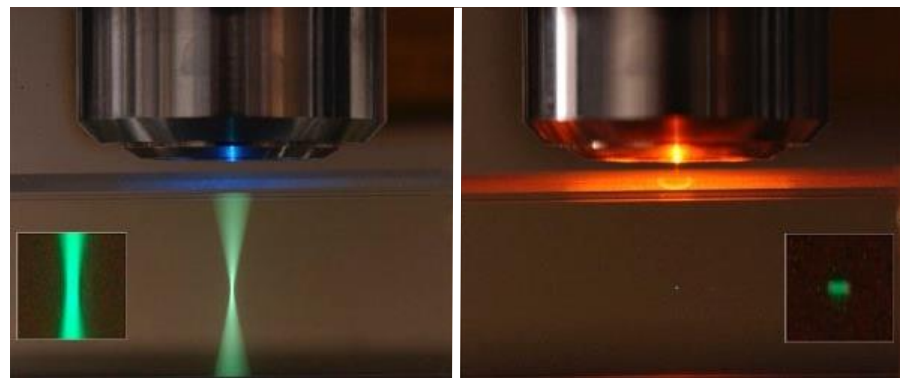
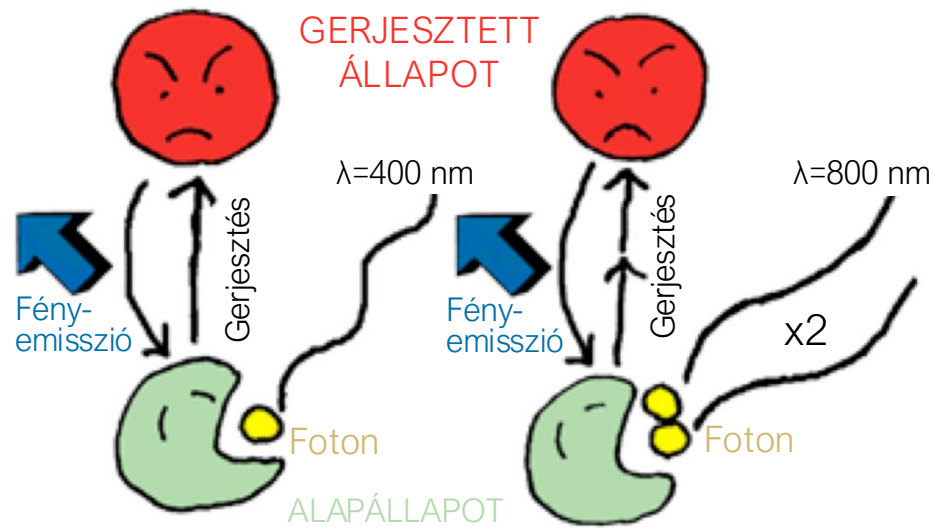
Maghártya pórus
komplexek STED
mikroszkópos képe

STED mikroszkópia



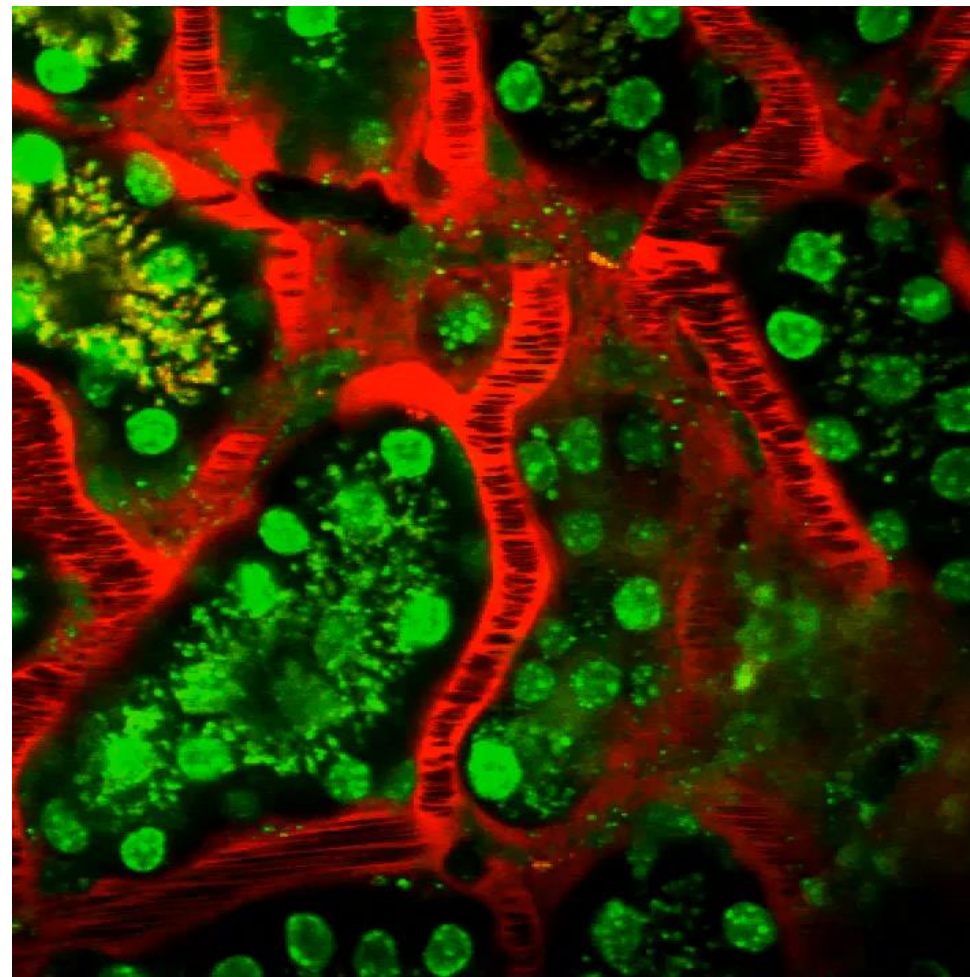
Multifoton mikroszkópia

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

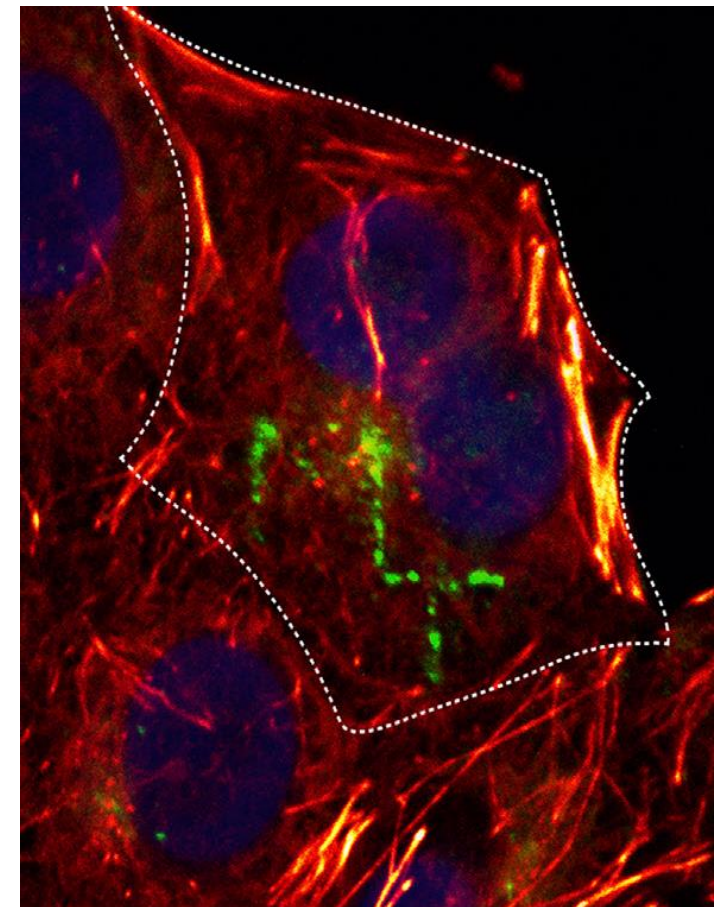


Egyfoton
fluoreszcencia

Kétfoton
fluoreszcencia



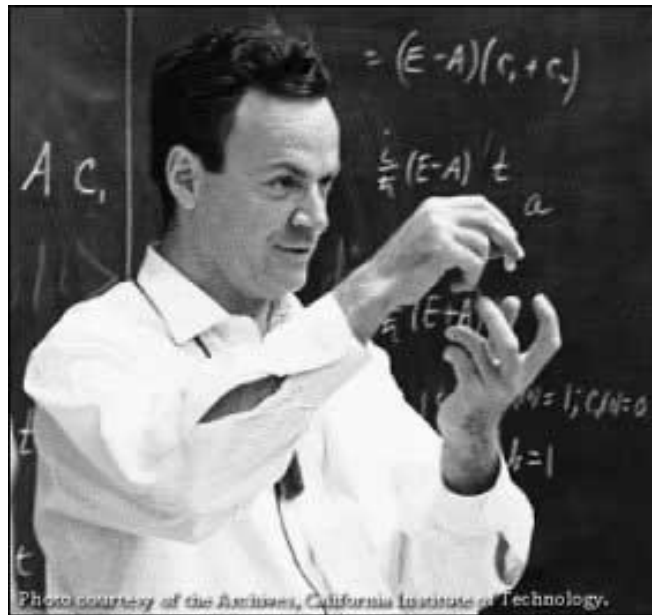
Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)



Molekuláris tetoválás:
térben lokalizált módon fotoaktivált
azido-blebbistatin (HeLa sejtben)

Pásztázó tűszondás mikroszkópia (SPM) Atomi erőmikroszkóp (AFM)

A nanotudományok "álomműszerei"



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



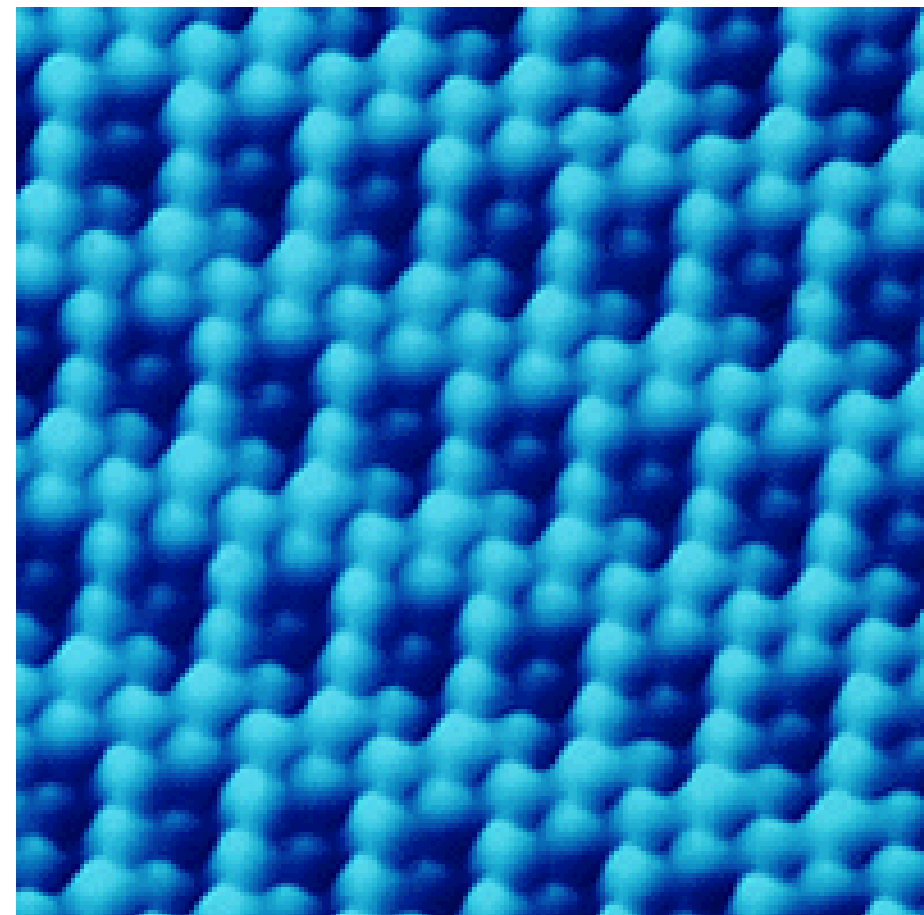
Gerd Binnig



Heinrich Rohrer

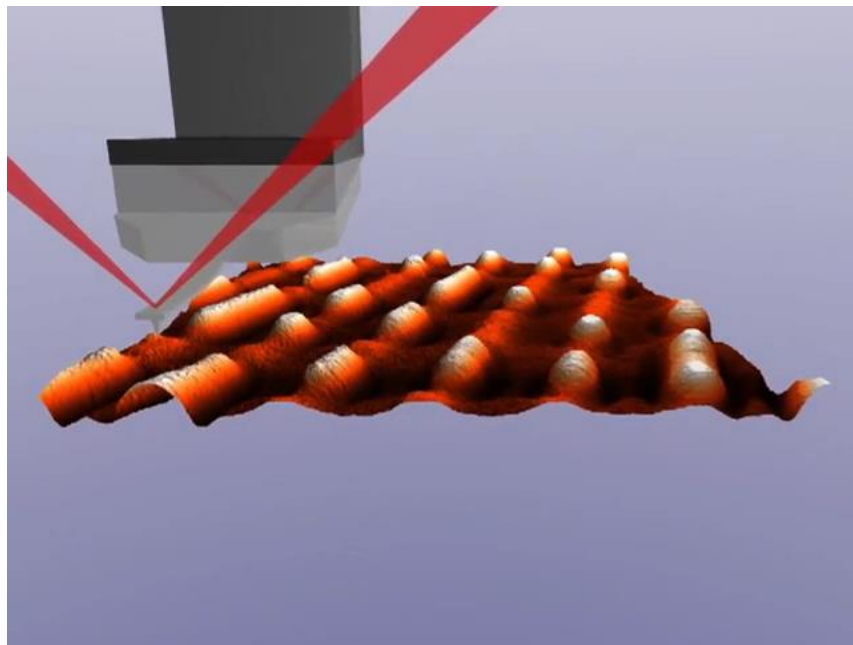
(Nobel-díj
1986)

Oxigén atomok rhodium
egy kristály felületén

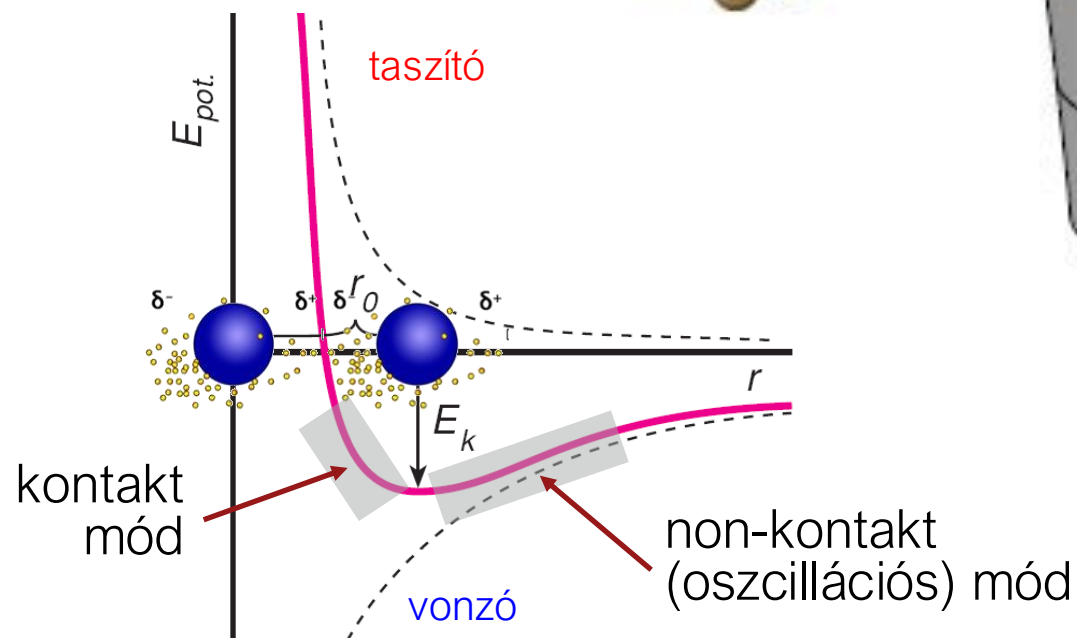


↔
a "nanovilág" léptéke:
1 nanométer

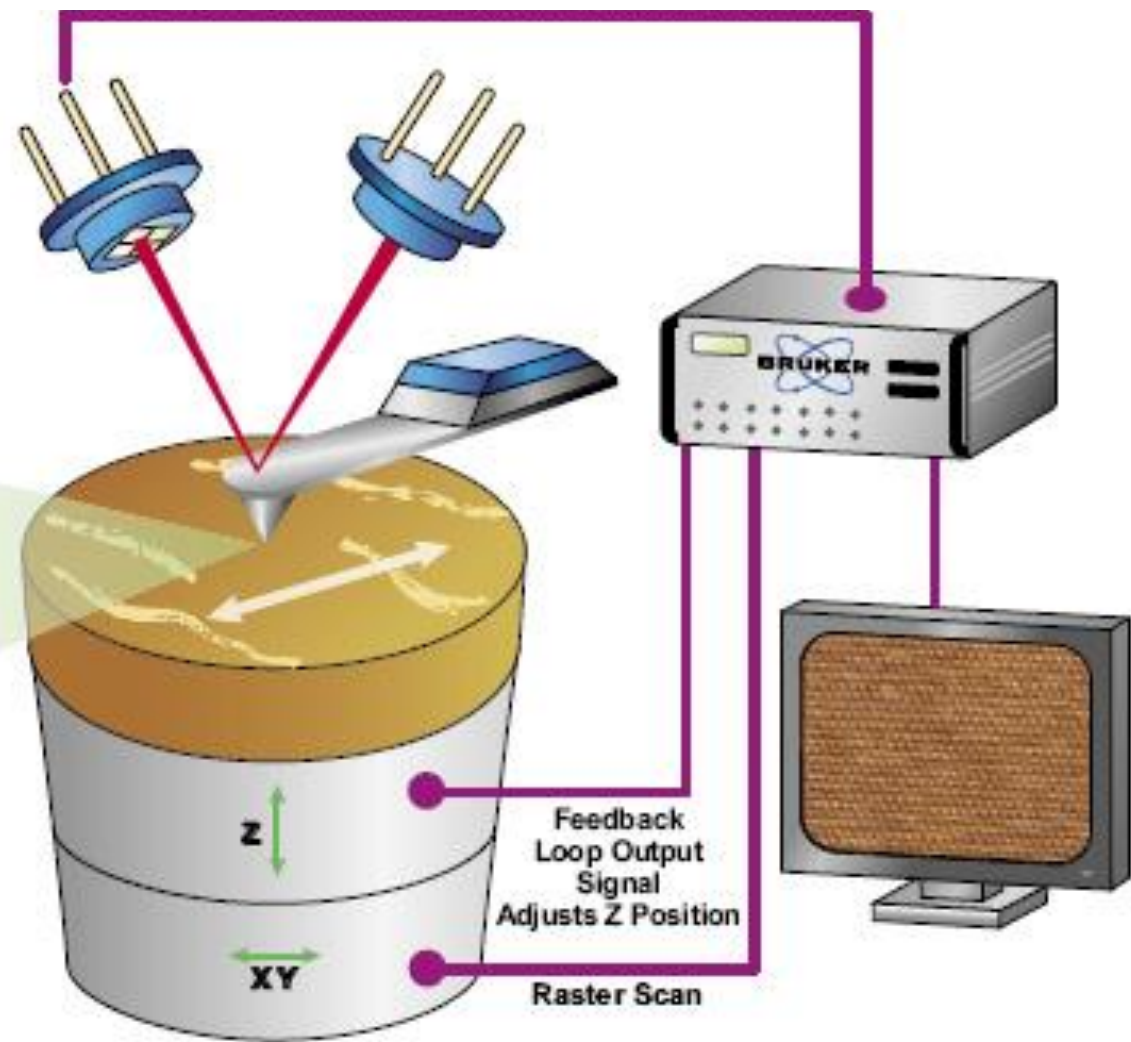
Az atomi erőmikroszkóp (AFM)



