

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE  
IN**

**NANOTECHNOLOGY ENGINEERING – MNAR**

**PROGRAMME OF THE COURSE  
BIOPHOTONICS LABORATORY**

**A.A. 2019/2020  
Prof. Francesco Michelotti**

**OBJECTIVES**

The course is devoted to students who are interested in the application of novel photonic techniques for the fabrication of integrated devices used in the life science field. The course has three practical aims:

- to give a theoretical description of the basic phenomena governing the interaction of organic molecules and light, increasing the background knowledge that students acquired during their bachelor courses;
- to show laboratory demonstrations of such phenomena by means of purposely prepared experiments, so as to put students in contact with the standard equipment used in optics and photonics laboratories;
- to describe the principal techniques and the devices commonly used for the advanced study of biological systems.

The three aims will be pursued simultaneously during the course, trying to put into evidence the fundamental and applied characteristics of all phenomena.

Skill to be acquired: The student who will overtake the exam will possess knowledge on the basic phenomena governing the imaging techniques used in biology and the photonic techniques ruling commonly used bio-opto-photonic devices.

**PROGRAMME**

1) Classical Electromagnetism; Complex refractive index; classical Lorentz oscillator model; dispersion of the complex index; Kramers-Kronig relations; Snell and Fresnel laws; dioptries; lenses; spherical mirrors; physical optics: interference and diffraction; limit of resolution of the optical microscope; brief description of the quantum approach to the polarizability.

- Lab Session 1 (Dipartimento SBAI - Prof.Michelotti): Laboratory practice with Snell laws; measurement of the refractive index of a liquid; practice with lenses and mirrors.
- Lab Session 2 (Remote access to the SBAI on-line Ellipsometer – Prof.Michelotti): Malus Law, Fresnel formulas, Phase retardation, Grating Diffraction, Ellipsometry.
- Lab Session 3 (Dipartimento SBAI - Prof.Michelotti): Experimental demonstration of the interference and diffraction phenomena.

2) Energetic levels in organic molecules; Electronic levels and symmetry of the orbitals; Morse potential; vibrational, rotational and spin levels; singlet and triplet states; Linear absorption; Spontaneous and stimulated emission; Selection rules; Franck-Condon principle; Absorption spectroscopy; Absorption spectra of most diffused endogenous and exogenous chromophores;

Jablonski diagram: internal conversion, inter-system crossing, quenching; Forster energy transfer; fluorescence and phosphorescence; Stationary and time-resolved luminescence spectroscopy; Emission spectra of most diffused endogenous and exogenous chromophores; Solvatochromism; Photobleaching; Advanced microscopic techniques: FLIM, FRET, FRAP, TIRFM; Nonlinear Optics; Fourier description of the 2nd and 3rd order dielectric susceptivities; Second harmonic generation; Kerr effect; Nonlinear absorption: two-photon absorption and excited state absorption; Spontaneous and stimulated Raman emission; Nonlinear optical microscopies: Raman, SRS, CARS, TPA, SHG; Super-resolution microscopies: STED, PALM, STORM; DNA microarrays; Label free techniques; Sanger sequencing; Sequencing by means of laser techniques; ELISA test ; Labelling techniques making use of fluorescent markers; Surface chemical functionalization techniques.

- Lab Session 4 (IIT Roma- Prof. F. Michelotti): Absorption spectroscopy in alcoholic and water solution of selected organic molecules.

- Lab Session 5 (ENEA CR Frascati - Prof. F. Michelotti, Dott.ssa Montereali, Dott.ssa Vincenti): CW fluorescence spectroscopy in alcoholic and water solution of selected organic molecules.

- Lab Session 6 (IIT – Nanolife Sciences - Dott. S. De Panfilis and in collaboration with Dipartimento di Biologia Molecolare C.Darwin – Dott.ssa A. Cirigliano): Use of a wide-field and confocal fluorescence microscope to study yeast cells labelled with DAPI, GFP, RFP.

3) Properties of surface plasmon polaritons on uniform thin metal films (SPP), Dispersion of the SPP, characteristics of the plasmonic modes, SPP excitation by means of ATR, Detection platforms based on SPP for biological applications.

- Lab session 7 (Dipartimento SBAI- Prof. Michelotti): Measurement of the SPP resonance in ATR regime ; Resonance shift due to the injection of several different liquids with varying refractive index; photonic crystal sensors.

### **Books and Lecture Notes**

- Slides and lecture notes distributed during the lectures.
- J.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, Springer (Berlin), 2007.

### **OBIETTIVI**

Il corso si rivolge a studenti che siano interessati all'applicazione delle tecniche fotoniche per la fabbricazione di dispositivi da utilizzare nel campo biologico. Il corso perseguirà tre finalità principali:

- Fornire una descrizione teorica dei principali fenomeni fisici di interazione tra molecole organiche e radiazione luminosa, approfondendo la preparazione che gli studenti hanno ricevuto nei corsi di base ed in quelli di specializzazione già seguiti;
- Dare una dimostrazione in laboratorio di tali fenomeni mediante esercitazioni appositamente realizzate, in modo da mettere gli studenti a contatto con la strumentazione più utilizzata in un laboratorio di ottica e fotonica;
- Descrivere le principali tecniche oppure i dispositivi comunemente utilizzati per lo studio avanzato dei sistemi biologici.

