

Luminesentspektroskoopia II Uuemad võimalused, eritehnikad, bio-objektid

- Märgistamine
- Valguse Polarisatsioonitasandi pöördumise mõõtmine
- Ergastusenergia ülekanne (FRET)
- Fluoresentsi eluea mõõtmine
- Fluorestseerivad valgud

6.11.2017

1

Universaalsus vs selektiivsus

- Üldistus: **Mida laiemalt levinud on mingi fenomen, seda madalamat selektiivsust see pakub**
 - **UV-Vis:** madalal lainepikkusel neelavaid aineid on palju, pikal lainepikkusel neelavaid vähe
 - Lühike lainepikkus: universaalne, pikk: selektiivne
 - **UV-Vis vs Fluoresents:**
 - UV-neelajaid molekule palju ⇨ **universaalne**
 - Fluorestseerivaid molekule vähe ⇨ **selektiivne**

6.11.2017

2

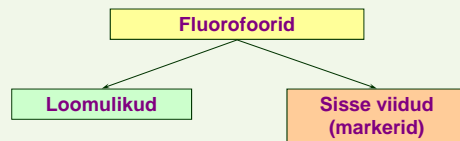
Uuringud in situ ja/või in vivo

- Kuna vaid vähesed ühendid fluorestseerivad, siis õnnestub sageli saavutada selektiivsust ka reaalses paljukomponentses objektides, mis annab võimaluse teha uuringuid
- **in situ** ("kohapeal") – ilma eraldamiseta
- **in vivo** ("elusa sees") – elusorganismis, häirides vähe või mõõdukalt organismi talitust

6.11.2017

3

Fluorofoorid



- Markerid seotakse uuritava süsteemiga (valk, rakk, viirus, ...) enamasti mõne keemilise reaktsiooniga
 - Neid on välja töötatud väga palju

6.11.2017

4

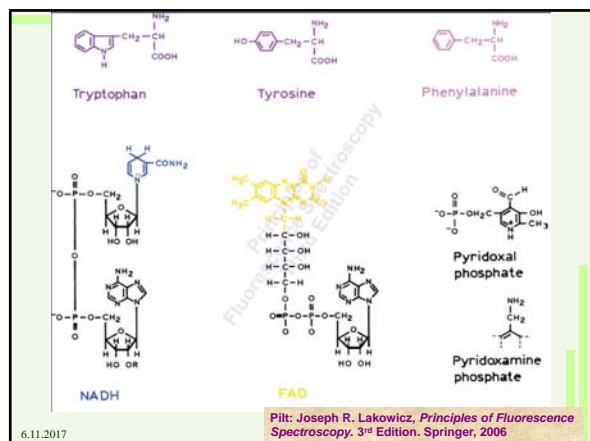
Loomulikud

Fluorofoorid

- Looduslikes kudedes on põhilised fluorestseerivad ained sellised:
 - aromaatsed aminohapped
 - NADH
 - flaviinid
 - pyridoksüül-ühendid
 - klorofüll

6.11.2017

5



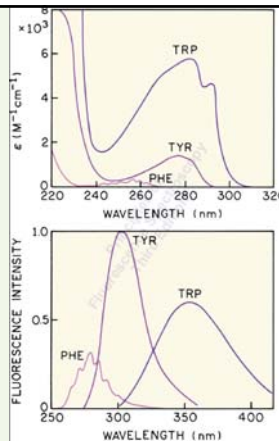
6.11.2017

Tavaliste valkude fluorestsents

- Erastusspektrid UV alas
- Emissioonispektrid UV või napilt nähtavas alas
- Trüptofaan domineerib

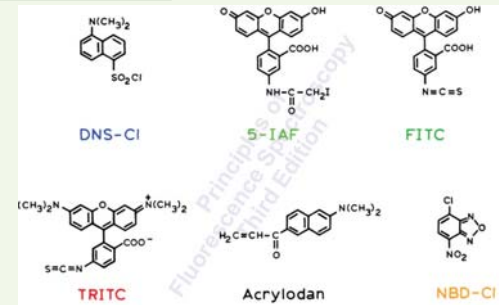
Kui markerite ergastus- ja emissioonispektrid on pikematel lainepikkustel, siis valkude iseeneslik fluorestsents ei sega

Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition. Springer, 2006



Sisse viidavad (markerid)