1. Van der Waals kölcsönhatás a tű és a minta atomjai között



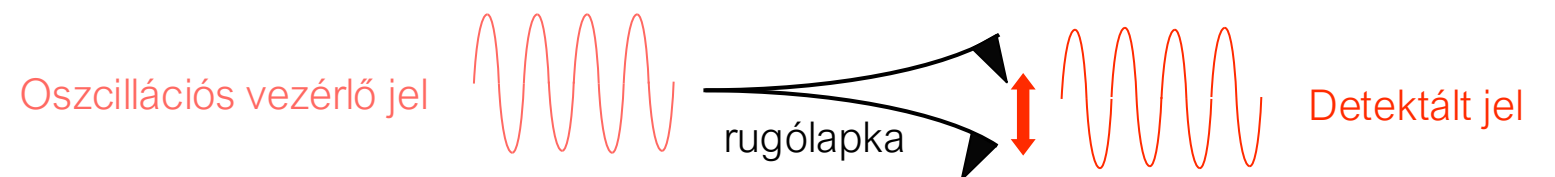
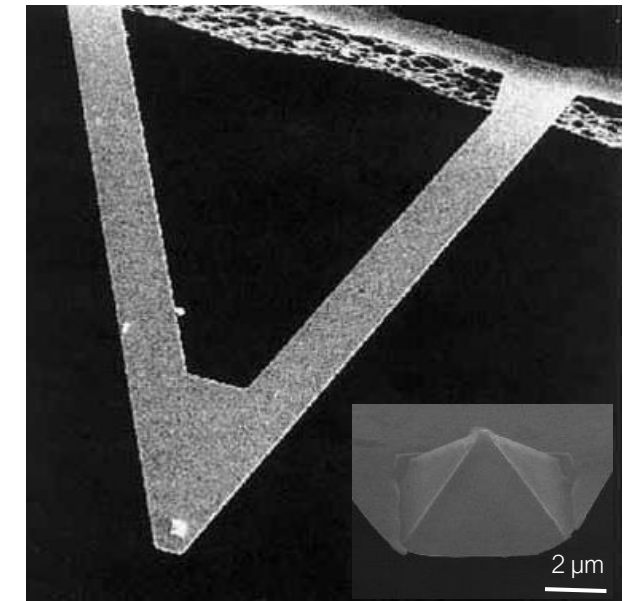
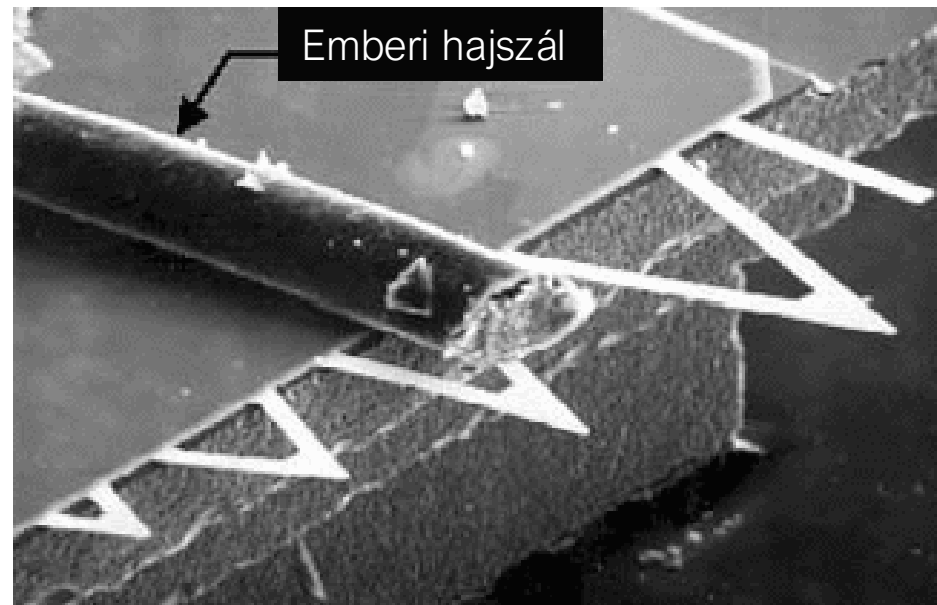
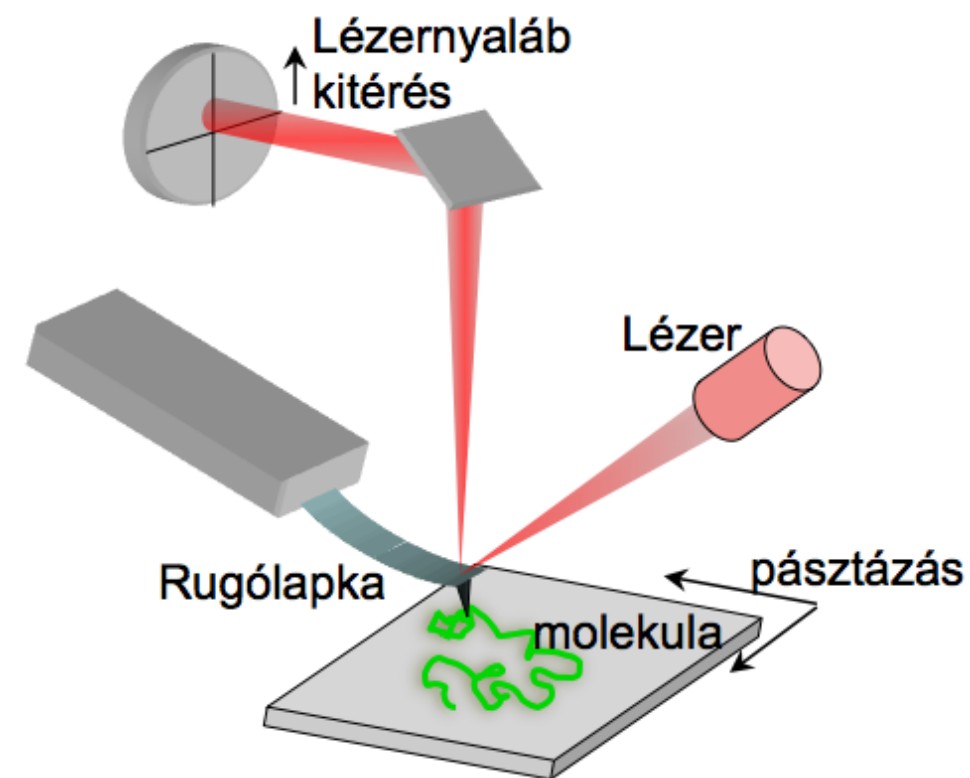
2. egy apró laprugó (rugólapka) elhajlását mérjük egy rávetülő lézerrel



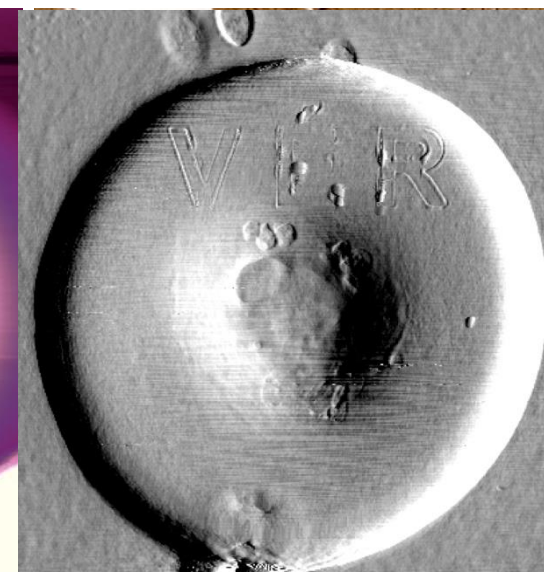
3. a mintát (vagy a rugólapkát) X-Y-Z irányokban mozgatva pásztázunk

Atomi erőmikroszkóp (AFM)

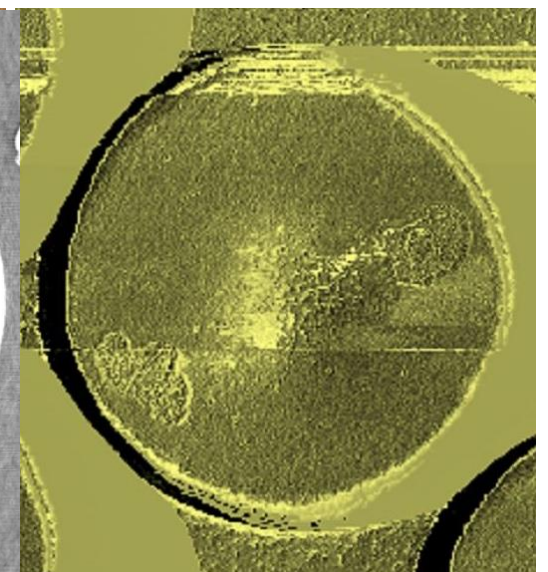
AFM működése



Magasság kontraszt

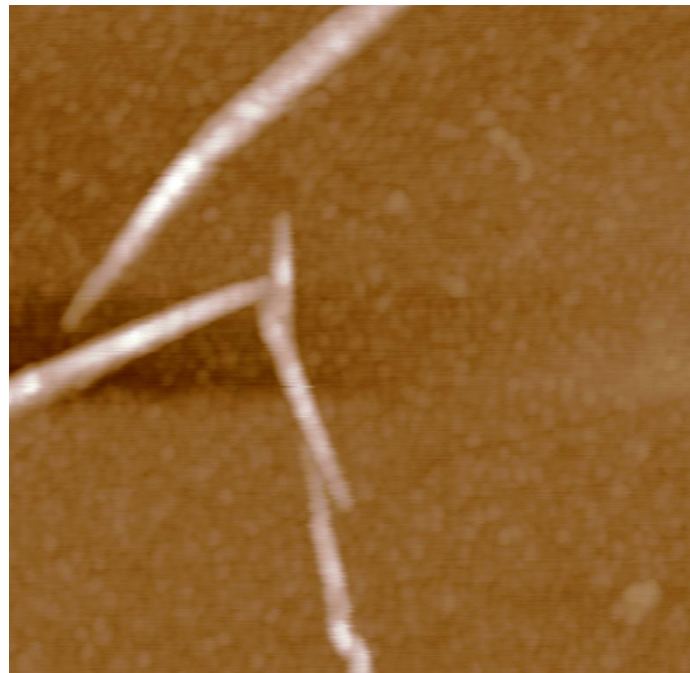


Amplitudó kontraszt



Fázis kontraszt

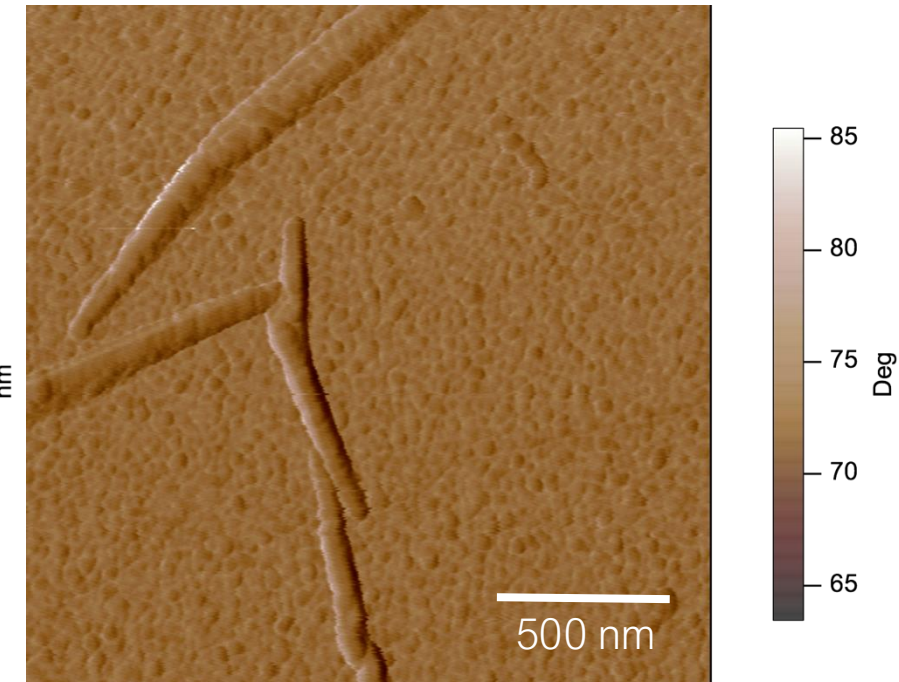
Kontrasztmechanizmusok



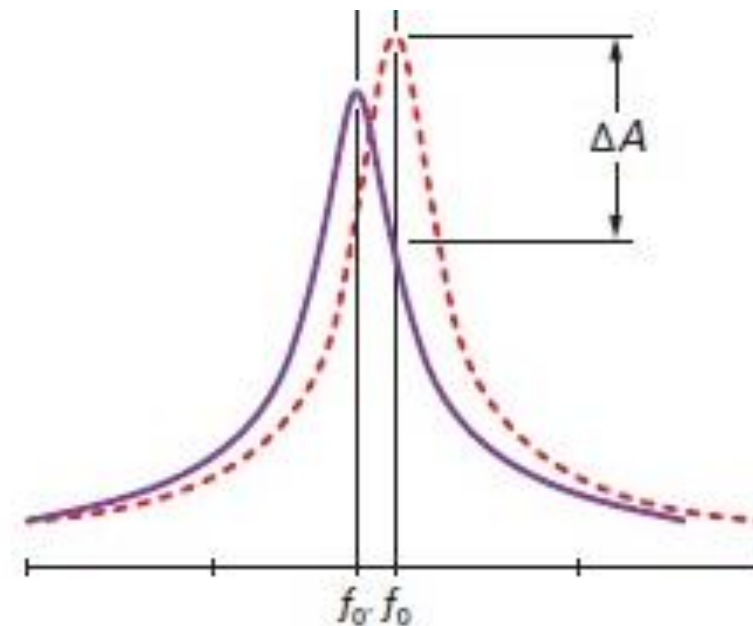
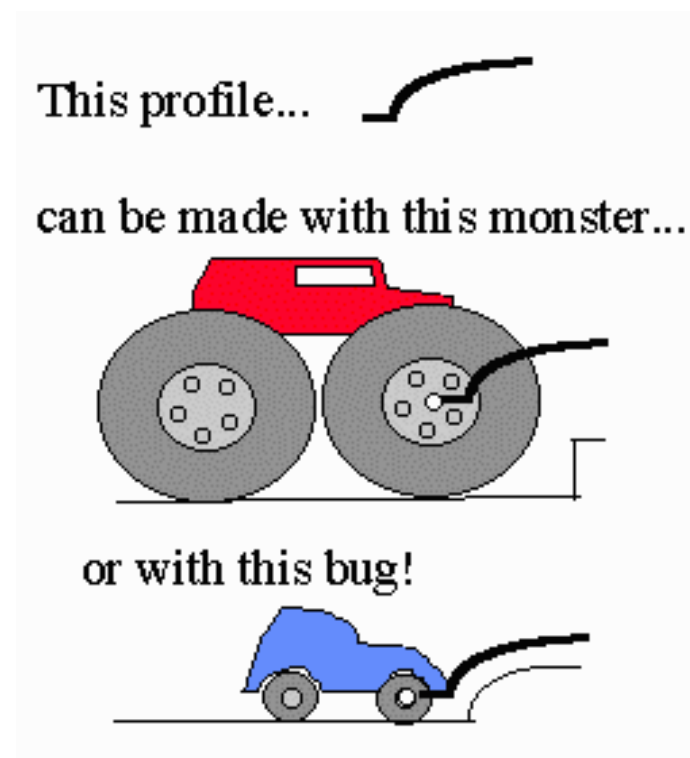
magasság kontraszt



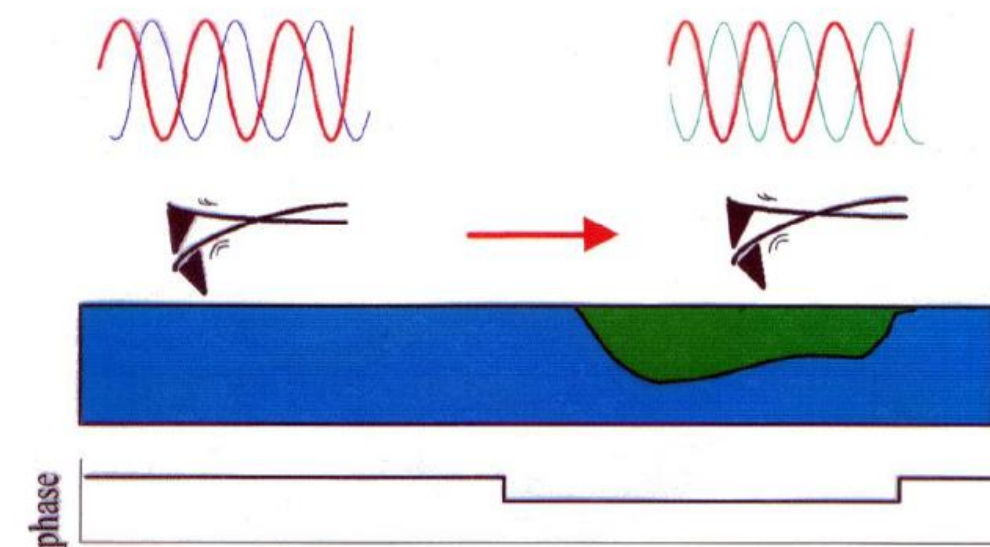
amplitúdó kontraszt



fázis kontraszt



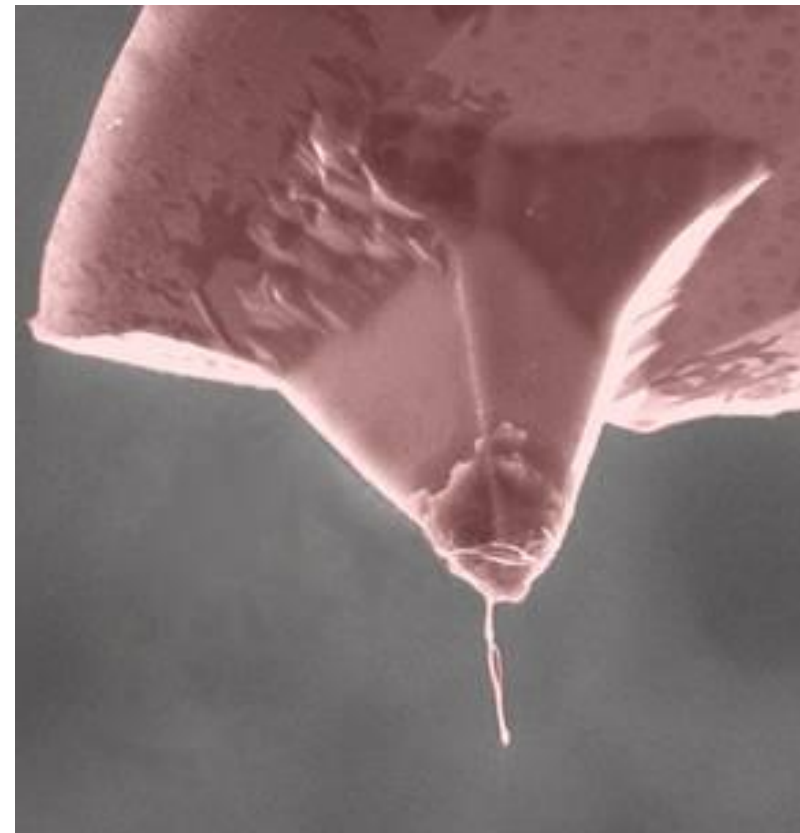
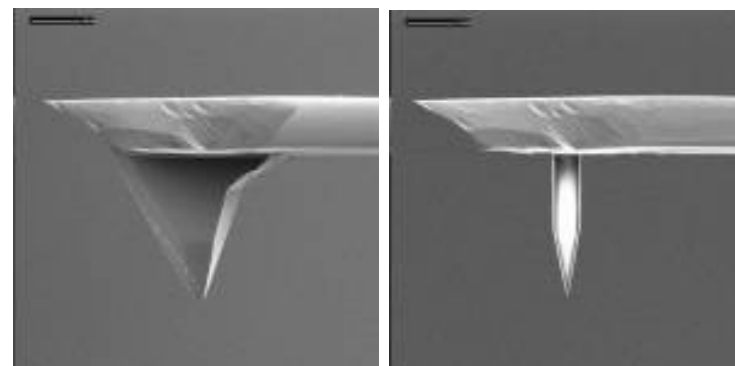
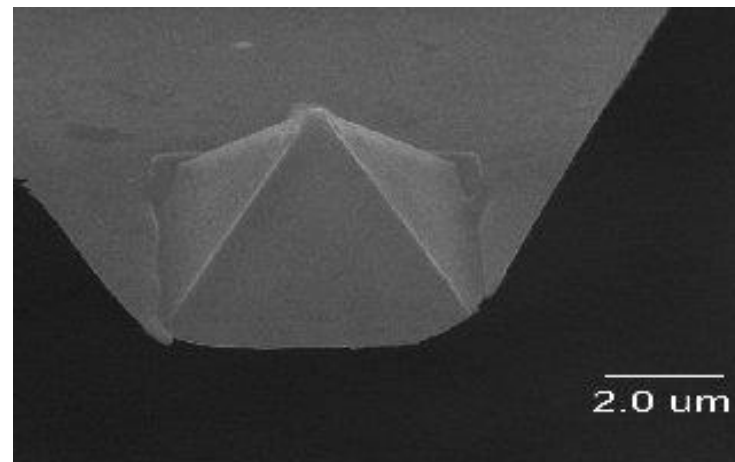
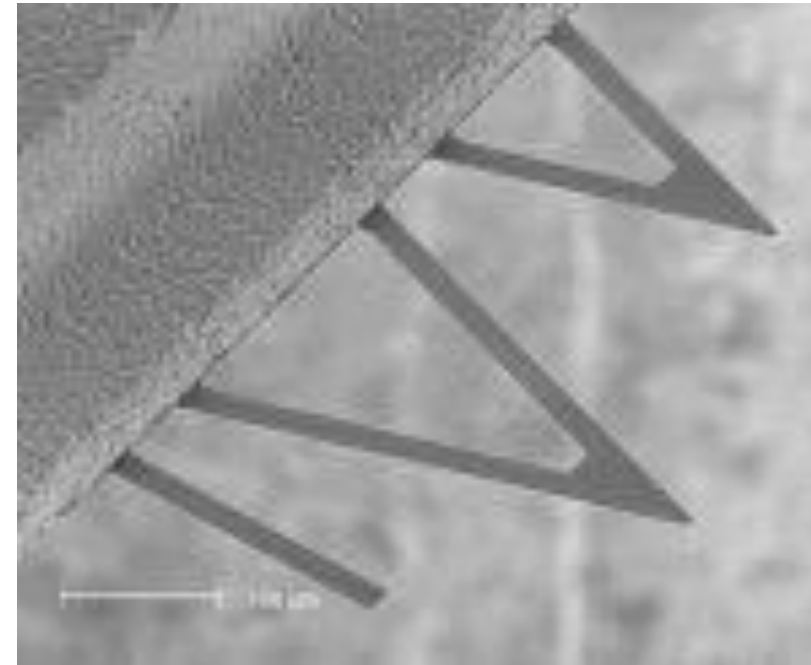
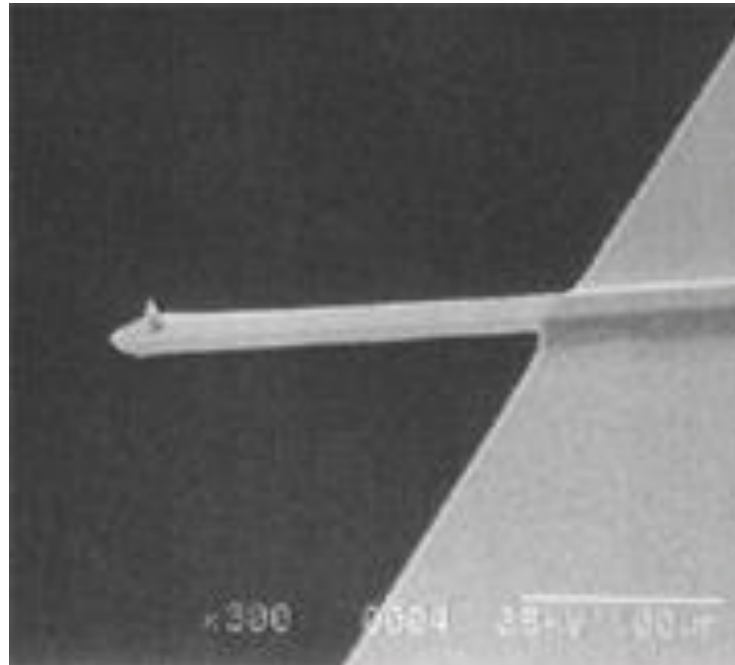
külső erők jelenlétében
„elhangelődő” rezonanciagörbe



