

Femtosekundumos lézerimpulzusok a biofizikában

Groma Géza, Ormos Pál, MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Intézet

Az MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézetében széles körben, nagyon eltérő kutatásokban használjuk a lézereket. Példaként bemutatjuk az ultrarövid lézerimpulzusok alkalmazásának két területét. A témák igen különbözőek, de természetesen egyaránt a rövid impulzusok speciális tulajdonságaira épülnek. Az egyikben a rövid impulzusokra támaszkodva nagy időfeloldással követünk nagyon gyors biológiai reakciókat, a másikban az impulzusokat mikroszkopikus struktúrák építésére, optikai manipulációra használjuk.

Femtobiológia

A femtobiológia elnevezés - amely a femtosekundumos időskálán lezajló biológiai jelenségekkel foglalkozó tudományágra utal - látszólag értelmetlen fogalmat takar. A biológiai jelenségek mögötti kémiai reakciók jellegzetesen ms-nál, de legalábbis ms-nál hosszabb időállandóúak. Az ellentmondás oka az, hogy a kinetikai állandók statisztikai paraméterek, azzal kapcsolatosak, hogy a kiindulási anyagot a terméktől elválasztó potenciálgáton az időegység alatt a molekulák mekkora hányada képes átjutni. Merőben más kérdés, hogy az akadályt éppen sikeresen "megmászó" egyedi molekula mennyi idő alatt jut át a potenciálgáton. (Világcsúcs körüli magasságokat néhány hónapos időközönként ugranak, a sikeres ugrás folyamata ugyanakkor rövidebb egy másodpercnél.) A kémiai kötések felszakadása, átrendeződése, új kialakulása a fs időskálán zajlik le. Ebben az értelemben minden kémiai jelenség femtokémia, minden biológiai folyamat femtobiológia. A fs-os tartományban figyelhetők meg továbbá valós időben a molekuláris vibrációk és rotációk, melyekről hagyományos (infravörös, Raman-) spektroszkópiával csak részleges (fázis nélküli) információt nyerhettünk.

Előbbiek alapján kívánatosnak tűnne, hogy minden biokémiai reakciót részletekbe menően megvizsgáljunk a fs-os időskálán. Ezzel például az enzimek mechanizmusának gazdag birodalmába nyerhetnénk betekintést, s a jövőbeli kutatások feltehetőleg egyre inkább ebbe az irányba tolnak el. A jelenlegi mérés-technikai korlátok miatt azonban általában csak molekulák nagy sokaságán létrejövő folyamatokat tudunk detektálni. Ha fs-os jelenségeket akarunk tanulmányozni, a sokaságot fs-os pontossággal szinkronizálnunk kell. Erre jelenleg egyetlen módszer kínálkozik: az ultragyors lézerimpulzussal való szinkronizálás. A kísérletileg elérhető femtobiológia tehát leszűkül a fényel indítható reakciók tartományára. Mivel egyetlen fotodetektor sem képes femtosekundumos időfelbontással működni, valamennyi fs-os mérés-technika az úgynevezett pumpa-próba módszeren alapszik. Ennek lényege, hogy a fénysebesség állandóságát kihasználva az időmérést távolságmérésre vezetjük vissza. A fentieknek megfelelően a pumpáló lézerimpulzussal molekulák nagy sokaságán szinkronizáltan elindítjuk a tanulmányozni kívánt reakciót. A pumpával szinkronban (optikai nyelven koherensen), de valamelyes késleltetéssel elindítunk egy másik, próbaimpulzust. A fotoreakció termékének abszorpció spektruma általában különbözik a kiindulási anyagétól, tehát a próbaimpulzus hullámhosszának alkalmas megválasztásával a mintán áthaladt próba intenzitásának megméréseiből megállapíthatjuk az adott késleltetési pillanathoz tartozó termék koncentrációt. Ezután egy tükör pozíciójának megváltoztatásával pontról pontra változtatva a késleltetést és megismételve a mérést megkapjuk a reakció kinetikáját. Az eljárásnak számtalan válfaja létezik, hiszen az egyszerű abszorpció helyett bármilyen (lineáris vagy nemlineáris) optikai paramétert mérhetünk.

