



Zastosowanie techniki stroboskopowej do pomiarów czasów życia fluorescencji materiałów biologicznych.

Cz. I. Podstawy metody, aparatura i metodyka pomiarów

MAKSYMILIAN WŁODARSKI, MIROŚLAW KWAŚNY,
MIRON KALISZEWSKI, BEATA RUTECKA

Wojskowa Akademia Techniczna, Instytut Optoelektroniki,
00-908 Warszawa, ul. S. Kaliskiego 2

Streszczenie. W pracy przedstawiono podstawy stroboskopowej metody pomiarów czasów życia fluorescencji, aparaturę, opracowaną metodykę pomiarów i analizę procesu dekonwolucji sygnałów. Pokazano, że krzywe zaniku fluorescencji z wykorzystaniem źródeł światła typu LED UV, (280 i 340 nm) mogą znaleźć zastosowanie do charakterystyki aminokwasów, białek, bakterii — w tym symulantów i interferentów bojowych środków biologicznych. Podstawowymi zaletami metody są: jej szybkość, możliwość wykorzystania tanich źródeł wzbudzenia, wysoka czułość, prostota obsługi, modułowa budowa umożliwiająca szybką wymianę źródeł wzbudzenia. Badania przeprowadzone na standardowych wzorcach — NATA, NADH wykazały zgodność czasów życia fluorescencji z danymi literaturowymi.
Słowa kluczowe: czas życia fluorescencji, metoda stroboskopowa, fluorescencja białek, UV LED
Symbole UKD: 535.37

1. Wstęp

Badania czasowo-rozdzielcze są powszechnie stosowane w badaniach makromolekuł, głównie białek. Ostatnio znalazły zastosowanie w charakterystyce symulantów bojowych środków biologicznych (BWA) [1-4]. Uzyskane tą metodą dane często dostarczają więcej informacji o strukturze cząsteczkowej niż widma fluorescencji. Technika ta wykorzystywana jest do pomiarów rezonansowego transferu energii, wygaszania fluorescencji, oddziaływania sond fluorescencyjnych

z białkami, DNA lub membranami, anizotropii zaniku i czasów korelacji stanów rotacyjnych, rozkładu czasów życia oraz wielowykładniczych zaników. Czas życia fluorescencji biocząsteczek jest bardzo wrażliwy na ich mikrootoczenie w białku, co umożliwia rozróżnianie pomiędzy cząsteczkami biologicznymi. Mimo wielkich możliwości, technika ta była dotychczas rzadko stosowana w badaniach bakterii oraz typowych interferentów. Dane dotyczące czasów życia można znaleźć w nielicznych publikacjach [5-9]. Czasy życia fluorescencji bakterii mierzone za pomocą dwóch podstawowych metod, tj. czasowo skorelowanego zliczania pojedynczych fotonów (TC-SPC) i fazowo-modulacyjnej (FD) znacząco się różnią. W ostatnich latach ponownie wzrasta zainteresowanie techniką stroboskopową. Zaletą tej metody jest detekcja wielu fotonów podczas pojedynczego impulsu wzbudzenia, sygnał fluorescencji jest wprost proporcjonalny do intensywności źródła wzbudzenia. Technika ta nie wymaga źródła światła o wysokiej repetycji, tak jak w przypadku TC-SPC. Jej atrakcyjność wynika z zastosowania jako źródeł wzbudzenia diod typu LED. Ważną cechą metody stroboskopowej jest krótki czas pojedynczego pomiaru rzędu 10-20 ns, co zapobiega rozkładowi fotochemicznemu próbki i uzyskiwaniu błędnych wyników. Połączenie stroboskopowej metody detekcji ze źródłami LED zamiast lamp błyskowych zaowocowało powstaniem konstrukcji EasyLife (Photon Technology International) [10], w którym jako standardowe występuje źródło LED emitujące promieniowanie o długości fali 280 nm. W pracy zastosowano dodatkowe źródło o długości fali 340 nm, co pozwala na wzbudzenie materiałów promieniowaniem idealnie dopasowanym do pasm absorpcji bakterii. Naszym celem było opanowanie techniki pomiarowej, dobranie odpowiednich filtrów optycznych, ośrodków rozpraszających i sprawdzenie wiarygodności metody na wzorcach o znanym czasie zaniku fluorescencji. Ma to znaczenie dla dalszych badań materiałów biologicznych, mających krótkożyłowe składniki zaniku fluorescencji poniżej 1 ns, podczas gdy szerokość impulsów LED jest rzędu 1-2 ns.

2. Metoda stroboskopowa

W celu wyznaczenia czasu życia fluorescencji wykorzystuje się różne metody spektroskopii laserowej rozdzielczej w czasie. Obecnie do najpopularniejszych metod pomiaru tego parametru należą:

- metoda pomiaru w dziedzinie częstotliwości tzw. metoda modulacyjno-fazowa (ang. *the frequency domain*),
- metody pomiaru w dziedzinie czasu (ang. *the time domain*).

