

# FEHÉRJÉK SZERKEZETVIZSGÁLÓ MÓDSZEREI

LUMINESZCENCIÁS TECHNIKÁK

KELLERMAYER MIKLÓS

## LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Fotolumineszcencia

## LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Fotolumineszcencia

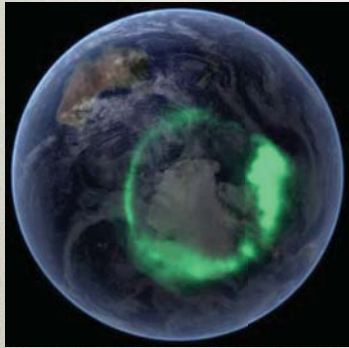
## LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Radiolumineszcencia



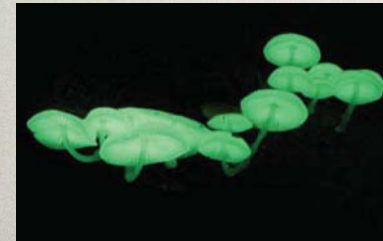
# LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Radiolumineszcencia  
*Aurora borealis* (sarki fény)



# LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Biolumineszcencia

# LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



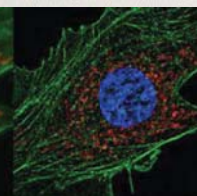
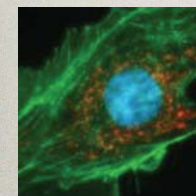
Biolumineszcencia  
Szentjánosbogár



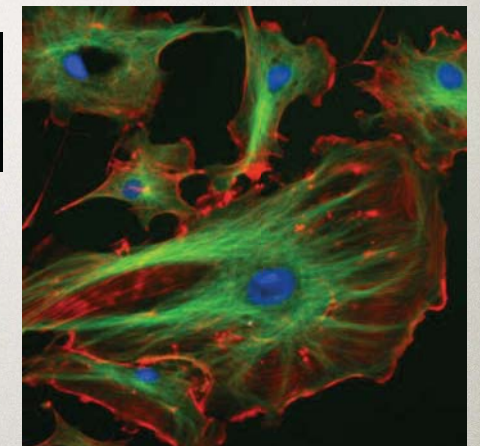
# LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



GFP-egér



Szuperrezolúciós mikroszkópia (Nobel-díj 2014)



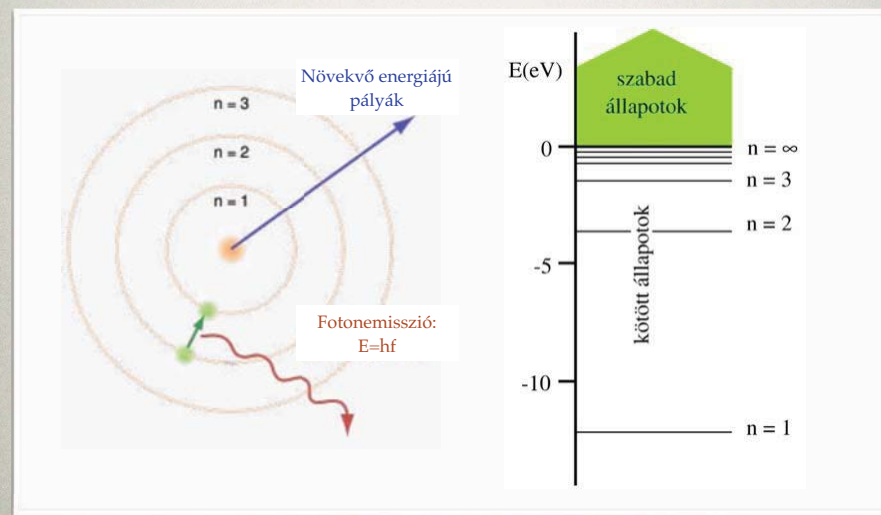
Epifluoreszcencia mikroszkópia (citoszkeletális rendszer)

Fluoreszcencia

# LUMINESZCENCIA

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

# ÁTOMSZERKEZET



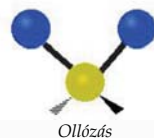
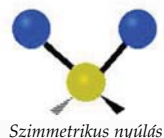
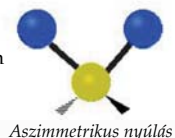
# MOLEKULASZERKEZET

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

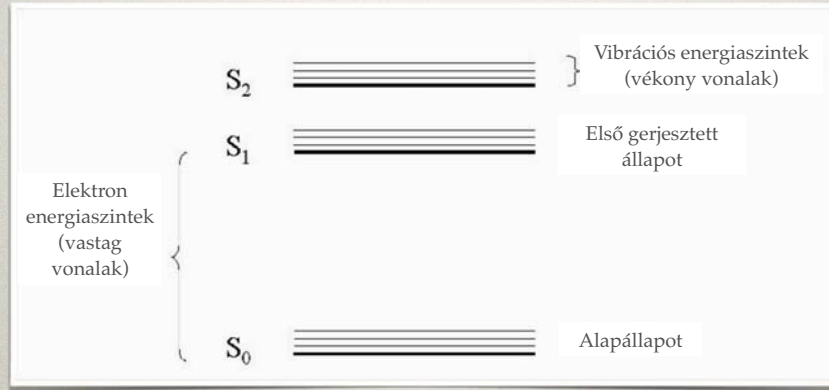
Átmenetek energia "csomag" elnyelésével/kibocsátásával járnak

