



2004-2006m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto 5 priemonė
„Žmogiškųjų išteklių kokybės gerinimas mokslinių tyrimų ir inovacijų srityje“

Projektas

**Fizinių mokslų II ir III studijų pakopų pertvarka, jas pritaikant
prioritetinių MTEP sričių vystymui**

Projekto numeris BPD2004-ESF-2.5.0-03-05/0012

Eksperimentinės biofizikos metodai: paskaitų konspektas

**Parengė:
Mikas Vengris**

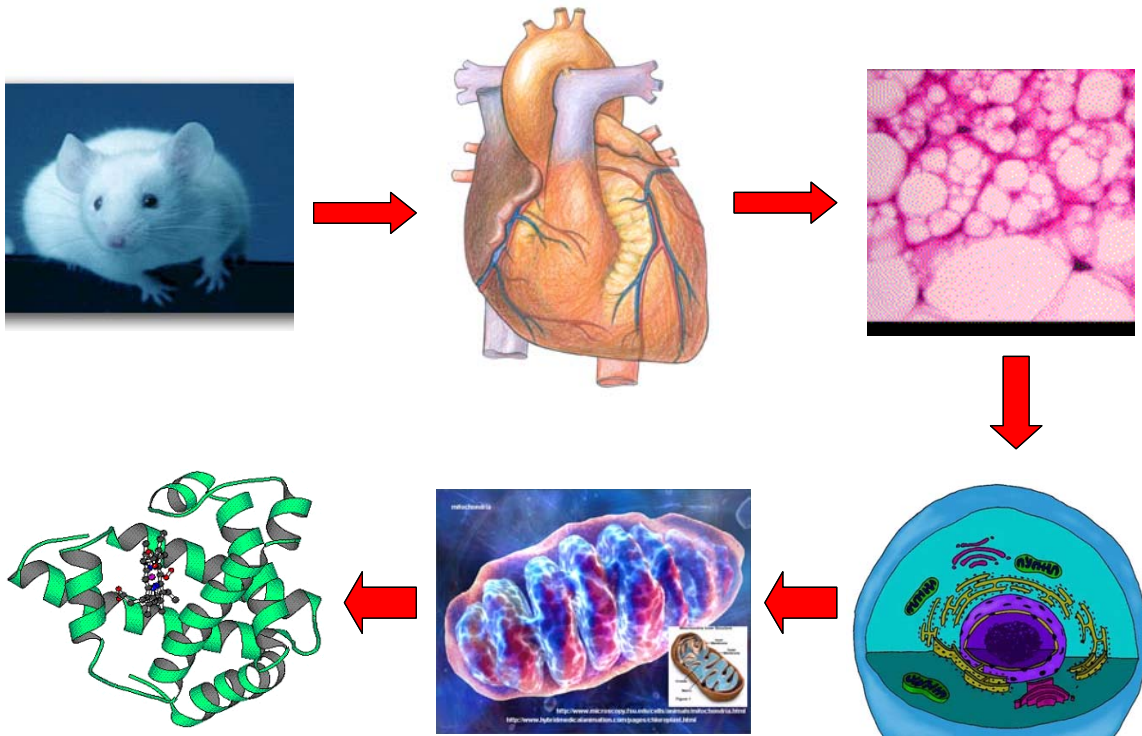
Vilnius 2006-2008

Turinys

Įvadas	3
Spektroskopija.....	5
Sugerties ir skirtuminės sugerties spektroskopija.....	8
Sugerties fizika.....	9
Biomolekulių sugertis	12
Tiesinis ir cirkuliarinis dichroizmas.....	21
Štarko spektroskopija.....	28
Fluorescencijos spektroskopija	33
Kinetinė spektroskopija	41
Optinė mikroskopija ir jos biologiniai taikymai	44
Įvadas	44
Paprasčiausio mikroskopo konstrukcija.....	44
Optinio mikroskopo charakteristikos.....	45
Šviesaus ir tamsaus lauko mikroskopija	50
Fluorescencijos mikroskopija	52
Försterio rezonansinė energijos pernaša (FRET).....	59
Laiko skyros vaizdinimas (FLIM) ir vaizdinimas su spektrine skyra.....	67
Fluorescencijos atsistatymas po fotaišblyškimo (FRAP) ir fluorescencijos gesimas dėl fotaišblyškimo (FLIP).....	71
Skenuojančio zondo mikroskopai	72
Veikimo principai	72
Skenuojantis tunelinis mikroskopas (STM).....	75
Atominės jėgos mikroskopas (AJM)	77
Skenuojantis artimojo lauko optinis mikroskopas (SNOM).....	82
Elektroninė mikroskopija.....	85
Pralaidumo elektroninis mikroskopas.....	88
Skenuojantis elektroninis mikroskopas.....	92
Branduolių magnetinio rezonanso metodai	95
Branduolių ir elektronų sukiniai	95
Paprasčiausias MR eksperimentas	96
Cheminis poslinkis.....	99
Smulkioji BMR spektro sandara: sukinių sąveika	102
Impulsinis ir daugiamačis BMR	110
BMR tomografija.....	123

Įvadas

Biologinių objektų įvairovė yra milžiniška. Gyvieji organizmai skirstomi į šešias karalystes, augalų, grybų, gyvūnų, pirmuonių, archeobakterijų ir eubakterijų. Biologiniai objektai – tai ne tik patys organizmai, bet atskiros jų dalys, kurioms būdinga tam tikra biologinė funkcija. Struktūriškai skaidydami sudėtingiausius gyvus organizmus į jų funkcinės dalis, sąlyginai galime sudaryti tokią hierarchiją: organizmas → organas → audinys → ląstelė → organelė → makromolekulė (pvz., DNR, baltymas) → biologinės molekulės. Į pastarąją grupę įeina amino rūgštys, lipidai, angliavandeniai ir įvairūs kofaktoriai. Aišku, kad tokiems įvairiems objektams tirti egzistuoja atskiros metodų klasės ir šie tyrimai apima daugelį mokslo sričių, pradedant ekologine biologija ir baigiant kvantine chemija.



1 pav. Biologinių objektų struktūrinė hierarchija.

Šiame kurse kalbėsime apie biofizikinius tyrimo metodus, kurie leidžia tirti pačių mažiausių struktūrinių biologinių organizmų dalių sandarą ir funkcijas bei surasti jų tarpusavio ryšius. Visų šių metodų paskirtys yra nevienodos, jas galima suskirstyti į keturias grupes:

- Objektų identifikavimas (susijęs su biologinių reiškinių stebėjimu)
- Objektų išskyrimas ir išgryninimas (daugiausia biochemijos metodai)
- Objektų sandaros nustatymas (mikroskopija, spektroskopija, kristalografija)
- Objektų funkcijų tyrimas; ryšio tarp sandaros ir funkcijos nustatymas (laikinė spektroskopija ir pan.)

