

Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

Kis Petik Katalin

14. A lumineszcencia gyakorlati alkalmazása

- a) lumineszcencián alapuló fényforrások
- b) a lumineszcencia orvosi/laboratóriumi felhasználása

65. Modern fénymikroszkópiai eljárások

- a) konfokális lézer-mikroszkóp
- b) kétfotonos gerjesztés

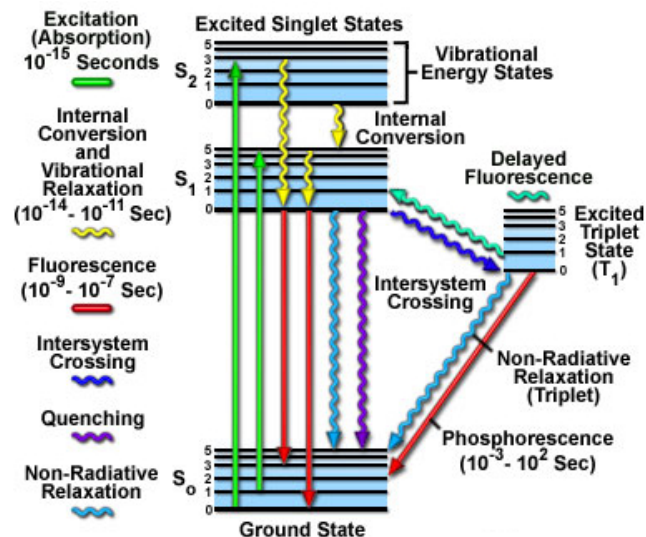
66. Pásztázó mikroszkópos módszerek

- a) A pásztázás elve
- b) Atomerő mikroszkópia

Kapcsolódó részek:
Damjanovich-Fidy-Szöllősi:
X/1, X/2., X/3.

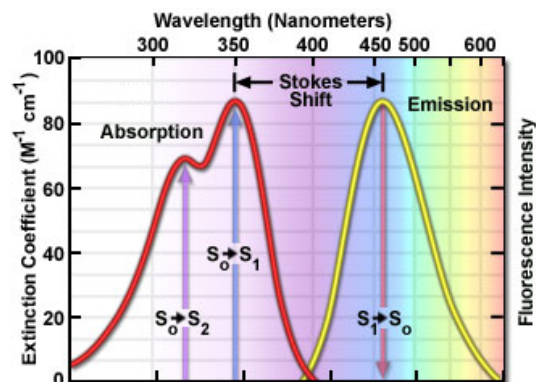
2017.03.07.

Fény abszorpció és emisszió – Jablonski diagram

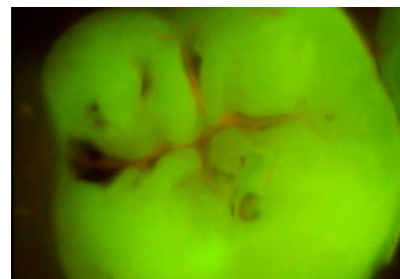


Fény abszorpció és emisszió spektrum

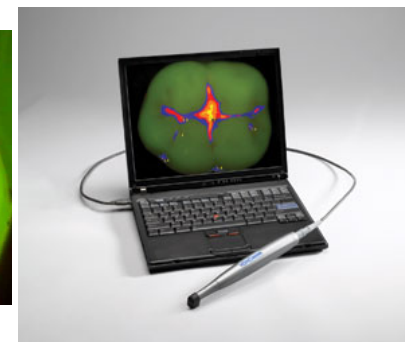
Stokes eltolódás (hullámhossz vagy frekvencia egységeiben) az abszorpció és emisszió spektrum maximuma közötti távolság.



Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF)



information about caries and bacterial activity



UVA gerjesztés ,

ZÖLD A fogzománc anyaga

PIROS baktériumok: protoporfirin-IX

fluoreszcencia

430-560 nm

590-700 nm

Autofluoreszcencia

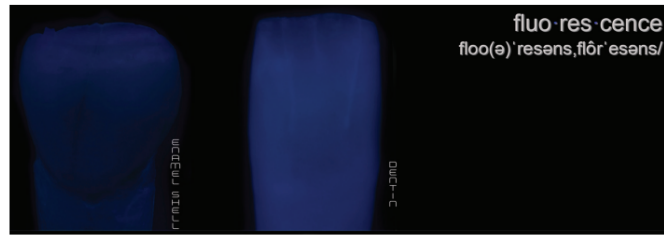
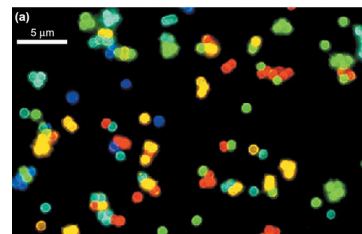


Figure 3: Enamel versus dentin. Dentin is more fluorescent than enamel under UV light. This greater fluorescence results from the higher organic content of dentin.

