



EUROPOS SAJUNGA



SVIETIMO IR MOKSLO MINISTERIJA



2004-2006m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto 5 priemonė
„Žmogiškųjų išteklių kokybės gerinimas mokslinių tyrimų ir inovacijų srityje“

Projektas

**Fizinių mokslų II ir III studijų pakopų pertvarka, jas pritaikant prioritетinių
MTEP sričių vystymui**

Projekto numeris BPD2004-ESF-2.5.0-03-05/0012

Kinetinė spektroskopija: paskaitų konspektas

Parengė dr. Mikas Vengris

Vilnius 2006-2008

Projektas “Fizinių mokslų II ir III studijų pakopų pertvarka, jas pritaikant prioritetinių MTEP sričių vystymui”, remiamas ES Struktūrinio fondo lėšomis, įgyvendinant 2004-2006 metų bendrojo programavimo dokumento 2.5 priemonę „Žmogiškųjų išteklių kokybės gerinimas mokslinių tyrimų ir inovacijų srityje“.

Turinys

1. Šviesos šaltiniai kinetinei spektroskopijai	7
1.1. Ultratrumpųjų impulsų generacija: principai ir metodai.....	7
1.1.1. Moduluotos kokybės lazeriai leidžia pasiekti didelių energijų keleto ns trukmės impulsus	8
1.1.2. Ultratrumpieji impulsai ir išilginės rezonatoriaus modos.....	10
1.1.3. Modų sinchronizacija.....	14
1.1.4. Impulsų stiprinimas.....	17
1.1.5. Netiesiniai optiniai procesai: reikiamų spalvų gavimas optinei spektroskopijai	19
1.1.6. Ultratrumpųjų impulsų charakterizavimas.....	25
2. Kinetinės fluorimetrijos metodai	28
2.1. Fluorescencijos spektroskopija su laiko skyra: metodai.....	28
2.1.1. Laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas.....	31
2.1.2. Fotoelektronų kamera	33
2.1.3. Fluorescencijos dažnio sumavimas.....	35
2.1.4. Optinė Kerro sklendė	37
2.1.5. Fazinė fluorimetrija.....	38
3. Fluorescencijos spektroskopija su laiko skyra: biologiniai taikymai	40
3.1. Sužadavimo energijos pernaša bakterijų šviesą surenkančioje antenoje LH1	40
3.2. Protono pernaša žaliajame fluorescuojančiame baltyme	44
3.3. Pirminis fotoindukuotas vyksmas bakteriorodopsine	47
4. Žadinimo-zondavimo spektroskopija: kinetinis sugerties matavimas	49
4.1. Žadinimo-zondavimo eksperimento technika.....	49
4.2. Skirtuminės sugerties spektras.....	51
4.3. Skirtuminės sugerties spektro dinamika	53
5. Skirtuminės sugerties taikymas biologinių procesų tyrimams: pavyzdžiai	59
5.1. Krūvio atskyrimas fotosintetiniame reakciniame centre.....	59
5.2. Karotinoidų sužadintos būsenos: elektroninė ir virpesinė relaksacija.....	62
5.3. Energijos pernaša iš karotinoidų į bakteriochlorofilus fotosintetinėje šviesą surenkančioje antenoje.....	66
6. Baigiamosios pastabos.....	69

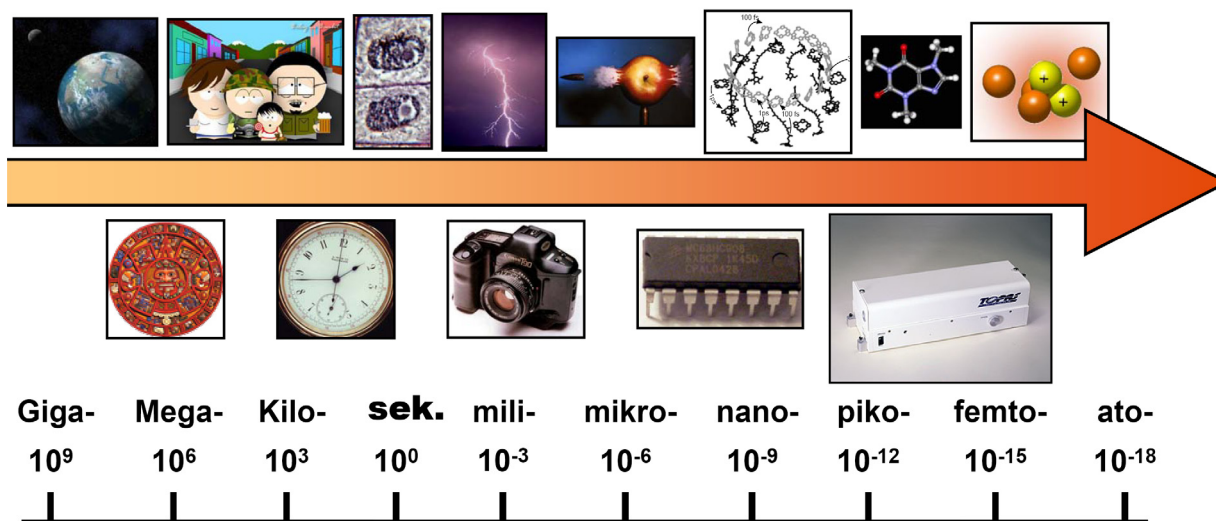
Greiti procesai ir kaip juos pamatyti

Daugelis tyrimų, kuriuos atlieka chemikai, fizikai ir biologai susiję su vyksmų kinetika arba, kitaip tariant, kažkokių sistemos parametrų stebėjimu laikui bėgant. Priklausomai nuo objektų dydžio, šių vyksmų laiko skalės gali kisti nuo labai lėtų iki itin greitų (žvelgiant iš žmogaus perspektyvos). Pabandykime juos pavardinti ir sudėkime į lentelę (žr. t.p. 1 pav.):

Vyksmas	Charakteringoji trukmė	Pavyzdžiai
Biologinė rūšių evoliucija	2 mln. metų ($6 \cdot 10^{13}$ s)	Iš <i>homo habilis</i> išsivysto <i>homo sapiens</i>
Populiacijų formavimasis	100 metų ($3 \cdot 10^9$ s)	Užauga miškas
Gyvūnų gyvenimo trukmė	65.4 metų ($2 \cdot 10^9$ s) 40 dienų ($3 \cdot 10^6$ s)	Vidutinis statistinis lietuvis ¹ Kambarinė musė
Gyvūno judesys	1 s 0.01 s	Rankos mostas Kolibrinio sparno mostas
Biocheminė reakcija	20 s 0.01 s 10 ⁻³ s 10 ⁻⁵ s	Baltymo sintezė Sudėtingo fermento reakcija (pvz., ATP sintetazė susintetina ATP molekulę iš ADP ir fosforo rūgšties liekanos) Veikimo potencialo kinetika neurone Signalinės būsenos susiformavimas bakterijų fotoreceptoriniame baltyme PYP Relaksuoja karotinoido tripletinę būseną fotosintetinėse antenose
Elementarieji biofizikiniai vyksmai	10 ⁻¹⁰ s 10 ⁻¹² s 10 ⁻¹³ s	Visiškas krūvio atsiskyrimas fotosintetiniame reakciniame centre Sužadinimo energijos pernaša iš fotosintetinių antenų į reakcinį centrą Retinalio izomerizacija bakteriorodopsine, ir regos baltyme rodopsine.

¹ 2005 metų duomenys, vyrų tikėtinausia vidutinė gyvenimo trukmė

Fotosintezė
Fotobiologija ir fotochemija



1 pav. Įvairūs gamtoje vykstantys procesai, jų charakteringos laiko skalės ir prietaisai, kuriais naudojantis, galima juos registruoti.

Kaip matome, biologijai svarbios vyksmų trukmės apima bent 26 laiko eiles. Tai labai didelis diapazonas, todėl skirtingiems procesams stebėti ir registruoti reikia skirtingų prietaisų. Patys lėčiausi prietaisai – tai kalendoriai ir uolų sienų piešiniai. Iš jų sprendžiame apie šimtmečius ir tūkstantmečius trunkančius procesus. Toliau pagal greitumą eina pačių žmonių atliekami ir dokumentuojami stebėjimai, „prietaiso“ pavyzdys – laikraštis ar metraštis. Dar greitesnius procesus registruojame greitomis vaizdo kameromis ir fotoaparatais su trumpa ekspozicijos trukme (jais galime stebėti vyksmus su charakteringomis trukmėmis iki 0.001 s), elektroniniai prietaisai leidžia sekti vyksmus iki kelių nanosekundžių ar šimtų pikosekundžių. Dar greitesniems – pikosekundžių trukmės – procesams stebėti jau tenka pasitelkti ir patį greičiausią žmogui žinomą įrankį – šviesą. Šviesos, kaip ir kitų elektromagnetinių bangų, greitis vakuume arba ore yra maždaug $3 \cdot 10^8$ m/s. Kad būtų vaizdžiau, galime sudėstyti lengvai įsivaizduojamus atstumus ir laiką, per kurį šviesa juos įveikia, į tokią lentelę:

1 s	300 000 km	Vidutiniško lengvojo automobilio rida iki subyrėjimo
1 ms	300 km	Vilnius-Klaipėda
1 μ s	300 m	Maždaug futbolo aikštės perimetras
1 ns	30 cm	Didelė vyro pėda
1 ps	0.3 mm	Alaus skardinės sienelių storis
1 fs	0.3 μ m	Benzino plėvelė and balos paviršius

Palyginę biologinių procesų trukmes ir atstumus, kuriuos per jas nukeliauja šviesa, matome, kad kai kurių biologinių procesų trukmės tokios, kad net pats greičiausias dalykas pasaulyje per tą laikąospėja sukarti vos kelias dešimtąsias milimetro. Sąlyginai įvardinkime visus reiškinius, kurių charakteringosios trukmės yra trumpesnės nei 1 μ s, *ultrasparčiaisiais reiškiniais*. Mokslas, kuris tiria ultrasparčiuosius reiškinius, vykstančius atomuose ir molekulėse, panaudodamas šviesą, vadinamas kinetine spektroskopija.

Ultraspartieji reiškiniai – kietas riešutėlis net ir tokiam greitam įrankiui kaip šviesa. Todėl tam, kad galėtume panaudoti šviesą šiems procesams tirti, reikia sugebėti ją labai preciziškai valdyti. Pagal šviesos parametrų kontrolės laipsnį nepralenkiami šviesos šaltiniai yra lazeriai. Nuo jų sukūrimo 1960 metais, jie ištobulėjo tiek, kad tapo nepakeičiami daugelyje mokslo, pramonės, medicinos ir kt. sričių. Lazeris unikalus tuo, leidžia eksperimentatoriams visiškai valdyti jo skleidžiamos šviesos savybes, tokias kaip

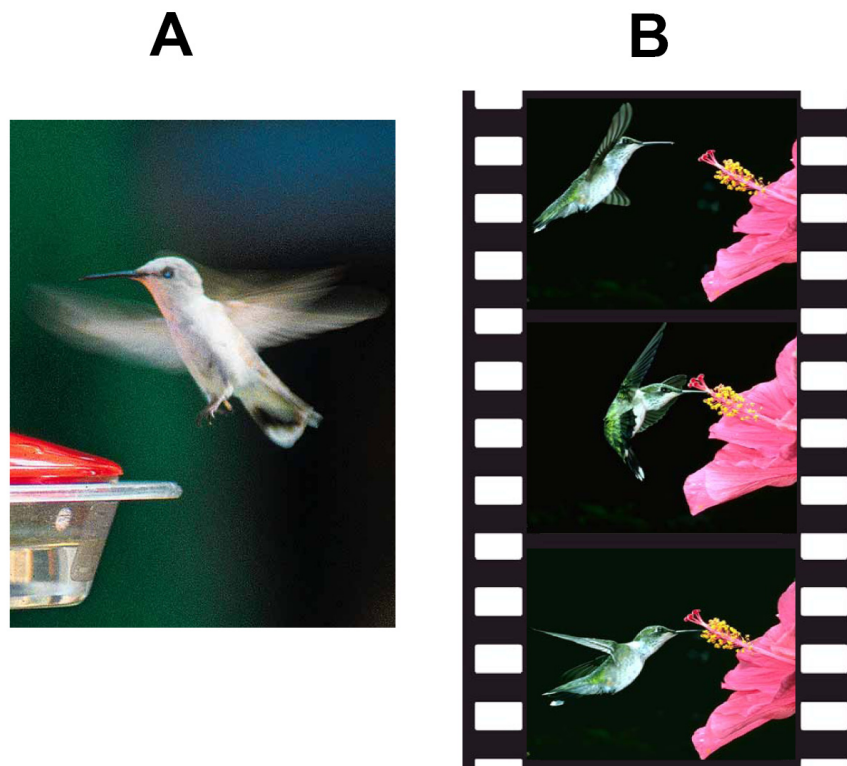
- intensyvumas,
- spalva (bangos ilgis),
- kryptis,
- impulso (žybsnio) trukmė,
- poliarizacija,
- fazė.

Būtent dėl šio nepralenkiamo kontrolės laipsnio lazerinė spektroskopija ir yra „aukso kasykla“, tyrinėjant ultrasparčiuosius procesus. Toliau šiame skyriuje aptarsime bendruosius lazerių naudojamų kinetinei spektroskopijai, veikimo principus ir išnagrinėsime keletą ultrasparčiosios spektroskopijos metodų, plačiai taikomų biologinėms reakcijoms tirti.

1. Šviesos šaltiniai kinetinei spektroskopijai

1.1. Ultratrumpųjų impulsų generacija: principai ir metodai

Kad galėtume sekti ultrasparčiuosius vyksmus, eksperimentui būtina *laikinė skyra*. T.y., aparaturoje turi būti kažkoks elementas, kuris kinta didesniu (ar bent jau panašiu) greičiu, negu procesas, kurį norime stebėti. Pavyzdžiui, norėdami tiksliai pamatyti kolibrio sparnų padėtį jam skrendant (2 pav.), turime panaudoti fotoaparata, kurio ekspozicijos trukmė tokia trumpa, kad kolibrio sparno judėjimo jos metu galime nepaisyti: jei kolibrio sparno mostas trunka 0.01 s, fotoaparato ekspozicijos trukmė turėtų būti bent 1/1000 s. Fotoaparatuose greitį užtikrina užraktas – mechaninis įrenginys. Aišku, kad pikosekundiniu greičiu joks mechaninis įrenginys atsidaryti ir užsidaryti negali. Todėl, kaip jau minėjome, kinetinėje spektroskopijoje fotoaparato užrakto vaidmenį atlieka greitai kintantis šviesos parametras – intensyvumas, kurį nusako jos elektrinio lauko amplitudė. Kitaip tariant, laikinė skyra kinetinėje spektroskopijoje gaunama panaudojant trumpus lazerio žybsnius, vadinamus impulsais. Šiame skyrelyje aptarsime kinetinės spektroskopijos tyrimų aparatūrą: išsiaiškinsime, kaip priversti



2 pav. A: kolibrio nuotrauka su standartine 1/60 s ekspozicijos trukme. Kadangi per tą laiką kolibris suspėja mostelėti sparnu, sparno nuotraukoje nesimato. B: kolibrio skrydis užfiksuotas su greita (1/1000) ekspozicijos trukme. Kiekviename kadre tiksliai matyti sparno padėtis.

lazerį generuoti trumpus impulsus ir panagrinėsime keletą kitų dalykų, susijusių su šviesos, kurios reikia kinetinės spektroskopijos eksperimentams, gavimu.

Kaip veikia ir iš ko sudarytas lazeris, nagrinėjama bendrosios fizikos ar lazerių technologijos kursuose [1], todėl čia manysime, kad su šiais dalykais skaitytojas jau susipažinęs ir jų nebeliesime. Panagrinėsime, ko reikia, kad lazeris generuotų ne nuolatinę koherentinę šviesą, o šviesos impulsus. Priklausomai nuo to, kokios trukmės ir galingumo impulsus norime sugeneruoti, tam egzistuoja du apibendrinti techniniai sprendimai:

- lazerio rezonatoriaus kokybės moduliacija (gaunami galingi keleto nanosekundžių trukmės impulsai)
- lazerio modų sinchronizacija (gaunami piko- ir femtosekundinės trukmės impulsai).

1.1.1. Moduluotos kokybės lazeriai leidžia pasiekti didelių energijų keleto ns trukmės impulsus

Rezonatoriaus kokybės moduliacija – tai būdas galingiems impulsams gauti. Jo esmė ta, kad į lazerio rezonatorių įdedamas *valdomas* nuostolių šaltinis, t.y., elementas, leidžiantis keisti rezonatoriaus nuostolius. Kai jis įjungtas, nuostoliai lazerio rezonatoriuje yra dideli, t.y., iš aktyviosios terpės išėjusi šviesa į ją nebegali grįžti. Dėl to nesusidaro grįžtamasis ryšys ir, netgi smarkiai kaupinant aktyviają terpę, tokia lazeryje generacija neprasideda. Tai leidžia sukurti lazerinėje terpėje milžinišką užpildos apgražą, t.y. „sukelti“ beveik visus aktyviosios terpės atomus į metastabilią sužadintą būseną. Išjungus nuostolius, lazerio rezonatoriaus kokybę staiga padidėja (t.y. užtikrinamas grįžtamasis ryšys), ir lazeris ima generuoti. Kadangi aktyviojoje terpėje būna sukaupta labai daug energijos, gaunamas labai didelis stiprinimas, ir lazerio spinduliuotės intensyvumas užauga labai sparčiai. Dėl tos pat priežasties jis labai greit ir užgęsta: sugeneruotas didelis spinduliuotės intensyvumas greitai „nušluoja“ užpildos apgražą. Taip gaunami vadinamieji milžiniškieji impulsai. Įvairių firmų gaminamuose Nd:YAG moduluotos kokybės lazeriuose gaunami apie 10 ns trukmės impulsai, kurių energijos siekia 1 J^2 .

Techniškai rezonatoriaus kokybės moduliacija dažniausiai realizuojama vienu iš trijų būdų: į rezonatorių dedamas

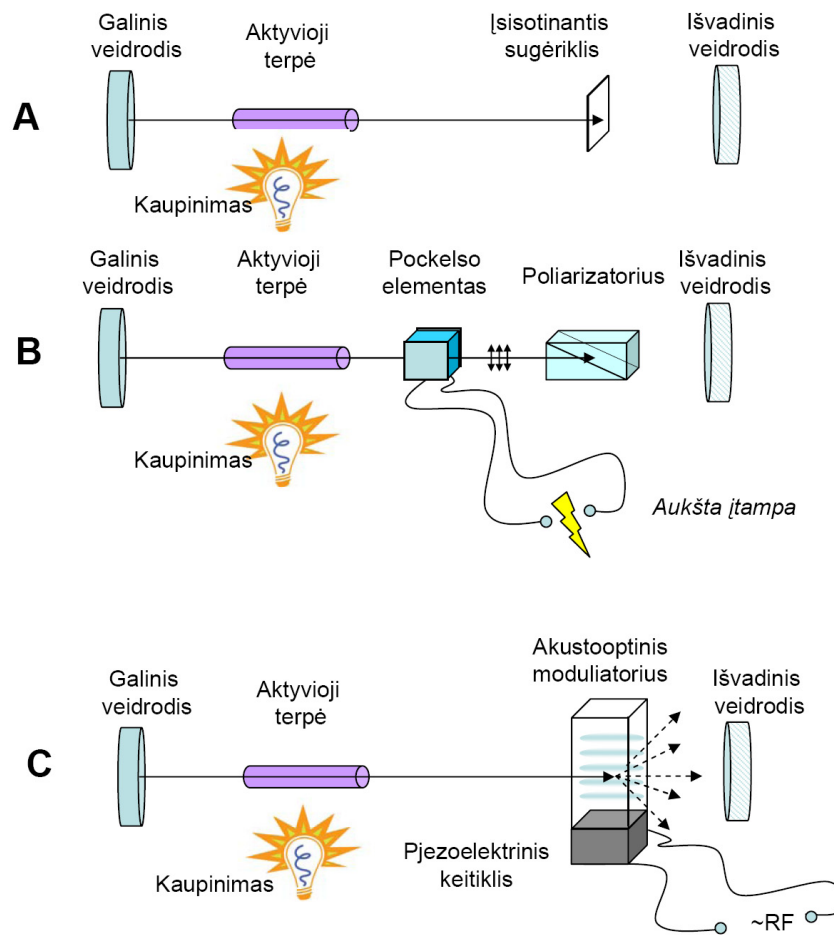
- įsisotinantis sugėriklis,

² Prisiminus termodinamiką, 1 J energija gal ir neatrodo didelė – jos neužtenka net norint 1 g vandens temperatūrą pakelti vienu laipsniu, bet paskaičiavus šio impulso šviesos galią (t.y., energiją per laiko vienetą), gauname 100 MW – jau gana įspūdingą skaičių, palyginamą su elektrinės galia.

- elektrooptinis moduliatorius,
- akustooptinis moduliatorius,

Įsisotinantis sugėriklis – tai terpė, sugerianti lazerio spinduliuotę. Kol didesnė dalis jos atomų yra pagrindinėje būsenoje, terpė sugeria stiprinamą šviesą ir nuostoliai rezonatoriuje dideli. Tačiau kai didesnė sugėriklio atomų dalis tampa sužadinta, terpė praskaidrėja ir nustoja sugerti šviesą. Kaip matome, toks moduliatorius yra *pasyvus*, t.y. nereikalauja išorinio poveikio (3A pav).

Vienas iš aktyvių kokybės moduliatorių – tai elektrooptinis Pockelso elementas – kristalas, prie kurio prijungus elektros įtampą (paprastai reikia keleto kV), jame atsiranda dviguba spindulių laužiamoji geba ir jis ima veikti kaip pusės bangos ilgio fazinė plokštelė; kitaip tariant, praėjusių pro tokį kristalą ypatingosios ir paprastosios poliarizacijos bangos fazių skirtumas lygus π . Tai reiškia, kad jis ima sukti pro jį einančios šviesos poliarizaciją 90° kampu. Kartu su juo į rezonatorių



3 pav. Lazerio rezonatoriaus su įvairiais kokybės moduliatoriais: A – įsisotinantis sugėriklis, B – elektrooptinis moduliatorius (Pockelso elementas), C – akustooptinis moduliatorius. RF žymi radijo dažnio elektrinį lauką, kuriuo per pjezoelektrinį keitiklį kristale generuojama stovinti ultragarso banga.

įdedamas poliarizatorius. Išjungus įtampą, lazerio generuojamos šviesos poliarizacija būna tokia, kad pro poliarizatorių nepraeina. Kai aktyvioje terpėje susikaupia pakankama užpildos apgraža, prie kristalo prijungiama vadinamoji pusės bangos ilgio įtampa, t.y. tokia įtampa, kurią pridėjus lazerio spinduliuotės poliarizacijos kryptis pasukama 90° kampu. Tuomet spinduliuotė be nuostolių praeina poliarizatorių ir atsiranda generacija – gaunamas milžiniškasis impulsas. Pockelso elementai naudojami palyginti mažo impulsų pasikartojimo dažnio (iki 1 kHz) ir didelės energijos lazeriuose (3B pav). Aktyvūs jie yra todėl, kad juos valdo išorinis įtampos šaltinis.

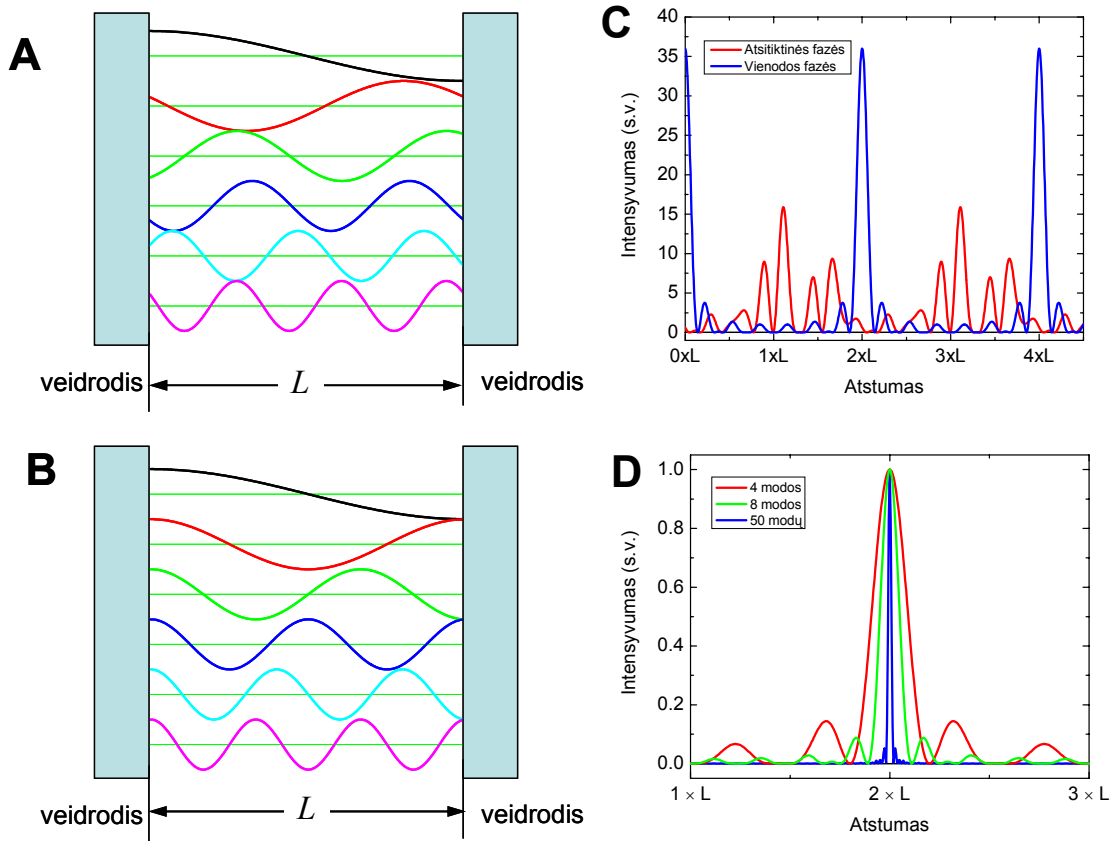
Kita aktyvių kokybės moduliatorių rūšis – tai akustooptinis moduliatorius. Tai yra skaidrios medžiagos (pvz., stiklo ar kvarco) plokštelė, kurioje panaudojant pjezoelektrinį efektą sužadinama stovinti ultragarso banga. Tam ši plokštelė pritvirtinama prie pjezoelektrinio keitiklio – pjezoelektriniu efektu pasižyminčios medžiagos (pvz., BaTiO_3) gabalėlio. Dėl šios bangos kristale atsiranda periodinė lūžio rodiklio moduliacija – fazinė difrakcinė gardelė. Nuo šios gardelės rezonatoriaus spinduliuotė difraguoja (t.y. pakeičia sklidimo kryptį ir išeina iš rezonatoriaus). Išjungus žadinantį radijo dažnio elektrinį lauką, fazinė gardelė išnyksta ir visa šviesa praeina pro kvarco plokštelę – prasideda generacija ir išspinduliuojamas milžiniškasis impulsas (3C pav). Daugiau informacijos apie moduliuotos kokybės lazerius besidomintis skaitytojas ras papildomoje literatūroje [2].

Moduluotos kokybės lazeriai plačiai naudojami tiriant mikrosekundžių ir didesnės trukmės procesus, žybsnio fotolizės spektroskopijoje. Jie taip pat naudojami kaip energijos (kaupinimo) šaltiniai kitiems (pavyzdžiui, femtosekundiniams) lazeriams.

1.1.2. Ultratrumpieji impulsai ir išilginės rezonatoriaus modos

Kadangi įdomiausi (ir sunkiausiai „pasiekiami“) procesai vyksta kaip tik piko- ir femtosekundiniame trukmių diapazone, šiems procesams tirti naudojami sinchronizuotų modų lazeriai. Labai trumpai aptarsime modų sinchronizacijos principus ir kodėl ji svarbi, norint priversti lazerį spinduliuoti trumpus šviesos impulsus.

Pirmiausia prisiminkime, kad lazeris – tai elektromagnetinių bangų stiprintuvas, sudarytas iš rezonatoriaus (veidrodžių, ribojančių spinduliuotę erdvėje) ir aktyviosios terpės. Rezonatoriuje spinduliuotė vaikšto per kaupinamą aktyviają terpę ir ten yra stiprinama. Lazerio, schematiškai pavaizduoto 3 pav., rezonatorių sudaro galinis ir išvadinis veidrodžiai; praktikoje naudojamos ir



4 pav. Išilginės modos lazerio rezonatoriuje: A – modų fazės atsitiktinės (rezonatoriaus pradžioje kai kurios kreivės, kyla, kai kurios leidžiasi); B – modų fazės vienodos (visos kreivės rezonatoriaus pradžioje turi maksimumą ir mažėja). C – lauko intensyvumas, gautas sudėjus 6 modas su atsitiktinėmis fazėmis (raudona linija) ir vienodomis fazėmis. D – impulsai, gauti sudėjus 4 (raudona linija), 8 (žalia linija) ir 50 modų.

sudėtingesnės rezonatorių konfigūracijos, sudarytos iš didesnio veidrodžių skaičiaus, tačiau principų išsiaiškinimui užteks ir paprasto rezonatoriaus, tokio, kaip pavaizduotas 3 pav. Toks rezonatorius veikia kaip dažnių filtras: tik elektromagnetinės bangos, kurių sveikas pusbangių skaičius telpa į rezonatoriaus ilgį (žr. 4A pav.), gali jame keliauti be nuostolių. Matematiškai šią sąlygą galime užrašyti taip:

$$n \frac{\lambda}{2} = L, \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (1)$$

Fizikinę tokio dažnių filtravimo prasmę lengva suprasti: juk kitokio dažnio bangos rezonatoriuje atsispindėję nuo veidrodžių, interferuodamos su savimi, save slopina ir dėl to išnyksta, o aprašomos (1) formule – stiprina. Bangos ilgiai arba dažniai, kurie tenkina (1) sąlygą, vadinami *rezonatoriaus išilginėmis modomis*.

