

Laboratorinis darbas

Kinetinė biomolekulių spektroskopija

2008
Vilnius

Kinetinė biomolekulių spektroskopija

1. Darbo tikslas

Išmatuoti BSA (jaučio serumo albumino) ir GFP (žaliai fluorescuojančio baltymo) baltymų fluorescencijos gyvavimo trukmes, nustatyti bei palyginti baltymų sukimosi relaksacijos laikus įvairaus klampumo terpėse. Pagal GFP sukimosi relaksacijos greitį apskaičiuoti tirpalo klampumą.

2. Darbo uždaviniai

1. Išmatuoti BSA ir GFP sugerties bei fluorescencijos spektrus.
2. Išmatuoti nuostoviosios GFP ir BSA fluorescencijos poliarizacijos laipsnį.
3. Išmatuoti fluorimetro FL920 laikinę skyrą.
4. Išmatuoti BSA ir GFP fluorescencijos gyvavimo trukmes fosfatinio buferio tirpaluose.
5. Išmatuoti BSA fluorescencijos anizotropiją su laikine skiriamąja geba, apskaičiuoti baltymo sukimosi relaksacijos laiką ir pagal jį apskaičiuoti tirpalo klampumą.
6. Išmatuoti GFP fluorescencijos anizotropiją su laikine skiriamąja geba, apskaičiuoti baltymo sukimosi relaksacijos laiką ir pagal jį apskaičiuoti tirpalo klampumą.
7. Išmatuoti GFP baltymo sukimosi relaksacijos laiko priklausomybę nuo tirpalo klampos.

3. Teorinė dalis

Šviesos sąveikos su bioobjektu pasekmėje vyksta daugelis fotofizikinių ir fotocheminių procesų. Vienas iš pagrindinių – šviesos emisijos vyksmas, kuris, be abejonės, labai informatyvus, tiek bioobjekto ar biostruktūros, tiek pačiame

bioobjekte vykstančių procesų požiūriu. Bendresniu pavadinimu šis reiškinys žinomas kaip liuminescencija, kuri apjungia du optiškai sužadintos molekulės energijos relaksacijos kelius – fluorescenciją ir fosforescenciją. Molekulei sugėrus šviesos kvantą, išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų ir molekulė tampa energiška sužadinta. Molekulė turi rinkinį neužpildytų lygmenų ir elektrono šuolį į tuščią lygmenį sąlygoja fotono energijos dydis, arba, tiksliau, šviesos bangos ilgis. Sužadinta molekulė yra nepusiausvyrinėje būsenoje, todėl visada stengiasi užimti energiška žemiausią padėtį, tai yra relaksuoja į pagrindinę nesužadintą būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir/ar rotacinę energiją, arba išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t.y. liuminescuodama. Remiantis Vavilov'o apibrėžimu, liuminescencija yra vadinama tam tikros temperatūros kūno perteklinį (virš šiluminio spinduliavimo) švytėjimą tam tikroje spektro srityje, jeigu šis perteklinis švytėjimas turi baigtinę trukmę (fluorescencijos gyvavimo trukmę), t.y. iš karto neišnyksta pašalinus jį sukeliančią priežastį. Vėliau Vavilov'as patikslino savo apibrėžimą pridėdamas trukmės kriterijų: liuminescencija yra švytėjimo perteklius virš šiluminio spinduliavimo, jeigu jis turi baigtinę trukmę – maždaug 10^{-10} s ir daugiau. Švytėjimo trukmė yra tiesiogiai susijusi su molekulių sužadintos būsenos gyvavimo laiku. Tai gana būdingas liuminescencijos požymis, skiriantis ją nuo šviesos sklaidos, atspindžio ir kitų reiškinių. Vėliau buvo įvestas dar vienas liuminescencijos apibrėžimas, apibūdinant ją kaip nepusiausvyrinį sužadintų dalelių arba iš jų sudarytų medžiagų spinduliavimą. Nepusiausvyrinis švytėjimo pobūdis atskiria liuminescenciją nuo šiluminio spinduliavimo, kuris atsiranda esant pusiausvyriniam elektronų pasiskirstymui energijos lygmenyse. Deja, visą apimančio liuminescencijos apibrėžimo taip ir nepavyko suformuluoti, tad priklausomai nuo objekto tyrimo sąlygų ir liuminescenciją palydinčių reiškinių išskiriamos vienos ar kitos liuminescencijos savybės, atskiriančios ją nuo kitų

reiškinių. Mus domina tai, kad liuminescenciją galima stebėti arba fiksuoti jautriais prietaisais ar medžiagomis ir ji specifinė konkrečiai molekulei, t.y iš liuminescencijos parametrų rinkinio galima identifikuoti konkrečią molekulę. Molekulių liuminescencija pasižymi visai kitomis, lyginant su sugertimi, savybėmis, kurios naudingos identifikuojant biomolekules ar atskirus biosubjektus.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija skirstoma į fluorescenciją (10^{-11} - 10^{-8} s), fosforescenciją ($>10^{-6}$ s) ir užlaikytąją fluorescenciją. Užlaikytoji fluorescencija būdinga medžiagoms, kurių energinis tarpas tarp S_1 ir T_1 lygmenų yra mažas (maždaug $k \cdot T$ eilės). Tokiu būdu užlaikytos fluorescencijos dažnis lygus fluorescencijos dažniui, tačiau švytėjimo trukmė yra žymiai ilgesnė.

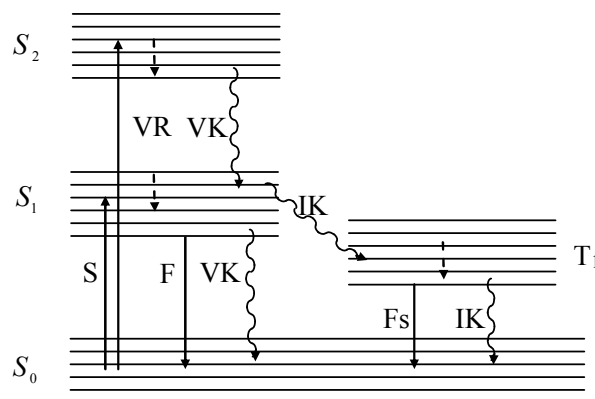
Gamtoje stebima liuminescencija taip pat yra skirstoma pagal jos sužadavimo pobūdį:

- fotoluminescencija - švytėjimui naudojama sugertos šviesos energija;
- (bio-)chemiluminescencija - švytėjimas sąlygotas tam tikrų (biologiniuose objektuose vykstančių) cheminių reakcijų metu vykstančių energijos virsmų;
- termoluminescencija - medžiagų švytėjimas jas pašildžius (esant žemai tripletinio lygmens padėčiai);
- elektroluminescencija - sužadinama stipriu elektriniu lauku;
- sonoluminescencija - ultragarso poveikyje atsiradęs švytėjimas;
- triboluminescencija - švytėjimas dėl trinties;
- katodoluminescencija - sužadinama katodiniais spinduliais;
- rentgenoluminescencija - sužadinama rentgeno spinduliais;
- radioluminescencija - sužadinama greitomis dalelėmis.

Molekulei sugėrus šviesos kvantą, išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulės elektroninių lygmenų ir molekulė tampa energetiškai

sužadinta. Sužadinta molekulė yra nepusiausvyroje būsenoje, todėl visada stengiasi užimti energetiškai žemiausią padėtį. Ji relaksuoja į pagrindinę būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir/arba rotacinę energiją, arba išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t.y., liuminescuodama. Liuminescencija, skirtingai nei šiluminis spinduliavimas, yra nepusiausvyrisis vyksmas. Liuminescencija yra perteklinis dalelių švytėjimas ta prasme, kad jis viršija temperatūrinį (arba šiluminį) spinduliavimą, kaip kad seka iš Kirchhoff'o dėsnio.

Profesorius A. Jablonskis pasiūlė daugiaatomės molekulės energijos lygmenų ir energetinių virsmų diagramą:



1 pav. Molekulės energijos lygmenų diagrama (S – sugertis, F – fluorescencija, VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombinacinė konversija, F_s – fosforescencija)

Žadinant šviesa, medžiagos molekulės iš pagrindinės singuletinės S_0 būsenos pereina į aukštesnes sužadintas singuletines būsenas (S_1, \dots, S_n). Vyksta šviesos sugertis. Daugiaatomių molekulių kiekvienas energinis lygmuo turi daug virpesinių bei rotacinių polygmenų, todėl sugerties spektrų juostos yra išplitusios.

Pradžioje sužadintos molekulės nespinduliniu keliu per $\sim 10^{-13}$ s relaksuoja į pirmo sužadinto elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį. Toks nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija

(VK). Iš žemiausio sužadinto energinio lygmens S_1 galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija iš $S_1 \rightarrow S_0$ (energija šimumos pavidalu atiduodama aplinkai), interkombinacinė konversija (IK) $S_1 \rightarrow T_1$ (pakinta būseną – iš singletą į tripletą) ir fluorescencija (F) – molekulės grįžimas į pagrindinę būseną išspinduliuojant fotoną. Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo molekulės simetrijos ir nuo S_1 ir S_0 lygmenų energijų skirtumo. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Taigi fluorescencijos tikimybė (tuo pačiu ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

Panagrinėkime hipotetinę molekulę turinčią du energinius lygmenis S_0 ir S_1 . Jeigu į šią molekulę krenta intensyvumo $I(\nu)$ šviesos srautas, kuris energetiškai atitinka energinį tarpą tarp molekulės lygmenų, tai sugerdama šviesos kvantą molekulė šuolio $S_0 \rightarrow S_1$ metu pereis į sužadintą būseną S_1 greičiu B_{01} . Tai energetiškai nenaudinga būseną, tad molekulė stengsis grįžti į energetiškai žemiausią lygmenį S_0 greičiu B_{10} , kuris tenkins sąlygą $B_{01} = B_{10}$ (čia B_{10} ir B_{01} yra Einšteino koeficientai). Tegu mūsų sistemoje n_0 molekulių yra būsenoje S_0 o n_1 molekulių - būsenoje S_1 . Atitinkamų šuolių greičiai šiuo atveju išreiškiami $n_0 \cdot B_{01} \cdot I(\nu)$ ir $n_1 \cdot B_{10} \cdot I(\nu)$. Jeigu mūsų sistema tenkina pusiausvyros sąlygas, tada $n_0 \cdot B_{01} \cdot I(\nu) = n_1 \cdot B_{10} \cdot I(\nu)$.

