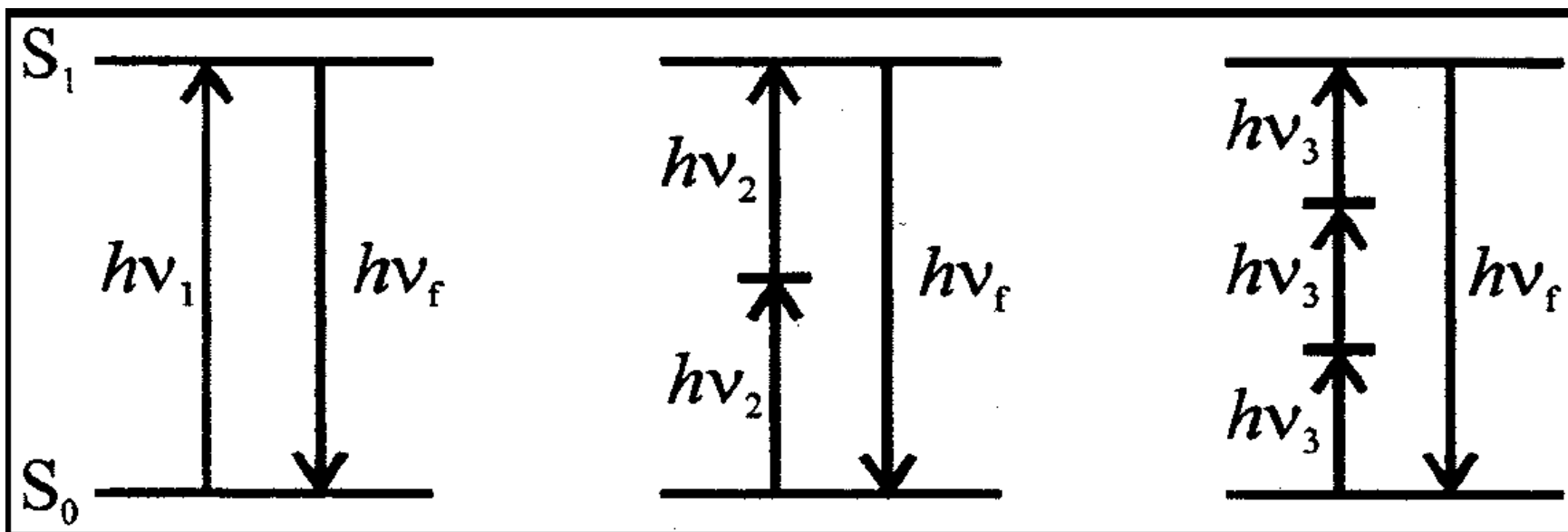


# 17. Multifotonová excitace fluorescence

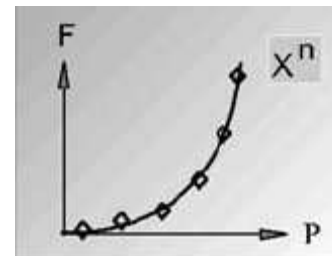
# Multifotonová absorpce

Při dostatečně vysoké intenzitě světla je možné, že molekula pohltí dva fotony, které mají energii rovnou polovině energie nutné pro přechod z  $S_0$  do  $S_1$  (popř. 3 fotony o třetinové energii, atd.). Pro dosažení potřebné intenzity je obvykle nutné zfokusovat paprsek velmi silného laseru objektivem s velkou NA.



*D.J.S. Birch, Spectrochimica Acta Part A 57 (2001) 2313–2336*

Jedná se o nelineární efekt, pravděpodobnost  $n$ -fotonové absorpce závisí na výkonu laseru  $W$  jako  $W^n$ .

