

Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Osváth Szabolcs

Semmelweis Egyetem

osvath.szabolcs@med.semmelweis-univ.hu

Abszorpció és fluoreszcencia spektroszkópia előnyei

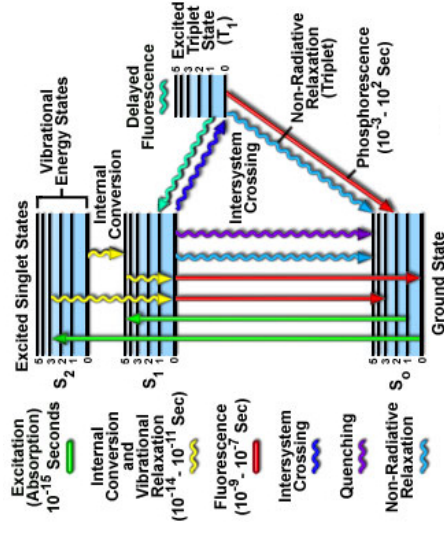
érzékeny

kvalitatív analízis

kvantitatív analízis

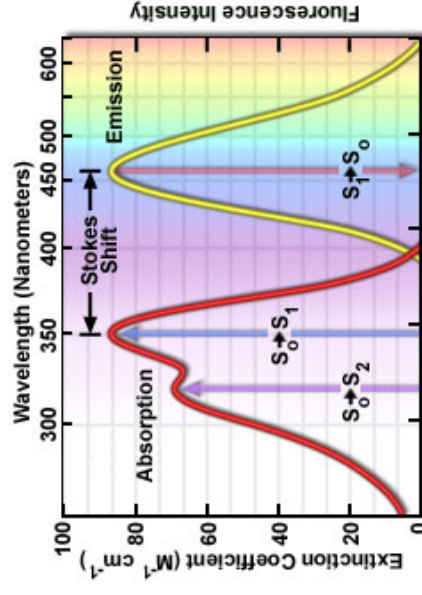
képzalkodó módszerekkel kombinálható

Fény abszorpció és emisszió – Jablonski diagram

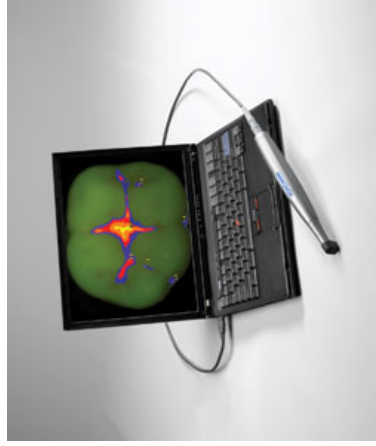
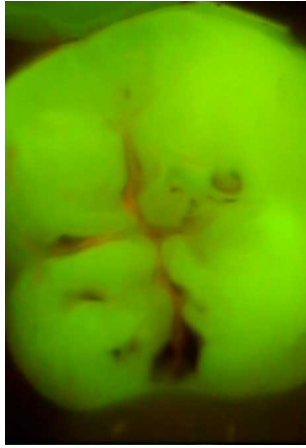


Fény abszorpció és emisszió spektrum

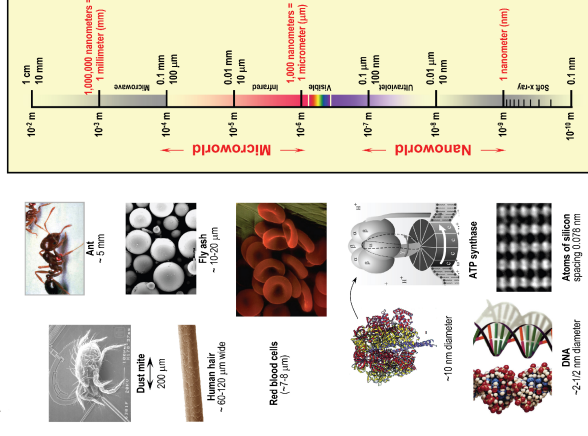
Stokes eltolódás (hullámhossz vagy frekvencia egységeiben) az abszorpció és emisszió spektrum maximuma közötti távolság.



Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF)



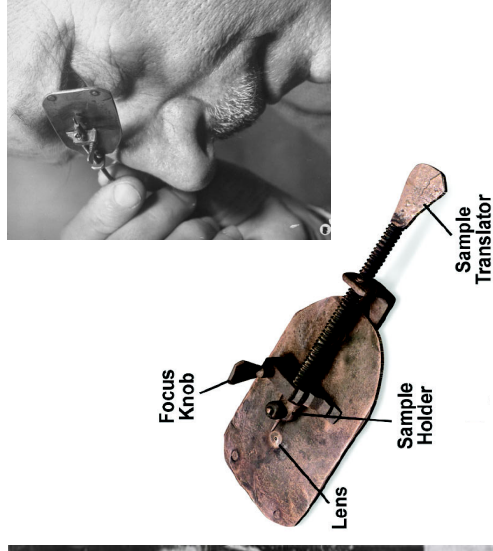
Mekkorák a dolgok?



Hans Jansen és Zacharias Jansen 1590-ben összetett mikroszkópot épít



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



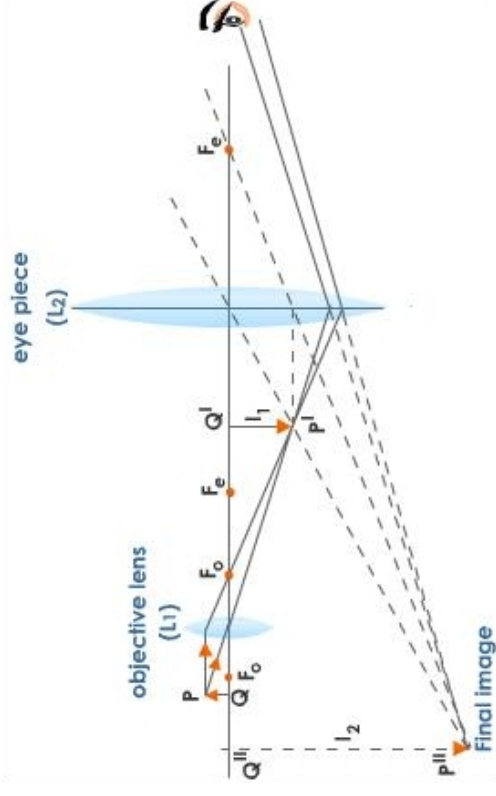
Ernst Karl Abbe (1840-1905)



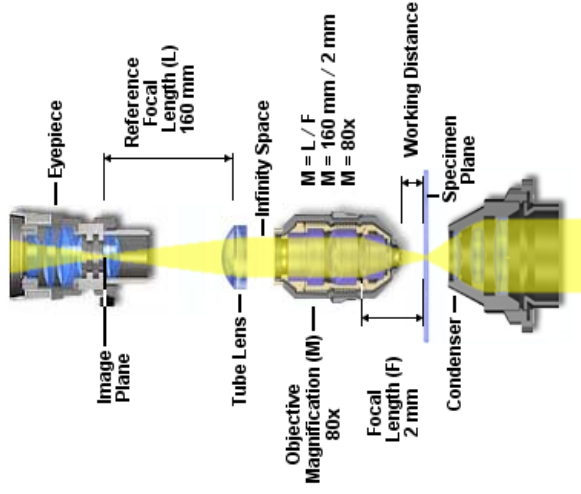
Fizikus és társadalomreformer

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

Összetett mikroszkóp optikai útja



“Végtelenre korrigált” optika

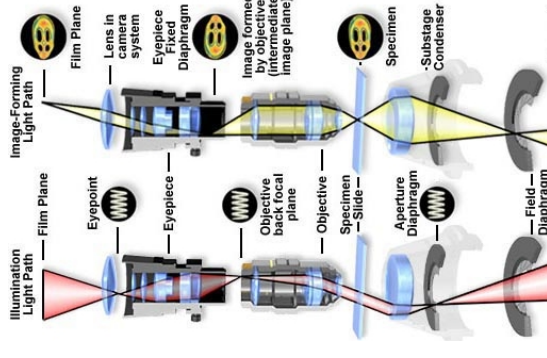


Köhler megvilágítás

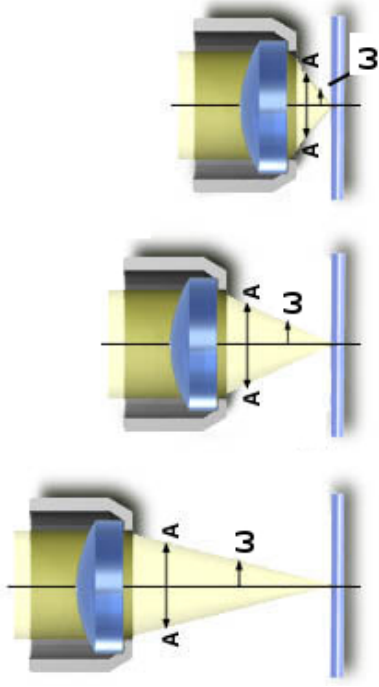


August Köhler
(1866-1948)

