

## A mikroszkópok legfontosabb típusai

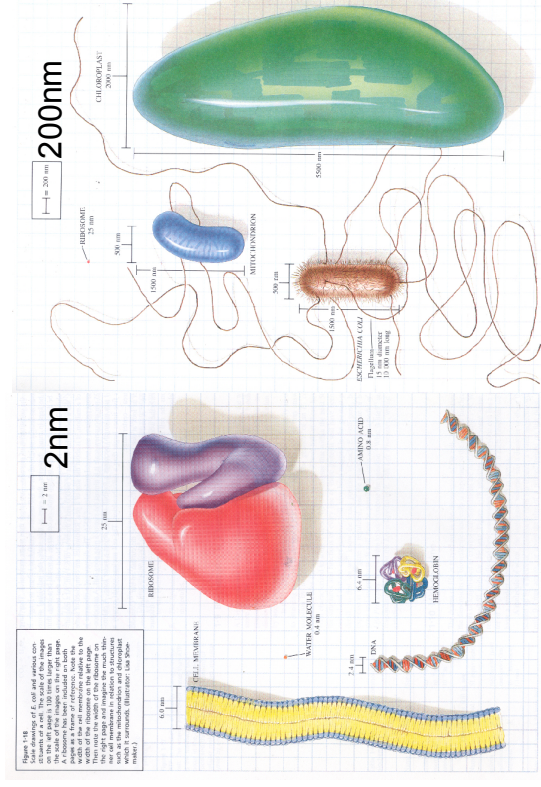
# Fehérjék szerkezetének és működésének mikroszkópi vizsgálata I

# Osváth Szabolcs

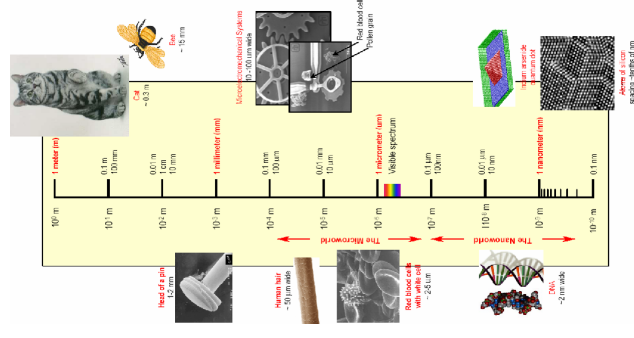
Semmelweis Egyetem  
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

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

## Mekkorák a dolgok?



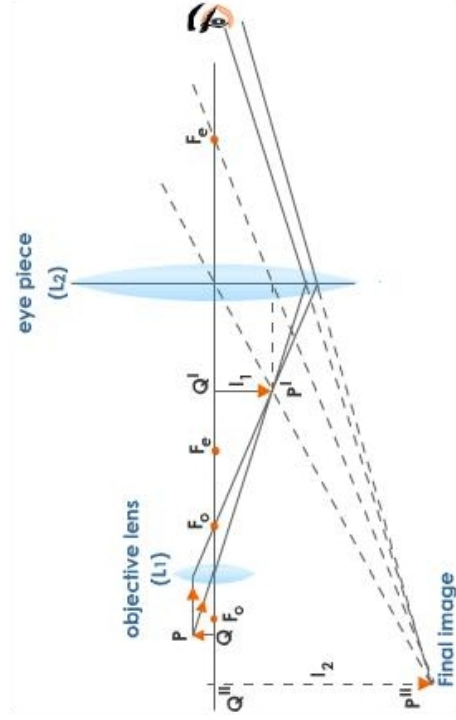
# Mekkorák a dolgok?



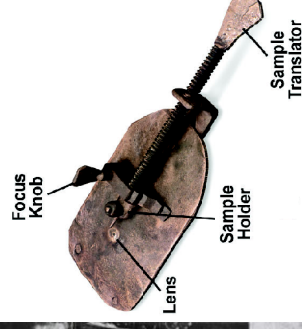
## Hans Jansen és Zacharias Jansen 1590-ben összetett mikroszkópot épít



