

Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

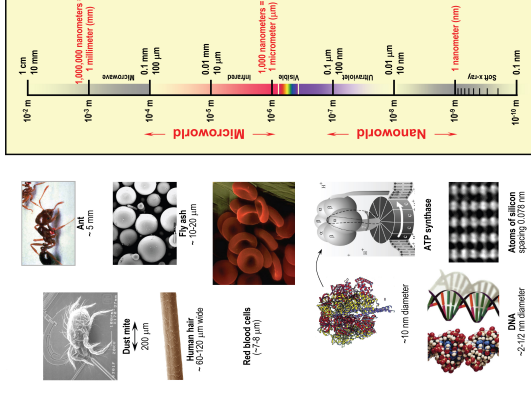
Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

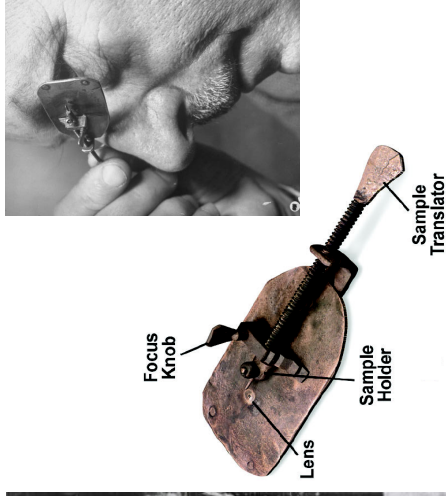
Hans Jansen és Zacharias Jansen
1590-ben összetett mikroszkópot épít



Mekkorák a dolgok?



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



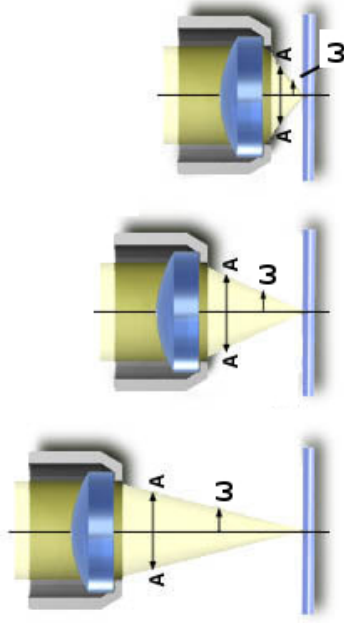
Ernst Karl Abbe (1840-1905)



Fizikus és társadalomreformer

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

Numerikus apertúra

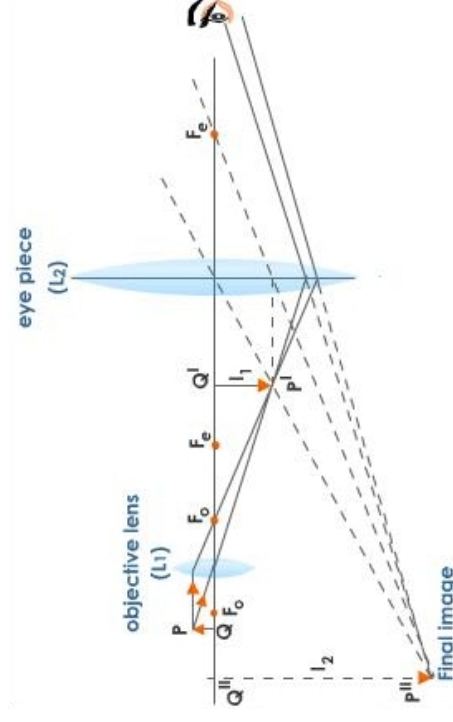


Point Spread Function (PSF)

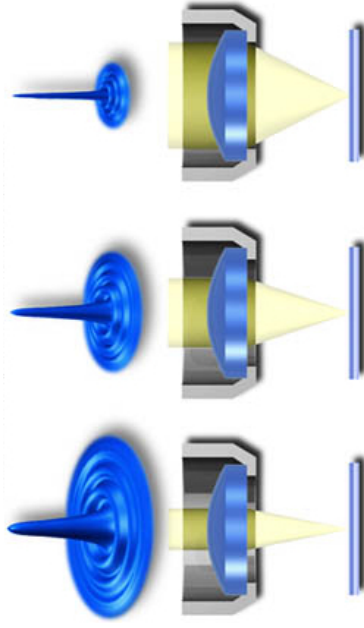
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

