

FLUORESCENČNA MIKROSPEKTROSKOPIJA

Seminar, 4. letnik

Iztok Urbančič

mentor: doc. dr. Janez Štrancar

POVZETEK

V seminarju je predstavljen nov eksperimentalni sistem, ki združuje konfokalni mikroskop, tekočekristalni zvezno nastavljivi filter in kamero z elektronskim pomnoževanjem. Celota omogoča izvedbo fluorescenčne spektroskopije na manj kot mikrometer velikih delih.

V uvodu so razčlenjeni motivi in cilji, ki so vodili načrtovanje nove tehnike. V nadaljevanju so razjasnjene osnove fluorescence, prednosti konfokalne mikroskopije ter delovanje nastavljivega filtra. Sledi predstavitev celotnega sistema v laboratoriju, kjer so izpostavljene pomembne fizikalne značilnosti posameznih komponent ter sklopitve med njimi, ki določajo končne lastnosti sistema. Na koncu je opisanih še nekaj prvih poskusov, s katerimi je bilo preverjeno delovanje posameznih sklopov.

KAZALO

1	UVOD.....	3
2	FLUORESCENCA.....	4
2.1	Zgodovina.....	4
2.2	Teorija.....	5
2.3	Fluorit.....	6
2.4	Fluorofori.....	6
3	MIKROSKOPIJA.....	7
3.1	Obrnjeni mikroskop.....	7
3.2	Konfokalnost.....	8
4	SPEKTROSKOPIJA.....	11
4.1	Osvetljevanje.....	11
4.2	Nastavljivi tekočerkristalni filter.....	13
4.3	Kamera.....	14
5	IZVEDBA V LABORATORIJU.....	15
5.1	Komponente.....	15
5.2	Prvi poskusi.....	18
6	ZAKLJUČEK.....	18
7	VIRI.....	19

1 UVOD

V dvajsetem stoletju se je razvila množica spektroskopskih metod, ki omogočajo raziskovanje fizikalnih in kemičnih lastnosti snovi. Le-te je moč določiti iz interakcije gradnikov z elektromagnetnim valovanjem, natančneje iz spektra sprejete, oddane ali sipane svetlobe. Za različne namene se uporablja valovanje v ustreznem območju valovnih dolžin, od gama in rentgenskih žarkov, prek ultravijolične, vidne in infrardeče svetlobe pa vse do mikro- in radijskih valov. Vsaka metoda posreduje svoje informacije in doda košček v mozaik znanja.

Spektroskopske metode odlično delujejo za raziskovanje vzorcev preproste sestave. Vsak del merjenca iz homogene snovi prispeva enak signal, kar močno poenostavi ali pa sploh omogoči dovolj natančne meritve, učinkovito analizo in smiselno interpretacijo zbranih podatkov. Pri proučevanju nehomogenih vzorcev, zgrajenih iz zapletenih podstruktur, kakršni so na primer vsi biološki sistemi, pa so spektroskopije pogosto v težavah. Iz posameznih predelov prihajajo različne informacije, se med seboj seštejejo ali izpovprečijo v skupen spekter, ki ga nato zazna merilna naprava. Razstavljanje tako bogatega signala na posamezne komponente je vsaj zelo mučno, marsikdaj pa povsem nemogoče opravilo, interpretacija rezultatov, od kod prihaja posamezni prispevek, pa lahko zahteva vrsto dodatnih kontrolnih poskusov [1]. Za spektroskopijo takih sistemov bi bilo nadvse prikladno opraviti meritve v vsaki točki vzorca posebej, poleg tega pa po možnosti še videti, od kod prihaja.

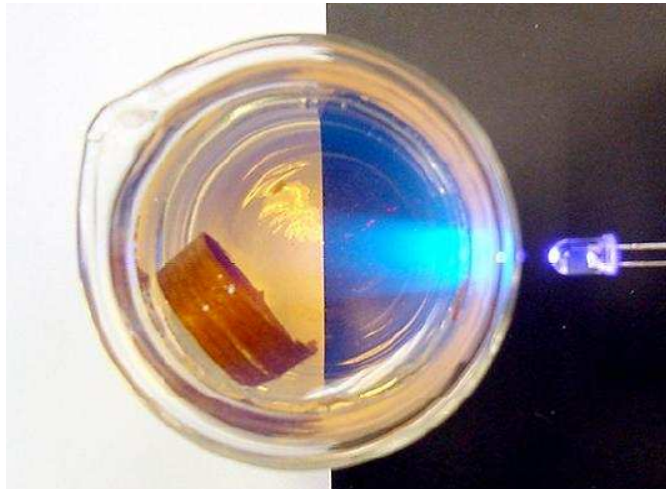
Zadnja ideja je bilo vodilo pri načrtovanju novega eksperimentalnega sistema, ki se prav zdaj postavlja v Centru za elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) Laboratorija za biofiziko na Institutu "Jožef Stefan" v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo. Doslej osnovni raziskovalni metodi centra se bo pridružila fluorescenčna mikrospektroskopija.

Omenjeni spektroskopski tehniki imata kar nekaj skupnih ali uporabno dopolnjujočih se lastnosti, zaradi katerih je njuna združitev izjemno obetavna. Tako za EPR kot za fluorescenco na bioloških vzorcih je potrebno dodajanje umetno pripravljenih označevalskih molekul, ki posredujejo informacije o svoji bližnji molekularni okolici. Obe funkcionalni skupini imata približno enaki prostorski in časovni ločljivosti – dogajanje z značilnimi časi okrog nanosekunde zaznavata na razdalji do nekaj desetink nanometra [1], [2], [3]. Če se označevalska centra pripne na isto molekulo, lahko torej iz istega molekularnega okolja dobimo dvojne informacije enakega časovnega značaja. Zmogljiv konfokalni mikroskop pa omogoča, da še dodatno preverimo, v katerem delu celice so se zbrale označevalske molekule in tako izvemo, katere strukture prispevajo izmerjene spektroskopske podatke.

2 FLUORESCENCA

2.1 Zgodovina

Že davnega leta 1565 je španski fizik in botanik Nicolas Monardes objavil opazovanja zanimivega pojava: voda v stiku s tropskim lesom *Lignum nephriticum* se je na sončni svetlobi nenavadno živo-modro svetila (Slika 1) [4]. Sto let kasneje je isti pojav proučeval Robert Boyle, približno hkrati ga je tudi Sir Isaac Newton poskusil vključiti v svojo teorijo o svetlobi in barvah, a ga ni znal pojasniti.

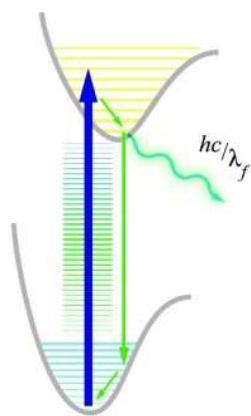


Slika 1: Kos lesa *Lignum nephriticum* v čaši z vodo: pri sobni osvetlitvi (levo) je raztopina rumenkaste barve, pod ultravijolično svetlobo diode (400 nm) pa modro zažari. [4]

