

MAKROMOLEKULÁK SZERKEZETVIZSGÁLÓ MÓDSZEREI

LUMINESZCENCIÁS TECHNIKÁK 2 (MÚLT HÉTRŐL)

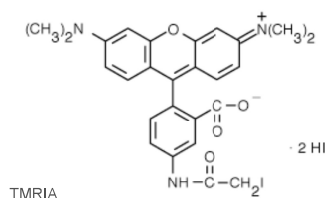
KELLERMAYER MIKLÓS

Fehérjefluoreszcencia forrása

- **Intrinsic fluorofórok**
triptofán, tirozin
- **Extrinsic fluorofórok**
kívülről bevitt festékmolekulák,
"fluoreszcens jelölés"
kémiai specificitás?
térbeli specificitás?

Fluoreszcens jelölési technikák

1. Natív oldalláncok jelölése



Fluorofór:
festékmolekula +
kémiai keresztkötő

Relatív kémiai specificitás (SH, NH₂)

Relatív térbeli specificitás

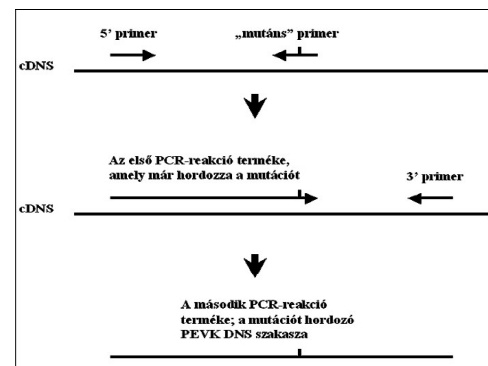
Lépések:

- moláris arány számítása
- inkubálás
- nem kötődött festék eltávolítása (dialízis, kromatográfia)

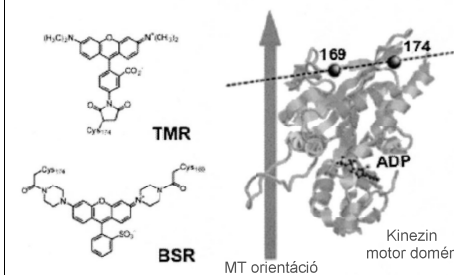
Fluoreszcens jelölési technikák

2. Célzott pontmutagenézis

Ciszteín aminosav célzott elhelyezése



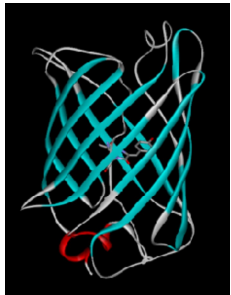
Bifunkcionális fluorofór



Fluoreszcens jelölési technikák

3. Fluoreszcens fehérjékkel való konjugálás

1. Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein, GFP)



Méret: ~27 kDa, 238 aa

Szerkezet: 11-szálú β -hordó

Kromofór: a központi hélix Ser65-Tyr66-Gly67 oldalláncaiból

Fluoreszcencia 3D szerkezet intaktaságától függ

Tandem fúziós konstrukció a GFP és a vizsgált fehérje génjeiből

Előnyök: *in vivo* mérések, mutánsokból spektrális variánsok állíthatók elő, melyek több különböző konstrukció együttes vizsgálatát is lehetővé teszik.

Hátrányok: pislogás, csak terminális (N vagy C) jelölés, a GFP a célfehérje működését szterikusan befolyásolhatja.

2. A GFP egyéb színű (kék, sárga, vörös) mutánsai

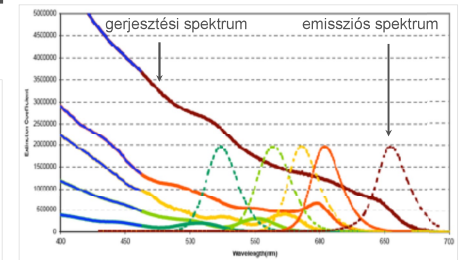
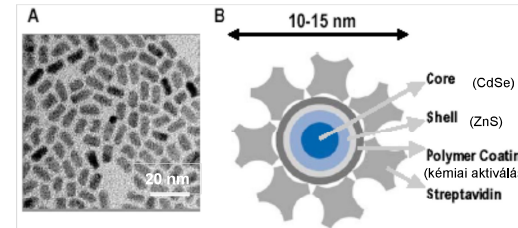
3. Fotoaktiválható GFP analóg

4. Kaede: korallból származó fluoreszcens fehérje, mely UV-indukálható zöld-vörös fotokonverziót mutat

Fluoreszcens jelölési technikák

4. Kvantumpontok

Félvezető nanokristályok
Emissziós spektrum a méret függvénye

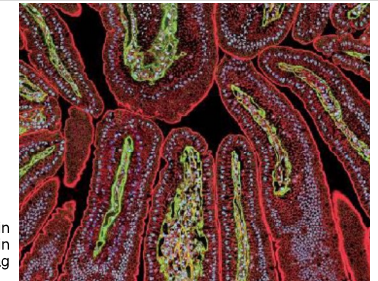


Előnyök:

széles gerjesztési spektrum

hangolható emissziós spektrum

fotokifehéredéssel szemben rendkívül ellenállóak

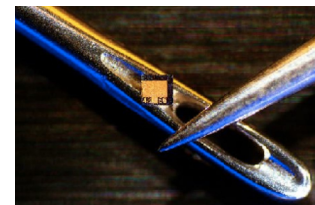


Vörös: aktin
Zöld: Laminin
Kék: sejtmag

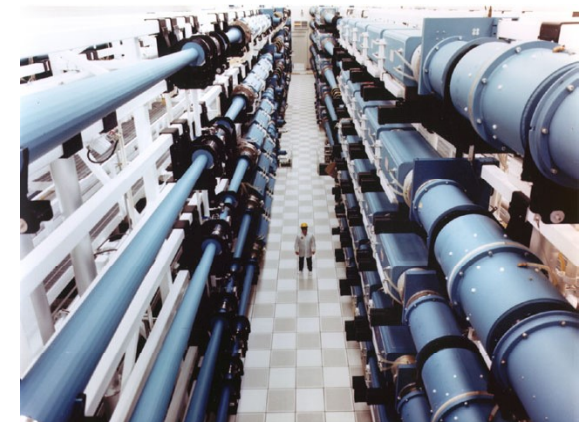
LUMINESZCENCIÁN ALAPULÓ FÉNYERŐSÍTÉS: LÉZER

ALAPOK, TULAJDONSÁGOK, ALKALMAZÁSOK

LÉZEREK MINDENÜTT



5 mW diódlézer
néhány mm



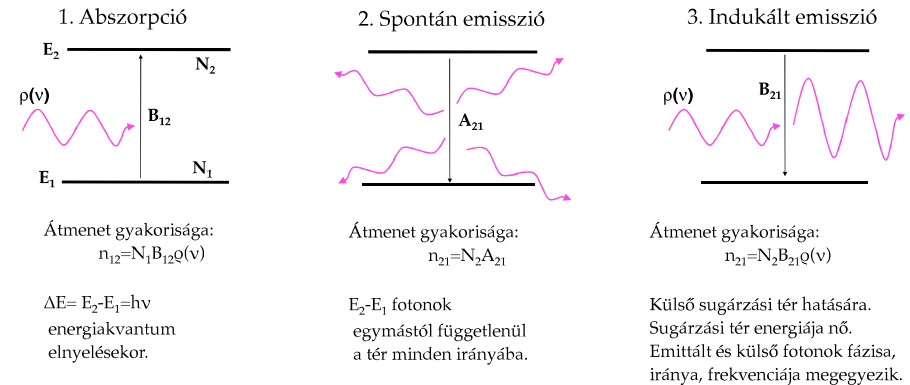
Terawattos NOVA lézer - Lawrence Livermore Laboratories
Futballpálya méret

LÉZERTÖRTÉNET DIÓHÉJBAN



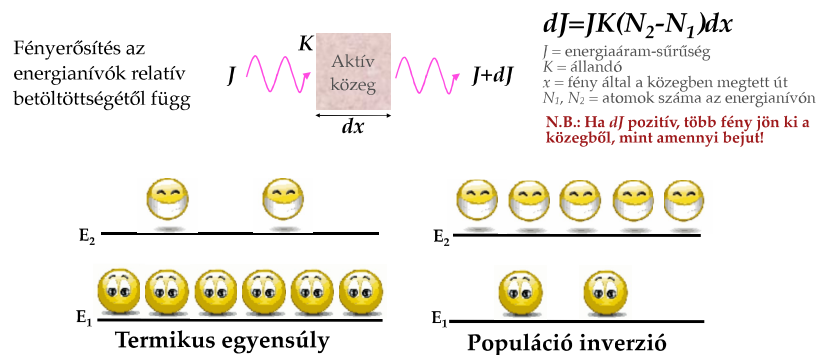
- **1917** - *Albert Einstein*: indukált emisszió elméleti predikciója.
- **1946** - *G. Meyer-Schwickerather*: első szemműtét fényvel.
- **1950** - *Arthur Schawlow és Charles Townes*: az emittált fotonok a látható tartományba eshetnek.
- **1954** - *N.G. Basov, A.M. Prochorov, és C. Townes*: ammónia mézer
- **1960** - *Theodore Maiman*: első lézer (rubin lézer)
- **1964** - *Basov, Prochorow, Townes (Nobel-díj)*: kvantum elektronika
- **1970** - *Arthur Ashkin*: lézercsipesz
- **1971** - *Gábor Dénes (Nobel-díj)*: holográfia
- **1997** - *S. Chu, W.D. Phillips és C. Cohen-Tanoudji (Nobel-díj)*: lézeres atomhűtés.
- **2013. október 8** - *NIF (National Ignition Facility, USA)*: magfúzió beindítása 192 lézernyalábbal, pozitív energiamérleg.
- **2017** - *ELI (Extreme Light Infrastructure)* indulása, Szeged. Attoszekundumos (10^{-18} s) fényimpulzusok előállítás.

