

Szegedi Tudományegyetem TTIK Optikai és
Kvantumelektronikai Tanszék

OTDK Dolgozat

**Fluoreszcens festékek "hot-band" anti-Stokes
fluoreszcenciájának vizsgálata az OptoSplit optikai
rendszerrel**

Készítette:

Sashalmi Balázs

Fizikus BSc hallgató

Témavezető:

Dr. Erdélyi Miklós

egyetemi docens

SZTE Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék

Szeged

2023

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
1.1. Fluoreszcencia	2
1.2. Hőmérsékletmérés nanoskálán	3
1.3. A forró energiasávok elnyelése	4
2. Célkitűzés	6
3. Kísérleti munka	7
3.1. Irodalmi áttekintés	7
3.2. Élettartam mérése	8
3.3. Használt eszközök	10
3.4. Kísérleti elrendezés	11
3.5. Stabilitás mérés (precizitás)	12
3.6. Hőmérsékletfüggés	16
4. Konklúzió	19
5. Köszönetnyilvánítás	20
6. Nyilatkozat	21

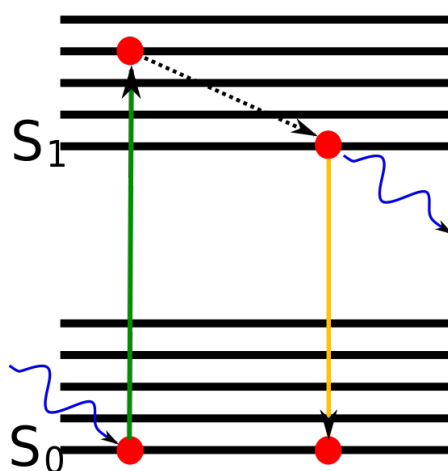
1. Bevezetés

A mikroszkóp feltalálása hatalmas lépés volt a biológia számára. Lehetővé tette, hogy olyan dolgokat is lássunk, amiket eddig a fizikai korlátaink miatt képtelenek voltunk. A mikroszkóp két gyűjtőlencséből (objektív és okulár) álló optikai rendszer, így egy többszörösen nagyított látszólagos képet kapunk. Ennek segítségével rengeteg új információt kaptunk mindenről, amit eddig a szemünk korlátai miatt nem is láthattunk. A hagyományos mikroszkópokat még mind a mai napig alkalmazzák főleg biológiai területeken.

Azonban a fény hullámtermészete miatt nem tudunk tetszőleges felbontásban nagyítani egy képen, hiszen adott nagyítás után elérjük a diffrakciós határt. A diffrakciós határt átlépve pontszerű fényforrás képe nem egy pont lesz, hanem egy folt (Airy-korong). Ilyenkor már a leképezés során már nem érünk el újabb információt. Ennek fényében megnőtt az igény arra, hogy tudjuk, mi rejtőzhet ezen a határon túl, milyen új információkat tudnánk szerezni, ha egyszer átlépjük. A 20. század óta azonban már több módszert is kidolgoztak arra, hogy hogyan lehetne mégis átlépni a diffrakciós határt.

1.1. Fluoreszcencia

Fluoreszcens mikroszkópia során képesek vagyunk az egyedi sejtalkotókat, illetve molekulákat megfesteni fluoreszcens festékekkel (fluorofórok). A fluoreszcencia során a festékmolekulát az S_0 alapállapotából felgerjesztjük egy magasabb, S_1 energiaállapot valamelyik energiaszintjére, majd onnan relaxál a legalacsonyabb, nem betöltött energiaszintre, végül egy foton kibocsátásával visszakerül az eredeti S_0 alapállapotba. Azt, hogy mennyi idő telik el a felgerjesztés után az S_0 -ba való visszakerüléséig nevezzük a fluoreszcencia élettartamának. Mivel van egy kis energiavesztés a relaxálás során, így az emittált foton hullámhossza nagyobb, mint a gerjesztő fotoné. Ezt a hullámhosszbeli eltérést nevezzük Stokes-eltolódásnak. [1]



1. ábra. A normál fluoreszcencia működése

Kísérletek azt is megmutatták, hogy bizonyos esetekben az emissziós spektrum a rövidebb hullámhossz irányába is eltolódik, ezt a jelenséget nevezzük anti-Stokes fluoreszcenciának. Bár intenzitásában az anti-Stokes fluoreszcencia sokkal gyengébb, kellő érzékeny műszerekkel még detektálható. Az, hogy az anti-Stokes jelensége miért történik, arra több ok is lehet. Az egyik ilyen ok lehetnek dipól-dipól mechanizmusok. Ekkor a felgerjesztett (donor) molekula dipól-dipól kölcsönhatásokon keresztül gerjeszt egy másik (akceptor) molekulát. Ezt a mechanizmus hívják hetero FRET-nek (Förster resonance energy transfer). A hetero FRET során azonban a donor molekula élettartama megváltozik a normál fluoreszcens élettartamhoz képest. Egy másik lehetséges mechanizmus a kétfotonos elnyelés, amikor a felkonverzió során a molekula két azonos fotont nyel el. Ekkor elég nagyobb hullámhosszú (kisebb energiájú) fotonnal gerjeszteni, hiszen a felkonverziót két foton fogja elvégezni. A kibocsátott foton hullámhossza így rövidebb lesz, mint a gerjesztő fotoné. [2]

1.2. Hőmérsékletmérés nanoskálán

Makroskálán már hozzászoktunk a hagyományos hőmérsékletmérő eszközökhöz, viszont ha mikro-, esetleg nanoskálán szeretnénk hőmérsékletet mérni, akkor új technikákhoz kell folyamodnunk. Azt, hogy milyen módon szeretnénk hőmérsékletet mérni ilyen kis skálán az is befolyásolja, hogy hol van szükségünk rá. Esetleg biológiai alkalmazásban, ahol szeretnénk akár élő sejtek hőmérsékletét mérni vagy mérnöki ágon, ahol pedig nagyon magas hőmérsékleteket szeretnénk mérni.

Erre a leggyakoribb módszer az infravörösben való detektálás. A feketetest sugárzás miatt minden test sugároz ki magából elektromágneses hullámokat valamilyen hullámhosszon (jellemzően az infravörös tartományon). A sugárzás spektruma és a test hőmérséklete közötti összefüggést Plank törvénye írja le. Mivel a testek jellemzően az infravörös tartományban sugároznak, ezért a hőmérsékletmérés egyik legelterjedtebb módszere az infravörösben való detektálás, amit mind makroskálán, mind nanoskálán alkalmaznak.

Az irodalmi kutatásaim alatt találtam, egy általam érdekesnek tűnő hőmérsékletmérési módszert, az interferometriás hőmérsékletmérést. Ez kihasználja a testek hőtágulását és a hőtágulás során történő hosszváltozásból következtet vissza a hőmérsékletre. Egy interferométer képes az akár kis skálán is bekövetkező hosszváltozást is kimutatni, ugyanis az optikai úthossz ilyen apró hosszváltozásra is érzékeny. Ezt a módszert inkább az iparban használják. Másik, az iparban felhasznált, metodika a termoreflexiós hőmérsékletmérés, amely bizonyos anyagok törésmutatójának hőmérsékletfüggését használja ki.