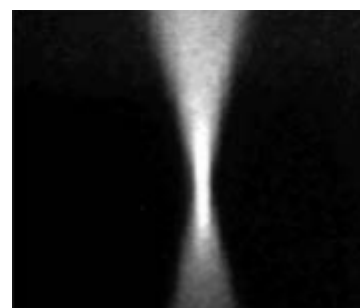


# Multifotonová fluorescence

Hustota fotonů pro vícefotonovou excitaci je dostatečná pouze v malém okolí ohniska

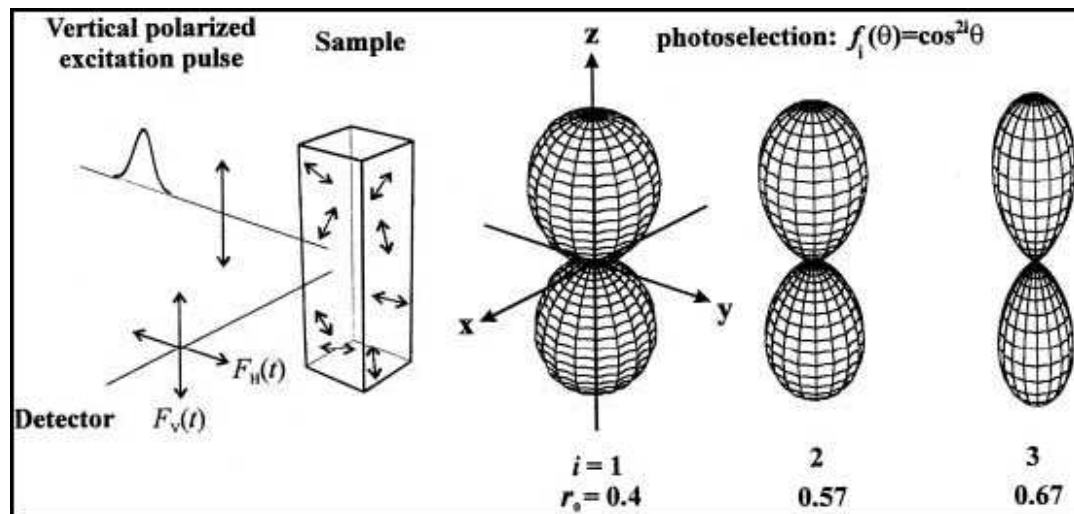
Výborná lokalizace detekčního objemu  
- vhodné např. pro konfokální mikroskopii, FCS  
- minimální fotodegradace vzorku mimo ohnisko

Potlačení interference Rayleighova a Ramanova rozptylu

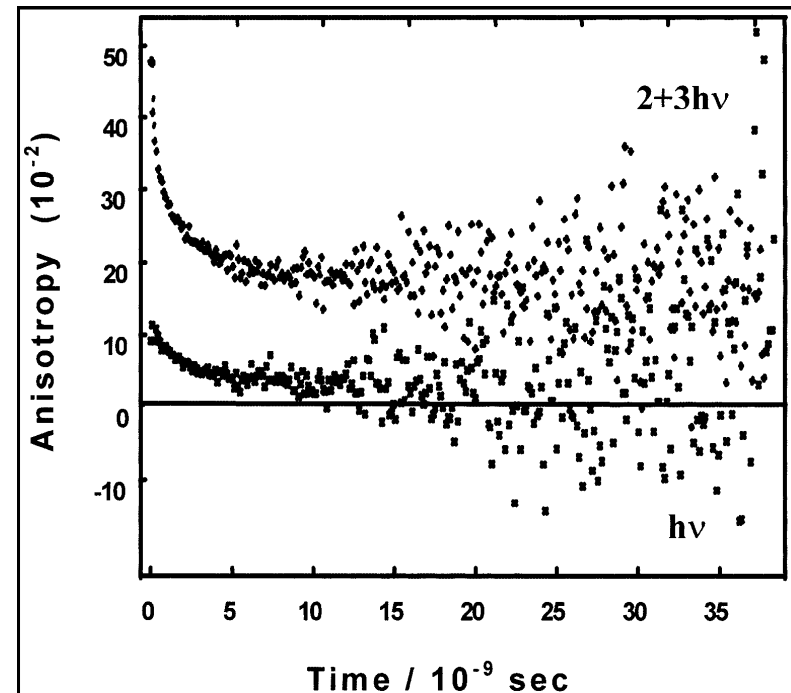


# Měření anizotropie

Maximální dosažitelná fundamentální anizotropie roste s počtem fotonů pro absorpci  
Zvyšuje se rozlišení experimentů založených na měření anizotropie



