

Šviesos sukeltų fluorescencijos pokyčių matavimai biologinių pigmentų bandiniuose

Darbo užduotys:

1. Susipažinti su šviesolaidine fluorescencijos registravimo sistema ir išsiaiškinti bandinio fluorescencijos spektrų registravimo techninius principus.
2. Išmatuoti kelių ant filtrinio popieriaus užlašintų tirpalų ir biologinių objektų fluorescencijos spektrus.
3. Užregistruoti turimų bandinių fluorescencijos intensyvumo laikinius pokyčius ties keliais šviesos bangų ilgiais, bandinius veikiant skirtingo bangos ilgio šviesos šaltiniu.
4. Pateikti išmatuotus bandinių fluorescencijos spektrus ir jos intensyvumo laikinius pokyčius grafiniu pavidalu ir paaiškinti gautus rezultatus.

Darbo eiga:

1. Susipažinę su šviesolaidine fluorescencijos registravimo sistema išmatuojame kelių ant filtrinio popieriaus užlašintų tirpalų ir biologinių bandinių fluorescencijos spektrus.
2. Pagal užregistruotus spektrus pasitarę su dėstytoju pasirenkame 3-5 bangos ilgius ties kuriais registruosime fluorescencijos kinetikas.
3. Užregistruojame turimų bandinių fluorescencijos intensyvumo pokyčių kinetiką veikiant dviejų skirtingo bangos ilgių šviesos šaltiniais. Registravimo trukmė – 5-10 minučių. Įsitikinus, kad fluorescencijos pokyčiai nevyksta, matavimas gali būti sustabdomas ir anksčiau,
4. Atvaizduojame išmatuotus biologinių pigmentų fluorescencijos intensyvumo kinetikas, nustatome fluoroforų (fluorescuojančių medžiagų) skaičių tirtuose bandiniuose.
5. Sunormuojame gautų intensyvumo laikinių pokyčių spektrus į pradines vertes ir palyginame pokyčius skirtingose medžiagose.
6. Atvaizduojame pradinis ir galutinius šviesos paveiktų bandinių fluorescencijos spektrus ir iš jų įvertiname santykinis intensyvumo pokyčius, nustatome galimų fotoproduktų spektrus.
7. Įvardijame fluorescencinės spektroskopijos metodu tirtas medžiagas.

Klausimai:

1. Kokie yra šviesos ir bandinio sąveikos metu vykstantys fizikiniai procesai? Kokia jų galima įtaka registruojamiems spektrams.
2. Kokios yra bandinio bei matavimų sistemos savybės, galinčios daryti įtaką registruojamam bandinio spektrui?
3. Kokie yra šviesolaidinės fluorescencijos registravimo sistemos privalumai ir trūkumai, lyginant ją su įprastiniu fluorimetru?

4. Kodėl šviesa sukelia skirtingus poveikius skirtingose medžiagose? Kokie tie poveikiai?
5. Kodėl gali skirtis stebimi šviesos sukelti fluoroforų pokyčiai gyvuose ir negyvuose objektuose?

Fluorescencijos spektrų ir jų laikinių parametru registravimas.

Fluorescencijos spektrų matavimas

Fluorescencijos spektrus matuojame šviesolaidiniu Ocean Optics USB 2000 spektrofluorimetru (FL), kurio matavimo ribos yra nuo 200 nm iki 1100 nm. Fluorescencijos žadinimui naudojama Ocean Optics LS-450 lempa (L) su adaptuotu mėlynos šviesos diodu. Diodo emituojamos spinduliuotės smailė yra ties 403 nm, jos spektrinis plotis pusės intensyvumo aukštyje (angl. – FWHM) yra 20 nm. Lempos optiniais elementais diodo emituojama šviesa sufokusuojama į bifurkacinio šviesolaidžio įvadą (IV). Bifurkacinį šviesolaidį sudaro du tarpusavyje sujungti šviesolaidžiai, kurių kiekvienas turi atskirą galą, o trečiame gale (BF), kuris nukreipiamas į bandinį, abiejų atskirų šviesolaidžių optinės skaidulos yra suglaustos drauge. Naudojamas „saulutės“ tipo šviesolaidis, kuriame vieno šviesolaidžio galo gija yra centrinė, o šešios kito šviesolaidžio galo gijos išsidėstę aplink ją ratu. Bandinio fluorescencijos žadinimui dažniausiai naudojama centrinė gija, tuomet fluorescencijos signalas renkamas aplink centrinę giją išdėstytomis šviesolaidinėmis skaidulomis. Siekiant atsiriboti nuo išsklaidytos žadinimo šviesos, bifurkacinio šviesolaidžio išvado (IŠV) galas sujungiamas su optiniu moduliu sudarytu iš dviejų lęšių ir filtro. Tarp lęšių L1 ir L2 statomas filtras F, kuris parenkamas taip, kad nepraleistų žadinimo šviesos signalo, tačiau netrukdytų registruoti bandinio fluorescenciją. Praėjusi filtrą šviesa šviesolaidžiu (SV) patenka į spektrofluorimetrą. Iš spektrofluorometro spektroskopiniai duomenys perduodami į kompiuterį (PC), kuriame jie toliau tvarkomi OOIBASE32 programine įranga. Fluorescencijos spektrai matuojami lygiai taip pat, kaip ir sugerties spektrai, pagal metodinėje literatūroje nurodytas procedūras. Fluorescencijos spektrų intensyvumo laikinių pokyčių registravimas atliekamas šiais etapais:

1. Pasirenkami spektrų ir jų laikinių pokyčių registravimo parametrai programos meniu lange “Time Acquisition→ Configure→ Time Acquisition Configuration”

2. Pasirenkamas norimas išmatuoti intensyvumo laikinių pokyčių kiekis ir nustatomos jų spektrinių padėčių vertės programos meniu lange “Time Acquisition→ Configure→ Time Acquisition Channel Configuration”

3. Aktyvuojamas laikinių parametru registravimo langas “Time Acquisition→ Activate Time Acquisition”

4. Sustabdžius matavimą, laikinių parametru išsaugojimas atliekamas meniu lange “Time Acquisition→ Save Data...”

Prieš pradėdant naują laikinių pokyčių matavimų seką, duomenų išsaugojimui reikia nurodyti naują tuščią direktoriją.