

A fluorescence microscopy image showing a complex biological structure. The structure is primarily outlined in a bright purple/magenta color, with numerous small, bright green spots scattered throughout, particularly concentrated in the lower-left and central regions. The background is dark, making the signals stand out.

Opazovanje struktur

1. del - Optična mikroskopija

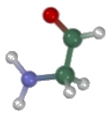
Smiling Face



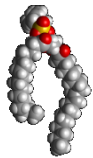
10 Centimeters

Velikostne skale življenja

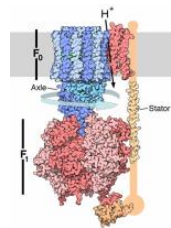
Medatomske vezi



Lipidi



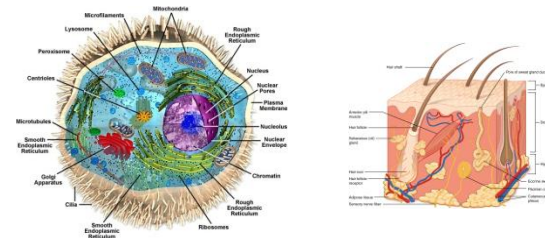
Proteini



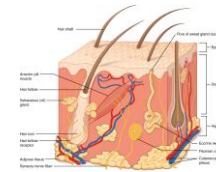
Kromosom



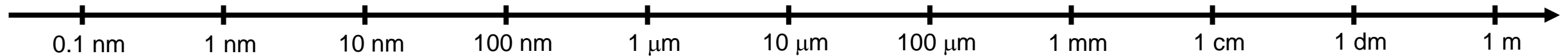
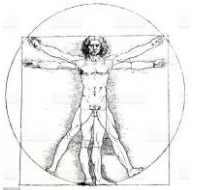
Evkarionska celica



Tkiva

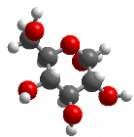


Telo

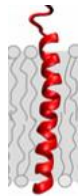


velikost

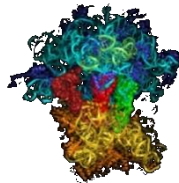
Monosaharidi,
aminokisliline



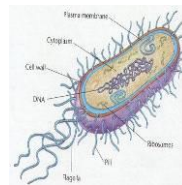
Trans-
membranska
vijačnica



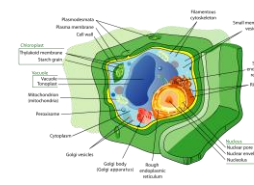
Ribosom



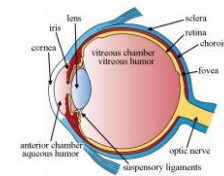
Bakterija



Rastlinska celica

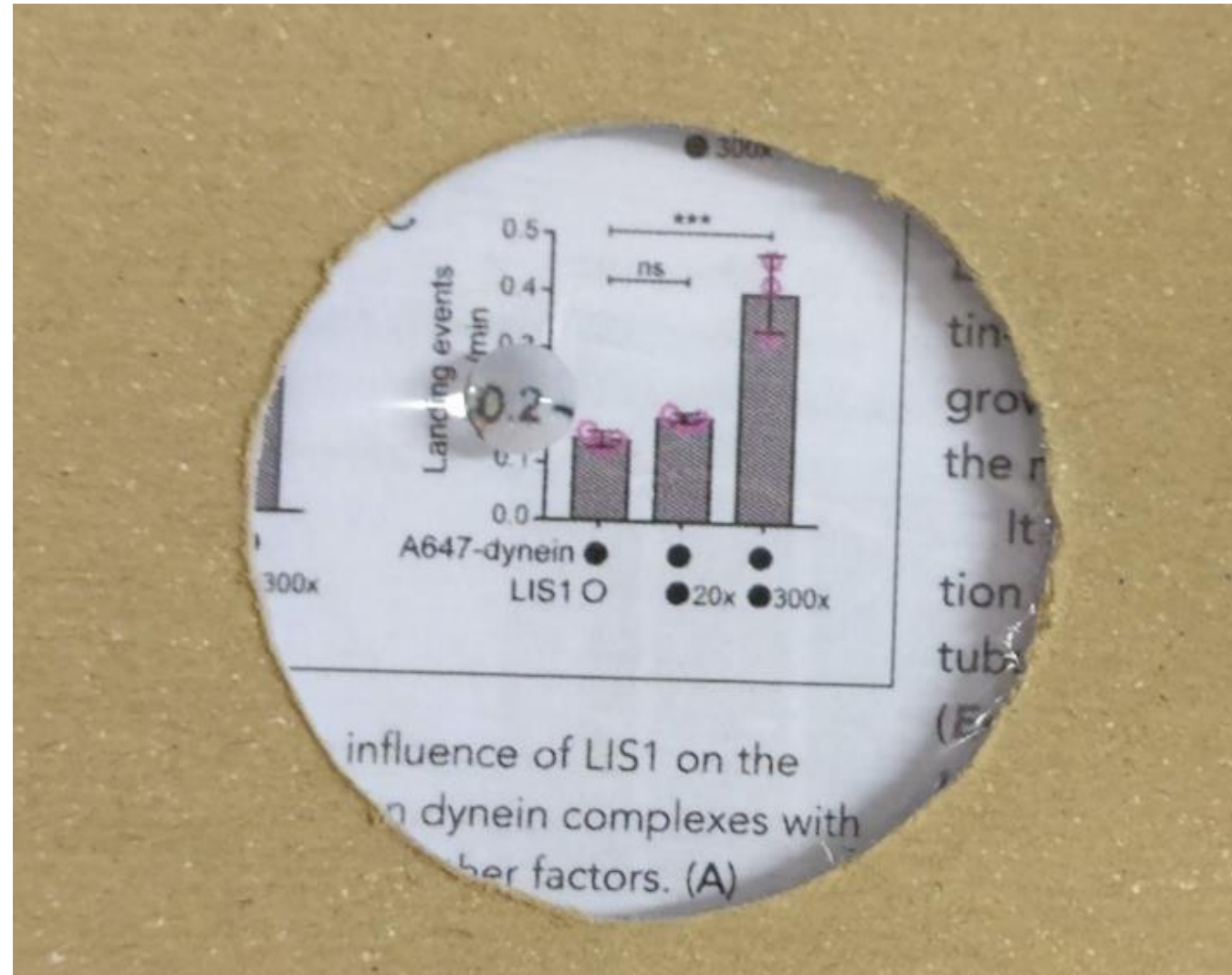


Organi



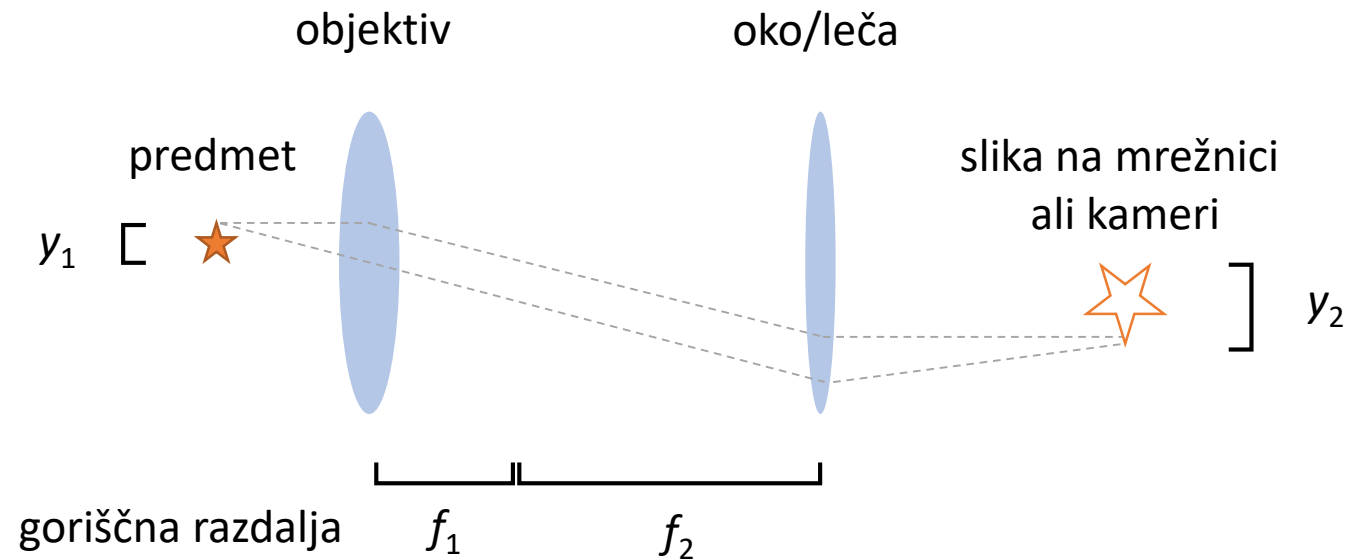
vidno s prostim očesom

Kako lahko vidimo majhne stvari?



Kako povečamo majhne stvari?

Nastanek slike zaradi loma svetlobe na ukrivljeni površini (geometrijska optika):



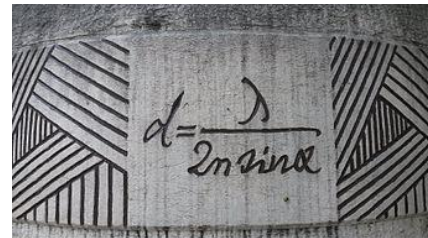
Optična povečava: $M = y_2 / y_1 = f_2 / f_1$

Kako podrobno vidimo majhne stvari?

- Slika točke zaradi uklona svetlobe ni neskončno ostra. Če sta dve točki preblizu skup, se njuni sliki zlijeta.
- Najmanjša razdalja med dvema točkama (d), pri kateri ju lahko razločimo na sliki, je **ločljivost mikroskopa**.

