



Nanoszekundum alatti fluoreszcencia élettartamok mérése kék diódalézerrel

TDK dolgozat

Steinbach Ferenc

Témavezető:

Dr. Lenk Sándor, egyetemi docens
BME Atomfizika Tanszék

Budapest, 2022. október

Tartalomjegyzék

1. Elméleti háttér	2
1.1. Rövid impulzusú lézerdiódák	2
1.2. A fluoreszcencia alapjelenségei	5
1.3. Időfelbontásos mérés technika alapjai	8
1.4. Mérés kiértékelési módszerek	10
2. Célkitűzések	13
3. Eredmények	13
3.1. Lézerforrás karakterizálása	13
3.1.1. Mérés elrendezés	13
3.1.2. Teljesítmény	14
3.1.3. Spektrumok	16
3.1.4. Nyalábalak mérése	18
3.1.5. Impulzusalakok	22
3.2. Próbamérések az új fényforrással	23
3.2.1. Klorofill kivonatok vizsgálata	24
3.2.2. Különböző módon stresszelt növényi minták vizsgálata	25
3.2.3. IRF mérése fluoreszcens festékkel	28
3.2.4. Eredmények az új IRF-ekkel	29
3.2.5. Az IRF meghatározásának optimalizálása a még rövidebb élettartamok méréséhez	32
3.2.6. Különböző detektorok hatása	34
4. Összegzés	37
5. Köszönetnyilvánítás	38

1. Elméleti háttér

A fényimpulzus által gerjesztett fluoreszcencia jelenségek karakterisztikus lecsengési ideje a nanoszekundumos, vagy annál is rövidebb tartományba esik. Ahhoz, hogy jó mérési eredményeket lehessen elérni ezen a területen, ennél jelentősen rövidebb impulzusú gerjesztésre van szükség, így jutunk el a pikoszekundumos tartományba. Munkám során diódalézerekkel dolgoztam, a bevezető első részében tehát azokat a mechanizmusokat és elrendezéseket mutatom be, melyek segítségével megérthető egy rövid impulzusú diódalézer működése.

1.1. Rövid impulzusú lézerdiódák

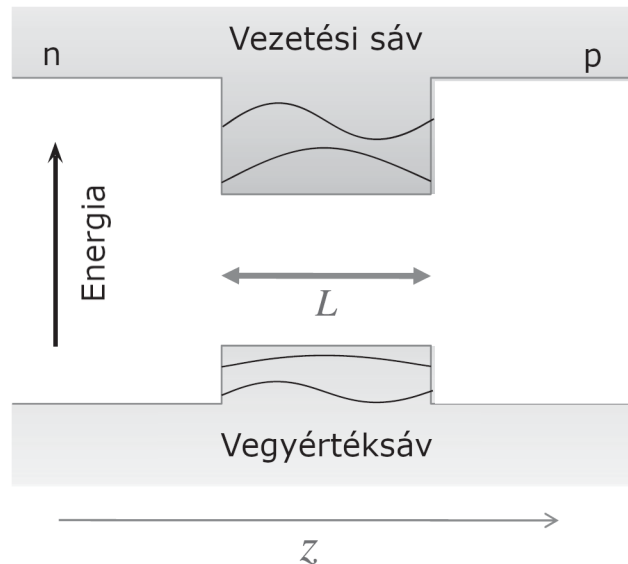
A legelső diódalézerek már a '60-as években elkészültek. Ezek egy egyszerű p-n átmenettel voltak megvalósítva, azonban nagyon kicsi hatásfokuk volt. Ráadásul extrém alacsony hőmérsékleten tudtak csak impulzusüzemben működni. Napjainkra a félvezetőipar jelentős fejlődésének eredményeként a mai diódalézerek igen kis méretűek, ugyanakkor jó hatásfokúak és tartósak. [1]

A lézerek fénykeltésének alapmechanizmusa az indukált emisszió. Ezen folyamat során egy gerjesztett héjon elhelyezkedő elektron találkozik egy akkora energiájú fotonnal, mely pont az ő alapállapotba való visszatérése miatt is keletkezne ($\Delta E = h\nu$). Ekkor a az elektron visszajuthat az alapállapotba és a folyamat során keletkezik egy, az eredetivel megegyező frekvenciájú, fázisú és polarizációjú foton, ami ráadásul a másikkal megegyező irányba is halad.[4]

Az imént leírtak a lézerműködésre általánosan igazak. A félvezető lézerekben a gerjesztett energiaszintet a vezetési sáv jelenti, az alapállapotot pedig a vegyértéksáv. A köztük fellépő energiakülönbségnek megfelelő energiájú fotonokra érvényesül az indukált emisszió. Itt érdemes még azt is megemlíteni, hogy az energiamegmaradás mellett az impulzusmegmaradásnak is teljesülnie kell. Mivel a keletkező foton impulzusa nagyon kicsi az elektronéhoz képest, ezért az úgynevezett direkt félvezetők lesznek alkalmasak ilyen célokra. Ez azt jelenti, hogy a diszperziós relációban vezetési sávnak ugyanott van minimuma, mint ahol a vegyértéksávnak maximuma, az impulzus függvényében. Ekkor teljesülhet ugyanis az, hogy a sugárzásos rekombináció során az elektron impulzusa gyakorlatilag változatlan maradjon.

A leginkább elterjedt elrendezés, melyet diódalézerekben használnak, az egy heteroszerkezet. Egy ilyen konstrukció vázlatát láthatjuk az 1. ábrán. Ez a heterostruktúra a legegyszerűbb esetben három részből áll: egy nagyon keskeny (néhány μm széles) középső tartományban olyan anyag van, melynek kisebb a tiltott sávja, mint a két külső tartományban található anyagé. Egy gyakori megvalósítás, hogy a két szélső blokk anyaga

AlGaAs, középen pedig GaAs található. Ilyenkor a potenciál olyan alakot vesz fel, hogy az elektronok (és bizonyos esetben a lyukak is) becsapdázódnak a középső tartományba. Elektronokat és lyukakat úgy juttatunk a rendszerbe, hogy a két szélső tartományt p, illetve n típusú szennyezővel adalékoljuk, melyek diffúzióval eljuthatnak a tartomány határához, és ott a számukra kedvezőbb középső tartományba kerülnek. [2]

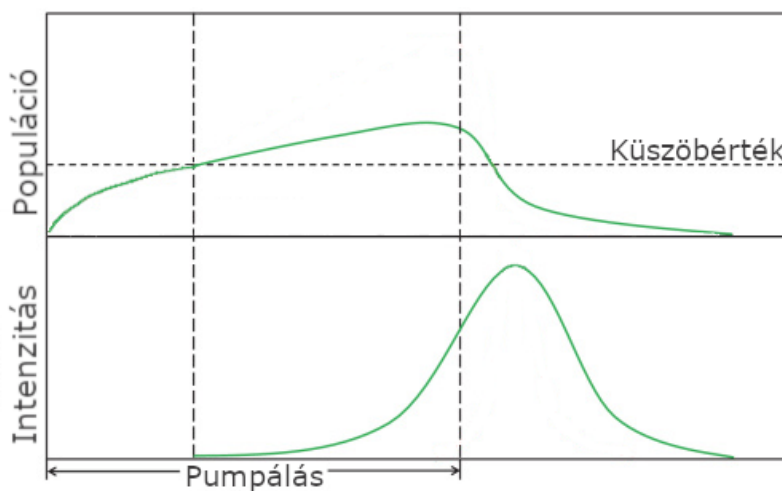


1. ábra. Egy heterostruktúra sávszerkezetének vázlata. A középső tartományban kisebb a tiltott sáv, mint a szélső tartományokban. Az L méret csökkentésével kvantumos viselkedés is megfigyelhető lesz, azaz a középső tartományban diszkrét energiaszintek jelennek meg. Bizonyos alkalmazások esetén ezt a tulajdonságot is ki lehet használni. Az illusztráció a [2] forrás 18.2 ábrája alapján készült

Egy modern diódalézerben valamilyen heterostruktúra alkotja a lézer aktív tartományát. Ezek hatásfoka sokkal nagyobb, mint ami egy egyszerű p-n átmenetnél elérhető, hiszen mint láttuk, a középső régióban „szívesen” tartózkodnak lyukak és elektronok. Egy másik kiaknázható lehetőség ebben az elrendezésben, hogy ha a középső anyag törésmutatója nagyobb, mint a szélsőké, akkor a fény középre koncentrálódik, ami egy nagyon jó tulajdonság lézerek készítésénél. A korábban példaként említett AlGaAs és GaAs anyagokra építő konstrukció rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal. Az anyagválasztást természetesen alapvetően meghatározza azt, hogy az eszközzel milyen működési hullámhosszt szeretnénk elérni. [1]

A lézer fénykibocsátását az indukált emisszió szolgáltatja, ahogy erről korábban szó esett. A lézerműködésnek két alapfeltétele az inverzpopuláció fenntartása (azaz, hogy a gerjesztett nívón legyen nagyobb a részecskeszám), és egy visszacsatoló mechanizmus (rezonátor). Amikor nincs elegendő gerjesztett elektron, akkor is tud lenni fénykibocsátás,

de olyankor LED-működésről, nem pedig lézerműködésről beszélhetünk. A megfelelő rezonátor az indukált emissziót kiváltó fotonok visszacsatolása miatt szükséges: ugyanis - ahogy az az imént bemutatásra került - az indukált emisszió által keletkező foton ugyanolyan frekvenciájú, mint az őt kiváltó, ezért alkalmas lesz később újabb fotonok keltésére ugyanilyen folyamatok során. Egy ilyen heterostruktúrában, mint amelyet megismertünk, könnyen megvalósítható az első feltétel (az inverzpopuláció fenntartása), hiszen a klasszikus p-n diódának megfelelően egy nyitóirányú feszültséget kell kapcsolni a rendszerre, és így a külső áram segítségével juttatunk új töltéshordozókat a rendszerbe. A második feltétel, azaz a visszacsatoló rezonátor egy ilyen konstrukcióban valamilyen szinten magától is teljesül, hiszen a kristály-levegő felületen elég nagy a reflexió ($\approx 30\%$), de megfelelő törésmutatójú szigetelő anyagból készült bevonatokkal, vagy külső vékonyréteg szerkezetekkel lehetőség van optimalizálni a reflexiót a rezonátor szélein. [1]



2. ábra. Erősítéskapcsolással létrehozott lézerimpulzus. A pumpálás alatt nő a gerjesztett nívelő populációja, és amikor az a küszöböt meghaladja, elindul a lézerműködés [6]

Az eddig leírtak még csak egy folytonos üzemi lézer működésének hátterét magyarázták, az impulzusok létrehozásához plusz mechanizmusokat kell tárgyalni. Az előző utaltam arra, hogy a gerjesztett elektronok számával lehet szabályozni, hogy legyen-e lézerműködés. A félvezető lézerekben a gerjesztést (pumpálást) külső árammal lehet szabályozni. A pumpáló teljesítmény megfelelő modulálásával létre lehet hozni rövid impulzusokat. Ez úgy történik, hogy amíg egy bizonyos szint alatt van az áram, és nem éri el a lézerműködéshez szükséges küszöböt, addig nincs optikai erősítés, nincs fénykibocsátás. Ha a pumpáló teljesítményt bekapcsoljuk, akkor elkezd növekedni a gerjesztett energiaszint betöltése, és egy küszöböt elérve beindul a lézerműködés. Azonban ha nagyon rövid idő elteltével ki is kapcsoljuk a pumpálást, akkor a gerjesztett elektronok száma lecsökken a küszöbszint alá, azaz megszűnik a populáció-inverzió, és ezzel a lézerműködés is leáll. Így

lehet tehát a külső áram modulálásával rövid ideig tartó lézerműködést elérni, vagyis impulzusokat létrehozni. A gyakorlatban a lézer gyártója a fényimpulzus alakját a meghajtó áramon keresztül optimalizálja.[5] A 2. ábrán egy sematikus rajz látható arról, hogy egy impulzus keltése során hogyan alakul időben a gerjesztett szint populációja, valamint a keletkező fény teljesítménye.

A diódalézerekre általában igaz, hogy spektrumuk szélesebb, mint például a gázlézereké. A keletkező nyaláb pedig meglehetősen divergens, ami a kis méretű aktív tartománnyal magyarázható, ráadásul a heterostruktúrák felépítés olyan, hogy az egyik irányban nagyon keskeny (a másik irányban szélesebb), emiatt a két fő szimmetriatengely mentén eltérő lesz a divergencia szöge. Összességében tehát egy elliptikusan divergens nyalábot kapunk, ezt az optikai rendszer tervezésekor (például az optikai szálba való becsatolásakor) figyelembe kell venni.

A félvezető lézerek legtöbbször több módusban működnek, ezek közül a számunkra érdekes hullámhosszok kiválasztása már sokféleképp megvalósítható. Legtöbbször ez a hullámhossz-szelekció egy optikai ráccsal történik. Sokszor azért nehéz egyetlen módusban működtetni a lézert, mert érzékeny a hőmérsékletváltozásra (ami az üzemeltetés velejárója), és ilyenkor a spektrumon adott esetben több csúcs is meg tud jelenni. Az is előfordul, hogy folytonos üzemmódban még egymódusú a működés, impulzusüzemben viszont már nem. Fontos tehát a megfelelő anyagok és konstrukció kiválasztása, hogy ezek a hatások kiküszöbölhetőek legyenek. [1]

1.2. A fluoreszcencia alapjelenségei

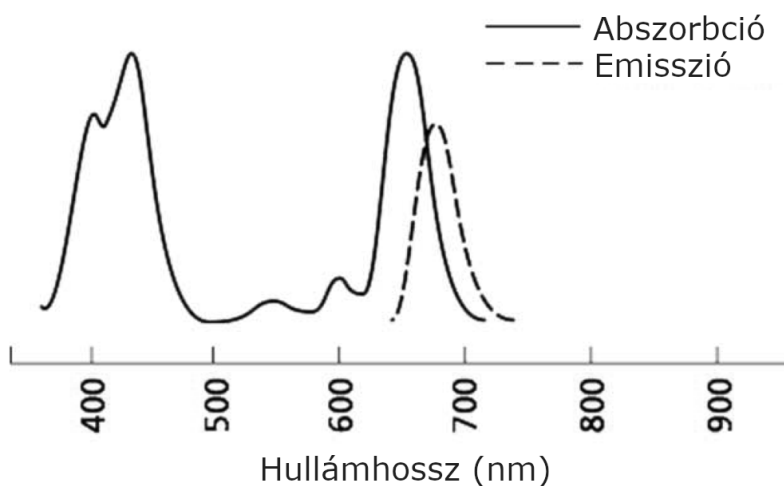
Vizsgálataim tárgya a fluoreszcencia jelensége volt, ezért ebben a fejezetben ezen mechanizmus kerül bemutatásra. A fluoreszcencia röviden úgy foglалható össze, hogy egy anyag elnyel egy bizonyos hullámhosszal rendelkező fotont (abszorpció), és egy bizonyos idő eltelte után általában egy nagyobb hullámhosszon ki is bocsát egyet (emisszió). A jelenség folytonos megvilágításnál is megfigyelhető: ha például egy (korábban sötétben tárolt) levelet kék fénnel (400-500 nm-es hullámhossz) megvilágítunk, és egy piros (690-730 nm között áteresztő) szűrőn keresztül figyeljük, akkor a megvilágítás helyén egy erős fénykibocsátás figyelhető meg, ami nem a világításból ered, hiszen azt a szűrővel nagymértékben elnyomtuk. A jelenség neve Kautsky-effektus, és egy hallgatói mérés során láthattuk is a kísérlet bemutatását.[8]

Az imént folytonos megvilágítás mellett fellépő fluoreszcenciáról volt szó. Érdekes megfigyeléseket végezhetünk azonban, ha rövid impulzusokkal gerjesztünk, azaz egy impulzusüzemű lézerral világítjuk meg a vizsgálandó mintát. Egy gerjesztő foton mintára való érkezéséhez képest valamennyi idő eltelik az emisszió bekövetkeztéig. Ez folytonos megvilágításnál is így van, rövid impulzusokkal gerjesztve viszont lehetőség nyílik megha-

tározni ezen időkéseket. Az időkülönbségekből statisztikát készíthetünk (hisztogramot veszünk fel). Megfigyelések szerint általában egy vagy több exponenciálissal írható le, hogy a késleltetés mértéke milyen eloszlást mutat, azaz egy adott időkülönbség a gerjesztés és emisszió között milyen gyakorisággal fordul elő (erről részletesebben ezen fejezet végén lesz szó). Az exponenciális függvény egyik paramétere a fluoreszcencia élettartam. (Lásd: 1.4. fejezet.)

A jelenség természetesen sok foton érkezésekor is működik, azonban ahhoz, hogy ezeket az időkéseket vizsgálni tudjuk, számunkra aránylag kevés foton detektálása az ideális. Ennek okáról, valamint a mérés technika részleteiről szintén később, az 1.3. fejezetben lesz szó.

Fluoreszcenciát sokféle anyag mutathat, ilyen például számos fluoreszkáló festékanyag, melyeket többek között festéklézerekben alkalmaznak, és ilyen a növények leveleiben található klorofill is. Minden egyes anyagra jellemző egy abszorpciós és egy emissziós spektrum: ezek mutatják meg, hogy a gerjesztést egyes hullámhosszokon milyen mértékben nyelik el, illetve, hogy a fluoreszcencia során kibocsátott foton milyen eloszlást mutat a hullámhossz függvényében. Különösen érdekesek a növényi minták, melyek kísérleti munkám fókuszában állnak. A levelekben található klorofiloknak jellegzetes abszorpciós spektruma van, erről egy vázlat látható a 3. ábrán.



