

## Biomolekuláris rendszerek vizsgálata

**Osváth Szabolcs**

Semmelweis Egyetem

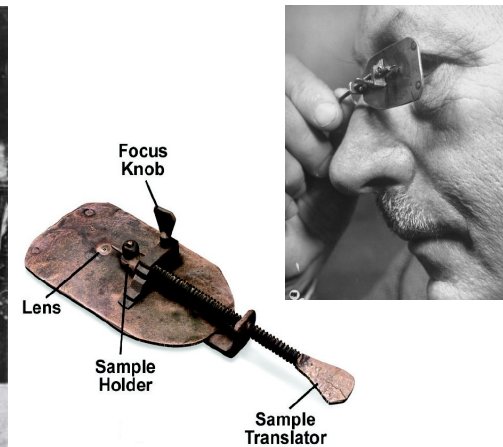
**Hans Jansen és Zacharias Jansen**  
1590-ben összetett mikroszkópot épít



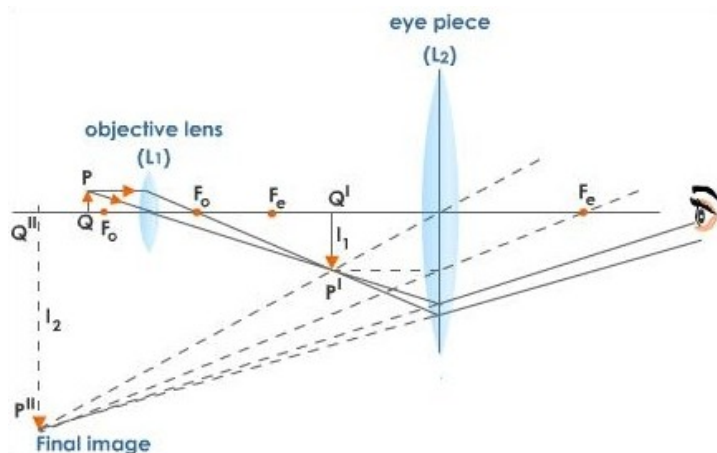
## A mikroszkópok legfontosabb típusai

- optikai mikroszkópok  
(Optical Microscope)
- elektron mikroszkópok  
(Electron Microscope)
- pásztázó mikroszkópok  
(Scanning Probe Microscope)

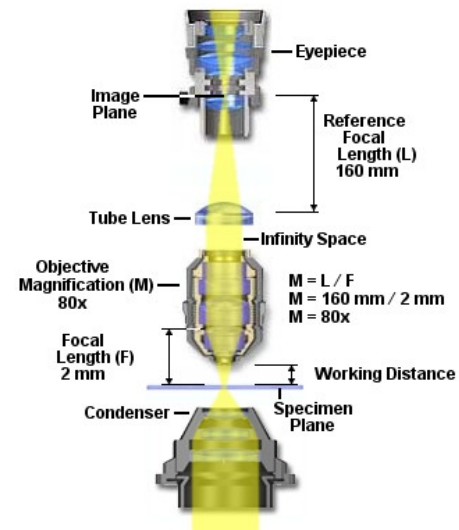
**Antoni van Leeuwenhoek (Thonis Philipszoon) 1632-1723**  
1674-ben egyszerű mikroszkópot készít



## Összetett mikroszkóp optikai útja



## “Végtelenre korrigált” optika

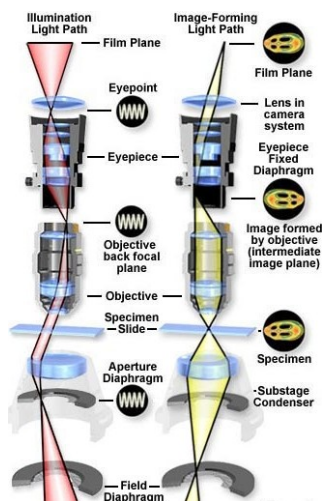


## Köhler megvilágítás



August Köhler  
(1866-1948)

