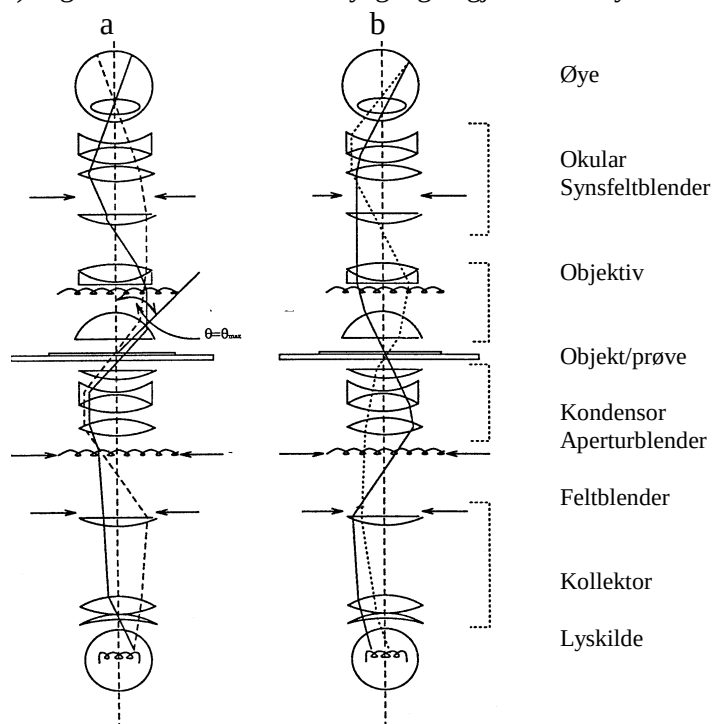


Løsningsforslag, Eksamen i emne TFY4265 Biofysiske mikroteknikker
Fredag 3. desember 2004 Tid: kl. 1500 – 1900.

Oppgave 1

a) Figur 1 viser en skisse av lysgangen gjennom et lysmikroskop innstilt i følge Köhlers belsningsprinsipp.



Figur 1. Skjematisk skisse av lysgangen gjennom et LM innstilt i følge Köhlers belsningsprinsipp. a) for lysstråler fra samme punkt på lyskilden, og b) for parallelle stråler fra lyskilden.

Aperturblenderen er plassert i fokalplanet til kondensorlinsa.

Köhlers belsningsprinsipp består av tre følgende trinn:

- 1) Lyskilden avbildes ved hjelp av kollektorlinsa a aperturblenderen
- 2) Feltblenderen avbildes ved hjelp av kondesoren i objektet/prøven
- 3) Aperturblenderen plasseres i fokalplanet til kondensorlinsa.

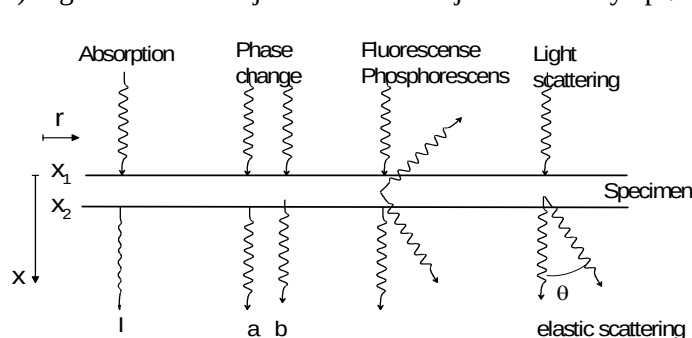
Ved denne innstillingen oppnår en at stråler som eventuelt ville brytes fra deler av prøven som ikke avbildes, ikke bidrar til lyset som registreres (pkt 2). Videre oppnår en at parallelle stråler ut fra lyskilden belyser samme punkt av prøve og at lys fra samme punkt i lyskilden går parallelt gjennom prøve (pkt 1 og 3). Dette gjør at maksimal vinkel av lysstrålene inn mot prøve er unikt bestemt av diameter av aperturblender.

Oppløsningsevnen i et lysmikroskop innstilt i følge Köhlers belsningsprinsipp er gitt ved likningen:

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{n \sin \theta_{\max}} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} \quad (1)$$

Dette uttrykket er gyldig for emitterende objekt, avildet ved hjelp av et linsesystem med sirkulære blendere (dette gir opphav til den numeriske faktoren 0.61). Her er d minste avstand mellom detaljer som kan gjenkjennes som ikke-overlappende, λ bølgelengden til lys, n brytningsindeks i prøven, og $\theta_{\max}$ er maksimal åpningsvinkel (også angitt i Fig. 1). $NA = n \sin \theta_{\max}$ er numerisk apertur. Med gitt prøve kan operatøren kontrollere oppløsningsevnen ved å velge ulike $\theta_{\max}$, for en gitt linse ved diameteren på apertureblenderen.

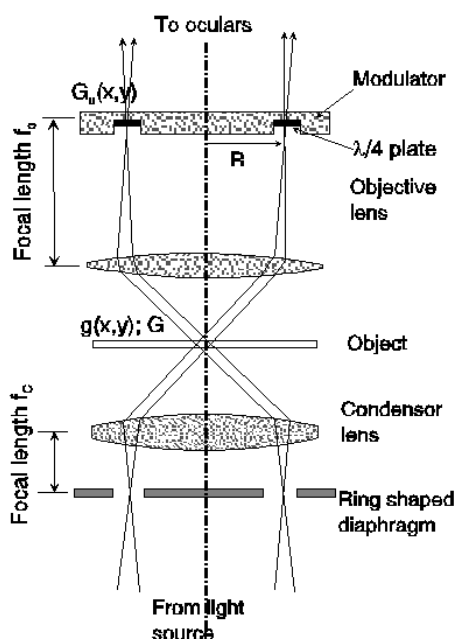
b) Figur 2 viser en skjematisk illustrasjon av ulike lys-prøve vekselvirkninger en kan dra nytte av i lysmikroskopi.



Figur 2. Ulike lys - prøve vekselvirkninger

Et amplitudeobjekt er karakterisert ved at prosessene absorpsjon og spredning av innfallende lys gir opphav til topografiske amplitudevariasjoner til lyset etter at det har passert prøven (mens fasen ikke er påvirket).

Et faseobjekt er karakterisert ved at det kun er topografiske variasjoner av fasen til lyset etter at det er passert prøven (mens amplituden ikke er påvirket). Dette har opphav i ulik optisk veilengde på ulike steder gjennom prøven. Dette kan være på grunn av ulike brytningsindekser som følge av ulike konsentrasjoner av stoffer eller ulike konsentrasjoner eller kombinasjoner av dette.

