

Försterowski rezonansowy transfer energii (FRET) — podstawy fizyczne i zastosowania

Agata M. Kotulska

Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk*

Streszczenie. Försterowski rezonansowy transfer energii (FRET) jest jednym ze zjawisk fizycznych, które znalazły szerokie zastosowanie w biologii i przyczyniły się do zrozumienia funkcjonowania żywych komórek na poziomie molekularnym. Zmiany efektywności transferu energii wraz ze zmianą wzajemnej odległości donora i akceptora są widoczne podczas pomiarów spektroskopowych czasów życia luminescencji lub widma emisji. Zjawisko to umożliwia badanie wielu procesów takich jak hybrydyzacja DNA, zmiany konformacji białek czy też reakcji wiązania się przeciwciała z antygenem. Tradycyjnie do tego celu stosuje się barwniki organiczne lub białka fluorescencyjne. Jednak ze względu na ich wady, takie jak słabo rozdzielone, szerokie pasma absorpcyjne i emisyjne, krótkie — nanosekundowe czasy życia fluorescencji poziomów energetycznych czy fotowysyblanie, nadal poszukuje się alternatywnych fluoroforów wykazujących pożądane cechy spektroskopowe. Rozwiązaniem dla napotykanymi niepożądanymi właściwościami spektroskopowymi barwników organicznych jest zastosowanie nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców jako donorów energii. Takie nanomateriały wykazują wysoką fotostabilność luminescencji, wąskie spektralnie pasma absorpcji i emisji, emisję antystokesowską oraz długie czasy zaniku luminescencji. W artykule przedstawiono podstawy fizyczne zjawiska FRET oraz zaprezentowano nowe wyzwania dla nanoluminoforów domieszkowanych jonami lantanowców, jako nowych alternatywnych donorów energii do studiowania procesów FRET.

Słowa kluczowe: FRET, försterowski rezonansowy transfer energii, nanokryształy, barwniki organiczne, lantanowce, linijka spektroskopowa

Abstract. Förster Resonance Energy Transfer (FRET) is the physical phenomena that has found wide application in biology and contributed to understanding the functioning of living cells at the molecular level. Changes in the energy transfer efficiency are associated with the change of distance between the donor and acceptor, are visible during spectroscopic measurements, such as luminescence lifetimes or emission spectra. This phenomenon enables the study of many processes such as DNA hybridization, changes in protein conformation or the binding reaction of an antibody to an antigen. Traditionally, organic dyes or fluorescent proteins are used for this purpose. However, due to their disadvantages, such as poorly separated, wide absorption and emission bands, short nanosecond luminescence lifetimes, and photobleaching, alternative fluorophores with the desired spectroscopic characteristics are still being sought. The solution to the encountered imperfections of organic dyes is the use of nanocrystals doped with lanthanide ions as energy donors. This kind of nanomaterials show high luminescence photostability, narrow spectral absorption and emission bands, anti-Stokes emission and long luminescence decay times. This article presents the physical basis of the FRET phenomenon and new challenges for lanthanide-doped nanoluminophores as new alternative energy donors for researches in FRET processes.

Keywords: FRET, Förster resonance energy transfer, nanocrystals, organic dyes, lanthanides ions, spectroscopic ruler

1. Wstęp

Mechanizm försterowskiego rezonansowego transferu energii (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) wykorzystuje bezpromienisty rezonansowy przekaz energii pomiędzy dwoma molekułami — donorem (D) i akceptorem (A). Efektywność mechanizmu FRET silnie i monotonicznie zależy od odległości między tymi molekułami. Zmiany efektywności transferu energii FRET można zarejestrować za pomocą statycznych pomiarów widm fluorescencji albo badania kinetyki fluorescencji, mierząc czasy zaniku luminescencji D oraz D w obecności A . Monotoniczna zmiana efektywności

transferu energii umożliwia pomiar odległości z precyzją subnanometrową (efektywność transferu jest odwrotnie proporcjonalna do 6. potęgi odległości pomiędzy D i A) [1, 3]. Efektywność transferu FRET silnie zależy również od doboru pary molekuł donora–akceptora. Obserwacja zjawiska FRET jest możliwa po spełnieniu kilku podstawowych warunków — pasma emisji donora oraz absorpcji akceptora muszą się spektralnie nakładać, a dodatkowo odległość między molekułami nie może przekraczać 10 nm, umożliwiając tym samym transfer energii pomiędzy D i A [3]. Interakcja pomiędzy dwoma molekułami w zjawisku FRET jest opisywana jako oddziaływanie dipol–dipol (które defi-

*ORCID: 0000-0001-6335-9537, e-mail: a.kotulska@intib.pl

niuje prawdopodobieństwo transferu energii pomiędzy dwoma dipolami elektrycznymi).

