

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

**BOKMÅL**

**EKSAMEN I KURS TFY4265  
BIOFYSISKE MIKROMETODER**

19. Desember 2009

Tid: 0900 – 1300

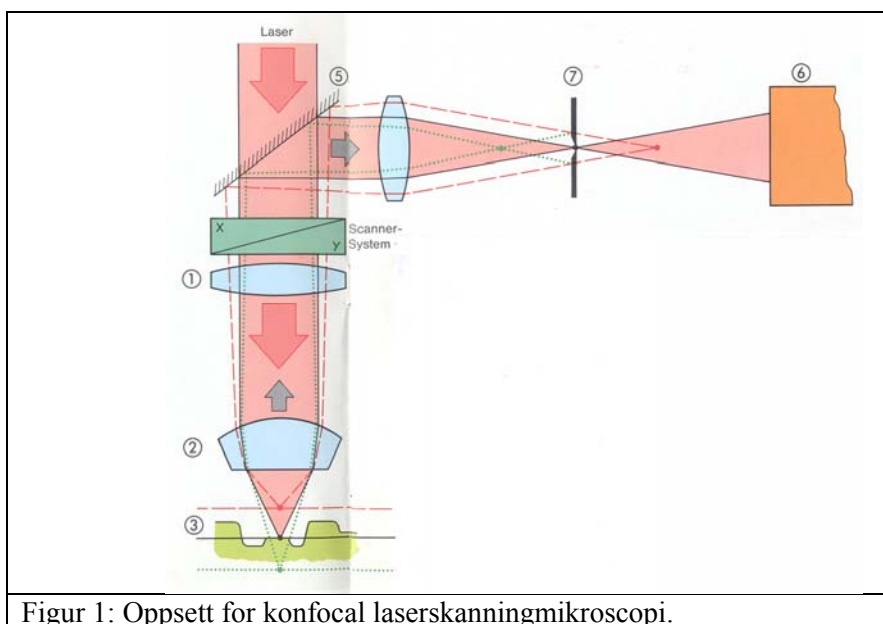
Tillatte hjelpemidler: Enkel kalkulator HP30S  
Ingen bøker eller papirer

Oppgave 1 – 4 vil hver telle 25 % av den totale poengsummen på eksamen.

**Oppgave 1: Lysmikroskopi**

a) Fluoresens vil si utsending av synlig lys fra et materiale som har absorbert lys med en annen bølgelengde enn det utsendte lyset

- 1- Beskriv hva som menes med Stokes shift og nevne hvilke prosesser som gir opphav til denne effekten.
- 2- Beskriv prinsippet for FRET og nevne noen krav som bør være oppfylt for at denne teknikken skal kunne benyttes.
- 3- Nevne tre fordeler ved kvanteprikker (Quantum dots , Q-dots) sammenlignet med organiske fluoroforer ved avbildning av biologiske prøver.