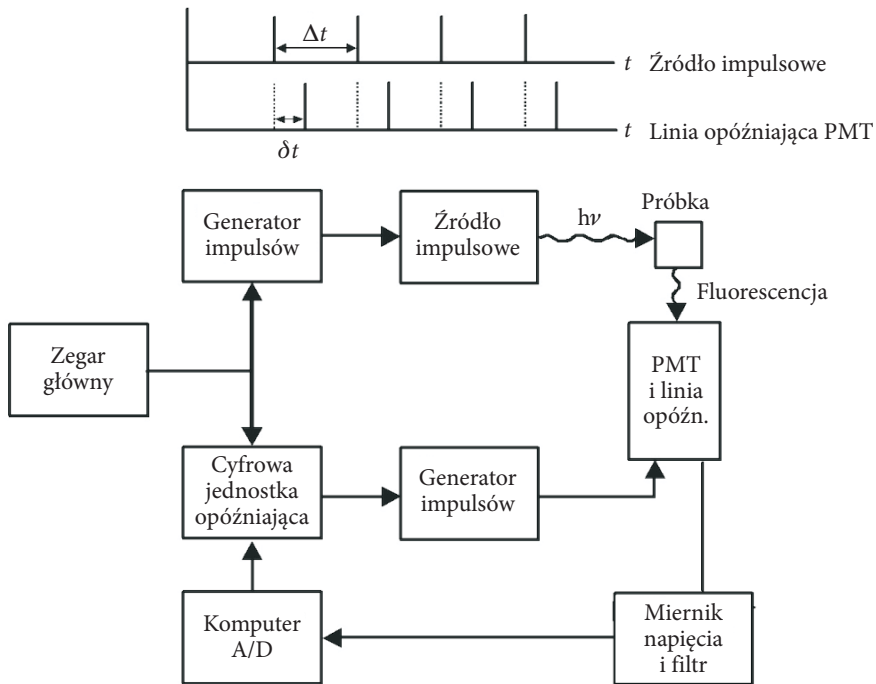
Do grupy metod pomiaru w dziedzinie czasu należą:

- metody korelowanego w czasie liczenia pojedynczych fotonów,
- uśrednianie za pomocą integratora z oknem prostokątnym „boxcar” (m.in. metoda stroboskopowa),

- metody bramkowania optycznego,
- metoda upkonwersji,
- metoda oscyloskopowa.

Stroboskopowa (Strobe) lub fotoprądowa technika próbkowania fluorescencji została rozwinięta przez Bennetta w 1960 roku [13]. Nazwa charakteryzuje sposób pomiaru — badanie natężenia fluorescencji w bardzo krótkich (w stosunku do czasu zaniku fluorescencji) chwilach czasowych, zsynchronizowanych z momentem wzbudzenia. Metoda pomiaru z integratorem typu boxcar stosowana była z powodzeniem przez wiele lat, głównie wykorzystaniem lampy ksenonowej, lecz została zarzucona, gdy pojawiła się metoda TC-SPC. Obecnie dzięki nowym źródłom światła, technika stroboskopowa uzyskuje znaczenie porównywalne z TC-SPC i modulacją fazy [9]. Schemat blokowy aparatury do pomiarów metodą stroboskopową przedstawiono na rysunku 1.

Zegar główny (oscylator) generuje ciąg impulsów, który jest jednocześnie kierowany do obwodu wyzwalacza źródła promieniowania UV i generatora impulsu bramkującego (ang. *Delay Gate Generator* — DGG). Generuje on kolejne impulsy, które są przekazywane do linii opóźniającej łączącej fotokatodę i dynody fotopo-



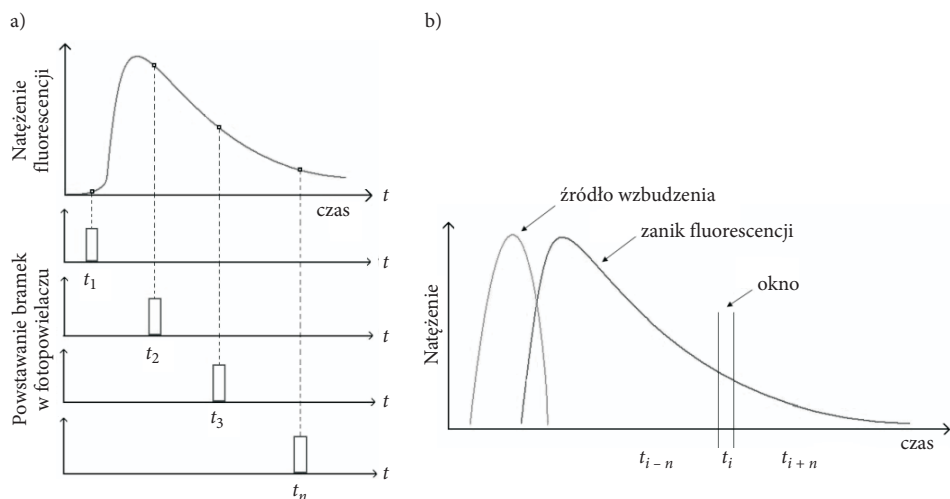
Rys. 1. Schemat blokowy systemu do pomiarów zaniku fluorescencji metodą stroboskopową

