

Fluorescenčna spektroskopija

Avtor: Rok Podlipec

Mentor: doc. dr. Primož Zihlerl

June 5, 2009

Povzetek

Fluorescenčna spektroskopija je oblika elektromagnetne spektroskopije, ki analizira fluorescenco vzorca. Metoda temelji na fokusiranem žarku svetlobe, ki povzroči vzbujanje elektronov v molekulah določenih snovi, ki nato pri prehajanju nazaj v nižja energijska stanja izsevajo svetlobo. Primer aplikativne uporabe fluorescenčne spektroskopije so raziskave na tkivih, kjer lahko npr. raziskujemo termično poškodovanost le-teh pod vplivom radiofrekvenčnega polja. To lahko bistveno vpliva na natančno določanje obsega terapije, v primeru, bolezenjskih stanj tkiv. Pomembna veja fluorescenčne spektroskopije je fluorescenčna korelacijska spektroskopija (FCS). To je občutljiva tehnika, razvita za študij dinamike procesov fluorescenčno označenih molekul pod ravnovesnimi pogoji. FCS meri fluktuacije fluorescenčne intenzitete v neki prostornini, ki jo določa fokusiran laserski žarek. Fluktuacije so lahko posledica difuzije fluorescenčno labeliranih molekul, dinamike kemijskih reakcij in drugih efektov. S korelacijo intenzitete fluktuacij lahko določimo lokalno koncentracijo, konstante kemijskih reakcij in hitrost difuzije.

Contents

1	Fluorescenčna spektroskopija	2
1.1	Uvod	2
1.2	Teorija	2
1.3	Fluorescenca	3
1.4	Diagram Jablonskega	3
1.5	Čas molekularnih procesov v raztopini	5
1.6	Fluorescenčna anizotropija	5
1.7	Načina fluorescenčne meritve	5
1.8	Naprava	7
1.9	Analiza spektralnih podatkov	8
1.10	Raziskave na živih celicah in tkivih	9
2	Fluorescenčna korelacijska spektroskopija	12
2.1	Zgodovina	13
2.2	Naprava	13
2.3	Interpretacija obsevanega območja	14
2.4	Interpretacija avtokorelacijske funkcije	14
2.5	Uporaba FCS	15
3	Zaključek	17

1 Fluorescenčna spektroskopija

1.1 Uvod

Fluorescenčna spektroskopija je eno osnovnih raziskovalnih orodij v biokemiji in biofiziki. V zadnjih dvajsetih letih se je uporaba fluorescence v bioloških raziskavah znatno povečala in se kot glavna metoda uporablja še v biotehnologiji, medicinski diagnostiki, genski analizi, ipd. Dobra lastnost pri detektiranju fluorescence je visoka občutljivost, ker fluorescenčni signal načeloma nima ozadja [1].

1.2 Teorija

Molekule zasedajo različna energijska stanja, ki jim pravimo energijski nivoji. Večina jih v ravnovesnem stanju zaseda najnižja energijska oz. elektronska stanja, ko pa jih obsevamo s primernim elektromagnetnim valovanjem, preidejo v energijsko višja (npr. iz $n = 1$ na $n = 2$). Molekule imajo poleg elektronskih še vibracijska in rotacijska stanja, katerih energijski prehodi so veliko manjši [2]. Ker molekule med seboj trkajo, izgubljajo vibracijsko energijo oz. preidejo v najnižje vibracijsko stanje vzbujenega elektronskega stanja. Molekula sčasoma preide v najnižje oz. osnovno elektronsko stanje, pri tem pa emitira foton (slika 1). Ker je v osnovnem energijskem stanju možnih več vibracijskih stanj, je energija fotonov in s tem njihova frekvenca lahko različna. Posledično lahko pri fluorescenčni spektroskopiji z analiziranjem frekvenc emitirane svetlobe in njihovih relativnih intenzitet določimo strukturo različnih vibracijskih nivojev (Dispersed Fluorescence Spectroscopy) [3].

Z analizo spektra lahko kvantitativno določimo količino fluorescenčnih delcev v vzorcu. Razmerje med fluorescenčno intenziteto in koncentracijo teh je:

$$F = kQP_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (1)$$

kjer F predstavlja izmerjeno fluorescenčno intenziteto, k geometrijski faktor, Q kvantni izkoristek (razmerje števila izsevanih in absorbiranih fotonov), P_0 moč izvora svetlobe, ϵ absorpcijski koeficient, ki je odvisen od valovne dolžine, b dolžino poti in c koncentracijo fluorescenčnih delcev [4].

Emisijski spektri se zelo razlikujejo in so odvisni od kemijske strukture fluorescenčnih označevalcev in raztopine, v kateri so raztopljeni (slika 2).

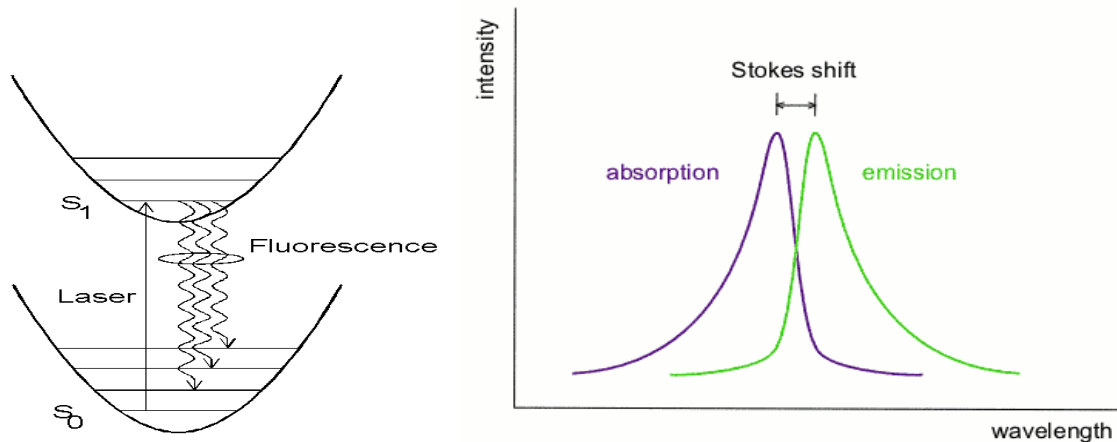


Figure 1: Shematski prikaz absorpcije in fluorescence. Vodoravne črte nad osnovnim (S_0) in vzbujenim stanjem (S_1) predstavljajo vibracijska stanja molekul. Obstajajo še rotacijski nivoji, ki jih je mnogo več in niso prikazani (leva slika) [3]. Pogosto ima emisijski spekter glede na absorpcijski spekter rdeči premik, imenovan Stokesov premik - gre za premik vrhov absorpcijskega in emisijskega spektra po valovni dolžini istega elektronskega prehoda (desna slika) [5].

1.3 Fluorescenca

Luminiscenca je svetloba, ki jo seva katerakoli snov, ko prehaja v nižja elektronska stanja. Luminiscenca se formalno loči v dve kategoriji, fluorescenco in fosforescenco. Ločita se po naravi vzbujenega stanja. Lahko imamo vzbujeno singletno stanje, kjer ima par vzbujenega in nevzbujenega elektrona nasprotno obrnjen spin. Tukaj je prehod vzbujenega elektrona nazaj v osnovno stanje dovoljen in se zgodi zelo hitro, praktično že med samim vzbujanjem. Življenski čas fluorescenc je približno 10 ns [1]. V drugem primeru imamo vzbujeni elektron, katerega spin kaže v isto smer kot njegov par v osnovnem stanju. Prehod vzbujenega elektrona nazaj v osnovno stanje je prepovedan zaradi simetrije, zato so življenski časi fosforescenc tipično zelo dolgi (od 10^{-3} do 10 s) [1]. Fosforescenčne snovi po svetlobnem vzbujanju ponavadi sevajo s spontano emisijo še nekaj minut. Obstajajo tudi snovi, ki vsebujejo tako singletna kot tudi tripletna stanja.

Fluorescenčni označevalci

Načeloma lahko fluorescira vsaka snov, če le ima nekaj ostro definiranih in razmaknjenih energijskih stanj, kakršna ima npr. kalijeva in natrijeva para. Fluorescenca je značilna tudi za aromatske molekule [1]. Če pa snov takšnih stanj nima, jih včasih lahko ustvarimo z dodatki aktivatorjev ali luminiscenčnih centrov. Ti omogočajo, da se del absorbirane energije predela v svetlobo z ozkim pasom valovnih dolžin.

