



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KORELACE MEZI MĚŘENÍM STACIONÁRNÍ
FLUORESCENČNÍ ANISOTROPIE NA FLUORIMETRU A
FLUORESCENČNÍM MIKROSKOPU**

CORRELATION BETWEEN STEADY-STATE FLUORESCENCE ANISOTROPY MEASUREMENT ON
FLUORIMETER AND FLUORESCENCE MICROSCOPE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lenka Obrusníková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1399/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Lenka Obrusníková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Korelace mezi měřením stacionární fluorescenční anisotropie na fluorimetru a fluorescenčním mikroskopu

Zadání bakalářské práce:

- 1) Provést literární rešerši na stanovení fluorescenční anisotropie pomocí stacionárního fluorimetru a fluorescenčního mikroskopu. Hledat modelové systémy prostředí–fluorescenční sonda vhodné pro měření pomocí fluorimetru a mikroskopu.
- 2) Navrhnout, připravit a proměřit modelové prostředí na přístrojích dostupných v rámci FCH VUT.
- 3) Zhodnotit rozdíly v měření fluorescenční anisotropie pomocí fluorimetru a fluorescenčního mikroskopu a najít případné korekční faktory pro mikroskopii.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lenka Obrusníková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem fluorescenční anizotropie na modelovém systému fluorescenční sondy a glycerolu. Fluorescenční látkou je v této práci použito ATTO 488 a jako modelové prostředí byly použity roztoky glycerolu o různých koncentracích k nasimulování různě viskózních prostředí. Měření bylo prováděno na fluorescenčním spektrofluorimetru a na konfokálním fluorescenčním mikroskopu. Byla pozorována lineárně se zvyšující naměřená hodnota anizotropie v závislosti na jednotlivých viskozitách jak u hodnot naměřených na fluorimetru, tak se stejným trendem zvyšující hodnot naměřených na fluorescenčním mikroskopu. Tyto hodnoty byly porovnány a byly stanoveny korekční faktory. Díky Perrinově rovnici bylo výpočtem ověřena správnost měření.

ABSTRACT

This Work concentrates on detection fluorescent anisotropy on a model system of fluorescent probe and glycerol. In this thesis, the ATTO 488 was used as a fluorescent substance and glycerol solutions of different concentrations were used to simulate different viscous environments. A fluorescence spectrofluorometer and confocal fluorescence microscope were used for the measurements. A linear increase anisotropy with increasing viscosity of the environment was observed on fluorometer. The same trend was detected on fluorescence microscope. The values were compared and correlation factors were determined. The accuracy of the measurement was verified by calculations using the Perrin's equation.

KLÍČOVÁ SLOVA

anizotropie fluorescence, ATTO 488, fluorimetr, fluorescenční konfokální mikroskop, Perrinova rovnice, FLIM

KEYWORDS

fluorescence anisotropy, ATTO 488, fluorimeter, fluorescence confocal microscope, Perrin equation, FLIM

OBRUSNÍKOVÁ, Lenka. *Korelace mezi měřením stacionární fluorescenční anisotropie na fluorimetru a fluorescenčním mikroskopu*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113586>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled a energii, kterou mi při vypracování této práce věnoval. Mé díky patří samozřejmě kolegům z laboratoře za ochotu při řešení problémů. Zvláštní poděkování patří mému příteli a nejbližším za podporu během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Fotoluminiscence	8
2.1.1	Fluorescence	8
2.1.1.1	<i>Fluorescenční zákony</i>	9
2.1.2	Fluorescenční sondy	10
2.1.2.1	<i>ATTO 488</i>	10
2.2	Anizotropie fluorescence	11
2.2.1	Vztahy pro výpočty a zavedené definice	12
2.2.1.1	<i>Anizotropie fluorescence</i>	12
2.2.1.2	<i>Perrinova rovnice</i>	12
2.3	Měření anizotropie fluorescence	13
2.3.1	Stacionární fluorimetrie, ustálená anizotropie	13
2.3.2	G-faktor a Magický úhel	14
2.3.3	Korekční faktory L_1 a L_2	15
2.4	Fluorescenční mikroskop	15
2.4.1	Fluorescence life-time imaging (FLIM)	15
2.4.2	Fluorescenční anizotropní mikroskopie	15
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	16
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
4.1	Chemikálie	18
4.2	Přístroje	18
4.3	Příprava vzorků a měření	18
4.3.1	Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy	18
4.3.2	Příprava vzorků pro měření	18
4.3.3	Měření viskozity	19
4.3.4	Měření na fluorimetru	19
4.3.5	Měření na fluorescenčním mikroskopu	19
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	20
5.1	Měření viskozity	20
5.2	Měření anizotropie na fluorimetru	21
5.2.1	Správnost měření	21

5.2.2	Vliv integračního času	23
5.3	Stanovení korekčních faktorů	24
5.4	Měření na fluorescenčním mikroskopu	25
5.4.1	Korekce naměřených hodnot	25
6	ZÁVĚR.....	32
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	33
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	35
8.1	Seznam symbolů	35
8.2	Seznam zkratk.....	36

1 ÚVOD

Hlavní zaměřením této práce bude měření anizotropie fluorescence na spektrofluorimetru a na fluorescenčním konfokálním mikroskopu. Anizotropie fluorescence je metodou, která je využitelná ve farmakologii, biochemii díky své citlivosti může nalézt uplatnění například v detekci drog nebo studiu buněčných materiálů, a tím být nápomocná k odhalení buněčných pochodů. Jelikož je hodnota anizotropie ovlivněná geometrií přístroje, tato práce se bude zabývat korekcí naměřených hodnot v případě fluorescenčního mikroskopu jako složitějšího přístroje v porovnání s klasickým spektrofluorimetrem, jehož naměřená data budou brána jako výchozí pro korekci. Práce tedy bude věnována korekci naměřených dat. Z tohoto důvodu bude nutné provést šetření správnosti měření na fluorimetru jako například prozkoumat vliv integračního času. A samotné ověření správnosti měření. Cílem této práce je získat poznatky o uvedených měřeních a získání korekčních faktorů s ohledem na jejich možné uplatnění v dalších výzkumech.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotoluminiscence

Jev, při kterém dochází vlivem absorpce záření o vhodné vlnové délce k excitaci molekuly, přičemž následuje její de-excitace spojená s emisí sekundárního záření v ultrafialové, viditelné až blízké infračervené oblasti se nazývá fotoluminiscence.

Po ozáření molekuly vhodným elektromagnetickým zářením z UV-VIS oblasti dochází k absorpci záření. Molekula tak přechází do excitovaného stavu, do stavu s vyšší energií. Její valenční elektron přechází ze základní singletové hladiny do vyššího singletového stavu, kde jsou spiny elektronů antiparalelní. Stav, při kterém přechází elektron do stavu s vyšší energií, kdy jsou elektrony orientovány paralelně, se nazývá tripletový. U tripletového stavu se molekula deexcituje různými možnostmi. Z hlediska spektrofotometrie jsou pro nás zajímavé přechody zářivé. Podle způsobu deexcitace předem vyexcitované molekuly můžeme rozdělovat fotoluminiscenci na **fluorescenci**, **fosforescenci** a zpožděnou fluorescenci.

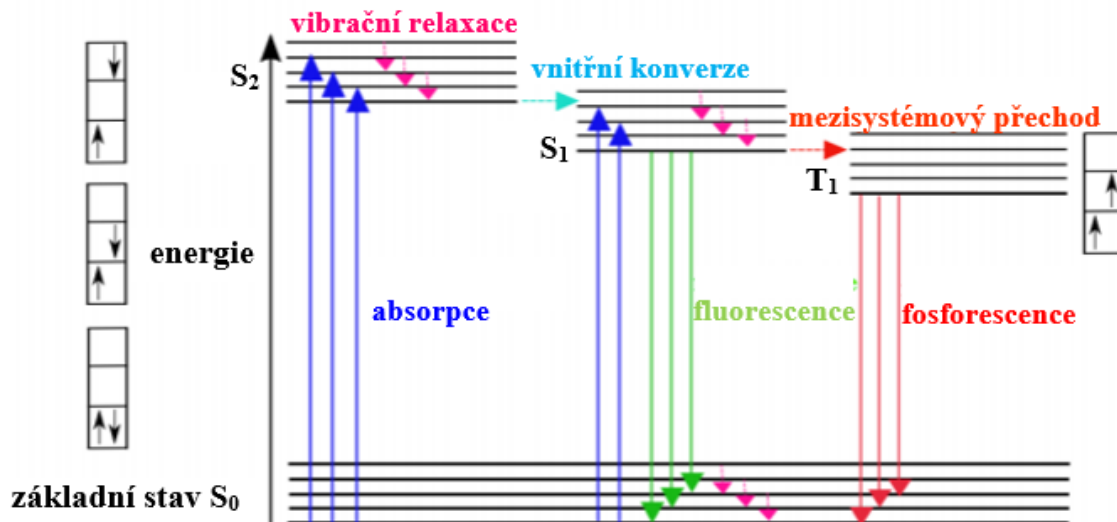
Zářivý přechod nastává vždy z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu dle Kashova pravidla. V případě, je-li elektron vyexcitován na vyšší vibrační hladinu dochází před samotnou emisí k vnitřní konverzi nebo vibrační relaxaci. Takováto změna je velmi rychlá, jedná se o nezářivý děj. Vnitřní relaxace je proces, při kterém je energie excitovaného stavu převedena na vibrační energii, která je následně vyzářena ve formě tepla. O vnitřní konverzi se jedná v případě, pokud elektron přechází mezi elektronovými stavy se stejně orientovaným spinem, přechody z S_2 do S_1 neboli přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou na nejvyšší vibrační hladinu základní singletové hladiny. Při přechodu elektronu z S_1 do T_1 , mezisystémový přechod, elektron přechází mezi stavy s opačnými spiny, jedná se o zakázaný přechod. U nezářivého procesu se celková energie na rozdíl od zářivých procesů nemění [1].

2.1.1 Fluorescence

Po absorpci světla molekulou v základním stavu nastává velmi rychlý zářivý přechod elektronu z rovnovážné hladiny S_1 do některé z vibračních hladin základního stavu S_0 . Elektron přechází z orbitalu s nejnižší energií (základní stav) do nejbližšího neobsazeného orbitalu s vyšší energií. Tato změna probíhá v krátkém časovém úseku, řádově nanosekundách, jelikož u fluorescence dochází ke spinově povolenému přechodu. Spiny obou elektronů jsou antiparalelní.

K popisu energetických přechodů, jako je absorpce fotonu, fluorescence či fosforescence, slouží Perrin-Jabloňského diagram, který je ilustrován na Obrázku 1. Přímými šipkami jsou znázorněny zářivé procesy, u nichž dochází ke změně celkové energie systému. Nezářivé procesy, u kterých se celková energie systému nemění, jsou znázorněny přerušovanými čarami. Tyto procesy se realizují mezi vibračně-rotacími hladinami různých elektronových stavů.

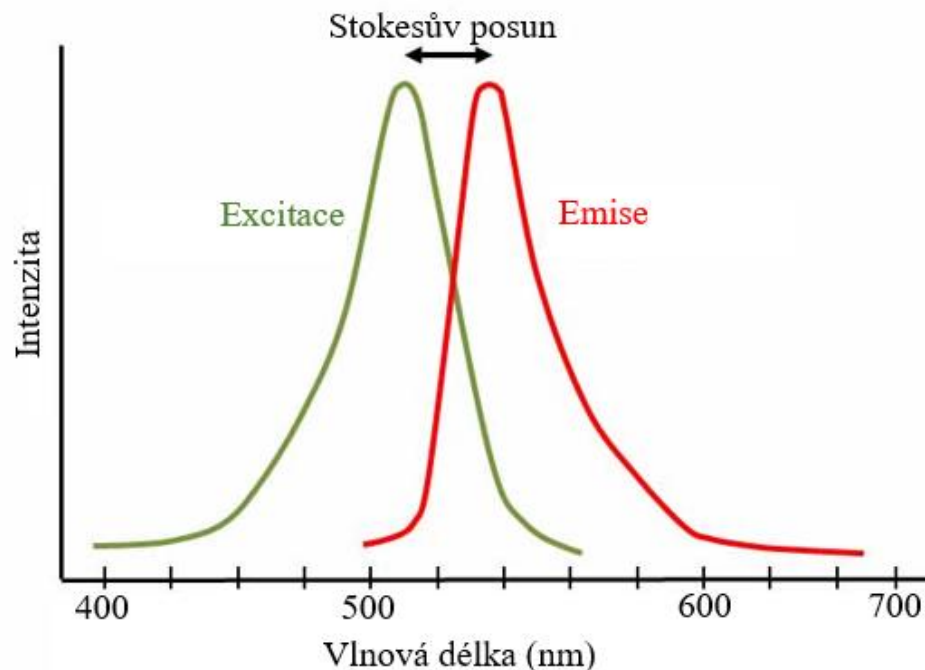
V procesu absorpce i emise záření se účastní stejné přechody a podobné vibrační hladiny stavů S_0 a S_1 . Z tohoto důvodu, jak můžeme vidět na Obrázku 2, emisní spektrum často připomíná zrcadlový obraz absorpčního spektra [2].



