

Besvarelse eksamen TFY 4260 Biofysiske mikroteknikker 18. des Desember 2006

Oppgave 1

a) Fasekontrastmikroskopi – vanlig lysmikroskopi.

I biologiske prøver er det liten absorpsjon og spredning av lyset. Det blir derfor liten kontrast i bildet ved vanlig lysmikroskopi (bright field).

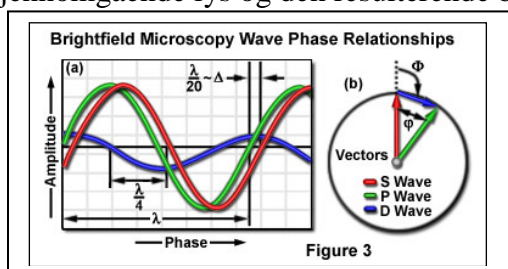
Fasekontrastmikroskop utnytter at fasen i den elektromagnetiske bølgen endres når lyset går gjennom prøven. På grunn av forskjellig optisk veilengde vil lysbølgen faseforskyves.

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

der n er refraktiv indeks og d er tykkelse av prøven.

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.

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.

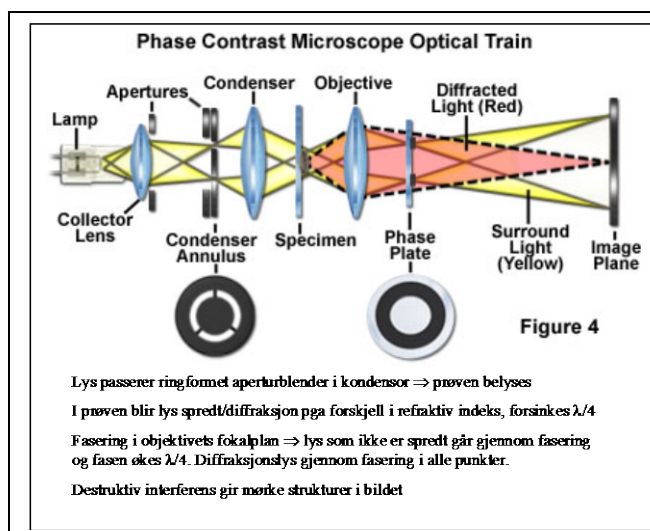


En ønsker derfor 1) separere ikke-spredt og spredt lys og

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 gjennomgår diffraksjon 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 tilbakelagt optisk veilengde.

Faseringen endrer fasen av det ikke-sprede lyset $\lambda/4$. Enten adderes $\lambda/4$ slik at konstruktiv interferens oppnås eller så subtraheres $\lambda/4$ slik at destruktiv interferens oppstår.

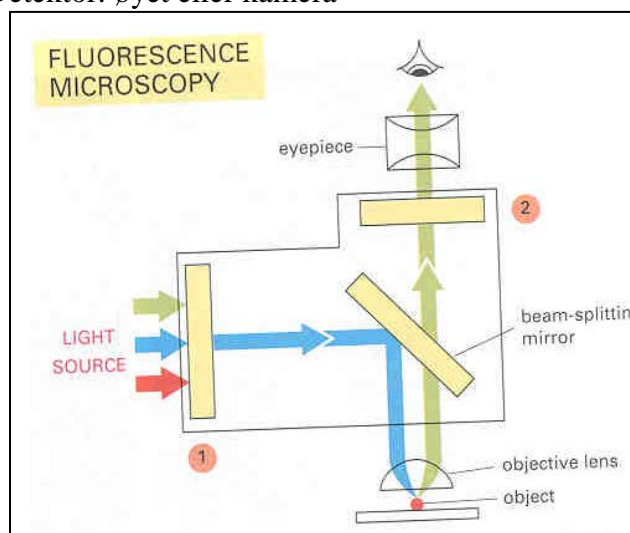
b) Fluoresensmikroskopi – Konfokal laser scanning mikroskopi:

Et konvensjonelt fluorescens mikroskop er vist nedenfor: Lyskilde Hg/Xe lampe.