Fluorofoorid



Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition. Springer, 2006

8

Fotolagunemine

- Kui fluorestseerivat ainet pidevalt kõrge intensiivsusega valgusega kiiritada, siis molekulid lõpuks lagunevad
- Seda nimetatakse **Fotolagunemiseks** (*photobleaching*)

6.11.2017

9

Fluorestsents-polarisatsioon

Fluorestsents-polarisatsioon

- Siiani pole me üldse üritanud vaadelda konkreetse molekuli asendit kvandiga pörkumisel
- Iga ainele on omane teatav üleminekumomendi vektor
 - See määrab, mil moel molekul ergastumiseks väliselt elektriväljalt energiat saab
- Aine molekul saab neelata kvandi, kui selle kvandi elektrivälja vektor on üleminekumomendiga samas suunas
- Sama kehtib ka kiirgumise kohta

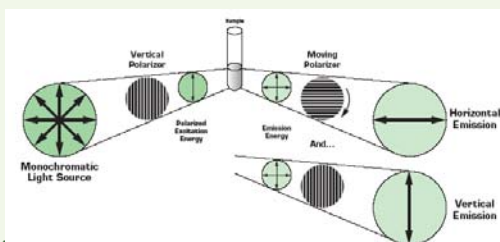
6.11.2017

10

Fluorestsents-polarisatsioon

Fluorestsents-polarisatsioon

- Ergastav kiirgus on polariseeritud
- Kui ergastunud olek "seisab paigal" siis on ka emiteeritav kiirgus polariseeritud



6.11

11

Fluorestsents-polarisatsioon

Molekulide pöörlemine ja olekute eluead

- **Ergastunud olekute eluead** (fluorestsentsi karakteristikud ajad) on tihti **1-10 ns** ($1 \cdot 10^{-9}$ s)
- Madalmolekulaarsete molekulide **pöörlemise** karakteristikud ajad on **50-100 ps** ($50 \cdot 100 \cdot 10^{-12}$ s)

Tulemus:
Madalmolekulaarsete ühendite emissiooni kiirgus on enam täielikult depolariseeritud

6.11.2017

12

Molekulide pöörlemine ja olekute eluead

- Makromolekulide pöörlemise karakteristikud ajad on pikemad: mitukümmend ns

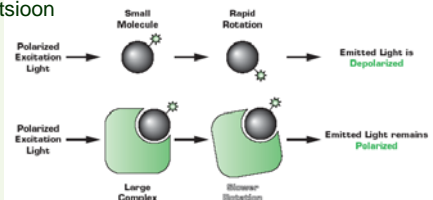
Tulemus:
Makromolekulide emissiooni kiirguse polarisatsioon säilib suurel määral

6.11.2017

13

Fluorestsents-polarisatsioon

- Seondumata fluorestsents-marker: väike molekul
 - Polarisatsioon kaob
- Makromolekuliga seondunud fluorestsents-marker: suur molekul
 - Polarisatsioon säilib



6.11.2017

Fluorestsents-polarisatsioon

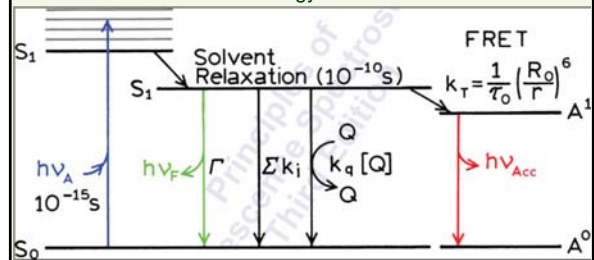
- Depolarisatsiooni saab mõõta kvantitatiivselt
 - Saab võrrelda molekulide suurusi
 - Saab määrata milline osa markerist on seondunud suure molekuliga

6.11.2017

15

FRET

- Fluorescence Resonance Energy Transfer
 - Förster Resonance Energy Transfer



Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition, Springer, 2006

16

FRET

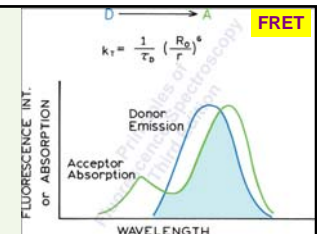
- Ergastunud olekus fluorestseerimisvõimeline molekul (doonor) annab oma energia üle läheduses viibivale molekulile (aktseptor), mille neeldumisspekter kattub doonori emissioonspektriga
- Kiirgust emiteerib aktseptor
- FRET on Mittekiirguslik protsess
 - Dipool-dipoolvastasmõju kaudu kandub energia üle