3. ábra. Klorofill-a abszorpciós és emissziós spektruma egy grafikonon szemléltetve. Jól látható, hogy a gerjesztés piros és kék (+UV) tartományban lehetséges, az emisszió pedig piros (és infravörös) tartományban történik[9]

Az itt bemutatott abszorpciós és emissziós görbék nem egy konkrét esetet ábrázolnak, hanem vázlatosan mutatják a spektrumok alapvető tulajdonságait. Konkrét növényi mintákat összehasonlítva persze lesznek eltérések azok spektrumaiban, melyekből bizonyos tulajdonságokra is lehet akár következtetni. Kicsit eltérő spektrumokat mutat például

az a-és b klorofill, illetve egy levélben egyéb fényelnyelő anyagok is megtalálhatóak, mint például a karotinoidok.[8] Ezen terület vizsgálatával foglalkozik a fluoreszcencia spektroszkópia. Számomra jelenleg nem a spektrumok részletei az érdekesek, hanem az, hogy az ábrán látható módon az abszorpciónak két nagy maximuma van, piros és kék tartományban, az emisszió pedig a piros hullámhosszok környékén történik (ez nagy általánosságban igaz). Ez azt jelenti, hogy a lézerindukált fluoreszcenciához piros vagy kék lézerforrást célszerű használnunk, a detektálás pedig mindkét esetben a piros tartományban fog történni.

Egy további érdekes jelenség, hogy a gerjesztés hullámhosszának függvényében változhat az emissziós spektrum is. Például a legtöbb növény levelének esetében UV gerjesztéssel a piros mellett zöld és kék fluoreszcencia is zajlik, tehát a fentitől jelentősen eltér az emissziós spektrum. Ezt az emissziót nem klorofilok okozzák, és a méréseink során egyáltalán nem is foglalkoztunk vele, hiszen csak piros hullámhossztartományban mértük a fluoreszcenciát.[8]

A jelenség kvantitatív értelmezéséhez szükség van egy matematikai modellre is. Ez a modell a fluoreszcencia esetében az első rendű (azaz lineáris) kinetika: eszerint a fotonok kibocsátásának rátája ($R = -\frac{dN}{dt}$) lineárisan függ a gerjesztett állapotok pillanatnyi számától (N) [10]. A lineáris kapcsolatot egy k tényezőn keresztül írjuk le. Ezek alapján a fotonok emisszióját leíró differenciálegyenlet az alábbi:

$$R = -\frac{dN}{dt} = kN \quad (1)$$

Az egyenlet a változók szétválasztásának módszerével megoldható, az integrálás elvégzése után az alábbi eredményt kapjuk ($N(t=0) = N_0$ kezdeti feltétellel):

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_0}} \quad (2)$$

A megoldásban szereplő τ_0 karakterisztikus idő az eredeti differenciálegyenletben szereplő k lineáris együttható reciproka.

Megfigyelték, hogy a gerjesztésből való lecsengésre jellemző teljes élettartam a nemsugárzásos és a sugárzásos (másként mondva fotonkibocsátással járó) élettartamok együttes figyelembevételével határozható meg. Emellett jelen lehet a folyamatban valamilyen egyéb tényező is, ami szintén hozzájárul a legerjesztődéshez, és ezt is valamilyen saját együtthatóval tudjuk leírni [10]. Az általánosított esetet tehát az (1) egyenlet módosításával írhatjuk le: a fenti összefüggésben egyetlen k lineáris együttható szerepelt, ezt most szétválasztjuk két tag (sugárzásos és nemsugárzásos folyamat) összegére: $k = k_1 + k_2$. Emellett szerepel a harmadik tényező, k_q is[10]. :

$$R = -\frac{dN}{dt} = k_1N + k_2N + k_qN = (k_1 + k_2 + k_q)N \quad (3)$$

A megoldás ismét az alábbi alakban írható fel:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4)$$

Ebben az esetben τ karakterisztikus idő k ($k = k_1 + k_2$) és k_q összegének lesz a reciproka, azaz kisebb lesz a, mint az első esetben, hiszen egy pozitív k_q tényezőt is figyelembe vettünk.

Ennek számunkra fontos következménye, hogy amennyiben a fotonkibocsátással járó fluoreszcencia mellett egyéb átmenetek is megjelennek, illetve más külső tényező is „részt vesz” a lecsengésben, akkor a fluoreszcencia-élettartam rövidülni fog. Ezt az élettartam-rövidülést fluoreszcencia-kioltásnak nevezik (angol szakkifejezéssel *quenching*, innen ered a k_q jelölés is). Amikor például egy levelet megvilágítunk, akkor beindulhat többek között a fotoszintézis, ami több nemsugárzásos átmenetet indukál (például fotoszintetikus elektrontranszport lánc avagy fotokémiai kioltás). Emellett egyéb, nem fotokémiai kioltási mechanizmusok is jelentkezhetnek például a fotokémiai reakcióközpontok védelmére a túl intenzív megvilágítás esetén. Ezek együttes hatása a lecsengés rövidülését fogja eredményezni.[11]

A mintákban a gerjesztést követően történnek belső konverziók, melyek során a legalsó gerjesztett szintre kerül az elektron. Ezen folyamatok karakterisztikus ideje nagyon rövid (jellemzően nagyságrendekkel kisebb, mint a fluoreszcencia élettartam). Ezt követően következik be fluoreszcencia, vagy más, nem sugárzással járó legerjesztődés.

A fent bemutatott rövid levezetés igazolja azt az eredményt, amire a fejezet elején már hivatkoztam, azaz, hogy a fluoreszcencia-lecsengéseket exponenciális függvényekkel lehet jellemezni. Ez az állítás az elsőrendű, azaz lineáris kinetika – mint modell – teljesülése esetén érvényes.

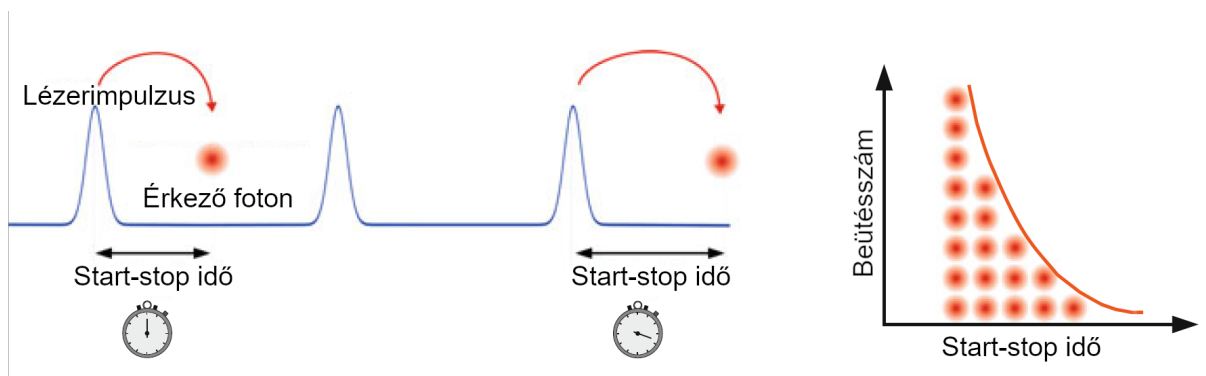
1.3. Időfelbontásos mérés technika alapjai

Ez a szakasz az [1] forrás 1. fejezetére alapozva készült.

A fluoreszcencia lecsengési idők méréséhez úgynevezett időkorrelált detektálásra van szükség, angol rövidítéssel TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*), a továbbiakban így fogok rá hivatkozni. A TCSPC mérés technika alapja, hogy egy összeköttetésben lévő impulzusüzemű lézerforrás és egy egyfoton-detektor méri az impulzus kiadása és a detektált foton beérkezése között eltelt időt. Ezen időtartamokból hisztogramot készítve a folyamatra jellemző lecsengést tudjuk meghatározni. Ez a hisztogram úgy is felfogható, hogy a gerjesztést követően az hogyan alakul időben az emisszió intenzitása, hiszen az idő függvényében határozzuk meg a fotonok időegységre jutó beütésszámát. Az általunk vizsgált növényi mintákra körülbelül 0,1-10 ns-os karakterisztikus élettartammal leírható

lacsengés volt jellemző. Ez alapján érezhető, hogy szükség lesz rövid impulzusok kiadása mellett nagyon pontos időmérésre is.

A 4. ábrán a TCSPC mérés folyamatának szemléltetése látható. A lézerforrással és a detektorral összekötött időmérő berendezés rögzíti a gerjesztés és a detektálás között eltelt időt. Ezt start-stop időnek is nevezzük, mert a lézerimpulzus indítja az időmérést, a foton beérkezése pedig leállítja azt. Ezen start-stop időkből egy hisztogramot készítve megkapjuk, hogy a gerjesztéstől számítva adott idővel mennyi a mért beütésszám.



4. ábra. TCSPC mérés technika alapelve: egy gerjesztő lézerimpulzus és az általa kiváltott fluoreszcencia foton közti időkülönbséget (start-stop időt) mérjük. Ezekből egy hisztogramot készítve megkapjuk a folyamatra jellemző lacsengést[1]

Az ábrán feltűnhet, hogy a középső periódusban nem érkezik foton a gerjesztést követően. Ez a valóságban tényleg így van, sőt a mérések végzésekor nagyon fontos szempont az úgynevezett 5%-os szabály: ez azt jelenti, hogy legfeljebb a gerjesztő impulzusok 5%-ánál szabad a detektorba foton érkezzen (ez egy „ököl szabály”). Ennek oka a következő: amennyiben a mintára egy impulzusból sok gerjesztő foton érkezik, és ezáltal sok fluoreszcencia foton lép ki, akkor a start-stop idő leáll az első érkező fotonnál, és csak a következő gerjesztő impulzusnál indul majd újra. Emiatt a holtidőben érkező fluoreszcencia fotonokat nem veszi figyelembe a mérés. Ilyen módon látszik, hogy a „korai” fotonok felülreprezentáltak lesznek, azaz a mért élettartam rövidebb élettartam idő felé lesz torzítva a valósághoz képest. Ez az úgynevezett *pile-up* jelenség.

Ezt a szisztematikus hibát úgy lehet kiküszöbölni, hogy már eleve kevés fotont engedünk a mintára érkezni, vagy pedig a detektor előtt csökkentjük a fluoreszcencia jel intenzitását. Ezt OD (*Optical Density*, optikai „sűrűség”) szűrőkkel valósítottam meg: a későbbiekben OD1, OD2, OD3, OD5-ként fogok hivatkozni rájuk, jelentésük pedig az, hogy a rajtuk áthaladó nyaláb intenzitását rendre 1, 2, 3, 5 nagyságrenddel csökkentik. Az 5%-os szabály pedig egy tapasztalatból adódó feltétel, az ilyen típusú méréseknél ez egy általános kritérium. Ezzel tehát azt érjük el, hogy elhanyagolható legyen az olyan periódusok száma, ahol sok fluoreszcencia-foton érkezik egyszerre a detektorra.

Ahogy azt korábban említettem, a növényi mintákra nagyjából 0,1-10 ns-os élettartam jellemző. Ahhoz tehát, hogy ezt megmérjük, azaz egy ilyen karakterisztikus idejű exponenciális adatsort kapjunk, pikoszekundumos pontosságú időmérésre van szükségünk. Ezt a feladatot a mai TCSPC berendezésekben egy úgynevezett *Time-To-Amplitude Converter* (TAC) végzi. Ez gyakorlatilag egy kondenzátor, melyet konstans árammal töltünk fel. A feltöltés kezdete a lézerimpulzushoz van hangolva (valamilyen trigger formájában), és a foton beérkezésekor áll le (szintén triggerelve, a detektor jelére). A konstans áram következtében a kapacitáson felgyűlő töltés, és ezáltal a rajta mérhető feszültség arányos lesz az indítás és leállítás között eltelt (start-stop) idővel. Ezt a feszültségjelet a legtöbb mérőberendezés egy analóg-digitál konverterrel dolgozza fel. Megfelelően kalibrálva az eszközt elérhető a pikoszekundumos felbontás.

Fontos jól megválasztani, hogy milyen detektorral végezzük a mérést. Ahogy arra már utaltam, egy egyfoton-detektorra van szükségünk. A modern egyfoton-detektorok egyik típusa egy lavinadiódával van megvalósítva. Ez azt jelenti, hogy egy diódát záróirányba annyira előfeszítünk, hogy egyetlen foton beérkezése „letörést”, azaz egy nagyon nagy áramimpulzust eredményez. Az ilyen típusú készülékeket angol rövidítéssel SPAD-nak nevezik (*Single Photon Avalanche Diode*). Ezzel analóg eszköz a nukleáris méréstechnikában jól ismert Geiger-Müller számláló. Mindkettőnél egy beütés egy áramimpulzust vált ki, nem érdekes számunkra, hogy mekkora energiával érkezett a beérkező részecske vagy foton, csak a számlálás a célunk. Sőt, az időméréshez kifejezetten jól jön, hogy mindegyik foton ugyanakkora áramimpulzust eredményez, mert így a triggerelés jól megoldható.

Fontos még az, hogy a választott detektornak kicsi legyen az úgynevezett sötétzaja, azaz a fotonok érkezése nélkül jelentkező impulzusok száma. A SPAD eszközöknél ez az érték akár mindössze 100-150 impulzus is lehet másodpercenként. Egy 10 másodpercig tartó mérés például a lézer 10 MHz-es ismétlési frekvenciája mellett, 5%-os detektálással (azaz éppen minden huszadik periódusban detektálunk egy fluoreszcencia fotont) 5 millió darab beütést jelent. Látszik, hogy ehhez képest a sötétzajból eredő hiba nem számottevő, azaz jó statisztikájú mérést tudunk elérni.

1.4. Méréskiértékelési módszerek

Ahogy arról az eddigi fejezetekben többször is szó volt, a fluoreszcencia élettartam méréseink egy hisztogramot eredményeznek, melyek adott időfelbontással reprezentálják az élettartam időbeli eloszlását. Ennek kiértékeléséhez a kommerszálisan elérhető *EasyTau2* nevű szoftvert használtam (gyártó: *PicoQuant*). Az elmentett adatsorokat beolvasva, a megfelelő méréseket kiválasztva egy GUI-ban (*Graphical User Interface*, azaz grafikus felhasználói felület) beállítható, hogy milyen illesztést szeretnénk elvégezni, és milyen kezdeti becsléseket szeretnénk megadni az egyes paraméterekre.

Mielőtt részletezném a kiértékelés módjait, fontos kitérni arra, hogy az eddig leírtak egy Dirac-delta szerű impulzussal modellezték a fluoreszcencia gerjesztését (egy darab foton beérkezése). Egy valós mérési elrendezésben azonban a detektor egy olyan időbeli intenzitáseloszlást érzékel, ami a fluoreszcens mintának a fényforrásból eredő adott alakú impulzusára előálló válasza, illetve hozzátevődik az optikai és elektronikai rendszerek időfüggő átvitele is. Ezen kívül a detektornak is van valamilyen átviteli függvénye. A mérendő mintán kívül álló tényezők átviteli függvényének konvolúciójából együttesen az úgynevezett IRF függvény áll elő. (Ez egy betűszó az angol *Instrument Response Function* kifejezésből.) Ez a függvény tehát azt írja le, hogy a gerjesztő impulzus az optikai rendszeren keresztül, mérendő minta nélkül milyen válaszfüggvényt vált ki a detektorban. Az alábbiakban látni fogjuk, hogy ez egy nagyon fontos mérendő jelalak, kiváltképp a rövid (impulzushosszal összemérhető) fluoreszcencia élettartamú minták esetében. Az IRF mérésének módszereiről az eredmények tárgyalása során lesz szó.

A kiértékeléseket két nagy csoportra oszthatjuk, az alapján, hogy milyen módszerrel illesztünk az adatsorokra exponenciális görbét vagy görbéket. Az első módszer az úgynevezett *Exponential Tailfit*. Itt a szoftverben kurzorokkal beállíthatjuk, hogy melyik tartományra szeretnénk egy hagyományos, négyzetes eltérések minimalizálásán alapuló illesztést elvégezni. Ahogy a *tailfit* kifejezés is sugallja, itt egy exponenciális lecsengés egyértelműen látszódó „farkát” kell kiválasztanunk, erre illesztünk. Kicsit konkrétabban, akkor alkalmazhattuk ezt az illesztést, amikor a mért lecsengési idő lényegesen hosszabb volt, mint az impulzusból adódó jel, azaz az IRF. Ekkor lesz ugyanis egy elegendően hosszú tartomány, ami már nem tartalmazza az IRF-et, és tudunk rá illesztést végezni. Az illesztés a már megismert modell szerint egy, vagy több exponenciális görbét jelent, azaz az alábbi függvényhez keresi a paramétereket a szoftver:

$$f(t) = \sum_{n=1}^N A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} + B \quad (5)$$

A kifejezésben N jelöli, hogy hány exponenciális függvény összegével szeretnénk leírni a jelenséget, A_i az i -edik „amplitúdó”, vagy súlyozó tényező, B egy háttér érték, τ_i pedig az i -edik karakterisztikus lecsengési idő. Ez utóbbi paraméter lesz számunkra a legérdekesebb, általában ennek a meghatározása az illesztés célja.