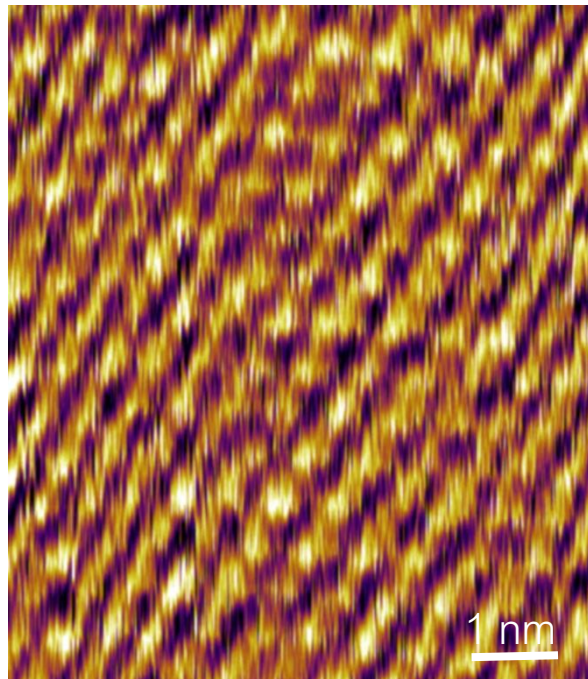
gerjesztő elektromos jel és a rugólapka
sajátrezgésének fáziskülönbsége

AFM Rugólapkák és tűk

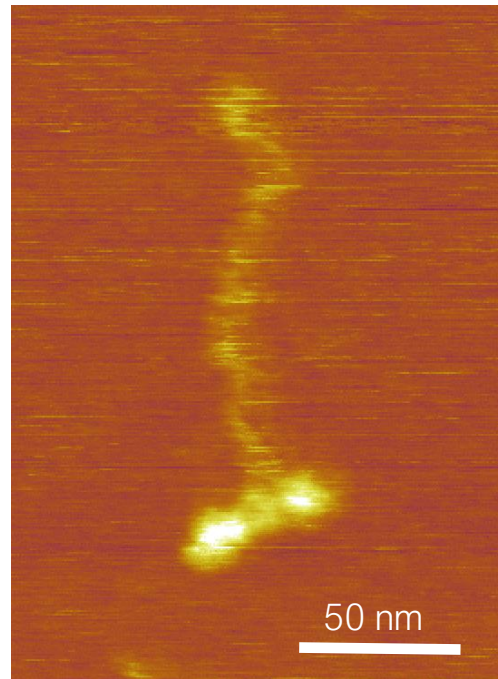
Az AFM kép térbeli feloldóképességét a tű görbületi sugara határozza meg



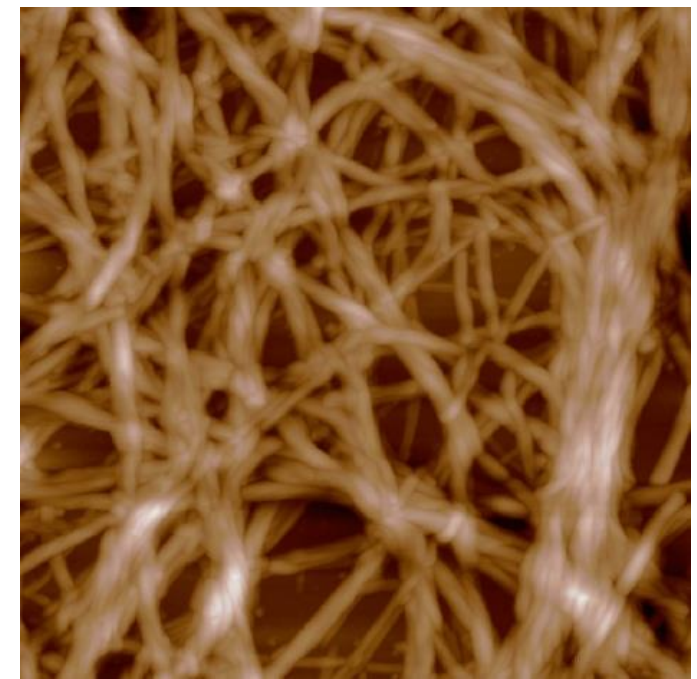
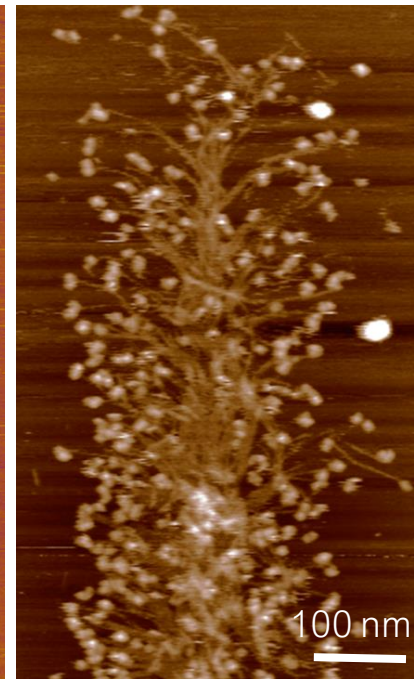
Atomok, molekulák, komplexek AFM képe



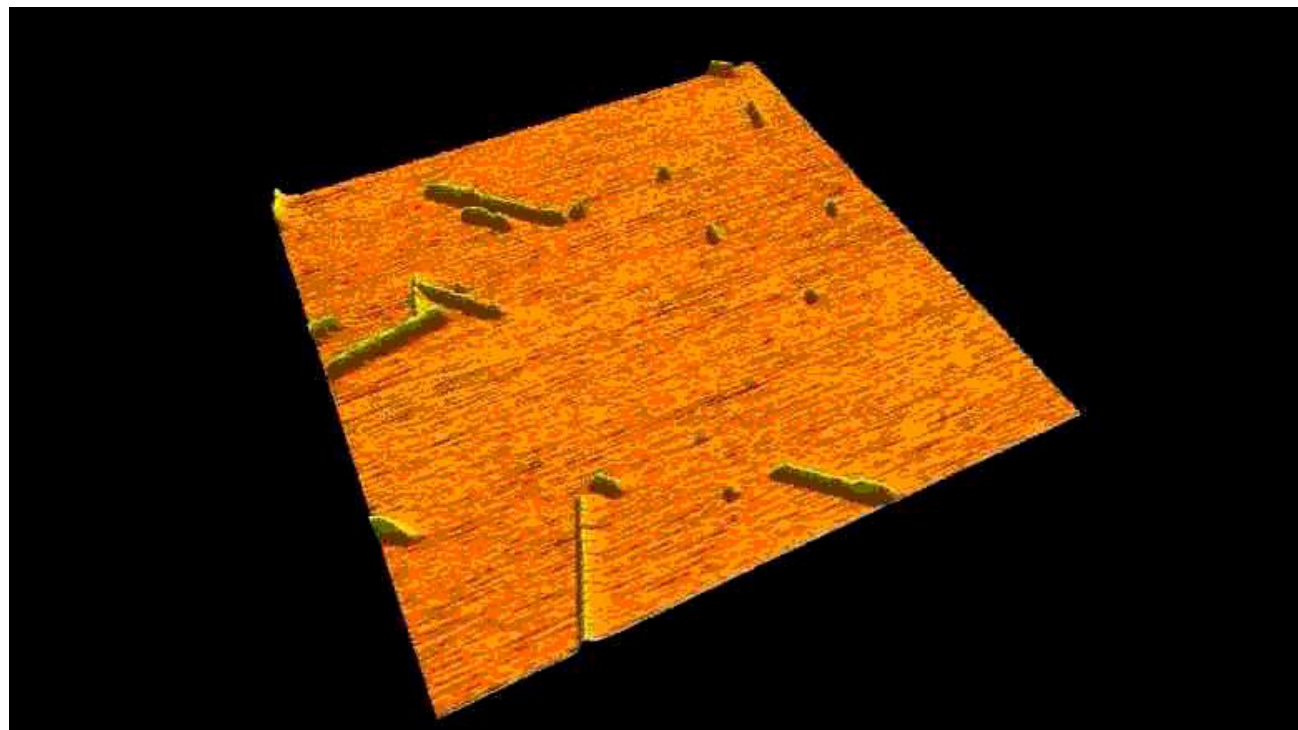
Csillám



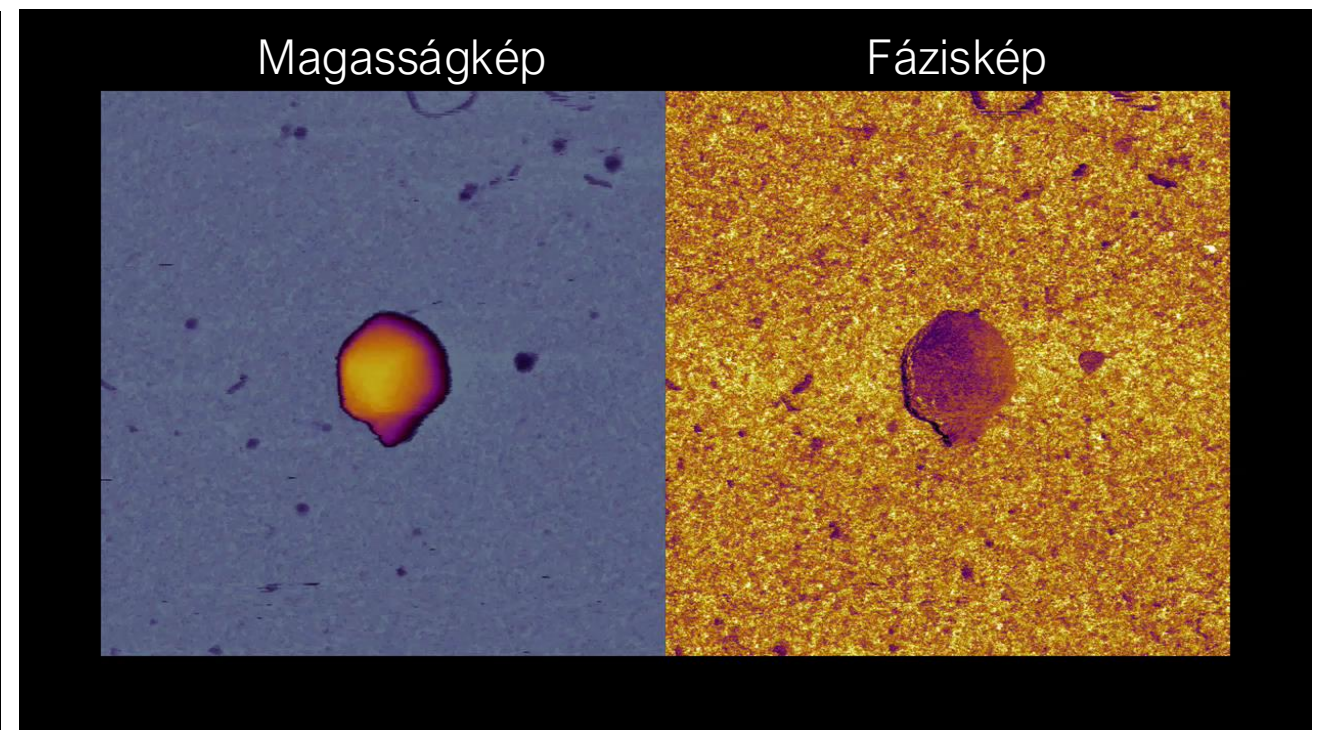
Miozinmolekula és filamentum



Amiloid β 1-40 fibrillumok

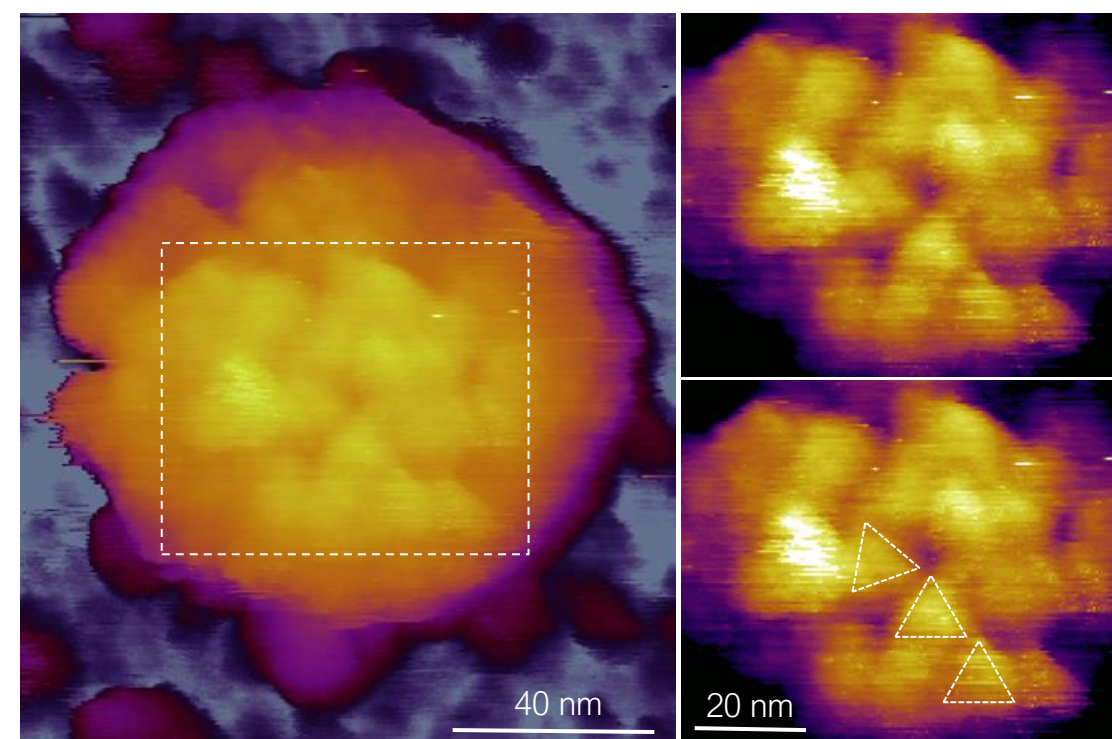
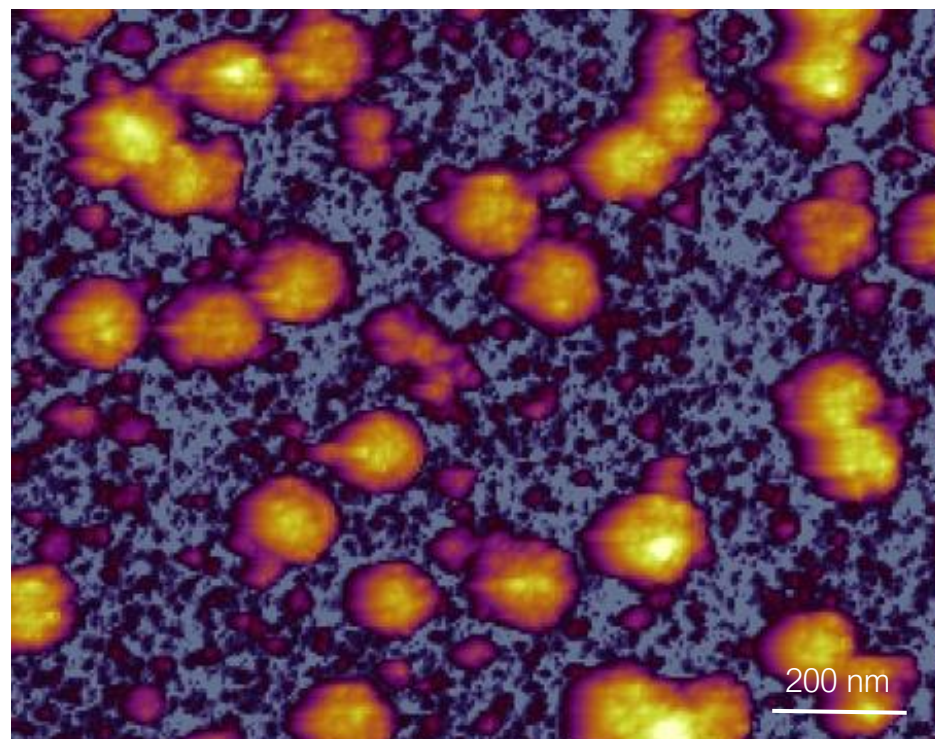
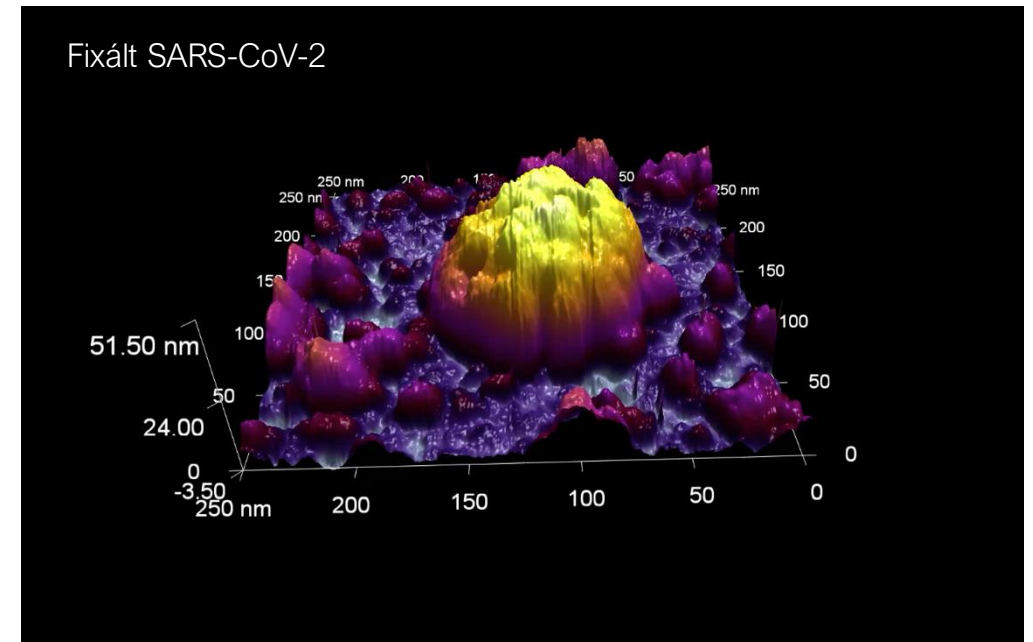
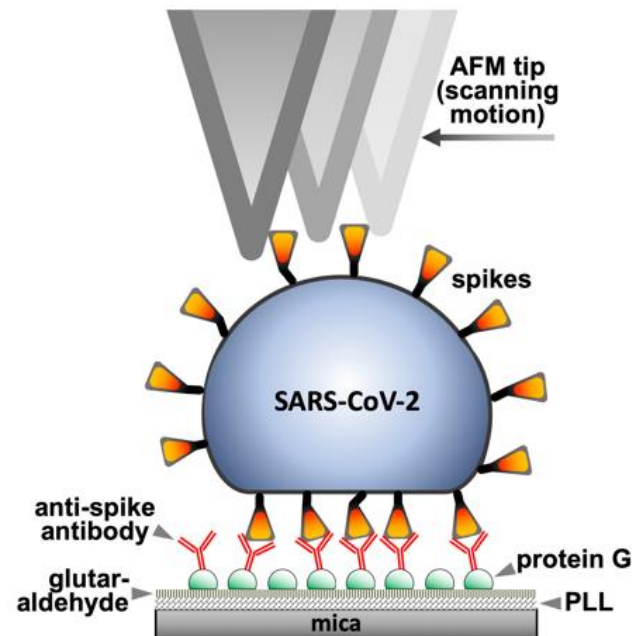
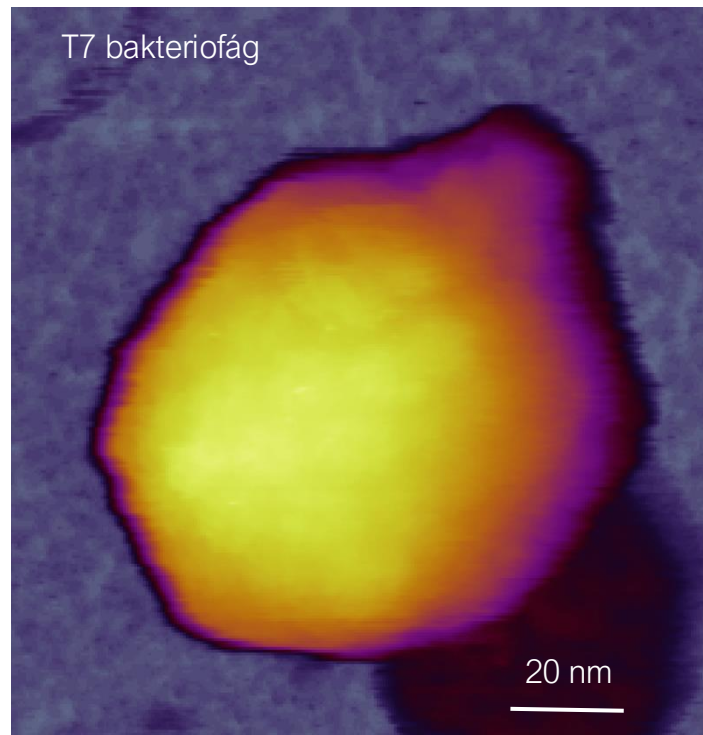


