

Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

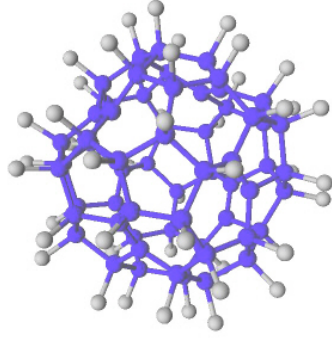
Egyedi molekulák vizsgálata

“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."

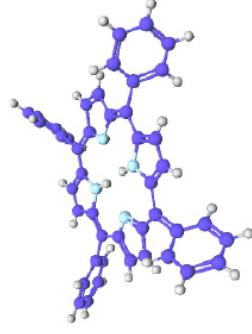
Richard Feynman, 1959

Hullám-részecske kettősség



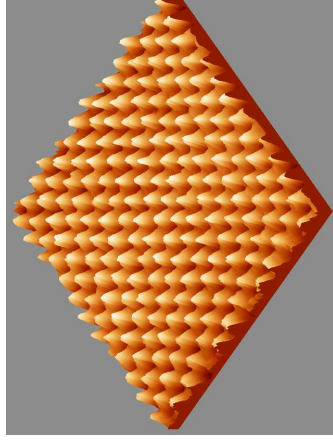
fluorofullerén $C_{60}F_{48}$
1632 Da

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



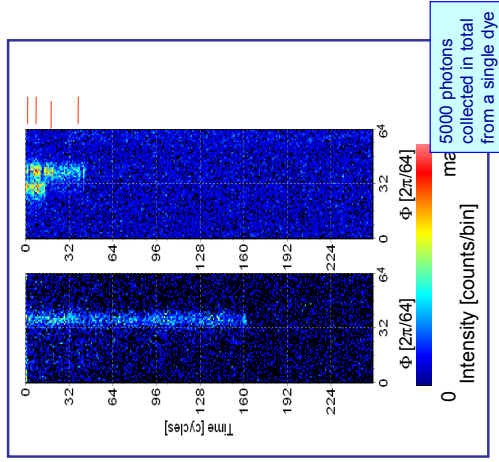
tetrafenilporfirin $C_{44}H_{30}N_4$

Hullám-részecske kettősség

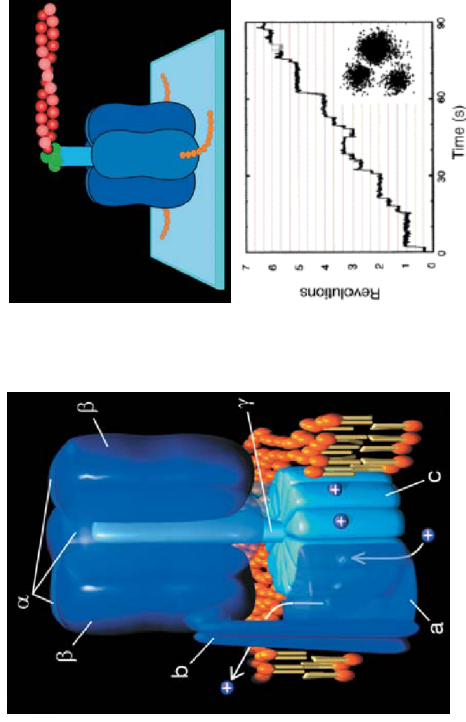


Grafitról készült Páztázó Alagútmikroszkópi (Scanning Tunneling Microscope, STM) kép

Egyedi Alexa molekulák kvarc felszínén



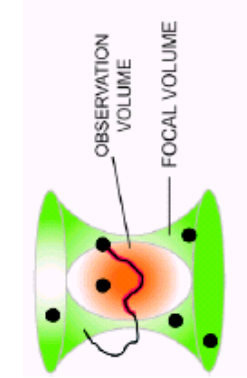
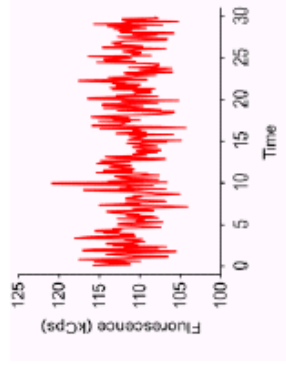
Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása



Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

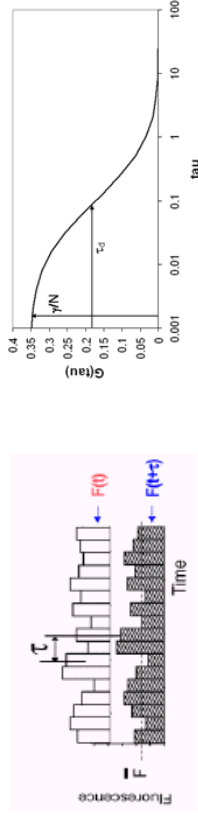
egyensúly körüli fluktuációk
megfigyelt térrész: fl
koncentráció: 10 nM
molekulák számának időátlag: 6

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 fókuszterefogaton
 γ - a PSF alaki tényezője
 N - a fókuszterefogatban 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

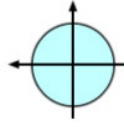
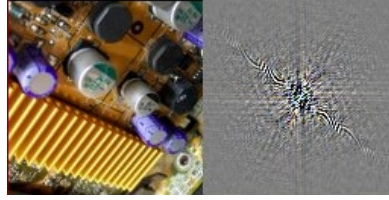
Abbe elv

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

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

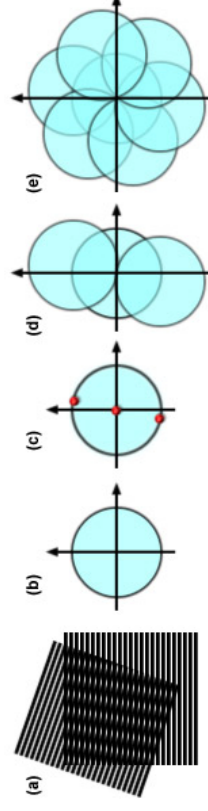
Hallgatolagos feltevések: a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet; a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képpontokat (foltokat) ad.

Abbe elv a minta térbeli frekvenciái szempontjából

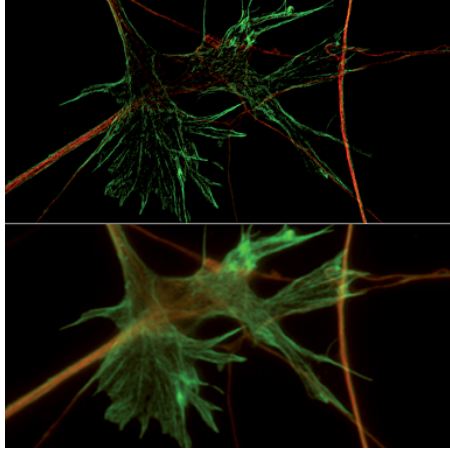


A képen lévő térbeli frekvenciákból a mikroszkóp objektív csak egy szűk tartományt enged át, ami korlátozza a térbeli feloldást.

Strukturált megvilágításos mikroszkóp

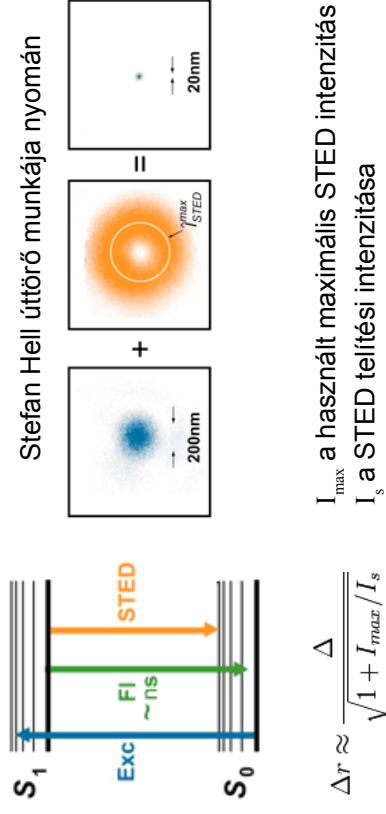


Strukturált megvilágításos mikroszkóp

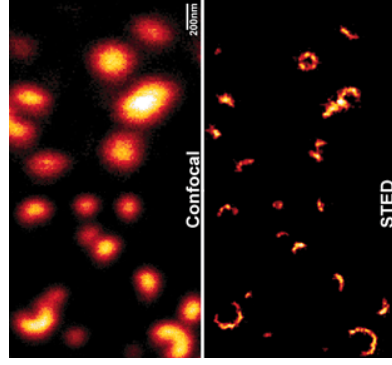


Hagyományos (bal) és strukturált megvilágításos mikroszkópi kép (jobb) idegsejtekről.