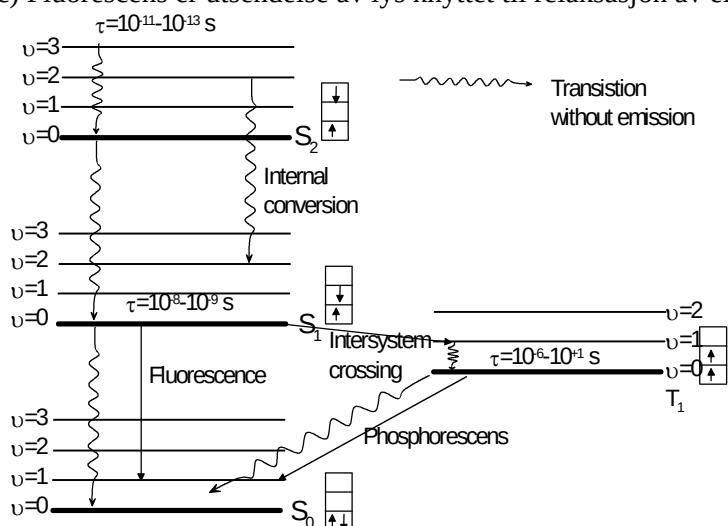


Figur 3. Skisse av lysgang gjennom lysmikroskop utstyrt for fasekontrastmikroskopi.

Figur 3 viser skjematisk lysgangen gjennom et lysmikroskop utstyrt for fasekontrast mikroskopi. De elementene som settes inn er: en ringformet aperturblander i fokalplanet til kondensorlinsen, og en ringformet modulator i "bakre" fokalplan til objektivlinsene. Bildet av den ringformede aperturblander i bakre fokalplan av objektivlinse faller sammen med den delen av modulatorens som demper lyset av faktor α og gir et fasetillegg på $\pi/2$.

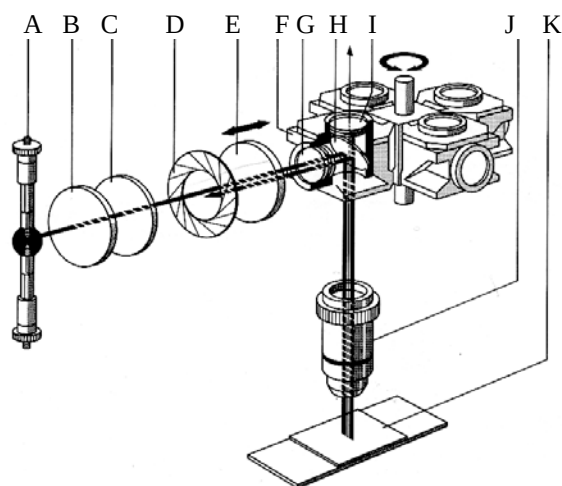
Skissen av lysgangen viser lysstråler som ikke endrer retning ved passering av prøven, dvs., det er ikke noe fasegradient i dette tilfellet. Disse lysstrålene treffer dermed modulatorens, og dermed får de et fasetillegg på $\pi/2$ samt at de blir dempet med en faktor α . Lysstråler som går gjennom prøven hvor det er en topografisk fasegradient vil treffe modulatorplaten utenfor det området som demper og gir fasetillegg til lys; dvs., ikke noe spesielt skjer. Etter modulatorens vil da disse komponentene kunne interferere, og en detektor (eller øyet vårt) vil kunne registrere topografiske variasjoner i fasen som intensitetsvariasjoner.

c) Fluorescens er utsendelse av lys knyttet til relaksasjon av elektronisk eksiterte molekyler med energi som



Figur 4. Effekt av vibrasjonsrelaksasjon på fluoresensprosessen, skissert i et Jablonski-diagram.

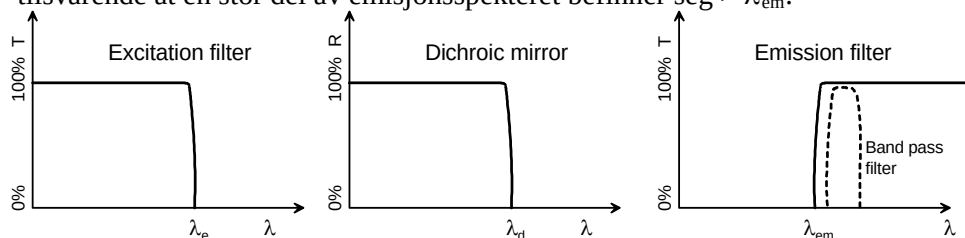
tilsvarer en del av det elektromagnetiske spektrum hvor synlig lys og tilgrensende bølglengder befinner seg. Det er de svakest bundne elektronene i bindingsorbitalene som blir eksitert ved hjelp av lys i synlig lys området. Emitert lys er rød-skiftet i forhold til eksitasjonslyset i fluorescensprosessen fordi en del av eksitasjonsenergien "tapes" ved strålingsløse overganger. Både eksitasjon og emisjoner skjer mellom tilstander som oppfyller utvalgsreglene for elektronisk eksiterte tilstander, og med størst sannsynlighet hvor overlap i bølgefunksjonene er størst. Det tapes energi i vibrasjonsrelaksasjon både før (S_1 tilstandene) og etter (S_0 tilstandene) utsendelse av foton i fluorescensprosessen. Dette fører til rødskift (lengre bølglengde) av emitert lys i forhold til eksitasjonslys.



Figur 5 Optiske komponenter benyttet ved epi-illumineringsfluorescensmikroskopi. (A) lyskilde; (B) varmefilter; (C) rød filter; (D) feltblende; (E) hjelpelinse for avbildning av feltblende i prøven; (F) Revolver med filterkuber; (G) eksitasjonsfilter; (H) dikroisk speil; (I) emisjonsfilter; (J) objektivlinse og (K) prøve

Fluorescens utnyttes i fluorescensmikroskopi ved at en benytter seg av fluorescerende molekyler som brukes som "merkelapper" til spesifikke molekyler, og således bestemme deres fordeling i vev eller celler. I et fluorescensmikroskop baserer en seg på at en selektivt kan observere fotoner som stammer fra fluorescensprosessen, og ikke har annen opprinnelse. Dvs., etter (konvensjonell) eksitering med en lys med relativt kort bølglengde, utnyttes rød-skiftet (se over) ved å observere emitert lys med høyere bølglengde enn eksiterende.

Figure 6 viser skjematisk illustrasjon av de optiske egenskapene til elementene i filterkuben brukt ved fluorescensmikroskopi. Eksitasjonsfilteret er transparent opp til en bølglengde λ_e . Det dikroiske speilet reflekter lys med $\lambda < \lambda_d$. Eksitasjonsfilteret er transparent kun for lys over en viss bølglengde λ_{em} . Nå er $\lambda_e < \lambda_d < \lambda_{em}$ og typisk velges disse slik at en finner en signifikant del av eksitasjonsspekteret til den fluorescerende proben $< \lambda_e$ og tilsvarende at en stor del av emisjonsspekteret befinner seg $> \lambda_{em}$.



