

Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem
szabolcs.osvath@eok.sote.hu

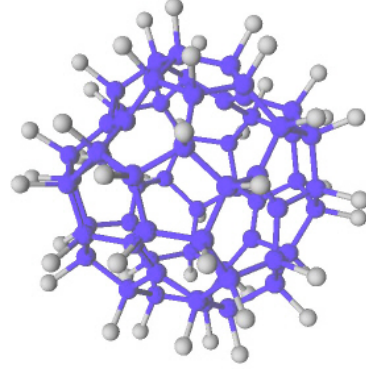
Egyedi molekulák vizsgálata

“Plenty of Room at the Bottom”

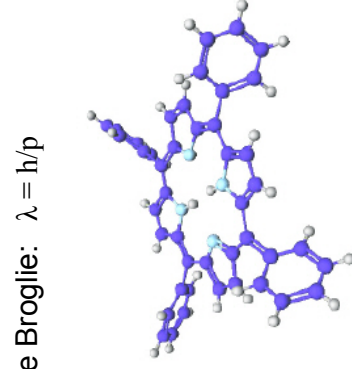
" The principles of physics, as far as I can see, do not speak against the possibility of maneuvering things atom by atom. It is not an attempt to violate any laws; it is something, in principle, that can be done; but in practice, it has not been done because we are too big."

Richard Feynman, 1959

Hullám-részecske kettősség



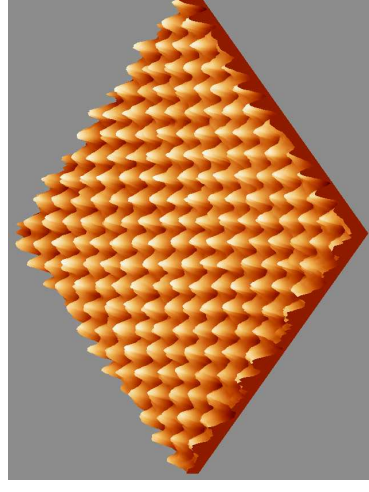
fluorofullerén $C_{60}F_{48}$
1632 Da



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

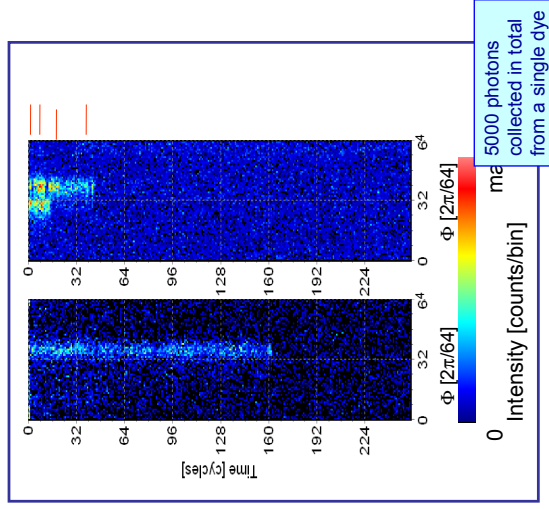
Louis De Broglie: $\lambda = h/p$

Hullám-részecske kettősség

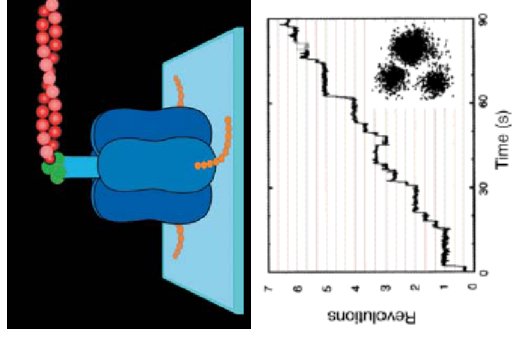
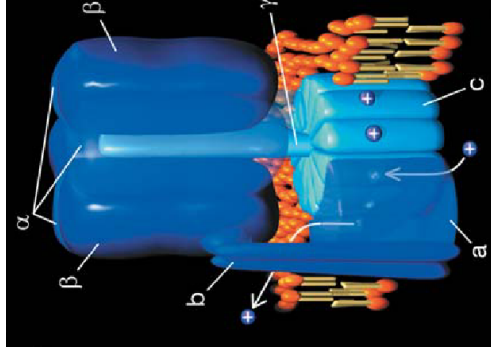