Az SZBK Biofizikai Intézetében évtizedek óta vizsgáljuk a bakteriorodopszin működését. Ez a fehérje a fényenergiát hasznosítja oly módon, hogy protonokat pumpál át a sejtmembránon, ezáltal elektrokémiai potenciált hoz létre. Intézetünk egyik legjelentősebb eredménye a protonmozgás direkt elektromos méréssel való detektálása a ps-tól a s-ig terjedő széles időskálán. Az alapvető kérdés azonban nyitva maradt: hogyan alakul át a fényenergia elektromos energiává, mi a kezdeti töltésszeparáció mechanizmusa. Ez a kérdés már a femtobiológia birodalmába tartozik, és megoldása merőben új elméleti és kísérleti megközelítést igényelt. A Stark-effektuson alapuló mérésekből a 70-es évek közepén kiderült, hogy miközben a bakteriorodopszin retinál kromofórja az alapállapotból a gerjesztett állapotba jut, annak mobilis p elektronszerkezete hatalmas töltésátrendeződésen megy keresztül: a két állapot közötti dipólmomentum különbsége 12 Debye. Néhány kutató felvetette, hogy ez a jelenség kapcsolatos lehet az energiaátalakítási funkcióval, de az elképzelés később háttérbe szorult. Ugyanakkor az eltelt 30 év során egy nagyon izgalmas kérdés az irodalomban fel sem merült: ha a gerjesztés során változik a dipólmomentum, akkor a retinának a klasszikus elektrodinamika szerint sugározni kell! Nyilvánvaló volt, hogy az elektromos mérésekhez használt makroszkopikusan orientált membránokat tartalmazó mintákon ez a sugárzás kísérletileg is detektálható. Később nyilvánvaló azonban, hogy optikai értelemben ez a sugárzás hova sorolható, hiszen intuitíve meglehetősen szokatlan tulajdonságai várhatók. A gerjesztés során a dipólmomentum változása azonnali (Frank-Condon-) folyamat, tehát miközben a retinál abszorbeál, egyúttal emittál is. A dipólmomentum a

gerjesztett állapotbeli populációval tűnik el, a sugárzás tehát aperiodikus, nem tartalmaz vivőfrekvenciát. A jelenség nyilvánvalóan rezonáns és csak orientált (nem centrálisan szimmetrikus) mintán léphet föl.

A fenti tulajdonságokból következik, hogy a várható sugárzás nem elsőrendű optikai folyamat, és a szimmetriából adódóan csak páros rendű lehet. A közelmúltban általunk kidolgozott kvantumelektrodinamikai levezetés szerint a jelenség az optikai egyenirányítás rezonáns esetével azonos. Az optikai egyenirányítás a frekvenciakétszerezéssel ellentétes (down-conversion) másodrendű folyamat, melynek során az anyagban zérus frekvenciájú (azaz vivőfrekvencia nélküli) polarizáció keletkezik. Nem rezonáns esetben - amely jól ismert és újabban kiterjedten használatos THz-es sugárzások keltésére - a polarizáció a gerjesztő impulzus burkológörbéjét követi. Ennek megfelelően a sugárzási tér a burkológörbe (a gerjesztési geometriától függően első vagy második) deriváltjával arányos. Számításaink szerint az irodalomban eddig nem vizsgált rezonáns esetben a helyzet merőben más, a fent leírt intuitív képnek megfelelően a polarizáció követi a gerjesztett állapot populációját. A klasszikus és a kvantumelektrodinamikai számítás csak csekély eltérést mutat.

