

Diffrazione e filtraggio ottico di micrografie elettroniche come metodo di analisi di strutture periodiche

GIANFRANCO DONELLI e LUIGI PAOLETTI (*)

INDICE

	Pag.
INTRODUZIONE	198
1) TRASFORMATE OTTICHE DI FOURIER	» 199
2) LA DIFFRAZIONE DI UN RETICOLO PIANO	» 202
a) Reticolo piano	» 202
b) Reticolo reciproco	» 203
c) Trasformata di Fourier di un reticolo piano	» 204
d) Diffrazione a piccolo angolo di un reticolo piano	» 206
3) LA DIFFRAZIONE DI STRUTTURE ELICOIDALI	» 208
a) Trasformata di Fourier di un'elica discontinua	» 208
b) Trasformata di Fourier di N eliche coassiali	» 210
c) Calcolo della trasformata della proiezione di una struttura elicoidale	» 211
4) TECNICA DEL FILTRAGGIO OTTICO	» 212
a) Immagine media	» 212
b) Filtraggio di strutture sovrapposte	» 215
5) IL BANCO OTTICO	» 216
a) Descrizione e disposizione dei componenti ottici	» 216
b) Allineamento dei componenti ottici	» 218
6) PROCEDURE SPERIMENTALI	» 219
a) Taratura del diffrattometro	» 219
b) Schermaggio delle micrografie elettroniche	» 220
c) Maschere per il filtraggio ottico	» 220
d) Tecniche fotografiche	» 221
7) APPLICAZIONI	» 221
a) Studio di cristalli proteici	» 221
b) Studio di membrane cellulari	» 223
c) Studio di capsidi fagici	» 223
d) Studio di strutture elicoidali	» 224
BIBLIOGRAFIA	» 228

(*) Ospite dei Laboratori di Fisica.

Riassunto. — Scopo di questa rassegna è quello di introdurre le tecniche di diffrazione e di filtraggio ottico come metodi di analisi di micrografie elettroniche e di presentarne, pur senza alcuna pretesa di completezza, gli aspetti teorici fondamentali. Vengono altresì forniti gli elementi necessari alla interpretazione delle figure di diffrazione, sia per strutture periodiche piane che per strutture a simmetria elicoidale, insieme ad alcuni esempi applicativi.

Summary (*Diffraction and optical filtering of electron micrographs as methods of periodical structure analysis*). — The aim of this review article is the introduction of the diffraction and optical filtering techniques as methods for the analysis of electron micrographs. We also introduce the main theoretical aspects although we do not aim at completeness. Furthermore, the necessary elements are given for the interpretation of the diffraction patterns of periodical structures both plane and helical, together with some applications.

INTRODUZIONE

L'applicazione dei metodi di diffrazione ottica all'analisi di micrografie elettroniche di strutture periodiche è stata introdotta per la prima volta da KLUG & BERGER (1964), proponendo a tale scopo l'impiego di un diffrattometro ottico del tipo realizzato da TAYLOR, HINDE & LIPSON (1951) per la interpretazione di figure di diffrazione a raggi X.

La tecnica venne proposta in alternativa ai metodi di integrazione fotografica dell'immagine descritti in precedenza (MARKHAM, FREY & HILLS, 1963). Lo studio di micrografie elettroniche mediante la diffrazione ottica permette di rivelare, attraverso una completa analisi di Fourier delle immagini, ogni eventuale periodicità presente; il metodo consiste nell'utilizzare le micrografie elettroniche come reticoli per ottenere le corrispondenti figure di diffrazione di Fraunhofer.

Data la sensibilità della tecnica, le informazioni che se ne possono ricavare danno un contributo indispensabile alla corretta interpretazione delle strutture studiate ed in particolare di quelle che si trovano al limite del potere risolutivo delle tecniche di osservazione impiegate.

Ciò risulta particolarmente evidente quando alla tecnica della diffrazione ottica si affianchi quella del filtraggio ottico proposta da KLUG & DE ROSIER (1966), che permette di giungere ad una immagine « ricostruita » da cui risulta eliminato il rumore di fondo presente sulla micrografia originale; va tuttavia osservato che questa tecnica deve essere utilizzata con particolari precauzioni ad evitare possibili artefatti.

1) TRASFORMATE OTTICHE DI FOURIER

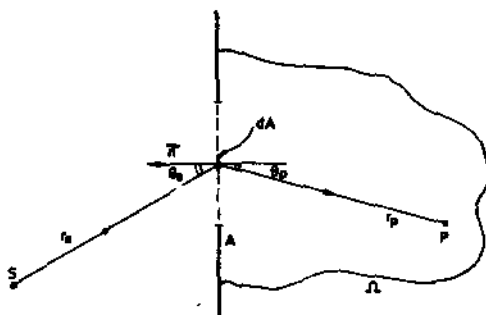
Il problema generale della diffrazione della luce, cioè della propagazione di un'onda elettromagnetica in presenza di ostacoli, consiste nell'ottenere una soluzione all'equazione delle onde:

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \Psi}{\partial z^2} = \frac{1}{c^2} \cdot \frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} \quad (1)$$

che soddisfi alle condizioni al contorno imposte dagli ostacoli stessi. Nella (1) la funzione d'onda Ψ rappresenta il campo elettromagnetico e c la velocità di propagazione dell'onda.

Una trattazione generale del problema (BORN & WOLF, 1964) risulta estremamente complessa; tuttavia, se si approssimano le effettive condizioni al contorno individuate dalla situazione sperimentale mediante le cosiddette « condizioni al contorno di Kirchhoff » si può giungere ad una trattazione del problema relativamente semplice che, seppure approssimata, risulta in buon accordo con i dati sperimentali. Le condizioni al contorno di Kirchhoff (essendo P un punto dello spazio interamente circondato da uno schermo opaco Ω con una o più aperture A , ed S una sorgente puntiforme di onde monocromatiche (Fig. 1), corrispondono ad assumere sull'intera

Fig. 1. — Geometria della diffrazione attraverso un'apertura.



apertura A gli stessi valori, per la funzione d'onda Ψ e la sua derivata normale $\vec{n} \times \text{grad } \Psi$, che queste avrebbero se lo schermo Ω non ci fosse; e ad assumere ancora Ψ ed $\vec{n} \times \text{grad } \Psi$ nulle su tutto Ω .

Se si suppone inoltre che la distanza r_s della sorgente, la distanza r_p dell'osservatore dallo schermo e le dimensioni dell'apertura A siano grandi rispetto alla lunghezza d'onda λ , la funzione d'onda nel punto P si potrà scrivere mediante la formula integrale di Fresnel-Kirchhoff che è soluzione della (1) per un'onda scalare monocromatica nel caso appunto delle condizioni al contorno di Kirchhoff:

$$\Psi(P) = -\frac{i \Psi_0 e^{-i\omega t}}{2\lambda} \int_A \frac{e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (r_p + r_s)} (\cos \theta_p + \cos \theta_s)}{r_p \cdot r_s} dA \quad (2)$$

dove Ψ_0 è l'ampiezza dell'onda alla distanza unitaria dalla sorgente S , ω la frequenza angolare, λ la corrispondente lunghezza d'onda e θ_S e θ_P rispettivamente gli angoli che le direzioni di r_S ed r_P fanno con il vettore unitario \vec{n} normale all'apertura.

La (2), valida a rigore solo per onde scalari, come ad esempio le onde sonore in un gas, può essere tuttavia applicata con buona approssimazione anche nel caso di onde vettoriali, come le onde elettromagnetiche, eccetto che nelle questioni direttamente connesse con il fenomeno della polarizzazione. Particolarmente importante, ai fini delle applicazioni sperimentali, è il caso della diffrazione ottica nelle condizioni limite di Fraunhofer. Tale limite corrisponde al caso in cui la sorgente S e l'osservatore P sono ad una distanza infinita dall'apertura, cioè al caso in cui le dimensioni dell'apertura sono piccole rispetto alle distanze r_S ed r_P e le onde incidenti e le onde diffratte sono onde piane.

Nella diffrazione di Fraunhofer la (2) può essere riscritta in una forma semplificata; in questo caso r_S ed r_P e gli angoli θ_S e θ_P si possono considerare costanti sull'intera apertura A . Ciò consente di portar fuori dal segno di integrale nella (2) il fattore $1/r_P \cdot r_S$ ed il fattore $(\cos \theta_P + \cos \theta_S)$ con il loro valor medio; il termine esponenziale deve essere invece tenuto entro il segno di integrale poichè la quantità $2\pi(r_P + r_S)/\lambda$, essendo r_P e r_S grandi rispetto a λ , può ancora variare di un fattore paragonabile a π .

La (2) si può allora riscrivere:

$$\Psi(P) = C_0 \int_A e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (r_P + r_S)} dA \quad (3)$$

dove C_0 è una opportuna costante complessa che ora comprende anche i fattori portati fuori dal segno di integrale.

Se si introduce un sistema di riferimento nel piano dell'apertura A con origine in un punto O del piano stesso (Fig. 2) il cammino $r_S(V) + r_P(V)$

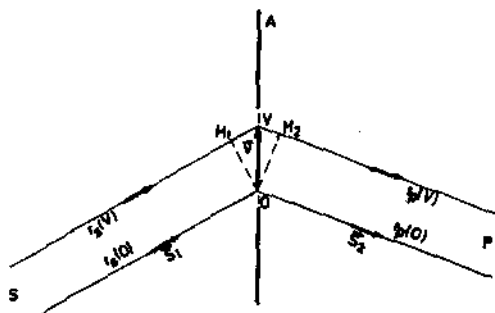


Fig. 2. — Diffrazione nel limite di Fraunhofer.

dell'onda passante per il generico punto V dell'apertura A sarà dato dalla:

$$r_S(V) + r_P(V) = r_S(O) + r_P(O) + H_1V + VH_2. \quad (4)$$

Chiamando \vec{S}_1 ed \vec{S}_2 i vettori unitari rispettivamente nella direzione dell'onda incidente e nella direzione dell'onda diffratta, ed indicando con \vec{v} il vettore nel piano dell'apertura da O a V , si potrà scrivere: $H_1 V = \vec{S}_1 \times \vec{v}$, $V H_2 = -\vec{S}_2 \times \vec{v}$, e perciò ancora:

$$r_S(V) + r_P(V) = r_S(O) + r_P(O) + (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{v} \quad (5)$$

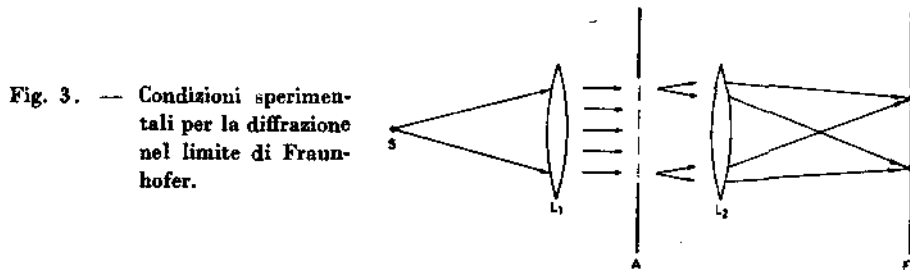
Essendo poi $r_S(O) + r_P(O)$ una costante, l'integrale (3) si potrà riscrivere nella forma:

$$\Psi(P) = C_1 \int_A e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{v}} dA \quad (6)$$

con C_1 costante complessa comprendente C_0 ed $e^{i \frac{2\pi}{\lambda} [r_S(O) + r_P(O)]}$.

La (6) rappresenta la funzione d'onda nel punto P nel limite di Fraunhofer. Caratteristica essenziale della (6) è di avere la forma matematica della trasformata di Fourier di una funzione diversa da zero sulla apertura ed uguale a zero al di fuori di questa. Ciò permette di considerare le figure di diffrazione nel limite di Fraunhofer come le trasformate di Fourier delle aperture (TAYLOR & LIPSON, 1964; LIPSON, 1972).

Per soddisfare sperimentalmente le condizioni di Fraunhofer, si utilizza una disposizione come quella schematizzata in Fig. 3.



L'apertura A è illuminata da una sorgente puntiforme S posta nel fuoco della lente convergente L_1 . Una seconda lente convergente L_2 è posta dietro l'apertura e la figura di diffrazione è osservata sul piano focale F di quest'ultima.

In tal modo sia il fronte d'onda incidente su A che i fronti d'onda diffratti da A sono rigorosamente piani e la lente L_2 , focalizzando i fronti d'onda diffratti sul piano F , porta la figura di diffrazione a distanza finita.

2) LA DIFFRAZIONE DI UN RETICOLO PIANO

a) Reticolo piano

Un reticolo piano è una distribuzione periodica di punti su di un piano (Fig. 4) per cui risulta possibile individuare due vettori \vec{a} e \vec{b} , che chiameremo le traslazioni elementari, tali che comunque si scelga una trasla-

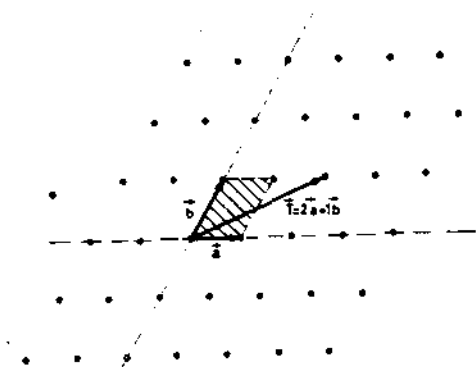


Fig. 4. — Traslazioni elementari di un reticolo piano e corrispondente alla elementare.

zione \vec{T} che riporta il reticolo su se stesso, questa si possa scrivere $\vec{T} = n_1 \vec{a} + n_2 \vec{b}$, con n_1 ed n_2 interi opportuni.

Per ogni reticolo piano è possibile determinare più di una coppia di traslazioni elementari; si verifica subito, ad esempio, che se \vec{a} , \vec{b} sono traslazioni elementari di un certo reticolo, lo sono anche \vec{a} , $-\vec{b}$ e $-\vec{a}$, \vec{b} .

Il parallelogramma individuato dai vettori \vec{a} e \vec{b} è detto cella elementare del reticolo. I vettori \vec{a} e \vec{b} individuano una coppia di assi di riferimento; ogni punto del reticolo risulta in questo modo individuato da una coppia di numeri interi.

Una retta reticolare è una retta passante per una serie di punti del reticolo; per ogni reticolo piano esiste un numero infinito di fasci di rette reticolari individuabili mediante una coppia di numeri interi, gli indici di Miller del fascio.

Tali indici si possono determinare (Fig. 5) considerando che rette successive di un fascio tagliano gli assi di riferimento \vec{a} e \vec{b} rispettivamente ad intervalli a/h e b/k ,

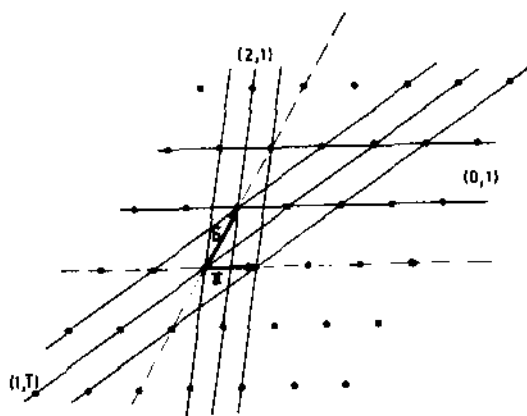


Fig. 5. — Fasci di rette reticolari con l'indicazione dei relativi indici di Miller.

ove h e k sono numeri interi primi fra loro, e si indicano con la scritta (h, k) . Secondo tale definizione, per un fascio di rette parallele ad uno degli assi di riferimento il corrispondente indice di Miller sarà zero; per un fascio di rette che interseca uno degli assi dal lato negativo il corrispondente indice di Miller sarà negativo e verrà indicato con un segno meno sopra l'indice stesso.

b) *Reticolo reciproco*

Si definisce come reticolo reciproco R^* di un dato reticolo R , quel reticolo le cui traslazioni elementari \vec{a}^* e \vec{b}^* sono definite dalle:

$$\begin{aligned}\vec{a}^* \times \vec{a} &= \vec{b}^* \times \vec{b} = 1 \\ \vec{a}^* \times \vec{b} &= \vec{a} \times \vec{b}^* = 0\end{aligned}\quad (7)$$

in cui \vec{a} e \vec{b} sono le traslazioni elementari di R .

Dalle (7) discendono le seguenti proprietà di R^* :

I) Il reticolo reciproco del reticolo reciproco coincide con il reticolo iniziale:

$$(R^*)^* = R \quad (8)$$

II) Il prodotto scalare di un vettore del reticolo reciproco con un vettore del reticolo iniziale è uguale ad un numero intero:

$$[\vec{r}^*(i, j)] \times [\vec{r}(h, k)] = [i \vec{a}^* + j \vec{b}^*] \times [h \vec{a} + k \vec{b}] = ih + jk \quad (9)$$

III) Il vettore $\vec{r}^*(h, k)$ del reticolo reciproco è normale al fascio di rette di indici (h, k) del reticolo iniziale:

considerando infatti un vettore parallelo al fascio di rette di indici (h, k) , ad esempio il vettore $\vec{r} = \frac{\vec{a}}{h} - \frac{\vec{b}}{k}$, si ha: $\vec{r}^* \times \vec{r} = (h \vec{a}^* + k \vec{b}^*) \times \left(\frac{\vec{a}}{h} - \frac{\vec{b}}{k} \right) = 0$.

IV) Il fascio di rette di indici (k, \bar{h}) di R^* è perpendicolare al fascio di rette di indici (h, k) di R :

infatti il vettore $\vec{v}^* = \frac{\vec{a}^*}{k} + \frac{\vec{b}^*}{h}$ è evidentemente parallelo alle rette di indici (k, \bar{h}) di R^* , ma allora lo è anche il vettore $\vec{r}^*(h, k) = hk \vec{v}^*$.

V) La spaziatura $d(h, k)$ fra le rette del fascio di indici (h, k) di R è uguale ad $1/|\vec{r}^*(h, k)|$:

infatti se \vec{n} è un vettore unitario normale al fascio (h, k) , la spaziatura sarà data da:

$$d(h, k) = \frac{\vec{n} \times \vec{a}}{h} = \frac{\vec{r}^*(h, k) \times \vec{a}}{|\vec{r}^*(h, k)| h} = \frac{h}{|\vec{r}^*(h, k)| h} = \frac{1}{|\vec{r}^*(h, k)|} \quad (10)$$

c) *Trasformata di Fourier di un reticolo piano*

Per calcolare la figura di diffrazione fornita da un reticolo piano nelle condizioni di Fraunhofer (ELMORE & HEALD, 1969), considereremo i punti del reticolo come centri di diffusione dell'onda incidente, cioè come sorgenti puntiformi di onde secondarie, aventi la stessa lunghezza d'onda dell'onda piana incidente, la cui fase risulta determinata dalla direzione di propagazione di questa ultima.

L'integrale (6), che fornisce la funzione d'onda diffratta nel punto P , si riduce in questo caso ad una sommatoria dei contributi provenienti da tutti i centri di diffusione del reticolo:

$$\Psi(P) = C_1 \sum_{\vec{v}(h,k)} e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{v}(h,k)} \quad (11)$$

con $\vec{v}(h,k) = h\vec{a} + k\vec{b}$, \vec{a} e \vec{b} una coppia di traslazioni elementari del reticolo ed h e k numeri interi. Esplicitando \vec{v} e separando le due sommatorie su h e k la (11) diventa:

$$\Psi(P) = C_1 \left[\sum_h e^{i \frac{2\pi}{\lambda} h (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a}} \right] \left[\sum_k e^{i \frac{2\pi}{\lambda} k (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b}} \right] \quad (12)$$

Considerando un reticolo i cui valori di h e k siano compresi rispettivamente tra 0 e H e tra 0 e K , cioè un reticolo con $H \cdot K$ celle elementari, la $\Psi(P)$ assumerà la forma:

$$\Psi(P) = C_1 \left[\frac{1 - e^{i \frac{2\pi}{\lambda} H (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a}}}{1 - e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a}}} \right] \left[\frac{1 - e^{i \frac{2\pi}{\lambda} K (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b}}}{1 - e^{i \frac{2\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b}}} \right] \quad (13)$$

L'intensità $I(P)$ della radiazione diffratta nel punto P è poi data dal modulo quadro dell'ampiezza d'onda:

$$I(P) = |\Psi(P)|^2 = I_0 \left[\frac{\text{sen} \frac{\pi}{\lambda} H (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a}}{H \text{sen} \frac{\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a}} \right]^2 \left[\frac{\text{sen} \frac{\pi}{\lambda} K (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b}}{K \text{sen} \frac{\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b}} \right]^2 \quad (14)$$

in cui I_0 è l'intensità dell'onda diffratta quando $\vec{S}_1 = \vec{S}_2$.

Per valutare il significato fisico dell'espressione ottenuta, consideriamo la funzione $\frac{\text{sen}^2 H \eta}{H^2 \text{sen}^2 \eta}$, periodica di periodo π , nell'intervallo $0, \pi$. Tale

funzione (Fig. 6) presenta i suoi massimi principali in corrispondenza dei valori di η uguali a 0 e π , per i quali :

$$\lim_{\eta \rightarrow \pi} \frac{\text{sen}^2 H \eta}{H^2 \text{sen}^2 \eta} = 1 \quad (15)$$

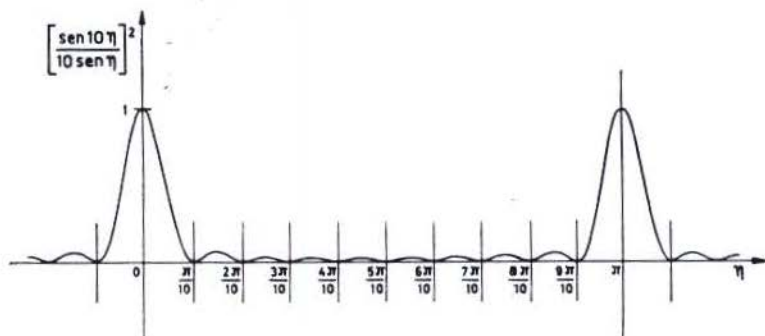


Fig. 6. — Andamento della funzione $[\text{sen } H \eta / H \text{sen } \eta]^2$ per $H = 10$ nell'intervallo $0, \pi$.

L'ampiezza di tali massimi si può calcolare considerando che il primo zero di $\frac{\text{sen}^2 H \eta}{H^2 \text{sen}^2 \eta}$ si ha quando η varia da π a $\pi + \varepsilon$, dove ε è il più piccolo valore non nullo per cui $\text{sen } H \varepsilon = 0$; cioè si ha quando $H \varepsilon = \pi$ ed $\varepsilon = \frac{\pi}{H}$. L'ampiezza dei massimi principali risulta quindi inversamente proporzionale ad H ed assume valori sempre più piccoli al crescere del numero di centri di diffusione del reticolo.

Gli altri zeri della funzione corrispondono a quei valori di η che rendono $H \eta$ multiplo intero di π , cioè $\frac{2\pi}{H}$, $\frac{3\pi}{H}$, $\frac{4\pi}{H}$, ecc.; quindi tra due massimi principali consecutivi cadono $H - 1$ zeri.

Per quanto riguarda i massimi secondari, si può verificare facilmente che questi cadono approssimativamente a metà fra due zeri consecutivi; con buona approssimazione si avranno perciò valori di η uguali a $\frac{3}{2} \frac{\pi}{H}$ per il primo massimo, $\frac{5}{2} \frac{\pi}{H}$ per il secondo ecc. Per valori abbastanza grandi di H l'altezza del primo massimo secondario si può ottenere dalla :

$$\lim_{H \rightarrow \infty} \frac{\text{sen}^2 \frac{3}{2} \pi}{H^2 \text{sen}^2 \frac{3}{2} \frac{\pi}{H}} = \left(\frac{2}{3\pi} \right)^2 \approx 0,04$$

Tenendo conto della (15) si vede subito come l'altezza dei massimi secondari risulta inferiore per uno o più ordini di grandezza a quella dei massimi principali.

Le considerazioni precedenti giustificano come una immagine di diffrazione sia in genere formata dai soli massimi principali e come la loro ampiezza sia inversamente proporzionale al numero totale di celle elementari del reticolo di diffrazione.

Dalla (14) si deduce che le direzioni \vec{S}_2 lungo le quali sono osservabili i raggi diffratti sono date dalle:

$$\frac{\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{a} = i\pi \quad (16)$$

$$\frac{\pi}{\lambda} (\vec{S}_1 - \vec{S}_2) \times \vec{b} = j\pi$$

con i e j interi qualsiasi.

Le (16) sono note come le equazioni di Laue.

Introducendo il vettore $\vec{G} = \frac{\vec{S}_2 - \vec{S}_1}{\lambda}$, considerando i suoi componenti G_n e G_p rispettivamente normale e parallelo al piano del reticolo di diffrazione, e tenendo conto infine che i prodotti scalari di \vec{G}_n con \vec{a} e \vec{b} sono uguali a zero, le (16) si possono porre nella forma:

$$\begin{aligned} \vec{G}_p \times \vec{a} &= i \\ \vec{G}_p \times \vec{b} &= j \end{aligned} \quad (17)$$

Ricordando la relazione (9) è facile riconoscere che le equazioni di Laue vengono soddisfatte quando \vec{G}_p è uguale ad un vettore \vec{V}^* del reticolo reciproco; cioè le condizioni di diffrazione si possono esprimere con la:

$$\vec{G}_p = \vec{V}^* \quad (18)$$

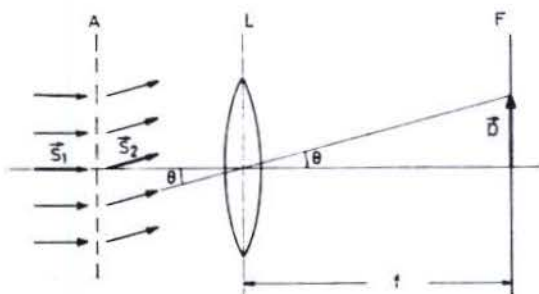
d) Diffrazione a piccolo angolo di un reticolo piano

Consideriamo una disposizione sperimentale per la diffrazione di Fraunhofer come quella schematizzata in Fig. 7. L'onda incidente \vec{S}_1 è normale al piano del reticolo di diffrazione A e le onde diffratte \vec{S}_2 vengono focalizzate dalla lente convergente L sul proprio piano focale F ad una distanza f .

In questo caso il vettore \vec{G}_p si riduce ad $\frac{\vec{S}_{2p}}{\lambda}$ dove \vec{S}_{2p} è il componente di \vec{S}_2 parallelo al piano del reticolo e la (18) si riscrive :

$$\vec{S}_{2p} = \lambda \vec{V}^* \quad (19)$$

Fig. 7. — Geometria della diffrazione a piccolo angolo di un reticolo piano.



L'onda \vec{S}_2 diffratta secondo un angolo θ viene focalizzata sul piano F ad una distanza D dal punto ove è focalizzato il raggio non diffuso, data dalla :

$$D = f \operatorname{tg} \theta \quad (20)$$

Nella diffrazione a piccolo angolo possiamo prendere $\operatorname{tg} \theta \simeq \operatorname{sen} \theta$, per cui, essendo $\operatorname{sen} \theta = |\vec{S}_{2p}|$ alla (20) si può dare la forma:

$$D = f |\vec{S}_{2p}| \quad (21)$$

Considerando infine le rispettive direzioni dei vettori \vec{D} ed \vec{S}_{2p} possiamo scrivere più in generale la :

$$\vec{D} = f \vec{S}_{2p} \quad (22)$$

che per la (19) diviene :

$$\vec{D} = f \lambda \vec{V}^* \quad (23)$$

Dalla (23) si può vedere che l'immagine prodotta focalizzando i raggi diffratti sul piano focale della lente è, a parte un fattore di ingrandimento, il reticolo reciproco del reticolo di diffrazione, almeno nel limite in cui $\operatorname{tg} \theta \simeq \operatorname{sen} \theta$, cioè nel limite della diffrazione a piccolo angolo.

3) LA DIFFRAZIONE DI STRUTTURE ELICOIDALI

a) *Trasformata di Fourier di un'elica discontinua*

Per studiare la diffrazione di una struttura elicoidale (VAINSHTEIN, 1966) considereremo la funzione d'onda diffratta come la trasformata di Fourier (che d'ora in poi indicheremo con l'operatore \mathcal{F}) della funzione relativa alla distribuzione dei centri di diffusione della struttura stessa.

Il caso che ci interessa trattare è quello di una elica discontinua H_d , cioè quello di una distribuzione regolare di centri di diffusione lungo un'elica; la funzione H_d si può pensare come il prodotto di un'elica continua H_c , di opportuno passo P , con un fascio di piani paralleli L_p , separati da una distanza p (Fig. 8) cioè :

$$H_d = H_c \cdot L_p \quad (24)$$

La trasformata di Fourier $\mathcal{F} [H_d(x, y, z)]$, dell'elica discontinua (COCHRAN, CRICK & VAND, 1952; KLUG, CRICK & WYCKOFF, 1958) si può allora scrivere come la convoluzione della trasformata $\mathcal{F} [H_c(x, y, z)] = F_{H_c}(X, Y, Z)$ dell'elica continua con la trasfor-

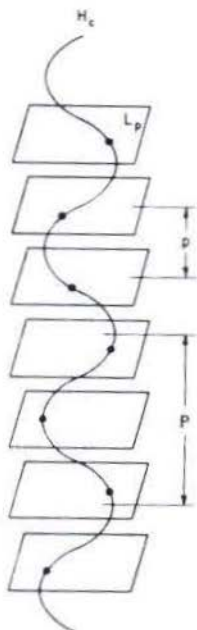


Fig. 8. — L'elica discontinua rappresentata come il prodotto di un'elica continua H_c e di un fascio di piani paralleli L_p .

mata $\mathcal{F} [L_p(x, y, z)] = F_{L_p}(X, Y, Z)$ del fascio di piani, con x, y, z , ed X, Y, Z , rispettivamente coordinate dello spazio reale e dello spazio reciproco.

Si avrà quindi :

$$\begin{aligned} \mathcal{F} [H_d(x, y, z)] &= \mathcal{F} [H_c(x, y, z) \cdot L_p(x, y, z)] = \\ &= \int F_{H_c}(X', Y', Z') F_{L_p}(X - X', Y - Y', Z - Z') dX' dY' dZ' \end{aligned} \quad (25)$$

La trasformata di un fascio di piani perpendicolari all'asse z nello spazio reale e separati da una distanza p , è una distribuzione di punti lungo l'asse Z dello spazio reciproco, separati da una distanza $1/p$; l' m -esimo punto si trova allora ad una distanza $Z_m = m/p$ dall'origine.

La trasformata di un'elica continua di passo P e raggio r , il cui asse coincide con l'asse z dello spazio reale, risulta diversa da zero solo su piani perpendicolari all'asse Z , nello spazio reciproco, separati da una distanza pari ad $1/P$. Sull' n -esimo di tali piani, per il quale $Z_n = n/P$, la $\mathcal{F}[H_c] = F_{H_c}$ assume il valore:

$$\mathcal{F}[H_c]_n = F_{H_c}(R, \Psi, Z_n) = J_n(2\pi Rr) \exp[in(\Psi + \pi/2)] \quad (26)$$

ove J_n è la funzione di Bessel di ordine intero n e R, Ψ, Z coordinate cilindriche nello spazio reciproco.

La convoluzione di due funzioni è la distribuzione della prima di esse secondo la legge specificata dall'altra; la trasformata di Fourier dell'elica discontinua si può allora ottenere sovrapponendo il sistema di piani della $\mathcal{F}[H_c]$ a ciascun punto della $\mathcal{F}[L_p]$.

Come risultato la trasformata $\mathcal{F}[H_d]$ sarà diversa da zero solo su piani le cui coordinate Z_l sono fornite dalla:

$$Z_l = \frac{n}{P} + \frac{m}{P} \quad (27)$$

Dalla (27) si vede come Z_l assume valori discreti solo se il rapporto P/p è razionale; in tal caso sulla figura di diffrazione si ha una distribuzione delle intensità dei raggi diffratti secondo piani distinti o «layer-lines».

Sul piano di coordinata Z_l sono presenti quelle funzioni di Bessel il cui ordine n soddisfa la (27) quando m assume tutti i possibili valori interi; la (27) è quindi una regola di selezione per l'ordine delle funzioni di Bessel presenti sul piano Z_l della trasformata.

Chiamando c il tratto di cui bisogna traslare l'elica discontinua H_d , lungo l'asse z , per sovrapporla a se stessa, t il numero di giri dell'elica continua H_c contenuti in c ed u il numero di «centri di diffusione» contenuti in t giri, varrà la $c = Pt = pu$.

Alla (27) si può allora dare la forma:

$$Z_l \cdot c = t \cdot n + u \cdot m = l \quad (28)$$

dove l è un numero intero, ed i piani Z_l della trasformata si possono indicare con l'indice l stesso.

Da quanto precede si vede che per la $\mathcal{F}[H_d] = F_{H_d}$ sul piano $Z_l = l/c$ vale la:

$$\mathcal{F}[H_d]_l = F_{H_d}(R, \Psi, Z_l) = \sum_n J_n(2\pi Rr) \exp[in(\Psi + \pi/2)] \quad (29)$$

in cui i valori possibili per gli indici n della sommatoria sono quelli forniti dalla regola di selezione (28), con l fisso ed m intero, positivo, negativo o nullo qualsiasi.

Nel caso più complesso di P/p irrazionale, il tratto c , periodo assiale dell'elica discontinua, è assente, cioè $c \rightarrow \infty$, e la spaziatura $1/c$ fra i piani della trasformata va a zero; cioè sulla figura di diffrazione non vi sono più degli effettivi piani distinti.

In pratica P/p può essere approssimato da una qualche frazione razionale q/q' che determina tutte le caratteristiche della figura di diffrazione; la distribuzione d'intensità risulta quindi concentrata sui «layer-lines» individuati dal rapporto q/q' , ma poiché questo non corrisponde ad un effettivo periodo della struttura, i «layer-lines» risultano allargati nella direzione dell'asse Z .

b) Trasformata di Fourier di N eliche coassiali

Considerando il caso di N eliche discontinue coassiali collegate da un asse di simmetria di grado N , la (24) si riscrive:

$$H_{dN} = H_{cN} \cdot L_p \quad (30)$$

dove la funzione H_{cN} rappresenta ora N eliche continue coassiali.

Per determinare le proprietà della $\mathcal{F} [H_{cN}]$ teniamo presente che una rotazione di H_{cN} intorno all'asse z di un angolo pari a $\frac{2\pi}{N}$ lascia la funzione inalterata e che questa rotazione è equivalente ad una traslazione pari a P/N lungo lo stesso asse; dopo una tale traslazione la H_{cN} si può scrivere: $H_{cN}(x, y, \zeta)$, con $\zeta = z + P/N$, e per quanto si è detto sopra:

$$H_{cN}(x, y, \zeta) = H_{cN}(x, y, z + P/N) = H_{cN}(x, y, z) \quad (31)$$

da cui conseguentemente:

$$\mathcal{F} [H_{cN}(x, y, \zeta)] = \mathcal{F} [H_{cN}(x, y, z)] \quad (32)$$

D'altra parte esplicitando la $\mathcal{F} [H_{cN}(x, y, \zeta)]$ si ha:

$$\begin{aligned} \mathcal{F} [H_{cN}(x, y, \zeta)] &= \int H_{cN}(x, y, \zeta) e^{i2\pi(xX + yY + \zeta Z)} dx dy d\zeta = \\ &= \int H_{cN}\left(x, y, z + \frac{P}{N}\right) e^{i2\pi(xX + yY + zZ)} e^{i2\pi \frac{P}{N} Z} dx dy dz = \\ &= e^{i2\pi \frac{P}{N} Z} \mathcal{F} [H_{cN}(x, y, z)] \end{aligned} \quad (33)$$

Confrontando le (32) e (33) si vede che il fattore di fase $e^{i2\pi \frac{P}{N} Z}$ deve essere uguale a 1; inoltre poichè sull' n -esimo piano Z_n della $\mathcal{F} [H_{cN}]$ vale la $P \cdot Z_n = n$ ed il fattore di fase diviene $e^{i2\pi \frac{n}{N}}$, n deve essere multiplo intero di N .

Da ciò consegue che nella $\mathcal{F} [H_{cN}]$ non sono presenti piani Z_n su cui compaiano funzioni di Bessel i cui ordini non siano multipli di N , e la corrispondente spaziatura aumenta da $1/P$ ad N/P .

È evidente allora che la $\mathcal{F} [H_{dN}]$ è ancora data dalla (29) in cui i possibili n sono ora forniti dalle due regole di selezione:

$$\begin{aligned} l &= t n + u m \\ n &= k \cdot N \end{aligned} \quad (34)$$

ove k è un intero positivo, negativo o nullo.

Si può dare una semplice interpretazione geometrica delle regole di selezione (34) considerando il reticolo reciproco della proiezione radiale dell'elica discontinua.

Se su tale reticolo reciproco si introduce un sistema di coordinate mediante un asse orizzontale « n » ed un asse verticale « l », in modo che ciascun punto sia caratterizzato da una coppia di interi n, l , è facile verificare come tutti i punti vengano a trovarsi su rette le cui equazioni sono date dalle (34); ciò significa che l'esistenza di un dato punto di coordinate n, l implica la presenza della funzione di Bessel J_n sull' l -esimo «layer-line» della figura di diffrazione.

Il grafico che si può costruire introducendo tale sistema di indici sul reticolo reciproco viene generalmente chiamato grafico (n, l) .

c) *Calcolo della trasformata della proiezione di una struttura elicoidale*

La particolare configurazione di una struttura elicoidale è tale che, in genere, le relative immagini elettroniche possono essere considerate come proiezioni normali all'asse longitudinale della struttura stessa.

La distribuzione di densità su una micrografia elettronica per un'elica $H(x, y, z)$, il cui asse longitudinale si assuma coincidere con l'asse z , sarà data quindi dalla:

$$\sigma(y, z) = \int H(x, y, z) dx \quad (35)$$

per la trasformata $\mathcal{F} [\sigma]$ si ottiene allora:

$$\begin{aligned} \mathcal{F} [\sigma(y, z)] &= \iint [\int H(x, y, z) dx] e^{i2\pi(yY + zZ)} dy dz = \\ &= \iiint H(x, y, z) e^{i2\pi(yY + zZ)} dx dy dz = \mathcal{F} [H](O, Y, Z) \end{aligned} \quad (36)$$

Dalla (36) si vede cioè che la trasformata di $\sigma(y, z)$ può essere considerata come la trasformata dell'elica tridimensionale $H(x, y, z)$ sul piano $X = 0$.

Nella disposizione sperimentale di paragrafo 1, Fig. 3, la trasformata della $\sigma(y, z)$ è osservabile sul piano F ; cioè tale piano corrisponde al piano $X = 0$ dello spazio di Fourier.

Nel punto P del piano della figura di diffrazione, l'intensità delle onde diffratte sarà data allora dalla:

$$I(P) = |\mathcal{F}[Hd](P)|^2 = \left| \sum_n J_n(2\pi R r_0) \right|^2 \quad (37)$$

ricavata dalla (29) tenendo conto che nel piano $X = 0$ la coordinata cilindrica ψ assume i valori $\psi = \frac{\pi}{2}$ e $\psi = \frac{3}{2}\pi$ rispettivamente per Y positivo e negativo, e che l'intensità della radiazione diffratta è data dal modulo quadrato dell'ampiezza.

4) LA TECNICA DEL FILTRAGGIO OTTICO

La tecnica del filtraggio ottico (KLUG & DE ROSIER, 1966) consente di ricostruire migliorata l'immagine di partenza, operando la trasformata ottica della relativa figura di diffrazione.

Con un procedimento sperimentale sostanzialmente semplice si possono eseguire due tipi di «filtraggio ottico» delle micrografie elettroniche: produrre immagini finali dalle quali sia stato «filtrato» il rumore di fondo presente sulla micrografia elettronica, o immagini finali dalle quali sia stato «filtrato» il contributo fornito da strutture sovrapposte a quella che si intende osservare.

Come vedremo nel seguito il procedimento tecnico è, nei due casi, essenzialmente lo stesso, ma i principi teorici sono diversi.

a) Immagine media

L'immagine elettronica di una struttura periodica, o di una distribuzione regolare di elementi simili, mostra spesso notevoli variazioni nei dettagli dei componenti stessi.

Tale variabilità può essere dovuta a più fattori che si manifestano tutti insieme come «rumore di fondo» della micrografia elettronica: danni subiti dal preparato, colorazione irregolare, struttura granulare del supporto, ecc. In questi casi può essere conveniente realizzare una «immagine media» (FRASER & MILLWARD, 1970) della struttura, mediante la «sovrapposizione» di un certo numero di immagini, con la conseguente riduzione del rumore di fondo.

Per ottenere ciò è possibile utilizzare il fatto che l'«immagine media» di una struttura periodica o di una distribuzione di elementi simili su di un reticolo, è parte della convoluzione della immagine originale con il reticolo stesso che, più brevemente, indicheremo come la funzione di media dell'immagine.

Questo è illustrato in Fig. 9, ove la micrografia è rappresentata dalla distribuzione regolare di elementi identici u, v, w , e la funzione di media dal reticolo x, y, z , di periodo corrispondente.

Dalla Fig. 9 risulta evidente come «l'immagine media» desiderata sia fornita dalla parte centrale della convoluzione, costituita dalla sovrapposizione dei tre elementi.

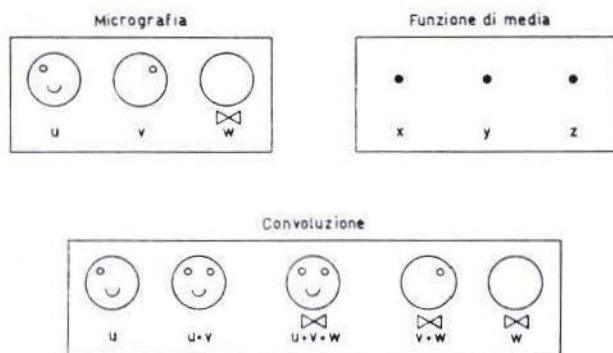


Fig. 9. — Immagine media ottenibile dalla convoluzione fra la micrografia e la corrispondente funzione di media.

Indicando con l'operatore \mathcal{F} la trasformata di Fourier, con l'operatore C la convoluzione, con f_1 la micrografia elettronica ed f_2 la corrispondente funzione di media, vale la relazione:

$$\mathcal{F} [\mathcal{F} (f_1) \cdot \mathcal{F} (f_2)] = C [f_1, f_2] \quad (38)$$

Cioè l'operazione di convoluzione può essere eseguita facendo la trasformata di Fourier del prodotto delle trasformate.

La $\mathcal{F} (f_1)$ viene ottenuta sul piano di diffrazione F di Fig. 10, mentre la trasformata della funzione di media f_2 può essere approssimata mediante

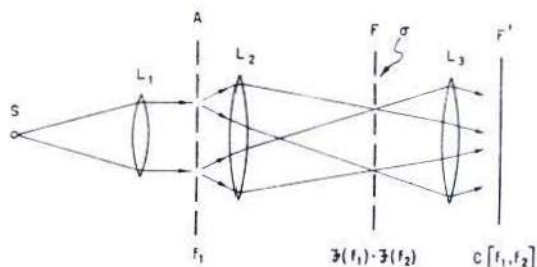


Fig. 10. — Condizioni sperimentali utilizzabili per ottenere l'immagine media di una micrografia.

aperture su di uno schermo opaco σ ; ponendo lo schermo σ sul piano di diffrazione F si può allora ottenere il prodotto $\mathcal{F}(f_1) \cdot \mathcal{F}(f_2)$. La convoluzione richiesta, $C[f_1, f_2]$, la cui parte centrale fornisce «l'immagine media», è la trasformata ottica della figura di diffrazione filtrata così ottenuta.

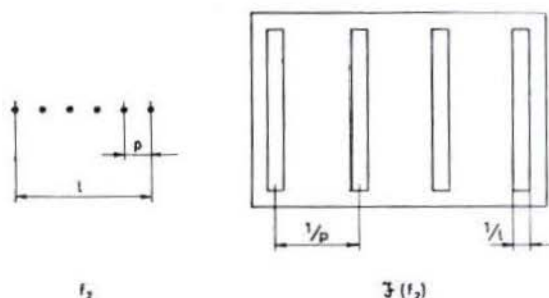
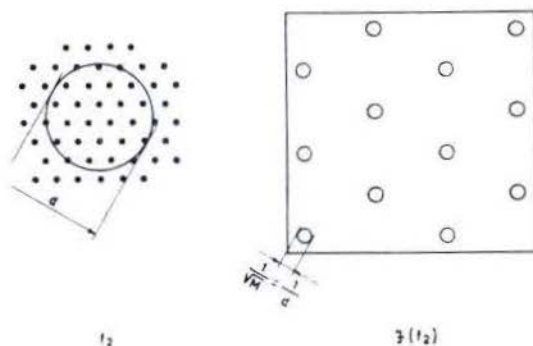


Fig. 11. — Costruzione della trasformata di Fourier $\mathcal{F}(f_2)$ di una funzione di media f_2 unidimensionale.

Il numero n di immagini parziali che compongono l'«immagine media» è evidentemente uguale al numero di punti della funzione di media f_2 . Le possibili alterazioni presenti nelle strutture studiate fanno sì che, dopo un certo numero n di elementi che nell'immagine si ripetono con un determinato periodo, compaiano elementi spazati con una periodicità diversa; il massimo valore utile di n risulta evidentemente quello corrispondente agli elementi separati dallo stesso periodo, mentre per valori di n maggiori la risoluzione dell'«immagine media» tende a diminuire. La parte della immagine entro cui gli elementi stessi si ripetono con il medesimo periodo p è definita come il dominio di coerenza dell'immagine stessa.

Fig. 12. — Costruzione della trasformata di Fourier $\mathcal{F}(f_2)$ di una funzione di media f_2 bidimensionale.



Cominciamo a considerare il caso in cui l'immagine originale sia costituita da una distribuzione periodica unidimensionale di elementi identici. Se l è la dimensione del dominio di coerenza, la funzione di media f_2 (Fig. 11) è una distribuzione lineare di lunghezza totale l , periodo p , ed $n = l/p$ punti; la corrispondente trasformata può essere approssimata da una serie

di fenditure parallele, su uno schermo opaco, con una spaziatura proporzionale ad $1/p$ ed una ampiezza proporzionale ad $1/n$ e quindi ad $1/l$ (paragrafo 2c).

Consideriamo ora il caso più generale in cui l'immagine sia costituita da una distribuzione di elementi su di un reticolo piano. Delimitando con una circonferenza di diametro d il dominio di coerenza dell'immagine, la funzione di media f_2 (Fig. 12) sarà data da una corrispondente zona circolare, di diametro d , del reticolo piano in cui sono contenuti un numero M , proporzionale a d^2 , di punti reticolari; la corrispondente trasformata può essere approssimata da una serie di aperture, su uno schermo opaco, di diametro proporzionale ad $1/\sqrt{M}$, e quindi a $1/d$ (paragrafo 2 c), distribuite secondo il reticolo reciproco della funzione di media f_2 .

Il valore della costante di proporzionalità, cioè il fattore di ingrandimento del reticolo reciproco necessario per determinare di volta in volta l'ampiezza delle aperture sullo schermo opaco, è funzione della disposizione degli elementi del diffrattometro e può venir convenientemente determinato tarando lo strumento con un reticolo campione.

b) Filtraggio di strutture sovrapposte

L'immagine che si ottiene da un microscopio elettronico a trasmissione può essere il risultato della sovrapposizione di immagini di strutture che nel campione osservato si trovano su piani diversi.

Ciò capita sistematicamente utilizzando la tecnica di osservazione in contrasto negativo che fornisce immagini che rappresentano la proiezione, su un piano, della distribuzione tridimensionale del mezzo di contrasto. Se le strutture sovrapposte possiedono una certa periodicità la tecnica della diffrazione ottica permette di separarne spazialmente, sul piano di diffrazione, i rispettivi contributi all'immagine finale.

La periodicità delle strutture dà infatti origine ad una distribuzione discreta di raggi diffratti, cosicchè sulla figura di diffrazione è possibile assegnare i vari massimi di intensità a gruppi diversi, corrispondenti ad altrettante strutture sovrapposte.

Utilizzando schermi opachi, opportunamente forati, posti sul piano di diffrazione, è possibile selezionare tali gruppi di raggi diffratti; la trasformata di Fourier della figura di diffrazione così «filtrata» fornisce allora l'immagine della sola struttura che si vuole studiare.

Una corretta selezione, sulla figura di diffrazione, dei gruppi di raggi diffratti provenienti dalle diverse strutture può essere tuttavia difficile a realizzarsi.

Può accadere infatti che ad alcuni massimi delle figure di diffrazione contribuiscano più strutture, cosicchè la loro intensità risulterà maggiore

che se provenissero da una sola: nell'attuare la ricostruzione dell'immagine occorrerà perciò attenuare opportunamente la loro intensità.

Inoltre l'esclusione o meno di qualche raggio diffratto può portare a grossolani artefatti; perciò la figura di diffrazione deve essere studiata e risolta, e le strutture che la producono determinate, prima di procedere alla operazione di « filtraggio ».

5) IL BANCO OTTICO

L'apparato sperimentale cui si fa riferimento in questo lavoro è costituito dal diffrattometro ottico commerciale della Polaron Instruments Ltd (Londra).

Gli elementi di tale apparato (MARKAM, 1968) sono montati su di un banco ottico di precisione, a doppio binario, della lunghezza di 3 metri, dotato di una graduazione millimetrica che permette la riproducibilità di posizione degli elementi stessi; la rigidità del banco è assicurata dal suo ancoraggio ad una doppia guida in acciaio.

L'intero apparato sperimentale poggia su di un supporto in legno e feltro che ne garantisce l'isolamento da vibrazioni meccaniche.

Nella disposizione sperimentale utilizzata, la condizione per la diffrazione a piccolo angolo, cioè la possibilità di prendere $\operatorname{tg} \theta \approx \sin \theta$, con l'angolo θ definito in Fig. 7, risulta completamente verificata.

La sorgente di luce a disposizione è un laser ad $H_l - N_l$ la cui radiazione ha lunghezza d'onda $\lambda \approx 10^4 \text{ \AA}$; i reticoli di diffrazione sono micrografie elettroniche di strutture periodiche i cui periodi p , sulle micrografie, sono in genere compresi nell'intervallo fra $1 \text{ mm} = 10^7 \text{ \AA}$ e $10^{-1} \text{ mm} = 10^6 \text{ \AA}$. Per gli angoli di diffrazione, dalla (19) si ha:

$$\sin \theta = \left| \vec{S}_{2p} \right| = \lambda \left| \vec{V}^* \right| = \frac{\lambda}{p} \quad (39)$$

$\sin \theta$ risulta perciò compreso fra 10^{-2} e 10^{-3} , ampiamente nel limite della diffrazione a piccolo angolo.

a) Descrizione e disposizione dei componenti ottici

I componenti ottici dell'apparato possono essere raccolti, secondo lo schema di Fig. 13, in tre gruppi distinti corrispondenti rispettivamente ai sistemi di: illuminazione della micrografia elettronica « a », formazione della figura di diffrazione « b » e ricostruzione dell'immagine « c ».

Il primo gruppo dei componenti realizza un fascio di luce coerente di grande estensione. Il laser (A), del tipo He - Ne, con potenza di uscita di 1,0 milliwatt, costituisce una sorgente di luce coerente di diametro di circa 2 mm e di lunghezza d'onda $\lambda = 6328 \text{ \AA}$.

La lente biconcava (*B*), inserita immediatamente dopo la sorgente laser, genera un fascio divergente che viene limitato da un diaframma fisso (*C*), di 300μ , per eliminare gli effetti della aberrazione sferica della lente stessa, e quindi collimato da una lente piano-convessa (*D*).

Tale sistema ottico permette di ottenere un fascio incidente sulla micrografia elettronica (*E*) di circa 2,5 cm di diametro.

La micrografia elettronica è fissata ad un supporto che ne permette traslazioni su un piano perpendicolare all'asse del banco ottico.

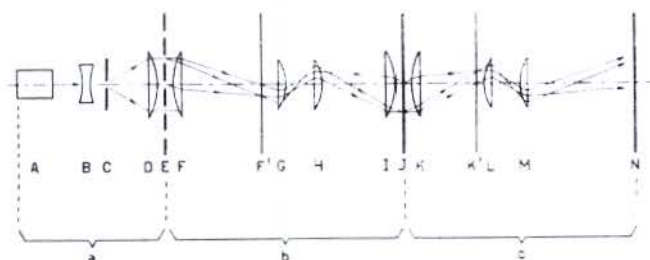


Fig. 13. — Componenti ottici del diffrattometro.

Il secondo gruppo di elementi è equivalente ad una lente convergente di lunghissima distanza focale.

La figura di diffrazione di (*E*) si forma sul piano focale (*F'*) della lente piano convessa (*F*); questa figura viene quindi ingrandita dalle due lenti (*G*) ed (*H*) che insieme si comportano come una lente convergente, e proiettata sul piano (*J*) dalla lente piano convessa (*I*). Variando opportunamente la posizione di tali lenti e del piano (*J*), è possibile ottenere ingrandimenti diversi per la figura di diffrazione; il fattore di ingrandimento, cioè il prodotto fra i periodi sulla micrografia elettronica e le distanze fra i corrispondenti massimi della figura di diffrazione può arrivare fino a circa 10. Nella disposizione da noi solitamente usata il fattore di ingrandimento risulta circa 2,5.

Il terzo gruppo di elementi, equivalente ancora ad una lente convergente, è in grado di ricostruire, opportunamente ingrandita, l'immagine della micrografia elettronica. In particolare la lente piano convessa (*K*) ricompono sul suo piano focale (*K'*) la figura di diffrazione del piano (*J*) in una immagine che è la ricostruzione della originale micrografia elettronica; questa viene poi ingrandita e proiettata sul piano (*N*) per mezzo delle due lenti (*L*) ed (*M*) che insieme si comportano come una lente convergente; l'immagine che così si forma sul piano (*N*) risulta rovesciata.

La possibilità di variare l'ingrandimento è limitata dalla lunghezza del banco ottico; con questo banco, modificando la disposizione delle lenti, si può raggiungere un ingrandimento pari a circa 2, mentre nella disposizione da noi solitamente usata l'ingrandimento è circa 1.

b) Allineamento dei componenti ottici

Tale operazione va eseguita in due fasi successive, la prima consistente in un allineamento preliminare del laser rispetto al banco ottico, la seconda nell'allineamento delle lenti rispetto al fascio laser.

Il laser, posto ad una estremità del banco, è fissato su di esso mediante due supporti che permettono di traslare e di ruotare il suo asse ottico rispetto al banco stesso. Il suo allineamento può essere ottenuto semplicemente ponendo, il più vicino possibile alla finestra di uscita del fascio, uno schermo su cui si possa segnare il centro del fascio stesso; trasladando lo schermo alla altra estremità del banco ed aggiustando il laser in modo che il fascio cada ancora sul centro segnato, si sarà reso parallelo al banco l'asse ottico del laser.

Dato il notevole numero di lenti presenti lungo il banco, la seconda fase, di allineamento del sistema ottico rispetto al fascio laser, risulta alquanto laboriosa ed estremamente critica, in quanto un eventuale disallineamento di una lente viene amplificato dalle successive.

È opportuno perciò seguire una procedura operativa che tenda a minimizzare l'incidenza di possibili errori nell'allineamento del sistema: per questo è necessario collocare ciascuna lente nella propria posizione lungo il banco ottico e quindi allinearla indipendentemente dalle altre. Questo può essere realizzato iniziando le operazioni con la lente più lontana dal laser, per procedere poi con quelle successivamente più vicine.

Il metodo più sensibile per valutare il buon allineamento di ciascuna lente con il fascio laser, è quello di osservare i due principali raggi riflessi dalle superfici della lente stessa. Ponendo davanti al laser uno schermo forato in modo da permettere il passaggio del fascio, si potranno osservare sul retro dello schermo i due raggi riflessi come macchie luminose; si otterrà una figura di interferenza a cerchi concentrici, centrata rispetto al fascio, solo quando l'asse ottico della lente risulterà allineato con il fascio stesso.

Tale condizione può essere realizzata poichè le lenti sono fissate al banco mediante supporti che permettono sia di traslare che di ruotare il loro asse ottico. Agendo con le viti di traslazione si porterà il fascio laser ad intersecare il centro della lente e si avrà quindi la sovrapposizione delle macchie luminose riflesse; per ottenere poi che l'asse ottico della lente risulti parallelo al fascio laser si dovrà agire con le viti di rotazione fino a centrare la figura di interferenza rispetto al fascio.

Procedendo per successive approssimazioni con il metodo descritto, si può in definitiva ottenere un soddisfacente allineamento di tutto il sistema ottico.

In linea di principio sarebbe opportuno procedere alle operazioni di allineamento fin qui descritte per ogni successiva utilizzazione dello strumento; nel caso non si proceda in tal modo, è comunque necessario controllare ogni volta il suo stato di allineamento. Un buon indice per questo è l'immagine finale del fascio prodotta dal sistema ottico: la presenza di macchie luminose secondarie e di bande di interferenza è sempre indizio del disallineamento di qualche lente.

6) PROCEDURE SPERIMENTALI

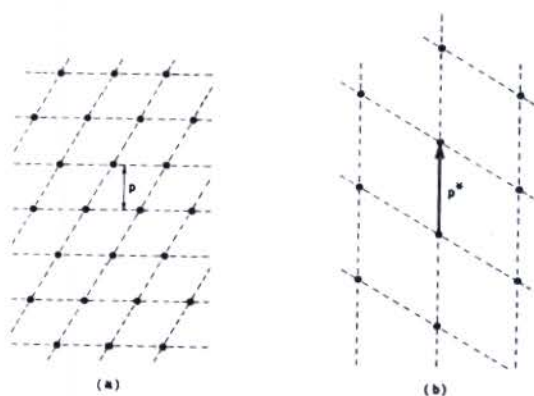
a) Taratura del diffrattometro

Tale operazione è necessaria quando si vogliono eseguire misure quantitative sulle figure di diffrazione ottenute.

Per la determinazione dei periodi reticolari è necessario conoscere il fattore di ingrandimento corrispondente alla disposizione sperimentale del sistema ottico utilizzata di volta in volta. Il fattore di ingrandimento M è definito come il prodotto tra uno qualsiasi dei periodi p del reticolo di diffrazione (Fig. 14a) ed il corrispondente periodo p^* della figura di diffrazione (Fig. 14b) cioè :

$$M = p \cdot p^* \quad (40)$$

Fig. 14. — Procedimento per la determinazione del fattore di ingrandimento $M = p \cdot p^*$ del diffrattometro.



La misura di M può essere ottenuta, una volta fissata la disposizione sperimentale dello strumento, ricorrendo ad un reticolo di diffrazione campione, di cui siano note le costanti reticolari, semplicemente misurando sul reticolo e sulla figura di diffrazione le distanze p e p^* e calcolando M a mezzo della (40).

Il fattore di ingrandimento potrebbe anche essere calcolato in base alla conoscenza delle costanti ottiche dello strumento, ma tale metodo risulta in pratica più laborioso e meno esatto.

b) Schermaggio delle micrografie elettroniche

La zona della micrografia elettronica di cui si vuole studiare la trasformata ottica deve essere opportunamente delimitata per evitare che il «rumore di fondo» proveniente dal resto della lastra pregiudichi la risoluzione della figura di diffrazione.

Questo può essere realizzato semplicemente applicando una finestrella di nastro adesivo opaco sul retro della micrografia elettronica in corrispondenza della zona prescelta.

Occorre tener presente che, così, la figura di diffrazione conterrà anche la trasformata di Fourier della «finestra» e risulterà perciò vantaggioso, per la interpretazione della figura di diffrazione stessa, che quella sia di forma geometrica regolare e con una trasformata di Fourier facilmente calcolabile, quadrata, rettangolare, ecc.

Le dimensioni della «finestra» dovranno essere scelte in modo da soddisfare contemporaneamente due opposte esigenze: ridurre al minimo il rumore di fondo ed includere un numero sufficiente di «ripetizioni» della struttura periodica esaminata.

A tal proposito sarà opportuno tener presente che la definizione e le dimensioni dei massimi di intensità sulla figura di diffrazione sono inversamente proporzionali al numero di «ripetizioni» contenute nella «finestra» utilizzata (paragrafo 2 c).

c) Maschere per il filtraggio ottico

Fra i possibili metodi per la loro preparazione quello che si è rivelato più pratico e che ha dato i migliori risultati è consistito nell'utilizzare stampe a contatto, su carta fotografica, delle figure di diffrazione, forate con opportuni punzoni in acciaio in corrispondenza dei massimi di intensità che si vogliono selezionare.

Si è visto che è preferibile l'uso di maschere con aperture piuttosto ampie in modo tale da non escludere alcuna parte dei raggi diffratti; così, pur introducendo un maggior rumore di fondo, si ha il vantaggio di conservare nell'immagine filtrata una maggior quantità di dettagli della immagine originale.

Prima di passare alla realizzazione pratica della maschera è necessario studiare in dettaglio la figura di diffrazione al fine di stabilire la geometria della struttura periodica esaminata; questo evita di giungere ad immagini filtrate la cui struttura non corrisponde a quella che si voleva filtrare dalla immagine originale.

Studiando immagini elettroniche di strutture sovrapposte può avvenire che, a taluni massimi della figura di diffrazione, contribuiscano più

strutture; in tal caso, volendo filtrare il contributo di una singola struttura, occorrerà attenuare l'intensità dei raggi diffratti corrispondenti a quei massimi velando con finissima garza di rame le relative aperture della maschera.

L'attenuazione ottimale si può ottenere per tentativi utilizzando garze di rame a maglie più o meno fitte.

d) *Tecniche fotografiche*

Per la raccolta delle figure di diffrazione e delle immagini filtrate, è predisposto sul banco ottico un sistema fotografico costituito da un otturatore e da una camera su cui è possibile montare sia films Polaroid sia normali lastre fotografiche.

Viene normalmente impiegato materiale fotografico ad elevato contrasto costituito da films Polaroid pancromatici tipo 55 P/N e da lastre Agfa-Gevaert pancromatiche tipo Gevapan 30.

I tempi di posa impiegati sono di solito compresi fra pochi decimi di secondo ed alcuni secondi in relazione all'annerimento della micrografia elettronica utilizzata come reticolo di diffrazione.

7) APPLICAZIONI

a) *Studio di cristalli proteici*

Una delle prime applicazioni della tecnica della diffrazione ottica alla analisi di micrografie elettroniche, è stata quella relativa allo studio di cristalli proteici.

Fra i lavori riportati in letteratura, appaiono di particolare interesse quelli relativi alla struttura di cristalli di catalasi (LONGLEY, 1967), e di inclusioni cristalline osservabili nei mitocondri di epatociti (STERNLIEB & BERGER, 1969).

Di seguito si riportano alcuni dati strutturali, ottenuti dagli AA., relativi a cristalli di catalasi. Tali cristalli, tra l'altro utilizzati per la taratura dell'ingrandimento del microscopio elettronico, si presentano macroscopicamente come piccole scaglie, larghe e sottili il cui reticolo superficiale è facilmente risolvibile sia con la tecnica di osservazione in contrasto negativo, che su repliche ottenute con la tecnica del freeze-etching.

Le figure di diffrazione ottenibili da micrografie elettroniche di queste strutture cristalline possono essere interpretate come il reticolo reciproco del reticolo superficiale del cristallo (paragrafo 2 d); di conseguenza le distanze fra i massimi di intensità sulle figure di diffrazione corrispondono esattamente ai periodi reticolari presenti sulle micrografie originali, calcolabili in base al fattore di ingrandimento del diffrattometro.

In Tav. 1 è riportata una micrografia in contrasto negativo di un cristallo di catalasi (Tav. 1A) e la corrispondente figura di diffrazione (Tav. 1B).

Il modello del reticolo superficiale del cristallo, che ne è stato dedotto, è schematizzato in Fig. 15; sulla figura sono indicati i periodi reticolari $a = 68,5 \pm 5 \text{ \AA}$ e $c = 87 \pm 6 \text{ \AA}$; le distanze corrispondenti ad $1/a$ ed $1/c$ sul reticolo reciproco sono invece riportate sulla figura di diffrazione (Tav. 1B).

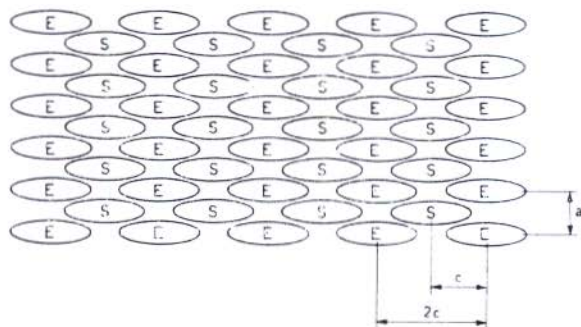


Fig. 15. — Modello del reticolo superficiale del cristallo di catalasi.

Dall'analisi delle figure di diffrazione si ricava inoltre un dato che non è facilmente ottenibile dall'esame delle micrografie in contrasto negativo: si possono infatti osservare una serie di massimi di minore intensità che giacciono sul reticolo reciproco corrispondente alla disposizione delle subunità *E* dello schema di Fig. 15; tali massimi, separati da distanze pari ad $1/2c$, dovrebbero essere assenti se il reticolo superficiale del cristallo fosse costituito da una distribuzione di subunità tutte equivalenti fra loro, come nel modello proposto. La loro presenza sembra suggerire che le subunità *E* e le subunità *S* non siano equivalenti; potrebbero ad esempio giacere su piani diversi.

Tale ipotesi sembra confermata dalla osservazione delle repliche del reticolo superficiale (Tav. 1C) e dall'analisi delle corrispondenti trasformate ottiche (Tav. 1D). Su queste ultime i massimi di intensità giacciono effettivamente sul reticolo corrispondente alla disposizione delle subunità *E* di Fig. 15, cioè sulle figure di diffrazione sono misurabili distanze fra i massimi che corrispondono rispettivamente ad $1/a$ ed a $1/2c$.

La scomparsa del periodo reticolare *c* dalle micrografie delle repliche dei cristalli suggerisce che le subunità *E* ed *S* possano trovarsi su piani diversi; va aggiunto tuttavia che potrebbe anche trattarsi di un artefatto dovuto all'interazione tra il materiale impiegato per l'ombratura (*Pt-C*) ed il preparato.

b) *Studio di membrane cellulari*

All'abbondante disponibilità di dati e di modelli teorici relativi alla struttura fine delle membrane cellulari, dovuti soprattutto all'utilizzazione delle tecniche classiche di microscopia elettronica, corrisponde a tutt'oggi una limitata serie di risultati sperimentali ottenuti con i metodi della diffrazione e del filtraggio ottico.

Questi ultimi hanno trovato finora applicazione solo nello studio strutturale di membrane della vescica urinaria del topo (VERGARA *et al.*, 1969) e di pareti cellulari di *Bacillus polymyxa* (FINCH *et al.*, 1967).

Si riportano in questa sede alcuni risultati ottenuti dagli AA. nello studio di pareti cellulari batteriche, in particolare di *Bacillus megatherium*. L'analisi al diffrattometro ottico è stata condotta su micrografie elettroniche di tali pareti cellulari, osservate con la tecnica del contrasto negativo e dell'ombatura con $Pt - C$ (Tav. 2A e 2C). Lo studio delle relative figure di diffrazione (Tav. 2B e 2D) ha mostrato che il reticolo superficiale di tali membrane è costituito da una distribuzione regolare di subunità la cui simmetria è quella di un gruppo piano $p4$ e la cui costante reticolare risulta $p \approx 130 \text{ \AA}$.

Questi dati, per la loro analogia con quelli ottenuti da FINCH, KLUG & NERMUT, (1967) nel caso del *B. polymyxa*, inducono a ritenere possibile l'ipotesi di una struttura reticolare superficiale delle pareti cellulari comune almeno alle diverse specie batteriche della famiglia delle Bacillacee.

c) *Studio di capsidi fagici*

Per quanto riguarda la struttura fine dei capsidi fagici si ritrovano in letteratura pochi lavori relativi alla disposizione delle subunità proteiche nelle polisteste del fago T4 (FINCH, KLUG & STRETTON, 1964; YANAGIDA *et al.*, 1970; DE ROSIER & KLUG, 1972; YANAGIDA *et al.*, 1972) e nel capsido del fago G (DONELLI, GUGLIELMI & PAOLETTI, 1971); Si riportano, a titolo di esempio, i risultati riguardanti la struttura fine di quest'ultimo.

Durante lo studio morfologico del fago G, è stata osservata una struttura regolare dei capsidi vuoti («ghosts») nelle sospensioni fagiche esaminate in contrasto negativo. Tali sospensioni sono state trattate in modo da ottenere preparati ad alta percentuale di capsidi vuoti e sono state quindi sottoposte ad osservazioni sistematiche sia in contrasto negativo che con la tecnica dell'ombatura.

Le micrografie elettroniche ottenute (Tav. 3A, 3C) sono state studiate con le tecniche della diffrazione ottica (Tav. 3B, 3D).

Le figure di diffrazione sono risultate caratteristiche di una struttura ordinata secondo un gruppo piano $p6$; la costante reticolare $p = 140 \text{ \AA}$ è stata misurata sulla figura di diffrazione con un errore del 5%.

In Tav. 3A è riportata una ricostruzione della struttura a subunità del capsido, ottenuta mediante la tecnica del filtraggio ottico.