Fluorescenca se pogosto uporablja v raziskavah celice. Fluorescenčne označevalce pritrdimo na želeni del celice. Ti označevalci nato sevajo, kar lahko opazujemo z mikroskopom.

Snovi, ki povzročajo fluorescenco, so kinin, klorofil, fluorescein¹, rodamin², zeleni fluorescenčni protein (GFP - Green Fluorescent Protein), itd. Standardni življenski časi nekaterih fluorescenčnih označevalcev so prikazani v tabeli 1. Pri raziskavah se vedno poskuša uporabiti najprimernejše fluorescenčne označevalce, ki ustrezajo eksperimentalnim zahtevam.

Zelo pogost fluorescenčni označevalec je kinin, ki je vsebovan v toniku. Če opazujemo, kaj se z njim dogaja med izpostavljenostjo sončni svetlobi, na površini vidimo rahlo modro svetlobo. Efekt je nabolj opazen, ko gledamo kozarec s tonikom desno od smeri vpadne sončne svetlobe in ko mu dodamo še alkohol, ki zmanjša dielektrično konstanto. Kinin vzbudi z ultravijolična svetloba, izseva pa modro svetlobo valovne dolžine približno 450 nm. Ta pojav je prvi opazoval Sir John Frederick William Herschel leta 1845. Še danes imamo kinin za najlepši zgled fluorescenc.

standardi	življenski čas [ns]	eksperimentalni pogoji	vzbujanje [nm]	emisija [nm]
2-aminopurin	11.34	voda	290	380
L-tirozin	3.27	voda	285	300
fluorescein	4.1±0.1	NaOH/voda	400	490-520
rodamin B	1.7	voda	400	583

Table 1: Standardni življenski časi fluorescenčnih označevalcev. Ti eksponentno razpadajo z enim samim karakterističnim časom. Ti podatki se lahko uporabijo za ugotavljanje instrumentacijskih napak naprave [6].

1.4 Diagram Jablonskega

Diagrami Jablonskega prikazujejo različne fizikalne procese, ki lahko potečejo v vzbujenih stanjih molekul. Poimenovani so po Alexandru Jablonskem, ki velja za očeta fluorescenčne spektroskopije. Tipičen diagram Jablonskega vidimo na sliki 3. Z S_0 , S_1 , S_2 in S_n so označeni singletno osnovno, prvo, drugo in n -to vzbujeno stanje. Na vsakem energijskem nivoju imajo fluorescenčni označevalci lahko več vibracijskih stanj (sive črte). Notranja konverzija je proces, pri katerem molekule hitro preidejo na najnižje vibracijsko stanje določenega energijskega nivoja (temu pravimo termalizacija, vzrok je prekrivanje stanj). Proces se zgodi znotraj 10^{-12} s, ker pa vemo, da je življenski čas fluorescenc tipično 10^{-8} s, izmenjava poteče še preden se izseva svetloba.

¹Oranžno rdeče barvilo, ki fluorescira zeleno in se uporablja med drugim za diagnozo poškodb roženice in v imunologiji

²Barvilo, ki se uporablja za merjenje tokov v vodi, za merjenje biološke aktivnosti s fluorescenčno spektroskopijo ipd.

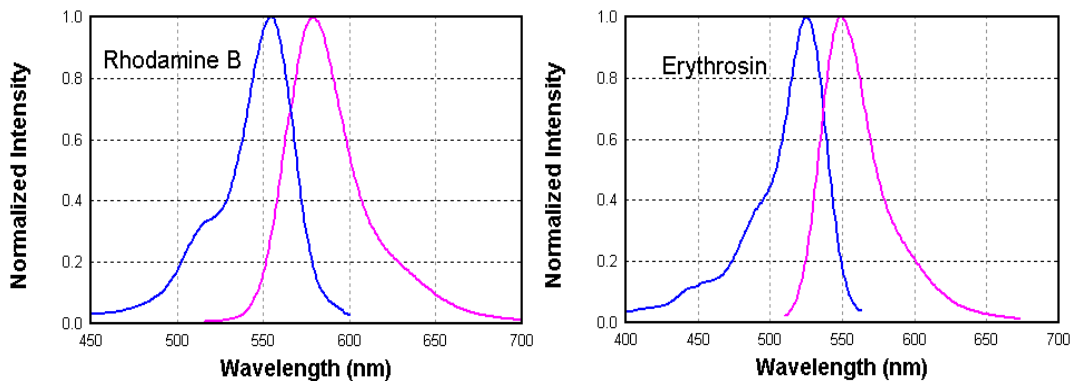


Figure 2: Absorpcijski in emisijski spekter [$\lambda_{max}(vzb) = 525$ nm, $\lambda_{max}(em) = 549$ nm] eritrozina v vodi (levo). Absorpcijski in emisijski spekter [$\lambda_{max}(vzb) = 554$ nm, $\lambda_{max}(em) = 579$ nm] Rodamina B v vodi (desno). Spektra sta bila izmerjena na PCITM (občutljiv, stabilen spektrofotometer, povezan z računalnikom, izdelan za uporabo v fizikalni kemiji, biokemiji, psihologiji, molekularni biologiji ipd.) s 300 W ksenonovo žarnico. Opazimo, da je emisijski spekter skoraj zrcalna slika absorpcijskega. Razlog je, da oba spektra prikazujeta enake elektronske prehode in da so si vibracijski nivoji v stanjih S_0 in S_1 podobni [6].

T_1 in T_2 predstavljata tripletna vzbujena stanja, ki jih dobimo, ko se elektronom iz S_1 in S_2 zamenja smer spina. Prehodi teh stanj v osnovno stanje S_0 so prepovedani zaradi simetrije, zato jih je zelo malo. Na tem diagramu ni prikazanih interakcij in še drugih možnih učinkov med molekulami v raztopini, ki so ponavadi prisotni zaradi kompleksnosti sistema [1].

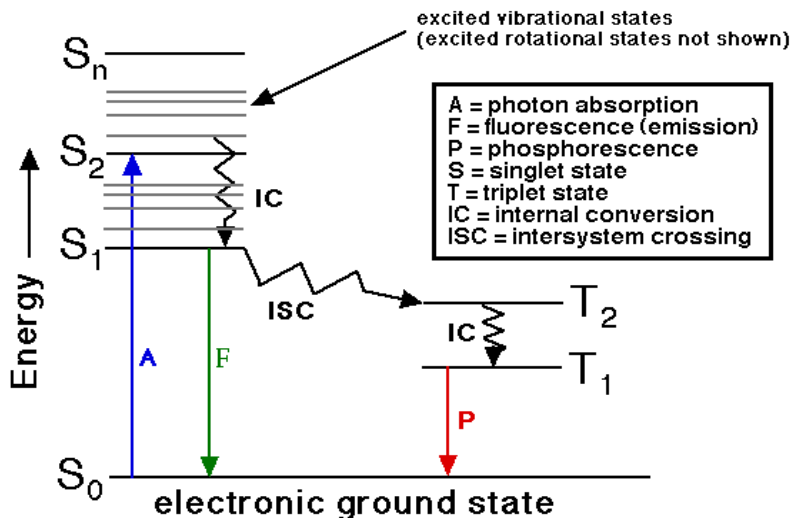


Figure 3: Primer diagrama Jablonskega. Na levi strani so z S_0 , S_1 , S_2 in S_n označeni energijski nivoji med katerimi sive vodoravne črte prikazujejo še vibracijske nivoje. Z IC je označena notranja konverzija, kjer molekule prehajajo v najnižje vibracijsko stanje in potem še v osnovno stanje, kjer se izseva foton (zelena puščica, F označuje fluorescenco). Možen je tudi prehod iz vzbujenega singletnega stanja v tripletno stanje T_2 . Ko molekule prehajajo v osnovno stanje fosforescirajo (rdeča puščica) [4].