Figur 6. Skjematisk illustrasjon av optiske egenskaper til elementene i filterpakken benyttet ved fluorescensmikroskopi

Ved multifoton lysmikroskopi drar en nytte av emmitert fluorescens, men eksitasjonen foregår ikke ved absorpsjon av et foton. Det må mer en et foton til for å bringe systemet opp i den eksisterte tilstanden. Energien til hvert enkelt av de innkomne fotonene er ikke alene tilstrekkelig til å føre til en elektronisk eksistert tilstand, til det trengs det flere, og de må komme så raskt at systemet ikke rekker å relaxere. Hvert enkelt foton har dermed mindre energi. Kravet om tilnærmet samtidighet av flere fotoner fører til at den kun er et tynkt skikt som opplever tilstrekkelig energitetthet til å blir eksitert. Eller med andre ord, at eksitasjonsmetoden oppfyller prinsippet om konfokal avbildning (eksitasjon) uten at en trenger å bruke pinhole foran detektoren.

Resonansenergioverføring innebærer at utsent foton i forbindelse med fluorescens fra et molekyl (donor) blir absorbert i et nærliggende molekyl (akseptor) som dermed blir eksitert og som deretter kan relaxere ved en påfølgende fluorescensprosess. Dersom donor og akseptor kun er to ulike kopier med samme kjemiske sammensetning, vil fluorescens fra akseptor og donor være "sammenfallende", og således ikke representerer noe som gir ekstra informasjon. Dersom donor og akseptor er ulike type molekyler, f.eks. en reseptor og en ligand, kan dette brukes til å studere nærhet mellom disse. Eksitasjonen av liganden som gir opphav til fluorescens fra reseptoren vil kun forekomme dersom disse er tilstrekkelig nærme hverandre (bundet). Direkte eksitasjon av den fluorescerende gruppen på reseptoren vil gi kunne gi informasjon om fordeling/plassering av alle reseptorene. Dette er et eksempel som antyder hvordan en kan finne fram til informasjon om "nærhet" mellom ulike komponenter, ved resonansenergioverføring.

OPPGAVE 2.

a) Hoveddelene til et AFM er: i) scanner; ii) spiss og spissholder; iii) deteksjonssystem og iv) tilbakekopling/reguleringssystem. Dette er skjematisk illustrert i Fig. 7.

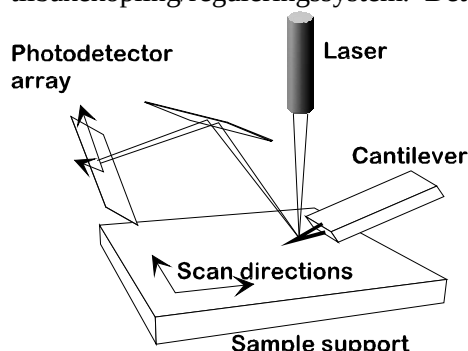


Fig. 7 Skjematisk illustrasjon av sentrale deler av AFM. Prøvebordet befinner seg på den piezoelektriske scanneren

Funksjonen til scanneren er å kunne kontrollere den relative posisjonen til spissen lateralt (x-y) og høyde (z) i forhold til den undersøkte prøven. Presisjonskravet er i området fraksjoner av nm, og en kan ikke oppnå bedre oppløsningen enn presisjonen til scanneren tilsier.

Posisjonskontrollen er laget ved å benytte piezo-elektriske materialer som viser en liten dimensjonsforandring ved påtrykk av elektrisk felt. Funksjonen til spissen er å føle overflaten enten ved å være i konstant kontakt (kontakt mode), eller oscillerende mode. Spissen må være tilstrekkelig spiss til at den totale vekselvirkningen mellom spiss og prøve ikke omfatter et for stort område av prøven. Spesielt hvor prøven viser trappeliknende høydesteg vil det settes store krav til spissen. En nålformet spiss (f.eks. karbon nanorør) vil ha muligheten for å gjengi slike detaljer mer naturtro enn en spiss formet som en pyramide. Egenskapene til spissen som er kritisk for lateral oppløsningen er dermed ytterste krumningsradius, og hvor skarp den er (det siste

også for vertikal oppløsning). Deteksjonssystemet brukes til å måle avbøyning av fjæren (hvor spissen er ytterst). En vekselvirkning omsettes til en avbøyning av fjæren ut fra materialegenskapene til fjæren. Omregning baserer seg på Hooke's lov, og det finnes fjærer (cantilevers) med ulike fjærkonstanter for å kunne optimalisere avbøyning i forhold til ulike materialer. Mest vanlig i dag er et deteksjonssystem basert på laserlys som reflekteres fra baksiden av fjæren inn mot en splittet fotodiode. Posisjonen laserlyset treffer på fotodioden er et mål for bøyningen av fjæren, og dermed vekselvirkningen mellom spissen og prøven. Tilbakekoplingen /

reguleringssystemet har som oppgave å sørge for konstant kraft (kontakt mode) mellom prøve og underlag for alle posisjoner under skanningen. Dette kan i kontaktmode illustreres med serien av illustrasjoner (Fig. 8). Det er alltid en viss avbøyning av fjæren (Fig. 8a) som representerer den kraft en gjennomfører målingen med. Ved scanning, vil en støte på ulike objekter, f.eks. illustrert som kulen vist på Fig.8.

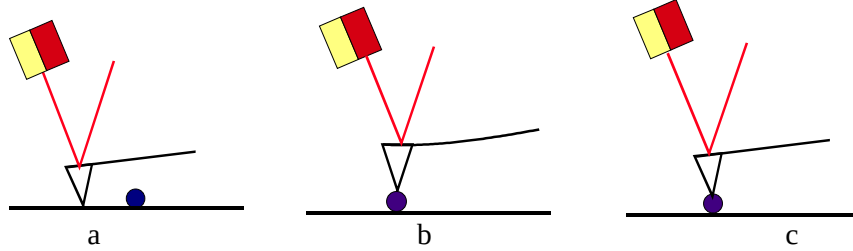


Fig. 8. Skjematisk illustrasjon av refleksjon av laserlys mot splittet fotodiode, ved bruk av AFM i kontaktmode

Straks før tilbakekoplingssystemet får virke (Fig. 8b), fører dette til en sterkere avbøyning av fjæren og dermed endring av posisjon som laserstrålen reflekteres inn på fotodioden. Reguleringssystemet endrer høyden til at laserlyset treffer samme punkt på splittet fotodiode (detektoren) (Fig. 8c). Dette representerer at samme kraft mellom spiss og prøve, som forsøkes holdes konstant over overflaten. Rollen til reguleringssystemet i forhold til oppløsning er dermed at det kan sørge for tilstrekkelig rask respons uten oversvingninger ved de brukte sveipehastigheter.

