

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

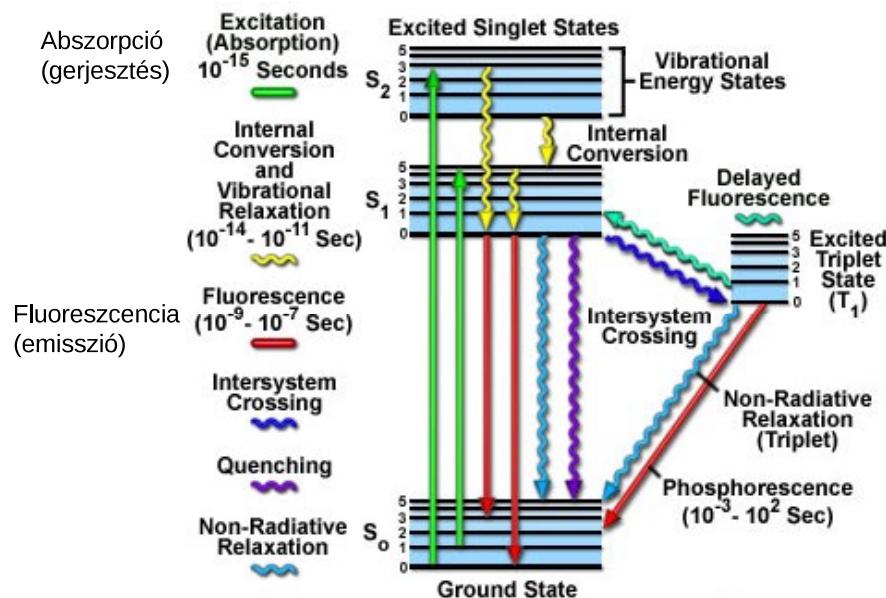
66. Pásztázó mikroszkópos módszerek

- a) A pásztázás elve
- b) Atomerő mikroszkópia

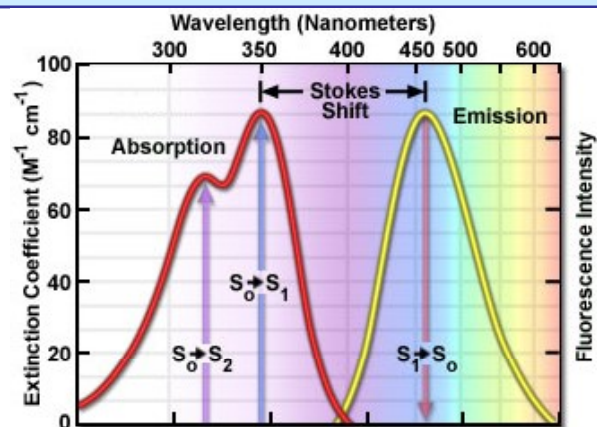
Kapcsolódó részek:
Damjanovich-Fidy-Szöllősi:
X/1, X/2., X/3.

2018.04.10.

Fény abszorpció és emisszió – Jablonski diagram



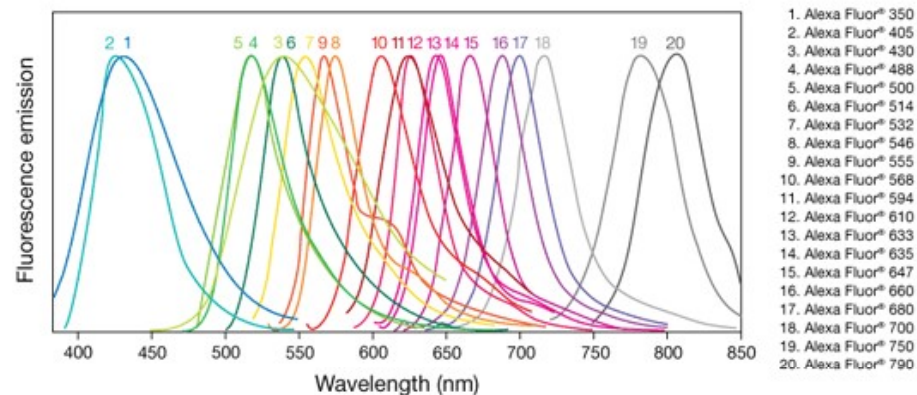
Fény abszorpció és emisszió spektrum



gerjesztés
alkalmas
hullámhosszon

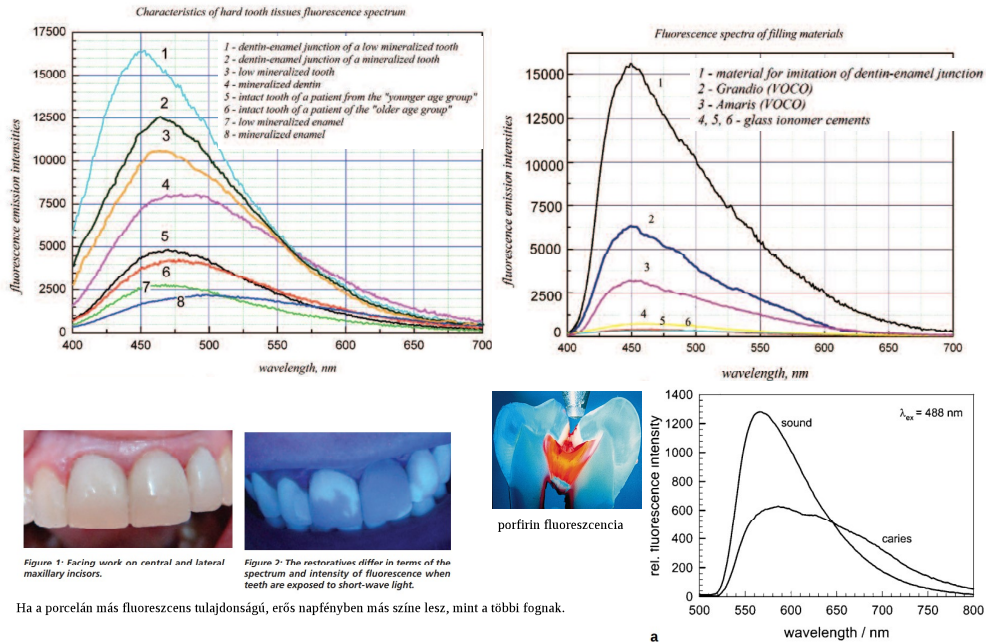
az emisszió
detektálása
alkalmas
hullámhosszon