Obrázek 1: Perrin-Jabloňského diagram [3].

2.1.1.1 Fluorescenční zákony

Stokesův zákon nám objasňuje, proč je emisní spektrum fluoroforu posunuto oproti spektru absorpčnímu. Říká, že vhodná vlnová délka emise při luminiscenci je větší nebo takřka stejná oproti vlnové délce excitačního světla. Část energie je spotřebována na vnitřní přechody, emisní spektrum je od absorpčního posunuto doprava, k vyšším vlnovým délkám (nižší energii).



Obrázek 2: Stokesův posun a zrcadlová symetrie absorpčního a emisního spektra (fluorescence) [1].

Druhým zákonem je Kashovo pravidlo. Je přímo spojeno s prvním Stokesovým zákonem. Podle tohoto zákona před samotnou emisí fluorescenčního kvanta dochází k vibračním přechodům a vnitřní konverzi, a to z toho důvodu, aby k excitaci (fluorescenci) docházelo z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu.

Třetím fluorescenčním zákonem je tzv. Vavilovo pravidlo. Podle něj jsou kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu molekul v roztoku nezávislé na vlnové délce budícího záření. Z toho vyplývá, že emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace [3].

2.1.2 Fluorescenční sondy

Látky používané ve fluorescenční spektroskopii a fluorescenční mikroskopii se nazývají fluorescenční sondy. V jejich chemické struktuře se objevuje fluorofor, ten je zodpovědný za absorpci energie vhodného elektromagnetického záření dané vlnové délky. Poté fluorofor emituje přebytečné záření při vyšší vlnové délce a dochází k fluorescenci.

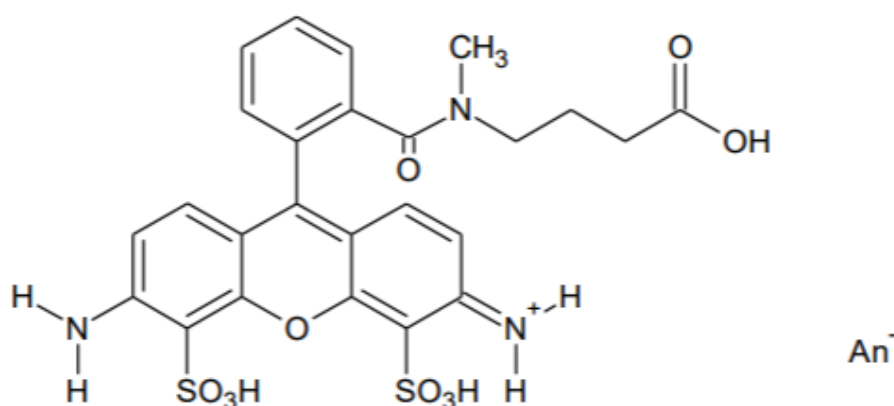
Fluorescenční sondy můžeme dělit do tří skupin. Vnitřní sondy, které se přirozeně vyskytují v molekulách některých látek, řadíme do první skupiny. Tyto látky vykazují autofluorescenci a patří mezi ně fluoreskující proteiny, flaviny, karotenoidy, aromatické aminokyseliny, koenzymy NADH a NADPH, chitin, chlorofyl atd. Jsou však využitelné pouze v malém okruhu experimentů [4].

Další skupinou sond jsou fyzikálně vázané fluorescenční sondy. Malé organické molekuly, které se do zkoumaného systému přidávají nebo se v něm inkorporují na základě rozpustnosti či elektrostatické interakce. Tyto molekuly poté vykazují specifické fotofyzikální chování.

Poslední skupinou fluorescenčních sond jsou tzv. fluorescenční značky. Jedná se o molekuly fluoroforů, které jsou kovalentně vázané na zkoumanou látku. Po navázání na sledovanou molekulu jsme schopni ji díky fluorescenčním technikám zobrazit [5].

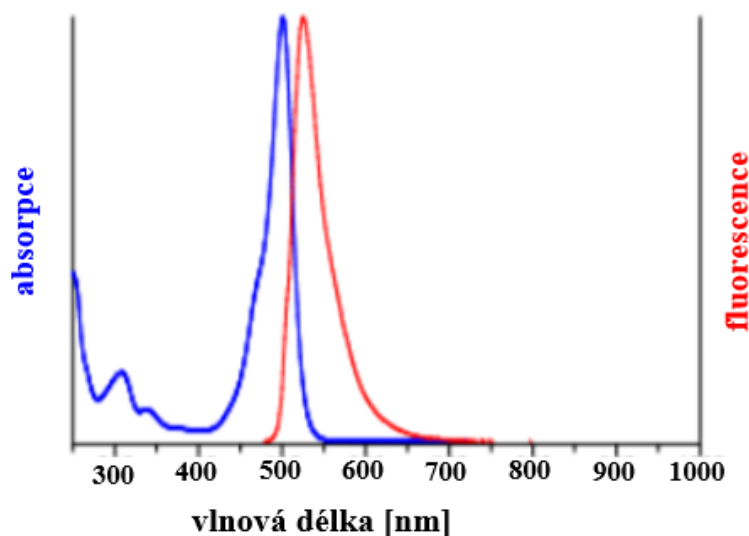
2.1.2.1 ATTO 488

ATTO 488 je hydrofilní fluorescenční látka, která se dobře rozpouští ve vodě. Strukturu vidíme na Obrázku 3. Její molekulová hmotnost je $981 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Vodný roztok je žlutozeleně zbarven. Nejúčinnější absorpce je v rozmezí 480–515 nm s absorpčním maximem u 501 nm viz Obrázek 4. Je to vhodná sonda pro mikroskopii s vysokým rozlišením, charakteristická je silná absorpce a vysoký kvantový výtěžek. ATTO 488 je látka fotostabilní a dochází k potlačení tripletního stavu.



Obrázek 3: Strukturální vzorec ATTO 488 [6].

Díky velkému kvantovému výtěžku je tato sonda vhodná pro aplikaci také v průtokové cytometrii nebo například fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) [6].



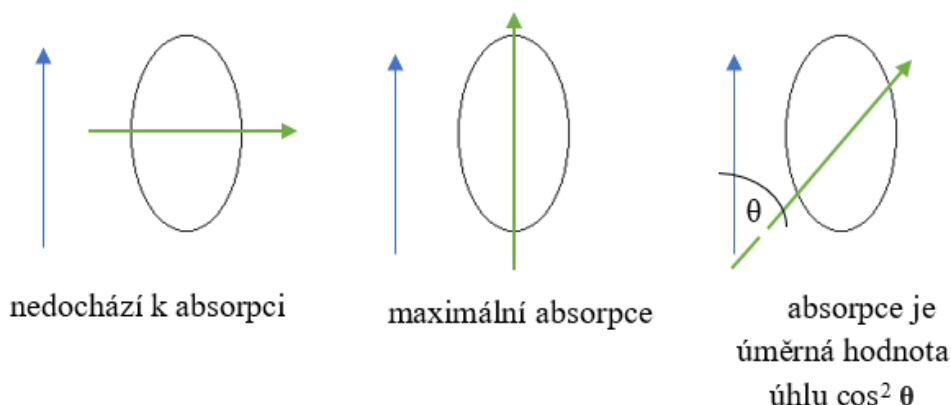
Obrázek 4: Normalizované absorpční a fluorescenční spektrum fluorescenční sondy ATTO 488 ve vodě při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ [7].

2.2 Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie fluorescence se dá využít jak pro zkoumání chemických látek, tak v oblastech biochemie, fyziky a v neposlední řadě v lékařských výzkumech. V této metodě je klíčovým faktorem provádění kvantitativní analýzy interakce mezi fluorescenčně značenými a fluorescenčně neznačenými molekulami. Způsob měření je založen na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem.

Světlo neboli elektromagnetická vlna, je složená ze dvou složek: elektrické a magnetické. Složky jsou k sobě navzájem kolmé a nemají vhodnou orientaci, ale při lineárně polarizovaném světle kmitá elektrická složka v jedné rovině, což je pro měření důležité. Pokud je daný systém fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, molekula a její fluorofory orientované ve stejné rovině, jako elektrický vektor budícího záření, jsou excitovány přednostně, viz Obrázek 5. Nastává tedy fotoselekce, jev popisující pravděpodobnost absorpci fotonů a jejich následnou excitaci.

Je-li tedy vzorek ozářen polarizovaným světlem, nastává excitace pouze u molekul majících vhodnou orientaci vzhledem ke zdroji, budícímu paprsku. Orientace fluoroforů ve vzorku tedy ovlivňuje signál. Fluorofory depolarizují, to znamená, že během své doby života podléhá molekula rotačnímu pohybu a emituje záření, které se s absorbovaným zářením neshoduje. Tento jev je závislý na viskozitě prostředí, velikosti molekuly (rotační difuzi) a vlastní rychlosti molekuly. Z toho tedy plyne, že v prostředí malé viskozity, kde fluoroforům nebrání nic v pohybu, se bude hodnota anizotropie blížit k nule. Naopak u velké molekuly fluoroforu v prostředí velké viskozity bude naměřená hodnota nejvyšší [3].



Obrázek 5: Fotoselekce, modrá šipka zobrazující rovinu polarizovaného světla, zeleně znázorněn přechodový moment molekuly [3].

2.2.1 Vztahy pro výpočty a zavedené definice

Anizotropie fluorescence (r), jinými slovy míra polarizace emise, závisí na fotoselekcii excitace fluoroforů při průchodu polarizovaného světla vzorkem, který je opticky izotropní [1].

U anizotropie zavádíme pojmy fundamentální a limitní anizotropie. Fundamentální je teoretická hodnota, kterou dostáváme v případě, že se fluorofory nijak nepohybují. Naměřená hodnota se pak označuje jako limitní anizotropie, nabývá menších hodnot oproti teoretické pro daný fluorofor. V praxi dochází např. k rotaci molekuly. Rotačnímu pohybu molekuly můžeme zabránit změnou viskozity prostředí. Zvýšením dojde k navýšení naměřené anizotropie.

Fundamentální anizotropie při jedno-fotonové excitaci závisí pouze na úhlu β mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly fluoroforu. Maximální hodnoty $r_0 = 0,4$ nabývá pro $\beta = 0^\circ$ a minimální hodnoty $r_0 = -0,2$ pro $\beta = 90^\circ$ [8].

2.2.1.1 Anizotropie fluorescence

Vztah pro výpočet anizotropie lze vyjádřit následující rovnicí:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}}, \quad (1)$$

kde při paralelní (kolmé) orientaci emisního a excitačního polarizátoru měříme intenzitu emise jako I_{\parallel} (vertikální neboli emisní), respektive I_{\perp} (horizontální neboli excitační).

2.2.1.2 Perrinova rovnice

Perrinova rovnice bere v úvahu kulové částice, které vykazují symetrické, izotropní rotace. Díky tomu předpokládá, že časová závislost fluoroforu má exponenciální průběh.

$$\frac{r_0}{r(t)} = 1 + \frac{\tau}{\varphi}, \quad (2)$$

kde r_0 je fundamentální anizotropie, $r(t)$ je steady-state anizotropie, φ je rotační korelační čas (pootočení molekuly o 1 radián $\varphi = \frac{1}{6 \cdot D}$).

Hodnota fundamentální anizotropie se dá, pomocí Perrinovy rovnice, využít k zjištění například rotačního difúzního koeficientu:

$$D_y = \frac{kT}{6 \cdot V\eta}, \quad (3)$$

kde V je objem částice, η je viskozita prostředí, k je Boltzmannova konstanta a T je absolutní teplota, pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah.