Energiaszintek közötti különbségek nagyságrendje különbözik:

$$E_e \sim 100 \times > E_v \sim 100 \times > E_r$$

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

# ENERGIA ÁLLAPOTOK ÁBRÁZOLÁSA

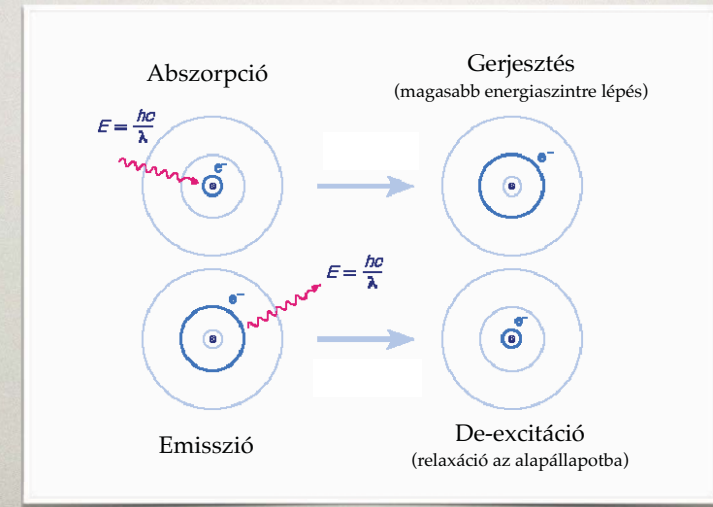


**S:** szingulett állapot; ellentétes spinű párosított elektronok  
(N.B.: Pauli-féle elv)

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



# A LUMINESZCENCIA LÉPÉSEI

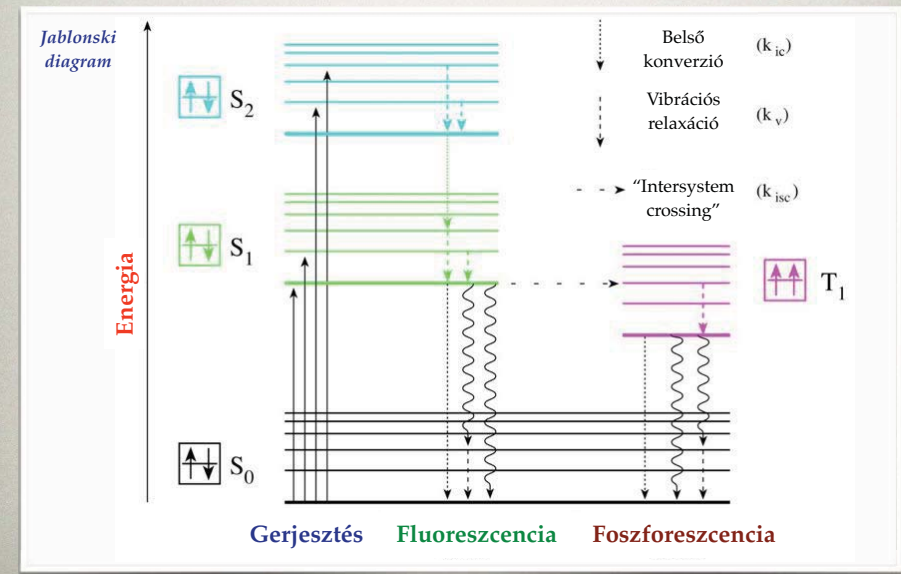


# A LUMINESZCENCIA TÍPUSAI

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



# A LUMINESZCENCIA FOLYAMATAI

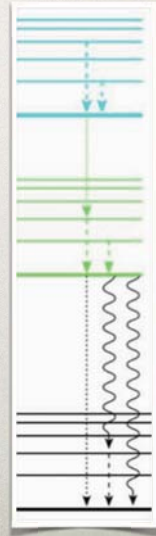


# KASHA-SZABÁLY

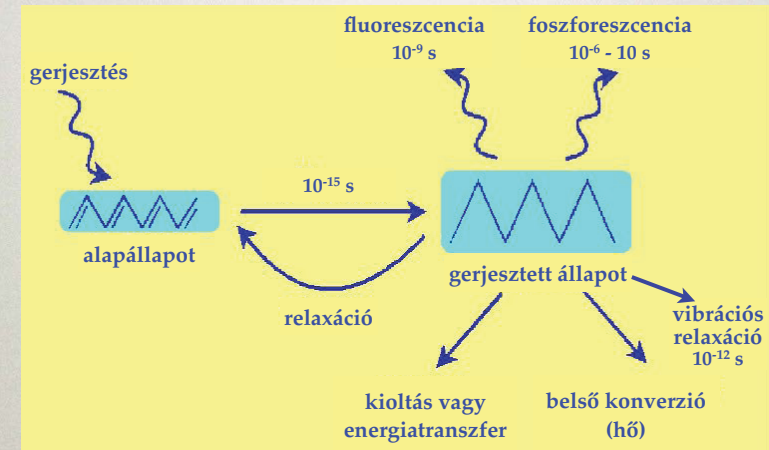
Fotonemisszió (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) a legalacsonyabb elektron-energiaállapotból történő átmenet során lép fel.



Michael Kasha (1920-)  
Amerikai fizikus

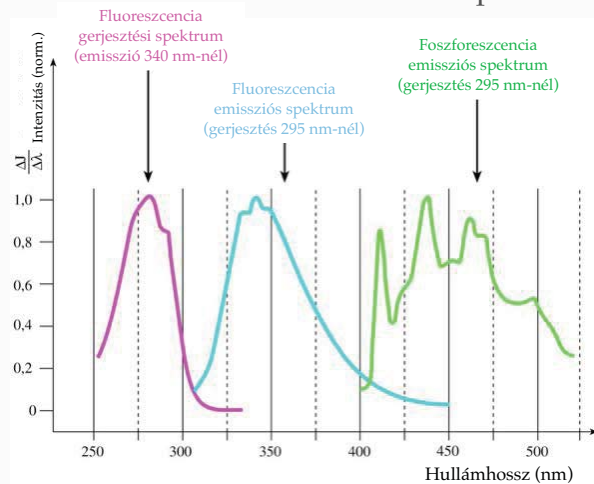


# AZ ÁTMENETEK SEBESSÉGE (IDŐSKÁLÁJA)



# A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI I.

## Lumineszcencia spektrumok



- Sávos színekép
- Gerjesztési és emissziós spektrumok tükörszimmetrikusak
- "Stokes shift"