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

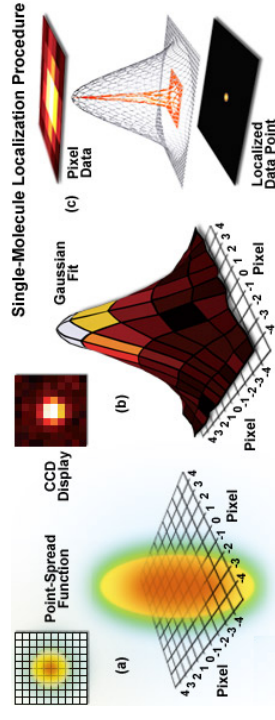


STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

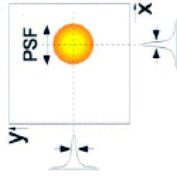


Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

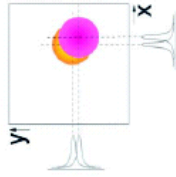
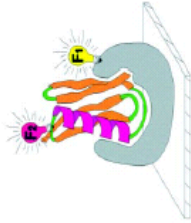
Lokalizáció



Lokalizáció és kolokalizáció



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



Két különböző színű kromofór helyének megállapítása.

A kolokalizáció nem feltétlen jelent kölcsönhatást.

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje

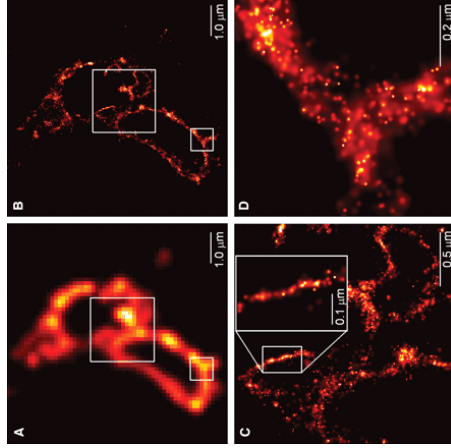
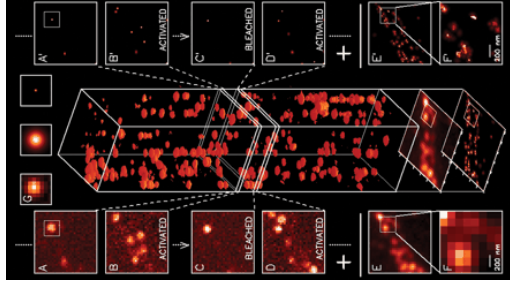
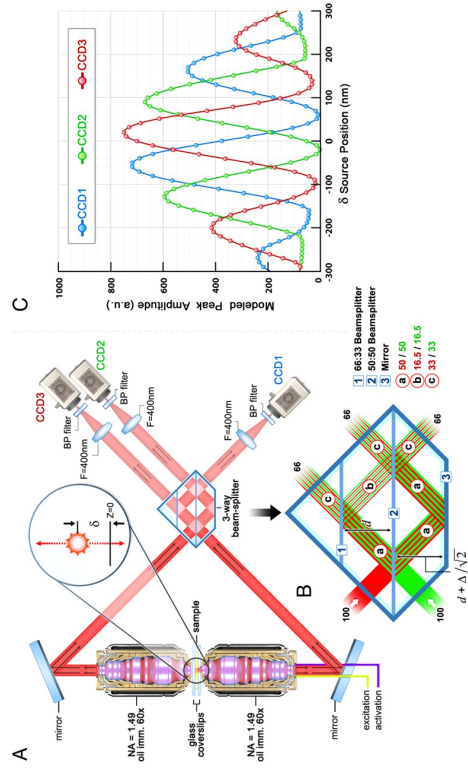


Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

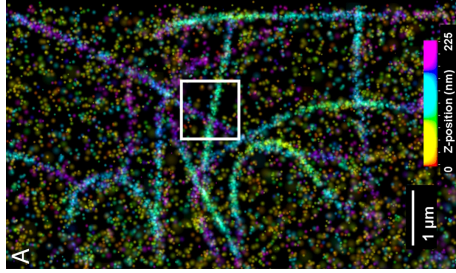
Eric Betzig és Harald Hess
találmánya nyomán