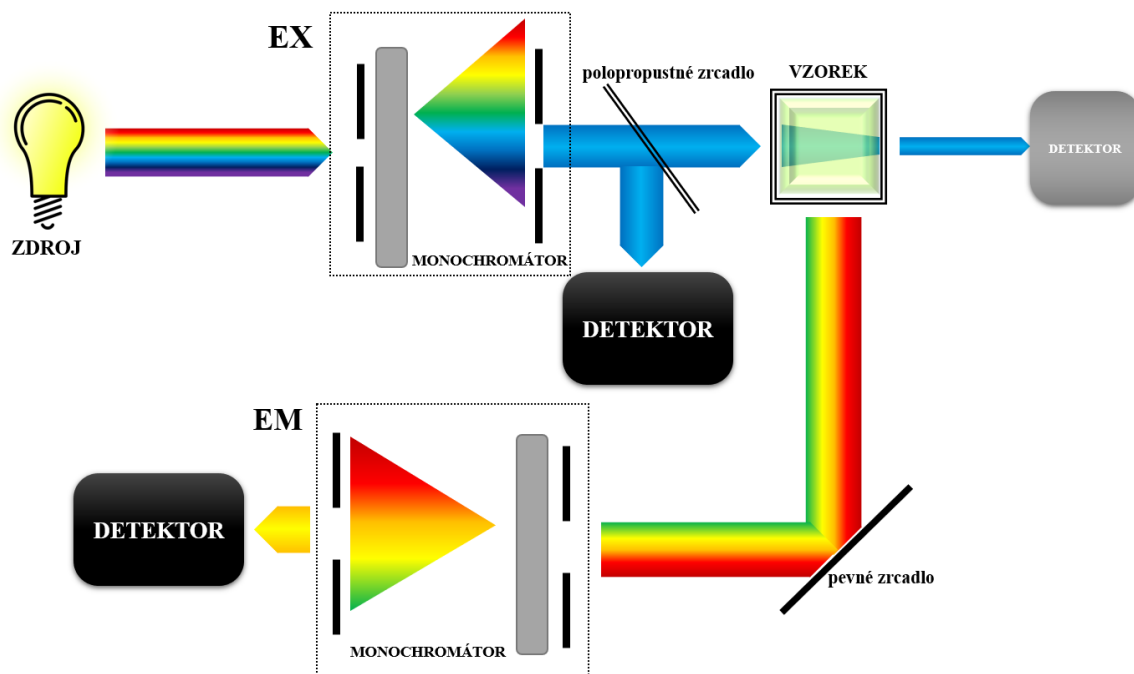
2.3 Měření anizotropie fluorescence

Rozlišujeme dvě metody měření **časově rozlišenou** a **ustálenou** anizotropii. První z nich je časově–rozlišené (time–resolved) anizotropie, pomocí které měříme samotný pokles nebo poklesy intenzit. Dodáváme pulz, který je většinou kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku. Na základě takto získané informace jsme schopni zjistit doby života dané molekuly a fluoroforu.

U časově ustálené (steady–state) anizotropie je vzorek ozáren kontinuálním paprskem a současně se zaznamenává emisní spektrum. Výstupem takového měření je střední hodnota intenzity či polarizace fluorescence [1].

2.3.1 Stacionární fluorimetrie, ustálená anizotropie

Fluorimetrie využívá jevu fotoluminiscence, kdy je monochromatickým světlem excitována fluoreskující látka do vyšší energetické hladiny. Při návratu do základní hladiny je část světla vyzářena ve formě světla a část ve formě fotonu. Energie emitovaného záření je tak zpravidla nižší než energie excitační.



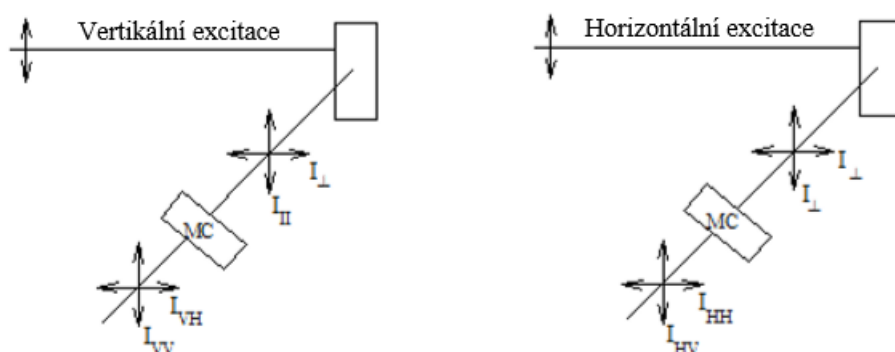
Obrázek 6: Schéma fluorimetru [9].

Emitované světlo se snímá ve směru kolmém na excitační paprsek, poté, co projde monochromátorem se měří fotonásobičem. Schéma vidíme na Obrázku 6. Většina fluorimetrů používá, jako emisní a excitační monochromátory, interferenční filtry. Dražší jsou vybaveny

optickou mřížkou, dá-li se plynule nastavit excitační i emisní vlnovou délku, hovoříme o spektrofluorimetrii.

Za použití polarizačních filtrů do excitační a emisní části, jsme schopni zaznamenat zpoždění excitovaného elektronu při jeho návratu do základního stavu. Pokud je toto zpoždění zcela zanedbatelné, nebo jsou-li fluorescenční molekuly zcela nepohyblivé, zachovalo by si emitované záření totožnou polarizaci jako záření excitační. Jestliže se fluorescenční molekula volně pohybuje a má dostatečný čas pro pootočení oproti rovině polarizace, polarizace není zachována. Malé molekuly mají zvýšenou rotační rychlost, díky polarizační fluorimetrii pak můžeme zjišťovat velikost fluoreskující molekuly. Toho se využívá například v imunochémii. Tímto způsobem jsme schopni rozlišit malou volnou fluorescenčně značenou protilátku a velký komplex s antigenem [10].

Běžně se měří ve dvou uspořádáních. **L-formát**, častěji používaný, měření pouze na jednom emisním kanálu, složky jsou detekovány postupně. Vzorek je excitován různě polarizovaným zářením. Emise je sledována monochromátorem, obvykle umístěným kolmo ke zdrojovému paprsku. Druhým je tzv. **T-formát**, ve kterém jsou kolmé a paralelní složky emise pozorovány současně prostřednictvím samostatných kanálů, což vyžaduje jejich stejnou odezvu. Při uspořádání na T-formátu se měření provádí ve dvou krocích, nejdříve je polarizátor nastaven na vertikální orientaci pro měření paralelní a kolmých signálů a poté je nastaven na horizontální orientaci. Zatím co excitační polarizátory mění svou orientaci, emisní polarizátory mají po celou dobu měření orientaci stejnou [1].



Obrázek 7: Schéma uspořádání při měření anizotropie fluorescence. Na levé straně – L-formát, napravo – T-formát [1].

2.3.2 G-faktor a Magický úhel

G-faktor a magický úhel hrají důležitou roli pro správné nastavení optické části přístroje, jejich neuvážením v analýze by mohlo dojít k nesprávné interpretaci výsledků.

G-faktor vyjadřuje poměr citlivosti při detekci vertikální a horizontální polarizované emise. Za jeho pomoci se dá korigovat detekční kanál pro každou vlnovou délku. Určí se pomocí proměření excitace vzorku horizontálně polarizovaným světlem, při všech původních nastavení přístroje jako jsou filtry, štěrby a podobně.

Aby celkové měření intenzity fluorescence nebylo závislé na stupni polarizace vzorku, musíme vhodně nastavit magický úhel. Při vertikálním excitačním polarizátoru nastavujeme emisní polarizátor na magický úhel $54,7^\circ$ [1]. Účinnost přenosu emisního monochromátoru je závislá na polarizaci záření, pozorovaný signál není přesně úměrný.

2.3.3 Korekční faktory L_1 a L_2

Vliv použitého objektivu korigujeme korekčními faktory L_1 a L_2 . Tyto faktory ovlivňují pouze jmenovatel celé stanovené rovnice:

$$r = \frac{I_{||} - G \cdot I_{\perp}}{(1 - 3L_2)I_{||} + (2 - 3L_1) \cdot G \cdot I_{\perp}}, \quad (4)$$

kde G je G-faktor, $I_{||}$ a I_{\perp} jsou intenzity horizontální a vertikální polarizace a L_1 a L_2 jsou korekční faktory [11].

2.4 Fluorescenční mikroskop

V mnoha vědních oblastech jako chemie, biologie a fyzika je fluorescenční mikroskopie využívanou metodou. Jelikož se často používá ke sledování buněčných systému je užitečným nástrojem v oblastech medicíny. Je schopna zobrazovat vnitřní část buněk s velkou přesností. Dále pak sledovat uspořádání zobrazovaných objektu nebo i buněk, fungování buněčných pochodů, označovat konkrétní části buňky fluorescenčními látkami a takto zvýrazněné části pozorovat.

K měření jsou využívány konfokální mikroskopy, typická je vysoká rozlišovací schopnost detekce světla z ohniskové vzdálenosti. Zaostření zajišťuje bodová clonka tzv. konfokální štěrbinu, která odfiltruje neostrý signál. Velikost této štěrbinu rozhoduje o pronikání světla mimo ohnisko nebo ztrátě užitečného světla. Intenzitu světla pak sledujeme pomocí Airyho kruhů na mikroskopu, které odpovídají šířce konfokální štěrbinu [12].

2.4.1 Fluorescence life-time imaging (FLIM)

Metoda FLIM na základě dob života ve vzorku vytváří obraz pozorovaného objektu. Dané době života fluoroforu vždy odpovídá jednotlivá intenzita obrazu. Jak dlouho je molekula v excitovaném stavu nám udává doba života. Je to tedy průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu, než nastane emise. Metodu ovlivňuje druh vazby mezi molekulami vzorku a okolní podmínky, jako například množství kyslíku a pH. Doba života však není závislá na absorpci vzorku, fotovybělování, koncentraci ani intenzitě excitačního záření [13].

2.4.2 Fluorescenční anizotropní mikroskopie

Označována jako r-FLIM, je podobná metodě FLIM. Umožňuje pozorovat velmi malé části na površích či uvnitř systémů. Výstupem je informace o kvantovém výtěžku, době života, pohybu a orientaci fluoroforů ve vzorku. Obraz na rozdíl od předešlé metody FLIM vytváří podle hodnot anizotropie odpovídající měřenému vzorku. Výstupem je barevný obraz, kdy podle nastavení přístroje barvy odpovídají jednotlivým hodnotám anizotropie v měřeném prostředí.

Strukturní vlastnosti, viskozita, volná otáčivost a tvar samotné molekuly fluoroforu se podílí na ovlivnění anizotropie vzorku. Bude-li se jednat o fluorofory, které se budou volně pohybovat ve vzorku a volně se otáčet, bude anizotropie nízká. Jedním z využití může být pozorování mobility a lokace fluoroforů. Nárůst anizotropie nám poukazuje na navázání fluoroforu (fluorescenční sondy) na objekty (části buňky), nebo proniknutí do více viskózního prostředí, ať už v modelových nebo živých systémech [13].

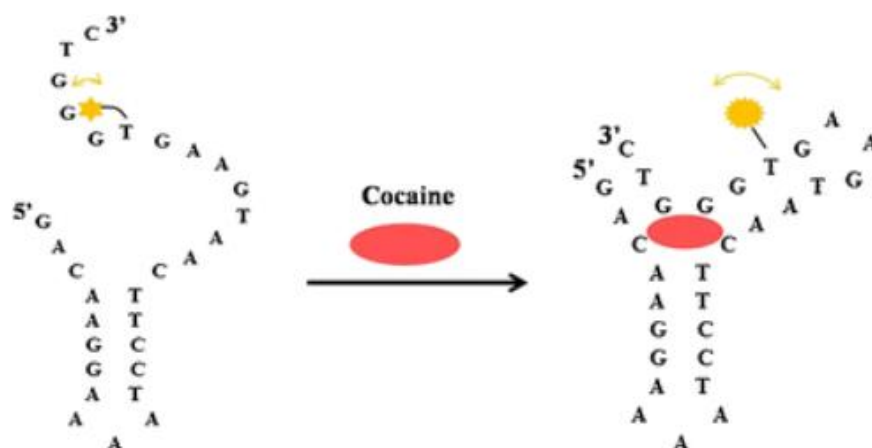
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Klaus Suhling a jeho kolektiv využili měření časově-rozlišené anizotropie na konfokálním fluorescenčním mikroskopu a za pomoci fluorescenční sondy fluoresceinu demonstrovali změny viskozity v prostředí živých buněk [14].