# A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI II.

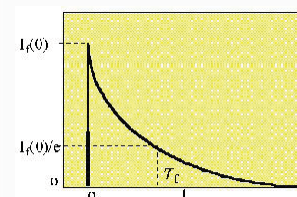
## Kvantumhatásfok

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

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

$k_{nr}$ =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

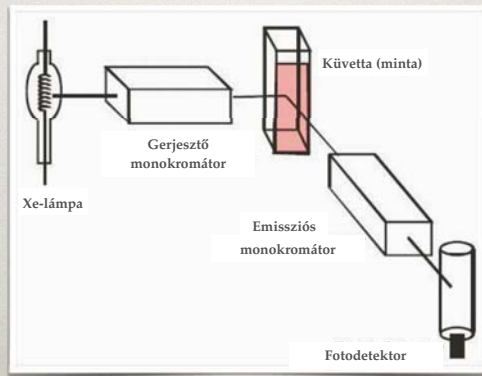
$k_f$ =fluoreszcencia sebességi állandó

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

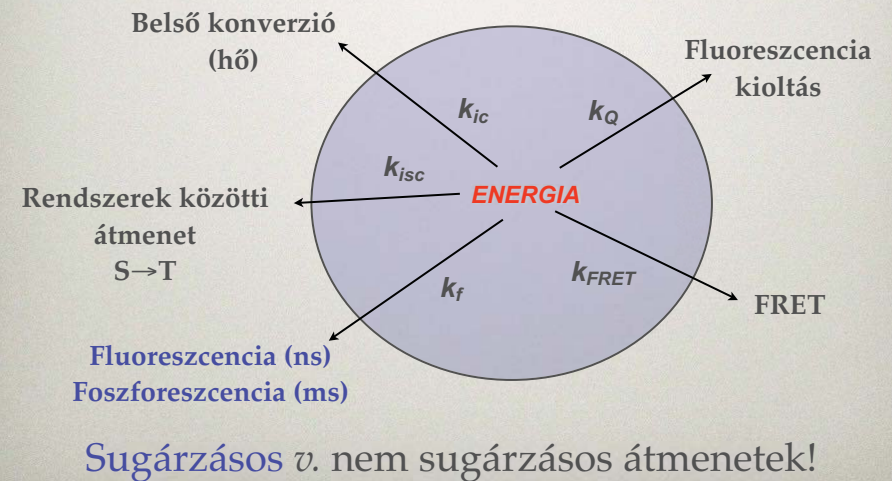
$\tau$ =fluoreszcencia élettartam

# A FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

Fluoreszcencia spektrométer  
("Steady-state" spektrofluoriméter)



# GERJESZTÉS SORÁN ELNYELT ENERGIA SORSA



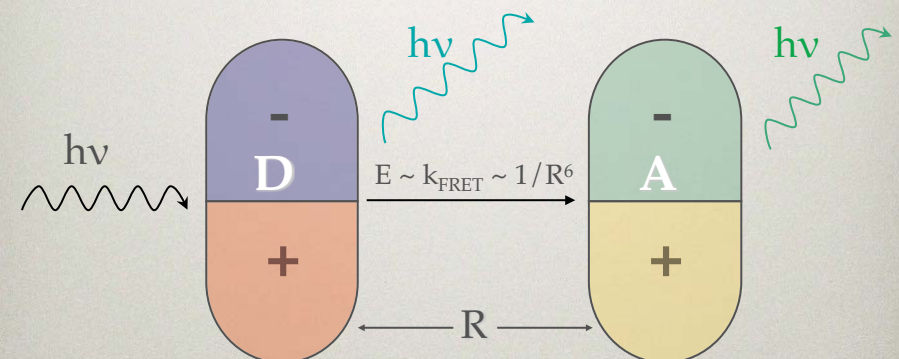
# FLUORESZCENCIA REZONANCIA ENERGIA TRANSZFER

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.

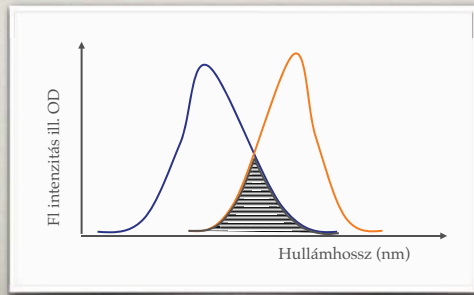
# FRET

- A gerjesztett donor relaxációjához hozzájárul az akceptor molekula emissziója!

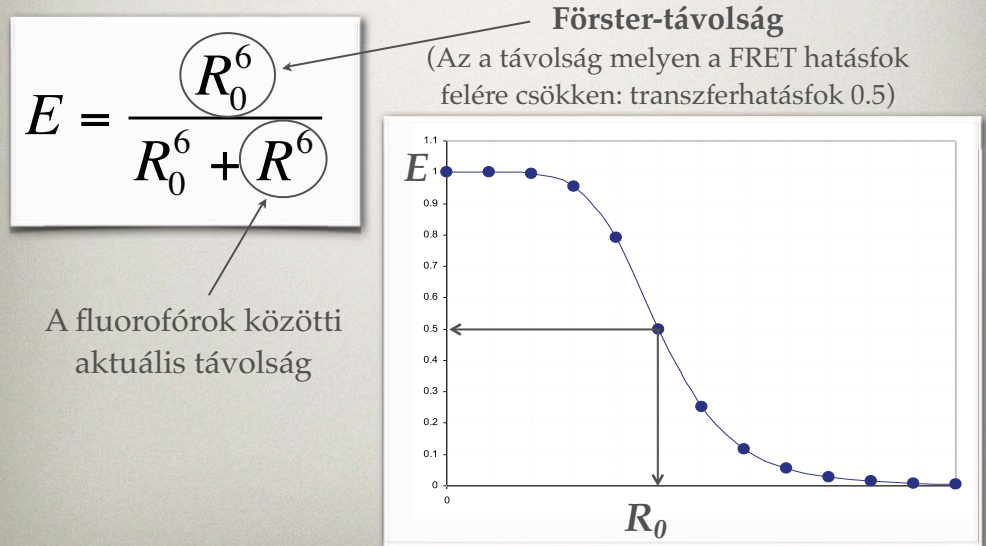


## A FRET FELTÉTELEI

- 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

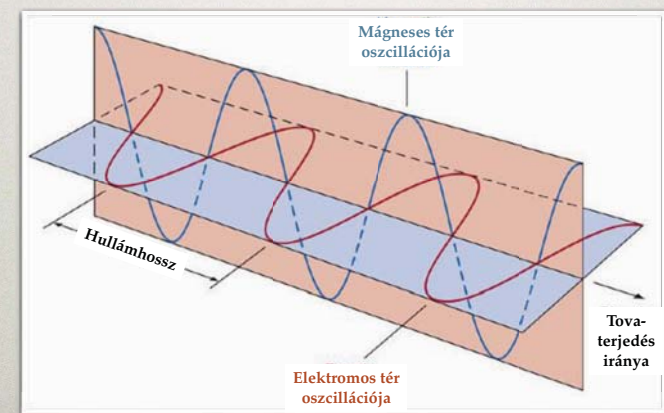


## A FRET ALKALMAZÁSA

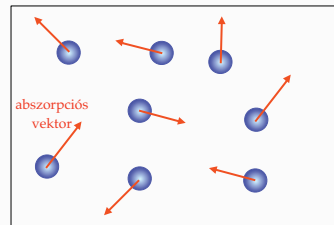
- **Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es ( $10^{-9}$ m) tartományban.
- Nagyon érzékeny!
- **Alkalmazás:**
  - Molekulák közötti *kölcsönhatások* tanulmányozása.
  - Molekulákon belüli *szerkezeti* változások tanulmányozása.

