



ЕЛЕКТРОНСКА И АФМ МИКРОСКОПИЈА

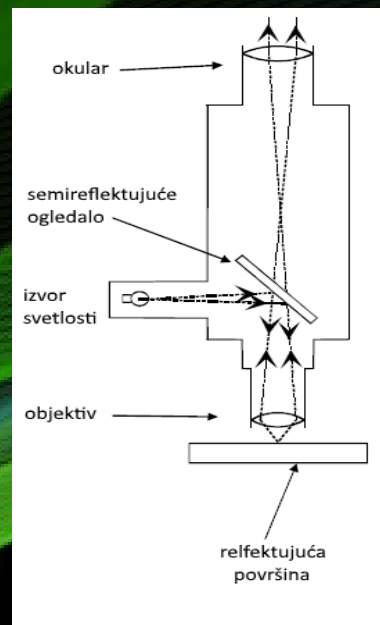
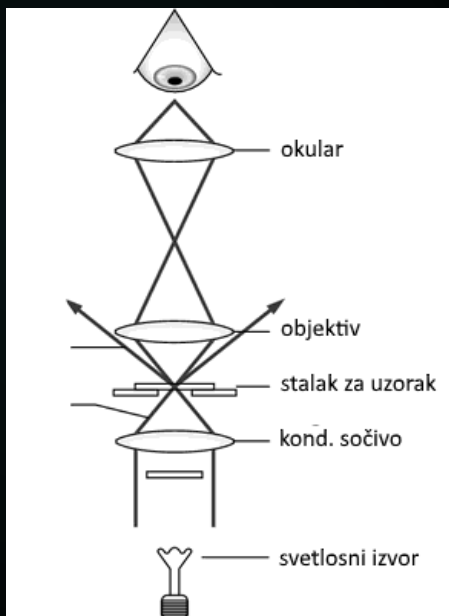
у анализи биолошких
узорака

ИЗА ГРАНИЦЕ „ВИДЉИВОГ“

- Максимална резолуција оптичке микроскопије је лимитирана таласном дужином употребљене светлости

$$AR_{lat} = \frac{\lambda}{2NA} = \frac{\lambda}{2n\sin\theta}$$

$$AR_{axial} = \frac{2\lambda}{NA^2}$$



Решење?

- УВ светлост?
- X-зраци?
- Електрони високих енергија

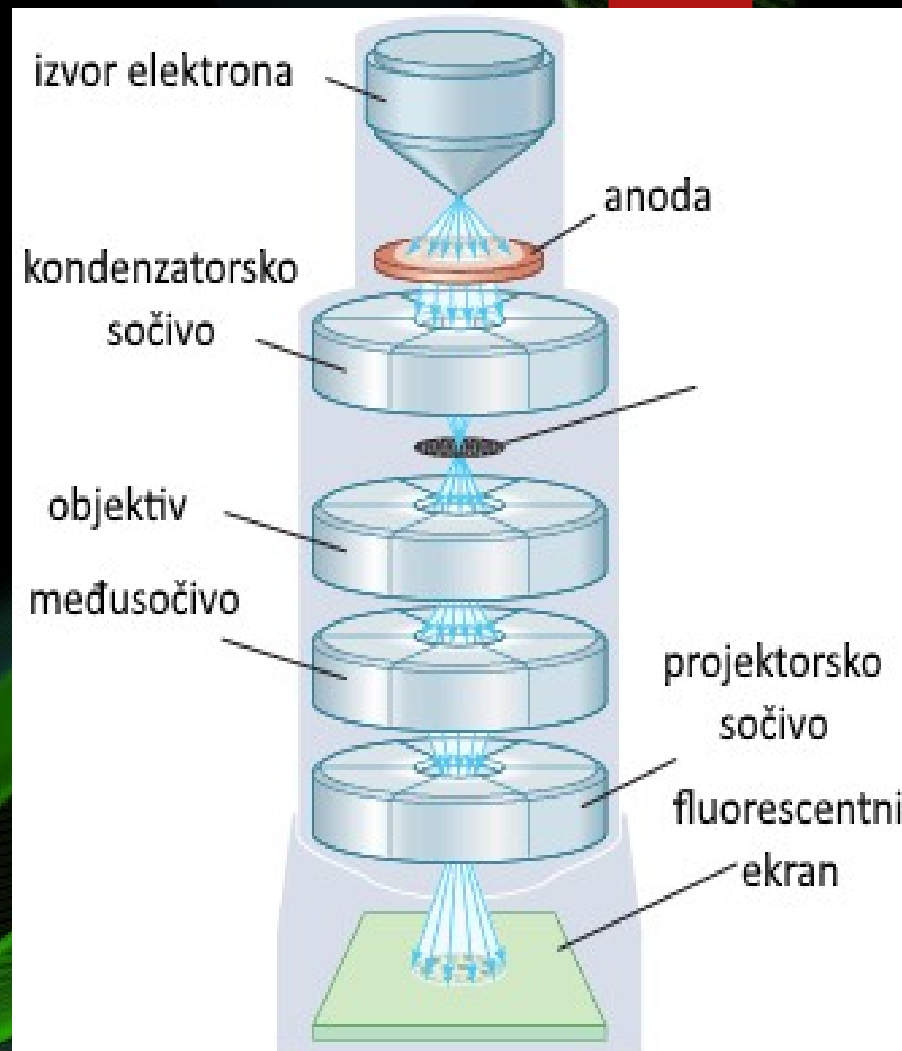
$$\lambda_e = \frac{h}{mv}$$

- Два основна модалитета
 - Рефлексиони (сканирајућа електронска микроскопија SEM). Омогућава добијање тродимензионалне слике објекта
 - Трансмисиони (ТЕМ). Слично као и оптички микроскоп сигнал је пропорционалан пропуштеном зрачењу (интензитету пропуштеног електронског снопа)

KONSTRUKCIJA

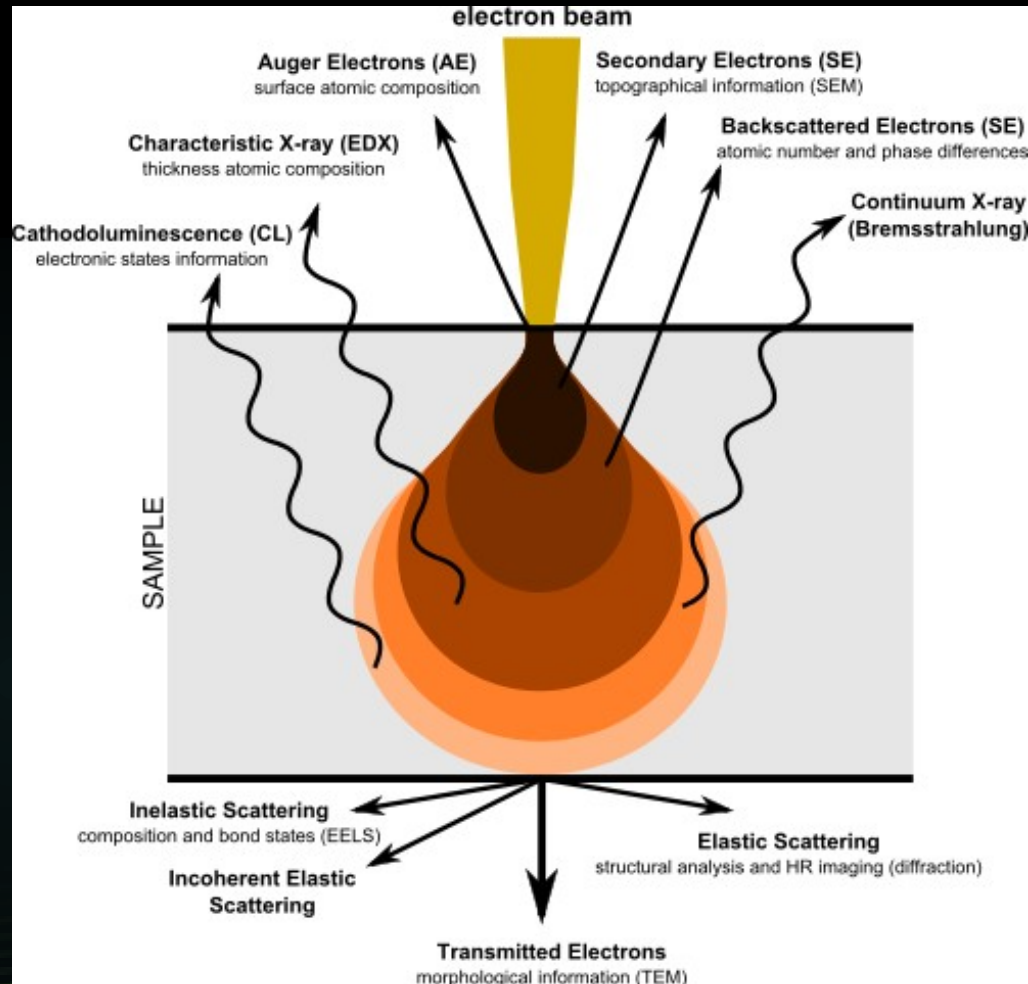


SEM



TEM

SEM, TEM - ПРОЦЕСИ У АНАЛИЗИРАНОМ УЗОРКУ



SEM/TEM ПОРЕЂЕЊЕ ОСНОВНИХ КАРАКТЕРИСТИКА

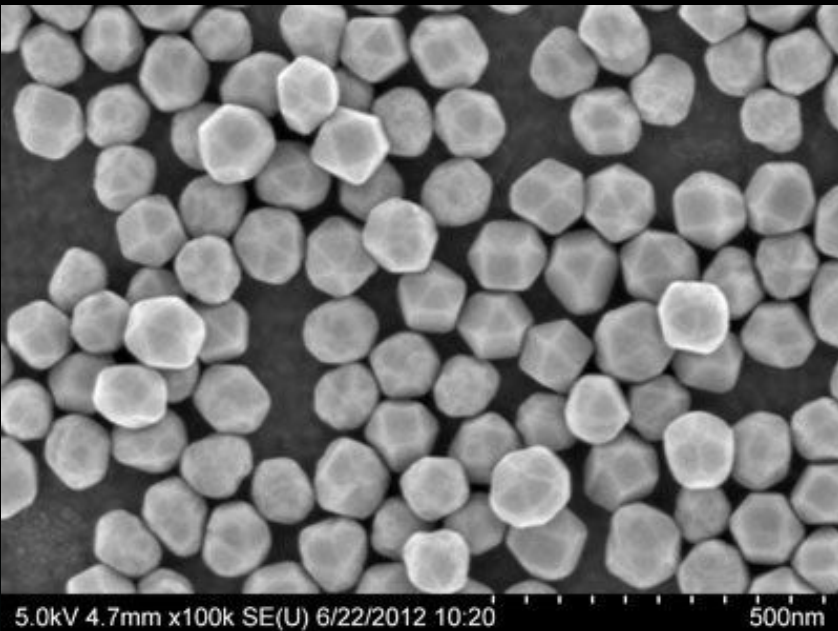
	SEM	TEM
слика	3D	2D (пројекциона слика)
Увећање	2E6	5E7
Максимална резолуција	1 nm	0,1 nm
Мод рада	скенирајући	интегрални
Додатне информације	Састав узорка	Могуће добијање 3D слике реконструкцијом уназад
Подлога за узорак	алуминијум	ТЕМ решетка
Радни напон	До 5 kV	5 kV -100 kV
Ограничења	Узорак мора бити проводан	Узорци мале електронске густине дају сваб контраст