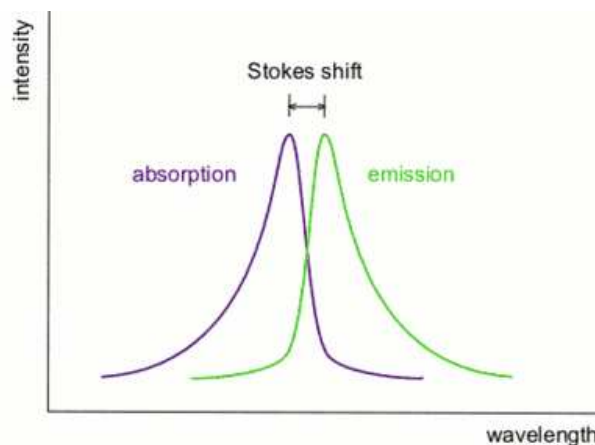
Pomemben korak v razumevanju je sredi devetnajstega stoletja prispeval Sir George Gabriel Stokes, ki je do svojih spoznanj prišel po nadvse preprostem poskusu [5]. Epruveto, napolnjeno z raztopino kininovega sulfata, je premikal skozi mavrico, ki jo je napravil z razklonom sončne svetlobe na stekleni prizmi. Dokler je vzorec osvetljevala vidna svetloba, je bila tekočina povsem prozorna, ko pa je epruveto pomaknil v temo naprej od vijoličnih žarkov, je vsebina modro zažarela. Presenečeno je zapisal: “*It was really darkness visible.*” Poskus ga je prepričal, da je snov najprej svetlobo sprejela in nato oddala, trdil pa je tudi, da ima izsevana svetloba vedno daljšo valovno dolžino kot absorbirana. Izjava je danes znana kot Stokesov zakon ali Stokesov premik, pojav pa je najprej imenoval “razpršilni odboj” (angl. “dispersive reflection”), a mu ni bil najbolj všeč. Že v svojem drugem delu imenoval ga je preimenoval v fluorescenco, po analogiji z drugim optičnim pojavom opalescenco. Oba sta tako poimenovana po mineralih, pri katerih je bil pojav opažen – po opalu oz. fluoritu.

2.2 Teorija

Za razlago fluorescence je bilo potrebno počakati na kvantno mehaniko, s katero je Jean Perrin leta 1918 pojasnil absorpcijo in emisijo valovanja s prehodi med diskretnimi energijskimi stanji molekule [6]. Shematsko so predstavljeni z diagramom Jablonskega (Slika 2): najširše razmaknjeni elektronski nivoji so pomnoženi z množico nihajnih in vrtilnih načinov cele molekule.



Slika 2: Diagram Jablonskega prikazuje diskretne energijske nivoje molekule, puščice pa ponazarjajo prehode pri fluorescenci. [7]



Slika 3: Stokesov premik med spektrom absorbirane in izsevane fluorescenčne svetlobe. [8]

Iz osnovnega stanja lahko elektron preide v višje (vzbujeno) stanje z absorpcijo vpadlega fotona, ki v vidnem delu spektra med 400 in 700 nm valovne dolžine nosi 2-3 elektronvolte energije. Proces se zgodi v nekaj femtosekundah (10^{-15} s) [3]. A elektronsko vzbujena stanja molekul so običajno nestabilna, navadno trajajo le nekaj nanosekund (10^{-9} s). Že v nekaj pikosekundah (10^{-12} s) elektron preda del energije nihajnim ali vrtilnim načinom molekule, nato pa se iz najnižjega vzbujenega stanja v osnovno vrne z izsevanjem fotona. Navzven dogajanje v sistemu opazimo kot oddajanje svetlobe daljše valovne dolžine, kot jo je sistem absorbiral (Slika 3), energijska razlika nekaj desetink elektronvolta med vhodnimi in izhodnimi fotoni (prej omenjeni Stokesov premik) pa se pretvori v toploto.

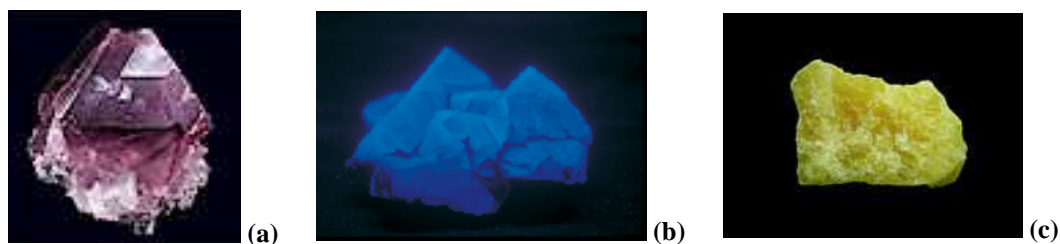
Merilo za učinkovitost procesa je kvantni izkoristek (angl. quantum yield), definiran kot

$$\Phi = \frac{\text{število izsevanih fotonov}}{\text{število absorbiranih fotonov}},$$

ki za značilne fluorescenčne vzorce zavzema vrednosti med 0,01 in 1,00.

2.3 Fluorit

Mineral, po katerem je pojav dobil ime, sestavlja kalcijev fluorid (CaF_2). Če je kristal izpostavljen ultravijolični svetlobi, sveti modro, zeleno, rumeno ali rdeče (Slika 4). Fluorescenca je očitno možna, čeprav so energijske razlike med elektronskimi nivoji čistega kristala večje od energije vpadlih fotonov. Pojav pri fluoritu pravzaprav omogočajo dodatni energijski nivoji v kristal vgrajenih nečistoč, denimo atomi itrija (Y), evropija (Eu), disprozija (Dy) ali razni organski vključki [5]. Od njih je odvisna valovna dolžina izsevanih fotonov, kar pojasni, zakaj kristali iste vrste, a iz različnih nahajališč, oddajajo svetlobo različnih barv.



Slika 4: Trije primerki minerala fluorit pod osvetlitvijo z vidno (a) in ultravijolično svetlobo (b, c). [9], [10], [11]

2.4 Fluorofori

Za kristale je značilno, da so energijski nivoji elektronov združeni v pasove z manjšimi energijskimi razmaki kot pri posameznih gradnikih in tako omogočijo fluorescenco v vidnem delu spektra. Podobno stanje se ustvari tudi v nekaterih organskih snoveh, ki navadno vsebujejo sisteme dvojnih vezi ali aromatskih obročev. Elektroni π -vezi so na jedra vezani šibkeje, tako da prehodom med njihovimi energijskimi nivoji zadošča energija fotonov vidne ali bližnje-ultravijolične svetlobe. Te funkcionalne skupine molekule po njihovi lastnosti imenujemo fluorofori (npr. Slika 5: fluorescein). Značilni kvantni izkoristki se gibljejo med 0,05 in 1,00 [3]. Ker sta kvantni izkoristek in Stokesov premik sevane svetlobe fluorescenčnih snovi značilna za izbrani fluorofor in hkrati odvisna od lastnosti okolja, lahko pojav izkoristimo za mnogo raziskav, denimo za merjenje lokalne koncentracije izbrane snovi, sledenje njeni difuziji ali opazovanje kemijskih reakcij, v katerih je udeležena.



Slika 5: Primer pogosto uporabljanega fluorofora je fluorescein ($\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_5$): iz strukturne formule (a) je razviden za fluorofore značilen sistem dvojnih vezi, čistega sintetizirajo v obliki prahu (b), slika (c) pa prikazuje s fluoresceinom označeno celico iz družine belih krvničk. [12], [13], [14]

Molekulam, ki bi jih želeli opazovati, a same po sebi niso fluorescenčne, lahko z ustreznimi kemijskimi postopki pripnejo dodatno funkcionalno skupino, tako da pod pravilno osvetlitvijo tudi te oddajajo svetlobo in s tem postanejo vidne. Ker je običajno zanimiva tudi njihova vloga v kemijskih in bioloških procesih, morajo pri načrtovanju spojine seveda paziti, da se njeno delovanje zaradi dodanega fluorofora čim manj spremeni. Celotna metoda je danes tako razvita, da je zares možno slediti posameznim molekulam in spremljati procese v realnem času [15], [16].

