

A fluorescence microscopy image showing a complex biological structure. The structure is primarily outlined in a bright purple/magenta color, with a central region densely packed with small, bright green fluorescent spots. The background is dark, making the signals stand out.

# Opazovanje struktur

1. del - Optična mikroskopija

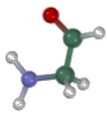
# Smiling Face



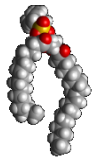
10 Centimeters

# Velikostne skale življenja

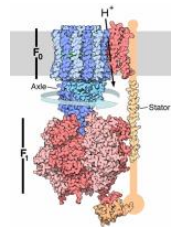
Medatomske vezi



Lipidi



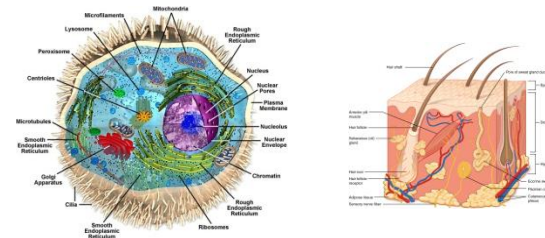
Proteini



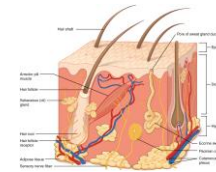
Kromosom



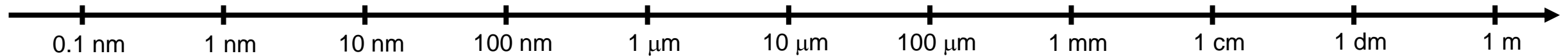
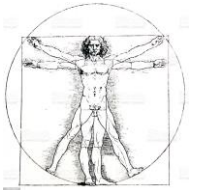
Evkarionska celica



Tkiva

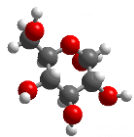


Telo



velikost

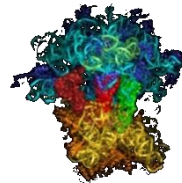
Monosaharidi,  
aminokisljine



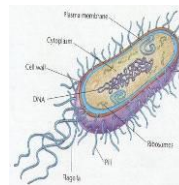
Trans-  
membranska  
vijačnica



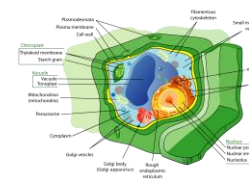
Ribosom



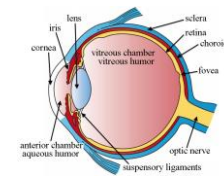
Bakterija



Rastlinska celica

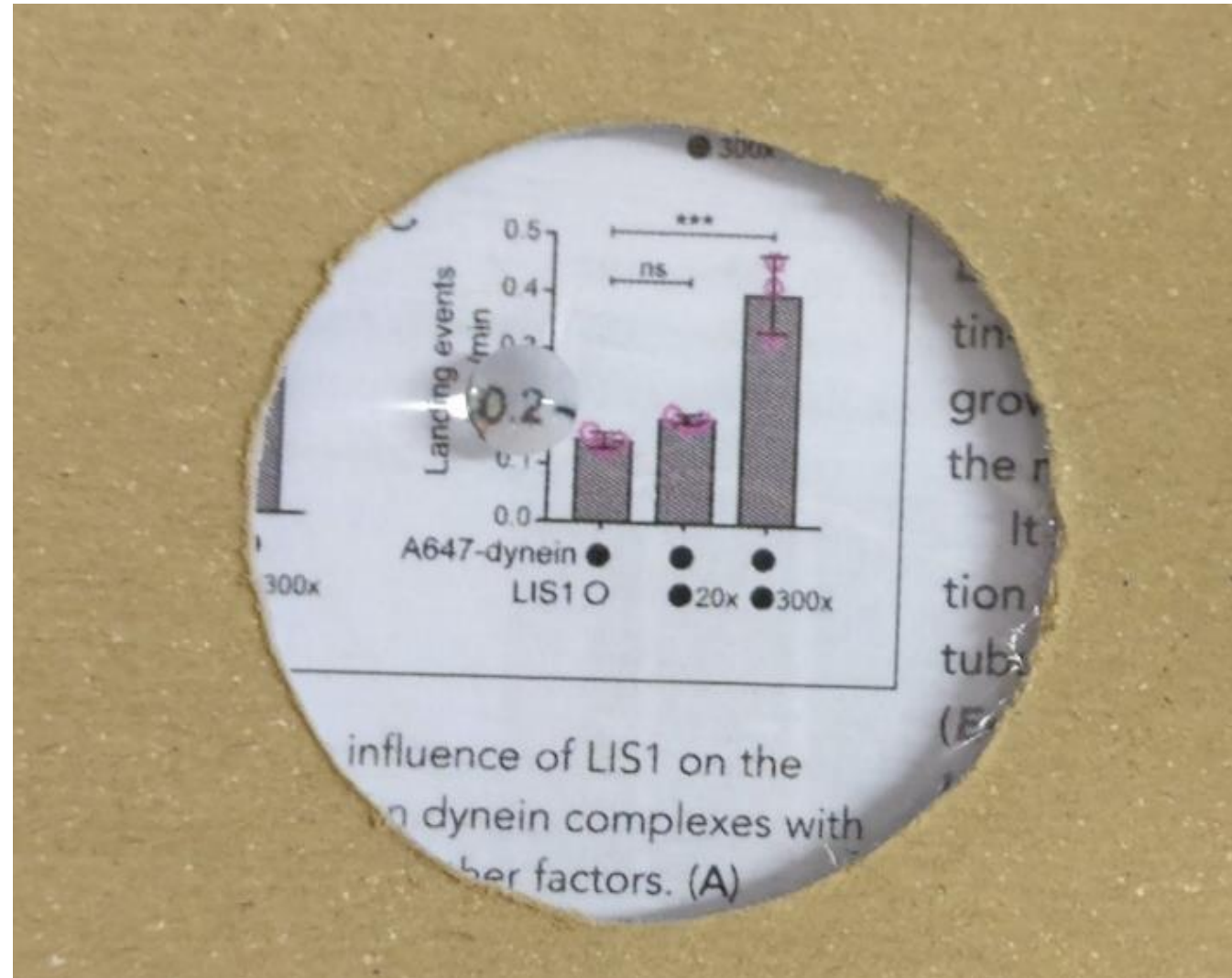


Organi



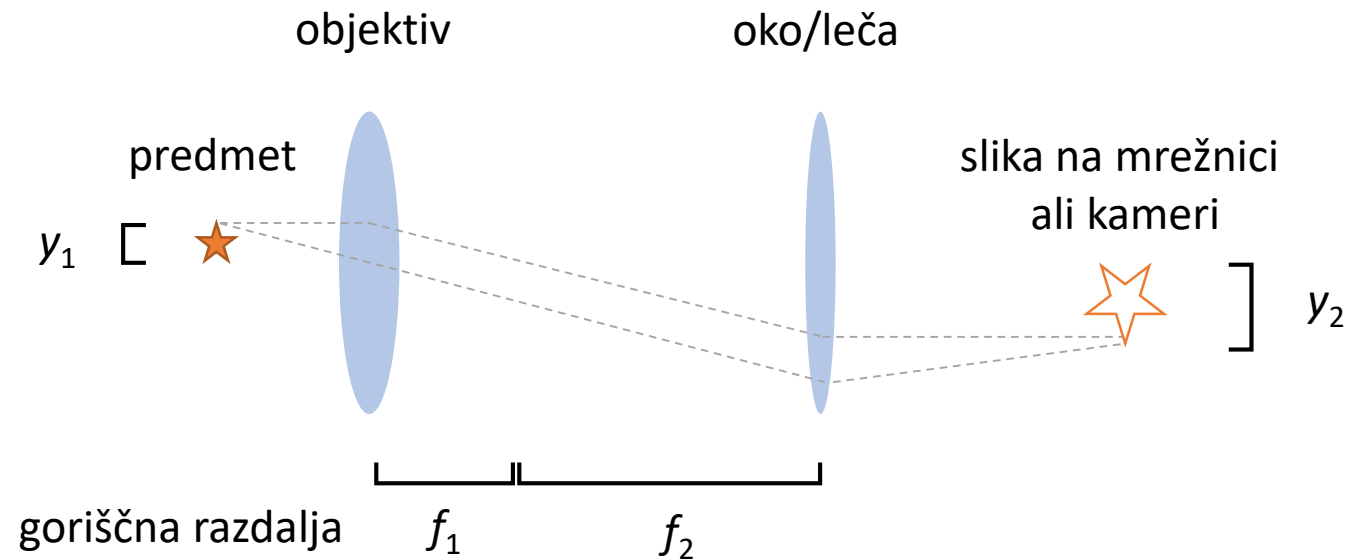
vidno s prostim očesom

# Kako lahko vidimo majhne stvari?



# Kako povečamo majhne stvari?

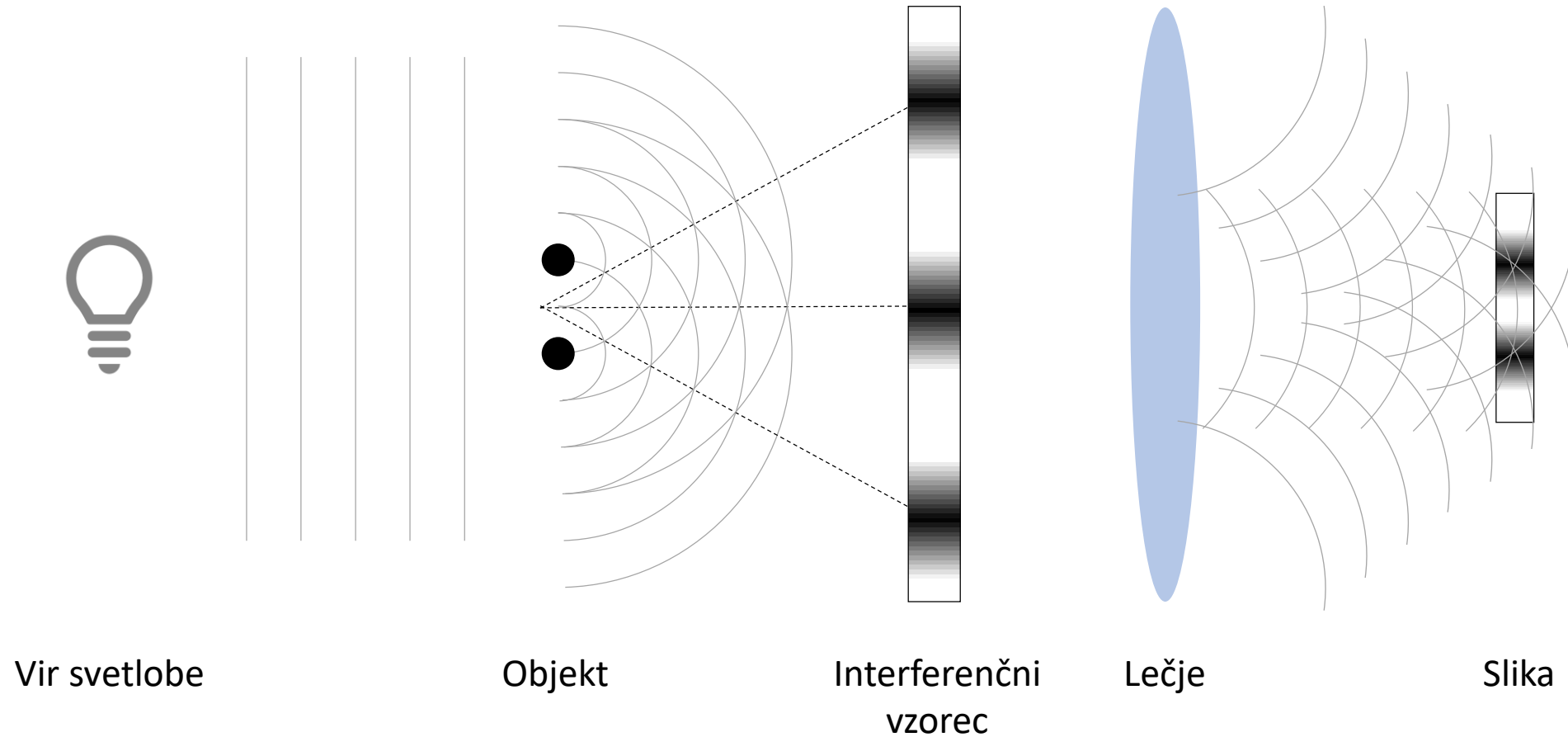
Nastanek slike zaradi loma svetlobe na ukrivljeni površini (geometrijska optika):



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

# Uklon svetlobe nam zamegli sliko

Nastanek slike zaradi uklona svetlobe:



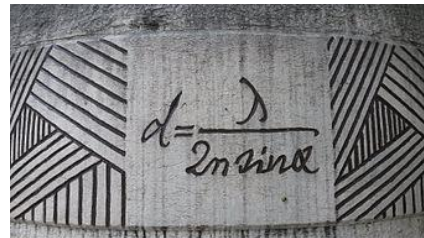
# Kako podrobno vidimo majhne stvari?

