Laboratorio di Biosistemi I

Elisabetta Agnello

A.A. 2024/2025

2

github.com/elisabettanello

Equazioni di Maxwell nella materia

- Unità di misura: c.g.s. $(\varepsilon_0 := 1)$

- $c = \dfrac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}}$

$$\begin{cases} \text{I} & \bar{\nabla}\cdot\bar{E} = 4\pi\rho_{TOT} \\ \text{II} & \bar{\nabla}\cdot\bar{B} = 0 \\ \text{III} & \bar{\nabla}\times\bar{E} = -\dfrac{1}{c}\dfrac{\partial\bar{B}}{\partial t} \\ \text{IV} & \bar{\nabla}\times\bar{B} = \dfrac{1}{c}\dfrac{\partial\bar{E}}{\partial t} + \dfrac{4\pi}{c}\bar{J}_{TOT} \end{cases}$$

Nella maggior parte dei casi, il contributo di $\bar{J}$ è trascurabile per la materia biologica; il termine più importante è dato da ρ.

I campi EM vengono considerati solo come mezzi esterni alla materia, usati per studiare quest'ultima.

corrente prodotta dalle cariche di bound in moto oscillatorio

$$\bar{J}_{TOT} = \bar{J}_{FREE} + \bar{J}_{BOUND}$$

corrente trasportata dalle cariche libere

Il termine di bound è sempre presente, perché ci sono sempre delle cariche in buche di potenziale che non sono libere di muoversi nello spazio.
Essendo di natura oscillatoria, può essere scritto come:

$$\bar{J}_{BOUND} = J_0 \cos(\omega t + \varphi)$$

Più in generale: $\bar{J}_{BOUND} = \sum_i J_{0_i} \cos(\omega_i t + \varphi_i)$

$\bar{J}_{BOUND}$ è dato dalla somma (generalmente finita) di oscillatori armonici, ciascuno con la propria frequenza ω_i (modi normali).

github.com / elisabettagnello

$$\rho_{TOT} = \rho_{EXT} + \rho_{INT}$$

ρ_{INT} → densità di carica interna (di polarizzazione ρ_{POL})

ρ_{EXT} → densità di carica esterna

$\bar{E} = 0 \longrightarrow$ applichiamo un campo uniforme $\longrightarrow \bar{E}_{EXT}$

$d \ll \lambda$, con
- d : dimensione atomi
- λ : lunghezza d'onda della luce

In presenza di campo uniforme $\bar{E}$, gli atomi assumono una forma ellittica andando a generare una carica positiva e una negativa fuori la molecola, e dunque una densità di carica di polarizzazione.
La definizione di ρ_{POL} non è univoca, in quanto non è possibile definire in modo netto i confini di una molecola.

Il vettore di polarizzazione $\bar{P}$ descrive la formazione di dipoli nel materiale in seguito all'applicazione di un campo esterno $\bar{E}_{EXT}$, con la conseguente formazione di un campo interno.

$$\rho_{POL} = -\bar{\nabla}\cdot\bar{P} \qquad \bar{J}_{POL} = \frac{\partial \bar{P}}{\partial t}$$

$\bar{D}$ (: vettore di spostamento)

I: $\bar{\nabla}\cdot\bar{E} = 4\pi(\rho_{EXT} - \bar{\nabla}\cdot\bar{P}) \longrightarrow \bar{\nabla}\cdot(\bar{E} + 4\pi\bar{P}) = 4\pi\rho_{EXT}$

$\bar{\nabla}\cdot\bar{D} = 0$ se $\rho_{EXT} = 0$ (ovvero in esperimenti di ottica)

Il contributo alla densità di corrente causato dagli spin è espresso in termini del vettore di magnetizzazione:

$$\bar{J}_{MAG} = c\,\bar{\nabla}\times\bar{M}$$

github.com / elisabettagnello

$$\bar{J}_{BOUND} = \frac{\partial \bar{P}}{\partial t} + c\,\bar{\nabla}\times\bar{M}$$

$\bar{J}_{FREE}$ è data da 2 contributi: $\bar{J}_{COND}$ (causata dal moto degli e^- di conduzione in presenza di un campo elettrico) e $\bar{J}_{EXT}$ (indotta da una sorgente esterna).

$$\bar{\nabla}\times\bar{B} = \frac{1}{c}\frac{\partial \bar{E}}{\partial t} + \frac{4\pi}{c}\frac{\partial \bar{P}}{\partial t} + 4\pi\,\bar{\nabla}\times\bar{M} + \frac{4\pi}{c}\bar{J}_{EXT} + \frac{4\pi}{c}\bar{J}_{COND}$$

$$\bar{H} = \bar{B} - 4\pi\bar{M}$$

$$\bar{\nabla}\times\bar{H} = \frac{1}{c}\frac{\partial \bar{D}}{\partial t} + \frac{4\pi}{c}\bar{J}_{EXT} + \frac{4\pi}{c}\bar{J}_{COND}$$

L'i-esima componente della polarizzazione può essere espressa come una serie di potenze:

$$P_i = \sum_j \chi_{ij} E_j + \sum_{j,k} \gamma_{ijk} E_j E_k + \dots$$

Consideriamo solo i termini lineari in hp. di isotropia, definendo:

$$\bar{P} = \chi\bar{E} \quad ; \quad \bar{D} = \varepsilon\bar{E} \quad ; \quad \bar{J}_{COND} = \sigma\bar{E} \quad ; \quad \bar{B} = \mu\bar{H} \qquad \mu \sim 1$$

$\bar{D} = \varepsilon\bar{E}$ è una funzione di risposta lineare, con cui si connette $\bar{D}(\bar{r},t)$ con il campo $\bar{E}(\bar{r}',t')$ esistente in tutte le posizioni in tutti gli istanti precedenti:

$$\bar{D}(\bar{r},t) = \int d\bar{r}' \int_{-\infty}^{t} dt' \; \varepsilon(\bar{r},\bar{r}',t,t')\,\bar{E}(\bar{r}',t')$$

Approssimazione del locale: si può trascurare $\int d\bar{r}'$ perché si suppone che la dipendenza da $\bar{r}$ sia $\delta(\bar{r}-\bar{r}')$

github.com / elisabettagnello

Equazioni di Maxwell linearizzate

$$\begin{cases} \text{I} & \bar{\nabla}\cdot(\varepsilon\bar{E}) = 4\pi \cancel{\rho_{EXT}} = 0 \\ \text{II} & \bar{\nabla}\cdot(\mu\bar{H}) = 0 \\ \text{III} & \bar{\nabla}\times\bar{E} = -\frac{\mu}{c}\frac{\partial\bar{H}}{\partial t} \\ \text{IV} & \bar{\nabla}\times\bar{H} = \frac{1}{c}\frac{\partial(\varepsilon\bar{E})}{\partial t} + \frac{4\pi}{c}(\sigma\bar{E}) + \underbrace{\cancel{\bar{J}_{EXT}}}_{=0} \end{cases}$$

in assenza di sorgenti esterne:

$\rho_{EXT} = 0$ $\qquad$ $\bar{J}_{EXT} = 0$

mezzo isotropo

$$\bar{\nabla}\times\bar{H} = \underbrace{\frac{1}{c}\frac{\partial(\varepsilon\bar{E})}{\partial t}}_{\text{I}} + \underbrace{\frac{4\pi}{c}(\sigma\bar{E})}_{\text{II}}$$

- I termine: descrive la variazione del campo nel tempo e contribuisce alla propagazione elettromagnetica
- II termine: termine dissipativo (o di assorbimento), descrive la risposta statica istantanea

$$\bar{\nabla}\times\bar{\nabla}\times\bar{E} = \bar{\nabla}(\bar{\nabla}\cdot\bar{E}) - \bar{\nabla}^2\bar{E}$$

Sotto l'ipotesi di omogeneità e di località, ε = costante $\quad \sigma$ = cost. :

$$\varepsilon\,\bar{\nabla}\cdot\bar{E} = 0 \quad \rightarrow \quad \bar{\nabla}(\bar{\nabla}\cdot\bar{E}) = 0 \quad \rightarrow \quad \bar{\nabla}\times\bar{\nabla}\times\bar{E} = -\bar{\nabla}^2\bar{E}$$

$$\bar{\nabla}\times\bar{\nabla}\times\bar{E} = \bar{\nabla}\times\left(-\frac{\mu}{c}\frac{\partial\bar{H}}{\partial t}\right) = -\frac{\mu}{c^2}\frac{\partial^2(\varepsilon\bar{E})}{\partial t^2} - \frac{4\pi}{c^2}\mu\sigma\frac{\partial\bar{E}}{\partial t} = -\bar{\nabla}^2\bar{E}$$

Equazione delle onde:

$$\boxed{\bar{\nabla}^2\bar{E} = \frac{\mu\varepsilon}{c^2}\frac{\partial^2\bar{E}}{\partial t^2} + \underbrace{\frac{4\pi}{c^2}\sigma\mu\frac{\partial\bar{E}}{\partial t}}}$$

↳ comporta un decadimento esponenziale (attenuazione)

Lo spettro di $\sigma(\omega)$ indica per quali frequenze ci sarà attenuazione
Lo spettro di $\varepsilon(\omega)$ consente di ricavare la velocità di propagazione

soluzione: $\bar{E} = \bar{E}_0\, e^{i(\bar{q}\cdot\bar{r} - \omega t)}$

gitlab.com / elisabetta.gnello

$$q^2 = \frac{\mu}{c^2}\left(\omega^2 \varepsilon + i 4\pi\sigma\omega\right)$$

$$n = \frac{c}{v} \geq 1 \qquad \text{(indice di rifrazione)}$$

$$\omega = v q = \frac{c}{n} q \quad \longrightarrow \quad q = \frac{n}{c}\omega$$

possiamo definire : $\tilde{n} = n + iK \in \mathbb{C}$

$$q^2 = \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 (n^2 - K^2) + i(2nK) = \frac{1}{c^2}\left(\omega^2 \varepsilon + i 4\pi\sigma\omega\right)$$

$$\left.\begin{aligned} \varepsilon &= \frac{n^2 - K^2}{\mu} := \mathrm{Re}(\tilde{\varepsilon}) \\ \frac{4\pi\sigma}{\omega} &= \frac{2nK}{\mu} := \mathrm{Im}(\tilde{\varepsilon}) \end{aligned}\right\} \quad \tilde{\varepsilon} = \varepsilon_{\mathbb{R}} + i\frac{4\pi\sigma}{\omega} \quad \longrightarrow \quad \sqrt{\tilde{\varepsilon}} = \tilde{n}$$

$$\bar{E} = \bar{E}_0 \, e^{-\frac{\omega}{c}\bar{k}\cdot\bar{r}} \, e^{i\left(\frac{\omega}{c} n \bar{r} - \omega t\right)}$$

l'onda si propaga verso z e decade esponenzialmente con il parametro K di attenuazione.

$$\begin{cases} \varepsilon_1 = n^2 - K^2 & \text{e' correlata principalmente con la dispersione (polarizzazione)} \\ \varepsilon_2 = 2nK & \text{e' correlata con la dissipazione} \end{cases}$$

Se le cariche sono ferme c'e' solo dispersione, nella realtà però le cariche si muovono quindi c'è dissipazione $\longrightarrow n, \varepsilon \in \mathbb{C}$

$$\tilde{\bar{D}} = \tilde{\varepsilon}\,\bar{E}$$

$\mathrm{Re}\{\bar{D}\}$ e' in fase , $\mathrm{Im}\{\bar{D}\}$ e' sfasato di $90°$

github.com / elisabettagnello

Relazioni di Fresnel

$\tilde{r}, \tilde{t}$ coeff. di riflessione e trasmissione

supponiamo che un sample abbia spessore d :

per $d \to 0$: $R + T = 1 - \alpha d$

$$\alpha = \frac{1}{I} \frac{dI}{dz}$$

$R_d(n, k)$: Riflettanza
$T_d(n, k)$: Trasmittanza

Vediamo come una perturbazione può far passare il sistema da uno stato iniziale m ad uno finale n :

$$\omega_{mn} = \frac{E_n - E_m}{\hbar}$$ (dipende solo dalle proprietà della materia)

Se $\omega_{FIELD} \simeq \omega_{mn}$

ad ogni transizione può essere associata una frequenza ω_0 di oscillazione nella materia

github.com/ elisabettagnello

Oscillatore di Lorentz

Il modello oscillatorio di Lorentz usato per gli atomi e le molecole descrive bene la risposta ottica. non c'è una vera forza armonica con una costante elastica $K = m\omega^2$

Il legame interatomico è ben descritto dal potenziale di Morse:

$$V(r) = V_\infty \left(1 - e^{-a(r - r_{eq})}\right)^2$$

Il potenziale di Morse può essere approssimato con una parabola (approx. armonica)

la costante elastica K in questo caso non è data da una molla
per trovare K si utilizza il parametro della parabola che meglio approssima il potenziale di Morse all'equilibrio:

$$K = 2 V_\infty a^2$$

Come ω si considera la distanza energetica:

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{K}{m}} = \frac{E_f - E_i}{\hbar} = \omega_{fi}$$

La massa del sistema oscillante è: $\frac{m_e}{M_{ION}}$

tramiziani elettroniche: la nuvola elettronica si espande

tramiziani vibrazionali: la distanza tra i nuclei aumenta

github.com/elisabettagnello

Si considera il sistema come un oscillatore armonico forzato; F è una forza sinusoidale, che in questo caso specifico coincide con la forza Coulombiana:

$$F = eE(t) = eE_0 e^{i\omega t}$$

e: carica qualsiasi causata dai dipoli

Equazione dell'oscillatore armonico:

$$m\frac{d^2r}{dt^2} + \underbrace{m\Gamma\frac{dr}{dt}}_{\text{termine di smorzamento}} + m\omega_0^2 r = F_{EXT} = -e E_0 e^{i\omega t}$$

la variabile r è definita in modo che r_{eq} sia nell'origine: $r = (r' - r_{eq})$

$\Gamma := \frac{1}{\tau_1}$ linewidth energy loss dissipation

Ampiezza oscillazione: $r = \frac{eE_0/m}{\omega_0^2 - \omega^2}$

vogliamo aggirare la divergenza del denominatore:

$$\Gamma := HWMH$$

Γ comporta della dissipazione, impedendo a r di divergere (nelle molecole c'è maggiore dissipazione che nei singoli atomi)

Soluzione dell'equazione: $\tilde{r}(t) = \frac{-eE_0/m}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega} e^{-i\omega t}$

$$Re\{\tilde{r}\} = \frac{eE_0}{m}\frac{\omega_0^2 - \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2) + \Gamma^2\omega^2} \qquad Im\{\tilde{r}\} = \frac{eE_0}{m}\frac{\Gamma\omega}{(\omega_0^2 - \omega^2) + \Gamma^2\omega^2}$$

per piccoli Γ, Im{r} è una lorentziana con un picco per $\omega = \omega_0$

github.com / elisabettagnello

Momento di dipolo indotto: $\tilde{p}_{IND}(r) = -e \cdot \tilde{r}(t) = \frac{e^2 E_0}{m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega} e^{-i\omega t}$

$\tilde{p}_{IND}$ oscilla con $\tilde{r}(t)$; aumenta all'aumentare della distanza e torna al valore iniziale (può essere 0) quando passa per r_{eq}, ovvero nell'origine.

Vettore di polarizzazione $\bar{P}$:

$$\bar{P} = \chi \bar{E} = N \langle \bar{p}_{ind} \rangle \xrightarrow{*} \chi = \frac{|\bar{P}|}{|\bar{E}|} = \frac{Ne^2}{m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega}$$

N: densità delle molecole

χ non è un termine oscillante

* hp: spazio isotropico

$\tilde{\varepsilon} = 1 + 4\pi\chi \in \mathbb{C}$

$$\begin{cases} Re\{\tilde{\varepsilon}\} = \varepsilon_1(\omega) = 1 + \frac{4\pi N e^2}{m} \frac{\omega_0^2 - \omega^2}{(\omega_0^2 - \omega^2) + \Gamma^2\omega^2} & (= n^2 - K^2) \\ Im\{\tilde{\varepsilon}\} = \varepsilon_2(\omega) = \frac{4\pi N e^2}{m} \frac{\Gamma\omega}{(\omega_0^2 - \omega^2) + \Gamma^2\omega^2} & (= 2nK) \end{cases}$$

- la parte reale è legata agli effetti dispersivi
- la parte immaginaria è legata a proprietà di assorbimento ed interviene nei processi dissipativi.
- solo in prossimità della regione di risonanza si palesa la natura complessa di ε ($\varepsilon_2 = 0$ altrove)

github.com/elisabettagnello

- ε_2 ha l'andamento di una Lorentziana

- L'andamento di ε_1, conferma che nel vuoto $\varepsilon = 1$ e non 0.
  Quando ci si trova in risonanza, il materiale si comporta come il vuoto: la velocità della luce in un materiale in risonanza è c

- Per $\omega > \omega_0$, $\varepsilon_1 < 0$. In questo caso v dovrebbe essere > c, poiché ciò è impossibile quella regione prende il nome di regione di dispersione anomala. È la regione in cui la radiazione non può propagarsi.
  Ci consente di stabilire quando c'è riflessione e quando trasmissione

· Caso con molti oscillatori:

Introduciamo N (= # di atomi nella mecolda) transizioni vibrazionali e transizioni elettroniche (dell'ordine del n° di confined states):

$$\varepsilon_{1\,TOT} = 1 + \sum_{j}^{N} \frac{4\pi N_j e_j^2}{m_j} \frac{\omega_j^2 - \omega^2}{(\omega_j^2 - \omega^2) + \Gamma_j^2 \omega^2}$$

Si usa quando ci sono diverse frequenze di risonanza ω_j
(atom with one electrons and many excited states, atom with many electrons...)

Se le diverse frequenze di oscillazione ω_j sono vicine, i vari andamenti si sovrappongono e scompare la regione anomala, rimane solo per l'ultima ω

frequenza di plasma: $\omega_p^2 = \frac{4\pi N e^2}{m}$

gitlab.com / elisabettagnello

Recap:

In his attempt to describe the interaction between atoms and electric fields in classical terms, Lorentz proposed that the electron is bound to the nucleus of the atom by a force that behaves according to Hooke's Law - a spring-like force. An applied electric field would then interact with the charge of the electron, causing "stretching" or "compression" of the spring, which would set the

Il legame interatomico e' ben descritto dal potenziale di Morse, che puo' essere approssimato con una parabola (approx. armonica)

la costante elastica K in questo caso non e' data da una molla
per trovare K si utilizza il parametro della parabola che meglio approssima il potenziale di Morse all'equilibrio.

Come ω si considera la distanza energetica: $\omega_0 = \sqrt{\frac{K}{m}} = \frac{E_f - E_i}{\hbar} = \omega_{fi}$

Si considera il sistema come un oscillatore armonico forzato; F e' una forza sinusoidale, che in questo caso specifico coincide con la forza Coulombiana:

$$F = eE(t) = eE_0 e^{i\omega t}$$

Equazione dell'oscillatore armonico:

$$m\frac{d^2r}{dt^2} + \underbrace{m\Gamma\frac{dr}{dt}}_{\text{termine di smorzamento}} + m\omega_0^2 r = F_{EXT} = -eE_0 e^{-i\omega t}$$

The damping term comes from internal collisions in the solid and radiation emitted by the electron.

$$\tilde{r}(t) = \frac{-eE_0/m}{(\omega_0^2-\omega^2) - i\Gamma\omega} e^{-i\omega t}$$

Momento di dipolo indotto: $\tilde{p}_{IND}(r) = -e \cdot \tilde{r}(t)$

Vettore di polarizzazione $\bar{P}$: $\bar{P} = \chi\bar{E} = N\langle\bar{p}_{ind}\rangle \xrightarrow{\star} \chi = \frac{Ne^2}{m}\frac{1}{(\omega_0^2-\omega^2) - i\Gamma\omega}$

github.com / elisabetagnello

Riflettanza

è la grandezza che viene osservata concretamente

Nel caso di incidenza normale:

$$R = \frac{(n-1)^2 + K^2}{(n+1)^2 + K^2}$$

Divisione del grafico in zone:

- T (trasmissione)
- A (assorbimento)
- R (riflessione)
- T (trasmissione)

in corrispondenza di ω_0 c'è il punto di flesso della riflettanza e non il max di R

La regione di massima R è al di là di ω_0, perché per $\omega > \omega_0$ nella regione anomala, l'indice di rifrazione diventa minore di 1 e non può esserci propagazione di radiazione nel mezzo

absorption takes place when the frequency of an EM wave matches one of the resonant frequencies of the material, what we called ω0 in the derivation of the Lorentz oscillator model. In fact, resonance is exactly this phenomenon of frequency-matching when driving any kind of oscillator. Therefore, when the frequency of the electromagnetic wave is in the vicinity of ω0, the predominant behavior in the material is absorption.

