

# Methoden der Strukturenuntersuchung

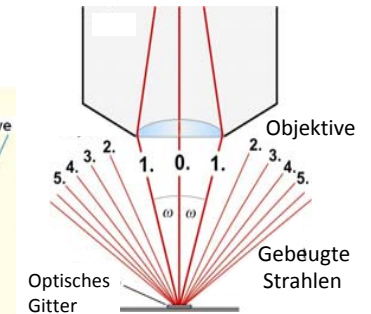
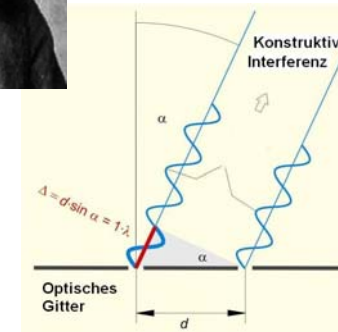
Lichtmikroskopische Techniken

Rastermikroskope

Elektronmikroskope

Diffraktionsmethode

## Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops


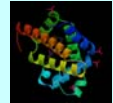





## Abbe'sches Prinzip und Auflösungsgrenze

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

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

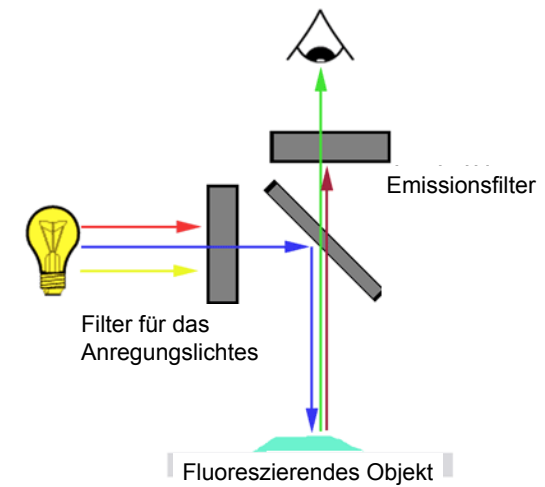
## Typische Größen

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

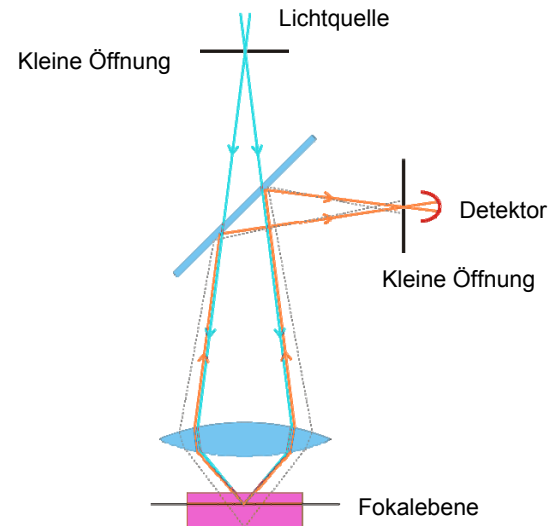
## Spezielle Lichtmikroskopische Techniken

- Siehe Praktikum
- Konfokale Mikroskopie
- Zweiphotonmikroskop
- Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

### Fluoreszenzmikroskop

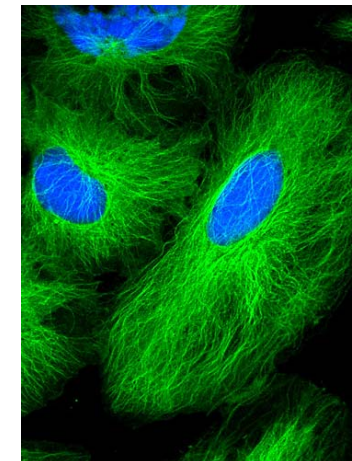


### Konfokales Mikroskop



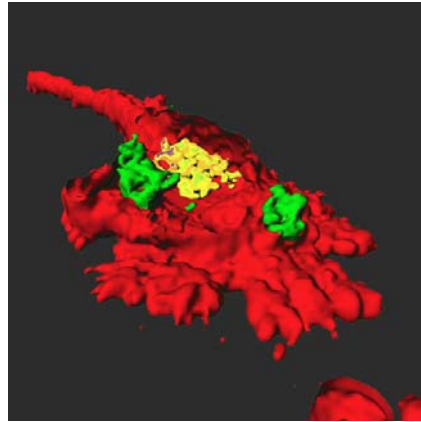
### Konfokales Mikroskop

Aus Tubulin bestehende Mikrotubuli in Zellen die rekombinanten Tubulin produzieren.