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

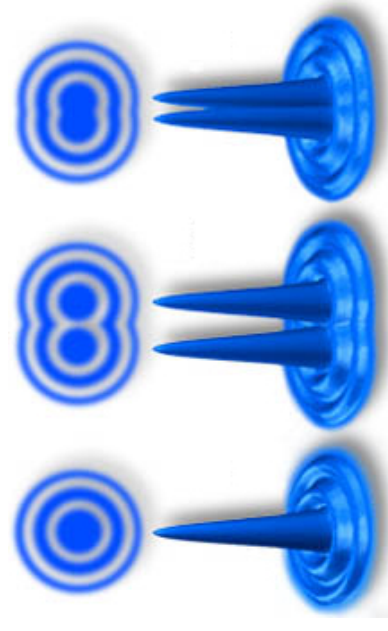
Összetett mikroszkóp optikai útja



A numerikus apertúra hatása a PSF-re



A fény hullámtermészetének hatása a képre



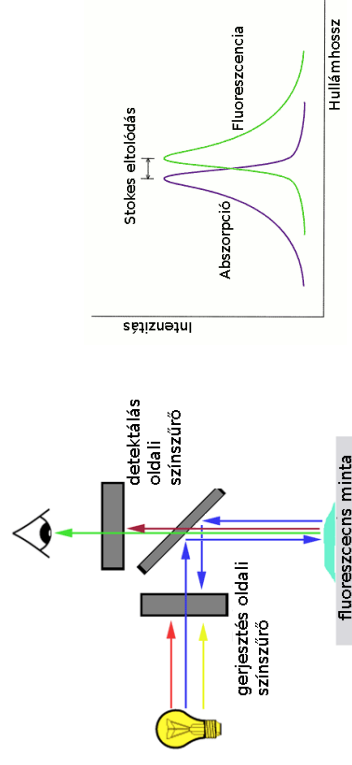
Abbe összefüggés

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

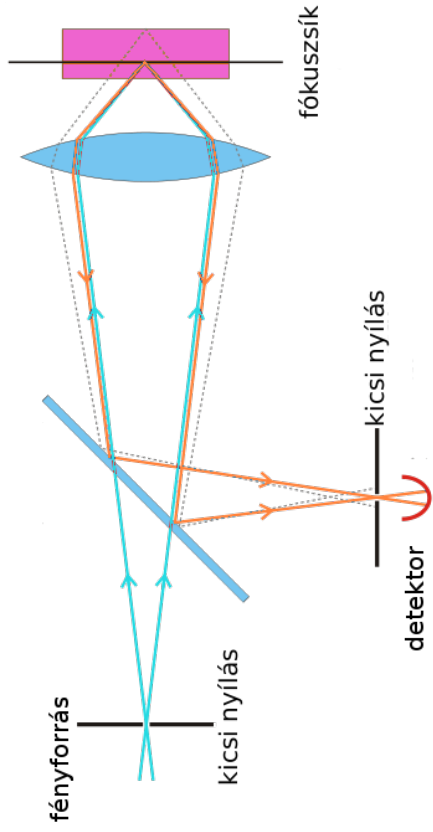
Hallgatolagos feltevések:

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

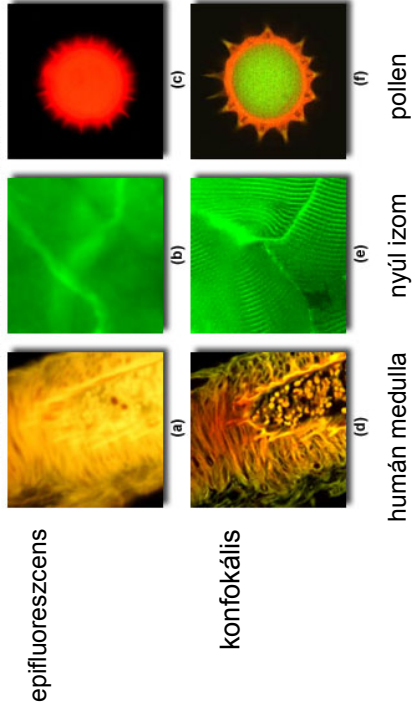
Fluoreszcencia mikroszkóp



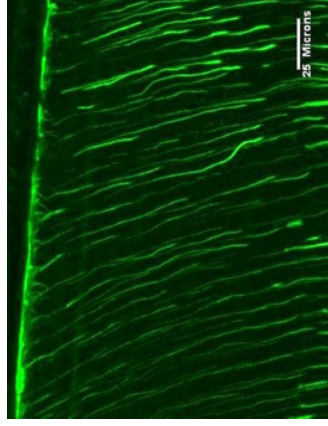
A konfokális fluoreszcencia mikroszkóp működése



