

Luce di Sincrotrone

Laurea Magistrale in Biotecnologie Mediche
Curriculum Nanobiotecnologie

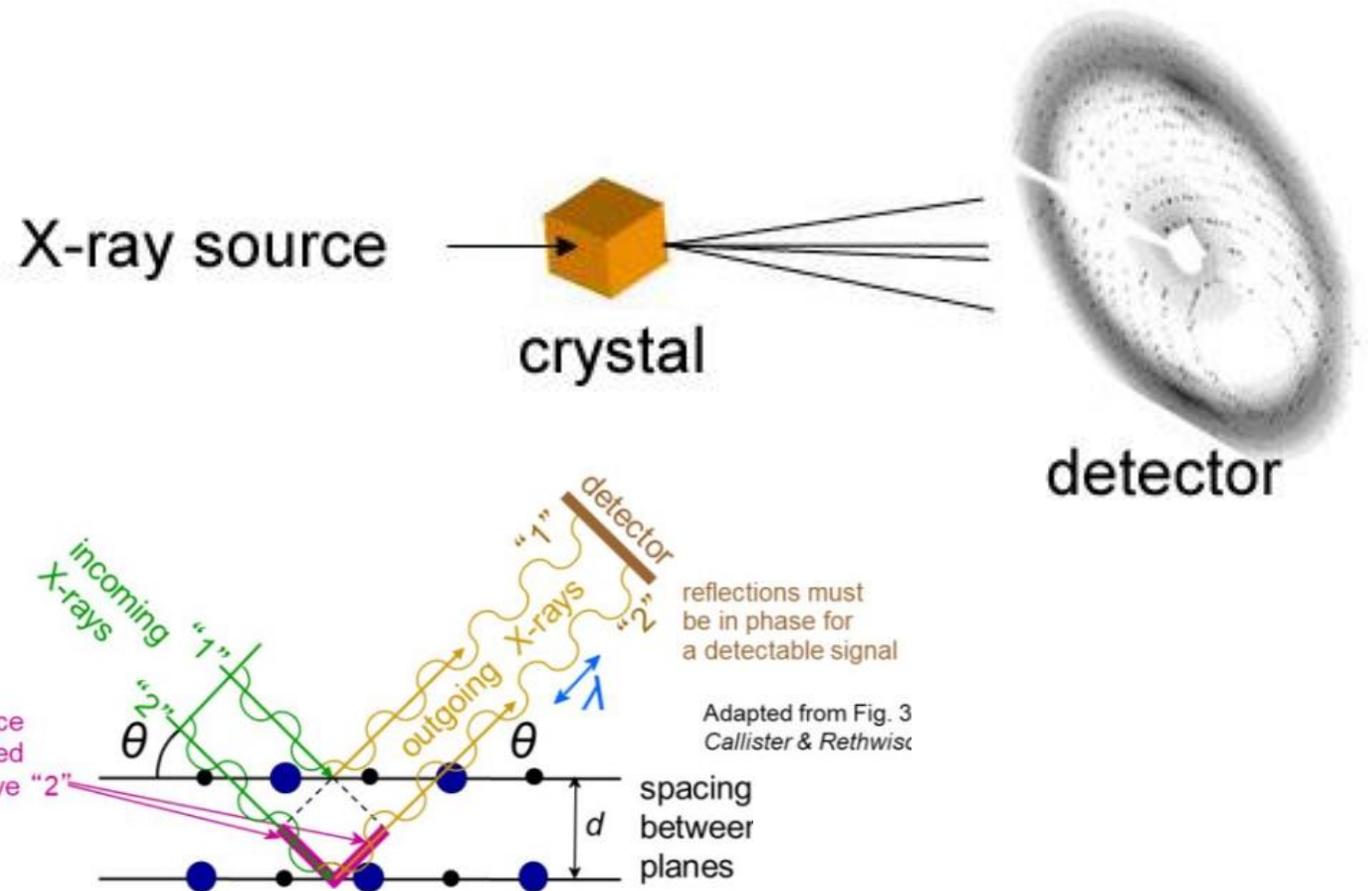
A.A. 2021-22

Esperimento di diffrazione di raggi-X

Un esperimento di diffrazione è concettualmente piuttosto semplice:

Un fascio di raggi-X colpisce un cristallo. I piani di cristallo grafici che soddisfano la legge di Bragg generano dei raggi diffratti che vengono acquisiti da un rilevatore di raggi-X

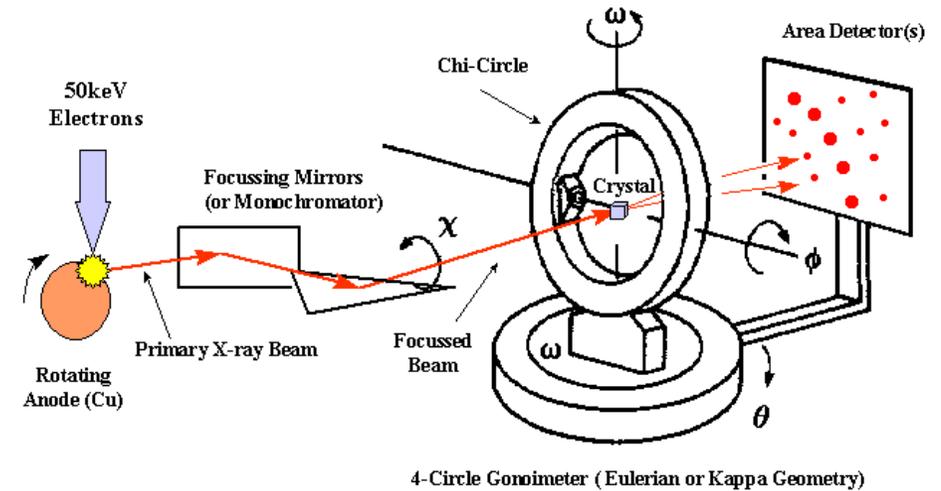
$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$$



Apparecchiatura per un esperimento di diffrazione

Perché l'esperimento di diffrazione sia possibile sono necessari le seguenti 'apparecchiature':

1. **Una sorgente di raggi-X**
2. Un sistema ottico che modifichi il fascio di raggi-X in modo opportuno per l'esperimento
3. Un sistema meccanico (goniometro) per orientare opportunamente il cristallo
4. Un rivelatore i raggi-X



A seconda delle modalità di acquisizione dei dati e del tipo di esperimento, sono disponibili diverse soluzioni e condizioni sperimentali.

Sorgenti di raggi-X: Introduzione

Sorgenti di raggi-X e intensità diffratta

Ricordiamo che l'intensità diffratta da una famiglia di piani è data da:

$$I_{hkl} = \frac{\lambda^3}{V_{cell}^2} V_{crys} I_0 PK |F_{hkl}|^2$$

- Più è elevata I_0 , più intenso sarà l'intensità diffratta dalla famiglia di piani del cristallo.
- Cristalli con celle grandi, come quelli delle macromolecole biologiche, diffrangono in modo meno intenso
- Il volume fisico del cristallo è importante, più è grande e più intensa è l'intensità diffratta
- **I cristalli di macromolecole biologiche sono piuttosto piccoli e costituiti per una larga parte (~ 40-60 %) da molecole disordinate di acqua che non contribuiscono all'intensità diffratta.**

E' importante che l'intensità I_0 sia elevata per controbilanciare l'effetto delle grandi dimensioni della cella unitaria, le piccole dimensioni fisiche dei cristalli di macromolecole, e il contenuto di molecole di acqua *disordinate*.

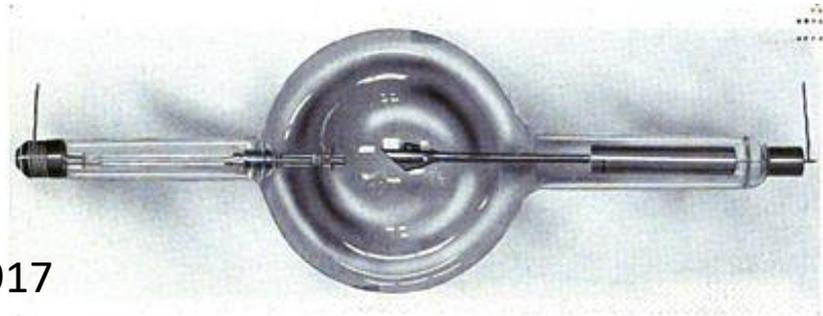
Raggi-X e esperimento di diffrazione

Per un esperimento di diffrazione i raggi-X incidenti devono godere di alcune proprietà:

1. Intensità elevata
2. Devono essere monocromatici (lunghezza d'onda definita)
3. Devono essere collimati (non devono divergere eccessivamente)

Sorgenti di raggi-X

Le sorgenti di raggi-X hanno avuto una notevole evoluzione nel corso dei decenni



1917



2019

Attualmente sono disponibili 3 diversi tipi di sorgente capaci di generare radiazione di lunghezza d'onda opportuna per un esperimento di diffrazione di raggi-X (**0.5 – 1.5 Å**, circa):

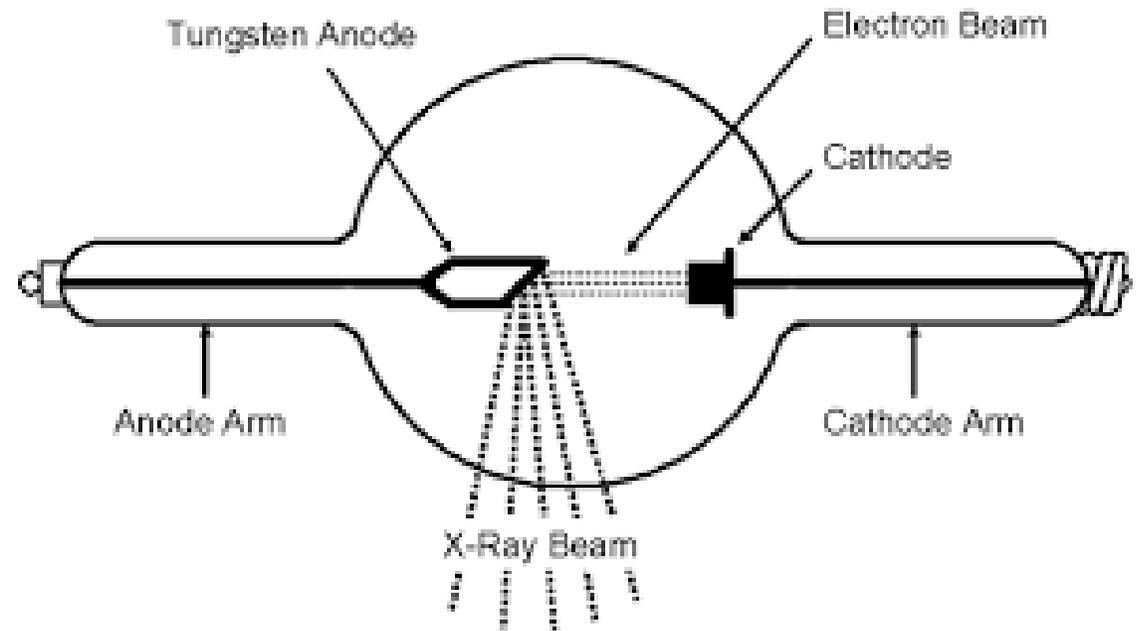
- Tubi a raggi-X
- Anodo Rotante
- Sincrotrone

Tubo per raggi-X e anodo rotante

Tubi per raggi-X - 1

I raggi-X sono prodotti in seguito all'impatto di elettroni ad alta energia emessi da un **catodo**, con un **anodo di materiale metallico** (Tungsteno, Rame, Molibdeno). L'impatto porta all'emissione di raggi-X di lunghezza d'onda opportuna.

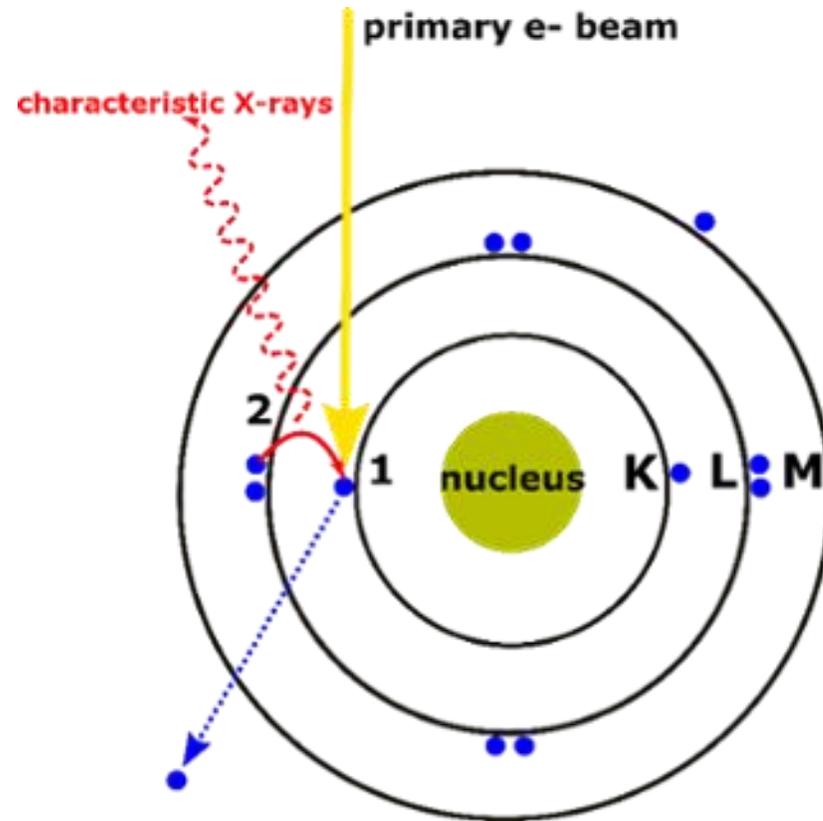
Gli elettroni emessi dal catodo sono accelerati per effetto della differenza di potenziale esistente tra catodo e anodo (decine di kilovolt) e quindi colpiscono l'anodo che viene ionizzato. La 'lacuna' creata viene riempita da elettroni più esterni che passando ad un livello elettronico di minor energia, emettono energia sotto forma di raggi-X



Tubi raggi-X - produzione

Vengono emessi raggi-X corrispondenti alla transizione al livello interno K.

Le emissioni sono indicate come K, L..

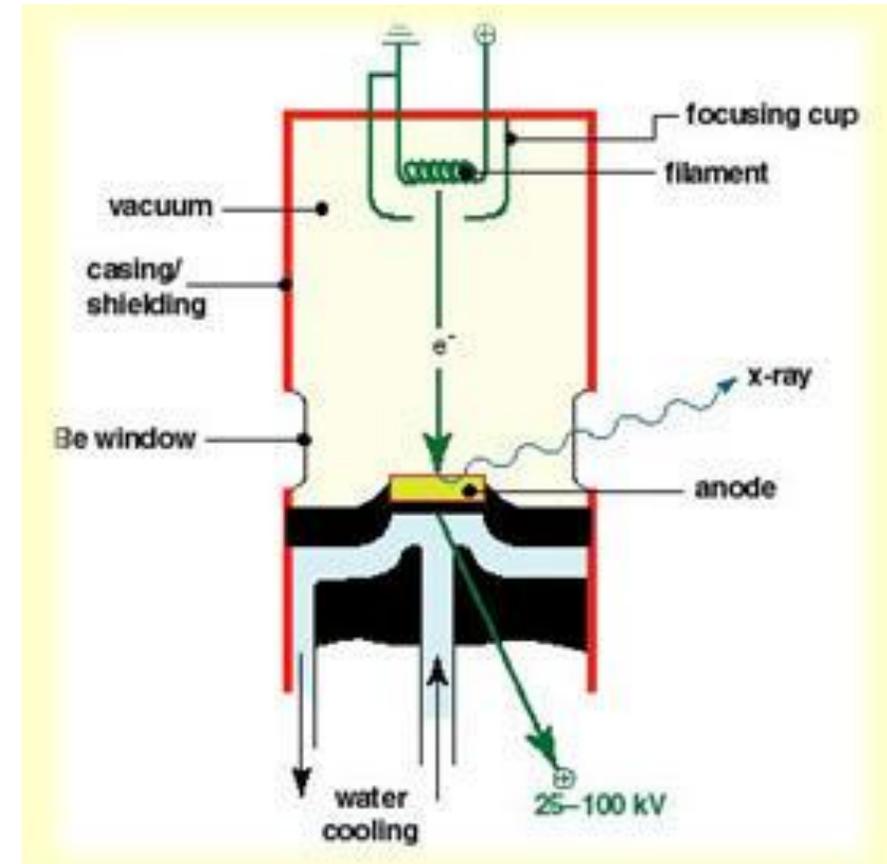


Tubi per raggi-X - 2

L'interno del tubo è mantenuto in alto vuoto.

La differenza di potenziale è creata da un generatore di alta tensione.

Il processo è poco efficiente, la maggior parte dell'energia depositata dagli elettroni è convertita in calore (i tubi per raggi-X devono essere raffreddati con acqua).

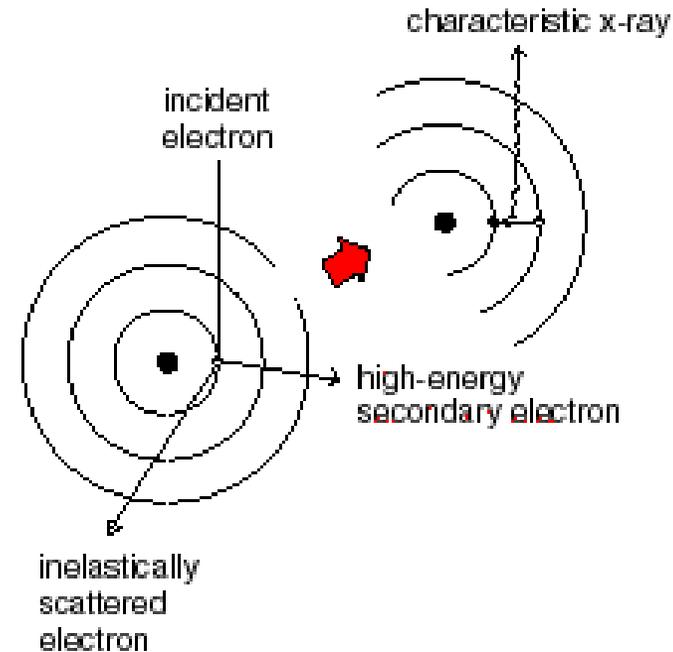
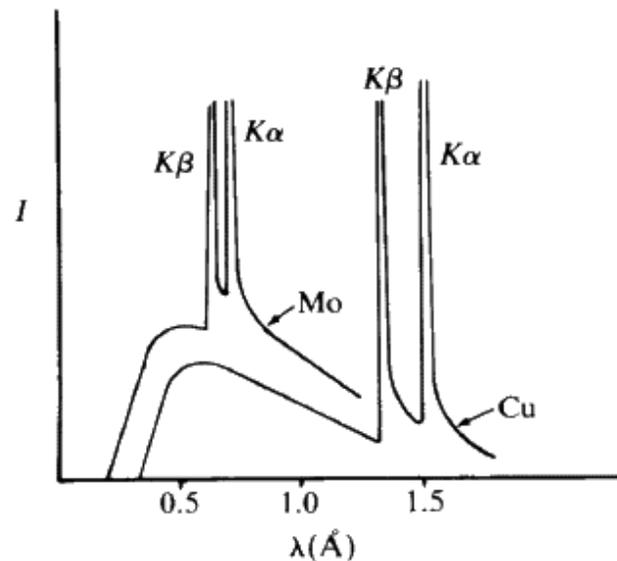


Tubi per raggi-X - 3

I tubi per raggi-X emettono radiazione dovuta a transizioni tra livelli elettronici degli atomi dell'anodo metallico.

I raggi-X prodotti dai tubi sono emessi come 'bande di emissione' intorno alle a lunghezze d'onda corrispondenti alle energie delle transizioni elettroniche.

I tubi per raggi-X emettono radiazione a lunghezze d'onda di circa **1.54 Å nel caso di tubi con anodo in rame**, e a 0.71 Å per anodi in molibdeno.



