

Az optikai spektroszkópia alapjai és alkalmazásai a szerkezetkutatásban

Dr. Fidy Judit
egyetemi tanár

Optikai spektroszkópia \leftrightarrow leglazábban kötött
atomi elektronok energiaátmenetei

Abszorpciós és emissziós
átmenetek --- UV-VIS

- Legkülső elektronpályák – érzékenyek a külső perturbációkra

- Lumineszcencia módszerek fontosak

gerjesztési átmenet – molekula-pályákra jellemző

emissziós átmenetek --- molekula-pályákra jellemző

--- érzékenyek a külső perturbációkra

--- nagy érzékenységű detektorok

Szerkezetkutatási alkalmazások

Fény-mikroszkópiai alkalmazások

Hatalmas fejlődés!

Figure 4-37 A model for the structure of a lampbrush chromosome. The set of lampbrush chromosomes in many amphibians contains a total of about 10,000 chromatin loops, although most of the DNA in each chromosome remains highly condensed in the chromomeres. Each loop corresponds to a particular DNA sequence. Four copies of each loop are present in each cell, since each of the two chromosomes shown at the top consists of two closely apposed, newly replicated chromosomes. This four-stranded structure is characteristic of this stage of development of the oocyte, the diplotene stage of meiosis; see Figure 20-12.

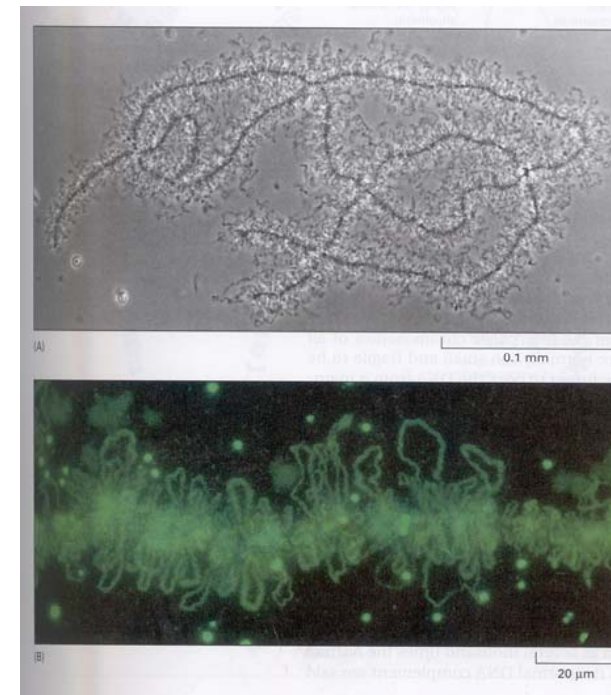
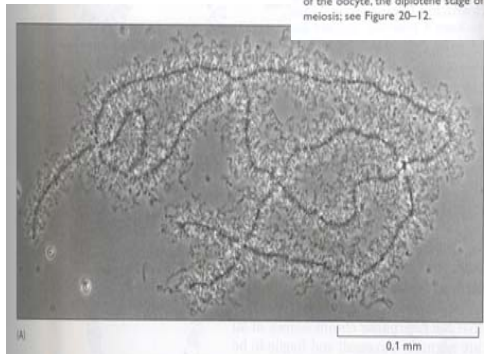
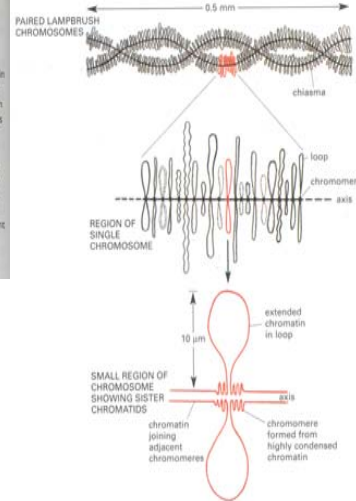
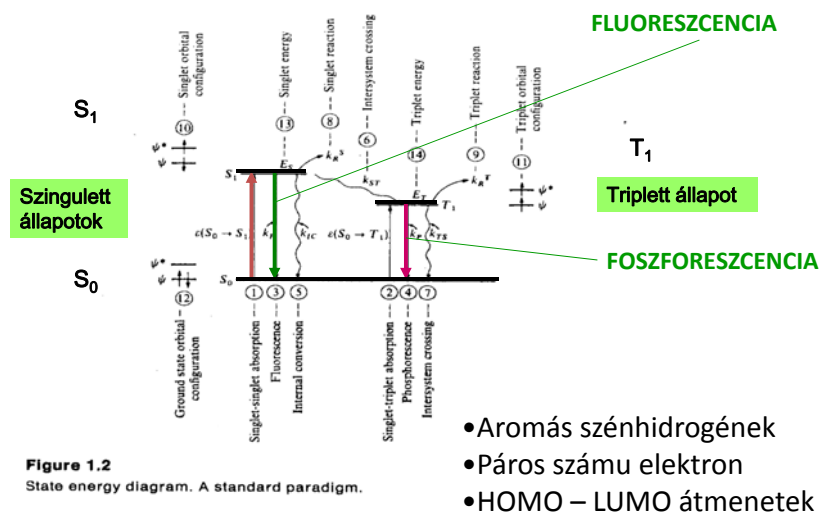


Figure 4-36 Lampbrush chromosomes. (A) A light micrograph of lampbrush chromosomes in an amphibian oocyte. Early in oocyte differentiation, each chromosome replicates to begin meiosis, and the homologous replicated chromosomes pair to form this highly extended structure containing a total of four replicated DNA molecules, or chromatids. The lampbrush chromosome stage persists for months or years, while the oocyte builds up a supply of materials required for its ultimate development into a new individual. (B) Fluorescence light micrograph showing a portion of an amphibian lampbrush chromosome. The regions of the chromosome that are being actively expressed are stained green by using antibodies against proteins that process RNA during one of the steps of gene expression (discussed in Chapter 6). The round granules are thought to correspond to large complexes of the RNA-splicing machinery that will also be discussed in Chapter 6. (A, courtesy of Joseph G. Gall; B, courtesy of Joseph G. Gall and Christine Murphy.)