Amiloid fibrillumok növekedése



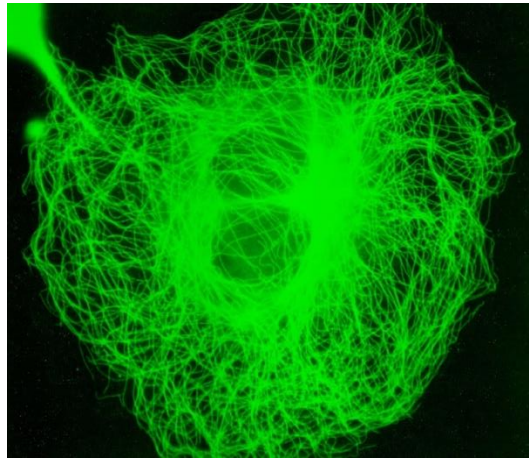
Vírus DNS kilökődése

SARS-CoV-2 vírusok AFM vizsgálata

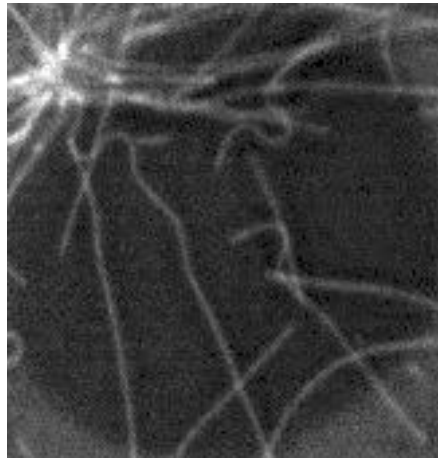


Molekulák - miért egyenként?

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

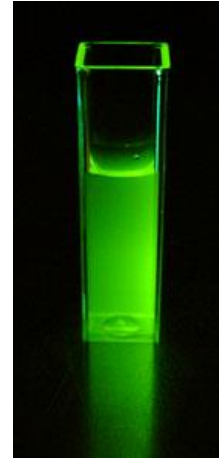


Sokaság - mikrotubuláris rendszer

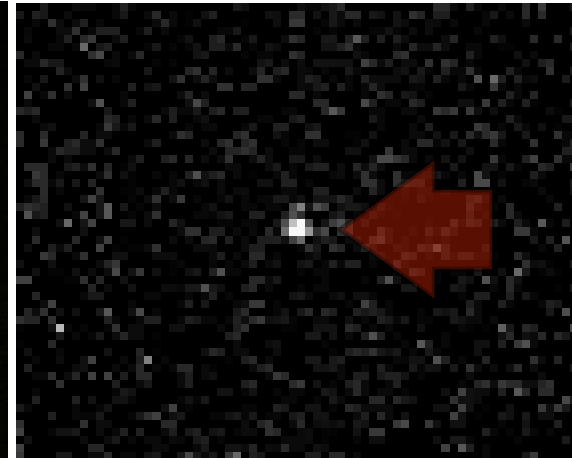


Egyedi mikrotubulusok - treadmilling

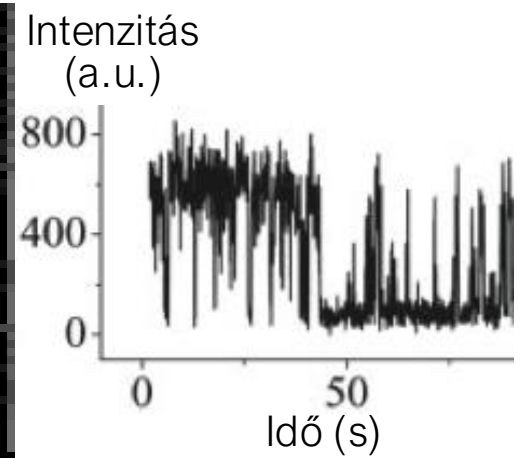
2. Sztochasztikus folyamatokat ismerhetünk meg



Sokaság - intenzitás

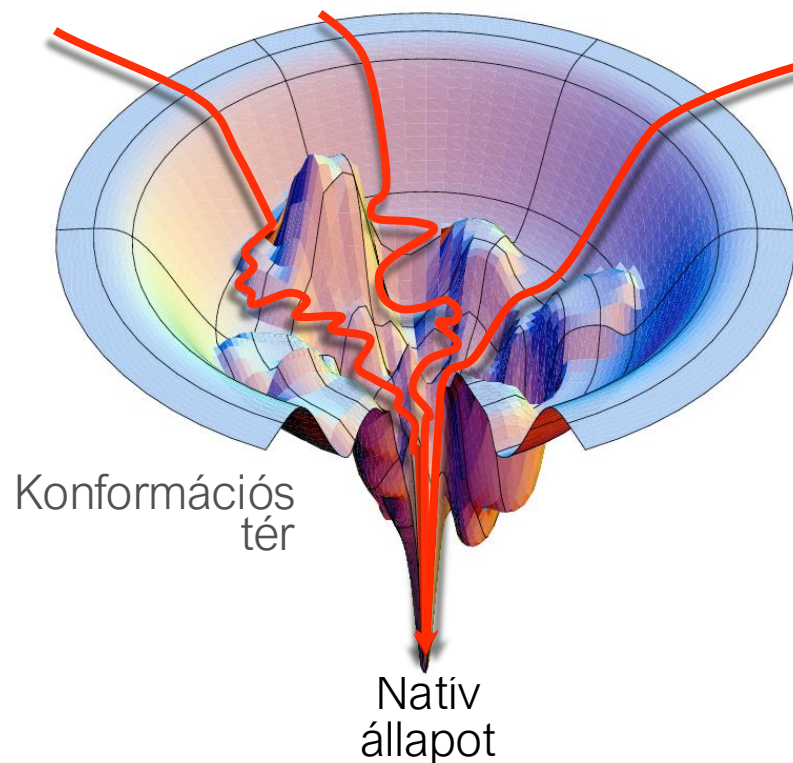


Egyedi kvantumpont - pislogás ("blinking")

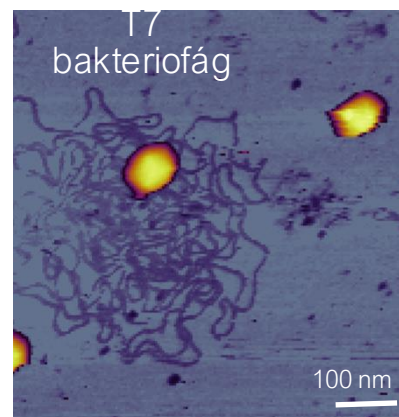
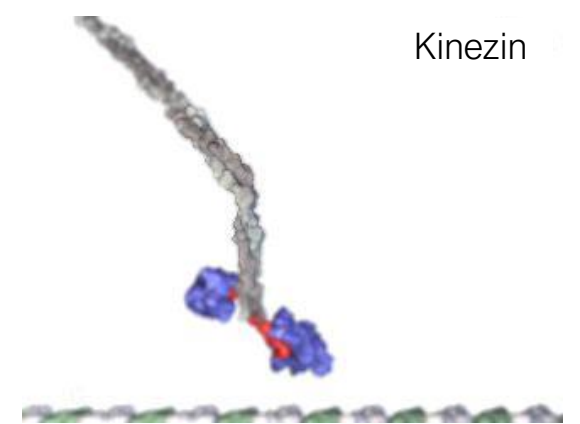


3. Párhuzamos útvonalakon zajló folyamatokat azonosíthatunk

Kigombolyodott állapot

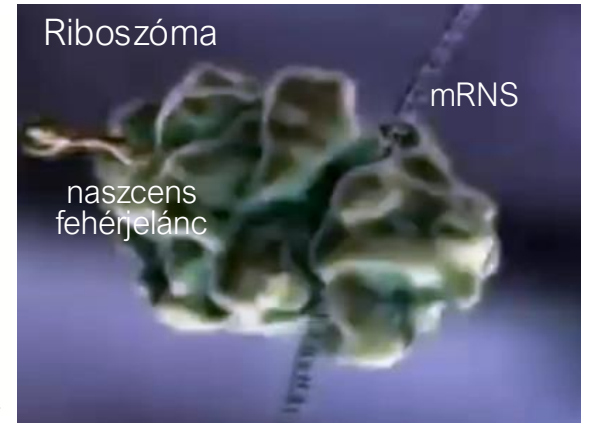
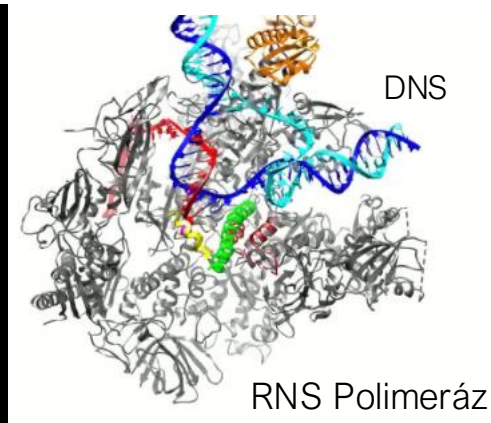
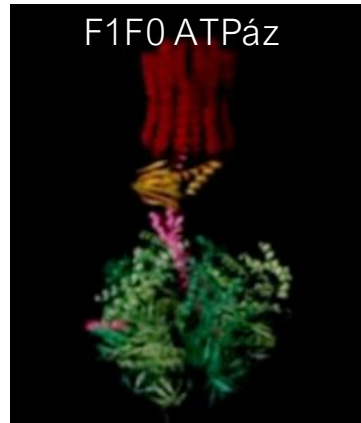


4. Biomolekulák mechanikáját jellemezhetjük

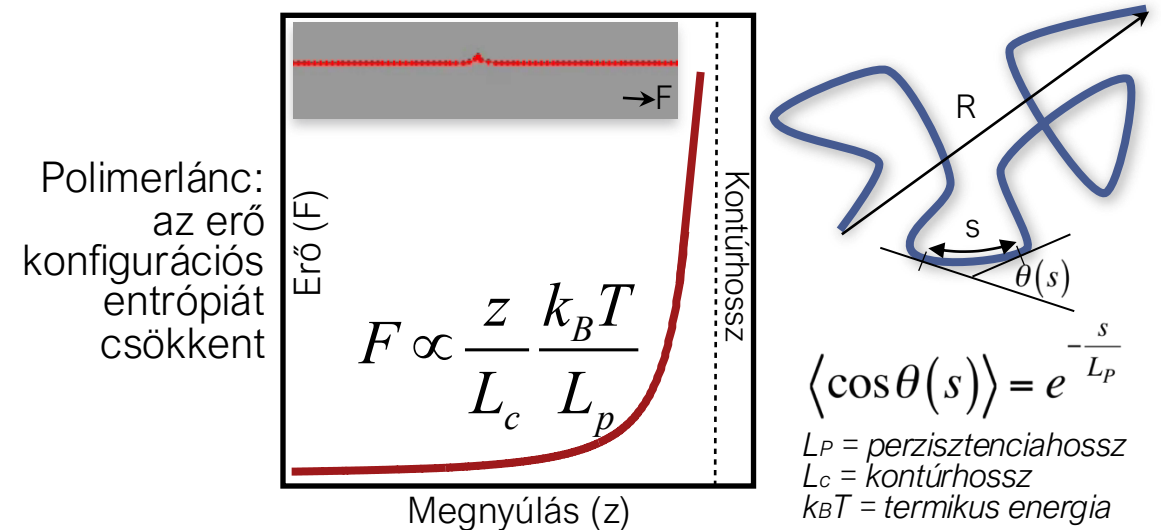
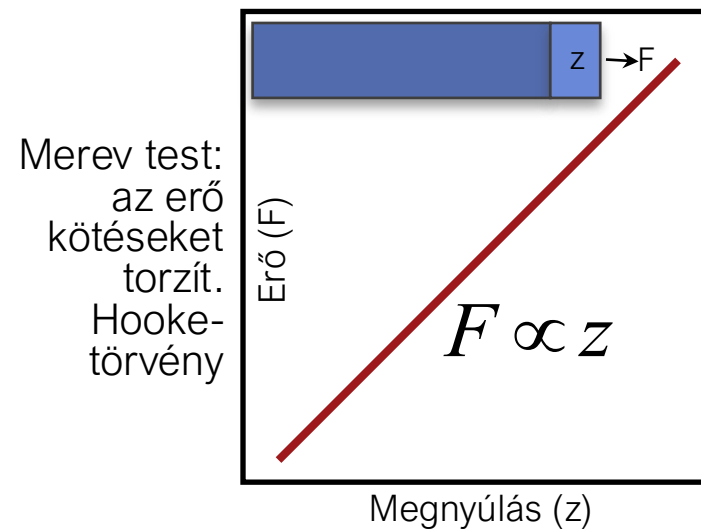


A mechanikai erő...

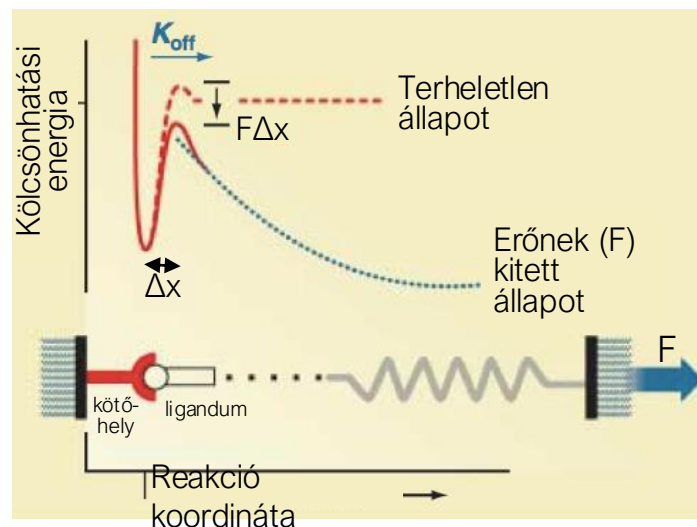
1) kifejlődik:



2) deformálja a szerkezetet:



3) kötéseket szakít fel:

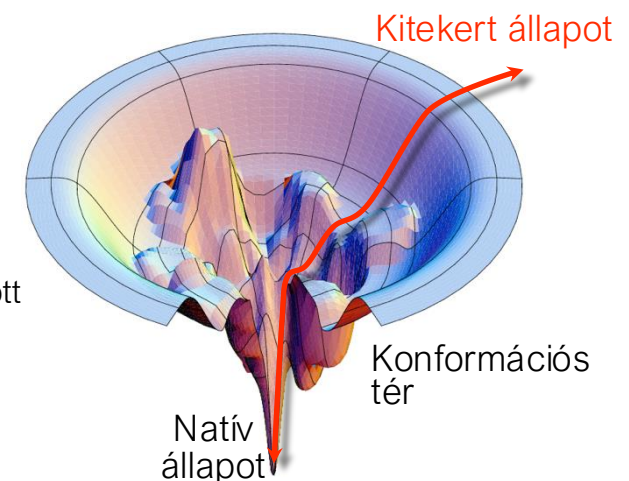


Terhelt kötés élettartama csökken:

$$\tau(F) = \omega e^{\frac{E_a - F\Delta x}{k_B T}}$$

ω = karakterisztikus idő
 E_a = aktivációs energia
 Δx = távolság a kötött és tanzíciós állapotok között

Kötés	Kovalens	H-híd, elektrosztatikus
Szakítási erő	~nN	~néhány 10 pN

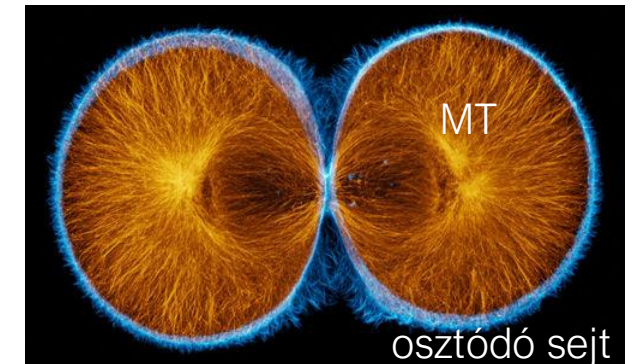
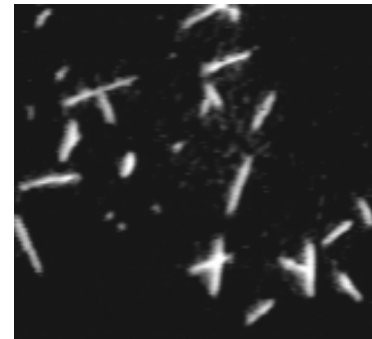


A polimerlánc egyensúlyi alakja és rugalmassága összefügg

Merev lánc

$$l_p \gg L$$

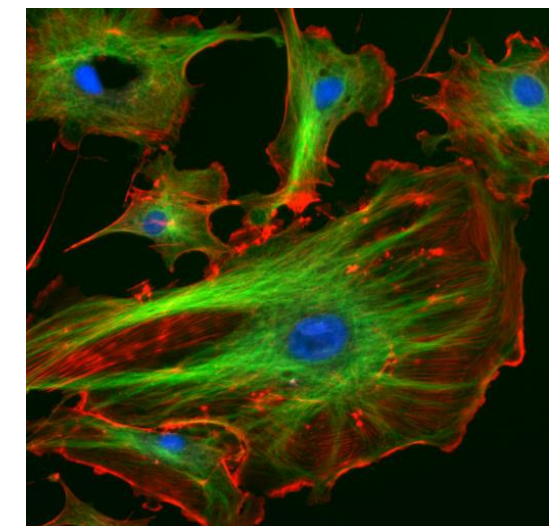
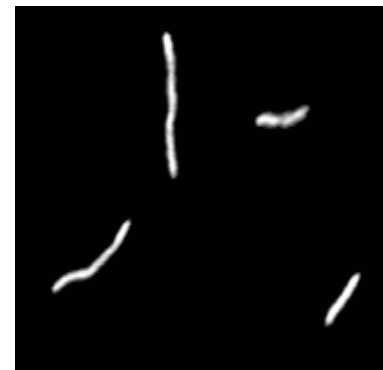
Mikrotubulus