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



Numerikus apertúra

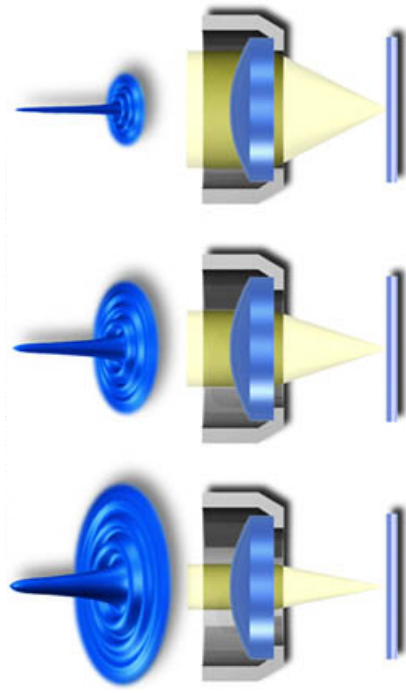


Point Spread Function (PSF)

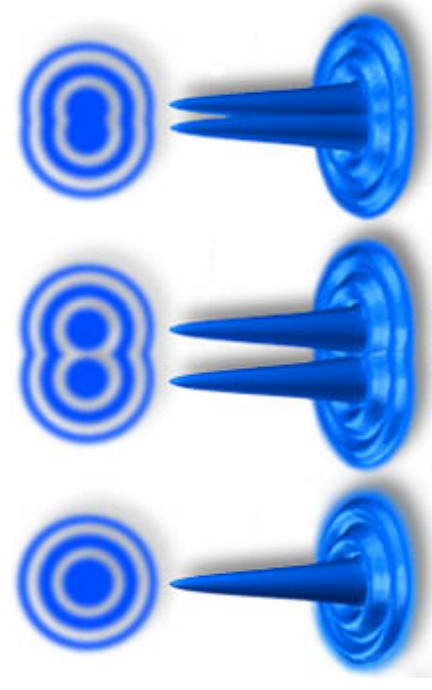
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