## Konfokales Mikroskop

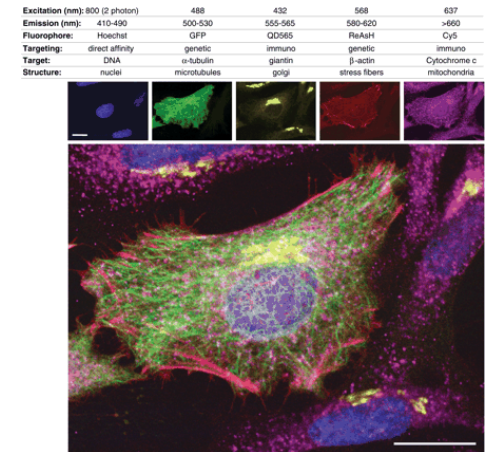
Dendritische Zelle mit  
Pollenteilchen.  
3D Aufnahme mit Konfokales  
Mikroskop.



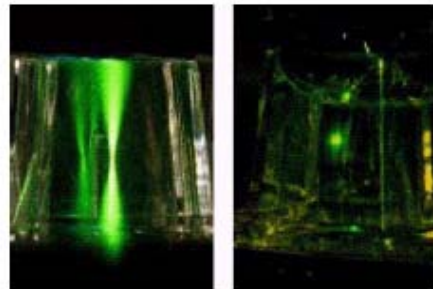
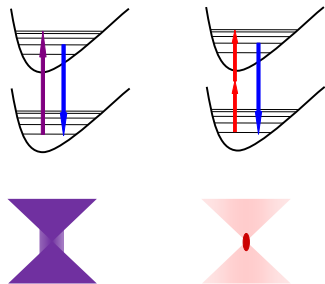
## Gleichzeitige Anwendung von mehreren fluoreszierenden Markierungen

He-La Zellen markiert mit  
fünf unterschiedlichen  
Fluoreszenzmethoden.

Der Masstab ist 20 µm.



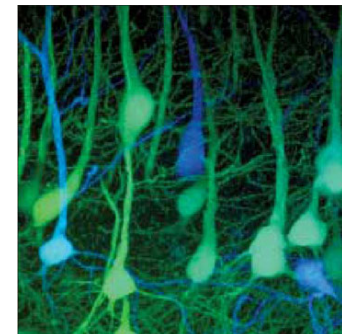
## Fluoreszenzanregung mit zwei Photonen Zweiphotonenmikroskop



IR Laser

Fluoreszenzemission bei  
Einphoton- und  
Zweiphotonenanregung.

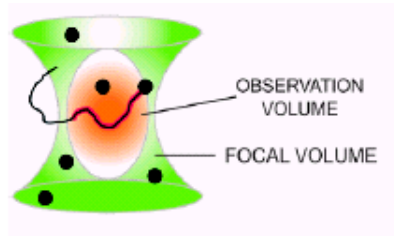
## Zweiphotonenmikroskopie



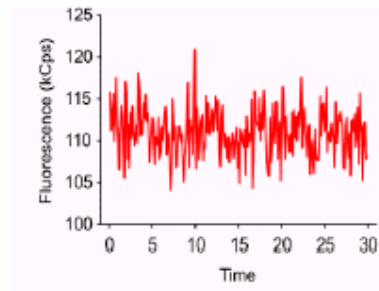
Visual Cortex von genetisch  
manipulierten Mause die (GFP)  
produzieren.

## Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS)

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

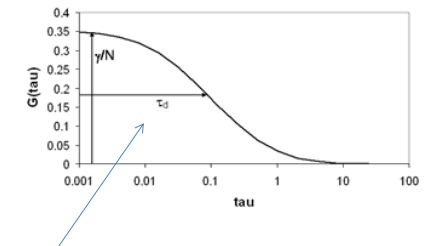
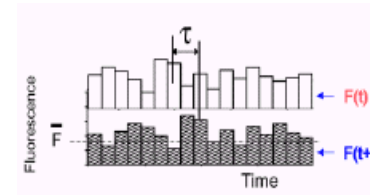


Fluktuationen des Fluoreszenzlichtes:



## Autokorrelationsfunktion

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



$\tau_d$  – charakteristische Zeit der Diffusion eines Moleküls

Diffusionskonstante ist abhängig von der Molekülengröße!