wielacza. Wędrujący impuls elektryczny generuje zmienną różnicę potencjałów pomiędzy dynodami, dając w rezultacie duże wzmocnienie w krótkim okresie czasu, tworząc „bramkę optyczną”. DGG odpowiada za precyzyjne opóźnienie impulsu bramkującego fotopowielacz, który jest wyzwalany w czasie przesuniętym o wartość δt względem źródła. Zmiana intensywności emisji w funkcji czasu może być zmierzona poprzez zmianę opóźnienia bramki. W standardowym detektorze PMT dynody połączone są z układem konwencjonalnego dzielnika napięcia, który określa dystrybucję napięcia pomiędzy dynodami.

W detekcji stroboskopowej dzielnik napięcia zastąpiony został przez linię opóźniającą. Jej długość dopasowano do czasu, którego potrzebują elektrony do przejścia pomiędzy każdą z par dynod. Wysokonapięciowy impuls zsynchronizowany z impulsem źródła zostaje wstrzyknięty do łańcucha dynod. Impuls ten przechodzi w dół linii opóźniającej i powoduje chwilową różnicę potencjałów przemieszczającą się pomiędzy kolejnymi parami dynod. Prowadzi to do wybiórczego wzmacniania elektronów wtórnych podczas przelotu przez łańcuch dynod. W wyniku tego procesu fotopowielacz wzmacnia sygnał pochodzący tylko z tych fotonów, które dotarły do fotokatody w trakcie trwania wysokonapięciowego impulsu pomiędzy fotokatodą a pierwszą dynodą.

Położenie bramki optycznej w zależności od czasu zaniku fluorescencji przedstawione jest schematycznie na rysunku 2.

Unikalną cechą metody stroboskopowej jest zdolność mierzenia zaniku fluorescencji przy użyciu nieliniowej skali czasu. Jest to możliwe, ponieważ oprogramowanie kontroluje opóźnienie impulsu bramkującego, co pozwala na pomiar

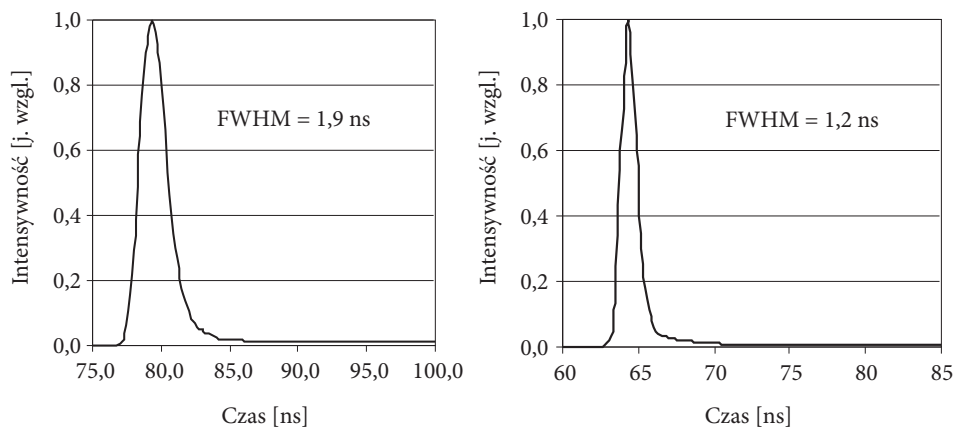


Rys. 2. Bramkowanie czasowe detektora w technice stroboskopowej; a) idea bramkowania; b) przesunięcie okna detekcji ($t_i - \delta$, $t_i + \delta$) [14]

natężenia fluorescencji w dowolnych chwilach czasowych. Detekcja stroboskopowa jest z natury szybka. Wynika to z tego, że mierzone jest bezpośrednio natężenie sygnału fluorescencji. W przeciwieństwie do metody TC-SPC wynik pomiaru w metodzie stroboskopowej nie zależy od prawdopodobieństwa wykrycia dokładnie jednego zliczanego w danej chwili fotonu, lecz pozwala wykorzystać wysoki poziom natężenia fluorescencji. Czasy życia fluorescencji od kilkuset pikosekund do setek nanosekund mogą być określone z dokładnością i precyzją wyższą niż $\pm 2\%$. Technika stroboskopowa stanowi alternatywę dla metody TC-SPC. Intensywność emisji fluorescencji jest mierzona w funkcji czasu w stosunku do błysku wzbudzenia, a analiza danych jest wykonywana przez iteracyjny rozplot (tzw. dekonwolucję).