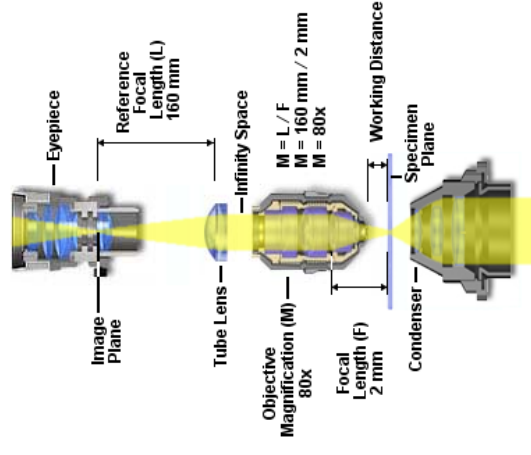
## Összetett mikroszkóp optikai útja



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



## “Végtelenre korrigált” optika

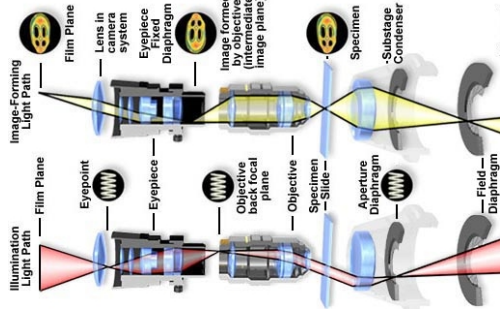


## Köhler megvilágítás

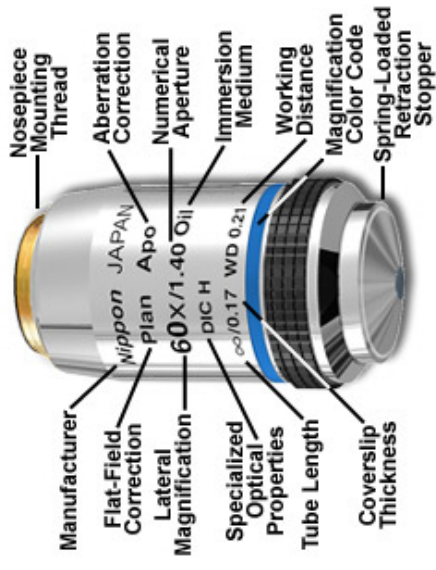


August Köhler  
(1866-1948)

