

## ARAŞTIRMA MAKALESİ

**BİR KONFOKAL LAZER TARAMALI MİKROSKOP KULLANARAK FLÜOROFOR KARAKTERİZASYONU****Nurten ÖNCAN***İstanbul Üniversitesi , Fen Fakültesi Fizik Bölümü, Vezneciler – İSTANBUL***Geliş Tarihi: 22.10.2001****FLUOROPHORE CHARACTERISATION USING A CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE****SUMMARY**

Fluorescein in aqueous solution is characterised using a Bio-Rad MRC 1024 confocal microscope. In one set of experiments, the fluorescence intensity of a solution is measured against scan speed. A simplified 1-D model indicates apparent "photobleaching" quantum efficiency up to  $10^{-3}$  or  $10^{-2}$ . However, transit time of the focal spot comparable with transfer time into triplet state. True photobleaching is observed at lower speeds.

In a second set of experiments, fluorescent intensity is measured for scanned and parked beam over a range of laser power. The diffusion coefficient is estimated from the intensity reduction by photobleaching, using a simplified spherically symmetric continuity equation. Diffusion coefficients for water/glycerol solutions are compared with Einstein-Stokes predictions.

**ÖZET**

Bir Bio-Rad MRC 1024 konfokal mikroskop kullanılarak sulu eriyikteki floresinin karakterizasyonu incelendi. Bir dizi deneyde , eriyiğin floresans şiddeti tarama hızına göre ölçüldü. Basitleştirilmiş 1 – D modeli, " photobleaching" (ışıktan zarar görme) kuvantum veriminin  $10^{-3}$  - $10^{-2}$  ye kadar olduğunu gösterdi. Bununla beraber artan photobleaching fokal spot geçiş zamanı, triplet duruma geçiş zamanı ile karşılaştırılabilir sùrededir. Düşük hızlarda da photobleaching gözlemlendi.

İkinci bir deney dizisinde flüoresans şiddeti, taramalı ve konumu sabitlenmiş lazer ışığında (parked beam) lazerin gücü değiştirilerek ölçüldü. Bir basitleştirilmiş küresel simetri süreklilik denklemini kullanarak "photobleaching" ile şiddetin azalmasından, difüzyon katsayısı tahmin edildi Su /gliserol eriyiklerinin difüzyon katsayıları Einstein – Stokes sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

**1. GİRİŞ**

İyon kanalları araştırmalarındaki amaç moleküler değişimleri anlamaktır. Floroforların davranışlarını, konfokal mikroskop şartlarında , eldeki verilere göre yorumlamak her zaman kolay değildir.

Çeşitli spektroskopik yöntemler, moleküllerin dinamik yapısını anlamakta ve zarların (membrane) araştırılmasında uzun zamandır kullanılmaktadır. Son otuz yılda, membran akımlarının anlaşılmasında önemli gelişmeler gözlenmiş ve yakın zamana kadar, spektroskopinin fazla bir rolü olmamıştır. Yakın zamanlarda bu değişmektedir. Spektroskopinin, kanal ve reseptörlerin dinamik davranışlarının gözlenmesinde büyük rol oynadığı bilinmektedir. Floresans spektroskopisi , özellikle çok kısa zaman diliminde uygulanan ve çok duyarlı olan eriyiğin doğasını, flüorofor hareketini açıklamaya uygun bir yöntemdir. Macdonald ve Wraight (1995) [1] , ultra hassas flüoresans spektroskopisi ile tek molekül elektriksel kayıt kombinasyonunu incelediler. Bu araştırma, iyon

kanallarının fonksiyonlarını bozmadan floresanla işaretlenmesi ile desteklenmiş oldu. Bundan sonraki bir yıl içinde böyle bir iyon kanalı Manuzzi ve arkadaşları tarafından tanımlandı[2]. Tek molekül flüoresansdaki [3,4] son gelişmeler, yakın alan optiği araştırmaları, konfokal mikroskopi ve diğer optiksel teknikler bu çalışmaların ilerlemesine destek sağlamaktadır[5-10].

Floresans çıkışlarındaki değişimlerden, moleküler seviyede edinilen bilgilerle, her bir kanal için elde edilen fonksiyonel bilgiler arasında ilişki kurmak ümit edilmektedir.

DeneySEL bölümünün İskoçya Aberdeen Üniversitesinde yapıldığı bu çalışmada, taramalı bir lazer konfokal mikroskop kullanılarak floroforların foto kinetiği ve difüze davranışlarının karakteristikleri incelenmiştir.