6.11.2017

17

FRET

- Energiaülekanne kiirus k_T sõltub molekulide vahelisest kaugusest ja spektrite kattumisest



- R_0 – D ja A molekulide "Förster'i distants"
 - Iseloomustab kattumist, ca 30 – 60 Å
- r – molekulide vaheline kaugus
- τ_D – D ergastunud oleku keskmine eluiga

Pilt: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition, Springer, 2006

18

FRET efektiivsus

FRET

- FRET efektiivsus: milline osa neeldunud kvantidest antakse aktseptorile ära

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)}$$

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

- F_D on palja doonori fluorestsentsi intensiivsus
- F_{DA} on doonori fluorestsentsi intensiivsus aktseptori juuresolekul

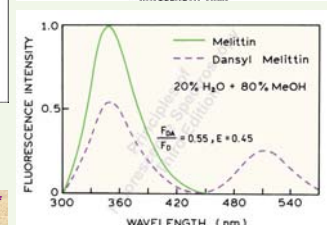
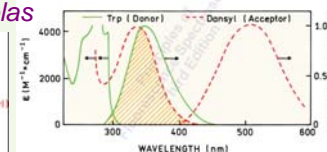
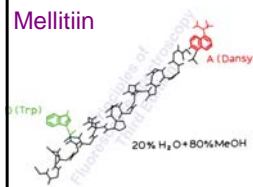
6.11.2017

19

Näide: fragmentide vahekauguse mõõtmine peptiidahelas

FRET

Mellitiin



Spektritest: $R_0 = 23.6 \text{ \AA}$
Eelmise slaidi valemistest:
D-A distants $r = 24.4 \text{ \AA}$

Pildid: Joseph R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Edition, Springer, 2006

Fluorestsentsi eluea mõõtmised

Eluea mõõtmised

- Kogu jutt siiani on olnud nn statsionaarse fluorestsentsi kohta
 - Lihtne aparatuur
- Tulemused on keskmistatud – iga molekuli ergastub ja relaxeerub eri aegadel
- Eluea mõõtmiseks (*lifetime measurements*) on vaja oluliselt keerukamat aparatuuri

6.11.2017

21

Aparatuur fluorestsentsi eluea mõõtmiseks

Eluea mõõtmised

- On kaks lähenemist:
 - Time-domain**
 - Fluorestsents ergastatakse üllühikese impulsi
 - Registreeritakse reaalne kustumiskõver
 - Frequency-domain**
 - Fluorestsentsi ergastatakse 1 .. 1000 MHz moduleeritud allikaga
 - Mõõdetakse faasinihet/faasinurka ergastuse ja emissiooni vahel

6.11.2017

22

Lahustunud hapniku sisalduse määramine fluorestsentsi eluea mõõtmise kaudu

Eluea mõõtmised

- Hapnik difundeerub läbi membraani värvaineni
- Teiselt poolt ergastatakse värvaines fluorestsentsi moduleeritud kiirgusega
 - Sinise värvuse lainepikkusega
- Detekteeritakse moduleeritud emissioonikiirgust
 - Punase värvuse lainepikkusega kiirgus
- O₂ sisaldus leitakse faasinihke kaudu

6.11.2017

23

Fluorestsentsi eluea mõõtmised

Eluea mõõtmised

- Konkreetse fluorofoori fluorestsentsiprotsessi kirjeldab eksponentsiaalse kustumise võrrand:

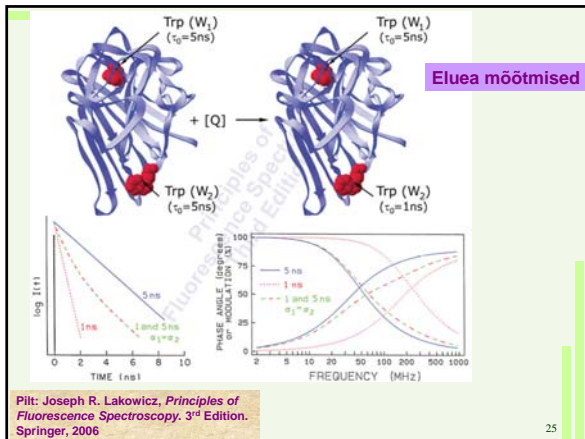
$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