Grafitról készült Pásztázó Alagútmikroszkópi
(Scanning Tunneling Microscope, STM) kép

Egyedi Alexa molekulák kvarc felszínén

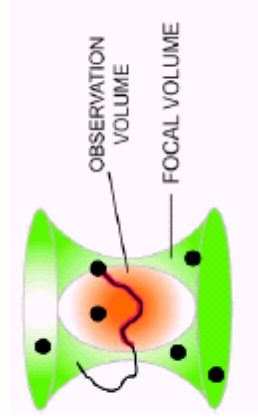


Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása

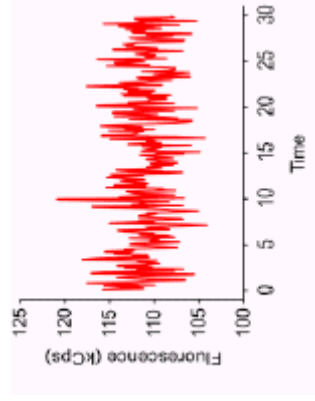


Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

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

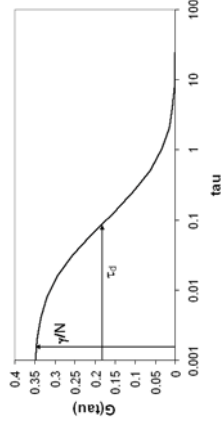
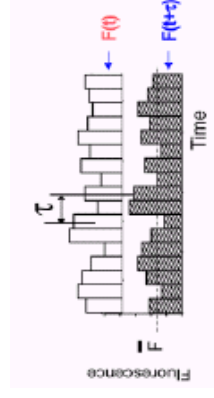


Fluoreszcencia fluktuációk



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 átlátfundáljon a fókuszterefogaton
 γ - a PSF alaki tényezője
 N - a fókuszterefogaton 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

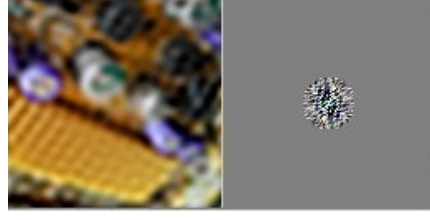
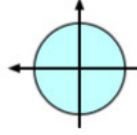
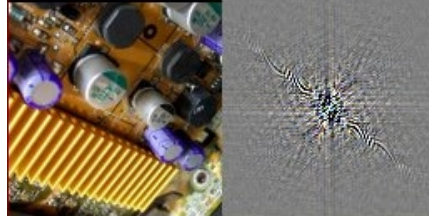
Abbe elv

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 képkalkotásban.

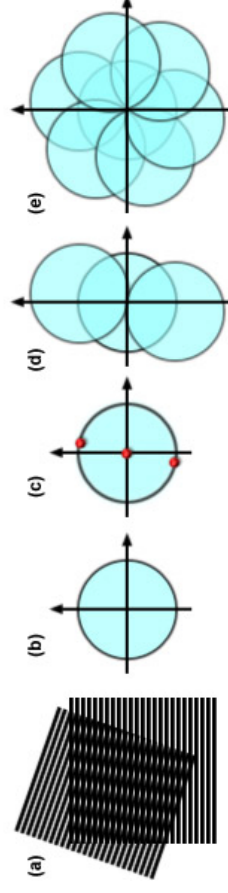
$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin \omega)$$

