

**Sestavení a zprovoznění aparatury pro  
měření fluorescenčních spekter jednotlivých  
molekul**

Fessler T. (2006): Sestavení a zprovoznění aparatury pro měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul [The Assembly and start-up of a single molecule fluorescence spectroscopy device; in Czech]. Diploma thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** The Assembly and start-up of a single molecule fluorescence spectroscopy device, the operation quality was verified by methodical experiments on single molecule of DIOC, chlorophyll and a single complex of photosystem I.

Tuto práci jsem vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury.  
V Českých Budějovicích 1.5.2006

Tomáš Fessler

## **Poděkování**

Děkuji všem, kdo mi v průběhu této práce jakkoliv pomohli. Především děkuji RNDRr. Františku Adamcovi, CSc. za neocenitelné rady a podnětné vedení, svému školiteli Doc. RNDr Františku Váchovi, Ph.D. za poskytnuté zázemí. Dále děkuji Doc. RNDr. **Janu** Valentovi, Ph.D. za změřením tloušťky vrstev a v neposlední Mgr. Miroslavě Herbstové za poskytnutí vzorků biologického materiálu.

## Obsah

<b>Použité zkratky</b> .....	0
<b>Cíl Práce</b> .....	1
<b>Úvod</b> .....	3
Teoretický úvod.....	3
Základní princip.....	3
Velikost signálu v spektroskopii jednotlivých molekul.....	4
Obecné faktory limitující spektroskopická měření.....	5
Šum.....	6
Poměr signálu k šumu a signálu z pozadí.....	7
Technika měření SMS.....	8
Detektory.....	11
Dvou-dimenzionální řádkové CCD detektory.....	12
Konfigurace mikroskopu.....	13
Skenovací metody.....	13
Konfokální mikroskopie.....	13
Near-field skenovací optická mikroskopie.....	13
Metody wide-field.....	14
Epifluorescence.....	16
Totální reflexe.....	17
Metody těsně související se spektroskopií jednotlivých molekul....	19
Polarizační mikroskopie.....	19
Spektrální disperze emise.....	21
Fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET.....	22
Dvou-fotonová excitace.....	23
Časově závislé dynamické studie.....	24
Měření doby života fluorescence.....	25
<b>Experimentální část, materiál a metody</b> .....	26
Popis a schéma aparatury.....	27
Kalibrace spektrofotometru.....	27
Příprava vzorků.....	28
Použitý materiál.....	29
<b>Výsledky</b> .....	30
Kalibrace spektrofotometru TRIAX 332 (JOBIN YVON).....	30
Základní výpočty parametrů aparatury a emise chlorofylu a.....	31

## Použité zkratky:

ADC	analog-digitální převodník
CCD	čip typ součásti detektoru pro získání spekter a zobrazování
Cy5	laserová barva
DIOC	laserová barva 3,3'Diethyloxakarbocyanin jodid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie
FWHM	plné šířky v polovině maxima
GFP	zelený fluoreskující protein
MHCII	vazebný protein pro T-buňky
NA	numerická apertura
NSOM nebo SNOM	Near-field skenovací optická mikroskopie
OD	neutrální filtr
PMMA	polymetyl metakrylát
PMT	mikrokanálovým fotonásobičem
PVA	polyvinyl alkohol
RNA	ribonukleová kyselina
SBR	poměr signálu k pozadí
SMS	spektroskopie jednotlivých molekul
SNR	poměr signálu k šumu
SPAD, APD	lavinové fotodiody
SPCD	zařízení detekující jednotlivé fotony
TIR	totální odraz

## Cíl práce

Cílem práce bylo aktivně se podílet na sestavení a zprovoznění aparatury pro měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul. Dále provést metodické experimenty, které povedou k ověření funkčnosti aparatury.

## Úvod

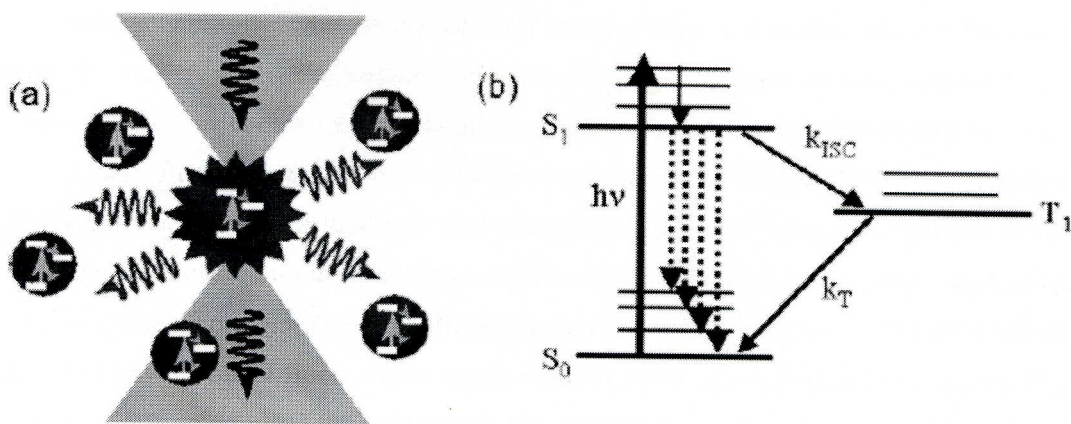
Současný vývoj ve fluorescenční mikroskopii umožňuje detekci, zobrazování a spektroskopii jednotlivých molekul za pokojové teploty. Jako důsledek tohoto vývoje se SMS, spektroskopie jednotlivých molekul (z anglického Single Molecule Spectroscopy) přiblížila z oblasti studií v kryogenních k hranici environmentálních podmínek. Byly odkryty dynamické vlastnosti biomolekul a molekulárních motorů, které se dosud skrývaly v průměru. V mnoha případech je nyní možné získat přímou informaci o distribuci fyzikálních veličin molekuly namísto průměrné informace z měření velkého souboru molekul. SMS je dynamicky se rozvíjející odvětví spektroskopie, které v současnosti významně pomohlo na poli výzkumu např. DNA transkripce, enzymatických reakcí, proteinové dynamiky a buněčné signalizace.<sup>1</sup>

## Teoretický úvod

### Základní princip

Pro fluorescenci jednotlivých molekul platí dva základní předpoklady. V rezonanci s excitačním zdrojem musí být skutečně pouze jedna molekula. Druhým je dobrý poměr signálu k šumu SNR (z anglického signal to noise ratio).

Pro měření za pokojových teplot je rezonance jedné konkrétní molekuly dosahována fokusací laserové sondy na malý objem vzorku ( $1 - 100 \mu\text{m}^3$  a ještě méně, až k  $10^{-4} \mu\text{m}^3$  pro metody near-field). Podstatná je také čistota použitých chemikálií, např. redestilovaná voda a důkladně přečištěná základní matrice. Velmi důležitý je i výběr nejnižší možné koncentrace molekul. Výběr koncentrace se řídí podle vlastností molekul, velikosti laserové sondy a vybrané techniky studia vzorku. Například pro kapalný vzorek dostačuje při pokojové teplotě a objemu sondy  $10 \mu\text{m}^3$  koncentrace vzorku  $10^{-10} \text{mol/l}$ , aby se v rezonanci s laserem vyskytovala právě jedna molekula. Seleční proces je zachycen na obrázku 1, kde fokusovaný paprsek laseru selektuje právě jednu molekulu, která emituje fotony, ty následně detekujeme.



Obrázek 1: a) Schéma oblasti fokusu laseru (trojúhelníky). Ve středu schématu je molekula v rezonanci, která absorbuje foton z laserového paprsku a následně foton emituje.

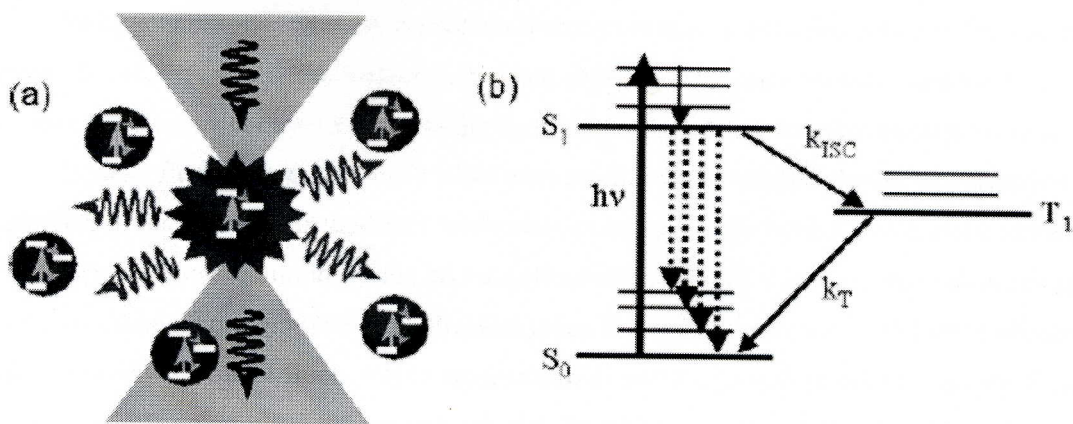
b) Tří-hladinové schéma typické organické molekuly.  $S_0$  – základní singletní stav,  $S_1$  – první excitovaný singlet,  $T_1$  nejnižší tripletní stav nebo jiný přechodný stav. Pro každý elektronový stav jsou znázorněny vibrační přechody. Pumpování fotony o energii  $h\nu$  povolený dipólový přechod singlet – singlet.  $k_{ISC}$  – rychlostní konstanta nezářivého přechodu  $S_1$ - $T_1$ )  $k_T$  - rychlostní konstanta zářivého přechodu  $T_1$ -  $S_0$ ). Emitovaná fluorescence (znázorněna čárkovaně) pochází z  $S_1$  a končí na rozličných excitačních vibračních hladinách  $S_0$  nebo na  $S_0$  samotné.

Dosažení požadovaného SNR vyžaduje nejvyšší možný signál a současně co nejmenší pozadí, šum laseru, detektoru a elektroniky. Je tedy zapotřebí malý objem laserové sondy, velký absorpční průřez molekuly, vysoká fotostabilita, malá náchylnost k přechodu do temných a tripletních stavů. V neposlední řadě je nutné měřit s intenzitou laseru, pod hodnotou saturace molekulární absorpce. Pro fluorescenční metody se používají molekuly s co největším kvantovým výtěžkem. Musí být odstraněny nežádoucí fluoreskující příměsi, minimalizována velikost stopy laseru kvůli redukci Ramanova rozptylu a musí být zabráněno Rayleighovu rozptylu na vlnové délce použitého laseru.

### Velikost signálu v spektroskopii jednotlivých molekul

Počet fotonů emitovaných molekulou za sekundu je mnohem menší než počet fotonů emitovaných laserem, ale emitované fotony jsou všeobecně posunuty k vyšším vlnovým délkám, což umožňuje přijatelný SNR.

Obrázek 1(b) ukazuje tří-hladinové schéma. Molekula má povolený elektron – dipólový optický přechod singlet – singlet  $S_0 \rightarrow S_1$ , vybuzený zářením o energii  $h\nu$  laseru nebo spektrální lampy (kde  $h$  je Planckova konstanta a  $\nu$  je frekvence záření). Obecně není nezbytné vybudit systém do nejnižšího elektronového excitovaného stavu, dostačující je i absorpce do blízkých vibračních stavů. Po absorpci budícího fotonu excitovaná molekula rychle relaxuje emisí z vibračních modů molekuly (vnitřní molekulová vibrační relaxace) a fononů na nejnižší elektronový excitovaný stav. Z tohoto stavu může být fluorescence emitována v podobě fotonu (přerušovaná čára) nebo následuje nezářivý přechod na triplet. Po emisí fotonu se molekula vrací zpět do počátečního stavu vibrační a fononovou relaxací.



Obrázek 1: a) Schéma oblasti fokusu laseru (trojúhelníky). Ve středu schématu je molekula v rezonanci, která absorbuje foton z laserového paprsku a následně foton emituje.

b) Tří-hladinové schéma typické organické molekuly.  $S_0$  – základní singletní stav,  $S_1$  – první excitovaný singlet,  $T_1$  nejnižší tripletní stav nebo jiný přechodný stav. Pro každý elektronový stav jsou znázorněny vibrační přechody. Pumpování fotony o energii  $h\nu$  povolený dipólový přechod singlet – singlet.  $k_{ISC}$  – rychlostní konstanta nezářivého přechodu  $S_1$ - $T_1$ )  $k_T$  - rychlostní konstanta zářivého přechodu  $T_1$ - $S_0$ ). Emitovaná fluorescence (znázorněna čárkovaně) pochází z  $S_1$  a končí na rozličných excitačních vibračních hladinách  $S_0$  nebo na  $S_0$  samotné.

Dosažení požadovaného SNR vyžaduje nejvyšší možný signál a současně co nejmenší pozadí, šum laseru, detektoru a elektroniky. Je tedy zapotřebí malý objem laserové sondy, velký absorpční průřez molekuly, vysoká fotostabilita, malá náchylnost k přechodu do temných a tripletních stavů. V neposlední řadě je nutné měřit s intenzitou laseru, pod hodnotou saturace molekulární absorpce. Pro fluorescenční metody se používají molekuly s co největším kvantovým výtěžkem. Musí být odstraněny nežádoucí fluoreskující příměsi, minimalizována velikost stopy laseru kvůli redukci Ramanova rozptylu a musí být zabráněno Rayleighovu rozptylu na vlnové délce použitého laseru.

### Velikost signálu v spektroskopii jednotlivých molekul

Počet fotonů emitovaných molekulou za sekundu je mnohem menší než počet fotonů emitovaných laserem, ale emitované fotony jsou všeobecně posunuty k vyšším vlnovým délkám, což umožňuje přijatelný SNR.

Obrázek 1(b) ukazuje tří-hladinové schéma. Molekula má povolený elektron – dipólový optický přechod singlet – singlet  $S_0 \rightarrow S_1$ , vybuzený zářením o energii  $h\nu$  laseru nebo spektrální lampy (kde  $h$  je Planckova konstanta a  $\nu$  je frekvence záření). Obecně není nezbytné vybudit systém do nejnižšího elektronového excitovaného stavu, dostačující je i absorpce do blízkých vibračních stavů. Po absorpci budícího fotonu excitovaná molekula rychle relaxuje emisí z vibračních modů molekuly (vnitřní molekulová vibrační relaxace) a fononů na nejnižší elektronový excitovaný stav. Z tohoto stavu může být fluorescence emitována v podobě fotonu (přerušovaná čára) nebo následuje nezářivý přechod na triplet. Po emisí fotonu se molekula vrací zpět do počátečního stavu vibrační a fononovou relaxací.



Relaxační nezářivé procesy reprezentují ztráty energie, v důsledku čehož je fluorescenční pás posunut vůči absorpčnímu pásu směrem k červené oblasti elektromagnetického spektra. Rozdíl vlnových délek maxima fluorescenčního a odpovídajícího absorpčního pásu je označován jako Stokesův posun.

Typické fluorofory používané v SMS patří do skupiny laserových barev, používaných v biologickém fluorescenčním značení (rhodaminy, cyaniny, oxaziny atd.)<sup>2</sup>, aromatické uhlovodíky jako terrylen nebo perilenové diimidy. Dále také autofluorescenční geneticky vytvořené proteiny jako např. zelený fluorescenční protein GFP (z anglického green fluorescent protein) a další jemu příbuzné proteiny. Některé proteiny přirozeně fluoreskují a navíc obsahují mnoho fluoroforů jako kofaktory. Silná fluorescence byla pozorována též pro jednotlivé polovodičové kvantové body<sup>3</sup>. Tyto emitory jsou nyní navrhovány pro biologické značení<sup>4</sup>. Jejich výhodou je, že mají úzké emisní čáry a jsou rezistentní proti vysvícení.

Pro získání nejvyšší možné fluorescence je nezbytná velká pravděpodobnost excitace molekuly a nejvyšší možný kvantový výtěžek  $\Phi_F$ . Pro laserové stopy (focal spots) rovné nebo větší difrakčnímu limitu (přibližně  $\lambda/2$ )<sup>5</sup> je rychlostní rezonanční optická konstanta přechodu, dána tokem fotonů laseru (fotony/cm<sup>2</sup>) a absorpčním průřezem molekuly  $\sigma_p$  (cm<sup>2</sup>). Jinak řečeno, pravděpodobnost, že jedna molekula absorbuje foton z budícího laserového paprsku je  $\sigma_p/A$ , kde A je plocha průřezu fokusovaného laserového paprsku. Tedy  $\sigma_p$  může být interpretováno jako efektivní plocha (jedné molekuly), která je schopna zachytit excitační foton. Vysoká hodnota  $\sigma_p$  znamená, že budící fotony jsou efektivně absorbovány a signál pozadí, z neabsorbovaných fotonů je tedy minimalizován. Obecné vyjádření pro absorpční průřez náhodně orientované molekuly je:

$$\sigma_p = 2\pi(\lambda/2\pi)^2 (\gamma_R / \Gamma_{tot}),$$

kde  $\lambda$  je vlnová délka,  $\gamma_R$  je rychlost spontánní fluorescence a  $\Gamma_{tot}$  je totální frekvenční šířka absorpce.

Dalším klíčovým parametrem, který kontroluje fluorescenci je fluorescenční kvantový výtěžek  $\Phi_F$ , který je určen vztahem:

$$\Phi_F = k_{rad} / (k_{rad} + k_{nonrad}) = \tau_F / \tau_{rad},$$

zjednodušeně jde o pravděpodobnost emise fotonu na jednu excitaci.  $k_{rad}$  je rychlostní konstanta zářivého přechodu (A, Einsteinův koeficient),  $k_{nonrad}$  je suma rychlostí všech nezářivých přechodů jako vnitřní konverze nebo intersystémový přechod,  $\tau_F$  je doba života fluorescence a  $\tau_{rad}$  je zářivá doba života.

Fyzikální jev, který limituje rychlost fluorescence molekuly je optická saturace přechodu. Se stoupajícím výkonem laseru se emituje více fotonů za sekundu, až může dojít k saturaci přechodu. Následně klesá absorpční průřez a velikost pozadí roste rychleji než signál. Závislost absorpčního průřezu na budící intenzitě laseru I vyjádříme tímto způsobem:

$$\sigma_p = \sigma_p^0 / (1 + I/I_S),$$

kde  $I_S$  je charakteristická saturační intenzita. Ta závisí na bližších detailech struktury energetických hladin molekuly.

V případě, dvou-hladinového systému, je intenzita, při níž dojde k saturaci dána vztahem:

$$I_S = h\nu / (2\sigma\tau_F).$$

Z rovnice vyplývá, že pokud se rychlost absorpce fotonů laseru příliš zvyšuje, nestačí molekula dostatečně rychle klesat do základního stavu a tím pádem schopnost molekuly absorbovat fotony klesá. Ačkoliv některé molekuly vyhovují dvou-hladinovému schématu, pro většinu molekul se lépe hodí tří-hladinové schéma.

Intersystémový přechod může být považován za model pro situace, které přivádějí molekulu do stavu, kdy již neabsorbuje ani neemituje fotony. V organických molekulách je intersystémový přechod ISC (z anglického intersystem crossing) poměrně častý. Pokud se vyskytne, přerušuje se absorpce i emise na relativně dlouhou dobu, která je rovna době života tripletního stavu ( $=1/k_T$ ). ISC tedy vyvolá předčasnou saturaci emise molekuly a redukci absorpčního průřezu  $\sigma_p$  v porovnání s dvou-hladinovým systémem.<sup>6</sup> V případě tří-hladinového schématu s tripletní hladinou platí pro velikost saturační intenzity vztah:

$$IS = \frac{h\nu}{2\sigma\tau_{21}} \left[ \frac{1 + (k_{ISC} / k_{21})}{1 + k_{ISC} / 2k_T} \right],$$

kde  $k_{21} = 1/\tau_{21}$  což je rychlostní konstanta přímého poklesu z  $S_1$  do  $S_0$ ,  $k_{ISC}$  je rychlostní konstanta intersystémového přechodu a  $k_T$  je totální pokles rychlosti z nejnižšího tripletového stavu  $T_1$  zpět na  $S_0$ . Tří-hladinový systém má nižší hodnoty saturační intenzity než systém dvou-hladinový. Právě nižší hodnota saturační intenzity limituje použitelný výkon laseru.

Na saturaci můžeme pohlízet i ze strany rezonanční emisní rychlosti molekuly  $R(I)$  a šířky spektrální čáry  $\Delta\nu(I)$ . Vyřešením rovnic pro systém se třemi stavy dostaneme<sup>7</sup>:

$$R(I) = R_\infty \left[ \frac{I / I_S}{1 + I / I_S} \right],$$

$$\Delta\nu(I) = \Delta\nu(0) [1 + (I / I_S)]^{1/2},$$

kde je maximální rychlost emise dána vztahem:

$$R_\infty = \frac{(k_{21} + k_{ISC})\Phi_F}{2 + (k_{ISC} / k_T)}.$$

Z uvedených rovnic vyplývá, že zvyšující se výkon laseru lineárně zvyšuje rozptyl signálu. Tento nárůst ztěžuje detekci fluorescence molekuly. Nízké hodnoty  $k_{ISC}$  a vysoké hodnoty  $k_T$  umožňují redukci tripletních stavů. Těmto požadavkům vyhovují rigidní planární aromatické barvy, aromatické uhlovodíky a jiné dobré fluorofory.

Dalším faktorem silně limitujícím integrovaný signál z jedné molekuly je vybělení (photobleaching). Vybělování molekuly je obecný termín používaný pro všechny fotochemické procesy, které mohou způsobit změnu molekuly. Vybělování tedy zastaví absorpci a/nebo emisi fotonů. V praxi, za pokojové teploty v roztoku se většina molekul vybělí po vyzáření  $10^6$  fotonů. Obecně maximální množství emitovaných fotonů je dáno vztahem,  $1/\Phi_B$ . V mnoha případech je vybělení způsobeno foto-oxidací fluoroforu. Proto je často třeba pracovat v podmínkách zabraňujících difúzi kyslíku do vzorků (práce v podmínkách vakua<sup>8</sup>). Důležité je také odstranit kyslík ve vzorku již difundovaný. Například použitím kyslík vázajících enzymů<sup>9</sup> nebo proplachováním vzorku inertním plynem jako argon, dusík.<sup>10</sup>

### **Obecné faktory limitující spektroskopická měření na úrovni jednotlivých molekul.**

Pozadí je způsobeno fotony dopadajícími na detektor z jiných zdrojů než ze zkoumaných molekul. Obvykle stoupá s výkonem laseru, zatímco temný signál ne. Přes veškerou snahu o minimalizaci pozadí je jím většina SMS fluorescenčních experimentů limitována

Proto je boj s pozadím jedním z hlavních úkolů experimentální práce v SMS.

Zdrojem mohou být barevné skleněné filtry nebo samotný objektiv mikroskopu. Také se může při detekci fluorescence projevit zbytková emise z excitačního zdroje z červeného posunu (Stokesův posun). To může být důležité, zvláště když se jedná o diodové lasery a je nutné použít více filtrů. První zdroj pozadí může být z fluorescence optických částí experimentální aparatury, například k potlačení emise na dlouhých vlnových délkách. Proto je důležitý výběr vysoce kvalitních komponent. Pozadí, které pochází ze vzorku samotného je daleko těžší potlačit. Jsou dva zdroje. Elastický Rayleighův rozptyl vlnové délky laseru a fotony, které jsou posunuty Stokesovým posunem ve vlnové délce do spektrální oblasti fluorescence námi zkoumaných molekul a mohou překrýt fotony emitované z molekuly. Rayleighův rozptyl může být potlačen použitím velmi čistých nepoškrábaných substrátů a použitím interferenčních filtrů.

Dva hlavní zdroje červeného posunu (Stokesova posunu) jsou zbytková fluorescence z ostatních nečistot a Ramanův rozptyl. Oba zdroje jsou proporcionalní k velikosti osvětlené části vzorku. Přestože intenzita fluorescence je často velmi slabá, miliony a biliony molekul nečistoty a molekulárních komponent rozpouštědla mohou obzvlášť v biologických vzorcích tvořit silné pozadí, čistě z kvantitativních důvodů. Proto je nutné k přípravě vzorků užívat rozpouštědla velmi vysoké čistoty, případně redestilovanou vodu.

Fluorescence pozadí narůstá se zvyšující se energií excitačních fotonů, a proto lasery s vlnovou délkou emise v modré a blízké UV oblasti spektra zvětšují problémy s pozadím. Hodnota pozadí je proporcionalní k velikosti excitovaného objemu. Pro optimální poměr signálu ku pozadí SBR je tedy výhodný tento objem co nejmenší.

Rayleighův rozptyl budícího laseru je nutné u SMS experimentů potlačit filtry. Všeobecně je u SMS experimentů nutné zmenšit Rayleighův rozptyl co nejvyšším faktorem (obvykle  $10^7$ - $10^8$ ) a zároveň

propustit Stokesovým posunem ovlivněnou fluorescenci zkoumané molekuly. Pokud je vyžadováno další potlačení Ramanova rozptylu, transmisní okénko filtru může být optimalizováno k nepropustnosti pro všechny silné (Stokesovsky posunuté) Ramanovy čáry. Ale toto nesmí nadměrně oslabit příjem fluorescenčních fotonů z jednotlivých molekul. Tyto podmínky obecně splňují nízko-fluorescenční skleněné filtry (např. od firmy Schott), interferenční filtry (např. od firem Chroma a Omega) nebo relativně drahé holografické filtry (notch filtry od firmy Keiser, AHF analysentechnik.). Spektrální charakteristika filtrů musí mít velké zešíkmení v transmisním spektru filtru. Aby filtr propouštěl vlnovou délku emise molekuly dostatečně rychle se vzrůstající intenzitou.

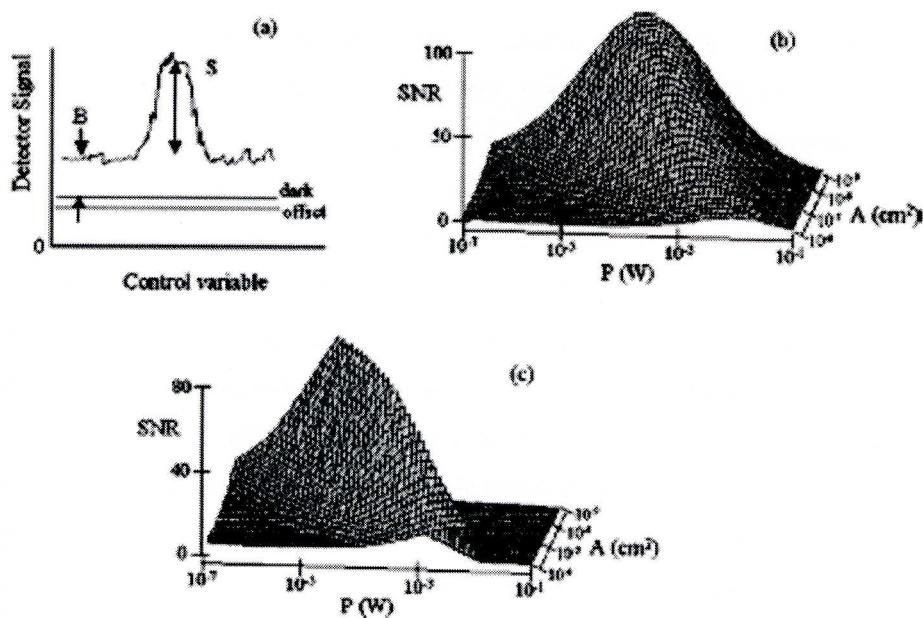
## Šum

Nejčastějšími zdroji šumu jsou především fluktuace vznikající z Poissonovy distribuce detekovaných fotonů, temný šum z CCD kamery a načítací šum.

$$N_{\text{detector}} = \sqrt{(N_{\text{signalshot}})^2 + (n_{\text{dark}})^2 + (n_{\text{read}})^2}$$

Šum z použitého laseru neovlivňuje poměr signálu k pozadí, ale pouze poměr signálu k šumu. Proto není tak klíčovým, jako faktory ovlivňující SBR.

## Poměr signálu k šumu a signálu z pozadí

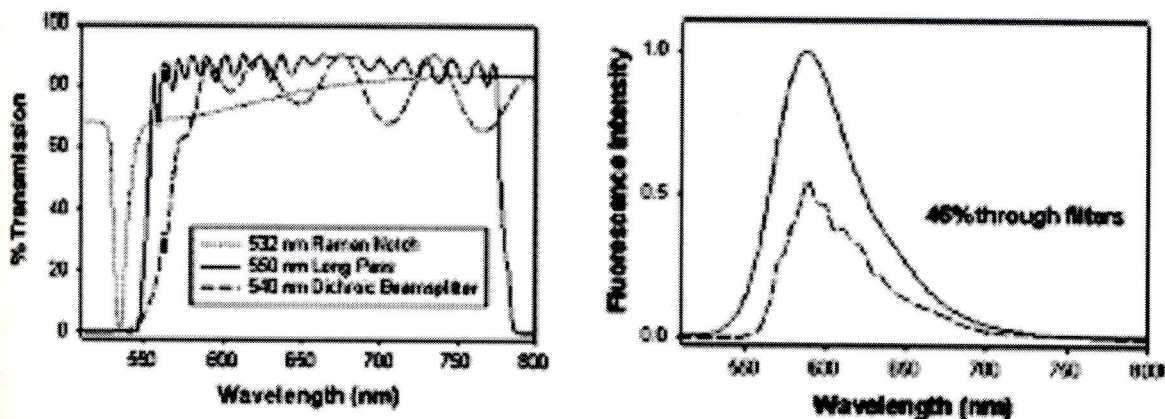


Obrázek 2: Poměr signálu k šumu.

a) Je zde ukázána definice základní nenulové hladiny, temného šumu a úrovně pozadí B. Signál z jednotlivé molekuly je S.

b) 3D obrázek závislosti fluorescenčního SNR na výkonu budícího laseru a velikosti stopy laseru pro fluorofor s následujícími parametry:  $\lambda = 532$  nm,  $\tau = 0,1$  s,  $\Phi_F = 0,28$ ,  $I_s = 5,6 \cdot 10^3$  W/cm<sup>2</sup>,  $\sigma = 4 \cdot 10^{-16}$  cm<sup>2</sup>,  $D = 0,072$ ,  $C_b = 2 \cdot 10^8$  fotonů/Wat s,  $N_d = 100$  fotonů/s

c) SNR pro tentýž model fluoroforu zahrnující kvantový výtěžek vybělení  $10^{-5}$ .



Obrázek 3: Příklad konfigurace filtrů pro SMS. Levý panel ukazuje transmisní spektra 532 nm, holografického Ramanova notch filtru, 550 nm long pass emission filtru a transmisí dichroického zrcadla. Pravý panel ukazuje emisní spektrum nilské červeně v metanolovém roztoku a výsledný tvar emisního spektra po projití všemi třemi filtry. Poměr integrovaných oblastí ukazuje, že skrz filtry prošlo 46% fluorescence sebrané objektivem mikroskopu.

Mnoho aplikací ve fluorescenčním zobrazování potřebuje vysoký poměr signálu ku šumu SNR (z anglického signal to noise ratio). Jen málokteré jsou však v tomto ohledu tak náročné jako SMS při pokojových teplotách. Některé detektory mají počáteční nenulovou hodnotu bez temného šumu a jakéhokoliv zdroje fotonů. Je to typické pro CCD detektory (z anglického Charge Coupled Device). Při všech kvantitativních výpočtech by měla být tato nenulová počáteční hodnota započtena. Nad touto hladinou je ještě signál z temného šumu detektoru. Množství temného šumu lineárně narůstá s délkou doby měření. Hodnota pozadí B se objevuje nad temným šumem jak je ukázáno na obrázku 2 (a). Pokud se zdroj pozadí mění bod od bodu, pak průměrná hodnota B nebude stejná jako variabilita kontrolní proměnné. Signál z jednotlivé molekuly se objevuje nad sumou pozadí a temného šumu.

Základní problém s detekcí v SMS by se dal shrnout následovně: abychom mohli sledovat signál S z jednotlivé molekuly, velikost S musíme porovnat s fluktuacemi S, B a temného šumu. Kvantitativně tyto vztahy vyjádřil Basché et al, který odvodil následující rovnici pro SNR pro fluorescenční detekci jednotlivých molekul.<sup>11</sup> Předpokládá, že limitující pro šum jsou Poissonovské fluktuace signálu molekuly, signál pozadí a temný šum,

$$SNR = \frac{D\Phi_F \left( \frac{\sigma_P}{A} \right) \left( \frac{P_0}{h\nu} \right) T}{\sqrt{\left( \frac{D\Phi_F \sigma_P P_0 T}{Ah\nu} \right) + C_b P_o T + N_d T}},$$

kde  $\Phi_F$  je kvantový výtěžek fluoroforu,  $\sigma_P$  je absorpční průřez, T je čas měření detektoru, A je plocha stopy paprsku,  $P_0/h\nu$  je počet fotonů za sekundu,  $C_0$  je pozadí přepočtené na wat excitačního výkonu a  $N_d$  je temný šum za sekundu. D je přístrojově závislý sběrný faktor, který je odvozen z úhlového sběrného faktoru  $F_{coll}$  detekčního systému (primárně závislý na numerické apertuře, NA). Optické ztráty jsou vyjádřeny jako transmisní faktor  $F_{opt}$ , transmise filtru  $F_{filtr}$  a kvantová účinnost detektoru  $\eta_Q$ :  $D = \eta_Q F_{coll} F_{opt} F_{filtr}$ .

Další důležitý parametr je SBR, poměr signálu ku pozadí (z anglického signal to background ratio). Tento parametr je o něco méně důležitý než SNR. Proto mu nebyla věnována obdobná pozornost a jeho definice není ustálená. Jednou z často citovaných definic je:

$$SBR = (\text{signál molekuly} + \text{rozptyl pozadí}) / \text{rozptyl pozadí}$$

nebo

$$SBR = \text{signál molekuly} / \text{rozptyl pozadí}$$

SBR i SNR závisí obecně na parametrech použitého experimentálního uspořádání, dále pak na kvalitě práce se vzorky. SBR je nezávislé na sběrném čase. Je to pouze porovnání signálu molekuly s čistotou vzorku a schopností detekčního systému potlačit pozadí. SNR je určující pro rozpoznání signálu

z molekuly v porovnání s fluktuacemi šumu, které mohou při nízkém SNR vypadat rovněž jako signál molekuly. Typické hodnoty SBR pro dobré fluorofory jsou v rozmezí 3–10 a více.

## Technika měření SMS

### Detektory

Detekce fluorescence v SMS vyžaduje zařízení, které je schopno detekovat jednotlivé fotony s minimálním temným šumem. Kvůli efektu nevratného vybělování molekuly je zapotřebí použít detektor s vysokou kvantovou účinností.

Detektory s citlivostí na úrovni jednotlivých fotonů.

Tyto detektory jsou obecně označovány jako single photon counting detectors SPCD. Dříve se fluorescence detekovala nejčastěji mikrokanálovým fotonásobičem PMT (z anglického plate photomultiplier microchannel tube).<sup>11</sup> Ačkoliv PMT nabízejí adekvátní časové rozlišení k pozorování krátkých záblesků fluorescence a nízkou hladinu temného šumu, mají malou kvantovou účinnost pro viditelné světlo (méně než 20%). Právě tento fakt limituje použití PMT v SMS. Plocha detekce je zhruba 1x1cm. Temný šum je i při chlazení okolo 10–100 cps.

Alternativou je použití tak zvaných lavinových fotodiod (APD – z anglického avalanche photodiode). APD jsou schopné detekovat události s citlivostí na úrovni jednotlivých fotonů. Jedná se o integrované soustavy zahrnující chlazení a zabudované zesilovače. Temný šum je na hodnotě okolo 25 cps.

Jedno-fotonové lavinové fotodiody SPAD (z anglického single photon avalanche photodiode) mají ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra kvantovou účinnost okolo 60%. V blízké infračervené oblasti spektra se jejich kvantová účinnost blíží k 95%. SPAD narozdíl od PMT vyžaduje jen nízké napětí (cca 5 V). Detekovaný foton je konvertován na digitálním TTL výstupu, převedený signál je snadno zpracován na počítači. Typická časová odpověď SPAD je srovnatelná s PMT. Fotony mohou být detekovány s přesností cca 350 fotonů za sekundu FWHM (plné šířky v polovině maxima). Nicméně detektor má delší mrtvou dobu což limituje rychlost záznamu. Rychlejší SPAD jsou dostupné, ale zvyšující se rychlost je u nich zaplácena nižší kvantovou účinností. Jediná reálná nevýhoda SPAD proti PMT pro použití v SMS je malá aktivní oblast detekce (180  $\mu\text{m}$  v průměru). Tato limitace může být jednoduše překonána měřením v konfokálním uspořádání SMS, případně použitím uspořádání měření v tak zvaném „blízkém poli“, tedy near field mikroskopii, kde velikost bodu v obrazové rovině mikroskopu může být nastavena právě na velikost čipu detektoru. Malá aktivní oblast je také využívána jako konfokální apertura v aplikacích pro konfokální zobrazování. Díky snadnosti použití a výborné kvantové účinnosti se SPAD stal standardním jedno-fotonovým detektorem pro SMS.

## Dvou-dimenzionální řádkové CCD detektory

V současné době v důsledku technologických inovací získávají velkou oblibu CCD detektory. Například dusíkem chlazená zezadu osvětlená Si CCD kamera, používaná pro některé aplikace v astronomii a spektroskopii. Zpětné osvětlení poskytuje vysokou kvantovou účinnost v červené a IR spektrální oblasti (okolo 70-80%). Chlazení tekutým dusíkem poskytuje kameře prostředí pro operace při teplotě okolo  $-120^{\circ}\text{C}$ . Tato teplota byla pečlivě vybrána pro umožnění pohybu náboje a snížení temného šumu. Dokonce na hodnotu blízkou 1 elektron/pixel/hod. Hlavní limitace tohoto typu CCD kamer je malá rychlost vyčítání čipu z důvodu chlazení kapalným dusíkem, za každý analog-digitální převod přibude 20 elektronů k šumu. Tyto detektory jsou velmi výhodné, v případech kdy jsou akceptovatelné dlouhé načítací časy (jako v případě měření spekter fluorescence jedné molekuly).<sup>12</sup>

Dalším používaným uspořádáním Si CCD kamer jsou kamery se zvýšenou citlivostí a rámcovým posunem, jako např. I-Pentamax. V tomto uspořádání jsou fotony nejdříve detekovány multialkalickou fotokatodou a emitovaný elektron je zesilován v mikrokáňkách, které jsou s fotokatodou spojeny svazkem vláken. Výsledná skupina elektronů dopadne na fosforové stínítko, kde opět vznikají fotony. CCD kamery osvětlené zepředu převádějí tyto fotony na elektrony a posléze rychlým ADC převodníkem převedou na digitální signál. CCD a/nebo fotokatoda mohou být chlazeny Peltiéroým jevem pro redukci šumu z tepelné iontové emise. Primární výhodou tohoto uspořádání je multiplikace signálu před možností vzniku načítacího šumu (tj. každý jeden foton bude načten, snižuje se význam šumu). Proto mohou být použity i rychlejší ADC (5 MHz převodní rychlost). Mají i menší „mrtvou dobu“, světlo dopadá vždy jen na polovinu čipu a obě poloviny se střídají. Limitace tohoto typu kamer je v nižší kvantové účinnosti materiálu fotokatody, ve zvýšeném šumu, vznikajícím při násobení signálu, v nejednotném příjmu na různých kanálech, v možnosti poškození detektoru nadbytkem světla.<sup>13</sup>

Další, v současnosti velmi využívaný typ CCD kamer, jsou kamery s čipy osvětlovanými ze zadní strany (označovaným jako back illuminated CCD, BICCD), kde nejsou jednotlivé pixely stíněny elektrodami, (firmy Micromax, Roper Scientific). Výhodou je především velké zvýšení citlivosti CCD čipu a mnohem vyšší stupeň uniformity v citlivosti jednotlivých pixelů.

CCD Si kamery s rámcovým posunem a se znásobeným výtěžkem čipu jsou dalším často využívaným typem (Cascade, Roper scientific, iXon, Andor Technology). Čipy v tomto uspořádání pracují z velké části stejně jako normální CCD, jen poslední řada CCD je propojena s ostatními spoji na čipu. Čistý efekt vícenásobného příjmu je až 100 násobek na čip před konverzí. Plně integrovaný design je velkou výhodou před ostatními typy, kde se musí jednotlivé části opticky propojit.



## Konfigurace mikroskopu

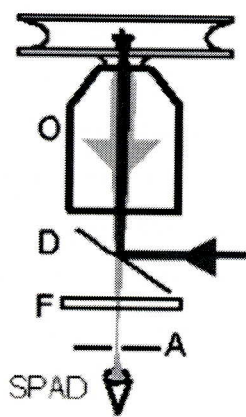
Pro potřeby SMS byly použity mnohé úspěšné mikroskopické techniky včetně skenovacích metod, jako mikroskopie blízkého pole (NSOM z anglického near-field optical microscopy) nebo konfokální mikroskopie a wide-field metody jako totální reflexe nebo epifluorescenční mikroskopie.

### Skenovací metody

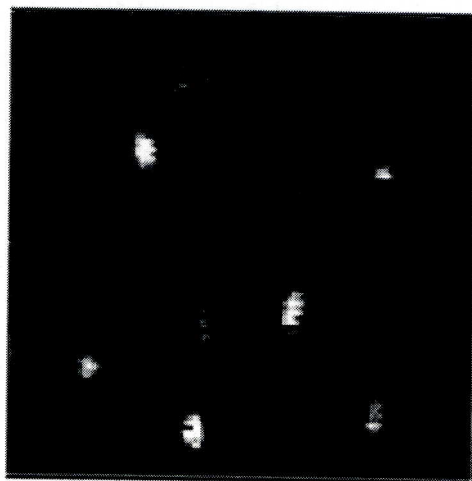
Jedna skupina SMS technik zahrnuje ozařování vzorku nejmenší možnou laserovou stopou (bodem) a postupné skenování vzorku. Obraz je konstruován bod po bodu, a když je imobilizovaná molekula lokalizována, může být studována přímo pohybem laserové stopy po celé molekule. Protože skenovací metody postrádají schopnost pozorovat mnoho izolovaných jednotlivých molekul paralelně a tím zabráňují pozorování pohybu molekul na mikroskopické vzdálenosti v reálném čase, používá se menší objem osvětlení a tím pádem je i menší pozadí a dochází k celkovému vylepšení SNR. Navíc detektory používané při skenovacích technikách nabízejí lepší časové rozlišení, než CCD kamery používané při použití wide-field mikroskopu. Jejich časová odpověď je limitována schopností vyčítat CCD čip. Tedy, pro experimenty, které vyžadují maximální citlivost a časové rozlišení jsou skenovací SMS metody zřejmě nejvýhodnější. Dále zmíním podrobněji dvě skenovací metody, konfokální mikroskopii, ve které je zdrojem skenovací stopy difrakčně limitovaný laser. Dále NSOM, kde tzv. near-field efekt vytváří laserovou stopu menší než je difrakční limit.

### Konfokální mikroskopie

(a) confocal



(b)



Obrázek 4: Konfokální mikroskopie

a) schéma experimentálního uspořádání: (O) objektiv, (D) dichroický filtr, (F) emisní filtry, (A) konfokální štěrbinu, SPAD, křemíková lavinová dioda

b) příklad konfokálního zobrazení jednotlivých molekul nilské červeně v tenké vrstvě PMMA.  $\lambda = 532 \text{ nm}$ , intenzita laseru  $1,1 \text{ kW/cm}^2$ , zobrazení 100 na 100 pixelů, odpovídá  $10 \text{ }\mu\text{m} \times 10 \text{ }\mu\text{m}$  poli na vzorku, 10 ms na pixel, celková doba měření 10 s. Fluorescence byla filtrována 540DLRP dichroickým zrcadlem (Chroma), E550LP emisním filtrem (Chroma), Raman Super Notch Plus 532 (Kaiser Optical) také emisní

filtr, zobrazováno přes 75  $\mu\text{m}$  konfokální štěrbinu a detekováno SPCM-AQ-141 SPAD (EG&G). PSF (point spread function) mikroskopu je lehce prodloužena ve vertikálním směru.

Obrázek 4 a) znázorňuje uspořádání při měření s konfokálním mikroskopem. Excitující laserový svazek odražený na dichroickém filtru do objektivu mikroskopu je fokusován do difrakčně limitované stopy do roviny vzorku. Průměr fokusované laserové stopy je dán především Rayleighovým a Sparowovým kritériem. Sparowovo kritérium říká, že dva body o stejné intenzitě mohou být rozlišeny, pokud intenzita v bodech mezi těmito body je stejná jako v těchto bodech (jinak řečeno gradient profilu sečtených vrcholů intenzit v této oblasti je roven nule).

Je dáno vztahem:

$$d_s = 0,51\lambda / NA,$$

kde  $\lambda$  je excitační vlnová délka, Tedy pro  $\lambda=448$  nm a  $NA=1,4$  (imersní olej) platí  $d_s=178$  nm. Pro vysoce kvalitní vzdušný objektiv,  $NA=0,9$  platí stopa s  $d_s=277$  nm. Pokud je rozptýl pozadí zhruba ve stejném poměru s osvětlenou oblastí, pomáhá vysoká NA (numerická apertura) objektivu vylepšit SNR. Zvyšuje signál (sbírá více světla) a redukuje pozadí.

Emitovaná fluorescence spolu s rozptýleným zářením excitujícího laseru jsou kolimovány tím samým mikroskopickým objektivem na dichroický filtr. Fluorescence je odfiltrována od rozptýleného excitačního záření emisním filtrem a fokusována čočkami v těle mikroskopu na kruhovou štěrbinu lokalizovanou v zobrazovací rovině mikroskopu. Kruhová štěrbinu slouží k prostorové selekci fluorescence pocházející z oblastí ležících mimo oblast zaostření a vylepšuje axiální rozlišení. Právě výborné axiální rozlišení je velkou výhodou konfokální mikroskopie. Průměr kruhové štěrbinu určuje absolutní hloubku konfokálního rozlišení. Výhody konfokálních systémů pomáhají rovněž v SMS. Je umožněna menší hloubka sondy do matrice s molekulami, což mimořádně snižuje pozadí. Toto může být velice důležité v biologických systémech, kde je nutné minimalizovat autofluorescenci, vycházející z oblastí mimo rovinu zaostření.

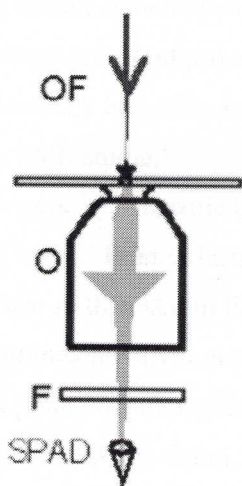
Nejen limitovaný počet jedno-molekulových emitů, ale i výběr správné velikosti kruhové štěrbinu je velmi důležitý. Menší průměr kruhové štěrbinu poskytuje skvělé axiální rozlišení avšak na úkor propustnosti a určitých těžkostí s prostorovým seřízením. Zvětšení mikroskopického objektivu rovněž ovlivňuje propustnost kruhovou štěrbinou, protože velikost stopy v rovině kruhové štěrbinu je jednoduše průměr difrakčně limitované laserové stopy násobený zvětšením objektivu. Pro 60x objektiv mikroskopu, 75  $\mu\text{m}$  průměr kruhové štěrbinu umožňuje velkou transmissi (>90%), dává dobré axiální rozlišení (<200nm) a je snadno nastavitelná jednoduchým 3D mikrometrickým posuvem. Fluorescence procházející kruhovou štěrbinou je detekována detektorem (například lavinovou diodou SPAD) nebo je po průchodu monochromátorem zachycena CCD kamerou pro získání jedno-molekulového emisního spektra.

Konfokální obraz je tvořen skenováním rastru roviny vzorku laserovou stopou, obvykle počítačem kontrovaným piezo-elektrickým systémem. Pro konfokální SMS je rozlišení piezo systému lepší než

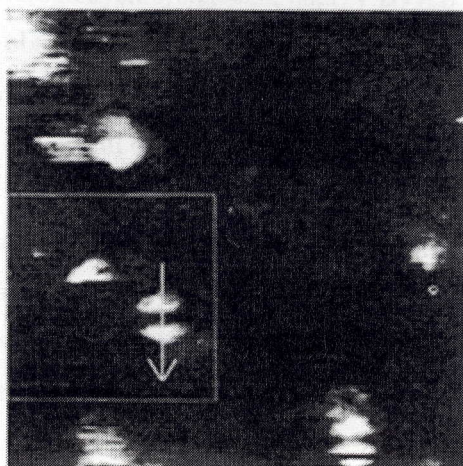
50nm a piezo skener s uzavřenou smyčkou velmi zjednodušuje lokalizaci. Typické konfokální zobrazení jednotlivých molekul nileské červeni ve vrstvě polymetyl metakrylátu (PMMA) je ukázáno na obrázku 4 (b). 2D zobrazení 100 x 100 pixelů, odpovídající oblasti na vzorku 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ , bylo získáváno po dobu 100 s. Každý pixel měl 10 ms měřicí čas. Obrázek byl skenován horizontálně směrem od horní části dolů. Během měření byly pozorovány fluktuace intensity a vybělování některých molekul.

### Near-field skenovací optická mikroskopie

(a) NSOM



(b)



Obrázek 5: Near-field skenovací optická mikroskopie (NSOM nebo SNOM).

a) schéma experimentálního uspořádání: (OF) pokovené optické vlákno, zdroj osvětlení pro NSOM, je velmi blízko povrchu vzorku, (O) objektiv, (F) filtry, (SPAD) křemíkový lavinový detektor.

b) NSOM zobrazení jednotlivých molekul R6G na křemíkovém povrchu, excitační laser na 514 nm. Pole obrázku 2,6  $\mu\text{m}$  x 2,7  $\mu\text{m}$ , signál v maximu je 250 fotonů / 20 ms.<sup>14</sup>

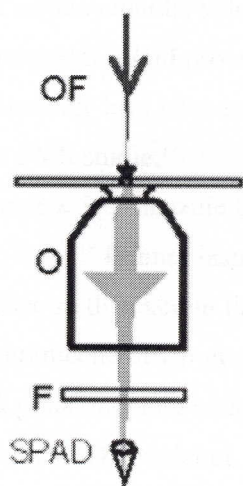
NSOM je další skenovací metoda používaná v SMS. Obrázek 5 a ukazuje zjednodušené schéma pro NSOM. Optika near-field se používá ke generování laserové stopy menší než je difrakční limit, pomocí otvoru s průměrem menším, než je vlnová délka světla a detekováním světla, které prochází skrz tento malý otvor. Pokud je záření, které prochází tímto malým otvorem detekováno v jeho těsné blízkosti, velikost detekované laserové stopy bude pod hodnotou vlnové délky použitého záření. Samozřejmě se vzrůstající axiální vzdáleností od tohoto otvoru, velikost stopy rapidně vzroste, až dosáhne difrakčního limitu v far-field režimu.

Near-field procesy jsou charakteristické nízkou intenzitou a propustností světla skrz malé otvory. V počátečních pokusech k vytvoření relativně efektivního otvoru pro optické vlnové délky byla zahřívána a natahována jedno-modová optická vlákna, dokud nepraskla, čímž byl získán hrot mnohem menší, než bylo původní optické vlákno.<sup>15</sup> Vlákno je pak potaženo na stranách tenkou vrstvou kovu (např. Al), čímž se vytvořil světlovod s malým otvorem na konci (70nm v průměru). Další zlepšení a nové nápady následovaly.<sup>16</sup> Použití skenovacích technologií, vyvinutých pro sondovací techniky, jako např. AFM

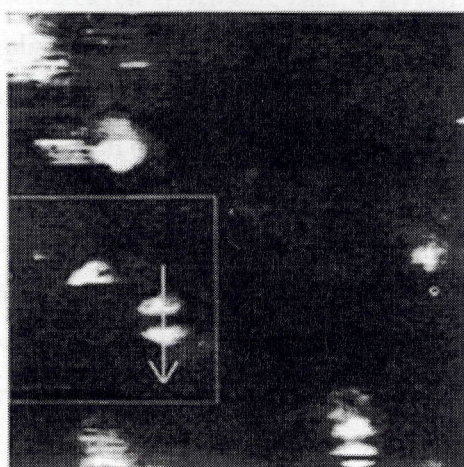
50nm a piezo skener s uzavřenou smyčkou velmi zjednodušuje lokalizaci. Typické konfokální zobrazení jednotlivých molekul nileské červeni ve vrstvě polymetyl metakrylátu (PMMA) je ukázáno na obrázku 4 (b). 2D zobrazení 100 x 100 pixelů, odpovídající oblasti na vzorku 10  $\mu\text{m}$  x 10  $\mu\text{m}$ , bylo získáváno po dobu 100 s. Každý pixel měl 10 ms měřicí čas. Obrázek byl skenován horizontálně směrem od horní části dolů. Během měření byly pozorovány fluktuace intenzity a vybělování některých molekul.

### Near-field skenovací optická mikroskopie

(a) NSOM



(b)



Obrázek 5: Near-field skenovací optická mikroskopie (NSOM nebo SNOM).

a) schéma experimentálního uspořádání: (OF) pokovené optické vlákno, zdroj osvětlení pro NSOM, je velmi blízko povrchu vzorku, (O) objektiv, (F) filtry, (SPAD) křemíkový lavinový detektor.

b) NSOM zobrazení jednotlivých molekul R6G na křemíkovém povrchu, excitační laser na 514 nm. Pole obrázku 2,6  $\mu\text{m}$  x 2,7  $\mu\text{m}$ , signál v maximu je 250 fotonů / 20 ms.<sup>14</sup>

NSOM je další skenovací metoda používaná v SMS. Obrázek 5 a ukazuje zjednodušené schéma pro NSOM. Optika near-field se používá ke generování laserové stopy menší než je difrakční limit, pomocí otvoru s průměrem menším, než je vlnová délka světla a detekováním světla, které prochází skrz tento malý otvor. Pokud je záření, které prochází tímto malým otvorem detekováno v jeho těsné blízkosti, velikost detekované laserové stopy bude pod hodnotou vlnové délky použitého záření. Samozřejmě se vzrůstající axiální vzdáleností od tohoto otvoru, velikost stopy rapidně vzroste, až dosáhne difrakčního limitu v far-field režimu.

Near-field procesy jsou charakteristické nízkou intenzitou a propustností světla skrz malé otvory. V počátečních pokusech k vytvoření relativně efektivního otvoru pro optické vlnové délky byla zahřívána a natahována jedno-modová optická vlákna, dokud nepraskla, čímž byl získán hrot mnohem menší, než bylo původní optické vlákno.<sup>15</sup> Vlákno je pak potaženo na stranách tenkou vrstvou kovu (např. Al), čímž se vytvořil světlovod s malým otvorem na konci (70nm v průměru). Další zlepšení a nové nápady následovaly.<sup>16</sup> Použití skenovacích technologií, vyvinutých pro sondovací techniky, jako např. AFM

(mikroskopie využívající atomárních sil), může být vlákno drženo ve vzdálenosti přibližně 5 nm od povrchu a skenovat. Prošlé světlo a fluorescence mohou pak být sebrány tradiční optikou a signál je detekován jedno-částicovým detektorem, např. v konfokálním mikroskopu.

Mezi primární výhody NSOM patří: redukovaný objem vzorku, na který dopadá redukovaná laserová stopa, generující malé pozadí. Dále okamžitá informace o orientaci. Také fakt, že monitorování pozice skenovacím vláknem dává topografickou informaci současně s fluorescenčním zobrazením. Nicméně NSOM má mnoho limitací. Vytažená vlákna jsou velmi křehká a náchylná k rozbití. Nejvíce to zřejmě hrozí u vzorků s hrubým a členitým povrchem. Vhodné jsou tedy spíše vzorky s plochým povrchem. Je možné zobrazit molekuly i dále od povrchu, ale near-field efekt rychle mizí ve směru osy z. Tento fakt zabraňuje použití NSOM v mnoha biologických systémech, např. v živých buňkách. V designu sondy byla udělána mnohá vylepšení, přesto je obtížné trvale vyrábět vlákna se stejnou velikostí otvoru. Jako potencionální řešení pro některé problémy NSOM by se mohla ukázat vhodná nová technika. Ta používá ultratenký hrot jako anténu k lokalizaci excitační oblasti. Zatím se tato technika jeví jako velmi vhodná pro SMS studie.<sup>17</sup>

Obrázek 5(b) ukazuje typické NSOM zobrazení R6G molekul na krycím sklíčku, v poli o velikosti 2,6  $\mu\text{m}$  x 2,7  $\mu\text{m}$ .<sup>18</sup> Průměr jasných stop na obrázku je závislý na rozlišení mikroskopu, ukazuje boční rozlišení lehce za difrakčním limitem, což byla v tomto případě daň za získání většího signálu z molekul. V oblasti ohraničené bílým rámečkem je dvoulaločnatá struktura napravo zobrazením molekuly očekávané vzhledem k polarizačnímu efektu.<sup>19</sup> Molekula nalevo v rámečku se vybělila v polovině času potřebného k zaznamenání obrázku molekul. Šipka ukazuje časovou posloupnost a odlišný směr, použitý ke sběru fluorescenční doby života jako funkce pozice. To ukazuje velké změny doby života excitovaného stavu, která se objevuje při interakci mezi kovovým hrotem a molekulou.<sup>18</sup>

### Metody wide-field

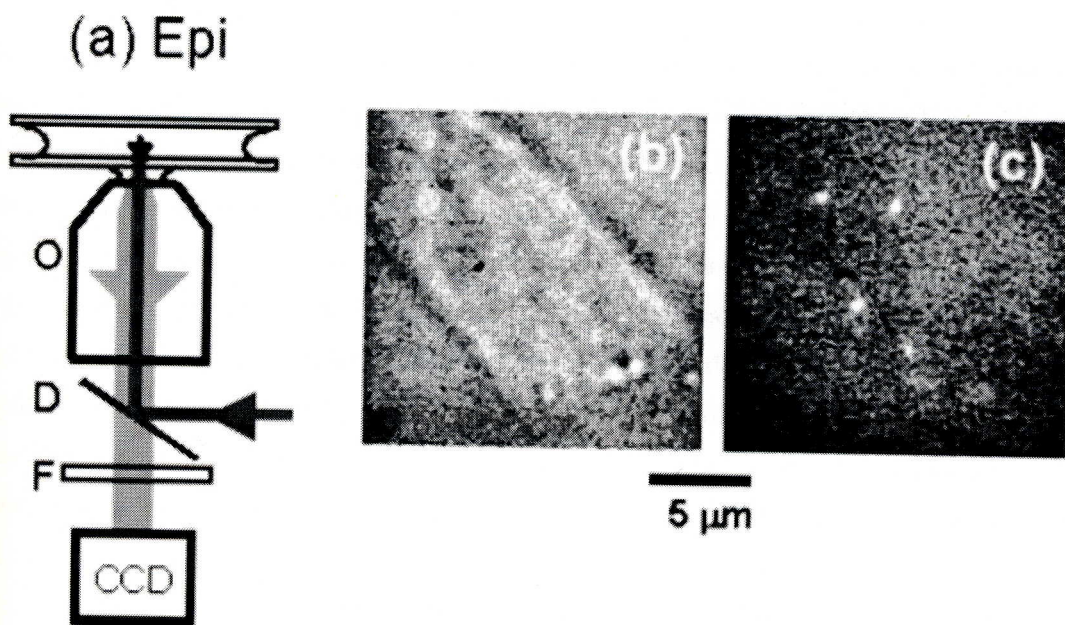
Zřejmě nejjednodušší metodou k měření fluorescence jednotlivých molekul je wide-field mikroskopie. Jak již název napovídá, laser nebo lampa jsou použity k osvětlení oblasti o průměru mnoho mikronů, podobně jako v obyčejném světelném mikroskopu. Opět je nutné použít vhodné filtry k odstranění excitačního světla a zachování emise molekuly. Fluorescence molekul je přiváděna na 2D řádkový detektor, obvykle CCD. Měření SMS tímto způsobem má dvě hlavní přednosti. Současně může být pozorováno několik individuálních chromoforů a mohou být monitorovány téměř ve video režimu. Umožňuje tedy sledování pohybu molekul v reálném čase. Primární omezení je způsobeno tím, že maximální načítací rychlost CCD kamer je mnohem menší než pro jedno-fotonové detektory. Ale pro experimenty vyžadující maximální časové rozlišení na úrovni 50 ms se wide-field SMS stala populární a velmi užitečnou technikou.

Přestože je velká oblast vzorku zobrazována do roviny detektoru, je prostorové rozlišení při použití kvalitních objektivů limitováno difrakčním limitem. Takže při použití optiky s velkou NA jsou jednotlivé molekuly zobrazeny na CCD jako malé tečky s průměrem 300 nm. Nicméně při dobrém SNR je možné zlepšit lokaci těchto bodů pod difrakční limit. Přesnost, s jakou jsme schopni určit pozici molekuly je závislá na velikosti pixelu a na zvětšení mikroskopu. Příkladem může být kamera s pixely 15  $\mu\text{m}$  x

15 $\mu\text{m}$ , připojená k mikroskopu s objektivem 100x a čočkou pro roztažení paprsku 5x (celkové zvětšení mikroskopu 500x). Pak wide-field systém zobrazí molekulu jako obrazec s průměrem 10 pixelů, s intenzitou o Gaussovském profilu. Střed obrazce je snadno zjistiitelný na hodnotu nejbližšího pixelu nebo 30 nm jako v tomto případě. Díky tomu je tato technika vhodná např. ke studiu difúze a podobných procesů. S uspokojivým SNR a fitováním osvětlených pixelů do Gaussova profilu je možné lokalizovat střed na vzdálenost menší, než je vzdálenost nejbližšího pixelu. Je možné zlepšit prostorové rozlišení, např. pro dvě molekuly blízko sebe, použitím odlišných barev pro různé intenzity zobrazení. Dále rozprostřením zobrazení na větší počet pixelů CCD nebo použitím CCD s menší velikostí pixelů, větší plochou čipu, větším zvětšením. Těmto krokům však zabraňuje mnoho faktorů. Vybělování jednotlivých molekul limituje počet detekovaných fotonů, přičemž pro dobré SNR je nutný určitý počet fotonů na pixel za daný integrační čas. Dalším faktorem je typický načítací šum pro CCD kamery, který limituje způsob, kterým se mohou fotony rozprostřít na pixely. Také rychlost CCD kamery klesá s množstvím pixelů ve čtecím rámci, je proto velmi důležité správně vyvážit prostorové a časové rozlišení. Parametry udané v této části textu jsou udané pro moderní CCD se zvýšenou intenzitou. Ta dává poměrně dobrý SNR pro výkonné jedno-molekulové fluorofory jako Rhodamin 6G (R6G), s 50 ms integračním časem.

Existují dvě nejrozšířenější wide-field techniky SMS zobrazování. Jedná se o epifluorescenci a totální reflexi TIR (z anglického total internal reflection).

### Epifluorescence



Obrázek 6: Epifluorescenční mikroskop

a) Schéma experimentálního uspořádání: (O) objektiv, (D) dichroické zrcadlo, ( F) filtry, (CCD) 2D řádkový detektor,

b) Transmisní zobrazení jednotlivé CHO buňky v bílém světle, jednotlivé organely v buňce jsou slabě viditelné

c) Epifluorescenční zobrazení té samé buňky, integrační čas 100 ms. Ukazuje emisi z jednotlivých Cy5-značených MHCII komplexů. Intenzita laseru 5  $\text{kW}/\text{cm}^2$  v rovině vzorku, vysílá záření o 633 nm.

Epifluorescence byla sbírána s 100násobným zvětšením, 1,3 NA, olejový imersní objektiv, (CFI PlanFluor, Nikon, Burlingame, CA). Zobrazení skrz 645 nm dichroické zrcadlo a 670 nm band-pass filtr (Omega Optical Inc., Brattleboro, VT) na zintenzivněné CCD kameře s posunem rámcí (I-Pentamax, Roper Scientific, Trenton, NJ). SBR bylo 1,6. Průměrný SM signál bez pozadí byl  $751 \pm 77$  pulzů.<sup>20</sup>

Epifluorescenční SMS mikroskop může být jednoduše sestrojen z běžně dostupných komerčních mikroskopů. Tato metoda je již dlouho a úspěšně používána v biologii. Poprvé byla při pokojových teplotách použita pro studium biomolekulárních motorů.<sup>21</sup>

Obrázek 6 ukazuje zjednodušené schéma epifluorescenčního mikroskopu pro SMS. Pro osvětlení oblasti o velikosti několika mikronů v průměru je nutné použít paprsek, který není kolimován. Jednoduchá metoda, jak vytvořit laserovou stopu požadované velikosti, je fokusovat paprsek na zpětný otvor objektivu mikroskopu. Toho se nejnázáze dosáhne použitím čočky s dostatečně dlouhou fokální délkou, aby mohla být namontována vně mikroskopu. Typická fokální délka je okolo 0,5 m. Vstupní laserový paprsek je pak odražen skrz objektiv mikroskopu na dichroický filtr. Objektiv by měl mít největší dostupné zvětšení. Pro všechny SMS experimenty je NA klíčovým parametrem.

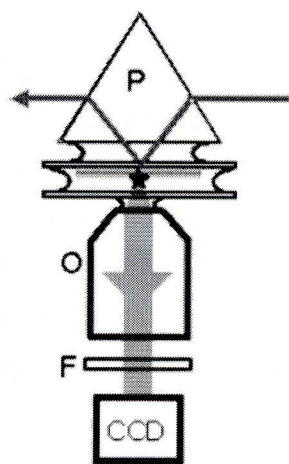
$NA = n \cdot \sin \alpha$ , kde  $n$  je index lomu media mezi vzorkem a objektivem a  $\alpha$  je maximální sběrný úhel objektivu. Pro maximální množství detekovaného světla by měla být NA co největší. Obvykle je to splněno použitím objektivu designovaného pro imerzi s vysokým indexem lomu. Pro většinu SMS experimentů se používají objektivy s olejovou imerzí ( $n=1,51$ ), tyto objektivy mají NA okolo 1,4. Pro zobrazování v některých biologických prostředích je vhodný objektiv pro vodní imerzi ( $n=1,33$ ), obvyklá NA 1,2. To mění některé světlosběrné schopnosti, které vylepšují kvalitu obrazu. Nicméně pro SMS jsou stále preferované objektivy s olejovou imerzí. Přirozeně použitý olej nesmí sám fluoreskovat, ani obsahovat fluoreskující komponenty či znečištění. Ploché pole objektivu má velký význam pro wide-field zobrazovací experimenty. Zvláště pokud nám jde o kvantifikaci vzdáleností na výsledném zobrazení. Objektivy mikroskopů „PlanApo“ jsou designované pro velkou plochost pole a barevnou korekci a měly by být používány pro veškeré wide-field zobrazování. Pro zobrazování na krátkých vlnových délkách je také nutné vybrat objektiv s velmi nízkou fluorescencí. Emise fluorescence je sbírána zpětně přes ten samý objektiv a dále jde na dichroický filtr. Zbytkové excitační záření je redukováno vhodnou sestavou long pass filtrů a/nebo notch filtrů. Světlo je dále fokusováno skrz čočky tubusu mikroskopu na CCD kameru. Pokud je vyžadované dodatečné zvětšení jsou komerčně snadno dostupné systémy čoček s zvětšením 2x až 8x.

Jedna z aplikací wide-field SMS je studium pohybu kritických struktur v membráně jednotlivých buněk.<sup>22</sup> Jedno-molekulové značky jsou preferovány před vícenásobnými značkami, či velkými kuličkami, kvůli zabránění narušení nativních struktur. Zmíním zde jeden současný úspěch, jedná se o výzkum difúze jedno-transmembránového proteinu, zabudovaného do živé buňky.<sup>20</sup> MHCII (Major Histocompatibility of Type II) je nezbytný vazebný protein pro T-buněčné rozpoznávání. Studie byla zaměřena na způsob, jakým se tyto důležité proteiny pohybují v buněčné membráně. Buňky vaječnicků čínské křečka (CHO) byly vybrány pro svou dobrou přilnavost k skleněným krycím sklíčkům, a protože opačná strana (k přilnavému povrchu) je extrémně plochá.

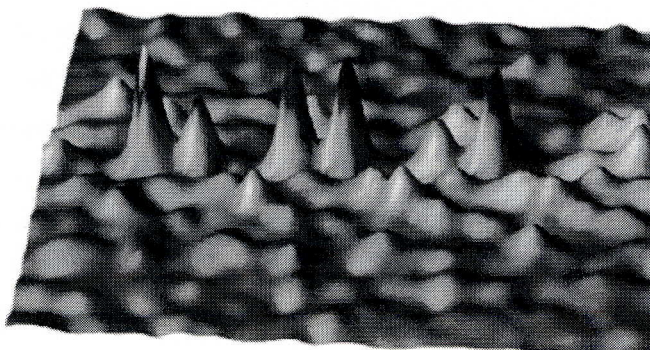
Obrázek 6. ukazuje zobrazení CHO buněk pod bílým světlem. Rohy obdélníkovitých buněk jsou zde jasně viditelné. Pro značení MHCII proteinů šetrnou metodou byl vybrán krátký polypeptid, který se silně váže k MHCII, byl značen molekulami barvy Cy5. Buňky pak byla exponovány těmto polypeptidům. Následně došlo k navázání MHCII struktury v membráně. Obrázek 6. ukazuje epifluorescenční zobrazení značených buněk. Viditelné jsou pouze barevné značky na povrchu vzdálenějším od skla. Je to kvůli hloubce pole epifluorescenčních mikroskopů 300–500 nm a faktu, že buňky CHO jsou několik mikronů silné. Autoři byli schopni monitorovat difúzi MHCII proteinu sledováním pozice Cy5 barvy s 100 ms integračním časem.

### Totální reflexe

(a) TIR-prism



(b)



Obrázek 7: Mikroskopie totální reflexe na hranolu.

a) Schéma experimentálního uspořádání: (P) hranol, (O) objektiv, (F) filtry, (CCD) 2D řádkový detektor, hvězdičkou je označena emitující molekula.

b) Zobrazení fluorescenční emise z oblasti o velikosti  $2,4 \mu\text{m} \times 2,4 \mu\text{m}$  jednotlivých molekul mutanta GFP T203Y, imobilizovaného v PAA na TIR mikroskopu. Podmínky:  $\text{pH}=7$ , expoziční doba 100 ms, výkon laseru  $2 \text{ kW/cm}^2$ , vlnová délka excitačního světla je 488 nm. Fluorescence byla zobrazována na Nikon Diaphot 200 invertovaném mikroskopu, 100x, 1,4 NA PlanApo olejový imersní objektiv skrz 515EFLP long-pass filtr nebo 535DF55 band-pass filtr (Omega Optical), na CCD kameře s zvýšenou intenzitou a posunem čtecího rámce (Princeton Instruments I-Pentamax).<sup>23</sup>

TIR (Total Internal Reflection) mikroskopie je používána rovněž pro pozorování jednotlivých molekul, jedná se o techniku s velkou citlivostí. TIR experimenty využívají exponenciálního poklesu evanescentního pole generovaného TIR na hranici vysokého a nízkého indexu lomu. Obvykle na rozhraní skleněného či křemenného krycího sklíčka a vzduchu nebo vody. Pro úhel dopadu měřený od kolmice povrchu ( $\theta$ ), nad kritickým úhlem intenzita evanescentního pole ( $I$ ) (která je proporcionalní k kvadrátu amplitudy elektrického pole), klesá se vzdáleností do media s nízkým indexem lomu podle vztahu:





$I(z) = I(0) \exp(-y/d)$ , kde  $I(0)$  je intenzita na rozhraní a exponenciální pokles vzdálenosti  $d$  je:

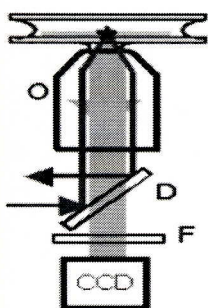
$$d = \frac{\lambda_0}{2\pi} (n_2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-1/2}, \text{ kde } \lambda_0 \text{ je vlnová délka excitačního světla ve vakuu, } n_1 \text{ a } n_2 \text{ jsou}$$

indexy lomu skla/křemene a vzduchu/vody (v stejném pořadí). Úhlově závislý pokles  $d$  je typický okolo 150 nm pro zelené excitační světlo. Malá velikost tohoto parametru ukazuje, že budící excitace zasahuje jen na krátkou vzdálenost do media s nízkým indexem lomu. Primární výhodou TIR mikroskopie tedy je, že budou excitovány pouze fluorofory, které jsou dostatečně blízko povrchu krycího skla. Objem vzorku, který může produkovat rušivé pozadí je tedy redukován. Přestože jsou TIR metody v biologii používány již delší dobu,<sup>24,25</sup> v SMS se objevují až v současnosti.<sup>21,26</sup>

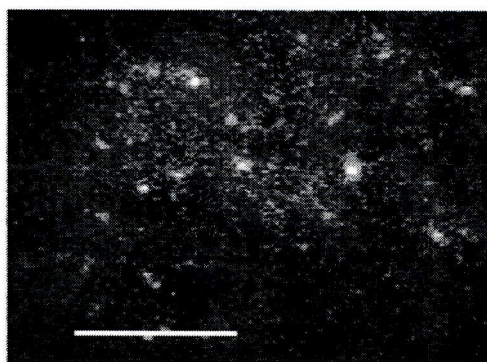
TIR mikroskop může být zrealizovaný spojením krycího sklíčka a hranolu pomocí kapaliny s vhodným indexem lomu (pro sklo  $n=1,51$ ). Paprsek laseru může pak jednoduše vstupovat do hranolu pod kritickým úhlem, aby dosáhl TIR. Mikroskop pak může snadno zviditelnit fluorescenci z evanescentní vlny na povrchu rozhraní.

Obrázek 7 (a) ukazuje schématický náčrt nastavení hranolu pro TIR, upravený pro zobrazení jednotlivých barviček<sup>26</sup> a jednotlivých kopií GFP v PAA (polyakrylamid) gelové matrici (kvůli zabránění Brownova pohybu).<sup>23,27,28</sup> Pro tento experiment bylo osvětlení zavedeno evanescentní vlnou, generovanou TIR lineárně polarizovaného laseru na rozhraní mezi křemenným krycím sklíčkem a vzorku. Správný úhel dopadu pro toto rozhraní byl získán použitím trojúhelníkového křemenného hranolu a vrstvou glycerolu. Křemenný hranol byl použit místo skleněného kvůli minimalizaci autofluorescence a pozadí. Typická excitační intenzita byla řádově 1 kW/cm<sup>2</sup>, vzdálenost molekul od rozhraní nebyla kontrolována, takže absolutní intenzita od každé molekuly se může měnit s faktorem 2 i více. Obrázek 7(b) ukazuje 3D graf fluorescence GFP jako funkci 2D pozice v rovině mikroskopu. Tento typ grafu je praktický pro zobrazení SMS dat.

(a) TIR-thru objective



(b)



Obrázek 8: Mikroskopie s využitím objektivu pro totální odraz.

a) Schéma experimentálního uspořádání: (O) objektiv, (D) dichroický filtr, (F) filtry, (CCD) 2D řádkový detektor.

b) Příklad zobrazení R6G v PMMA, měřítko 10  $\mu\text{m}$ , intenzita 0,56 kW/cm<sup>2</sup>, vlnová délka 532 nm. Tento obrázek byl získán na TE300 invertovaném mikroskopu (NIKON), zvětšení 60x, NA=1,4, objektiv

s olejovou imersí, 545LP dichroický filtr, HQ525/50 emisní filtr (Chroma, Brattleboro, VT), CCD kamera s zvýšenou citlivostí a posunem rámce, integrační čas 100ms (Princeton Instruments I-Pentamax).<sup>29</sup>

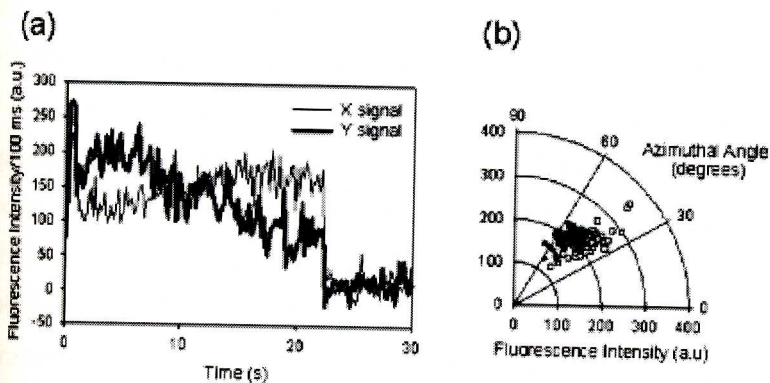
TIR může rovněž vznikat v objektivu s vysokou NA, jak je ukázáno na obrázku 8 (a). Jako u epifluorescenčního mikroskopu paprsek laseru není kolimován. Dokonce mohou být pro obě techniky použity stejné optické součásti. Rozdíl je jen v přidání jednoho zrcadla, jehož nastavením můžeme „přepínat“ mikroskop mezi oběma nastaveními. Na obrázku 8 (b) vidíme zobrazení jednotlivých molekul R6G v PMMA matrici.

Hlavním přínosem TIR je redukce pozadí, které vzniká kvůli tloušťce vzorku a menší výkon, který je zapotřebí k osvětlení vzorků. Dosah TIR je omezen na oblasti, které jsou od krycího skla vzdáleny do cca 150 nm.

## Metody těsně související se spektroskopií jednotlivých molekul

Možnost pozorovat jednotlivé členy rozsáhlé populace demonstrovala heterogenita vyskytující se i mezi jednotlivými individui v měřených maticích. SMS ukázala, že molekuly jsou spektrálně citlivé na své bezprostřední okolí a tato citlivost by měla být studována pro získání lepšího vhledu na mnohotvárnost procesů. Byly vyvinuty mnohé techniky pro pozorování různých fyzikálních parametrů, jako je orientace molekuly, makromolekulární konformační změny, procesy spjaté s přenosem energie a lepší vhled do fyziky fluorescence jako takové. Základní téma je získání největšího možného množství informace z emitovaných fotonů. Jako např. polarizace, vlnová délka, fluorescenční spektrum, doba života stavů atd. Např. pro studium difúzních efektů je nutné zjistit přesnou polohu molekuly a sledovat ji v čase, následně data analyzovat z pohledu Brownova pohybu.<sup>22</sup>

### Polarizační mikroskopie



Obrázek 9: Příklad použití polarizační modulační mikroskopie k zjištění plošné orientace přechodu dipólového momentu jednotlivého fluoroforu na jednom polymerovém řetězci.

a) Fluorescenční emise s x a y polarizovaným buzením v závislosti na čase. Ilustruje nám neustále se měnící rovinný dipólový úhel.

b) Trajektorie rovinného dipólového úhlu intenzity fluorescence stejné molekuly. Ukazuje rozsah úhlů dipólu. Prázdné čtverce korespondují s první polovinou trajektorie a plné kruhy s druhou.

Navzdory faktu, že (difrakčně limitované) rozlišení optických metod je v řádech stovek nanometrů, extrémní citlivost SMS na změny v lokální orientaci umožňuje zkoumat jevy na molekulární úrovni. V tomto ohledu je velmi silnou technikou polarizační mikroskopie, která umožňuje určit úhlovou orientaci molekuly. Ve většině případů jsou absorpční a emisní dipóly fluoreskujících molekul paralelní. Jednou z cest jak získat informace o orientaci je polarizovaná excitace PM (z anglického Polarization Modulation).

Excitace molekulového přechodu je závislá na úhlové orientaci excitačního vektoru elektrického pole  $\mathbf{E}$  (polarizace) a molekulárního přechodového dipólu  $\mu$ . Pravděpodobnost excitace můžeme vyjádřit  $|\mu \cdot \mathbf{E}|^2$ . Pro jednotlivé molekuly, kde je pouze jeden přechodový dipól, takže pro ni předpokládáme diskrétní polarizační anizotropii fluorescence. Pokud je molekula statická nebo rotuje pomalu s ohledem na integrační čas, můžeme pozorovat závislost  $\cos^2$  fluorescenčního signálu, jak polarizace excitačního laserového paprsku rotuje s ohledem na  $\mu$ . Podobná pravidla platí i pro emisní polarizaci. Protože emise molekuly má podobu dipólové emise, umožňuje nám detekce emise ve dvou ortogonálních polarizačních kanálech získat informaci o orientaci molekuly.

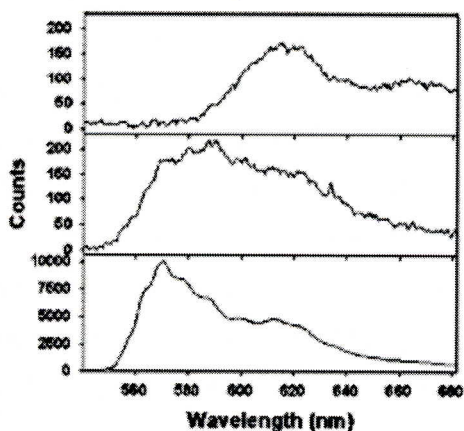
Modulace excitační polarizace může být snadno zabudována do konfokálního nebo wide-field mikroskopu, použitím elektro-optických modulátorů pro rotaci polarizace lineárně polarizovaného laserového paprsku. Konfokální PM geometrie je používána pro měření reorientace laserových barev v polymerových vrstvách<sup>30</sup> a rotace molekul barviv spojených s molekulami DNA ve vodním prostředí. Wide-field experimenty se používají pro pozorování molekulových motorů v reálném čase. Např. rotace F1-ATPázy nebo studie zabývající se rotační flexibilitou jednotlivých proteinů kinesinových motorů, což je bráno jako funkce stavů nukleotidů. Tímto způsobem byl navržen nový pohled na pohybový mechanismus tohoto důležitého proteinu.<sup>31,32</sup>

Ukázkou použití PM pro získání informace o orientaci z jednotlivé molekuly je epifluorescenční experiment. obr. X. ukazuje výsledky ze studie značeného polybutadienového řetězce v PMMA substrátu.<sup>33</sup> K buzení polarizace bylo elektro-opticky přesmykováno mezi ortogonálně kolmými směry v rovině vzorku, označenými x, y. Emitovaná fluorescence byla sbírána přes potřebné filtry obvyklým způsobem. Na každou polarizaci byl sebrán 100 ms záznam jednotlivých molekul. Po skončení experimentu byla sebrána trajektorie každé molekuly. Data typické molekuly ukázány na obrázku 9 (a). Poměr mezi dvěma emisními signály se jasně mění podle rotace molekuly, až do vybělení molekuly (22 s). Obrázek 9 (b) ukazuje jednu z cest zobrazení dat jako polární graf rovinných úhlů, radiálních souřadnic pro získání totální intenzity molekuly odhadované dle vztahu  $(X^2+Y^2)^{1/2}$ . Dynamický charakter takovýchto tras se mění molekulu od molekuly, v důsledku skryté heterogenity v amorfním materiálu.

Alternativní cesta k získání polarizační informace zahrnuje buzení cirkulárně polarizovaným světlem a rozdělení emise ve dvou ortogonálních směrech A a B.<sup>34</sup> I.V tomto případě je fluorescenční polarizace často počítána pomocí vztahu  $(I_A - I_B)/(I_A + I_B)$ . Pokud molekula rotuje rychle, emise nebude polarizovaná a hodnoty P se budou shlukovat kolem nuly. V případě pomalé rotace se vyskytují odchylky P od nuly. Propojení PM a rozlišení emise může poskytnout další informace jako prostorový úhel

kovalentně vázaného fluoroforu.<sup>35</sup> Díky geometrii TIR a NSOM mohou vznikat komplikované polarizační efekty, využitelné k získání informace o orientaci molekuly. V případě TIR, *p*-polarizovaný laser produkuje evanescentní polarizované světlo v obou transverzálních i axiálním směru. Geometrie TIR je využívána pro zobrazení dipólové orientace emise jednotlivých molekul,<sup>36</sup> Sférický Z-efekt způsobuje, že se emise molekuly u tohoto způsobu zobrazování zdá lehce rozostřená ve směru osy Z. Lokální elektrická pole se mění neuspořádaně v rozmezí apertury vlákna sondy NSOM podle efektu blízkého pole.<sup>37</sup> Velikost apertury je větší než jednotlivé molekuly a molekula interaguje s rozdílnými lokálními elektrickými poli během skenování optickým vláknem. Detekovaná mapa fluorescenční intenzity pak ukazuje, jak molekuly interagují s komplexními poli. To může být použito k zjištění orientace molekuly. Ostatní metody zjišťující orientaci molekuly zahrnují prstencovité osvětlení<sup>38</sup> a současně rozlišení emise ve třech polarizovaných směrech.<sup>39</sup>

### Spektrální disperze emise



Obrázek 10: Fluorescenční spektrum molekuly Dilc<sub>18</sub> na vrstvě PMMA, získané na mřížkovém spektrofotometru s dusíkem chlazenou CCD kamerou. Excitační intenzita 1,5 kW/cm<sup>2</sup> při 532 nm. Na vrchním a prostředním panelu je spektrum z odlišných molekul (integrační čas 30 s). Spodní panel – široké spektrum (z mnoha molekul, integrační čas 1 s, silně zeslabený laser)

Dříve zmíněné metody detekce SMS zahrnují měření totálního množství fotonů na širokopásmovém detektoru, nejčastěji CCD nebo SPAD, měření červeně posunuté totální fluorescence jako funkce času. Je také možné získat spektrální informaci o SMS pomocí speciálně upraveného skenovacího mikroskopu. Jedno-částicový detektor může být nahrazen spektrometrem s mřížkou pro spektrální disperzi, která je snímána CCD kamerou, umístěnou za štěrbinu. Každý vertikální proužek sloupec CCD čipu může být sečten a vytvořit „superpixel“, který reprezentuje jednu vlnovou délku. Vyčtením informace z čipu pak dostaneme kompletní spektrální informaci. Je dobré si uvědomit, že emisní spektrum z jedné molekuly má zákonitě horší SNR než vlnově integrovaný signál, protože stejný počet fotonů je nyní rozložen na mnoho superpixelů, které se chovají jako individuální detektory. Optická disperze indukuje

další optické ztráty v mikroskopickém systému. Z tohoto důvodu se mřížkové spektrometry s vysokým rozlišením příliš nepoužívají.

Prvotní jedno-molekulová spektra byla získána na pevných látkách při nízkých teplotách.<sup>40</sup> Tento typ spekter je ekvivalentní Ramanovským spektrům a pozice čar ukazuje Ramanovy aktivní mody základního elektronového stavu. Primární přínos práce při nízkých teplotách je, že šířky čar jsou extrémně úzké a je velmi snadné vidět malé změny v pozici maxim. I velmi slabé čáry jsou detekovány, protože fotony z jednotlivé molekuly jsou koncentrovány na malý počet pixelů. Spektra byla měřena pro jednotlivé molekuly zabudované v řadě krystalických a polymerových matic. Data o poloze maxim se lišily, v závislosti na prostředí molekuly.

Emisní spektra jsou také měřena při pokojových teplotách. Byly získány podobné efekty jako při nízkých teplotách, spektrální difúze, heterogenita v maximech fluorescence pro různé molekuly<sup>41</sup> a pro podlouhlé molekuly chromoforů na jedno-molekulových řetězcích polymerů.<sup>42</sup> Primární potíží při měření spekter za pokojové teploty je, že šířka maxim je poměrně velká. Obvykle kolem 75 nm a více. Současné studie<sup>43</sup> zkoumají změny indukované lokálními charakteristikami tenkých polymerových filmů sběrem spektrálních dat nílské červeně. Je to barva citlivá na polaritu, schopná výměny náboje s okolním prostředím. Autoři sbírali spektra tenkých filmů z relativně nepolárního PMMA a polárního PVA. Měřili polohy a šířky maxim fluorescenčních spekter. V PMMA se objevují dvě šířky maxim. Tento efekt autoři připisují přítomnosti dvou domén v filmu PMMA s odlišnými lokálními podmínkami. Naopak filmy z PVA vykazují široké spektrum prostředí, podmínky velmi závisí na míře hydratace.

Příklad fluorescenčního emisního spektra jedné molekuly při pokojové teplotě je ukázán na obrázku 10. Molekula Dilc<sub>18</sub> na vrstvě PMMA ozářena laserem (1,5 kW/cm<sup>2</sup>, 532 nm v konfiguraci konfokálního mikroskopu). Vrchní a prostřední spektrum ukazují spektra odlišných molekul, integrační čas 30 s. Vidíme radikální změnu v poloze i tvaru spektra jako výsledek lokálních interakcí. Pro porovnání ukazuje nižší panel obrázek 10 spektrum sebrané z mnoha molekul (integrační čas 1 s, daleko nižší výkon laseru). Vlnky ve spodním spektru jsou důsledkem transmisních charakteristik mikroskopických filtrů.

## Fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET

Další, velmi často používaná, fluorescenční technika. Krátkovlnný „donor“, fluorofor je buzen zdrojem světla, jeho energie je transformována na delší vlnové délky „akceptorové“ molekuly přes Försterovu dipól-dipól interakci. Posléze „akceptor“ fluoreskuje, emituje světlo o dlouhých vlnových délkách. Efektivita FRET,  $E_d$  je závislá na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem a může být vyjádřena vztahem:

$$E_d = 1 / \left\{ 1 + (R / R_0)^6 \right\},$$

kde  $R$  je vzdálenost mezi donorem a akceptorem a  $R_0$  je charakteristická vzdálenost, kde je 50% energie přeneseno z donoru na akceptor. Za řádných podmínek může být účinnost přenosu energie vyjádřena z poměru emisní intenzity donoru a akceptoru. Molekulární faktory, které ovlivňují  $R_0$  jsou spektrální překryvy donorového–akceptorového páru, index lomu média, kvantový výtěžek donoru a akceptoru, relativní orientace přechodového dipólu donoru a akceptoru. Typické hodnoty  $R_0$  se pohybují v rozsahu 2–6 nm. Technika FRET v SMS je popsána v mnoha člancích.<sup>44</sup>

V důsledku šesté mocniny vzdálenosti donoru a akceptoru je FRET široce používán pro měření malých vzdáleností mezi místy na velkých molekulách (např. proteiny). Prostorový rozsah FRET je daleko pod difrakčním limitem, takže je díky této technice v principu možné získat prostorovou informaci s lepším rozlišením. Zvláště výjimečným nástrojem se FRET ukázal při zkoumání konformačních změn biologických makromolekul. Ha *et al.*<sup>45</sup> Jako první využil FRET pro sledování konformačních změn na 3-helixovém RNA spoji, jehož konformace se měnila po navázání ribozomálního proteinu S15. V tomto experimentu autor použil konfokální mikroskop a detekované světlo rozdělil přes dichroické zrcadlo na dva SPAD detektory. Propuštěná červená (donorová) intenzita a odražená modrá (akceptorová) intenzita mohou být sledovány zároveň.

Stupeň přenosu energie je vysoce citlivý na fluorescenční vlastnosti každé molekuly barvy. Fluorescenční dynamika může být extrémně komplikovaná i pro nejjednodušší systémy, jak bylo např. ukázáno na spektrálním posunu jednotlivých molekul. Fluktuace ve fluorescenčních vlastnostech barev samotných souvisí s interakcemi mezi molekulou barvy a jejím lokálním prostředím. Drasticky se mění parametry jako emisní spektrum a kvantový výtěžek. Právě tyto parametry by měly být měřeny odděleně v kontrolním experimentu. Dále rotační charakteristiky laserových barev ovlivňují orientační faktor  $R_0$  a ten se může dynamicky měnit na časové škále experimentu. Pro fixní vzdálenost  $R$  platí, že při poklesu účinnosti FRET z maxima, když jsou přechodové dipóly donoru i akceptoru uspořádány paralelně k nule, a když jsou dipóly kolmé, můžeme mylně předpokládat konformační změnu v rotaci, v případě, že je relativní rotace barvy dostatečně pomalá. Při měření v SMS je nutné stanovit mnoho kontrol. Například i malé změny v hodnotě  $R_0$  mají obrovský dopad na účinnost FRET. Třeba rotační korelační časy dvou laserových barev mohou vyžadovat oddělené měření s polarizační anizotropií pro získání správné informace.

Další limitací FRET je, že do systému musí být přidány dvě odlišné barvy. Protože základním přínosem SMS je citlivost na heterogenitu systému, obě laserové barvy musí být citlivě a rovnoměrně rozptýleny v celém vzorku. Zvláštním problémem je přidání barev u proteinů.<sup>46</sup> Ještě obtížnější situace je u introdukování barev do živých buněk. GFP (zelené fluoreskující proteiny) nám umožňují se těmto problémům vyhnout, protože díky genetickým modifikacím je možné vložit DNA pro GFP na specifickou lokaci na DNA sekvenci, čímž vzniká přirozená fluoreskující značka o známém umístění. Poměrně nový postup je používání tzv. „cameleon“ konstruktů. Jedná se o fúzi dvou GFP mutantů na  $Ca^{2+}$  dependentní calmodulin protein.<sup>47</sup> Po navázání  $Ca^{2+}$  se cameleon protein stáhne, tlačí při tom své dva konce blíže k sobě. Na jednom jeho konci je exprimována modře posunutá varianta GFP a na druhém mutant, jehož emise je posunutá do červené části spektra. Buzením modrého donoru GFP vznikl signifikantní nárůst v účinnosti FRET (přenos na červený GFP přes  $Ca^{2+}$  cameleon). Nicméně slabá fotostabilita GFP redukuje množství získatelné informace.

Přes veškeré obtíže FRET nepochybně je velmi účinným nástrojem ve studiu biomolekulární dynamiky. K upřesnění orientačního faktoru jsou často dva fluorofory propojeny plochou alkanovou saturevanou spojkou pro redukci rotačního korelačního času. Další výhodou je, že velké kvalitativní změny v účinnosti FRET mohou ukazovat konformační změny systému. V SMS je FRET využíván ke studiu konformační dynamiky,<sup>48</sup> skládání (folding) jednotlivých RNA enzymů,<sup>49</sup> jednotlivých GCN4 proteinů,<sup>50</sup> rozplétání DNA Rep helikázou.<sup>51</sup>

### Dvou-fotonová excitace

V současné době se dvou-fotonová excitace stala užitečným nástrojem pro zobrazování biologických objektů ve 3 dimenzích. V souvislosti s kvadratickou závislostí pravděpodobnosti dvou-fotonové excitace na intenzitě laseru se jedná o proces, který obrovsky redukuje excitační objem.<sup>52</sup> Tento faktor může být obrovskou výhodou např. pro konfokální mikroskopii, kde je hloubka pole velmi malá. Intenzita laseru mimo laserový paprsek je mnohem menší než ve fokusu, což poskytuje výbornou možnost ohraničeného průřezu. Konstrukce dvou-fotonového mikroskopu je velmi podobná konstrukci konfokálního mikroskopu. Používá pulsní femtosekundový excitační zdroj, odstraněna je jen kruhová štěrbin. Jednou z hlavních výhod je nízké pozadí z nečistot, díky malému objemu laserové sondy. To znamená i nízkou fluorescenci pozadí. Další výhodou je možnost dosáhnout přechodu v oblasti blízké UV za použití záření blízkého IR, což je velkým přínosem, protože mnoho materiálů silně fluoreskuje při buzení blízko UV oblasti, ale pro IR jsou prostupné (včetně živých buněk a optického skla).

Dvou-fotonová excitace SMS fluorescence byla poprvé prováděna v roce 1995 na jednotlivých molekulách Rhodaminu B pohybujících se ve fokusu laseru.<sup>53</sup> Znehybněné jednotlivé molekuly byly také pozorovány s porovnatelným SBR ke konvenčnímu konfokálnímu mikroskopu. Nicméně pravděpodobnost vybělení vzrůstala přibližně s faktorem dva. Zřejmě díky absorpci fotonu v momentě, kdy se molekula nachází v temném tripletním stavu.<sup>54</sup> Právě toto je zřejmě limitací dvou-fotonové excitace. Je zde také možnost zahřívání hostitelské matrice nebo kapaliny vyšší harmonickou absorpcí. Fokuseování femtosekundového pulsního laseru musí být velmi obezřetné, i malé změny mohou generovat bílé světlo ve vzorku. Limitující pro SMS experimenty je režim intenzity. Díky tomu jsou často vyžadovány dlouhé excitační doby pro získání kvalitního SNR. Dvou-fotonová excitace je velmi nadějný nástroj obzvláště vhodný pro buněčné systémy a jiné silné objekty autofluorescence.

### Časově závislé dynamické studie

Velkou výhodou SMS je, že zkoumaný systém může být neinvazivně zkoumán v různě časově závislých stavech. Právě tento typ informace je poměrně obtížné získat z průměrovaných měření, jako například rtg, kryo-elektronová mikroskopie. Modelová situace je například: vzorek s velkým množstvím molekul, složený z enzymů v různém chemickém stavu. Stav jsou často nesynchronizované a detaily těchto změn mohou být často ztraceny v statistice. Právě SMS experiment sledující časově závislé děje může odstranit tuto heterogenitu bez potřeby synchronizace.

Časově závislé efekty se mohou měnit na odlišných časových škálách, od nanosekund po minuty a mohou záviset na mnohých faktorech.

## Měření doby života fluorescence

Na krátké časové škále nanosekund obsahuje proud fotonů emitovaných z molekuly informaci ve formě doby dopadu jednotlivých fotonů. Jedna z cest jak získat informaci v tomto režimu zahrnuje buzení vzorku krátkými pulsy z opakovaně pulsujícího zdroje, jako například pulsní laser nebo pulsní světlo-emitující dioda. Po každém excitačním pulsu může být emitován pouze jeden foton (za předpokladu, že je buzena právě jedna molekula). Měření distribuce časové odpovědi krátkými excitačními pulsy mezi budícím fotonem a emitovaným fotonem umožňuje přímé měření doby života excitovaného stavu molekuly  $\tau_F$ . Na konfiguraci mikroskopu příliš nezáleží, doba života může být měřena pomocí standardních technik časově korelovaného jedno-fotonového sčítání. Při této metodě je k měření histogramu časových odpovědí pro páry budících a emitovaných fotonů používána digitální časová elektronika. Např. speciální deska do PC (TimeHarp, Picoquant). Obvyklý počet fotonů, který je nutno detekovat pro zjištění doby života (stavu) molekuly je v řádech 100. S větším požadavkem na přesnost se toto číslo zvyšuje. Měření časového rozlišení je limitováno funkcí odpovědi aparatury a maximální rychlost odpovědi je ovlivněna mrtvým časem detektoru. Pro tento parametr mají SPAD detektory obvykle delší mrtvý čas než PMT.

Současné experimenty měření doby života zahrnují studie protékajících proudů,<sup>55</sup> následované nízkoteplotními SMS měřeními doby života pro systém pentacen/P-terpenyl.<sup>56</sup> První experimenty v této oblasti měřené za pokojové teploty byly prováděny na R6G na površích, za použití NSOM metod.<sup>42</sup> V současné době lepší technika sběru a zpracování dat umožňuje dynamicky posunovat rámec, ve kterém je doba života měřena. To umožňuje pozorování časově závislých změn v době života ve spojitosti s dynamickým efektem zhášení, který vyplývá z konformačních změn.<sup>57</sup> SMS měření doby života bylo použito při výzkumu dynamiky tRNA,<sup>58</sup> fluktuace v konformaci DNA<sup>59</sup> a při výzkumu elektronového transferu na rozhraní.<sup>66</sup>



## Experimentální část, materiál a metody

### Popis a schéma aparatury

Jako excitační zdroj pro fluorescenční spektra byl použit He-Cd laser (IK4151-C, KIMMON electric co., ltd) o výkonu 28 mW, průměrem paprsku 0,81 mm a vlnové délce 441,6 nm, úroveň šumu je v rozmezí 1% (30 kHz-2MHz). Paprsek prochází přes elektronickou závěrku VMM-T1 (UNIBLITZ) a sadu neutrálních filtrů s možností volby 6 různých OD (0,1/ 0,3/ 0,5/ 1,0/ 2,0/ 3,0). Následně je laser fokusován křemennou čočkou s ohniskovou vzdáleností 10 cm, průměrem 0,5 palce (1,27 cm) na skleněný nebo křemenný hranol pro totální reflexi.

Křemenný hranol byl vyroben v „Vývojových optických dílnách AVČR v Turnově“ (511 01 Turnov, Skálova 89). Na spodní straně hranolu je imersním olejem (v případě skla) nebo glycerolem (v případě křemene) připevněno krycí sklíčko (z téhož materiálu jako je hranol) s vrstvou vzorku v tenké vrstvě matrice (nepolární PMMA nebo polární PVA). Tyto tenké vrstvy jsou připravené rotačním nanášením na spin-coateru domácí výroby.

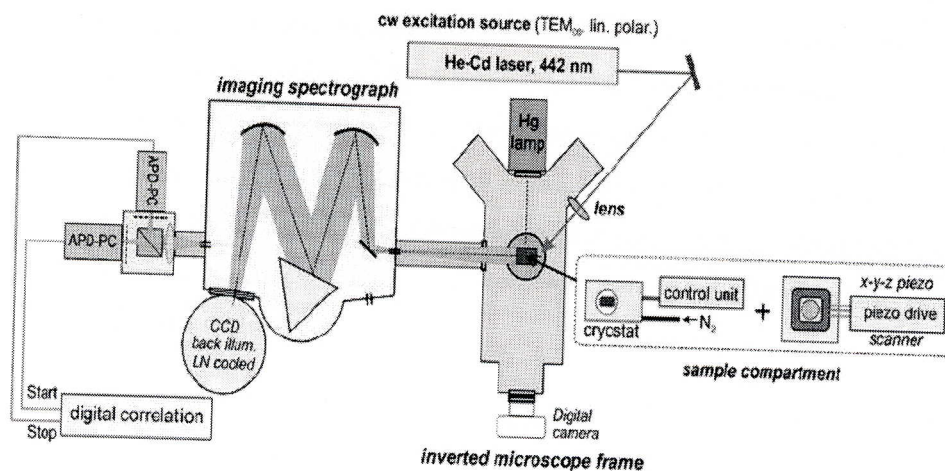
Hranol leží na posuvném stolku invertovaného mikroskopu (OLYMPUS IX70) v objektivové rovině. Díky totální reflexi je generována evanescentní vlna, která ve vzorku budí fluorescenční signál. Ten je zachycován objektivem Uapo / 340, zvětšení 20x, NA=0,75,  $\infty / 0,17$ . Objektiv Uapo / 340 jsem použil pouze k zjištění velikosti stopy laseru. Při měření fluorescenčních spekter jsem použil objektiv UMPlan FI, zvětšení 100x, NA=0,95,  $\infty / 0$ .

Signál je veden objektivem na dva filtry. HC-Laser Clean-up maxline 441,6/1,7 (AHF analysentechnik, Tübingen) průměr 12,5 mm, pro odstranění laserové čáry a Raman emitter RS 442 LP, (AHF analysentechnik, Tübingen), transmise pro 452–996 nm, OD6 (441,6nm)/FWHM<444  $\text{cm}^{-1}$ , průměr 25 mm, tloušťka 3,5 mm.

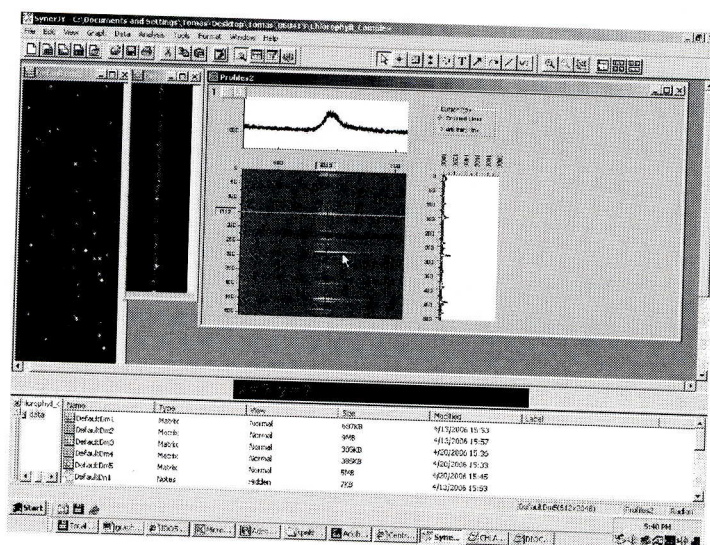
Po přefiltrování vstupují emitované fotony do spektrofotometru TRIAX 332 (JOBIN YVON), kde se rozloží na spektrum pomocí mřížky. Pro měření fluorescenčních spekter jsem použil mřížku (510 19) s hustotou vrypů 300 vr/mm s nejvyšší propustností při 600 nm v úhlu  $5^\circ 10'$ . Výsledné spektrum je detekováno na CCD kameře SpectrumOne (JOBIN YVON). Kamera je chlazená dusíkem na 77°K. Světlo je zde k CCD k čipu přiváděno zezadu (Back Illuminated), čip o velikosti 26,6 x 6,9 mm odpovídá 2048 x 512 pixelů. Velikost jednoho pixelu je 13,5  $\mu\text{m}$  x 13,5  $\mu\text{m}$ . Typický temný proud se pohybuje okolo hodnoty 0,5  $e^-$ /pixel/hod, maximální 1  $e^-$ /pixel/hod. Dynamický rozsah je 16 bitů, typický načítací šum je 13  $e^-$ rms, maximální 15  $e^-$ rms. Temný šum kamery má hodnotu 816 pulzů. Pozadí tedy vychází okolo 204 pulzů.

Digitální výstup je zpracován osobním počítačem se softwarem SynerJY (JOBIN YVON), postaveném na základě Origin (OriginLab Corporation).

### SINGLE MOLECULE SET-UP



Obrázek 11: Schéma aparatury pro měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul. Na schématu můžeme vidět základní součásti aparatury: He-Cd laser, 441,6 nm, invertovaný optický mikroskop, hranol pro totální reflexi, spektrofotometr, CCD kameru. Aparatura umožňuje i měření s kryostatem za teploty 77°K, dále také Hg lampu. Část s korelační spektroskopií je zatím ve výstavbě. Kryostat (NMR Technologies, Inc.) využívá ke chlazení Joule-Thomsonův efekt.



Obrázek 12: Typické aktivní okno používaného software SynerJY (JOBIN YVON), postaveném na základě Origin (OriginLab Corporation).

#### Kalibrace spektrofotometru

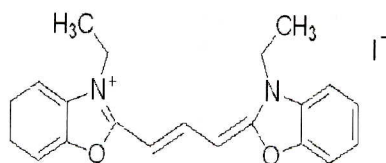
Pro kalibraci jsem použil neonovou a argonovou kalibrační lampu ( Pen-Ray Lamp, ULTRA-VIOLET PRODUCTS, INC. CA. U.S.A.) se zdroji (Pen-Ray Power Supply MODEL SCT-2). Pro samotnou kalibraci jsem přiřadil k jednotlivým pixelům správnou vlnovou délku podle dodaného protokolu. Program SynerJY-CCD CALIBRATION (JOBIN YVON), dále fitoval data polynomem druhého řádu.

### **Příprava vzorků**

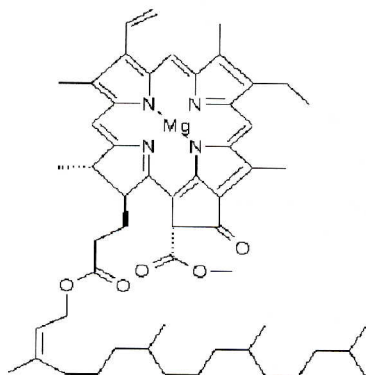
Chlorofyl a, DIOC jsem naředil na požadovanou koncentraci v metanolu. Příprava matric: Pevné PMMA jsem rozpustil v chloroformu. Lepší čistoty je dosaženo vysrážením do methanolu. Pro odstranění fluoreskujících nečistot jsem na roztok nechal působit germicidní lampu. Výsledný roztok měl koncentraci 4%. Roztok PVA jsem ředil na koncentraci 2%. Vzorek jsem nanášel na křemenné sklo v spincoateru v objemu 40 $\mu$ l. Tloušťka vrstvy byla změřena J. Valentou na mechanickém profilometru Alpha-Step IQ fy KLA Tencor. Při námi používaných podmínkách se tloušťka vrstvy pohybuje v rozmezí 160 – 300 nm pro PMMA a 300 – 410 nm pro PVA. Kyslík jsem odstraňoval probubláváním zásobního roztoku matrice a následně i vzorku plynným dusíkem (N<sub>2</sub>). Dalším krokem bylo ponechání sklíček s naneseným vzorkem v exikátoru po dobu několika hodin.

**Použitý materiál**DIOC<sub>2</sub>(3)

3,3'-Diethyloxakarbocyanin jodid, sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, molekulová hmotnost je 460,31 g/Mol, výrobce SIGMA-ALDRICH.



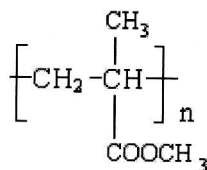
Chlorofyl a, sumární vzorec: C<sub>55</sub>H<sub>72</sub>MgN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, molekulová hmotnost: 893,49 g/Mol. Dodán Františkem Váchou, oddělení fotosyntézy ÚMBR AVČR.



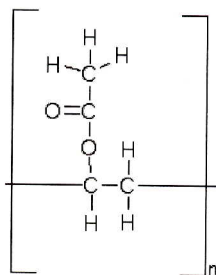
Chloroform pro spektroskopii, sumární vzorec: CHCl<sub>3</sub>, molekulová hmotnost: 119,38 g/Mol. Stabilizovaný 1% etanolem. Výrobce Merck KG a A.

Metanol pro spektroskopii, sumární vzorec: CH<sub>3</sub>OH, molekulová hmotnost: 32,04 g/Mol, výrobce Uvasol®

PMMA Polymetyl metakrylát, sumární vzorec: n[C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>2</sub>], výrobce Merck KG a A.

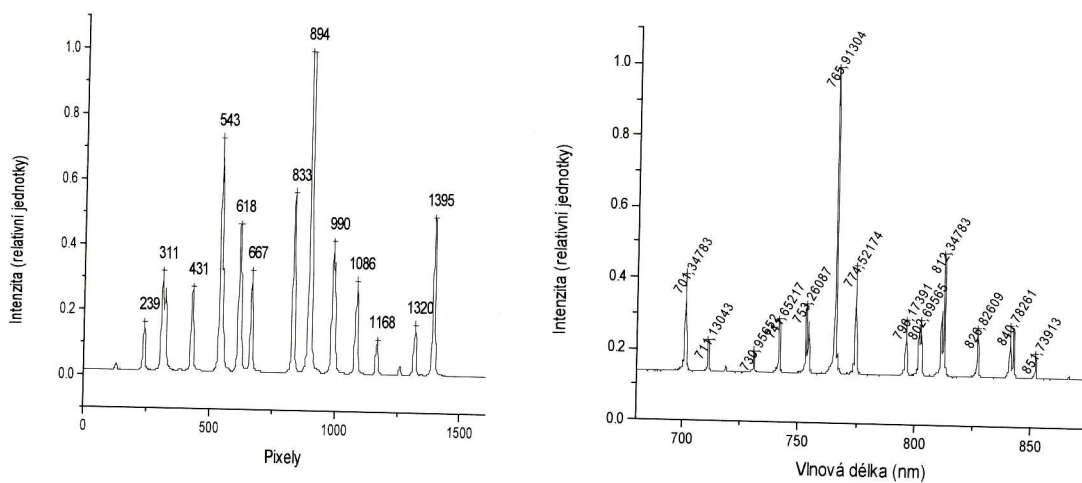


PVA Polyvinyl alkohol, sumární vzorec: n[C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>], Merck KG a A.

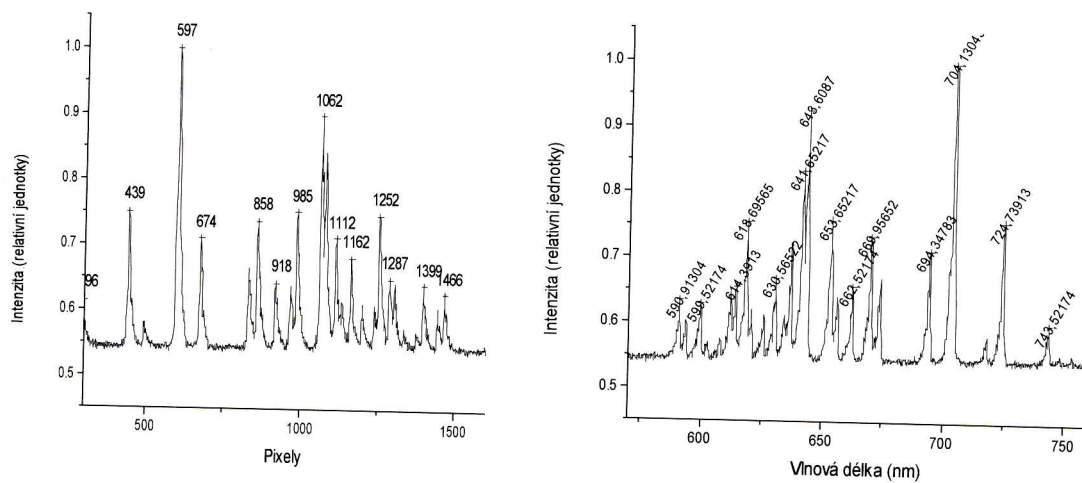


## Výsledky

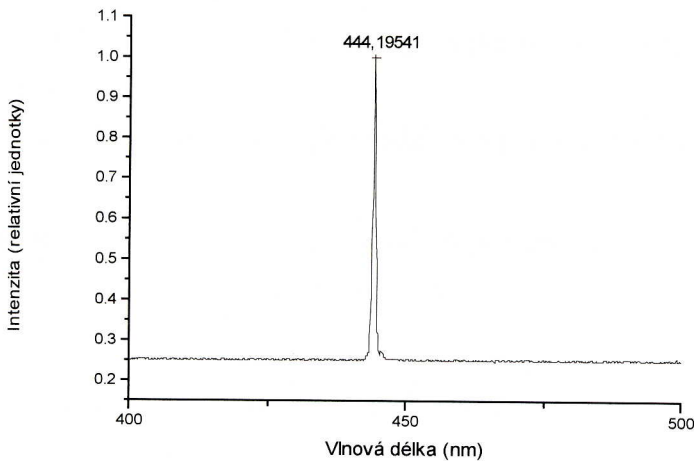
### Kalibrace spektrofotometru TRIAX 332 (JOBIN YVON)



Obrázek v1: Kalibrační spektrum argonové lampy, štěrba 0,05 mm, centrální vlnová délka 700 nm, integrační čas 60 s.



Obrázek v2: Kalibrační spektrum neonové lampy, štěrba 0,05 mm, centrální vlnová délka 650 nm, integrační čas 30 s.



Obrázek v3: Spektrum čáry laseru po kalibraci CCD kamery.

### Základní výpočty parametrů aparatury a emise chlorofylu A

základní údaje:

vlnová délka excitačního světla,	$\lambda = 441,6$
indexy lomu, umělý křemen	$n_q = 1,463$
imerzní olej	$n_{oil} = 1,479$
vzduch	$n = 1$

kritický úhel pro totální reflexi (rozhraní umělý křemen – vzduch):

$$\theta_c = \arcsin(n/n_q) = \arcsin(1/1,463) = 43^\circ$$

Úhel dopadu paprsku laseru na odrazivém rozhraní hranolu  $\theta_i = 69^\circ$  a je určen polohou zrcadla, které směřuje paprsek na hranol pro TIR.

### Intenzita laserového paprsku v rovině vzorku

Průměr laserového paprsku je 0,81 mm, nicméně po odrazu na spodní ploše hranolu se laserová stopa protáhne do eliptického tvaru. Nejdříve jsem získal velikost poloos a, b z obrázku získaného na CCD kameře (odečtením souřadnic pixelů, [988;183], [1054;183] a [1017;90], [1017;270]) podle vztahu:

$$d = \sqrt{((x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2)},$$

dlouhá poloosa  $a = 90$  pixelů, krátká poloosa  $b = 33$  pixelů na obrázku z CCD. Po přepočtení z jednotek pixelů na cm (velikost jednoho pixelu je při zvětšení 1x:  $13,5 \mu\text{m} \times 13,5 \mu\text{m}$ ) a po započtení zvětšení (20x) získáme:  $a = 61 \mu\text{m}$ ,  $b = 22 \mu\text{m}$  pro skutečný vzorek. Dále jsem dosadil do vztahu pro obsah elipsy:

$$S_{elipsy} = \Pi ab$$

dostaneme velikost osvětlené plochy vzorku  $S=0,421 \cdot 10^{-4}$ ,  $\text{cm}^2$ . Výkon laseru jsem změřil v rovině vzorku na  $p = 2,7 \text{ mW}$ .

Intenzitu laseru můžeme vyjádřit jako:  $I_0 = p/S$ , pak  $I_0 = 64 \text{ W/cm}^2$ .

### Intenzita evanescentní vlny a hloubka penetrace

Intenzita evanescentní vlny je dána vztahem:

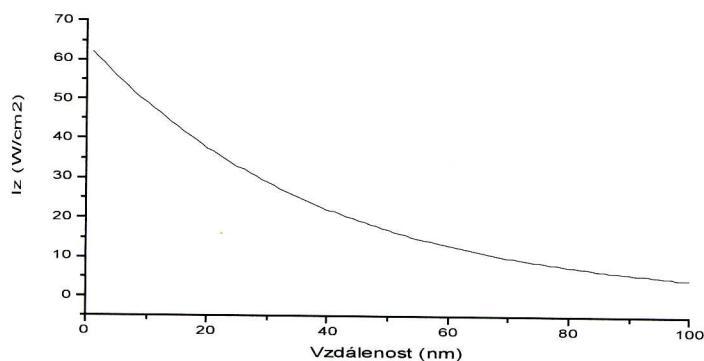
$$I_z = I_0 e^{-z/d},$$

$I_z = I_0/2$  (získáme  $z$ , vzdálenost 50ti% intenzity),

penetrační hloubka:

$$d = \lambda / 4\pi \sqrt{(n_q^2 \sin^2 \theta_i - n^2)},$$

pokud je  $\theta_i = 69^\circ$ , pak  $d = 37,8 \text{ nm}$ , intenzita je znázorněna na tomto grafu:



Obrázek v4: Počet molekul ve zkoumaném objemu

Objem vzorku osvětlený excitačním zářením je dán:  $V = Sz$ , kde  $z$  je vzdálenost, od rozhraní, kde intenzita poklesne na 50%, tedy  $I_z = I_0/2$ , z grafu vidíme, že  $z = 26,2 \text{ nm}$ .

Použil jsem tyto koncentrace roztoků roztoků DIOC a chlorofylu A:  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-9}$ . Z

koncentrace  $C$  jsem vypočetl počet molekul  $N$  v osvětleném objemu vzorku podle vztahu:

$N = C \cdot V \cdot N_A$  ( $N_A$  je Avogardova konstanta). Pro tyto koncentrace tedy platí:

$$N_1 (\text{konc. } 10^{-4}) \approx 10^8 \text{ molekul}$$

$$N_2 (\text{konc. } 10^{-6}) \approx 10^6 \text{ molekul}$$

$$N_3 (\text{konc. } 10^{-7}) \approx 10^5 \text{ molekul}$$

$$N_4 (\text{konc. } 10^{-9}) \approx 10^3 \text{ molekul}$$

Nyní předpokládejme, že zkoumaná oblast o objemu  $V_z$  je selektivně vymezena štěrbinou o šířce 0,1 mm, na výšku čipu 6,9 mm (štěrbinu 0,1 mm používáme pro měření fluorescenčních spekter), penetrační hloubka  $z = 26,2$  nm a dostaneme  $V_z = 1,8 \cdot 10^{-19} \text{ m}^3$ , pak tedy platí:

$$N_1 (\text{konc. } 10^{-4}) \approx 10^5 \text{ molekul}$$

$$N_2 (\text{konc. } 10^{-6}) \approx 10^3 \text{ molekul}$$

$$N_3 (\text{konc. } 10^{-7}) \approx 10^2 \text{ molekul}$$

$$N_4 (\text{konc. } 10^{-9}) \approx 10^0 \text{ molekul}$$

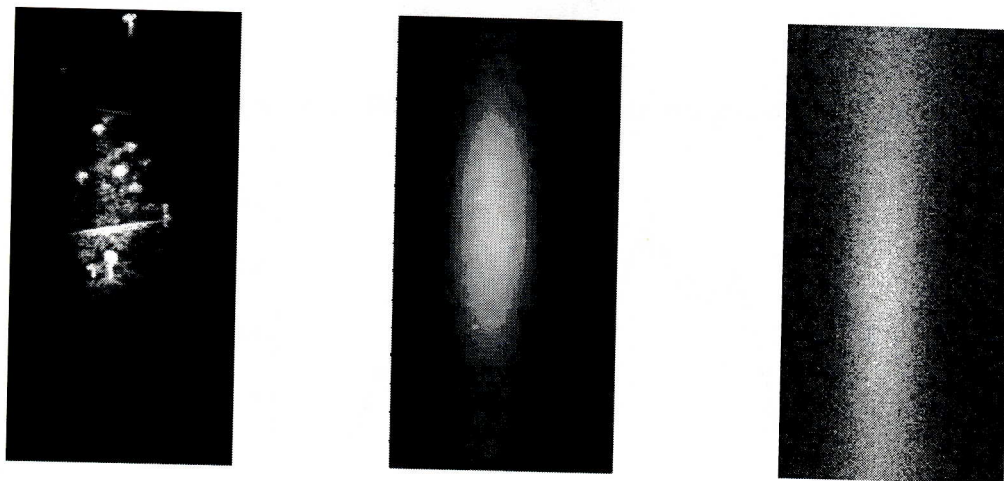
tyto hodnoty se přibližně potvrdily i v praxi.

### Počet emitovaných fotonů pro chlorofyl a

$$\text{Energie jednoho fotonu je } E = h\nu = hc/\lambda = 6,63 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8 / 441,6 \cdot 10^{-9} = 5 \cdot 10^{-19} \text{ J}$$

Absorpční průřez molekuly chlorofylu je  $\sigma = 0,5 \cdot 10^{-20} \text{ m}^2$  a fluorescenční kvantový výtěžek je  $\Phi_F = 0,32$ .

Počet emitovaných fluorescenčních fotonů je signál  $S = \Phi_F \sigma P_{\text{laser}} / S h\nu = 0,32 \cdot 0,5 \cdot 10^{-20} \cdot 64 / 0,421 \cdot 10^{-4} \cdot 5 \cdot 10^{-19} = 1,21 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Do výsledku není započtena efektivita detektoru.

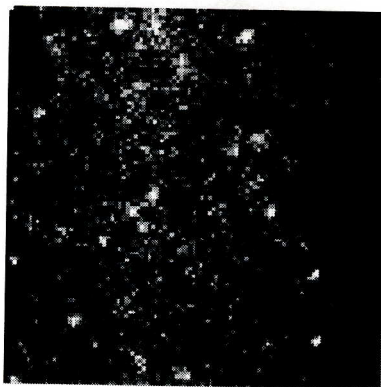


Obrázek v5: Stopa laseru, v pořadí zleva doprava: stopa laseru bez filtru, s dvěma různými filtry na skleněném hranolu. Štěrbina 4 mm, integrační čas 3 s, OD 0.

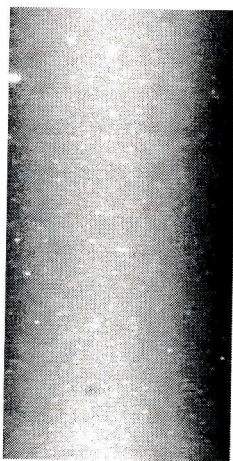


### Měření na skleněném hranolu

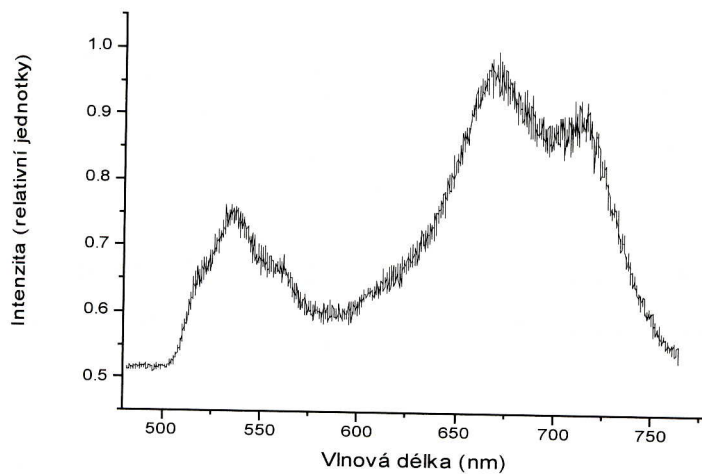
Velmi podstatným problémem při stavbě aparatury byla fluorescence skleněných komponent mikroskopu, konkrétně skleněných filtrů a hranolu. To znamená omezené použití takovéto aparatury pouze na objekty, jejichž fluorescenční maxima nemají překryv s fluorescencí skla.



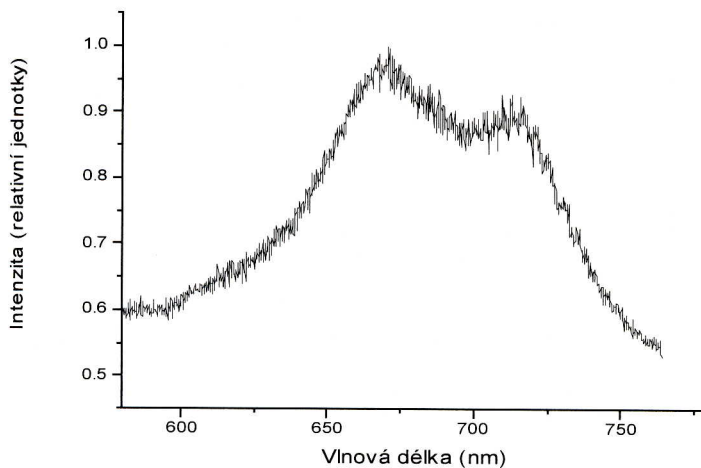
Obrázek v6: Fluorescence skla v rozsahu 50 x 50 pixelů. Štěrbina 4 mm, integrační čas 500 ms, OD 0.



Obrázek v7: Fluorescence skla na široké štěrbině. Štěrbina 4 mm, integrační čas 3 s, OD 0.



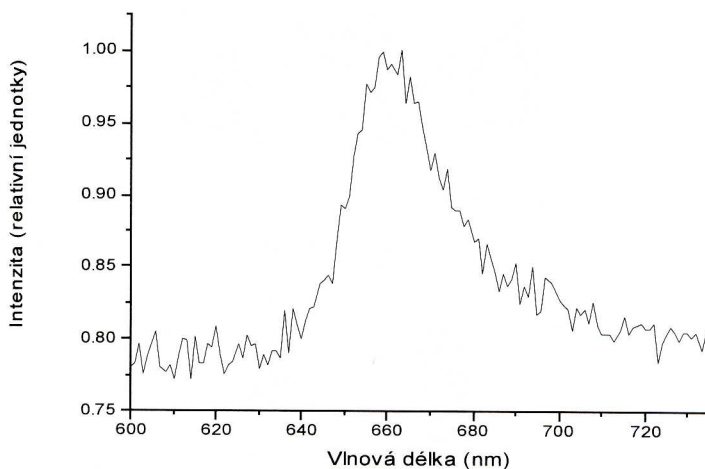
Obrázek v8: Porovnání velikosti signálu fluorescence DIOC a skla. Štěrbina 0.1 mm, centrální vlnová délka 625 nm, integrační čas 60 s, OD 0. Spektrum DIOC vidíme v rozmezí 500 – 580 nm, fluorescenci skla 600 – 750 nm.



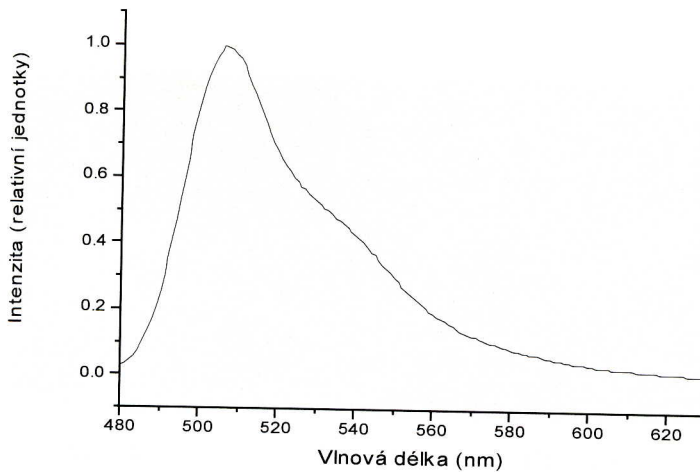
Obrázek v9: Detailní zobrazení spektra fluorescence skla. Štěrbina 0.1 mm, centrální vlnová délka 625 nm, integrační čas 60 s, OD 0.

#### Kontrolní spektra měřená naměřená na spektrofluorometru SPEX Fluorolog (JOBIN YVON)

Pro určení správné polohy maxim jsem použil spektra těchto vzorků naměřená na spektrofluorometru SPEX Fluorolog (JOBIN YVON).

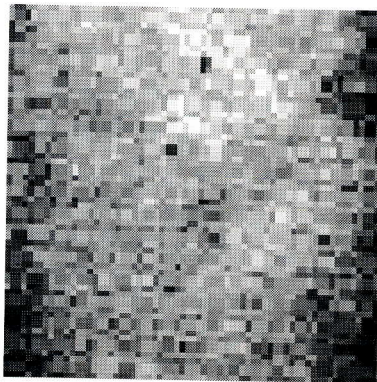


Obrázek v10: Spektrum fluorescence chlorofylu a naměřené na spektrofluorometru SPEX Fluorolog (JOBIN YVON). 17 integrací, pevné matrici PVA na křemenném skle, koncentrace  $10^{-8}$ , maximum 661 nm

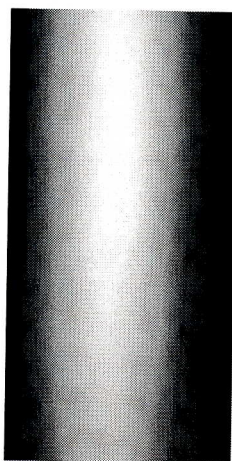


Obrázek v11: Spektrum fluorescence DIOC naměřené na spektrofotometru SPEX Fluorolog (JOBIN YVON). Bez integrace, v pevném matrici PMMA na křemenném skle, koncentrace  $10^{-8}$ , maximum 507 nm.

#### Měření DIOC na křemenném skle, koncentrace $10^{-4}$



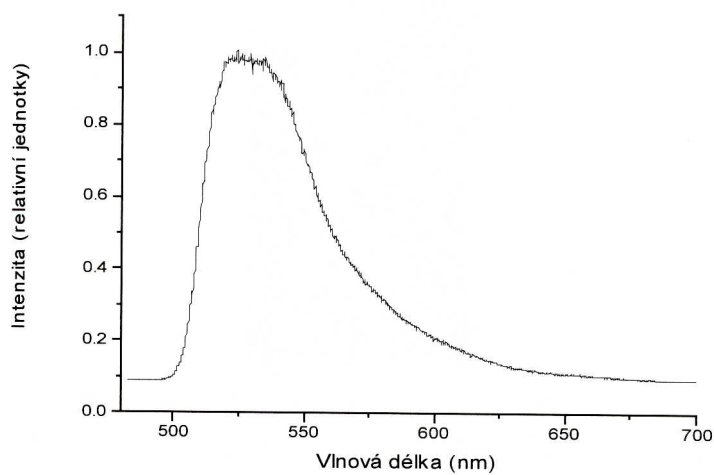
Obrázek v12: Fluorescence DIOC na křemenném skle koncentrace  $10^{-4}$ . Štěrbina 4 mm, integrační čas 0.5 s, OD 4, výřez 50 x 50 pixelů. Vidíme, že koncentrace je příliš vysoká, nejsme schopni rozlišit jednotlivé molekuly.



Obrázek v13: Zobrazení fluorescence DIOC z široké štěrbině na křemenném skle koncentrace  $10^{-4}$ . Štěrbina 4 mm, integrační čas 0.5 s, OD 4.

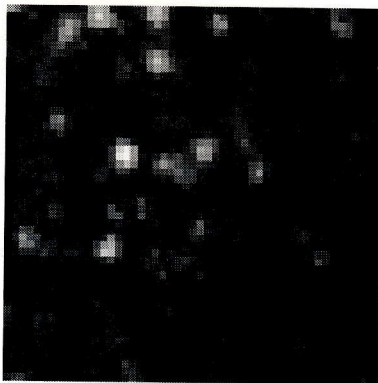


Obrázek v14: Vlevo obrázek úzké štěrbině (bez jednotlivých molekul). Štěrbina 0,1 mm, integrační čas 10 s, OD 4. Vpravo obrázek spektra na celém čipu CCD. Štěrbina 0.1 mm, centrální vlnová délka 625 nm, integrační čas 60 s, OD 4.

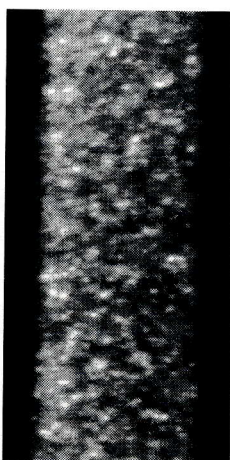


Obrázek v15: Spektrum DIOC na křemenném skle. Spektrum odpovídá průřezu předchozího obrázku celé plochy čipu.

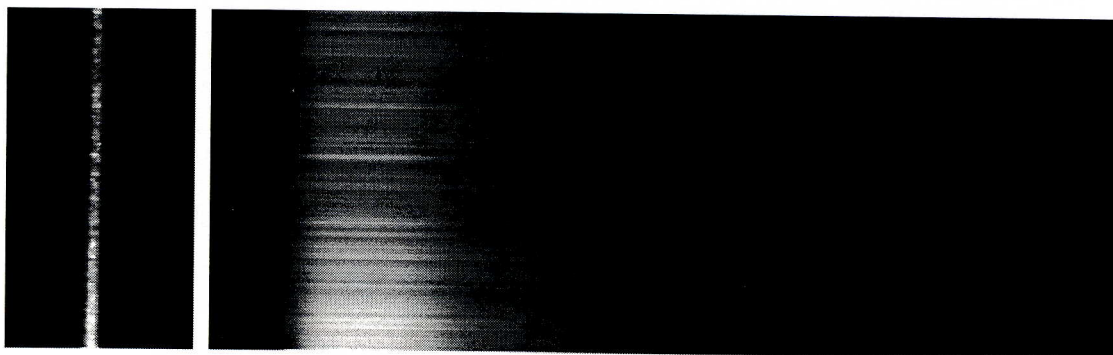
### Měření DIOC na křemenném skle, koncentrace $10^{-7}$



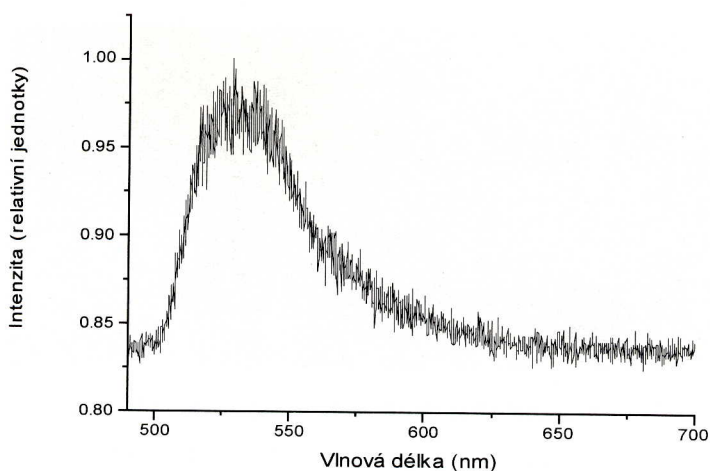
Obrázek v16: Zobrazení fluorescence DIOC na křemenném skle koncentrace  $10^{-7}$ . Na obrázku jsou rozlišitelné jednotlivé molekuly. Výřez 50 x 50 pixelů, štěrбина 4 mm, integrační čas 500 ms, OD0.



Obrázek v17: Zobrazení fluorescence DIOC na křemenném skle, koncentrace  $10^{-7}$ . Na obrázku jsou rozlišitelné jednotlivé molekuly. Vidíme obrázek z široké štěrbině. Štěrbina 4 mm, integrační čas 500 ms, OD 0.

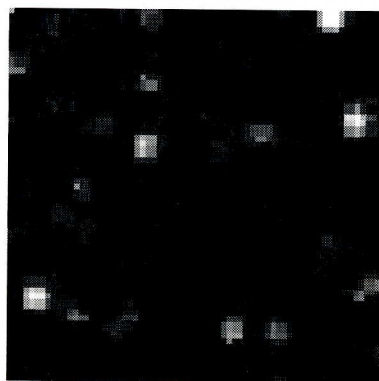


Obrázek v18: Vpravo obrázek úzké štěrbině (s jednotlivými molekulami). Štěrbina 0,1 mm, integrační čas 15 s, OD 4. Vlevo obrázek spektra na celém čipu CCD (jednotlivým molekulám z štěrbině odpovídají čáry na obrázku spektra). Jednotlivé molekuly jsou na obou obrázcích poměrně dobře rozlišitelné. Štěrbina 0.1 mm, centrální vlnová délka 625 nm (pro spektrum), integrační čas 60 s, OD 4.

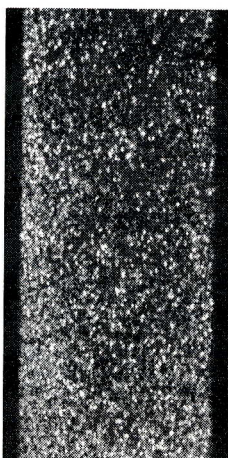


Obrázek v19: Spektrum jedné molekuly DIOC na křemenném skle. Spektrum odpovídá molekule z předchozího obrázku.

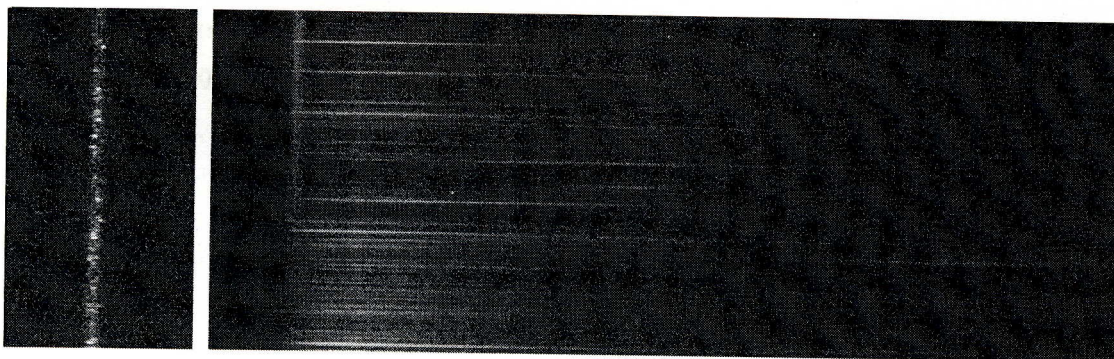
### Měření DIOC na křemenném skle konc. $10^{-9}$



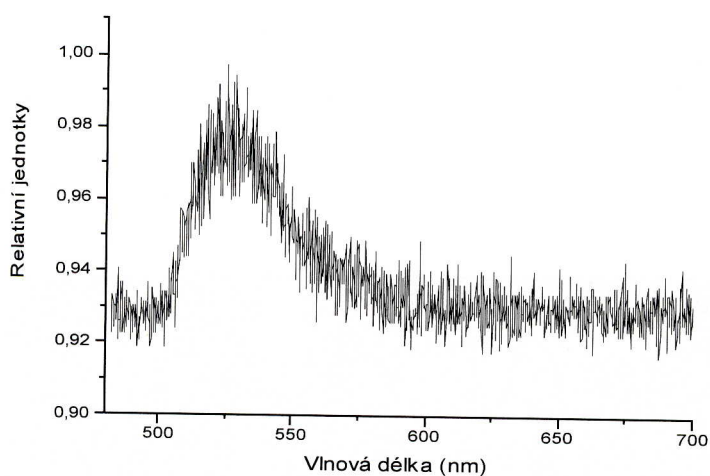
Obrázek v20: Zobrazení fluorescence DIOC na křemenném skle koncentrace  $10^{-9}$ . Na obrázku jsou velmi dobře rozlišitelné jednotlivé molekuly. Výřez 50 x 50 pixelů, štěrbinu 4 mm, integrační čas 500 ms, OD 0.



Obrázek 21: Zobrazení fluorescence DIOC na křemenném skle koncentrace  $10^{-9}$ . Na obrázku jsou velmi dobře rozlišitelné jednotlivé molekuly. Vidíme obrázek z široké štěrbinu, štěrbinu 0.1 mm, integrační čas 60 s OD 0, centrální vlnová délka 625 nm.



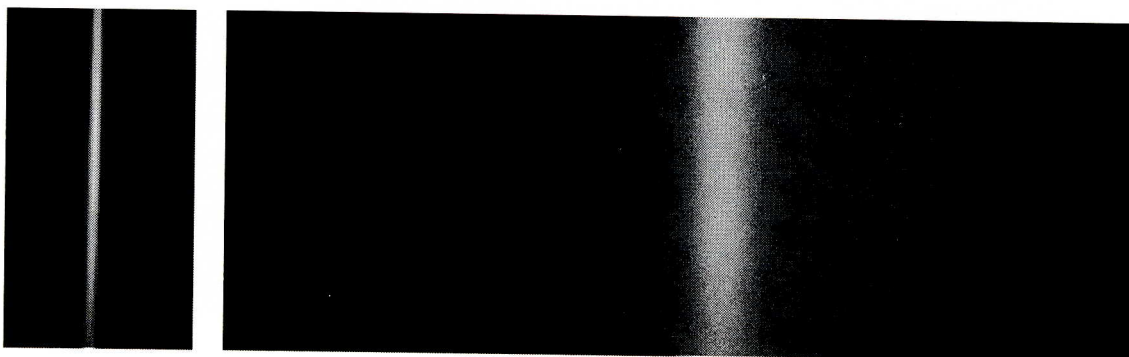
Obrázek v22: Vpravo zobrazení úzké štěrbině (s velmi dobře rozlišitelnými jednotlivými molekulami). Štěrbina 0,1 mm, integrační čas 30 s, OD 4. Vlevo obrázek spektra na celém čipu CCD (jednotlivým molekulám z štěrbině odpovídají čáry na obrázku spektra). Jednotlivé molekuly jsou na obou obrázcích velice dobře rozlišitelné. Štěrbina 0.1 mm, centrální vlnová délka 625 nm (pro spektrum), integrační čas 60 s, OD 4.



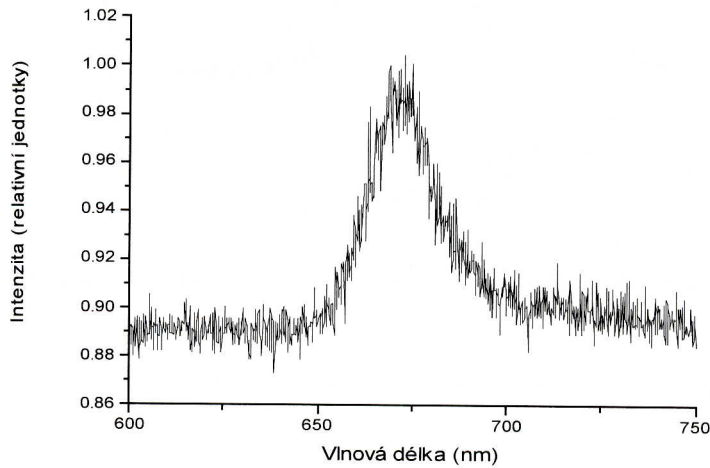
Obrázek v23: Spektrum jedné molekuly DIOC na křemenném skle. Spektrum odpovídá molekule z předchozího obrázku.

## Měření chlorofylu a na křemenném skle

### Měření chlorofylu a, koncentrace $10^{-4}$

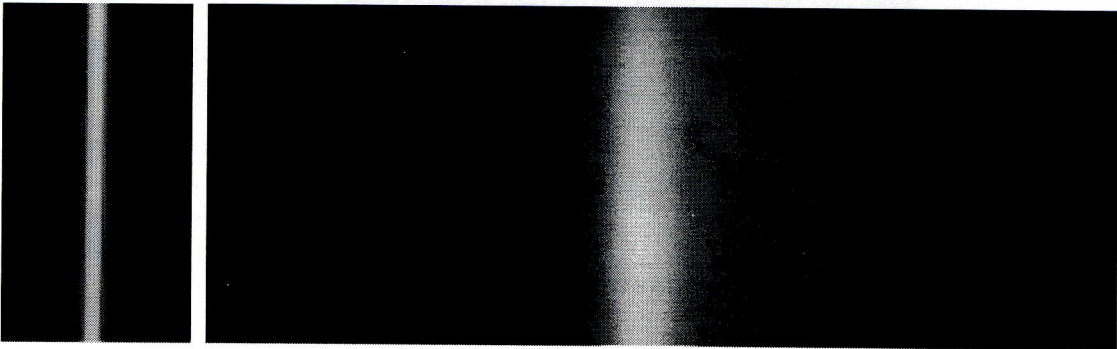


Obrázek v24: Vpravo obrázek úzké štěrby (příliš vysoká koncentrace, jednotlivé molekuly nejsou rozlišitelné). Štěrba 0,1 mm, integrační čas 3 s, OD 4. Vlevo spektrum na celém čipu CCD. Štěrba 0,1 mm, integrační čas 3 s, OD 4.



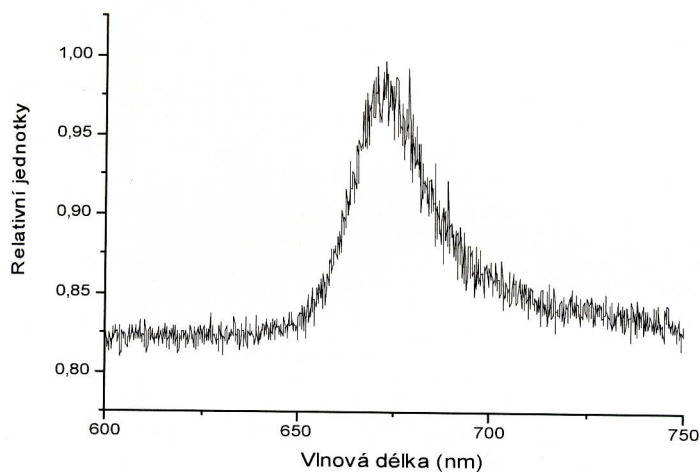
Obrázek v25: Spektrum chlorofylu a. Spektrum odpovídá průřezu předchozího obrázku celé plochy čipu.

#### Měření chlorofylu a, koncentrace $10^{-6}$



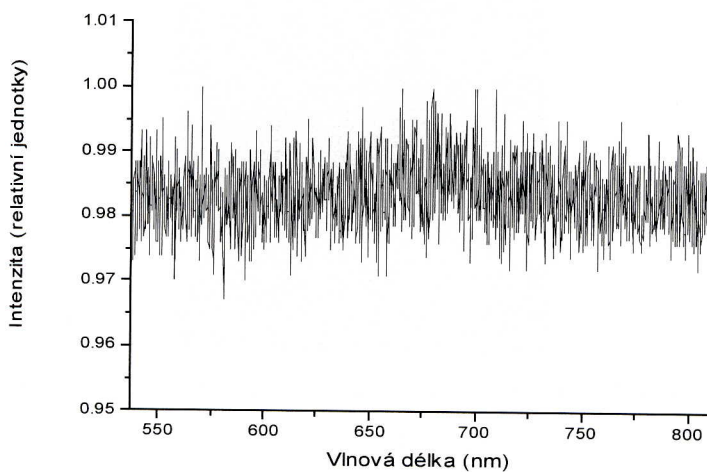
Obrázek v26: Vlevo zobrazení úzké štěrby (příliš vysoká koncentrace – bez jednotlivých molekul). Štěrba 0,1 mm, integrační čas 3s, OD 4. Vpravo spektrum na celém čipu CCD. Štěrba 0.1 mm, centrální vlnová délka 680 nm, integrační čas 60 s, OD 3.



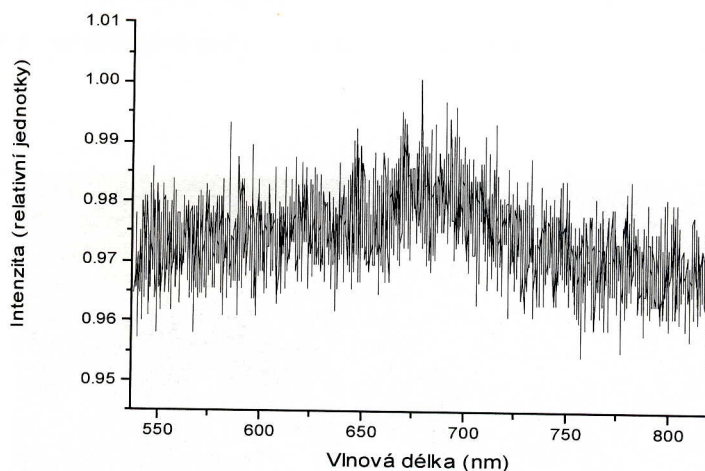


Obrázek v27: Spektrum chlorofylu a. Spektrum odpovídá průřezu předchozího obrázku celé plochy čipu.

**Chlorofyl a, koncentrace  $10^{-7}$  Výňatek z experimentu pro určení závislosti vybělování na integrační době a intenzitě**

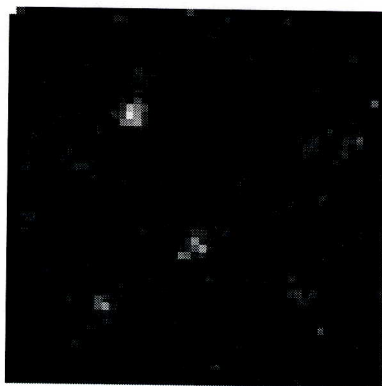


Obrázek v28: Spektrum chlorofylu a, je vidět, že za těchto podmínek ještě nedochází k fotodegradaci. (Neméně koncentrace je ještě příliš veliká na to, abychom viděli jednotlivé molekuly) štěrbinu 0,1 mm, OD 4, integrační čas 1 s.



Obrázek v29: Spektrum chlorofylu a, zde můžeme vidět rozšíření maxima a vznik pásu v kratších vlnových délkách – vznik fotoproductu. Štěrbina 0,1, OD 4, integrační doba 40 s.

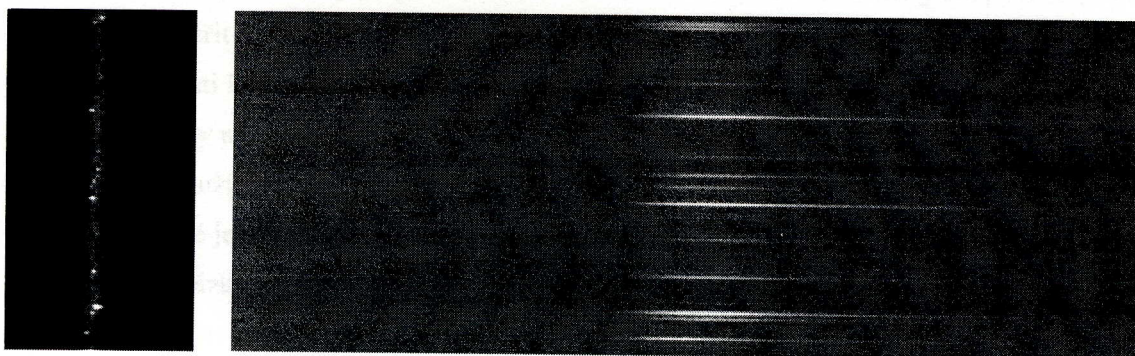
**Komplex fotosystému I z thylakoidní membrány *Prochlorotrix hollandica*. Koncentrace  $10^{-6}$**



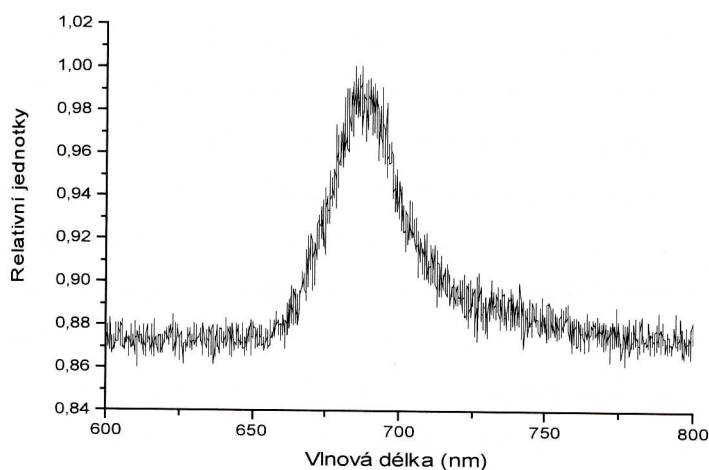
Obrázek v30: Zobrazení fluorescence fotosystému I na křemenném skle koncentrace  $10^{-6}$ . Na obrázku jsou opět velice dobře rozlišitelné jednotlivé molekuly, výřez 50 x 50 pixelů. OD 2, integrační čas 15 s, štěrba 2 mm.



Obrázek v31: Zobrazení fluorescence fotosystému I na křemenném skle koncentrace  $10^{-6}$ . Na obrázku jsou velmi dobře rozlišitelné jednotlivé molekuly. Vidíme obrázek z široké štěrbině. OD 2, integrační čas 15 s, štěrbina 2 mm.



Obrázek v32: Vpravo zobrazení úzké štěrbině (s velmi dobře rozlišitelnými jednotlivými molekulami), vlevo zobrazení spektra na celém čipu CCD (jednotlivým molekulám z štěrbině odpovídají čáry na obrázku spektra). Jednotlivé molekuly jsou na obou obrázcích velice dobře rozlišitelné. OD3, štěrbina 0,2 mm, integrační čas 30s, centrální vlnová délka 680 nm (integrační čas pro štěrbinu 15 s).



Obrázek v33: Spektrum jednoho komplexu fotosystému I v pevné matici PMMA.

OD3, štěrbina 0,2 mm, integrační čas 30s, centrální vlnová délka 680 nm. SNR = 9,543, SBR = 6,372.

Spektrum odpovídá molekulě z předchozího obrázku.

## Diskuse

### DIOC

Pro testování aparatury byly vybrány molekuly DIOC. Testy na DIOC měly zodpovědět, zda je aparatura schopna měřit signály a spektra jednotlivých molekul. Hlavními důvody pro tuto volbu byly fotofyzikální vlastnosti DIOC. Jedná se o laserovou barvu používanou v průtokové cytometrii. Má vysokou stabilitu, tedy nízkou náchylnost k fotodegradaci. Právě fotostabilita je velice důležitá. Jako zdroj excitačního záření používáme laser o vlnové délce v blízkém UV (441,6 nm). Jedná se tedy o záření s vysokou energií, které je schopno molekuly poměrně rychle vybělit. Pro kontrolu naměřených spekter jsem použil data (obrázky v10, v11), získaná na spektrofluorometru SPEX Fluorolog (JOBIN YVON) pro tytéž molekuly za stejných podmínek. Jak je vidět na obrázcích v23, v27 naměřená maxima se dobře shodují. Velikost pozadí se pro aparaturu s prázdnou maticí bez vzorku pohybuje okolo 204 pulzů. Hodnota pro spektrum jedné molekuly DIOC (obrázek v23) vychází  $SNR = 5,388$ ,  $SBR = 3,875$ . Potvrdilo se tedy, že je na aparatuře možné měřit přesná fluorescenční spektra jednotlivých molekul DIOC.

### Chlorofyl a

Dalším krokem bylo testování aparatury pro aplikaci na biologickém materiálu. Vybrány byly konkrétně molekuly chlorofylu a. Cílem tedy bylo dokázat, že na aparatuře je možno měřit i autofluorescenční biologické vzorky (právě chlorofyl a je jejich častou součástí). Tedy vzorky s nižším kvantovým výtěžkem a menší fotostabilitou než jaké mají laserové barvy. Kvantový výtěžek chlorofylu a je 0,32 a je několiknásobně nižší než kvantový výtěžek DIOC. Navíc spektrum jedné molekuly chlorofylu a v době výstavby aparatury nebylo naměřeno. Zřejmě proto, že měření a práce s tímto pigmentem je náročná, kvůli relativně nízké fotostabilitě. Nicméně chlorofyl a v pevné matici fluoreskuje, jak můžeme vidět na obrázku v27. Jedná se však o vzorky s vyšší koncentrací, proto zde nemůžeme rozlišit jednotlivé molekuly. Při naředění vzorku na potřebnou koncentraci dochází rychle k fotodegradaci. Nejdříve je nutné zaostřit mikroskop, udělat snímek štěrbinou, poté až je možné samotné měření spekter. Během této doby však došlo k fotodegradaci. Maximum se rozšířilo ke kratším vlnovým délkám a zřejmě došlo k vytvoření fotodegradačního produktu s maximem celkově posunutým k nižším vlnovým délkám (obrázek v29). Tato degradace je, jak vyplynulo z dalších experimentů aditivní a nevratná. Součástí pokusu byla měření s různými intenzitami paprsku laseru (různé OD filtry) a integračními časy měření. Spektra na obrázcích v28 a v29 dokumentují část těchto změn. Možným důvodem změny je nízká fotostabilita materiálu, citlivost na UV záření, náchylnost k fotooxidaci.

Hlavní příčinou vybělování bývá fotooxidace. Z tohoto důvodu jsem vzorek zbavil kyslíku probubláváním zásobních roztoků plynným dusíkem a následně umístil do exikátoru. Toto opatření zřejmě nebylo dostatečné, proto bych navrhoval kompletní přípravu vzorku v inertní dusíkové atmosféře,<sup>61</sup> případně použití jiné matrice. Dalším postupem by mohla být volba excitačního záření o jiné vlnové délce (nižší energii) případně objektiv s vyšší světelností. Vyskytly se také drobné technické problémy. Během měření, s dlouhým integračním časem dochází k rozostření mikroskopu. I odstranění této drobné překážky by mohlo přispět k lepšímu měření spekter.

## Biologický vzorek

Závěrečnou částí testování aparatury bylo naměření spektra komplexního biologického materiálu. Konkrétně komplexů fotosystému 1, izolovaných z *Prochlorotrix hollandica*. Spektrum tohoto komplexu jsem na aparatuře naměřil bez problémů (obrázek v33), SNR = 9,543, SBR = 6,372. Na aparatuře je tedy možné měřit jednotlivé biologické komplexy. Chlorofyl a tedy sice působil při měření potíže, ale měření komplexů fotosystému I vedlo k výbornému výsledku. Tento jev přisuzuji ochranné funkci fotosystémů, (molekuly chlorofylu jsou zde stabilnější, chráněny proti nevratné oxidaci).

## Závěr

Aktivně jsem se podílel na sestavení a zprovoznění aparatury pro měření spekter jednotlivých molekul. Provedl jsem metodické experimenty za účelem ověření funkčnosti aparatury. Aparatura je schopna měření signálů na úrovni jednotlivých molekul. Příčinou potíží při měření spekter chlorofylu a je způsob přípravy vzorků. Není tedy způsobena nízkou citlivostí aparatury. Tato potíž je podle mě překonatelná a nijak nebrání v dalším použití aparatury. Měření spekter chlorofylu a nebylo hlavním cílem, jednalo se pouze o mezikrok v cestě k biologickým aplikacím. To se skutečně podařilo. Aparatura není původně určena pouze k měření fluorescenčních spekter jednotlivých molekul. Velmi zajímavá je také dynamika fluorescenčních dějů, sledování časové závislosti fluorescence umožňuje fluorescenční korelační spektroskopie. Právě ta bude tedy dalším krokem ve výstavbě aparatury.

## Použitá literatura:

- <sup>1</sup> *Single Molecule Detection in Life Science*, Y. Ishii and T. Yanagida, *Single Mol.* **1**, 5-16 (2000).
- <sup>2</sup> R. Y. Tsien and A. Waggoner, in *Handbook of biological Confocal Microscopy*, 2nd ed., edited by J. B.
- <sup>3</sup> S. Empedocles and M. Bawendi, *Acc. Chem. Res.* **32**, 389 (1999).
- <sup>4</sup> M. J. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, *Science* **281**, 2013 (1998).
- <sup>5</sup> W. E. Moerner and L. Kador, *Phys. Rev. Lett.* **62**, 2535 (1989).
- <sup>6</sup> W. P. Ambrose, Th. Basché, and W. E. Moerner, *J. Chem. Phys.* **95**, 7150 (1991).
- <sup>7</sup> T. Plakhotnik, E. A. Donley, and U. P. Wild, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **48**, 181 (1996).
- <sup>8</sup> K. D. Weston, P. J. Carson, J. A. DeAro, and S. K. Buratto, *Chem. Phys. Lett.* **308**, 58 (1999).
- <sup>9</sup> R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita and M. Yoshida, *Cell* **93**, 1117 (1998).
- <sup>10</sup> L.A. Deschenes and D. A. Vanden Bout, *Science* **292**, 255 (2001).
- <sup>11</sup> Th. Basché, W. P. Ambrose, and W. E. Moerner, *J. Opt. Soc. Am. B* **9**, 829 (1992).
- <sup>12</sup> P. Tchénio, A. B. Myers, and W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **97**, 2491 (1993).
- <sup>13</sup> *Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy*, Rev. Sci. Instrum. Vol. 74, number 8, W. E. Moerner, David P. Fromm (Stanford, California 2003)
- <sup>14</sup> W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, and R. A. Keller, *Science* **265**, 364 (1994).
- <sup>15</sup> E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, and R. K. Kostelak, *Science* **251**, 146 (1991).
- <sup>16</sup> B. Hecht, B. Sick, U. P. Wild, V. Decker, R. Zenobi, O. J. F. Martin, and D. W. Pohl, *J. Chem. Phys.* **112**, 7761 (2000).
- <sup>17</sup> Zenhausern, Y. Martin, and H. K. Wickramasinghe, *Science* **269**, 1083 (1995).
- <sup>18</sup> W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin, and R. A. Keller, *Science* **265**, 364 (1994).
- <sup>19</sup> E. Betzig and R. J. Chichester, *Science* **262**, 1422 (1993).
- <sup>20</sup> M. Vrijlic, S. Y. Nishimura, S. Brasselet, W. E. Moerner, and H. M. McConnell, *Biophys. J.* **83**, 2681 (2002).
- <sup>21</sup> T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida, *Nature (London)* **374**, 555 (1995).
- <sup>22</sup> G. J. Schuřtz, G. Kada, V. P. Pastushenko, and H. Schindler, *EMBO J.* **19**, 892 (2000).
- <sup>23</sup> W. E. Moerner, E. J. G. Peterman, S. Brasselet, S. Kummer, and R. M. Dickson, *Cytometry* **36**, 232 (1999).
- <sup>24</sup> D. Axelrod, T. P. Burghardt, and N. L. Thompson, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **13**, 247 (1984).
- <sup>25</sup> N. L. Thompson, H. M. McConnell, and T. P. Burghardt, *Biophys. J.* **46**, 739 (1984).
- <sup>26</sup> R. M. Dickson, D. J. Norris, Y.-L. Tzeng, and W. E. Moerner, *Science* **274**, 966 (1996).

- <sup>27</sup> R. M. Dickson, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, and W. E. Moerner, *Nature* (London) **388**, 355 (1997).
- <sup>28</sup> S. Kummer, R. M. Dickson, and W. E. Moerner, *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* **3273**, 165 (1998).
- <sup>29</sup> M. F. Paige, E. J. Bjerneld, and W. E. Moerner, *Single Molecules* **2**, 191 (2001).
- <sup>30</sup> T. Ha, T. Enderle, D. S. Chemla, P. R. Selvin, and S. Weiss, *Phys. Rev. Lett.* **77**, 3979 (1996).
- <sup>31</sup> H. Sosa, E. J. G. Peterman, W. E. Moerner, and L. S. B. Goldstein, *Nat. Struct. Biol.* **8**, 540 (2001)
- <sup>32</sup> E. J. G. Peterman, H. Sosa, L. S. B. Goldstein, and W. E. Moerner, *Biophys. J.* **81**, 2851 (2001)
- <sup>33</sup> N. B. Bowden, K. A. Willets, W. E. Moerner, and R. M. Waymouth, *macromolecules* **35**, 8122 (2002).
- <sup>34</sup> E. J. G. Peterman, S. Brasselet, and W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. A* **103**, 10053 (1999).
- <sup>35</sup> J. N. Forkey, M. E. Quinlan, and Y. E. Goldman, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **74**, 1 (2000).
- <sup>36</sup> R. M. Dickson, D. J. Norris, and W. E. Moerner, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 5322 (1998)
- <sup>37</sup> E. Betzig and R. J. Chichester, *Science* **262**, 1422 (1993).
- <sup>38</sup> B. Sick, B. Hecht, and L. Novotny, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 4482 (2000).
- <sup>39</sup> J. T. Fourkas, *Opt. Lett.* **26**, 211 (2001).
- <sup>40</sup> P. Tchénio, A. B. Myers, and W. E. Moerner, *J. Phys. Chem.* **97**, 2491 (1993).
- <sup>41</sup> J. K. Trautman, J. J. Macklin, L. E. Brus and E. Betzig, *Nature* (London) **369**, 40 (1994).
- <sup>42</sup> D. A. Vanden Bout, W. T. Yip, D. HU, D. K. Fu, T. M. Swager, and P. F. Barbara, *Science* **277**, 1074 (1997).
- <sup>43</sup> Y. Hou, A. M. Bardo, C. Martinez, and D. A. Higgins, *J. Phys. Chem. B* **104**, 212 (2000).
- <sup>44</sup> T. Ha, *Methods* **25**, 78 (2001).
- <sup>45</sup> T. Ha, X. Zhuang, H. D. Kim, J. W. Orr, J. R. Williamson, and S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 9077 (1999).
- <sup>46</sup> A. N. Kapanidis and S. Weiss, *J. Chem. Phys.* **117**, 1093 (2002).
- <sup>47</sup> A. Myiawaky, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffrey, J. A. Adams, M. Ikura, and R. Y. Tsien, *Nature* (London) **388**, 882 (1997).
- <sup>48</sup> T. Ha, A. Y. Ting, J. Liang, W. E. Caldwell, A. A: Deniz, D. S. Chemla, P. G. Schultz and S. Weis, *Procl. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 893 (1999).
- <sup>49</sup> X. Zhuang, L. Bartley, H. Babcock, R. Russel, T. Ha, D. Herschlag, and S: Chu, *Science* **288**, 2048 (2000)
- <sup>50</sup> Y. Jia, D. s. Talaga, W. L. Lau, H. S. M. Lu, W. F. DeGrado, and R. M. Hochstrasser, *Chem. Phys.* **247**, 69 (1999).
- <sup>51</sup> T. Ha, I. Rasnik, W. Cheng, H. P. Babcock, G. H. Gauss, T. M. Lohman, and S. Chu, *Nature* (London) **419**, 638 (2002).
- <sup>52</sup> W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Web, *Science* **248**, 73 (1990).
- <sup>53</sup> J. Mertz, C. Xu, and W. W. Web, *Opt. Lett.* **20**, 2532 (1995).
- <sup>54</sup> E. J. Sanchez, L. Novotny, G. R. Holtom, and X. S. Xie, *J. Phys. Chem. A* **101.**, 7019 (1997).
- <sup>55</sup> S, A, Soper, L. M. Davis, and E. B. Shera, *J. Opt. Soc. Am. B* **9**, 1761 (1992).

- <sup>56</sup> M. Pirotta, F. Guetler, H. Gygax, A. Renn, J. Sepiol, and U. P. Wild, *Chem. Phys. Lett.* **208**, 379 (1993).
- <sup>57</sup> C. Eggeling, J. R. Fries, L. Brand, R. Gunther, and C. A. M. Seidel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1556 (1998).
- <sup>58</sup> Y. Jia, A. Sitnik, L. Li, S. Vladimarov, B. S. Cooperman, and R. M. Hochstrasser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7932 (1997).
- <sup>59</sup> S. Wennmalm, L. Edman, and R. Rigler, *Chem. Phys.* **247**, 61 (1991).
- <sup>60</sup> H. P. Lu and X. S. Xie, *J. Phys. Chem. B* **101**, 2753 (1997).
- <sup>61</sup> J. Dong-Mei, H. Zheng-Xi, X. An-Dong, *Chin. Phys. Lett.* **22**, 317 (2005).