I bordi delle cellule al microscopio appaiono neri perché sono talmente sharp da scatterare la luce in direzioni diverse da quella perpendicolare

Se delle cellule non hanno il picco di risonanza nel visibile, si usano dei coloranti e si osserva alla ω di risonanza del colorante

github.com / elisabettagnello

04
Coloranti e modello di Lorentz

La maggioranza delle biomolecole che costituiscono gli organismi sono trasparenti nello spettro del visibile.

- DNA: picco di assorbimento a ~260 nm, lunghezza d'onda che si trova negli ultravioletti (in questo modo il DNA non può interagire e essere modificato neanche dagli UV del sole)
  Il picco a 260 nm è il primo di una serie, sempre più intensa, che si incontra negli UV. Ciascun picco corrisponde ad una specifica transizione elettronica descritta dal modello di Lorentz.
  Il picco a 260 nm è legato all'anello eterociclico (= anello composto da almeno due atomi diversi)

- PROTEINE: una proteina è formata da una sequenza di amminoacidi diversi, ciascuno con il proprio spettro di assorbimento.
  Lo spettro della proteina è dato dalla sovrapposizione dei singoli spettri. Poiché tutte le proteine hanno tutti gli amminoacidi, gli spettri delle varie proteine sono molto simili tra loro, ciò rende difficile l'identificazione delle diverse proteine tramite spettroscopia.
  Le proteine non interagiscono con lo spettro visibile e del Sole.
  L'ultimo picco si trova a ~280 nm ed è causato dalla presenza dell'anello aromatico in alcuni amminoacidi.

Per osservare le biomolecole che non hanno picchi di assorbimento nel visibile si usano i coloranti.

- verde indocianina: questo tracciante può legarsi alle proteine e me segue la traiettoria. Ha un picco a ~800 nm

- blu di metilene: usato per colorare i batteri

- violetto di genziana (crystal violet): si lega alle membrane cellulari e viene usato per rivelare i batteri

github.com/elisabettagnello

coefficiente di assorbimento: $\alpha = -\frac{1}{I}\frac{dI}{dr}$

$$\alpha = \frac{2\omega k}{c} = \frac{4\pi k}{\lambda}$$

Il picco del verde cade nel IR, quello del blu nel rosso e quello del viola nel verde. Questo shift è causato dal fatto che il grafico mostra l'andamento del coefficiente di assorbimento, il quale corrisponde alla parte immaginaria dell'indice di rifrazione, che corrisponde (~) a ε_2, ovvero al picco della lorentziana. Il coefficiente di riflessione non è massimo in corrispondenza del picco della lorentziana ma per lunghezze d'onda più piccole (= shift verso s_x)

github.com/elisabettagnello

quando il grafico interseca l'asse y, il valore di ε coincide con la costante dielettrica statica.
Se la molecola non ha dipolo, non ha lo spettro vibrazionale, quindi la costante dielettrica statica e' uguale a quella del visibile (O_2, Si, N_2)
Le molecole che possono ruotare, possono avere altri picchi a frequenze molto basse.

real materials correspond to a collection of Lorentz oscillators with different frequencies spread out over bands.
we can think of the frequency of a Lorentz oscillator as corresponding to the transition frequency across the band gap of an insulator or semiconductor.

github.com / elisabettagnello

Approccio quantistico per trovare $\tilde{\varepsilon}$

hp: materia descrivibile con una funzione di densità di probabilità, campi EM non quantizzati

Lo spettro vibrazionale ha un equivalente classico, mentre le transizioni elettroniche non ce l'hanno.

$H_0 \Phi_m = \varepsilon_m \Phi_m$ $\qquad \Phi_m(x,y,z)$ sistema imperturbato

$\psi(x,y,z)$ sistema sottoposto ad una perturbazione (campi EM) H'

equazione di Schrödinger dipendente dal tempo: $\quad i\hbar \frac{\partial}{\partial t}\psi = (H_0 + H')\psi$

$H' \sim e\bar{E}\cdot\bar{r}$ (approx. dipolare)

$= e E x$ (1D, approx. onda piana e spazio isotropico)

$$x_{mn} = \iiint \Phi_m^* \underbrace{\hat{x}}_{\text{operatore posizione}} \Phi_n \, dx\,dy\,dz$$

$$\underbrace{\langle p \rangle}_{\text{operatore di polarizzazione}} = \langle -ex \rangle = \ldots = \frac{e^2 E}{2\hbar} \sum_m |x_{m0}|^2 \left(\frac{1}{\omega_{m0} - \omega} + \frac{1}{\omega_{m0} + \omega} \right)$$

x_{m0}: hp: si parte dal GS

$\omega_{m0} = \frac{E_m - E_0}{\hbar}$

$$\chi_e = N\alpha = \frac{N\langle p \rangle}{E} = \frac{2Ne^2}{\hbar} \sum_m |x_{m0}|^2 \frac{\omega_{m0}}{\omega_{m0}^2 - \omega^2}$$

Il risultato ottenuto è simile a quello trovato con il modello di Lorentz, ma privo della parte immaginaria, che può essere aggiunta:

$$\chi_e = \frac{2Ne^2}{\hbar} \sum_m |x_{m0}|^2 \frac{\omega_{m0}}{\omega_{m0}^2 - \omega^2 - i\Gamma_m \omega}$$

$\Gamma_m = \frac{1}{\tau_m}$ coincide con il termine dissipativo nel modello di Lorentz

github.com / elisabettagnello

τ_m : periodo di permanenza nel livello eccitato
l'unico livello con lifetime infinita è il GS, quindi deve necessariamente comparire Γ nella formula

Nell'approccio classico di Lorentz non c'è una spiegazione fisica per l'origine delle frequenze di oscillazione (non ci sono molle), nell'approccio quantistico:

$$\omega_{mn} = \frac{E_m - E_n}{\hbar}$$

oscillator strenght

$$\tilde{\varepsilon}_{quant} = 1 + \frac{4\pi N e^2}{m} \sum_j \frac{f_{j0}}{\omega_{j0}^2 - \omega^2 - i\Gamma_j \omega} \qquad \sum_j f_j = 1$$

$$\tilde{\varepsilon}_{class} = 1 + \frac{4\pi e^2}{m} \sum_j \frac{N_j}{\omega_j^2 - \omega^2 - i\Gamma_j \omega} \qquad \sum_j N_j = N$$

$$f_{j0} = \frac{2m\hbar\omega_{j0}}{\hbar^2} |x_{j0}|^2$$

- approccio classico : N dipoli sono distribuiti in famiglie con diversa frequenza di risonanza ω_j e con frazione di popolazione N_j
- approccio quantistico : N dipoli nel ground state possono effettuare una transizione ad uno stato eccitato j con probabilità f_{j0}

github.com / elisabettagnello

Kramers-Kroning

- Response function: lega la risposta del sistema ad uno stimolo ricevuto

Per un sistema lineare, in generale la risposta indotta da uno stimolo è:

$$X(\bar{r},t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \underbrace{G(\bar{r},\bar{r}',t,t')}_{\text{response function}} f(\bar{r}',t')\, d\bar{r}'\, dt'$$

l'espressione descrive la risposta $X(\bar{r},t)$ nella posizione $\bar{r}$ e al tempo t, allo stimolo $f(\bar{r}',t')$ che agisce in $\bar{r}'$ e al tempo t'

- local approximation: si assume che ciò che accade in una certa posizione dipende solo dal campo esistente in quella particolare posizione

$$G(\bar{r},\bar{r}',t,t') = \delta(\bar{r}-\bar{r}')\, G(t-t') \qquad X(\bar{r},t) = \int_{-\infty}^{+\infty} G(t-t')\, f(t')\, dt'$$

- Causality assumption: non può esserci una risposta prima dello stimolo

$$G(t-t') = 0 \qquad , t<t'$$

Se $f(t') = \delta(t'-t_0)$:

$$X(\bar{r},t) = \int G(t-t')\, \delta(t'-t_0)\, dt'$$

$$= G(t-t_0)$$

La response function è una funzione di Green (è la funzione di ingresso ad un operatore che produce per risposta la δ).

TRASFORMATE DI FOURIER NEL DOMINIO DELLE FREQUENZE:

excitation field: $f(\omega) = \int f(t)\, e^{i\omega t}\, dt$

observable response: $X(\omega) = \int X(t)\, e^{i\omega t}\, dt$

response function: $G(\omega) = \int G(t-t')\, e^{i\omega(t-t')}\, dt$

github.com / elisabettagnello

nel dominio delle frequenze, uno stimolo monocromatico $f(\omega)$ viene semplicemente moltiplicato per un numero $G(\omega)$ per ottenere la risposta $X(\omega)$:

$$X(\omega) = G(\omega) f(\omega)$$

MODI NORMALI

In corrispondenza dei poli di $G(\omega)$ ($\omega = \omega_0$ in cui il denominatore di G si annulla), la risposta e' finita anche in assenza di stimoli.
In corrispondenza dei poli, quindi, il sistema ha dei modi normali.
La divergenza in ω_0 riflette una risposta infinita a un input infinitesimo.

Per evitare questa incoerenza, nell'oscillatore di Lorentz il polo e' spostato nel piano complesso aggiungendo $-i\Gamma\omega$ e rendendo χ una funzione complessa.

$$\bar{P} = \underbrace{\frac{Ne^2}{m} \frac{1}{(\omega_0^2 - \omega^2) - i\Gamma\omega}}_{= \chi(\omega) = G(\omega)} E(\omega)$$

e' una funzione di Green

Se nel dominio del tempo consideriamo uno stimolo luminoso pulsante:

$$E(t') = E_0 \delta(t)$$

$$P(t) = -\frac{Ne^2}{m} E_0 e^{-\frac{\Gamma}{2}t} \sin(\omega_0 t)$$

la suscettività nel modello di Lorentz rispetta il principio di causalità, poiche' e' nulla per $t<0$.

Poiche' χ rispetta la causalità e $\tilde{\varepsilon} - 1 = 4\pi\chi$, quindi anche' $\tilde{\varepsilon}$ la deve rispettare e deve essere una funzione di Green.

Il teorema di Cauchy fornisce delle relazioni tra la parte reale e quella immaginaria delle funzioni di Green.

Le relazioni che legano ε_1 e ε_2 sono dette relazioni di Kramers-Kroning

$$\varepsilon_1(\omega_0) - 1 = \frac{1}{\pi} P \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \frac{\varepsilon_2(\omega)}{\omega - \omega_0}$$

$$\varepsilon_2(\omega_0) = -\frac{1}{\pi} P \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \frac{\varepsilon_1(\omega) - 1}{\omega - \omega_0}$$

Poiche' ε_2 e' dispari e ε_1 e' pari, moltiplicando e dividendo per $(\omega_0 + \omega)$ si ha:

$$\varepsilon_1(\omega_0) - 1 = \frac{2}{\pi} P \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \frac{\varepsilon_2(\omega)}{\omega^2 - \omega_0^2} \omega$$

$$\varepsilon_2(\omega_0) = -\frac{2\omega_0}{\pi} P \int_{-\infty}^{+\infty} d\omega \frac{\varepsilon_1(\omega) - 1}{\omega^2 - \omega_0^2}$$

github.com / elisabettagnello

P : valore principale

ε_1 è legata alla dispersione, ε_2 all'assorbimento
Poiché ε_1 e ε_2 sono legate tra loro, da misure dell'assorbimento si possono ricavare info sulla dispersione e viceversa.

La causalità implica che l'assorbimento di una frequenza sia accompagnato da uno shift di fase di tutte le altre frequenze per compensare.
Quindi, in un materiale dispersivo l'assorbimento influenza anche la velocità di propagazione della luce.

github.com / elisabettagnello

Consideriamo un sistema in uno stato $|s\rangle$ che assorbe un fotone in uno stato $|q\rangle$
Dopo aver assorbito il fotone, il sistema e' nello stato $|s'\rangle$

n_q : densità dei fotoni quando il sistema e' nello stato $|s\rangle$
$n_q - 1$: densità dei fotoni quando il sistema e' nello stato $|s'\rangle$

Il rate di transizione e': $W_{s',s} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle s', n_q - 1 | H^{EXT} | s, n_q \rangle|^2 \delta(\omega - \omega_{s',s})$

L'hamiltoniana di seconda quantizzazione e': $H^{EXT} = -\frac{1}{c} \int dr\, \bar{J}(\bar{r}) \cdot A^{EXT}(\bar{r}, t)$

Scrivendo $\bar{J}(\bar{r})$ usando la trasformata di Fourier $\bar{J}(\bar{q})$ e scrivendo A in termini degli operatori di creazione e distruzione dei fotoni, si ha:

$$W_{s',s} = (2\pi)^6 \frac{4\pi^2 n_q}{\hbar \omega} \langle s | \bar{J}(q) | s' \rangle \langle s' | \bar{J}^*(q) | s \rangle \delta(\omega - \omega_{s,s'})$$

Considerando la probabilità totale che qualsiasi transizione avvenga, si ottiene una espressione che contiene la funzione di autocorrelazione della corrente dipendente dal tempo (o funzione di correlazione corrente-corrente), che quantifica le fluttuazioni statistiche

$$\sum_{s,s'} W_{s,s'} = (2\pi)^6 \frac{2\pi\, n_q}{\hbar \omega} \int dt\, e^{i\omega t} \sum_s \rho_s \langle s | \bar{J}_q(0) \bar{J}_q^*(t) | s \rangle$$

La potenza dell'assorbimento e' dalla probabilità totale per l'energia $\hbar\omega$ di tran.

$$\text{Power} = (2\pi)^6 2\pi\, n_q \int dt\, e^{i\omega t} \sum_s \rho_s \langle s | \bar{J}_q(0) \bar{J}_q^*(t) | s \rangle$$

Se il sistema fluttuante e' all'equilibrio, la potenza assorbita e quella emessa sono uguali ma non zero; le fluttuazioni implicano sempre dissipazione.

legge di Ohm: $J = \sigma E$

Potenza: $P = J \cdot E = \sigma E^2 = (2\pi)^6 2\pi\, n_q \int dt\, e^{i\omega t} \sum_s \rho_s \langle s | \bar{J}_q(0) \bar{J}_q^*(t) | s \rangle$

densità di energia EM: $E E^* = 2\pi\, n_q \hbar \omega$

gitHub.com / Giacomettagnello

teorema di fluttuazione-dissipazione:

$$\sigma(\omega) = \frac{(2\pi)^6}{\hbar\omega} \int dt\, e^{i\omega t} \sum_s \rho_s \langle s|\bar{J}_q(0)\bar{J}_q^*(t)|s\rangle$$

La parte immaginaria di $\tilde{\varepsilon}(\omega)$ e' proporzionale alla componente di Fourier della funzione di correlazione corrente-corrente.

Espressione generale del tensore conduttivita' per T finita:

$$\sigma_{xx}(\omega) = \frac{(2\pi)^6}{\hbar\omega\coth(\hbar\omega/2kT)} \int dt\, e^{i\omega t} \sum_s \rho_s \langle s|\bar{J}_q(0)\bar{J}_q^*(t)|s\rangle$$

github.com / elisabettagnello

THE LIGHT MICROSCOPE

1. Lente di ingrandimento:

E' il metodo più semplice per ingrandire, e' costituito da una singola lente.
Puo' ingrandire fino a ×4.
Con una lente, una cellula di raggio 10 μm può essere ingrandita fino a 40 μm (l'occhio umano non e' in grado di identificare oggetti più piccoli di 100 μm).

Figure 4

2. Microscopio:

Puo' ingrandire fino a ×50, ×100, ×200, ×400 in base al modello.
Con il microscopio, le cellule vengono ingrandite fino a 1÷2 mm; di ciò ne risente il campo (field), ovvero l'area visibile attraverso l'obiettivo del microscopio, che diminuisce. All'aumentare dell'ingrandimento, il campo visivo si restringe, permettendo di vedere una porzione più dettagliata, ma più piccola del campione.

Figure 5

Il microscopio e' formato da:
- una prima lente posta molto vicina al campione, ovvero l'obiettivo.
- tube lens che consente di mantenere il diametro del fascio pari a quello dell'obiettivo.
- magnified intermediate image (immagine secondaria).
- una lente chiamata oculare che effettua un secondo ingrandimento.

L'ingrandimento complessivo e' dato dal prodotto dei 2 ingrandimenti, ciascuno dell'ordine di 10, quindi complessivamente $10 \cdot 10 = 100$

github.com/elisabettagnello

Il campione deve essere illuminato; l'intensità luminosa che colpisce il campione deve essere maggiore di quella nell'ambiente circostante.
Per focalizzare la luce sul campione si usa una condenser lens.
La sezione di illuminazione è speculare alla sezione sopra l'obiettivo.
L'immagine della lampada non arriva ai nostri occhi perché l'apparato non è esattamente simmetrico, l'occhio è posto 2cm indietro rispetto al punto simmetrico.

Reflection

* beam splitter

L'illuminazione proviene dall'alto

L'illuminazione viene dal basso; si osserva la luce trasmessa dal sample.

Transmission

Magnification

infinity optical systems: a parallel beam is formed between the objective and he tube lens.

f-number: $\frac{f}{D} = \frac{1}{2\tan\vartheta}$

f: lunghezza focale,
D: diametro
ϑ: angolo tra l'asse ottico e il raggio più largo che viene dal campione

Numerical aperture: $NA = n \sin\vartheta$
n: indice di rifrazione

github.com / elisabettagnello

Numerical Aperture and f-number

28

$$NA = n \sin\theta$$

n: refractive index of the medium in which the object is immersed
used for objectives

$$f/\# = f/D = 1/2\tan\theta$$

f: focal length
D: diameter
used for lenses

L'obiettivo e' l'ultima lente del microscopio, quella piú vicina al sample (o specimen). E' caratterizzato da 2 parametri:

- focal lenght f : distanza tra la lente e il sample
- diametro D : e' solitamente fissa (2-3 cm)

per questo motivo il parametro realmente importante e' f

f e D definiscono un angolo ϑ
Le onde luminose che formano l'immagine passano attraverso il campione ed entrano nell'obiettivo sotto forma di un cono rovesciato.
ϑ e' l'angolo dato dal raggio piú obliquo proveniente dal campione

f definisce sia il valore dell'ingrandimento che il numero di raggi (angular acceptance), da quest'ultimo dipende la quantità di informazioni ricevuta dal sample

Risoluzione: e' la distanza minima tra 2 punti di un campione tale per cui i 2 punti possono ancora essere considerati come distinti

gitlab.com/elisabettagiello

Numerical Aperture: $N.A. = n \sin\vartheta$

n: indice di rifrazione del mezzo tra il sample e la front lens
solitamente il mezzo è aria quindi $n=1$
usando un mezzo con un grande n si può ottenere N.A. più grande

L'apertura numerica di un obiettivo descrive l'angolo del cono di luce che può essere accettato dall'obiettivo. Maggiore è N.A., più ampio è il cono e più luce l'obiettivo raccoglie dal campione.
Maggiore è N.A., maggiore è l'ingrandimento.

