
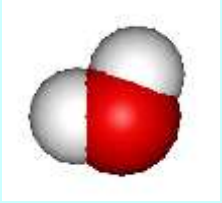
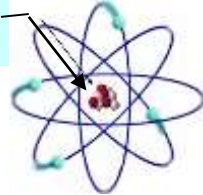


Methoden der Strukturenuntersuchung

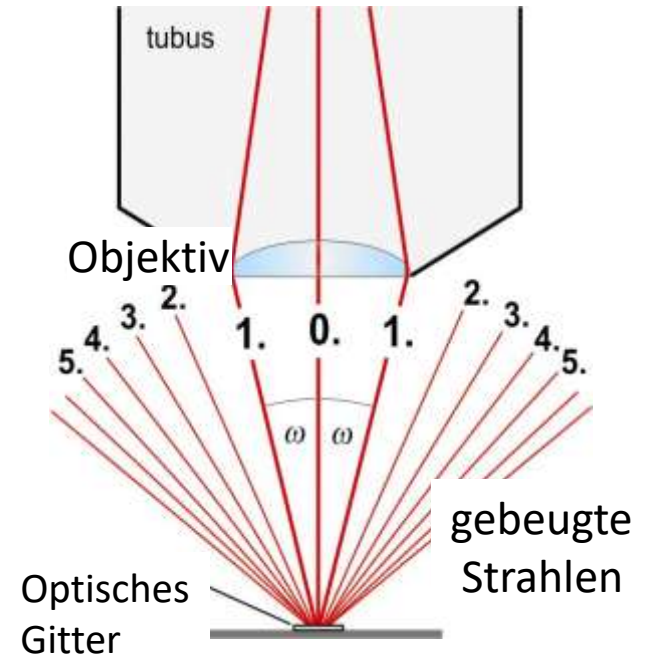
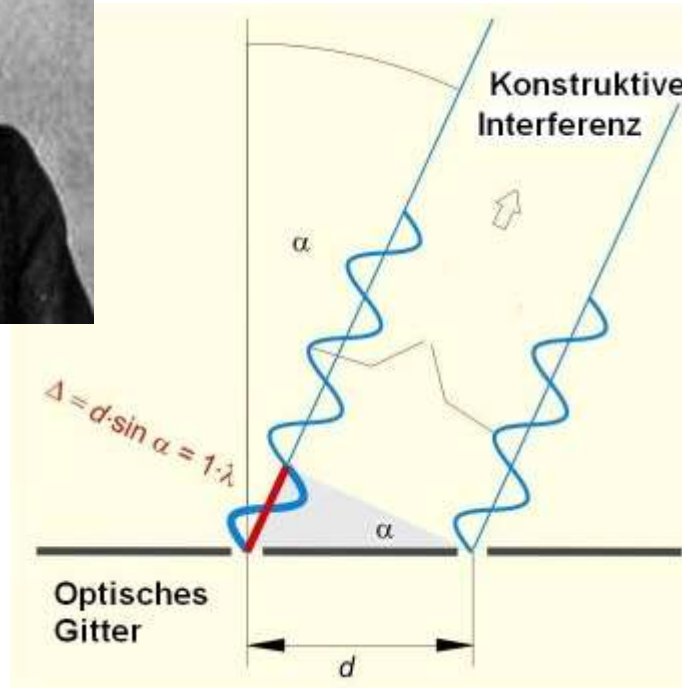
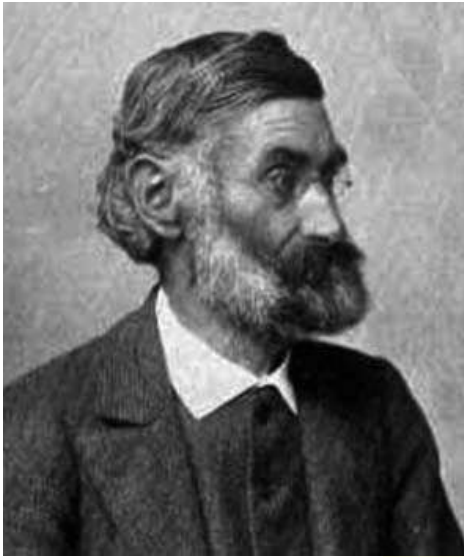
Lichtmikroskopische Techniken
Rastermikroskope

Typische Grössen

m		
10^0	meter	Mann
10^{-3}	millimeter	Abstand der man mit Auge sehen kann
10^{-6}	mikrometer	Zelle (z.B. Blutkörpern)
		 $\varnothing 7\mu\text{m}$
10^{-9}	nanometer	Protein
10^{-10}	– Angström	Durchmesser des Atoms, H Atom $\varnothing \approx 1$ Angström (Å)
		
10^{-12}	pikometer	Wellenlänge der Röntgenstrahlung
10^{-15}	femtométer	Atomkern
		



Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops



Auflösungsgrenze: $\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin\omega)$

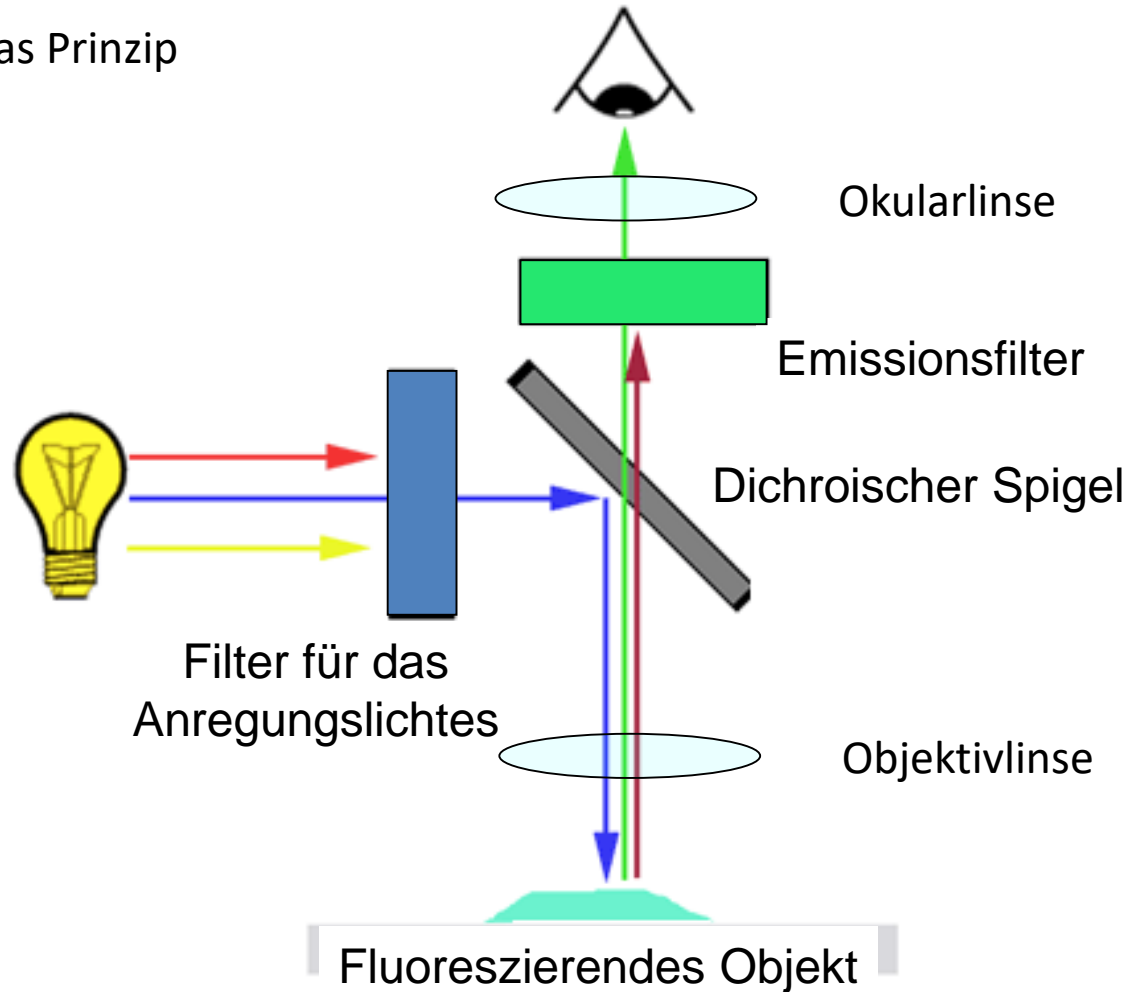
Mit $\lambda=400 \text{ nm}$, $n=1,6$ und $\omega \approx 90^\circ$ ist $d \approx 150 \text{ nm}$

Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

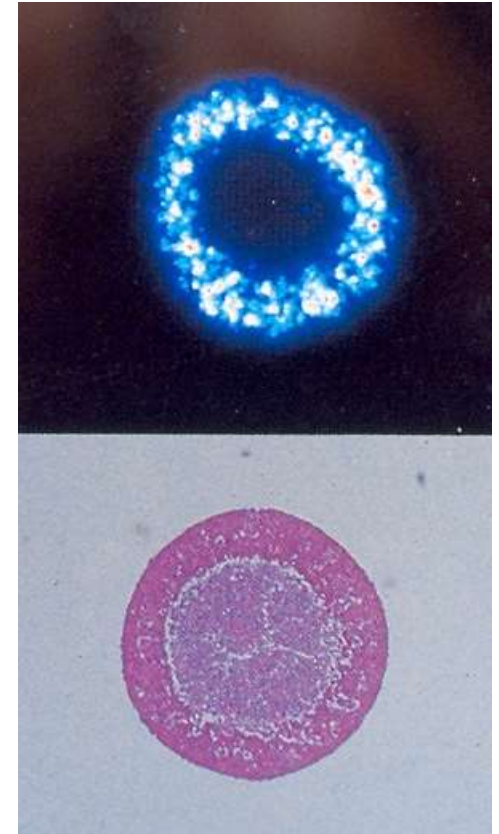
- Schon gelernt beim Praktikum:
 - Stereomikroskop
 - Phasenkontrast Mikroskop
 - Immersionsmikroskop
 - Dunkelfeldmikroskop
- Konfokales Mikroskop
- Zweiphotonenmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsmethode

Fluoreszenzmikroskop

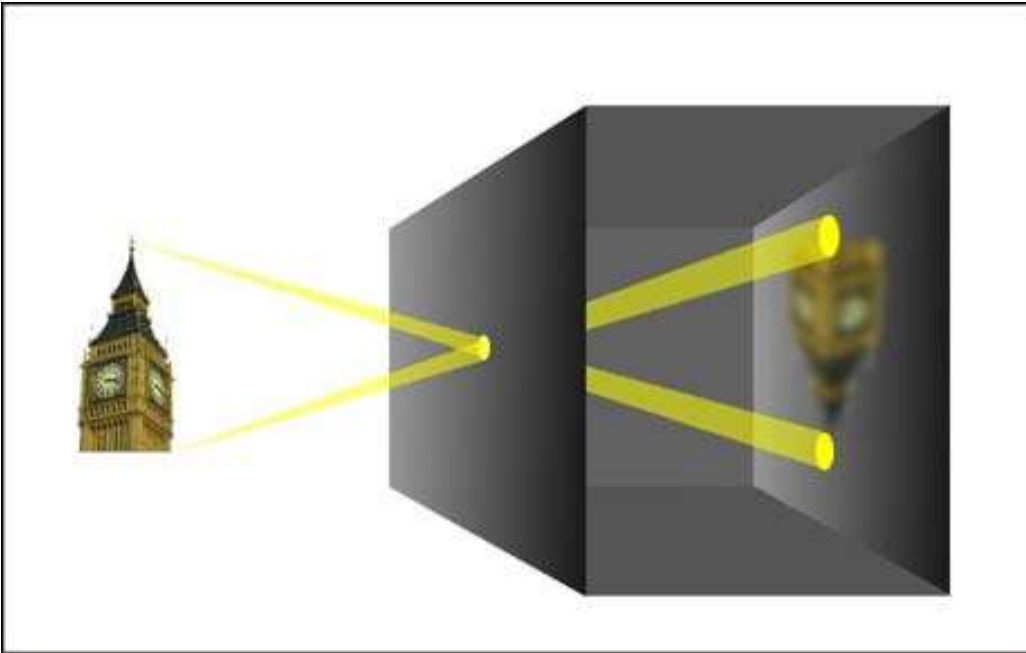
Das Prinzip



ATP-Verteilung
visualisiert mit Luciferin

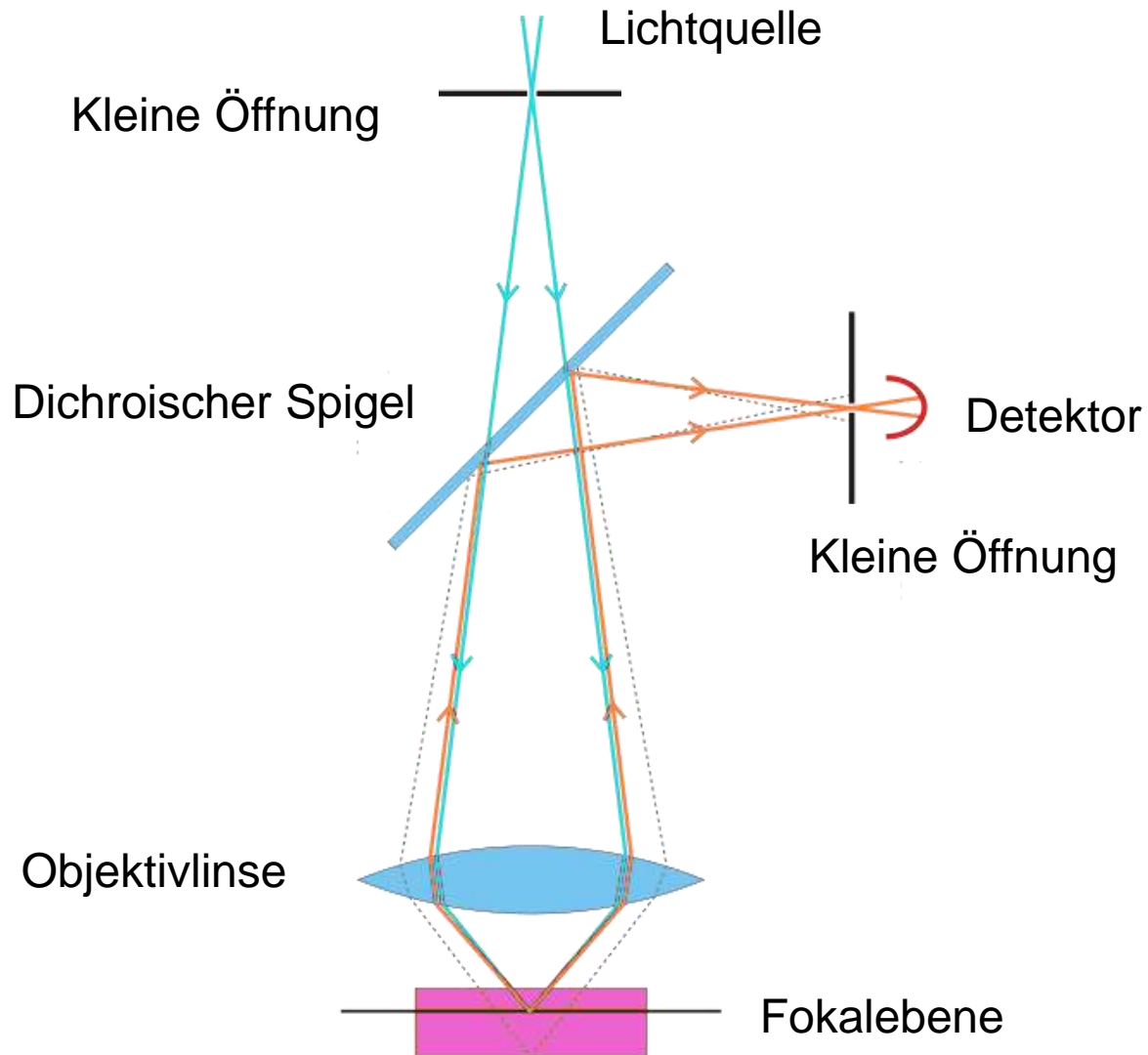


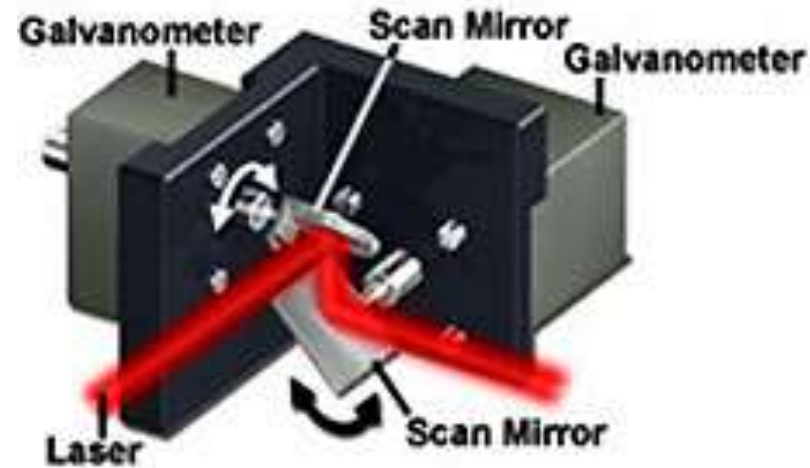
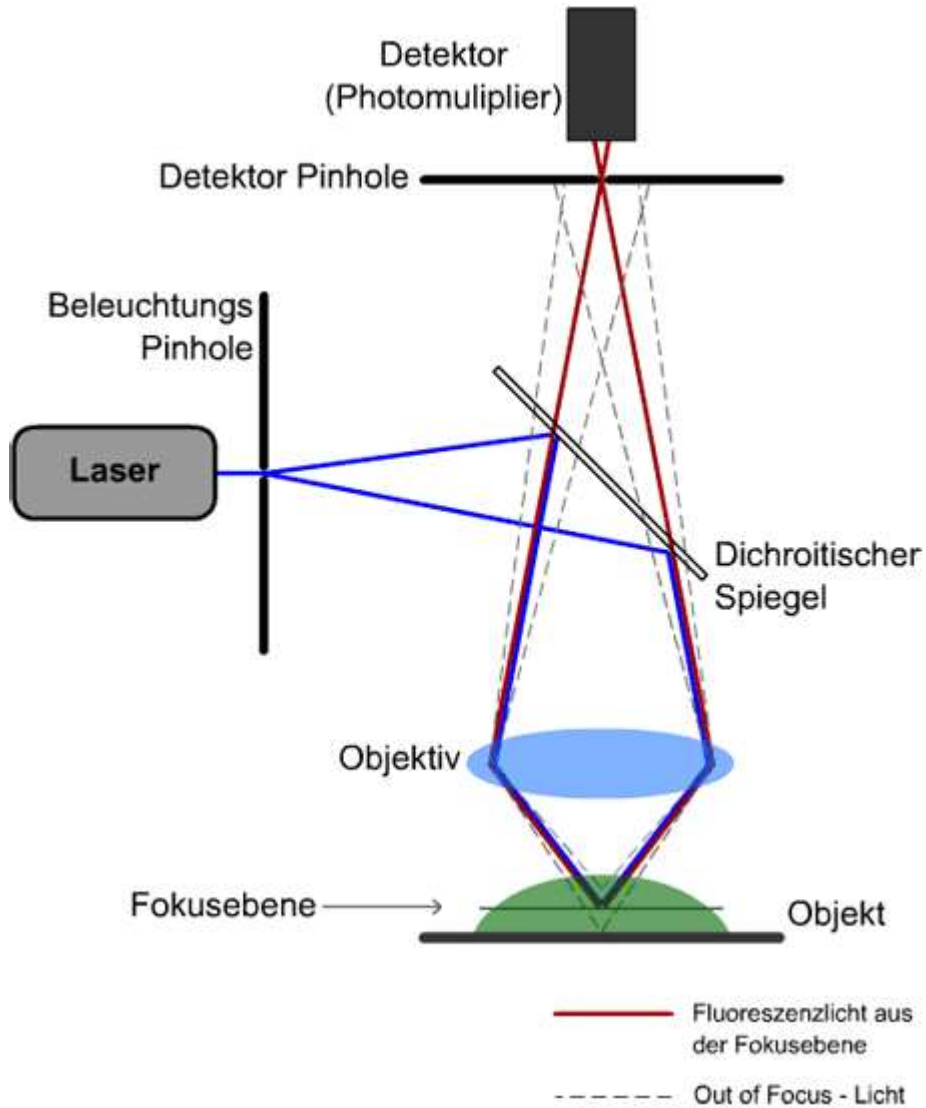
Konventionelle mikros-
kopische Aufnahme

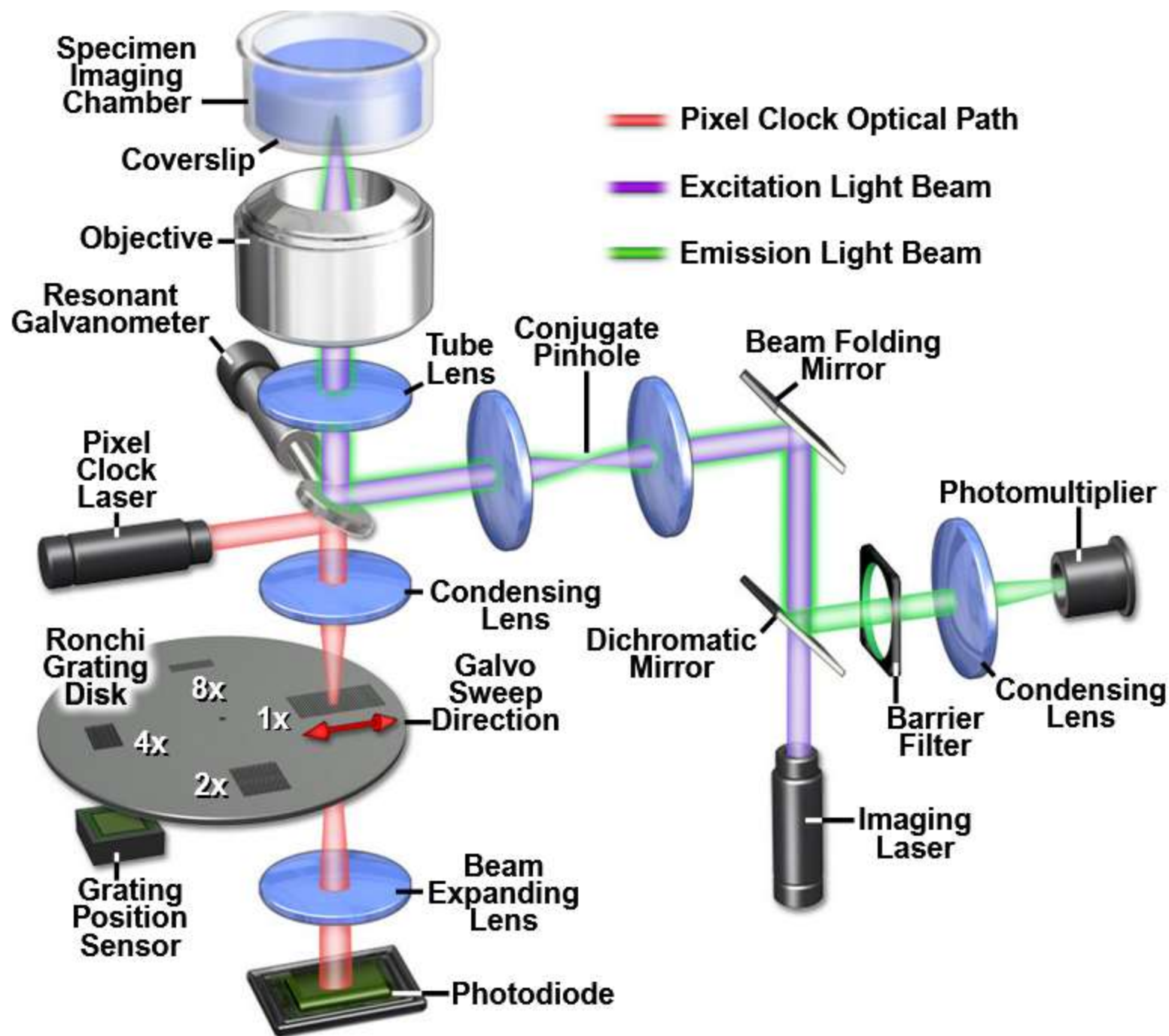


Lochkamera

Konfokales Mikroskop







Airy Disks and Diffraction Pattern Intensity Profiles

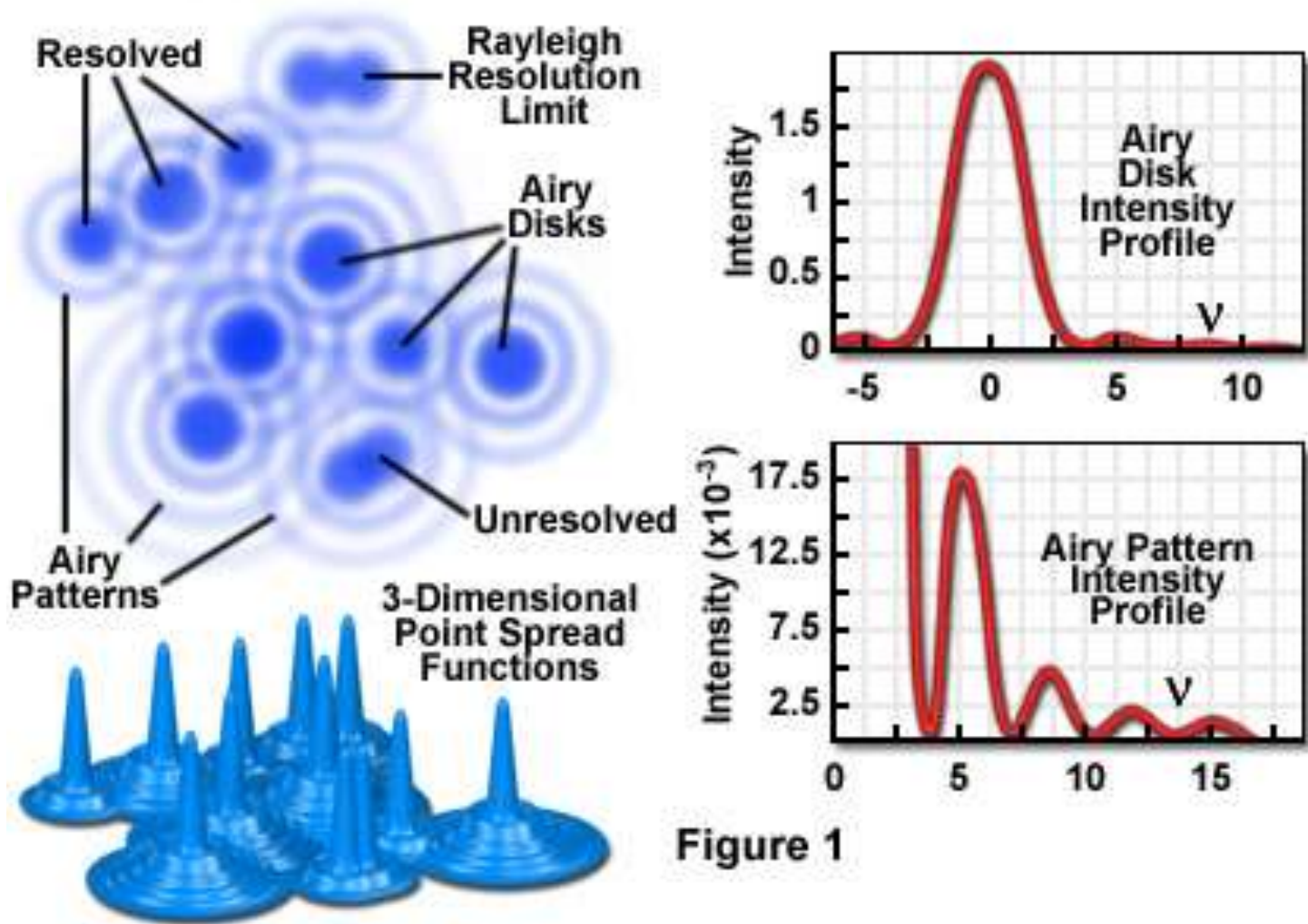
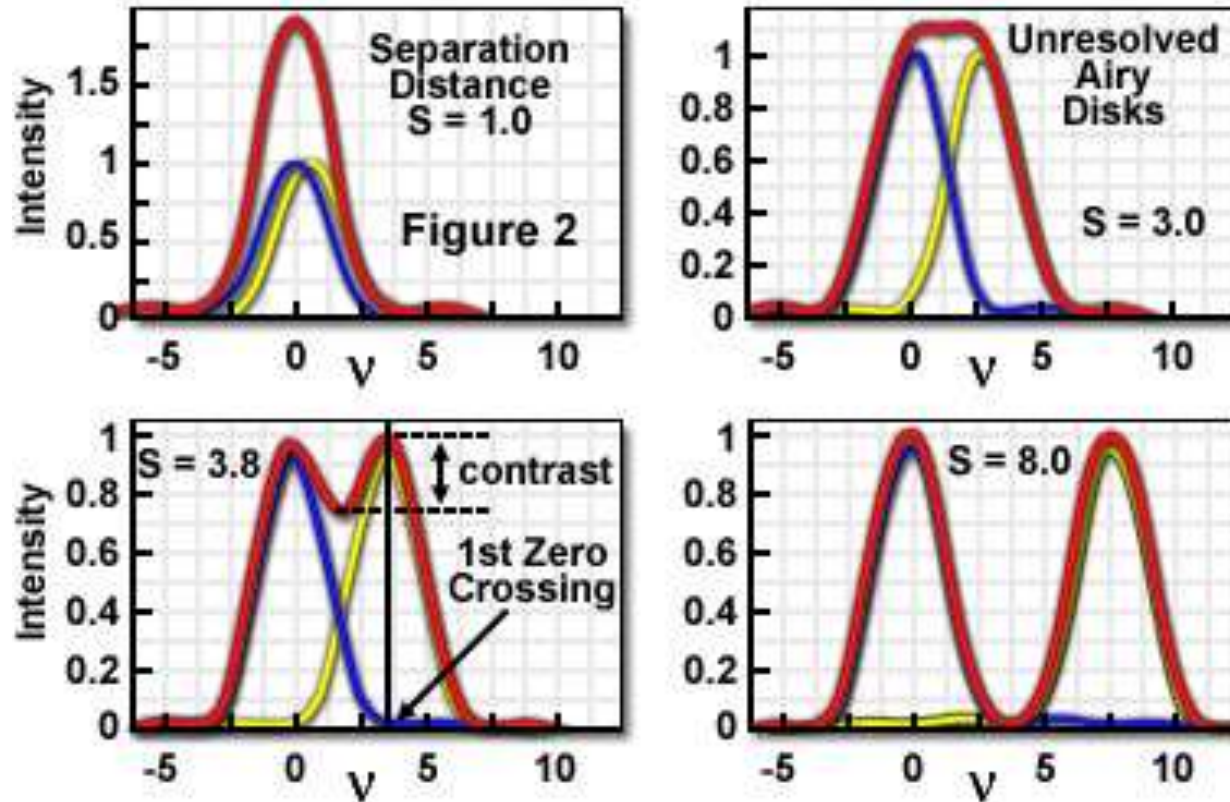


