

A FÉNY KELTÉSE

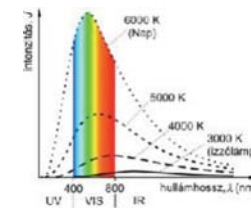
KELLERMAYER MIKLÓS

A FÉNYEMISSZIÓ EREDETE

Emisszió: "kibocsátás"

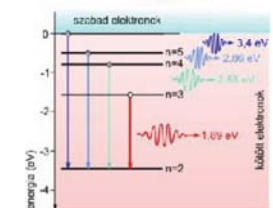
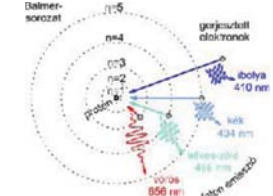
1. Termikus (feketetest) sugárzás

Mechanizmus: atomok, molekulák hőmozgása



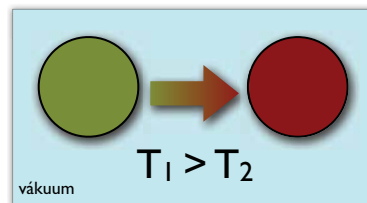
2. Lumineszcencia

Mechanizmus: gerjesztett állapotú energia kibocsátása



“Feketetest” (Termikus) sugárzás

A termikus sugárzás a fénykeltés egyik mechanizmusa



Hőcsere:
hőmérséklet
kiegyenlítődés



- Magas hőmérsékletű testek fényt bocsátanak ki (emittálnak).
- Minél magasabb a test hőmérséklete, annál rövidebb hullámhosszak jelennek meg az emissziós spektrumában.

... no de mi az a “fekete test”...?

A feketetest minden ráeső fényt elnyel

A tárgyak nemcsak sugároznak, hanem a sugárzást el is nyelik (abszorbeálnak)!

Kisugárzott felületi teljesítmény (M) és abszorpció tényező (α) aránya konstans (Kirchoff törvénye):



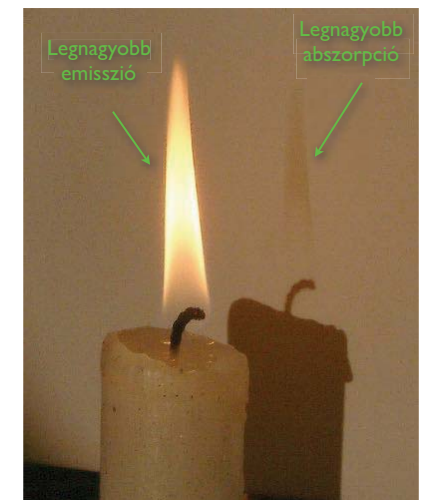
Gustav Robert **Kirchoff**
(1824-1887)

$$\frac{M_{\lambda i}}{\alpha_{\lambda i}} = \frac{M_{\lambda j}}{\alpha_{\lambda j}}$$

Abszolút fekete testre (BB*):

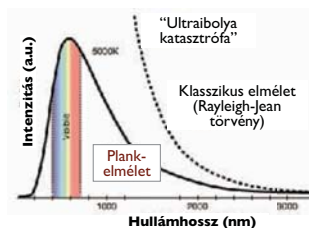
$$\alpha_{\lambda BB} = 1 \quad ("BB" = "black body")$$

- Vagyis az abszolút fekete test minden ráeső sugárzást elnyel ("semmit" nem ver vissza).
- Az abszolút fekete testen ezért a hőmérsékletfüggő emisszió ("feketetest sugárzás") ideálisan vizsgálható.



Feketestest sugárzás

Tulajdonságai és a levonható következtetések



Stefan-Boltzmann törvény:

$$M_{BB}(T) = \sigma T^4$$

M_{BB} = kisugárzott felületi teljesítmény, emissziós spektrum alatti terület.



Jozef Stefan
(1835-1893)



Ludwig Eduard Boltzmann
(1844-1906)

Wien-féle eltolódási törvény:

$$\lambda_{\max} T = \text{const}$$

Planck-féle sugárzási törvény:

$$E = hf$$

h = hatáskvantum, Planck-állandó (6.626×10^{-34} Js).