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

A numerikus apertúra hatása a PSF-re



A fény hullámtermészetének hatása a képre



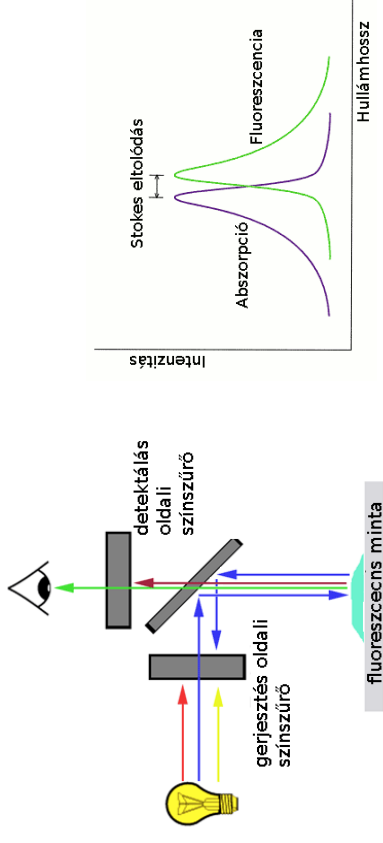
Abbe összefüggés

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

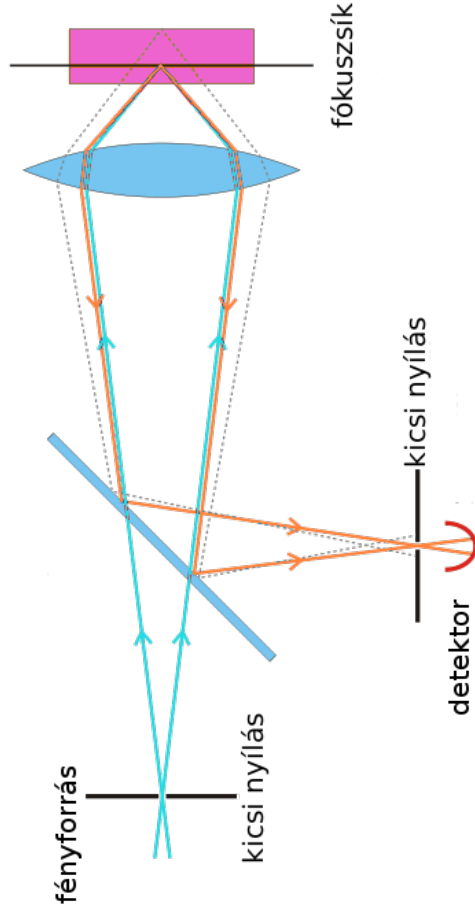
Hallgatólagos feltevések:

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

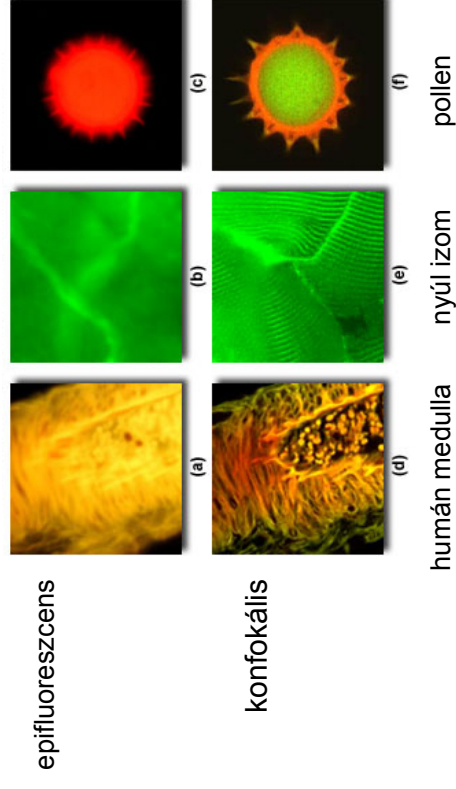
Fluoreszcencia mikroszkóp



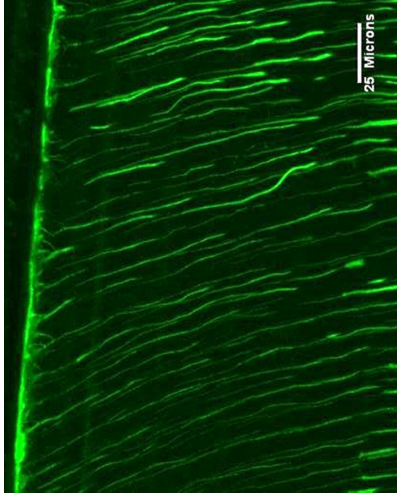
A konfokális fluoreszcencia mikroszkóp működése



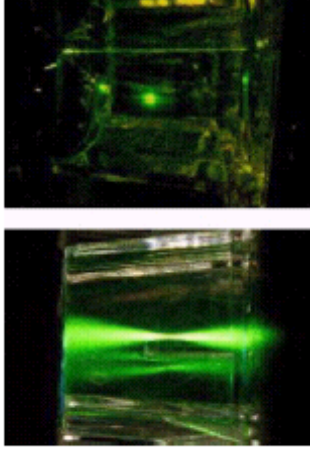
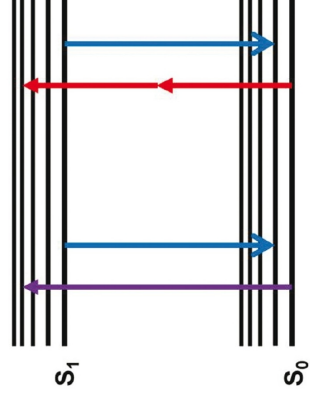
Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása



Dentinalis tubulusok humán fogban



A kétfotonos mikroszkóp működési elve

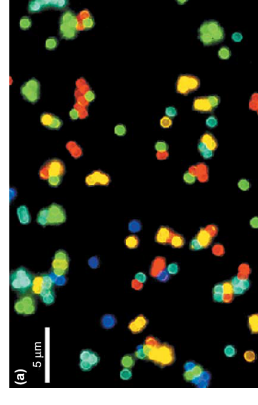


Az ideális fluorofór

- 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

Fluoreszcens kvantumpöttyök

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

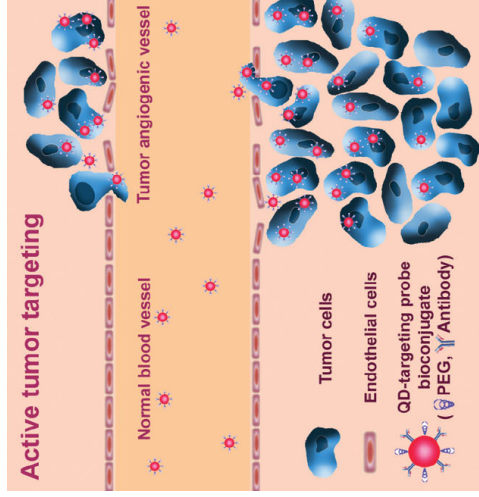


A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.



(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)

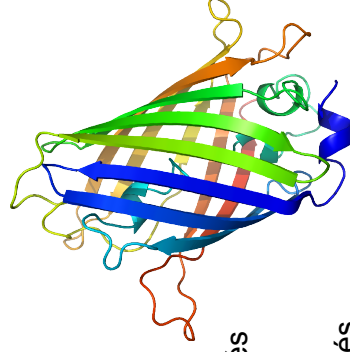
2008. évi kémiai Nobel díj

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

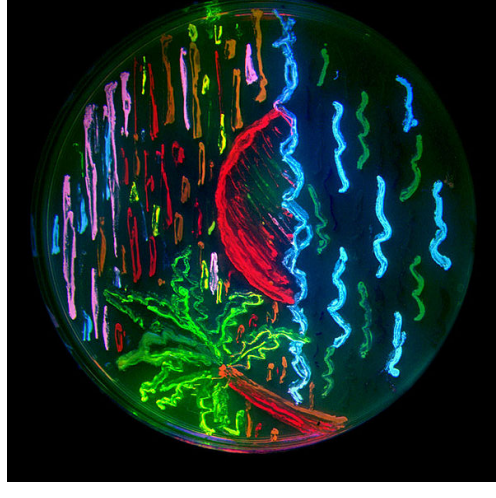
Douglas Prasher – 1992-ben klónozte és szekvenálta a génjét

Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

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



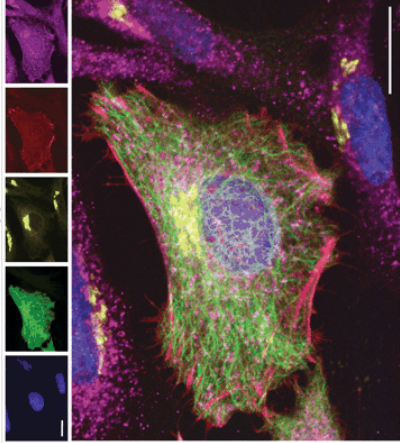
A fluoreszcens fehérjék sokfélesége



A képet teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal festették.

Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

Excitation (nm)	488	493	488	493
Emission (nm)	505-530	555-565	580-620	640
Fluorophore	HOECHST	GFP	RAA-H	Cy5
Targeting	direct affinity	genetic	genetic	immuno
Target	DNA	α-tubulin	glutath	Cytokhrome c
Structure	nuclei	microtubules	golgi	stress fibres



Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20 µm hosszú.

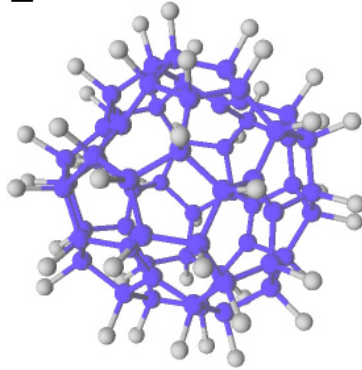
Egyedi molekulák vizsgálata

“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. "