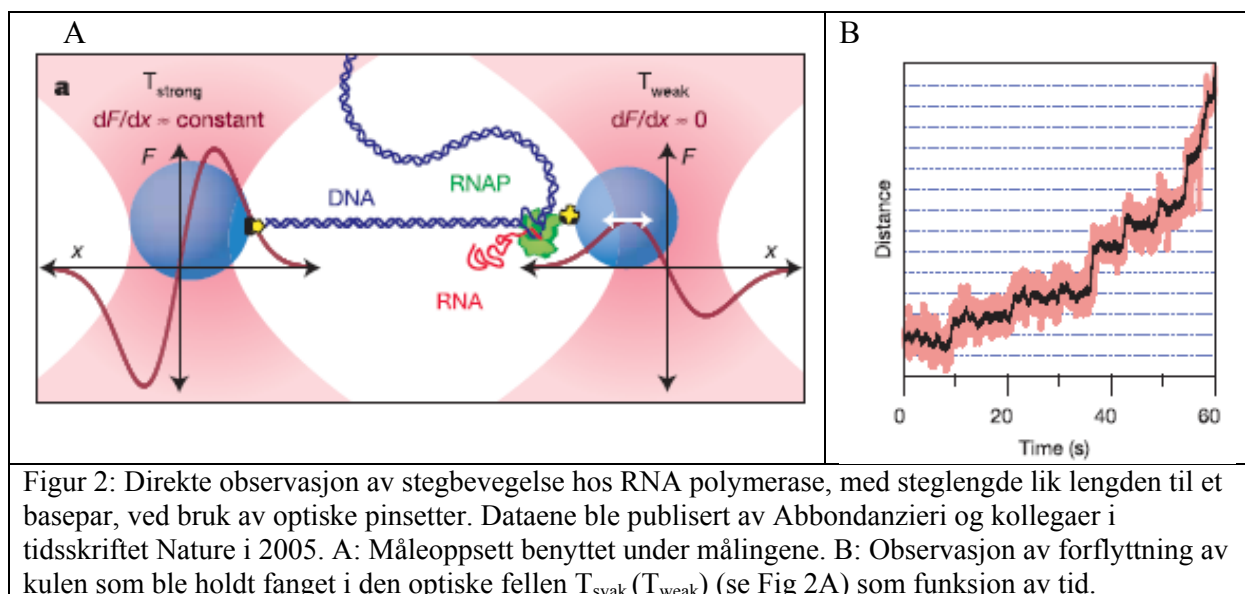


- b) Figur 1 viser et oppsett for konfokal laserskanningmikroskopi.  
 1- Navngi komponentene i posisjon 2, 3, 5, 6, 7.  
 2- Forklar funksjonen til komponenten i posisjon 7 i figur 1

c) PMT benyttes både i væskestrømscytometri (flowcytometri) og i skanning lysmikroskop. Hva er PMT en forkortelse for og hvordan fungerer et PMT?

d) Navngi de optiske komponentene som er innsatt i lysveien i et differensiell interferens kontrast (DIC) mikroskop.  
 Beskriv kort funksjonen til hver av komponentene (1-3 setninger per komponent er tilstrekkelig)

## Oppgave 2: Optiske pinsetter



Oppsettet vist i figur 2A ble benyttet i et studium hvor DNAmolekyler ble immobilisert til overflaten av en kule som så ble fanget i en optisk felle. Overflaten av en annen kule ble funksjonalisert med RNA polymerasemolekyler og holdt i en annen optiske felle plassert i nærheten av den første. De to kulene ble så brakt sammen slik at den immobiliserte RNA-polymerasen kunne binde seg til det immobiliserte DNAet og transkribere dette.

- a) Forklar hvorfor partikler fanges i fokuspunktet av en laser.
- b) Forklar metoden som benyttes for å følge lateral (off-axis) forflytning av kulen fanget i den optiske fellen.
- c) I figur 2A kalles den ene fellen  $T_{sterk}$  ( $T_{strong}$ ) og den andre fellen  $T_{svak}$  ( $T_{weak}$ ). Hva er forskjellen mellom en sterk og en svak felle og hva ville du gjøre for å regulere styrken til en optisk felle?

I dette studiet var målet å bestemme steglengden til RNA-polymerasen idet den transkriberte (leste) DNA. RNAP er festet til kulen som holdes i fellen  $T_{svak}$  ( $T_{weak}$ ) og festet via DNA til kulen som holdes i fellen  $T_{sterk}$  ( $T_{strong}$ ). Under eksperimentet holdes høyre kule i en posisjon nær maksimum i kraft-ekstensjonskurven (force-extension curve) til  $T_{weak}$  (hvit pil). Som følge av RNA transkripsjon blir DNA fragmentet som holdes mellom de to kulene lengre og kulene beveges dermed fra hverandre. Figure 2B viser data om posisjon til kulene over tid oppnådd for kulen som er holdt fanget i  $T_{svak}$ .