3. Charakterystyki spektralne źródeł światła UV i filtrów optycznych

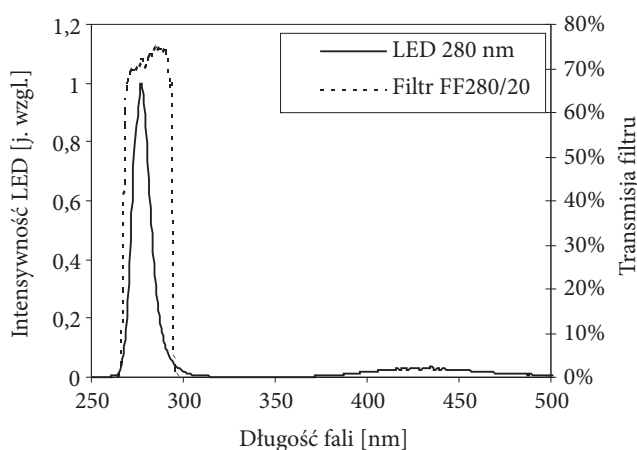
Na rysunku 3 przedstawione zostały charakterystyki spektralne źródeł światła UV, wykorzystanych do pomiaru krzywych fluorescencji. Źródłami tymi są diody elektroluminescencyjne mające moc kilku mW firmy Sensor Electronic Technology (SETI). Materiałem wykorzystanym do ich produkcji jest azotek galowo-aluminiowy (AlGaIn).



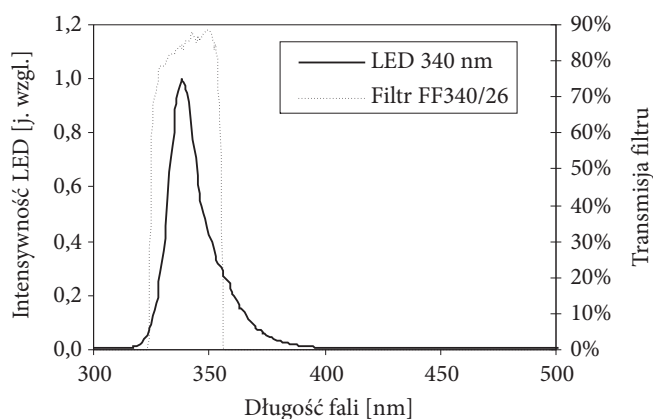
Rys. 3. Charakterystyki czasowe źródeł LED

Długość impulsów źródeł LED jest rzędu 1,2-1,9 ns i jest niższa od tej dla stosowanych lamp ksenonowych (3 ns) i wyższa niż dla laserów OPO (ok. 0,5 ns). Opisana w dalszej części metoda dekonwolucji pozwala wydzielić sygnały źródła i mierzyć czasy życia fluorescencji poniżej jednej nanosekundy.

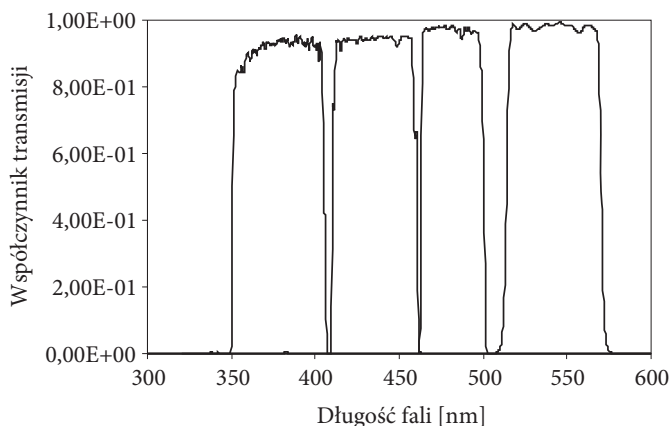
Filtry optyczne są istotnymi elementami fluorescencyjnych układów pomiarowych. Stosowane źródła UV poza głównymi pasmami emisji mają szczątkową emisję w zakresie 340-450 nm, której natężenie jest większe niż badane sygnały fluorescencji. Do całkowitego wyeliminowania tych sygnałów zastosowano filtry interferencyjne firmy SEMROCK o transmisji około 80% w paśmie emisji LED i wysokim współczynniku tłumienia rzędu 10^6 poza pasmem. Gwarantuje to odcięcie emisji długofalowej i otrzymanie czystego sygnału fluorescencji. Rysunki 4 i 6 przedstawiają charakterystyki pasmowych filtrów z naniesionymi charakterystykami źródeł wzbudzenia.