Vanligst med epibelysning, dvs samme linsesystem benyttes som kondensor og objektiv.

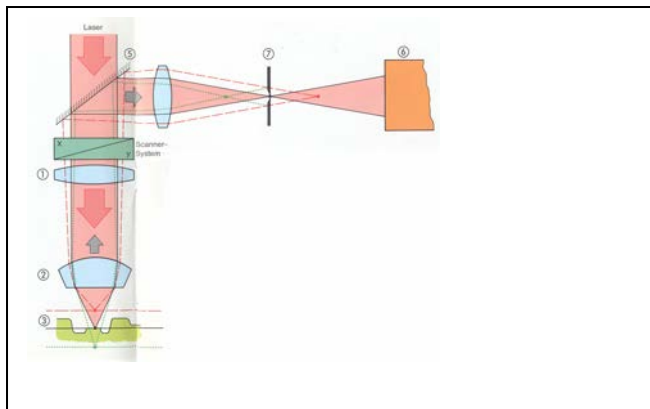
En filterkubus som beskrevet i figuren benyttes.

Detektor: øyet eller kamera



Filter 1: excitation filter transmits light that excites fluorescent dyes
Dichromatic filter = beam-splitting mirror: Light below a certain wavelength is reflected, light over is transmitted
Filter 2: Bandpass filter or longpass filter transmits emission light

Et konfokalt laser scanning mikroskop har en blendeåpning/pinhole i bildeplanets konjugate plan, som vist i figur. Dett gjør at kun lys fra fokalplanet når detektoren. Lyskilde er en laser og detektor et fotomultiplikatorrør. To galvaniske speil skanner laserstrålen over prøven.



Fordelene med et KLSM:

- Reduserer bidragene utenfor fokus
- Optisk snitting av prøven
- 3-dim rekonstruksjon
- Noe forbedret oppløsning

Begrensinger

- Fotobleking av fluorokrom pga en irreversibel prosess, vanligvis oksydering av reaktive tripletter.
- Demping av lys pga spredning av absorpsjon. Vanskelig å avbilde langt inne i tykke snitt

Oppgave 2

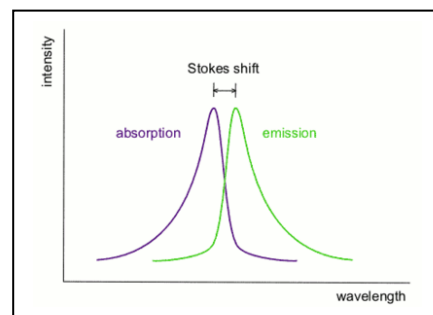
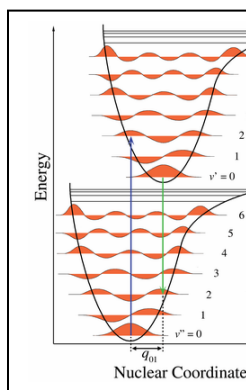
a) Franck Condon prinsippet.

Franck Condon prinsippet sier at absorpsjon og emisjon av et foton skjer så raskt (ca 10-15 s) at posisjonen til atomene i molekylet ikke endres. Da de atomære posisjonen ikke endres vil overgangen fra grunntilstand til eksitert tilstand beskrives ved vertikale linjer i et energidiagram som vist på figuren.

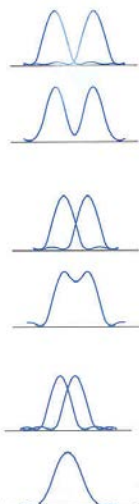
Det er størst sannsynlighet for en elektronisk eksitasjon når bølgefunksjonene i grunn tilstand og eksitert tilstand overlapper. Vil derfor få en eksitasjon til en vibrasjonstilstand med maksimalt overlapp mellom de to bølgefunksjonene.