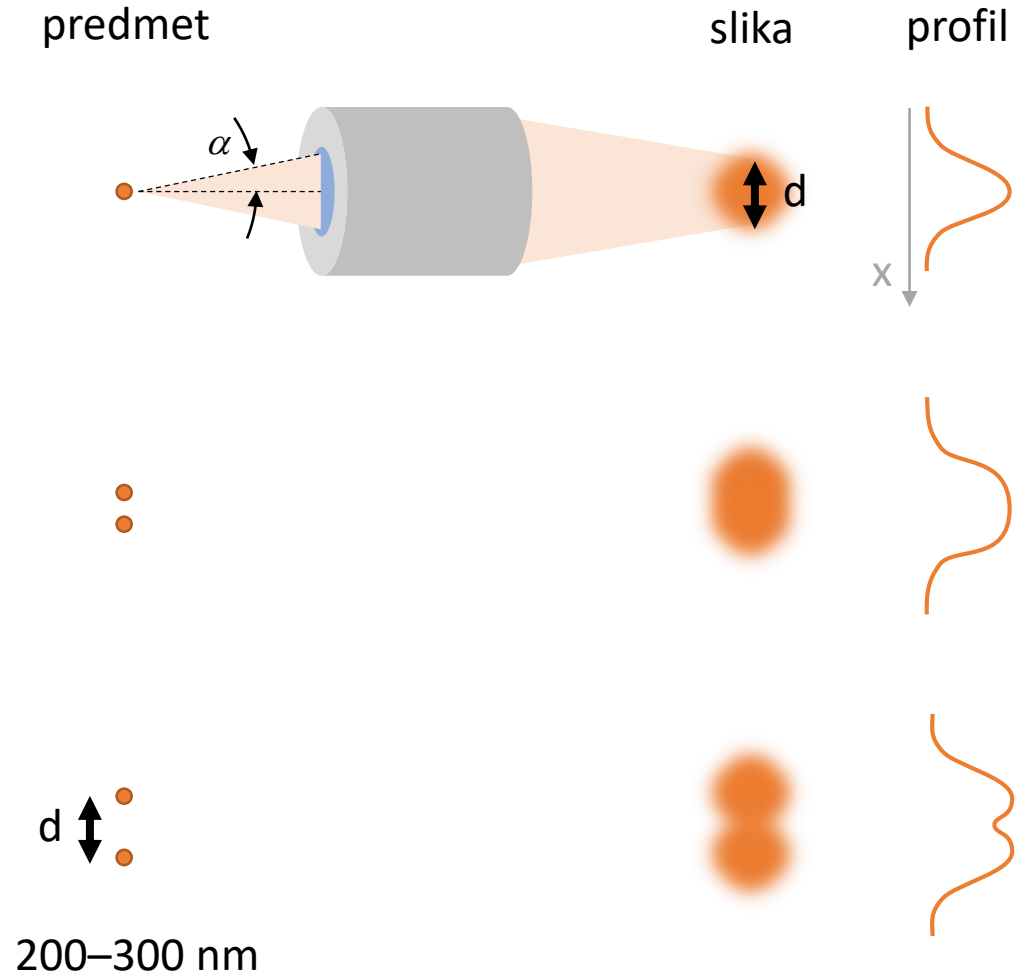
Ta je odvisna od:

- valovne dolžine svetlobe - λ
- numerične odprtine objektiva - $NA = n \sin(\alpha)$
 - n - lomni količnik medija
 - α - polovični kot zajema svetlobe
- ne od povečave!



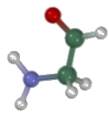
Ernst Abbe

- **Z optičnim mikroskopom lahko razločimo le podrobnosti večje od d** (v najboljšem primeru $\lambda / 2$, t.i. uklonska limita)!

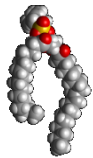


Velikostne skale življenja

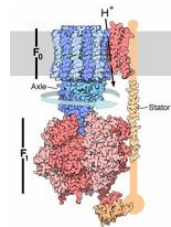
Medatomske vezi



Lipidi



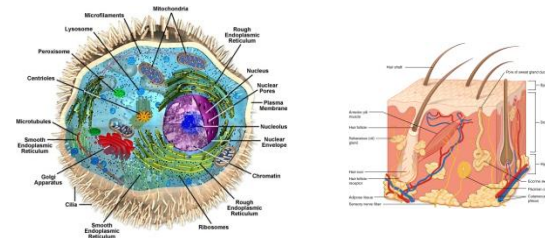
Proteini



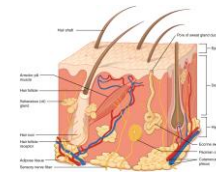
Kromosom



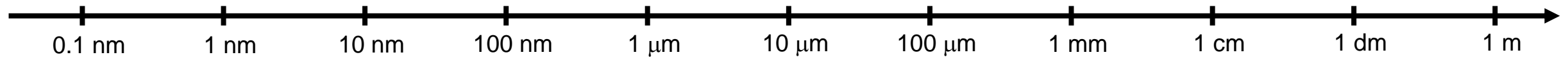
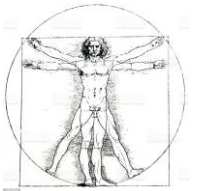
Evkarionska celica



Tkiva

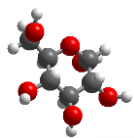


Telo

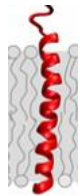


velikost

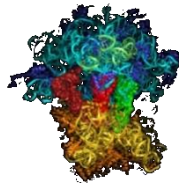
Monosaharidi,
aminokisliline



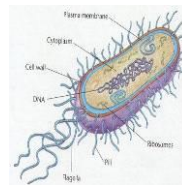
Trans-
membranska
vijačnica



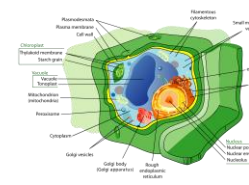
Ribosom



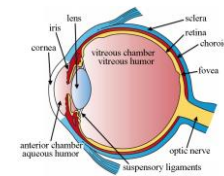
Bakterija



Rastlinska celica



Organi



s svetlobnim mikroskopom

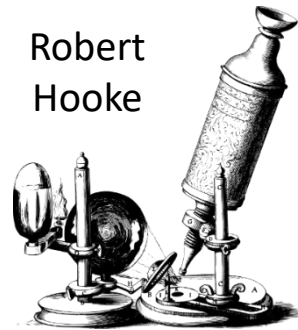
vidno s prostim očesom

Kratka zgodovina svetlobne mikroskopije

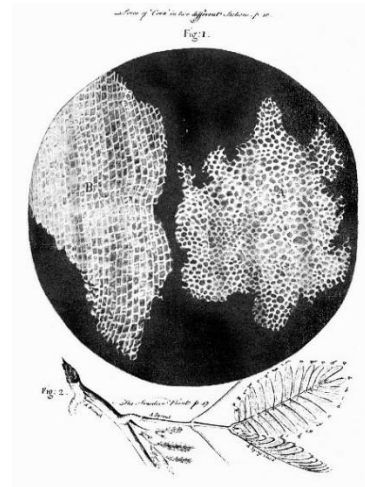
17. stol.



Leeuwenhoek
Microscope
(circa late 1600s)



Robert
Hooke



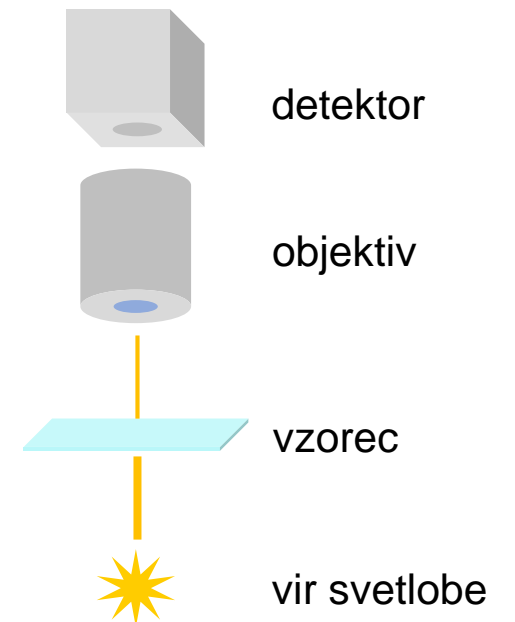
20. stol.



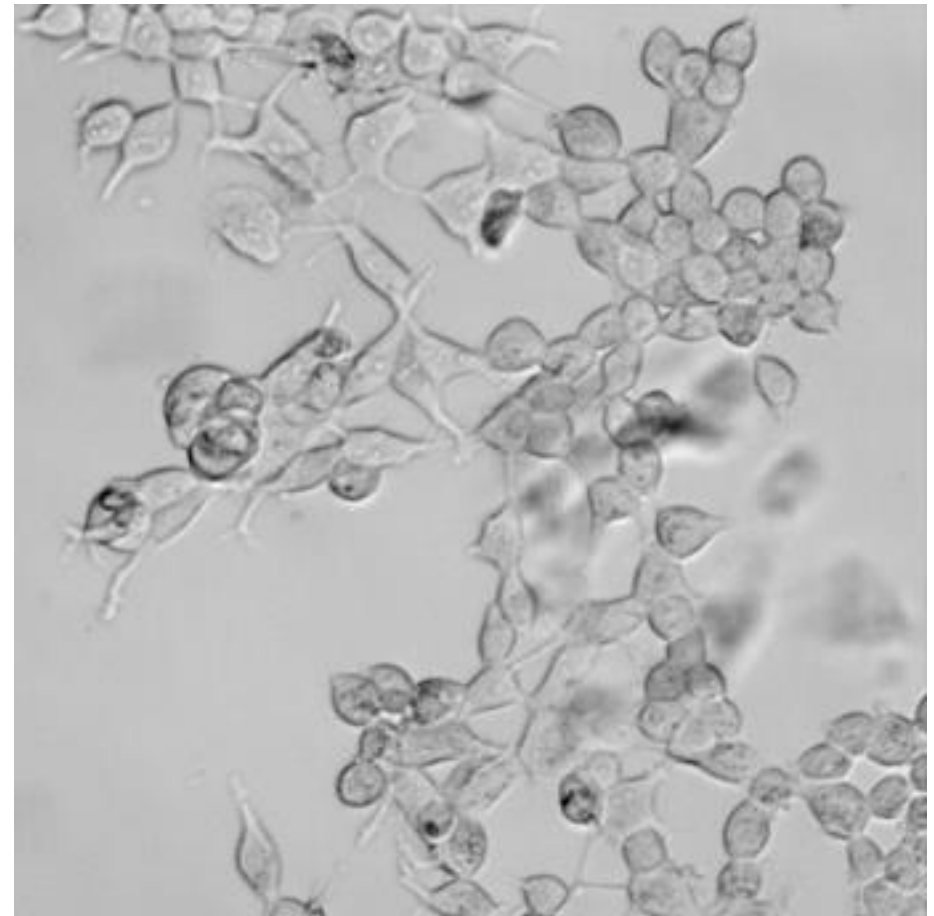
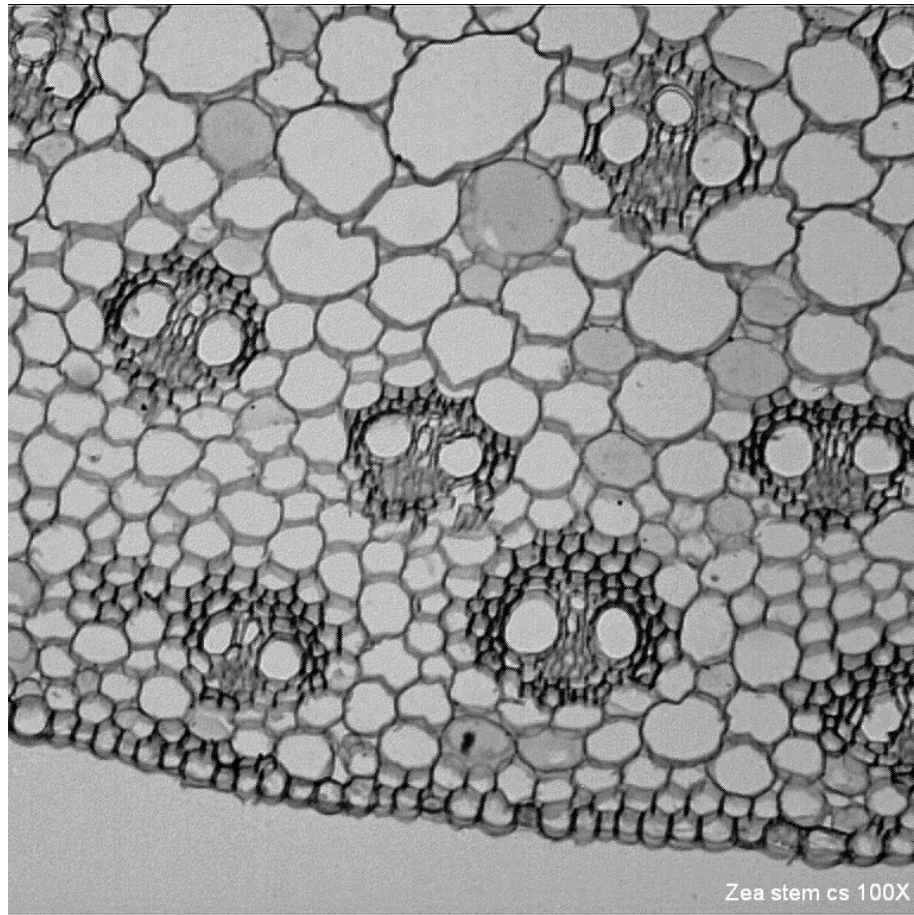
21. stol.