Pagrindinį dėmesį kreipsime į fizikinius metodų principus, stengsimės išsiaiškinti, kokiems tikslams kurie metodai tinka. Aptariamus metodus galima išvardinti kaip šias apibendrintas tyrimų sritis:

- Optinė spektroskopija;
- Optinė mikroskopija ir susiję metodai;
- Neoptinė mikroskopija ir susiję metodai;
- Branduolių ir elektronų magnetinio rezonanso metodai, spektroskopija ir tomografija;

Visų šių metodų nagrinėjimą atliksime biologinių objektų kontekste, nors metodų kaip tokių taikymo sritys biologiniais objektais neapsiriboja.

Spektroskopija

Spektroskopija – tai mokslas, tiriantis molekulių ir atomų savybes, panaudodamas šviesos sąveiką su jomis.

Kodėl biologiniams objektams tirti naudojama spektroskopija?

- Šviesa – nežalojantis įrankis (tai svarbu biomolekulėms)
- Vienintelis “paprastas” būdas pažinti kvantines sistemas
- Metodai leidžia pasiekti didelį tikslumą, pamatyti labai nedidelius skirtumus tarp molekulių
- Yra galimybė matyti sistemų dinamiką, t.y. ‘realiam laike’ stebėti biologiniuose objektuose vykstančius procesus (charakteringi laikai gali būti <100fs!)

Molekulės ir atomai priklauso mikropasauiui ir yra kvantinės sistemos, t.y. sistemos, kuriose stebimi kvantiniai reiškiniai. Vienas iš jų yra energijos kvantavimas. Energijos kvantavimas reiškia, kad sistema gali turėti ne bet kokią energiją (kaip, pvz., metalinis rutuliukas, riedantis nuo kalno – kuo greičiau rieda, tuo didesnė kinetinė energija, o greitis gali keistis tolydžiai), o tik užimti būsenas su tam tikromis diskretinėmis energijos vertėmis.

Iš vienos savo energetinės būsenos į kitą kvantinė sistema gali patekti sugerdama arba spinduliuodama šviesos kvantą (fotoną). Tokio proceso metu galioja energijos tvermės dėsnis, t.y. molekulės ar atomo energijos pokytis yra lygus sugerto arba išspinduliuoto fotono energijai:

$$h\nu = E_1 - E_2 \quad (1)$$

Taigi, spektroskopija „čiupinėja“ molekulių energijos lygmenis, kurių padėtys savo ruožtu priklauso nuo:

- Molekulinės branduolių virpėjimo
- Molekulių rotacijos (sukimasis dujų fazėje)

- Sąveikos su aplinka (pavyzdžiui, tirpikliu, baltymu, kitomis molekulėmis)
- Cheminė struktūra

Jei fotonas sugeriamas, turime sugerties spektroskopiją, jei spinduliuojamas – emisijos spektroskopiją.

Spektroskopijos būna įvairios:

- Sugerties
- Fluorescencijos
- Ramano sklaidos

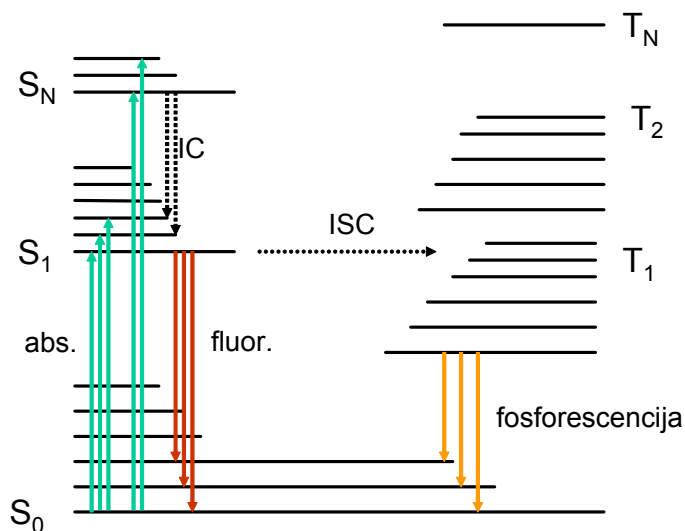
arba

- Elektroninė
- Virpesinė

Molekulių spektrus priimta aprašyti Jablonskio diagrama (2 pav.). Kaip matome, molekulės energetinė struktūra sudaryta iš elektroninių būsenų, žymimų S raidėmis (S_0 , S_1 ir t.t.), kurių kiekviena yra suskilusi į virpesinių lygmenų aibę. Virpesiniai lygmenys atsiranda dėl to, kad molekulės branduoliai virpa vienas kito atžvilgiu. Dujų fazėje, kur molekulės gali laisvai sukis, kiekvienas virpesinis lygmuo turi ir savo rotacinių polygmenų aibę. Energiniai atstumai tarp gretimų molekulės elektroninių lygmenų paprastai yra 10000 atvirkštinių centimetrų eilės, t.y. atitinka UV-VIS-nIR fotono energiją, tuo tarpu energiniai atstumai tarp gretimų virpesinių polygmenų yra nuo kelių šimtų iki kelių tūkstančių atvirkštinių centimetrų ir tuos atstumus atitinkantys fotonai pakliūva į midIR diapazoną.

Kambario temperatūroje molekulės paprastai stengiasi užimti minimalios energijos būseną ir būna pagrindinės elektroninės būsenos (S_0) žemiausiame virpesiniame polygmenyje. Taigi, atėję šviesos fotonai gali sukelti šuolius 2 pav. parodytus žaliomis rodyklėmis. Matome, kad sugeriamo šviesos kvanto energija tokiu atveju turi apatinę ribą, atitinkančią šuolį iš S_0 būsenos žemiausio virpesinio polygmenio į S_1 būsenos žemiausią virpesinį polygmenį (tai vadinamasis 0-0 šuolis). Todėl molekulių sugerties spektras paprastai yra apribotas iš raudonosios (žemųjų dažnių) pusės ir turi į mėlynąją spektro

sritį nusidriekiančią uodegą, kuri atitinka sugerties šuolius į aukštesnius S_1 būsenos virpesinius polygmenius.



2 pav. Jablonskio diagrama.

Sužadinus molekulę, nepriklausomai nuo to, į kurią elektroninę ar virpesinę būseną ji pakliūva, pirmasis vykstantis procesas paprastai yra vidinė konversija (angl. *internal conversion*). Šio proceso metu (o jis įvyksta per maždaug 100 fs nuo sužadavimo) molekulė atiduoda aplinkai ar virpesiniams laisvės laipsniams visą perteklinę energiją ir labai greitai relaksuoja į S_1 būsenos žemiausią virpesinį lygmenį. Tolesni procesai paprastai vyksta būtent iš šito lygmens. Toks dėsningumas (pirmiausia – relaksacija į S_1 “dugną”, tada visa kita) vadinamas Kaša taisykle (Kasha’s rule). Ji galioja ne visoms, tik daugumai molekulių, nes jų yra įvairių ir kai kurios iš jų pasižymi specifinėmis spektroskopinėmis savybėmis.