*D.J.S. Birch, Spectrochimica Acta Part A 57 (2001) 2313–2336*

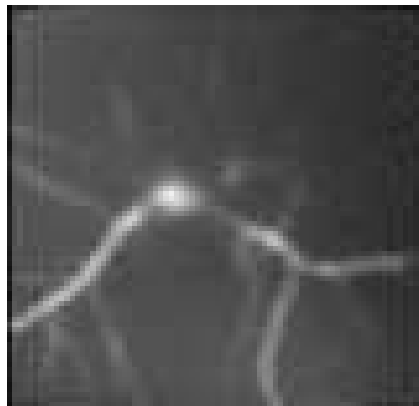


# Multifotonová mikroskopie

Tkáň je v červené a infračervené oblasti spektra lépe propustná.

Možnost sledování fluorescence in vivo

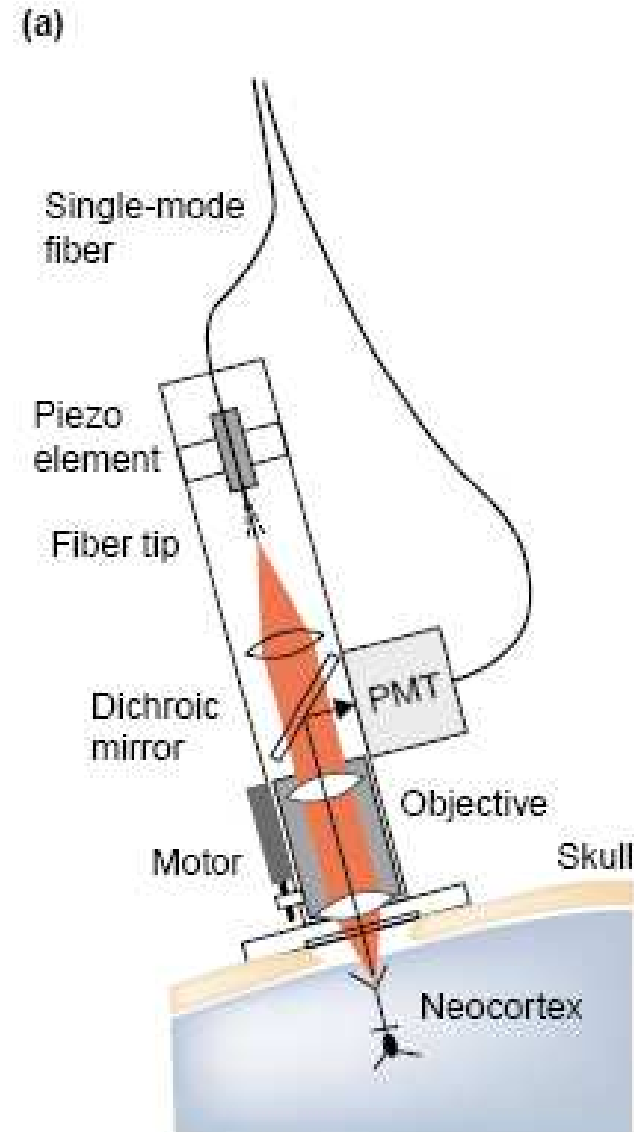
In vivo imaging



dendrity



cévní řečiště



# Shrnutí

Při velké lokální hustotě fotonů je možná vícefotonová absorpce  
Výborná lokalizace detekčního objemu  
Minimální fotodegradace vzorku mimo ohnisko  
Potlačení interference Rayleighova a Ramanova rozptylu  
Možná vyšší fundamentální anizotropie fluorescence  
Lepší propustnost tkáně v červené a IČ oblasti spektra umožňuje lepší měření in vivo