Detectors: il rivelatore può essere l'occhio umano
in microscopia digitale si usano le fotocamere digitali, che sono sensibili a lunghezze d'onda fuori dallo spettro visibile e con alta risoluzione

github.com / elisabettagnello

SORGENTI LUMINOSE

La sorgente più usata è la lampadina ad incandescenza alogena; è costituita da un filamento di tungsteno in cui passa una forte corrente.
Il tungsteno ha una alta resistenza, perciò si scalda molto al passaggio di corrente. Il tungsteno ha un alto punto di fusione, perciò può raggiungere temperature molto alte.
Il suo spettro coincide con quello di un corpo nero a 3300 K (picco verso il rosso, coda nel blu → motivo per cui emettono luce gialla).

Il fatto che queste lampadine emettano molte radiazioni "inutili" nell'infrarosso e meno radiazioni nel visibile, costituisce un problema in microscopia. Per questo motivo viene inserita in uno specchio metallico che riflette la luce visibile; la funzione (matematica) della riflettività dello specchio "corregge" lo spettro di emissione della lampadina

github.com/ elisabettagnello

Moltiplicando la funzione della riflettività per lo spettro della lampadina, si ottiene uno spettro continuo nel visibile e privo di IR (quella parte di radiazione viene trasmessa dallo specchio).
Questo tipo di specchi che riflette parte della radiazione e ne trasmette un'altra in base alla frequenza, prende il nome di specchio dicroico.

La presenza dell'alogeno nella lampada, ne allunga la "vita" e porta lo spettro da 3000 K a 3300 K.

Lampada fluorescente (a scarica): è costituita da un tubo riempito con del gas (come neon o mercurio) le cui estremità vengono polarizzate, generando un campo elettrico. Nel tubo, a causa dell'eccitazione termica, alcuni atomi si ionizzano. Gli ioni sono accelerati da $\bar{E}$ e collidono con gli altri atomi ionizzandoli. Gli e^- liberi tendono a rilegarsi agli atomi con con conseguente emissione di fotoni.

Quindi è basata sull'emissione luminosa per luminescenza da parte di un gas ionizzato. La ionizzazione è ottenuta tramite una differenza di potenziale che porta gli ioni ad urtare con gli atomi.
Questo tipo di lampada ha un grande efficienza nella conversione corrente applicata → luce emessa.
Svantaggio: ha uno spettro che segue il modello di Lorentz, quindi presenta delle discontinuità, per ovviare questo problema si usa il fenomeno di fluorescence down-conversion (fotoni ad alta energia → r a bassa energia) (da UV a VIS).

github.com/elisabettagnello

Sincrotrone: la luce viene emessa da elettroni accelerati posti in presenza di un campo magnetico. La luce è emessa principalmente nei raggi x.

LED: è un semiconduttore che emette luce per ricombinazione elettrone-lacuna. Ci sono LED che emettono luce di colore blu, rosso o verde, e per questo lo spettro ha dei picchi in corrispondenza di quei colori.
Per avere luce bianca o si uniscono LED di tutti e 3 i colori, o si prende un solo LED e si pittura con un colore fluorescente.

SEMICONDUTTORI (alla base dei LED e delle fotocamere digitali)

Un semiconduttore è un materiale (cristallo) con resistività intermedia tra metalli e isolanti.

In un isolante o un semiconduttore, si definisce come banda di valenza quella della struttura elettronica a bande più alta in energia fra quelle occupate da elettroni. La banda di conduzione per gli elettroni di un isolante è inaccessibile. La distanza tra il più alto livello di valenza e il più basso livello di conduzione è detta energy gap. Nel mezzo del gap vi è il livello di Fermi.

Negli isolanti E_{GAP} è enorme, nei semiconduttori è più piccola, è dell'ordine dell'energia dei fotoni nel visibile ($\sim \hbar\omega_{VIS}$)

$E_{GAP} \sim \hbar\omega_{VIS}$ → questa proprietà rende i semiconduttori interessanti per quanto riguarda l'emissione della luce.

Possiamo studiare l'occupazione dei livelli usando la statistica di Fermi-Dirac.

Semiconduttore intrinseco:
Poiché a T ambiente, $E_{GAP} \gg K_b T$ non vi sarà alcuna presenza di e^- statisticamente rilevante nella banda di conduzione.

giulia.gnt / elisabettagnetto

Semiconduttore drogato: è un semiconduttore in cui è stato aggiunto un piccolo numero di impurità. Gli impurity states sono livelli energetici che possono essere occupati e che si trovano molto vicino la banda di conduzione. La distanza tra la banda di conduzione e un impurity state è dell'ordine di $\sim K_b T$, quindi per la statistica di F-D è possibile portare un e^- da un impurity state alla banda di conduzione.
Se l'impurity state è vicino la banda di conduzione: drogaggio-N
Se l'impurity state è vicino la banda di valenza: drogaggio-P

Se si aggiunge il P che ha $5e^-$ come impurità nel Si che ha $4e^-$, si formerà la stessa struttura cristallina che si sarebbe formata con 4Si, quindi vengono usati $4e^-$ del P ed $1e^-$ rimane libero.

drogaggio-N: si aggiunge un atomo con un e^- in più

drogaggio-P: si aggiunge un atomo con un e^- in meno

Assorbimento ottico: quando un fotone incide su un semiconduttore, la sua energia viene trasferita agli elettroni del materiale. Affinché avvenga questa interazione, l'energia del fotone deve essere almeno uguale a E_{GAP} del semiconduttore. Se il fotone ha abbastanza energia, esso eccita un elettrone dalla banda di valenza a quella di conduzione. Quando l'elettrone lascia la banda di valenza, crea una lacuna in questa banda.
L'elettrone nella banda di conduzione e la lacuna nella banda di valenza sono liberi di muoversi, contribuendo alla conduzione di corrente.
Se l'elettrone e la lacuna si avvicinano nuovamente, possono ricombinarsi rilasciando energia.
Questo fenomeno è alla base del funzionamento dei fotodiodi.

Fotorivelatore: è un dispositivo in grado di rivelare la radiazione EM, fornendo in uscita un segnale avente un'intensità di corrente proporzionale all'intensità della radiazione rilevata.
I fotorivelatori a fotodiodo si basano sulle cariche fotogenerate in una giunzione P-N.

appunti di elisabetta gallo

P-N JUNCTION:

quando si uniscono le 2 parti (N e P), dopo qualche μs, gli e^- e le lacune dopo un random walk si ricombinano. Tale ricombinazione produce delle cariche negative extra nella parte P e delle cariche positive extra nella parte N. Lontano dal punto di giunzione sono neutri perché lí non c'è ricombinazione. La zona vicina al punto di giunzione è non-conducting

Con il termine giunzione p-n si indica l'interfaccia che separa le parti di un semiconduttore sottoposte a drogaggio di tipo differente. La giunzione p-n è composta di due zone: una con un eccesso di lacune (strato p) e una con eccedenza di elettroni (strato n). Le eccedenze di elettroni e lacune si ottengono mediante drogaggio. La regione di confine tra i blocchi di tipo P e di tipo N è detta regione di carica spaziale (o di svuotamento); in questo volume i portatori, rispettivamente del lato p e del lato n, di fronte al forte gradiente dovuto al diverso tipo di drogaggio, diffondono nel semiconduttore adiacente (generando una corrente di diffusione), lasciando non compensati gli atomi ionizzati dei droganti, i quali a loro volta genereranno una differenza di potenziale, un campo elettrico e, spostando i portatori, una corrente di trascinamento che si oppone a quella di diffusione. La differenza di potenziale costante generata dagli ioni di materiale drogante è chiamata tensione di

Incidendo su una giunzione P-N con della luce, i fotoni incidenti vanno a generare una coppia elettrone-lacuna. Tale coppia risente del campo elettrico statico di built-in. La lacuna in P si sposterà lontano dal punto di giunzione, mentre e^- raggiungerà la parte neutra del materiale N. Quindi gli elettroni e le lacune, a causa di $\bar{E}$ built-in, vanno rispettivamente nella parte neutra di N e P, e non possono piú ricombinarsi.

A questo punto chiudendo il circuito e mettendo un amperometro, questo misurerà una corrente pari a $\frac{2e}{\Delta t}$ corrispondente all'assorbimento di un fotone.

ogni volta che un fotone viene assorbito si genera un picco di corrente pari a $\frac{2e}{\Delta t}$

Si può realizzare un device costituito da una matrice di 10^6 P-N junctions, ciascuno dei quali costituisce un pixel ed è elettricamente isolato dagli altri. Ogni pixel ha 2 contatti elettrici per misurare la corrente.
La corrente può essere digitalizzata con un convertitore (ADC) e si può creare il file.

Materiale: silicio

E_{GAP} Si : 1.1 eV $\longrightarrow$ un P-N junction in Si può rilevare fotoni con $E > 1.1$ eV, ovvero dall'infrarosso in su

Processo inverso in cui la corrente non viene misurata, ma mandata in input: fotodiodo con produzione di luce

github.com/elisabettagnello

Digital imaging

conversione immagine da analogica a digitale:

- la corrente viene digitalizzata in un formato bit-based (solitamente con max 6 bit)

pericolo della discretizzazione del sample: perdita di info, per evitarlo bisogna scegliere un numero di pixel sufficiente
La dimensione del pixel nella fotocamera è fissato (~ μm), quindi bisogna scegliere il giusto obiettivo affinché il segnale analogico possa essere convertito in digitale senza perdere info. Quindi bisogna scegliere il giusto ingrandimento, in quanto questo è correlato alla frequenza di campionamento (= distanza tra i pixel nell'immagine).

Le immagini digitali sono composte da una matrice di pixel rettangolare o quadrata, ciascuno rappresentato da una coppia di coordinate (x, y) in un sistema cartesiano. La qualità dell'immagine digitale, o risoluzione, dipende dal numero totale di pixel. La risoluzione spaziale descrive il numero di pixel utilizzati per costruire un'immagine digitale ed è determinata dalla frequenza di campionamento. Un'adeguata frequenza di campionamento è fondamentale per rappresentare correttamente l'immagine analogica originale. Se il campionamento è insufficiente, si perdono dettagli significativi.

CCD (Charge-Coupled Device) e CMOS (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) sono due tipi di sensori utilizzati per catturare immagini digitali.
Un sensore CCD cattura la luce attraverso fotodiodi su una griglia. La carica generata da ciascun fotodiodo viene trasferita, pixel per pixel, verso un'area di lettura comune. Qui, le cariche vengono convertite in segnali elettrici e successivamente digitalizzate.
Un sensore CMOS utilizza un'architettura diversa in cui ogni pixel ha un proprio amplificatore e convertitore analogico-digitale (ADC) integrato. Ciò consente di convertire la luce in segnali elettrici direttamente all'interno di ogni pixel, eliminando la necessità di un trasferimento di carica.
Il CCD offre prestazioni superiori in termini di qualità dell'immagine, mentre il CMOS si distingue per velocità, efficienza e costi ridotti.

DIFFRAZIONE

limite di diffrazione: limite fisico per cui è impossibile vedere tramite la luce dei campioni più piccoli di un certo valore

Principio di Huygens-Fresnel: formulazione matematica basata sulla Scalar Optics Theory, ovvero una teoria in cui la luce è definita come una grandezza scalare complessa che dipende da spazio e tempo:

$$\tilde{E}(x,y,z,t) = E_0 e^{i\varphi} = E_0 e^{i(\omega t - \bar{k}\cdot\bar{r})}$$

La luce viene definita come un'onda (non necessariamente EM), con:

- ampiezza $E_0 \in \mathbb{R}$
- frequenza $\omega = kc$, c = velocità della luce
- $|\bar{k}| = \frac{2\pi}{\lambda}$, λ = lunghezza d'onda
- intensità $I_0 = |E_0|^2$

Consideriamo una sorgente puntiforme che genera onde sferiche in ogni direzione e che è completamente isotropa.
Consideriamo di osservare la sorgente da un punto di osservazione P, con coordinate $\bar{r}_P = (x_P, y_P, z_P)$ rispetto O.

Se non ci sono ostacoli e lo spazio è omogeneo, sappiamo che:

$$E(P) = E(\bar{r}_P, t) = \frac{E_0}{|\bar{r}_P|} e^{i(\omega t - \bar{k}\cdot\bar{r}_P)} \qquad (1)$$

t non è rilevante perché è un problema stazionario.

Vogliamo ritrovare la (1) sommando su tante piccole onde, le **WAVELETS**
Le wavelets sono generate da altri punti dello spazio $Q^{(i)}$ con $i = 1, 2, \dots, N$
L'interferenza generata dalle wavelets ci restituirà il valore di E in P

Ciò viene fatto perché vogliamo poter introdurre ostacoli o pezzi non omogenei ed è più comodo "dividere" il problema in tanti pezzi.

github.com/elisabettagnello

Principio di Huygens-Fresnel: ogni elemento $Q^{(i)}$ della superficie sferica Q può essere considerato come una sorgente di onde secondarie sferiche, le wavelets.

Quindi si calcola E in $Q^{(i)}$ e poi si considera ciascuna $Q^{(i)}$ come sorgente di onde secondarie, le wavelets; E in P si calcola come la somma su tutte le wavelets:

$$E(P) = \sum_{Q^{(i)}} E(Q^{(i)})$$

* Poiché le $Q^{(i)}$ si trovano sulla medesima superficie sferica, hanno tutte la stessa ampiezza, sono tutte identiche sulla superficie. Ciò che può cambiare è la distanza tra $Q^{(i)}$ e P, o l'indice di rifrazione del mezzo, o la somma può essere limitata solo ad alcune $Q^{(i)}$ a causa della presenza di ostacoli.

Questo modello si avvicina a ciò che accade realmente: la materia assorbe quanti di luce e li riemette come se fosse una sorgente secondaria.

· coseni direttori: $\cos\chi$ con χ angolo compreso tra $\overline{OQ^{(i)}}$ e $\overline{Q^{(i)}P}$

$S(\chi) := \overline{Q^{(i)}P}$

$$E(P) = \underbrace{E(Q)}_{} \int_{-\pi}^{\pi} d\chi \, \frac{e^{iKS(\chi)}}{S(\chi)} \underbrace{K(\chi)}_{}$$

(Kirchoff diffraction integral)

E(Q) = prefattore* uguale per ogni wavelets, è il valore di E quando arriva in Q

Kernel, è fissato dalla geometria e dagli indici di rifrazione del problema è l'unica parte che cambia nelle diverse situazioni

Se non ci sono ostacoli e lo spazio è omogeneo: $K(\chi) = 1 + \cos(\chi)$

github.com/elisabettagnello

Fraunhofer diffraction theory: la sorgente O è molto distante dalle wavelets Q, che a loro volta sono molto lontane da P

hp: lo strumento ottico utilizzato ha dimensioni (a) molto minori della distanza fra O e lo strumento stesso (r_Q)

$r_Q \gg a$

hp2: lo strumento ottico utilizzato ha dimensioni (a) molto minori della distanza fra lo strumento e l'osservatore (s), ma molto maggiori della lunghezza d'onda

$s \gg a \gg \lambda$

Con queste approssimazioni si possono usare le onde piane (che sono parallele ai punti di osservazione).

Consideriamo l'obiettivo del microscopio come se fosse uno schermo opaco infinito con una apertura nel mezzo.
Consideriamo anche uno schermo costituito da diversi punti d'osservazione

github.com/ elisabettagnello

1° CASO:

schermo infinito con una fenditura molto sottile.
la formulazione della diffrazione di Fraunhofer è valida nel limite $a \sim \lambda$, ma anche se $a \gg \lambda$

consideriamo che la larghezza della fenditura sia $2a$
chiamiamo ϑ l'angolo formato tra l'asse ottico e il raggio che parte dal centro dell'obiettivo e arriva ad un punto di osservazione

consideriamo l'apertura come costituita da tante sorgenti sferiche $Q^{(i)}$, poiché sono molto lontane dalla sorgente, possiamo considerarle come onde piane

$$E(\vartheta) = E(Q) \int_{-a}^{a} dy' \, e^{iK(y' \sin\vartheta)} = A \frac{\sin(\rho)}{\rho} \quad ; \quad \rho := Ka \sin\vartheta$$

sullo schermo di osservazione si creerà un pattern che è funzione di ρ (e quindi di ϑ):

$$I(\rho) = |E|^2 \propto \left| \frac{\sin(\rho)}{\rho} \right|^2$$

primo minimo per:

$$\sin\vartheta^* = \frac{\lambda}{2a}$$

Se $a \gg \lambda$: $\sin\vartheta^* = \frac{\lambda}{2a} \longrightarrow 0$ quindi si avrà luce solo per $\vartheta = 0$
l'effetto della diffrazione è trascurabile

Se $a \sim \lambda$: la regione centrale illuminata sullo schermo non è puntiforme

Se $a < \lambda$: la regione illuminata sullo schermo è più ampia

Notiamo subito che se a è molto maggiore della lunghezza d'onda, otteniamo un massimo principale stretto, e questo ci riporta al caso della semplice interferenza (a dimostrazione del fatto che la diffrazione è un caso speciale di interferenza fra onde). Viceversa, per valori di a nell'ordine della lunghezza d'onda, ad esempio $a = \lambda$ otteniamo un massimo che si annulla in $\Delta \sin\theta = 2$, ovvero in $\theta = \pi/2$: il fenomeno della diffrazione è ora decisamente evidente. Risulta importante sottolineare quindi che la diffrazione si verifica sempre, ma la sua rilevanza dipende dal valore di a.

In microscopia è importante solo la larghezza del massimo principale.

github.com / elisabettagnello

2° CASO:

fenditura circolare di raggio a
suddividiamo la fenditura circolare in tante piccole aperture e applichiamo la formula della singola fenditura (trovata prima) a ciascuna apertura usando il fatto che: $2a \gg dy'$
Ciascun contributo sarà pesato in base alla lunghezza dell'apertura considerata: quelle al centro pesano di più

fattore per pesare: $2\sqrt{a^2-y'^2}$ (= area della singola apertura)

$$E(\vartheta) = E(Q)\int_{-a}^{a} dy'\, e^{iK(y'\sin\vartheta)}\, 2\sqrt{a^2-y'^2}$$

$$= E(Q)\int_{-1}^{1} d\left(\frac{y'}{a}\right) e^{i\rho\frac{y'}{a}}\sqrt{1-(y'/a)^2}$$

$$= A\,\frac{\pi J_1(\rho)}{\rho} \quad ; \quad J(\rho) = \text{funzione di Bessel}$$

$$I(\rho) \propto \left|\frac{J_1(\rho)}{\rho}\right|^2$$

primo minimo per: $\sin\vartheta^* = 1.22\,\frac{\lambda}{2a}$

$$\rho^* = 3.83$$

Quando l'apertura è un foro circolare, la figura di diffrazione consta di un disco luminoso centrale circondato da una serie di corone circolari alternativamente scure e chiare. Il pattern di diffrazione risultante prende il nome di Disco di Airy.

github.com / elisabettagnello

Criterio di Rayleigh: quando 2 sorgenti puntiformi S_1 e S_2 sono viste sotto un angolo

$$\vartheta_R = 1.22 \frac{\lambda}{D} \quad ; \quad D: \text{diametro}$$

il primo minimo della figura di diffrazione di una sorgente coincide con il picco dell'altra. Tale valore è l'angolo minimo risolvibile.

- In un microscopio:

Consideriamo che la sorgente puntiforme O sia il campione, la fenditura circolare sia l'obiettivo e lo schermo sia l'occhio (o fotocamera).

