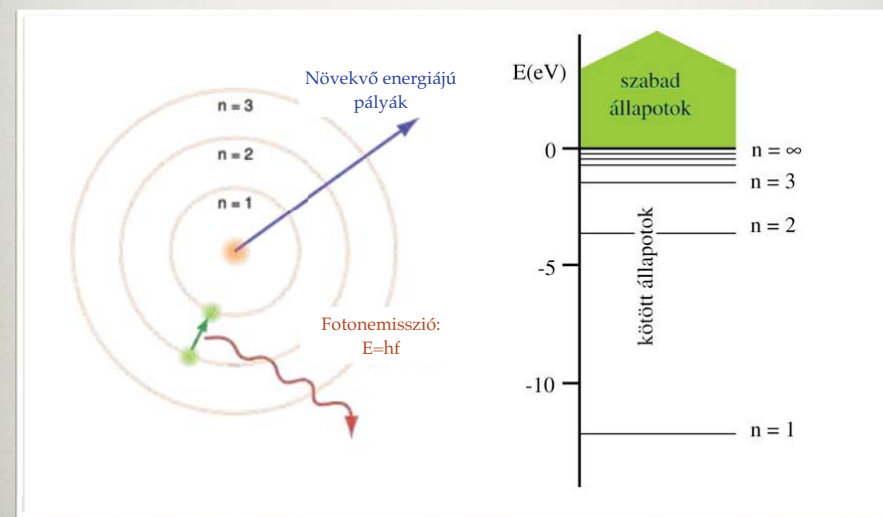


FEHÉRJÉK SZERKEZETVIZSGÁLÓ MÓDSZEREI

LUMINESZCENCIÁS TECHNIKÁK

KELLERMAYER MIKLÓS

ÁTOMSZERKEZET



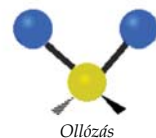
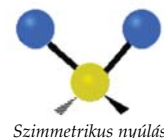
MOLEKULASZERKEZET

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



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

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



MOLEKULA ENERGIÁJA

Born-Oppenheimer - közelítés:

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

Fontos megjegyzések:

Energia állapotok egymástól függetlenek (csatolás elhanyagolható)

Állapotok energianívói kvantáltak

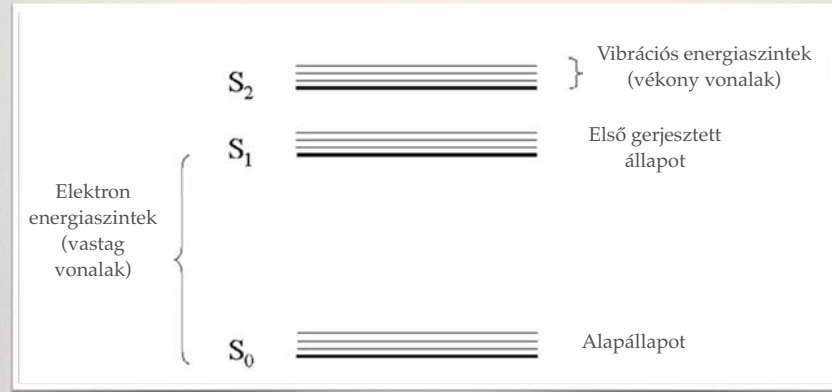
Átmenetek energia "csomag" elnyelésével/kibocsátásával járnak

Energiaszintek közötti különbségek nagyságrendje különbözik:

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

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

ENERGIA ÁLLAPOTOK ÁBRÁZOLÁSA



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

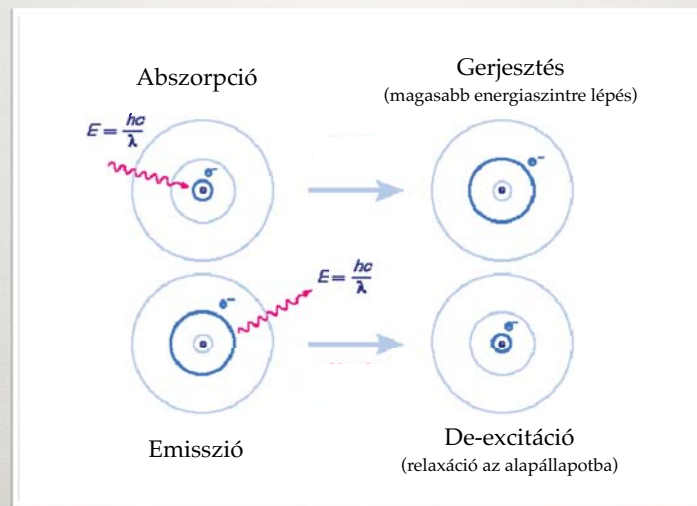
T: triplett állapot; azonos spinű "párosított" elektronok



