

PRACOWNIA PODSTAW BIOFIZYKI

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów III roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

Badanie wygaszania fluorescencji SPQ przez jony chloru – pomiary stacjonarne i czasowo-rozdzielcze (PB18d)



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



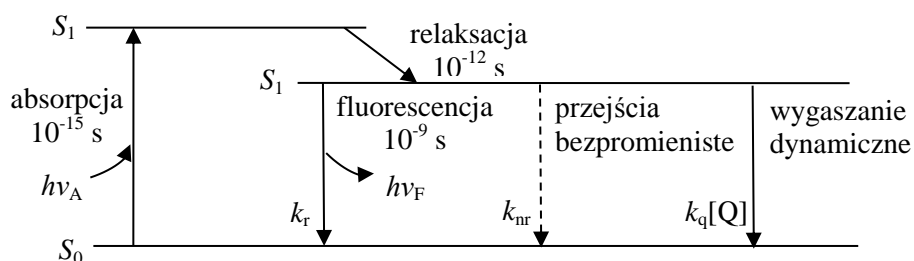
Projekt *Fizyka wobec wyzwań XXI wieku* współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

I. Wstęp

Celem ćwiczenia jest określenie mechanizmu wygaszania fluorescencji 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ) przez jony chloru. Zastosujesz w tym celu metody fluorescencji stacjonarnej i czasowo-rozdzielczej.

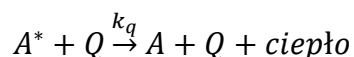
I.1. Wygaszanie dynamiczne i statyczne

Pojęcie wygaszania fluorescencji odnosi się do wszystkich procesów powodujących zmniejszenie natężenia fluorescencji danej substancji. Do procesów tych należą reakcje zachodzące w stanie wzbudzonym, bezpromieniste przeniesienie energii, tworzenie kompleksów (wygaszanie statyczne) oraz wygaszanie kolizyjne (dynamiczne). W dalszej części instrukcji skoncentrujemy się na dwóch ostatnich typach wygaszania.



Rysunek 1. Schemat Jabłońskiego przedstawiający procesy absorpcji, relaksacji rozpuszczalnikowej i fluorescencji, uwzględniający wygaszanie dynamiczne. Dla uproszczenia zaznaczono tylko pierwszy singletowy stan wzbudzony S_1 i nie uwzględniono poziomów oscylacyjnych ani elektronowych stanów tripletowych. k_r i k_{nr} to stałe szybkości odpowiednio emisji fluorescencji i procesów bezpromienistych (na schemacie wszystkie możliwe procesy bezpromieniste zostały scharakteryzowane przez jedną stałą szybkości k_{nr}), a k_q to bimolekularna stała wygaszania.

W przypadku **wygaszania dynamicznego** dochodzi do kontaktu wygaszacza (Q) z fluoroforem będącym w stanie wzbudzonym (A^*), po którym fluorofor powraca do stanu podstawowego bez emisji fotonu:



gdzie k_q to bimolekularna stała wygaszania, proporcjonalna do dyfuzyjnie kontrolowanej bimolekularnej stałej szybkości k_0 . Efektywność wygaszania zależy od stężenia wygaszacza [Q] oraz od szybkości wzajemnej dyfuzji cząsteczki emitującej i wygaszacza, określonej stałą szybkości k_0 .

Jak wynika ze schematu Jabłońskiego przedstawionego na Rys. 1, stosunek wydajności kwantowych, a co za tym idzie proporcjonalnych do nich natężeń fluorescencji bez i w obecności wygaszacza wyraża zależność:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\frac{k_r}{k_r + k_{nr}}}{\frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_q[Q]}} = \frac{k_r + k_{nr} + k_q[Q]}{k_r + k_{nr}} = 1 + \frac{k_q}{k_r + k_{nr}}[Q] \quad (1)$$

gdzie F_0 i F to natężenia fluorescencji odpowiednio bez i w obecności wygaszacza, a k_r i k_{nr} to stałe szybkości odpowiednio emisji fluorescencji i procesów bezpromienistych.

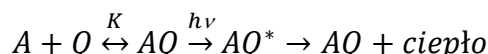
Pamiętając, że czas życia fluorescencji jest odwrotnością sumy wszystkich stałych szybkości prowadzących do depopulacji stanu wzbudzonego, równanie (1) można przedstawić w postaci:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad (2)$$

gdzie $\tau_0 = (k_r + k_{nr})^{-1}$ i $\tau = (k_r + k_{nr} + k_q[Q])^{-1}$ są czasami życia odpowiednio bez i w obecności wygaszacza, a $K_{SV} = k_q\tau_0$ to stała wygaszania Sterna-Volmera.

Równanie (2) jest nazywane **równaniem Sterna-Volmera**. Wynika z niego, że zależność F_0/F oraz τ_0/τ w funkcji stężenia wygaszacza jest liniowa. Stała K_{SV} jest miarą „wrażliwości” fluoroforu wobec wygaszacza.

W przypadku **wygaszania statycznego** powstający w stanie podstawowym kompleks fluorofor-wygaszacza nie posiada właściwości fluorescencyjnych:



gdzie $K = \frac{[AQ]}{[A][Q]}$ to równowagowa stała asocjacji dla „ciemnego” kompleksu AQ.

Korzystając z definicji stałej asocjacji oraz z faktu, że natężenie fluorescencji w obecności wygaszacza jest proporcjonalne do stężenia nieskompleksowanych fluoroforów ($[A] = [A_0] - [AQ]$) otrzymujemy wyrażenie opisujące stosunek natężeń fluorescencji bez i w obecności wygaszacza:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] \quad (3)$$

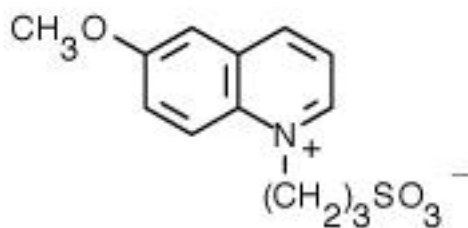
Zależność F_0/F od stężenia wygaszacza jest identyczna jak w przypadku wygaszania dynamicznego (równanie 2). Inna jest jedynie interpretacja czynnika stojącego przy $[Q]$: stała wygaszania K_{sv} z wyrażenia (2) została zastąpiona przez stałą asocjacji K w (3). Pomiary zmian natężenia fluorescencji zachodzących pod wpływem wygaszacza nie są więc wstanie rozstrzygnąć, z którym typem wygaszania mamy do czynienia. Dopiero znajomość czasów życia w bez i obecności wygaszającego ligandu pozwala na określenie mechanizmu wygaszania. Z równania (2) wynika, że dla wygaszania dynamicznego $\frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau}$. Z kolei w przypadku wygaszania statycznego oddziaływanie wygaszacza z cząsteczką emitującą

zachodzi w stanie podstawowym i nie wpływa na czas życia jej stanu wzbudzonego i związku z tym $\frac{\tau_0}{\tau} = 1$.

Wiele małych cząsteczek lub jonów może powodować wygaszanie dynamiczne. Wśród nich należy wymienić tlen, jony Cl^- czy I^- oraz akrylamid. Badania dostępności fluoroforów dla tych wygaszaczy mogą być wykorzystane do określenia położenia fluoryzujących grupy w makromolekule.

I.2. SPQ – fluorescencyjny wskaźnik stężenia jonów chloru

6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ) jest sondą fluorescencyjną, której emisja jest wygaszana przez jony chloru (prawdopodobnie na skutek fotoindukowanego przeniesienia elektronu). W związku z tym SPQ jest wykorzystywana w celu określania wewnątrzkomórkowej zawartości jonów Cl^- .



Rysunek 2. Wzór strukturalny 6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)quinolinium (SPQ)

Podczas ćwiczenia zbadasz wpływ stężenia KCl (źródło jonów Cl^-) na natężenie fluorescencji i czasy życia wodnego roztworu SPQ i na podstawie przeprowadzonych pomiarów określisz mechanizm wygaszania.

II. Wymagania do kolokwium wstępnego

1. Zjawisko absorpcji i emisji promieniowania elektromagnetycznego
2. Fluorescencja, widma emisji fluorescencji, zaniki fluorescencji, wydajność kwantowa i czas życia, analiza zaników fluorescencji
3. Wygaszanie statyczne i dynamiczne, równanie Sterna-Volmera, stała wygaszania

III. Przebieg ćwiczenia

Podczas ćwiczenia wykonasz pomiary widm emisji fluorescencji oraz zaników fluorescencji wodnych roztworów SPQ z różną zawartością KCl. Pomiary widm stacjonarnych przeprowadzisz na spektrofluorymetrze Cary-Eclipse (Agilent), a czasy życia

wyznaczysz za pomocą fluorymetru czasowo-rozdzielczego FT300 (PicoQuant), wykorzystującego metodę skorelowanego w czasie zliczania pojedynczych fotonów.

Masz do dyspozycji:

- wodny roztwór SPQ
- wodę dejonizowaną
- 100 mM KCl w wodzie
- wodny koloidalny roztwór krzemionki (Ludox)
- parę kwarcowych kuwet absorpcyjnych o długości drogi optycznej 1 cm
- kwarcową kuwetę fluorescencyjną o długości drogi optycznej 1 cm

1. Przygotuj roztwory SPQ z różniące się zawartością KCl: 0, 10, 20, 30 i 40 mM
2. Zarejestruj widmo absorpcji wyjściowego roztworu SPQ w zakresie 250-450 nm używając spektrofotometru. Jakie jest położenie maksimum widma absorpcji? Wyznacz stężenie SPQ (współczynnik ekstynkcji SPQ w 344 nm wynosi $\epsilon(344) = 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).
3. Zarejestruj widma emisji fluorescencji wszystkich roztworów z pkt.1 w zakresie 360-620 nm. Na podstawie widma absorpcji wybierz odpowiednią długość fali wzbudzenia. Gdzie zaobserwowałeś maksima widm emisji? Odczytaj wartości natężenia fluorescencji w maksimum dla poszczególnych próbek.
4. Zmierz zaniki fluorescencji dla poszczególnych próbek z pkt. 1. Na podstawie zmierzonych widm absorpcji i emisji, wybierz odpowiednie źródło wzbudzenia i długość fali obserwacji. Nie zapomnij o pomiarach funkcji odpowiedzi aparatury (IRF). Użyj w tym celu roztworu rozpraszacza (Ludox). Jakie długości fali wzbudzenia i emisji należy wybrać przy pomiarach IRF?
5. Dokonaj analizy uzyskanych zaników w programie FluoFit w celu wyznaczenia czasów życia dla poszczególnych próbek. Zastosuj rekonwolucję dla modelu eksponentyjnego.

IV. Opis końcowy

Opis końcowy powinien zawierać poszczególne elementy charakterystyczne dla raportu z przebiegu eksperymentu (streszczenie, wstęp teoretyczny, opis układu doświadczalnego oraz wyniki i ich dyskusję).

Uzyskane wyniki powinny zostać udokumentowane za pomocą czytelnych tabel i wykresów. Zaniki fluorescencji należy opracować korzystając z programu FluoFit.

Opracowanie wyników powinno uwzględniać następujące zagadnienia:

1. Wykonanie wykresów zależności F_0/F oraz τ_0/τ w funkcji stężenia $[Cl^-]$
2. Określenie mechanizmu wygaszania fluorescencji SPQ przez jony chloru
3. Wyznaczenie stałej wygaszania Sterna-Volmera K_{sv} oraz bimolekularnej stałej wygaszania k_q
4. Porównanie wartości k_q z wartością dyfuzyjnie kontrolowanej bimolekularnej stałej szybkości k_0 w wodzie ($k_0 = 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)

V. Literatura

1. „Podstawy spektroskopii molekularnej”, Z. Kęcki, PWN 1998
2. „Biospektroskopia” cz. 3, pod redakcją J. Twardowskiego, PWN 1989
3. „Principles of fluorescence spectroscopy”, J.R. Lakowicz
4. „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”, red. Z. Józwiak i G. Bartosz, PWN 2007
5. Instrukcja do ćwiczenia PB16 „Pomiary zaników fluorescencji wybranych barwników”, A. Modrak-Wójcik