Szingulett alapállapotú elektronok átmenetei:

↑ abszorpció ↓ emisszió



Izolált molekulákban az energiátmenetek széles variációja lehetséges

Átmenetek fajtái:

- sugárzásos (nem izolált molekulák)
- sugárzás nélküli

Biológiai rendszerekben:

Nem izolált molekulák

Lumineszcencia a legalacsonyabb energiájú gerjesztett állapotból történik - *Kasha-szabály*

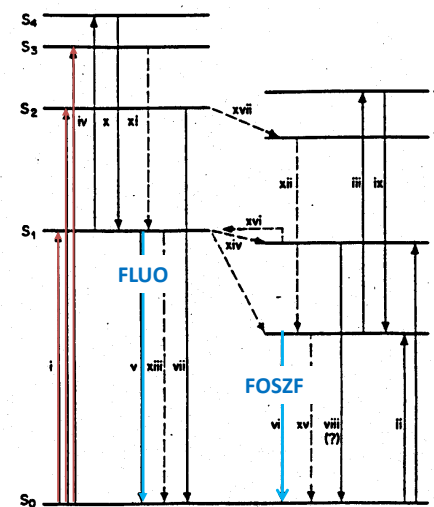


Figure 2.1 Unimolecular photophysical processes. Solid lines, radiative transitions; broken lines, radiationless transitions

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

1. Kötött elektronok állapotai és energiái – hullámfüggvény leírás

$$E_{reljes} = \frac{1}{2}mv^2 + V(x) = \frac{p^2}{2m} + V(x)$$

Kvantummechanikai kép:

-- a megfigyelhető mennyiségeket operátorokkal helyettesítjük, amelyek kielégítik a Heisenberg-féle határozatlansági relációt

$$p(x) \text{ mint operátor: } \frac{\hbar}{i} \frac{d}{dx} \quad X - \text{operátor: } x\text{-el való szorzás}$$

$$\text{Heisenberg-féle határozatlansági reláció: } \hat{x}\hat{p} - \hat{p}\hat{x} = i\hbar$$

-- feltesszük, hogy az elektron-rendszer állapotát leírhatjuk egy hullámfüggvénnyel

$$\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \vec{r}_3, \vec{r}_4, \dots, t)$$

1.elektron

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

1. Kötött elektronok állapotai és energiái – hullámfüggvény leírás

Kvantummechanikai kép:

A megfigyelhető mennyiséget a megfelelő operátornak a rendszer egy hullámfüggvénnyel jellemzett állapotával képezett *várható értéként* adjuk meg.

$$\langle \hat{\Omega} \rangle = \frac{\int \psi^* \hat{\Omega} \psi d\tau}{\int \psi^* \psi d\tau} = \int \psi^* \hat{\Omega} \psi d\tau$$

ha $\hat{\Omega} \equiv \hat{H}$ és ψ sajátfüggvénye, akkor

$$\langle \hat{H} \rangle = E$$

Elektron-átmenetek *átmeneti reakciósebességét*, vagy *átmeneti valószínűségét* hasonló várható érték-képzéssel kapjuk meg.

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

1. Kötött elektronok állapotai és energiái – hullámfüggvény leírás

Elektron-átmenetek **átmeneti reakciósebessége**, vagy **átmeneti valószínűsége az elektromos dipól-operátor várható értékének négyzetével arányos**

$$P_{g \leftarrow a} \sim \left(\frac{\int \Psi_a^* \hat{\Omega} \Psi_g d\tau}{\int \Psi_a^* \Psi_g d\tau} \right)^2 = \left(\int \Psi_a^* \hat{\Omega} \Psi_g d\tau \right)^2$$

$$\hat{\Omega} \equiv \hat{\mu} \equiv \sum q_e z_i \vec{r}_i = q_e \left(\sum \vec{r}_{i,e} - \sum z_j \vec{r}_{j,mag} \right)$$

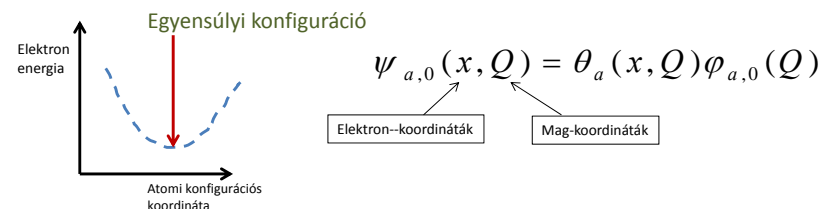
Elektromos dipólus - operátor

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

2. Molekula-pályák – Born-Oppenheimer közelítés

A Schrödinger-egyenletet molekulák esetén nem lehet megoldani.