Vinegoni Claudio a spol. za použití mikroskopie s fluorescenční anizotropií s vysokým rozlišením prováděli klinická měření intracelulární distribuce léčiva na myších modelech. Neinvasivní měření působnosti léčiva a jeho distribuci v buňkách a samotných orgánech může poskytnout kritický pohled na molekulární farmakologii léků s malou molekulou.

Měření fluorescenční anizotropie se běžně používají v screeningových testech. Fluorescenční anizotropie je tedy výhodnou metodou, jelikož umožňuje kvantitativní měření bez separačního kroku, tedy izolace léčiva ze vzorku (živých buněk). Za použití dvoufotonového mikroskopu FV1000 (Olympus, Japonsko) pro in vitro i in vivo měření cílové koncentrace léčiva. Zvláště problematické pro pomalu se otáčející fluorofory s vysokou anizotropií je indukce depolarizačního faktoru, ten je závislý na numerické apertuře použitého mikroskopu. Pozorovali například, že u měření anizotropie roztoku tetramethylrhodaminu v glycerolu docházelo k poklesu naměřených hodnot o 32 %. Ve fluorescenčním zobrazování se nacházejí defekty. Místa, kde kvůli použité optice dochází ke snížení hodnoty naměřené anizotropie s tím, jak roste numerická apertura cíle. U konfokálního laserového skenovacího mikroskopu je pomocí galvo zrcadel snímán excitační laserový paprsek přes zadní ohniskovou rovinu objektivu. Pohyby zrcadel se promítaly do rastrového skenování přes zobrazený vzorek. V případě velkého zorného pole se v pohraničních oblastech zakříví pole, jelikož se dostáváme do os mimo ohnisko. V pohraničních oblastech zorného pole jsou díky tomu nezanedbatelné rozdíly. To bude mít za následek vznik artefaktů hranic obrazu se sníženými hodnotami fluorescence anizotropie na okrajích obrazu. K odstranění těchto artefaktů zobrazovací přístup spočíval v získání snímků v omezeném zorném poli. Při použití vodotěsného objektivu (25 ×, 1,05 NA, pracovní vzdálenost 2 mm; Olympus, model no. XLPLN25XWMP2) byly získány obrazy fluorescenční anizotropie v zorném poli 150 μm · s minimálními artefakty fluorescenční anizotropie [15].

Yingxiong Liu a Qiang Zhao pracovali na vývoji jednoduché, citlivé a rychlé metody detekce kokainu. Jejich metoda využívá výhody fluorescenční anizotropie a aptameru, kokain se váže pomocí aptamerové sondy s tetramethylrhodaminem (TMR) označeným na specifické pozici. V případě, že se v analyzované složce nachází kokain dojde k vazbě na aptamer a tím se změní jeho struktura, což vede ke změnám interakce mezi značeným TMR a sousedními bázemi v aptamerové sekvenci. Takže fluorescenční anizotropie se mění s nárůstem kokainu. Za optimalizovaných testovacích podmínek tento aptamer značený TMR umožňoval přímou detekci kokainu už při koncentraci 5 μM. Tato metoda také umožnila detekci kokainu obohaceného ve zředěném vzorku séra a moči.



Obrázek 8: Reakce značeného aptameru s kokainem [16].

Vazba kokainu na aptamer značený TMR způsobuje změnu konformace (Obrázek 8) a změnu intramolekulární interakce mezi TMR a bázemi aptameru, takže je dosaženo přímé analýzy FA kokainu [16].

James A. Dix ve spolupráci s A.S. Verkman za použití fluorescenční sondy (2,7-bis-karboxyethyl-5 (a 6) -karboxy-fluorescein (BCECF) a indo-1) pomocí anizotropního mapování, zkoumali buňky psích ledvin a Swiss 3T3 fibroblastů. K měření použili pulsní světelný zdroj a epifluorescenční mikroskop. Zjistili, že anizotropie v cytoplazmě těchto buněk je vyšší než v intersticiální oblasti. Pomocí hodnot anizotropie a dob života a kalibrace systému na glycerol/voda zjišťovali viskozitu cytoplazmatu buňky [17].

Komaromy-Hiller s kolektivem zkoumali vývoj hodnot anizotropie fluorescence perylenu v závislosti na teplotě a koncentraci neiontového tenzidu tritonu X-114 před a po zakalení vzorků. Měření prováděli na standardním fluorimetru. Naměřené hodnoty anizotropie využil ke stanovení micelárního jádra. Maximum anizotropie bylo pozorováno při dosažení kritické micelární koncentrace, bezprostředně po jejím překročení se hodnoty anizotropie snížily, což bylo připisováno zvětšení objemu micelárního jádra. Hodnoty anizotropie se pod bodem zákalu snižovaly i vlivem vzrůstající teploty, což souvisí s výraznějším rotačním pohybem sond. V bodě zákalu žádné výraznější změny nenastaly [18].

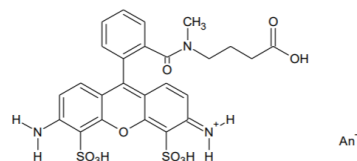
C. M. Futsaether a kolektiv pomocí fluorescenční spektroskopie stanovovali intracelulární pH v gram-pozitivní bakteriích *Propionibacterium acnes*. Fluorescenční sonda BCECF_AM (2',7'- bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein) byla do bakterie vnášena kvůli lepší penetraci membránou. Pozorovali buňky po přidání glukózy, tento vliv neměnil pH. Další vlivy, které měli pozorovatelnou změnu na pH jako acidifikace buňky za přidání NH_4Cl a alkalizace pomocí NaHCO_3 . Změny sledovali pomocí měření intenzity fluorescence fluorescenční sondy. Intenzity fluorescence při stanovení byly 505 nm a 450 nm a výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí nukleární magnetické rezonance s použitím ^{31}P [19].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie

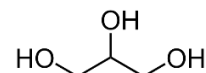
ATTO 488

CAS: 923585-42-6
Sigma Aldrich s.r.o.
č. šarže: BCBV8900



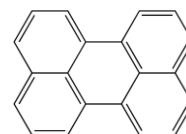
Glycerol

CAS: 56-81-5
Sigma Aldrich s.r.o.
čistota: $\geq 99,5\%$
č. šarže: BCBK9967V



Perylen

CAS: 198-55-0
Fluka
č. šarže: 2059009



Deionizovaná voda

Miliphore, Purelab: ELGA

H₂O

4.2 Přístroje

Fluorescenční spektrofotometr FS5

EDINBURGH INSTRUMENTS

Fluorescenční konfokální mikroskop

MicroTime 200, PicoQuant GmbH

Analytické váhy

Denver Instrument, Mdl BC 100

Mikropipety

Finnpipette, Eppendorf Research

Vibrační míchadlo

IKA MS2 Minishaker

4.3 Příprava vzorků a měření

4.3.1 Příprava zásobního roztoku fluorescenční sondy

Pro měření anizotropie fluorescence byla zvolena sonda ATTO 488, která je rozpustná ve vodě. Pro výslednou koncentraci fluorescenční sondy ATTO 488 v zásobním roztoku $1 \cdot 10^{-4}$ M bylo naváženo potřebné množství pevné látky na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa. Za použití rozpouštědla byla látka kvantitativně převedena do odměrné baňky a objem byl doplněn po rysku.

4.3.2 Příprava vzorků pro měření

Pro měření anizotropie bylo zapotřebí vytvořit prostředí s různými hodnotami viskozit. Z tohoto důvodu byl použit glycerol, ten díky své značné viskozitě omezuje sondu v rotačním pohybu, a tím umožní naměřit vyšší hodnoty anizotropie. Byla připravena koncentrační řada roztoku glycerolu a do ní bylo přidáno vždy stejné množství zásobního roztoku ATTO 488, tak aby výsledná koncentrace byla $1 \cdot 10^{-6}$ M. Takto připravené vzorky byly měřeny na reometru, fluorimetru a fluorescenčním mikroskopu. Celkem bylo připraveno 6 vzorků (Tabulka 1).

4.3.3 Měření viskozity

K vytvoření vzorků pro měření byl použit glycerol ze zásobní lahve čistoty $\geq 99,5\%$, jelikož je ale hygroskopickou látkou a snadno poutá vzdušnou vlhkost, hodnota viskozity nebyla shodná s tabelovanými hodnotami a bylo nutné stanovit reálnou viskozitu připravených roztoků.

Byly naměřeny jednotlivé hodnoty viskozit při 25 °C. Vždy pro 10 ml stanovovaného vzorku. Jednalo se o Newtonovské kapaliny, tedy pro ně platí Perrinova rovnice.

4.3.4 Měření na fluorimetru

Pro měření anizotropie fluorescence byl využit fluorimetr FS5 – EDINBURGH INSTRUMENTS. Při měření emisních anizotropie byl nastaven excitační a emisní monochromátor v 90°, šířka štěrby byla nastavena na 2 nm, excitační monochromátor byl nastaven na 467 nm, výsledný sken byl měřen v rozsahu od 490 nm do 550 nm. Ve spektru byly zaznamenávány hodnoty intenzity fluorescence. Integrační čas byl zvolen 1 s, volba integračního času je odůvodněna v kapitole 5.2.2.

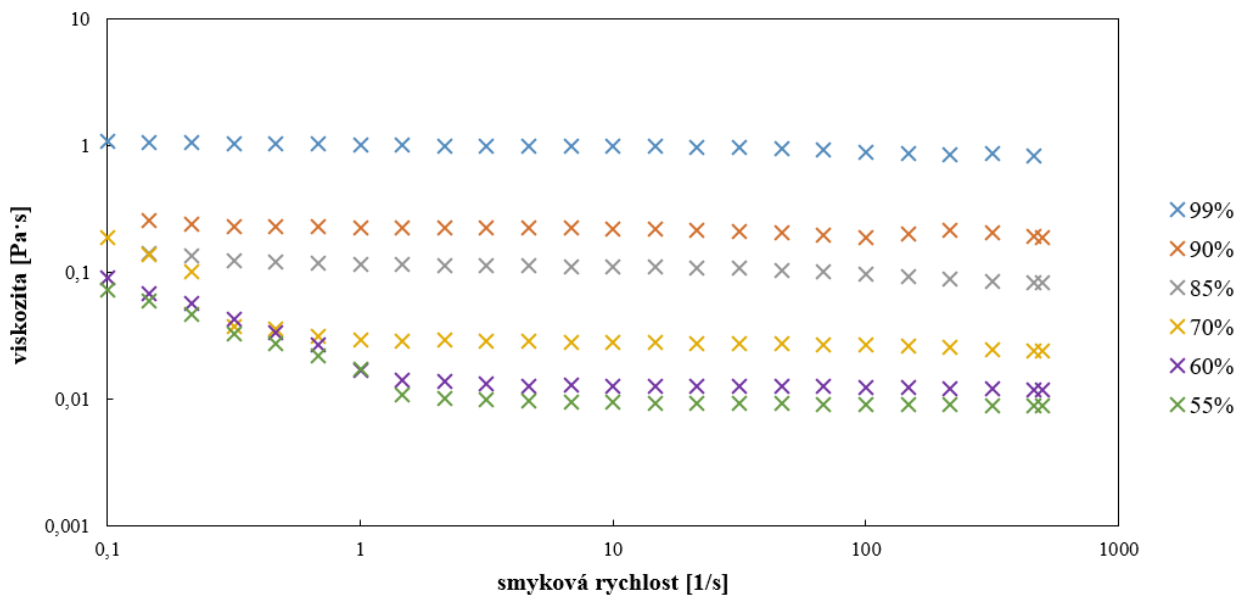
4.3.5 Měření na fluorescenčním mikroskopu

Jako excitační zdroj byl použitý LDH-470 (H in MOU, V in LCU), byla nastavena frekvence 25 MHz a rozlišení 8 ps/kanál. Měření probíhalo za použití ultraplanárního super apochromatického objektivu UPLANSAPO 60x WI (Olympus), dále bylo použito dichroické zrcadlo 405/467rdc (Chroma), Bandpass filtr byl nastaven na 520/35 (Chroma) s využitím detektoru (Excelitas) SPCM-AQRH. Bylo měřeno přes polarizační filtr Polarization cube (Olympus).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Měření viskozity

Byly naměřeny viskozity připravených vzorků a následně byla data vyhodnocena. Měření se provádělo pro 25 °C a v objemu 10 ml vzorku.