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

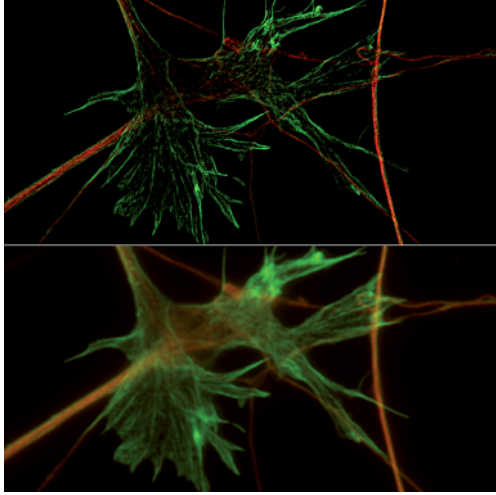


Strukturált megvilágításos mikroszkóp



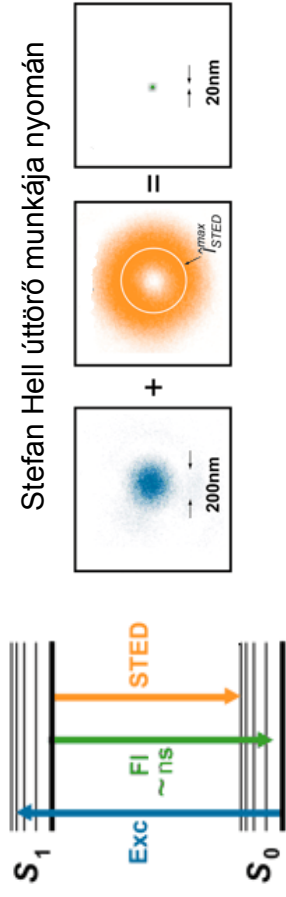
A képben lévő térbeli frekvenciákból a mikroszkóp objektív csak egy szűk tartományt enged át, ami korlátozza a térbeli feloldást.

Strukturált megvilágításos mikroszkóp



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

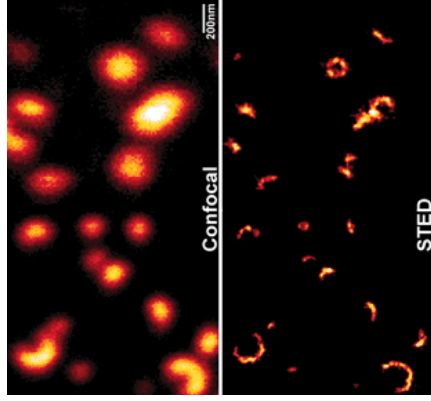
STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



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

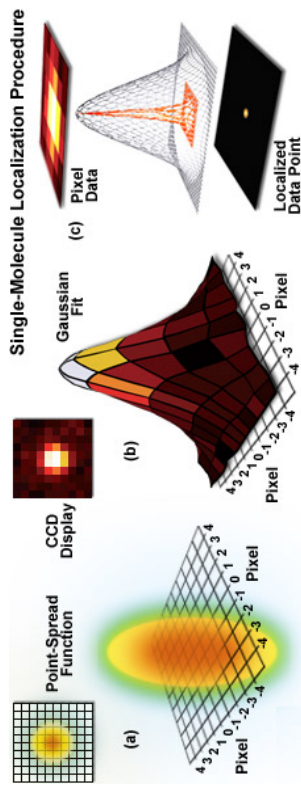
I_{max} a használt maximális STED intenzitás
 I_s a STED telítési intenzitása

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

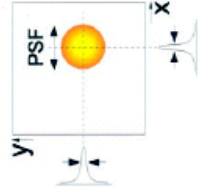
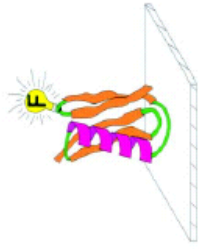


Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

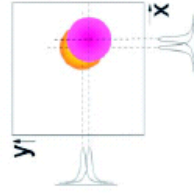
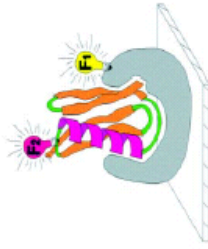
Lokalizáció



Lokalizáció és kolokalizáció



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



Két különböző színű kromofór helyének megállapítása.

A kolokalizáció nem feltétlen jelent kölcsönhatást.