Azonban a biológiában már relevánsabb hőmérsékletmérési technika például foszforeszkáló anyagok időbeli lecsengésének hőmérsékletfüggése. A foszforeszkálás, a fluoreszcenciához hasonlóan, a fotolumineszcencia egyik fajtája. Annyiban különbözik a fluoreszcenciától, hogy az élettartama sokkal hosszabb. Míg a fluoreszcencia élettartama jellemzően ns-os tartományban van, a foszforeszkálás akár percekig is eltarthat. A fosz-

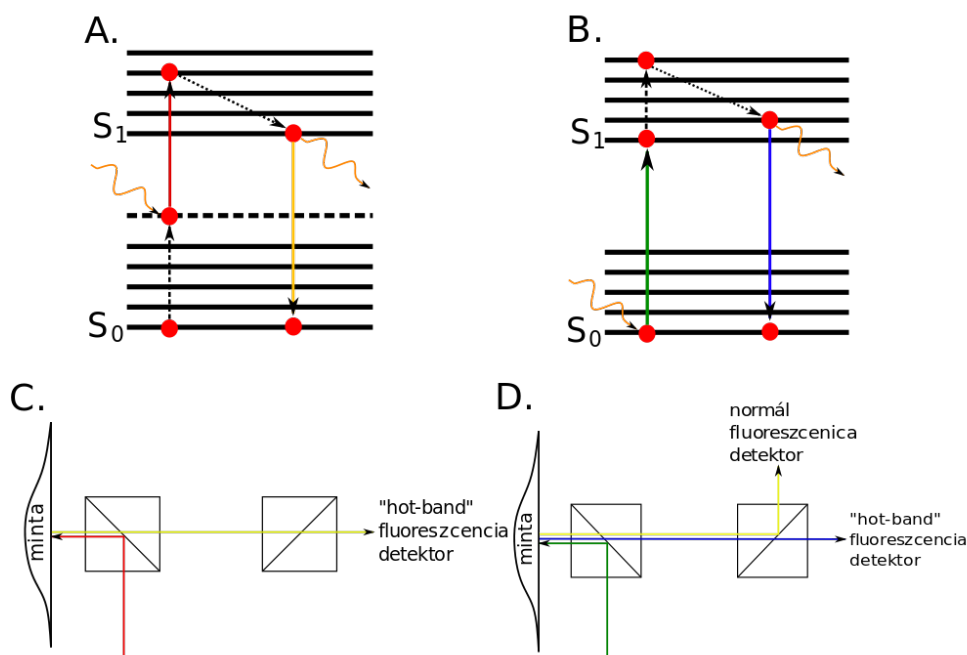
foreszkálás lecsengése bizonyos anyagok esetén hőmérsékletfüggő, ez alapján vissza lehet következtetni a hőmérsékletre. Ezt szintén főleg az iparban használják, de biológiai alkalmazása is elképzelhető. [6]

A biológiában még inkább releváns mérési módszer a Raman szóráson alapul, ami összefoglalóan jelenti a Stokesi és az anti-Stokesi eltolódást. Ezt a jelenséget lehet vizsgálni a Raman spektroszkóppal. A termálisan már felgerjesztett molekulák más vibrációs szinten helyezkednek el, ezek pedig kimutathatók az emissziós spektrumon Stokes és anti-Stokes vonalak formájában. Innen a hőmérséklet visszakövetkeztethető. [4]

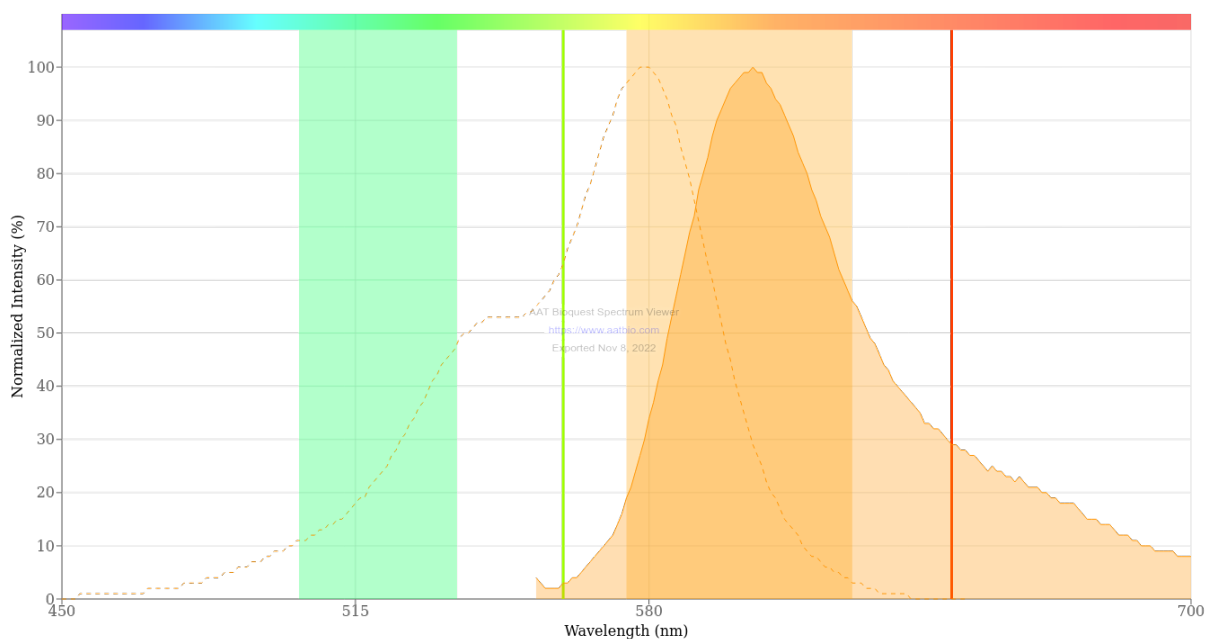
Másik módszer, ahol a biológiai mintát két fluoreszcens proteinnel is megfestik, egy olyan, aminek a normál fluoreszcenciája kevésbé hőmérsékletérzékeny és egy olyan, aminek a normál fluoreszcenciája erősebben hőmérsékletfüggő.[7] Ez használható, viszont élő sejt számára nem feltétlenül kedvező, ezért mi olyan mechanizmust szerettünk volna, ahol elég egy festékkel megfesteni a mintát. Erre használtuk ki a forró energiasávok elnyelést.

1.3. A forró energiasávok elnyelés

Termikus egyensúlyban a vibrációs energiaszintek betöltöttsége a Boltzmann-eloszlást követi, így a magasabb energiaszintekről történő elnyelődés is hőmérsékletfüggő, ez a forró energiasávok elnyelés (hot-band). Ez azt is jelenti, hogy a forró energiasávok elnyeléséhez szükséges többletenergia hőmérsékleti energiából származik. Ilyenkor kétféle hot-band fluoreszcenciáról beszélünk, attól függően, hogy a termális gerjesztés melyik energiaszinten történik. A hot-band nem változtat az élettartamon, ezért el tudjuk különíteni a hetero FRET-től. Ezt a jelenséget terveztük felhasználni arra, hogy hőmérsékletet tudjunk mérni.[3] [5]



2. ábra. A kétféle hot-band működése és detektálása. Az "A." ábrán a termális gerjesztés az S_0 alapszinten történik, ahonnan egy vibrációs energiaszintre gerjesztődik, majd onnan gerjesztődik fel az S_1 -re. A "C." ábrán ennek a fajta hot-bandnek a mérése látható, ahol az emittált foton a dikroikus tükrön át fog engedni. A "B." ábrán a másik fajta hot-band gerjesztés látható, ahol előbb az S_0 szintről gerjesztünk fel és később, az S_1 szinten történik a termális gerjesztés. A "D." ábrán ennek a mérése látható, ahol a normál és az anti-Stokes jelet kettéválasztja a dikroikus tükr.



3. ábra. Az AF568 spektruma és az általunk használt gerjesztések és emissziós szűrők.