Mechanizm FRET pomiędzy jonami lantanowców a barwnikami organicznymi

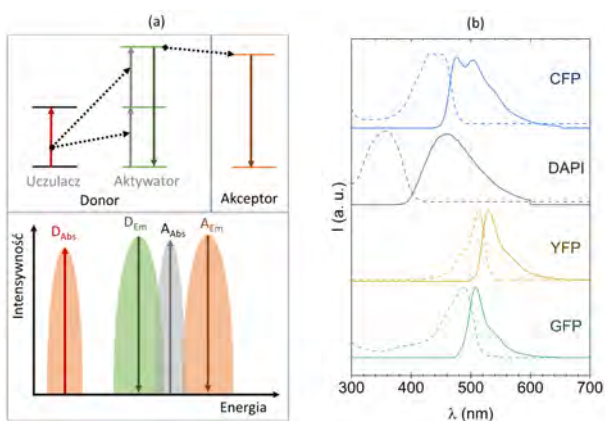
Fundamenty umożliwiające zrozumienie fizycznej natury rezonansowego bezpromienistego transferu energii położył w 1946 roku Theodor Förster [4, 5]. Przedstawił matematyczny model opisujący migrację energii pomiędzy molekułami (dwoma oscylatorami mechanicznymi posiadającymi ładunek elektryczny), analizując zmiany intensywności oraz czasy zaników luminescencji związane z odległością pomiędzy D i A [4, 5, 6]. Na podstawie wcześniejszych obserwacji właściwości transferu energii pomiędzy molekułami, Förster przedstawił równania opisujące krytyczną odległość, poniżej której może zachodzić transfer energii między donorem i akceptorem. Odległość tę można wyznaczyć na podstawie widm luminescencji oraz stężenia fluoroforów, co bardzo dobrze zgadzało się z już wcześniej obserwowanymi wynikami eksperymentalnymi właściwości transferów energii pomiędzy atomami [7, 8]. Przegląd początkowo opracowanych technik FRET został opublikowany w 1959 roku [9]. Mimo, że od opublikowania tych teoretycznych prac upłynęło już kilkadziesiąt lat i rozwinięte zostały opisy teoretyczne zjawisk transferów energii [10, 11], a technika ta stała się wygodnym i powszechnie stosowanym narzędziem, nadal poszukiwane są nowe barwniki fluorescencyjne, które powinny ułatwić interpretację procesów biologicznych *in vitro* i *in vivo*, a w konsekwencji zrozumienie funkcjonowania żywych komórek i organizmów. Dodatkowo rozwijany jest aparat matematyczny umożliwiający korekcję licznych niepożądaných właściwości spektroskopowych wynikających ze stosowania barwników organicznych [12] oraz powstają nowe narzędzia i techniki pomiarowe mające dostarczyć wniosków ilościowych (dotyczących np. odległości czy też efektywności transferu energii).

W tradycyjnym obrazowaniu lub detekcji z wykorzystaniem zjawiska FRET, jako molekuły D i A stosowane są barwniki organiczne. Charakteryzują się one wysokimi wartościami współczynnika ekstynkcji, co umożliwia wydajne wzbudzenie donora i efektywny transfer energii do akceptora [13]. Mnogość barwników organicznych [14, 15] umożliwia prowadzenie skomplikowanych biologicznych eksperymentów, na przykład współbarwienia struktur biologicznych w celu wizualizacji położenia jądra lub szkieletu ciała komórki [16]. Niestety barwniki organiczne (np. CFP, DAPI, YFP, GFP itd.), ulegają fotowysbieleniu, co oznacza, że pod wpływem oświetlenia światłem laserowym następuje ich szybka fotodegradacja [17, 18]. Dodatkowo, dozwolony charakter

przebieg, prowadzący do wydajnej emisji w tych związkach, odpowiada za krótkie czasy zaniku fluorescencji (rzędu nanosekund), co komplikuje techniczną stronę pomiaru. W barwnikach organicznych obserwuje się też pasma absorpcji w zakresie krótkofalowym widma. W przypadku złożonych próbek biologicznych bardzo często obserwuje się niepożądaną fluorescencję tła (autofluorescencję), gdyż wiele molekuł organicznych budujących nasze komórki (np. DNA, FAD, NADH, kolagen, elastyna) ma pasma wzbudzenia i wykazuje spontaniczną fluorescencję w zakresie widzialnym [17, 18]. Niestety, barwniki organiczne mają również inne wady, takie jak szerokie, nachodzące na siebie widma absorpcji i emisji, które często prowadzą do przekazania energii określanego jako „przeciekanie” sygnału (przykładowo emisja donora jest bezpośrednio rejestrowana w kanale detekcyjnym akceptora, albo linia wzbudzająca donora wzbudza bezpośrednio molekuły akceptora) i konieczności korygowania tych wad [12, 18, 19]. Właściwości spektroskopowe barwników organicznych zależą również od chemicznego i biologicznego otoczenia molekuły, co utrudnia ilościowe pomiary FRET. Te wszystkie cechy zmuszają do poszukiwania alternatywnych materiałów eliminujących wady barwników, a jedną z propozycji jest stosowanie nanokryształów domieszkowanych lantanowcami.

Badanie właściwości spektroskopowych dla jonów Ln^{3+} wykorzystuje zjawisko luminescencji. Polega to na optycznym wzbudzeniu badanego materiału za pomocą energii wiązki laserowej, a następnie transferze energii w sposób radiacyjny (emisja fali elektromagnetycznej w zakresie UV, VIS, NIR) lub na drodze nieradiacyjnej [20]. Dużym atutem nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców jest ich wysoka fotostabilność, wąskie linie absorpcyjne i emisyjne oraz długie czasy zaniku poziomów energetycznych [17]. Długie czasy życia luminescencji poziomów energetycznych wynikają z zabronionej regułą Laporte'a przejścia wewnątrz powłoki f [17, 20]. Stabilność emisji lantanowców jest spowodowana obecnością jonów Ln^{3+} , gdyż elektrony zajmujące orbitale $4f$, odpowiadające za właściwości optyczne, są ekranowane przed wpływem chemicznego otoczenia przez zapełnione orbitale $5s$ i $5p$ [21]. W najprostszym przypadku, opisu poziomów energetycznych oraz zachodzących możliwych procesów transferów energii między nimi, rozpatruje się dwa poziomy energetyczne: podstawowy oraz wzbudzony. Bogata struktura poziomów energetycznych w jonach lantanowców (Ln^{3+}) umożliwia obserwację wielu przejść i procesów wymiany energii, niespotykanych w innych związkach [22]. Współdomieszkowanie nanokryształów dwoma różnymi jonami lantanowców, gdzie jeden z nich pełni rolę uczulacza (wzbudzanego świa-

tłem laserowym), natomiast drugi jest aktywatorem (wzbudzany za pomocą konwersji energii z uczulacza w górę, czyli na wyższy poziom), dodatkowo poszerza możliwości wyboru długości fal wzbudzenia oraz emisji. Szczególnie korzystna jest emisja antystokesowska, gdyż do wzbudzenia używane jest światło z zakresu bliskiej podczerwieni, a emisja następuje w zakresie widzialnym. Przykładem takiego procesu jest właśnie konwersja energii w górę (ang. *upconversion*). Następuje w ten sposób eliminacja wysokiego sygnału autofluorescencji tła, co jest szczególnie pożądane przy obrazowaniu struktur biologicznych. Odpowiedni wybór jonu, długości fali wzbudzenia oraz emisji umożliwia wpasowanie się w transmisyjne okna biologiczne dla tkanek — są to obszary wykazujące niższy współczynnik absorpcji, a tym samym większą głębokość penetracji światłem, niższy sygnał tła i w konsekwencji wyższą czułość takich metod pomiarowych [17]. W jonach Ln^{3+} , oprócz typowej absorpcji ze stanu podstawowego (GSA, ang. *Ground-State Absorption*), obserwuje się również wydają absorpcję ze stanu wzbudzonego (ESA, ang. *Excited State Absorption*), relaksację krzyżową (CR, ang. *Cross-Relaxation*) lub bardzo wydajny transfer energii w górę (ETU, ang. *Energy Transfer Upconversion*) [17, 21]. Struktura elektronowa lantanowców jako grupy pierwiastków jest szczególnie przydatna w badaniach spektroskopowych. Schemat mechanizmu FRET pomiędzy donorem w postaci nanokryształu, a organicznym barwnikiem jako akceptorem, został przedstawiony na rys. 1a, natomiast widma absorpcji i emisji wybranych barwników organicznych na rys. 1b.

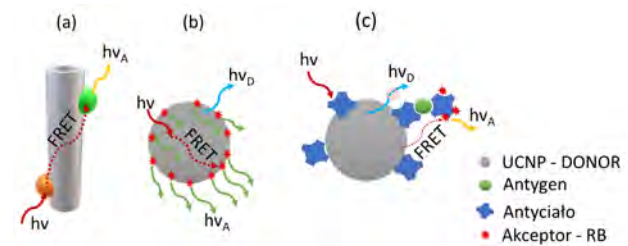


Rys. 1. (a) Schemat wzbudzenia donora (nanokryształu) oraz schemat mechanizmu FRET [34]; (b) przykładowe widma absorpcji i luminescencji barwników organicznych [14]

Zastosowania

Czasy zaników dla D maleją wraz ze skracaniem się odległości D - A do rzędu kilku nanometrów, co umożliwia zastosowanie zjawiska FRET do badań zachowania struktur biologicznych i efektów w nich występujących,

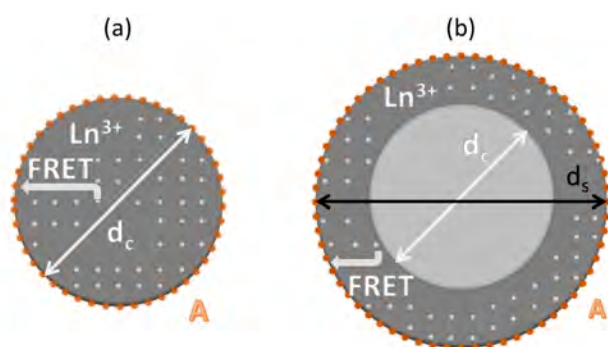
takich jak hybrydyzacja DNA [23, 24], badania konformacji białek [25] czy wykonywanie testów immunoenzymatycznych [25–27]. W konsekwencji zjawisko FRET znajduje liczne zastosowania w biologii oraz wykazuje duży potencjał dla zastosowań w diagnostyce medycznej [19], na przykład do rejestracji oddziaływań molekularnych w żywych komórkach [29–31], czy też przy przeprowadzeniu homogenicznych diagnostycznych testów biologicznych [32]. Jednym z najbardziej zaawansowanych narzędzi w biologii, umożliwiającym rejestrowanie zjawiska FRET w mikroskopii fluorescencyjnej, jest metoda FLIM (ang. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*), która umożliwia wizualizację procesów biologicznych w czasie rzeczywistym za pomocą czasów zaników [18]. Na rysunku 2a zostały przedstawione schematycznie badania struktury DNA za pomocą zjawiska FRET, gdzie molekula (D) dołączona do jednej z zasad kwasu DNA jest pobudzana energią dostarczoną za pośrednictwem światła laserowego, a następnie przekazuje energię drugiej molekule (A) dołączonej do innej części DNA lub do komplementarnego fragmentu nici DNA. Na rysunku 2b został przedstawiony schemat stosowanych układów z nanokryształami jako donorami oraz barwnikami organicznymi jako akceptorami. Celem obecnie prowadzonych badań opisywanego zjawiska jest wykorzystanie FRET w naukach biologicznych, gdzie do donora, mającego postać nanokryształu domieszkowanego lantanowcami zostanie dołączony antygen ze specyficznymi przeciwciałami (rys. 2c). Taki test pozwala wykrywać obecność antygenów lub mierzyć aktywności enzymów.