De ulike leddene i likningen:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma \frac{dz}{dt} + kz = F_0 \sin \omega t + F_{\text{int}}(z) \quad (2)$$

beskriver aksellerasjon til fjærarmen ved spissen ($m d^2 z/dt^2$), dempningen av fjærarmen ($\gamma dz/dt$); kraftvirkningen i følge Hooke's lov (kz), det oscillerende pådragskraften ($F_0 \sin \omega t$) og vekselvirkning mellom spiss og underlag (F_{int}). Totalt sett er likn. 2 bevegelseslikningen for fjærarmen. Resonansfrekvens og kvalitetsfaktor, Q er gitt ved:

$$\omega_0 = \sqrt{k/m} \quad Q = \frac{m\omega_0}{\gamma} = \frac{\sqrt{km}}{\gamma} \quad (3)$$

Når instrumentet anvendes i luft og en bruker en drivfrekvens $\omega < \omega_0$, (ca 90 % av amplitude ved ω_0) og avstanden mellom spiss og underlag reduseres, vil følgende betydningen av F_{int} øke. Effekten av dette analyseres ved å linearisere bidraget fra denne kraften:

$$F_{\text{int}}(z) = \frac{dF_{\text{int}}(z)}{dz} z = f' z \quad (4)$$

Innsatt i likn (2) oppnås da:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma \frac{dz}{dt} + (k - f')z = F_0 \sin \omega t \quad (5)$$

som viser at resonansfrekvensen endres til:

$$\omega_{\text{eff}} = \sqrt{\frac{k - f'}{m}} \quad (6)$$

Fortegnet her er basert på en attraktiv kraft mellom spiss og underlag. Alternativt vil fortegnet endre seg avhengig av karakteren til kraften. Ved drivfrekvensen ω vil en dermed observere endring i amplitude (og fase) som følge av endring av svingesystemets egenskaper (ω_0) når spissen begynner å nærme seg underlaget.

Ved måling i væske vil den effektive masse øke betydelig (fordi væske beveges med fjæren), dempningen øker (fordi cantileveren beveges i væske i forhold til luft). Dette fører til at resonansfrekvensen reduseres

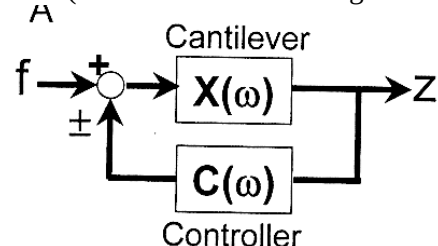


Fig. 9. Tilbakekopling anvendt ved tapping mode i væske

betydelig, og at Q reduseres. Konsekvensen er at den resulterende amplitudeendring til svingning av cantilever som følge av v.v. mellom prøve og spiss (F_{int}) når instrumentet opereres ved en konstant omega, blir mindre. En annen effekt er at får større innslag av overharmoniske. Totalt sett gir dette dårligere oppløsning. For å kompensere for dette brukes en tilbakekopling hvor tilbakekoplingssignalet er proporsjonalt med bevegelseshastigheten til færing (Fig. 7). Denne tilbakekoplingen er satt opp på denne måten for å redusere den effektive dempingen. Dette oppnås ved å bruke et variabelt tilbakekoplingssignal (reguleres med verdien på C) som er proporsjonalt med hastigheten til cantilever, og som fører til at transferfunksjonen endres til :

$$\chi'(\omega) = \frac{\chi(\omega)}{1 \pm C\chi(\omega)} \quad (7)$$

Her er transferfunksjonen $\chi(\omega)$ til vektarmen i antatt det som er gyldig for en harmoniske oscillator:

$$\chi(\omega) = \frac{\omega_0^2 / k}{\omega_0^2 - \omega^2 + j\omega_0\omega/Q} \quad (8)$$

og responsen til cantilever som følge av en påtrykt kraft kan uttrykkes:

$$z(\omega) = \chi(\omega) F(\omega) \quad (9)$$

I ligning 7 er:

$$C = C(\omega) = j \frac{\omega}{\omega_0} k \left(\frac{1}{Q} - \frac{1}{Q_{eff}} \right) \cong jk \left(\frac{1}{Q} - \frac{1}{Q_{eff}} \right) = G e^{j\pi/2} \quad (10)$$

hvor en i tilnærmelsen har antatt en frekvensuavhengig tilbakekopplingskonstant innenfor det området som anvendes. Effekten av tilbakekopplingen kan ses direkte ut fra bevegelseslikningen, som nå har fått et tilleggsledd pga tilbakekopplingen proporsjonal med hastigheten for bevegelsen:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} + G e^{j\pi/2} A_1 e^{j(\omega t - \varphi)} + F_{int}(z) \quad (11)$$

Bruk av $\frac{dz}{dt} = j\omega A_1 e^{j(\omega t - \varphi)} = \omega e^{j\pi/2} z$ gir $m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} + \frac{G}{\omega} \frac{dz}{dt}$

En oppnår da likningen:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \left(\gamma - \frac{G}{\omega} \right) \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} \quad (12)$$

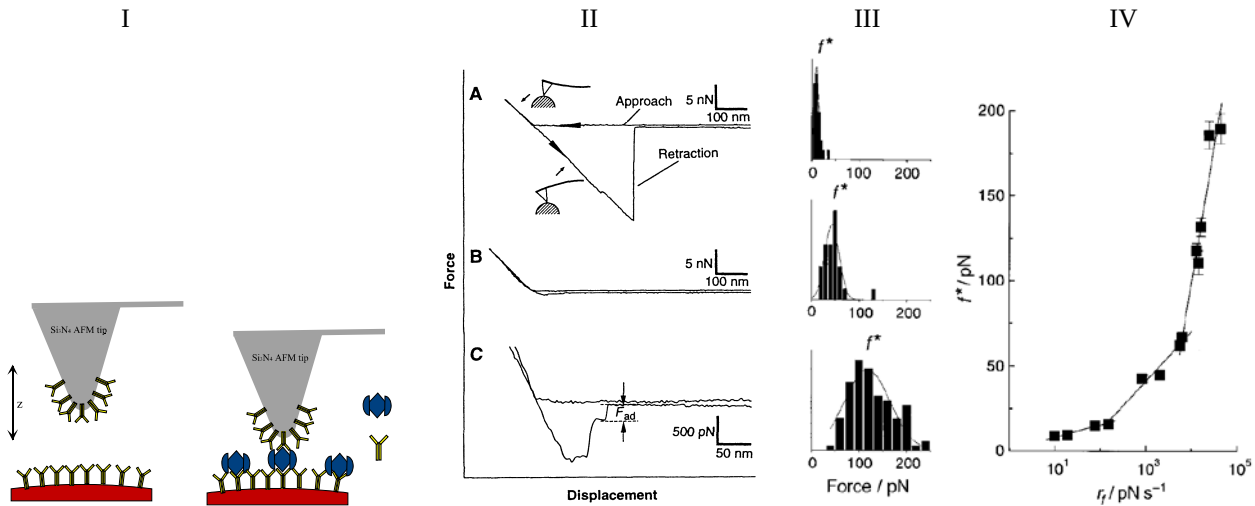
som eksplisitt viser at tilbakekopplingen fører til reduksjon av den effektive dempningen. Innføring av variabelen: $\gamma_{eff} = (\gamma - G/\omega)$ gjør at bevegelseslikningen kan skrives som:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma_{eff} \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} \quad (13)$$

Dvs., samme form som uten tilbakekoppling (dvs., effekten er "bakt inn" i dempeleddet). Dermed oppnås en mindre demping, og dermed større endringer i svingeamplitude som følge av $F_{int}(z)$.

b) Med dynamisk kraftspektroskopi menes effekt av krefter intermolekylære krefter, eller krefter mellom f.eks. segmenter i globulære makromolekyler. Dynamisk i denne sammenheng innbefatter en situasjon hvor kreftene endres som funksjon av tid, i emnet er det kun en lineært økende kraft som er analysert.