Szemiflexibilis lánc

$$l_p \approx L$$

Mikrofilamentum

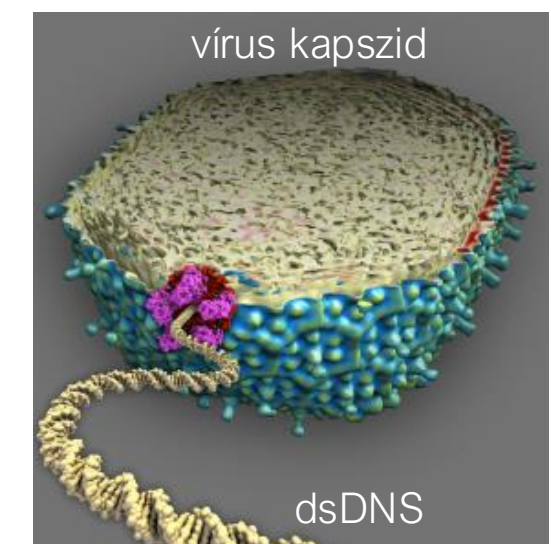
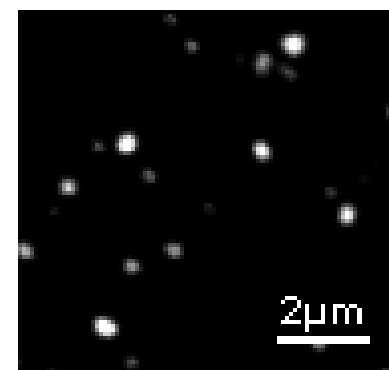
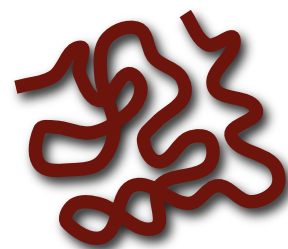


aktin
tubulin

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

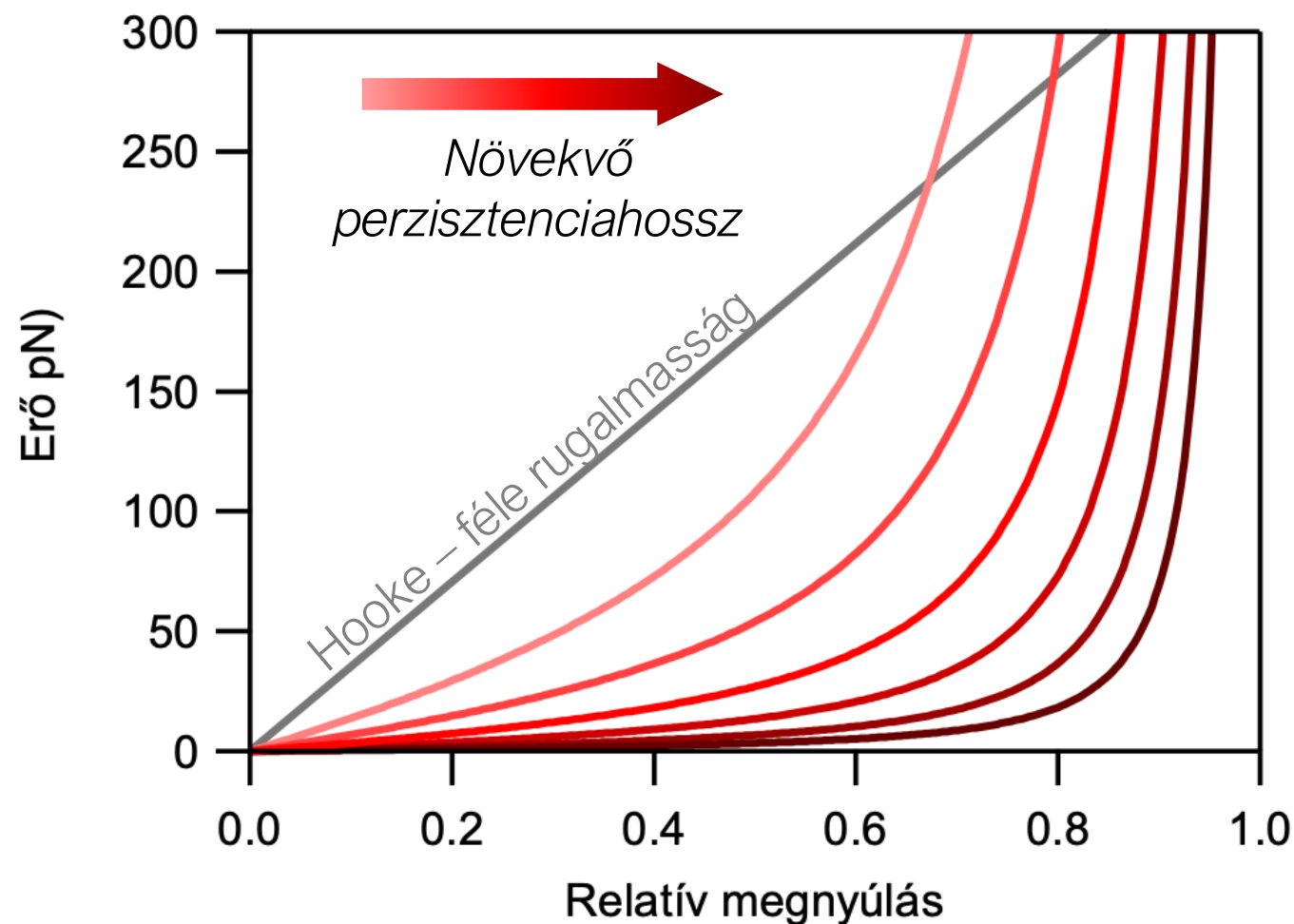
T = abszolút hőmérséklet

L = kontúrhossz

R = vég-vég hossz

R/L = relatív megnyúlás

Nemlineáris erőválasz

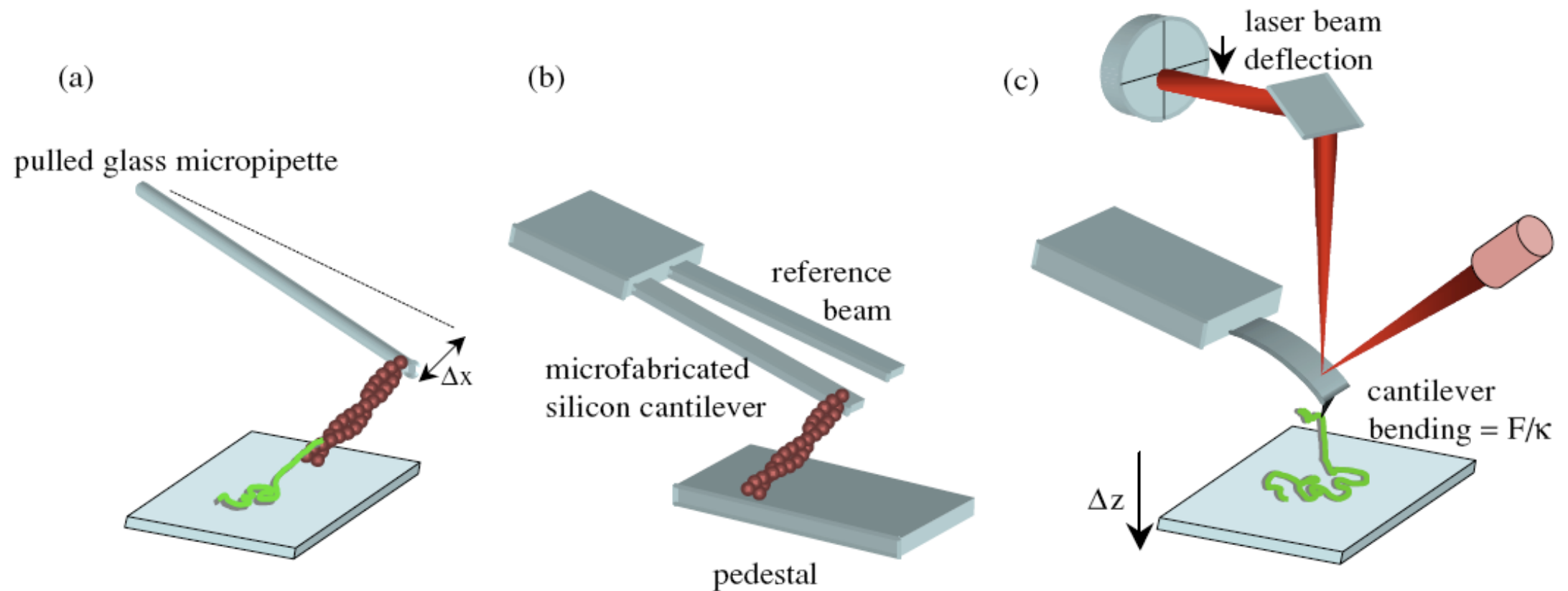


Gough-Joule effektus

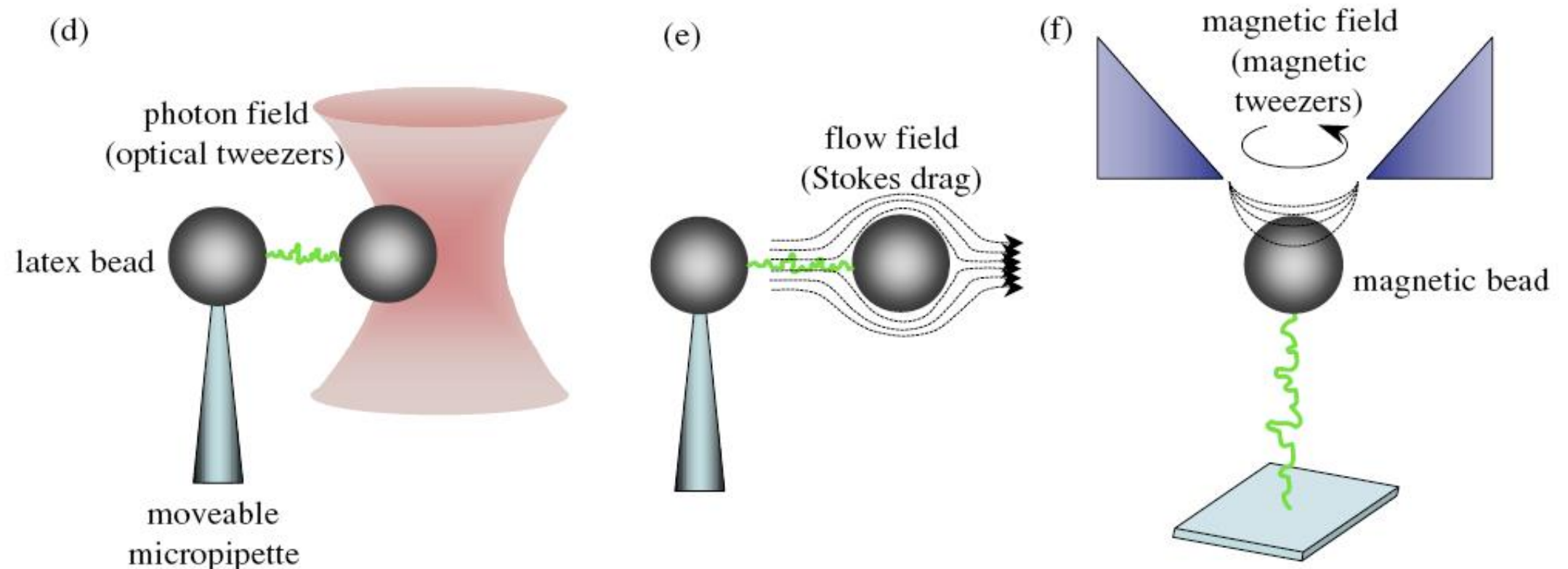


Egyedi molekulák manipulálása

Laprugó
módszerek:



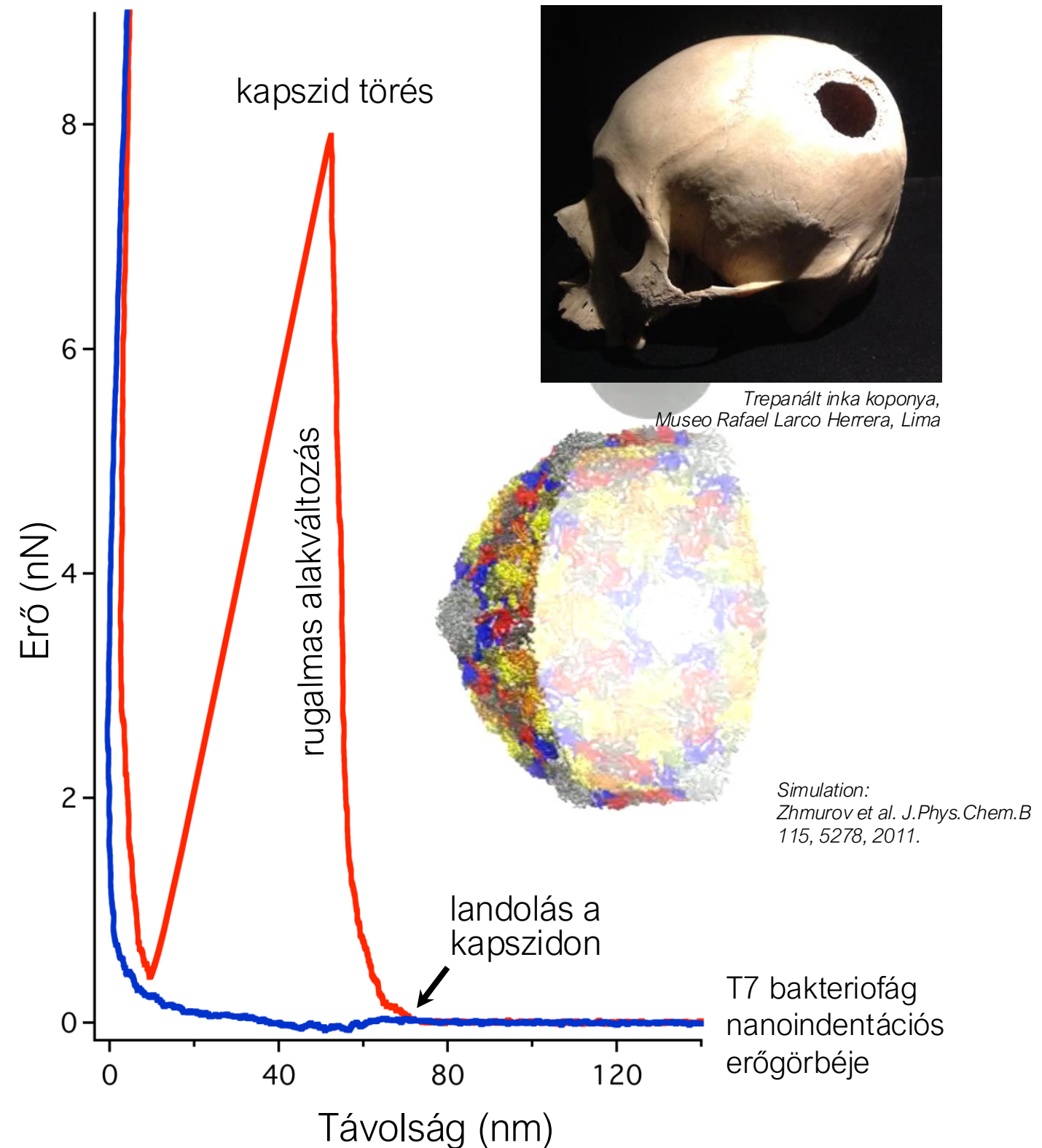
Mező alapú
módszerek:



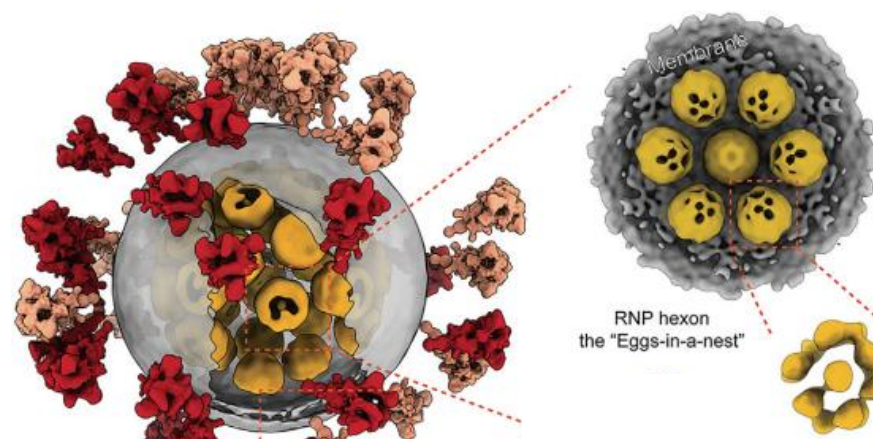
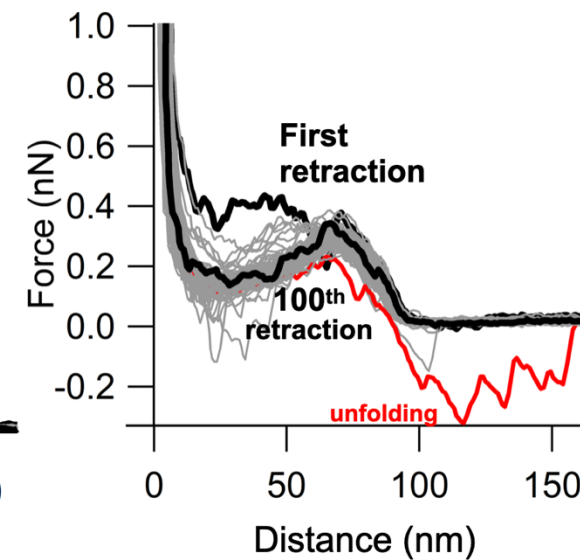
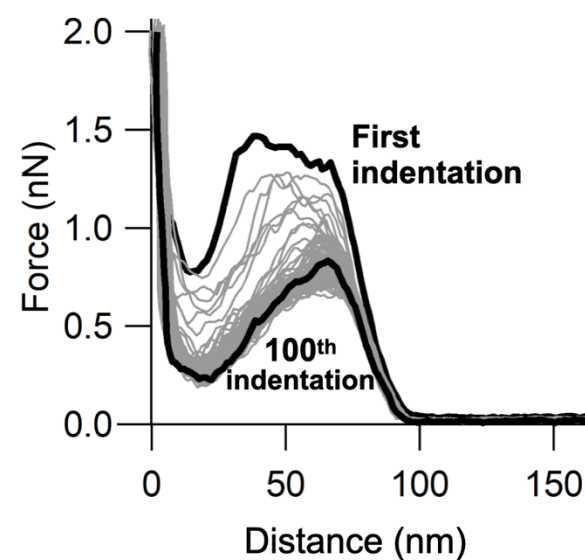
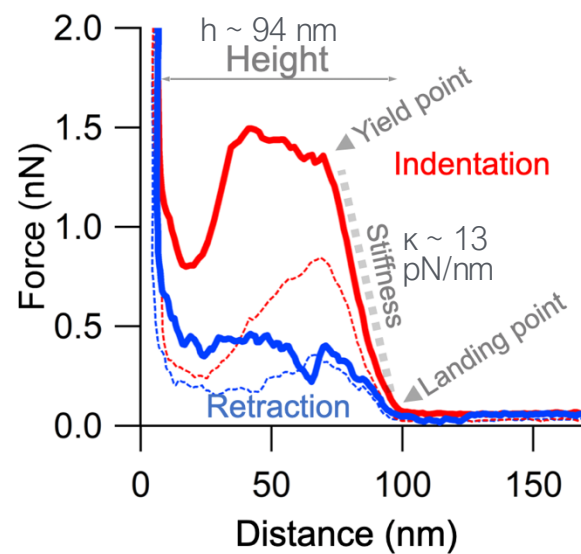
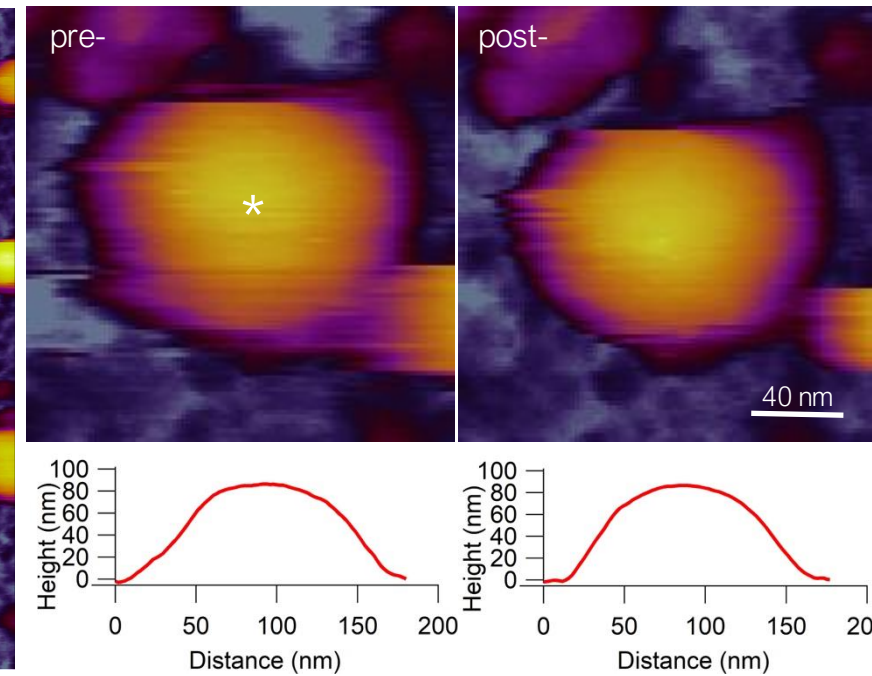
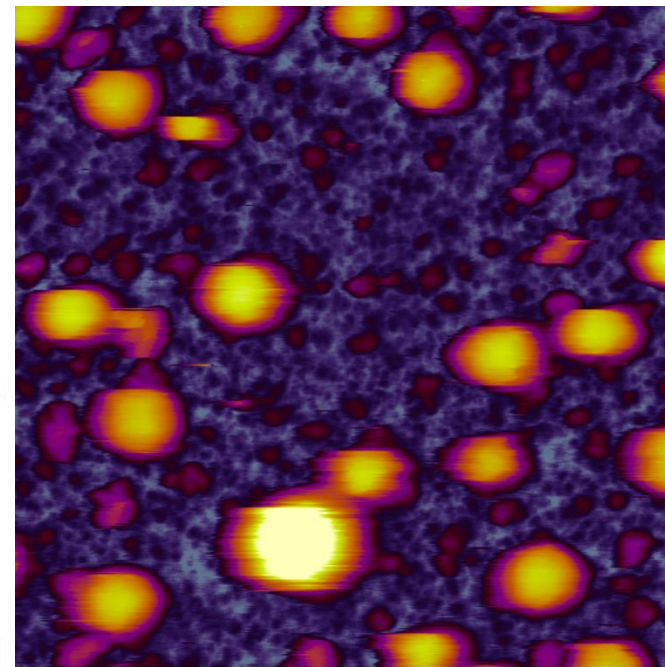
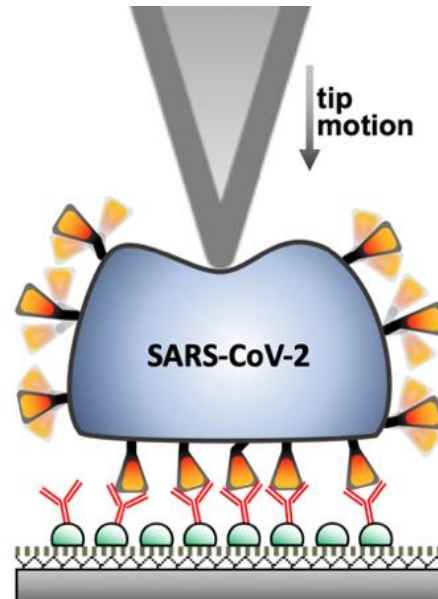
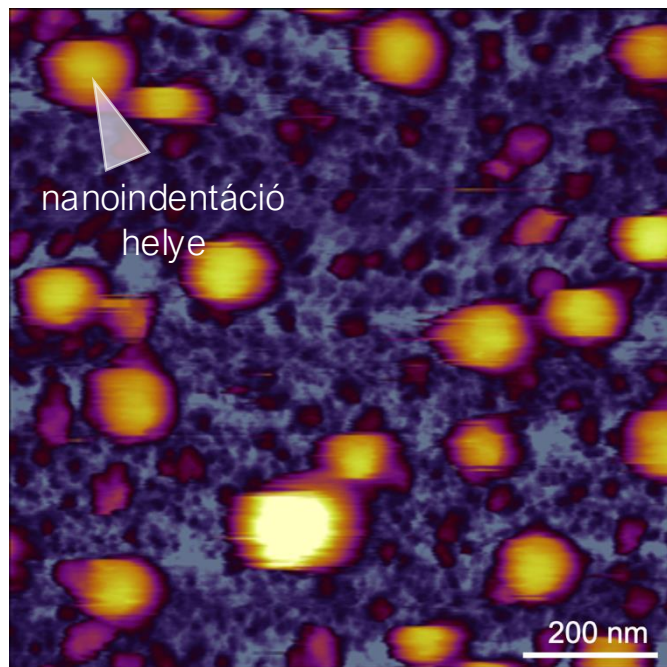
Egyedi vírusrészecske nanoindentáció AFM-mel



Video by Scixel for Pedro de Pablo, Madrid



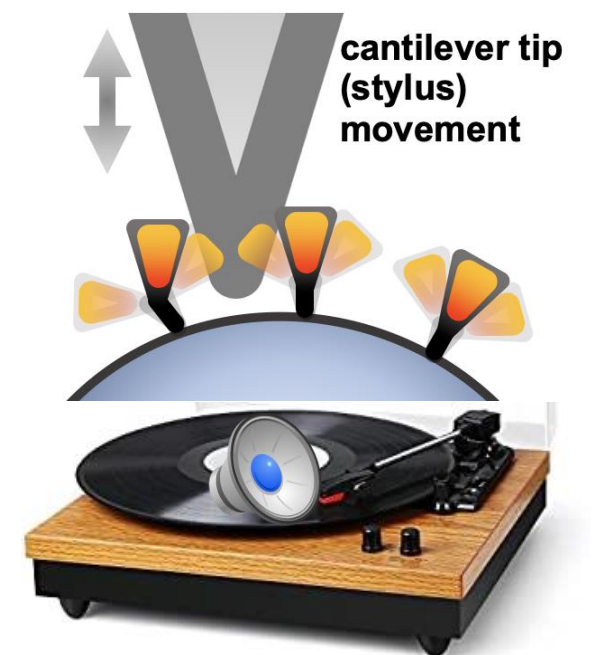
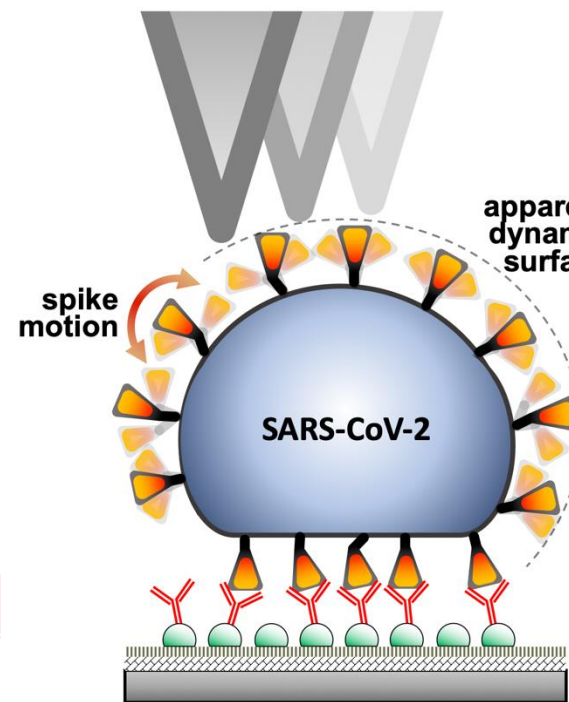
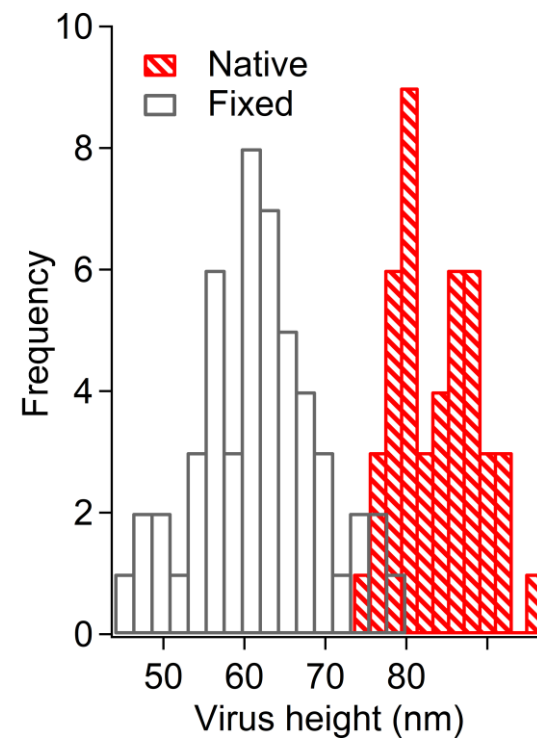
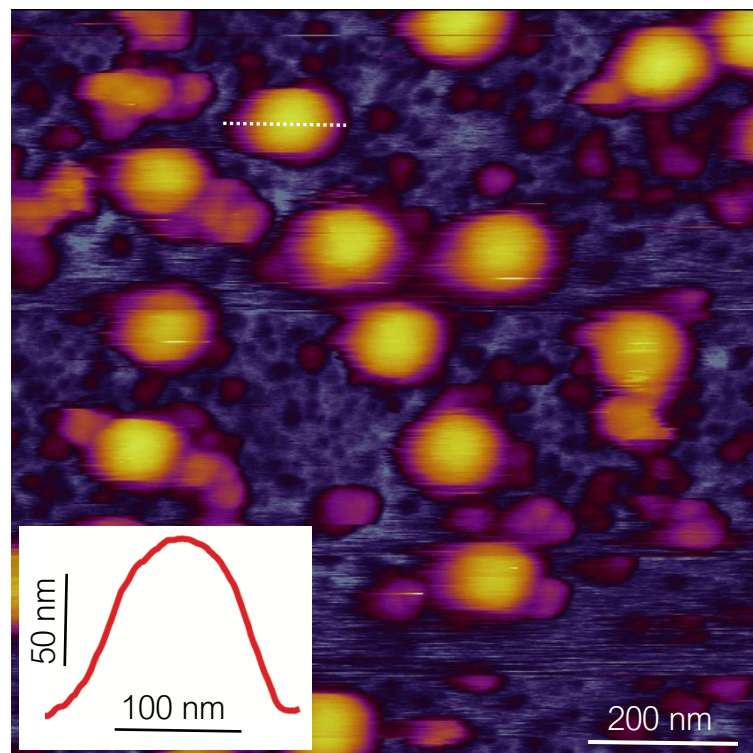
SARS-CoV-2 nanomechanika



Az RNP fészekszerű elrendeződése a SARS-CoV-2 virionban ellenállhat a nanoindentációnak

A koronavírus tüskék mozgását ”meghallgathatjuk”

Natív, “élő” minta



Különleges mikroszkóp alkalmazás: lézercsipesz

Einstein:
tömeg-energia
ekvivalencia

$$E = mc^2$$

Planck:
sugárzási
törvény

$$E = hf$$

Maxwell:
fény terjedési
sebessége

$$c = \lambda f$$



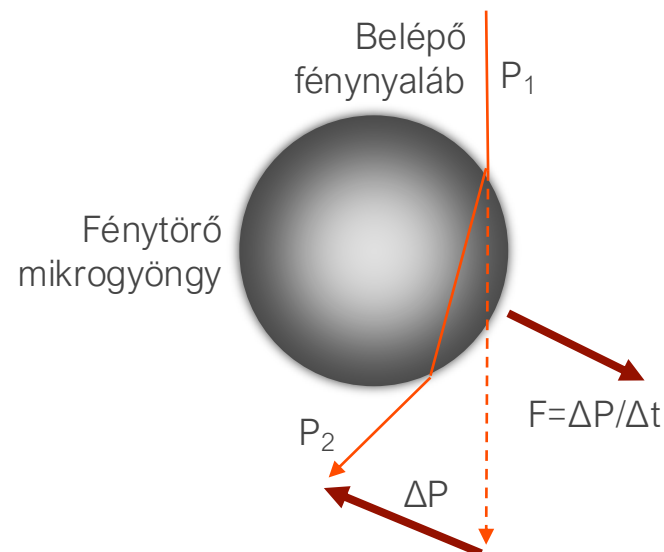
Louis-Victor-Pierre-Raymond, 7th duc de Broglie (1892-1987)

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

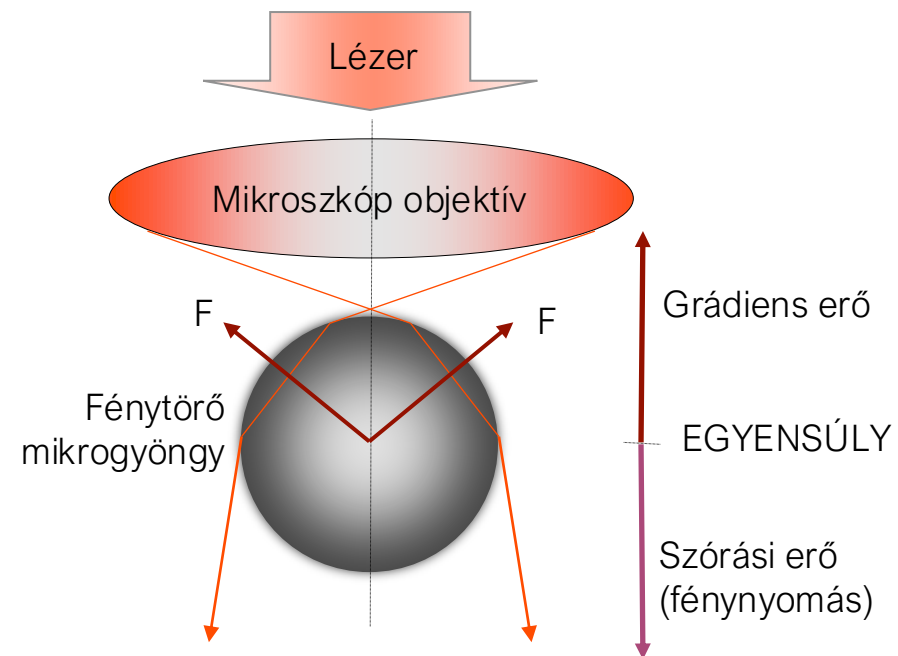
A foton impulzusa:

$$P = \frac{h}{\lambda}$$

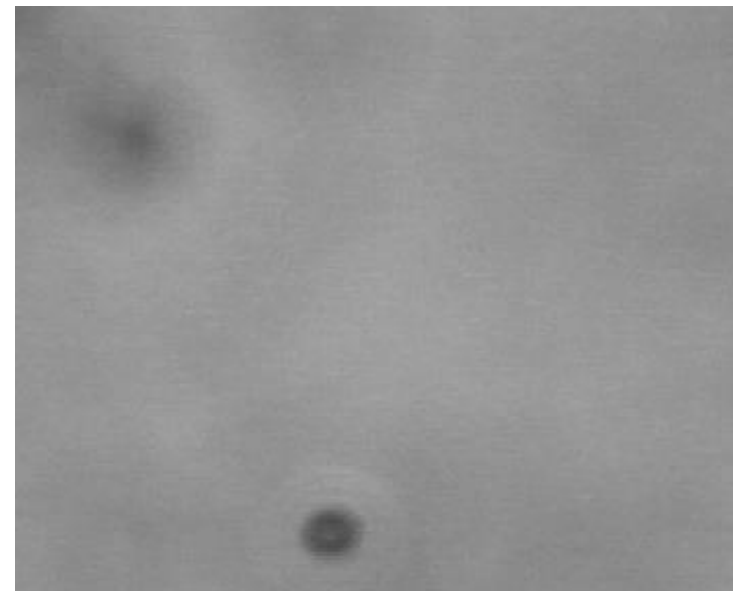
A refrakció fényimpulzus-változással (ΔP) jár:



Fénytörő részecskék “optikai erőkkel” megfoghatók:



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



3 μm átmérőjű latex (polistírol) mikrogöngyök optikai csipeszben

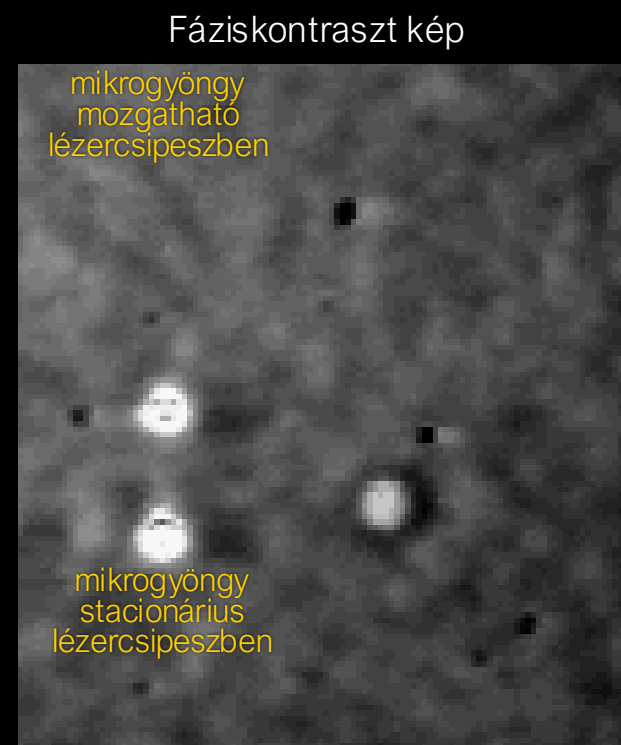
Biomolekula manipulálás fénnnyel



E. coli baktériumsejt

Aktin
filamentum

DNS

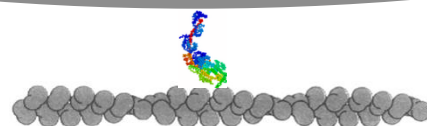


Fluoreszcencia kép



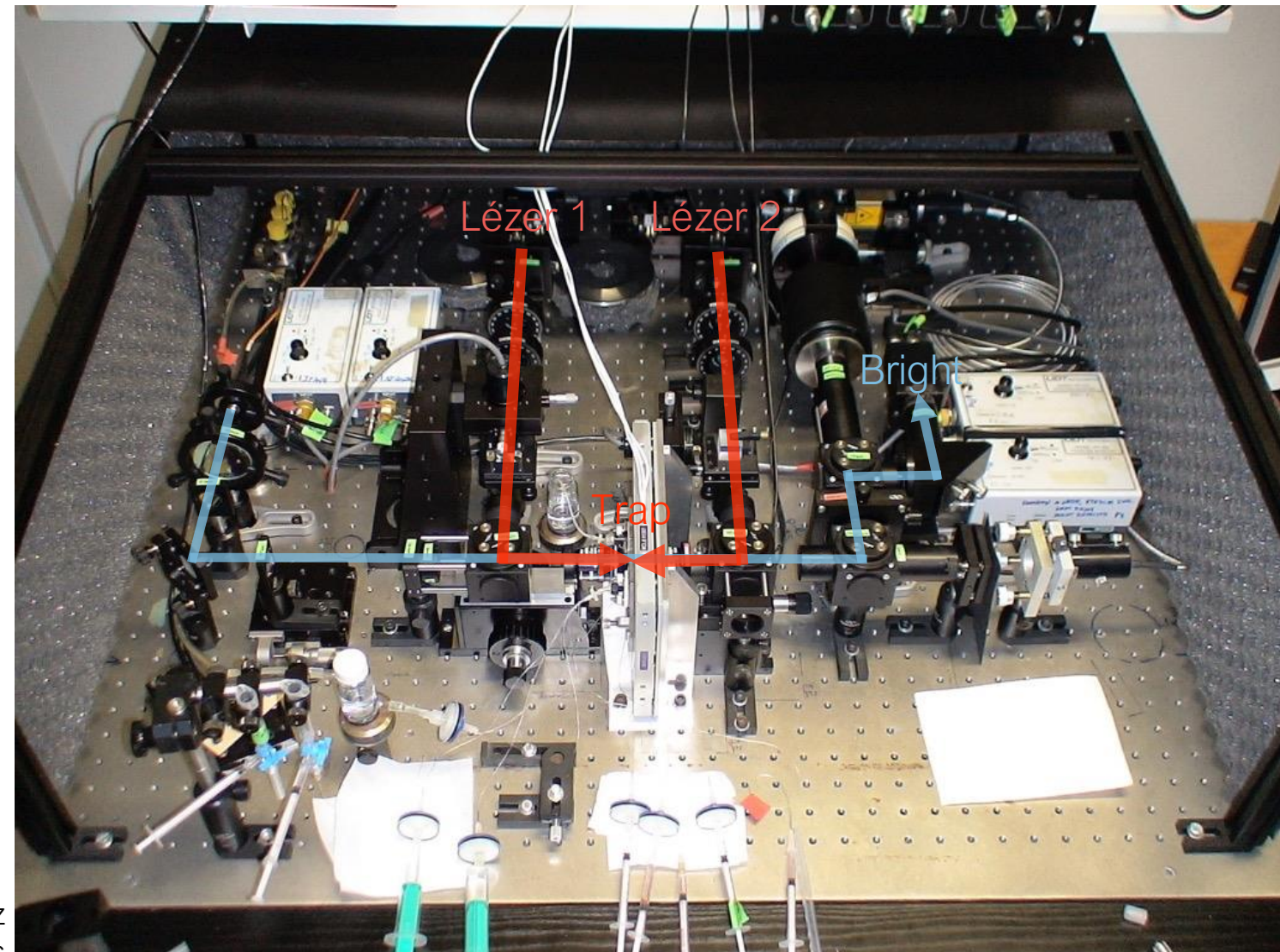
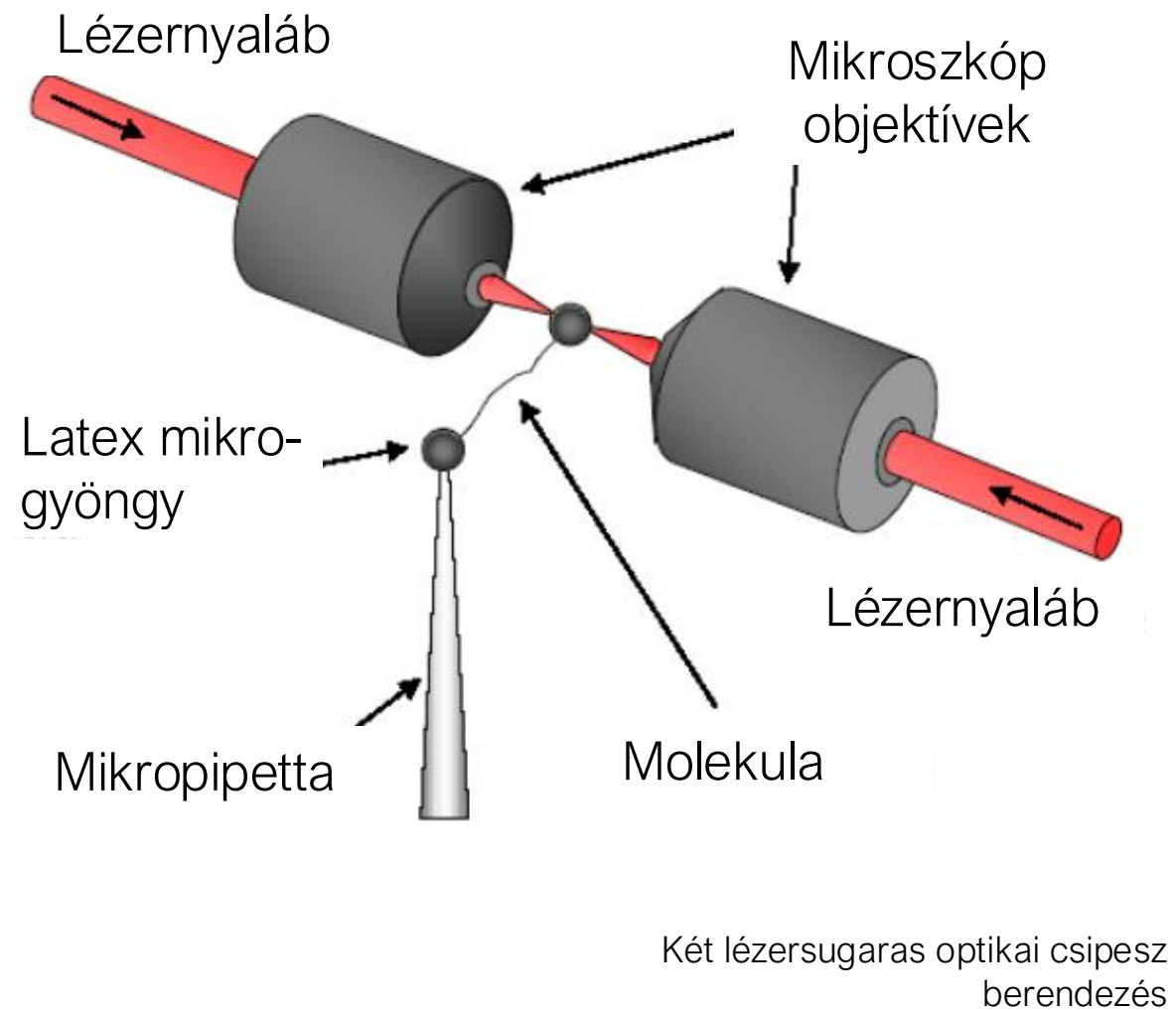
MOLEKULA - FOGANTYÚ GEOMETRIA

mikrogyöngy ~ 1 μm



molekula ~ 10 nm

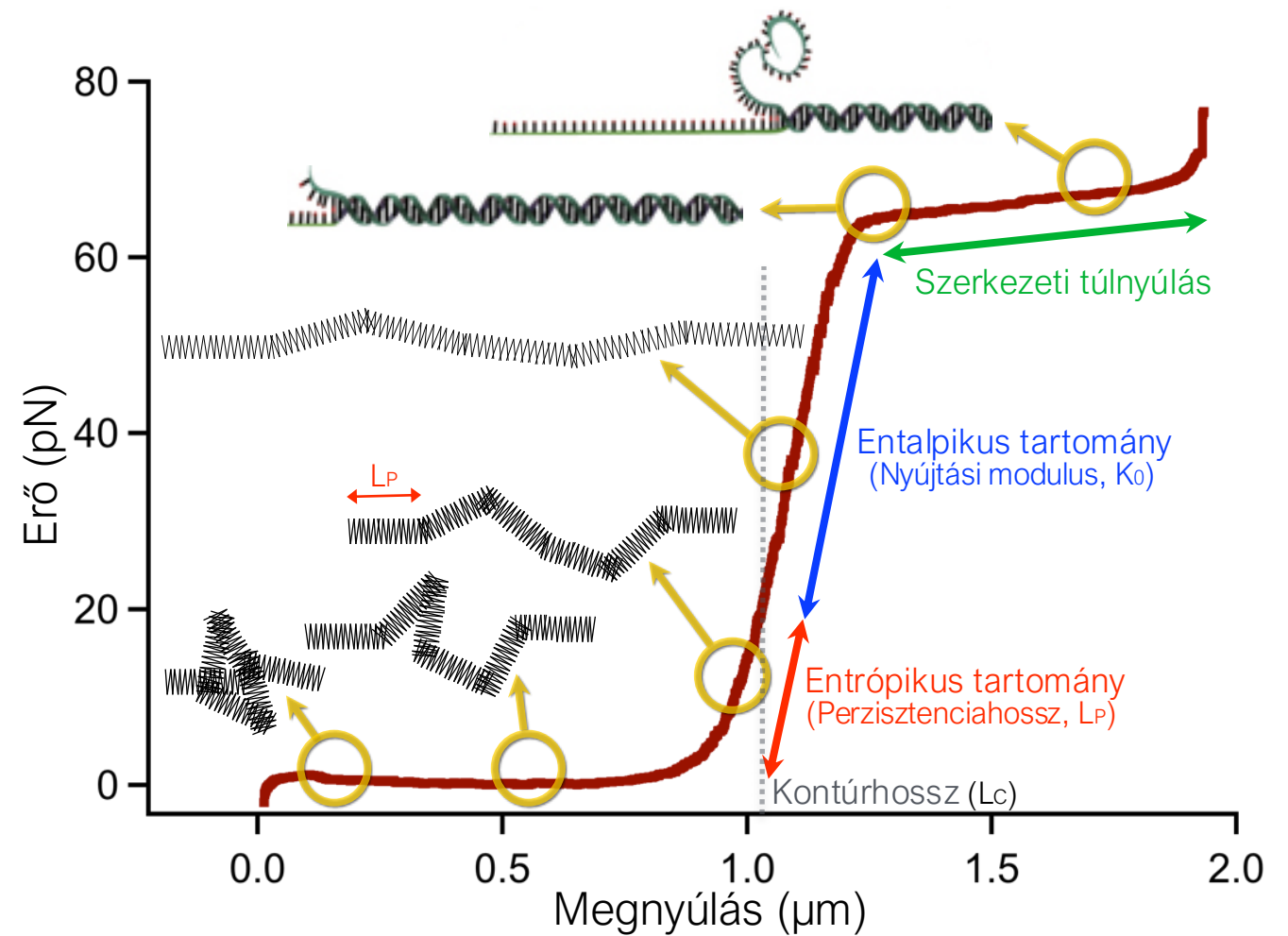
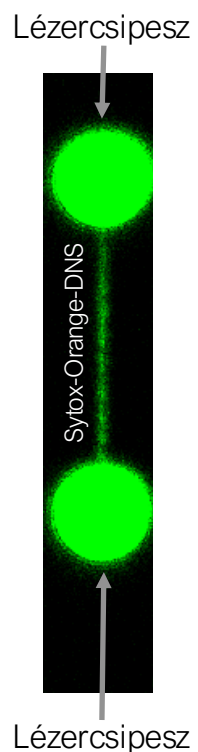
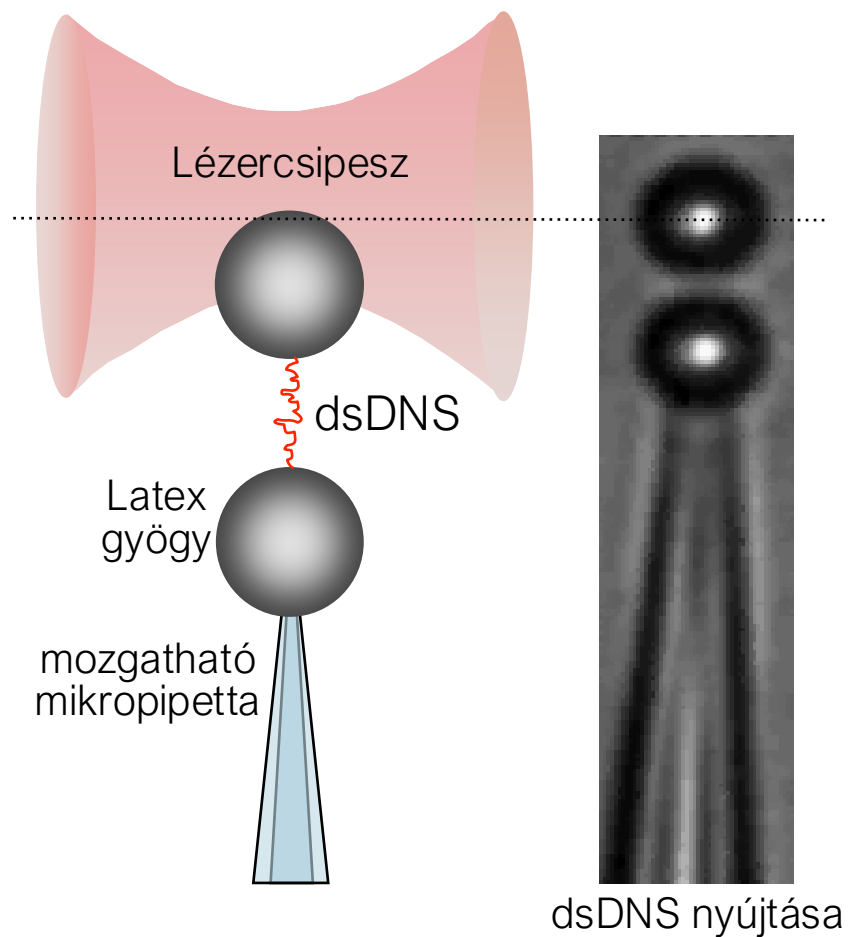
A lézercsipeszel erőt is lehet mérni



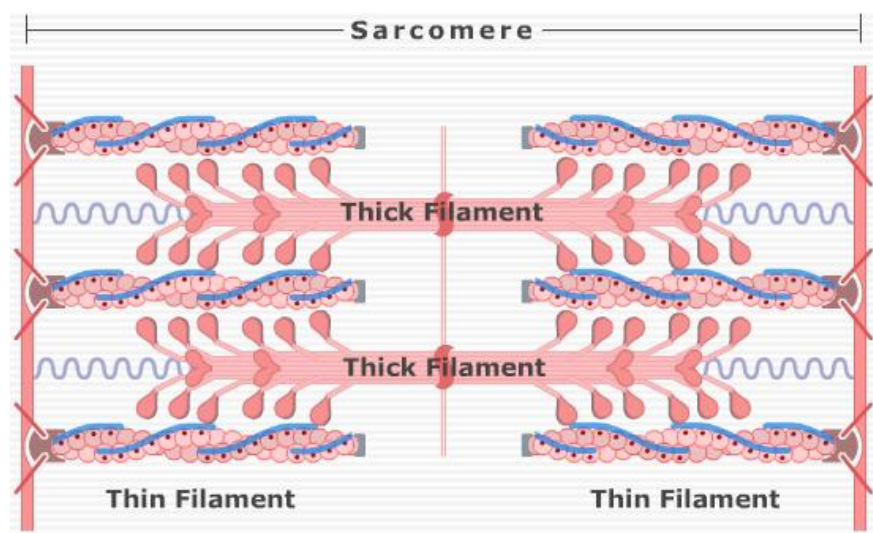
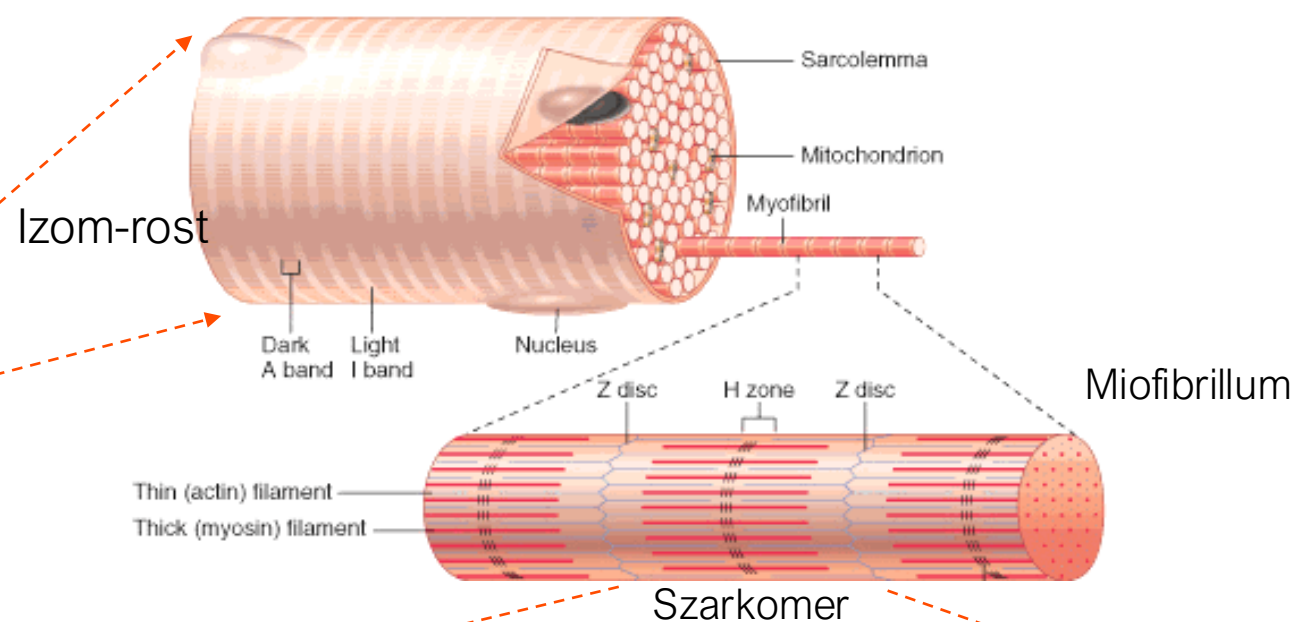
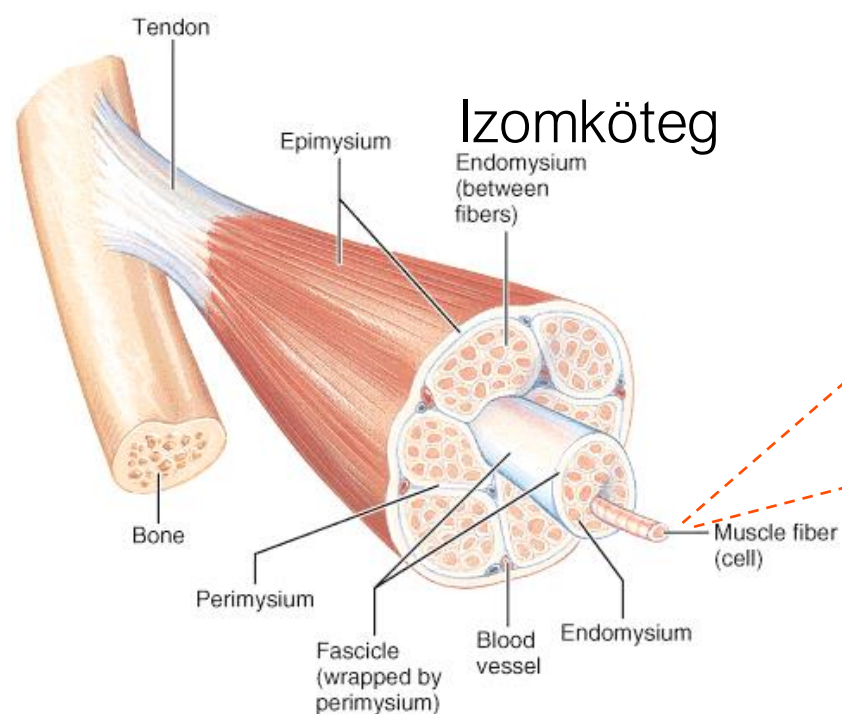
Erőkalibráció

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

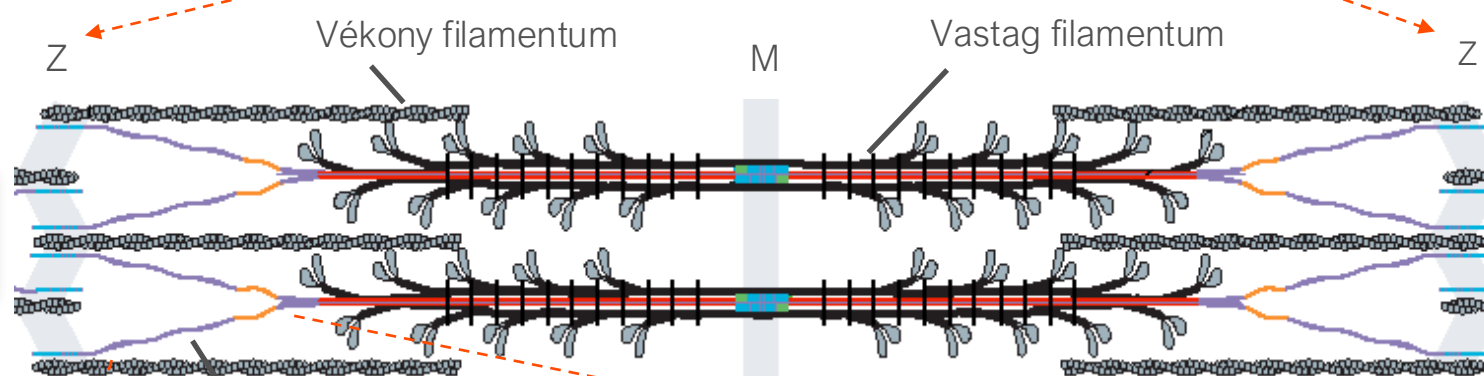
dsDNS mechanikai túlnyújtása



Titin: rugalmas molekuláris “gyöngyfüzér”

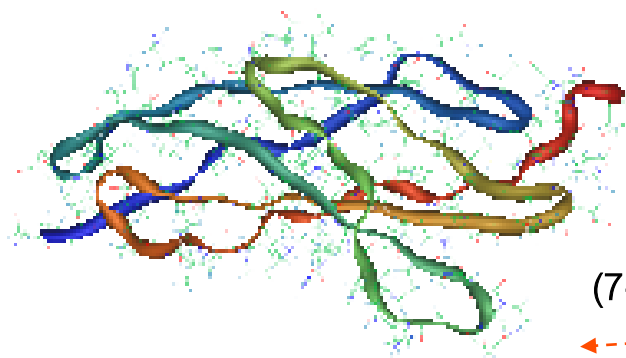
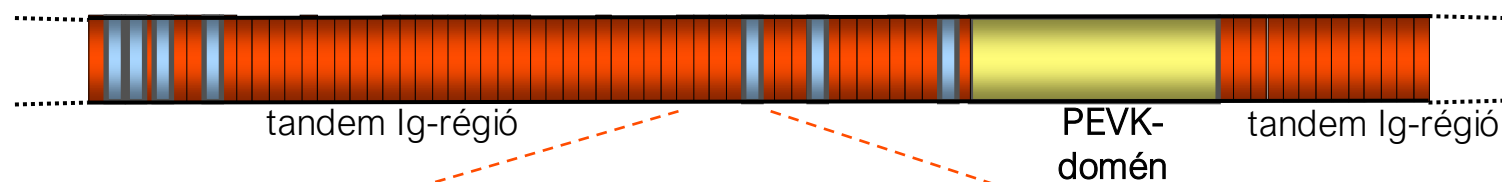