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje

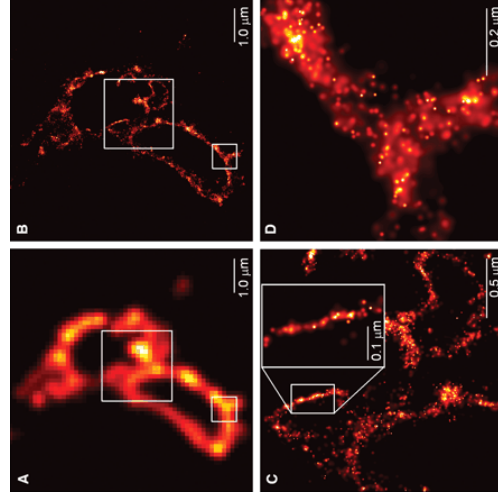
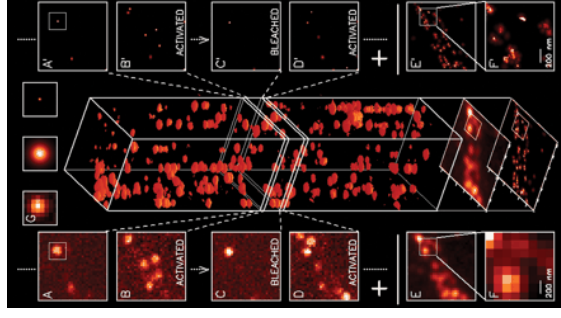
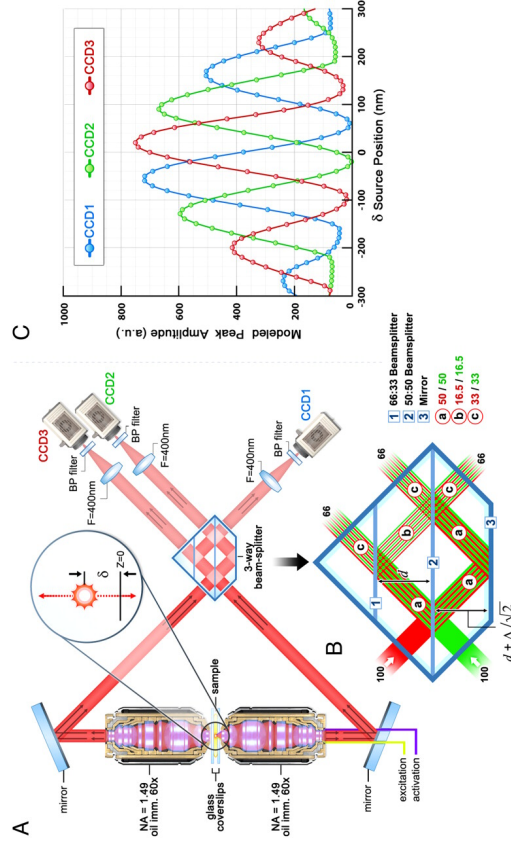


Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

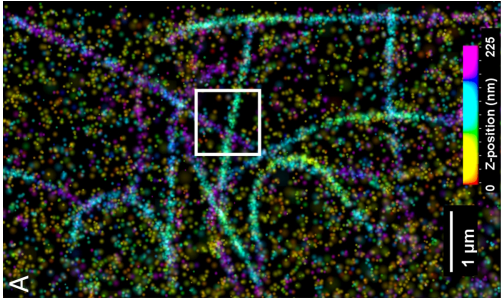
Eric Betzig és Harald Hess találmánya nyomán



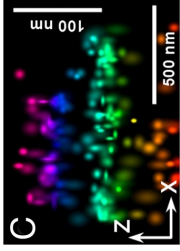
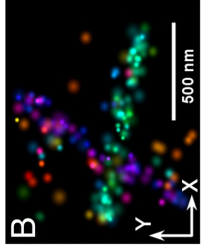
Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)



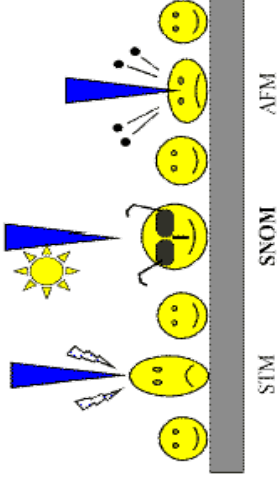
Mikrotubulus szerkezete Ptk1 sejtekben, amelyek humán tubulinhoz fuzionált m-KikGR fluorofórt fejeznek ki.



Pásztázó tűszondás mikroszkópok

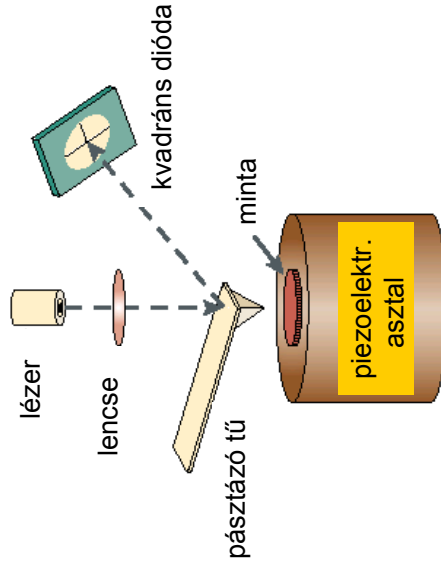
(Scanning Probe Microscopy - SPM)