Bu çalışmanın, hücre karakteristiklerinin özellikle de, kanallar olarak bilinen yaşayan hücre yapılarının, detaylı bir şekilde anlaşılması konusunda yapılan araştırmalara ışık tutacağı düşüncesindeyim.

## 2. MATERYAL VE METOT

Deneyde, oldukça hassas bir optik alet, Bio-Rad MRC 1024 Lazer taramalı konfokal mikroskop kullanıldı. Tarama, Kripton/Argon iyon lazeri kullanarak yapıldı. Görüntüler IBM OS2 operasyon sisteminde Laser Sharp Software kullanılarak kaydedildi.

Hazırlanan floresin sulu eriyiklerinden (pH 9) pipetle çekilerek, üzerinde 2 mm çukur olan bir mikroskop camına damlatılıp lamelle kapatıldıktan sonra ölçümler için mikroskoba yerleştirildi.

Homojen floresin eriyiğinin flüoresans şiddeti, tarama hızının bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Ayrıca, konumu sabitlenmiş lazer ışınıyla yapılan deneylerde, photobleaching durumunda, flüoresans şiddeti ölçüldü. Bu ölçüm sırasında, aydınlanma şiddeti, 35 kW cm<sup>-2</sup> ve aydınlanma yarıçapı, 0.22 µm idi.

Lazerin farklı güç oranlarına göre,  $I_{bleached}/I_{unbleached}$ , zarara uğrama (bleaching) şiddetinin, zarara uğramama (unbleaching) floresans şiddetlerinin oranı ölçüldü.

Deney sonuçlarına ve Einstein-Stokes denkleminde elde edilen sonuçlara göre difüzyon analizi yapıldı.

## 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bir etkin 'photobleaching' kuantum verimini hesaplamak için, bir dizi deney yapılarak homojen bir eriyiğin flüoresans şiddeti, tarama hızının bir fonksiyonu olarak ölçüldü. Bu durum, klasik deneyler akışına çok benzemektedir [11]. Aşağıda verilen basitleştirilmiş bir boyutlu süreklilik denklemi, ışının geçişi sırasındaki değişimi tanımlamaktadır:

$$\frac{\partial N(x,t)}{\partial t} + \gamma_{scan} \cdot \frac{\partial N(x,t)}{x} + \frac{1}{\tau_{bleach}} N(x,t) = 0 \quad (1)$$

Burada  $N(x,t)$ , t zamanında x konumundaki floroforların sayı yoğunluğu,  $\tau_{bleach}$  ise "photobleaching" zaman sabitidir. Bağlı flüoresans şiddeti için, denklemin analitik çözümü:

$$I_f(R, \tau_{bleach}, \nu_{scan}) = \frac{\nu_{scan} \cdot \tau_{bleach}}{2R} \left[ 1 - \exp\left(-\frac{2R}{\nu_{scan} \cdot \tau_{bleach}}\right) \right] \quad (2)$$

Burada  $I_f$ , 'photobleaching' olmadığında bulunan değere bağlı flüoresans şiddeti, R, fokal spotun yarıçapı ve  $\nu_{scan}$  ise tarama hızıdır.

Bir tarama hızı dizisi için, homojen bir eriyikten elde edilen floresans şiddeti değerlerine fitting (uyarlama) modeli uygulanması, zaman sabiti  $\tau_{bleach}$  ve bir efektif "photobleaching" kuantum veriminin ( $Q_{bleach}$ ) tahminini sağlar.

$$Q_{bleach} = \tau_{bleach} \frac{1 + \tau_f a_f}{a_f} \quad (3)$$

Formüldeki  $a_f$ , lazer ışınması ve florofor absorpsiyon katsayısından hesaplanan absorpsiyon oranı,  $\tau_f$  ise flüoresans ömrüdür.

Bu metotla bulunan değerler, aydınlanma şiddeti ve deney şartlarına bağlı olarak oldukça yüksektir ( $10^{-3}$  ile  $10^{-2}$  arasında). Literatürden, floresin fotokinetik modeliyle [4] karşılaştırma yapılarak bu sorun giderilmektedir. Operasyon şartları; nümerik apertür, NA=1.4, lazer gücü = 0,05 mW, ışığın dalga boyu = 488nm, aydınlanma şiddeti,  $35 \text{ kW cm}^{-2}$  olarak seçilen deneyde, pH değeri 9 olan,  $100 \mu\text{M}$  flüoresin eriyiği için alınan bleaching sonuçları (2) denklemine uygulanarak tarama hızına göre bulunan flüoresans şiddeti, şekil 1'de verilmektedir.

Buna göre;  $\tau_{bleach} = 4,74 \mu\text{s}$  ve  $Q_{bleach} = 1,01 \times 10^{-2}$  olarak bulunmuştur.

