

Contact during exam: Associate Professor Marit Sletmoen  
Department of Physics, Realfagbygget  
Phone.73593463 / 47280447

**EXAM IN COURSE TFY4265 AND FY8906  
BIOPHYSICAL MICROMETHODS**

13. December 2010  
Hours: 0900 – 1300

Permitted aids: Simple calculator according to NTNU regulations  
No written books or papers

**Exercise 1**

a) Figure 1 shows a schematic optical layout employed for light microscopy. Name the components depicted 1 and 2 in Figure 1 and describe their function in light microscopy.

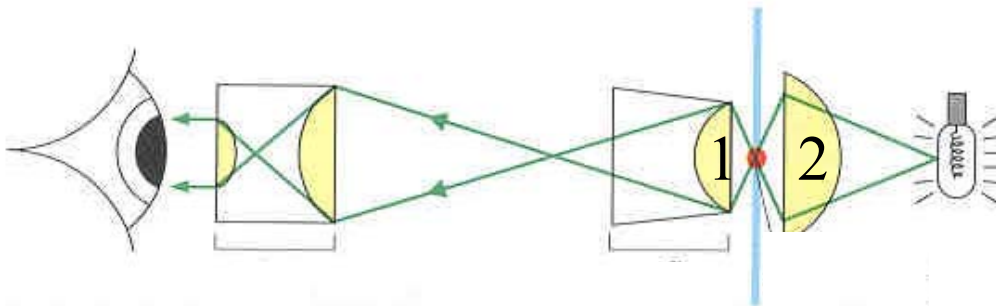


Figure 1: Schematic drawing of light path through light microscope

b) Define the lateral resolution in light microscopy and describe the parameters in equation 1:

$$d = 0.61 \lambda / \text{NA} \quad (1)$$

c) The terms amplitude objects and phase objects are routinely employed concepts in light microscopy of biological specimens. Describe briefly what the terms amplitude and phase objects involve when employed in light microscopy, and in particular their difference.

d) The optical layout employed for light microscopy schematically indicated in Figure 1 can be transformed to a phase contrast light microscope by insertion of two additional optical components. Describe briefly these two optical elements and depict the position of these two optical elements in Figure 1. (Figure 1 is reproduced on a separate page of this exam that can be enclosed in your answer).

## Exercise 2

- a) Describe briefly the Franck Condon principle.
- b) The abbreviation STED is applied for a particular high resolution optical microscopy method. What is the full name the technique abbreviated with STED?
- c) Describe briefly three essential consecutive events taking place in STED microscopy.

## Exercise 3

AFM can be used both as an imaging technique and as a sensitive device to measure small forces between single molecules or small objects.

- a) Describe how an attachment between two molecules or larger structures is exposed during a typical AFM experiment. In your explanation you should include an explanation of the equation  $F = -k \Delta x_t$ . Explain the three parameters in this equation and state how each of the three parameters  $F$ ,  $k$  and  $\Delta x_t$  are determined experimentally or calculated based on experimental observations during a typical AFM experiment.
- b) Explain the term loading rate that is used in dynamic force spectroscopy.

Optical tweezers is another technique that can be applied for determination of minuscule forces. Figure 2 depicts schematically the Gaussian intensity profile of light from a laser light source. The position of the polystyrene bead (grey circle) is slightly to the left of the intensity maximum of the laser light beam.

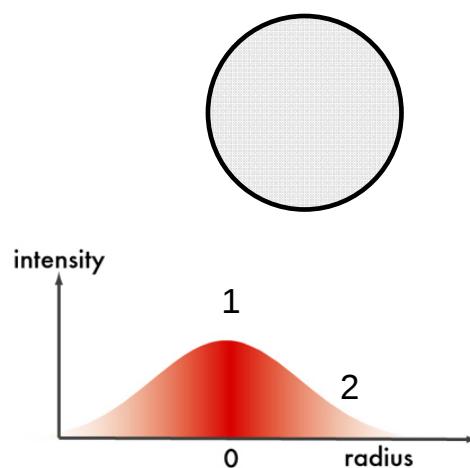


Figure 2: Schematic illustration of a polystyrene bead in a Gaussian intensity profile laser beam.

- c) Assume that the polystyrene bead has a larger refractive index than the surrounding medium and:
- 1 Indicate by arrows the propagation direction of the light rays originating from position 1 and 2 in the gaussian intensity profile of the laser (see figure 2) after being refracted at the medium-bead and bead-medium interfaces.
  - 2 Indicate by vectors  $p_1$  and  $p_2$  the net momentum transfer to the sphere due to the light rays 1 and 2. (let the thickness of the vector indicate the amount of momentum)
  - 3 Indicate by a separate vector the direction of the net force acting on the sphere.