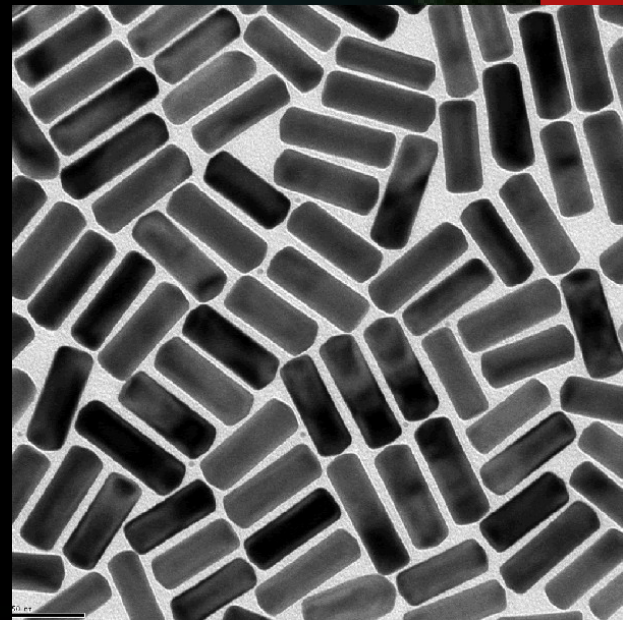
SEM



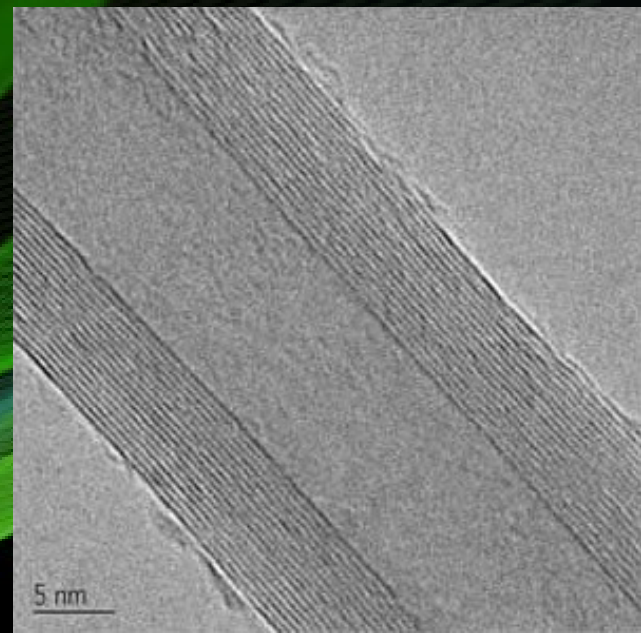
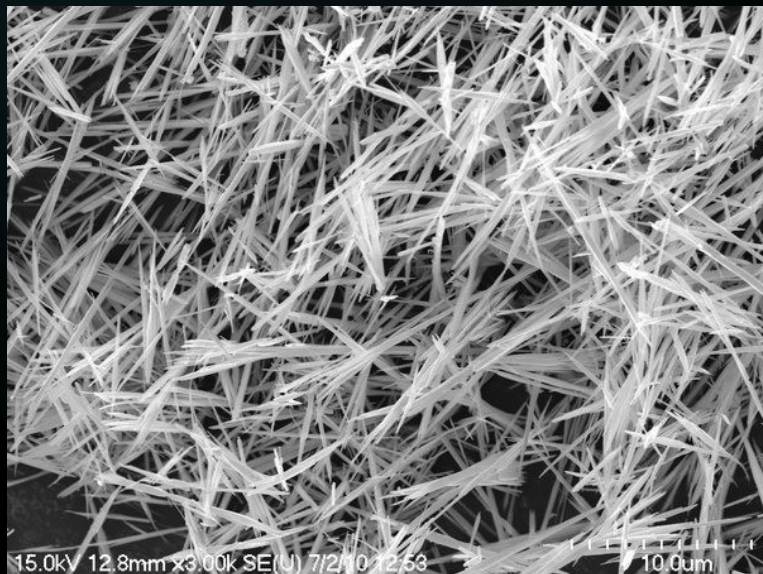
TEM



SEM



TEM



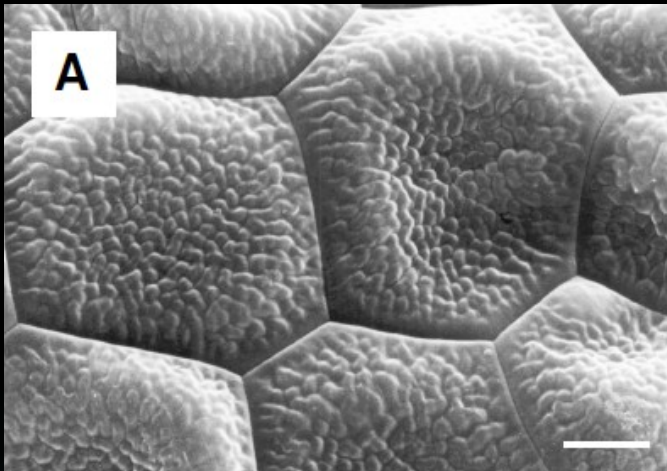
КАРАКТЕРИСТИКЕ SEM У АНАЛИЗИ БИОЛОШКИХ УЗОРАКА

- Проблеми:
 - висок вакуум у сканирајућем електронском микроскопу може изазвати губитак биолошког материјала. То захтева фиксацију материјала.
 - Биолошки материјали су слаби проводници. Потребно наношење проводног материјала
- Подаци који се могу добити су морфологија ћелија и ткива, ћелијског зида

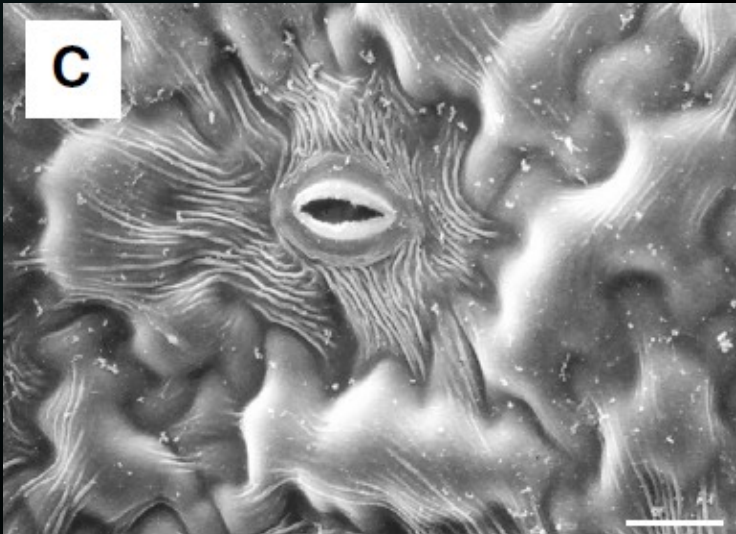
ПРИПРЕМА БИОЛОШКИХ УЗОРАКА ЗА SEM

- Хемијска фиксација узорка за алуминијумску подлогу помоћу глутаралдехида обезбеђује очување ћелијских структура. Након тога служи постфиксација са раствором осмијум тетроксида.
- Дехидратација узорка у низу смеша етанол-вода.
- Сушење узорака у течном CO₂.
- Лепљење за алуминијумску подлогу помоћу специјалног сребрног или проводног лепка на бази угљеника
- Напаравање злата техником вакуумске депозицијом или спатеровањем

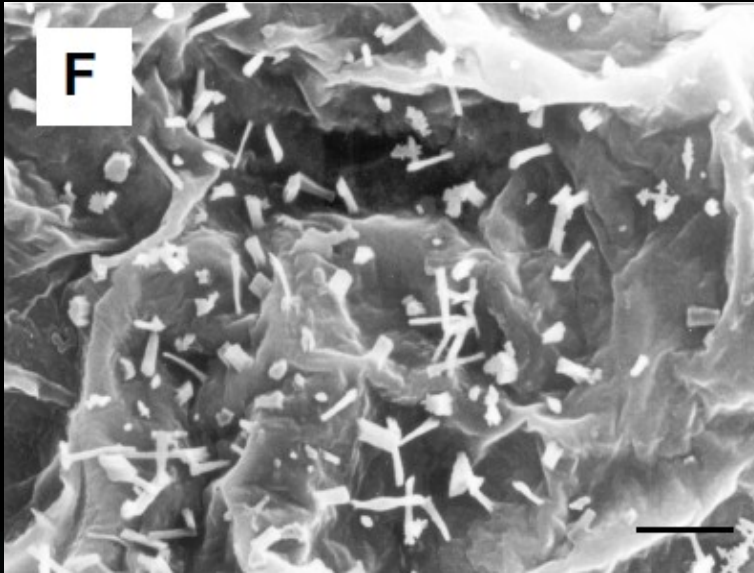
ПРИМЕРИ КОРИШЋЕЊА SEM У АНАЛИЗИ БИОЛОШКИХ УЗОРАКА



Огранизациони образац ћелија:
Хексагоналне ћелије семена
Oenothera parviflora (ноћурак)