Taigi nepriklausomai nuo krentančios į molekulę šviesos intensyvumo molekulių esančių lygmenyje a ir lygmenyje b koncentracijos yra lygios: $n_0 = n_1$. Gavome absurdišką rezultatą. Kai molekulės nešvitinamos, natūralu jos visos bus lygmenyje S_0 , kuris energetiškai patogiausias. Prie silpnų žadinančios šviesos intensyvumų, kažin ar mes turėsime didelius nukrypimus nuo energetiškai pusiausvyrinės padėties, taigi sunku tikėtis didelės lygmens S_1 užpildos. Šias užpildos vertes galime surasti naudodamiesi statistikine mechanika. Jeigu lygmenys neišsigimę, eksponentinio Boltzman'o daugiklio išraiška:

$$\frac{n_0}{n_1} = e^{(E_0 - E_1)/kT} = e^{h\nu/kT} \quad (1)$$

Pirmasis nurodęs kaip išspręsti šį loginį prieštaravimą, buvo Einšteinas, kuris įvedė spontaninį fotono išspinduliavimą iš sužadinto lygmens (A_{10}) kurio intensyvumas nepriklauso nuo krentančios šviesos intensyvumo $I(\nu)$. Šiuo atveju pusiausvyros lygtis, kai tenkinama tiesioginio ir grįžtamo proceso greičių lygybė tarp S_0 ir S_1 lygmenų išreiškiama taip:

$$\frac{n_0}{n_1} = \frac{B_{10}I(\nu) + A_{10}}{B_{01}I(\nu)} = \frac{1 + A_{10}}{B_{01}I(\nu)} \quad (2)$$

Sulyginę (1) ir (2) lygybes, galime nesunkiai surasti A_{10} . Tačiau prieš tai išsiveskime absoliučiai juodo kūno spinduliavimo išraišką, esant temperatūrai T . Absoliučiai juodo kūno sugerties ir spinduliavimo tankiai pusiausvyrinėse sąlygose turi sutapti, ir kūno, esančio pusiausvyroje, prie temperatūros T išspinduliuojamo intensyvumo tankis išreiškiamas:

$$I(\nu) = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3 (e^{h\nu/kT} - 1)} \quad (3)$$

Įrašę šią intensyvumo išraišką į (2) gauname

$$\frac{n_0}{n_1} = \frac{1 + A_{10}}{B_{01}I(\nu)} = \frac{1 + A_{10}(e^{h\nu/kT} - 1)c^3}{B_{01}8\pi h \nu^3} \quad (4)$$

Sulyginę (1) ir (4) lygčių dešiniąsias puses, gauname

$$A_{10} = \frac{B_{01}8\pi h \nu^3}{c^3} \quad (5)$$

Papildomą spontaninio molekulės spinduliavimo išraišką galime gauti, pasinaudoję koeficiento $B_{01} = (2\pi/3\hbar^2)D_{01}$ išraiška gaunama vertinant šviesos sąveiką su medžiaga, kur D_{01} molekulės dipolinis momentas rezonansinis žadinančiai elektromagnetinei bangai.

$$A_{10} = \frac{32\pi^3 \nu^3}{3c^3 \hbar} D_{01} \quad (6)$$

Ši išraiška yra patogi tuo, kad netgi be spontaninio spinduliavimo matavimų, o tiesiog iš molekulės sugerties spektrų galima apskaičiuoti

spontaninio spinduliavimo parametrus, kadangi dipolio stiprumą (D_{01}) ir dažnį (ν) galime surasti iš molekulos sugerties spektrų.

Kai molekulė iš anksto jau yra būsenoje S_1 tai jos šuolis iš šios būsenos į pusiausvyrinę, kai molekulos neveikia jokie išoriniai veiksniai yra išreiškiamas:

$$\frac{dn_1}{dt} = -A_{10}n \quad (7)$$

šios diferencialinės lygties sprendinys yra funkcija $n_1(t) = n_1(0)e^{-A_{10}t}$, kur $n_1(0)$ - molekulių sužadintoje būsenoje koncentracija laiko momentu $t = 0$. Tokiu būdu mes galime apsiskaičiuoti spindulinę molekulos gyvavimo trukmę būsenoje S_1 , kuri išreiškiama

$$\tau = \frac{1}{A_{10}} \quad (8)$$

Molekulos dipolinis momentas D_{01} tiesiogiai susijęs su molekulos sugertimi. D_{01} ir A_{10} proporcingi, kaip tai matyti iš formulės (6). Tokiu būdu lygtis (6) rodo, kad kuo intensyvesnė sugertis, tuo stipresnis neindukuotas spinduliavimas. Realių molekulių sugertis yra sąlygota ne tik elektroninių šuolių, bet ir vibracinių ir rotacinių lygmenų bei molekulos sąveikos su aplinka, taigi tirdami spinduliavimo charakteristikas mes galime daug ką pasakyti apie biologinių molekulių savybes.

Molekulių sugerties ir fluorescencijos charakteristikų ryšys.

Jeigu molekulos neveikia jokie papildomi išoriniai poveikiai, šviesos sugertį vienalytėse sistemose aprašo Buger'io dėsnis:

$$I = I_0 \exp(-k \cdot l) \quad (9)$$

čia I_0 yra kritusios, o I - praėjusios šviesos intensyvumas, l - optinio kelio ilgis (bandinio ar kiuvetės storis). Dydis k yra vadinamas sugerties koeficientu. Šviesos sugertį silpnuose pigmentų tirpaluose aprašo Buger'io ir Beer'o dėsnis:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c l} \quad (10)$$

čia α yra sugerties rodiklis, n - pigmento molekulių skaičius tūrio vienetė (cm^{-3}). Skaičiavimuose patogū naudoti dešimtainius logaritmus, todėl) dėsnį galima parašyti kitaip:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} \quad (11)$$

Šioje formulėje ε vadinamas ekstinkcijos koeficientu arba tiesiog ekstinkcija. Medžiagos tirpalo koncentracija c išreiškiama $\text{mol/l} = M$, optinio kelio ilgis l - cm , todėl ekstinkcijos koeficiento dimensija yra $M^{-1} \text{cm}^{-1}$. Išlogaritnavus formulę gauname:

$$\lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l \quad (12)$$

Kaip žinome dydis $T = I/I_0$ vadinamas bandinio pralaidumu, o $D = \varepsilon c l$ - bandinio optiniu tankiu. Taigi, formulę galima perrašyti taip:

$$\lg \frac{1}{T} = \varepsilon c l = D \quad (13)$$

Aprašant šviesos sugerties molekulinėse sistemose vyksmą, yra įvedama molekulių, patalpintų šviesos sraute, sugerties akto statistikinės tikimybės sąvoka, t.y. molekulių sugerties skerspjūvis σ . Sugerties akto tikimybė, perskaičiuota vienai molekulei, yra vadinama sugerties skerspjūviu:

$$\sigma = \frac{k}{n} \quad (14)$$

čia n - molekulių skaičius tūrio vienetė. Sugerties skerspjūvio dimensija yra cm^2 .

Aukščiau aprašyti pagrindiniai sugerties ir fluorescencijos dėsningumai rodo, kad tarp sugerties ir fluorescencijos vyksmų yra tam tikras ryšys. Pabandykime nustatyti šį ryšį idealioms molekulėms, kurių fluorescencijos tikimybė būtų lygi 1.

Jei šviesos srauto intensyvumas yra I , tai fotonų skaičius bus $I/h\nu$, o sugertų fotonų skaičius tūrio vienetė $\sigma n I/h\nu$. Tuomet idealioms molekulėms nuostovaus žadinimo sąlygomis sugertų fotonų skaičius per 1 s turi būti lygus išspinduliuotų fotonų skaičiui:

$$\sigma n \frac{I}{h\nu} = k_{fl} n^* \quad (15)$$

čia k_{fl} - fluorescencijos spartos konstanta [s^{-1}], n^* - sužadintų molekulių koncentracija. Perrašome (15) išraišką:

$$\sigma(\nu) n \frac{I}{h\nu} = \frac{k_{fl}(\nu) n^* h\nu_{fl}}{h\nu_{fl}} \quad (16)$$

čia ν_{fl} - fluorescencijos dažnis, h - Planck'o konstanta, $\sigma(\nu)n = k(\nu)$.

Nuostovaus žadinimo sąlygomis kairėje lygybės pusėje esantis narys $I/h\nu = \text{const}$, o dešinėje pusėje esantis narys $k_{fl}(\nu)n^* h\nu_{fl}$ išreiškia fluorescencijos intensyvumą I_{fl} . Tada (16) išraišką galima užrašyti šitaip:

$$k(\nu) \cdot \text{const} = \frac{I_{fl}}{h\nu_{fl}} \quad (17)$$

Ši išraiška naudojama sugretinant sugerties ir fluorescencijos spektrus, o taip pat skaičiuojant grynai elektroninio šuolio dažnį. Ji yra išvesta idealioms molekulėms, kai kiekvieną sugerties aktą lydi fluorescencijos aktas. Praktikoje, kaip taisyklė, fluorescencijos kvantinis našumas $\varphi_{fl} < 1$. Nežiūrint į tai, (17) išraiška turi savo prasmę ir šiuo atveju. Lyginant sugerties ir fluorescencijos spektrus, (17) formulėje vietoje sugerties koeficiento galima naudoti ekstinkcijos koeficientą $\varepsilon(\nu)$.