Zgradba presevnega mikroskopa

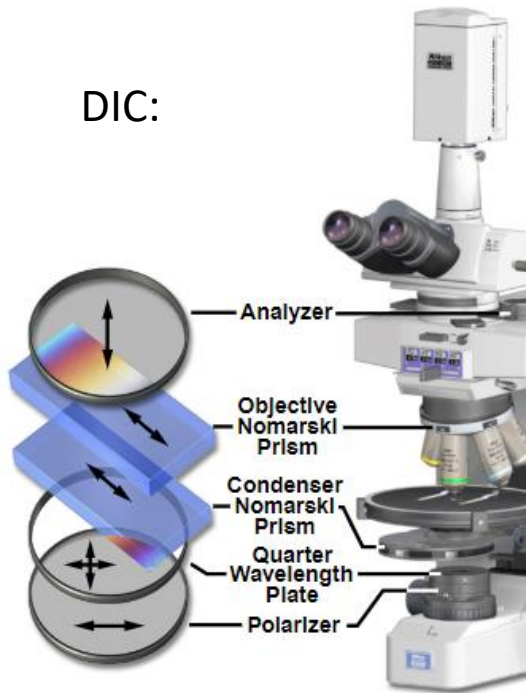


Kaj vidmo na teh slikah?

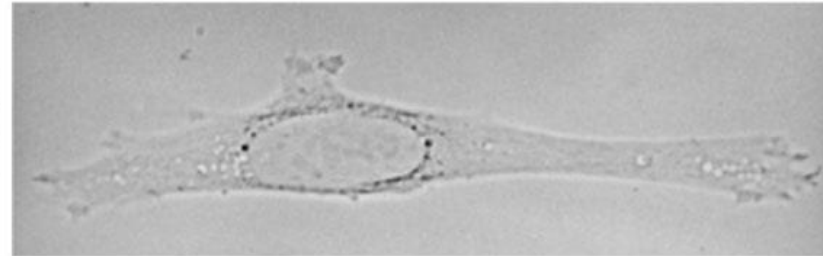


Dve nadgradnji presevnega mikroskopa

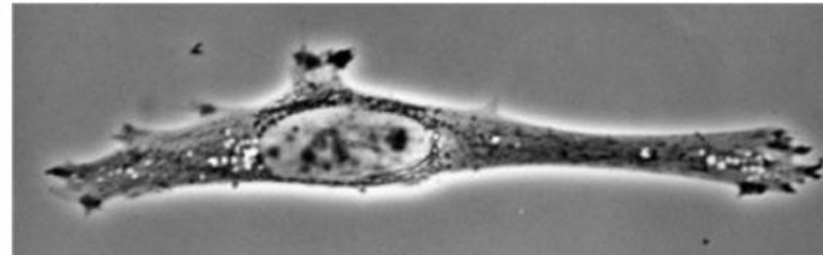
DIC:



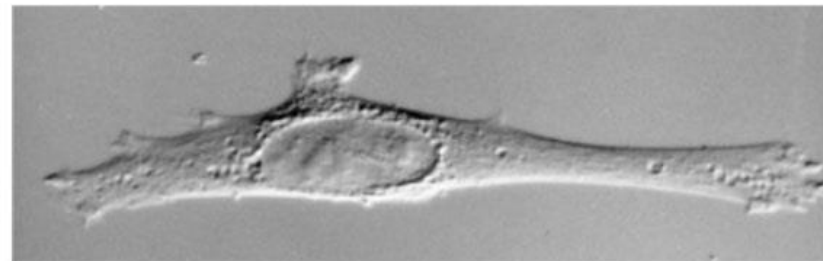
Bright Field



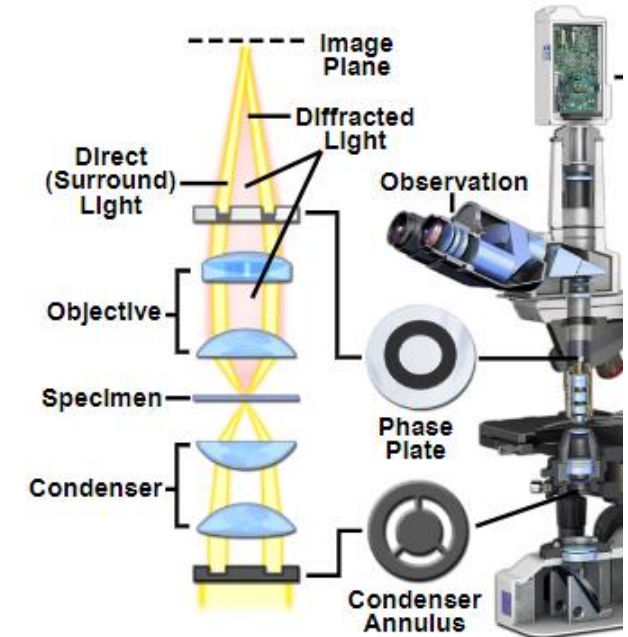
Phase Contrast



Differential Interference Contrast

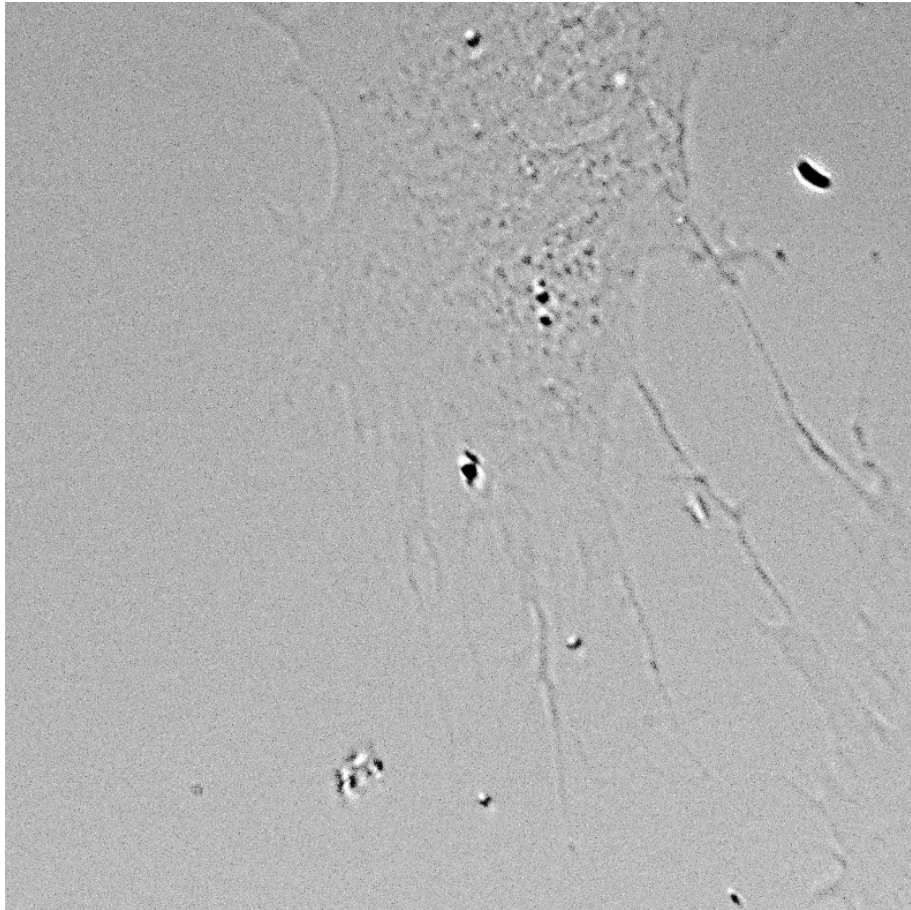


PhC:

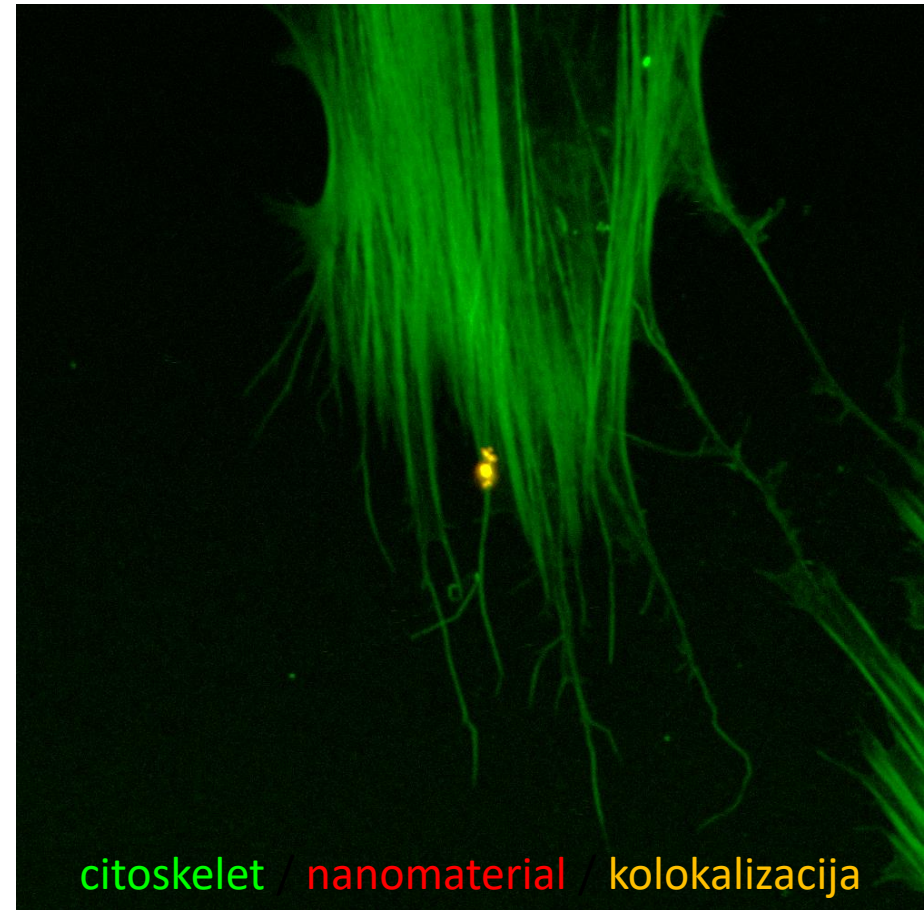


V čem se razlikujeta sliki iste celice?