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

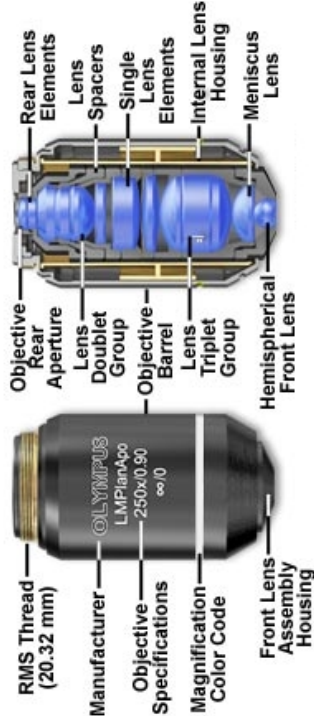


## Mikroszkóp objektív lencsék



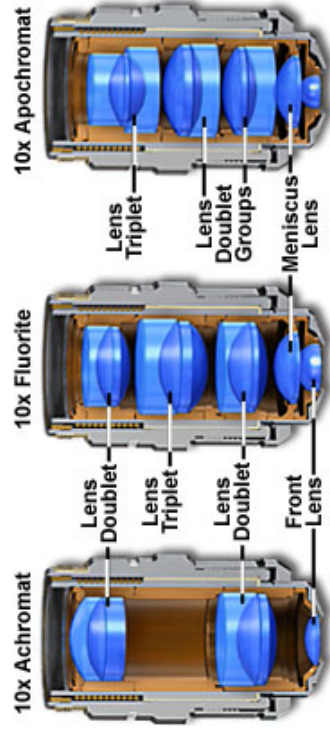
## Mikroszkóp objektívek felépítése

### LWD Plan Infinity-Corrected Apochromat Objective



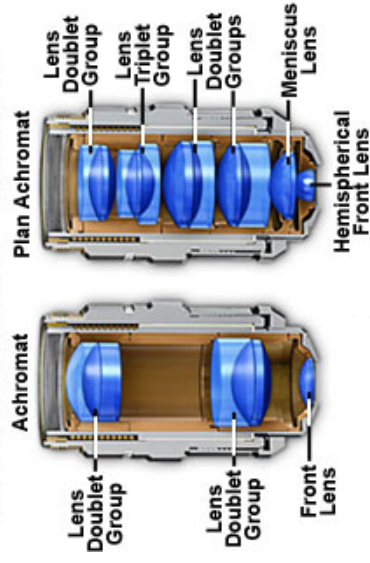
## Színkorrekció

### Common Objective Optical Correction Factors

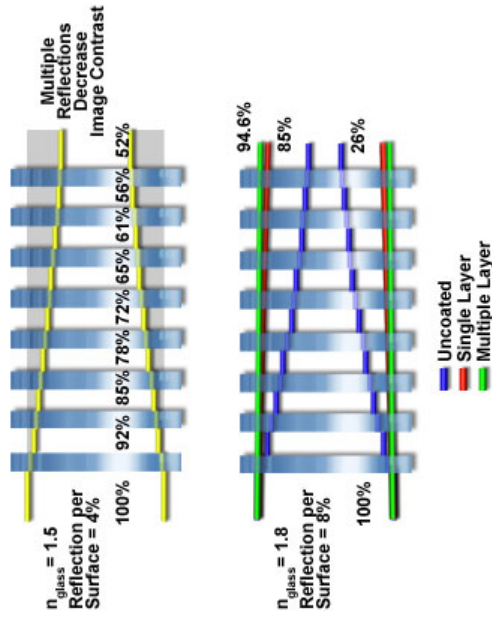


## Plánkorrekció

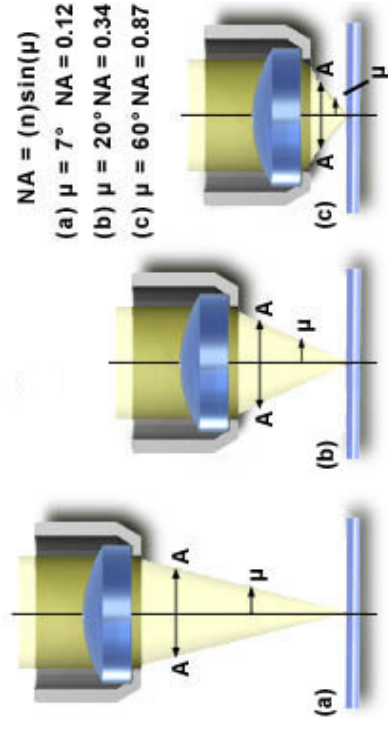
### Objective Correction for Field Curvature



## Fényvisszaverődés a felszíneken



## Numerikus apertúra



## Point Spread Function (PSF)

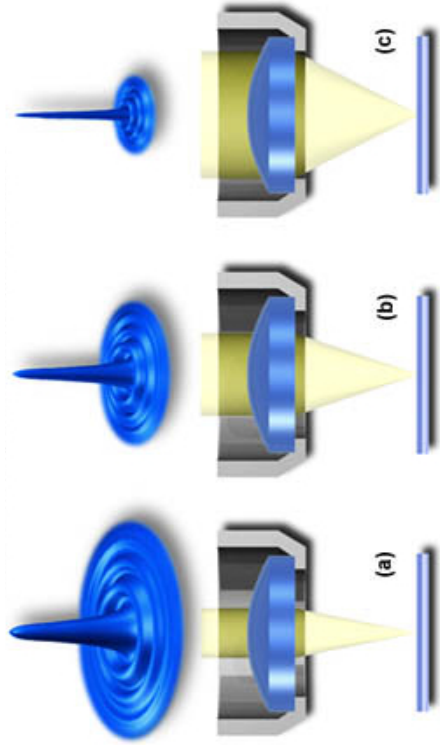
A PSF a mikroszkóp átviteli függvénye.

