

PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku
„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”
Biofizyka molekularna

Pomiary zaników fluorescencji wybranych barwników (PB16)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



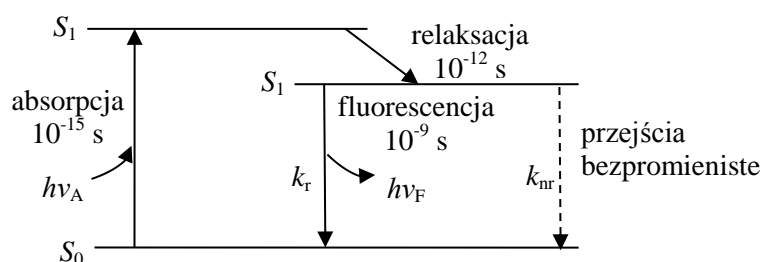
Projekt *Fizyka wobec wyzwań XXI wieku* współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

I. Wstęp

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z zasadą pomiaru zaników fluorescencji metodą skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting*, *TCSPC*) oraz wyznaczenie czasów życia fluorescencji wybranych barwników i ich mieszanin.

I.1. Zjawisko fluorescencji

Związki posiadające pierścienie z układem sprzężonych podwójnych wiązań węglowych typu π absorbują i emitują promieniowanie w zakresie bliskiego nadfioletu i widzialnym (200-800 nm). Taki układ wiązań powoduje zmniejszenie różnicy energetycznej między poziomami π i π^* i wzrost prawdopodobieństwa przejść $\pi \rightarrow \pi^*$ i $\pi^* \rightarrow \pi$. Rozkład poziomów elektronowych oraz intensywność absorbowanego lub emitowanego promieniowania zależą od struktury cząsteczki i jej mikrootoczenia.



Rysunek 1. Schemat Jabłońskiego przedstawiający procesy absorpcji, relaksacji rozpuszczalnikowej i fluorescencji. Dla uproszczenia zaznaczono tylko pierwszy singletowy stan wzbudzony S_1 i nie uwzględniono poziomów oscylacyjnych ani elektronowych stanów tripletowych. k_r i k_{nr} to stałe szybkości odpowiednio emisji fluorescencji i procesów bezpromienistych (na schemacie wszystkie możliwe procesy bezpromieniste zostały scharakteryzowane przez jedną stałą szybkości k_{nr}).

Podstawowe procesy zachodzące w cząsteczce wzbudzonej do wyższego stanu elektronowego w wyniku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego (poziomy oscylacyjne stanu S_1 , rzadziej S_2) przedstawia schematycznie diagram Jabłońskiego (Rys. 1). Po zaabsorbowaniu energii cząsteczka dąży do powrotu do stanu równowagi termodynamicznej określonego przez boltzmanowski rozkład energii, czyli w warunkach temperatury pokojowej do najniższego poziomu oscylacyjnego podstawowego stanu elektronowego S_0 . Z wyższych stanów wzbudzonych cząsteczka bardzo szybko przechodzi w wyniku dezaktywacji bezpromienistej do najniższego poziomu oscylacyjnego pierwszego singletowego stanu wzbudzonego S_1 . Jednocześnie, ze względu na inny rozkład ładunku w stanie wzbudzonym niż w podstawowym, następuje reorganizacja cząsteczek rozpuszczalnika wokół wzbudzonej cząsteczki (relaksacja rozpuszczalnikowa), co prowadzi

do obniżenia energii stanu wzbudzonego. Te procesy bezpromienistej relaksacji zachodzą w czasach rzędu 10^{-13} - 10^{-12} sekundy.

Z najniższego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego S_1 możliwe są trzy drogi powrotu do stanu podstawowego: (a) przejścia promieniste do poszczególnych poziomów oscylacyjnych stanu S_0 czyli emisja **fluorescencji** (skala czasowa 10^{-10} - 10^{-8} sekundy); (b) przejścia bezpromieniste do wysokich stanów oscylacyjnych stanu S_0 i szybka relaksacja oscylacyjna w obrębie tego stanu do najniższego poziomu oscylacyjnego; (c) przejścia bezpromieniste do układu stanów tripletowych (przejścia międzysystemowe), a następnie na drodze promienistej do stanu S_0 w wyniku emisji **fosforescencji** (proces nie został uwzględniony na Rys. 1). Z rysunku 1 wynika, że długości fali promieniowania fluorescencyjnego są większe lub co najwyżej równe długościom fali promieniowania zaabsorbowanego (tzw. przesunięcie Stokesa)