B.- O. közelítés: az elektronok állapotait rögzített atommagok terében határozzuk meg



Az átmeneti valószínűség meghatározásakor az elektron- és a mag-koordinátáktól függő rész szorzat formájában különválasztható

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

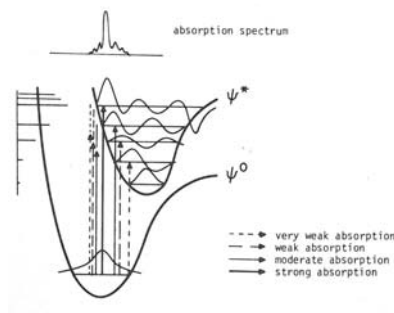
3. Az átmeneti momentum

$$M_{gn \leftarrow a0} = \langle \hat{\mu} \rangle$$

$$M_{gn \leftarrow a0} = \overline{M}_{g \leftarrow a} * \langle \phi_{a0} | \phi_{gn} \rangle = \overline{M}_{g \leftarrow a} * S_{a0,gn}$$

Tiszta elektronátmenet

Franck-Condon átfedési integrál



Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

3. Az átmeneti momentum

$$M_{gn \leftarrow a0} = \langle \hat{\mu} \rangle$$

$$M_{gn \leftarrow a0} = \overline{M}_{g \leftarrow a} * \langle \phi_{a0} | \phi_{gn} \rangle = \overline{M}_{g \leftarrow a} * S_{a0,gn}$$

Tiszta elektronátmenet
Összes vibronikus

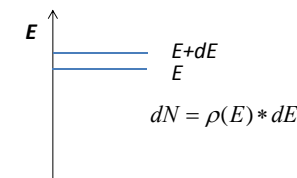
Franck-Condon átfedési integrál

Az elektron-gerjesztés átmeneti reakciósebessége:

$$W_{g \leftarrow a} = \frac{dP_g}{dt} = k * |\overline{M}_{ag}|^2 \rho(v_{ag})$$

Energia-állapot-sűrűség

Spin-állapotok figyelembevétele



Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

4. Einstein valószínűségek , emissziós átmenetek:

Gerj.: $B_{a,g}$, Ind. Em.: $B_{g,a}$ Spont.em.: A_{ga}



$$W_{a \leftarrow g} \text{ (spontán emisszió) } = A_{a \leftarrow g}$$

$$W_{a \leftarrow g} \text{ (spontán és indukált emisszió) } = A_{a \leftarrow g} + B_{a \leftarrow g} * \rho$$

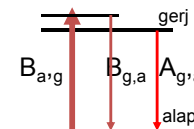
$$A_{a \leftarrow g} = 8\pi \times h \times \nu_{a \rightarrow g}^3 n^3 c^{-3} B_{g \rightarrow a}$$

$$B_{g \leftarrow a} = B_{a \leftarrow g} = k * M_{a \rightarrow g}^2$$

Abszorpciós és emissziós átmenetek kapcsolata

4. Einstein valószínűségek \rightarrow kapcsolat az emissziós és abszorpciós spektrumok között

Gerj.: $B_{a,g}$, Ind. Em.: $B_{g,a}$ Spont.em.: A_{ga}



$$A_{g \rightarrow a} = 8\pi \times h \times \nu_{a \rightarrow g}^3 n^3 c^{-3} B_{g \rightarrow a}$$

Abszorpciós spektrum

$$\sim \int F(\nu) d\nu$$

Fluoreszcencia spektrum

$$\propto \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu}$$

Az abszorpciós és emissziós spektrumok görbe alatti területei egymásból kiszámíthatók, ha nincs külső energiáttranszfer

Abszorpciós spektroszkópia

Alapja a Beer-Lambert törvény

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) * c * x$$

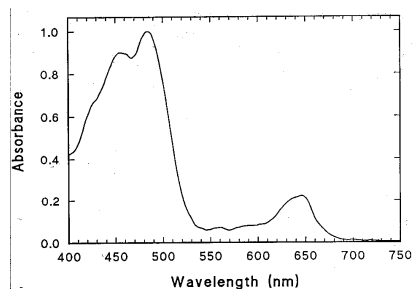
Híg oldatok elnyelőképessége (A) lineárisan függ a moláris koncentrációtól
követta rétegvastagsága

Abszorbanca
Optikai Denzitás

moláris konc.

moláris extinkció

Molekuláris szerkezetvizsgálat



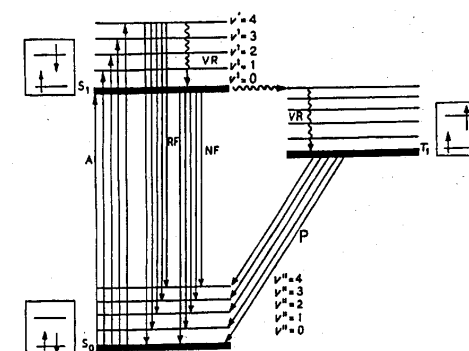
Az a-g átmeneti valószínűség az összes vibrációs állapotokat tekintve

multiplicitás

$$k_{spin} * |M_{a \rightarrow g}|^2 = const. \int \frac{\varepsilon(\nu)}{\nu} d\nu$$

$$\nu = \frac{1}{\lambda} \text{ hullámszám}$$

Emlékeztető: molekulákban elektron-vibrációs átmenetek



Gerjesztési átmenet valószínűsége → Kiválasztási szabályok →
→ oszillátor erő

$$f = 4.3 \cdot 10^{-9} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) \cdot d\tilde{\nu}$$

oszillátor erő
SI egységben, dimenzió nélküli szám

$$f = \frac{4\pi m_e \nu_{ag}}{3q_e^2 \hbar} |M_{ag}|^2$$

$$hf = \text{fotonenergia (eV)} = 12345/\lambda(\text{\AA})$$

$$\text{Hullámszám (cm}^{-1}\text{)} = (1/\lambda(\text{nm})) \cdot 10^7$$

pl. Vibrációk energiája
100 – 2000 cm⁻¹

| | f | ε |
|--------------------|------------------|----------------------------------|
| megengedett | 1 | 10 ⁴ -10 ⁵ |
| spin tiltott | 10 ⁻⁵ | 10 – 10 ² |
| szimmetria tiltott | 10 ⁻¹ | 10 ³ |