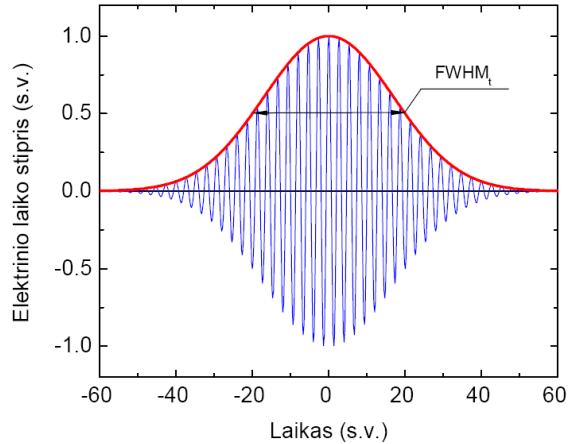
Žinoma, lazerio generuojamos šviesos dažnius riboja ne tik rezonatoriaus ilgis, bet ir lazerio aktyviosios terpės stiprinimo juosta (t.y. priverstinio spinduliavimo spektras). Kadangi modų dažniai skiriasi, jų generacija lazerio rezonatoriuje prasideda nepriklausomai viena nuo kitos³, taigi bendru atveju jų fazės yra atsitiktinai išsibarstę viena kitos atžvilgiu (4B pav.). Sudėję keletą tokių modų ir pakėlę sumą kvadratu, gausime elektrinio lauko intensyvumą. Kai modų fazės atsitiktinės, generuojamas intensyvumas bus kažkokia atsitiktinė periodinė funkcija su periodiškumu, lygiu dvigubam rezonatoriaus ilgiui (4C pav., raudona linija). Kita vertus, jei modas sudėsime su vienodomis fazėmis, kaip jos pavaizduotos 4A pav., ir pakelsime kvadratu, gautas lauko intensyvumas bus *impulsų vora*, o atstumai tarp impulsų bus vėlgi dvigubas rezonatoriaus ilgis. Fizikinė šio periodiškumo prasmė aiški: juk kaip tik tiek kelio kiekvieno bangos ilgio šviesai reikia sukarti, kol apeina rezonatorių ir vėl pasiekia išvadinį veidrodį, pro kurį dalis spinduliuotės išeina į išorę. Todėl atstumas tarp impulsų voroje lygus rezonatoriaus apėjimo keliui, o impulsų spinduliavimo dažnis (vadinamas lazerio pasikartojimo dažniu) suskaičiuojamas, šviesos greitį dalinant iš rezonatoriaus ilgio.

Kuo daugiau modų sudėsime, tuo trumpesnius gausime impulsus, nes erdvės (arba laiko) sritis, kurioje *visos* modos turės maksimumą (4A pav. rezonatoriaus pradžia), bus trumpesnė. Ši priklausomybė pavaizduota 4D pav., kur parodytas elektrinio lauko amplitudės kvadratas (intensyvumas), gautas sudėjus 4, 8 ir 50 modų su vienodomis fazėmis. Kitaip formuluojant, galima teigti, kad kuo daugiau skirtingų spalvų (dažnių) sudėsime, tuo trumpesnę impulsą galėsime sugeneruoti. Tai galima parodyti ir matematiškai. Tam apraškyme šviesos impulso elektrinį lauką kaip osciliuojančią funkciją (menamą eksponentę) su Gauso formos gaubtine, t.y. gausinės funkcijos ir menamos eksponentės sandaugą:

$$E(t) = E_0 e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}} e^{-i\omega_0 t} \quad (2)$$

Tokią impulso aprašymo formą, kuri grafiškai pavaizduota 5A pav., mokslininkai plačiai naudoja: daugelio ultrasparčių lazerių impulsai jei ir nėra tiksliai aprašomi (2) formule, tai bent jau gana gerai ja aproksimuojami. Parametras ω_0 vadinamas centriniu impulso dažniu, o τ - impulso trukme. Vietoje τ dar dažnai naudojamas impulso laikinis plotis pusės amplitudės aukštyje, žymimas

³ Kiekvieno dažnio moda lazeryje "mato" tik tuos aktyviosios terpės atomus, kurių priverstinio spinduliavimo dažniai sutampa su tos modos dažniu.



5 pav. A: Gausinio impulso elektrinis laukas (mėlyna linija) ir amplitudės gaubtinė (raudona linija). Impulso trukmė pusės amplitudės aukštyje $FWHM_t$ parodyta rodykle.

$FWHM_t^4$. Prilyginus gausinę impulso gaubtinę (2) formulėje 0.5, lengva suskaičiuoti sąryšį tarp $FWHM_t$ ir τ :

$$FWHM = \sqrt{8 \ln 2} \tau \quad (3)$$

Norėdami suskaičiuoti (2) formule aprašomo impulso dažnių spektrą, kurį išmatuoti galime, pvz., išskleidę impulso šviesą difrakcine gardele ant kokio nors detektoriaus (pvz. skaitmeninio fotoaparato CCD matricos), atliekame Furjė transformaciją:

$$E(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} E(t) e^{-i\omega t} dt = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} E_0 e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}} e^{-i\omega t} dt \quad (4).$$

Ši Furjė integralą nesunku suskaičiuoti: tereikia eksponentės rodiklį papildyti iki pilno kvadrato, t.y. suvesti jį į integralą $\int_{-\infty}^{+\infty} e^{\xi^2} d\xi$, kurio vertė, kaip žinome iš matematinės analizės, lygi $\sqrt{\pi}$. Surinkę visus daugiklius, gausime (2) formule aprašomo impulso dažnių spektrą:

$$E(\omega) = E_0 \tau e^{-\frac{\tau^2(\omega-\omega_0)^2}{2}} = E_0 \tau e^{-\frac{(\omega-\omega_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (5).$$

Čia pažymėjome $\sigma^2 = \frac{1}{\tau^2}$. Matome, kad gausinio impulso spektras taip pat aprašomas Gauso funkcija, o jos spektrinis plotis yra atvirkščiai proporcingas impulso laikinei trukmei, t.y.

⁴ Santrumpa iš angliško Full Width at Half Maximum – visas plotis pusės aukštyje.

$$\tau \cdot \sigma = 1 \quad (6)$$

Šioje formulėje aprašyta konstanta (lygi vienetui) vadinama *trukmės ir spektrinio pločio sandauga*. Jos minimali vertė yra 1, tada turime „gražų“ ir simetrišką gausinį elektromagnetinio lauko impulsą, dar vadinamą *transformacijos apribotu* impulsu⁵. Jei dažninės impulso komponentės kiek „pakrikę“ laike, šis skaičius bus didesnis už vienetą, taigi ši konstanta gali būti didesnė (bet ne mažesnė) už vienetą. Iš (6) matyti, kad kuo trumpesnis impulsas, tuo platesnė jo dažnių juosta (t.y. tuo daugiau skirtingų dažnių jame turi būti); tą patį iliustruoja ir 4D pav. Formules (2)-(6) mes užrašėme elektrinio lauko stipriui E , išreikšdami jį per kampinį dažnį ω . Tai matematiškai patogesnė forma, tačiau laboratorijoje matuojama ne lauko amplitudė, o intensyvumas, t.y. amplitudės kvadratas. Dažnis irgi daugiausia naudojamas paprastas, o ne kampinis. Įrašius šiuos parametrus į formules, ir pakėlus lauko stiprį kvadratu atsiranda papildomų daugiklių ir gausiniam impulsui impulso spektrinio ir laikinio intensyvumo puspločio sandauga tampa tokia:

$$FWHM_v \cdot FWHM_t \approx 0.441 \quad (7).$$

Skaičiuojant šią sandaugą, dažninis plotis *pusės intensyvumo aukštyje* išreiškiamas hercais, o laikinė impulso trukmė – sekundėmis.

1.1.3. Modų sinchronizacija

Taigi, kaip išsiaiškinome praeitame skyrelyje, norint lazeriu generuoti trumpus impulsus, reikia, kad tas lazeris

- a) generuotų kuo platesniame dažnių diapazone, ir
- b) kad skirtingų dažnių modos turėtų vienodas fazes.

Taigi, pirma būtina sąlyga, norint pasigaminti ultratrumpųjų (1 ps ir trumpesnių) impulsų lazerį yra plati stiprinamų dažnių juosta. Tai žinant, tampa aišku, kad dujiniai lazeriai trumpiems impulsams generuoti nelabai tinka: dujų spinduliavimo linijos labai siauros ir daugelio dažnių tokiuose lazeriuose stiprinti nepavyksta. Todėl pirmieji „tikri“ ultratrumpųjų impulsų lazeriai buvo dažų lazeriai, kurių stiprinimo juosta apima visą dažų molekulės fluorescencijos spektrą (jis gali būti iki 50 nm pločio matomoje srityje). Vis dėlto dažų tirpalai nėra labai patogi aktyvioji terpė – jiems pumpuoti reikia siurblių, nepatogu juos keisti, kai prireikia kito bangos ilgio. Natūralu, kad lazerių inžinieriai surado dažams kietakūnį pakaitalą: beveik visuose šiuo metu atliekamuose biofizikiniuose

⁵ T.y. impulsu, kurio plotį pagal trukmę apibrėžia Fourier transformacija.

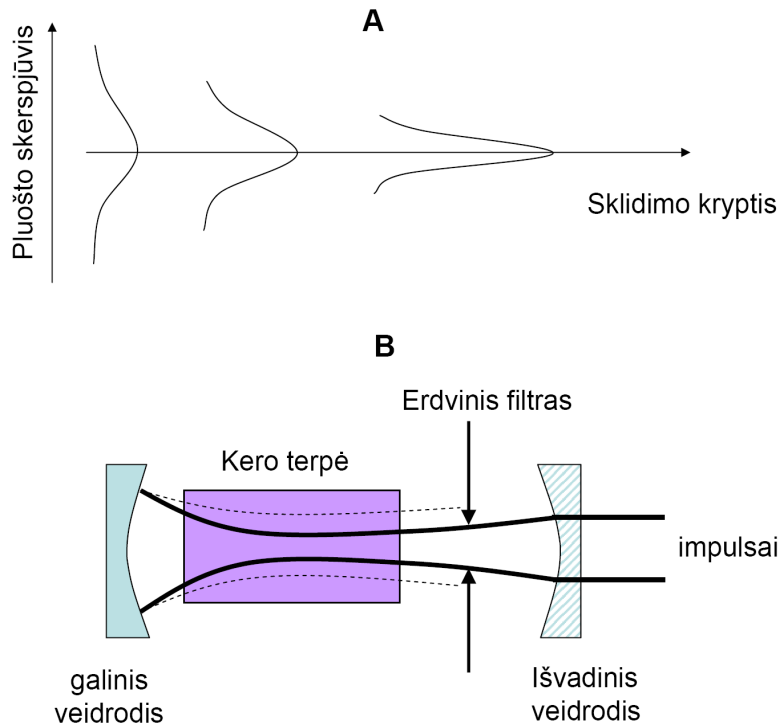
tyrimuose naudojami titanu legiruoto safyro (Ti:Safyro, $Ti:Al_2O_3$) lazerius, kurie leidžia generuoti šviesą diapazone nuo 690 nm iki 1050 nm, o jų stiprinimo maksimumas yra ties maždaug 800 nm. Pastaruoju metu atsirado ir kitokių kietakūnių ultratrumpuosius impulsus generuojančių lazerių, pagamintų naudojant pvz., Yb:KGW kristalus, tačiau Ti:Safyras išlieka labiausiai paplitusi ultrasparčiųjų lazerių aktyvioji terpė.

Kaip priversti lazerį generuoti taip, kad visos išilginės modos turėtų vienodas fazes? Bendra idėja yra ta, kad į lazerio rezonatorių, panašiai kaip ir kokybės moduliacijos atveju, dedamas elementas, gsinantis lazerio generaciją (sukuriantis rezonatoriaus nuostolius), kai lazeris dirba nuolatinės veikos (nesinchronizuotų modų) režime ir skatinantis ją, kai modų fazės (atsitiktinai) sutampa. Techninių sprendimų tam yra keletas, čia aptarsime tik vieną, vadinamą *Kero lęšio modų sincronizacija*, nes šis metodas yra vienas iš paprasčiausių ir plačiausiai taikomas Ti:Safyro lazerių sistemose.

Kero efektas – tai terpės lūžio rodiklio priklausomybė nuo ja sklindančios šviesos intensyvumo I . Tokioje terpėje lūžio rodiklis užrašomas taip:

$$n = n_0 + n_1 I \quad (8),$$

čia n_0 – tai įprastinis lūžio rodiklis, stebimas prie žemų šviesos intensyvumų. Pastebėkime, kad lazerio spinduliuotės pluoštas plokštumoje, statmenoje šviesos sklidimo kryptčiai, dažniausiai pasiskirsto pagal dėsnį artimą gausiniam, t.y. kraštuose juo intensyvumas mažas, o centre – didžiausias. Tokiam pluoštui sklindant terpėje su netiesiniu lūžio rodikliu, pluošto kraštuose terpės lūžio rodiklis pasikeičia nedaug, o centre – daugiausiai. Todėl terpėje susidaro lūžio rodiklio profilis, panašus į lęšį, ir pluoštas ima fokusuotis (6A pav.). Kuo jis labiau fokusuojasi, tuo didesnis intensyvumas, ir tuo lęšio efektas didesnis. Taigi, ėmęs fokusuotis, pluoštas fokusuojasi ir toliau, kol fokusavimasis ima riboti kiti reiškiniai (pvz., difrakcija arba medžiagos optinis pažeidimas). Pažymėkime, kad šitoks fokusavimasis įmanomas tik esant dideliame šviesos intensyvumui (juk lūžio rodiklio pokytis proporcingas intensyvumui), t.y., jis daug efektyviau vyks tada, kai lazerio modos sinchronizuotos ir turime stiprų impulsą, o ne nuolatinę lazerio veiką (palyginkite maksimalius impulsų ir nuolatinės veikos intensyvumus 4C pav.). Taigi, jei į rezonatorių įdėsime diafragmą (erdvinį filtrą, iš kraštų ribojantį šviesą), pro jį praeis tik susifokusavusi, t.y. tik impulsinė šviesa. Susifokusavusios impulsinės šviesos erdvinis filtras neriboja ir lazeris generuoja impulsus. Jei tik lazeris pabando generuoti kitaip (t.y. nesinchronizuotomis fazėmis), maksimalus intensyvumas sumažėja ir erdvinis filtras tokią generaciją užgesina (t.y., pluoštas nesusifokusuoja ir didelė dalis jo



6 pav. A: Šviesos pluošto fokusavimasis dėl Kerro efekto: šviesai sklindant netiesine terpe, jos lūžio rodiklis pluošto centre (didelis intensyvumas) pakinta labiausiai, o kraštuose (mažas intensyvumas) – mažiausiai. Dėl to susidaro lūžio rodiklio profilis, panašus į lęšį, kuris fokusuoja pluoštą. Sufokusuotas pluoštas dar stipriau pakeičia lūžio rodiklį ir dar labiau fokusuojasi, ir t.t. B: lazerio modų sinchronizacija, panaudojant Kerro lęšį. Kai lazeris generuoja impulsus (modos sinchronizuotos), Kerro lęšis sufokusuoja spindulį, jo neberiboja erdvinis filtras ir lazeris ima efektyviai generuoti (stora juoda linija). Nuolatinėje veikoje (plona punktyrinė linija) elektrinio lauko intensyvumas nepakankamas, kad pluoštas susifokusuotų ir lazerio generacija neprasideda, nes šviesa prarandama ant erdvinio filtro.

šviesos prarandama ant erdvinio filtro – padidėja nuostoliai). Tokiu būdu susiformuoja natūrali spinduliuotės atranka, kuri užtikrina modų sinchronizaciją. Kai jau lazeris ima generuoti impulsus, jį gana sunku išmušti iš sinchronizuotų modų režimo: impulsinė veika „išnaudoja“ visą užpildos apgrąžą ir nuolatinėi veikai jos nebelieka. Lazeriui, užuot ėmus generuoti nuolatinėje veikoje, geriau „apsimoka“ palaukti iki sekančio impulso, kad kaupinimas per tą laiką vėl sukurtų pakankamą užpildos apgrąžą.

Taip veikia sinchronizuotų modų Ti:Safyro lazeris, dar vadinamas *oscilatoriumi*. Jis generuoja impulsų vorą, kurios atskirų impulsų trukmė gali būti apie 30 fs (spektrinis plotis apie 32 nm), impulsų pasikartojimo dažnis atitinka rezonatoriaus apėjimo laiką (paprastai apie 80 MHz, tai atitinka maždaug 12 ns laiko tarpus tarp atskirų voros impulsų), o atskirų impulsų energijos yra 1-6 nJ.

1.1.4. Impulsų stiprinimas

Nors oscilatoriaus generuojami impulsai puikiai tinka kai kuriems kinetinės spektroskopijos eksperimentams, tačiau vienišas Ti:Safyro oscilatorius be papildomų stiprintuvų turi keletą trūkumų:

- Labai aukštas pasikartojimo dažnis. Biologinėse sistemose šviesa inicijuoja procesus, kurie kartais trunka milisekundes ar dar ilgiau (pvz., chlorofilo tripletinė būseną gyvuoja apie 3 ms). Jei laiko tarpai tarp atskirų impulsų yra mažesni, negu šių procesų trukmė, kiekvienas atėjęs impulsas „randa“ prieš jį buvusio impulso „pėdsakus“, paliktus bandinyje ir eksperimentas yra nekorektiškas. Norint šią problemą išspręsti, bandinys eksperimento metu gali būti judinamas, kad kiekvienas impulsas pataikytų į „šviežią“ jo vietą, tačiau, kai tarp impulsų tėra 12 ns, fiziškai neįmanoma spėti pajudinti bandinio tiek, kiek reikia, kad visas lazerio pluoštas atsidurtų naujoje jo vietoje.
- Siaurokas bangų ilgių diapazonas. Nors Ti:Safyro oscilatorių galima derinti ribose nuo 700 iki 1000 nm, daugeliui tyrimų to nepakanka – bandiniai tiesiog nesugeria šių bangos ilgių šviesos. Lazerių bangos ilgį derinti leidžia netiesiniai įrenginiai - optiniai parametriniai stiprintuvai (OPA⁶), apie kuriuos kalbėsime vėliau, tačiau jiems reikia didesnių energijų, nei leidžia pasiekti oscilatorius. Be to, kai kurios kinetinės spektroskopijos rūšys yra savaime netiesiniai procesai (pvz., dvifotonės sugerties, fotonų aido spektroskopija), kurie vyksta tik esant stipriems lazerio elektriniams laukams.

Siekiant aukštesnių impulso energijų, naudojamas metodas, vadinamas *čirpuotųjų impulsų stiprinimu*. Lazeris, kuriame tai atliekama vadinamas *regeneratyviniu stiprintuvu*.

Stiprinimo proceso seka, pavaizduota 7 pav. yra tokia:

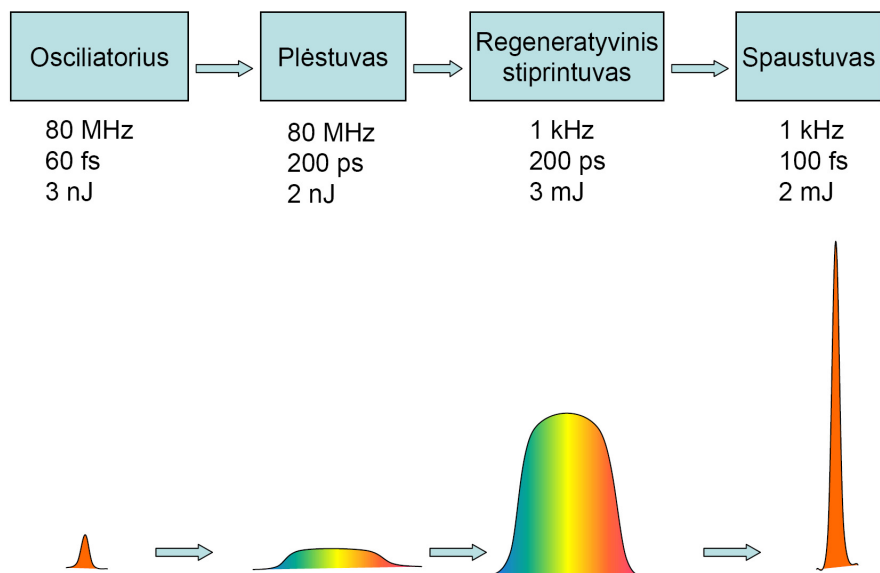
- Oscilatoriaus impulsai išplečiami laike (t.y. padidinama jų trukmė) iki kelių šimtų pikosekundžių.
- Vienas iš maždaug 80000 impulsų įvedamas į rezonatorių su Ti:Safyro kristalu, kurį kaupina impulsinis moduluotos kokybės lazeris.
- Šis impulsas keletą ar keliolika kartų apeina rezonatorių, kol yra sustiprinamas iki kelių mJ energijos.
- Sustiprintas impulsas išmetamas iš rezonatoriaus.

⁶ Santrumpa iš angliško Optical Parametric Amplifier – optinis parametrinis stiprintuvas.

- Impulsas vėl suspaudžiamas (sutrumpinamas laike) iki keliasdešimties (ar kelių šimtų) femtosekundžių trukmės.

Impulsą prieš stiprinant išplėsti ir paskui vėl suspausti reikia todėl, kad jeigu stiprintume trumpą keliasdešimties femtosekundžių trukmės impulsą, jo maksimumo galia taptų labai didelė ir jis galėtų pažeisti (pradeginti) stiprintuvo optinius elementus.

Impulsų plėtimas ir suspaudimas atliekamas gardelėmis išskleidžiant impulso spektrą erdvėje ir organizuojant spindulių kelią taip, kad mėlynieji impulso dažnio komponentai praeitų ilgesnį (plėstuve) ir trumpesnį (spaustuve) kelią negu raudonieji. Tokio išplėsto impulso elektrinio lauko kitimas laike schematiškai pavaizduotas 7 pav. intarpe, kuriame matome, kad stebėtoją pirma pasieks mažesnio dažnio, o vėliau – didesnio dažnio bangos. Į rezonatorių impulsus atrankiai įveda ir išveda elektroniškai valdomi Pockelso elementai ir atspindintys plonasluoksniai poliarizatoriai (Briusterio kampu pastatytos plokštelės), veikiantys taip pat kaip elektrooptinis kokybės modulatorius (žr. aukščiau). Plačiau apie čirpuotų impulsų stiprinimo metodiką ir naudojamas technologijas galima pasiskaityti papildomoje literatūroje [3]. Atlikus čirpuotųjų impulsų stiprinimą, šviesos parametrai gaunami tokie: centrinis bangos ilgis – apie 800 nm, impulsų pasikartojimo dažnis – apie 1 kHz, impulso trukmė apie 50 fs, spektrinis plotis apie 20 nm, impulso energija – apie 0.5-3 mJ.



7 pav. Čirpuotųjų impulsų regeneratyvinio stiprintuvo veikimo schema. Vienas iš 80000 impulsas išplečiamas, sustiprinamas ir vėl suspaudžiamas. Sumažėja impulso pasikartojimo dažnis ir užauga energija. Intarpe parodyta, kaip atrodo čirpuoto impulso elektrinis laukas: pradžioje ateina mažesni dažniai (raudonesni fotonai), o vėliau - mėlynesni.

1.1.5. Netiesiniai optiniai procesai: reikiamų spalvų gavimas optinei spektroskopijai

Sustiprinti ultratrumpieji Ti:Safyro lazerio impulsai jau gali būti naudojami kinetinės spektroskopijos eksperimentams. Lieka neišspręstas dar vienas klausimas: ką daryti, jeigu sistema, kurią norime tirti, sugeria ne 800 nm (artimąją infraraudonąją), o, sakykime, 670 nm bangos ilgio (raudoną) šviesą? Juk nekonstruosi kaskart vis naujo lazerio, kai nori atlikti naujos, kitą bangos ilgį sugeriančios, sistemos tyrimus? Keisti lazerio bangos ilgį, t.y. iš 800 nm bangos ilgio šviesos generuoti naujus dažnius (spalvas), galima pasinaudojant *netiesinės optikos reiškinius*. Netiesinė optika – tai atskiras mokslas, nagrinėjantis optinius reiškinius medžiagoje, kai sklindančios šviesos elektriniai laukai yra labai stiprūs, palyginami su medžiagos elektriniu lauku (apytiksliai 10^{10} V/m). Apie ją rašomos ištisos knygos [4], o čia mes tik labai trumpai aptarsime kinetinėje spektroskopijoje taikomus netiesinės optikos metodus.

Dispersija

Tiesą sakant, dispersija yra tiesinės optikos reiškinys, tačiau ji svarbi atliekant kinetinės spektroskopijos eksperimentus, todėl pasakysime apie ją keletą žodžių. Dispersija optikoje vadinama medžiagos lūžio rodiklio priklausomybė nuo šviesos dažnio (arba bangos ilgio). Skaidrioms medžiagoms būdinga vadinamoji normalioji dispersija, t.y. didėjant dažniui (mažėjant bangos ilgiui), medžiagos lūžio rodiklis didėja. Šviesos greitis medžiagoje atvirkščiai proporcingas jos lūžio rodikliui, taigi, mėlynesni fotonai (trumpesnis bangos ilgis) medžiagoje sklis lėčiau nei raudonesni (didesnis bangos ilgis). Todėl praleidus transformacijos apribotą femtosekundinį impulsą, aprašomą (2) išraiška, pro skaidrią terpę (pvz., stiklo gabalą), jo trukmė pailgėja, nes skirtingų spalvų impulso fotonai „pasklinda“ ir ne visi pasiekia stebėtoją vienu metu. Jei terpei būdinga normalioji dispersija (didėjant dažniui, lūžio rodiklis didėja), praėjusio pro tokią terpę impulso raudoni fotonai ateina pirmiau, o mėlyni – vėliau (žr. impulsą, panašus į pavaizduotą 7 pav. intarpe). Toks impulsas vadinamas *čirpuotu*, jis panašus į impulsą, kuris stiprinamas regeneratyviniame stiprintuve. Dispersinis impulsų plitimas dažnai yra nepageidautinas reiškinys, atliekant kinetinės spektroskopijos eksperimentus – dėl jo ilgėja impulsai ir atitinkamai blogėja eksperimento laikinė skyra. Todėl femtosekundinės optikos elementus (lęšius, prizmes ir pan.) visada stengiamasi daryti kuo plonesnius, kad jais keliaudamas impulsas nepailgėtų. Taip pat dėl šios priežasties negalima femtosekundinių impulsų perduoti šviesolaidžiais: po kokio metro šviesolaidžio stiklo ne tik impulso

ilgis pasidarys dešimtys pikosekundžių, bet dar ir skirtingi dažniai „išsibėgios“ laike ir apie gerą laikinę skyrą bus galima užmiršti...

Harmonikų generacija.

Pats paprasčiausias eksperimentinis būdas lazerio generuojamų bangos ilgių diapazonui praplėsti – tai harmonikų generacija. Tai jau netiesinės optikos reiškinys. Jo padedami, iš šviesos bangos, kurios dažnis ω , galime gauti 2ω , 3ω dažnius. Jo, kaip ir visų netiesinės optikos reiškinų, fizikos nagrinėjimas prasideda nuo netiesinės poliarizacijos išraiškos. Iš Maxwello lygčių, užrašomų elektrodinamikoje, žinome, kad poliarizacija – tai vienas iš galimų elektrinio lauko šaltinių (kitas yra krūviai). Medžiagos poliarizacija bendruoju atveju yra elektrinio lauko funkcija, kurią galime skleisti lauko laipsnių eilute:

$$P = \varepsilon_0 \left(\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots \right) \quad (9).$$

Šioje formulėje $\chi^{(i)}$ žymi i -osios eilės dielektrinį jautrį. Jei elektriniai laukai labai silpni, (9) formulėje lieka tik pirmasis narys, kuris aprašo tiesinės optikos reiškinius (dispersiją, lūžį ir pan.), nes medžiagos poliarizacija *tiesiškai* proporcinga sklindančiam elektriniam laukui. Sakykime, kad laukas yra plokščioji elektromagnetinė banga:

$$E = E_0 e^{-i(\omega_0 t - kz)} \quad (10).$$

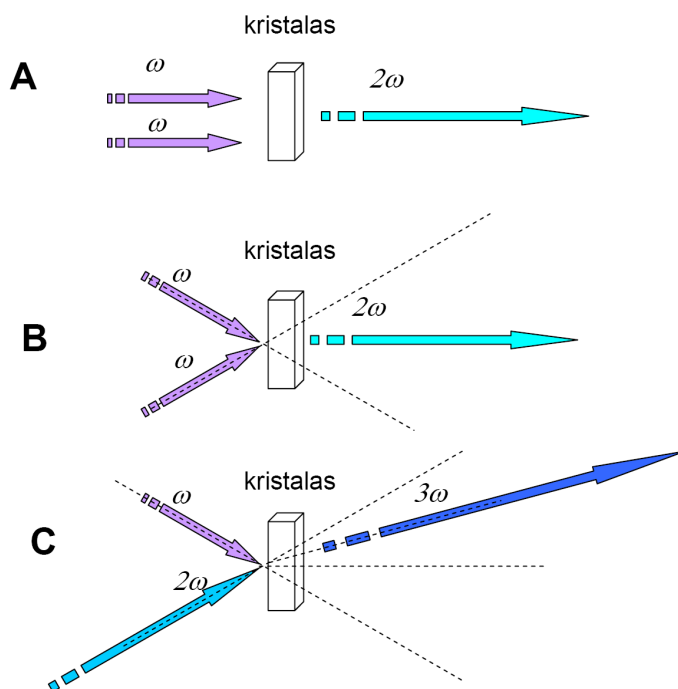
Čia $k = \frac{2\pi}{\lambda} n = \frac{\omega}{c} n$ - bangos vektorius. Jei įrašysime (10) į (9), ir paliksime tik tiesinį (pirmąjį) narį, aišku, kad naujų dažnių iš medžiagos negausime: pasikeis tik bangos sklidimo greitis (daugiamučiu atveju – dar ir kryptis). Tačiau jei elektrinis laukas pakankamai stiprus, kad (9) reikėtų atsižvelgti į antrąjį narį, jis bus proporcingas

$$P^{(2)} \sim e^{i(2\omega_0 t - 2kz)} \quad (11),$$

t.y. medžiagoje atsiras dvigubo dažnio šviesos banga. Tokiu pat būdu galima parodyti, kad įleidę į medžiagą dvi skirtingo dažnio bangas galime gauti dviejų skirtingų dažnių sudėtį arba skirtumą. Dvigubo dažnio bangos atsiradimas, galimas esant kvadratiniam netiesiškumui medžiagoje, vadinamas antrosios harmonikos generacija, o bendrasis tokios bangų sąveikos atvejis (kai krintančios bangos yra nevienodų dažnių ir krypčių) – *tribangiu maišymu*⁷.