1.5 Čas molekularnih procesov v raztopini

Intenziteta fluorescence se lahko zmanjša kot posledica več različnih procesov. Vzbujeno stanje fluorescenčnega označevalca se npr. po stiku z drugo molekulo v raztopini deaktivira oz. preide v osnovno stanje. Ti procesi nam pri meritvi življenjskih časov fluorescence omogočajo določevanje dinamičnih procesov v raztopini ali v makromolekulah. Absorpcijski spekter ni odvisen od molekularne dinamike (dinamika molekul je počasnejša od absorpcijskega časa), medtem ko emisijski je [1]. Če vemo, kolikšen je npr. difuzijski koeficient kisika v vodi pri določenih pogojih ($T = 25^\circ\text{C}$, $D = 2.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$) in kolikšen življenjski čas fluorescenčnih označevalcev ($\tau = 10 \text{ ns}$), lahko z Einsteinovo enačbo izračunamo povprečen kvadrat razdalje, ki jo prepotuje kisik v tem času [1]:

$$\Delta x^2 = 2D\tau. \quad (2)$$

Razdalja je približno 7 nm, kar je primerljivo z debelino membran oz. premerom proteinov. Če so življenjski časi fluorescenčnih označevalcev še daljši, lahko v tem primeru opazujemo kisikove molekule še na večjem prostoru [1].

1.6 Fluorescenčna anizotropija

Meritve anizotropije se uporabljajo predvsem v biokemijskih raziskavah. Dajo informacijo o velikosti in obliki proteinov ali pa o stopnji togosti različnih molekularnih okolij. Primer je meritev fluidnosti membran. Princip meritve je na selektivnem vzbujanju fluorescenčnih označevalcev s polarizirano svetlobo (slika 4). Fluorescenčna anizotropija (r) in polarizacija (P) sta definirani takole[1]:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}, \quad P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}, \quad (3)$$

kjer sta $I_{||}$ in I_{\perp} fluorescenčni intenziteti v vertikalni in horizontalni smeri: vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo.

Obstaja več dejavnikov, ki vplivajo na zmanjšanje vrednosti r in P . Eden izmed pomembnejših je rotacijska difuzija, ki toliko zarotira fluorescenčne označevalce med njihovim življenjskim časom, da emisijski spekter ni več polariziran. Čas rotacijske difuzije je mnogo krajši od življenjskega časa označevalcev.

1.7 Načina fluorescenčne meritve

Fluorescenčne meritve delimo na dva načina. Prvi način je, da imamo konstanten izvor svetlobe, ki osvetljuje vzorec, v drugem primeru pa imamo pulzni izvor svetlobe. Ker je časovna skala fluorescence reda ns, je pri prvem načinu meritve vzorec v stacionarnem stanju. To stanje je doseženo takoj, ko je vzorec prvič izpostavljen svetlobi.

V drugem primeru imamo pulzni izvor, katerega širina je tipično krajša od razpadnega časa fluorescenčnega vzorca, zato lahko merimo spremembo intenzitete ali anizotropije (slika 5). Padec intenzitete posnamemo s hitrim detekcijskim sistemom, ki omogoča meritev na časovnih skalah oz. intervalih reda ns [1]. Ta načina sta povezana tako, da je prvi preprosto povprečenje drugega čez časovno območje. Kot primer vzemimo fluorescenčni označevalec, ki razpada z enim samim razpadnim časom (τ) in rotacijskim korelacijskim časom (θ). Intenziteta in anizotropija sta podani z:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \quad r(t) = r_0 e^{-t/\theta}, \quad (4)$$

kjer sta I_0 in r_0 intenziteta in anizotropija ob času $t = 0$. S pomočjo teh enačb lahko izračunamo povprečno anizotropijo (r):

$$r = \frac{\int_0^\infty r(t)I(t)dt}{\int_0^\infty I(t)dt} \quad (5)$$

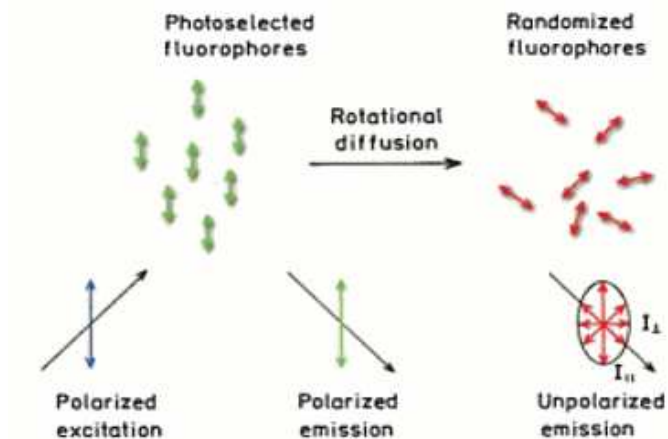


Figure 4: Vplivi polariziranega vzbujanja in rotacijske difuzije na polarizacijo oz. anizotropijo izsevane svetlobe. Na levi strani slike vpadna polarizirana svetloba vzbudi fluorescenčne označevalce, ki v primeru, da nimajo rotacijske difuzije oz. je ta počasnejša od njihovega življenjskega časa, sevajo polarizirano svetlobo (zeleni puščici). V primeru rotacijske difuzije, ki je krajša od njihovih življenjskih časov, pa sevajo nepolarizirano svetlobo (rdeče puščice) [1].

S členom v imenovalcu normaliziramo vrednost anizotropije, da je neodvisna od totalne intenzitete (slika 5). S povprečenjem izgubimo veliko informacij o vzorcu. Fluorescenčne makromolekule so v večini kompleksne, zato imajo tudi kompleksne anizotropne razpade. Natančna oblika anizotropnega razpada nam da informacijo o razvejanosti in mobilnosti makromolekule. Podobno velja za meritev intenzitete, kjer lahko oblika razkrije prisotnost dveh razpadnih časov, medtem ko nam povprečenje intenzitete po času da le povprečno vrednost razpadnih časov [1].

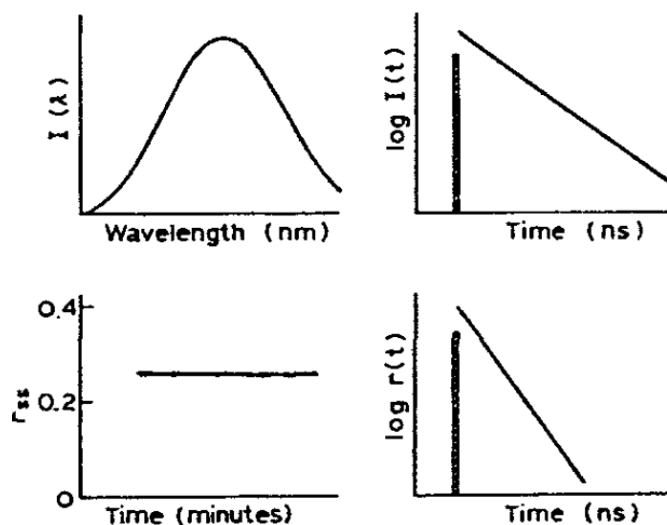


Figure 5: Primerjava načinov fluorescenčne spektroskopije. Grafi na levi prikazujeta porazdelitev intenzitete po valovnih dolžinah in anizotropijo preko daljšega časovnega območja (konstanten izvor svetlobe), grafi na desni pa intenziteto in anizotropijo posameznega razpada fluorescence v logaritmski skali (pulzni izvor svetlobe) [1].

1.8 Naprava

Spektrofluorometri

Z njimi lahko merimo tako ekscitacijski kot tudi emisijski spekter. Emisijski spekter je porazdelitev intenzitete po valovni dolžini pri dani valovni dolžini ekscitacijske svetlobe. Pri idealnem instrumentu emisijski spekter predstavlja izsevano moč po posameznih valovnih dolžinah v območju, določenem s širino rež in disperzijo monokromatorja (slika 6).

Naprava vsebuje dva filtra: primarni filter oz. filter vpadne svetlobe izolira valovno dolžino, ki na vzorcu povzroči fluorescenco, medtem ko sekundarni filter izolira zeleno emitirano svetlobo. Zelo je pomembna primerna izbira filtrov. Primarni filter izberemo tako, da prepušča le tiste valovne dolžine, ki se pri emisijskem in ekscitacijskem spektru prekrivajo [7].

