

Løsningsforslag, Eksamen i emne TFY4265 Biofysiske mikroteknikker
Fredag 5. desember 2003 Tid: kl. 0900 – 1400.

OPPGAVE 1.

a)

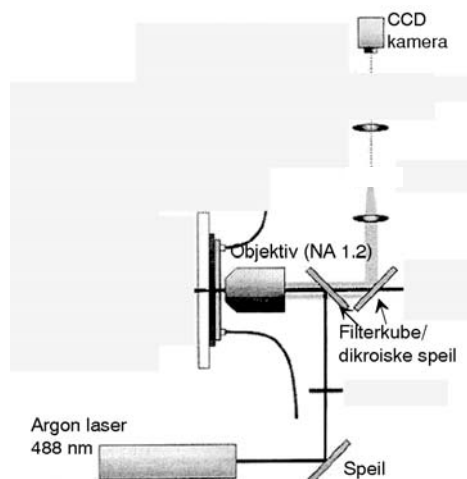


Fig 1a. Skjematisk skisse av optisk oppsett for epi-illuminerings fluorescens mikroskopi

Figur 1a viser hoveddelene fra fig. 1 i oppgavesettet som trengs for et oppsett for epi-illuminerings fluorescens mikroskopi.

Disse er:

- lyskilde: laser med bølglengde nær absorpsjonsmaksimum i eksitasjonsspekteret ved 470 nm, dvs. argon laser
- (speil: avhengig av optisk arrangement)
- Filterkube med filter som angitt i fig. 1b (beskrives under).
- Objektiv
- Prøvebord (på samme plass som flow-celle). Alle komponenter bør orienteres slik av prøvebordet blir horisontalt.
- Deteksjonssystem, her valg som ett av CCD kameraene. Bildeforsterk i kombinasjon med det andre CCD kameraet fra Fig. 1 i oppgaveteksten er også OK. Når det anvendes en laser som lyskilde som ikke fokuseres og sveipes over prøven, som i laserskanning konfokal, vil det også være behov for linser for justering av belsningsarealet.

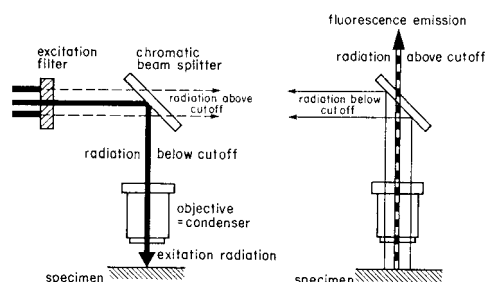


Fig 1b. Illustrasjon av funksjon til komponenter i filterkuben

Egenskaper til komponentene i filterkuben:

- Eksitasjonsfilter og dikroisk speil fører til at lys av ønsket bølglengde dirigeres ned på prøven. Her innebærer det at cut-off bølglengde for eksitasjonsfilteret må være mindre enn 488 nm; at lys med $\lambda=488$ nm reflekteres ned på prøven, (lengre bølglengder, størrelsesorden 500 nm, slipper i gjennom.) På den måten er det kun lys som er emitert ved fluorescensprosessen som kommer fram til detektoren og bidrar til bildedannelsen.

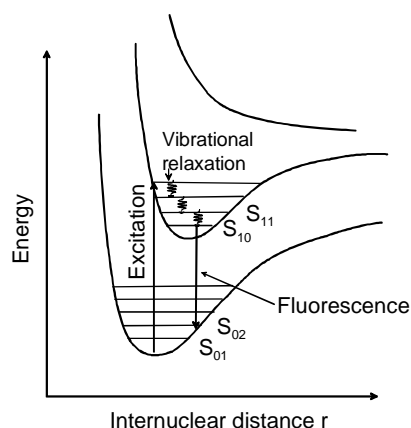


Fig. 1c. Effekt av vibrasjonsrelaksasjon på fluorescens prosessen

Fluorescens er utsendelse av lys knyttet til relaksasjon av elektronisk eksiterte molekyler med energi som tilsvarer en del av det elektromagnetiske spektrum hvor synlig lys og tilgrensende bølglengder befinner seg.

Emitert lys er rød-skiftet i forhold til eksitasjonslyset i fluorescensprosessen fordi det eksitasjon skjer mellom tilstander som oppfyller utvalgsreglene for elektronisk eksiterte tilstander, og med størst sansynlighet 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, se fig. 1c. Dette fører til rødskift (lengre bølglengde) av emitert lys i forhold til eksitasjonslys.

b)

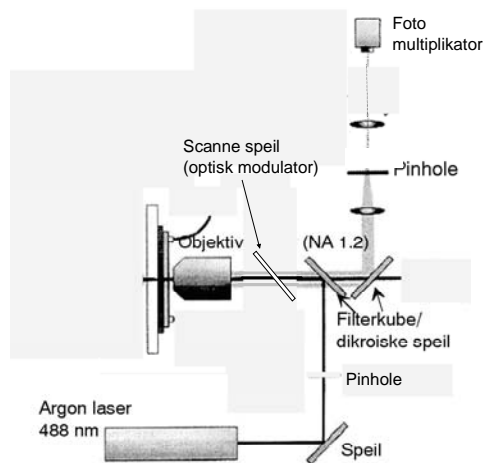


Fig 2a. Skjematisk skisse av optisk oppsett for epi-illuminerings fluor. mikroskopi