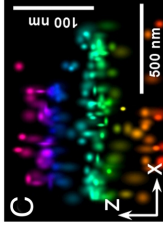
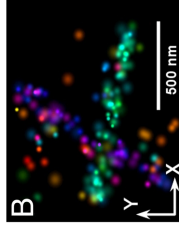
Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



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



Az elektron mint hullám



Louis de Broglie:

$$\lambda = h / p$$

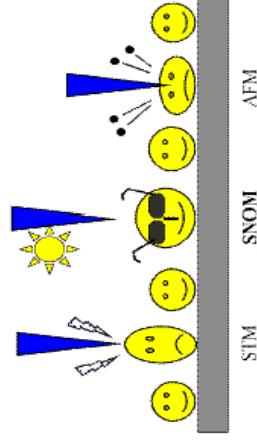
λ az elektron hullámhossza
h a Planck állandó
p az elektron impulzusa

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

Pásztázó tűszondás mikroszkópok

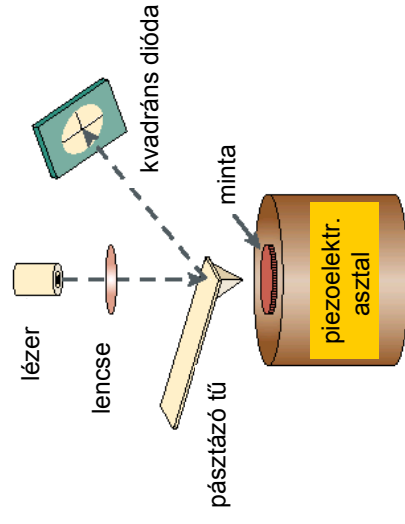
(Scanning Probe Microscopy - SPM)

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)

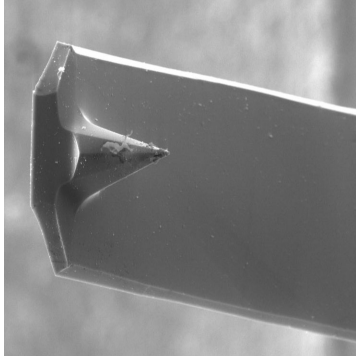
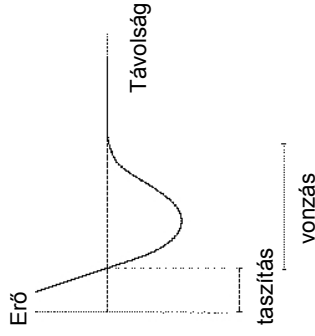
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



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)



Előnyök és hátrányok

Contact Mode AFM

Előny:

gyors pásztázás
atomi felbontás
érdes felületekre jó

Hátrány:

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

Tapping Mode AFM

Előny:

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

Hátrány:

lassabb pásztázás

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.

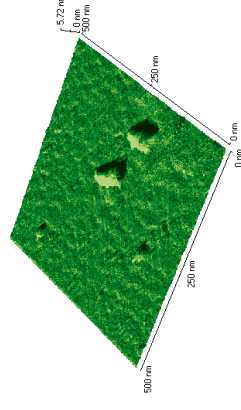
Tapping Mode AFM

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

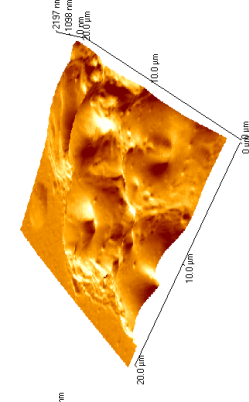
A rezgési amplitúdó és fázis változik ahogy a felszínen a kiemelkedések és mélyedések vannak.