A LÉZER ALAPJAI I. INDUKÁLT (STIMULÁLT) EMISSZIÓ

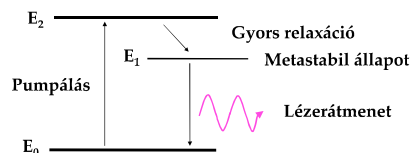


Magyarázat: kétállapotú atomi vagy molekuláris rendszer
 E_1, E_2 : energianívók, $E_2 > E_1$
 $\rho(\nu)$: sugárzási tér spektrális energiasűrűsége
 N_1, N_2 : adott energianívón levő atomok, molekulák száma
 B_{12}, A_{21}, B_{21} : energianívók közötti átmeneti valószínűségek (Einstein-féle együtthatók), $B_{12} = B_{21}$

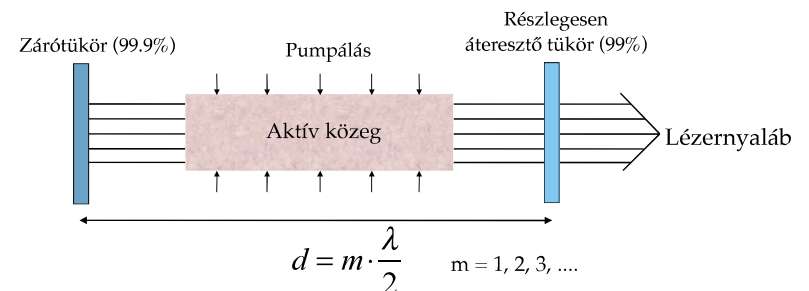
A LÉZER ALAPJAI II. POPULÁCIÓ INVERZIÓ



- Populáció inverzió csak többállapotú rendszerben!
- Pumpálás: elektromos, optikai, kémiai energia



A LÉZER ALAPJAI III. OPTIKAI REZONANCIA



Rezonátor:

- két párhuzamos sík (vagy homorú) tükör
- a kimenő fényt eljuttatja egy részét visszacsatolja a közegbe
- pozitív visszacsatolás -> öngerjesztés -> rezonancia

• Optikai zár a rezonátorban: Q-csatolás, impulzus üzemmód

A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI I.

1. Kis divergencia

Párhuzamos nyaláb

2. Nagy teljesítmény

Folytonos üzemmódban több tíz, akár száz W (pl. CO₂ lézer)

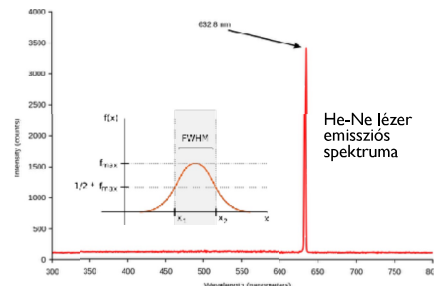
Q-csatolású üzemmódban a pillanatnyi teljesítmény hatalmas (GW)

Kis divergencia miatt óriási térbeli teljesítménysűrűség

3. Kis spektrális sávszélesség

“Monokromaticitás”

Nagy spektrális energiasűrűség



4. Polarizáltság

5. Rendkívül rövid impulzusok lehetősége

ps, fs

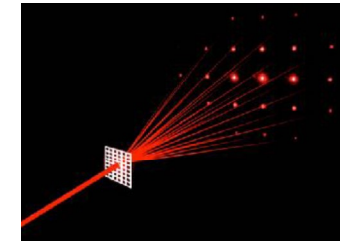
A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI II.

6. Koherencia

Fázisazonosság, interferenciaképesség

Időbeli koherencia (különböző időpontokban emittált fotonok fázisazonossága)

Térbeli koherencia (nyalábkeresztmetszet menti fázisazonosság)



Alkalmazás: holográfia, optikai koherencia tomográfia

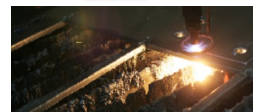
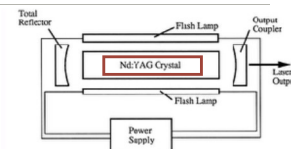
LÉZERTÍPUSOK

Fényerősítő közeg alapján:

1. Szilárdtest lézerek

Kristályokba v. üvegyanyagokba bevitt fémszennyeződések; Rubin, Nd-YAG, Ti-zafir

Vörös-infravörös spektrális tartomány; Folytonos, Q-kapcsolású üzemmód, nagy teljesítmény

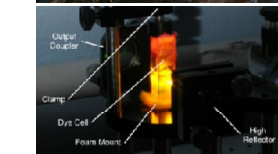


fém-
lap
vágása
CO₂
lézerrel

2. Gázlézerek

Legismertebb: He-Ne lézer (10 He/Ne). Kis energia, Széleskörű használat

CO₂ lézer: CO₂-N₂-He keverék; λ~10 μm; Óriási teljesítmény (100 W)



festéklézer

3. Festéklézerek

Szerves festékek (pl. rodamin, kumarin) híg oldata; Pumpálásra más lézer használt

Nagy teljesítmény (Q-kapcsolt módban); Hangolható

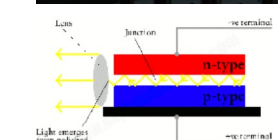
4. Félvezető lézerek

Összelekvő p- és n-típusú, szennyezett félvezetők határán.

Rezonátor tükrökre nincs szükség (belső visszaverődés)

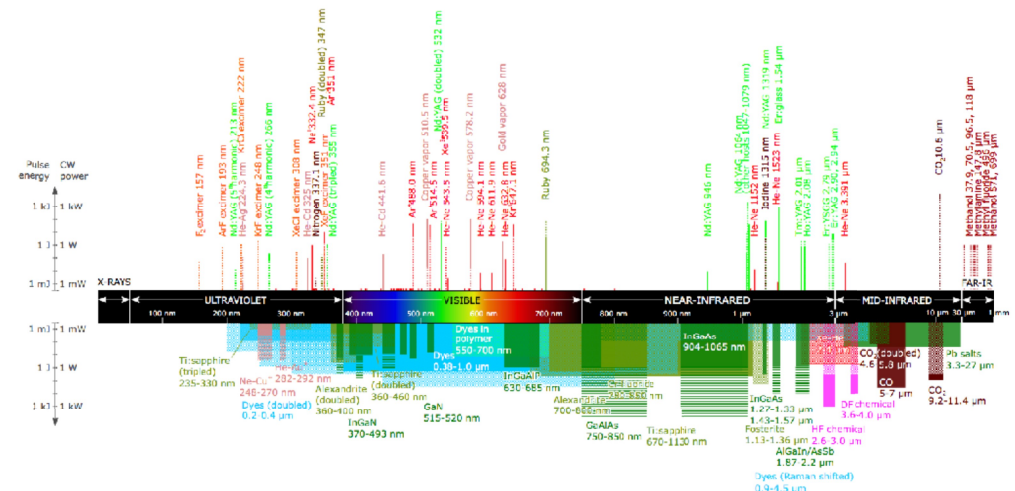
Vörös, IR spektrális tartomány. Nagy kontinuos üzemmódú teljesítmény (akár 100W)

Nyalábkarakterisztika nem túl jó. Kis méret miatt széleskörű alkalmazás.



diódalézer

LÉZEREK, SPEKTRÁLIS VONALAK ÉS SÁVOK



A röntgentől az infravörösig rendelkezésre állnak lézervonalak.

