Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

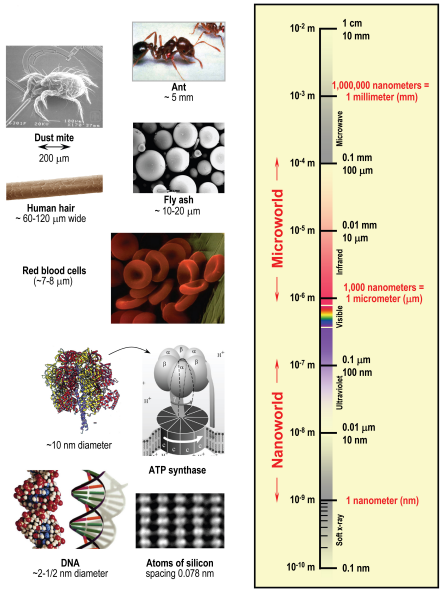
A mikroszkópok legfontosabb típusai

- optikai mikroszkópok
  (Optical Microscope)

- elektron mikroszkópok
  (Electron Microscope)

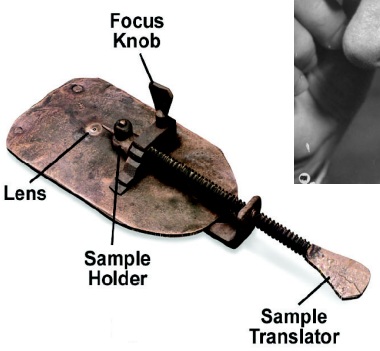
- pásztázó mikroszkópok
  (Scanning Probe Microscope)

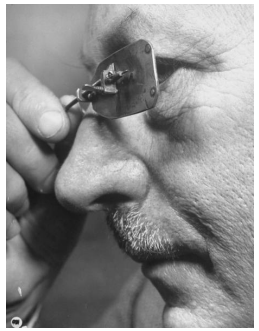
Mekkorák a dolgok?



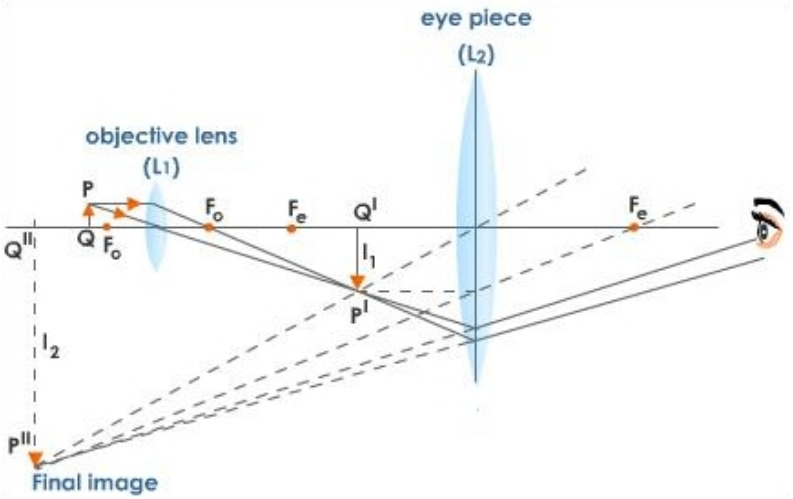
Hans Jansen és Zacharias Jansen 1590-ben összetett mikroszkópot épít