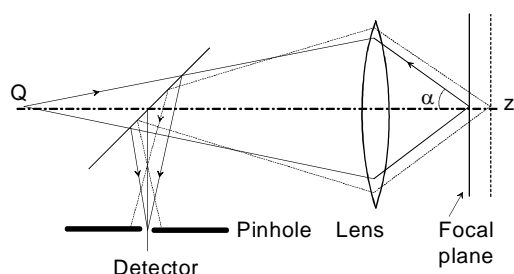


Fig. 2b Skjematisk skisse av prinsipp for konfokal mikroskopi

Underliggende prinsipper for konfokal mikroskopi er skissert i Fig. 2b. I laserscannings konfokal mikroskopet blir eksitasjonslyset fokusert ned på prøven og scannet i et veldefinert rastermønster. Emitert lys fra deler av prøven som ligger i fokalplanet avbildes ved hjelp av objektivlinse og gir et bilde av emitert lys i fokalplanet som et fokusert punkt der hvor pinhole er plassert. Lys emitert fra et annet plan enn fokalplanet av prøven vil ikke avbildes som et punkt i planet hvor pinhole er plassert, men utenfor dette. Som en følge av dette vil bare en fraksjon av dette lyset passer pinhole, noe som gjør at emitert lys fra deler av prøven utenfor fokalplanet dempes. På en slik måte oppnås "optisk snitting" av prøven, dvs., selektiv deteksjon av signal fra fokalplanet. Fokalplanet kan videre lokaliseres til ulike deler av prøven. Ved to- eller multifoton mikroskopi deles den totale energien som trengs for eksitasjon (for eksempel S_0 til S_1 overgang) mellom ett eller flere fotoner. Intensiteten må være stor for å unngå at systemet relaxerer etter at det er brakt "halvveis" mellom grunntilstand og eksitert tilstand. Dette oppnås ved pulset laser. På grunn av kravet om høy intensitet vil konfokal prinsippet være en implisitt del av belysningsoptikken, noe som gjør at pinhole ikke trengs for demping ev. emitert lys fra plan utenfor fokalplanet. Energien til hvert enkelt foton er dermed også lavere enn ved enkelt-foton eksitasjon. Bølgelengden er typisk i infrarød området, og lengre enn emisjonsbølgelengden for fluorescensen. Endringen av elementene i oppsettet: Laser må endre bølgelengde, pinhole trengs ikke, og egenskapene til filterne i filterpakken må endres.

c)

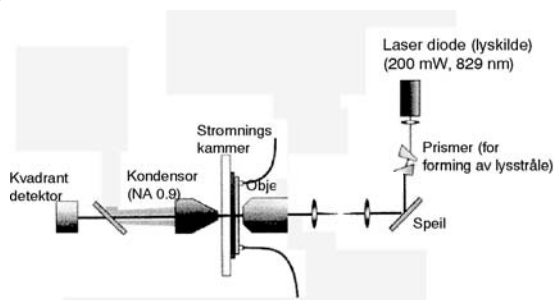


Fig 3a. Skjematisk skisse av optisk oppsett for epi-illuminerings fluorescens mikroskopi

Alternativt kan det også brukes CCD kamera, men dette vil kreve mer prosessering av data for bestemmelse av posisjon til prøve (kolloidal kule) fanget ved hjelp av den optiske pinsetten. Funksjonen til objektivet vil være å gi

Figur 2a viser oppsettet med hoveddelene fra fig. 1 i oppgavesettet slik det var satt opp for epi-illuminerings fluorescens mikroskopi, men som nå er endret for å laser-skanning konfokal mikroskopi.

Følgende deler er de samme som i Oppgave 1a) og har samme funksjon: laser som lyskilde; Filterkube; Objektiv; og Prøvebord

Følgende nye deler er satt inn:

- skanne-speil for x-y (lateral) sveiping av fokusert laser stråle over prøven for eksitasjon og tilsvarende (synkront) på emisjonssiden. Dersom det kun brukes ett sett, må disse plasseres mellom filterkube og objektiv (som angitt). Alternativt kan det brukes to sett som settes opp til å skanne synkront. Pinhole for emisjonslyset, foran detektor og i et plan som er konjugert til det plan en ønsker bilde fra. (fokusert laserstråle på prøven er fokusert her). Se videre forklaring under.
- deteksjonssystem er endret fra CCD kamera til fotomultiplikatorrør.

Pinhole på eksitasjonssiden trengs vanligvis ikke når en bruker laser som lyskilde.

en fokusert lysstråle med tilstrekkelig strålingstrykk til å fange en probe (kolloidal kule). Her er intensiteten fokusert både lateralt og langs den optiske akse. Funksjonen til strømningskammeret er å kunne påtrykke en kontrollerbar kraft på den kolloidale kule. Dette gjøres ved å bruke en laminær væskestrøm, og regne om til kraft ut fra Stokes lov. Ulike kraftpåvirkninger fra den hydrodynamiske metoden fører til forskyvning av den kolloidale partikkelen. Ny likevekt innstilles ved en posisjon hvor kraftvirkning påført av væsken er i balanse med den fra de optiske pinsettene. Ved beregning av hydrodynamisk kraft, og bruke observert forskyvning, finnes fjærkonstanten til den optiske pinsetten.