A jelenség kísérleti kimutatása a Palaiseau-i (Fr) École Polytechnique intézettel való együttműködés során vált lehetővé. Ebben az intézetben működik a világ jelenleg egyetlen koherens infravörös emissziós készüléke. A mérőkészülékben egy félvezető anyagon keltett nemrezonáns optikai egyenirányításból származó sugárzást interferáltatunk a mintából eredő sugárzással. Az interferogramot pumpa-próba módszerrel detektálva kiszámítható a minta sugárzási térerőssége <10 fs időfelbontással. E méréstechnikával elsőként mutattuk ki biológiai objektumon az optikai egyenirányítás jelenségét, melyet fenti elmélet alapján az energiaátalakítási mechanizmus funkcionális motorjának gondolunk. Detektáltunk egy legalább 9 módusból álló koherens vibrációs jelenségekört is $700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ tartományban, mely feltehetőleg részben szintén funkcionális jelentőségű későbbi protonpumpálási folyamatokban.

Az elmúlt évben az SZBK Biofizikai Intézetében Magyarországon először létrehoztunk egy femtobiológiai laboratóriumot. A jelenleg is fejlesztés alatt álló labor egy 100 fs időfelbontású, Ti-zafír lézerrel pumpált közeli infravörös OPO-t és frekvenciakettőzőket tartalmazó abszorpciókinetikai pumpa-próba készüléken alapul. A jövőben az eszközt fluoreszcencia up- és down-conversion mérőrésszel is bővíteni tervezzük; országos szolgáltató laboratóriumként kívánjuk működtetni.

Mikromanipuláció és struktúraépítés fényel

A lézerek egyre szélesebb körű biológiai alkalmazása az optikai mikromanipuláció. Mikrométer nagyságú testek esetében a fény nyomása nem elhanyagolható: vízben úszó sejt méretű testek manapság könnyen előállítható fényel (például 10 mW intenzitású fókuszált lézerfényel) mozgathatóak, megragadhatóak. Intézetünkben e módszert alkalmazzuk, illetve a használat tartományát terjesztjük ki a lézerfényel előállított speciális alakú testek létrehozásával, amelyekkel újfajta manipulációs eljárások valósíthatók meg. A fotopolimerizációs eljárásban fényre keményedő anyagokból építünk struktúrákat. Lézerfényt fókuszálva az anyagba az a fókuszban megkeményedik, és a fókuszpont mozgatásával bonyolult alakzatok rajzolhatók. Ebben az eljárásban igen jól alkalmazhatók az ultrarövid impulzusok.

A Ti-zafír lézer módusszinkronizált üzemmódjában nagyon rövid, 100 fs körüli időtartamú impulzusok sorozatával sugároz. Még ha a lézer átlagos teljesítménye nem is nagy - mondjuk 1W -, az impulzusokban igen nagy a teljesítmény. Ezzel kétfotonos gerjesztés valósítható meg: ha egy anyagot gerjesztő fotonok elegendően gyorsan követik egymást, két foton energiája összeadódhat, és kétszeres energiájú átmenetet gerjeszthet. E kétfotonos gerjesztésnek, nemlineáris folyamat lévén, különleges tulajdonságai vannak, amelyek számos optikai eljárásban előnyösen kihasználhatóak, pl. mivel a gerjesztés az intenzitás négyzetével arányos, fókuszált sugár esetében a gerjesztés igen kis térrészre korlátozható. Így azután a fotopolimerizációs folyamatban a térbeli feloldás megnövelhető. Néhány száz nm térbeli feloldás is elérhető ezzel az eljárással, tehát tetszőleges bonyolultságú, elvileg tetszőleges nagyságú háromdimenziós alakzatok építhetők szubmikrométeres feloldással.

Az optikai mikromanipuláció alapjelenségében fókuszált lézerfény ragad meg a környezeténél nagyobb törésmutatójú, általában gömb alakú testet. Ha azonban a test alakja nem gömb, további szabadsági fokai is befolyásolhatók. Például ha a test lapos, és az optikai csapdát lineárisan poláros fény alkotja, a test orientálódni is fog, mégpedig a lapos oldala lesz párhuzamos a fény polarizációs síkjával. Ilyen testeket elő tudunk állítani kétfotonos fotopolimerizációval. E testtel forgatónyomatékot fejthetünk ki, ill. mérhetünk: meg tudunk vele csavarni egyetlen DNS-molekulát, illetve torziós mechanikai paramétereit is meg tudjuk határozni - mivel a DNS helix alakú molekula, és a genetikai kód olvasása a molekula csavarodásával együtt járó folyamatokban zajlik, e tulajdonságok ismerete fontos a mechanizmusok megértéséhez.