Stokes skift

Er forskjellen i bølgelende/frekvens mellom maksimal absorpsjon og emisjon ved same elektroniske eksitasjon. Dette skiftet i bølgelende inntreffer fordi molekyler mister en liten del av den absorberte energien i form av termisk energi/vibrasjon relaksasjon før molekylet deeksiteres fra laveste vibrasjonsnivå i S1 til et vibrasjonsnivå i So



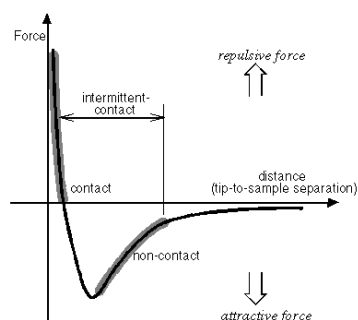
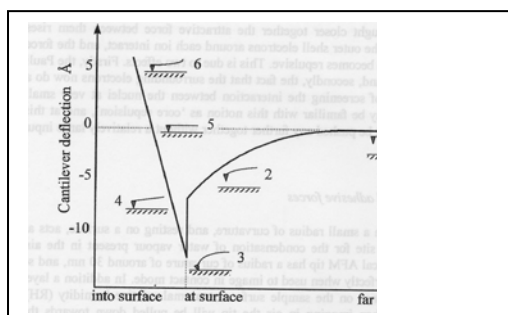
b) Rayleigh criterion:



Rayleigh criterion: two adjacent object points are defined as being resolved when the central diffraction spot of one point coincides with the first diffraction minimum of the other point in the image plane.

Oppgave 3 AFM

a) Kraft-avstand diagram er angitt nedenfor:



- 1) Tip far from sample: no force
- 2) Deflection increases with decreasing distance to sample
- 3) Sudden contact, force is changed with constant distance
- 4) contact, cantilever is not deflected if sample is not easily deformed
- 5) Balance between attractive (force from cantilever + capillary force) and repulsive force
- 6) Tip even closer to sample, repulsive force – cantilever deflected opposite direction

b) Kontakt mode

- Tip i direkte kontakt med prøveoverflate (innen \AA)
- Prøve scannes under tip
- Vertikal avbøying av tip-arm måles

- Tilbakekopling til pizelektrisk skanner som setter tip-arm i 0 posisjon. Konstant kraft/avbøyning avbildning er vanligst. Vertikalbevegelsen til Pizelektrisk skanner som gir bildet.
- Gir informasjon om frastøtingskrefter tip – prøve/ prøvens overflate topografi

Oscillating mode: The tip is oscillating.

Change in resonant frequency or vibration amplitude when tip is close to sample is detected.

Tapping mode også kalt intermittent mode. Tip oscillerer med en frekvens litt lavere men nær resonansfrekvensen.

Avstanden mellom tip og prøve er ca 10 Å. Tip treffer prøven i korte øyeblikk (derav navnet tapping)

Kraften mellom tip og prøve større en ved kontakt mode, og kapillærkraften unngås idet avstanden tip-prøve er større en avstanden der kapillærkrefter finnes.

Avbøyningen av tip registreres og ved negativ tilbakekopling vil posisjon til pizelektrisk skanner endres i Z-retningen for å opprettholde konstant avbøyning av tip-arm.

Ikke-kontakt mode: Tip oscillerer.

Distance tip – sample several 100 Å.

Attractive forces ca 10^{-12} N.

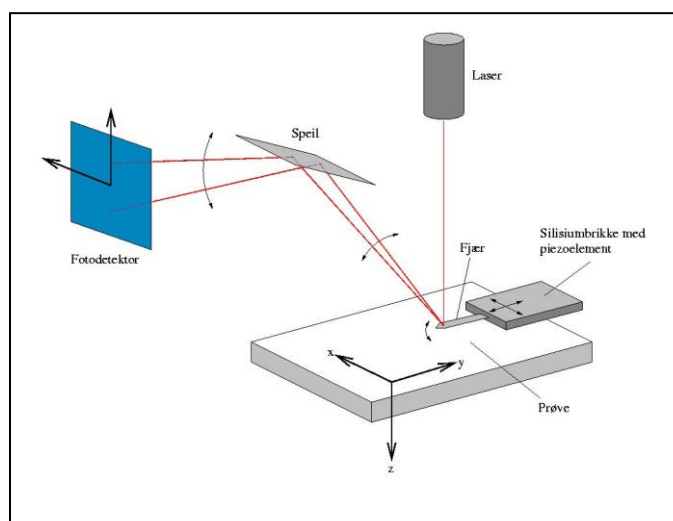
Held constant by negative feedback loop to piezoelectric scanner