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

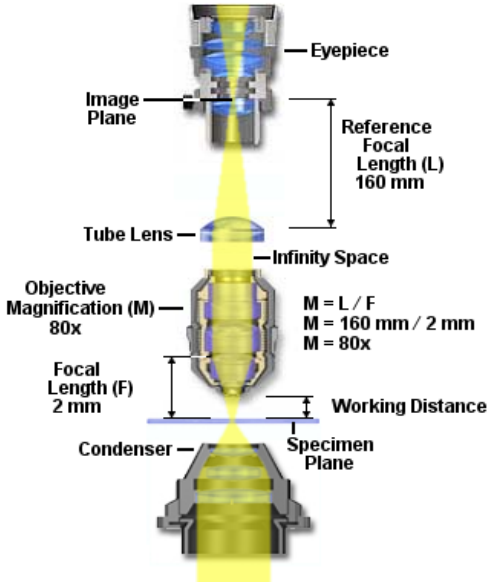




Összetett mikroszkóp optikai útja



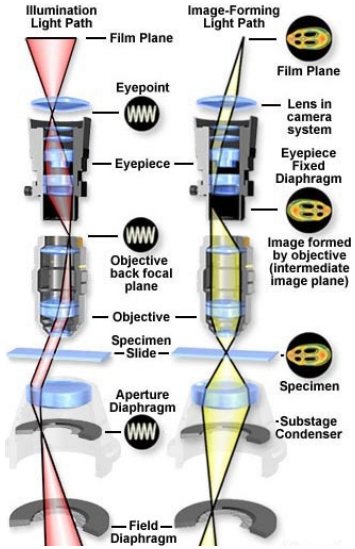
“Végtelenre korrigált” optika



Köhler megvilágítás

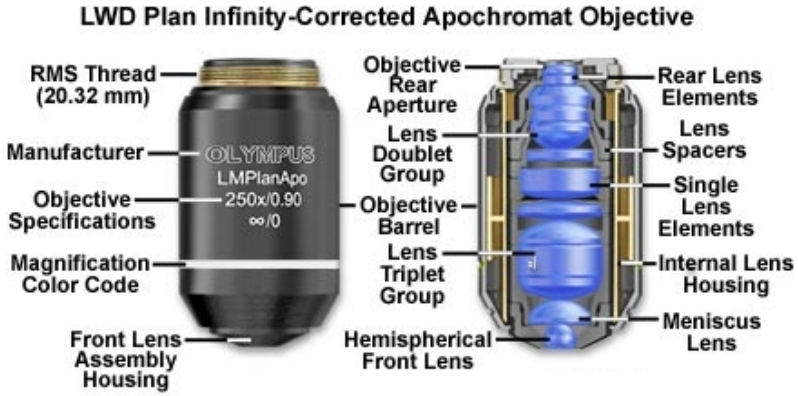
August Köhler (1866-1948)