Vienas procesų, galinčių vyktui po to, kai molekulė atsiduria S_1 būsenos “dugne”, yra fluorescencija, t.y. molekulės grįžimas į pagrindinę būseną, išspinduliuojant fotoną. Kadangi fluorescencija vyksta iš S_1 “dugno”, fotonų, kuriuos molekulė gali spinduliuoti energijos spektras yra apribotas iš mėlynosios pusės: didžiausios energijos fotonas atitinka 0-0 šuolį, o šuoliai į aukštesnius S_0 būsenos virpesinius lygmenis vyks spinduliuojant mažesnės energijos (raudonesnius) fotonus. Taigi, fluorescencijos spektras

turės ribą iš mėlynosios spektro pusės (ta riba sutampa su sugerties spektro raudonąja riba) ir „uodegą“ besidriekiančią į raudonąją pusę. Tokia sugerties ir fluorescencijos spektrų formos simetrija vadinama „veidrodinio atspindžio“ principu. Jis, kaip ir Kaša taisyklė, nėra absoliutus; yra molekulių, kurioms jis negalioja.

Sugerties ir skirtuminės sugerties spektroskopija

Sugerties spektrų matavimas – viena iš seniausių, tačiau ir informatyviausių metodikų, leidžiančių įvertinti medžiagos molekulinę sudėtį, stebėti sąveikas tarp molekulių ir taip tirti biologinius objektus. Vienalytėje medžiagoje, kur sugeria vienos rūšies molekulės, šviesos sugertį aprašo Bugerio-Lamberto-Bero dėsnis:

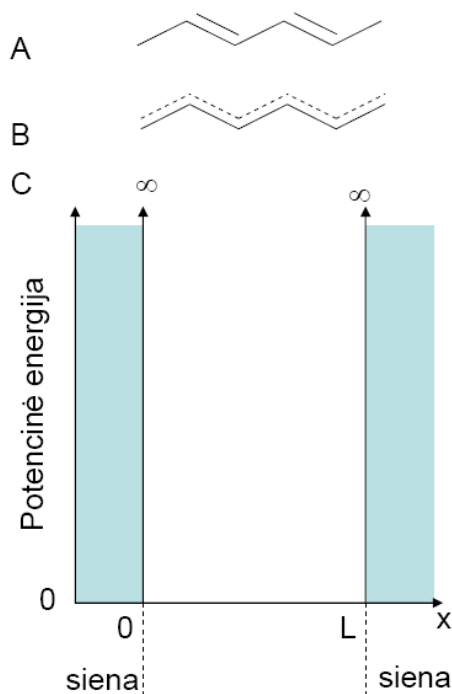
$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} \quad (2),$$

kur I – šviesos intensyvumas už bandinio, I_0 - kritusios šviesos intensyvumas, ε - sugeriančių molekulių molinis ekstinkcijos koeficientas, c - jų molinė koncentracija tiriamoje medžiagoje, o l – medžiagos, pro kurią eina šviesa, ilgis. Jei medžiagoje šviesą sugeria kelių rūšių tarpusavyje nesąveikaujančios molekulės, tai sugerčiai galioja adityvumo principas (t.y. (2) formulėje esančios laipsninės funkcijos rodiklyje atsiranda funkcija $(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + \dots)l$, kurioje sumuojama pagal visas medžiagoje esančias sugėriklio molekules.

Sugerties fizika

Molekulių sugerties spektrai ir konjuguotos dvigubos jungtys

Molekulių sugerties spektro maksimumo padėtis priklauso nuo konjuguotų jungčių grandinės ilgio. Taip yra todėl, kad konjuguotose jungtyse, π jungčių elektronai yra *delokalizuoti*, t.y., tikimybė surasti elektroną tam tikroje konjuguotos grandinės vietoje praktiškai nepriklauso nuo tos vietos koordinatės. Todėl konjuguotų jungčių grandinę, laikantis fizikos dėsnių, geriau vaizduoti ne įprastiniu būdu, kaip seriją viengubų jungčių, besikaitaliojančių su dvigubomis, o kaip elektronus, „pasklidusius“ po visą konjuguotos grandinės ilgį. Tokį elektroną galime aproksimuoti kaip dalelę vienmatėje stačiakampėje potencinėje duobėje (3 pav.).



3 pav. Konjuguotų jungčių grandinė, pavaizduota įprastiniu būdu (A) ir labiau fizikiniu būdu, atspindint elektronų delokalizaciją (B). C. Vienmatė potencinė duobė, kuria aproksimuojamas elektronas konjuguotų jungčių grandinėje.

Jei duobės ilgis L , potencinė energija duobės apačioje – nulis, o už duobės ribų – begalybė, tokiam elektronui nuostovioji Šredingerio (Schrödinger) lygtis yra tokia [1]:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\psi}{dx^2} = E\psi \quad (3).$$

Duobėje ši lygtis iš esmės sutampa su lygtimi visiškai laisvai dalelei, jos sprendiniai – de Broilio (de Broglie) bangos:

$$\psi = C \sin \frac{p}{\hbar} x + D \cos \frac{p}{\hbar} x, \quad (4)$$

čia p – elektrono impulsas, o m – jo masė [1]. Elektrono energiją surandame iš impulso:

$$E = \frac{p^2}{2m} \quad (5)$$

(kadangi duobės viduje potencinę energiją prilyginome nuliui, skaičiuojame tik kinetinę). Būsenos funkcijos modulio kvadratas – tai tikimybė rasti elektroną tam tikroje erdvės vietoje. Už duobės ribų elektronas būti negali, nes tada turėtų begalinę energiją, todėl

$$\psi = 0, \text{ kai } x = 0, x = L \quad (6)$$

Tam, kad (6) lygybė būtų tenkinama ties duobės pradžia ($x = 0$), banginė funkcija turi turėti formą $\psi = C \sin \frac{p}{\hbar} x$, t.y., konstanta D privalo būti lygi nuliui, nes $\cos 0 = 1$.

