

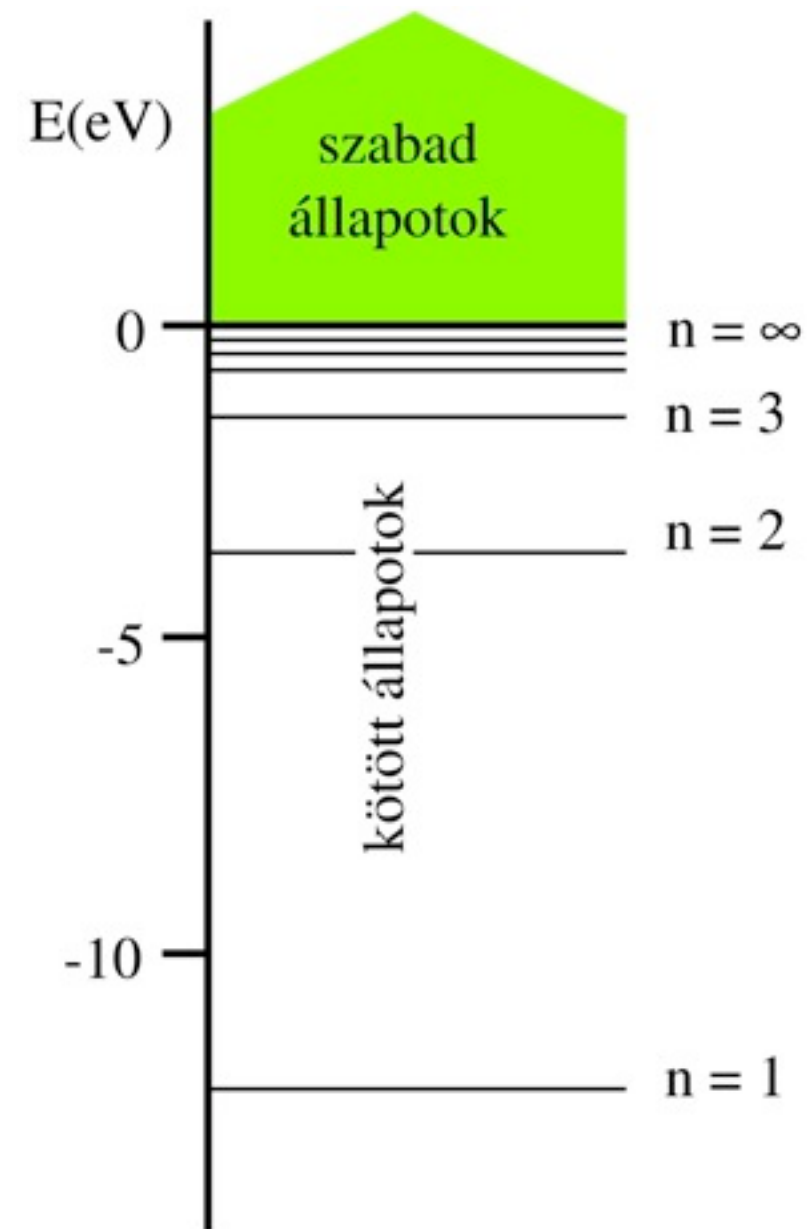
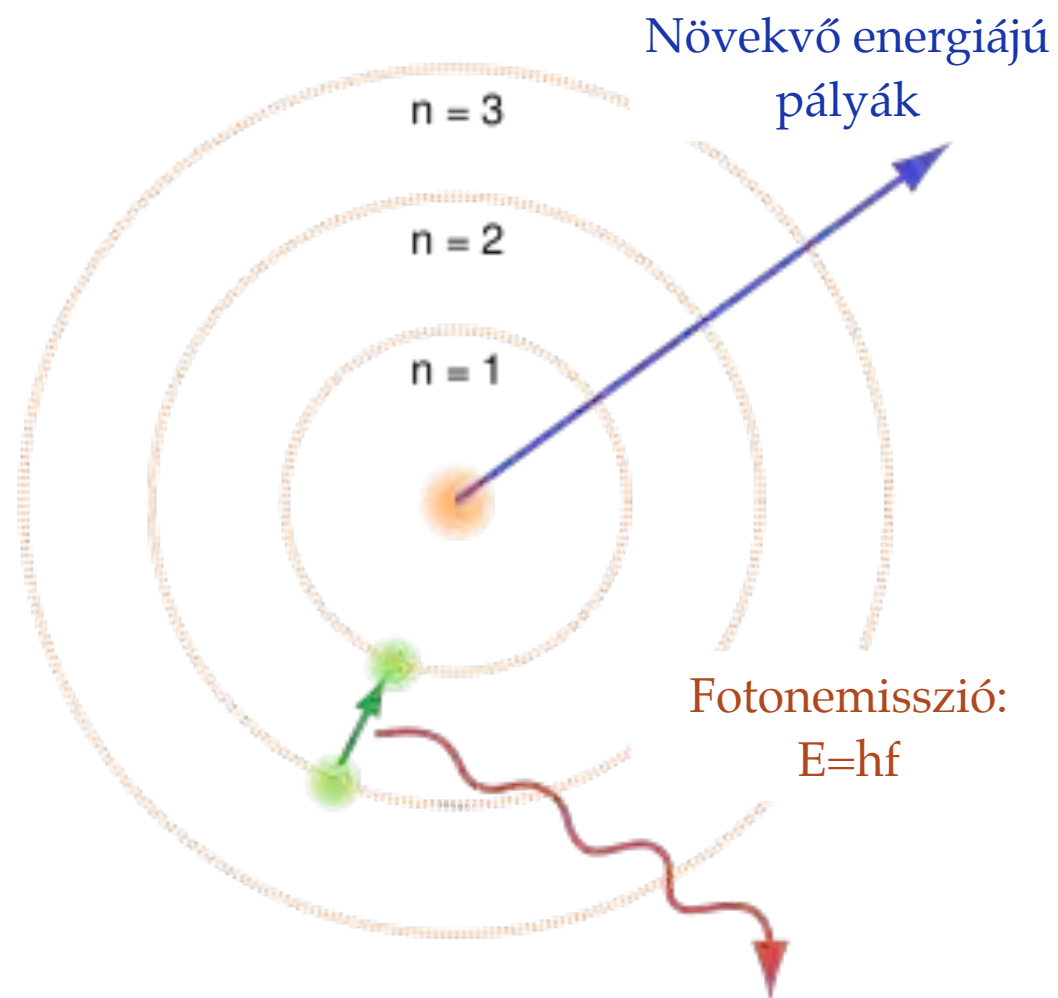
# FEHÉRJÉK SZERKEZETVIZSGÁLÓ MÓDSZEREI

LUMINESZCENCIÁS TECHNIKÁK

KELLERMAYER MIKLÓS

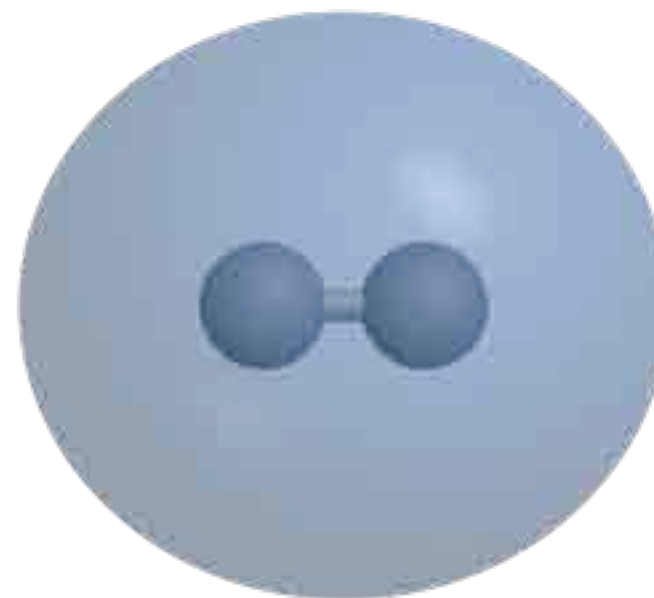


# ÁTOMSZERKEZET



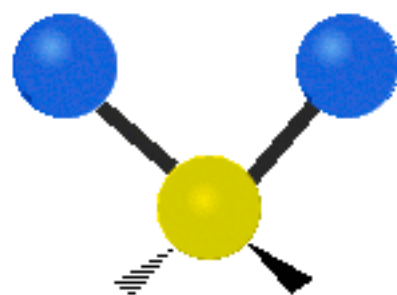
# MOLEKULASZERKEZET

Molekula: kémiai kötéssel  
összekapcsolt atomok  
Legegyszerűbb eset: kétatomos  
molekula (pl., hidrogénmolekula)

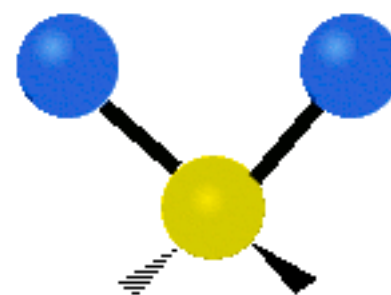


**A molekulák vibrációs és rotációs mozgásokat végeznek!**

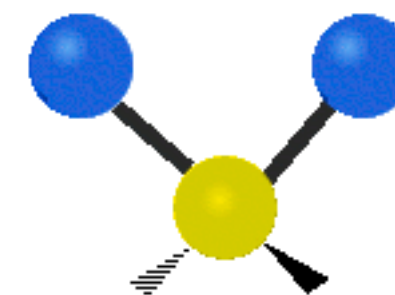
Vibrációs mozgás  
háromatomos csoportban  
( $-\text{CH}_2-$ ):



*Aszimmetrikus nyúlás*



*Szimmetrikus nyúlás*



*Ollózás*



# MOLEKULA ENERGIÁJA

---

Born-Oppenheimer - közelítés:

$$E_{total} = E_e + E_v + E_r$$

## *Fontos megjegyzések:*

Energia állapotok egymástól függetlenek (csatolás elhanyagolható)

Állapotok energianívói kvantáltak

Átmenetek energia "csomag" elnyelésével / kibocsátásával járnak

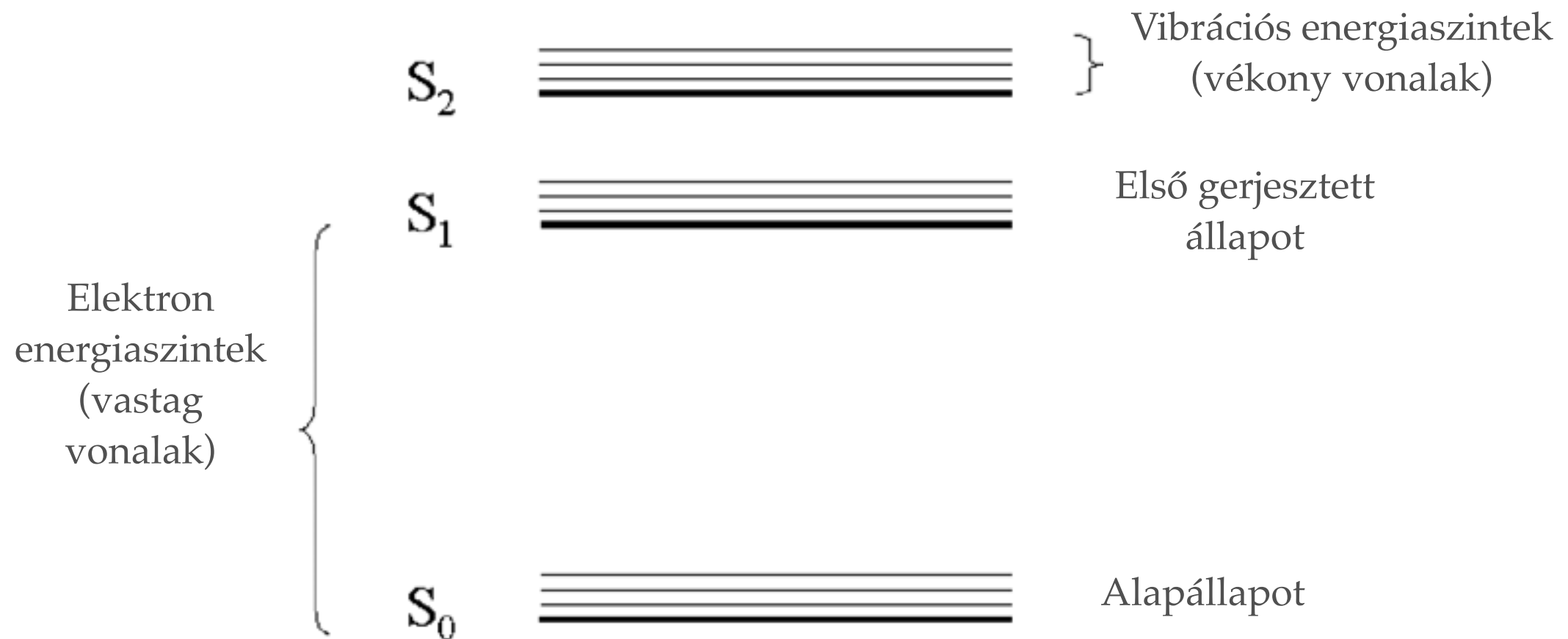
Energiaszintek közötti különbségek nagyságrendje különbözik:

$$E_e \overset{\sim 100\times}{>} E_v \overset{\sim 100\times}{>} E_r$$

$$\sim 3 \times 10^{-19} \text{ J } (\sim 2 \text{ eV}) > \sim 3 \times 10^{-21} \text{ J } > \sim 3 \times 10^{-23} \text{ J }$$

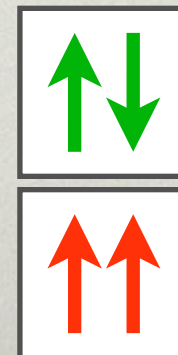


# ENERGIA ÁLLAPOTOK ÁBRÁZOLÁSA



**S:** szingulett állapot; ellentétes spinű párosított elektronok  
(N.B.: Pauli-féle elv)





**T:** triplett állapot; azonos spinű "párosított" elektronok





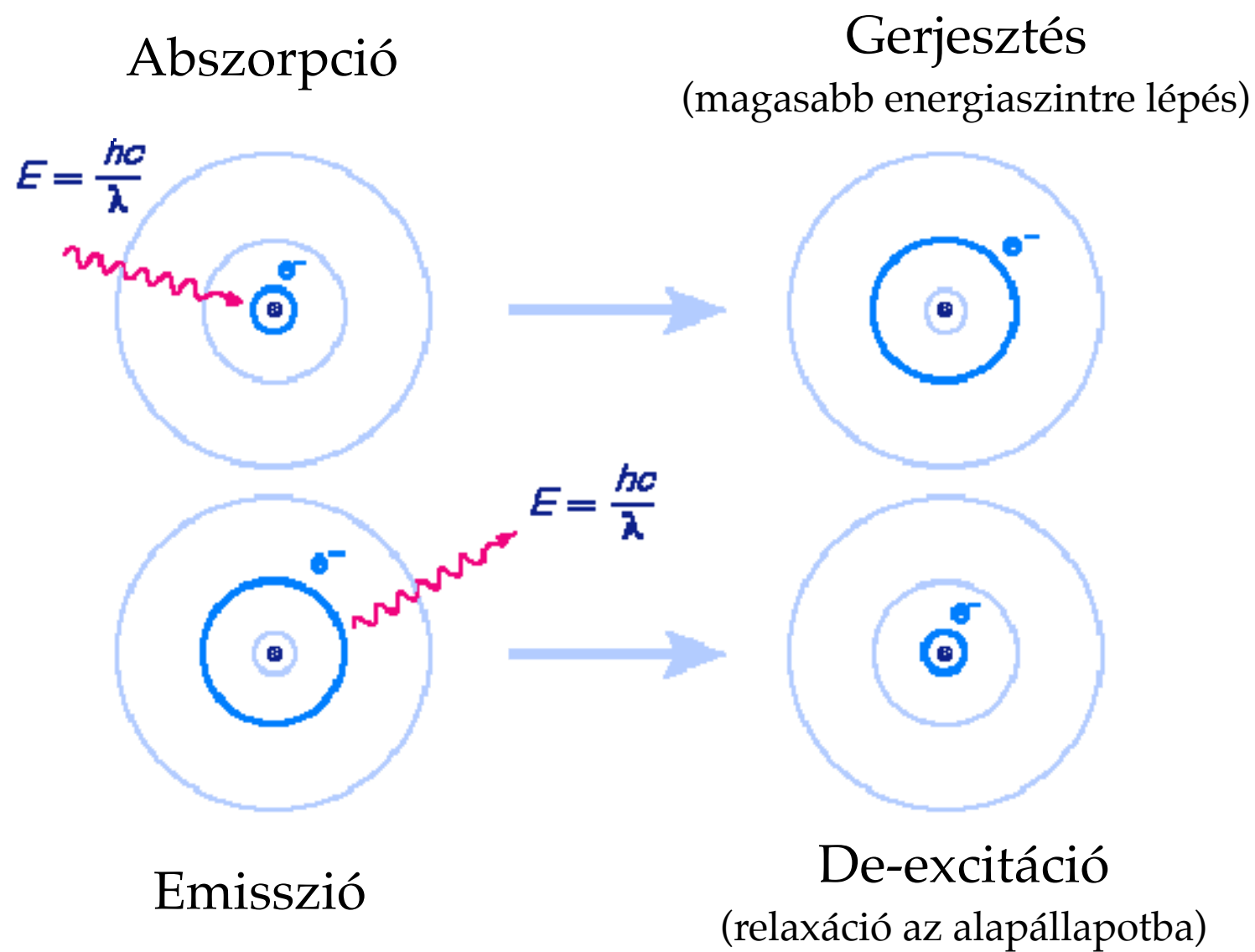
# LUMINESZCENCIA

---

-  Gerjesztett állapotból fényemisszióval járó relaxáció
-  A hőmérsékleti sugárzáson felül kibocsátott sugárzás
-  “Hideg fény”
-  Fluoreszcencia és foszforeszcencia



# A LUMINESZCENCIA LÉPÉSEI





# A LUMINESZCENCIA TÍPUSAI

Gerjesztés módja	Lumineszcencia típusa
abszorpció	fotolumineszcencia
kémiai reakció	kemilumineszcencia, biolumineszcencia
termikusan aktivált ion-rekombináció	termolumineszcencia
töltés injekció	elektrolumineszcencia
nagyenergiájú radioaktív sugárzás	radiolumineszcencia
súrlódás	tribolumineszcencia
hanghullámok	szonolumineszcencia
Gerjesztett állapot	Lumineszcencia típusa
első gerjesztett szingulett állapot	fluoreszcencia
legalsó triplett állapot	foszforeszcencia

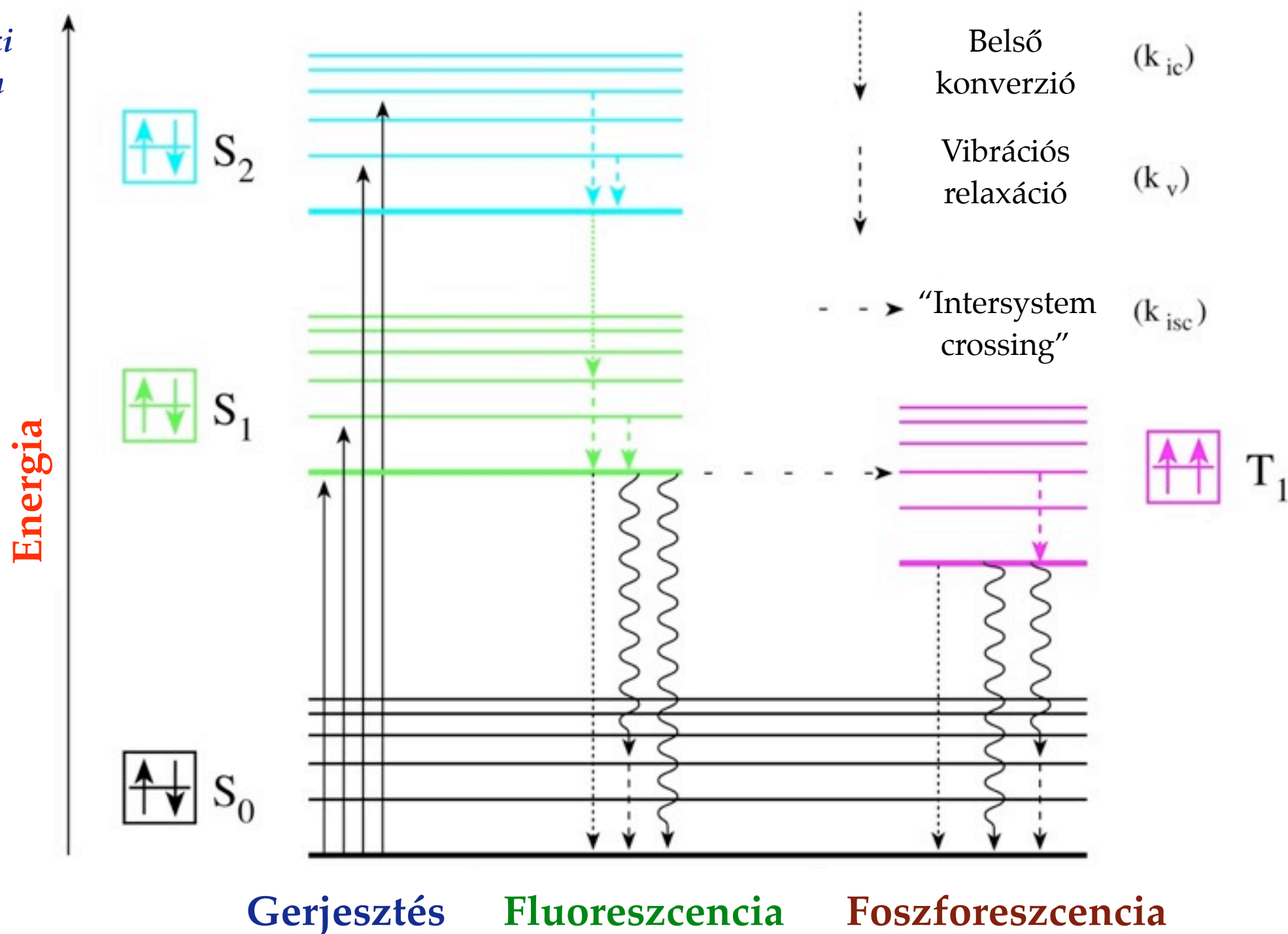
Biolumineszcencia





# A LUMINESZCENCIA FOLYAMATAI

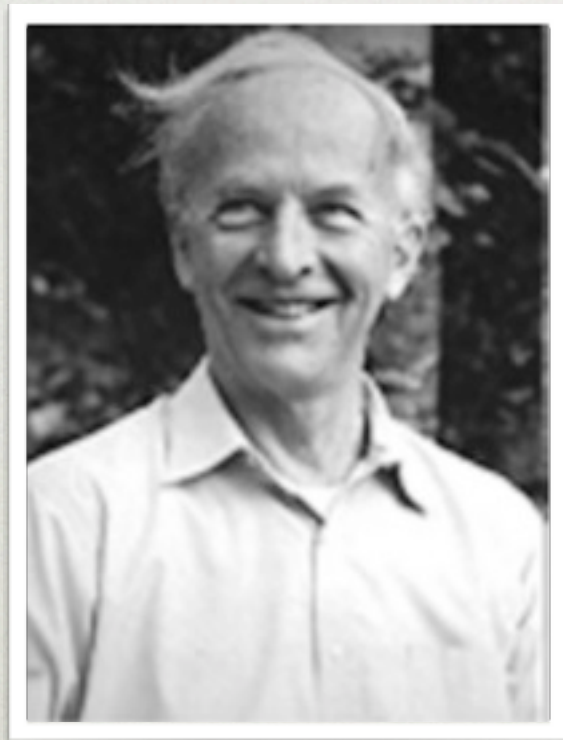
*Jablonski  
diagram*



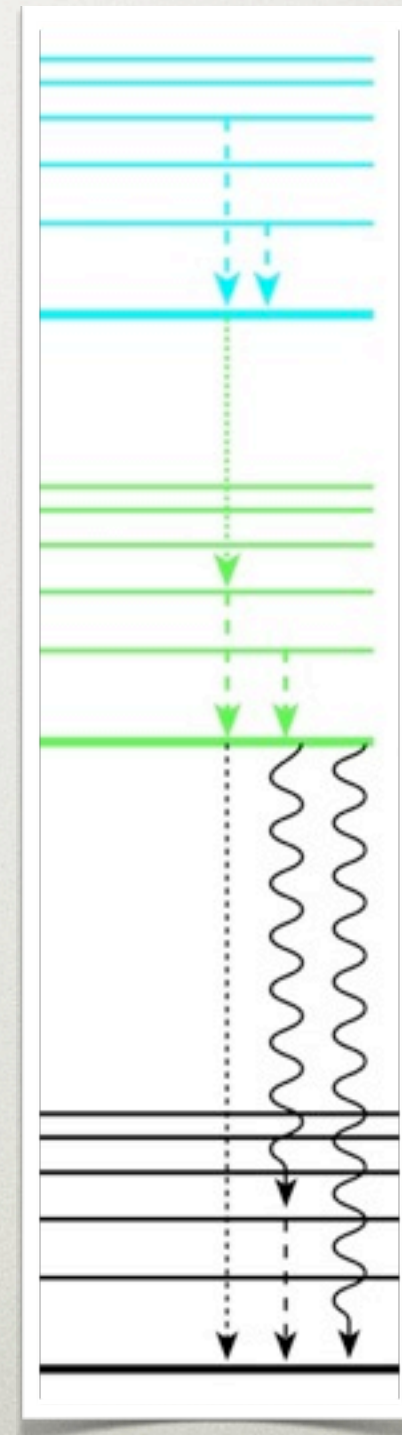


# KASHA-SZABÁLY

Fotonemisszió (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) a legalacsonyabb elektron-energiaállapotból történő átmenet során lép fel.