A fotopolimerizációval előállítható mikron méretű, propeller alakú test is: ez az optikai csapdában megragadva forogni kezd. Ilyen rotorok is használhatók biológiai objektumok forgatására, csavarására. Használhatók ugyanakkor mikroszkopikus gépek hajtására is.

A fotopolimerizációs eljárással tehát mindenféle, szinte tetszőlegesen bonyolult alakú mikroszkopikus struktúra előállítható. Fontos körülmény, hogy a modern biológiai, biotechnológiai kutatásokban nagy szerepet szánunk a mikrofluidikai berendezéseknek. Ilyen mikronnyi karakterisztikus méretű biokémiai laboratóriumokban terveznek megvalósítani összetett vizsgálati, preparációs eljárásokat. E berendezések legfontosabb tulajdonsága a kicsinyisége, ezért ezekben nagyszámú vizsgálatot lehet gyorsan elvégezni kis mennyiségű anyagokon. E tulajdonságok a genomika információáradatában kulcsfontosságúak. Ezért azután e "chiplaboratóriumok" fejlesztése igen nagy energiák befektetésével zajlik. Többféle technológia alkalmazását próbálják. A kutatás-fejlesztés még a kezdeteknél tart, nincs még domináns koncepció. Mi úgy gondoljuk, hogy a fotopolimerizációs struktúraépítés ígéretes út, szerintünk a kétfotonos fotopolimerizáció a feladatok zömét ellátja.

Láttuk, fotopolimerizációval létrehozhatunk propellereket, amelyeket aztán fénnel hajtani is tudunk. Az eljárás alkalmas a mikrofluidikai csatornák, edények létrehozására is. Síküveghordozóra fel tudunk építeni bonyolult csatornarendszereket, együtt mozgó alkatrészekkel.

A vizsgálandó testeket fénnel azonosítjuk (abszorpciójukat, fluoreszcenciájukat mérjük), és mint látjuk, akár mozgatjuk is. A gyakorlatban jól használható berendezéseknek minél függetlenebbül kellene működniük a komplikált mikroszkópos berendezésektől. A rotoroknak, motoroknak az optikai csapdáktól is függetleneknek kellene lenniük. A berendezéseknek ezért lényeges alkotórészei a fényvezetők: ezek a mérő fényt vezetnek, ill. a mechanikai komponensek hajtásához szükséges fényt is a rendszerhez integrált fényvezetővel célszerű továbbítani. A fotopolimerizációs eljárással ez is megoldható: tetszőleges keresztmetszetű, optimalizált optikai tulajdonságú fényvezetőt készíthetünk eljárással, a többi alkatrésszel együtt. Az elv illusztrálására bemutatunk egy integrált optikai motort, amely üveglapra készült. A rotort tartó állórész, a rotor és a fényt a rotorhoz juttató fényvezető mind fotopolimerizációval készült. Az ábrán a motor sematikus rajza, ill. az elkészült gép mikroszkópos képe látható. A motor működtetéséhez elegendő fényvezető szálon hozzá vezetni a fényt. Reméljük, bemutatott példánk jól illusztrálja, hogy a fotopolimerizációs eljárással bonyolult mikrofluidikai berendezések legfontosabb komponensei előállíthatóak, ráadásul integrált egységben, mind az előállítást, mind a működést tekintve.

IRODALOM

- Galajda P. - Ormos P. (2001): Applied Physics Letters. 78, 249-251.
Galajda P. - Ormos P. (2003): Optics Express. 11, 446-451.