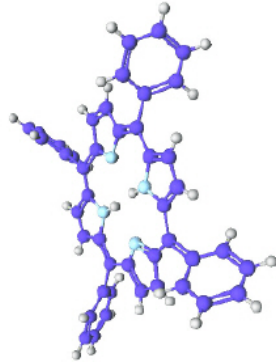
Richard Feynman, 1959

Hullám-részecske kettősség



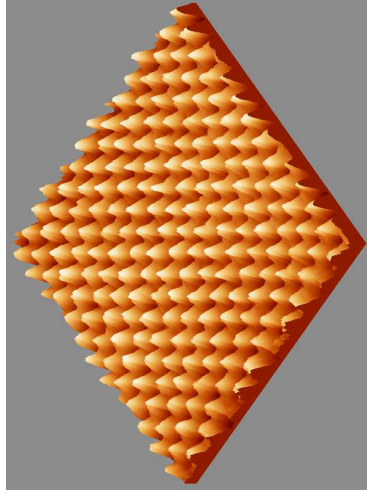
fluorofulleren C₆₀F₄₈
1632 Da

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



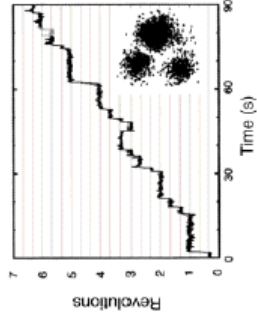
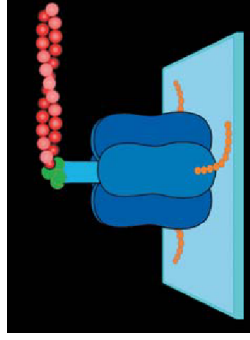
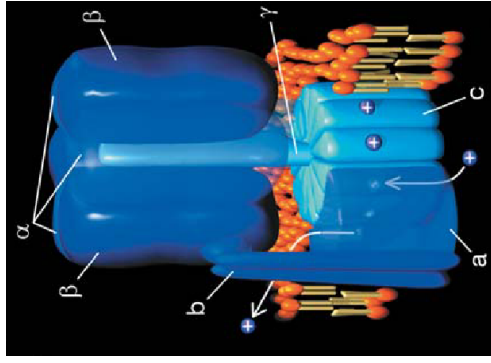
tetraphenilporfirin C₄₄H₃₀N₄

Hullám-részecske kettősség



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

Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása

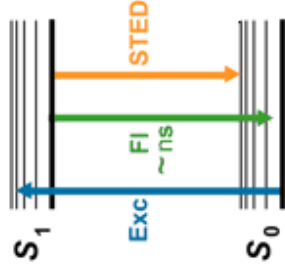


Szuperrezolúciós mikroszkóp

A szuperrezolúciós mikroszkópi technikák kidolgozásáért 2014-ben kémiai Nobel díjat kaptak:

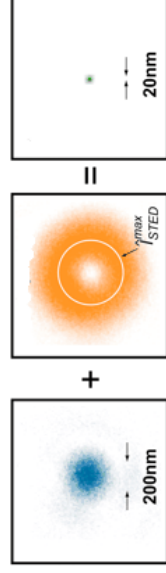
- Eric Betzig
- Stefan W. Hell
- William E. Moerner

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



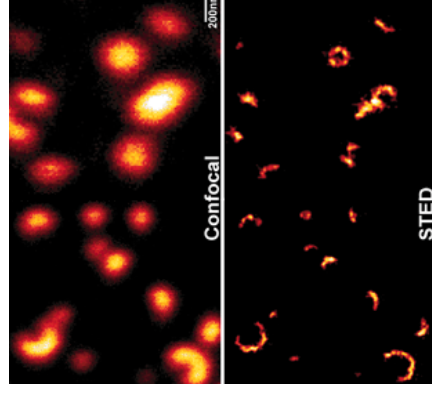
$$\Delta r \approx \frac{\Delta}{\sqrt{1 + I_{max}/I_s}}$$