⁷ Tribangiu todėl, kad yra dvi krintančios bangos ir viena sugeneruota banga.

Netiesinėje optikoje parodoma, kad dėl simetrijos sąlygų visose izotropinėse medžiagose antrosios eilės netiesinis dielektrinis jautris $\chi^{(2)}$ lygus nuliui. Todėl harmonikų generacija, dažnių sumavimas ir skirtuminio dažnio generacija praktiškai realizuojama kristaluose, neturinčiuose inversijos centro⁸. Kad harmonikų generacija būtų efektyvi, kristale turi būti patenkinta dar ir vadinamoji fazinio sinchronizmo sąlyga, t.y. tiek krintanti, tiek sugeneruota banga turi kristale sklirti vienodu faziniu greičiu (t.y. lūžio rodikliai joms turi būti lygūs). Tai irgi realizuojama pasinaudojant kristalų anizotropija: antrosios harmonikos banga generuojama statmenos poliarizacijos krintančiai bangai. Kadangi skirtingos poliarizacijos „jaučia“ skirtingas kristalo kryptis, tai skirtingi yra ir jų lūžio rodikliai. Tinkamai pasukus kristalą, galima pasiekti, kad tiek ω dažnio, tiek 2ω dažnio bangos



8 pav. Impulso tvermės dėsnis harmonikų generacijoje. A – kolineari antrosios harmonikos generacija, antrosios harmonikos bangos kryptis sutampa su generuojančių bangų kryptimi; B – nekolineari antrosios harmonikos generacija, antrosios harmonikos banga sklinda atstojamąja kryptimi (pusiaukampinėje tarp generuojančiųjų bangų vektorių); C – suminio dažnio (trečiosios harmonikos) generacija, maišant ω ir 2ω dažnio bangas: 3ω bangos kryptis gaunama vektoriškai sudėjus pirmosios ir antrosios bangos vektorius.

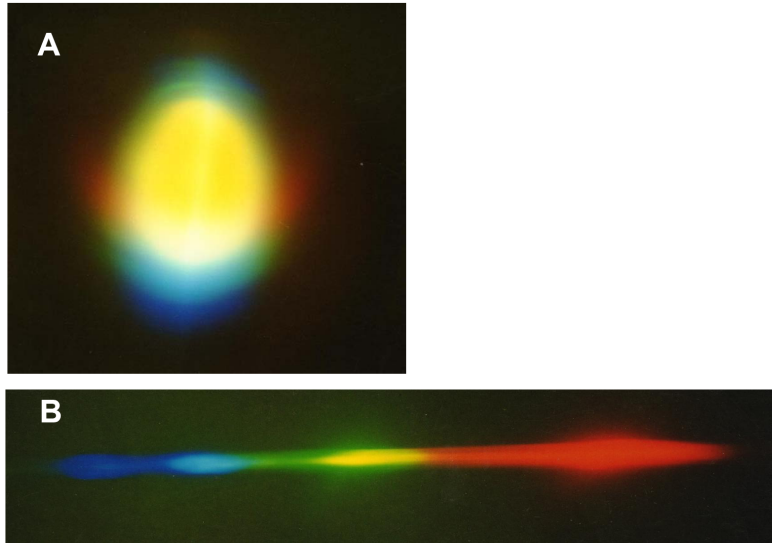
⁸ Femtosekundinių impulsų antrosios harmonikos generacijai dažniausiai naudojami β -bario borato (BBO) kristalai, nes jų labai aukštas optinio pažeidimo slenkstis (lazerio energijos tankis, kuriam esant kristale pradega skylė) ir didelis netiesiškumas, aprašomas koeficientu $\chi^{(2)}$.

matys vienodą lūžio rodiklį ir jų faziniai greičiai sutaps. Be fazinio sinchronizmo sąlygos, generuojant harmonikas turi būti patenkinti ir energijos bei impulso tvermės dėsniai. Energijos tvermės dėsnis pasireiškia tuo, kad iš dviejų fotonų ω dažnio bangoje gaunamas vienas 2ω dažnio fotonas (t.y. generuojant antrą harmoniką, bendras fotonų skaičius sistemoje sumažėja). Impulso tvermės dėsnio galiojimas paaiškintas 8 pav. Dėl impulso tvermės dėsnio, jei ateinančios ω dažnio bangos bus skirtingų krypčių, 2ω dažnio banga bus generuojama pagal vektorinę jų sudėtį (žr. 8B pav.), o jei maišomos bangos bus skirtingų dažnių ir krypčių, suminis dažnis bus generuojamas kryptimi, kuri gaunama vektoriškai sudedant generuojančiųjų bangų vektorius ir atsižvelgiant į jų dydį (proporcingą dažniui, žr. 8C pav.).

Kristaluose galime generuoti ne tik antrąją lazerio spinduliuotės harmoniką, bet ir aukštesnes: trečiąją, ketvirtąją ir t.t. Trečiąją harmoniką gauname, kristale maišydami pirmosios ir antrosios harmonikos bangas, o ketvirtąją – dvigubindami antrosios harmonikos dažnį. Šie procesai leidžia labai paprastai (tereikia tinkamo kristalo) praplėsti ultrasparčiojo lazerio generuojamų bangos ilgių diapazoną. Tiesa, netiesinių procesų efektyvumas visada mažesnis už vieneta, todėl kiekvienos harmonikos generacijos pakopoje prarandama nemažai energijos, tačiau tinkamai parinkus kristalo parametrus, galima pasiekti net kelių dešimčių procentų harmonikų generacijos efektyvumą. Tuomet sugeneruotos šviesos šočiai pakaks norimam eksperimentui atlikti.

Fazinė savimoduliacija ir baltos šviesos generacija

Kaip jau minėjome, izotropinėse medžiagose antrosios eilės (kvadratinis) dielektrinis jautris yra lygus nuliui. Tada pirmasis (9) formulės narys, dėl kurio atsiranda netiesiniai optiniai efektai yra kubinis netiesiškumas. Vieną iš jo sąlygotų reiškinių jau aptarėme - tai pluošto susifokusavimas, naudojamas Kerro lęšio modų sinchronizacijai. Jo pagrindas yra optinis Kerro efektas, arba netiesinis lūžio rodiklis, aprašomas (8) priklausomybe. Dėl tos pačios priklausomybės atsiranda dar vienas reiškinys, vadinamas baltos šviesos kontinuumo generacija, kuri plačiai taikoma kinetinės spektroskopijos šviesos šaltiniuose. Fizikinė reiškinio esmė yra ta, kad (netiesinis) lūžio rodiklis įeina į elektrinio lauko, aprašomo (10) formule, fazę, nes bangos vektorius k yra proporcingas lūžio rodikliui. Tai reiškia, kad medžiaga sklindanti banga patiria fazės postūmį (moduliaciją), priklausančią nuo elektrinio lauko intensyvumo. Fazinė moduliacija yra iš esmės tas pats kas ir dažninė moduliacija: viena neįmanoma be kito, nes dažnis apibrėžiamas kaip fazės išvestinė pagal laiką. Taigi, banga, sklisdama kubinio netiesiškumo terpėje patiria *susifokusavimą ir fazinę*



9 pav. Baltos šviesos generacija safyro kristale: A – spindulio spalva praėjus kristalą; B – to paties spindulio dažnių spektras, išskleistas difrakcine gardoje ir apimantis visą matomos šviesos spektrą.

savimoduliaciją. Dėl to intensyvaus femtosekundinio impulso, sklindančio per kubinio netiesiškumo terpę, spektras plečiasi: iš transformacijos apriboto impulso generuojasi balta šviesa (dar vadinama *baltos šviesos kontinuumu*), turinti platų dažnių spektrą.

Eksperimentiškai susifokusavimas ir fazinė savimoduliacija stebima įleidus galingus Ti:Safyro lazerio impulsus į stiklą ar vandenį: iš 800 nm šviesos gaunama balta plataus spektro šviesa (9A,B pav.). Nors tokiu būdu gaunamas šviesos intensyvumas vienetiniame dažnių intervale yra nedidelis, baltos šviesos generacija labai svarbi kinetinei spektroskopijai: baltos šviesos kontinuumo impulsai naudojami skirtuminės sugerties spektrams matuoti žadinimo-zondavimo spektroskopijoje (žr. toliau), taip pat – kaip užkratas optiniams parametriniams stiprintuvams, kuriuos aptarsime kitame skyrelyje.

Optinis parametrinis stiprinimas ir generacija

Optinė parametrinė generacija – tai dar vienas reiškinys susijęs su kvadratinio terpės netiesiškumu ir stebimas kristaluose, neturinčiuose inversijos centro. Jis yra iš esmės „atvirkščias“ reiškinys dviejų bangų dažnio sumavimui: dabar vienas kaupinimo bangos fotonas kristale suskyla į du fotonus (10A pav.). Atsiradusi didesnės energijos (dažnio) banga vadinama *signaline*, o mažesnės – *šalutine*. Bendru atveju, šie fotonai yra skirtingo dažnio, o jų dažniai, bangos ilgiai ir impulsai tenkina tvermės dėsnius:

$$\omega_{kaupinimo} = \omega_{signalinė} + \omega_{šalutinė}$$

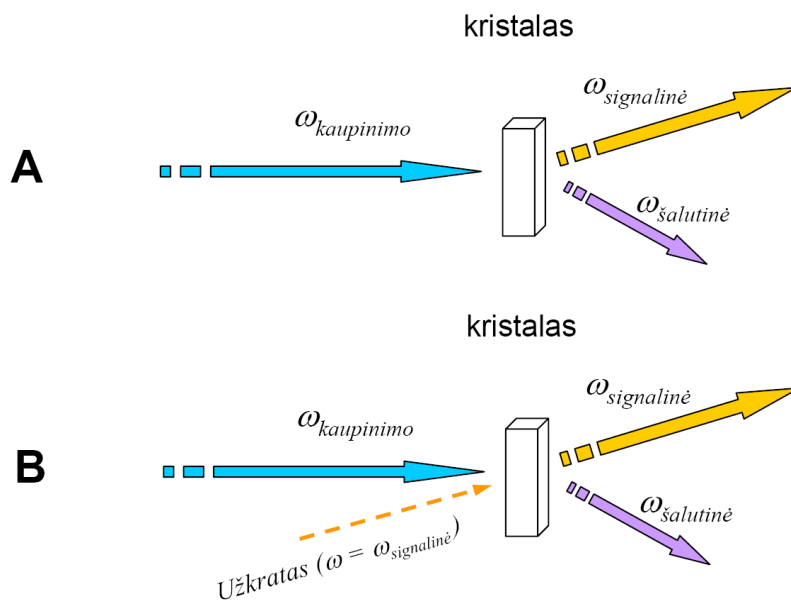
arba

$$\lambda_{kaupinimo} = \frac{1}{\frac{1}{\lambda_{signalinė}} + \frac{1}{\lambda_{šalutinė}}}; \quad (12)$$

$$\mathbf{k}_{kaupinimo} = \mathbf{k}_{signalinė} + \mathbf{k}_{šalutinė}$$

Svarbiausias ir naudingiausias parametrinės generacijos bruožas yra tas, kad dažnių (fotono energijų) pasidalijimas tarp signalinės ir šalutinės bangos priklauso nuo fazinio sinchronizmo kampo arba, paprastais žodžiais, kristalo orientacijos. Tai leidžia iš duoto dažnio kaupinančios bangos generuoti *norimo dažnio* signalinę bangą tiesiog pasukant kristalą norimu kampu, o tai itin patogu, norint pasigaminti derinamo bangos ilgio šaltinį kinetinei spektroskopijai.

Optinė parametrinė generacija kristaluose vyksta, kai signalinės arba šalutinės bangos fotonas susigeneruoja iš kvantinių triukšmų medžiagoje, ir toliau yra stiprinamas kaupinančios bangos sąskaita. Triukšmai – dalykas nepatikimas, todėl parametrinės generacijos efektyvumas ir stabilumas gerokai išauga, jei į kristalą kartu su kaupinama banga leidžiame silpną norimo signalinio dažnio (kurio mums reikia eksperimentui) bangą, kristale ji yra stiprinama. Toks procesas vadinamas *parametriniu šviesos stiprinimu*. Silpna banga, kurią stipriname, vadinama parametrinio stiprintuvo užkratu. Čia vėl praverčia baltos šviesos kontinuumas: kadangi jame yra visi norimi dažniai,



10 pav. A: Optinė parametrinė generacija: netiesiniame kristale fotonas suskyla į du skirtingų energijų fotonus; šio proceso metu patenkinamas energijos ir impulso tvermės dėsnis. B: optinis parametrinis stiprinimas: kartu su kaupinimu į kristalą leidžiamas užkratas, kuris kristale stiprinamas, perduodant jam energiją iš kaupinančios bangos.

paleidus jį į netiesinį kristalą kartu su kaupinančia banga, ir pasukus kristalą atitinkamu kampu, galima gauti stabilią ir stiprią norimo bangos ilgio šviesą (10B pav).

1.1.6. Ultratrumpųjų impulsų charakterizavimas

Iki šiol nagrinėjome būdus, kaip pasigaminti ultratrumpuosius šviesos impulsus, kurių reikia kinetinei spektroskopijai. Šiame skyrelyje aptarsime, kaip nustatyti svarbiausius jų parametrus. Du svarbiausi impulso parametrai, kuriuos eksperimentatoriui visada reikia žinoti, yra jo dažnių spektras ir trukmė. Impulso dažnių spektrą nustatyti nesunku: tereikia praleisti jį pro spektrinį prietaisą su dispersiniu elementu (difrakcinę gardelę arba prizmę) ir užrašyti spektrą detektoriumi. Dabartiniuose spektrometruose signalų registracijai paprastai naudojamos CCD matricos, labai panašios į esančias skaitmeniniuose fotoaparatuose. Tokio matavimo schema parodyta 11A pav.

Impulso trukmę nustatyti sunkiau, juk ji tėra kelios dešimtys (ar šimtai) femtosekundžių. Juk tokioms trukmėms matuoti šie impulsai ir naudojami, jokių greitesnių įrankių už juos nėra. Todėl sprendimas, kaip išmatuoti trumpų impulsų trukmę, iš tiesų saliamoniškas: pasinaudojama tuo pačiu impulsu. Paprasčiausias metodas femtosekundinių impulsų trukmei matuoti pavaizduotas 11B pav. Jis vadinamas autokoreliacija, o prietaisas, kurio schema pavaizduota 11B pav. – autokoreliatoriumi. Prietaiso veikimo principas yra tas, kad impulsas padalijamas į du, iš kurių vieno vėlinimą galima keisti, erdvėje stumdant jį atspindinčius veidrodžius, sumontuotus ant poslinkio staliuko. Šie veidrodžiai sudaro vadinamąją užlaikymo liniją (žr. 11B pav.). Po to abu impulsai susikerta netiesiniame kristale, kur vyksta nekolineari antrosios harmonikos generacija, analogiška pavaizduotai 8B pav. Matuojant autokoreliacinę funkciją, registruojama sugeneruotos antrosios harmonikos priklausomybė nuo užlaikymo linijos padėties. Kadangi antra harmonika bus generuojama tik tada, kai abu impulsai persikloja tiek laike (t.y. ateina į kristalą tuo pat momentu), tiek erdvėje (t.y. pataiko į tą pačią kristalo vietą), stumdami vėlinimo liniją gauname funkciją, proporcingą abiejų impulsų laikinei sanklotai, iš kurios galime nustatyti impulso ilgį. Norėdami surasti antrosios harmonikos intensyvumą laiko momentu t , turime sudauginti pirmojo (judančio) impulso ir antrojo (nejudančio) impulso intensyvumą ir suintegruoti visais laiko momentais:

$$AC(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_1(\tau)I_2(t-\tau)d\tau \quad (13).$$

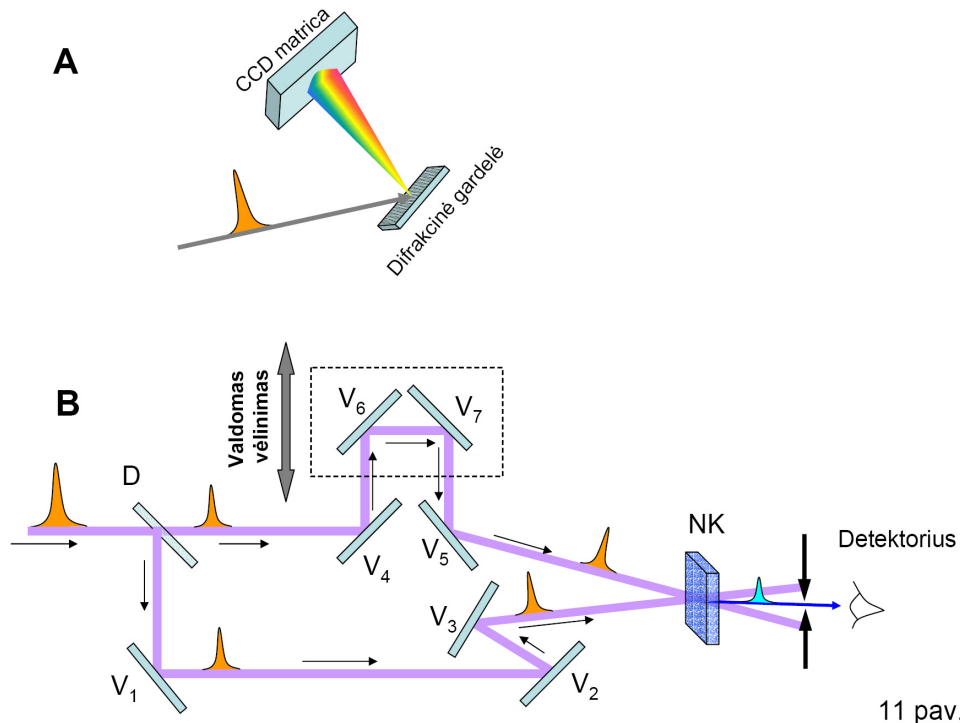
Kadangi impulsai identiški – jie pluošto dalikliu gaunami iš to paties pradinio impulso, tai antrosios harmonikos intensyvumas

$$AC(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_1(\tau)I_1(t-\tau)d\tau \quad (14).$$

Iš statistikos žinome, kad taip aprašoma laike kintančio dydžio autokoreliacijos funkcija, todėl šis impulso trukmės nustatymo metodas vadinamas autokoreliaciniu, o prietaisas, surinktas pagal 11B pav. pavaizduotą schemą – autokoreliatoriumi. Įrašę į (14) formulę gausinio impulso intensyvumo išraišką (2) ir suintegravę⁹, gausime, kad gausinio impulso autokoreliacijos funkcija taip pat aprašoma gausiniu pasiskirstymu, o jos plotis yra $\sqrt{2}$ didesnis už paties impulso:

$$\tau_{impulso} = \frac{\tau_{autokoreliacinės\ f-jos}}{\sqrt{2}} \quad (15).$$

Pastebėkime, kad jeigu atliktume dviejų *skirtingų* impulsų kryžminės koreliacijos eksperimentą, ir vieno iš jų trukmė būtų daug trumpesnė už kito, iš (13) gautume, kad



11 pav.

11 pav. Ultratrumpųjų šviesos impulsų charakterizavimas. A – impulso spektro matavimas spektrometru; B - impulso trukmės nustatymas autokoreliatoriumi. D – pluošto daliklis, V – veidrodžiai, NK - netiesinis suminio dažnio generacijos kristalas. V₆ ir V₇ sudaro užlaikymo liniją, kurios padėtį keičiant galima vėlinti vieną impulsą kito atžvilgiu. Signalas detektoriuje bus matomas tada, kai abu impulsai persikloja laike ir erdvėje, t.y. ateina į tą pačią kristalo vietą tuo pačiu laiko momentu.

$$AC(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_1(\tau)I_2(t-\tau)d\tau \approx \int_{-\infty}^{+\infty} I_1(\tau)\delta(t-\tau)d\tau = I_1(t) \quad (16)$$

t.y., kad sugeneruotas antrosios harmonikos intensyvumas tiesiogiai atitinka lėtai kintančio signalo intensyvumą tuo momentu, ties kuriuo yra trumpasis impulsas. Paprastai tariant, labai trumpu impulsu galime „pjaustyti“ ilgą impulsą „laikinėmis riekelėmis“ ir tokiu būdu nustatyti jo kitimą laikui bėgant. Šia išvalga pagrįstas kinetinės spektroskopijos metodas, vadinamas fluorescencijos dažnio sumavimo spektroskopija.

Žinodami impulso spektro plotį ir trukmę, galime paskaičiuoti jų sandaugą (žr. (7) formulę) ir pažiūrėti, ar daug impulsas skiriasi nuo „tobulo“ gausinio impulso. Praktikoje ši sandauga dažniausiai yra didesnė už 0.441, t.y. naudojami lazerio impulsai nėra idealiai gausiniai. Tačiau ji dažnai nurodoma moksliniuose straipsniuose kaip patogus parametras impulso kokybei nusakyti.

Pažymėkime, kad tiek autokoreliacija, tiek spektro matavimas nesuteikia pilnos informacijos apie impulsą. Pilna tokia informacija būtų kompleksinė funkcija, aprašanti elektrinį lauką, kuri priklausytų nuo dviejų skersinių erdvės koordinatų ir laiko. Mes tiesiog padarėme prielaidą, kad impulsas yra gausinis ir išmokome nustatyti jo trukmę bei pamatuoti spektrą. Praktiniams tikslams impulso dažnių pasiskirstymo ir trukmės, nustatytos iš autokoreliacinio matavimo dažniausiai užtenka. Siekiant gauti kuo išsamesnę informaciją apie impulsą (t.y., sužinoti ne tik elektrinio lauko amplitudę, bet ir fazę, dažnių pasiskirstymą laike ir t.t.), naudojami kiti, sudėtingesni, impulsų charakterizavimo metodai, vadinami FROG, SPIDER, GRENOUILLE ir kt., [5] kurių čia nenagrinėsime; besidomintis skaitytojas informacijos apie juos ras papildomoje literatūroje.

⁹ Osciliuojantį narį $\exp(-i\omega_0 t)$ galime praleisti – vis tiek jis integruojant susividorkins į nulį – užtenka įrašyti gaubtinę.

2. Kinetinės fluorimetrijos metodai

2.1. Fluorescencijos spektroskopija su laiko skyra: metodai

Vienas iš būdų, kuriais relaksuoja sužadintos molekulių būsenos, yra fluorescencija. Nuostoviojoje fluorescencijos spektroskopijoje matuojami fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrai, t.p. fluorescencijos anizotropija. Nuostovusis fluorescencijos spektras – tai fluorescencijos intensyvumas suintegruotas laike:

$$F_{nuost.}(\omega) = \int_0^{\infty} F(\omega, t) dt \quad (17).$$

Kitaip tariant, detektorius susumuoja visus fotonus, kuriuos išspinduliuoja bandinio molekulės, pradedant tuo momentu, kai jos buvo sužadintos, ir baigiant tuo, kai užgeso paskutinės molekulės sužadinta būsena. Iš (17) formulės matyti, kad iš nuostoviosios fluorescencijos eksperimento neįmanoma nustatyti, kada ir kaip užgesta molekulės sužadinta būsena: pvz., dviejų molekulių fluorescencijos intensyvumas gali būti vienodas, nors viena šviečia labai stipriai, bet trumpai, o kita – labai silpnai, užtat ilgai. Atitinkamai nėra galimybės iš nuostoviosios fluorescencijos matavimų pasakyti, kas vyksta su molekule per tą laiką, kol ji yra sužadinta, ar kaip jos sužadinta būsena praranda energiją.

Kinetinėje spektroskopijoje, kurioje nėra signalo integravimo laiko atžvilgiu, gauname informaciją apie procesus, vykstančius su molekule tol, kol ji dar tebėra sužadinta. Šie procesai gali būti tokie:

- spindulinė relaksacija (molekulė išspinduliuoja fotoną ir grįžta į pagrindinę būseną);
- vidinė konversija arba nespindulinė relaksacija (molekulė virpesinių būsenų „kopetėlėmis“ nusileidžia į žemesnę elektroninę būseną);
- interkombinacinė konversija (susidaro tripletinė molekulės būsena);
- konformacinis molekulės pakitimas (pvz., *trans-cis* izomerizacija).

Pavienės molekulės būna tik dujų fazėje, o biologinėje medžiagoje jas visada supa kitos molekulės – baltymai, vanduo, lipidai ir pan. todėl egzistuoja dar keletas procesų, veikiančių sužadintos molekulės dinamiką:

- energijos pernaša į gretimą molekulę;

- solvatacija (tirpiklio molekulių persiorientavimas, prisitaikant prie sužadintos molekulės elektroninės orbitalės konfigūracijos);
- fotoindukuota reakcija, pvz., protono arba elektrono pernaša nuo sužadintos molekulės į tirpiklį arba ant jos kaimynės.

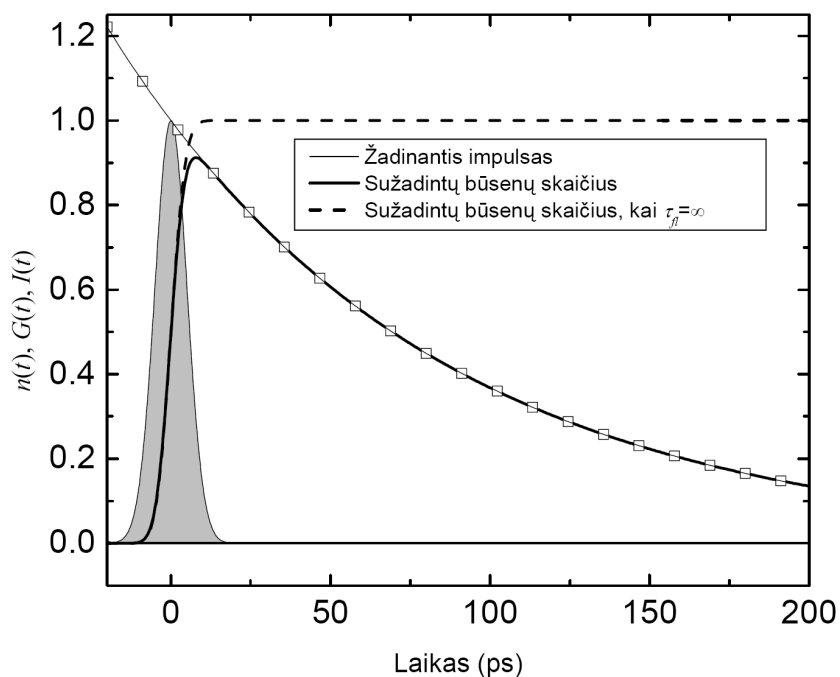
Visi šie (ir kai kurie kiti) procesai veikia molekulės būseną, dėl to ir jos fluorescencijos spektrą; ši poveikį stebime kinetinės fluorimetrijos metodais. Fluorescencijos kinetinėje spektroskopijoje molekulės sužadinamos lazerio impulsu ir matuojamas jų fluorescencijos spektras kaip laiko funkcija, t.y. registruojamas signalas užrašomas taip:

$$F = F(\lambda, t) \quad (18)$$

Čia užrašėme spektrą kaip bangos ilgio funkciją, nors galima naudoti ir dažnį ar bangos skaičių.

Panagrinėkime supaprastintą pavyzdį: molekulių ansamblis sužadinamas gausiniu lazerio impulsu, kurio intensyvumas aprašomas formule $I(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\tau}} e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}}$ (žr. užtušotą kreivę 12 pav.), o

molekulės sužadinta būsena gęsta tik spinduliniu būdu (išspinduliuojant fotoną). Tarsime, kad



12 pav. Fluorescencijos kinetika hipotetinėje molekulėje, sužadinus ją gausiniu impulsu. Žadinančio gausinio impulso intensyvumas parodytas užtušuota kreive, fluorescencijos intensyvumas – ištisine linija. Punktyrinė linija rodo fluorescencijos intensyvumą tuo atveju, kai fluorescencija neužgęsta (arba gęsta be galo lėtai, palyginti su žadinančiojo impulsu trukme). Plona linija su kvadratukais rodo eksponentę, aprašančią sužadintos būsenos gesimą (žr. (20) formulę).

žadinantis impulsas nėra labai intensyvus ir sugerties įsisotinimo dėl priverstinio spinduliavimo galime nepaisyti. Molekulių skaičius sužadintoje būsenoje tuomet aprašomas tokia diferencialine lygtimi:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{A}{\sqrt{2\pi\tau}} e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}} - \frac{1}{\tau_{fl}} n \quad (19),$$

kurioje A – žadinančio impulso amplitudė, o τ_{fl} – charakteringoji sužadintosios būsenos fluorescencijos trukmė (atvirkštinis dydis fluorescencijos greičiui).

Lygtį (19) atitinkančios homogeninės lygties sprendinys yra gėstanti eksponentė $Ce^{-\frac{t}{\tau_{fl}}}$ (plona linija su kvadratais 12 pav.), o varijuodami konstantą ir įrašę pradinę sąlygą, $n(t = -\infty) = 0$, galime surasti ir bendrąjį sprendinį, kurio grafinis vaizdas pateiktas 12 pav. (ištiesinė linija) kuris susideda iš dviejų daugiklių:

$$n(t) = G(t) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{fl}}} \quad (20)$$

$G(t)$ analizinės išraiškos neturi, tačiau ji yra proporcinga gausinės impulso gaubtinės integralui nuo $-\infty$ iki t ir išreiškiama per vadinamąją paklaidos funkciją $erf(t)$:

$$G(t) \sim 1 + erf\left(\frac{t}{\tau}\right) \quad (21).$$

$$erf(t) \equiv \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^t e^{-t^2} dt$$

Grafinis jos pavidalas pateiktas 12 pav. (punktyrinė linija), o fizikinė prasmė irgi aiški: taip kistų sužadintos būsenos molekulių skaičius, jei fluorescencijos gyvavimo trukmė τ_{fl} būtų be galo ilga (tuomet eksponentė (20) formulėje pavirstų vienetu). Natūralu, kad tuomet sužadintų molekulių skaičius ansamblyje yra proporcingas ansamblių aplankiusių fotonų skaičiui iki laiko momento t , t.y. impulso gaubtinės integralui nuo $-\infty$ iki t .