Fluorescencija apibūdinama jos trukme $\tau_{fl} = 1/k_{fl}$. Realiai matuojame jos gyvavimo trukmę τ_g , mažesnę už tikrąją τ_{fl} , nes lygmens S_1 užpildos mažėjimas sąlygotas kelių dezaktyvacijos vyksmų: fluorescencijos (k_{fl}), vidinės (k_V) ir interkombinacinės (k_{ST}) konversijų bei gesinimo (k_g), jeigu tirpale yra gesiklio molekulių (pvz., deguonies). Taigi, tikroji fluorescencijos gyvavimo trukmė

$$\tau_g = \frac{1}{k_{fl} + k_V + k_{ST} + k_g[Q]}; \quad (18)$$

čia $[Q]$ – gesiklio molekulių koncentracija.

Iš šios formulės matome, kad kuo didesnės fluorescencijos (k_{fl}), vidinės (k_V) ir interkombinacinės (k_{ST}) konversijų spartos konstantos tuo trumpesnė

fluorescencijos gyvavimo trukmė. Molekulės fluorescencijos gyvavimo trukmė taip pat mažėja didinant gesiklio molekulių koncentraciją.

Statinis ir dinaminis fluorescencijos gesinimas. Šterno-Folmerio (Stern-Volmer) lygtis.

Bet koks fluorescencijos kvantinio našumo mažėjimas gali būti nagrinėjamas, kaip fluorescencijos gesinimo vyksmas. Pagrindinė fluorescencijos intensyvumo mažėjimo priežastis – tai fluorescuojančių molekulių sąveika su kitomis molekulėmis tirpale. Gesiklio ir fluorescuojančios molekulės sąveika gali pakeisti atstumą tarp jos energinių lygmenų, padidinti bespindulinės sužadinimo energijos relaksacijos tikimybę, kartais padidinti interkombinacinės konversijos $S_1 \Rightarrow T_1$ tikimybę.

Labai aktyvūs fluorescencijos gesikliai:

1. Sunkiųjų metalų katijonai ir anijonai I^- , Br^- , Cs^+ , Cu^{2+} (šie gesikliai padidina interkombinacinės konversijos tikimybę).
2. Paramagnetiniai jonai ir molekulės O_2 , Mn^{2+} , nitroksiliniai radikalai.
3. Tirpiklio molekulės. Fluorescenciją labiausiai gesina poliniai tirpikliai, (pav. Vanduo) kurie padidina interkombinacinės konversijos tikimybę fluorescuojančioje molekulėje.
4. Elektroninio sužadinimo energijos akceptorai vieni aktyviausių fluorescencijos gesiklių.

Tenka pažymėti, kad fluorescenciją gesinamą tirpikliais sunku nagrinėti, kadangi biologiškai aktyvių molekulių fluorescencija matuojama viename ar kitame tirpiklyje – todėl galime tik palyginti fluorescencijos kvantinę išeigą viename ar kitame tirpiklyje.

Anksčiau nagrinėtais gesinimo atvejais tirpiklio koncentracija buvo laikoma pastovi ir tirpiklio gesinimas buvo įskaitomas į konstantą k_2 (vidinė konversija). Praktikoje gesikliais laikomas papildomai į tirpiklį įvedamos medžiagos, kurias aprašo konstanta k_3 ir $[Q]$ – gesiklio koncentracija.

Pagal Vavilovą fluorescencijos gesinimas gali būti statinis (I tipas) ir dinaminis (II tipas). Dinaminio gesinimo atveju stebimas lygiagretus φ ir τ mažėjimas didinant gesiklio koncentraciją.

$$\begin{cases} \frac{I}{I_0} = 1 + k[Q] \\ \frac{\tau}{\tau_{fl}} = 1 + k_3\tau[Q] = 1 - k[Q] \\ \frac{\tau}{\tau_{fl}} = \varphi \end{cases} \quad (19)$$

Statinis gesinimas sąlygotas su nefluorescuojančių kompleksų (NK) susidarymu: $\Phi + Q \leftrightarrow NK$. Santykis laisvos ir surištos fluorescuojančios medžiagos gali būti surastas iš pusiausvyros lygties:

$$K_D = \frac{[\phi][Q]}{[NK]} \quad (20)$$

kur K_D – komplekso disociacijos konstanta.

Lyginant fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio komplekso sugerties spektrus skiriami du atvejai:

1. Fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio komplekso sugerties spektrai nesiskiria. Gesinimo laipsnis:

$$\frac{\varphi}{\varphi_{fl}} = \frac{[NK] + [\phi]}{[\Phi]} = 1 + \frac{[NK]}{[\Phi]} \quad (21)$$

2. Fluorescuojančios medžiagos ir jos nefluorescuojančio komplekso sugerties spektrai skiriasi. Gesinimo laipsnis randamas analogiškai pirmajam atvejui, tačiau esant mažam optiniam tankiui, t.y. $[\phi]$ mažėja nežymiai:

$$\frac{I}{I_{fl}} = \frac{[NK] + [\phi]}{[\phi]} \quad (22)$$

kur I – fluorescencijos intensyvumas be gesintojo, I_{fl} – fluorescencijos intensyvumas esant gesintojui. Pasinaudoję $\frac{I}{I_{fl}} = 1 + K[Q]$ gauname analogišką išraišką:

$$\frac{I}{I_{fl}} = 1 + \frac{1}{K_D}[Q]. \quad (23)$$

Ši lygtis labai panaši į pagrindinę Šterno-Folmerio lygtį:

$$\frac{I}{I_q} = 1 + K[Q] \quad (24)$$

Tokiu būdu, pagal fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo gesintojo koncentracijos, statinio ir dinaminio fluorescencijos gesinimo mechanizmai neatskiriami. Tačiau esant statiniam gesinimui fluorescencijos gyvavimo trukmė nesikeičia, keičiasi tik fluorescuojančių molekulių fluorescencijos kvantinės išeigos kitimas.

Atskiru statinio fluorescencijos gesinimo atveju gali būti laikomas fluorescencijos gesinimas, kuris susijęs su nefluorescuojančių dimerų ar agregatų susidarymu esant didelei molekulių koncentracijai: $[\Phi] + [\Phi] \leftrightarrow \text{Dimeras}(\text{nefluorescuojantis})$. Pavyzdžiui turime tirpalą su 9-aminoakridinu. Įvedus ląstelių į tirpalą 9-aminoakridinas kaupiasi ląstelėse ir mitochondrijose. Susidaro didelė jų koncentracija, ko pasekoje lokalinė koncentracija didėja ir susidaro nefluorescuojantys agregatai. Kadangi 9-aminoakridino kaupimasis ląstelėse ir mitochondrijose priklauso nuo pH, tai pagal fluorescencijos gesinimą galima išmatuoti pH ląstelėse.

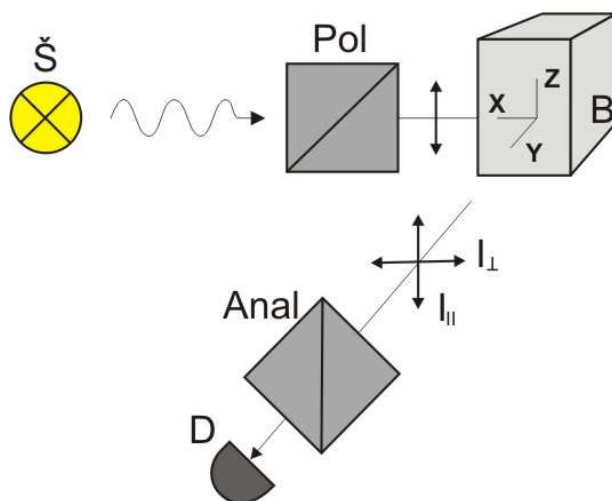
Cianiniai dažai gali būti sėkmingai naudojami ląstelių transmembraninio potencialo matavimams. Pav. Zondas dis-C₃ – kurio molekulės yra teigiamai įelektrintos kaupiasi mitochondrijose joms energizuojantis, kada ant mitochondrijų membranos vidinės pusės kaupiasi neigiamas krūvis. Kuo didesnis neigiamas vidinis membranos potencialas tuo daugiau kaupiasi zondo molekulių, tuo labiau pasireiškia zondo fluorescencijos gesinimas. Taip ir gali būti matuojamas mitochondrijos vidinis potencialas.

Liuminescencijos poliarizacija ir jos taikymas molekulių tyrimui.

Molekulės sugeria tą spinduliavimą, kurio elektrinis vektorius nukreiptas lygiagrečiai elektrono šuolio vektoriui molekulėje. Tirpaluose molekulės išsidėsto chaotiškai – tuo pačiu ir jų elektroninių šuolių vektoriai. Žadinant poliarizuota šviesa – selektyviai žadiname tik dalį molekulių. Tuo pačiu ir fluorescencija turi būti dalinai poliarizuota. Fluorescencijos poliarizacija bus maksimali kai:

- 1) Tirpalas apšviečiamas tiesiškai poliarizuota šviesa.
- 2) Molekulės sugerties ir emisijos vektoriai lygiagretūs.
- 3) Kai molekulė per sužadintą būsenos gyvavimo trukmę nespėja pakeisti savo orientacijos (pasisukti).

Kiekybiniam aprašymui naudojamos dvi tarpusavyje susijusios charakteristikos emisijos poliarizacijos koeficientas P ir emisijos anizotropija A . Principinė matavimo schema labai paprasta.



2 Pav. Fluorescencijos poliarizacijos registravimo schema: Š- šviesos šaltinis, Pol – poliarizatorius, B- bandinys, Anal – analizatorius, D – detektorius.

Iš šaltinio šviesa patenka į poliarizatorių iš kurio išeina su elektrinio vektoriaus orientacija z kryptimi. Y kryptimi fiksuojama fluorescencija per analizatorių. Vienu atveju analizatorius orientuojamas taip, kad praleistų x krypties poliarizacijos plokštumą, kitu – kad praleistų z poliarizacijos šviesą.