De grunnleggende prinsippene for optisk pinsetter er som følger. Brytning av lys i en grenseflate analysert ut fra bevaring av moment gir at objektet som bryter lyset må påføre en kraft/ moment på fotonet. Optiske pinsetter kan anvendes for fanging av kolloidale (små, typisk i området 1-10 micro meter) som har en høyere brytningsindeks n_p enn løsningsmiddelet.

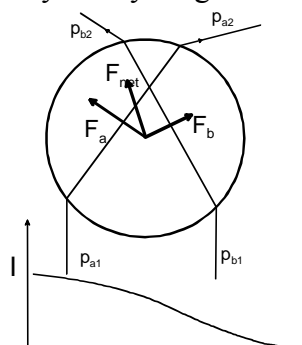


Fig. 4a. Nettokraft på kolloidal partikkel som følge av brytning av lys.

Partikler med $n_p < n_{\text{løsningsmiddel}}$ vil skyves bort fra senter av en laserstråle, og vil ikke presenteres her. Fig. 4a. illustrerer skjematiske retningen på nettokraften fra fotonene på partikkelen i en situasjon hvor strålene i posisjon a (gir p_{a1}) er mer intens enn i posisjon b. Brytningsvinkelen i grenseflaten kan regnes ut fra Snells lov, og momentoverføringen til partikkelen kan regnes ut fra total momentbevarelse:

$$\vec{p}_a = \vec{p}_{a1} - \vec{p}_{a2} \quad \text{og} \quad \vec{p}_b = \vec{p}_{b1} - \vec{p}_{b2} \quad (1)$$

Dette er kun to punkter i en kontinuerlig intensitetsfordeling, men illustrerer nettoeffekten: Partikkelen blir påført en nettokraft som drar den mot intensitetsmaksimum i strålen. Tilsvarende vil gjelde på langs optisk akse i en situasjon hvor objektivet brukes for å fokusere laserstråle (nettokraft mot intensitetsmaks som følge av forskyvning langs optisk akse) (Fig. 4b& c):

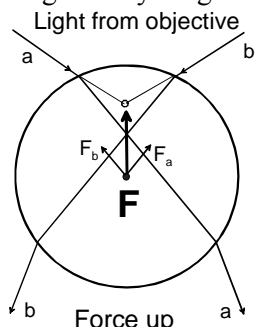


Fig. 4b & c: Skjematiske illustrasjoner av nettokraft på kolloidal partikkel utenfor fokalplanet, lokalisert i objektivet til oppsettet for optiske pinsetter

Tilsvarende vil gjelde for forskyvning lateralt. I tillegg til strålingstrykket satt opp på grunn av brytning, vil også kunne være bidrag fra refleksjon (spredning).

OPPGAVE 2.

a) Hoveddelene til et AFM er: i) scanner; ii) spiss og spissholder; iii) deteksjonssystem og iv) tilbakekopling/reguleringssystem. Dette er skjematiske illustrert i Fig. 5.

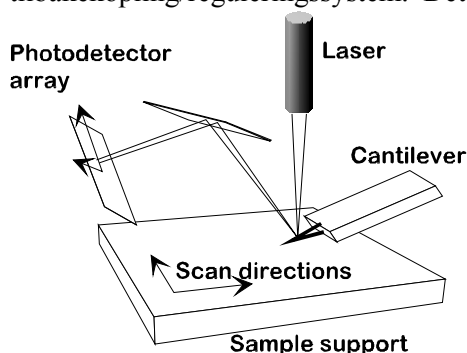


Fig. 5 Skjematiske illustrasjoner av sentrale deler av AFM. Prøvebordet befinner seg på den piezoelektriske scanneren

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 materialeegenskapene 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. 6). Det er alltid en viss avbøyning av fjæren (Fig. 6a) som representerer den kraft en gjennomfører målingen med. Ved scanning, vil en støte på ulike objekter, f.eks. illustrert som kulen vist på Fig.6.

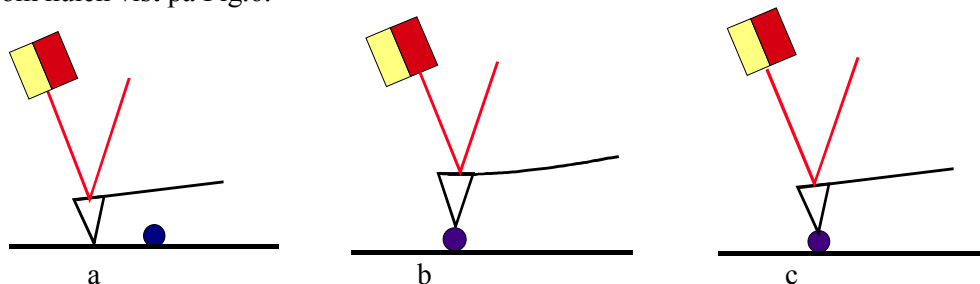


Fig. 6. Skjematiske illustrasjoner av refleksjon av laserlys mot splittet fotodiode, ved bruk av AFM i kontaktmode

Straks før tilbakekoplingsystemet får virke (Fig. 6b), 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. 6c). 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.