Rys. 4. Charakterystyki spektralne źródła światła UV o długości fali 280 nm oraz filtru optycznego w torze wzbudzenia



Rys. 5. Charakterystyki spektralne źródła światła UV o długości fali 340 nm oraz filtru optycznego w torze wzbudzenia



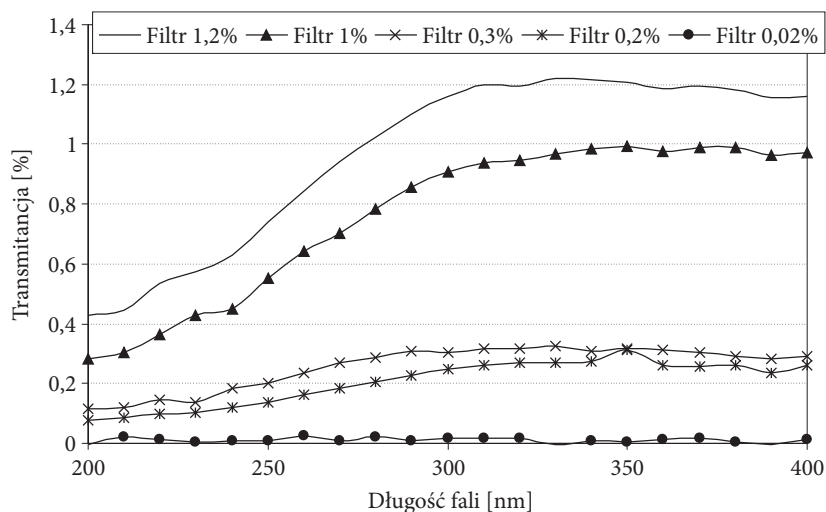
Rys. 6. Charakterystyki spektralne filtrów w torze emisji (FF377, FF435, FF482, FF542)

Następne filtry optyczne muszą zostać zastosowane w torze emisji. Podstawową ich rolę jest całkowite odcięcie promieniowania wzbudzającego i wydzielenie odpowiedniego zakresu spektralnego fluorescencji badanych związków.

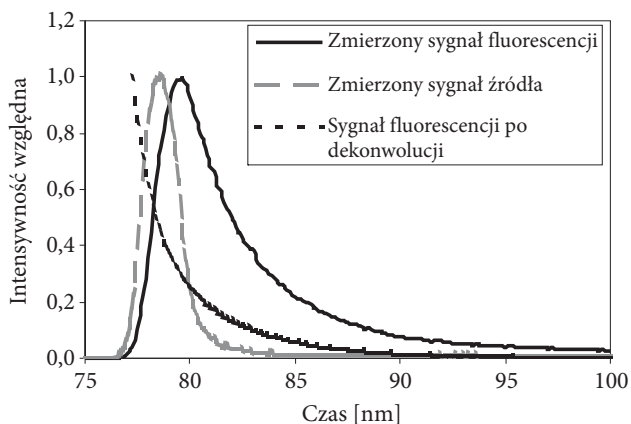
Na rysunku 8 zostały przedstawione charakterystyki spektralne filtrów w torze emisji. Ich zadanie sprowadza się do wyizolowania długości fali emisji fluorescencji od impulsu wzbudzającego.

Problem filtrów optycznych do badań fluorescencji został rozwiązany z chwilą pojawienia się na rynku filtrów firmy SEMROCK. Odcinają one sygnał promieniowania wzbudzającego na poziomie współczynnika transmisji 10^6 - 10^7 , a ich transmisja w paśmie badania emisji wynosi 80-90%. Możliwe jest dobranie filtru o szerokości od 10 do 80 nm. W przypadku badań materiałów biologicznych stosowano filtry FF340 (dla wzbudzenia 280 nm i FF435 (dla wzbudzenia 340 nm) o szerokości połowkowej około 50 nm, co odpowiada szerokości spektralnej pasm emisji. Na rysunku 8 podano charakterystykę filtrów optycznych w torze emisji.

Mierzone sygnały emisji składają się z widma fluorescencji i sygnału źródła wzbudzającego. W celu wyeliminowania sygnału LED konieczny jest pomiar charakterystyki emisyjnej samego źródła w identycznych warunkach pomiarowych (wzmocnienie detektora, wielkość szczelin). Natężenie promieniowania LED jest przynajmniej o kilka rzędów większe niż sygnał fluorescencji. Stąd zaszła konieczność opracowania szeregu filtrów szarych o różnej transmisji, których zadaniem było obniżenie natężenia źródła wzbudzenia do poziomu fluorescencji mierzonych substancji. Pozwoliło to na otrzymanie sygnału diod o natężeniu zbliżonym do pochodzących od próbek. W dalszym etapie jest to konieczne do przeprowadzenia procesu dekonwolucji. Filtry opracowano i wykonano w pracowni cienkich warstw Instytutu Optoelektroniki. Charakterystyka transmisyjna filtrów została przedstawiona na rysunku 7. Złożenie tych filtrów pozwala na tłumienie sygnału źródła na poziomie badanej fluorescencji.