Taip užregistruojami I_{\parallel} ir I_{\perp} fluorescencijos intensyvumai. Fluorescencijos intensyvumas gali būti nagrinėjamas, kaip mišinys plokščiai poliarizuotos bangos I_p ir nepoliarizuotos I_n mišinys. Poliarizacijos laipsnis šiuo atveju gali būti išreikštas kaip:

$$P = \frac{I_p}{I_p + I_n} \quad (25)$$

Poliarizacijos laipsnį galime išreikšti ir eksperimente gaunamais dydžiais I_{\parallel} ir I_{\perp} . Iš optikos žinoma, kad idealus poliarizatorius sumažina nepoliarizuotos šviesos intensyvumą 2 kartus ir praleidžia visą tiesišką poliarizuotą šviesą jeigu poliarizuotos šviesos vektorius sutampa su poliarizatoriaus vektoriumi ir visiškai nepraleidžia šviesos, jeigu poliarizatoriaus ir šviesos vektoriai statmeni. Tada aišku:

$$\begin{aligned} I_{\parallel} &= I_p + \frac{I_n}{2}; \\ I_{\perp} &= \frac{I_n}{2}; \end{aligned} \quad (26)$$

Įsistatę I_{\parallel} ir I_{\perp} reikšmes į P gauname:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (27)$$

Indėlis vektoriaus, sklindančio y kryptimi, lygus 0, kadangi šviesos bangos judančios y kryptimi neturi poliarizacijos vektoriaus. Tačiau paties pavyzdžio švietimas turi šį vektorių. Todėl kartais liuminescencijos charakteristikoms nusakyti naudojama anizotropija A, kur įeina visi elektrinio lauko vektoriai.

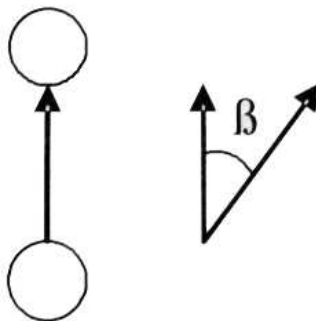
$$I_z + I_x + I_y = I_{\parallel} + I_{\perp} \quad (28)$$

Tada fluorescencijos anizotropija yra lygi:

$$A = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (29)$$

Iš čia galima surasti ryšį tarp P ir A.

Fluorescencijos poliarizacijos dydis priklauso nuo kampo β tarp elektroninių sugerties ir fluorescencijos šuolių vektorių bei nuo aplinkos klampumo η . (t.y. tegu $\eta = \infty$, tai reiškia, kad per būsenos gyvavimo laiką elektrinių šuolių vektoriai nepasikeičia.)



3 pav. elektroninių sugerties ir fluorescencijos vektorių šuoliai

Panagrinėkime β kampo įtaką. Poliarizaciją pažymime P_0 . Pagal Perrenoformulę (tiesiškai poliarizuotai bangai):

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \beta - 1}{\cos^2 \beta + 3} \quad (30)$$

Įdomu tai, kad netgi nepoliarizuotai bangai, fluorescenciją matuojant 90° kampu, kaip ir mūsų atveju, fluorescencija bus dalinai poliarizuota. Tai susiję su tuo, kad dėka skersinių šviesos bangos svyravimų šviečiant nepoliarizuota šviesa susižadina molekulės kurių sugerties osciliatoriaus vektorius guli plokštumoje zOy , ir nesusižadina jeigu šio vektoriaus kryptis sutampa su ašimi X. Tokiu atveju poliarizacija P_0 esant nepoliarizuotam žadinimui ir kampą β keičiant nuo 0 iki 90° :

$$P_0 = \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{(7 - \cos^2 \beta)} \quad (31)$$

Poliarizuotai šviesai: P_0 keičiasi nuo $+1/2$ iki $-1/3$;

Nepoliarizuotai šviesai: P_0 keičiasi nuo $1/3$ iki $-1/7$;

Šie poliarizacijos koeficientai nagrinėti ties fiksuotu žadinimo ir fluorescencijos bangos ilgiu. Naudojant monochromatorius galima matuoti du poliarizacijos spektrus. Žadinimo poliarizacija $P_0 = f(\lambda_{\text{žad}})$. Fluorescencijos

poliarizacija $P_0 = f(\lambda_{\text{fluor}})$. Kadangi fluorescencija visada vyksta iš to paties lygmens S_1 nepriklausomai nuo sužadavimo kampo β , o tuo pačiu P_0 nepriklauso nuo bangos ilgio λ jeigu tirpalas homogeninis. Spektre tai būtų tiesios linijos. Tačiau visiškai kitaip su poliarizacijos žadinimo spektru, kadangi žadiname į skirtingus elektroninius lygmenis, o jie gali turėti skirtingą β su fluorescencijos poliarizacija. Tuo pačiu galima gauti informaciją apie molekulės vidinių elektroninių šuolių tarpusavio orientaciją.

Visi šie išvedimai yra teisingi jeigu molekulės nejuda. Tačiau realiose sąlygose fluorescencijos poliarizacija paprastai stipriai sumažinta dėl difuzijos ir rotacijos (sukamoji difuzija). Sukamoji (arba rotacinė difuzija) aprašoma rotaciniu difuzijos koeficientu D_s arba sukamosios relaksacijos laiku ρ :

$$D_s = \frac{RT}{\xi} \quad (32)$$

$$\rho = \frac{1}{2} D_s \quad (33)$$

ξ - trinties koeficientas aplinkoje, R – dujų konstanta; T – absoliutinė temperatūra. Pagal Stokso dėsnį ξ priklauso nuo aplinkos klampumo η ir molekulės spindulio r . Sferinėms molekulėms:

$$\xi = 8\pi r^3 \eta = 6\eta V \quad (34)$$

$$D_s = \frac{RT}{6\eta V} \quad (35)$$

kur V – vieno molio molekulių tūris. Vietoje ρ dažnai naudojamas rotacinis koreliacijos laikas $\sigma = \frac{\rho}{3}$.

Natūralu, kad dėka rotacinės difuzijos fiksuojama fluorescencijos papildoma depoliarizacija, t.y. P yra mažesnis negu P_0 . Taip pat fluorescencijos depoliarizacija priklauso nuo sužadintos molekulės gyvavimo laiko τ .

Bendras fluorescencijos poliarizacijos laipsnis P aprašomas Perino – Jablonskio formule:

$$\frac{1}{P} \pm \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho} \right) = \left(\frac{1}{P_0} \pm \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right) \quad (36)$$

Anizotropija A esant poliarizuotam žadinimui užrašoma formule:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_0} \left(1 + \frac{RT}{V\eta} \tau \right) \quad (37)$$

čia $\eta = \frac{A \tau RT}{(A_0 - A)V}$.

Tokiu būdu iš fluorescencijos poliarizacijos arba anizotropijos matavimų žinant sužadinto lygmens gyvavimo laiką galima išmatuoti aplinkos mikroklampumą. Tačiau reikia atsiminti, kad šio metodo naudojimas yra sąlygotas:

1. zondo matmenų;
2. sužadintos būsenos gyvavimo laiko τ ;
3. zondo geometrijos nukrypimų nuo sferinės molekulės modelio.

Daugumos dažų fluorescencija vandeniniuose tirpaluose pilnai depoliarizuota. Tačiau poliarizacija atsiranda, kai dažo molekulę patalpiname klampioje aplinkoje (pvz. lipidų sluoksnyje). Taip pat poliarizacija stebima baltymų ir dažų molekulių kompleksų vandeniniame tirpale.

Iš poliarizacijos matavimų galima nustatyti:

1. baltymo molekulių dydį;
2. baltymų kompleksaciją vieno su kitu (susidarant kompleksui molekulės dydis padidėja ir poliarizacija didėja);
3. fluorescuojančių molekulių kompleksaciją (agregaciją).

Poliarizaciniai procesai yra neįvertinti, todėl galima atlikti kinetinius matavimus. Šiuo metodu nustatyta, kad membranų lipidinio bisluoksniu klampumas lygus augalinio aliejaus klampumui.

Fluorescencijos spektroskopija su laiko skyra.

Kaip jau minėjome, 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:

$$F_{nuost.}(\omega) = \int_0^{\infty} F(\omega, t) dt \quad (38)$$

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 (38) 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;
- 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 procesai veikia molekulės būseną, (taigi ir jos fluorescencijos spektrą). Šį poveikį galima stebėti kinetinės fluorimetrijos metodais. Fluorescencijos kinetinėje spektroskopijoje molekulės sužadinamos trumpu šviesos impulsu (lazerio impulsu arba impulsinės lempos blyksniu) ir matuojamas jų fluorescencijos spektras kaip laiko funkcija, t.y. registruojamas signalas užrašomas taip:

$$F = F(\lambda, t) \quad (39)$$

Panagrinėkime supaprastintą pavyzdį: molekulių ansamblis sužadinamas gausiniu lazerio impulsu, kurio intensyvumas aprašomas formule

$$I(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\tau}} e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}} \quad (\text{žr. užtušotą kreivę 4 pav.}),$$

o molekulės sužadinta būseną gęsta tik spinduliniu būdu (išspinduliuojant fotoną). Tarsime, kad žadinantis impulsas nėra labai intensyvus ir sugerties įsisotinimo dėl priverstinio spinduliavimo galime nepaisyti. Molekulių skaičius sužadintoje būsenoje tuomet aprašomas tokia diferencialine lygtimi:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{A}{\sqrt{2\pi\tau}} e^{-\frac{t^2}{2\tau^2}} - \frac{1}{\tau_f} n \quad (40)$$

kurioje A – žadinančio impulso amplitudė, o τ_f – charakteringoji sužadintosios būsenos fluorescencijos trukmė (atvirkštinis dydis fluorescencijos greičiui).