**Şekil 1.** "Bleaching" sonuçları.  $100 \mu\text{M}$  sulu flüoresin eriyiğinin tarama hızına göre floresans şiddeti.

Tipik bir taramalı mikroskopta, kısa geçiş zamanları, triplet duruma başlangıçtaki geçiş zamanı ile karşılaştırılabilir mertebededir. Çünkü flüoroforların büyük bir kısmı triplet duruma geçer. Şekil 2 de görüldüğü gibi photobleaching bundan oldukça etkilenir. Bununla beraber gerçek photobleaching, daha düşük tarama hızlarında gözlenebilir.  $Q_{bleach}$  değerinin yüksek olma nedenlerinden biri de kısa geçiş zamanında gözlemin yapılmış olmasıdır. Triplet duruma geçişin (2-3)  $\mu s$  de olması başlangıçta şiddet kaybına neden olmaktadır. 10  $\mu s$  süre için tahmin edilen etkin  $Q_{bleach}=7.6 \times 10^{-3}$ , etkin  $Q_{flüoresans}=0.54$  tür.

**Şekil 2.** [4] modeliyle hesaplanan sulu floresin eriyiğinin foto kinetiği

İkinci deney serisinde ise lazer şiddeti taramalı ve konumu sabitlenmiş (parked) lazer ışını pozisyonlarına göre ayarlanarak flüoresans şiddeti bulundu. Konumu sabitlenmiş ışın durumunda, şiddet 'photobleaching' ile azalır ve bu azalmanın derecesi difüzyon katsayısının tahmininde kullanılabilir. Bu aslında tarif edilen durumun bir kararlı hal (steady-state) versiyonudur [12].

Basitleştirilmiş bir küresel simetrik süreklilik denklemi:

$$\frac{\partial N(r,t)}{\partial t} - D \cdot \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial N(r,t)}{\partial r} \right) + \frac{1}{\tau_{bleach}} \cdot N(r,t) = 0 \quad (4)$$

burada,  $N(r,t)$ ,  $t$  zamanında  $r$  yarıçapındaki unbleached floroforların sayı yoğunluğudur. Bir analitik kararlı hal çözümü

$$N_{ss}(r) = \frac{A}{r} \sinh(kr) \quad r < R_{III} \text{ için}$$

$$N_{ss}(r) = 1 - \frac{B}{r} \quad r \geq R_{III} \text{ için} \quad (5)$$

$$A = \frac{1}{k \cosh(kR_{III})} \quad \text{ve} \quad B = R_{III} - B \sinh(kR_{III})$$

$$k = \frac{1}{\sqrt{\tau_{bleach} D}}$$

burada  $R_{III}$ , küresel hacmin yarıçapıdır.

Sulu flüoresin eriyiği için bir örnek çözüm şekil 3'te verilmektedir. Kullanılan parametre değerleri; aydınlanma şiddeti,  $35 \text{ kW cm}^{-2}$ , aydınlatma yarıçapı,  $R_{III} = 0.22 \mu\text{m}$ .  $Q_{bleach} = 8 \times 10^{-3}$  ve  $D = 1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

**Şekil 3.** Bleached konsantrasyon profili. Radyal mesafeye karşılık unbleached Flüorofor steady-state sayı yoğunluğu.

(5) denklemini hacim üzerinden integre edildiğinde, bleaching durumundaki  $I_{bleach}$  floresans şiddetinin, bleaching olmadığında floresans şiddetine oranını,  $I_{bleached} / I_{nobleached}$  verir.

Bu sonuç, şekil 4'te gösterildiği gibi rasgele tarayarak ve konumu sabitleştirilmiş lazer ışınıyla bulunan deneysel verilerle karşılaştırılabilir.

**Şekil 4.** Difüzyon analizi. P lazer gücüne karşı tipik  $I_{\text{bleached}} / I_{\text{nonbleached}} x^P$  grafiği.

Teorik eğri, denklem (4) dön hacim üzerinden integre edilmesi ile, deneysel eğri ise tarama hızına göre flüoresans şiddetini tahmin etmek için denklem (2) yi kullanarak düzeltme yapıldıktan sonra konumu sabitleştirilmiş lazer ışınıyla  $I_{\text{bleach}}$  ve taramalı  $I_{\text{nonbleach}}$  elde edilmişlerdir.  $Q_{\text{bleach}} = 8 \times 10^{-3}$  ile fit D  $0.84 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  değeri bulunur. Hazırlanan su / gliserol eriyiği ile bir dizi deney yapıp eriyiğin difüzyon katsayıları belirlendi ve Einstein – Stokes denklemi ile belirlenen değerlerle karşılaştırıldı, şekil 5. Burada moleküler yarıçap 0.8 nm olarak alındı ve  $Q_{\text{bleach}} = 8 \times 10^{-4}$  olarak kullanıldı. Difüzyon zamanı, tarama (scanning) zamanından çok daha uzun (ms) olduğundan  $Q_{\text{bleach}}$  için alınan değerlerde genel bir belirsizlik vardır. Bu testlerden elde edilen değerler fazla incelikli olmamakla birlikte, pratik mikroskopik şartlarda yapılan ölçümlerde, parametrelerin anlaşılmasında büyük yarar sağlar.