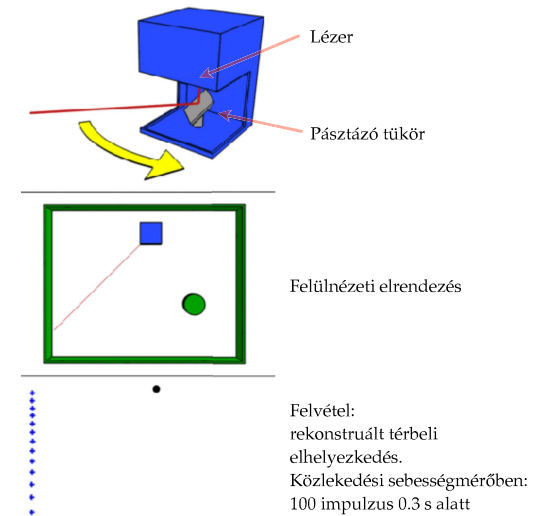
LÉZERALKALMAZÁS SZEMPONTJAI

- Irányíthatóság
- Teljesítmény
- Monokromaticitás
- Koherencia

SEBESSÉGMÉRÉS LÉZERREL

Irányíthatóság

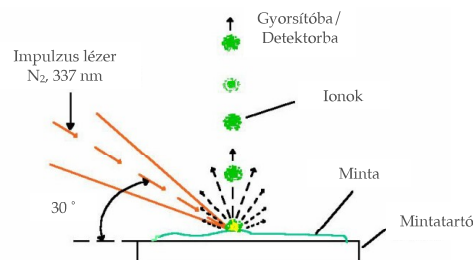
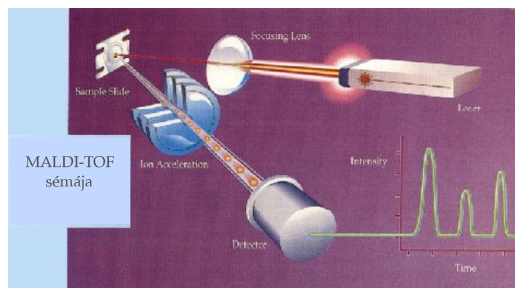
LIDAR: "LIGHT DETECTION AND RANGING"



MALDI-TOF:

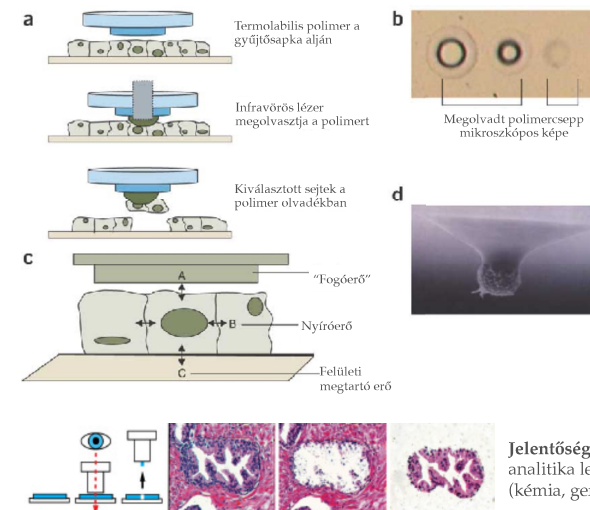
Teljesítménysűrűség

MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION
TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY



"LASER CAPTURE MICRODISSECTION"

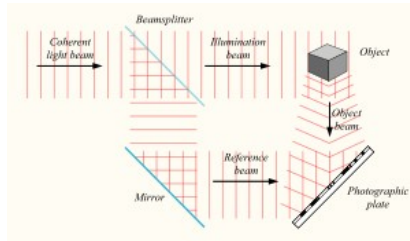
Teljesítménysűrűség



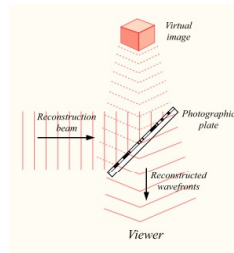
HOLOGRÁFIA



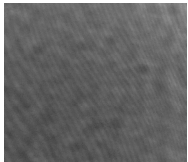
Gábor Dénes
(1900-1979)



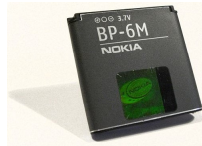
Hologram felvétele



Hologram megtekintése



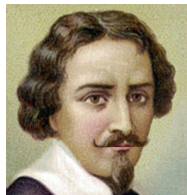
Hologram fotólemez felülete



Hologramok



Fénymikroszkópia



Zacharias Jensen
(1580-1638)



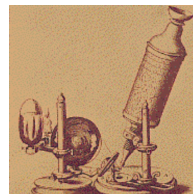
Anton van Leeuwenhoek
(1632-1723)



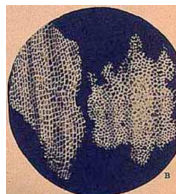
Robert Hooke
(1635-1703)



Leeuwenhoek egyszerű mikroszkópja



Robert Hooke mikroszkópja

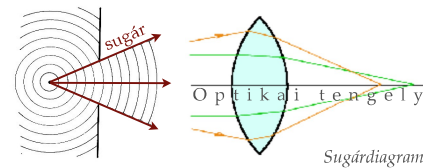


Cellulák parafában
(Robert Hooke)

GEOMETRIAI ÉS HULLÁMOPTIKA

Geometriai optika

Ha a fény a hullámhossznál sokkal nagyobb résen halad át, a hullámfront (fázis) terjedése egy egyenessé ("sugár") egyszerűsíthető.

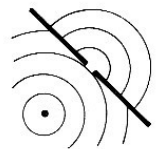


- Optikai nyaláb ("fényszugár"): absztrakció, matematikai egyenes.
- A nyílak az energiaterjedés irányát jelölik.
- Optikai tengely: az optikai elemek (pl. lencsék) középpontján áthaladó egyenes.
- Reverzibilitás elve: az energiaterjedés (nyílak) iránya megfordítható.

Hullámoptika

Ha a fény a hullámhossznál kisebb vagy azzal összemérhető résen halad át, a hullámtermészetet figyelembe kell venni.

Bizonyos jelenségek nem magyarázhatók a geometriai optikával!



A fény mint hullám fontos paraméterei:

- Periódusidő (T)
- Frekvencia ($f=1/T$)
- Terjedési sebesség (v, c)
- Hullámhossz (λ): egy T alatt megtett távolság:

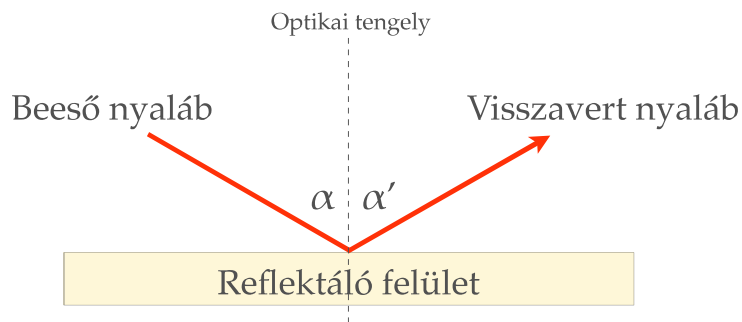
$$\lambda = cT = \frac{c}{f}$$

A fény terjedési sebessége *vákuumban*: $c=2,99792458 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$

Optikailag sűrűbb közegben a fény terjedési sebessége csökken (c_1). Ez kifejezhető az abszolút törésmutatóval (n_1):

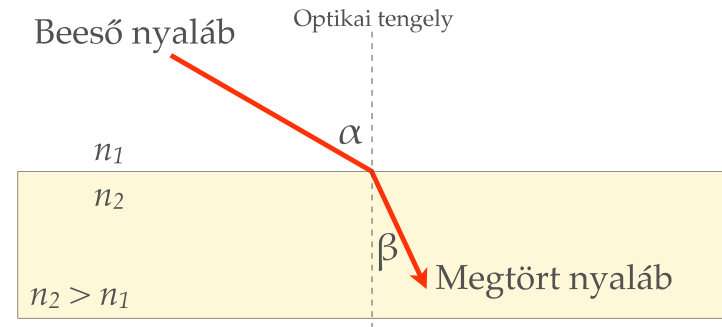
$$n_1 = \frac{c}{c_1}$$

FÉNYVISSZAVERŐDÉS: REFLEXIÓ



- α = beesési szög; α' = visszaverődési szög.
- Beeső és visszavert nyalábok azonos síkban vannak.
- Beesési és visszaverődési szögek azonosak ($\alpha = \alpha'$).

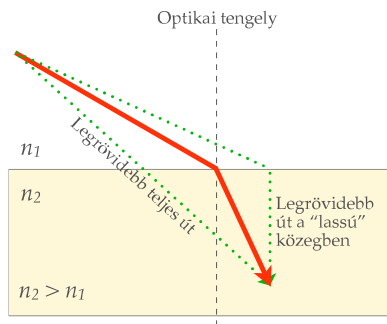
FÉNYTÖRÉS



- α = beesési szög; β = törési szög.
- Beeső és megtört nyalábok azonos síkban vannak.
- Snellius-Descartes törvény:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{c_1}{c_2} = \frac{n_2}{n_1}$$

A FÉNYTÖRÉS MAGYARÁZATA: A LEGRÖVIDEBB IDŐ FERMAT-FÉLE ELVE



A fény azt az utat járja be, amelyet a leggyorsabban (i.e., **legrövidebb idő** alatt) tud megtenni.