Tubi per raggi-X - 4

L'intensità dei raggi-X emessa dai tubi è piuttosto bassa, non sono adatti agli studi cristallografici di macromolecole biologiche.

Sono oggetti relativamente poco costosi (2-5000 €) e poco ingombranti, adatti per strumenti di laboratorio



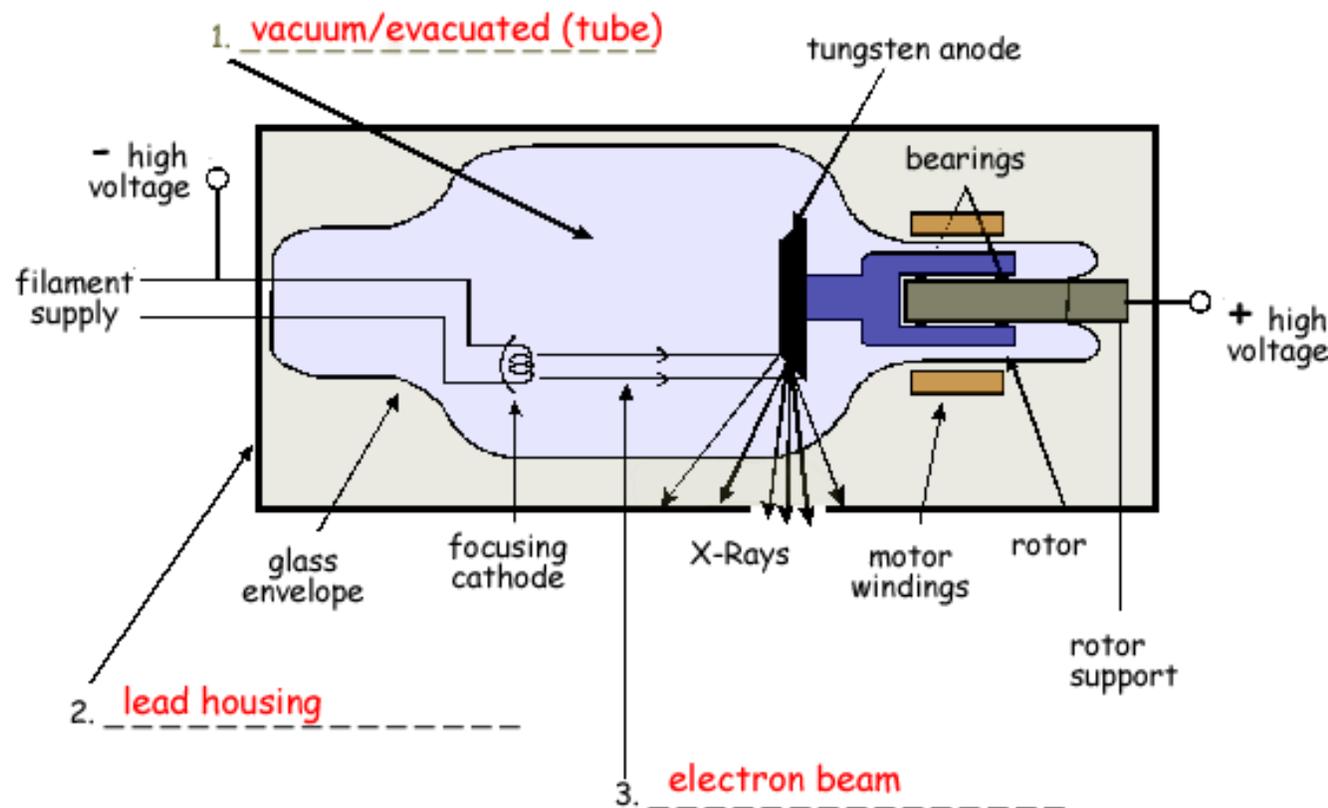
Anodo Rotante - 1

Il calore prodotto dall'impatto degli elettroni sull'anodo limita la quantità di elettroni (corrente elettrica) che può colpire gli elettroni.

Una quantità eccessiva di calore danneggerebbe il tubo per raggi-X

Questo limita l'intensità ottenibile dai tubi per raggi-X, ovvero la potenza massima del tubo ottenibile dal tubo.

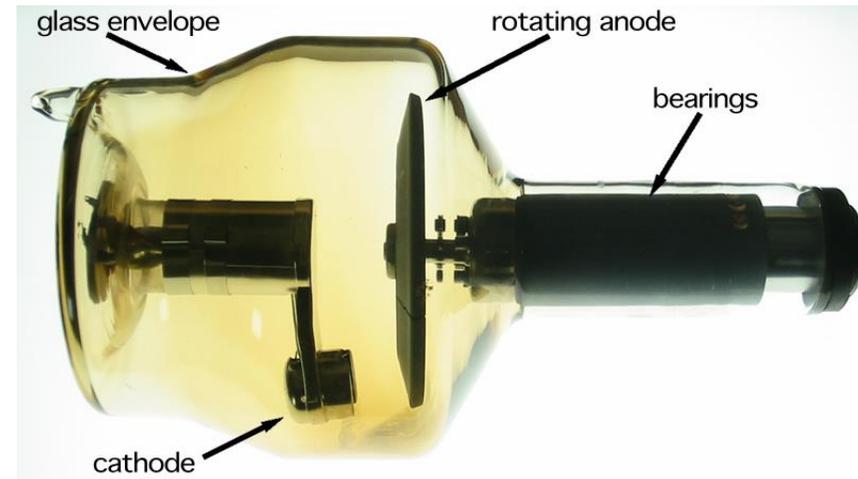
Negli anodi rotanti il problema del calore generato è in parte risolto **con un anodo che, ruotando, espone in ogni momento una parte diversa dell'anodo, disperdendo il calore e permettendo il raggiungimento di potenze più elevate, ovvero di intensità di raggi-X prodotte, maggiori.**



Anodo Rotante - 2

Come per i tubi di raggi-x, l'intero processo deve avvenire in vuoto, per evitare l'interazione degli elettroni con l'aria

Sono sistemi decisamente più complessi dei tubi, poiché devo assicurare la rotazione e il raffreddamento dell'anodo, garantendone la rotazione



Anodo Rotante - 3

Con i tubi a raggi-X non si possono avere potenze superiori ai 3 kW, con gli anodi rotanti si può arrivare a 18-20 kW.

Il flusso di raggi-X prodotto è decisamente più alto

Sono le sorgenti di laboratorio più usate per la cristallografia di proteine.

Sono macchine più costose e richiedono un manutenzione costante.



Luce di Sincrotrone: Introduzione

Motivazioni per l'uso della luce di sincrotrone

L'anodo rotante è una sorgente di raggi-X da laboratorio, utilizzata in cristallografia di macromolecole biologiche, tuttavia questo tipo di sorgente soffre di alcune limitazioni:

Intensità massima raggiungibile, della sorgente di raggi-X

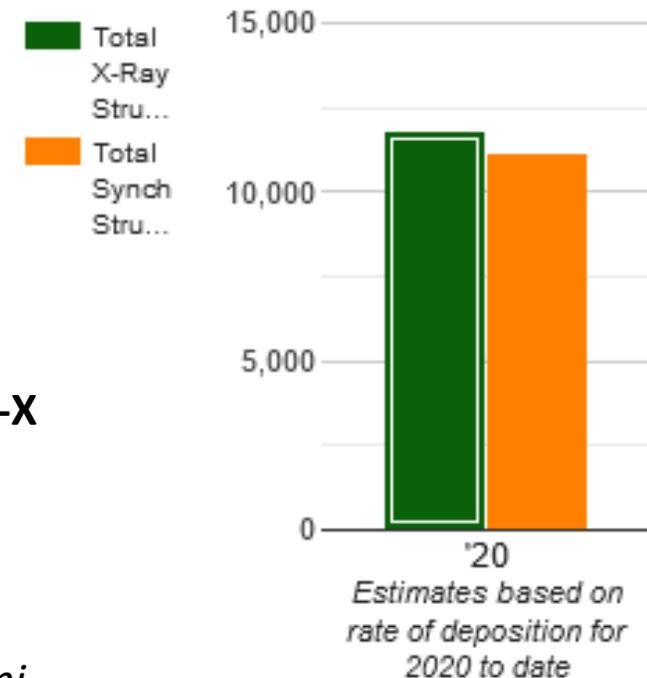
Lunghezza d'onda fissa: Cu (1.54 Å) o Mo (0.71 Å)

Dimensioni e focalizzazione del fascio di raggi-X non-ottimali

Per superare queste limitazioni si fa ricorso alla **Luce di Sincrotrone**

Al giorno d'oggi, la luce di sincrotrone è largamente la sorgente di raggi-X più utilizzata in cristallografia di macromolecole.

N.B. I termini luce di sincrotrone o radiazione di sincrotrone sono sinonimi



www.biosync.com

Luce di Sincrotrone

La produzione di luce di sincrotrone è legata **all'emissione di radiazione elettromagnetica da parte di particelle cariche in moto accelerato alla velocità della luce (o quasi).**

La produzione di raggi-X da parte di elettroni o più in generale particelle cariche, quando soggetti ad un campo magnetico esterno, è nota sin dagli anni 40 (betatrone).

Negli anni 50 si è constatato che una radiazione elettromagnetica di particolari proprietà era prodotta da acceleratori di particelle come i sincrotroni.

Negli anni 60 si è cominciato a considerare le particolari proprietà della radiazione prodotta dai sincrotroni (radiazione di sincrotrone) per lo studio della struttura della materia [**prima generazione**]

Alla fine degli anni 70 si è costruito il primo sincrotrone esplicitamente **dedicato** all'uso della radiazione di sincrotrone per lo studio della struttura della materia [**seconda generazione**]

Nella prima metà degli anni 90 entrano in funzione anelli di accumulazione esplicitamente **progettati** per l'utilizzo della radiazione di sincrotrone per lo studio della struttura della materia [**terza generazione**]

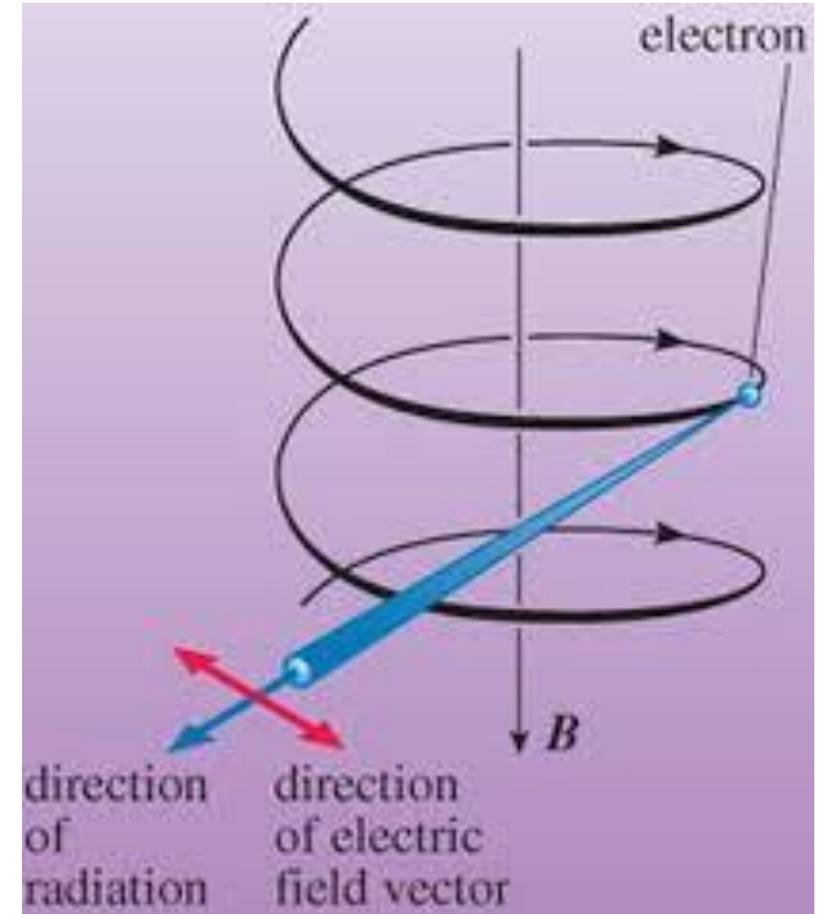
Luce di Sincrotrone: Principi teorici

Principi fisici - 1

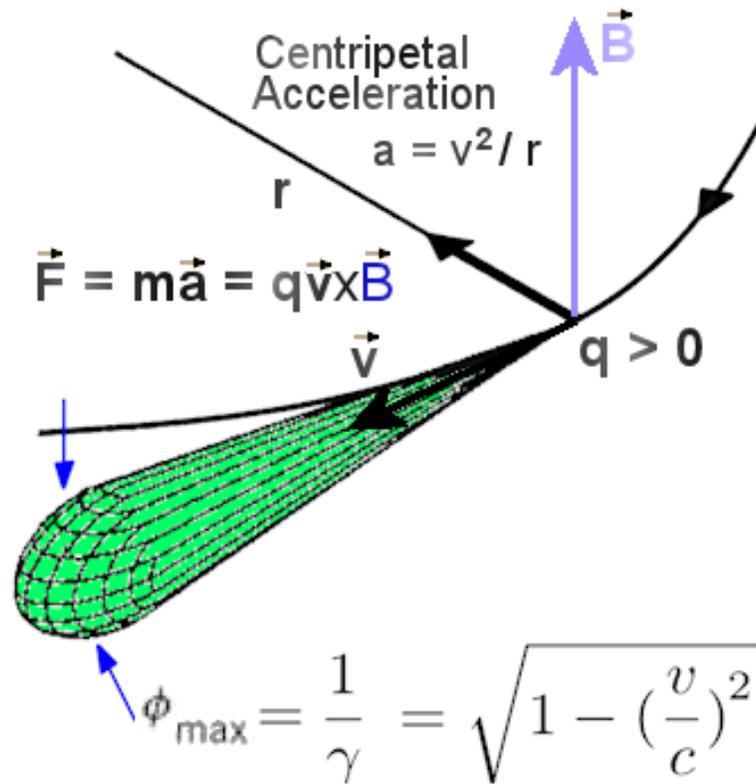
Una particella carica, tipicamente un elettrone, soggetta ad un **campo magnetico** esterno, assume una traiettoria a spirale intorno alle linee del campo magnetico.

L'elettrone soggetto al campo magnetico \vec{B} subisce un **cambiamento di velocità** ovvero un'accelerazione centripeta lungo una **direzione perpendicolare a quella del campo magnetico**.

La conseguenza di questa accelerazione è **che l'elettrone perde energia sotto forma di radiazione elettromagnetica** che viene **emessa perpendicolarmente alla direzione della direzione di accelerazione** e al campo magnetico, cioè **tangenzialmente alla direzione del moto dell'elettrone**.



Principi fisici - 2



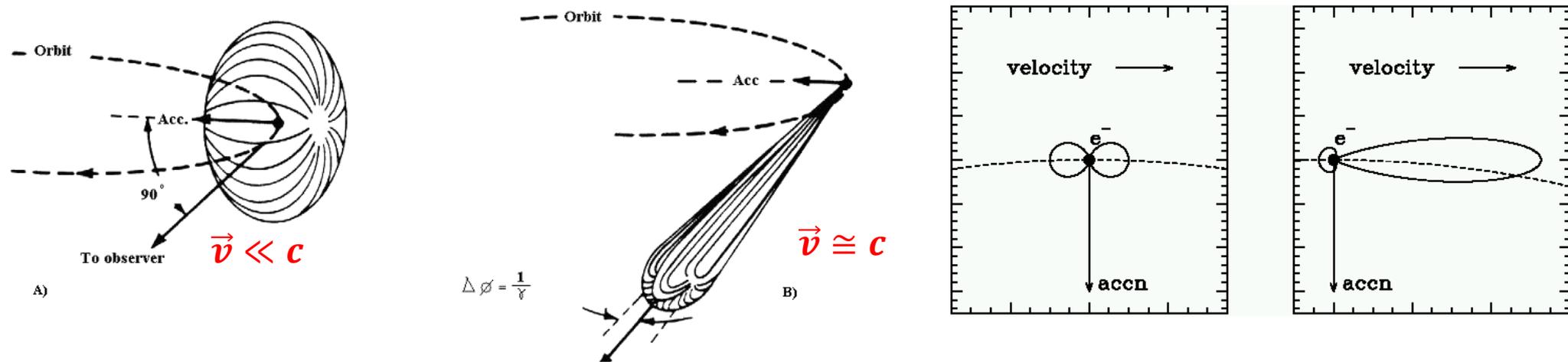
Principi fisici - 3

Se la particella carica soggetta al campo magnetico si muove ad una **velocità relativistica**, cioè vicino alla velocità della luce, la radiazione emessa gode di particolari proprietà di energia, intensità e collimazione.

Questa radiazione è la **luce di sincrotrone**.

La radiazione di sincrotrone è prodotta da qualsiasi acceleratore di particelle.

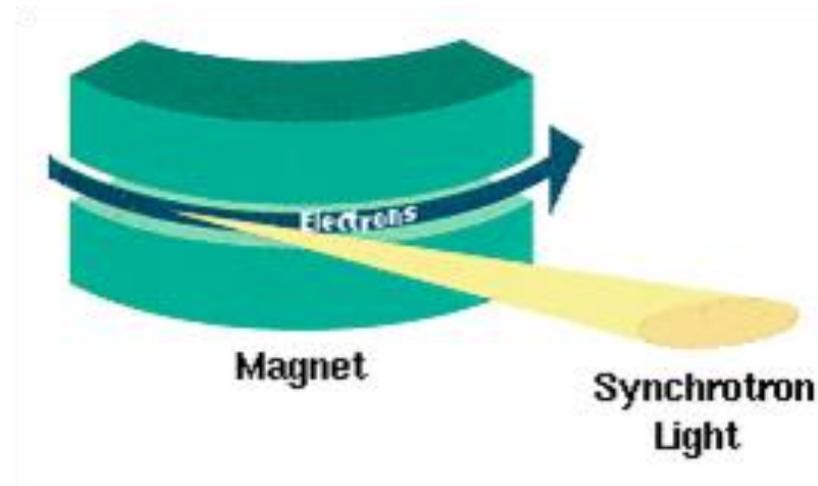
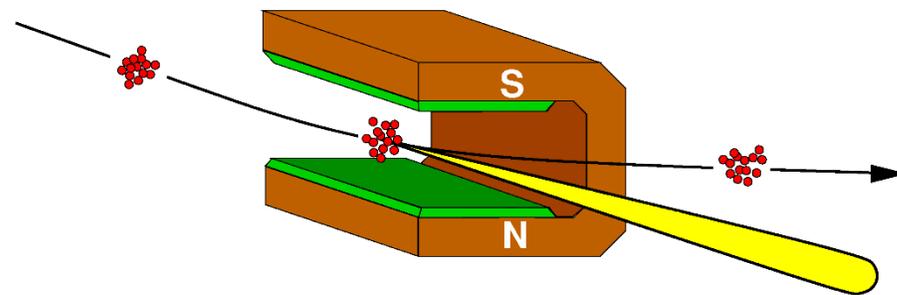
Negli acceleratori di particelle per la fisica nucleare è considerata un fenomeno 'fastidioso'.



Emissione da un dipolo

Consideriamo l'effetto di un magnete 'curvante', capace di cambiare la direzione del moto degli elettroni, modificandone la traiettoria.