## A FÉNY ELEKTROMÁGNESES HULLÁM

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



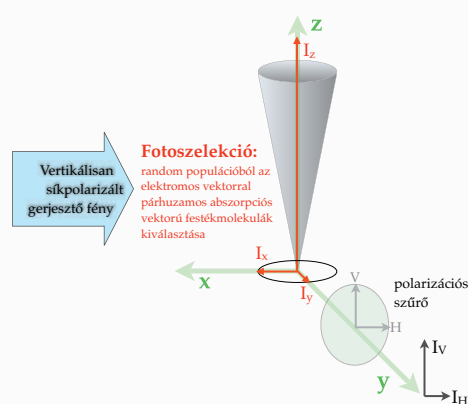
# POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA



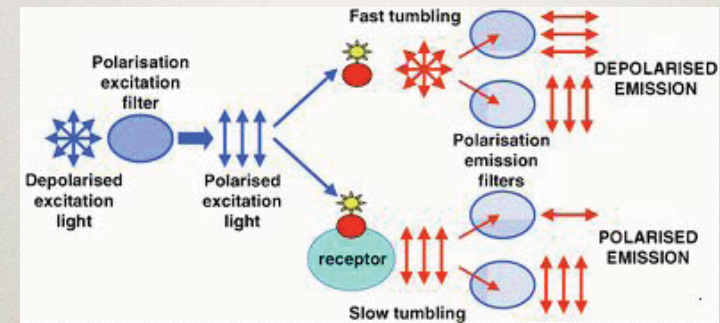
Fluorofórokhoz rendelhető **abszorpciós és emissziós vektor**: megszabja a foton abszorpció és emisszió valószínűségét.

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

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



# POLARIZÁCIÓ, ANIZOTRÓPIA

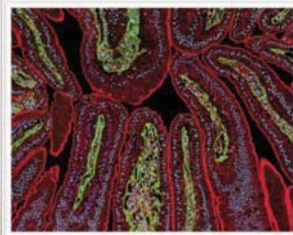
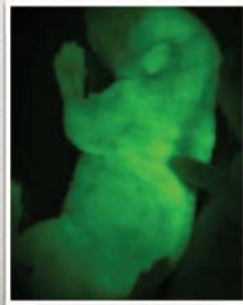
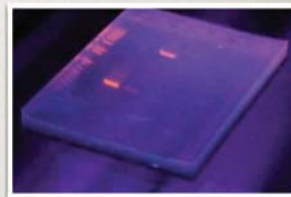
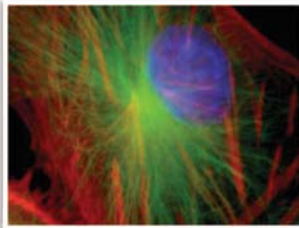


$$\text{Polarizáció: } p = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + I_{VH}}$$

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

## 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

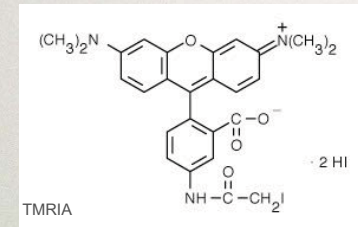
- Intrinsic fluorofórok**  
triptofán, tirozin
- Extrinsic fluorofórok**  
kívülről bevitt festékmolekulák,  
"fluoreszcens jelölés"  
kémiai specificitás?  
térbeli specificitás?

# 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, NH<sub>2</sub>)

Relatív térbeli specificitás

Lépések:

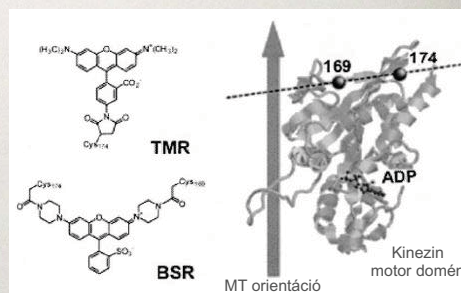
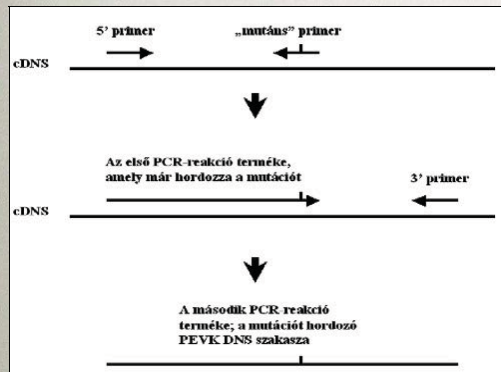
- moláris arány számítása
- inkubálás
- nem kötődött festék eltávolítása (dialízis, kromatográfia)

# Fluoreszcens jelölési technikák

## 2. Célzott pontmutagenézis

Cisztein aminosav célzott elhelyezése

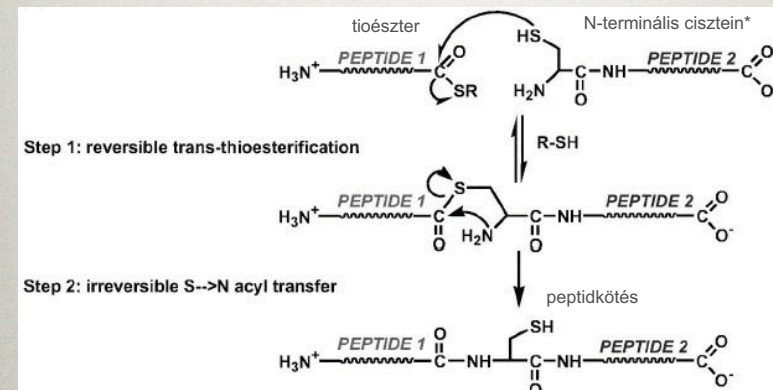
Bifunkcionális fluorofór



# Fluoreszcens jelölési technikák

## 3. Peptid ligáció

Fehérje "összeállítása" szintetikus, fluoreszcensen jelölt peptidekből



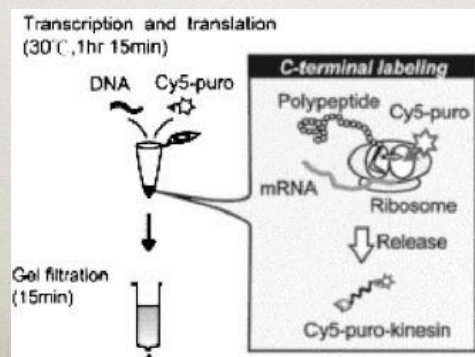
\*Csak N-terminális cisztein vesz részt a reakcióban