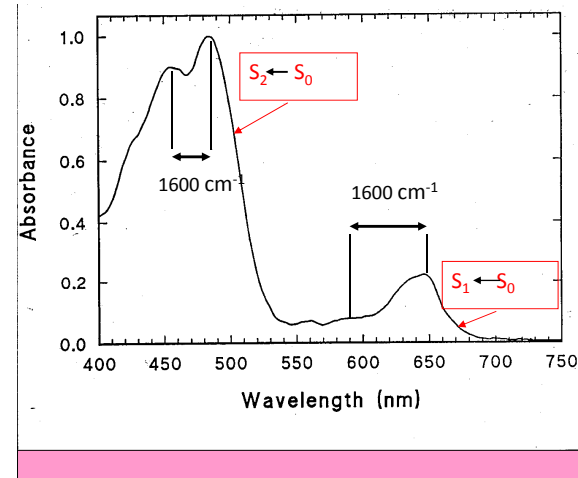
Egy példa

$$hf = \text{fotonenergia (eV)} = 12345/\lambda(\text{\AA})$$

$$\text{Hullámszám (cm}^{-1}\text{)} = (1/\lambda(\text{nm})) \cdot 10^7$$

pl. Vibrációk energiája
100 – 2000 cm⁻¹

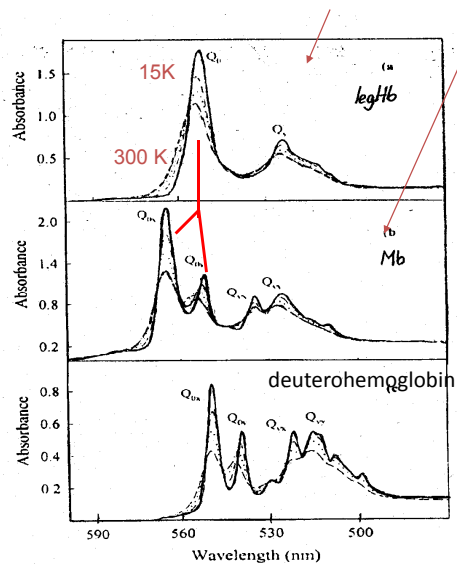
Kloroplaszt spektruma



Elektronátmenetek és
molekuláris rezgések
gerjesztése

„vibronikus”
átmenetek

Nikotin komplexek----- hemoglobin és mioglobin hemcsoportjai

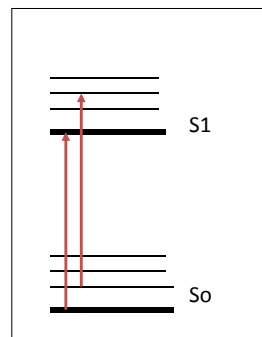


A kromofór azonos,
a ligandum-kötés és
a fehérjekörnyezet
más

A hemoglobin S1
elektronállapota
a mioglobinban
két nívóra hasad

Hőmérséklet hatása:
T csökken →
→ felbontás nő

Alacsony hőmérsékletű spektrumok



Boltzmann eloszlás

$$\frac{N_2}{N_1} = e^{\frac{-\Delta\varepsilon}{kT}}$$

A hőmérséklet csak az állapotok
betöltöttségét befolyásolja,
az energiaállapotokat nem

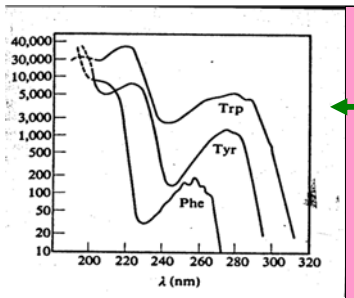
de a felbontás nő

Szobahőmérsékleten $kT \sim 100 \text{ cm}^{-1} \leftrightarrow \Delta\varepsilon(\text{vibr.}) \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$
alapállapotban a legalacsonyabb vibrációs állapot
valósul meg

Abszorpció → gerjesztett állapot vibrációs „envelope” -ja

Gyakorlati szempontok

Kromofórok szövetekben

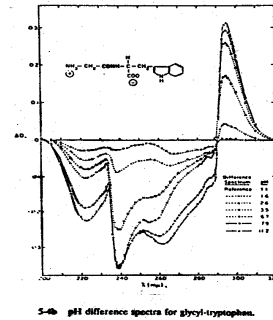


Aromás aminosavak: Trp, Tyr, Phe
 $\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetek, UV-ben

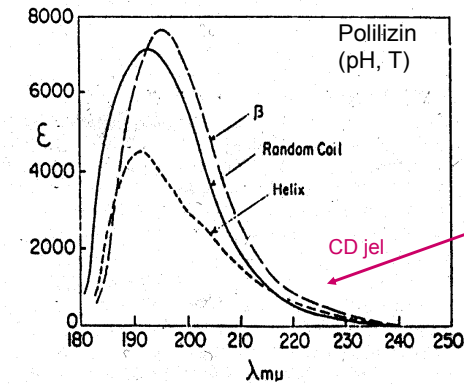
Trp spektrális változása a pH-val
 Differencia Abszorpció módszer

Tyr spektrum igen érzékeny a fenol-ionizációra

| | |
|--------------------|-----------------|
| | ϵ |
| Megengedett | 10^4 - 10^5 |
| Spin tiltott | 10 - 10^2 |
| Szimmetria tiltott | $\sim 10^3$ |



Érzékenység az aminosavak konformációs környezetére



Peptidkötés:

O, C, N ~ delokalizált π elektronok

$\pi \rightarrow \pi^*$ átmenetek ~ farUV absz.