Biológiai mintákról készült AFM képek

Hősokk fehérjék



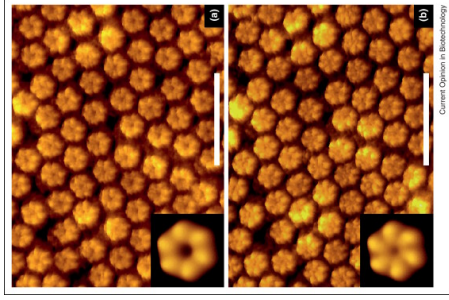
Vörös véresejtek



Extra-celluláris konnexon AFM képe

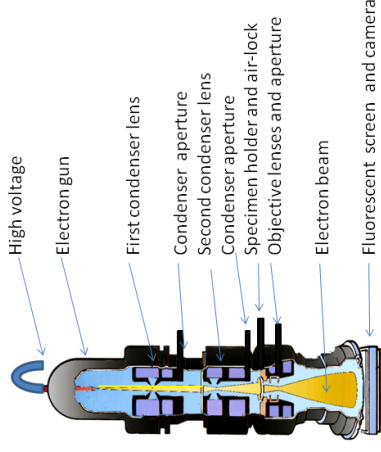
Kalcium-indukált konformáció változás az extra-celluláris konnexon felszínben.

A vonal 23 nm hosszú.



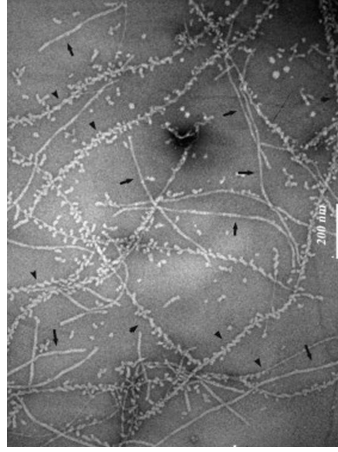
Transzmissziós elektronmikroszkóp

Ruska 1933-ban épült elektronmikroszkópja



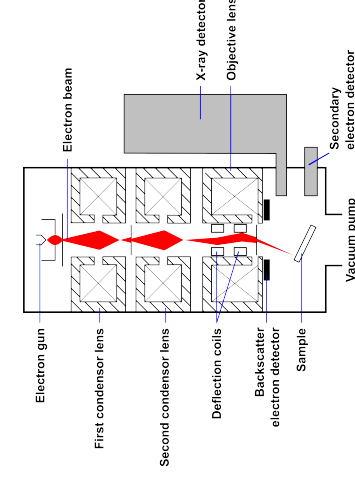
Ernst August Friedrich Ruska és Max Knoll készítették az első elektronmikroszkópot 1931-ben. Ruska 1986-ban Nobel díjat kapott az elektronoptika fejlesztése terén elért eredményeiért.

Amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkópi képe



Koleszterin kötődése amiloid fibrillumokhoz.

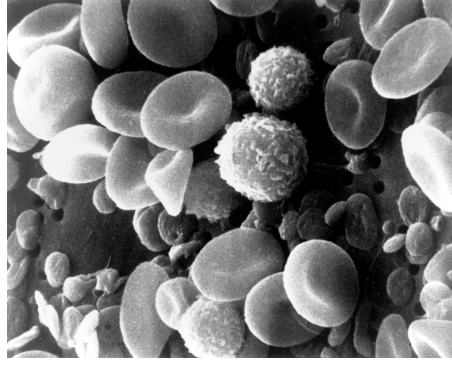
SEM



SEM



Vérsejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe



ESEM

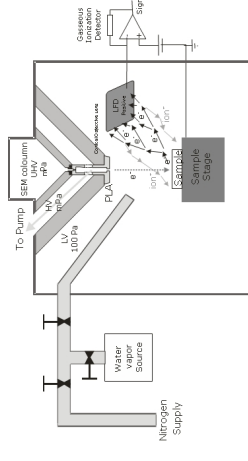
$p > 609 \text{ Pa}$
 $p \cdot L = 1 \text{ Pa} \cdot \text{m}$

előny:

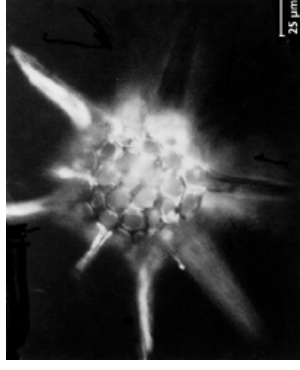
- hidratált minta
- nem csak vezető minta
- a gáz mint detektor

hátrány:

- a mintatér magassága:
töredék mm < 10 mm
- limitált képterület



Optikai- és elektronmikroszkóp összehasonlítása



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



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