Likningen:

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

beskriver bevegelsen til fjærarmen ved bruk i tapping eller oscillerende mode. m er effektiv masse, γ er demping, k er fjærkonstant, F_0 er amplitude til påtrykt signal, F_{int} beskriver vekselvirkningen mellom prøve og spiss. Resonansfrekvens og kvalitetsfaktor, Q er gitt ved:

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

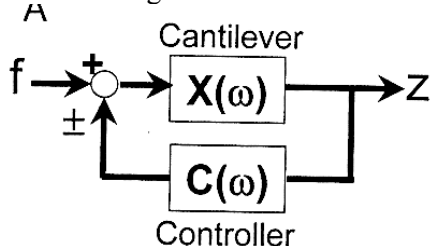
Frekvensresponsen til amplituden kan også beskrives ved:

$$z(\omega) = \chi(\omega) F(\omega) \tag{4}$$

hvor $\chi(\omega)$ er transfer funksjonen til vektarmen (cantilever). Denne kan er gitt ved uttrykket for en dempet harmonisk oscillator:

$$\chi(\omega) = \frac{\omega_0^2 / k}{\omega_0^2 - \omega^2 + j \omega \omega_0 / Q} \tag{5}$$

Ved måling i væske vil den effektive masse øke betydelig (fordi væske beveges med fjæren), dempingen øker (fordi cantileveren beveges i væske i forhold til luft). Dette fører til at resonansfrekvensen reduseres 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 bevegelsehastigheten til fjæring (Fig. 7). Denne tilbakekoplingen er satt opp på denne måten for å redusere den effektive dempingen. Dette oppnås ved å bruke et variabelt tilbakekoplingsignal (reguleres med verdien på C) som er proporsjonalt med hastigheten til cantilever, og som fører til at transferfunksjonen endres til:

$$\chi'(\omega) = \frac{\chi(\omega)}{1 \pm C\chi(\omega)} \tag{6}$$

Fig. 7. Tilbakekopling anvendt ved tapping mode i væske
Her er:

$$C = C(\omega) = j \frac{\omega}{\omega_0} k \left(\frac{1}{Q} - \frac{1}{Q_{eff}} \right) \cong j k \left(\frac{1}{Q} - \frac{1}{Q_{eff}} \right) = G e^{j\pi/2} \quad (7)$$

hvor en i tilnærmelsen har antatt en frekvensuavhengig tilbakekoplingskonstant innenfor det området som anvendes. Effekten av tilbakekoplingen kan ses direkte ut fra bevegelseslikningen, som nå har fått et tilleggsledd pga tilbakekoplingen:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} + G e^{j\pi/2} A_1 e^{j(\omega t - \varphi)} + F_{int}(z) \quad (8)$$

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:

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \left(\gamma - \frac{G}{\omega} \right) \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} \quad (9)$$

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

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} + \gamma_{eff} \frac{dz}{dt} + kz = F_0 e^{j\omega t} \quad (10)$$

Dvs., samme form som uten tilbakekopling (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) Mekaniske egenskaper kan bestemmes ved hjelp av AFM ved to ulike metoder. Den første baserer seg på å presse spissen inn i materialet (kompresjon), og å analysere avbøyning av cantilever i følge en teori som beskriver den type materiale som studeres. Her brukes spisser som ikke er behandlet ved f.eks. påkopling av biologiske makromolekyler. I prinsippet kan enkelt makromolekyl også komprimeres, men dette er pr. dato ikke en mye brukt metode. Den andre metoden baserer seg på strekking av biologisk makromolekyler som er spent opp mellom cantilever og et underlag. Beslektet med dette er også måling av vekselvirkning mellom par av molekyler, ved å funksjonalisere AFM spissen og underlaget med ulike molekyler.

Kompresjon. Fig. 8 viser skjematisk et resultat. Den observerte avbøyningen kan brukes som grunnlag for bestemmelse av elastiske egenskaper i følge f.eks. Hertz model for kompresjon med en sfærisk spiss med radius R inn i plant elastisk kontinuum:

$$F_C = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \delta^{3/2} \quad (11)$$