UV fényben a dentin jobban világít, mint a fogzománc
(szervesanyag-tartalma nagyobb)

Fluoreszcens kvantumpöttyök

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



A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

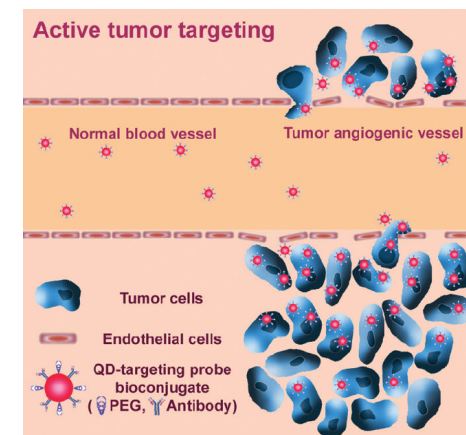
(b) tíz eltérő méretű, ezért elérő színben fluoreszkáló CdSe/ZnS kvantumpötty



Az ideális fluorofór

- kicsi
- hidrofil
- a látható tartományban nyel el és emittál (kétfoton: IR-ben nyel el)
- nagy Stokes eltolódása van
- specifikusan kötődik
(biotin/avidin, His-tag/Ni, antitest/antigén, NH₂, SH)
- fényes (abszorpció*fluoreszcencia hatásfok nagy)
- nem, vagy lassan ég ki (kivéve: FRAP)
- nem csinál fotokémiai reakciókat (kivéve: uncageing)
- nem pislog (kivéve: STORM)
- ...

Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



Fluoreszcens fehérjék



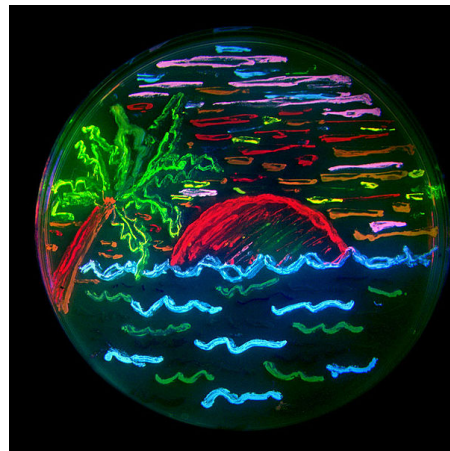
Aequorea victoria
(medúza)



Acropora millepora
(korall)

A fluoreszcens fehérjék sokfélesége

A képet teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal festették.



GFP (Green Fluorescent Protein)

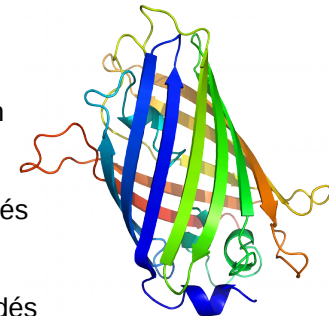
2008. évi kémiai Nobel díj

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

Douglas Prasher – 1992-ben klónozte és szekvenálta a génjét

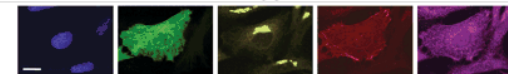
Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

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



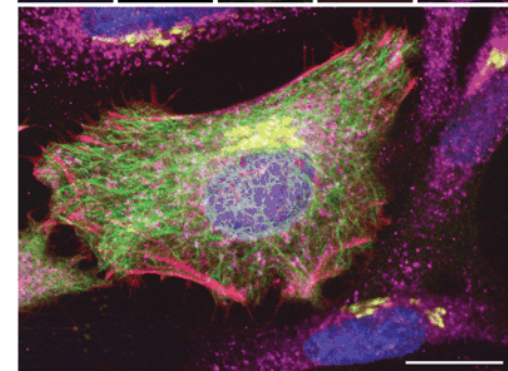
Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

Excitation (nm): 800 (2 photon)	488	432	568	637
Emission (nm):	410-490	500-530	555-565	580-620
Fluorophore:	Hoechst	GFP	QD565	ReAsH
Targeting:	direct affinity	genetic	immuno	genetic
Target:	DNA	α -tubulin	giantin	β -actin
Structure:	nuclei	microtubules	golgi	stress fibers