Advantage: No contact, tip does not destroy sample. Small force used to study soft and elastic materials

Disadvantage: difficult to measure force because deflection of cantilever is small

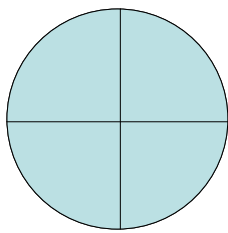
c) Deteksjonssystemet:

Basert på optisk vektstang prinsipp som vist på figur:



Principle of optical lever.
Advantage: small deflections give large effect on photo diode. Photo diode divided in 4 region for spatial resolution.

Posisjons-følsom fotodiode er inndelt i 4 områder. Når tipholder avbøyes vil laser spot endre posisjon slik at intensiteten i de 4 regionene endres. Endringene langs y-akse gir informasjon om avbøyning. Endring langs x-akse gir informasjon om bending(twist) mellom prøve og tip pga friksjonskrefter.



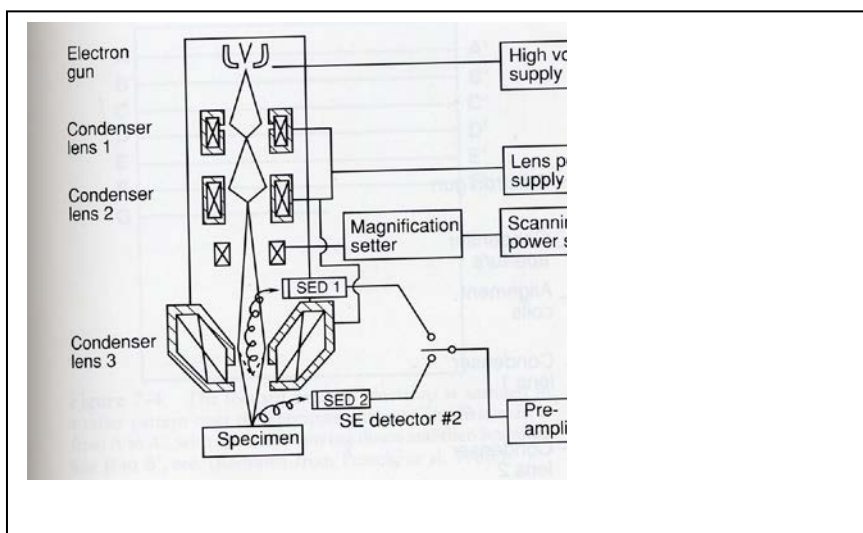
Detects light intensity in the four regions of the photodiode. The difference in intensity in the four regions relative to initial laser spot determines the new position of the laser spot, and thereby the deflection of the cantilever.

$$F_{deflection} = \alpha \left[(I_{upperleft} + I_{upperright}) - (I_{lowerleft} + I_{lowerright}) \right]$$

$$F_{friction} = \beta \left[(I_{upperleft} + I_{lowerleft}) - (I_{upperright} + I_{lowerright}) \right]$$

Oppgave 4: Electron microscopy

a) SEM



Consists of:

1. Electron illumination system = Electron gun and 3 condenser lenses
2. Object chamber/sample holder
3. Detectors for secondary and reflected e & amplification system
4. Monitor
5. Vacuum system

Illumination system: Electron-gun: Cathode emitting electrons accelerating to the anode and through the vacuum tube.

Condenser lenses 1 and 2: Reduce diameter of electron beam to 2 nm or less

Electron beam swept over sample

Small diameter necessary for high resolution at high magnifications

Condenser lens 3: final demagnification, fine adjustment of electron beam diameter without loss of e.

Consists of: Two sets of deflection coils and stigmators. Coils connected to scan generator \Rightarrow raster electron spot over sample. Strong lens (large i, small f)

Detectors for secondary electrons: Secondary electrons leaves the samples in many different directions and are attracted to a positive source. The positive source is a Faraday cage around the end of detector covered in a thin layer of Al.