Reynoutria bohemica, наличје листа са
стомом и увојима ћелијског зида
епитела

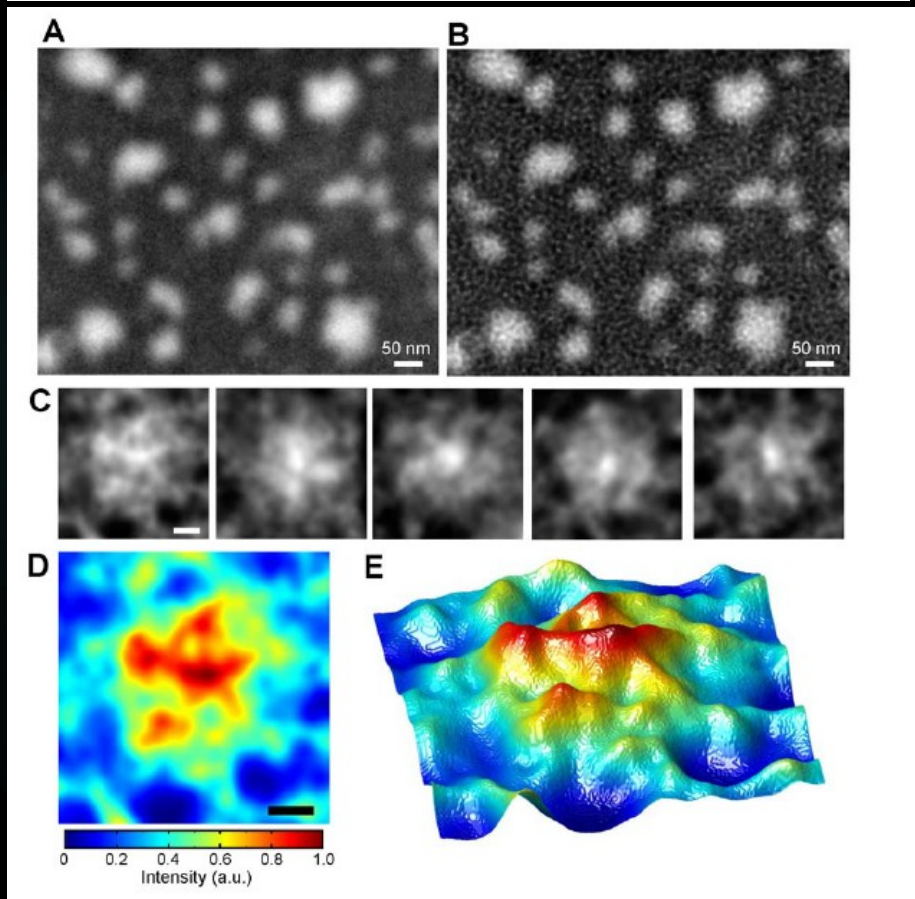
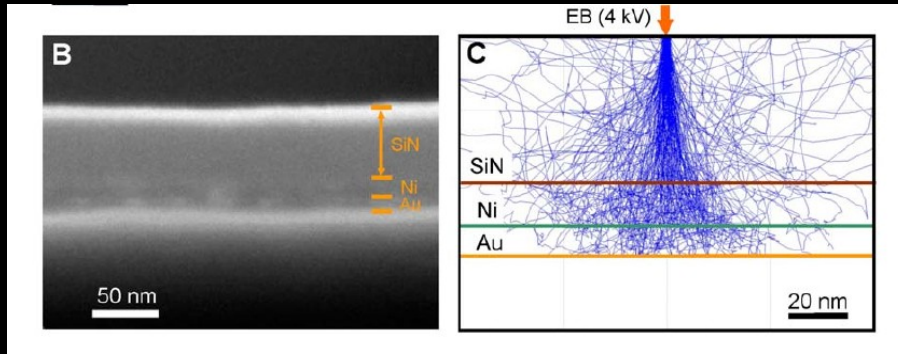


Површина листа *Brassica campestris*
(уљана репица) са
епикутикалним воштаним
структурама



Морфологија биљне ваши

SEM ПРОТЕИНА?



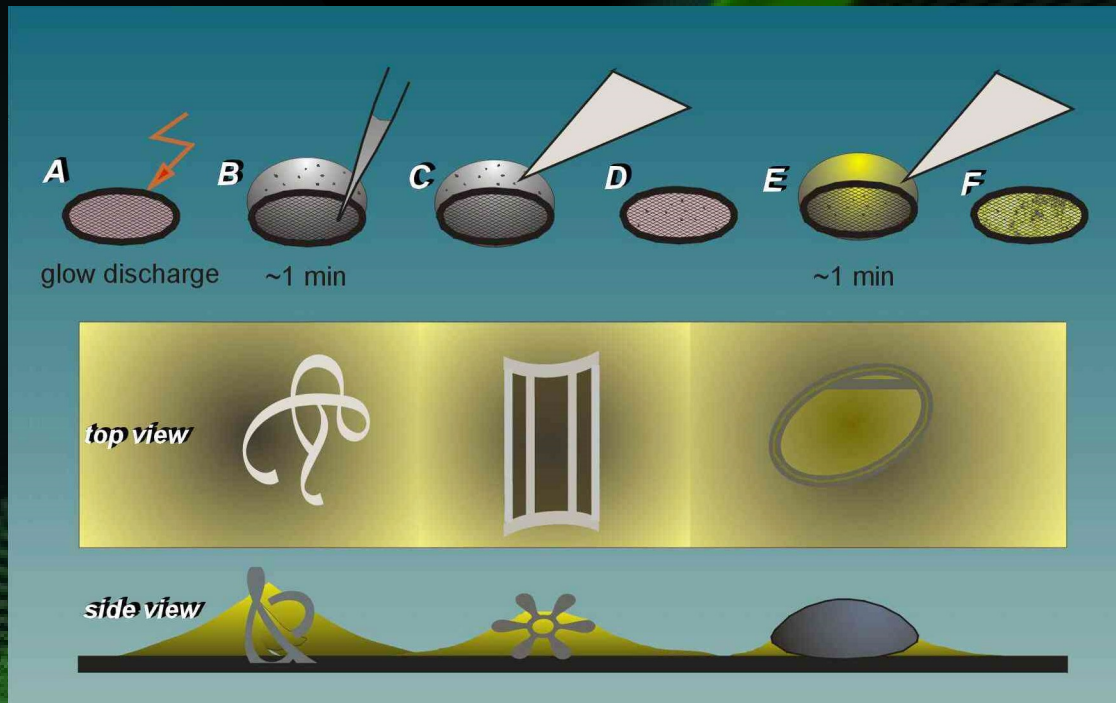
SEM IgG помоћу
излагања
секундарним
електронима

ТЕМ ЈЕ КОРИСНИЈИ... ЗА АНАЛИЗУ БИОЛОШКИХ УЗОРАКА

Али...

Биолошки узорци имају малу електронску густину па добијене слике имају лош контраст...

Решење... Додаје се „боја“ која има велику електронску густину. Најчешће се препарат „боји“ уранил ацетатом. Техника се зове „негативно бојење“ Мана-артефакти.



ТЕМ криомикроскопија

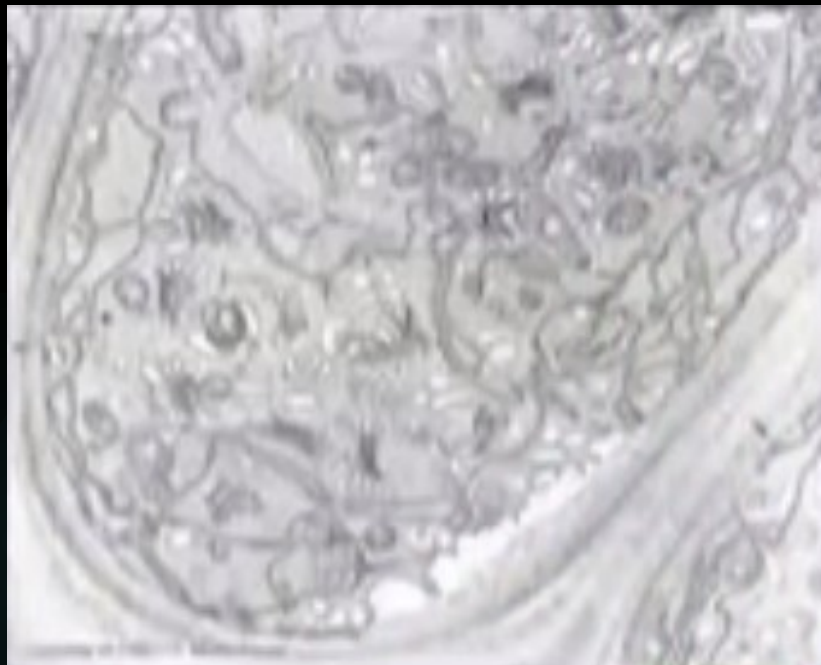
Нобелова награда 2017.

Узорак се тренутно замрзава у течном етану, тако да вода у његовом окружењу кристалише у аморфном стању.

Монтира се на графитну мрежицу-носач узорка који се ставља у вакуумску комору ТЕМ-а и све се држи на температури течног азота или хелијума.

Слике се добијају комбиновањем сигнала који потиче од еластично расејаних електрона и трансмитованих електрона.