Jak wynika ze schematu Jabłońskiego, nie każdy akt absorpcji prowadzi do emisji fotonu. Fakt ten w sposób ilościowy opisuje wielkość nazywana wydajnością kwantową (Q). Jest ona równa stosunkowi liczby kwantów wyemitowanych (n_F) do liczby kwantów zaabsorbowanych (n_A), co odpowiada stosunkowi stałej szybkości emisji fluorescencji do sumy stałych szybkości wszystkich procesów prowadzących do powrotu do stanu podstawowego:

$$Q = \frac{n_F}{n_A} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (1)$$

gdzie k_r i k_{nr} to stałe szybkości odpowiednio emisji fluorescencji i procesów bezpromienistych.

Po wzbudzeniu próbki krótkim impulsem światła, omówione wyżej procesy dezaktywacji prowadzą do zmniejszania się początkowej populacji cząsteczek w stanie wzbudzonym (N_0) ze stałą szybkości $k_r + k_{nr}$ zgodnie z równaniem:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})N(t) \quad (2)$$

gdzie $N(t)$ to liczba cząsteczek w stanie wzbudzonym po czasie t .

Z zależności (2) wynika, że zanik ten jest eksponentialny:

$$N(t) = N_0 \exp(-(k_r + k_{nr})t) = N_0 \exp(-t/\tau) \quad (3)$$

Czas τ równy odwrotności sumy stałych szybkości wszystkich procesów prowadzących do depopulacji stanu wzbudzonego $\tau = (k_r + k_{nr})^{-1}$ jest nazywany **czasem życia** lub **czasem zaniku fluorescencji**. Jest to średni czas jaki cząsteczka przebywa w stanie wzbudzonym.

Podczas eksperymentów nie obserwujemy liczby wzbudzonych cząsteczek, tylko intensywność fluorescencji, która jest do niej proporcjonalna. Wynika stąd, że zmianę natężenia fluorescencji w czasie opisuje funkcja:

$$I(t) = I_0 \exp(-t/\tau) \quad (4)$$

Z równania (4) wynika, że po czasie $t = \tau$ natężenie fluorescencji spada do wartości I_0/e .

Nie zawsze mamy do czynienia z monoekspotencjalną funkcją zaniku. Przyczyn wielowykładniczego lub wręcz niewykładniczego zaniku może być wiele, m. in. współistnienie kilku form danego związku o różnych właściwościach absorpcyjnych i emisyjnych, zachodzenie reakcji w stanie wzbudzonym czy bezpromieniste przeniesienie energii (FRET).

Wydajności procesów dezaktywacji promienistej i bezpromienistej silnie zależą od różnych czynników środowiskowych (pH, lepkość, temperatura, obecność ligandów, rodzaj solwentu), co czyni fluorescencję czasoworozdzielczą cennym narzędziem w badaniach mikrootoczenia fluoroforów i procesów zachodzących w stanie wzbudzonym.