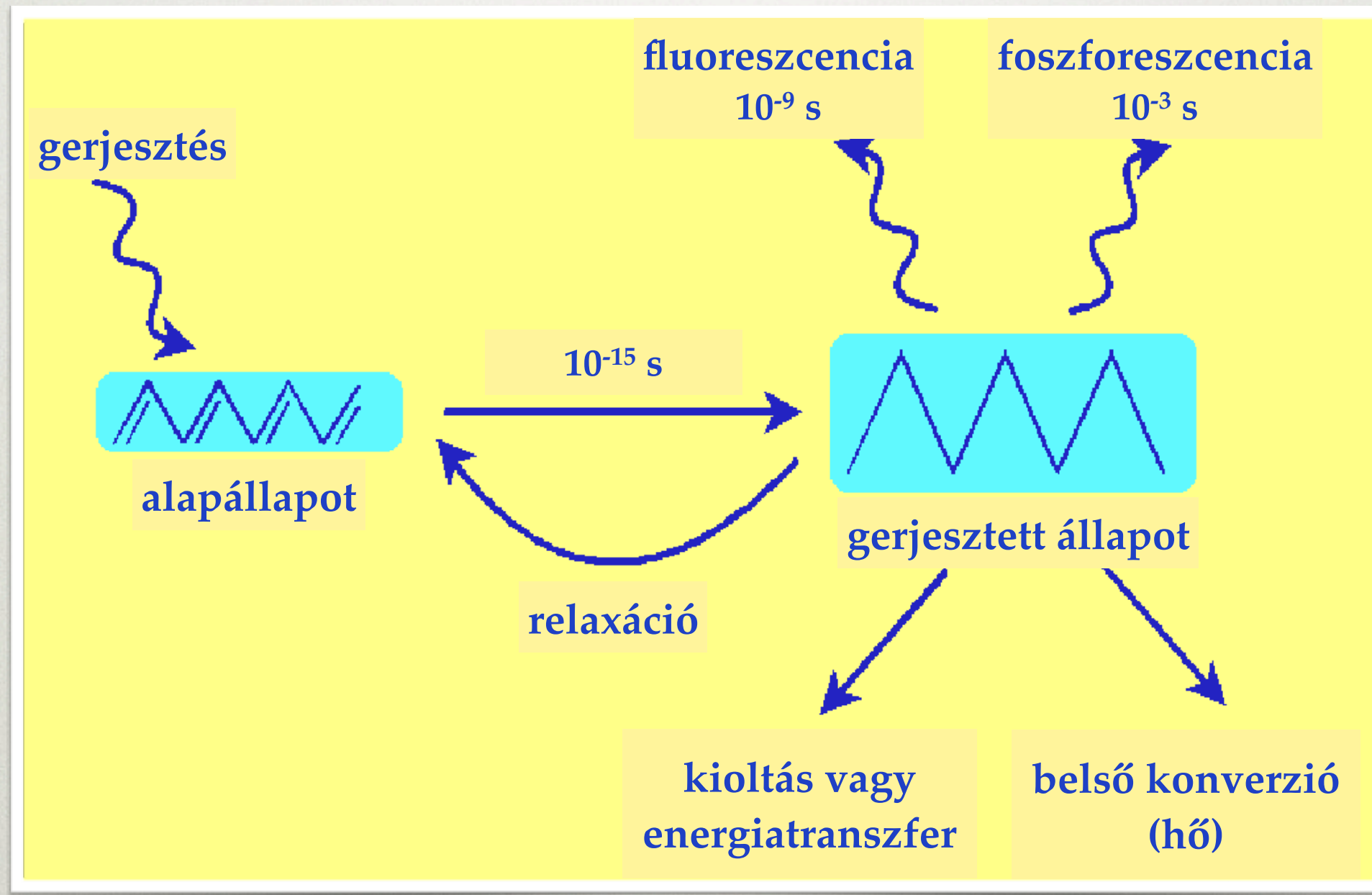


*Michael Kasha (1920-)*  
*Amerikai fizikus*





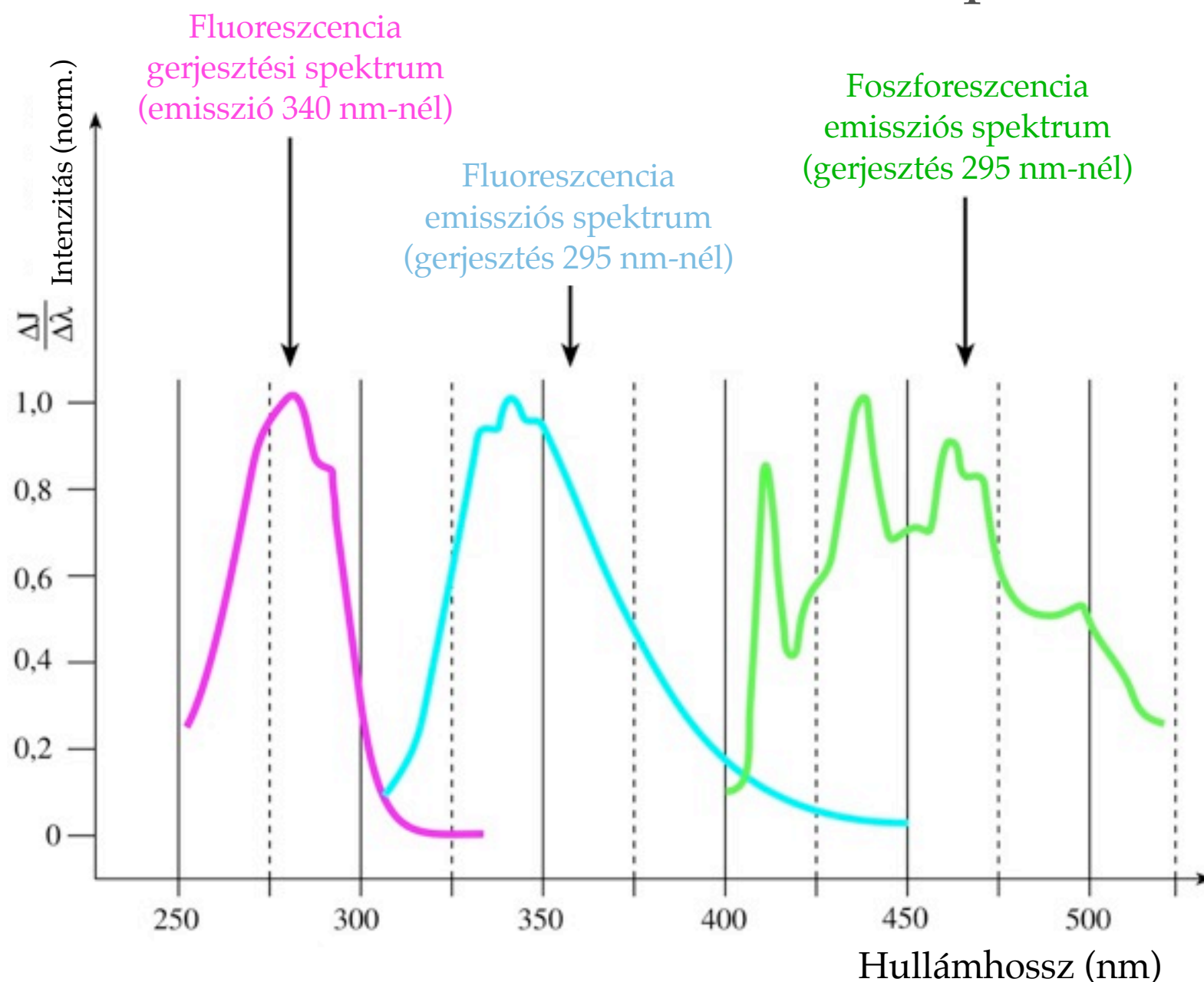
# AZ ÁTMENETEK SEBESSÉGE





# A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI I.

## Lumineszcencia spektrumok



- Sávós színekép
- Gerjesztési és emissziós spektrumok tükörszimmetrikusak
- “Stokes shift”



# A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI II.

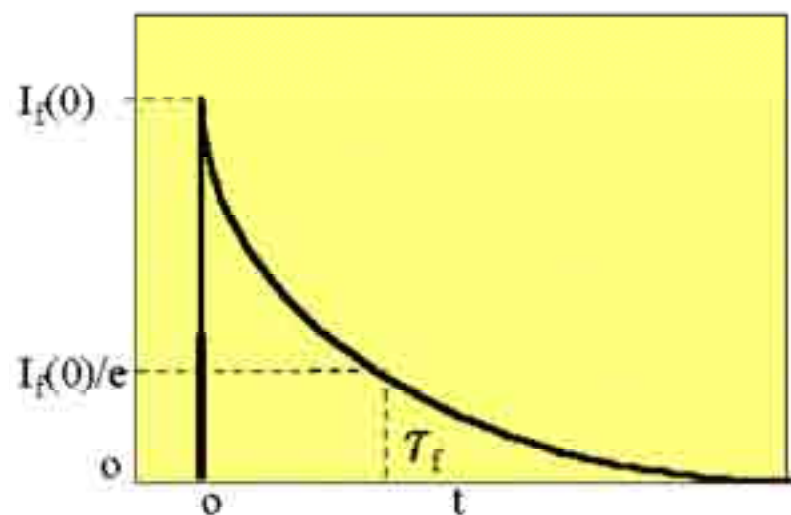
## Kvantumhatásfok

$$\Phi = \frac{\text{emittált fotonok száma}}{\text{abszorbeált fotonok száma}} \leq 1$$

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_{isc} + k_Q}$$

$k_{nr}$ =nem sugárzásos átmenetek sebességi állandói

## A gerjesztett állapot élettartama



$$\frac{dN}{dt} = -(k_f + k_{nr}) \cdot N$$

$$N = N_0 e^{-(k_f + k_{nr})t}$$

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}}$$

$N$ =gerjesztett állapotú  
molekulák száma

$t$ =idő

$k_f$ =fluoreszcencia sebességi  
állandó

$k_{nr}$ =nem-sugárzásos  
átmenetek sebességi  
állandója

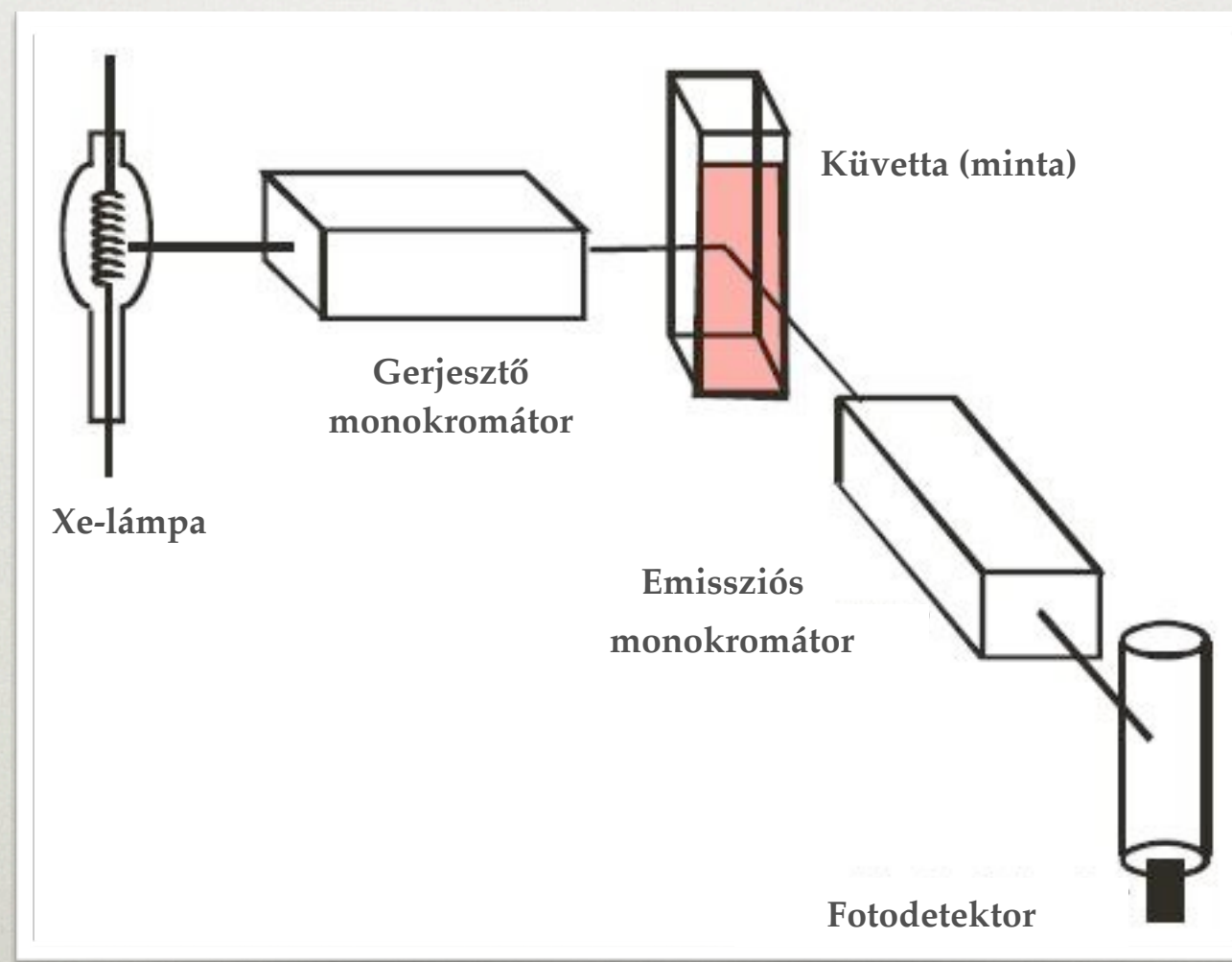
$\tau$ =fluoreszcencia élettartam



# A FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

---

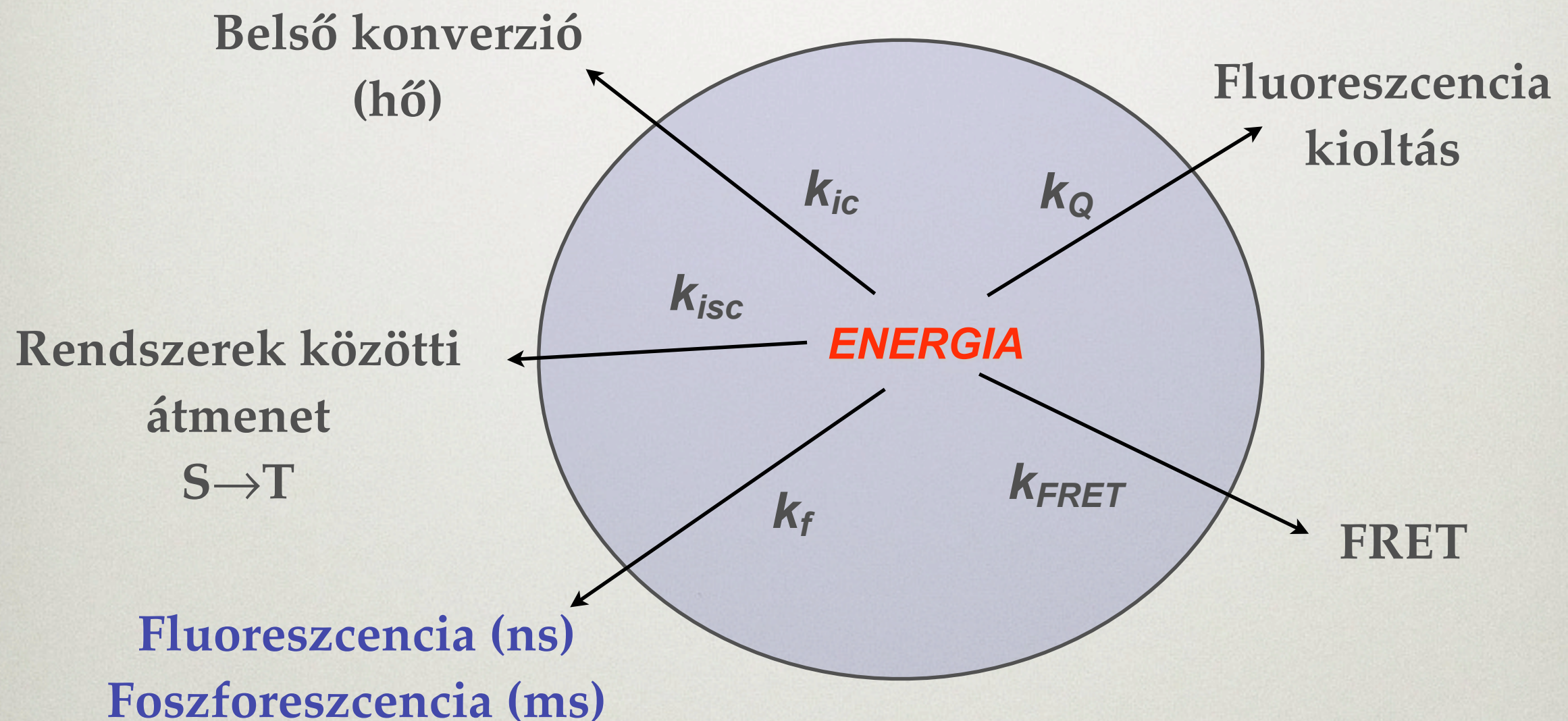
Fluoreszcencia spektrométer  
(*“Steady-state”* spektrofluoriméter)





# GERJESZTÉS SORÁN ELNYELT ENERGIA SORSA

---



Sugárzásos v. nem sugárzásos átmenetek!



# FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER

---

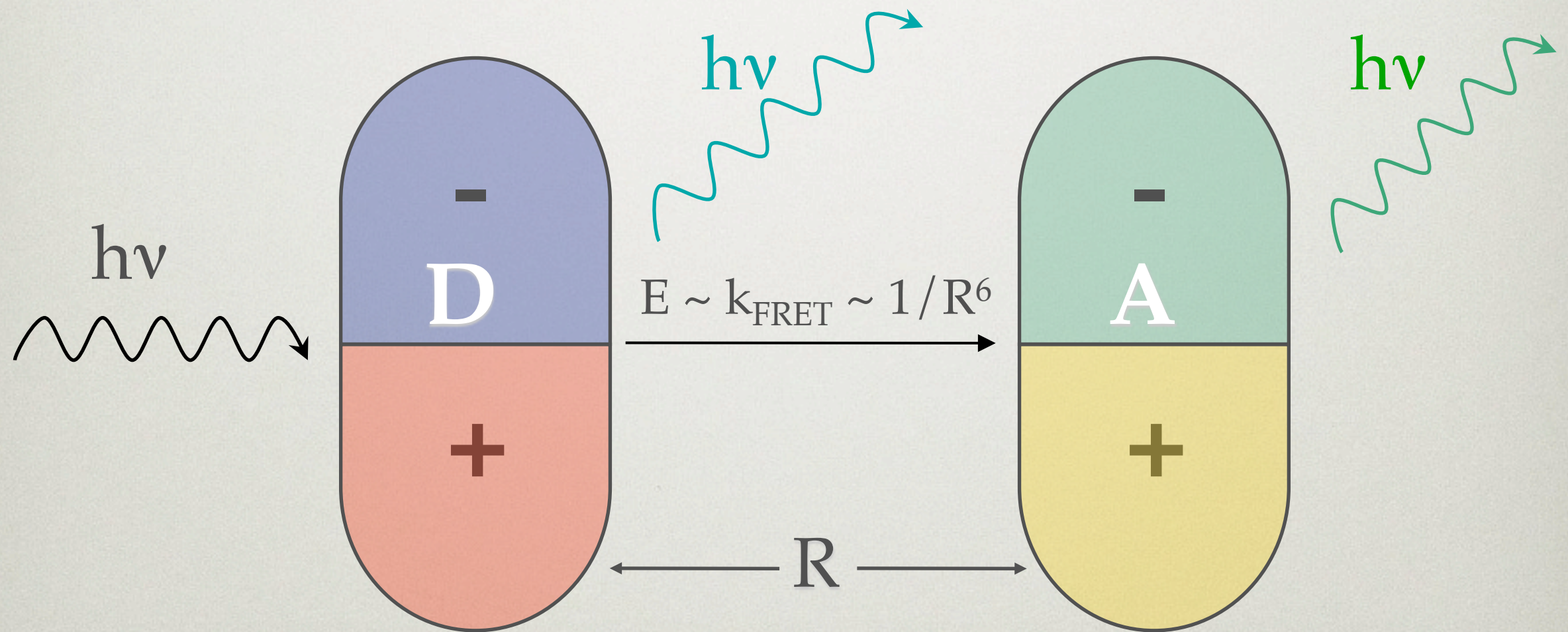
Általánosan:

- A gerjesztett állapotban lévő molekula (*donor*), valamint egy megfelelő spektroszkópiás követelményeket kielégítő molekula (*akceptor*) között *dipól-dipól* kölcsönhatás révén, *sugárzás nélküli* energiaátadás formájában jön létre.
- *Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET)*: ha az energiatranszfer szereplői fluorofórok.