Lygtį (40) atitinkančios homogeninės lygties sprendinys yra gęstanti eksponentė $Ce^{-\frac{t}{\tau_n}}$ (plona linija su kvadratais 4 pav.), o varijuodami konstantą ir įrašę pradinę sąlygą, $n(t = -\infty) = 0$, galime surasti ir bendrąjį sprendinį, kurio grafinis vaizdas pateiktas 4 pav. (ištiesinė linija) kuris susideda iš dviejų daugiklių:

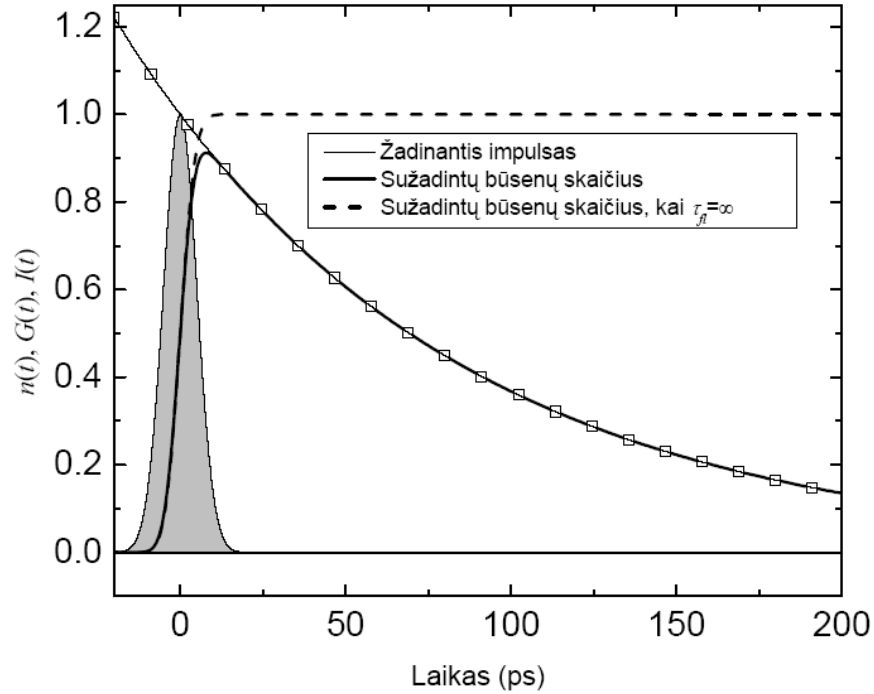
$$n(t) = G(t) \cdot e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (41)$$

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

$$G(t) \propto 1 + erf\left(\frac{t}{\tau}\right) \quad (42).$$

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

Grafinis jos pavidalas pateiktas 4 pav. (punktyrinė linija), o fizikinė prasmė irgi aiški: taip kistų sužadintos būsenos molekulių skaičius, jei fluorescencijos gyvavimo trukmė τ_f būtų be galo ilga (tuomet eksponentė (41) formulėje pavirstų vienetu). Natūralu, kad tuomet sužadintų molekulių skaičius ansamblyje yra proporcingas ansambli aplankiusių fotonų skaičiui iki laiko momento t , t.y. impulso gaubtinės integralui nuo $-\infty$ iki t .



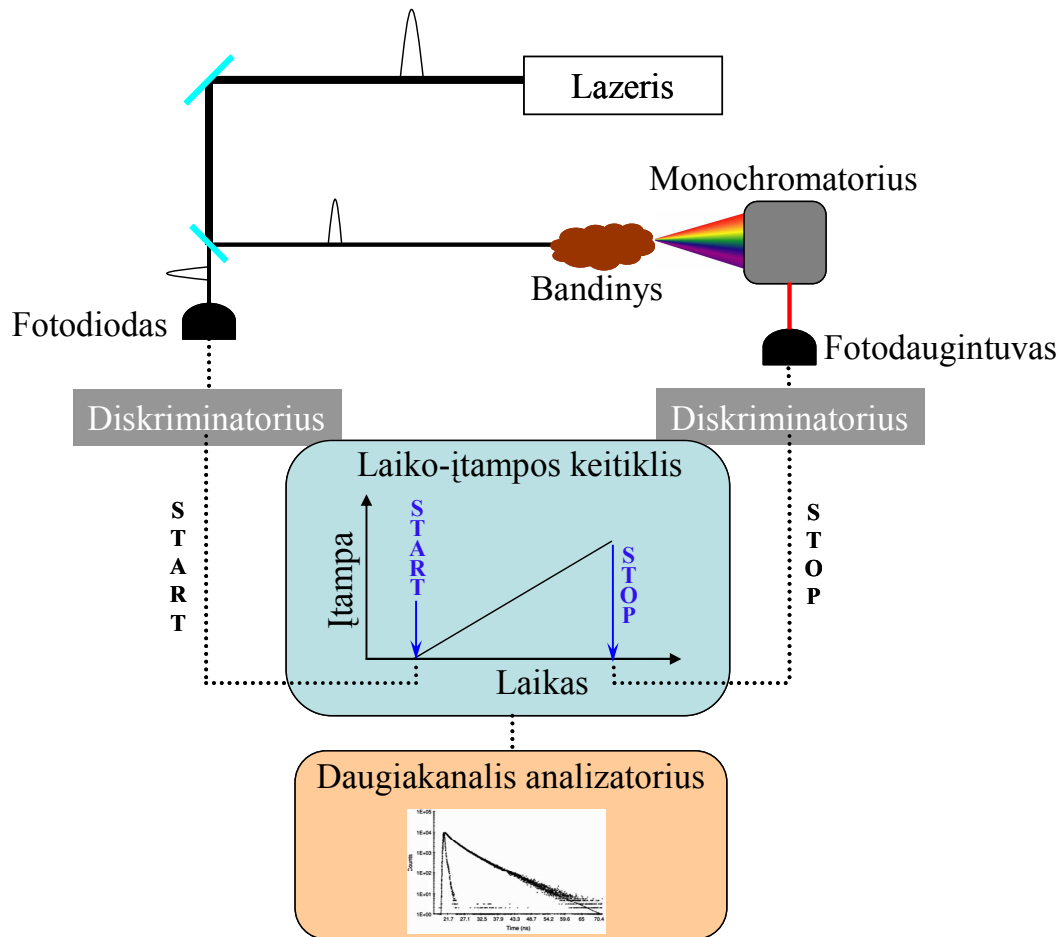
4 pav. Fluorescencijos kinetika hipotetinėje molekulėje, sužadintus ją gausiniu impulsu. Žadinančio gausinio impulso intensyvumas parodytas užtušuota kreive, fluorescencijos intensyvumas – ištisine linija. Punktyrinė linija rodo fluorescencijos intensyvumą tuo atveju, kai fluorescencija neužgęsta (arba gęsta be galo lėtai, palyginti su žadinančiojo impulsu trukme). Plona linija su kvadratais rodo eksponentę, aprašančią sužadintos būsenos gesimą (žr. (41) formulę).

Eksperimente stebimas fluorescencijos intensyvumas yra proporcingas molekulių, esančių sužadintoje būsenoje, skaičiui, taigi (41) formulės matome, kad mūsų paprastame molekulių ansamblyje fluorescencijos intensyvumas, užgaus tokiu greičiu, koku 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. 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 registruojamo fluorescencijos spektro forma bus pastovi, tik jo intensyvumas laikui bėgant užges pagal (41) formulę.

Laike koreliuotas pavienių fotonų skaičiavimas

Šis elektroninis metodas taikomas, kai žadinimui naudojame didelio impulsų pasikartojimo dažnio lazerius arba impulsines lempas. 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 (TCSPC (*angl. Time-Correlated Single Photon Counting*)) eksperimente, kurio principinė schema pateikta 5 pav. Didelio pasikartojimo dažnio šviesos šaltinis 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, kurį 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 sužadavimo ir fotono išspinduliavimo. Ši įtampa užrašoma daugiakanaliniame analizatoriuje. Šis analizatorius - tai elektroninis prietaisas, kuris paskirsto įtampas į kanalus, pagal jų vertę, pvz, įtampos 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.



5 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 ją sustabdo fluorescencijos fotonas, kurį išspinduliuoja bandinio molekulė, užregistruotas fotodaugintuvu. Trukmę tarp impulso, atėjusio į fotodiodą ir fono, užregistruoto fotodaugintuvu, atitinkanti įtampos vertė įrašoma daugiakanaliniame analizatoriuje. Atlikus eksperimentą daugelį kartų, gaunamas laikinis fluorescencijos trukmės pasiskirstymas (fluorescencijos gesimo kinetika).

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. 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“ (*angl. Jitter*) triukšmas, t.y. detektoriaus atsako formos kitimas nuo impulso prie impulso. Praktikoje TCSPC metodika leidžia pasiekti iki 50 ps laikinę skyrą. Laikinė skyra apibrėžiama kaip instrumentinės atsako funkcijos pilnas plotis pusės aukštyje. Ją galima išmatuoti, vietoje bandinio įdėjus šiek tiek šviesą išsklaidančios nefluorescuojančios medžiagos (pvz., vandens su kreida ar pienu). Kadangi tampri sklaida yra momentinis procesas, tai ir matysime signalą kurį lems matavimo sistemos atsakas į momentinį žadinimą. 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 prietaise įmontuoti keletą detektorių ir *visų* elektronikos komponentų, o tai yra brangus sprendimas.

Tačiau TCSPC metodika turi svarbių privalumų: jai nereikia didelių lazerio intensyvumų (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), 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.

Fluorescencijos anizotropijos su laikine skyra matavimas

Fluorescencijos anizotropiją su laikine skiriamąja geba galima išmatuoti naudojant fluorimetrą (ar fluorescencijos matavimo sistemą), kuriuo matuojamos fluorescencijos gyvavimo trukmės. Šiuo atveju reikia atlikti tik nežymų prietaiso patobulinimą – įmontuoti poliarizatorių (kuris poliarizuotą žadinančią spinduliuotę) ir analizatorių (per kurį į detektorius patektų tik reikiamos poliarizacijos šviesa). Kai kurie fluorimetrai su laikine skiriamąja geba šiuos komponentus turi įmontuotus.

Fluorescencijos anizotropija su laikine skyra yra apibrėžiama kaip:

$$A(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)} \quad (43)$$

čia $I_{\parallel}(t)$ - išmatuoto fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko kai poliarizatorius ir analizatorius yra orientuotas lygiagrečiai vienas kito atžvilgiu, $I_{\perp}(t)$ - išmatuoto fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo laiko kai poliarizatorius ir analizatorius yra orientuotas lygiagrečiai vienas kito atžvilgiu.