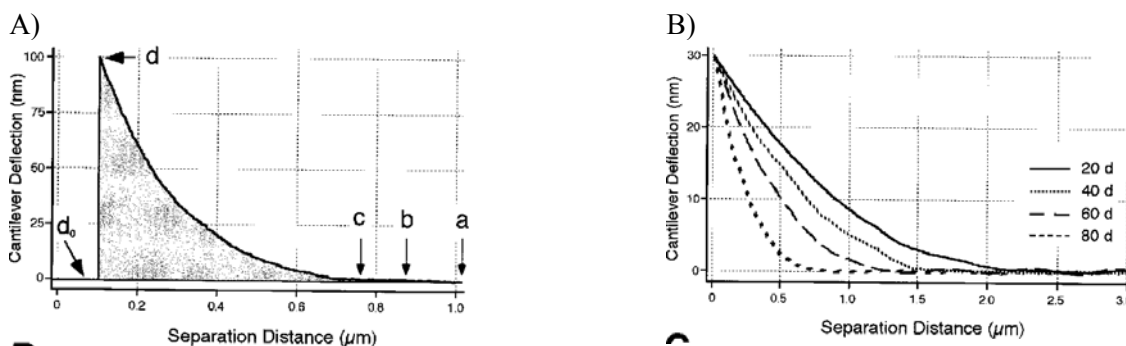


Fig. 8. A) Eksempel på kraft(målt som avbøyning)-kompresjon kurve målt ved AFM på et elastisk materiale, og (B): ulike materialer med forskjellige Youngs modulus. (A) Arbeidet utført av cantilever på materialet er direkte proporsjonalt med det grå arealet.

I likning 11 er F_C den observerte kraften, E er Youngs modulus, ν er Poisson's forhold til materialet, og δ er deformasjonen (inntrengningsdybde) under spissen. Utfordringen i denne tilnærmelsen er at det kan være

vanskelig å definere kontaktpunktet, (a, b, eller c i Fig. 8 A) og siden tilpasningen er følsom for dette, vil usikkerhet i dette føre til usikkerhet i bestemmelse av E (topografisk oppløst). En alternativ metode som innebærer bestemmelse av deformasjonsarbeidet utført på prøven opp til en viss inntrengningsdybde, er foreslått. Denne baserer seg på integrasjon til lik kraftgrense, og tilsvarer å sammenlikne det totale deformasjonsarbeide som utføres, opp til en lik kraft. Dette tilsvarer beregning av det går arealet i Fig. 8A. Innføring av $k_s = (1 - \nu) / \pi E$ i likning 11, forenkler denne til:

$$F_C = \frac{4E\sqrt{R}}{3(1-\nu)} \delta^{3/2} = \frac{4\sqrt{R}}{3\pi k_s} \delta^{3/2} \quad (12)$$

Integrasjon til lik kraftgrense gjør at en gjør en relativ sammenlikning av materialegenskapene under betingelsen:

$$F_{C,1} = F_{C,2} \Rightarrow \frac{4\sqrt{R}}{3\pi k_1} \delta_1^{3/2} = \frac{4\sqrt{R}}{3\pi k_2} \delta_2^{3/2} \quad (13)$$

Dvs., at det relative forholdet mellom k 'ene forholder seg til inntrengningsdybden som $k_1/k_2 = (\delta_1/\delta_2)^{3/2}$ (14)

Arbeidet som cantilever utfører på materialet finnes ved integrasjon:

$$w_1 = \int_0^{\delta_1} \frac{4\sqrt{R}}{3\pi k_1} \delta^{3/2} d\delta = \frac{8}{15} \frac{\sqrt{R}}{\pi k_1} \delta_1^{5/2} \quad (15)$$

Forholdet mellom arbeidet som utføres i posisjonene 1 og 2 kan da finnes:

$$\frac{w_1}{w_2} = \left(\frac{k_1}{k_2} \right)^{2/3} \quad (16)$$

Ved strekking er analysen i stor grad avhengig av type makromolekyl som strekkes. 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. Strekking 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 kraftsprangene er et mål for energien som stabiliserer den ordnede (biologisk funksjonelle) konformasjonen.

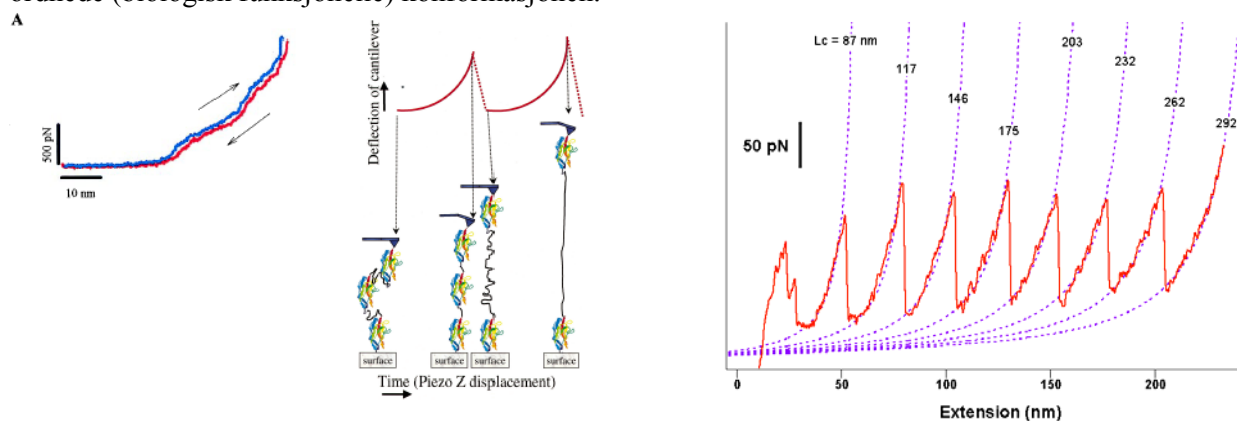


Fig. 9. Kraft - strekkekurver for (a) et polysakkarid som viser deformasjon av sukkerringen og (c) titin som viser utfolding av globulære domener. (b) viser skjematisk hvordan strekking av titin gjennomføres.

