

A fluorescence microscopy image of a cell. The cell's internal structure is highlighted with green fluorescence, showing a dense network of filaments and puncta. The cell's periphery is outlined by a thin red line. The background is black.

Opazovanje struktur

1. del - Optična mikroskopija

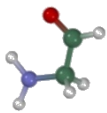
Smiling Face



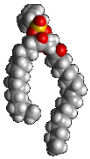
10 Centimeters

Velikostne skale življenja

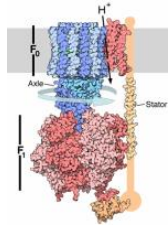
Medatomske vezi



Lipidi



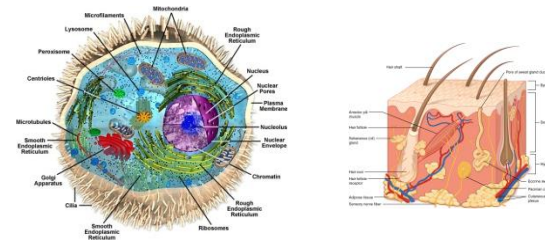
Proteini



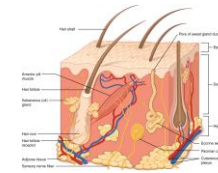
Kromosom



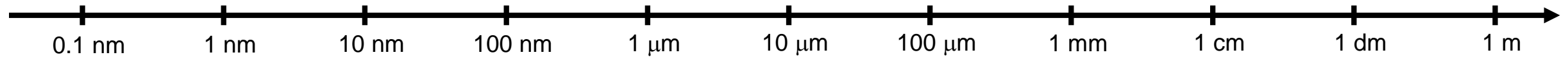
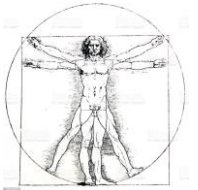
Evkariontska celica



Tkiva

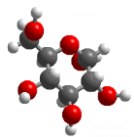


Telo

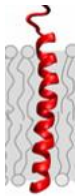


velikost

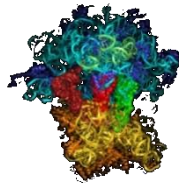
Monosaharidi,
aminokisline



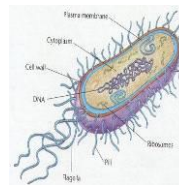
Trans-
membranska
vijačnica



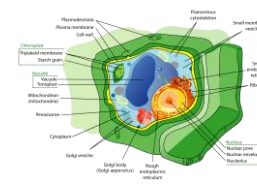
Ribosom



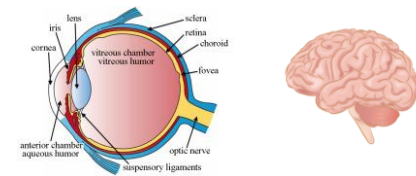
Bakterija



Rastlinska celica

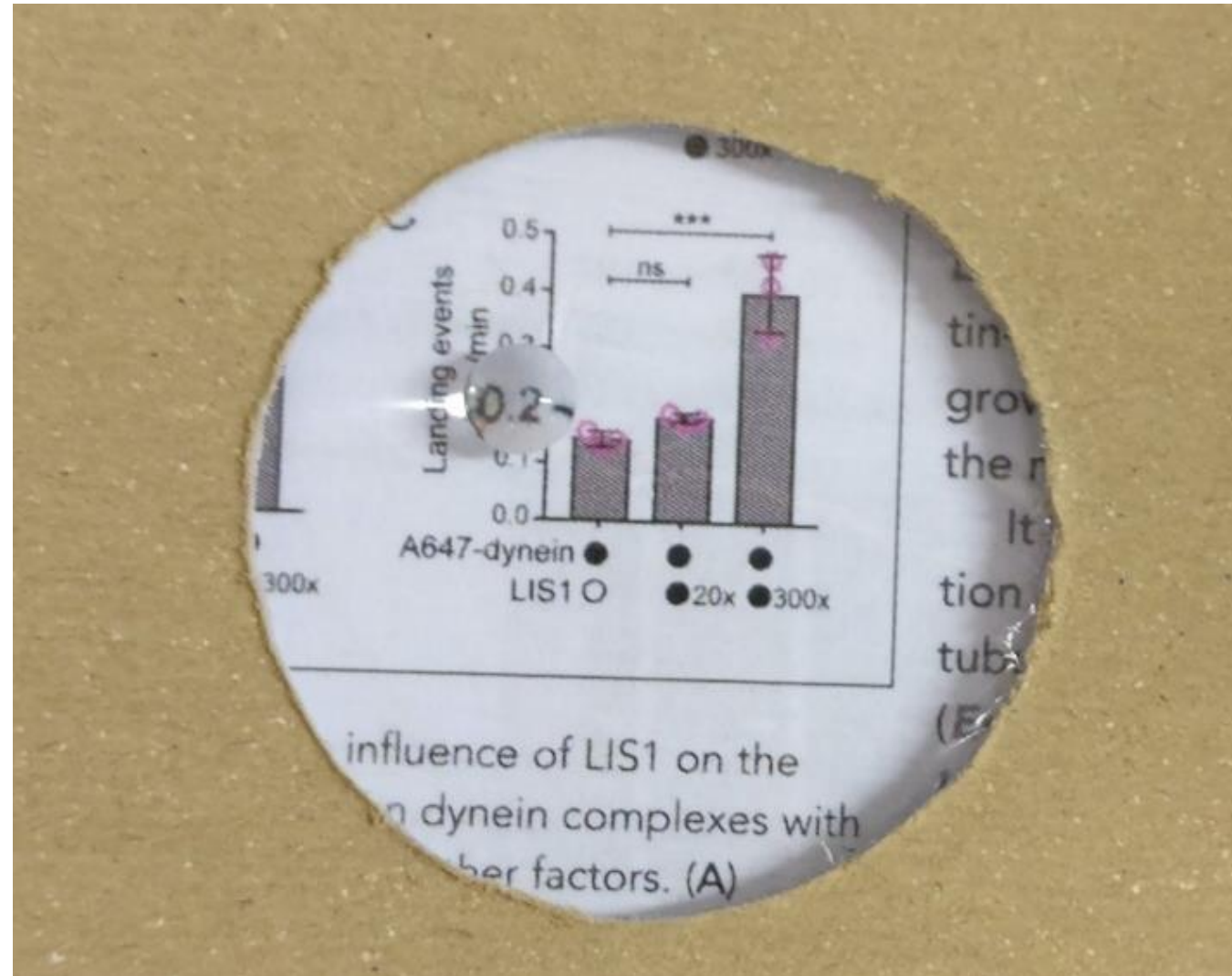


Organi



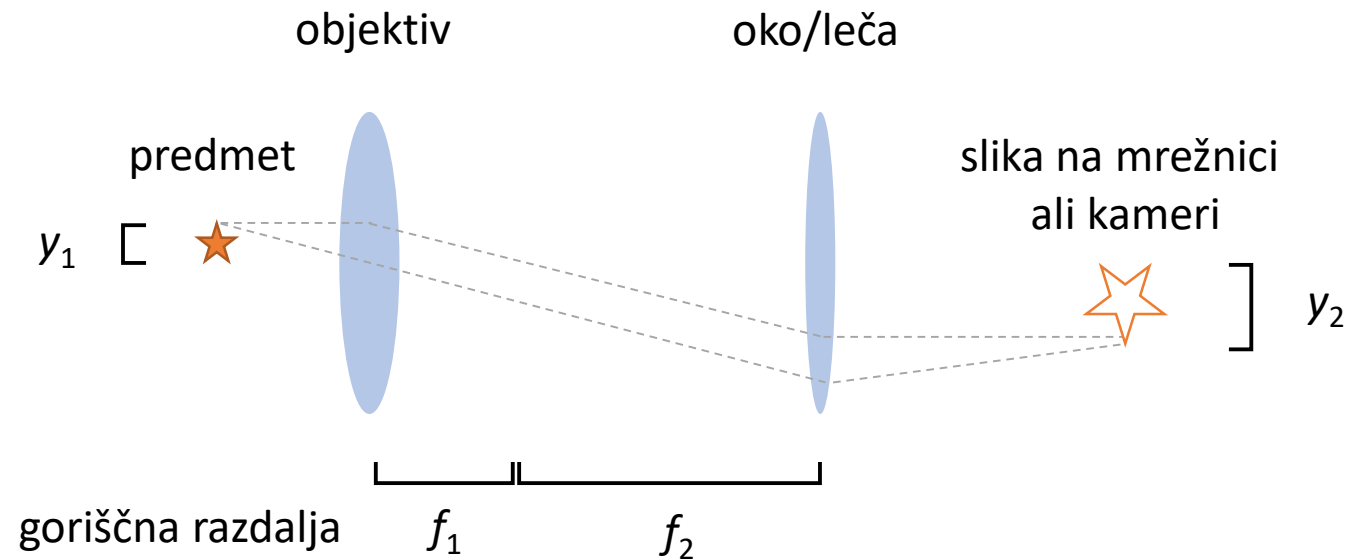
vidno s prostim očesom

Kako lahko vidimo majhne stvari?



Kako povečamo majhne stvari?

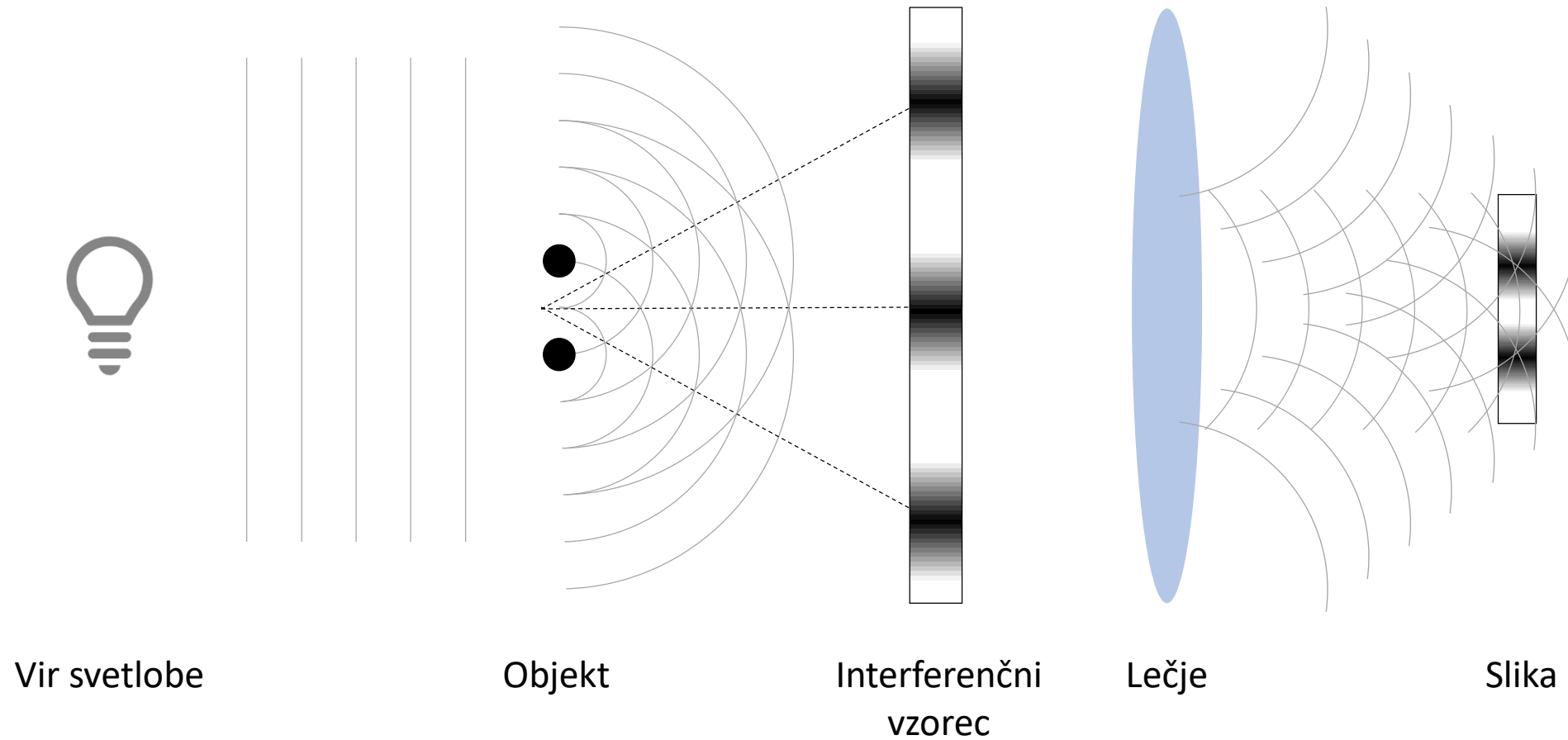
Nastanek slike zaradi loma svetlobe na ukrivljeni površini (geometrijska optika):



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

Uklon svetlobe nam zamegli sliko

Nastanek slike zaradi uklona svetlobe:



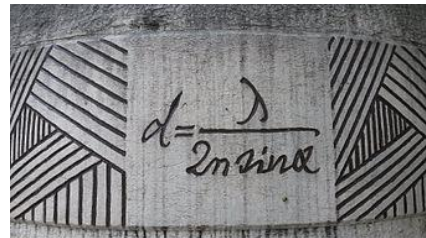
Kako podrobno vidimo majhne stvari?

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

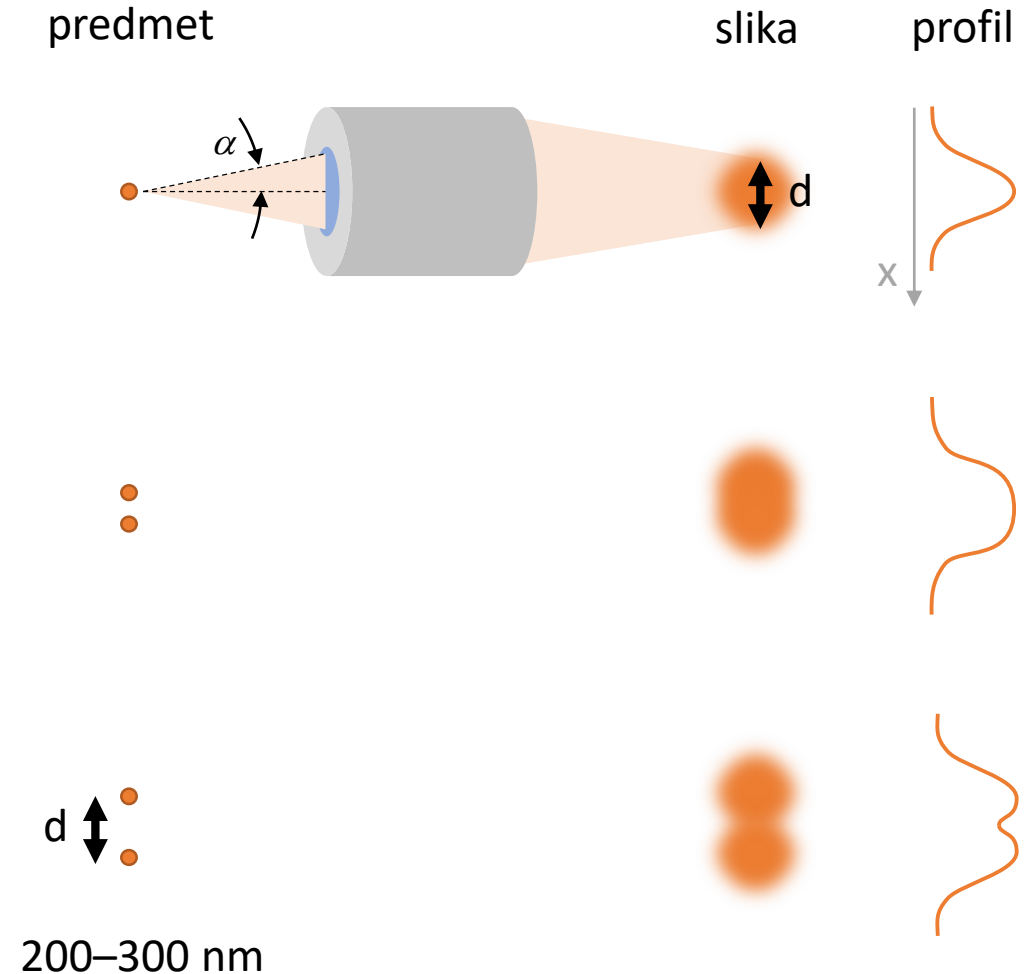
Ta je odvisna od:

- 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

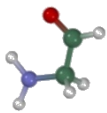


- **Z optičnim mikroskopom lahko razločimo le podrobnosti večje od d** (v najboljšem primeru $\lambda / 2$, t.i. uklonska limita)!

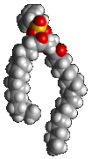


Velikostne skale življenja

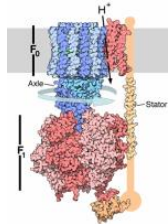
Medatomske vezi



Lipidi



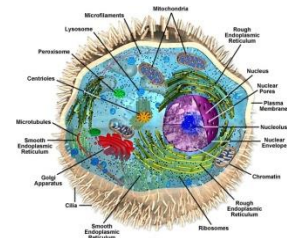
Proteini



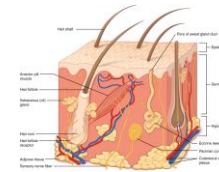
Kromosom



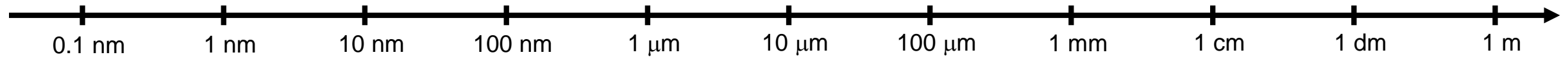
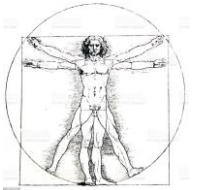
Evkariontska celica



Tkiva

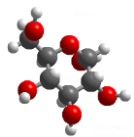


Telo



velikost

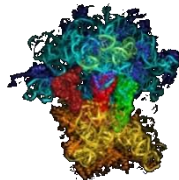
Monosaharidi,
aminokisline



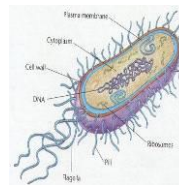
Trans-
membranska
vijačnica



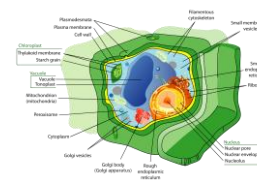
Ribosom



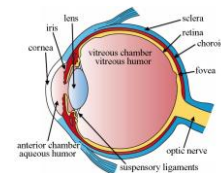
Bakterija



Rastlinska celica



Organi

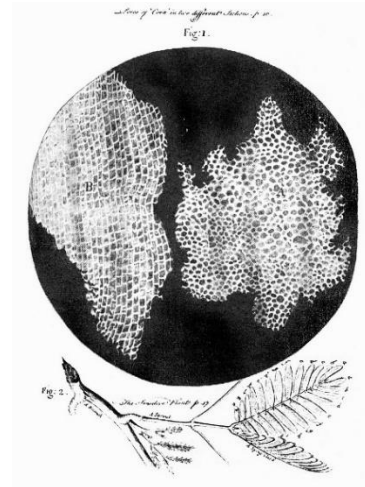
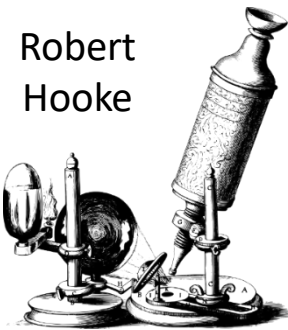


s svetlobnim mikroskopom

vidno s prostim očesom

Kratka zgodovina svetlobne mikroskopije

17. stol.



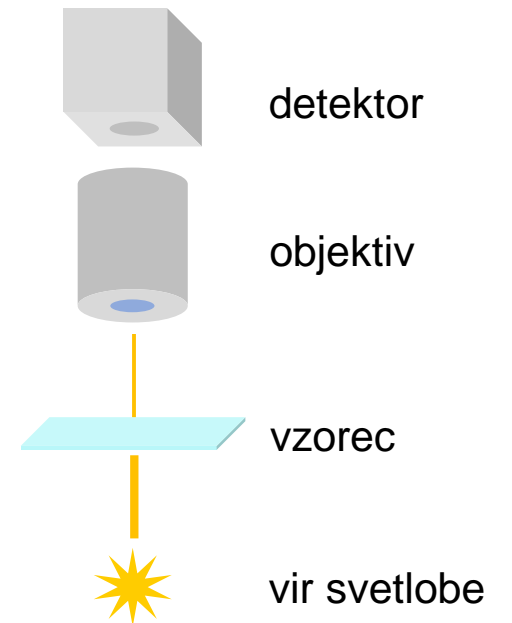
20. stol.



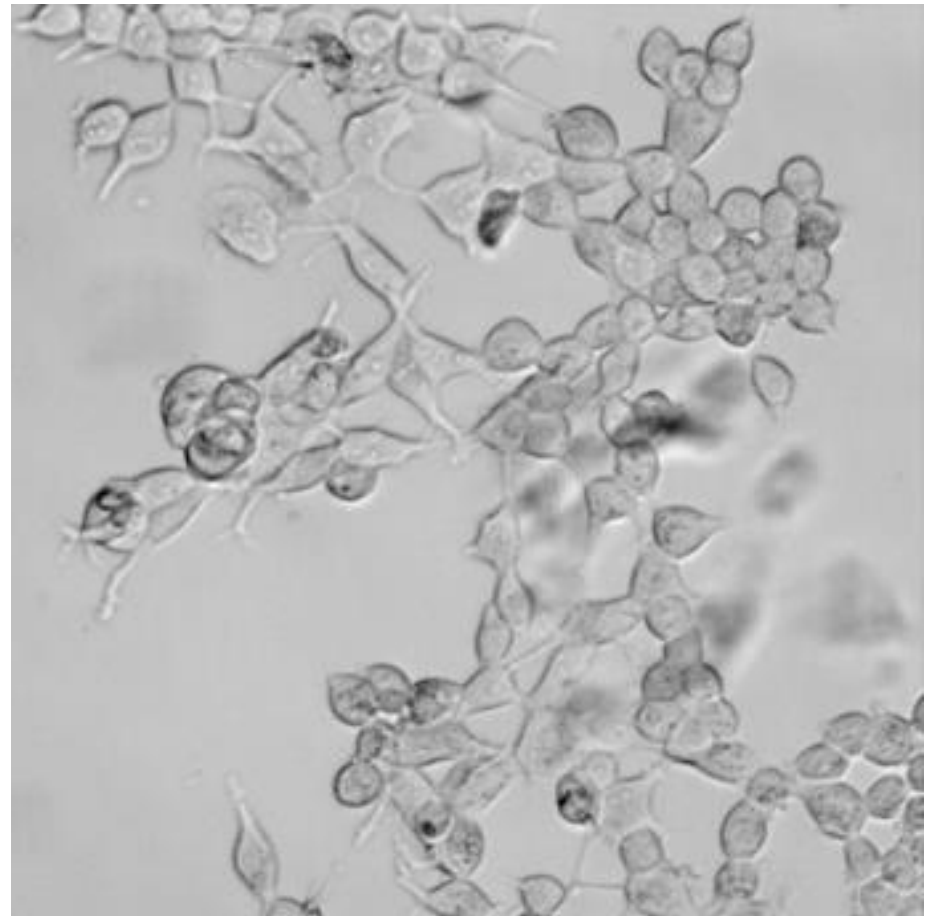
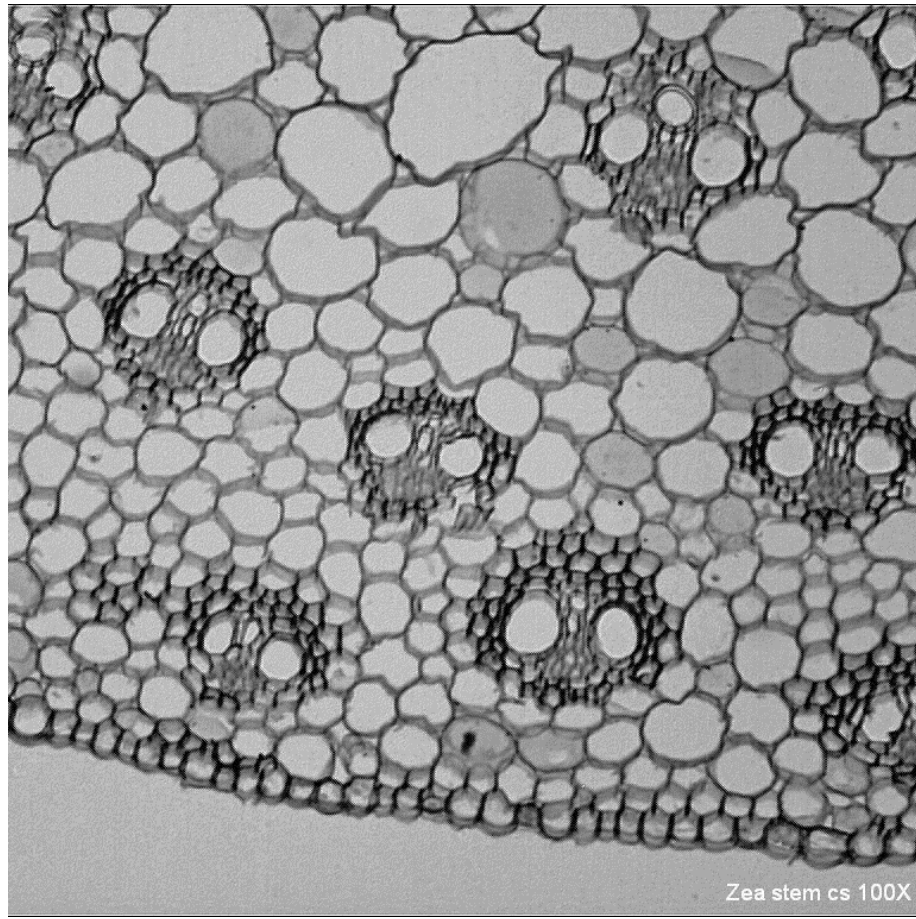
21. stol.



Zgradba presevnega mikroskopa

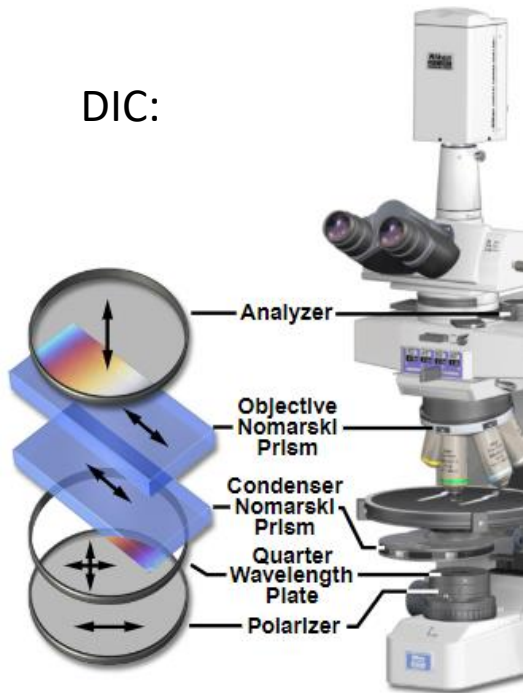


Kaj vidmo na teh slikah?

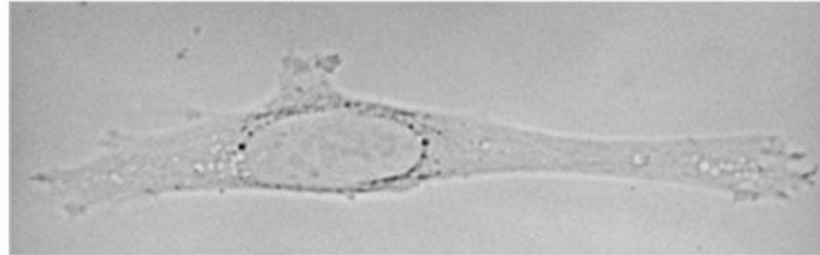


Dve nadgradnji presevnega mikroskopa

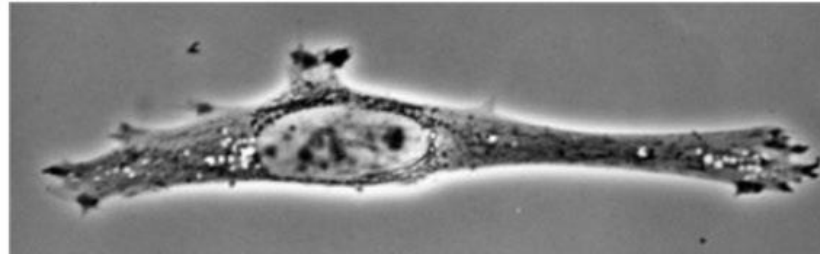
DIC:



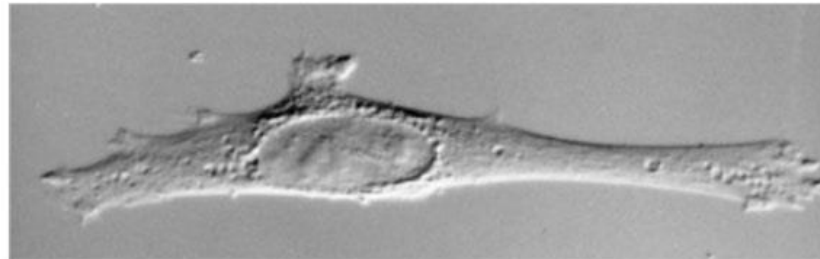
Bright Field



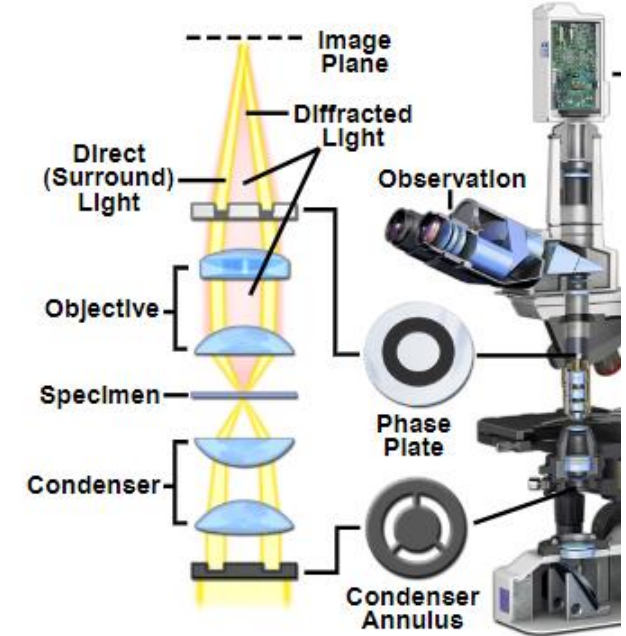
Phase Contrast



Differential Interference Contrast

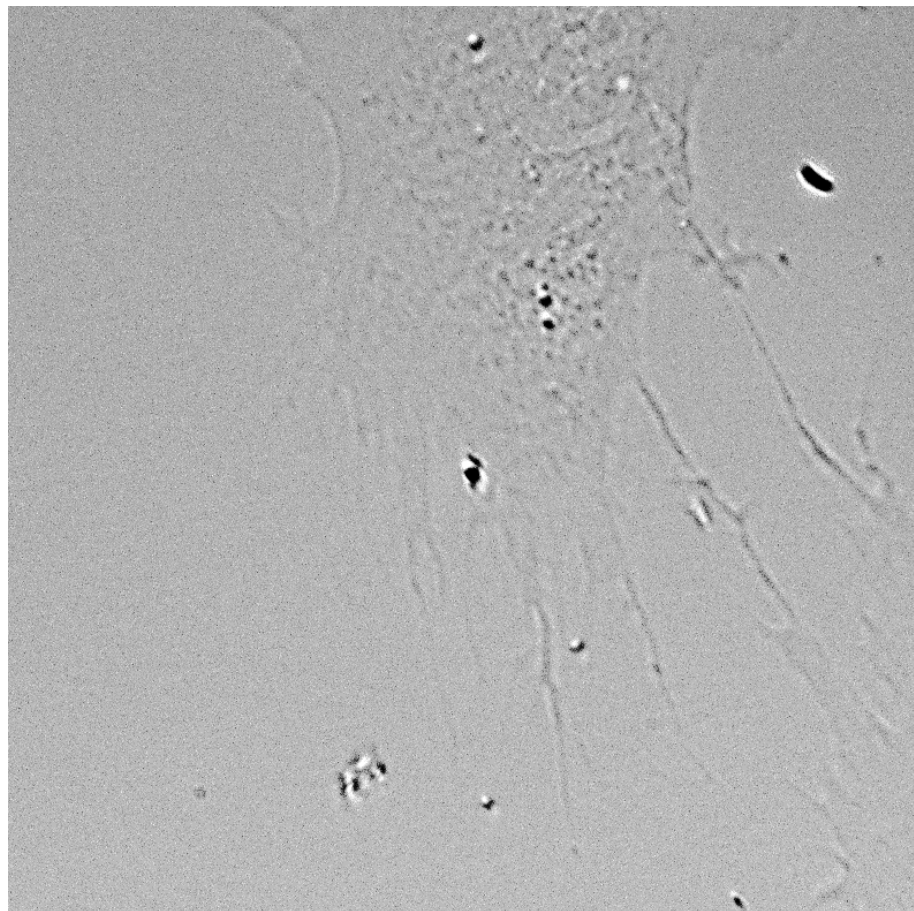


PhC:

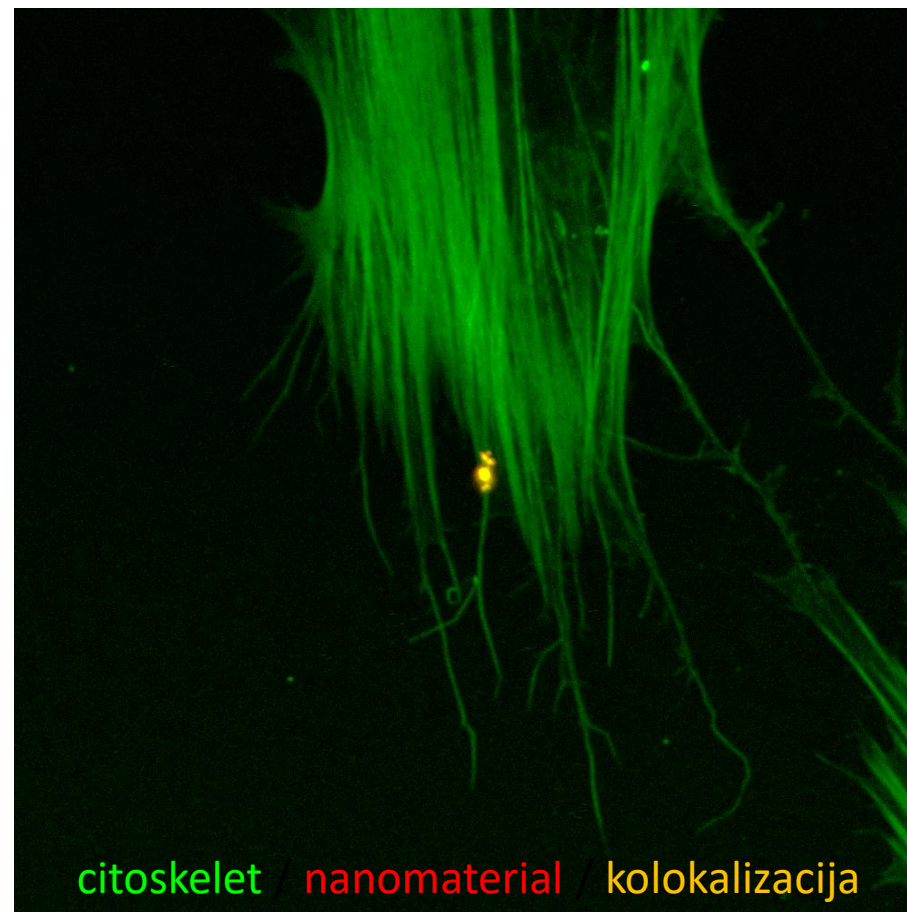


V čem se razlikujeta sliki iste celice?

Presevna mikroskopija



Fluorescenčna mikroskopija



Fluorescenca: revolucija kontrasta



Osnove fluorescence

Energijski prehodi elektrona

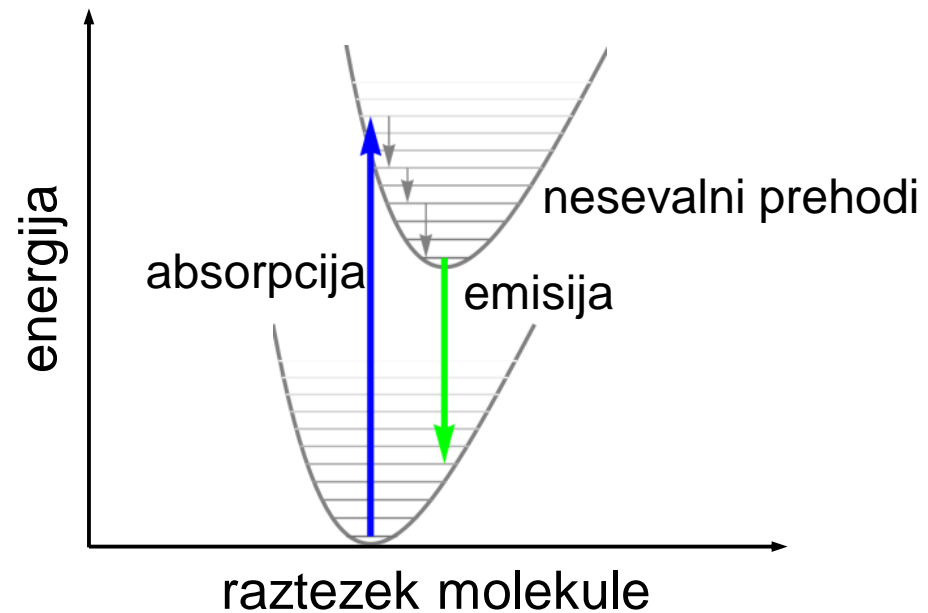
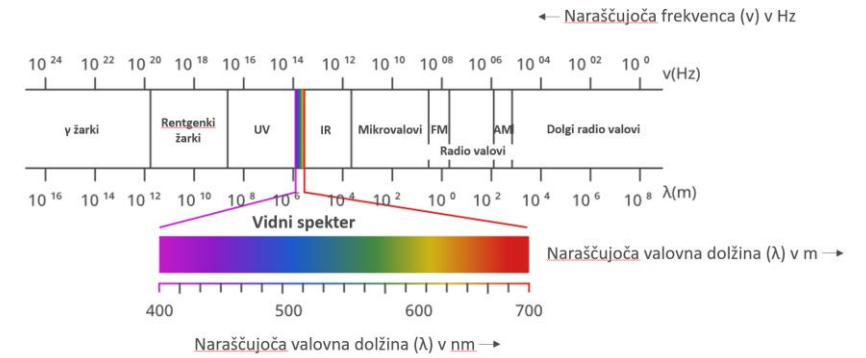
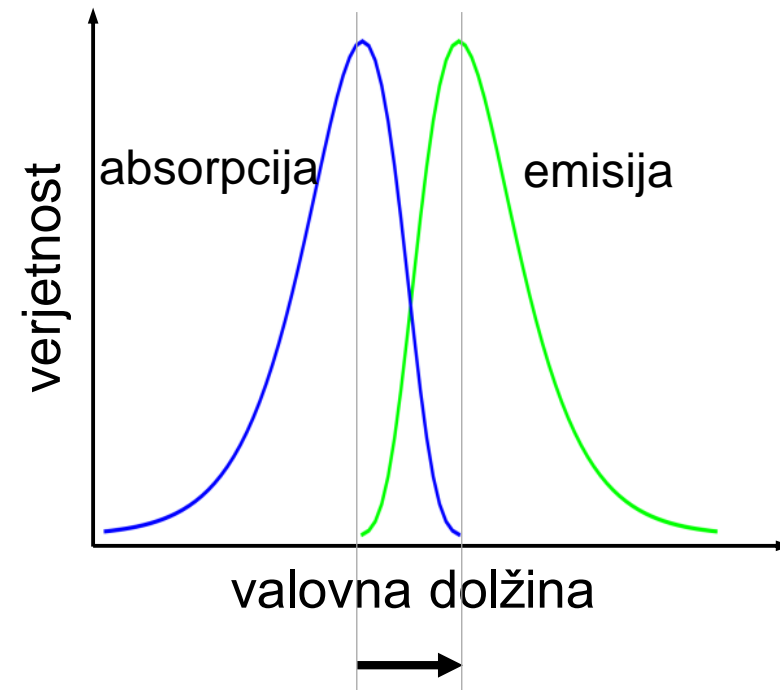


Diagram Jablonskega

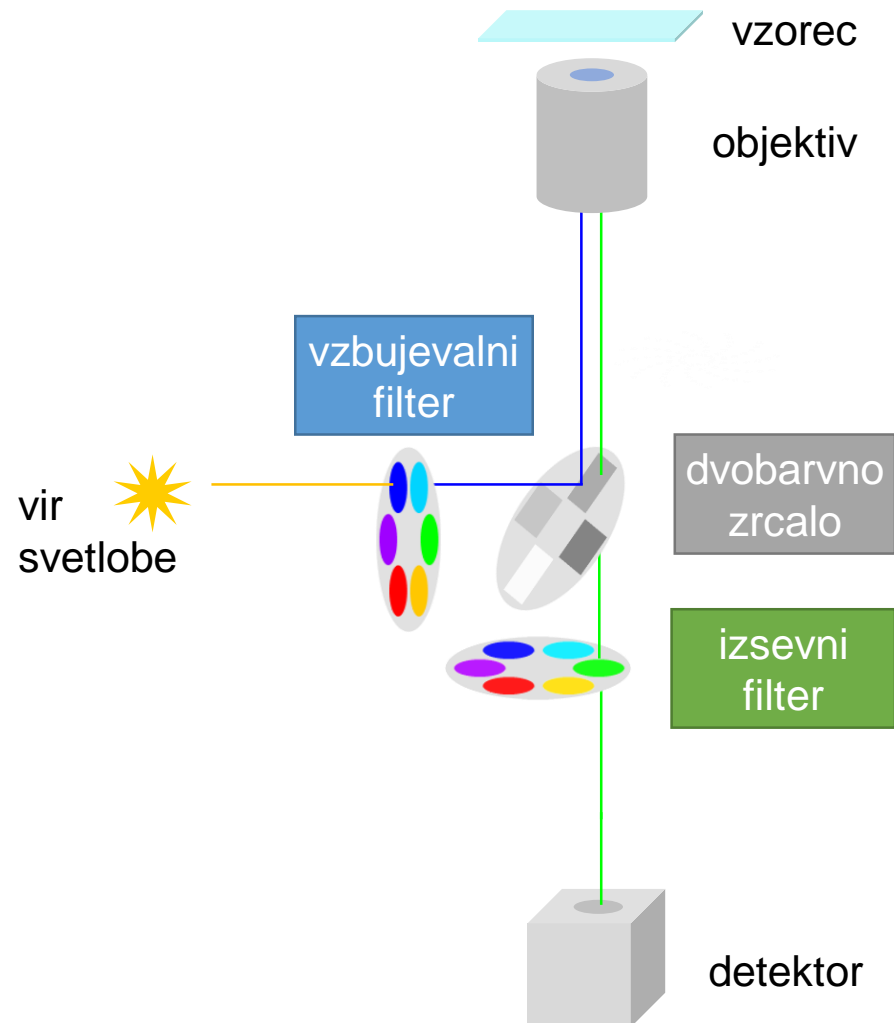


Spekter svetlobe

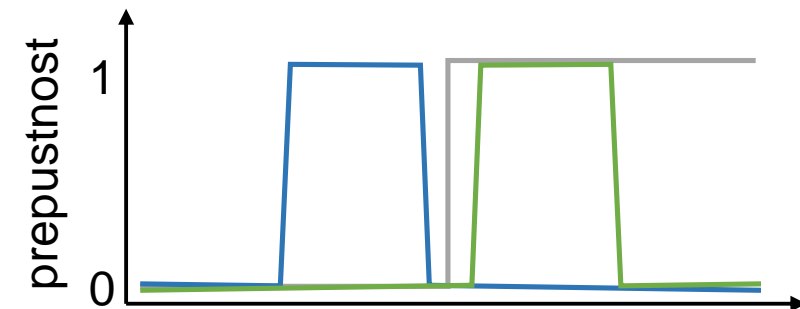
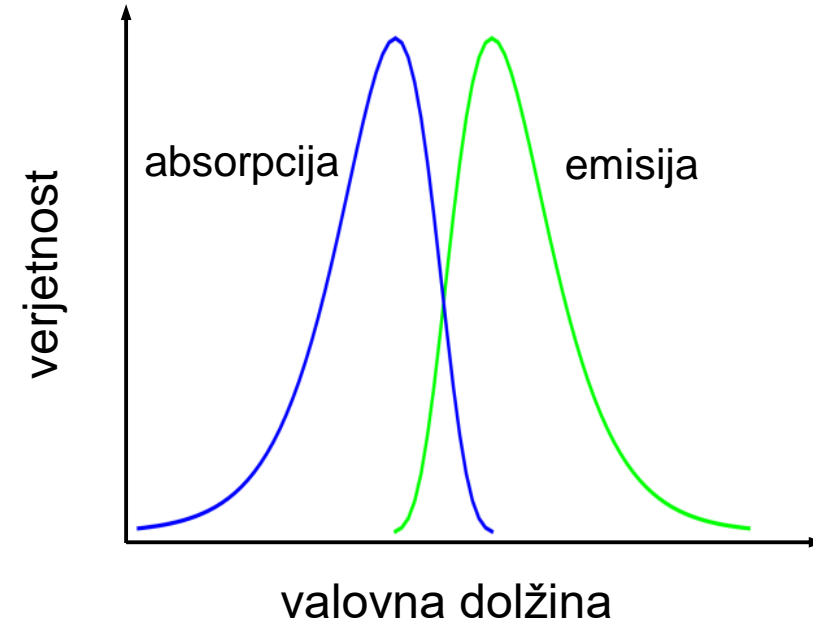


Stokesov premik

Fluorescenčni mikroskop



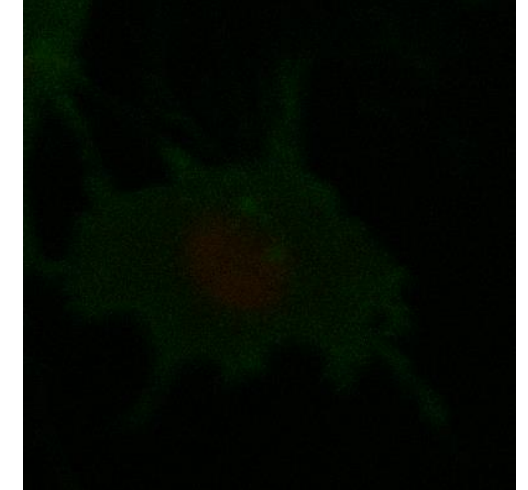
Spekter svetlobe



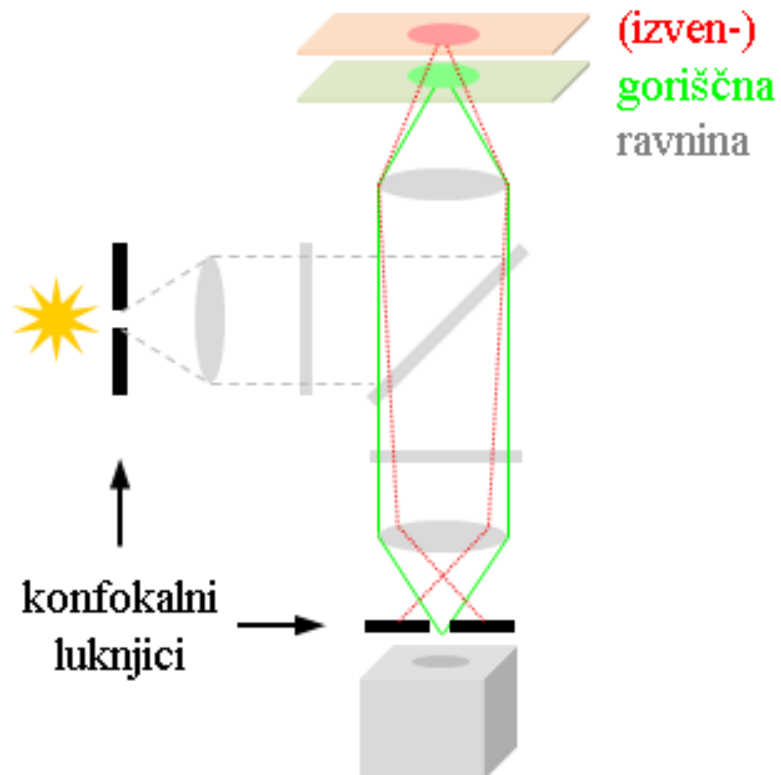
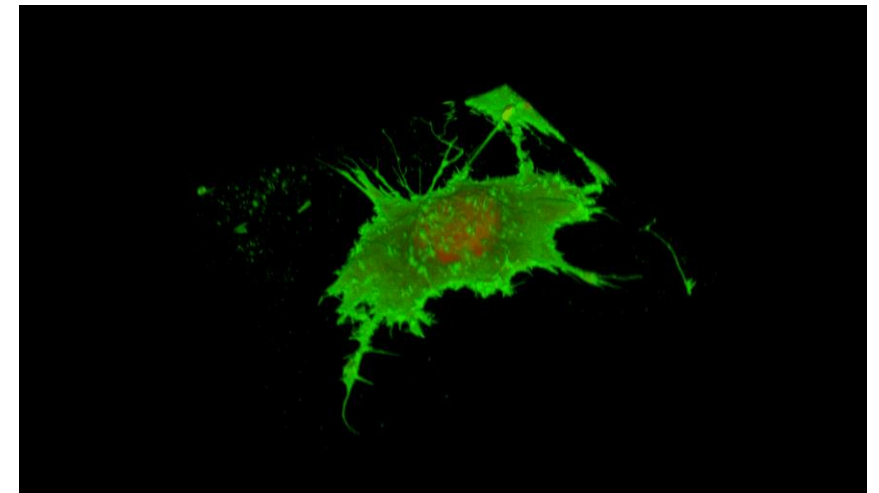
Konfokalni fluorescenčni mikroskop

- Omogoča optično rezinjenje

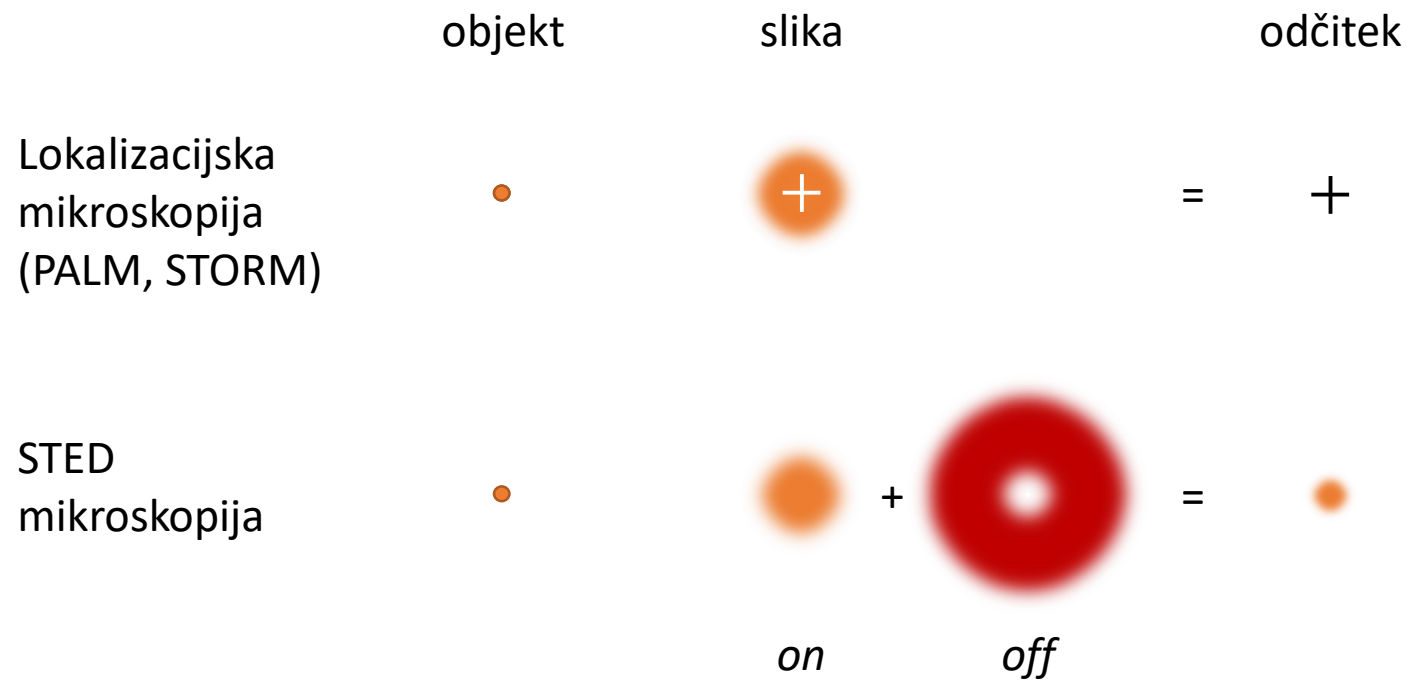
Niz slik po globini:



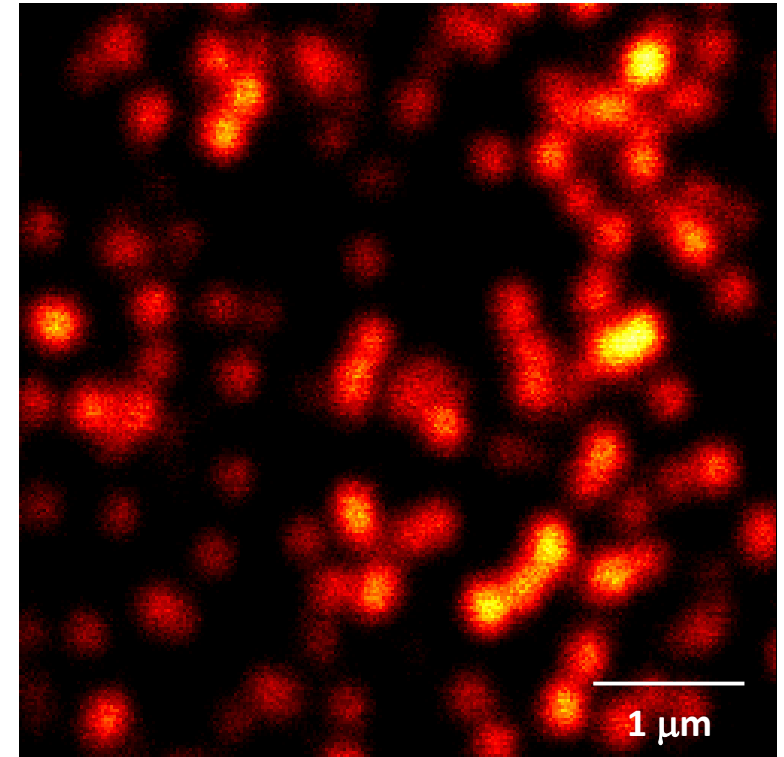
3D rekonstrukcija:



Superločljiv fluorescenčni mikroskop

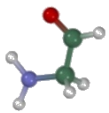


Fluorescenčne kroglice (40 nm)

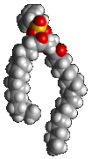


Velikostne skale življenja

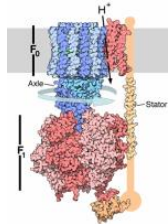
Medatomske vezi



Lipidi



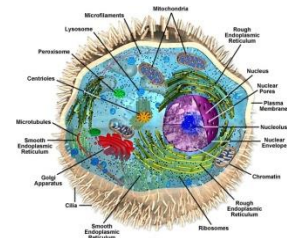
Proteini



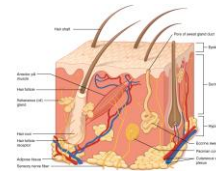
Kromosom



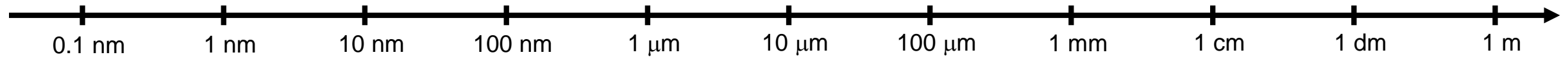
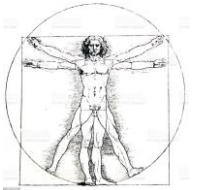
Evkariontska celica



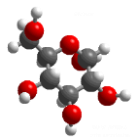
Tkiva



Telo



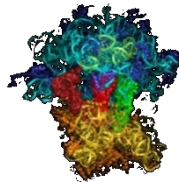
velikost



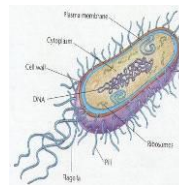
Monosaharidi,
aminokisline



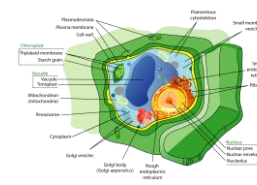
Trans-
membranska
vijačnica



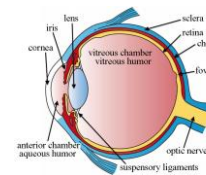
Ribosom



Bakterija



Rastlinska celica



Organi



s super-ločljivim m.

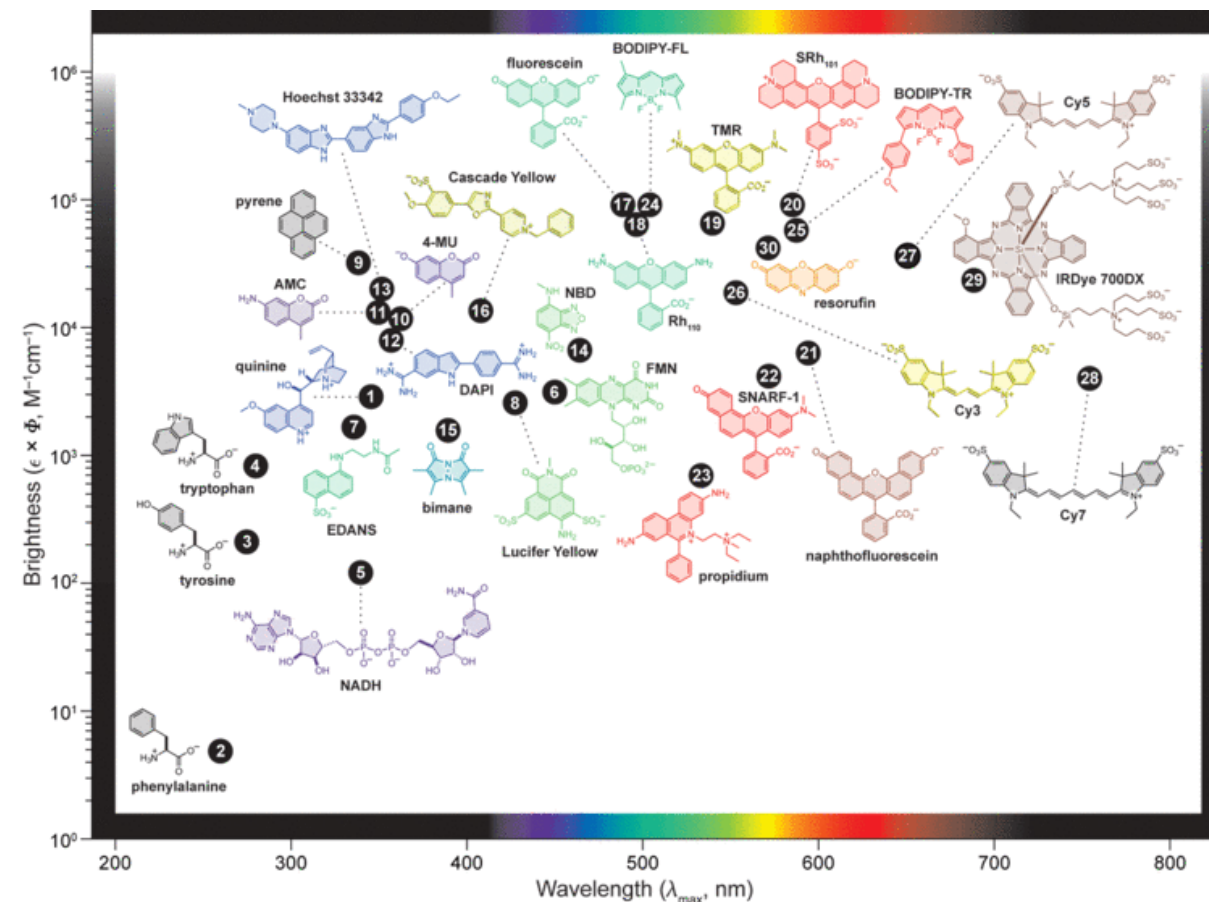
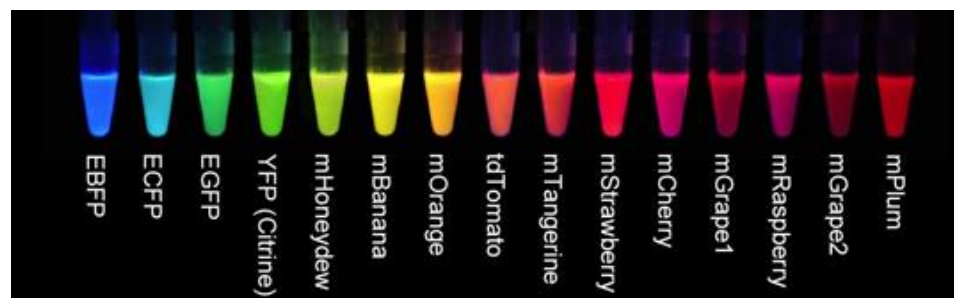
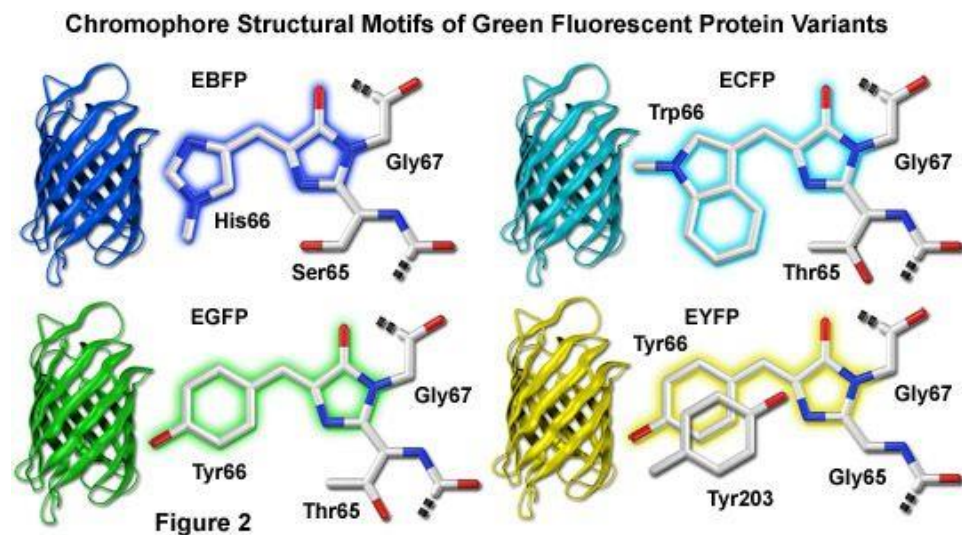
s svetlobnim mikroskopom

vidno s prostim očesom

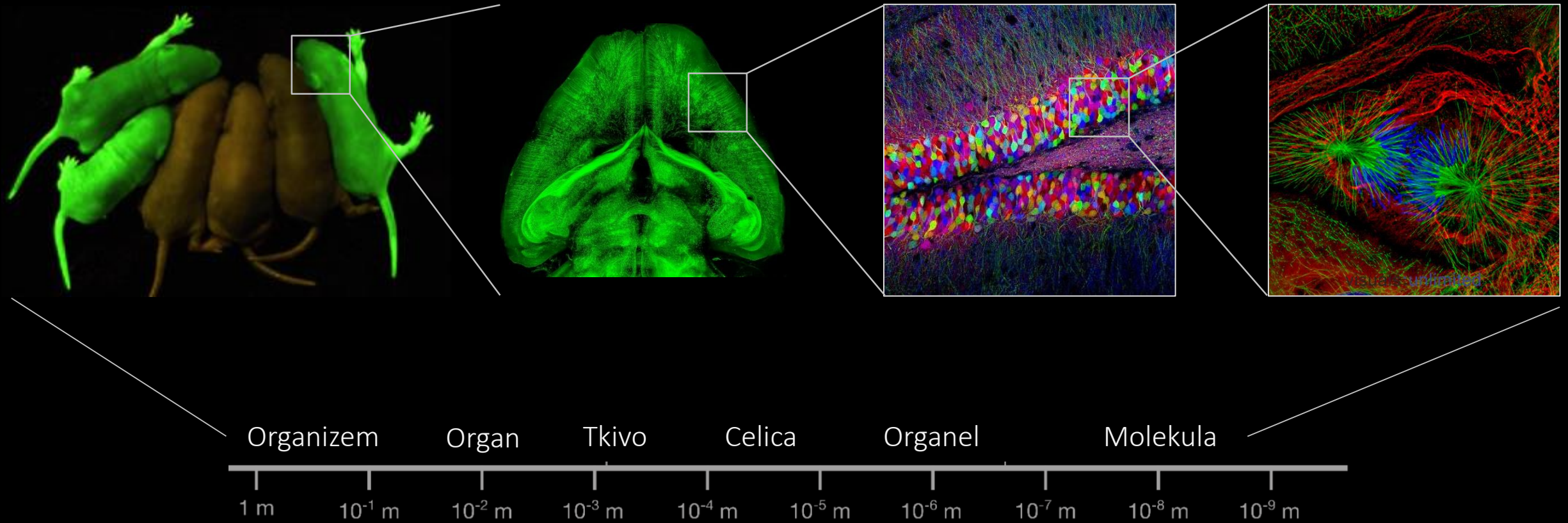
Fluorescenčna barvila

Fluorescenčni proteini

Organska barvila



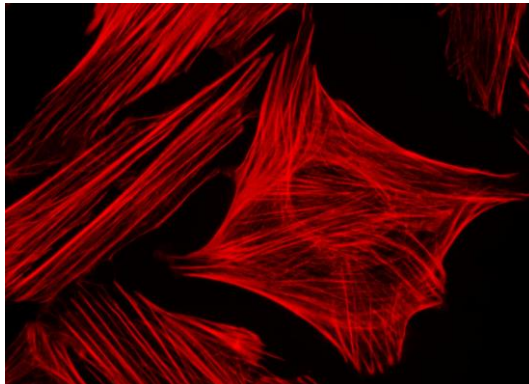
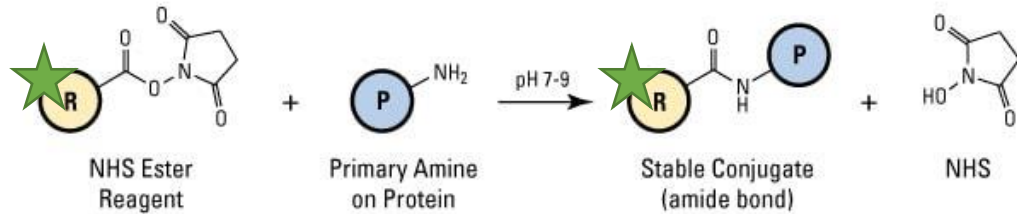
Fluorescenca: revolucija specifičnosti



Fluorescenčno označevanje proteinov

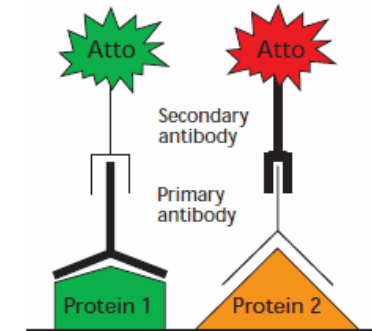
Nespecifično

Označevanje izoliranih proteinov
(npr. protiteles)



Specifično

Fluorescenčno označena protitelesa



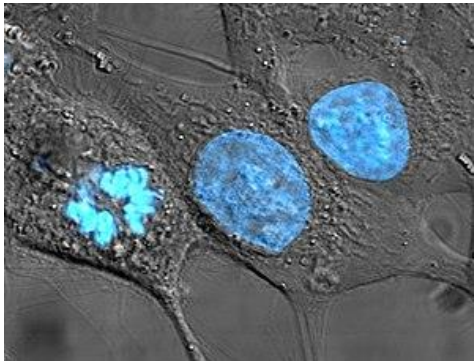
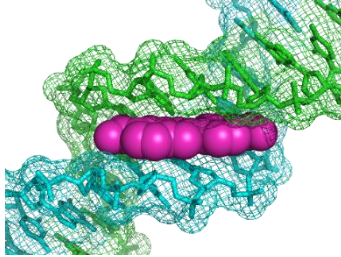
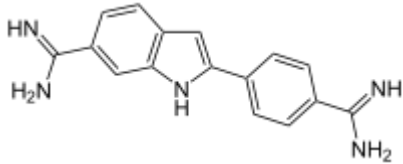
Ekspresija fluorescenčnih proteinov v celici



Fluorescenčno označevanje DNA/RNA

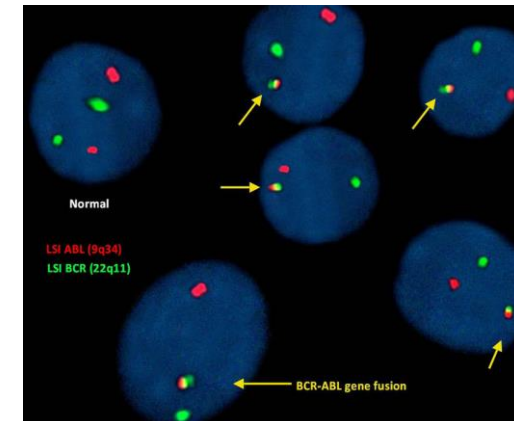
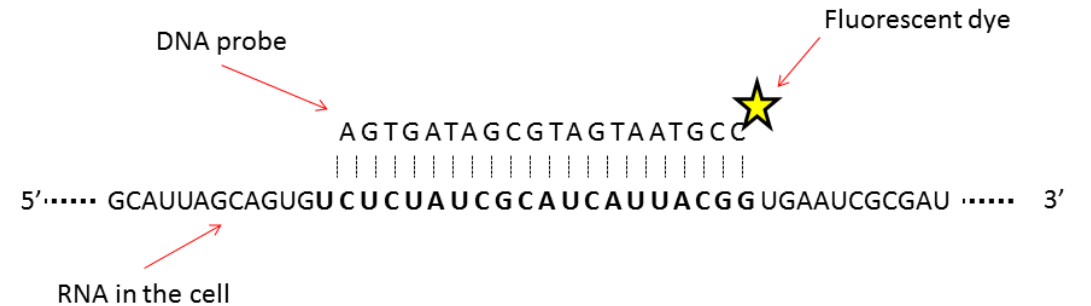
Nespecifično

DAPI, Hoechst, ...



Specifično

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

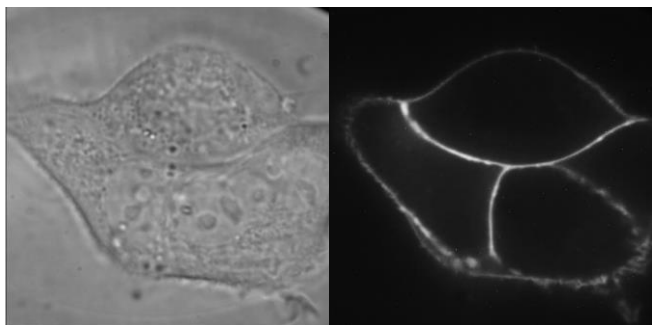
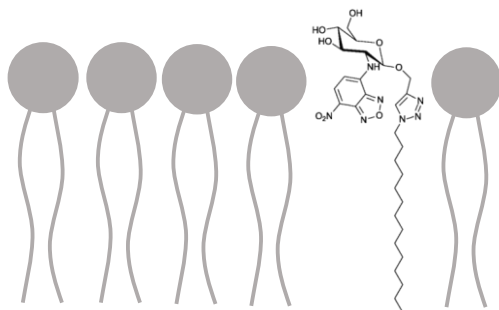


Fluorescenčno označevanje lipidov

Nespecifično

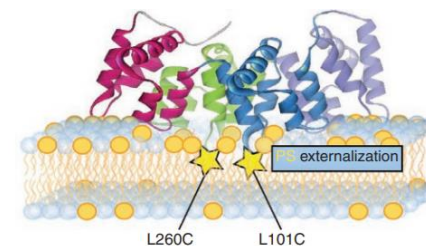
Fluorescenčni analogi lipidov, maščobnih kislin, transmembranskih proteinov ipd. (amfifilne molekule)

hidrofilno {
hidrofobno {

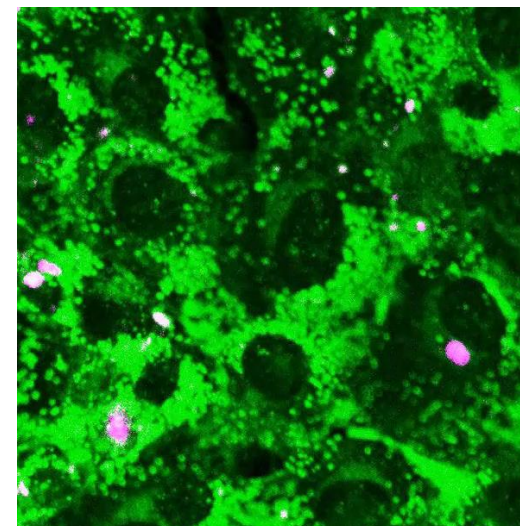


Specifično

Vezava na izbrano vrsto lipidov (fosfatidilserin)



Kim *Nature Protocols* 2010



A fluorescence microscopy image of a cell. The image is split vertically by a dashed white line. The left side shows a cell with green fluorescence, while the right side shows the same cell with magenta fluorescence. The text 'Fluorescenčná mikroskopija' is centered across the image.

Fluorescenčná mikroskopija


Kontrast + špecifičnosť

konfokálne STED

1 μm

Vaje na IJS: petek, 18. 4. 2025

- 2 skupini do 7 oseb.
- 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 25. 4. 2025

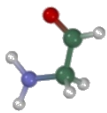


Določanje molekularnih struktur

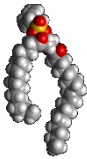
2. del - elektronska mikroskopija, sipanja, spektroskopije

Kako lahko opazujemo še manjše strukture?

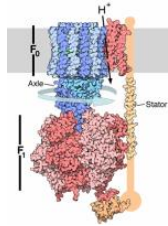
Medatomske vezi



Lipidi



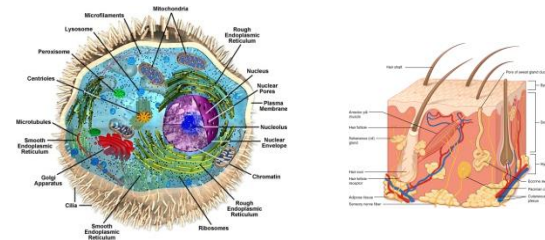
Proteini



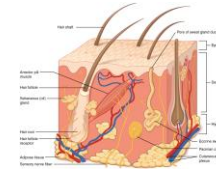
Kromosom



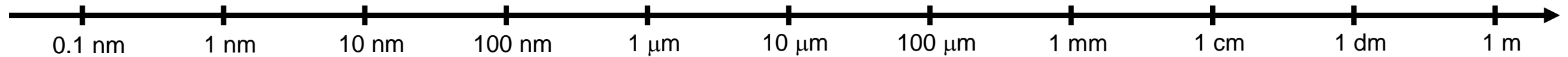
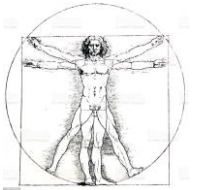
Evkarionska celica



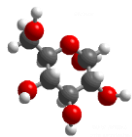
Tkiva



Telo



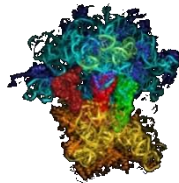
velikost



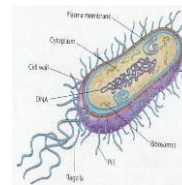
Monosaharidi,
aminokisline



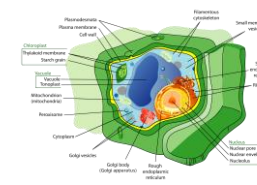
Trans-
membranska
vijačnica



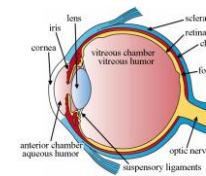
Ribosom



Bakterija



Rastlinska celica



Organi



?

s super-ločljivim m.

s svetlobnim mikroskopom

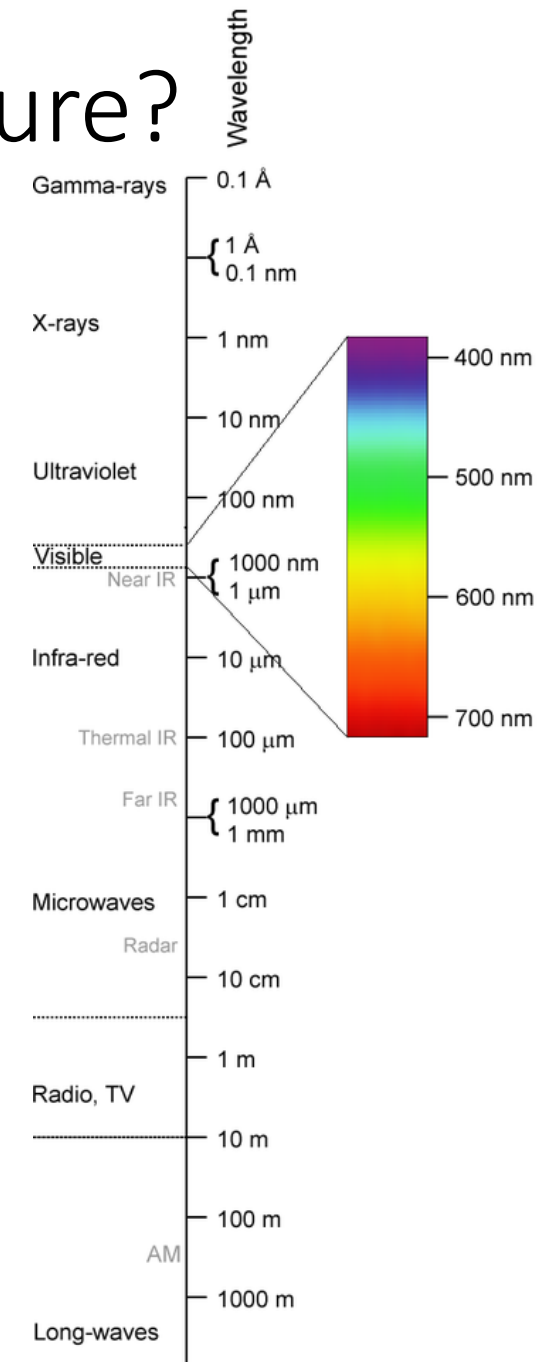
vidno s prostim očesom

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

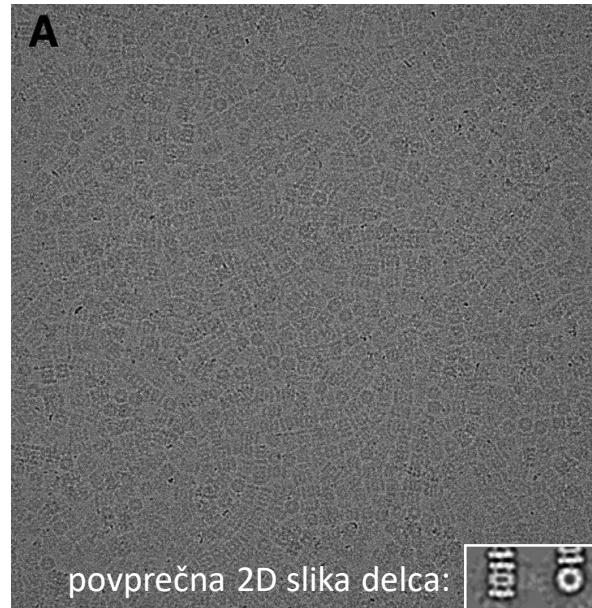
Namesto EM valovanja uporabimo hitre delce, ki se obnašajo podobno!

cryo-TEM

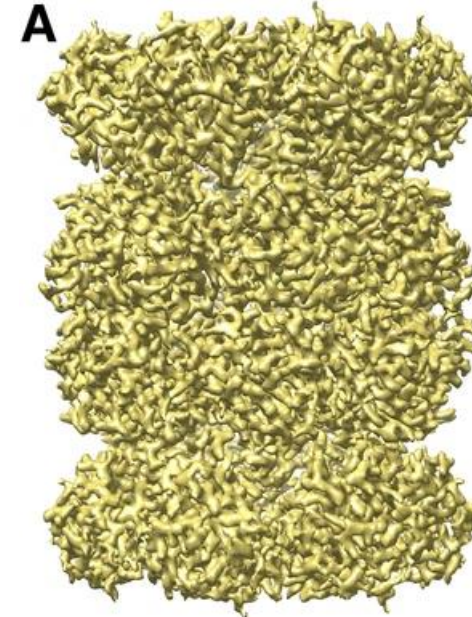


Kemijski Inštitut

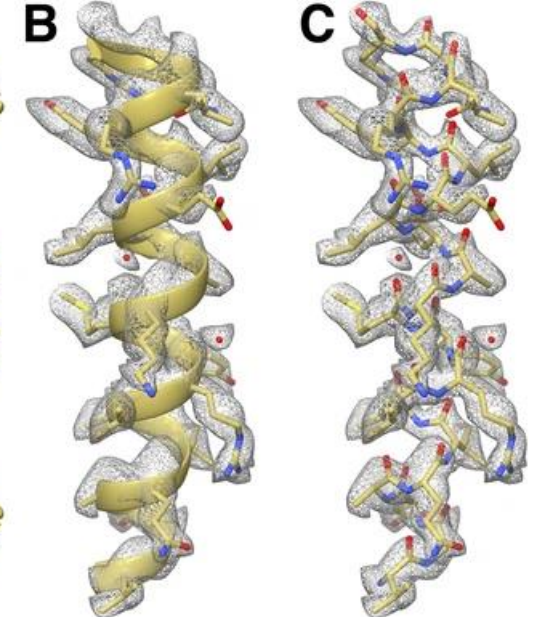
slika



3D elektronska gostota

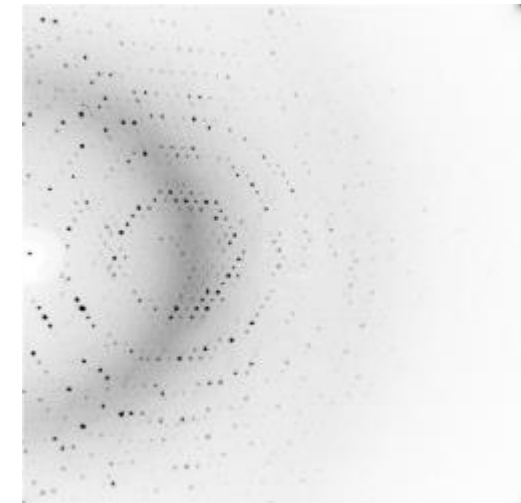
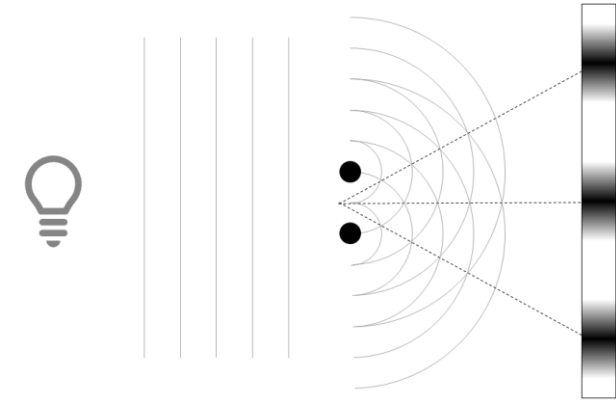


model strukture



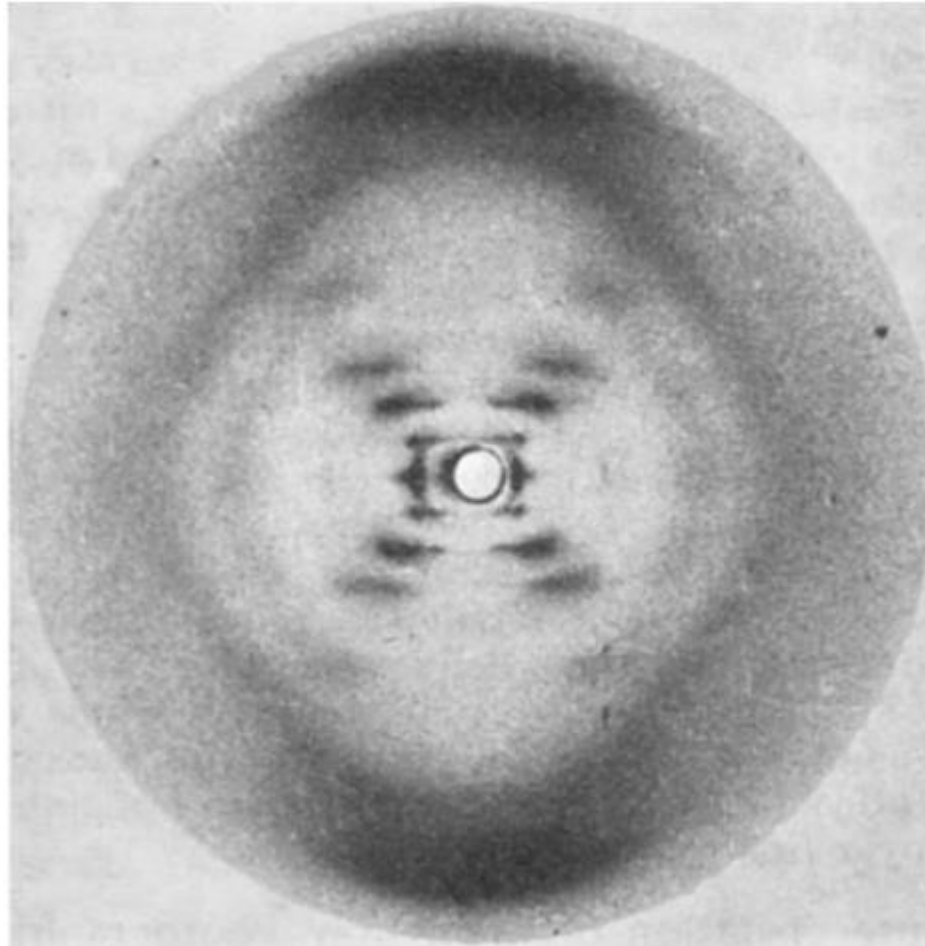
... s sipanjem rentgenske svetlobe

- 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?

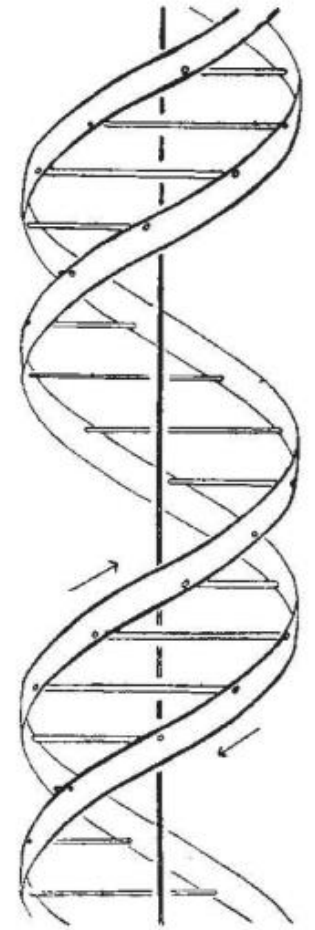


... s sipanjem rentgenske svetlobe

- 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)



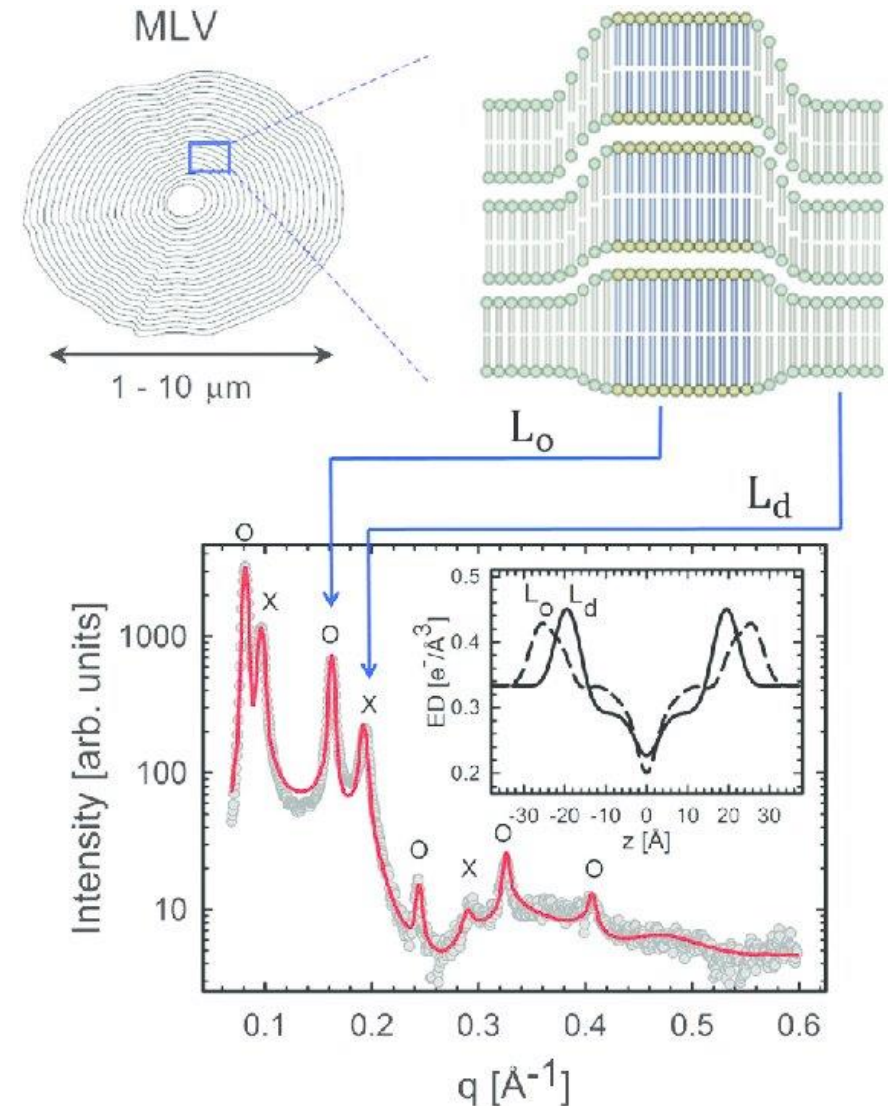
Franklin & Gosling *Nature* 1953



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)