3 MIKROSKOPIJA

3.1 Obrnjeni mikroskop

Za fluorescenčno opazovanje struktur in procesov v tkivih, celicah ali na nivoju makromolekul potrebujemo optični mikroskop. Pri običajni (pokončni) izvedbi svetloba vzorec osvetli s spodnje strani, prepuščena pa skozi objektiv nad vzorcem potuje do opazovalca (Slika 6a). Celice so v tem primeru nanešene le v tankem sloju med objektivnim in krovnim stekelcem. Ker jih obdaja zelo majhna količina raztopine, se njihovo okolje s časom zelo spreminja: ob robovih voda hitro izhlapi, zato se povečajo koncentracije raztopljenih soli in s tem osmotski tlak na membranah, poleg tega žive celice z izmenjavo snovi še pospešijo vzpostavitev nenaravnih razmer. Uporabnost pripravljenih vzorcev je zato vedno časovno omejena, večjih celičnih kultur pa niti ne moremo opazovati, saj na mizici mikroskopa ni dovolj prostora za njihove posodice. Zaradi naštetih problemov se je za tovrstne raziskave uveljavil t. i. obrnjen (invertni) mikroskop, pri katerem vzorec opazujemo s spodnje strani, luč mikroskopa pa je nad vzorcem (Slika 6b). Pri tej izvedbi se lahko nad objektiv postavi cela čaša raztopine, tako da lahko celice ostanejo v svojem naravnem okolju, optične lastnosti sistema pa ostanejo enake kot pri pokončnem mikroskopu.



Slika 6: Primerjava pokončnega (a) in obrnjenega mikroskopa (b). [17],[18]

3.2 Konfokalnost

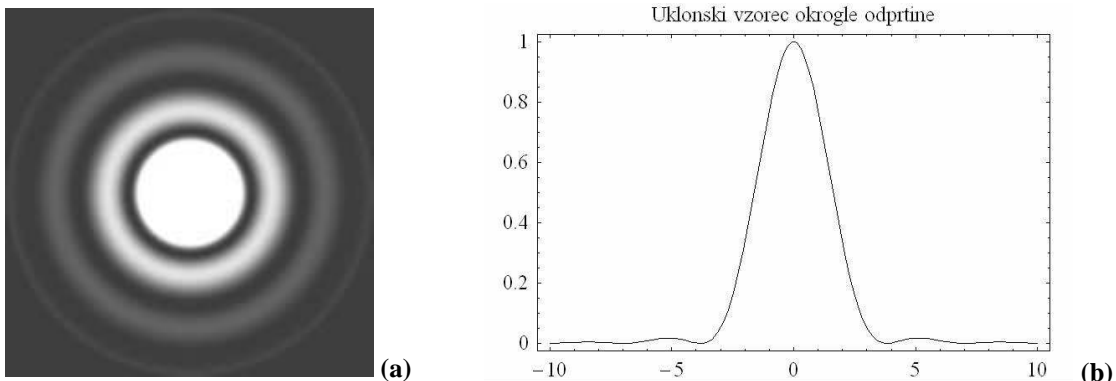
Pri preslikavi z dvema idealnima lečama se vsaka točka iz goriščne ravnine pred prvo lečo preslika v ustrezno točko v goriščni ravnini za drugo lečo (Slika 8: zeleni žarki). Ostrino realne slike omejuje le uklon svetlobe na končno velikih optičnih elementih, ki povzroči, da se podoba točkastega izvora razširi v niz Airyjevih obročev (Slika 7). Njihov matematični opis dobimo v Fraunhoferjevem približku uklona na okrogli leči [19]: intenziteta svetlobe na zaslonu se z oddaljenostjo od optične osi $I(r)$ spreminja kot

$$I(x) = I_0 \left(\frac{2J_1(x)}{x} \right)^2, \quad x = \frac{2\pi a}{\lambda} \frac{a}{z} r,$$

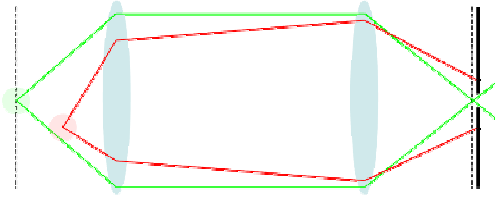
kjer je a polmer leče, z razdalja med lečo in zaslonom, I_0 pa intenziteta v sredini zaslona. Svetloba, ki ne izhaja iz goriščne ravnine pred prvo lečo, bi tvorila ostro sliko v neki drugi ravnini, na zaslonu v goriščni ravnini za drugo lečo pa bo vsaka točka razmazana po večji površini. To pomeni enakomerno osvetljenje ozadja slike iz goriščne ravnine in s tem manjši kontrast, ki ga je Michelson definiriral z največjo in najmanjšo intenziteto na sliki:

$$C_M = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}.$$

Težava ima preprosto rešitev: v goriščno ravnino za drugo lečo postavimo zaslon z majhno luknjico, ki prepusti vse žarke, zbrane iz neke točke v vzorcu, večino ostale, nezaželene svetlobe pa zadrži (Slika 8). Če nato spreminjamo lego luknjice, lahko po točkah poslikamo celo ravnino, ne da bi zajeli svetlobo iz sosednjih ravnin, pri čemer je posamezna rezina lahko tanjša od 500 nm.



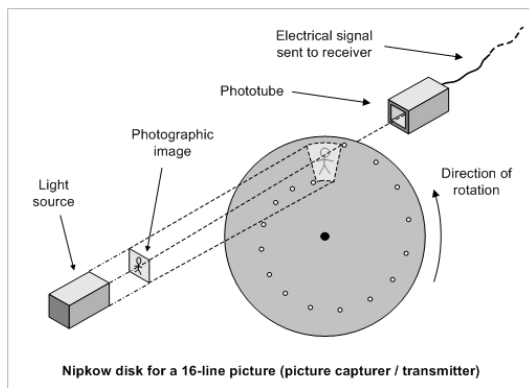
Slika 7: Uklonski vzorec točkastega izvora so Airyjevi kolobarji (a) [20], odvisnost intenzitete od oddaljenosti od središča prikazuje graf (b).



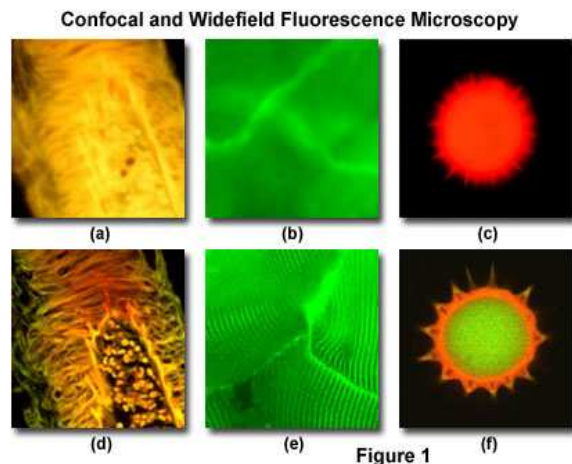
Slika 8: Osnovna ideja konfokalne mikroskopije je zaslon, ki skozi luknjico prepusti le svetlobo iz nasprotne goriščne ravnine (zeleni žarki), vso ostalo pa zadrži (rdeči žarki).