# FRET

- A gerjesztett donor relaxációjához hozzájárul az akceptor molekula emissziója!

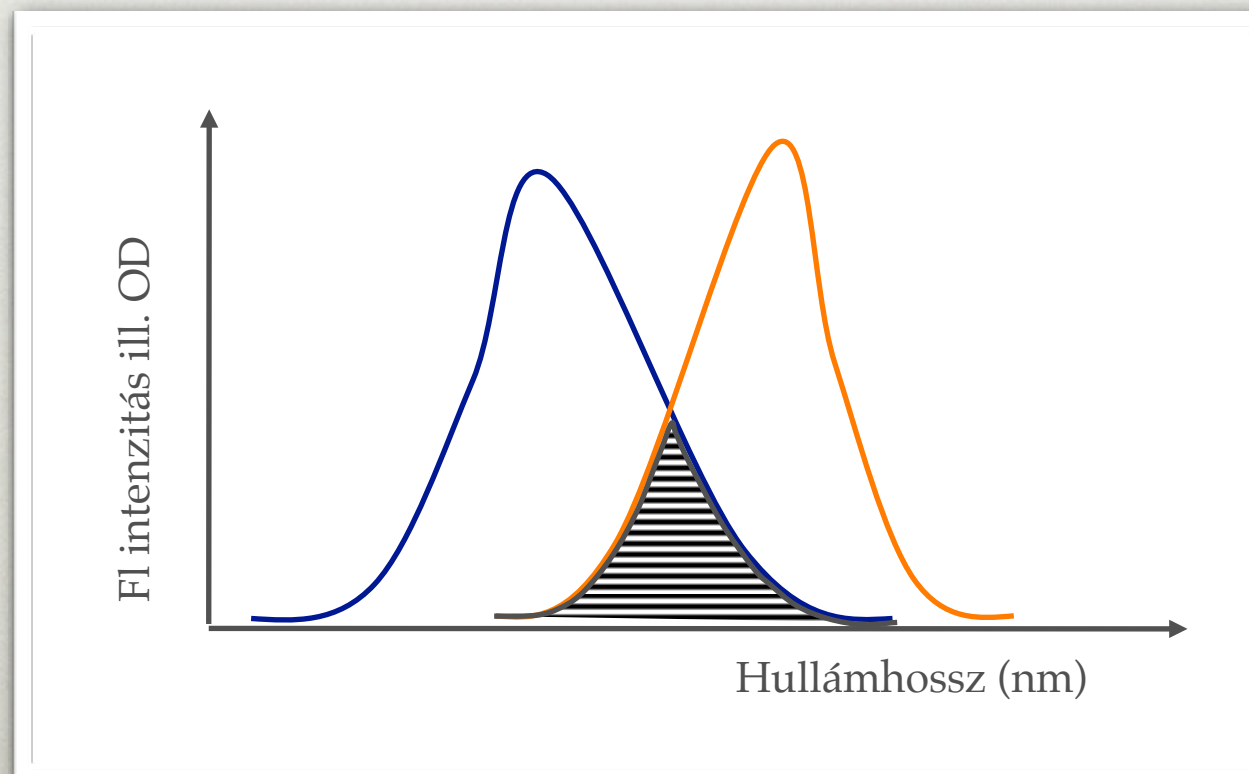




# A FRET FELTÉTELEI

---

- Fluoreszcens donor és akceptor molekula.
- A donor és akceptor molekula közötti távolság ( $R$ ) 2-10 nm!
- Átfedés a donor emissziós spektruma és az akceptor abszorpciós spektruma között.





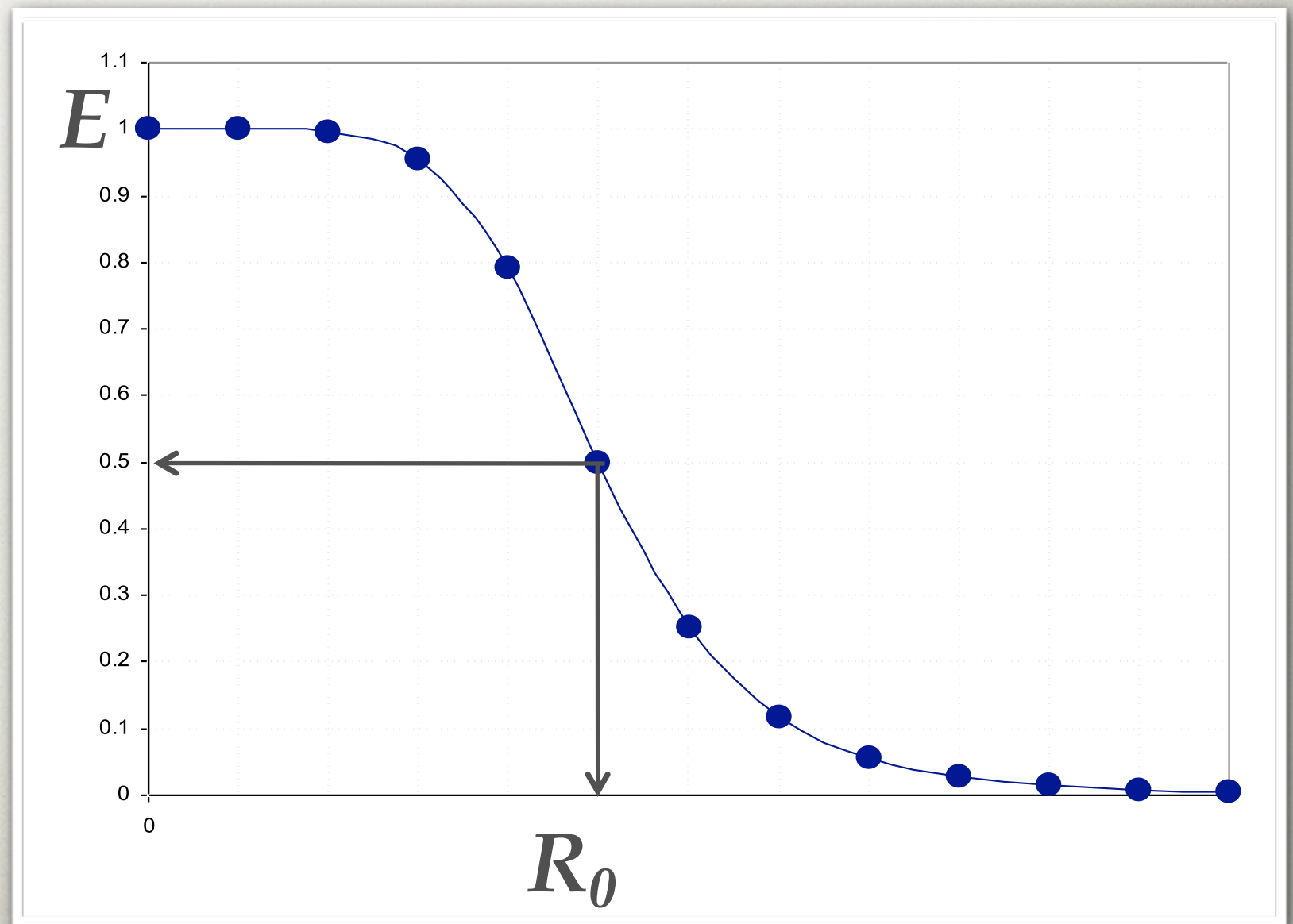
# A FRET TÁVOLSÁGFÜGGÉSE

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

A fluorofórok közötti  
aktuális távolság

Förster-távolság

(Az a távolság melyen a FRET hatásfok  
felére csökken: transzferhatásfok 0.5)





# A FRET ALKALMAZÁSA

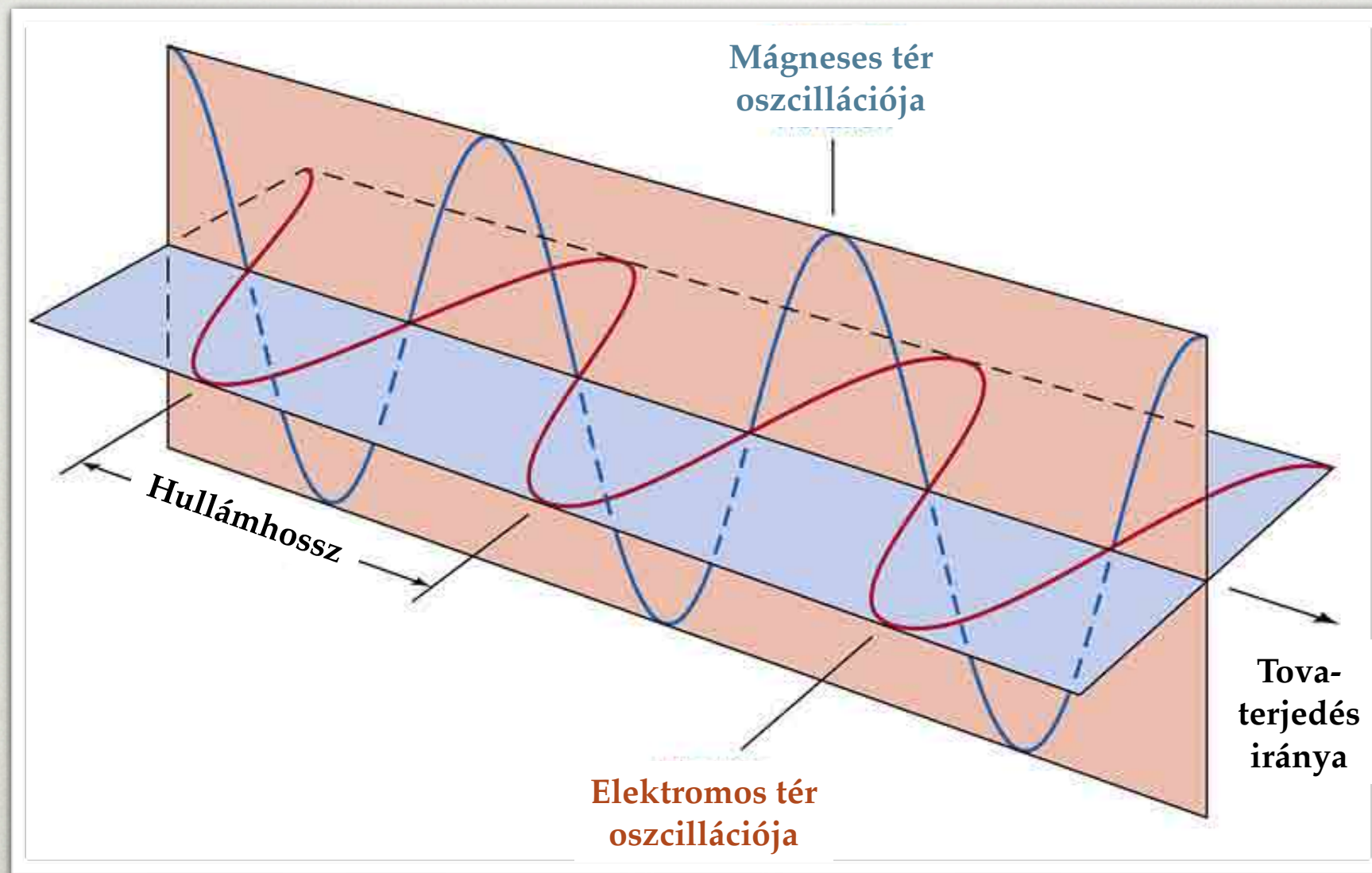
---

- **Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es ( $10^{-9}\text{m}$ ) tartományban.
- Nagyon érzékeny!
- **Alkalmazás:**
  - Molekulák közötti *kölcsönhatások* tanulmányozása.
  - Molekulákon belüli *szerkezeti* változások tanulmányozása.



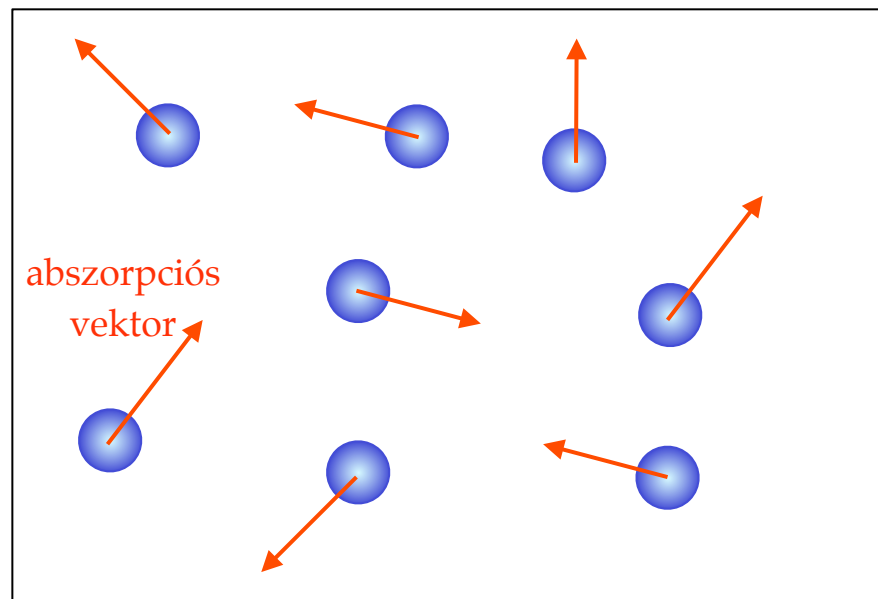
# A FÉNY ELEKTROMÁGNESES HULLÁM

- Térben tovaterjedő elektromágneses zavar.
- Tranzverzális hullám.
- Polarizálható.





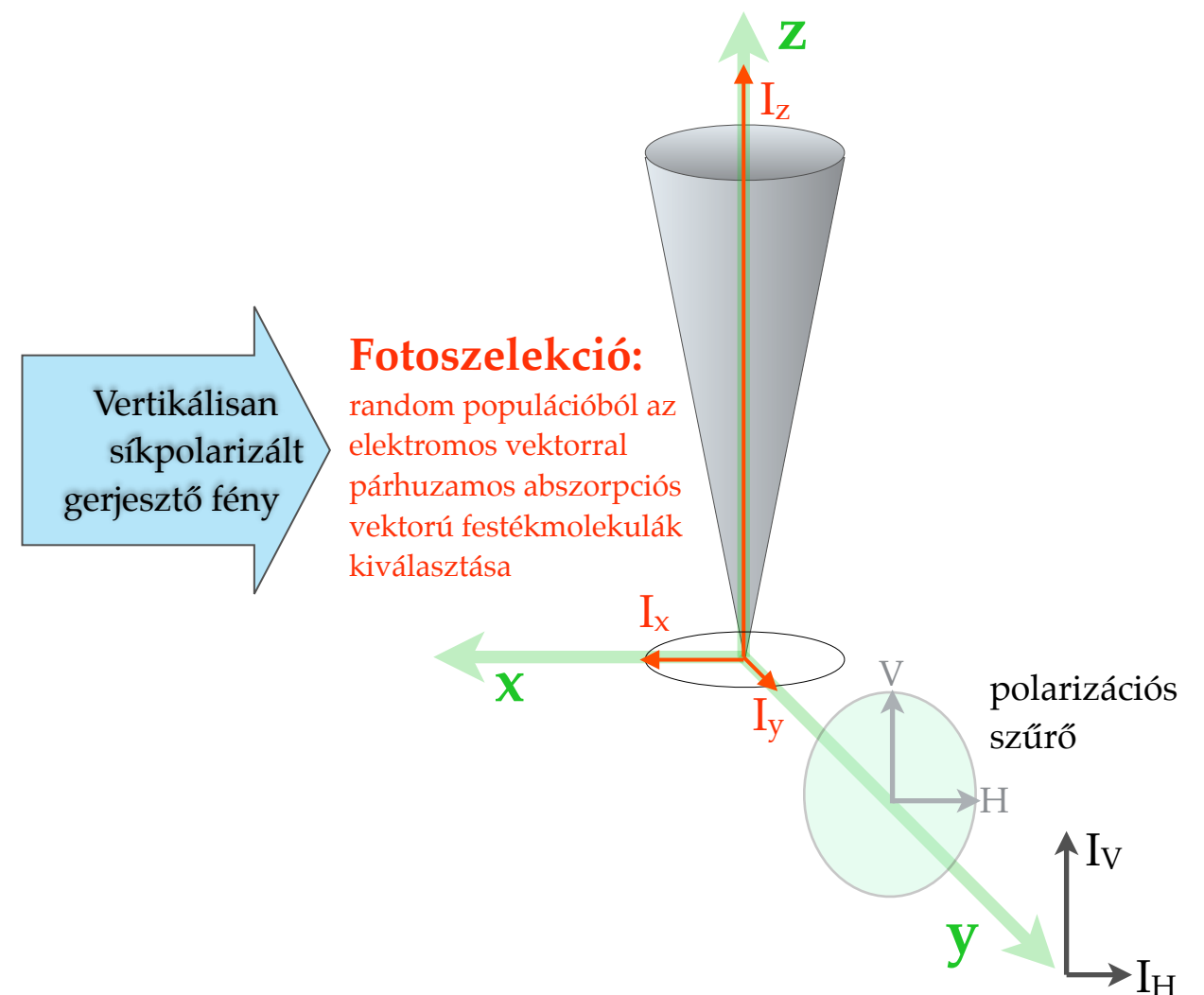
# POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA



Fluorofórokhoz rendelhető **abszorpciós és emissziós vektor**: megszabja a foton abszorpció és emisszió valószínűségét.

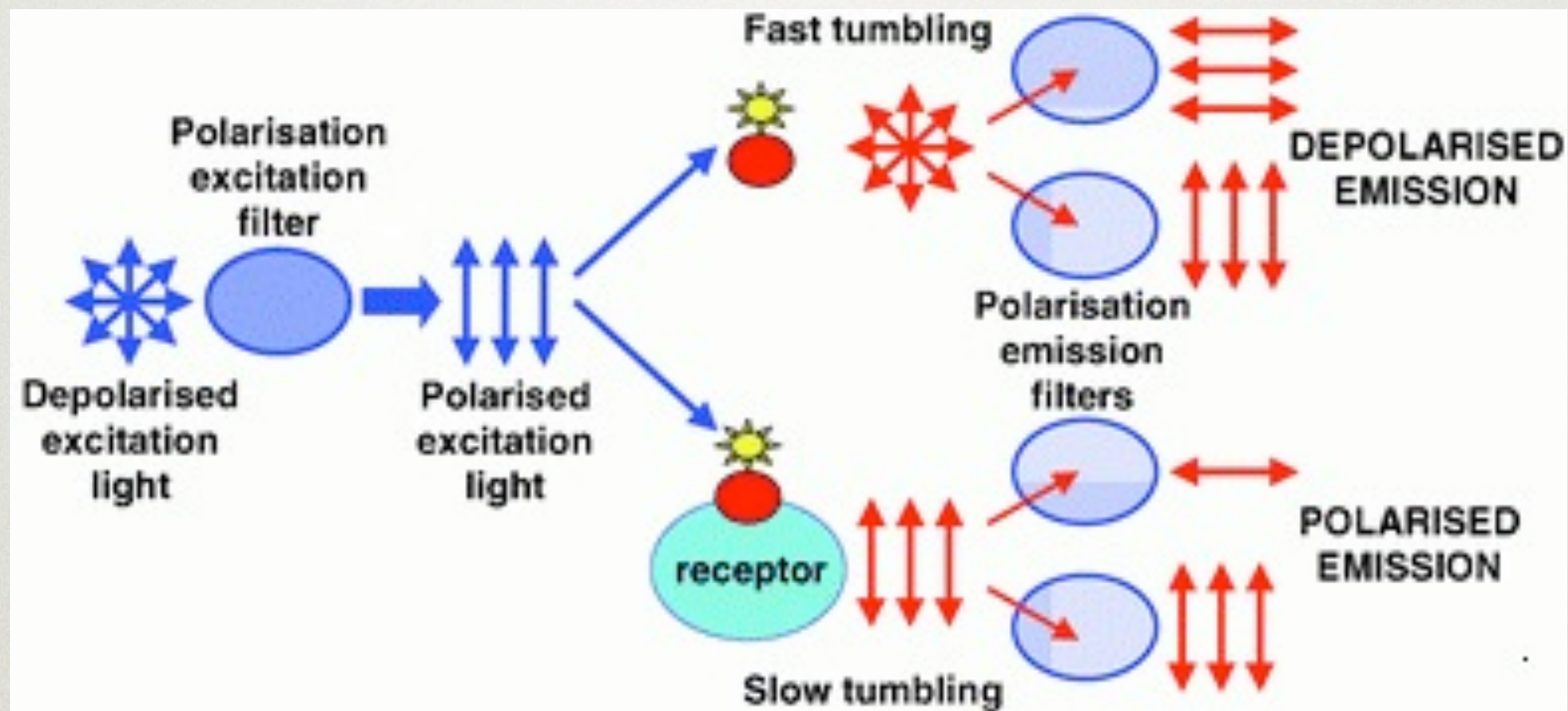
Abszorpció maximális, ha absz. vektor és a fény elektromos vektora párhuzamos.

Abszorpció képessége függ  $\cos^2\alpha$ -tól ( $\alpha$  az absz. vektor és a fény elektromos vektora közötti szög).





# POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA



Polarizáció: 
$$p = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

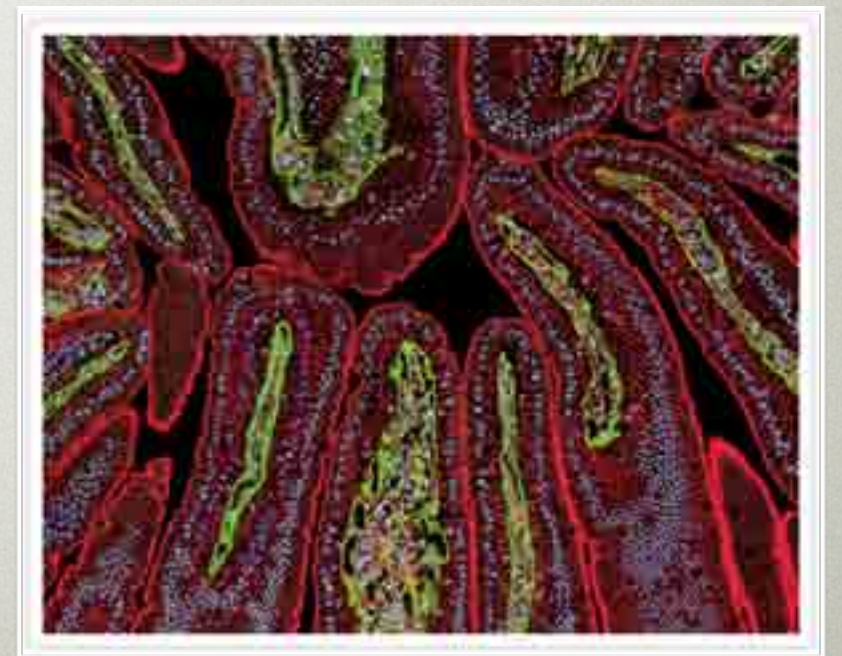
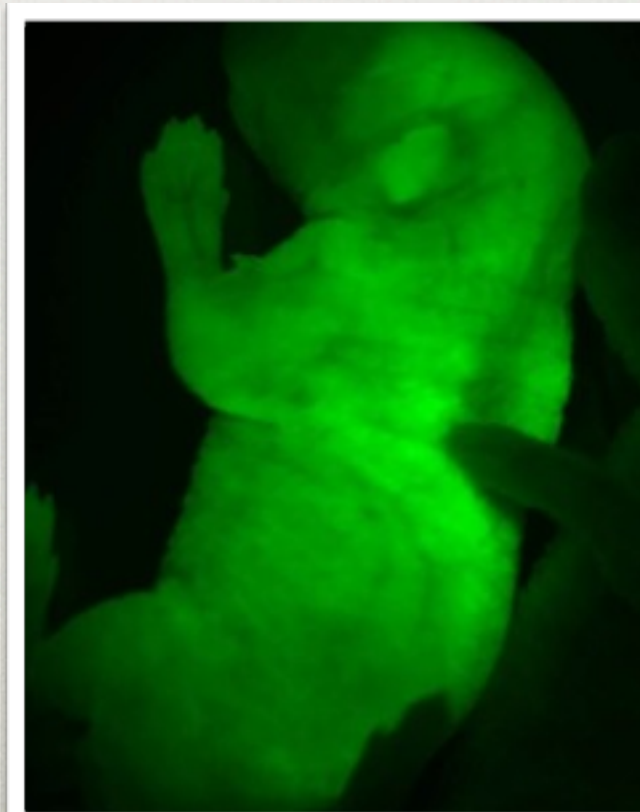
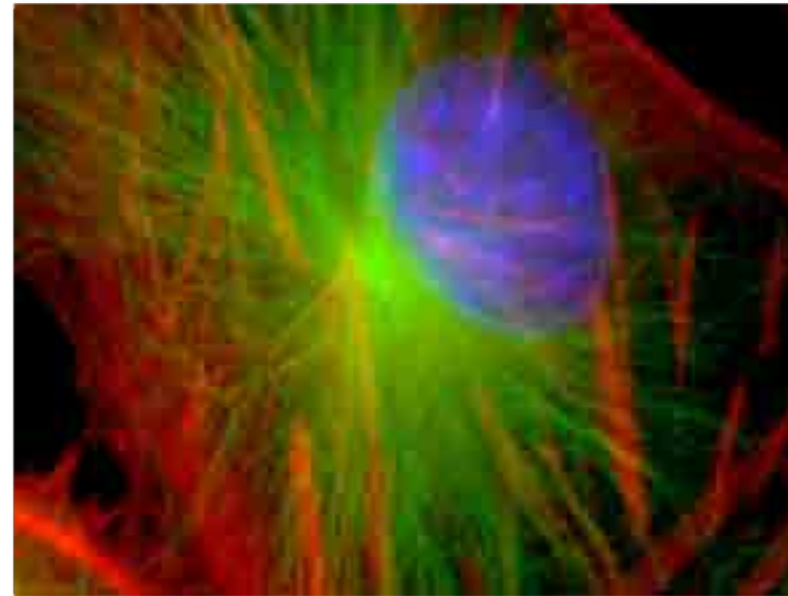
Anizotrópia: 
$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$



# A FLUORESZCENCIA ORVOSI-BIOLÓGIAI ALKALMAZÁSAI

---

- ❶ Fluoreszcencia mikroszkópia
- ❷ DNS szekvenálás (lánc terminációs módszer)
- ❸ DNS festés (EtBr)
- ❹ DNS microarray technológia
- ❺ Immunfluoreszcencia
- ❻ Fluoreszcencia-aktivált sejt válogatás (FACS)
- ❼ Förster rezonancia energia transzfer (FRET)
- ❽ “Fluorescence recovery after photobleaching” (FRAP)
- ❾ Fluoreszcens fehérje-konjugációs technikák
- ❿ Kvantum pontok (quantum dots)





# Fehérjefluoreszcencia forrása

---

- **Intrinsic fluorofórok**  
triptofán, tirozin
- **Extrinsic fluorofórok**  
kívülről bevitt festékmolekulák,  
"fluoreszcens jelölés"  
kémiai specificitás?  
térbeli specificitás?



# Fluoreszcens jelölési technikák

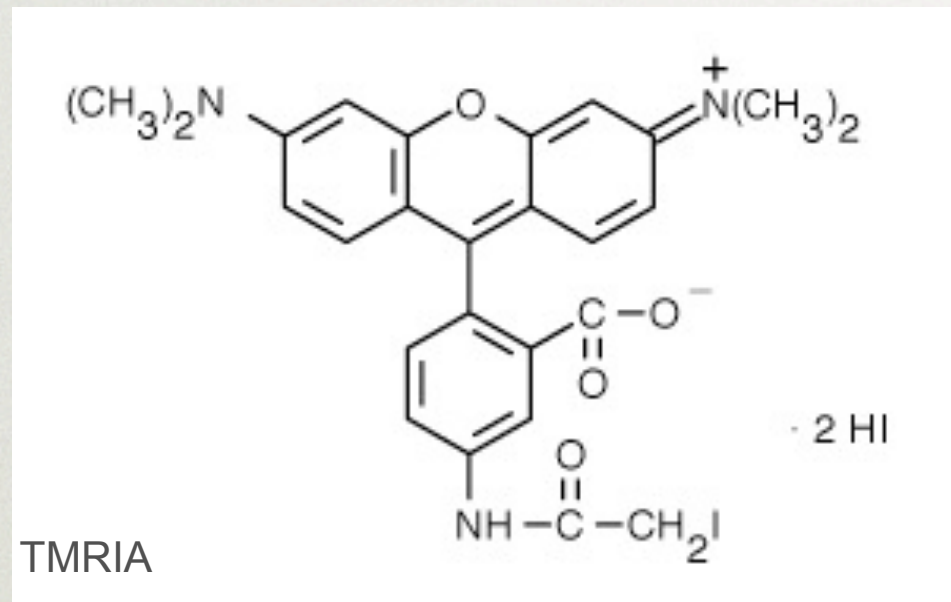
---

1. **Natív oldalláncok jelölése**
2. **Célzott pontmutagenézis**
3. **Peptid ligáció**
4. **C-terminális jelölés puromicin-származékokkal**
5. **Nem természetes aminosavak pontmutagenézise**  
(egyedi fluorofór analízisre nem igazán alkalmas)
6. **Fehérjekomplexek rekonstitúciója előre megjelölt alegységekből**
7. **Fluoreszcens fehérjékkel való konjugálás**
8. **Kvantumpontok**



# Fluoreszcens jelölési technikák

## 1. Natív oldalláncok jelölése



**Fluorofór:**

festékmolekula +  
kémiai keresztkötő

Relatív kémiai specificitás ( $\text{SH}$ ,  $\text{NH}_2$ )

Relatív térbeli specificitás

Lépések:

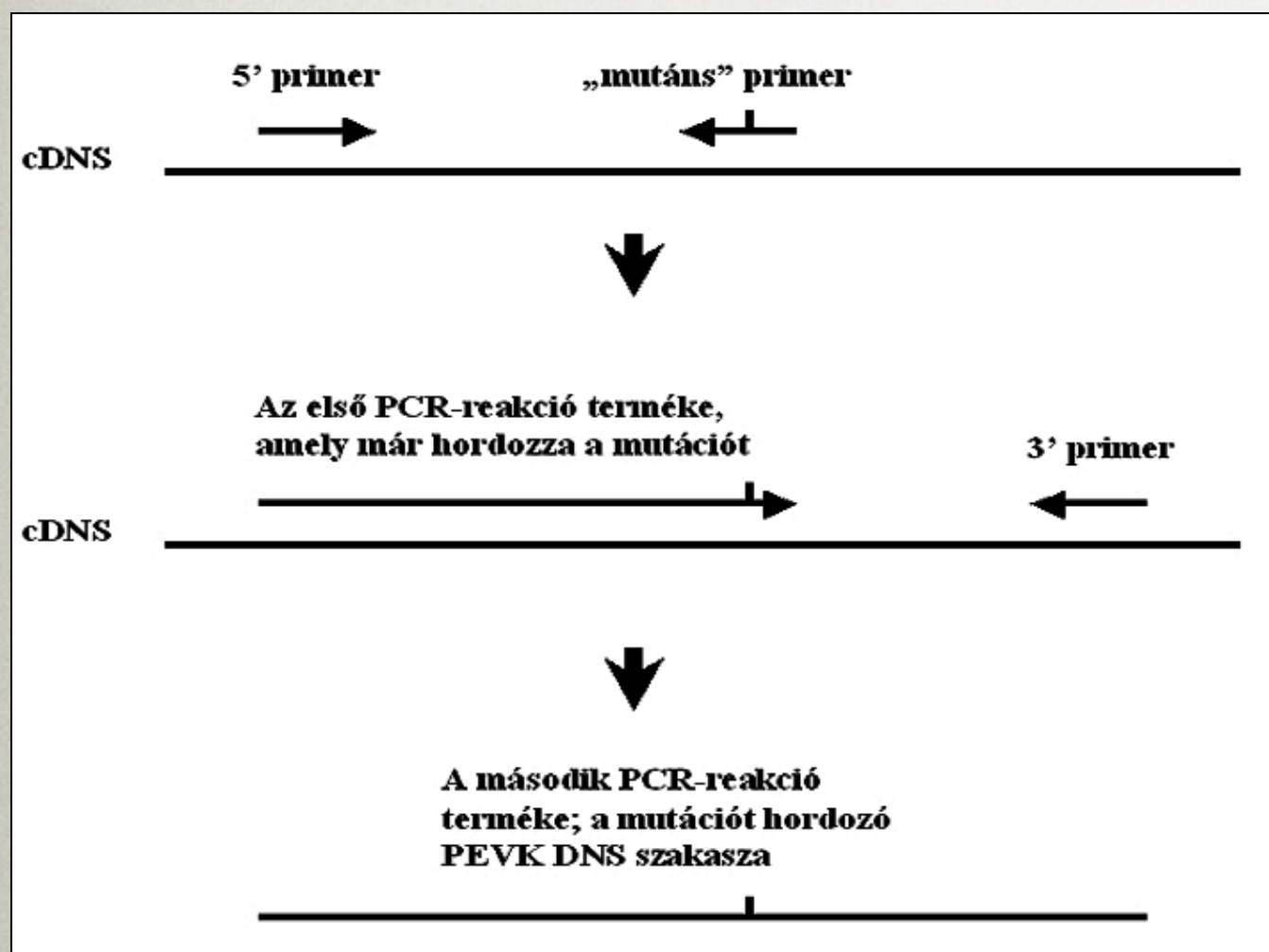
- moláris arány számítása
- inkubálás
- nem kötődött festék eltávolítása (dialízis, kromatográfia)



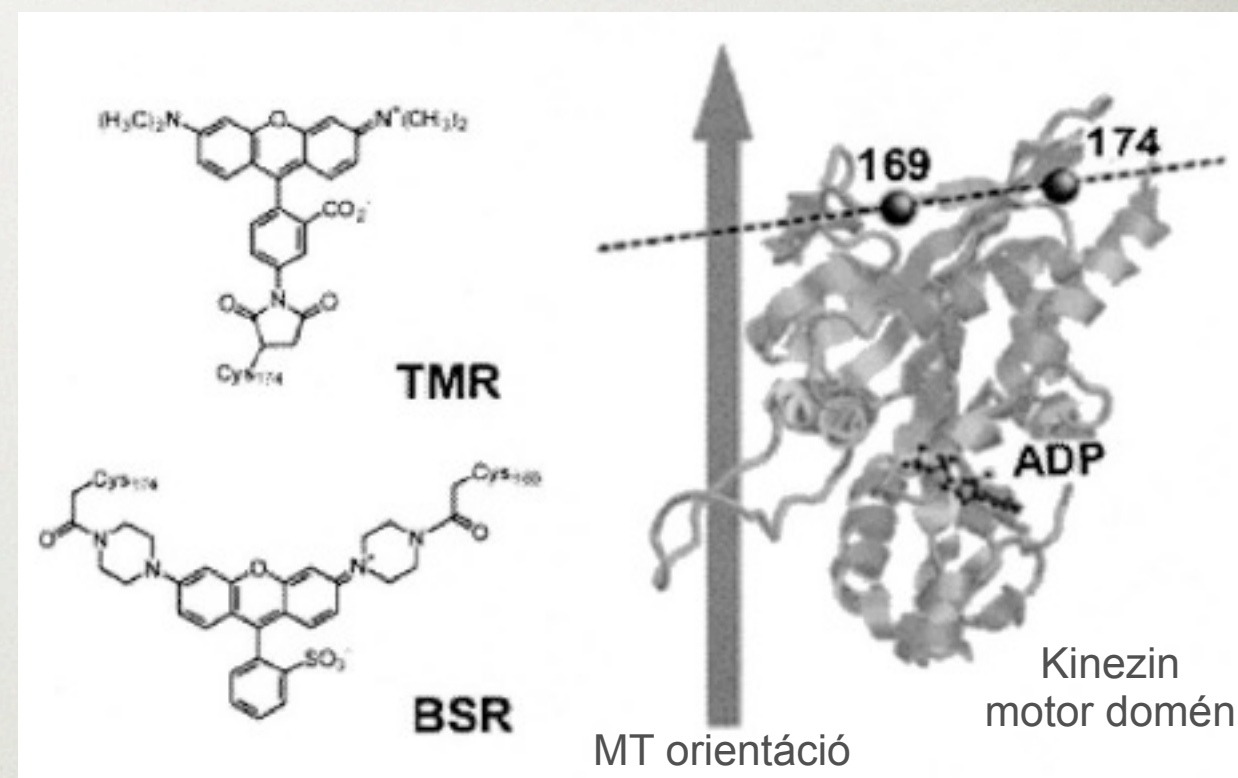
# Fluoreszcens jelölési technikák

## 2. Célzott pontmutagenézis

Cisztein aminosav célzott elhelyezése



Bifunkcionális fluorofór

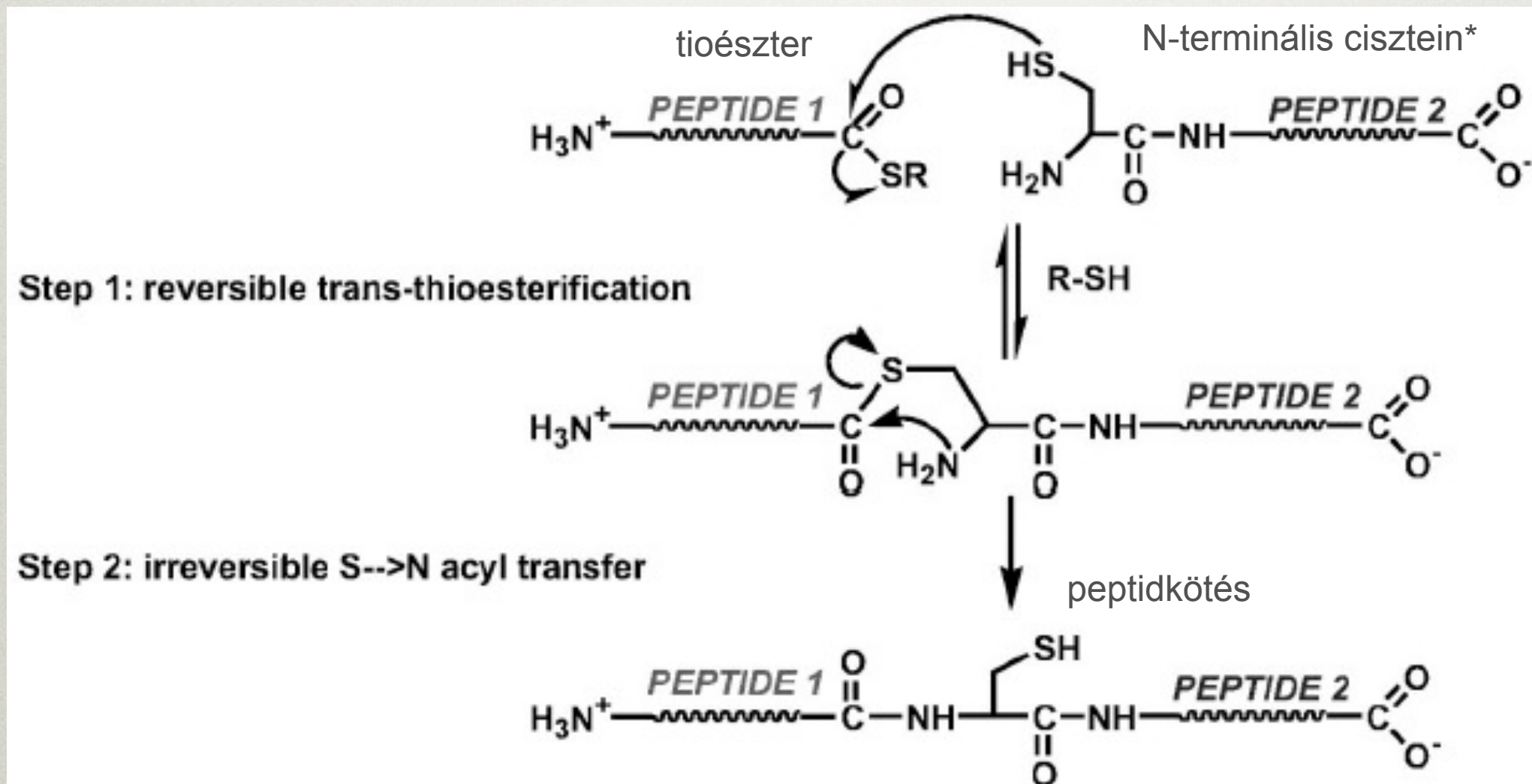




# Fluoreszcens jelölési technikák

## 3. Peptid ligáció

Fehérje "összeállítása" szintetikus, fluoreszcensen jelölt peptidekből



\*Csak N-terminális cisztein vesz részt a reakcióban

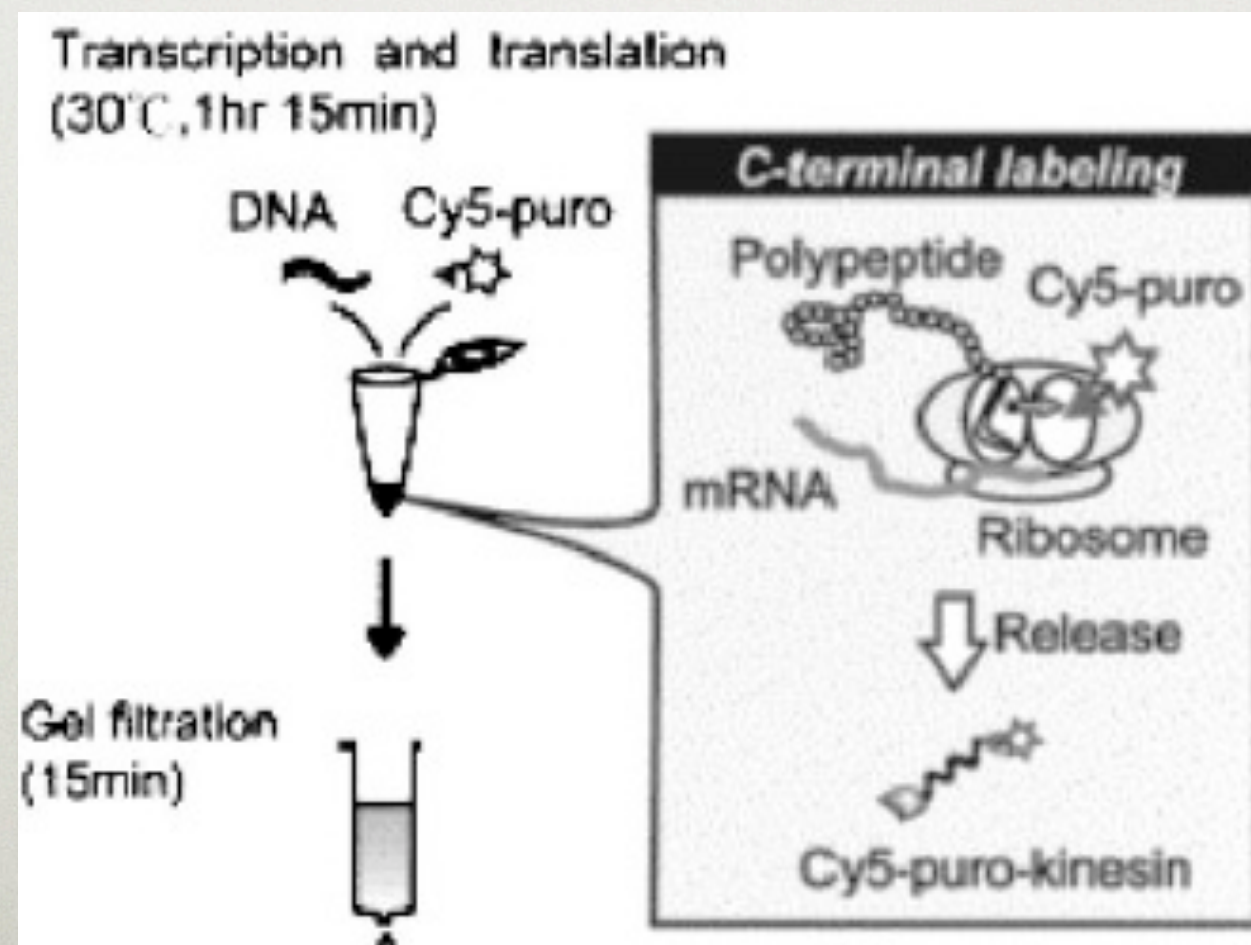


# Fluoreszcens jelölési technikák

## 4. C-terminális jelölés puromicin-származékokkal

### Puromicin:

- riboszóma A helyére, az aminoacyl tRNS helyére kötődő antibiotikum
- fehérjeszintézist gátol
- kovalensen kapcsolódik a már megszintetizálódott fehérje C-terminálisához
- fluoreszcens konjugátumai fehérjelölelésre használhatók





# Fluoreszcens jelölési technikák

---

## 5. Nem természetes aminosavak pontmutagenézise

1. Direkt: intrinzip fluorofór származékok (pl. 7-aza-triptofán)
2. Indirekt: nem proteinogén reaktív csoportokat (pl. keto) tartalmazó aminosavak

## 6. Fehérjekomplexek rekonstitúciója előre megjelölt alegységekből

Multi-subunit (alegység) fehérjék, fehérjekomplexek esetén



# Fluoreszcens jelölési technikák

---

## 7. Fluoreszcens fehérjével való konjugálás

### 1. Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein, GFP)



**Méret:** ~27 kDa, 238 aa

**Szerkezet:** 11-szálú  $\beta$ -hordó

**Kromofór:** a központi hélix Ser65-Tyr66-Gly67 oldalláncaiból

**Fluoreszcencia** 3D szerkezet intaktságától függ

**Tandem fúziós konstrukció** a GFP és a vizsgált fehérje génjeiből

**Előnyök:** *in vivo* mérések, mutánsokból spektrális variánsok állíthatók elő, melyek több különböző konstrukció együttes vizsgálatát is lehetővé teszik .