Eksperimente stebimas fluorescencijos intensyvumas yra proporcingas molekulių, esančių sužadintoje būsenoje, skaičiui, taigi (20) formulės matome, kad mūsų paprastame molekulių ansamblyje fluorescencijos intensyvumas, užaugs tokiu greičiu, kokiu į jį impulsas atneš fotonus, o paskui eksponentiškai užges. Svarbu tai, kad laiko momentais, daug vėlesniais už žadinančio impulso pasirodymą, fluorescencijos gesimas yra eksponentinis ir visų su impulsu susijusių

subtilybių galime nepaisyti (plg. kreivę su kvadratukais ir ištiesinę liniją 12 pav.). Tai galioja tada, kai žadinančio impulso trukmė daug trumpesnė už fluorescencijos gesimo trukmę.

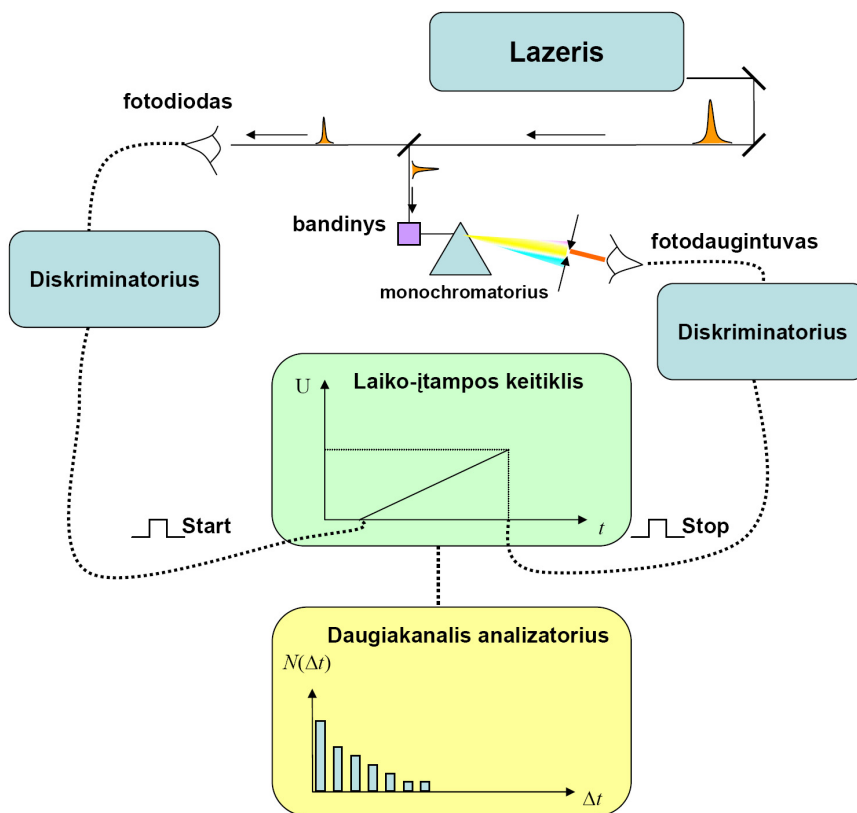
Kol kas mūsų modelyje nebuvo įtrauktas joks procesas, veikiantis bandinio fluorescencijos spektrą, todėl išnagrinėtu atveju registruojamas fluorescencijos spektro forma bus pastovi, tik jo intensyvumas laikui bėgant užges pagal (20) formulę. Toliau pateikiamuose pavyzdžiuose matysime, kad įdomus yra kaip tik spektro formos kitimas, nes jis leidžia spręsti apie bandinyje vykstančius įdomius fizikinius procesus.

Aptarsime pagrindinius eksperimentinius metodus, leidžiančius išmatuoti fluorescencijos spektrą su laiko skyra (18). Sąlyginai šiuos metodus galime suskirstyti į elektroninius, kai fluorescencija registruojama panaudojant greitus elektroninius detektorius, ir optinius, kai laiko skyrai gauti panaudojami netiesinės optikos triukai, panašūs į tą, kuri aptarėme kalbėdami apie impulsų trukmės matavimą autokoreliatoriumi.

2.1.1. Laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas

Šis elektroninis metodas taikomas, kai žadinimui naudojame didelio impulsų pasikartojimo dažnio lazerius (pvz., Ti:Safyro osciliatorių). Molekulę sužadinus lazerio impulsu, po tam tikro laiko tarpo Δt ji išspinduliuos fotoną. Jei pavyktų išmatuoti Δt daugelį kartų (t.y. sužadinus molekules daugeliu impulsų), gautos vertės pasiskirstytų pagal tikimybę, jog molekulė išspinduliuos fotoną tam tikru laiko momentu. Tai ir atliekama laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo (TCSPC¹⁰) eksperimente, kurio principinė schema pateikta 13 pav. Didelio pasikartojimo dažnio lazeris siunčia ultratrumpuosius impulsus į bandinį. Dalis lazerio impulso šviesos atskeliama pluošto dalikliu ir nukreipiama į fotodiodą, kuris generuoja elektroninį impulsą. Šis impulsas toliau patenka į diskriminatorių, kuris iš diodo (nežinomos formos) impulso sugeneruoja skaitmeninį elektroninį impulsą, vadinama „start“ impulsu. „Start“ impulsas patenka į vadinamąjį laiko-įtampos keitiklį ir jį paleidžia. Laiko-įtampos keitiklis – tai prietaisas, išduodantis įtampą, proporcingą laiko tarpui tarp dviejų elektroninių signalų („start“ ir „stop“). Iš esmės tai yra kondensatorius, įkraunamas pastovia elektros srove. Fluorescencijos fotoną, kuri išspinduliuoja bandinys, užregistruoja jautrus fotodaugintuvas, kurio signalas irgi pereina diskriminatorių ir patenka į laiko-įtampos keitiklį; tai vadinamasis „stop“ signalas. Tokiu būdu laiko-įtampos keitiklyje atsiranda įtampa, proporcinga laiko tarpui tarp „start“ ir „stop“ fotonų pasirodymo, arba, paprasčiau tariant, trukmei tarp bandinio

¹⁰ Santrumpa iš angliško Time-Correlated Single Photon Counting – laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas.



13 pav. Laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo eksperimento schema: lazerio impulsas padalijamas į dvi dalis, kurių viena paleidžia laiko-įtampos keitiklį, o kita – sužadina bandinį. Keitiklis ima kaupti įtampą, o ji sustabdo fluorescencijos fotonas, kurį išspinduliuoja bandinio molekulė, užregistruotas fotodaugintuvu. Trukmė tarp impulso, atėjusio į fotodiodą ir fotoną, užregistruoto fotodaugintuvu, atitinkanti įtampos vertė įrašoma daugiakanaliniame analizatoriuje. Atlikus eksperimentą daugelį kartų, gaunamas laikinis fluorescencijos trukmės pasiskirstymas (fluorescencijos gesimo kinetika).

sužadimo ir fotonų išspinduliuojimo. Ši įtampa užrašoma daugiakanaliniame analizatoriuje. Šis analizatorius - tai elektroninis prietaisas, kuris paskirsto įtampas į kanalus, pagal jų vertę, pvz, įtampas nuo 0 iki 0.1 V pakliūva į pirmą, kanalą, nuo 0.1 iki 0.2 V – į antrą ir t.t. Kiekvienas kanalas turi su juo susietą skaitiklį, kurio vertė, padidinama vienetu, jei įtampa į jį pakliuvo.

Tokiu būdu registruojama fluorescencijos gesimo histograma: kanalai, kurie atitinka dažniausiai stebimas fluorescencijos užlaikymo trukmes, sukaupia didžiausias vertes (jų skaitikliai suveikia dažnai), o rečiausias vertes atitinkantys kanalai „pamato“ vos keletą fotonų.

TCSPC metodas – elektroninis metodas, taigi pagrindinis jo trūkumas – nelabai gera laikinė skyra. Pažymėkime, kad ją riboja ne detektorių (fotodiodo, fotodaugintuvo) atsako laikas: diskriminatoriai registruoja ne patį atsaką, bet generuoja sinchronizacijos impulsą tada kai detektoriaus įtampa pasiekia tam tikrą procentą maksimalios įtampos. Tokiu būdu, net jei diodo atsakas į lazerio impulsą užtrunka kelias mikrosekundes, jei tik jo forma tobulai atsikartoja tarp

skirtingų impulsų, paklaidos neturėsime ir galėsime registruoti nanosekundžių ir pikosekundžių trukmės procesus. Paklaidas sąlygoja vadinamasis „tirtėjimo“¹¹ triukšmas, t.y. detektoriaus atsako formos kitimas nuo impulso prie impulso. Praktikoje TCSPC metodika leidžia pasiekti apie 50 ps laikinę skyrą¹². Kaip dar vieną trūkumą galime paminėti tai, jog metodas yra iš esmės vienspalvis: vienu metu registruojama fluorescencijos kinetika ties vienu bangos ilgiu, o norint registruoti spektrą, reikia matuoti daugelį bangos ilgių paeiliui, arba nusipirkti daugiau detektorių ir *visų* elektronikos komponentų, nors tai brangus sprendimas.

Tačiau TCSPC metodika turi svarbių privalumų: jai nereikia didelių lazerio intensyvumų¹³, beveik visai nesvarbus lazerio stabilumas (t.y. net jei lazerio impulsų energijos svyruoja labai smarkiai, pvz., du kartus, metodas veikia). TCSPC eksperimento metu galima pusvalandžiui išjungti lazerį, o grįžus lyg niekur nieko jį įjungti ir matuoti toliau. Kadangi metodas yra kaupiamasis, galima skaičiuoti fotonus tol, kol signalo-triukšmo santykis pasieks norimą ribą ir gauti duomenys leis atsakyti į eksperimentatorių dominantį klausimą.

Be to, šis metodas yra pigus, palyginti su kitais laiko skyros fluorescencijos metodais. Ypač jis išpopuliarėjo, kai atsirado diodiniai lazeriai, galintys generuoti apie 100 ps trukmės impulsus, kurių kaina tesudaro keletą procentų to, kiek kainuoja „tikra“ ultrasparčioji lazerinė sistema. TCSPC pastaruoju metu plačiai taikomas vadinamojoje laiko skyros mikroskopijoje, kur konfokaliniu mikroskopu registruojama fluorescencija dar išskleidžiama ir laike [6].

2.1.2. Fotoelektronų kamera¹⁴

Dar vienas elektroninis laiko skyros fluorescencijos registravimo metodas yra fotoelektronų kamera. Jos veikimo principas kiek primena analoginį oscilografą, o registracijos schema, pavaizduota 14 pav., susideda iš trijų fizikinių procesų:

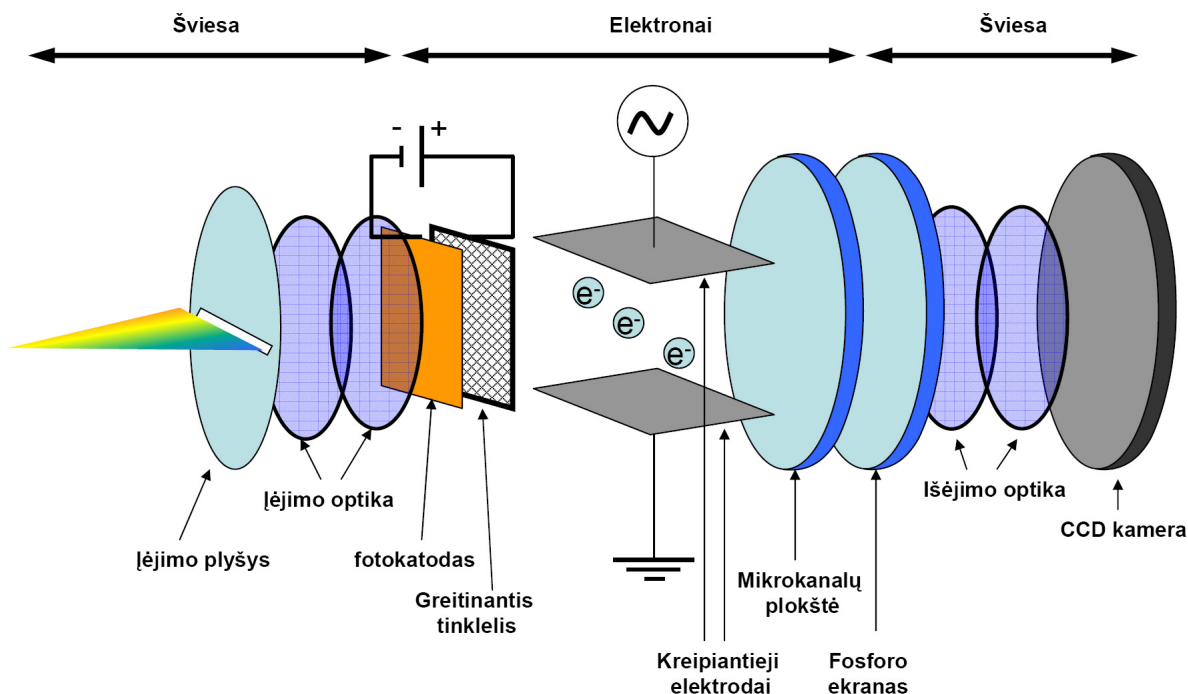
- Iš bandinio atėję fluorescencijos fotonai išmuša elektronus iš fotokatodo;

¹¹ Angl. jitter.

¹² Laikinės skyra apibrėžiama kaip instrumentinės atsako funkcijos pilnas plotis pusės aukštyje. Atsako funkciją galima išmatuoti, įdėjus vietoje bandinio šiek tiek šviesą išsklaidančios nefluorescuojančios medžiagos (pvz., vandens su kreida ar pienu). Kadangi tamprai sklaida – momentinis procesas, tai ir matysime signalą kurį lems matavimo sistemos atsakas į momentinį žadinimą.

¹³ Netgi priešingai: impulsų energijos negali būti per didelės, nes visas metodas grindžiamas prielaida prielaida, kad iš kiekvieno impulso bandinys išspinduliuoja *tik vieną* fluorescencijos fotoną, kurį registruoja detektorius.

¹⁴ Angl. streak camera.



14 pav. Fotoelektronų kameros principinė schema. Fluorescencijos fotonai išmuša iš fotokatodo elektronus, kurie pagreitinami elektriniu lauku ir pakliūva tarp kreipiančiųjų elektrodų, prie kurių prijungta greitai kintanti įtampa, sinchronizuota su žadinančiu lazerio impulsu. Nukreipti elektronai pakliūva ant fosforo ekrano, kurio vaizdą registruoja CCD kamera.

- Elektronai pagreitinami elektriniame lauke, o tuomet pakliūva į kintamąjį kreipiantį elektrinį lauką;
- Elektronai pataiko į fosforo ekraną, kuriame sukelia žybsnius; pagal juos užregistruojamas elektronų skersinis nuokrypis.

Taigi, fotoelektronų kameroje fotonai paverčiami elektronais, kurie yra pagreitinami greitančios įtampos. Po to elektronų srautas pakliūva tarp kreipiančiųjų elektrodų, prie kurių prijungtas kintantis elektrinis laukas. Šio lauko kitimas sinchronizuojamas su žadinančiu lazerio impulsu, todėl elektrono vertikalus nuokrypis priklauso nuo laiko momento, kuriuo atėjo jį išmušęs fotonas. Taigi, fotoelektronų kamera yra keitiklis, kuris fotono „atvykimo“ laiką pakeičia į elektrono padėtį fosforo ekrane. Prietaiso jautrumui padidinti prieš fosforo ekraną paprastai montuojama mikrokanalinė plokštė (elektronų daugintuvas). Fosforo ekrano vaizdą registruoja jautri CCD kamera.

Pagrindinis fotoelektronų kameros privalumas prieš kitas metodikas yra tas, kad kreipiantieji elektrodai pagreitintus elektronus nukreipia tik viena kryptimi (14 pav. pavaizduotoje schemoje - vertikaliai), todėl kitą skersinę koordinatę galima panaudoti šviesos spektrui išskleisti spektrografu. Tokiu būdu fotoelektronų kamera leidžia užregistruoti iš karto ir fluorescencijos spektrą, ir kinetiką.

Be to, palyginti su pavienių fotonų skaičiavimo metodika, fotoelektronų kameros yra greitesnės, kadangi jų pagrindą sudaro elektrovakuuminis vamzdis. Tipinės sinchroniškai paleidžiamos¹⁵ fotoelektronų kameros laiko skyra siekia 1 ps ir mažiau. Turint omenyje, kad su šitokia skyra per vieną eksperimentą užrašomas *visas* fluorescencijos spektras su laiko skyra (žr. (18) formulę), duomenų registravimo greičio prasme šis metodas yra daug pranašesnis už pavienių fotonų skaičiavimą (bet, aišku, nuo dešimties iki šimto kartų brangesnis).

2.1.3. Fluorescencijos dažnio sumavimas

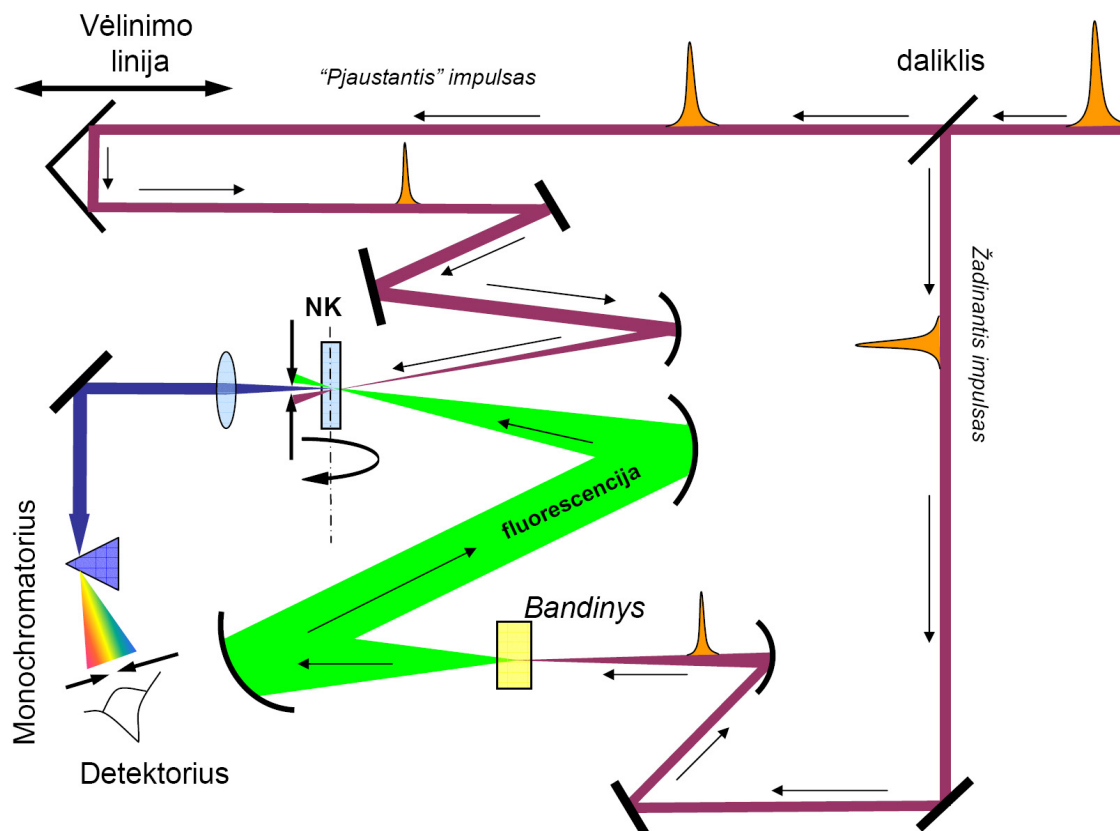
Šis fluorescencijos spektroskopijos metodas remiasi jau ne tobuliausiomis elektronikos technologijomis, o netiesinės optikos metodais. Tokio eksperimento schema parodyta 15 pav. Ji savo struktūra labai panaši į autokoreliatoriaus schemą (11B pav.). Norint išmatuoti laiko skyros fluorescenciją bandinyje, bandinys įdedamas į vieną iš autokoreliatoriaus šakų ir matuojama kryžminė koreliacija tarp žadinančio lazerio impulso ir bandinio fluorescencijos, generuojant jų suminį dažnį netiesiniame kristale. Techniškai tai realizuojama taip: lazerio impulsas pusiau pralaidžiu veidrodžiu padalinamas į dvi dalis, iš kurių viena užlaikoma valdomoje vėlinimo linijoje (ji vadinama valdančiuoju impulsu), o kita sužadina bandinį. Bandinio fluorescencija surenkama paraboliniiais (arba eliptiniais) veidrodžiais arba lęšiais ir fokusuojama į netiesinį dažnio sumavimo kristalą [7]. Norint gauti kuo geresnę fluorescencijos laikinę skyrą, kolimavimui ir fokusavimui geriau naudoti įgaubtus veidrodžius, nes jie į signalą neįneša papildomos grupinių greičių dispersijos. Kartu su surinkta fluorescencijos šviesa į netiesinį kristalą fokusuojamas ir valdantysis impulsas. Kristalo orientacija parenkama taip, kad būtų efektyviai generuojamas suminis dažnis tarp valdančiojo impulso ir bandinio fluorescencijos.

Kadangi dažnio sumavimas yra kvadratinis netiesinis reiškinys (žr. skyrelį apie netiesinės optikos metodus), sugeneruoto suminio dažnio intensyvumas yra proporcingas jį generuojančių laukų intensyvumų sandaugai

$$I_{sum.dazn.}(t) \sim I_{vald.imp.}(t) \times I_{fluorescencijos}(t) \quad (22).$$

Taigi, kai valdančio impulso intensyvumas pastovus, registruojamas signalas bus proporcingas bandinio fluorescencijos intensyvumui *tuoj pat*, kai bandinio fluorescencija persikloja su

¹⁵ Sinchroniškai paleidžiama fotoelektronų kamera yra tokia, kur CCD detektorius registruoja daugelio lazerio impulsų elektronus. Tokia kamera yra daug kartų jautresnė už vieno impulso kameras, kurių jautrio nepakanka praktiniams fluorescencijos matavimams, tačiau dėl elektroninių triukšmų nuo impulso prie impulso, jos laiko skyra kiek mažesnė.



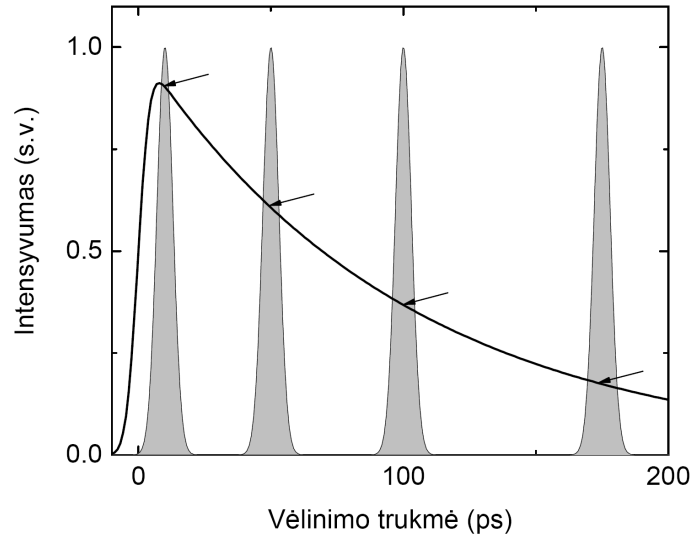
15 pav. Fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimentinė schema: impulsas padalinamas į du, iš kurių vienas (valdantysis) užlaikomas vėlinimo linijoje, o kitas sužadina bandinį. Bandinio fluorescencija surenkama paraboliniiais veidrodžiais ir fokusuojama į netiesinį kristalą (NK) kartu su užlaikytuoju impulsu. Netiesiniame kristale generuojamas suminio dažnio signalas tarp fluorescencijos ir valdančiojo impulso, kurio spektras išskleidžiamas monochromatoriuje ir registruojamas detektoriumi.

valdančiuoju impulsu (16 pav.). Kitaip tariant, valdantysis impulsas „išpjauna“ iš ilgo bandinio fluorescencijos impulso jo dalį, atitinkančią valdančiojo impulso ilgį. Tą fluorescencijos dalį ir mato detektorius. Tokiu būdu, keičiant valdančiojo impulso vėlinimą galima išmatuoti bandinio fluorescencijos intensyvumą įvairiais laiko momentais. Kadangi valdančiojo impulso dažniai sudedami su fluorescencijos dažniais, bandinio fluorescencijos spektrą (priklausomybę nuo bangos ilgio) galime atstatyti iš formulės

$$\frac{1}{\lambda_{\text{užregistruotas}}} = \frac{1}{\lambda_{\text{fluorescencijos}}} + \frac{1}{\lambda_{\text{valdančiojo}}} \quad (23),$$

nes registruojamo signalo bangos ilgių pasiskirstymą ir valdančiojo impulso spektrą išmatuojame eksperimentiškai.

Kadangi fluorescencijos dažnio sumavimas yra grynai optinis metodas, jo laiko skyrą riboja tik naudojamų lazerio impulsų trukmė. Ši skyra, naudojant Ti:Safyro lazerius nesunkiai pasiekia



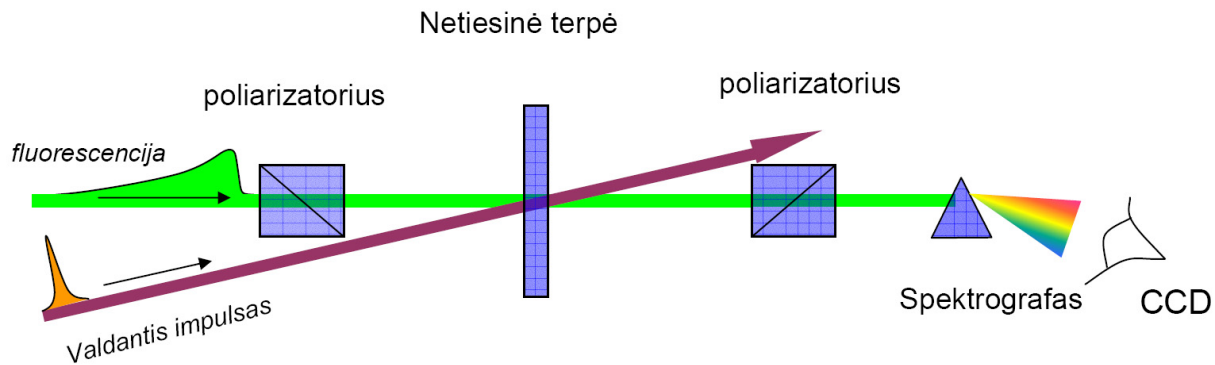
16 pav. Fluorescencijos dažnio sumavimas: iš ilgo bandinio fluorescencijos impulso atskiras „riekes“ netiesiniame kristale išrenka trumpi valdantieji impulsai, kurių vėlinimą galima keisti. Registruojamas signalas (parodytas rodyklėmis), proporcingas fluorescencijos intensyvumui tuo laiko momentu, kai ji persikloja su trumpu valdančiuoju impulsu.

150 fs. Todėl šis metodas turėtų būti pirmasis pasirinkimas, kai tiriami procesai yra labai greiti (greitesni už 1 ps). Šiuo atveju kitos metodikos tiesiog negali su juo konkuruoti. Tačiau jis turi ir trūkumų: kadangi fluorescencija registruojama panaudojant netiesinį optinį procesą – suminio dažnio generaciją – reikalingi gana stiprūs žadinantys impulsai, kurie kartais gali pažeisti biologinius bandinius. Dėl būtinybės parinkti tinkamą fazinio sinchronizmo kryptį netiesiniame kristale, neatidžiai naudojant šį metodą lengviau gauti eksperimentinių artefaktų (pvz., netinkamai nustačius kristalo orientaciją, gaunamas iškreiptas fluorescencijos spektras). Galų gale, šiuo metodu matuojamas fluorescencijos intensyvumas tik viename spektro taške ir tik vienu laiko momentu. Todėl norint gauti visą laiko skryos fluorescencijos spektrą, tenka skenuoti tiek valdančio impulso vėlinimą, tiek registruojamą bangos ilgį – dėl to eksperimentas paprastai užtrunka.

2.1.4. Optinė Kerro sklendė

Šis metodas iš esmės yra fluorescencijos dažnio sumavimo variantas: bendra eksperimento idėja yra lygiai tokia pat, kaip ir dažnio sumavimo, tik panaudojamas kitas netiesinis efektas – optinis Kerro efektas. Tai reiškiny, kai stipriame elektriniame lauke izotropinė medžiaga (vanduo, kvarcas) įgyja dvigubą laužiamąją gebą, t.y. pradeda sukti pro ją einančios šviesos poliarizaciją.