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

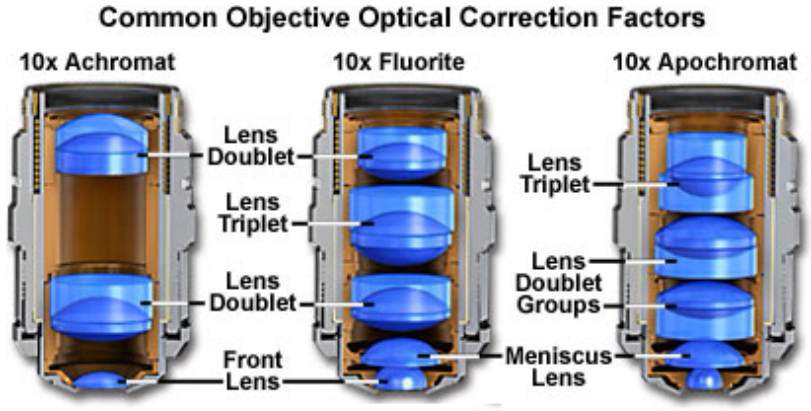


Mikroszkóp objektív lencsék

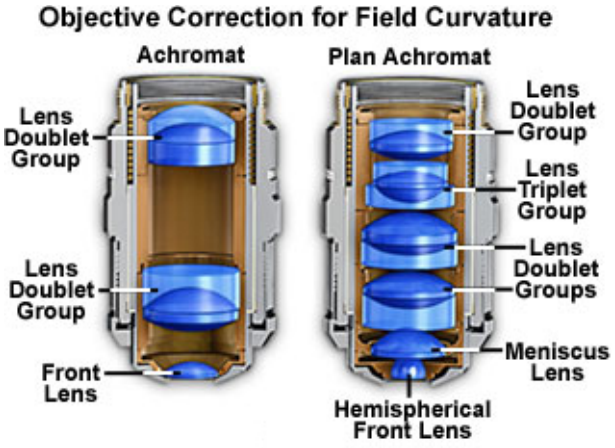
Mikroszkóp objektívek felépítése



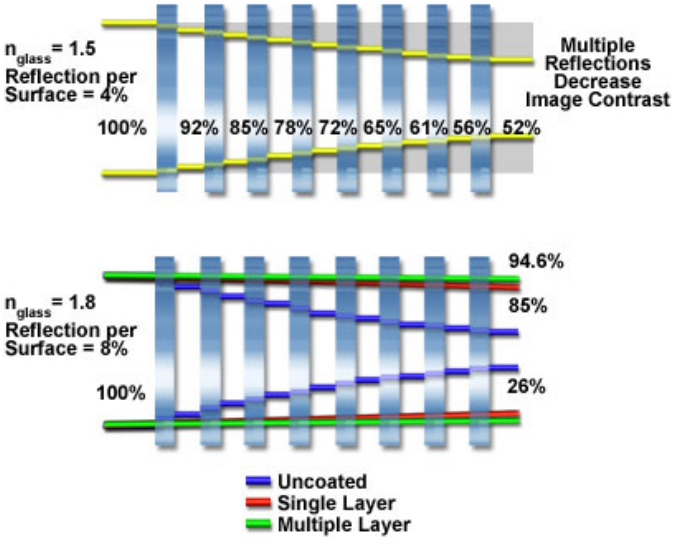
Színkorrekció



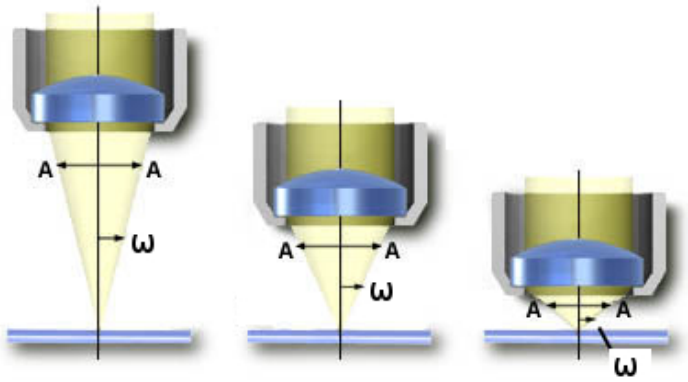
Plánkorrekció



Fényvisszaverődés a felszíneken



Numerikus apertúra



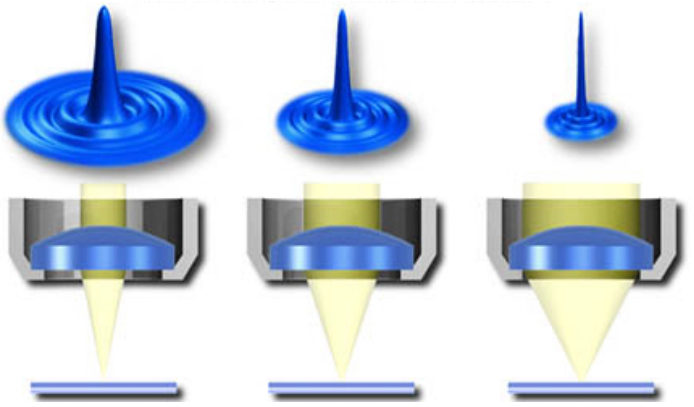
Point Spread Function (PSF)

A PSF a mikroszkóp átviteli függvénye.

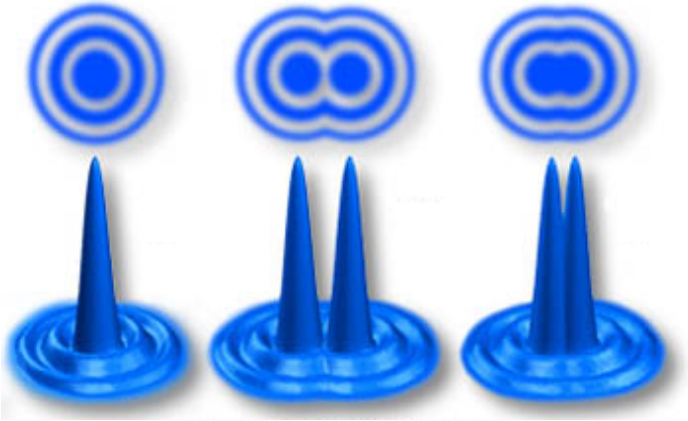
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