Figure 1

Contrast and Resolution in Fluorescence Microscopy



Axial PSF Intensity Profiles

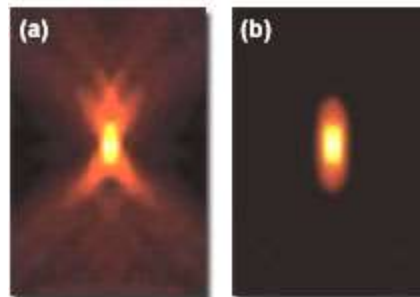
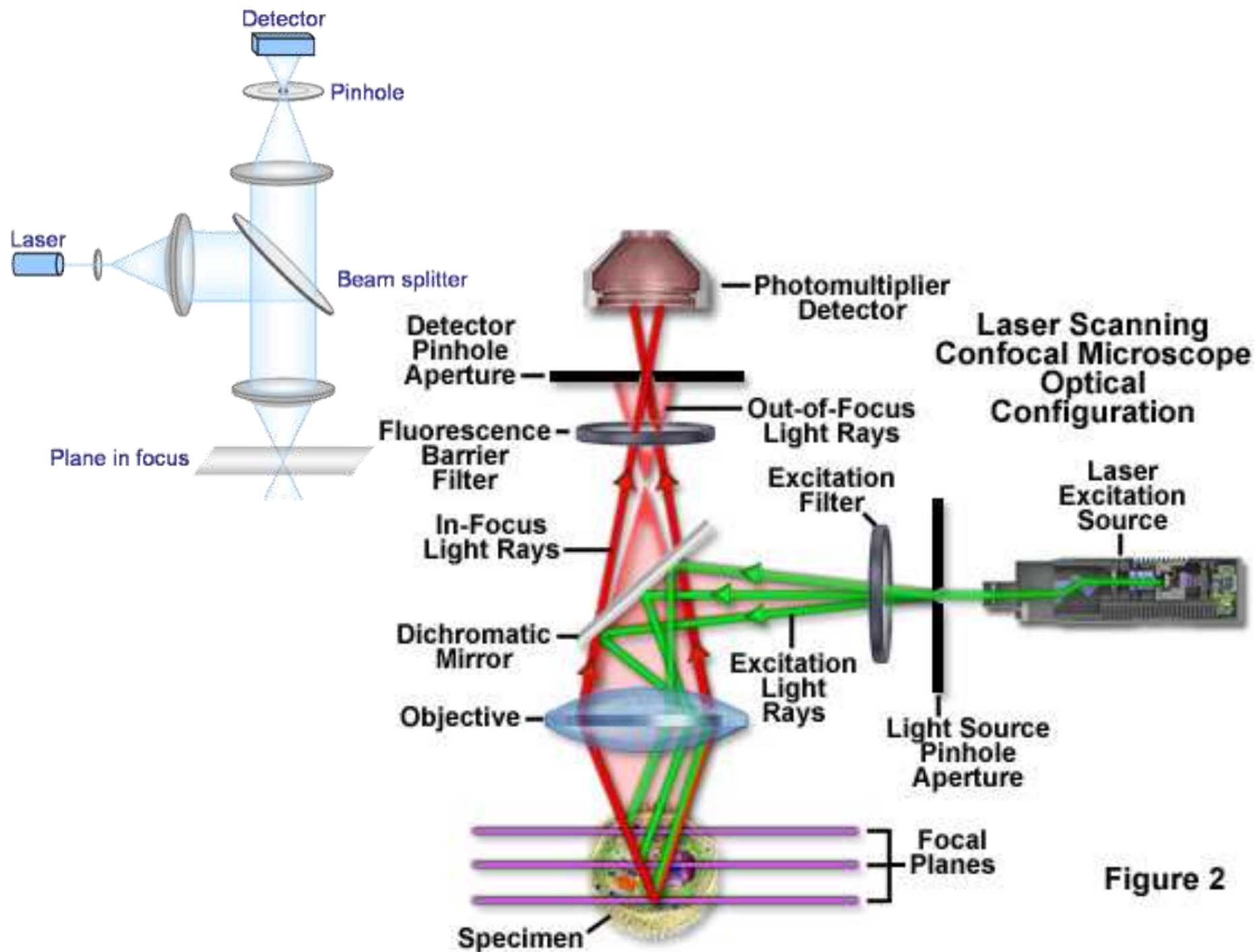


Figure 3



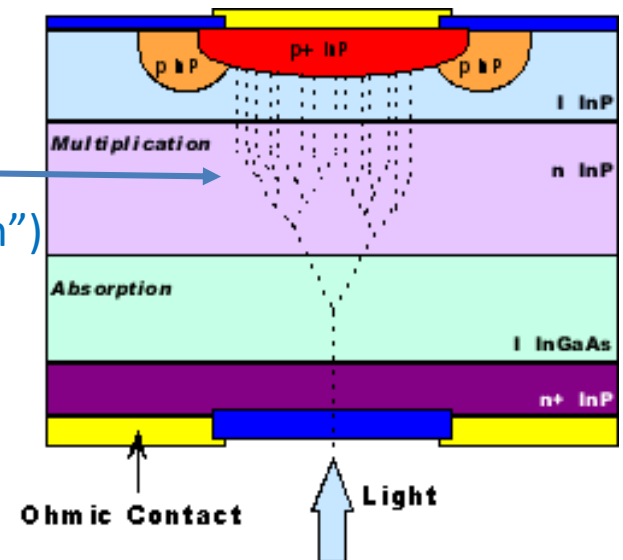
PMT



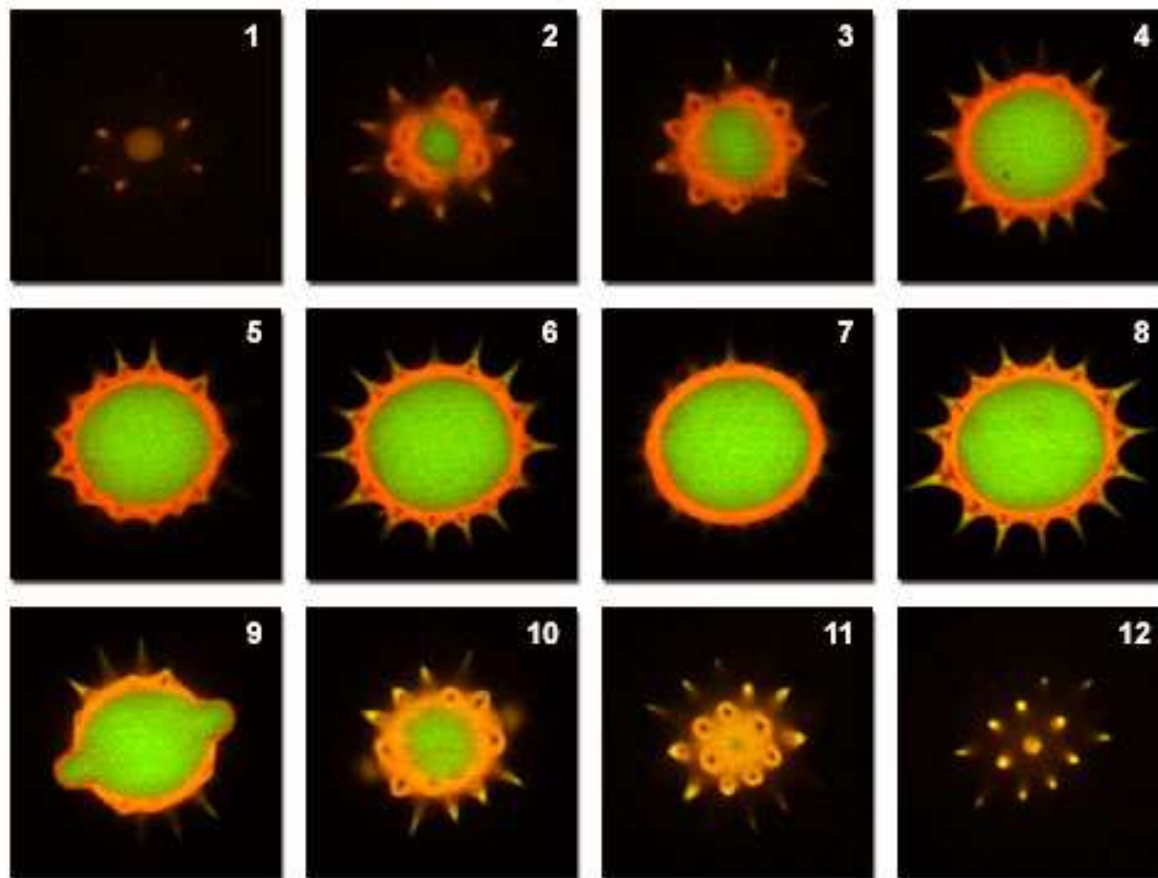
APD: Avalanche Photodiode
(Lavinenphotodiode)



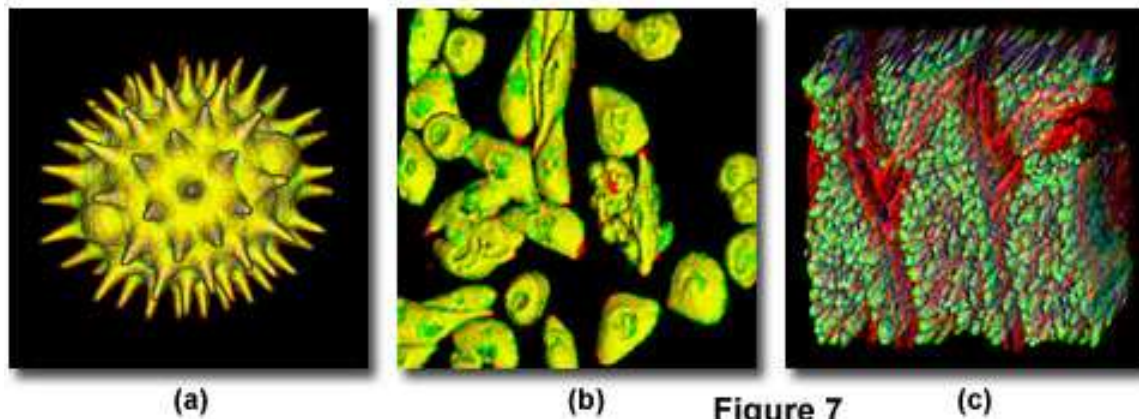
Vervielfachung
(„sekundäre Ionisation“)



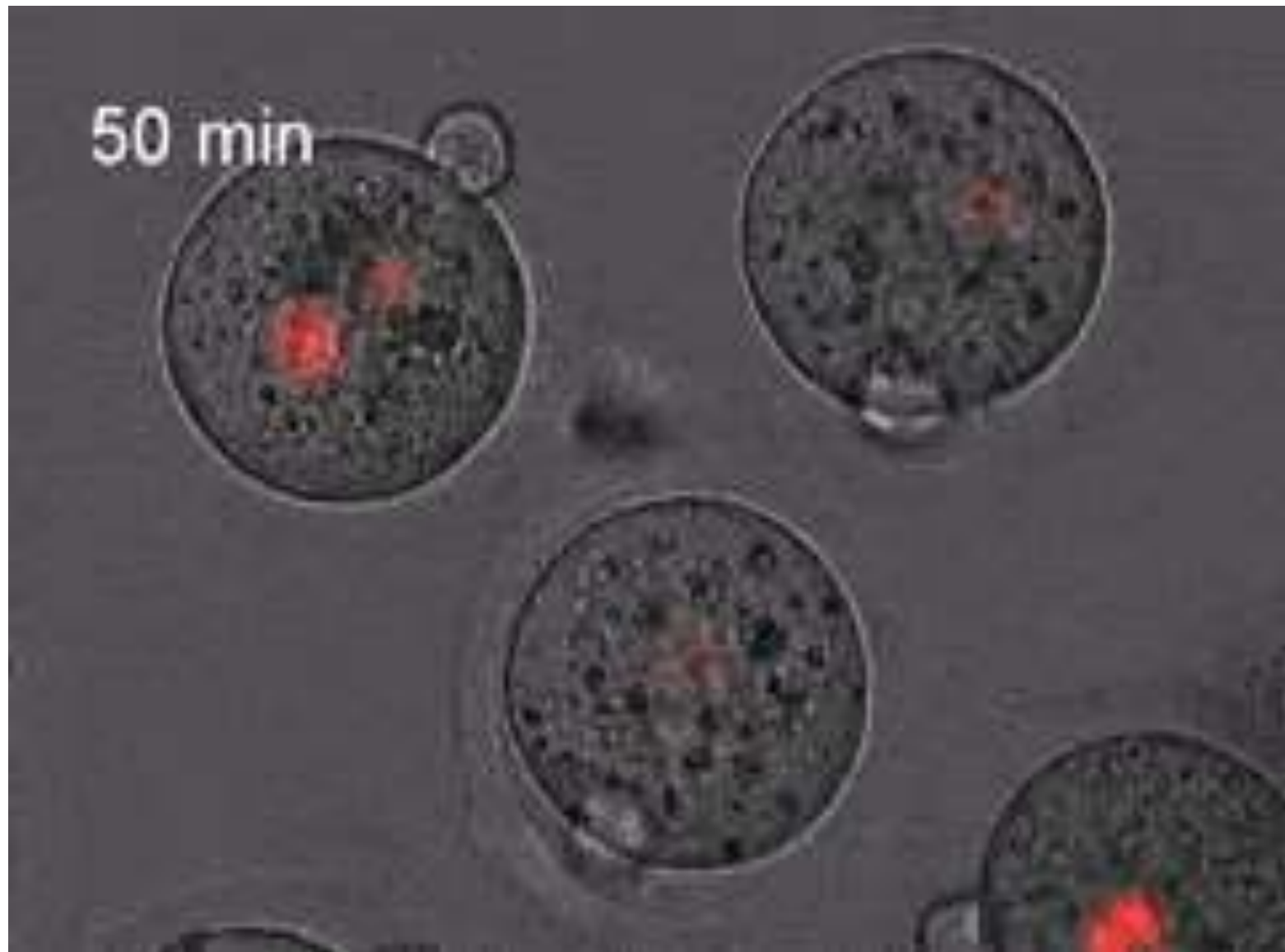
Pollen Grain Serial Optical Sections by Confocal Microscopy

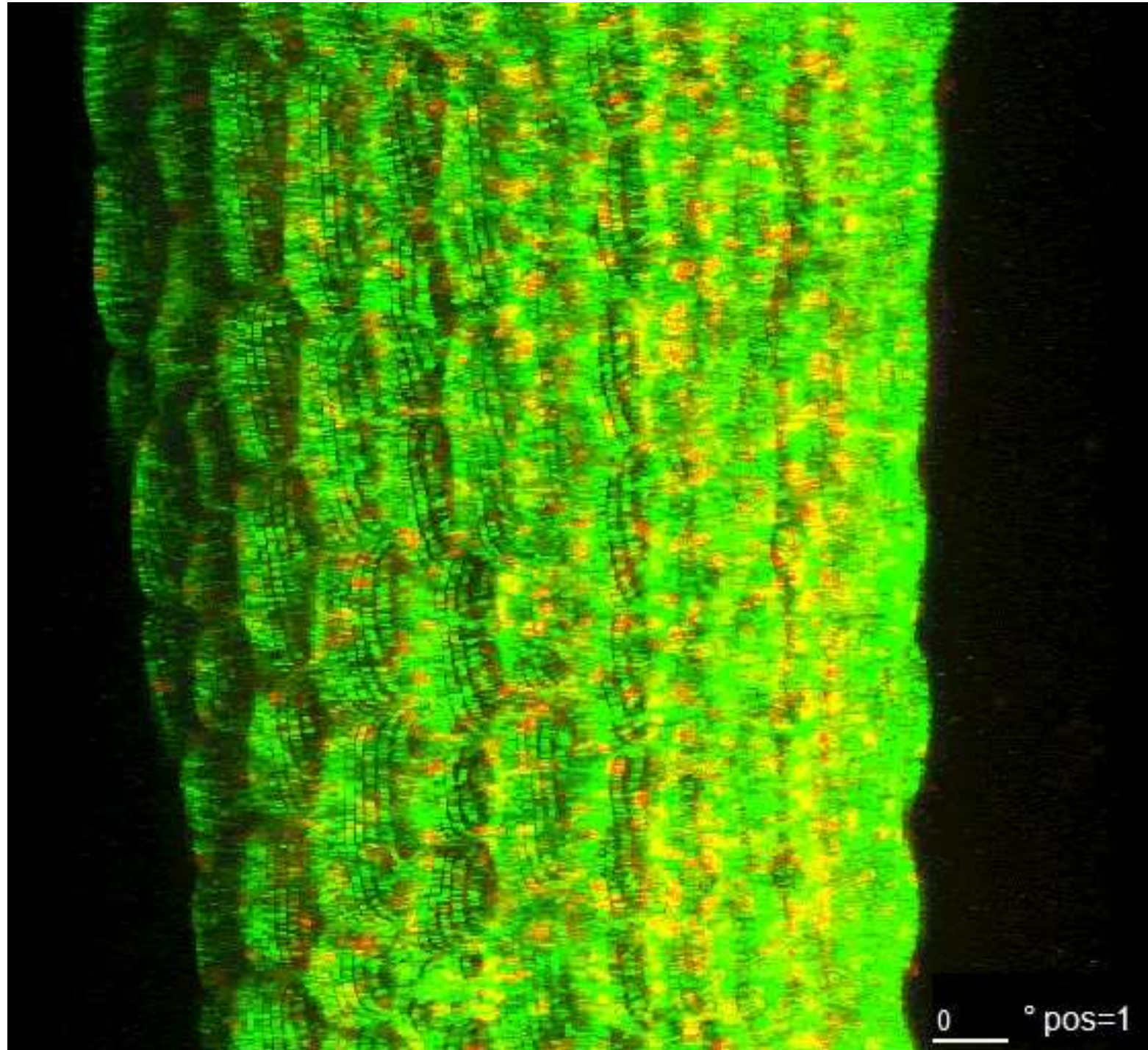


Three-Dimensional Volume Renders from Confocal Optical Sections



50 min



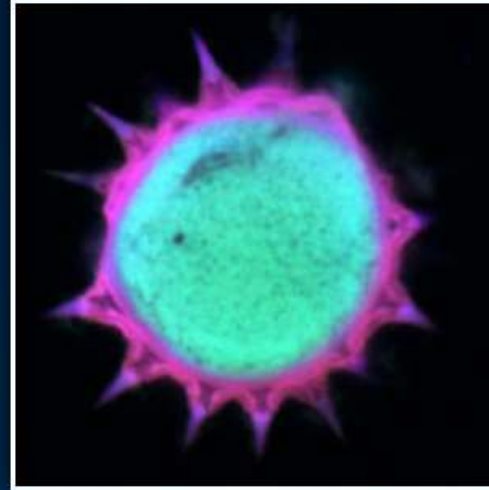


Comparing Confocal and Widefield Fluorescence Microscopy

Widefield Image



Confocal Image



Red: 25%



Green: 25%



Blue: 25%



Magnification:

100X

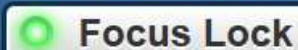
Specimen Set:

Specimen Set 1

Specimen Set 2

Specimen Set 3

Lock Button



Focus



Brightness



Z-Axis Position



Choose A Specimen

Pollen Grain

Pinhole Aperture Size:

Small Medium Large

Scan Line Speed: Medium



Spectral Overlap in Paired Alexa Fluor Probes

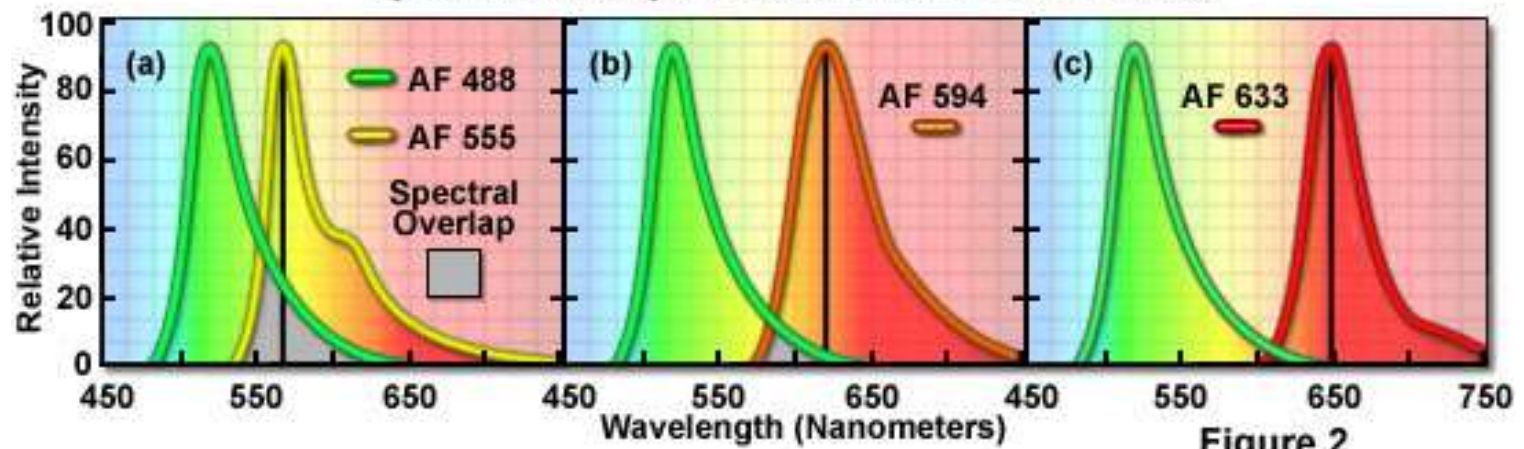


Figure 2

Fluorophore Emission Bleed-Through in Confocal Microscopy

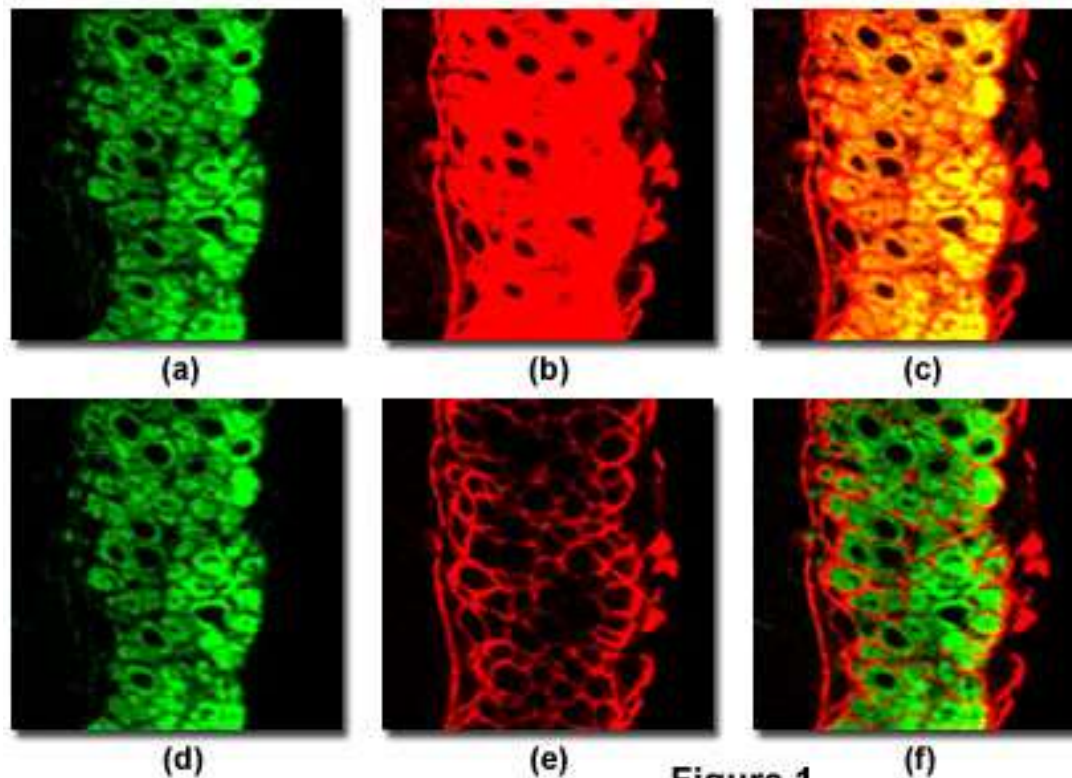
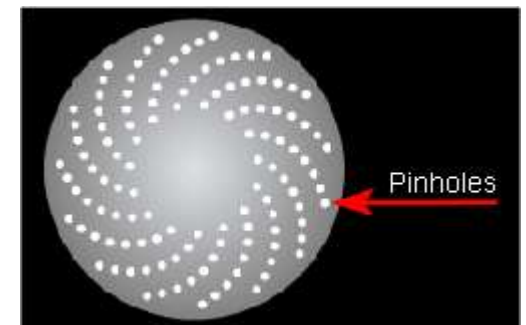
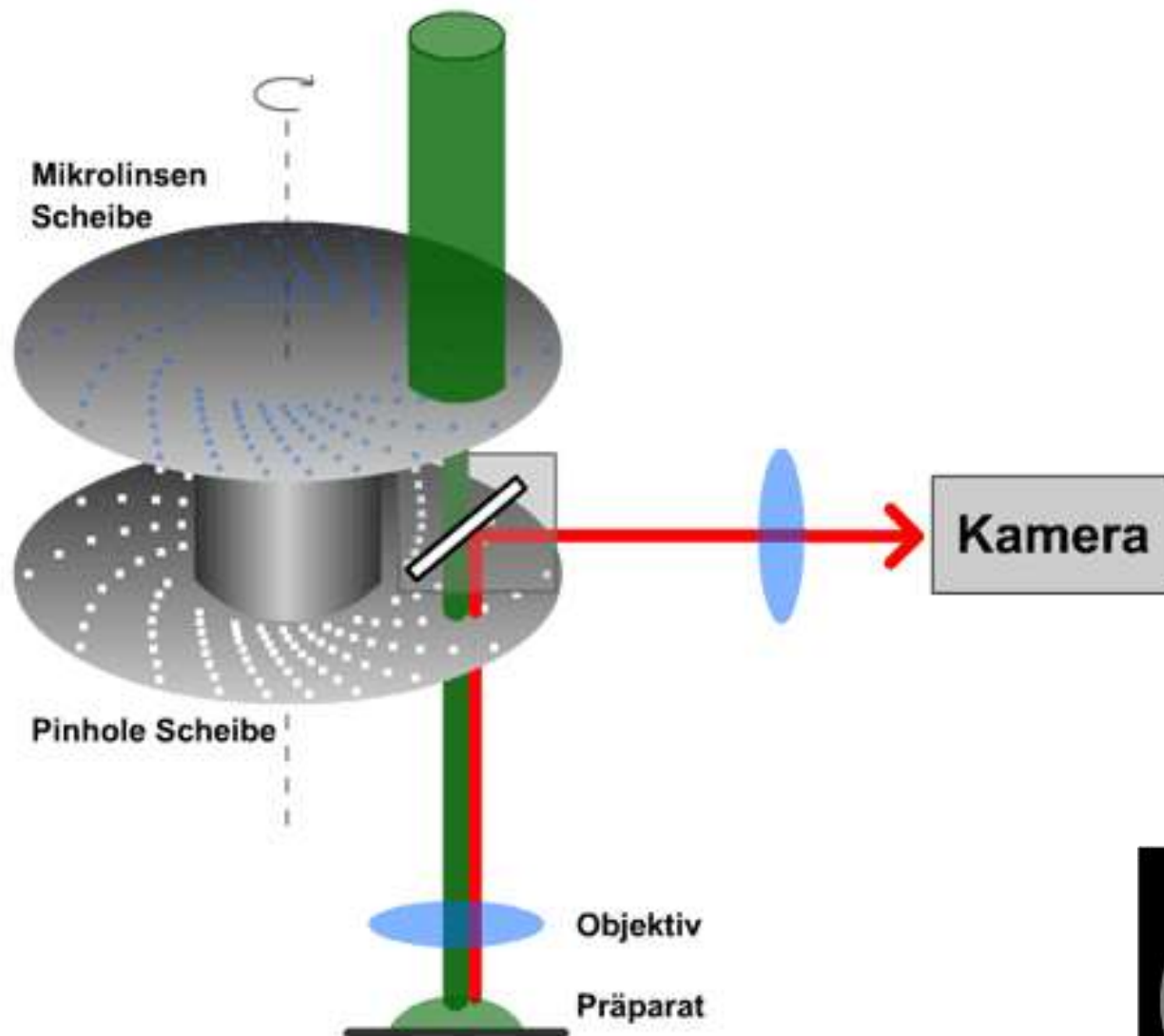
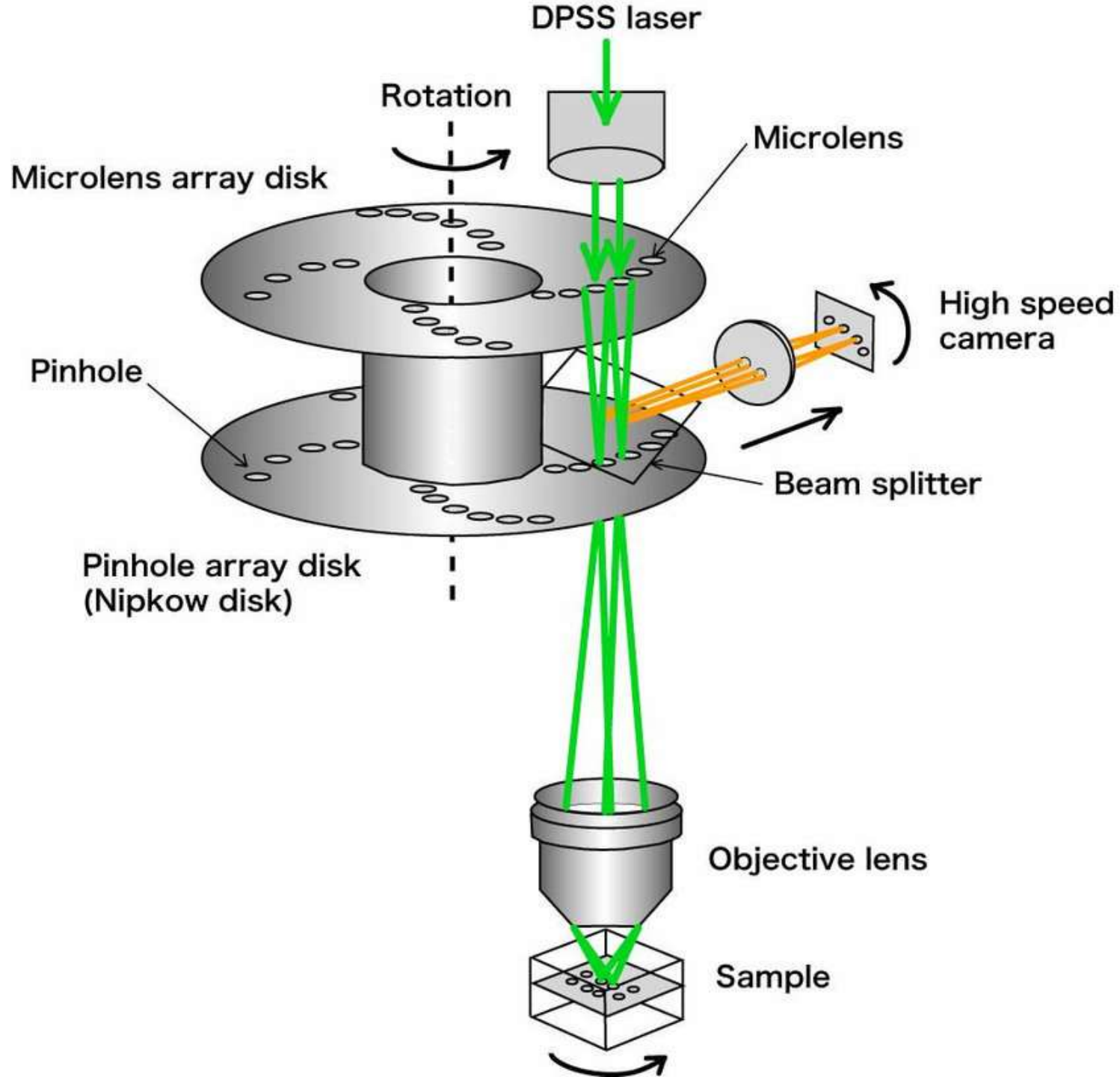


Figure 1

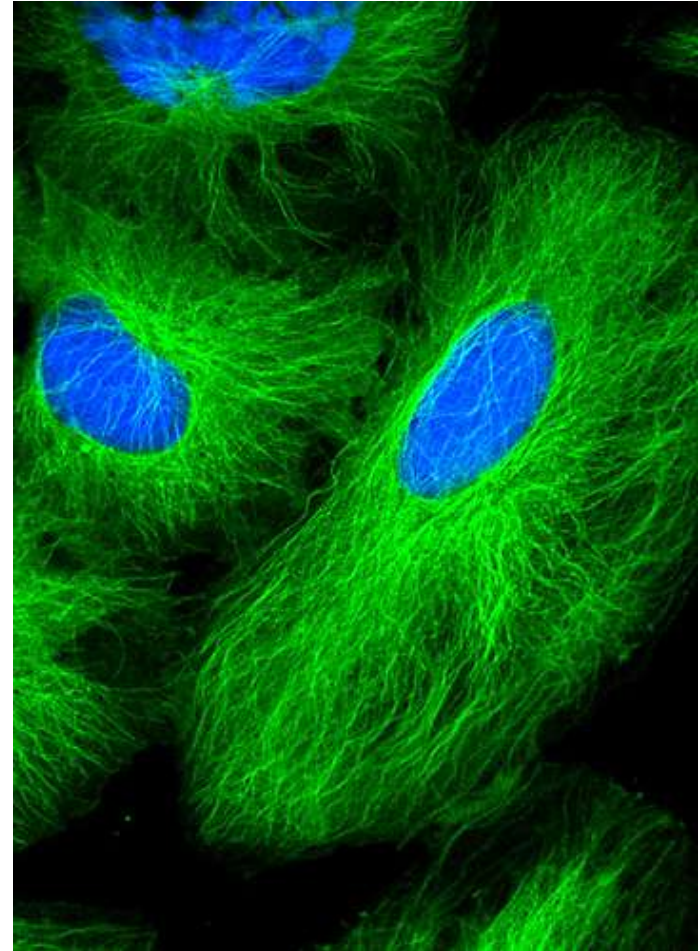


Nipkow-Disk



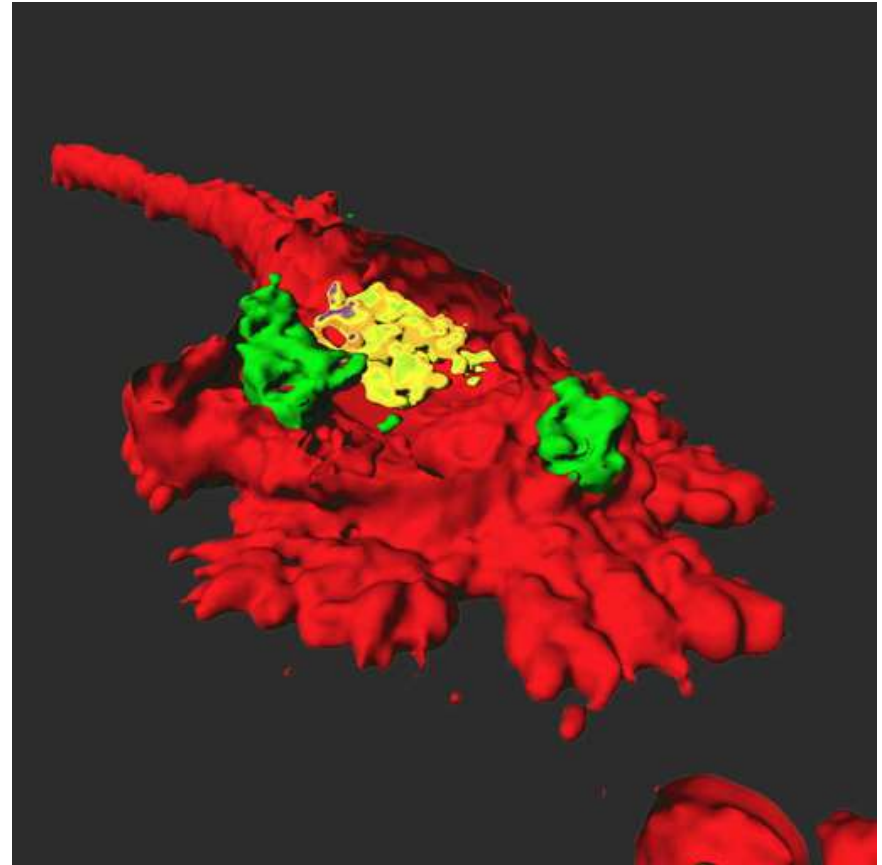
Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende
Mikrotubuli in Zellen

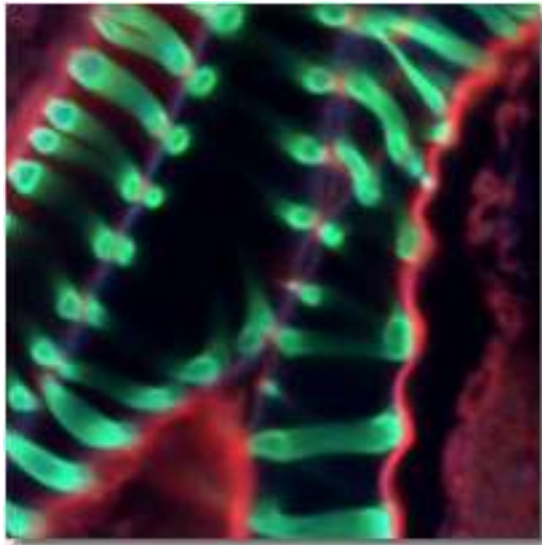
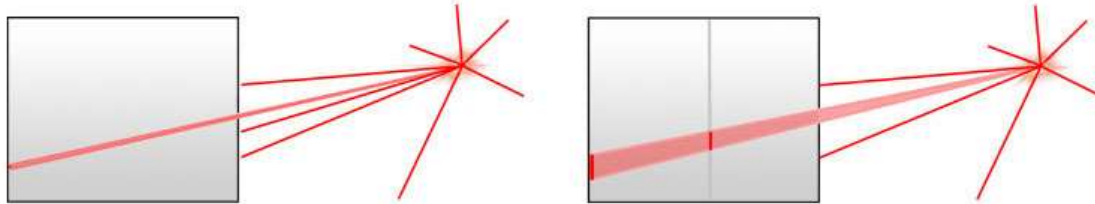


Konfokales Mikroskop

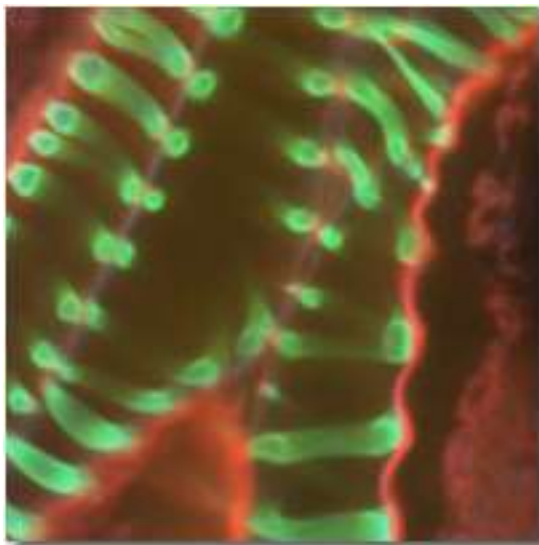
Dendritische Zelle mit
Pollenteilchen.
3D Aufnahme mit konfokalem
Mikroskop.



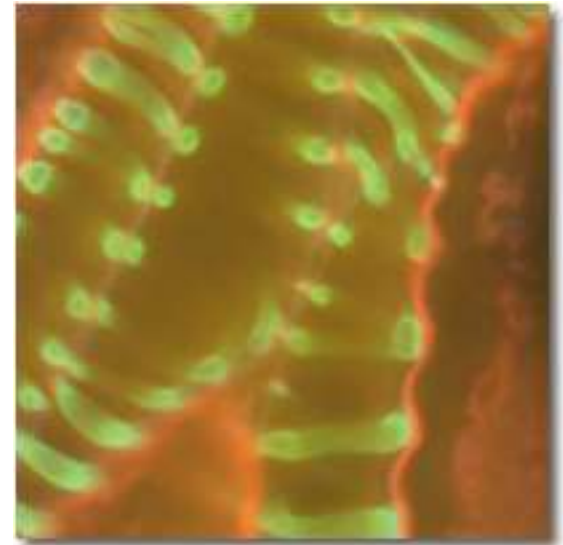
Lochblendengrösse (pinhole size)



1 Airy-Einheit



4 Airy-Einheiten

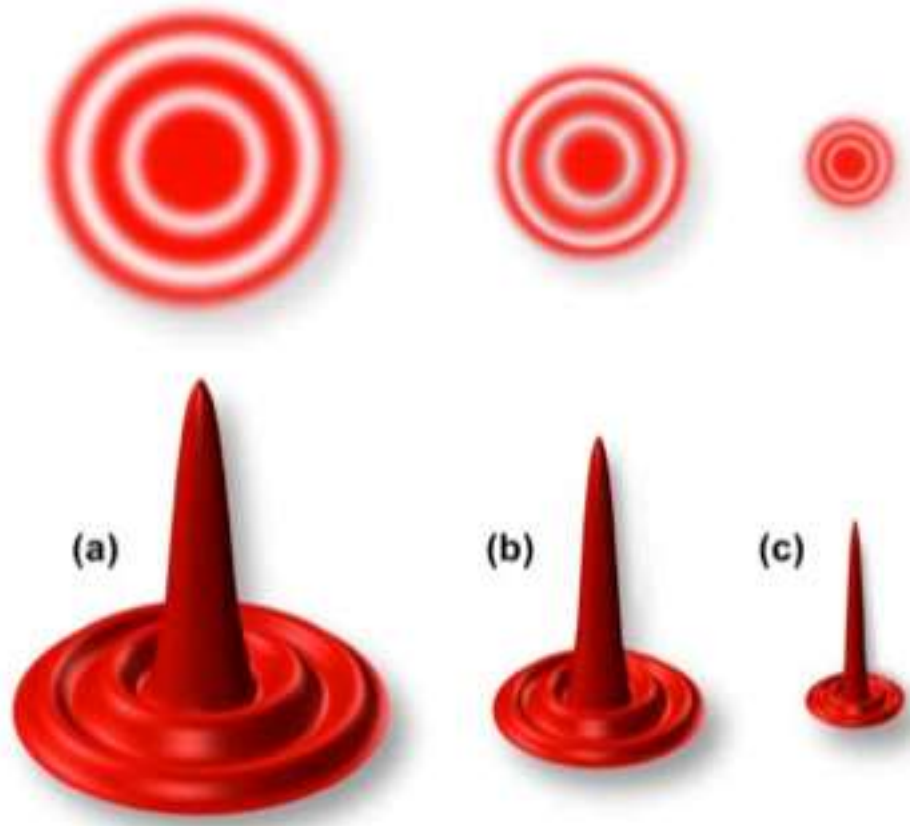


20 Airy-Einheiten

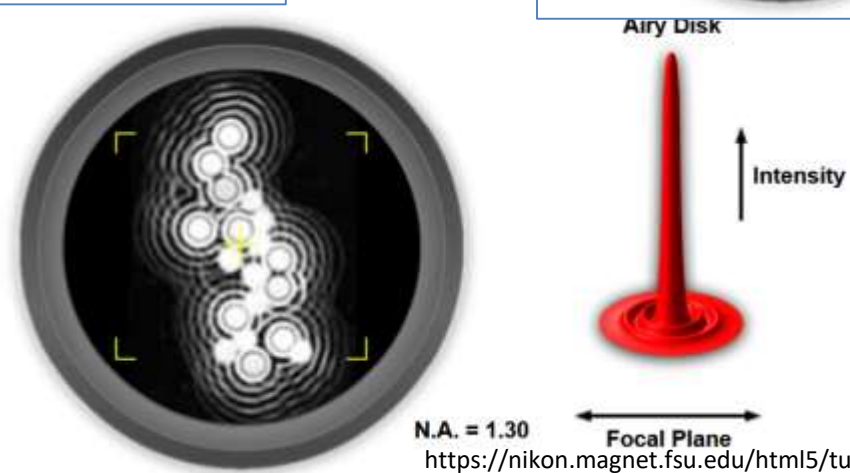
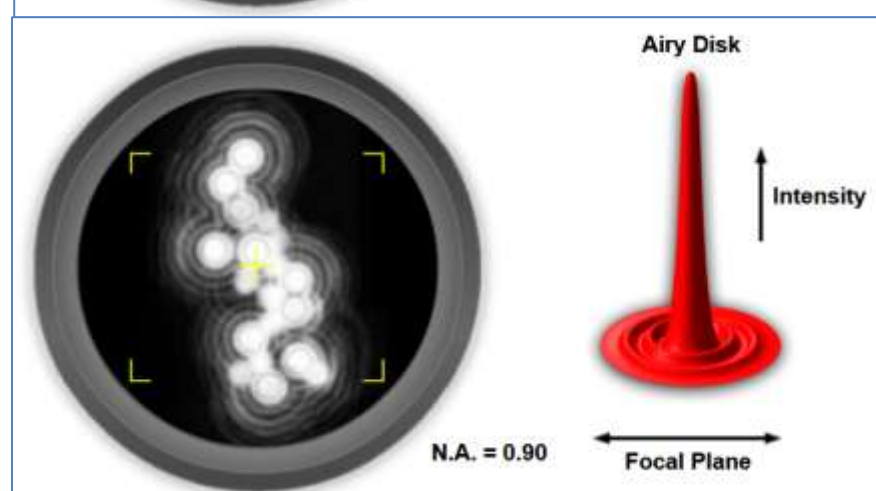
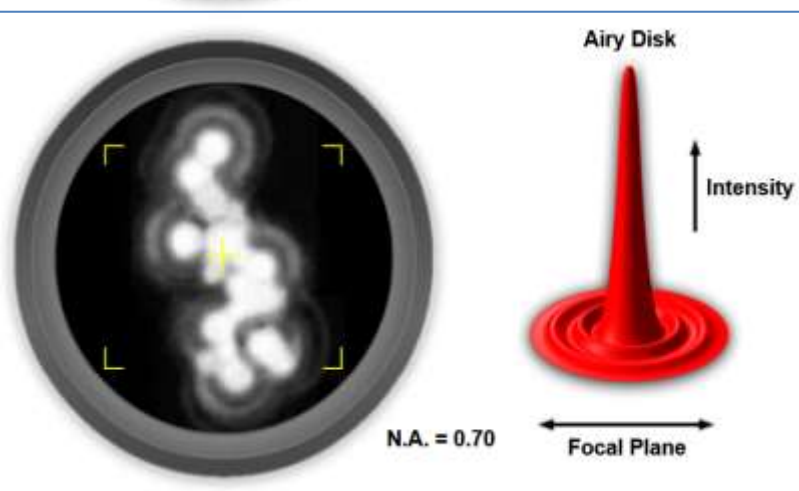
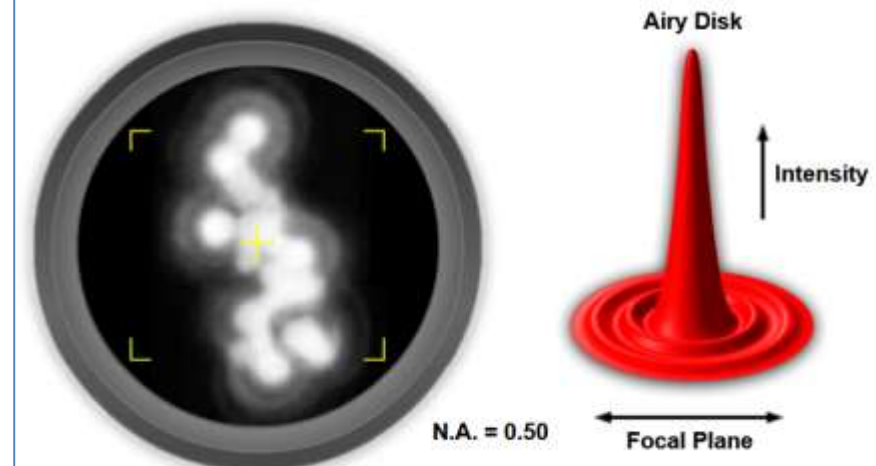
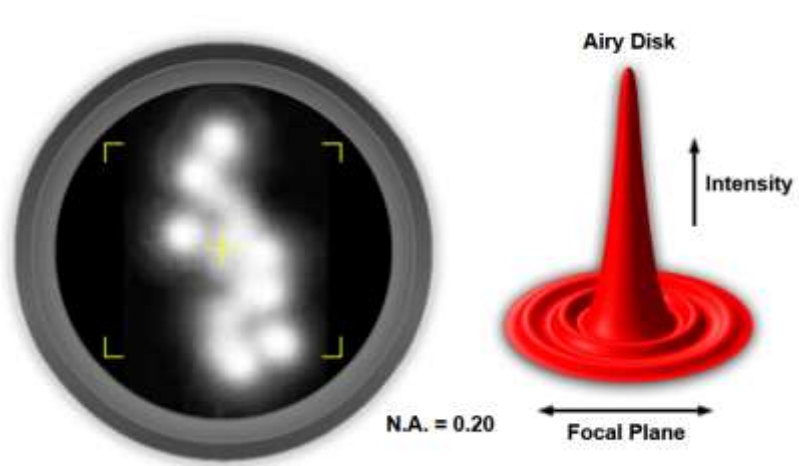
Airy-Einheit