Tokio eksperimento schema parodyta 17 pav. Fluorescencijos šviesa praleidžiama pro sklendę, kurią sudaro sukryžiuoti poliarizatoriai ir netiesinė terpė (kvarco plokštelė, kiuvetė su



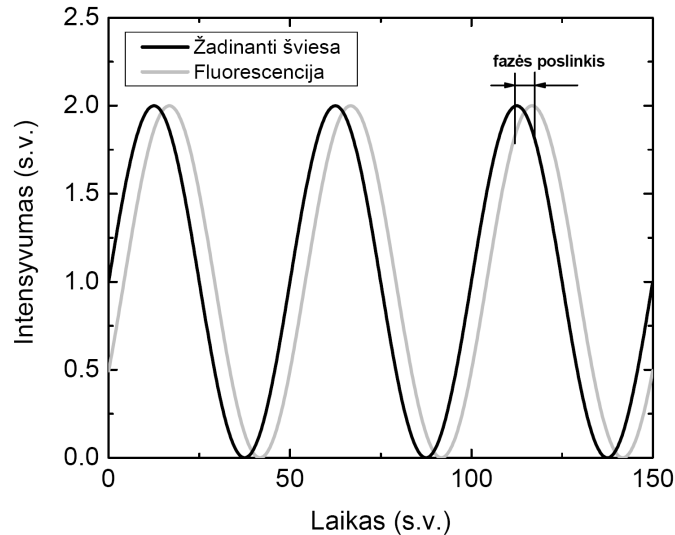
17 pav. Optinė Kerro sklendė: fluorescencija praleidžiama pro sistemą, sudarytą iš dviejų sukryžiuotų poliarizatorių ir netiesinės terpės. Kai į terpę ateina valdantis impulsas, ji pasuka fluorescencijos šviesos poliarizaciją ir fluorescencijos dalis, persiklojanti su valdančiuoju impulsu, praeina pro antrąjį poliarizatorių.

vandeniui arba anglies tetrachloridui, CS_2). Kol valdančiojo impulso nėra, terpėje dvigubas lūžis nevyksta ir fluorescencija pro antrąjį poliarizatorių nepraeina. Atėjus valdančiajam impulsui, fluorescencijos šviesos poliarizacija pasukama dėl optinio Kerro efekto ir praeina pro poliarizatorių. Kaip ir fluorescencijos dažnio sumavimo atveju, signalą turime tik iš tos fluorescencijos impulso dalies, kuri persikloja su valdančiuoju impulsu.

Šio metodo privalumai ir trūkumai iš esmės nesiskiria nuo fluorescencijos dažnio sumavimo. Tačiau Kerro sklendės privalumas prieš dažnio sumavimą yra tas, kad nesikeičia fluorescencijos dažnis – spektrografu tiesiogiai registruojame bandinio fluorescencijos intensyvumą. Pažymėtina, kad netiesinės optikos triukus panaudojantys laiko skyros fluorescencijos eksperimentai nelengvi – reikia jautrių detektorių, didelių valdančiojo impulso intensyvumų ir t.t.

2.1.5. Fazinė fluorimetrija

Fazinė fluorimetrija – tai seniausias kinetinės fluorimetrijos metodas, dabar naudojamas, kai reikia „greitai ir nešvariai“ pamatuoti įvairių junginių fluorescencijos gyvavimo trukmes. Jam nebūtinai impulsiniai lazeriai, užtenka paprasto nekoherentinės šviesos šaltinio, poros monochromatorių ir detektoriaus, todėl šis metodas pats pigiausias. Jo veikimo principas pagrįstas tuo, jog fluorescencijos šviesa išeina iš bandinio šiek tiek (maždaug fluorescencijos gyvavimo trukme) vėliau nei bandinį apšviečia žadinanti šviesa. Todėl, jei apšviesime bandinį moduluota nuolatine šviesa (pvz., praleisime šviesą pro besisukantį diską su skylėmis), fluorescencijos šviesa bus moduluota tuo pačiu dažniu, tačiau turės fazės poslinkį (vėluos), palyginus su žadinančia šviesa (18 pav.), nes nuo fotono sugerties iki išspinduliavimo praeina tam tikras laiko tarpas. Jautriais elektroniniais



18 pav. Fazinė fluorimetrija: bandinys apšviečiamas greitai moduluota šviesa (juoda linija). Kadangi sužadinus bandinį, fluorescencija įvyksta ne iš karto, o po tam tikro laiko, fluorescencijos šviesa (pilka linija) taip pat yra moduluota, bet turi fazės poslinkį, palyginti su žadinančia šviesa. Iš šio poslinkio galima įvertinti fluorescencijos gyvavimo trukmę.

prietaisais, vadinamaisiais sinchroniniais stiprintuvais¹⁶, dviejų signalų fazės poslinkį galima registruoti labai tiksliai. Padarę prielaidą, kaip gęsta bandinio fluorescencija po sužadinimo (dažniausiai tariama, kad ji gęsta vieneksponentiškai), galime iš fazės poslinkio nustatyti fluorescencijos gyvavimo trukmę.

Kaip jau minėjome, šis metodas yra pats paprasčiausias ir dėl to pigiausias: jam nereikia impulsinių lazerių, netiesinių kristalų ir kitų brangių elementų. Jo tikslumas ir patikimumas daug mažesnis nei kitų metodų, nes tam, kad nustatytume fluorescencijos gyvavimo trukmę, privalome *postuluoti* jos gesimo dėsnį. Kiti metodai tą gesimą išmatuoja tiesiogiai, nedarydami jokių prielaidų apie tai, kaip fluorescencija gęsta. Tačiau, kadangi metodas pigus ir lengvai prieinamas, jis yra svarbus, kai reikia charakterizuoti daugelį junginių iš karto (tarkime, išmatuoti penkiasdešimties susintetintų skirtingų oligopeptidų arba oligonukleotidų fluorescencijos gyvavimo trukmes).

¹⁶ Angliškai lock-in amplifier.

3. Fluorescencijos spektroskopija su laiko skyra: biologiniai taikymai

Šiame skyriuje išnagrinėsime keletą biologinių laiko skyros fluorescencijos taikymų, kad pailiuotume, kokius gamtoje svarbius procesus leidžia tirti kinetinė fluorimetrija. Pateiksime eksperimentinių duomenų pavyzdžius ir aptarsime jų biofizikines interpretacijas. Aptarsime energijos pernašą bakterijų fotosintetinėse antenose, protono pernašos reakciją žaliajame fluorescuojančiame baltyme (GFP¹⁷) ir sužadintos būsenos gesimą bakteriodrodopsine.

3.1. Sužadinimo energijos pernaša bakterijų šviesą surenkančioje antenoje LH1

Fotosintezė – tai procesas, būdingas augalams, kai kurioms bakterijoms ir dumbliams, kurio metu fiksuojama beveik visa gyvųjų organizmų egzistavimui reikalinga energija. Jos metu šviesos kvantai sugeriami ir panaudojami krūvio atskyrimui pro biologinę membraną, o atskirtų krūvių energija vėliau panaudojama ATP ir NADPH sintezei, ir galiausiai - angliavandenių sintezei Calvinio cikle [8]. Energijos pernaša ir krūvio atskyrimas vyksta labai greitai: sugėrus šviesos kvantą, jo energija jau po kelių dešimčių pikosekundžių atsiduria reakciniame centre ir įvyksta pirminis krūvio atskyrimas, o bendras fotosintezės kvantinis našumas yra artimas vienetui [9].

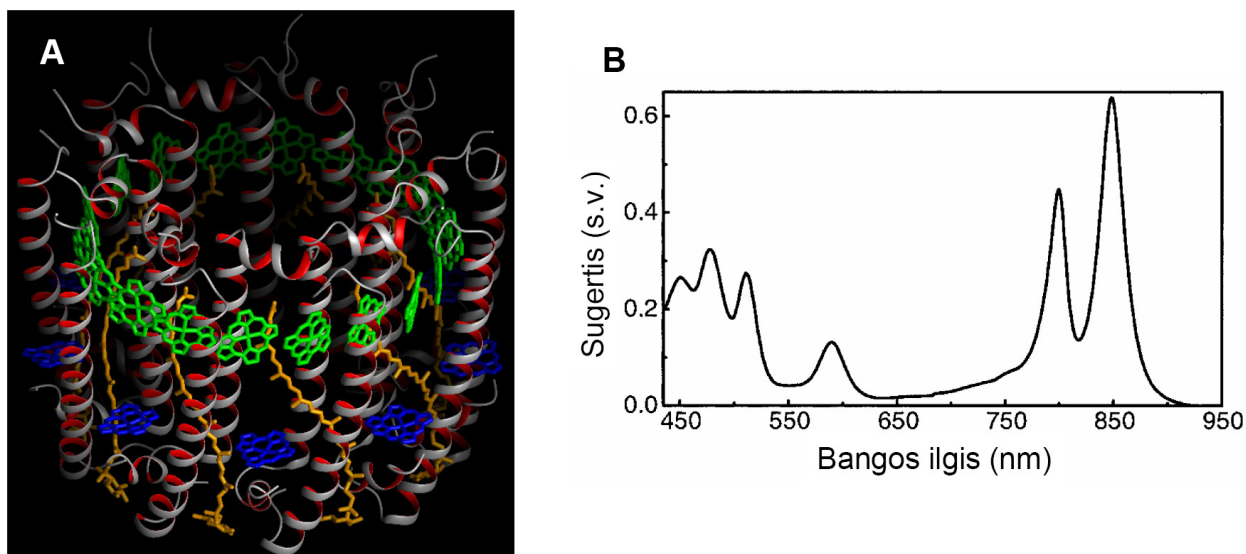
Fotosintetinių purpurinių bakterijų *Rhodobacter sphaeroides* ir *Rhodospseudomonas acidophila* aparatą sudaro dviejų tipų šviesą surenkančios antenos ir reakcinis centras. Šviesą surenkančios antenos – tai pigmentų ir baltymų kompleksai, kurių paskirtis – sugerti šviesą ir perduoti sužadinimo energiją reakciniam centrui, kuris ją panaudoja krūviams atskirti per ląstelės membraną. Vienos iš antenų, vadinamos LH2, trimatė erdvinė struktūra, nustatyta iš rentgeno kristalografijos duomenų [10], ir sugerties spektras parodytas 19 pav. LH2 sudaryta iš dviejų bakteriochlorofilo „komplektų“, ir vieno karodinoidų „komplekto“ išsidėsčiusių žiedu, sudarytų iš devynių identiškų sudedamųjų dalių, kurių kiekvienoje yra po tris bakteriochlorofilo ir vieną karotinoido molekulę. Tankiu žiedu išsidėsčiusių bakteriochlorofilų (žalia spalva 19A pav.) žemiausia sugerties juosta, atitinkanti vadinamąjį Q_y kvantinį šuolį, yra ties 850 nm (19B pav.), todėl šio žiedo bakteriochlorofilai vadinami B850. Retai išsidėsčiusio bakteriochlorofilų žiedo (mėlyna spalva 19A pav.) Q_y sugertis yra ties 800 nm, todėl šie bakteriochlorofilai vadinami B800. Visų bakteriochlorofilų Q_x juostos sugertis yra maždaug ties 590 nm (19B pav.). Karotinoidai (pailgi oranžine spalva parodyti pigmentai) sugeria matomoje spektro srityje, nuo 400-550 nm (žr. 19B

¹⁷ Angl. Green Fluorescent Protein.

pav.). Šie pigmentai padeda bakterijai panaudoti tų bangos ilgių šviesą, kurios nesugeria bakteriochlorofilai. Kinetinės fluorescencijos eksperimentai, kuriuos atliko R.Jimenez su bendraautoriais [11], padėjo išsiaiškinti, kaip vyksta energijos pernaša tiek tarp skirtingų, tiek tarp vienodą sugerties maksimumą turinčių bakteriochlorofilo pigmentų.

Pernašą iš B800 į B850 pigmentų grupę „pačiupinėti“ galima tiesiog žadinant B800 pigmentus 800 nm bangos ilgio šviesa ir registruojant fluorescenciją ties 900 nm. Kadangi pradžioje energija bus ant B800 bakteriochlorofilų, o tik vėliau bus pernešta į B850, fluorescencijos intensyvumas ties 900 nm, kur fluorescuoja tik B850 bakteriochlorofilai, pradžioje turētu būti žemas, o kai energija bus perduota šiems pigmentams, jis išaugs. Šio eksperimento rezultatai parodyti 20A pav. Kaip ir tikėjomės, sužadinus B800 pigmentus, pradiniu laiko momentu $t=0$ ties 900 nm fluorescencijos neregistruojame, bet maždaug per 650 fs ji užauga ir pasiekia maksimalią vertę. Taigi, šiuo kinetinės fluorimetrijos eksperimentu buvo nustatytas energijos pernašos greitis iš B800 į B850 bakteriochlorofilų žiedą.

B800 → B850 energijos pernašos greitį kinetinės fluorescencijos eksperimentu išmatuoti nesunku (jei nepaisysime visų problemų iškylančių konstruojant eksperimento schemą, apie kurias moksliniai straipsniai paprastai nutyli). Tačiau kaip pamatyti pernašą tarp atskirų pigmentų B850 žiede? Juk čia visų pigmentų energijos yra vienodos – atitinka 850 nm fono energiją – ir spektre



19 pav. Trimatė bakterijos *Rhodospseudomonas acidophila* šviesą surenkančio komplekso LH2 struktūra (A) [10] ir sugerties spektras (B) [12]. Karotinoidų molekulės, pavaizduotos oranžine spalva, sugeria ties 450-550 nm, mėlynai pavaizduoti bakteriochlorofilai (B800) – ties 800 nm, o žaliai pavaizduoti bakteriochlorofilai – ties 850 nm. Baltymas parodytas spiralėmis.

pernašos proceso atskirti negalime. R.Jimenez su bendraautorais šią problemą išsprendė registruodami fluorescencijos depoliarizaciją, t.y. žadindami B850 bakteriochlorofilus ir registruodami fluorescencijos signalą, poliarizuotą lygiagrečiai ir statmenai žadinančios šviesos poliarizacijai. Kaip jau buvo aptarta 4.14 skyriuje, jei fluorescencija registruojama iš tos pačios būsenos kuri buvo sužadinta, ir molekulė nesisuka, atsitiktinai orientuotų pigmentų ansamblyje fluorescencijos anizotropija, apibrėžta pagal formulę

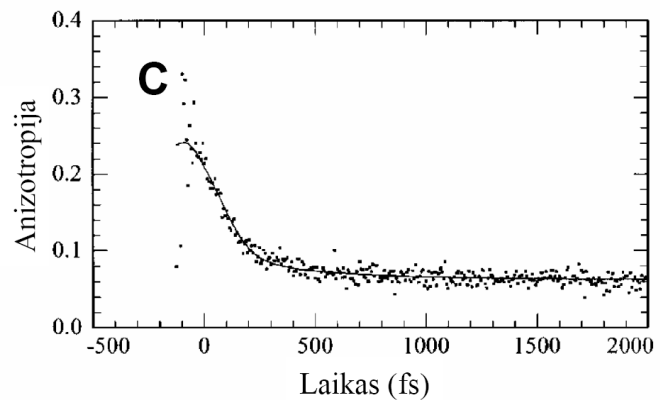
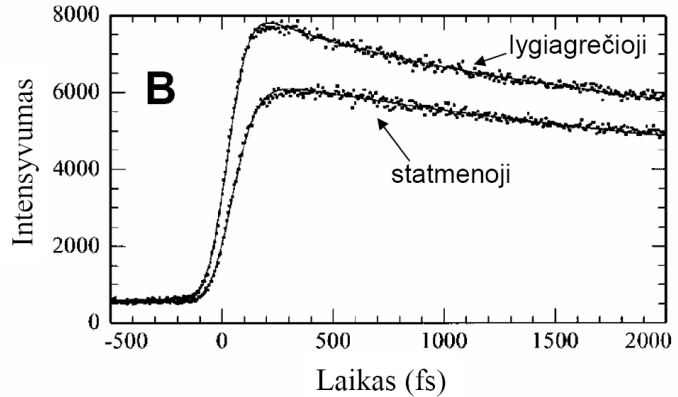
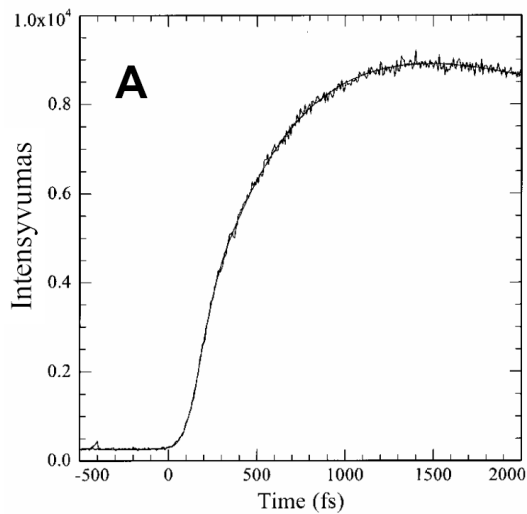
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (24),$$

bus lygi 0.4. Kinetinės fluorescencijos eksperimento kontekste tai reiškia, kad pradiniu laiko momentu po sužadinimo fluorescencijos anizotropija *visada* bus lygi 0.4, nes pradžioje *visada* spinduliuos tas pats pigmentas, kurį sužadinome. Laikui bėgant dėl įvairių priežasčių fluorescencija gali depoliarizuotis (t.y. spinduliuojančių dipolių kryptis gali pasikeisti). Šios priežastys gali būti įvairios:

- rotacinė molekulių difuzija,
- molekulės persitvarkymas (fotoreakcija) sužadintoje būsenoje,
- bespindulinė relaksacija į kitą molekulės būseną su kitaip orientuotu dipoliniu momentu,
- energijos pernaša,
- kt.

Mums svarbi depoliarizacija dėl energijos pernašos, nes būtent šį fotosintezės procesą norime stebėti kinetinės fluorescencijos eksperimente. Aišku, kad jei sužadinimas peršoko nuo vieno pigmento ant kito, kurio orientacija (t.y. ir šuolio dipolinio momento kryptis) skiriasi nuo pirmojo, fluorescencija depoliarizuosis, nors fluorescencijos bangos ilgis gali ir nepasikeisti. Fluorescencijos depoliarizacija išmatuota LH2 B850 žiede parodyta 20B, C pav. B paveikslėlyje parodytas fluorescencijos signalas, žadinant LH2 ties 850 nm ir registruojant jos lygiagrečiąją¹⁸ (viršutinę kreivę) ir statmenąją (apatinę kreivę) komponentes ties 940 nm. Pastebėkime, kad nė vienoje iš šių fluorescencijos kreivų labai greitos (~100 fs) dinamikos nesimato. Tačiau iš jų suskaičiuotos anizotropijos vertės laikui bėgant kinta visai kitaip; šis kitimas parodytas 20C pav. Matome, kad B850 fluorescencija depoliarizuojasi

¹⁸ Lygiagretumas nustatomas žadinančio pluošto poliarizacijos atžvilgiu.



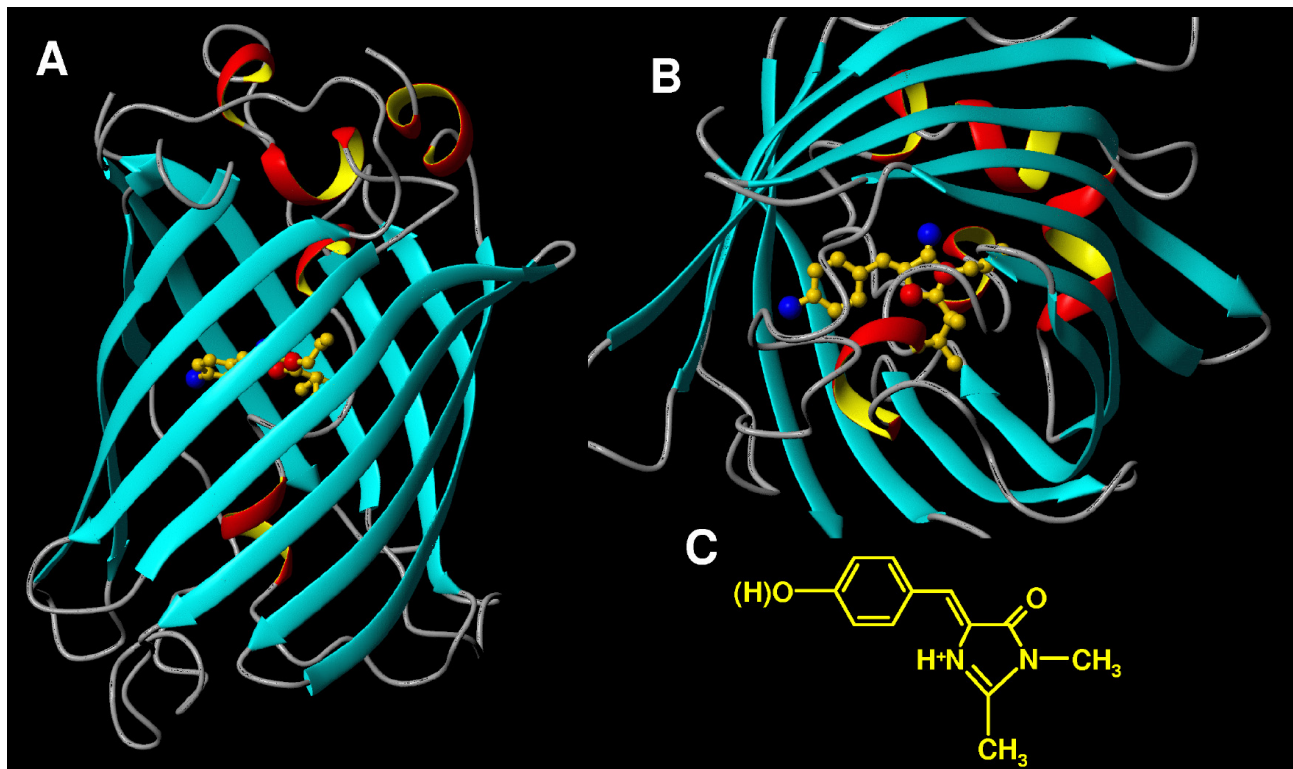
20 pav. Fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimentai purpurinių bakterijų šviesą surenkančioje antenoje LH2. A: Fluorescencijos kinetika ties 940 nm, sužadinus 800 nm sugerties juostą. B: poliarizuotos fluorescencijos eksperimentas, žadinant B850 bakteriochlorofilus. Viršutinė kreivė rodo signalą, registruojama su poliarizacija, lygiagrečia žadinančio signalo poliarizacijai, o apatinė – signalą, kurio poliarizacija statmena žadinančiojo signalo. C: fluorescencijos anizotropijos kinetika, suskaičiuota iš B paveikslėlyje pateiktų duomenų pagal (4.14.5) formulę. Paimta iš [11].

žaibiškai: instrumento atsakas (šiam eksperimente 160 fs) yra per lėtas, kad pamatytume pradinę 0.4 vertę, o per maždaug 200 fs jau nusistovi galutinė poliarizacijos vertė, lygi maždaug 0.06. Tai rodo, kad energijos pernaša B850 žiede yra labai greita. Atlikę modeliavimą, kuris atsižvelgia į B850 bakteriochlorofilų tarpusavio orientacijas, R.Jimenez su bendraautoriais [11] įvertino, kad energijos pernaša tarp poros B850 bakteriochlorofilų trunka maždaug 100 fs. Kaip matyti iš galutinės anizotropijos vertės 20C pav., fluorescencija ir po daugelio energijos pernašos aktų išlieka šiek tiek poliarizuota, nes viename LH2 B850 žiede tėra tik 18 bakteriochlorofilų, kurių tarpusavio orientacijoms būdinga gana griežta cilindrinė simetrija (žr. 19A pav.), todėl visiškos depoliarizacijos nestebime. Tai galime interpretuoti kaip faktą, kad sužadavimo energijai migruojant B850 žiede, ji gali ir *grįžti* į pigmentą, kurį sužadino pradžioje, o tada to pigmento sukurtas signalas vėl bus poliarizuotas.

Matome, kad poliarizuoti fluorescencijos matavimai leido gauti atsakymą į klausimą, į kurią negali atsakyti izotropiniai eksperimentai: jie leidžia pamatyti energijos pernašą tarp izoenergetinių, t.y. vienodos energijos pigmentų.

3.2. Protono pernaša žaliajame fluorescuojančiame baltyme

Kai kurie jūrų organizmai, tokie kaip planktonas, žuvis ir medūzos kartais spinduliuoja šviesą, kuri susidaro jų metabolizmo cheminių reakcijų metu. Vienas iš tokių organizmų yra medūza *Aequoria victoria*. Kodėl ši medūza liuminescuoja, nežinoma; tiesą sakant, jei jos niekas neliečia, ji šviečia gana retai, tačiau švytėjimą iššaukti nesunku, išoriškai dirginant šiuos gyvūnus. Žinoma, kad švytėjimas atsiranda chemiškai aktyviame baltyme, vadinamame aekvorinu, kuris skleidžia mėlyną šviesą (spektro maksimumas apie 469 nm [13]). Tačiau dirginant medūzą, ji šviečia žaliai (508 nm). Šį skirtumą sąlygoja dar vienas baltymas, vadinamas žaliai fluorescuojančiu baltymu (GFP¹⁹), kuriam aekvorinas perduoda energiją, ir kuris išspinduliuoja žalius fotonus. Šis baltymas unikalus



21 pav. Erdvinės GFP struktūros vaizdas „iš šono“ (A) ir „iš viršaus“ (B). Beta klostės pavaizduotos žaliomis juostomis, o chromoforas parodytas kaip rutuliukų ir strypelių struktūra. C: GFP chromoforo, susintetinto atskirai nuo baltymo, cheminė struktūrinė formulė.

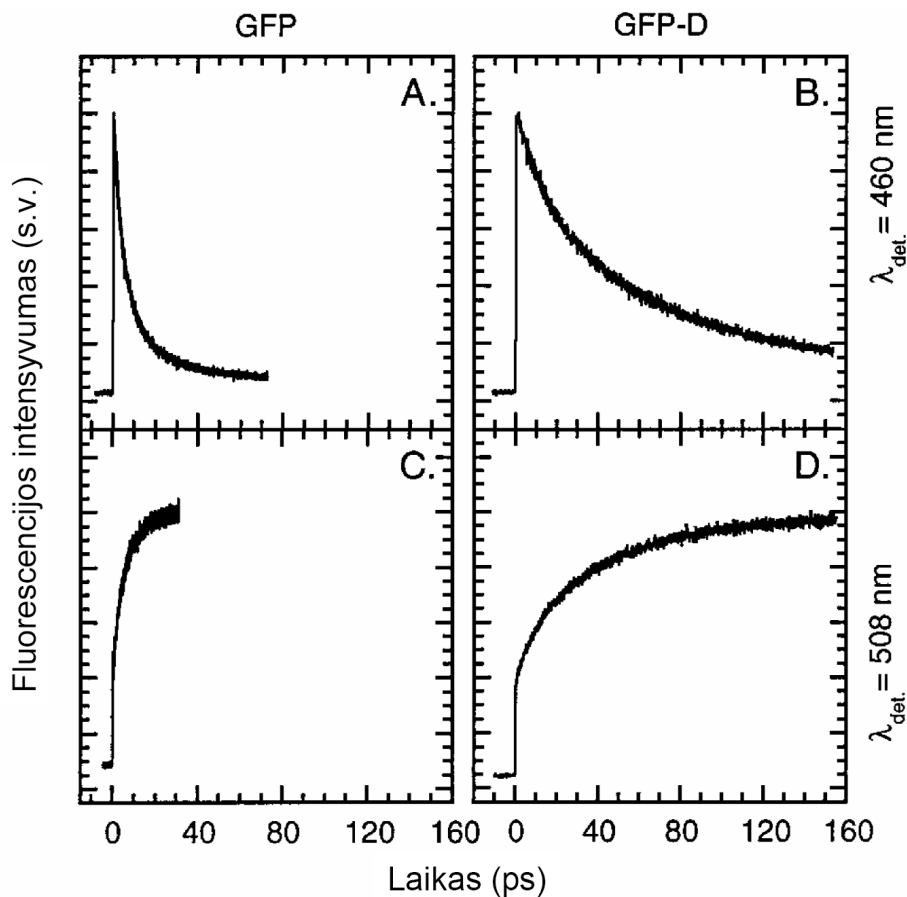
¹⁹ Angliškai Green Fluorescent Protein.

tuo, kad yra optiškai aktyvus matomoje spektro srityje visiškai neturėdamas prostetinių grupių (tokių, kaip fotosintezėje dalyvaujantys pigmentai – chlorofilai ir karotinoidai). GFP fluoroforas susiformuoja autokatalitiškai iš pirminės jo amino rūgščių sekos [14]. Ši GFP savybė yra neįkainojama molekulinėje biologijoje: biochemikai išmoko ją klonuoti ir privertė bakterijas sintetinti šį baltymą [15]. Genetinėmis manipuliacijomis galima „privirinti“ šį baltymą prie kito kokio nors mus dominančio baltymo, o tada pastarojo judėjimą ir pasiskirstymą organizme galime stebėti pagal žalią fluorescenciją²⁰. Taigi, GFP naudojamas kaip nenuodingas ir visiškai biologiškas fluorescencinis žymeklis, kurio savybes biochemikai išmoko tiksliai valdyti [13]. Svarbu suprasti ir biofizikinius šio baltymo fluorescencijos mechanizmus, nes jie atveria kelią sintetinti jo analogus su molekulinės biologijos tyrimams reikalingomis savybėmis.

GFP yra vandenyje tirpus baltymas, kurio trimatę erdvinę struktūrą 1996 nustatė Ormo su bendraautoriais [16]. Baltymo globulę sudaro beta klosčių „statinaitė“ (21A, B pav.), kuri supa ir saugo nuo aplinkos autokatalitiškai susiformavusį chromoforą (21C pav.). Chromoforą sudaro benzolo žiedas, kurio OH grupė baltyme yra prisijungusi protoną, ir imidazolo žiedas su dviem azoto atomais. Konjuguotų jungčių sistema, atsakinga už pigmento sugertį matomoje spektro srityje, jungia abu žiedus. GFP sugeria violetinę šviesą (apie 400 nm), tačiau fluorescuoja žaliojoje spektro srityje (apie 508 nm). Ilgai buvo neaišku, iš kur atsiranda toks didelis stoksos poslinkis, kol M. Chatteraj su bendraautoriais atliko fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimentą, pagaliau leidusi išsiaiškinti žalios GFP fluorescencijos prigimtį [17].