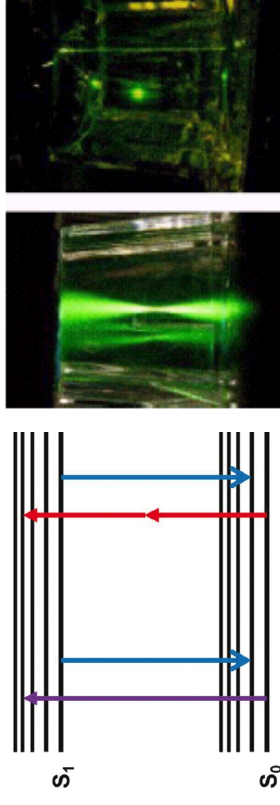
Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása



Dentinalis tubulusok humán fogban



A kétfotonos mikroszkóp működési elve

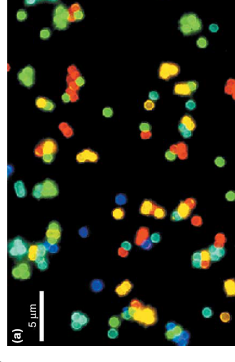


Az ideális fluorofor

- kicsi
- hidrofili
- a látható tartományban nyel el és emittál
- nagy Stokes eltolódás
- specifikus kötődés (biotin/avidin, His-tag/Ni, antitest/antigén NH₂, 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

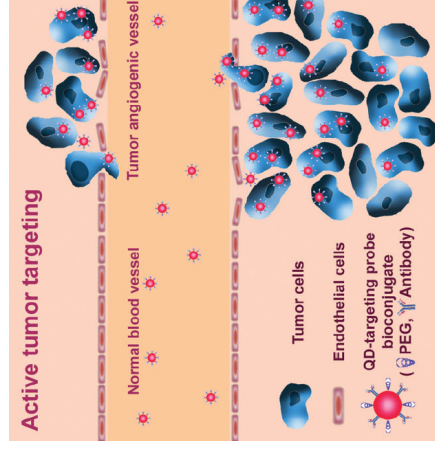


A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

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



Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



Fluoreszcens fehérjék

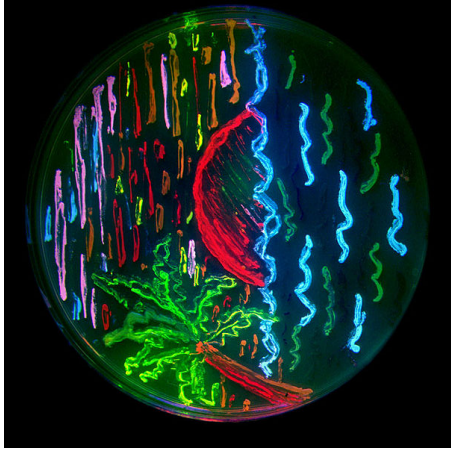


Aequorea victoria (medúza)



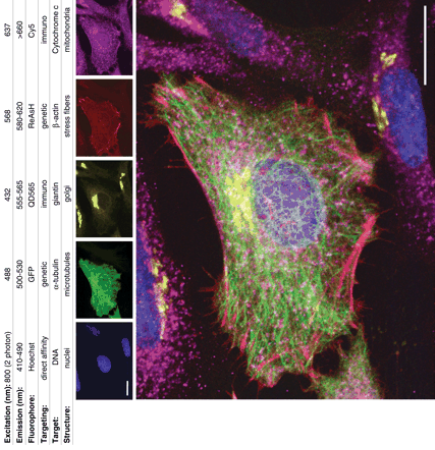
Acropora millepora (korall)

A fluoreszcens fehérjék sokfélesége



A képet teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal festették.

Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása



Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20 µm hosszú.

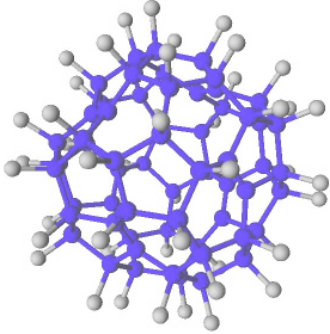
Egyedi molekulák vizsgálata

“Plenty of Room at the Bottom”

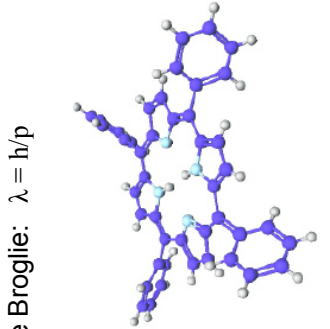
"The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom. It is not an attempt to violate any laws; it is something, in principle, that can be done; but in practice, it has not been done because we are too big."

Richard Feynman, 1959

Hullám-részecske kettősség



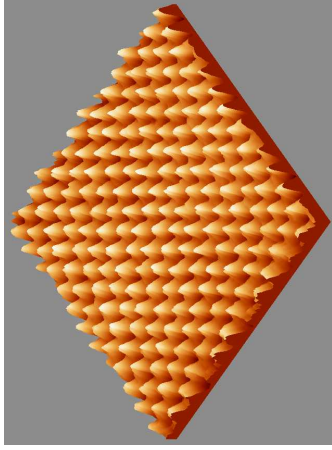
fluorofullerén $C_{60}F_{48}$
1632 Da



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

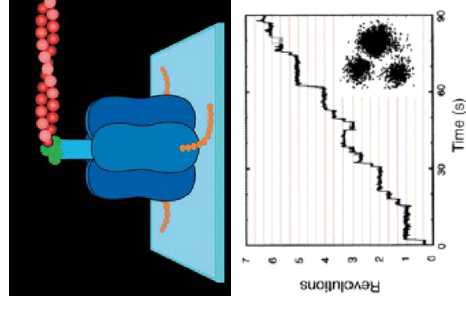
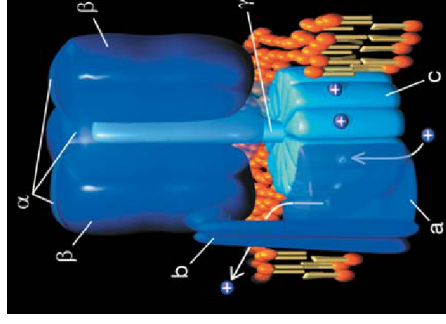
Louis De Broglie: $\lambda = h/p$

Hullám-részeske kettősség



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

Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása



Lokalizáció

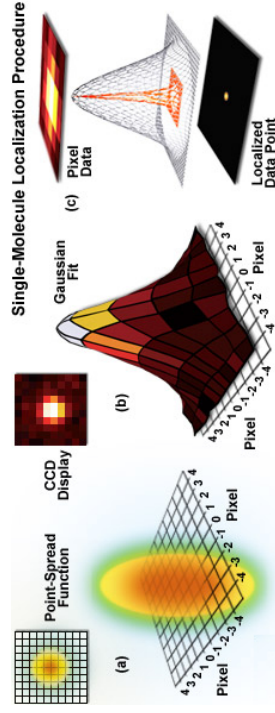
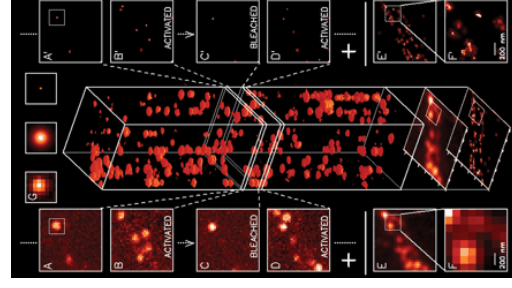


