

A FÉNY KELTÉSE

FÉNYEMISSZIÓ, TERMIKUS SUGÁRZÁS,
LUMINESZCENCIA

KELLERMAYER MIKLÓS

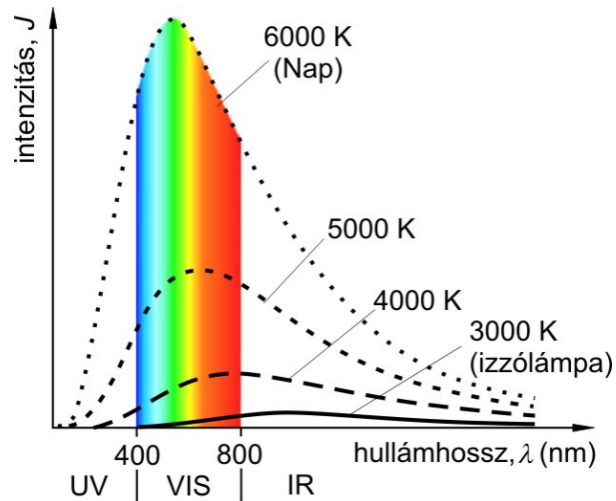
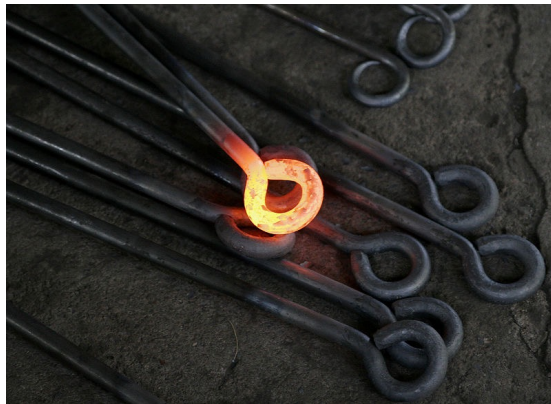
A fényemisszió eredete

Emisszió: “kibocsátás”

1. Termikus (“feketetest” v. hő-) sugárzás

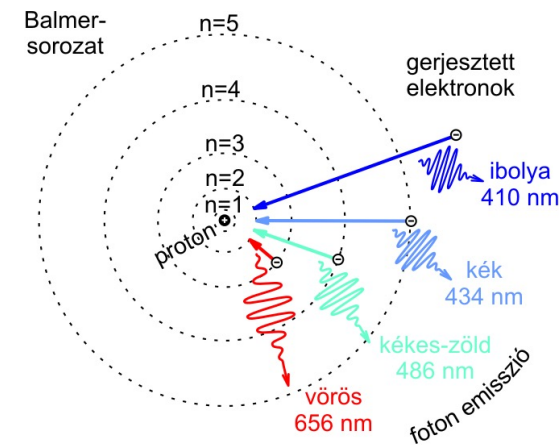
Mechanizmus: atomok, molekulák hőmozgása

Fényenergia
forrása:
rendszer
belső
energiája

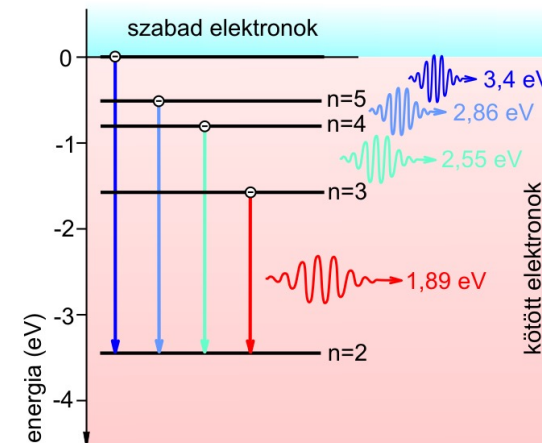


2. Lumineszcencia

Mechanizmus: gerjesztett állapoti energia kibocsátása

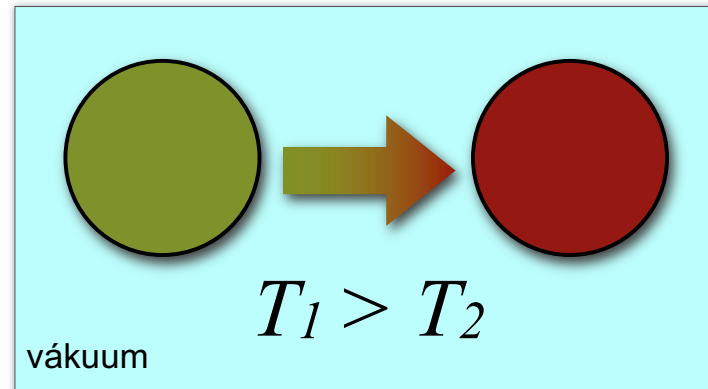


Fényenergia
forrása:
gerjesztett állapot
energiája



“Feketetest” (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 fekete test minden ráeső fényt elnyel

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

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



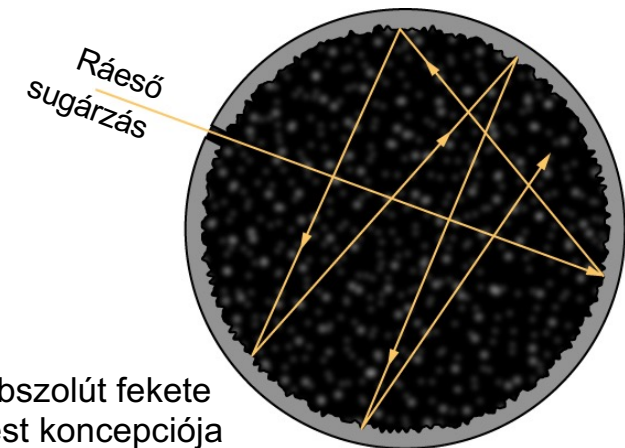
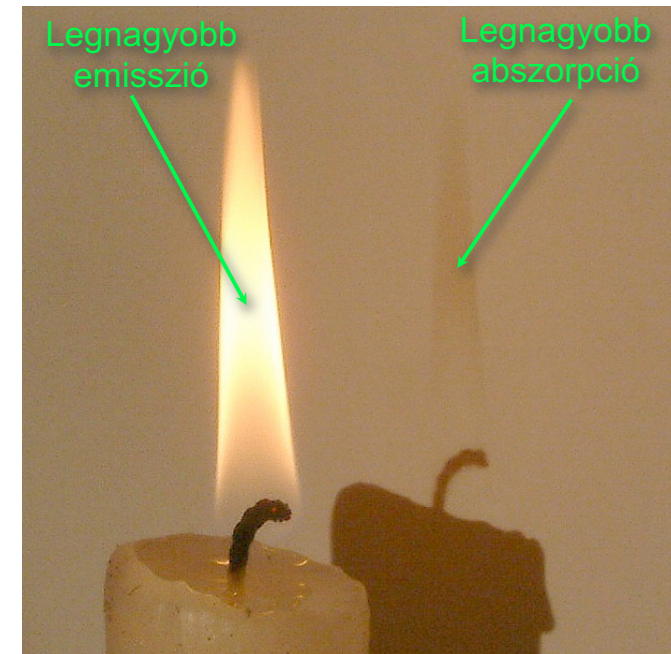
Gustav Robert Kirchhoff
(1824-1887)

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

Abszolút fekete testre (BB*):

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

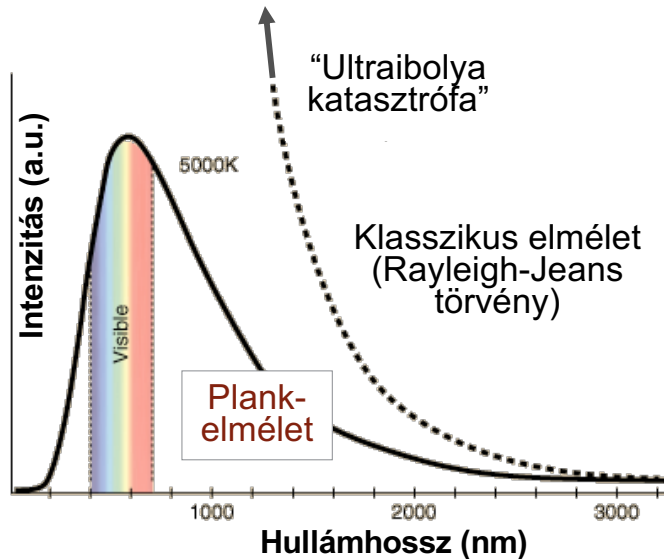
- Tehát, az abszolút fekete test minden reá eső sugárzást elnyel ("semmit" nem ver vissza).
- Az abszolút fekete testen ezért a hőmérsékletfüggő emisszió ("feketetest sugárzás") ideálisan vizsgálható.



Abszolút fekete
test koncepciója

Feketestest sugárzás

Tulajdonságok és levonható következtetések



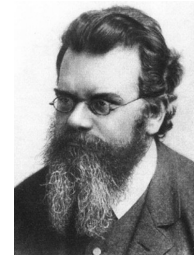
Stefan-Boltzmann törvény:

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

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



Jozef Stefan
(1835-1893)



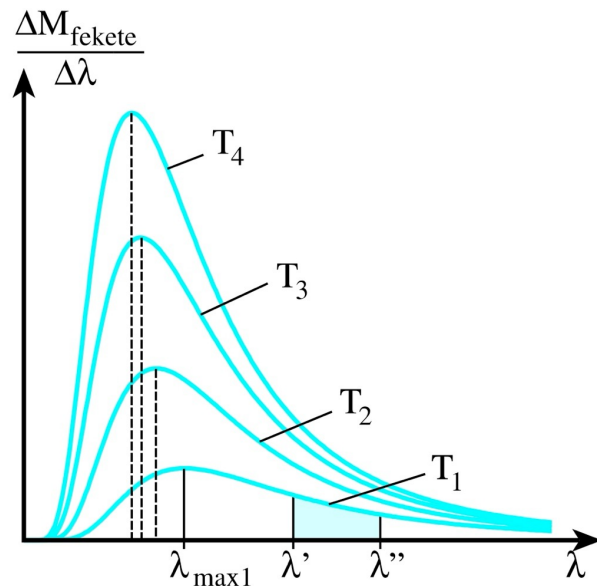
Ludwig E. Boltzmann
(1844-1906)

Wien-féle eltolódási törvény:

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



Wilhelm Wien
(1864-1928)

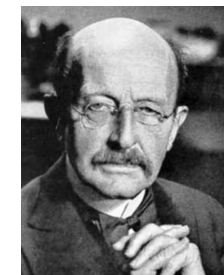


Planck-féle sugárzási törvény:

$$E = hf$$

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

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

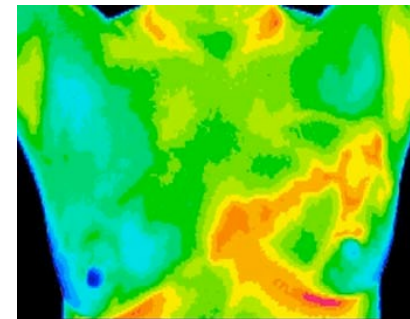


Max K. E. L. Planck
(1858-1947)

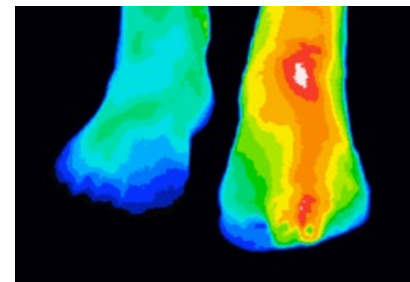
Termikus sugárzás alkalmazása

Thermográfia, infradiagnosztika

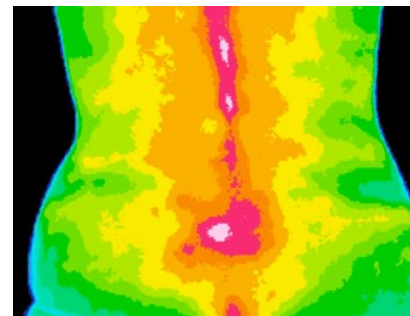
Nem abszorbeáló rétegeten “át lehet látni”



Emlőszűrés,
emlőcarcinoma



Gyulladás



Krónikus
musculoskeletális
stressz (fájdalom)

Reptéri termográfia



Lázás állapot, epidémia/pandémia detektálása, követése

Lumineszcencia

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

Lumineszcencia mindenütt

Foto-
lumineszcencia



Lumineszcencia mindenütt

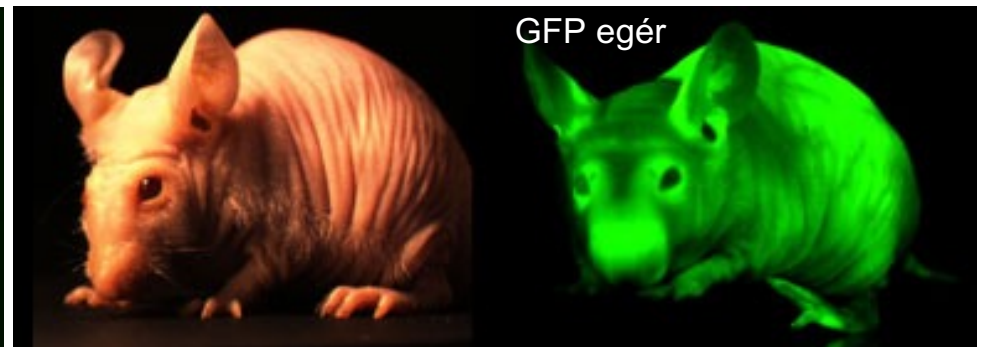
Radio-
lumineszcencia



Bio-/kemi-
lumineszcencia



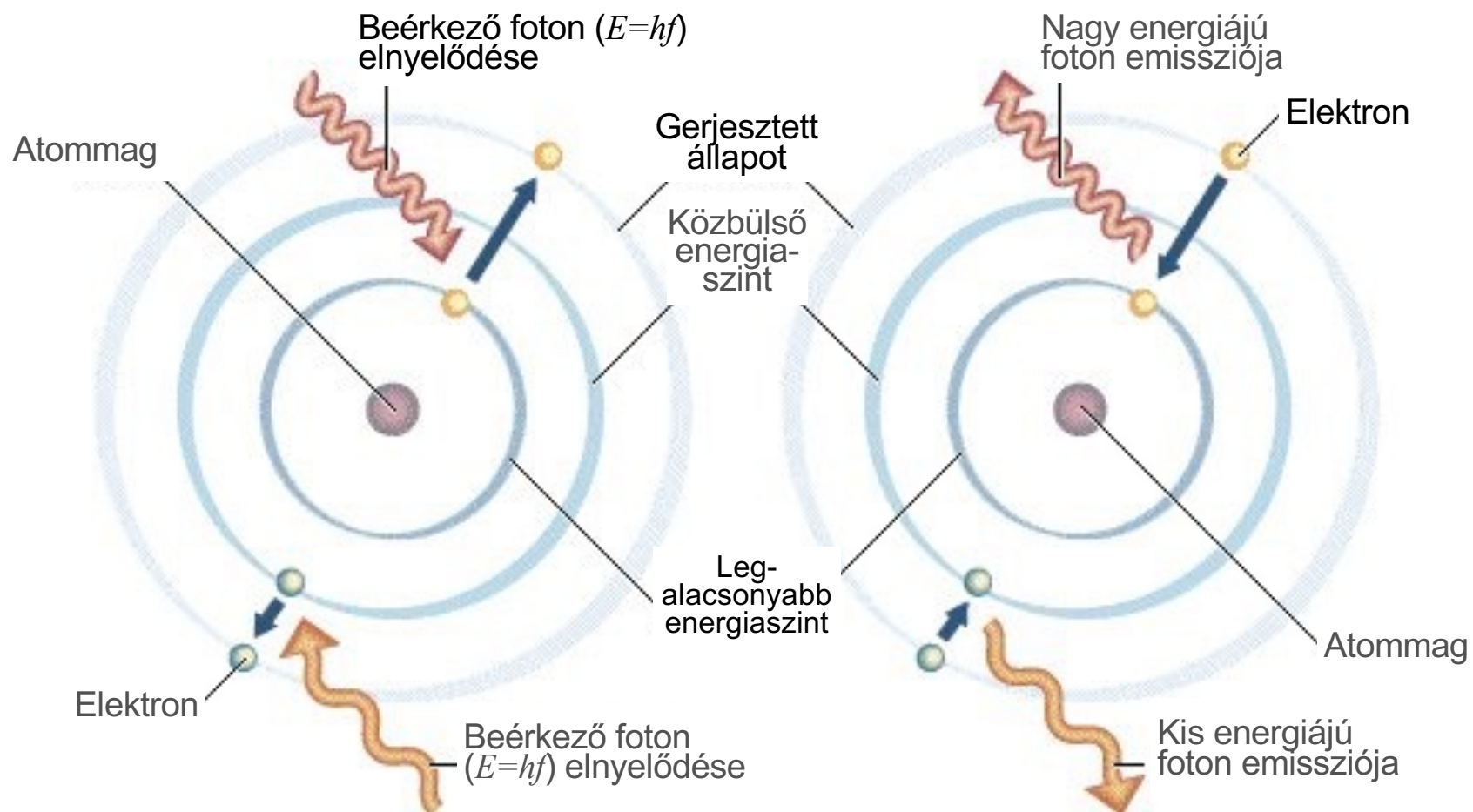
Fluoreszcencia
alkalmazások



A lumineszcencia típusai

Gerjesztés <i>módja</i> szerint	Lumineszcencia típusa
fényabszorpció	fotolumineszcencia
kémiai reakció	kemilumineszcencia, biolumineszcencia
termikusan aktivált ion-rekombináció	termolumineszcencia
töltés injekció	elektrolumineszcencia
nagyenergiájú radioaktív sugárzás	radiolumineszcencia
súrlódás	tribolumineszcencia
hanghullámok	szonolumineszcencia
Gerjesztett <i>állapot</i> szerint	Lumineszcencia típusa
első gerjesztett szingulett állapot	fluoreszcencia
legalsó (gerjesztet) triplett állapot	foszforeszcencia