O atom $n \rightarrow \pi^*$ ~

His (imidazol),
 Cisztein, Metionin

UV: 200-220 nm

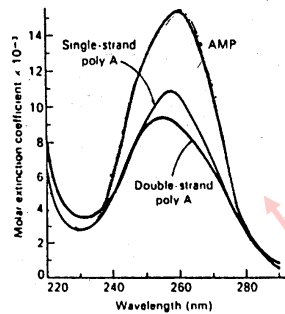
Aromás aminosavak: Phe (257 nm) Tyr (274 nm) Trp (280 nm)

Konformációs érzékenység: Trp/Tyr sáv „vörös” eltolódása poláros környezetben – diff. spektroszkópia

Near UV

Hipokróm effektus nukleinsavakban

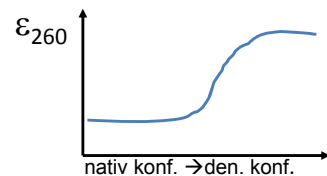
UV
 ~ 260 nm



Egymás feletti nukleotid bázisok delokalizált π -rendszereinek van der Waals kölcsönhatása

„stacking” kölcsönhatás

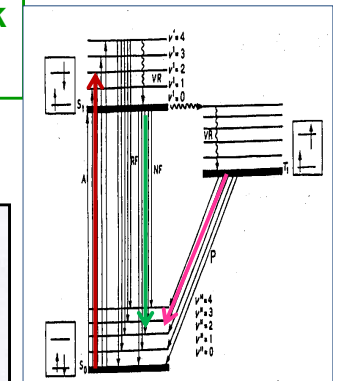
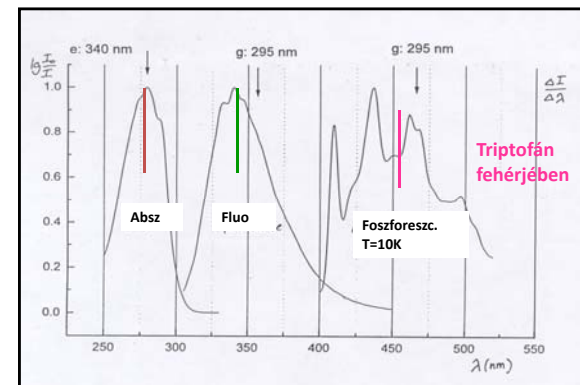
- moláris extinkció (ϵ) csökken
- sáveltolódás



Emissziós jelenségek, jellemzők

1. Az emissziós spektrum

Fluoreszcencia
 Foszforeszcencia



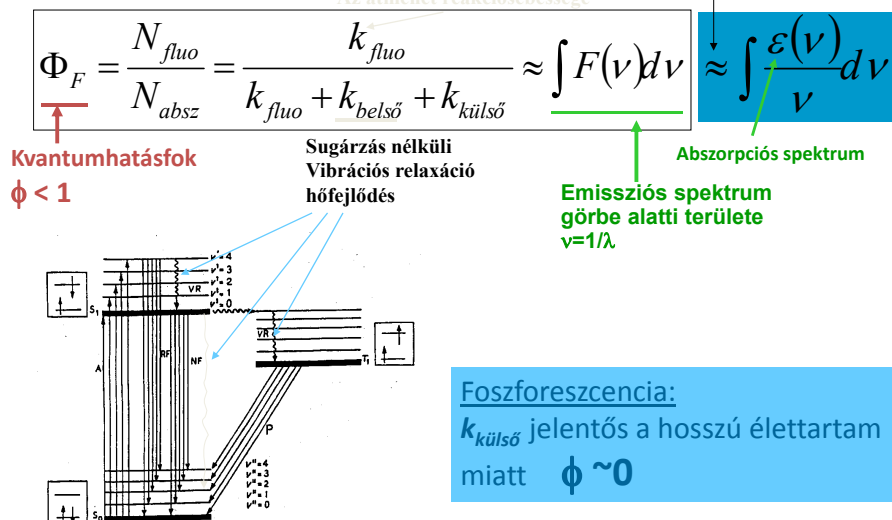
Vibrációs relaxáció

$$\lambda_{\text{foszf}} > \lambda_{\text{fluo}} > \lambda_{\text{absz}}$$

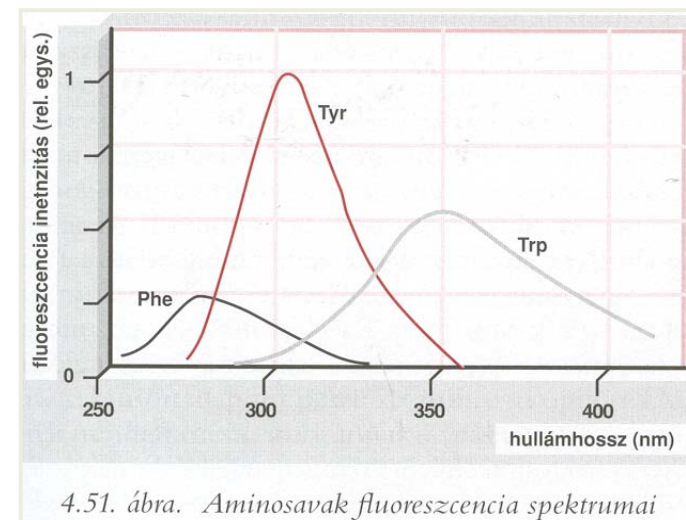
Stokes-féle eltolódás
 Kasha-szabály

A fluoreszcencia jellemzői

2. A kvantumhatásfok



Általában a molekulák kvantumhatásfoka kicsi :
igen kevés fajta molekula fluoreszkál