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



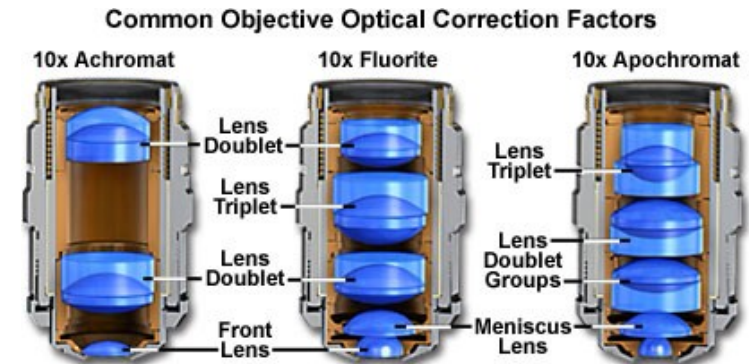
## Mikroszkóp objektív lencsék



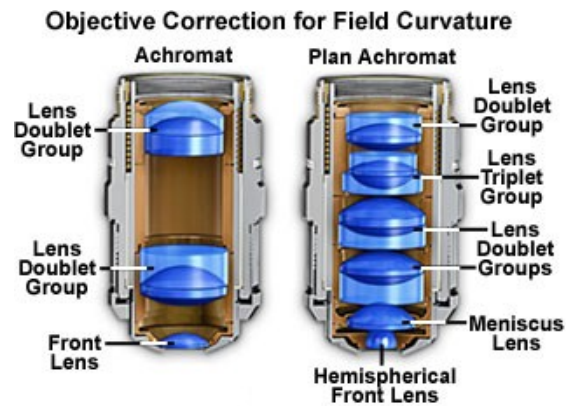
## Mikroszkóp objektívek felépítése



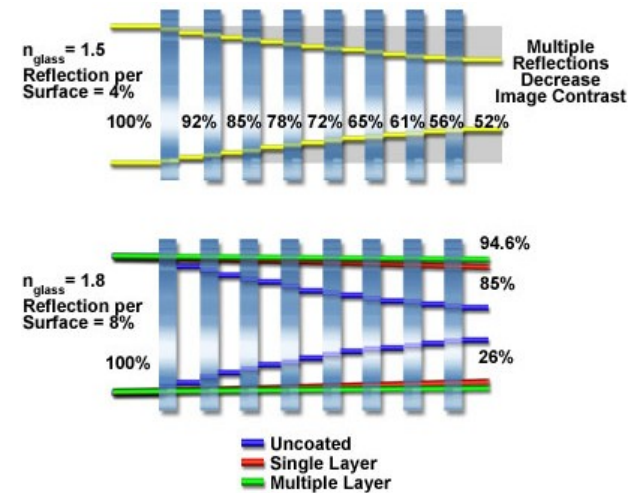
## Színkorrekció



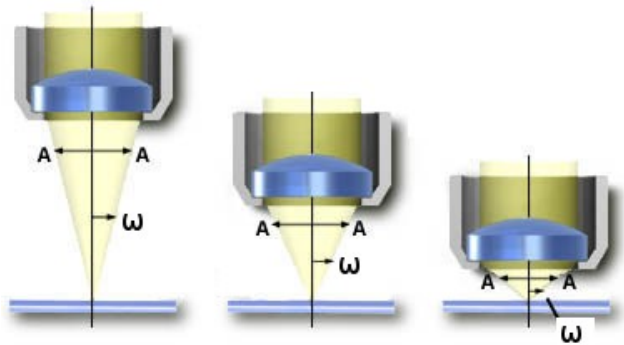
## Plánkorrekció



## Fényvisszaverődés a felszíneken



## Numerikus apertúra



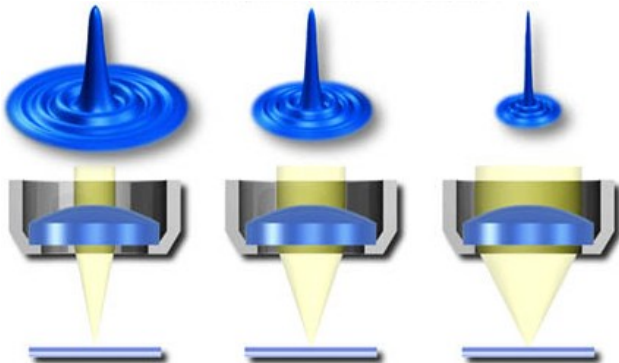
## Point Spread Function (PSF)

A PSF a mikroszkóp átviteli függvénye.

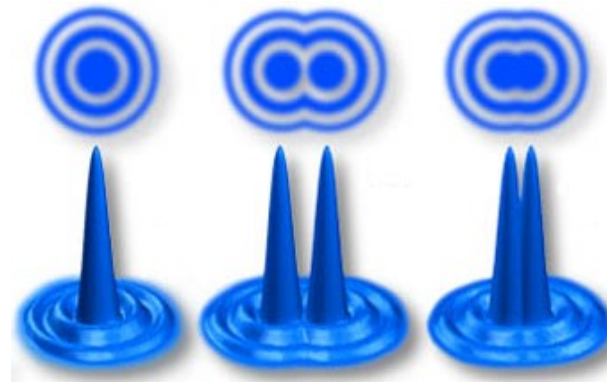
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

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

## A numerikus apertúra hatása a PSF-re

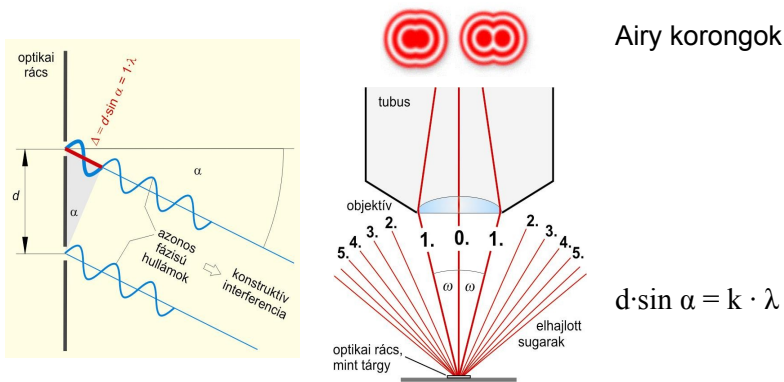


## A fény hullámtermészetének hatása a képre





## A fényc hullámmtermészetének hatása a képre



## Abbe elv

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

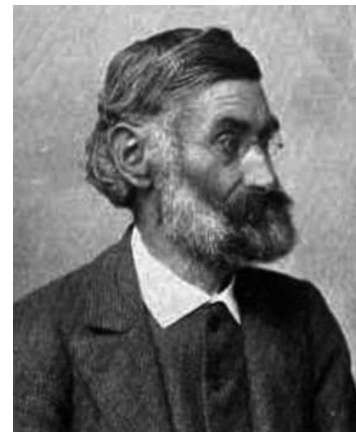
## Abbe összefüggés

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

Hallgatólagos feltevések:

- a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet
- a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képen megkülönböztethető képfoltokat ad.