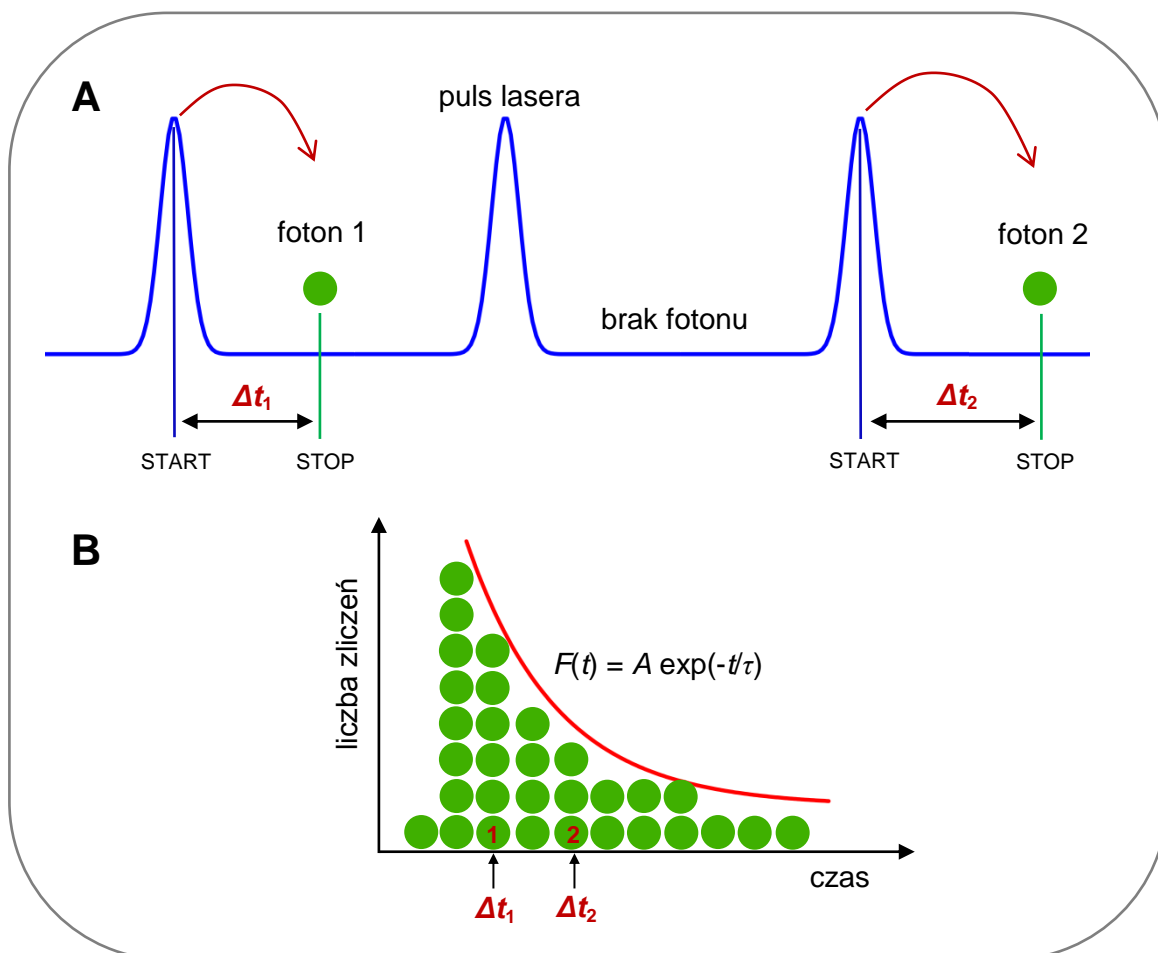
I.2. Metody pomiarów zaników fluorescencji

Istnieją dwie metody badania zaników fluorescencji. Pierwsza, impulsowa (ang. *time-domain*), polega na wzbudzeniu próbki bardzo krótkim impulsem światła (np. laserowego) i obserwacji zmian intensywności emitowanego sygnału w czasie. W drugiej metodzie, fazowo-modulacyjnej (ang. *phase-modulation* lub *frequency-domain*), próbka wzbudzana jest wiązką światła o natężeniu modulowanym z dużą częstotliwością (do 100 MHz), co powoduje również modulację sygnału fluorescencji z tą samą częstotliwością. Ze względu na to, że fluorofor zanim wyemituje foton przebywa przez jakiś czas w stanie wzbudzonym, sygnał emitowany będzie przesunięty w fazie w stosunku do wzbudzającego, a pomiar tego przesunięcia umożliwi wyznaczenie czasu życia fluorescencji.

I.3. Skorelowane w czasie zliczanie pojedynczych fotonów

W dalszej części skupimy się na metodzie impulsowej, gdyż ona będzie wykorzystywana podczas niniejszego ćwiczenia. Obecnie większość pomiarów impulsowych wykorzystuje metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów (ang. *Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC*). Metoda ta polega na precyzyjnym pomiarze czasu pomiędzy pulsem wzbudzającym a emisją fotonu. Pomiar jest powtarzany wielokrotnie, a warunki są tak dobrane, by prawdopodobieństwo rejestracji więcej niż jednego fotonu w cyklu było bardzo niskie (typowo rejestruje się 1 foton na 100 pulsów lasera) (Rys. 2A).