## Welche Information kann man erhalten?

### Ligandenbindung

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

### Aggregation

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

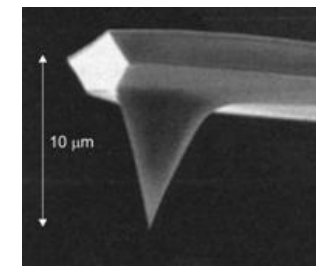
### Konzentration

### Reaktionsgeschwindigkeit

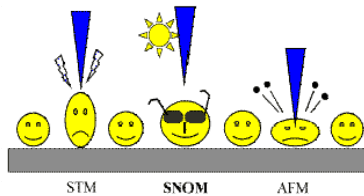
### Diffusion in der Inneren der Zellen

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

## RASTERSONDENMIKROSKOPE



## Rastermikroskope (Scanning Probe Microscopes)



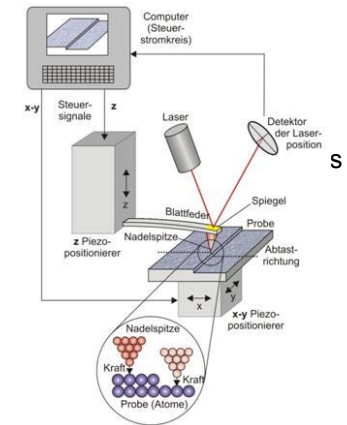
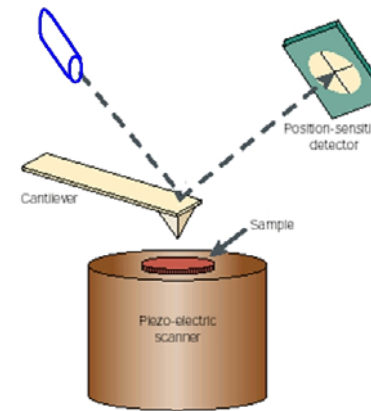
STM:  
Scanning Tunneling Microscope  
Rastertunnelmikroskop

SNOM:  
Scanning Nearfield Optical Microscope

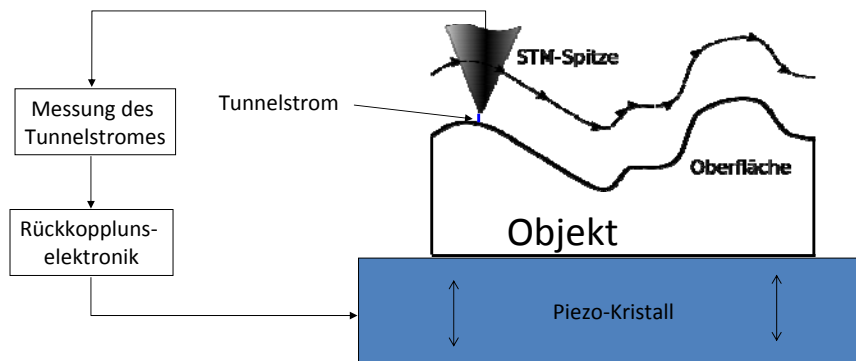
AFM:  
Atomic Force Microscope  
Rasterkraftmikroskop  
(Atomkraftmikroskop)

Das Atomkraftmikroskop wurde in 1981 von Heinrich Rohrer és Gerd K. Binnig entwickelt. Fünf Jahre später sie erhalten den Nobel-Preis.

## Rasterkraftmikroskop (Atomkraftmikroskop) (Atomic Force Microscope-AFM)



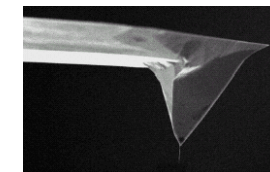
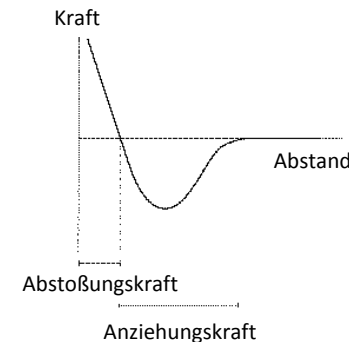
## Rastertunnelmikroskop



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!