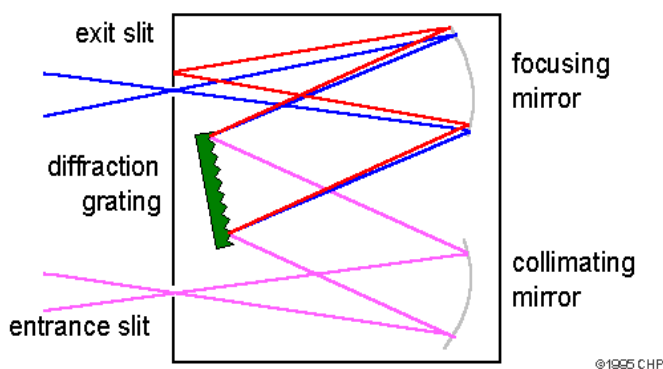


Figure 6: Shema monokromatorja. Spodaj levo je vstopna reža, skozi katero žarek potuje na zrcalo, ki je usmerjeno tako, da svetlobo kolimira na uklonsko mrežico. Ta svetlobo odbije in razprši po valovnih dolžinah. Sekundarno zrcalo jo nato fokusira v različne točke glede na valovno dolžino. S spreminjanjem lege izstopne reže prepuščamo svetlobo zelene valovne dolžine [4].

Svetloba iz izvora potuje skozi filter oz. monokromator na vzorec. Vzorec absorbira del vpadne svetlobe, v katerem posamezne molekule oddajo svetlobo pri prehajanju v nižja stanja. Razširja se v vse smeri. Del te svetlobe potuje skozi drugi monokromator, kjer nato doseže detektor. Ponavadi je postavljen pod kotom 90° glede na vpadni žarek, da minimizira tveganje detekcije prepuščene oz. odbite vpadne svetlobe (slika 7) [7]. V napravah, ki merijo fluorescenco, so običajni izvori sevanja laserji³, laserske diode, LED⁴, ksenonske

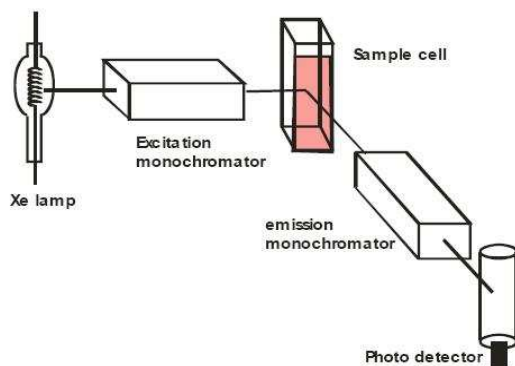


Figure 7: Shematičen prikaz fluorometra z 90° geometrijo in ksenonskim izvorom svetlobe [7].

žarnice⁵ in živosrebrne žarnice⁶.

Laser emitira svetlobo visoke intenzitete v ozkem valovnem pasu širine tipično pod 0.01 nm, za kar ne potrebujemo monokromatorja oz. filtra. Slabost te metode je, da ne moremo zadosti prilagajati valovne dolžine laserske svetlobe.

Noben monokromator ni idealen, zato prepušča tudi del svetlobe, ki ne pride direktno iz izvora, ampak iz drugih smeri (to si predstavljamo kot signal proti šumu). Če imamo postavitev 90° , je ta svetloba lahko le sipana svetloba iz vzorca. Posledica tega je, da imamo boljše razmerje signal/šum, kar zniža detekcijsko mejo, v primerjavi z geometrijo 180° za približno 10000.

Detektorji so lahko enokanalni ali večkanalni. Enokanalni detektorji lahko zaznajo intenziteto signala le pri eni valovni dolžini, medtem ko jo večkanalni detektira pri več valovnih dolžinah hkrati.

Najbolj prilagodljivi spektrofluorometri z dvojnimi monokromatorji lahko zabeležijo tako eksitacijski spekter kot tudi fluorescenčni spekter (slika 8). Pomembno je, da je valovna dolžina izvora pri meritvi fluorescenčnega spektra konstantna, kjer je absorbcija največja [7].

1.9 Analiza spektralnih podatkov

Fluorescenčna intenziteta bo v splošnem sorazmerna koncentraciji fluorescenčnih označevalcev, če je ta le dovolj majhna. Ni lahko dobiti standardnega spektra, ki bi bil neodvisen od naprave. Na spekter vpliva kar nekaj dejavnikov, zato so nujni natančni popravki, da dobimo spekter neodvisen od aparature. V spektru se pojavijo motnje in neujemanja tako zaradi instrumentalnih napak kot tudi samega vzorca [7].

Instrumentalne napake

Intenziteta in valovna dolžina svetlobe se lahko med eksperimentom spreminjata. Nobeno svetilo nima pri fiksnih valovnih dolžinah konstantne intenzitete. Ta problem rešimo tako, da za monokromator postavimo delilnik žarka, kjer ga del usmerimo na referenčni detektor.

Dodatno je treba upoštevati tudi prepustnost monokromatorjev oz. filtrov, ki se s časom lahko spreminja. Prepustnost variira tudi glede na valovno dolžino in polarizacijo emitirane svetlobe [1]. Tudi tu je bistveno, da za filter postavimo neki referenčni detektor. Od samega sistema pa je odvisen tudi odstotek detektirane fluorescenčne svetlobe. Kvantni izkoristek detektorja variira glede na detektorje, ki se s časom tudi kvarijo. Popravek vseh teh instrumentalnih faktorjev za pridobitev standardnega spektra je zoprn proces, ki ga izvedemo le, če je nujno potrebno [7].

Napake vzorca

Intenziteta fluorescence se zaradi razpada molekul pod vplivom elektromagnetnega polja s časom lahko zmanjša. Na zmanjšanje vpliva tudi sipanje svetlobe. Najbolj pomembna tipa sipanja sta Rayleighovo in Ramanovo. Svetloba, ki se siplje po Rayleighu, ima enako valovno dolžino kot vpadna, medtem ko se pri Ramanovem sipanju svetlobi valovna dolžina poveča [7].

Sekundarna absorbcija in neneakomerna koncentracija

Sekundarna absorbcija se zgodi, ko druga molekula ali del makromolekule absorbira ravno tiste valovne dolžine svetlobe, emitirane iz fluorescenčnih molekul. Če je to res, potem se lahko velik del izsevanih fotonov ponovno absorbira.

Drug pomemben efekt, ki vpliva na spekter, je neenakomerna koncentracija absorbirajočih molekul vključno s

³Pomembna karakteristika laserskih izvorov je njihov časovni profil. Na eni strani imamo izvor konstantnega sevanja (argonov, helijev laser), na drugi strani pa pulzni izvor sevanja (titanov, Nd:YAG laser).

⁴So mnogo šibkejši in nekolimirani izvori v primeru z laserji, vendar so za komercialno uporabo veliko primernejši, ne povzročajo dodatnega segrevanja, itd.

⁵Svetloba se generira med elektrodama, kjer se ksenonov plin ionizira in pri tem seva močno belo svetlobo, ki je zelo podobna dnevni. Emitirana svetloba je relativno konstantna čez spektralno območje (od ultravijoličnega do infrardečega). Svetilo je najprimernejše za raziskave na bioloških vzorcih, ker so ti neobčutljivi za to spektralno območje.

⁶Žarnice, kjer izhlapeva živosrebrna para, ki pri prehajanju nazaj v osnovno stanje oddaja svetlobo. Spekter je neenakomeren in ima vrhove.