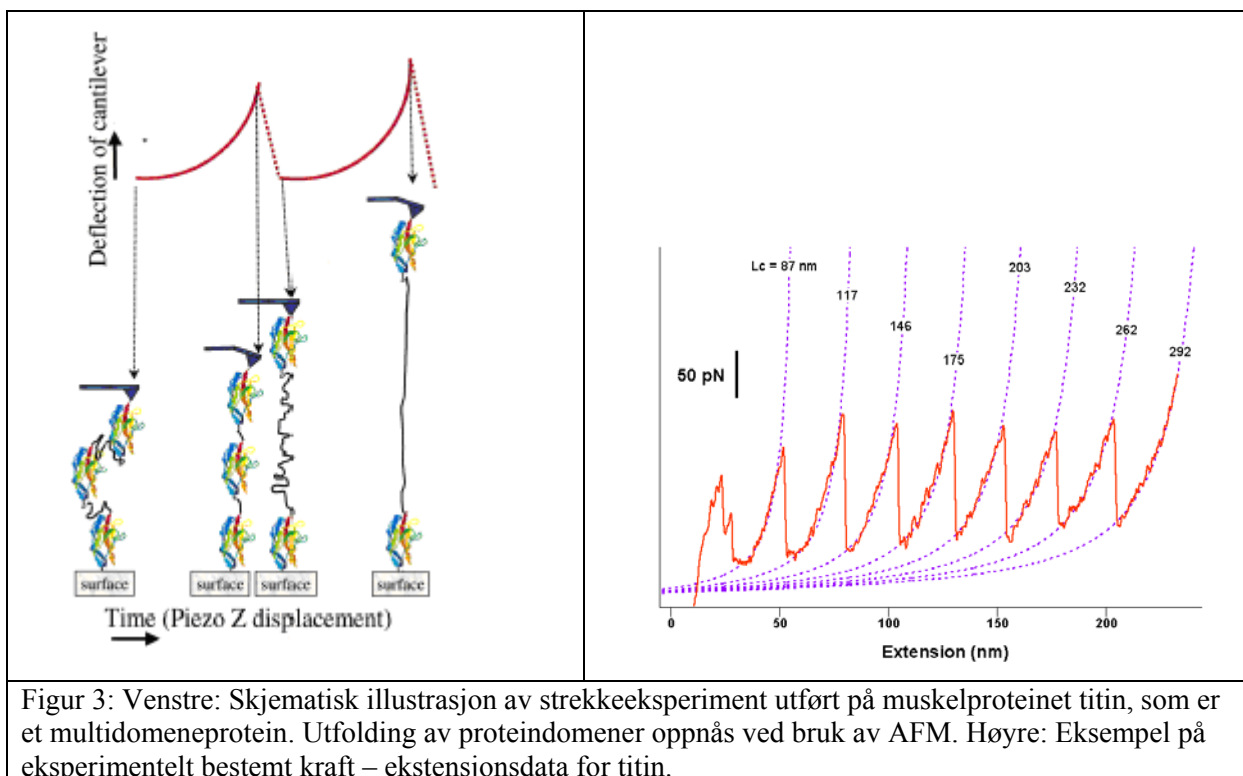
d) Ser du for eksperimentet beskrevet i figure 2 noen fordeler ved å velge et dobbeltfelle (dual beam) oppsett med ulik styrke på de to fellene sammenlignet med et dobbeltfelleoppsett med lik styrke på begge feller?

e) Forklar hvordan krefter måles ved bruk av optiske pinsetter og sammenlign kraftområdet som kan bestemmes ved bruk av optiske pinsetter med kraftområdet som er tilgjengelig ved bruk av atomær kraftmikroskopi.

### Oppgave 3: AFM

a) Forklar hvordan et tappingmode AFM bilde oppnås og nevnt en eller flere faktorer som begrenser den laterale oppløsningen i AFM.

b) Forklar effekten av å påføre en ekstern kraft på to molekyler som er bundet sammen via en ikke kovalent binding og lag en skjematisk tegning av et dynamisk kraftspektrum som reflekterer eksistensen av to separate energibarrierer i energilandskapet til en intermolekylær kraftvekselvirkning.



Figur 3: Venstre: Skjematisk illustrasjon av strekkeeksperiment utført på muskelprotein titin, som er et multidomeneprotein. Utfolding av proteindomener oppnås ved bruk av AFM. Høyre: Eksempel på eksperimentelt bestemt kraft – ekstensjonsdata for titin.

c) Figur 3 viser en illustrasjon av et kraft-strekkeeksperiment utført på titin. Beskriv hva slags informasjon man kan oppnå ved å utføre utfoldingsmålinger (kraftindusert denaturering) på enslige proteiner.

d) Beskriv den vanligste metoden for kalibrering av fjæren benyttet i AFM.

e) Forklar hva som menes med aktiv Q-kontroll i AFM.