Jei tiriamą molekulę laikysime sferiniu rotoriumi tai tokiu atveju fluorescencijos anizotropijos gesimą galima aprašyti monoeksponentine funkcija, kuri priklauso nuo sukamosios relaksacijos koreliacijos laiko τ_{rot} ir yra aprašoma lygtimi:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{rot}}} \quad (44)$$

čia A_0 – yra anizotropija pradiniu laiko momentu.

Šis sukamosios relaksacijos laikas τ_{rot} yra tiesiogiai proporcingas molekulės tūriui V ir ją supančios aplinkos klampai η . Ši ryšį nusako lygtis:

$$\tau_{rot} = \frac{\eta V}{kT} \quad (45)$$

čia k – Bolcmano konstanta, T – tiriamo tirpalo temperatūra kelvinais. Taigi išmatavus baltymo sukamosios relaksacijos laiką ir tirpalo klampą galima apskaičiuoti baltymo tūrį.

Globulinių baltymų sukimosi relaksacijos laikas yra susijęs su jų moline mase ir apytiksliai yra apskaičiuojamas pasinaudojus tokia formule:

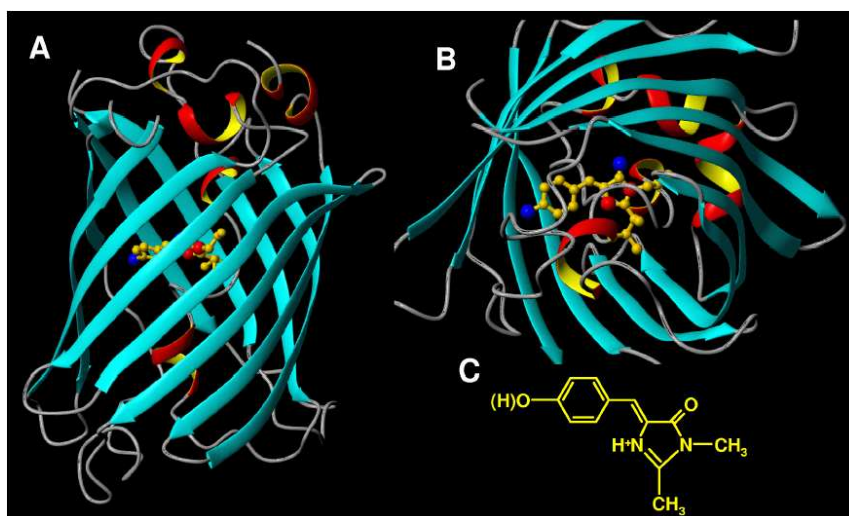
$$\tau_{rot} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{V} + h) \quad (46)$$

čia \bar{V} - specifinis baltymo tūris, h – baltymo hidratacijos koeficientas, T – temperatūra kelvinais, R – universalioji dujų konstanta, η – tirpalo klampumas. Baltymo specifinis tūris apytiksliai yra lygus 0,73 ml/g, hidratacija apie 0,23 g vandens 1 g baltymo. Pagal šią lygybę apskaičiuoti baltymo sukimosi relaksacijos laikai gali skirtis nuo išmatuotų apie du kartus (jie yra trumpesni). Šis skirtumas atsiranda dėl to, kad specifinis baltymo tūris bei baltymo hidratacijos laipsnis yra įvertinami ne tiksliai, be to daroma prielaida, kad baltymas yra sferinis.

Žaliai fluorescuojantis baltymas

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). Tačiau dirginant medūzą, ji šviečia žaliai (508 nm). Šį skirtumą sąlygoja dar vienas baltymas, vadinamas žaliai fluorescuojančiu baltymu (GFP – *angl. green fluorescent proteine*), kuriam aekvorinas perduoda energiją, ir kuris išspinduliuoja žalius fotonus. Šis baltymas unikalus tuo, kad yra optiškai aktyvus matomoje spektro srityje visiškai neturėdamas prostetinių grupių (tokių, kaip fotosintezėje dalyvaujantys pigmentai – chlorofilai ir karotinoidai).



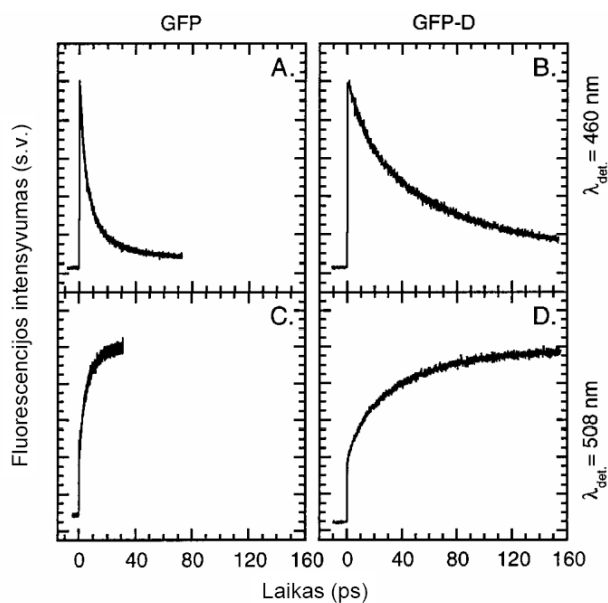
6 pav. Erdvinės GFP struktūros vaizdas „iš šono“ (A) ir „iš viršaus“ (B). Beta klostės pavaizduotos žaliomis juostomis, o chromoforas parodytas kaip rutuliukų ir strypelių struktūra. C: GFP chromoforo, susintetinto atskirai nuo baltymo, cheminė struktūrinė formulė.

GFP fluoroforas susiformuoja autokatalitiškai iš pirminės jo amino rūgščių sekos. Ši GFP savybė yra neįkainojama molekuliniėje biologijoje: biochemikai išmoko jį klonuoti ir privertė bakterijas sintetinti šį baltymą. Genetinėmis manipuliacijomis galima „privirinti“ šį baltymą prie kito kokio nors mus dominančio baltymo, o tada pastarojo judėjimą ir pasiskirstymą organizme galime stebėti pagal žalią fluorescenciją. Taigi, GFP naudojamas kaip nenuodingas ir visiškai biologiškas fluorescencinis žymeklis, kurio savybes biochemikai išmoko tiksliai valdyti. 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 [15]. Baltymo globulę sudaro beta klosčių „statinaitė“ (6A, B pav.), kuri supa ir saugo nuo aplinkos autokatalitiškai susiformavusį chromoforą (6 C 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 stokso poslinkis, kol M. Chatteraj su bendraautoriais atliko fluorescencijos dažnio sumavimo eksperimentą, pagaliau leidusi išsiaiškinti žalios GFP fluorescencijos prigimtį.



7 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.

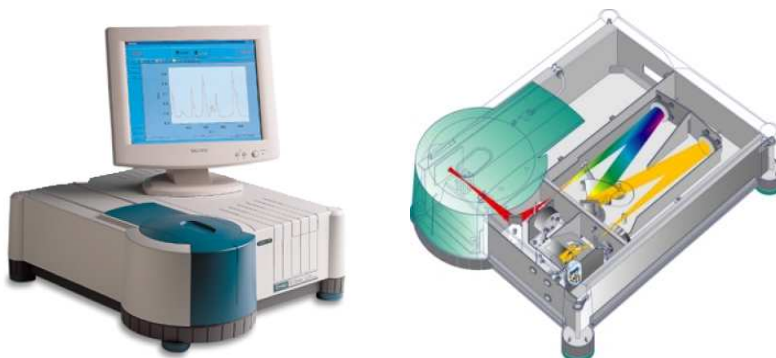
Eksperimente fluorescencijos dažnio sumavimo būdu buvo matuojama laiko skyros fluorescencija ties 460 nm ir 508 nm. Ištirti du bandiniai: vienas „įprastinis“ GFP, kitas – GFP, ištirpintas buferiniame tirpale, kurio pagrindą vietoje vandens sudarė D_2O . Tokiomis sąlygomis GFP chromoforo benzolo grupės protonas pakeičiamas deuteriu (t.y. „pasunkėja“ du kartus). Matome, kad fluorescencija ties 460 nm abiejuose bandiniuose atsiranda iš karto po sužadavimo (7 A,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 (7 B,D pav.). Praėjus maždaug 20 ps paprastame GFP ir 100 ps deuteruotame GFP, pradžioje stebėta fluorescencija ties 460 nm užgesa, ir užauga intensyvumas ties 508 nm (t.y. ten, kur GFP nuostovusis fluorescencijos spektras 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. Chattoraj 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 H_2O , ar D_2O buferiniame tirpale).

4. Praktinės užduotys

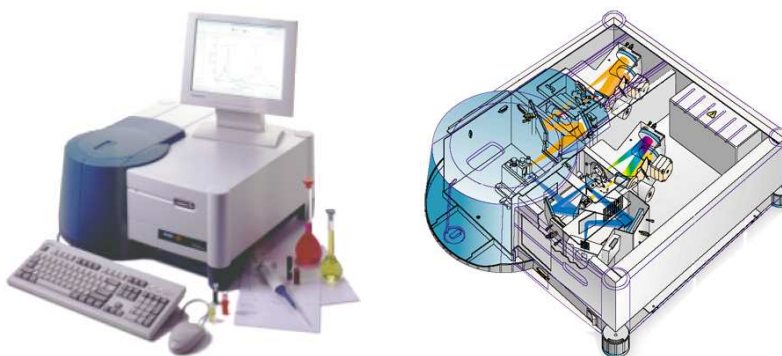
1. Kas yra fluorescencija, kokios jai būdingos gyvavimo trukmės?
2. Kas yra fluorescencijos kvantinis našumas? Kokie procesai vykstantys molekulėje jį mažina?
3. Kodėl fluorescencijos spektras yra pasislinkęs, sugerties spektro atžvilgiu, į ilgesnių bangų sritį?
4. Kaip galima apskaičiuoti S_1 būsenos molekulės radiacinę gyvavimo trukmę?
5. Nuo ko priklauso molekulės fluorescencijos gyvavimo trukmė? Kaip ji keičiasi didėjant vidinės konversijos spartos konstantai?
6. Kas yra statinis ir dinaminis fluorescencijos gesinimas? Ar jiems vykstant keičiasi fluorescencijos gyvavimo trukmė? Kodėl?
7. Kokia šviesa vadinama poliarizuota?
8. Kaip apskaičiuojamas fluorescencijos poliarizacijos laipsnis? Apskaičiuokite jį kai $I_{\parallel} = 0,8 \times I_{\perp}$.
9. Nubraižykite fluorescencijos anizotropijos matavimo schemą.
10. Kaip galima išmatuoti molekulės fluorescencijos gyvavimo trukmę?
11. Nubraižykite fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimo (naudojant laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo metoda) schemą.
12. Nubraižykite fluorescencijos anizotropijos su laikine skyra matavimo schemą.