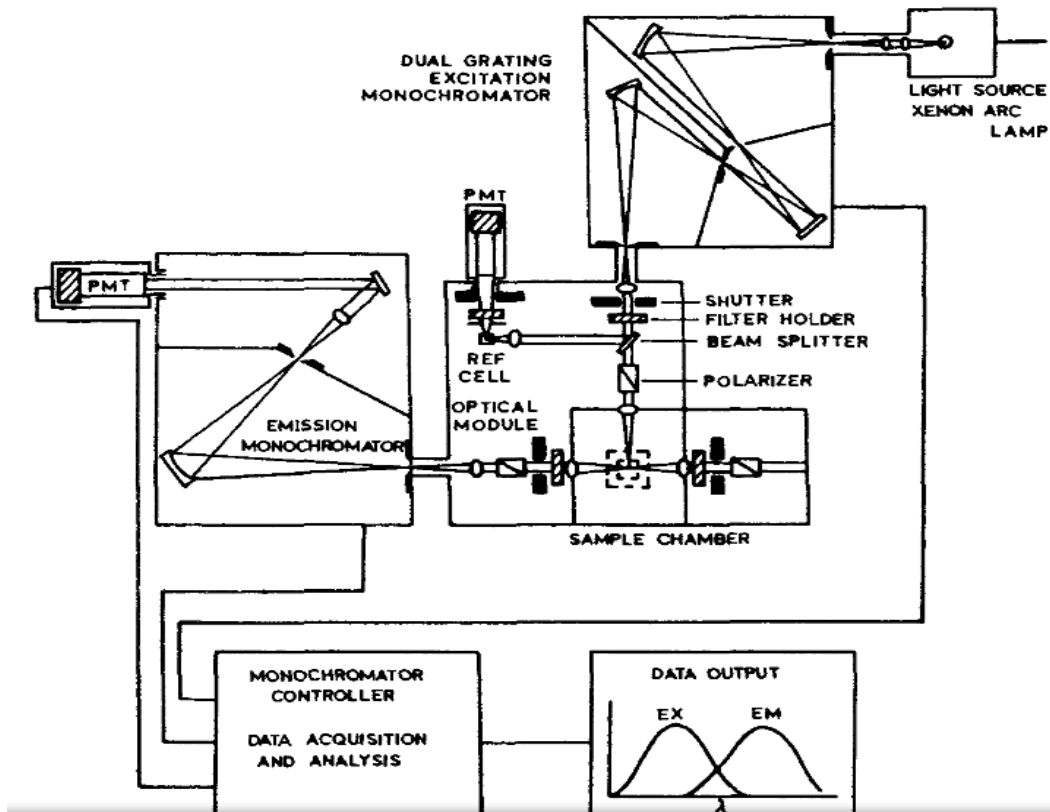


Figure 8: Shema spektrofluorometra. Izvor svetlobe je ksenonska svetilka (zgoraj desno). Naprava ima dva monokromatorja, s katerima izbiramo primerno ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino svetlobe. Ekscitacijski monokromator vsebuje dve uklonski mrežici, ki sta postavljeni tako, da zmanjšata intenziteto izhodne svetlobe valovne dolžine, ki je ne potrebujemo. Za monokromatorjem imamo filter, za njim delilnik žarka, katerega majhen del potuje na referenčno celico, ki vsebuje stabilen referenčni fluorescenčni označevalec. Intenziteta emitirane svetlobe na referenčni celici je sorazmerna z intenziteto vpadne svetlobe. Za delilnikom žarka je polarizator, ki ga lahko odstranimo. Uporablja se za meritve fluorescenčne anizotropije. To je zelo občutljiva meritev, kjer potrebujemo natančno orientacijo polarizatorjev. Preverimo jo z dodatnimi optičnimi nastavitvami (desno od vzorca). Svetlobo iz vzorca gre skozi filter, polarizator, monokromator in na koncu na detektor. Skoraj vsi fluorometri uporabljajo za detektorje fotopomnoževalke [1].

fluorescenčnimi označevalci. Posledica je, da intenziteta ekscitacijske svetlobe ni konstantna po vsej raztopini in tako le majhen odstotek te svetlobe doseže fluorescenčne označevalce, ki jih nato detektiramo. Pri analizi spektra moramo to upoštevati [7].

1.10 Raziskave na živih celicah in tkivih

Fluorescenčna spektroskopija se uporablja predvsem v medicinske in biokemijske raziskovalne namene in sicer za analizo tkiv ipd. Zadnja leta je uporabna tudi za ločevanje malignih in benignih kožnih tumorjev. Fluorescenčni spekter tkiv je odvisen od fizične karakteristike celic, kot je npr. struktura oz. urejenost proteinov. V kliničnih aplikacijah, ko npr. odstranjujemo rakaste celice s termičnim vzbujanjem, se ta karakteristika lahko spremeni v tolikšni meri, da opazimo spremembe v spektru [8]. V nadaljevanju bomo opisali, kako fluorescenčna spektroskopija pripomore k natančnejši interpretaciji in posledično uspešnejšem zdravljenju tkiv z radiofrekvenčnim sevanjem.

Fluorescenčna spektroskopija za detekcijo termične poškodovanosti tkiv

Obstaja kar nekaj teorij, ki opisujejo obseg poškodb tkiv zaradi obsevanja. Po Arrheniusovem modelu je termična poškodba določena kot integral, ki je odvisen od lokalne temperature tkiva po času in empiričnih konstant posameznega tkiva, frekvenčnega faktorja in aktivacijske energijske bariere. Ta model še spreminjamo glede na določene eksperimentalne pogoje, da najnatančneje predvidimo poškodovanost tkiva. Uporabili so ga tudi pri določevanju termičnega sesedanja oz. koagulacije tkiv kot posledica izpostavljenosti različnim energijskim izvorom. Časovni potek termičnega poškodovanja tkiv pa se kaže tudi v njihovi fluorescenci, saj so na podlagi eksperimentov ugotovili soodvisnost oz. sovpadanje [8].

Kot primer imamo na sliki 9 fluorescenčna spektra nepoškodovanih jeter in koaguliranih jeter. Opazimo, da se spektralni vrh koaguliranih jeter premakne iz 490 nm na 510 nm in se razširi. Te eksperimentalne rezultate so primerjali z Arrheniusovim teoretičnim modelom in ugotovili, da se pri koagulaciji tkiva pod 70°C ujema, medtem ko se pod 50°C ne povsem (slika 10). Na osi y je normalizirana vrednost $F_{510/490}$, ki predstavlja razmerje intenzitet svetlobe z valovno dolžino 510 nm in 490 nm koaguliranega tkiva z razmerjem intenzitet pri zdravem tkivu. Ob segrevanju se vzorec sčasoma koagulira, kar se kaže v naraščanju vrednosti na osi y . To je posledica tega, da se spektralni vrh pomika proti vrednosti 510 nm [8].

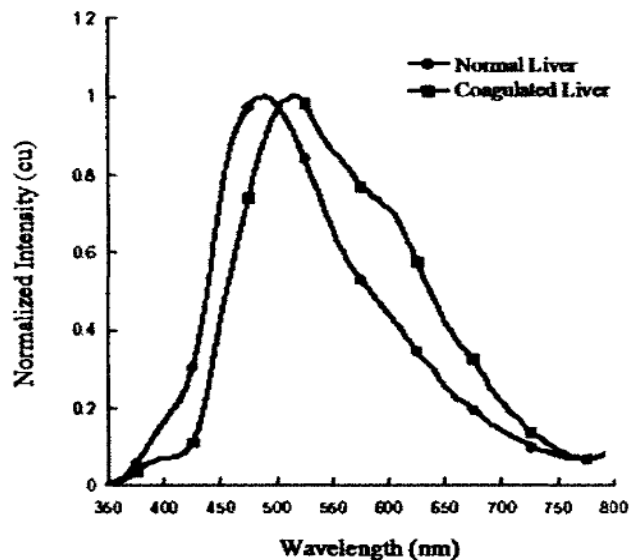


Figure 9: Fluorescenčni spekter zdravega in koaguliranega jetrnega tkiva (segrevanje pri 70°C, 60 minut). Spektra sta normalizirana na pripadajočo intenziteto v spektralnem vrhu [8].

Meritve fluorescenčnega spektra v živih tkivih

Za opazovanje spektralnih sprememb v živih tkivih so razvili spektroskopijo z uporabo optičnih vlaken (Biomedical Optics Laboratory at Vanderbilt University). Sistem je osnovan tako, da nepretrgoma dobivamo fluorescenčni spekter jetrnih tkiv s pomočjo mikrosond iz optičnih vlaken (MIP - micro-interrogation probe), pripetih znotraj pričakovanega obsega radiofrekvenčne ablacije⁷ [8].

S to metodo so dobili fluorescenčni spekter tkiva pred, med in po radiofrekvenčni ablaciji. Tkivo je bilo obsevano toliko časa, dokler so še zaznali spektralne spremembe.

⁷Operativna, poškodbeno ali medikamentna odstranitev dela telesa ali manjše patološke tvorbe ali tujka, navadno s površja telesa ali organa.