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

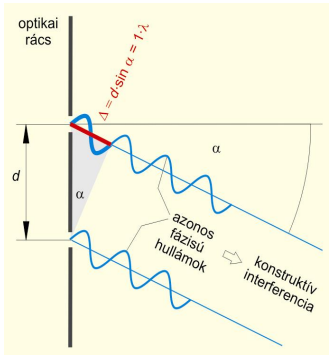
A numerikus apertúra hatása a PSF-re

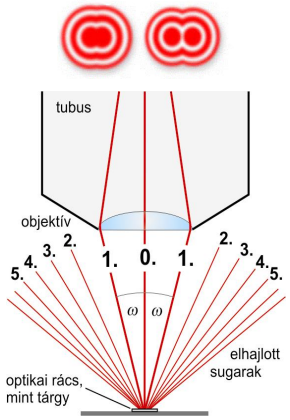


A fény hullámtermészetének hatása a képre



A fény hullámtermészetének hatása a képre





Airy korongok

$d \cdot \sin\alpha = k \cdot \lambda$

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 képalkotásban.

Abbe összefüggés

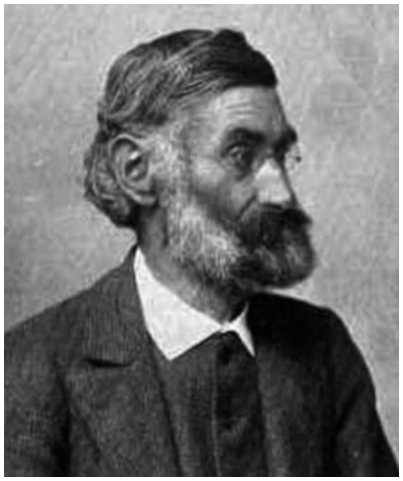
$\delta = 0{,}61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$

Hallgatólagos feltevések:

- a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet

- a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képfoltokat ad.

Ernst Karl Abbe (1840-1905)



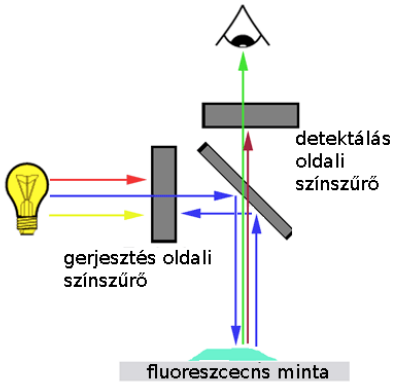
Fizikus és társadalomreformer

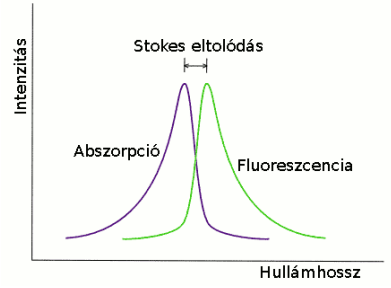
Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