2. Célkitűzés

A kutatócsoportnál végzett munkálataim célja az volt, hogy kihasználva bizonyos festékek hot-band tulajdonságát, kidolgozzunk egy metodikát arra, hogy kellő pontossággal ($\sim 0,1^\circ\text{C}$) tudjunk lokálisan hőmérsékletet mérni. A hosszútávú célunk az, hogy lokális hőmérsékletmérést használva megmérjük élő sejtek mitokondriumának a hőmérsékletét. Az irodalom szerint a mitokondrium akár 50°C -os is lehet, ezt szeretnénk volna többek közt belátni. [8] A metodika részeként szeretnénk egy kép regisztrációs algoritmust megírni, amivel lokálisan meg tudjuk mondani a hőmérsékletet.

3. Kísérleti munka

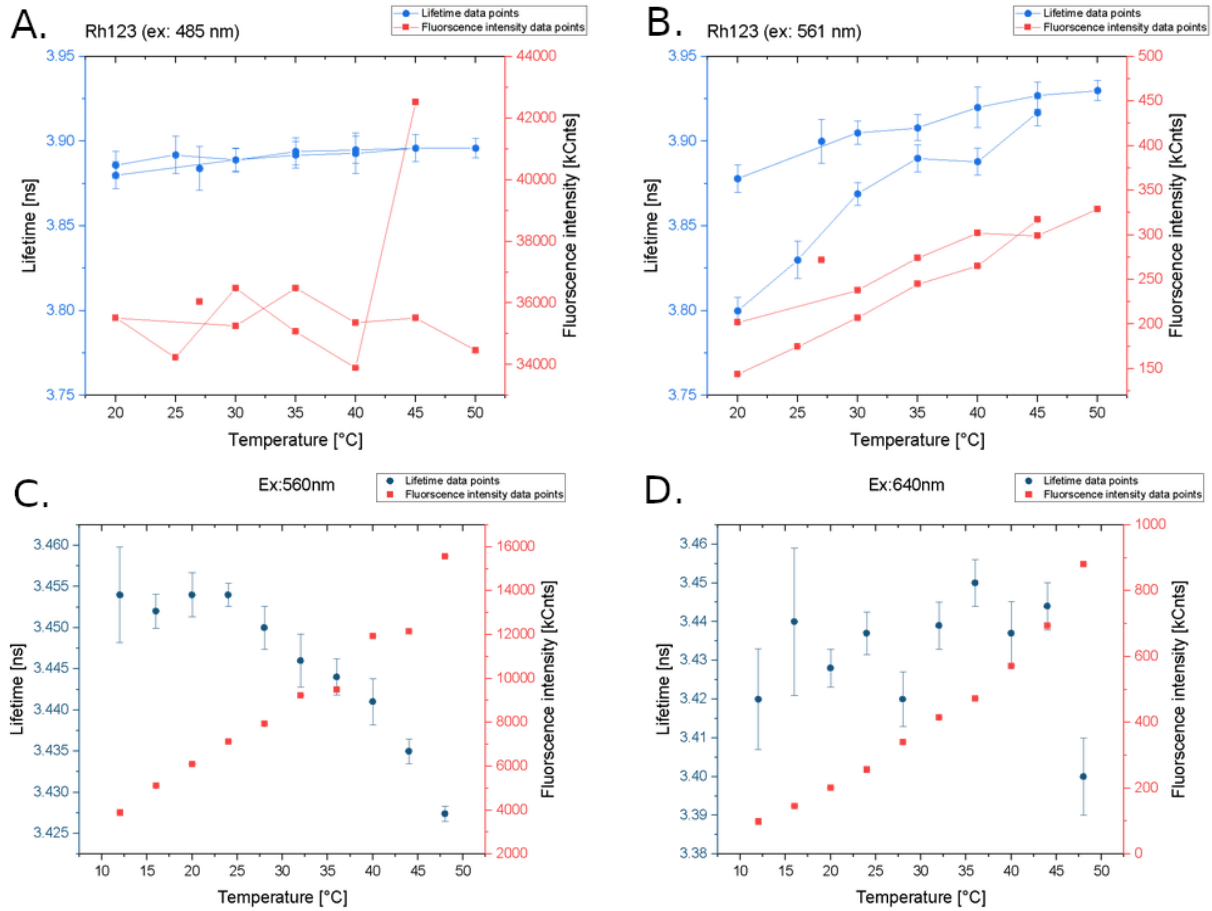
3.1. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi kutatásom főleg Gajdos Tamás volt PhD hallgató doktori disszertációra alapult, hiszen ő végzett hasonló méréseket a kutatásai alatt. [10] Mi szeretnénk volna az ő méréseit reprodukálni és olyan módszereket kidolgozni, amikre neki nem jutott ideje. Tamás mind a Rhodamine 101-nél (Rh101) és az Alexa Fluor 568-nál (AF568) kimutatta a forró energiasávú elnyelést és azt is megállapította, hogy a Rh101 hőmérsékletfüggése erősebb, mint az AF568-é, ezért ő a Rh101-et alkalmasabbnak találta hőmérsékletmérésre. Mi ennek ellenére mégis az AF568-nál maradtunk és ennek a forró energiasávú elnyelését mértük, mivel ezzel a festékkel van tapasztalatunk a kutatócsoportnál.

A célkitűzés alapján, mi adott sejtek mitokondriumjának a hőmérsékletét szeretnénk mérni. Ehhez azt is fontos tudnunk, hogy egyáltalán milyen olyan fluoreszcens festékek vannak, amelyek festik a mitokondriumot. A szakirodalom szerint a legkedvezőbb festék erre a célra a Rhodamine 123 (Rh123).

Végül az általunk választott három festék az AF568, a Rh101 és az Rh123 lett, mivel ezek a festékek mutatták a forró energiasávú elnyelést.

3.2. Élettartam mérése



4. ábra. Az Rh123 és az AF568 élettartam mérésének eredményei. Az "A." és "B." ábrák mutatják a Rh123-as mérés eredményeit. Az "A." ábrán a 485nm-es gerjesztéssel, a "B."-pedig az 561nm-es gerjesztés. A "C." és "D." ábrán az AF568-as mérés eredményei szerepelnek. A "C."-n az 560nm-es, a "D."-n pedig a 640nm-es gerjesztés. A mérési adatokat egy egyoldali exponenciális illesztésből kaptuk.

Ahhoz, hogy meg tudjuk különböztetni a forró energiasávok elnyelést a FRET-től, egy kulcsfontosságú mérés volt a fluoreszcens élettartam vizsgálata, ugyanis FRET-nél ez jelentősen több idő, míg a forró sávok abszorpciónál nem változik jelentősen (a normál fluoreszcens élettartamhoz képest).

Ezt a mérést nem én, hanem Nagy Eszter PhD hallgató végezte és megosztotta velem az eredményeit, ezúttal is köszönöm neki. Élettartam mérésére egy PicoQuant márkájú fotonszámláló volt használva.

Az AF568 mérése során 12-40 °C-ig lett intenzitás és élettartam mérve 4°C-os lépésközzel. A festékkoldat 560 és 640nm-es lézerekkel volt gerjesztve.

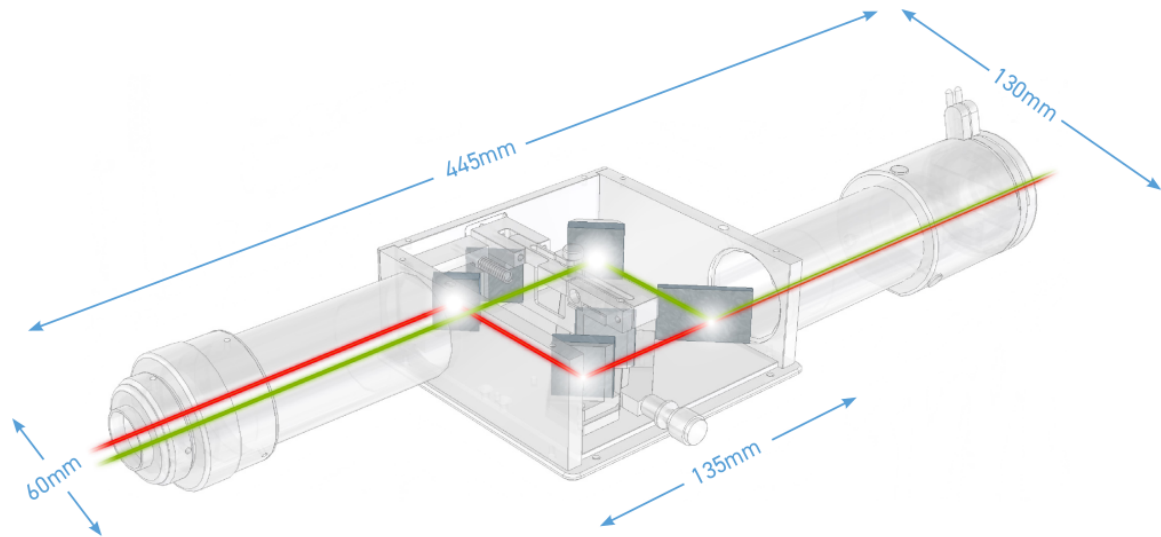
A Rh123 mérése során szobahőmérsékleten (~ 27°C) és 20-50 °C-ig és vissza lettek mérve az intenzitások és az élettartamok 5 °C-os lépésközzel. A festékkoldat 485 és 561nm-es lézerekkel volt gerjesztve.

A 4.ábrán láthatók az élettartam mérési eredményei. A 4/"C." és 4/"D." ábrán az AF568 eredményei szerepel, ahol szépen látszódik is a hőmérséklet növekedésével az in-

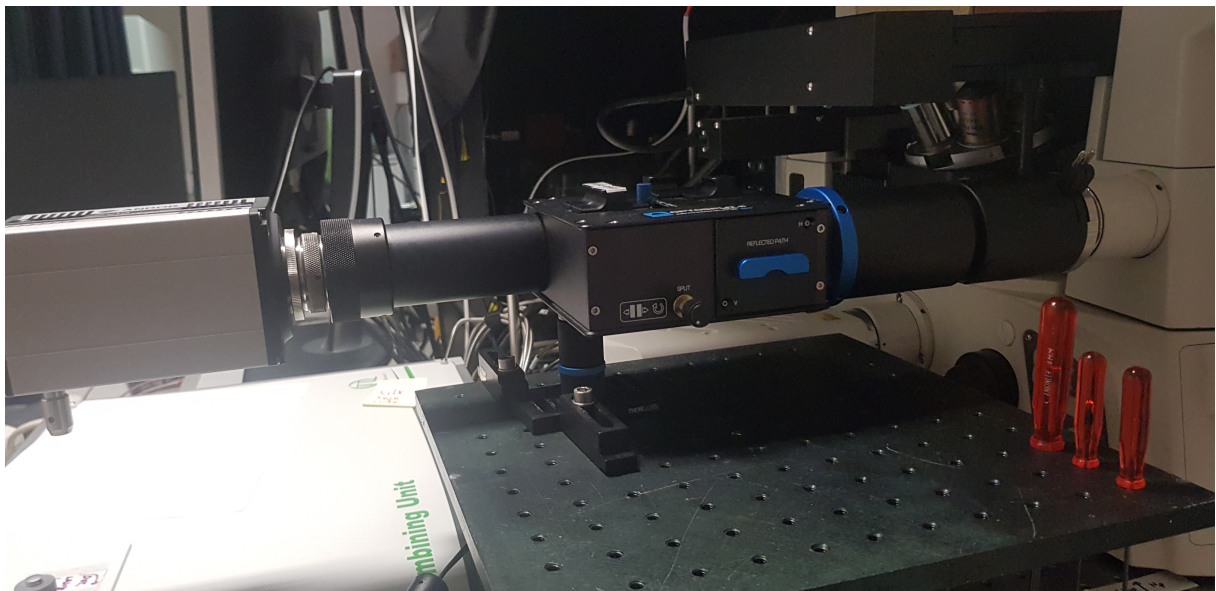
tenzitás mindkét forró energiasávot elnyelés esetén. A 4/”B.” ábrán a Rh123 forró energiasávot elnyelése is látható, illetve az, hogy az élettartam nő a hőmérséklet növekedésével (ez egyelőre megválaszolatlan).

3.3. Használt eszközök

A metodika kidolgozásához az OptoSplit II Bypass optikai rendszert használtuk, ami lehetővé teszi, hogy a beérkező jelet adott hullámhosszon kettéválassza egy dikroikus tükörrel, majd a detektorba az emittált fény úgy érkezett, hogy a kép egyik oldalán a normál fluoreszcenciához tartozó jel volt látható, a másik oldalon pedig az anti-Stokesi jel. Az OptoSplitbe helyezhető egy szűrőkocka, amelybe megfelelő dikroikus tükört, illetve emissziós szűrőket tudunk helyezni.



5. ábra. Az OptoSplit működése



6. ábra. Az OptoSplit beszerelve

Az első mérések során az AF568 fluoreszcens festéket használtuk, hiszen ennek már mutatták ki a forró energiasávok elnyelését. [9]

3.4. Kísérleti elrendezés

Az AF568 fluoreszcens festék forró energiasávot elnyelését az OptoSplit II Bypass rendszer segítségével mértük. Ez a rendszer lehetővé teszi, hogy két csatornán egyszerre tudjunk leképezni. A bemenő nyaláb egy szűrőkockához ér, amely adott hullámhosszon kettéosztja a nyalábot. Az osztott nyalábok útjában lehetőségünk van két-két emissziós szűrőt elhelyezni. Majd miután mindkét nyaláb áthaladt a szűrőkön és visszaverődött a tükrökről, a detektorba úgy érkeznek, hogy térben szét lesznek választva. A kettéválasztás mértéke állítható egy "split" feliratú csavarral, amelyet tekerve a képek óramutató járása szerint elfordulnak. Továbbá a rendszeren található egy csúszka, amely vagy "bypass" módba, vagy "split" módba állítható. Bypass módban, csak az átmenő nyaláb jut a kamerába, míg a Split módban az átmenő és a visszavert nyaláb is látszódik. Az OptoSplit apertúráját, a mikroszkóp felőli végén, két csúszkával lehet állítani, az egyik vertikálisan, a másik horizontálisan szűkíti. Ha az apertúra megfelelő méretűre van beállítva, akkor egy csavar elforgatásával le tudjuk zárni, így nem mozdul el. Az apertúra beállítása után összerakjuk a szűrőkockát. A "reflected path" feliratú mágneses ajtót kinyitottuk és kivettük a kockát. Ebbe a szűrőkockába lehetőségünk van tetszőleges dikroikus tükröt, illetve két emissziós szűrőt belerakni. A kalibrációs kockával tudjuk bekalibrálni a rendszert, illetve be tudjuk állítani a megfelelő apertúraméretet (ez egy 50-50%-os tükröt tartalmaz) vagy használhatjuk a polarizációs kockát, ha polarizációban szeretnénk bontani. A szűrőkockát visszahelyezzük a rendszerbe és visszarakjuk rá a mágneses ajtót, ezután további szűrőket is tudunk mindkét nyaláb útjába rakni. A mágneszáras filtertartót kivesszük és bele tudjuk helyezni a számunkra kívánt szűrőt.

Mivel az OptoSplit-hez nem volt megfelelő dikroikus szűrő, ezért a Picoquant rendszerből kellett a megfelelő szűrőket és dikroikus tükröt kisorsolni. Az OptoSplit egyik kockájából kivettük a T685LPXR (685nm-en választó, long pass¹) dikroikus osztót és egy 719/60² szűrőt. A Picoquant rendszerből kivettünk egy 560LP dikroikus szűrőt, egy 600/50 és egy 520/35-ös szűrőt és ezeket az OptoSplit kockájába helyeztük. Az 560LP lehetővé tette, hogy a jelet 560nm-nél kettéosztjuk és a hosszabb hullámhosszt engedi át, a 600/50-es szűrő csak a normál fluoreszcens jelet, míg a 520/35-ös az anti-Stokesi jelet engedte át. (lásd: 3. ábra) Magát az OptoSplitet egy Nikon Eclipse inverz mikroszkópra helyeztük és egy Zyla sCMOS detektort használtunk. Az AF568-at 561 és 647nm-es lézerrel gerjesztettük.

¹long pass: hosszú hullámhosszat enged át

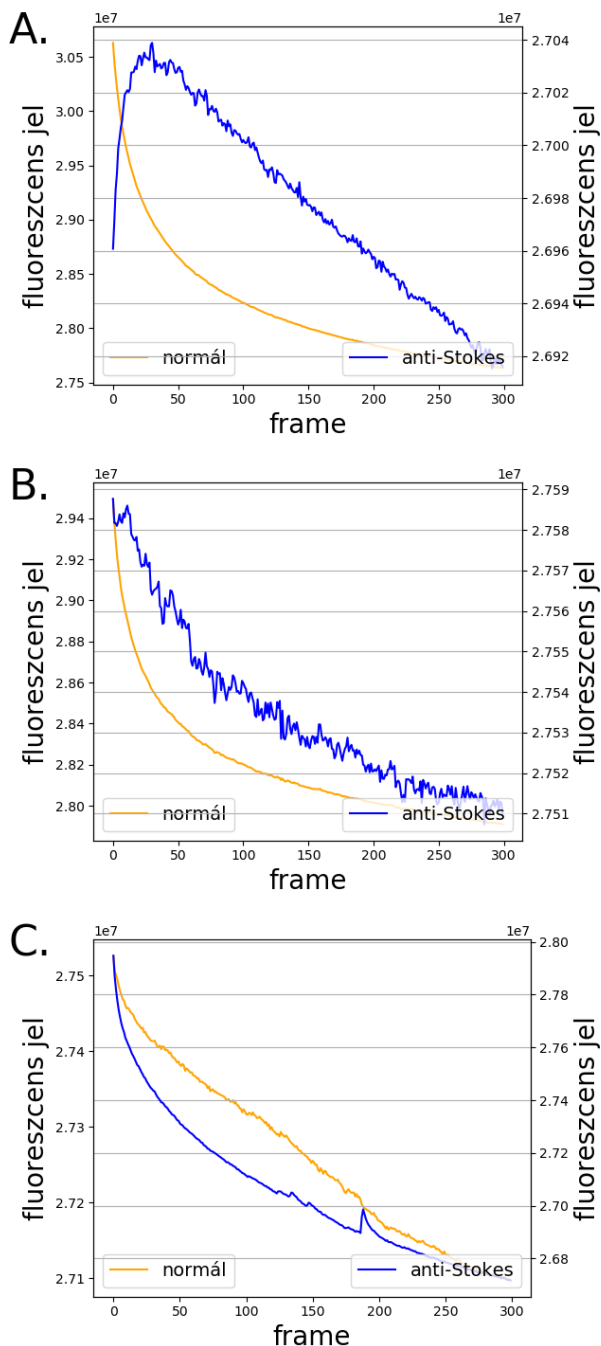
²A x/y alak azt jelenti, hogy x nm központi hullámhosszon, y nm sávszélességgel enged át

3.5. Stabilitás mérés (precizitás)

Ahhoz, hogy ki tudjunk dolgozni egy metodikát, tudni kell, hogy maga a rendszer mennyire stabil. Ennek a mérés körnek a célja az volt, hogy meg tudjuk állapítani, hogy mennyire precízen tudunk mérni. Annak érdekében, hogy ezt ellenőrizzük, elvégeztünk egy pár mérést, amiket ebben az alfejezetben fogok ismertetni. Azt fontos megjegyezni, hogy a stabilitással kapcsolatos mérések időben később készültek, mint a tényleges hot-band mérése.

Az első stabilitással kapcsolatos mérésnél vékony festékkoldatot vizsgáltuk 5 percig és egy felvételt készítettünk 1s-os expozíciós idővel (300 képkocka). Az OptoSplit-be helyeztünk egy 0,1%-os ND szűrőt, ami ezredelte a jel intenzitását. Így a nyers képen kb egyforma intenzitású foltokat láttunk. A mérést elvégeztük szobahőmérsékleten illetve, 20 és 40°C-on. Ezeket a hőmérsékleteket egy Peltier elemmel értük el, amit a festékkoldat lemezére helyeztünk. A felvételt úgy értékeltem ki, hogy a két folt körül körbevágtam a képet és egy numerikus integrállal jellemeztem a fluoreszcens jelet (részletesebben lásd: 3.6 alfejezet). Az eredményeket a 7. ábra mutatja.

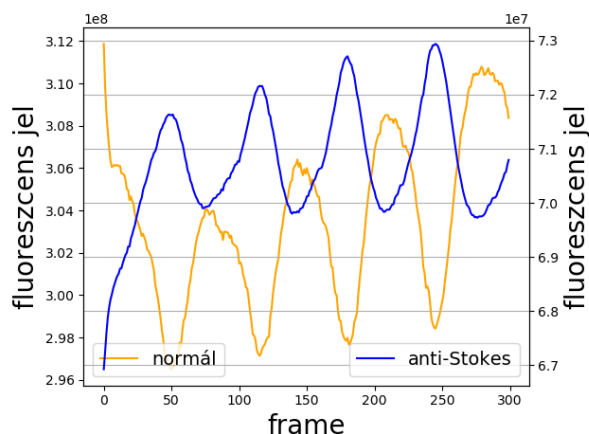
Ez azonban olyan eredmény, amire nem számítottunk. Azt vártuk, hogy a festék adott hőmérsékleten stabil és időben állandó intenzitású. Itt azonban az látszódik, hogy időben exponenciálisan lecseng az intenzitás. Az is látszódik, hogy nem csak a normál jel csökkent, hanem az anti-Stokesi is. Erre több magyarázatot adtunk. Előfordulhat, hogy a tárgylemez közelében voltunk (mivel itt még mindig



7. ábra. Függvény alatti területek az idő függvényében, mind 561nm-es gerjesztéssel. Az "A." ábrán a 20°C-os, a "B." ábrán szobahőmérsékleten és a "C." ábrán 40°C-on. Itt a "fluoreszcens jel" a kivágott függvény alatti területet jelenti. A mérés során az expozíciós idő 1s volt.

vékony festékoldatban vizsgáldtunk), és a festékmolekulák *bleachelődtek*³. A másik magyarázatunk az volt, hogy szintén bleachelődik, viszont lassan diffundál, ezért nem pótlódnak elég gyorsan a festékmolekulák.

Hogy választ tudjunk adni arra, hogy miért történt ez, elvégeztünk egy újabb mérést. Mivel a lassú diffúziót és bleachelődést sejtettük, így a vékony festékoldat helyett vastag mintában végeztük el a kísérletet. Mivel azonban a vastag mintatartóra nem tudtuk ráhelyezni a Peltier elemet, nem tudtuk fűteni sem, tehát csak szobahőmérsékleten néztük.



8. ábra. A fluoreszcens jel az idő függvényében.

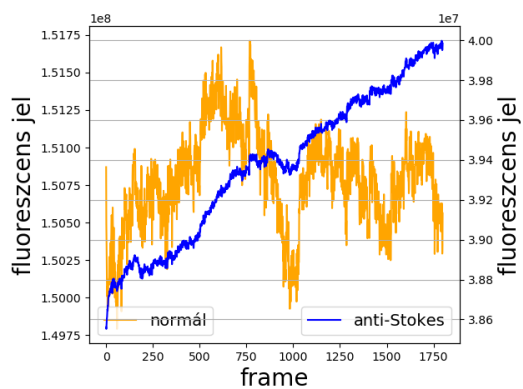
anti-Stokesival. A másik magyarázat maga a mikroszkópframe lett volna, elsősorban a tárgyasztal, amire a minta el van helyezve. Erről ugyanis korábbi ellenőrzésekből láttuk, hogy eléggé fel tud melegedni. A harmadik magyarázat az AOTF(acousto-optic tunable filter[12]) lett volna. Felmerült ugyanis, hogy az AOTF-ből kikerülő lézer hullámhosszában van egy kis moduláció. Ez azonban még mindig nem magyarázta volna a normál fluoreszcencia modulációját.

Mindenesetre elvégeztünk egy mérést arra, hogy ezeket a felvetéseinket ki tudjuk szűrni. Ennél a mérésnél szintén állandó, szobahőmérsékleten tartottuk a mintát. Leellenőriztük magának a légkondicionálónak a befolyását úgy, hogy 30p besugárzás alatt 5 percenként ki és bekapcsoltuk a légkondit. Az AOTF befolyását úgy ellenőriztük le, hogy 15p besugárzás alatt véletlen időközönként bekapcsoltuk a lézer shuttert.

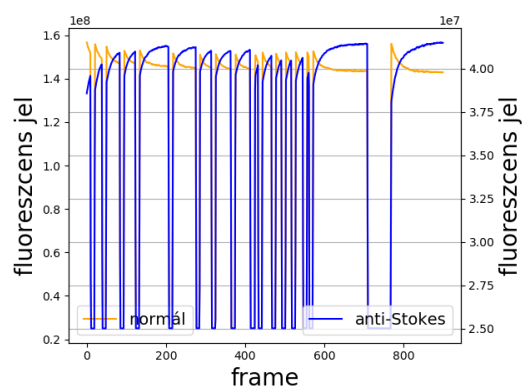
Ennek a mérésnek az eredményei azonban még érdekesebbek voltak. Az látszódik, hogy az intenzitásban fellép egyfajta moduláció. Ráadásul a normál és az anti-Stokesi moduláció ellentétes fázisú. Ekkor merült fel, hogy mennyire stabil egyáltalán az egész rendszer.

Több dologra is gondoltunk, ami okozhatta a modulációt. Az egyik a légkondicionáló volt, hiszen az is, ahogy tartja a hőmérsékletet kissé modulál, viszont attól még a normál jelnek nem kéne modulálódnia és nem ellentétes fázisban az

³bleachelődés: kiégés, a festékmolekula elveszíti a fluoreszcens tulajdonságát.

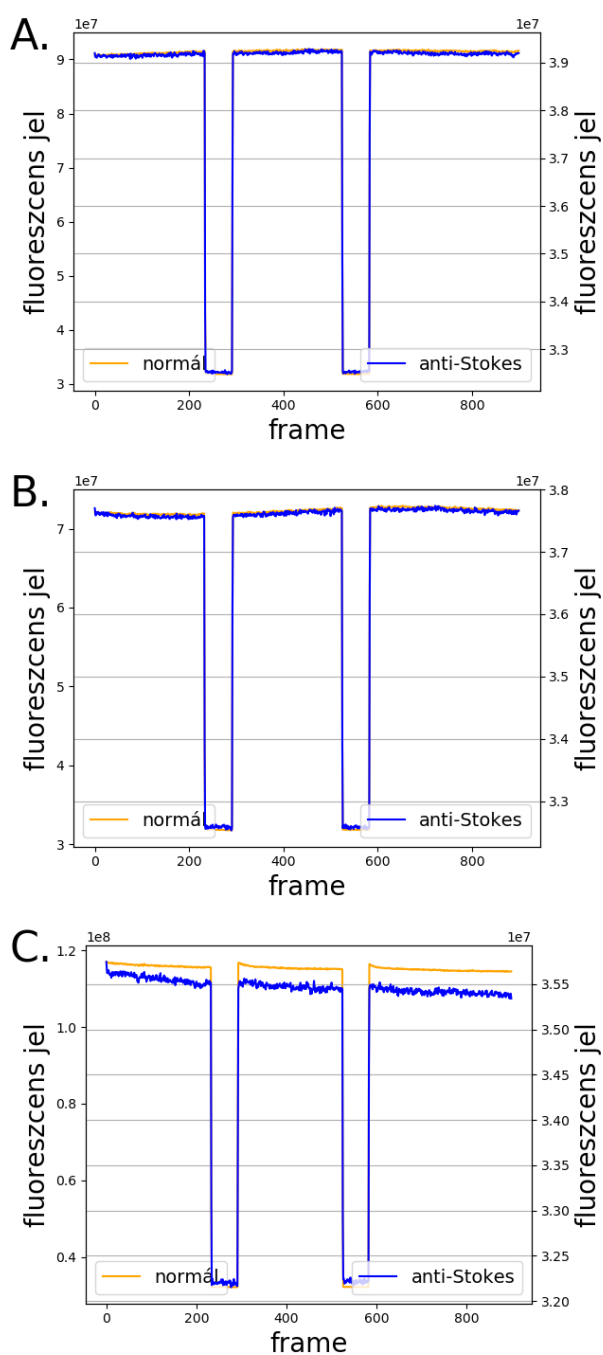


9. ábra. A légkondicionálás mérése



10. ábra. A lézer shutteres mérése

Itt már megszűnt a moduláció, legalábbis azt állapíthatjuk meg, hogy a légkondi nem okozta a modulációt. A lézer shutteres mérésnél azonban ismét előjön az exponenciális lecsengés. A shutter kikapcsolása után az látszódik, hogy az intenzitás felugrik valamekkora értékre, majd onnan exponenciálisan lecseng és beáll egy konstans értékre.



11. ábra. A fluoreszcens jel az idő függvényében. Az "A." ábrán az AF568, a "B." ábrán a Rh101 és a "C." ábrán a Rh123. Itt a fluoreszcens jel egy numerikus integrált jelent, amit a körbevágott képek alapján és a detektorban mért intenzitás alapján számoltam.

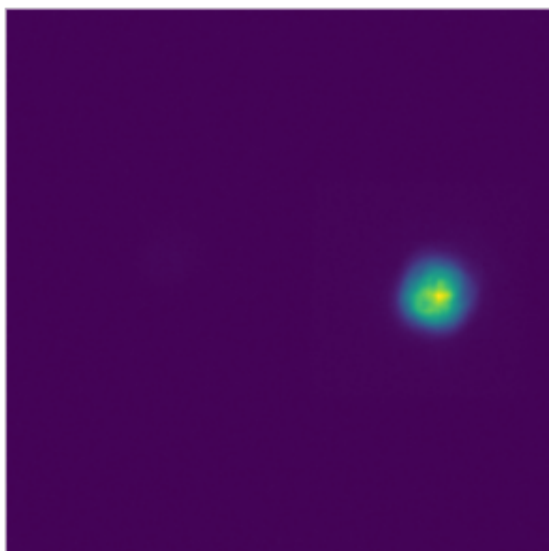
A felvételek kiszűrése érdekében végeztünk még egy mérést, hogy megtudjuk, hogy mi volt az exponenciális lecsengés oka. Most csak szobahőmérsékleten, vastag festékoldatban és mélyen a mintába fókuszálva mértük a festékoldatot. Az erdei célunk az, hogy sejtekben tudjuk a mitokondrium hőmérsékletét mérni. Ehhez az kell, hogy találjunk olyan festékeket, amik tudják a hot-band fluoreszcenciát és képesek festeni a mitokondriumot. Így kigyűjtöttünk több festéket és megnéztük azok anti-Stokes, illetve hot-band tulajdonságát. Ezt a mérést Nagy Eszter PhD hallgató irányításával végeztem, viszont a kiértékelés az én feladatom volt. Ezek alapján döntöttünk úgy, hogy nem csak az AF568-at, hanem a Rh101-et és a Rh123-at is megnézzük azért, mert ezek mutatták a hot-bandet.

A mérés során 4 percre besugároztunk, majd 1 percre becsuktuk a lézer shuttert, majd ismét 4 percre besugárzás, 1 percre shutter és végül 5 percre besugárzás. Mindez szobahőmérsékleten. Itt már javítottam a kiértékelő algoritmuson és a függvény alatti terület helyett már a teljes kép alatti numerikus integrált számoltam. Így jobban közelíthetjük az intenzitást.

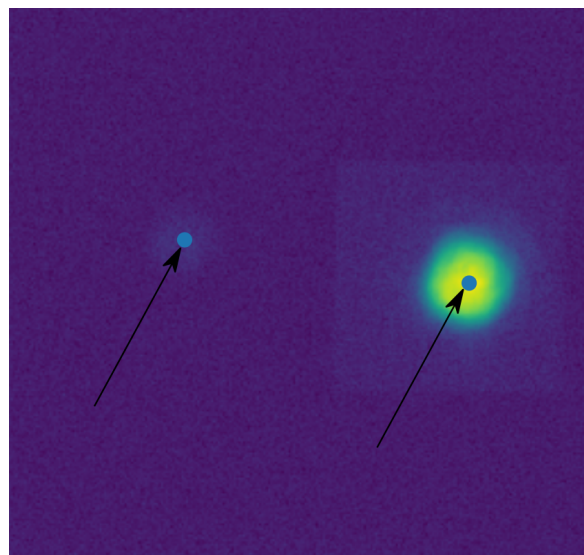
3.6. Hőmérsékletfüggés

A legelső mérés során az AF568 hot-band tulajdonságát akartuk kísérletileg igazolni, ami már ki lett mutatva. A mérés során az AF568-ból vettünk vékony festékréteget, amit egy Peltier elemre helyeztünk, így tudtuk a hőmérsékletét beállítani. Két lézerrel gerjesztettük: 561nm és 647nm. A felvett próbaképeken az látszódott, hogy a normál fluoreszcencia csatornája túltelítette a detektort, ezért behelyeztünk egy ND10 és egy ND25-ös szűrőt, ami tizedeli, illetve negyedeli a jel intenzitását.

A mérés során $T = 15^\circ\text{C}$ -tól $T = 50^\circ\text{C}$ -ig felfűtöttük 5°C -os lépésközzel, majd visszahűtöttük $T = 15^\circ\text{C}$ -ig ugyanígy. Minden hőmérsékleten felvettünk egy felvételt az 561nm-es és a 647nm-es gerjesztéssel is. 561nm-en 40 és 60ms-os expozíciós időt használtunk, azonban 20°C -on 60ms-on már túltelített volt a detektor és csak 40ms-al folytattuk. 647nm-es gerjesztés esetén 500ms-os expozíciós időt használtunk. Az 561nm-es lézer esetén az AOTF 50%-os volt, a 647nm-nél 100%. Minden hőmérsékleten egy pillanatképet vettünk fel és az alapján értékeltük ki a mérést.

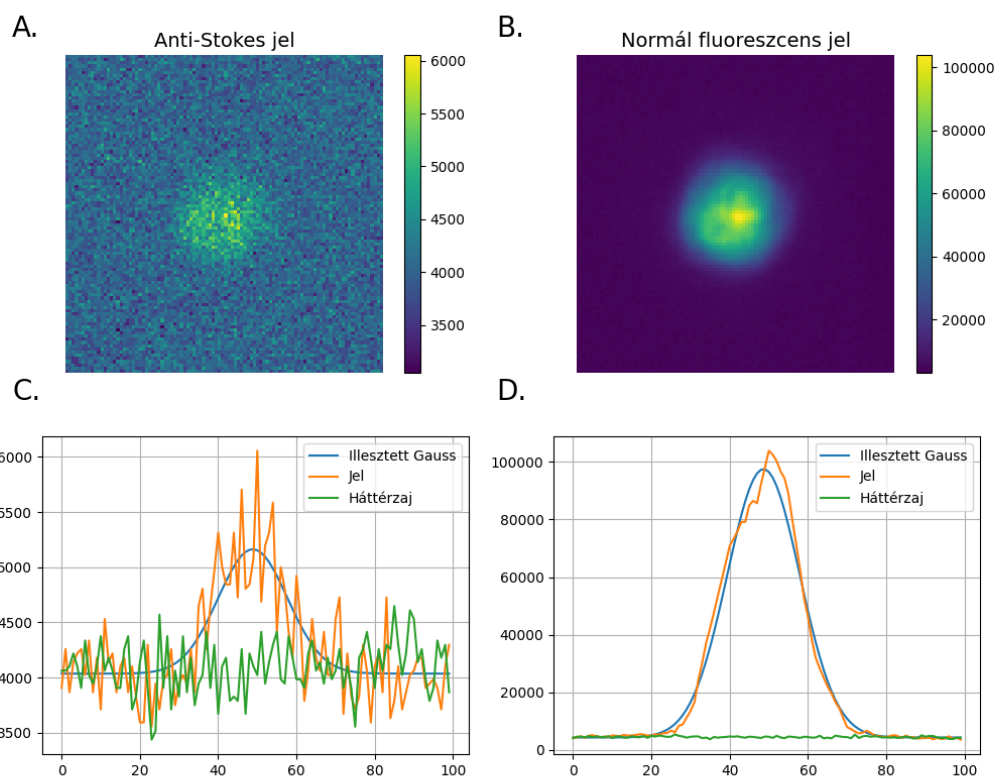


12. ábra. Nyers kép $T = 50^\circ\text{C}$ -on, 561nm-es gerjesztéssel (hamis színezéssel)



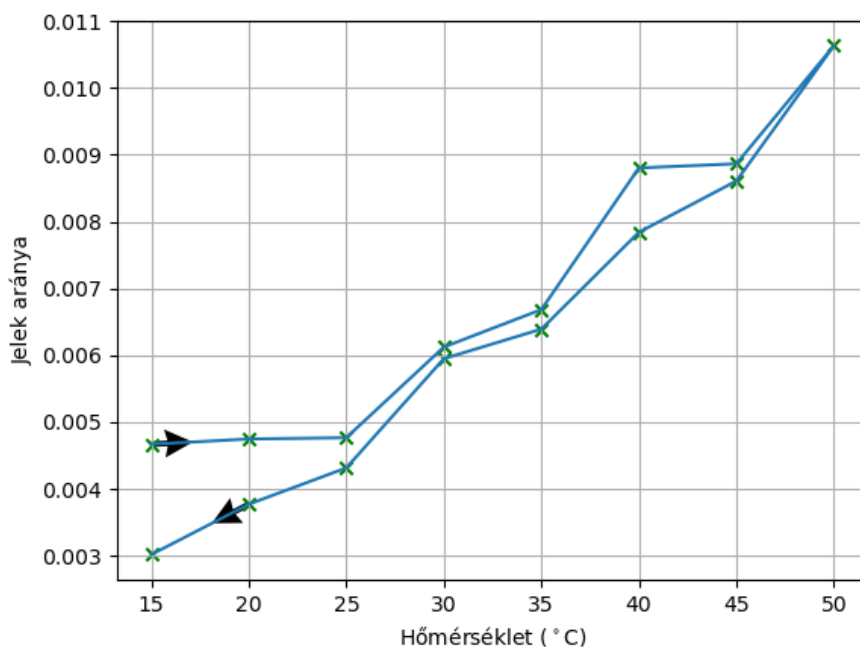
13. ábra. Nagyobb kontraszt, a maximumok jelölve (hamis színezéssel)

A 12.ábrán látható a nyers kép, ahol az alacsony kontraszt miatt csak a normál fluoreszcencia jel látszódik, ezért a 13.ábra mutatja, hogy valóban két jelről beszélünk. A felvétel egy `tif` formátumú fájlba lett elmentve és egy Python kóddal értékeltem ki a következő módon. Lokális maximumkereséssel megtaláltam a két foltot, majd körbevágtam egy 100×100 pixeles képpé. Az eredeti kiértékelés során két módszerrel próbálkoztunk, az egyiknél egy 2D-s Gauss-görbét illesztettünk a foltra és az az alatti területet számoltuk, a másik módszernél egyszerűen a nyers képre vett numerikus integrált vettük. Erre egy példa látható a 14.ábrán.



14. ábra. Kiértékelte képek $T = 50^{\circ}\text{C}$ -on. Az "A." ábrán az anti-Stokesi jel látható a körbevágás után, mellette egy színskála ami a fotonszámot mutatja. A "B." ábrán a normál fluoreszcens jel, szintén a kivágás után színskálával. A kiértékelések a "C." és "D." ábrán láthatók, rajtuk az illesztett 2D-s Gauss görbe, a nyers jel és a háttérzaj.

Így a jelet egy numerikus integrállal jellemeztük. Ahhoz, hogy a koncentrációtól független legyen a mérési eredmény, a hot-band és a normál fluoreszcens jel arányát vettük a hőmérséklet függvényében. Az általunk használt metodika azért is lett volna más, mint a többi, mivel független a koncentrációtól, ugyanis jelek arányát nézzük. Így kaptuk a 15.ábrát.



15. ábra. Jel arány a hőmérséklet függvényében. Az ábrán a kis nyilak a hőmérséklet növekedését és csökkenését jelentik

A normál fluoreszcens jeltől nem várjuk, hogy az intenzitása függjön a hőmérséklettől, csak a hot-bandnél. Ezért a grafikontól azt várnánk, hogy a jelek aránya a hőmérséklet változásával (kis skálán) lineárisan nő. Mivel a célunk az, hogy az 20 és 50°C-os hőmérsékleteket meg tudjuk különböztetni a hot-band alapján. Ha erre az adatsokaságra egyenest illesztünk, akkor a meredekséggel tudjuk jellemezni a festék hot-bandjét, azaz megadjuk, hogy egységnyi hőmérsékletváltozás mekkora jel arány különbségnek felel meg. Az egyenest megillesztettem és a meredekség $m = 0,0001946$ -ra adódott, azaz ezzel a kiértékelési módszerrel egységnyi hőmérsékletkülönbség 0,0001946 jel arálynak feleltethető meg. Ez alapján az AF568-nál kimutatható a forró energiasávok elnyelése.

4. Konklúzió

A kutatócsoportnál végzett munkálataim során megismerkedtem a fluoreszcens mikroszkópiával és megvizsgáltuk különböző fluoreszcens festékek stabilitását és hőmérsékletfüggését. A jel modulációjára nem tudunk magyarázatot adni. Az AF568-nál megállapítottuk a hot-band anti-Stokes tulajdonságot. A lokális hőmérsékletmérésre sikerült egy metódikát kidolgozni, amihez felhasználtuk az OptoSplit II optikai rendszert.

Az irodalmi kutatásaim után megállapítottuk, hogy érdekesebb lenne a Rh123-al foglalkozni, megnézni annak a forró energiasávok elnyelését és hogy hogyan lehetne felhasználni lokális hőmérséklet mérésére. A továbbiakban szeretnénk majd azt is elérni, hogy az OptoSplit segítségével kapott két képet egymásra tudjuk majd regisztrálni, hogy egy sejten belül a különböző hőmérsékletű területek vizuálisan is megkülönböztethetők legyenek.

A precizitással kapcsolatos mérési tapasztalataink alapján ismét el fogunk végezni egy mérést az AF568 hőmérsékletfüggésére.

5. Köszönetnyilvánítás

Ez úton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Erdélyi Miklósnak aki hozzájárult tanulmányi és szellemi fejlődésemhez és szakmai tanácsaival hozzájárult a kutatásaimhoz. Köszönöm továbbá Nagy Eszter és Novák Tibor PhD hallgatóknak, hogy a laborban való munkálataim során segítettek és a sokéves tapasztalataikat átadták. Köszönöm továbbá Gajdos Tamás volt PhD hallgatónak, akinek az eredményeire alapultak az én munkálataim és hogy megosztotta velem a saját tapasztalatait a mérései kapcsán.

6. Nyilatkozat

Alulírott *Sashalmi Balázs* Fizika BSc hallgató (Neptun kód: Z2ZG94) a "*Fluoreszcens festékek "hot-band" anti-Stokes fluoreszcenciájának vizsgálata az OptoSplit optikai rendszerrel*" című TDK dolgozat szerzője fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem, hogy dolgozatom önálló munkám eredménye, saját szellemi termékem, abban a hivatkozások és idézések általános szabályait következetesen alkalmaztam, mások által írt részeket megfelelő idézés nélkül nem használtam fel.

Szeged, 2022. október

.....
Sashalmi Balázs

Hivatkozások

- [1] J Vangindertael et al 2018 *Methods Appl. Fluoresc.* 6 022003
- [2] Valeur, B., & Berberan-Santos, M. N. (2012). *Molecular fluorescence: principles and applications*. John Wiley & Sons.
- [3] M. Quintanilla, L.M. Liz-Marzán, Guiding Rules for Selecting a Nanothermometer, *Nano Today* (2018)
- [4] Peter R. N. Childs, Chapter 1:Nanoscale Thermometry and Temperature Measurement , in *Thermometry at the Nanoscale: Techniques and Selected Applications*, 2015, pp. 1-22
- [5] *J. Appl. Phys.* 128, 040902 (2020)
- [6] Marcus Aldén, Alaa Omrane, Mattias Richter, Gustaf Särner, Thermographic phosphors for thermometry: A survey of combustion applications, *Progress in Energy and Combustion Science*, Volume 37, Issue 4, 2011, Pages 422-461, ISSN 0360-1285
- [7] *Nano Lett.* 2022, 22, 5698-5707
- [8] David Macherel, Francis Haraux, Hervé Guillou, Olivier Bourgeois, The conundrum of hot mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, Volume 1862, Issue 2, 2021, 148348, ISSN 0005-2728
- [9] Gajdos, T., Hopp, B. & Erdélyi, M. Hot-Band Anti-Stokes Fluorescence Properties of Alexa Fluor 568. *J Fluoresc* 30, 437–443 (2020)
- [10] Gajdos Tamás: Nagyfeloldású lokalizációs mikroszkópia több modalitásban (2020, doktori értekezés) <http://doktori.bibl.u-szeged.hu/id/eprint/10417/1/gajdost-phd-dissertation.pdf>
- [11] L.B. Chen Fluorescent labeling of mitochondria *Methods Cell Biol.* (1988), 10.1016/S0091-679X(08)60190-9
- [12] I. C. Chang "Acousto-Optic Tunable Filters," *Optical Engineering* 20(6), 206824 (1 December 1981).