Fluoreszcens festékek (molekulák)



Különböző színű festékmolekulák köthetők különböző helyekre

A fog és a tömőanyag autofluoreszcenciája

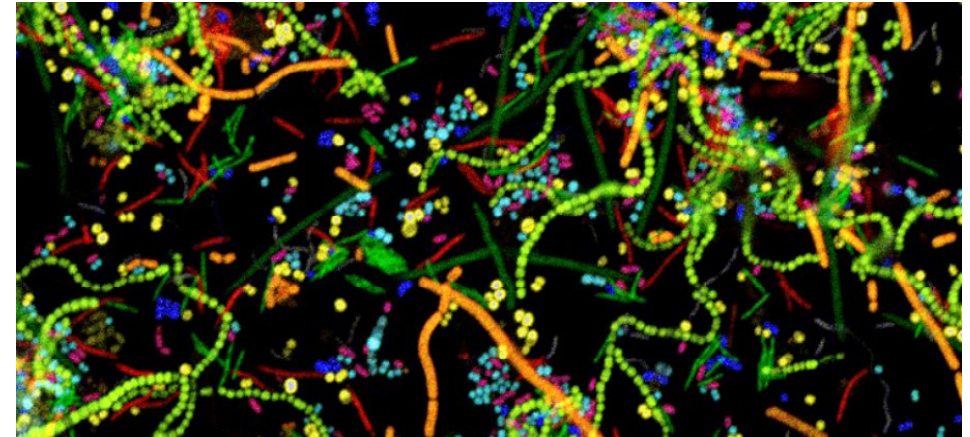


Ha a porcelán más fluoreszcens tulajdonságú, erős napfényben más színe lesz, mint a többi fognak.

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)
- ...

Fluoreszcensen jelzett baktériumok

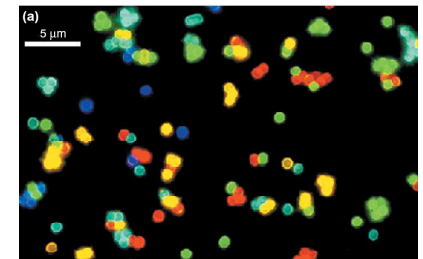


CLASI-FISH: fluoreszcens festékkel jelölt, egyszálú DNS-darabkák kombinációjának specifikus kötődésén alapul, más-más szín keverődik ki, ahogy más kombinációban és arányban kötődnek az egyes darabok a különböző fajtájú baktériumokhoz.

After looking at these samples, Leeuwenhoek wrote that he saw "an unbelievably great company of living animalcules, swimming more nimbly than any I had ever seen up to this time. The biggest sort . . . bent their body into curves in going forwards. . . Moreover, the other animalcules were in such enormous numbers, that all the water . . . seemed to be alive."

Fluoreszcens kvantumpöttyök

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



A kvantumpöttyök mérete határozza meg az emittált fluoreszcencia színét.

A nanométeres méretű félvezető kristály darabkába elektron vagy lyuk van "bezárva",


elektronok vannak egy zárt dobozban meghatározott energiaszinteken, mint a molekulákban is



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

közel 100% hatásfok!

A tökéletes fénykibocsátó anyag



WHAT ARE QUANTUM DOTS?

At 10,000x narrower than a human hair, Quantum Dots are so small that they cannot even be seen under a microscope.

- With nearly 100% efficiency, quantum dots are the most efficient light-emitting material on the planet.
- Quantum dots can reproduce any color in the visible spectrum with unmatched brightness and purity.

SPECTRUM

Ultra HD TV has a whole new color palette. Called rec.2020, this new standard encompasses all the colors found in the natural world. Quantum Dots offer the best coverage of rec.2020 today, bringing Ultra HD displays closer to what our eyes can see than ever before.

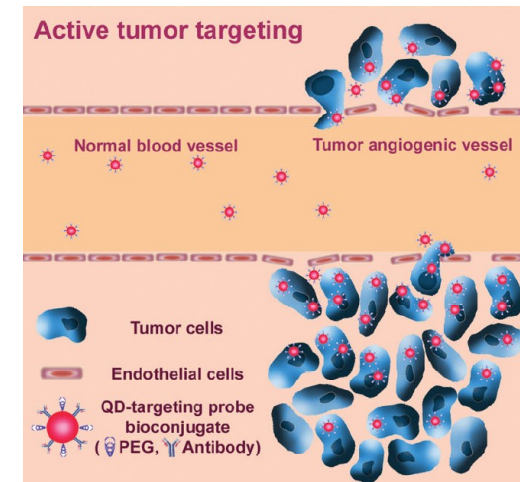
QDEF® by nanosys.

Nanosys designed QDEF to be a straightforward replacement for an existing film in LCD backlights.

Each QDEF sheet contains trillions of tiny nanocrystals called quantum dots that have a unique property – they emit light in pure colors more efficiently than any other material on the planet. Display makers can simply drop Nanosys QDEF technology into their LCD manufacturing process to experience displays with color and efficiency beyond the best OLEDs, at a fraction of the cost.