Pagrindinis šio tyrimo rezultatas pateiktas 22 pav. Eksperimente fluorescencijos dažnio sumavimo būdu buvo matuojama laiko skyros fluorescencija ties 460 nm ir 508 nm. Ištirti du bandiniai: vienas „įprastinis“ GFP, kitas – GFP, ištirpintas buferiniame tirpale, kurio pagrindą vietoje vandens sudarė D₂O. Tokiomis sąlygomis GFP chromoforo benzolo grupės protonas pakeičiamas deuteriu (t.y. „pasunkėja“ du kartus). Matome, kad fluorescencija ties 460 nm abiejuose bandiniuose atsiranda iš karto po sužadavimo (22A,B pav.), t.y. ji vyksta iš tos pačios būsenos, į kurią GFP chromoforą sužadina fotonas. Tuo tarpu pradiniu laiko momentu $t=0$ nei deuteruotame, nei paprastame bandinyje fluorescencijos ties 508 nm nestebime (22B,D pav.). Praėjus maždaug 20 ps paprastame GFP ir 100 ps deuteruotame GFP, pradžioje stebėta fluorescencija ties 460 nm užgęsta, ir užauga intensyvumas ties 508 nm (t.y. ten, kur GFP nuostovusis fluorescencijos spektras

²⁰ Pvz., genetiškai „prisiuvus“ GFP geną prie pelių epitelio ląstelių buvo gautos žaliai fluorescuojančios pelės



22 pav. Fluorescencijos dažnio sumavimo signalai GFP: A, C fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko „normaliame“ GFP. A paveikslėlyje parodyta fluorescencija užregistruota ties 460 nm, C paveikslėlyje – ties 508 nm. B, D – tokie patys eksperimentai, kaip A ir C, atlikti su GFP, ištirpintu D₂O, kuriame benzolo žiedo OH grupės protonas pakeistas deuteriu. Paimta iš [17].

turi maksimumą). Čia ypač svarbūs yra eksperimentiniai faktai, jog ši fluorescencija yra daug intensyvesnė, nei stebima ties 460 nm, ir kad jos atsiradimo greitis priklauso nuo to, ar GFP chromofore ant benzolo žiedo yra protonas, ar deuteris. Tai leido M. Chatteraj ir bendraautoriams padaryti dvigubą išvadą: a) stebima žalia GFP fluorescencija vyksta iš kitos būsenos, negu ta, į kurią GFP sužadina fotonas; b) ši žaliai fluorescuojanti būsena susiformuoja iš sužadintos GFP būsenos pernešant protoną (nes kitaip jos susiformavimo greitis nepriklausytų nuo to, ar GFP yra H₂O, ar D₂O buferiniame tirpale).

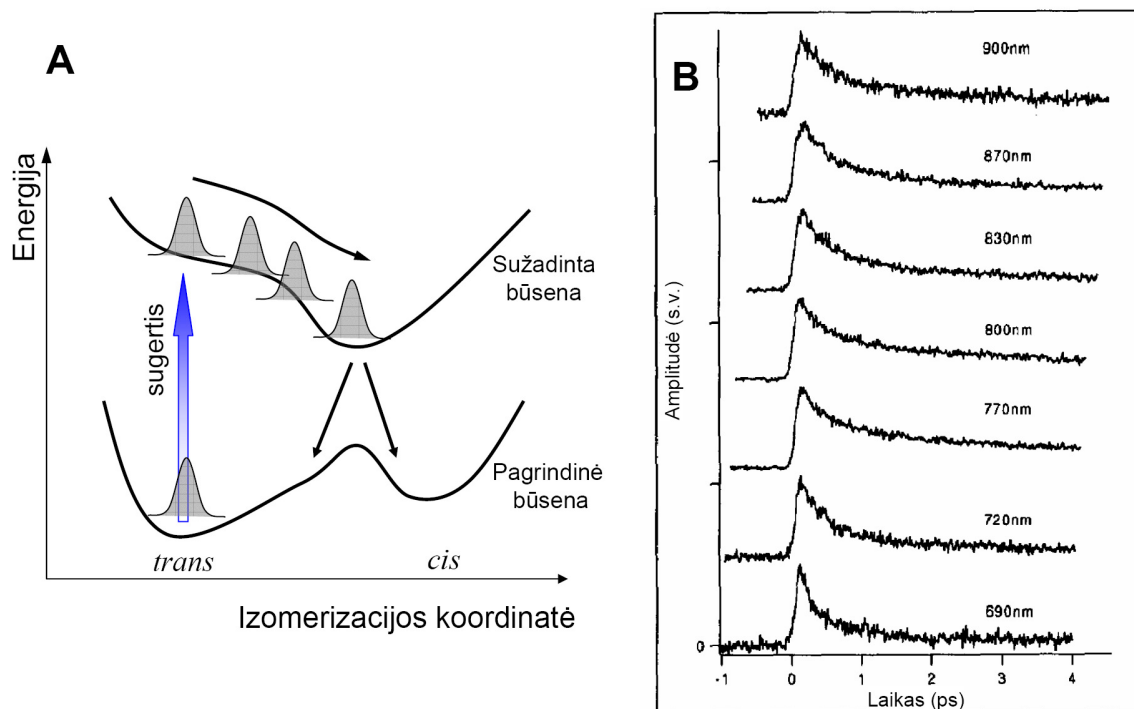
Ši svarbi išvalga, prie kurios atvedė laiko skyros fluorescencijos eksperimentas, leido geriau suprasti žalio GFP švytėjimo mechanizmą. Be to, eksperimentatoriai gavo įdomų žaisliuką: molekulę, kurią, panaudojant šviesą, galima priversti atiduoti protoną. Protono pernašos charakteringas laikas, išmatuotas eksperimente, yra apie 8 ps (su tokia laiko konstanta užgęsta fluorescencija ties 460 nm 22A pav.) ir atsiranda ties 508 nm (22C pav.). Chemijoje tokių molekulių

žinoma daug (jos vadinamos fotorūgštimis), bet šiame darbe pirmą kartą buvo parodyta, kad šis procesas svarbus ir biologijoje.

3.3. Pirminis fotoindukuotas vyksmas bakteriorodopsine

Bakteriorodopsinas – tai fotosintetinių druską mėgstančių (halofilinių) bakterijų baltymas, kurio funkcija – panaudoti šviesos energiją protonų transportui per ląstelės membraną. Jo funkcijos išsamiai aptariamos fotosintezės kurse, čia apsiribosime tik pastabomis, kurių būtinai reikia eksperimento rezultatų supratimui.

Šviesą bakteriorodopsine sugeria retinalis – pailga į karotiną panaši molekulė, prisitvirtinusi prie baltymo per Schiffo bazę. Pirminis fotoindukuotas įvykis, kuris galų gale atveda prie protono pernašos per membraną yra šio pigmento *trans-cis* izomerizacija. Retinalio molekulės žemiausia sužadinta būseną yra π^* tipo [19], t.y., jos orbitalė yra ardanti, ir molekulė, skirtingai nei pagrindinėje būsenoje, gali sukurti aplink konjuguotą jungtį. Jai sukantis, sužadintos būsenos energija mažėja, o pagrindinės – didėja, kol energijų tarpas tarp šių būsenų pasidaro pakankamai mažas, jog



23 pav. A: Retinalio izomerizacijos bakteriorodopsine energetinė schema (modelis). Sužadintos būsenos energijos minimumas atitinka *cis* molekulės konfigūraciją. Molekulei judant link šios konfigūracijos sužadintoje būsenoje, energijų tarpas tarp būsenų mažėja ir kažkuriuo momentu dėl šiluminių virpesių įvyksta molekulės relaksacija į pagrindinę būseną. B: Fluorescencijos gesimo kinetika ties įvairiais bangos ilgiais bakteriorodopsine. Paimta iš [18].

įvyktų nespindulinė relaksacija į pagrindinę būseną (23A pav.). Jei konfigūracija tuo metu jau yra arčiau *trans* būsenos, vėl grįžti į *cis* būseną molekulė nebegali dėl atsiradusio energijos barjero pagrindinėje būsenoje. Vėliau izomerizuoto retinalio jungtyse sukaupta energija panaudojama protono pernašai per ląstelės membraną.

Ilgą laiką eksperimentatoriai negalėjo nustatyti, koku greičiu šis procesas vyksta: kinetinės fluorescencijos eksperimentų laiko skyra buvo nepakankama ir bakteriorodopsinas vis „aplenkdavo“ lazerius. Kiekvieno eksperimento metu buvo daroma išvada, kad izomerizacija yra panaši arba greitesnė, nei eksperimento laiko skyra. Tik 1993, atsiradus pirmiesiems parduodamiems femtosekundiniams Ti:Safyro lazeriams M.Du ir G.Flemingui pavyko išmatuoti, koku greičiu išnyksta bakteriorodopsino sužadinta būseną. Jų išmatuotos fluorescencijos dažnio sumavimo kinetikos pavaizduotos 23B pav. Matome, kad fluorescencija atsiranda iškart po retinalio sužadinimo ir nyksta tiesiog žaibiškai: didžioji jos dalis prarandama dar per pirmąją pikosekundę. Taigi, veikusiai tokiu greičiu ir izomerizuojasi retinalio molekulė. Taip pat iš 23B pav. matyti, kad fluorescencija gęsta ne vienaeksponentiškai: šiek tiek jos lieka ir po 4 ps (žr., pvz., 23B pav. pavaizduotą kinetiką ties 800 nm), ir dar vėliau. Tai rodo, kad izomerizacijos dinamika baltyme yra sudėtinga – jai suprasti reikalingas modelis, kuris aprašytų tokį nevienalytį fluorescencijos elgesį.

Įdomu pastebėti, kad jei retinalis ištirpinamas organiniame tirpiklyje, jo izomerizacija tampa daug lėtesnė, nei bakteriorodopsine [20]. Tai rodo, kad evoliucijos eigoje bakteriorodopsino baltymas susiformavo taip, kad sudarytų optimalias sąlygas retinaliui izomerizuotis ir kuo efektyviau panaudotų sugerto fotono energiją.

4. Žadinimo-zondavimo spektroskopija: kinetinis sugerties matavimas

4.1. Žadinimo-zondavimo eksperimento technika

Iki šiol aptarti kinetinės spektroskopijos eksperimentai registravo fluorescenciją, arba savaiminių molekulių, esančių sužadintose būsenose, švytėjimą. Šiame skyriuje aptarsime kitą plačiai naudojamą kinetinės spektroskopijos metodiką, pagrįstą sugerties matavimu. Tai vadinamoji žadinimo-zondavimo (PP²¹) spektroskopija.

Žadinimo-zondavimo spektroskopijos idėja yra paprasta: bandinys (biologinė molekulė) sužadinama vienu trumpu lazerio impulsu, o kitas impulsas, atėjęs po tam tikro laiko tarpo nuo pirmojo, matuoja, kaip dėl pirmojo impulso pasikeitė bandinio sugertis. Keičiant antrojo impulso vėlinimą, palyginus su pirmuoju, gaunama sugerties spektro laikinė dinamika. Vėlinimui keisti, kaip ir autokoreliatoriuje (11B pav.) arba fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimente (15 pav.), naudojamas retroreflektorius įtaisytas ant motorizuoto poslinkio staliuko Taigi, PP spektroskopijoje naudojami du lazerio impulsai: žadinantis ir zonduojantis. Aišku, kad žadinantis impulsas turi būti daug stipresnis už matuojantįjį, nes juo mes siekiame sukelti pokyčius molekulėje, ją sužadinti, o antruoju tik bandome tuos pokyčius apžiūrėti. Geriausia būtų, jei zonduojantis impulsas sistemos visai nepaveiktų. PP spektroskopija už laiko skyros fluorescencijos metodus pranašesnė tuo, kad matuoja sugerties pokyčius, kuriuos lemia pakitimai tiek molekulės sužadintose būsenose, tiek pagrindinėje būsenoje. Tuo tarpu fluorescencija visada susijusi su kvantiniais šuoliais iš sužadintos į pagrindinę būseną, todėl fluorescencijos spektroskopija jautri būtent sužadintų būsenų dinamikai. Iš kitos pusės, skirtuminės sugerties spektrai yra sudėtingesni ir sunkiau interpretuojami už laiko skyros fluorescencijos spektrus. Todėl laiko skyros fluorescencijos ir žadinimo-zondavimo metodikos dažnai taikomos kartu, siekiant gauti kuo išsamesnę informaciją apie tiriamas sistemas.

Taigi, žadinimo-zondavimo eksperimente vienas po kito į tą pačią bandinio vietą ateina du femtosekundiniai impulsai – žadinantis ir zonduojantis. Už bandinio registruojamas zonduojančiojo spindulio intensyvumas. Pagal šviesos sugerties dėsnį (Bugerio-Lamberto-Bero), išreiškiamą formule, zonduojančios šviesos intensyvumas už sužadinto bandinio

$$I_{suž} = I_0 \cdot 10^{-A_{suž}} \quad (25).$$

²¹ Angl pump-probe.

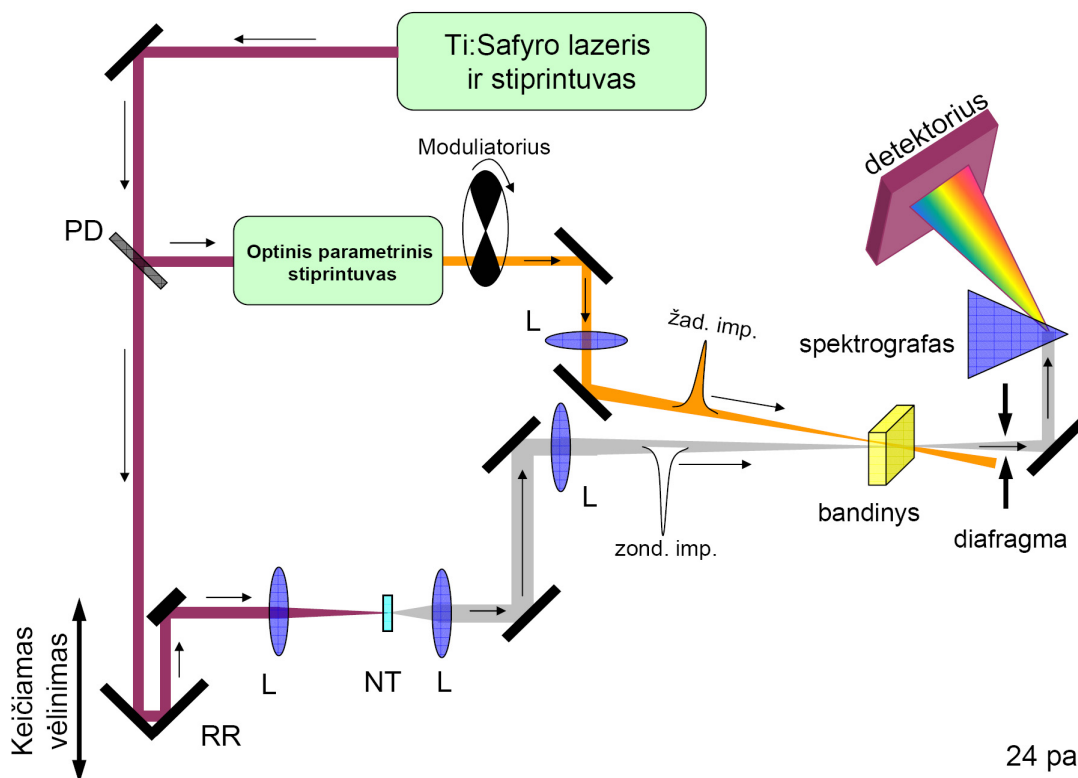
Čia I_0 – kritusio pluošto intensyvumas, o $A_{suž}$ – sužadinto bandinio sugertis. Analogiškai, už nesužadinto bandinio

$$I_{nesuž} = I_0 \cdot 10^{-A_{nesuž}} \quad (26).$$

Padalinę (26) iš (25) ir paėmę abiejų lygybės pusių logaritmą, gauname, kad

$$\Delta A \equiv A_{suž} - A_{nesuž} = \lg \frac{I_{nesuž}}{I_{suž}} \quad (27)$$

T.y., norint sužinoti žadinančio impulso sukeltą sugerties pokytį bandinyje, mums nebūtina matuoti



24 pav.

24 pav. Skirtuminės laiko skyros sugerties eksperimento schema: du impulsai – žadinantis ir zonduojantis apšviečia bandinį, o zonduojančio spindulio intensyvumas registruojamas detektoriumi. B: Tipinė eksperimentinio stendo išdėstymo schema: sustiprinti Ti:Safyro lazerio impulsai pluošto daliklio (PD) padalijami į dvi dalis. Viena dalis kaupina optinį parametrinį stiprintuvą, kuris generuoja derinamo bangos ilgio impulsus žadinimui. Kita dalis užlaikoma mechaniškai valdomoje užlaikymo linijoje (ją sudaro motorizuotas poslinkio staliukas su pritvirtintu retroreflektoriu²² RR) ir sufokusuojama į netiesinę terpę (NT), kur generuojamas baltos šviesos kontinuumas (žr. 1.1.5 skyrelį). Ši šviesa susikerta su žadinančiu spinduliu bandinyje. Erdvinis moduliatorius periodiškai uždaro žadinantį impulsą, kad galima būtų išmatuoti bandinio sugerties skirtumą su juo ir be jo.

²² Retroreflektorius – tai sudėtinis veidrodys, sudarytas iš trijų veidrodžių, kurių visų plokštumos susikerta stačiais kampais. Į tokių veidrodį pataikęs spindulys atsispindi *tiksliai lygiagrečiai* įeinančiam spinduliui. Todėl judinant poslinkio staliuką keičiasi tik spindulio praeinamas kelias, bet ne kryptis.

zonduojančio pluošto intensyvumą prieš bandinį I_0 . Formule (27) išreikštas sugerties pokytis ir yra signalas, matuojamas skirtuminės sugerties spektroskopijoje. Praktikoje šis eksperimentas gali būti realizuojamas schema, panašia į pateiktą 24 pav. Ti:Safyro lazeris ir stiprintuvas generuoja femtosekundinius impulsus. Iš jų, panaudojant optinį parametrinį stiprintuvą arba harmonikų generaciją (žr. 1.1.5 šio skyriaus poskyrį), gaunami norimo bangos ilgio šviesos impulsai, kuriais sužadinamas bandinys. Šiuos impulsus periodiškai uždengia ir atidengia erdvinis modulatorius (pvz., besisukantis diskas su išpjautomis skylėmis), kad būtų galima išmatuoti tiek $I_{\text{nesuž}}$, tiek $I_{\text{suž}}$, įeinančius į (27) formulę. Zondavimui matomoje spektro srityje²³ dažniausiai naudojamas baltos šviesos kontinuumas, sugeneruotas netiesinėje terpėje – plonoje vandens kiuvetėje, safyro ar CaF_2 plokštelėje. Difrakcine gardele ar dispersine prizme iš kontinuumo išrenkamas norimas zondavimo bangos ilgis ir jo intensyvumas registruojamas fotodetektoriumi (arba, registruojamas visas spektras iš karto, išskleidžiant jį ant daugiakanalio detektoriaus). Pažymėtina, kad detektorius turi būti sinchronizuotas su modulatoriumi, kad galima būtų atskirai pamatuoti bandinio pralaidumą tiek esant, tiek nesant žadinimo impulsui. Taigi, skirtuminės sugerties spektrinė dimensija gaunama spektrografu arba monochromatoriumi, esančiu už bandinio, o laiko skyra – judinant mechaninę vėlinimo liniją. Išmatuotas signalas yra vėlinimo laiko (užlaikymo tarp žadinančio ir zonduojančio impulso) ir zondavimo bangos ilgio funkcija:

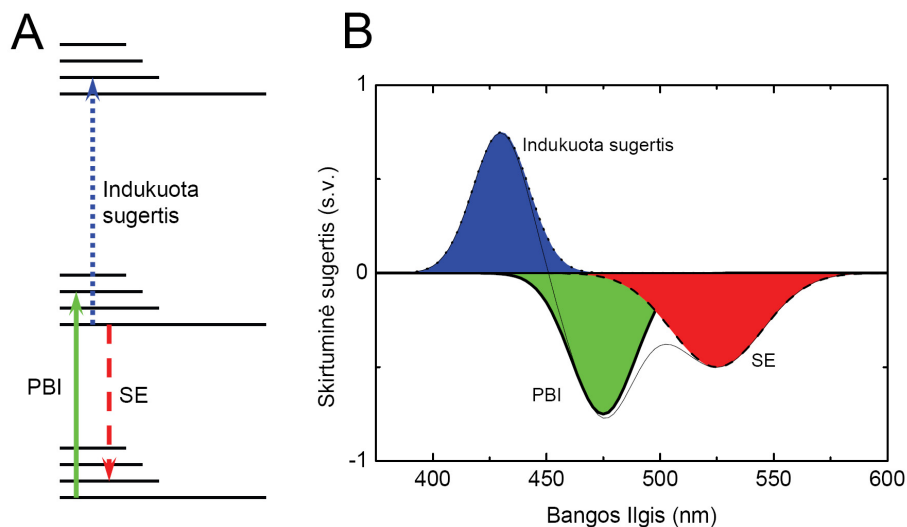
$$\Delta A = \Delta A(t, \lambda) \quad (28)$$

Toliau aptarsime, kokie veiksniai suformuoja skirtuminės sugerties spektrą (28).

4.2. Skirtuminės sugerties spektras

Kaip jau minėjome, PP signalas yra sudėtingesnis už laiko skyros fluorescencijos signalą tuo, kad jį sudaro keletas skirtingų įnašų. Toliau ir aptarsime, kokie tie įnašai gali būti. Tuo tikslu panagrinėkime hipotetinės molekulės energijos lygmenų schemą, pavaizduotą 25A pav. Kai molekulės sužadina žadinantis impulsas, dalis jų pereina į sužadintą būseną (ištisinė rodyklė). Tuomet molekulių koncentracija pagrindinėje būsenoje sumažėja; vadinasi ties tuo bangos ilgiu, kur

²³ Jei zonduojame ultravioletinėje, matomoje ir artimojoje infraraudonojoje srityje, dirbame su elektroninėmis molekulių būsenomis, nes tokie bangos ilgiai atitinka kvantinius šuolius tarp elektroninių būsenų. Jei zonduojančio ir(arba) žadinančio impulso centrinis bangos ilgis būtų infraraudonojoje srityje (3-15 μm), turėtume *virpesinę* kinetinę spektroskopiją, nes tokios kvanto energijos atitinka šuolius tarp virpesinių molekulės būsenų. Čia visur kalbėsime apie elektroninę spektroskopiją.



25 pav. A: hipotetinės molekulės energijos lygmenys ir kai kurie kvantiniai šuoliai, lemiantys skirtuminės sugerties spektrą. B: atitinkamas skirtuminės sugerties spektras ir nurodytų kvantinių šuolių įnašai į jį.

sugeria molekulės, būdamos pagrindinėje būsenoje, sugertis dingsta. Todėl skirtuminės sugerties signalas (27) įgyja neigiamą vertę. Spektrinė šio neigiamo įnašo į ΔA forma yra tokia pat, kaip ir pagrindinės būsenos sugerties spektro, matuojamo spektrofotometru – juk būtent šios sugerties dabar trūksta. Ši signalo dalis, vadinama *pagrindinės būsenos išblyškimu*²⁴ (PBI), parodyta 25B pav. (žalias fonas). Laikui bėgant, šis įnašas į signalą išlieka tol, kol visos sužadintos molekulės sugrįžta į tą pačią pagrindinę būseną, iš kurios buvo sužadintos.

Kitas įnašas į PP signalą yra susijęs su priverstiniu spinduliavimu arba stimuliuota emisija²⁵. Jis atsiranda dėl to, kad atėjęs zondojuojantis impulsas randa dalį molekulių sužadintoje būsenoje, ir jo fotonai gali priversti šias molekules spinduliuoti (25A pav., raudona brūkšninė rodyklė). Šiuo reiškiniu yra pagrįstas lazerių veikimas. Molekulių išspinduliuoti fotonai bus lygiai tos pačios poliarizacijos, krypties ir bangos ilgio kaip zondojuojančio impulso fotonai, kurie „numetė“ molekules iš sužadintos į pagrindinę būseną. Šis signalas, kaip ir pagrindinės būsenos išblyškimas, duos neigiamą įnašą į skirtuminę sugertį. Kad taip bus, nesunku suprasti, pažiūrėjus į (27) formulę. Kai žadinantis impulsas uždengtas, į detektorių pakliūs visi zondojuojančio impulso fotonai (tai bus intensyvumas I_{np}); kai žadinantis impulsas atidengtas ir zondojuojantis impulsas randa dalį molekulių jau sužadintą, į detektorių pakliūs taip pat visi zondojuojančio impulso fotonai *plius fotonai, kuriuos*

²⁴ Angl. ground state bleaching

²⁵ Angl. stimulated emission

priverstiniu būdu išspinduliavo bandinio molekules. Taigi, turėsime, kad $I_p > I_{np}$ ir signalas ΔA (27) išraiškoje bus neigiamas. Einšteino teorijos apie spontanią ir priverstinę spinduliavimą bei sugertį ribose [21] stimuliuotos emisijos (SE) spektras yra susijęs su fluorescencijos (spontaninės emisijos) spektru F Einšteino sąryšiu (žr. t.p. 3.2.11 formulę):

$$F(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} SE(\nu) \quad (29).$$

Praktikoje tai reiškia, kad realių molekulių tirpaluose SE ir fluorescencijos spektrų forma yra labai panaši. Kaip ir fluorescencijos spektrui, molekulių SE spektrui būdingas stokso poslinkis į raudonųjų bangos ilgių pusę sugerties spektro atžvilgiu (25B pav., raudonai užtušuota kreivė). Jos fizikinė priežastis – molekules ir jos artimiausios aplinkos relaksacija sužadintoje būsenoje.

Trečiasis įnašas į PP signalą – tai indukuota sugertis (IS), atsirandanti dėl to, kad molekules, kurias žadinantis impulsas perkėlė į sužadintą būseną, gali iš zonduojančio impulso sugerti dar vieną fotoną ir pereiti į dar aukštesnę elektroninę būseną (taškinė mėlyna rodyklė 25A pav.). Šis procesas vyksti gali tik sužadintose molekulėse, dėl to, kai bandinys apšviečiamas žadinančiu impulsu, atsiranda *papildoma* sugertis, t.y. šis įnašas į ΔA signalą yra teigiamas (25A pav. mėlynai užtušuota kreivė). Pažymėkime, kad indukuotą sugertį gali sąlygoti ne tik singletinės sužadintos molekulių būsenos. Jei sužadinta molekulė dėl interkombinacinės konversijos perėjo į tripletinę būseną, atsiranda tripletinės būsenos sužadinta sugertis ($T_1 \rightarrow T_n$). Net jei molekulė grįžo į pagrindinę būseną, bet ši būseną skiriasi nuo tos, iš kurios ji buvo sužadinta (pavyzdžiui, sužadintoje būsenoje molekulė izomerzavosi ar prisijungė arba atidavė protoną), turėsime indukuotą naujos pagrindinės būsenos sugertį. Tokiu atveju skirtuminės sugerties signalas ΔA susidės iš pagrindinės būsenos išblyškimo (juk pradinės pagrindinės būsenos molekulių sumažėjo) ir naujosios pagrindinės būsenos indukuotos sugerties. Čia ir yra PP spektroskopijos pranašumas prieš laiko skyros fluorescencijos spektroskopiją: kai išnyksta sužadinta būseną, fluorescencijos signalas dingsta, o skirtuminės sugerties vis dar gali būti registruojamas ir suteikti informacijos apie tai, kas įvyko sužadintus molekulę.

4.3. Skirtuminės sugerties spektro dinamika

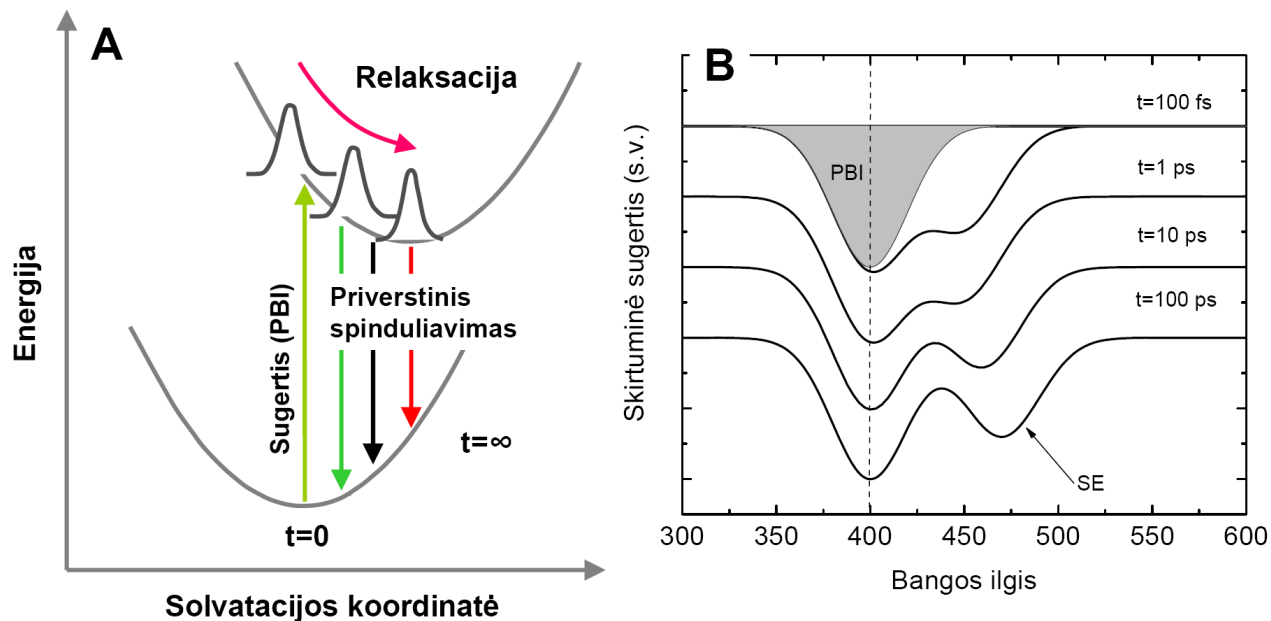
Iš pirmo žvilgsnio atrodo, kad skirtuminės sugerties spektrų ir kinetikų interpretacija gana paprasta: juk visų stebimų signalų (PBI, SE, IS) intensyvumas proporcingas sužadintų molekulių skaičiui, t.y. sužadintos būsenos užpildai. Iš tiesų, pačiu primityviausiu artėjimu taip ir bus. Tokiu atveju,

sužadinus molekulę, atsiras kažkoks jai būdingas skirtuminis spektras ir tolygiai užges su charakteringą trukme, lygia molekulės sužadintos būsenos gyvavimo trukmei, analogiškai kaip turėjome (20) formulėje. Tačiau molekulės, ypač kai jos yra ne vakuume, o kokioje nors aplinkoje (tirpale, baltyme, kietojo kūno matricoje) yra daug sudėtingesnės, jas sužadinus vyksta aibė procesų, kurie beveik visi vienaip ar kitaip įtakoja skirtuminį spektrą.