Målemetoden som brukes er typisk et svært følsomt kraft-posisjonsinstrument, hvor AFM og optiske pinsetter begge kan brukes. Disse har ulike fjærkonstanter, og avhengig av størrelsen på de kreftene som skal bestemmes, kan enten det ene eller andre type oppsett være å foretrekke. For intermolekylære interaksjoner 50 pN og større, vil AFM være å foretrekke fordi en oppnår god posisjonskontroll samtidig som oppløsning i kraft er tilstrekkelig. I beskrivelsen av et typisk eksperiment i det følgende brukes antistoff-antigen som eksempel. Tilsvarende vil måtte gjennomføres for andre type vekselvirkninger som ønskes studert. Antistoff immobiliseres på et substrat, og antigenet på AFM spissen ved hjelp av kjemiske metoder. Alternativt kan en snu om på hvilke underlag som skal bære en viss type makromolekyl. Kontroll av overflatetetthet av disse komponentene er viktig for å lette den etterfølgende analysen av observasjonene. Det funksjonaliserte substratet og AFM spissen monteres i AFM instrumenter, og eksperimentene gjennomføres med væske tilstede. Væsken kan inneholde ko-faktorer som er nødvendig for bindingen, som kan påvirke bindingsstyrken, eller være av samme kjemiske natur som en av de immobiliserte komponentene for å teste spesifisitet i vekselvirkningen. Typisk består eksperimentet av en serie av forankringsforsøk med etterfølgende separering av substrat og AFM spiss. Forankringen mellom antistoff og antigen gjennomføres ved å bringe AFM spissen i kontakt med underlaget, og å holde posisjonen der i en tilstrekkelig til å la bindingen finne sted. Deretter føres disse fra hverandre ved hjelp av z-piezo'en på AFM'en hvor x og y posisjonen holdes konstant. Dersom forankring har funnet sted, vil en kunne observere dissosiering mellom anti-stoff antigen par som typiske tap av adhesjonskrefter som sprang i kraftkurvene. Størrelsene på disse kraftsprangene analyseres ved å samle mange observasjoner som grunnlag for fordelinger av slike. Slike eksperimentelle serier gjennomføres med ulike hastigheter for hvort en trekker AFM spissen bort fra underlaget. Dette gir grunnlag for å utsette de bimolekylære interaksjonene for ulike "kraftlastrater" i dynamiske kraftregime.



Figur 10. Ulike trinn i dynamisk kraftspektroskopi. (I) Skjematisk illustrasjon av immobiliserte molekyler på substrat og AFM spiss. Eksempelen viser multifunksjonelt antistoff og samme type antigen på substrat og AFM spiss. (II) Eksempler på kraft-avstandsprofiler oppnådd ved hjelp av system som illustrert i (I). IIA: Adhesjon mellom umerket AFM spiss og underlag registrert ved "tørkede" prøver. IIB Kraft-avstandsprofil med umerket AFM spiss og underlag som i IIA, men nå observert med væske tilstede. IIC: Kraft avstandsprofil for funksjonalisert AFM spiss i kombinasjon med funksjonalisert substrat, observert med væske tilstede. (III) Fordeling av dissosiasjonskrefter (F_{ad} i IIC) ved tre ulike rater for kraftpåvirkning. f^* angir den mest sannsynlige dissosiasjonskraften ved en gitt rate for kraftpåvirkning. (IV) f^* som funksjon av raten for kraftpåvirkning, r_f

De ulike trinnene i prosedyren er også illustrert i Fig. 10. Analysen av fordelingene av f (Fig. 10 III) og f^* (Fig. 10 IV), tar utgangspunkt i at kreftene som holder molekylene sammen er fysikalske, og er karakterisert av at det trengs tilførsel av energi for å komme over aktiveringsbarieren:

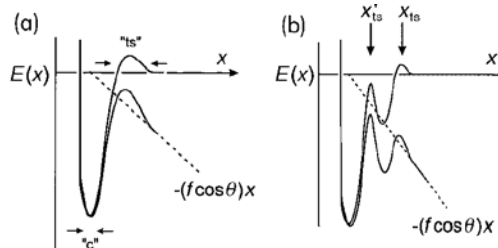


Fig. 11 Skjematisk illustrasjon av energilandskap for dissosiering av et molekyllpar uten (a) og med (b) kraftpåvirkning.

Raten for dissosiering fra den bundne tilstand over transisjonsbarieren ("ts" i Fig. 11) kan beskrives ved dissosiasjonsratekoeffisienten k_{off} :

$$: \quad k_{off} \approx \frac{D}{l_c l_{ts}} \exp \left[-\frac{E_b(F)}{k_B T} \right] \quad (14)$$

hvor E_b er energibarieren, og $D/l_c l_{ts}$ kan betraktes som prøvfrekvens for å komme over barrieren. Parameterne l_c og l_{ts} er to lengdeskalaer som er gitt av detaljer i energilandskapet. En ekstern kraft F fører til at et mekanisk potensial $-F x \cos \theta$ dreier formen på energilandskapet (Fig 11b). Her er x avstand mellom de makromolekylene og θ er vinkel mellom retning til F og dissosiasjonsstien x . Av parameterne i likn. 14 er hovedvirkningen av F knyttet til hvordan aktiveringsbarieren endres:

$$E_b(F) = E_b - F x_\beta \cos \theta = E_b - F < x_{ts} \cos \theta > \quad (15)$$

Dvs., barrieren minker i forhold til den eksterne kraftvirkningen. Den termiske aktivering gir opphav til den karakteristiske skala for kraft ved forholdet mellom termisk energi og lengden x_β . Nå er $k_B T \approx 4.1$ pN nm ved romtemperatur, og ved typiske $x_\beta \approx 0.1 - 1$ nm, er denne målestokken $F_\beta = k_B T / x_\beta$ relativt liten. Ved å anvende disse uttrykkene, finner en:

$$k_{off} \approx \frac{D}{l_c l_{ts}} \exp \left[-\frac{E_b(F)}{k_B T} \right] = \frac{1}{t_D} \exp \left[-\frac{(E_b - F x_\beta \cos \theta)}{k_B T} \right] = \frac{1}{t_D} \exp \left[-\frac{E_b}{k_B T} \right] \exp \left[\frac{F x_\beta \cos \theta}{k_B T} \right] = \frac{1}{t_0} \exp \left[\frac{F}{F_\beta} \right] \quad (16)$$

Dvs., at dissosiasjonraten øker med økende kraft. I eksperimentet observeres dissosiasjonskraft ved dynamisk kraftpåvirkning, og grunnlaget finnes som følger.