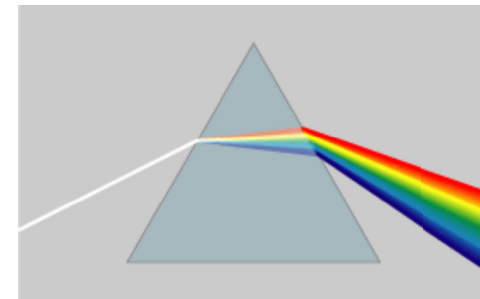
A Fermat-elv a természetben máshol is működik!



Hangyák (*Wasmannia auropunctata*) "útválasztása" különböző "ellenállású" közegek találkozásánál

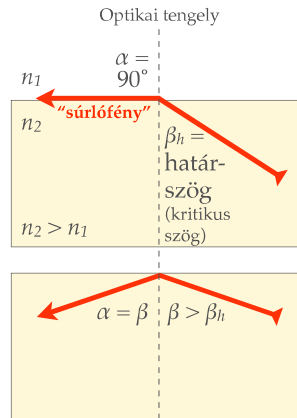
DISZPERZIÓ

A törésmutató hullámhosszfüggő!



- Nagyobb frekvencia - nagyobb törésmutató
- A prizma hullámhossz (fizikai szín) szerinti komponensekre bontja a fehér fényt

TELJES BELSŐ VISSZAVERŐDÉS

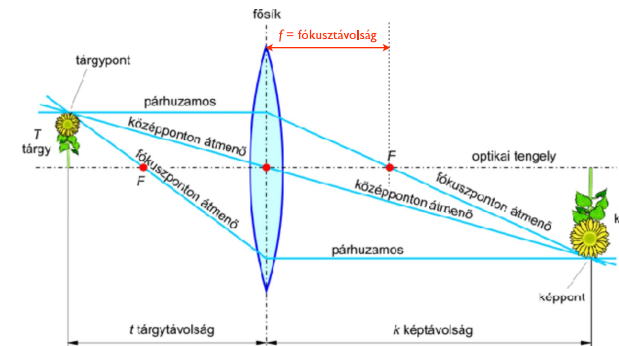


Fényvisszaverődés az optikailag sűrűbb közegben



Fény kölcsönhatása fénytörő közeggel: Optikai leképezés

Egyszerű mikroszkóp: leképezés görbült felületű törőközeggel (egy tárgypontból a tér egy másik pontjára képet alkotunk)



- Valós kép: kivethető
- Virtuális kép: járulékos lencsével leképezhető
- Nagyítás > 1 , ha a tárgy $2f$ -en belül

Nagyítás

$$N = \frac{K}{T} = \frac{k}{t}$$

Lencsetörvény

$$D = \frac{1}{f} = \frac{1}{t} + \frac{1}{k}$$

$D =$ törőképeség (dioptria, m^{-1})

Törőfelület törőképesége

$$D = \frac{n - n'}{r}$$

$n - n' =$ törőközegek törésmutató-különbsége
 $r =$ törőfelület görbületi sugara

Hullámjelenségek I. Diffrakció, hullámelhajlás

Huygens-Fresnel elv:
egy hullámfront minden pontja további hullámok forrása

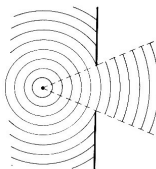


Christiaan Huygens
(1629-1695)

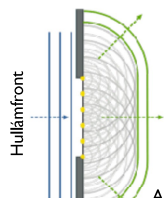
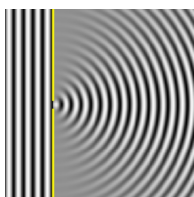
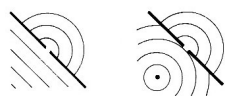


Augustin-Jean Fresnel
(1788-1827)

Hullámhossznál sokkal nagyobb rés



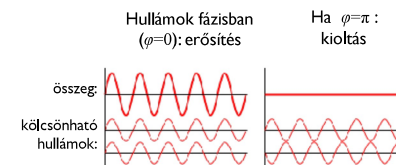
Hullámhossznál kisebb rés



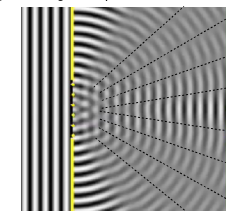
A hullám megjelenik az "árnyékos" területen is.

Hullámjelenségek II. Interferencia

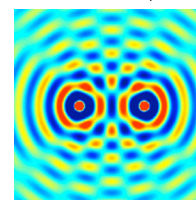
Alapja: szuperpozíció elve



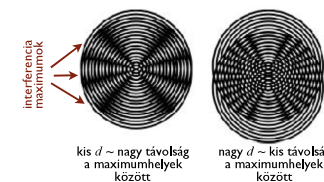
Több (> 1), hullámhosszal összemérhető nagyságú rés
($= d$ távolságra levő pontszerű részek, ahol $d \sim \lambda$)



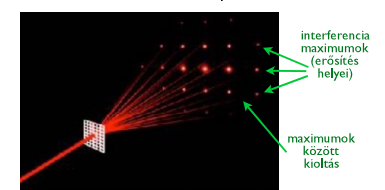
Két, pontszerű forrásból származó hullámok interferenciája



Kialakuló **interferencia mintázat** a pontszerű részek közötti távolságtól (d) függ



2D optikai rács elhajlása (diffrakció) interferencia képe



Hullámjelenségek III.

Polarizáció

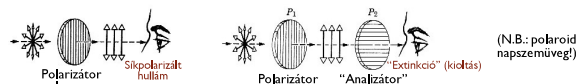
Polarizáció: kitüntetett irányú rezgés
Kettős törés: anizotróp terjedési sebesség
 Csak a **tranzverzális** hullámok polarizálhatók.



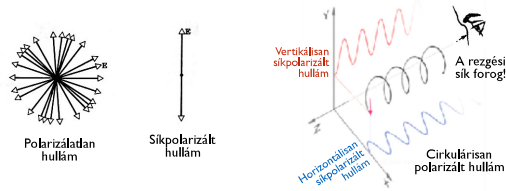
Mechanikai
 hullámok polarizálása



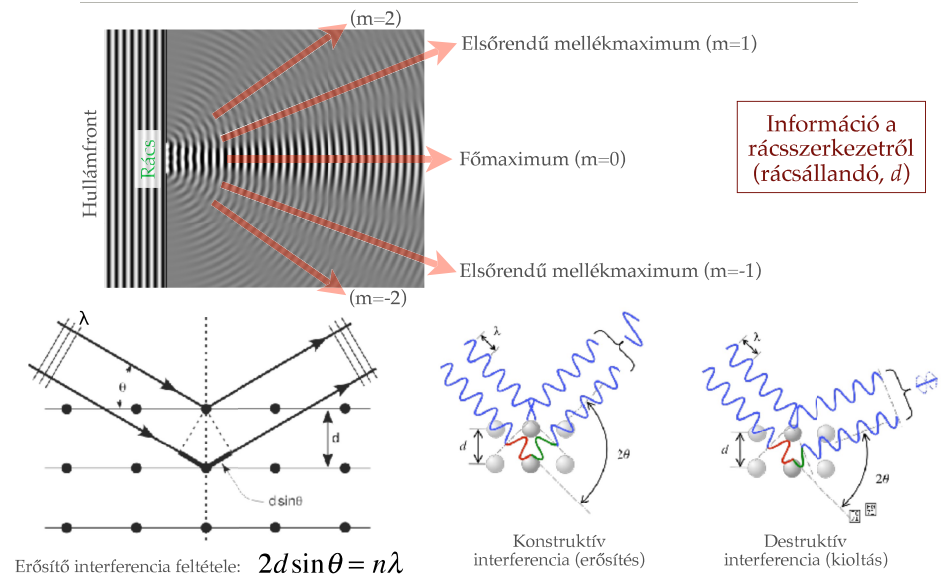
Elektromágneses
 hullámok polarizálása



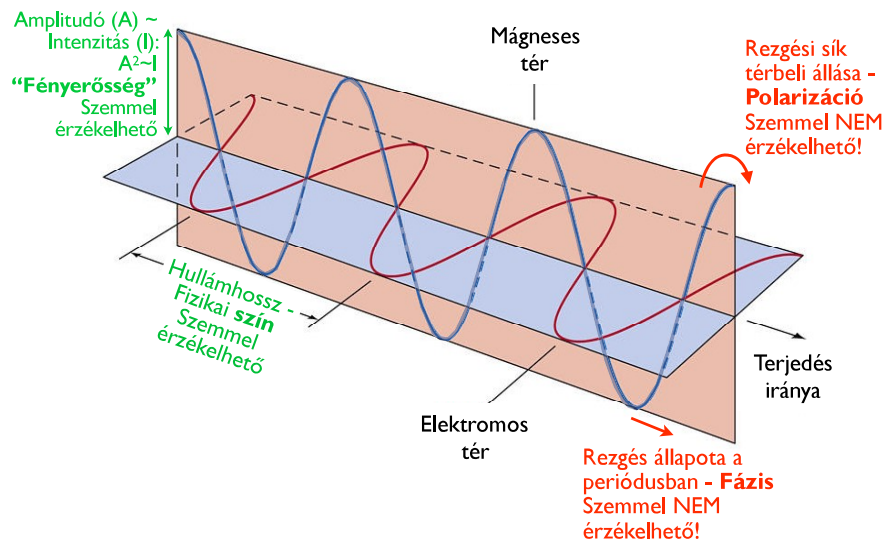
Polarizáció
 illusztrálása a terjedési
 irányból nézve:



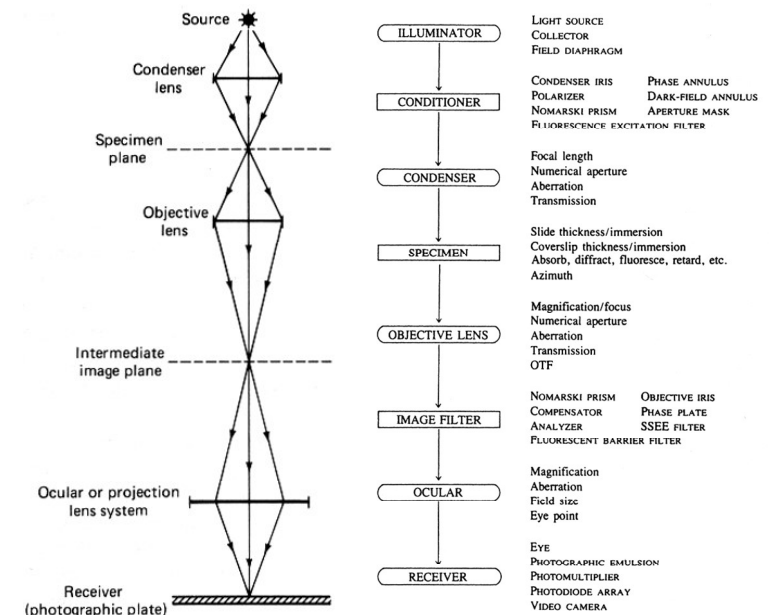
AZ ELHAJLÁSI INTERFERENCIA MINTÁZAT SZERKEZETI INFORMÁCIÓT HORDOZ



A fény mint hullám érzékelhető paraméterei

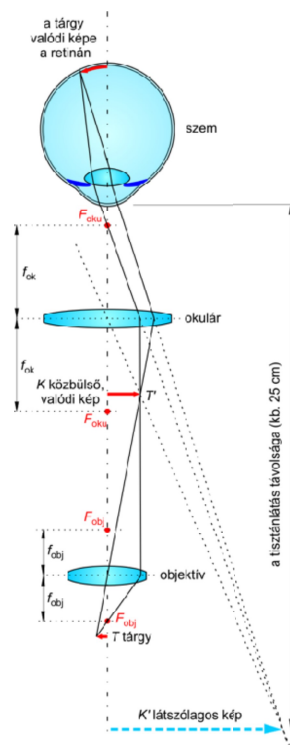


A MIKROSZKÓP VÁZLATOS FELÉPÍTÉSE

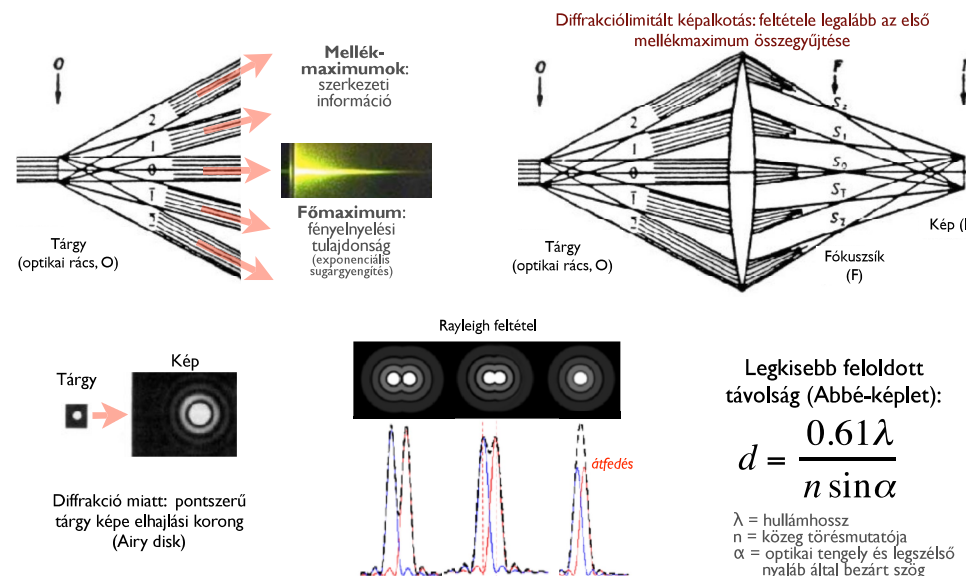


Képkotás az összetett fény-mikroszkópban

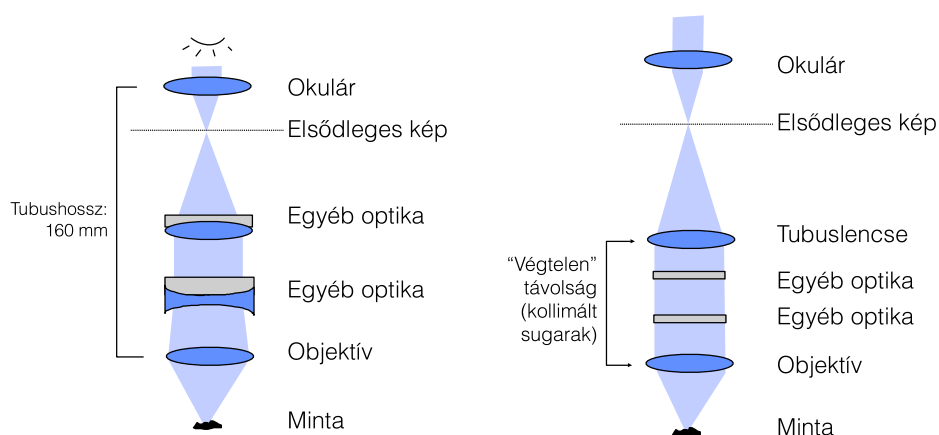
- Nagyított, fordított állású virtuális kép
- Leképezés feltétele: egy járulékos lencse (szemlencse) optikai útba helyezése



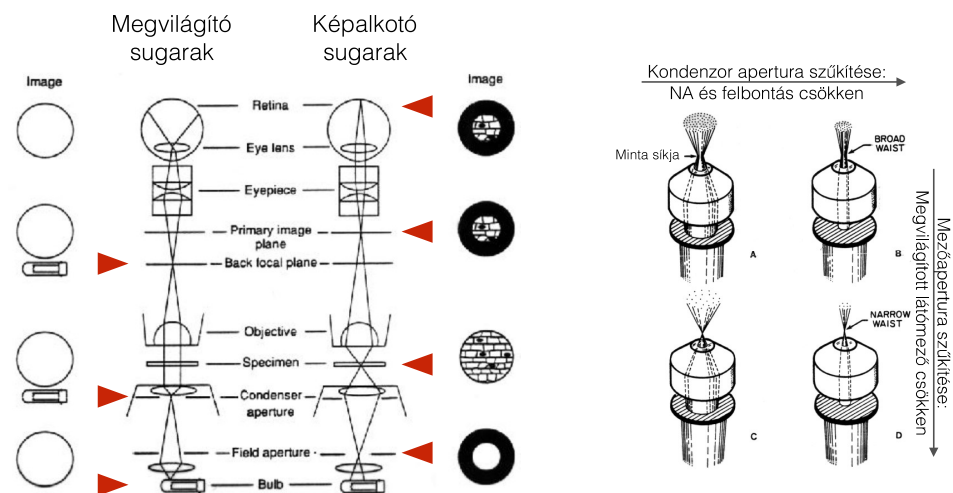
A fénymikroszkóp feloldóképességét a hullámtulajdonság korlátozza



Hagyományos vs. végtelenre korrigált optika



Köhler-féle megvilágítás

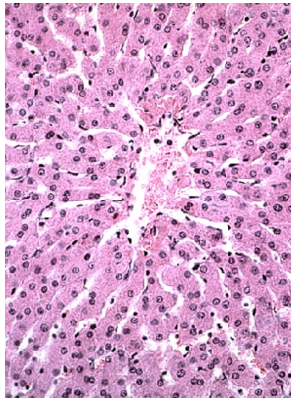


► Konjugált fókuszsíkok!