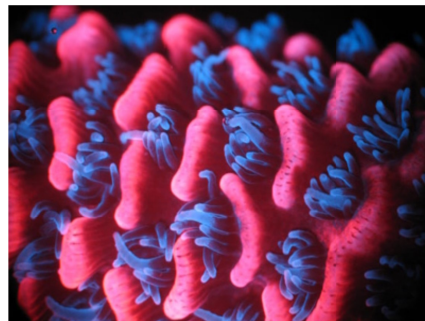
Fluoreszcens kvantumpöttyökkel jelölt rákos daganatok



Fluoreszcens fehérjék



Aequorea victoria
(medúza)



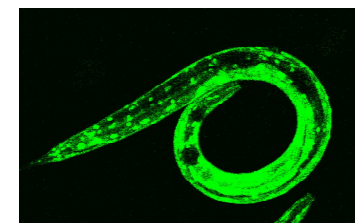
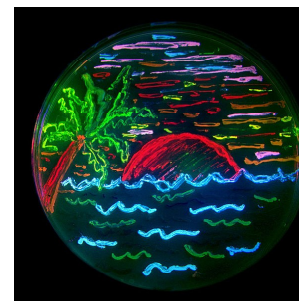
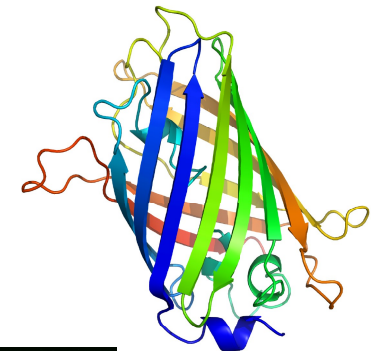
Acropora millepora
(korall)

GFP (Green Fluorescent Protein)

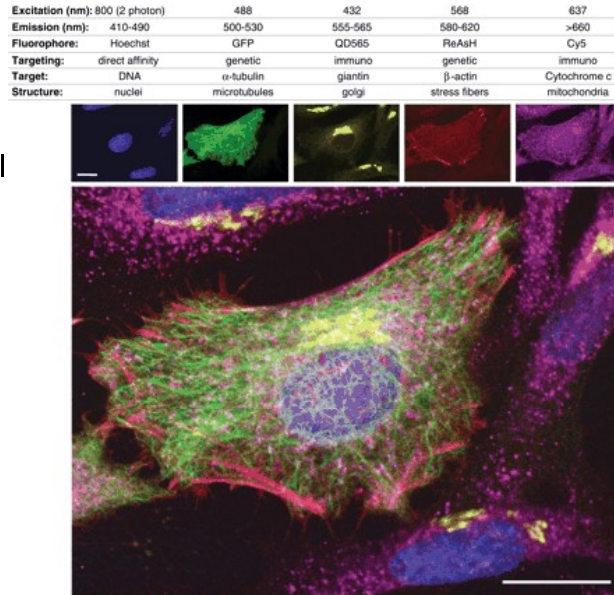
genetikailag kódolt fehérje, ami együtt expresszálódik a vizsgált fehérjével

a vizsgált fehérje eloszlását látjuk, hol termelődik

színvariációk



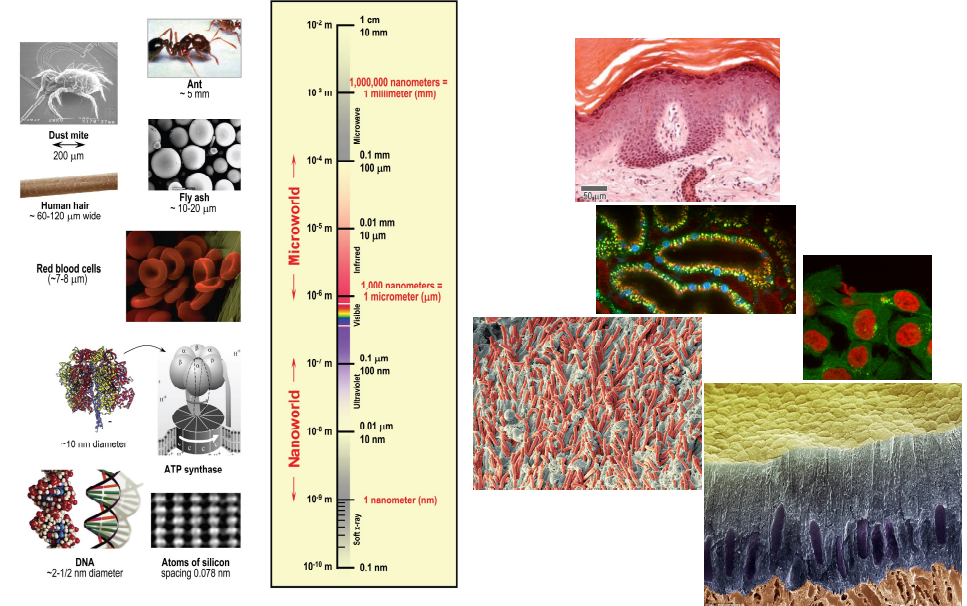
Fluoreszcens jelölő módszerek párhuzamos alkalmazása



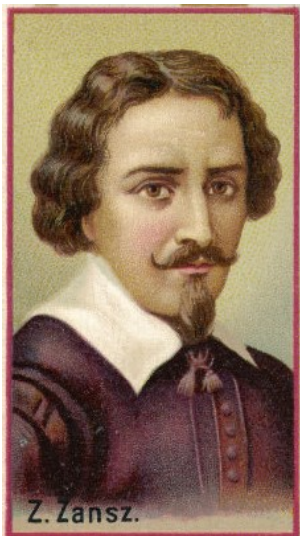
Öt különböző módszerrel megfestett HeLa sejtek.

A vonal 20 μm hosszú.

Mekkorák a dolgok?