Presvetljevanje izbrane ravnine v vzorcu omogoča vrteči se disk z luknjicami, razporejenimi v spiralo – “Nipkow disk” (Slika 9). Osvetljena luknjica deluje kot točkasto svetilo v goriščni ravnini objektiva mikroskopa, ki na drugi strani, v drugi goriščni ravnini, vso njeno svetlobo zbere v zelo majhnem predelu vzorca. Tam, kjer je gostota energije največja, je vzbujanje fluoroforov najučinkovitejše in zato od tod izhaja največ fluorescenčnih fotonov. Isti objektiv sedaj polovi vso svetlobo, ki izhaja v prostorski kot, določen z njegovo numerično odprtino, ne glede na to, od kod svetloba prihaja. Vse fotone, ki so nastali v predelu vzorca, kamor se je odprtina preslikala, pošlje po isti poti nazaj skozi luknjico, od preostalih, ki bi se zbrali v kaki drugi točki, pa ima pravo smer le zanemarljiv delež, večino pa zaustavi zaslon. Ko se disk dovolj zavrti, je osvetljena naslednja luknjica, ki prispeva informacijo iz sosednje točke in tako dalje, dokler ne preslika celotnega območja.

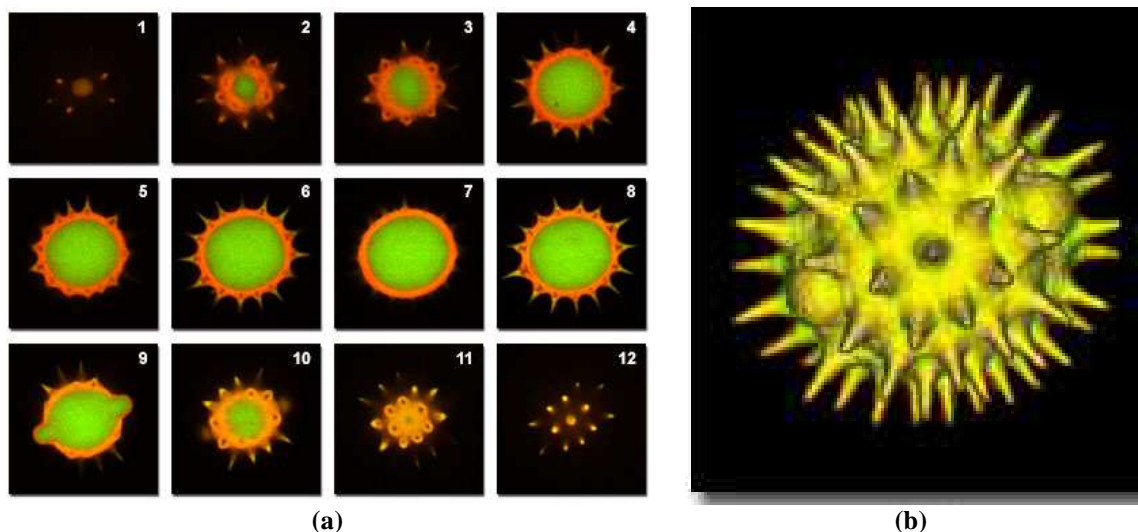
Sosednje ravnine dosežemo s spreminjanjem goriščne razdalje ali premikanjem vzorca. Na ta način dobimo niz zelo kontrastnih slik iz posameznih plasti (Slika 11a), ki jih lahko na koncu združimo v trirazsežno predstavitev opazovanega vzorca (Slika 11b). To je osnovna ideja in glavna prednost konfokalne mikroskopije v primerjavi s klasično tehniko.



Slika 9: Princip preslikave območja z Nipkowim diskom se je najprej uveljavil za potrebe prenašanja televizijske slike. [21]



Slika 10: Primerjava slik treh različnih vzorcev s klasično (a, b, c) in konfokalno tehniko (d, e, f) nazorno prikaže prednosti slednje. [22]



Slika 11: Konfokalne posnetke zaporednih ravnin (a) lahko združimo v trirazsežno podobo vzorca (b). [22]

Velikost luknjice določa globinsko ostrino sistema, t. j. debelino rezne, iz katere dobimo ostro sliko – ožja luknjica seveda pomeni tanjšo rezino. Po drugi strani skozi manjšo luknjico pride manj svetlobe, navadno diski prepustijo le okoli 1 % vpadle svetlobe [23]. To prinese slabšo kvaliteto slike, saj je razmerje signala proti šumu na detektorju nižje. Statistični šum naj bi bil vsaj velikostni red manjši od signala, torej potrebujemo več kot deset fotonov. Fizikalno to sicer lahko popravimo s podaljševanjem časa zbiranja signala, s čimer si omejimo opazovanje procesov v vzorcu, ali s povečanjem svetlobnega toka, tako da se vzbudi več fluoroforov, kar pa lahko uniči fluorescenčne centre molekul (Poglavje 4.1). Izkazalo se je tudi, da se globinska ostrina ne zmanjšuje več znantno, ko pade velikost luknjice pod določeno mejo, ki je primerljiva s premerom prvega Airyjevega kroga danega optičnega sistema (Slika 12) [23], [24].

Dodatni učinek zaslona z luknjico je izboljšana ločljivost slike [25]. Če se točka iz prve goriščne ravnine preslika v Airyjeve kolobarje v drugi goriščni ravnini, velja tudi obratnen sklep: v točko v drugi ravnini se bodo preslikale točke iz prve ravnine, obtežene z istim uklonskim vzorcem. Prenosna funkcija za točkast izvor (angl. poin spread function) se torej kvadrira in je za konfokalni sistem tako enaka

$$I(x) = I_0 \left(\frac{2J_1(x)}{x} \right)^4$$

(Slika 13). Po Rayleighjevem kriteriju ločljivosti, ki se najpogosteje uporablja, to sicer ne prinese spremembe, saj ostane ničla funkcije na istem mestu, a se za 28 % zmanjša širina na polovični višini, pa tudi stranski kolobarji so močnejše zadušeni, kar je za opazovalca očitno izboljšanje. Pri zeleno-modri svetlobi z valovno dolžino okoli 500 nm lahko ločljivost pade tudi pod 200 nm.

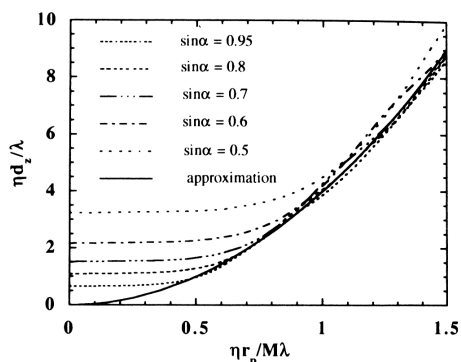
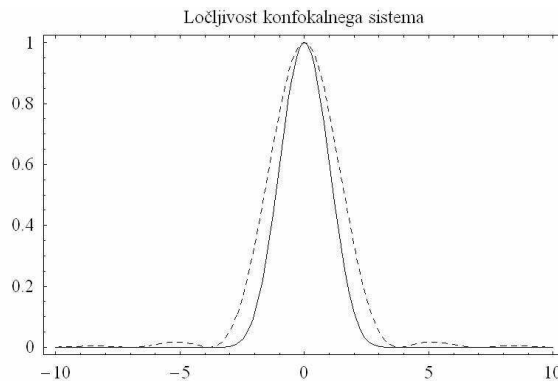


FIGURE 10. Plots of the normalized z-resolution $\eta d_z / \lambda$ as a function of the normalized pinhole radius $\eta r_p / M \lambda$ for different angles of acceptance α of the objective.

Slika 12: Debelina optične rezine d_z se z ožanjem luknjice r_p manjša le do meje, določene z uklonom svetlobe. [23]

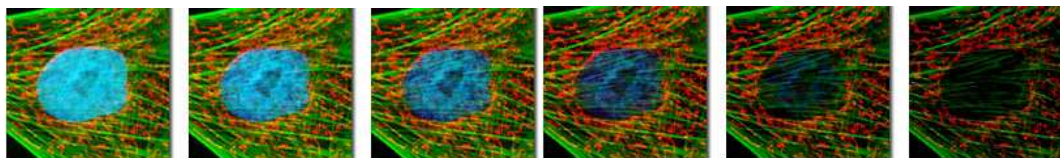


Slika 13: Primerjava prenosnih funkcij točkastega izvora za klasičen (črtkana črta) in konfokalni sistem (polna krivulja).

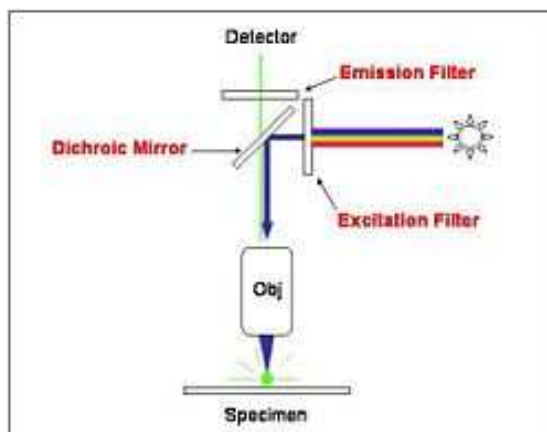
4 SPEKTROSKOPIJA

4.1 Osvetljevanje

Za vzbujanje fluorescence je običajna luč mikroskopa prešibka, zato se uporabljajo močnejši izvori svetlobe: laserji, svetleče diode, živosrebrne ali ksenonske luči. Pri osvetljevanju bioloških sistemov je ustrezna jakost svetlobnega toka zelo pomembna. Če je vzbujevalne svetlobe premalo, je še šibkejše izsevano svetlobo zato težko zaznati, pri premočnem vzbujanju pa zaradi nasičenja fluorescence slika zopet zbledi. V goriščni ravnini je naenkrat več fluoroforov v vzbujenem kot v osnovnem stanju, tako da dodatni fotoni v tem delu ne najdejo ustreznega prejemnika energije, signal iz neželenih predelov pa še vedno narašča in zmanjšuje kontrast slike. Če se jakost svetlobe še povečuje, pa se fluorofori trajno uničijo (Slika 14). Razpad funkcionalne skupine povzroči absorpcija drugega fotona, med tem ko je elektron že v vzbujenem stanju [3], [26]. Molekula, ki preide iz vzbujenega singletnega v vzbujeno tripletno stanje, lahko z molekulami v okolici tvori nove stabilne kovalentne vezi, s čimer izgubi sposobnost fluorescence.



Slika 14: Primer uničenja fluorescence s premočnim osvetljevanjem. [3]



Slika 15: Postavitev osnovnih elementov za fluorescenčne poskuse: svetloba najprej potuje skozi vzbujevalni filter, dvobarvno zrcalo jo skozi objektiv preusmeri proti vzorcu, izsevano svetlobo pa zrcalo prepusti proti izhodnemu filtru in detektorju. [27]

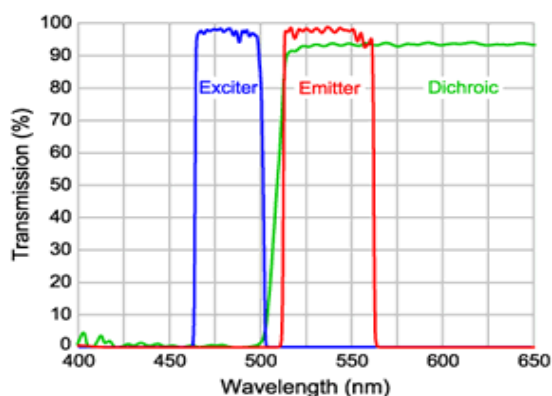
Običajno želimo opazovati le izbrano vrsto molekul, zato vzorec osvetlimo le z ustreznim delom spektra svetila (oz. izberemo pravi laser). Svetloba zato od izvora najprej potuje skozi primerni vzbujevalni filter (Slika 15), ki prepusti le pas valovnih dolžin okoli vrha absorpcijskega spektra ciljnega fluorofora.

Ko pade svetloba na vzorec, je večina potuje skozi, nekaj se je odbije od stekla ali siplje v vzorcu, del pa je absorbirajo fluorofori in nato pri daljši valovni dolžini izsevajo v vse smeri. Fluorescenčno svetlobo najlaže zaznamo, če prepuščena vzbujevalna svetloba ne moti opazovanja. Ker pri obrnjenem mikroskopu vedno opazujemo od spodaj, moramo torej tudi svetlobo do vzorca pripeljati s spodnje strani, skozi isti objektiv. Tak način se imenuje epifluorescenčna mikroskopija.

Vzbujevalno in izsevano svetlobo ločimo s pomočjo dvobarvnega polprepustnega zrcala s stopničasto karakteristiko (Slika 16 in Slika 17: zelena krivulja). Njegova naloga je, da najprej odbije vso vzbujevalno svetlobo od izvora proti vzorcu, izsevano fluorescenčno



Slika 16: Posnetek nazorno prikazuje lastnosti dvobarvnih zrcal, ki jih vidimo delno v odbiti, delno pa v prepuščeni svetlobi. [28]



Slika 17: Pravilna izbira spektralnih lastnosti obeh filtrov in zrcala je ključna za opazovanje fluorescenčne svetlobe. [29]

svetlobo nekoliko daljših valovnih dolžin, ki potuje v nasprotno smer, pa mora prepustiti proti opazovalcu. Prvi pogoj hkrati še avtomatično zaustavi vzbujevalno svetlobo, ki se je od vzorca odbila in bi drugače otežila opazovanje fluorescence. Take lastnosti se na omejenem spektralnem območju lahko doseže z ustreznim nanosom tankih slojev, ki se jih priredi absorpcijskemu in emisijskemu spektru posameznih fluoroforov.

Zadnji optični element pred opazovalcem ali detektorjem je še emisijski filter, ki prepusti le pas valovnih dolžin okoli vrha emisijskega spektra izbranega fluorofora ter tako močno poveča verjetnost, da opazujemo le fluorescenčno svetlobo določene vrste molekul in ne vsega, kar je uspelo priti skozi dvobarvno zrcalo.

4.2 Nastavljivi tekočerkristalni filter

Kot je bilo že omenjeno, lahko biokemijsko okolje močno vpliva na spekter fluorescence opazovanega fluorofora. Običajni detektor omogoča le meritev skupne jakosti svetlobe, če pa predenj postavimo filter, ki prepusti le zelo ozek spektralni pas, lahko z zveznim premikanjem vrha prepustnosti preiščemo celoten spekter vpadnega sevanja in tako pridemo do informacije o okolju molekule. Ena od izvedb ideje izkorišča dvolomnost nekaterih kristalnih struktur ter zvezen odziv lomnih količnikov tekočih kristalov na električno polje.