A szövetekben előforduló natív fluorofórok paraméterei:

Triptofán és NADH Kiemelkedő paraméterek

| Substance | Conditions | Absorption | | Fluorescence | | Sensitivity | |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------|--|
| | | λ_{max} (nm) | ϵ_{max} x 10^{-3} | λ_{max} (nm) | Φ_F | τ_F (nsec) | $\epsilon_{\text{max}} \cdot \Phi_F$ x 10^{-2} |
| Tryptophan | H ₂ O, pH 7 | 280 | 5.6 | 348 | 0.20 | 2.6 | 11. |
| Tyrosine | H ₂ O, pH 7 | 274 | 1.4 | 303 | 0.14 | 3.6 | 2.0 |
| Phenylalanine | H ₂ O, pH 7 | 257 | 0.2 | 282 | 0.04 | 6.4 | 0.08 |
| Y base | Yeast tRNA ^{Phe} | 320 | 1.3 | 460 | 0.07 | 6.3 | 0.91 |
| Adenine | H ₂ O, pH 7 | 260 | 13.4 | 321 | 2.6×10^{-4} | <0.02 | 0.032 |
| Guanine | H ₂ O, pH 7 | 275 | 8.1 | 329 | 3.0×10^{-4} | <0.02 | 0.024 |
| Cytosine | H ₂ O, pH 7 | 267 | 6.1 | 313 | 0.8×10^{-4} | <0.02 | 0.005 |
| Uracil | H ₂ O, pH 7 | 260 | 9.5 | 308 | 0.4×10^{-4} | <0.02 | 0.004 |
| NADH | H ₂ O, pH 7 | 0 | 6.2 | 470 | 0.019 | 0.40 | 1.2 |

Emisszió reakciósebessége

$$k_F = 1/\tau_F$$

A gerjesztett állapot élettartama τ_F

Érzékenység:

50 molekula/ μm^3

Erős jel sötét háttéren

szövetekben igen gyenge

A natív fluoreszcencia

+ $k_{\text{kölcs}}$ $\rightarrow \Phi$ kicsi.

A VIS-ben elnyelő molekulák (pl. Hb) nem fluoreszkálnak

Fluoreszcens jelzés biológiai mintákon

A környezet nem fluoreszkál \longleftrightarrow szelektív kötés
* a fluoreszcencia külső (delokalizált) elektronpályáról történik \rightarrow érzékenység a környezeti perturbációkra

* protonáltság – pH érzékeny próbák

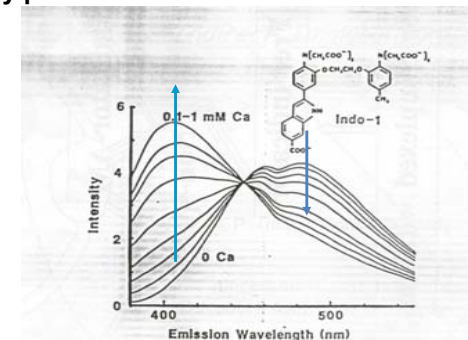
* polaritás – pl. Trp jel érzékenysége a vizes környezetre

* ionok megkötése – Ca- érzékeny próbák

* membránpotenciálra érzékeny próbák

KALCIUM ÉRZÉKENY FESTÉKEK

| Festék | Excitáció | Emisszió |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| • INDO-1 | E_{ex} 350 | E_{em} 405/480 |
| • QUIN-2 | E_{ex} 350 | E_{em} 490 |
| • Fluo-3 | E_{ex} 488 | E_{em} 525 |
| • Fura -2 | E_{ex} 330/360 | E_{em} 510 |



Lumineszcencia jellemzők

3. A gerjesztett állapot élettartama és kapcsolata a kvantumhatásfokkal

A gerjesztett elektronállapotok időben lecsengenek → az elektron visszatér alapállapotába

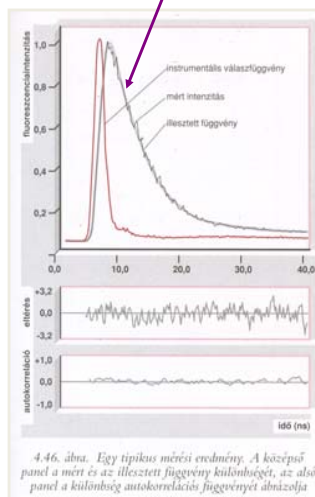
N_0 : $t=0$ –ban a gerjesztett molekulák száma

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad \tau_{\text{fluo}} \sim \text{ns} \quad \text{"mért élettartam"}$$

Mikroszkópia:

A molekuláris környezet a **spektrumot nem**,
De az **élettartamot befolyásolja** →
szinkronizálás τ szerint

Impulzus gerjesztés
után mért emisszió



$$\Phi_F = \frac{N_{\text{fluo}}}{N_{\text{absz}}} = \frac{k_{\text{fluo}}}{k_{\text{fluo}} + k_{\text{belső}} + k_{\text{külső}}} = k_{\text{fluo}} \frac{1}{k_{\text{fluo}} + k_{\text{belső}} + k_{\text{külső}}} = k_{\text{fluo}} \tau = \frac{\tau}{\tau_0}$$

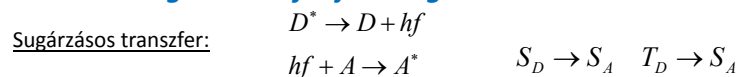
Szintillátorok: nagy az emissziós kvantumhatásfok
nagy a **belső sugárzásos átmenet reakciósebessége**

Reaktív csoportok → nagy $k_{\text{külső}} \rightarrow \tau$ rövid → Φ kicsi

Foszforeszcencia: $S \rightarrow T$ átmenet tiltott, $k_{\text{emisszió}}$ kicsi $\sim 10^3 \text{s}^{-1}$
és $k_{\text{külső}}$ általában $\sim 10^9 \text{s}^{-1} \rightarrow \Phi \sim 10^{-6}$

A sugárzásos átmenettel versengő folyamatok $k_{\text{külső}} = ?$

1. Triviális energia-transzfer jelenségek



$$k \sim \frac{1}{R_{AB}^2} \bar{q}_D [A] \int \epsilon_A(f) \times F_D(f) df$$

J - spektrális átfedési integrál

Ütközéses transzfer:

ütközés: elektron-felhők átfedése – elektron-kicserélődés
Dexter-elmélet



ha minden ütközés transzferhez vezet:

$$k = k_{\text{diff}} \times c_A$$

általánosan:

$$k_{ET} = \text{konst} \times J \times e^{-\frac{2R_{DA}}{L}}$$

D-A van der Waals rádiusza

Töltésátviteli komplexek

Ütközéses kioltás – Stern-Volmer egyenlet

$$\Phi_{F,Q} = \frac{k_{\text{fluo}}}{k_{\text{fluo}} + k_{\text{belső}} + k_{\text{külső}}} = \frac{k_{\text{fluo}}}{k_{\text{fluo}} + k_{\text{belső}} + k_q [Q]}$$

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{F,Q}} = 1 + k_q \frac{1}{k_{\text{fluo}} + k_{\text{belső}}} [Q]$$

τ élettartam quencher nélkül

Ütközési valószínűség

2. Nem-triviális energia-transzfer jelenségek

Sugárzás nélküli kicserélődési kölcsönhatások: $S \leftrightarrow S$ $T \leftrightarrow T$

mint az ütközések, de C_{ompl} * igen rövid életű
 pl. ha nagy viszkozitással kizárjuk az ütközéseket
 mindkettőnél spin-megmaradás
 rövid hatótávolság

Coulomb-kölcsönhatás alapján:

dipól-dipól kölcsönhatás egy donor abszorpció és egy akceptor emissziós átmeneti momentuma között – gyenge kölcsönhatás →

→ Föster típusú rezonancia-energia transzfer: FRET

Föster típusú rezonancia-energia transzfer: FRET

Kölcsönhatási energia:

$$V = \kappa |\mu_D| |\mu_A| \frac{1}{R^3}$$

$$\kappa = \cos \phi_{M(D), M(A)} - 3 \cos \phi_{M(D), R(D,A)} \cos \phi_{M(A), R(D,A)}$$

Fermi-féle aranyszabály: az átmeneti valószínűség arányos a kölcsönhatási energia várható érték-négyzetének és az energia-sűrűségnek szorzatával

$$k_T \sim \left| \langle \psi_{Da} \psi_{Ag} | \hat{V} | \psi_{Dg} \psi_{Aa} \rangle \right|^2 \rho(E)$$

$$k_T = \left(\frac{\kappa}{R^3} \right)^2 \left| \langle \psi_{Da} | \hat{\mu}_D | \psi_{Dg} \rangle \right|^2 \left| \langle \psi_{Ag} | \hat{\mu}_A | \psi_{Aa} \rangle \right|^2$$

$$k_T = \text{konst} \frac{\kappa^2 * \phi_D}{n^2 * \tau_D * R^6} \int \epsilon_A(\nu) F_D(\nu) \nu^{-4} d\nu$$

Az orientációs faktor

$$\kappa^2 = 4 \quad \uparrow \uparrow$$

$$\kappa^2 = 1 \quad \uparrow \downarrow$$

$$\kappa^2 = 0 \quad \uparrow \rightarrow$$

$$\bar{\kappa}^2 = 2/3 \quad \text{D és A szabad, gyors Brown mozgást végeznek}$$

$$\kappa^2 = 0.475 \quad \text{Véletlenszerű orientációval merev dipólusok}$$

A kritikus távolság: R_0

ha k_T egyenlő az összes többi deaktiváló folyamat k -jával

Energiatranszfer hatásfoka:

$$E = \frac{k_T}{k_T + \frac{1}{\tau_D}} \quad \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} = 1 - E$$

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R_{DA}^6} \quad \longrightarrow$$

$$k_T(R_0) = \frac{1}{\tau_D}$$

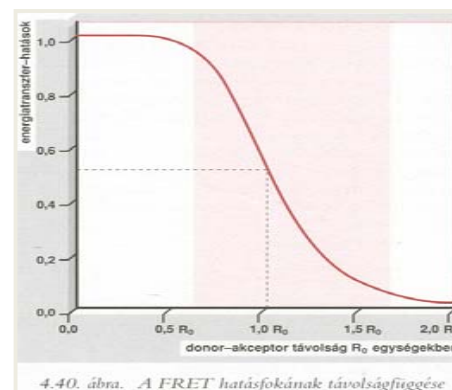
$$\longrightarrow k_T = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

D—A távolság mérése

Az A molekula D által gerjesztett

emissziójának - ENERGIATRANSZFERNEK hatékonysága

$$E = 1 - \frac{\Phi_{D/A}}{\Phi_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6}$$



Donor és akceptor
Spektrumokból számítható

Távolságmérés
 $5 < R < 10 \text{ nm}$

A fluoreszcencia jellemzői

4. Az emisszió polarizáció-foka

A molekulák gerjesztésekor elektronállapotváltozás → töltéseltolódás

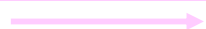
Dipólus vektorral jellemezhető: 'átmeneti momentum'