## Ernst Karl Abbe (1840-1905)



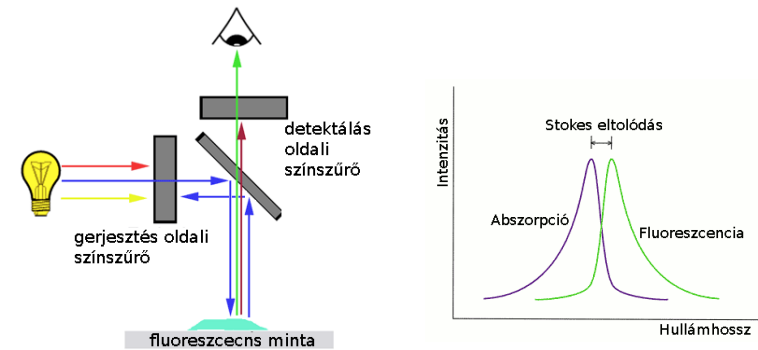
Fizikus és társadalomreformer

Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

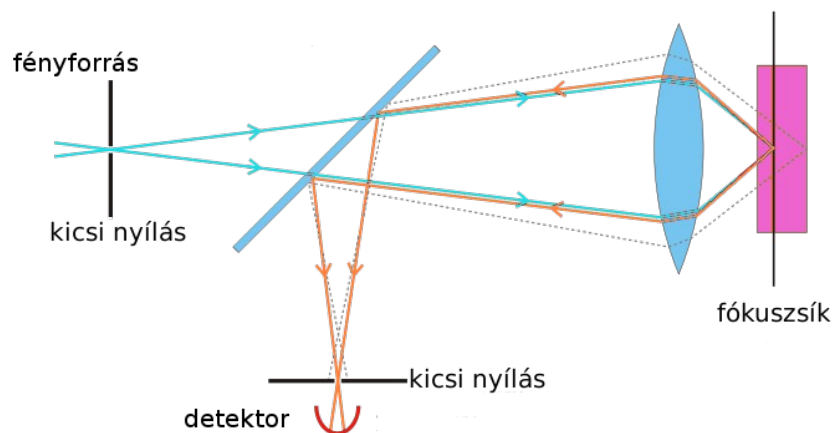
## Objektívek numerikus apertúrája

| 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                 |

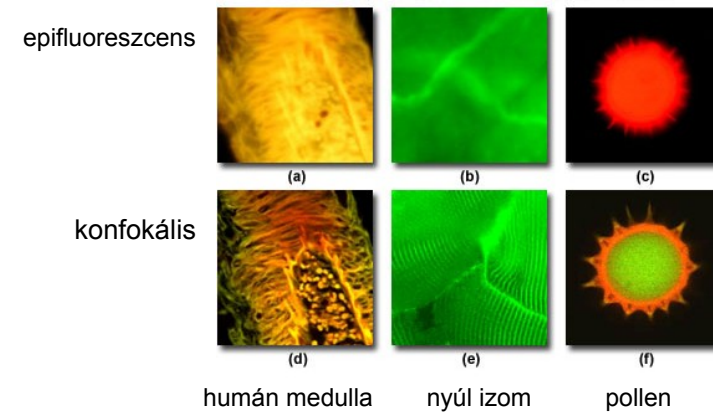
## Fluoreszcencia mikroszkóp



## A konfokális fluoreszcencia mikroszkóp működése

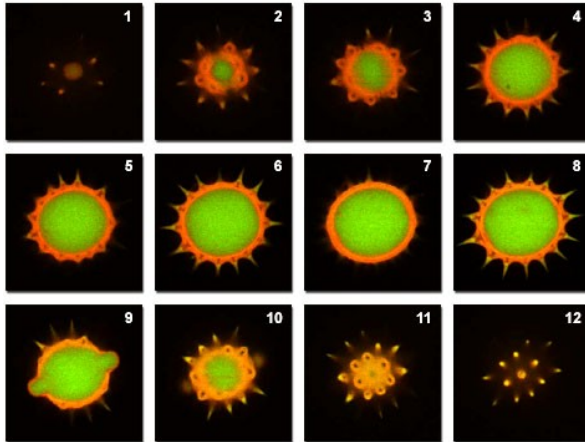


## Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása



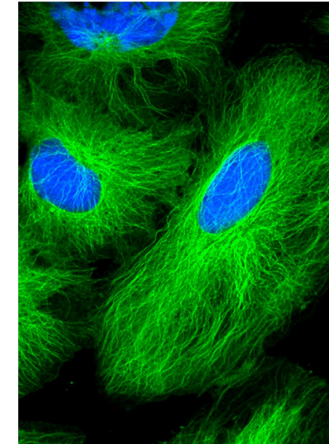
## Térbeli szeletelés

Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy



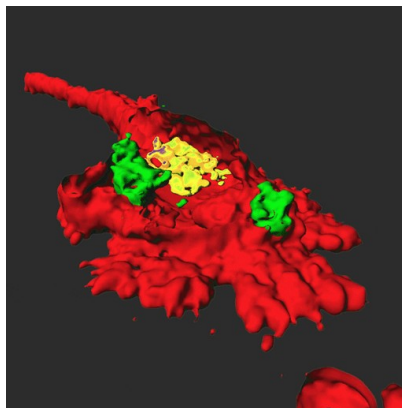
## Konfokális mikroszkóp

Tubulin mikrotubulusok  
rekombináns tubulint kifejező  
sejtekben.

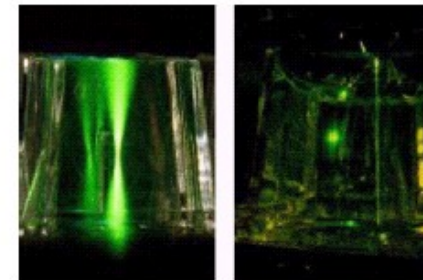
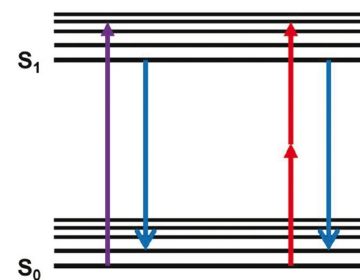


## Konfokális mikroszkóp

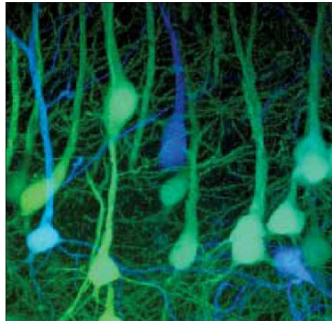
Dendritikus sejt pollen  
szemcséket takarít el.  
Konfokális mikroszkópi  
technikával készített 3D kép.



## A kétfotonos mikroszkóp működési elve

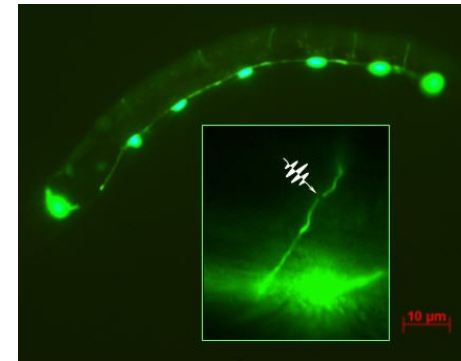


## Kétfotonos mikroszkópia



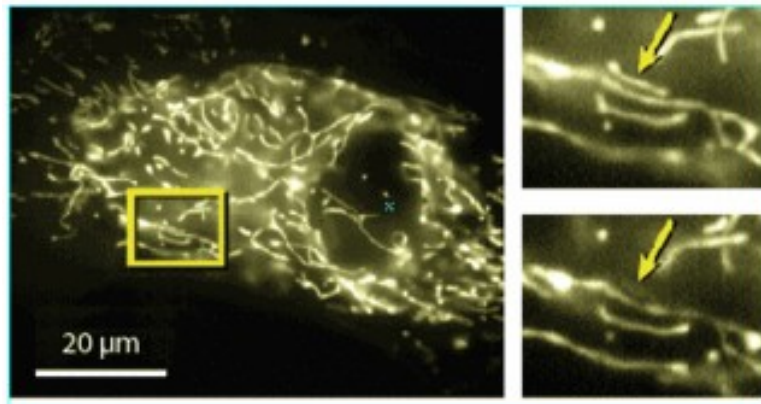
Zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező transzgenikus egerek vizuális kortexének kétfotonos mikroszkóppal készült képe.