**Hátrányok:** pislogás, csak terminális (N vagy C) jelölés, a GFP a célfehérje működését szterikusan befolyásolhatja.

2. A GFP egyéb színű (kék, sárga, vörös) mutánsai

3. Fotoaktiválható GFP analóg

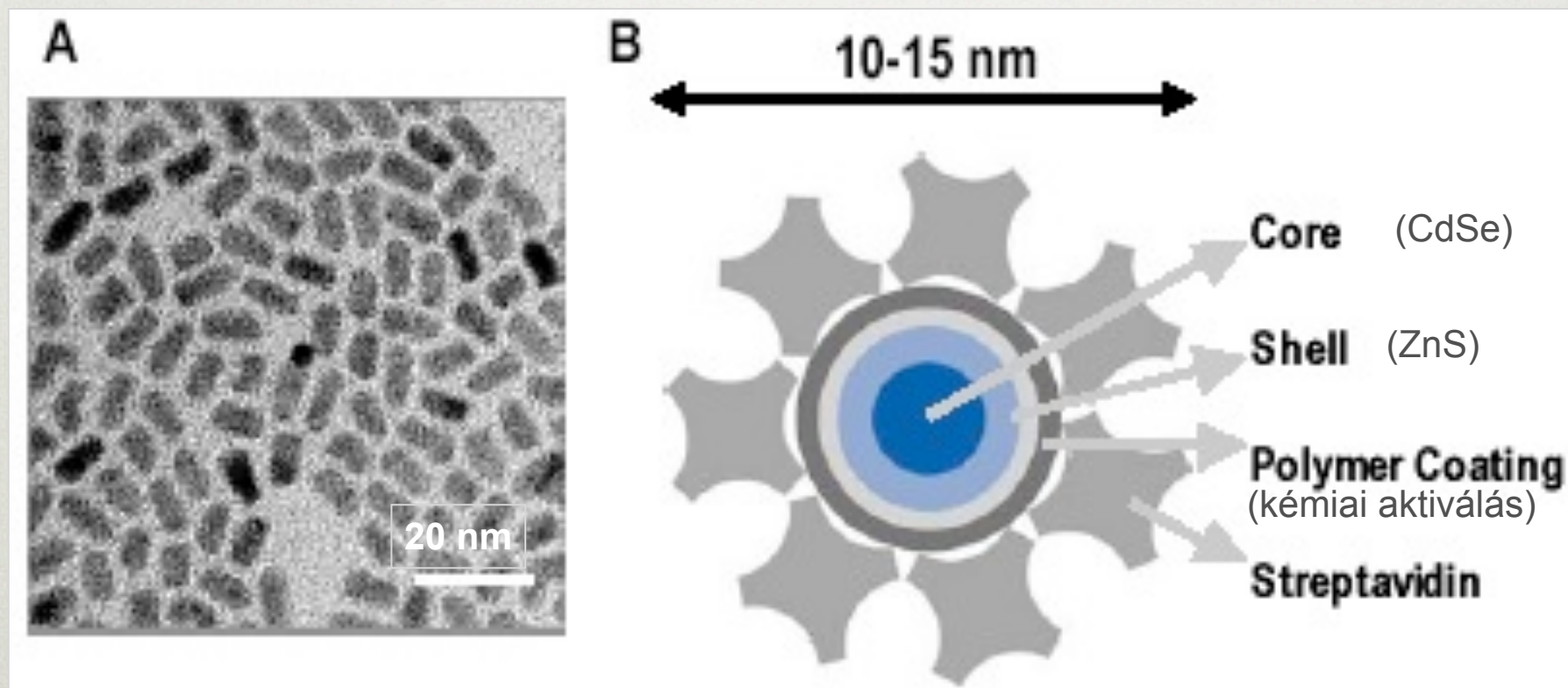
4. Kaede: korallból származó fluoreszcens fehérje, mely UV-indukálható zöld-vörös fotokonverziót mutat



# Fluoreszcens jelölési technikák

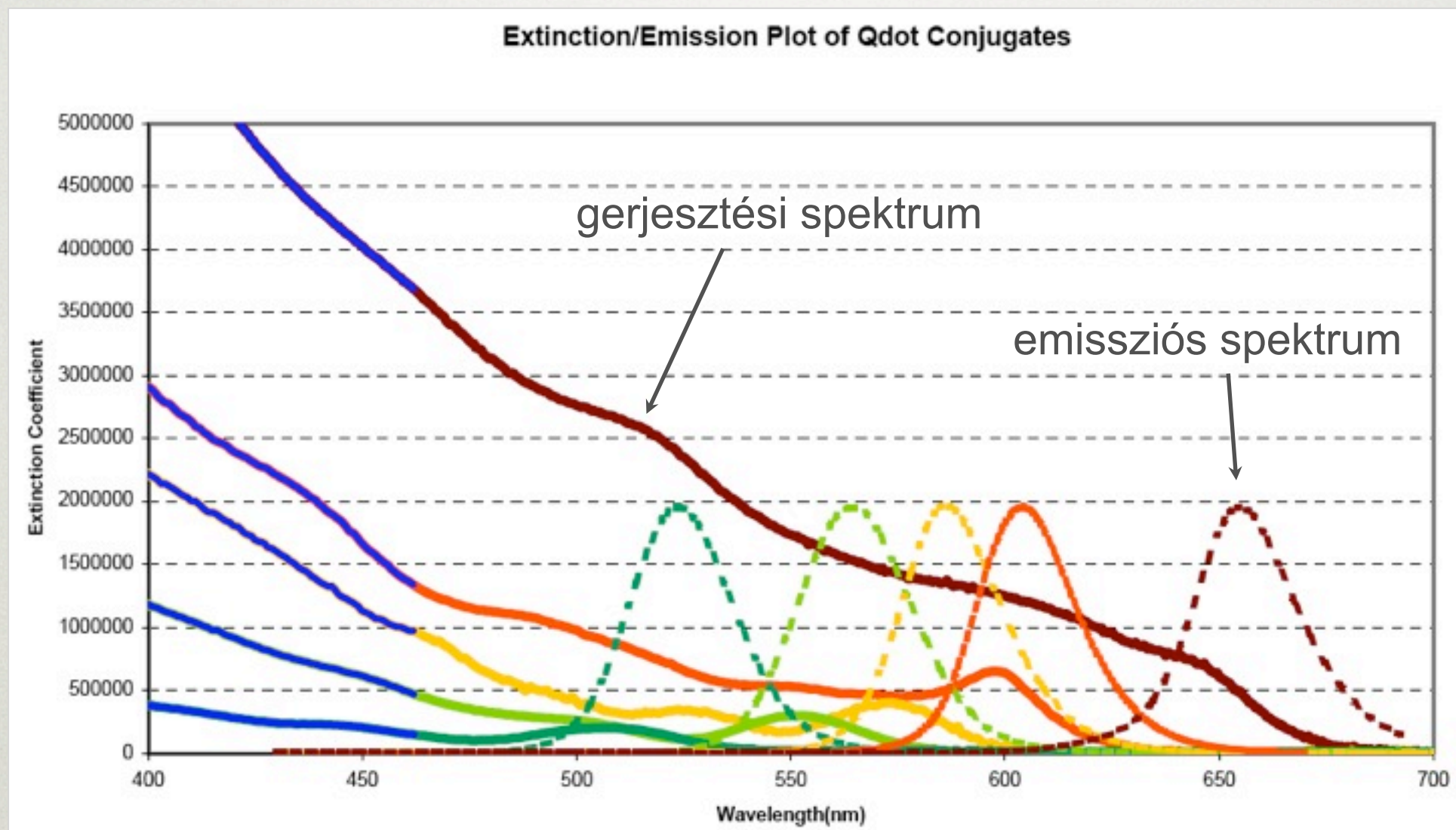
## 8. Kvantumpontok

Félvezető nanokristályok  
Emissziós spektrum a méret függvénye





# Kvantumpont jelölés



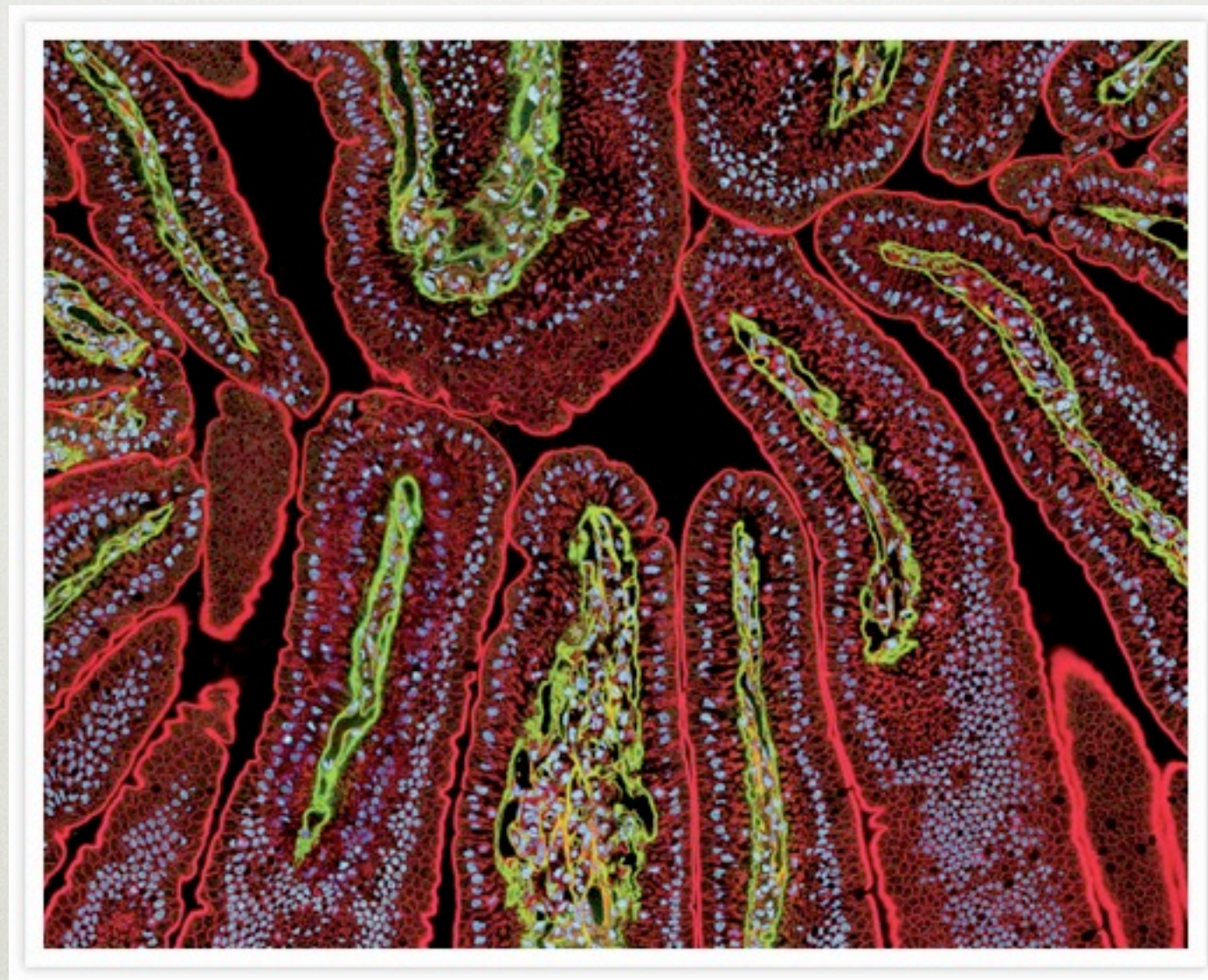
## Előnyök:

- széles gerjesztési spektrum
- hangolható emissziós spektrum
- fotokifehéredéssel szemben rendkívül ellenállóak



# Kvantumpont jelölés

---



Vörös: aktin  
Zöld: Laminin  
Kék: sejtmag

A mouse intestinal section visualized using fluorescent Qdot nanocrystal conjugates. Actin was labeled with a mouse anti-actin monoclonal antibody and visualized using red-fluorescent Qdot 655 goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG. Laminin was labeled with a rabbit anti-laminin polyclonal antibody and visualized using green-fluorescent Qdot 525 goat F(ab')<sub>2</sub> anti-rabbit IgG. Nuclei were stained with blue-fluorescent Hoechst 33342



# LUMINESZCENCIÁN ALAPULÓ FÉNYERŐSÍTÉS: LÉZER

ALAPOK, TULAJDONSÁGOK, ALKALMAZÁSOK



# LÉZEREK MINDENÜTT



5 mW diódalézer  
néhány mm



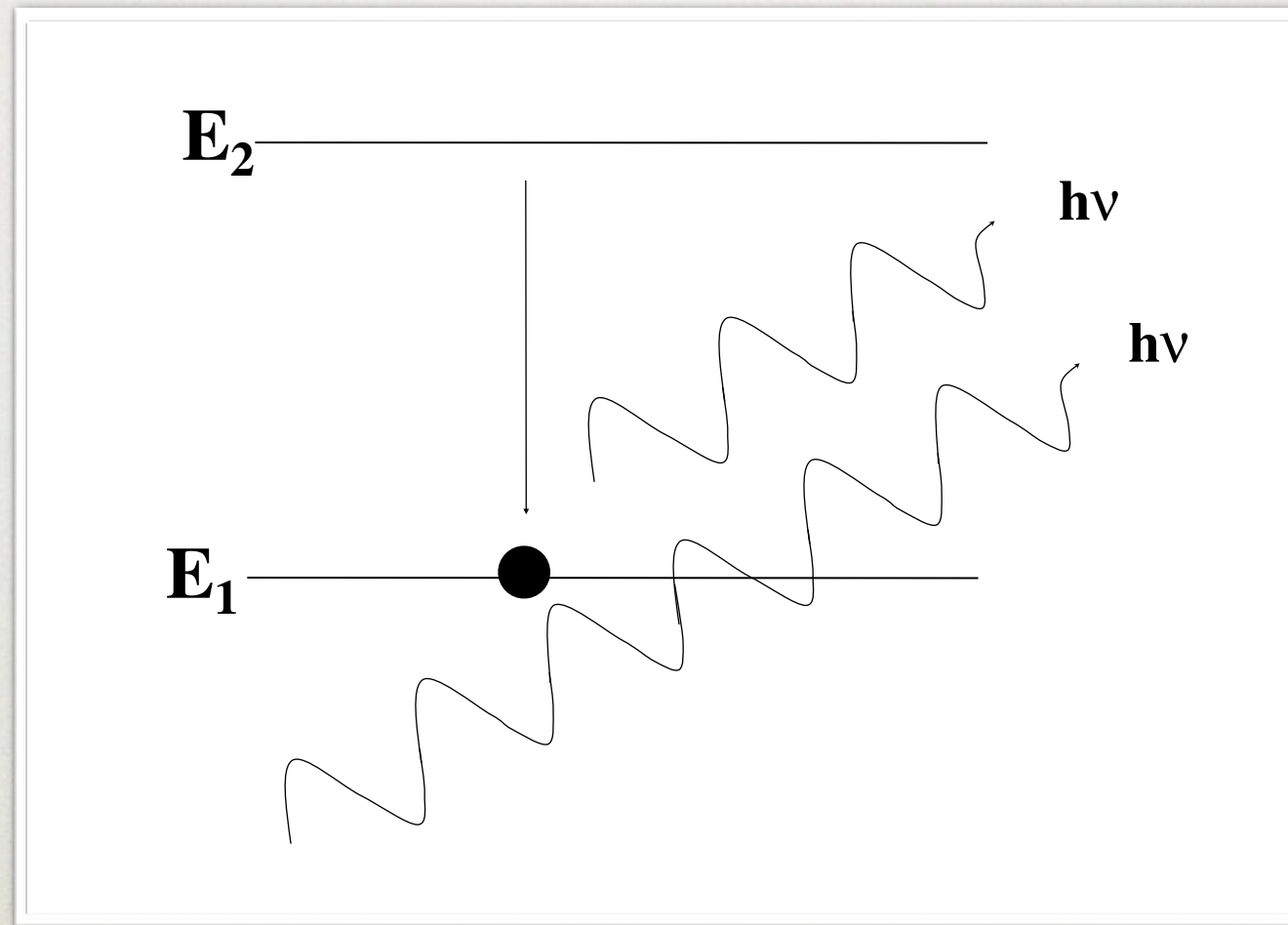
Terawattos NOVA lézer  
Lawrence Livermore  
Laboratories  
Futballpálya méretű



# LÉZER:

“LIGHT Amplification by Stimulated Emission of Radiation”

---



MASER: Microwave Amplification by Stimulated Emission of  
Radiation



# LÉZERTÖRTÉNET DIÓHÉJBAN

---

**1917** - *Albert Einstein:*

indukált emisszió elméleti predikciója.

**1946** - *G. Meyer-Schwickerath:* első szemműtét fénnel.

**1950** - *Arthur Schawlow és Charles Townes:*

az emittált fotonok a látható tartományba eshetnek.

**1954** - *N.G. Basow, A.M. Prochorow, és C. Townes:* ammónia mézer

**1960** - *Theodore Maiman:* első lézer (rubin lézer)

**1964** - *Basow, Prochorow, Townes (Nobel-díj):* kvantum elektronika

**1970** - *Arthur Ashkin:* lézercsipesz

**1971** - *Gábor Dénes (Nobel-díj):* holográfia

**1997** - *S. Chu, W.D. Phillips és C. Cohen-Tanoudji (Nobel-díj):*

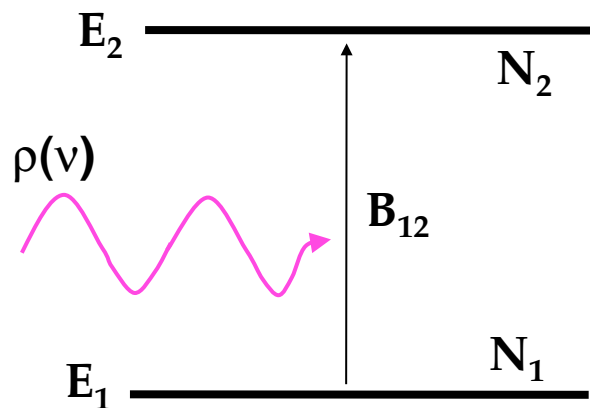
lézeres atomhűtés.



# A LÉZER ALAPJAI I.

## INDUKÁLT EMISSZIÓ

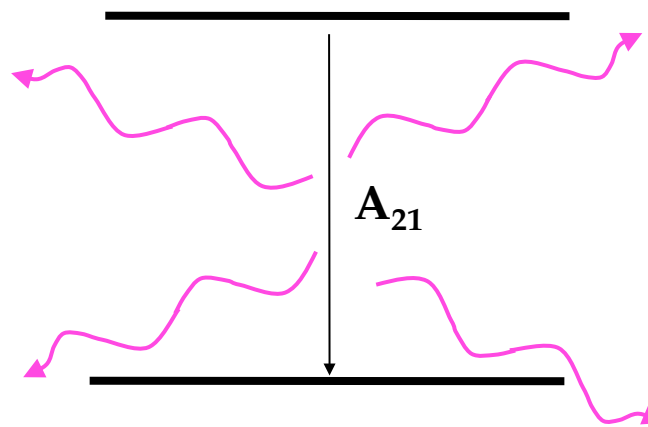
### 1. Abszorpció



Átmenet gyakorisága:  
 $n_{12} = N_1 B_{12} \rho(\nu)$

$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$   
 energiakvantum  
 elnyelésekor.

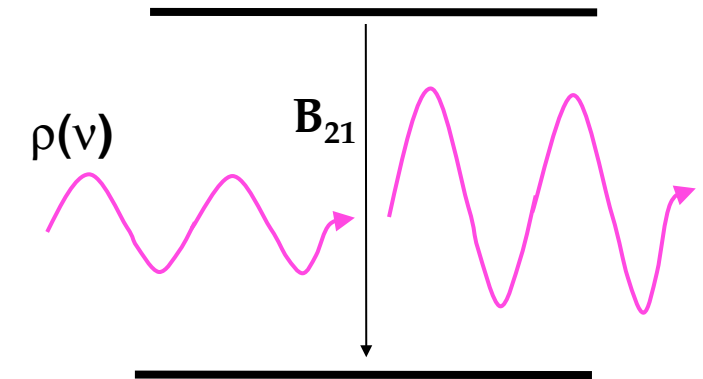
### 2. Spontán emisszió



Átmenet gyakorisága:  
 $n_{21} = N_2 A_{21}$

$E_2 - E_1$  fotonok  
 egymástól függetlenül  
 a tér minden irányába.

### 3. Indukált emisszió



Átmenet gyakorisága:  
 $n_{21} = N_2 B_{21} \rho(\nu)$

Külső sugárzási tér hatására.  
 Sugárzási tér energiája nő.  
 Emittált és külső fotonok fázisa,  
 iránya, frekvenciája megegyezik.

*Magyarázat:* kétállapotú atomi vagy molekuláris rendszer

$E_1, E_2$ : energianívók,  $E_2 > E_1$

$\rho(\nu)$ : sugárzási tér spektrális energiasűrűsége

$N_1, N_2$ : adott energianívón levő atomok, molekulák száma

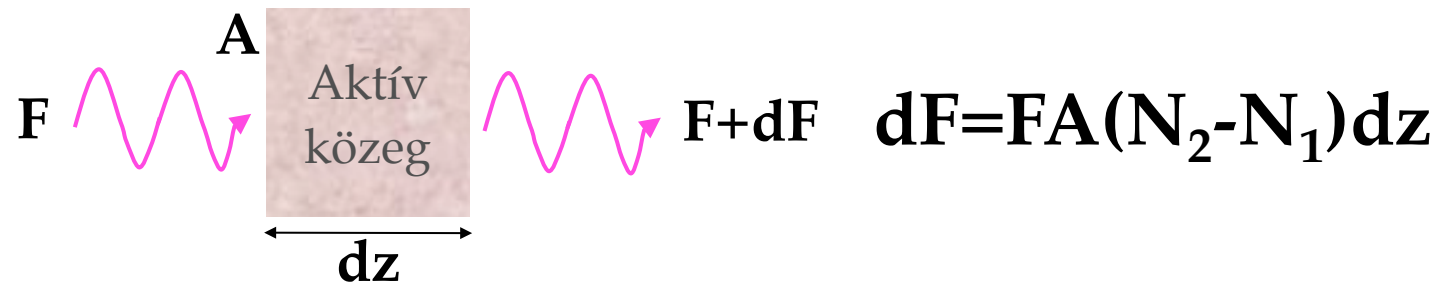
$B_{12}, A_{21}, B_{21}$ : energianívók közötti átmeneti valószínűségek (Einstein-féle együtthatók),  $B_{12} = B_{21}$



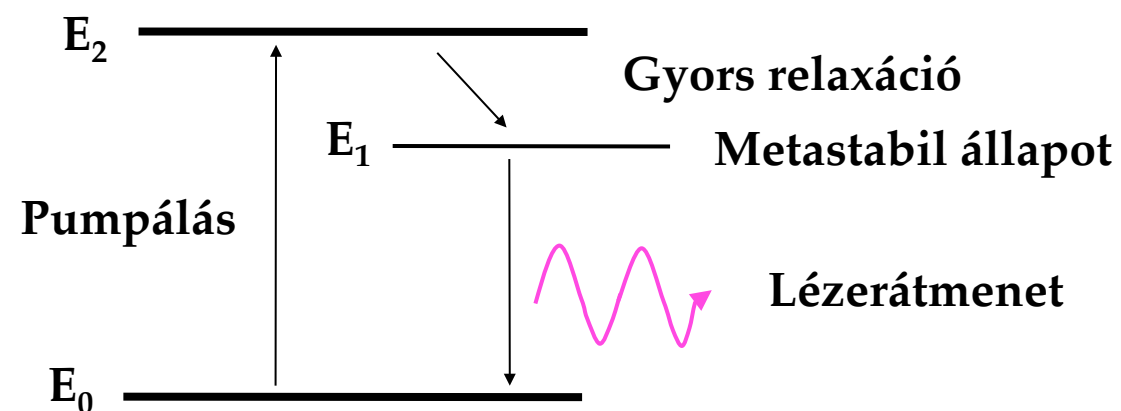
# A LÉZER ALAPJAI II.

## POPULÁCIÓ INVERZIÓ

Fényerősítés az energianívók relatív betöltöttségétől függ



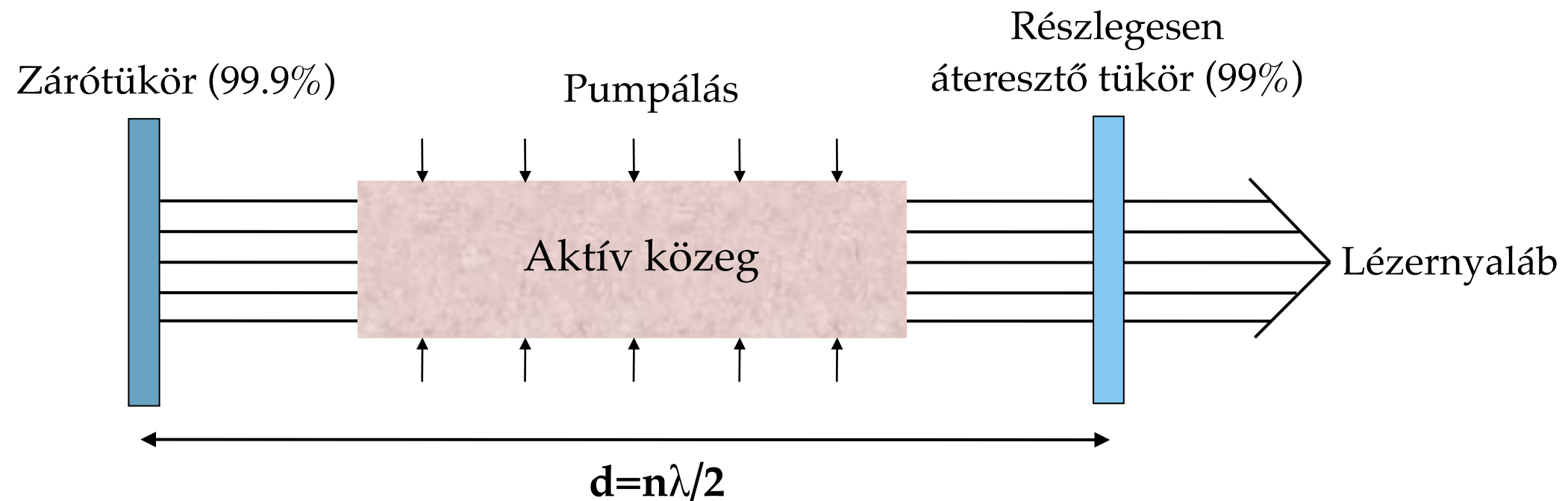
- Populáció inverzió csak többállapotú rendszerben!
- Pumpálás: elektromos, optikai, kémiai energia





# A LÉZER ALAPJAI III.

## OPTIKAI REZONANCIA



### Rezonátor:

- két párhuzamos sík (vagy homorú) tükör
- a kimenő fénytéljesítmény egy részét visszacsatolja a közegbe
- pozitív visszacsatolás -> öngerjesztés -> rezonancia

• Optikai zár a rezonátorban: Q-csatolás, impulzus üzemmód



# A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI I.

## 1. Kis divergencia

Párhuzamos nyaláb

## 2. Nagy teljesítmény

Folytonos üzemmódban több tíz, akár száz W (pl. CO<sub>2</sub> lézer)

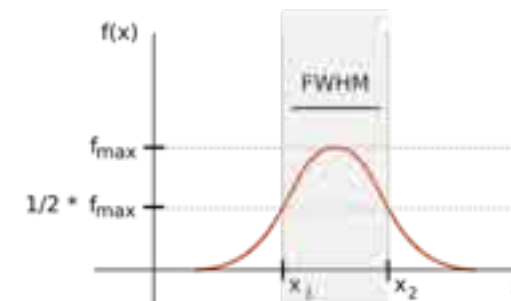
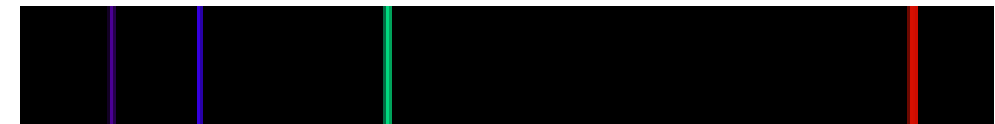
Q-csatolású üzemmódban a pillanatnyi teljesítmény hatalmas (GW)

Kis divergencia miatt óriási térbeli teljesítménysűrűség

## 3. Kis spektrális sávzélesség

“Monokromaticitás”

Nagy spektrális energiasűrűség



## 4. Polarizáltság

## 5. Rendkívül rövid impulzusok lehetősége

ps, fs



# A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI II.

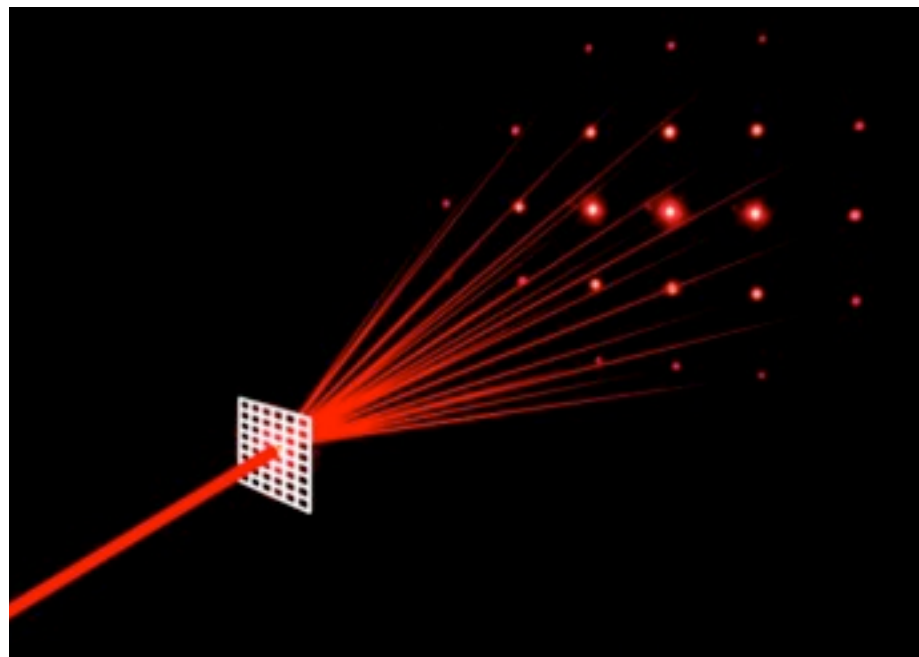
---

## 6. Koherencia

fázisazonosság, interferenciaképesség

Időbeli koherencia (különböző időpontokban emittált fotonok fázisazonossága)

Térbeli koherencia (nyalábkeresztmetszet menti fázisazonosság)



*Alkalmazás: holográfia*



# LÉZERTÍPUSOK

## Fényerősítő közeg alapján:

### 1. Szilárdtest lézerek

Kristályokba v. üveganyagokba bevitt fémszennyeződés; Rubin, Nd-YAG, Ti-zafír  
Vörös-infravörös spektrális tartomány; Folytonos, Q-kapcsolású üzemmód, nagy teljesítmény

### 2. Gázlézerek

Legismertebb: *He-Ne lézer* (10 He / Ne). Kis energia, Széleskörű használat  
*CO<sub>2</sub> lézer*: CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub>-He keverék;  $\lambda \sim 10 \mu\text{m}$ ; Óriási teljesítmény (100 W)

### 3. Festéklézerek

Szerves festékek (pl. rodamin, kumarin) híg oldata; Pumpálásra más lézer használt  
Nagy teljesítmény (Q-kapcsolt módban); Hangolható

### 4. Félvezető lézerek

Összefekvő p- és n-típusú, szennyezett félvezetők határán.

Rezonátor tükrökre nincs szükség (belső visszaverődés)

Vörös, IR spektrális tartomány. Nagy kontinuus üzemmódú teljesítmény (akár 100W)

Nyalábkarakterisztika nem túl jó. Kis méret miatt széleskörű alkalmazás.



# LÉZEREK ALKALMAZÁSA

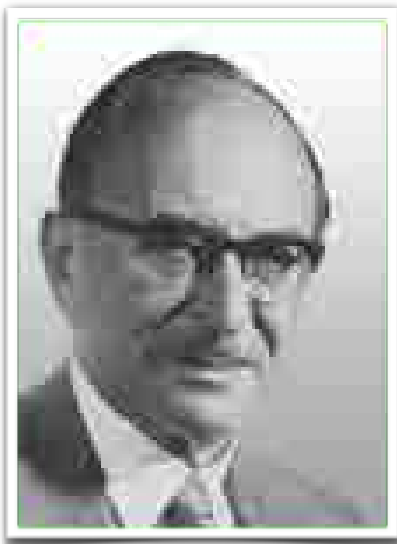
## TELJESÍTMÉNY ALAPJÁN

---

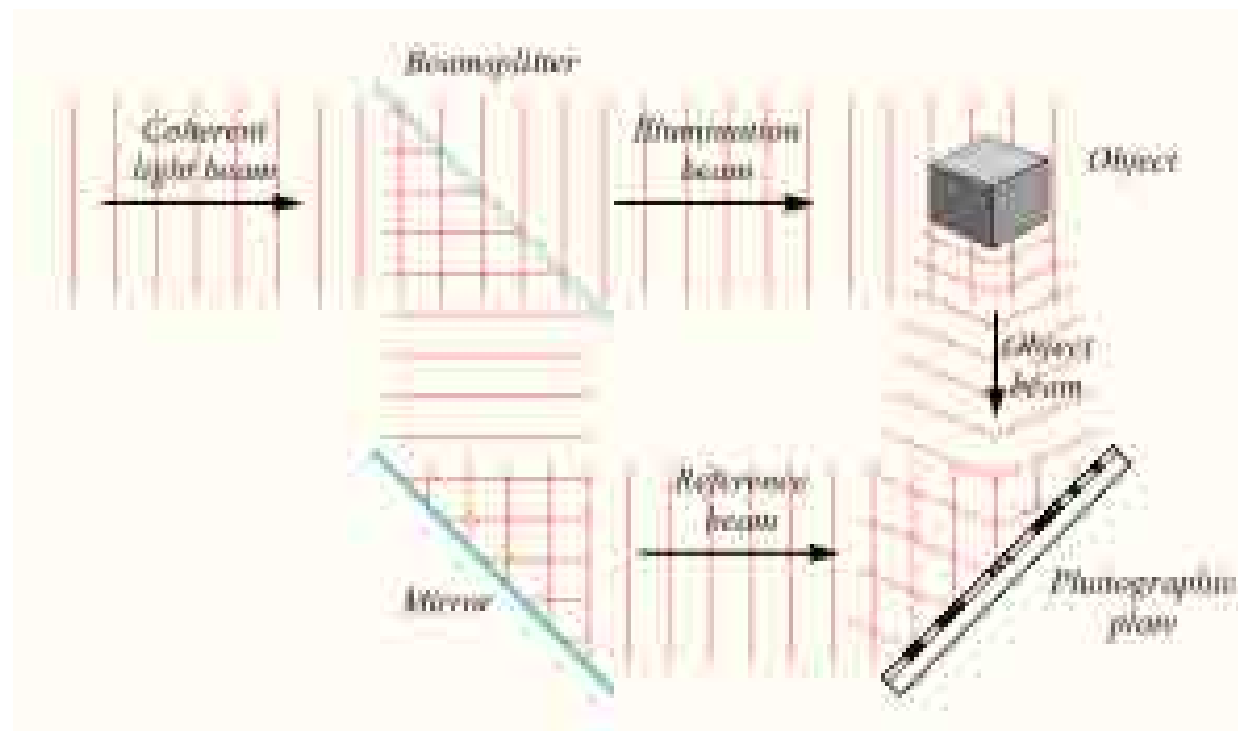
- 5 mW – CD-ROM meghajtó
- 5–10 mW – DVD lejátszó vagy DVD-ROM meghajtó
- 100 mW – Nagysebességű CD-RW író
- 250 mW – DVD-R író
- 1–20 W – szilárdtest-lézer mikromegmunkálásra
- 30–100 W – sebészeti CO<sub>2</sub> lézer
- 100–3000 W – ipari CO<sub>2</sub> lézer (lézervágó)
- 1 kW – 1 cm diódalézer rúd



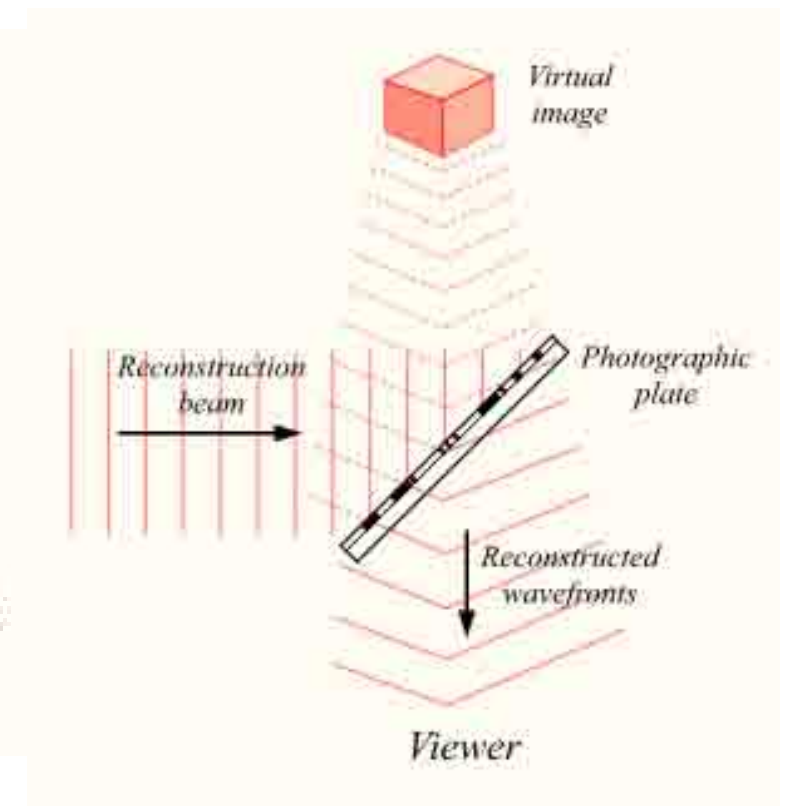
# HOLOGRÁFIA



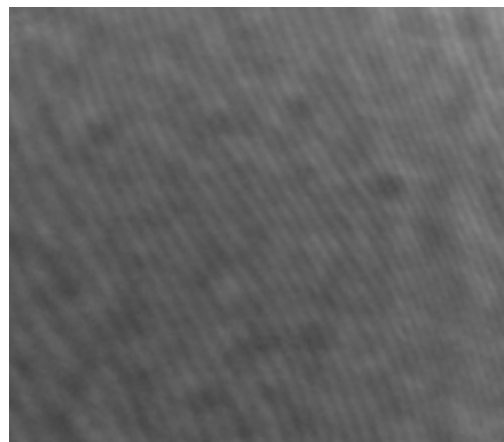
Gábor Dénes



Hologram felvétele



Hologram megtekintése



Hologram fotolemez felülete



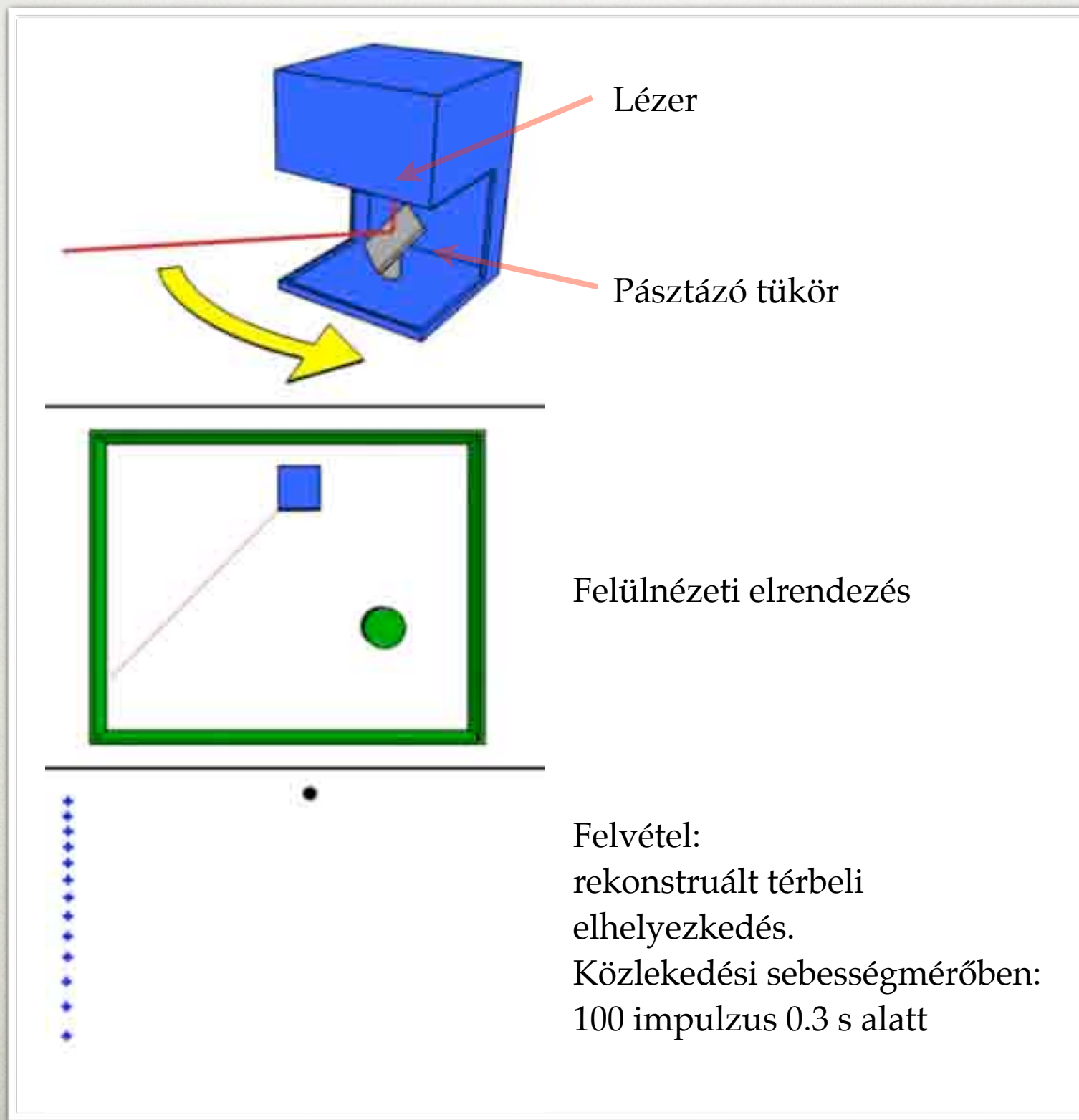
Hologramok





# SEBESSÉGMÉRÉS LÉZERREL

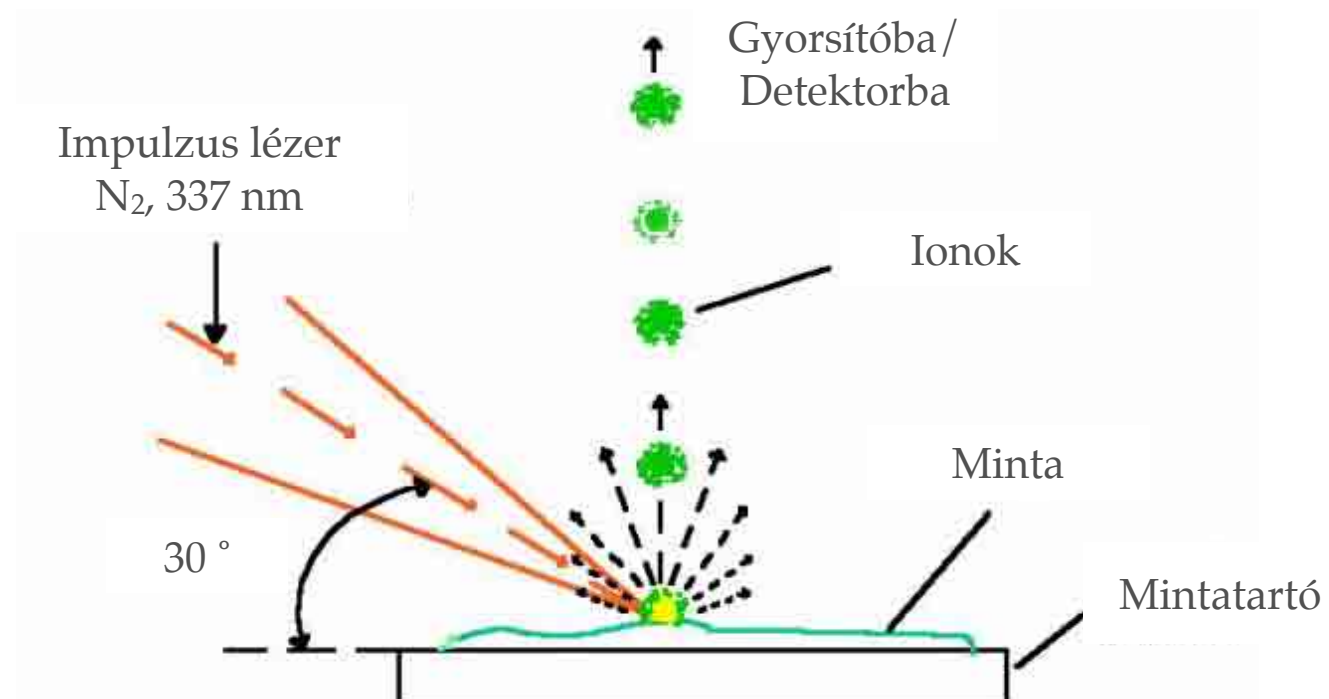
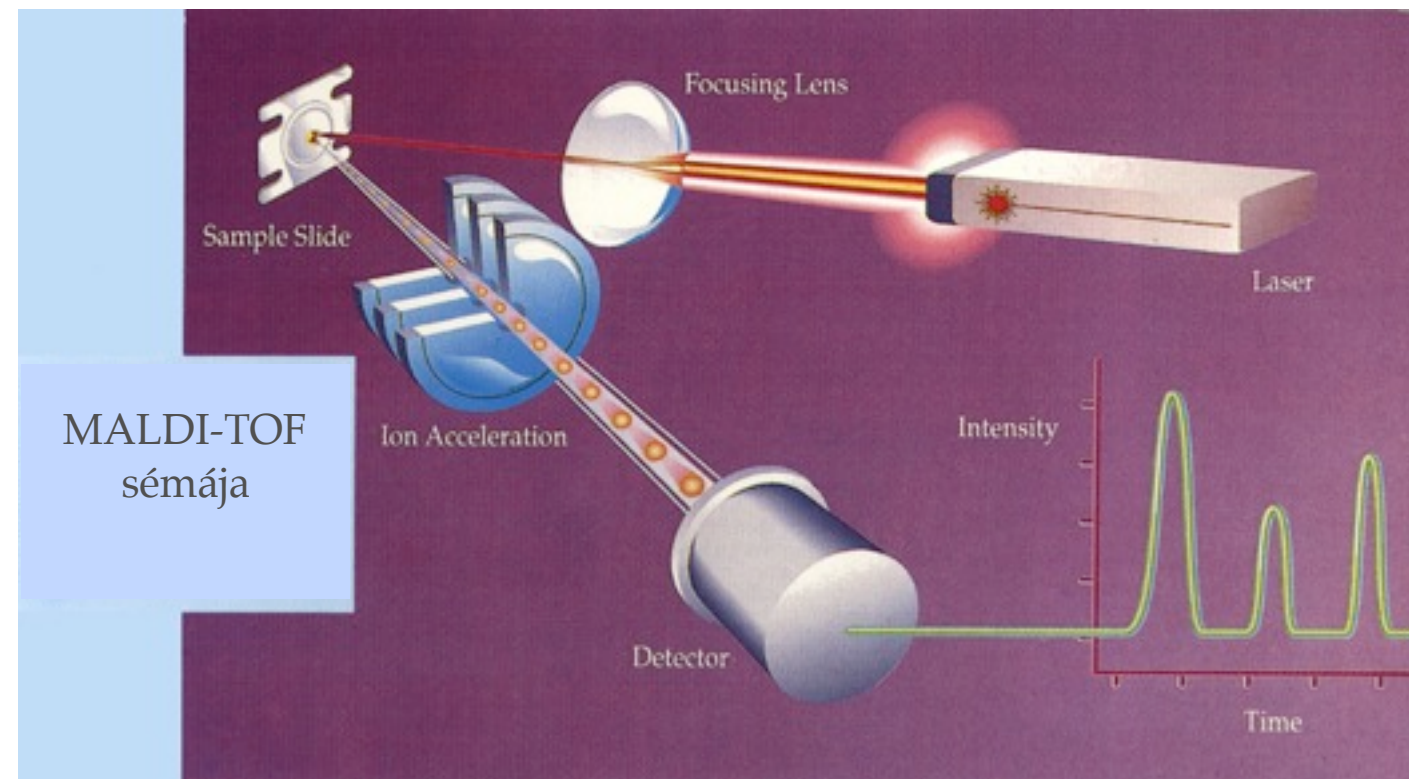
LIDAR: “LIGHT DETECTION AND RANGING”





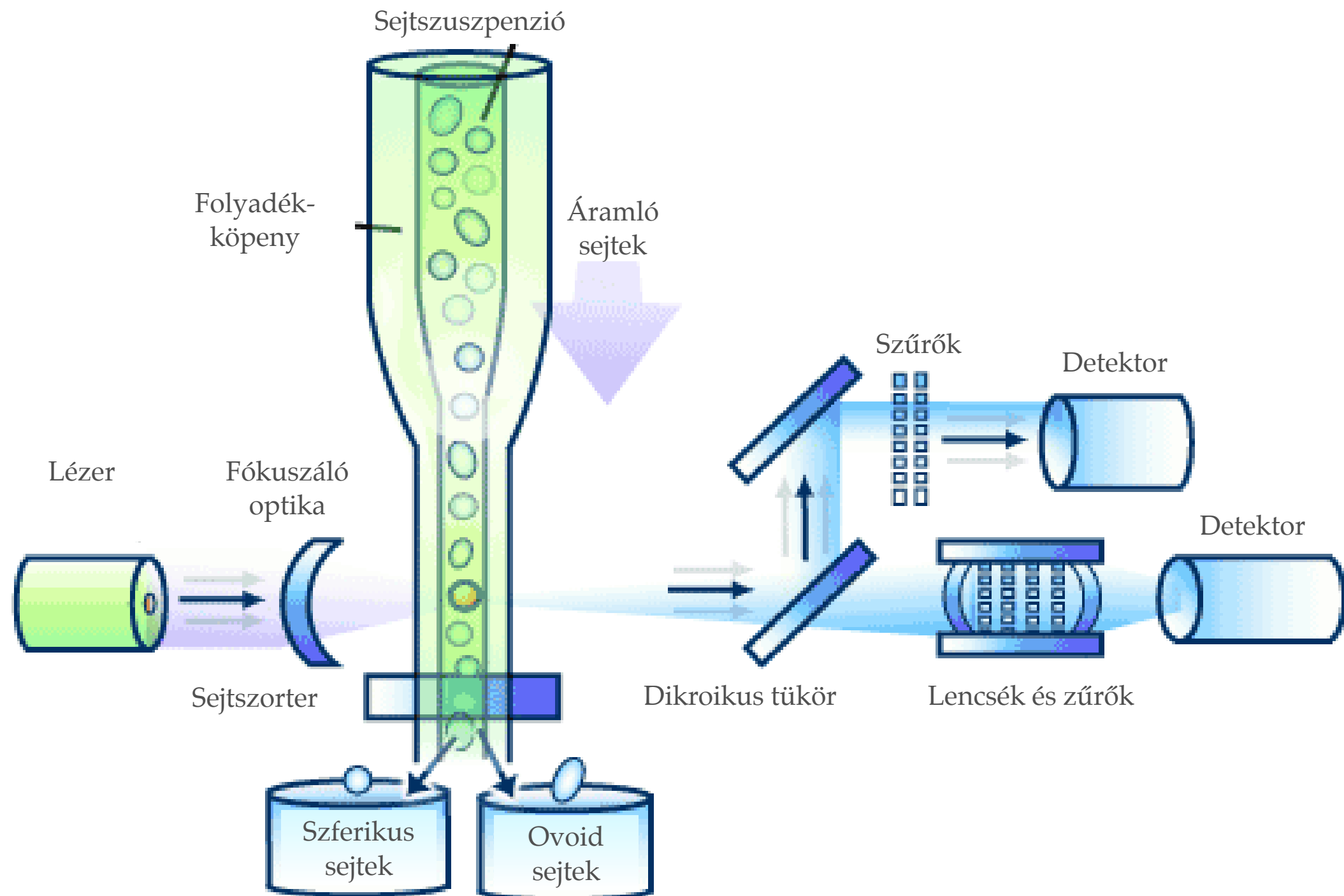
# MALDI-TOF:

## MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY



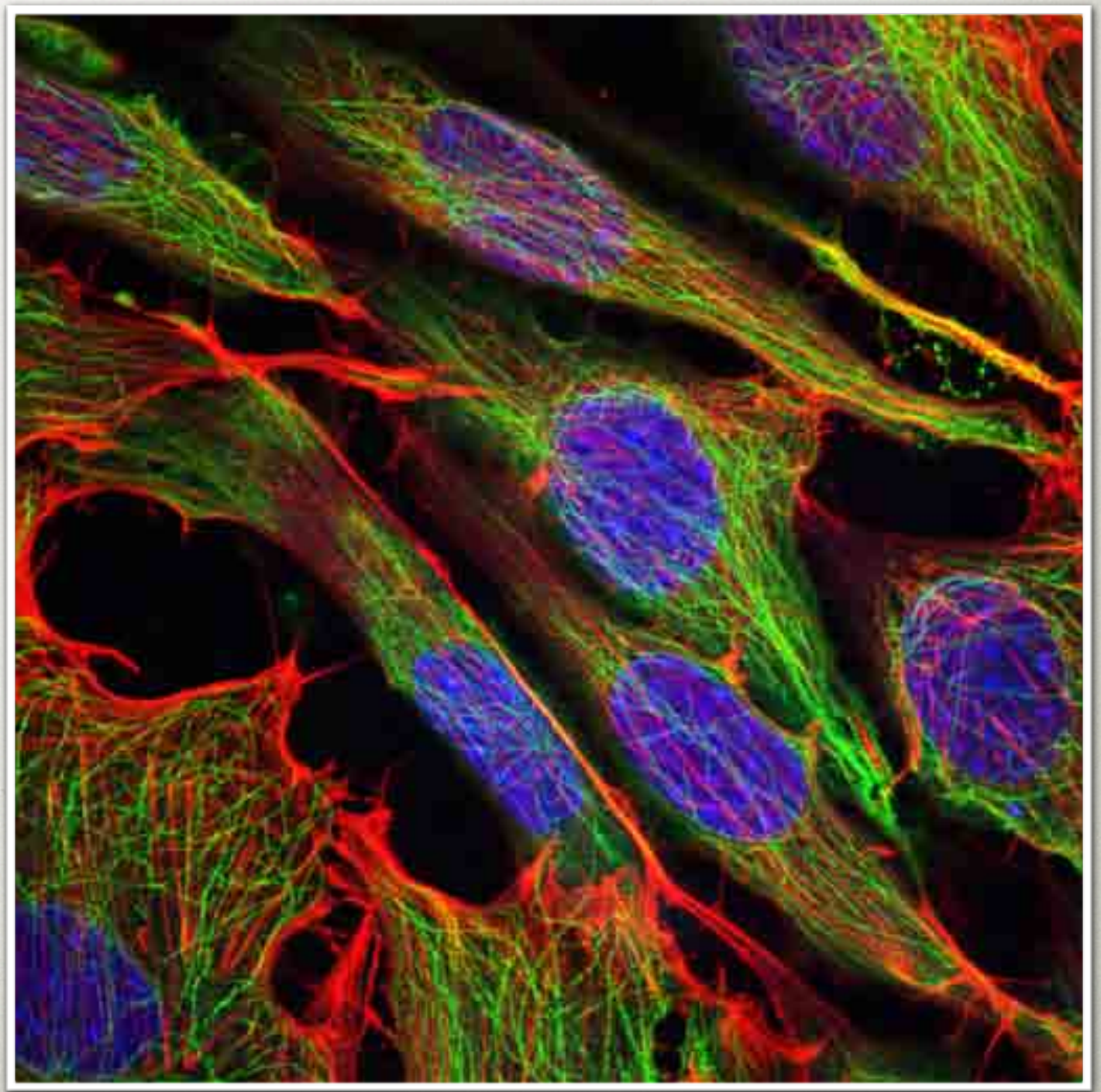
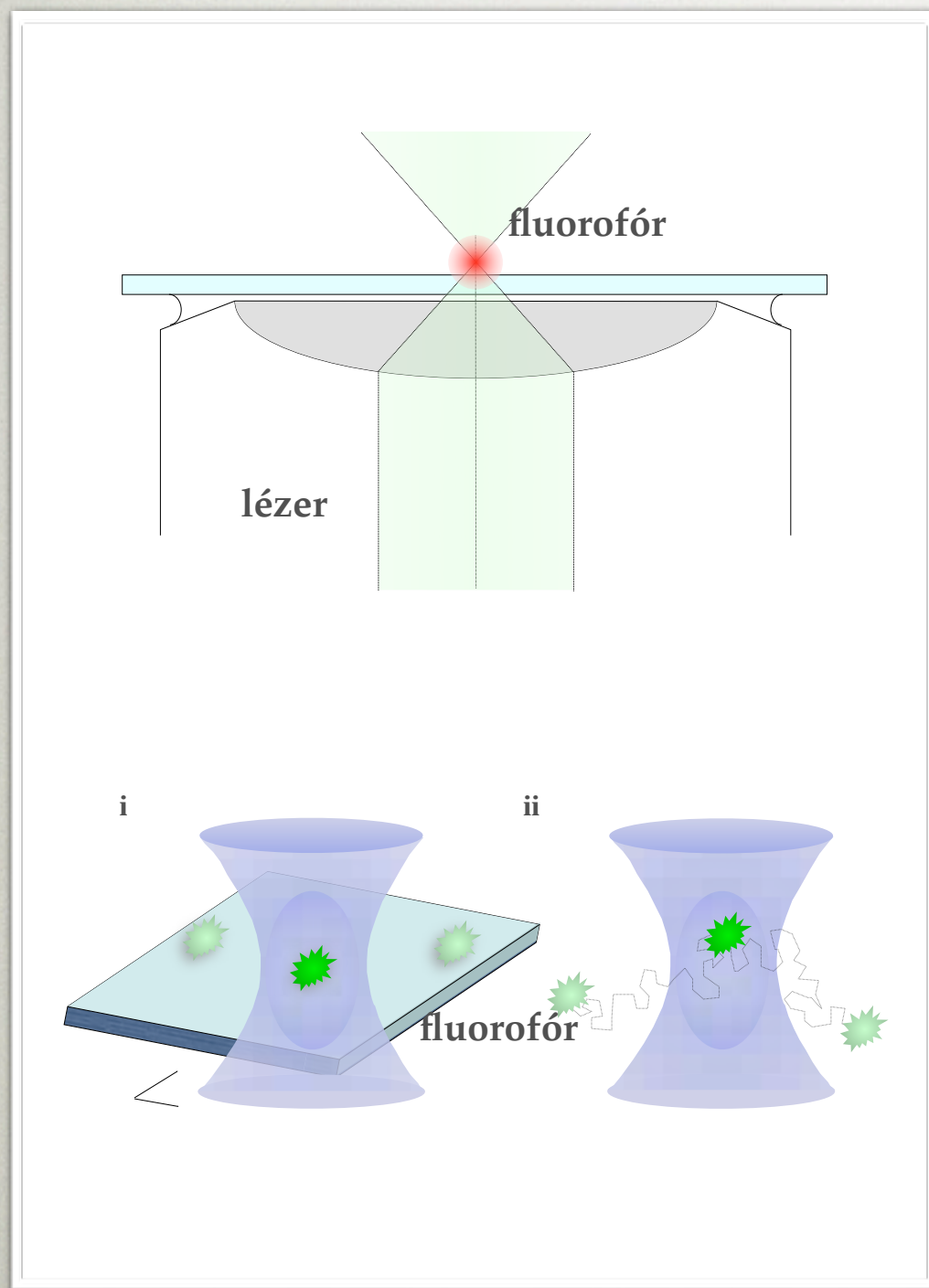


# FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS)



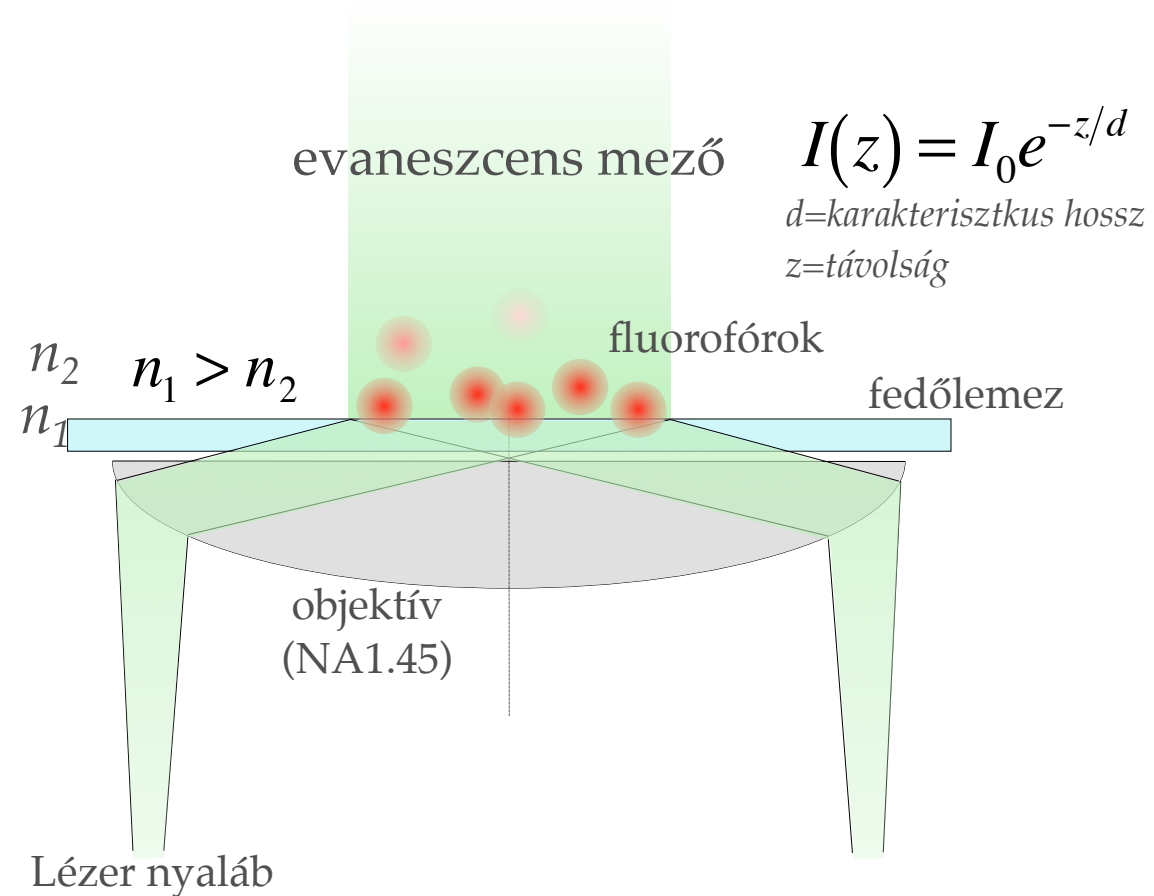


# LÉZER PÁSZTÁZÓ KONFOKÁLIS MIKROSKÓP



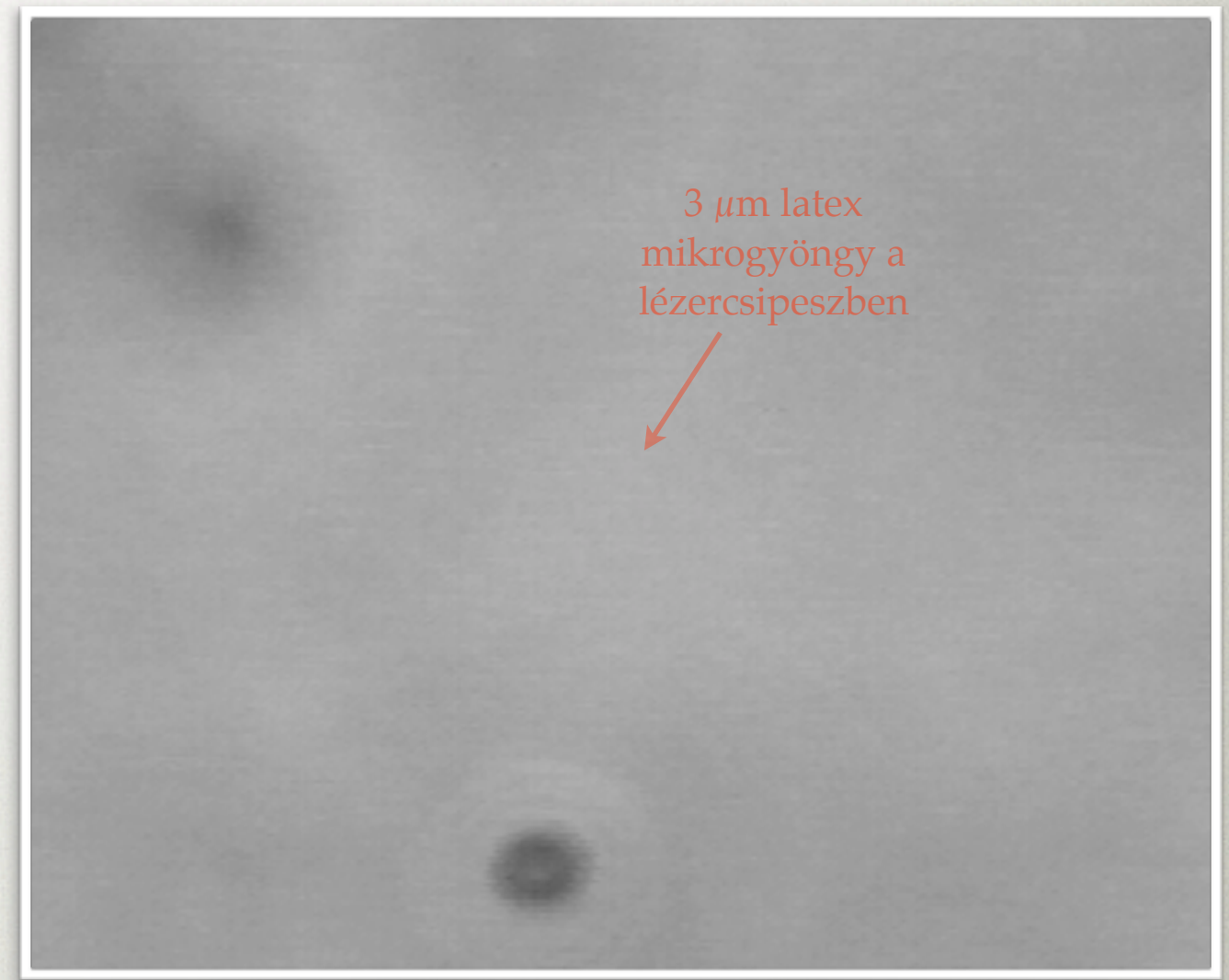
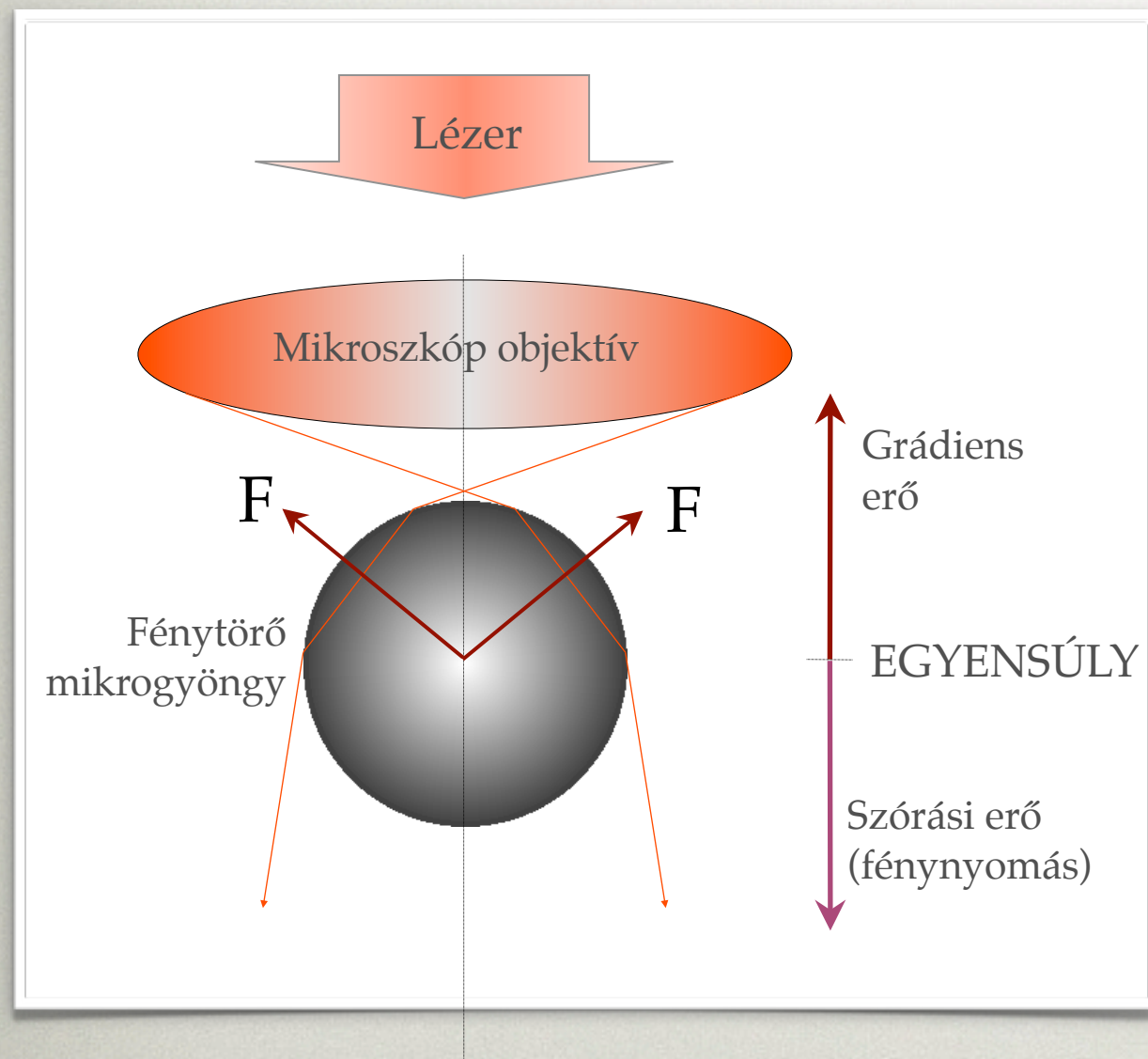


# TELJES BELSŐ VISSZAVERŐDÉS FLUORESZCENCIA MIKROSKÓPIA (TIRFM)





# LÉZERCSIPESZ

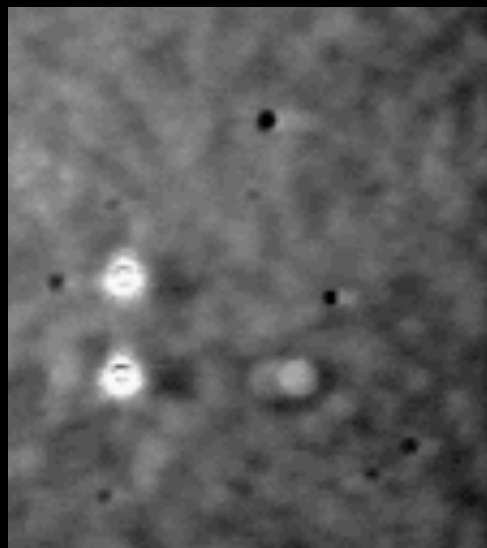




# CSOMÓKÖTÉS EGYETLEN DNS LÁNCRA

mikrogyöngy mozgatható  
lézercsipeszben

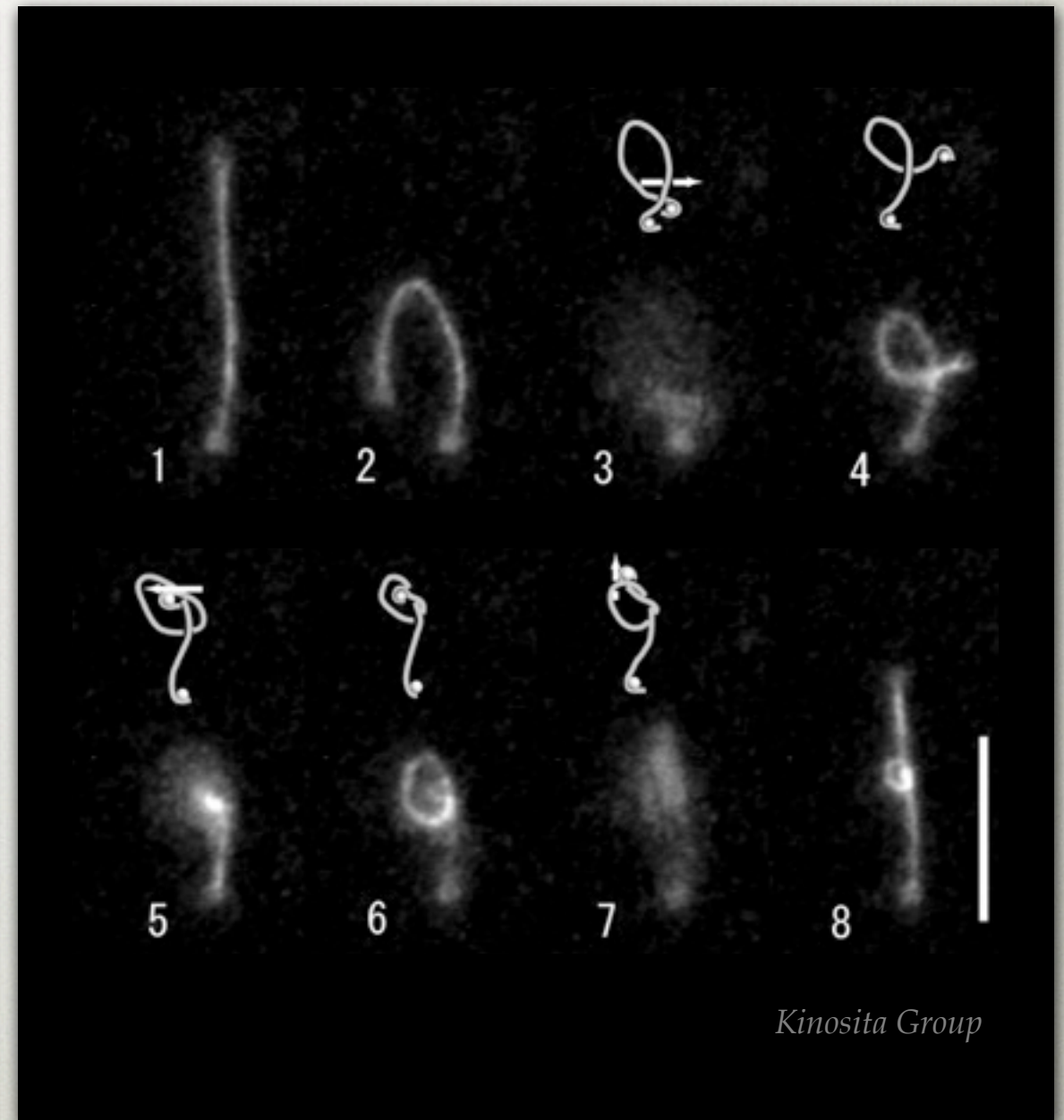
Fáziskontraszt kép



Fluoreszcencia kép



mikrogyöngy stacionárius  
lézercsipeszben



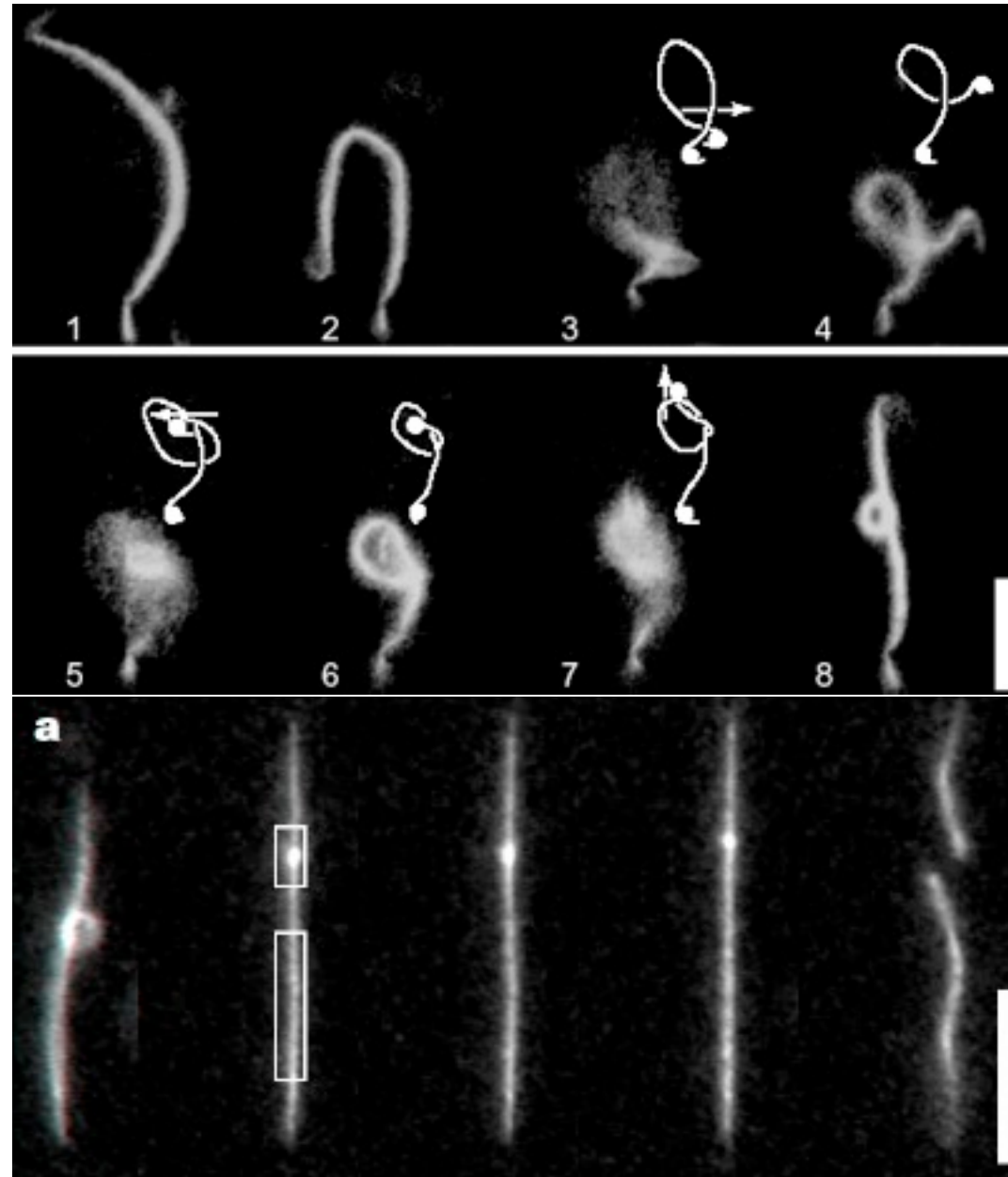
*Kinosita Group*



# CSOMÓKÖTÉS AKTIN FILAMENTUMRA LÉZERCSSIPESSZEL



*Arai et al. Nature 399, 446, 1999.*

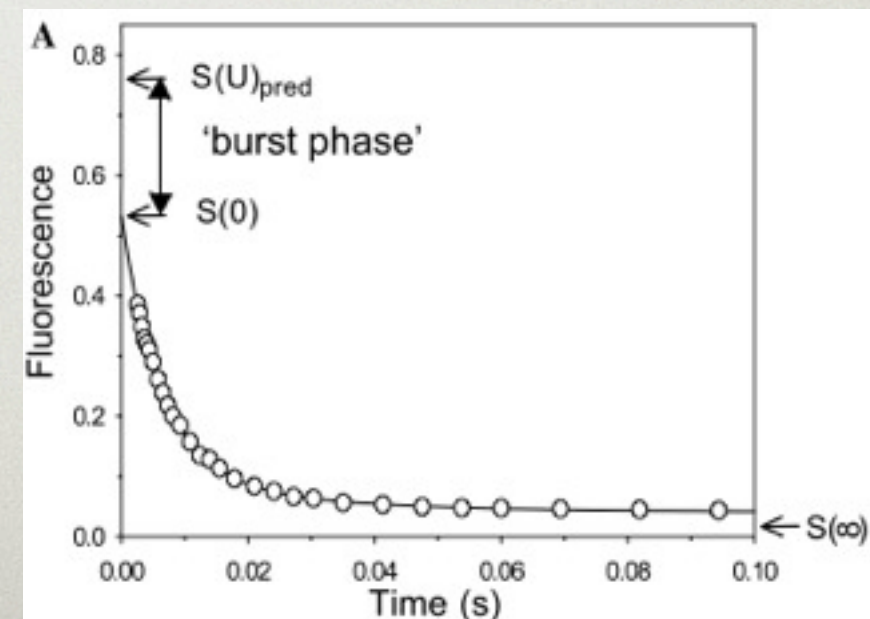
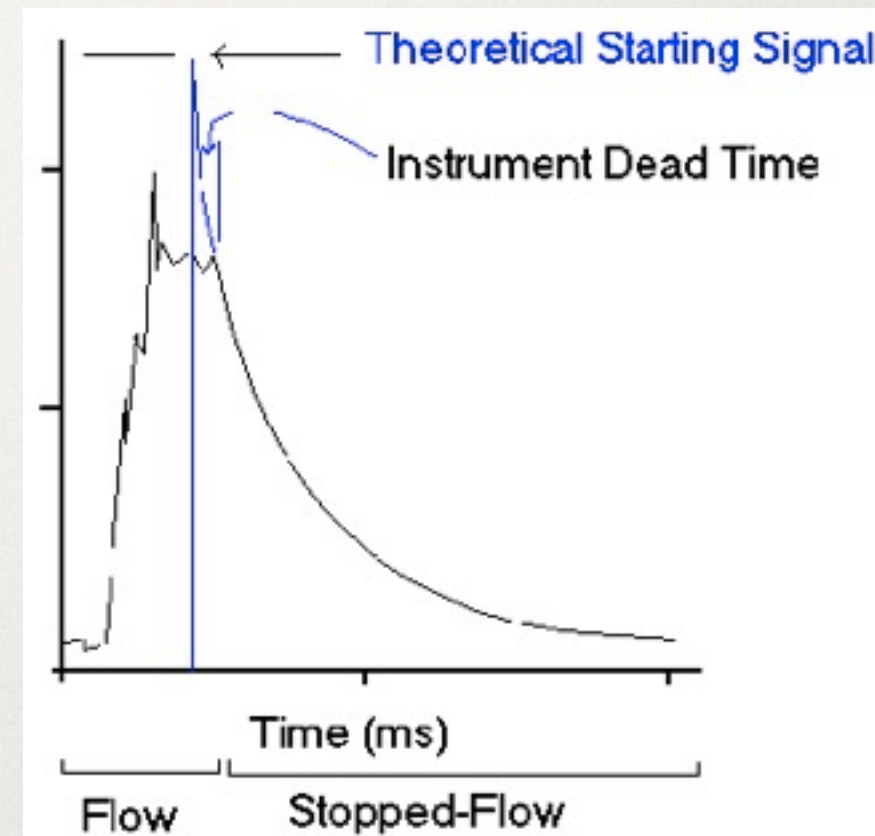
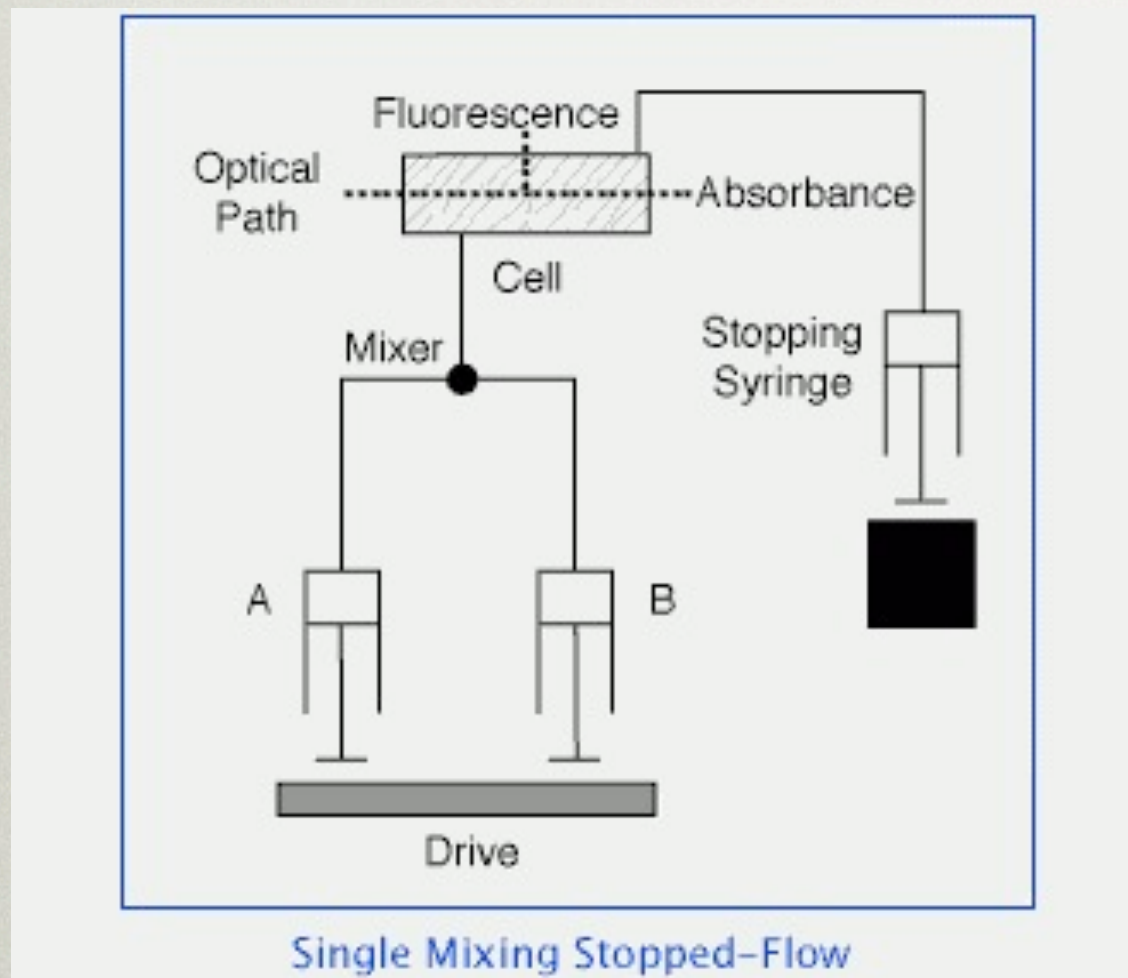




FEHÉRJEGOMBOLYODÁS  
VIZSGÁLATA TRANZIENS  
KINETIKAI  
MÓDSZEREKKEL



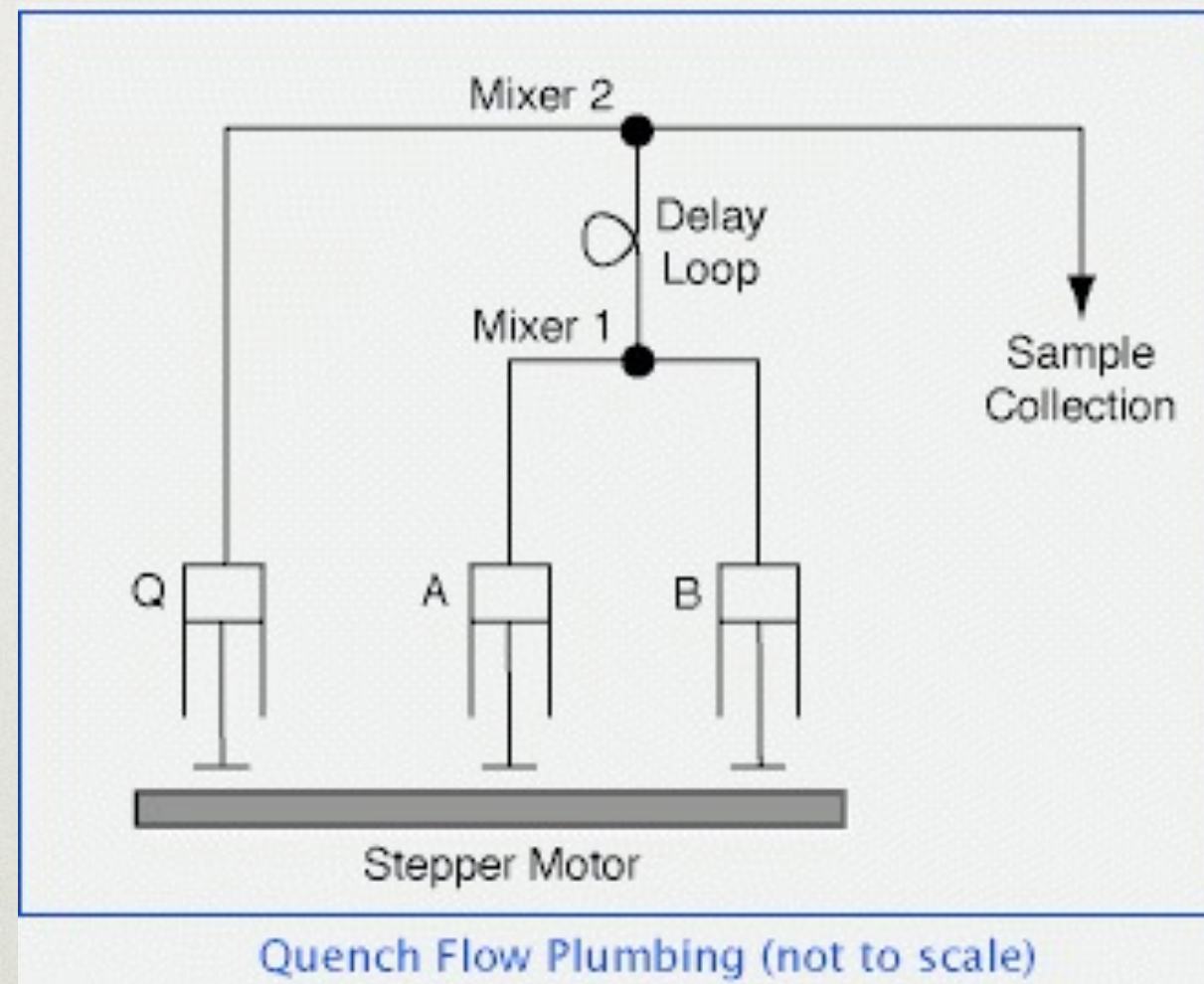
# FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: STOPPED-FLOW





# FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: QUENCH-FLOW

---



Analitika kémiai módszerekkel (SDS-PAGE, stb.)