Függ a molekula szerkezetétől

pl. triptofán: a molekula síkjában

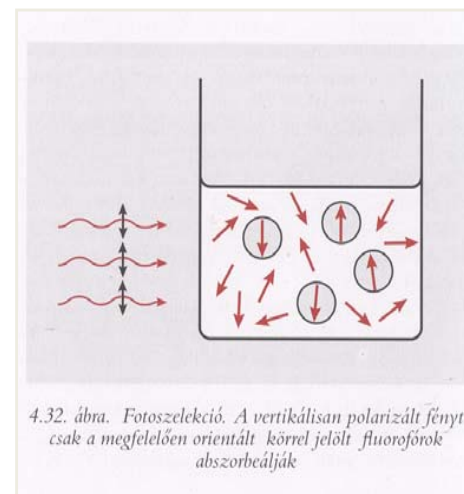
Fotoszelekció: poláros fény elektromos térerősség vektora azokat az elektronokat gerjeszti, ahol az átmeneti momentum és a térerősség vektor iránya (közelítőleg) megegyezik

Polarizált gerjesztés



Álló molekula

Polarizált emisszió



4.32. ábra. Fotoszelekció. A vertikálisan polarizált fényt csak a megfelelően orientált körrel jelölt fluorofórok abszorbeálják

Az emisszió polarizációfokának (p) mérése

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

V vertikális

polarizáció

H horizontális

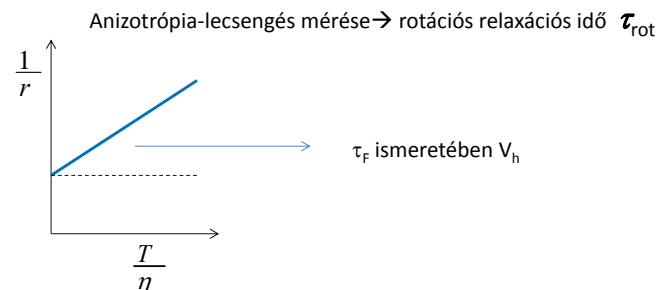
Ha a molekula a gerjesztett állapot ideje alatt **elfordul** →
az emisszió polarizációja csökken
 Beágyazó környezet (plazmamembrán) **fluiditásának** jellemzése

Polarizáció helyett anizotrópia (r) praktikusabb mennyiség

$$r = \frac{2p}{3-p}$$

$$r = r_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad \tau_{rot} = \frac{V_h * \eta}{kT} \quad \bar{r} = r_0 \frac{1}{1 + \frac{\tau_F}{\tau_{rot}}}$$

Perrin-egyenlet



Energia-transzfer jelenségek

Osztályozásuk

transzfer: inter-molekuláris

migráció: intra-molekuláris

radiatív ↔ non-radiatív

triviális ↔ nem-triviális

Donor – akceptor párok

D

A

Karl Bo^o rjesson,[†] Søren Preus,[‡] Afaf H. El-Sagheer,[§] Tom Brown,[§] Bo Albinsson,[†] and L. Marcus Wilhelmsson*,[†]: **Nucleic Acid Base Analog FRET-Pair Facilitating Detailed Structural Measurements in Nucleic Acid Containing Systems**, *JACS* **2009**, *131*, 4288–4293

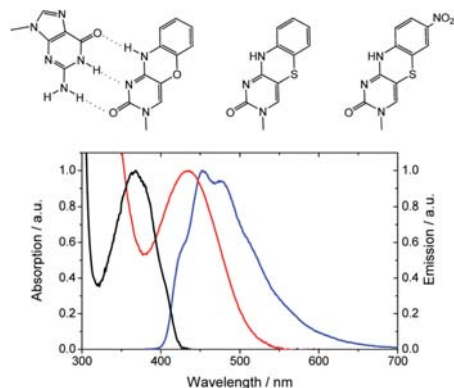


Figure 1. Top: Structure of G-tCO base pair (left), fluorescent cytosine analog tC (middle), and newly developed cytosine analog tCnitro (right). Bottom: Representative normalized absorption (black) and emission (blue) spectra of FRET donor tCO and absorption spectrum (red) of virtually nonfluorescent acceptor tCnitro within dsDNA showing the donor/acceptor spectral overlap. Measurements performed at 22 °C in 25 mM phosphate buffer (pH 7.5) and [Na⁺] 100 mM.

$$R_0 = 0.211(JDA\kappa / 2n^4D)^{1/6}$$

$$\kappa = \mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{e}_2 - 3(\mathbf{e}_1 \cdot \mathbf{e}_{12})(\mathbf{e}_{12} \cdot \mathbf{e}_2)$$

The efficiency of energy transfer is also governed by the Förster critical distance, R_0 , (eq 2; at which the E is 0.5) which in turn depends on the quantum yield of the donor (ϕ_D), the donor/acceptor spectral overlap integral (JDA), the refractive index of the medium (n), and importantly the geometric factor (κ).

The geometric factor takes the direction of the donor and acceptor transition dipoles into consideration and is described by eq 3:

where \mathbf{e}_1 and \mathbf{e}_2 are the unit vectors of the donor and acceptor transition dipoles and \mathbf{e}_{12} the unit vector between their centers. The value of κ^2 can range from 0 to 4. Thus, to be able to extract detailed structural information from the measured FRET efficiency, an accurate estimate of κ^2 is required. Such estimates of κ^2 are rarely available due to the lack of knowledge of orientation of the donor or acceptor molecules themselves and/or their interacting transition dipole moments.⁷ The most frequently used (both correctly and incorrectly) κ^2 is 2/3, which corresponds to freely rotating donor and acceptor transition dipoles.

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + RDA)$$

6) (1)