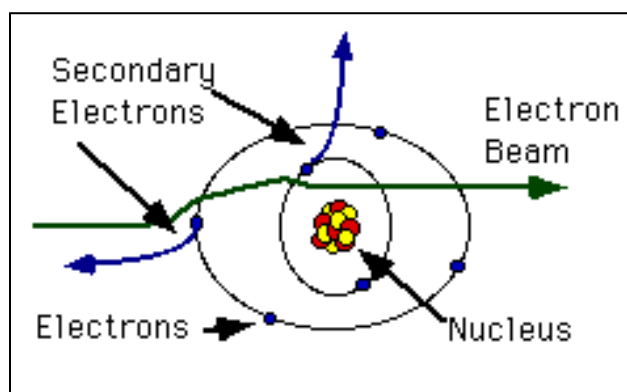
e through Al hits phosphorescence – scintillation material gives light. Photons into PMT.

PMT voltage determines contrast.

Detectors for backscattered electrons: backscattered electrons are high energy electrons travelling in straight lines and the detector is placed above the specimen. The detector is either a wide angle scintillation-PMT or a solid state detector. The backscattered electrons are detected when they strike the scintillator coating or the solid state detector. Backscattered electrons strike the silicon diode and the current is detected and related to number of electrons striking it.

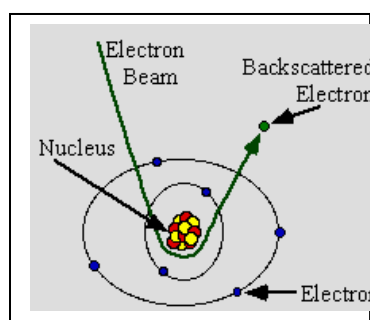
Vacuum system: The whole electron microscope from the electron gun to the specimen is in a vacuum system. The vacuum is obtained by pumps, valves and switches. The main purpose with the vacuum is to avoid collision between the electron and gas molecules.

Secondary electrons:



Incident electron repel electrons in the sample.
Emitted from outermost 100 Å layer of sample.
Number of secondary electrons depending on incident angle.
Low energy electrons

Backscattered electrons:



Elastic and inelastic backscattering of incident electrons.
The closer the incident electron comes to the nucleus, the higher force and higher scatter angle.
High energy electrons.

b) En sammenlikning mellom prøvepreparering for lys og TEM er vist nedenfor:
Hovedforskjellene er:

- Fixering kan enten være kjemisk eller ved frysefixering . For TEM er det kritisk at frysefixering foregår meget raskt for å unngå at store iskrystaller dannes. Dette vil gi artefakter i prøven. Kun små prøver kan derfor frysefixeres.
- at for TEM er en dehydrering av prøven nødvendig siden prøven befinner seg i vakuum
- Snittene er mye tynnere for TEM sammenliknet med LM. Dette stiller strengere krav til innstøping og snitting.
- Ved LM legges snittene på objektglass. For TEM kan ikke glass benyttes og prøven legges på et gitter (grid) oftest av Cu
- Farging for LM som regel ved organiske stoffer. Farging for TEM med tungmetaller for å øke spredning av elektroner og dermed få forbedret kontrast. Tungmetaller legges på ved skyggelegging for å gi økt kontrast. Kan ha positiv farging (strukturen en ønsker å studere farges) eller negativ farging (bakgrunnen farges, prøve lys mot mørk bakgrunn).

Steps	Rational	Light microscopy	TEM
<i>Fixation</i>	Preservation of structural detail according to level of resolution sought	Most common crosslinker: paraformaldehyde. Others fixatives: alcohols, ketones	Fixative penetrate tissue: C tetroxide glutaraldehyde (2.5%)
<i>Dehydration</i>	Avoids collapse of structure in vacuum	Not necessary	Essential. sequential in 50-100% ethanol/water
<i>Infiltration and Embedment</i>	Provides support for sectioning	When done, paraffin is commonly used	More rigid essential but thinner sections. Epoxy and acrylic resins are used
			Ultrathin sections