Tam, kad patenkintume (6) lygybę ties kitu potencinės duobės kraštu ($x = L$), galime prilyginti nuliui ir konstantą C , tačiau tada būsenos funkcija bus tapatingai lygi nuliui ir elektronas neegzistuos (banginė funkcija ir jos modulio kvadratas – tikimybė jį rasti kurioje nors erdvės vietoje – visuomet bus lygi nuliui). Todėl pareikalaujame, kad kai $x = L$, sinuso argumentas būtų kartotinis π .

$$\frac{p}{\hbar} L = n\pi, \quad n = 1, 2, \dots \quad (7)$$

Dėl šios sąlygos, kurią privalo patenkinti impulso vertės, kai apribojame elektrono judėjimą erdvėje (įdedame jį į konjuguotą π jungčių grandinę), elektrono impulso vertės tampa *kvantuotos*. Kartu tampa kvantuotos ir energijos vertės, kurias surandame iš (5) ir (7):

$$E_n = \frac{n^2 \hbar^2 \pi^2}{2mL^2} \quad (8)$$

Iš (8) išraiškos surandame energijų skirtumą tarp n -ojo ir $(n+1)$ -ojo lygmens:

$$E_{n+1} - E_n = \frac{(2n+1)\hbar^2 \pi^2}{2mL^2} \quad (9)$$

Šviesos sugertis vyksta, kai elektronas, esantis π jungčių grandinėje, sugėręs fotoną, peršoka iš pagrindinės būsenos ($n = 0$) į žemiausią sužadintą būseną ($n = 1$). Iš (9) matome, kad ši šuoli atitinkantis energijų tarpas tuo mažesnis, kuo didesnis L , t.y., kuo ilgesnė konjuguotų jungčių grandinė. T.y., ilginant konjuguotų jungčių grandinę, molekulos sugerties spektro maksimumas slenka į raudonesnių bangų (mažesnių energijų) pusę.

Sugertis ir šuolio dipolinis momentas

Molekulos sugertį aprašanti jos charakteristika yra molinis ekstinkcijos koeficientas. Iš esmės jis nusako fotono sugerties tikimybę arba molekulos sugerties skerspjūvį – plotą aplink molekulę, į kurią pakliuvęs fotonas bus sugertas su tikimybe $\frac{1}{2}$ (jei tai molinis ekstinkcijos koeficientas jis nusako vieno molio molekulių suminį sugerties skerspjūvį). Juk ir molinio ekstinkcijos koeficiento dimensija yra cm^2mmol^{-1} .

Aptarsime, kas yra šuolio dipolinis momentas. Aprašant molekulių tarpusavio sąveikas bei jų sąveikas su išoriniu elektriniu lauku (šviesa), dažniausiai naudojamas dipolinis artinys, t.y., daroma prielaida, kad visi molekulėje esantys krūviai (tiek protonų, tiek elektronų) kolektyviai elgiasi kaip dipolis – darinys iš vieno teigiamo ir vieno neigiamo taškinio krūvio, atskirtų tam tikru atstumu. Molekulos ir elektrinio lauko sąveikos energija yra lygi jos šuolio dipolinio momento ir elektrinio lauko skaliarinei sandaugai:

$$W_{s\grave{a}veikos} \sim \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E} \quad (10)$$

Pažymėkime, sugerčiai reikalingas ne nuolatinis molekulos dipolinis momentas pagrindinėje ar sužadintoje būsenoje, bet *šuolio dipolinis momentas*, t.y., molekulos dipolinio momento virpėjimas elektriniame lauke, vykstant kvantiniam šuoliui iš pagrindinės į sužadintą būseną. Šiek tiek paaiškinsime jį, panaudodami klasikinę analogiją, kuri sako, kad sąveika vyksta taip: molekulei atsidūrus kintamame elektriniame lauke (pvz., šviesoje), jos dipolinio momento krūviai ima virpėti aplink dipolio centrą. Jei lauko dažnis ir dipolio savasis virpėjimo dažnis sutampa, energija efektyviai perduodama iš lauko į dipolį, t. y. molekulė sugeria šviesą ir pereina į aukštesnės energijos būseną.

Molekulės gebėjimas keisti savo elektroninę būseną dėl elektrinio lauko poveikio ir nusakomas molekulės *šulio dipoliniu momentu*:

$$\boldsymbol{\mu} = \langle \varphi_g | \hat{\boldsymbol{\mu}} | \varphi_e \rangle \quad (11),$$

kur φ_g ir φ_e – molekulės pagrindinės ir sužadintos būsenos banginės funkcijos, o $\hat{\boldsymbol{\mu}}$ – dipolinio momento operatorius. Palyginimui pastebėkime, kad nuolatinis molekulės dipolinis momentas pagrindinėje ir sužadintoje būsenoje yra atitinkamai

$$\begin{aligned} \boldsymbol{\mu}_e &= \langle \varphi_g | \hat{\boldsymbol{\mu}} | \varphi_g \rangle, \\ \boldsymbol{\mu}_g &= \langle \varphi_e | \hat{\boldsymbol{\mu}} | \varphi_e \rangle \end{aligned} \quad (12).$$

Šulio dipolinis momentas yra molekulės savybė; ji priklauso nuo molekulės konformacijos (erdvinės struktūros) ir aplinkos (pvz., tirpiklio arba baltymo, kuriame yra molekulė). Kadangi elektroninis šulis vyksta sugeriant fotoną, šulio dipolinis momentas tiesiogiai susijęs su molekulės sugerties intensyvumą aprašančiu ekstinkcijos koeficientu. Tiksliau, molinis ekstinkcijos koeficientas yra proporcingas šulio dipolinio momento kvadratui. Jei šulio dipolinis momentas lygus nuliui – molekulė su elektriniu lauku rezonansiškai nesąveikauja (t.y., negali jo sugerti arba išspinduliuoti), priešingu atveju egzistuoja elektrinio lauko sugerties ir (arba) spinduliavimo tikimybė.

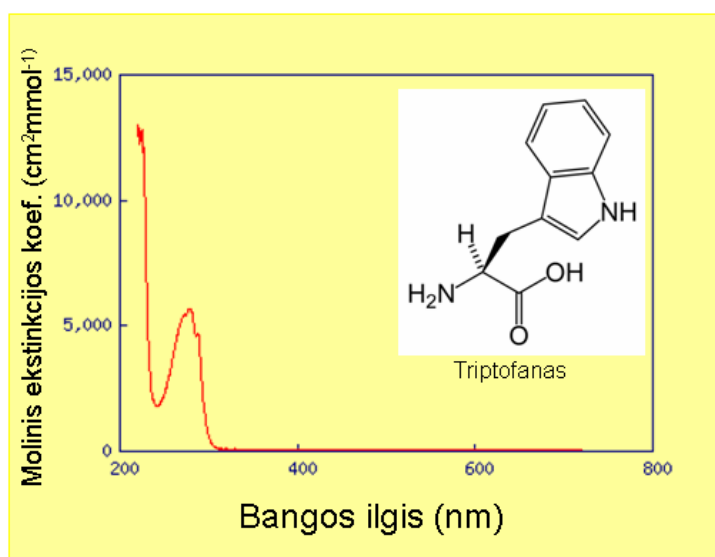
Iš klasikinės virpančių dipolių analogijos nesunku suprasti, kad molekulių orientacija svarbi jų sąveikai su elektriniu lauku: jei dipolio teigiamas ir neigiamas krūvis išsidėstę linijoje, statmenoje kintamojo elektrinio lauko poliarizacijai, tai molekulės elektromagnetinė banga neveiks ir šuliai tarp būsenų nevyks. Iš šios sąveikos savybės atsiranda galimybė poliarizacinės spektroskopijos rūšims, tokioms kaip linijinis ir cirkuliarinis dichroizmas (žr. toliau).