Interaksjoner mellom par av makromolekyler kan studeres ved hjelp av AFM instrumentering ved at de ulike komponente festes henholdsvis til underlaget og til spissen. Disse bringes i kontakt, og en drar spissen fra underlaget. En kan da observere dissosieringskrefter (tilsvarende krafthoppene i Fig. 9, eksempel med titin) som reflekterer bindingsstyrken (eks. avidin - biotin), og som også er avhengig av hvor fort en trekker spissen bort fra underlaget.

OPPGAVE 3.

a)

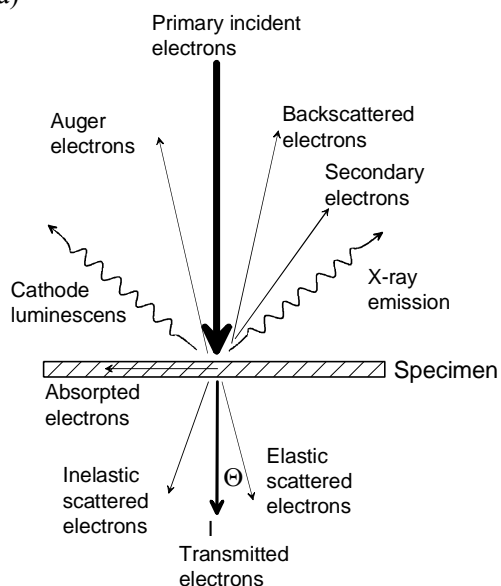


Fig. 10 Illustration of various processes in electron beam – specimen interactions.

Fig. viser ulike type vekselvirkninger (v.v.) mellom elektroner og (biologiske) prøver en kan dra nytte av i elektronmikroskopi. Disse er: (Fig. 10)

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, spaltning 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-, mørkefeltmikroskopi** 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.

Fig. 11 viser intensitetsfordeling av emiterte elektroner i sekundærprosesser.

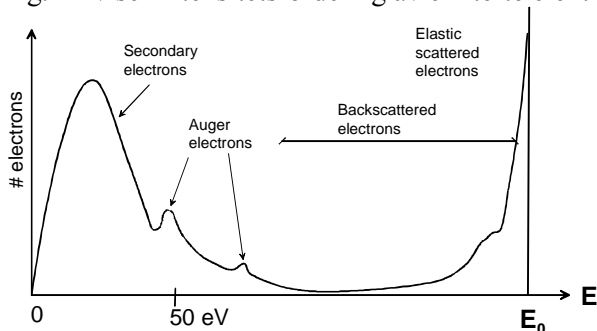


Fig. 11. Skjematisk illustrasjon av energi til elektron generert i elektron - prøve v.v.

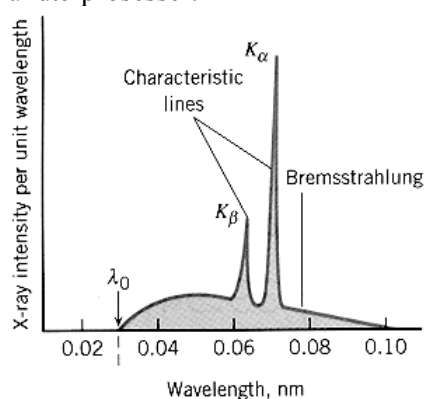


Fig. 12. Skjematisk illustrasjon av et røntgenspekter

Ved røntgen mikro-analyse, drar en nytte av følgende prinsipp. Innfallende elektroner har tilstrekkelig energi til å dissosiere sterkt bundne elektroner i orbitalene til atomene (K, L skallet, feks). Disse ledige tilstandene fylles ved

overgang av elektroner fra utenforliggende orbitaler, samtidig som at den frigjorte energien sendes ut som elektromagnetisk stråling (røntgen). Kvantemekaniske utvalgsregler setter begrensninger for tillatte overganger. Totalt sett vil røntgenspekteret inneholde bremsestråling med overlagrede karakteristiske bølglengder som reflekterer atomsammensetningen i den undersøkte prøven (Fig. 12).

b) Fig. 13 viser en skjematisk skisse av en unipotensial, elektrostatisk elektronlinse.