LUMINESZCENCIA

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

A LUMINESZCENCIA LÉPÉSEI



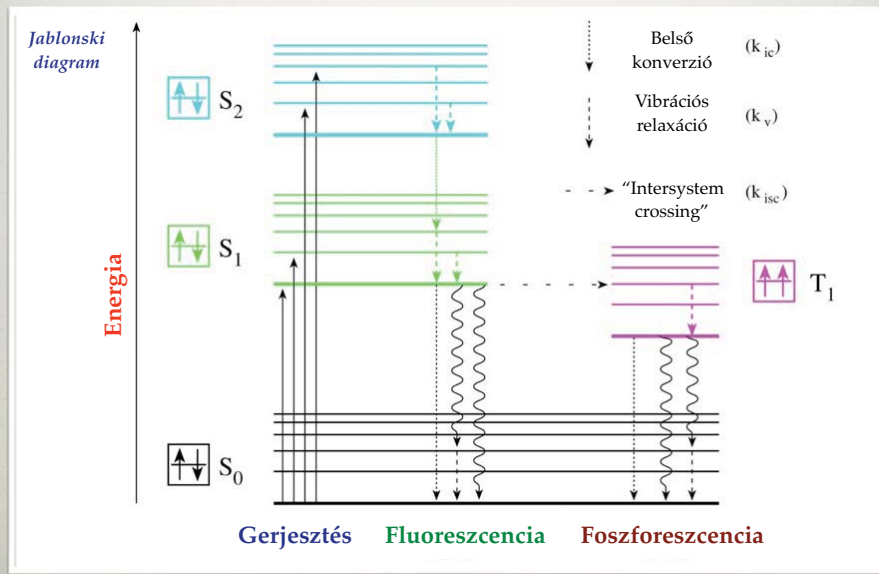
A LUMINESZCENCIA TÍPUSAI

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

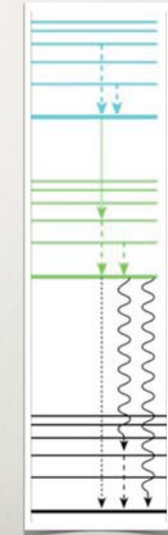


KASHA-SZABÁLY

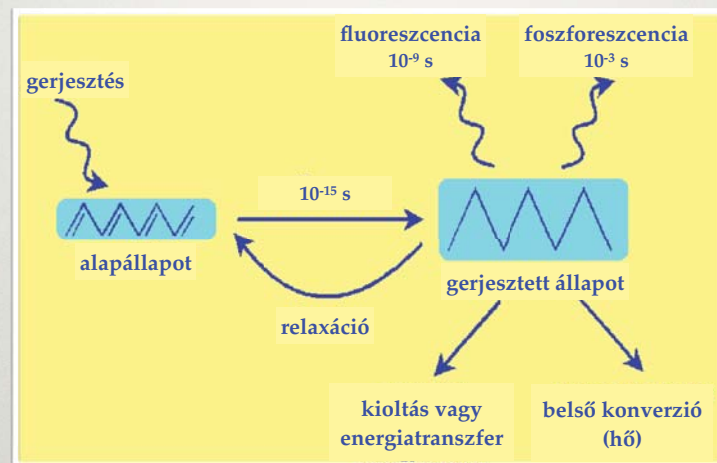
Fotonemisszió (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) a legalacsonyabb elektron-energiaállapotból történő átmenet során lép fel.



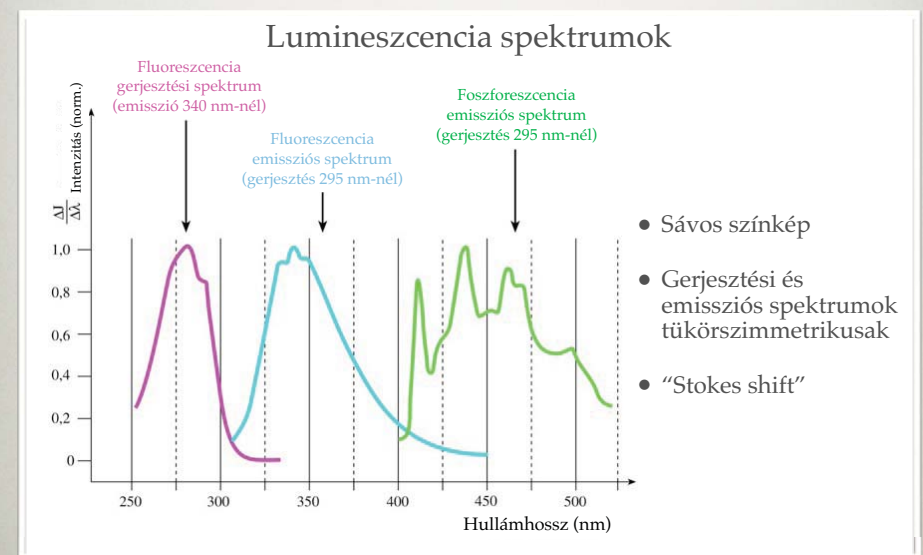
Michael Kasha (1920-)
Amerikai fizikus



AZ ÁTMENETEK SEBESSÉGE



A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI I.



A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI II.

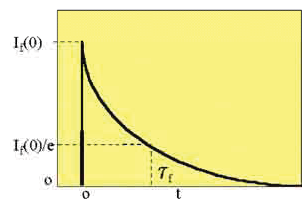
Kvantumhatásfok

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

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

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

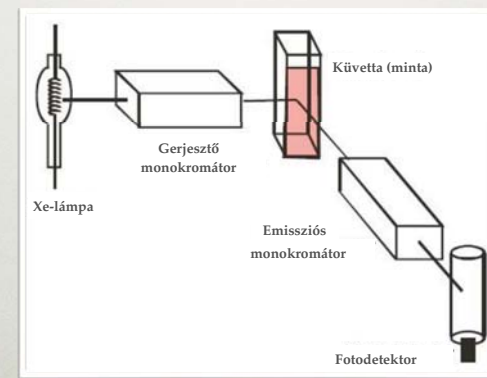
k_f = fluoreszcencia sebességi állandó

k_{nr} = nem-sugárzásos átmenetek sebességi állandója

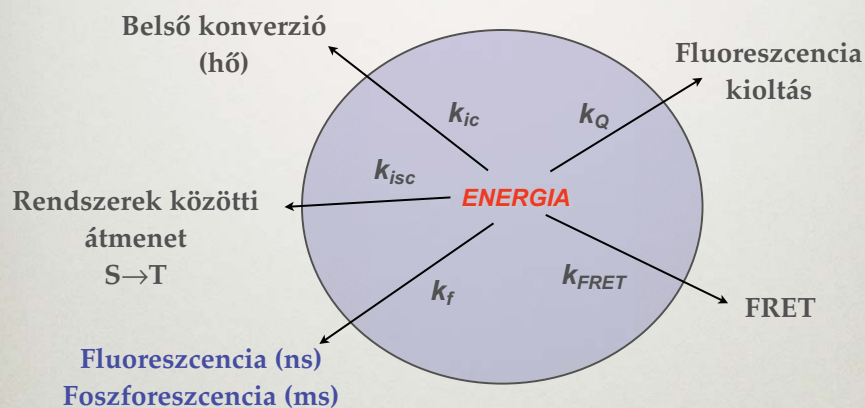
τ = fluoreszcencia élettartam

A FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

Fluoreszcencia spektrométer ("Steady-state" spektrofluoriméter)



GERJESZTÉS SORÁN ELNYELT ENERGIA SORSA



Sugárzásos v. nem sugárzásos átmenetek!