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)

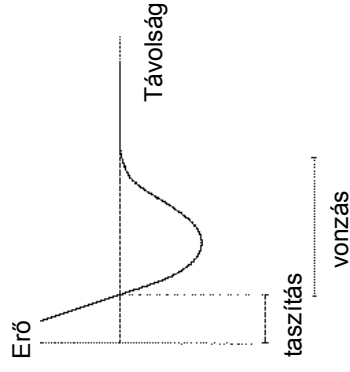
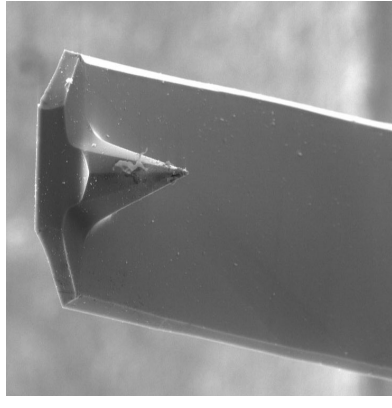
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



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 torzítják 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:

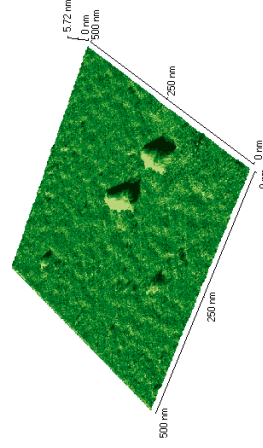
nagyobb laterális felbontás (1 – 5nm)
kevésbé teszi tönkre a lágy mintákat

Hátrány:

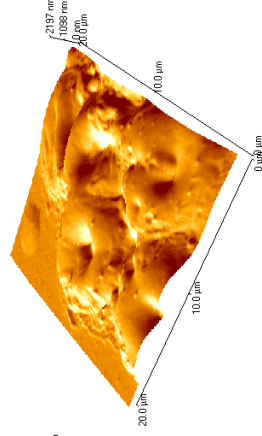
lassabb pásztázás

Biológiai mintákról készült AFM képek

Hószokk fehérjék



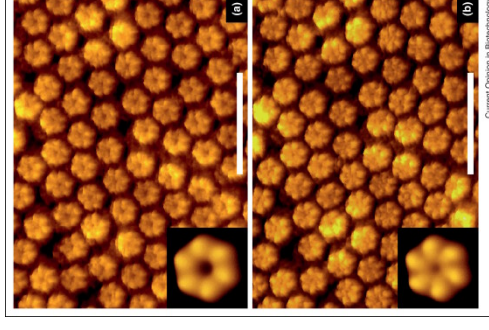
Vörös véresejték



Extra-celluláris konnexon AFM képe

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

A vonal 23 nm hosszú.



Az elektron mint hullám



Louis de Broglie:

$$\lambda = h / p$$

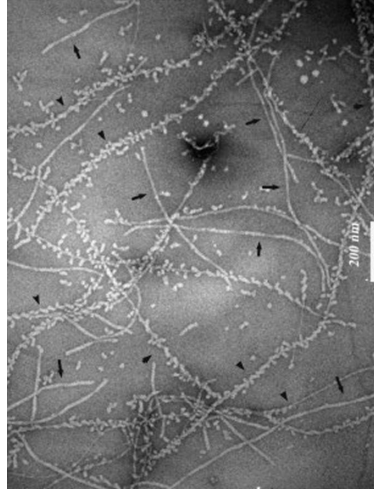
λ az elektron hullámhossza

h a Planck állandó

p az elektron impulzusa

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

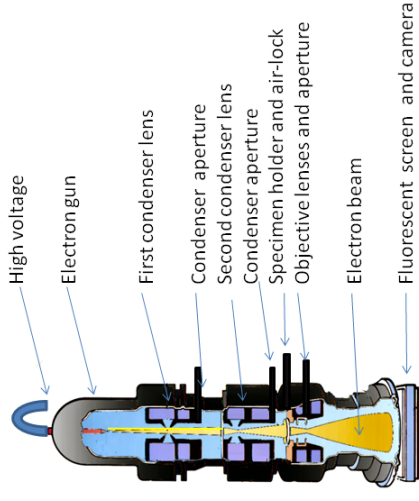
Amlolid szálak transzmissziós elektronmikroszkópi képe



Koleszterin kötődése
amiloid fibrillumokhoz.

