

Fehérjék szerkezetének és működésének mikroszkópi vizsgálata II

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

Egyedi molekulák vizsgálata

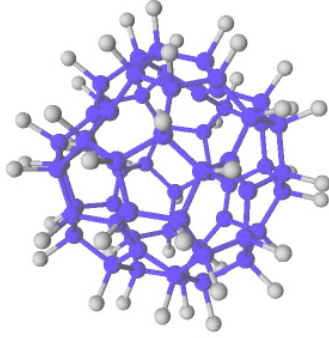
“Plenty of Room at the Bottom”

" The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom. It is not an attempt to violate any laws; it is something, in principle, that can be done; but in practice, it has not been done because we are too big."

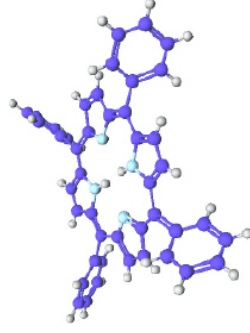
Richard Feynman, 1959

Hullám-részecske kettősség

Louis De Broglie: $\lambda = h/p$

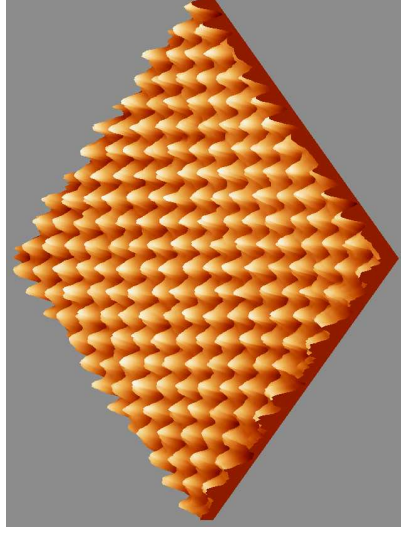


fluorofullerén $C_{60}F_{48}$
1632 Da



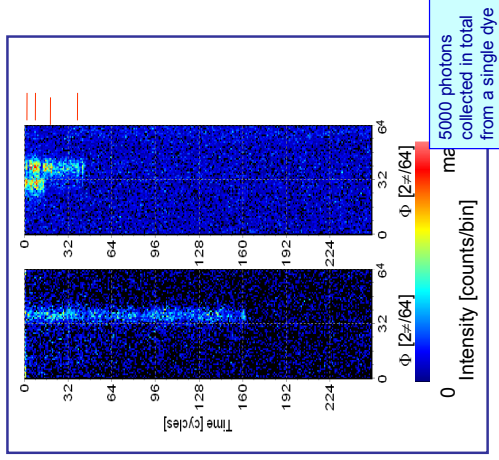
tetrafenilporfirin $C_{44}H_{30}N_4$

Hullám-részecske kettősség

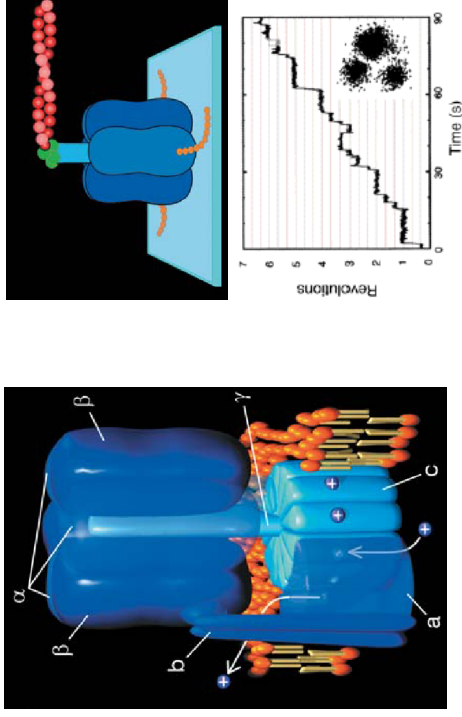


Grafitról készült Páztázó Alagútmikroszkópi
(Scanning Tunneling Microscope, STM) kép