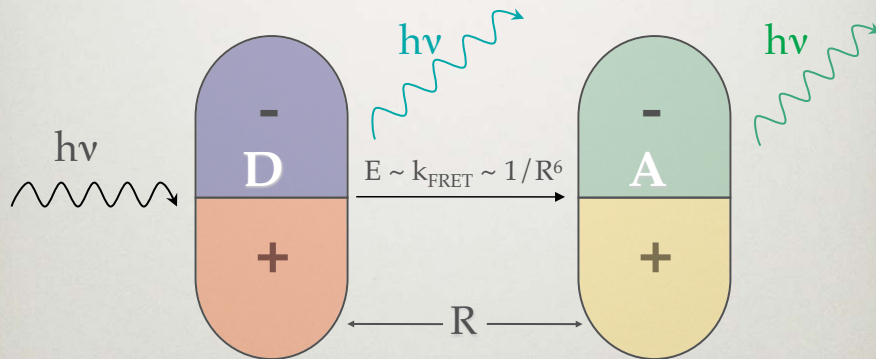
FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER

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.

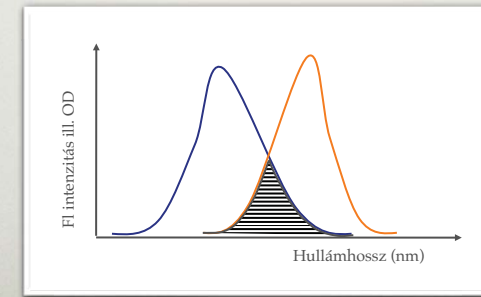
FRET

- A gerjesztett donor relaxációjához hozzájárul az akceptor molekula emissziója!

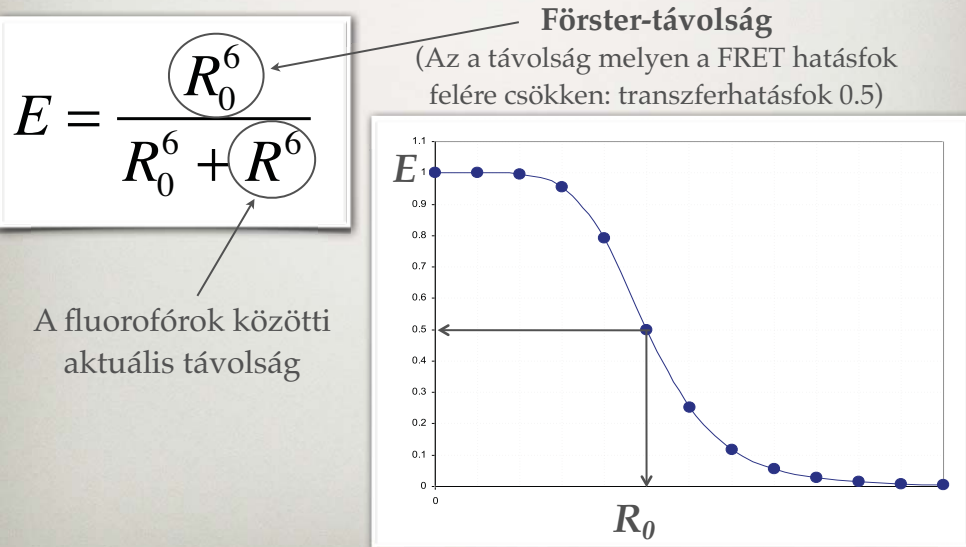


A FRET FELTÉTELEI

- 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

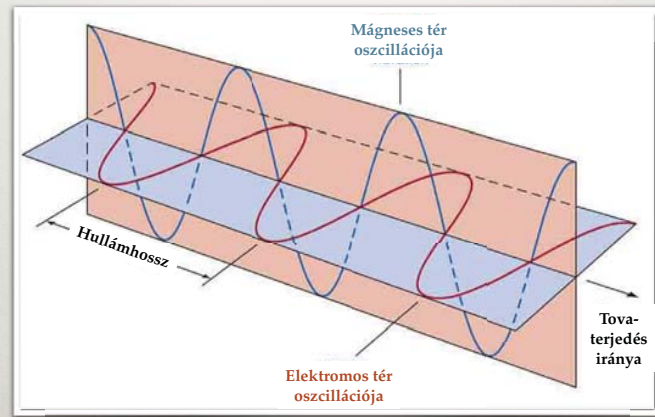


A FRET ALKALMAZÁSA

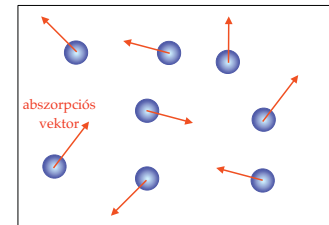
- Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es (10^{-9}m) tartományban.
- Nagyon érzékeny!
- Alkalmazás:**
 - Molekulák közötti *kölcsönhatások* tanulmányozása.
 - Molekulákon belüli *szerkezeti* változások tanulmányozása.

A FÉNY ELEKTROMÁGNESES HULLÁM

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



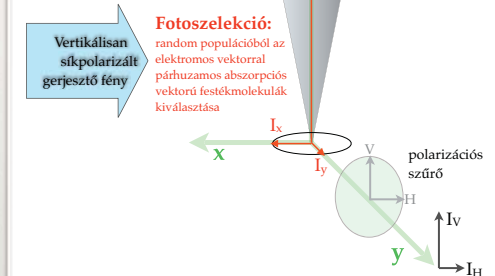
POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA



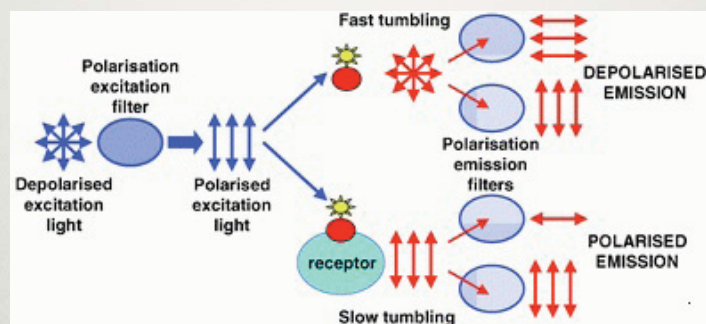
Fluorofórokhoz rendelhető **abszorpciós és emissziós vektor**: megszabja a foton abszorpció és emisszió valószínűségét.

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

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



POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA

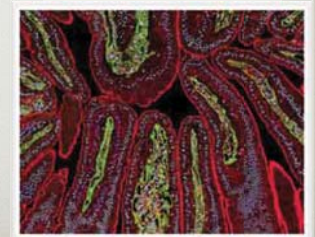
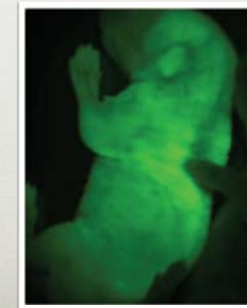
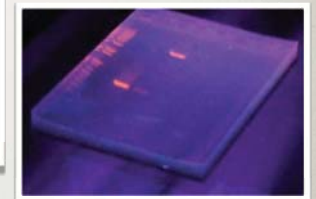
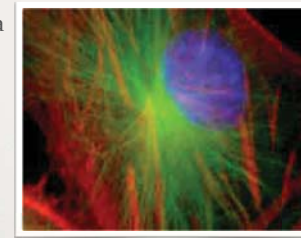


Polarizáció:
$$p = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

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

A FLUORESZCENCIA ORVOSI-BIOLÓGIAI ALKALMAZÁSAI

- Fluoreszcencia mikroszkópia
- DNS szekvenálás (lánc terminációs módszer)
- DNS festés (EtBr)
- DNS microarray technológia
- Immunfluoreszcencia
- Fluoreszcencia-aktivált sejt válogatás (FACS)
- Förster rezonancia energia transzfer (FRET)
- "Fluorescence recovery after photobleaching" (FRAP)
- Fluoreszcens fehérje-konjugációs technikák
- Kvantum pontok (quantum dots)



Fehérje fluoreszcencia forrása

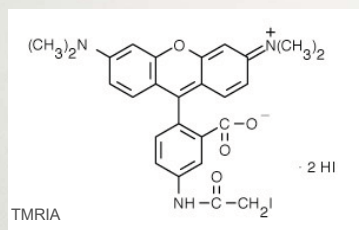
- **Intrinsic fluorofórok**
triptofán, tirozin
- **Extrinsic fluorofórok**
kívülről bevitt festékmolekulák,
"fluoreszcens jelölés"
kémiai specificitás?
térbeli specificitás?

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 (SH, NH₂)

Relatív térbeli specificitás

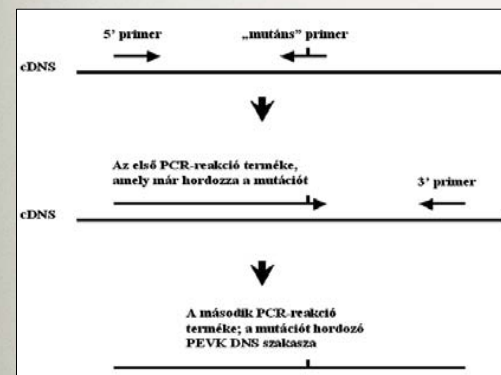
Lépések:

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

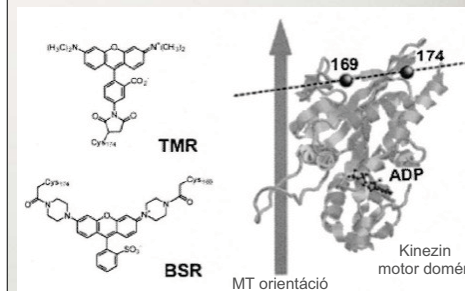
Fluoreszcens jelölési technikák

2. Célzott pontmutagenézis

Cisztein aminosav célzott elhelyezése



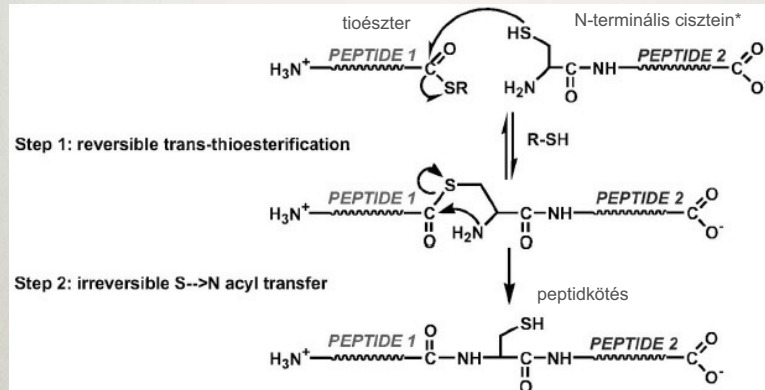
Bifunkcionális fluorofór



Fluoreszcens jelölési technikák

3. Peptid ligáció

Fehérje "összeállítása" szintetikus, fluoreszcensen jelölt peptidekből



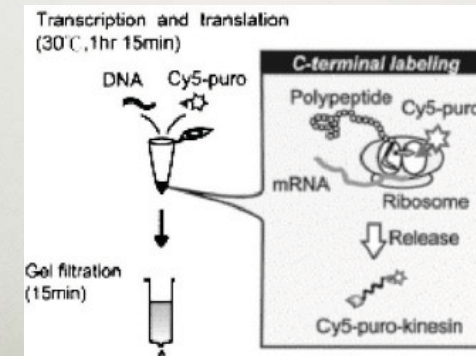
*Csak N-terminális cisztein vesz részt a reakcióban

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 β -hordó

Kromofór: a központi hélix Ser65-Tyr66-Gly67 oldalláncából

Fluoreszcencia 3D szerkezet intaktaságától 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

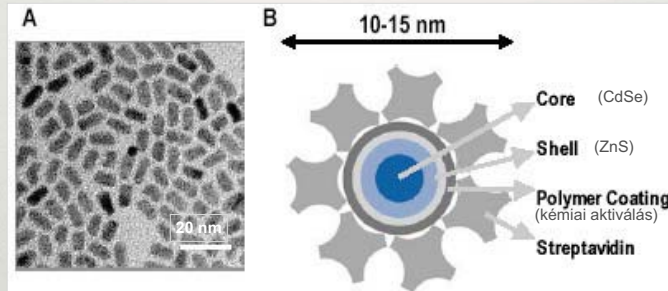
3. Fotoaktiválható GFP analóg

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

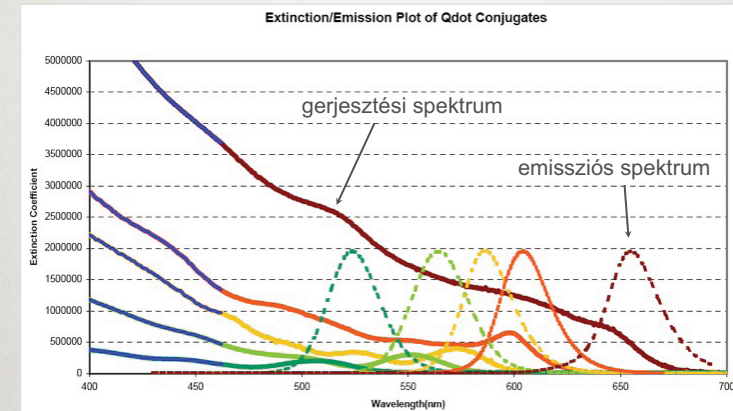
Fluoreszcens jelölési technikák

8. Kvantumpontok

Félvezető nanokristályok
Emissziós spektrum a méret függvénye



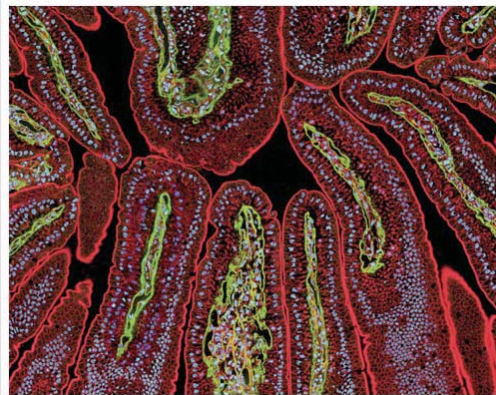
Kvantumpont jelölés



Előnyök:

- széles gerjesztési spektrum
- hangolható emissziós spektrum
- fotokifáradással 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')₂ anti-mouse IgG. Laminin was labeled with a rabbit anti-laminin polyclonal antibody and visualized using green-fluorescent Qdot 525 goat F(ab')₂ anti-rabbit IgG. Nuclei were stained with blue-fluorescent Hoechst 33342

LUMINESZCENCIÁN ALAPULÓ FÉNYERŐSÍTÉS: LÉZER

ALAPOK, TULAJDONSÁGOK, ALKALMAZÁSOK

LÉZEREK MINDENÜTT



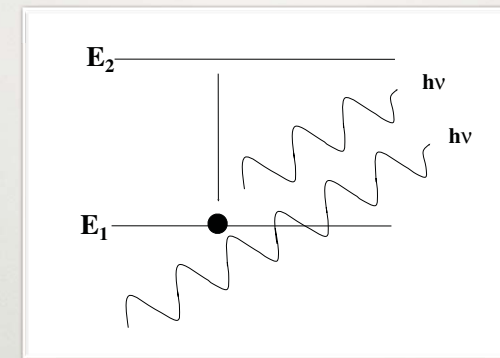
5 mW diódlézer
néhány mm



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-Schwickerather: első szemműtét fényvel.

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

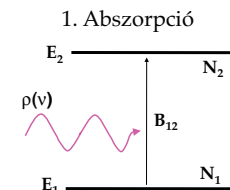
1970 - Arthur Ashkin: lézercsipesz

1971 - Gábor Dénes (Nobel-díj): holográfia

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

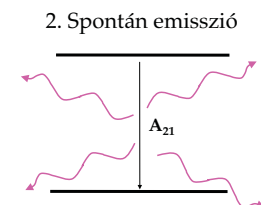
lézeres atomhűtés.

A LÉZER ALAPJAI I. INDUKÁLT EMISSZIÓ



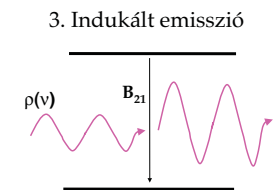
Átmenet gyakorisága:
 $n_{12} = N_1 B_{12} \rho(v)$

$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$
energikvantum
elnyelések.



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

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



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

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, $E_2 > E_1$

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

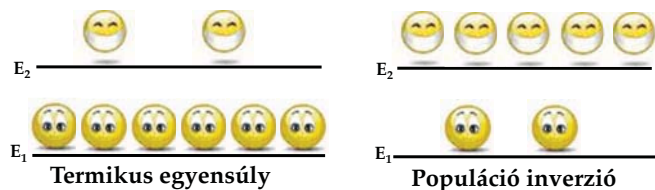
N_1, N_2 : adott energianívón levő atomok, molekulák száma

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

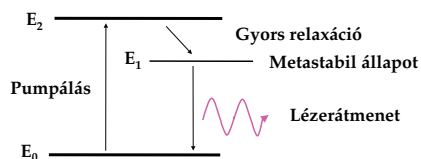
A LÉZER ALAPJAI II. POPULÁCIÓ INVERZIÓ

Fényerősítés az energianívók relatív betöltöttségétől függ

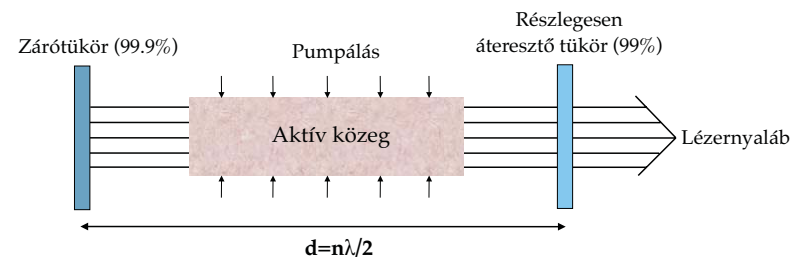
$$F \xrightarrow{\text{Aktív közeg}} F + dF \quad dF = FA(N_2 - N_1)dz$$



- 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 fénytjeljesítmény 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

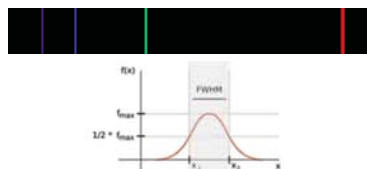
2. Nagy teljesítmény

Folytonos üzemmódban több tíz, akár száz W (pl. CO₂ lézer)
Q-csatolású üzemmódban a pillanatnyi teljesítmény hatalmas (GW)
Kis divergencia miatt óriási térbeli teljesítménysűrűség

3. Kis spektrális sáv szélesség

"Monokromaticitás"

Nagy spektrális energiasűrűség



4. Polarizáltság

5. Rendkívül rövid impulzusok lehetősége

ps, fs

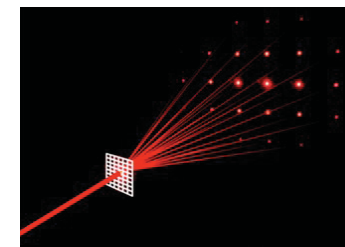
A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI II.

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. üvegyanyagokba bevitt fémszennyeződés; Rubin, Nd-YAG, Ti-zafir
Vörös-infravörös spektrális tartomány; Folytonos, Q-kapcsolású üzemmód, nagy teljesítmény

2. Gázlézerek

Legismertebb: He-Ne lézer (10 He/Ne). Kis energia, Széleskörű használat
CO₂ lézer: CO₂-N₂-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

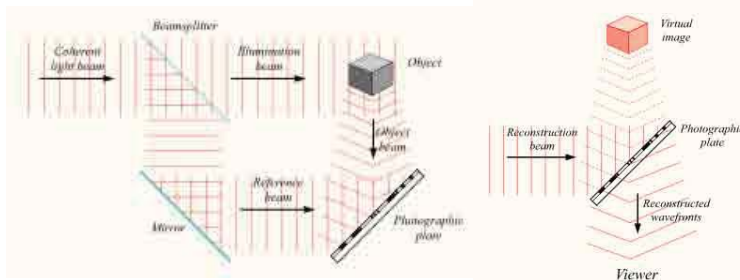
TELJESÍTMÉNY ALAPJÁN

- 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 CO₂ lézer
- 100–3000 W – ipari CO₂ lézer (lézervágó)
- 1 kW – 1 cm diódalézer rúd