A második illesztési módszerre akkor van szükség, amikor az élettartam már túl rövid ahhoz, hogy jól elkülönüljön egy, az IRF-től független része a mért adatsornak. Ekkor lesz szükség arra, hogy a megmért IRF-et fel is használjuk az illesztéshez. A szoftverben ilyenkor az *Exponential Reconvolution* illesztést választjuk ki. Egy lecsengést tartalmazó adatsorhoz társítani kell egy IRF-et tartalmazó adatsort, és így fogja tudni a program elvégezni az illesztést. A módszer, ahogy a nevéből is látszik egy rekonvolúcióval való

számolást jelent, a szoftver az alábbi függvény illesztését végzi:

$$f(t) = \left[\int_{-\infty}^t dt' \left[IRF(t - Shift_{IRF}) - B_{IRF} \right] \left[\sum_{i=1}^N A_i \cdot e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} \right] \right] + B \quad (6)$$

A kifejezésben az integrálás egy konvolúciót jelent a keresett paraméterekkel rendelkező exponenciális függvény(ek) és az IRF függvény között. (Az exponenciális tag alakja, paraméterei megegyeznek a *Tailfit* módszernél leírtakkal.) A B_{IRF} és B paraméterek az IRF-hez és a lecsengéshez tartozó háttérrel jelentik, $Shift_{IRF}$ pedig egy időkülönbség az IRF és a lecsengés görbéje között. Ez a paraméter akkor nem zérus, ha az IRF-et más geometriával mérjük, mint a lecsengést, és például az eltérő fényút miatt a periódus kezdetéhez képest más időpontban érkezik a két jel.

Ahogy arról már többször is szó esett, a lecsengés egy vagy több exponenciális függvény összegével jellemezhető. Amennyiben N db ilyen tagunk van, akkor az illesztéssel meghatározunk N db időállandót. Ezek együttesen jellemezhetőek egy úgynevezett intenzitás átlagolt fluoreszcencia élettartammal. Ezt a mennyiséget széles körben használják a több exponenciálissal leírható lecsengések jellemzésére [3]. Az intenzitás átlagolt élettartam definíciója a következő:

$$\tau_{\text{int}} = \frac{\sum_{i=1}^N A_i \cdot \tau_i^2}{\sum_{i=1}^N A_i \cdot \tau_i} \quad (7)$$

A kifejezésben τ_i és A_i az i -edik élettartamot, illetve az ahhoz tartozó súlyt jelöli, mely paramétereket az illesztés elvégzésével kapjuk.

Az illesztések jóságát az *EasyTau2* szoftver a χ^2 paraméterrel jellemzi. Ezt a paramétert az alábbi egyenlet definiálja [12]:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(E_i - O_i)^2}{E_i} \quad (8)$$

Az egyenletben O_i a megfigyelt (mért) adatpontokat jelenti, E_i pedig azt, hogy az adott ponton a modellünk szerint milyen eredményre számítottunk, valamint n jelöli a mérési pontok számát. Esetünkben ez utóbbit az illesztett görbe pontjai képviselik, hiszen ezek éppen az általunk definiált modellt írják le. A gyakorlatban χ^2 -tel azt jellemzik, hogy egy modell mennyire írja le jól a megfigyelhető jelenséget. [12]

Minél inkább 1-től eltérő értéket vesz fel ez a paraméter, annál jelentősebb az eltérés az illesztett függvény és a mérési adatsor között. Az eredményeim kiértékelése során azt tapasztaltam, hogy 1,3 alatti érték esetén jónak mondható az illesztés, 2 fölötti érték pedig már valamilyen nagyobb hibára utal. A mérésikiértékelés során ezt a paramétert azzal a céllal vizsgáltam, hogy a kiugróan rossz illesztéseket ki tudjam szűrni. A χ^2 mellett az illesztés és az eredeti adatsor közti különbséget (reziduális függvényt) is ellenőriztem.

Amennyiben itt jelentős eltérés volt az adatsor egy bizonyos tartományán, az is hibát jelentett (és ez meg is mutatkozott a χ^2 paraméter értékének megnövekedésében). A jó illesztéskor a reziduális egy 0 érték körüli véletlen szórásnak felel meg.

2. Célkitűzések

Munkám kezdetekor egy időkorrelált mérés technikán alakuló, fluoreszcencia lecsengési időket mérő kísérleti elrendezés már rendelkezésre állt. A megvalósított elrendezés 655 nm-es (piros) gerjesztés mellett mérte a klorofill fluoreszcencia lecsengési időket. Az első eredmények alapján cél volt a gerjesztési oldalon rövidebb – 440 nm hullámhosszú – gerjesztés alkalmazása is. Az új gerjesztéssel mind a növénybiológiai, mind a jövőben tervezett félvezető alkalmazások köre bővül. Például szélesebb hullámhossztartományból detektálhatunk fluoreszcencia jelet, valamint bizonyos mintáknál a kioltási mechanizmusok is hullámhossz függőek lehetnek.

Az alkalmazott pikoszekundumos lézerdiódák egyedi gyártásban készülnek. Már az első teszteknel kiderült, hogy az új forrás tulajdonságai jelentősen eltérnek az előzőtől. Ennek megfelelően célom volt, hogy az új forrás optikai tulajdonságait kísérletekkel ellenőrizsem. Ezt követően megvizsgáljam azt, hogy a korábbi kísérleti összeállításba történő illesztésnél mire kell különösen odafigyelni, és hogy méréseket végezzek előbb hosszabb, majd minél rövidebb fluoreszcencia élettartamú mintákon. Végül, de nem utolsó sorban az új gerjesztőlézerből eredő problémákra – ha ilyenek adódnak – megoldást keressek.

3. Eredmények

3.1. Lézerforrás karakterizálása

A kísérleti munkám célkitűzésének első része az újonnan beszerzett lézerforrás karakterizálása, fontosabb paramétereinek megismerése volt, valamint az, hogy a rendelkezésre álló mérési elrendezésbe hogyan tudom megfelelően illeszteni. Ennek érdekében különböző beállítások mellett a spektrum és az impulzusalak mérésének segítségével kiválasztottam, hogy mik a későbbi mérésekhez optimális paraméterek. A karakterizálás részeként a nyaláb intenzitáseloszlását is meghatároztam, ezzel kiszűrve az esetleges optikai eredetű rendellenességeket. Az alábbiakban ezeket a vizsgálatokat mutatom be részletesebben.

3.1.1. Mérési elrendezés

A kísérletekhez egy PicoQuant LDH-D-C-440 lézerforrást használtam. Az időkorrelált mérésekhez az egyfoton-detektor (lavinadiódás fotodetektor) típusa MPD-100-CTB,

az időkorrelált számláló pedig PicoHarp 300 volt. Az egyfoton-detektor optikai szálcsatlakozóval volt ellátva, ide a mérendő jelet egy ThorlabsM18L01 típusú optikai szálon vezettem.

A lézer úgy lett gyártva, hogy a kimenete egy egymódusú, polarizációt megőrző optikai szálba volt csatolva, melynek kimenetén egy kollimátor lencse található. Ezt szabvány, illetve egyedi elemekkel kétféle korábban fejlesztett mintatartóba lehetett rögzíteni: az egyik küvettában található folyékony minták mérésére alkalmas, a másik pedig szilárd minták (növényi levelek) befogására lett tervezve. A két mintatartót láthatjuk az 5. ábrán.

Az 1.3. fejezetben szó esett az OD szűrők alkalmazásáról. Ezeket mindig úgy választottam meg, hogy az 5%-os szabály teljesüljön (erre a mérőprogram is adott figyelmeztetést). Ezek tehát a gerjesztés intenzitását csökkentették, a fluoreszcencia jel méréséhez azonban szükség volt arra is, hogy a gerjesztő fény ne jusson el a detektorig. Ennek érdekében egy sávszűrő került a detektorba futó optikai szál elé. Ez a szűrő 708 nm középpontú, 75 nm-es félértékszélességű transzmissziós karakterisztikával rendelkezett (típusa: Semrock FF01-708/75-25). Már itt egy változtatás történt a piros lézeres elrendezéshez képest, mert ott egy további élszűrőre volt szükség a detektálási tartomány szűkítése érdekében. A kék lézer gerjesztése azonban már ezzel a szűrővel is kellően elnyomható, az élszűrőre nem volt szükség.



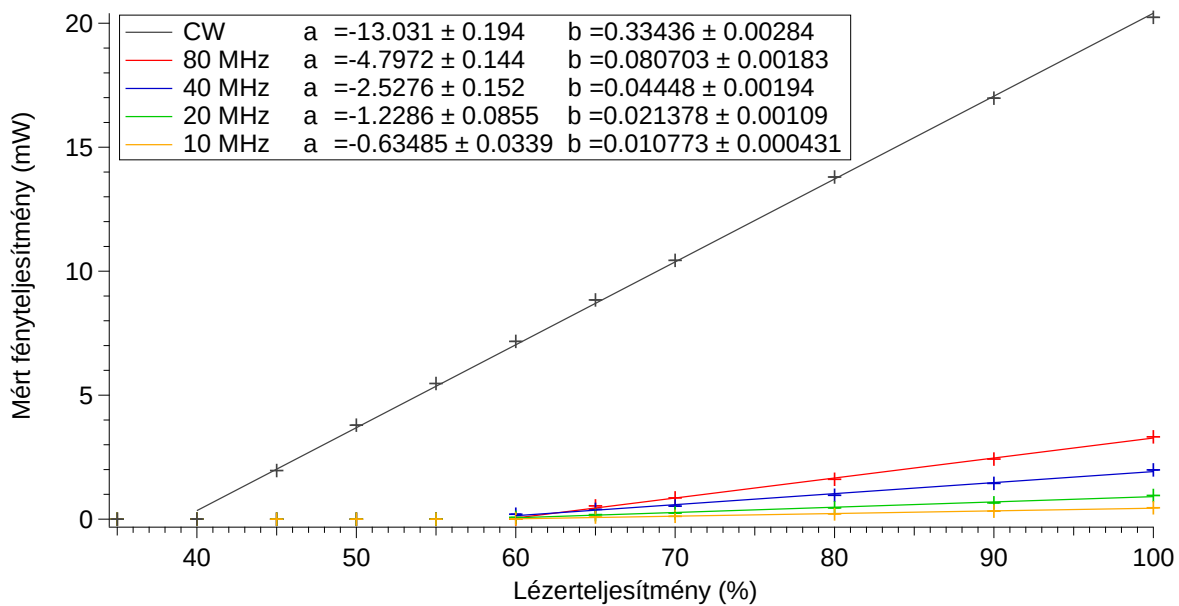
5. ábra. Kuvettatartós (A) és levéltartós (B) mérési elrendezés

3.1.2. Teljesítmény

Az első mérésem célja az volt, hogy megvizsgáljam a lézerműködés határait, és meghatározzam, hogy adott beállítások esetén milyen fényteltjesítményt bocsát ki a forrás. A

lézert vezérlő szoftverben be lehetett állítani, hogy milyen lézerteljesítménnyel szeretnék dolgozni: 0% és 100% között lehetett változtatni, hogy a fényforrást milyen feszültség hajtja meg. A mérés célja az volt, hogy egy kalibrációt készítsék az itt beállított érték és a valós fénytéljesítmény között. A továbbiakban ezen mennyiségre lézerteljesítményként fogok hivatkozni.

A kísérlet során az optikai szálát közvetlenül a fénymérő érzékeny felületére irányítottam, majd az elrendezést lefedtem, és a lámpákat is lekapcsoltam a háttér csökkentésének érdekében. A lézerteljesítményt 100%-ról kezdtem el csökkenteni először 10-esével, majd 5-ösével, amikor nagyon lecsökkent a fényintenzitás. Végül megmértem a *Zero* beállítás mellett a háttérrel, később ezt levontam a mért adatokból. Ezt a mérést elvégeztem impulzus üzemben különböző ismétlési frekvenciákkal, valamint folytonos üzem esetén is. A mérés eredményeit a 6. ábrán foglaltam össze.



6. ábra. Mért fénytéljesítmény és beállított lézerteljesítmény kapcsolata az egyes ismétlési frekvenciákon, illetve folytonos üzemben

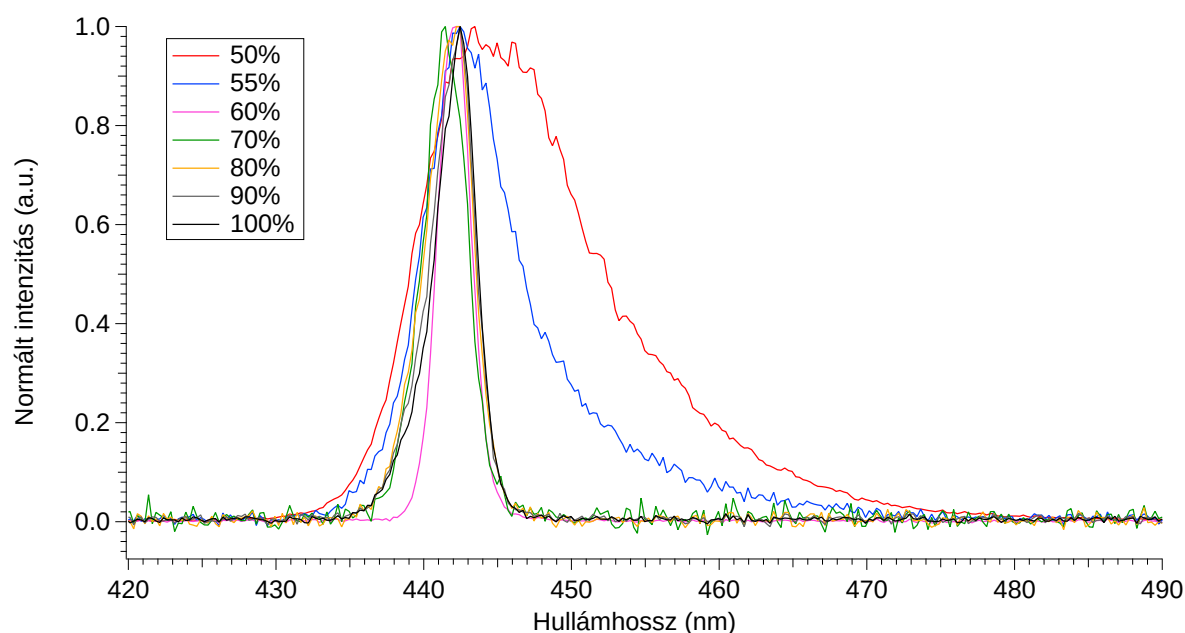
Azokra a tartományokra, ahol az intenzitás egyértelműen megnövekedett, azaz elindult a lézerműködés, egyenesek illesztésével meghatároztam egy kalibrációs görbét. Az illesztett egyenesek alakja $y = a + b \cdot x$ volt, ezeket a paramétereket is láthatjuk az ábrán. Elmondható, hogy a lézerműködés tartományában valóban lineáris a kapcsolat a szoftverrel beállítható lézerteljesítmény és a mérhető fénytéljesítmény között.

Impulzusüzemben mindegyik ismétlési frekvencián 60% környékén volt a lézerműködés alsó határa, míg folytonos üzemben ez a határ 40%. A várakozásoknak megfelelően a nagyobb ismétlési frekvenciákon nagyobb fénytéljesítmény mérhető. A későbbiekben szinte kizárólag 10 MHz-es ismétlési frekvenciával dolgoztam.

3.1.3. Spektrumok

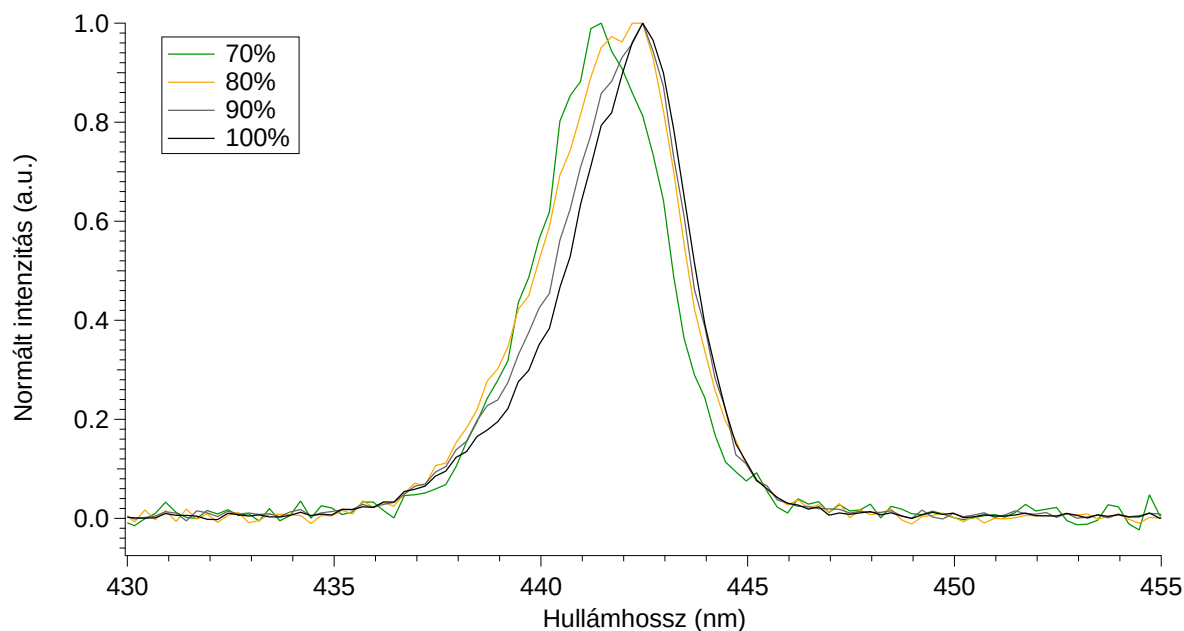
A következő feladatomban a fényforrás spektrumának vizsgálata volt különböző beállítások mellett. Az ismétlési frekvenciát innentől kezdve mindig 10 MHz-nek választottam (amikor impulzus üzemben működött a lézer), illetve végeztem mérést folytonos üzemi működés esetén is. Itt az impulzusüzemben felvett spektrumokat mutatom be, hiszen későbbi méréseim során is ilyen üzemmódban használtam a lézert.