$$1AE = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

Die Numerische Appertur beeinflusst die Scheibengrösse:



$$\Delta r_E = \frac{1.22 \cdot \lambda}{NA}$$

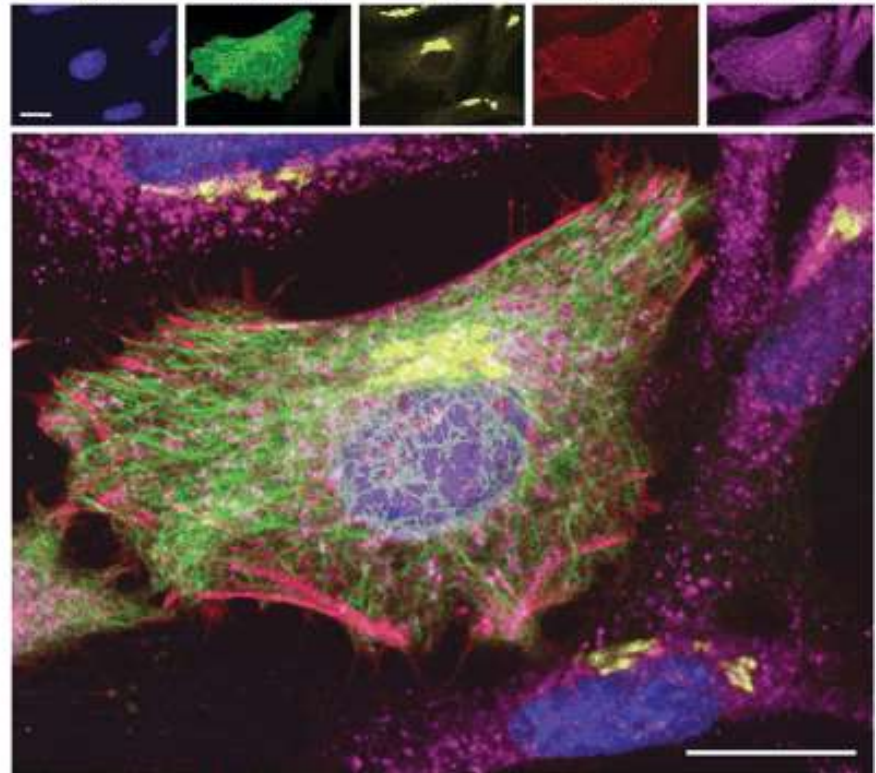


Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit fünf unterschiedlichen Fluoreszenzmethoden.

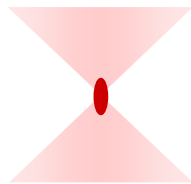
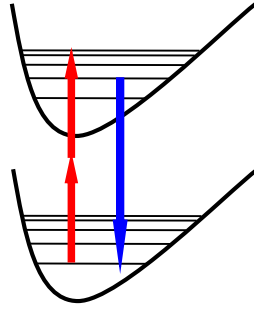
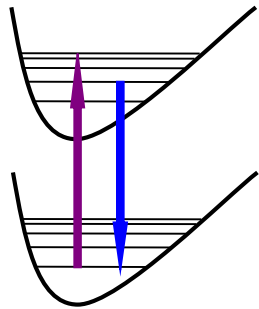
Der Masstab ist 20 μm .

Excitation (nm):	800 (2 photon)	488	432	568	637
Emission (nm):	410-490	500-530	555-565	580-620	>660
Fluorophore:	Hoechst	GFP	QD565	ReAsH	Cy5
Targeting:	direct affinity	genetic	immuno	genetic	immuno
Target:	DNA	α -tubulin	giantin	β -actin	Cytochrome c
Structure:	nuclei	microtubules	golgi	stress fibers	mitochondria

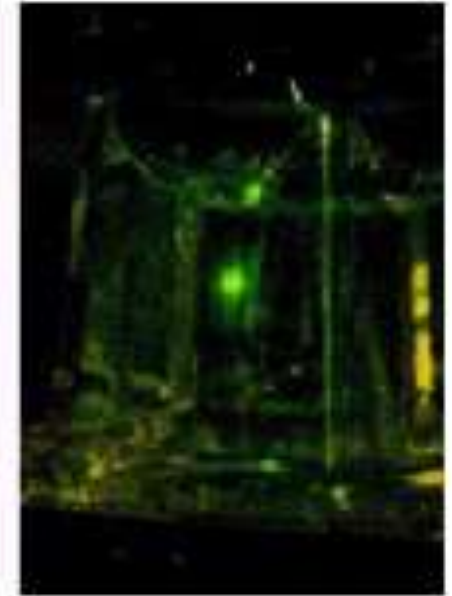


Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen

Zweiphotonenmikroskop



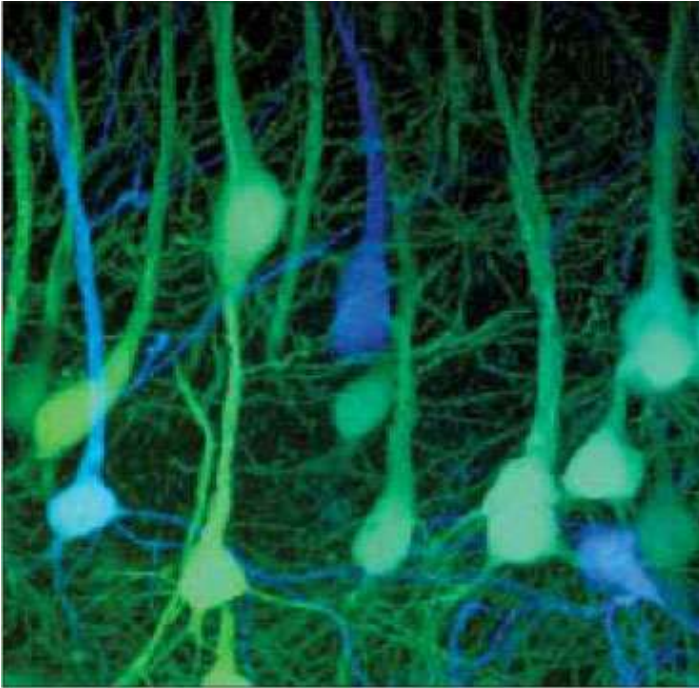
IR Laser



Fluoreszenzmission bei
Einphoton- und
Zweiphotonenanregung.

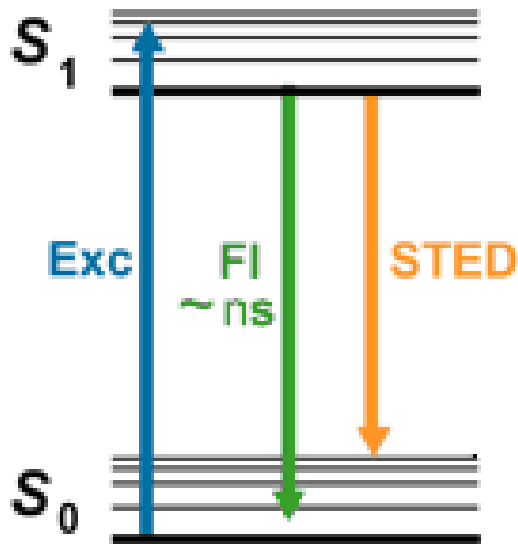
Auflösung!

Zweiphotonenmikroskopie

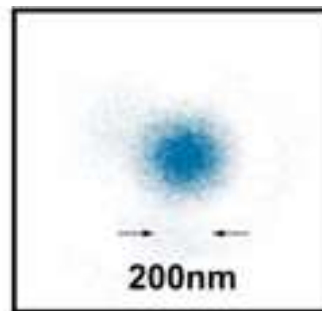


Visual Cortex von genetisch manipulierten Mause die GFP produzieren.

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

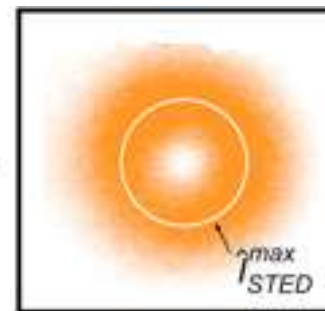


Stefan Hell (Nobelpreis 2014)



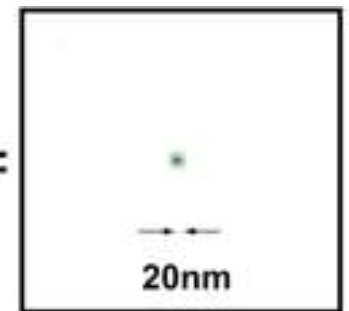
Anregung

+



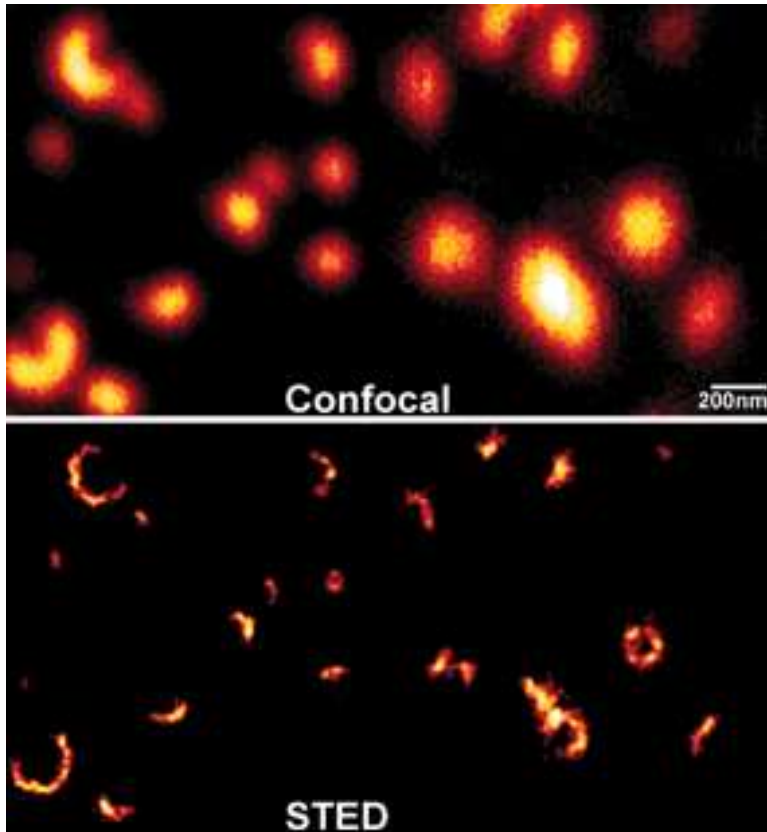
Auslöschung

=



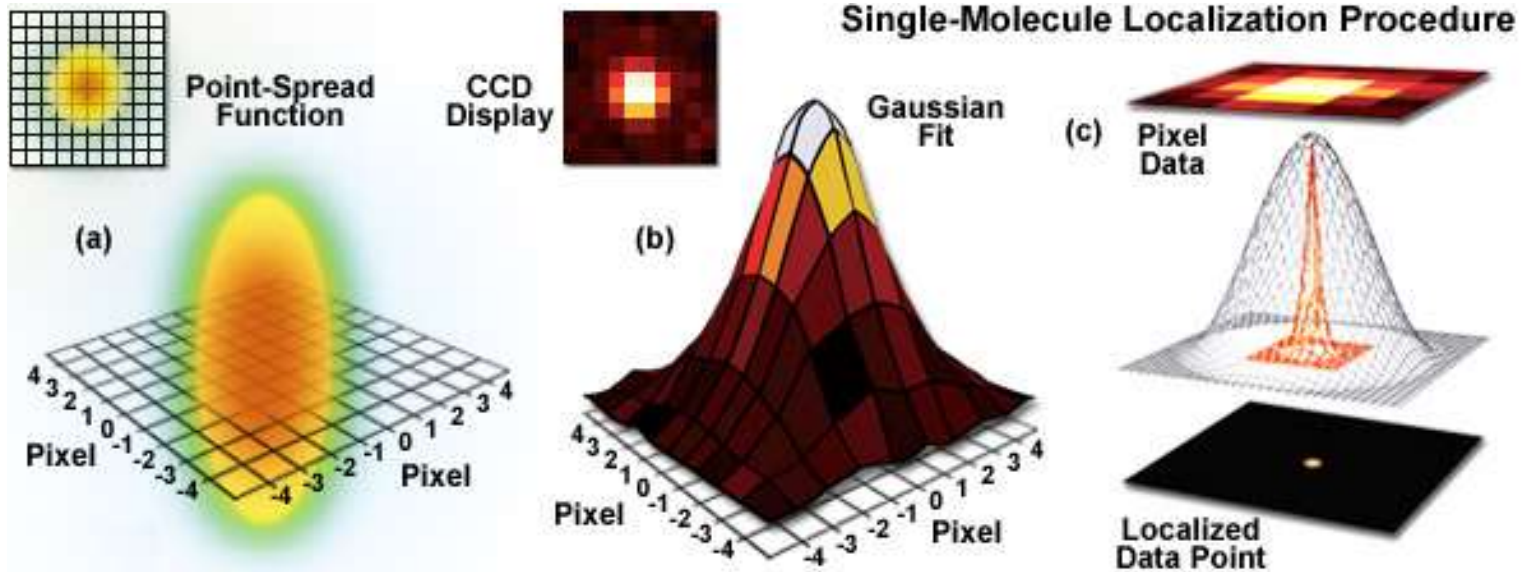
Lumineszenz nach
dem Auslöschung

STimulated Emission Depletion (STED) Mikroskop

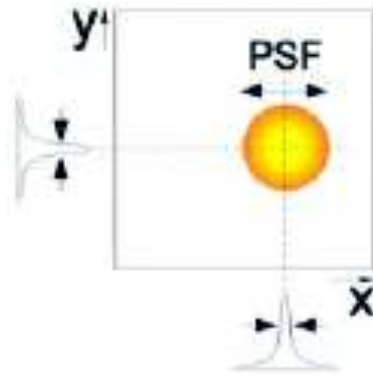
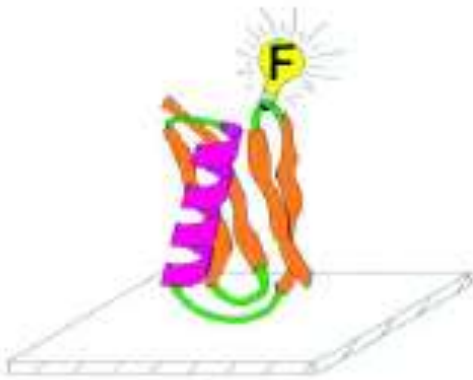