HOLOGRÁFIA

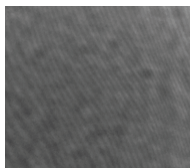


Gábor Dénes



Hologram felvétele

Hologram megtekintése



Hologram fotolemez felülete

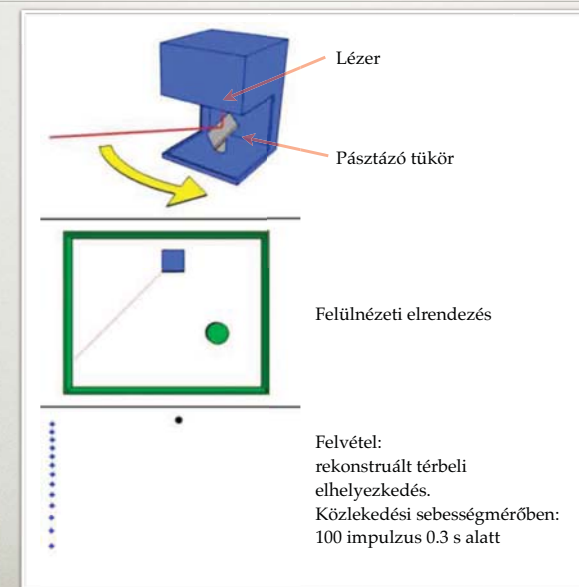


Hologramok



SEBESSÉGMÉRÉS LÉZERREL

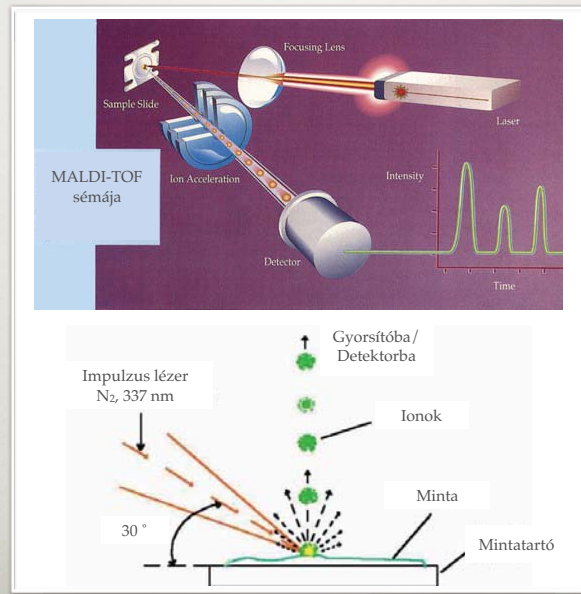
LIDAR: "LIGHT DETECTION AND RANGING"



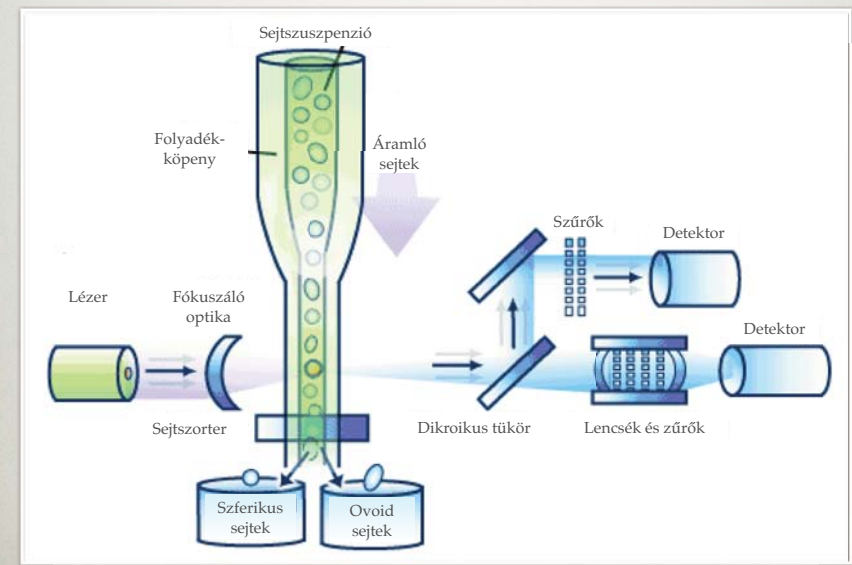
Felvétel:
rekonstruált térbeli
elhelyezkedés.
Közlekedési sebességmérőben:
100 impulzus 0.3 s alatt

MALDI-TOF:

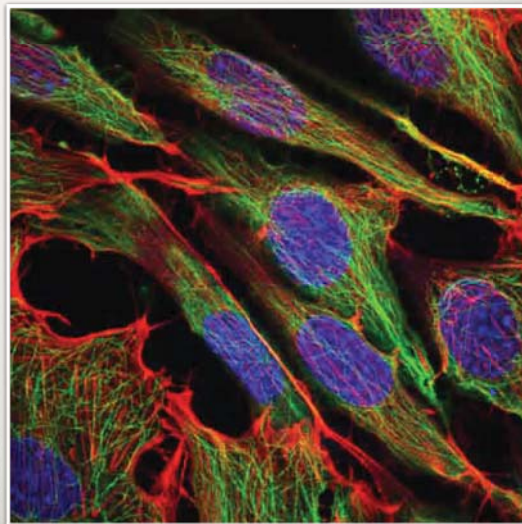
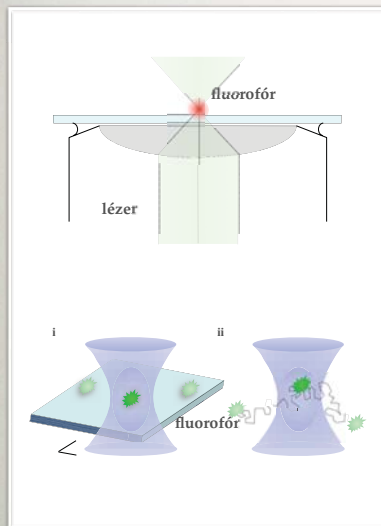
MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION
TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY



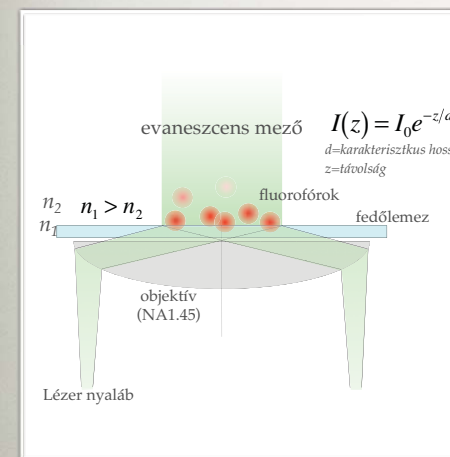
FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS)