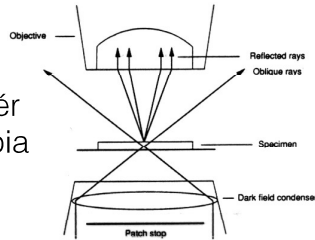
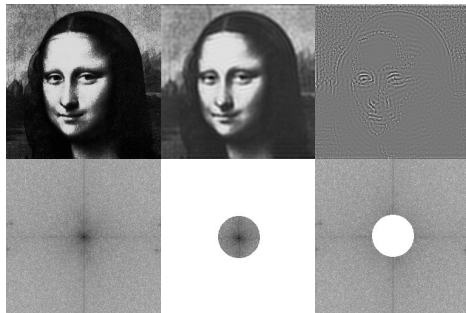
Kontrasztmechanizmusok I.

Abszorpció kontraszt

Festett minták



Sötét látótér mikroszkópia



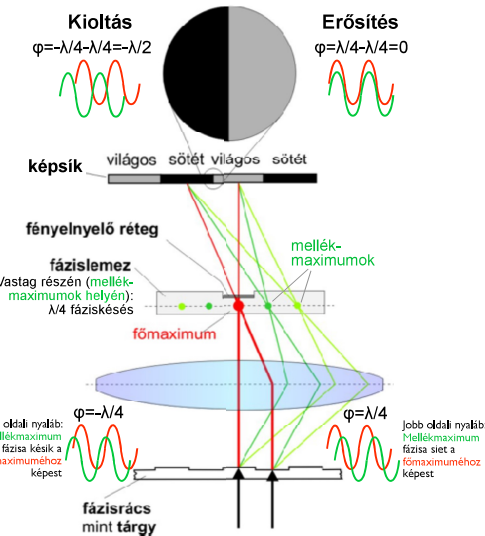
Kontrasztmechanizmusok II.

Fáziskontraszt mikroszkópia

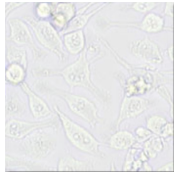


Frits Zernike
(1894-1993)
Nobel-díj

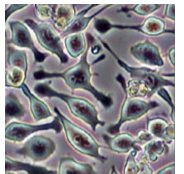
- **Fázis:** azt mutatja meg, hogy a teljes hullámmozgási periódus (2π) mely részén tart a rezgés.
- **Fáziszöggel (ϕ)** fejezzük ki.
- **Hullámok egymáshoz viszonyított fáziskülönbsége:** **fáziseltolódás** (késés v. sietés)



Élő (festetlen) sejtek
mikroszkópos képe



Világos látótér
mikroszkóp



Fáziskontraszt
mikroszkóp

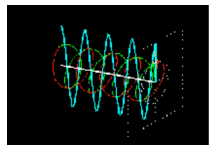
Kontrasztmechanizmusok III.

Polarizációs mikroszkópia

Síkpolárizált fény

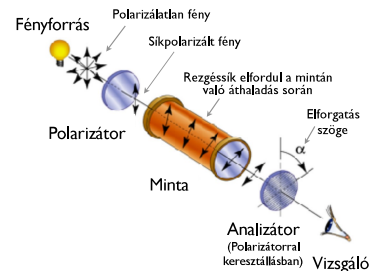
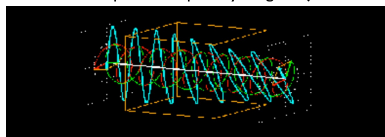


Jobbra és balra körkülisan polarizált fény
szuperpozíciója síkpolárizált fény eredményez:

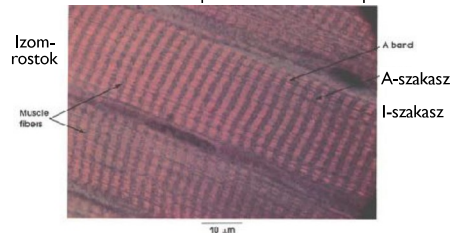


A rezgési sík orientációja a körkülisan polarizált
hullámok relatív fázisai függvénye

Anizotróp* közegben a körkülisan polarizált komponensek között
fáziseltolódás lép fel: a kilépő fény rezgéssíkja "elfordul"



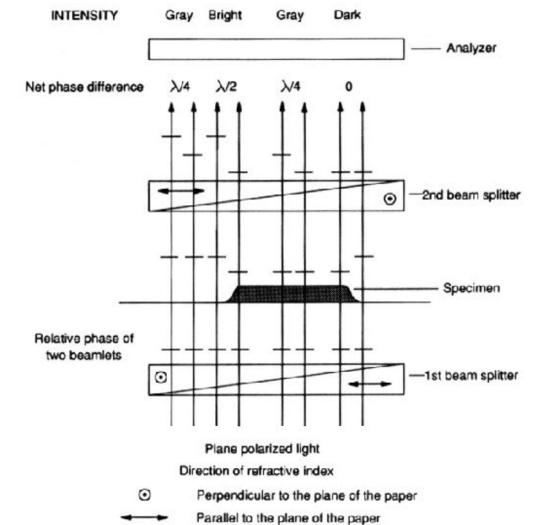
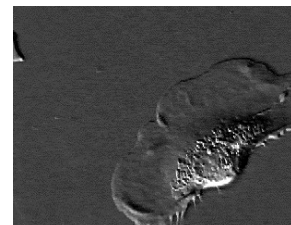
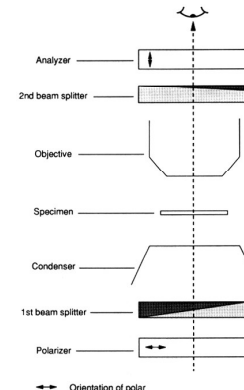
Harántcsikolt izomrost polarizációs mikroszkópban



- A-szakasz: anizotróp (kettőtörő) szakasz (helikális filamentumokba rendezett miozinmolekulákat tartalmaz)
- I-szakasz: izotróp szakasz

Kontrasztmechanizmusok IV.

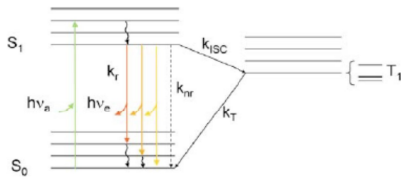
Differenciál interferenciakontraszt (DIC, Nomarski mikroszkópia)



Kontrasztmechanizmusok V.

Fluoreszcencia

A fluoreszcencia alapjai

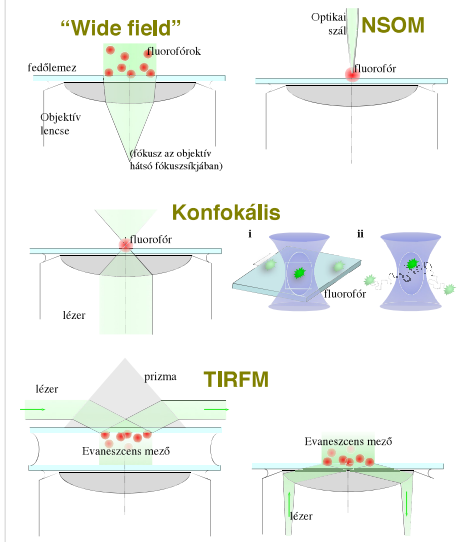


Időfelbontás: **ns**
Térfelbontás: **diffrakciólimitált**
(de FRET: nm)