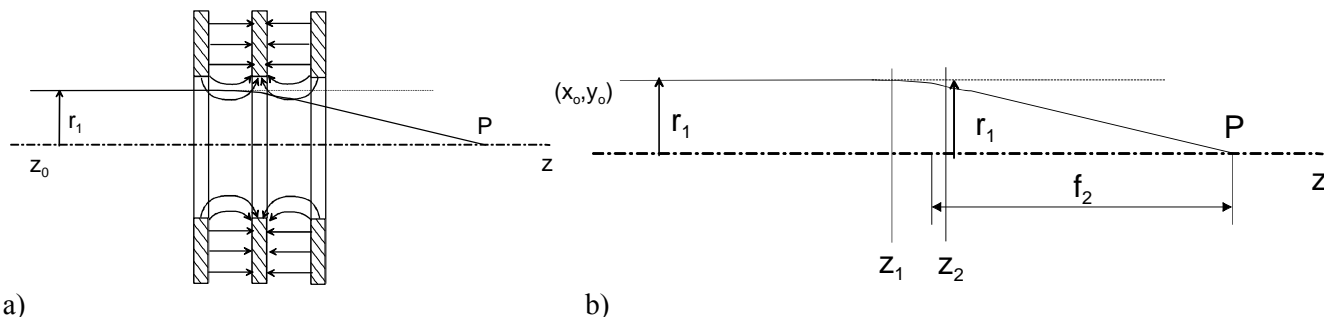


Fig. 13 a) Skjematisk illustrasjon av elektrostatisk unipotensiallinse, og b) parametre brukt til å beskrive avbildningsegenskaper.

Avbildningsegenskapene til elektromagnetiske linser beskrives av paraksiallikningen:

$$\frac{\partial^2 r}{\partial z^2} + \frac{\partial V(0, z)/\partial z}{2V(0, z)} \frac{\partial r}{\partial z} + \frac{\partial^2 V(0, z)/\partial z^2}{4V(0, z)} r - \frac{qB_z^2(0, z)}{8mV(0, z)} r = 0 \quad (17)$$

Her er r avstand fra (elektron)optisk akse, z avstanden langs aksene, V og B_z er henholdsvis elektrostatisk feltstyrke og magnetisk feltstyrke i z -retning. B regnes lik 0 for det aktuelle tilfellet. Får da:

$$\frac{\partial^2 r}{\partial z^2} + \frac{\partial V(0, z)/\partial z}{2V(0, z)} \frac{\partial r}{\partial z} + \frac{\partial^2 V(0, z)/\partial z^2}{4V(0, z)} r = 0 \quad (18)$$

Nå gjelder:

$$\frac{\partial^2 r}{\partial z^2} + \frac{\partial V_0/\partial z}{2V_0} \frac{\partial r}{\partial z} = \frac{1}{\sqrt{V_0}} \frac{d}{dz} (\sqrt{V_0} r') \quad (19)$$

hvor symbolene $' = \partial/\partial z$ og $V_0 = V(0, z)$ er anvendt for å lette notasjonen. Innsatt i likn 18 oppnås:

$$\sqrt{V_0} \frac{d}{dz} (\sqrt{V_0} r') = -\frac{1}{4} \frac{\partial^2 V_0/\partial z^2}{\sqrt{V_0}} r = 0 \quad (20)$$

Integrasjon langs elektronbanen gir (Fig. 13b):

$$\sqrt{V_0} r' \Big|_{z=z_2} - \sqrt{V_0} r' \Big|_{z=z_1} = -\frac{1}{4} \int_{z_1}^{z_2} \frac{\partial^2 V_0/\partial z^2}{\sqrt{V_0}} r dz \quad (21)$$

Dersom det antas tynn linse er forholdet mellom stigningstallet til banen og avbildningsegenskapene gitt som:

$$\frac{\partial r}{\partial z} \Big|_{z=z_2} \cong -\frac{r_1}{f_2} \quad (22)$$

Her er det antatt at endring i avstanden til elektronet når de går gjennom linsa, er liten: $r(z_1) \cong r(z_2) \cong r_m$. Ut fra dette oppnås følgende uttrykk for fokalavstanden:

$$\frac{1}{f_2} = \frac{1}{4\sqrt{V_0}} \int_{z_1}^{z_2} \frac{\partial^2 V_0/\partial z^2}{\sqrt{V_0}} dz \quad (23)$$

Ut fra at integralet er positivt, ser en at unipotensial linsen alltid vil være konvergerende.

OPPGAVE 4.

De to type eksperimentelle oppsett som kan foreslås brukt for bestemmelse av vandring av motorproteinet dynein langs mikrotubulus er fluorescens mikroskopi med eksitasjon ved hjelp av evanescent lys, og tidsoppløst AFM.

Total indre refleksjon av lys i grenseflaten mellom glass (brytningsindeks n_g) og løsning (brytningsindeks n_s) gir en evanescent bølge som kan betraktes om en vandrende bølge langs denne grenseflaten. Intensitet er utbredt kun til et område svært nær overflaten, (decaylengde 20 – 50 nm) og kan brukes til å eksiterende fluorescerende molekyler som ligger nær overflaten. Deteksjonen i dette oppsettet gjennomføres på tilsvarende måte som for ”vanlig” fluorescensmikroskopi, og det er nødvendig å kunne bruke to- eller tre- ulike fluorescerende stoff. Både eksitasjonslyset og emisjonslyset må filtreres på tilsvarende måte som beskrevet over (Oppgave 1).