5. Aparatūra ir darbo metodika

Šio laboratorinio darbo metu bus naudojamas sugerties spektrometras Carry 50 (Varian, Australija), fluorimetras Carry Eclipse (Varian, Australija) ir fluorimetras su laikine skyra FL920 (Edinburgh Instruments, Škotija). Trumpai aptarsime šiuos prietaisus.



8 pav Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometras



9 pav Cary Eclipse fluorescencinis spektrofotometras.

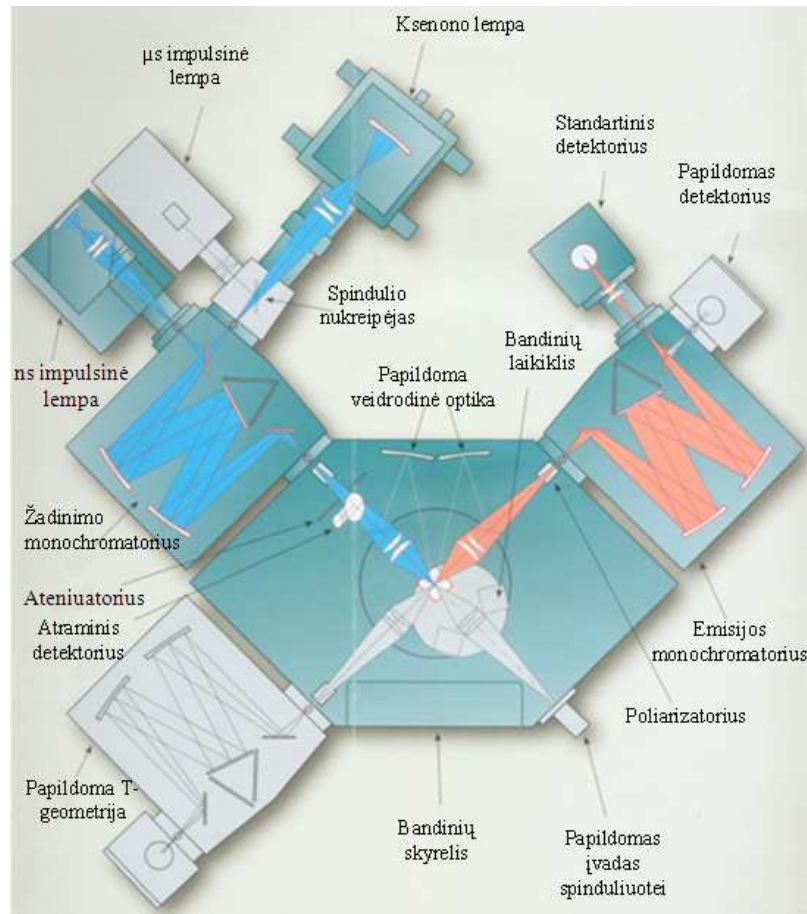
Carry 50 spektrometre kaip šviesos šaltinis yra naudojama ksenono lempa, juo galima atlikti matavimus 190 nm – 1100 nm bangų ilgio intervale. Prietaiso skiriamoji geba didesnė nei 1,5 nm. Spektrometras gali išmatuoti bandinių sugertį iki 3 optinių vienetų, todėl atliekant matavimui reikia stebėti kad tirpalų optinis tankis neviršytų šios reikšmės.

Carry Elipse spektrometre kaip šviesos šaltinis yra naudojama impulsinė ksenono lempa, todėl juo galima dirbti neuždarius bandinių skyrelio, tačiau rekomenduojama jį uždaryti, kad atliekant matavimus būtų išlaikomos pastovios sąlygos. Šiuo fluorimetru galima atlikti matavimus 200 nm – 900 nm bangų

ilgio intervale. Prietaiso skiriamoji geba didesnė nei 1,5 nm. Detaliau apie šiuos prietaisus galima pasiskaityti spektrometrų aprašuose.

Pagrindinis prietaisas kuris bus naudojamas atliekant šį laboratorinį darbą yra modulinis spektrometras (10 pav.). Tai yra plačiausių galimybių bei pats sudėtingiausias spektrų registravimo įrenginys. Jame kiekviena dalis, pvz. lempa, monochromatorius ir t.t. yra atskiras modulis. Prietaisas, kaip konstruktorius, yra surenkamas iš tokių modulių. Natūralu, kad šiuos modulius reikalui esant galima nesunkiai keisti, tačiau modulinio spektrometro esmė, kad būtų galima pasidaryti prietaisą sujungiant tiek modulių, kiek yra reikalinga ir dirbant nieko keisti nereiktų. Taigi pirmoji visų spektrometrų dalis yra šviesos šaltinis. Kad būtų galima atlikti įvairių tipų fluorescencijos matavimus reikalingas šviesos šaltinis spinduliuojantis šviesą nuo ultravioleto iki infraraudonosios spektrinės srities. Šiame prietaise yra naudojama ksenono lempa, kuri skleidžia tiek UV, tiek VIS, tiek ir NIR srities šviesą. Tam tikrais atvejais netgi IR srityje gali būti naudojama ksenono lempa. Tačiau jos emituojamas spektras nėra tolygus. IR sričiai labiau tinkamos kvarco-volframo halogeninės lempos. Abiejų tipų lempas galima pajungti prie spektrometro ir atliekant atitinkamą užduotį pasirinkti vienos arba kitos lempos spinduliuotę. Šios lempos – tai nuostoviosios fluorescencijos šviesos šaltiniai. Prie šio spektrometro taip pat yra prijungti ir šviesos šaltiniai skirti fluorescencijos registravimui su laikine skyra. Pirmiausia tai yra impulsinė ksenono lempa, kurios impulso trukmė siekia kelias nanosekundes. Tam tikrais atvejais tokia trukmė yra per ilga, todėl papildomai galima naudoti impulsinius lazerius (jų impulso trukmė yra kelių dešimčių pikosekundžių eilės), kurie taip pat yra pajungiami prie spektrometro per specialų lazerinės spinduliuotės įvadą. Prie šio fluorimetro yra prijungtas 405 nm bei 490 nm bangos ilgio šviesą spinduliuojantys lazeriai. Jei šie bangos ilgiai tinka numatomam eksperimentui tada, kaip šviesos šaltinį reikėtų naudoti lazerį. Jei šis bangos ilgis netinka eksperimentui reikės naudoti impulsinę ksenono lempą. Kaip jau aukščiau

minėjome lempa skleidžia plataus spektro šviesą, todėl naudojant lempą yra reikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Taigi visos lempos yra jungiamos taip, kad įvairių optinių sistemų pagalba (lęšiai, veidrodžiai ir pan.) jų spinduliuotės būtų suvedamos į kitą modulį – monochromatorių. Pagrindinė monochromatoriaus dalis, kuria šviesa yra išskaidoma į spektrą, yra difrakcinė gardelė, o pagrindinės monochromatorių apibūdinančios charakteristikos yra dispersija (arba išbarstymas), pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis. Moduliniame spektrometre monochromatorius yra kaip atskiras prietaisas, todėl šiuos reikalavimus galima išpildyti geriausiai. Dispersiją, arba kaip stipriai bus išskirtos šviesos spalvos, nulemia tiek pati gardelė, tiek monochromatoriaus matmenys. Kadangi tai yra atskiras modulis, jis gali būti daromas tiek mažas, tiek ir didelis. Pralaidumas yra nevienodas kiekvienam bangos ilgiui, tai vėlgi nulemia, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuoti difrakcinės gardelės rėžiai. Taigi dirbant skirtingose spektrinėse srityse (UV, VIS, NIR, IR) reikėtų prietaiso su keliomis skirtingomis gardelėmis. Šiame prietaise monochromatoriuje galima įmontuoti tris skirtingas gardeles ir vėliau pasirinkti tinkamą pagal spektrinę sritį, kurioje numatome dirbti. Tokiu būdu yra išlaikomas aukštas monochromatoriaus pralaidumas plačiame spektriniame ruože. Paskutinis parametras, kurio apibūdinamas monochromatorius yra šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų. Norint sumažinti pašalinės šviesos kiekį reiktų išskirtą tam tikros spalvos spinduliuotę dar kartą praleisti pro monochromatorių. Moduliniame spektrometre ir tai gali būti padaryta sujungiant du atskirus monochromatorius. Be abejo, monochromatoriai turi įėjimo bei išėjimo plyšius, kurių pločiai gali būti keičiami.



10 pav. Edinburgh Instruments spektrometro FL920, principinė schema.

Sekanti modulinio spektrometro dalis – bandinių skyrius, jame yra kai kurie svarbūs optiniai komponentai. Tai yra poliarizatorius, kuriuo yra poliarizuojama spinduliuotė, jei yra atliekami poliarizaciniai matavimai, bei intensyvumo reguliatorius, kuriuo galima keisti į audinį krentančios žadinančiosios spinduliuotės intensyvumą. Bandinio skyriuje taip pat yra įmontuotas spinduliuotės intensyvumo detektorius, kuris registruoja bet kokius žadinančiosios spinduliuotės svyravimus ir atitinkamai yra modifikuojamas fluorescencijos spektras. Bandinių skyriuje yra dar vienas įvadas šviesos šaltiniui, t.y. kelias aplenkiant monochromatorių. Jis yra skirtas lazeriniams šviesos šaltiniams, kurių spinduliuotė yra monochromatinė.