Egyedi Alexa molekulák kvarc felszínén

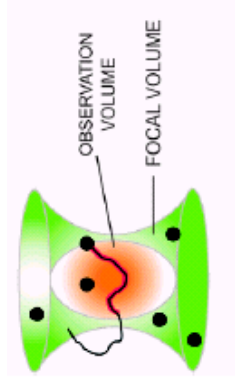


Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása

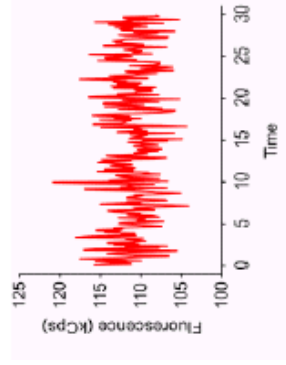


Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

egyensúly körüli fluktuációk
megfigyelt térrész: fl
koncentráció: 10 nM
molekulák számának időátlaga: 6

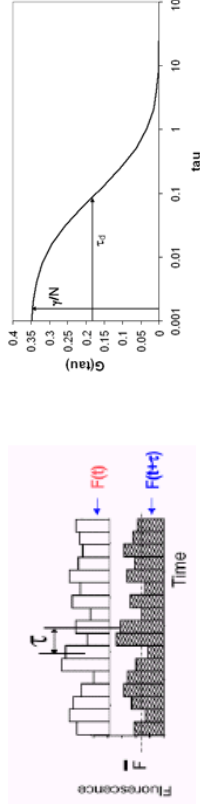


Fluoreszcencia fluktuációk



Autokorrelációs függvény

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$



τ_d - a karakterisztikus ideje annak, hogy egy molekula átdiffundáljon a fókuszterfogaton
 γ - a PSF alaki tényezője
 N - a fókuszterfogatban lévő átlagos molekulaszám

Mikor mit határozzunk meg

Ligandumkötődés

kis jelölt ligandum+nagy fehérje diffúziós állandó

Aggregáció

jelölt fehérjék dimerei fényesség

Koncentráció

pl. nagy aggregátumok számának megállapítása az oldatban
több komponens illesztése, PCH és autokorreláció

Reakciósebesség

autokorreláció illesztése modellel

Diffúzió a sejt belsejében vagy membránban

autokorreláció a megfelelő modellel illesztve

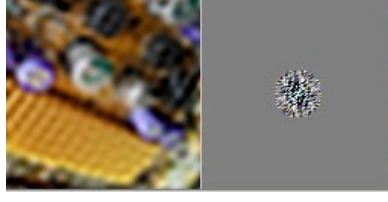
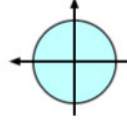
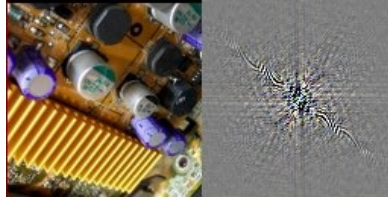
Abbe elv

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

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

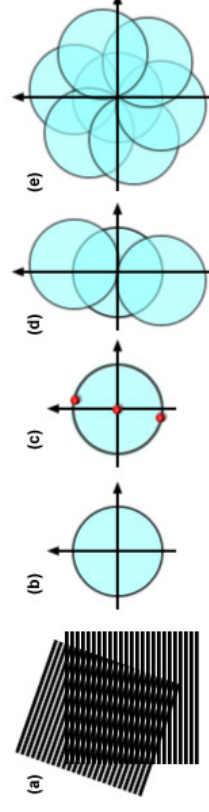
Hallgatólagos feltevések: a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet; a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képpontokat (foltokat) ad.