A méréseket egy Ocean Optics USB4000-XR1 típusú spektrométerrel végeztem. A felvett spektrumokat 1-re normáltam, hogy a nagyon eltérő intenzitások spektrális tulajdonságai is könnyen összehasonlíthatóak legyenek.



7. ábra. Kék lézerforrás spektruma impulzusüzemben (10 MHz ismétlési frekvencián), különböző lézerteljesítmények mellett

Az előző fejezet eredményei alapján azt vártam, hogy körülbelül 60%-os lézerteljesítménynél indul be a lézerműködés. A 7. ábrán azt láthatjuk, hogy valóban ezen érték körül szűkül össze a spektrum, ami a LED-es típusú fénykibocsátásból lézerműködésre való átváltás jele.

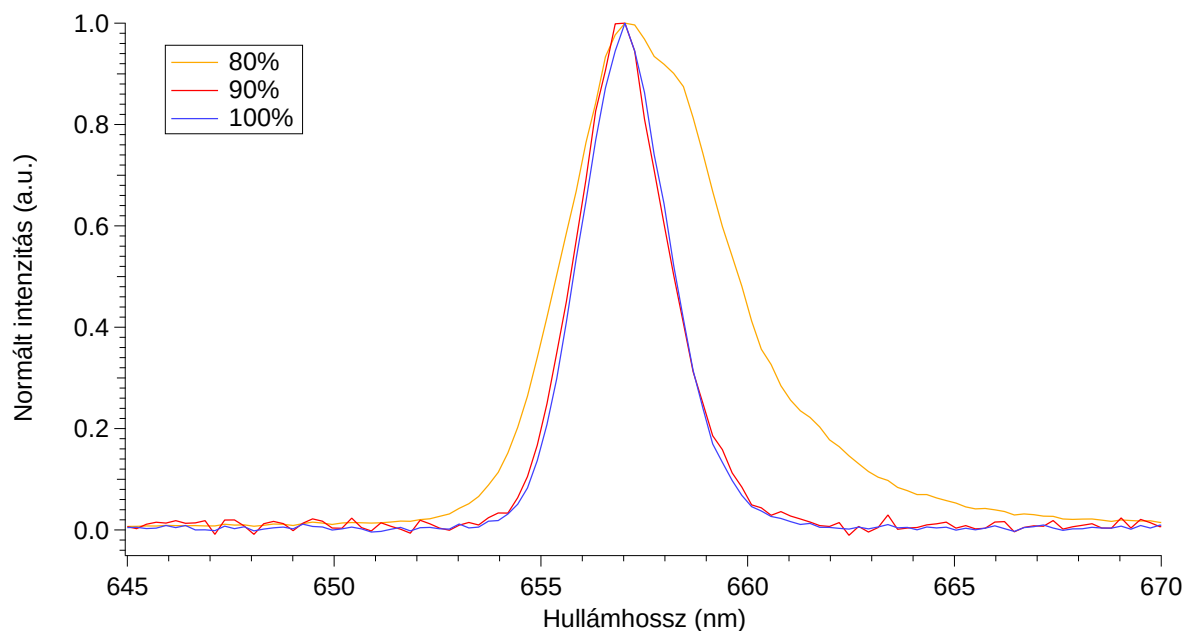


8. ábra. Kék lézerforrás spektruma impulzusüzemben (10 MHz ismétlési frekvencián), a későbbiekben gyakran használt lézerteljesítmények mellett

A jobb áttekinthetőség érdekében külön ábrázoltam a négy legnagyobb teljesítményhez tartozó spektrumot is, ez látható a 8. ábrán. A későbbi mérések során is ezeket a lézerteljesítményeket használtam. Itt tehát már egyértelműen érvényesül a lézerműködés, a spektrum keskenyebb a LED-szerű működéshez képest. Észrevehető, hogy a spektrum maximuma kis mértékben eltolódik a nagyobb hullámhosszok irányába a teljesítmény növelésével. Elmondható, hogy ezen a négy teljesítményen a maximumok 1-2 nm-en belül találhatók, kiszélesedésük pedig hasonló mértékű.

Összességében tehát azt emelhetjük ki, hogy a 70%-100% lézerteljesítmények esetén körülbelül 436 nm és 446 nm közötti hullámhosszú fényt bocsájt ki a lézerforrás. Az is fontos konklúzió, hogy a négy kiemelt lézerteljesítmény esetében nincs kiugróan jó vagy rossz spektrummal rendelkező beállítás a többihez képest, spektrális tulajdonságaik nagyon hasonlóak, illetve a lézer dokumentációjának is megfelelnek. [15]

A munkám során egy olyan kísérleti elrendezésbe való illesztés volt a cél, mellyel a korábbi években egy piros lézerciódával folytattak az Atomfizika Tanszéken kísérleteket. Emiatt a kék lézer spektrumát érdemes összevetni a piroséval, hogy az esetleges eltérések látszódnak. A piros lézerforrás spektrumát szintén 10 MHz ismétlési frekvencián mértem, azokon a lézerteljesítményeken, amiket általában mérésekre használtak a korábbiakban. Az eredmény a 9. ábrán látható. Ennél a fényforrásnál a legnagyobb intenzitás 667 nm környékén volt, a spektrumok szélessége 90% és 100% esetén szinte megegyezett, 80% esetén azonban már jelentősen szélesebb volt. Előbbi két esetben körülbelül egy 5 nm széles tartományban van számottevő sugárzás, míg ez a kék forrásnál kicsivel szélesebb,



9. ábra. Piros diódalézer spektruma impulzusüzemben (10 MHz ismétlési frekvencián), különböző lézerteljesítmények mellett

8-10 nm széles tartomány volt.

A spektrumok pontosabb mérésére egy nagyobb felbontású rácson elrendezéssel lenne lehetőség. Ettől azonban eltekintettem, mert a jelenlegi alkalmazások szempontjából egyelőre nem tűnik fontosnak. A fluoreszcencia-élettartam mérések során ugyanis általában nem okoz gondot, ha a névlegestől kis mértékben eltér a lézer emissziós hullámhossza, hiszen az abszorpciós spektrum ennél lassabban változik (azaz viszonylag széles tartományban van elnyelés).

3.1.4. Nyalábalak mérése

Az elméleti bevezetőben a diódalézerek tárgyalásakor (1.1. fejezet) esett szó arról, hogy a keletkező nyaláb meglehetősen divergens, ráadásul a széttartás szöge különböző a két fő kristálytani irányban. Az általam használt diódalézer kimenete azonban egy optikai szálba való csatolással készült. A keletkező nyaláb tulajdonságait tehát már ez az optikai szál határozza meg. A szál végén ráadásul egy kollimátor lencse is található, tehát „szép”, azaz Gauss-nyalábot várunk. (Egészen pontosan Bessel-függvényekkel írhatóak le a szálban terjedő módusok, de a Gauss-függvény nagyon jó közelítést ad [13].) Ez azt jelenti, hogy egy tetszőleges metszet mentén megmérve az intenzitást egy Gauss-függvénnyel leírható adatsort kapunk. A nyaláb két dimenziós intenzitáseloszlását pedig egy kétdimenziós Gauss-eloszlás fogja leírni.

Az intenzitáseloszlást két különböző módszerrel mértem meg. Az első módszer az úgynevezett késél-teszt volt (*knife edge method*). Ennek a folyamata a következő volt: a

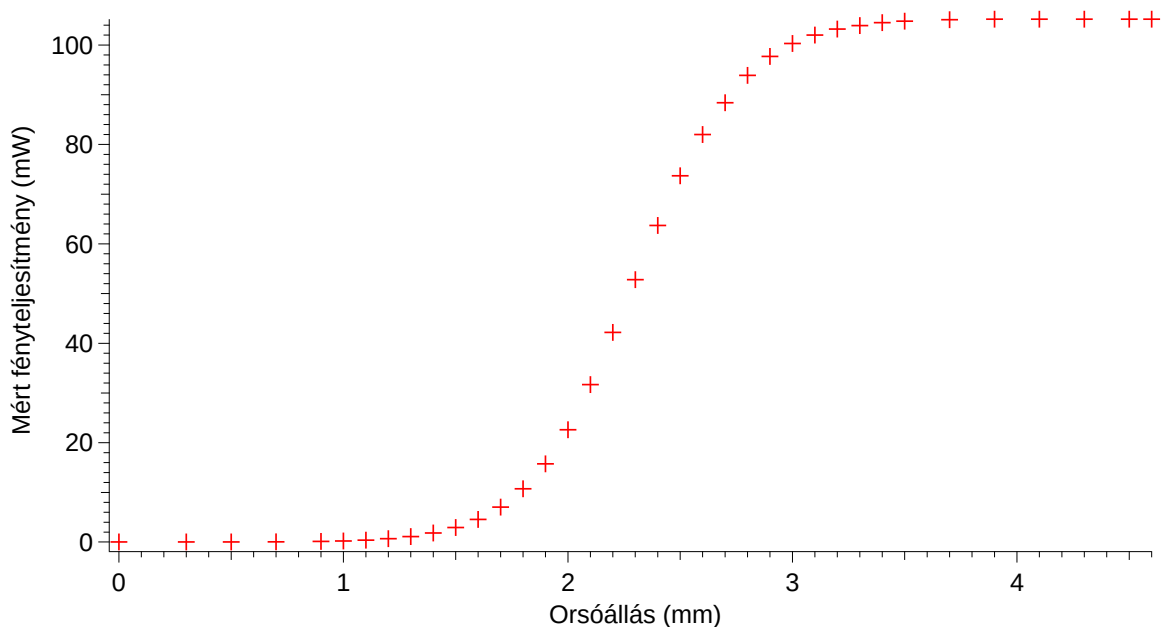
fényforrás kimenetét (tehát az optikai szál végét) a fénymérővel szemben rögzítettem úgy, hogy a nyaláb az érzékeny felület közepére világítson. Ezt követően egy egyenes oldalú fémlapot egy finoman állítható mikrométerorsóra rögzítettem, úgy, hogy az éppen ne fedjen el a nyalábból semennyit. Az orsót tekerve a fémlap vízszintesen mozogva fokozatosan takart el egyre többet a nyalábból, és így egyre kevesebb fény jutott a detektorra értelem-szerűen. Az orsó elmozdulásának függvényében mértem a detektor által meghatározott fényteltjesítményt. Ezzel a módszerrel egy integrálját kaptam a nyalábintenzitásnak. Az $x = a$ orsóállásban a mérhető fényteltjesítmény:

$$P_{\text{mért}} = \int_{-\infty}^{\infty} dy \int_{-\infty}^a I(x,y) dx \quad (9)$$

Az $I(x,y)$ intenzitáseloszlás feltételezésünk szerint egy szimmetrikus ($\sigma_x = \sigma_y$) kétdimenziós Gauss-függvénnyel írható le, és ennek paramétereit keressük:

$$I(x,y) = A \cdot e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (10)$$

Látható, hogy egy adott a orsóállásban az y szerinti integrálás egy konstans tagot fog adni, az x szerinti integrálás pedig éppen a Gauss-féle hibafüggvényt (valószínűségi számításban definiált eloszlásfüggvényt) adja. Ez nem egy analitikus függvény, viszont ha a mért görbét numerikusan deriváljuk, akkor éppen visszkapjuk a keresett $I(x,y)$ függvény marginális eloszlását, $I(x)$ -et. [14]



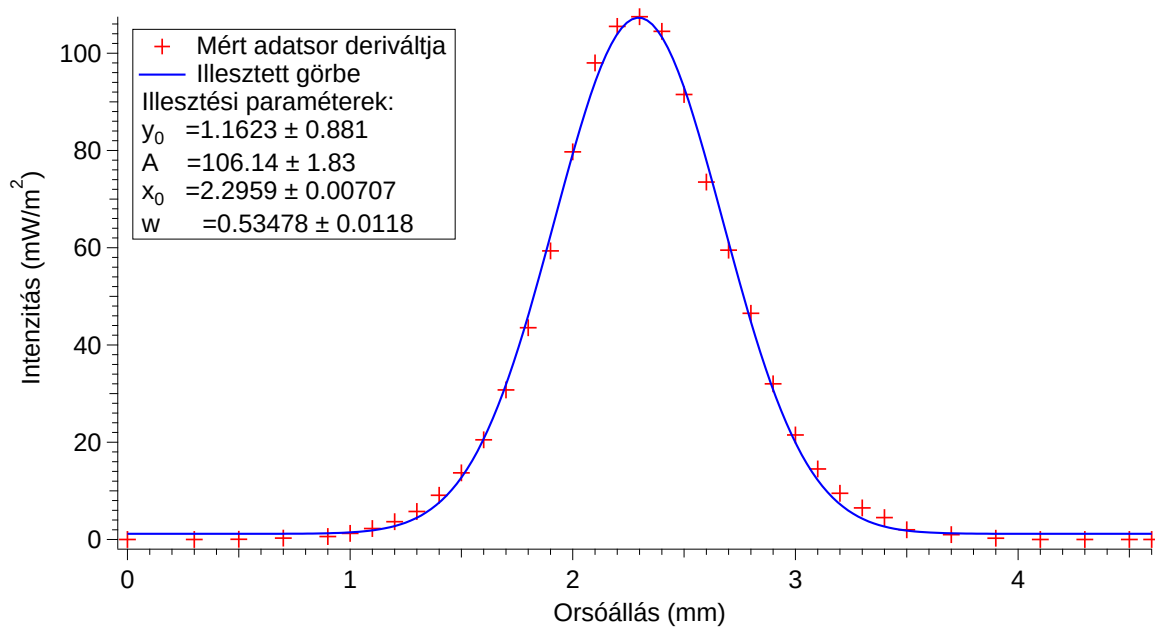
10. ábra. A késél-teszt nyers mérési adatsora 70%-os lézerteltjesítmény mellett

A fent leírtak alapján tehát elkészítettem egy grafikont, amin a nyers mérési adatok szerepelnek (fényteltjesítmények a orsóállás függvényében). Ez látható a 10. ábrán. Ennek

numerikus deriválását is elvégeztem, és az így kapott grafikonra egy Gauss-függvényt illesztettem, melynek alakja:

$$y = y_0 + A \cdot e^{-\frac{(x - x_0)^2}{w^2}} \quad (11)$$

Az illesztési paraméterként meghatározott w -ból számolható a σ , valamint a félértékszélesség. Az így kapott grafikon 70%-os lézerteljesítmény esetén a 11. ábrán látható.

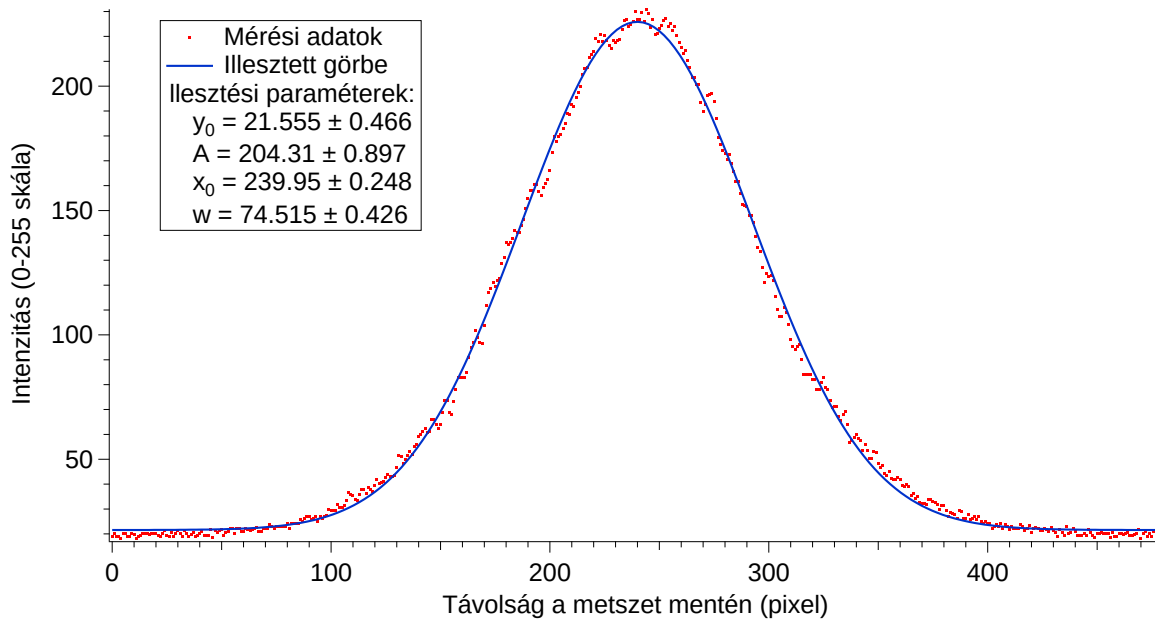


11. ábra. A késél-teszt adatsorának deriváltja 70%-os lézerteljesítmény mellett, illetve az arra illesztett Gauss-függvény

A második módszer, amivel a nyaláb intenzitáseloszlását meghatároztam, egy kamerás teszt volt. Ezt úgy végeztem, hogy a nyalábot egy OD2-es szűrőn keresztül közvetlenül a kamera objektívére irányítottam, és beállítottam az integrálási időt úgy, hogy ne menjen telítésbe a kép. A mérést egy 8 bites fekete-fehér kamerával végeztem (típusa: Marlin F131B). Ez azt jelenti, hogy a felvett kép egy adott pixele 0 és 255 közötti értéket tárol el, mely érték arányos a pixelre érkező teljesítménnyel. A felvett képeket úgy értékeltem ki, hogy minden fényképre három különböző irányú metszetet húztam, és azok mentén vizsgáltam az intenzitáseloszlást (ezt az *ImageJ* alkalmazás segítségével végeztem). Az imént beláttuk, hogy egy adott tengely mentén a nyaláb intenzitáseloszlására egy Gauss-függvény illeszthető. Egy ilyen illesztést mellékeltem a 12. ábrán. Az összes felvett képre tehát három ilyen illesztést végeztem, és azokból kapott paraméterek átlagát vettem, mint végleges eredmény.