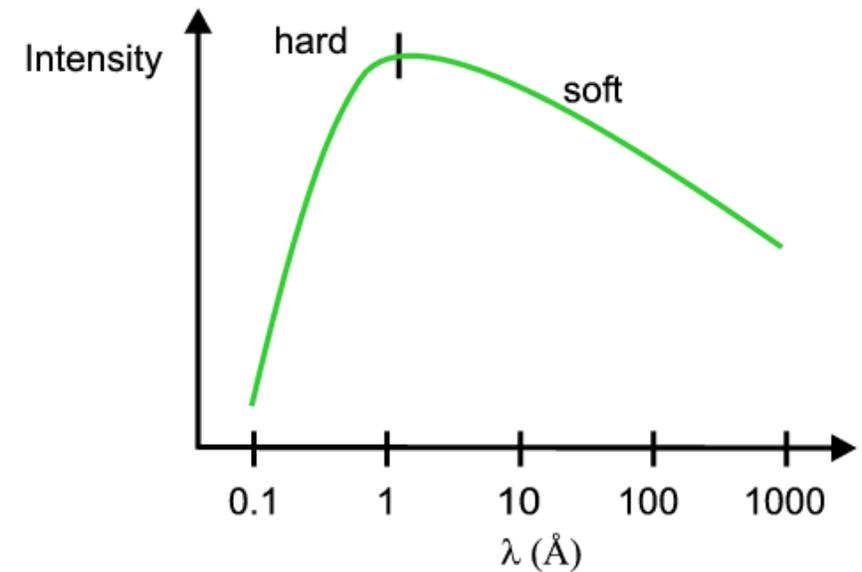
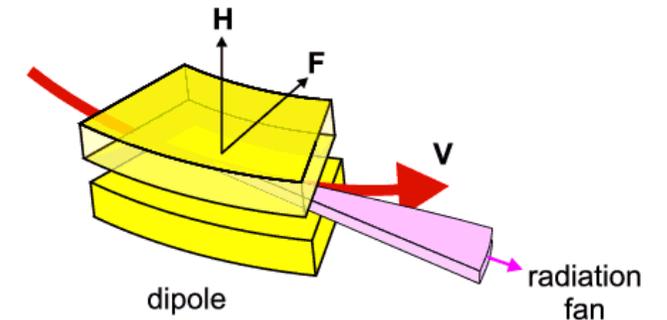
Se gli elettroni si muovono a velocità relativistica, la radiazione emessa da un dipolo (curvante), avrà la forma di una 'lamina', **ampia orizzontalmente ma schiacciata verticalmente**.



Spettro della Radiazione emessa

La radiazione emessa non avrà una lunghezza d'onda (λ) unica, ma sarà distribuita su uno **spettro continuo**.

Sebbene la forma dello spettro sia sempre la stessa per qualsiasi magnete curvante, l'intensità della radiazione emessa e la sua distribuzione spettrale (lunghezza d'onda) dipendono dai parametri costruttivi del magnete come l'**intensità del campo magnetico (H)** e il **raggio di curvatura del magnete**, e dall'energia degli elettroni.



Proprietà della radiazione di sincrotrone

Proprietà della luce di sincrotrone

La luce di sincrotrone gode di proprietà particolari che la rendono uno strumento utilissimo nello studio della chimica e fisica dei materiali:

- 1. Intensità**
- 2. Divergenza (collimazione)**
- 3. Lunghezza d'onda variabile**
- 4. Polarizzazione della radiazione**
- 5. Struttura temporale**

Le prime tre proprietà sono particolarmente importanti nella cristallografia di macromolecole

Intensità della luce di sincrotrone

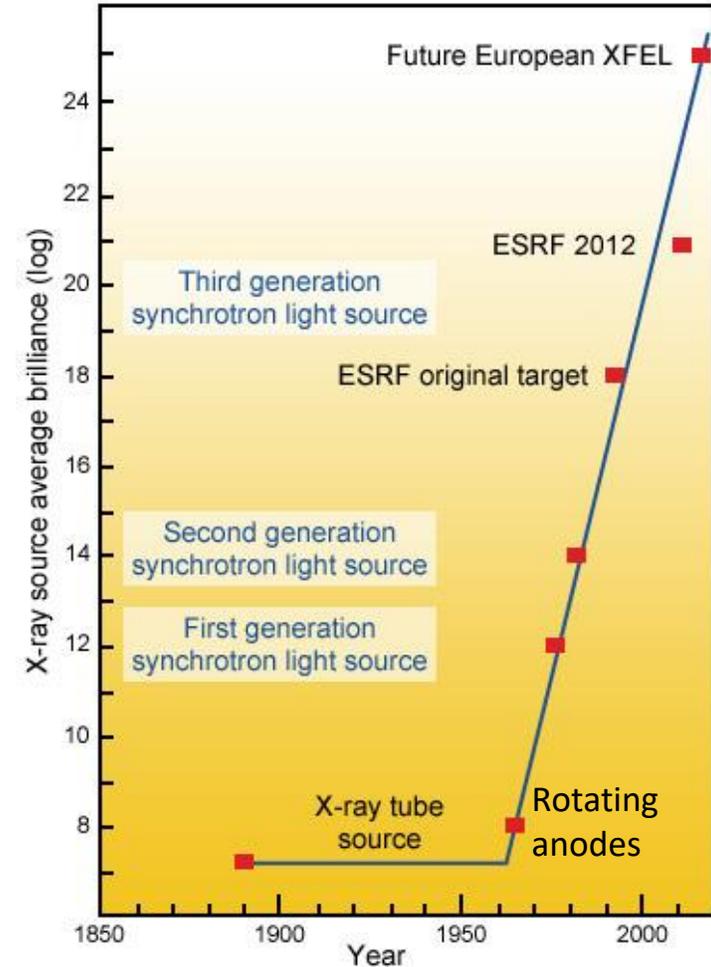
La prima e più importante caratteristica della luce di sincrotrone è la sua straordinaria **intensità**.

Con i moderni sincrotroni è possibile ottenere fasci di raggi-X più intensi delle sorgenti di laboratorio di parecchi ordini di grandezza.

Gli effetti positivi su un esperimento di diffrazione sono:

- **Dati di migliore qualità** (rapporto segnale/rumore migliore)
- **Risoluzione dei dati più alta** (raggiungo angoli 2θ più alti)
- **Posso utilizzare Cristalli piccoli**
- **Acquisizione dei dati molto più veloce**

Ricordiamo che un cristallo di macromolecole biologiche inerentemente diffrange 'poco'



Divergenza (collimazione) della luce di sincrotrone

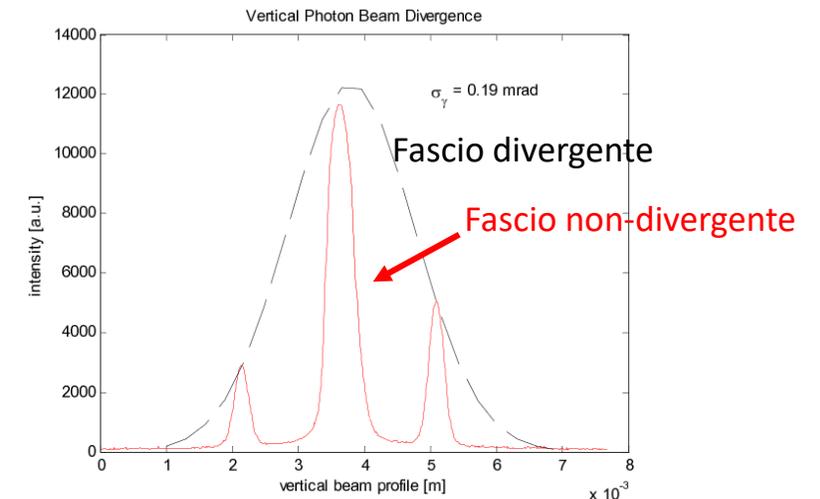
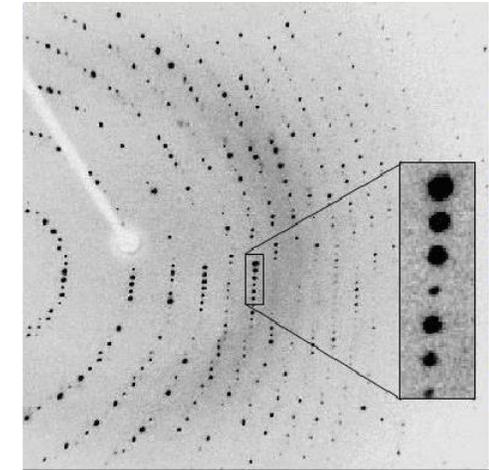
Le immagini di diffrazione, da cui verranno 'estratte' le intensità diffratte, si presenta come un insieme di 'macchie' (spots). Affinchè le intensità diffratte siano correttamente determinate gli spots devono essere ben separati.

Più la cella unitaria è grande e più gli spots sono vicini. Inoltre la larghezza degli spots sull'immagine dipende dalla divergenza della radiazione incidente, più il fascio di raggi-X è divergente più le dimensioni degli spots sono grandi.

Un fascio di raggi-X poco divergente sarà concentrato sul campione in esame, quindi le dimensioni del campione possono essere ridotte

Gli effetti positivi su un esperimento di diffrazione sono:

- **Cristalli con celle unitarie (molto) grandi** (virus, ribosomi...)
- **Cristalli di piccole dimensioni**



Spettro Continuo

La radiazione di sincrotrone ha uno spettro continuo, indispensabile per qualsiasi forma di spettroscopia che utilizzi i raggi-X, come ad esempio l'**EXAFS** o le **spettroscopie di fotoemissione**.

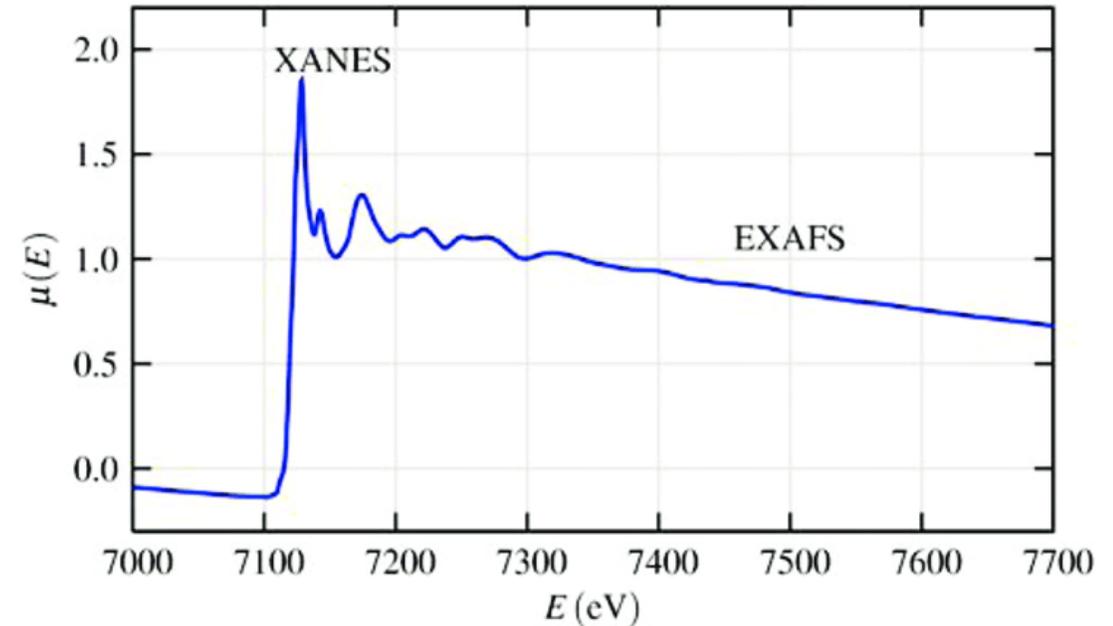
E' una proprietà sfruttata nel **dicroismo circolare**.

Inoltre, per la risoluzione del '**problema della fase**' in cristallografia di proteine, si fa un largo uso del fenomeno dello '**scattering anomalo**' che si verifica in corrispondenza di una soglia di assorbimento di un elemento.

E' quindi necessario poter variare la lunghezza d'onda della radiazione incidente in modo opportuno.

Gli effetti positivi su un esperimento di diffrazione sono:

- **Utilizzo dello scattering anomalo**
- **Scelta della lunghezza d'onda più idonea** (background, separazione tra gli spots...)



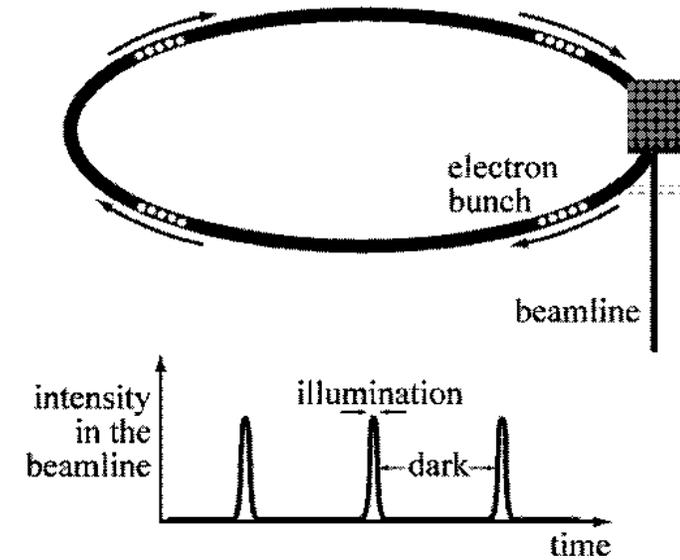
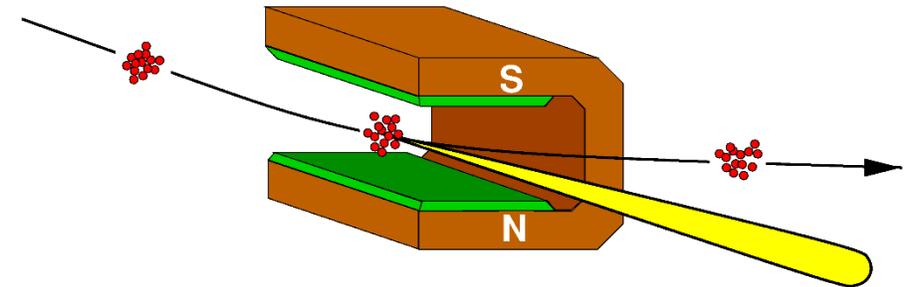
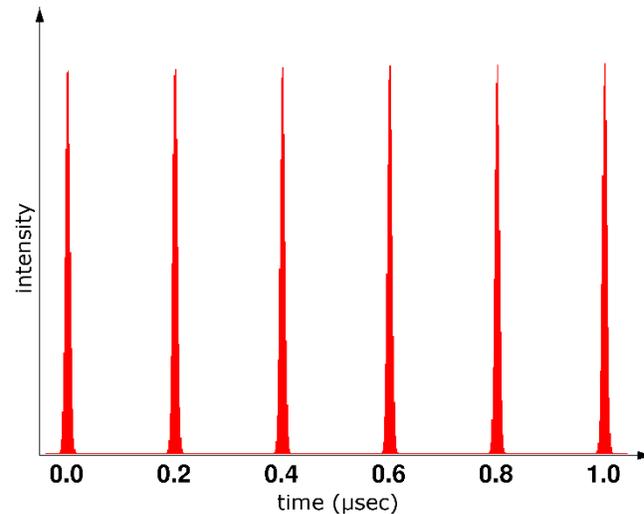
Struttura Temporale

In un sincrotrone gli elettroni viaggiano in 'pacchetti' temporalmente e spazialmente separati.

Tra un pacchetto di elettroni ed un altro intercorre un tempo dell'ordine dei ns.

La struttura temporale può essere utilizzata in esperimenti *time-resolved*: scattering, esperimenti *pump-probe*.

Non ha trovato una grande applicazione in cristallografia di proteine

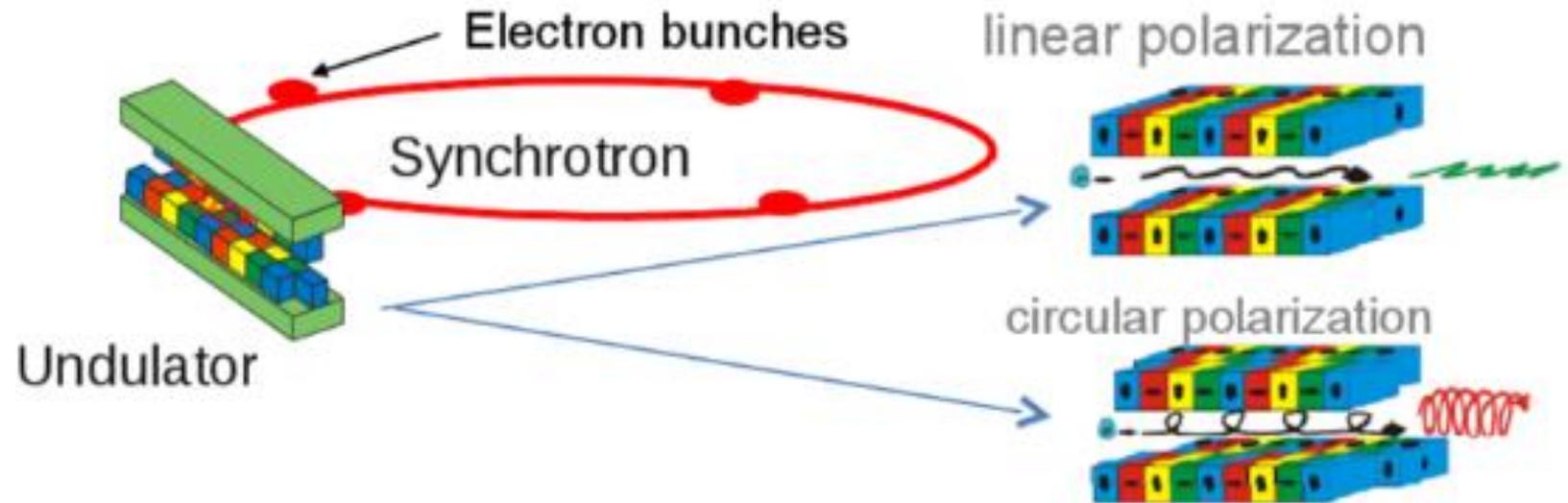


Polarizzazione

La radiazione di sincrotrone è linearmente polarizzata sul piano dell'orbita (piano ortogonale al vettore campo magnetico). Il grado di polarizzazione decresce quando ci allontaniamo dal piano dell'orbita. Questa polarizzazione può essere ulteriormente accentuata o modificata con opportuni dispositivi magnetici.

La polarizzazione è usata in esperimenti **dicroismo circolare** e in altre spettroscopie in cui è importante la polarizzazione della radiazione incidente.

La polarizzazione non è sfruttata in cristallografia di macromolecole, ma bisogna tenerne conto quando si analizzano i dati di diffrazione



Il Sincrotrone (Anello di accumulazione)

Come è fatto un sincrotrone

How a Synchrotron Works

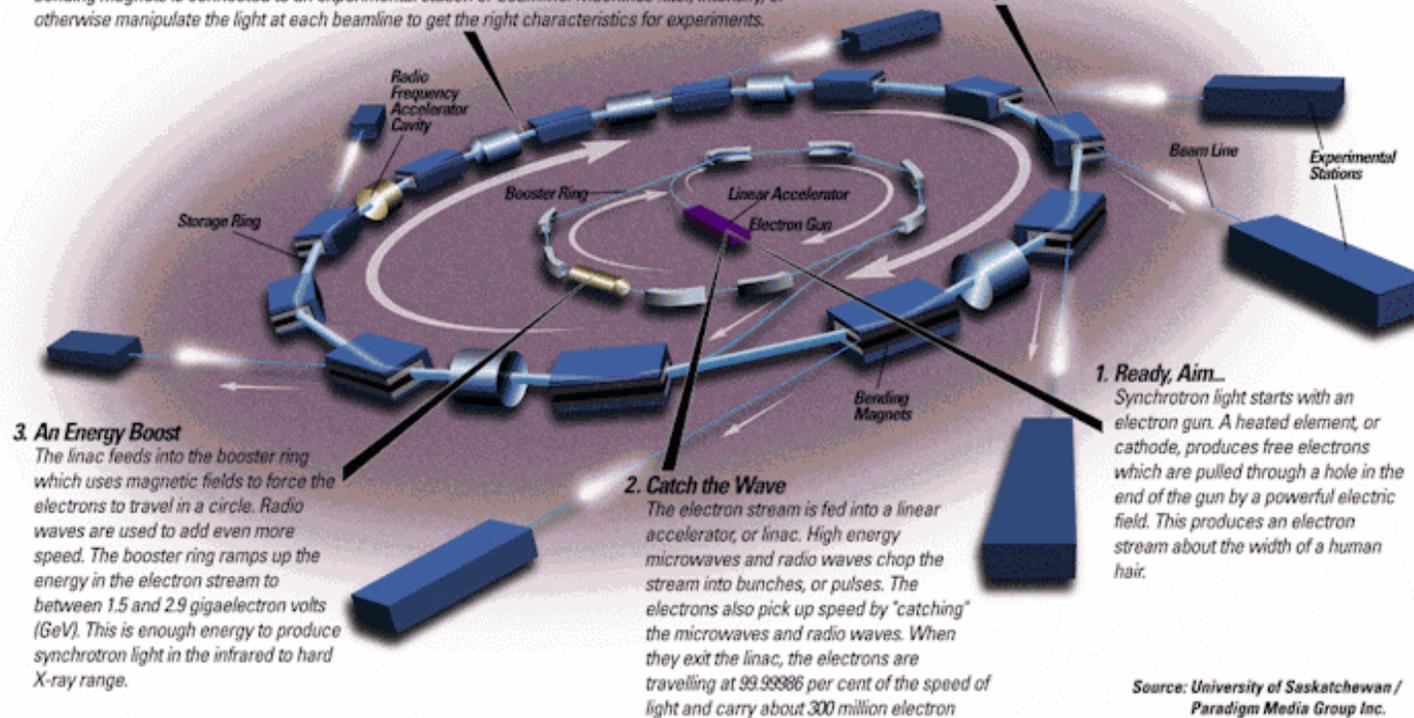
4. Storage Ring

The booster ring feeds electrons into the storage ring, a many-sided donut-shaped tube. The tube is maintained under vacuum, as free as possible of air or other stray atoms that could deflect the electron beam. Computer-controlled magnets keep the beam absolutely true.