Le tre finalità verranno perseguite contemporaneamente nel corso delle lezioni cercando di mettere in evidenza in ciascun caso gli aspetti fondamentali o applicativi di ogni fenomeno.

Gli studenti che abbiano superato l'esame saranno in possesso delle conoscenze sui fenomeni di base che governano il funzionamento delle tecniche di imaging utilizzate nel campo biologico e di quelle fotoniche su cui sono basati i comuni dispositivi bio-opto-fotonici.

## PROGRAMMA

1) Richiami di elettromagnetismo classico; Indice di rifrazione complesso; Modello di Lorentz dell'oscillatore armonico; Dispersione dell'indice; Leggi di Snell e Fresnel; Diottri; Lenti; Specchi sferici; Ottica fisica: interferenza e diffrazione; Limite di risoluzione di un microscopio ottico.

- Esercitazione di laboratorio 1 (presso Dipartimento SBAI - Prof. Michelotti): Pratica di laboratorio con le leggi di Snell; misura dell'indice di rifrazione di un liquido; pratica con le proprietà di lenti sottili e specchi.

- Esercitazione di laboratorio 2 (Accesso remoto all'ellissometro on-line di SBAI - Prof. Michelotti): Dimostrazione sperimentale delle leggi di Malus, del ritardo di fase, delle leggi di Fresnel, della diffrazione da reticolo, dei fenomeni ellissometrici.

- Esercitazione di laboratorio 3 (presso Dipartimento SBAI - Prof. Michelotti): Dimostrazione sperimentale dei fenomeni di interferenza e diffrazione.

2) Struttura dei livelli energetici di molecole organiche; Livelli elettronici e simmetria degli orbitali; Curva di Morse; Livelli vibrazionali, rotazionali e di spin; Stati di singoletto e di tripletto; Assorbimento lineare; Emissione spontanea e stimolata; Regole di selezione; Principio di Franck-Condon; Spettroscopia di assorbimento; Spettri di assorbimento di cromofori endogeni ed esogeni; Diagramma di Jablonski: Conversione interna, inter-system crossing, quenching; Forster energy transfer; Fluorescenza e fosforescenza; Spettroscopia di luminescenza stazionaria e risolta in tempo; Spettri di emissione di cromofori endogeni ed esogeni; Solvatocromismo; Photobleaching; Tecniche microscopiche FLIM, FRET, FRAP, TIRFM; Ottica nonlineare; Trattazione di Fourier delle suscettività dielettriche del secondo e terzo ordine; Generazione di seconda armonica; Effetto Kerr; Assorbimento nonlineare a due fotoni e da stati eccitati; Effetto Raman spontaneo e stimolato; Microscopie ottiche nonlineari Raman, SRS, CARS, TPA e SHG; Microscopie a super risoluzione STED, PALM, STORM; DNA microarrays; Sistemi di luminescenza label free; Tecnica di sequenziamento di Sanger; Sequenziamento mediante tecniche laser; Test ELISA; Tecniche di etichettatura di sistemi biologici mediante marker luminescenti; Tecniche di funzionalizzazione chimica di superficie.

- Esercitazione di laboratorio 4 (presso IIT – Nanolife Sciences – Prof. Michelotti): Misura dell'assorbanza di soluzioni alcoliche e acquose di molecole organiche.

- Esercitazione di laboratorio 5 (presso ENEA CR Frascati - Dott.ssa Montereali, Dott.ssa Vincenti): Misura della luminescenza emessa da molecole organiche mediante eccitazione da radiazione emessa da sistemi di illuminazione convenzionali o laser.

- Esercitazione di laboratorio 6 (presso IIT – Nanolife Sciences - Dott. S. De Panfilis ed in collaborazione con Dipartimento di Biologia Molecolare C. Darwin – Dott.ssa A. Cirigliano): Utilizzo di un microscopio a fluorescenza in wide-field e confocale per lo studio di lieviti marcati con DAPI o GFP.

3) Generalità sui plasmoni di superficie su film sottili metallici uniformi (SPP), Equazione di dispersione, Caratteristiche dei modi plasmonici, Eccitazione mediante tecniche ATR, Sistemi di analisi a SPR per applicazioni biologiche.

- Esercitazione di laboratorio 7 (presso Dipartimento SBAI- Prof.Michelotti): Misura della risonanza plasmonica in regime ATR; Spostamento della risonanza plasmonica indotta da esposizione a liquidi con costante dielettrica variabile (sensing); Sensori a cristallo fotonico.

### **Testi**

- Slides e dispense distribuite a lezione.
- J.Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition, Springer (Berlin), 2007.