- $I(t)$ ja I_0 on intensiivsus ajal t ja intensiivsus ajahetkel 0
- τ on fluorestsentsi keskmine eluiga
- Mitme fluorofooriga:

$$I(t) = \alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2}$$

6.11.2017

24



Fluorestseerivad valgud

Fluorestseerivad valgud

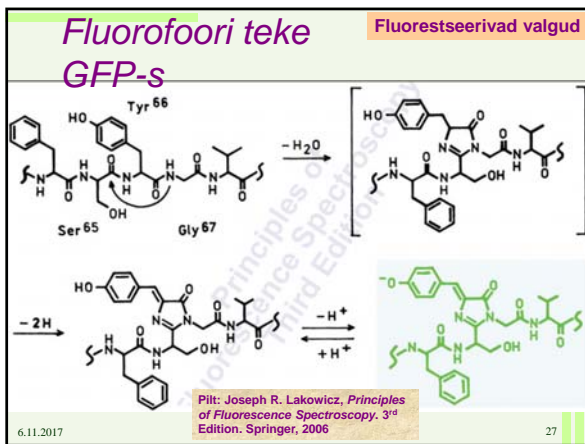
The Nobel Prize in Chemistry 2008

“for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP”

- Rohelise fluorestseeriva valggu (GFP) avastamine ja arendamine

Osamu Shimomura	Martin Chalfie	Roger Y. Tsien
1/3 of the prize	1/3 of the prize	1/3 of the prize
USA	USA	USA
Marine Biological Laboratory (MBL), Woods Hole, MA, USA; Boston University Medical School, Massachusetts, MA, USA	Columbia University, New York, NY, USA	University of California San Diego, CA, USA; Howard Hughes Medical Institute

6.11.2017 26

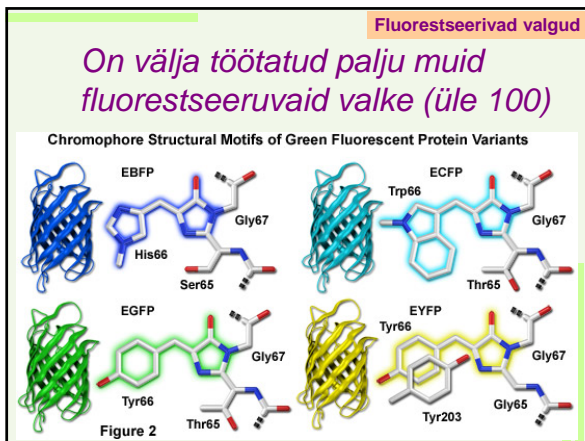


Fluorestseerivad valgud

GFP omadused

- Struktuur:
 - Max emissioon: 510 nm
 - Fluorofoor on peidus
 - Mõjutuste eest kaitstud
- Fluorofoor tekib iseenesest, koos polümeeri struktuuri tekkega
- Selletõttu on võimalik seda fluorestseerivat fragmenti **ekspresseerida** muudesse valkudesse ja muuta nad fluorestsentsmeetodite jaoks nähtavaks

6.11.2017 28




Fluorestseerivad valgud

Fluorestseerivate valkude rakendused

- Molekulaarsondid** – erinevates organismides geenide ekspresseerumise ja valkude toimimise jälgimiseks
 - Fluorestseerivat märgist saab panna külge erinevatele valkudele
- Imetajate eluskoe **visualiseerimine** ja mitmevärviline märgistamine nt **mikroskoopia** jaoks
- Biosensorite** valmistamine

6.11.2017 30

 The Nobel Prize in Chemistry 2014
Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner

Share this:     1.2K 

The Nobel Prize in Chemistry 2014



Photo: Matt Staley/PHHRI
Eric Betzig
Prize share: 1/3



© Bernd Schüller, Max Planck Institut
Stefan W. Hell
Prize share: 1/3



Photo: K. Lowder via Wikimedia Commons, CC-BY-SA 3.0
William E. Moerner
Prize share: 1/3

The Nobel Prize in Chemistry 2014 was awarded jointly to Eric Betzig, Stefan W. Hell and William E. Moerner *"for the development of super-resolved fluorescence microscopy"*.

6.11.2017

31