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

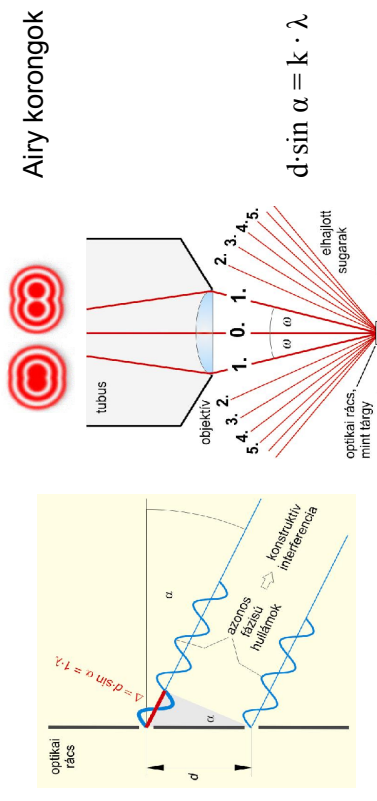
Az objektív segítségével egy térrészbe lehet a fényt fókuszálni, nem egy pontba.



## A numerikus apertúra hatása a PSF-ra



## A fény hullámtermészetének hatása a képre



## Abbe elv

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

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

Hallgatóságos feltevések: a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet; a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képpontokat (foltokat) ad.

## Ernst Karl Abbe (1840-1905)

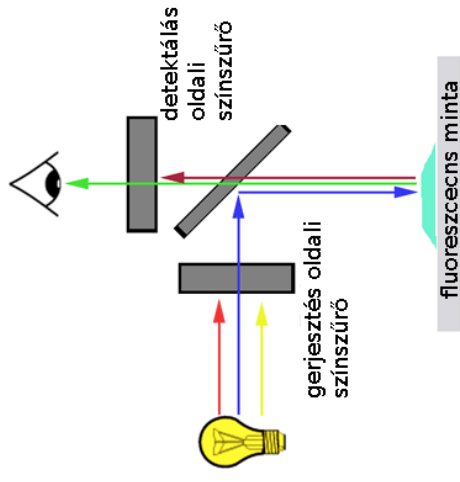


Fizikus és társadalomreformmer  
Az optikai eszközök gyártását  
tudományos alapokra helyezte.

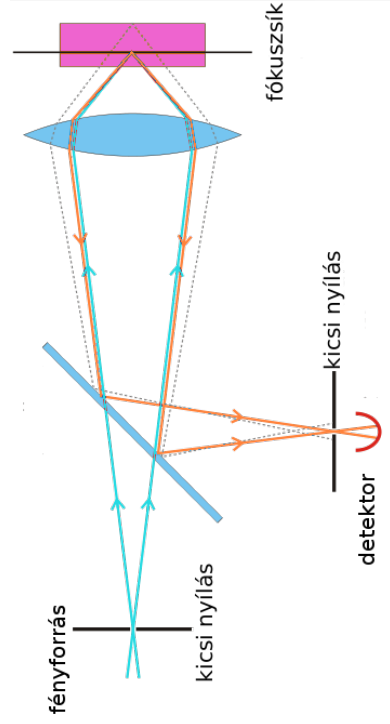
## Objektívek numerikus apertúrája

Magnification	Plan 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

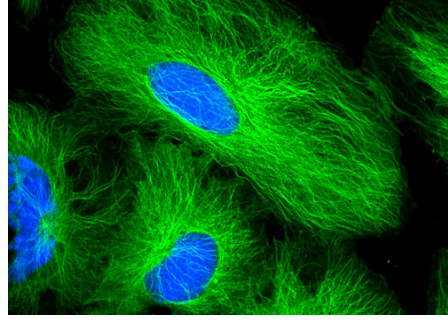
## Fluoreszcencia mikroszkóp



## Konfokális mikroszkóp

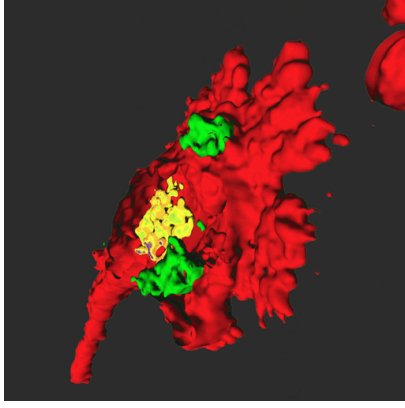


## Konfokális mikroszkóp



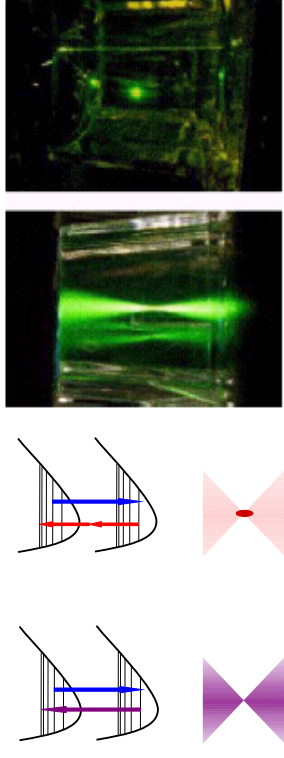
Tubulin mikrotubulusok rekombináns tubulint kifejező sejtekben.