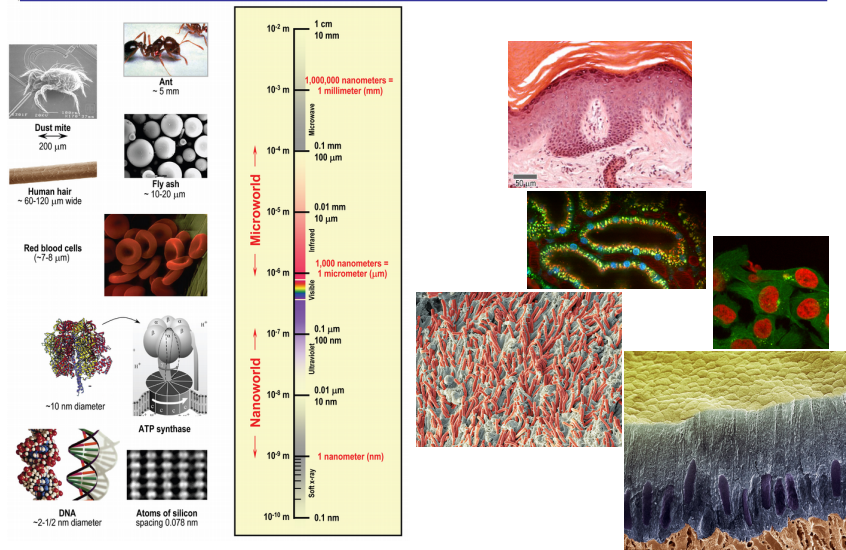


Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejt

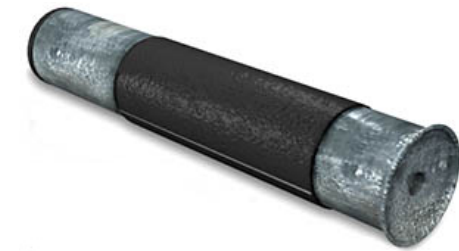
A vonal 20 μ m hosszú



Mekkorák a dolgok?



Hans Jansen és Zacharias Jansen 1590-ben összetett mikroszkópot épít



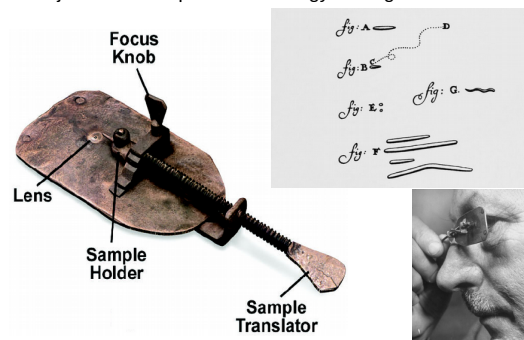
3x-10x nagyítás

Antoni van Leeuwenhoek 1632-1723 1674-ben egyszerű mikroszkópot készít



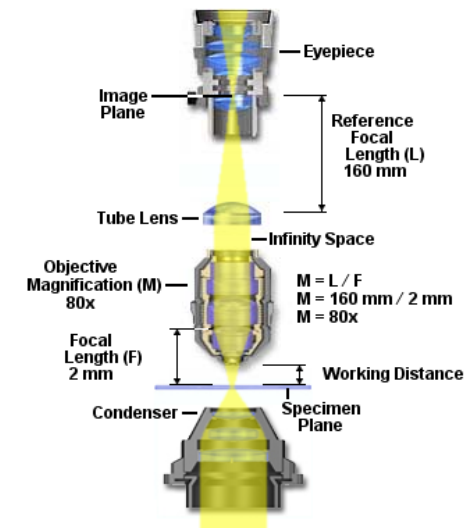
Kíváncsi volt és jó lencséket tudott csiszolni

először látott baktériumokat a saját maga és mások fogáról vett mintában (animacules), felfedezte a vörsejteket és élő spermiumokat figyelt meg.



70x-250x a lencse minőségétől függően

“Végtelenre korrigált” optika

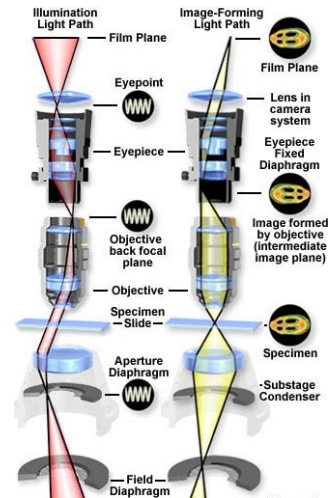


Köhler megvilágítás



August Köhler
(1866-1948)

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



Ernst Karl Abbe (1840-1905)



Carl Friedrich Zeiss
(1816-1888)

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

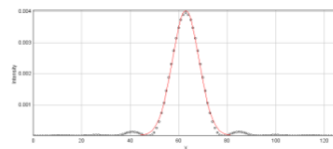
$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$$

Point Spread Function (PSF)



(a) Airy disk

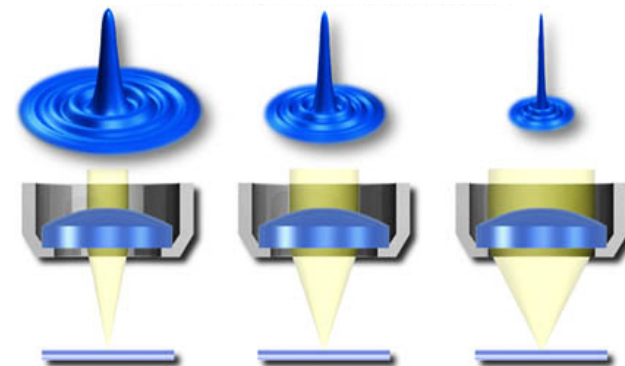
(b) 2D Gaussian



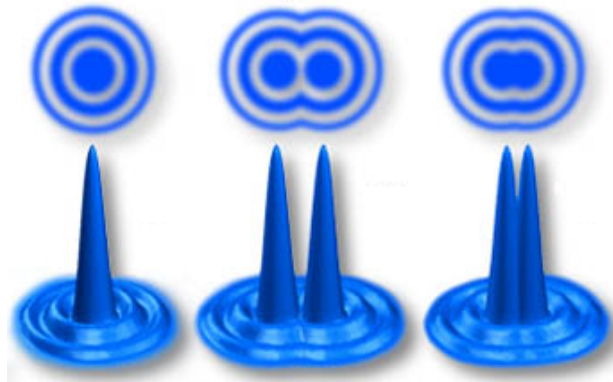
(c) Profile through the centre of the Airy disk (black) and Gaussian fit (red)

Figure 15.7: Comparison of an Airy disk (taken from a theoretical PSF) and a Gaussian of a similar size, using two psychedelic surface plots and a 1D cross-section. The Gaussian is a very close match to the Airy disk.

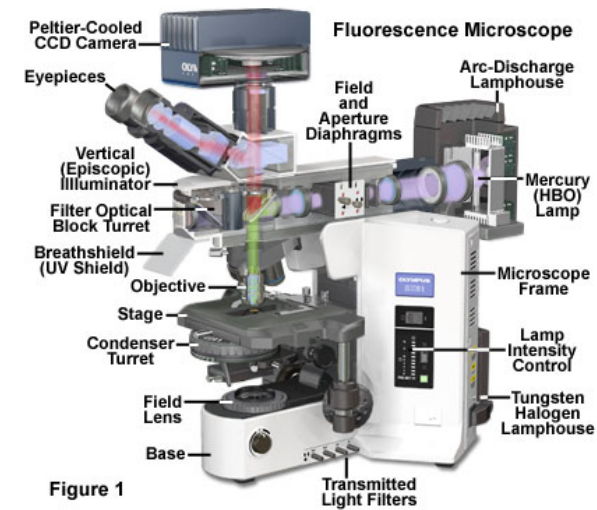
A numerikus apertúra hatása a PSF-re



A fény hullámtermészetének hatása a képre



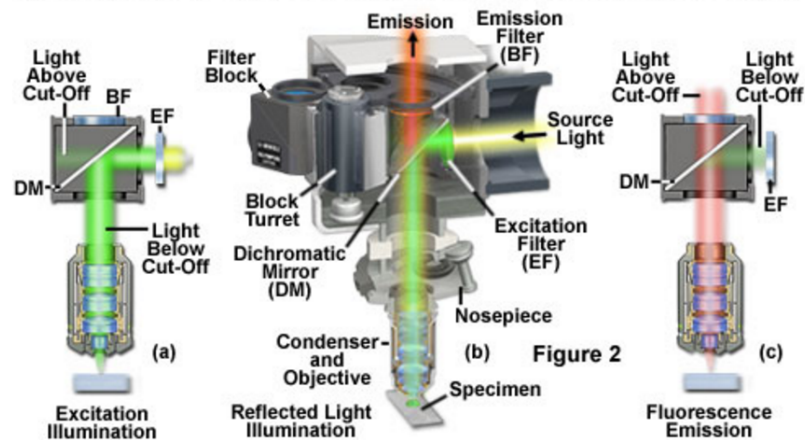
Fluoreszcencia mikroszkóp



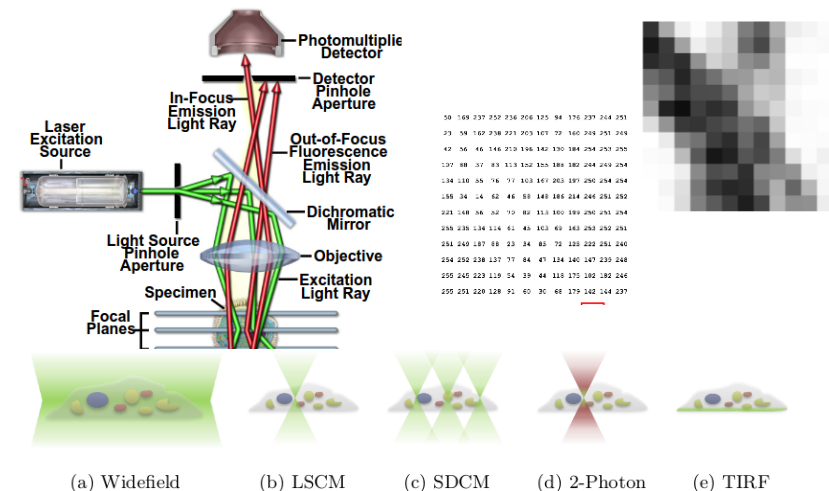
Fluoreszcencia mikroszkóp

Hogyan válasszuk el a gerjesztést az emissziótól?

Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



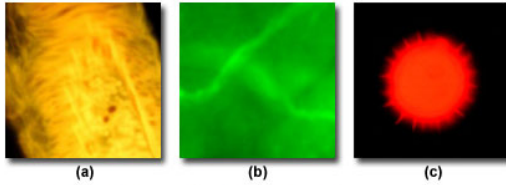
A konfokális mikroszkóp működése (CLSM)



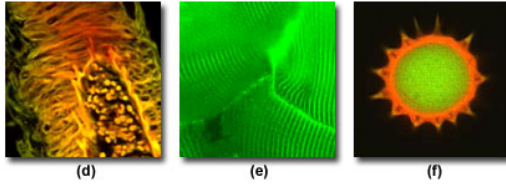
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/confocal/index.html>

Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

epifluoreszcens



konfokális



humán medulla

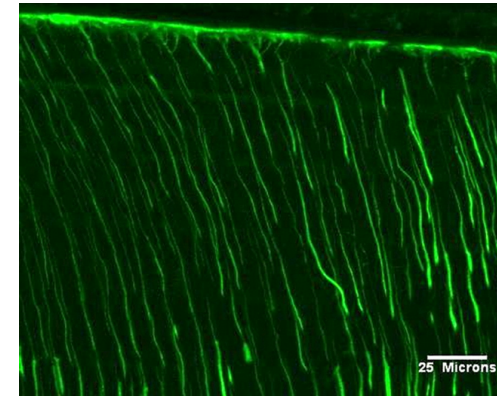
nyúl izom

pollen

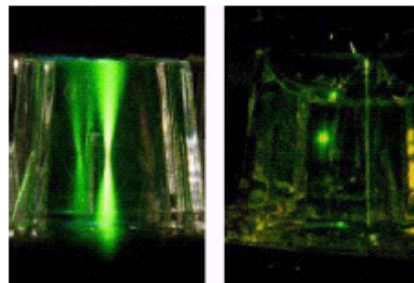
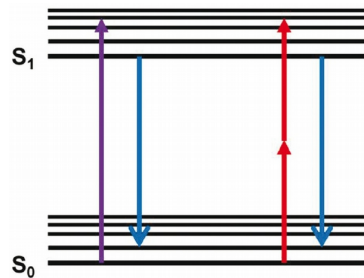
optikai szeletelés, STACK-3D rekonstrukció, timelapse, tracking

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/confocal/index.html>

Dentinalis tubulusok humán fogban



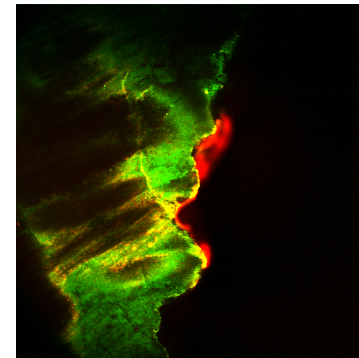
A kétfotonos mikroszkóp működési elve



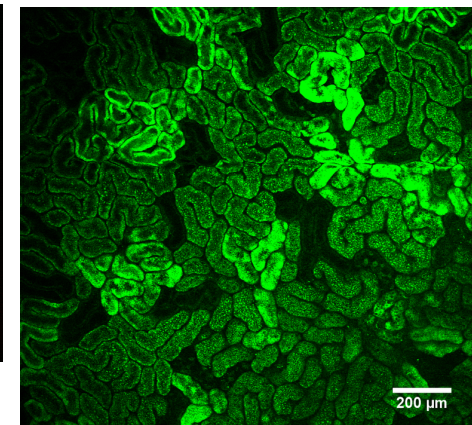
Miért jobb vastag minták esetén (in vivo)?

- gerjesztés: hangolható impulzus laser (nagy fotonsűrűség a fókuszban, 1 femtoliter)
- nincs kétfoton-elnyelődés a fókuszon kívül - optikai szeletelés
- a gerjesztő vörös-infravörös fény kevésbé szóródik
- az összes szórt fluoreszcencia fényt detektáljuk
- kevesebb fakulás
- autofluoreszcencia is látszik
- több festék gerjeszthető egyszerre

A kétfoton gerjesztésű pásztázó fluoreszcencia mikroszkóp



Fog metszete



Vese in vivo, sejten belüli Ca

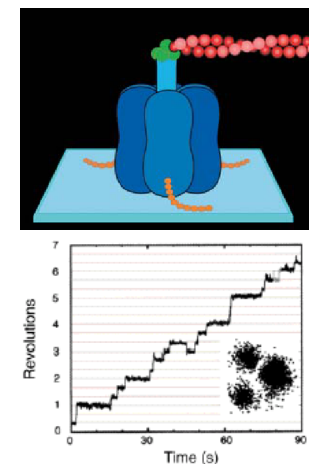
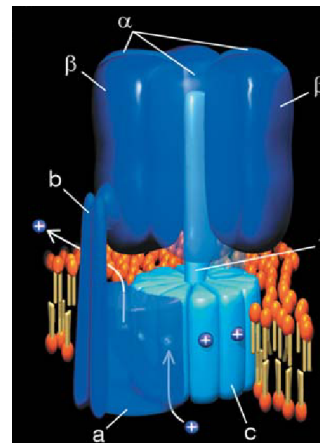
Egyedi molekulák vizsgálata

“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

Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása



Szuperrezolúciós mikroszkóp

The Nobel Prize in Chemistry 2014



Photo: A. Mahmoud
Eric Betzig
Prize share: 1/3



Photo: A. Mahmoud
Stefan W. Hell
Prize share: 1/3



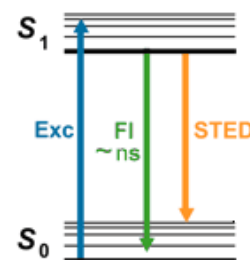
Photo: A. Mahmoud
William E. Moerner
Prize share: 1/3



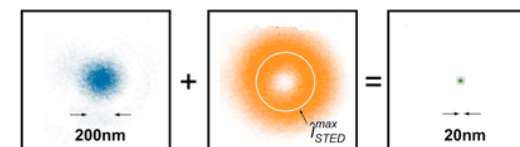
STED
PALM
STORM

The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded jointly to Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner "for the development of super-resolved fluorescence microscopy".

Stimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



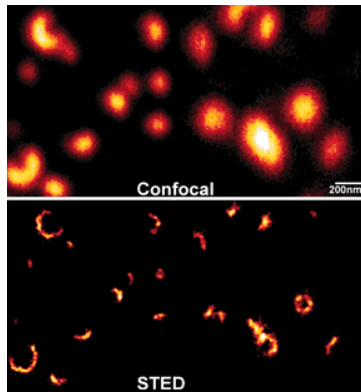
Stefan Hell úttörő munkája nyomán



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

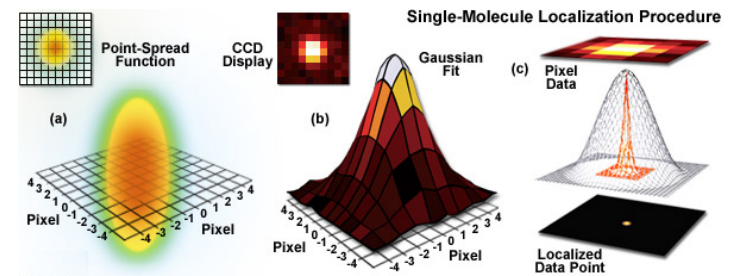
I_{max} a használt maximális STED intenzitás
 I_s a STED telítési intenzitása

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

Lokalizáció



STORM

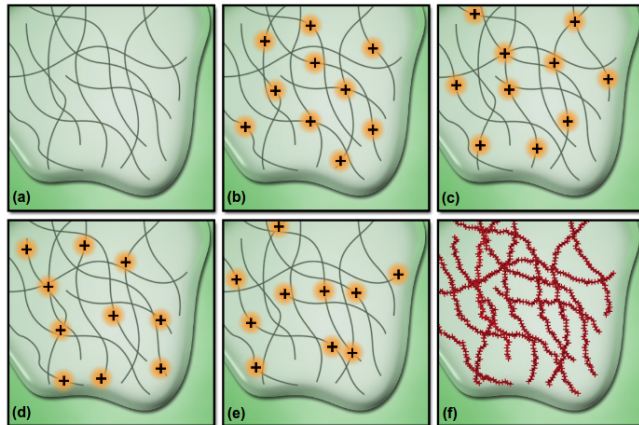
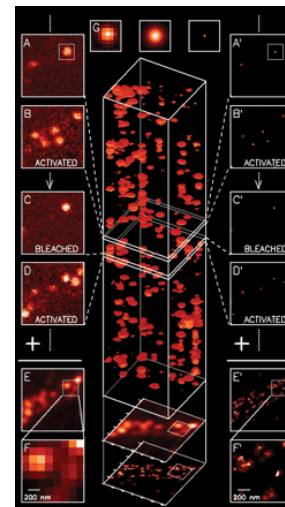


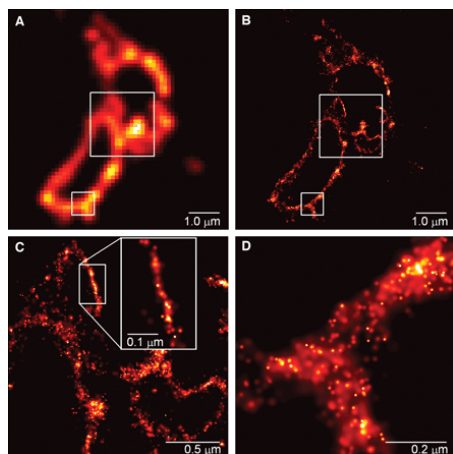
Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



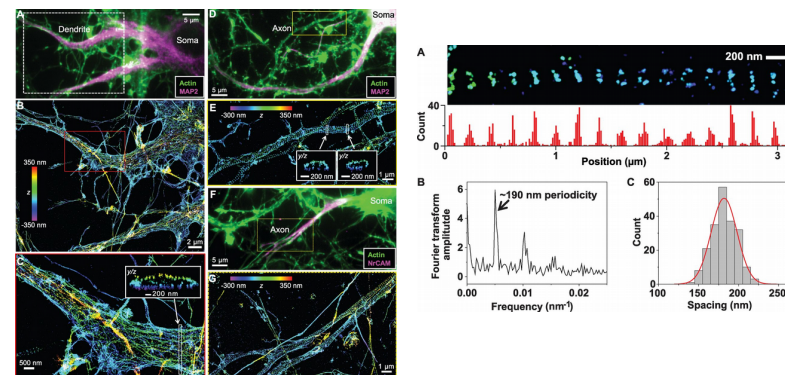
Eric Betzig és Harald Hess találmánya nyomán

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje



Axonok citoszkeletális szerkezete

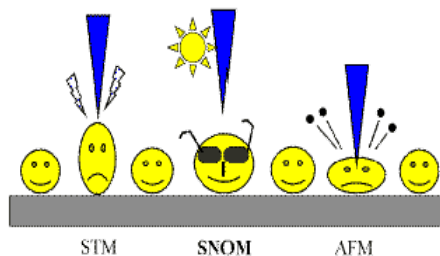


Pásztázó tűszondás mikroszkópok

(Scanning Probe Microscopy – SPM)

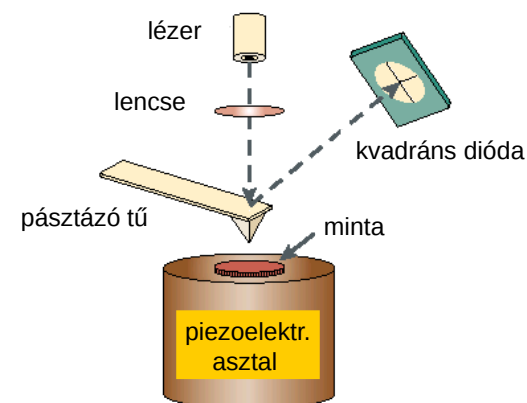
A mikroszkópok olyan családja, amely a minta felszínének domborzati képét hozza létre. Egy hegyes tűvel pásztázzunk a felszínt és a hegy-minta kölcsönhatást mérjük.

STM feltalálói (1981): Heinrich Rohrer and Gerd Binnig



Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy - AFM)

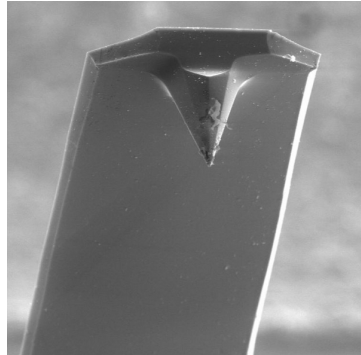
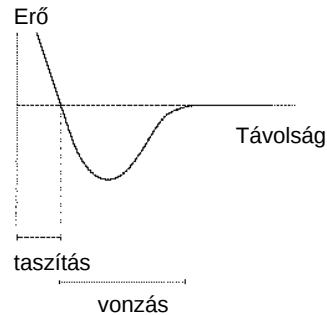
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



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.

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.

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

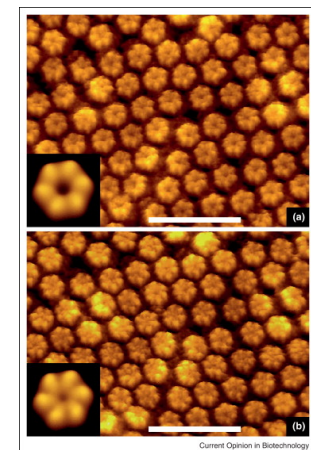
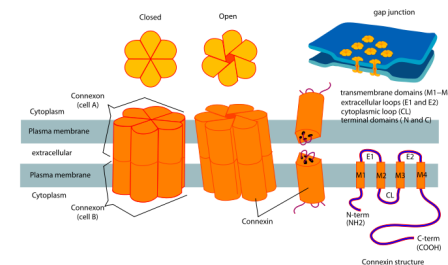
Hátrány:

lassabb pásztázás

Extra-celluláris konnexon AFM képe

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

A vonal 23 nm hosszú.



Kollagén szálak

S. Habelitz et al. / Journal of Structural Biology 138 (2002) 227-236

231

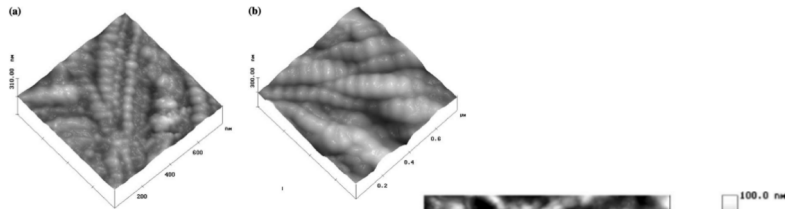


Fig. 3. Mixed-mode surface plots of tapping and phase mode AFM images of dentin collagen fibrils, obtained (a) in repeat pattern is still present after dehydration.

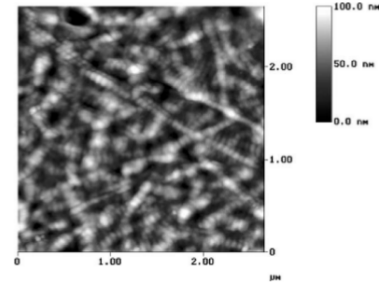
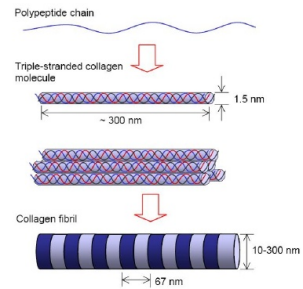
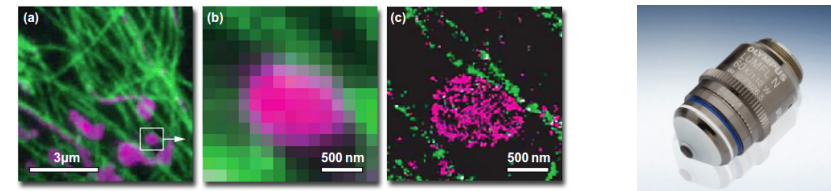


Fig. 2. Tapping mode AFM image of dentin collagen fibrils, obtained from demineralized specimen (15s citric acid) treated with 6.5 vol% NaOCl_{4q} for 130s and in air, showing the repeat pattern and the random distribution of fibrils in intertubular dentin.

Kérdés

Mekkora a legkisebb feloldható távolság abban a mikroszkópban, amelyik 580 nm hullámhosszú fényt használ a képalkotáshoz, és az alábbi objektívet használjuk? Milyen numerikus apertúra értékű objektívre lenne szükség, hogy a sejtben kb. 70 nm-re lévő fehérjéket megkülönböztessük egymástól? Létezik ilyen objektív? Milyen más módszerrel lenne ez lehetséges?



W.D.	MAG	F.N.	NA	IM	BF	DE	FL	DIC	TIR	EMPE
1.5	60	26.5	1.1	Water	PH	PO	RC	UV	CY	