Surinktas fluorescencijos signalas eina į detektorių. Emisijos atšaka yra labai panaši į žadinimo atšaką: taipogi yra poliarizatorius, kuris šioje atšakoje yra vadinamas analizatoriumi, viengubas arba dvigubas monochromatorius ir

detektoriai. Monochromatoriuose yra įmontuotos kitokios difrakcinės gardelės nei žadinimo atšakoje, nes fluorescencija vyksta kitoje spektrinėje srityje nei žadinimo spinduliuotė. Detektorių skaičių vėlgi apsprendžia tai, kokioje spektrinėje srityje ir kokio tipo yra atliekamas tyrimas. Bendrai galima išskirti tris detektorius – vienas UV – VIS sričiai, Kitas NIR ir IR sričiai, ir trečias, labai greitas – fluorescencijai su laikine skiriamąja geba. Šie greiti detektoriai taip pat yra skirtingi skirtingoms sritims.

Detaliau apie šį spektrometrą, jo galimybes bei darbo eigą atliekant matavimus galite pasiskaityti spektrometro apraše.

6. Darbo eiga

Darbas sudarytas ir žemiau išvardintų etapų:

- tirpalų paruošimas;
- nuostoviosios sugerties ir fluorescencijos spektrų matavimas;
- fluorescencijos poliarizacijos laipsnio matavimas;
- fluorimetro laikinės skyros matavimas;
- tiriamų tirpalų fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimas;
- tiriamų tirpalų fluorescencijos anizotropijos gyvavimo trukmių

matavimas.

Toliau šias dalis aptarsime detaliau.

Tirpalų paruošimas.

1. Fosfatiniame buferyje kurio pH=7,3 ištirpinkite GFP. Paruoštame tirpale GFP koncentracija turi būti $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l. GFP molinė masė M=27 kDa. Fluorescencijos anizotropijos matavimams taip pat reikės pasiruošti $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l GFP tirpalus kuriuose glicerolio koncentracija būtų 10%, 30%, 50% ir 70%.

2. Fosfatiname buferyje kurio pH=7,3 ištirpinkite BSA. Paruoštame tirpale BSA koncentracija turi būti $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l. BSA molinė masė M=66,4 kDa.
3. Paruoškite sklaidantį tirpalą fluorimetro laikinės skyros matavimams (į vandenį įlašinti pieno).

Nuostoviosios sugerties ir fluorescencijos spektrų matavimas (matavimai atliekami su Varian spektrometrais)

1. Išmatuokite paruoštų GFP ir BSA tirpalų sugerties spektrus. Matuojant sugertį, sugertis ties visais bangos ilgiais neturi neviršyti 3 optinio tankio vienetų. Gautus duomenis pavaizduoti grafiškai.
2. Išmatuokite paruoštų GFP ir BSA tirpalų fluorescencijos spektrus. Gautus duomenis pavaizduojami grafiškai.
3. Sugerties ir fluorescencijos spektrus pavaizduokite viename grafike.

Fluorescencijos poliarizacijos laipsnio matavimas (Šis ir tolesni matavimai atliekami fluorimetru FL920)

1. Išmatuokite GFP tirpalo fluorescencijos spektrą esant lygiagrečiai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui.
2. Išmatuokite GFP tirpalo fluorescencijos spektrą esant statmenai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui.
3. Abu gautus spektrus pavaizduokite viename grafike.
4. Pagal $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ formulę apskaičiuokite fluorescencijos poliarizacijos laipsnį.
5. Išmatuokite BSA tirpalo fluorescencijos spektrą esant lygiagrečiai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui.
6. Išmatuokite BSA tirpalo fluorescencijos spektrą esant statmenai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui.
7. Abu gautus spektrus pavaizduokite viename grafike.

8. Pagal $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ formulę apskaičiuokite fluorescencijos poliarizacijos laipsnį.
9. Palyginkite gautus GFP ir BSA poliarizacijos laipsnius.

Fluorimetro laikinės skyros matavimas

1. Išmatuokite fluorimetro FL920 instrumentinę atsako funkciją. Ji matuojama į bandinio skyrelį įdėjus sklaidantį bandinį.
2. Atvaizduokite gautą kreivę grafiškai.
3. Apskaičiuokite fluorimetro laikinę skyrą (laikinė skyra apibrėžiama kaip instrumentinės atsako funkcijos pilnas plotis pusės aukštyje).

Tiriamų tirpalų fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimas

1. Išmatuokite GFP tirpalo fluorescencijos kinetiką. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią GFP sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).
2. Iš gautos kreivės apskaičiuokite (aproksimuokite eksponente) GFP fluorescencijos gyvavimo trukmę. Šiam tikslui galima naudoti fluorimetre esančią kinetinių fluorescencijos matavimų analizės programą.
3. Išmatuokite BSA tirpalo fluorescencijos kinetiką. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią BSA sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).
4. Iš gautos kreivės apskaičiuokite (aproksimuokite eksponente) BSA fluorescencijos gyvavimo trukmę. Šiam tikslui galima naudoti fluorimetre esančią kinetinių fluorescencijos matavimų analizės programą.
5. Palyginkite gautas GFP ir BSA fluorescencijos gyvavimo trukmes.

Tirpalų fluorescencijos anizotropijos matavimas su laikine skyra

1. Išmatuokite GFP tirpalo fluorescencijos kinetiką esant lygiagrečiai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią GFP sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).
2. Išmatuokite GFP tirpalo fluorescencijos kinetiką esant statmenai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią GFP sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).
3. Abi gautas kinetikas pavaizduoti viename grafike.
4. Pagal $A(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)}$ formulę apskaičiuokite fluorescencijos anizotropijos kinetiką, apskaičiuokite (aproksimuokite gautą kinetiką eksponente) GFP sukimosi relaksacijos trukmę. Šiam tikslui galima naudoti fluorimetre esančią kinetinių fluorescencijos matavimų analizės programą.
5. Pasinaudodami $\tau_{rot} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{V} + h)$ formule apskaičiuokite baltymo aplinkos klampą (naudokite apytiksles \bar{V} ir h vertes: $\bar{V} = 0,73 \frac{ml}{g_{baltymo}}$, $h = 0,23 \frac{g_{H_2O}}{g_{baltymo}}$).
6. Išmatuokite BSA tirpalo fluorescencijos kinetiką esant lygiagrečiai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią BSA sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).
7. Išmatuokite BSA tirpalo fluorescencijos kinetiką esant statmenai orientuotiems poliarizatoriui ir analizatoriui. Fluorescencijos žadinimui reikia pasirinkti to bangos ilgio šviesą, kurią BSA sugeria labiausiai (nustatykite tai iš ankščiau išmatuotų sugerties spektrų).

8. Abi gautas kinetikas pavaizduokite viename grafike.
9. Pagal $A(t) = \frac{I_{||}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)}$ formulę apskaičiuokite fluorescencijos anizotropijos kinetiką, apskaičiuokite (aproksimuokite gautą kinetiką eksponente) BSA sukimosi relaksacijos trukmę. Šiam tikslui galima naudoti fluorimetre esančią kinetinių fluorescencijos matavimų analizės programą.
10. Pasinaudodami $\tau_{rot} = \frac{\eta M}{RT} (\bar{V} + h)$ formule apskaičiuokite baltymo aplinkos klampą (naudokite apytiksles \bar{V} ir h vertes: $\bar{V} = 0,73 \frac{ml}{g_{baltymo}}$, $h = 0,23 \frac{g_{H_2O}}{g_{baltymo}}$).
11. Palyginkite gautas GFP ir BSA fluorescencijos anizotropijos kinetikas, sukimosi relaksacijos laikus, apskaičiuotas tirpalo klampas.

GFP fluorescencijos anizotropijos gyvavimo trukmių matavimas skirtingo klampumo terpėse

- Atlikite įvairaus klampumo tirpalų (vienodos GFP koncentracijos, bet skirtingo klampumo (0%, 10%, 30%, 50% 70% glicerolio) tirpalų) fluorescencijos gyvavimo trukmių bei fluorescencijos anizotropijos matavimus bei skaičiavimus aprašytus aukščiau (darbo etape „*Tirpalų fluorescencijos anizotropijos matavimas su laikine skyra*“) 1 – 5 punktuose.
- Gautas anizotropijos kinetikas pavaizduokite viename grafike.
- Nubraižykite tirpalo klampos priklausomybės nuo glicerolio koncentracijos grafiką.

7. Kontroliniai klausimai

1. Laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo metodo schema, šio metodo privalumai ir trūkumai.
2. Ką galima nustatyti iš fluorescencijos depoliarizacijos?
3. Kaip galima išmatuoti kinetinės fluorescencijos matavimo sistemos laikinę skiriamąją gebą?
4. Nuo ko priklauso baltymo sukimosi greitis? Kaip jis kinta didinant tirpalo klampumą?
5. Kaip apytiksliai galima apskaičiuoti baltymo sukimosi relaksacijos trukmę?
6. Kaip apskaičiuojama sukimosi greičio relaksacijos trukmė?
7. Nubraižykite fluorimetro FL920 principinę schemą ir paaiškinkite jo veikimo principą?

8. Literatūra

1. R. Rotomskis, S. Bagdonas, J. Valančiūnaitė. Biofotonika, Vilniaus universiteto leidykla, 2007.
2. S. Bagdonas, R. Rotomskis, M. Vengris. Fotobiologija, Vilniaus universiteto leidykla, 2007.
3. J.R. Lakowicz. Principles of fluorescence spectroscopy. Second edition. Kluwer Academic/plenum publishers, New York, 1999.
4. V. A. Šalna. Optika. Vilniaus universiteto leidykla, 2001.
5. M. Whal, U. Ortman, K. Lauritsen, R. Erdman, Application of sub-ns pulsed LEDs in fluorescence lifetime spectroscopy, Proceedings of SPIE, Vol. 4648, Testt and measurement of optoelectronic devices, 2002.
6. Roger Y. Tsien. 1998. THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN. Annu. Rev. Biochem. 67:509–44.
7. K.Suhling, D.M. Davis, D. Phillips, The Influence of Solvent Viscosity on the Fluorescence Decay and Time-Resolved Anisotropy of Green Fluorescent Protein, Journal of Fluorescence, Vol. 12, No. 1, March 2002.