ТЕМ СЛИКА

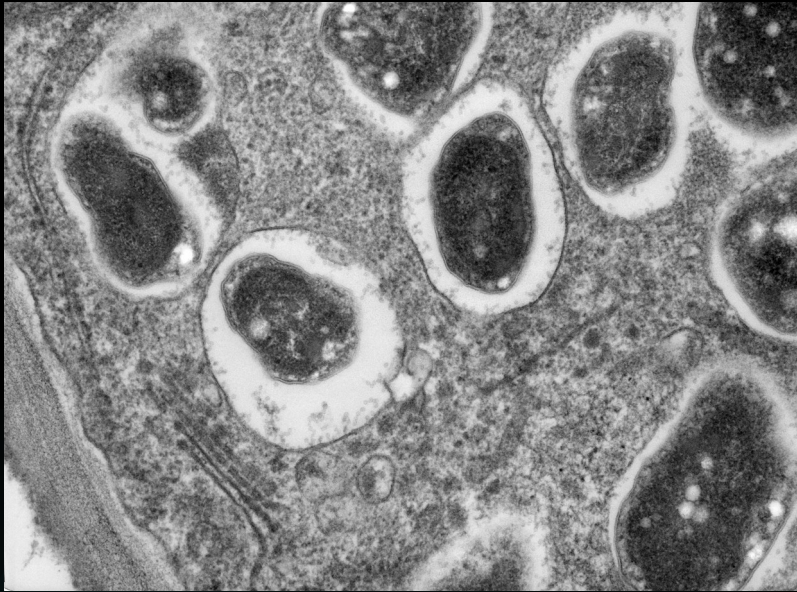


Пропуштени електрони

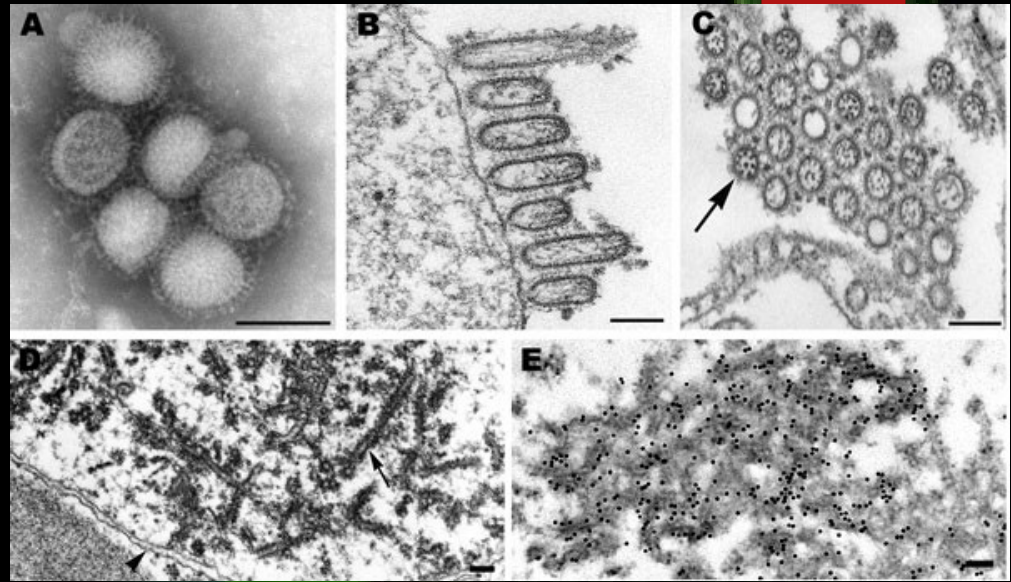


Фазни контраст - интерференција

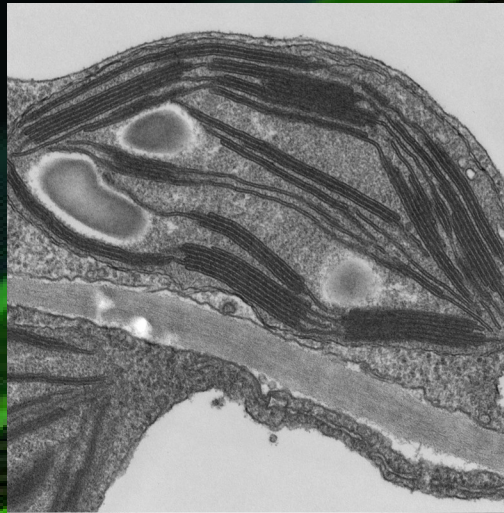
СТРУКТУРА ЋЕЛИЈЕ



симбиоза



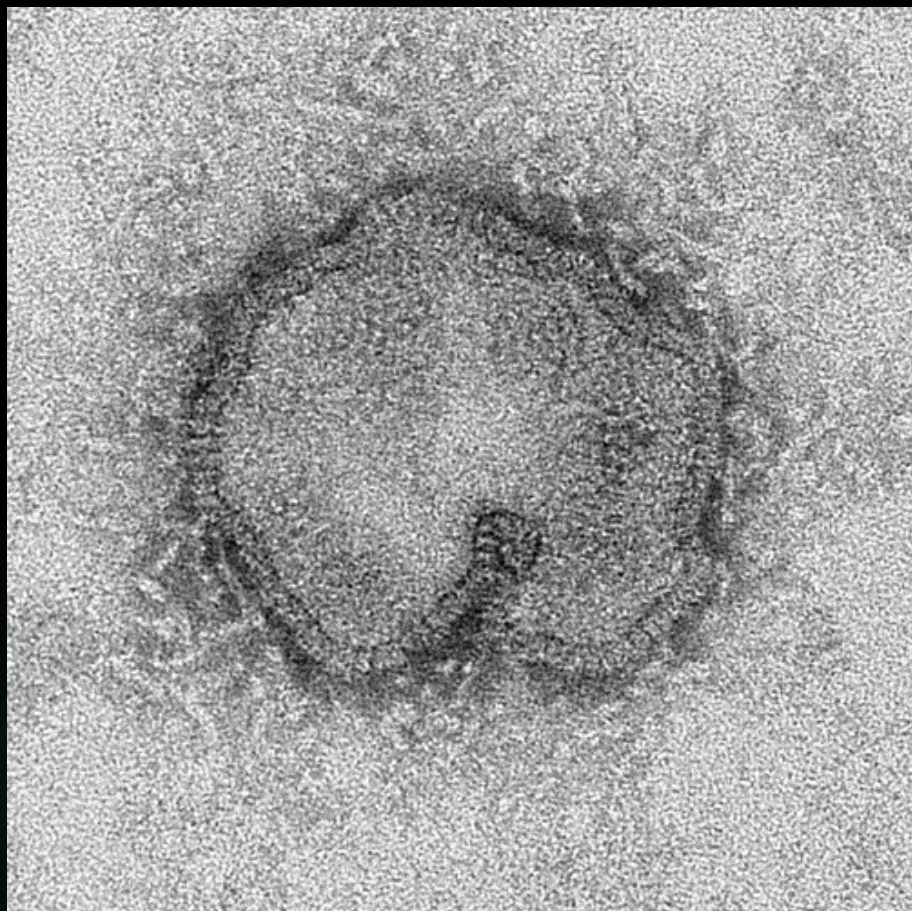
H1N1



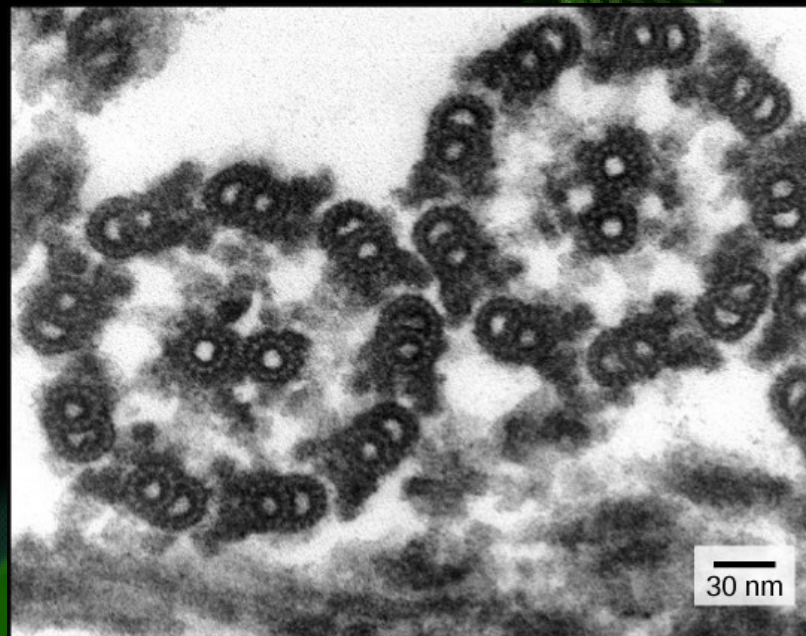
2b-coleusleaf-4.tif
1b-MV coleus leaf near
apical meristem
Print Mag: 70400x @ 7.0 in
10-29-04/02/08
Microscopist: Mouiza