- 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**.

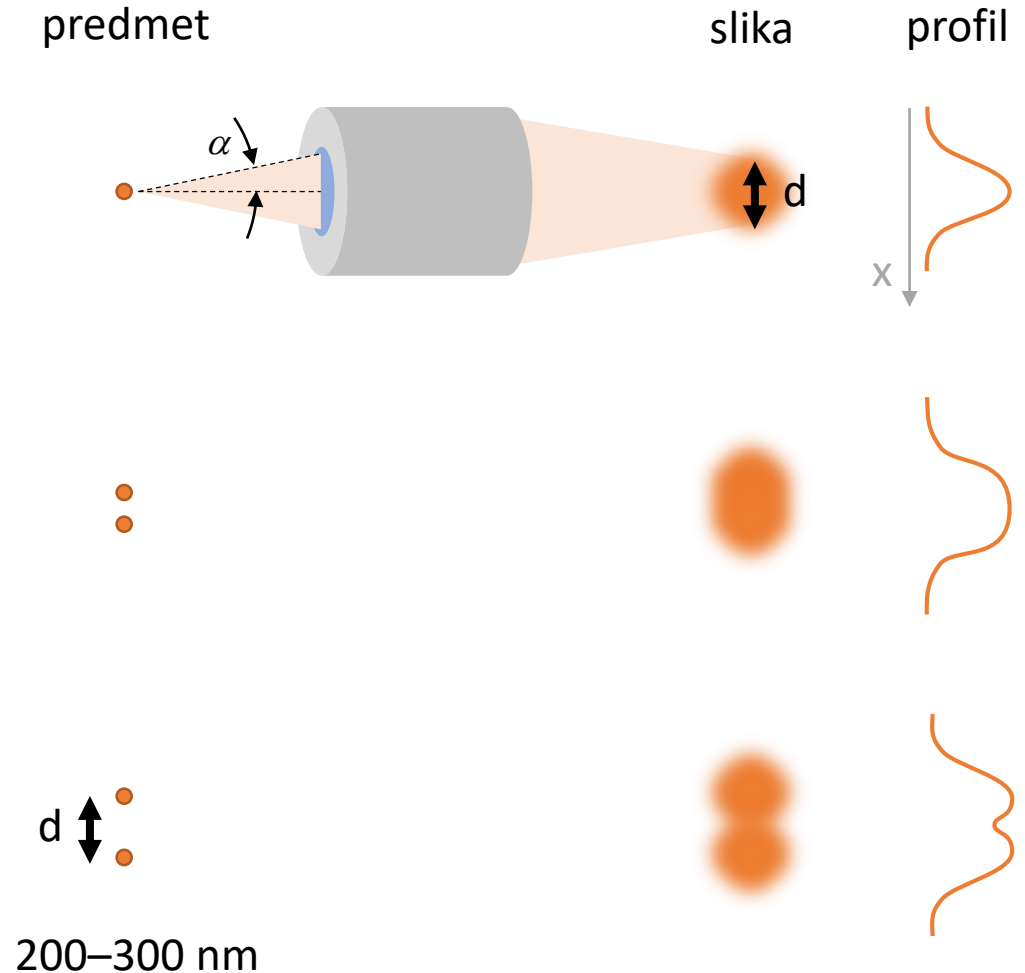
Ta je odvisna od:

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

Ernst Abbe

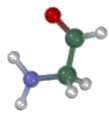


- **Z optičnim mikroskopom lahko razločimo le podrobnosti večje od  $d$**  (v najboljšem primeru  $\lambda / 2$ , t.i. uklonska limita)!

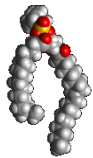


# Velikostne skale življenja

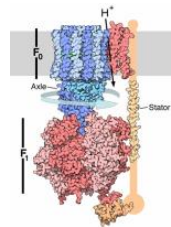
Medatomske vezi



Lipidi



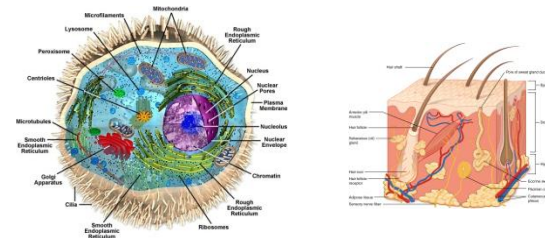
Proteini



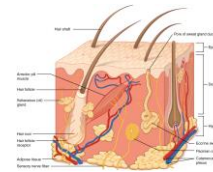
Kromosom



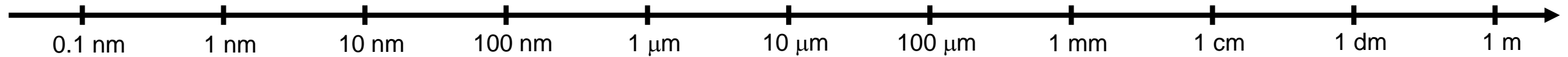
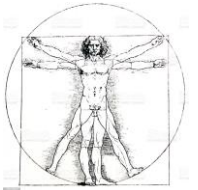
Evkarionska celica



Tkiva

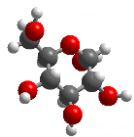


Telo

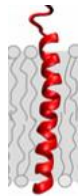


velikost

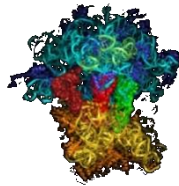
Monosaharidi,  
aminokisljine



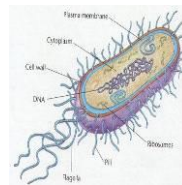
Trans-  
membranska  
vijačnica



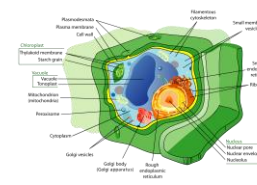
Ribosom



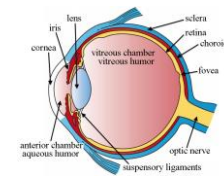
Bakterija



Rastlinska celica



Organi



s svetlobnim mikroskopom

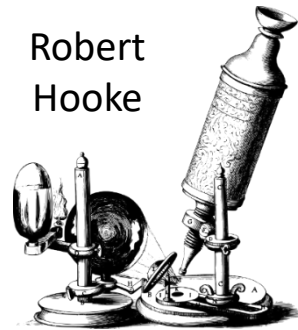
vidno s prostim očesom

# Kratka zgodovina svetlobne mikroskopije

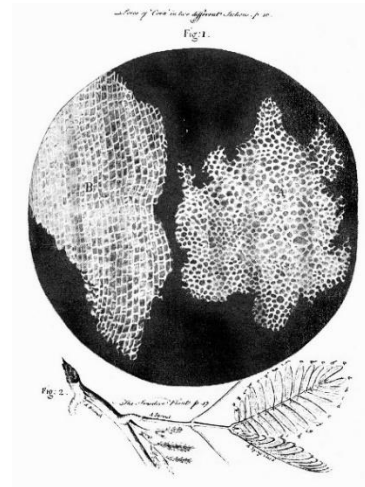
17. stol.



Leeuwenhoek  
Microscope  
(circa late 1600s)



Robert  
Hooke



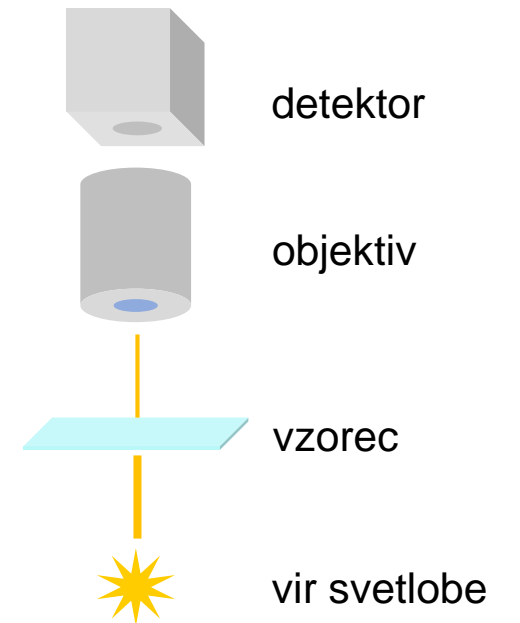
20. stol.