A kamera adatlapján szerepelt, hogy egy pixel mérete $6,7 \mu\text{m} \cdot 6,7 \mu\text{m}$. Ezek alapján az illesztett paraméterekből meg tudtam határozni a nyaláb szélességének valós mérete-

it. Az eredményeimet összehasonlítottam a késél-teszt során kapott eredményekkel, ezek összefoglalása az 1. táblázatban látható.



12. ábra. Kamerával végzett mérés kiértékelése során készített metszet, és az arra illesztett Gauss-függvény

	Kamera teszt				Késél-teszt
Lézerteljesítmény	70%	80%	90%	100%	70%
Félértékszélesség (μm)	812 ± 8	820 ± 7	821 ± 7	817 ± 7	881 ± 17
$\frac{1}{e^2}$ -szélesség (μm)	1379 ± 14	1393 ± 11	1395 ± 12	1388 ± 13	1496 ± 29

1. táblázat. Lézernyaláb félértékszélessége és $\frac{1}{e^2}$ -szélessége különböző lézerteljesítményeken, a két különböző módszerrel meghatározva

A táblázat utolsó sorában szereplő $\frac{1}{e^2}$ -szélességet szokás a Gauss-nyaláb nyalábátmérőjeként értelmezni. Ez az a szélesség, ahol az elektromágneses tér amplitúdója az $\frac{1}{e}$ -szeresére csökken, vagyis itt az intenzitás a maximumnak $\frac{1}{e^2}$ -szerese. Ez a mennyiség, akárcsak a félértékszélesség, az illesztések w paraméteréből számolható rövid átalakításokkal.

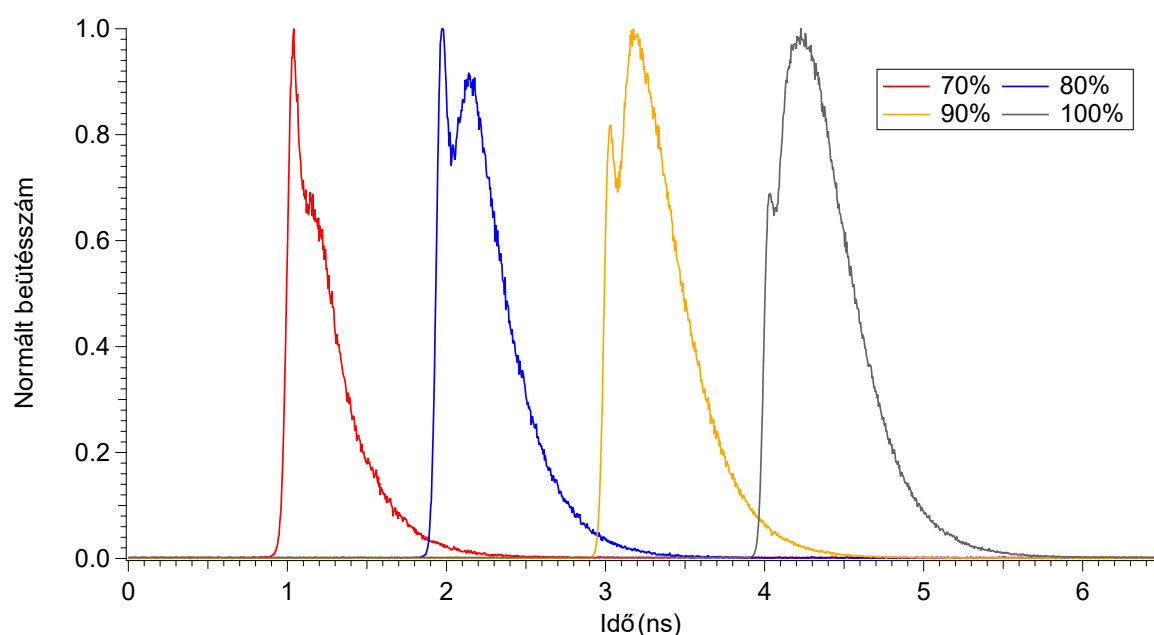
A két mérési módszer hasonló eredményeket adott. A kettő közül a kamerával végzett mérést tartom a pontosabbnak. A nyalábátmérőt így 1,4 mm-nek vehetjük. Továbbá azt is sikerült igazolni, hogy az intenzitáseloszlás jól leírható egy Gauss-függvénnyel, azaz „szép” nyalábot állít elő a rendszer.

3.1.5. Impulzusalakok

A lézerkarakterizálás utolsó lépése a fényforrás impulzusalakjának vizsgálata volt. Az ide kapcsolódó mérések során azt tanulmányoztam, hogy az egyes lézerbeállításoktól hogyan függenek a kiadott impulzus tulajdonságai.

Ezen méréseket úgy végeztem, hogy az optikai szálból kilépő nyalábot az egyfoton detektorra irányítottam, és közéjük OD szűrőket helyeztem. Az elrendezést a küvettás mintatartóban valósítottam meg (5/A ábra), mert itt lehetett az optikai szál, detektor, szűrőket fixen rögzíteni, illetve megfelelő sötétítést biztosítani a háttér csökkentése érdekében.

Az eredmények bemutatása előtt fontos kitérni arra, hogy ezek a mérések is egyfajta IRF-et határoznak meg: a fényforrás által kiadott impulzus, az optikai kábel átvitelén keresztül jut el a detektorhoz, és az ezekre adott válaszfüggvényt tudjuk mérni. Ez praktikusán azt jelenti, hogy a detektor válaszfüggvénye egy adott gerjesztésre jelentősen befolyásolja a felvett impulzusalakot. Ahhoz, hogy ez az effektus ne legyen jelen, nagyon gyors detektorra és elektronikára lenne szükség, a rendelkezésre álló rendszerben azonban egyértelmű, hogy nem kizárólag a fényforrás impulzusalakja jelenik meg a mérési adatsorban.



13. ábra. Impulzusalakok összehasonlítása különböző lézerteljesítmények mellett

A spektrumok kiértékelésekor már leszűkült a vizsgálandó beállítások köre, tehát itt csak a 70%-100% közti lézerteljesítményekhez tartozó eredményeket fogom bemutatni. A 13. ábrán ezen lézerteljesítmények mellett felvett impulzusalakok láthatóak. A teljesítmény növelésével természetesen nőtt a fotonszám, azaz a mérhető beütésszám, ezért

a jó összehasonlíthatóság érdekében 1-re normált értékeket jelenítettem meg az ábrán. Továbbá időben eltoltam az adatsorokat egymáshoz képest, szintén az áttekinthetőség miatt.

Az ábrán az látszik, hogy mind a négy beállítás esetén két maximuma jelenik meg a mért jelnek. A második maximum ráadásul egyre jelentősebb a teljesítmény növelésével. A normálás miatt nem látható egyértelműen, de mindkét maximum növekszik a nagyobb teljesítmények felé haladva. A második maximumon ez erőteljesebben jelentkezik: valahol 80% és 90% között egyenlő a két maximum értéke, utána pedig a második felül is múlja az elsőt. A második maximum megjelenése és felerősödése miatt az impulzus félértékszerűsége láthatóan megnő, ilyen tekintetben a 70%-os teljesítmény az optimális a fentiek közül.

A mérési eredmények alapján azt tapasztaltam, hogy jelentősen hosszabb, és kevésbé „szép” impulzusokat vettem fel a kék lézerrel, mint amelyet pirossal lehetett mérni, és a különbség egyre jelentősebb a lézerteljesítmény növelésével. Ugyanakkor a lézer adatlapja alapján az impulzusnak ennél rövidebbnek kellett volna lennie, illetve a második maximum nem haladhatná meg az elsőt. [15]

Azt gyanítom tehát, hogy ebben az eredményben a detektornak is szerepe van, azaz a detektor hullámhosszfüggő válaszfüggvénye egy konvolúciós integrálon keresztül alapvetően módosítja (rontja) a mérhető készülék válaszfüggvényét. Ez a második csúcs ráadásul láthatóan rendelkezik egy (exponenciálisan) lecsengő farokkal is, ami a SPAD detektor karakterisztikája miatt jelenhet meg. [16].

A 3.2.2. fejezetben látni fogjuk, hogy ez a feltételezés megmagyarázná néhány konkrét mérési eredmény pontatlanságának okát is. Bővebben erről az említett szakaszban lesz szó.

3.2. Próbamérések az új fényforrással

A lézer néhány általános tulajdonságának feltérképezése után célom az volt, hogy a fluoreszcencia lecsengési időket mérő elrendezésben is vizsgáljam a kék fényforrást.

Vizsgálataimhoz az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék kollégái által nevelt cékla (*Beta vulgaris L.*) növényekből származó leveleket, illetve acetonban oldott extrakt mintákat használtam. A kontroll csoport mellett egyes növényeket kadmiumstressznek tették ki, illetve néhányat vashiányos nevelésben részesítettek a [17] cikkben ismertetett módon.

A méréseim alapján kiderült, hogy a rendszerben szükség van néhány változtatásra a megfelelő eredmények kinyerése érdekében, ebben a fejezetben tehát kísérleti munkám ide tartozó fejleményeit mutatom be.

3.2.1. Klorofill kivonatok vizsgálata

Az első fluoreszcencia élettartam méréseim során klorofill kivonatokat (extraktokat) vizsgáltam. Ezek a minták különböző módon stresszelt növényi levelekből származtak, és acetone oldószerben voltak preparálva. Az oldatokat küvettákba öntve, a küvettatartós elrendezésben mértem.

Több oka is volt annak, hogy ezekkel a mérésekkel kezdtük a fluoreszcencia élettartam méréseket. Egyrészt az extraktoknak jellemzően hosszabb az élettartamuk, mint a valódi levélmintáknak, ezért a bevezetőben bemutatott mindkét kiértékelési módszerrel jó eredményt kaphatunk, ezzel visszaellenőrizve a mérés érvényességét. A másik indok pedig, hogy a korábbi években a piros lézerrel hasonló minták vizsgálata is zajlott, és így össze lehet hasonlítani az általunk kapott eredményeket a korábbiakkal.

A vizsgált minták között volt kadmiumstresszelt, vashiányos, illetve kontroll (stressz nélküli) levélből származó extrakt. Mindegyik mintát megmértem 70% és 100% lézerteljesítmény mellett, az alkalmazott ismétlési frekvencia 10 MHz, a felhasznált szűrő OD2-es volt. A kontroll minta fluoreszcenciáját piros gerjesztés esetén is mértem, a másik kettőt csak kékkel.

Ahogy említettem, az extraktok vizsgálata azért is előnyös, mert a természetes levélmintákhoz képest viszonylag hosszú az élettartamuk, így lehetőség van egyszerű tailfit kiértékelésre is a rekonvolúciós módszer mellett. Ezeknél a mintáknál tehát mindkét típusú illesztést elvégeztem. Eredményeimet a 2. táblázatban foglaltam össze. Minden itt megjelenő élettartam öt egymást követő mérés kiértékelésével kapott eredmény átlaga, illetve a bizonytalanságokat is ezen eredmények szórásával becsültem. Egy további fontos megjegyzés, hogy a mért adatsorokra egyetlen exponenciális függvényt illesztettem, azaz (5) és (6) egyenletekben $N = 1$.

Minta	Rekonvolúció élettartam (ns)	Tailfit élettartam (ns)
Kontroll, 70%	$5,662 \pm 0,013$	$5,64 \pm 0,01$
Kontroll, 100%	$5,51 \pm 0,02$	$5,732 \pm 0,006$
Kontroll, piros lézer	$5,90 \pm 0,01$	$5,94 \pm 0,01$
Kadmiumstressz, 70%	$5,49 \pm 0,01$	$5,47 \pm 0,01$
Kadmiumstressz, 100%	$5,47 \pm 0,01$	$5,46 \pm 0,01$
Vashiány, 70%	$5,620 \pm 0,006$	$5,620 \pm 0,013$
Vashiány, 100%	$5,583 \pm 0,025$	$5,56 \pm 0,03$

2. táblázat. Különböző módon stresszelt levelekből származó extraktokon mért fluoreszcencia élettartamok, a kétféle illesztési módszer összehasonlítása

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az 1 ns-nál rövidebb gerjesztő impulzushoz képest valóban érdemben hosszabb volt a lecsengés, tehát jogosan alkalmazható a talilfit módszer. Ez egyrészt mutatkozik abban, hogy az egyes mérések kétféle kiértékelésével kapott eredmények minden esetben legfeljebb 4%-kal tértek el egymástól. Másrészt emiatt lehetséges az, hogy 70%-os és 100%-os gerjesztéssel hasonló eredményeket kaptunk minden esetben (itt is legfeljebb néhány százalékon belüli az eltérés a releváns eredmények között). Ezek azt mutatják, hogy a gerjesztő impulzus alakja itt még nem befolyásolta jelentősen a mérhető lecsengést.

A következő megállapításom, hogy az egyes stresszelt mintákon mért élettartamok egymáshoz nagyon hasonlóak: a legnagyobb és legkisebb kapott eredmény között kevesebb, mint 5%-os az eltérés (5,47 ns és 5,732 ns, csak a kék gerjesztéssel kapott eredményeket figyelembe véve). Későbbi fejezetekben látni fogjuk, hogy levelek esetén a stresszek jelentős hatással vannak a fluoreszcencia élettartamra. Az extraktokban ez nem mutatkozik, mert a növényi stressz nem közvetlenül a fluoreszcens anyagra (klorofillra) van hatással.

A harmadik, egyben utolsó ide tartozó megfigyelés a kontroll mintán végzett piros és kék gerjesztésű mérés összehasonlításához kötődik. Itt akár 7-8% eltérés is fellépett két eredmény között. A szakirodalomban is dokumentált a jelenség, miszerint a *klorofill a* molekulák esetén a gerjesztő hullámhossz növelésével hosszabbnak találták a minta fluoreszcencia élettartamát. [18]

A mérések kiértékelése során feltűnt, hogy a kék gerjesztéssel végzett minták esetén az illesztésnél konzisztensen kicsit nagyobb χ^2 -et kaptam, mint a piros gerjesztésű adat-sornál. Az eltérés leginkább onnan adódott, hogy a lecsengés kezdetén – azaz ott, ahol a gerjesztő impulzus még közvetlenül hatással van a mért jelre – valamilyen rendellenesség volt megfigyelhető. A hosszú élettartam miatt viszont a teljes illesztés átlagosan jónak volt mondható: a χ^2 paraméter legfeljebb 1,3 körüli értéket vett fel mindkét kiértékelési módszerrel.

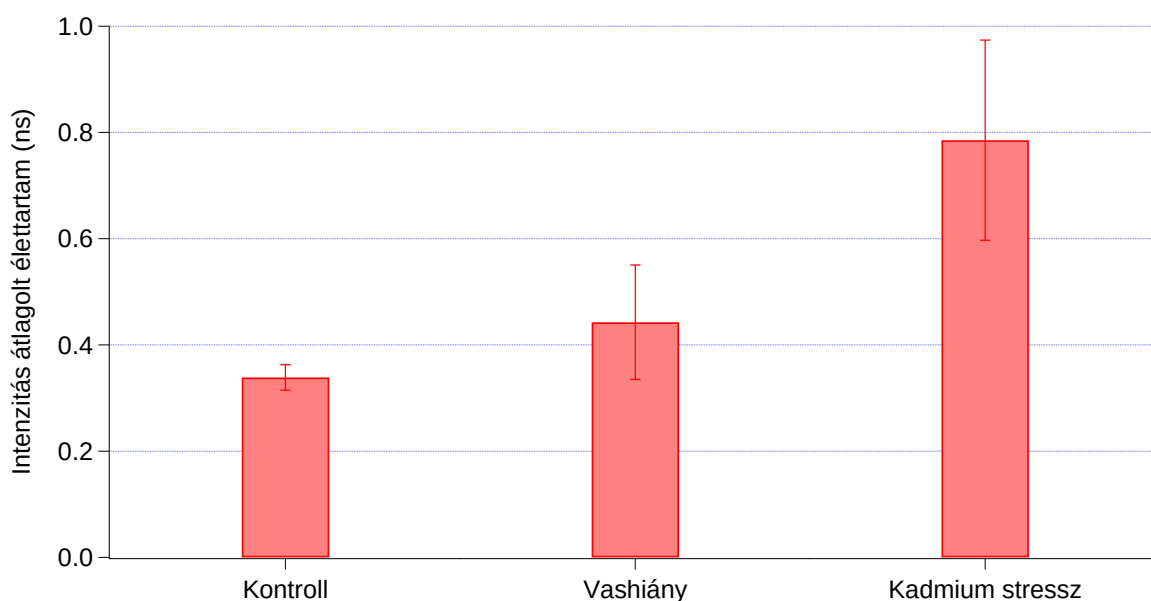
3.2.2. Különböző módon stresszelt növényi minták vizsgálata

A következő méréseim során az extraktok után valódi levelek lézerindukált fluoreszcenciáját vizsgáltam. A minták most is különböző növényi stressznek kitett levelek voltak. Az előző, extraktos mérésekhez képest eltérés, hogy most a levélminták mérésére kifejlesztett elrendezést használtam (5/B ábra).

