

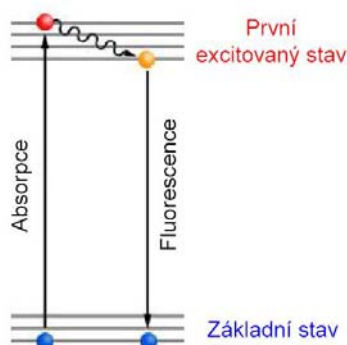
# Fluorescenční mikroskopie a fluorescenční korelační spektroskopie jako nástroje pro měření velikosti a pohyblivosti nanočástic

Jan Sýkora

(oddělení biofyzikální chemie;

T: 266053142, 3484, 3187; jan.sykora@jh-inst.cas.cz)

Jak název přednášky napovídá, budeme hovořit o fluorescenci. Fluorescence je jev, kdy molekula po excitaci elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce při návratu do základního stavu vyzáří energii ve formě fotonu o nižší energii (tzn. při standardní jedno-fotonové excitaci vyzáří světlo o delší vlnové délce než excitační záření). Tuto skutečnost popisuje tzv. Jablonskiho diagram (Obr. 1). Je třeba zdůraznit fakt, že excitační a emisní (fluorescenční) záření mají rozdílnou energii a tak se dají od sebe snadno rozlišit a oddělit. Proto je možné měřit i slabý fluorescenční signál na pozadí intenzivního excitačního záření.

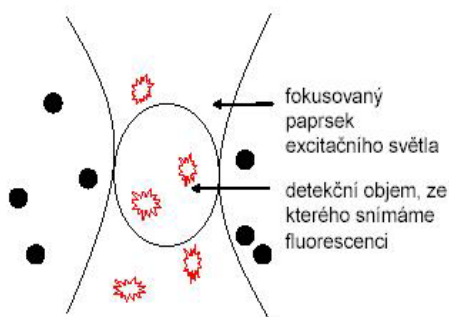


Obr. 1: Zjednodušený Jablonskiho diagram. Po excitaci elektromagnetickým zářením o vhodné energii dochází k absorpci a molekula přechází ze základního elektronového stavu do excitovaného elektronového stavu. Část této absorbované energie předá molekula ve formě tepelné energie okolí (naznačeno vlnovkou). Zbylou energii může molekula vyzářit v podobě fluorescenčního fotonu a přejde tak zpět do základního stavu.

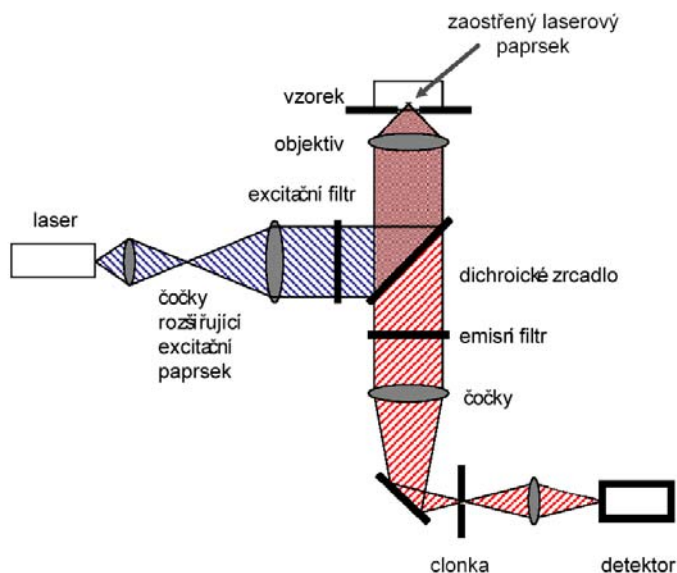
Jaké možnosti nám poskytuje fluorescence? V první řadě je to vysoká selektivita sbíraného signálu. Zdaleka ne všechny molekuly totiž fluoreskují po excitaci blízkým UV a viditelným světlem. Fluorescenci vykazují tak zvané fluorescenční sondy neboli značky, ke kterým se řadí např. některé organické látky se systémem dvojných konjugovaných vazeb, polovodičové nanočástice či fluorescenční proteiny. Současné chemické a biologické metody umožňují těmito sondami označit selektivně právě jeden druh molekul, a tak můžeme pomocí fluorescence získávat informace o rozmístění, pohyblivosti a vlastnosti mikrookolí jediného druhu molekuly přítomného ve složitých systémech. Fluorescence je přitom citlivá na širokou škálu parametrů například na polaritu, viskozitu, potenciál, koncentraci různých iontů a látek přítomných v mikrookolí dané sondy.

Druhá část přednášky bude věnována fluorescenční mikroskopii, která je založena na obdobném principu jako klasická mikroskopie. Pomocí mikroskopů pozorujeme rozložení fluorescenčního signálu ve fluorescenčně označených mikroobjektech. V zásadě rozlišujeme dva základní typy fluorescenčních mikroskopů: prvním z nich je mikroskopie širokého pole, kdy ozařujeme najednou celý vzorek a snímáme fluorescenční signál z celé ozářené plochy. Druhým typem je skenovací konfokální mikroskopie, při které projíždíme vzorek bod po bodu s vysoce zaostřeným laserovým paprskem (Obr. 2), měříme fluorescenční signál v každé

pozici a výsledný obrázek vzniká vynesemím intenzity fluorescence pro jednotlivé proskenované body. Schéma konfokálního mikroskopu je znázorněno na (Obr. 3). Jak již bylo zmíněno v předchozím odstavci, i s fluorescenčními mikroskopy můžeme pozorovat signál pocházející pouze z jednoho druhu molekul, po případě i z jednotlivých molekul.