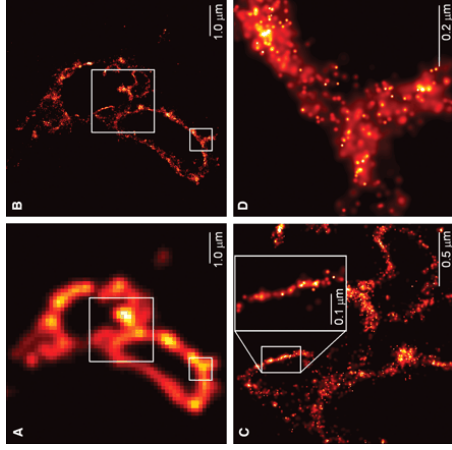
Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



Eric Betzig és Harald Hess
találmánya nyomán

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

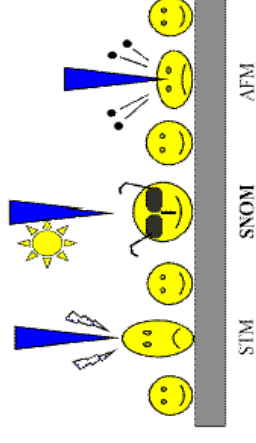
CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje



Pásztázó tűszondás mikroszkópok

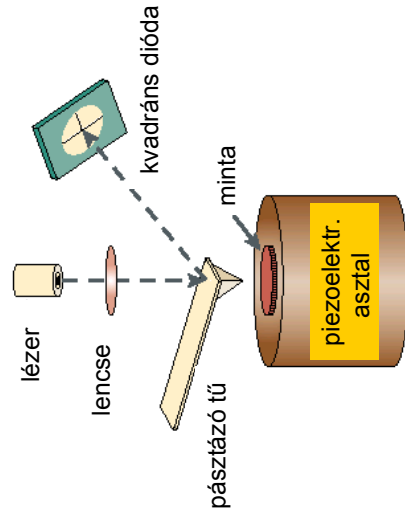
(Scanning Probe Microscopy - SPM)

A mikroszkópok olyan családja, amely a minta felszínének domborzati képét hozza létre. Egy hegyes tűvel pásztázzunk a felszínt és a hegy-minta kölcsönhatást mérjük.



Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy - AFM)

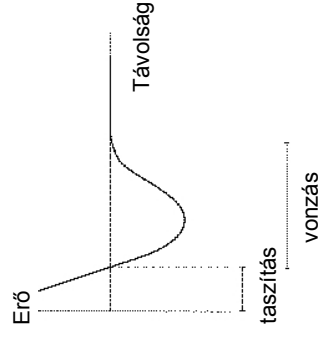
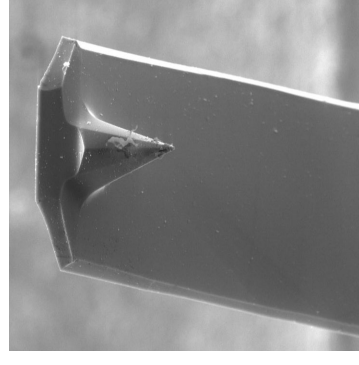
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



A tű és a minta közötti erő

A tű jellemzői:

- tipikusan 100 µm hosszú, 1 µm vastag, V alakú
- kis rugóállandó
- nagy rezonanciafrekvencia
- szilícium (-oxid, -nitrid)



Contact Mode AFM

A tű és a minta állandó kontaktusban vannak.
A taszító tartományban dolgozik.
Állandónak tartja az erőt: követi a felszín hullámzását.
A mérőrugó függőleges deformációját detektáljuk.
Lokális erő spektroszkópia: a felület egy adott pontjában az erő/elmozdulás függvény.

Előnyök és hátrányok

Contact Mode AFM

Előny:

gyors pásztázás
atomi felbontás
érdes felületekre jó

Hátrány:

a vízszintes erők torzíják a képet
torzítás a minta felületén lévő víz miatt
a lágy biológiai mintákat megkarcolja

Tapping Mode AFM

A tű 20-100 nm amplitúdójú rezgéseket végez, minden rezgésnél érinti a felületet.
A rezgési amplitúdó és fázis változik ahogy a felszínen a kiemelkedések és mélyedések vannak.

Tapping Mode AFM

Előny:

nagyobb laterális felbontás (1 – 5nm)
kevésbé teszi tönkre a lágy mintákat

Hátrány:

lassabb pásztázás

Extra-celluláris konnexon AFM képe

Kalcium-indukált konformáció
változás az extra-celluláris
konnexon felszínben.

A vonal 23 nm hosszú.