Rys. 2. Przykładowe zastosowania zjawiska FRET w biologii: (a) schemat hybrydyzacji DNA [24]; (b) schemat mechanizmu wzbudzenia nanokryształu oraz zjawiska FRET pomiędzy nanokryształem a barwnikiem [27]; (c) schematyczne przedstawienie wzbudzenia donora (nanokryształu) skoniugowanego z antygenem ze specyficznymi przeciwciałami oraz barwnikiem jako akceptorem [27]

Nanokryształy domieszkowane jonami Ln^{3+} , pomimo posiadanych zalet, jednocześnie stawiają kolejne nowe wyzwania, wymagające optymalizacji i dogłębnego zrozumienia procesu transferu pomiędzy jonami lantanowców w nanokryształach a barwnikiem na jego powierzchni. Podczas projektowania czujników biologicznych występuje niepożądany efekt uboczny, polegający na zwiększeniu odległości D - A , będący konsekwencją biofunkcjonalizacji nanokryształów, która jest

niezbędna do uzyskania możliwości obserwacji reakcji biologicznych. Dodatkowo pojedynczy nanokryształ może posiadać wiele (rzędu setek lub tysięcy) jonów lantanowców, z których każdy może pełnić funkcję donora FRET. Jednak jednorodne domieszkowanie całej objętości nanokryształu powoduje, że jony te znajdują się w różnej odległości od powierzchni i znajdujących się tam akceptorów. W celu wyeliminowania tych niepożądanych cech, utrudniających realizację testów biologicznych z wykorzystaniem FRET, należałoby zwiększyć efektywność transferu FRET i czułość takich sond przez zoptymalizowanie architektury i składu chemicznego (rozmieszczenia aktywnych domieszek) nanokryształów.



Rys. 3. Architektura nanokryształów wpływa na dystrybucję jonów Ln^{3+} (jako donorów) oraz ich średnią odległość od akceptorów znajdujących się na powierzchni. W celu optymalizacji architektury nanokryształów pod kątem największej efektywności transferu energii między jonami a barwnikiem, można zweryfikować i zoptymalizować średnie odległości pomiędzy D i A. Analizowane architektury pod kątem transferu energii to: (a) domieszkowany rdzeń (o średnicy d_c) do nanokryształów; (b) rdzeń-płaszcz (o średnicy rdzenia d_c oraz średnicy płaszczka d_s). Umieszczając domieszki jonów D w powłoce zmniejsza się efektywną odległość D-A (r_{DA}) [33].

Architektura typu rdzeń-płaszcz daje możliwości różnorodnej dystrybucji jonów uczulacza oraz aktywatora w nanokryształach [33], umożliwiając wprowadzenie zmian i optymalizację właściwości luminescencyjnych D oraz zwiększenie efektywności transferu do A. Rozwiązaniem trudności napotykanym podczas obserwacji zjawiska FRET pomiędzy D i A, z wykorzystaniem nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców, jest optymalizacja architektury oraz ich składu chemicznego. W celu zwiększenia efektywności transferu energii z D (jony Ln^{3+}) do A (barwniki organiczne), należy rozmieścić jony domieszki w równomiernej i niewielkiej odległości od powierzchni — optymalnie zbliżonej do odległości Förstera R_0 . W tym celu zamiast nanokryształu, w którym jony domieszki znajdują się w całej objętości (rys. 3a), można wykorzystać nanokryształy postaci rdzeń-płaszcz. W takim rozwiązaniu domieszka spełniająca rolę donora powinna znaleźć się tylko w zewnętrznym płaszczu, dzięki czemu znajduje się efektywnie bliżej powierzchni niż w przypadku jednorodnie domieszkowanego nanokryształu

(rys. 3b). W następstwie tego średnia odległość pomiędzy jonami Ln^{3+} efektywnie się zmniejsza. Liczba jonów domieszki Ln^{3+} może być zmieniana przez intencjonalną zmianę koncentracji lub kontrolowanie grubości płaszczka. W konsekwencji zmianie ulega objętość, w której znajdują się jony Ln^{3+} , zgodnie z równaniem $d_s - d_c < d_c$, gdzie d_s to średnica płaszczka, a d_c to średnica rdzenia.