**Şekil 5.** Difüzyon sonuçları. Gliserol konsantrasyonuna göre difüzyon katsayısı.

#### 4. SONUÇ

Bu basit ölçüm metotları ve analizler, florofofor davranışları hakkında elverişli fikirler edinmemizi sağlar. Elde edilen değerler, fazla incelikli olmamakla birlikte pratik mikroskopi şartlarında uygulanan parametrelerin anlaşılmasında önemli ipuçları verirler.

Zamana bağlı olarak, tipik CLSM (Confocal Laser Scanning Microscope) ba uygun tarama hızı değerleri, nümerik apertür ve aydınlanma ile “photobleaching” davranışı gözlenmektedir. Muhtemelen bu davranış, gerçek photobleaching ile başlangıçta geçici olarak oluşan triplet durum yoğunluğunun bir kombinasyonudur. Daha büyük tarama hızları triplet duruma geçişi azaltabilir, bundan dolayı flüoresans çıkışı gelişme gösterir ve gerçek “photobleaching” te azalma olur.

Difüzyon teriminin teoriye katılmasıyla kullanılan metotlar ve modellerin denklem (2) ve denklem (4) ile birleştirilmesi sonucu foto kinetiğin daha iyi anlaşılmasının, florofofor parametrelerinin hesaplanmasında önemli katkısı olacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı, yürütücüsü olduğum 1147/010598 numaralı proje ile destekleyen İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonuna ve Aberdeen Üniversitesine teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- [1] Macdonald AG & Wraight P 1995, Combined spectroscopic and electrical recording techniques in membrane research : prospects for single channel studies Prog. Biophys. Molec. Biol. 63, 1-29.
- [2] Mannuzzu LM, Moronne MM & Isacoff EY 1996, Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating, Science 271, 213-216.
- [3] Basche T, Kummer S & Brauchle C 1995, Direct spectroscopic observation of quantum jumps in a single molecule, Nature 373, 132-134.
- [4] Song et al.1995, Biophysical J 68, 2588-2600.
- [5] Nie S, Chiu DT & Zare RN 1994, Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy, Science 256, 1018-1021,
- [6] Nie S, Chiu DT & Zare RN 1995, Real-time detection of single molecules in solution by confocal fluorescence microscopy, Anal. Chem. 67, 2849-2857.
- [7] Niles WD, Silvis JR & Cohen FS 1996, Resonance energy transfer imaging of phospholipid vesicle interaction with a planar phospholipid membrane-undulations and attachment sites in the region of calcium-moderated membrane adhesion, J Gen Physiol. 107, 329-351.
- [8] Minsky M 1988, Memoir on inventing the CSM, Scanning Microscopy 10, 128-138.
- [9] Ghauharali RI, Hofstraat JW and Brakenhoff GJ 1998, Fluorescence Photobleaching-Based Shading Correction For Fluorescence Microscopy, J Microscopy 192, Pt.2.
- [10] Wedekind P, Kubitscheck U, Heinrich O, Peters R 1996, Line-Scanning Microphotolysis for Diffraction-Limited Measurements of Lateral Diffusion, Biophys. J 172, 1621-1632.
- [11] Soper et al. 1993, Photochem. and Photobio. 57(6), 972-977.
- [12] Cutts et al. 1995, J Microscopy 180(2), 131-139.



## ŞEKİL BAŞLIKLARI

Şekil 1. "Bleaching" sonuçları. 100 µM sulu flüoresin eriyiğinin tarama hızına göre floresans şiddeti.

Şekil 2. [4] modeliyle hesaplanan sulu floresin eriyiğinin foto kinetiği.

Şekil 3. Bleached konsantrasyon profili. Radyal mesafeye karşılık unbleached Flüorofor steady-state sayı yoğunluğu.

Şekil 4. Difüzyon analizi. P lazer gücüne karşı tipik  $I_{bleach}/I_{nobleach}XP$  grafiği.

Şekil 5. Difüzyon sonuçları. Gliserol konsantrasyonuna göre difüzyon katsayısı.