TRITC-cel jelölt titinmolekulák

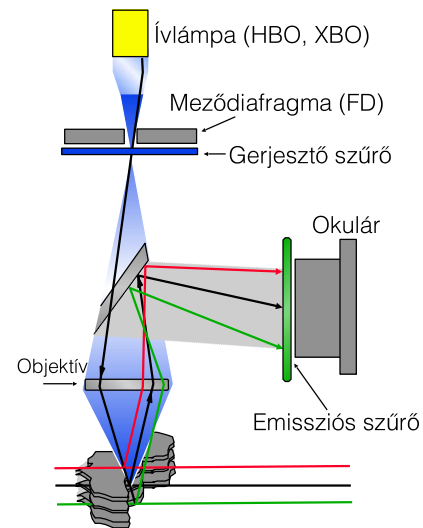


Gerjesztési geometriák

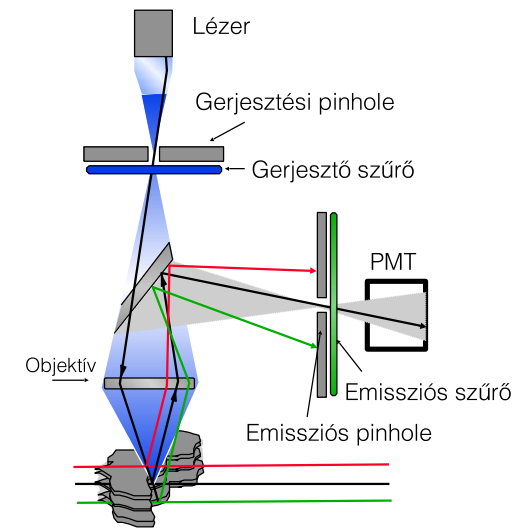


Wide-field vs. konfokális fluoreszcencia mikroszkóp

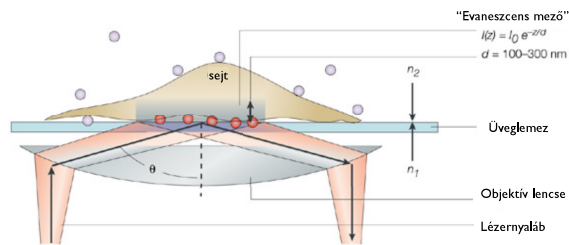
"Wide field"



Konfokális

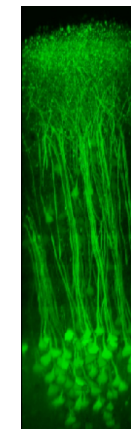
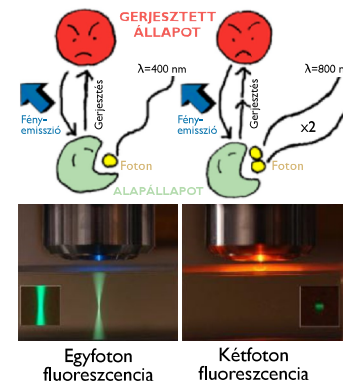


Teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)

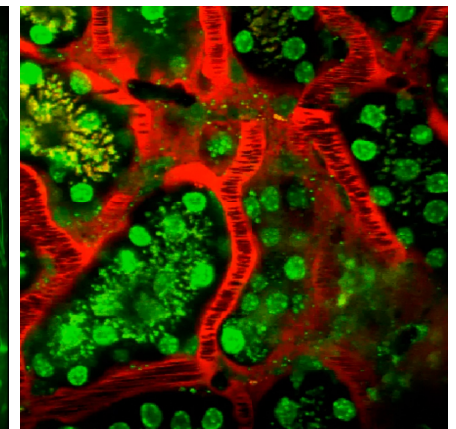


Multifoton fluoreszcencia mikroszkópia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közel IR) hullámhosszú, rövid (fs) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm)



Agykérgi piramis sejtek



Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)

Különleges mikroszkóp alkalmazás: lézercsipesz

Einstein: tömeg-energia ekvivalencia
 $E = mc^2$

Planck: fénnyyerjeési törvény
 $E = hf$

Maxwell: fény terjedési sebessége
 $c = \lambda f$

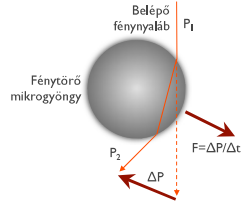


$$mc^2 = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

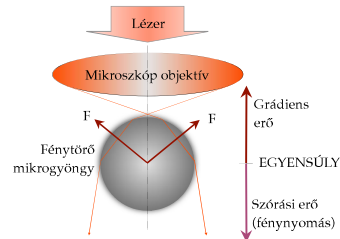
Louis-Victor-Pierre-Raymond, 7th duc de Broglie (1892-1987)

A foton impulzusa: $P = \frac{h}{\lambda}$

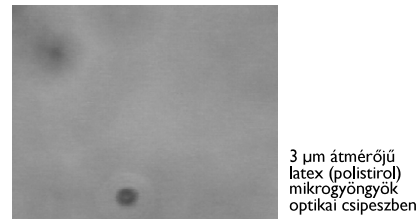
A refrakció fényimpulzus-változással (ΔP) jár:



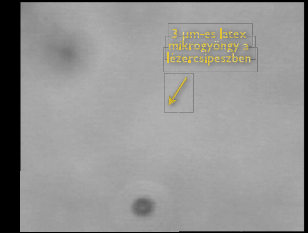
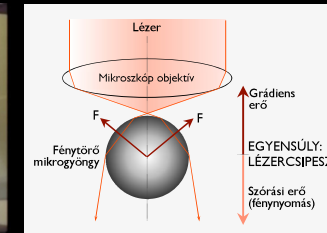
Fénytörő részecskék "optikai erőkkel" megfoghatók:



Az optikai csipeszben a fotonok és a fénytörő részecske között impulzuscsere lép fel



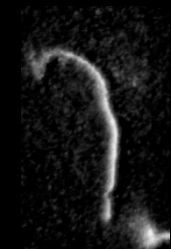
Nanomanipulálás fénnel



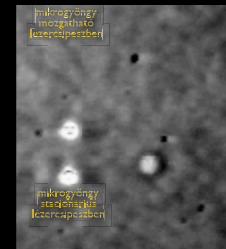
E. coli baktériumsejt



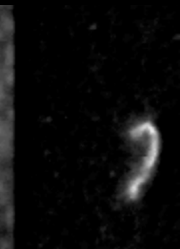
Aktin filamentum



Fáziskontraszt kép

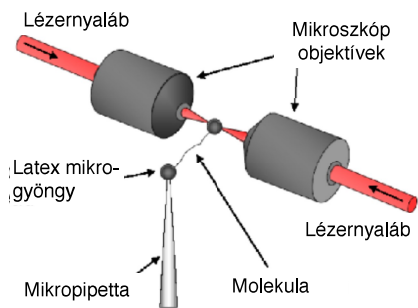


Fluoreszcencia kép

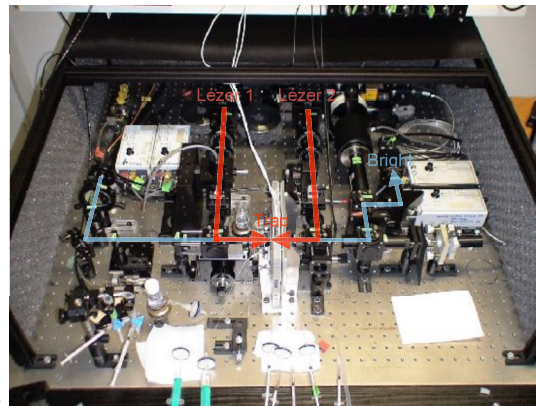


Arai et al Nature 399, 446, 1999

A lézercsipeszrel erőt is lehet mérni



Két lézergusaras optikai csipesz berendezés

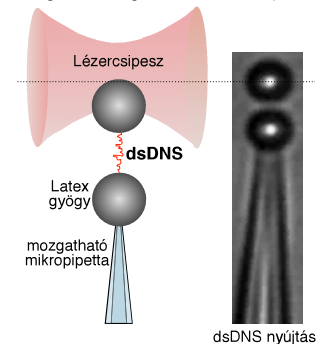


Erőkalibráció

- Fényimpulzus-változás közvetlen megmérése
- Ismert erővel való kalibrálás (Stokes erő)
- Ekvipartíció tétele

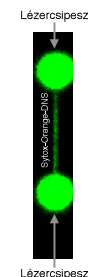
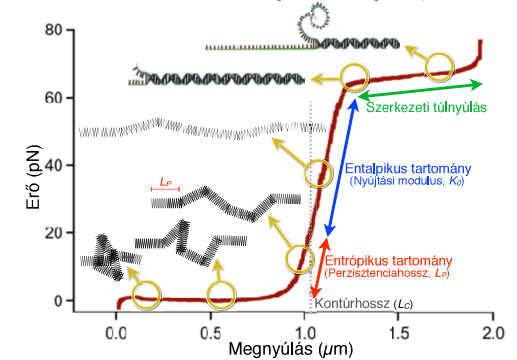
A dsDNS molekula manipulálása

Rugalmasságmérés: lézercsipeszrel



dsDNS nyújtása

A dsDNS rugalmas erőgörbéje



Egyedi molekulák lokalizálása a sejtben: Szuperfelbontású mikroszkópia

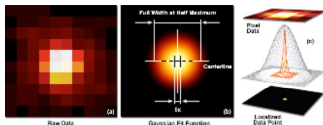
Kémiai Nobel-díj, 2014



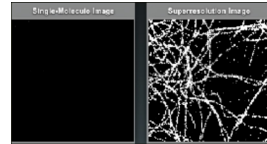
Feloldási probléma (Abbé-elv)