Abbe elv a minta térbeli frekvenciái szempontjából

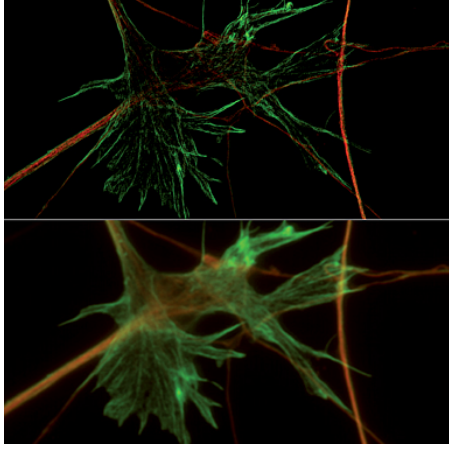


A képen lévő térbeli frekvenciákból a mikroszkóp objektív csak egy szűk tartományt enged át, ami korlátozza a térbeli feloldást.

Strukturált megvilágításos mikroszkóp

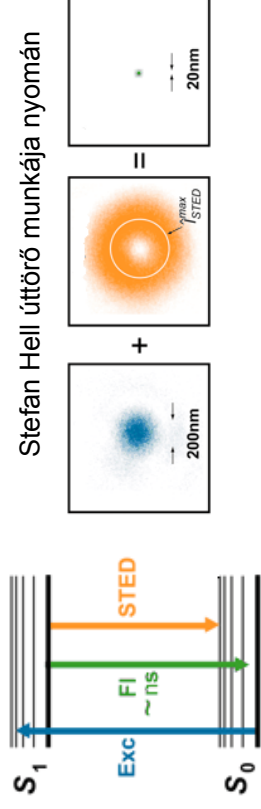


Strukturált megvilágításos mikroszkóp



Hagyományos (bal) és strukturált megvilágításos mikroszkópi kép (jobb) idegsejtekről.

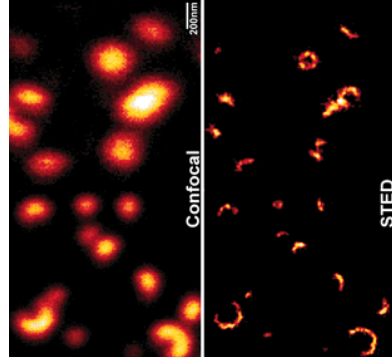
STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



$$\Delta r \approx \frac{\Delta}{\sqrt{1 + I_{max}/I_s}}$$

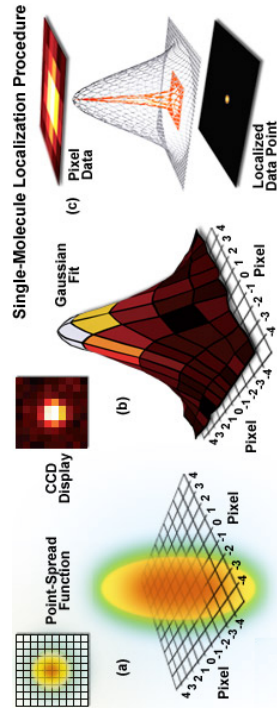
I_{max} a használt maximális STED intenzitás
 I_s a STED telítési intenzitása

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

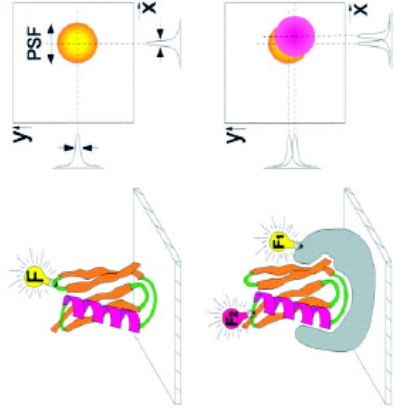


Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

Lokalizáció



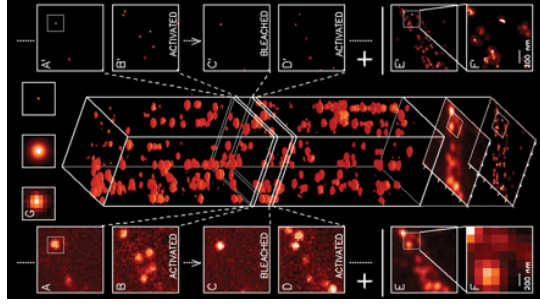
Lokalizáció és kolokalizáció



A PSF illesztése alapján nm pontossággal tudjuk megállapítani a jelölt makromolekula helyét.