Össze-
húzó-
dás



Titin

I-szakaszbeli szegmens

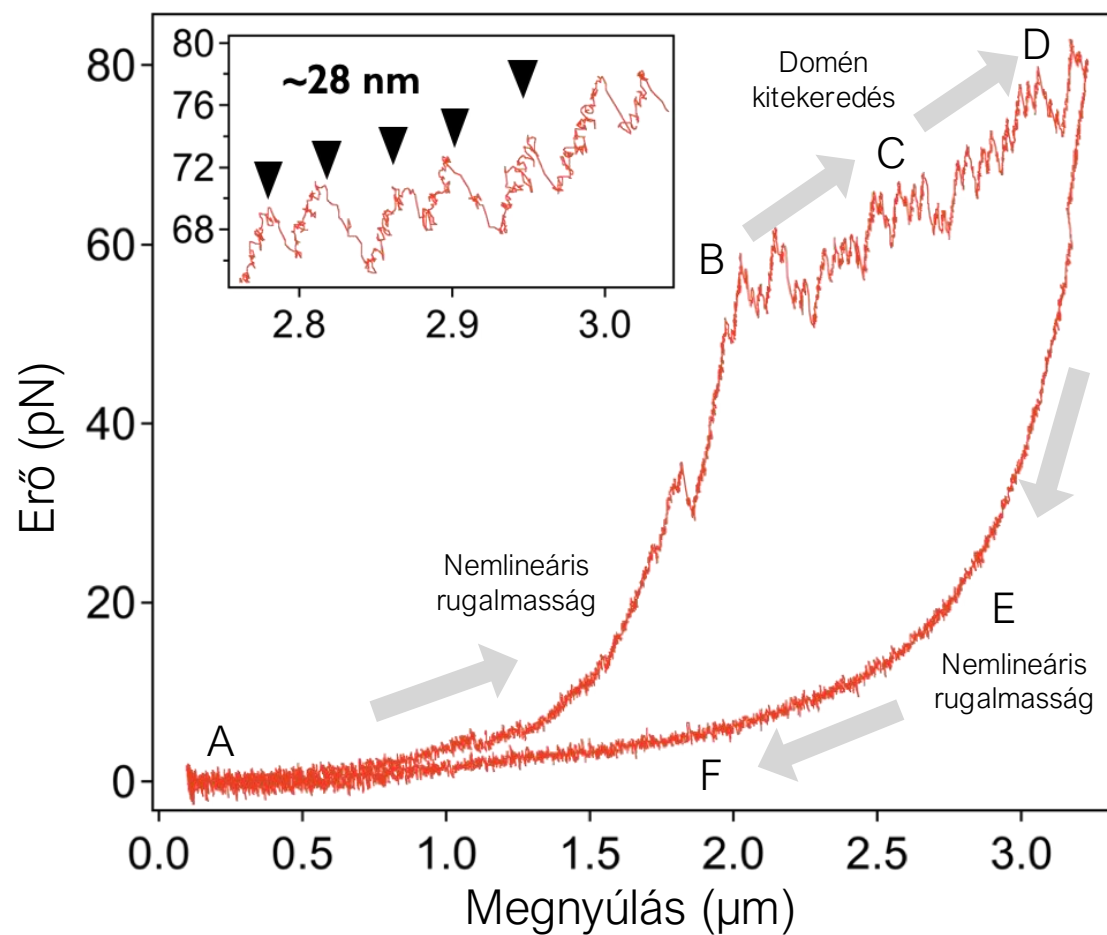


Ig-domén
(7-szálú β -hordó)



Titinmolekula nanomechanikája lézercsipesssel

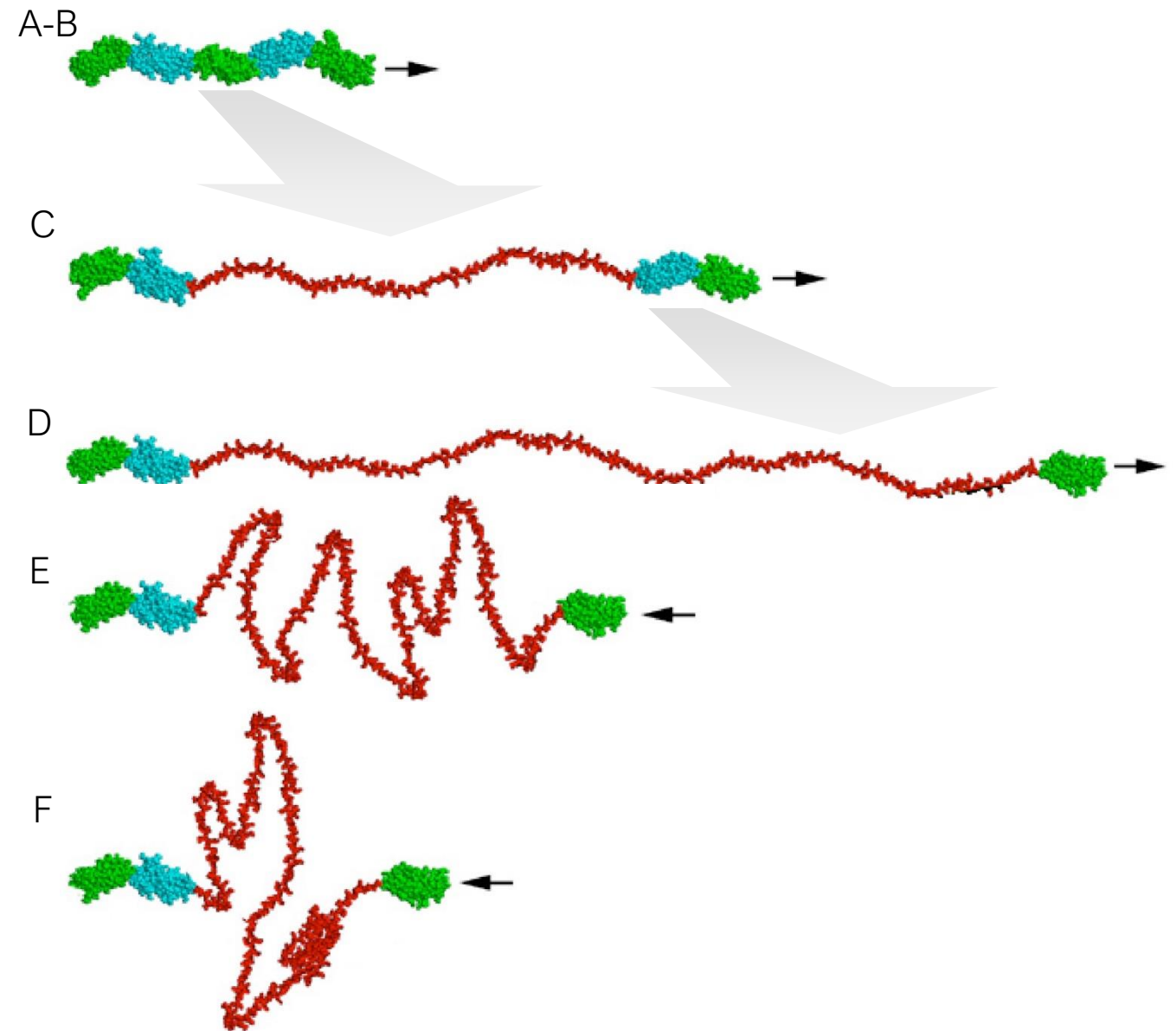
Erőválasz



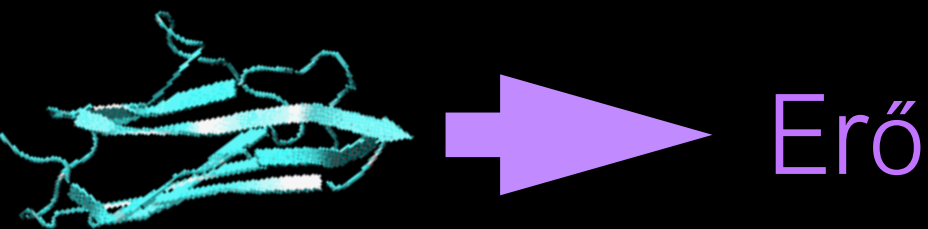
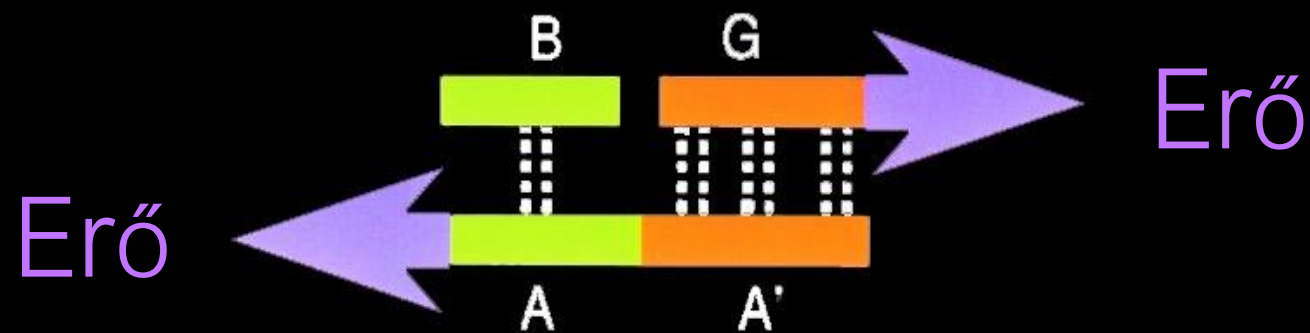
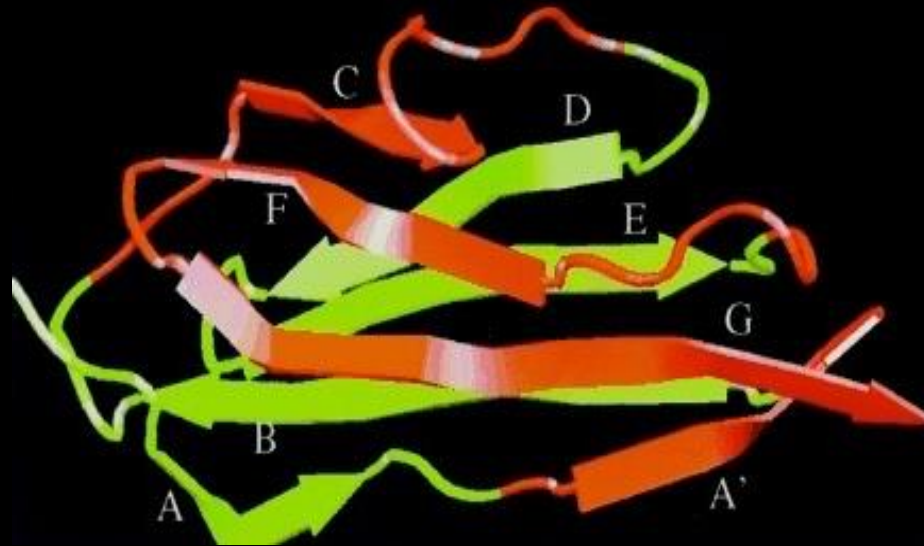
A domének egymás után, a mechanikai stabilitásuk növekvő sorrendjében tekerednek ki.

Erővezérelt szerkezetváltozások:

Nemlineáris rugalmasságra szuperponált domén kitekeredés



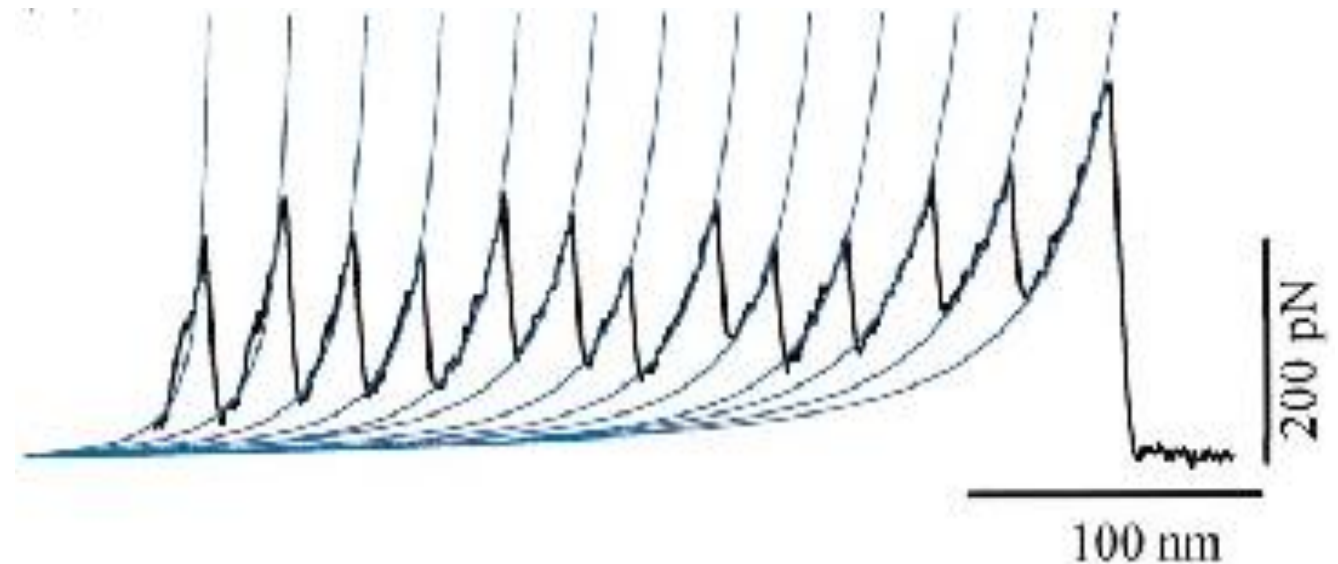
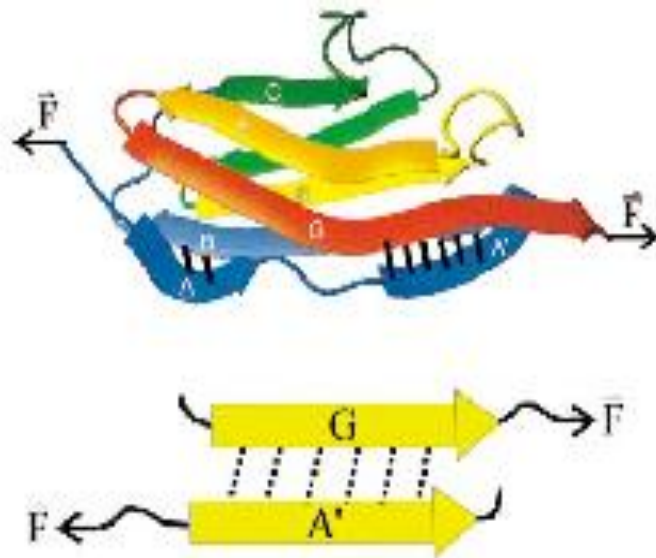
A titin doméneket párhuzamosan
csatolt H-hidak stabilizálják



A mechanikai stabilitás biológiai logikája

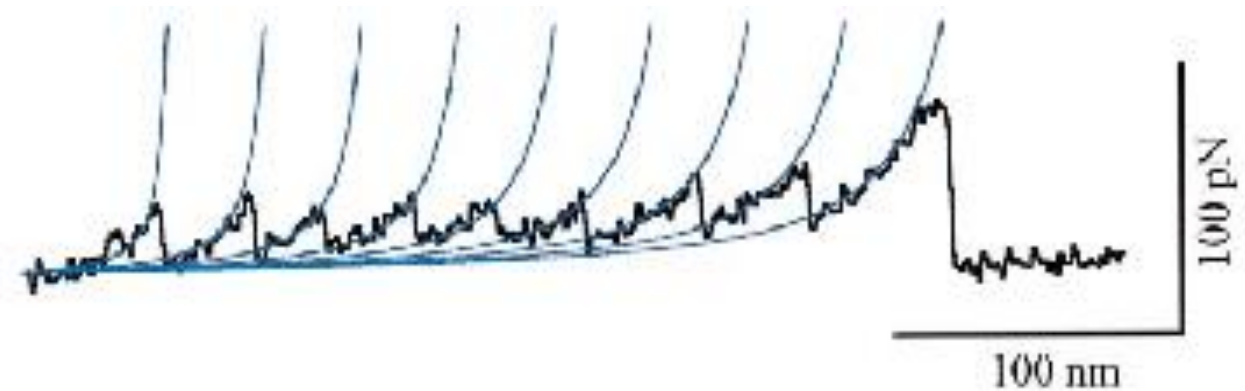
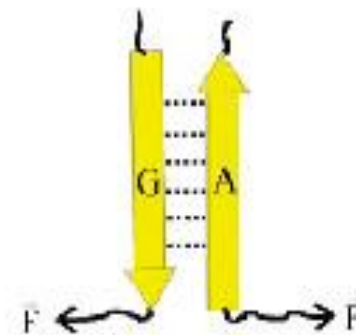
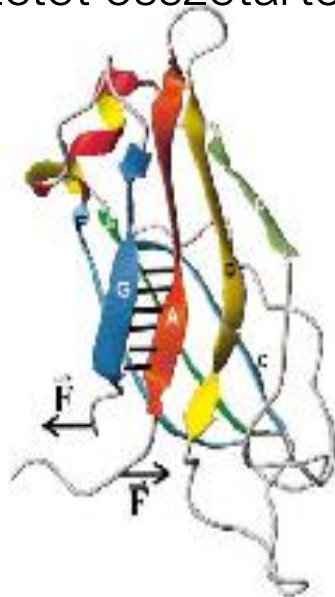
Szerkezetet összetartó H-hidak párhuzamos csatolása

Nagy kitereredési erő



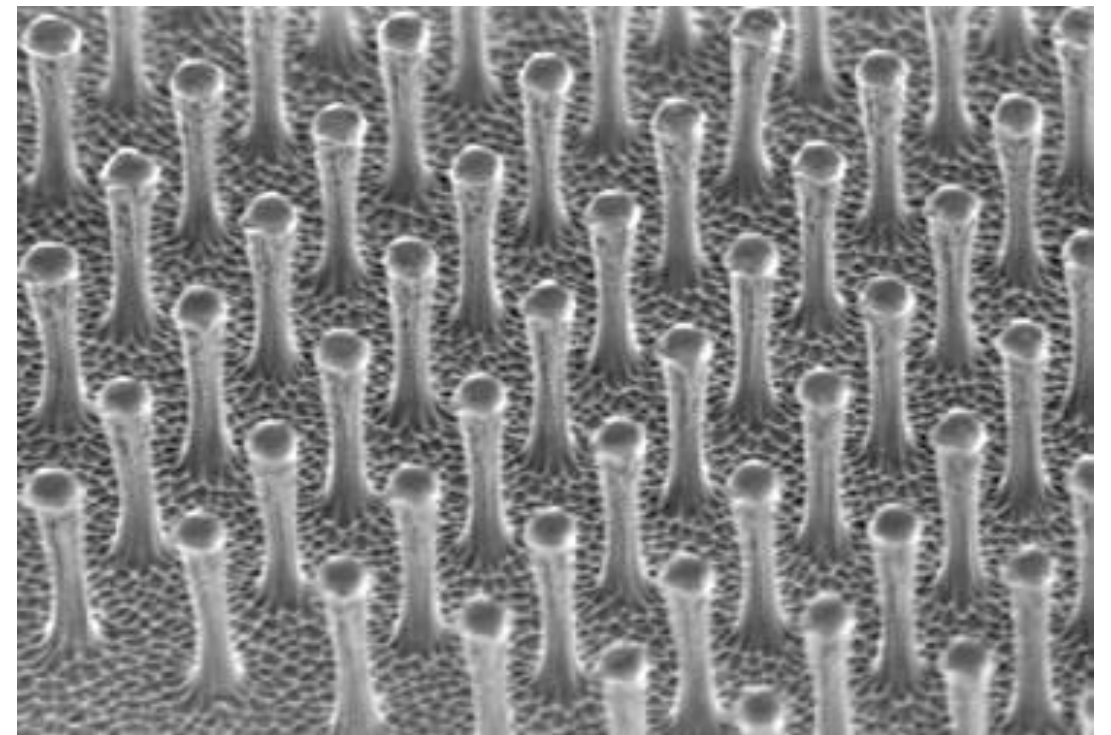
Szerkezetet összetartó H-hidak soros csatolása

Alacsony kitereredési 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