# 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 fehérjejelölésre használhatók



# Fluoreszcens jelölési technikák

## 5. Nem természetes aminosavak pontmutagenézise

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

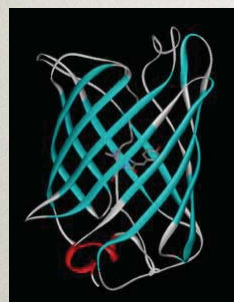
## 6. Fehérjekomplexek rekonstitúciója előre megjelölt alegységekből

Multi-subunit (alegység) fehérjék, fehérjekomplexek esetén

# Fluoreszcens jelölési technikák

## 7. Fluoreszcens fehérjékkel 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 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.

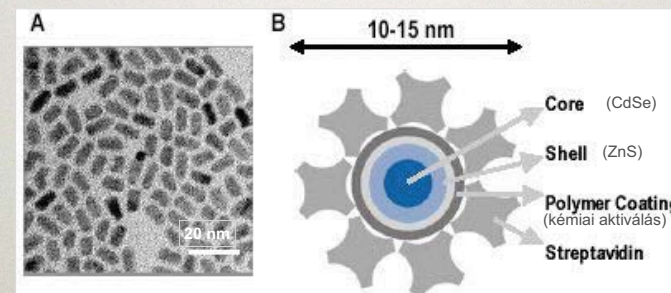
Hátrányok: pislogás, csak terminális (N vagy C) jelölés, a GFP a célfehérje működését szterikusan befolyásolhatja.

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

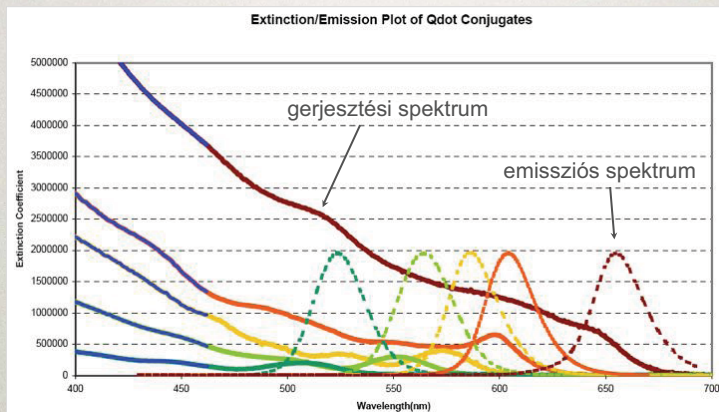
# Fluoreszcens jelölési technikák

## 8. Kvantumpontok

Félvezető nanokristályok  
Emissziós spektrum a méret függvénye



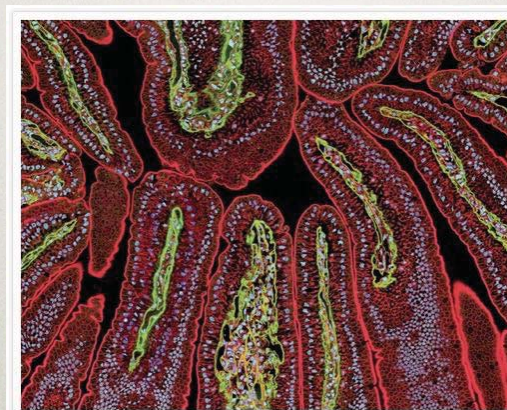
# Kvantumpont jelölés



## Előnyök:

széles gerjesztési spektrum  
hangolható emissziós spektrum  
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



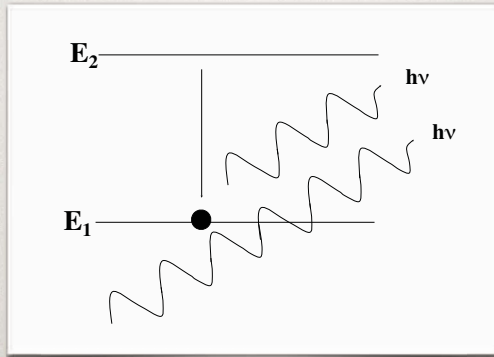
5 mW diódalézer  
néhány mm



Terawattos NOVA lézer  
Lawrence Livermore  
Laboratories  
Futballpálya méretű

# LÉZER:

“LIGHT AMPHIFICATION 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 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 (Nobe-díj): kvantum elektronika

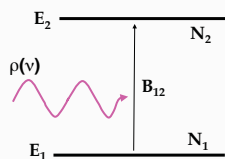
1970 - Arthur Ashkin: lézercsipesz

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

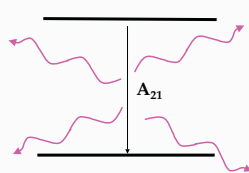
### 1. Abszorpció



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

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

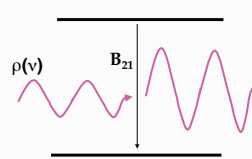
### 2. Spontán emisszió



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

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

### 3. Indukált emisszió



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

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,  $E_2 > E_1$

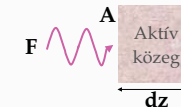
$\rho(v)$ : sugárzási tér spektrális energiasűrűsége

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

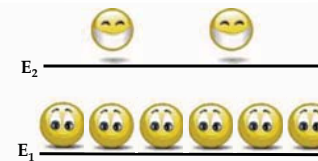
$B_{12}, A_{21}, B_{21}$ : energianívók közötti átmeneti valószínűsége (Einstein-féle együtthatók),  $B_{12} = B_{21}$