Den dynamiske kraftlastraten beregnes fra fra hastighet for z-piezo og fjærkonstanten til AFM-cantilever'en:

$$r_f = kv_t \quad (17)$$

Når kraftvirkningen på grunn av den eksterne kraften blir større en grensen satt av termiske krefter:

$$r_f t > F_\beta = k_B T / x_\beta \quad (18)$$

øker foroverraten raskt, mens tilbakeraten undertrykkes i økende grad. I dette regimet er det derfor tilstrekkelig å betrakte dissosieringen Sansynligheten $S(t)$ for et makromolekylkompleks til å være i den bundne tilstand er da gitt ved $dS(t)/dt \approx -k_{off} S(t)$. Løsningen av denne likningen er:

$$S(t) = \exp \left[- \int_0^t k_{off}(t') dt' \right] \quad (19)$$

Fordi kraften F ved en gitt tid er produktet av tiden og r_f , er sansynlighetstettheten $p(f)$ for dissosiering mellom f og $f+\Delta f$ gitt ved fordelinger i levetider $p(t)$:

$$p(f) = \frac{1}{r_f} k_{off}(f) \exp \left[- \frac{1}{r_f} \int_0^f k_{off}(f') df' \right] \quad (20)$$

Her er $p(t)dt = p(f)df$ benyttet. Denne likningen gir grunnlag for analyse av fordelingene (Fig. 10 III) direkte. Den mest sansynlige dissosiasjonskraften finnes fra $\partial p(f)/\partial f = 0$. Dette gir

$$f^* = F_\beta \ln(r_f / r_f^0) \quad (21)$$

hvor $r_f^0 = F_\beta / t_0$. Dvs., f^* plottet som funksjon av $\ln r_f$ (Fig. 10 IV) gir skaleringen som kan brukes til å bestemme x_β . I eksemplet i Fig. 10 IV er det flere lineære områder i denne grafen, som representerer ulike barrierer.

Andre eksempler inkludere strekking av makromolekyler som inneholder globulære domener. Ved strekking av polymerer uten globulære domener vil typisk være polymeregenskaper modellert ved worm-like kjede som brukes, destabilisering av sekundærstruktur slik som ved DNA, og deformasjon av ringstrukturer slik som i polysakkarider, som er sentrale. Streckning av titin er et velkjent eksempel på strekking av makromolekyler med globulære domener (Fig. 9). Her observeres typisk et sagtannmønster hvor avstanden mellom toppene angir lengden på aminosyresekvensen i et domene, og størrelsen på kraftsprangende er et mål for energien som stabiliserer den ordnede (biologisk funksjonelle) konformasjonen.

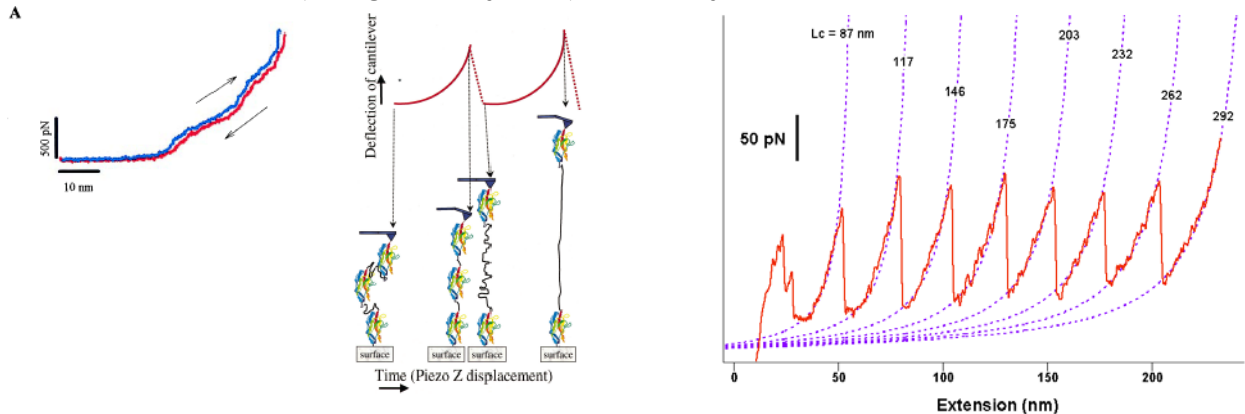


Fig. 12. Kraft - strekkekurver for (a) et polysakkarid som viser deformasjon av sukkerringen og (c) titin som viser utfolding av globulære domener. (b) viser skjematisk hvordan strekking av titin gjennomføres.

OPPGAVE 3.

a)

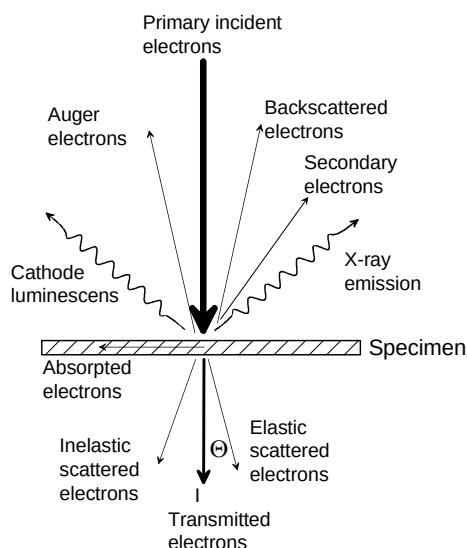


Fig. 13 Illustration of various processes in electron beam – specimen interactions.

Fig. viser ulike type vekselvirkninger (v.v.) mellom elektroner og (biologiske) prøver en kan dra nytte av i elektronmikroskopi. Disse er: (Fig. 13)

De primære v.v. er elastisk elektron spredning, uelastisk elektron spredning, og absorpsjon av elektroner. Absorpsjon av elektroner er det første steget som trengs for en rekke sekundærprosesser som: elektron emisjon, røntgen emisjon, emisjon av lys, elektrostatisk oppladning av prøve, spalting av kovalente bindinger og sublimering av materiale.

Elastisk elektronspredning er karakterisert ved at den totale kinetiske energi E_k (elektron + atom som elektronet kolliderer med) er den samme før og etter støtet. Overføring av kinetisk energi fra elektroner med E_k av den størrelseorden som er brukt i elektronmikroskopene, til atomene i prøven, kan være tilstrekkelig til å dissosiere protoner fra enkelte atom, og også atomer med lavt atomnummer fra en prøve. Dette er en viktig mekanismer for tap av materiale i biologiske prøver.

Ved uelastisk spredning vil ikke all energi bevares som E_k , men vil i tillegg føre til eksitasjon eller de-eksitasjon av systemet.

Ved **transmisjons-, lysfeltmikroskopi** er det de transmitterte elektronene som fanges opp ved billedannelsen, og amplitudekontrast kommer frem ved topografiske variasjoner i hvor tap av elektroner i andre prosesser, elastisk, uelastisk og adsorberte (som første trinn til videre prosesser) elektroner.