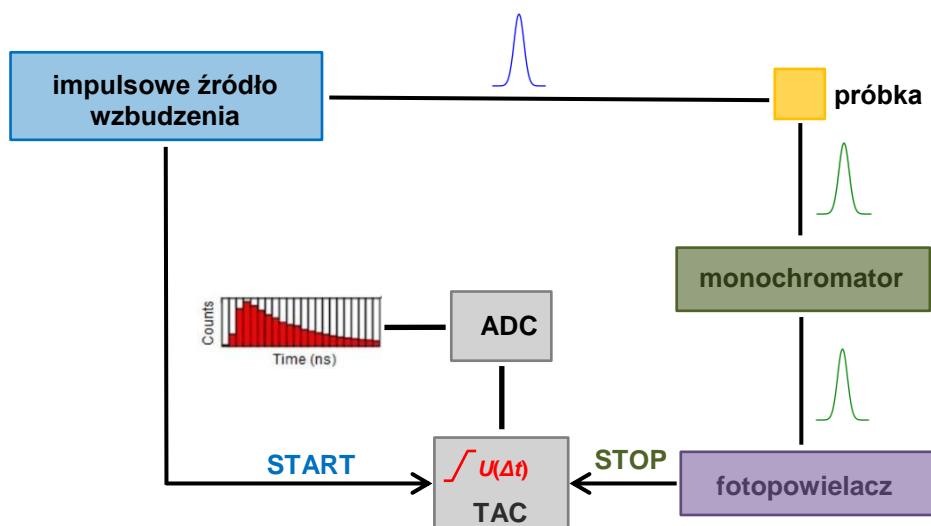
W efekcie otrzymujemy histogram, przedstawiający liczbę fotonów w funkcji czasu, jaki upłynął między wzbudzeniem a emisją (Rys. 2B). Jego kształt opisuje taka sama funkcja zaniku, jaką otrzymalibyśmy w przypadku pomiaru zmian intensywności fluorescencji w czasie po wzbudzeniu pojedynczym pulsem lasera jednocześnie wielu fluoroforów w próbce.



Rysunek 2. Zasada pomiarów zaników fluorescencji metodą skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów. (A) Pomiar czasu pomiędzy pulsem wzbudzającym a emisją fotonu oraz (B) utworzony na ich podstawie histogram przedstawiający liczbę fotonów odpowiadających poszczególnym czasom START-STOP.

Fluorymetry czasowo-rozdzielcze oparte na metodzie TCSPC są wyposażone w wyspecjalizowany system elektroniczny umożliwiający pomiar czasu jaki upłynął pomiędzy absorpcją i emisją fotonu. Działa on jak bardzo dokładny stoper o rozdzielczości pikosekundowej. Rysunek 3 przedstawia schemat układu pomiarowego do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów. Impuls wzbudzający próbkę wysyła sygnał START do konwertera czas-amplituda (ang. *time-to-amplitude-converter*, TAC), który generuje napięcie liniowo narastające w czasie. Wyemitowany przez próbkę foton, po przejściu przez monochromator, trafia do detektora (fotopowielacz). Fotopowielacz wysyła sygnał STOP

do TAC, który zatrzymuje wzrost napięcia. W ten sposób TAC rejestruje napięcie proporcjonalne do różnicy czasu między impulsami START a STOP. Napięciu temu jest nadawana wartość numeryczna przez przetwornik analogowo-cyfrowy (ang. *analog-to-digital conversion*, ADC), która jest zapamiętywana jako pojedyncze zliczenie wraz z odpowiadającą mu różnicą czasu. Wielokrotne powtarzanie opisanej procedury prowadzi do uzyskania histogramu przedstawionego na rysunku 2B.



Rysunek 3. Schemat aparatury do skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów.