#### Oppgave 4

Flervalgsoppgave:

For hver av oppgavene A- H finner du 3-4 setninger hvorav noen inneholder korrekt informasjon, andre ikke. Sett et kryss ved alle linjene som gir korrekt informasjon og lever inn dette arket sammen med eksamensbesvarelsen.

NB!: For hver oppgave kan mer enn en av setningene være korrekt. Dersom dette er tilfelle: sett mer enn ett kryss.

##### A Stivheten til en optisk felle

- er uavhengig av størrelsen til kulen som fanges, men avhenger dens materialeegenskaper (i.e. brytningsindeks).
- avhenger av størrelsen på kulen som fanges, dens form, samt styrken på laserstrålen.
- avhenger kun av styrken på laserstrålen.

##### B Faktoren som omsetter detektorsignal $Q$ til fysisk forflytning $x$ kalles

- detektorens sensitivitet
- detektorens omdanningsfaktor
- $\beta$

##### C I væskestrømscytometri oppnås hydrodynamisk sentrering av partiklene i eksitasjonslyset / fokusplanet til objektivlinsen ved bruk av:

- en støttevæske
- en optisk linse med høy NA
- et elektrostatiske felt

##### D Interlacing:

- Interlacing er en teknikk som benyttes for utlesing av signal i interline transfer CCD
- Målsettingen med interlacing er å gi et bilde som mennesker oppfatter som mer stabilt.
- Interlacing forekommer alltid i en viss grad under bildedannelse i en CCD brikke.

##### E Kvanteeffektivitet (Quantum efficiency, QE) er for et CCD kamera:

- definert som andel av fotonene som danner fotoelektroner.
- uavhengig av bølglengden til lyset.
- størst i UV området.

##### F Kraftlastrate (loading rate) benyttet innen dynamisk kraftspektroskopi er lik:

- Kraft / tid
- Kraft x hastighet
- Fjærkonstant x hastighet

##### G Total indre refleksjon av lys benyttes innen lysmikroskopi til å:

- kontrollere retningen på det innkommende lyset mot et objekt slik at man etterpå kan observere det ved bruk av mørkefeltemikroskopi.

- selektivt eksitere og dermed gi opphav til fluoresens fra fluoreserende molekyler lokalisert nær en grenseflate.
- kontrollere retningen på lys som er blitt reflektert fra en prøve slik at forbedret kontrast kan oppnåes.

**H** FRAP er en forkortelse benyttet for:

- Fluorescence recovery after photobleaching
- Fluorescence resonance after phosphorescence
- Fluorescence rotation after polarization
- Fluorescence recovery after phosphorescence

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

**EXAM IN COURSE TFY4265  
BIOPHYSICAL MICROMETHODS**

19. December 2009

Hours: 0900 – 1300

Permitted aids: Simple calculator HP30S  
No written books or papers

Exercices 1 – 4 will each count for 25 % of the total score on the exam.

**Exercise 1: Light microscopy**

a) Fluorescence is the emission of visible light by a substance that has absorbed light of a different wavelength.

- 1- Describe what is meant by Stokes shift and mention the processes giving rise to this effect.
- 2- Describe the principle for FRET and mention some requirements for the successful use of this technique.
- 3- Mention three advantages of Quantumdots (Q-dots) over organic fluorophores for bioimaging.