500 nm
HV=100kV
Direct Mag: 10000x
TEM 1010 AMT Camera

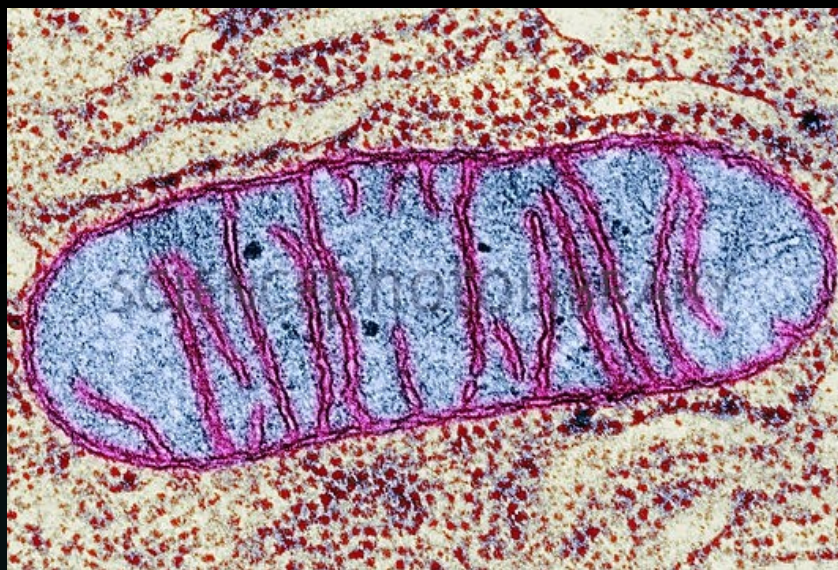
хлоропласт



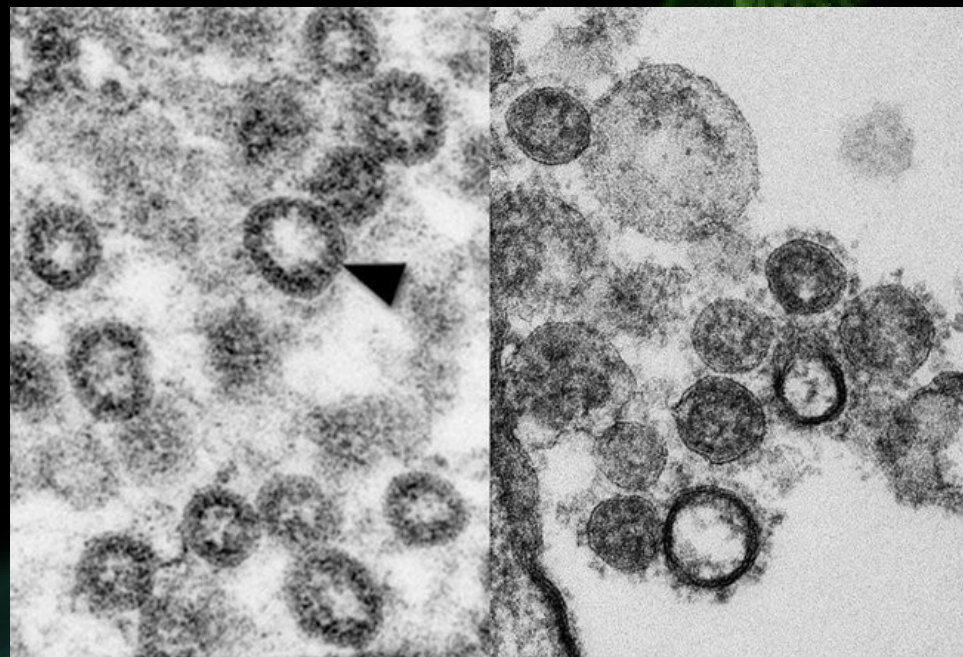
H9N9 „инвазија“



Тубуле у флагели

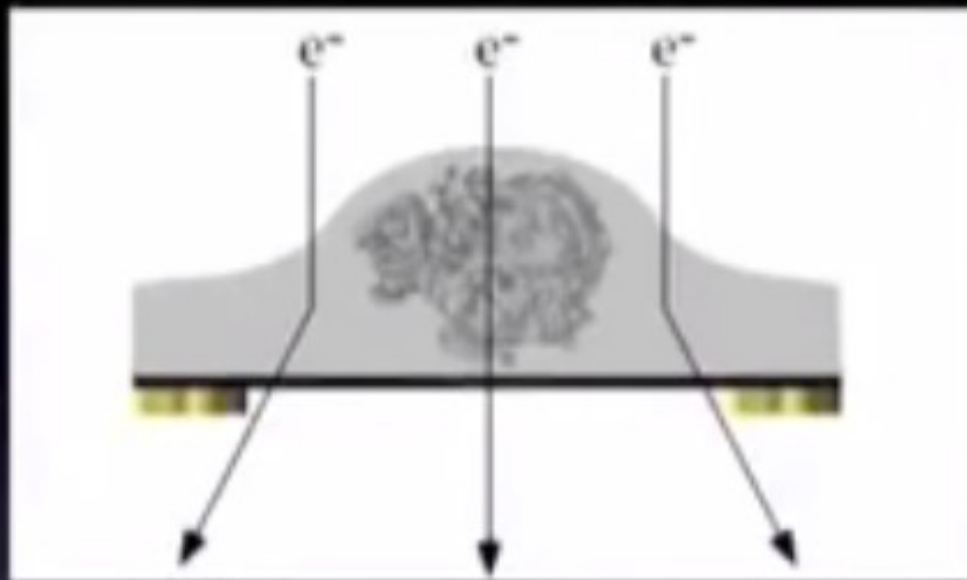


ТЕМ митохондрия

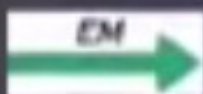


COVID-19 TEM

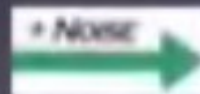
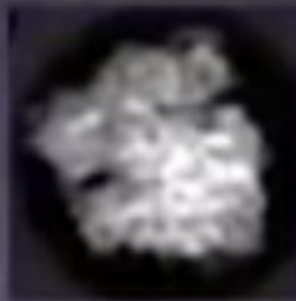
ТЕМ ПРОТЕИНА



VOLUME (3D)



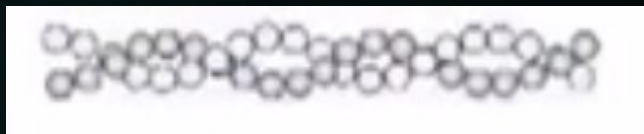
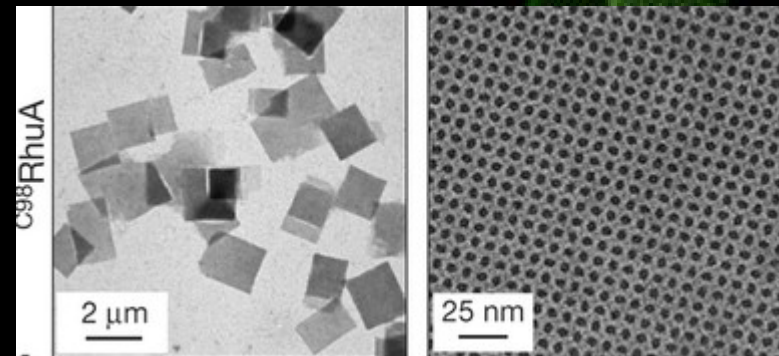
PROJECTION (2D)



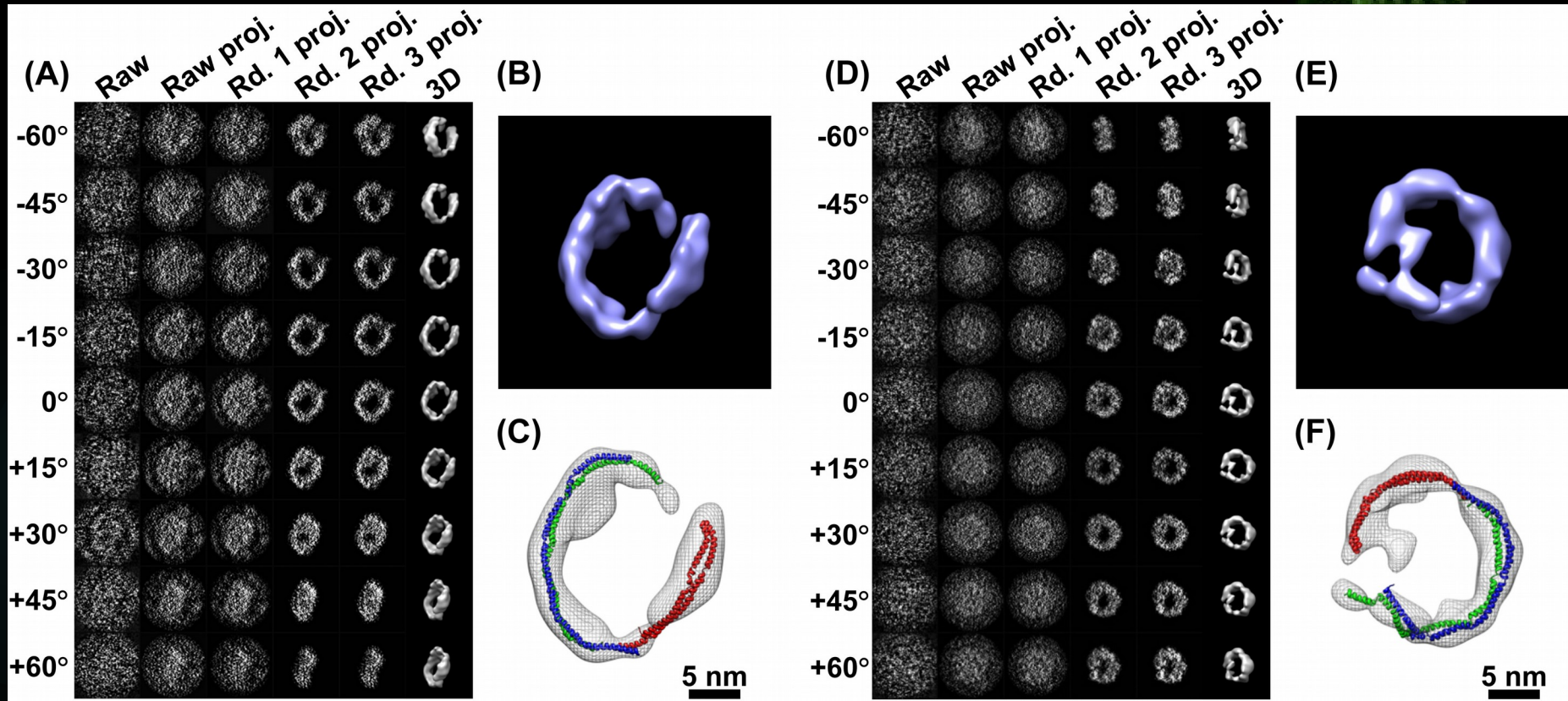
EM IMAGE



ВАРИЈАНТЕ УЗОРАКА ПРОТЕИНА



TEM 3D?

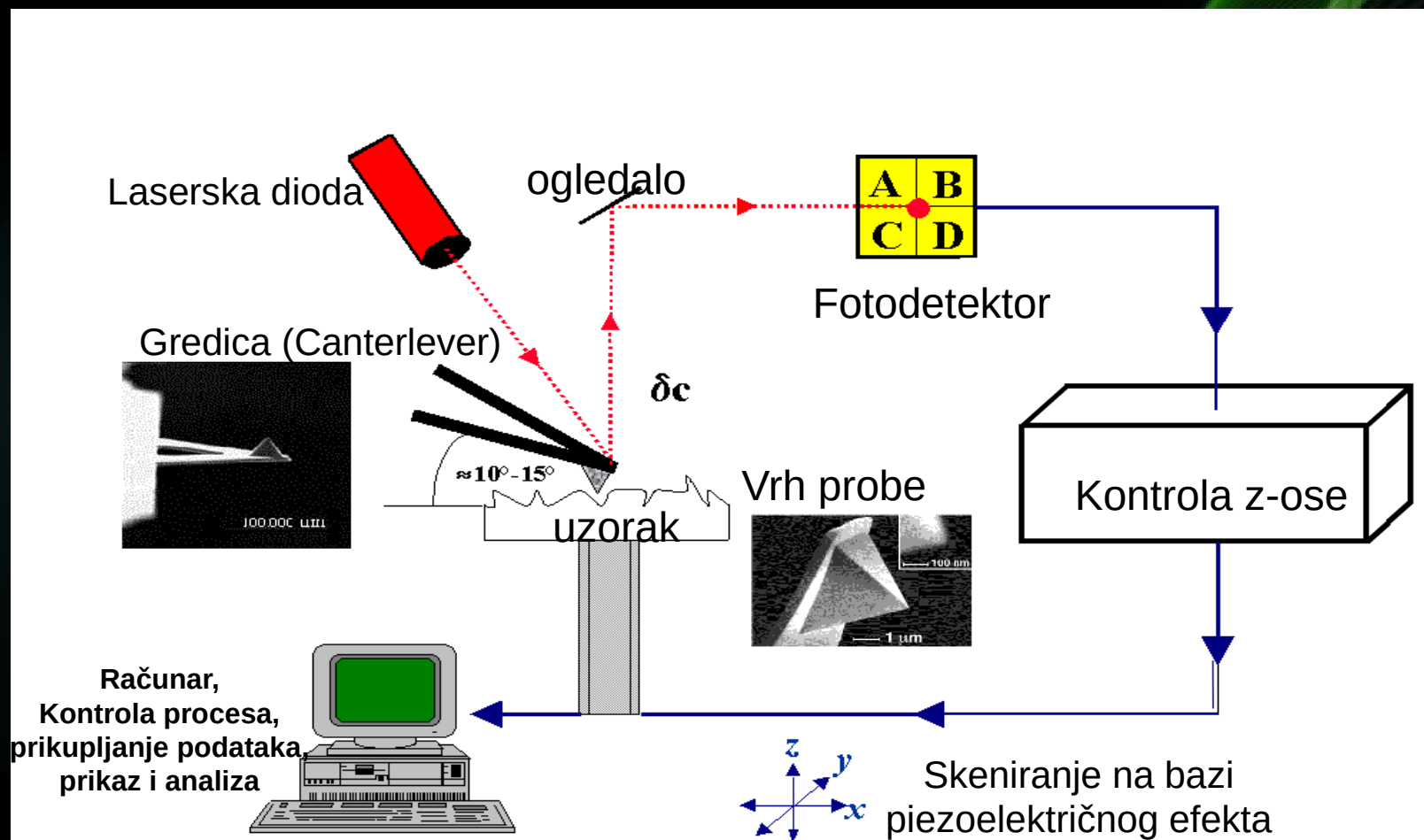


The background is black with several abstract elements. A large, bright green, wavy line sweeps diagonally from the bottom left towards the top right. To its right, a series of thinner, darker green wavy lines follow a similar path. In the top right corner, there is a solid red rectangle. Faint, dark green circular patterns are visible in the background, particularly on the left side.