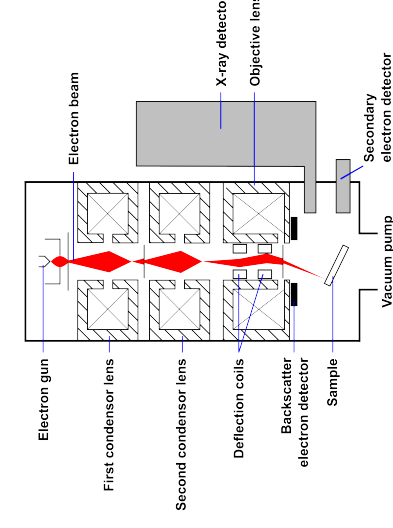
Transzmissziós elektronmikroszkóp

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.

SEM



SEM



ESEM

$p > 609 \text{ Pa}$

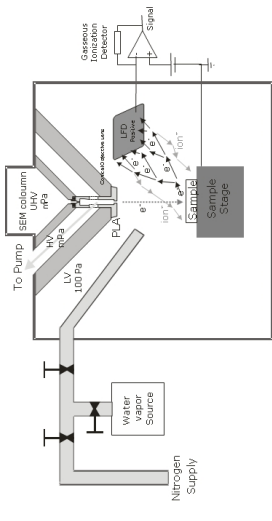
$p \cdot L = 1 \text{ Pa} \cdot \text{m}$

előny:

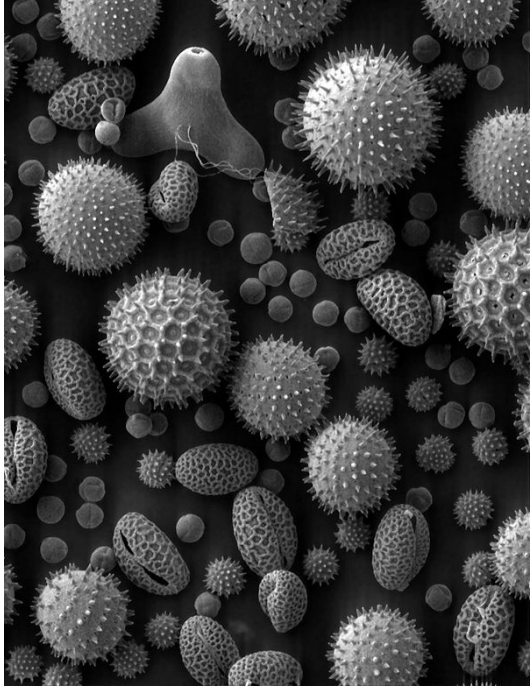
- hidratált minta
- nem csak vezető minta
- a gáz mint detektor

hátrány:

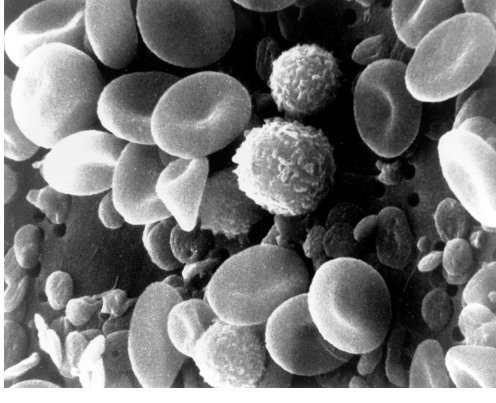
- a mintatér magassága: töredék mm $< 10 \text{ mm}$
- limitált képterület



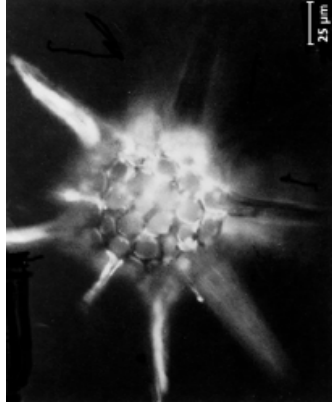
Pollen pásztázó elektronmikroszkópos képe



Vérsejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe



Optikai- és elektronmikroszkóp összehasonlítása



- kis mélységélesség
- alacsony felbontás
- + élő minta, élett folyamatok
- + légköri nyomáson



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