Biomolekulių sugertis

Baltymai, lipidai, angliavandeniai ir nukleino rūgštys matomame EM bangų diapazone yra skaidrūs, t.y. šviesos nesugeria. Ilgiausias konjuguotų jungčių grandinės iš amino rūgščių turi triptofanas, fenilalaninas ir tirozinas. Jų sugerties spektrai pakliūva į

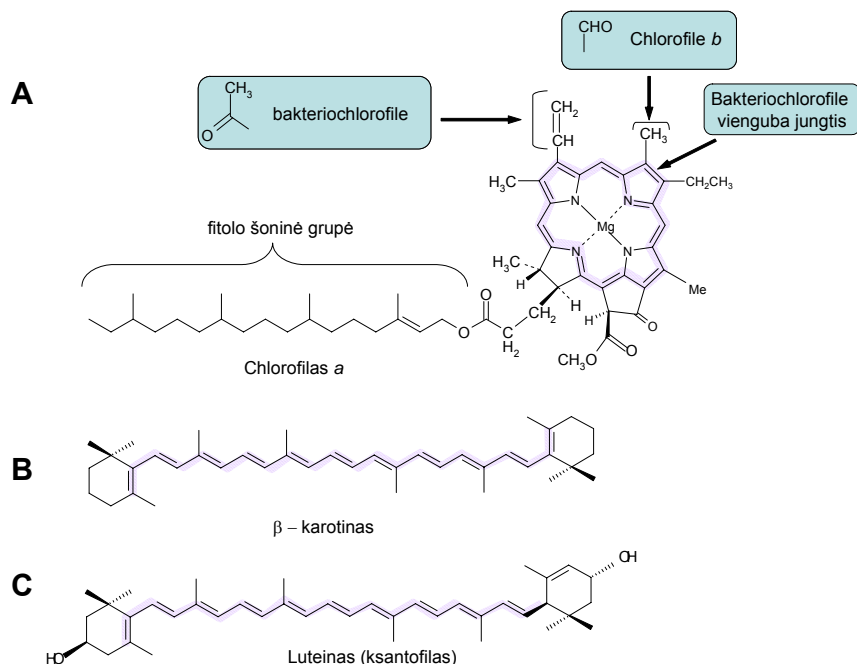
ultravioletinę spektro sritį. Lentelėje pateikiami šių molekulių sugerties koeficientai ir raudoniausios spektro juostos maksimumai:

Amino rūgštis	Konjuguotų jungčių skaičius	Ekstinkcijos koeficientas $\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$	Sugerties maksimumo padėtis nm
Triptofanas	4	5500	278
Tirozinas	3	1400	274
Fenilalaninas	3	195	257



4 pav. Triptofano sugerties spektras ir struktūrinė formulė.

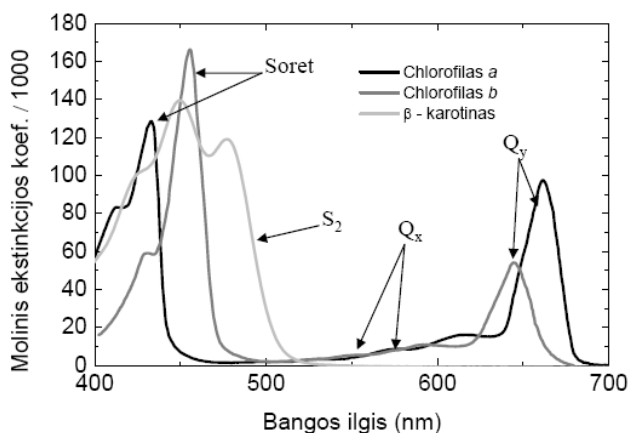
Biologinių objektų sugertį matomoje srityje daugiausia lemia pigmentai arba kofaktoriai. Jų yra įvairių, bet ko gero svarbiausi yra fotosintezės pigmentai, būtent karotinoidai ir chlorofilai (5 pav.).



5 pav. Fotosintezės pigmentai – chlorofilai (A) ir karotinoidai (B). Parodyta chlorofilo *a* molekulė ir pakeitimai, kuriuos reikia padaryti, norint iš jos gauti bakteriochlorofilą *a* ir chlorofilą. Iš karotinoidų parodytas β-karotinas ir luteinas (ksantofilas). Pigmentų konjuguotų jungčių grandinė, kurios lemia jų sugertį regimojoje spektro srityje, apvestos rausva spalva.

Chlorofilai – svarbiausi šviesą sugeriantys fotosintezės pigmentai. Jiems būdinga policiklinė plokščia struktūra (5 pav.), panaši į hemoglobine esančio protoporfirino, tik centrinius azoto atomus koordinuoja ne Fe^{2+} , o Mg^{2+} . Visiems chlorofilams būdinga ilga šoninė fitolo grupė, prisijungusi prie IV žiedo karboksilo grupės, bei penktasis papildomas žiedas, kurio nėra hemo policiklinėje struktūroje. Penkiuose žieduose, esančiuose aplink Mg^{2+} , išsidėsčiusi konjuguotų dvigubų jungčių grandinė, kuri lemia stiprią chlorofilo sugertį regimojoje šviesos spektro srityje (6 pav.). Chlorofilai sugeria mėlyną (400 – 450 nm) ir raudoną (650 – 680 nm) šviesą, bet nesąveikauja su žalia šviesa (apie 530 nm), todėl ir augalų lapai, apšviesti balta šviesa, atrodo žali. Energinė chlorofilo molekulių struktūra ir sugerties spektrai pavaizduoti 6 pav. Raudonojoje spektro srityje išskiriamos dvi sugerties juostos, vadinamos Q_y ir Q_x , atitinkančios dvi energiškai žemiausias singuletines elektronines chlorofilo būsenas (Chl Q_y sugertis atitinka maždaug 675 nm), o mėlynojoje – intensyvi vadinamoji Soret juosta, atitinkanti keletą aukštesnių elektroninių singuletinių būsenų. Be singuletinių elektroninių būsenų,

chlorofilai turi ir tripletines būsenas, žemiausia kurių yra žemiau nei Q_y , tačiau dėl atrankos taisyklių sugertis iš pagrindinės būsenos į tripletinę būseną negalima¹.



6 pav. Chlorofilo *a*, Chlorofilo *b* ir β -karotino sugerties spektrai. Chlorofilai buvo ištirpinti dietilo eteryje, o β -karotinas – n-heksane.

Chlorofilai yra itin efektyvus šviesos „sugėrikiai“ – jų molinis ekstinkcijos koeficientas siekia $10^5 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Įvairios chlorofilo formos (pvz., chlorofilas *a* ir chlorofilas *b*, bakteriochlorofilas *a*, bakteriochlorofilas *b*) skiriasi savo šoninėmis grupėmis (5 pav.), o kartu ir sugerties spektrais (6 B pav.). Tai leidžia fotosintetantiems organizmams panaudoti įvairių bangos ilgių šviesą. Be to, jų sugerties spektrus modifikuoja sąveika su baltymais, kuriuose šie pigmentai paprastai išsidėsto, bei kitais aplink esančiais pigmentais. Pvz., bakterijų fotosintetinėje antenoje LH2 tas pats bakteriochlorofilas *a* sugeria ir ties 800 nm, ir ties 850 nm, tuo tarpu, kai laisvo bakteriochlorofilo sugertis yra ties 790 nm. Taigi, sugerties spektrai parodo, kokioje aplinkoje yra tiriami pigmentai.

Karotinoidai – tai dar viena fotosintezės pigmentų rūšis. Šios molekulės sutinkamos ne tik fotosintezėje - jos lemia ryškias rudeninių lapų², vaisių (pvz., pomidorų), grybų, augalų ir net kai kurių gyvūnų (pvz., kanarėlių) spalvas, taip pat turi kitų funkcijų, nesusijusių su fotosinteze, pvz., iš jų organizme sintetinamas retinalis –

¹ Singuletinėje būsenoje aukščiausios molekulinės orbitalės elektronų sukiniai yra priešingų orientacijų, o tripletinėje būsenoje – vienodų. Optinio šuolio metu, kai sistema sugeria fotoną, elektrono sukiny pasikeisti negali.

² Atšalus orams, chlorofilai, esantys lapuose, suyra pirmiausiai, tuomet lieka karotinoidai, kurie rudeninius lapus nudažo geltona ar oranžine spalva.

regos pigmentas. Tipiškas karotinoidas yra β -karotinas³ (tai pigmentas, suteikiantis oranžinę spalvą morkoms), jis parodytas 5B pav. Deguonies atomų turintys karotinoidai vadinami ksantofilais. Vienas iš plačiausiai paplitusių augaluose ksantofilų luteinas, pavaizduotas 5C pav. Visiems karotinoidams būdinga tiesinio polieno struktūra su konjuguotų dvigubų jungčių grandinėle. Karotinoidai priklausomai nuo molekulės ilgio sugeria šviesą, kurios bangos ilgis – nuo 450 iki 550 nm (t.y., atrodo geltoni, oranžiniai ar net raudoni). Jų sugertis papildo chlorofilo sugerties spektrą ir padeda fotosintetinantiesiems organizmams dar geriau panaudoti visą Saulės spinduliuotę. Karotinoidų sugerties maksimumas priklauso nuo jų konjuguotų jungčių grandinės ilgio (žr. toliau): kuo ilgesnis karotinoidas, tuo raudonesnę šviesą jis sugeria [2]. Įdomu, kad karotinoidų sugertis regimojoje spektro srityje yra sąlygota ne žemiausios sužadintos elektroninės būsenos, S_1 , bet antrosios sužadintos būsenos, S_2 (žr. 6A pav.). Žemiausiai sužadintai (S_1) būsenai būdinga tokia pat simetrija ($1A_g^-$) kaip ir pagrindinei būsenai, todėl vienfotoniai šuoliai į ją iš pagrindinės būsenos yra draudžiami [2]. Tačiau ši „optiškai tamsi“ būsena irgi dalyvauja fotosintetinėje energijos pernašoje – sužadinus karotinoidą į S_2 būseną, ši relaxuoja į S_1 , kuri savo ruožtu perduoda energiją chlorofilams. Karotinoidai taip pat svarbūs dėl žemos energijos tripletinės būsenos, kuri sąveikauja su singuletiniais deguonimi ir chlorofilų tripletinėmis būsenomis.

Skirtinga pigmentinė fotosintezę vykdančių kompleksų sudėtis leidžia įvairiems organizmams užimti savo unikalias ekologines (spalvines) nišas ir „maitintis“ šviesa, kurios nesugeria konkuruojantys organizmai. Dėl šios priežasties kai kuriuose jūriniuose organizmuose, pvz., raudonuosiuose dumbliuose, karotinoidai yra pagrindiniai šviesą sugeriantys pigmentai: šie dumbliai gyvena toliau nuo paviršiaus, kur mėlyną šviesą išsklaido vanduo, o raudoną sugeria virš jų plūduriuojantys organizmai. Tada karotinoidai, sugeriantys žalią šviesą, lieka vieninteliai efektyvūs šviesą surenkantys pigmentai.

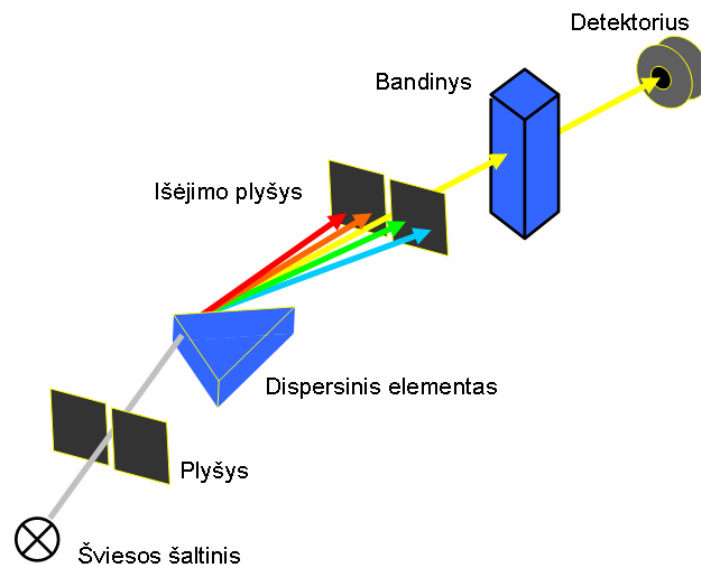
Yra ir kitų biologinių pigmentų. Dalis jų yra porfirinų prigimties (pvz., hemas, kurio funkcija – deguonies ir CO_2 transportas), taip pat – flavinai (flavino mononukleotidas, FMN yra pigmentas susijęs su augalų fototropizmu), flavonoidai (augalų žiedus nuspalvinantys pigmentai), retinalis (regos ir halobakterijų fotosintezės pigmentas), parakumarino rūgštis (bakterijų neigiamo fototaksio pigmentas), fikocianinas

³ Lotyniškai *carrota* – morka, iš šio žodžio ir kilęs šių pigmentų pavadinimas.

ir fikoeritrinas (chlorofilo pakaitalas dumblių fotosintezėje) ir kt. Pažymėtinas ir vienintelis iki šiol žinomas natūraliai spalvotas baltymas, būtent žaliai fluorescuojantis baltymas (GFP), kuriame chromoforas susiformuoja baltymui susivyniojus į tretinę struktūrą bei autokatališkai sureagavus trims amino rūgštims.