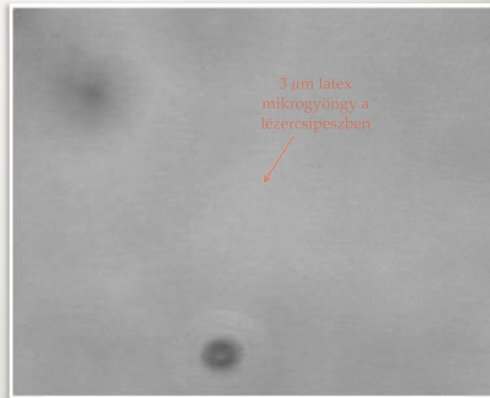
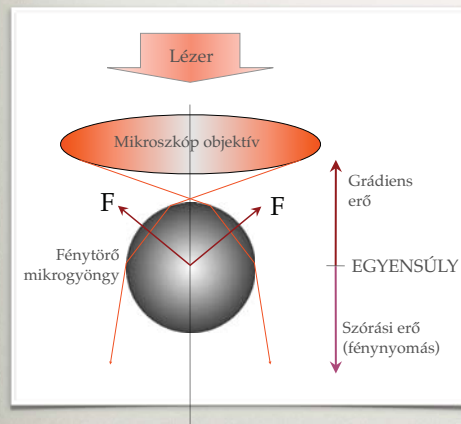
LÉZER PÁSZTÁZÓ KONFOKÁLIS MIKROSKÓP



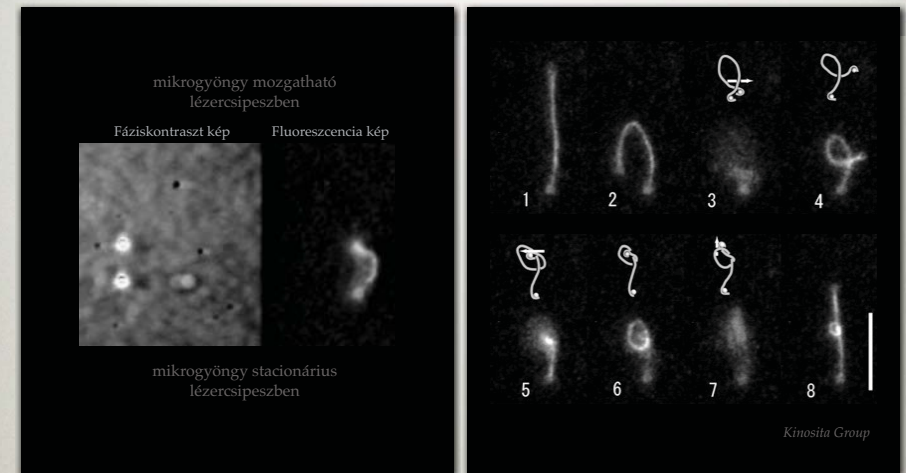
TELJES BELSŐ VISSZAZERŐDÉS FLUORESZCENCIA MIKROSKÓPIA (TIRFM)



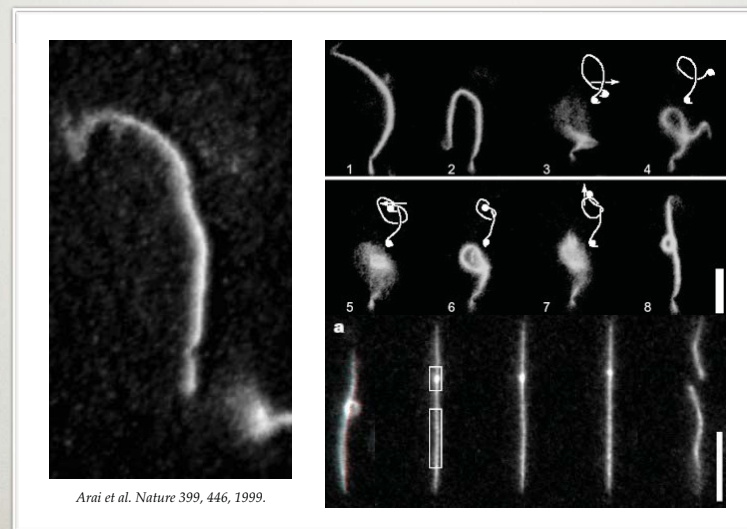
LÉZERCSIPESZ



CSOMÓKÖTÉS EGYETLEN DNS LÁNCRA

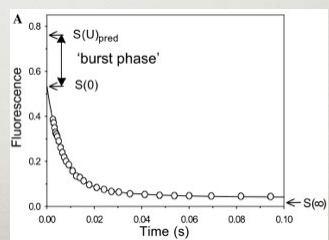
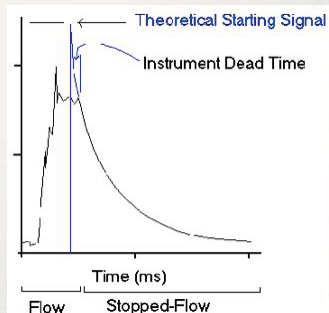
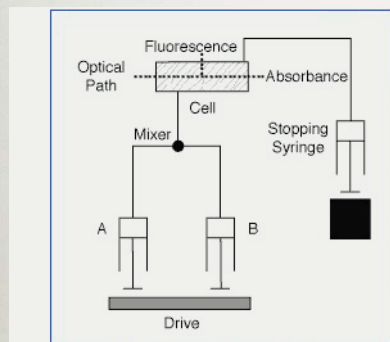


CSOMÓKÖTÉS AKTIN FILAMENTUMRA LÉZERCSIPESSEL

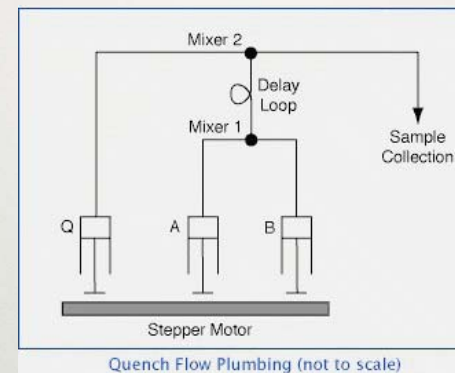


FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA TRANZIENS KINETIKAI MÓDSZEREKKEL

FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: STOPPED-FLOW



FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: QUENCH-FLOW



Analitika kémiai módszerekkel (SDS-PAGE, stb.)