Paminėsime keletą iš jų:

1. **Vidinė konversija ir virpesinė relaksacija.** Molekulės, turi aibę elektroninių būsenų, kurių kiekviena turi dar ir savo virpesinius polygmenius. Sužadinus molekulę į aukštesnius virpesinius polygmenius (arba į aukštesnę elektroninę būseną), ji greitai relaksuoja į žemesnius lygmenis. Kadangi šio proceso metu mažėja sužadintos būsenos energija, šio proceso eigą galima stebėti žadinimo zondavimo spektroskopijoje: SE bangos ilgis tam tikru momentu priklauso nuo energijų tarpo tarp būsenos, *kurioje molekulė yra tuo momentu*, ir pagrindinės būsenos. Relaksaciją tarp elektroninių būsenų gali parodyti ir indukuota sugertis: jos bangos ilgis priklauso nuo energijų tarpo tarp būsenos, *kurioje molekulė yra tiriamu momentu*, ir aukštesnės būsenos. Todėl, jei sužadiname molekulę į S_2 elektroninę būseną, matysime indukuotą sugertį, atitinkančią $S_2 \rightarrow S_{n>2}$ kvantinius šuolius, o kai molekulė relaksuos į S_1 būseną, ši IS užges ir atsiras $S_1 \rightarrow S_{n>1}$ šuolių energijų tarpą atitinkanti sugertis. Be to, jei molekulių ansamblis pasiskirsto po skirtingas būsenas, SE ir IS spektrai dar ir išplinta. Todėl iš SE spektro kinetikos galima matyti, kaip vyksta molekulės energijos persiskirstymas.

2. **Solvatacija ir aplinkos relaksacija.** Pagrindinėje būsenoje molekulei būdingas tam tikras krūvio pasiskirstymas (t.y. branduolių ir elektronų konfigūracija). Aplinkos (tirpiklio, baltymo) molekulės prie jo prisitaiko taip, kad bendra sistemos molekulė-tirpiklis energija būtų kuo mažesnė. Sužadinus molekulę, akimirksniu pakinta jos elektronų konfigūracija, taigi, ir krūvio pasiskirstymas. Kadangi aplinkos molekulės tai „jaučia“, jos taip pat pakeičia savo elektronų konfigūracijas o vėliau ir dipolinių momentų (t.y. pačių molekulių) orientacijas. Elektroninių konfigūracijų pokytis vadinamas dielektrine relaksacija; jis yra labai greitas, greitesnis nei 10 fs. Aplinkos (tirpiklio) molekulių persiorientavimas vadinamas solvatacija, jis priklauso nuo tirpiklio molekulių judrumo ir dipolinio momento. Tipinės jo trukmės – kelios ir kelios dešimtys pikosekundžių. Taigi, molekulės sužadintos būsenos energija, vykstant solvatacijai mažėja (26A pav.). Kas vyksta su pagrindinės būsenos energija? Į šį klausimą nesunku atsakyti: kadangi dabar aplinkos molekulės yra prisitaikę prie *sužadintos būsenos*, jei staiga grąžintume molekulę į *pagrindinę* būseną, tokia aplinka jai



26 pav. A. Solvatacijos proceso energetinė schema: sužadinus aplinkoje esančią molekulę, aplinka persiorientuoja, prisitaikydama prie naujos molekulės elektroninės konfigūracijos. Dėl to molekulės sužadintos būsenos energija mažėja, o pagrindinės būsenos – auga. Tai lemia SE spektro, stebimo skirtuminės sugerties eksperimente, poslinkį į raudonųjų bangų pusę (B). Pagrindinės būsenos išblyškimo spektras lieka nepakitęs.

„nepatiktų“, t.y. pagrindinės būsenos energija tokioje aplinkoje būtų *didesnė* nei įprastoje pagrindinėje būsenoje. Taigi, vykstant solvatacijai, sužadintos būsenos energija mažėja, o pagrindinės – auga. Tiesiogiai energijų tarpą tarp šių būsenų matuoja stimuliuotos emisijos spektras. Kadangi aplinkai keičiant konfigūraciją energijų tarpas mažėja, vykstant solvatacijai SE spektro maksimumas slinksis į raudonųjų bangų pusę (26B pav.). Pažymėkime, kad PBI spektras dėl solvatacijos niekur nesislinks, o liks savo vietoje, nes jis rodo sugertį, kuri dinga, sužadinus molekules. Ta sugertis dingsta sužadavimo momentu ir atsistato tada, kai molekulė vėl sugrįžta į mažiausios energijos pagrindinę būseną.

3. **Konformacinis molekulės pakitimas.** Dar viena biologijoje svarbi reakcija – tai šviesos indukuotas molekulės sandaros pasikeitimas. Biologinis tokio proceso pavyzdys – bakteriorodopsine vykstanti retinalio fotoizomerizacija, nuo kurios prasideda halofilinių bakterijų fotosintezės procesas. Labai panašus konformacinis pokytis vyksta ir rodopsine – akies tinklainės baltyme, kuris atsakingas už gyvūnų regą. Konformacinių pakitimų būna įvairių, *trans-cis* izomerizacija yra tik vienas iš jų. Molekulės, kurios paveiktos šviesa, keičia savo erdvinę struktūrą yra labai įdomios dėl savo potencialių taikymų nanotechnologijose, optoelektronikoje ir pan. Panagrinėkime, kas turėtų vykti su skirtuminės sugerties spektru, kai molekulė izomerizuojasi, tarkime, pagal 23A pav.

pavaizduotą schemą. Aišku, kadangi molekulei izomerizuojantis, jos sužadintos ir pagrindinės būsenos energijos elgiasi panašiai, kaip ir vykstant solvatacijai (plg. 23A pav. ir 26 pav.), galime tikėtis SE spektrinės juostos slinkimosi į raudonųjų bangų pusę. Įvykus izomerizacijai ir molekulei sugrįžus į *kitą* pagrindinę būseną, SE užges - nebebus sužadintos būsenos, kuri galėtų spinduliuoti fotonus. Tačiau, kadangi pagrindinė būseną, į kurią sugrįžo molekulė, vis dar nesutampa su ta, iš kurios ji buvo sužadinta, galime tikėtis, jog PBI visiškai neišnyks, o be to, atsiras nauja indukuota sugertis ties bangos ilgiu, atitinkančiu energijų tarpą tarp naujosios pagrindinės ir ją atitinkančios sužadintos būsenos. Taigi, panaudodami PP spektroskopiją, galime stebėti ne tik izomerizacijos vyksmą, bet ir susiformavusio produkto sugertį.

4. **Tripletinės būsenos susiformavimas.** Panašiai kaip konformacinį pakitimą, galime įsivaizduoti ir kitokią molekulės fotoreakciją – pvz., tripletinės būsenos susiformavimą. Kadangi tripletai praktiškai nešviečia, įvykus interkombinacinei konversijai, galime tikėtis, kad molekulės SE signalas skirtuminės sugerties spektre išnyks, bet atsiras tripletinės būsenos indukuota sugertis (kvantinis šuolis iš T_1 į T_2 būseną). Taip pat spektre matysime PBI signalą, kol nerelaksuos susidariusi tripletinė būseną.

5. **Energijos pernaša.** Apie energijos pernašą jau kalbėjome. Ją galime stebėti tiek fluorescencijos, tiek PP spektroskopijos metodais. Aišku, kad kai donoro molekulė perduoda energiją akceptorius molekulei (ir grįžta į pagrindinę būseną), PP signale išnyksta skirtuminės sugerties spektras (PBI, SE, IS), būdingas donoro molekulei, ir atsiranda sužadinto akceptorius spektras. Taigi, PP metodika puikiai tinka energijos pernašai tarp molekulių stebėti su femtosekundine laiko skyra. Palyginti su laiko skyros fluorescencijos metodika, PP yra ne tik jautresnė (t.y. užtikrina geresnį signalo/triukšmo santykį), bet ir lankstesnė: donoro ir akceptorius koncentracijas galima stebėti ties įvairiais bangos ilgiais, pvz., ties donoro sužadintos būsenos sugerties ir akceptorius pagrindinės būsenos išblykimo bangos ilgiu. Todėl, tinkamai pasirinkus spektrines juostas, galima padidinti eksperimentų jautrumą ir selektyvumą.

6. **Protono arba elektrono pernaša.** Dar viena svarbi fotoindukuotų reakcijų klasė – tai šviesos sukeltos krūvio pernašos reakcijos. Jos svarbios tuo, kad krūvio atskyrimas leidžia paversti šviesos energiją į elektrinę energiją. Krūvio atskyrimo reakcijos sudaro fotosintezės proceso pagrindą, jos taip pat gali būti naudojamos saulės elementams ir šviesos jutikliams kurti. Dvi pagrindinės krūvio pernašos reakcijų klasės – tai protono ir elektrono pernaša. Protono pernaša vyksta molekulėse, vadinamose fotorūgštėmis ir fotobazėmis. Tai molekulės, turinčios protoną prisijungti galinčių (pvz.,

–OH) grupių, kurių pK_a keičiasi, sužadinus molekules. Galimos dvi protono pernašos rūšys: intramolekulinė, kai protonas atsiskiria nuo vienos molekulės grupės ir prisijungia prie kitos, ir protono disociacija, kai jis atiduodamas į aplinką, ir lieka molekulės anijonas. Elektronų pernaša vyksta tarp elektronų donoro (molekulė, kurią sužadiname) ir akceptorius molekulių, susidarant abiejų molekulių radikalams. Fizikinis krūvio pernašos mechanizmas visuomet yra toks pat: sužadintos būsenos molekulės energija yra mažesnė atidavus (prisijungus) protoną arba elektroną. Jei ši krūvininką „pagauna“ ir stabilizuoja aplinkos molekulės (tirpiklis ar akceptorius), užgesus sužadintai būsenai molekulė nebeturi iš kur jo paimti, todėl (bent jau kurį laiką) egzistuoja atskirų krūvių sistema: radikalas, jonas ar izomeras. Kadangi visų šių reakcijų metu keičiasi molekulių struktūra, o kai kuriais atvejais jos įgauna ir elektrinį krūvį, keičiasi ir jų sugerties spektras. Taikydami bendrą skirtuminės sugerties spektrų nagrinėjimo logiką, galime tikėtis, kad pradžioje (esant trumpoms vėlinimo trukmės) stebėsime sužadintos donoro būsenos spektrą (sužadintas būsenas lengviausia atpažinti pagal tik joms būdingą SE signalą), po kurio laiko jis užges ir matysime, kaip atsiranda naujos sugerties juostos, atitinkančios akceptorius radikalą. Pažymėkime, kad donoro PBI šiuo atveju taip pat neišnyks – juk lieka jo radikalas, o ne grįžtama į pradinę būseną. Todėl galima tikėtis, jog įvykus krūvio pernašai matysime a) donoro PBI; b) donoro radikalo (jono) IS; c) akceptorius PBI; akceptorius radikalo (jono) IS. Žinoma, gali būti ir taip, kad kai kurie iš šių signalų nepateks į eksperimento spektrinę sritį ir jų nestebėsime.

7. Fotojonizacija. Dar viena fotoreakcijų klasė, kurią galime stebėti PP eksperimente, – tai fotojonizacija. Jei sugerto šviesos kvanto energija viršija molekulės jonizacijos potencialą, nuo molekulės šviesos kvantas „nulups“ elektroną, kuris pateks į aplinką. Kadangi šis procesas yra momentinis, tokiu atveju sužadintos molekulės būsenos išvis nestebėsime, o iš karto po sužadinimo susiformuos radikalo skirtuminis spektras, susidedantis iš molekulės PBI ir radikalo IS. Jei molekulė yra aplinkoje (tirpiklyje), matysime ir solvatuoto (tirpiklio molekulių apsupto) elektronų indukuotos sugerties spektrą. Vandenyje ši IS juosta labai plati (apie 0.84 eV), jos maksimumas yra maždaug ties 720 nm [22]. Pažymėkime, kad ultrasparčiosios spektroskopijos eksperimente, kai impulsų viršūninė galia labai aukšta, fotojonizacija gali vykti ne tik dėl įprastinės vieno fotono sugerties, bet ir dėl *daugiafotonės sugerties*, kai molekulė iš karto sugeria du žadinančio impulso fotonus. Jei

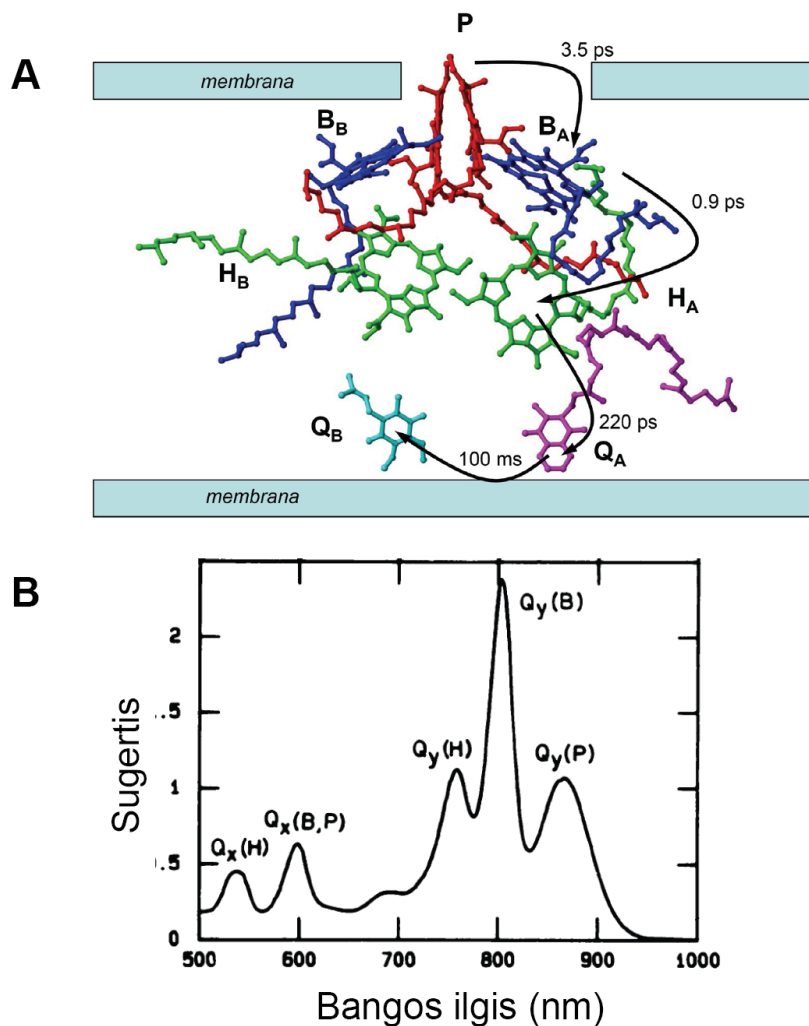
fotojonizacija vyksta būtent taip, žadinimo bangos ilgis gali būti ir didesnis už molekulės jonizacijos slenkstį, nes jonizacijai panaudojama dviejų fotonų energija²⁶.

²⁶ Atskirti, ar fotojonizacija vyksta dėl vienfotonės, ar dėl dvifotonės sugerties, galima išmatavus jos efektyvumo priklausomybę nuo žadinančio impulso intensyvumo. Vienfotonės sugerties atveju ši priklausomybė turi būti tiesinė, o dvifotonės – kvadratinė.

5. Skirtuminės sugerties taikymas biologinių procesų tyrimams: pavyzdžiai

5.1. Krūvio atskyrimas fotosintetiniame reakciniame centre

Fotosintetinė krūvio atskyrimo reakcija – tai viena iš svarbiausių šviesos sukeltų reakcijų, kurios pagalba iš Saulės atėjusi šviesos energija paverčiama į cheminę energiją (protonų gradientą). Pirminis krūvio atskyrimo vyksmas – tai elektrono pernaša per fotosintetinę membraną (bakterijų



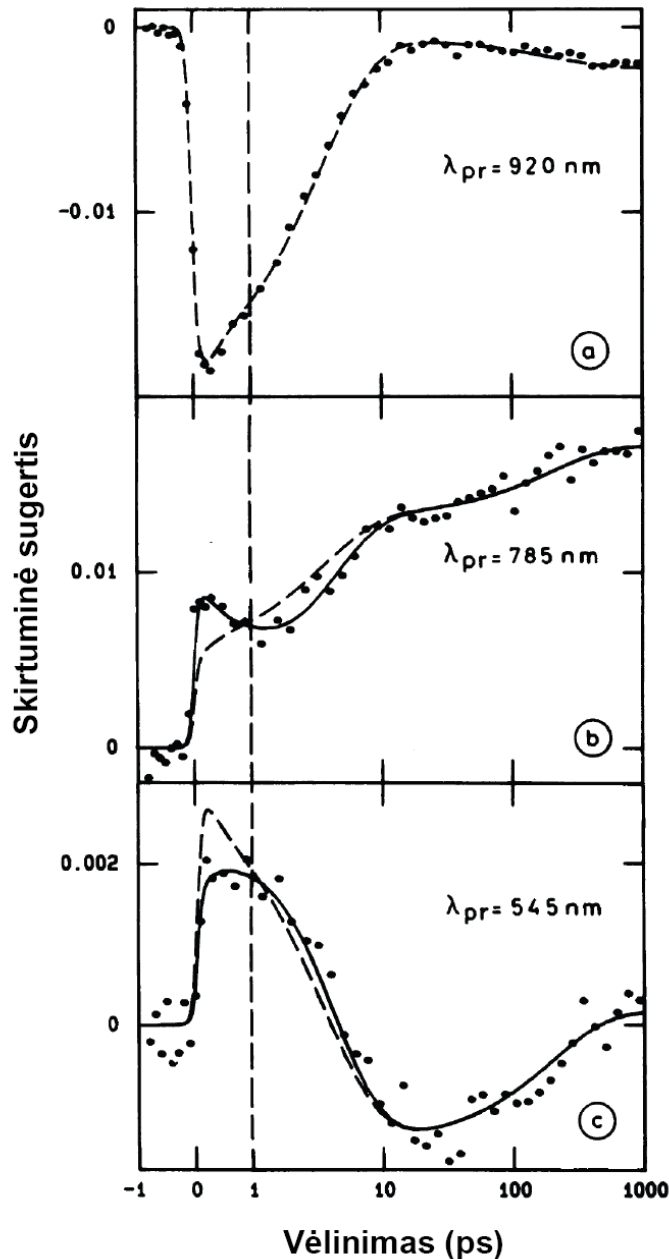
27 pav. A: Pigmentų išsidėstymas fotosintetinės bakterijos *Rhodospseudomonas viridis* reakciniame centre. Raudonai pažymėti bakteriochlorofilai, sudarantys vadinamąją specialiąją porą (P), mėlynai – pagalbiniai bakteriochlorofilai (B), žaliai – bakteriofeofitinai (H), avietinė ir melsvai žalia spalva parodyti chinonai (Q). Rodyklės rodo elektrono pernašos kelią ir atskirų jo etapų spartas kambario temperatūroje, kurias, panaudodamas PP spektroskopiją, išmatavo W.Zinth su bendraautoriais [23]. B: *Rhodobacter sphaeroides* fotosintetinio reakcinio centro sugerties spektras. Specialiosios poros P bakteriochlorofilų žemiausia elektroninė būseną (žymima Q_y) sugeria ties 870 nm, pagalbinių bakteriochlorofilų B – ties 800 nm, bakteriofeofitinų H – ties 760 nm. Aukštesnės bakteriochlorofilų (tiek P, tiek B) elektroninės būsenos (žymima Q_x) sugertis yra ties 600 nm, o bakteriofeofitino – ties 545 nm. Paimta iš [23].

fotosintezėje tai yra ląstelės membrana). Ši reakcija vyksta specialiame pigmentų ir baltymų, komplekse, vadinamame reakciniu centru. Fotosintetinių bakterijų *Rhodospseudomonas viridis* reakcinio centro struktūrą 1986 metais iš rentgeno kristalografijos duomenų nustatė H. Michel su bendraautoriais [24], o netrukus po to buvo „pamatytas“ ir *Rhodobacter spheroides* reakcinis centras [25]. Pigmentų išsidėstymas reakciniame centre parodytas 27A pav. Matome, kad reakciniam centrui būdinga apytikslė dvipusė simetrija. Pigmentai, dalyvaujantys krūvio atskyrimo, pažymėti skirtingomis spalvomis: raudonai parodyti du labai arti vienas kito esantys bakteriochlorofilai, vadinami specialiaja pora P. Kiek „žemiau“ mėlyna spalva parodyti vadinamieji „papildomi“ bakteriochlorofilai B, žaliai pavaizduoti bakteriofeofitinai H, dar žemiau avietinė ir melsvai žalsva spalva pavaizduotos dvi chinono molekulės. Elektronų pernaša vyksta, kai sužadinti specialiosios poros chlorofilai, tuomet elektronas perduodamas papildomiems bakteriochlorofilams, iš šių – bakteriofeofitinui H, dar vėliau – chinonui Q_A ir galiausiai – kitam chinonui Q_B . Šios reakcijos vyksta ypač sparčiai, ir tik palyginti neseniai – 1990 metais – W. Zinthas su bendraautoriais atliko femtosekundinius žadinimo-zondavimo eksperimentus, galutinai išaiškinusius šio proceso detales [23]. Kad galėtume suprasti PP eksperimento rezultatus, pirmiausia išnagrinėkime reakcinio centro sugerties spektrą, parodytą 27B pav. Skirtingiems pigmentams šiame komplekse būdingos ir skirtingos sužadinimo energijos (t.y. sugerties juostų padėtys): specialiosios poros bakteriochlorofilai sugeria ties 870 nm, pagalbinių bakteriochlorofilų – ties 800 nm, bakteriofeofitinai – ties 760 nm. Šie šuoliai atitinka žemiausias elektronines pigmentų būsenas, vadinamas Q_y . Aukštesnės bakteriochlorofilų būsenos, vadinamosios Q_x , sugeria ties 600 nm (27B pav.), o bakteriofeofitinų – maždaug ties 545 nm. Natūralu tikėtis, kad elektronui keliaujant per reakcinio centro pigmentus stebėsime šių juostų išblyškimą būtent tada, kai elektronas pasiekia atitinkamus pigmentus. Tačiau nereikia pamiršti, kad PP signalą sudaro ir kiti įnašai (SE, IS), ir interpretuojant eksperimentų duomenis privalu atsižvelgti į juos visus.

Reakcinio centro skirtuminės sugerties kinetika, sužadinus specialiosios poros (P) bakteriochlorofilus 860 nm centrinio bangos ilgio impulsais parodyta 28 pav. Kinetiką, išmatuotą ties 920 nm (28a pav.) pagrindinai lemia priverstinis spinduliavimas iš specialiosios poros (P) sužadintos būsenos. Matome, kad neigiamas sugerties pokytis ties 920 nm atsiranda iš karto, kai sužadinama P ir atsistato per maždaug 3.5 ps. Tai rodo, kad sužadinta P būsena (žymima P^*) išnyksta per maždaug 3.5 ps. Vėlesniais laiko momentais ($t > 10$ ps), sugertis vėl šiek tiek sumažėja, tai rodo, kad sužadintos būsenos gesimu reakcinio centro dinamika nesibaigia. Kinetiką ties 920 nm

gerai aproksimuoja trijų komponentų modelis (t.y. trys eksponentės) – 3.5 ps, 220 ps ir ∞ (t.y. liekamoji vertė, kuri nesikeičia eksperimento laiko srityje).

Sugerties pokytis ties 785 nm visą laiką yra teigiamas (28b pav.). Indukuota sugertis



28 pav. Skirtuminės sugerties kinetika *Rhodobacter spheroides* reakciniame centre, žadinant ties 860 nm ir zonduojant ties 920 nm (a), 785 nm (b) ir 545 nm (c). Laiko skalė yra tiesinė iki 1 ps, toliau - logaritminė. Simboliai vaizduoja eksperimento duomenis, ištisinės linijos - modeliavimo rezultatus, panaudojant 4 kinetinius komponentus, punktyrinės linijos - modeliavimą, panaudojant 3 komponentus.

atsiranda iš karto po sužadavimo, tuomet šiek sumažėja per pirmąsias dvi pikosekundes (charakteringoji sumažėjimo trukmė yra apie 0.9 ps), o vėliau vėl užauga. Šis antrasis sugerties didėjimas yra dvieksponentinis, jo charteringosios trukmės yra 3.5 ps ir 220 ps. Kinetikos ties 785 nm nepavyksta aproksimuoti trimis eksponentėmis – jei neįskaitome 0.9 ps komponento, gauname aiškiai netinkamą aproksimaciją, kurią rodo punktyrinė linija 28b pav. Įvedus ketvirtąjį komponentą, modeliavimo ir eksperimento rezultatai sutampa puikiai (ištisinė linija 28b pav.).

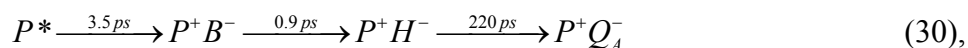
Ties 545 nm, kur sugeria bakteriofeofitinas (H), stebima sudėtinga skirtuminės sugerties kinetika (28c pav.). Iškart po sužadavimo atsiranda indukuota sugertis, išlieka beveik nepakitusi iki maždaug 2 ps. Vėliau ΔA ima mažėti, tampa neigiama (nuo 2 iki 20 ps) ir galiausiai vėl padidėja, priartėdama prie nulio (~200 ps laiko skalė). Šios kinetikos vėlgi neįmanoma aprašyti

trimis kinetiniais komponentais, reikia bent keturių (plg. punktyrinę ir ištisinę liniją 28c pav.). Kadangi ties šiuo bangos ilgiu sugeria bakteriofeofitinas, tai neigiamos skirtuminės sugerties (išblyškimo) atsiradimas rodo, jog elektronas atsiranda ant šio pigmento. Išblyškimas išnyksta, kai bakteriofeofitinas perduoda elektroną chinonui. Pradinė indukuota sugertis akivaizdžiai yra dėl P^* sužadintos būsenos sugerties - juk ji atsiranda pačiu pradiniu laiko momentu, kai sužadinama specialioji pora.

Taigi, turime tokius eksperimentinius faktus:

- P^* sužadinta būsena išnyksta per 3.5 ps.
- Elektronas ant bakteriofeofitino H atsiranda per ~ 3.5 ps ir išnyksta per ~ 220 ps.
- Tiek bakteriofeofitino, tiek pagalbinio bakteriochlorofilo išblyškimo signaluose matosi papildomas, maždaug 0.9 ps trukmės procesas (t.y. norint tinkamai aproksimuoti eksperimento duomenis, reikalingi ne mažiau kaip 4 kinetiniai komponentai).

Šiems eksperimentiniams faktams paaiškinti W.Zinthas su bendraautoriais pasiūlė tokį pirminio krūvio atskyrimo modelį reakciniame centre:



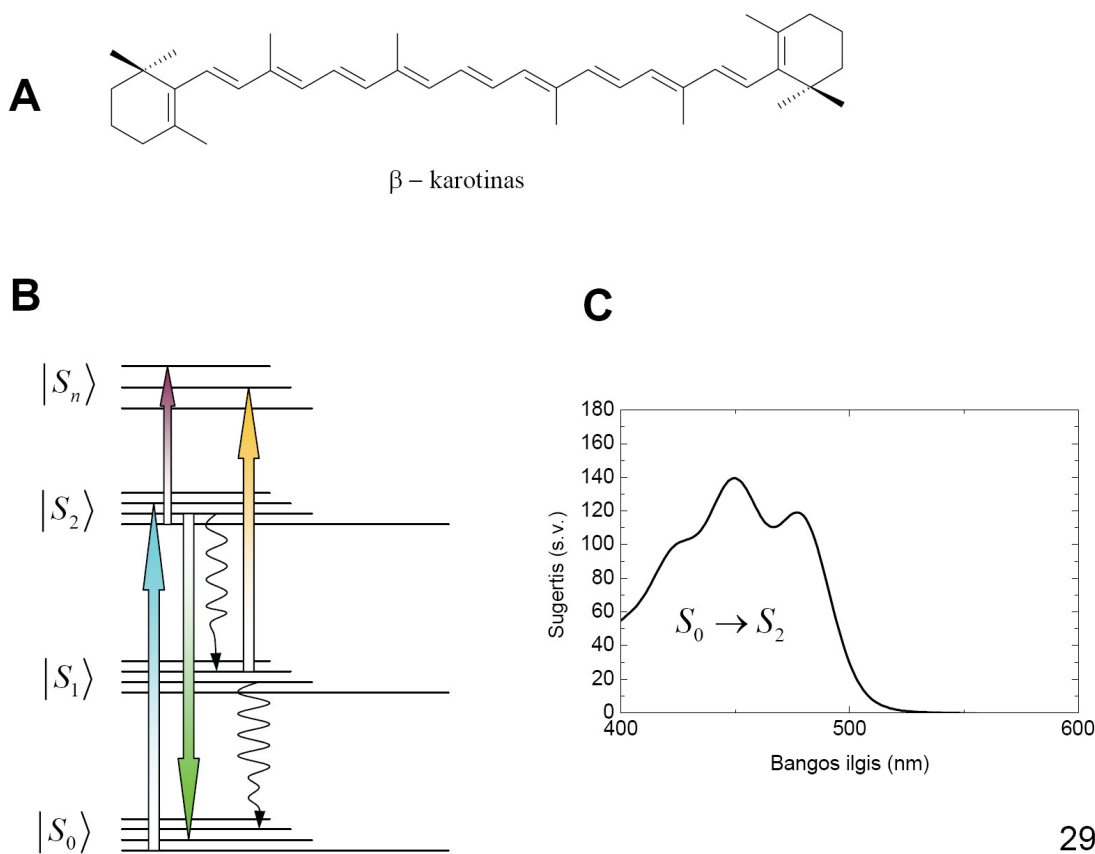
t.y. nuo sužadintos specialiosios poros P^* elektronas perduodamas pagalbiniam bakteriochlorofilui B per 3.5 ps, tuomet per 0.9 ps jis atsiduria ant bakteriofeofitino H , nuo kurio per 220 ps pasiekia chinoną Q_A (žr. rodyklės 27A pav.). Kadangi nuo pagalbinio bakteriochlorofilo elektronas „pabėga“ daug greičiau (900 fs), negu yra į jį atnešamas (3.5 ps), būsenos $P^+ B^-$ koncentracija yra labai maža. Būtent todėl ilgą šios būsenos laiką nepavyko aptikti ir buvo galvojama, kad pagalbinis bakteriochlorofilas krūvio pernašos grandinėje nedalyvauja. W.Zintho eksperimentinių duomenų kokybė ir atliktas modeliavimas pirmą kartą leido parodyti, kad šis pigmentas yra integrali krūvio atskyrimo grandinės dalis. Vėliau šiuos rezultatus patvirtino ir kiti eksperimentai [26].