Objektívek numerikus apertúrája

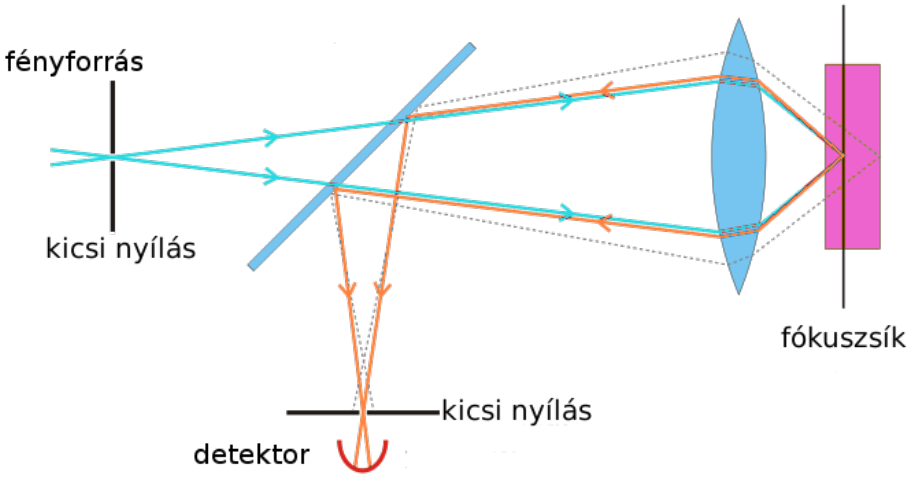
Magnification	Plan Achromat (NA)	Plan Fluorite (NA)	Plan Apochromat (NA)
0.5x	0.025	n/a	n/a
1x	0.04	n/a	n/a
2x	0.06	n/a	0.10
4x	0.10	0.13	0.20
10x	0.25	0.30	0.45
20x	0.40	0.50	0.75
40x	0.65	0.75	0.95
40x (oil)	n/a	1.30	1.00
60x	0.75	0.85	0.95
60x (oil)	n/a	n/a	1.40
100x (oil)	1.25	1.30	1.40
150x	n/a	n/a	0.90

Fluoreszcencia mikroszkóp





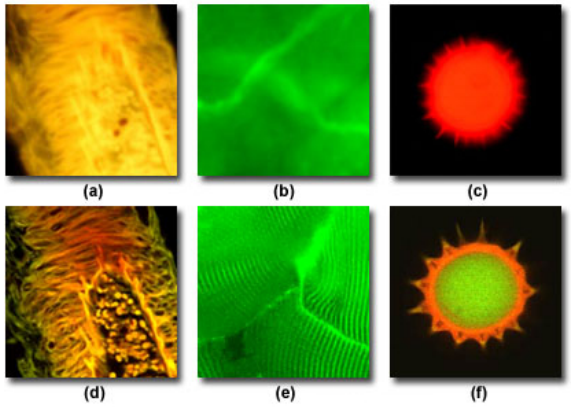
A konfokális fluoreszcencia mikroszkóp működése



Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

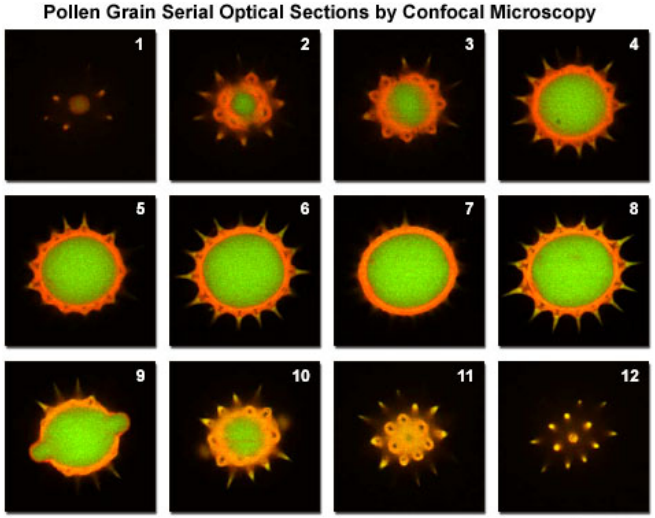
epifluoreszcens

konfokális



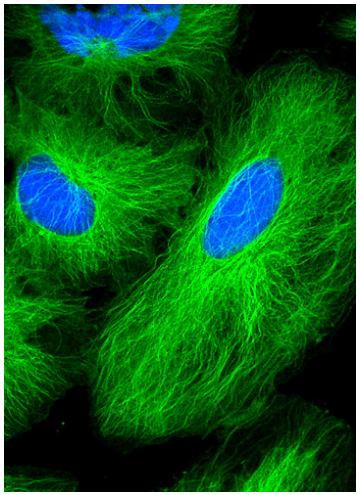
humán medulla nyúl izom pollen

Térbeli szeletelés



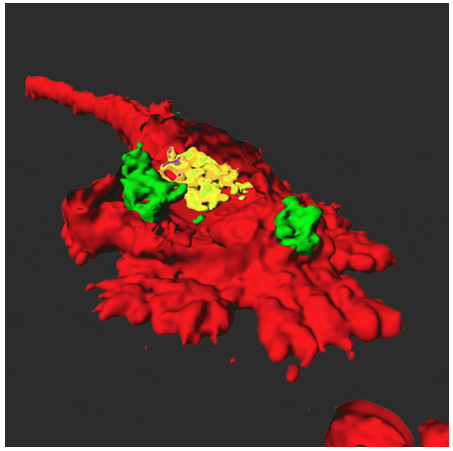
Konfokális mikroszkóp

Tubulin mikrotubulusok rekombináns tubulint kifejező sejtekben.

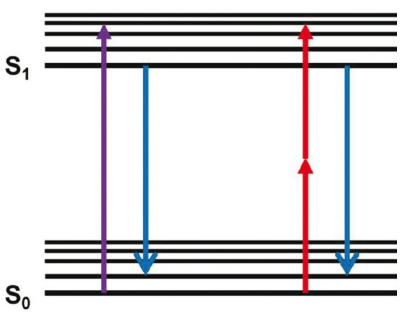


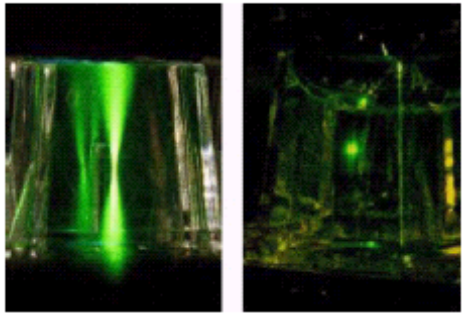
Konfokális mikroszkóp

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

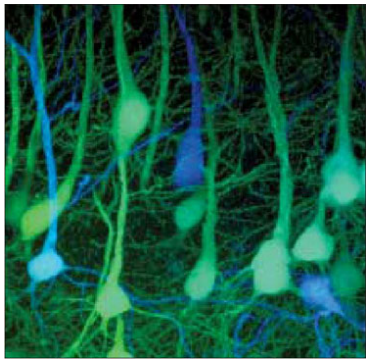


A kétfotonos mikroszkóp működési elve



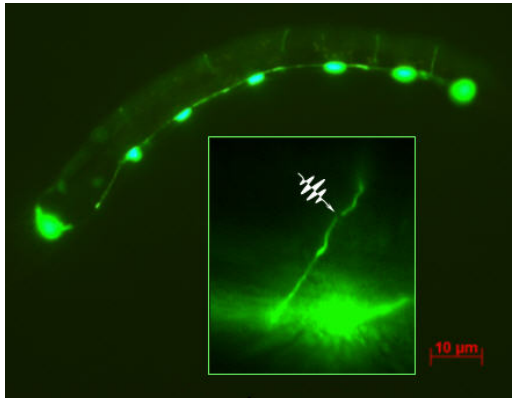


Kétfotonos mikroszkópia



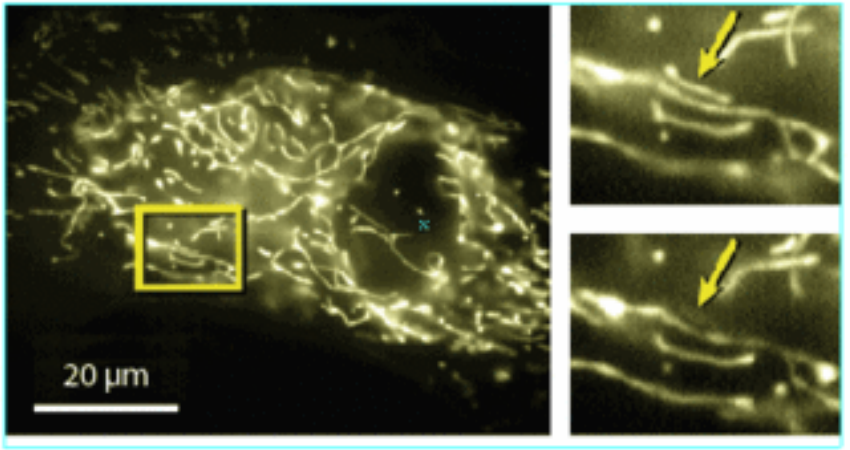
Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező transzgenikus egerek vizuális kortexének kétfotonos mikroszkóppal készült képe.

Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



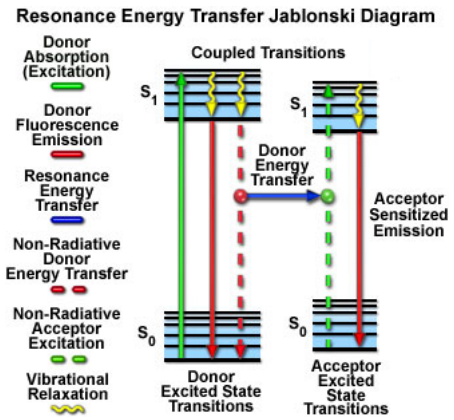
Caenorhabditis elegans 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

Egyedi sejtek fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Egyetlen mitokondrium elpusztítása élő szarvasmarha epitheliális sejtben

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

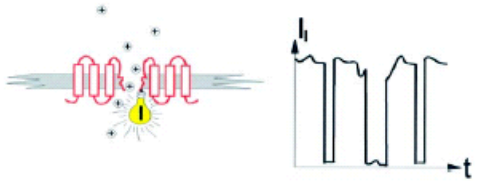


Az energiatranszfer hatásfoka:

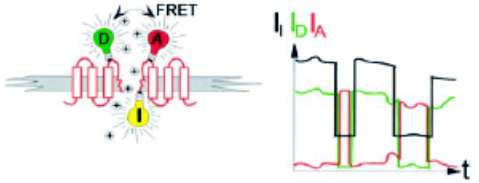
$$E = R_0^6/(R_0^6 + r^6)$$

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

Fluoreszcens indikátorok

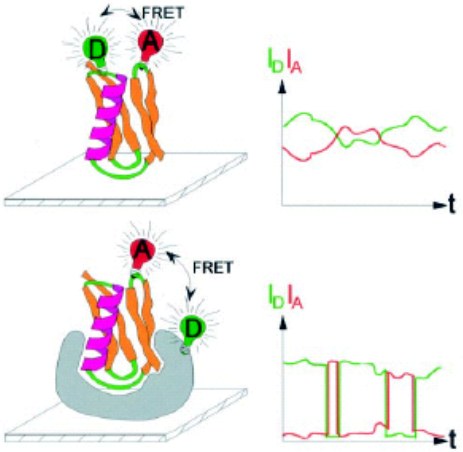


Ioncsatorna működése a helyi ionkoncentráció mérése alapján



Ionkoncentráció és konformációs változások együttes mérése

FRET alkalmazások: távolságmérés



Molekulán belüli konformációs változások

Asszociáció és disszociáció

Az ideális fluorofór

- kicsi
- hidrofil
- 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

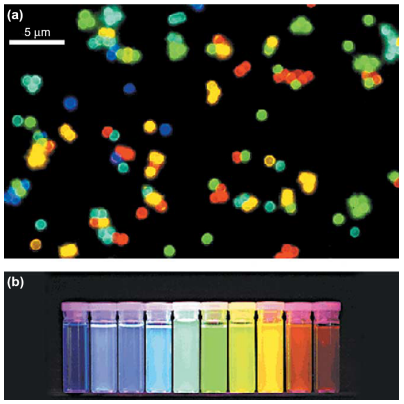
www.probes.com (Invitrogen)

Fluoreszcens kvantumpöttyök

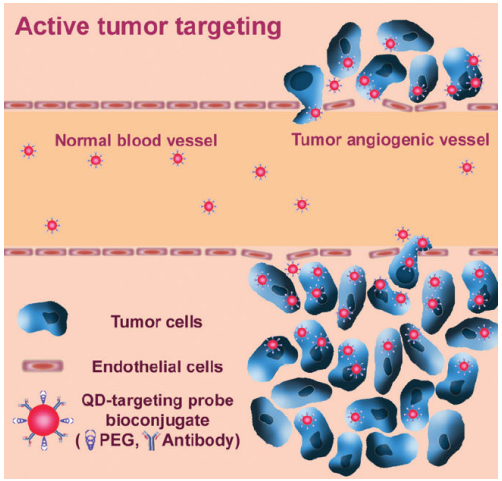
(a) CdSe-ből ZnS borítással készült kvantumpöttyök fluoreszcenciamikroszkópos képe