Obrázek 9: Graf závislost viskozity na smykové rychlosti vzorků glycerolu a ATTO 488.

Byl ověřen fakt, že se jednalo o Newtonovské kapaliny, při vyšších smykových rychlostech od 1 Hz byla hodnota viskozit konstantní. Díky tomu, jsme mohli vyhodnotit danou viskozitu pro každý z připravených vzorků. Pro Newtonovské kapaliny platí Perrinova rovnice, díky které jsme schopni ověřit správnost měření anizotropie na fluorimetru.

Tabulka 1: Naměřené hodnoty viskozit vzorků glycerolu a ATTO 488.

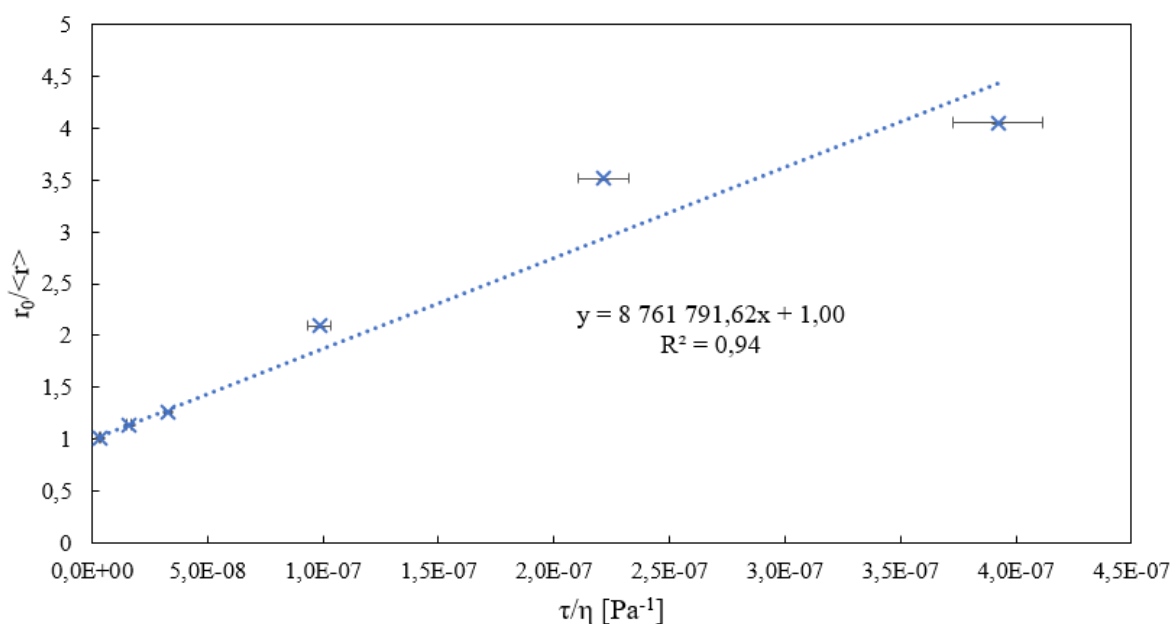
Vzorek	přibližná procenta glycerolu [hm. %]	viskozita [mPa·s]	směrodatná odchylka [mPa·s]	směrodatná odchylka [%]
1	99	943,4	52,9	5,6
2	90	207,0	11,4	5,5
3	85	99,3	9,5	9,5
4	70	33,6	1,3	3,8
5	60	15,6	0,5	3,4
6	55	9,0	0,5	5,5

5.2 Měření anizotropie na fluorimetru

Do měrné cely přístroje byla umístěna křemenná kyveta se vzorkem (1 až 6) a podle kapitoly 4.3.4 byl fluorimetr nastaven a bylo spuštěno měření.

5.2.1 Správnost měření

Vzorky vykazovaly chování Newtonovských kapalin, můžeme si správnost měření ověřit na Perrinově rovnici.



Obrázek 10: Graf závislosti poměru fundamentální anizotropie ku naměřené hodnotě anizotropie fluorescenční sondy ATTO 488 v závislosti na poměru doby života k reálné viskozitě. Tečkovaně vyznačena rovnice lineární regrese.

Molární plynová konstanta R 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹, teplota T 293,15 K, doba života excitovaného stavu (dohasínání fluorescence) τ naměřena na fluorescenčním mikroskopu, N_A Avogadrovo číslo $6,022 \cdot 10^9$ mol⁻¹.

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = a \cdot \frac{1}{\eta} + 1,$$

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{\tau}{\varphi},$$

Ze Stokes-Einsteinova vztahu:

$$\varphi = \frac{\eta V_m}{RT},$$

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{RT\tau}{\eta V_m},$$

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = \frac{RT\tau}{V_m} \cdot \frac{1}{\eta} + 1,$$

Z podobnosti s rovnicí směrnice z grafu na Obrázku 10:

$$y = ax + 1$$

$$y = 8761791,62x + 1$$

$$a = 8761791,62$$

$$\frac{1}{a} = 1,141 \cdot 10^{-7}$$

$$a = \frac{RT}{V_m}$$

$$V_m = \frac{1}{a} \cdot R \cdot T = 8,92 \cdot 10^{-8} \cdot 8,314 \cdot 293,15 = 2,782 \cdot 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$$

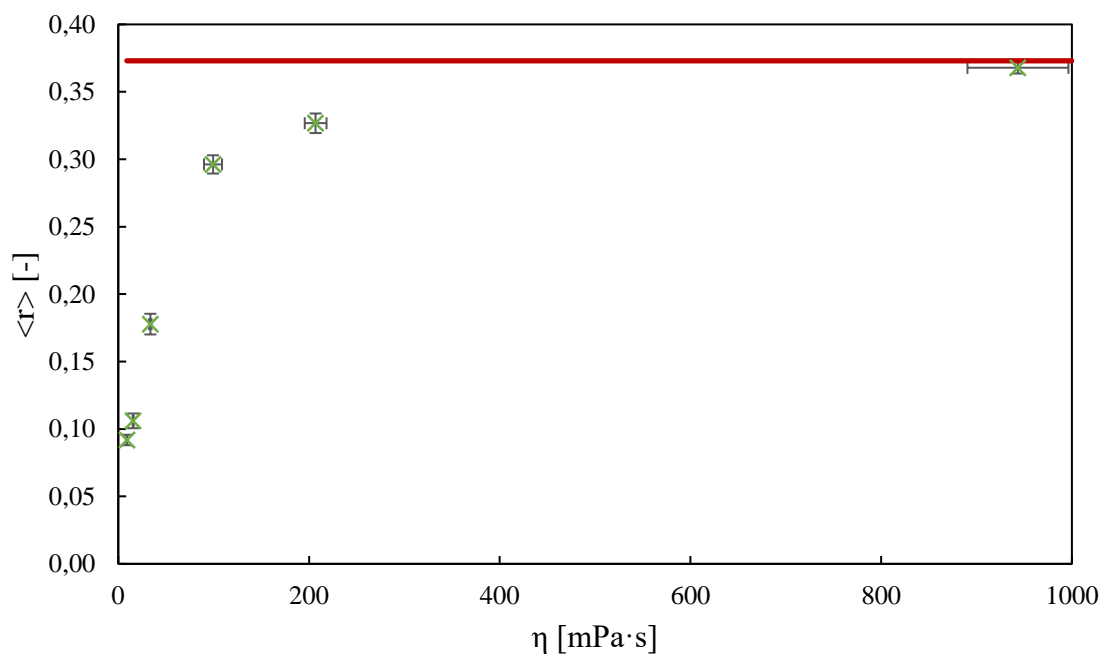
$$V = \frac{V_m}{N_A} = \frac{2,782 \cdot 10^{-4}}{6,022 \cdot 10^{23}} = 4,62 \cdot 10^{-28} \text{ m}^3 = 0,46 \text{ nm}^3$$

$$R = \sqrt[3]{\left(\frac{\frac{3}{4} \cdot V_m}{\pi}\right)} = \sqrt[3]{\left(\frac{\frac{3}{4} \cdot 0,46}{\pi}\right)} = 0,48 \text{ nm}$$

$$d = 2 \cdot R = 2 \cdot 0,48 = 0,96 \text{ nm}$$

Vypočtená hodnota 0,96 nm odpovídá reálné velikosti molekuly fluorescenční sondy ATTO 488. Tímto byla ověřena správnost měření.

Dále byl ověřen předpoklad, že se zvyšující se hodnotou viskozity daného vzorku se zvyšuje i hodnota naměřené anisotropie limitně se blíží hodnotě fundamentální anisotropie.



Obrázek 11: Graf závislost anisotropie na viskozitě vzorků glycerolu a ATTO 488.

Zeleně vyznačené body odpovídají jednotlivým vzorkům, kdy nejméně viskózní vzorek se vyznačuje hodnotami anizotropie blížíící se k nule, nejviskoznější vzorek se svou hodnotou blíží hodnotě fundamentální anizotropie (vynesená červeně). Fundamentální anizotropie derivátů fluoresceinu podle Valeura $r_0 = (0,373 \pm 0,002)$ [3].

Po dosažení do Perrinovy rovnice jsme schopni stanovit velikost molekuly (fluorescenční sondy ATTO 488).

5.2.2 Vliv integračního času

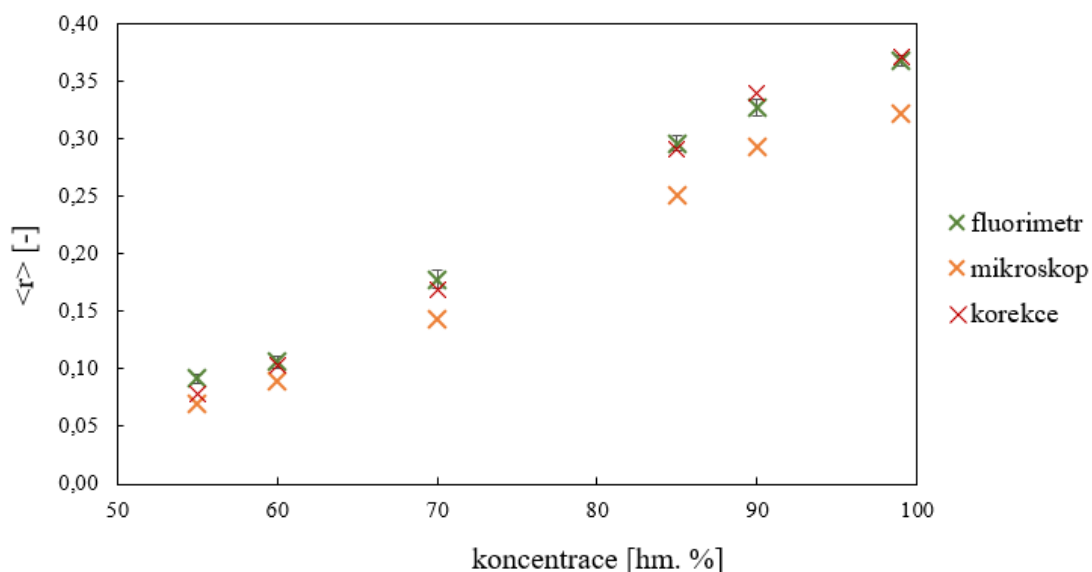
Při měření na fluorimetru zadáváme do přístroje integrační čas. Dalším cílem bylo zjistit, zda má tento parametr vliv na naměřené hodnoty anizotropie. Proto byly jednotlivé vzorky, systém glycerol s fluorescenční sondou ATTO 488, proměřeny se stejným nastavením přístroje při různých integračních časech. Postupně byly proměřeny časy 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 20; 30 s. Měření bylo provedeno pro nejkonzentrovanejší (1. vzorek, 99%, s nejvyšší viskozitou) a pro nejzředěnější (6. vzorek, 55%, s nejnižší viskozitou).

Tabulka 2: Naměřené hodnoty anizotropie pro nejkonzentrovanejší (99%) a nejzředěnější (55%) vzorky sondy ATTO 488 s různými integračními časy.