## A LÉZER ALAPJAI II. POPULÁCIÓ INVERZIÓ

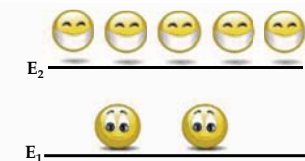
Fényerősítés az  
energianívók relatív  
betöltöttségétől függ



$$dF = FA(N_2 - N_1)dz$$

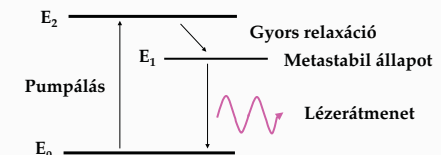


Termikus egyensúly

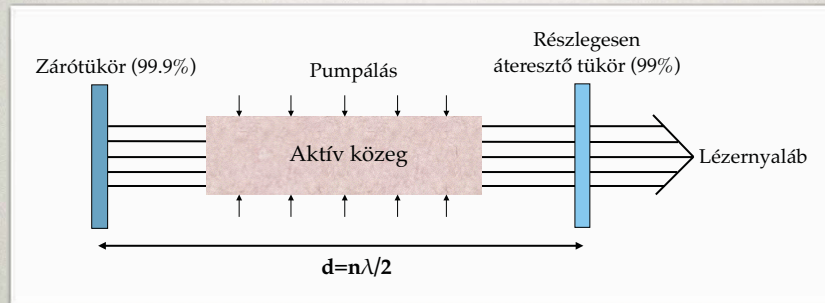


Populáció inverzió

- 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 fényteljesítmény egy részét visszacsatolja a közegbe
- pozitív visszacsatolás  $\rightarrow$  öngerjesztés  $\rightarrow$  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)

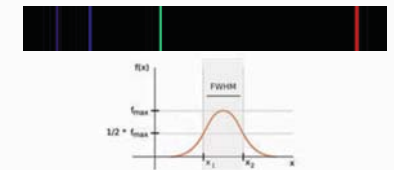
Q-csatolású üzemmódban a pillanatnyi teljesítmény hatalmas (GW)

Kis divergencia miatt óriási térbeli teljesítménysűrűség

### 3. Kis spektrális sávszélesség

“Monokromaticitás”

Nagy spektrális energiasűrűség



### 4. Polarizáltság

### 5. Rendkívül rövid impulzusok lehetősége

ps, fs

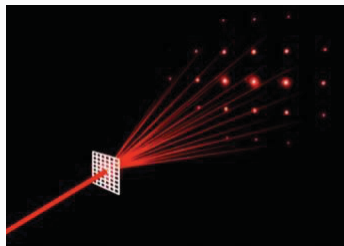
## A LÉZERFÉNY TULAJDONSÁGAI II.

### 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 fémszennyeződések; 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 kontinuuus üzemmódú teljesítmény (akár 100W)

Nyalábkarakterisztika nem túl jó. Kis méret miatt széleskörű alkalmazás.