## Élőlények fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



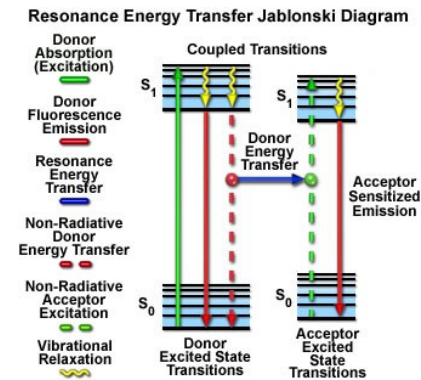
Caenorhabditis elegans 302 neuronja közül egyetlen idegsejt axonjának átvágása

## Egyedi sejtek fluoreszcencia mikroszkópos tanulmányozása, nanosebészet



Egyetlen mitokondrium elpusztítása élő szarvasmarha epitheliális sejtben

## FRET (Förster Resonance Energy Transfer)



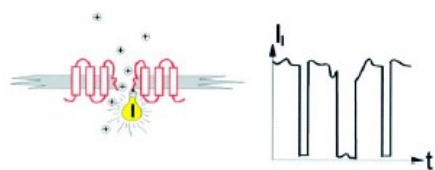
Az energiatranszfer hatásfoka:

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

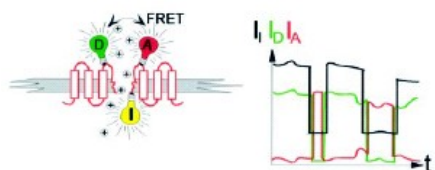
Ahol  $R_0$  a festékpárra jellemző állandó,  $r$  a festékek közötti távolság.



## Fluoreszcens indikátorok

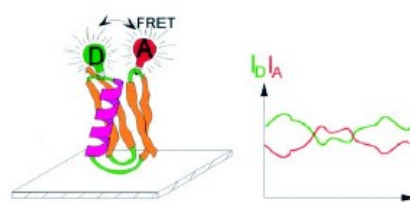


Ioncsatorna működése  
a helyi ionkoncentráció  
mérése alapján

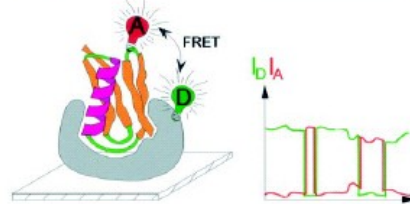


Ionkoncentráció és  
konformációs változások  
együttes mérése

## FRET alkalmazások: távolságmérés



Molekulán belüli  
konformációs változások



Asszociáció és disszociáció

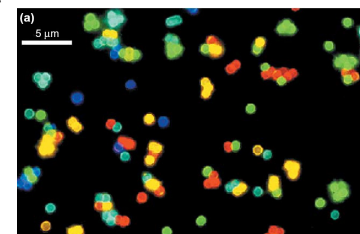
## Az ideális fluorofór

- kicsi
- hidrofil
- a látható tartományban nyel el és emittál
- nagy Stokes eltolódás
- specifikus kötődés  
(biotin/avidin, His-tag/Ni, antitest/antigén, NH<sub>2</sub>, SH)
- fényes (abszorpció\*fluoreszcencia hatásfok)
- nem, vagy lassan ég ki
- nem csinál fotokémiai reakciókat
- nem pislog

[www.probes.com](http://www.probes.com) (Invitrogen)

## Fluoreszcens kvantumpöttyök

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

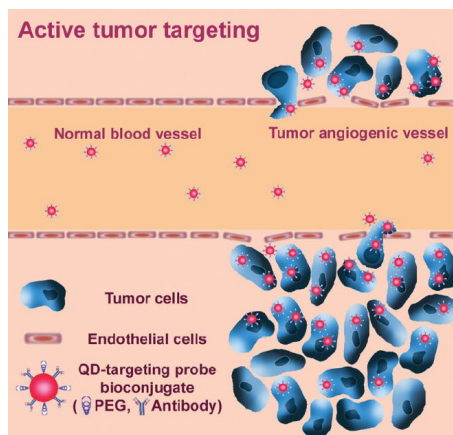


A kvantumpöttyök mérete  
határozza meg az emittált  
fluoreszcencia színét.

(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)

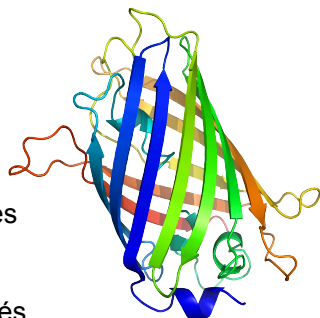
2008. évi kémiai Nobel díj

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

Douglas Prasher – 1992-ben klónozte és szekvenálta a génjét

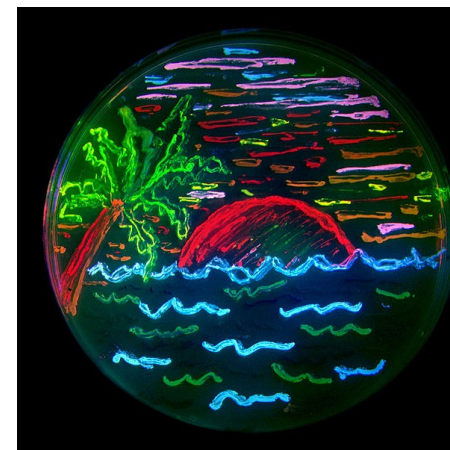
Martin Chalfie – 1994-ben génkifejeződés indikátoraként használta

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



## A fluoreszcens fehérjék sokfélesége

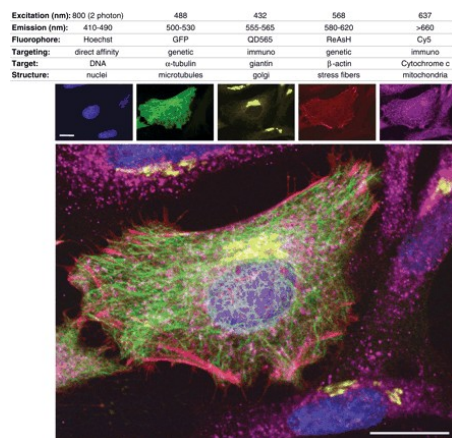
A képet teljes egészében fluoreszcens fehérjéket kifejező baktériumokkal festették.



## Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása

Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20  $\mu\text{m}$  hosszú.