Integrační čas [s]	r (55%)	směrodatná odchylka	r (99%)	směrodatná odchylka
0,2	0,0850	0,0061	0,3727	0,0090
0,5	0,0913	0,0061	0,3688	0,0050
1	0,0918	0,0039	0,3678	0,0042
5	0,0906	0,0042	0,3672	0,0030
10	0,0833	0,0037	0,3667	0,0024
20	0,0815	0,0036	0,3656	0,0010
30	0,0820	0,0041	0,3670	0,0027

Můžeme vidět, že integrační čas má pouze nepatrný vliv na naměřené hodnoty, proto byl pro měření vybrán integrační čas takový, u kterého byly nejpříznivější hodnoty odchylek, tedy co nejmenší. Zároveň byla zohledněna délka měření. Ideální hodnota integračního času, při které probíhala měření, byla určena na 1 s.

5.3 Stanovení korekčních faktorů



Obrázek 12: Graf závislosti anizotropie na koncentraci vzorků naměřených na fluorimetru (zeleně) a na fluorescenčním mikroskopu (oranžově). Zkorigované hodnoty anizotropie naměřené na mikroskopu znázorněny červeně.

Bylo zjištěno, že anizotropie naměřená na fluorimetru tak na fluorescenčním mikroskopu vykazují stejný trend. Hodnoty téměř lineárně rostou.

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{(1 - 3L_2)I_{\parallel} + (2 - 3L_1) \cdot G \cdot I_{\perp}}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{(1 - 3L_2)I_{\parallel} + (2 - 3L_1) \cdot G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}$$

$$\frac{1}{r} \cdot (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) = (1 - 3L_2)I_{\parallel} + (2 - 3L_1) \cdot G \cdot I_{\perp}$$

$$\frac{1}{r} \cdot (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}) = I_{\parallel} - 3L_2 I_{\parallel} + 2G I_{\perp} - 3L_1 G I_{\perp}$$

$$\frac{\left(\frac{1}{r} \cdot (I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp})\right) - I_{\parallel} - 2G I_{\perp}}{-3} = L_2 I_{\parallel} + L_1 G I_{\perp}$$

Po dosazení hodnot naměřených na mikroskopu z Tabulky 4 (intenzita signálu v kolmém a rovnoběžném směru a G-faktoru) a hodnot anizotropie naměřené na fluorimetru byly za pomoci funkce řešitel z Microsoft Excel vypočteny korekční faktory L_1 a L_2 . Výsledky uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Naměřené hodnoty anizotropie na fluorimetru, mikroskopu, hodnoty po korekci a vypočtené korekční faktory L_1 a L_2 .

vzorek	hm. %	r			L_2	L_1
		fluorimetr	mikroskop	hodnoty po korekci		
1	55	$0,092 \pm 0,004$	0,070	0,078	0	0,227
2	60	$0,106 \pm 0,006$	0,090	0,103		
3	70	$0,178 \pm 0,008$	0,144	0,168		
4	85	$0,296 \pm 0,007$	0,251	0,291		
5	90	$0,327 \pm 0,007$	0,293	0,340		
6	99	$0,368 \pm 0,004$	0,322	0,371		

Naměřené hodnoty na fluorimetru jsou brány jako výchozí pro stanovení korekčních faktorů hodnot naměřených na fluorescenčním mikroskopu.

5.4 Měření na fluorescenčním mikroskopu

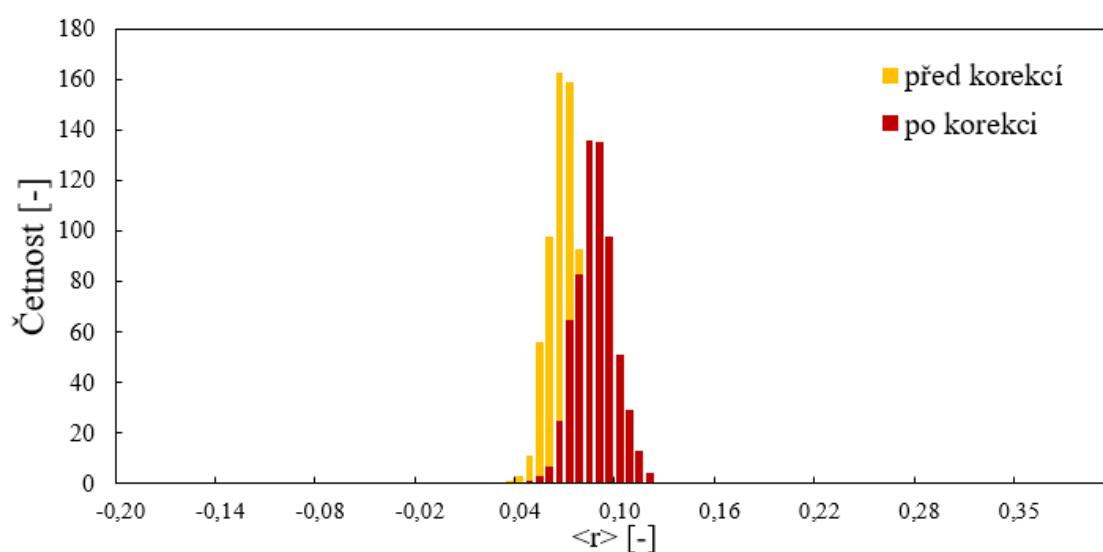
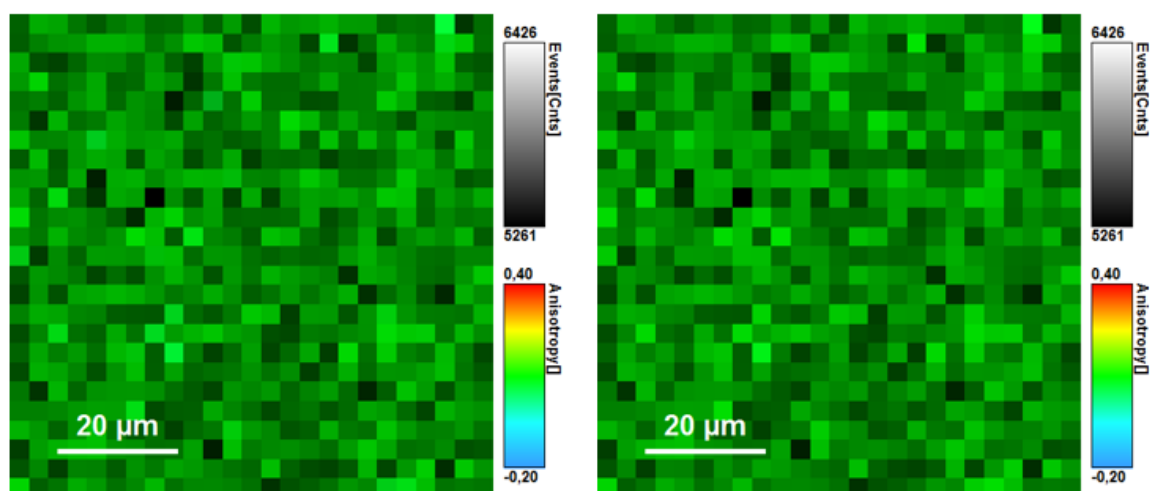
Fluorescenční mikroskop byl nastaven a na sklíčko byl nakápnut vzorek. Byla zaznamenána hodnota anizotropie, hodnoty intenzity v rovnoběžném a kolmém směru společně s dobou života excitovaného stavu (dohasínání fluorescence) a G-faktoru pro každý ze vzorků. Výsledné hodnoty jsou zaznamenány v Tabulce 4.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty intenzit signálu na mikroskopu v rovnoběžném a kolmém směru, doby života fluorescence a G-faktor.

vzorek	[hm. %]	I_{\parallel}	I_{\perp}	τ [ns]	G
1	55	2 091 222	1 727 184	3,54	1,011
2	60	1 766 471	1 379 278	3,46	
3	70	2 139 128	1 439 527	3,31	
4	85	2 345 160	1 188 675	3,27	
5	90	1 779 909	802 832	3,34	
6	99	1 919 006	801 218	3,35	

5.4.1 Korekce naměřených hodnot

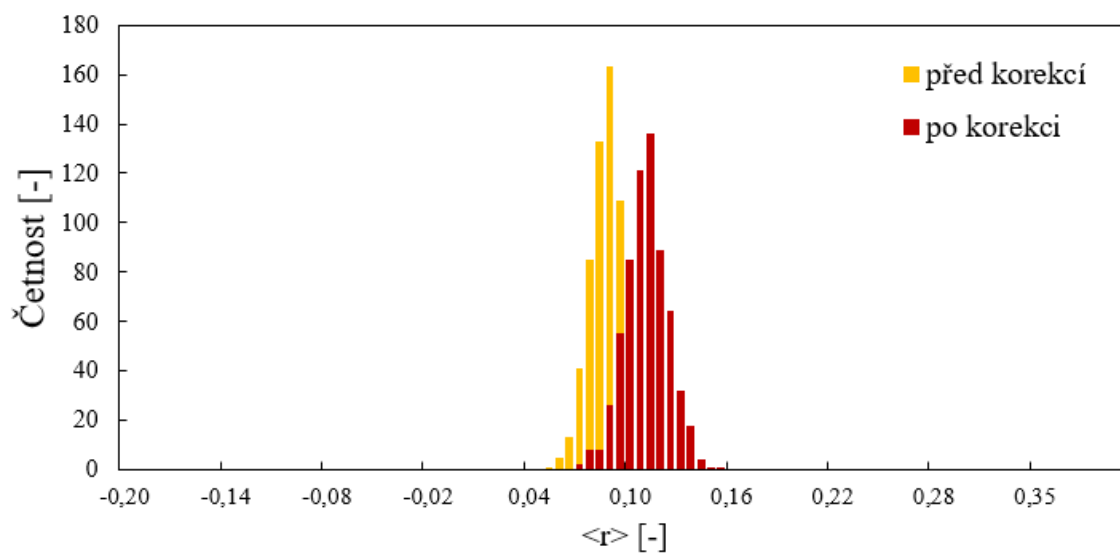
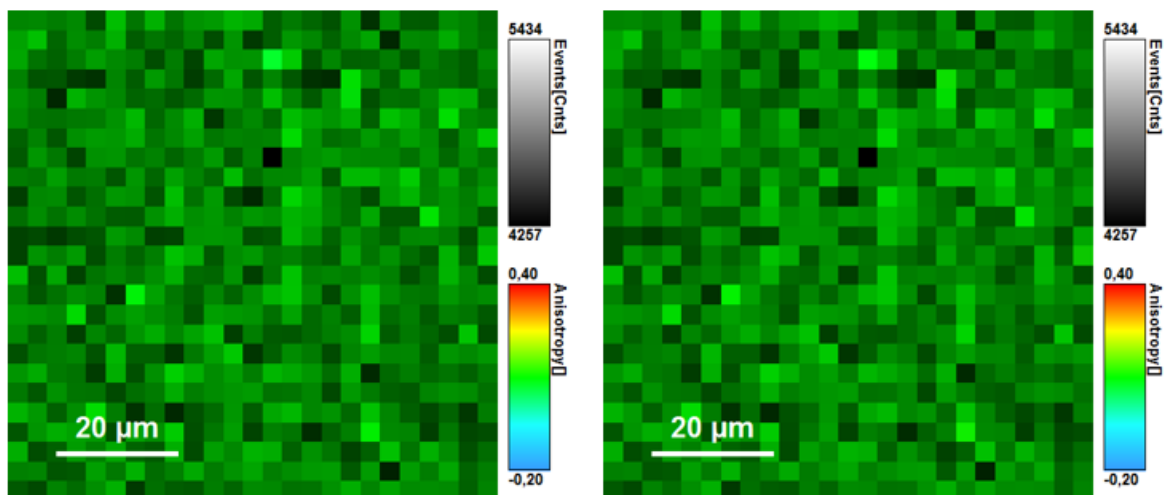
Výstupem měření jsou histogramy četností jednotlivých naměřených hodnot anizotropie, kdy na ose x je celé rozpětí možných hodnot anizotropie tedy maximální hodnotou je $r = 0,4$ a minimální hodnotou je $r = -0,2$. Dalším výstupem z měření na fluorescenčním mikroskopu je graficky znázorněná distribuce anizotropie ve vzorku. Jednotlivým hodnotám anizotropie je podle naměřených dat přiřazena barevná škála od minimální hodnoty anizotropie znázorněnou modře až k polím červeně vyznačeným (pohybující v blízkosti fundamentální anizotropie).