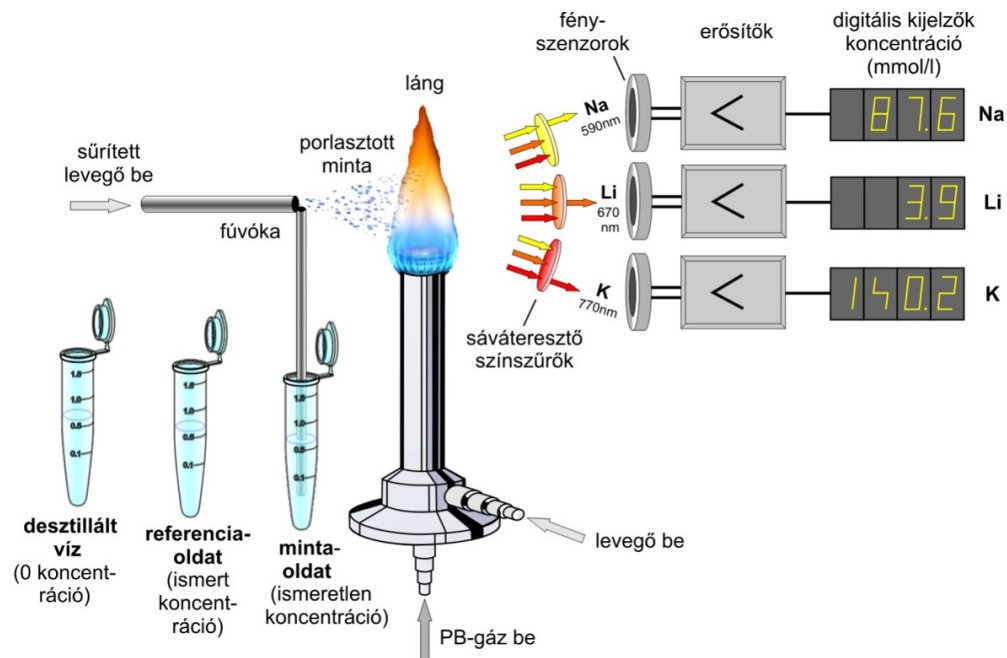
Fényemisszó gerjesztett **atom** által



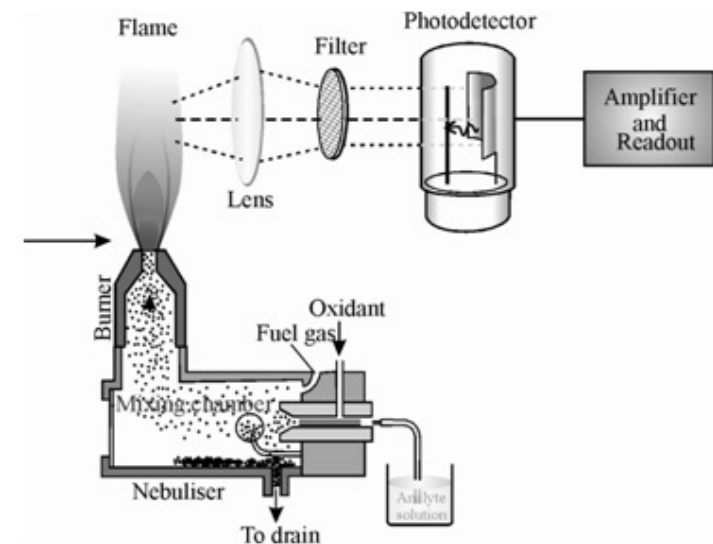
Vonalas emissziós spektrum

Emissziós spektroszkópia alkalmazása: lángfotometria

Alkáli fémek kvalitatív és
kvantitatív meghatározása



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

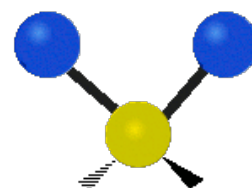
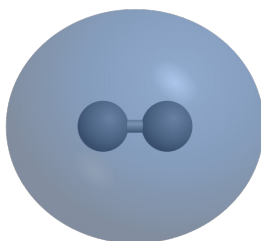


Lángfotométer

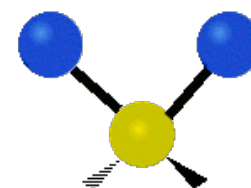


Egy gerjesztett **molekula** emissziója bonyolultabb, mert energianívói összetettek

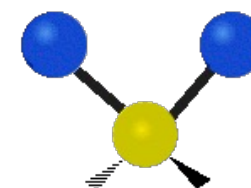
Molekula: kovalens kötéssel
összekapcsolt atomok
Legegyszerűbb eset: kétatomos
molekula (pl., hidrogénmolekula)



Aszimmetrikus
nyúlás



Szimmetrikus
nyúlás



Ollózás

A molekulák **vibrációs** és **rotációs** mozgásokat végeznek: **Vibráció:** kovalens kötés **mentén** történő periodikus mozgás
Rotáció: kovalens kötés **tengelye körüli** periodikus mozgás

Molekula energiája: Born-
Oppenheimer - közelítés:

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

- Energia állapotok egymástól függetlenek.
- Állapotok energianívói kvantáltak.
- Átmenetek energiacsomag elnyelésével/kibocsátásával járnak.
- Energiaszintek nagyságrendje különbözik (lásd ökölszabály).

Energiák skálázódása:

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

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

(Ökölszabály: ultraibolya > látható > infravörös)

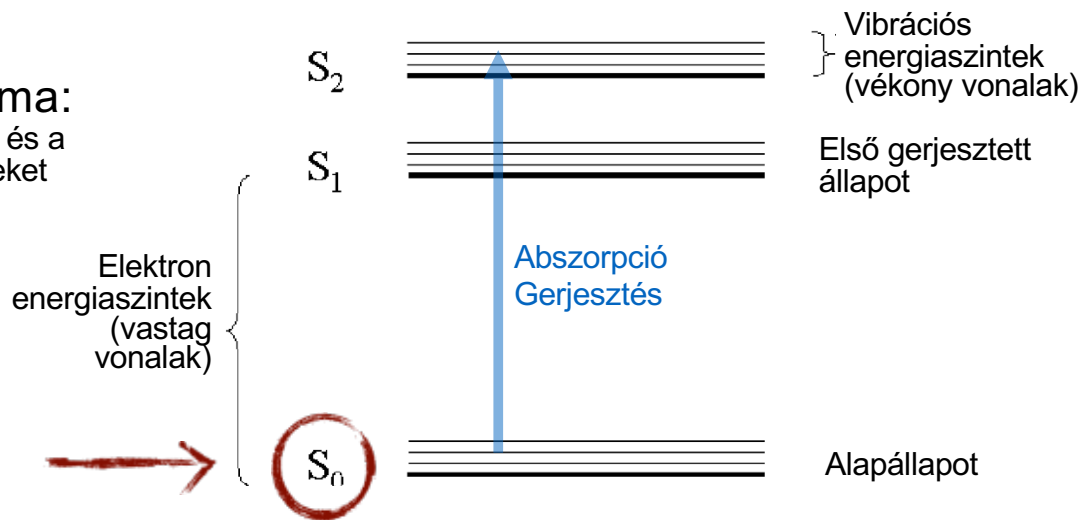
Energia állapotok ábrázolása



Alexander Jabłoński
(1898-1980)

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

Vajon mi ez az "S" (szingulett)
állapot?



Spinállapotok - a Pauli-elv

Wolfgang Pauli
(1900-1958)



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

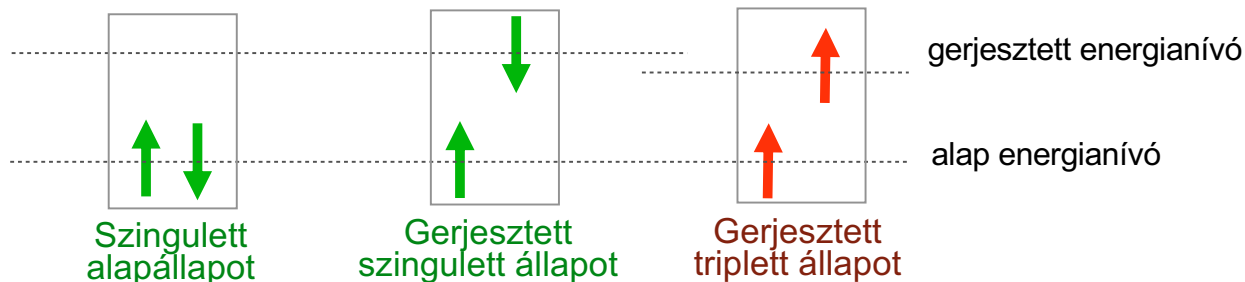


betöltött alhéj: spin párosítás
(ellentétes spinű elektronok
párosodnak)

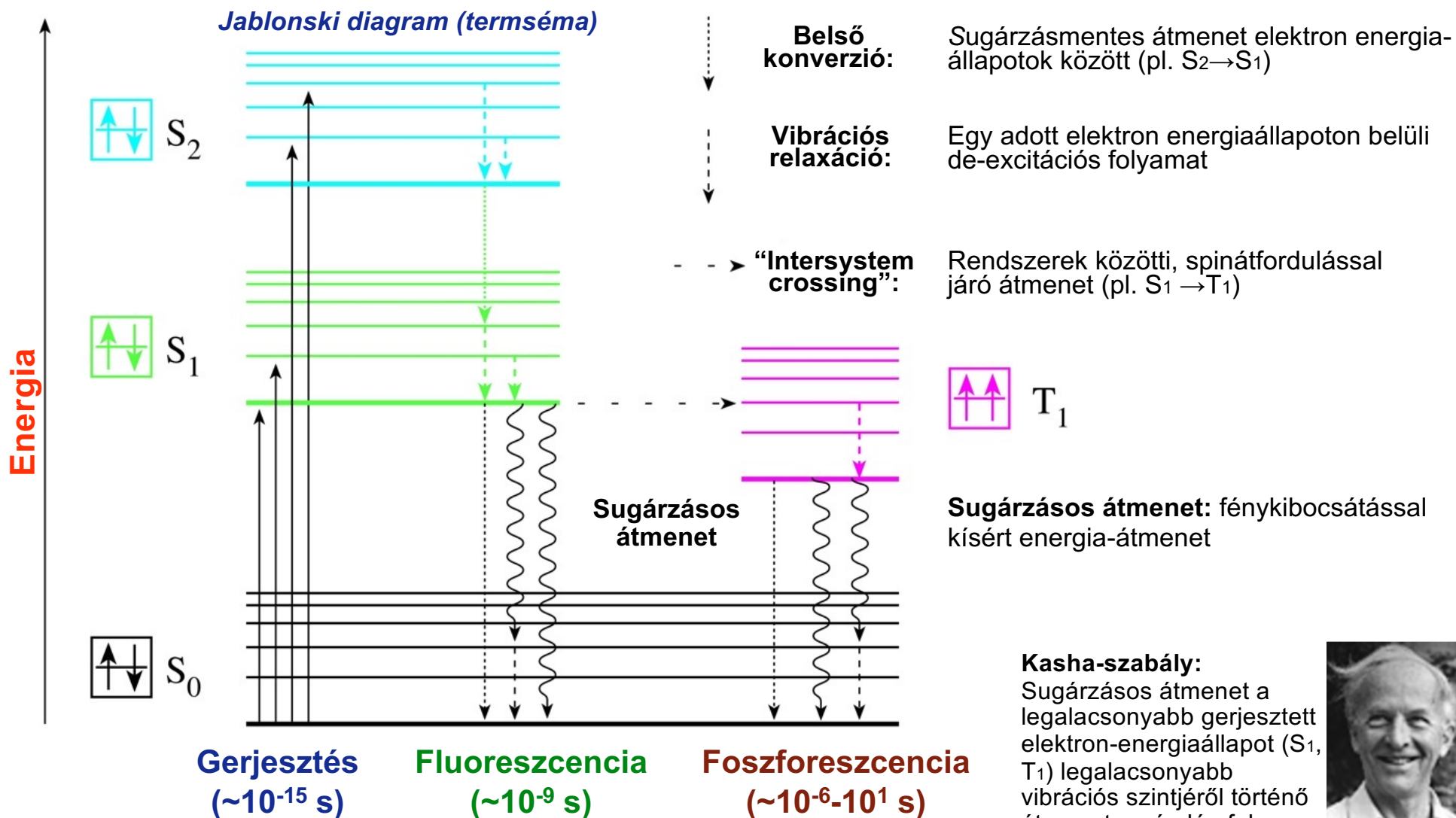
Szingulett és **triplett** állapotok: az eredő spinállapothoz rendelt mágneses momentum **orientációinak száma** (mágneses térben) = $2S+1 = 1$ (szingulett) vagy 3 (triplett). (S = eredő spin, pl. betöltött alhéj esetén $(+1/2)+(-1/2) = 0$)

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** = $(2S+1) = 2+1 = 3$.

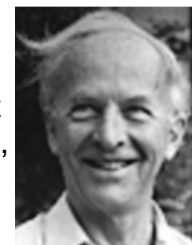


A lumineszcencia folyamatai



Kasha-szabály:

Sugárzásos átmenet a legalacsonyabb gerjesztett elektron-energiaállapot (S₁, T₁) legalacsonyabb vibrációs szintjéről történő átmenet során lép fel.

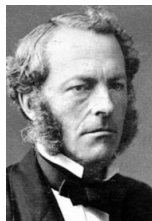
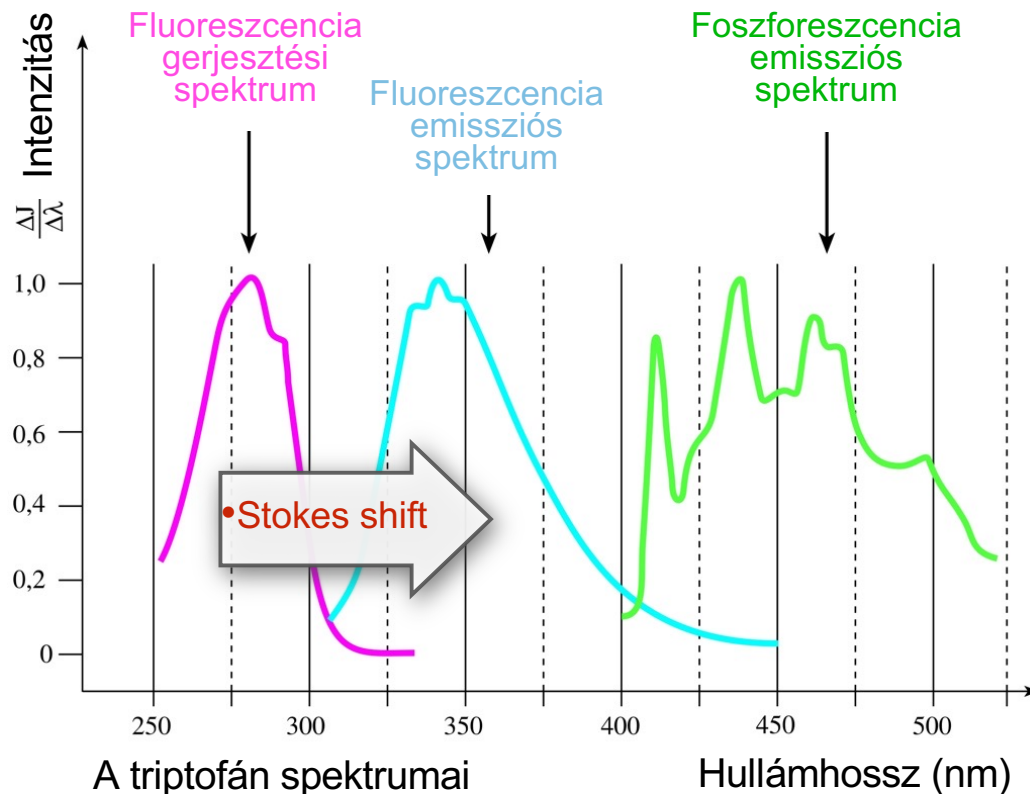


Michael Kasha
(1920-2013)

A lumineszcencia jellemzése

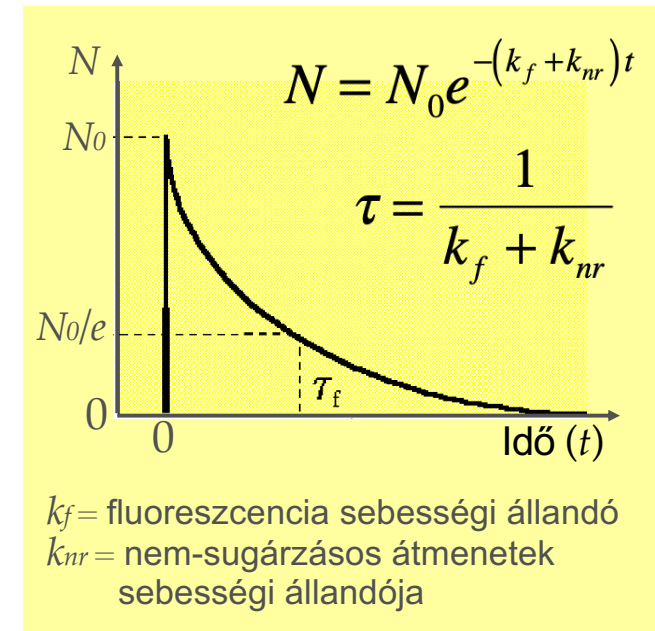
1. Spektrumok

- Sávos
- Gerjesztés-emisszió tükröszimmetrikus



George Stokes
(1819-1903)

2. A gerjesztett állapot élettartama (τ)

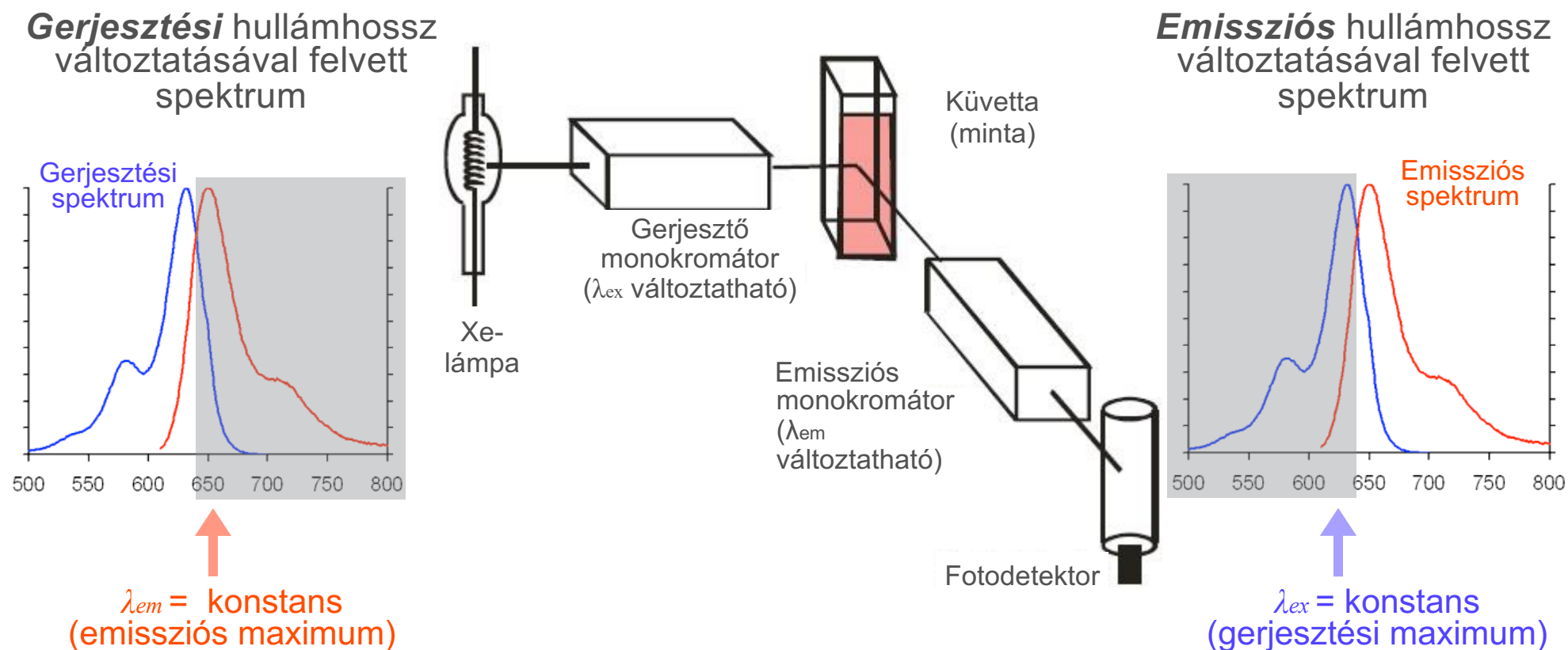


3. Kvantumhatásfok (Φ)

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} = \frac{N_{\text{emittált foton}}}{N_{\text{abszorbeált foton}}}$$

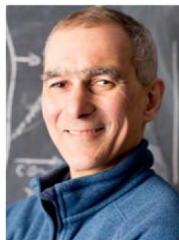
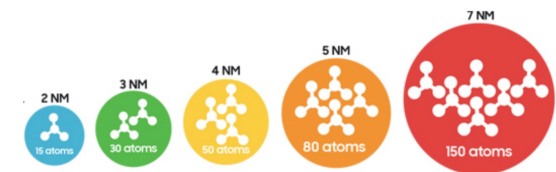
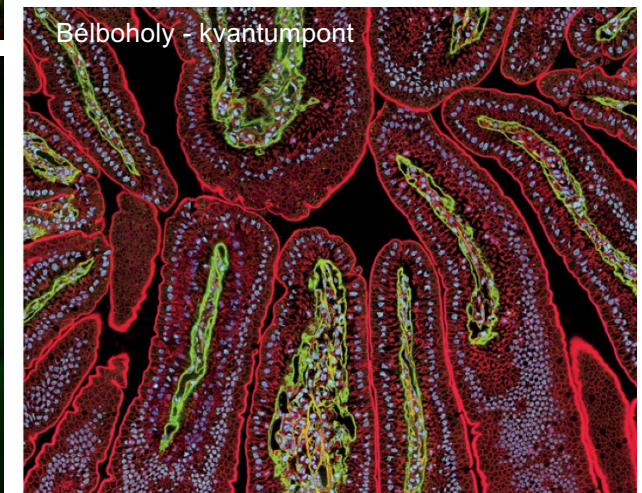
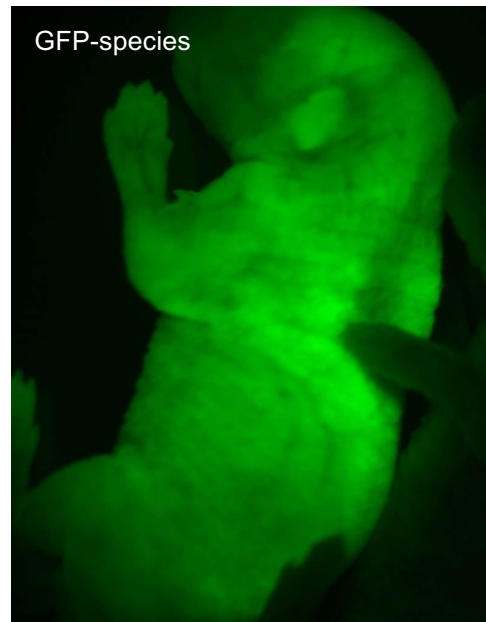
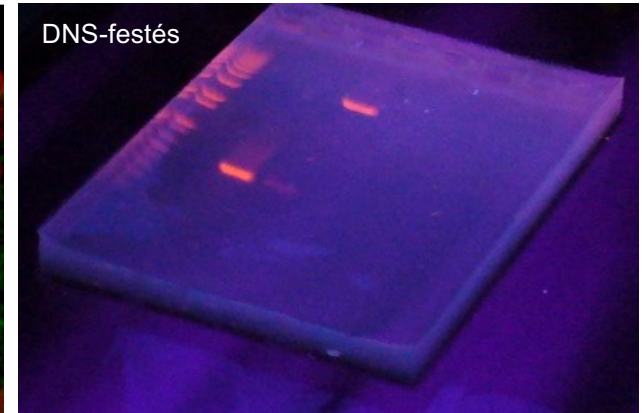
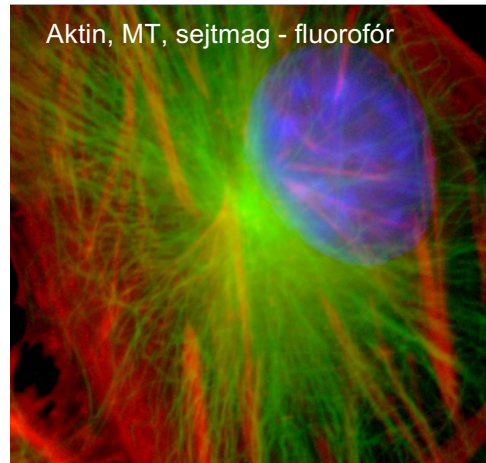
A lumineszcencia mérése

Fluoreszcencia spektrométer ("Steady-state" spektrofluoriméter)



A fluoreszcencia orvosi-biológiai alkalmazásai

- Fluoreszcens jelölés fluorofórokkal
- DNS szekvenálás (lánc terminációs módszer)
- DNS festés (EtBr)
- DNS microarray technológia
- Immunfluoreszcencia
- Fluoreszcens fehérje-konjugációs technikák (GFP)
- Jelölés kvantum pontokkal (quantum dots)
- stb., stb.



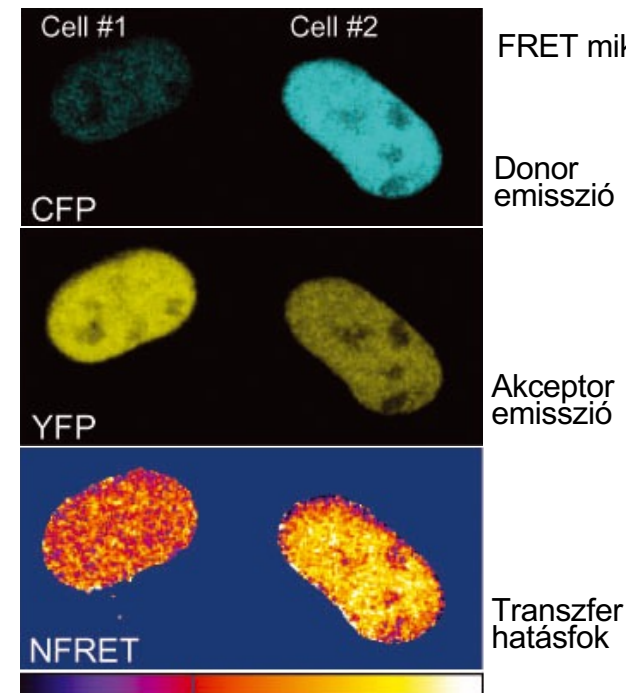
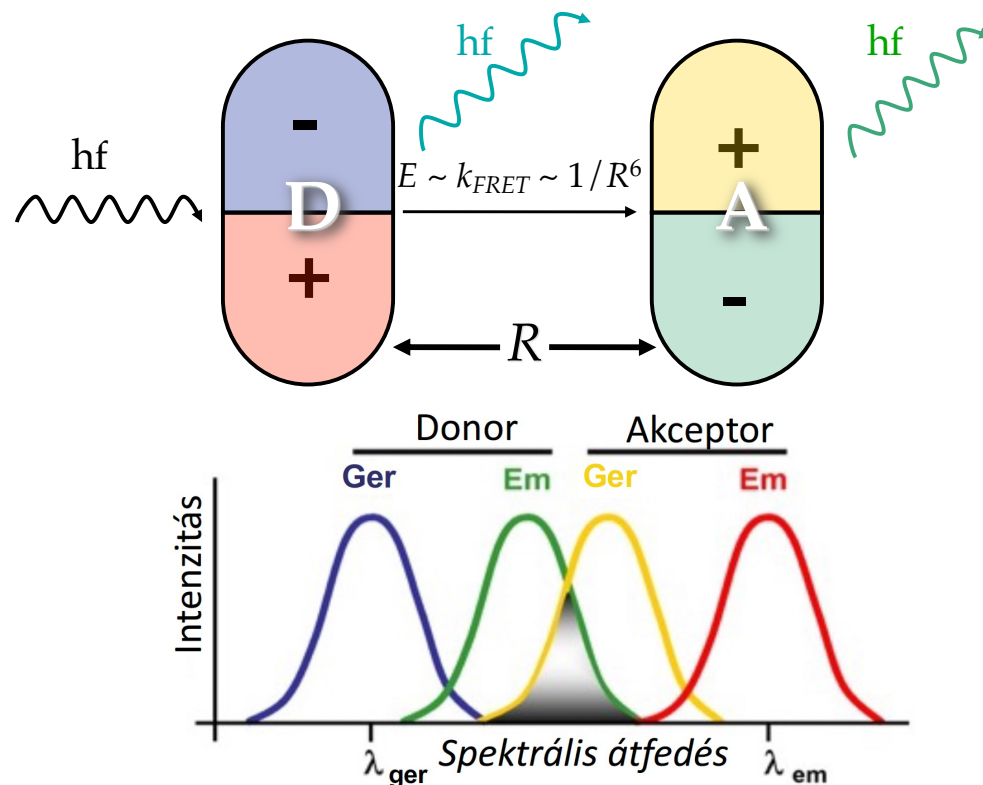
Mounji G. Bawendi, Louis E. Brus, Alexei I. Ekimov
kémiai Nobel-díj 2023

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.
- **Fluoreszcencia Rezonancia Energia Transzfer (FRET)**: energiatranszfer szereplői fluorofórok.
- **Feltételek**: A donor és akceptor molekula közötti **távolság (R)** 2-10 nm! **Átfedés** a **donor** emissziós spektruma és az **akceptor** abszorpciós spektruma között.
- **Alkalmazások**: molekuláris mérőszalag (2-10 nm tartományon); kötődések, kölcsönhatások, intramolekuláris távolságok mérése.



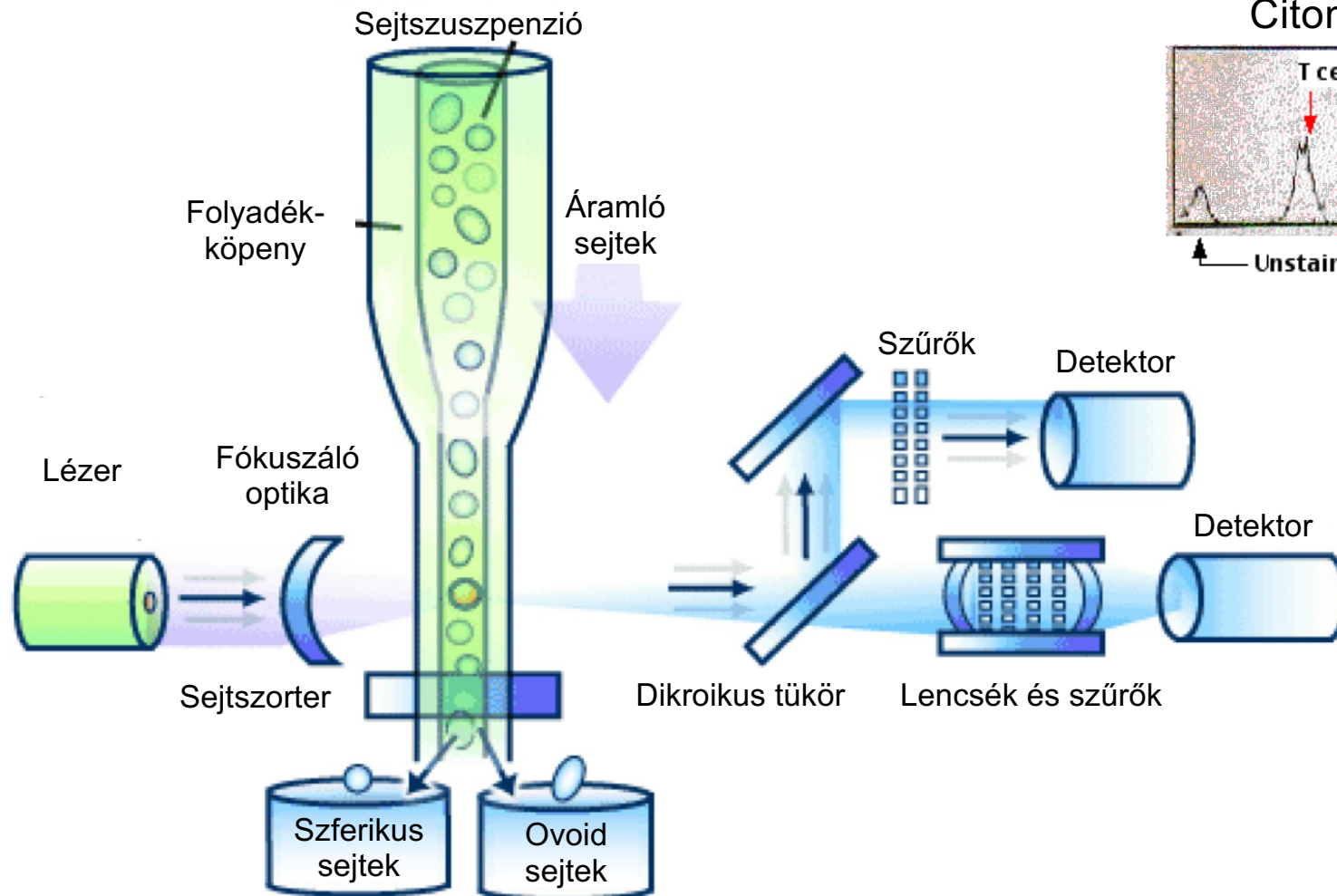
Theodor Förster
(1910-1974)



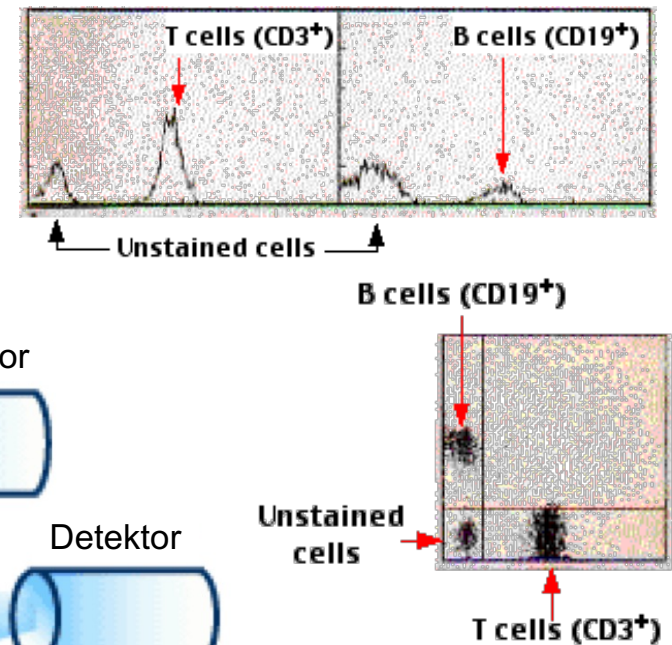
Fluorescence activated cell sorter (FACS)

Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás; Áramlási citometria (flow cytometry)

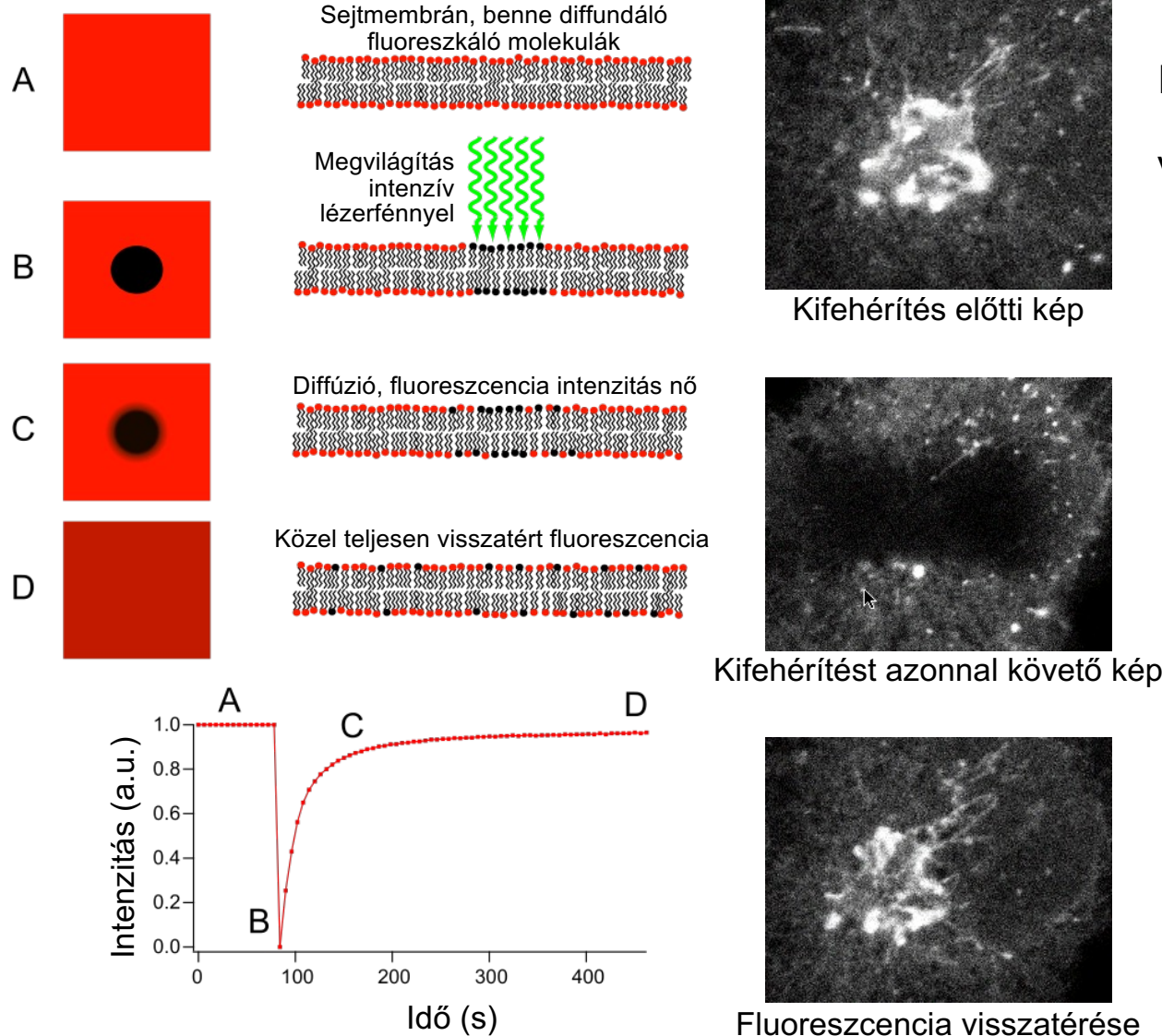
- Fluoreszcensen fajlagosan megjelölt sejtuszupenziót sejtenként analizálunk
- Sok paramétert mérünk (fluoreszcencia intenzitás különböző hullámhosszokon, kis- és nagyszögű szórás)
- Statisztikai analízist végzünk
- Szükség esetén a sejteket szétválogathatjuk a paraméterek alapján



Citometriás statisztika



Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)



Diffúziós állandó meghatározható a fluoreszcencia intenzitás visszatérésének időbeli lefutásából:

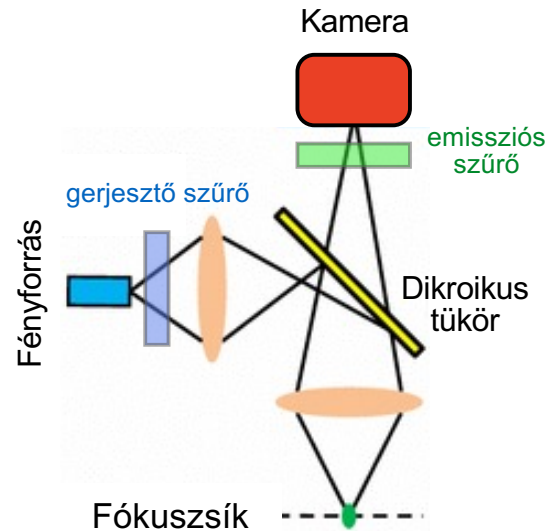
$$D = \frac{w^2}{4t_D}$$

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

N.B.: "Bleaching": fehérítés
 "Photobleaching": fotokifehérítés

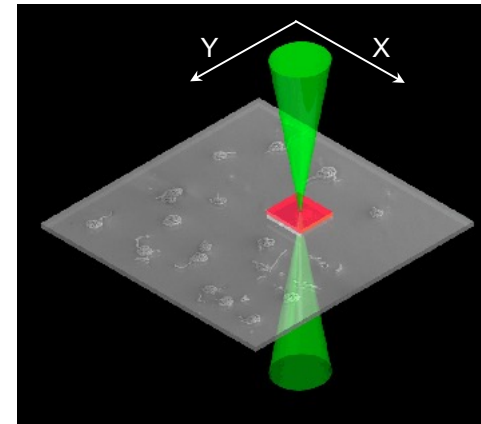
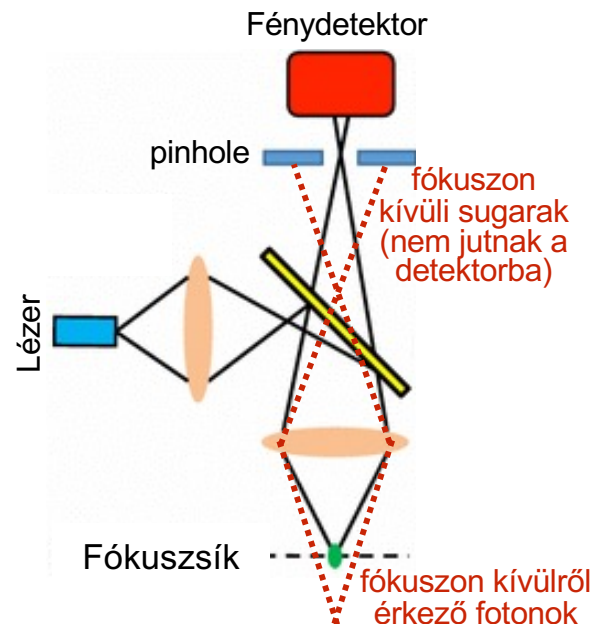
Epifluoreszcencia mikroszkóp és Lézer pásztázó konfokális mikroszkóp

„Epi”:
felületi,
felülről érkező



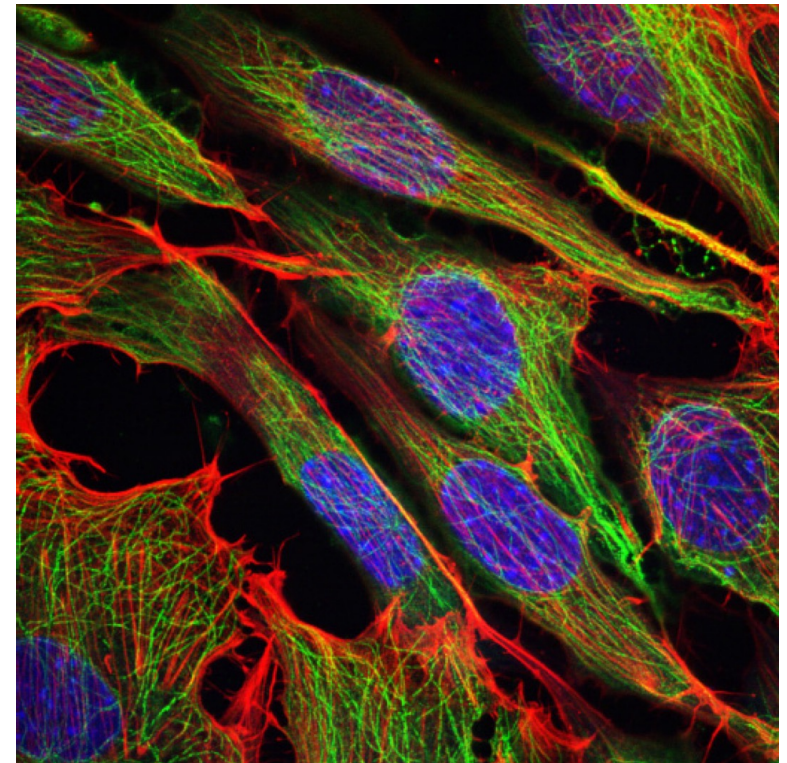
Konfokálitás:
a gerjesztő és
emissziós oldali optikai
geometria fókuszpontja
ugyanaz.

Konfokális elv:
a „pinhole”
segítségével a nem
fókuszpontból érkező
fotonok kiszűrhetők.



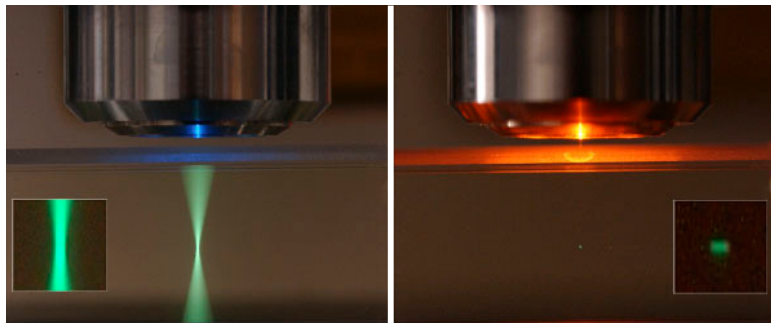
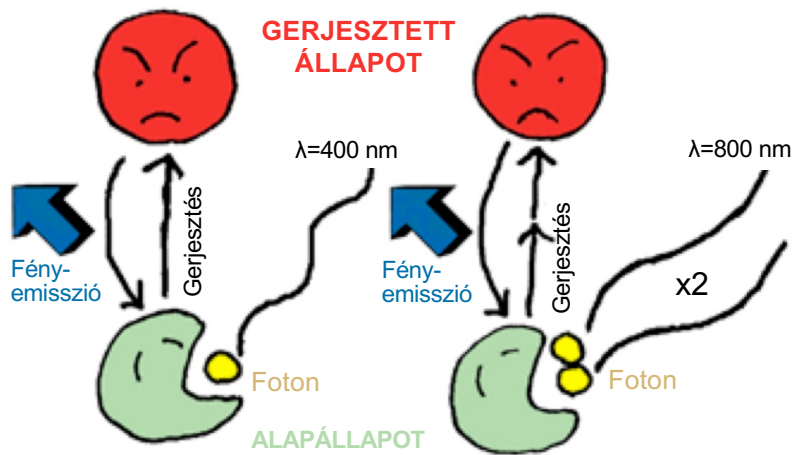
Pásztázás,
pontról pontra
adatgyűjtés

Zöld: mikrotubulusok;
Vörös: aktin;
Kék: sejtmag



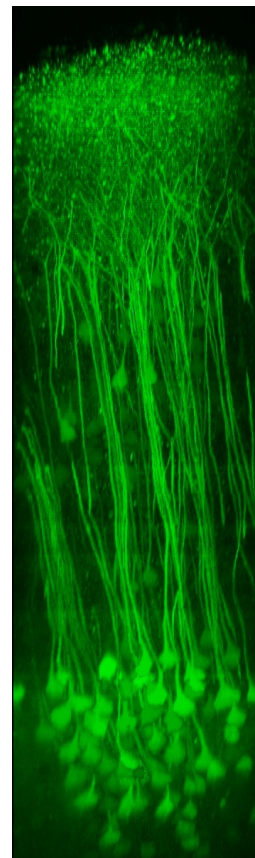
Multifoton fluoreszcencia

- Két (vagy több) foton energiája összeadódik a gerjesztéskor (frekvencia 2x, 3x...)
- Gerjesztés (következésképp emisszió) csak a fókuszpontban (limitált fotokárosítás)
- Gerjesztés nagy (közele IR) hullámhosszú, rövid (fs, 10^{-15} s) fényimpulzusokkal
- Nagy hullámhossz miatt mély optikai behatolás (akár 2 mm!)

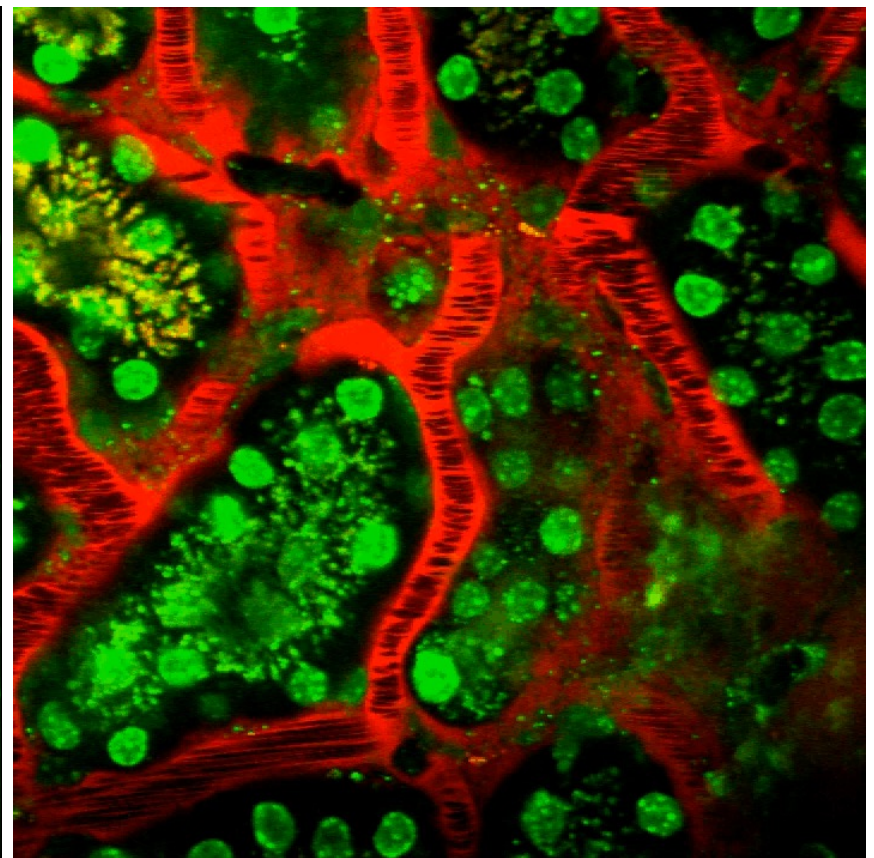


Egyfoton
fluoreszcencia

Kétfoton
fluoreszcencia



Agykérgi piramis sejtek



Zöld: proximális vesetubulusok; Vörös: albumin (plazma)

Szuperfelbontású mikroszkópia

Kémiai Nobel-díj, 2014



Eric Betzig



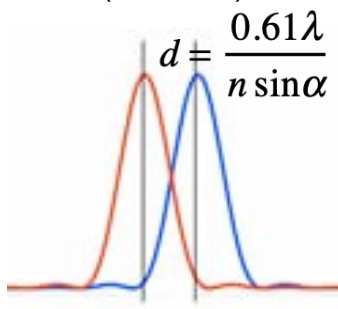
Stefan Hell



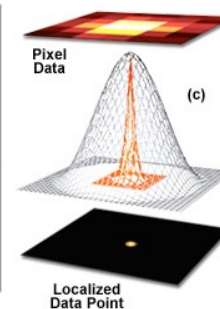
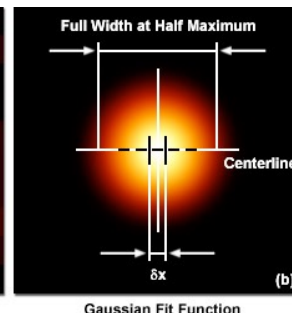
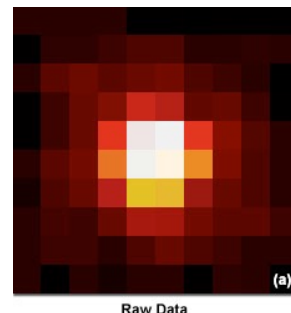
William E. Moerner

A feloldási problémát pozíciómeghatározási problémává alakítjuk!

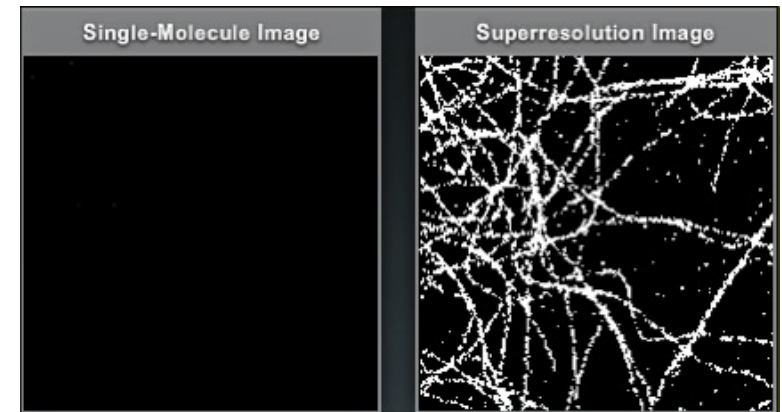
Feloldási probléma
(Abbé-elv)



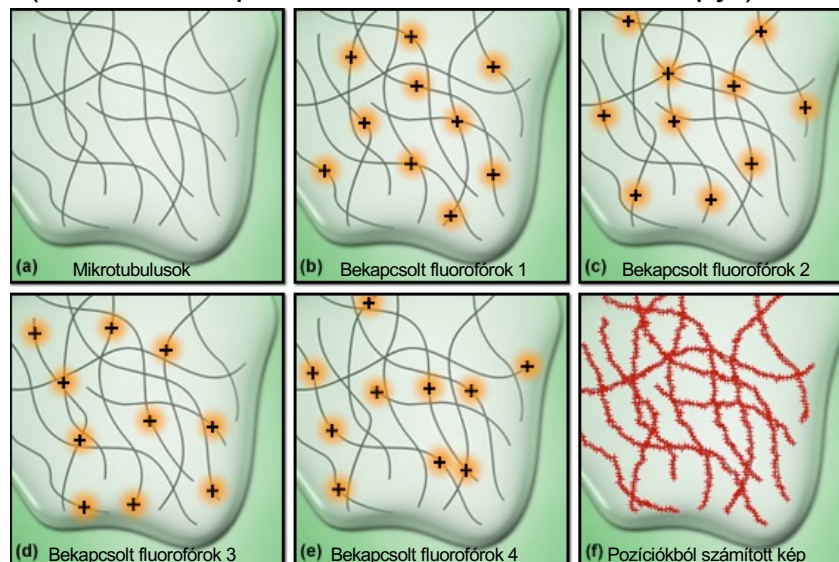
Pozíciómeghatározási probléma
(pontosság a foton számától függ)



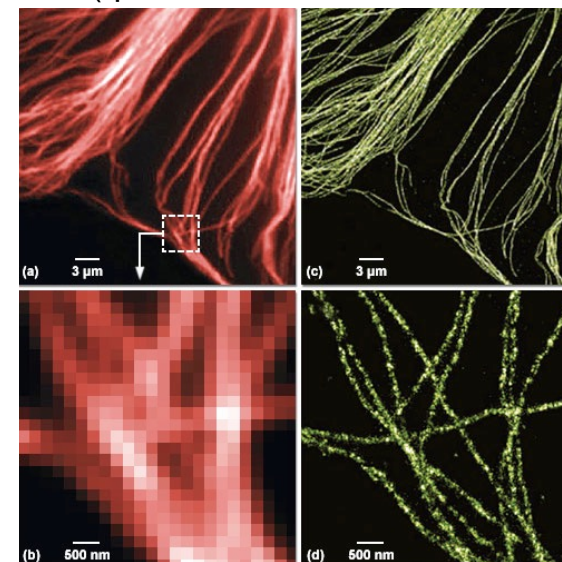
“Sztocasztikus” adatgyűjtés (egyedi fluorofórokról)



STORM (“stochastic optical reconstruction microscopy”); PALM (“photoactivated localization microscopy”)



Adatgyűjtési
folyamat



Mikrotubuláris
rendszer

OMHV



<https://feedback.semmelweis.hu/feedback/index.php?feedback-qr=GCN1855BMP0NG6YZ>