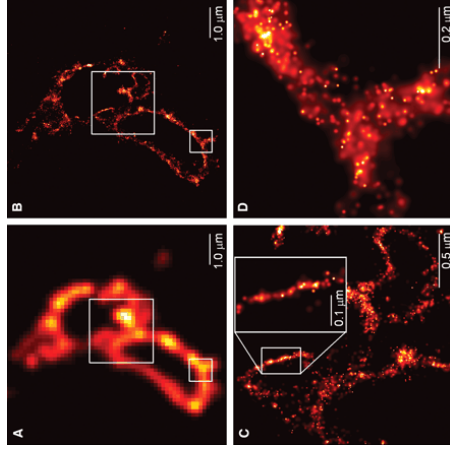
Két különböző színű, egymással nem kölcsönható kromofór helyének megállapítása.

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



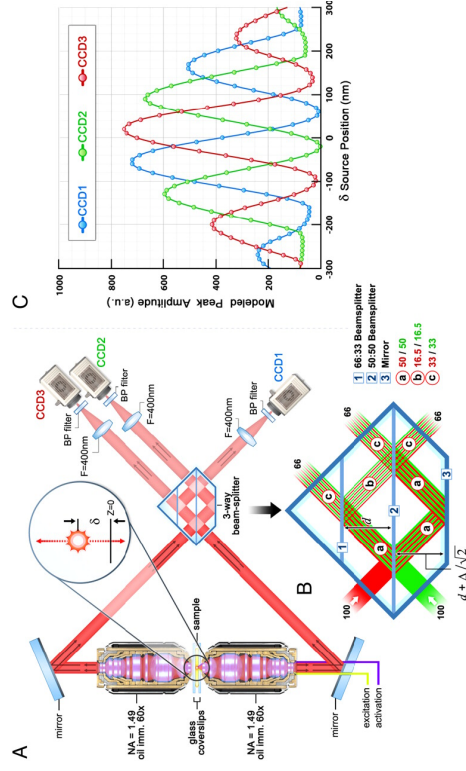
Eric Betzig és Harald Hess
találománya nyomán

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

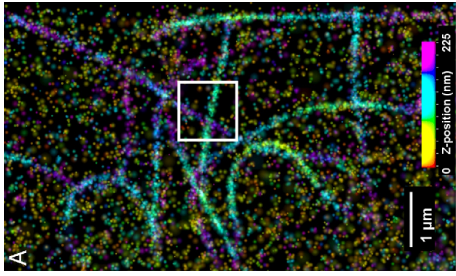


CD63, lizoszóma
transzmembrán fehérje

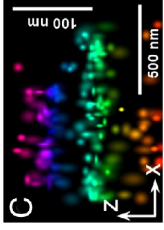
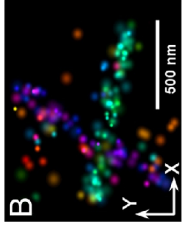
Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



Mikrotubulus szerkezete PtK1 sejtekben, amelyek humán tubulinhoz fuzionált m-KikGR fluorofórt fejnek ki.