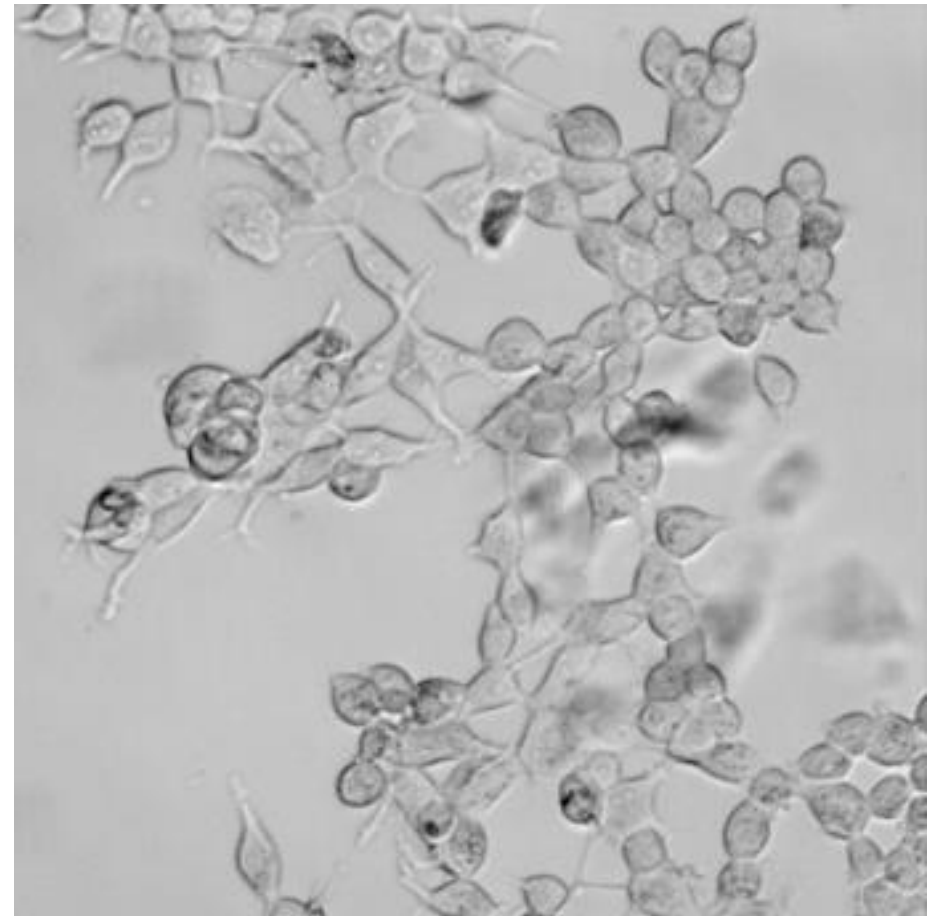
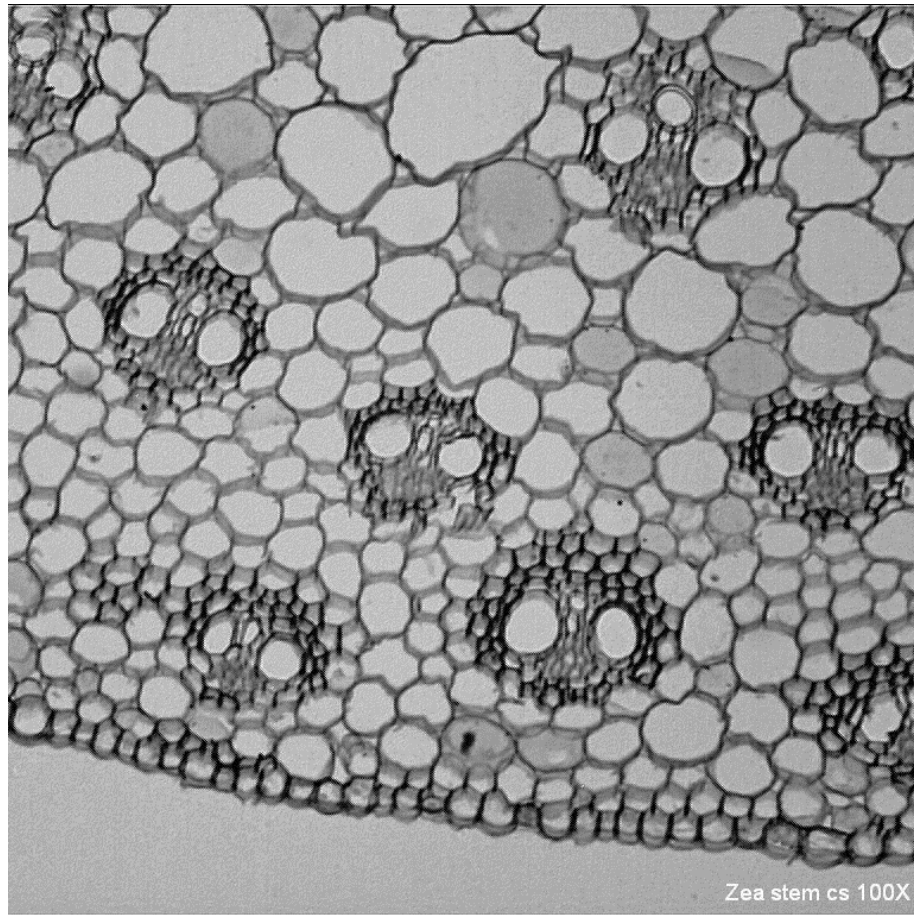
21. stol.



## Zgradba presevnega mikroskopa

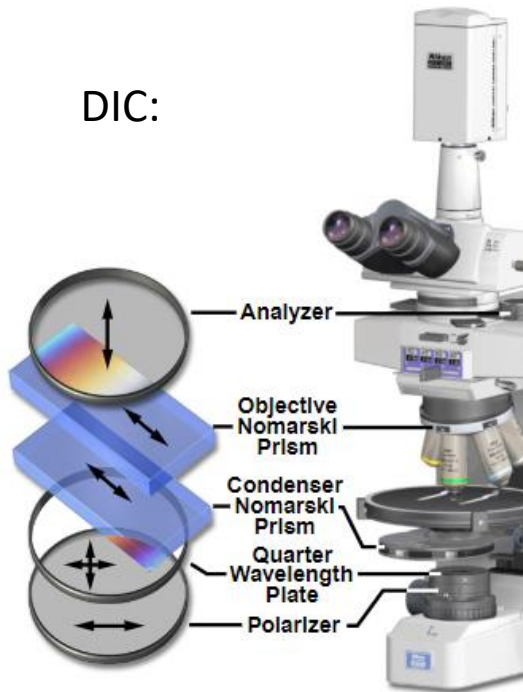


Kaj vidmo na teh slikah?

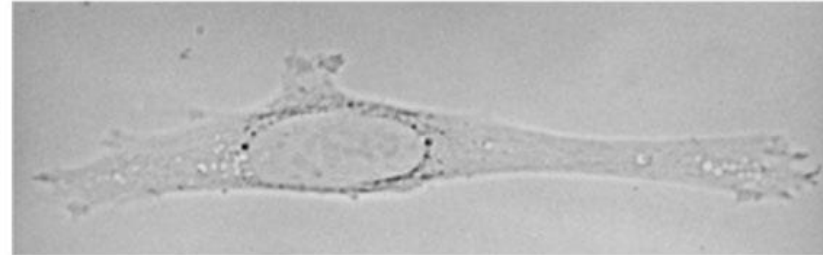


# Dve nadgradnji presevnega mikroskopa

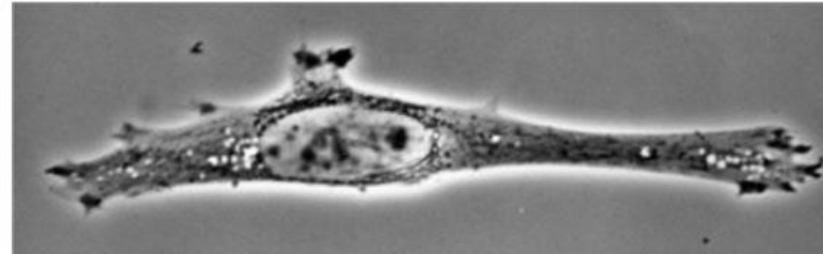
DIC:



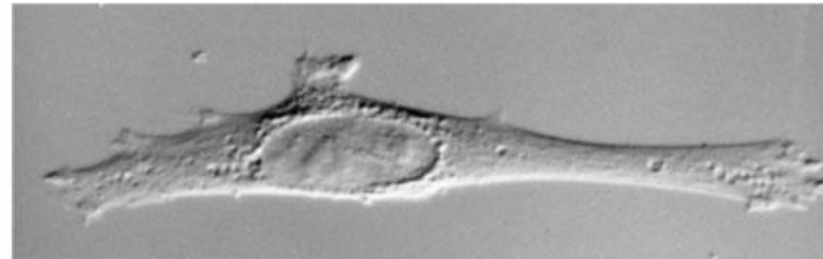
Bright Field



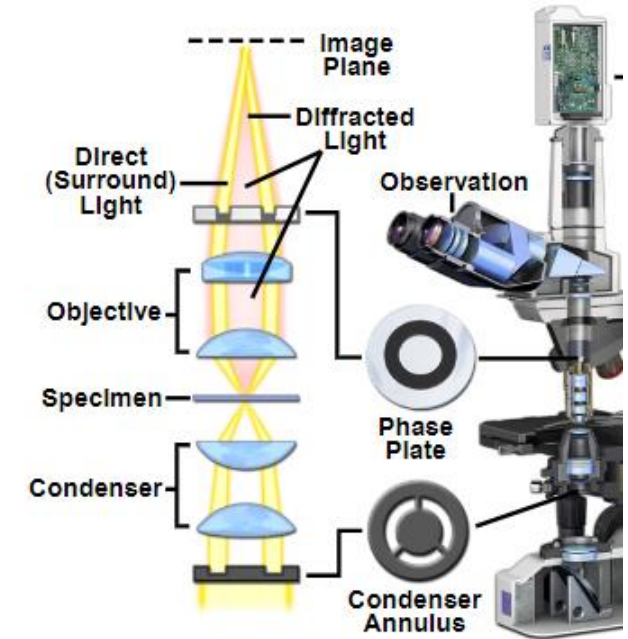
Phase Contrast



Differential Interference Contrast

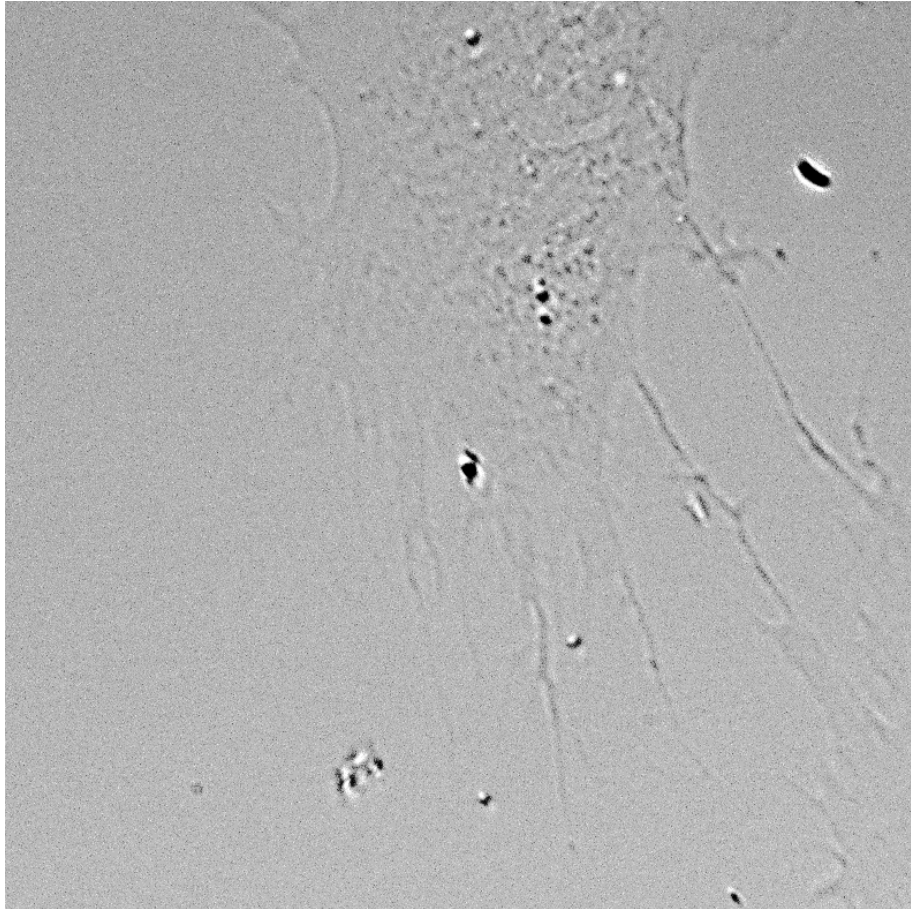


PhC:

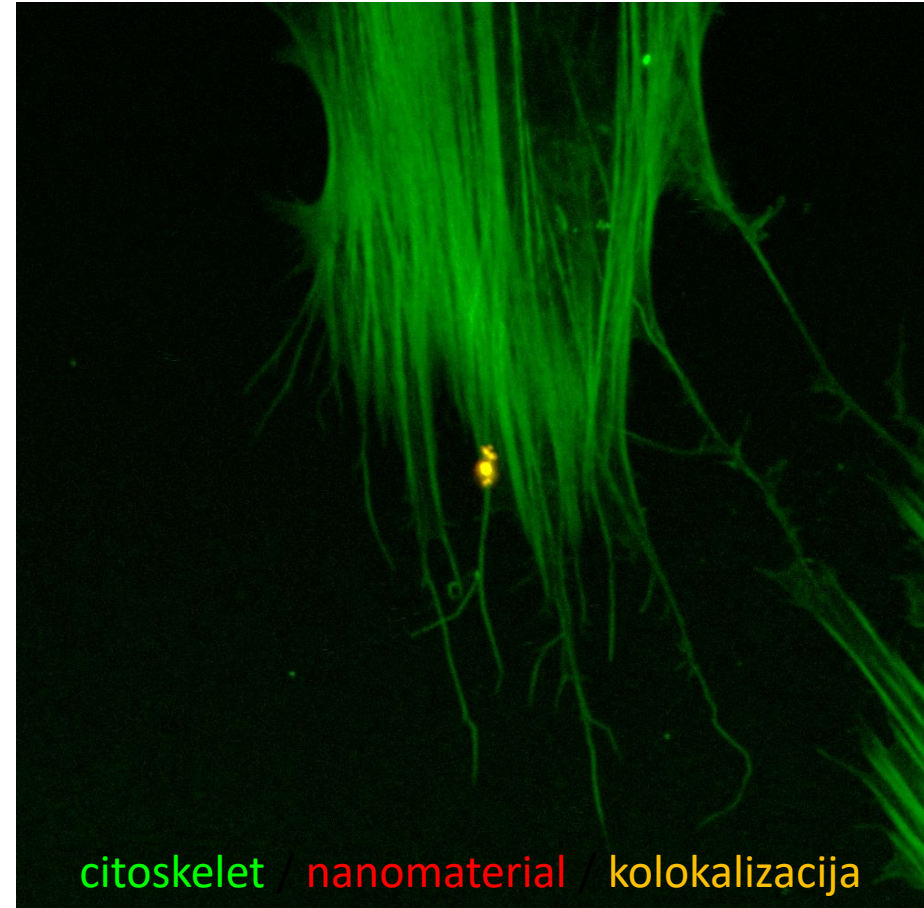


# V čem se razlikujeta sliki iste celice?

Presevna mikroskopija



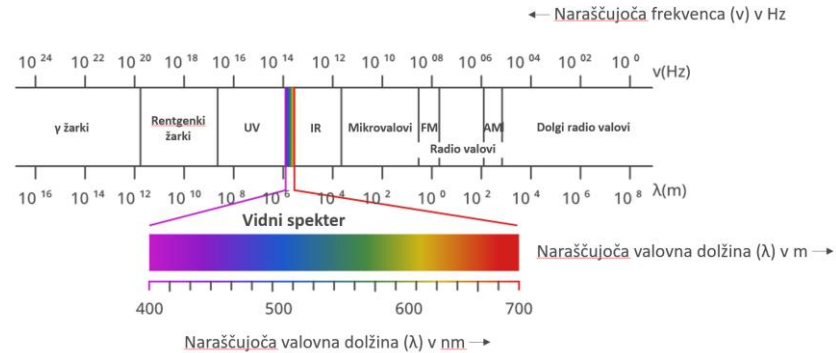
Fluorescenčna mikroskopija



# Fluorescenca: revolucija kontrasta

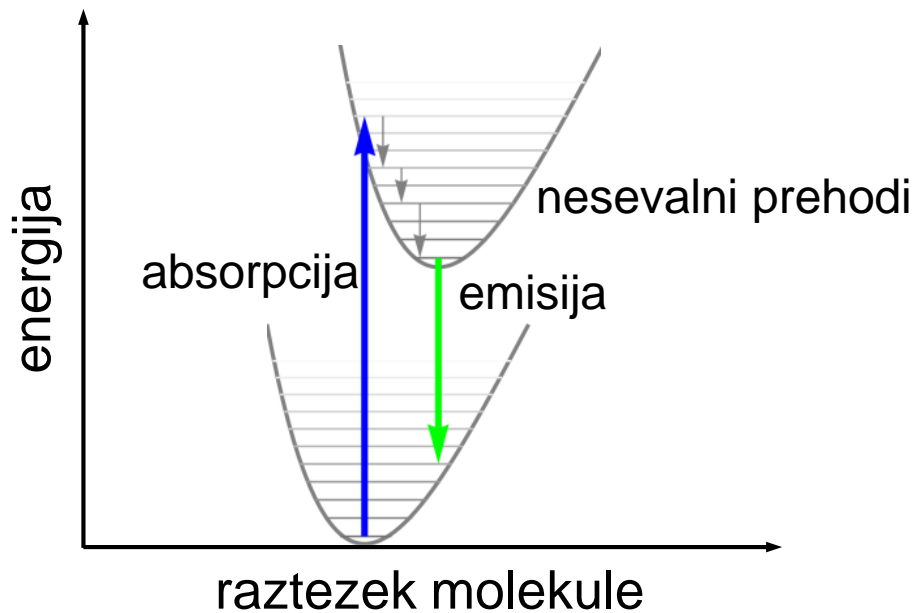


# Osnove fluorescence

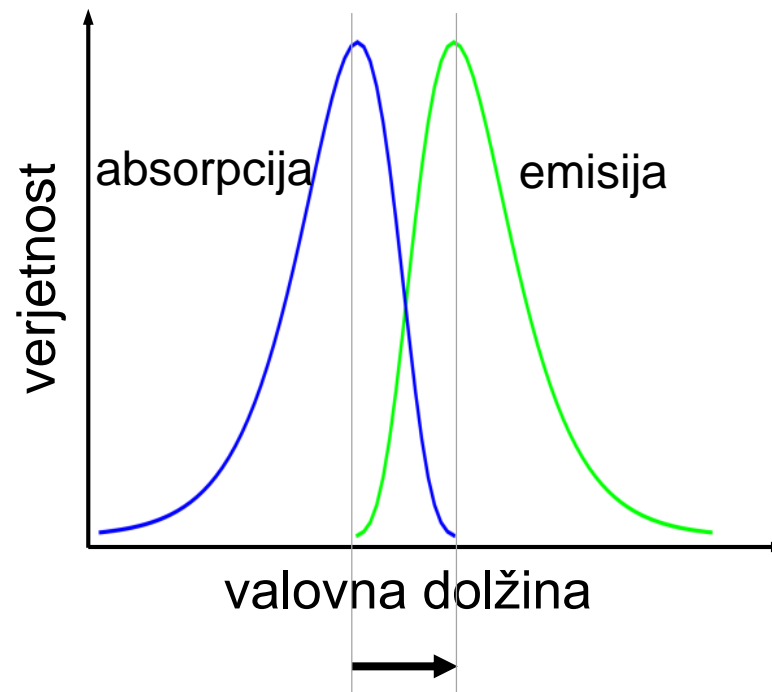


## Spekter svetlobe

## Energijski prehodi elektrona

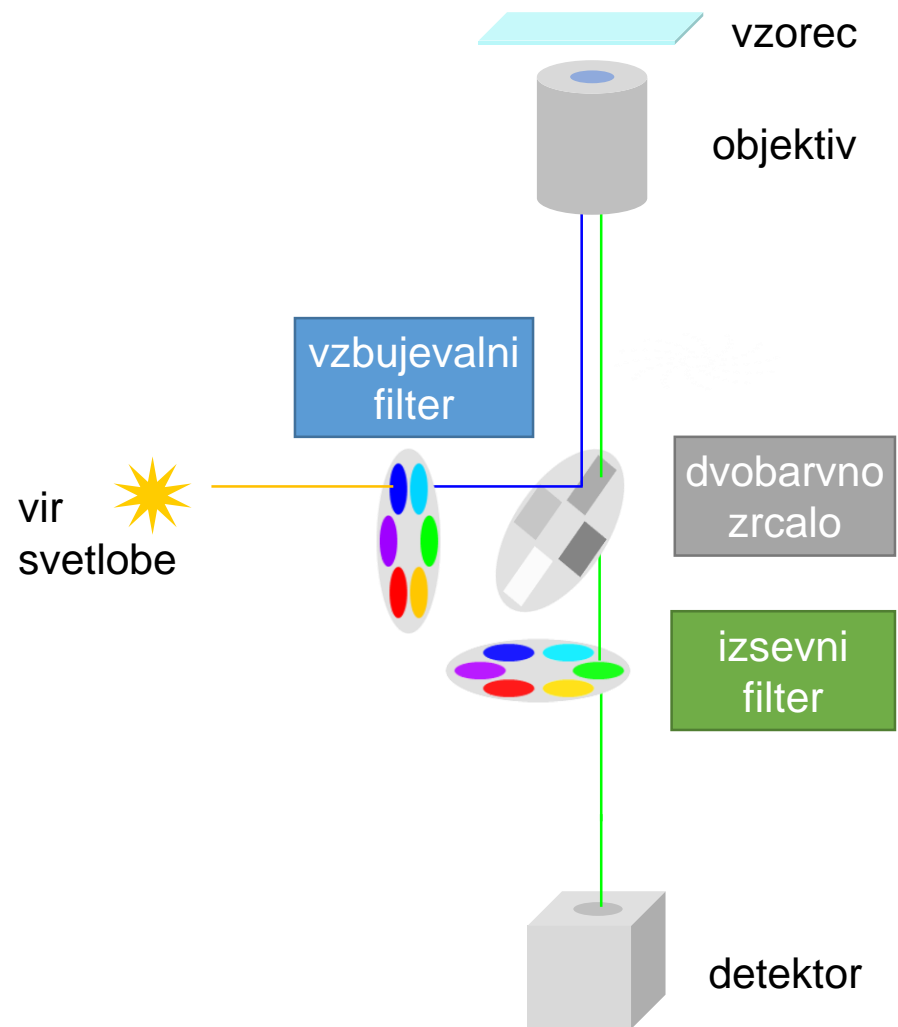


## Diagram Jablonskega

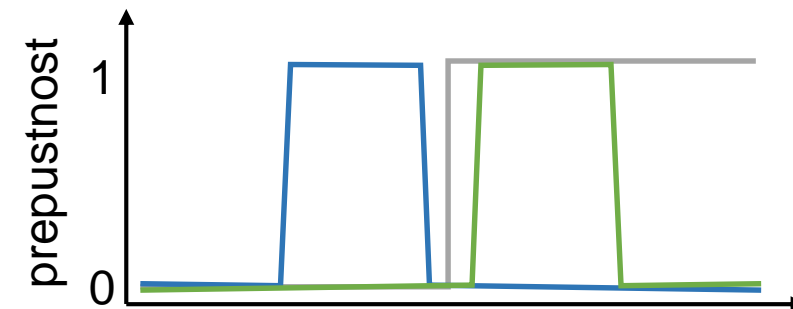
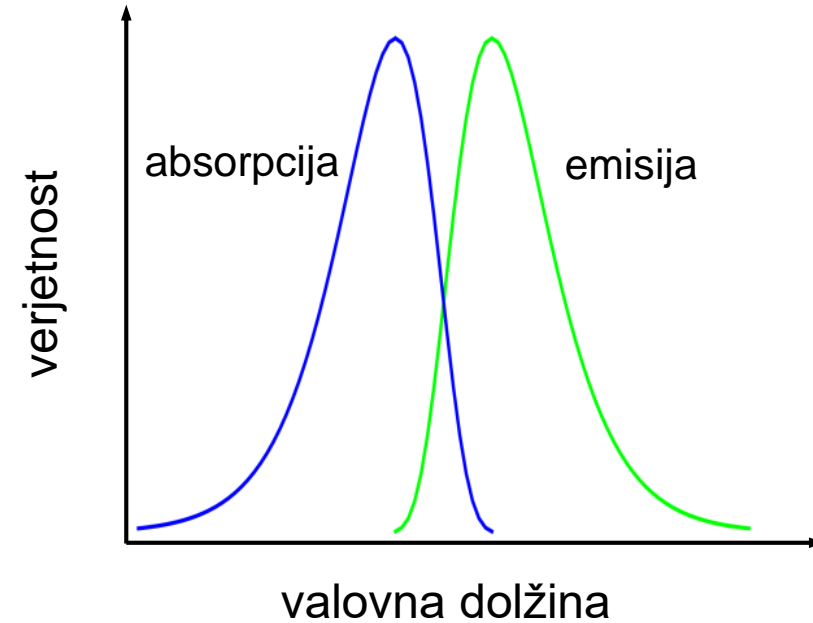