Értelme: az energia csomagokban (kvantumokban) nyelődik el és emittálódik



Wilhelm Wien
(1864-1928)

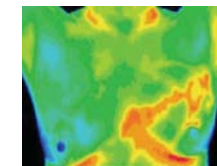


Max Karl Ernst Ludwig Planck
(1858-1947)

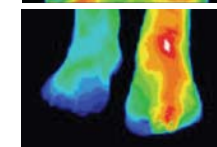
TERMIKUS SUGÁRZÁS ALKALMAZÁSA

Thermográfia, infradiagnosztika

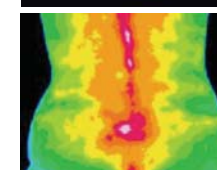
Nem abszorbeáló rétegeten "át lehet látni"



Emlőszűrés,
emlőcarcinoma



Gyulladás



Krónikus
muskuloskeletális
stressz (fájdalom)

Reptéri termográfia



LUMINESZCENCIA

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

LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Fotolumineszcencia

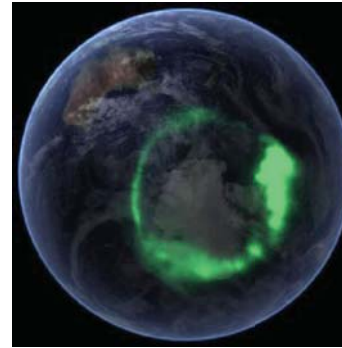
LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Radiolumineszcencia



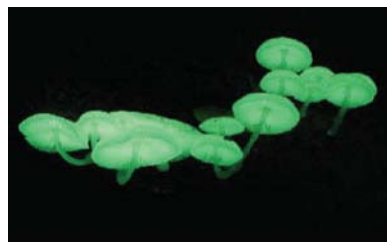
LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Radiolumineszcencia
Aurora borealis (sarki fény)



LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



Biolumineszcencia

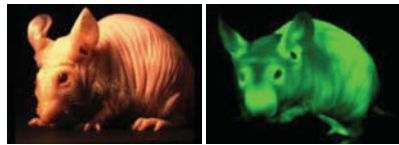
LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



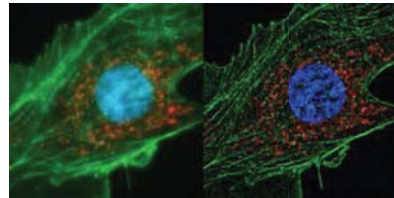
Biolumineszcencia
Szentjánosbogár



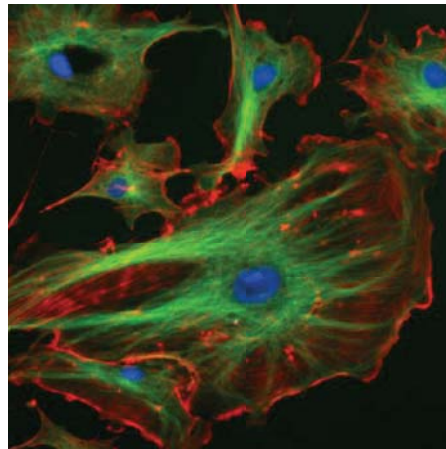
LUMINESZCENCIA MINDENÜTT



GFP-egér



Szuperrezolúciós mikroszkópia (Nobel-díj 2014)



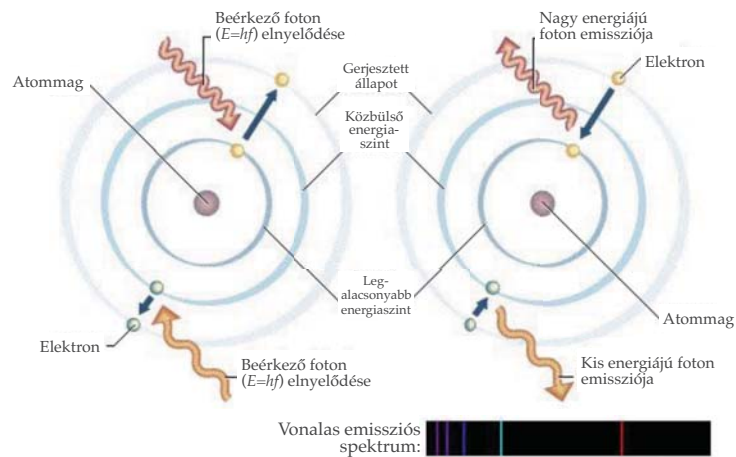
Epifluoreszcencia mikroszkópia (citoszkeletális rendszer)