A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

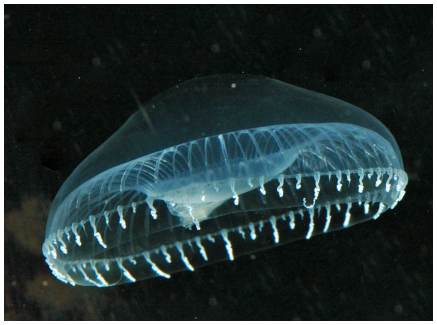
(b) tíz eltérő méretű, ezért elérő színben fluoreszkáló CdSe/ZnS kvantumpötty



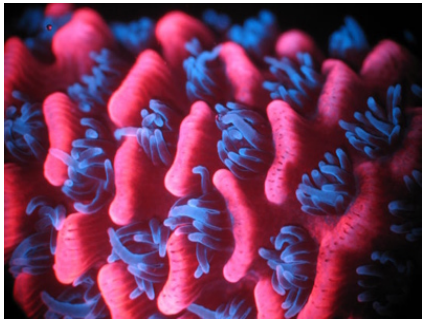
Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



Fluoreszcens fehérjék



Aequorea victoria
(medúza)



Acropora millepora
(korall)

GFP (Green Fluorescent Protein)

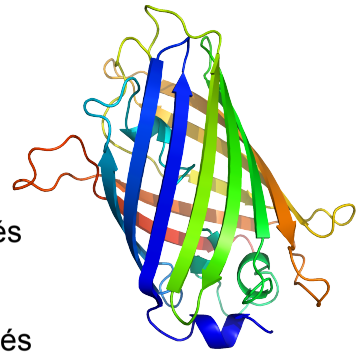
2008. évi kémiai Nobel díj

Osamu Shimomura – a '60 as években izolálta és elkezdte tanulmányozni

Douglas Prasher – 1992-ben klónozta és szekvenálta a génjét

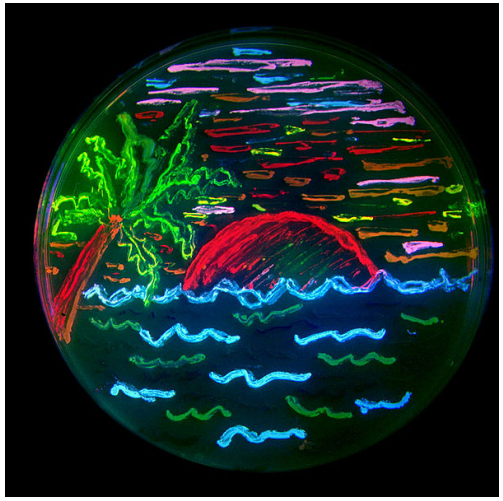
Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

Roger Y. Tsien – 1995-ben előállított az első javított változatot

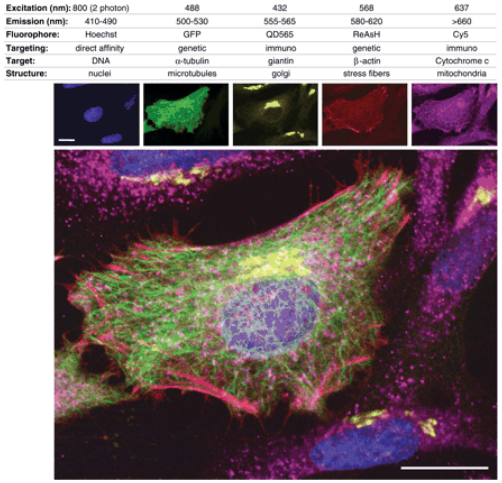


A fluoreszcens fehérjék sokfélesége

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.