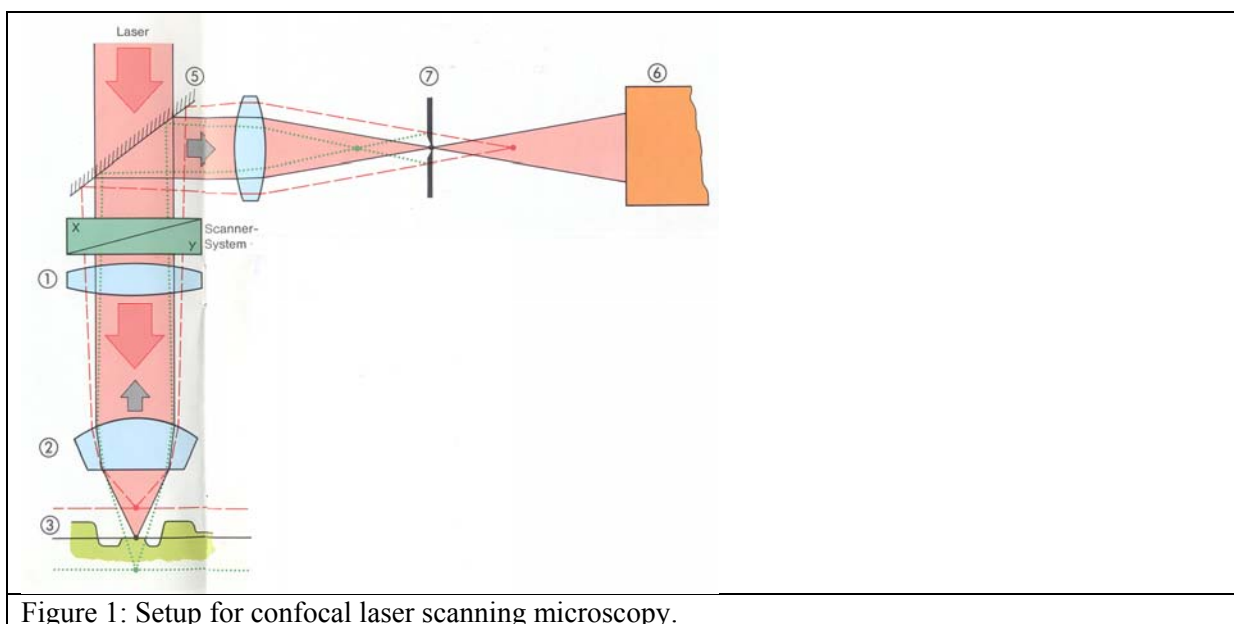


Figure 1: Setup for confocal laser scanning microscopy.

b) Figure 1 depicts a setup for confocal laser scanning microscopy.

1- Name the components found at position 2, 3, 5, 6, 7.

2- What is the function of the component found at position 7 in figure 1?

c) PMT is used both in flow cytometers and scanning light microscopes. What does PMT stand for and how does it work?

d) Name the optical components that are inserted in the light path in a differential interference contrast (DIC) microscope.

Describe briefly the function of the components (1-3 sentences per component is enough)