Describe qualitatively what would happen if the refractive index of the bead had been less than the surrounding medium

#### **Exercise 4**

- a) Describe briefly what types of electron-specimen interactions that can be used as a basis for imaging biological specimens by electron microscopy. Which type(s) of interactions are used in various types of electron microscopy? What type of information is obtained when a sample is characterized employing X-ray microanalysis, and describe briefly the fundamental process that give rise to observables.
- b) Make a schematic drawing of a uni-potential electrostatic electron lense, and describe why such a lens design principle always will yield a focusing lens.

Attachment to exercise 1:

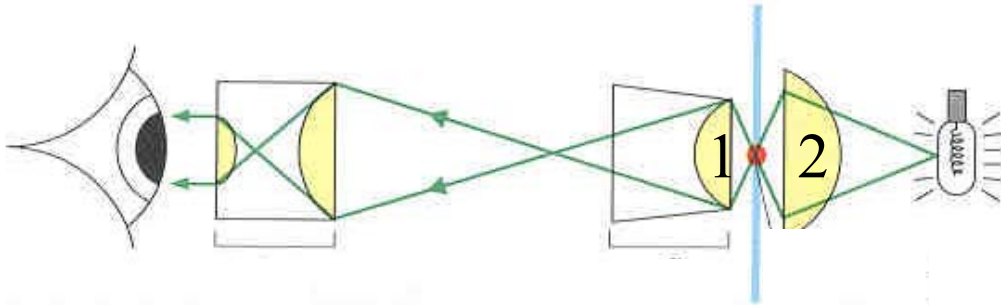


Figure 1: Schematic drawing of light path through light microscope

Kontakt under eksamen: Førsteamanuensis Marit Sletmoen  
Institutt for fysikk, Realfagbygget  
Tlf.73593463 / 47280447

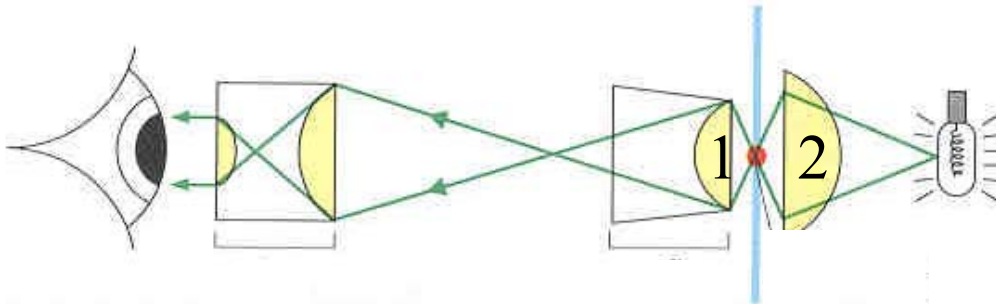
**EKSAMEN I EMNE TFY4265 OG FY8906  
BIOFYSISKE MIKROTEKNIKKER**

13. Desember 2010  
Tid: kl. 0900 – 1300

Tillatte hjelpemidler: Kalkulator i henhold til NTNUs reglement  
Ingen skriftlige hjelpemidler

**OPPGAVE 1**

a) Figur 1 viser skjematisk lysgangen gjennom et optisk oppsett som benyttes for lysmikroskopi. Navngi komponentene merket med 1 og 2 i figur 1, og beskriv funksjonen til disse komponentene.



Figur 1: Skjematisk skisse av lysgang gjennom et optisk mikroskop

b) Definer lateral oppløsning i lysmikroskopi og beskriv parameterne i ligning 1:

$$d = 0.61 \lambda / NA \quad (1)$$

c) Amplitudeobjekt og faseobjekt er vanlig benyttede begrep i forbindelse med lysmikroskopi av biologiske prøver. Beskriv hva begrepene amplitude- og faseobjekt representerer ifb med lysmikroskopi, og redegjør herunder også for forskjellen mellom disse.

d) Det optiske oppsettet skjematis vist i figur 1 kan endres til å understøtte fasekontrast lysmikroskopi ved å sette inn to ytterligere optiske elementer. Gi en kort beskrivelse av disse to optiske elementene, og angi posisjonen hvor de må settes inn (Figur 1 er også gjengitt på en egen side av eksamensoppgaven som du kan legge ved besvarelsen).

## OPPGAVE 2

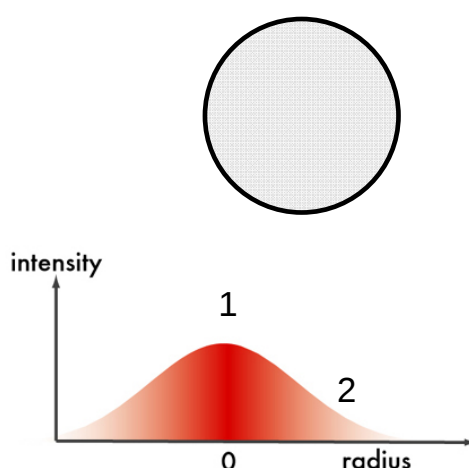
- a) Gi en kortfattet beskrivelse av Franck Condon prinsippet.
- b) Forkortelsen STED blir benyttet for en spesiell type høyoppløsnings lysmikroskopi. Hva er det fullstendige navnet på lysmikroskopiteknikken som blir forkortet med STED?
- c) Gi en kort beskrivelse av tre essensielle etterfølgende hendelser som foregår ved benyttelse av STED mikroskopi.

## OPPGAVE 3

AFM kan benyttes både som en avbildningsteknikk og som et følsomt instrument for å bestemme små krefter mellom par av enkeltmolekyler eller små objekter.

- a) Beskriv signaturen til en binding mellom to molekyler eller større strukturer i et typisk AFM eksperiment. Beskrivelsen bør inkludere en forklaring på hvordan ligningen  $F = -k \Delta x_t$  benyttes i slike eksperimenter. Forklar de tre parameterne  $F$ ,  $k$  og  $\Delta x_t$  i ligningen og hvordan de er eksperimentelt bestemt eller beregnet basert på eksperimentelle data fra de relevante målinger ved hjelp av et AFM.
- b) Beskriv begrepet “kraftlastrate” (loading rate) som benyttes i forbindelse med kraftspektroskopi.

Optiske pinsetter er en annen teknikk som kan brukes for å bestemme små krefter. Figur 2 viser skjematisk en Gaussisk intensitetsprofil til lyset fra en laser. En polystyrenkule (grå sirkel) befinner seg litt til venstre for intensitetsmaksimum til laserlyset.



Figur 2: Skjematisk illustrasjon av en polystyrenkule i en Gaussisk intensitetsprofil til en laserstråle.

- c) Anta at polystyrenkula har en større brytningsindeks enn det omgivende medium og:
- 1 Indiker ved hjelp av piler, lysgangen til lysstråler som kommer fra posisjonene 1 og 2 i den Gaussiske intensitetsprofilen til laserlyset (Figur 2). Tegningen skal redegjøre for brytningen i grenseflatene omgivende medium – polystyrenkule og polystyrenkule – omgivende medium.
  - 2 Indiker vektorene  $p_1$  og  $p_2$  til netto momentoverføring til polystyrenkula fra lysstrålene 1 og 2 som kommer fra punktene 1 og 2 i intensitetsprofilen til laserlyset. Den relative størrelsen på momentene  $p_1$  og  $p_2$  synliggjøres ved å benytte ulike tykkelse på vektorene.
  - 3 Tegn opp en vektor som angir nettokraften som virker på polystyrenkulen.

Beskriv kvalitativt hva som ville skje dersom brytningsindeksen til kulen hadde vært mindre enn det omgivende medium.

#### **OPPGAVE 4.**

a) Gjør rede for hvilke type elektron-prøve vekselvirkning som en kan dra nytte av i elektronmikroskopi. Hvilke type vekselvirkninger benyttes i de ulike typer elektron mikroskopi? Hva slags informasjon oppnås ved hjelp av røntgen-mikroanalyse, og beskriv den fundamentale prosessen som gir opphav til de observerte fenomen.

b) Skisser oppbyggingen av en unipotensial, elektrostatisk elektronlise, og gi en forklaring på hvorfor en slik linse alltid er en samlelinse.

Vedlegg til oppgave 1:

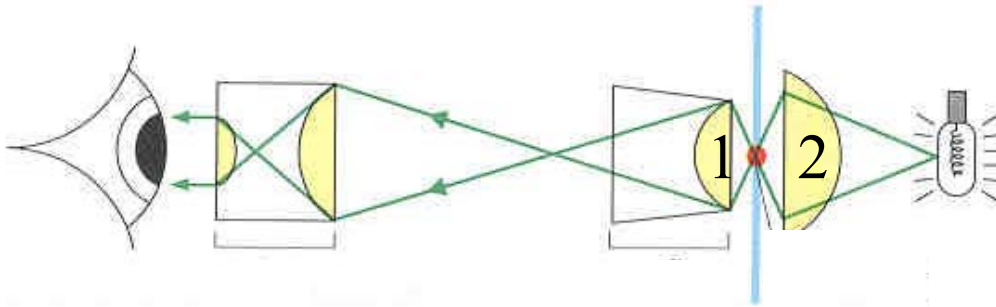


Figure 1: Schematic drawing of light path through light microscope