## Konfokális mikroszkóp



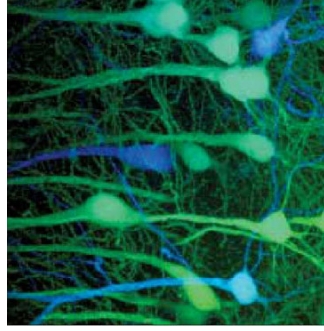
Dendritikus sejt pollen szemcséket takarít el.  
Konfokális mikroszkópi technikával készített 3D kép.

## Egyfotonos és kétfotonos gerjesztés



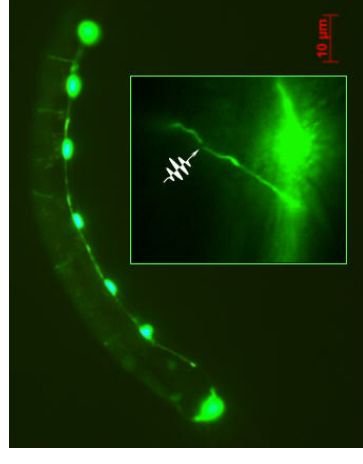
Fluoreszcein oldat emissziója egyfotonos illetve kétfotonos gerjesztés esetén

## Kétfotonos mikroszkópia



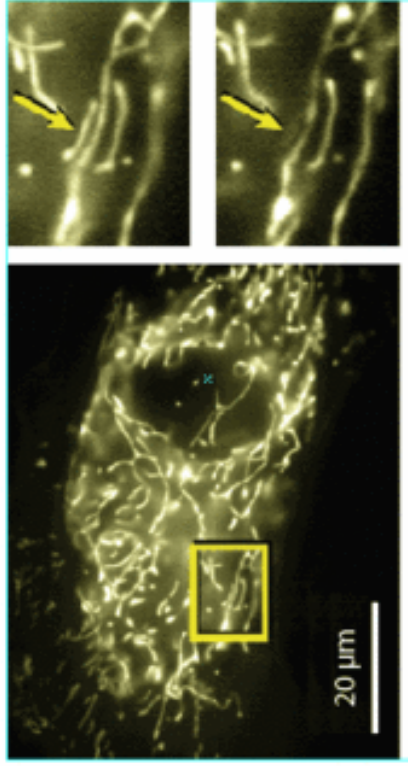
Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező transzgenikus egerek vizuális kortexének kétfotonos mikroszkóppal készült képe.

## Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



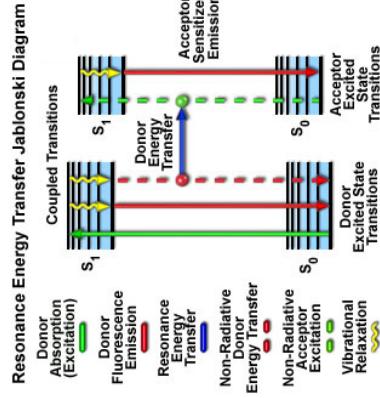
*Caenorhabditis elegans* 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

## Egyedi sejtek fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Egyetlen mitokondrium elpusztítása élő szarvasmarha epitheliális sejtben

## FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

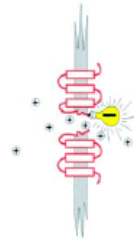


Az energiatranszfer hatásfoka:

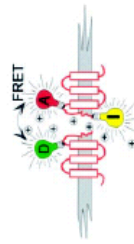
$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$$

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

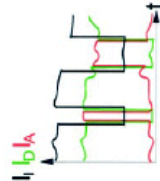
## Fluoreszcens indikátorok



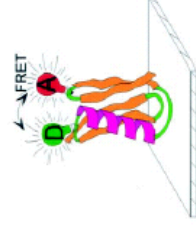
Ioncsatorna működése a helyi ionkoncentráció mérése alapján