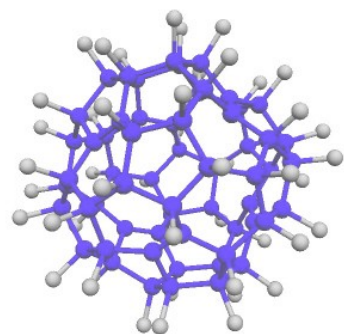
## Egyedi molekulák vizsgálata

### “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."

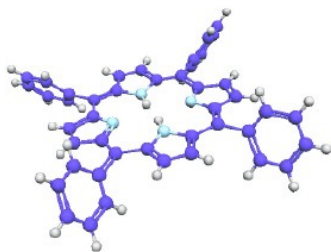
Richard Feynman, 1959

## Hullám-részecske kettősség



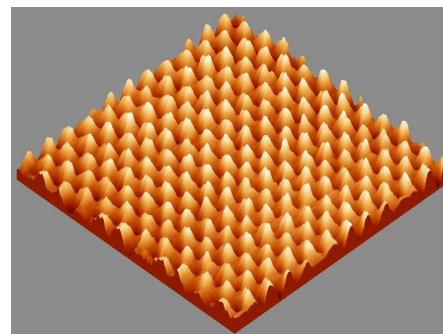
fluorofullerén  $\text{C}_{60}\text{F}_{48}$   
1632 Da

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



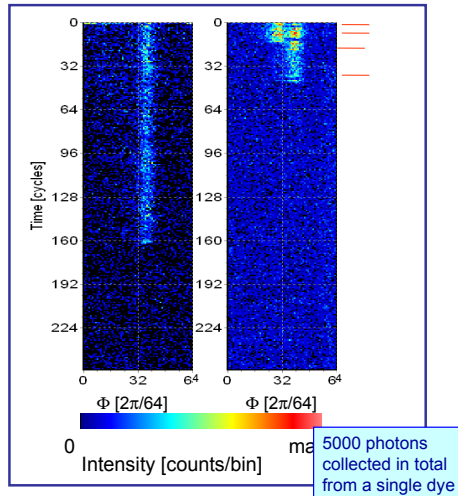
tetrafenilporfirin  $\text{C}_{44}\text{H}_{30}\text{N}_4$

## Hullám-részecske kettősség

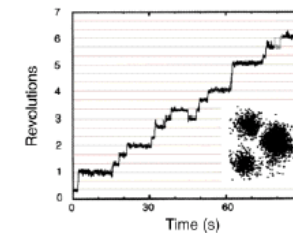
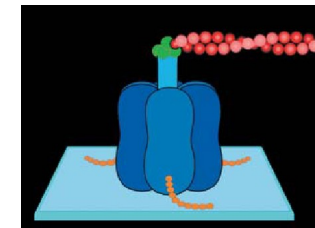
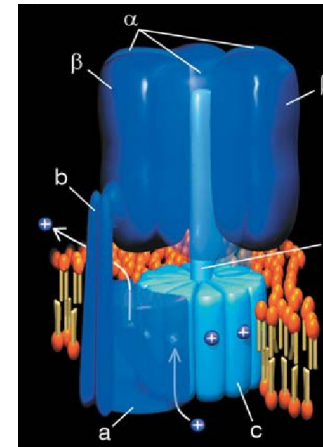


Grafitról készült Pásztázó Alagútmikroszkópi (Scanning Tunneling Microscope, STM) kép

## Egyedi Alexa molekulák kvarc felszínén



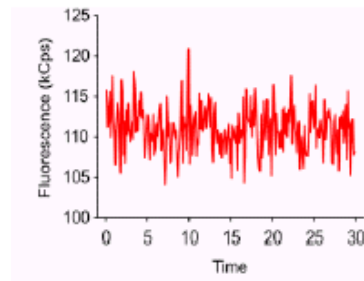
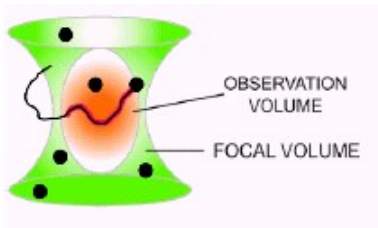
## Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása



## Fluoreszcencia korrelációs spektroszkópia (FCS)

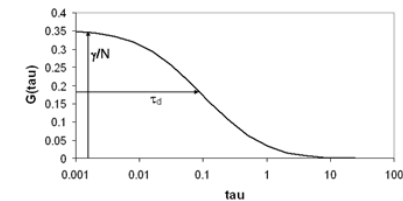
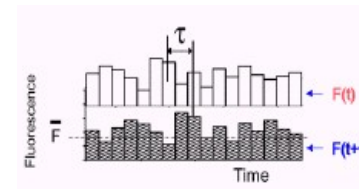
egyensúly körüli fluktuációk  
megfigyelt térrész: fl  
koncentráció: 10 nM  
molekulák számának időátlagos: 6

Fluoreszcencia fluktuációk



## Autokorrelációs függvény

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$



$\tau_d$  - a karakterisztikus ideje annak, hogy egy molekula átdiffundáljon a fókuszterefogaton  
 $\gamma$  - a PSF alakú 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 képalkotásban.

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

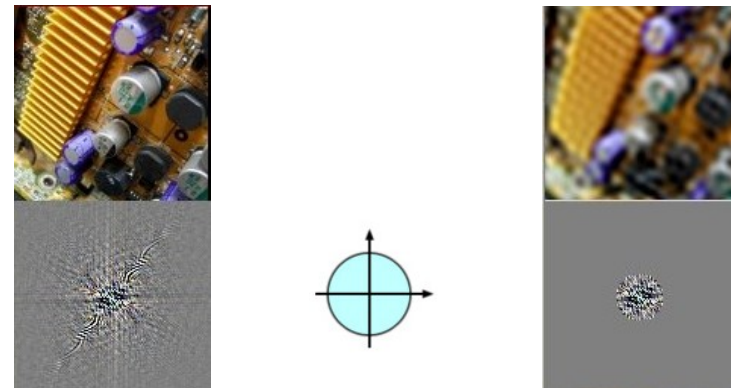
Hallgatólagos feltevések: a minta különböző részeiről egyszerre alkotunk képet; a minta részleteit úgy különböztetjük meg, hogy a róluk jövő fény a létrejövő képben megkülönböztethető képpontokat (foltokat) ad.