Az elektron mint hullám



Louis de Broglie:

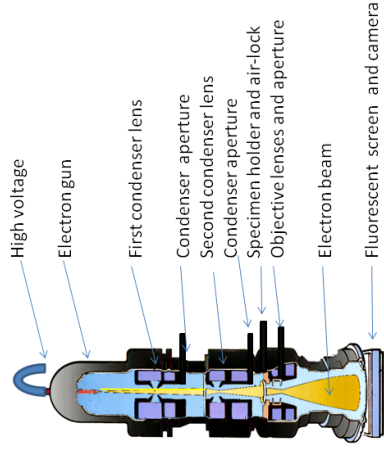
$$\lambda = h / p$$

λ az elektron hullámhossza
h a Planck állandó
p az elektron impulzusa

Louis-Victor-Pierre-Raymond,
de Broglie hetedik hercege

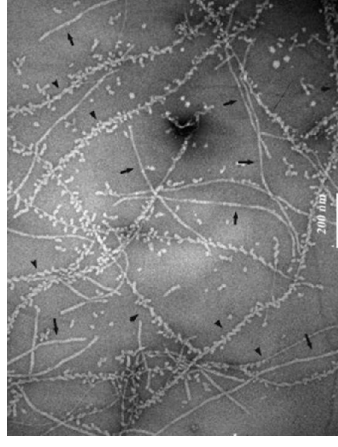
Transzmissziós elektronmikroszkóp

Ruska 1933-ban épült
elektronmikroszkópja



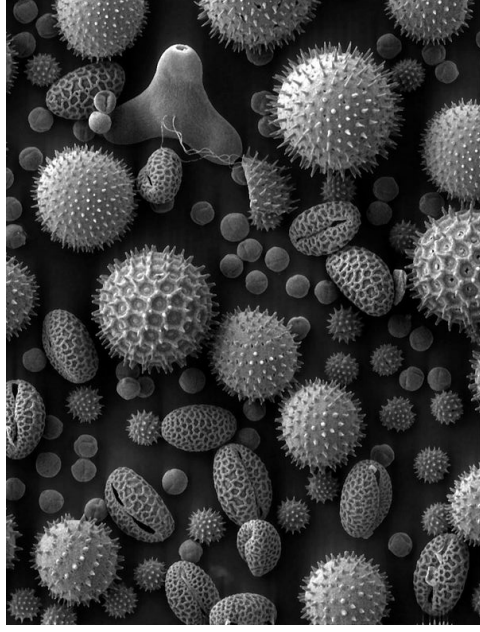
Ernst August Friedrich Ruska és Max Knoll készítették az első elektronmikroszkópot 1931-ben. Ruska 1986-ban Nobel díjat kapott az elektronoptika fejlesztése terén elért eredményeiért.

Amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkópi képe

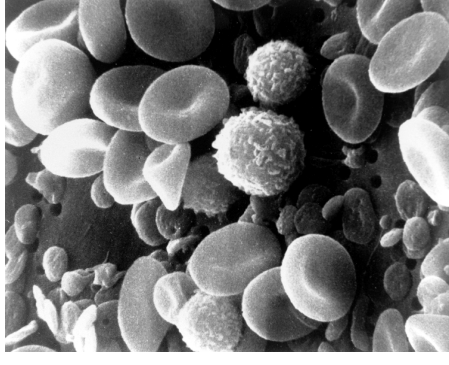


Koleszterin kötődése
amiloid fibrillumokhoz.

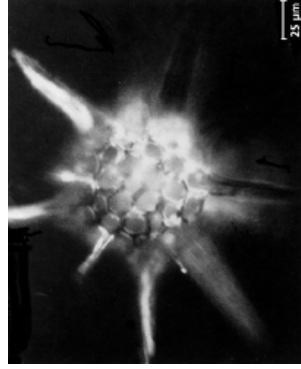
Pollen pásztázó elektronmikroszkópos képe



Vérsejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe



Optikai- és elektronmikroszkóp összehasonlítása

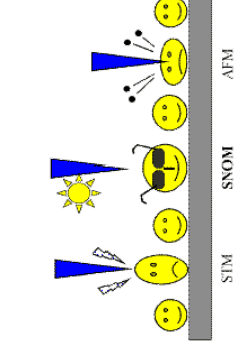


- kis mélységélesség
- alacsony felbontás
- + élő minta, életfolyamatok
- + légköri nyomáson