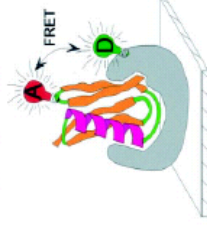
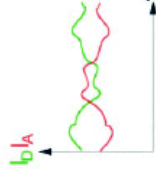
Ionkoncentráció és konformációs változások együttes mérése



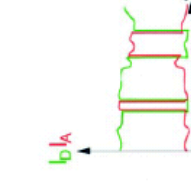
## FRET alkalmazások: távolságmérés



Molekulán belüli konformációs változások



Asszociáció és disszociáció





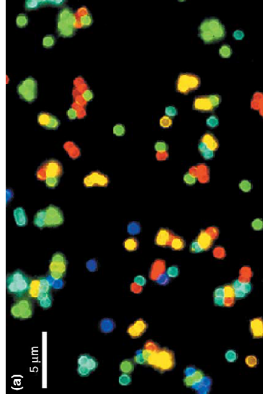
## Az ideális fluorofór

[www.probes.com](http://www.probes.com) (Invitrogen)

- kicsi
- hidrofil
- 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 hatásfok)
- nem, vagy lassan ég ki
- nem csinál fotokémiai reakciókat
- nem pislog

## Fluoreszcens kvantumpöttyök

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

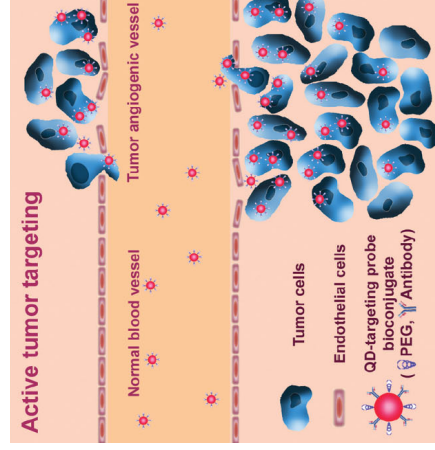


A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

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



## Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



## Fluoreszcens fehérjék



Aequorea victoria (medúza)



Acropora millepora (korall)

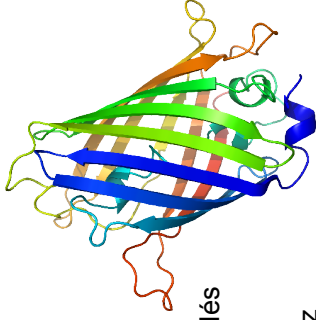
## GFP (Green Fluorescent Protein)

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

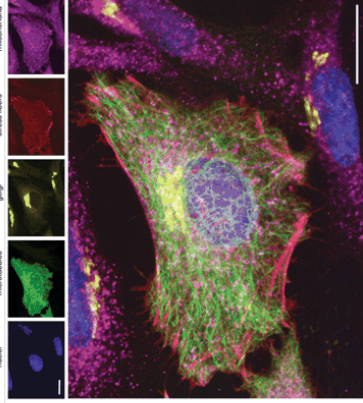


## Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

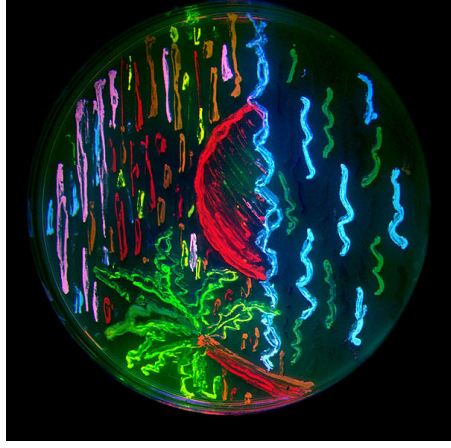
Excitation (nm) (2 photon)	488	412	568	637
Emission (nm)	505-530	555-565	590-600	>660
Fluorophore	fluorescein	OD265	Ruby-H	Cy5
Targeting	direct affinity	immuno	genetic	immuno
Target	cytoskeleton	cytoskeleton	cytoskeleton	cytoskeleton
Structure	nuclei	microtubules	stress fibers	microtubules

Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20 µm hosszú.



## A fluoreszcens fehérjék sokfélesége



A kép teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal készült.