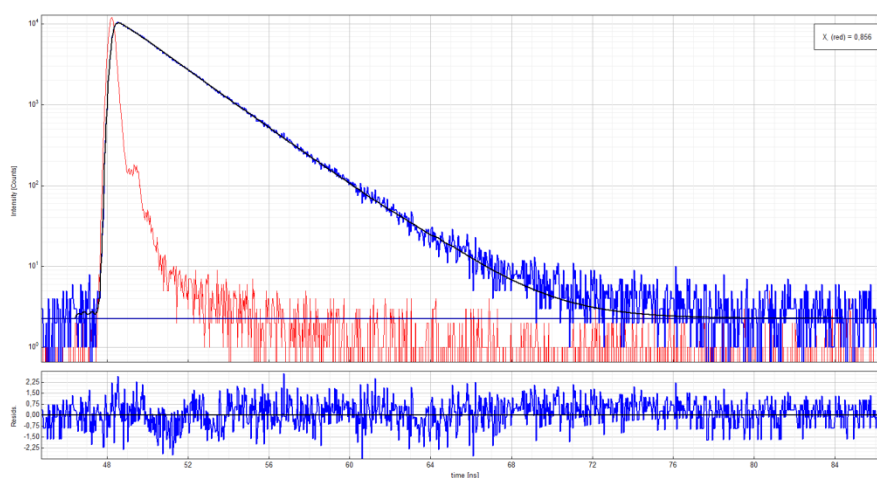
W pomiarach opartych na TCPSC bardzo ważne jest spełnienie warunku rejestracji fotonu z częstotliwością znacznie mniejszą niż częstość pulsów wzbudzających. Obecne układy pomiarowe nie są na tyle szybkie, by dokonać detekcji kilku fotonów w jednym cyklu dla próbek o czasach życia rzędu nanosekund. W wypadku gdy więcej niż jeden foton jest emitowany w danym cyklu, histogram przeszacowuje liczbę wczesnych fotonów – kolejny nie jest już liczony i uzyskane zaniki są szybsze niż w rzeczywistości (tzw. *pile-up distortion*). Warunek rejestracji pojedynczego fotonu w cyklu uzyskuje się poprzez osłabianie intensywności pulsu wzbudzającego i/lub promieniowania emitowanego.

I.4 Analiza zaników fluorescencji

Należy mieć świadomość, że jedynie w układzie idealnym, w którym impuls wzbudzający byłby nieskończenie wąski, a detektor i elementy elektroniczne nieskończenie dokładne, moglibyśmy zmierzyć prawdziwe zaniki $I(t)$. W rzeczywistości rejestrowana krzywa zaniku $F(t)$ jest splotem funkcji odpowiedzi aparatury na impuls wzbudzający (ang. *Instrument Response Function*, IRF) oraz funkcji zaniku $I(t)$:

$$F(t) = \int_0^t IRF(t)I(t - \hat{t})d\hat{t} \quad (5)$$

Znalezienie rzeczywistej funkcji zaniku wymaga rozwikłania powyższego splotu, co uzyskuje się metodą rekonwolucji iteracyjnej. Do przeprowadzenia tej analizy numerycznej niezbędna jest znajomość funkcji IRF. W tym celu wykonuje się pomiary dla próbki rozpraszającej światło i nie posiadającej właściwości emisyjnych, np. koloidalnego roztworu krzemionki (tzw. Ludox). Rysunek 4 przedstawia przykładowy zanik fluorescencji oraz funkcję odpowiedzi aparaturowej IRF wraz z dopasowanym modelem eksponentialnym. O tym jak szeroka jest funkcja IRF decyduje zarówno szerokość impulsu wzbudzającego, jak i rozdzielczość czasowa detektora i elementów elektronicznych.



Rysunek 4. Analiza zaników fluorescencji. Wykres przedstawia krzywą zaniku fluorescencji (niebieska krzywa), funkcję odpowiedzi aparaturowej IRF (czerwona krzywa) oraz dopasowany model eksponentialny (czarna krzywa). Dolny panel zawiera odchylenia residualne.

II. Wymagania do kolokwium wstępnego

1. Zjawisko absorpcji i emisji promieniowania elektromagnetycznego
2. Fluorescencja, widma emisji fluorescencji, zaniki fluorescencji, wydajność kwantowa i czas życia
3. Metody pomiaru fluorescencji czasowo-rozdzielczej
4. Metoda skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów
5. Analiza zaników fluorescencji

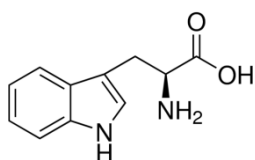
III. Przebieg ćwiczenia

Podczas ćwiczenia wykonasz pomiary zaników fluorescencji wybranych barwników i ich mieszanin za pomocą fluorymetru czasowo-rozdzielczego FT300 firmy PicoQuant, wykorzystującego metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów. Aparat

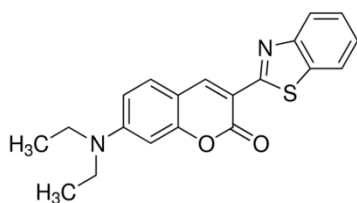
wyposażony jest w dwa rodzaje impulsowych źródeł światła o regulowanej częstotliwości pulsów (do 40 lub 10 MHz): (i) lasery półprzewodnikowe o szerokości pulsu ~50 ps (dostępne długości fali to 405 i 485 nm) oraz (ii) diody pulsacyjne o szerokości pulsu ~1 ns (długości fali: 270, 280, 300, 340 i 450 nm).