- + nagy mélységélesség
- + nagy felbontás
- fixált, festett minta
- vákuumban

Pásztázó próba mikroszkópok (Scanning Probe Microscopes)

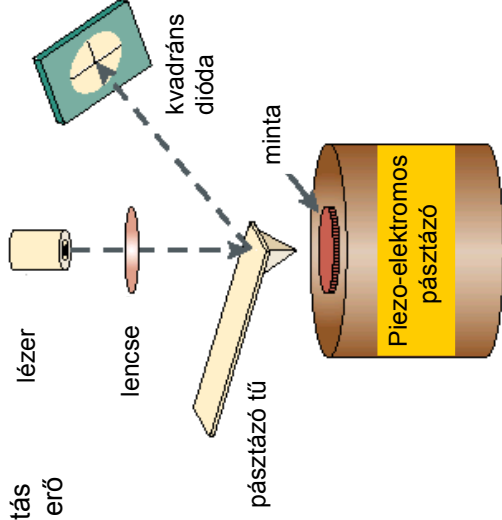


- STM:
Scanning Tunneling Microscope
- SNOM:
Scanning Nearfield Optical Microscope
- AFM:
Atomic Force Microscope

A pásztázó alagútmikroszkópot 1981-ben találta fel Heinrich Rohrer és Gerd K. Binnig. Őt évvel később a munkájukért Nobel díjat kaptak.

Pásztázó Erőméréses Mikroszkóp (Atomic Force Microscope-AFM)

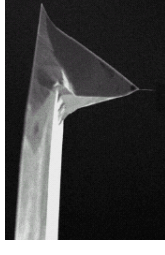
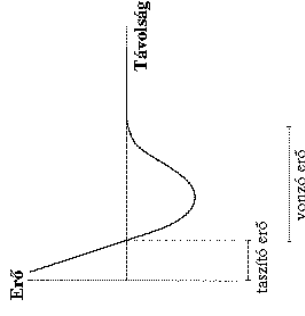
AFM: a mért kölcsönhatás
a hegy és minta közötti erő



A minta és a tű közötti erő

tipikusan 100 μm hosszú, 1 μm vastag, V alakú tű: szilícium (-oxid, -nitrid),
5 μm a talpánál, 50 nm görbületi sugár a hegyén

- kis rugóállandó
- nagy rezonanciafrekvencia



Contact Mode AFM

A tű és a minta állandó kontaktusban vannak. A taszító tartományban dolgozik.

A tű a felülethez adszorbeált folyadékrétegen keresztül érintkezik a mintával.

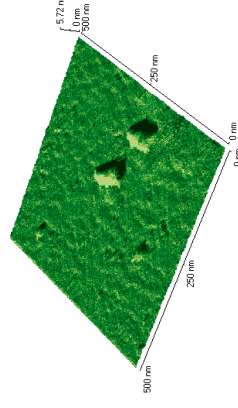
Állandónak tartja az erőt: követi a felzín hullámzását.

Piezo kristály z irányú feszültsége állandó: a mérőrugó deformációját detektáljuk.

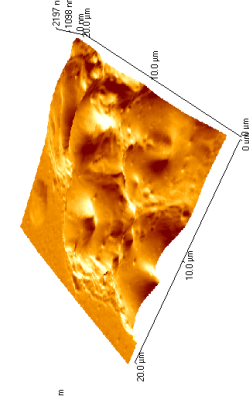
Lokális erő spektroszkópia: a felület egy adott pontjában az erő/elmozdulás függvény.

Biológiai mintákról készült AFM képek

Hősokek fehérjék



Vörös véresejtek



Tapping Mode AFM

A tű 20-100 nm-es rezgéseket végez, és minden rezgésnél érinti a felületet.

Pásztázás közben az amplitúdó változik ahogy a felszínen dombok vannak.