Fluoreszcencia

A LUMINESZCENCIA TÍPUSAI

| Gerjesztés módja szerint | 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 szerint | Lumineszcencia típusa |
| első gerjesztett szingulett állapot | fluoreszcencia |
| legalsó (gerjesztet) triplett állapot | foszforeszcencia |

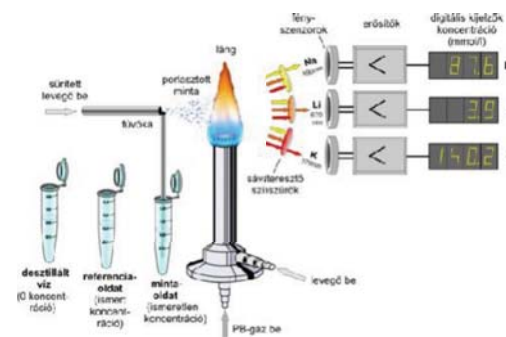
FÉNYEMISSZÓ GERJESZTETT ATOM ÁLTAL



EMISSZIÓS SPEKTROSKÓPIA ALKALMAZÁSA

Lángfotometria

Alkáli fémek kvalitatív és kvantitatív meghatározása



Klinikum: szérum ionok (Na^+ , K^+) meghatározása



EGY GERJESZTETT MOLEKULA EMISSZIÓJA BONYOLULTABB...

...MERT ENERGIANÍVÓI ÖSSZETETTEK.

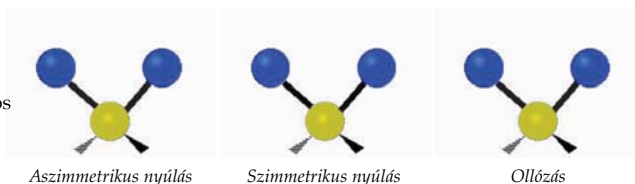
Molekula: kovalens kötéssel
összekapcsolt atomok
Legegyszerűbb eset: kétatomos
molekula (pl., hidrogénmolekula)



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

Vibráció: kovalens kötés *mentén* történő periodikus mozgás
Rotáció: kovalens kötés *tengelye körüli* periodikus mozgás

Példák a vibrációs
mozgásra háromatomos
(metilén) csoportban
(-CH₂-):

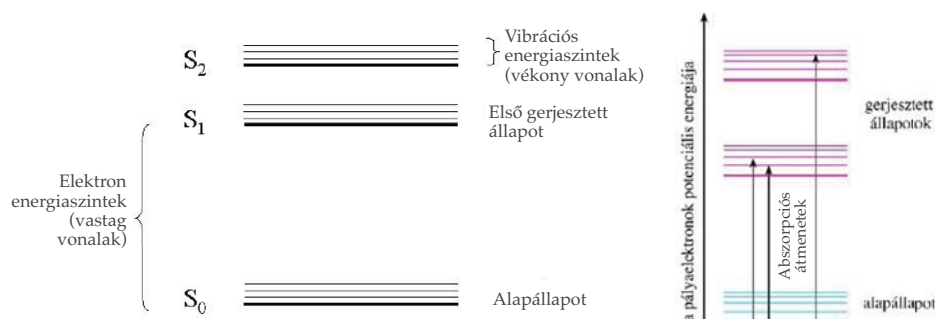


ENERGIA ÁLLAPOTOK ÁBRÁZOLÁSA

Jabłoński-féle termséma:
egy molekula elektronállapotait, és a közöttük
végbemenő átmeneteket (nyilakkal) mutatja



Alexander Jabłoński
(1898-1980)



MOLEKULA ENERGÁJA



Max Born
(1882-1970)



J. Robert Oppenheimer
(1904-1967)

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:

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

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

SPINÁLLAPOTOK

Wolfgang Pauli
(1900-1958)



Pauli-elv:

- Minden kvantumállapotot csak egyetlen elektron tölthet be.
- Egy atomon belül nem létezhet két olyan elektron, amelynek mind a négy kvantumszáma megegyezik.