2. Parametry wpływające na efektywność FRET

Wyznaczenie wartości efektywności rezonansowego niepromienistego transferu energii pomiędzy dwoma molekułami (η) umożliwia obliczenie odległości pomiędzy dwoma molekułami (r_{DA}) ze wzoru:

$$\eta_{FRET} = 1 + \left(\frac{r_{DA}}{R_0} \right)^6. \quad (1)$$

Na wartość efektywności transferu energii wpływają także takie parametry jak: dystans Förstera (R_0 – wzór 2), współczynnik orientacji molekuł (κ), współczynnik załamania światła (n), całka przekrywania (część wspólna widma emisji D i widma absorpcji A) (J – wzór 3), wydajność kwantowa fluorescencji donora (ϕ_D) oraz liczba Avogadra (N_A). Aby było możliwe zaobserwowanie FRET, musi istnieć część wspólna widma emisji donora i widma absorpcji akceptora, a jest to odwzorowane przez całkę przekrywania emisji donora i absorpcji akceptora J . Dodatkowo, odległość między molekułami nie może przekraczać kilku nanometrów, co jest zdeterminowane odległością Förstera R_0 .

- R_0 — odległość, przy której dla danej pary D-A efektywność transferu energii jest równa 50%. Wartość tego parametru jest w pierwszym przybliżeniu stała dla każdej pary D-A. W zależności od rzeczywistej odległości (r_{DA}) pomiędzy molekułami zmienia się efektywność transferu zgodnie ze wzorem 1. Odległość Förstera wyznacza się za pomocą równania:

$$R_0 = \left(\frac{(9 \ln 10) \cdot \phi_D \cdot \kappa^2 \cdot J(\lambda)}{128 \cdot \pi^5 \cdot N_A \cdot n^4} \right)^{\frac{1}{6}}, \quad (2)$$

gdzie N_A jest liczbą Avogadra równą $6.02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

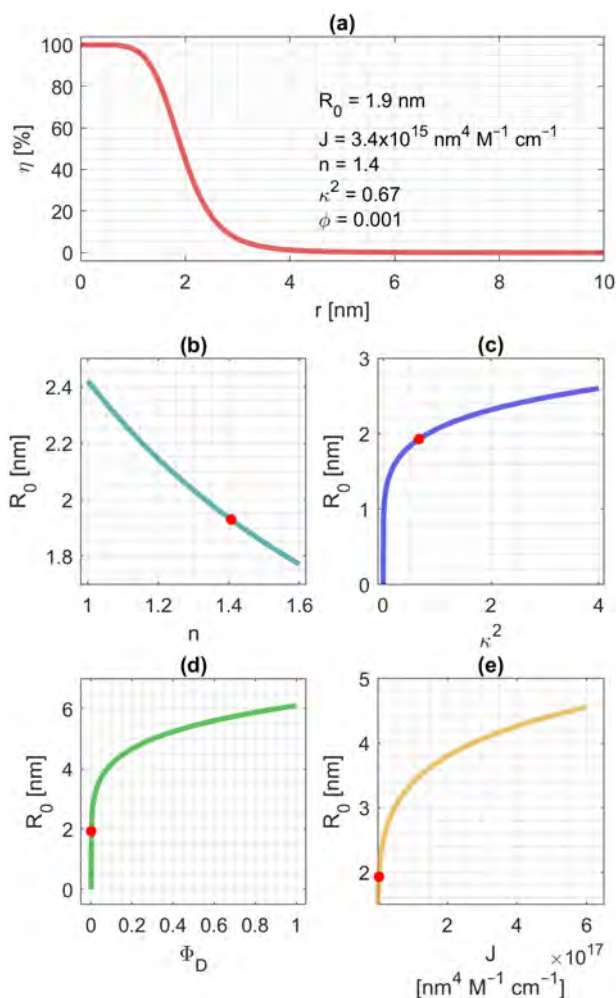
- κ — współczynnik orientacji molekuł. W zależności od kąta pomiędzy ustawieniem dipola donora D względem dipola akceptora A, wartość efektywności transferu energii może się zmieniać wraz ze zmianą κ^2 w zakresie od 0 do 4. Dla większości przypadków nieuporządkowanych molekuł κ^2 przyjmuje się stałą wartość równą $2/3$ (dla równoległych molekuł κ^2 przyjmuje wartość między 1 a 4, dla prostopadłych $\kappa^2 = 0$).

- n — współczynnik załamania światła ośrodka, w którym znajdują się D i A .
- J — całka przekrywania emisji donora i absorpcji akceptora jest wyznaczana jako całka znormalizowanego widma emisji donora oraz współczynnika ekstynkcji akceptora, pomnożonego przez czwartą potęgę długości fali. Wielkość ta jest opisana wzorem:

$$J = \int f_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (3)$$

gdzie f_D jest znormalizowanym widmem fluorescencji donora, $f_D(\lambda) = F_D / \int F_D(\lambda) d\lambda$, F_D zaś jest widmem fluorescencji donora w funkcji długości fali λ .

- ϕ_D — wydajność kwantowa donora, opisująca ile fotonów zostało wyemitowanych w stosunku do fotonów zaabsorbowanych (n_E/n_A).



Rys. 4. (a) Efektywność transferu FRET (η) w zależności od odległości D - A ; wartość odległości Förstera w funkcji parametrów fizycznych: (b) współczynnika załamania światła (n), (c) orientacji molekuł (κ^2), (d) wydajności kwantowej fluorescencji donora (ϕ_D), (e) całki przekrywania emisji donora i absorpcji akceptora (J) [34].