Spot size on camera: $f \cdot \tan\vartheta^* \sim f \cdot \sin\vartheta^* = f \cdot 1.22 \frac{\lambda}{D} = 1.22\,\lambda \underbrace{\left(\frac{f}{D}\right)}_{\text{F-NUMBER}}$

quanto larga appare una sorgente puntiforme in camera

Spot size on camera = smaller laser spot

Limite della risoluzione della fotocamera si ha quando lo zero del 1° campione è in corrispondenza del massimo del 2°
distanza minima per cui i campioni sono ancora distinguibili

Si può agire su f e D affinché il picco dell'Airy disk assomigli ad una distribuzione a δ di Dirac e la risoluzione aumenti; bisogna aumentare D e diminuire f. Per questo vogliamo che nei microscopi l'obiettivo sia molto vicino al campione.

Abbe's formulation of diffraction limit

The Airy disk of each emitter is overlapping with the neighboring emitters.
The Numerical Aperture of the objective defines the width of the Airy disk and therefore it defines *d*, or the minimum resolvable distance between objects (or the minimum object size).

$$d = \frac{\lambda}{2n\sin\theta} = \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}$$

with NA = $n \sin(\theta_{max})$
maximum aperture angle of the objective

n: refractive index of the medium in which the sample is immersed
(Rayleigh limit is recovered by setting n=1 and approximating the first zero of $J_1(x) = 3.83 \approx \pi$)

Se si usa un olio con n maggiore, migliora la risoluzione.

elisabettagnello

Point Spred Function

Data una sorgente puntiforme da cui parte un raggio che passa attraverso la lente di un obiettivo, l'immagine che ne risulterà su uno schermo posto a distanza focale f, non sarà un punto ma un disco di Airy.
Con il termine Airy disk si fa riferimento solo al disco più centrale.
La funzione che descrive l'intera immagine è la Point Spread Function.
La PSF è una funzione bidimensionale definita nel piano dello schermo:

$$PSF = PSF(x,y)$$

È una caratteristica di ciascun microscopio.

Wide Field illumination: tutto il campione viene illuminato simultaneamente.

Ogni punto del campione può essere considerato come una sorgente di wavelets.
A causa dell'apertura finita della lente dell'obiettivo, si ha diffrazione e sullo schermo si ottiene un Airy disk.

grandezza molecola grande : $10^{-9}\,m \ll \lambda \sim 10^{-7}\,m$

distanza focale $f \sim 1\,m$

diametro dell'Airy disk: $\frac{f \cdot 1.22\,\lambda}{D_{\sim cm}} \sim \frac{1 \cdot 10^{-7}}{10^{-1}} \sim 10^{-6}\,m$ = microm

$10^{-6}\,m$ = ordine di grandezza minimo rilevabile con la luce visibile

diametro dell'Airy disk >> grandezza molecola grande
↓
l'immagine ottenuta è molto più grande del campione

Se in un raggio dell'ordine di $10^{-8}\,m$ ci sono più molecole, non è possibile capire quale ha emesso luce ⟶ diffraction limit

github.com/elisabettagnello

In una P-N junction bisogna scegliere la grandezza dei pixel: non ha senso scegliere pixel < 1μm perché ciascun pixel al meglio produrrà l'immagine di un Airy disk, non avrebbe senso distribuire un Airy Disk in più pixel. Quindi un pixel è grande circa come un Airy disk.

$$O(x_o, y_o) = \iint O(u,v)\,\delta(x_o - u, y_o - v)\,du\,dv$$

perfect image identical to the object — object — ideal, M=1

any value of M

$$I(x_o, y_o) = \iint O(u,v)\,\mathrm{PSF}(x_i/M - u, y_i/M - v)\,du\,dv$$

real image, magnified — object — real PSF is not a delta function!

L'immagine ideale è la convoluzione dell'oggetto per una funzione a δ

L'immagine reale è la convoluzione dell'oggetto per la PSF

Optical Transfer Function: trasformata di Fourier della PSF

Con un'ampia apertura senza aberrazioni, l'OTF diminuisce gradualmente con la frequenza spaziale.
Con una piccola apertura e aberrazioni, l'OTF decade più rapidamente e mostra una risposta peggiore per le alte frequenze spaziali.

Nel caso senza aberrazioni, la PSF è compatta e ben definita.
Nel caso con aberrazioni, la PSF è più ampia e presenta anelli, indicando una perdita di risoluzione.

Con un'ampia apertura senza aberrazioni, l'immagine di un pattern radiale appare nitida e ben contrastata.
Con una piccola apertura e aberrazioni, l'immagine appare sfocata e con un contrasto ridotto, specialmente nelle alte frequenze spaziali.

github.com/elisabettagnello

Fino ad ora abbiamo analizzato gli effetti della diffrazione solo nel tratto dall'obiettivo allo schermo.
Ora vogliamo vedere se c'è una perdita di informazioni nel passaggio dalla sorgente luminosa all'obiettivo → nuova definizione di diffraction limit

LIMITE DI DIFFRAZIONE - OTTICA FOURIER

luce descritta come una grandezza scalare: $E(x,y,z,t) = E_0\, e^{-i(\omega t - \bar{k}\cdot\bar{r})}$

ignoriamo la dipendenza temporale: $E(x,y,z,t) = E_0\, e^{i\bar{k}\cdot\bar{r}}$

Fourier optics: definiamo la trasformata di Fourier bidimensionale nel piano perpendicolare all'asse ottico.

$k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 = |\bar{k}|^2 = \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \longrightarrow K_i \leq \frac{2\pi}{\lambda}$

oggetto: $E(x,y,0)$

TF dell'oggetto: $\tilde{E}(k_x,k_y) = \iint dx\,dy\; E(x,y,0)\; e^{-i(k_x x + k_y y)}$

ATF: $E(x,y,0) = \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} dk_x\, dk_y\; \tilde{E}(k_x,k_y)\; e^{i(k_x x + k_y y)}$

oggetto $(z=0)$

il termine esponenziale usato in qualsiasi trasformata di Fourier in questo caso coincide con quello di propagazione presente nella definizione di onda.

immagine: $E_I(x,y,z) = E(x,y,0)\; e^{i k_z z}$ (oggetto propagato lungo z)

$k_z = \pm\sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2}$ con $(k_x^2 + k_y^2) \leq \frac{2\pi}{\lambda}$

github.com / elisabettagnello

$$E_I(x,y,z) = E(x,y,0)\, e^{ik_z z}$$

$$= \int_{-\infty}^{+\infty}\int_{-\infty}^{+\infty} dk_x\, dk_y\, \tilde{E}(k_x,k_y)\, e^{i(k_x x + k_y y)}\, e^{\pm i\sqrt{k^2-k_x^2-k_y^2}\, z}$$

trasformata di Fourier dell'immagine

Se $k^2 - k_x^2 - k_y^2 > 0 \longrightarrow e^{\pm i\sqrt{k^2-k_x^2-k_y^2}}$ e' un termine oscillante (chiamato propagatore), non cambia nulla

Se $k^2 - k_x^2 - k_y^2 < 0$, la radice e' immaginaria e l'esponente diventa reale in questo caso, l'exp comporterà o un decadimento o un ingrandimento, escludiamo quest'ultimo perchè comporta dei termini che esplodono

in questo caso quindi $(k_x^2 + k_y^2)$ e' maggiore di $\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2$

solo i punti che sono dentro la circonferenza di raggio $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ possono essere trasmessi come luce
nei punti esternni alla circonferenza, la TF e' nulla poiche' $\exp(\pm i\sqrt{k^2-k_x^2-k_y^2})$ decade molto velocemente.

github.com/elisabettarnello

in un microscopio, l'obiettivo ha una certa N.A. fissata, quindi esiste un certo valore massimo per ϑ, segue che può trasmettersi solo la luce con: $k_x^2 + k_y^2 < k^2 \sin^2\vartheta$ quindi possono trasmettersi meno punti rispetto a quelli permessi dalla condizione $k_x^2 + k_y^2 < k^2$

Quando si rifà l'ATF, il quadrato non ha più bordi sharp e ben definiti, in quanto con la prima TF si sono perse le info con $k_x^2 + k_y^2 > k^2 \sin^2\vartheta$, si sono perse principalmente le info sulle diagonali.

Il limite di diffrazione quindi è causato dalla perdita di molte componenti ad alta frequenza della trasformata di Fourier dell'oggetto; queste componenti sono perse perchè hanno $k_x^2 + k_y^2 > k^2 \sin^2\vartheta$ e il loro propagatore diventa esponenzialmente decrescente

Se si sceglie un obiettivo con N.A. maggiore, ϑ_{max} è più grande e la qualità dell'immagine è migliore, poichè aumentano le componenti di Fourier che vengono considerate.

dato un ϑ_{max}:

limite di diff. sperimentale — limite di diff. teorico

$$\sqrt{k_x^2 + k_y^2} \leq k \underbrace{(\sin\vartheta_{max})}_{\text{N.A. con } n=1} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \text{N.A.} \quad \left(< \frac{2\pi}{\lambda} \right)$$

Limite di diffrazione di Abbe: $d_{min} = \dfrac{\lambda}{2\,\text{N.A.}}$

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2\,\text{N.A.}} = \frac{\pi}{\sqrt{k_x^2 + k_y^2}}$$

Il massimo raggio che si può avere per il cerchio nel piano della trasformata di Fourier dell'immagine corrisponde alla minima distanza

elisabettagnetto / github.com

Recap:
Data la natura ondulatoria della luce, risulta facile e vantaggioso studiare problemi di imaging con l'analisi di Fourier; in quanto sia le onde luminose che le TF sono espresse in termini di cos/sin.
tutte le componenti di Fourier dell'oggetto che sono all'interno della optical transfer function (Fourier filter) formano la TF dell'immagine, quelle all'esterno vengono perse.
In questo contesto il ruolo di NA è quello di aumentare il raggio della optical transfer function, in modo da farlo avvicinare a $R_{max} = \frac{2\pi}{\lambda} = K$
il raggio non potrà mai essere esattamente uguale a R_{max} perchè NA non può mai essere esattamente uguale a 1. Se NA fosse 1 sarebbe possibile prendere anche i raggi paralleli al piano x-y, cosa che non è possibile

Wide field: la sorgente luminosa è estesa ed illumina un'ampia porzione del campione, creando un'immagine estesa

A causa del limite della diffrazione non si possono vedere le molecole nè la struttura interna delle cellule.

github.com/ elisabettagnello

MICROSCOPIO CONFOCALE

Tutti i microscopi risentono del limite di diffrazione.
Per superare questo limite si usa il microscopio confocale. Non si usa più la wide field illumination, ma si illumina un punto alla volta e poi si ricombinano tutte le immagini per averne una globale dell'intero campione.

concetti chiave:

1. usare lo stesso obiettivo in illumination e collection, in modalità di reflection microscope.
   Se si usano 2 obiettivi identici ai 2 lati del campione, è un microscopio a trasmissione.

2. pinhole: schermo con un'apertura molto piccola
   in questo modo sorgente e detector sono puntiformi
3. beamsplitter dicroico: è il componente che consente di usare lo stesso obiettivo in illumination e collection.

Usando un unico obiettivo e i pinholes, esiste un unico tragitto possibile per i raggi dalla lampada al campione e dal campione al detector.

Dalla sorgente luminosa (laser, LED), la luce viene diffratta dall'apertura. Il beamsplitter manda i raggi nella lente dell'obiettivo che focalizza i raggi sul focal plane del campione. Il campione riflette i raggi. Il beamsplitter fa passare parte della luce verso il rivelatore. Se il pinhole è posizionato correttamente nel fuoco posteriore dell'obiettivo, passano solo i raggi che partono dal pinhole dell'apertura (4). In questo modo i raggi emessi dal campione con un angolo diverso (in rosso) che sono fuori dal piano focale (out off focus), formeranno l'immagine lontano dal rivelatore (*) e non colpiranno il pinhole (2) nel centro ma sullo schermo. Se al posto del pinhole si usa un'apertura più grande, si raccoglieranno tutti i raggi, anche quelli esterni al piano focale, cosa che non accade con il pinhole che seleziona solo i raggi sul piano focale.

elisabettagnello.com / elisabettagnello

Svantaggio: solo una piccola frazione di luce viene effettivamente usata e raggiunge il rivelatore. E' diventato vantaggioso solo dopo l'invenzione dei laser.

Con questo microscopio si possono creare immagini in 3D oltre che in 2D, muovendo l'obiettivo lungo l'asse z (ad esempio per i nuclei delle cellule).

Voxel : elemento di volume di una immagine (versione 3D del pixel)
non e' esattamente un cubo perche' lungo l'asse z la risoluzione e' piú bassa che sul piano x-y. E' un cilindro ($d \sim \lambda$, $h \sim 10\lambda$)

Con un microscopio confocale si possono rilevare campioni piú piccoli, come i virus (~200 nm).

Si puo' anche usare un pinhole "digitale" usando solo alcuni pixel di una fotocamera.

Point Spread Function

Passando 2 volte nell'apertura, la PSF del microscopio confocale è data da:

$$PSF_c = PSF_a^2$$

Point Spread Function dell'apertura

Al posto dell'Airy Disk si avrà il quadrato del disco, con $FWHM_c$ che è:

$$FWHM_c = \frac{1}{\sqrt{2}} FWHM_a$$

Nel piano x-y, in un microscopio confocale la risoluzione migliora di un fattore $\sqrt{2} \sim 1.4$

se si usa un laser (sorgente coerente): $\Delta x \sim \frac{0.82\lambda}{\sqrt{2}\ N.A.}$

se la sorgente non è un laser: $\Delta x \sim \frac{1.22\lambda}{\sqrt{2}\ N.A.}$

Δx equivale $\frac{1}{2} d_{min}$, quindi è più piccolo del limite di diffrazione di Abbe di un fattore $\sqrt{2}$

La risoluzione assiale prima non c'era, ora è: $\Delta z \sim \frac{4.4\ \lambda}{2\pi (NA)^2}$

$\Delta z \sim 10\ \Delta x$

In realtà, quindi, l'intensità nel cono di luce che raggiunge il rivelatore non è omogenea, ma ha un picco al centro $\longrightarrow$ fascio gaussiano

Il modo migliore per usare un microscopio confocale è in riflessione.

github.com / elisabettagnello

Microscopio confocale in trasmissione:

in questo caso il condenser deve fungere da "secondo obiettivo", per questo si usano 2 lenti uguali.

il condenser deve deve essere messo in una posizione precisa in modo che il fuoco del condenser coincida con quello dell'obiettivo. Questa configurazione è più difficile da realizzare di quella in riflessione.

Dark-field microscopy:

configurazione usata con campioni opachi che non trasmettono radiazione.
Illuminando con un grande angolo e raccogliendo con un piccolo angolo, si raccoglie solo la luce diffusa o deviata (scatterata).
La luce non deviata va fuori dall'obiettivo

è sempre confocale

darkfield, confocal

VIS confocal microscopy reflection vs. fluorescence

- Detection of unlabeled cells in a population of fluorescently labeled cells
- Imaging the interactions between fluorescently labeled cells growing on opaque, patterned substrata,

HERE: neurons growing on a silicon substrate and labeled with an antibody to microtubule associated protein

Fluorescence (next lecture): only cells are visible on a dark background

Reflection (this lecture): both cells and background are visible (the green color is the true color of the fluorescent dye)

https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/confocal-reflection-microscopy

Per vedere sia le cellule che il background si deve usare un microscopio confocale in riflessione con la stessa lunghezza d'onda per illumination e collection.
Anche in darkfield non si illumina il background, si usa con cellule non fluorescenti.

elisabettagnello

FLUORESCENCE

Il microscopio confocale è particolarmente utile in fluorescence microscopy.

Un campione fluorescente irradiato con luce con lunghezza d'onda λ_1, riemette luce con lunghezza d'onda λ_2, con $\lambda_2 > \lambda_1$ (Stokes shift). Quindi cambia la lunghezza d'onda di illuminazione e detection. Ciò consente di mettere dei filtri in modo che nel detector non arrivino altre lunghezze d'onda oltre λ_2.

Vantaggio microscopio confocale + fluorescenza: è possibile localizzare con precisione il centro del campione.

L'altro vantaggio è legato all'effetto di photobleaching, grazie al quale l'emissione fluorescente non dura per sempre, dopo che l'emissione è avvenuta si deve aspettare un po' affinché possa riavvenire e nell'arco di tempo in mezzo non accade nulla anche se viene illuminato. Questo effetto risulta vantaggioso con il microscopio confocale perché dopo aver illuminato un punto, mentre questo è in fase di recupero, si può illuminare il voxel adiacente.

$\lambda_2 > \lambda_1 \longrightarrow \hbar\omega_2 < \hbar\omega_1$

github.com / elisabettapapello

Funzione d'onda di una molecola: $\psi_{TOT}(\bar{r}, \bar{R}, s)$

Approssimazione di Born-Oppenheimer:

$M \gg m_e$ quindi $V_e \gg V_v$

$$\psi_{TOT} = \psi_e(\bar{r}, \bar{R}) \cdot \psi_v(\bar{R}) \cdot \psi_s$$

$$\hat{H}_e \psi_e(\bar{r}) = E_e \psi_e(\bar{r})$$ hamiltoniana elettronica

$$\left(\sum_N \frac{p^2}{2M} + E_e(\bar{R}) \right) \psi_v(\bar{R}) = E_v \psi_v(\bar{R})$$ hamiltoniana nucleare

Le funzioni d'onda elettroniche si possono ottenere assumendo che i nuclei siano fermi.
La distanza R tra i due nuclei viene assunta fissa e pari a R_i con i=1,2,...,n; si risolve l'equaz. di Schroedinger in modo approssimato ottenendo un valore di E=E_i.
La curva ottenuta è il potenziale di Morse.

Approx. armonica: il potenziale di Morse vicino al minimo viene approssimato da una parabola → oscillazioni armoniche
gli stati eccitati per il nucleo sono stati vibrazionali descritti dalle funzioni d'onda dell'oscillatore armonico (Polinomi di Hermitte)
la loro energia è definita da ω_{vib} : $E_v = n\hbar\omega_{vib}$

Con l'approx. di B-O, si passa da una funzione d'onda complicata che dipende dalle coordinate elettroniche e nucleari, e dallo spin, ad una funzione d'onda fattorizzata. Fattorizzando si ottiene una funzione orbitale che dipende dalle coordinate dei nuclei, una funzione (~) armonica (Polinomi di Hermitte) e un termine di spin.

(in materia condensata non ci sono rotazioni)

gitHub.com / elisabettagnello

Principio di Franck-Condon :

dipolo totale di una molecola: $\bar{P}_{TOT} = -e \sum_i (\bar{r}_{i,E} - \bar{r}_{i,eq}) + e \sum_I Z_I (\bar{R}_{I,E} - \bar{R}_{I,eq})$

spostamento degli e^- dalla posizione di equilibrio a causa di un campo E

termine nucleare (o ionico)

funzione d'onda della molecola: $|\psi_{TOT}\rangle = |\psi_e \cdot \psi_v \cdot \psi_s\rangle$

la funzione d'onda totale è approssimata fattorizzandola in 3 contributi: elettronico, nucleare e di spin

Quando la luce visibile colpisce la molecola, il fotone interagisce con gli elettroni e si ha una transizione elettronica da uno stato elettronico (ψ_e) ad un altro (ψ_e'). Vogliamo capire cosa accade a ψ_v e ψ_s nel mentre.

ψ_e e ψ_e' dipendono dallo stesso valore di $\bar{R}$, perché mentre avviene la transizione elettronica i nuclei non hanno tempo di ricombinarsi (approx. di B-O).

$\psi_v^{(e')}(\bar{R})$ è una diversa funzione d'onda, che dipende dalla nuova forma dell'orbitale.

La coordinata del ground-state cambia: $\bar{R}_0 \neq \bar{R}_0'$

Per B-O la transizione elettronica deve essere verticale (stessa $\bar{R}$) poiché stiamo supponendo che i nuclei siano fermi. Se consideriamo una transizione verticale e supponiamo di partire dal GS di ψ_e', non finiremo nel GS di ψ_e', ma in uno stato vibrazionale eccitato ψ_v' con $v>0$.

github.com / elisabettagiallo

Il nuovo stato vibrazionale ψ'_v occupato sarà il primo con un discreto overlap con il GS. E' quello che in $\bar{R}_0$ ha una ampiezza di probabilità alta.

Quindi a causa del gap tra $\bar{R}_0$ e R_0', e a causa del fatto che stiamo considerando i nuclei fermi ($\bar{R} = \bar{R}'$), e' impossibile partire dal GS vibrazionale ($\psi_{v=0}$) e arrivare al GS vibrazionale mentre si effettua una transizione elettronica. Si arriverà ad uno stato vibrazionale eccitato ψ'_v con $v > 0$.

hamiltoniana di interazione in approx. di dipolo: $H_{int} \simeq \bar{P}_{TOT} \cdot \bar{E}_{RAD} = (\mu_e + \mu_v)$

$\bar{E}$ della radiazione

elementi di matrice elettr. e nucleare

probabilità di transizione:

$$W = \langle \psi' | H_{int} | \psi \rangle$$

$$= \langle \psi'_e \, \psi'_v \, \psi'_s | (\mu_e + \mu_v) | \psi_e \, \psi_v \, \psi_s \rangle$$

usando l'approx. di B-O possiamo separare i 2 integrali

github.com/elisabettagnello

$$= \langle \psi_e' | \mu_e | \psi_e \rangle \langle \psi_v' | \psi_v \rangle \langle \psi_s' | \psi_s \rangle + \underbrace{\langle \psi_v' | \mu_v | \psi_v \rangle}_{\sim 0 \text{ con luce visibile}} \overset{0}{\overset{\shortparallel}{\langle \psi_e' | \psi_e \rangle}} \langle \psi_s' | \psi_s \rangle$$

perchè ψ_e, ψ_e' sono ortogonali

Se si usano gli infrarossi è $\neq 0$

Si usa luce visibile, quindi si effettua una transizione elettronica e non nucleare.

$$= \langle \psi_e' | \mu_e | \psi_e \rangle \langle \psi_v' | \psi_v \rangle \langle \psi_s' | \psi_s \rangle + \cancel{\langle \psi_v' | \mu_v | \psi_v \rangle \langle \psi_e' | \psi_e \rangle \langle \psi_s' | \psi_s \rangle}$$

$$= \langle \psi_e' | \mu_e | \psi_e \rangle \quad \langle \psi_v' | \psi_v \rangle \quad \langle \psi_s' | \psi_s \rangle$$

orbital selection rule: l'orbitale deve cambiare

$\neq 0$

spin selection rule: in una transizione ottica S non cambia

$\langle \psi_v' | \psi_v \rangle$: fattore di Franck-Condon

Poiché ψ_v' e ψ_v non appartengono allo stesso set di soluzioni armoniche (corrispondono a ψ_e diverse), non sono ortogonali e il prodotto scalare è non nullo. È il termine che ci dice quale stato vibrazionale finale è il più popolato.

L'assorbimento del fotone avviene in ~ femto secondi.
L'energia vibrazionale viene dissipata in ~ pico secondi e si arriva al GS vibrazionale $\psi_{v=0}'$ con dis-eccitazioni vibrazionali.
Per tornare al punto di partenza si deve considerare un'altra transizione verticale (linea verde). Anche in questo caso, scendendo non si ricadrà in corrispondenza del GS vibrazionale ψ_v.
In questa transizione si perde energia con emissione di un fotone.
Infine per tornare allo stato iniziale ci sarà una dis-eccitazione vibrazionale.
A causa della simmetria del potenziale, se si passa da $\psi_{v=0}$ a $\psi_{v=2}'$, quando si scende si passerà da $\psi_{v=0}'$ a $\psi_{v=2}$.

Github.com/elisabettagnello

Il fotone riemesso quindi avrà $\lambda_2 > \lambda_1$

$$\hbar\omega_1 = \hbar\omega_2 + 2\,\underbrace{\hbar\omega_{vib}}$$

distanza energetica tra stato di partenza e di arrivo

$\hbar\omega_1 = \hbar\omega_2 + 2\hbar\omega_{vib} \longrightarrow 3\,eV = 2.8\,eV + 2\cdot 0.1\,eV$

non è una grande differenza energetica ma a livello di λ si cambia colore

$\lambda_1 = 450\,nm$ (blu) $\longrightarrow \lambda_2 = 500\,nm$ (verde)

La riflessione comporta un leggero shift verso il blu rispetto allo spettro di assorbimento.
Nel caso della fluorescenza, invece, c'è uno shift verso il rosso

Quando si usa il microscopio confocale + fluorescenza, si ottiene un'immagine che è del colore associato a λ_2 di emissione, su uno sfondo nero. Il colore associato a λ_1 è stato filtrato da un filtro, quindi non si vede.
Si possono usare molecole fluorescenti con diversa λ di emissione, effettuare 2 scan diversi usando dei filtri per rimuovere l'altro colore e poi sovrapporli per ottenere un'immagine con 2 colori diversi.

Si può usare il microscopio confocale anche per fare microscopia fuori dal visibile: in UV, raggi X...
Questo perché nel processo di imaging non si usa una fotocamera, ma un detector di singolo pixel, che consente di andare in qualsiasi range di λ.
Usando un detector di singolo pixel si può mettere uno spettrometro in quanto in questo caso c'è solo un canale di output. Lo spettrometro non può essere usato con una fotocamera digitale, in cui ci sono migliaia di pixel.
Hyperspectral imaging: processo in cui si realizza l'immagine di un campione e per ciascun punto si rileva l'intero spettro.

github.com / elisabettagnello

Figure 2

laser: sorgente monocromatica con una sola λ

filtro: seleziona solo la luce con la λ del laser

Si illumina il campione solo ad una λ, quindi si seleziona solo uno stato vibrazionale.

Specchio dicroico: riflette la luce con λ del laser e trasmette solo la luce emessa dal campione fluorescente.

filtro 2: viene messo per sicurezza davanti il detector

Con il laser, al posto di usare un xyz stage per fare uno scan del campione muovendolo direttamente, si può muovere il laser molto velocemente con un galvanometer e tenere fermo il campione.

github.com / elisabettagnello

Green Fluorescent Protein (GFP)

In cell and molecular biology, the GFP gene is frequently used for expression of fluorescent proteins (the GFPs) by non-fluorescent species.

Many animals have been created that express GFP, which demonstrates a proof of concept that a gene can be expressed throughout a given organism, in selected organs, or in cells of interest.

GFP can be introduced into animals or other species through transgenic techniques, and maintained in their genome and that of their offspring.

To date, GFP has been expressed in many species, including bacteria, yeasts, fungi, fish and mammals, including in human cells. (2008 Nobel Prize in Chemistry)

238 amino acid residues (26.9 kDa)
Network of beta sheets (blue)
Beta-Barrel contains chromphore
Beta turns (red)
Alpha helix (purple)
Unfolded (green)
Chromophore (ylw)

si possono modificare geneticamente degli animali per renderli fluorescenti (topi, vermi...)

e' la molecola responsabile della fluorescenza

Figure 1

→ widefield

→ confocal
permette di guardare all'interno del campione

Fluorescence Microscopy

- Measure of the fluorescence emission intensity across a given object object plane. Excitation can be widefield (UV lamp/LED) or confocal (Laser)
- **Fluorescence microscopy** of tissues, cells, or subcellular structures, which is accomplished by labeling an antibody with a fluorophore and allowing the antibody to find its target antigen within the sample.
- Labelling multiple antibodies with different fluorophores allows visualization of multiple targets within a single image (multiple channels). DNA microarrays are a variant of this (see below).
- Immuno-fluorescence: An antibody is first prepared by having a fluorescent chemical group attached, and the sites (e.g., on a microscopic specimen) where the antibody has bound can be seen, and even quantified, by the fluorescence.
- FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) can be used to detect certain bio-molecular interactions that manifest themselves by influencing fluorescence lifetimes.
- Cell and molecular biology: detection of colocalization using fluorescence-labelled antibodies for selective detection of the antigens of interest

per monitorare le reazioni chimiche

github.com / elisabettagiallo

Fluorescenza nel sequenziamento

Sequencing

Sequencing means to determine the primary structure of a biopolymer:

- DNA sequence of basis A, T , C , G *(secondary: double strand helix)*
- RNA seuqence of basis: A, U , C , G *(secondary: single strand helix)*
- Protein sequence of aminoacids: Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile Leu Lys Met Phe Pro Ser Thr Trp Tyr *Val (secondary: helix, sheet, coil or unfolded structures)*

3 basi
↓
1 amminoacido

The Central Dogma of molecular biology states that once "information" has passed into protein it cannot get out again. In more detail, the transfer of information from nucleic acid to nucleic acid, or from nucleic acid to protein may be possible, but transfer from protein to protein, or from protein to nucleic acid is impossible. Information means here the precise determination of sequence, either of bases in the nucleic acid or of amino acid residues in the protein. *Francis Crick, 1958*

una proteina non può sintetizzare il DNA

The enzyme Polymerase

A polymerase is an enzyme that synthesizes long chains of polymers or nucleic acids. DNA polymerase and RNA polymerase are used to assemble DNA and RNA molecules, respectively, by copying a DNA template strand using base-pairing interactions or RNA by half ladder replication.

ethereum / elisabetarello

Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR nei laboratori non viene usata per duplicare il DNA, ma per sequenziarlo.

PCR nel sequenziamento dei geni:

Si parte da un frammento di DNA che viene diviso in 2 singoli filamenti (doppia elica "unfolded").
Viene aggiunta una struttura all'inizio e alla fine del frammento come marker per indicare l'inizio e la fine.
Si usa una flow cell su cui vengono attaccati i vari frammenti, metà si legano dal tratto iniziale e metà da quello finale. Si usa una soluzione contenente la polimerasi e delle basi. La polimerasi crea spontaneamente una copia del frammento (ripetendo il processo si ottengono tante copie). Si attacca una diversa molecola fluorescente a ciascuna base nella soluzione. La base fluorescente non emette luce fin quando non si lega alla sua base "sorella" del frammento di DNA copiato. Osservando la sequenza di colori diversi si risale alla sequenza delle basi.
Si osservano tante copie simultaneamente per motivi statistici, in modo da ottimizzare i tempi. In questo caso dalla risoluzione del microscopio dipende la minima distanza tra 2 copie.

Quantitative PCR: la PCR si sfrutta per realizzare test (es. covid) che indicano la quantità di virus presente in un campione. Si ripete molte volte il processo e si conteggia il segnale fluorescente legato al virus.

elisabettagnello.com / elisabettagnello

Coefficienti di Einstein

1. consideriamo un atomo/molecola preparato nello stato 2 ad un certo punto, a causa della life-time finita degli stati eccitati, ci sarà un decadimento nel GS con possibile emissione di un fotone. Questo fenomeno prende il nome di **emissione spontanea**. (es. fluorescenza)

$$\frac{dn_1}{dt} = A_{21} \cdot n_2$$

A_{21}: coeff. di emissione spontanea

n_i = densità di popolazione dello stato

(causata da fluttuazioni del vacum field)

2. consideriamo un atomo nel GS che viene illuminato con un laser. L'atomo può assorbire un fotone e salire allo stato 2. Questo fenomeno prende il nome di **assorbimento**; non può avvenire in modo spontaneo, è necessaria una radiazione esterna.

$$\frac{dn_1}{dt} = -B_{12}\, n_1 \cdot \rho(\nu)$$

B_{12}: coeff. di assorbimento

$\rho(\nu)$: **radiation density** (dipende dalla sorgente lum.)

3. **emissione stimolata**: $\frac{dn_1}{dt} = +B_{21}\, n_2 \cdot \rho(\nu)$

tutti i fotoni sono uguali tra di loro, hanno stessi ω, $\bar{k}$ e polarizzazione di quelli iniziali. È necessario che all'inizio vi siano già dei fotoni, a differenza di quella spontanea che può avvenire anche al buio ed è indipendente dall'intensità EM.

$\cdot B_{21} = B_{12}$

All'equilibrio termodinamico, la somma di tutti i termini deve essere nulla.

probabilità di occupazione: $n_1 = e^{-\varepsilon_1/k_bT}$ $\quad n_2 = e^{-\varepsilon_2/k_bT}$

github.com / elisabettagnello

LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

non c'è quasi assorbimento, l'emissione è sia spontanea che stimolata ma quest'ultima è molto più intensa, quindi si può trascurare quella spontanea.

questo perché ci sono molti atomi nello stato eccitato ($n_2 = 1$) e o nel GS ($n_1 = 0$) (population inversion).

Componenti di un Laser:
1) Mezzo ottico attivo
2) Energia fornita al mezzo ottico
3) Specchio
4) Specchio semiriflettente
5) Fascio laser in uscita

Nel laser si sfrutta il mezzo attivo, il quale possiede la capacità di emettere radiazioni elettromagnetiche (fotoni) quando attivato. Dal mezzo attivo dipende la lunghezza

Come dice la stessa sigla (LASER → Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation), la radiazione laser proviene dal processo di emissione stimolata.
Normalmente la luce che attraversa un materiale viene assorbita dal materiale stesso man mano che avanza, cioè cede energia agli atomi che incontra, eccitandoli, perché li trova in uno stato energetico "basso". Se però interveniamo eccitando gli atomi del materiale con una fonte di energia esterna, allora secondo l'analisi di Einstein le probabilità che avvengano l'emissione stimolata e l'assorbimento sono date dalla percentuale di atomi eccitati a fronte di quella di atomi nello stato energetico base:

$$P_{esp} = BN_2\rho(v_{12})$$

$$P_{ass} = BN_1\rho(v_{12})$$

dove B è il coefficiente di Einstein, N1 è la popolazione dello stato a energia E1 e N2 è la popolazione dello stato a energia E2; (E2 > E1); ρ(v12) è la densità del campo di radiazione alla frequenza v12 = (E2 - E1)/h.
Da questo si vede che se riusciamo a ottenere una inversione di popolazione, cioè se ci sono più atomi eccitati che atomi normali, la luce che attraversa il materiale guadagnerà potenza invece di perderla: cioè verrà amplificata dall'emissione stimolata degli atomi.

github.com/ elisabettagnello

Il principio di funzionamento del laser

- Quando un elettrone nel livello più basso viene investito da un fotone con la giusta energia E_f, l'elettrone passa ad un livello di energia superiore
- La differenza di energia tra il livello iniziale e quello finale è pari all'energia del fotone incidente

- Quando un nuovo fotone, della stessa energia E_f investe l'atomo, l'elettrone eccitato decade al livello fondamentale emettendo un fotone della stessa energia e nella stessa direzione di quello incidente
- Tale processo è denominato **emissione stimolata**

- Un fotone incide su un atomo del mezzo attivo in uno stato eccitato
- Per emissione stimolata, dopo l'interazione si ottengono due fotoni: quello incidente e quello emesso

- I due fotoni ottenuti dalla prima interazione incidono su altri due atomi nello stato eccitato
- Per emissione stimolata da ogni atomo emergono due fotoni della stessa frequenza che si propagano nella stessa direzione
- Dopo ogni interazione il numero di fotoni è raddoppiato

- Dopo N interazioni il numero di fotoni è diventato 2N
- Con un adeguato numero di atomi nello stato eccitato il mezzo attivo si comporta da amplificatore
- Quindi se viene creata la possibilità per i fotoni di passare più volte attraverso il mezzo attivo, si ottiene una continua amplificazione del fascio, un continuo incremento del numero di fotoni che lo costituiscono e dunque della sua energia

L'inversione di popolazione

Popolazione normale
(equilibrio termico)

- All'equilibrio termico la maggior parte degli atomi si trova nel livello energetico più basso 0, detto stato fondamentale
- Questa è la condizione in cui si trovano gli atomi di un qualsiasi materiale ed è la più favorevole perché corrisponde allo stato la cui energia è la minima possibile
- Pochi atomi si trovano nel livello 1, primo eccitato
- Quasi nessun atomo si trova negli altri livelli

Inversione di popolazione

- Il mezzo attivo viene stimolato normalmente tramite luce emessa da una lampada a flash o da diodi
- Gli atomi saltano così nel livello energetico 3, il più elevato
- Grazie a questo effetto della stimolazione luminosa sugli atomi del mezzo attivo, tale processo viene detto **pompaggio**
- Dopo un breve tempo decadono nel livello 2, che ha una maggiore stabilità
- La transizione tra il livello 2 e il livello 1 è utilizzata per generare la luce laser e l'amplificazione si ottiene quando il numero di atomi nel livello 2 è maggiore di quelli nel livello 1

ethanb.com / ethanbsaggiaeanello

STED (microscopia a esaurimento delle emissioni stimolate)

depletion

FRANK-CONDON

Consideriamo il fenomeno della fluorescenza e aggiungiamo una seconda sorgente esterna come un laser (k_{STED}), con lunghezza d'onda simile a quella di emissione fluorescente. Il laser causerà una emissione stimolata delle molecole che si trovano nel GS vibrazionale dello stato elettronico eccitato (S_1).
Ne segue una "depletion", ovvero si annulla la popolazione di quello stato in modo che non possa più esserci fluorescenza.
Per poter fare microscopia, bisogna illuminare solo parte del campione con questo secondo laser in modo da lasciare che una zona del campione sia fluorescente; in questo modo è possibile localizzare con precisione da dove arriva la fluorescenza.
Non si usa un semplice laser*, ma uno con delle forme particolari; il più usato è a forma di doughnut (01*).
Un laser donut ha intensità nulla al centro e diversa da 0 altrove.

General limited-energy solutions of the wave equation in cylindrical symmetry:

$$I_{pl}(\rho,\varphi) = I_0 \rho^l \left[L_p^l(\rho)\right]^2 \cos^2(l\varphi) e^{-\rho}$$

where $\rho = 2r^2/w^2$, L_p^l is the associated Laguerre polynomial of order p and index l, and w is the spot size
The Gaussian beam 00 is the most commonly observed solution, but it is not the only one
The donut beam 01* is the superposition of two 01 modes with pattern rotated by 90°

*produce un fascio gaussiano

Per ottenere un fascio donut bisogna inserirne una phase plate ruotata di 45° rispetto all'asse di polarizzazione del fascio del laser.
Si può ottenere anche con un vortex plate con una singolarità al centro.
Oppure con un axicon.

si sceglie una λ diversa per quella stimolata e spontanea, in modo da poter separare i 2 fasci con lo specchio dicroico.

La fluorescenza non proviene dall'intera Point Spread Function del fascio laser di eccitazione, ma solo dal centro del fascio donut.

L'errore associato alla posizione del campione fluorescente, non corrisponde a quello dell'Airy Disk, ma corrisponde alla grandezza dello spot nero centrale del fascio STED (non dipende dal limite della diffrazione).

github.com / alisabettagnello

L'emissione spontanea (verde) richiede un intervallo di tempo proporzionale al life-time dello stato eccitato (~ ns) e coinvolge poche molecole.
L'emissione stimolata è istantanea con l'arrivo del fascio STED, avviene prima di quella spontanea.
Tra le 2 emissioni c'è una separazione temporale, spettrale e spaziale.

grafico rosso: profilo di un donut beam, è dato da 2 gaussiane una dopo l'altra. È la soluzione in coordinate cilindriche della funzione d'onda. Se si aumenta sempre di più l'intensità, si raggiunge una saturazione di depletion, perché non si possono esaurire più parti di quelle eccitate. In questo modo il grafico di emissione STED migliora sempre di più, avvicinandosi ad una δ.

La definizione di limite di risoluzione in questo modo è funzione dell'intensità del laser.
Quindi il limite ultimo della risoluzione non è dato dalla diffrazione, ma è dato dalla precisione dell'apparato realizzato per muovere il fascio e posizionarlo sul campione. L'errore sulla posizione del fascio corrisponde all'errore sulla posizione della molecola.
10 nm è la massima risoluzioni per la STED, ed è limitata da motivi prettamente meccanici.

Si può usare la STED per migliorare i processi di sequenziamento.

Con la STED si può fare microscopia in super-risoluzione (= va oltre il limite di diffrazione).

github.com/elisabettagnello

Se si usa la tecnica STED senza saturazione, il limite di risoluzione sarà sempre dato dalla diffrazione. Quando si giunge in saturazione, si ha:

$$N^{o} \text{ di fotoni} \sim N^{o} \text{ di fluorofori}$$

Si entra in regime di saturazione quando ci sono talmente tanti fotoni da poter eccitare tutti gli atomi che possono esibire fluorescenza (fluorofori).

Si entra in regime di super-risoluzione solo quando si è in saturazione.

N^{o} di fotoni è proporzionale all'intensità del fascio laser STED.

Quando il laser è abbastanza intenso, si può superare di molto la soglia di saturazione (es. $\times 10\ I_{SAT}$) e in questo caso si ha depletion praticamente ovunque tranne che in una piccola porzione al centro del donut beam. In questo caso:

$$N^{o} \text{ di fotoni} \gg N^{o} \text{ di fluorofori}$$

È importante che la transizione sia reversibile, in quanto per formare l'immagine bisogna eseguire uno scan di ogni punto del campione.

RESOLFT: REversible Saturation of Optical Fluorescent Transition

Risoluzione: $\Delta x = \dfrac{\lambda}{2\,N.A.\sqrt{1+\dfrac{I_{MAX}}{I_{SAT}}}}$, λ del donut beam

github.com/elisabettagnello

Microscopia GSD (Ground State Depletion)

Invece di esaurire con l'emissione stimolata lo stato eccitato, si può esaurire il GS, "mettendo" gli atomi del GS in una optical shelf, ovvero in uno stato in cui non partecipano più a fotoactivity (non assorbono ne emettono luce) per un certo lasso di tempo. In questo modo, solo pochi fluorofori al centro del donut beam che non sono stati messi nella optical shelf (e che sono rimasti nel GS) potranno emettere luce.

Nella STED c'è: eccitazione, depletion ed infine emissione.
In questo caso invece cambia l'ordine: in primis depletion, poi eccitazione ed infine emissione.

Analogie GSD e STED:

- il depletion beam è a forma di donut;
- come beam di eccitazione si usa un laser che è limitato dal limite della diffrazione;
- è necessaria la saturazione per far sì che la radiazione provenga da un piccolo punto al centro del donut beam;
- tutte le transizioni (tra cui quella nella optical shelf) devono essere reversibili, perché si vuole eseguire uno scan del sample molto velocemente.

Tempo necessario affinché gli elettroni tornino al GS dalla optical shelf: μs
ovvero tornano DOPO che tutti i fluorofori rimasti nel GS hanno emesso luce

1. eccitazione istantanea (femto sec)
2. rilassamento negli stati vibrazionali più bassi in pico secondi
3. emissione fluorescente in nano sec
4. ritorno dei fluorofori dalla optical shelf al GS in micro sec
5. il donut beam può essere spostato nel punto adiacente e il processo può ricominciare.

gitthub.com / alessandragnello

Per la selection rule dello spin, nelle transizioni ottiche lo spin deve restare invariato. Quindi ΔJ deve dipendere solo da un cambiamento del numero quantico molecolare orbitale e non da S.
Quindi solitamente durante la transizione si passa dal GS di singoletto, ad uno stato eccitato sempre di singoletto (S rimane invariato).

E' possibile rompere la selection rule con un effetto di secondo ordine, come l'accoppiamento spin-orbita (prodotto scalare tra $\bar{L}$ e $\bar{S}$).
Rompendo la selection rule si può effettuare una transizione dal GS di singoletto ad uno stato eccitato di tripletto. Poiché questa transizione è molto rara, si può usare lo stato eccitato di tripletto come optical shelf.

- Per Frank-Condon:
  tramite l'assorbimento di un fotone, si eccita la molecola dal GS elettronico e vibrazionale, ad uno stato elettronico e vibrazionale eccitato. Poi si ha una vibrational ladder con cui avviene la dis-eccitazione/rilassamento vibrazionale in un tempo ~ pico sec. Fino a quando non si raggiunge il GS vib dello stato elettronico eccitato di singoletto e si può avere emissione fluorescente.

- In realtà ad un certo punto la vibrational ladder entra in risonanza con lo stato vib eccitato del tripletto. Questo stato è diverso da quello di singoletto ed ha una energia inferiore. Se avviene una risonanza perfetta tra S_1 e T_1, può avvenire una resonant tunneling (= trasferimento di un elettrone da uno stato ad un altro con la stessa energia).
  Una volta in T_1, l'e^- continua la dis-eccitazione vib, fino a raggiungere il fondo di T_1.

La transizione radiativa da T_1 a S_0 è detta fosforescenza.
Si arriva ad uno stato vib diverso da quello raggiunto con la fluorescenza, e il fotone ha una energia inferiore. La fosforescenza è molto più lenta della fluorescenza perché in quella transizione si deve rompere la selection rule dello spin (μs ÷ ms).

Si usa la fosforescenza per realizzare la optical shelf.

github.com / elisabettagnello

I fluorofori posti nella optical shelf si chiamano blinking fluorofori.

Problema: quando le molecole sono in T_1 possono reagire facilmente con l'ossigeno O_2 che è anch'essa in uno stato di tripletto. Bisogna quindi proteggere il campione con della cera/colla/olio ... Ciò non può essere fatto su campioni vivi.

Intersystem crossing can be seen as a vibrational+electronic transition that breaks the spin selection rule, which is possible due to spin-orbit coupling.

A fluorophore that undergoes intersystem crossing to the triplet excited state no longer fluoresces and instead remains in the triplet excited state, which has a relatively long lifetime, before phosphorescing and relaxing back to the singlet ground state so that it may continue to undergo repeated excitation and fluorescence.

Fluorescence and phosphorescence are competitive methods of relaxation.
This process in which fluorophores temporarily do not fluoresce is called blinking.
While in the triplet excited state, the fluorophore may undergo photobleaching, a process in which the fluorophore reacts with e.g. molecular oxygen (also a triplet), which can lead to the loss of the fluorescent characteristic of the fluorophore.

Recap:

1. Eccitazione del sample con un donut beam per un lasso di tempo lungo (molti microsecondi), finché tutte le molecole non passano dal GS allo stato di shelf. Il fascio luminoso deve essere molto intenso.

2. Il sample viene illuminato con un secondo fascio di eccitazione che può avere la stessa λ del primo (si può usare un solo laser a differenza della STED). Il fascio può essere un fascio gaussiano standard di bassa intensità.

3. Vibrational ladder ed emissione fluorescente ad una λ diversa.

4. Bisogna aspettare ~ms, finché non avviene la fosforescenza.

5. Scan in un punto adiacente.

PRO rispetto STED: si può usare un solo laser
CONTRO rispetto STED: più lento a causa della fosforescenza

risoluzione: 20 nm

github.com/elisabetta-nelli

Ultrafast Pulsed Lasers

- Electrical switching cannot be faster than tens of nanoseconds 10^{-8} s
- Ultrafast pulsed lasers are all-optical (no elettrical) devices that store the energy of a laser beam for some time and concentrate it in a single "burst" or "pulse" event, which is periodic
- Any pulse length can be obtained down to tens of femtoseconds 10^{-14} s
- Pulse energy is inversely proportional to pulse period (total number of photons per pulse, relevant for excitation of spontaneous emission):
- Peak power is inversely proportional to pulse duration (photon density per unit time, relevant for absorption and stimulated emission):

	duration	period	pulse energy	peak power at focus	notes
Ti:Sa oscillator	10^{-14} s	10^{-7} s	0.1 mJ	10^{10} W/cm^2	fluorophores idle for long time fraction (nsec relax)
Reg. Amplifier	10^{-14} s	10^{-5} s	10 mJ	10^{12} W/cm^2	>1 photon per molecule simultaneously → depletion
Picosec Ti:Sa	10^{-11} s	10^{-7} s	0.1 mJ	10^{7} W/cm^2	allows thermalization during the pulse → excitation

github.com / elisabettagrillo

Confocal time-resolved fluorescence microscopy (FLIM)

Super-resolved stimulated emission depletion (STED)

Super-resolved ground-state depeltion (GSD)

Laser numbers for saturation (RESOLFT)

REversible Saturation of OpticaL Fluorescence Transitions: RESOLFT (inlcudes STED, GSD).
"Saturation" means that each molecule in the focal volume is reached by 1 photon.
The lateral resolution depends on the ratio between depletion laser intensity I_{max} and the saturation threshold I_{sat}.

$$d \approx \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}\sqrt{1+\frac{I_{max}}{I_{sat}}}}$$

(if the saturation threshold is not surpassed, we are still within the diffraction limit for confocal microscopes. Intensity=peak power)

SAMPLE
Avogadro number: 10^{22} molecules/cm^3
Depth of focus in confocal microscopy (z-axis resolution): 10^{-6} m= 10^{-4} cm $\Delta z = 2 \cdot \lambda$
Sheet density of molecules (pixel): $10^{22}*10^{-4}=10^{18}$ molec/cm^2 $= N_{2D} = N_A \cdot \Delta z$
Of which approx. 0.1% are fluorescent (labels, or gene expression): 10^{15} fluorophores/cm^2
RESOLFT
=> the **saturation threshold** corresponds to a laser flux density of 10^{15} photons/cm^2
Energy of 1 photon: 4 eV = $7*10^{-19}$ J ≈ 10^{-18} J → **Energy of one laser pulse**: 10^{-3} J/cm^2
(1 cm^2 is a good number for a laser beam section, so this means 1 mJ total pulse energy)

STED laser numbers: for saturation-depletion, we have to stimulate ALL molecules in the doughnut BEFORE the molecules in the central spot spontaneously emit fluorescence (10^{-9} s)
Picosecond lasers: pulse duration = 10^{-12} s, **peak power=energy/duration = 10^9 W/cm^2 = I_{sat}**
Average power (relevant for **photodamage**): should be $P < 10^2$ W/cm^2 (solar irrad. 0.01 W/cm^2 !!).
P=I*(duration/period)=(pulse energy/period) => period > 10^{-5} s to avoid photodamage
=> I_{max} cannot be much larger than I_{sat} say max 10 times.
Minimum resolution in practice is limited by photodamage: d ≈ λ/2NA*√10 = only 1/3 of confocal!
Problem: period > 10^{-5} s >> fluorescence lifetime 10^{-9} s => fluorophores idle for 99.99% of exp. time

La risoluzione migliora di un fattore 10, da 250 nm a 25 nm.

Energia fotone rosso = 2eV
Energia fotone blu = 4eV

github.com / elisabettagnello

Stochastic Optical Reconstruction Microscopy - STORM

Se si ha un Airy disk che copre più di un pixel della fotocamera, si può eseguire un fit con una gaussiana per sapere dove si trova il centro del disco.

oversampling

La posizione delle molecole spazialmente isolate è determinata dall'intensità del loro pattern di emissione in ciascun pixel . La precisione di localizzazione, σ_loc, dipende dal numero di fotoni che sono stati rilevati ed è molto più alta rispetto alla deviazione standard della distribuzione di intensità dell'emettitore σ_PSF (larghezza della PSF).

$$\sigma_{LOC} = \frac{\sigma_{PSF}}{\sqrt{N_{FOT}}}$$

This works for Isolated emitters, very far one from the other (distance d >> Δx PSF)
But in real samples molecules are much closer to each other (diffraction limit)
So one has to find a way to make the molecules fluorescent **one at a time** and record many images of the same scene until the entire scene is reconstructed:
Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)

Each "bright spot" can correspond to several overlapping molecule emissions (remember the Rayleigh criterion...) but the intensity of the Gaussian fit function can be used to deconvolve the number of molecules (all fluorophores are nominally identical and should emit the same average number of photons in a given time).

gitHub.com / elisabettagnello

È necessario che le molecole siano lontane tra di loro e isolate.
Si usano molti pixel.

La STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) è una tecnica di microscopia a super-risoluzione che permette di ottenere immagini dettagliate oltre il limite di diffrazione della luce, arrivando a risoluzioni nanometriche.
Utilizza fluorofori che possono essere attivati e disattivati in modo stocastico (casuale). Solo un sottoinsieme casuale di fluorofori si illumina in ciascun ciclo di acquisizione. Ripetendo cicli di attivazione e disattivazione, si raccolgono numerose immagini in cui diverse sottopopolazioni di fluorofori sono attive. Successivamente, attraverso algoritmi di localizzazione, si determinano con precisione le posizioni dei singoli fluorofori, ricostruendo un'immagine a super-risoluzione combinando tutte le localizzazioni ottenute.
Raggiunge una risoluzione di circa 20-30 nm.

Potential energy landscape

Nello schema ideale si ha un sistema a 2 livelli: GS, stato eccitato.

In realtà (b), ci sono molti minimi secondari. Quindi quando un fluoroforo viene eccitato, può ricadere in un minimo secondario invece che nel GS. Si tratta del fenomeno di blinking, un fenomeno per cui il fluoroforo non funziona per un lasso di tempo, fin quando non torna nel GS per causa di eccitazioni termiche/random walk stocastiche.

Per controllare il fenomeno di blinking, si devono usare 2 laser diversi: un beam di eccitazione standard per la fluorescenza e un beam UV che fa rieccitare il fluoroforo caduto nel minimo secondario. Questo viene eccitato ad un livello così alto che poi può solo ricadere nel GS.

hub.com/elisabettagnello

Fluoroforo: proteina fluorescente, anticorpi fluorenti, "tinte" fluo, elementi inorganici fluo...

github.com / elisabettagnello

Photo-Activeted Localization Microscopy - PALM

I fluorofori vengono preparati nel dark state, nel quale non possono interagire con la luce.
Il laser per l'eccitazione fluorescente resta sempre acceso.
Ad un certo punto un LED UV poco intenso e limitato dal limite di diffrazione, illumina il campione. Poiché il LED ha una intensità molto bassa, solo alcuni fluorofori vengono attivati stocasticamente.
La fluorescenza viene rilevata e si esegue un fit.
Dopo pochi cicli (idealmente uno solo), il fluoroforo torna nel dark state e non interferisce più nell'esperimento.
Si rimanda luce UV e si attivano altri fluorofori e così via.

A. fluorescence excitation laser always ON (488 nm, large PSF, it does not limit resolution)
B. stochastic photoactivation laser turns ON (UV, 405 nm, low power, small PSF)
C. the few photoactivated proteins start to fluoresce, several single-photon frames recorded

wide field

D. as the number of emitted photons increases, molecules are first localized...
E. ...and then photo-bleach (red cross) and are removed form the experiment
F. when all activated molecules have photo-bleached, return to B: new molecules activated.

github.com/elisabettagnello

PALM setup

funziona solo in 2D quindi si deve usare

The 2-dimensional sample condition is realized by TIRF: Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

ci sono solo onde evanescenti che si propagano sulla superficie

TIRF microscopy objective is imilar to a darkfield objective: only the large incidence angles are sent to the sample. The immersion oil and the glass slide form the critical-angle medium

Electron-Multiplying CCD camera for single photon detection

co-localization = capire se 2 molecole sono legate

Single-particle-tracking PALM (sptPALM). The trajectories of the fluorescent proteins were used to compare the distribution and dynamics of two viral proteins on the cell membrane. The molecules were localized in each frame and their determined positions in consecutive frames were linked into tracks. The tracks in Figure 10(a) represent molecules that remained fluorescent for more than 0.75 seconds (plotted as different colors to distinguish individual tracks). The diffusion coefficient for each track was determined and plotted as a filled circle at the start of the track (Figure 10(b)). Each track has been assigned a color based on its diffusion value. Spatially resolved maps of single-molecule diffusion coefficients revealed strikingly different diffusional behavior (blue: not diffusing, red: diffusing),

SIM - Structured Illumination Microscopy

- molecole (DNA, proteine) $\sim 5 \div 10$ nm
- diff. limit (widefield) : $d \sim \frac{\lambda}{2\,N.A.} \sim \frac{\lambda}{2} \sim 250$ nm
- diff. limit (confocal) : $d \sim \frac{\lambda}{2\,N.A.\sqrt{2}} \sim 150$ nm
- STED e GSD (confocal) : $d \sim \frac{\lambda}{2\,N.A.} \frac{1}{\sqrt{1 + I/I_{SAT}}} \sim 50$ nm
- PALM-STORM (widefield 2D) : $d \sim 20$ nm

SIM : widefield 2D-3D

Si migliora la risoluzione di un fattore 2 rispetto al limite della diff

$$d \sim \frac{\lambda}{2\,N.A.} \cdot 0.5 \sim 125 \text{ nm}$$

frequency mixing:

consideriamo di avere un segnale sinusoidale: $E_1 \sin(\omega_2 t)$

il ricevitore ha un filtro passa-basso:

solo le basse frequenze sono captate, quelle alte vanno perse

consideriamo che il segnale che vogliamo inviare abbia una frequenza maggiore di quella di cut-off : $\omega_2 > \omega_{cut\,off}$

moltiplichiamo il nostro segnale per un altro con frequenza ω_1 (carrier sig)

$$E_1 \sin(\omega_2 t) \cdot E_2 \sin(\omega_1 t)$$

$$= \frac{1}{2}\left[\cos((\omega_1 - \omega_2)t) + \cancel{\cos((\omega_1 + \omega_2)t)}\right]$$

battimenti

$\omega_2 + \omega_1 > \omega_{cut\,off}$ quindi viene perso

github.com / elisabettagnello

Se $(\omega_1 - \omega_2) < \omega_{cut\,off}$, $\cos((\omega_1 - \omega_2)t)$ può essere rivelato
Poiché ω_1 è nota in quanto viene scelta, si può risalire a ω_2

Lo stesso approccio può essere usato in ottica.

Spatial frequency mixing:

2D fourier transform

il microscopio può essere visto come un rivelatore con filtro passa-basso, nel dominio dei $\bar{k}$:

per il limite di diff.: $K_{cut\,off} \sim \frac{2\pi}{\lambda} N.A.$

consideriamo $K_2 > K_{cut\,off}$ e applichiamo una modulazione spaziale tale che

$|K_1 - K_2| < K_{cut\,off}$, possiamo osservare dettagli geometrici che corrispondono a $\bar{k}$

maggiori di $K_{cut\,off}$

Si deve illuminare il sample con una sorgente periodica "strutturata" (structured illumination) a bande, con K_1 che è pari all'inverso del periodo di illuminazione

Se $K_1 \sim K_{cut\,off}$, K_2 può essere al massimo: $K_2 \sim 2\,K_{cut\,off}$

Facendo la trasformata di Fourier, la PSF risultante quindi è metà di quella data dal limite di diffrazione

github.com/elisabettagnello

As described, Moiré fringes are the product of frequency mixing, and will be observable if the magnitude of the mixed frequency is less than or equal to that of k_0 and thus lying within the observable region. This effectively increases the OTF support by creating an additional observable region with an origin at k_1 and all information within radius k_0 of k_1 is accessible. Thus resolution is stretched from k_0 to $k_1 + k_0$ and, because the magnitude of k_1 cannot exceed that of k_0, the ultimate theoretical resolution limit becomes $2k_0$. This translates into a doubling of

ELECTRON MICROSCOPY

Con i microscopi ottici e le tecniche di super risoluzione, si può superare il limite della diffrazione (250 nm), ma non si può andare oltre i 20 nm, quindi non si possono vedere le molecole (5÷10 nm).
Per ovviare questo problema si potrebbero usare i raggi x, che hanno $\lambda \sim 0{,}1$ nm (=1 Å), ma questi raggi distruggono la materia organica, la quale tra l'altro risulta trasparente ai raggi x.

Al posto di usare onde EM, si possono usare fasci di elettroni, a causa della corrispondenza onda-particella.
A causa della loro carica, non possono propagarsi indisturbati in materia dielettrica, ma solo nel vuoto.

$\lambda_{e^-} \sim 1$ Å

la funzione d'onda di un fascio di e^- uguali, tutti con energia cinetica nel vuoto pari a $E_k = \hbar\omega$:

$$\psi(x,y,z,t) = \psi_0(x,y,z)\, e^{it\frac{E_k}{\hbar}} = \psi_0(x,y,z)\, e^{i\omega t}$$

Sopponiamo che ψ sia soluzione di un'equazione d'onda:

$$\nabla^2\psi = -\frac{1}{u^2}\frac{\partial^2\psi}{\partial t^2}$$, con u: velocità di gruppo

$$\nabla^2\psi = -\frac{\omega^2}{u^2}\psi = -K^2\psi = -\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2\psi$$

definizione di lunghezza d'onda di un elettrone

Postuliamo che: $\lambda_e \overset{\text{def. assiomatica}}{=} \frac{h}{p}$, P: quantità di moto

$$= \frac{h}{\sqrt{2m(E_{TOT} - e\phi)}}$$

λ_{e^-} deve essere quella che massimizza l'energia cinetica

se c'è anche un potenziale elettrostatico è $\neq 0$

Sostituendo nell'eq. precedente: $\nabla^2\psi = \frac{8\pi^2 m}{h^2}(E - e\phi)\psi$ eq. di Schrödinger

github.com / elisabettagnello

Affinché λ_{e^-} sia abbastanza piccola è necessario che v sia relativistica.
La relazione relativistica per p è:

$$p = \frac{mv}{\sqrt{1-\beta^2}} \quad , \beta = \frac{v}{c}$$

Per la conservazione dell'energia: $\frac{mc^2}{\sqrt{1-\beta^2}} = -e\Phi + C$

Consideriamo degli e^- a riposo in un catodo. Sia Φ_0 il potenziale del catodo e Φ quello di un e^- estratto dal catodo. Con $V = \Phi - \Phi_0$, detto potenziale di accelerazione.

$K_f - K_i = -U_f + U_i = -e(\Phi - \Phi_0)$

$$mc^2\left(\frac{1}{\sqrt{1-\beta^2}} - 1\right) = -eV$$

$$mc^2\left[\sqrt{1+\left(\frac{p}{mc}\right)^2} - 1\right] = -eV$$

$$mc^2\left[\sqrt{1+\left(\frac{h/\lambda}{mc}\right)^2} - 1\right] = -eV$$

$$\lambda_e = \frac{h}{\sqrt{2meV\left(1+\frac{eV}{mc^2}\right)}}$$

Il limite della diffrazione viene superato.

U_{acc} / kV	Relativistic wavelength / pm	Mass x m_0	Velocity x 10^8 m/s
100	3.70	1.20	1.64
200	2.51	1.39	2.09
300	1.97	1.59	2.33
400	1.64	1.78	2.48
1000	0.87	2.96	2.82

github.com / elisabettagnello

Accelerating and guiding electrons

Field emission gun or Thermionic

Vacuum required! (Coulomb repulsion)

Magnetic lenses (Lorentz force)

Electric field lens

"Hamilton analogy" between light rays and electron beams

equivalent "refractive index" for electrons in free space:

$$n = \frac{mv}{\sqrt{1-\beta^2}} + \frac{e}{c} A \cdot s$$

Very approximately, the electron trajectory will bend towards the vector potential direction and towards the direction of the electric field gradient.

In microscopia elettronica non è necessario cambiare obiettivo per ottenere un maggiore ingrandimento, si deve solo cambiare il valore del campo magnetico.

interactions

Scanning Electron Microscopy: topography

X-ray photon spectroscopy reveals composition of the sample point by point

Transmission Electron Microscopy: internal structures requires VERY THIN samples (<100 nm)

Electron diffraction: local crystal structure

github.com / elisabettagnello

SEM produces images by scanning the sample with a high-energy beam of electrons. As the electrons interact with the sample, they produce secondary electrons, backscattered electrons, and characteristic X-rays. These signals are collected by one or more detectors to form images which are then displayed on the computer screen. When the electron beam hits the surface of the sample, it penetrates the sample to a depth of a few microns, depending on the accelerating voltage and the density of the sample. Many signals, like secondary electrons and X-rays, are produced as a result of this interaction inside the sample.

Secondary electrons are emitted when the primary beam that has lost a part of its own energy, excites atoms of the sample. The secondary electrons have a little energy (about 50 eV) divided upon a large spectrum.

Backscattered electrons are electrons which have been emitted from the primary beam and have reacted elastically with the sample's atoms. They are sent back almost in the same direction as the one they came from, and with very little energy loss. Chemical elements that have a high atomic number produce more backscattered electrons than the ones that have a low atomic number. The areas of the sample with a high atomic number will thus look whiter than the ones with a low atomic number. Rutherford scattering.

X-ray emision is electromagnetic radiations induced by primary (incident) radiation. The energy of the secondary X-rays produced from atomes present in the sample in SEM are usualy between 0.5 et 30KeV

Catodoluminescenza: fluorescenza indotta dagli elettroni

La risoluzione dipende dalla grandezza della "goccia":
secondary e^-: risoluzione migliore ma solo superficiale

Se il campione è abbastanza sottile, alcuni e^- vengono trasmessi senza interagire e possono essere usati per formare l'immagine, come in un microscopio a trasmissione. In questo modo si ha la risoluzione più alta.

Anche se il limite della diffrazione viene superato, avviene comunque della diffrazione (di Bragg) coerente. Quindi si può studiare la struttura di cristalli usando la diffrazione degli e^-.

github.com / elisabettaghezzi

TEM SEM

si rivelano gli e⁻ del sample che sono stati ionizzati dagli e⁻ del fascio incidente.

Simile a scanning confocal microscopy

non è il campione ad essere fluorescente, ma lo schermo che interagisce con gli e⁻

1. Il campione viene posto su una superficie a "griglia" con molti fori e talvolta poi coperto con un materiale spugnoso molto sottile che consente il passaggio degli e⁻. Gli e⁻ passano nei buchi della griglia.

Biological sample preparation

2. Si mette una soluzione liquida sulla griglia e si mette il campione nel vuoto

per mettere i virus sulla griglia, si possono "intrappolare" con dei anticorpi

github.com/elisabettagrolle

Recap:
grazie alla dualità onda-particella, è possibile usare gli elettroni per fare microscopia. Abbiamo calcolato λ (lunghezza d'onda di De Broglie) per un e^- relativistico; nel caso di un e^- con $v = c/2$ si ha: $\lambda = 0.004$ nm.
Con gli e^- relativistici quindi si possono visualizzare le molecole e i singoli atomi.

- **T**ransmission **E**lectron **M**icroscope: è la tecnica più simile alla microscopia ottica. Ha la risoluzione più alta (0.04 Å). widefield

- **S**canning **E**lectron **M**icroscope: è più simile alla microscopia confocale. La risoluzione è un po' più bassa perché gli e^- sono più lenti (~ fattore 10). Non raggiunge il limite atomico.

1. Sorgente elettronica = catodo (-)

2. Anodo (+). Tra catodo e anodo si forma un campo elettrico che accelera gli e^- verso l'anodo. Gli e^- passano nel buco al centro dell'anodo. Si ottiene così un fascio di e^- che ha una grande energia. In SEM hanno 20 keV, in TEM 100 keV. In SEM, $\lambda = 1 \div 0.1$ nm.

3. Lenti di condensatore: producono un piccolo fascio collimato. Sono costituite da lenti magnetiche.

4. bobina x,y: è una parte che non c'è nel TEM. Produce un campo magnetico statico che può essere modulato in intensità o spento a piacere variando la corrente elettrica. Possono esserci 4-8-16... bobine; il loro scopo è quello di fare uno scan del fascio di e^- a Dx e a Sx, su e giù. Mentre si esegue lo scan, i segnali vengono rivelati da 3 detectors in funzione del tempo.
Rivelatori: Back-scattered electron detector, secondary electron detector, x-ray det.

Televisione a tubi catodici: le bobine x,y scammerizzano il fascio lungo x e y in un pattern quadrato o rettangolare. La scala temporale in cui avviene è μs. Lo scan di un Mega pixel avviene in ~100 μs. In questo lasso di tempo il segnale viene rilevato dai detectors in funzione del tempo. Il segnale viene amplificato con un amplificatore analogico e mandato ad un convertitore (analog → digital) I punti rivelati vengono sovrapposti alla matrice x,y con i movimenti compiuti dalle bobine, e viene formata l'immagine.

L'immagine risultante, quindi, non viene fatta tutta simultaneamente, ma è il risultato di uno scan (10^6 punti) avvenuto in un lasso di tempo ~100 ms.

- Secondary electron detector: l'elettrone principale (pe) proveniente dal fascio incidente, colpisce l'elettrone secondario (se) appartenente ad un atomo del sample. Il p.e. cede parte della sua energia al s.e., il quale può allontanarsi dall'atomo diventando un e^- libero. L'atomo, quindi, viene ionizzato. L'energia di ionizzazione è ~10 eV, quindi il p.e. (con energia ~20 keV) può ionizzare molti atomi. Il s.e. viene scatterato fuori dall'atomo e rilevato dal detector. Il detector genera una corrente che è proporzionale al numero di e^- rilevati. Se il focus non è sulla superficie del campione non viene rilevato alcun s.e., perché non hanno abbastanza energia per uscire dal sample, solo quelli superficiali possono essere rilevati. Questa tecnica, quindi, fornisce info sulla topografia superficiale del campione. La distribuzione spaziale dei s.e. è omogenea e casuale, quindi non è necessario che il detector copra tutto l'angolo solido. (usati per SEM)

- Back-scattered electron detector: rileva gli e^- scatterati "alla Rutherford". È un fenomeno che ha una probabilità di avvenire molto più bassa del precedente. Il p.e. viaggia così vicino al nucleo, da essere scatterato da quest'ultimo e non da altri e^-.

github.com/elisabettagiulio

Il BSE detector ha la forma di un disco e viene messo intorno al fascio incidente. Poiché lo scattering è elastico, i BSE hanno una grande energia, simile a quella del p.e. Il detector è un calorimetro che rileva l'energia complessiva, che divisa per 20 keV restituisce il numero di e^-.
Con il BSE si può capire il numero atomico dell'atomo e risalire al tipo di atomo.

- X-ray detector: il p.e. interagisce con una shell più interna, ionizzando l'atomo ma rimuovendo un e^- di core. Il posto dell'e^- di core viene immediatamente preso da un e^- più esterno, producendo l'emissione di un raggio x (~ keV). Con un prisma vengono separati i raggi con energia diversa, che consente di fare un'analisi dello spettro energetico del sample (spettroscopia a raggi-x). L'immagine che si ricava è di bassa qualità, quindi il segnale si usa principalmente per fare spettroscopia (microanalisi).

  perché si ricava un intero spettro da ogni punto

→ l'unica incognita è Z
si può capire la tipologia di atomo con cui si interagisce

La posizione del SE detector crea un effetto di shadowing e apparent illumination non molto rilevante.
L'immagine è solo superficiale.
Per aumentare il segnale, il sample può essere ricoperto con un sottile strato metallico.

A software allows users to define and modify boundaries around objects.
Semi-automation: Object size filters, Free border editing, Definition of secondary boundaries
Pattern recognition algorithms identify multiple similar objects
A color is allocated depending upon its size or shape.

Different types of bacteria are identified (and colored) by automated pattern recognition

thus contact elisabetta.ranello

Formare immagini in 3D: invece di usare un solo BSE detector, si usa un detector diviso in 4. Ogni parte rileva un segnale diverso e produce un'immagine diversa in base alla sua posizione. Usando un algoritmo, partendo dalle 4 foto se ne può ottenere una in 3D.

3D "Shapes from shading"

Quadrant detector of Backscattered electrons (BSE – Rutherford scattering)

SEM used in coinage

3D Stereophotogrammetry

In case topography is unclear from shades, two images are taken from two different angles by tilting the sample in the SEM chamber. Height information can then be calculated trigonometrically.

SEM si usa anche per le analisi genetiche dei cromosomi.

Cathodo-luminescence

Catodoluminescenza: quando un fascio di e^- incide su un sample, parte dell'energia di rilassamento comporta l'emissione di fotoni nel range visibile. Ponendo un ulteriore detector (spettrometro) si posso individuare le tipologie di molecole nel sample.

elisabettagne

Cryo-EM

Cryo - EM è una tipologia di microscopia elettronica a trasmissione in cui il campione viene portato a temperature molto basse (~ temperatura dell'azoto liquido ~ -200°C).
A quelle temperature le molecole non possono accedere agli stati vibrazionali eccitati, quindi non può avvenire neanche la spontanea agitazione termica e le molecole restano ferme.

La Cryo-EM viene usata per le grandi proteine.

Si prepara una soluzione pura di proteine che viene posta su una griglia TEM.
Il campione viene congelato con la formazione di ghiaccio amorfo.

Durante l'acquisizione delle immagini, si ottengono tante foto della stessa proteina orientata in modo diverso.
Le foto vengono classificate in base all'orientazione della proteina e vengono usate per ricavare la struttura 3D della proteina.

github.com / elisabettarinello

1. Protein purification: extraction of protein from cellular environment in a buffer, in a stable form.

2. Negative Stain: Stain of the sample with uranyl stain, a heavy metal salt that absorbs electrons. The stain absorbs electrons and does not penetrate in the sample. The sample can be easily distinguished from the coloured background with excellent contrast.
   Cons: Limited Resolution (> 30 Å)

3. Misure preliminarie
   AIM: optimize specimen properties (Sample Distribution, Sample concentration, Ice thickness and uniformity, Microscope exposure time...) to have the best data collection.

freezing the sample fast enough to prevent the water from forming crystals
Ice Crystals: 3D ordered structure that creates noise when interacting with electrons (and may destroy biological sample)
Amorphous ice: disordered structure that does not interfere with the measurement

Sulla griglia dove è posta la soluzione di proteine, viene fatta cadere una goccia d'acqua. La griglia viene immersa nell'azoto liquido e, a causa della variazione repentina della temperatura, si forma il ghiaccio amorfo.

4. Poiché le molecole sono orientate casualmente nella soluzione, durante la presa dati si ottengono tante foto (micrograph) della stessa proteina orientata in modo diverso.

fino al 2013: il detector era costituito da uno scintillatore (schermo fluorescente) che trasformava l'energia elettrica in energia elettromagnetica, e poi i fotoni venivano misurati con una fotocamera CCD. A causa del passaggio da e^- a γ, c'era una limitazione nella massima risoluzione possibile.

2013: resolution revolution
può rilevare direttamente gli e^-, senza aver bisogno degli scintillatori

github.com / elisabettagnello

5. analisi dei dati: i dati vengono allineati e de-convoluti dalla PSF
Vengono selezionate delle particelle e tramite degli algoritmi vengono divise in clusters. Dopo averle classificate, si usano le diverse immagini per realizzare la struttura 3D della proteina (central projection theorem).

github.com / elisabettagnello

tissue: biopsy - wide field microscopy $\Delta x \sim 1\,\mu m$

cell : confocal fluorescence $\Delta x \sim 200\,nm$

inside the cell: super resolution $\Delta x \sim 20\,nm$

virus : electron microscope $\Delta x \sim 1\,nm$
↳ micro-spectroscopy (x-ray)

macro molecule (~ 100 K atoms)
micro molecule (< 100 K atoms)
} non e' importante fare immagini ma capirne la struttura

metodi per risalire alla posizione degli atomi in una proteina piegata ?

github.com / elisabettagnello

cristallografia

si basa sul fatto che molte sostanze hanno una struttura a cristallo, ovvero sono formate dalla ripetizione di unità su un reticolo geometrico. Le unità possono essere costituite da atomi, molecole...

Se si colpisce il reticolo con un raggio x di lunghezza d'onda affine alla distanza tra 2 piani del reticolo, si ha una diffrazione coerente. A causa dei numerosi piani che interferiscono con il raggio, alla fine si creano dei picchi molto stretti, simili a dei punti → Bragg dots

condizione per l'interferenza costruttiva: $m\lambda = 2d \sin\vartheta$

Each crystal plane produces a high number of reflections at non-trivial (non-specular) angle: one for each m (diffraction orders)

affinché avvenga non deve esserci scattering multiplo, anaelastico o a cascata.

La figura di diffrazione viene usata per determinare la posizione degli atomi nella unit cell, in particolare si deve analizzare l'intensità della figura.

Problema: non tutte le molecole biologiche cristallizzano e la cristallizzazione delle proteine è del tutto artificiale e può modificare la struttura reale.

github.com / elisabettagnello

Synchrotron Radiation

Electromagnetic wave emission pattern from an accelerated charged particle

$$[\mathbf{S}\cdot\hat{\mathbf{n}}] = \frac{q^2}{16\pi^2\varepsilon_0 c}\left\{\frac{1}{R^2}\left|\frac{\hat{\mathbf{n}}\times[(\hat{\mathbf{n}}-\vec{\beta})\times\dot{\vec{\beta}}]}{(1-\vec{\beta}\cdot\hat{\mathbf{n}})^3}\right|^2\right\}_{\text{reta}}$$

To obtain X-rays in the range of 10 keV (λ=0.1 nm or 1 A) an electron beam with at least 3 GeV is required
(note: TEM and SEM have 100 keV and 20 keV respectively!)

La radiazione di sincrotone è emessa da fasci di elettroni relativistici con una traiettoria curva.

Se l'e⁻ si muove su una traiettoria circolare con velocità NON relativistica, la radiazione emessa ha la forma di un dipolo ed è omogenea in tutte le direzioni.
Se l'e⁻ è relativistico, la radiazione viene tutta emessa lungo la direzione del vettore della velocità.

Il sincrotone quindi consente di produrre della radiazione EM che viaggia in un'unica direzione e che proviene da una piccola sorgente.
Lo spettro della radiazione di sincrotone è quasi bianco (vengono prodotte quasi tutte le λ) con un cut-off in corrispondenza dell'energia cinetica dell'e⁻ sorgente.

Per ottenere raggi x con E=10 KeV, il fascio di e⁻ deve avere E=3 GeV; per raggiungere quelle energie si usano degli acceleratori di particelle circolari (=sincrotroni).

github.com/ elisabettagnello

Vibrational Spettroscopy

metodo per determinare la struttura di una proteina che non può cristallizzare.

In spettroscopia non si è interessati alla posizione del campione, si usa una soluzione omogenea per determinare la struttura delle proteine.

Per ricavare informazioni sulla struttura delle proteine si deve studiare lo spettro vibrazionale in quanto da informazioni sulle distanze atomiche e sugli angoli di legame, a partire dalle quali si può dedurre la struttura.

Vibrational transitions

Rotations are not relevant in condensed matter (including liquids, colloids, membranes, glasses.. and biosystems). The only residual effect of blocked rotations is a broadening of the vibrational transition lines

Vibrational transition selection rule: Δv = +-1

Most molecules at room-T have hv > kT = 25 meV (100 meV < hv < 500 meV)
→ only v=0 is populated

→ the 0 → 1 transition is most easily observed
→ the 0→2 transition ("overtone") is weak and its frequency is not exactly the double of the 0→1 (Morse potential is a better approx than harmonic parabola)

Poiché la transizioni possono avvenire senza emissione di luce, quello che viene rilevato è l'assorbimento della luce. Quindi si incide sul campione con una sorgente di luce e si osserva lo spettro della radiazione mancante che è stata assorbita.

La scala di energie è molto più bassa di quella che si ha in microscopia con emissione fluorescente. Nella fluorescenza avviene una transizione elettronica, in questo caso è vibrazionale.

energie vibrazionali: 100 meV < h ν < 500 meV
↳ sono molto più alte dell'energia a T ambiente: 25 meV ; quindi non può avvenire spontaneamente una transizione e popolare i primi stati eccitati.

Si illumina il campione con diverse frequenze nell'infrarosso, e si osserva quale di quelle frequenze ha perso energia dopo essere passata nel campione, ovvero quale frequenza è stata assorbita (= vibrazione) dal sample.

github.com / enochegagnello

Types of vibrational modes H_2O

high frequency
hv > 300 meV
easy to calculate

mid frequency
100 < hv < 200 meV
sensitive to nearest * neighbors (secondary structure)
mid-infrared range

low frequency
hv <100 meV
difficult to calculate

1. gli atomi si muovono lungo la direzione del legame, cambiandone la lunghezza. Gli spostamenti dei 2 atomi possono avvenire nella stessa direzione o in direzioni diverse.

2. cambia l'angolo di legame.

3. cambia la carica equivalente degli atomi, cambia il momento di dipolo.

*Osservando lo shift verso energie più elevate delle vibrazione di bending angle, si deduce la presenza di altri atomi vicini.

Infrared-active vibrational modes

In the harmonic oscillator approximation, a vibrational mode corresponds to a mass-and-spring mechanical model

For the stretching mode, the interpretation of spring oscillation is correct. For other modes it is symbolic.

Electric dipole operator ***D***
The matrix element between v=0 and v=1 is non-zero for the first-order Taylor term in ($R-R_0$), called the **induced dipole moment**
(a permanent dipole moment is not required)

$$\boldsymbol{D}(R) = \boldsymbol{D}(R_0) + (R - R_0)\frac{d\boldsymbol{D}(R_0)}{dR} + \cdots$$

pos. di eq.

All modes have resonant frequencies in the IR, but not all modes are IR-active:
If the electric dipole moment does not change during the vibrational motion, **the mode is NOT infrared active.** = NON interagisce con la radiazione EM

Example: CO_2 symmetric stretch

github.com/elisabettagnello

Quando il momento di dipolo non c'è:

Vibrational Raman effect

effetto di 2° ordine

Consider the polarization vector of a molecule "pumped" by a strong laser field E_0 oscillating at a frequency much higher than any vibrational mode (VIS, not IR)

ν_0: freq. laser

$$P = \alpha E_o \cos(2\pi\nu_o t),$$

linear response function

The nonresonant oscillation energy transfers to resonant vibrational modes. The dynamic polarizability $\alpha(t)$ will have a stronger component at the vibrational mode frequency ν_m with corresponding normal mode coordinate q

$$\alpha = \alpha_o + q\left(\frac{\partial\alpha}{\partial t}\right)_{q=0} + \cdots, \qquad q(t) = q_0 \cos(2\pi\nu_m t)$$

ha un termine lineare e uno di 2° ordine

substituting α in the first relation we get:

$$P = \alpha_o E_o \cos(2\pi\nu_o t) + q_o \cos(2\pi\nu_m t)\, E_o \cos(2\pi\nu_o t)\left(\frac{\partial\alpha}{\partial t}\right)_{q=0}.$$

By applying trigonometric relations we obtain two beatnote oscillation frequencies at $\nu_0+\nu_m$ e $\nu_0-\nu_m$: in the radiation exiting the sample (scattering)

$$q_o E_o \left(\frac{\partial\alpha}{\partial t}\right)_{q=0} [\cos(2\pi\{\nu_o - \nu_m\}t) + \cos(2\pi\{\nu_o + \nu_m\}t)],$$

Raman scattering processes

$$q_o E_o \left(\frac{\partial\alpha}{\partial t}\right)_{q=0} [\cos(2\pi\{\nu_o - \nu_m\}t) + \cos(2\pi\{\nu_o + \nu_m\}t)],$$

Stokes Anti-Stokes

Il campione viene illuminato con un laser molto intenso. La luce viene scatterata in direzioni non normali. Non c'è riflessione nè trasmissione. La luce scatterata viene analizzata con uno spettrometro.

github.com / elisabattagnello

Fluorescence vs. Raman

stessa strumentazione

Raman effect:

Inelastic light scattering
Ep-Es is called Raman shift and it corresponds to ONE vibrational quantum (usually a single isolated peak)

l'energia non è risonante con nessuna trans. fenomeno di 2° ordine

Photoluminescence/ fluorescence:

Sequence of an absorption and an emission process.
Ep-Es is called Stokes shift and it can corresponds to the sum of MANY vibrational quanta (usually, a broad spectral convolution of them)

Resonant (pump is absorbed)

2 fenomeni di 1° ordine

Chemical bond identification

a vibrational line corresponds to a specific chemical bond

Important case: peptide bond
Amide band series (I, II, III etc)
The Amide-I band can be deconvolved in several contributions at different frequency related to the different secondary structures

Il pattern di assorbimento può essere de-convoluto in tante lorentziane, ognuna delle quali corrisponde a una oscillazione pura di un determinato legame. In base all'intensità si ricava il numero di legami con una certa struttura.

github.com / elisabettagnello

(Nobel prizes in Physics 1944 and 1952)
Energy of nuclear spin states in an external magneti

$$E = -\gamma m \hbar B_0 \ .$$

(γ is called the *gyromagnetic ratio* and depends on the particle $\gamma = eg/2m$, g=1 for a proton).
For a proton with spin quantum number $m = ½$:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \ ,$$

Larmor precession freqiuency:

$$\omega_L = 2\pi\nu_L = -\gamma B_0$$

Now consider a trnscerse excitation field $B = B\sin(w_L t)$

$$\vec{\tau} = \vec{\mu} \times \vec{B} = \gamma \vec{J} \times \vec{B},$$

the transverse magnetization generated by the resonant oscillating field is measured.
Magnetic resonance imaging (MRI) is used in medical imaging, but resolution is 1 mm, no microscopy!
In this course however we study **NMR Spectroscopy**

Dato un campo magnetico Bo molto forte, si aspetta che tutti i nuclei siano allineati con Bo. A questo punto si aggiunge un secondo campo B poco intenso e orientato in direzione transversa.
Lo spin inizia una precessione intorno a Bo.

Conoscendo B, si può ricavare la frequenza della precessione di Larmor.

NMR Spectroscopy: consente nella rilevazione di piccoli shift dalla frequenza di precessione di Larmor in accordo con l'environment chimico della molecola → Chemical Shift

Chemical shift

Electron spin is "distributed" in space according to the electron wavefunction. Each hydrogen nucleus (proton) in a molecule "sees" a different electron wavefunction environment.

Ethanol

Electron spins produce a magnetic field opposite to the excitation magnetic field. This electronic shielding reduces the magnetic field *at the nucleus* (which is what determines the NMR frequency).

Therefore, each class of hydrogen atoms will experience a very small **shift** (part per million in frequency, ppm) from the bare proton Larmor frequency . The chemical shift characterizes the position of H in the molecule, so it is a fine probe of the molecular structure.
The ppm shift measurement is more accurate at higher frequency (=stronger B-field), e.g.:
B=7 Tesla, w_L=300 MHz, shift= 300-900 Hz
(noise of electronic receivers is 1/f)

giunti.com / elisabettagnello

Protein NMR for structure calculation

No crystals required as in XRC, but liquid solution (average over all orientations): important for all proteins that do not crystallize!

H-atom position is normally not sufficient:
C and N NMR spectroscopy is required.
^{12}C has spin zero! ^{13}C substitution required.
^{15}N and ^{13}C may be purposely substituted in only one of the aminoacids before protein synthesis.

C-chain
H-bond network

N-H bond direction

In order to make structure calculations, a number of **restraints are** experimentally determined:
distance restraints;
angle restraints;
helix orientation restraints; etc.

github.com / elisabetta

Scanning Probe Microscopy - Microscopia a scansione di sonda

~300 K

Metodo per avere una risoluzione atomica a temperatura ambiente, senza dover usare la Cryo-TEM, e a condizioni fisiologiche (a un dato livello di ph, di potassio e sodio). Queste condizioni sono necessarie per fare esperimenti *in vitro*.

un e^- con una certa funzione d'onda in un materiale, può entrare in un altro materiale grazie all'effetto tunnel anche se i 2 materiali non sono in diretto contatto. Il vuoto tra i 2 materiali è rappresentato da una barriera di potenziale. (materiale ≠ gas)

La tunneling propability dipende da un exp che è funzione della distanza L e dell'altezza della barriera di potenziale β.
Se l'energia del potenziale U_0 è nota, l'unica incognita che rimane e che può essere facilmente dedotta è L. Quindi si sfrutta l'effetto tunnel per misurare la distanza di 2 oggetti, uno dei 2 oggetti è il campione (molecola), mentre l'altro è un "dente di metallo".
Con il tungsteno è possibile realizzare una punta con un singolo atomo.
Quella che viene misurata direttamente è la tunneling current (che è proporzionale alla probabilità).

tubo piezoelettrico = cambia dimensione quando si applica una corrente. Si può cambiare la distanza tra il sample e la punta di frazioni di Å (<< delle dimensioni di un atomo). (0.1 Å)

U_0 = energia di legame

Scanning Tunneling Microscopy

1. Si misura la tunneling current tra il campione e la punta, la quale e' una funzione esponenziale della distanza.

2. La corrente viene immessa in un feedback loop, ovvero un dispositivo che cambia il voltaggio che va al tubo piezoelettrico fin quando la corrente non torna ad un valore costante. Serve per evitare che la punta si rompa toccando il campione.

3. La sonda esegue uno scan di tutto il campione.
   Si può agire in 2 modi:

   - o si tiene L costante e si misura la corrente
   - o si tiene la corrente costante e si misura L

In entrambi i casi si ricava un profilo topografico, fino a visualizzare il profilo delle nuvole elettroniche e degli orbitali.

Cons: le misurazioni devono avvenire in un contesto asciutto e privo di liquidi e le info ottenute sono solo superficiali

La risoluzione dipende sia dalla precisione con cui la punta può essere spostata lungo il campione, sia dalla tipologia di interazione presente tra punta e sample, più è a corto raggio e maggiore sarà la risoluzione.

Short range interaction: scala con un fattore più piccolo di $\frac{1}{r^2}$
l'interazione dipolo-dipolo $\propto \frac{1}{r^6}$

long range: forza Coulomb $\propto \frac{1}{r^2}$

github.com / elisabettagnello

interazione dipolo-dipolo (forza di Van der Waals)

le fluttuazioni statistiche in un atomo neutro, prima o poi causeranno uno spostamento delle cariche positive rispetto alle posizioni di quelle negative.
Ciò produce un campo di dipolo instantaneo che interagisce con gli altri atomi.
Quando gli altri atomi neutri vengono in contatto con le fluttuazioni statistiche del dipolo, si riarrangiano e diventano dipoli indotti.
Il dipolo indotto e quello statistico interagiscono. L'interazione e' sempre attrattiva.

e' un' interazione a corto raggio: $\frac{1}{r^6}$

In questo caso come device si usa un laser beam bounce

Il fascio laser rimbalza sulla base della punta metallica (cantilever) viene riflesso e va in un photodetector costituito da 4 quadranti.
Quindi quando la punta si abbassa leggermente, il fascio luminoso rimbalza su un quadrante diverso del photodetector.

Si misura la forza attrattiva tra la punta e il sample, se sono molto vicini la forza dipolo-dipolo e' molto forte e fa abbassare la punta.
La forza dipolo-dipolo e' una forza atomica perche' e' una forza che agisce anche fra 2 atomi. Se la punta viene realizzata in modo tale che all' estremità vi sia un solo atomo, si può registrare la forza tra 2 atomi.
Con il photodetector si ottiene una misura di Δz in funzione di x e y.
Questo metodo, quindi, prende il nome di atomic force microscope, perchè può mappare la topografia del campione a partire dalle misure della forza atomica tra la punta e il sample.

github.com / elisabettagnello

Più la distanza è piccola (= più il sample è spesso) maggiore è la forza.

Anche AFM può funzionare in 2 modi come STM.

Forze atomiche:

Nell' AFM non è necessario il vuoto. Si possono visualizzare i virus.

Silicon cantilever

Elastic "micro-springboard" with a sharp tip at the free end.
The tip can be atomically sharp
It can bend and oscillate, driven by the very small atomic forces.
The large structure from which it springs is called the "carrier chip" and it can be handled easily.

github.com / elisabettagrillo

Fig. 2 (A) AFM images of the arrangement of connexons (hexameric half-channels that bridge the extracellular space between adjacent plasma membranes) in gap junctions plaques. (B) Top and side view of a single connexon. (C) Enhanced structural details of a single connexon. Reprinted with permission from ref. 37. Copyright 2002 American Chemical Society.

Fig. 4 AFM height (left) and stiffness (right) images of bacteria (*Rhodococcus wratislaviensis*) in their physiological medium. Reprinted with permission from ref. 46. Copyright 2013, PLoS One.

Contact –mode imaging of cell membranes, single proteins, individual bactyeria in liquid (physiological environment)

Purple membrane
Bacteriorhodopsin trimers

github.com / elisabettacello

Near-field Scanning Optical Microscopy - NSOM

L'equazione delle onde e' solo una soluzione del campo EM, nella condizione di far field (= la sorgente delle onde EM e' molto distante dal punto di osservazione).
"distante" = distanza >> lunghezza d'onda

Nel caso di near field microscopy, si considera una distanza tra sample e sorgente inferiore rispetto alla lunghezza d'onda. Non si considerano le onde EM che si propagano lontano dalla sorgente, ma il campo EM near field.
In questo modo il limite della diffrazione non e' piú rilevante.

Per tenere il sample e la sorgente cosí vicini si deve usare la stessa tecnologia della scanning probe microscopy.
Lo scan del sample avviene spostando la sorgente.

Mie scattering:

consideriamo una piccola particella sferica fatta di metallo con conduttività $\sigma \sim \varepsilon_2$ (ε_2 = parte immaginaria della costante dielettrica), che ha un grande assorbimento.
skin depth δ : penetrazione della radiazione EM dentro il mezzo

$$\delta = \frac{c}{\sqrt{8\pi\mu\sigma\omega}} \sim 20\ nm$$ per i metalli nello spettro IR-VIS

il raggio della particella (a) e' dell'ordine di δ

la particella scattera la luce incidente, che poi può propagarsi anche lungo direzioni diverse da quella incidente.

github.com/ elisabettagnello

Il campo EM può essere calcolato ovunque nello spazio analiticamente:

Mie scattering

Born & Wolf, Chapter 14.5

$$E_{scatt}^{(r)} = \frac{\lambda_0^2}{4\pi^2\epsilon^2}\frac{1}{r^2}\cos\phi\sum_{l=1}^{\infty}\mathcal{F}_l^{(r)}\left(\frac{a}{\lambda};\sigma\right)$$

F: spherical harmonics sums

$$E_{scatt}^{(\theta)} = \frac{\lambda_0}{2\pi\epsilon}\frac{1}{r}\cos\phi\sum_{l=1}^{\infty}\mathcal{F}_l^{(\theta)}\left(\frac{a}{\lambda};\sigma\right)$$

$$E_{scatt}^{(\phi)} = \frac{\lambda_0}{2\pi\epsilon}\frac{1}{r}\sin\phi\sum_{l=1}^{\infty}\mathcal{F}_l^{(\phi)}\left(\frac{a}{\lambda};\sigma\right)$$

The near-field ($1/r^2$) is radial and has an extension in space of the order of the **skin depth:** $\delta = \frac{c}{\sqrt{8\pi\mu\sigma\omega}}$

From VIS to IR, δ is around 20 nm for noble metals (Al, Au, Ag, Cu, Pt...)

The propagating far-field (1/r) is non-radial and has the same radiation pattern as that of a linear dipole oriented along x

L'unica componente che rispetta la conservazione dell'energia e' quella angolare $\left(I \propto \frac{1}{r^2}\right)$

Quindi quella radiale partecipa solo al near-field, mentre quella angolare principalmente al far field poiché si propaga.

Per $r \to 0$ il radial near field e' molto più intenso di quello far field.

The concept of near field

Spherical silver nanoparticle with radius of 20nm (λ= 400 nm, λ/r=20)
Z: direction of illumination (from left to right)
X: direction of the electric field vector of the illumination

High E-field, no propagation Low E-field, propagation (far-field)

High energy density, but field orientation not adequate for energy propagation ➔ near-field

github.com / elisabettagallo

Rayleigh and Mie scattering plots

Figure 1.2: Normalized angular distribution of the scatterd light for 4 different size parameters. **(a)** Rayleigh limit **(b)** $x = 0.01$ **(c)** $x = 0.1$ **(d)** $x = 10$. The green curve is the parallel incident polarization. The red is the perpendicular one and the blue one for unpolarized light.

Rayleigh scattering (blue sky) is the limit of Mie scattering for small particle size (molecules) and small conductivity σ

Rayleigh pattern is symmetric
Mie pattern is almost symmetric for **small particles** (therefore, backscattered radiation can be detected in Aperture-less NSOM)

For **large particles** the forward Mie scattering is stronger (the dipole analogy is not valid any more). Important for microscopy of single cells or bacteria with dimensions of a few wavelengths.

Two ways beyond the diffraction limit

Near-field detection, no propagation: the imaging resolution does not depend on λ !!

Relevant length scales:

1) wavelength λ does not determine resolution but it determines intensity
2) probe-sample distance r<<λ: controlled by the feedback loop with piezo (Scanning probe)
3) aperture diameter or radius of curvature of the probe tip: determines resolution !!

1. **Aperture Type NSOM:** come scanning probe microscopy ma la punta viene sostituita da una fibra ottica coperta di metallo in modo che la luce può uscire solo da un piccolo foro in cui non c'è la copertura di metallo. La piccola apertura costituisce la sorgente EM per il sample.

2. **Aperture Less NSOM:** si usa una sonda standard usata in atomic force microscopy e si considera la punta come sorgente di onde EM. Problema: il silicio non assorbe molto, quindi si ricopre con un metallo

Si illumina la punta con una sorgente luminosa di far field, in modo da approssimare la punta con una particella sferica che agisce da Mie scattering device.

Aperture-type NSOM

Metal-coated Tapered Fiber optics with a very small aperture of diameter $d \ll \lambda$ at the end:
Very high resolution (d), very low efficiency.

Bethe formula:

$$P_{out} \propto \left(\frac{d}{\lambda}\right)^4$$

Power

2D material photoluminescence.
Scale bar: 1 micron

Aperture-less NSOM

Experimental configuration:

- an AFM with gold-coated cantilever
- a laser focused on to the probe tip
- a sensitive light detector to see the weak scattered light, originated by the near-field interaction
- a modulation mechanism to separate near-field and far-field signals (e.g. tip oscilation)

Electromagnetic model: Mie scattering

- the probe tip is seen as a metal sphere
- the laser is the illumination wave
- the near-field region penetrates into the sample but does not propagate

elisabettagriello

Aperture-less near-field IR spectroscopy ?

Giliberti V. et al., Small, (2017)

Example: near-field Raman imaging of a single molecule

Se si usa un singolo atomo come probe tip si può eccitare un solo atomo del sample

Excitation of a vibrational mode of a single molecule in a specific position

(**Resonant Raman scattering**: Laser tuned at the sum of resonant electronic absorption plus the vibrational mode frequency, so the specific vibrational mode can be selected by laser tuning)

Nature Communications **volume 10**, Article number: 2567 (2019)

gabb.com / elisabettagnello