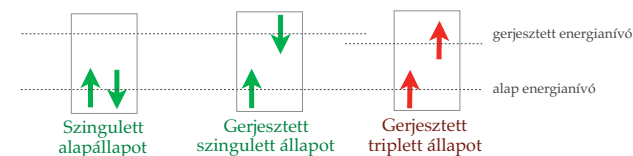
betöltött alhéj: spin párosítás
(ellentétes spinű elektronok párosodnak)

Szingulett és **triplett** állapotok:

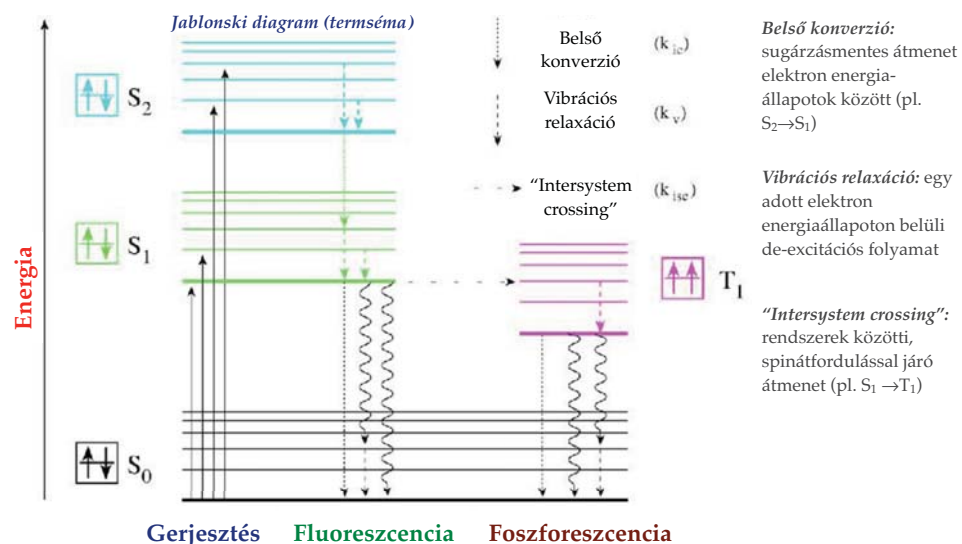
az eredő spinállapothoz rendelt mágneses momentum orientációinak száma (mágneses térben) = $2S+1 = 1$ (*szingulett*) vagy 3 (*triplett*). (S = eredő spin, pl. betöltött alhéj esetén $(+1/2) + (-1/2) = 0$)

S: szingulett állapot: ellentétes spinű párosított elektronok, eredő spin (S) = 0, orientációk száma ($2S+1$) = 1.

T: triplett állapot: a molekulában azonos spinállapotú elektronok vannak, eredő spin = 1 (pl. $(+1/2) + (+1/2) = 1$), orientációk száma ($2S+1 = 2+1$) = 3.