A másik jelentős különbség, hogy a levelekben jellemzően rövidebb az élettartam, mint az extraktokban, ezt a levélben zajló kioltási mechanizmusok okozzák (az 1.2. fejezetben szó esett arról, hogy a kioltás csökkenti az élettartamot). Az extraktoknál bemutatott eredményekhez hasonlóan most is kadmiumstresszelt, vashiányos, illetve kontroll mintát vizsgáltam.

Mivel a valódi levelek nem annyira „homogének”, preparáltak, mint az extraktok, ezért köztük várhatóan nagyobb szórás lesz megfigyelhető, akár ugyanazon mintán végzett két mérés eredményei között is. Ennek csökkentése érdekében ugyanazon stressznek kitett növényről származó több eltérő levelet is mértem, illetve egy levelet egymás után többször is. Így az eredményeimet egy bővebb mintavételezésre alapozva tudtam kiértékelni.

A 3.2.1. fejezet végén az volt a konklúzióm, hogy a hosszú élettartamú extraktok esetében a *Tailfit* és a rekonvolúciós módszerek is megfelelő eredményt adtak. A levélminták fluoreszcenciája azonban jelentősen gyorsabb lecsengést mutat, ezért elsőre egyértelmű volt, hogy csak a rekonvolúció a célravezető. A *Tailfit* módszerhez szükséges egy olyan tartomány a lecsengésben, ami alatt a gerjesztő impulzus már eltűnik, itt pedig ez nem volt meg. Egy másik eltérés pedig az, hogy az extraktok esetében egy exponenciálist illesztettem, míg a növényi mintákra kettő összegét, azaz (5) és (6) egyenletekben $N = 2$. A bevezetőben leírtak alapján egy minta lecsengését az intenzitás átlagolt élettartammal jellemeztem. (Lásd: (7) egyenlet.)

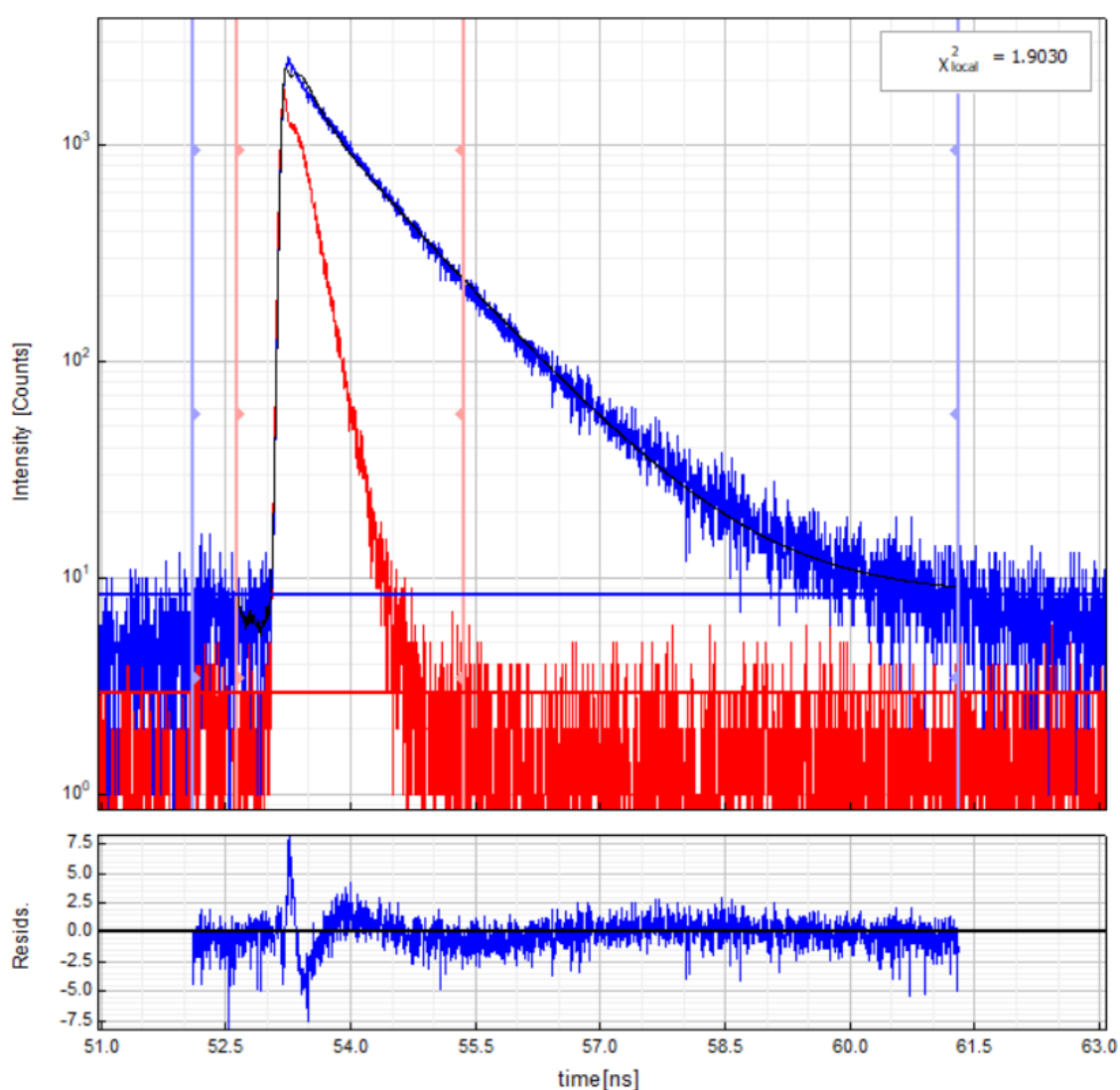


14. ábra. Különböző módon stresszelt leveleken mért fluoreszcencia élettartamok, a kiértékeléshez szórt fényen alapuló IRF-et használva

A leírtak szerint elkészült mérési eredményeimet összefoglaltam a 14. ábrán. A gerjesztéshez a 70%-os lézerteljesítményt alkalmaztam, 10 MHz-es ismétlési frekvencián, az alkalmazott szűrő OD2-es volt. Az egyes élettartamokat több minta többszöri mérésével, az eredmények átlagolásával határoztam meg, az eredmények bizonytalanságát pedig ezek szórásával becsültem. Ez a hiba így tartalmazza a „biológiai” szórást is, azaz azt, hogy eltérő levelek valamennyire más tulajdonságúak lehetnek.

A diagram alapján elmondható, hogy a stressz hatására növekszik a levél fluoreszcencia élettartama. Ez az eredmény az 1.2. fejezetben leírtakkal összhangban van, hiszen a növényfiziológiai stressz csökkenti a fotoszintetikus működés hatékonyságát. Ez pedig a kioltási mechanizmusok gyengüléséhez vezet, aminek eredménye a fluoreszcencia élettartam megnövekedése. Továbbá egyezik a tendencia az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék kollégáinak a velem párhuzamosan végzett munkájával, akik hasonló növényélettani változásokat találtak ennél a stresszkísérletnél. [19]

Elmondható az is, hogy az eredmények szórása a kontroll mintán volt a legkisebb, ez tapasztalatom szerint azzal magyarázható, hogy a stresszelt minták között éppen a fent említett biológiai szórás jelentős volt.



15. ábra. Illesztés kadmiumstresszelt levél lecsengésére, szórt fényen alapuló IRF-et használva

A méréseim fontos tanulsága azonban az volt, hogy annak ellenére, hogy a várt tendenciákat kimutattam, az illesztések meglehetősen pontatlanok voltak, erről tanúskodik

a 15. ábra (*EasyTau2* programban felvett kép). Felül maga az illesztés látható, alatta pedig az illesztett görbe és a mért adatsor különbsége (reziduális függvény). Ahogy 1.4. fejezetben írtam, egy megfelelő modell és illesztés esetén ennek a grafikonnak egy zérus érték körüli véletlen szórásnak kéne lennie. Egyértelműen látszik, hogy ennél az illesztésnél ez nem teljesül: a maximum környékén jelentős az eltérés. Az is megfigyelhető, hogy a χ^2 paraméter ennél az illesztésnél 1,9 volt, valamint a többi mintánál is 1,7 fölötti értéket kaptam (bizonyos esetekben akár 2,5-3-at is elérte, ami már meglehetősen rossz illesztést jelent).

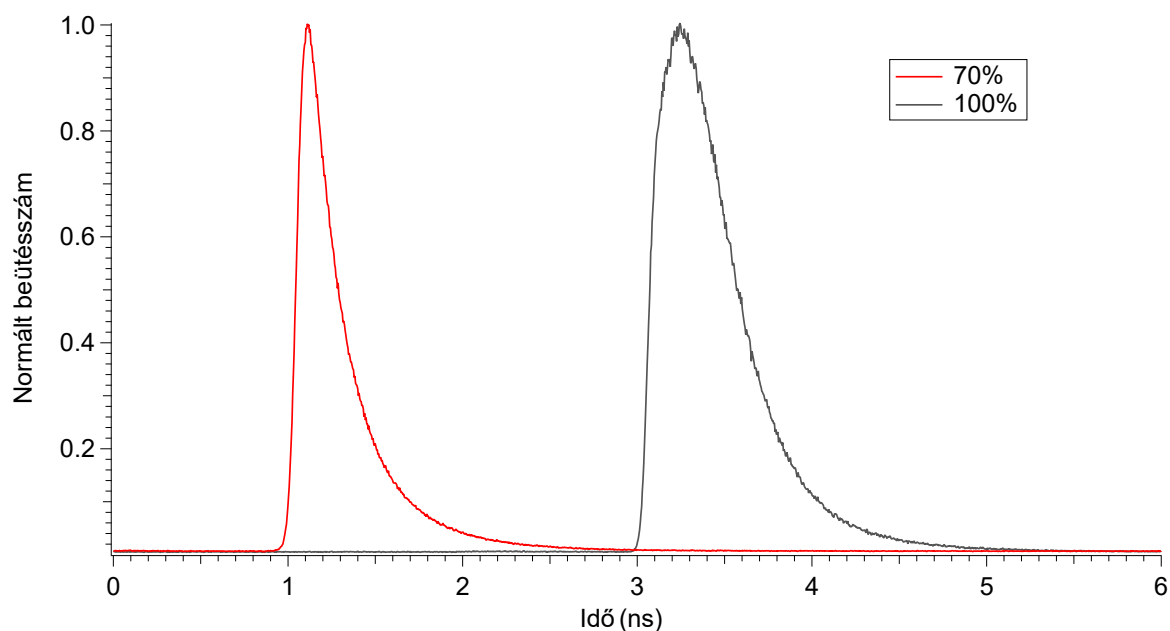
Az itt bemutatott megfigyelésekre az a magyarázat, hogy a rekonvolúciós illesztéshez használt, szórt fénnel felvett IRF adatsor nem megfelelően tükrözi a rendszer valódi válaszfüggvényét, erről a 3.1.5. fejezetben is esett szó. Ennek okára azt feltételeztem, hogy az impulzus második maximuma nem, vagy nem kizárólag a forrásból, hanem a detektor hullámhossz-függő válaszából is ered.

Itt jegyzem meg, hogy ez a probléma nem jelentős a piros (655 nm-es) forrásnál, hiszen abban az esetben alig van eltérés a gerjesztési hullámhossz és a detektálási tartomány ($\approx 700\text{-}750$ nm) között. Az új forrásnál így egy mérés technikai kihívás jelentkezett, melynek megoldásával a következő alfejezek foglalkoznak.

3.2.3. IRF mérése fluoreszcens festékkel

A kék lézer kísérleti rendszerbe való illesztéséhez tehát szükség volt arra, hogy az IRF-et megfelelő módon (a fluoreszcenciához tartozó hullámhosszon) lehessen felvenni. A lézer gyártójával való egyeztetés után arra jutottunk, hogy egy nagyon rövid élettartamú fluoreszcencia festék alkalmas lehet erre a célra. Ha kellően rövid a festék lecsengése, akkor jó pontossággal magát az impulzust, és a detektor arra adott válaszát fogjuk mérni. Ha pedig ez sikerül, akkor megoldódik az a probléma, hogy a kékben mért IRF nem összeegyeztethető a pirosban detektált fluoreszcencia jellel, hiszen már a festékből származó jel is piros hullámhosszú.

Az általunk kiválasztott anyag az *Erythrosin B* volt. Ennek fluoreszcencia élettartama nagyon rövid, 0,1 ns alatti [20]. A festékanyag abszorpciós spektrumának 545-550 nm között van maximuma, de a mi gerjesztésünk közelében is volt valamekkora (nem túl nagy) elnyelése. Az emisszió maximuma 560 nm körül található, viszont itt is elmondható, hogy van valamekkora fénykibocsátás azokon a hullámhosszokon, amit a 3.1.1. fejezetben bemutatott sávszűrő átenged (708 ± 75 nm). [21] Ezek alapján tehát azt vártam, hogy nem túl nagy erősséggel, de lesz mérhető fluoreszcencia jel. Ezt igazolták az első mérések: kis intenzitással ugyan, de sikerült a küvetta elrendezésben *Erythrosin B* festékkel méréseket végezni. A mérést 70%-os és 100%-os lézerteljesítmény mellett végeztem, mert ezeket használtam a levélminták vizsgálatához is. Az eredmények a 16. ábrán láthatóak.



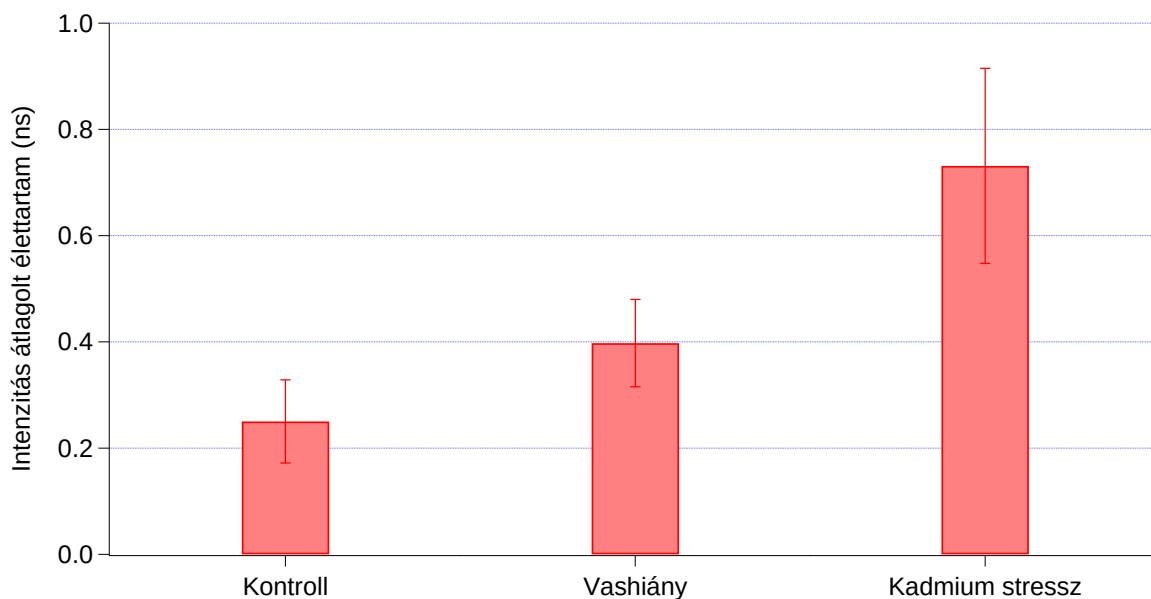
16. ábra. Az *Erythrosin B* festékkel felvett IRF-ek a két kiemelt lézerteljesítményen

Egyértelműen látszik, hogy a 13. ábrához képest sikerült érdemleges javulást elérni ezzel a módszerrel. A korábban megfigyelhető két maximum helyett most csak egy van jelen, úgy, hogy közben az impulzushossz kis mértékben rövidült is. Ez utóbbi azt jelenti, hogy az alkalmazott festékanyag lecsengése valóban kellően rövid volt ahhoz, hogy ilyen módon az IRF-et meg lehessen határozni. Az is egy pozitív változás, hogy a két különböző impulzus között a jel alakjában már nincs akkora eltérés, mint korábban volt: most már csak a szélességük eltérő, de hasonló az alakjuk.

3.2.4. Eredmények az új IRF-ekkel

Az előző fejezetben bemutatott fejlemények lehetőséget adtak arra, hogy a 3.2.2. fejezet eredményeit újra kiértékeljem. Tehát ugyanazon mérési eredményekre végeztem újabb illesztéseket a rekonvolúciós módszerrel, viszont most az új, *Erythrosin B*-vel becsült IRF-eket használtam ehhez.