# LÉZEREK ALKALMAZÁSA

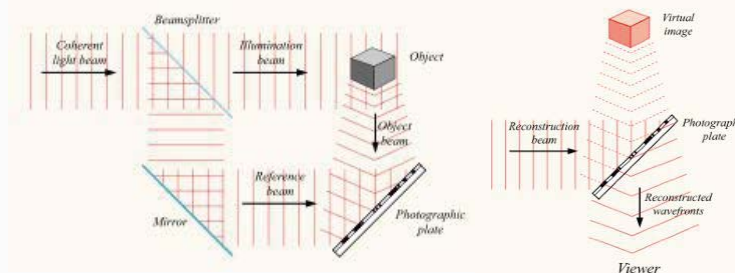
## TELJESÍTMÉNY ALAPJÁN

- 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

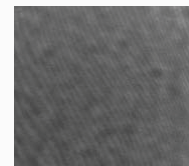


Gábor Dénes



Hologram felvétele

Hologram megtekintése



Hologram fotolemez felülete

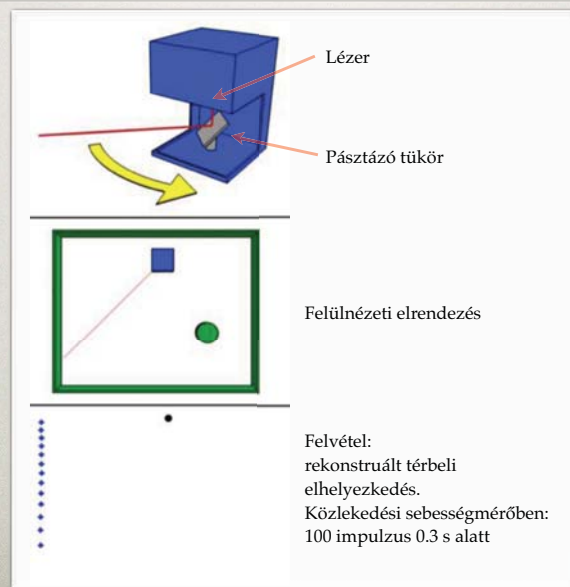


Hologramok



# SEBESSÉGMÉRÉS LÉZERREL

## LIDAR: "LIGHT DETECTION AND RANGING"

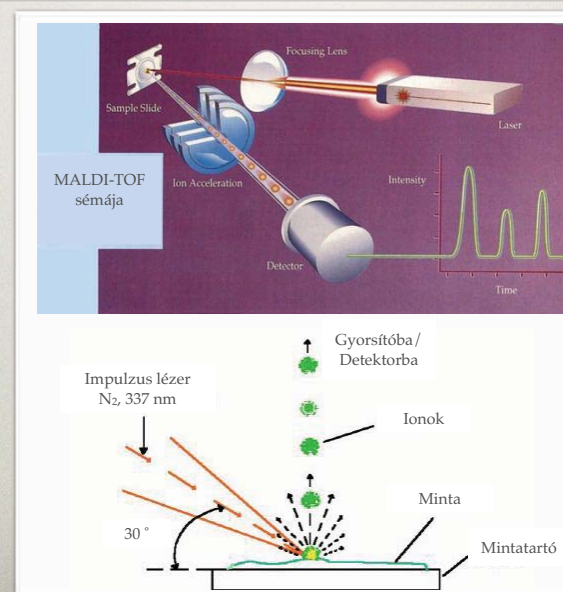


Felülnézeti elrendezés

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

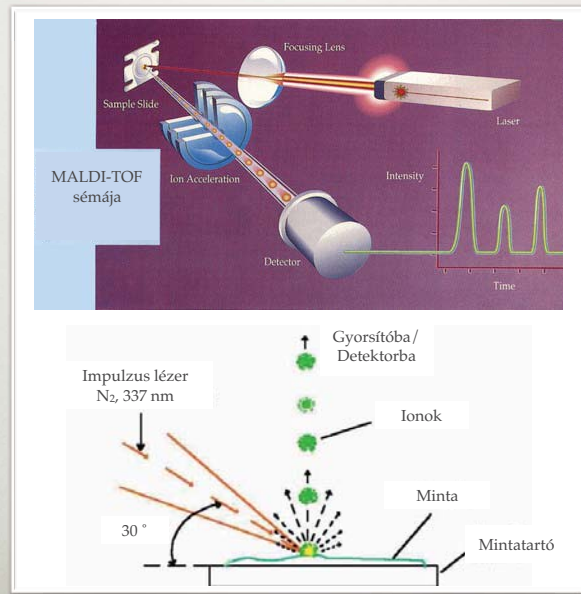
# MALDI-TOF:

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

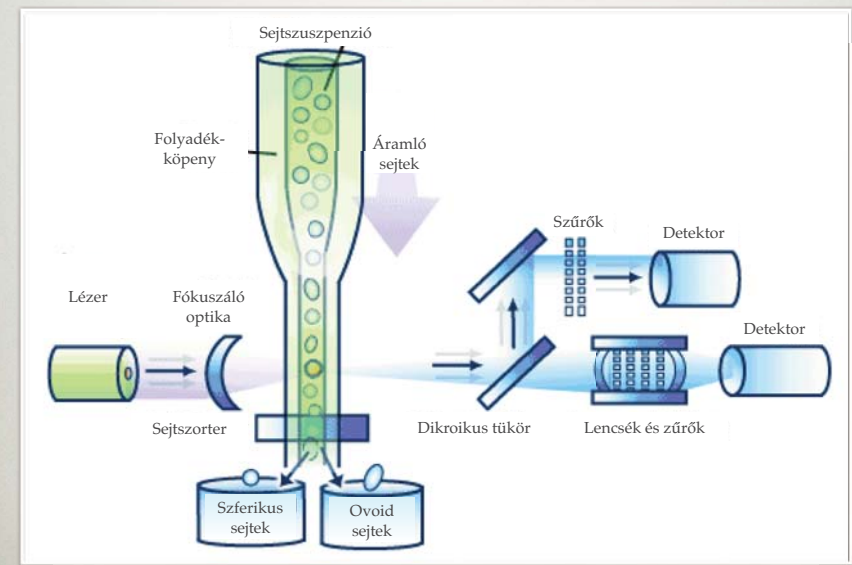


## MALDI-TOF:

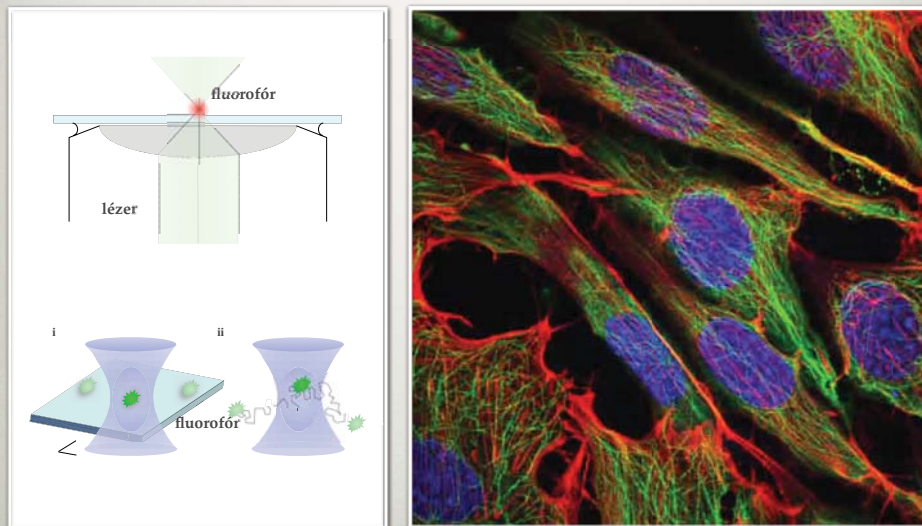
MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION  
TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY



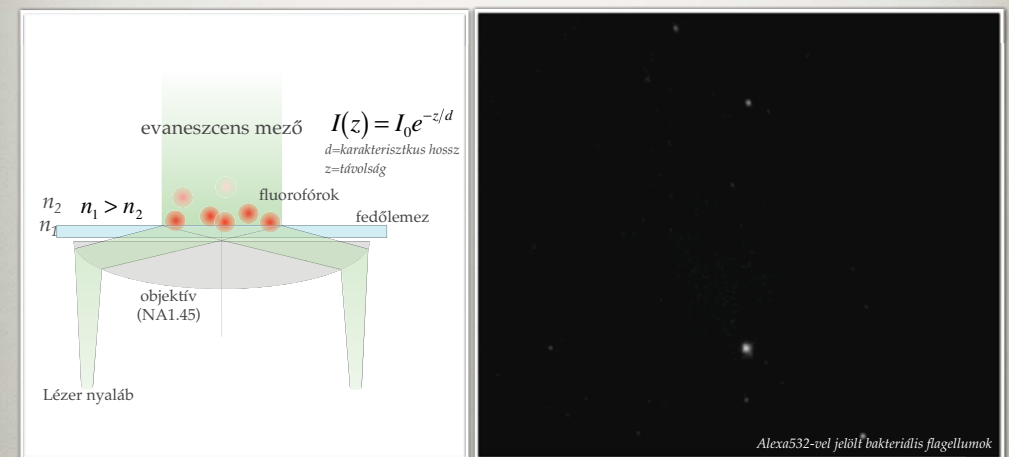
## FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTER (FACS)