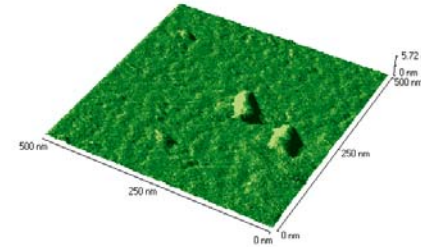
## AFM Messmethoden



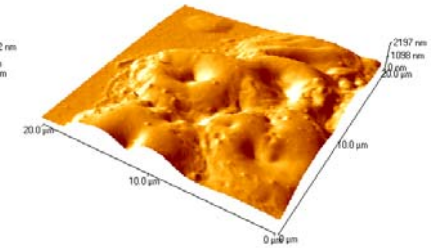
- Kontakt-Modus
- Der intermittierende Modus  
(engl.: *intermittent contact mode*, oder *tapping mode* genannt)

## AFM Aufnahmen

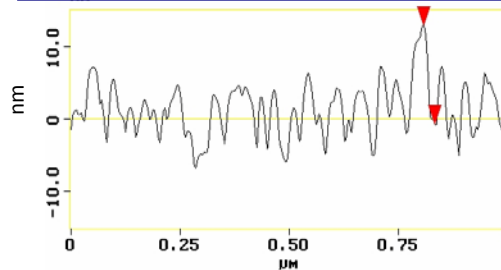
Hitzeschockproteine



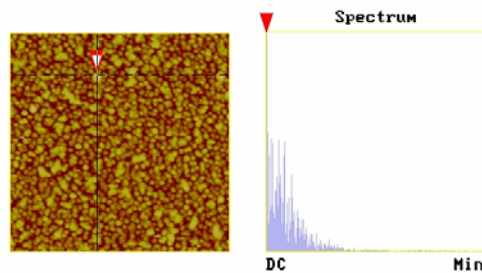
Rote blutzellen



## AFM Aufnahmen



Alpha-Crystallin  
Aggregate

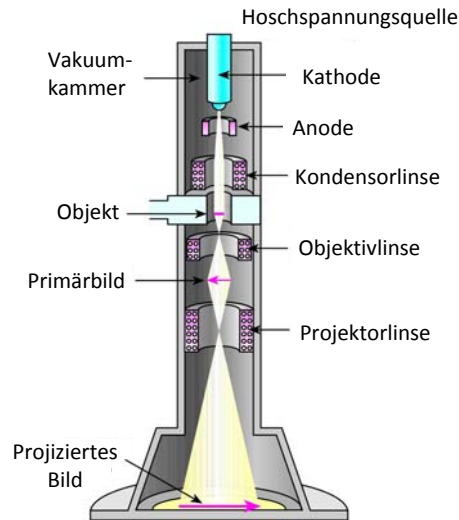


acryins1.004

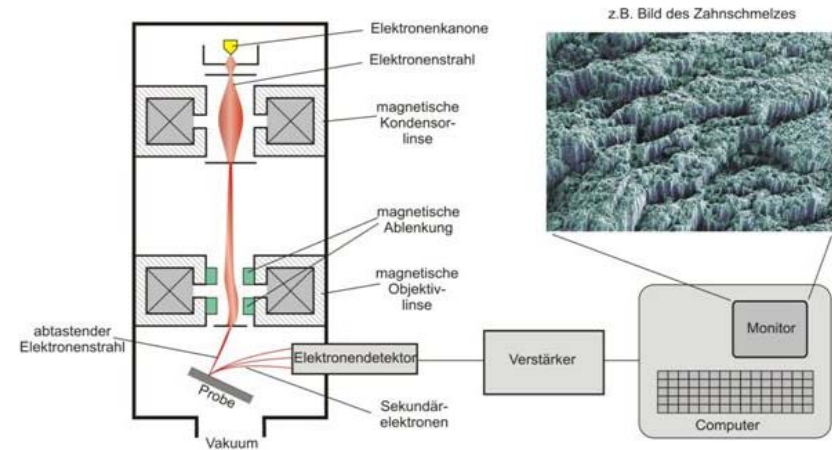
## ELEKTRONENMIKROSKOPE

Transmissionselektronenmikroskop  
Rasterelektronenmikroskop

## Transmissionselektronenmikroskop



## Rasterelektronenmikroskop



## Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops Abbe'sches Prinzip und Materialwellen

Materialwelle: Zu einem Teilchen mit  $m$  Masse und  $v$  Geschwindigkeit, kann man eine Welle (Materiewelle)

zuordnen, die eine Wellenlänge von  $\lambda = \frac{h}{mv}$  hat.