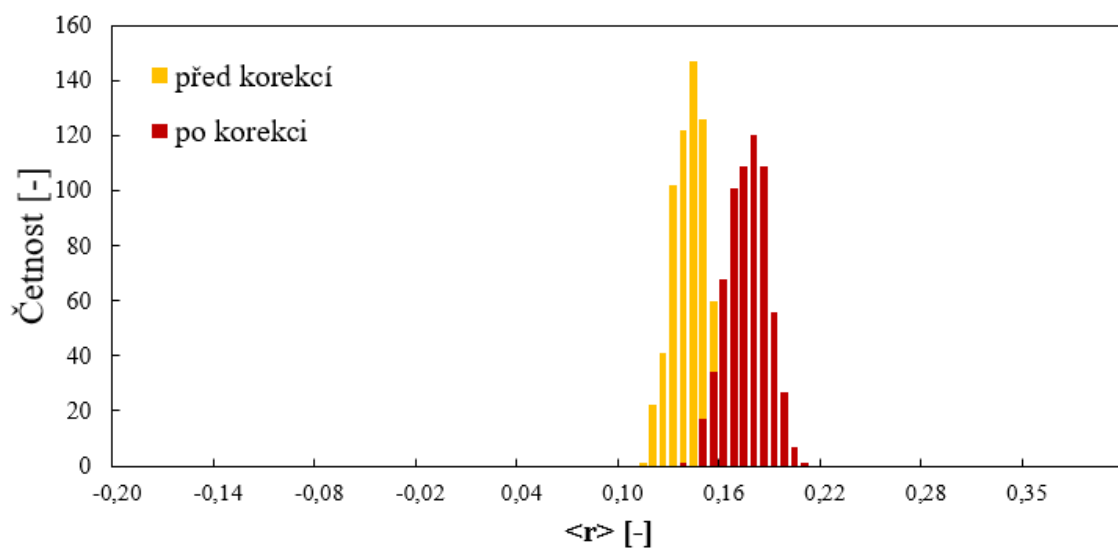
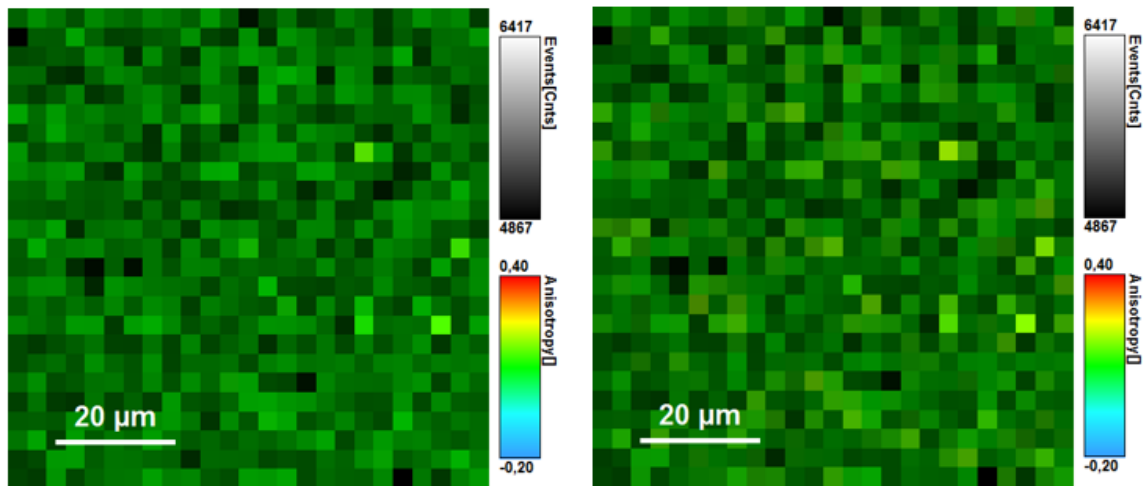
Obrázek 13: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 1 (55% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).

V histogramu na Obrázku 13 je žlutě znázorněna distribuce anizotropie rozmístěna kolem naměřené hodnoty $r = 0,070$. Červeně pak vidíme rozložení po korekci, korekcí určená hodnota byla stanovena na $r = 0,078$. Dále je patrné, že je vzorek homogenní, nejsou zde viditelné žádné výrazné odchylky naměřených hodnot. Ty by se ve výstupu projevíly barevnými změnami. Korekce hodnot v tomto případě nebyla značná. Zřetelněji ji můžeme vidět v grafu na Obrázku 12.

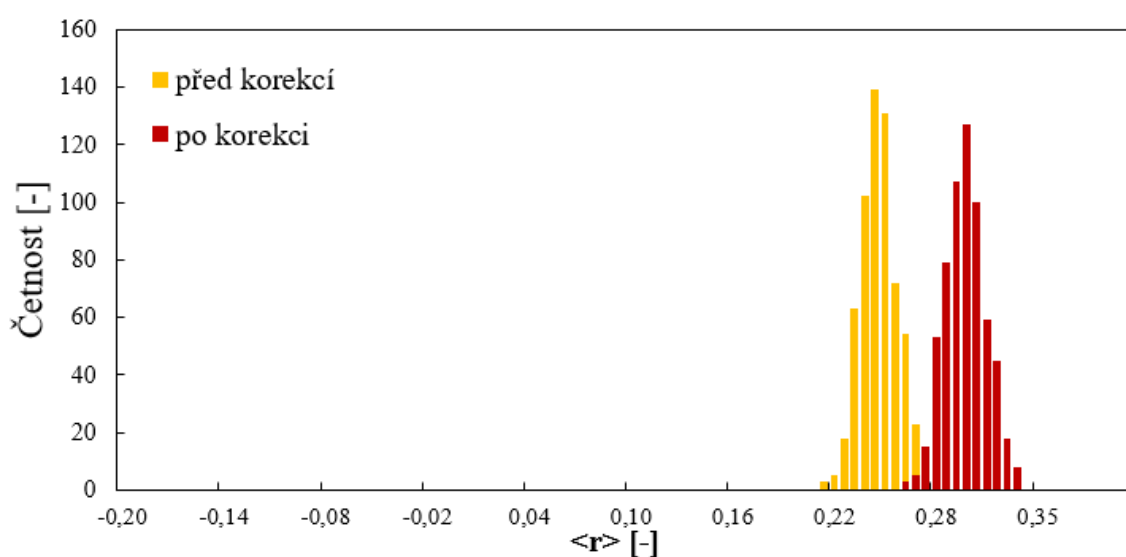
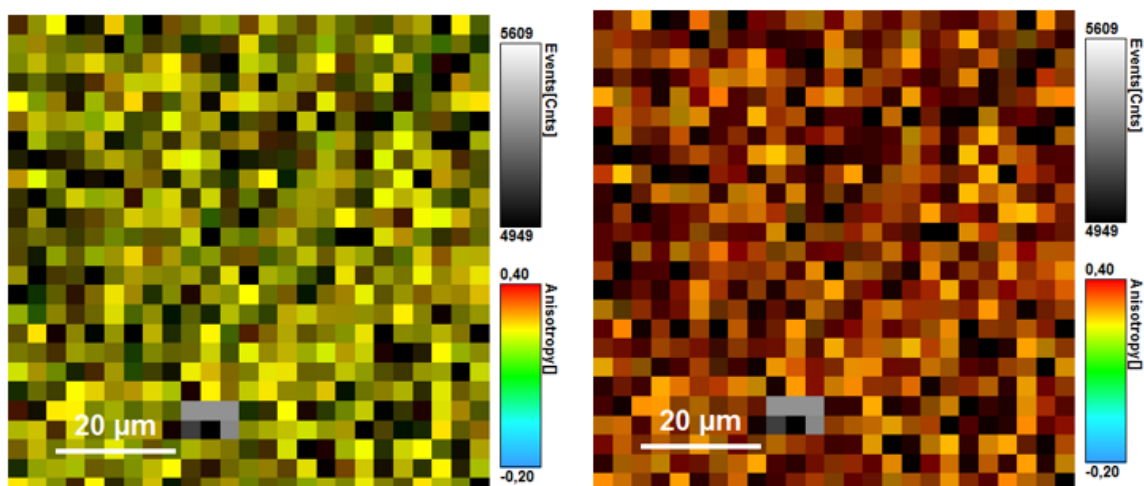
Stejně tak tomu bylo i u dalších vzorků, jak hodnoty naměřené, tak hodnoty anizotropie po korekci nalezneme v Tabulce 3.



Obrázek 14: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 2 (60% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).

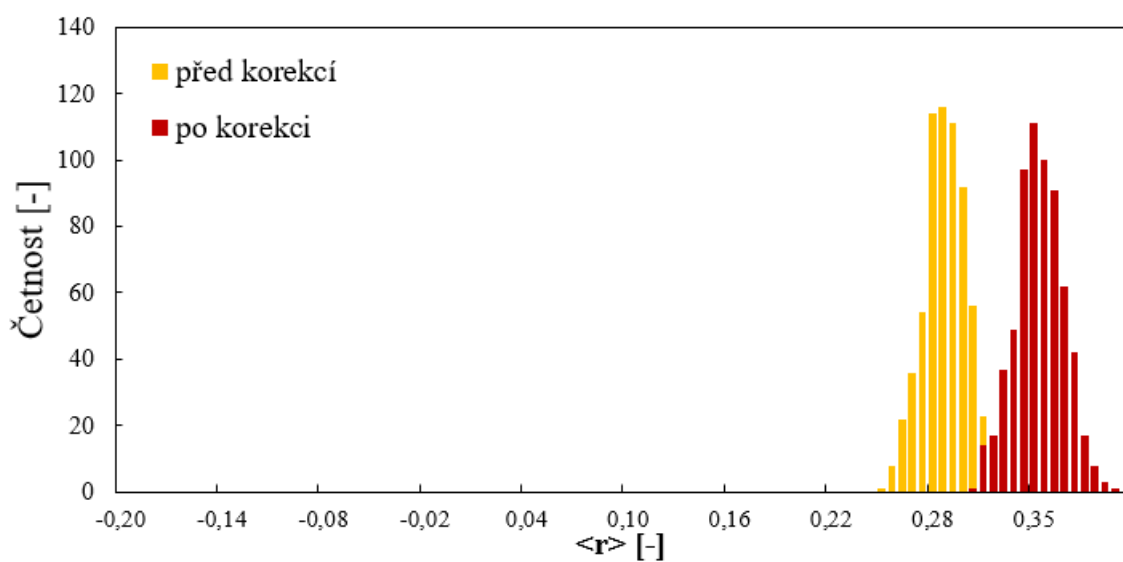
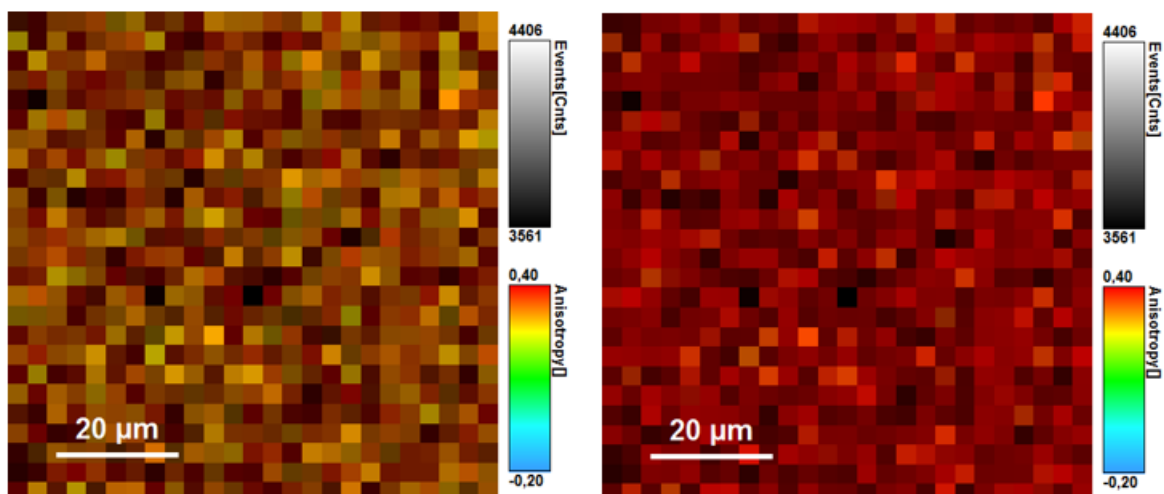


Obrázek 15: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 3 (70% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).