Masz do dyspozycji:

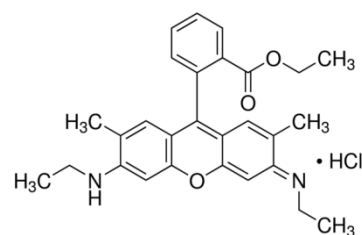
- wodny koloidalny roztwór krzemionki (Ludox)
- roztwór tryptofanu w wodzie
- roztwór kumaryny 6 w etanolu
- roztwór rodaminy 6G w etanolu
- roztwór mieszaniny kumaryny 6 i rodaminy 6G w etanolu
- parę kwarcowych kuwet absorpcyjnych o długości drogi optycznej 1 cm
- kwarcową kuwetę fluorescencyjną o długości drogi optycznej 1 cm



tryptofan



kumaryna 6



rodamina 6G

1. Wykonaj widma absorpcyjne badanych barwników w zakresie 220-350 nm dla tryptofanu oraz 300-600 nm dla kumaryny i rodaminy. Czy widzisz korelację między strukturą związku a położeniem maksimum absorpcji? Na podstawie zmierzonych widm wybierz źródła wzbudzenia odpowiednie dla danej próbki. Pamiętaj, że lasery mają znacznie większą moc niż diody (0.4 mW vs 1-2 μ M), w związku z tym pomiary z użyciem diód zajmują znacznie więcej czasu.

2. Zmierz zaniki fluorescencji dla poszczególnych próbek dla kilku długości fali emisji i jeśli to możliwe dla więcej niż jednego źródła wzbudzającego. Nie zapomnij o pomiarach funkcji odpowiedzi aparatury (IRF). Użyj w tym celu roztworu rozpraszacza (Ludox). Jakie długości fali wzbudzenia i emisji należy wybrać przy pomiarach IRF?

3. Dokonaj analizy uzyskanych zaników w programie FluoFit w celu wyznaczenia czasów życia dla poszczególnych próbek. Zastosuj rekonwolucję dla modelu eksponentyjnego (1, 2

lub 3 komponenty eksponentalne). Zawsze zaczynaj od modelu monowykładniczego i sprawdzaj czy dodanie kolejnego komponentu wpłynie na obniżenie wartości χ^2 oraz poprawę rozkładu odchyleń residualnych

IV. Opis końcowy

Opis końcowy powinien zawierać poszczególne elementy charakterystyczne dla raportu z przebiegu eksperymentu (streszczenie, wstęp teoretyczny, opis układu doświadczalnego oraz wyniki i ich dyskusję).

Uzyskane wyniki powinny zostać udokumentowane za pomocą czytelnych tabel i wykresów. Zaniki fluorescencji należy opracować korzystając z programu FluoFit.

Opracowanie wyników powinno uwzględniać następujące zagadnienia:

1. Uzasadnienie w oparciu o widma absorpcji wyboru źródła wzbudzającego
2. Wyznaczenie czasów życia dla tryptofanu, kumaryny 6 i rodaminu 6G oraz ich mieszaniny
3. Analizę i interpretację zależności otrzymanych czasów życia od długości fali wzbudzenia i emisji

V. Literatura

1. „Podstawy spektroskopii molekularnej”, Z. Kęcki, PWN 1998
2. „Biospektroskopia” cz. 3, pod redakcją J. Twardowskiego, PWN 1989
3. „Principles of fluorescence spectroscopy” J.R. Lakowicz
4. „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”, red. Z. Józwiak i G. Bartosz, PWN 2007
5. „Spektroskopia molekularna”, J. Sadlej, WNT 2002
6. „Time-Correlated Single Photon Counting”, Michael Wahl, materiały PicoQuant (http://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf)