



## Zastosowanie techniki stroboskopowej do pomiarów czasów życia fluorescencji materiałów biologicznych. Cz. II. Pomiary i analizy czasów życia symulantów i interferentów bojowych środków biologicznych

MAKSYMILIAN WŁODARSKI, MIROSŁAW KWAŚNY,  
BEATA RUTECKA, MIRON KALISZEWSKI

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

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono wyniki pomiarów czasów życia fluorescencji 9 materiałów, w tym 2 symulantów bojowych środków biologicznych, przy wzbudzeniu dwoma długościami fali — 280 nm i 340 nm. Analiza wyników wykazuje możliwość odróżniania symulantów od części interferentów. Jednakże badanie jedynie czasów życia fluorescencji nie wystarcza do pełnego rozróżniania symulantów od interferentów o zbliżonej budowie chemicznej.

**Słowa kluczowe:** endospory, analiza PCA, czas życia fluorescencji, metoda stroboskopowa

**Symbole UKD:** 535.37

### Wstęp

W pierwszej części artykułu zostały opisane: podstawy metody stroboskopowej, aparatura wykorzystywana w tej technice oraz metodyka pomiarów. W drugiej części zostaną przedstawione wyniki pomiarów czasów życia fluorescencji 9 materiałów, w tym 2 symulantów bojowych środków biologicznych (BSB), przy wzbudzeniu dwoma długościami fali — 280 nm i 340 nm. Przedstawione zostaną również wyniki analizy możliwości rozróżniania symulantów od interferentów BSB.

## 1. Charakterystyki emisyjne materiałów biologicznych

Czasem życia fluorescencji określa się czas, po którym poziom natężenia fluorescencji zmaleje  $e$ -krotnie w porównaniu do jej wartości początkowej. Czas życia związany jest z opóźnieniem powstającym pomiędzy absorpcją a emisją kwantów energii. Ośrodek wzbudzony krótkim impulsem promieniowania emituje fluorescencję o natężeniu zmieniającym się w czasie zgodnie z zależnością:

$$I(t) = I_0 \exp(-t / \tau),$$

gdzie:  $I_0$  — natężenie fluorescencji dla  $t = 0$ ;  
 $\tau$  — czas życia fluorescencji.

Fluorescencyjny czas życia  $\tau$  cząsteczki na poziomie wzbudzonym jest zależny od otoczenia. Jego pomiar może nam dostarczyć wielu interesujących informacji na temat mechanizmów przebiegu chemicznych bądź biochemicznych reakcji. Na czas życia fluorescencji mają wpływ następujące czynniki:

- parametry środowiska, w którym znajdują się cząsteczki (lepkość, pH, temperatura, polarność),
- rozmiar oraz kształt cząsteczek badanej próbki, jak również szybkość ruchów molekularnych w otoczeniu cząsteczki,
- udział poszczególnych cząsteczek w składzie mieszaniny.

Źródłem endogennej fluorescencji w komórkach i tkankach biologicznych są aminokwasy aromatyczne, służące do budowy białek oraz koenzymy. Spośród 20 aminokwasów, z których zbudowane są białka jedynie tryptofan (TRP), tyrozyna (TYR) i fenyloalanina (PHE) wykazują fluorescencję w obszarze UV. Wydajność kwantowa fluorescencji TYR jest zbliżona do TRP, widmo emisji TYR jest węższe, co daje złudzenie silniejszej emisji. W naturalnych białkach fluorescencja TYR jest często gaszona, a powodem są oddziaływania z łańcuchami peptydowymi lub transfer energii do TRP. Gdy jedna lub dwie reszty TRP są obecne w białkach, fluorescencja pochodząca od TYR stanowi jedynie około 10% całkowitej emisji, a udział fluorescencji PHE można pominąć. Emisję PHE można zaobserwować jedynie w przypadkach nieobecności TYR i TRP, co zdarza się bardzo rzadko. Parametry emisji TRP są bardzo czułe na lokalne zmiany właściwości środowiska, stąd często są wykorzystywane do badania zmian konformacyjnych białek. Obserwowane przesunięcia widmowe są wynikiem takich procesów, jak wiązanie ligandów czy asocjacja protein. Czasy życia fluorescencji TRP w zależności od różnych warunków środowiska zmieniają się od 1 do 6 ns [1, 11]. Jest to jedna z przyczyn występowania składowych o różnym czasie życia przy badaniach zaniku fluorescencji w czasie. Do drugiej grupy fluoryzujących endogennych związków

należą następujące koenzymy: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinowy (FMN). Koenzymy te współdziałają z oksyreduktazami, ich zadaniem jest przenoszenie protonów i elektronów. Silnie fluorescencyjne właściwości wykazuje NADH, mający maksima absorpcji i emisji przy długościach fal 340 i odpowiednio 460 nm, przy czym forma utleniona koenzymu —  $\text{NAD}^+$  nie fluoryzuje.

Czas życia fluorescencji NADH w wodnych, obojętnych roztworach wynosi około 0,4 ns [1, 5]. W roztworach fluorescencja związku jest częściowo gaszona przez zderzenia z cząsteczkami adeniny. Podczas wiązania NADH do protein wydajność kwantowa fluorescencji wzrasta czterokrotnie, a czas życia fluorescencji osiąga wartość 1,2 ns [5].

Koenzymy FAD i FMN oraz witamina  $\text{B}_2$  (różni się od FMN jedynie brakiem reszty fosforanowej) absorbują światło o długości fali około 450 nm, a emisja występuje przy długości fali około 530 nm. W przeciwieństwie do NADH, jedynie forma utleniona wykazuje fluorescencję. Typowe czasy życia dla FMN i FAD wynoszą odpowiednio 4,7 i 2,6 ns [1, 5].

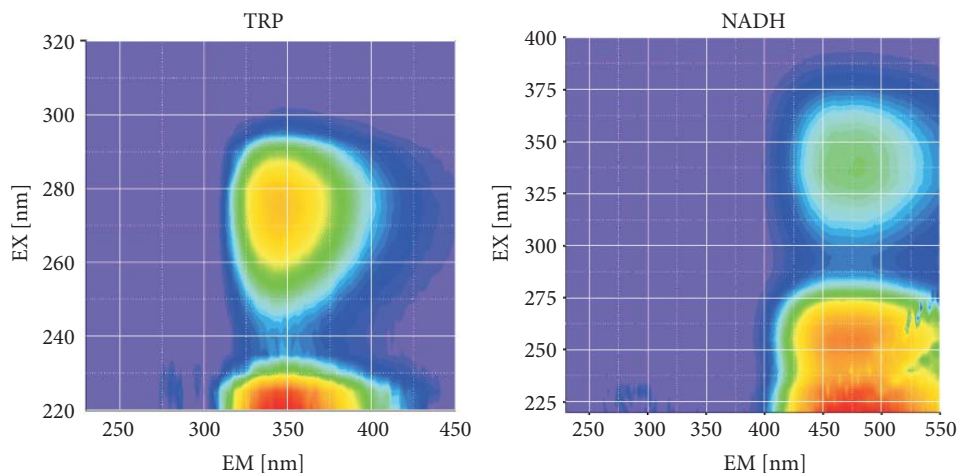
Parametry fluorescencji wymienionych związków chemicznych przedstawiono w tabeli 1 [1, 11].

TABELA 1

Maksima wzbudzenia i emisji oraz czasy zaniku niezwiązanych fluoroforów bakteryjnych w pH neutralnym

Związek	Wzbudzenie [nm]	Emisja [nm]	Czas życia (ns)	Ref.
Fenylalanina	260	282	6,8	11
Tyrozyna	275	304	3,6	11
Tryptofan	280	340	0,79 (12%), 3,06	5
NADH	346	457	0,48	5
Kwas foliowy	361	442	1,60 (12%), 4,78	5
Pteryna	353	440	4,79	5
Biopteryna	358	360	5,45	5
Lumazyna	331	373	6,57	5
FMN	467	520	4,66	5
FAD	467	520	2,63 (49%), 4,68	5

Dla materiałów biologicznych typu żywych bakterii lub ich form przetrwalnikowych charakterystyczne są dwa obszary wzbudzenia i emisji, zwane potocznie obszarem tryptofanu (I obszar) i NADH (II obszar). Na rysunku 1 przedstawiono przykłady charakterystyk wzbudzeniowo-emisyjnych tryptofanu i NADH.



Rys. 1. Mapy EX-EM tryptofanu (TRP) i NADH

## 2. Materiały i metodyka

Spory techniczne *Bacillus athropheus* (BGst) i *Bacillus thuringensis* (BTst) otrzymano z PVT (Finnish Defence Forces Technical Research Centre). Pyłki zostały zakupione w Duke Scientific Corporation. Białka zakupiono w firmie Sigma-Aldrich. Próbkę sproszkowanej substancji umieszczano pomiędzy płytkami kwarcowymi, ściskano na prasie ręcznej i brzegi płytek klejono. Gotową próbkę o grubości około 0,1 mm umieszczano w komorze pomiarowej pod kątem padania promieniowania wzbudającego 30°. Emisja była mierzona z powierzchni czołowej płytek pod kątem 60°, zapewniło to identyczne i powtarzalne warunki pomiaru. Ponadto metoda ta eliminuje efekt tzw. filtru wewnętrznego, tj. absorpcję promieniowania wzbudającego i emitowanego wewnątrz próbki. Materiał nikotyny ekstrahowano etanolem z filtru papierosowego i roztwór umieszczano w kuzetce kwarcowej o grubości 1 mm. Pomiar przeprowadzono w identycznych warunkach jak dla płytek kwarcowych.

TABELA 2

Lista symulantów i interferentów BSB

Materiał	Skrót	Typ
Albumina kurza	HSA	Interferent, symulant
Albumina ludzka	BSA	Interferent, symulant
Agar	AGA	Interferent
Ragweed pyłek	RAG	Interferent

cd. tabeli 1

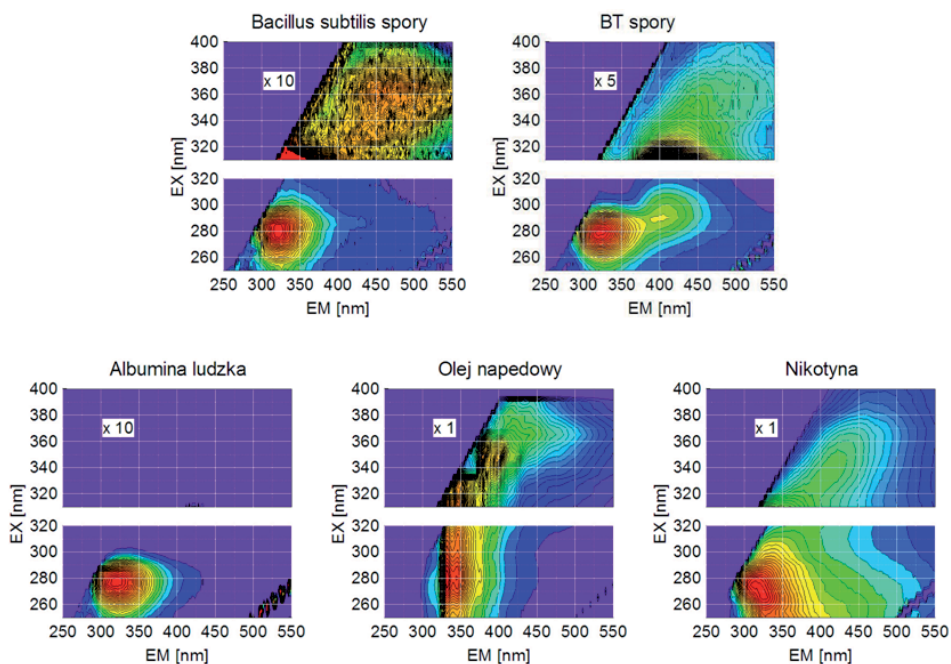
Kukurydza pyłek	COR	Interferent
Nikotyna	NIC	Interferent
Olej napędowy	FUE	Interferent
B. atropaeus spory	BGst	Symulant
B. thuringensis spory	BTst	Symulant

### 3. Pomiar czasu życia fluorescencji

Pomiary zaników fluorescencji wykonane zostały za pomocą systemu „EasyLife S” Photon Technology International. Układ został przedstawiony na rysunku 2. Krzywe zaniku były uśredniane z 5-10 pomiarów. Zastosowano dwie długości fali wzbudzenia — 280 nm (pasmo I) i 340 nm (pasmo II). Długości fal odpowiadają maksimum wzbudzenia bakterii wegetatywnych i ich form przetrwalnikowych (sporów). Przykładowe charakterystyki wzbudzeniowo-emisyjne symulantów i interferentów BSB zostały przedstawione na rysunku 3. W celu wyizolowania długości fali emisji zastosowano optyczne filtry interferencyjne firmy Semrock: FF01-300/LP (pasmo I) i FF01-435/40 (pasmo II).



Rys. 2. Widok systemu EasyLife ze źródłem wzbudzenia



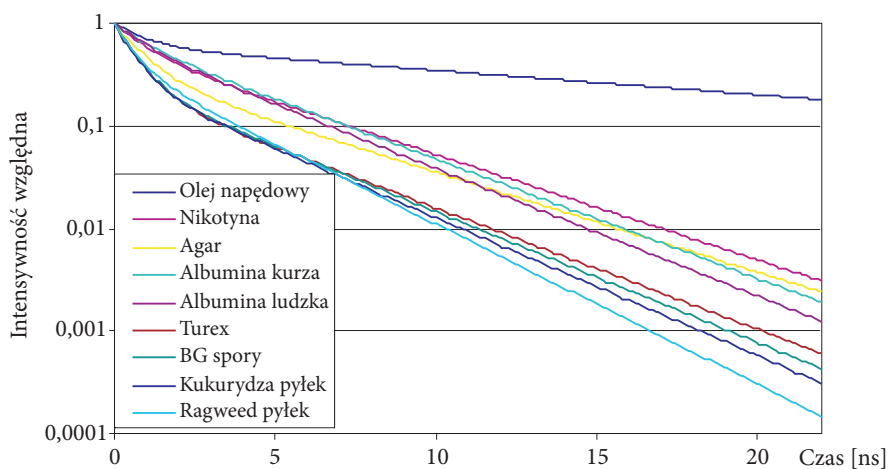
Rys. 3. Mapy EM-EX symulantów i interferentów BSB [12]

#### 4. Wyniki i dyskusja

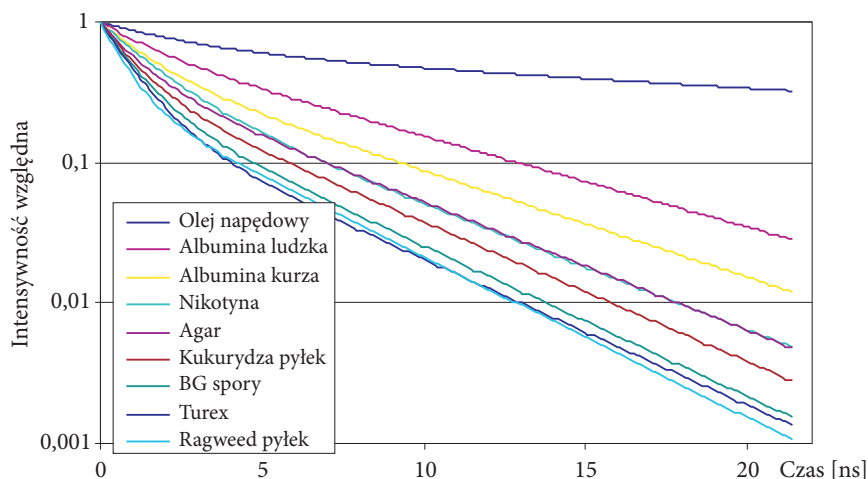
Krzywe zaniku fluorescencji po procesie dekonwolucji oznaczanych materiałów przedstawiono na rysunkach 4 i 5, a w tabeli 3 obliczone czasy życia fluorescencji ( $\tau$  — czas życia,  $\alpha$  — zawartość procentowa składnika o tym czasie w całym sygnale). Nazwy materiałów w legendzie wykresów zostały uszeregowane zgodnie z malejącym czasem zaniku fluorescencji. (Na górze — najdłuższy czas zaniku, na dole — najkrótszy).

Dla wzbudzenia przy 280 nm czasy życia sporów bakterii mieszczą się w dwóch zakresach: 0,64-1,03 ns dla krótkożyjącego i 3,41-4,18 ns dla długożyjącego składnika. Wyniki te są zgodne z uzyskanymi przez Alimową i wsp. [8] i dwa razy niższe od zmierzonych za pomocą metody TC-SPC [5-7]. Najszybszy zanik fluorescencji wykazują pyłki i spory bakterii. Odróżniają się przy tym widocznie od białek, pożywki do hodowli bakterii i pozostałych interferentów. Przy wzbudzeniu 280 nm długożyjący składnik pyłków ma najkrótszy czas życia (2,78 i 3,23 ns). Przy wzbudzeniu 340 nm czas życia fluorescencji pyłków jest zbliżony do bakterii.

Z rysunków 4 i 5 wynika, że dla każdej substancji istnieje charakterystyczny przebieg krzywych zaniku fluorescencji. Do badania podobieństw krzywych zaniku oraz możliwości rozróżniania materiałów biologicznych zastosowano analizę głównych składowych (PCA — *Principal Components Analysis*). Jest to metoda redukcji



Rys. 4. Krzywe zaniku fluorescencji po dekonwolucji, wzbudzenie 280 nm



Rys. 5. Krzywe zaniku fluorescencji po dekonwolucji, wzbudzenie 340 nm

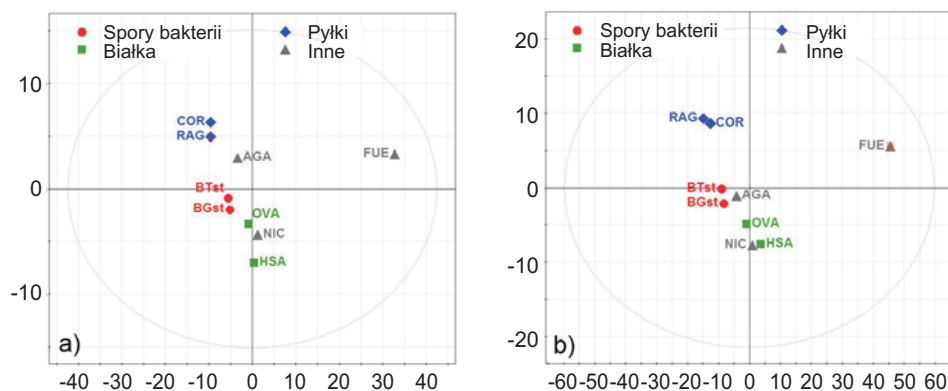
liczby zmiennych w wielowymiarowej przestrzeni danych. Celem PCA jest opisanie danych za pomocą mniejszej, nieskorelowanej liczby zmiennych (głównych składowych), opisujących jak największy zakres zmienności danych w zbiorze. Elementy podobne będą położone blisko siebie w nowej przestrzeni zmiennych.

Analiza ta wykonana została przy użyciu oprogramowania SIMCA-P 11.5 firmy Umetrics. Wyniki uzyskane za pomocą PCA przedstawiono na rysunku 6. Przy wzbudzeniu 280 nm widać podobieństwo bakterii w obrębie grupy. Pyłki również oddzielają się jako grupa. Nie ma natomiast wyraźnej separacji pomiędzy bakteriami a białkami i pożywką (AGA). Wynika to z tego, że bakterie są zbudowane z białek,

TABELA 3

Czasy życia fluorescencji szybkiego i wolnego składnika materiałów biologicznych uzyskane za pomocą techniki stroboskopowej.

Nazwa	Wzbudzenie [nm]	Czasy życia				
		$\tau_1$ [ns]	$\alpha_1$ [%]	$\tau_2$ [ns]	$\alpha_2$ [%]	$\chi^2$
Albumina kurza	280	0,93	47,52	3,73	52,48	1,33
Albumina kurza	340	1,40	60,64	5,76	39,36	1,41
Albumina ludzka	280	0,95	46,66	3,49	53,34	1,15
Albumina ludzka	340	1,34	51,03	6,58	48,97	1,32
Agar	280	0,85	74,05	4,45	25,95	1,20
Agar	340	1,10	72,88	4,76	27,12	1,24
Ragweed pyłek	280	0,57	92,40	2,78	7,60	1,69
Ragweed pyłek	340	0,75	90,00	3,80	10,00	1,66
Kukurydza pyłek	280	0,62	92,97	3,23	7,03	1,14
Kukurydza pyłek	340	1,02	80,04	4,38	19,96	0,99
Nikotyna	280	0,89	57,95	4,23	42,05	1,25
Nikotyna	340	1,52	63,69	4,87	36,31	1,22
Olej napędowy	280	0,92	43,30	18,30	56,70	1,13
Olej napędowy	340	2,82	41,20	32,24	58,80	0,92
BG spory	280	0,64	83,36	3,41	16,64	1,47
BG spory	340	1,01	80,51	4,06	19,49	1,26
BT spory	280	0,67	85,24	3,67	14,76	1,54
BT spory	340	1,03	80,70	4,18	19,30	1,41



Rys. 6. Wyniki analizy PCA: a) EX = 280 nm; b) EX = 280 + EX = 340 nm



a dodatkowo spory techniczne zawierają dodatek pożywki. Po dodaniu do analizy fluorescencji wzbudzonej przy 340 nm widać jeszcze większe zbliżenie pożywki do bakterii. W obu przypadkach olej napędowy oddziela się wyraźnie od reszty materiałów, ponieważ bardzo różni się od reszty budową chemiczną.

## 5. Wnioski

Dla badanych sporów bakterii metoda ta dostarcza podobnych wyników do tych uzyskanych za pomocą kamery smugowej lub oscyloskopu. Jednak w zestawieniu z metodą TC-SPC dostarcza dwukrotnie krótszych czasów życia. Rozróżnienie materiału biologicznego na podstawie jedynie krzywych zaniku dla dwóch długości fali wzbudzenia i emisji jest bardzo trudne. Analiza krzywych zaniku fluorescencji metodą PCA umożliwia rozróżnienie różnych rodzajów substancji. Różnorodność dotychczas użytego materiału badawczego jest zbyt mała, aby można było sformułować opinię o przydatności tej metody do biodetekcji. Jednakże, wstępne badania wykazały, że jej możliwości mogą być ograniczone z uwagi na zbyt małe różnice czasów życia fluorescencji interferentów i symulantów BSB. Następnym rozszerzeniem możliwości detekcyjnych będzie metoda analizy połączonych widm fluorescencji i czasów życia.

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.

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

**Application of stroboscopic technique for measurement of biological materials' fluorescence lifetimes. Pt. II. Measurement and analysis of fluorescence lifetimes of biological warfare agents' simulants and interferents**

**Abstract.** Fluorescence lifetime measurements of 9 materials, including 2 biological warfare agents' simulants, are presented. Measurements were made using 2 excitation wavelengths — 280 nm and 340 nm. Analysis of results shows the possibility of discrimination of simulants from interferents. However, fluorescence lifetimes data alone is not sufficient for separation of simulants from interferents with similar chemical structure.

**Keywords:** endospores, PCA, fluorescence lifetimes, stroboscopic method

**Universal Decimal Classification:** 535.37