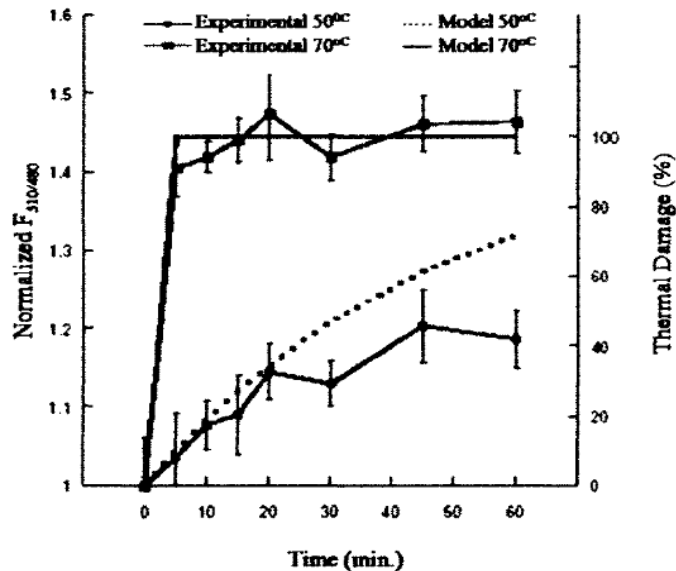


Figure 10: Časovni potek razmerja spektralnih intenzitet F_{510}/F_{480} pri segrevanju tkiva pri temperaturi 50°C in 70°C . Na grafu sta še krivulji teoretičnega modela časovnega poteka opazovanega razmerja. Vrednost F_{510}/F_{480} doseže plato (totalna termična poškodba) znotraj 5 minut pri segrevanju pri 70°C . To se zelo ujema z Arrheniusovim teoretičnim modelom, medtem ko pri segrevanju pri 50°C model za približno 30 % preceni termično poškodbo po 60 sekundah [8].

Vidne spremembe v spektru so se zgodile med 400 nm in 650 nm (slika 11). Nepoškodovana jetra kažejo močno emisijo fluorescenc med 450 in 550 nm. Konsistentno z *in vitro*⁸ raziskavami tkiv se je tudi tu med ablacijo pokazalo zmanjševanje fluorescenčne intenzitete, premik in razširjanje primarnega spektralnega vrha z 482 nm na 508 nm.

Najpomembnejša ugotovitev raziskave je bila, da lahko predvidimo, kje je meja radiofrekvenčne ablacije [8].

⁸V umetnem okolju.

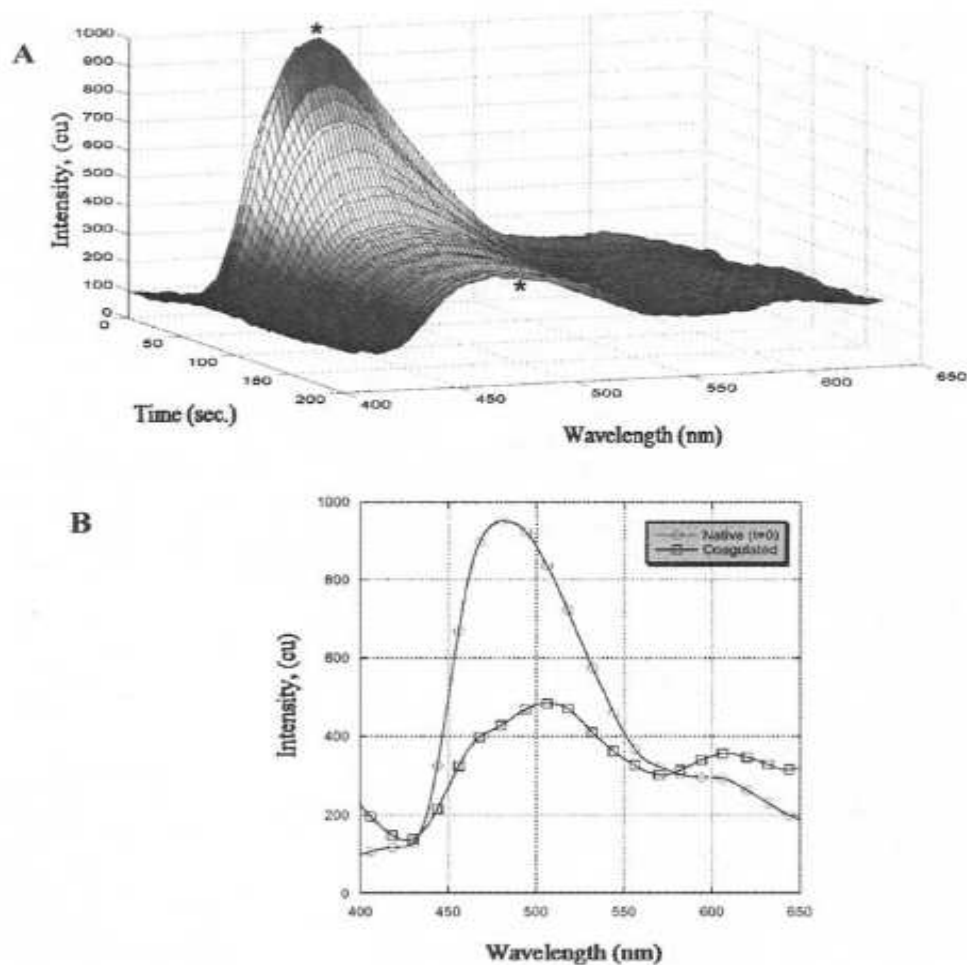


Figure 11: Celoten časovni potek frekvenčnega spektra med radofrekvenčno ablacijo (A). Zvezdica označuje premik spektralnih vrhov z 480 nm na 508 nm. Začetni in končni frekvenčni spekter dve rezini zgornjega spektra (B) [8].

2 Fluorescenčna korelacijska spektroskopija

Fluorescenčna korelacijska spektroskopija (FCS) je uporabna znanstvena metoda, ki jo uporabljajo fiziki, kemiki, biologi in še drugi pri ugotavljanju lastnosti snovi na podlagi dinamike fluorescenčnih označevalcev (to so lahko npr. fluorescenčno obarvane molekule v nanostrukturnih materialih, avtofluorescenčni proteini v živih celicah itd.). Shematski prikaz metode je na sliki 12. V splošnem je to metoda, s katero natančno določamo lokalne koncentracije, difuzijske koeficiente (tabela 2) in reakcijske konstante [10]. FCS je novejša metoda fluorescenčne spektroskopije, ki se od nje razlikuje po tem, da gledamo spekter v časovnem območju, ne frekvenčnem.

Intenziteta svetlobe, ki jo izsevajo fluorescenčni označevalci, flukturira. Fluktuacije so posledica difuzije, kemijskih reakcij, faznih sprememb, itd. Pri analizi spektra je potrebno uporabiti pravi model saj se lahko zgodi, da je v obsevanem vzorcu več različnih sevalcev fluorescence hkrati, kar nam da večji signal in manjše fluktuacije, po drugi strani pa nam problem lahko predstavljajo dolgi intervali med posameznimi fluktuacijami in bi meritev trajala preveč časa. Ker lahko fluorescenčne označevalce, katerih spektralne lastnosti poznamo, vežemo na točno določene molekule, je možno raziskovati obnašanje posameznih molekul [9].

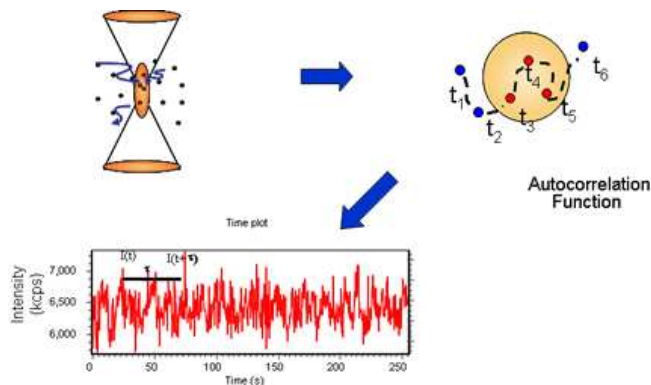


Figure 12: Shematski prikaz FCS. Levo zgoraj je obsevana prostornina, iz katere dobimo podatke o fluorescenci molekul. Desno zgoraj je prečen prerez te prostornine, levo spodaj pa dobljeni signal, ki ga z avtokorelacijo obdelamo ter ugotovljamo lastnosti vzorca [9].

fluorescenčni označevalec	difuzijski koeficient ($\mu\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$)
Rhodamine 6G	426 ± 1
Alexa488	435
eGFP	95
Alexa543	341
Atto655	426 ± 8

Table 2: Največkrat uporabljeni fluorescenčni označevalci pri meritvah FCS. Difuzijski koeficienti so izmerjeni v vodni raztopini pri temperaturi 22.5°C razen zadnjega, ki je izmerjen pri temperaturi 25°C [6].

