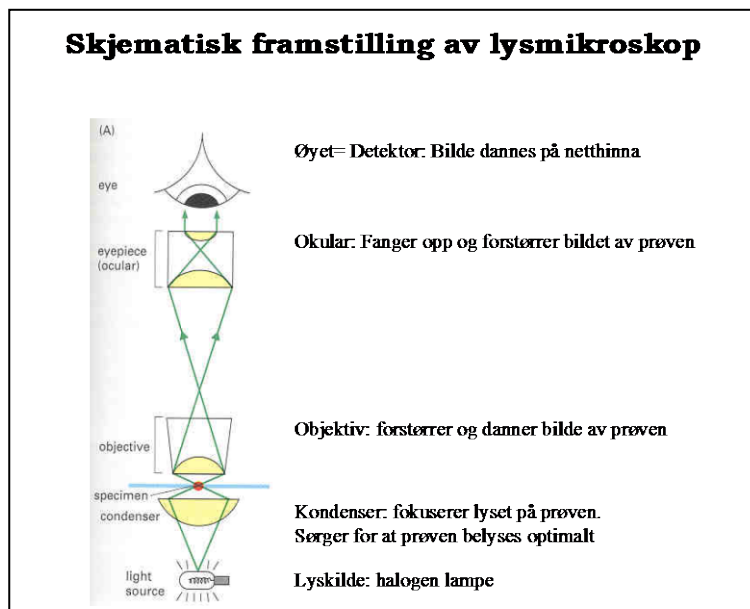


FORSLAG TIL BESVARELSE I EKSAMEN I EMNE TFY4265 BIOFYSISKE MIKROTEKNIKKER 14 desember 2005

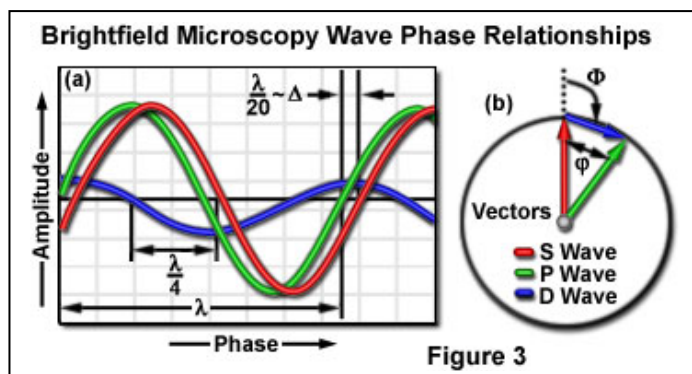
Oppgave 1. Sammenlikn lysmikroskopi, fasekontrast og differentiell interferens kontrast



Fasekontrast mikroskop utnytter at fasen i den elektromagnetiske bølgen endres når lyset går gjennom prøver. På grunn av forskjellig optisk veilengde vil lysbølgen faseforskyves.