## Exercise 2: Optical tweezers

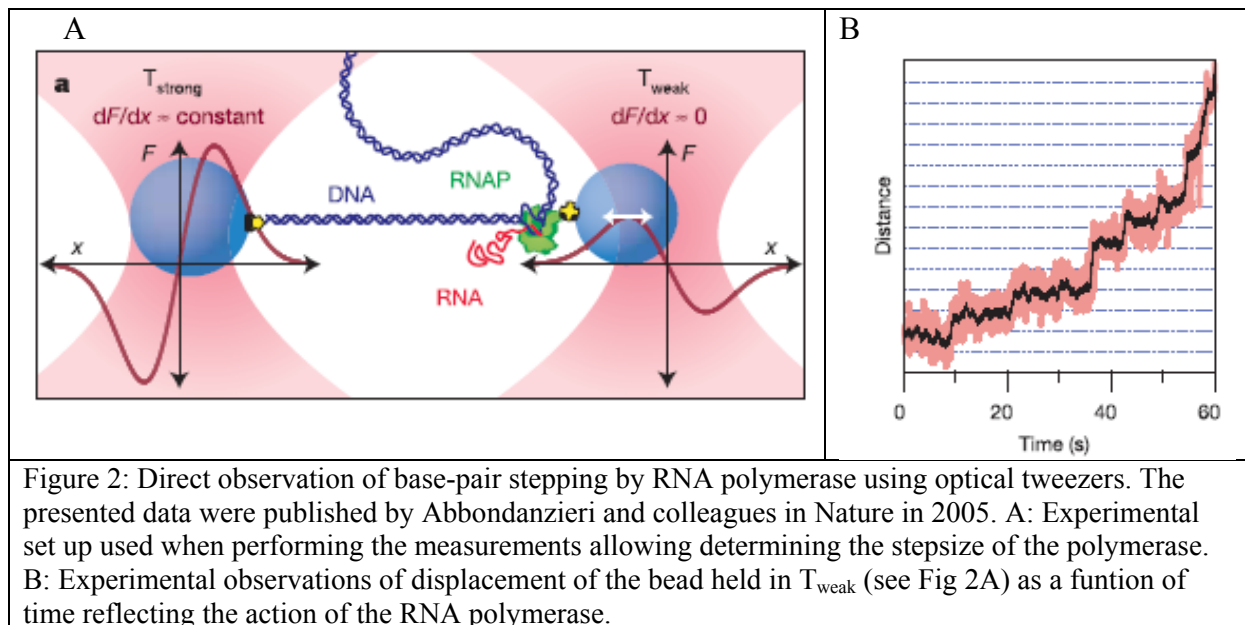


Figure 2: Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase using optical tweezers. The presented data were published by Abbondanzieri and colleagues in Nature in 2005. A: Experimental set up used when performing the measurements allowing determining the stepsize of the polymerase. B: Experimental observations of displacement of the bead held in  $T_{\text{weak}}$  (see Fig 2A) as a function of time reflecting the action of the RNA polymerase.

The set-up presented in figure 2A is from a published study where a DNA molecule was immobilised to the surface of a bead held in an optical trap. The surface of another bead was functionalised by RNA polymerases and held in a trap nearby. The two beads were then brought together so that the immobilised RNA polymerase could attach to the DNA and start to transcribe the DNA.

a) Explain why particles are trapped in the focal point of a laser.

b) Explain the method used for detecting the lateral (off-axis) displacement of the bead held in an optical trap.

c) In this study one trap was named  $T_{\text{strong}}$  and the other trap  $T_{\text{weak}}$ . What is the difference between a strong and a weak trap and what would you do in order to regulate the stiffness of an optical trap?



In this study the aim was to determine the step size of the RNA polymerase as it transcribes DNA. RNAP is attached to the bead in trap  $T_{\text{weak}}$  and tethered via DNA to the bead in trap  $T_{\text{strong}}$ . During the experiment the right bead is maintained at a position near the peak of the force-extension curve of  $T_{\text{weak}}$  (white arrow). During elongation (RNA transcription), the DNA tether stretched between the two beads lengthens and the beads move apart. Figure 2B displays the position versus time data obtained for the bead held in  $T_{\text{weak}}$ .

d) Do you for the experiment described in figure 2 see any advantages of choosing a dual beam set-up with different strength of the two traps (as described in figure 3A), compared to a dual trap set-up with equal strength of both traps?

e) Explain how forces are measured using optical tweezers and compare the force range that can be determined using optical tweezers with the force range accessible with the atomic force microscope.

### Exercise 3: AFM

a) Explain how a tapping mode AFM image is obtained and mention the factor / factors limiting the lateral resolution in AFM.

b) Explain the effect of applying an external force onto two molecules that are interacting through a non-covalent interaction and make a schematic drawing of a dynamic force spectrum reflecting the existence of two separate energy barriers in the energy landscape of the intermolecular interaction investigated.