Rys. 7. Charakterystyki spektralne optycznych filtrów transmissyjnych



Rys. 8. Ilustracja efektu dekonwolucji sygnału fluorescencji dla waty bawełniano-wiskozowej

4. Metoda dekonwolucji

W celu otrzymania właściwej wartości czasu życia fluorescencji należy wyznaczyć funkcję odpowiedzi urządzenia (ang. *Instrumental Response Function* — IRF). Jest nią charakterystyka emisyjna LED, która wpływa na przebieg krzywej zaniku fluorescencji. Spowodowane jest to ograniczoną rozdzielczością czasową (ang. *temporal width*) impulsu wzbudzającego i powoduje zniekształcenie właściwej wartości fluorescencji pochodzącej od próbki. Zjawisko to znane jest w literaturze jako konwolucja (spot).

Wylimowanie wpływu sygnału wzbudzenia polega na dokonaniu (obok pomiaru krzywej zaniku) pomiaru charakterystyki emisyjnej źródła. W miejsce próbki w komorze pomiarowej wstawia się ośrodek rozpraszający (np. teflon). Następnie wykonywana jest analiza uzyskanych wyników poprzez splot funkcji odpowiedzi urządzenia z funkcją modelową (może to być np. funkcja typu $1/e$), po czym splot ten zostaje porównany z krzywą zaniku uzyskaną doświadczalnie. Analiza przeprowadzana jest za pomocą procedury iteracji numerycznej do momentu uzyskania możliwie najlepszego dopasowania do doświadczalnej krzywej zaniku.

Zanik fluorescencji $I(t)$ pojedynczego fluoroforu znajdującego się w jednorodnym środowisku jest zazwyczaj opisywany jako pojedyncza funkcja wykładnicza zgodnie z równaniem (1). Jeżeli próbka zawiera więcej niż jeden fluorofor lub znajduje się w środowisku niejednorodnym, zanik fluorescencji będzie lepiej opisany jako suma funkcji wykładniczych:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \quad (1)$$

gdzie: τ_i — czasy życia różnych form fluorescencji;
 a_i — współczynniki przed eksponentyjalne odpowiadające udziałom poszczególnych składników.

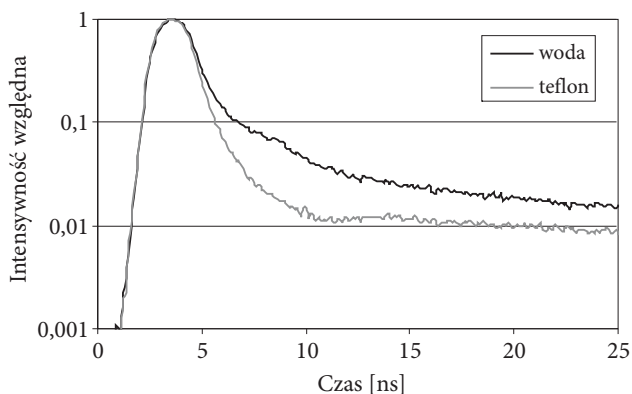
Krzywe zaniku opisane przez równanie (1) można zaobserwować tylko wtedy, gdy próbka zostanie wzbudzona przez nieskończenie wąski impuls. Jednak w większości wypadków szerokość impulsu pobudzenia nie może być zaniedbana i obserwowany rozkład $I_{obs}(t)$ będzie zniekształcony przez splot z funkcją odpowiedzi urządzenia $L(t)$ zgodnie z następującym równaniem:

$$I_{obs}(t) = \int_0^t L(t-s)D(s)ds. \quad (2)$$

Funkcja odpowiedzi urządzenia $L(t)$ może być określona doświadczalnie przez użycie roztworu rozpraszającego zamiast próbki. IRF określa kształt impulsu wzbudzenia dla czasowej odpowiedzi systemu detekcji. Pomiar intensywności fluorescencji w funkcji czasu wykonywany jest w stosunku do impulsu wzbudzającego LED. Gdy $I_{obs}(t)$ i $L(t)$ zostaną zmierzone, rozpoczyna się analiza danych polegająca na iteracji rozplotu (dekonwolucji) stosownie do równania (2). Rysunek 8 pokazuje przykładowy przebieg otrzymanych krzywych w typowym eksperymencie pomiaru zaniku fluorescencji materiału–celulozy.