Forskjellen i optisk veilengde er: $\Delta\delta = (n_2 - n_1)d$

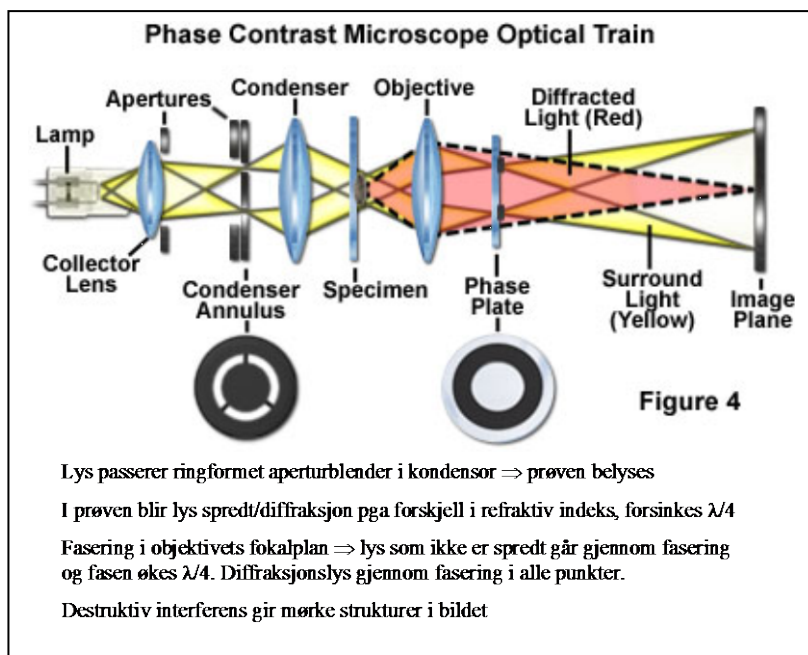
der n er refraktiv indeks og d er tykkelse av prøven. Da bare en liten del av lyset (få fotoner) utsettes for diffraksjon er amplituden på den diffrakte bølgen liten og den er faseforskjøvet ca $\pi/2$ eller $\lambda/4$ sammenliknet med lyset som går rett gjennom prøven. Figuren under viser amplitude og fasediagram for diffrakt lys, gjennomgående lys og den resulterende bølgen.



Øyet vil ikke kunne observere en endring i faseforskjell. Denne forskjellen må derfor omgjøres til en endring i intensitet eller amplitude for den elektromagnetiske bølgen.

En ønsker derfor 1) separere ikke-spredt og spredt lys og 2) faseforskyve lyset ytterligere $\lambda/4$ som tilsvarer $\pi/2$. Dersom den totale faseforskyvningen er $\lambda/2$ oppnås konstruktiv interferens (positiv faseforskyvning), mens ved total faseforskyvning $\lambda/2 - \lambda/2 = 0$ oppnås destruktiv interferens (negativ faseforskyvning).

Dette oppnås ved å sette inn en ringformet blender i kondensoren og en faseplate i objektivets bakre fokalplan. Se figur under.

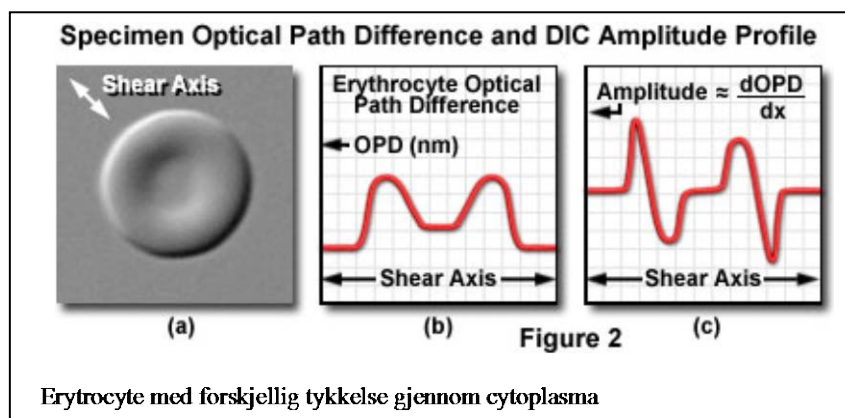


Konstruktiv/destruktiv interferens oppnås ved å sette inn i lysgangen i mikroskopet:

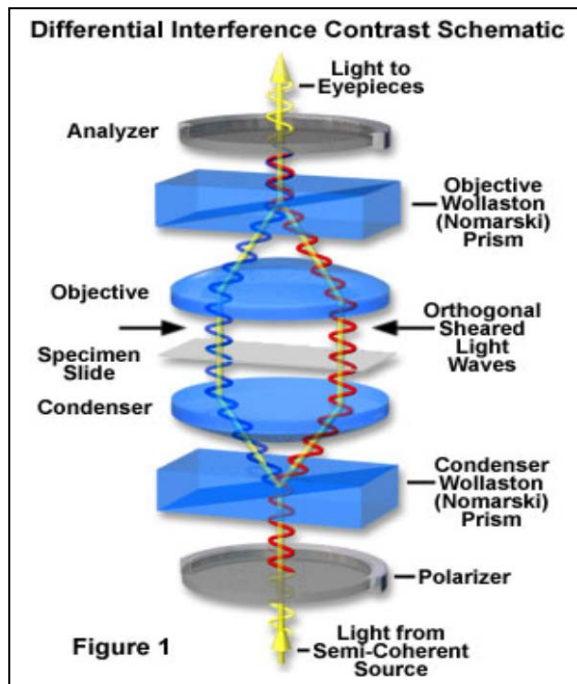
- 1) Ringformet aperturblander i kondensoren (fremre fokalplan).
- 2) Fasering i objektivets bakre fokalplan.

Lys som ikke er spredt/diffrakt gjennom prøven avbildes som en ring, idet dette lyset går gjennom en transparent ring i kondensoren. Diffrakt lys når bakre fokalplan i alle punkter avhengig av forskjell i tilbaketilt optisk veilengde. Faseringen endrer fasen av det ikke-spredte lyset $\lambda/4$. Enten adderes $\lambda/4$ slik at konstruktiv interferens oppnås eller så subtraheres $\lambda/4$ slik at destruktiv interferens oppstår.

Differentiell interferens kontrast mikroskopi utnytter lokale gradienter i den optiske veilengden.

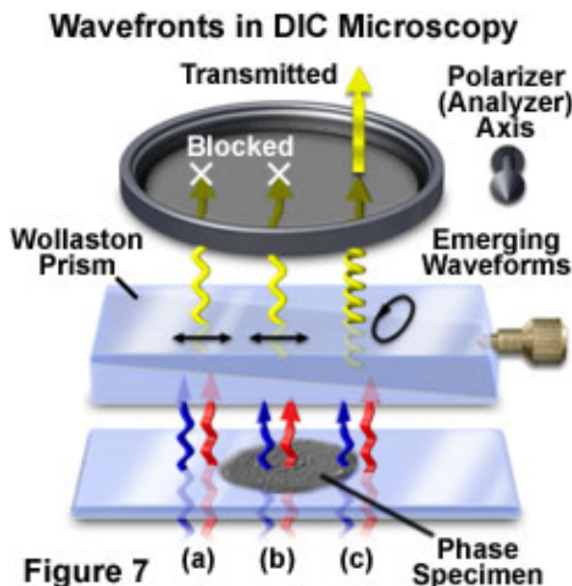


Dette oppnås ved at innfallende lysstråle separeres i to lysstråler med en avstand som tilsvarer mikroskopets oppløsning (ca 200 nm). Dersom de to lysstrålene treffer vev med forskjellig refraktiv indeks n eller tykkelse d oppstår en optisk veilengde forskjell som gir en amplitude forskjell som øyet kan observere.



I et DIC mikroskop må derfor følgende komponenter settes inn i lysgangen:

- 1) Lineær polarisator som plan polariserer lyset i øst-vest retning vinkelrett på lysets bevegelsesretning
- 2) Wollaston prisme som separerer polarisert lys i to stråler. Disse har den elektriske feltvektoren E vinkelrett på hverandre slik at ikke kan interferere med hverandre.
- 3) Kondensor der de to stålene blir parallelle.
- 4) I prøven vil lyset i de to stålene bli diffrakt avhengig av optiske veilengde
- 5) Objektiv fokuserer lyset på 2. Wollaston prisme
- 6) 2. Wollaston prisme kombinerer de to lysstrålene. Prismet er plassert i objektivets bakre fokalplan
- 7) Analysator er en lineær polarisator



I Wollaston prisme i objektivets bakre fokalplan rekombineres lysstrålene/bølgefronten:

- Lys med uendret optisk veilengde blir lineær polarisert når de kombineres
- Lys med forskjellig optisk veilengde blir elliptisk polarisert når de kombineres

I analysator:

- Lineær polarisert lys ut av prisme treffer polarisert lys vinkelrett på og blokkeres
- Elliptisk polarisert lys passerer analysator og interferens dannes

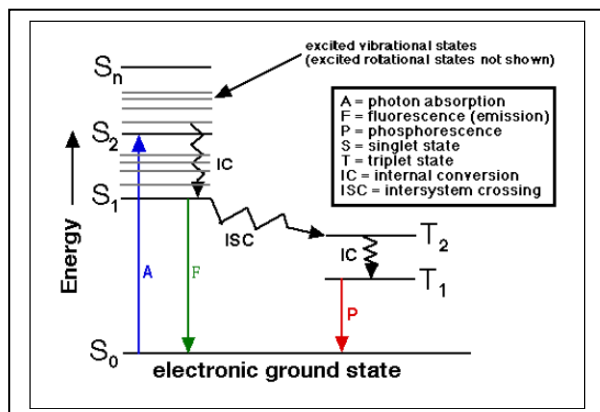
Oppgave 2 Vekselvirkning mellom lys og vev

a) Jablonski diagrammet angir to eksiterte tilstander:

1. *Elektronisk eksitasjon*: Elektroner eksiteres til vakant orbital angitt som singlett: $S_1, S_2 \dots S_n$.

Nødvendig energi: $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$

2. *Vibrasjonseksitasjon*: Finnes i to former strekk og rotasjonsvibrasjon. Oppstår pga binding mellom atomer. Angitt som energinivåer ved hver Singlett S_n og Triplett T_n (I tillegg finnes Rotasjonseksitasjon som oppstår pga rotasjon omkring en symmetriakse, med energi mindre enn vibrasjonsenergi. Dette er ikke angitt i diagrammet)



Elektroner kan deeksiteres via strålingsløse prosesser der lys ikke sendes ut: Internal conversion (IC) og Intersystem crossing (ISC), eller ved utsendelse av lys: fluorescens og fosforescens.

Internal conversion er en tillatt deeksitasjon dvs skjer mellom to eksiterte tilstander med samme spin kvantetall. Elektroner deeksiterer fra eksitert singlett tilstand til en lavere singlett tilstand eller fra en eksitert triplett tilstand til en lavere triplett tilstand.

Intersystem crossing er en ikke tillatt deeksitasjon, dvs skjer mellom to tilstander med forskjellig spin kvantetall. Elektroner deeksiterer fra eksitert singlett tilstand S_1 til triplett tilstand T_1 eller fra T_1 til S_0 . Forbudt elektronisk deeksitasjon kan skje pga spin-bane kopling.

Fluorescens: Foton sendes ut fra laveste eksiterte tilstand S_1 til grunntilstand S_0 . Dette skjer mellom to singletter med samme spin kvantetall og er en tillatt deeksitasjon.

Fosforescens: Foton sendes ut fra laveste eksiterte triplett tilstand T_1 til grunntilstand S_0 . Dette skjer mellom to tilstander med forskjellig spin kvantetall og er en ikke tillatt deeksitasjon.

I tillegg vil deeksitasjon skje ved at vibrasjonsenergien omformes til varme.

b) Ulike former for lysspredning:

To hovedformer for lysspredning: elastisk der energien bevares (inngående og utsendte foton samme energi) og uelastisk der energien ikke bevares (inngående og utsendte foton forskjellig energi).

Elastisk lysspredning kan inndeles i:

Rayleigh spredning: Genereres av partikler med en størrelse mindre enn lysets bølgelengde. Avhenger av bølgelengde som λ^{-4} , slik at lavere λ spres mest. (Som en konsekvens av dette til mer langbølget lys kunne penetrere lengre inn i vevet). Avhenger av forskjellen i refraktiv

indeks mellom strukturen som sprer lyset og omkringliggende medium. Skjer både i foroverretning og ved tilbakespredning.

Mie spredning: Genereres av partikler med en størrelse sammenliknbar som med lysets bølgelengde. Avhenger av bølgelengde som λ^{-x} , der $0,4 < x < 0,5$. Skjer primært i foroverretning.

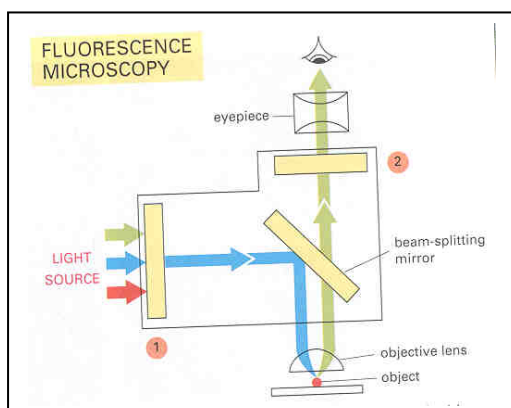
Uleasteisk lysspredning kan deles inn i

Raman spredning: innsendt foton med energi $\Delta E_1 = h\nu_1$ spres og foton med energi $\Delta E_2 = h\nu_2$ sendes ut. Dersom energiforskjellen $\Delta E_1 - \Delta E_2$ er positiv vil den avsettes i et molekyl og eksitere dette til en vibrasjonsenergitilstand. Dette utnyttes i Raman spektroskopi for å bestemme energiforskjellen og dermed gi informasjon om vibrasjonsbånd mellom atomer. Energiforskjellen kan være negativ, kalt anti-Stokes Raman spredning.

Brillouin spredning: opptrer ved sjokkbølger der energiforskjellen genererer akustiske fotoner med ultralyd frekvenser.

Oppgave3. Fluorescens baserte oppgaver

a) Filterkubus ved epi-fluorescensmikroskopi:



For å avbilde fluorescein benyttes som eksitasjonsfilter (1) et båndpassfilter BP 460-490 nm. Dette skal sørge for at lys med riktig bølgelengde eksiterer fargestoffet. For å separere eksitasjonslys og emisjonslys benyttes et dikromatisk filter (beam splitting mirror) med bølgelengde ca 510 nm. Dette sørger for at bare den mer langbølgete fluorescensen kan passere. Som emisjonsfilter (2) benyttes BP 520-550. Dette sørger for at kun fluorescenslys når detektor (øyet).

b) Fordeler med multifoton mikroskopi sammenliknet med konfokal laser scanning mikroskopi:

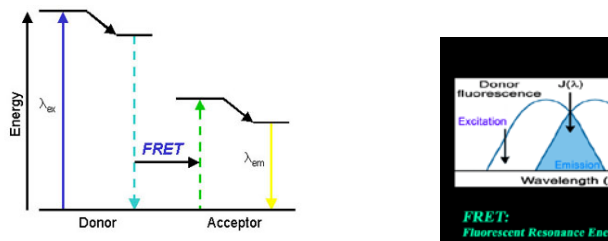
- Bleking reduseres. Bare bleking i fokalplanet
- Penetrasjon gjennom vev øker.

Ingen absorpsjon utenfor fokalplanet. Mer langbølget lys

- Fotoskade på celler induisert av UV lys unngås
- Mer effektiv deteksjon mulig. Bruk av direkte detektorer

c) Fluorescens resonans energi overføring: Energi overføres fra et eksitert donor molekyl til et akseptor molekyl som dermed eksiteres og sender ut fluorescens. Ingen fluorescens sendes ut fra donor molekyl

FRET, Fluorescence Resonance Energy Transfer prinsipp



To krav:

- Emisjonsspekter for donor må overlappe eksitasjonsspekter
- Donor og akseptor må være $< 100 \text{ \AA}$ fra hverandre

Sannsynligheten for resonansoverføring (hastighetskonstant)

$$k(r) = \frac{1}{\tau} \left(\frac{R_0}{r_{ad}} \right)^6$$

T =levetiden for eksitert tilstand for donor
 R_0 =kritisk radius, karakteristisk for overføring
 r_{ad} =avstand donor-akseptor

Typiske anvendelser:

- studere vekselvirkninger mellom proteiner. Pga kravet om nærhet mellom de to molekylene kan en studere hvilke proteiner som er nær nok til å vekselvirke
- Calcium-metabolisme/ Ca^{2+} som intracellulær budbærer. Bindingen av Ca^{2+} til calmodulin eller andre Ca-bindende proteiner kan være nødvendig for igangsetting av intracellulær signaloverføring.
- protease aktivitet

Oppgave 4 Atomærkraft mikroskopi

a) De tre leddene i likningen for van der Waals krefter representerer:

I rekkefølge som angitt i oppgaveteksten:

- Induserte dipol (α) vekselvirkninger med permanente dipoler (u)/ induksjonskraft (Debye krefter). Lys polariserer atomer og dipoler induseres.
- Permanente dipoler (u_1, u_2) vekselvirkninger / orienteringskraft (Keesom krefter)

Roterende dipoler midlet over alle romvinkler

- Midlertidige dipol vekselvirkninger / dispersjonskraft (London krefter)

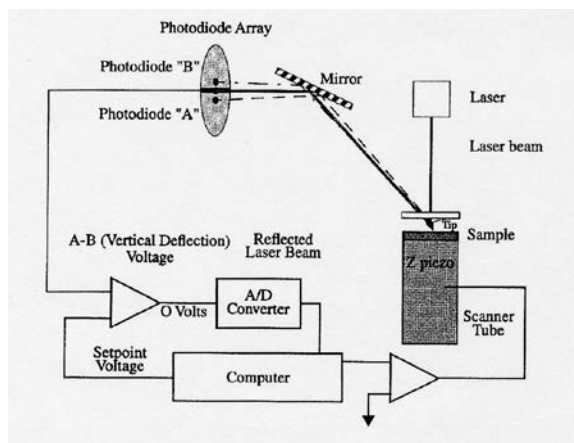
Oppstår fordi elektroner i bane rundt kjernen forflyttes midlertidig slik at atomene danner midlertidige dipoler

Prinsipp:

Tip er i direkte kontakt med prøveoverflate (innen $\text{\AA}$).

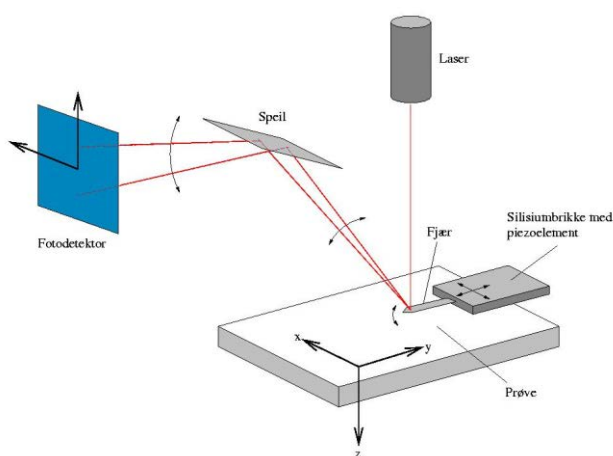
- Prøve scannes under tip
- Vertikal avbøying av tip-arm pga frastøtingskrefter mellom elektronskyene i prøve og tip. Når tiparm presser tip mot prøven vil van der Waals kreftene bøye tiparmen for å unngå at atomer i prøve og tip skal komme for nær hverandre

b) Oppbyggingen av AFM i kontakt mode:



Tip: Kvaliteten på tipen er avgjørende for oppløsningen av bildet. Tipen sitter vanligvis på en V-formet arm. Dimensjonene (lengde, bredde, høyde) og Youngs modulus for materialet til armen bestemmer "fjærkonstanten" til armen. Dimensjonen for tipen er typisk lengde 100-500 nm og diameter 20-50.

Deteksjon av avbøyingen av tip-armen:



Deteksjonen basert på optisk vektstang prinsipp. Avbøying av tiparm registreres ved at laser belyser tipholder og det reflekterte lyset treffer fotodiode. Fotodioden er delt i 4 områder slik at romlige forskjeller registreres. Et speil kan settes inn i den reflekterte strålegangen for å forlenge avstanden til fotodioden slik at små utslag på tiparm kan registreres. Fordel med dette prinsippet er at små avbøyninger gir store utslag på fotodioden.

Tilbakekopling: Registreringen på fotodioden tilbakekoples til piezoelektrisk element slik at posisjonen til dette nullstilles.

Pizeoelektrisk krystall: elektrisk spenning gir en endring i utsreknimngen av krystallen. Funksjon posisjonerer krystallen relativt til tip.

Oppløsning for AFM bestemt av:

Vertikaloppløsning: Høyde/Kraft-forskjell bestemt av:

- Termisk støy pga vibrasjon i tip-arm, bestemt av fjærkonstant

Lateral oppløsning, separasjon av nærliggende strukturer avhengig av:

- Radius av tip. Diameter < struktur avbildet
- Elastiske egenskaper til prøven
- Høydeforskjeller

Typisk verdi 10-20 Å med beste tip ca 50Å

Oppgave 5: Elektronmikroskopi

a) Oppløsning

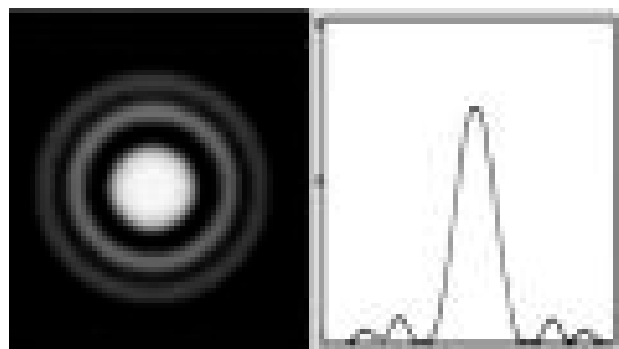
Oppløsningen (d) til et lysmikroskopi er bestemt av lysets diffraksjon og gitt ved Rayleigh kriteriet:

Airy-disk beskriver diffraksjonsmønsteret for en sirkulær åpning. Radian er gitt ved

$$r_{\text{airy}} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}$$

der λ = bølgelengden

$NA = n \sin \theta$ = numerisk apertur der n er refraktiv indeks og θ maksimum vinkel lysetstråler treffer objektivet under.



Typisk verdi for de beste objektiv med $NA=1,6$ og bølgelengde 500 nm er 200nm

Oppløsningen til et elektronmikroskop er bestemt av elektronets diffraksjon og gitt ved samme likning som over men med en bølgelengde for elektroner som i følge de Broglie er:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m \cdot v} = \frac{h}{\sqrt{2meV}} = \frac{1,23nm\sqrt{volt}}{V}$$

$$d = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA} = \frac{0,75nm\sqrt{volt}}{V}$$

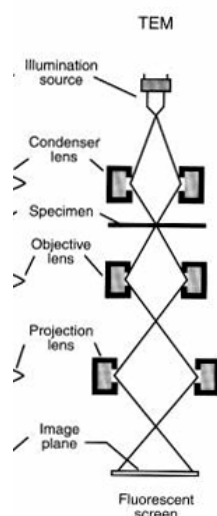
Typisk teoretisk verdi er 0,025Å dersom $NA=1$ og $V=60kV$

I praksis er d 1-2 Å ca 1000x bedre enn for lysmikroskopi

Forskjell teoretisk-praktisk oppløsning skyldes:

1. Elektromagnetiske linsene har ekstremt liten romvinkel slik at NA liten. Nødvendig for å redusere sfæriske aberrasjoner
2. Linsefeil som kromatisk aberrasjon og astigmatisme
3. Diffraksjon

b) Oppbyggingen av et transmisjon elektronmikroskop



Belysningskilde – elektronkanon

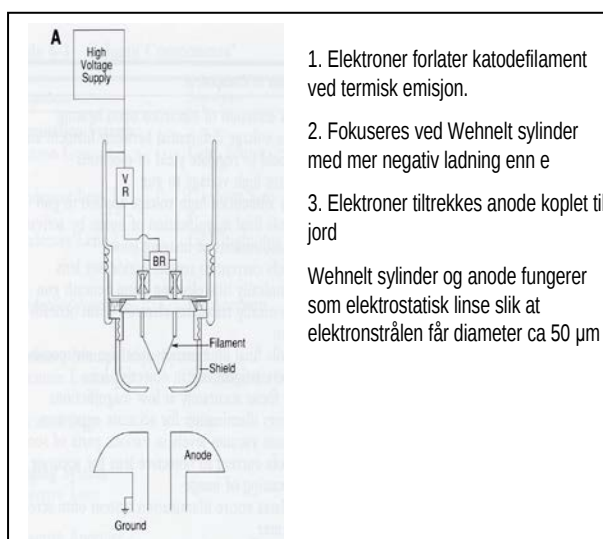
Kondensorlinse: fokuserer e på prøven. Består av to linser. Linse1 forminsker, linse2 forstørrer. Til sammen kontrollerer mengde e som treffer prøven og størrelse på spot.

Objektivlinse: Danner bildet som siden forstørres. Store krav til kvalitet, minimalt med aberrasjoner

Intermediærlinse forstørrer bildet. Forstørrelse reguleres av strøm gjennom spole

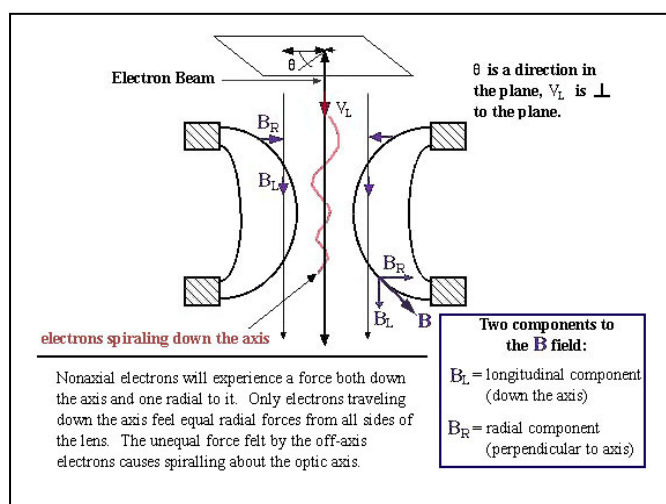
Prosjektørlinse. Vanligvis 2 linser som forstørrer bildet. Har stor dybdefokus.

Totalt 4 linser på avbildningssiden av preparatet. Vanligvis benyttes bare 3. Ved svært store forstørrelse benyttes alle 4.



Belysningskilde – elektronkanon:

Katode som emitterer e som akselereres til anode



Elektromagnetiske linser:

Linsene er elektromagnetiske linser bestående av en spole som danner et magnetisk felt. Elektroner kommer inn i feltet og går i en helix-bane og fokuseres

Avbildningssystem under mikroskopering = fosforescerende skjerm
Bildet avbildes også på fotografisk film eller på CCD kamera.

Vakuumsystem: Hele elektronmikroskopet, fra elektronkanon til avbilding er i vakuum.
Formålet med vakuum er at e ikke skal kollidere med gassmolekyler