Osnova sistema je t. i. Lyotov filter, ki ga sestavlja zaporedje dvolomnih ploščic, ločenih z linearnimi polarizatorji pod kotom 45° glede na optično os kristalov [3], [30]. Ko pride svetloba skozi vhodni polarizator v prvo ploščico, posamezni komponenti polarizacije iste valovne dolžine λ čutita različna lomna količnika (Δn) in potujeta vsaka s svojo fazno hitrostjo. Pri izhodu iz ploščice debeline d sta zato fazno zamaknjeni za

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} \Delta n d ,$$

kar v splošnem ne predstavlja več linearno polarizirane svetlobe, razen če je debelina ploščice celoštevilski večkratnik razlike optičnih poti:

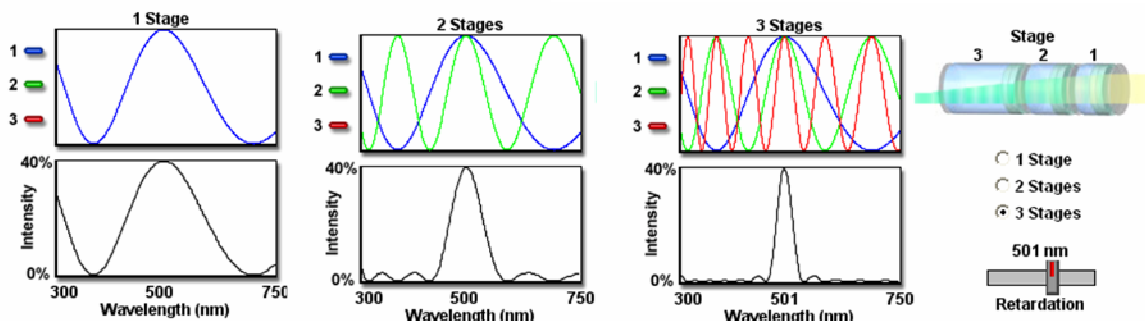
$$d = N \frac{\lambda}{\Delta n} \Rightarrow \delta = 2\pi N .$$

Naslednji polarizator prepusti vso svetlobo le za valovne dolžine λ , ki ustrezajo temu pogoju, vse ostele pa obteži s prepustnostjo

$$T = \frac{1}{2} \cos^2 \left(\frac{\delta}{2} \right) .$$

Naslednji pari ploščic in analizatorjev delujejo enako, končno prepustnost pa določa zmnožek posameznih funkcij. Če debeline ploščic izberemo tako, da je vsaka dvakrat debelejša od prejšnje,

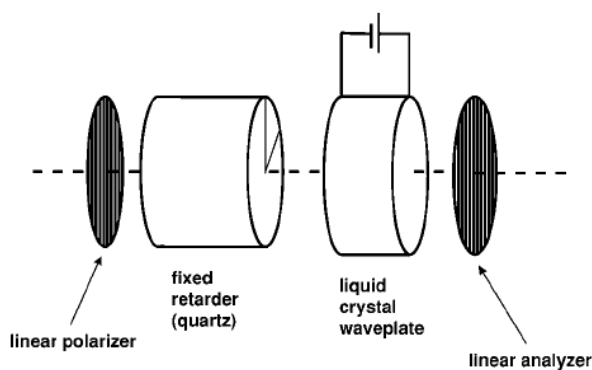
$$d_{i+1} = 2 d_i ,$$



Slika 18: Prikaz delovanja posameznih plasti klasičnega Lyotovega filtra. [32]

potem vse plasti prepustijo valovne dolžine, za katere ima tudi prva ploščica največjo prepustnost, vmesna spektralna območja pa so zadušena (Slika 18). Debelina prve ploščice izbere razmak med vrhovi skupne prepustnosti, tako da ostane v zanimivem območju le eden, število ploščic pa določi širino prepuščenega pasu in kvaliteto zadušitve ostalih valovnih dolžin.

Lastnosti takega filtra ne moremo med poskusom spreminjati, da bi posneli celoten spekter vzorca. Če pa za vsako plastjo dvolomnega kristala vgradimo še celico tekočih kristalov z naporjenimi elektrodami (Slika 19), lahko z ustreznimi napetostmi poljubno spreminjamo fazni zamik med polarizacijama v posamezni plasti in tako zvezno krmilimo prepustnost celotnega filtra.



Slika 19: Zvezno prilagodljivo prepustnost filtra omogočajo vmesne plasti s tekočimi kristali, ki jih krmili električna napetost na elektrodah. [30]

4.3 Kamera

Za meritev spektra fluorofora moramo filtrirano svetlobo še zaznati. Različne vrste vezij za zajem slike, njihovo delovanje, prednosti in slabosti ter izvore in odpravljanje šuma smo podrobno spoznali v seminarju Luke Pitamiča [31], tako da osnov na tem mestu ni potrebno ponavljati.

5 IZVEDBA V LABORATORIJU

Vse zgoraj opisane ideje so v Laboratorija za biofiziko pod vodstvom mentorja seminarja združili v nov eksperimentalni sistem za fluorescenčno mikrospektrometrijo (Slika 20). Posamezne komponente so na Institut "Jožef Stefan" prispele letos jeseni, zdaj pa že potekajo prvi potrebni umeritveni poskusi.

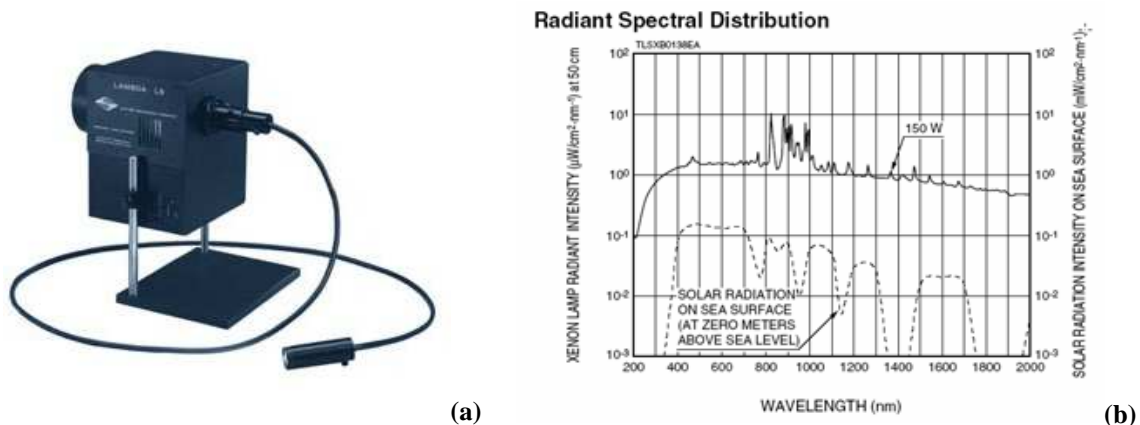


Slika 20: Postavitev sistema v laboratoriju: na optični mizi v sredini slike so od desne proti levi vidni mikroskop, konfokalna komponenta ter kamera, med katerima je nameščen še tekočekristalni filter, levo v ozadju je prostostoječa svetilka, na desni mizi pa kontrolne enote.

5.1 Komponente

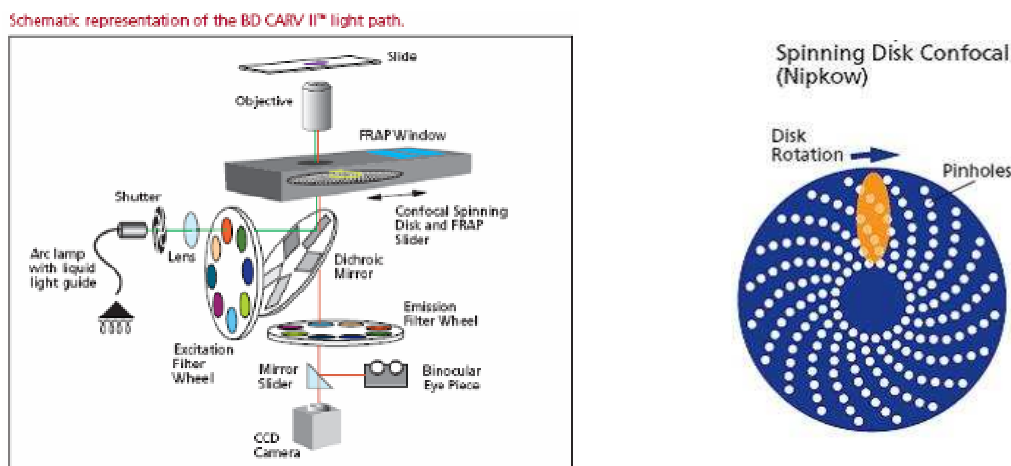
Osnova za nadgradnjo je Nikonov obrnjeni mikroskop Eclipse TE2000-E in tremi objektivi z deset-, štirideset- in stokratno povečavo. Dodana mu je posebno natančno pomična mizica, ki lahko vzorec v prečni ravnini premika za dva centimetra v korakih po dva nanometra.

Fluorescenco vzbuja samostojna luč Lambda LS s kombinirano ksenonsko-živosrebrno žarnico moči 175 W, od tega je 25 W pretvori v svetlobo. Izbrana je bila zaradi enakomernega spektra v celotnem področju od 300 nm do infrardeče svetlobe, zadostno moč za fluorescenčne poskuse pa daje že od 200 nm naprej. Spekter takega svetila je še najbolj podoben spektru dnevne svetlobe (Slika 21b). Ker pa bi dolge valovne dolžine vzorec močno segrevale, je vgrajeno še izhodno ogledalo, ki ustavi svetlobo nad 700 nm. Parabolično zrcalo v žarnici žarke usmeri v svetlobni vodnik s tekočim polnilom, v katerem intenziteta po vsem spektru pade za približno trideset odstotkov [33].

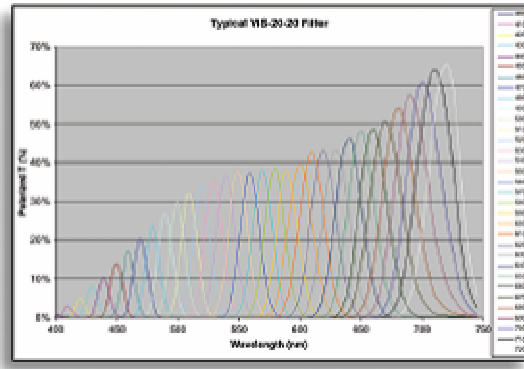


Slika 21: Kombinirano Xe-Hg svetilo Lambda LS (a) in njen spekter v primerjavi s sončevim (b). [33][34]

Svetloba nato vstopi v konfokalno komponento Carv II (BD Biosciences) (Slika 22). Najprej potuje skozi izbrani vzbujevalni filter, ustrezno dvoobarvno zrcalo pa jo preusmeri proti vzorcu. Nato potuje skozi glavni element, ki omogoča konfokalni način mikroskopije: to je vrteči se disk s tisoč luknjicami premera $70\ \mu\text{m}$, ki so razporejene v več prepletenih spiral in predstavljajo 7 % površine diska [35]. Taka geometrija omogoča, da je hkrati osvetljenih več luknjic sosednjih spiral, kar pomeni vzporedno slikanje več točk vzorca in s tem višjo hitrost. Celotno območje premera 13 milimetrov je tako presvetljeno tisočkrat v sekundi.



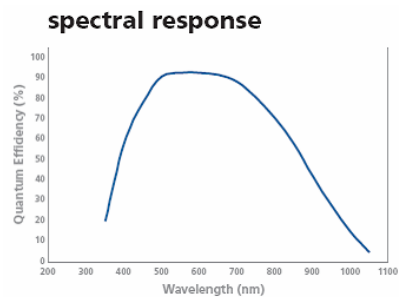
Slika 22: Zgradba konfokalne enote BD Carv II. [35]



Slika 23: Nastavljivi tekočerkristalni filter (modra škatlica) s kontrolno enoto in primer grafov prepustnosti za model s širino spektralnih pasov 20 nm. [36]

Spektralno analizo omogoča tekočerkristalni prilagodljivi filter VariSpec (Cambridge Research & Instrumentation, Inc – CRi). Filter v območju med 400 in 720 nm prepušča pasove širine 7 nm, za preklop med območji pa potrebuje 50 milisekund [36].

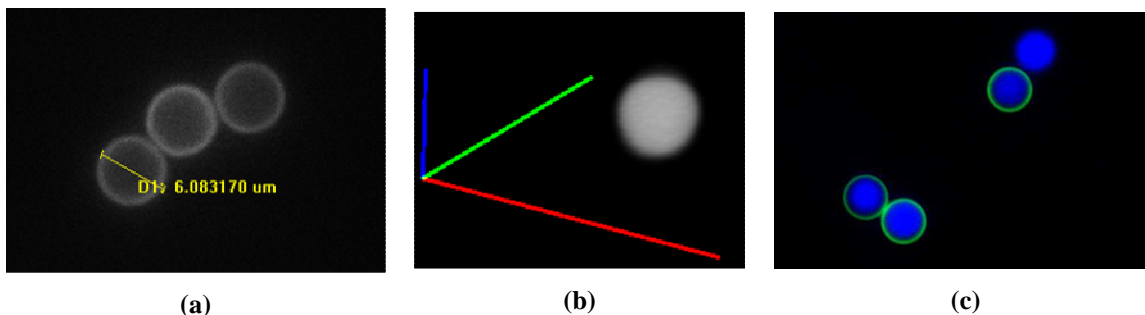
Z zadnjo enoto moramo tako obdelano svetlobo še zaznati. Ker smo je na prejšnjih korakih ogromno izgubili ali namensko zavrgli, mora biti detektor čim občutljivejši, da ni bil ves trud zaman. Izbrani kameri Rolera-MGi visok kvantni izkoristek omogoča osvetljevanje čipa CCD z zadnje strani (“back illuminated CCD”), signal se še ojača z elektronskim pomnoževanjem, šum pa zmanjšuje hlajenje vezja s Peltierjevim elementom [37]. V celoti to omogoča občutljivost pod desetimi fotoni. Senzor ima v kvadratno matriko razporejenih 25 tisoč slikovnih elementov velikosti 16 μm , v vsako potencialno jamo pa se lahko nabere 800 tisoč elektronov. Velikost posameznih slikovnih elementov omejitvam zaradi uklona svetlobe, podobno kot pri velikosti luknjic v disku: manjši elementi bi kljub večji nazivni ločljivosti pokrivali uklonski vzorec iste točke, na vsakem bi se nabralo manj elektronov, statistični šum pa bi bil v primerjavi s signalom večji. Kamera pri polni ločljivosti lahko zajame in prebere trideset slik v sekundi, z združevanjem točk ali zmanjšanjem aktivnega dela vezja pa se hitrost lahko povzpne nad tristo posnetkov vsako sekundo. Do računalnika jih v 14-bitni ločljivosti dostavi povezava FireWire. Pri tako hitrem snemanju mora biti prenos popolnoma usklajen, ključna pa je tudi sinhronizacija z vrtečim se diskom, da so vsi predeli vzorca osvetljeni enakokrat.



Slika 24: Kamera Rolera-MGi in njen spektralni odziv. [37]

5.2 Prvi poskusi

Za prva opazovanja in umeritev mikroskopa so bili uporabljeni vzorci izdelovalca Invitrogen, v katerem so steklene kroglice velikosti $6\ \mu\text{m}$, obarvane s različnimi fluorofori.



Slika 25: Posnetki $6\ \mu\text{m}$ velikih steklenih kroglic z različnimi fluorofori.

Iz velikosti kroglic na Slika 25a je bila umerjena razdalja na vzorcu. Delovanje konfokalnega dela pa je potrdila uspešna sestavitev trirazsežne podobe kroglice iz slik posameznih rezin z razmakom $500\ \text{nm}$ (Slika 25b). Na Slika 25c pa je še preprost primer spektroskopije. Pri vzbujanju s pasom valovnih dolžin od 350 do $410\ \text{nm}$ sta bila narejena dva črno-bela posnetka s filtriranjem izhodne svetlobe pri 470 in $520\ \text{nm}$. Sliki sta bili nato ustrezno obarvani in združeni s programom za obdelavo slik. Jasno je vidna sestava kroglic, kot jo navaja proizvajalec vzorcev: v notranjosti je spojina z vrhom emisije v modrem delu spektra, molekule na površini pa oddajajo zeleno svetlobo. Oster zeleni rob in dober kontrast slike dokazujeta, da je možno svetlobo zajeti iz zelo tanke optične rezine.