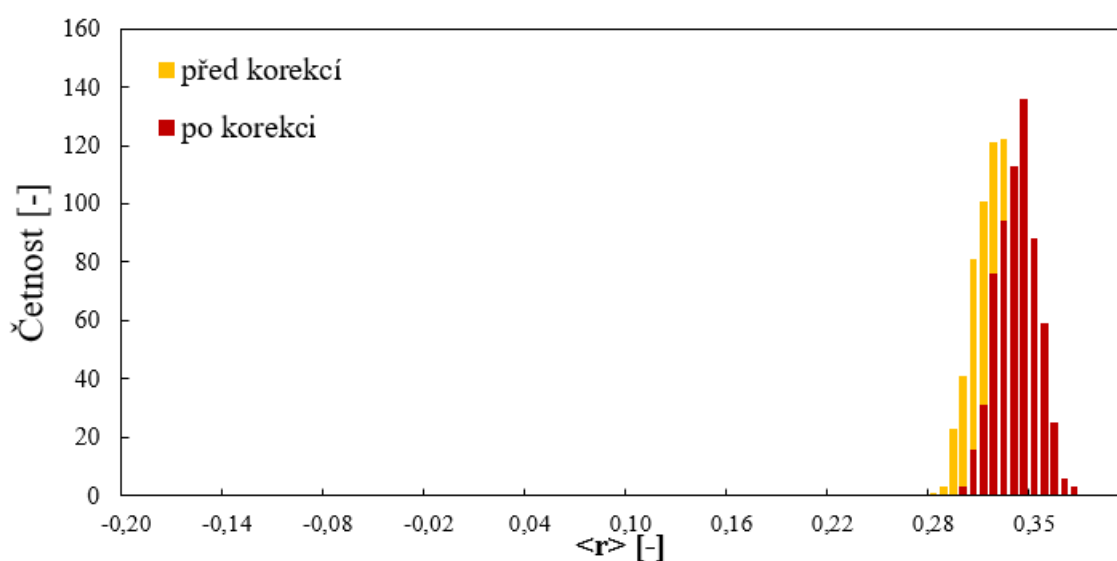
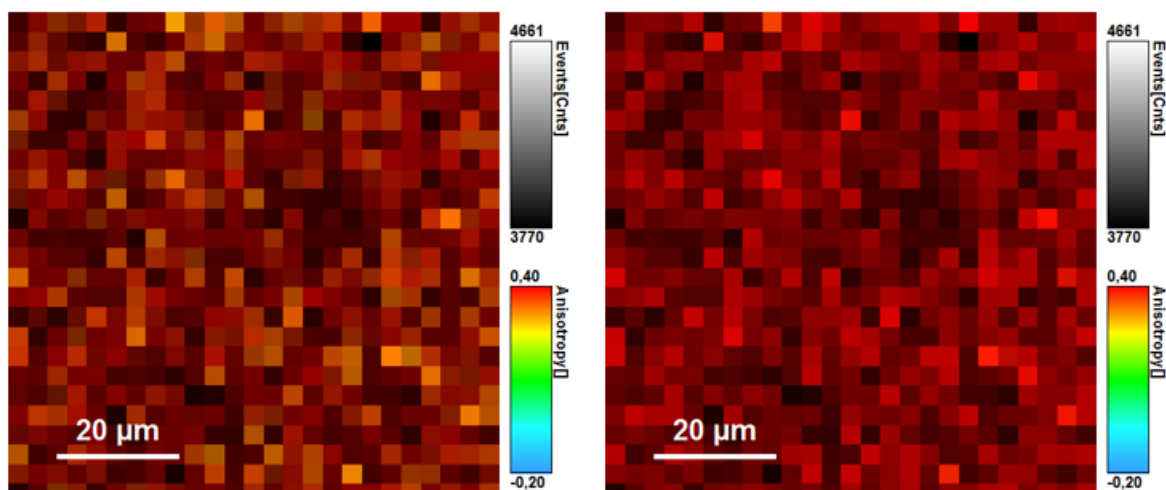


Obrázek 16: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 4 (85% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).

Zde na Obrázku 16 už je změna po korekci zřetelná. Oproti původní naměřené distribuci na obrázku vlevo je vidět jasný posun. Kdy před korekcí se pohybují hodnoty kolem naměřené anizotropie $r = 0,251$ a po korekci $r = 0,291$.



Obrázek 17: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 5 (90% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).



Obrázek 18: Distribuce anizotropie před korekcí vlevo, po korekci vpravo pro vzorek 6 (99% glycerolu s použitím sondy ATTO 488). Ve spodní části histogram četností anizotropie naměřené (žlutě) a po korekci (červeně).

Na všech předešlých histogramech stejně tak, jako na Obrázku 12 můžeme pozorovat vzrůstající trend anizotropie, kde se dostáváme od vzorku 1 s nejnižší viskozitou a nejnižší anizotropií po ose x v histogramech až téměř k hodnotě fundamentální ($0,373 \pm 0,002$) anizotropie u posledního vzorku (naměřená 0,371).

6 ZÁVĚR

Byla provedena literární rešerše na stanovení fluorescenční anizotropie pomocí fluorimetru a pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jako modelové prostředí byl zvolen systém glycerol/voda s vybranou sondou ATTO 488. Připravené vzorky byly proměřeny na fluorescenčním konfokálním mikroskopu a na spektrofluorimetru.

Byly naměřeny reálné hodnoty viskozit pro připravené vzorky. Bylo ověřeno chování anizotropie při různých viskozitách vzorků, kdy naměřené hodnoty anizotropie vzrůstaly společně s růstem viskozity a limitně se blížily fundamentální anizotropii. Nejvyšší naměřená hodnota anizotropie naměřená na fluorimetru $r = (0,368 \pm 0,004)$, se téměř shoduje s tabelovanou hodnotou fundamentální anizotropie $r_0 = (0,373 \pm 0,002)$, což poukazuje na správnost měření.

Při měření na fluorimetru byl prověřen vliv integračního času. Naměřené hodnoty anizotropie se se změnou integračního času měnily minimálně, stejně tak jako odchylky, které byly téměř totožné. Bylo zjištěno, že integrační čas neměl značný vliv na naměřené hodnoty. Dále byla výpočtem ověřena správnost měření anizotropie, díky Perrinově rovnici jsem bylo možné z naměřených hodnot vypočítat průměr molekuly ATTO 488. Tato hodnota byla stanovena na 96 nm, což přibližně odpovídá reálné hodnotě. Podle naměřených hodnot na fluorescenčním mikroskopu byly korigovány naměřené hodnoty na mikroskopu.

Na fluorescenčním mikroskopu byly změřeny fluorescenční anizotropie, doby života fluorescence, hodnoty intenzit signálu v rovnoběžném a kolmém směru. Průměrná doba života fluorescence byla stanovena na $\tau = (3,38 \pm 0,09)$ ns. Mezi sebou se doby života razantně neměnily, z čehož je možné usuzovat, že viskozita systému neměla na tento parametr vliv. Nakonec byly stanoveny korekční faktory $L_1 = 0,227$ a $L_2 = 0$. A byla provedena korekce naměřených hodnot anizotropie na mikroskopu.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] GOLDYS, Ewa M. *Fluorescence applications in biotechnology and life sciences*. Hoboken, N.J., c2009. ISBN 978-047-0083-703.
- [3] VALEUR, Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 387 s. ISBN 35-272-9919-X.
- [4] Fišar, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie* [online]. 2003. [cit. 2019-02-02].
- [5] NELSON, K.A., D.D. DLOTT a M.D. FAYER. Excited state dynamics in pure molecular crystals: perylene and the excimer problem. *Chemical Physics Letters*. 1979, vol. 64, issue 1, s. 88-93. DOI: 10.1016/0009-2614(79)87282-6.
- [6] ATTO-Tec GmbH: Fluorescent Labels and Dyes. ATTO 488 [online]. b.r. [cit. 2019-02-22]. Dostupné také z: https://www.attotec.com/attotecshop/product_info.php?language=en&info=p99_ATTO-488.html.
- [7] PETERMAN, Erwin J. G. a Gijs J. L. WUITE. *Single molecule analysis: methods and protocols*. New York: Humana Press, c2011. Springer protocols (Series), v. 783. ISBN 978-1-61779-281-6.
- [8] BARTOVSKÁ, Lidmila. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [9] *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1963, **52**(5). ISSN 00223549. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915339447>
- [10] GORE, Michael G. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN 01-996-3812-8.
- [11] SCHAFFER J., A. VOLKMER, C. EGGELING, V. SUBRAMANIAM, G. STRIKER a C. A. M. SEIDEL. "Identification of Single Molecules in Aqueous Solution by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy". *American Chemical Society* Vol. 103, č. 3, 1999 [online]. [cit. 2019-2-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp9833597>
- [12] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Praha: Chem. Listy*, 2009, (103): 125-129. 2013 [online]. [cit. 2019-02-17]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [13] YAO L., J. SEGALA, A.J. BUCCI, G.O. ANDREEY, Y.K. RESHETNYAK, a O.A. ANDREEY, "Fluorescence anistropy imaging microscopy," *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, Formatex Research Center, 3, pp. 2072-8, 2010.
- [14] SUHLING, Klaus, Jan SIEGEL, Peter M. P. LANIGAN, Sandrine LÉVÊQUE-FORT, Stephen E. D. WEBB, David PHILLIPS, Daniel M. DAVIS a Paul M. W. FRENCH. Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells. *Optics Letters*. 2004, **29**(6), 3. DOI: 10.1364/OL.29.000584. ISSN 0146-9592. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ol-29-6-584>

- [15] VINEGONI, Claudio, Paolo Fumene FERUGLIO, Ignacy GRZYCZYNSKI, Ralph MAZITSCHKEK a Ralph WEISSLEDER. Fluorescence anisotropy imaging in drug discovery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018, **2018**, 27. DOI: 10.1016/j.addr.2018.01.019. ISSN 0169409X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X18300279>
- [16] LIU, Yingxiong a Qiang ZHAO. Direct fluorescence anisotropy assay for cocaine using tetramethylrhodamine-labeled aptamer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, **409**(16), 3993-4000. DOI: 10.1007/s00216-017-0349-z. ISSN 1618-2642. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0349-z>
- [17] DIX, J.A. a A.S. VERKMAN. Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging. Application to cytoplasmic viscosity. *Biophysical Journal*. 1990, **57**(2), 231-240. DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82526-1. ISSN 00063495. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349590825261>
- [18] KOMAROMY-HILLER, Gabor a Ray VON WANDRUSZKA. Anisotropy Changes of a Fluorescent Probe during the Micellar Growth and Clouding of a Nonionic Detergent. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1996, **177**(1), 156-161. DOI: 10.1006/jcis.1996.0016. ISSN 00219797. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979796900168>
- [19] FUTSAETHER, C. M., B. KJELDSTAD a A. JOHNSON. Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes*: comparison between the fluorescent probe BCECF and ³¹P-NMR spectroscopy. *Canadian Journal of Microbiology*. 1993, 39(2), 180-186. DOI: 10.1139/m93-025. ISSN 0008-4166. Dostupné také z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m93-025>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

8.1 Seznam symbolů

<i>Symbol</i>	<i>Název veličiny</i>
S_0	základní energetická hladina
S_1	singletový stav
T_1	tripletový stav
λ	vlnová délka
Da	Dalton
g/mol	gram na mol
β	úhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem molekuly fluoroforu
r_0	fundamentální anizotropie
r	anizotropie
hm. %	hmotnostní procenta
I_{\parallel}	intenzita signálu v rovnoběžném směru
I_{\perp}	intenzita signálu v kolmém směru
ϕ	rotační korelační čas
M	molární
k	Boltzmannova konstanta
τ	doba života fluorescence
T	termodynamická teplota
K	Kelvin
D_y	rotační difúzní koeficient
V	objem
η	viskozita
EM, EX	emisní, excitační
L_1, L_2	korekční faktory
G	G-faktor
μm	mikrometr
μM	mikromolární
Pa	paskal
R	poloměr molekuly

8.2 Seznam zkratek

<i>Zkratka</i>	<i>Význam</i>
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
FLIM	fluorescence life-time imaging
r-FLIM	fluorescenční anizotropní mikroskopie
NA	Numerická apertura
TMR	tetramethylrhodamin
FA	fluorescenční anizotropie
BCECF	2,7-bis-karboxyethyl-5 (a 6) -karboxy-fluorescein
BCECF_AM	2',7'- bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
NH ₄ Cl	chlorid amonný
NaHCO ₃	hydrogenuhličitan sodný