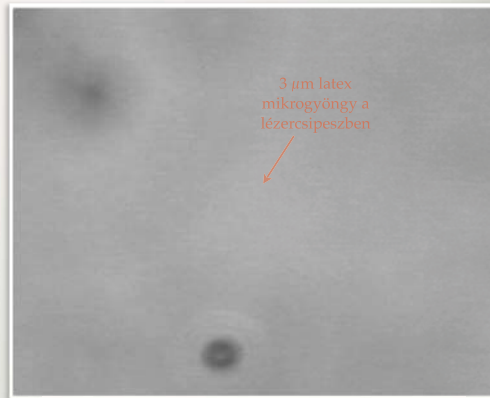
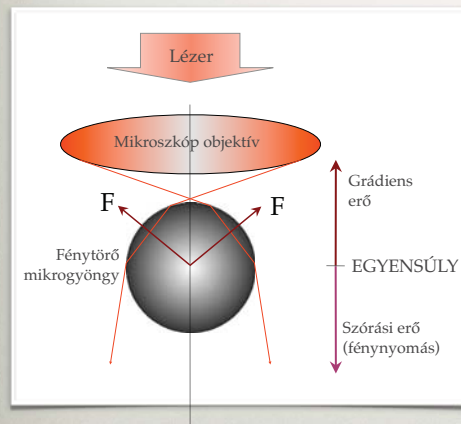
## LÉZER PÁSZTÁZÓ KONFOKÁLIS MIKROSKÓP



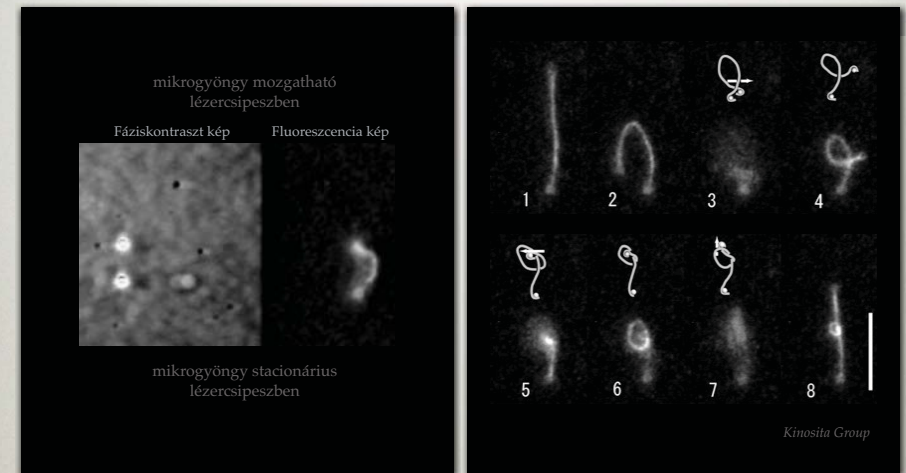
## TELJES BELSŐ VISSZAZERŐDÉS FLUORESZCENCIA MIKROSKÓPIA (TIRFM)



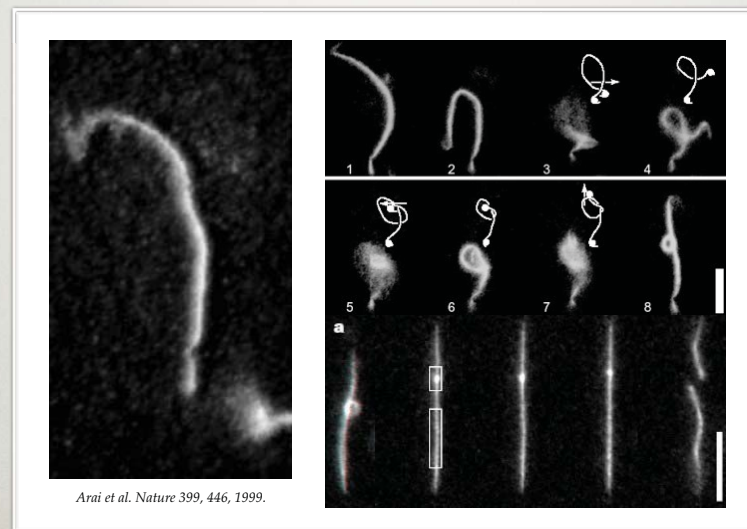
# LÉZERCSIPESZ



# CSOMÓKÖTÉS EGYETLEN DNS LÁNCRA

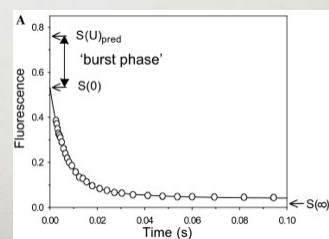
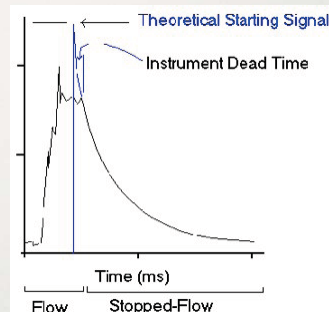
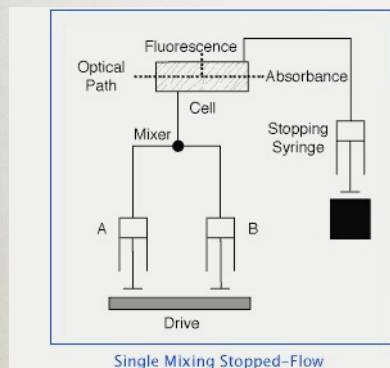


# CSOMÓKÖTÉS AKTIN FILAMENTUMRA LÉZERCSIPESSEL

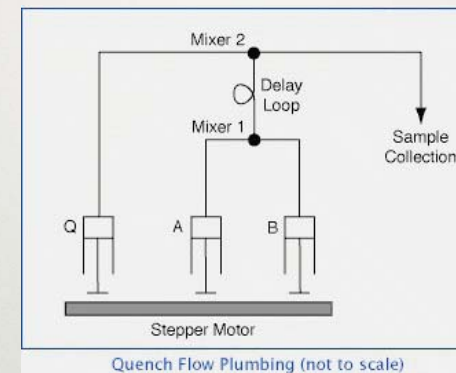


# FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA TRANZIENS KINETIKAI MÓDSZEREKKEL

# FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: STOPPED-FLOW



# FEHÉRJEGOMBOLYODÁS VIZSGÁLATA: QUENCH-FLOW



Analitika kémiai módszerekkel (SDS-PAGE, stb.)