Synchrotron light is produced when the bending magnets deflect the electron beam; each set of bending magnets is connected to an experimental station or beamline. Machines filter, intensify, or otherwise manipulate the light at each beamline to get the right characteristics for experiments.

5. Focusing the Beam

Keeping the electron beam absolutely true is vital when the material you're studying is measured in billionths of a metre. This precise control is accomplished with computer-controlled quadrupole (four pole) and sextupole (six pole) magnets. Small adjustments with these magnets act to focus the electron beam.

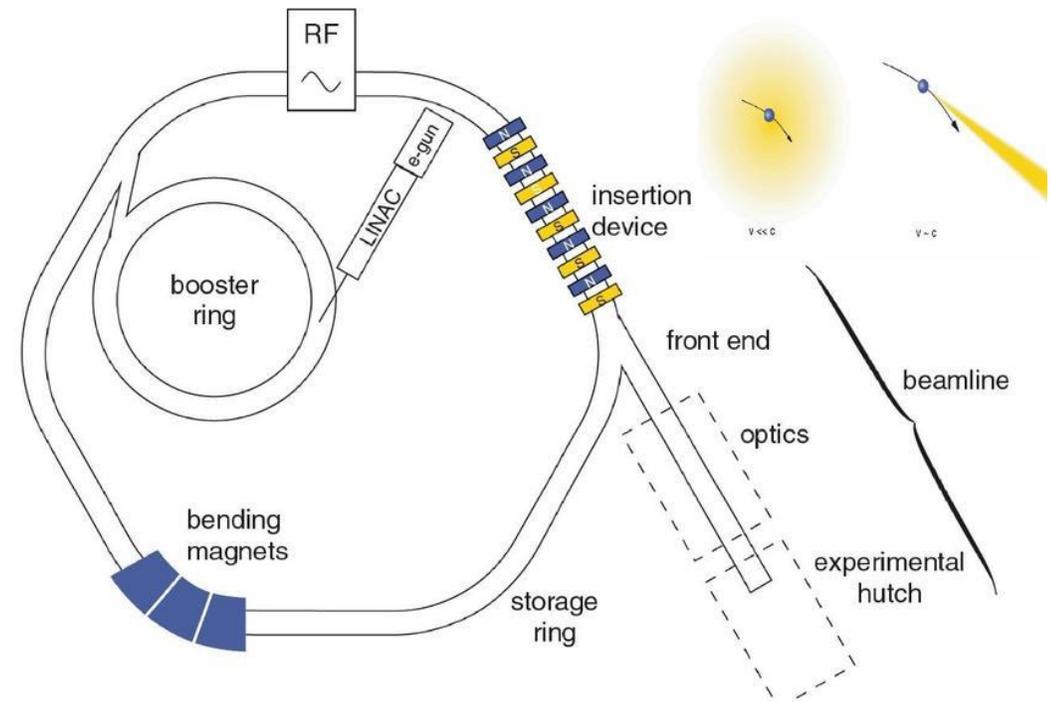


Come è fatto un sincrotrone

In un sincrotrone utilizzato per la produzione della radiazione di sincrotrone, gli elettroni percorrono **un'orbita chiusa** (circolare o quasi). Il raggio dell'**anello** è collegato all'energia degli elettroni in movimento (più è elevata l'energia degli elettroni e più il raggio deve essere grande)

Gli elettroni si muovono ad una velocità prossima a quella della luce e possiedono un'**energia** dell'ordine dei gigaelettronvolt (GeV).

Gli elettroni si muovono in pacchetti (**bunch**) e per un sincrotrone è possibile definire una **corrente**, dell'ordine dei **milli-Ampere** (mA), che indica quanti elettroni circolano nell'unità di tempo.



Parametri di un sincrotrone

L'**energia** di un sincrotrone, cioè l'energia 'trasportata' dai suoi elettroni, è importante poiché determina lo spettro di emissione del sincrotrone stesso.

Più l'energia è elevata e più lo spettro di emissione è spostato verso radiazioni di **lunghezza d'onda corta**.

I sincrotroni utili per la cristallografia di macromolecole hanno energie comprese tra i **2.5 e i 6 GeV** (circa)

Un altro parametro importante è l'intensità della **corrente di anello**, che determina l'intensità della radiazione emessa (**più è elevata la corrente e più intenso è il fascio di raggi-X prodotto**).

Nei sincrotroni moderni la corrente di un anello è tra i 150-500 mA.

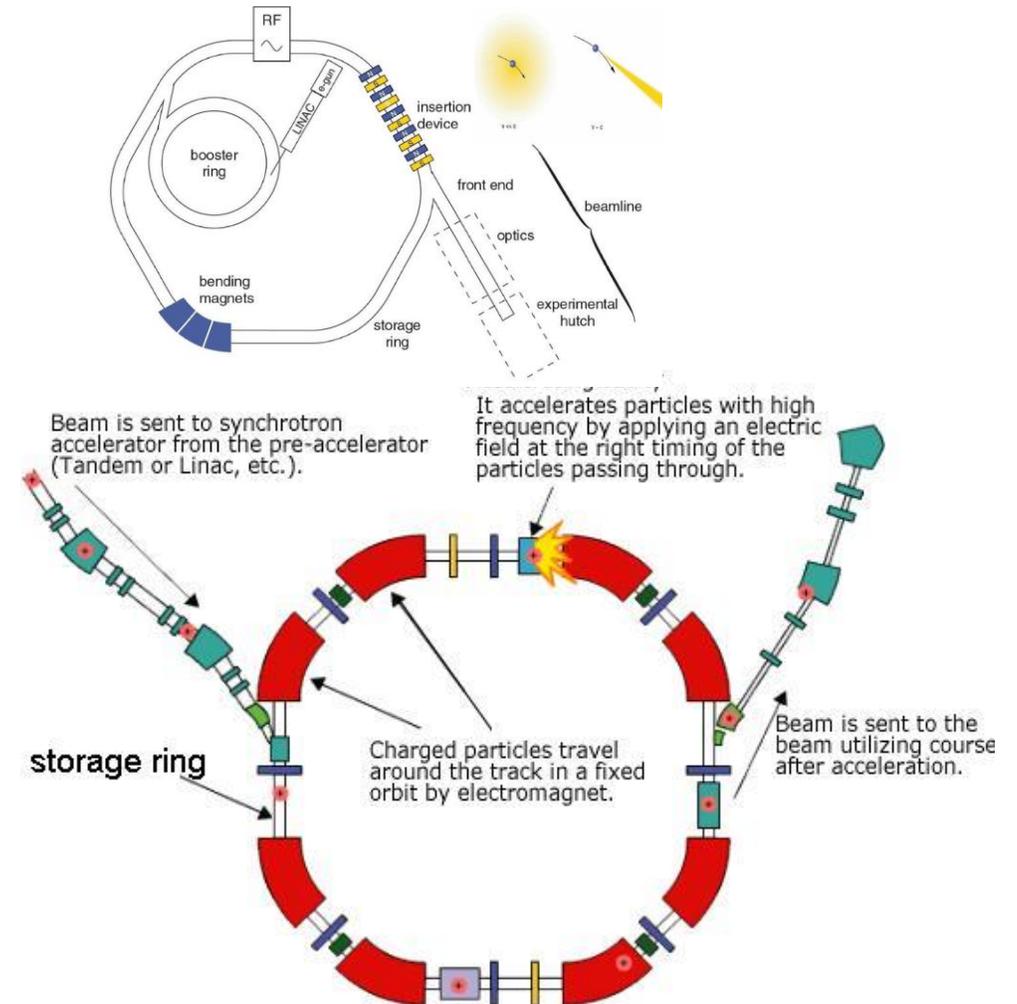
Altri parametri importanti sono le **dimensioni e la divergenza della sorgente** (**i pacchetti di elettroni che generano i raggi-X hanno una loro dimensione e divergenza**), che determinano a loro volta la dimensione e la divergenza della radiazione prodotta.

Più la dimensione dei pacchetti è piccola (dell'ordine delle decine di μm) e più sarà piccolo il fascio di raggi-X prodotto. Lo stesso discorso è valido per la divergenza.

Elementi di un sincrotrone

Un moderno sincrotrone dedicato a studi con radiazione di sincrotrone è in realtà un **anello di accumulazione** e si compone delle seguenti parti:

- **Electron-gun/linac.** Produce gli elettroni, li accelera (fino ad una certa energia) e li organizza in pacchetti.
- **Booster.** Dal Linac gli elettroni sono trasferiti in un booster (un anello più piccolo) dove gli elettroni sono ulteriormente accelerati fino alla loro energia finale.
- **Anello di accumulazione.** gli elettroni sono quindi immessi nell'anello e poi fatti circolare indefinitamente. Poiché ad ogni cambio di traiettoria operata dai magneti curvanti (**bending magnets**) perdono energia (la radiazione emessa), gli elettroni vengono 'riforniti' di energia dalle radiofrequenze. Sono inoltre presenti degli elementi elettromagnetici (**quadrupoli e sestupoli**) che hanno la funzione di mantenere la dimensione e divergenza del fascio di elettroni nell'anello di accumulazione, entro i valori richiesti.

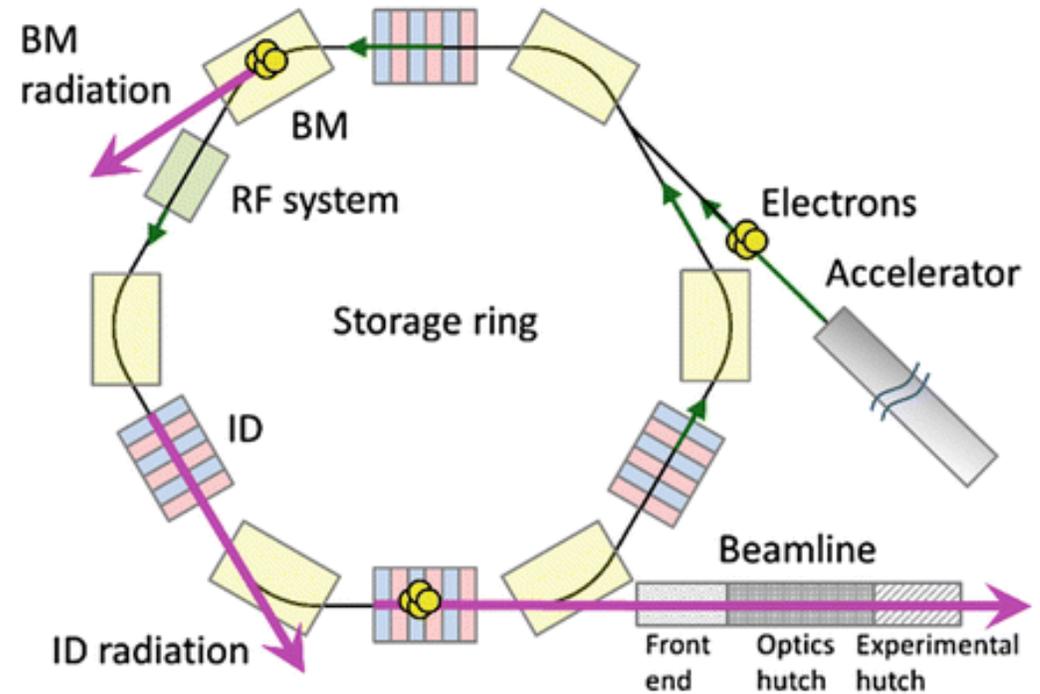


Sorgente di raggi-X

Ad ogni cambio di traiettoria degli elettroni vengono emessi raggi-X che sono incanalati nelle **beamlines**, il luogo dove avverranno gli esperimenti (con raggi-X).

I **magneti curvanti** (bending magnets; sono **dipoli**) curvano il fascio di elettroni e li mantengono in un'orbita chiusa. Nel curvare gli elettroni i magneti curvanti producono una 'lamina' di raggi-X.

Nei moderni **anelli di accumulazione** (storage rings) esistono altri dispositivi elettromagnetici in grado di produrre raggi-X: gli **Insertion Devices**

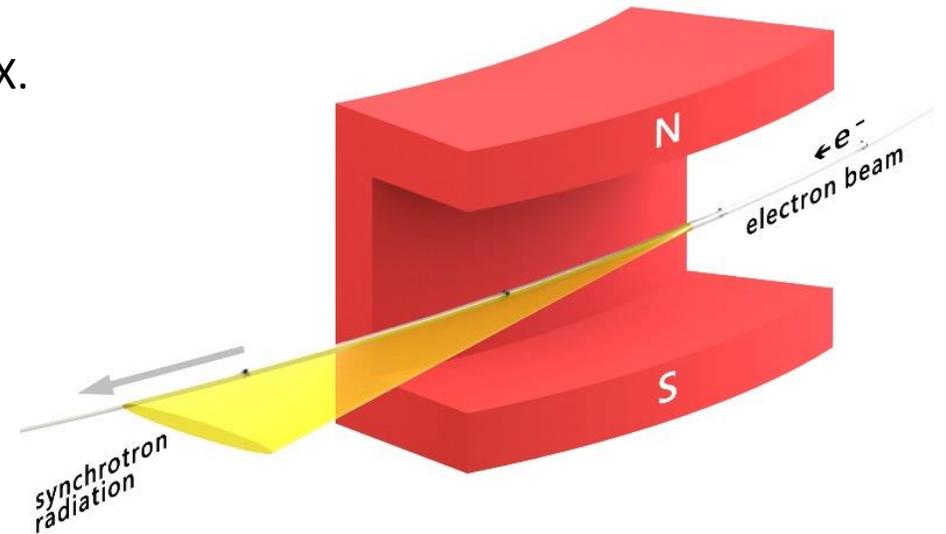
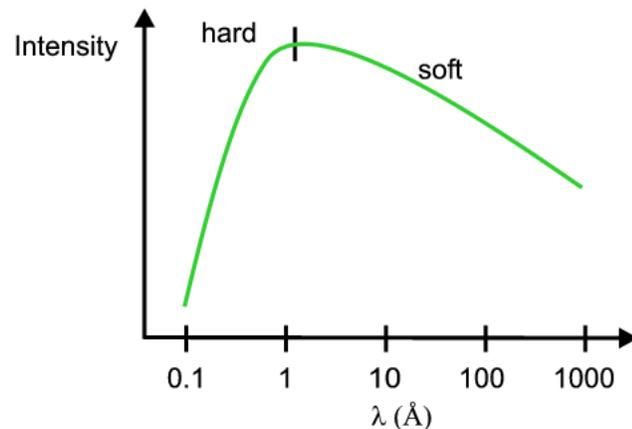


Magneti Curvanti

La curvatura degli elettroni prodotta dai **magneti curvanti** (bending magnets; sono **dipoli**) genera una 'lamina' di raggi-X.

Il fascio di raggi-X prodotto dai magneti curvanti sarà largo orizzontalmente ma stretto verticalmente.

I raggi-X prodotti da un magnete curvante avranno una piccola divergenza verticale e una larga divergenza orizzontale (lamina di raggi-X).



La radiazione è emessa su uno spettro continuo di lunghezze d'onda.

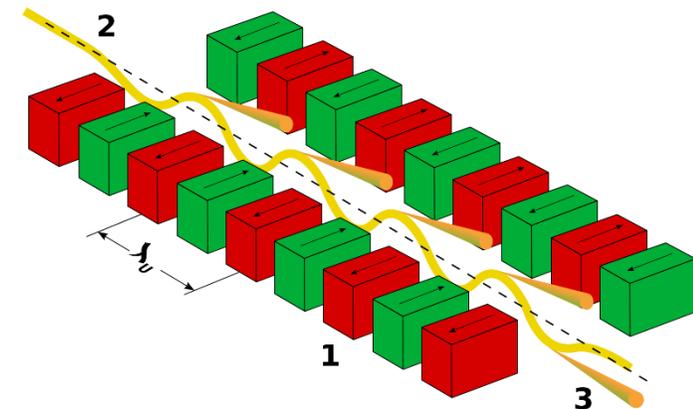
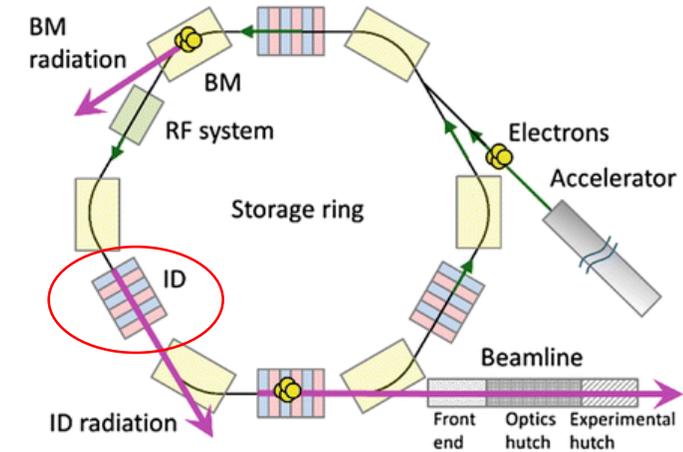
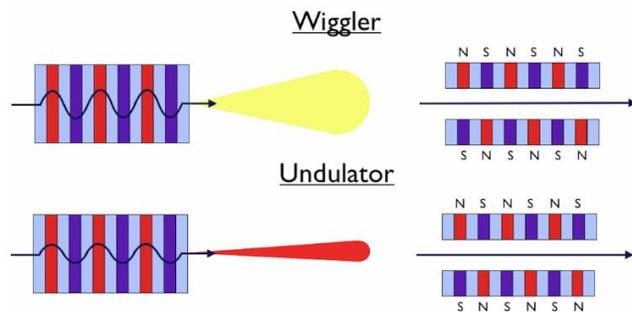
Le caratteristiche spettrali dipendono dai parametri dell'anello di accumulazione e dal campo magnetico e dal raggio di curvatura del magnete.

Insertion Devices

Gli **Insertion Devices** sono dei dispositivi elettromagnetici, inseriti nelle parti diritte dell'anello di accumulazione che, **pur non modificando il percorso complessivo del fascio di elettroni, impongono agli elettroni delle oscillazioni.**

Oscillando, gli elettroni emettono fasci di raggi-X che saranno complessivamente più intensi di quelli prodotti dai magneti curvanti e che potranno avere particolari proprietà.

Gli insertion devices si dividono in **Wigglers** e **Ondulatori** (Undulators).



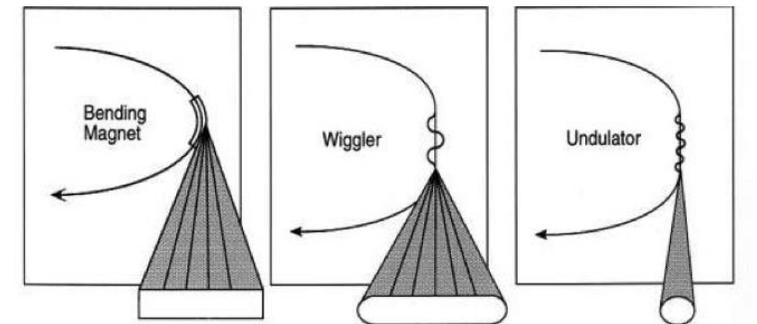
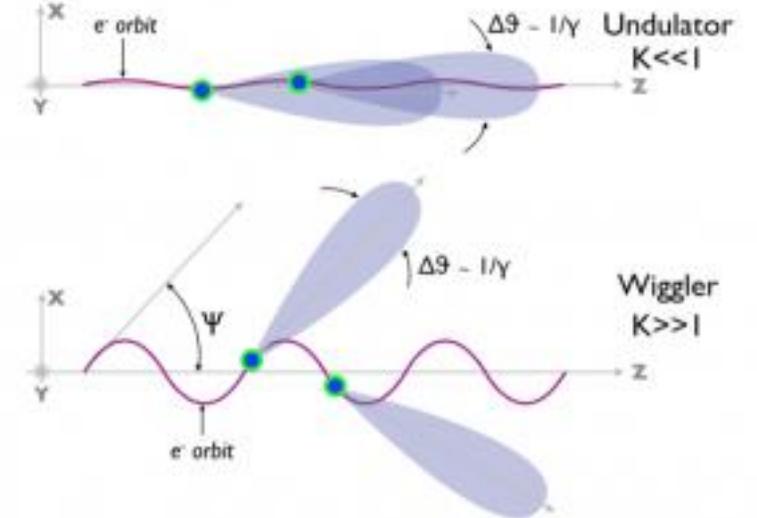
Wiggler

I wigglers e gli ondulatori differiscono principalmente per l'intensità del campo magnetico applicato e quindi l'ampiezza della deflessione degli elettroni.

Nei Wigglers ho una deflessione maggiore a causa di un campo magnetico più intenso. **I raggi-X prodotti ad ogni curvatura non danno luogo a fenomeni interferenziali**

I wigglers si comportano come se ci fossero tanti magneti curvanti in sequenza e producono quindi una **lamina larga** orizzontalmente (ma meno dei magneti curvanti) e stretta verticalmente. **Lo spettro di emissione è continuo**, la forma è quella dello spettro dei magneti curvanti. Le lunghezze d'onda emesse dal wiggler dipendono dal campo magnetico del Wiggler.

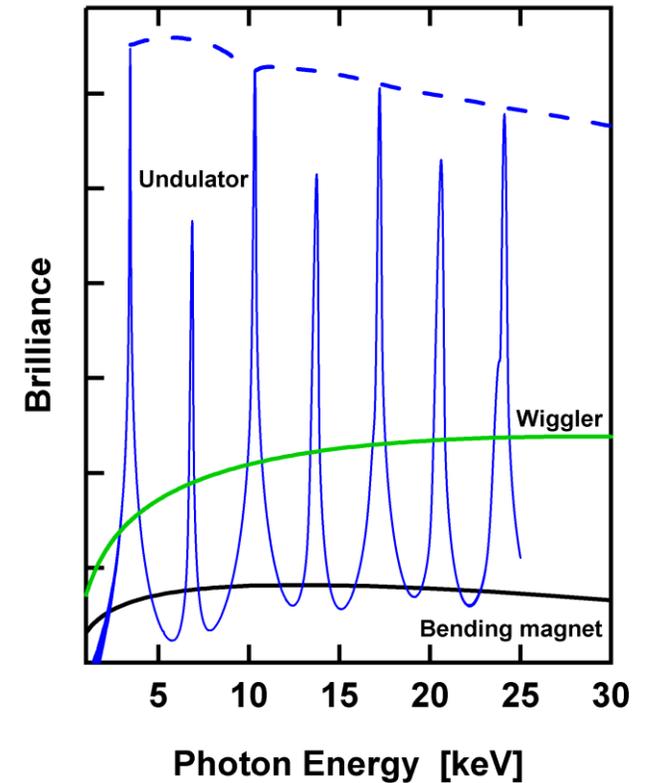
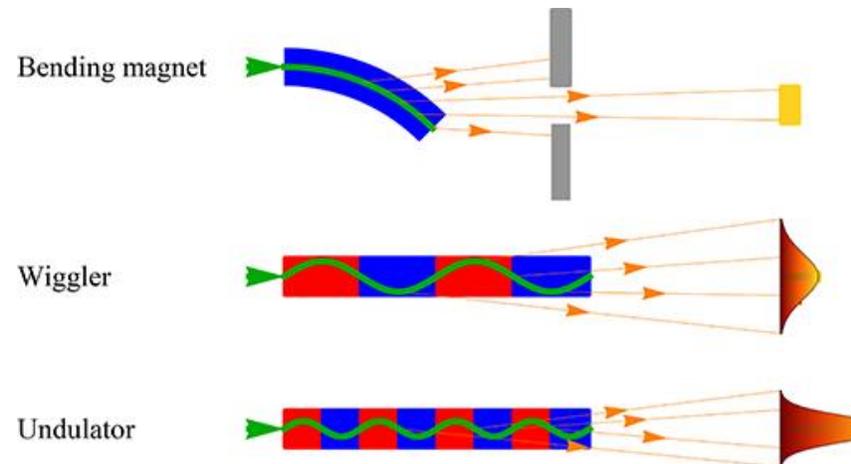
L'intensità dei raggi-X prodotta da un Wiggler è come quella di un magnete curvante ma moltiplicata per il numero di poli del magnete, quindi è **molto più intensa di un magnete curvante**.



Ondulatori

Negli ondulatori la deflessione degli elettroni è minore, quindi si manifestano effetti di interferenza tra i raggi-X prodotti, questo modifica le loro proprietà spettrali e di intensità

Gli **ondulatori** producono una radiazione **più intensa anche rispetto ai Wiggler**, ma con **spettro 'discontinuo'** per via di fenomeni di interferenza. **La radiazione emessa è molto collimata sia orizzontalmente che verticalmente.**



Confronto tra sorgenti

	Magnete Curvante		Wiggler		Ondulatore
Forma del fascio	Lamina molto larga orizzontalmente		Lamina (meno larga del magnete curvante)		'circolare' (spot)
Intensità	elevata		Elevata (più di un magnete curvante corrispondente)		Molto elevata
Spettro	continuo		continuo		Discontinuo
Collimazione	Solo verticalmente		Solo verticalmente		Verticalmente e orizzontalmente

Flusso e Brillanza

Le due grandezze principali che esprimono l'intensità di raggi-X emessi da una sorgente da sincrotrone (magnete curvante, wiggler o ondulatore), sono il Flusso e la Brillanza.

Il **Flusso** (Flux) esprime fondamentalmente la quantità di fotoni totale emessa dalla sorgente ad una data lunghezza d'onda.

La **Brillanza** (Brilliance o Brightness) si riferisce alla quantità di fotoni emessi dalla sorgente ad una certa lunghezza d'onda, ma normalizzati per le dimensioni e la divergenza (collimazione) della sorgente, cioè del fascio di elettroni.

La Brillanza è un parametro più utile del flusso per valutare l'intensità di una sorgente ad una certa lunghezza d'onda poiché tiene conto di quanto la radiazione è collimata e quindi effettivamente 'sfruttabile' nell'esperimento.

Gli ondulatori sono sorgenti più brillanti dei wigglers.

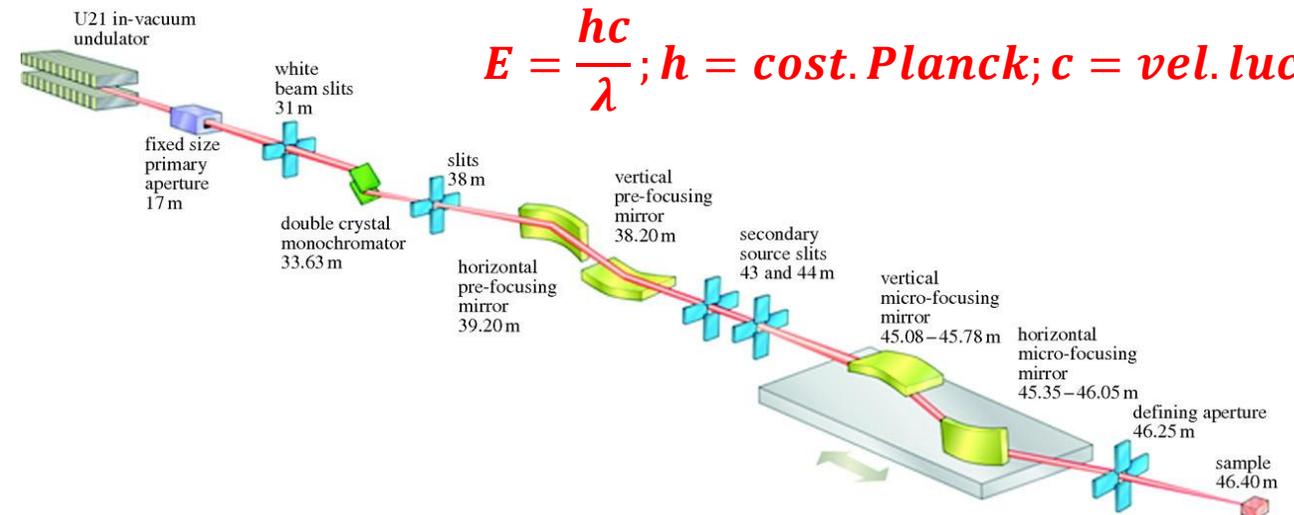
Sorgenti per cristallografia di proteine

Gli ondulatori sono sicuramente delle sorgenti più interessanti dei wiggler e dei magneti curvanti, tuttavia non sempre possono essere utilizzati per la produzione di raggi-X con la lunghezza d'onda appropriata per un esperimento di cristallografia di macromolecole (λ intorno ad 1 Å; 12400 eV)

Le beamlines XRD1 e XRD2 ad Elettra utilizzano dei Wiggler come sorgenti.

Nell'upgrade previsto in tempi recenti, è però prevista una nuova beamline da Ondulatore.

Nei moderni sincrotroni, la cui energia (di anello) è compresa tra i 2.5 e 3.0 GeV, vengono utilizzati *ondulatori 'in vuoto'* (i magneti sono in vuoto, come gli elettroni). In questo modo si riesce ad avere un fascio **di raggi-X di elevatissima intensità, di dimensioni ridotte (5-50 μm) e di λ variabile tra 0.8 – 1.5 Å**



$$E = \frac{hc}{\lambda}; h = \text{const. Planck}; c = \text{vel. luce}$$

Beamlines e sistemi ottici

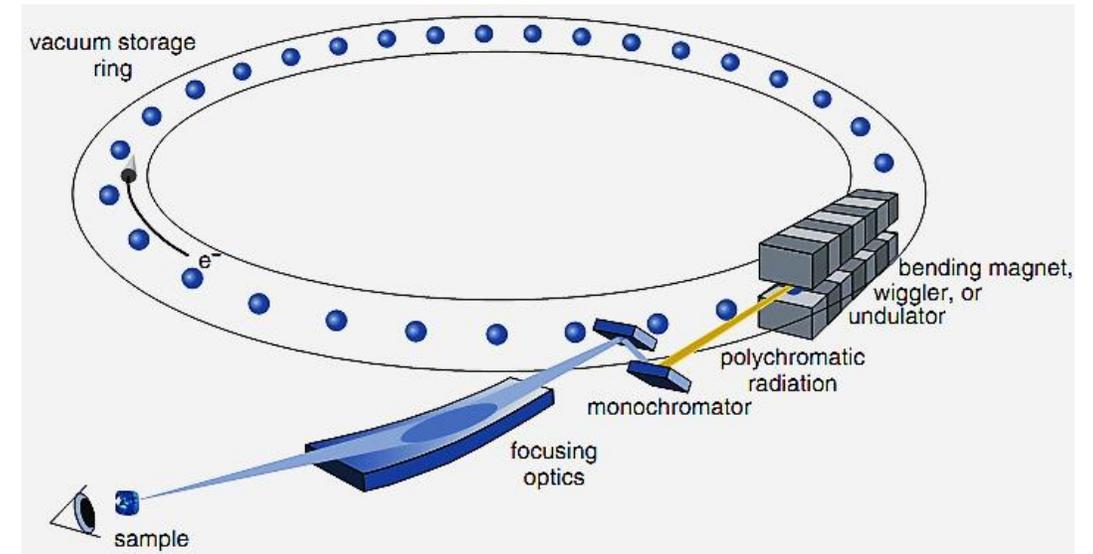
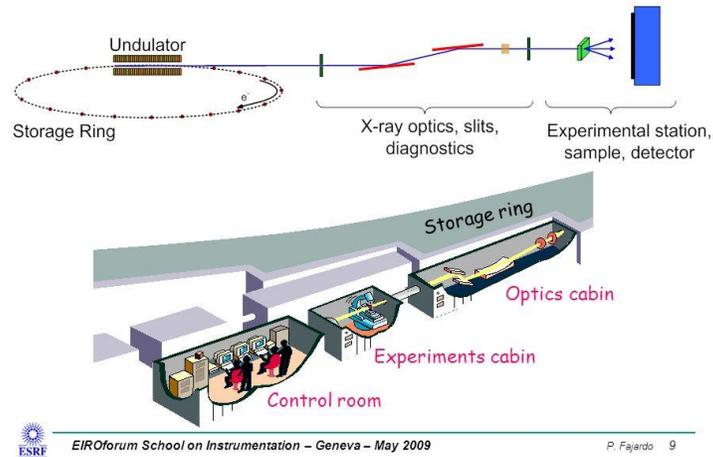
Beamlines

I raggi-X prodotti dalla sorgente vengono convogliati in ‘tubi’ in acciaio in ultra-alto vuoto (10^{-10} mbar) affinché siano utilizzati per gli esperimenti. La radiazione prodotta dalla sorgente è ‘bianca’ nel senso che non è monocromatica ma contiene uno spettro più o meno ampio di lunghezze d’onda.

Affinché il fascio di raggi-X sia effettivamente utilizzabile per la misura o esperimento, è necessario che sia monocromatico, di lunghezza d’onda opportuna e abbia dimensioni adeguate.

La beamline è il luogo dove sono effettuate tutte quelle operazioni che permettono di avere un fascio di raggi-X monocromatico pienamente utilizzabile per l’esperimento.

A synchrotron radiation beamline



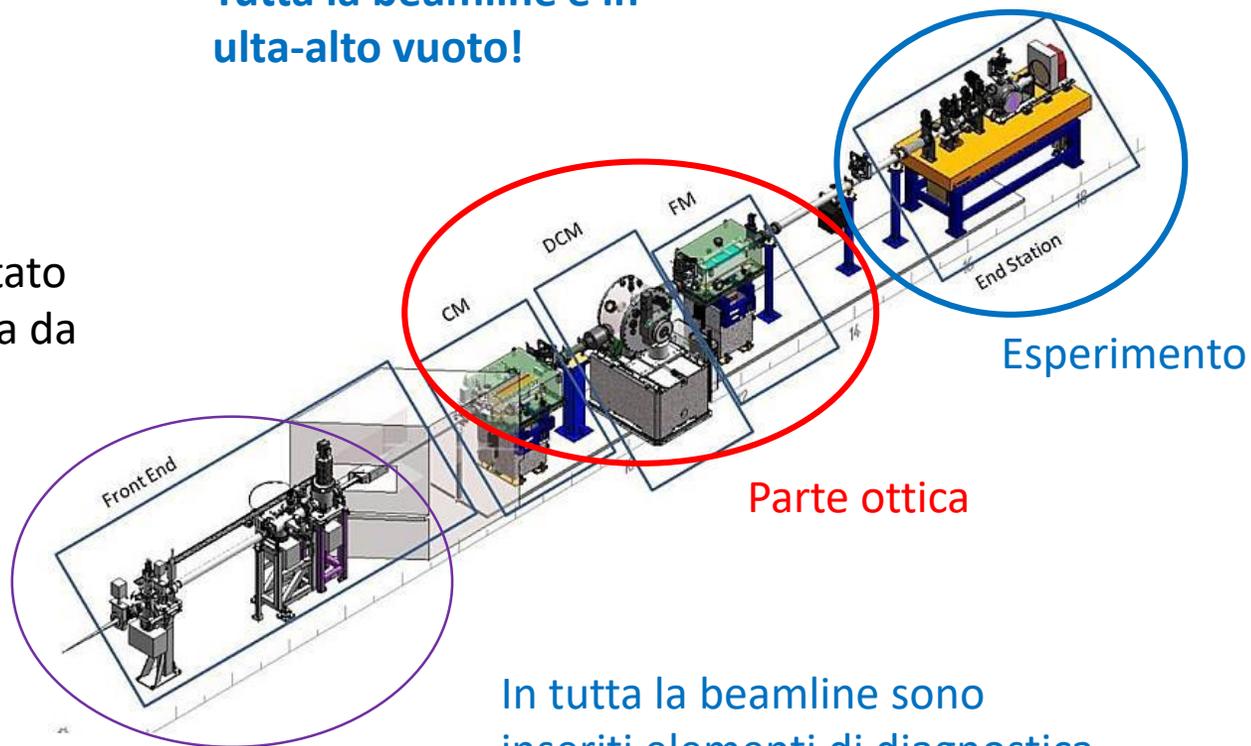
Struttura di una beamline

Una beamline può essere suddivisa in tre sezioni:

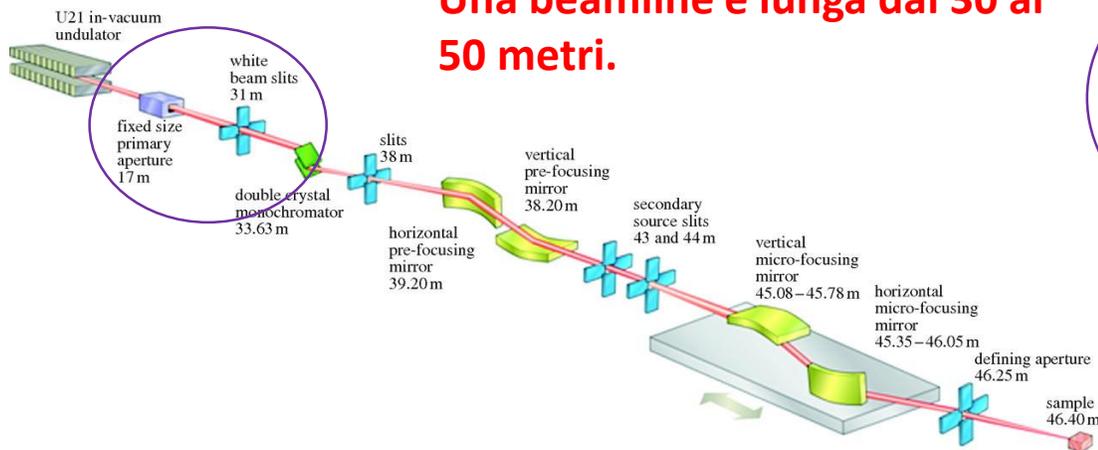
- Il front-end
- La parte ottica (optical hutch)
- La stazione sperimentale

Nel front-end il fascio di radiazione bianca è delimitato da un sistema di fenditure ed eventualmente filtrata da componenti a bassa energia.

Tutta la beamline è in ultra-alto vuoto!



Una beamline è lunga dai 30 ai 50 metri.



In tutta la beamline sono inseriti elementi di diagnostica della qualità del fascio e della strumentazione.

Sistema Ottico di una beamline

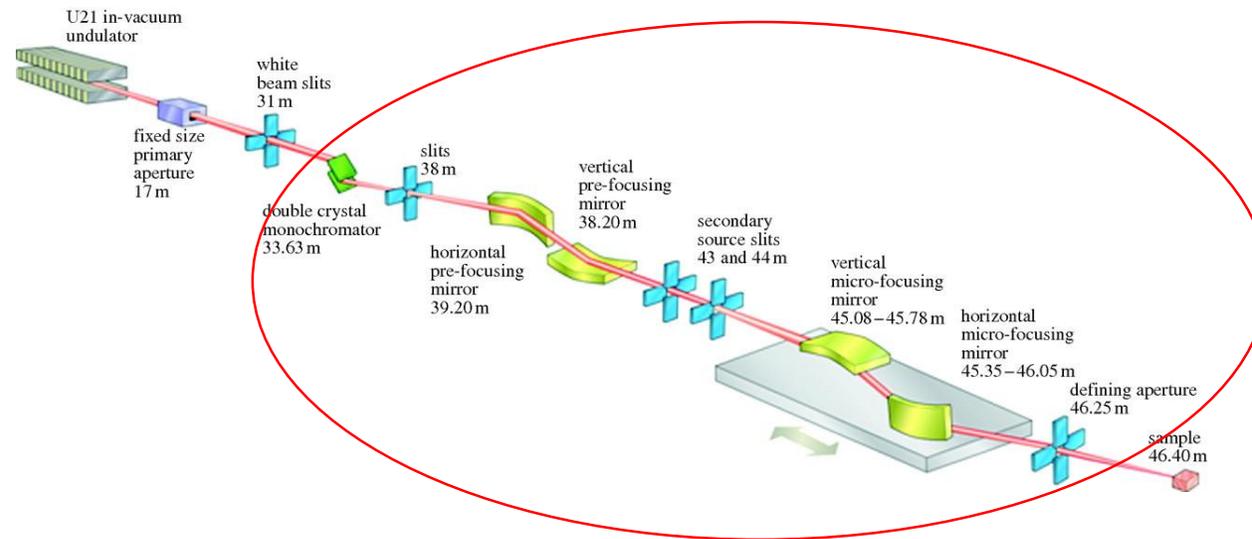
La parte ottica è il cuore della beamline e in generale si compone dei seguenti elementi (oltre alle parti di diagnostica):

Un sistema di specchi per la **focalizzazione** dei raggi-X

Un sistema per **selezionare la lunghezza d'onda** opportuna (**monocromatore**)

Un sistema di fenditure (slits) per la delimitazione del fascio di raggi-X

Il sistema può essere più o meno complesso a seconda della tipologia o qualità dei raggi-X necessaria per l'esperimento.



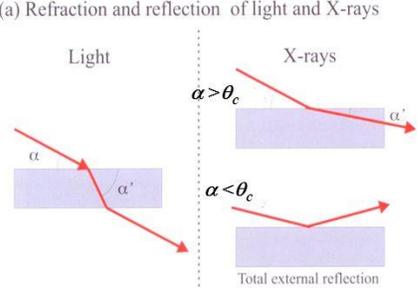
Focalizzazione dei raggi-X

I raggi-X hanno indice di rifrazione molto vicino ad 1 nel passare da un mezzo ad un altro, di conseguenza non possono essere focalizzati con delle lenti.

I raggi-X sono focalizzati per mezzo di specchi che sfruttano il fenomeno della riflessione totale per cui al di sotto di un certo angolo di incidenza, i raggi-X sono completamente riflessi dal mezzo. Tale angolo (*angolo critico*) dipende dalla natura chimica del mezzo

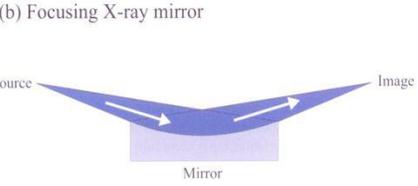


X-ray Mirrors



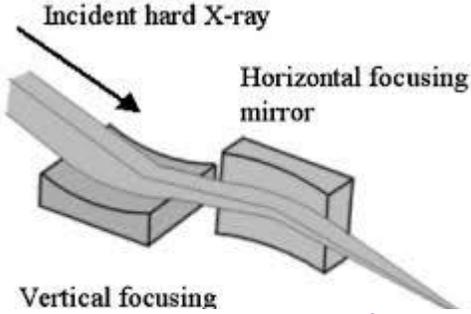
The index of refraction for X-rays is slightly less than 1

θ_c : critical angle where total reflection occurs

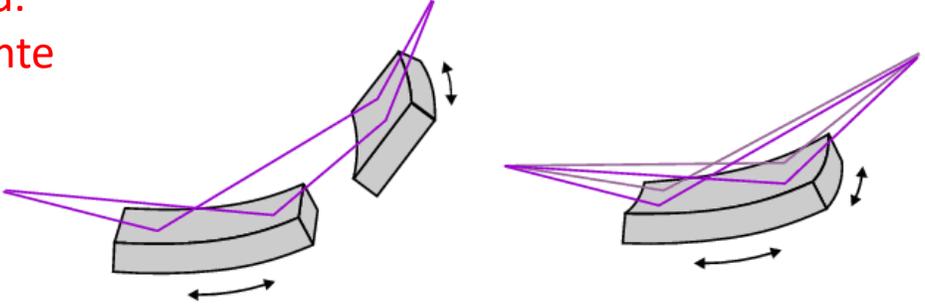


Plane mirror: collimation;
Curved mirror (spherical, elliptical, etc.): focusing₃₁

Uno specchio è costituito di un materiale, tipicamente silicio, ricoperto di un materiale metallico come Rh, Pt, Pd. E curvato opportunamente



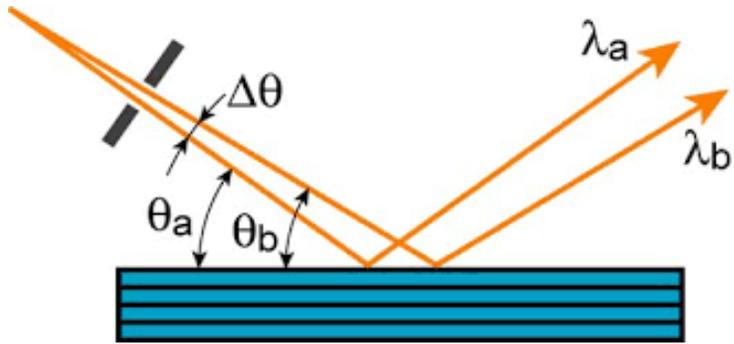
La configurazione può essere complessa



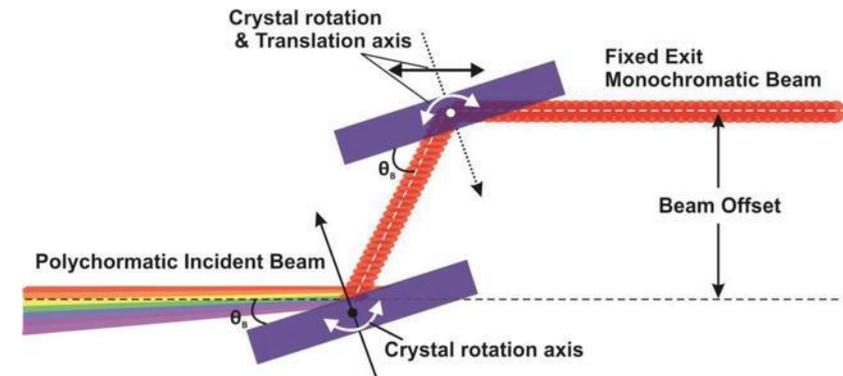
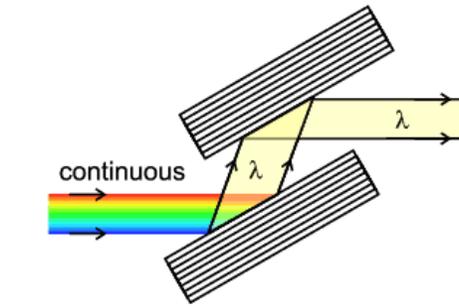
Monocromatore

La radiazione proveniente dalla sorgente è una radiazione policromatica, per un esperimento di cristallografia abbiamo bisogno di una radiazione monocromatica.

Per selezionare una radiazione di lunghezza opportuna, per lunghezze d'onda dell'ordine dell' Angstrom, sfruttiamo la legge di Bragg. **Ruotando il cristallo cambiamo l'angolo di incidenza del raggio incidente e selezioniamo la lunghezza d'onda opportuna.**



$$n\lambda = 2d\sin\theta$$



Tipicamente si utilizzano due cristalli di silicio, per via delle sue caratteristiche cristalline di cristallo perfetto. Si usano due cristalli paralleli che ruotano insieme, in modo da non alterare molto la posizione in uscita dei raggi-X. L'angolo di Bragg è lo stesso per i due cristalli.

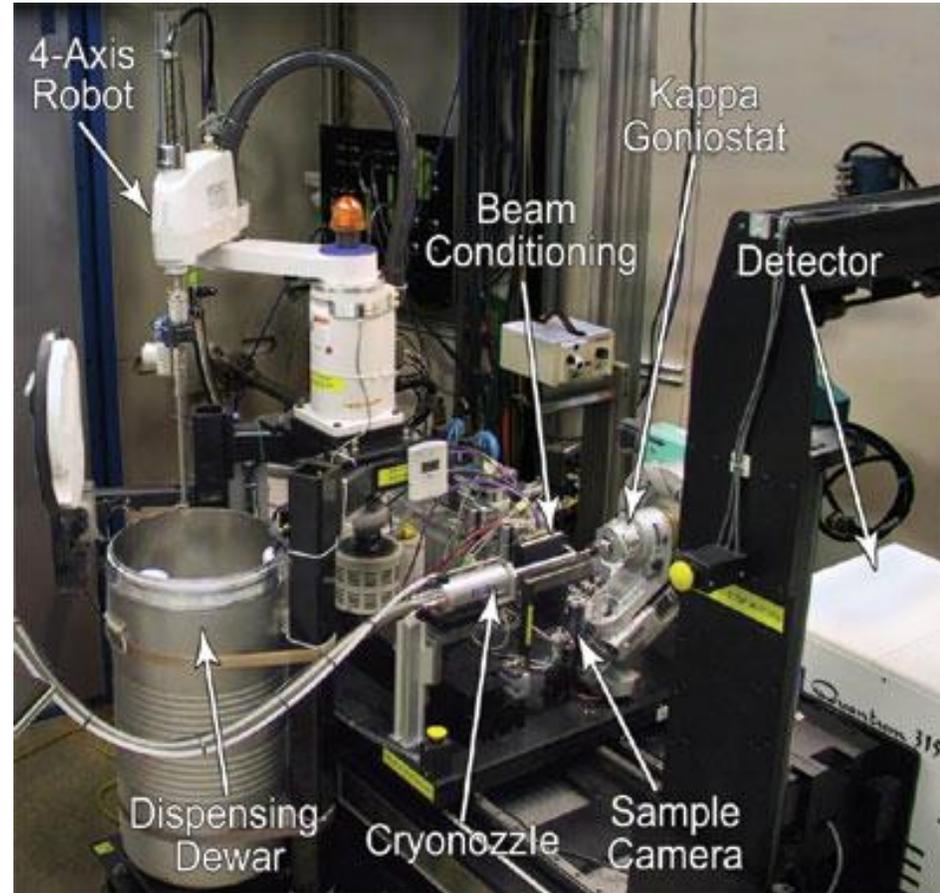
Apparato sperimentale

Stazione (Hutch) sperimentale

E' il luogo dove viene effettuato l'esperimento.

Sono presenti il goniometro e il detector.

Ci sono inoltre una serie di apparati necessari all'esperimento.

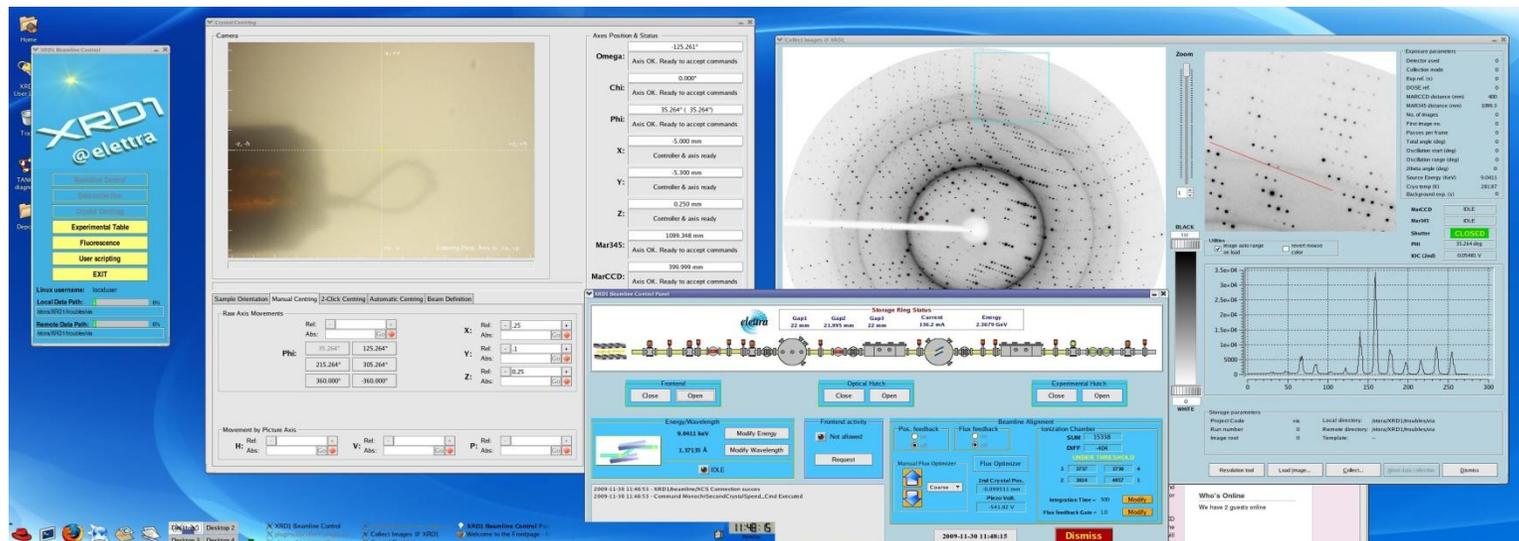


Stazione di Controllo

L'insieme dei controlli e operazioni da fare può essere di una certa complessità.

Un esperimento di diffrazione di raggi-X ad un sincrotrone pone seri problemi di radioprotezione, l'esperimento deve essere controllato 'in-remoto'

L'esperimento e il controllo della beamline sono effettuate da una 'stazione di controllo'.

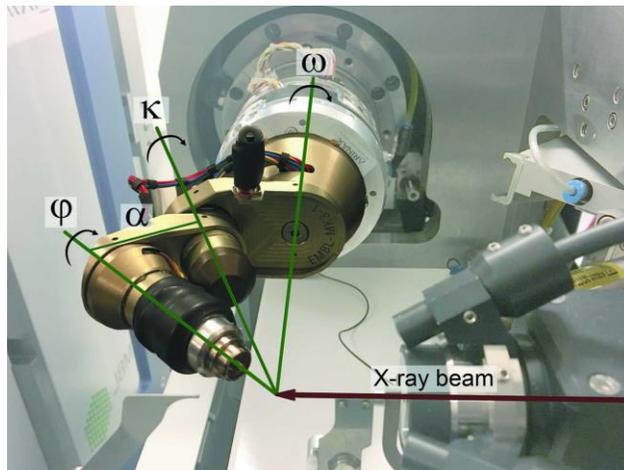


Goniometro

Il cristallo viene collocato su di un goniometro che lo ruoterà secondo quanto previsto dal **metodo del cristallo rotante**.

I goniometri possono essere piuttosto semplici (**un solo asse**, ovvero rotazione intorno ad una singola direzione), o più complessi (**multi-asse**, rotazione possibile lungo diverse orientazioni).

Goniometro
Multi-asse



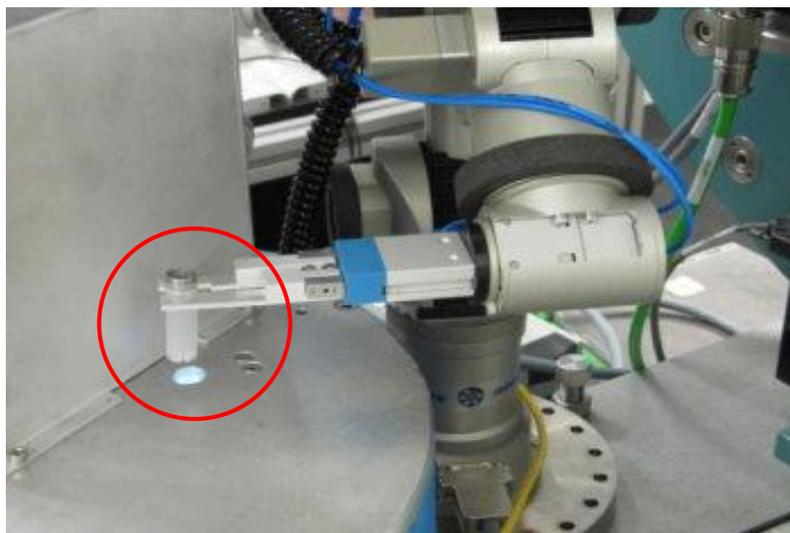
Goniometro
monoasse



Montaggio automatico

I cristalli congelati sono mantenuti a temperatura criogenica e sono montati sul goniometro per mezzo di un sistema robotico controllato remotamente.

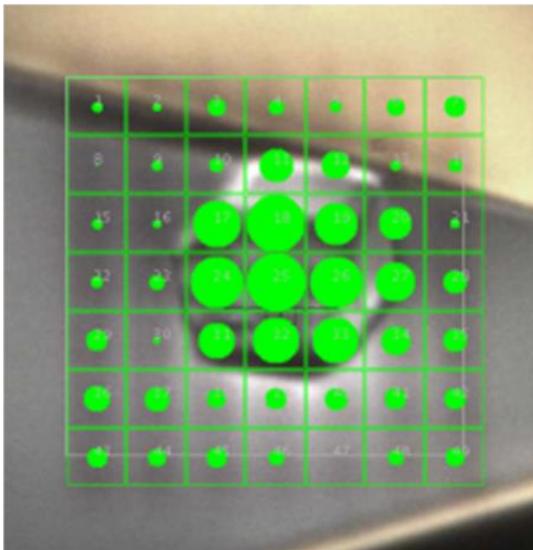
Il cristallo montato su un goniometro è mantenuto alla temperatura criogenica per mezzo di un criostato che investe il cristallo con un flusso di azoto gassoso alla temperatura voluta (100 K, in genere)



Acquisizione con luce di sincrotrone

Con le moderne sorgenti di luce di sincrotrone, alla luce delle dimensioni molto contenute del fascio di raggi-X (pochi μm , **microbeam**) è possibile mettere in atto nuovi metodi di acquisizione.

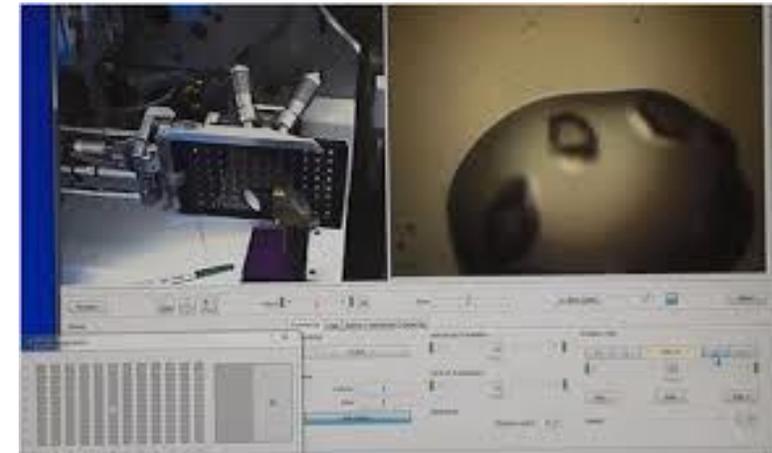
Ad esempio è possibile fare una **scansione** di un cristallo per centrare il punto di miglior diffrazione, o acquisire dati direttamente dal contenitore (piastra multiwell) di crescita dei cristalli.



Grid Scan



Helical Scan



In-situ Scan

Rivelatori di raggi-X usati in cristallografia di macromolecole

Rivelatori per raggi-X

I detectors per raggi-X sono usati per rivelare i raggi-X diffratti dal cristallo. Devono avere una serie di proprietà:

- Devono essere **bidimensionali** e avere una superficie attiva molto ampia
- Devono avere una **Quantum Detection Efficiency (QDE)** il più possibile vicina ad 1, ovvero devono essere capaci di assorbire la più elevata percentuale possibile dei fotoni incidenti
- Devono avere un **Dynamic Range** più ampio possibile, ovvero devono poter rivelare sia intensità diffratte molto deboli che estremamente intensi
- Devono avere una **risposta lineare** su tutto il range dinamico, cioè deve sempre esistere una risposta lineare tra fotoni incidenti e fotoni rivelati
- La risposta del detector deve essere **uniforme** su tutta la superficie
- Il detector deve poter discriminare spot molto vicini, deve cioè avere una buona **Point Spread Function (PSF)**.
- Devono avere un Tempo Morto (**Dead Time**) molto basso, ovvero devono poter discriminare due eventi molto vicini nel tempo.

Tipologie di Rivelatori per raggi-X

Distinguiamo tra:

- **Integrating Detectors** (Integratori): Viene generato un segnale proporzionale alla totalità dei fotoni assorbiti nel corso dell'esposizione. La lettura è effettuata al termine dell'esposizione
- **Single Photon Counters**: Ogni fotone è contato individualmente appena arriva sul detector

Integrating Detectors:

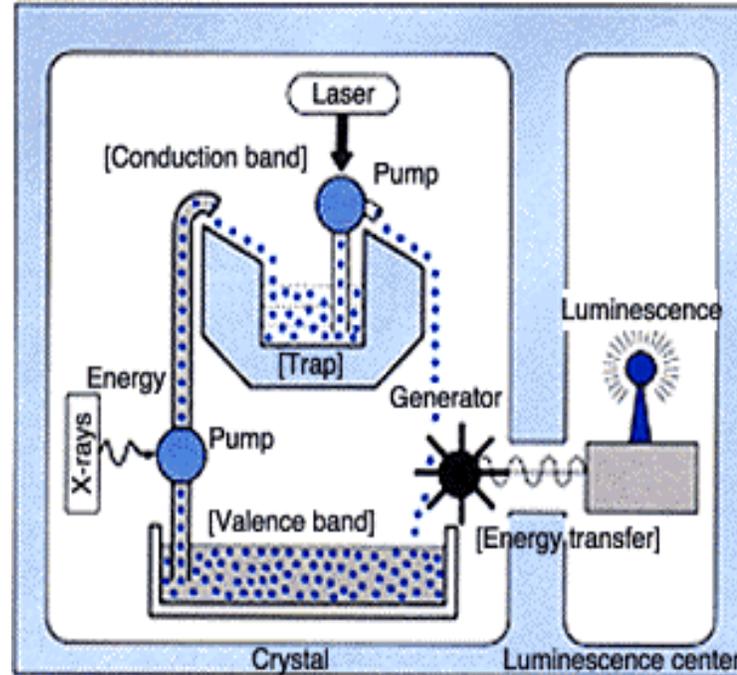
- Film fotografico (non più usato)
- Imaging Plate (IP). Non più usato in cristallografia
- **Charge Coupled Device (CCD)**

Single Photon Counters:

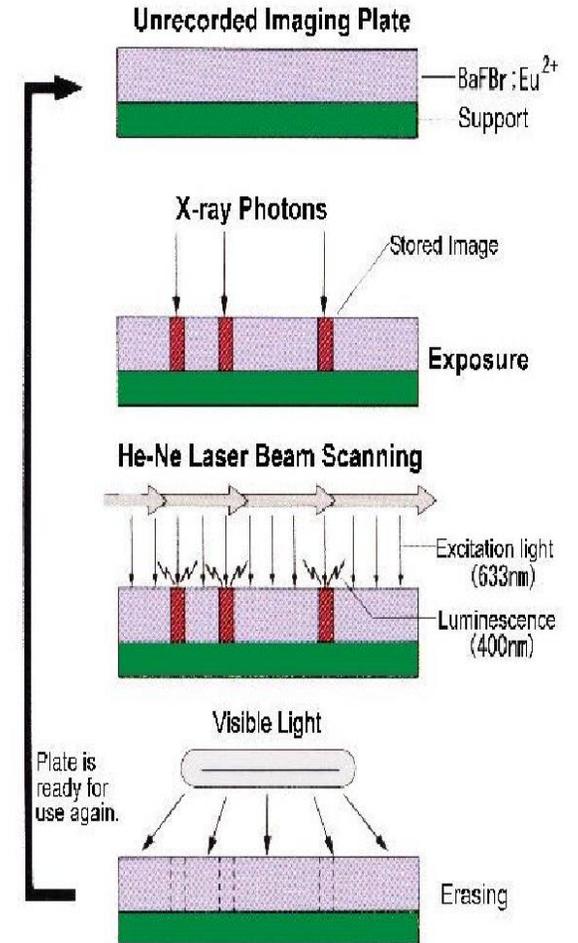
- Multiwire Proportional Counters (MWPC): obsoleti
- **Pixel Array Detectors (più usato al giorno d'oggi)**

Imaging Plate

I fotoni X eccitano in una banda metastabile gli elettroni di un fosforo. In seguito all'illuminazione con un laser di lunghezza d'onda opportuna, gli elettroni tornano allo stato iniziale e in questo processo viene emessa una radiazione luminosa che è rivelata da un fotomoltiplicatore. L'intensità della radiazione emessa è proporzionale all'intensità dei fotoni X



Gli IP hanno una buona QDE, una buona PSF e un ottimo range dinamico. Hanno però un tempo complessivo di lettura dell'ordine dei minuti (**lenti!**).



CCD

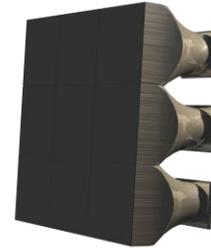
Nelle CCD i raggi-X colpiscono un fosforo che produce fotoni (di una certa lunghezza d'onda) a loro volta capaci di promuovere la formazione di elettroni liberi in un chip di silicio, gli elettroni sono accumulati e rivelati da un contatore elettronico.

Il chip di silicio della CCD è fisicamente piuttosto piccolo e richiede una fosforo più grande con successiva demagnificazione. Alternativamente è possibile avere in parallelo diversi chip di silicio. Le CCD hanno superficie generalmente un po' più piccola degli IP.

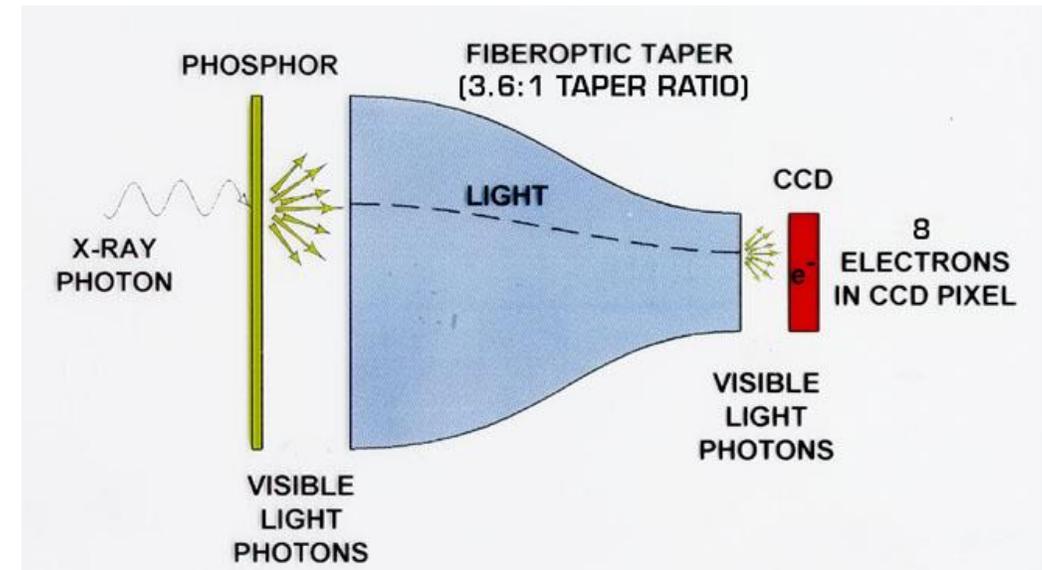
Hanno una buon Dynamic Range, buona QDE ed eccellente PSF.

Soprattutto **hanno un tempo di lettura dell'ordine dei secondi.**

Sono ancora usati come rivelatori per gli strumenti di laboratorio



CCD in parallelo



Pixel Array Detector

Come le CCD, I Pixel Array Detector (PAD) sono basate sulla tecnologia del Silicio e sono di fatto delle matrici di 'fotomoltiplicatori digitali', dove ogni singolo fotone incidente su di un pixel è rivelato e 'contato' dalla sua elettronica di conteggio direttamente 'saldata' sul chip di silicio

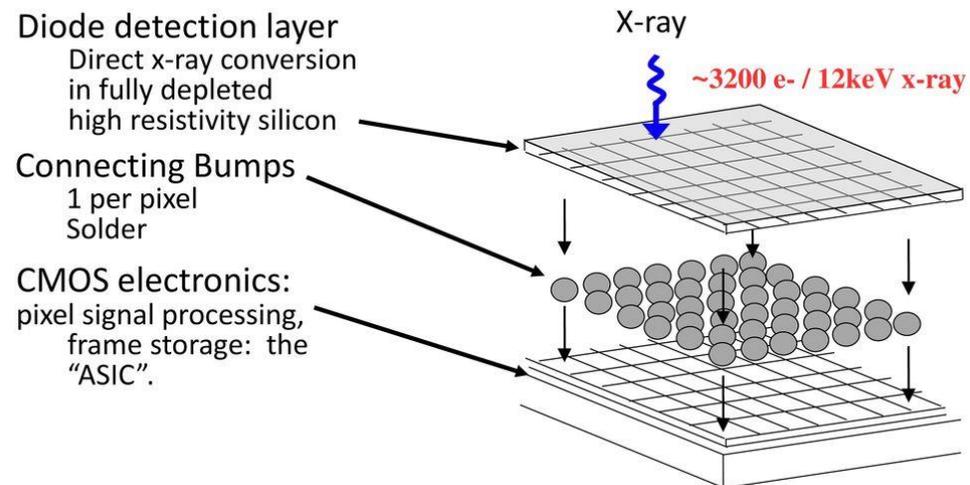
Nella loro configurazione attuale (Dectris Eiger 16M) i PAD hanno un eccellente Dynamic Range e PSF. Oramai hanno dimensioni del pixel abbastanza contenute e soprattutto **hanno un rumore elettronico pari a zero e tempi di lettura dell'ordine del ms.**

Sono oramai gli unici detector utilizzati presso i sincrotroni (molto usati anche nei laboratori).

Sono costosi (Dectris Eiger 16M circa 2 milioni di €)



Basic Structure of Pixel Array Detectors



Laser a elettroni liberi: X-FEL

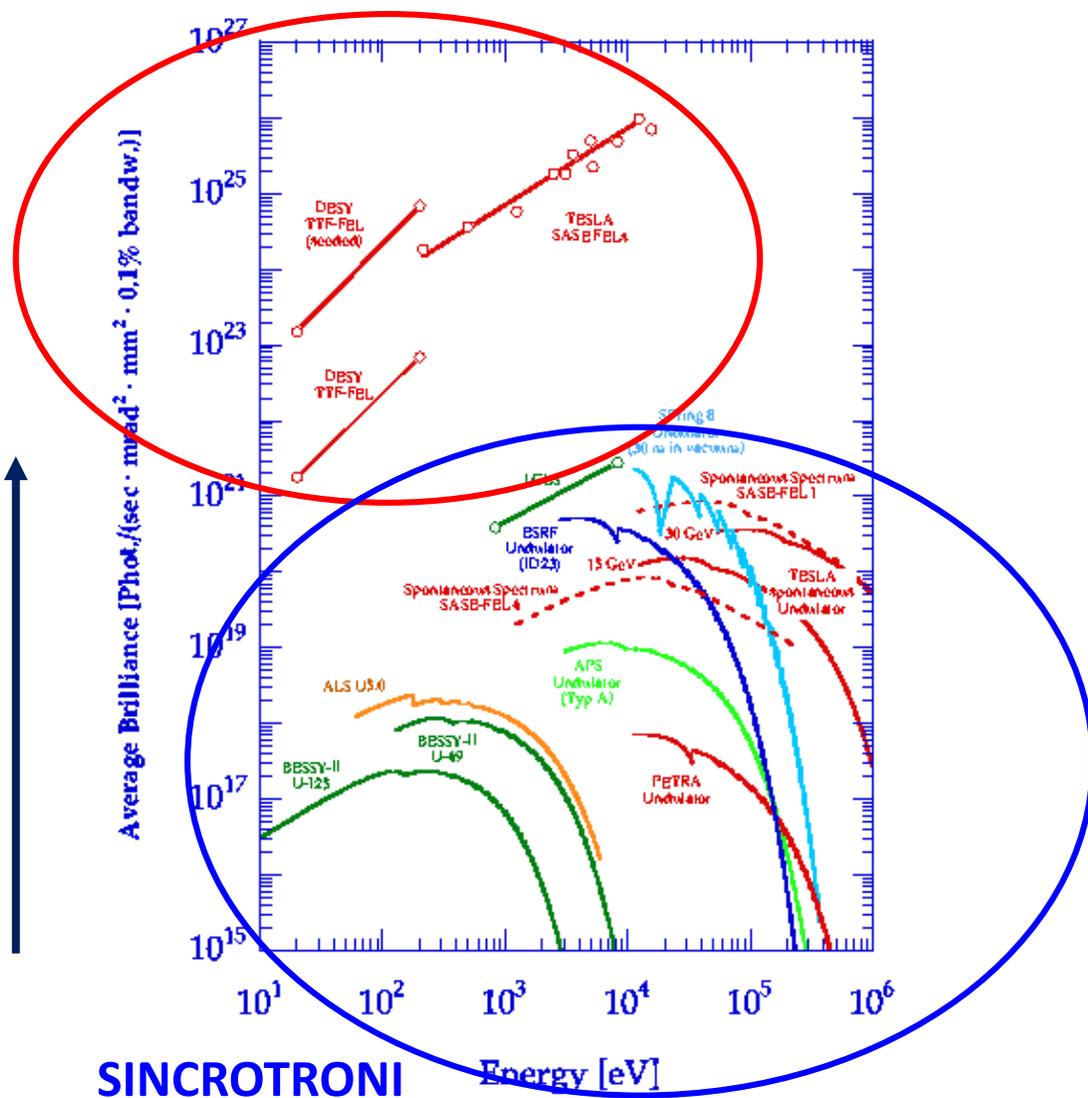
XFEL - 1

I laser ad elettroni liberi: Free Electron Laser (FEL) sono acceleratori capaci di produrre raggi-X con **intensità addirittura maggiori dei più potenti sincrotroni**.

Per quanto l'intensità sia la caratteristica più evidente di un X-FEL, questo ha altre proprietà interessanti, non riscontrabili nemmeno nei moderni sincrotroni (ad esempio la **coerenza**)

Intensità

X-FEL



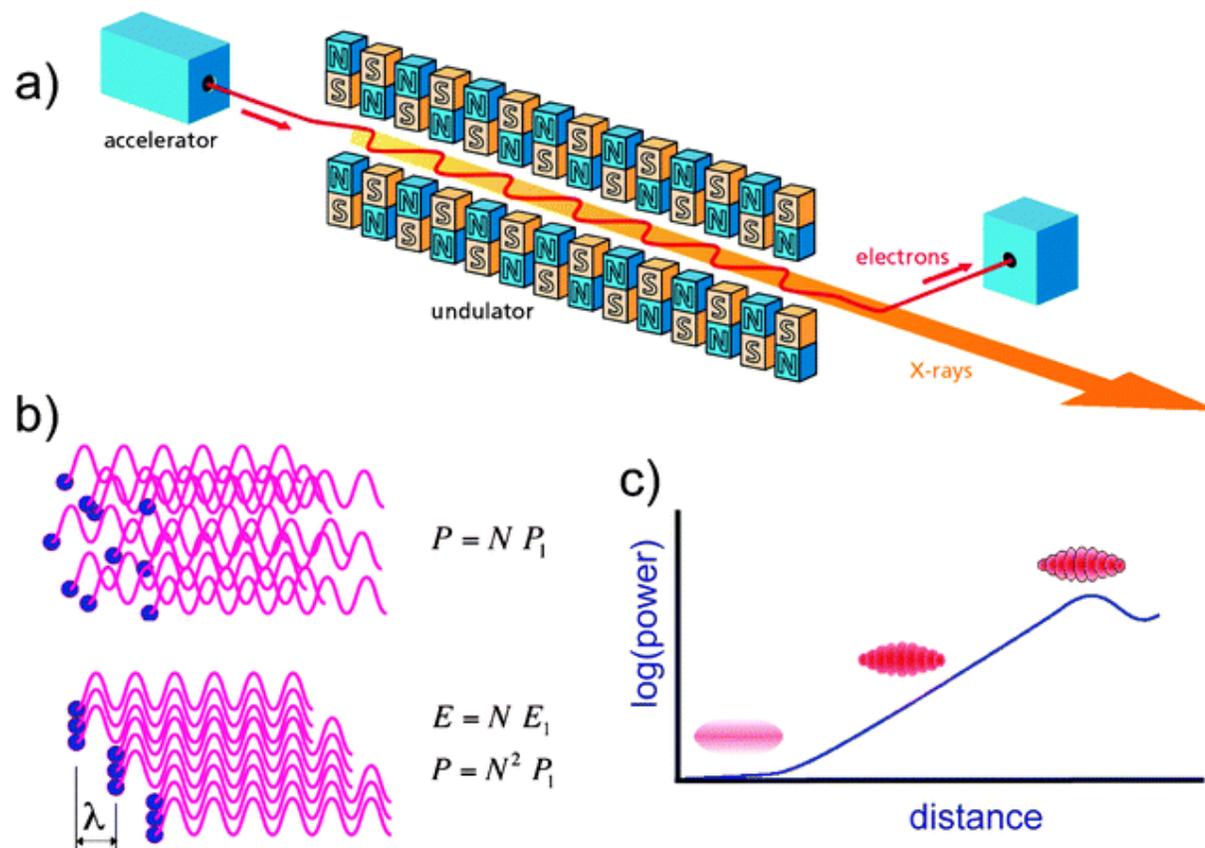
XFEL - 2

I FEL per raggi-X con λ intorno ad 1 \AA sono basati sulla tecnologia degli acceleratori lineari.

Gli elettroni accelerati sono fatti oscillare da ondulatori molto lunghi (decine di metri) generando radiazione elettromagnetica incoerente.

L'interazione della radiazione con gli elettroni causa il fenomeno del 'microbunching' degli elettroni che così si organizzano in pacchetti distanti una lunghezza d'onda l'un l'altro.

I pacchetti di elettroni iniziano ad emettere radiazione coerente **in fase** e che raggiunge intensità elevatissime (Self-Amplified Stimulated Emission: SASE X-FEL).



XFEL

La caratteristica principale di un FEL per raggi-X è la capacità di produrre **impulsi di raggi-X estremamente intensi e collimati**.

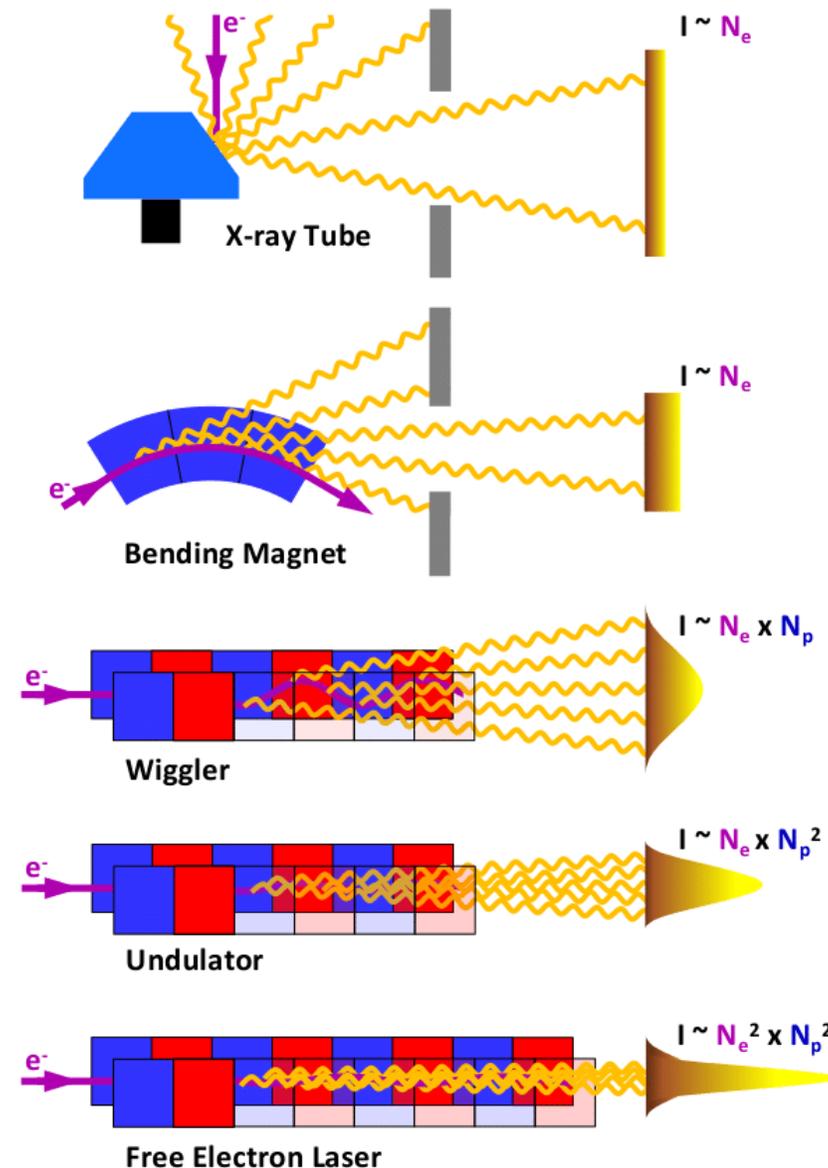
La brillantezza di un FEL è di diversi ordini di grandezza maggiore di quella ottenibile da sincrotroni di 3° generazione.

I pacchetti di fotoni hanno durate temporali dell'ordine dei fs.

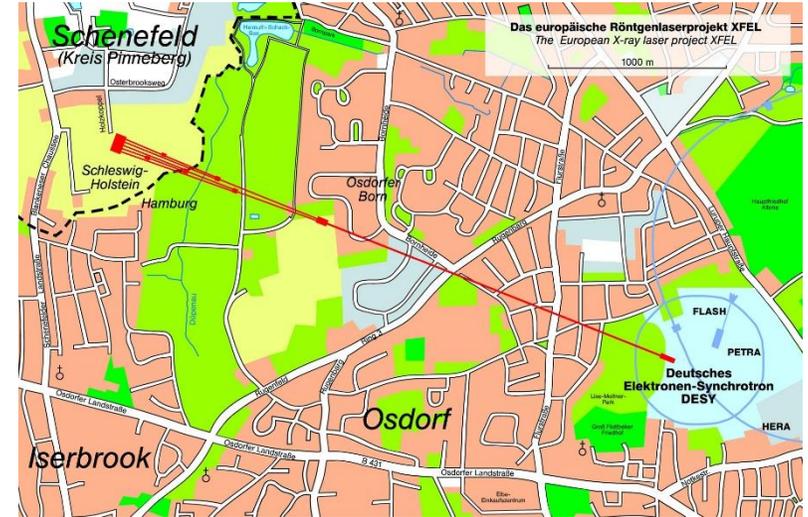
Si possono quindi studiare, anche a livello di molecola singola, fenomeni chimico-fisici rapidissimi.

La radiazione di un FEL ha **dimensioni addirittura inferiori a quelle prodotte dagli ondulatori e meno divergenti** (dimensioni $< \mu\text{m}$).

La radiazione di un FEL ha **un notevole livello di coerenza spaziale** (importante per l'imaging)



European XFEL

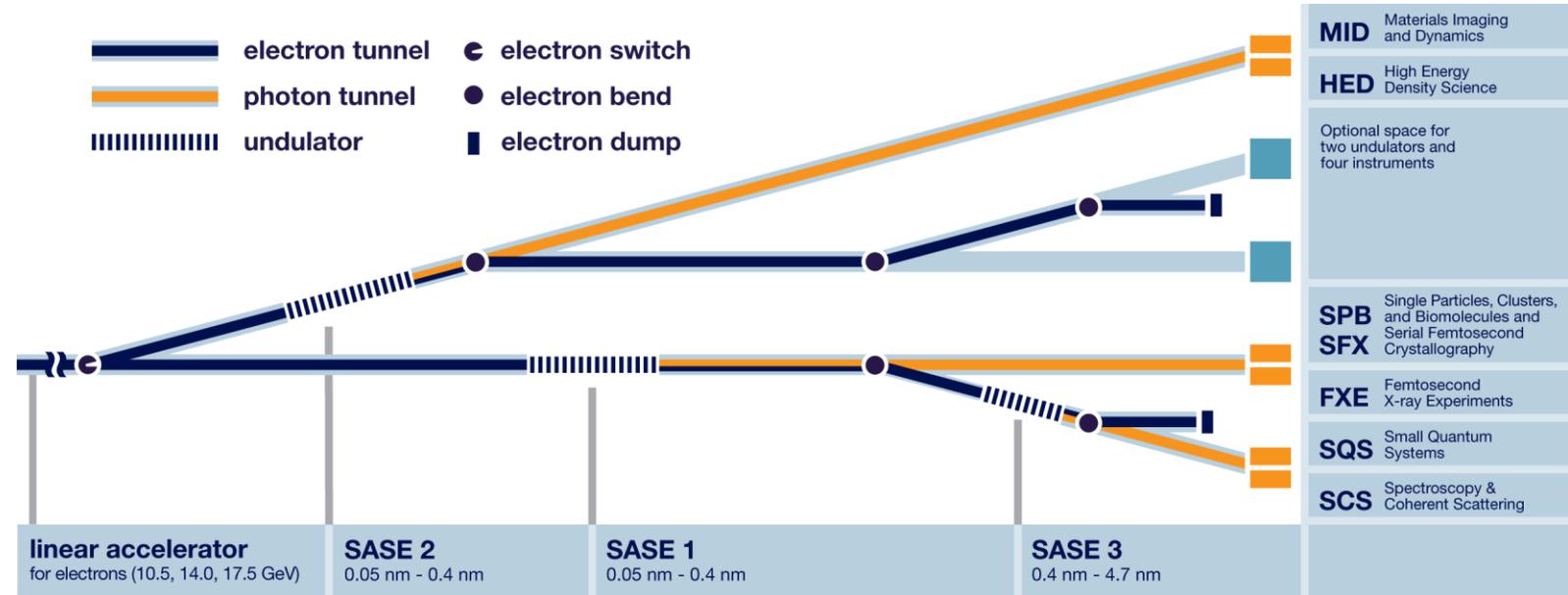


Lunghezza: 3.4 km

Energia 17.5 GeV

Frequenza: 27 kHz

Brillanza (Picco): 2×10^{33}

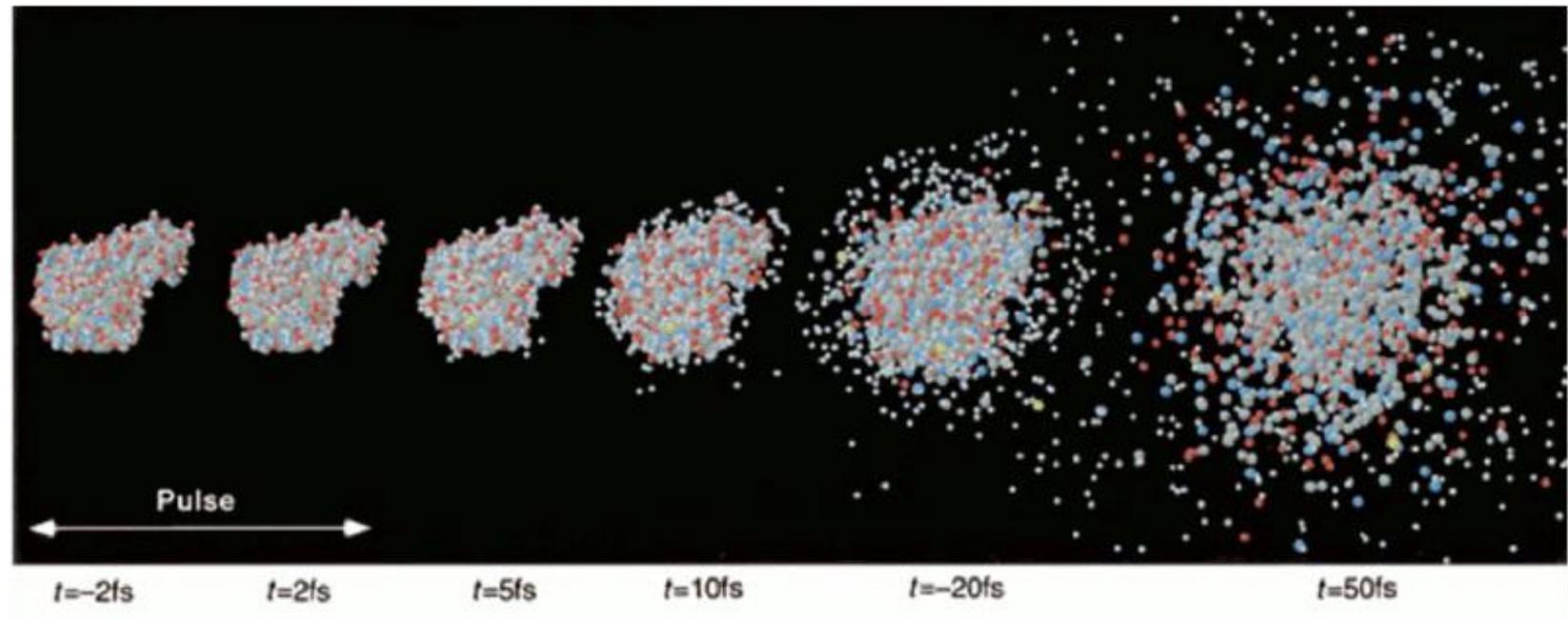


Danno da radiazione

La quantità di energia trasferita al campione è enorme. Il sistema 'esplode'. Questo crea grossi problemi sia per le ottiche che per le misure.

Cambia il modo di fare le misure: **Un impulso – una misura**

Simulazione dell'evoluzione temporale di una molecola di lisozima soggetta ad un impulso di raggi-X di un X-FEL

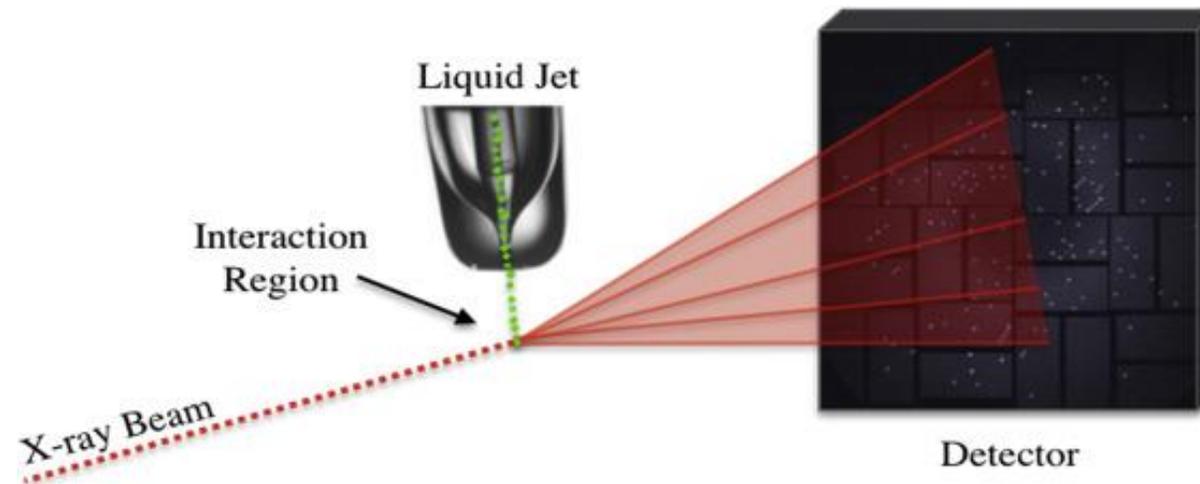


Esperimenti con XFEL: Serial Femtosecond Crystallography (SFX)

Cristalli di dimensioni inferiori al μm sono 'sparati' da un iniettore e intercettati dal fascio di raggi-X del X-FEL con frequenza molto elevata.

Le immagini di diffrazione sono acquisite e quindi 'processate' per ottenere i fattori di struttura.

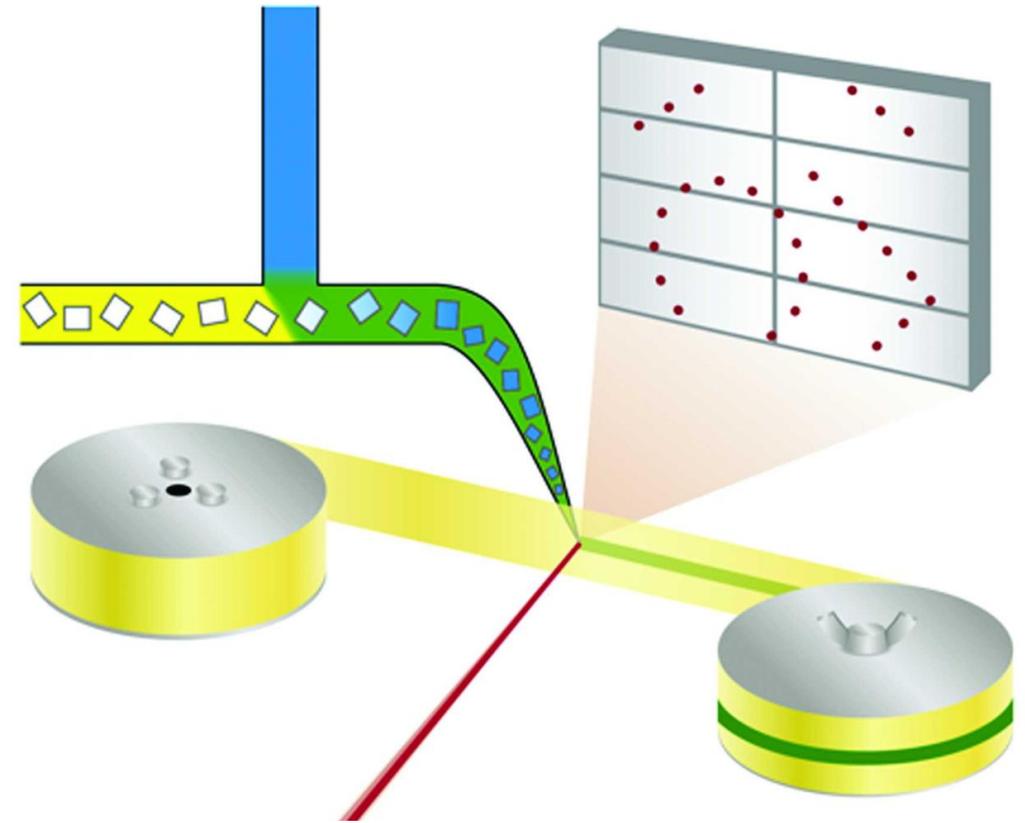
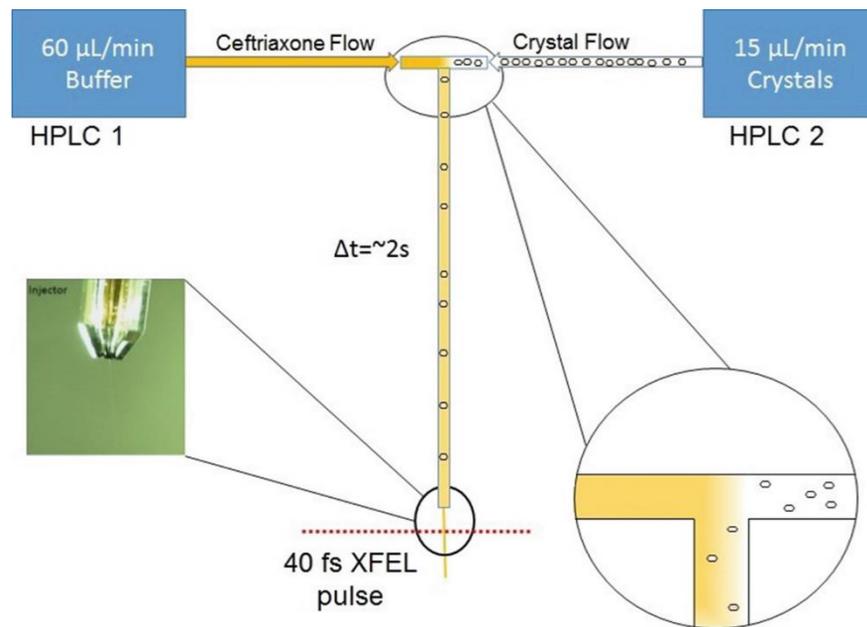
Uso **microcristalli** e non ho bisogno della crioprotezione (misure a temperatura ambiente).



11

Esperimenti con XFEL: complessi proteina-ligando

Prima di essere 'sparati' nel fascio di raggi-X, i microcristalli entrano in contatto con un substrato (o inibitore). **Misure di complessi proteina-ligando a temperatura ambiente.**

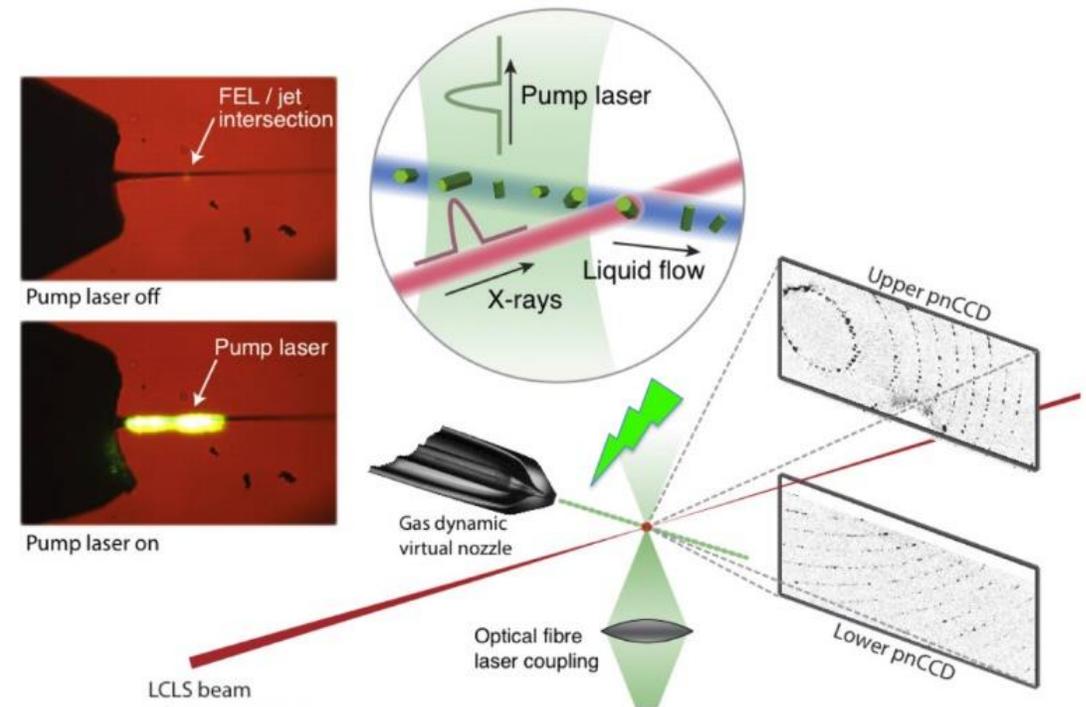


Esperimenti con XFEL: *pump and probe*

Sulla base dello stesso principio degli esperimenti precedenti sono possibili anche studi risolti in tempo (*pump-probe*).

I microcristalli sono 'sparati' nel fascio di raggi-X, ma prima di essere colpiti dai raggi-X sono 'eccitati' da un laser (*pump*).

In tal modo posso avere immagini di diffrazioni di 'stati eccitati' (*probe*) utilizzando i raggi-X del X-FEL.



Esperimenti con XFEL : Cristalli *in-vivo*

Cristalli di dimensioni < 300 nm, sono analizzati con un (sottile) fascio molto intenso di raggi-X prodotto da un X-FEL