**Reorganization des
Synaptolysins in
synaptischen Vesikeln**

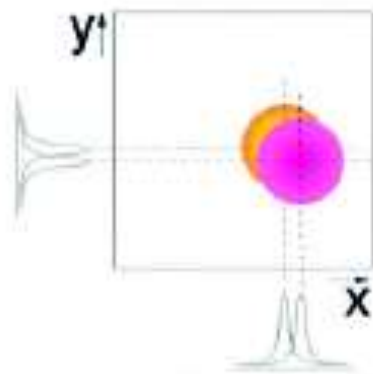
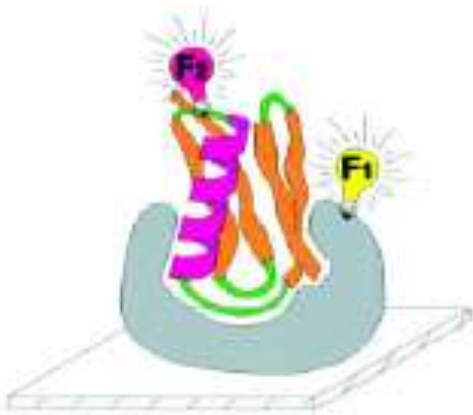
STED: Localization



STED: Lokalization und Kolokalization



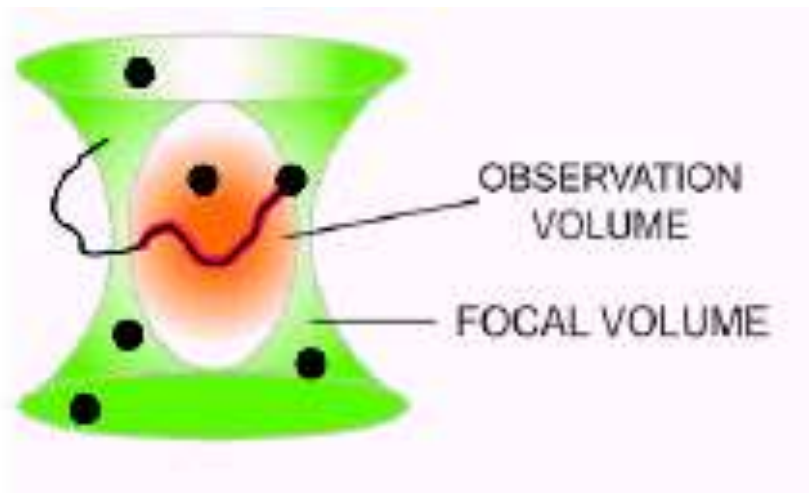
Die Position des Eiweisses kann mit nm Genauigkeit angenommen werden.



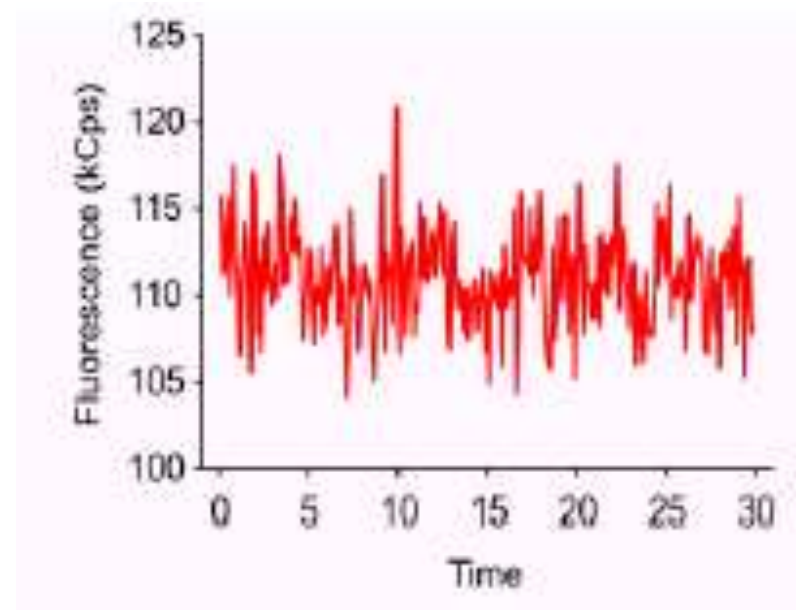
Kolokalization bedeutet nicht unbedingt eine Wechselwirkung!

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

Fluktuation der Molekülen in einem
sehr kleinen Volumen: fl
Konzentration: 10 nM
Anzahl der Moleküle in
Beobachtungsvolumen beträgt
durchschnittlich: 6



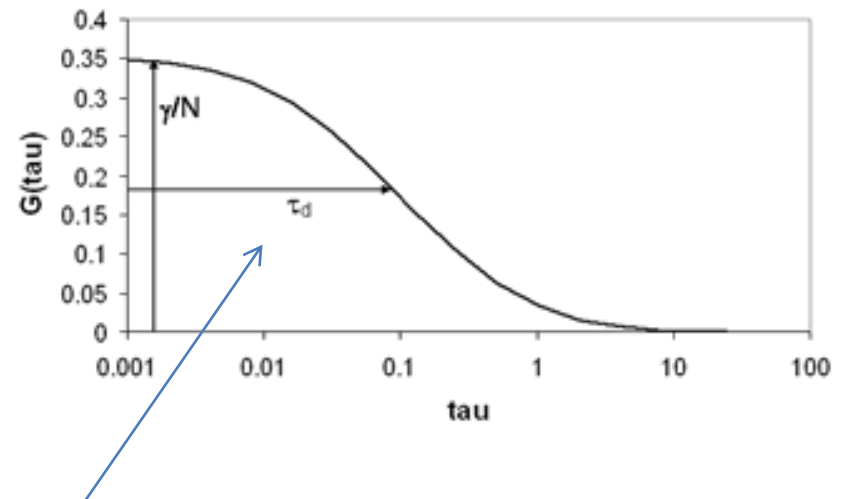
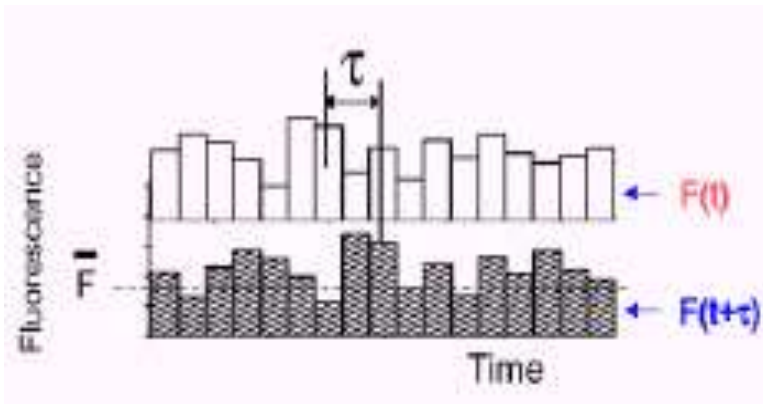
Fluktuationen des
Fluoreszenzlichtes:



Ähnlich zur dynamischen Lichtstreuung, aber mit Fluoreszenz

FCS: Autokorrelationsfunktion

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle I(t) I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} - 1$$



τ_d – charakteristische Zeit der Diffusion eines Moleküls

Diffusionskonstante ist abhängig von der Molekülengröße!

FCS: Welche Information kann man erhalten?

Ligandenbindung

Kleines Ligandmolekül mit Fluoreszenzmarkierung + großes Eiweißmolekül: **Diffusionskonstante** ändert sich

Aggregation

Markierte Proteine: **Lichtintensität** von Dimere, Tetramere... ist höher

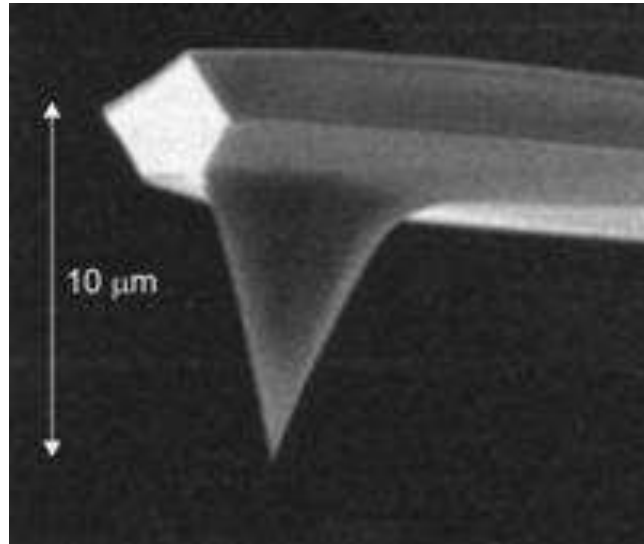
Konzentration

Reaktionsgeschwindigkeit

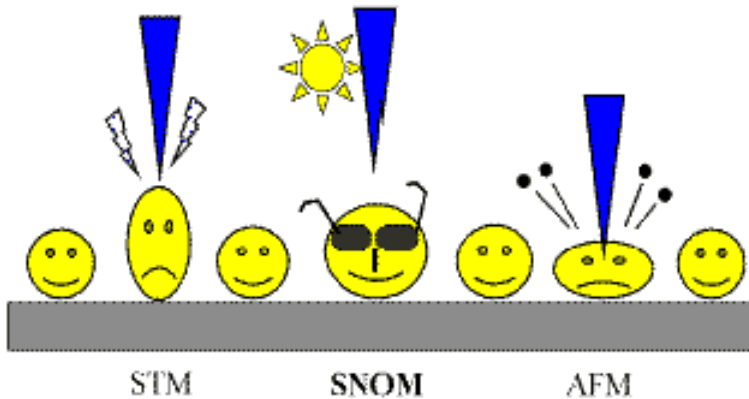
Diffusion in der Inneren der Zellen

Die Autokorrelationsfunktion muss zu einer Modellfunktion angepasst werden um diese Informationen aus der Parametern der angepasste Funktion zu erhalten.

RASTERSONDENMIKROSKOPE



Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



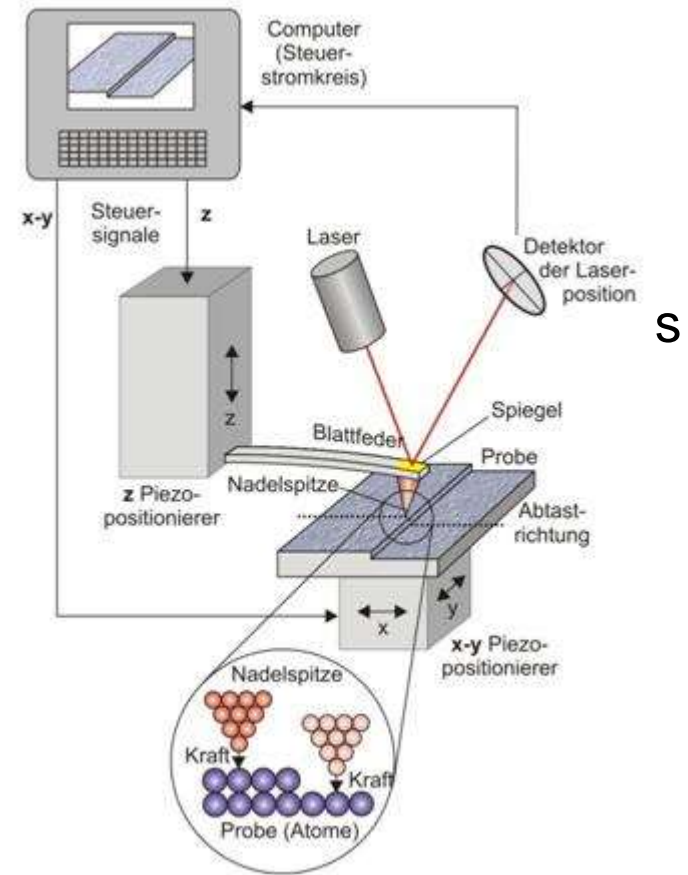
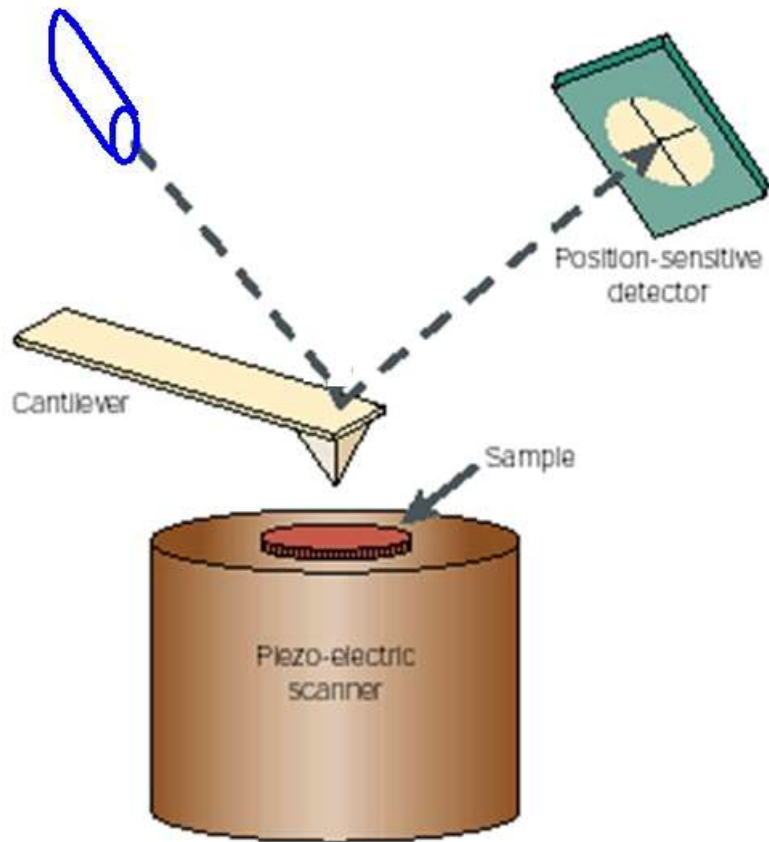
STM:
Scanning Tunneling Microscope
Rastertunnelmikroskop