Jednym z warunków poprawnie przeprowadzonej dekonwolucji jest uzyskanie rzeczywistej charakterystyki źródła wzbudzającego. Pierwsze eksperymenty, w których jako ośrodek rozpraszający stosowano wodne zawiesiny rozpraszaczy,

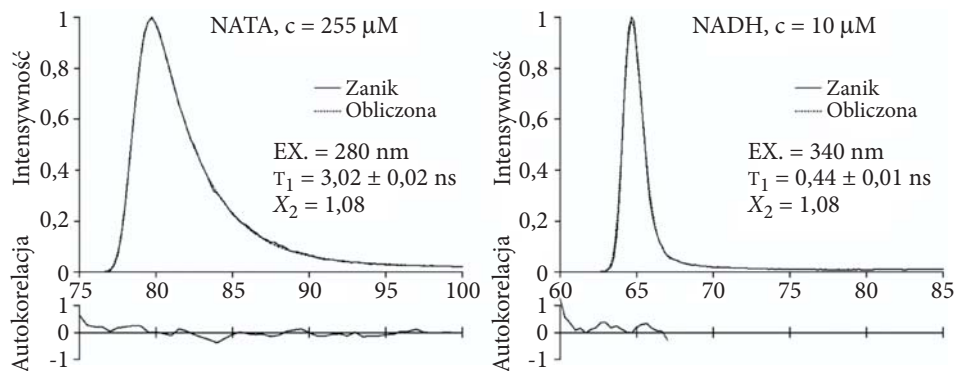
wykazały wydłużenie czasów życia emisji. Odpowiedzialna za to była woda, którą w kolejnych eksperymentach zastąpiono teflonem. Różnica pomiędzy własnościami tych ośrodków jest pokazana na rysunku 9.



Rys. 9. Porównanie sygnału diody rozproszonego na wodzie i teflonie

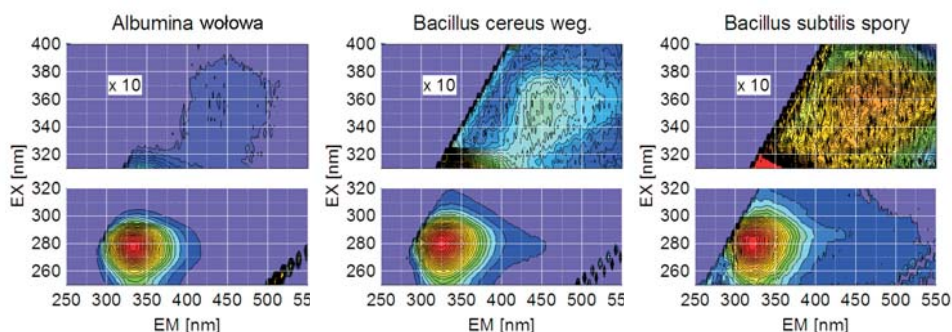
Na rysunku 10 zostały przedstawione przykłady zaniku krzywej fluorescencji dla amidu L-tryptofanu (NATA) oraz koenzymu (NADH). Wzorce te charakteryzują się monoekspotencjalnym zanikiem, a ich wartości są zgodne z wartościami literaturowymi wyznaczonymi za pomocą różnych metod. Dodatkowo poziom sygnału jest bardzo wysoki przy jednocześnie niskiej wartości szumu. Można również zaobserwować bardzo duży stopień dopasowania krzywej teoretycznej do doświadczalnej, co pokazuje, że wykorzystana metoda jest wiarygodna.

Na rysunku 11 przedstawiono przykłady map emisyjno-wzbudzeniowych (EM-EX) materiałów biologicznych, których czasy życia fluorescencji mogą być



Rys. 10. Krzywe zaniku fluorescencji substancji wzorcowych NATA i NADH

mierzone za pomocą techniki stroboskopowej. Charakterystyki były wyznaczone na spektrofluorymetrze FL900 firmy Edinbburgh Inst. Widać wyraźnie, że centra wzbudzenia substancji leżą w pobliżu długości fal 280 i 340 nm.



Rys. 11. Charakterystyki EM-EX wybranych substancji pochodzenia biologicznego

6. Podsumowanie

Metoda stroboskopowa z wykorzystaniem źródeł wzbudzenia typu LED UV (280 i 340 nm) idealnie nadaje się do wyznaczania czasowo-rozdzielczych charakterystyk emisyjnych fluoroforów zawartych w materiałach biologicznych. Może też znaleźć zastosowanie do charakterystyki materiałów mających pasma absorpcji w zakresie UV, w tym białek, bakterii, ich form przetrwalnikowych będących symulantami i interferentami bojowych środków biologicznych. Jest to technika alternatywna w stosunku do TC-SPC. Czasy życia fluorescencji są mierzalne na poziomie już od 0,2 milisekundy. W metodyce pomiarowej rozwiązano wiele problemów technicznych — dopasowanie wysokiej klasy pasmowych i tłumiących filtrów optycznych w torach wzbudzenia i emisji oraz sposób pomiaru sygnału źródła światła przed procesem dekonwolucji.