Presevna mikroskopija



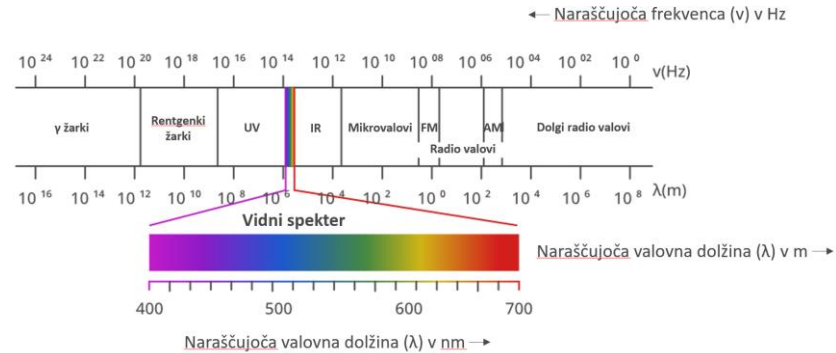
Fluorescenčna mikroskopija



Fluorescenca: revolucija kontrasta



Osnove fluorescence



Spekter svetlobe

Energijski prehodi elektrona

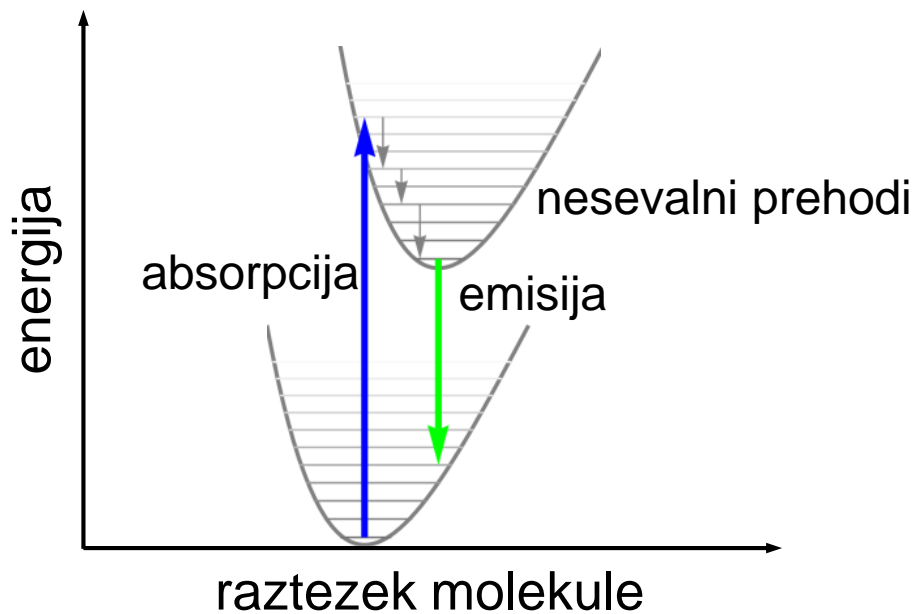
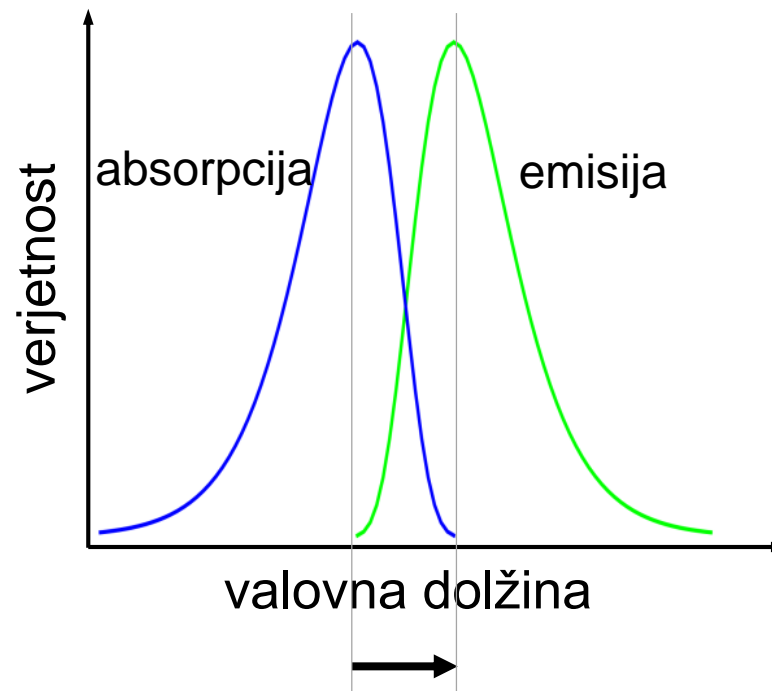
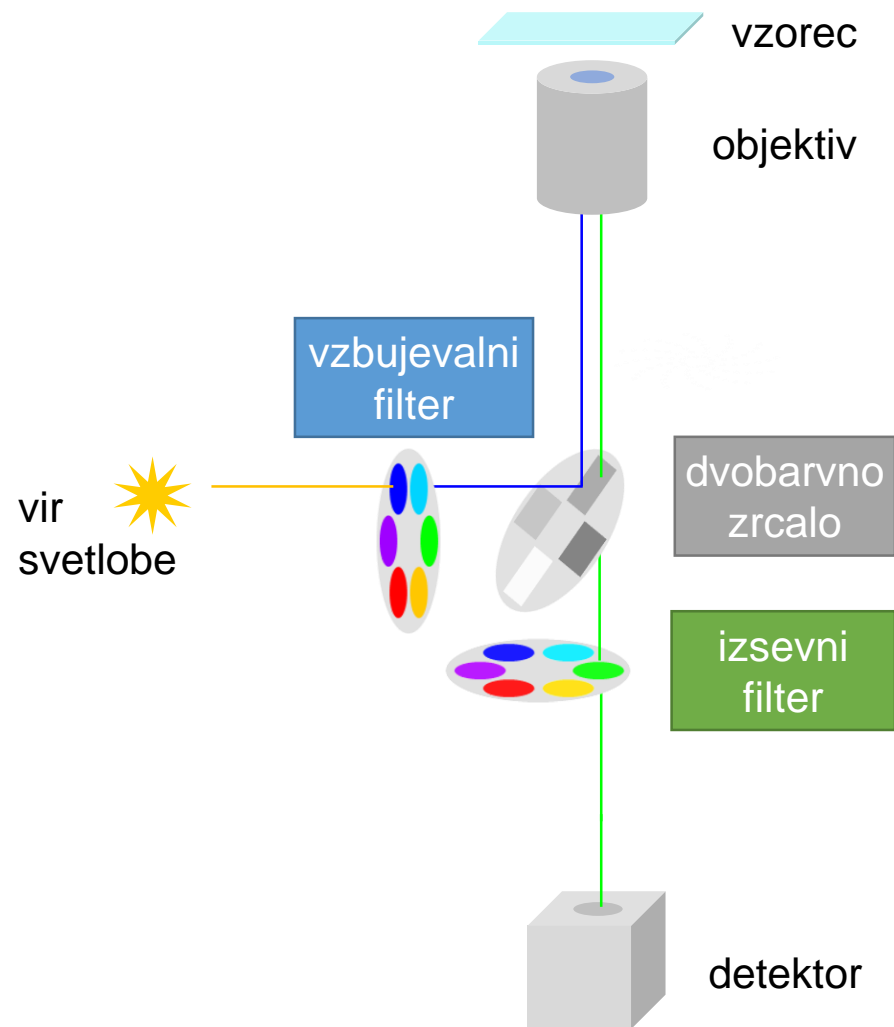


Diagram Jablonskega

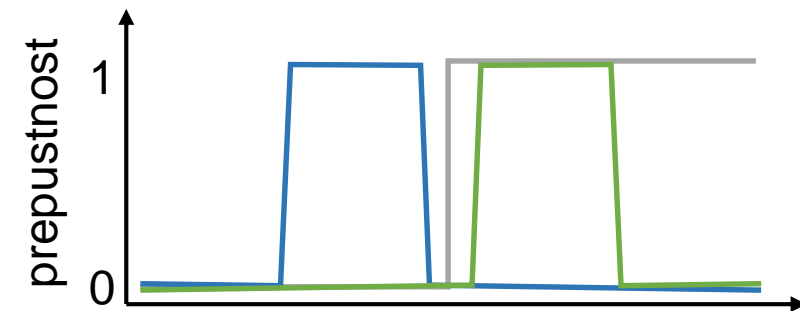
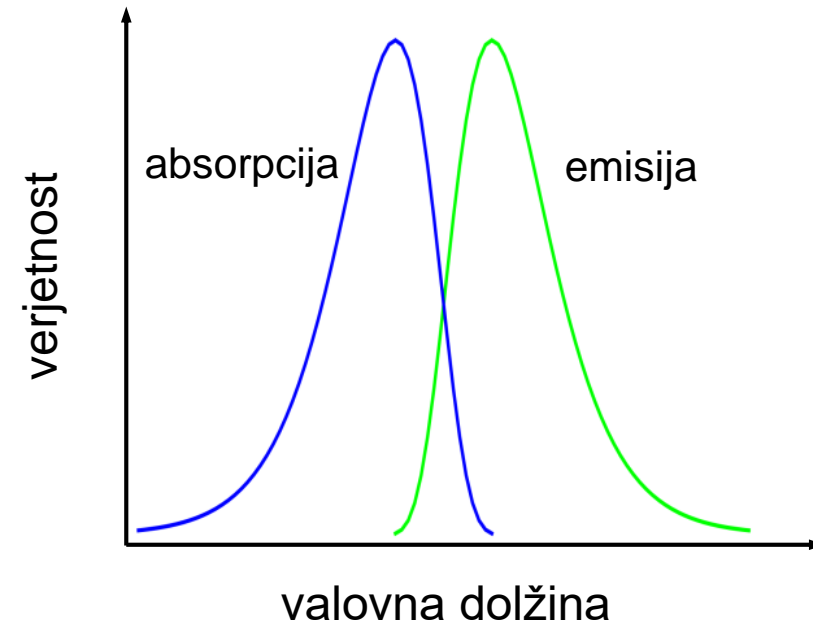