## Stokesov premik

# Fluorescenčni mikroskop



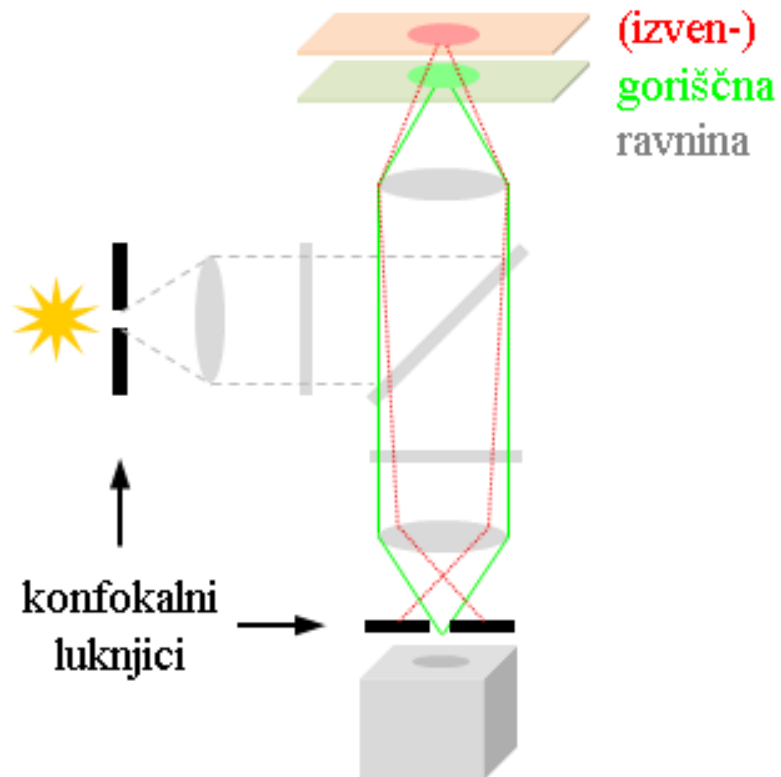
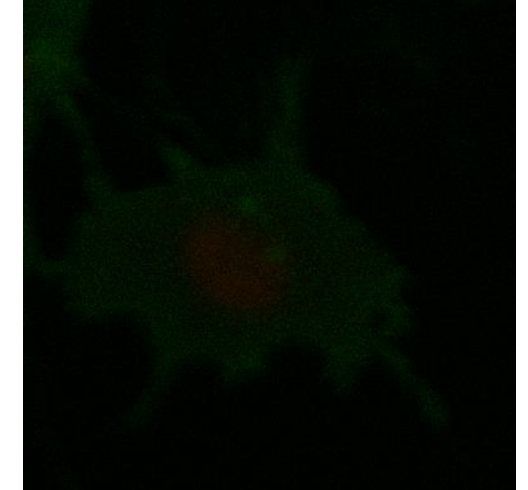
## Spekter svetlobe



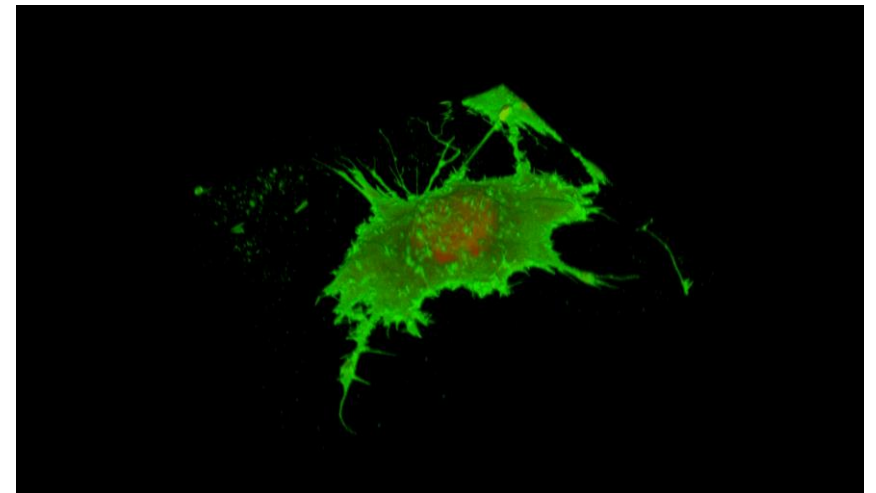
# Konfokalni fluorescenčni mikroskop

- Omogoča optično rezinjenje

Niz slik po globini:



3D rekonstrukcija:



# Superločljiv fluorescenčni mikroskop

Lokalizacijska  
mikroskopija  
(PALM, STORM)

objekt      slika      =      odčitek



=



STED  
mikroskopija



+



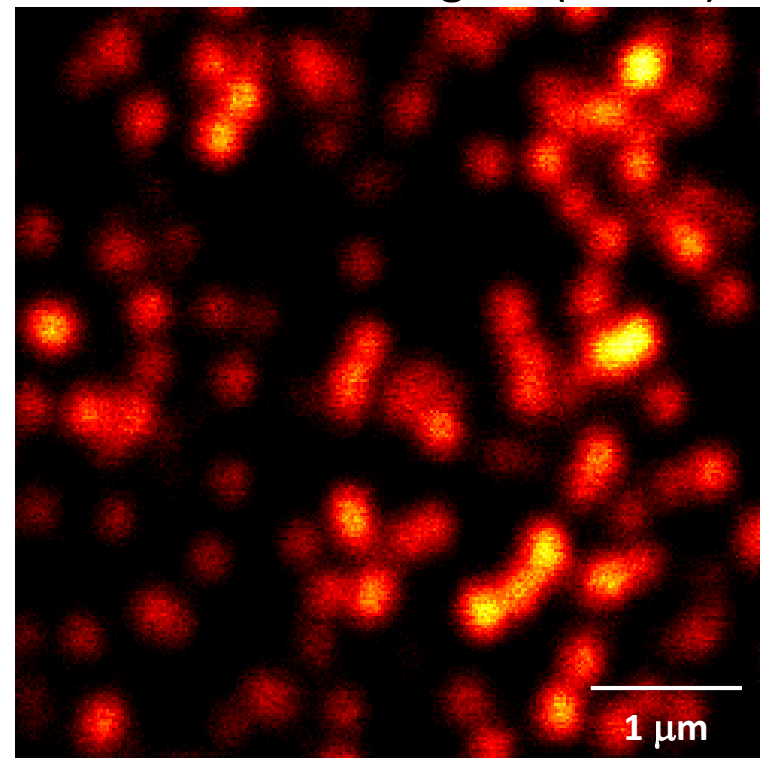
=



*on*

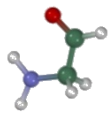
*off*

Fluorescenčne kroglice (40 nm)

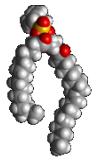


# Velikostne skale življenja

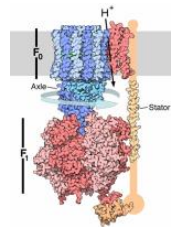
Medatomske vezi



Lipidi



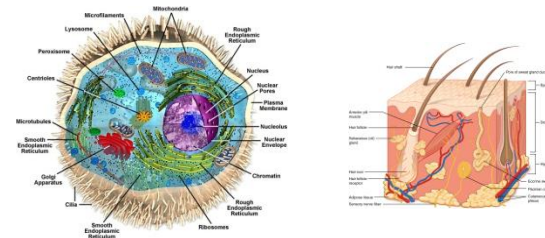
Proteini



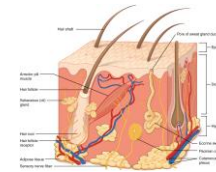
Kromosom



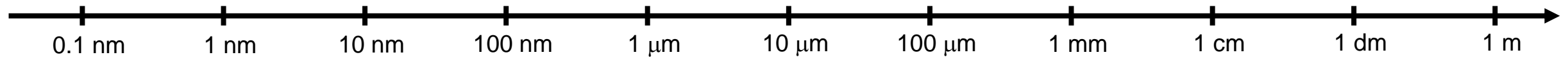
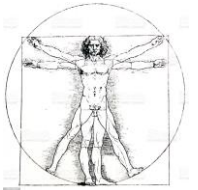
Evkarionska celica



Tkiva

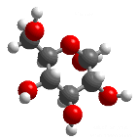


Telo



velikost

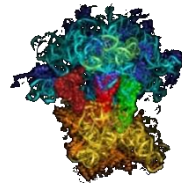
Monosaharidi,  
aminokisljine



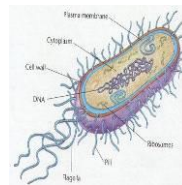
Trans-  
membranska  
vijačnica



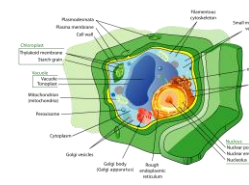
Ribosom



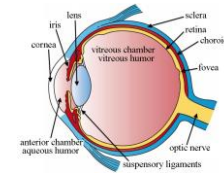
Bakterija



Rastlinska celica



Organi



← s super-ločljivim m.

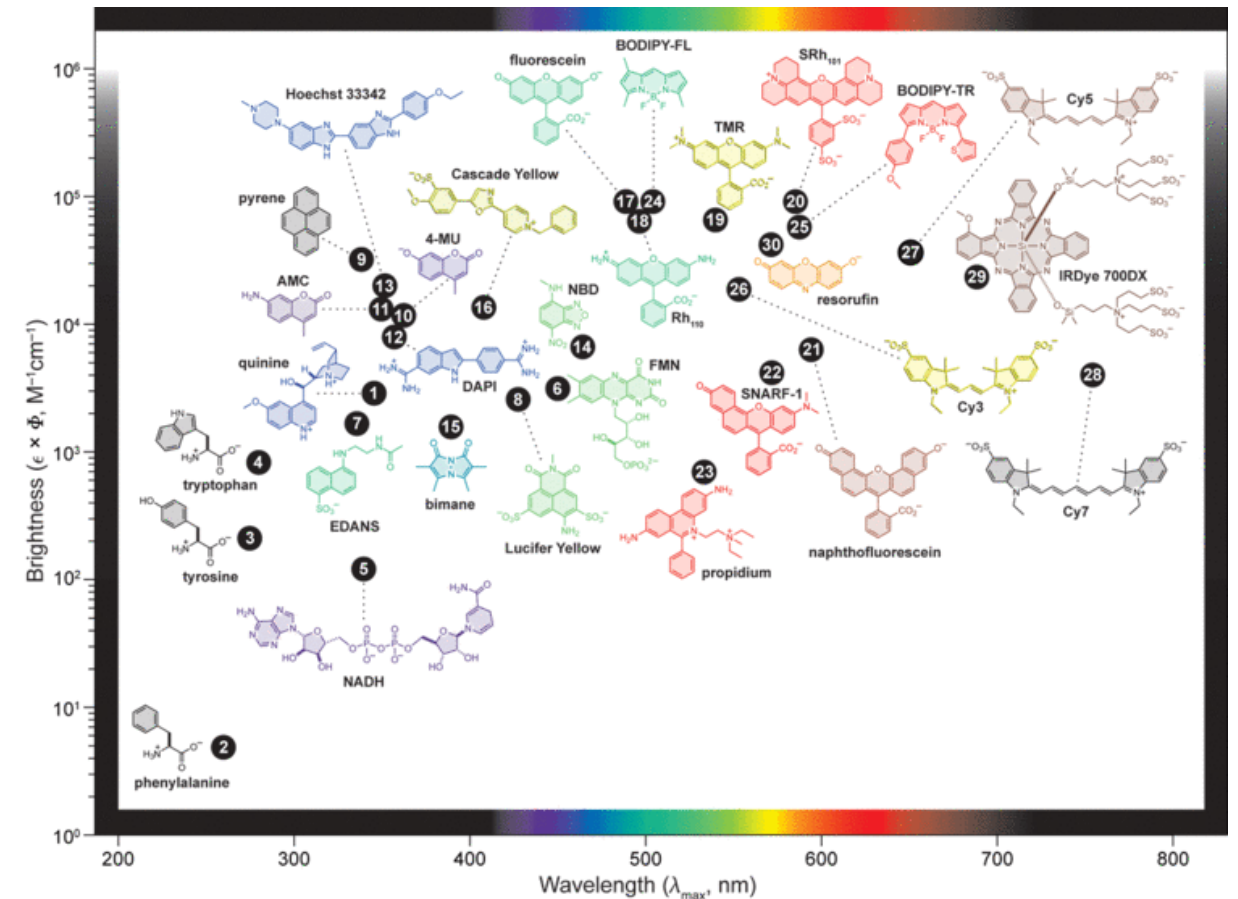
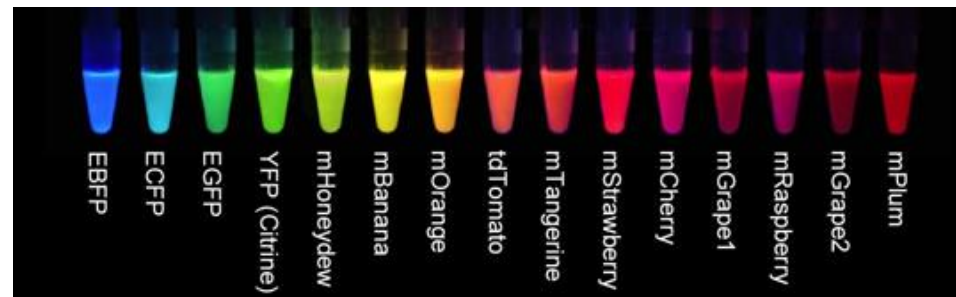
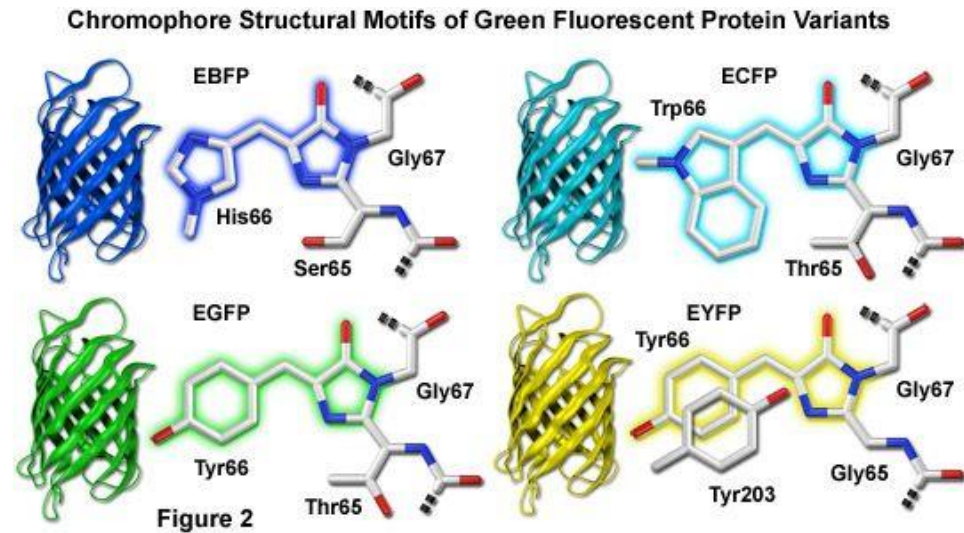
← s svetlobnim mikroskopom

← vidno s prostim očesom

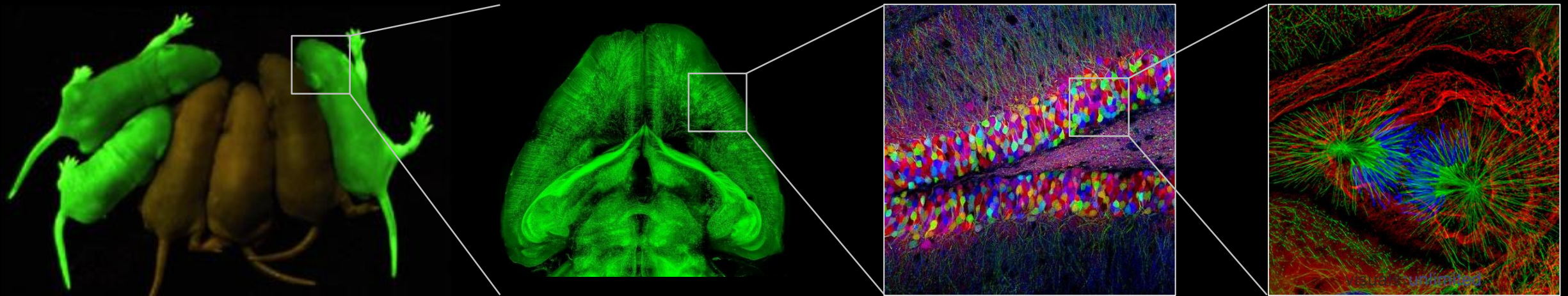
# Fluorescenčna barvila

## 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

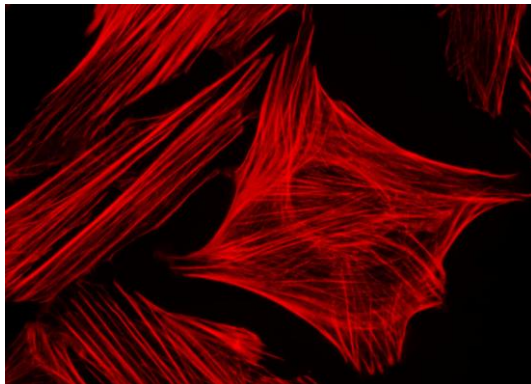
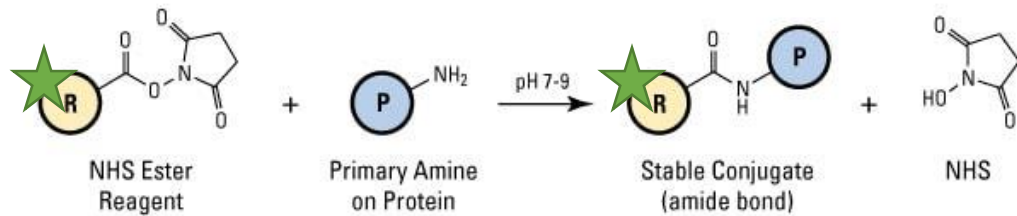
$10^{-8}$  m

$10^{-9}$  m

# Fluorescenčno označevanje proteinov

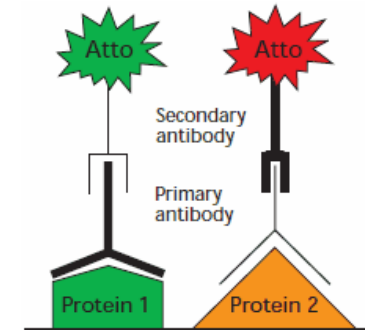
## Nespecifično

Označevanje izoliranih proteinov  
(npr. protiteles)



## Specifično

Fluorescenčno označena protitelesa



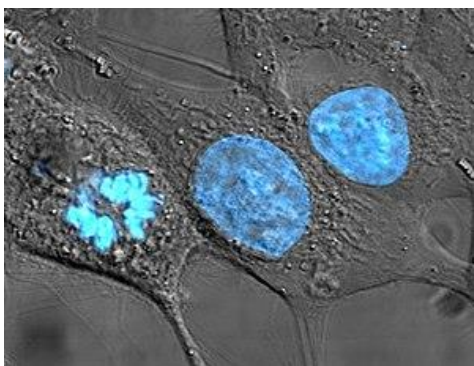
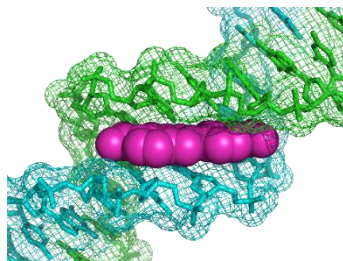
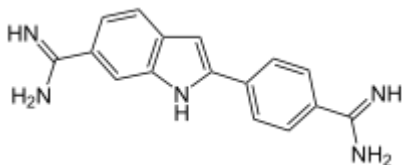
Ekspresija fluorescenčnih proteinov v celici



# Fluorescenčno označevanje DNA/RNA

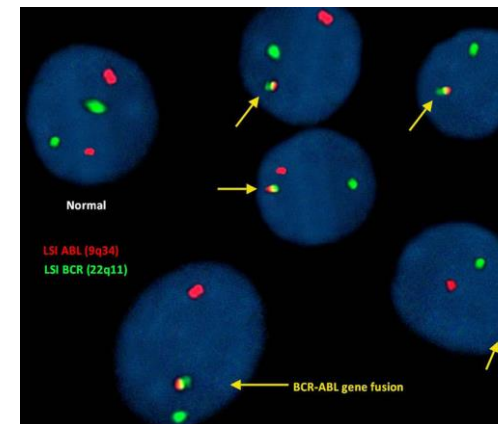
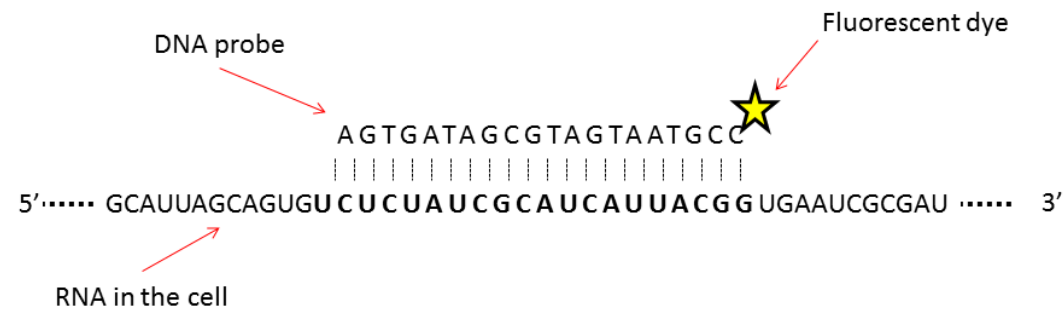
## Nespecifično

DAPI, Hoechst, ...



## Specifično

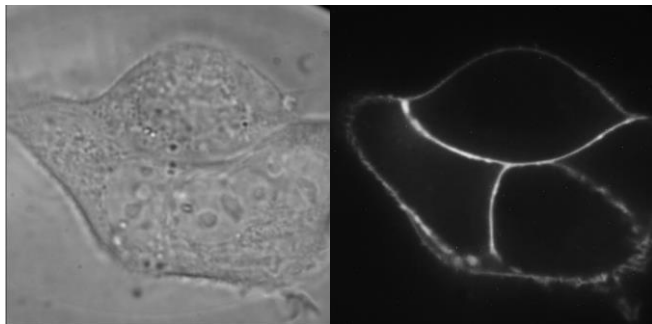
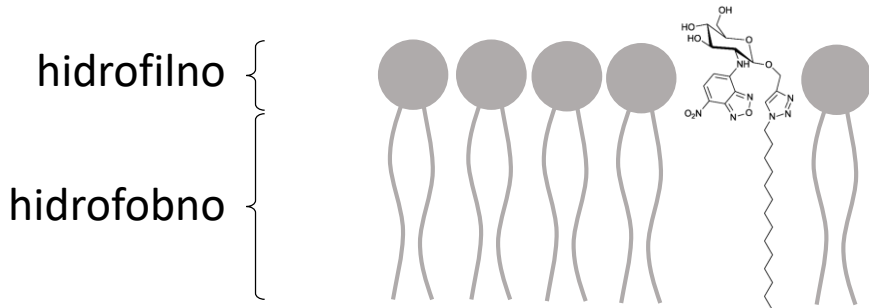
Fluorescence in situ hybridization (FISH)



# Fluorescenčno označevanje lipidov

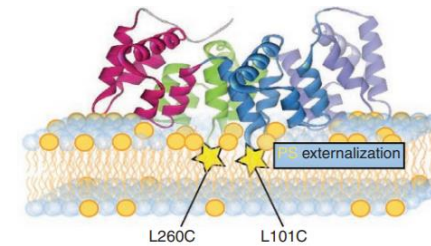
## Nespecifično

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

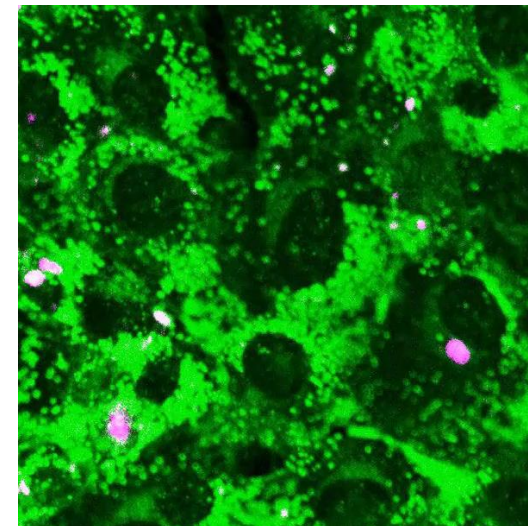


## Specifično

Vezava na izbrano vrsto lipidov (fosfatidilserin)



Kim *Nature Protocols* 2010



# Fluorescenčná mikroskopija


Kontrast + špecifičnost

konfokálne STED

1  $\mu\text{m}$

# Vaje na IJS: sreda, 22. 4. 2026

- 2 skupini
- Začetek ob 11.00 / 13.00.
- 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: Hana Kokot, Boštjan Kokot
- Vsaka skupina pripravi kratko predstavitev (cca 10 min), pri tem sta vam koordinatorja vaj na voljo še eno dodatno uro (se sami dogovorite za termin)
- Predstavitve 8. 5. 2026

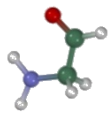


# Določanje molekularnih struktur

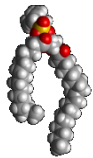
2. del - elektronska mikroskopija, sipanja, spektroskopije

# Kako lahko opazujemo še manjše strukture?

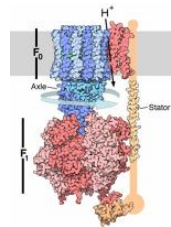
Medatomske vezi



Lipidi



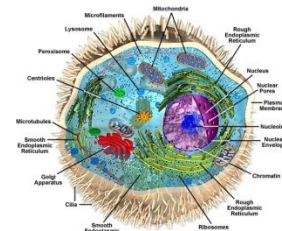
Proteini



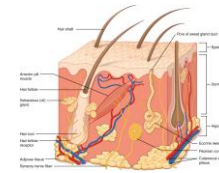
Kromosom



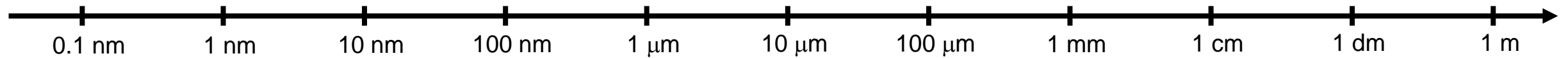
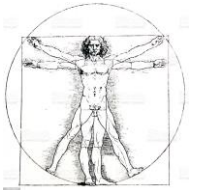
Evkarionska celica



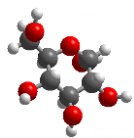
Tkiva



Telo



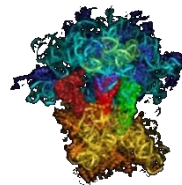
velikost



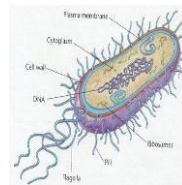
Monosaharidi,  
aminokisljine



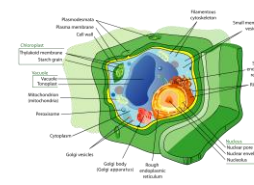
Trans-  
membranska  
vijačnica



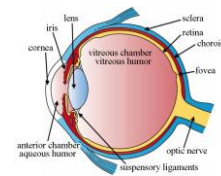
Ribosom



Bakterija



Rastlinska celica



Organi



← ?

← s super-ločljivim m.

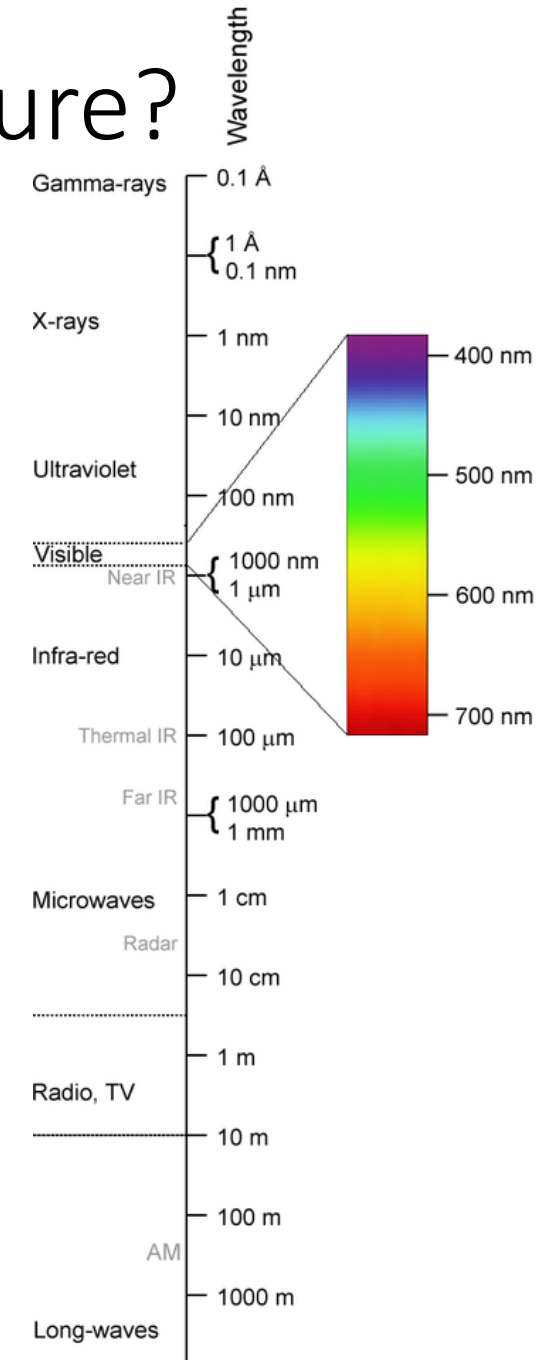
← s svetlobnim mikroskopom

← 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

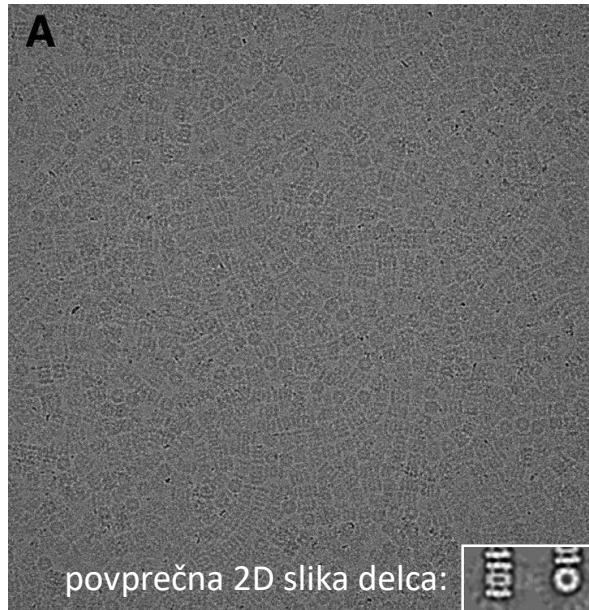
Namesto EM valovanja uporabimo hitre delce, ki se obnašajo podobno!

cryo-TEM

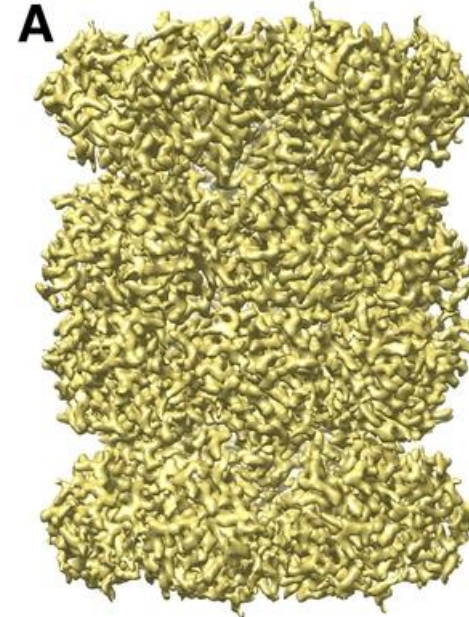


Kemijski Inštitut

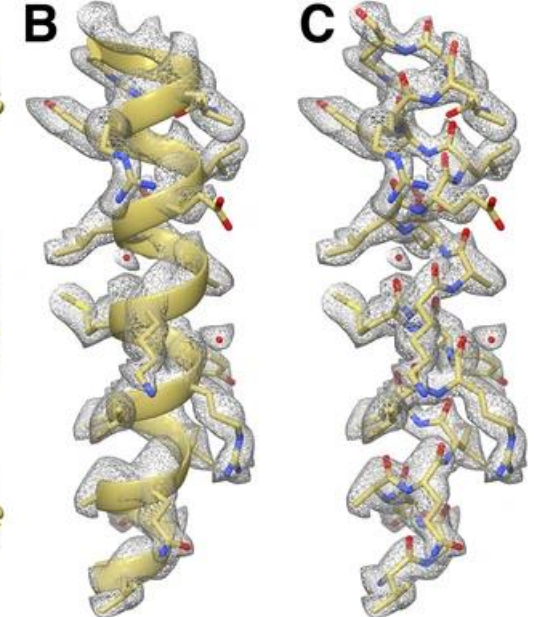
slika



3D elektronska gostota



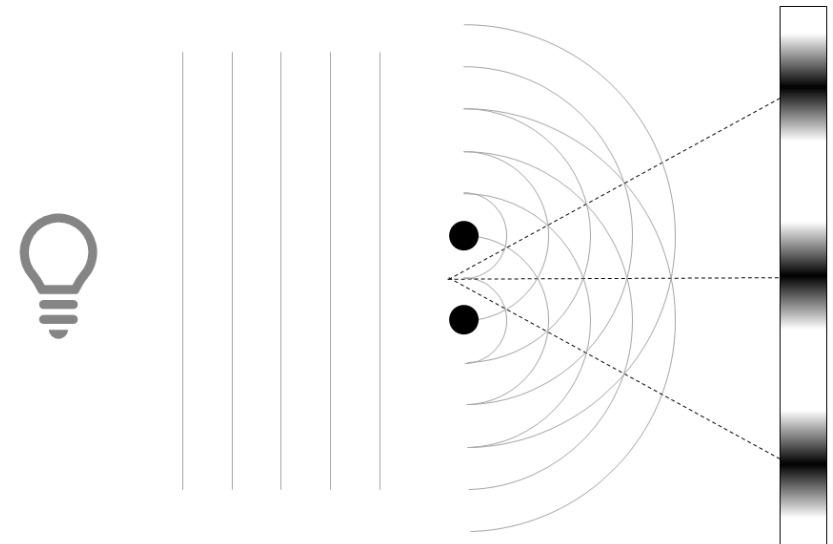
model strukture



# ... s sipanjem rentgenske svetlobe

- Za rentgensko svetlobo ne poznamo leč, da bi ustvarili mikroskopsko sliko.
- Obliko objekta moramo 'uganiti' iz interferenčnega vzorca sipane rentgenske svetlobe

...



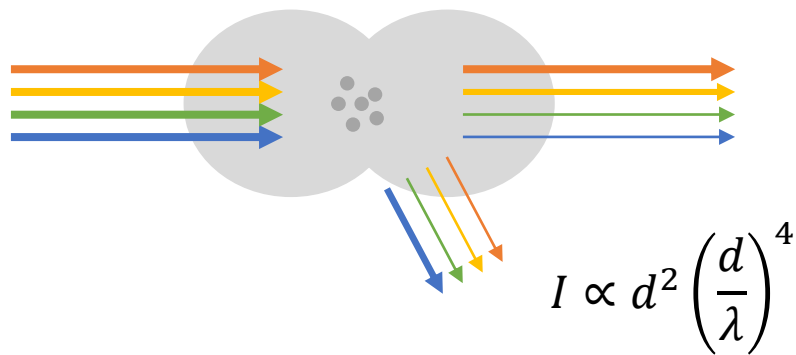
# (o sipanju svetlobe)

Svetloba lahko zaradi delcev spremeni smer svojega potovanja!

Majhni delci ( $d \ll \lambda$ ): Rayleigh-jevo sipanje

- močna odvisnost od valovne dolžine
- v vse smeri

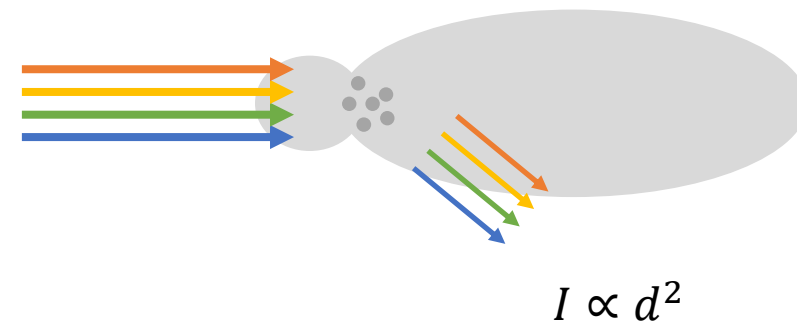
→ modro nebo (rdeč sončni zahod)



Večji delci ( $d > \lambda$ ): Mie-jevo sipanje

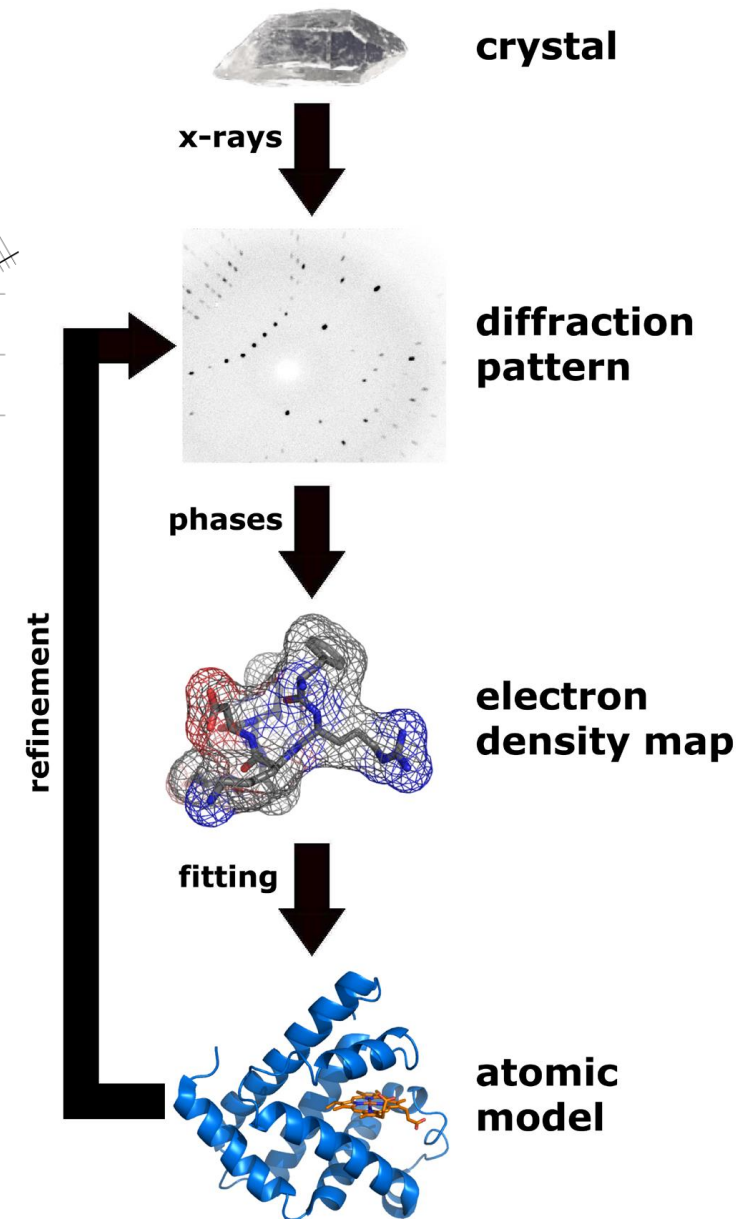
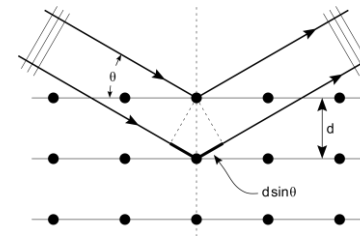
- vse valovne dolžine enako
- predvsem naprej

→ bela megla, suspenzija z večjimi agregati



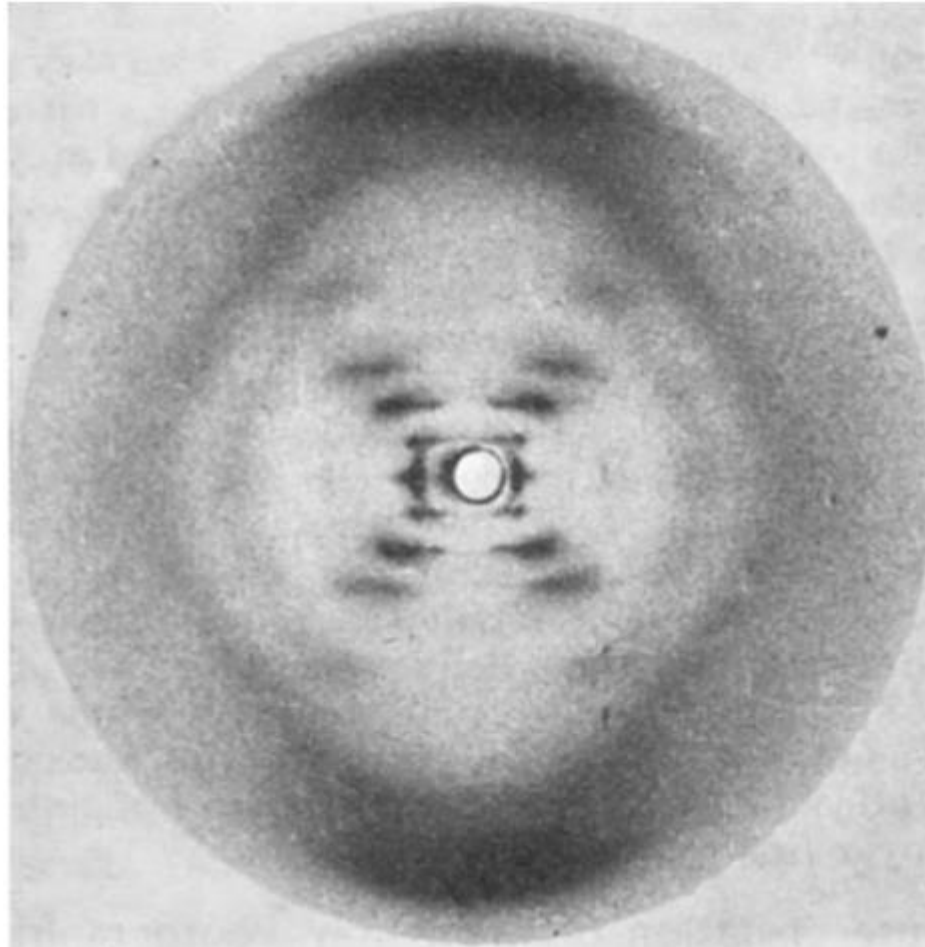
# ... s sipanjem rentgenske svetlobe

- 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?

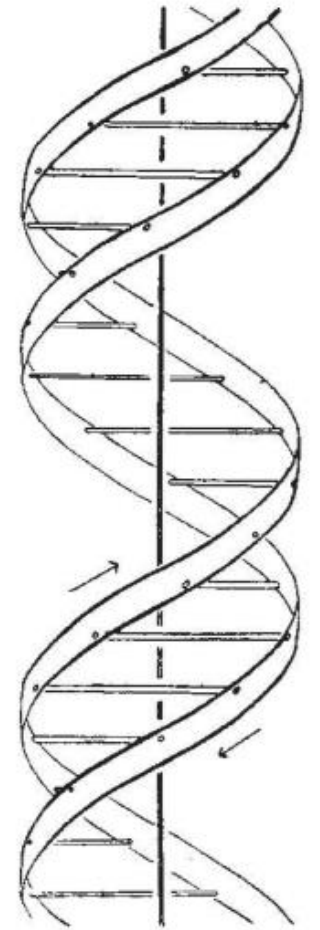


# ... s sipanjem rentgenske svetlobe

- 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)



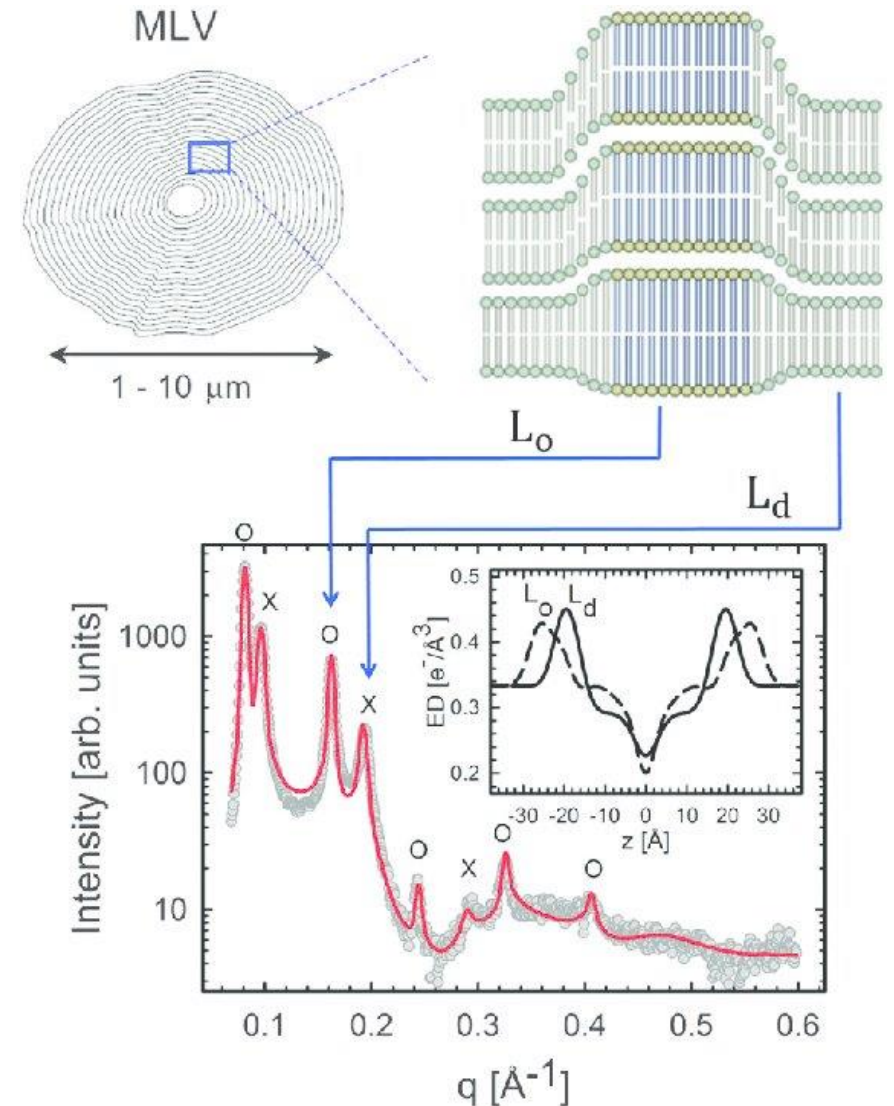
Franklin & Gosling *Nature* 1953



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)