2.1 Zgodovina

Fluorescenčno korelacijsko metodo so Magde, Elson in Webb eksperimentalno prvič uporabili leta 1972. Ko so bili narejeni teoretični izračuni oz. osnove, se je FCS šele dobro začela razvijati. Do začetka leta 1993 je bilo izboljšanih in izpopolnjenih več metod meritev. Najpomembnejši sta uporaba konfokalne in dvo-fotonske mikroskopije (two photon microscopy), ki sta izboljšali natančnost obsega obsevanja in razmerje signal/šum do te mere, da se je nivo občutljivosti povečal na eno samo molekulo. FCS je s tem postala zelo zanimiva za veliko novih aplikacij, kar se odraža v tem, da je bilo do avgusta 2007 objavljenih že več kot 3000 člankov na to temo [7].

2.2 Naprava

Napravo ponavadi sestavljajo običajni fluorescenčni mikroskopi, ki se od vrste meritev v določenih podrobnostih razlikujejo. Konfokalni mikroskop omogoča natančno lokalizacijo opazovanega vzorca (npr. membrane) v goriščni ravnini. To pomeni, da lahko v gorišču dosežemo tako tanek snop svetlobe, da je v njem le nekaj fluorescenčnih molekul [1, 11].

Svetlobo iz laserja usmerimo skozi mikroskopski objektiv na vzorec, ki vsebuje fluorescenčne molekule (slika 13, graf A). FCS teži k čim tanjšem generiranju laserskega snopa v goriščni ravnini in čim večjem izkoristku detekcije izsevanih fotonov fluorescenčnih molekul, da dosežemo občutljivost ene same molekule. Svetlobo iz vzorca zberemo z istim objektivom in usmerimo v detektor (fotopomnoževalka, fotodioda). Pred detektor postavimo še delilnik žarka, ki prepušča le emitirano svetlobo. Elektronski signal iz detektorja lahko opazujemo direktno kot intenziteto preko časovnega območja ali pa že takoj uporabimo avtokorelacijo. Zaključke in ugotovitve iz samega spektra dobimo šele z uporabo primernih modelov. S prilaganjem modelirane funkcije avtokorelacijski krivulji dobimo ustrezne parametre, ki nam določajo lastnosti spektra in samega vzorca.

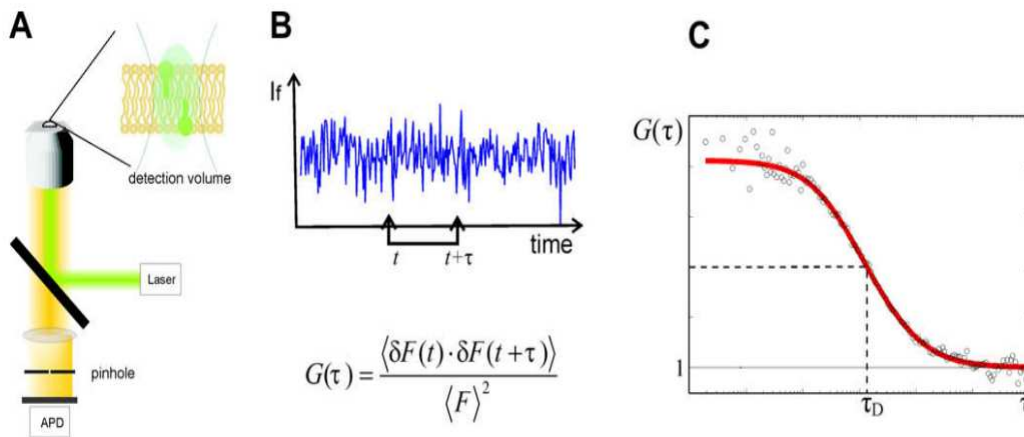


Figure 13: Princip delovanja FCS. Laserski žarek fokusiramo na ravnino membrane. Emitirane fotone najprej zberemo z objektivom, nato s filtrom prepustimo zelene valovne dolžine, na koncu pa jih detektiramo s fotodiodo (A). Fluorescenčne molekule, ki difundirajo v in iz goriščnega volumna, v fluorescenčnem signalu povzročijo fluktuacije (B). Signal nato avtokoreliramo, da dobimo avtokorelacijsko krivuljo (točke na grafu C). Difuzijski čas τ_d lahko ocenimo s fitanjem avtokorelacijske krivulje z določeno funkcijo (C) [11].

2.3 Interpretacija obsevanega območja

Dimenzije obsevanega območja lahko matematično opišemo s funkcijo PSF (point spread function). Pogosto je opisano kot elipsoid z nedoločenimi oz. neostrimi robovi, premera nekaj sto nanometrov v gorišču in dolžine mikrometra v smeri optične osi. Oblika je močno odvisna od kvalitete optičnih elementov. V primeru konfokalne mikroskopije je PSF dobro aproksimirana s 3D Gaussovo funkcijo [7]:

$$PSF(r, t) = I_0 \exp(-2r^2/r_0^2) \exp(-2z^2/z_0^2), \quad (6)$$

kjer je I_0 intenziteta v vrhu, r prečna oddaljenost od osi, z pa položaj na osi. r_0 in z_0 sta radija svetlobnega žarka oz. snopa v prečni in vzdolžni smeri, ko intenziteta pade na $I_0 e^{-2}$. Tipičen r_0 je med 200 in 300 nm, medtem ko je tipičen z_0 2 – 6 krat večji.

Eden od načinov kalibracije teh volumskih parametrov, je, da izvedemo FCS na vzorcih s poznano difuzijsko konstanto in koncentracijo. Gaussovska aproksimacija deluje v okviru različnih optičnih nastavitvev, včasih pa so potrebni tudi popravki [7].

2.4 Interpretacija avtokorelacijske funkcije

FCS temelji na korelacijski analizi fluorescenčne intenzitete, pridobljene na majhnem volumnu vzorca. Avtokorelacijska analiza je matematično orodje, ki meri sebpodobnost signala preko časovnega območja. Povezuje fluorescenčni signal s samim seboj pri različnih zakasnenjih časih. Avtokorelacijska funkcija je:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt \quad (7)$$

kjer je F fluorescenčna intenziteta kot funkcija časa, τ korelacijski čas, lomljeni oklepaji pa predstavljajo povprečenje funkcije po času. Dobljeno korelacijsko krivuljo nato prilagajamo z matematičnimi funkcijami, ki najbolj ustrezajo karakteristikam opazovanega sistema. Z njimi določamo parametre, kot so velikost in oblika detektiranega volumna ter koncentracija fluorescenčnih označevalcev kot funkcijo lege in časa. V primeru čiste difuzije fluorescenčnih delcev znotraj lipidnih membran difuzija poteka v dveh dimezijah in sicer v goriščni ravnini objektiva. Avtokorelacijska funkcija za 2D difuzijo v ravnini pravokotni na optično os v točki $z = 0$, se izraža kot [11]:

$$G(\tau) = G(0) \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1}, \quad (8)$$

kjer je $N = C\pi\omega_0^2$ povprečno število fluorescenčnih delcev v detektiranem volumnu, C koncentracija in ω_0 širina obsevanega pasu v gorišču. Difuzijski čas τ_D pa je $\tau_D = \omega_0^2/4D$, kjer je D difuzijski koeficient. Glede na eksperimentalne pogoje imamo še druge izvore fluorescenčnih fluktuacij, ki vplivajo na avtokorelacijsko krivuljo, npr. zasedenost tripletnih stanj, dodatne sile na difundirajoče molekule, dodaten tok delcev, difundiranje molekul različnih velikosti, utripanje fluorescenčnih označevalcev, kemijska relaksacija itd. Pripadajo jim različne avtokorelacijske funkcije z različnim številom prostih parametrov, ki nam na koncu določijo lastnosti vzorca.

Vpliv intenzitete svetlobe na avtokorelacijsko funkcijo

Pri zelenem fluorescenčnem proteinu je avtokorelacijska krivulja močno odvisna od vpadne laserske moči (slika 14). Na grafu so prikazane avtokorelacijske krivulje za različne moči vpadnega laserja. Ko so izvedli analize, so ugotovili, da se je s povečanjem laserske moči τ_d očitno zmanjšal. To anomalijo verjetno pripisujemo obstoju temnega stanja, ki je zasedeno ob relativno velikih laserskih močeh [12]. Molekule ne preidejo nazaj v osnovno stanje v času detekcije, zato dobimo manjši signal in posledično krajši τ_d .

V splošnem pa τ_d ni odvisen od intenzitete vpadne svetlobe (slika 16). Le določene snovi, kot je v tem primeru zeleni fluorescenčni protein, prikazuje to odvisnost.