Stokesov premik

Fluorescenčni mikroskop



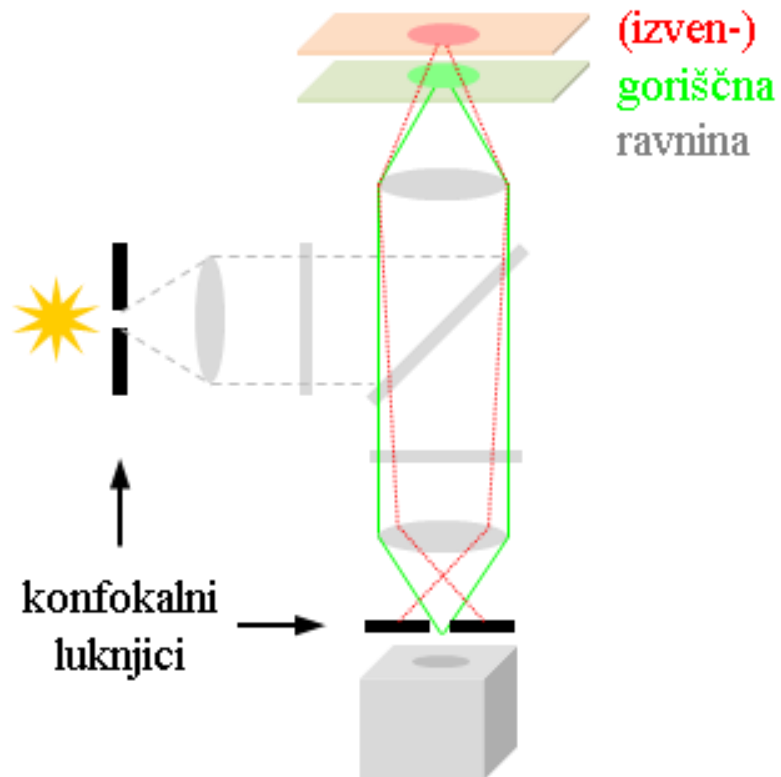
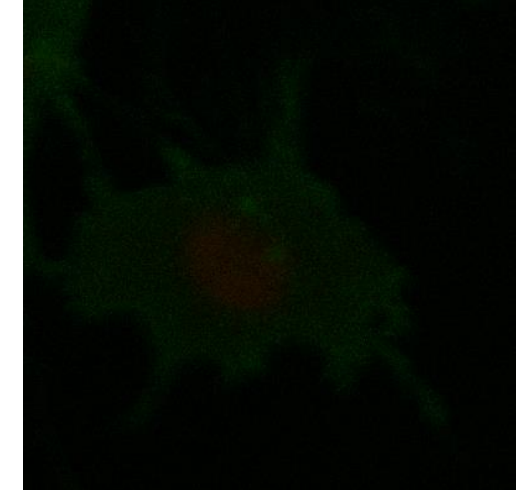
Spekter svetlobe



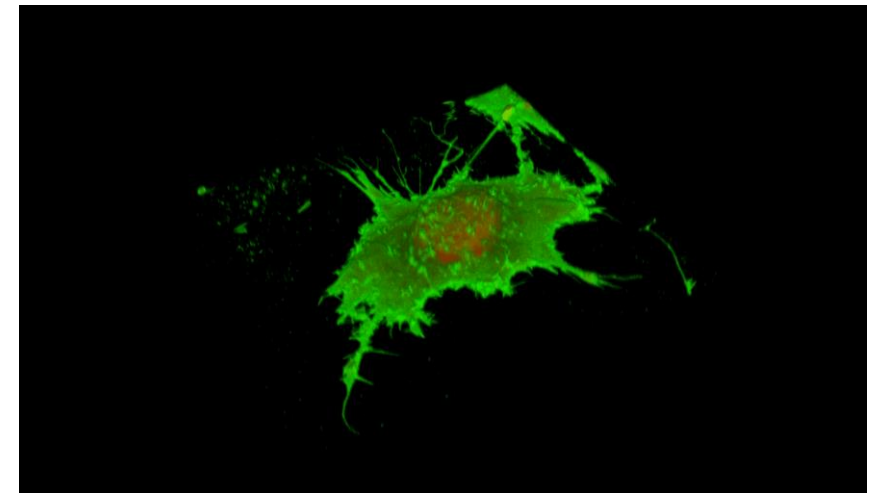
Konfokalni fluorescenčni mikroskop

- Omogoča optično rezinjenje

Niz slik po globini:



3D rekonstrukcija:



Superločljiv fluorescenčni mikroskop

Lokalizacijska
mikroskopija
(PALM, STORM)

objekt slika = odčitek



=



STED
mikroskopija



+



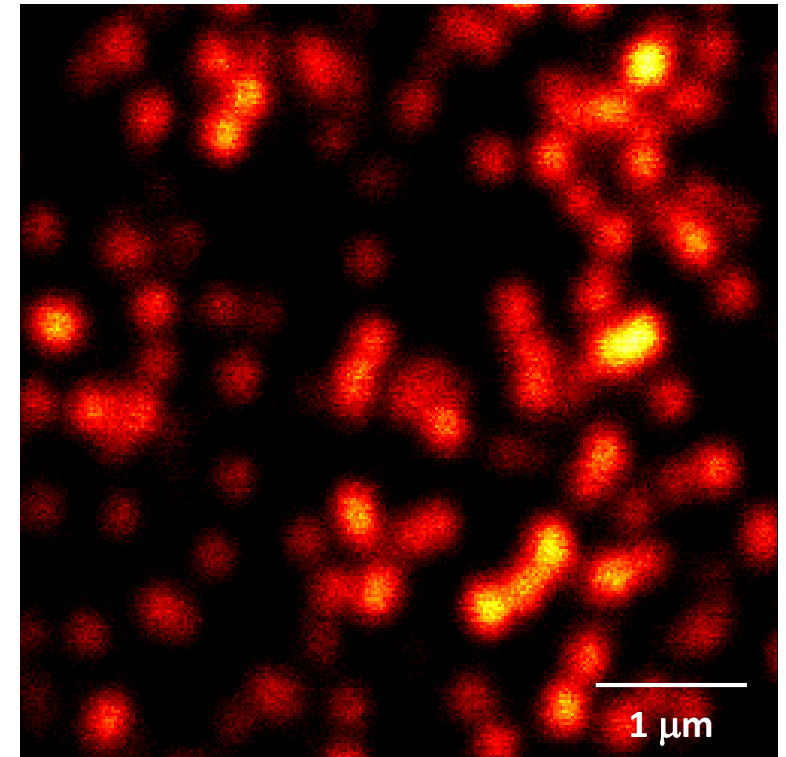
=



on

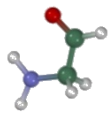
off

Fluorescenčne kroglice (40 nm)

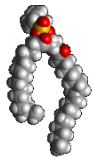


Velikostne skale življenja

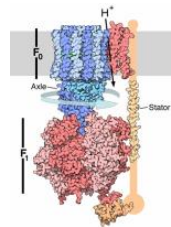
Medatomske vezi



Lipidi



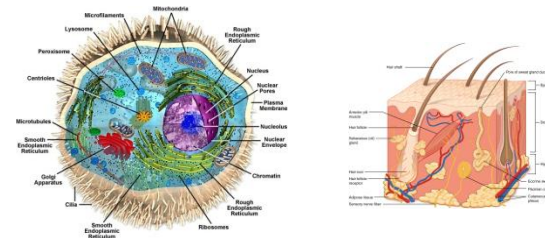
Proteini



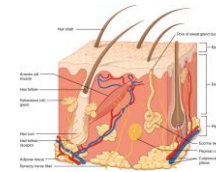
Kromosom



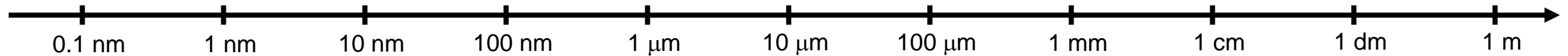
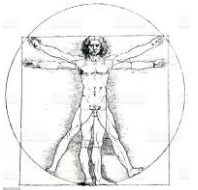
Evkarionska celica



Tkiva

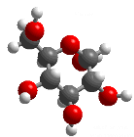


Telo



velikost

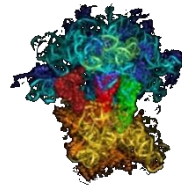
Monosaharidi,
aminokisljine



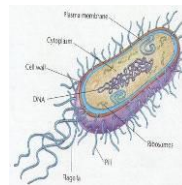
Trans-
membranska
vijačnica



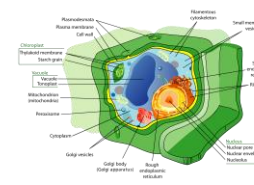
Ribosom



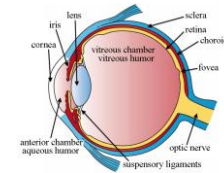
Bakterija



Rastlinska celica



Organi



← s super-ločljivim m.

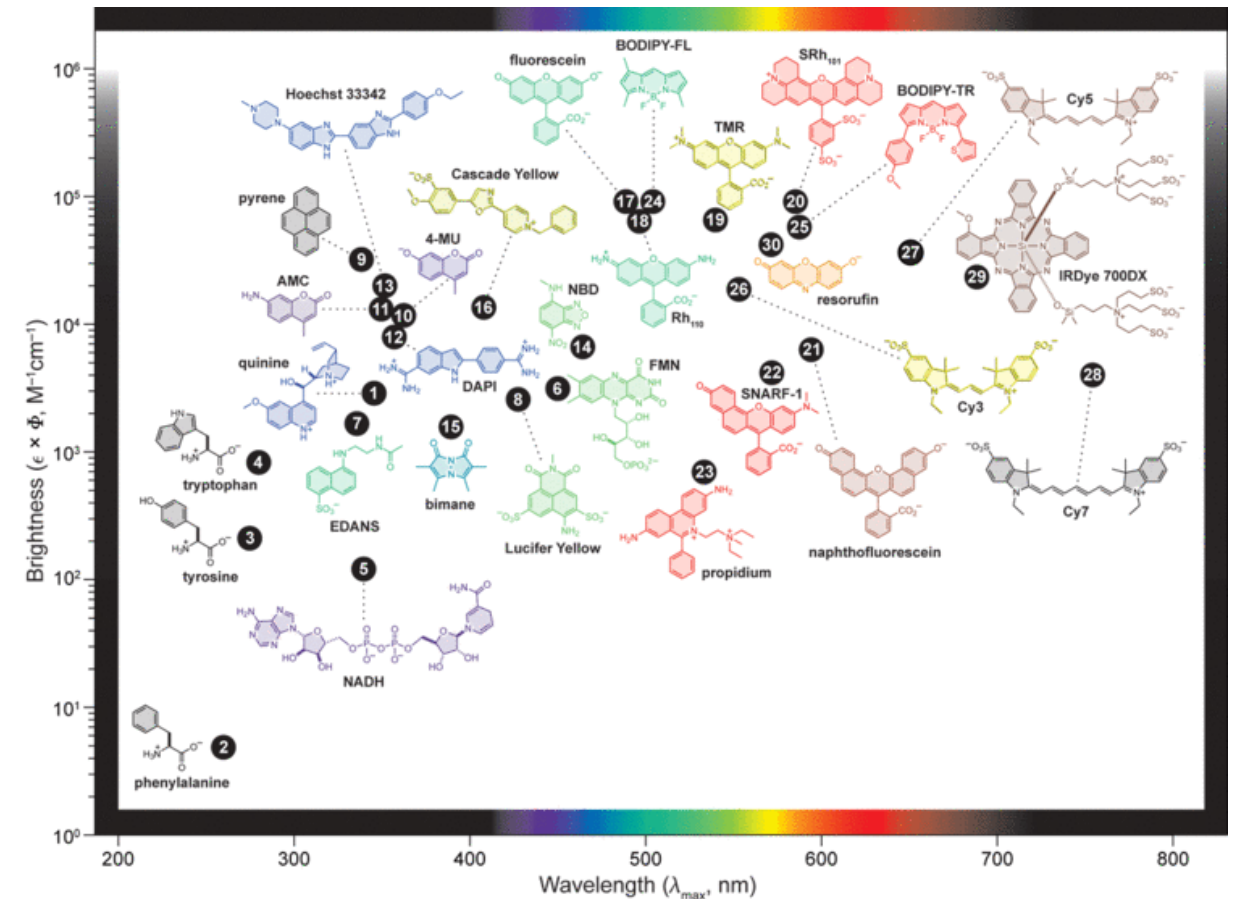
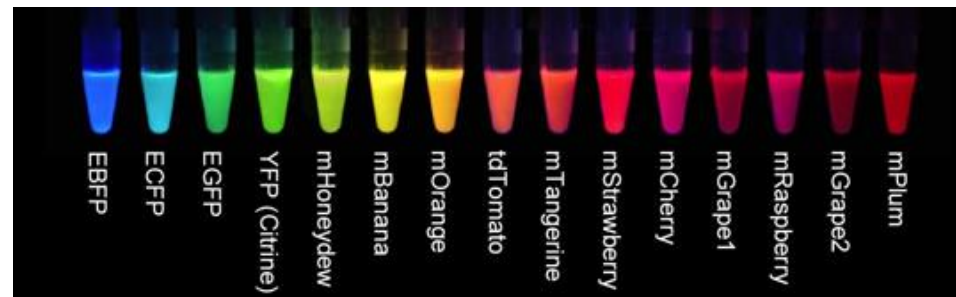
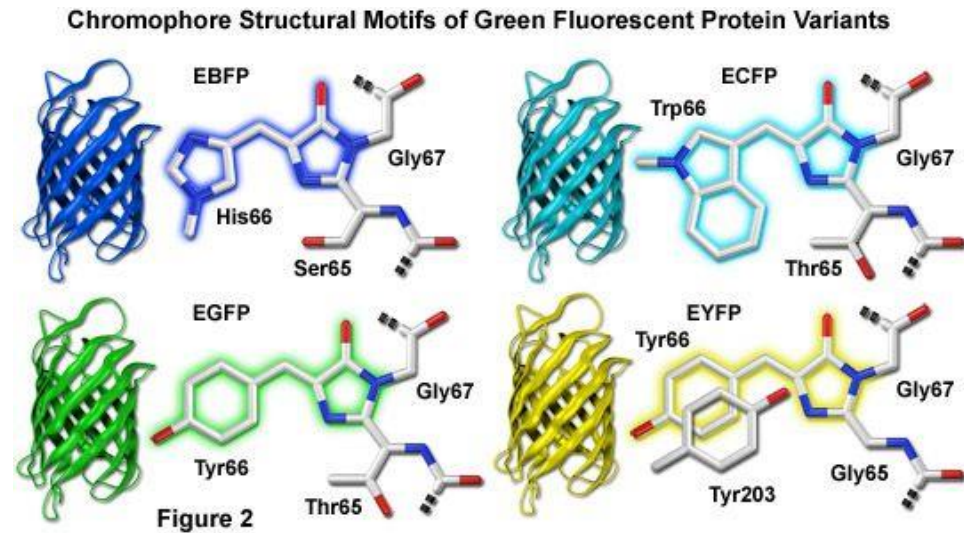
← s svetlobnim mikroskopom