ATOMIC FORCE MICROSCOPY

ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM) 3D СКЕНИРАЊЕ ПОВРШИНЕ

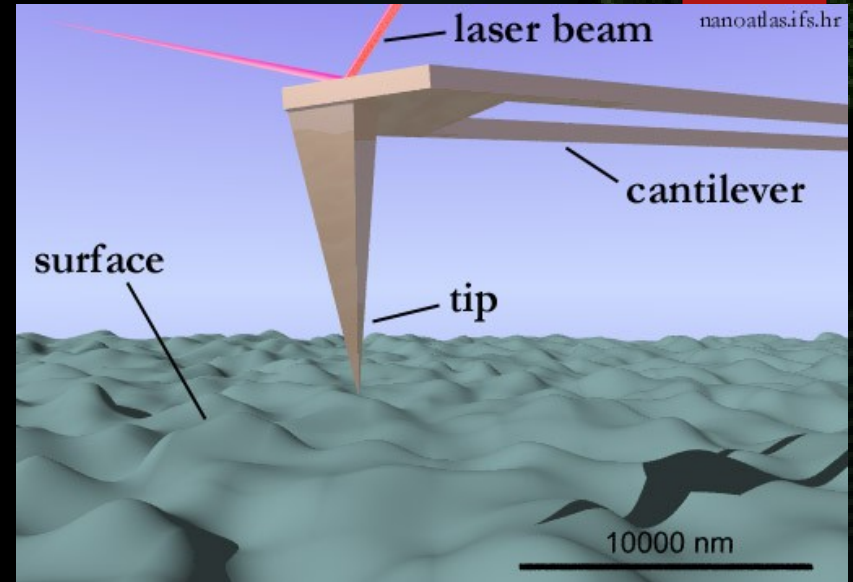
Врх пробе (величина је један до неколико атома) и атоми на површини **узорка** интерагују одређеним силама (нпр. Вандервалсовским) што доводи до промена у положају врха пробе и савијања гредице мери се пиезоелектричним ефектом (сила интеракције, у-оса). Позицију врха током скенирање мери ласер (х-у оса).



AFM

Атомске (молекулске) интеракције
врха и испитиваног материјала.

Van der Waals и друге врсте
међућелијских интеракција



Lennard-Jones-ov потенцијал
(VdW)

$$\varphi(r) = 4\varepsilon[(\sigma/r)^{12} - (\sigma/r)^6]$$

σ – сударни пречник

ε – минимум потенцијалне енергије

odbijanje (¹²)

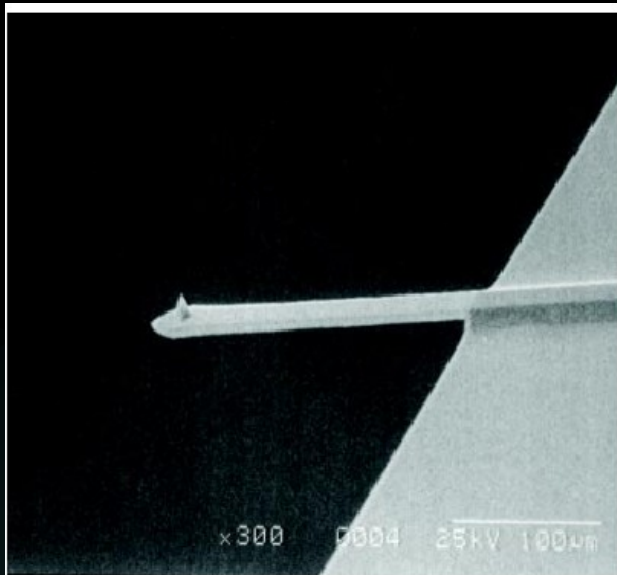
привлачење (⁶)

Топографска (морфолошка)
информација зависи од избора
материјала врха и режима рада:
-Контактни режим– одбојне силе
-Безконтактни – привлачне силе –
већи домет

СЕНЗОР СИЛЕ - ГРЕДИЦА (CANTILEVER)

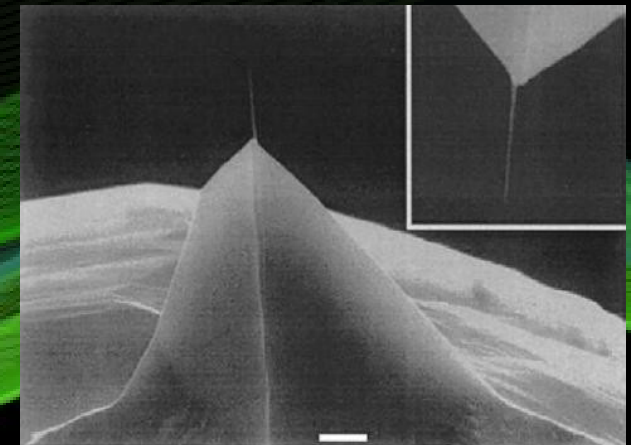
Монокристал (Si , Si_3N_4)

Гредица и врх



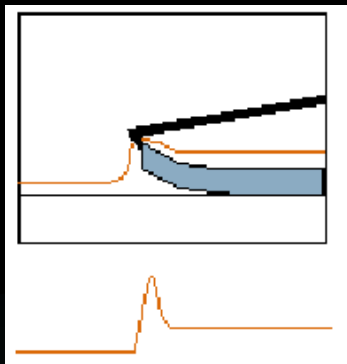
1-4 μm 100-200 μm 10 μm
Димензије врха 2-10nm

Вишезидне угљеничне нанотубе везане за силицијумски врх АФМ микроскопа. У горњем десном углу је слика истог, увећаног врха ротираног за 180 степени у односу на главну слику (bar = 1 μm)



МОДОВИ СКЕНИРАЊА

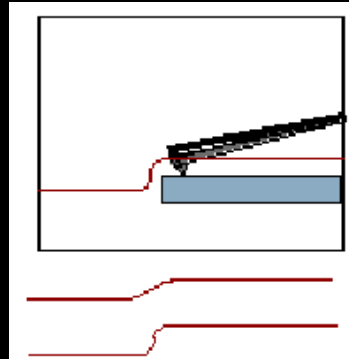
контактни



Гредица
Сила
Трење
Растојање
Оштећења

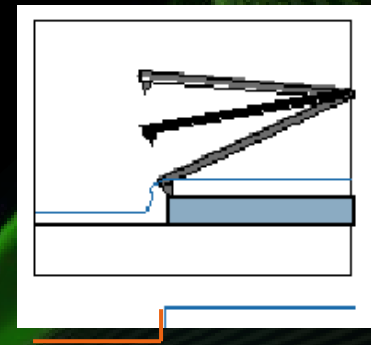
soft
1-10 nN
велико
<0.2nm
велика

безконтактни



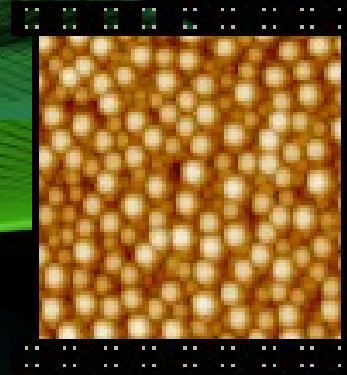
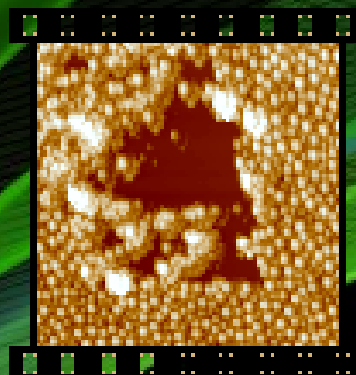
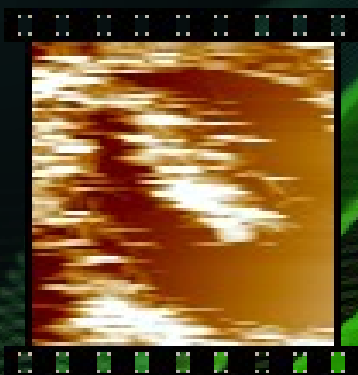
hard
0.1-0.01 nN
мало
~ 1nm
мала

вибрирајући



hard
мало
>10nm
мала

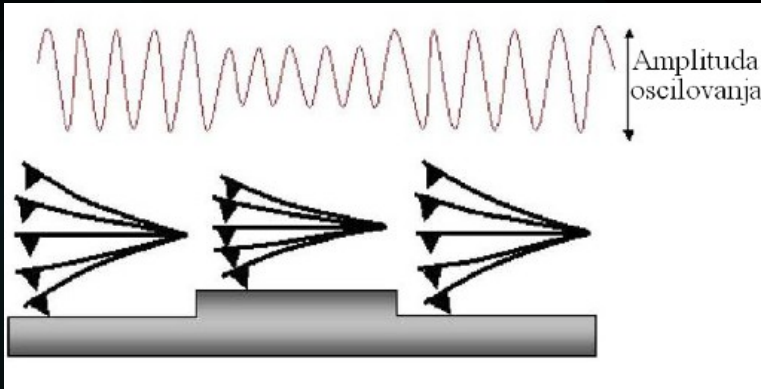
Полимер
латекса



ВИБРИРАЈУЋИ МОД

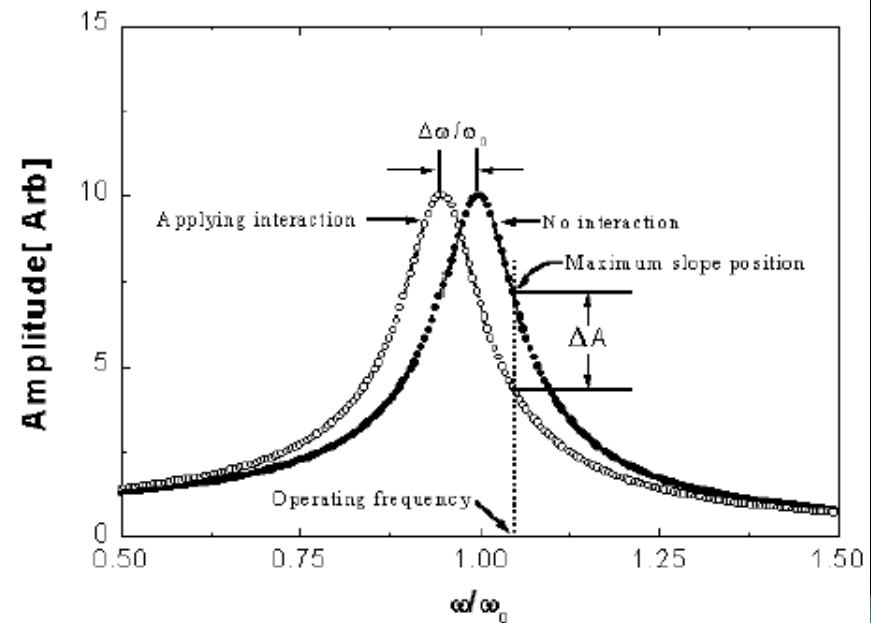
Вибрација гредице око неке сопствене резонантне фреквенције
Промена фреквенције због интеракције узорка и гредице

Схематски приказ кретања
врха гредице АФМ-а при
испрекиданом контактном
режиму.



$$k_{\text{eff}} = k_0 - dF/dz$$

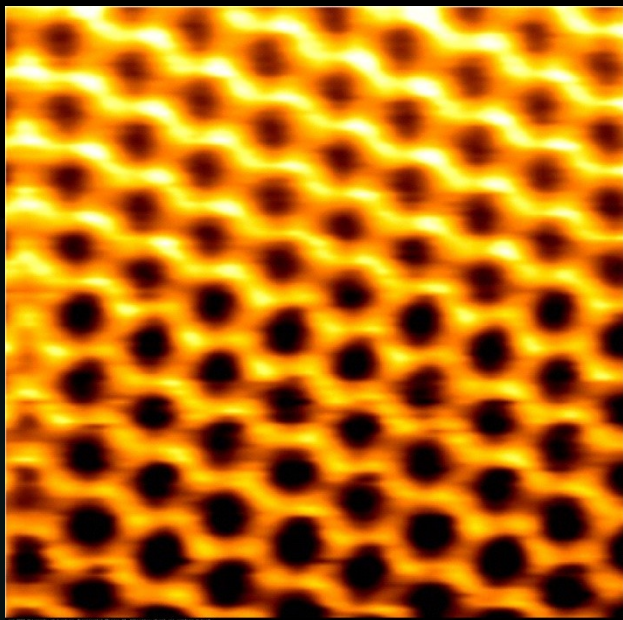
$$f_{\text{eff}} = 2\pi(k_{\text{eff}}/m)^{1/2}$$



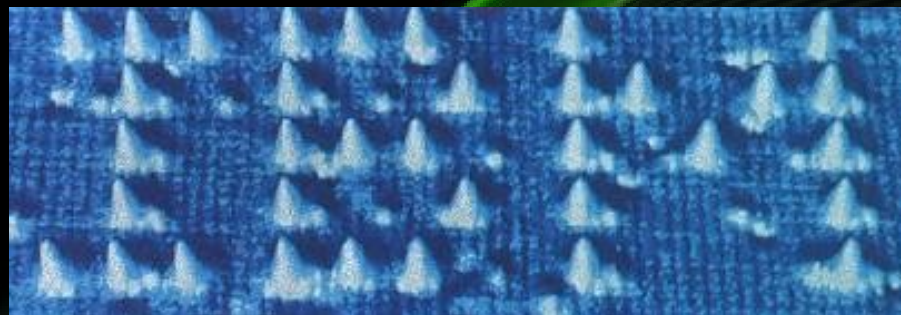
За осликавање се користе промене у амплитуди и фази

Главна примена је испитивање материјала Топографија и различите особине

Графит, 2nm x 2nm



IBM logo, 35 атома ксенона



Различите конструкције врха за испитивање различитих особина

AFM И БИОЛОШКИ СИСТЕМИ

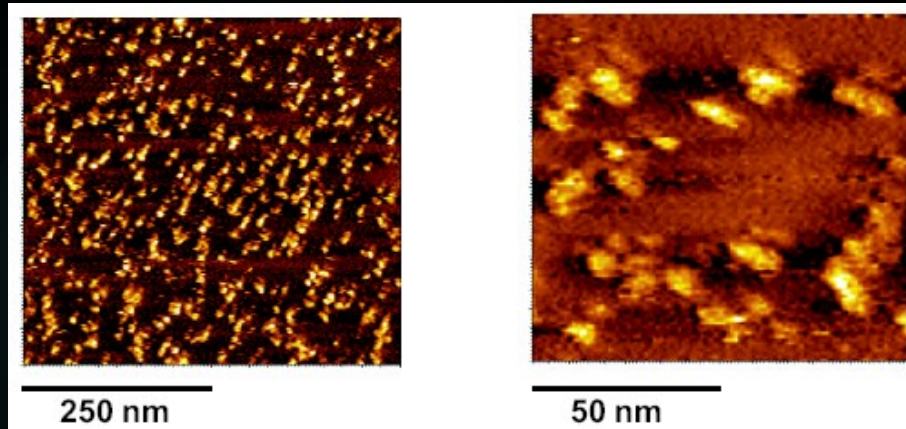
Могућност испитивања биолошких система у средини која одговара физиолошким условима и без додавања страних материјала.

Од 'малих' молекула (фосфолипиди) преко протеина, ДНК и субћелијских структура (мембране) до живих ћелија и ткива.

Топографија (структура), али и механичке, хемијске и функционалне особине укључујући и динамичка испитивања конформационих промена и међумолекулских интеракција.

ПРОТЕИНИ

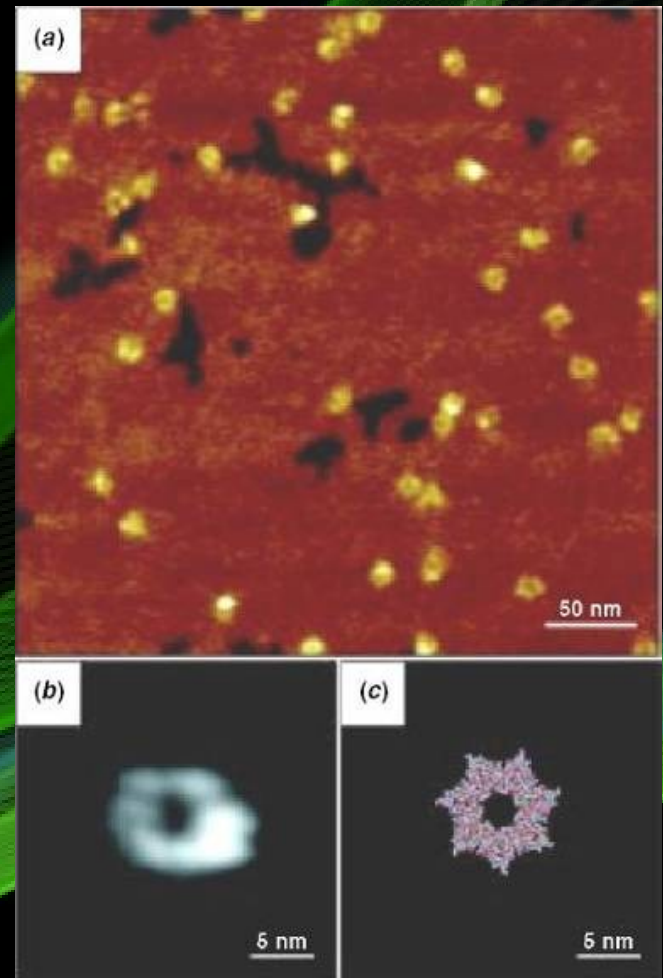
AFM слиек протеина на подлози од лискуна

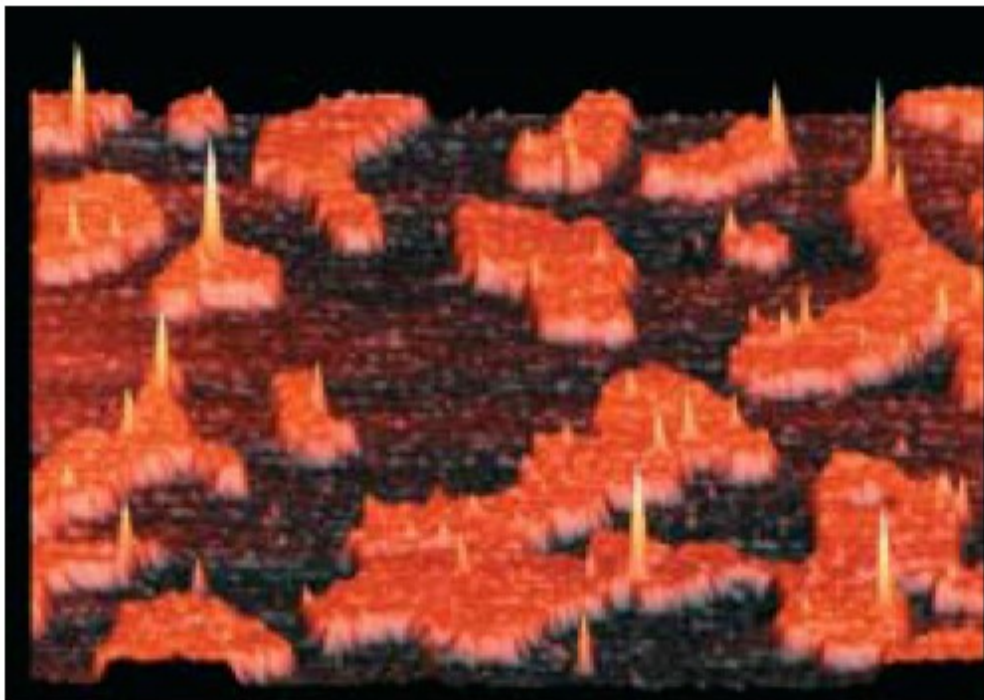


Примена:
Монослојеви протеина за биосензоре

Протейн GroES – AFC слика снимљена са нанотубом као врх.

(а) Велика област на слици приказује затворене и отворене конформације са две стране ГроЕС.
(б) Слика веће резолуције приказује субјединице са хептамерском симетријом и централном шупљином што је у доброј сагласности са кристалном структуром (ц).