Sugerties spektrų matavimas

Sugerties spektras matuojamas komerciniais prietaisais, kurių visų veikimo principas iš esmės nesiskiria (7pav.): iš šviesos šaltinio išėjusi šviesa suskaidoma į spektrines dedamąsias dispersiniu elementu (priziminiu ar gardeliniu monochromatoriumi, juostiniu šviesos filtru), tuomet patenka į bandinį ir praėjusios šviesos intensyvumas registruojamas detektoriumi. Užregistravus intensyvumą su bandiniu ir be jo, pagal (2) formulę apskaičiuojama bandinio sugertis. Keičiant dispersinio elemento konfigūraciją (pvz., sukant prizmę arba gardelę), galima išmatuoti visą sugerties spektrą. Dažnai naudojama dviejų spindulių schema, kai krintantis šviesos pluoštas padalinamas į du, iš kurių vieno kelyje pastatomas bandinys, o kitame – kiuvetė su tirpikliu arba tiesiog oras. Tokia schema leidžia vienu metu išmatuoti tiek I , tiek I_0 , įeinančius į (2) formulę ir rezultatai gaunami tikslesni.

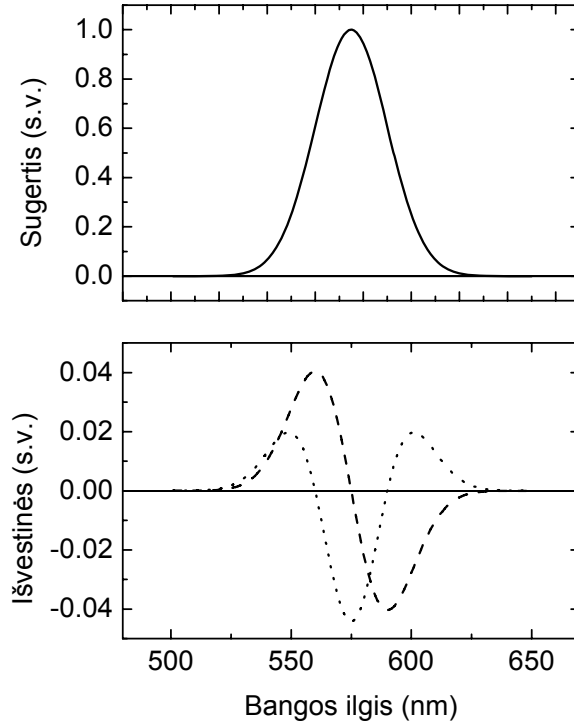


7 pav. Principinė sugerties spektrometro schema.

Šiuo metu labiausiai paplitę dvi sugerties spektrometrų rūšys – skenuojantieji ir šviesolaidiniai. Pirmieji yra dviejų kanalų ir pasižymi dideliu tikslumu, o pastarieji yra kompaktiški, vietoje detektoriaus paprastai naudoja nMOS, CMOS arba CCD liniuotes (t.y. neturi judančių dalių) ir tinka naudoti „lauko sąlygomis“. Juose šviesos pluošto atvedimui naudojami daugiamodžiai šviesolaidžiai. Skenuojančius UV-VIS-nIR srities spektrofotometrus gamina firmos „Perkin-Elmer“, „Jenway, Shimadzu“ ir kt., o šviesolaidinius – „Ocean Optics“, „Avantes“ ir kt.

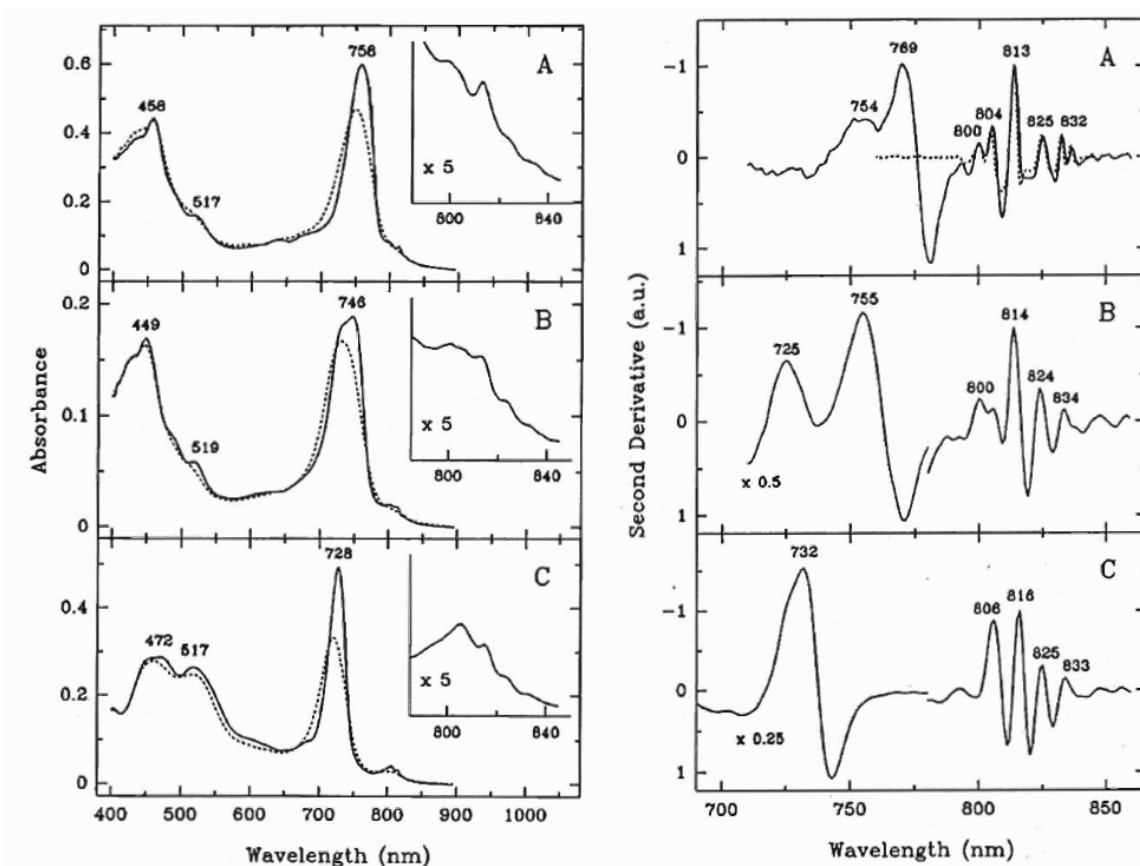
Nors sugerties spektrai matuojami komerciniais prietaisais, mokslinėse publikacijose vis dar pasitaiko prastos kokybės duomenų. Dažniausiai biologinių objektų sugerties spektrai iškraipomi dėl to, kad medžiagai be sugerties būdinga dar ir sklaida, o prietaisai nėra skirti sklaidančios medžiagos sugerčiai matuoti. Sklaida ne tik prideda prie išmatuoto sugerties spektro „foną“, kuris paprastai auga mažėjant bangos ilgiui, bet gali sumažinti ir išmatuotų sugerties juostų amplitudę. Sklaidos įtakai sumažinti, matuojant stengiamasi surinkti šviesą iš kuo didesnio erdvinio kampo. Reikia pažymėti, kad net ir tinkamai išmatuotas biologinio audinio pigmentų sugerties spektras skiriasi nuo tų pigmentų spektro tirpale, jei tie pigmentai yra dalelėse, kurių sugerties negalime nepaisyti (tai spektro plokštėjimo efektas, kurį aprašė L. Duysens, 1956). Šios problemos galioja ir išvestiniams sugerties spektroskopijos metodams, tokiems kaip skirtuminės sugerties spektroskopija arba tiesinio ar cirkuliarinio dichroizmo spektroskopija.