← vidno s prostim očesom

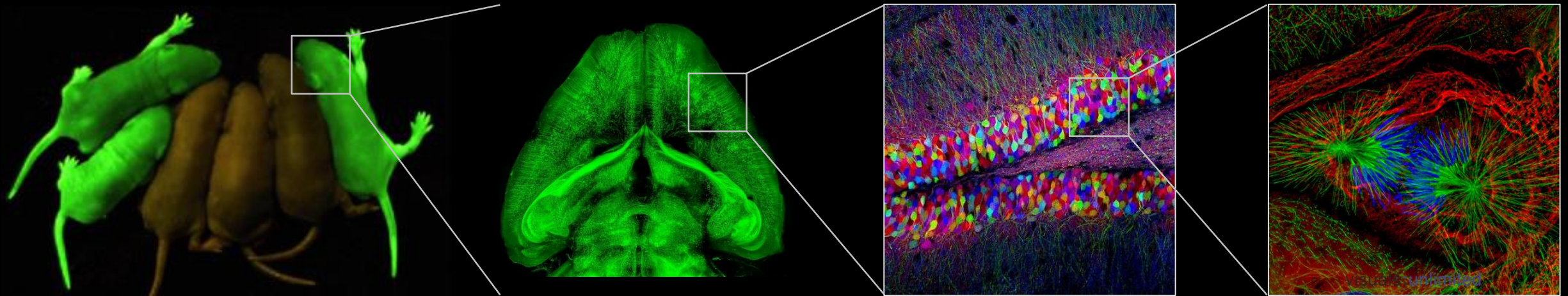
Fluorescenčna barvila

Fluorescenčni proteini

Organska barvila



Fluorescenca: revolucija specifičnosti



Organizem

Organ

Tkivo

Celica

Organel

Molekula

1 m

10^{-1} m

10^{-2} m

10^{-3} m

10^{-4} m

10^{-5} m

10^{-6} m

10^{-7} m

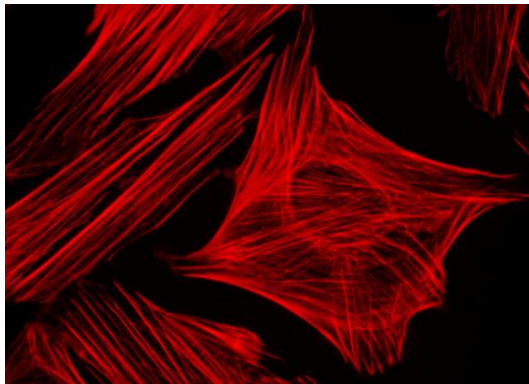
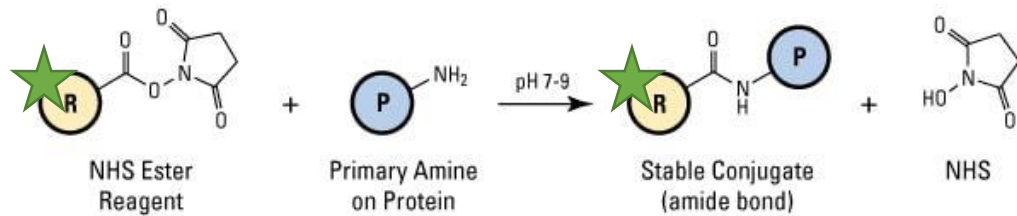
10^{-8} m

10^{-9} m

Fluorescenčno označevanje proteinov

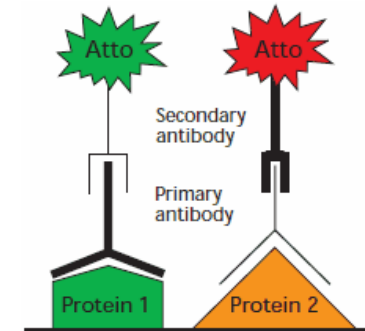
Nespecifično

Označevanje izoliranih proteinov
(npr. protiteles)



Specifično

Fluorescenčno označena protitelesa



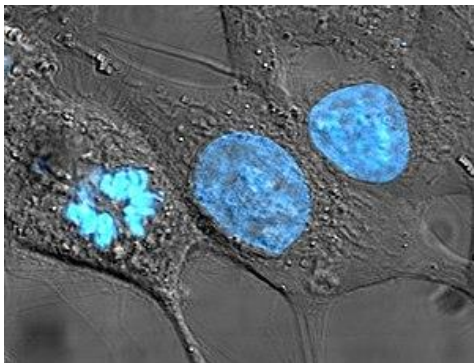
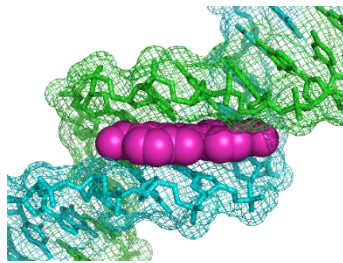
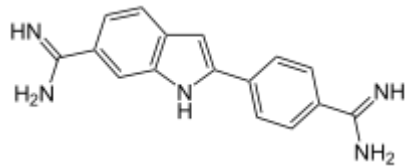
Ekspresija fluorescenčnih proteinov v celici



Fluorescenčno označevanje DNA/RNA

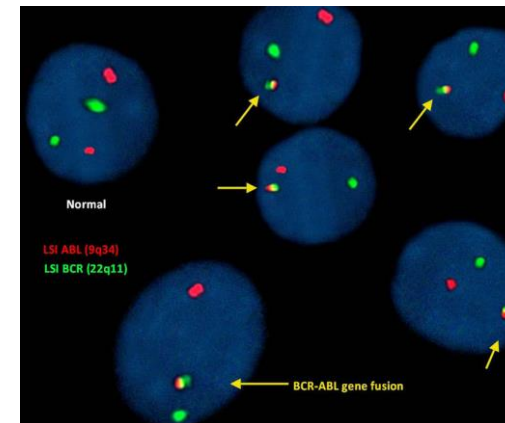
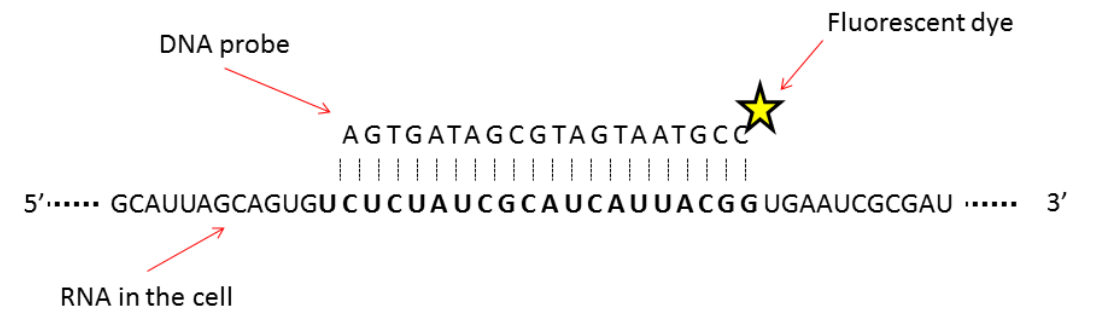
Nespecifično

DAPI, Hoechst, ...