A 17. ábrán a korábbihoz hasonlóan összefoglaltam a három eltérő levélcsoporton meghatározott fluoreszcencia élettartamokat. A fő tendencia ugyanaz maradt: a kontroll mintáknak volt a leggyorsabb a lecsengése, a kadmiumstresszelt levelek rendelkeztek a leghosszabb élettartammal, a vashiányos minták pedig a kettő közé estek. Ugyanakkor elmondható, hogy mindegyik levélcsoportra rövidebb élettartamot határoztam meg ezzel a módszerrel, a különbség korábbiakhoz képest körülbelül 0,05-0,08 ns (v.ö. 14. ábra).



17. ábra. Különböző módon stresszelt leveleken mért fluoreszcencia élettartamok, a kiértékeléshez *Erythrosin B* fluoreszcens festékkoldatot tartalmazó küvetával felvett IRF-et használva

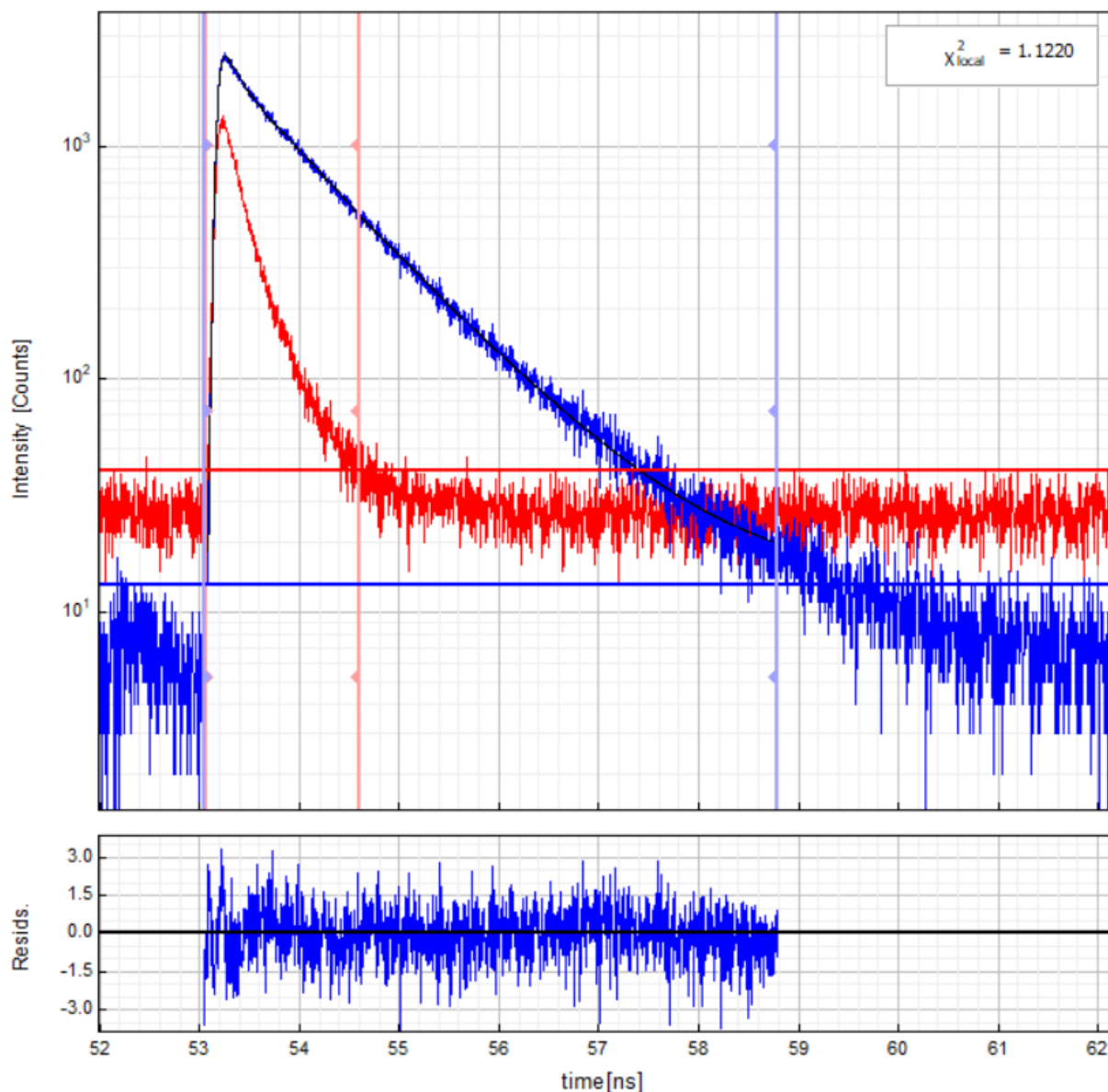
A két módszerrel tehát valamennyire eltérő élettartamokat kaptam, és a különbség az illesztések jószágában is meglátszott. A 15. ábra kapcsán bemutattam, hogy a szórt fénnnyel felvett IRF esetén milyen pontatlanságok jelentek meg az ottani kiértékelésnél. Ehhez képest az *Erythrosin B*-vel felvett IRF alkalmazásával jelentős javulást sikerült elérni. Erről tanúskodik a 18. ábra. Ugyanazon az adatsoron végeztem az illesztést, mint a fent bemutatott példában, tehát direktben össze lehet vetni az eredményeket.

A két említett ábra között két fontos különbséget emelnék ki. Az első, hogy a maximum körül látható, hogy a korábbi esetben a két csúccsal rendelkező IRF miatt a rekonvolúció nem adta vissza jól a megmért lecsengést, ez volt nyomon követhető az ábra alján a reziduális függvényénél is. Ehhez képest az új módszer esetén ez a különbség az illesztett és mért adatsor között már nem mutatja a csúcs környékén azt a nagy hibát, hanem gyakorlatilag egy zérus érték körüli szórást látunk, ahogy azt a 1.4. fejezetben leírtak alapján el is várjuk egy jó illesztéstől.

A második jelentős különbség a χ^2 paraméterek változása. Ennél a konkrét példánál sikerült 1,9-ről 1,12-re javítani ennek értékét, ami jelentős fejlődés. A javulás a többi mintára is teljesült: a korábbi 1,7-2,2 (néhány esetben 2,5-3) helyett az új IRF-et használva átlagosan 1,1-1,5 körül mozgott ezen paraméter értéke. Itt is volt a többihez képest kiemelkedően rosszabb illesztés, azonban ez sem adott 1,9-nél magasabb χ^2 -et, ami korábban a még a jobbnak számító illesztésekre volt jellemző. Ezek a kiugróan magas értékek egyébként azoknál a mintáknál jelentkeztek, amiknek a legrövidebb volt az élettartama.

Ez pedig mutatja, hogy van egy alsó határa annak, hogy a rekonvolúciós módszerrel mennyire gyors lecsengéseket lehet kiértékelni.

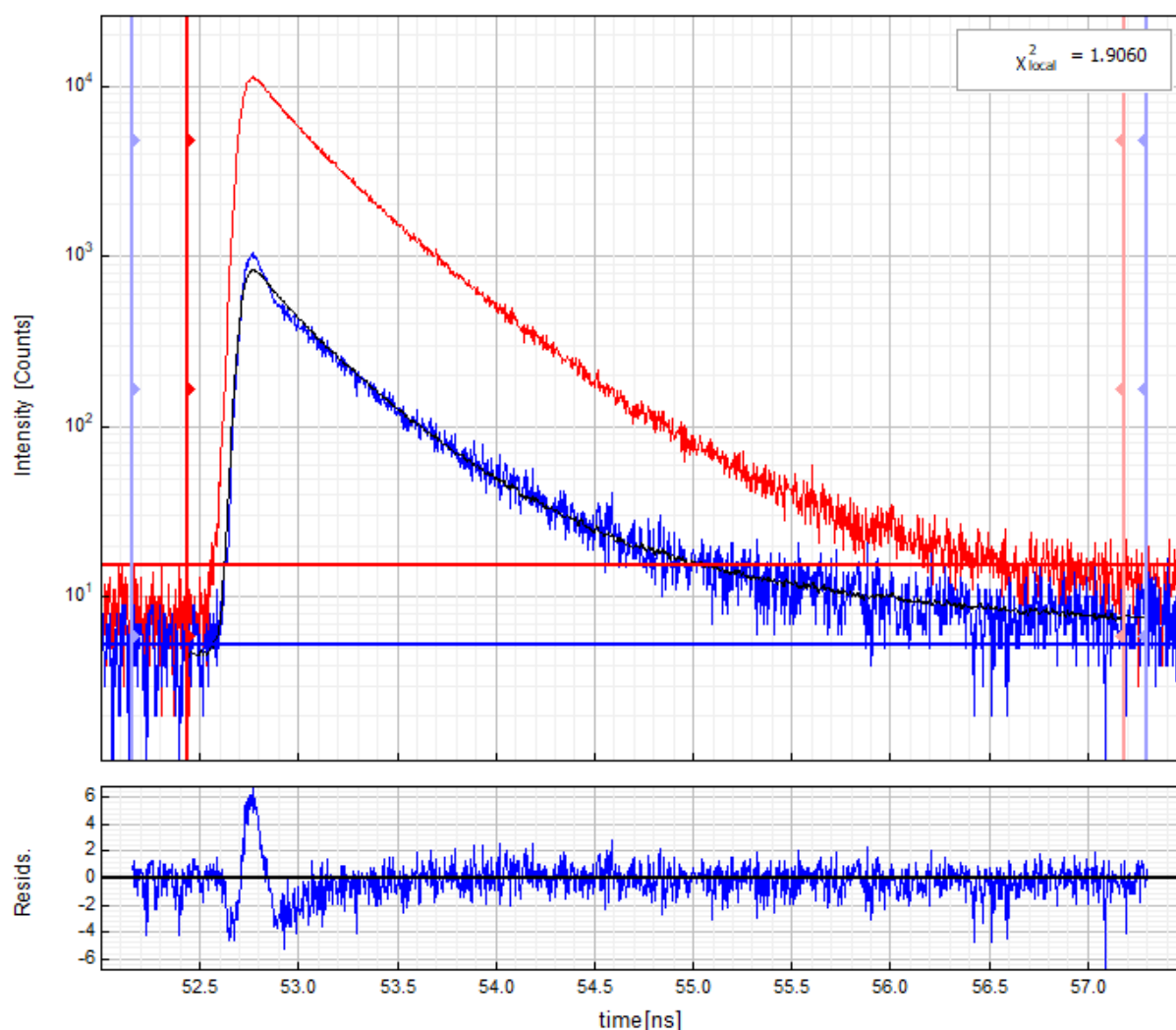
Összességében tehát egyértelműen kijelenthető, hogy az *Erythrosin B* fluoreszcens festék segítségével megmért IRF érdemben javította a kék lézerrel gerjesztett fluoreszcencia élettartam mérések kiértékelésének pontosságát. Erre a – kék lézernél egyedi módon felmerülő – problémára megoldást találtam.



18. ábra. Illesztés kadmiumstresszelt levél lecsengésére, *Erythrosin B* fluoreszcens festékkoldatot tartalmazó küvetával felvett IRF-et használva

3.2.5. Az IRF meghatározásának optimalizálása a még rövidebb élettartamok méréséhez

2022 szeptemberében érkeztek új algaminták, melyek között találtam egy nagyon rövid élettartammal rendelkező típust is. Ez a *Microcystis aeruginosa* nevű minta volt, a továbbiakban MA-ként fogok rá hivatkozni. Itt a lecsengés gyakorlatilag az *Erythrosin B*-vel felvett IRF-fel összemérhető hosszúságú volt, és a kiértékelésüknél nem kaptam kellően jó illesztést, erről tanúskodik a 19. ábra. Itt a mérési adatsor (kékkel) és az illesztett görbe (feketével) eltérése megfigyelhető a maximum körül: a mért jel „túl hegyes” ahhoz képest, amit a rekonvolúcióval számol a szoftver. Az illesztés hibája a χ^2 paraméteren is meglátszik, ennél a mintánál rendre 1,9-2 körüli értéket kaptam.



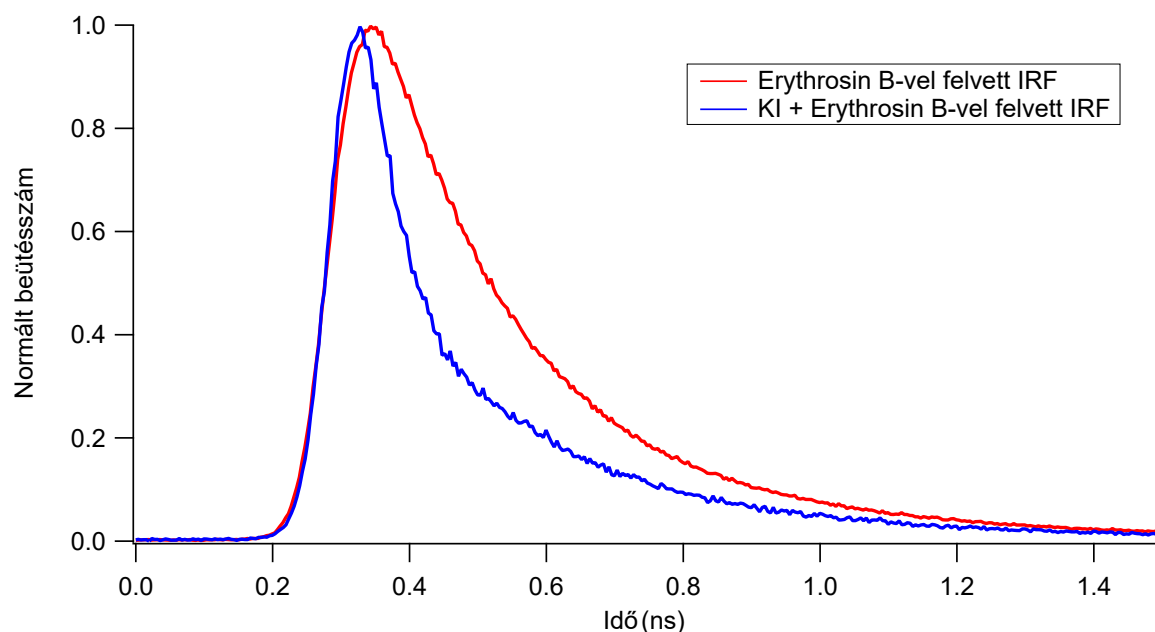
19. ábra. MA alga lecsengése, *Erythrosin B*-vel felvett IRF-fel kiértékelve

Az előző eredményeim alapján az volt a célom, hogy a festék élettartamát a lehető legjobban lerövidítsem, ezáltal rövidebb IRF-et lehessen felvenni. Az 1.2. fejezetben leírtak alapján erre lehetőség van, amennyiben a fluoreszcencia kioltást elősegítjük külsőleg.

Az interneten találtam útmutatást arra vonatkozóan, hogy milyen módszerekkel lehet a kioltás növelését megvalósítani. [22] [23]. Az általam alkalmazott eljárás ezen leírások alapján az volt, hogy egy telített KI (kálium-jodid) oldatot készítettem desztillált vízben, és ehhez valamennyi fluoreszcens festéket adtam. Esetünkben ez a festék ugyanúgy az *Erythrosin B* volt.

Az oldat elkészítéséhez 5,34 g KI port oldottam fel 4 ml desztillált vízben. Ehhez 7 mg *Erythrosin B* port kevertem (az 1 M koncentrációhoz 5,5 mg kellett volna, ez annál kicsivel több).

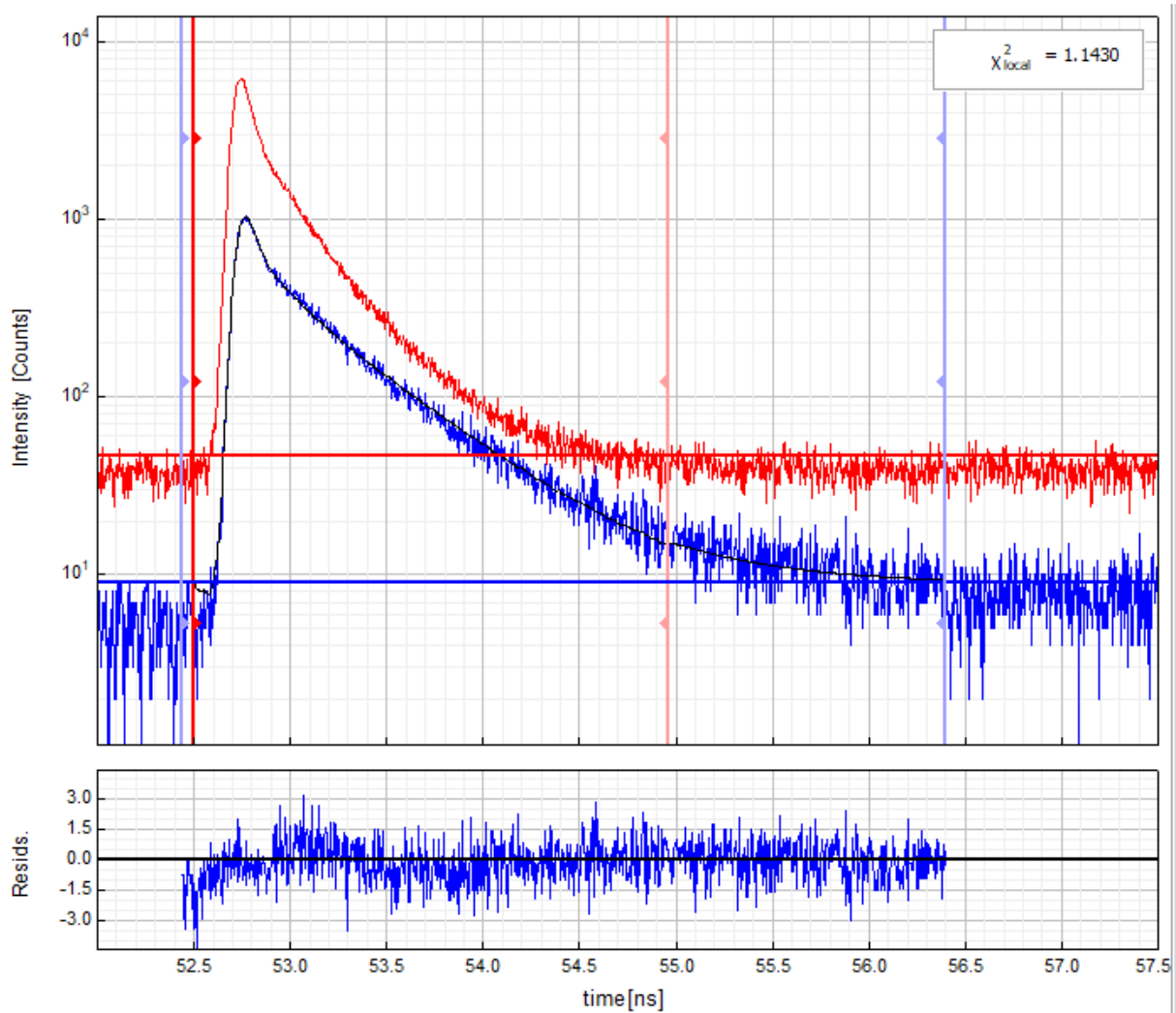
Az elkészült oldattal elvégeztem a próbaméréseket, és biztató eredményeket találtam: a tiszta *Erythrosin B*-vel felvett IRF-hez képest fele-kétharmad olyan széles impulzust tudtam felvenni a *quencher* anyaggal való keverés után. Az erről készült grafikon a 20. ábrán látható. (Csak a 70%-os lézerteljesítményhez tartozó görbét ábrázoltam, hiszen ezzel történtek a későbbi mérések is.)