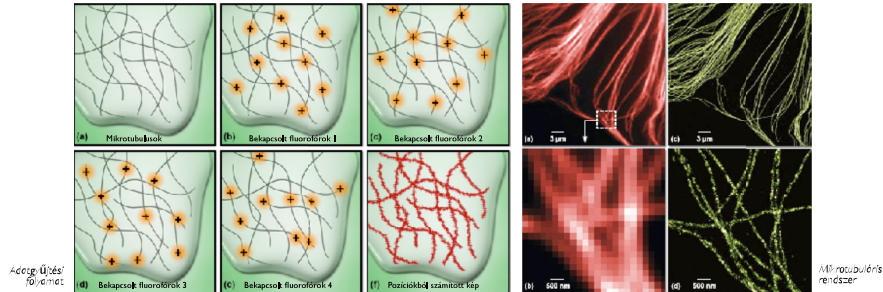
Pozíciómeghatározási probléma
(pontosság a fotonzámtól függ)



"Sztochasztikus" adatgyűjtés egyedi fluorofórokról



STORM ("stochastic optical reconstruction microscopy"); PALM ("photoactivated localization microscopy")

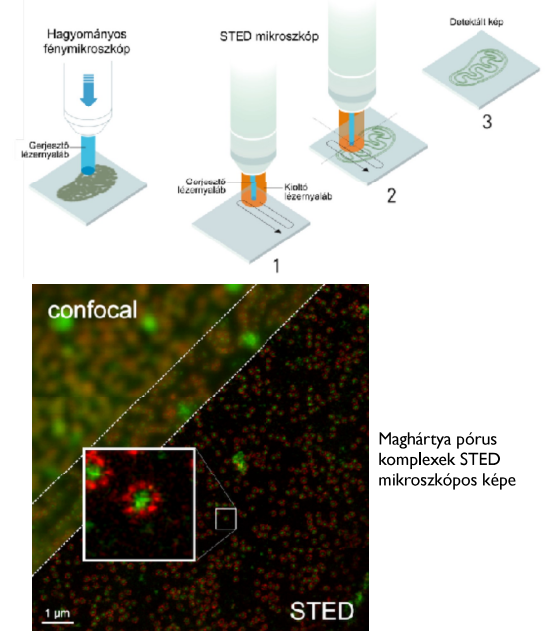
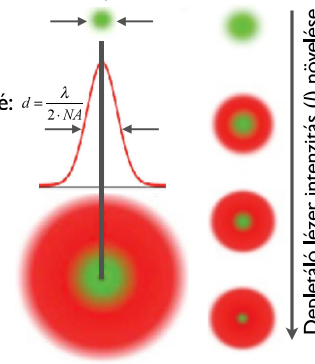


STED mikroszkópia (STimulated Emission Depletion)

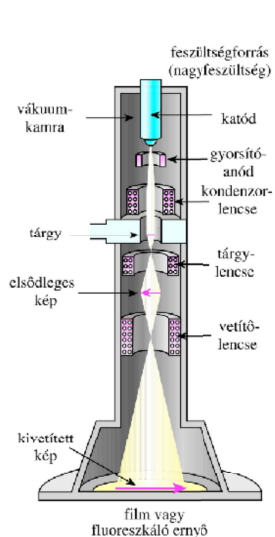


Hell: $d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA \sqrt{1 + I/I_s}}$

Abbé: $d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$

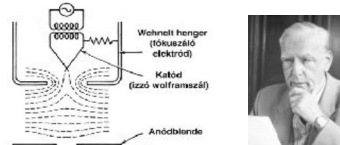


Elektronmikroszkóp



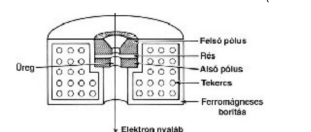
Transmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

Sugárforrás:
elektronágyú



Ernst Ruska
(Nobel-díj 1986)

Fókuszálás:
elektronnyaláb
kiterítése
mágnestlencsével



$$F = eBV_e \sin \alpha$$

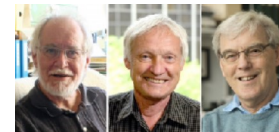
F=elektronra ható erő; e=elektron töltése; B=mágneses
télerő; V_e =elektron sebessége; α =optikai tengely és a
mágneses tér iránya által bezárt szög

Feloldóképesség: $d = \frac{\lambda}{\alpha}$

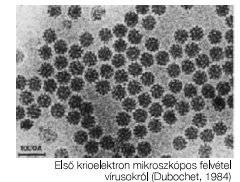
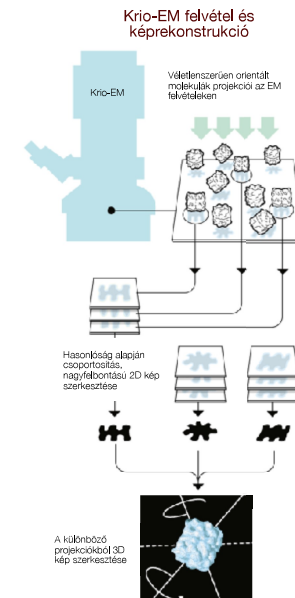
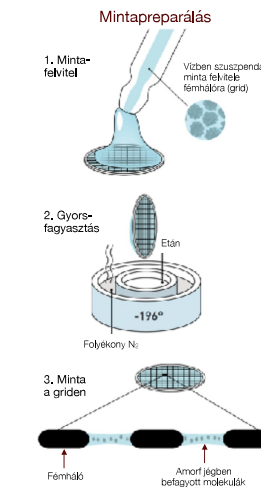
d =legkisebb feloldott távolság
 λ =de Broglie hullámhossz
 α =optikai tengely és a mágneses tér
iránya által bezárt szög

de Broglie hullámhossz alapján elméleti $d \sim 0.005 \text{ nm}$ ($\approx 5 \text{ pm}$)

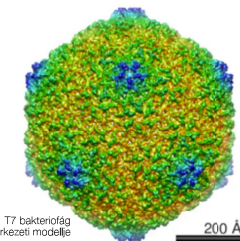
Kémiai Nobel-díj 2017: Krio-elektron mikroszkópia



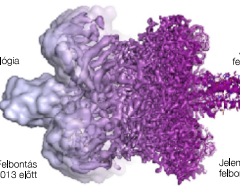
Jacques Dubochet, Joachim Frank, Richard Henderson



Első krio-elektron mikroszkópos felvétel
vírusról (Dubochet, 1984)



T7 bakteriófág
szerkezeti modellje



Felbontás
2013 éjkt

Pásztázó tűszondás mikroszkópia I.



Richard P. Feynman:
"There is plenty of room at the bottom"
1959. december 29.

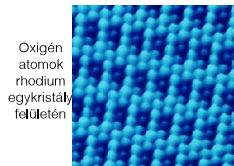


Gerd Binnig



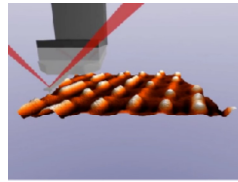
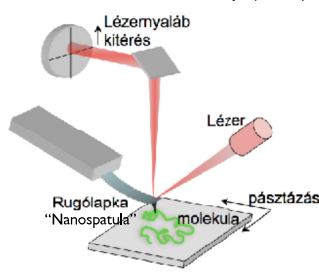
Heinrich Rohrer

(Nobel-díj
1986)

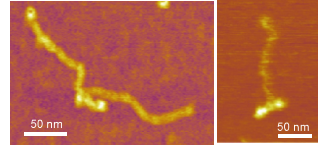


Oxigén atomok
rhodium
egyikristály
felületén

Atomerő-mikroszkóp (AFM)



RNS-DNS hibrid Miozinmolekula



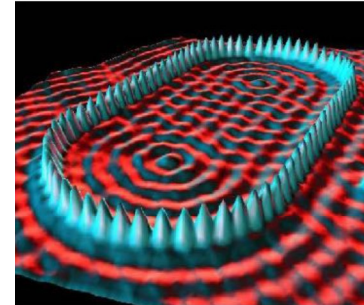
Az AFM-mel
molekulákat is
manipulálhatunk



Pásztázó tűszondás mikroszkópia II.

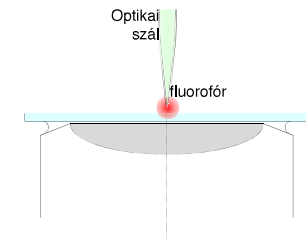
Pásztázó alagúteffektus mikroszkóp (STM)

Minta és tű atomjai között távolságfüggő
alagútáram alapján jön létre a kép



Felszínen elrendezett vas atomok STM képe

Közele mező pásztázó optikai mikroszkóp (NSOM)



Optikai szál kimenetének átmérője: kisebb, mint
az alkalmazott fény hullámhossza

Minta és optikai szál távolsága: kisebb, mint az
alkalmazott fény hullámhossza

Felbontás: az optikai szál átmérőjétől függ (akár
néhány 10 nm)

Evaneszcens mező fluoreszcencia kombinálása atomerőmikroszkóppal