Hans Jansen és Zacharias Jansen 1590-ben összetett mikroszkópot épít



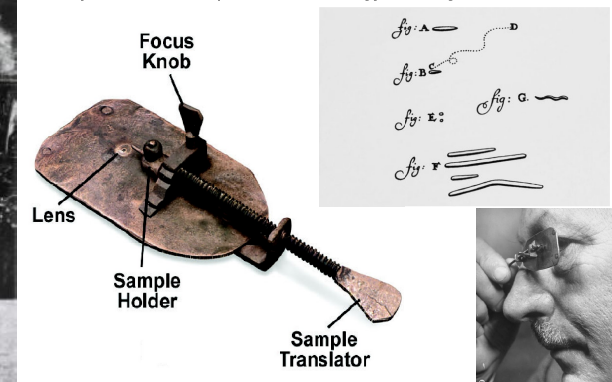
3x-10x nagyítás

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



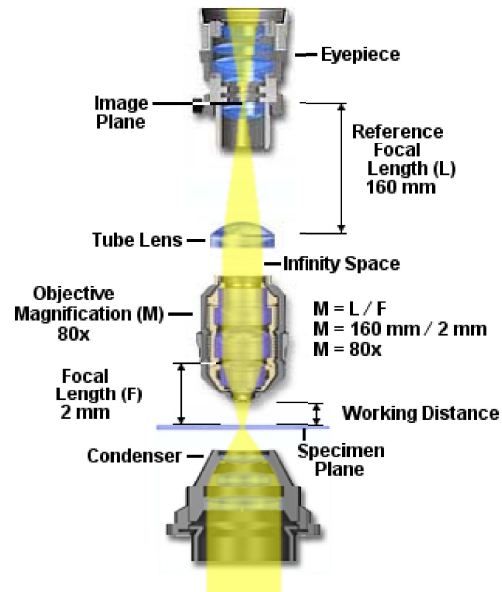
kíváncsi volt és jó lencsákat tudott csiszolni

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



70x-250x a lencse minőségétől függően

“Végtelenre korrigált” optika

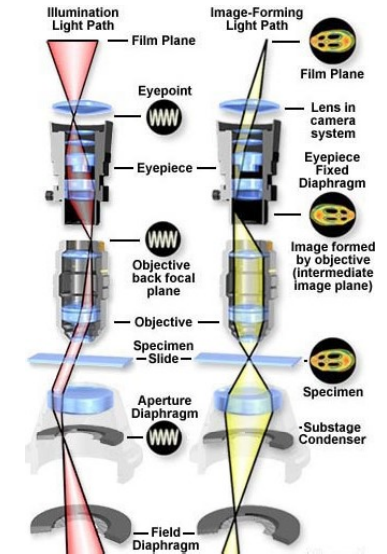


Köhler megvilágítás



August Köhler
(1866-1948)

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



Ernst Karl Abbe (1840-1905)



Az optikai eszközök gyártását tudományos alapokra helyezte.

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

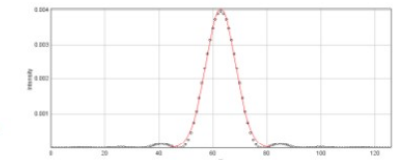
$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin \omega)$ NA numerikus appertúra, az objektív fontos paramétere

Point Spread Function (PSF)



(a) Airy disk

(b) 2D Gaussian

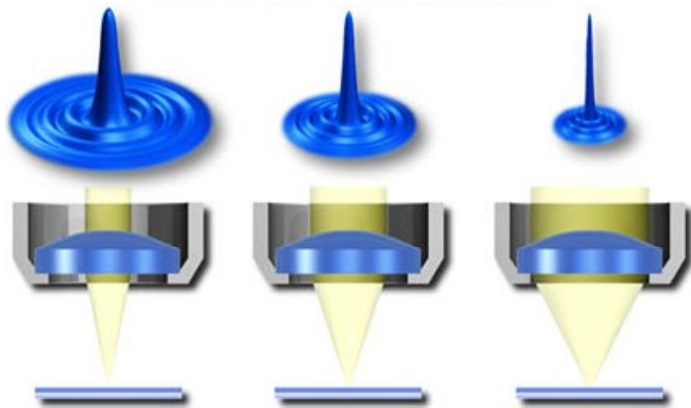


(c) Profile through the centre of the Airy disk (black) and Gaussian fit (red)

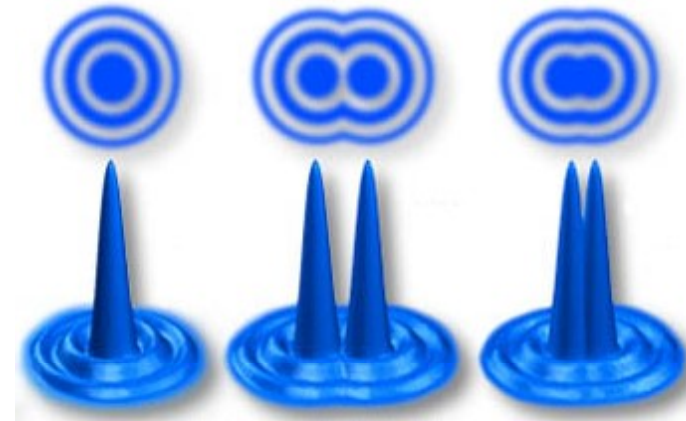
A (fluoreszcens) tárgy egy pontjának képe, nem egy pont, hanem adott intenzitáseloszlású folt. Ez a tulajdonság a fény hullámtermészetének a következménye.