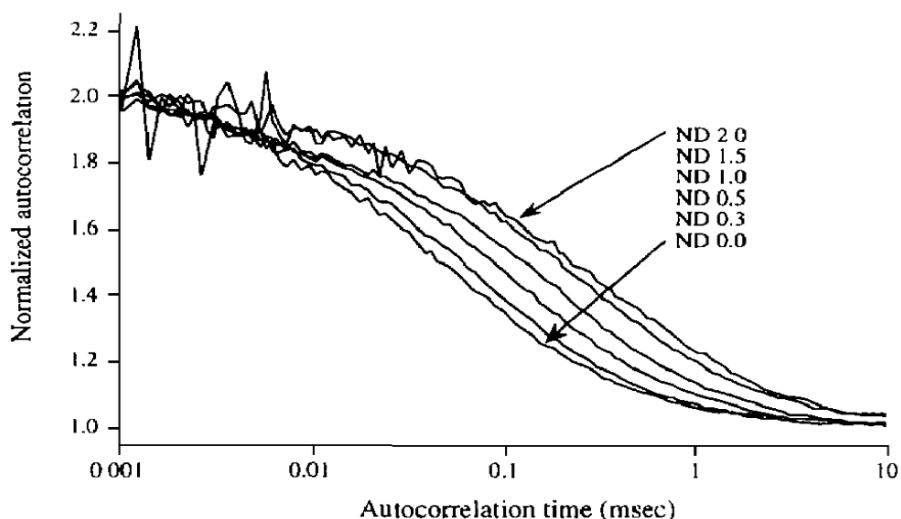


Figure 14: Normalizirana avtokorelacija v odvisnosti od intenzitete vpadne svetlobe za zeleni fluorescenčni protein. Oznake ND na grafu pripadajo različnim filtrom, ki zmanjšajo vstopno lasersko moč. $ND = 1$ pomeni, da se je moč laserja zmanjšala za faktor 10. [12].

2.5 Uporaba FCS

Področja fluorescenčne korelacijske spektroskopije so biokemija, molekularna biologija [membrane, proteini, ugotavljanje njihovih lastnosti (slika 16)], farmacevtska kemija, fizika površin, nanomateriali in nanotehnologija. Primer uporabe so raziskave dinamike celičnih membran [11]. Z metodo pridobivanja več avtokorelacijskih krivulj pri različnih legah gorišča konfokalnega mikroskopa glede na ravnino membrane lahko ugotovimo njeno lego. Če membrana leži znotraj goriščnega volumna izmerimo najmanjši difuzijski čas (slika 16 B). Tej metodi pravimo prostorsko ločljiva FCS (angleško: Z-scan FCS). Je natančna metoda za ugotavljanje difuzijskih koeficientov in koncentracij. Problem, ki lahko nastane pri meritvi celičnih membran je neujemanje lomnih količnikov snovi v membrani in zunaj nje, kar lahko vpliva na obliko goriščnega volumna.

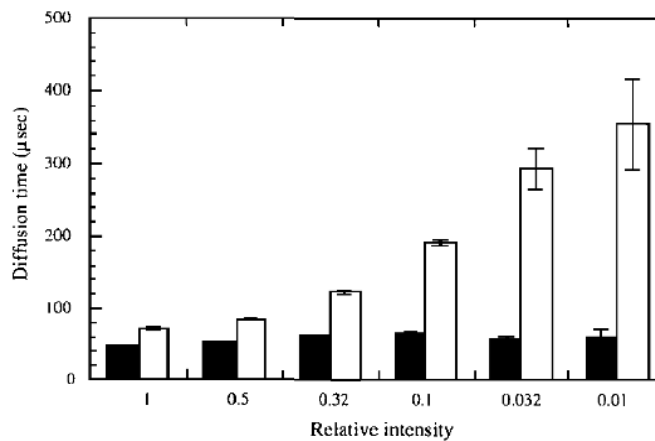


Figure 15: Beli stolpci prikazujejo difuzijske čase zelenega fluorescenčnega proteina v odvisnosti od intenzitete vpadne svetlobe, medtem ko črni difuzijske čase rodamina 6G. Opazimo, da se difuzijski časi tega označevalca ne spreminjajo. [12].

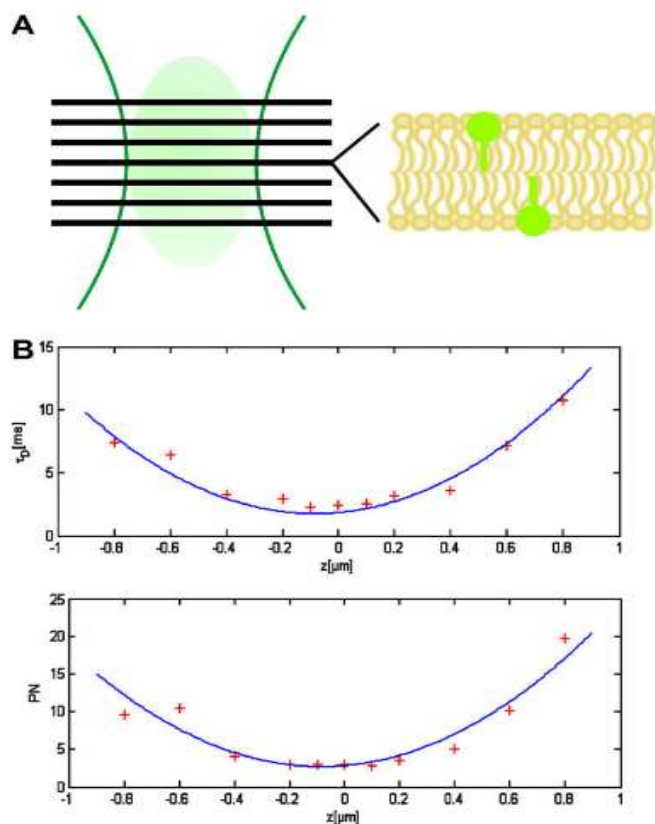


Figure 16: Prostorsko ločljiva FCS. (A) S to metodo merimo krivulje FCS pri različnih legah goriščne ravnine v smeri optične osi. (B) S prilagajanjem krivulje izmerjenim difuzijskim časom in številu delcev pri različnih položajih gorišča lahko določimo vrednosti difuzijskih koeficientov in koncentracije. Lega pri $z = 0$ je najbližja ravnini membrane [11].

3 Zaključek

Fluorescenčna spektroskopija je zaradi visoke ločljivosti in selektivnosti pomembno raziskovalno orodje na mnogih področjih znanosti. Uporablja se predvsem v kemiji, biokemiji in medicini, za natančno opazovanje struktur in dinamike bioloških sistemov v visoki resoluciji. Dober primer so klinične aplikacije, kjer fluorescenčna spektroskopija natančno določi meje med tkivi z različnimi lastnostmi, se pravi lahko določi položaj oz. lokalizacijo rakastih, malignih tkiv ipd. Zelo uporabna veja fluorescenčne spektroskopije je fluorescenčna korelacijska spektroskopija, ki nam s pomočjo korelacije signala določa lastnosti opazovanega vzorca, kot so koncentracija fluorescenčnih kazalcev, difuzijski koeficienti, molekularne interakcije ipd. Aktualen primer so raziskave celičnih membran, interakcij med lipidi in proteini, ki predstavljajo kompleksen sistem, katerega fizikalna interpretacija dinamike ni enostavna. Ta metoda bo najverjetneje v bližnji prihodnosti ponudila še boljše razumevanje teh procesov.

References

- [1] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition* (Springer, Berlin, 2008).
- [2] <http://www.fiz.uni-lj.si/tine/fizikaII.html> dostopno dne 5. 5. 2009
- [3] <http://www.chem.hope.edu> dostopno dne 25. 4. 2009
- [4] <http://elchem.kaist.ac.kr> dostopno dne 10. 5. 2009
- [5] <http://www.absoluteastronomy.com> dostopno dne 10. 5. 2009
- [6] <http://www.iss.com> dostopno dne 5. 5. 2009
- [7] <http://en.wikipedia.org> dostopno dne 5. 4. 2009
- [8] C. D. Geddes in J. R. Lakowicz, *Reviews in fluorescence 2006* (Springer, Berlin, 2007).
- [9] <http://www.cellmigration.org> dostopno dne 5. 5. 2009
- [10] S. Chiantia, J. Ries in P. Schwille, *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 225 (2009).
- [11] A. J. Garca-Sez in P. Schwille, *Methods* **46**, 116 (2008).
- [12] A. J. W. G. Visser in M. A. Hink, *J. Fluoresc.* **9**, 81 (1999)