20. ábra. Tiszta *Erythrosin B*-vel, illetve KI jelenlétében felvett IRF-ek összevetése, 70%-os lézerteljesítmény mellett

Az IRF sikeres lerövidítése után elvégeztem a 19. ábrán bemutatott kiértékelést újra, most már a KI-os oldattal felvett mérést használva. Az erről készített képernyőkép a 21. ábrán látható. Egyértelműen látszik, hogy egyrészt a lecsengéshez (kékkel) képest az IRF (pirossal) most rövidebb, mint az előző esetben. Emellett a fontos eredmény, hogy a korábbi hiba - miszerint a maximumot nem tudta kellően „csúcsosra” venni a rekonvolúció - itt nem jelenik meg. Az illesztéshez tartozó χ^2 paraméter értéke ebben az esetben rendre 1,2 alatti volt, ami kifejezetten jónak mondható. Az MA jelzésű algamintán 70 %-os

gerjesztéssel 3 mérés kiértékelését végeztem el, ezek alapján a fluoreszcencia élettartam $\tau_{\text{int}} = 0,20 \pm 0,01$ ns volt.



21. ábra. MA alga lecsengése, KI-os *Erythrosin B*-vel felvett IRF-fel kiértékelve

Ez a mérés már gyakorlatilag az IRF-fel megegyező hosszúságú lecsengés kiértékelését tette lehetővé, jóval a nanoszekundum alatti tartományban. Elmondható tehát, hogy az *Erythrosin B*-vel felvett IRF-et a kioltási mechanizmusokat elősegítő KI adalékolásával sikeresen lerövidítettem, ezáltal elérhetővé tettem meglehetősen rövid fluoreszcencia élettartamok mérését.

3.2.6. Különböző detektorok hatása

Az eddig bemutatott kísérleti eredmények alapján azt a következtetést vontam le, hogy az élettartam mérés korlátja nem a lézerforrás, hanem a detektor oldalán van. Az MPD SPAD detektora egy széles körben elterjedt egyfoton-detektor, ám lehetőségem nyílt arra, hogy megvizsgáljam más gyártó SPAD detektorát is: egy IDQ100-50 típusú detektorral

végeztem méréseket. (A 3.1.1. fejezetben már említésre került, hogy az általam használt detektor típusa MPD-100-CTB volt.)

Az interneten megtalálható adatlapok alapján ([24], [25]) elkészítettem a fontosabb paramétereket tartalmazó 3. táblázatot. Az figyelhető meg, hogy jelentős eltérés nincs a paraméterek között: mindenhol hasonló értékek szerepeltek az adatlapokon. A legnagyobb különbség az *after-pulsing probability*-nél figyelhető meg. Ezen paraméter egy utólagos, második impulzus kiadásának valószínűségét jelenti. Azonban ebben a paraméterben sem túl nagy az eltérés a két detektor között, főleg azt figyelembe véve, hogy a mérési eredményekben mekkora különbségek voltak megfigyelhetőek (ezt fogom a következőkben bemutatni).

	MPD	IDQ
Időfelbontás (ps)	50	40-60
Fotondetektálási valószínűség 450 nm-en (%)	35	25
Holtidő (ns)	77	45-50
<i>After-pulsing probability</i>	0,1-3%	typical: 0,5%

3. táblázat. MPD és IDQ detektorok fontosabb paramétereinek összehasonlítása

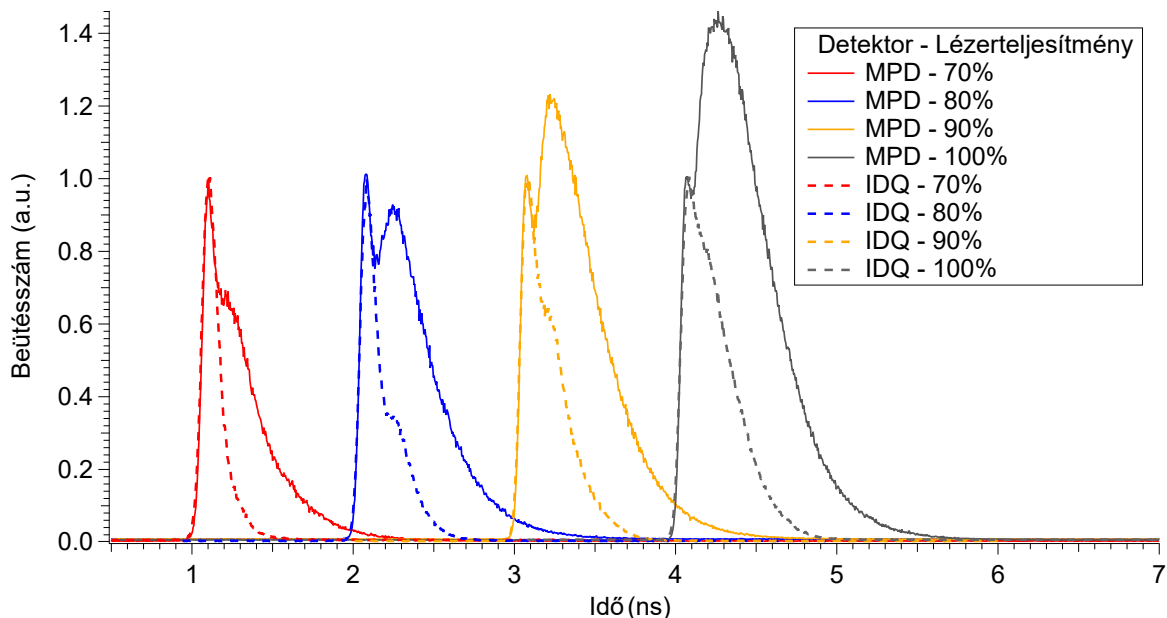
A méréseim során kiderült, hogy jelentősen más eredményeket ad a két különböző detektor. A 3.1.5. fejezetben bemutattam, hogy hogyan mértem a lézer impulzusalakját (egyfajta IRF-et). Most ugyanazt a mérést végeztem el, viszont az „új”, IDQ detektorral.

Az IDQ detektor TTL jeleket szolgáltat, szemben az MPD detektor NIM logikai jeleivel. A TTL jelek mintavételezéséhez a *PicoHarp300*-as egységgel egy jelszintillesztő áramkör alkalmazására lenne szükség. Az IDQ detektorral együtt azonban kölcsönkaptam egy *Time Tagger Ultra* (*Swabian Instruments*) számláló elektronikát is, amely mindkét jeltípus mintavételezésére alkalmas. A két detektort így most ugyanazzal a fotonszámlálóval használtam.

A 22. ábrán láthatóak a mérés eredményei. Itt a 13. ábrán már bemutatott görbék mellett (amiket még az MPD detektorral mértem, ezek láthatóak folytonos vonallal) tüntettem fel a friss mérési eredményeket (ezek szaggatott vonallal láthatóak).

A 3.1.5. fejezetben írtam arról, hogy a második csúcs feltehetőleg a detektor hullámhosszfüggő válasza miatt jelenik meg, és ezt valamilyen szinten már igazolta az is, hogy a rövid élettartamú fluoreszcens festék segítségével felvett (azaz piros hullámhosszokhoz rendelhető) IRF-ben nem volt jelen ez a második maximum. Most pedig az látszik, hogy az IDQ detektorral végzett mérés során sem jelent meg második maximum, sőt, az első maximum alakjára nagyon jól illeszkedik az új mérés során felvett görbe. Tehát úgy gondolom, hogy az első maximum az, ami valóban a lézer által kiadott impulzusból ered,

a második maximum pedig az MPD detektorra jellemző, kék hullámhossz esetén fellépő (adatlap alapján váratlan) effektus miatt van jelen. (A 22. ábrán erre az első csúcsra normáltam a görbéket a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében.)



22. ábra. Impulzusok összevetése az MPD és IDQ detektorral való mérésekre

A kísérlet eredménye egyértelművé tette, hogy a kék gerjesztéssel mért rövid (<1 ns) fluoreszcencia lecsengési idők mérésekor tapasztalt nehézségek alapvetően a detektor oldalról származnak. Alig eltérő műszaki adatlappal a piacon lévő kellékek között nagy különbség van egy ilyen alkalmazásnál.

Rövid fluoreszcencia élettartamok meghatározásához tehát célszerű referenciaméréseket végezni, melyekre alkalmas választás a dolgozatomban bemutatott kálium-jodid *quencher* anyaggal adalékolt *Erythrosin B* fluoreszcens festék. Ennek a referenciaanyagnak az alkalmazása mind egy detektor minősítésére, mind a detektorválaszból adódó problémák korrigálására is jónak bizonyult.

4. Összegzés

A dolgozatom elején összefoglaltam a diódalézerek működésének alapjait és a lézerindukált fluoreszcencia jelenségkörét. Áttekintettem az időfelbontásos mérés technika, illetve a mérések kiértékeléséhez alkalmazott módszerek elméleti hátterét.

A kísérleti munkám első felében az új lézerforrás paramétereinek vizsgálatát végeztem: különböző beállítások mellett mértem a kiadott fényteljesítményt, a spektrális tulajdonságokat, a nyaláb intenzitáseloszlását. Végül az impulzusalak mérése során eltérést találtam a lézer dokumentációja alapján várt eredménytől, ami a későbbi kísérleteknél problémát jelentett.

A kék lézert illesztettem a meglévő mérési elrendezéshez, és próbaméréseket végeztem. Először hosszabb élettartamú klorofill kivonatokat vizsgáltam. A kiértékelés során megfelelő illesztéseket tudtam végezni, és az irodalom alapján elvárt eredményeket kaptam.

A fotoszintetikusan aktív növényi levelekre az extraktokhoz képest rövidebb fluoreszcencia élettartam jellemző. A fő tendenciát sikerült kimutatnom a három (kontroll, illetve két stressznek kitett) levélcsoport élettartama között, azonban pontatlan illesztéseket lehetett csak végezni.

A problémát véleményem szerint az jelentette, hogy a kék tartományban felvett készület válaszfüggvény (IRF) nem összeegyeztethető a piros tartományban mért fluoreszcencia jellel, mert a detektor válasza erősen hullámhosszfüggő. Ezt úgy sikerült áthidalnom, hogy nagyon rövid élettartamú fluoreszcens festékkel határoztam meg az IRF-et.

Az új IRF segítségével ismét elvégeztem a korábbi mérések kiértékelését, és ezzel a módszerrel jelentősen javultak az illesztések. Néhány kiugróan rövid élettartamú mintát leszámítva illesztéseim az pontossága a kívánt szintet elérte.

A következő célom a fluoreszcens festék lecsengési idejének további rövidítése volt, annak érdekében, hogy még rövidebb fluoreszcencia élettartammal rendelkező mintákat is lehessen mérni. Ezt úgy sikerült elérni, hogy fluoreszcencia kioltást elősegítő anyagot (kálium-jodidot) kevertem a festékhez. Jelentősen sikerült rövidebbé tenni az IRF-et, és ezzel már jó illesztéseket kaptam olyan algaminták lecsengésére, amik esetében a korábbi „tisztá” fluoreszcens festékkel felvett IRF már nem volt megfelelő.

Végül lehetőségem nyílt egy másik gyártó által készített (de ugyanolyan elven működő) detektorral méréseket végezni. Ezzel a detektorral elvégeztem az impulzusalakok újbóli mérését a kék tartományban, és jelentős különbséget találtam a korábbi mérési eredményeimhez képest. Az újonnan felvett görbéket a korábbiakhoz hasonlítva sikerült alátámasztani a korábbi sejtésemet, miszerint a detektor volt felelős az impulzusalak mérésekor megjelenő második maximum megjelenéséért.

5. Köszönetnyilvánítás

A kutatást a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatta az NKFIH-873-4/2020 azonosítójú Kvantuminformatikai Nemzeti Labor keretében.

Köszönet illeti az ELTE Növényélettani és Molekuláris Növénybiológiai Tanszék kollégáit a növényminták neveléséért, valamint a MATE Környezettudományi Intézet dolgozóit az algaminták biztosításáért.

Hivatkozások

- [1] P. Kapusta, M. Wahl, R. Erdmann, Advanced Photon Counting, Springer (2015), ISSN 1617-1306
- [2] S. H. Simon, The Oxford Solid State Physics, Oxford University Press (2013), UK, ISBN 978-0-19-968076-4
- [3] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer (2006), USA, ISBN 0-387-31278-1
- [4] https://en.wikipedia.org/wiki/Stimulated_emission
- [5] https://www.rp-photonics.com/gain_switching.html
- [6] Jianlong Yang, Yulong Tang, and Jianqiu Xu, „Development and applications of gain-switched fiber lasers”, Photon. Res. 1, 52-57 (2013)
- [7] <https://www.gcc.hu/lezerbiztonsagi-osztalyok/>
- [8] A. Barócsi, S. Lenk, L. Kocsányi, „Lézerindukált fluoreszcencia mérése”, hallgatói mérés
- [9] A. A. Fernandez-Jaramillo, C. Duarte-Galvan, L. M. Contreras-Medina, I. Torres-Pacheco, R. de J. Romero-Troncoso, R. G. Guevara-Gonzalez, J. R. Millan-Almaraz, „Instrumentation in Developing Chlorophyll Fluorescence Biosensing: A Review”, Sensors (2012)
- [10] https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Exercises%3A_Physical_and_Theoretical_Chemistry/Data-Driven_Exercises/Fluorescence_Lifetimes_and_Dynamic_Quenching
- [11] H.K. Lichtentaler, C. Buschmann, M. Knapp, „How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer” , Photosynthetica (2005)
- [12] https://www.jmp.com/en_sg/statistics-knowledge-portal/chi-square-test/chi-square-goodness-of-fit-test.html
- [13] https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=14203
- [14] W. Koechner, Solid-State Laser Engineering, Springer (2006)
- [15] PicoQuant GmbH, Light Sources, Operation Manual and Technical Data (2021)

- [16] R. Krah, A. Bülter, F. Koberling, PicoQuant GmbH: „Performance of the Micro Photon Devices PDM 50CT SPAD detector with PicoQuant TCSPC systems” (2011)
- [17] B. Basa, G. Lattanzio, Á. Solti, B. Tóth, J. Abadia, F. Fodor, E. Sarvari, „Changes induced by cadmium stress and iron deficiency in the composition and organization of thylakoid complexes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.), Environmental and Experimental Botany” (2014)
- [18] Kapranová M., Parma L., „Effect of Excitation and Emission Wavelength on the Fluorescence Lifetimes of Chlorophyll *a*”, General Physiology and Biophysics (1984)
- [19] Solti Á. és Sági-Kazár M. szóbeli közlése
- [20] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, „Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy”, Analytical Chemistry (2007)
- [21] L. S. Herculano, G. V. B. Lukasiewicz, E. Sehn, W. Caetano, D. Pellosi, N. Hioka, N. G. C. Astrath, L. C. Malacarne, „Photodegradation in Micellar Aqueous Solutions of Erythrosin Esters Derivatives”, Applied Spectroscopy (2015)
- [22] https://www.tcspc.com/doku.php/howto:how_to_measure_the_instrument_response_function_irf
- [23] A. Chmyrov, T. Sandén, J. Widengren, „Iodide as a Fluorescence Quencher and Promoter—Mechanisms and Possible Implications”, The Journal of Physical Chemistry B (2010)
- [24] <http://www.micro-photon-devices.com/Docs/Datasheet/PDM.pdf>
- [25] <https://www.photonicsolutions.co.uk/upfiles/id100brochure.pdf>