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

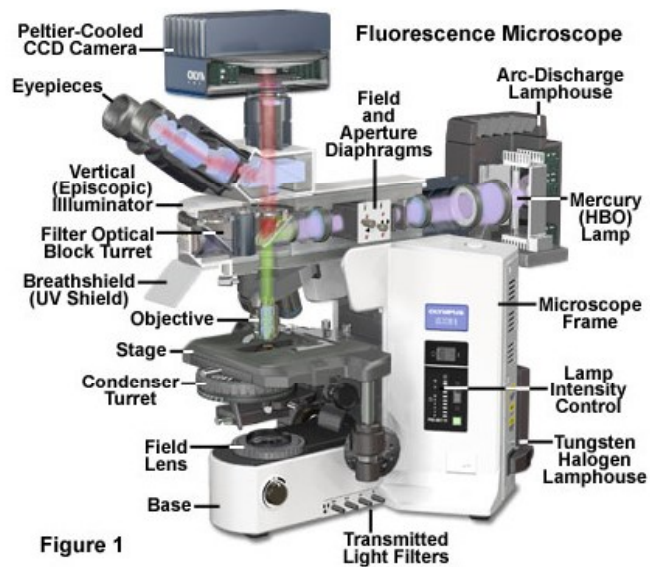
A numerikus apertúra hatása a PSF-re



A fény hullámtermészetének hatása a képre



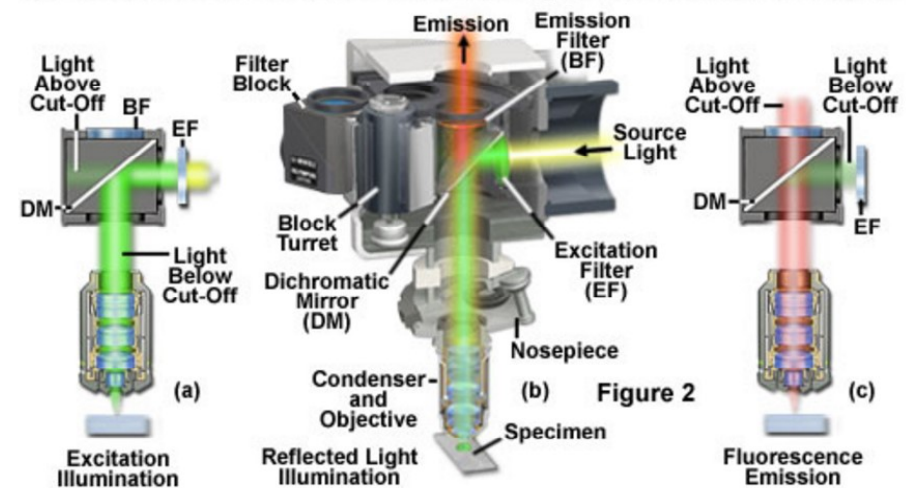
Fluoreszcencia mikroszkóp



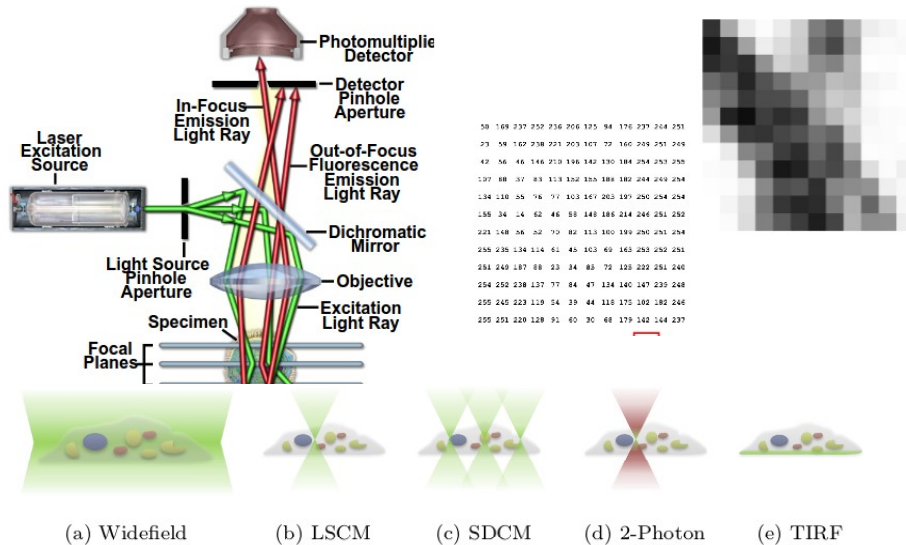
Fluoreszcencia mikroszkóp

Hogyan válasszuk el a gerjesztést az emissziótól?

Dichromatic Mirror Function in Reflected Light Fluorescence Illumination



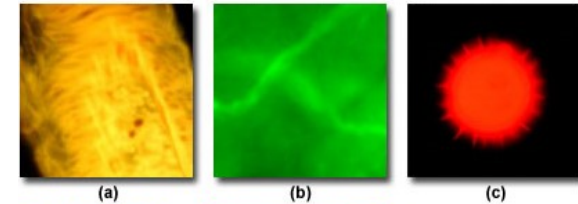
A konfokális mikroszkóp működése (CLSM)



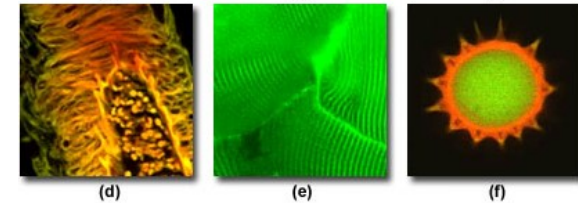
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/virtual/confocal/index.html>

Epifluoreszcens és konfokális mikroszkóp összehasonlítása

epifluoreszcens



konfokális



humán medulla

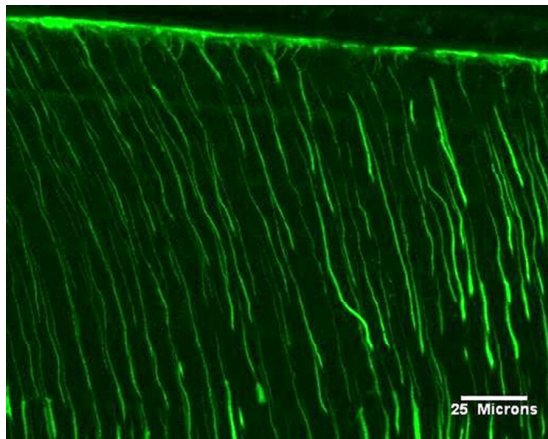
nyúl izom

pollen

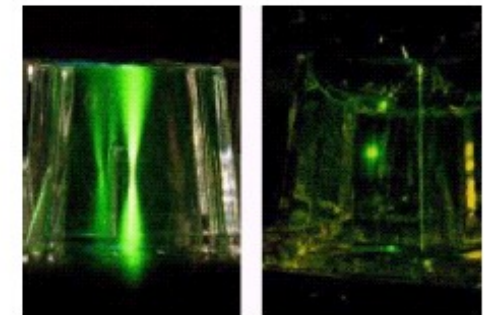
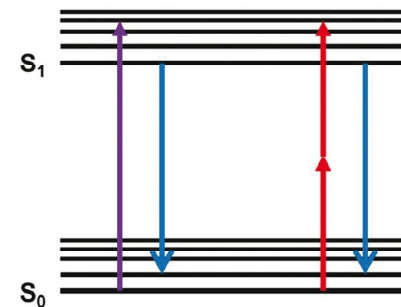
optikai szeletelés, STACK-3D rekonstrukció, timelapse, tracking