Ved **transmisjons-, mørkefeltemikroskopi** er det elektroner som danner en liten vinkel med retningen til de transmitterte elektronene som fanges opp brukes som grunnlag for billedannelsen. Dvs., det er de elastisk og uelastisk spredte elektronene som benyttes.

Ved **scanning elektronmikroskopi** er det enten tilbakespredte eller sekundærelektronene som danner grunnlag for billedannelsen. Intensiteten av disse brukes som grunnlag for å modulere intensiteten på en fluorescerende skjerm på et punkt som samsvarer med instantan posisjon til den fokuserte elektronstrålen.

Ved **scanning-transmisjons elektronmikroskopi** er det transmitterte elektroner som brukes som grunnlag for billedannelsen. I denne type elektronmikroskopi skyldes, som for TEM, kontrasten topografiske variasjoner i alle prosesser som fører reduksjon av intensiteten til de transmitterte elektronene. Til forskjell fra TEM, fokuseres strålen, og all registrert, transmittert intensitet brukes for å representere intensiteten til det aktuelle punkt innfallende stråle belyser på prøven. Ved scanning av elektronstrålen oppnås bildet.

OPPGAVE 4.

Rett svar er angitt i hver av delspørsmålene i det følgende.

- a) Modulasjonskontrast lysmikroskopi realiseres ved å sette inn følgende type optiske element(er) i lysgangen til et lysmikroskop:

1. filterpakke
2. elektronoptisk modulator og "pinnehull" (pinhole)
3. wollaston prizmer og polariserende filter

x **4. aperturblender med rektangulært hull og modulasjonsplate med sektorer som demper lys**

- b) Transferfunksjonen til et optisk mikroskop beskriver:

1. totale lysmengde i bildet i forhold til objektet
2. avbildningssystemets billedannende egenskaper i det reelle rom

x **3. den fouriertransformerte av avbildningssystemets impulsresponsfunksjon**

4. dybdeskarphet ved avbildningen

- c) Kvanteutbytte til en gitt emisjonsprosess stimulert ved absorpsjon av fotoner angir:
1. hvor mange tilnærmet samtidige eksitasjoner som er nødvendig for å få til emisjonen
 - x 2. sansynlighet for at et absorbert foton resulterer i den angitt emisjonsprosessen**
 3. andel av energi til absorberte fotoner som ikke er tapt i vibrasjonsrelaksasjon
 4. sansynlighet for en kaskadereaksjon som spalter molekylet
- d) FRAP er forkortelse som brukes om:
- x 1. Fluorescence recovery after photobleaching**
 2. Fluorescence resonance after phosphorence
 3. Fluorescence rotation after polarization
 4. Fluorescence recovery after polarization
- e) Prinsippet om total indre refleksjon anvendes i lysmikroskopi for å:
1. avgrense retningen til innfallende lys mot et objekt slik at en kan observere etter mørkefeltprinsippet
 - x 2. selektivt stimulere til fluorescens til fluorescerende molekyler som ligger svært nær en grenseflate**
 3. avgrense retningen til lys som har blitt reflektert fra en prøve for dermed oppnå bedre kontrast
 4. samle alt lyset fra lyskilden ved å bruke et hulspeil bak lyskilden for deretter sende det inn i mikroskopet
- f) Polymer "reptation" (åling) observert blant annet ved sekvensiell avbildning av F-aktin in vitro ved hjelp av fluorescensmikroskopi, er karakterisert ved
1. Aktiv transport drevet ved forbruk av ATP som katalyserer en polymerisasjons- depolymerisasjonssyklus i de to endene til enkelt F-aktin
 - x 2. Bevegelse til enkeltfiber av F-aktin begrenset av nærvær av de andre F-aktin fiberne**
 3. Liten bevegelseshastighet langs lengderetningen til det enkelte F-aktin i forhold til på tvers
 4. Økt bevegelsesfrihet til enkeltfiber av F-aktin med økende konsentrasjon av F-aktin.
- g) En dielektrisk kolloidal kule med brytningsindeks mindre enn løsningsmiddel påvirkes av en fokusert laserstråle til å:
1. bli fanget med sentrum av kule i intensitetsmaksimum
 2. bli fokusert sentralt i strålegangen, men ha frihet til å forflytte seg langs stråleaksen til laserlyset
 - x 3. Bli frastøtt av laserstrålen**
 4. Fordamper på grunn av for stor oppvarming
- h) For van der Waals interaksjonen mellom to atomer gjelder:
- 1. tiltrekkende potensial med avstandsavhengig proporsjonalt med $1/r^6$ hvor r er avstand**
 2. kan betraktes til å være sammensatt av to additive bidrag
 3. har en tiltrekkende og frastøtende komponent som gir et total potensial med både ett $1/r^{12}$ og ett $1/r^6$ ledd
 4. gjelder kun for netto ladede atomer hvor utledningen tar utgangspunkt i den elektrostatiske betrakningen.
- i) FIEL er en forkortelse knyttet til:
- x 1. Analysemetode for bestemmelse av relativ elastiske egenskaper til en prøve bestemt ved hjelp av AFM, ved integrasjon av kraft-deformasjonsprofilen til lik deformasjon**
 2. Angivelse av maksimalt dynamisk kraftområde tilgjengelig ved kontrollelektronikk til AFM (Force Implemented to Electronic Limit)
 3. Høyeste kraftpåvirkning fra AFM spiss på prøve innen tilgjengelig vibrasjonsamplitude, Force Induced Excitation Limit
 4. AFM analyse for bestemmelse av relativ ladningstetthet i forhold til topografiske variasjoner av steriske vekselvirkninger.
- j) Busch teoremet beskriver
1. Sammenheng mellom avbøyning av en elektronbane i et magnetfelt i forhold til elektronets hastighet og styrken på magnetfeltet
 - x 2. Sammenheng mellom dreiemoment til et elektron som beveger seg i en bane langs en elektronoptisk akse og magnetisk fluks**

3. Effekt av elektrisk felt på bevegelsen et elektron innen en elektromagnetisk linse
4. Effekt av magnetfeltstyrken i en magnetisk linse for fokallengden til denne.

Oppgitte formler. Definer alle størrelser i de du eventuelt bruker.

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \qquad \nabla \cdot \vec{B} = 0$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \qquad \nabla \cdot \vec{D} = \rho$$

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \exp \left\{ -j(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t) \right\}$$

$$I = \left\langle \vec{E} \times \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \left(\vec{e}_k \times \vec{E} \right) \right\rangle = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\mu}} \langle E^2 \rangle = \varepsilon c \langle E^2 \rangle$$

$$hf \text{ (eV)} = \frac{1240}{\lambda \text{ (nm)}} \qquad p = hv/c = h/\lambda$$

$$c = 1/\sqrt{\varepsilon_0 \varepsilon_r \mu_0} = c_0/\sqrt{\varepsilon_r} \qquad n = c/c_0 = 1/\sqrt{\varepsilon_r}$$

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M} (1 + 2Bc + \dots) \frac{1}{P(\theta)} = \frac{1}{M} (1 + 2Bc) \left(1 + \frac{16\pi^2}{3\lambda^2} \sin^2(\theta/2) R_G^2 \right)$$

$$\Phi(P) = \Phi_0 \frac{1}{r_0} e^{-jkr_0} \iint_{\substack{\text{spherical} \\ \text{surface}}} \frac{1}{r} e^{-jkr} k(\theta) dA$$

$$\Omega = \Omega(x,y) = |\Omega(x,y)| e^{j\varphi(x,y)} \qquad k_R = \frac{1}{\tau_M} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

$$\phi(\vec{r}) \approx C_1 \frac{1}{r} e^{-jkr} \qquad w(z) = w_0 \left(1 + \left(\frac{jz}{\pi w_0^2} \right)^2 \right)^{1/2}$$

$$\phi(P) \propto \Pi \left(\frac{\alpha - \alpha_0}{\lambda}, \frac{\beta - \beta_0}{\lambda} \right) * \Omega \left(\frac{\alpha - \alpha_0}{\lambda}, \frac{\beta - \beta_0}{\lambda} \right)$$

$$g_u(x_2,y_2) = \iint_{-\infty} g_i(x_1,y_1) h(x_2,y_2;x_1,y_1) dx_1 dy_1$$

$$\frac{d\rho}{dt} = -\nabla \cdot \vec{J} = -D\nabla \cdot \left\{ (\vec{F} - \nabla E) \frac{\rho}{k_B T} - \nabla \rho \right\}$$

$$h(x_i,y_i;x_0,y_0) = k\delta(x_i + Mx_0, y_i + My_0)$$

$$H(X,Y) = \begin{cases} \pm j\alpha & \text{at } X^2 + Y^2 = R \\ 1 & \text{elsewhere} \end{cases}$$

$$g(x,y) \cong 1 + j\varphi(x,y)$$

$$I(x_u,y_u) \propto \left| \pm j\alpha + j\varphi(x_u,y_u) \right|^2 \cong \alpha^2 \pm 2\alpha\varphi(x_u,y_u)$$

$$H(X,Y) = \begin{cases} 1 & \text{for } Y > Y_0 \\ \frac{0.85}{Y_0} Y + 0.15 & \text{for } Y \in [-0.16Y_0, Y_0] \\ 0.01 & \text{for } Y \leq -0.16Y_0 \end{cases}$$

$$k_{\text{off}} \approx \frac{D}{l_c l_{\text{ts}}} \exp \left[-\frac{E_b(F)}{k_B T} \right]$$

$$I = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos[2kh(x)\cos\nu + \delta]$$

$$h(x) = h_0 + R - \sqrt{R^2 - x^2} \qquad d = \frac{\lambda_0}{4\pi\sqrt{n_3^2 \sin^2 \theta_3 - n_1^2}}$$

$$l_i \approx l_{ts} / l_{ts}^0 = \sqrt{\kappa_{ts}^0 / \kappa_{ts}}$$

$$w(r)=-u_1u_2\frac{2\cos\theta_1\cos\theta_2-\sin\theta_1\sin\theta_2\cos\phi}{4\pi\epsilon_0r^3}$$

$$\tau_D=l_cl_{ts}\frac{\gamma}{k_bT}$$

$$l_c=\sqrt{2\pi k_BT/\kappa_c}$$

$$e^{-w(r)/kT}=\frac{\int e^{-w(r,\Omega)/kT}d\Omega}{\int d\Omega}=\frac{1}{4\pi}\int e^{-w(r,\Omega)/kT}d\Omega=\left\langle e^{-w(r,\Omega)/kT}\right\rangle$$

$$w(r)=\frac{A}{r^{12}}-\frac{B}{r^6}=4\in\left[(\sigma/r)^{12}-(\sigma/r)^6\right]$$

$$F_{\beta}=k_{\mathrm{B}}T/x_{\beta}$$

$$P=\vec{d}\,\sigma+\varepsilon_0\,\overset{\rightarrow}{\chi}\,E$$

$$K_y=\frac{2\sqrt{2}\;d_{13}L^2}{\pi Dh}$$

$$f_0=\frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{m}}=\frac{1}{4\pi}\frac{t}{l^2}\sqrt{\frac{E}{\rho}}$$

$$E_b(F)=E_b-Fx_{\beta}$$

$$\chi(\omega)=\frac{\omega_0^2/k}{\omega_0^2-\omega^2+j\omega_0\omega/Q}$$

$$r_f = k v_t$$

$$Q=\frac{m\omega_0}{\gamma}=\frac{\sqrt{km}}{\gamma}$$

$$m\frac{d^2z}{dt^2}+\gamma\frac{dz}{dt}+(k-f')z=F_0\sin\omega t$$

$$W(D)=-\frac{2\pi^2C\rho^2}{(n-2)(n-3)}\int\limits_{z=0}^{z=2R}\frac{(2R-z)zdz}{(D+z)^{n-3}}=-\frac{2\pi C\rho(4\pi R^3\rho/3)}{(n-2)(n-3)D^{n-3}}$$

$$F(D)=\frac{4\pi}{\varepsilon \varepsilon_0}R\kappa^{-1}\sigma_R\sigma_S e^{-D\kappa}$$

$$F(D)_{sphere-plane} = 2\pi R W(D)_{plane-plane}$$

$$S(t)=\exp\left[-\int\limits_0^tk_{off}\left(t'\right)dt'\right]$$

$$F_C=\frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu)}\delta^{3/2}=\frac{4\sqrt{R}}{3\pi k_s}\delta^{3/2}$$

$$p(f)=\frac{1}{r_f}k_{off}(F)\exp\left[-\frac{1}{r_f}\int_0^Fk_{off}(F')dF'\right]$$

$$\left[k_{off}\right]_{F=F^*}=r_f\left[\partial\ln k_{off}/\partial f\right]_{F=F^*}$$

$$F^*=F_{\beta}\ln\left(r_f/r_f^0\right)$$

$$I(z)=I(0)e^{-z/d}$$

$$j\hbar\frac{\partial}{\partial t}\Psi(\vec{q},t)=H(\vec{p}_{op},\vec{q}_{op},t)\Psi(\vec{q},t)$$

$$\lambda=\frac{h}{\sqrt{2m_e}}\frac{1}{\sqrt{E_k}}=\frac{1.2\,nm}{\sqrt{E_k/eV}}$$

$$\Delta E=\frac{2m_e}{M_A}\left(2+\frac{E_k}{m_e c^2}\right)E_k\sin^2(\theta/2)$$

$$\frac{\partial^2r}{\partial z^2}+\frac{\partial V(0,z)/\partial z}{2V(0,z)}\frac{\partial r}{\partial z}+\frac{\partial^2V(0,z)/\partial z^2}{4V(0,z)}r-\frac{qB_z^2(0.z)}{8mV(0,z)}r=0$$

$$\frac{1}{f_2}=-\frac{q}{8mV(0,z)}\int\limits_{z_1}^{z_2}B_z^2(0,z)dz$$