Сфингомијелински сплавови у ћелијском мембрани. Врхови одговарају алкалној фосфатази која се налази искључиво у сплавовима

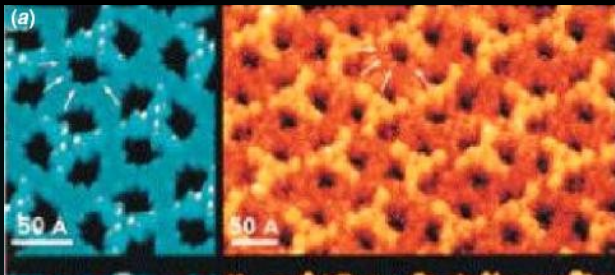
ЋЕЛИЈСКЕ МЕМБРАНЕ

*Конформација порина OtrF
(одговоран за транспорт
супстанција растворних у води) у
мембрани од фосфолипида*

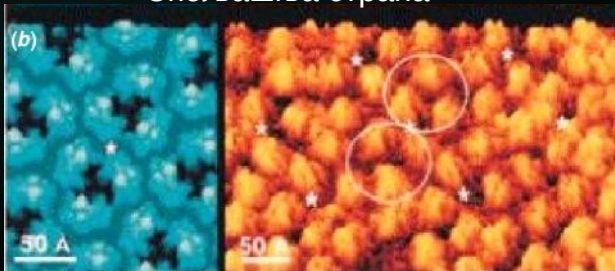
Модел, X-дифракција
Rezolucija 0,3 nm

AFC

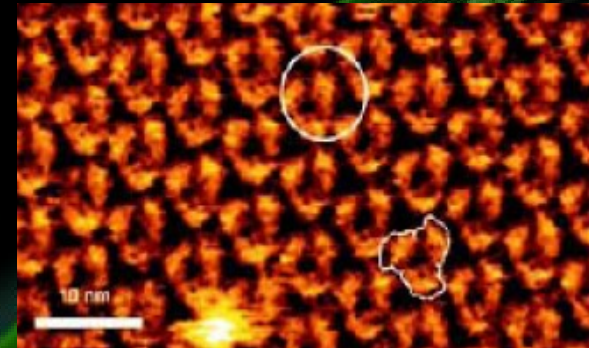
Унутрашња страна



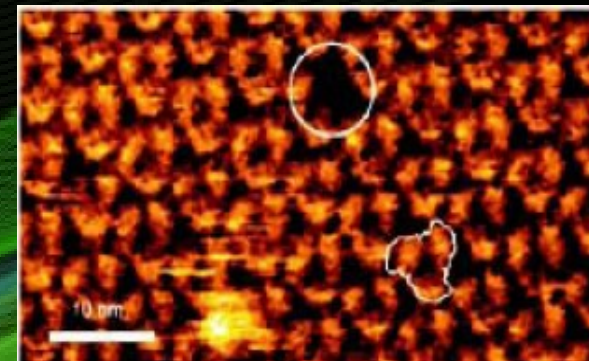
Спољашња страна



Праћење екстракције протеина
помоћу AFM-а

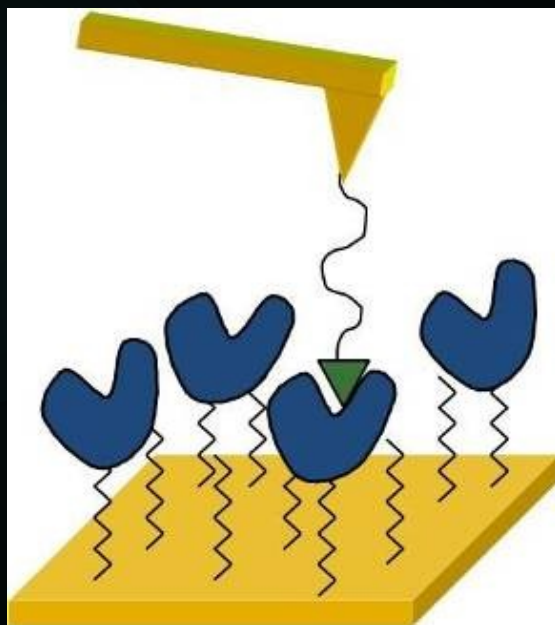


Мембрана пре и после
Екстракције једног протеина

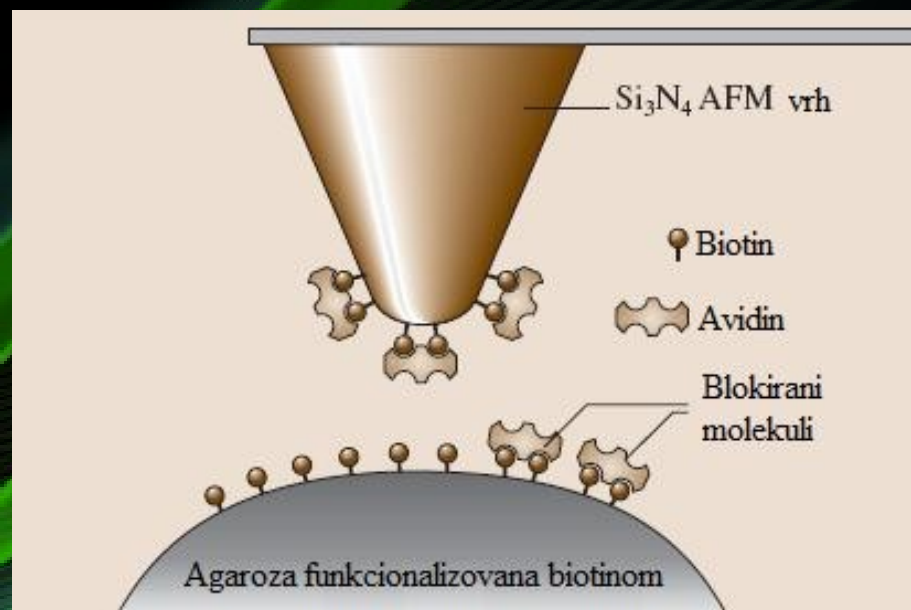


МЕЋУМОЛЕКУЛСКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ ПРОТЕИН-ЛИГАНД

Схематски приказ мерења интеракције између лиганда везаног за врх гредице и рецептора, ковалентно везаног за подлогу.



Врх АФМ микроскопа је функционализован са авидином. Слој биотина је абсорбован на врх и засићен авидином. Подлога од агарозе је функционализована са биотином.

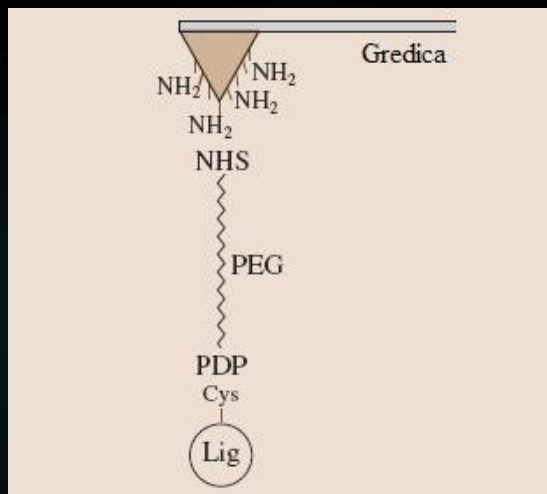


МЕЂУМОЛЕКУЛСКЕ ИНТЕРАКЦИЈЕ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО

Интеракције између антигена и антитела имају знатно нижи афинитет и већу специфичност везивања услед стерних ефеката. Примена флексибилних линкера преко којих се за врх АФМ-а везује антиген или антитело.

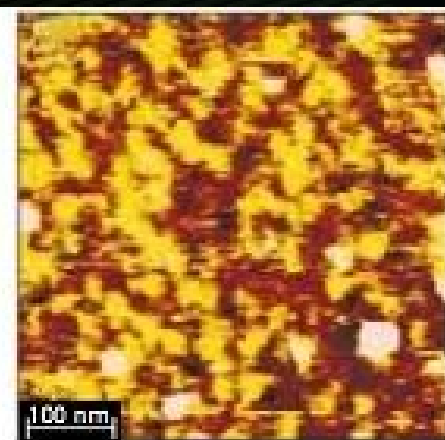
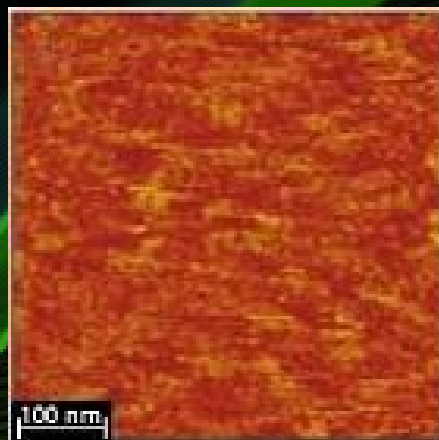
Лизозим-подлога

Антилизозимска антитела + PEG - врх



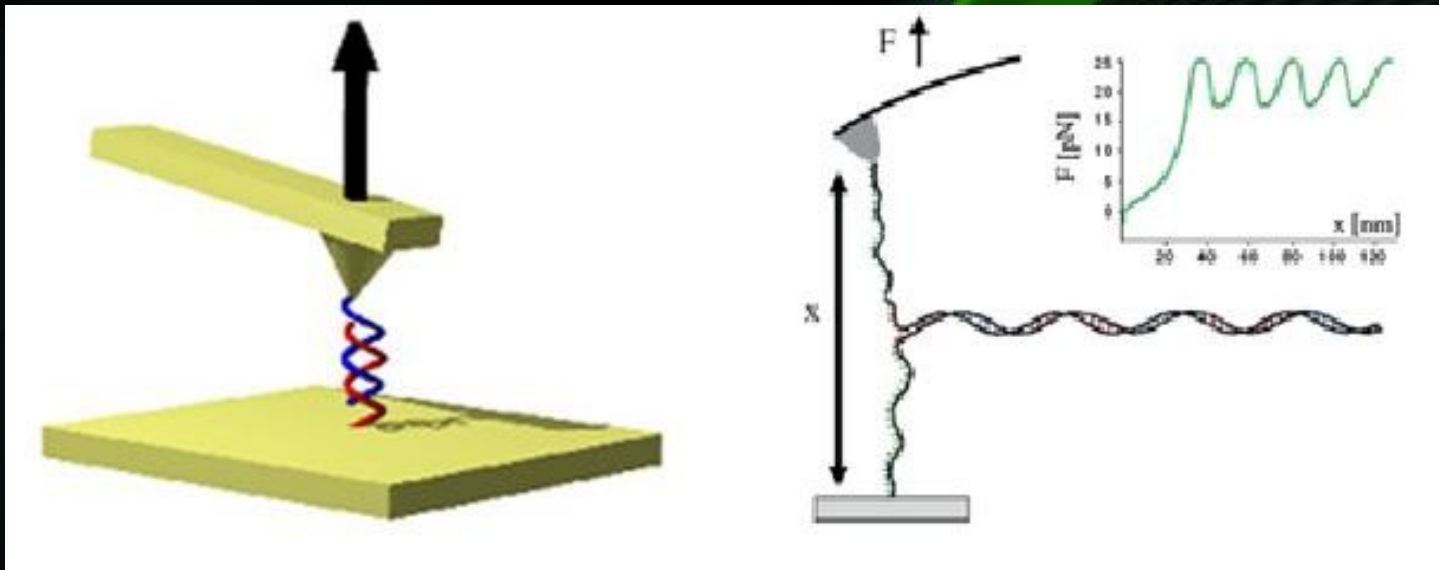
AFC топографска
слика слојева лизозима

AFC антиген-антитело
Препознавање – светле зоне



НУКЛЕОТИДИ И ДНК

Комплементарни хемијски нуклеотиди (по 10 CG и AT парова) су хемијски везани за врх АФМ-а и стаклену подлогу. Када се врх приближи површини стакла, формира се двострука спирала, која се постепено може распрести при померања врха на горе.



НУКЛЕОТИДИ И ДНК

Динамика транскрипције ДНК снимљена у таппинг режиму под дејством РНКП. (а) Слика комплекса пре додавања нуклеозид три фосфата (NTP) у течну ћелију микроскопа. (б)–(г) Сlike добијене у различитим временским периодима након додавања NTP у раствор. На слици дата је мапа коришћеног ДНК темплата са секвенцом која омогућава формирање елонгационог комплекса (1-70)