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

Dentinalis tubulusok humán fogban



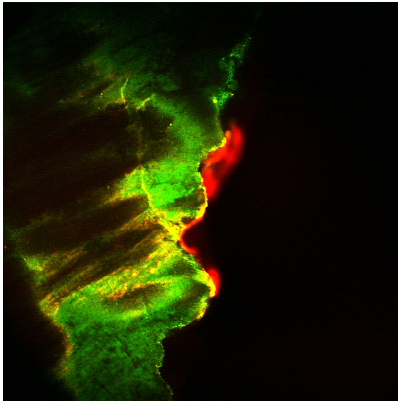
A kétfotonos mikroszkóp működési elve



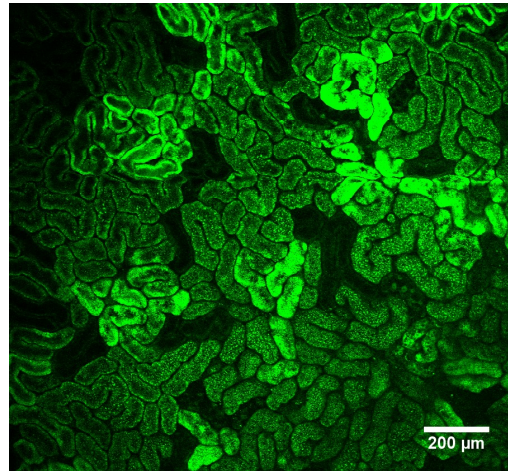
Miért jobb vastag minták esetén (in vivo)?

- gerjesztés: hangolható impulzus laser (nagy fotonsűrűség a fókuszbán, 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

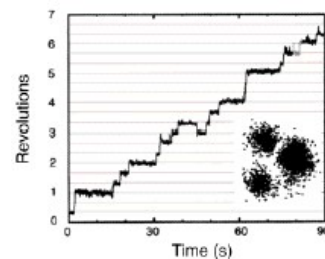
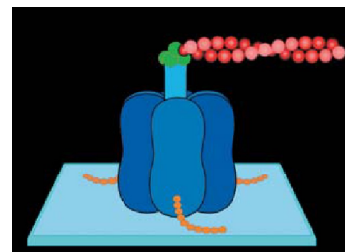
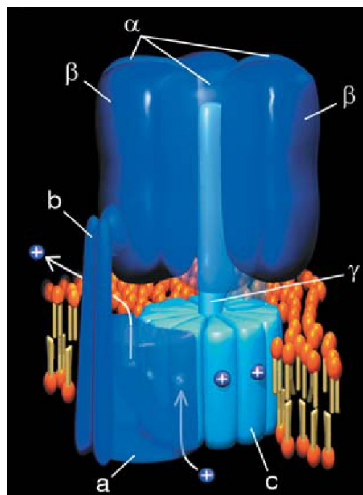


Fog metszete



Vese in vivo, sejten belüli Ca

Egyedi F1 motor (ATP szintáz) forgó mozgása



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

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

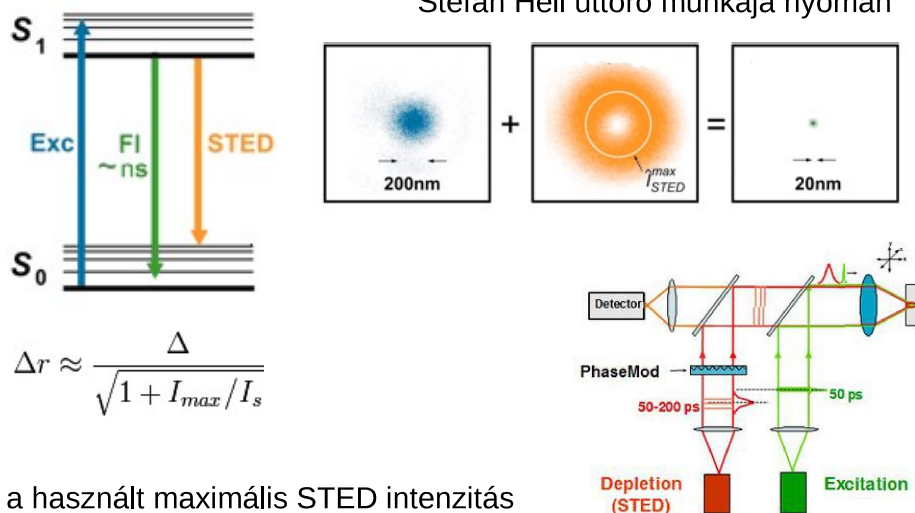
The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded jointly to Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner "for the development of super-resolved fluorescence microscopy".



STED
PALM
STORM

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp

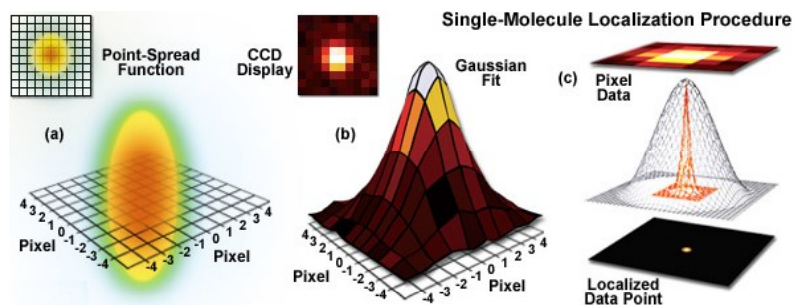
Stefan Hell úttörő munkája nyomán



I_{\max} a használt maximális STED intenzitás

I_s a STED telítési intenzitása

Lokalizáció



emlékeztető:

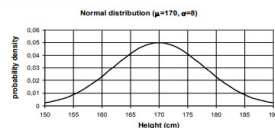
1D
Gauss

$$g(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Paraméterek:

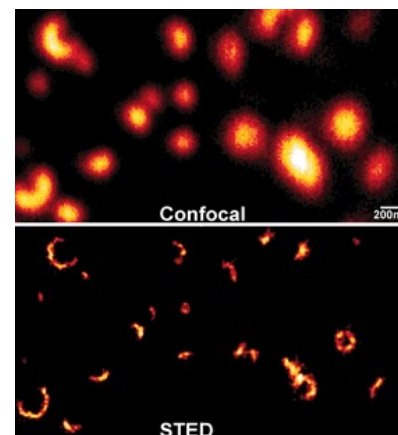
μ – várható érték, vagy elméleti átlag

σ – elméleti szórás



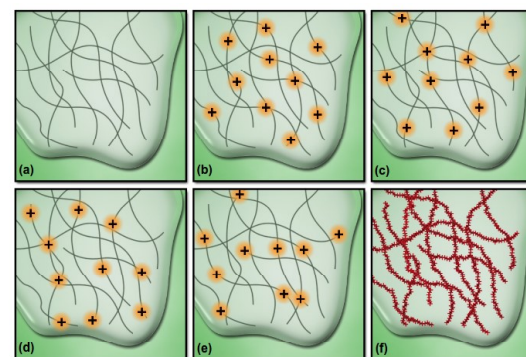
Azt, hogy hol a közepe nagyobb pontossággal tudom megmondani, mint a szórás

STimulated Emission Depletion (STED) mikroszkóp



Szinaptolizin szerveződése az újra-hasznosított szinaptikus vezikulákban.

STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy)



gerjesztésre nem minden festék fog világítani

sok képet veszünk fel

a túl közeli festékek egyszerre ritkán világítanak

az emittált fényfoltok illesztéséből kapott középpontokat rajzoljuk fel

<https://www.microscopyu.com/tutorials/a-comparison-of-sted-and-storm-superresolution-imaging>

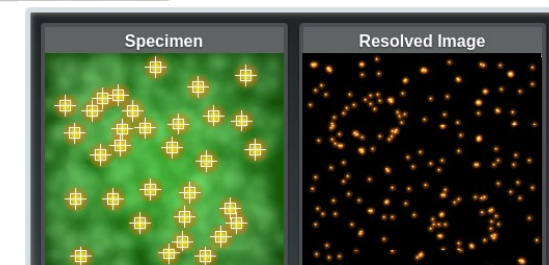
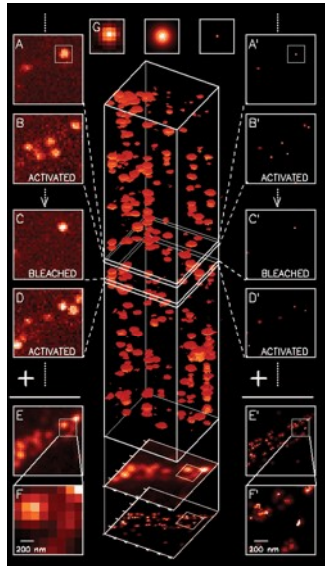


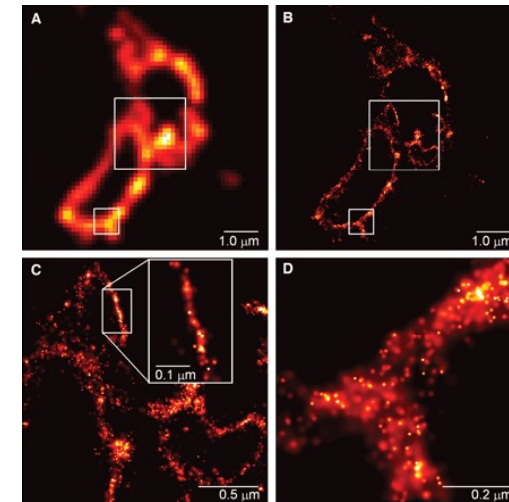
Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)



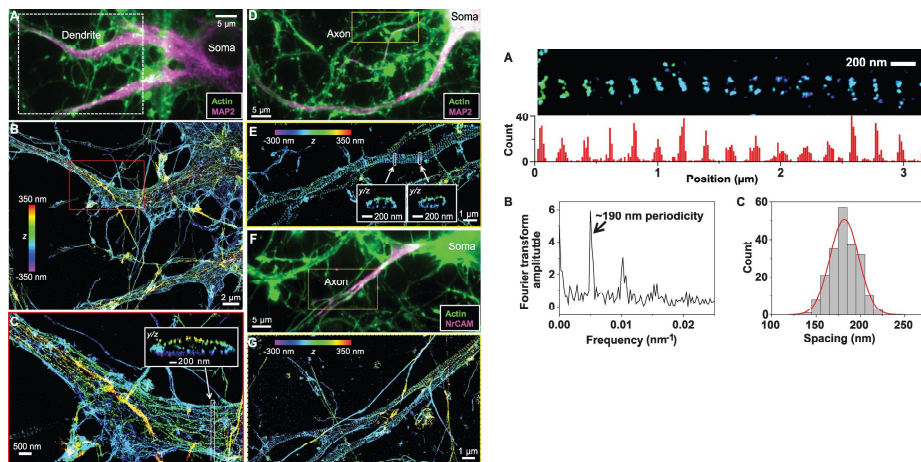
Eric Betzig és Harald Hess
találmánya nyomán

Photo-Activated Localization Microscopy (PALM)

CD63, lizoszóma transzmembrán fehérje



Axonok citoskeletális szerkezete

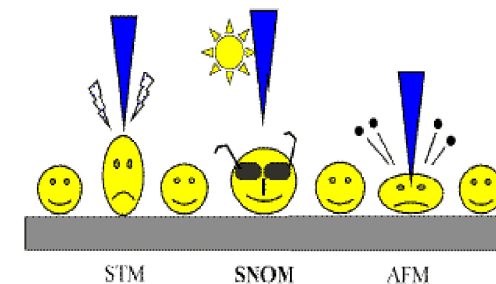


Pásztázó tűszondás mikroszkópok

(Scanning Probe Microscopy – SPM)