In base ai dati raccolti i «ghosts» sono risultati costituiti, secondo lo schema di Fig. 16, da un monostrato proteico le cui subunità sono sistemate su di un reticolo superficiale dotato della simmetria del gruppo piano $p6$, nella posizione corrispondente agli assi a simmetria ternaria.

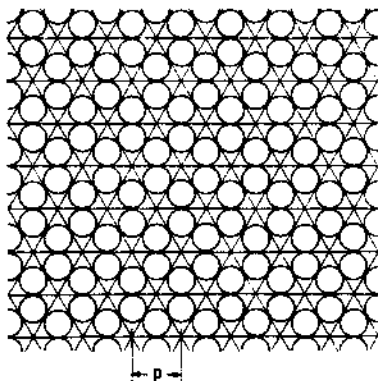


Fig. 16. — Modello del monostrato proteico costituente il capsido del fago G.

d) Studio di strutture elicoidali

I primi dati sperimentali, ottenuti con metodi ottici di analisi, relativi a strutture biologiche elicoidali, sono quelli di KLUG & BERGER (1964) riguardanti il TMV (virus del mosaico del tabacco). Successivamente tali metodi sono stati applicati allo studio della struttura fine delle fibre flagellari di *Trichonympha* (GRIMSTONE & KLUG, 1966), delle code e policode del fago T_4 (MOODY, 1967; KRIMM & ANDERSON, 1967), dei tubi di catalasi (KISELEV, DE ROSIER & KLUG, 1968), delle variazioni tubulari di virus del tipo Papilloma-Polyoma (KISELEV & KLUG, 1969), dei filamenti di F-actina (MOORE *et al.*, 1970), dei tubi di glicogeno fosforilasi β (KISELEV, LERNER & LIVANOVA, 1971) delle code del fago G (DONELLI, GUGLIELMI & PAOLETTI, 1971).

Di quest'ultimo fago gli AA. hanno studiato la struttura del manicotto caudale sia nello stato disteso che nello stato contratto. Qui di seguito è riportato, a titolo esemplificativo, come si è proceduto all'analisi strutturale del manicotto nello stato disteso.

Una analisi statistica delle dimensioni del manicotto, eseguita sulle micrografie in contrasto negativo (Tav. 4A), ha fornito una lunghezza media di 4550 Å , con scarti dalla media compresi entro il 3,5%; con tale analisi è stata inoltre accertata l'esistenza di vari gradi di collassamento della struttura ed è stato possibile assegnare un valore di circa 65 Å al raggio esterno del manicotto stesso. Le figure di diffrazione (Tav. 4B), del mani-

cotto disteso, ottenute da micrografie in contrasto negativo di fago *G*, sono state analizzate sulla base della teoria della diffrazione di una struttura elicoidale (paragrafo 3).

Sulle figure di diffrazione studiate i massimi principali possono essere assegnati all'uno o all'altro dei reticoli reciproci (Tav. 4C), corrispondenti rispettivamente alle due superfici del manicotto. Nella grande maggioranza dei casi questi reticoli sono risultati, con buona approssimazione, la immagine speculare l'uno dell'altro; cioè la struttura del manicotto deve aver subito, durante i processi di colorazione ed osservazione al microscopio elettronico, deformazioni simmetriche sulle due facce.

In molte delle figure di diffrazione studiate è stata anche riscontrata una maggiore intensità dei massimi di uno dei due reticoli reciproci, rispetto all'intensità dei massimi dell'altro. Ciò è interpretabile con una diversa colorazione delle due facce del manicotto. In questi casi è risultata sempre la medesima faccia a contribuire ad i massimi più intensi. Pur non essendo possibile distinguere con sicurezza le due superfici del manicotto, relativamente al loro contributo in intensità alla figura di diffrazione, è tuttavia possibile, come già suggerito da altri AA. (FINCH & KLUG, 1965) che i massimi più intensi siano quelli relativi alla superficie del manicotto che si trova a contatto con la pellicola supporto.

Sulle figure di diffrazione analizzate i massimi di intensità cadono su un sistema di piani le cui spaziatore risultano equidistanti entro un fattore del 12%. Il grafico (n, l) ricavato dalla analisi delle figure di diffrazione e la corrispondente proiezione radiale del reticolo superficiale, riportati in Fig. 17, sono dunque da considerarsi rappresentazioni della struttura del manicotto disteso valide entro tale approssimazione. L'elica base è stata, poi, disegnata levogira in accordo con l'ipotesi che la superficie che contribuisce ai massimi più intensi sia quella in contatto con la pellicola supporto.

Dal grafico (n, l) si può dedurre immediatamente come l'elica base della struttura studiata, cioè l'elica con il passo maggiore, venga descritta dalla regola di selezione: $l = 1 \cdot n/N + 3 \cdot m$, dove N è il nu-

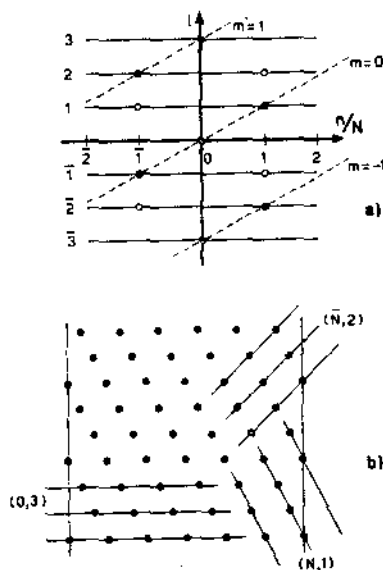


Fig. 17. — a) Grafico (n, l) del reticolo superficiale del manicotto. b) Proiezione radiale del reticolo superficiale; la superficie cilindrica è aperta e distesa sul piano con la superficie interna verso l'alto.

mero di partenza dell'elica base, stessa cioè il grado di simmetria assiale della struttura. La spaziatura dei piani sulle figure di diffrazione corrisponde ad un periodo nella direzione assiale: $c = 115 \pm 14 \text{ \AA}$; la presenza di un massimo su $l = 3$ in corrispondenza del meridiano permette inoltre di determinare la spaziatura tra gli anelli trasversali di subunità: $p = 38 \pm 4 \text{ \AA}$.

L'intero manicotto disteso risulta quindi costituito da:

$$L/p = 4550 \text{ \AA} / 38 \text{ \AA} = 120 \pm 18 \text{ anelli trasversali di subunità.}$$

Per determinare il numero di partenze N dell'elica base, è stato ricavato il più basso ordine n delle funzioni di Bessel presenti sulla figura di diffrazione. Nel nostro caso le funzioni di ordine più basso dominano la distribuzione di intensità sul piano $l = 1$; la posizione del massimo principale di intensità su tale piano è stata allora misurata su figure di diffrazione di manicotti che, in base alla analisi statistica delle dimensioni apparenti del manicotto erano stati classificati rispettivamente come indeformati o completamente collassati.

I valori sperimentali così ottenuti sono stati poi confrontati con i valori teorici calcolati in corrispondenza di un certo numero di possibili valori del grado di simmetria (Tab. 1).

TABELLA 1

Posizione del massimo principale su $l = 1$

Manicotto	$(2\pi r R)_{\text{per.}}$	$(2\pi r R)_{\text{teor. } n=6}$	$(2\pi r R)_{\text{teor. } n=7}$
Indeformato	$7,9 \pm 0,5$	7,5	8,6
Manicotto	$(2\pi r R)_{\text{per.}}$	$(2\pi r R)_{\text{teor. } n=6}$	$(2\pi r R)_{\text{teor. } n=7}$
Collassato	$6,1 \pm 0,4$	6,0	7,0

Deve essere messo in evidenza il fatto che il valore di $r = 62 \pm 3 \text{ \AA}$ usato per calcolare la quantità $(2\pi r R)_{\text{per.}}$, dove r è il raggio della struttura elicoidale ed R la coordinata radiale nello spazio reciproco, corrisponde al raggio accessibile al colorante negativo. Per ottenere tale valore è stata misurata, dalle figure di diffrazione di manicotti classificati rispettivamente indeformati o completamente collassati, la distanza dal meridiano dei massimi del secondo ordine della distribuzione di intensità sul piano $l = 3$; il valore di r è stato quindi calcolato supponendo che tale distribuzione corrisponda alla trasformata di Fourier di una struttura elicoidale nel caso dei manicotti indeformati ed alla trasformata di un reticolo piano nel caso dei manicotti collassati. I dati sperimentali di Tab. 1 sembrano accordarsi bene con i valori teorici per $n = 6$, calcolati ancora utilizzando la trasformata di Fourier di una struttura elicoidale e di un reticolo piano rispettivamente per i manicotti indeformati e collassati.

In Tab. 2 sono riassunti tutti i valori dei parametri della struttura elicoidale del manicotto disteso come sono stati dedotti dallo studio delle figure di diffrazione.

TABELLA 2

Parametri della struttura elicoidale del manicotto disteso

Raggio esterno	$r = 65 \text{ \AA}$
Circonferenza	$2\pi r = 410 \text{ \AA}$
Lunghezza	$L = 4550 \text{ \AA}$
Spaziatura assiale	$c = 115 \text{ \AA}$
Giri dell'elica-base per spaziatura assiale	$t = 1/6$
Passo dell'elica-base	$P = 690 \text{ \AA}$
Subunità asimmetriche distribuite su t giri dell'elica-base	$u = 3$
Spaziatura degli anelli di subunità asimmetriche	$p = 38 \text{ \AA}$
Partenze dell'elica-base	$N = 6$
Anelli trasversali di subunità	$A = 120$

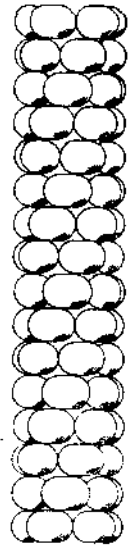
Fig. 18. — Modello del manicotto caudale del fago *G* nello stato disteso.

Dalle micrografie elettroniche originali è stata estratta, mediante la tecnica del filtraggio ottico, l'immagine di una delle due superfici del manicotto disteso. Le maschere necessarie per l'estrazione dell'immagine, sono state preparate in base ai reticoli reciproci corrispondenti alle due superfici del manicotto.

Le aperture corrispondenti ai massimi che cadono sui layer-lines $l = 3$, $l = \bar{3}$ ed $l = 0$, cui contribuiscono ambedue le superfici del manicotto, sono state velate con garza di rame, in modo da attenuare l'intensità dei raggi diffratti che le attraversano.

Dalla immagine ricostruita (Tav. 4D) risulta sostanzialmente confermata la struttura ad anelli di subunità, 6 subunità per anello, perpendicolari all'asse del manicotto, come era stata dedotta dallo studio della figura di diffrazione. Viene anche confermata la ripetizione della struttura ogni 3 anelli. Scarse informazioni si ricavano invece dalla immagine ricostruita circa la forma delle subunità stesse, che appaiono approssimativamente ellissoidali, con l'asse maggiore disposto secondo la direzione degli anelli.

La Fig. 18 riporta uno schema della struttura del manicotto disteso quale si può dedurre dai risultati acquisiti.



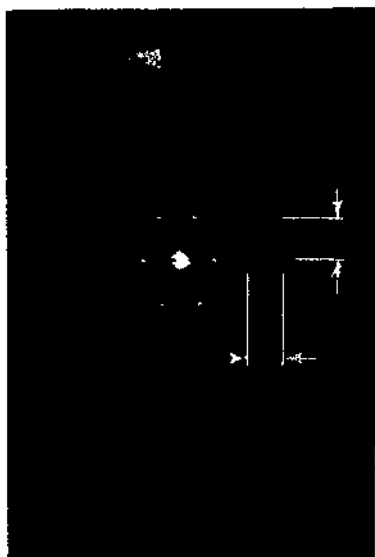
Gli AA. desiderano ringraziare la Prof.ssa D. Steve Bocciairelli ed il Prof. L. Maiani per la lettura critica del manoscritto.