Podstawowe zalety metody to: szybkość, możliwość wykorzystania tanich źródeł wzbudzenia, wysoka czułość, prostota obsługi, modułowa budowa umożliwiająca szybką wymianę źródeł wzbudzenia. Pomiarzy czasów życia fluorescencji wzorców (NATA, NADH) wykazały identyczne wartości w stosunku do literaturowych.

Artykuł wpłynął do redakcji 15.04.2009 r. Zweryfikowaną wersję po recenzji otrzymano w listopadzie 2009 r.

LITERATURA

- [1] J. R. LAKOWICZ, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum, New York, 1999.
- [2] Y. CHEN, M. D. BARKLEY, *Towards understanding tryptophan fluorescence in proteins*, *Biochemistry* 37, 1998, 9976-9982.
- [3] C. D. MCGUINNES, K. SAGOO, D. MCLOSKEY, D. J. BIRCH, *A new sub-nanosecond LED at 280 nm: applications to protein fluorescence*, *Meas. Sci. Technol.*, 15, 2004, 19-22.
- [4] J. R. ALCALA, E. GRATTON, F. G. PRENDERGAST, *Interpretation of fluorescence decays in protein using continuous lifetime distribution*, *Biophys. J.*, 51, 1987, 925-936.
- [5] R. A. DALTERIO, H. W. NELSON, D. BRITT, J. F. SPERRY, J. F. TANGUAY, L. SUIB, *The steady-state and decay characteristics of primary fluorescence from live bacteria*, *Applied Spectroscopy*, 41, 1987, 234-241.
- [6] R. A. DALTERIO, H. W. NELSON, D. BRITT, J. F. SPERRY, D. PSARAS, J. F. TANGUAY, L. SUIB, *The steady-state and decay characteristics of protein tryptophan fluorescence from bacteria*, *Applied Spectroscopy*, 40, 1986, 86-90.
- [7] P. JONSSON, F. KULLANDER, M. NORDSTAND, T. TJARNHAGE, P. WASTERBY, M. LINDGREN, *Development of fluorescence-based point detector for biological sensing*, *Proc. SPIE*, 5617, 2004, 60-74.
- [8] A. ALIMOVA, A. KATZ, M. SIDDIGUE, G. MINKO, H. E. SAVAGE, M. K. SHAH, R. B. ROSEN, R. R. ALFANO, *Native fluorescence changes by bactericidal agents*, *IEEE Sensor Journal*, 5, 2005, 704-710.
- [9] P. VITTA, N. KURILCIK, A. NOVICKOVA, S. JURSENAS, H. ZALKAUSKAS, A. ZAKAUSKAS, R. GASKA, *ALGaN-based deep UV LEDs for fluorescence sensing*, *Proc. SPIE*, 5617, 2004, 249-260.
- [10] <http://www.pti-nj.com>
- [11] A. P. DEMCZENKO, *Ultrafiolet Spectroscopy of proteins*, Springer-Verlag, New York, 1981.
- [12] M. WŁODARSKI, M. KALISZEWSKI, M. KWAŚNY, Z. ZAWADZKI, K. KOPCZYŃSKI, Z. MIERCZYK, J. MŁYŃCZAK, E. TRAFNY, M. SZPAKOWSKA, *Fluorescence excitation-emission maps database of biological agents*, *Proc. SPIE*, 6398, 06-1-12, 2006.
- [13] R. G. BENNETT, *Instrument to Measure Fluorescence Lifetimes in the Millimicrosecond Region*, *Rev. Sci. Instr.*, 31, 1960, 1275.
- [14] D. R. JAMES, A. SIEMIARCZUK, W. R. WARE, *Stroboscopic optical boxcar technique for the determination of fluorescence lifetimes*, *Rev. Sci. Instr.*, 63, 1992, 1710-1716.

M. WŁODARSKI, M. KWAŚNY, M. KALISZEWSKI, B. RUTECKA

Application of stroboscopic technique for measurement of biological materials' fluorescence lifetimes. Pt. I. Basics of stroboscopic technique, instruments and methods

Abstract. Stroboscopic method for determination of fluorescence lifetimes, using 280-nm and 340-nm UV LED sources, may be used for characterization of biological substances — including simulants and interferents of Biological Warfare Agents (BWA). Main advantages of this method are: quickness of measurement, cheap UV sources, high sensitivity, simplicity of operation, modular construction allowing quick changing of sources. Principle of stroboscopic method, developed method of measurements and analysis of deconvolution process are presented in this work. Results of measurement of NATA and NADH standards correspond to data published by other authors.

Keywords: fluorescence lifetime, stroboscopic method, protein fluorescence, UV LED

Universal Decimal Classification: 535.37