Specifično

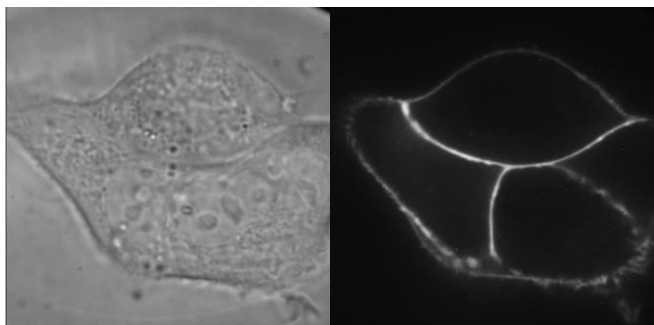
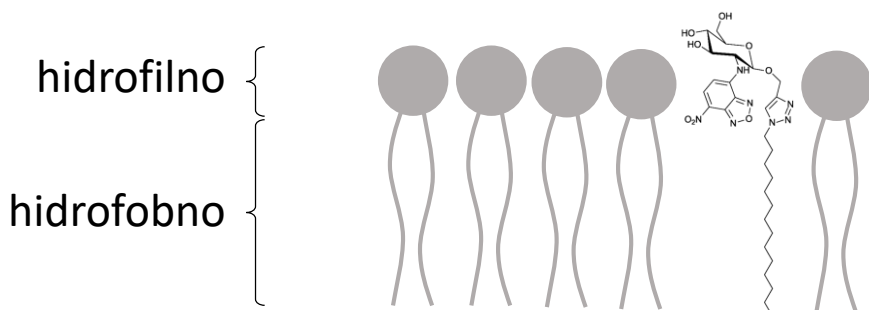
Fluorescence in situ hybridization (FISH)



Fluorescenčno označevanje lipidov

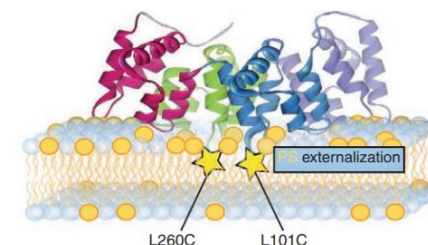
Nespecifično

Fluorescenčni analogi lipidov, maščobnih kislin, transmembranskih proteinov ipd. (amfifilne molekule)

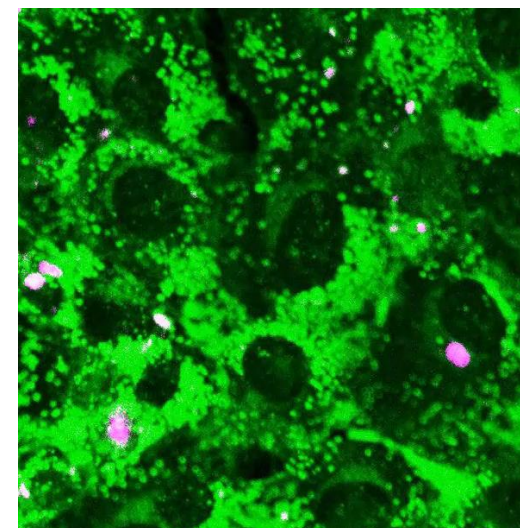


Specifično

Vezava na izbrano vrsto lipidov (fosfatidilserin)



Kim *Nature Protocols* 2010



Fluorescenčná mikroskopija


Kontrast + špecifičnost

konfokálne STED

1 μm

Vaje na IJS: sreda, 29. 11. 2023

- 4 skupine po 10 oseb.
- Začetek ob 9.00 / 10.30 / 12.30 / 14.00.
- Dobimo se v galeriji IJS (glavna stavba, vhod s parkirišča na Jamovi cesti).
- Trajanje vaje vsake skupine: 3h (2h v laboratoriju + 1h za obdelavo materiala).
- Vsaka skupina potrebuje en računalnik z naloženim programom Fiji (<https://fiji.sc>)
- Vaje vodijo kolegi Laboratorija za biofiziko:
Rok Podlipec, Hana Kokot, Boštjan Kokot, Benjamin Koroševič Koser.
- Vsaka skupina pripravi kratko predstavitev (cca 10 min), pri tem so vam koordinatorji vaj na voljo še eno dodatno uro (se sami dogovorite za termin)
- Predstavitve 6. 12. 2023

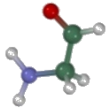


Določanje molekularnih struktur

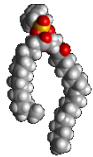
2. del - elektronska mikroskopija, sipanja, spektroskopije

Kako lahko opazujemo še manjše strukture?

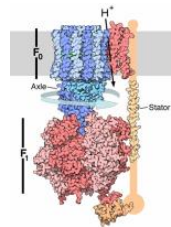
Medatomske vezi



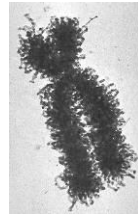
Lipidi



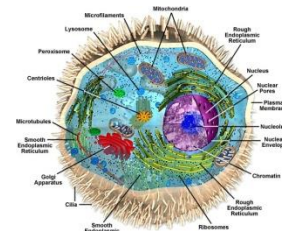
Proteini



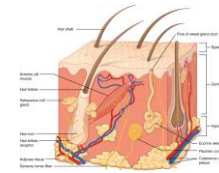
Kromosom



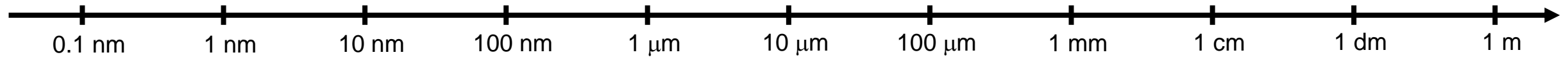
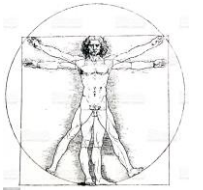
Evkarionska celica



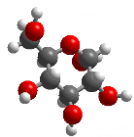
Tkiva



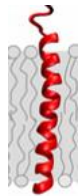
Telo



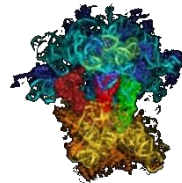
velikost



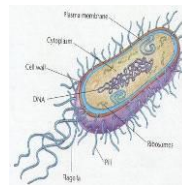
Monosaharidi,
aminokisljine



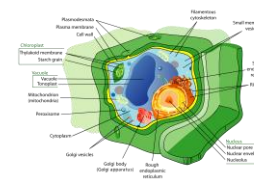
Trans-
membranska
vijačnica



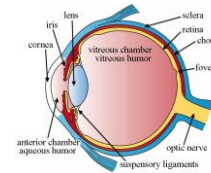
Ribosom



Bakterija



Rastlinska celica



Organi



← ?

← s super-ločljivim m.

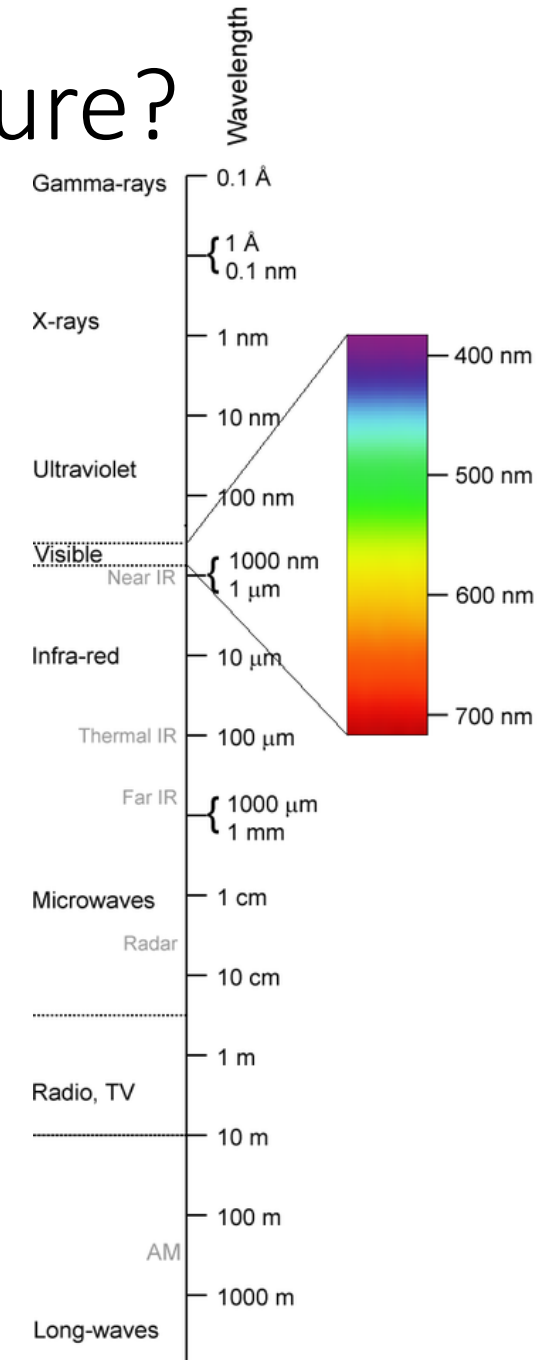
← s svetlobnim mikroskopom

← vidno s prostim očesom

Kako lahko opazujemo molekularne strukture?

- „Slika“ ustvari interakcija svetlobe s snovjo: fotoni („delci svetlobe“) se od elektronov v snovi „odbijajo“ v vse smeri (= sipanje)
- Da lahko delce snovi razločimo na sliki, morajo biti razdalje med njimi primerljive ali večje od valovne dolžine svetlobe
→ Z vidno svetlobo ne ločimo struktur pod 200 nm
- Za opazovanje molekularnih struktur potrebujemo svetlobo s krajšo valovno dolžino ($\lambda \sim 0,1\text{--}10\text{ nm}$):
 - Rentgenski žarki $\lambda = h c / E$
 - Hitri delci (e, n): $\lambda = h / m v$ (de Broglie)

h .. Planckova konstanta ($6,6 \times 10^{-34}\text{ J s} = 4,1 \times 10^{-15}\text{ eV s}$)
 c .. svetlobna hitrost ($3 \times 10^8\text{ m/s}$)



... z elektronskim mikroskopom

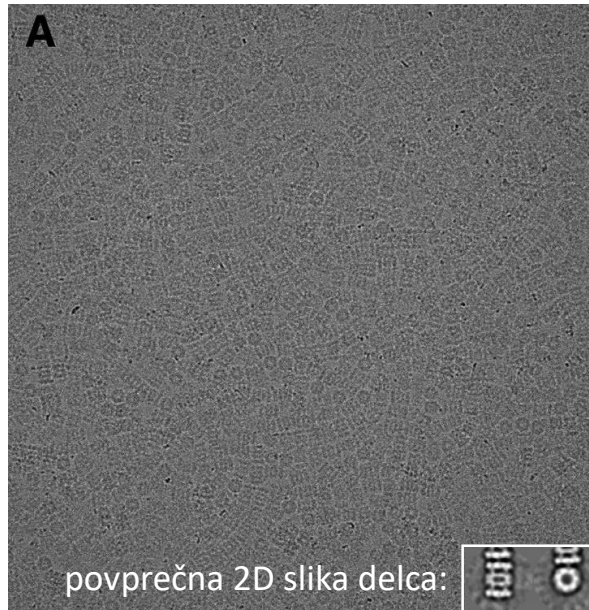
Namesto EM valovanja uporabimo hitre delce, ki se obnašajo podobno!