Die Geschwindigkeit des Elektrons nach einer Beschleunigung mit  $U$  Spannung beträgt:

$$v = \sqrt{\frac{2eU}{m}} \quad \text{womit:} \quad \lambda = \frac{h}{\sqrt{2emU}}$$

Typisch kann  $\lambda$  5 pm sein. Aber  $\omega$  ist sehr klein!  $NA \approx 0,002$

$$\delta = 0,61 \cdot \lambda / (n \cdot \sin \omega) \approx \text{nm}$$

## DIFFRAKTIONSMETHODE

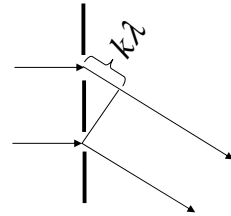


## Röntgendiffraktion

Anwendung der Röntgenstrahlung in Strukturanalyse der Materie.

Zur Erinnerung:  
Diffraction des Lichtes

$$\sin \alpha_k = \frac{k\lambda}{d}$$



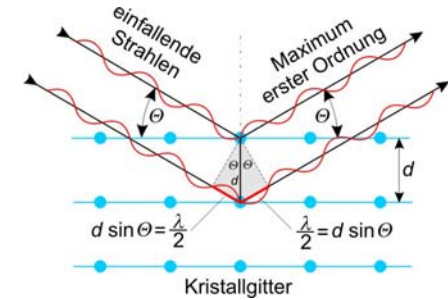
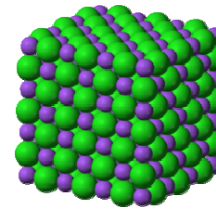
## Röntgendiffraktion

Was für ein Gitter passt zur Röntgenstrahlung?

$$\lambda < \sim d$$

$\lambda_{\text{Rtg}}$  10-100 pm

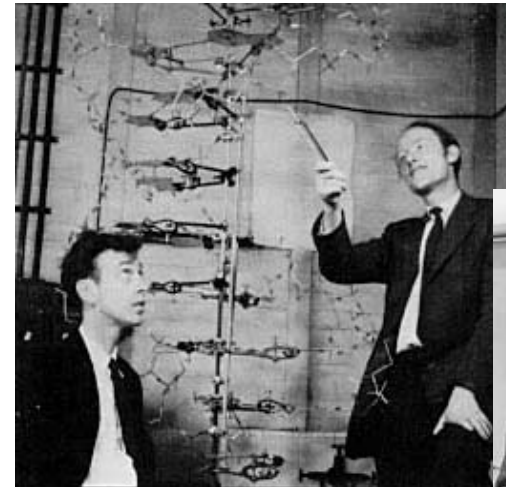
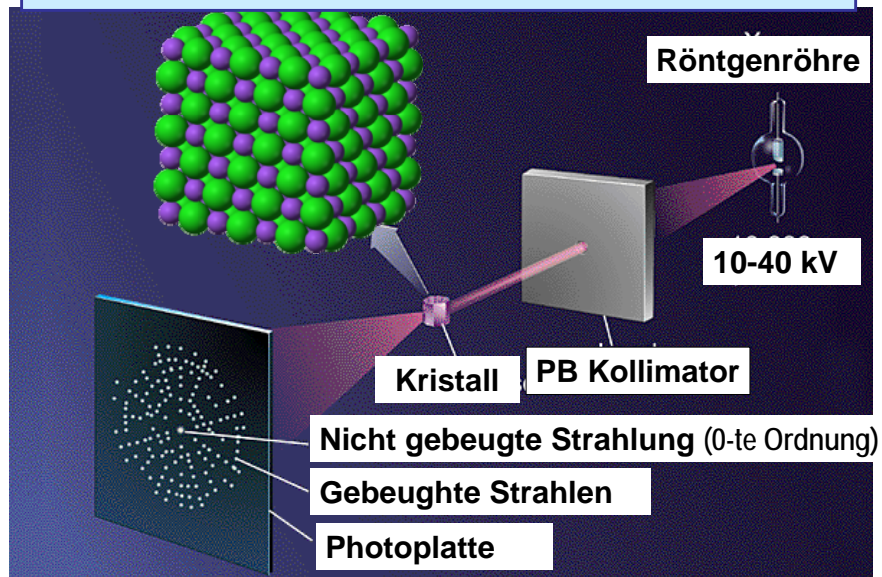
$\text{H} \approx 100 \text{ pm}$