Podane powyżej zależności są obliczone w przybliżeniu makroskopowym. Do dalszych analiz dla pojedyn-

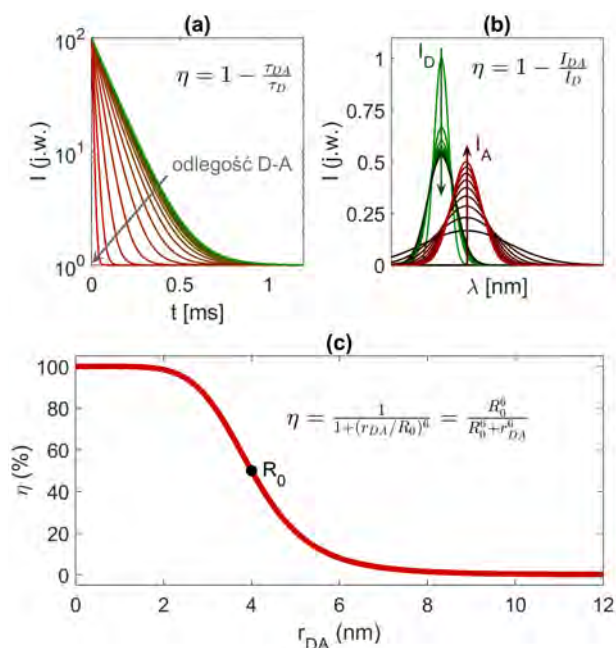
nych molekuł należy uwzględnić ich budowę i zastosować bardziej zaawansowane techniki analizy oraz pomiaru [34]. Zmienność powyższych parametrów i ich wpływ na wartość odległości Förstera oraz pośrednio na efektywność transferu energii, zaprezentowano na rys. 4. Zależność efektywności FRET od odległości pomiędzy molekułami dla ustalonych wartości powyżej opisanych parametrów została przedstawiona na rys. 4a. Kolejne wykresy przedstawiają przykładowe zależności odległości Förstera R_0 od: współczynnika załamania światła n — rys. 4b, orientacji molekuł κ^2 — rys. 4c, wydajności kwantowej ϕ_D — rys. 4d, całki przekrywania J — rys. 4e.

Metody pomiarowe

Zjawisko FRET ujawnia się podczas pomiarów czasów zaników (skracanie czasu zaniku luminescencji D w obecności A) oraz rejestracji widm emisji (zmniejszenie intensywności emisji D wraz ze wzrostem emisji A). Efektywność transferu (η) między molekułami donora i akceptora zależy monotonicznie od 6 potęgi odwrotności odległości pomiędzy nimi (r_{DA}) oraz odległości Förstera (R_0), zdefiniowanej jako odległość, dla której η jest równa 50% maksymalnej efektywności dla danej pary D - A . Wyznaczenie efektywności transferu FRET może być zrealizowane przez pomiar emisji dla próbki zawierającej D i A oraz porównanie z luminescencją samego D . Wraz ze zmniejszeniem odległości pomiędzy D i A lub zwiększeniem koncentracji A maleje intensywność luminescencji D (I_D), natomiast zwiększa się intensywność emisji A (I_A). Drugim sposobem wyznaczenia efektywności transferu energii η jest pomiar czasów zaniku luminescencji danego poziomu energetycznego D (τ_D), dla którego rejestruje się coraz krótsze czasy życia luminescencji pod wpływem transferu energii FRET do akceptora. Zmiany efektywności transferu energii z D do A wyznacza się na podstawie intensywności (I_D) lub czasów życia luminescencji (τ_D) dla D względem tych samych wartości w obecności A (oznaczonych jako I_{DA} , τ_{DA}). Na podstawie obserwacji powyżej opisanych zmian oraz znajomości wartości odległości Förstera R_0 można określić odległość, w jakiej znajdują się względem siebie donor i akceptor, a także wyznaczyć efektywność FRET (r_{DA}). Jest to opisane równaniem:

$$\eta_{FRET} = \frac{1}{1 + (r_{DA}/R_0)^6} = \frac{1}{1 + I_{DA}/I_D} = \frac{1}{1 + \tau_{DA}/\tau_D}. \quad (4)$$

Powyższa zależność opisuje efektywność FRET (rys. 5c) oraz powiązanie odległości pomiędzy D i A (r_{DA}) z wynikami pomiarów spektroskopowych, takich



Rys. 5. Odległość pomiędzy donorem (D) a akceptorem (A) r_{DA} można wyznaczyć na podstawie efektywności transferu FRET (η). Jest to możliwe za pomocą pomiarów życia luminescencji poziomów energetycznych lub widm emisji oraz znajomości odległości Förstera R_0 (tj. odległości dla danej pary D - A , dla której $\eta = 50\%$) zgodnie z równaniem (4). (a) Czasy zaników dla donora τ_D skracająca się wraz ze zmniejszaniem odległości pomiędzy D i A lub zwiększaniem koncentracji akceptora. (b) Widmo emisji donora (I_D) maleje wraz ze wzrostem intensywności emisji akceptora (I_A). (c) Zmiana efektywności transferu w funkcji odległości pomiędzy D i A (r_{DA}) [34]

jak widma emisji (rys. 5b) czy czasy zaników luminescencji ze wzbudzonych poziomów energetycznych (rys. 5a).