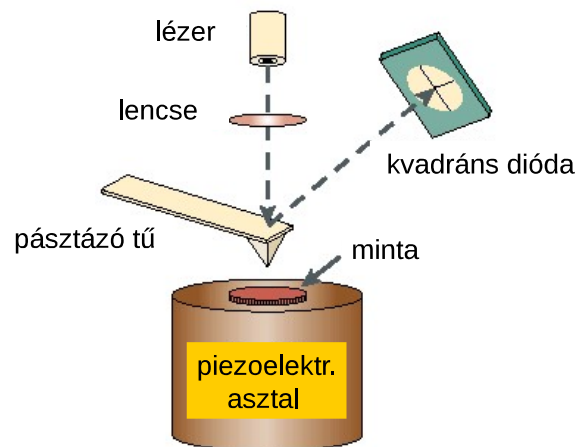
A mikroszkópok olyan családja, amely a minta felszínének domborzati képét hozza létre. Egy hegyes tűvel pásztázzunk a felszínt és a hegy-minta kölcsönhatást mérjük.

STM feltalálói (1981): Heinrich Rohrer and Gerd Binnig



Atomerő mikroszkóp (Atomic Force Microscopy - AFM)

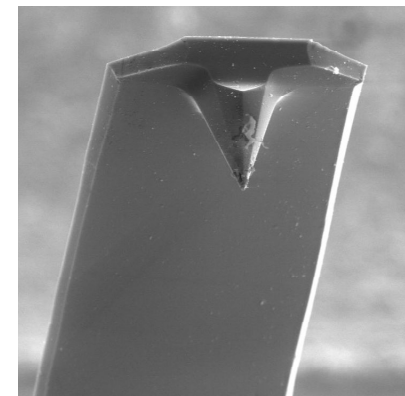
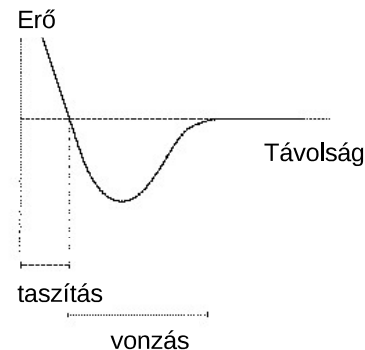
AFM: a mért kölcsönhatás a hegy és minta közötti erő



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.

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

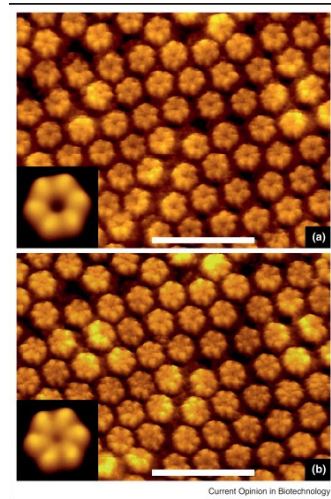
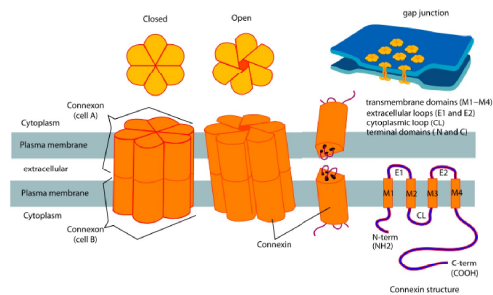
Előny:
nagyobb laterális felbontás (1 – 5nm)
kevésbé teszi tönkre a lágy mintákat

Hátrány:
lassabb pásztázás

Extra-celluláris konnexon AFM képe

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

A vonal 23 nm hosszú.



Kérdés

Hogyan tudjuk szétválasztani a gerjesztő fényt (lámpa) a detektálendő gyenge fluoreszcens jeltől a fluoreszcens mikroszkópban? Mi teszi ezt lehetővé?

Kollagén szálak

S. Habelitz et al. / Journal of Structural Biology 138 (2002) 227–235

231

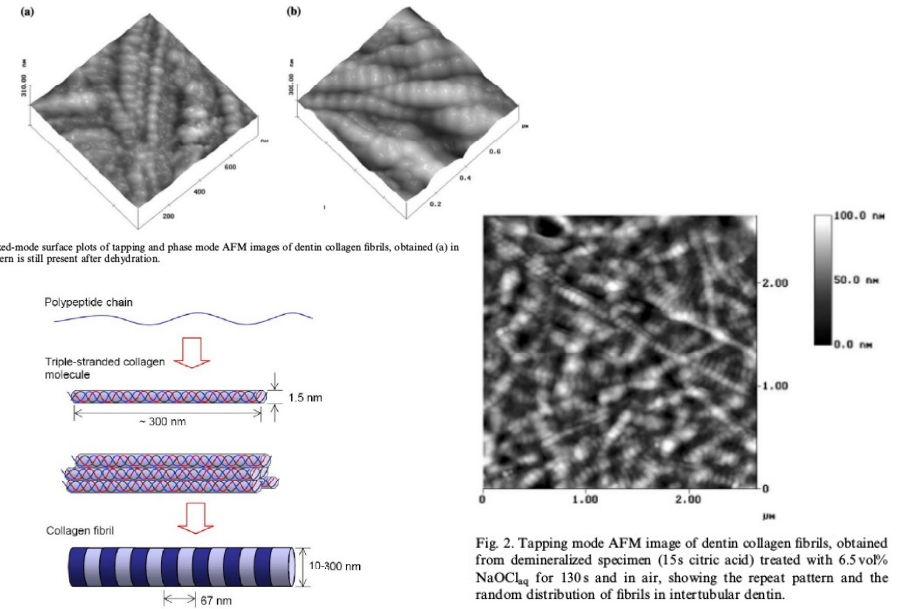


Fig. 3. Mixed-mode surface plots of tapping and phase mode AFM images of dentin collagen fibrils, obtained (a) in repeat pattern is still present after dehydration.

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