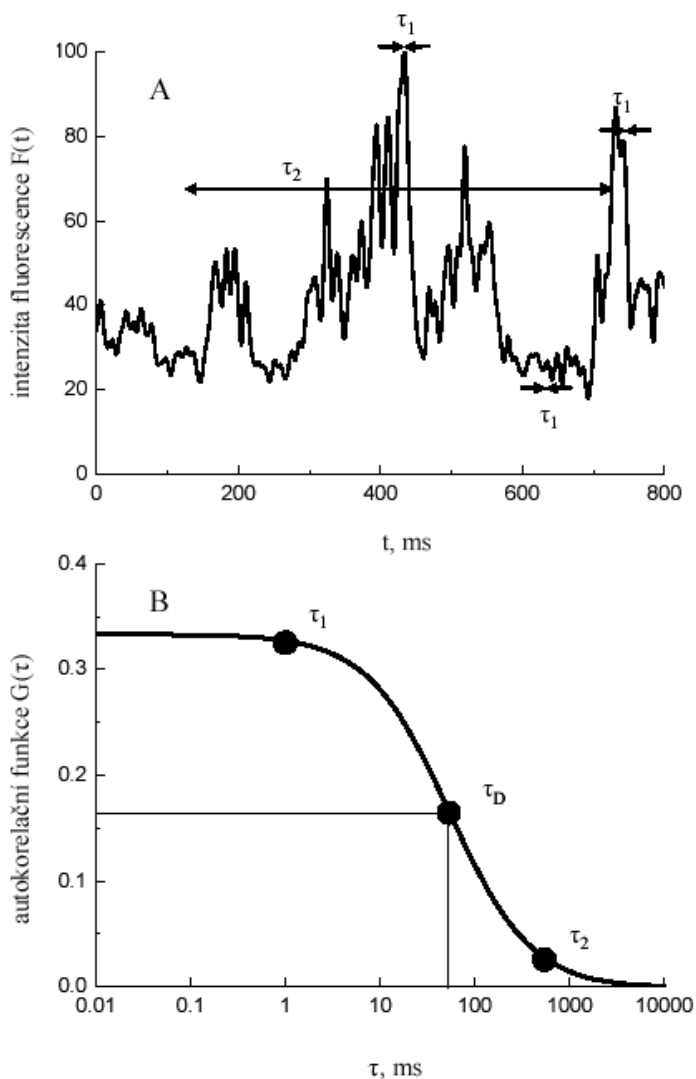
Obr. 2: Schéma zaostřeného laserového paprsku. Fluorescenční Signál pochází pouze z detekčního objemu (červeně zbarvené molekuly). Molekuly, které jsou mimo fokuzovaný paprsek, nejsou excitovány a nevykazují fluorescenci (černé tečky).



Obr. 3: Schéma konfokálního skenovacího mikroskopu. Excitační laserové světlo (naznačeno modrou barvou) je vedeno do objektivu, který paprsek zaostří do miniaturního konfokálního objemu. Totožný objektiv potom sbírá fluorescenční záření, které je od odraženého či rozptýleného excitačního záření odděleno dichroickým zrcadlem a emisním filtrem. Fluorescenční fotony jsou registrovány citlivým detektorem.

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je aplikace konfokální skenovací mikroskopie, která nám přináší dodatečné informace o velikosti, pohyblivosti a koncentraci fluorescenční látky ve vzorku. Používá obdobného uspořádání jako konfokální fluorescenční mikroskopie s tím rozdílem, že se zaostřeným laserovým paprskem nepohybujeme, ale snímáme časově proměnný signál pouze z jednoho bodu. Princip této metody spočívá ve sledování vývoje intenzity fluorescenčního signálu pocházejícího z jednotkového množství molekul v čase. Jestliže fluorescenční molekula dorazí do oblasti vzorku, která je ozářena zaostřeným laserovým paprskem, dojde k nárůstu fluorescenčního signálu. Naopak, když tento prostor

molekula opustí, dochází k poklesu signálu. Statistickou analýzou (Obr. 4) těchto fluktuací fluorescenčního signálu, jež jsou způsobeny průchody fluorescenčních molekul zaostřeným laserovým paprskem, lze určit, jak dlouho molekula průměrně v tomto laserem ozářeném objemu pobývala (informace o pohyblivosti a velikosti částice) a kolik molekul v tomto ozářeném objemu se průměrně vyskytovalo (úměrné koncentraci částic ve vzorku).



Obr. 4: Náčrt principu fluorescenční korelační spektroskopie a statistické analýzy. Panel A zachycuje časový vývoj intenzity fluorescenčního signálu. Na obrázku jsou patrné fluktuace způsobené průchody jednotlivých fluorescenčních molekul konfokálním objemem. Panel B potom ukazuje statistické zpracování tohoto časového vývoje intenzity. Vypočítá se tzv. autokorelační funkce  $G(\tau)$ , jejíž hodnota je pro krátké časové intervaly ( $\tau_1$ ) velká, pro větší časové intervaly ( $\tau_2$ ) se snižuje, protože hodnoty intenzity fluorescence na začátku a na konci intervalu  $\tau_2$  už spolu nesouvisí. Čas  $\tau_D$  (tzv. difúzní čas) udává dobu, po kterou se fluoreskující částice průměrně zdržuje v detekčním objemu. Tento čas závisí na velikosti, respektive pohyblivosti fluorescenčně označených částic. Absolutní hodnota  $G(\tau)$  pro  $\tau = 0$  ms je potom nepřímo úměrná počtu částic v detekčním objemu a odráží koncentraci fluorescenční látky ve vzorku.