Podsumowanie

Zjawisko försterowskiego rezonansowego transferu energii (FRET) pozwala na określenie odległości pomiędzy dwoma molekułami: donorem (D) i akceptorem (A) energii. Odległość ta determinuje wartość efektywności transferu energii, co można wyznaczyć na podstawie widm luminescencji oraz czasów zaników z danego poziomu energetycznego. Jeżeli dwie różne biomolekuły (przykładowo przeciwciało i antygen) są związane odpowiednio z molekułami D i A , zjawisko FRET dostarcza informacji na temat ich interakcji lub jej braku.

Zwiększenie wydajności FRET można uzyskać przez dobranie odpowiedniego materiału optycznie aktywnego, o odpowiednich zakresach emisji oraz absorpcji (pod kątem długości fali wzbudzenia oraz części wspólnej emisji donora i absorpcji akceptora). W mikroskopii fluorescencyjnej obecnie najbardziej powszechnie przy pomiarach FRET stosuje się barwniki fluorescencyjne, które niestety pomimo powszechności ich stosowania wykazują szereg wad.

Niepożądane cechy barwników organicznych to: słabo oddzielone szerokie pasma absorpcji i emisji, krót-

kie czasy życia fluorescencji (co powoduje także rejestrację tła pochodzącego z komórek) oraz fotowysielanie pod wpływem oświetlenia laserem (co skutkuje krótkim czasem na wykonanie pomiarów).

Rozwiązaniem tego problemu może być wybór nanokryształów domieszkowanych lantanowcami, wykazujących wąskie, rozdzielone pasma energetyczne, długi czas zaniku luminescencji oraz fotostabilność. Właściwości optyczne oraz stabilność chemiczna nanokryształów domieszkowanych jonami lantanowców są dużymi zaletami umożliwiającymi dalsze zastosowania odpowiednio dobranych architektur kryształów do badań FRET, w tym np. zamiana barwników organicznych jako alternatywnych materiałów. Dystrybucja jonów domieszki oraz odległość pomiędzy jonami Ln^{3+} a powierzchnią wymusza optymalizację dobieranych struktur pod kątem efektywności transferu. Zjawisko FRET zachodzi, gdy odległość D - A nie przekracza kilku nanometrów, co wymaga uwzględnienia w potencjalnych zastosowaniach odległości D - A wraz z wymiarami badanych struktur biologicznych. Wybór architektury nanokryształu oraz jego składu będzie wpływał na dystrybucję jonów lantanowców oraz ich odległość od powierzchni, na której mogą zostać zakotwiczone barwniki organiczne.

Zasady działania mechanizmu FRET dają możliwość jego stosowania do badań reakcji biochemicznych w czasie rzeczywistym. Może też być z powodzeniem stosowane do prowadzenia badań zachowania struktur biologicznych w organizmach żywych na poziomie molekularnym.

Pokrycie powierzchni nanokryształów biomolekułami (tzw. biofunkcjonalizacja) pozwala śledzić i zrozumieć procesy biologiczne w czasie rzeczywistym.

Podziękowanie

Dziękuję prof. A. Bednarkiewiczowi za krytyczne uwagi, które były bardzo pomocne przy pisaniu niniejszego artykułu.

Literatura

- [1] D. Geißler, S. Linden, K. Liermann, K. D. Wegner, L. J. Charbonnière, N. Hildebrandt "Lanthanides and Quantum Dots as Förster Resonance Energy Transfer Agents for Diagnostics and Cellular Imaging" *Inorg. Chem.* vol. 53, no. 4, pp. 1824–1838, 2014.
- [2] R. Zhou, S. Kunzelmann, M. R. Webb, T. Ha "Detecting Intramolecular Conformational Dynamics of Single Molecules in Short Distance Range with Subnanometer Sensitivity" *Nano Lett* vol. 11, pp. 5482–5488, 2011.