5.2. Karotinoidų sužadintos būsenos: elektroninė ir virpesinė relaksacija

Karotinoidai – tai viena iš labiausiai gyvuose organizmuose paplitusių pigmentų klasių. Šios molekulės lemia geltoną ir oranžinę rudeninių lapų spalvą, t.p. nudažo vaisius (pvz., pomidorus, apelsinus), žuvis ir net kai kuriuos gyvūnus, tokius, kaip kanarėlės. Bet akivaizdžios estetinės naudos, karotinoidai turi ir svarbių biologinių funkcijų, pirmiausia tai, kad jie padeda augalams, bakterijoms ir dumbliams sugerti fotosintezei naudojamą šviesą. Pagrindiniai fotosintezės pigmentai,

chlorofilai, nesugeria žalios ir geltonos šviesos, o juk jos Saulė – geltonoji žvaigždė į Žemę atsiunčia daugiausia. Kad ši energija nenueitų veltui, fotosintetiniuose pigmentų ir baltymų kompleksuose be chlorofilo pigmentų dar yra ir karotinoidai, sugeriantys šviesą žydroje ir žalioje matomo spektro srityje (maždaug 420-550 nm), kurie padeda augalams efektyviau panaudoti Saulės energiją. Šie pigmentai yra ir pagrindiniai šviesos sugėrikliai jūros dumbliuose, gyvenančiuose gilesniuose vandenyse, į kuriuos teprasiskverbia žydra ir žalia šviesa.

Visiems karotinoidams būdinga polieninė struktūra – ilga konjuguotų dvigubų jungčių grandinė (29A pav.). Karotinoidai – netipiški pigmentai, pirmiausia tuo, kad beveik visai nefluorescuoja. Tai lemia jų savotiška energetinė struktūra: stiprią karotinoidų sugertį žydroje ir žalioje spektro srityje (jų molinis ekstinkcijos koeficientas siekia $150000 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) sąlygoja antroji elektroninė sužadinta būsena S_2 , o žemiausia sužadinta elektroninė būsena S_1 dėl savo

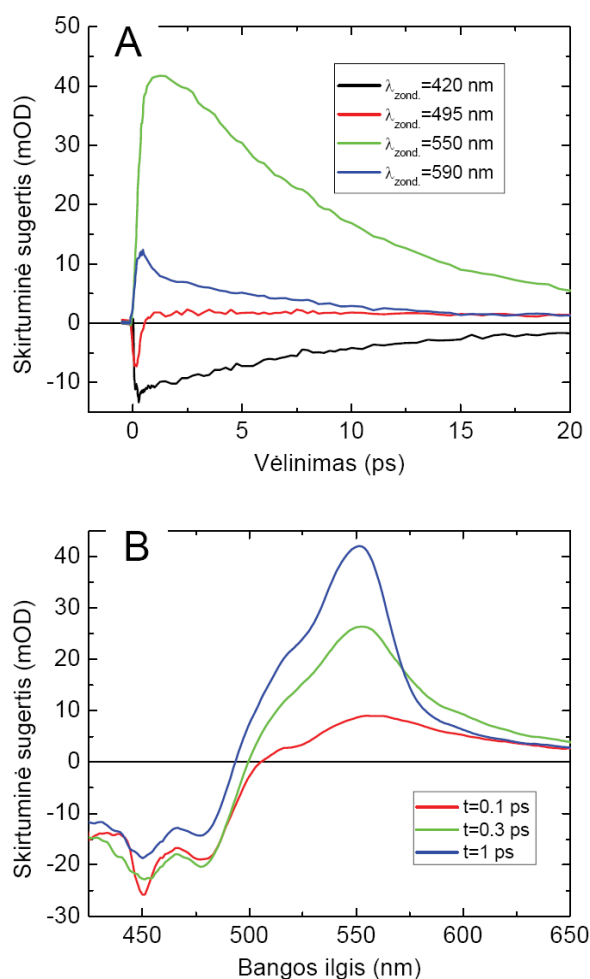


29 pav.

29 pav. Vieno iš labiausiai paplitusių karotinoidų - β-karotino struktūrinė formulė (A), energijos lygmenų schema (B) ir sugerties spektras. Sugertis matomoje spektro srityje (C) atitinka šuolį tarp S_0 ir S_2 būsenų (žydra rodyklė B paveikslėlyje). PP eksperimente galime stebėti SE iš S_2 į S_0 (žalia rodyklė), IS iš S_1 į S_2 (oranžinė rodyklė) ir S_2 į S_n (rausva rodyklė). Vingiuotos rodyklės rodo vidinės konversijos procesus, vykstančius sužadintus karotiną.

simetrijos yra optiškai draudžiama (t.y. jos molekulinės orbitalės simetrija sutampa su pagrindinės būsenos simetrija, ir dipolinio šuolio į ją matricinis elementas lygus nuliui). Vieno iš labiausiai paplitusių karotinoidų - β -karotino struktūra, energijos lygmenys ir sugerties spektras parodytas 29 pav. Iš pagrindinės būsenos optiškai karotiną galima sužadinti į S_2 būseną, kuri gyvuoja labai trumpai ir greitai relaksuoja į optiškai draudžiamą S_1 būseną, kuri dar po kiek laiko grįžta į pagrindinę. Šiuos procesus stebėti ir elektroninių būsenų modelį karotinoiduose patikrinti galime PP eksperimente [27].

Skirtuminės sugerties dinamika β -karotine (tirpiklis: n-heksanas) parodyta 30 pav. Duomenys pavaizduoti, pateikiant kinetines kreives ties tam tikrais reprezentatyviais bangos ilgiais (A) ir skirtuminius spektrus, praėjus skirtingiems laiko tarpams tarp žadinančio ir zonduojančio



30 pav. Skirtuminės sugerties dinamika β -karotine, ištirpintame n-heksane. A paveikslėlyje parodytos skirtuminės sugerties kinetikos, sužadinus karotinoidą ties 400 nm ir zonduojant ties 420 nm (juoda linija), 495 nm (raudona linija), 550 nm (žalia linija) ir 590 nm (mėlyna linija). B paveikslėlyje parodyti skirtuminės sugerties spektrai esant 100 fs (raudona linija), 300 fs (žalia linija) ir 1 ps (mėlyna linija) vėlinimui.

impulsų. Jau iš pirmo žvilgsnio į akis krenta tai, kad tiek kinetikos ties skirtingais zondavimo bangos ilgiais, tiek spektrai, esant skirtingiems vėlinimams, yra labai skirtingi. Tai rodo, kad sužadintas β -karotinas elgiasi ne kaip tipiška molekulė, iš kurios galėtume tikėtis monoeksponentinės relaksacijos (žr. 12 pav., (20) formulę) - jo dinamiką įtakoja eilė procesų, kuriuos toliau ir aptarsime, analizuodami PP eksperimento duomenis.

Skirtuminės sugerties kinetiką ties 420 nm (30A pav., juoda linija) pagrindinai lemia pagrindinės būsenos išblyškimas. Tuo galima įsitikinti, palyginus skirtuminės sugerties spektrus ties bangos ilgiais nuo 400nm iki 490 nm (30B pav.) su nuostoviosios sugerties spektru 29C pav. Abiejuose spektruose stebime „trijų pirštų“ virpesinę struktūrą, tik, kaip ir reikia tikėtis, išblyškimo spektras yra neigiamas. Iš kinetikos ties PBI bangos ilgiais matome, kad iškart po sužadinimo pagrindinės būsenos sugertis sumažėja ir atsistato per maždaug 20 ps. Būtent po tiek laiko β -karotinas sugrįžta į pagrindinę būseną po sužadinimo.

Ties bangos ilgiais, esančiais į raudonąją spektro pusę nuo sugertiems maksimumo (kinetika ties 495 nm) galime tikėtis matyti neigiamą skirtuminę sugertį dėl priverstinio spinduliavimo (SE). Iš tikrųjų, kinetinė kreivė ties šiuo bangos ilgiu pradžioje rodo neigiamą signalą (raudona kreivė 30A pav.), tačiau šis signalas gyvuoja vos 200 fs. Vėliau šis signalas išnyksta ir ties šiuo bangos ilgiu atsiranda nedidelė indukuota sugertis. Tokia greita SE dinamika rodo, kad būseną, į kurią sužadiname β -karotiną (S_2), išnyksta per maždaug 200 fs. Tačiau, kadangi išnyksta tik SE, o PBI atsistatymo šioje laiko skalėje nestebime (30A pav., juoda linija), tai rodo, kad į pagrindinę būseną β -karotinas dar negrįžo. Skirtuminės sugerties spektre matome intensyvią IS juostą, atsirandančią per maždaug 200 fs (plg. spektrus ties 100 fs ir 300 fs vėlinimu 30B pav.), kurios maksimumas yra ties maždaug 550 nm. Abi šios įžvalgos leidžia padaryti išvadą, kad S_2 būseną, į kurią sužadiname β -karotiną gyvuoja apytikriai 100 fs, o vėliau dėl vidinės konversijos molekulė relaksuoja į S_1 elektroninę būseną. Būtent indukuotą sugertį iš šios būsenos į aukštesnes elektronines būsenas ir stebime ties 550 nm (žr. oranžinę rodyklę 29B pav.).

Palyginę spektrus ties 300 fs ir 1 ps vėlinimu, matome, kad S_1 indukuotos sugerties juosta per šį laiko tarpą susiaurėja ir tampa intensyvesnė. Taip yra dėl vibracinės energijos persiskirstymo: molekulei relaksuojant iš S_2 į S_1 , pradžioje užpildomos aukštesnės S_1 virpesinės būsenos, kurios greitai relaksuoja į apatinę S_1 virpesinę būseną. Todėl molekulių ansambliui pereinamuojau laikotarpiu būdingas platesnis energijų pasiskirstymas ir kartu – platesnis IS spektras (30B pav). Kaip jis relaksuoja, matome ir kinetinėse kreivėse ties 550 nm ir 590 nm (30A pav., žalia ir mėlyna

kreivė), kur sugertis ties 590 nm („karšta“ S_1 būseną) dalinai išnyksta, o ties 550 nm („atšalusią S_1 būseną“) – užauga tokiu pačiu greičiu. Ties maždaug 1 ps vėlinimu, visos molekulės pasiekia pusiausvyrą pasiskirstymą S_1 virpesinių būsenų aibėje ir IS spektras praktiškai nebesikeičia.

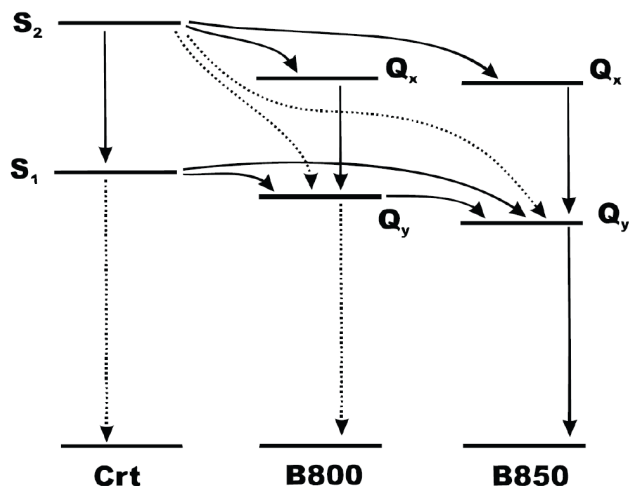
Skirtuminė sugertis visiškai užgęsta per maždaug 20 ps, tai atitinka sužadintos būsenos gyvavimo trukmę. Kaip matome, žadinimo zondavimo eksperimentai leidžia stebėti sudėtingą β -karotino sužadintų būsenų dinamiką, apimančią elektroninės ir virpesinės energijos relaksaciją ir jų nulemtus spektrinius pokyčius. Tokia sudėtinga dinamika būdinga ne tik β -karotinui, bet ir kitiems karotinoidams, o kai kuriuose jų ji dar sudėtingesnė, nes signalus lemia ne tik S_2 , „karšta“ ir relaksavusi S_1 būseną, tačiau ir krūvio pernašos būsenos [27].

5.3. Energijos pernaša iš karotinoidų į bakteriochlorofilus fotosintetinėje šviesoje surenkančioje antenoje

Šiame skyrelyje vėl nagrinėsime karotinoidų sužadintos būsenos dinamiką, tačiau ne tirpiklyje, kaip buvo praeitame skyrelyje, o šviesoje surenkančiame bakterijos *Rhodobacter sphaeroides* anteniniame pigmentų ir baltymų komplekse LH2, kurio struktūrą ir kai kurias energijos pernašos funkcijas jau aptarėme 3.1 šio skyriaus poskyryje.

Sužadinus karotinoido molekulę (*Rhodobacter sphaeroides* karotinoidas yra sferoidinas), galima tikėtis energijos pernašos iš karotinoido S_2 būsenos į bakteriochlorofilą (sugeriantį ties 800 nm arba 850 nm), vidinės konversijos į S_1 būseną, energijos pernašos iš S_1 būsenos į bakteriochlorofilus. Karotinoidas energiją gali atiduoti tiek B800, tiek B850 bakteriochlorofilams, bet, energija gali pereiti tiek į jų Q_x , tiek į Q_y elektroninę būseną, todėl bendra energijos pernašos schema gana sudėtinga (31 pav.) [28]. Žadinimo-zondavimo eksperimentai su LH2 plačiame spektriniame diapazone leido detaliai išsiaiškinti, kaip karotinoidai padeda bakterijoms panaudoti saulės energiją. Pirmieji femtosekundinius skirtuminės sugerties eksperimentus su LH2, kuriais buvo stebėta energijos pernaša iš karotinoidų į bakteriochlorofilus, atliko A.P.Shreve su bendraautoriais [29]. Jų rezultatus, parodytus 32 pav., dabar ir aptarsime.

Pirmajame eksperimente buvo žadinami B800 bakteriochlorofilai, ir tiriama jų dinamika, zonduojant ties tuo pačiu bangos ilgiu, 800 nm. Šio eksperimento rezultatai pavaizduoti 32A pav. Iš skirtuminės sugerties kinetikos matyti, kad sužadinus B800 chlorofilus, ties jų sugerties bangos ilgiu iš karto stebime praskaidrėjimą, kuris per maždaug 700 fs išnyksta ir atsiranda indukuota sugertis (žr. neapdorotus duomenis, pavaizduotus trikampiais), nes sužadinimo energija perduodama B850



31 pav. Bendra galimų energijos pernašos kelių schema purpurinių bakterijų šviesą sugeriančioje antenoje LH2. Paimta iš [28].

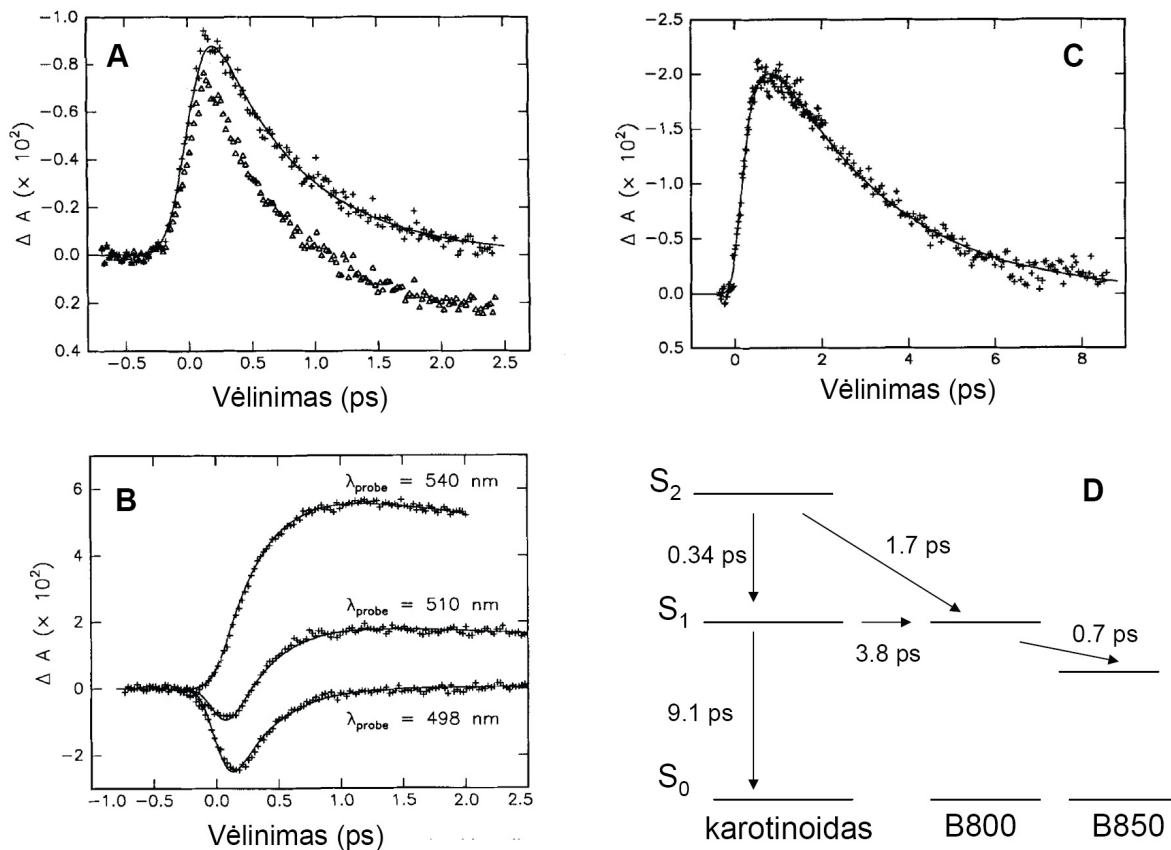
bakteriochlorofilams, kurių skirtuminė sugertis ties 800 nm yra teigiama²⁷. Taigi, energijos pernaša iš B800 į B850 LH2 antenoje įvyksta per maždaug 700 fs. Ši trukmė puikiai sutampa su trukme, kurią atskleidė fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimentas, aptartas 3.1 poskyryje.

Antrasis eksperimentas buvo analogiškas mūsų jau išnagrinėtam žadinimo-zondavimo eksperimentui β -karotine: buvo žadinamas sferoidinas (ties 480 nm) ir matuojamos skirtuminės sugerties kinetikos ties 498 nm, 510 nm, 540 nm. Kaip ir β -karotine, matome kaip užgęsta S_2 priverstinis spinduliavimas – neigiamas pradinis sugerties skirtumas ties 510 nm ir 498 nm. Šiam signalui užgesus, ties 540 nm (ir šiek tiek ties 510 nm) stebime S_1 būsenos indukuotos sugerties atsiradimą ir gesimo pradžia. Taigi, kaip ir tirpiklyje, LH2 komplekse karotinoidas yra sužadinas į S_2 elektroninę būseną, kuri per maždaug 200 fs relaksuoja į S_1 , kuri savo ruožtu užgęsta per maždaug 20 ps. Šio gesimo pradžia matome kinetikoje, išmatuotoje ties 540 nm (32B pav.)

Įdomus klausimas yra tai, ar S_1 ir S_2 perduoda sužadimo energiją bakteriochlorofilams, ir jei perduoda, tai koku greičiu. Į šį klausimą padėjo atsakyti dar vienas PP eksperimentas, kurio rezultatai parodyti 32C pav. Čia buvo sužadintos sferoidino pigmentai ties 510 nm, ir registruotas sugerties pokytis B800 bakteriochlorofilų sugerties juostoje. Iš skirtuminės sugerties kinetikos matyti, kad B800 juosta išblyšksta iš beveik karto (per kelis šimtus femtosekundžių) po to, kai sužadinas sferoidinas. Tai reiškia, kad prieš relaksuodama, sferoidino S_2 būseną perneša į B800 dalį energijos. Jei energiją į B800 bakteriochlorofilus perneštų *vien tik* S_2 , atsiradęs išblyškimas

²⁷ Tuo įsitikinta buvo sužadinus B850 bakteriochlorofilus tiesiogiai.

turėtų išnykti per maždaug 700 fs, kaip tai yra tiesiogiai žadinant B800 juostą (32A pav.). Tačiau eksperimento duomenyse matome, kad B800 išblyškimas, sužadinus karotinoidus, užtrunka ilgiau: jis užgęsta tik per kelias pikosekundes. Vienintelis galimas šio eksperimentinio fakto paaiškinimas yra tas, kad sferoidino S_1 būseną taip pat perduoda energiją B800 bakteriochlorofilams savo gyvavimo metu. Tokiu būdu tarp S_1 B800 nusistovi dinaminė pusiausvyra (B800 atiduoda sužadinius į B850, tačiau gauna juos iš S_1) ir sužadintų B800 populiacija išsilaiko ilgiau negu tiesiog sužadinus B800. A.P. Shreve su bendraautoriais atliko eksperimentinių duomenų modeliavimą pagal energijos pernašos schemą, pavaizduotą 32D pav., ir nustatė energijos pernašos greičius ir kelius tarp įvairių pigmentų būsenų LH2 komplekse. Jų nustatytos charakteringosios pernašos trukmės parodytos šalia rodyklių 32D pav. pateiktoje schemoje.



32 pav. Žadinimo-zondavimo eksperimentai fotosintetinės bakterijos *Rhodospirillum rubrum* šviesą surenkančioje antenoje LH2. A: žadinimo ir zondavimo bangos ilgis – 800 nm (neapdoroti duomenys pavaizduoti trikampaiais, o kryžiuokai vaizduoja duomenis, iš kurių atimta atsirandanti B850 indukuota sugertis, t.y. „grynas“ B800 PBI); B: žadinimo bangos ilgis – 480 nm (karotinoidų S_2 sugertis - žr. 31B pav.), zondavimo bangos ilgiai parodyti ant grafiko; C: žadinimo bangos ilgis – 510 nm (karotinoidų S_2 sugertis, zondavimas ties 800 nm). Šioje kreivėje duomenys pakoreguoti, atimant B850 indukuotą sugertį, t.y. ji vaizduoja „gryną“ B800 išblyškimą. Atkreipkite dėmesį, kad A ir C paveikslėliuose vertikaloje skalėje atidėtas neigiamas sugerties pokytis. Paimta iš [29].

6. Baigiamosios pastabos

Šiame skyriuje aptarėme kinetinės spektroskopijos metodus, leidžiančius realiaame laike stebėti labai greitus procesus, vykstančius biologinėse sistemose. Išnagrinėjome tiek spektroskopijos „įrankius“ – lazerius, leidžiančius generuoti femtosekundžių trukmės ir norimų parametru (galios, spalvos ir t.t.) impulsus, tų impulsų charakterizacijos principus, ir impulsinių lazerių taikymą ultraspartiesiems procesams tirti. Kinetinės spektroskopijos metodai, pagrįsti sužadintų molekulių sugerties pokyčio ar fluorescencijos stebėjimu su femtosekundine skiriamąja geba, leidžia detaliau pažinti nanometrinių matmenų biologinius (ir ne tik biologinius) darinius bei suprasti jų funkcijas.

Kalbėdami apie konkrečius kinetinės spektroskopijos taikymus, aptarėme ultrasparčiuosius biologinėse sistemose vykstančius procesus tokius, kaip fotoindukuota protono, elektrono ir energijos pernaša, ir parodėme, kaip kinetinės spektroskopijos metodai padėjo suprasti šių procesų eigą.

Pažymėkime, kad šie tyrimai svarbus ne tik fundamentaliu moksliniu požiūriu, bet turi ir milžinišką taikomąjį potencialą. Kuriant optinius kompiuterius, kurie ateityje neišvengiamai pakeis elektroninius, svarbu suprasti ir mokėti valdyti pikosekundinių vyksmų dinamiką nanometriniu dydžio loginiuose elementuose. Ieškant alternatyvių energijos šaltinių, kurie ateityje turės pakeisti senkančias gamtinio kuro atsargas, didžiulis vaidmuo tenka tyrimams, kuriais bandoma, kaip Gamta išmoko panaudoti saulės energiją fotosintezėje. Kuriant dirbtinės fotosintezės elementus, būtina mokėti juos patikrinti ir matyti, ar jie veikia taip, kaip mes norime, ir kokios jų savybės, palyginus su natūraliomis sistemoms. Čia vėl pasitelkiami kinetinės spektroskopijos matavimai. Ir apskritai, visose sistemose, kurių matmenys artėja prie keleto nanometrų (o nanoelektronika, nanorobotai ir visi kiti „nano“ šiuo metu yra didelio mokslininkų ir visuomenės susidomėjimo objektas), charakteringosios vyksmų trukmės artėja prie pikosekundžių ir femtosekundžių (t.y., kuo mažesnė sistema, tuo greičiau ji „laksto“). Mūsų aptarti optiniai kinetiniai matavimo metodai yra vienas iš pagrindinių įrankių, atveriančių duris į nanometrų ir femtosekundžių pasaulį.

Papildoma literatūra

1. J. Butrimaitė, A. Dementjev, G. Dikėius, R. Gadonas, J. Jaseviėiūtė, V. Karenauskaitė, V. Sirutkaitis, and V. Smilgeviėius, *Fizika biomedicinos ir fiziniø mokslø studentams*. Vol. II. 2004, Vilnius: Vilniaus Universiteto Leidykla. 212.
2. W. Koechner and M. Bass, *Solid State Lasers: a Graduate Text*. 2003, New York: Springer-Verlag. 409.
3. F. Salin, How to manipulate and change the characteristics of laser pulses, in *Femtosecond laser pulses: principles and applications*, C. Rullière, Editor. 2005, Springer: New York. p. 426.
4. Y.R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*. 2003, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 565.
5. L. Sarger and J. Oberlé, How to measure characteristics of laser pulses, in *Femtosecond laser pulses: principles and applications*, C. Rullière, Editor. 2005, Springer: New York. p. 426.
6. P.I.H. Bastiaens and A. Squire, *Trends in Cell Biology*, 1999. **9**(2): p. 48-52.
7. R. Jimenez and G.R. Fleming, Ultrafast Spectroscopy of Photosynthetic Systems, in *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, J. Amesz and A.J. Hoff, Editors. 1996, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p. 409.
8. A.L. Lehninger, D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed. 2004, New York: W H Freeman & Co. 1100.
9. H. van Amerongen, L. Valkunas, and R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons*. 2000, Singapore: World Scientific.
10. G. McDermott, S.M. Prince, A.A. Freer, A.M. Hawthornthwaite-Lawless, M.Z. Papiz, R.J. Cogdell, and N.W. Isaacs, *Nature*, 1995. **374**: p. 517-521.
11. R. Jimenez, S.N. Dikshit, S.E. Bradforth, and G.R. Fleming, *Journal of Physical Chemistry*, 1996. **100**(16): p. 6825-6834.
12. E. Papagiannakis, S.K. Das, A. Gall, I.H.M. van Stokkum, B. Robert, R. van Grondelle, H.A. Frank, and J.T.M. Kennis, *Journal of Physical Chemistry B*, 2003. **107**(23): p. 5642-5649.
13. J.M. Kendall and M.N. Badminton, *Trends in Biotechnology*, 1998. **16**(5): p. 216-224.
14. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W.W. Ward, and D.C. Prasher, *Science*, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
15. D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward, F.G. Prendergast, and M.J. Cormier, *Gene*, 1992. **111**(2): p. 229-233.
16. M. Ormo, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, and S.J. Remington, *Science*, 1996. **273**(5280): p. 1392-1395.
17. M. Chattoraj, B.A. King, G.U. Bublitz, and S.G. Boxer, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 1996. **93**: p. 8362-8367.
18. M. Du and G.R. Fleming, *Biophysical Chemistry*, 1993. **48**(2): p. 101-111.
19. P.W. Atkins, *Physical Chemistry*. 1994, Oxford: Oxford University Press. 1031.
20. G. Zgrablic, K. Voitchovsky, M. Kindermann, S. Haacke, and M. Chergui, *Biophys. J.*, 2005. **88**(4): p. 2779-2788.
21. A. Einstein, *Physika Zeitschrift*, 1917. **18**: p. 121-128.
22. J.W. Boag and E.J. Hart, *Nature*, 1963. **197**: p. 45-47.

23. W. Holzapfel, U. Finkele, W. Kaiser, D. Oesterhelt, H. Scheer, H.U. Stilz, and W. Zinth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(13): p. 5168-5172.
24. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, and H. Michel, 1985. **318**(6047): p. 618-624.
25. J.P. Allen, G. Feher, T.O. Yeates, H. Komiya, and D.C. Rees, *PNAS*, 1987. **84**(16): p. 5730-5734.
26. T. Arlt, S. Schmidt, W. Kaiser, C. Lauterwasser, M. Meyer, H. Scheer, and W. Zinth, *PNAS*, 1993. **90**(24): p. 11757-11761.
27. T. Polivka and V. Sundstrom, *Chemical Reviews*, 2004. **104**(4): p. 2021-.
28. V. Sundstrom, T. Pullerits, and R. van Grondelle, *Journal of Physical Chemistry B*, 1999. **103**(13): p. 2327-2346.
29. A.P. Shreve, J.K. Trautman, H.A. Frank, T.G. Owens, and A.C. Albrecht, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1991. **1058**(2): p. 280-288.