Forsøket kan gjennomføres ved å binde fluorescensmerket mikrotubuli til en glassoverflate (Fig. 14). Både fluorescensmerkingen og innbindingen til glassoverflaten må ikke påvirke muligheten for vandringen av dynein. Mikrotubuli og dynein må fluorescensmerkes, med stoffer som gir emisjon i ulike bølgelengdeområder. Den laterale oppløsningen til optiske mikroskop er begrenset av diffraksjon, og ikke bedre enn ca 200 – 300 nm. Dette gir begrensninger på presisjon i bestemmelse av vandring av dynein langs mikrotubuli. Ved tidsoppløst fluorescensmikroskopi med et slikt oppsett vil en kunne, innen en viss romlig oppløsning bestemme vandring av dynein langs mikrotubuli ut fra vandringen av den ubundne, fluorescerende signalet fra dynein langs mikrotubuli (med et annet fluorescerende signal). Forsøket må gjennomføres under de biokjemiske betingelser som kreves for at motorproteinene dynein vandrer.

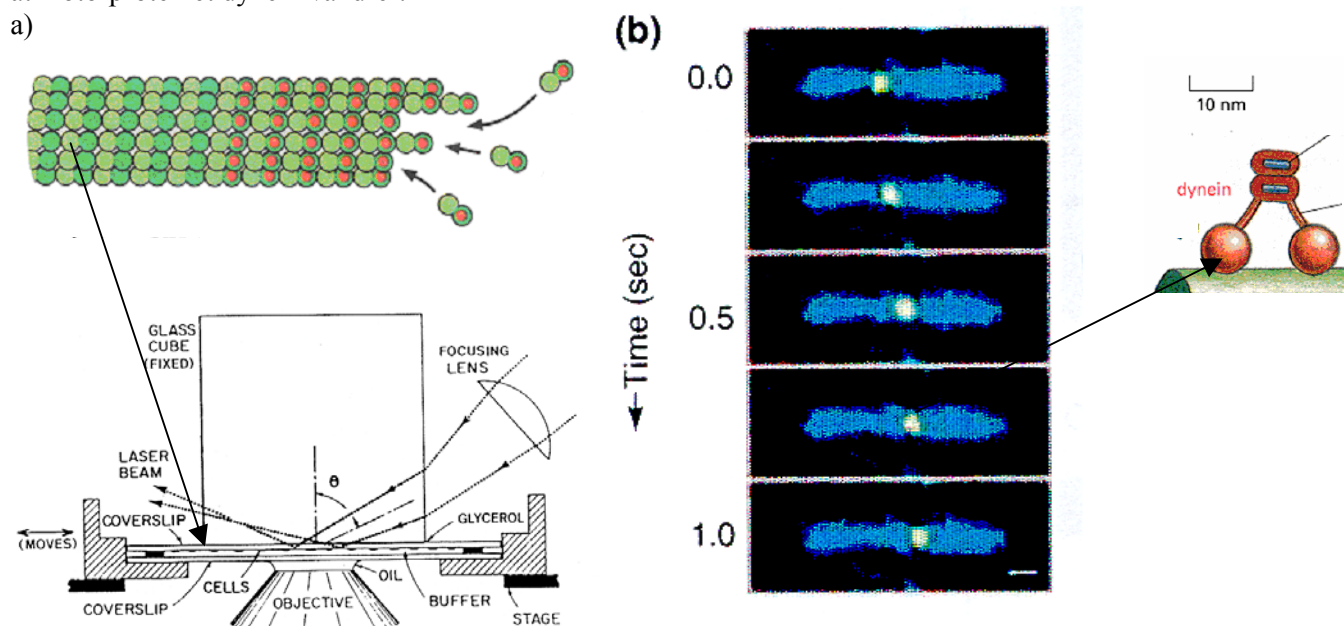


Fig. 14 Skjematiske illustrasjoner av oppsett for bestemmelse av vandring av dynein langs mikrotubuli. a) Mikrotubuli festes til dekkglass for total indre refleksjons eksitasjon av fluorescens. b) observasjon av vandrende dynein langs mikrotubuli ved to-komponent fluorescens.

Vandringsretningen av dynein i forhold til polaritet til mikrotubuli kan bestemmes ved at det også gjennomføres eksperimenter hvor en enten kan bestemme vektretning ved tilsats av GTP-formen av $\alpha\beta$ tubulin (dimeren) ut fra fysisk størrelse, eller ved fluorescensmerking av denne formen av $\alpha\beta$ tubulin. Her bør det velges et fluorescerende merkestoff som emitterer ved andre bølgelengder enn de to andre som er anvendt.

Tidsoppløst AFM vil også kunne brukes for bestemmelse av vandring av dynein langs mikrotubuli. AFM opereres ved tapping mode i væske, og en kan starte den eksperimentelle serien med mikrotubuli bundet til et underlag. Tilsats av dynein (til en viss konsentrasjon), bruk av betingelser som skulle gi vandring, tilstrekkelig rask sekvensiell avbildning vil gi informasjon om vandring av dynein. Vandringsretning i forhold til polaritet skulle kunne bestemmes ved tilsats GTP-formen av $\alpha\beta$ tubulin, og registrere hvilken ende mikrotubuli ble forlenget på (fysiske dimensjoner). I utgangspunktet, vil tidsoppløst AFM kunne gi bedre bestemmelse av vandring enn ved hjelp av fluorescensbasert metode. Utfordringen i tidsoppløst AFM her er å nå til tilstrekkelig hastighet under dataopptaket som krever tapping mode i væske.