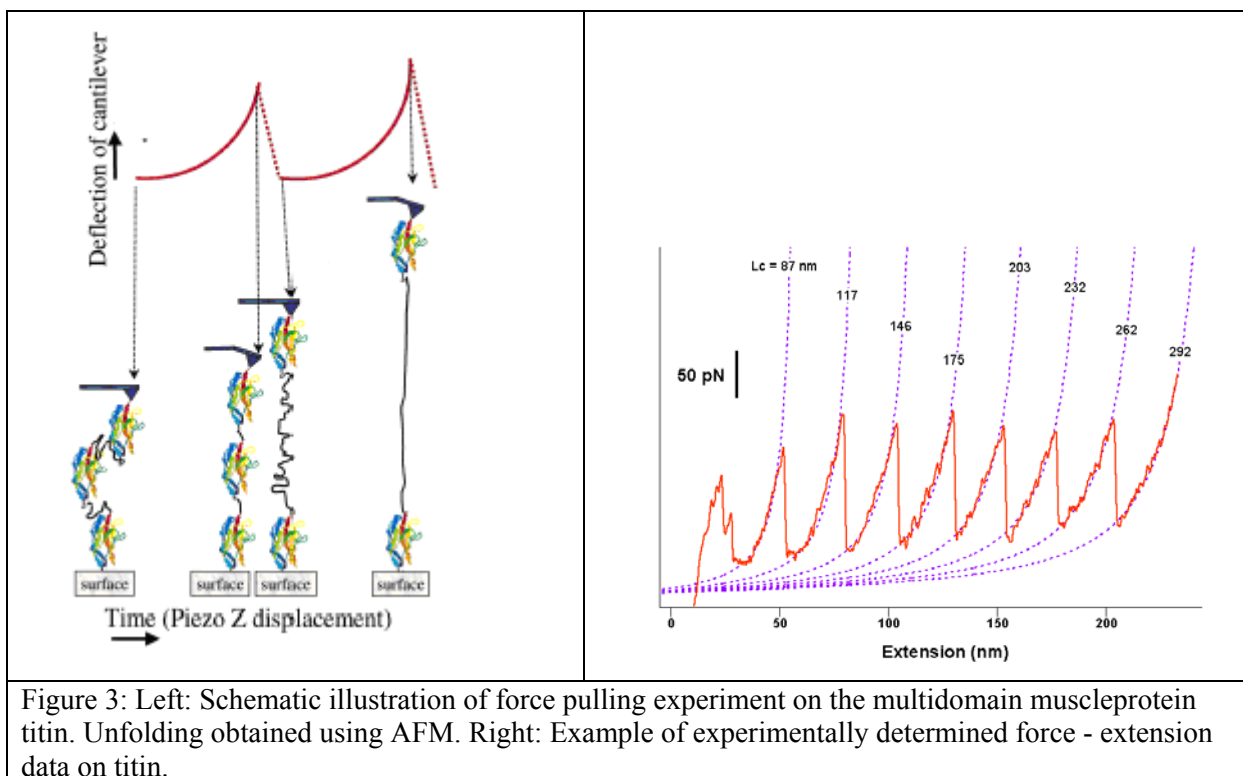


Figure 3: Left: Schematic illustration of force pulling experiment on the multidomain muscleprotein titin. Unfolding obtained using AFM. Right: Example of experimentally determined force - extension data on titin.

- c) Figure 3 shows a schematic illustration of force pulling experiment on titin. Explain the types of information that can be obtained when performing unfolding (force induced denaturation) experiments on proteins.
- d) Explain the most common method used for calibration of the cantilever used in AFM.
- e) Explain what is meant by Q-control in AFM.

#### Exercise 4

Multiple choice:

In each exercise A- H below you find 3-4 phrases, of which some are correct and some are wrong. Cross out all the lines giving correct information and hand in this page together with the rest of your exam.

NB!: More than one of the alternatives may be correct. If that is the case: make more than one cross:

**A** The stiffness of an optical trap

- is independent of the size of the bead size but is dependent on its material properties (i.e. refractive index).
- depends on the bead size and shape and the laser power.
- only depends on the laser power.

**B** The factor that translates detector signal  $Q$  into physical displacement  $x$  is called

- detector sensitivity.
- detector conversion factor.
- $\beta$ .

**C** In flowcytometry, the hydrodynamic centering of the particles in the excitation light / focus plane of the objective lens is obtained using:

- a support fluid
- an optical lens with high NA
- an electrostatic field

**D** Interlacing:

- Interlacing is a technique used for signal readout in interline transfer CCD
- The aim of interlacing is to provide a picture that humans observe as more stable.
- Interlacing always occurs to a certain extent during image formation in CCD chips.

**E** Quantum efficiency (QE) of a CCD camera:

- Is defined as the % of the photons that form photoelectrons.
- Is independent of the wavelength of the light.
- Is maximum in the UV range.

**F** Loading rate used in dynamic force spectroscopy equals:

- Force / time
- Force x speed
- Spring constant x speed

**G** The principle of total internal reflection is used in light microscopy to:

- control the direction of the incoming light towards an object so that one can observe using the dark field principle.

- selectively excite and thus induce fluorescence from fluorescent molecules localised close to an interface.
- control the direction of the light that has been reflected off a sample in order to achieve improved contrast.

**H** FRAP is an abbreviation used for:

- Fluorescence recovery after photobleaching
- Fluorescence resonance after phosphorescence
- Fluorescence rotation after polarization
- Fluorescence recovery after phosphorescence