A LUMINESZCENCIA FOLYAMATAI

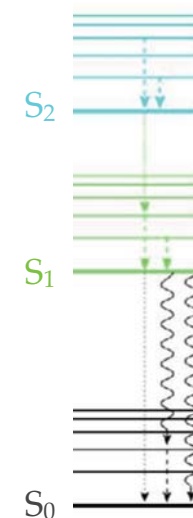


KASHA-SZABÁLY

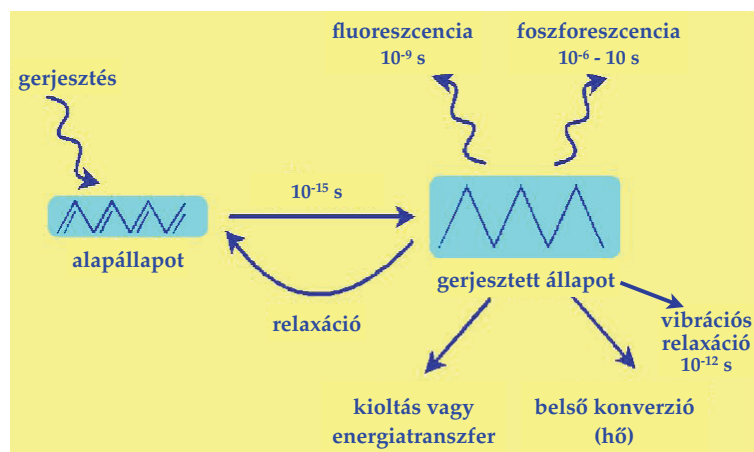
Fotonemisszió (fluoreszcencia vagy foszforeszcencia) a legalacsonyabb gerjesztett elektron-energiaállapot (S_1 , T_1) legalacsonyabb vibrációs szintjéről történő átmenet során lép fel.



Michael Kasha (1920-)
Amerikai fizikus

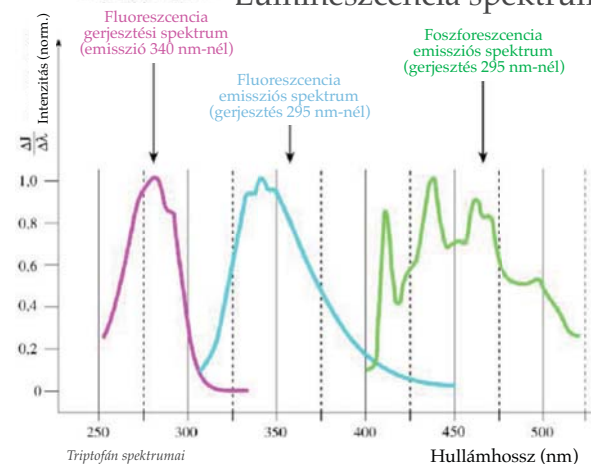


AZ ÁTMENETEK SEBESSÉGE (IDŐSKÁLÁJA)



A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI I.

Lumineszcencia spektrumok



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



George Stokes (1819-1903)

Fluoreszcens festékmolekulák: "fluorofórok"

Fluorofórok célzott bekötésével nem fluoreszkáló molekulák is vizsgálhatóvá válnak ("fluoreszcens jelölés")

A LUMINESZCENCIA TULAJDONSÁGAI II.

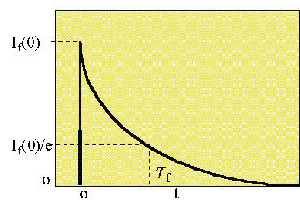
Kvantumhatásfok

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

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

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

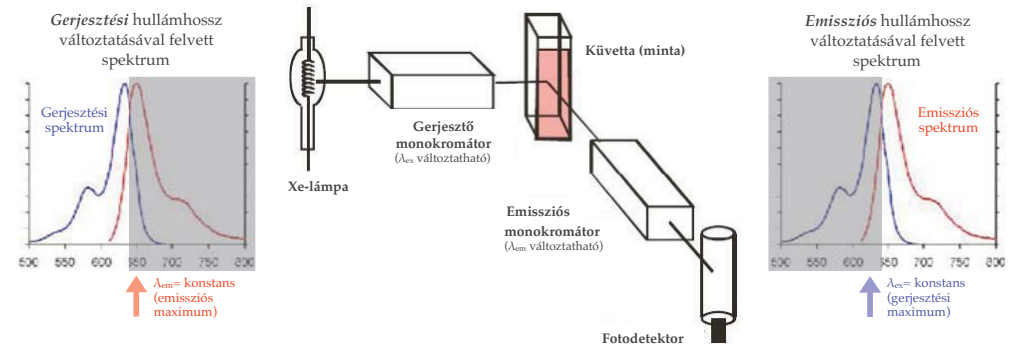
k_f = fluoreszcencia sebességi állandó

k_{nr} = nem-sugárzásos átmenetek sebességi állandója

τ = fluoreszcencia élettartam

A FLUORESZCENCIA MÉRÉSE

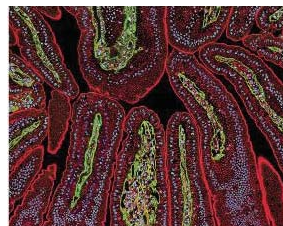
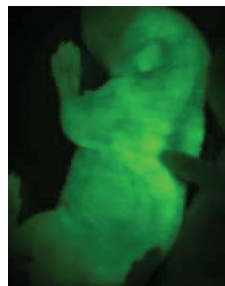
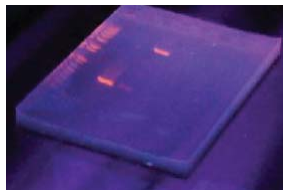
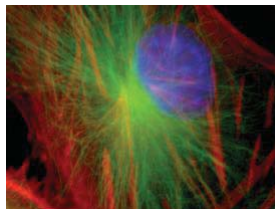
Fluoreszcencia spektrométer ("Steady-state" spektrofluoriméter)



A fluoreszcencia orvosi- biológiai alkalmazásai

Néhány példa:

- 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
- Jelölés kvantum pontokkal (quantum dots)
- stb...

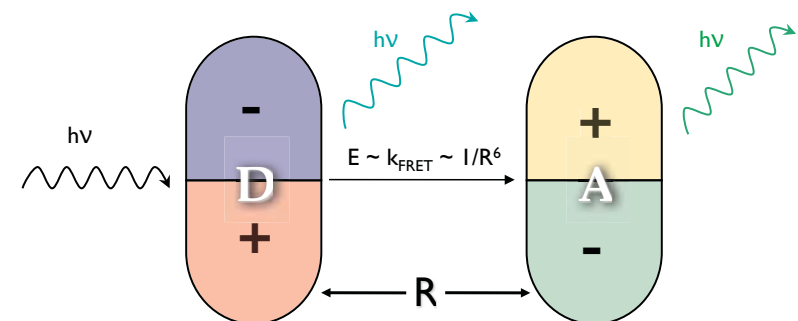


Förster Rezonancia Energia Transzfer (FRET)

- 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.

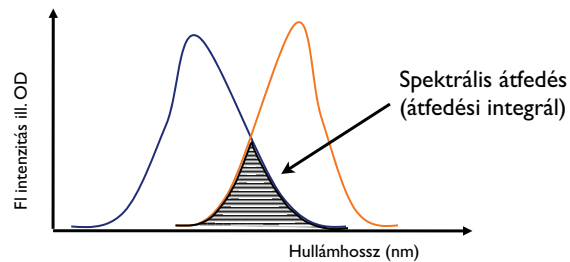


Theodor Förster
(1910-1974)



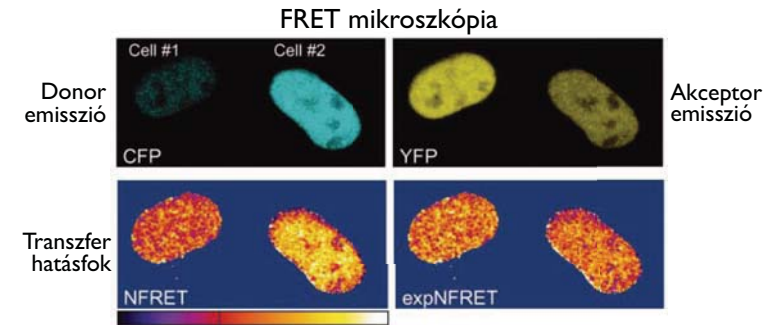
A FRET feltételei

- **Fluoreszcens** donor (D) és akceptor (A) 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 alkalmazása