Ringraziano inoltre i Sig.ri E. Chessa e G. Monteleoni per l'accuratezza del lavoro fotografico ed i Sig.ri A. Camuso ed L. Pierangeli per l'attenta esecuzione dei disegni.

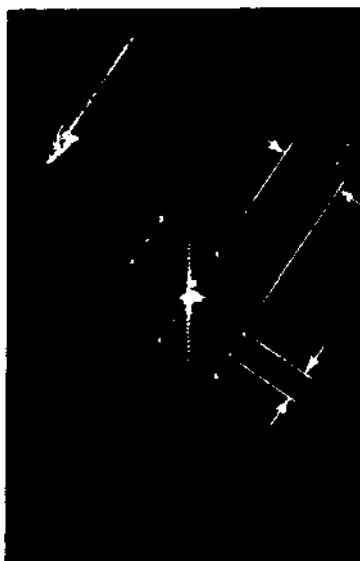
BIBLIOGRAFIA

- BORN, M. & E. WOLF, 1964. *Principles of Optics*, MacMillan, Ed., New York.
- COCHRAN, W., F. H. C. CRICK & V. VAND, 1952. *Acta Cryst.*, **5**, 581.
- DE ROSIER, D. J. & A. KLUG, 1972. *J. Mol. Biol.*, **65**, 469.
- DONELLI, G., F. GUGLIELMI & L. PAOLETTI, 1971. *Proc. First Europ. Biophys. Congr.*, **1**, 547.
- ELMORE, W. C. & M. A. HEALD, 1969. *Physics of Waves*, MacGraw Hill, Ed., New York.
- FINCH, J. T., A. KLUG & A. O. W. STRETTON, 1964. *J. Mol. Biol.*, **10**, 570.
- FINCH, J. T. & A. KLUG, 1965. *J. Mol. Biol.*, **13**, 1.
- FINCH, J. T. A. KLUG, & M. V. NERMUT, 1967. *J. Cell. Sci.*, **2**, 587.
- FRASER, R. D. B. & G. R. MILLWARD, 1970. *J. Ultrastruct. Res.*, **31**, 203.
- GRIMSTONE, A. V. & A. KLUG, 1966. *J. Cell. Sci.*, **1**, 351.
- KISELEV, N. A., D. J. DE ROSIER & A. KLUG, 1968. *J. Mol. Biol.*, **35**, 561.
- KISELEV, N. A. & A. KLUG, 1969. *J. Mol. Biol.*, **40**, 155.
- KISELEV, N. A., F. YA. LERNER & N. B. LIVANOVA, 1971. *J. Mol. Biol.*, **62**, 537.
- KLUG, A., F. H. C. CRICK and M. W. WYCKOFF, 1958. *Acta Cryst.*, **11**, 199.
- KLUG, A. & J. E. BERGER, 1964. *J. Mol. Biol.*, **10**, 565.
- KLUG, A. & D. J. DE ROSIER, 1966. *Nature*, **212**, 29.
- KRIMM, S. & T. F. ANDERSON, 1967. *J. Mol. Biol.*, **27**, 197.
- LIPSON, H. S., 1972. *Optical Transforms*, Academic Press, London and New York.
- LONGLEY, W., 1967. *J. Mol. Biol.*, **30**, 323.
- MARKHAM, R., S. FREY & G. J. HILLS, 1963. *Virology*, **20**, 88.
- MARKHAM, R., 1968. In: *Methods in Virology*, **4**, 503. K. Maramosch and H. Koprowski. Ed., Academic Press, New York and London.
- MOODY, M. F., 1967. *J. Mol. Biol.*, **25**, 167.
- MOORE, P. B., M. E. HUXLEY & D. J. DE ROSIER, 1970. *J. Mol. Biol.*, **50**, 279.
- STERNLIEB, J., & J. E. BERGER, 1969. *J. Cell. Biol.*, **43**, 448.
- TAYLOR, C. A., R. M. HINDE & H. LIPSON, 1951. *Acta Cryst.*, **4**, 261.
- TAYLOR, C. A. & H. LIPSON, 1964. *Optical Transforms*, G. Bell and Sons Ltd., London.
- VAINSHTEIN, B. K., 1966. *Diffraction of X-Rays by Chain Molecules*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York.
- VERGARA, J., W. LONGLEY & J. D. ROBERTSON, 1969. *J. Mol. Biol.*, **46**, 593.
- YANAGIDA, M., E. BOY DE LA TOUR, C. ALFF-STEINBERGER & E. KELLENBERGER, 1970. *J. Mol. Biol.*, **50**, 35.
- YANAGIDA, M., D. J. DE ROSIER & A. KLUG, 1972. *J. Mol. Biol.*, **65**, 489.

Tav. 1. — A) Cristallo di catalasi in contrasto negativo; B) Corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce); C) Replica di un cristallo di catalasi ottenuta con la tecnica del freeze-etching; D) Corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce).

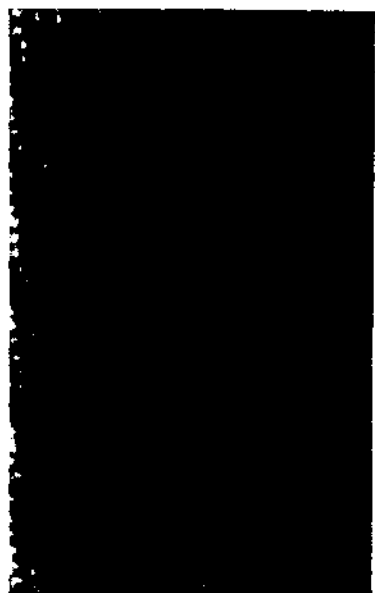


B

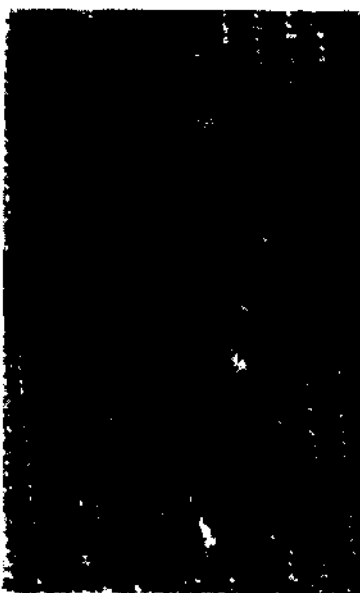


D

TAVOLA I

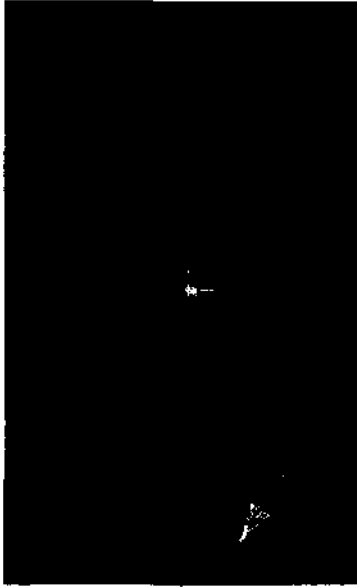


A

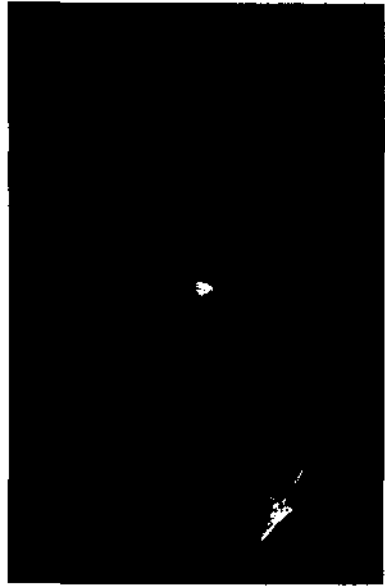


C

Tav. 2. — *A)* Parete cellulare di *B. megatherium* in contrasto negativo; *B)* corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce); *C)* Parete cellulare di *B. megatherium* ombrata con *PT-C*; *D)* corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce).



B

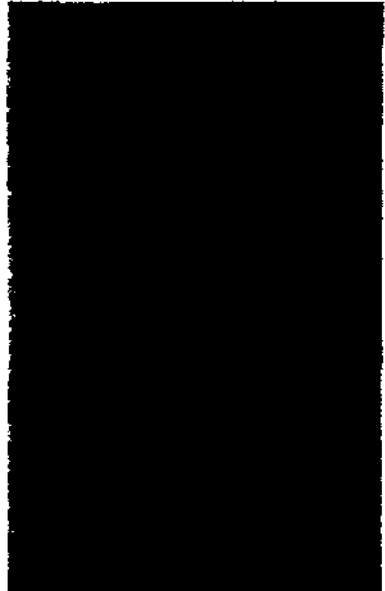


D

TAVOLA 2



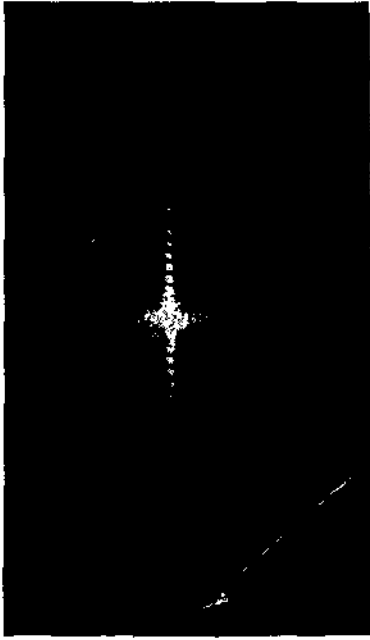
A



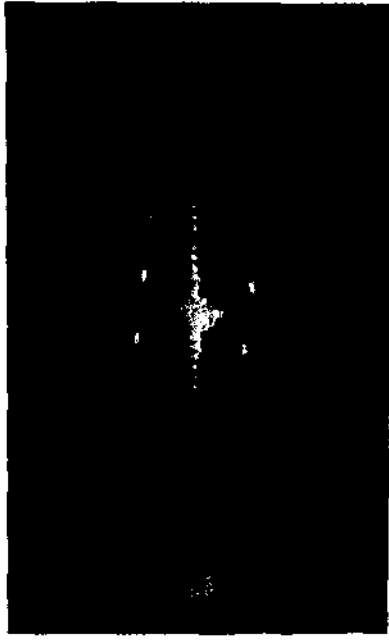
C

Tav. 3. — *A)* Capside di fago *G* in contrasto negativo; nel riquadro in alto a destra è riportata la ricostruzione della struttura, ottenuta con la tecnica del filtraggio ottico; *B)* Corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce); *C)* Capside di fago *G* ombrato con *Pt-C*; *D)* Corrispondente figura di diffrazione (il relativo orientamento è indicato dalle frecce).

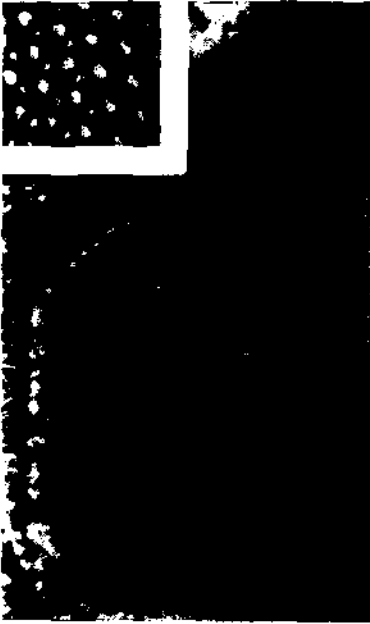
TAVOLA 3



B



D



A



C

Tav. 4. — *A)* Manicotto caudale del fago *G* in contrasto negativo; *B)* corrispondente figure di diffrazione. *C)* Figura di diffrazione con sovrapposti i reticoli reciproci della due superfici. *D)* Ricostruzione della struttura mediante tecnica del filtraggio ottico.

TAVOLA 4