SNOM:
Scanning Nearfield Optical Microscope

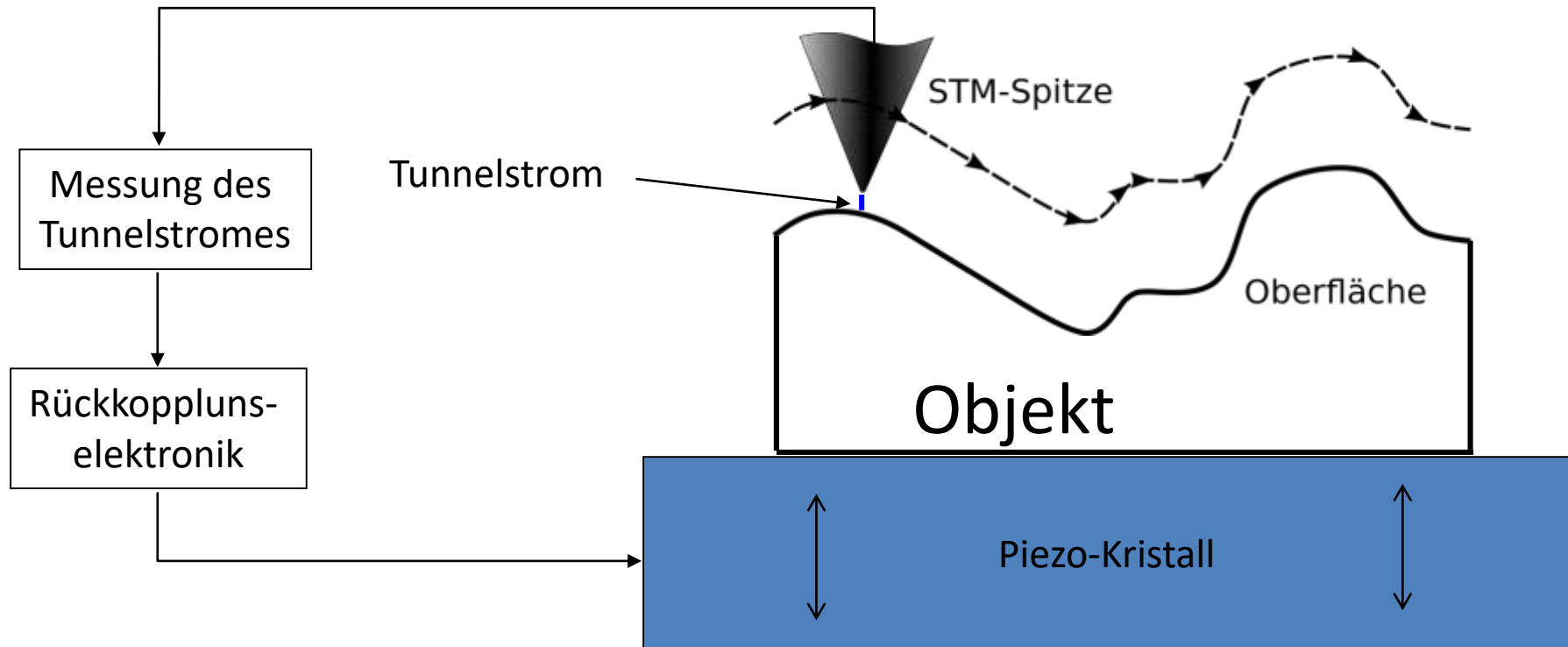
AFM:
Atomic Force Microscope
Rasterkraftmikroskop
(Atomkraftmikroskop)

Das Rastertunnelmikroskop wurde in 1981 von Heinrich Rohrer und Gerd K. Binnig entwickelt. Fünf Jahre später erhielten sie den Nobel-Preis.

Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



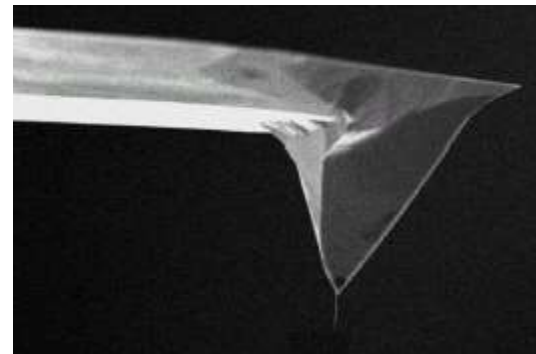
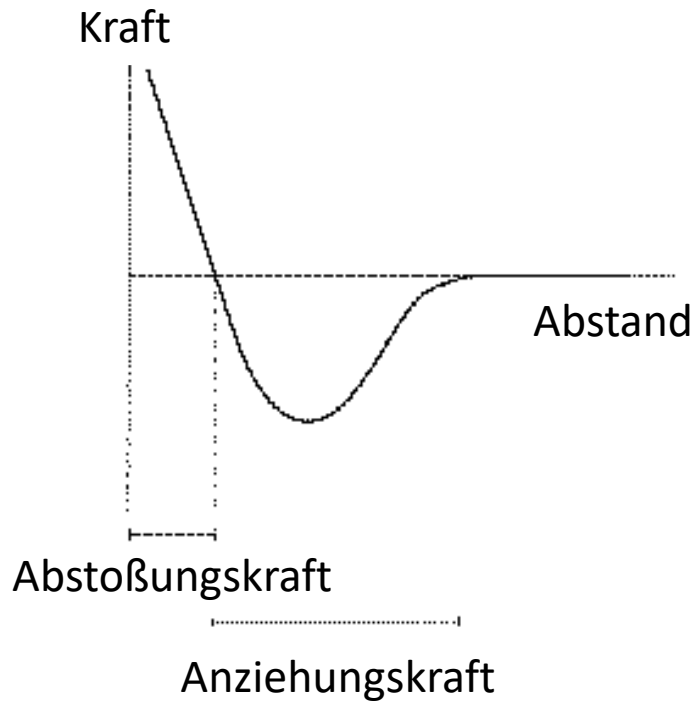
Rastertunnelmikroskop



Der Tunnelstrom ist konstant gehalten mit der vertikalen Bewegung des Objektes.

Die Kraft zwischen der Nadel und dem Objekt

- eine sehr spitze, nadelartige Sonde
- Krümmungsradius bei der Spitze $\approx 10\text{-}20\text{ nm}$ \Rightarrow x-y Auflösung!



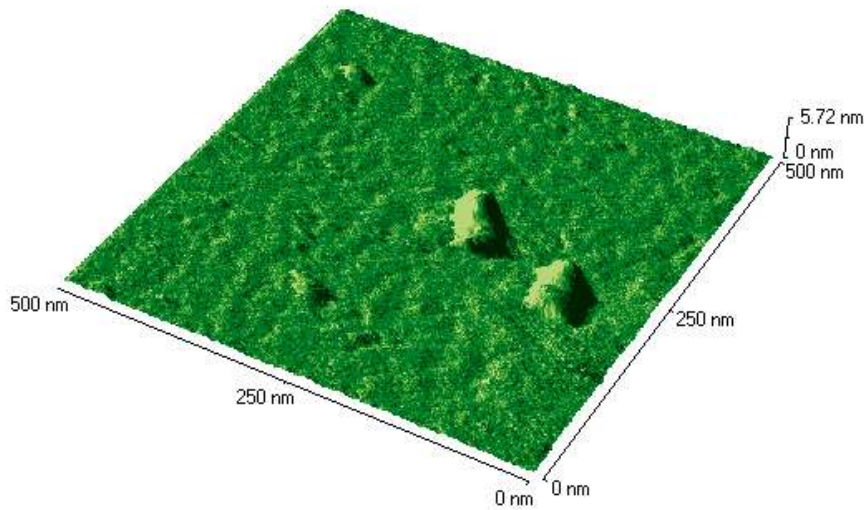
AFM Messmethoden



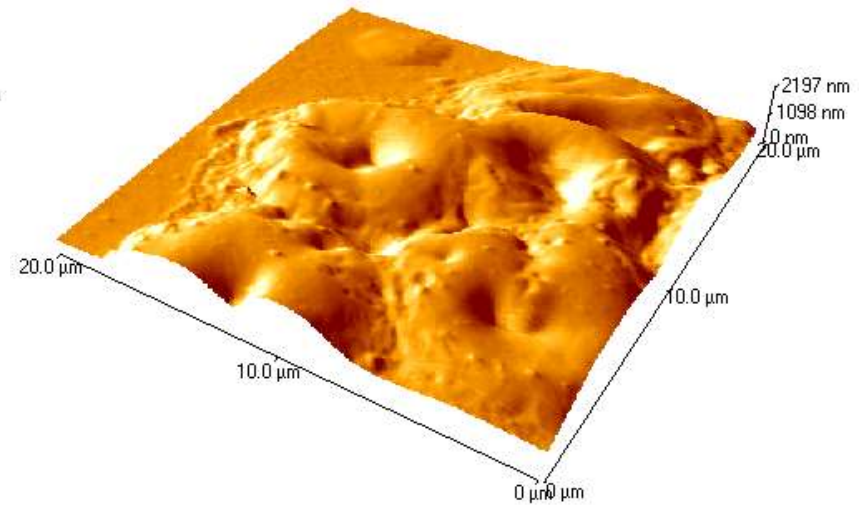
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

AFM Aufnahmen

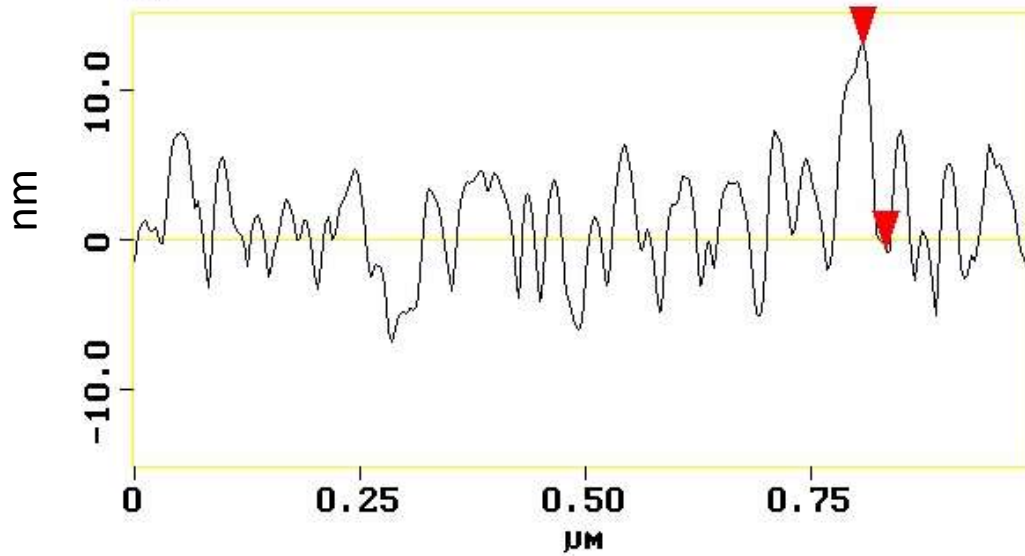
Hitzeschockproteine



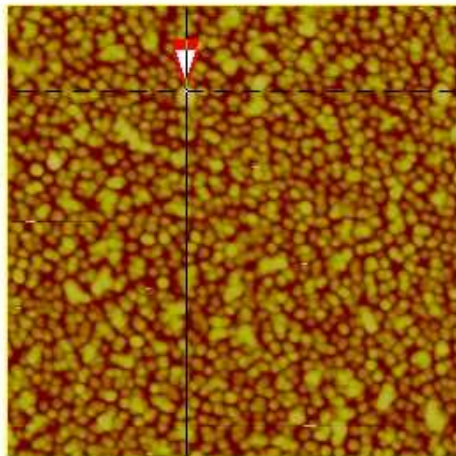
Rote blutzellen



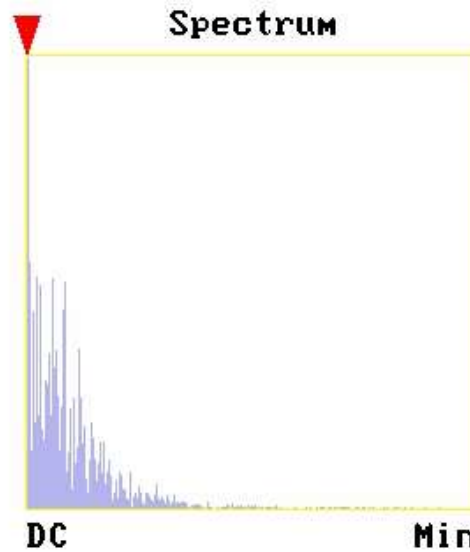
AFM Aufnahmen



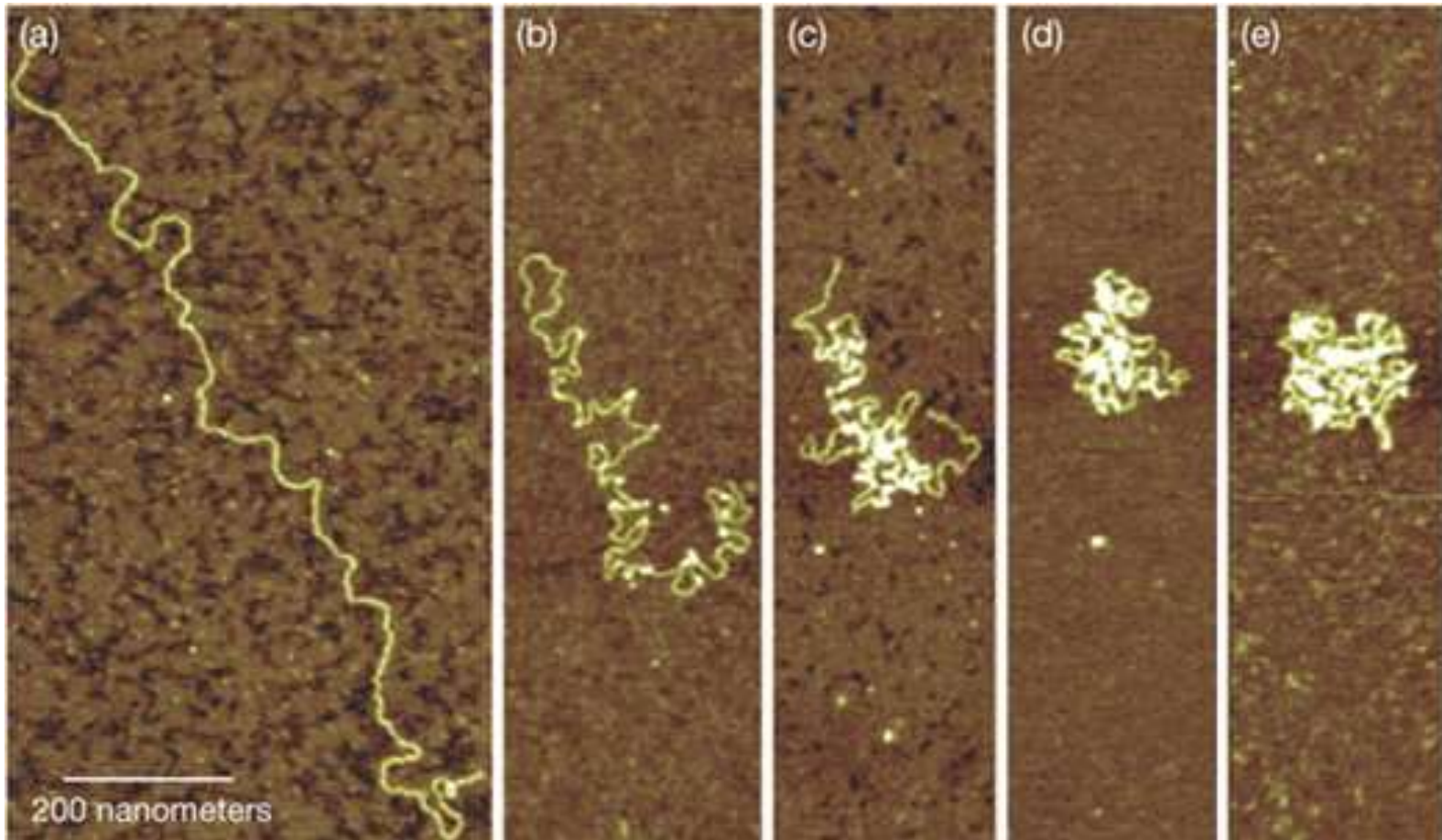
Alpha-Crystallin
Aggregate



acryins1.004



DNS



Progressive images from atomic force microscopy show the compaction of DNA caused by a protein called AbF2. (<https://www.llnl.gov/str/May04/DeYoreo.html>)