- [3] I. Medintz and N. Hildebrandt, *FRET — Förster Resonance Energy Transfer* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014.
- [4] T. Förster “Energiewanderung und Fluoreszenz” *Naturwissenschaften* vol. 33, no. 6, pp. 166–175, 1946.
- [5] T. Förster “Energy migration and fluorescence” *J. Biomed. Opt.* vol. 17, no. 1, p. 011002, 2012.
- [6] J. Deal, D. J. Pleshinger, S. C. Johnson, S. J. Leavesley, T. C. Rich “Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: A biological perspective of the history of FRET” *Cellular Signalling* vol. 75. Elsevier Inc., p. 109769, 2020.
- [7] R. S. Knox “Intermolecular energy migration and fluorescence” w *Biological Physics* 1st ed., E. V. Mielczarek, R. S. Knox, E. Greenbaum (Eds.) AIP-Press, 1993, pp. 148–160.
- [8] T. Förster “Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz” *Ann. Phys.* vol. 437, no. 1–2, pp. 55–75, 1948.
- [9] T. Förster “10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation” *Discussions of the Faraday Society* vol. 27, no. 0. The Royal Society of Chemistry, pp. 7–17, 1959.
- [10] D. L. Dexter “A theory of sensitized luminescence in solids” *J. Chem. Phys.* vol. 21, no. 5, pp. 836–850, 1953.
- [11] F. Auzel “Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids” *Chem. Rev.* vol. 104, no. 1, pp. 139–173, 2004.
- [12] B. Hellenkamp et al. “Precision and accuracy of single-molecule FRET measurements— a multi-laboratory benchmark study” *Nat. Methods* vol. 15, no. 9, pp. 669–676, 2018.
- [13] A. Gopi, S. Lingamoorthy, S. Soman, K. Yoosaf, R. Haridas, S. Das “Modulating FRET in Organic–Inorganic Nanohybrids for Light Harvesting Applications” *J. Phys. Chem. C* vol. 120, no. 46, pp. 26569–26578, 2016.
- [14] Thermo Fischer Scientific “Fluorescence Spectra-Viewer” Brand, 2017 [online]. <https://www.thermofisher.com/pl/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>. [Accessed: 18-Mar-2020].
- [15] “Fluorescence Spectra Viewers” [online]. Available: <https://www.nightsea.com/sfa-sharing/fluorescence-spectra-viewers/>. [Accessed: 20-Apr-2020].
- [16] A. Miyawaki, A. Sawano, T. Kogure “Lighting up cells: Labelling proteins with fluorophores” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* vol. 4, no. SUPPL. 2003.
- [17] A. Gnach A. Bednarkiewicz “Lanthanide-doped up-converting nanoparticles: Merits and challenges” *Nano Today* vol. 7, no. 6, pp. 532–563, 2012.
- [18] K. Quan, C. Yi, X. Yang, X. He, J. Huang, K. Wang “FRET-based nucleic acid probes: Basic designs and applications in bioimaging” *TrAC - Trends Anal. Chem.* vol. 124, p. 115784, 2020.
- [19] A. Kaur S. Dhakal “Recent applications of FRET-based multiplexed techniques” *TrAC - Trends Anal. Chem.* vol. 123. Elsevier B.V., p. 115777, 2020.
- [20] G. Blasse B. C. Grabmaier *Luminescent Materials* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1994.
- [21] S. McLennan R. S. Taylor *The Rare Earth Elements: Fundamentals and Applications* vol. 91, no. 5. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- [22] G. H. Dieke, H. M. Crosswhite, B. Dunn “Emission Spectra of the Doubly and Triply Ionized Rare Earths” *J. Opt. Soc. Am.* vol. 51, no. 8, p. 820, 1961.
- [23] L. H. Yang, D. J. Ahn, E. Koo “Ultrasensitive FRET-based DNA sensor using PNA/DNA hybridization” *Mater. Sci. Eng. C* vol. 69, pp. 625–630, 2016.
- [24] R. M. Clegg “Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids” *Methods Enzymol.* vol. 211, no. C, pp. 353–388, 1992.
- [25] M. V. Golynskiy, W. F. Rurup, M. Merckx “Antibody Detection by Using a FRET-Based Protein Conformational Switch” *ChemBioChem* vol. 11, no. 16, pp. 2264–2267, 2010.
- [26] K. R. Bajgiran, J. A. Dorman, A. T. Melvin “Dipole-Modulated Downconversion Nanoparticles as Label-Free Biological Sensors” *ACS Sensors* vol. 5, no. 1, pp. 29–33, 2020.
- [27] J. T. Cao, W. S. Zhang, H. Wang, S. H. Ma, Y. M. Liu “A novel fluorescence immunosensor based on Förster resonance energy transfer between nitrogen and sulfur co-doped carbon dot functionalized silica nanospheres and Au@Ag NPs” *New J. Chem.* vol. 43, no. 3, pp. 1424–1430, 2019.
- [28] S. Wang, N. Mamedova, N. A. Kotov, W. Chen, J. Studer “Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates” *Nano Lett.* vol. 2, no. 8, pp. 817–822, 2002.
- [29] H. E. Grecco et al. “Ensemble and single particle photophysical properties (two-photon excitation, anisotropy, FRET, lifetime, spectral conversion) of commercial quantum dots in solution and in live cells” *Microsc. Res. Tech.* vol. 65, no. 4–5, pp. 169–179, 2004.
- [30] E. A. Jares-Erijman T. M. Jovin “Imaging molecular interactions in living cells by FRET microscopy” *Current Opinion in Chemical Biology* vol.

- 10, no. 5. Elsevier Current Trends, pp. 409–416, 2006.
- [31] E. A. Jares-Erijman T. M. Jovin “FRET imaging” *Nature Biotechnology* vol. 21, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 1387–1395, 2003.
- [32] O. Tagit, G. Annio, N. Hildebrandt, “Terbium to quantum rod Förster resonance energy transfer for homogeneous bioassays with picomolar detection limits” *Microchim. Acta* vol. 182, no. 9–10, pp. 1693–1700, 2015.
- [33] A. Pilch et al. “Shaping Luminescent Properties of Yb³⁺ and Ho³⁺ Co-Doped Upconverting Core-Shell β -NaYF₄ Nanoparticles by Dopant Distribution and Spacing” *Small* vol. 13, no. 47, pp. 54–66, 2017.
- [34] W. R. Algar, N. Hildebrandt, S. S. Vogel, I. L. Medintz “FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls” *Nat. Methods* vol. 16, no. 9, pp. 815–829, 2019.