$$n\lambda = 2d \sin \Theta$$

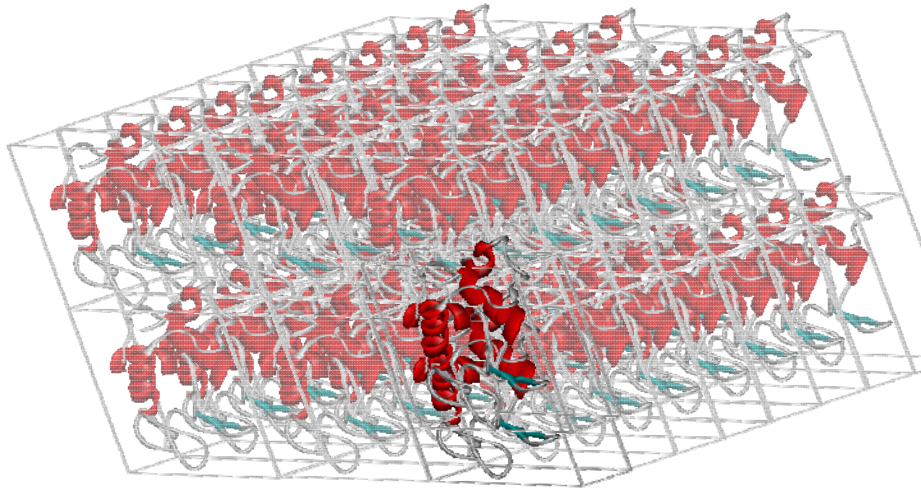
Atomgitter → Kristall → auch DNS o. Proteinkristall!

## Aufbau des Röntgendiffraktionsgerätes

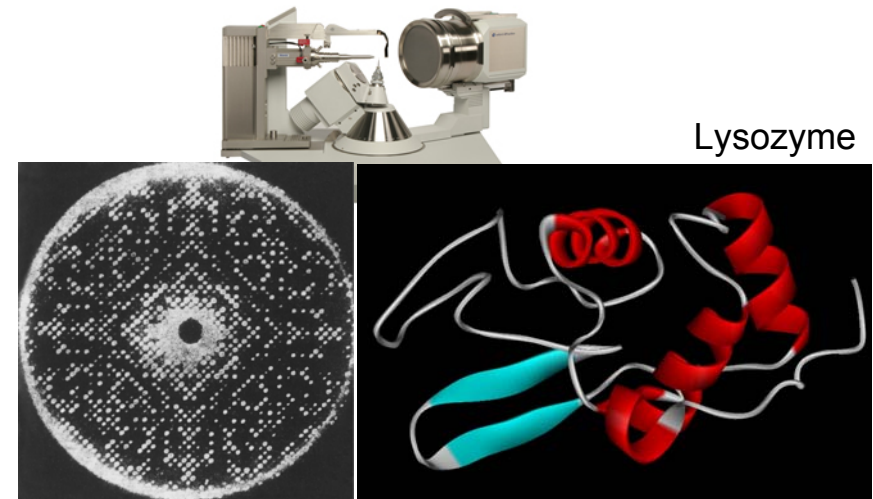




## Eiweißkristalle



## Bestimmung der Raumstruktur der Eiweiße



Lysozyme

## Elektronen und Neutronendiffraktion

$\lambda$ : Materialwellen

Elektronen: Kleine Eindringtiefe: Oberflächen

Elektronen und Neutronen werden an den Atomkernen gestreut.

(Rtg wird durch Elektronenwolken gestreut.)

Elektronen werden an den schwereren Kernen gestreut

Neutronen auch an den Protonen, =>

Neutronendiffraktion gut zur Strukturuntersuchung von wasserstoffhaltigem Material.