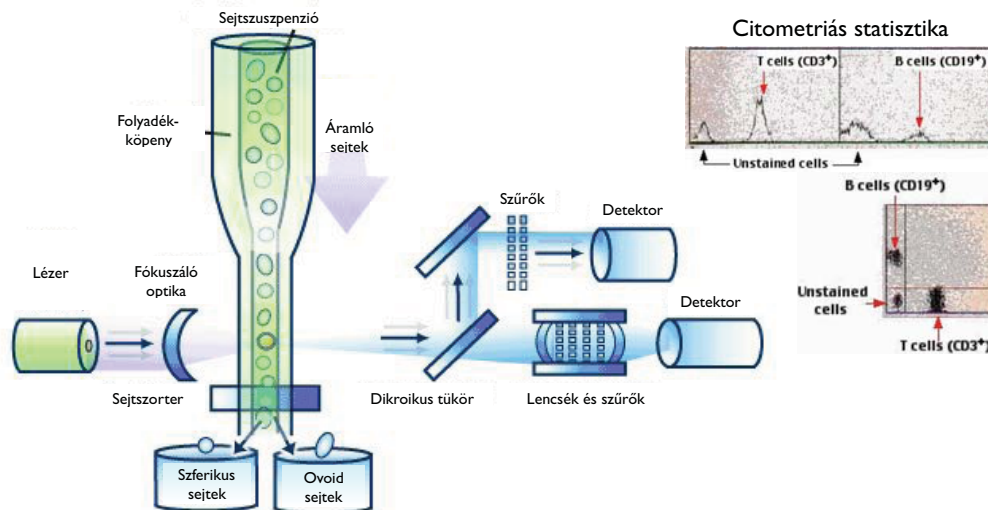
- **Molekuláris mérőszalag:** távolságmérés a nm-es (10^{-9} m) tartományban.
- Nagyon érzékeny (lásd hatvány összefüggés)!
- **Alkalmazás:**
 - Molekulák közötti **kölcsönhatások** tanulmányozása.
 - Molekulákon belüli **szerkezeti** változások tanulmányozása.



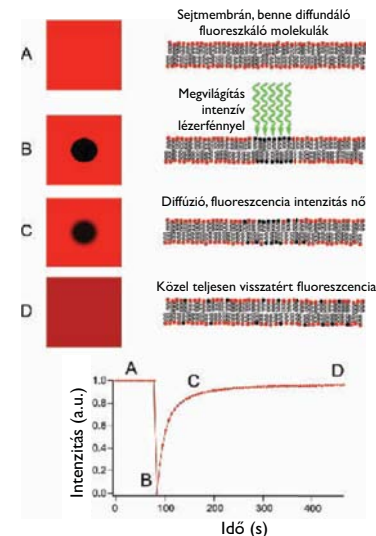
Fluorescence activated cell sorter (FACS)

Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás; Áramlási citometria (flow cytometry)

- Fluoreszcensen fajlagosan megjelölt sejtszuszpenziót sejtenként analizálunk
- Sok paramétert mérünk (fluoreszcencia intenzitás különböző hullámhosszokon, kis- és nagyszögű szórás)
- Statisztikai analízist végzünk
- Szükség esetén a sejteket szétválogathatjuk a paraméterek alapján



Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)



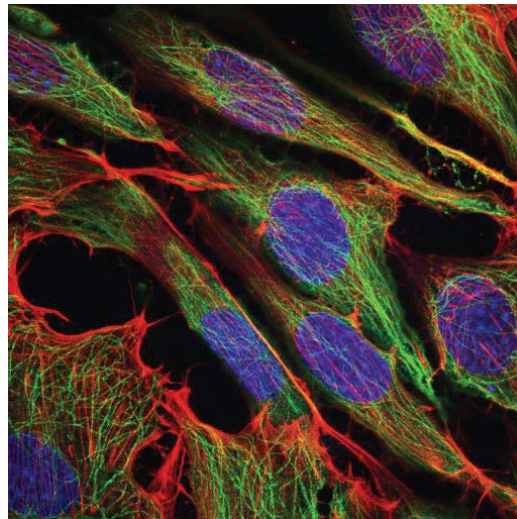
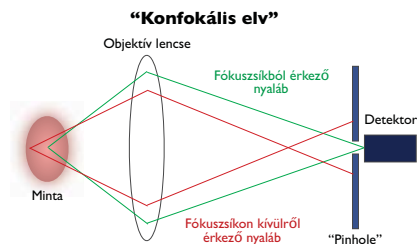
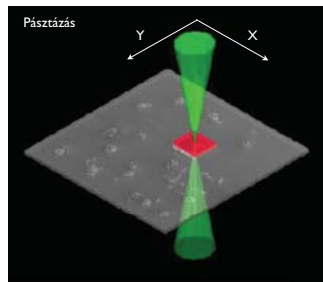
Diffúziós állandó meghatározható a fluoreszcencia intenzitás visszatérésének időbeli lefutásából:

$$D = \frac{w^2}{4t_D}$$

D = diffúziós állandó
w = kifehérített terület átmérője
t_D = időállandó



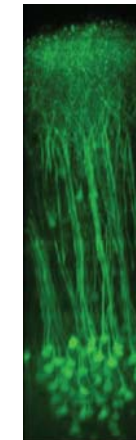
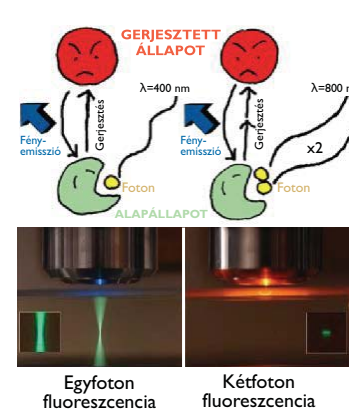
Lézer pásztázó konfokális mikroszkópia



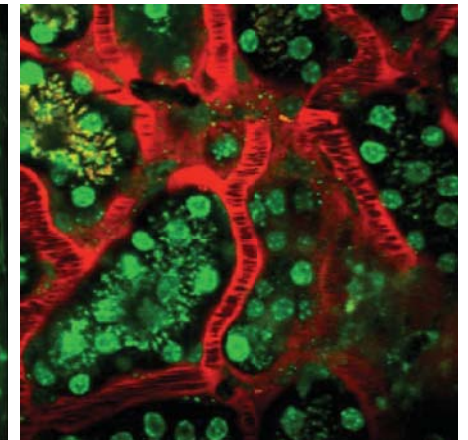
Zöld: mikrotubulusok; Vörös: aktin; Kék: sejtmag

Multifoton mikroszkópia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közel IR) hullámhosszú, rövid (fs) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm)



Agykérgi piramisisejtek



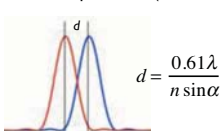
Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)

Szuperfelbontású mikroszkópia

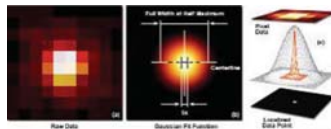
Kémiai Nobel-díj, 2014

A feloldási problémát pozíciómeghatározási problémává alakítjuk

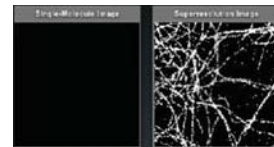
Feloldási probléma (Abbé-elv)



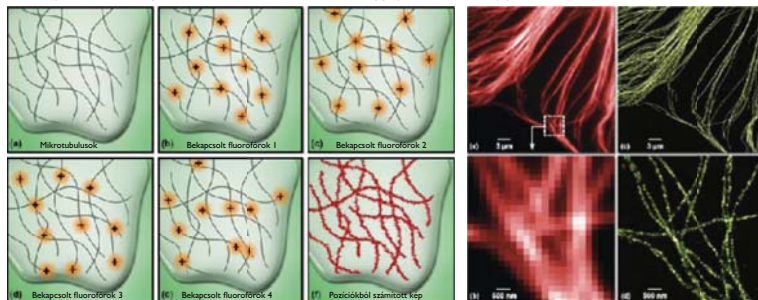
Pozíciómeghatározási probléma (pontosság a fotonszámtól függ)



"Stochasztikus" adatgyűjtés egyedi fluorofórokról



STORM ("stochastic optical reconstruction microscopy"); PALM ("photoactivated localization microscopy")



Mikrotubuláris rendszer

Adatgyűjtési folyamat