Za natančno spektroskopijo bo potrebno natančno premeriti odzive celega sistema, saj vsaka komponenta v spekter izsevane svetlobe opazovanega vzorca odtisne svoje lastnosti. Upoštevati je potrebno porazdelitev intenzitete svetlobe izvora po valovnih dolžinah, resnične prepustnosti vseh filtrov in ogledal ter spektralni odziv kamere. Šele z vsemi popravki nastane pravi spekter fluorescence, ki ga lahko primerjamo z ostalimi.

6 ZAKLJUČEK

Skrbno izbrani sestavni deli, povezani v enoten sistem, obljublajo izjemne zmogljivosti. Pri valovni dolžini $500\ \text{nm}$ in objektivu s stokratno povečavo naj bi bila prečna ločljivost konfokalnega sistema in kamere pod $200\ \text{nm}$, debelina opazovane rezine pa dobrih $300\ \text{nm}$. Za primerjavo: bakterije so navadno velike nekaj mikrometrov, evkariontske celice pa desetkrat toliko, ločljivost mikroskopije je torej povsem na ravni celičnih struktur, ki jih bo s sestavljanjem slik mogoče videti v treh razsežnostih. Hitrost kamere naj bi zadoščala za opazovanje raznovrstnih celičnih procesov v živo, torej je združena metoda – fluorescenčna mikrospektroskopija – tako s prostorsko, časovno in spektralno ločljivostjo pomembna nadgradnja laboratorija in zelo obetavna novost v fluorescenčnih raziskavah.

7 VIRI

- [1] Štrancar, J. *osebna komunikacija*, december 2007
- [2] Štrancar, J. *Electron Paramagnetic Resonance*, v *Analytical biotechnology: principles and applications*, (ured. Billiet, H., Draghici, C.), Editura Universității Transilvania Brașov, Brașov, 2004.
- [3] *Molecular Expressions: Exploring the World of Optics and Microscopy*
<http://www.micro.magnet.fsu.edu/>
- [4] Muyskens, M. *The fluorescence of Lignum nephriticum: a flash back to the past, and a simple demonstration of natural substance fluorescence*, *Journal of Chemical Education*, 2006 **83** N5: 765
<http://www.calvin.edu/academic/chemistry/faculty/muyskensmark/Narra%20preprint.pdf>
(23. 11. 2007)
- [5] Valeur, B. *On the Origin of the Terms Fluorescence, Phosphorescence, and Luminescence*, v *New Trends in Fluorescence Spectroscopy* (ured. Valeur, B., Brochon, J.-C.), Springer, Berlin 2001.
- [6] Berberan-Santos, M. N. *Pioneering Contributions of Jean and Francis Perrin to Molecular Luminescence*, v *New Trends in Fluorescence Spectroscopy* (ured. Valeur, B., Brochon, J.-C.), Springer, Berlin 2001.
- [7] Slika 2: <http://www.drbio.cornell.edu/MPE/mpe1.html> (2. 12. 2007)
- [8] Slika 3: <http://www.answers.com/topic/stokes-shift> (2. 12. 2007)
- [9] Slika 4a: <http://www.a-m.de/deutsch/lexikon/mineral/halogenide/fluorit-bild1.htm>
(2. 12. 2007)
- [10] Slika 4b: <http://www.daviddarling.info/encyclopedia/F/fluorescence.html> (2. 12. 2007)
- [11] Slika 4c: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorite> (2. 12. 2007)
- [12] Slika 5a: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein> (2. 12. 2007)
- [13] Slika 5b: <http://www.sciencemadness.org/lambdasyn/synfiles/fluorescein.htm> (2. 12. 2007)
- [14] Slika 5c: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/photos/cells/images.htm>
(2. 12. 2007)
- [15] Valeur, B., Brochon, J.-C. *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Berlin 2001.
- [16] Kraayenhof, R. et. al. *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes*, Springer, Berlin 2002.
- [17] Slika 6a: <http://www.nikon-instruments.jp/eng/tech/1-0-2.aspx> (2. 12. 2007)
- [18] Slika 6b: http://www.nikon-instruments.jp/eng/image/product/e142_i.jpg (2. 12. 2007)
- [19] Hecht, E. *Optics*, 3rd Ed., Addison Wesley Longman, Inc., Reading, 1998.
- [20] Slika 7a: <http://www.cambridgeincolour.com/tutorials/diffraction-photography.htm>
(2. 12. 2007)
- [21] Slika 9: <http://www.diycalculator.com/sp-console.shtml> (2. 12. 2007)

- [22] Slika 10, Slika 11: <http://www.olympusconfocal.com/theory/confocalintro.html> (2. 12. 2007)
- [23] Kino, G S. *Intermediate Optics in Nipkow Disk Microscopes*, v Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd Ed. (ured. Pawley, J. B.), Plenum Press, New York, 1995.
- [24] Wilson, T. *The Role of the Pinhole in Confocal Imaging System*, v Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd Ed. (ured. Pawley, J. B.), Plenum Press, New York, 1995.
- [25] Brooker, G. *Modern Classical Optics*, Oxford University Press, New York, 2003.
- [26] Semwogerere, D., Weeks, E. R. *Confocal Microscopy*, v Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Taylor & Francis, 2005.
<http://www.physics.emory.edu/~weeks/lab/papers/ebbe05.pdf> (23. 11. 2007)
- [27] Slika 15: http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_microscope (2. 12. 2007)
- [28] Slika 16: http://en.wikipedia.org/wiki/Dichroic_mirror (2. 12. 2007)
- [29] Slika 17: http://www.semrock.com/Catalog/BrightLine_FITC-3540.htm (2. 12. 2007)
- [30] Slawson, R. W., et. al. *Hyperspectral Imaging: Wide-Area Spectrophotometry Using a Liquid-Crystal Tunable Filter*, Publications of the Astronomical Society of the Pacific, 1999 **111**: 621-626.
- [31] Pitamič, L. *CCD vs. CMOS, FMF*, seminar v 4. letniku (10. 10. 2007) <http://mafija.fmf.uni-lj.si/seminar/seminar.php>
- [32] Slika 18: <http://www.olympusmicro.com/primer/java/filters/lctf/index.html> (2. 12. 2007)
- [33] Linton Instrumentation *Lambda LS Xenon Arc Lamp*
http://www.lintoninst.co.uk/lambda_ls.htm (23. 11. 2007)
- [34] Slika 21b: http://jp.hamamatsu.com/products/division/etd/pd023/pd024/index_en.html (2. 12. 2007)
- [35] BD Biosciences *BD CARV II Confocal Imager* (2005)
<http://www.optikon.ca/pdf/Carv%20II%20Confocal%20Imager.pdf> (24. 10. 2007)
- [36] Cambridge Research & Instrumentation, Inc. *VariSpec Liquid Cristal Tunable Filters*
http://www.cri-inc.com/files/VariSpec_Brochure.pdf (30. 10. 2007)
- [37] QImaging Corporation *Rolera-MGi* <http://www.qimaging.com/products/datasheets/rolera-mgi.pdf> (8. 11. 2007)
- [38] Nikon Corporation *Inverted Reaserch Microscope TE2000* (2004)
http://www.nikoninstruments.com/images/stories/PDFs/TE2000_Brochure.jpg (30. 10. 2007)
- [39] Wikipedia, spletna enciklopedija www.wikipedia.org