

III. Messmethoden und Observable

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Verschiedene Messmethoden I

Elektronmikroskopie (EM) statisch, aber höchstauflösend

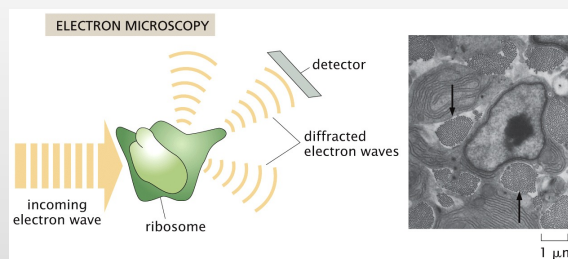


Figure 2.13c: Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

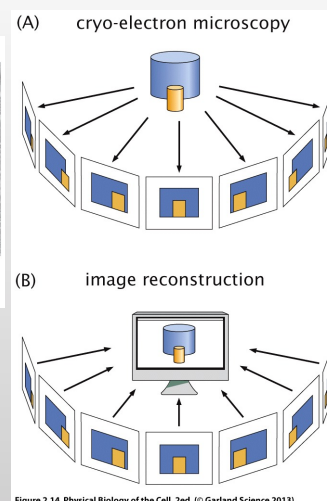
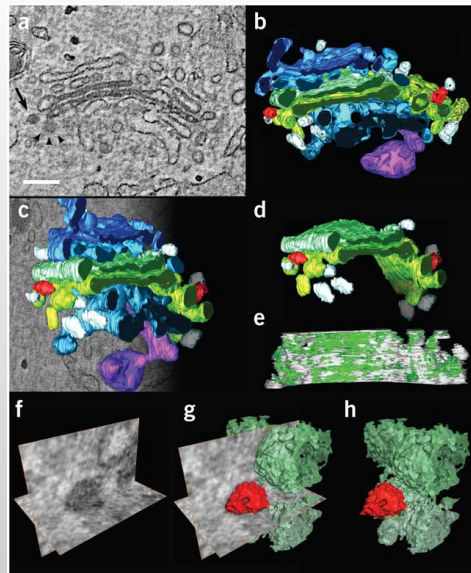


Figure 2.14 Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Beispiel für EM: Golgi-Apparat



M. Grabenbauer,
MPI Dortmund

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Verschiedene Messmethoden II

Atomic Force Microscopy sehr hohe Auflösung, nur Oberflächen

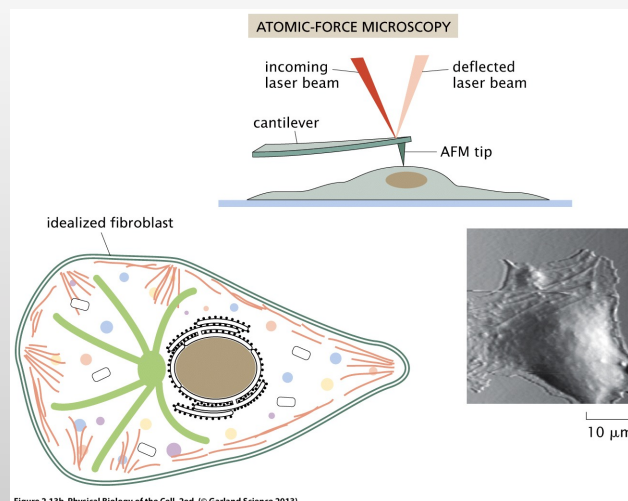


Figure 2.13b Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Lichtmikroskopie?

Hohe Zeitauflösung (bis zu wenigen μs)

Hohe räumliche Auflösung (typisch $\sim 200\text{nm}$; machbar bis 50nm)

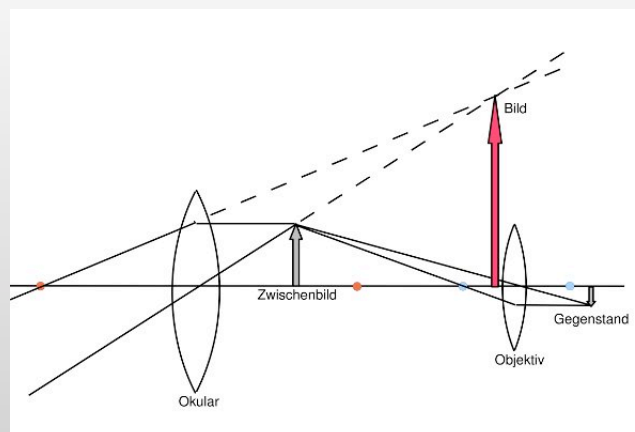
=> Ideal für das Studium dynamischer Vorgänge in Zellen

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Grundlagen des Lichtmikroskops

Strahlenoptik, zwei Linsen (Brennweiten legen Vergrößerung fest)



Bessere Selektivität?

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Wichtiges aus der Quantenmechanik

Elektronen halten sich auf (unscharfen) diskreten Bahnen um Kern auf (Bohrsches Atommodell, Schrödinger/Heisenberg/Born QM)

Übergang von Elektronen zwischen Niveaus unter Absorption/Emission eines Photons möglich

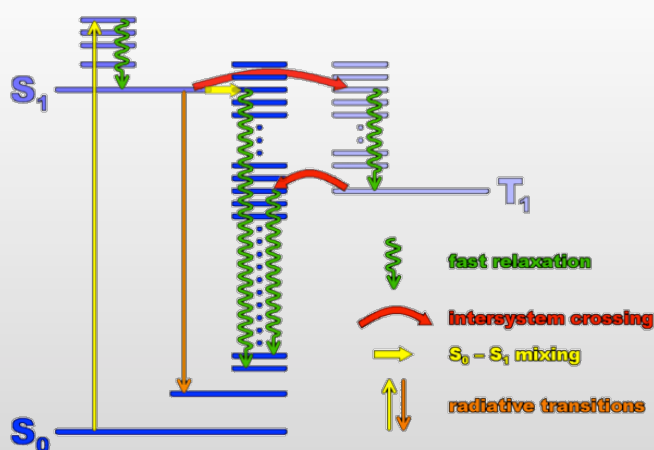
Bei Molekülen zusätzliche Unterniveaus durch Vibration der Einzelatome

Auswahlregeln (z.B. bzgl. Spin) diktieren, welche Übergänge möglich sind

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Elektronische Anregungen – Fluoreszenz

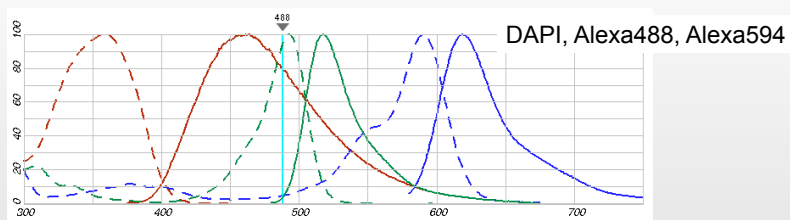


Kopplung an Vibrationen => Stokes shift (Anti-Stokes unterdrückt)
 Fluorophor kann vom Triplett-Zustand aus irreversibel gebleicht werden
 typische Zeiten: spontane Emission 1-5ns $S_1 \rightarrow S_0$, $10\mu s$ $T_1 \rightarrow S_0$

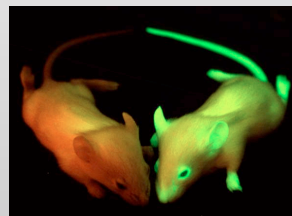
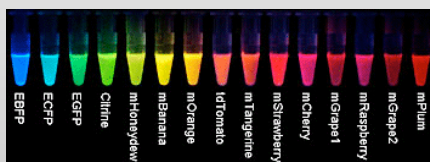
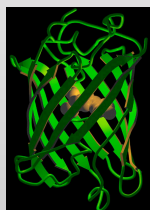
Experimental Physics I, University of Bayreuth



Fluoreszenz in vivo...



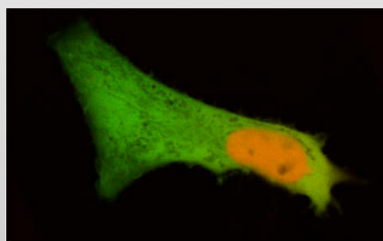
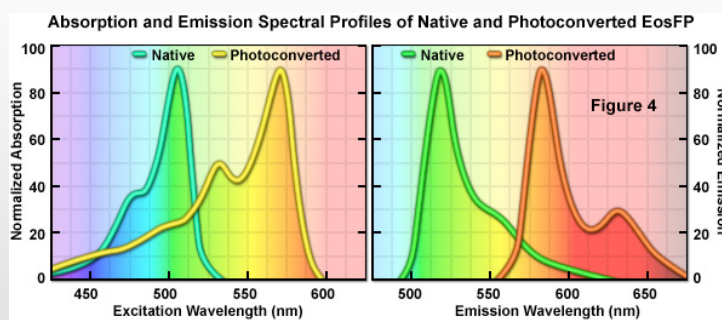
Non-toxic GFPs (Tsien, Nobelpreis 2008), paGFP, Dronpa, Dendra



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Schaltbare Fluorophore

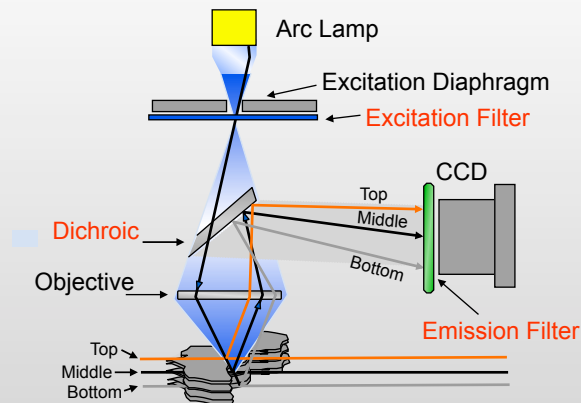


Experimental Physics I, University of Bayreuth



Fluoreszenzmikroskopie

Epi-Fluoreszenzmikroskop



schnell (100fps und mehr), schonende Illumination, günstig

Problem:

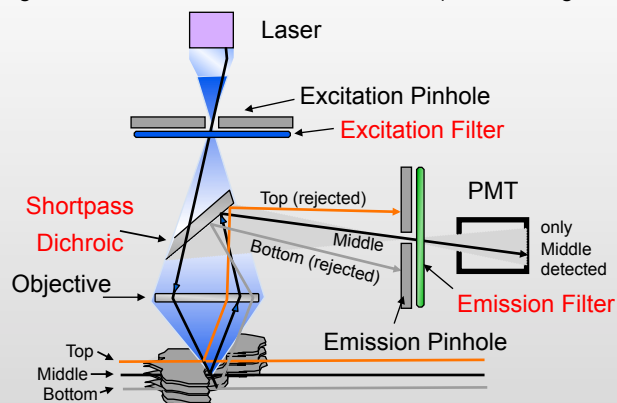
Keine Tiefendiskriminierung ('blur'), *Dekonvolution* a posteriori möglich

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Abbildung der beiden Lochblenden aufeinander (confocal – gem. Fokus)



3D-Information, Abrastern des Bildes mit Laser, Datenaufnahme (pixelweise) mit PMT

Problem:

teuer, langsam (~1fps), >50% der Fluoreszenz wird verworfen
wiederholte Belichtung der Probe für nächste fokale Ebene (=> Bleichen)

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Alternative: spinning disk statt scanning

laser point scanning

Nipkow area scanning

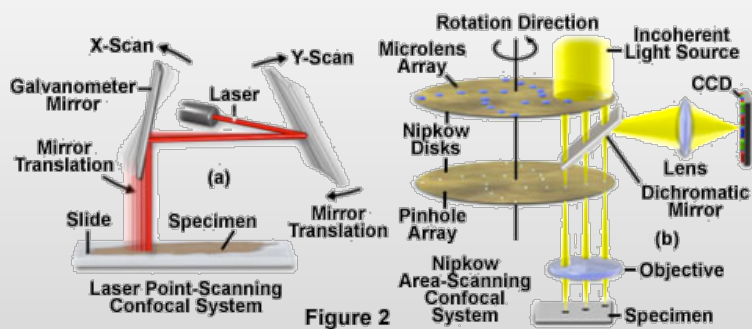


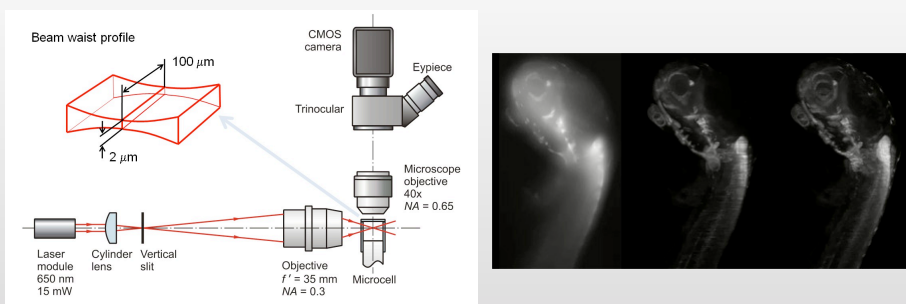
Figure 2

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Alternative für Entwicklungsbiologie

Selektive Plane Illumination Microscopy



Siedentopf & Zsigmondy 1903(!)
Steltzer-AG (2000er Jahre)

Mehr dazu Ende der Woche

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Die Grenzen der Lichtmikroskopie

Abbesches Beugungslimit, Auflösungsgrenze



Ernst Abbe, 1873

$$d = \frac{\lambda}{2 \text{NA}}$$

$\lambda_{\text{exc.}} = 520 \text{ nm (green)}$
 $\text{NA} = 1.3$
 $\Rightarrow \text{resolution: } 200 \text{ nm}$

n = Brechungsindex des Immersionsmediums
 • 1.0 Luft
 • 1.33 Wasser
 • <1.56 Öl

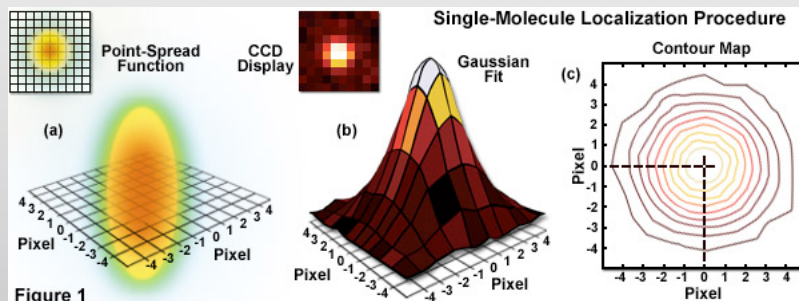
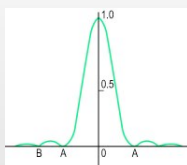
Steigende numerische Apertur => bessere Auflösung

Experimental Physics I, University of Bayreuth



Wichtige Folgerung – die PSF

Pointspread function – Bild eines Punktes (Airy-Fkt)

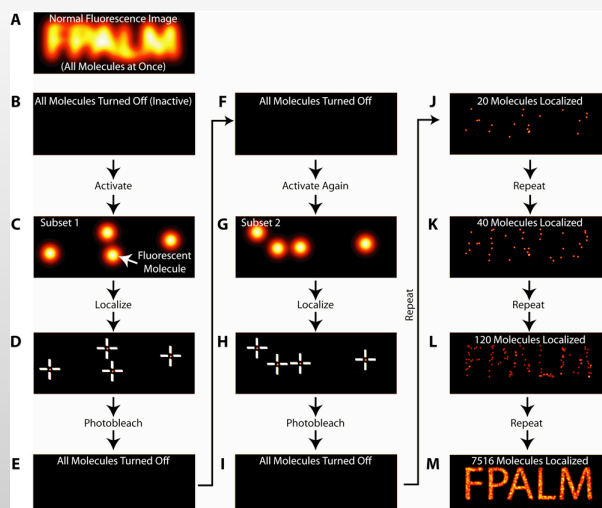


Experimental Physics I, University of Bayreuth



Umgehen der Beugungsgrenze...

Nutze schaltbare Farbstoffe und die PSF einzelner Moleküle



Experimental Physics I, University of Bayreuth



Quantitative Mikroskopie

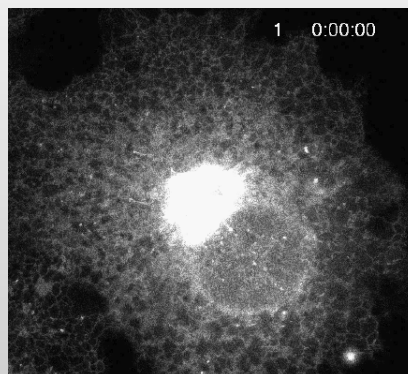
“Treat it as data”

Bild = $N \times N$ – Matrix von Zahlen (z.B. 0-255 bei 8Bit-Bildern)
Pixel = Wegstrecke, z.B. 200nm

Time lapse

Verfolge interessantes Objekt
im Bild, erhalte z.B. Geschwindigkeit

Nötig dazu: *single-particle tracking*
(Bildanalyse z.T. schwierig)



Experimental Physics I, University of Bayreuth