Stefan Hell úttörő munkája nyomán



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

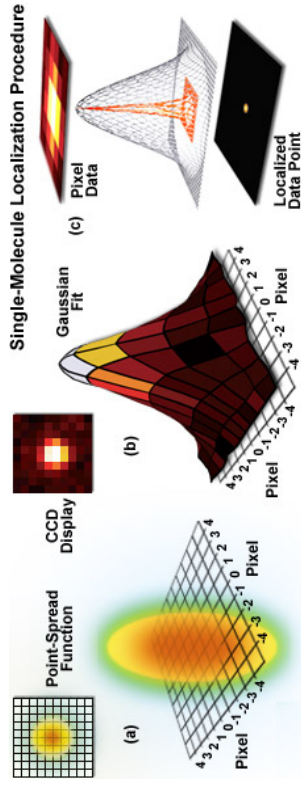


Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje

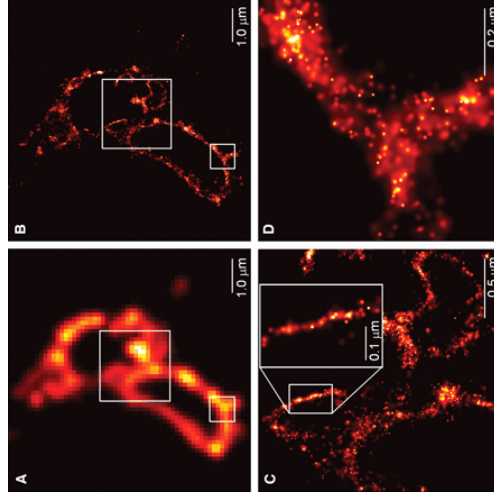
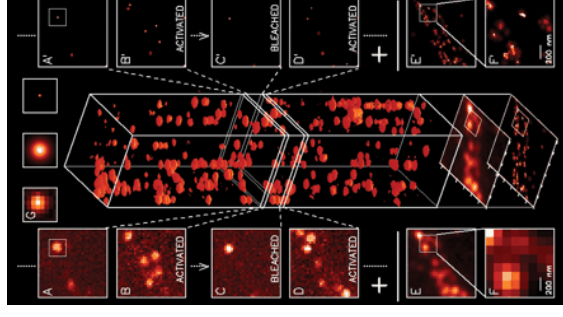


Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

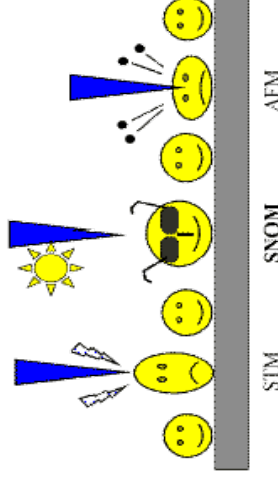
Eric Betzig és Harald Hess
találmánya nyomán



Pásztázó tűszondás mikroszkópok

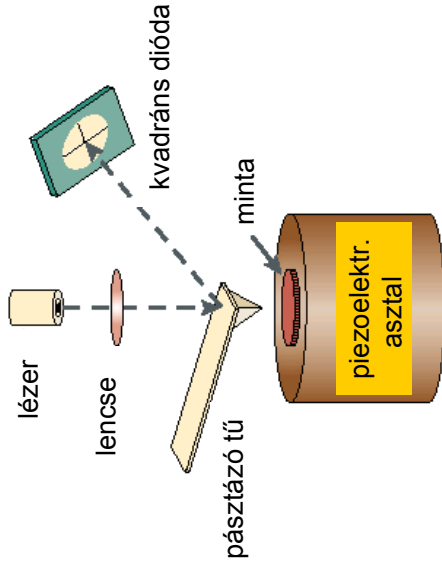
(Scanning Probe Microscopy - SPM)

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)

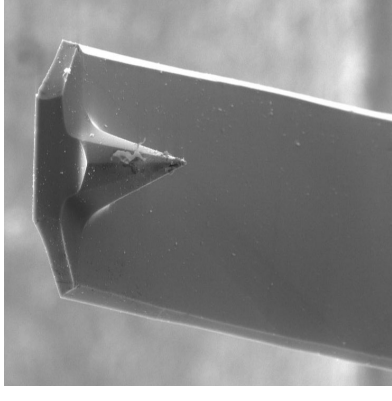
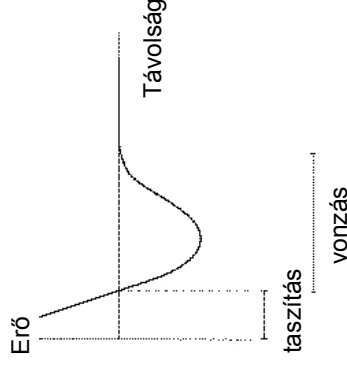
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



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 tasztító 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.

Előny:

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

Hátrány:

lassabb pásztázás