## Szuperrezolúciós mikroszkóp

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

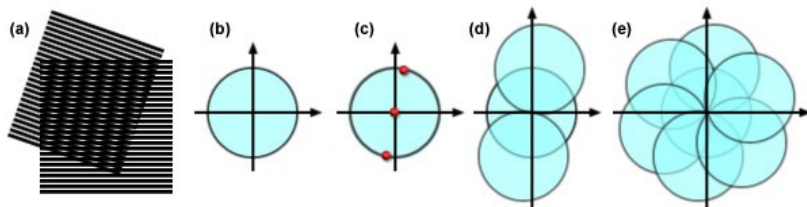
- Eric Betzig
- Stefan W. Hell
- William E. Moerner

## Abbe elv a minta térbeli frekvenciái szempontjából

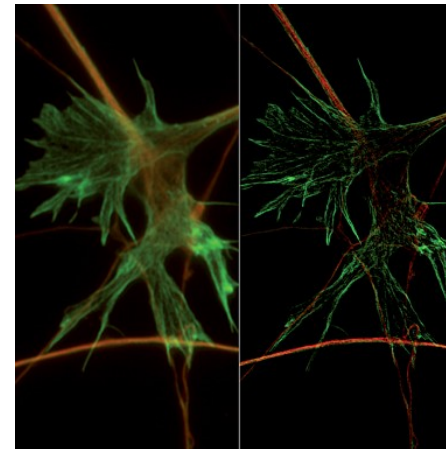


A képben lévő térbeli frekvenciákból a mikroszkóp objektív csak egy szűk tartományt enged át, ami korlátozza a térbeli feloldást.

## Strukturált megvilágításos mikroszkóp

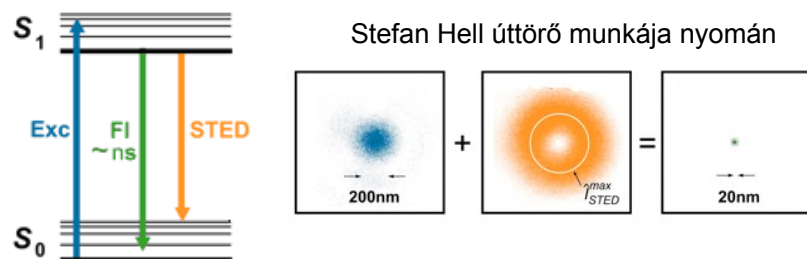


## Strukturált megvilágításos mikroszkóp



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

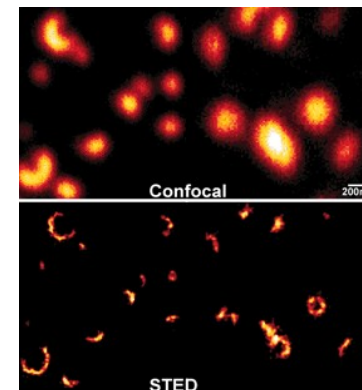
## STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



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

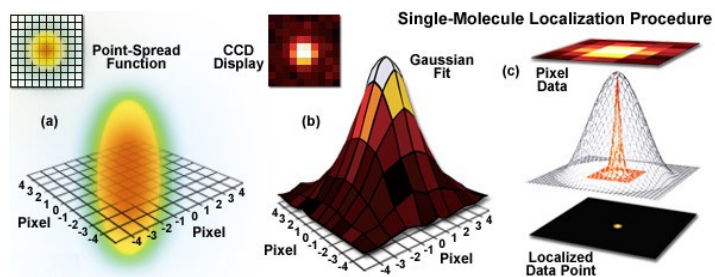
$I_{max}$  a használt maximális STED intenzitás  
 $I_s$  a STED telítési intenzitása

## STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

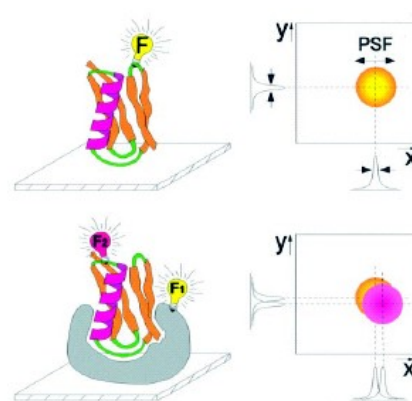


Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

## Lokalizáció



## Lokalizáció és kolokalizáció

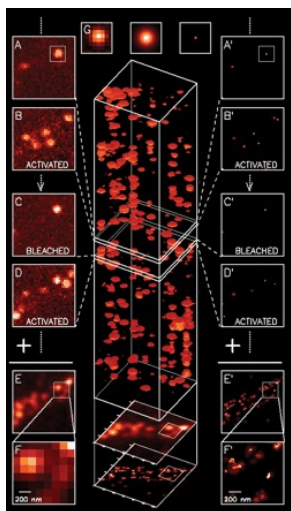


A PSF illesztése alapján nm pontossággal tudjuk megállapítani a jelölt makromolekula helyét.

Két különböző színű kromofór helyének megállapítása.

A kolokalizáció nem feltétlen jelent kölcsönhatást.

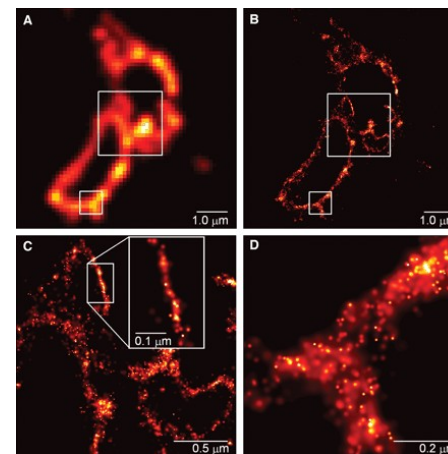
## Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



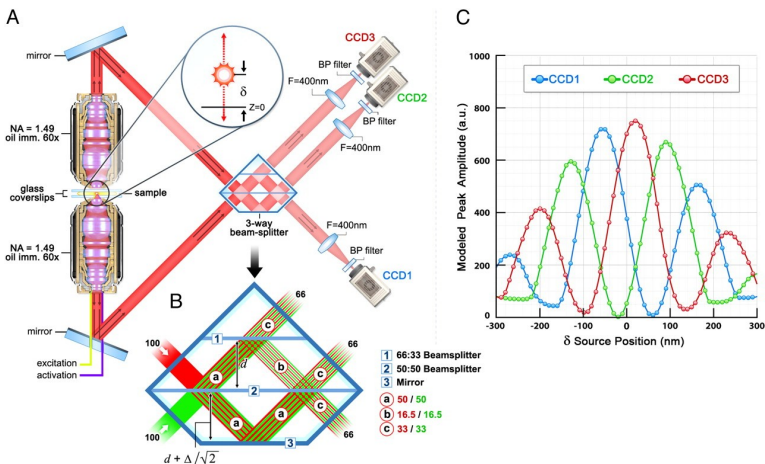
Eric Betzig és Harald Hess találmánya nyomán

## Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

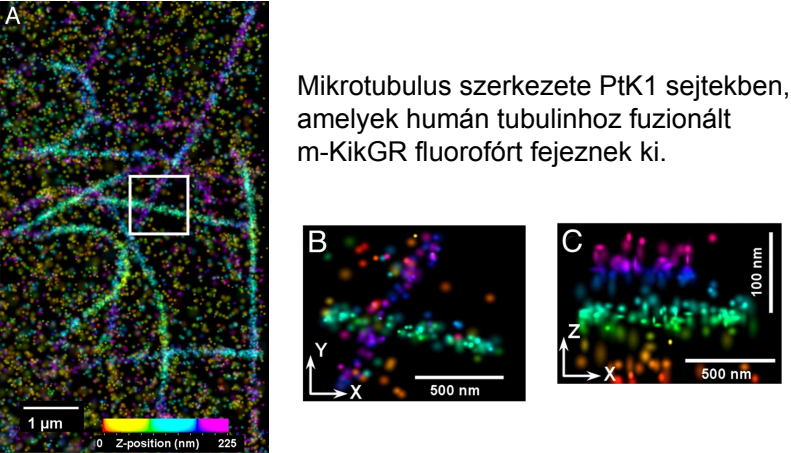
CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje



# Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)

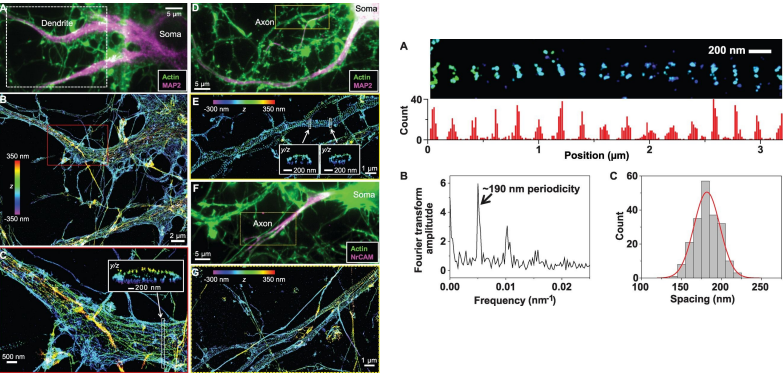


# Interferometric Photo-Activated Localization Microscopy (iPALM)

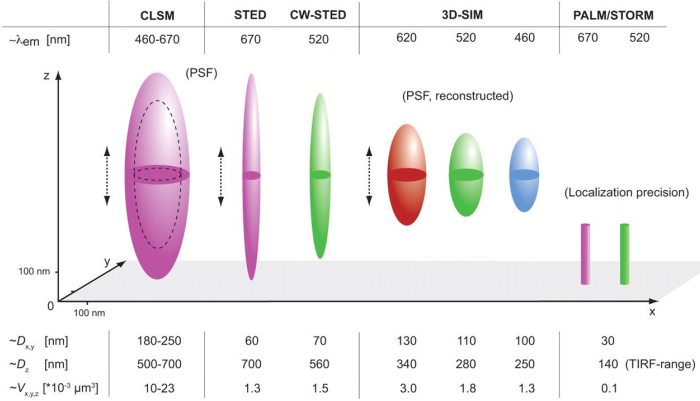


Mikrotubulus szerkezete PtK1 sejtekben, amelyek humán tubulinhoz fuzionált m-KikGR fluorofórt fejeznek ki.

# Axonok citoszkeletális szerkezete



# Szuperrezolúciós technikák összehasonlítása



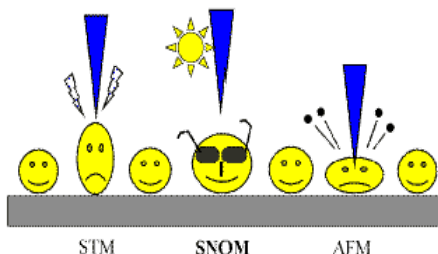


## Pásztázó tűszondás mikroszkópok

(Scanning Probe Microscopy – SPM)

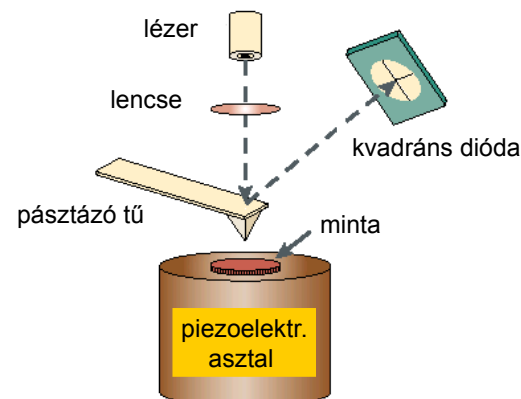
A mikroszkópok olyan családja, amely a minta felszínének domborzati képét hozza létre. Egy hegyes tűvel pásztázzunk a felszínt és a hegy-minta kölcsönhatást mérjük.

STM feltalálói (1981): Heinrich Rohrer and Gerd Binnig 1986-ban Nobel díjat nyertek ezért a munkáikért



## Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy - AFM)

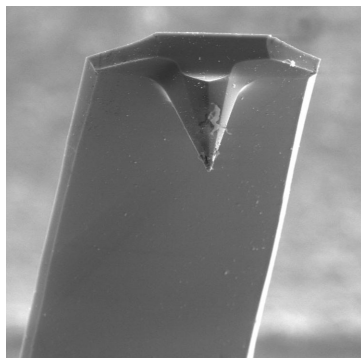
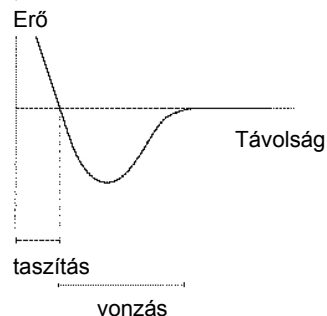
**AFM:** a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



## A tű és a minta közötti erő

A tű jellemzői:

- tipikusan 100  $\mu\text{m}$  hosszú, 1  $\mu\text{m}$  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

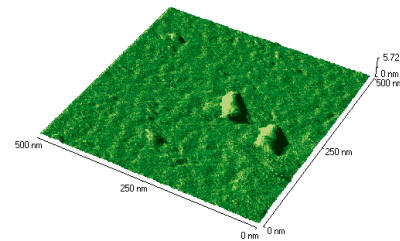
### Tapping Mode AFM

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

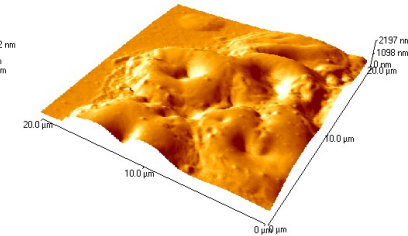
Hátrány:  
lassabb pásztázás

## Biológiai mintákról készült AFM képek

Hőszokk fehérjék



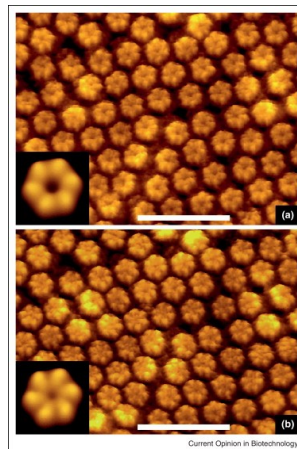
Vörös vörsejtek



## Extra-celluláris konnexon AFM képe

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

A vonal 23 nm hosszú.



## Az elektron mint hullám



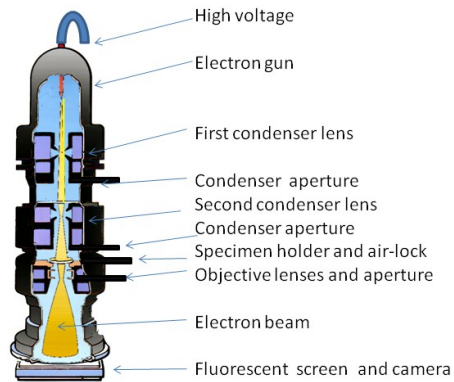
Louis-Victor-Pierre-Raymond,  
de Broglie hetedik hercege

Louis de Broglie:

$$\lambda = h / p$$

$\lambda$  az elektron hullámhossza  
 $h$  a Planck állandó  
 $p$  az elektron impulzusa

## Transzmissziós elektronmikroszkóp

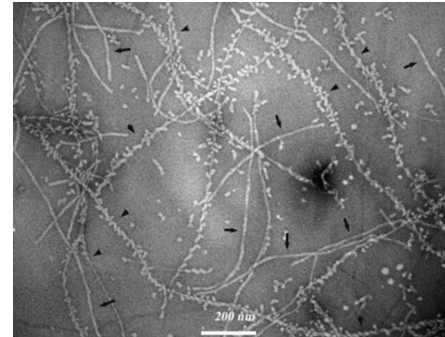


Ruska 1933-ban épült elektronmikroszkópja



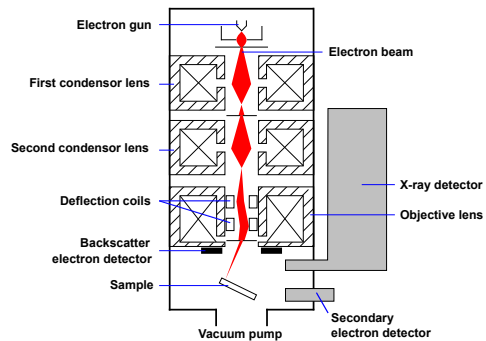
Ernst August Friedrich Ruska és Max Knoll készítették az első elektronmikroszkópot 1931-ben. Ruska 1986-ban Nobel díjat kapott az elektronoptika fejlesztése terén elért eredményeiért.

## Amiloid szálak transzmissziós elektronmikroszkópi képe



Koleszterin kötődése amiloid fibrillumokhoz.

## SEM



## SEM



## ESEM

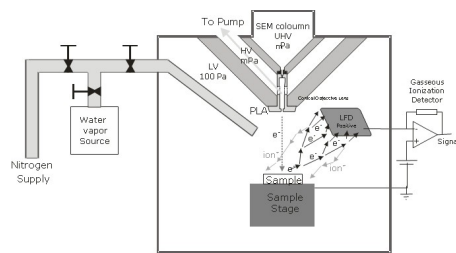
$p > 609 \text{ Pa}$   
 $p \cdot L = 1 \text{ Pa} \cdot \text{m}$

előny:

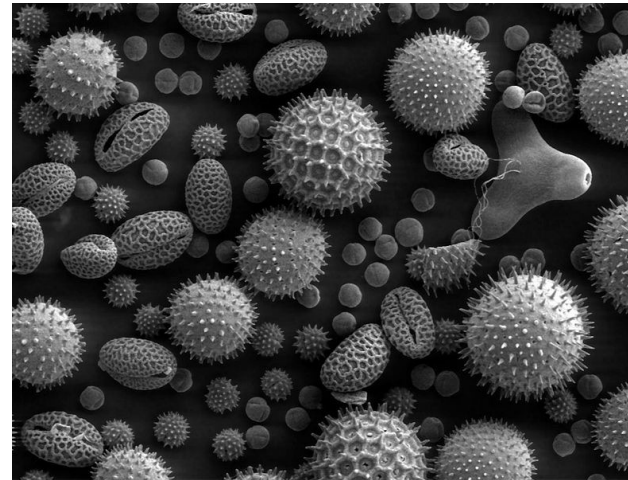
- hidratált minta
- nem csak vezető minta
- a gáz mint detektor

hátrány:

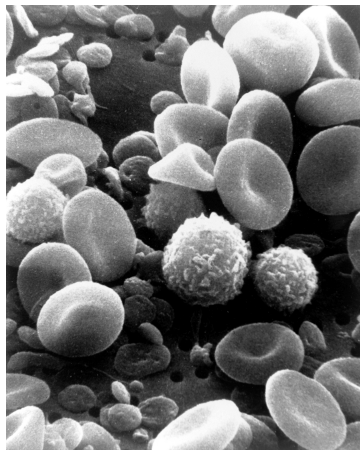
- a mintatér magassága:  
töredék  $\text{mm} < 10 \text{ mm}$
- limitált képterület



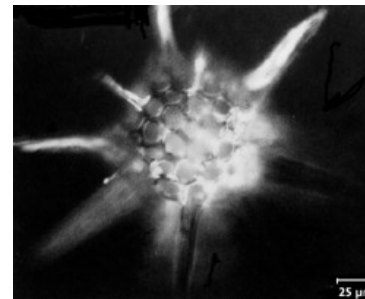
## Pollen pásztázó elektronmikroszkópos képe



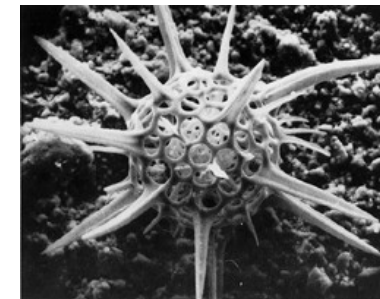
## Vérsejtek pásztázó elektronmikroszkópos képe



## Optikai- és elektronmikroszkóp összehasonlítása



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



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