cryo-TEM

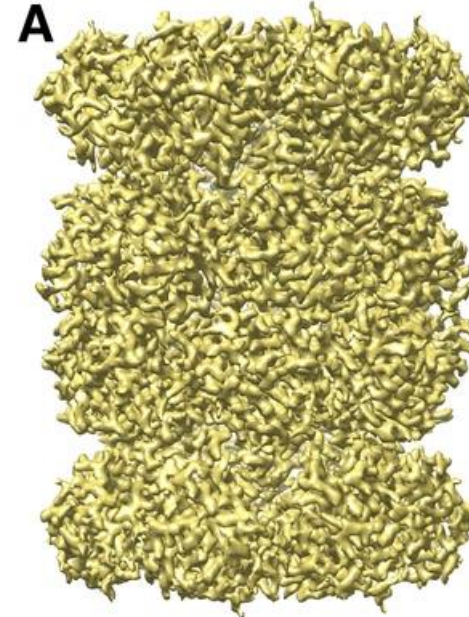


Kemijski Inštitut

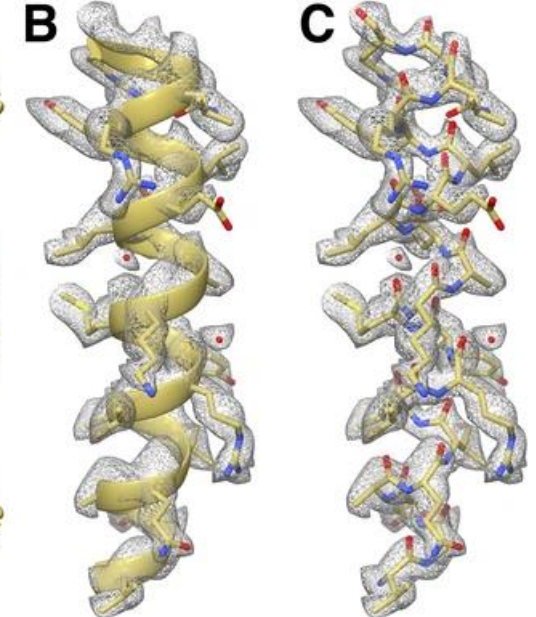
slika



3D elektronska gostota

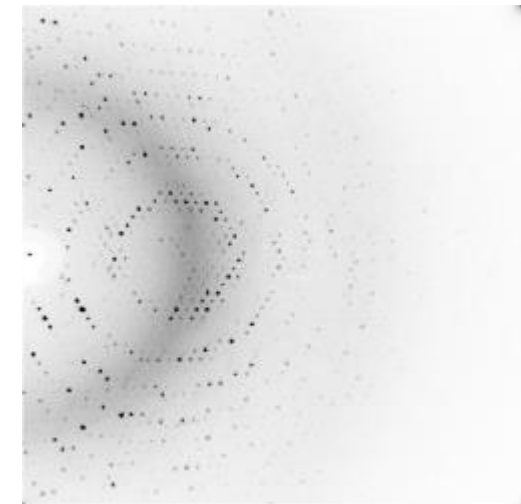
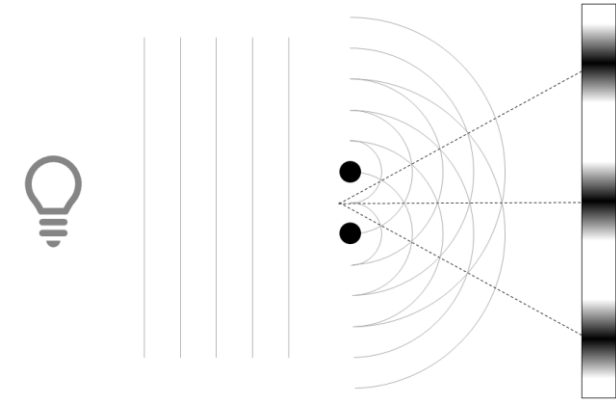


model strukture



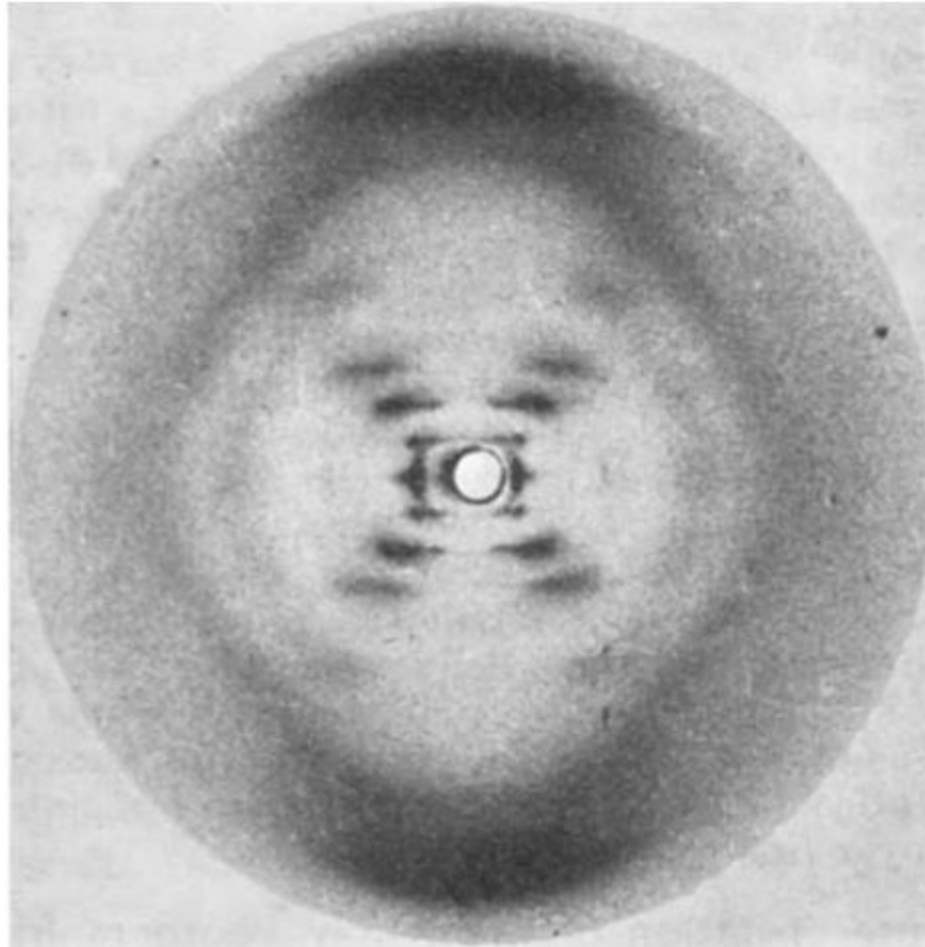
... s sipanjem rentgenske svetlobe

- Pri sipanju svetlobe na več delcih dobimo interferenčni vzorec
- Če se razdalje pravilno ponavljajo (kristal), so interferenčne ojačitve ostre
- Kakšna elektronska struktura je povzročila izmerjen interferenčni vzorec?

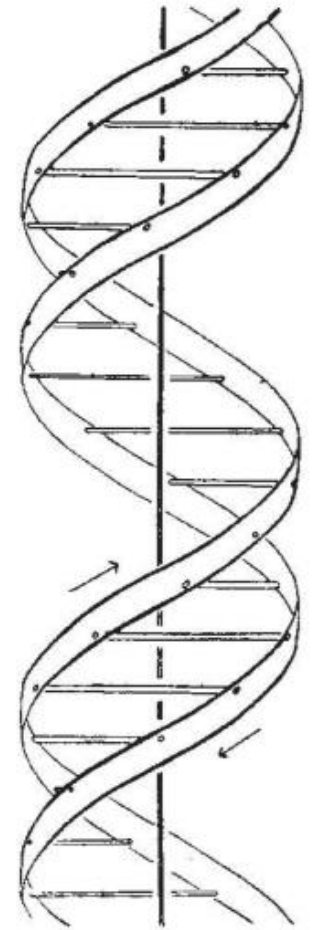


... s sipanjem rentgenske svetlobe

- Rentgenski interferenčni vzorec na kristalu DNA razkrije obliko dvojne vijačnice!
- **Rentgenska kristalografija** je do sedaj najuspešnejša metoda za določanje struktur proteinov!
 - + doseže ločljivost pod 0,1 nm
 - potrebna kristalizacija vzorca (red dolgega dosega ojači signal)



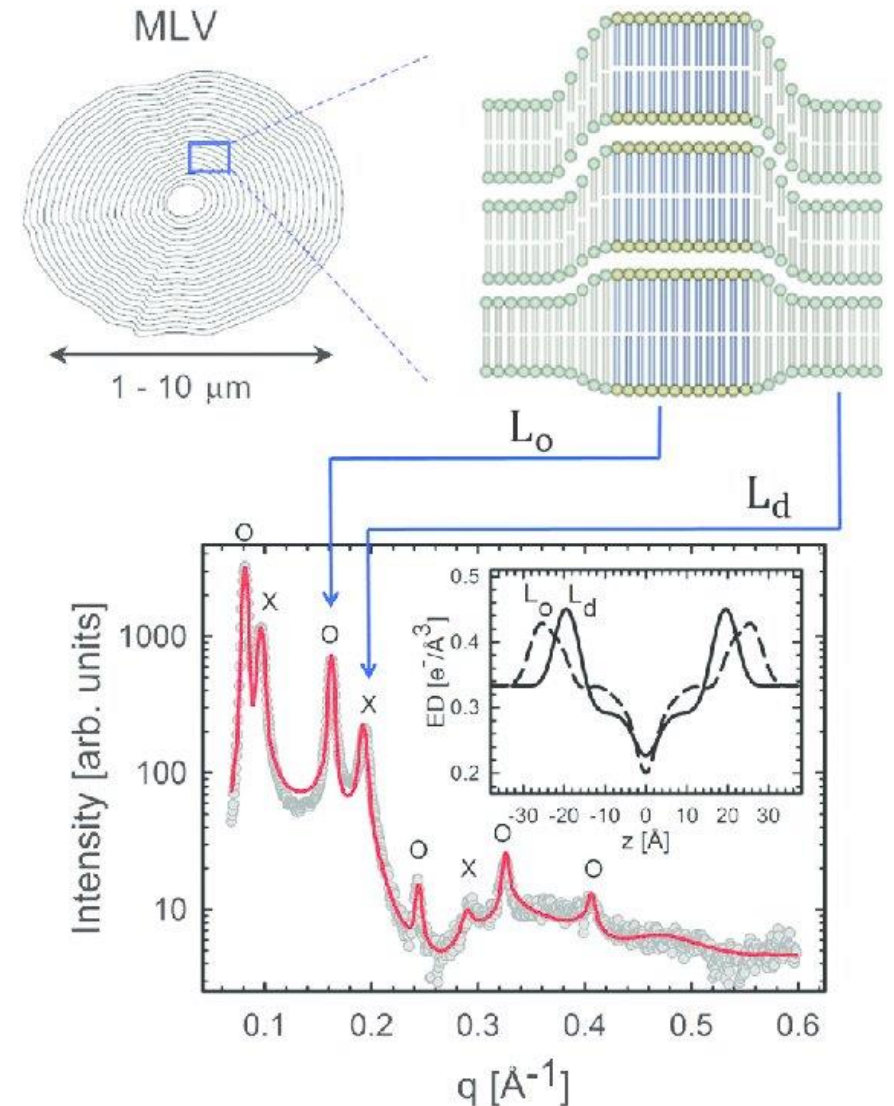
Franklin & Gosling *Nature* 1953



Watson & Crick *Nature* 1953

... s sipanjem rentgenske svetlobe pod ozkimi koti (SAXS)

- Ponavljajoče se dimenzije molekularnih struktur povzročijo interferenčne vrhove tudi v raztopini.
- Iz izračunanega profila elektronske gostote določimo značilne razdalje:
 - velikost micel
 - debelina membran
 - povprečne razdalje med molekulami
 - ...
- Podobno tudi z nevtroni (SANS)



... s spektroskopijami

- Merimo prenos energije vzbujenega stanja z enega dela molekule na drugi del
- Z EM valovanjem v vidnem, IR, MW ali RF delu spektra lahko merimo razdalje v molekuli z natančnostjo pod 0,1 nm!
- primeri:
 - FRET (fluorescence resonance energy transfer)
 - NOE (nuclear Overhauser effect)
 - ELDOR (electron-electron double resonance)