Kadangi biologiniuose pigmentų ir baltymų kompleksuose pigmentai yra įvairių konfigūracijų bei sąveikauja tarpusavyje, *in vivo* sugerties spektruose sugerties juostos beveik visuomet yra nevienalytiškai išplitę ir persikloja tarpusavyje. Norint išskirti atskirų pigmentų „grupių“ įnašus, dažnai skaičiuojamos pirmosios, antrosios ar net ketvirtosios spektro išvestinės[3-6]. Pirmojoje išvestinėje kiekviena sugerties juosta transformuojasi į nulio kirtimo tašką, o antroji – į naują, aštresnį neigiamą maksimumą (8 pav.)



8 pav. Viršuje: gauso formos sugerties spektras. Apačioje: jo pirmoji (brūkšninė linija) ir antroji (taškinė linija) išvestinės.

Kaip iliustraciją, jog išvestinės gali suteikti papildomos informacijos apie tiriamą objektą, pateiksime žaliųjų sieros bakterijų sugerties spektrus, išmatuotus 6K temperatūroje. 9 pav. parodyti bakterijų *Prostechochloris aestuarii*, *Chlorobium vibrioforme* ir *C. Phaeovibrioides* sugerties spektrai kambario temperatūroje bei 6K temperatūroje, bei jų antrosios išvestinės. Bakteriochlorofilų *a* sugerties juostoje (virš 790 nm) antroji išvestinė aiškiai atskleidžia spektro sandarą, kurios plika akimi nesimato paprastame sugerties spektre.



9 pav. Fotosintetinių bakterijų sugerties spektrai (dešinėje) ir jų antrosios išvestinės (kairėje). Atkreipkite dėmesį, kaip antroji išvestinė paryškina spektro struktūrą. Iš Otte et al., 1991 [7].

Be įprastinės sugerties metodų, biologijoje labai plačiai taikomi skirtuminės sugerties metodai, kai matuojamas dydis yra skirtumas tarp bandinio sugerties esant tam tikram išoriniam poveikiui bei jo nesant. Išorinis poveikis gali būti įvairus:

- Šviesa;
- Temperatūros pokytis;
- Kokios nors cheminės medžiagos perteklius ar trūkumas;
- Kt.

Matuojant sugerties skirtumą, galima nustatyti, kuri tiriamo objekto dalis yra jautri naudojamam išoriniam poveikiui. Pavyzdžiui, jei šildome augalą (t.y. jis gyvena terminio streso sąlygomis), kuri fotosistema „išsijungia“ pirmiau – PSI ar PSII? Arba, jei į augalą šviečiame itin stiprią šviesą, kas pirmiau neatlaiko: šviesą surenkanti antena, ar reakcinis centras?

Kai išorinis poveikis yra šviesa, skirtuminės sugerties metodikos leidžia nustatyti biologinio objekto reakciją į apšvietimą. Iš šio metodo kilo žybsnio fotolizė, žadinimo-zondavimo spektroskopija ir kitos kinetinės spektroskopijos rūšys, kai bandinys paveikiamas šviesos žybsniu, o tuomet, matuojant sugertį, stebimas jo sugerties kitimas laikui bėgant.

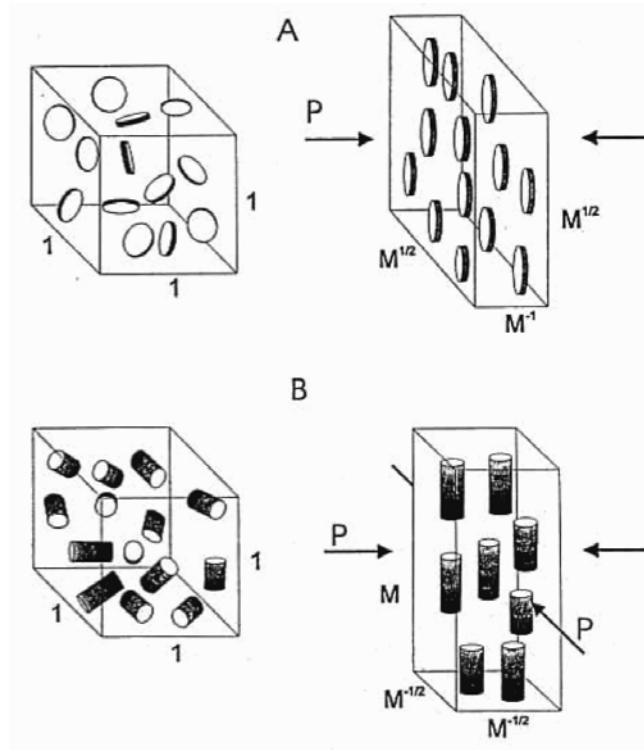
Tiesinis ir cirkuliarinis dichroizmas

Tiesinis dichroizmas – tai skirtuminės sugerties sugerties atmaina, kurioje matuojamas sugerties skirtumas tarp dviejų tarpusavyje statmenų poliarizacijų šviesos. Ši spektroskopijos rūšis leidžia išmatuoti chromoforų orientacijas laboratorinės koordinatinių sistemos atžvilgiu. Jei chromoforas orientuotas taip, kad jo dipolinio momento kryptis guli išilgai šviesos poliarizacijos, jis tą šviesą sugers efektyviai, o jei dipolinio momento kryptis statmena šviesos poliarizacijai, sugerties visai nebus.

Kadangi molekulės ar didesni biologiniai objektai (pvz., ląstelių organelės) tirpaluose bendruoju atveju nėra orientuoti, jos orientuojamos dirbtinai. Tam gali būti naudojami keli metodai:

- Suspaudimas gelyje. Tiriama objektai įdedami į poliakrilamido, agarozės ar želatinos gelį ir suspaudžiami. Jei objektų forma panaši į diską (ląstelės membranos fragmentai, eritrocitai), suspaudžiama viena kryptimi, o jei objektas pailgas (pvz., membraninio baltymo globulė) – dviem kryptimis (10 pav.). Dažniausiai naudojamas poliakrilamido gelis, kuris yra skaidrus matomoje ir artimojoje IR srityje, todėl netrikdo spektroskopinių matavimų.
- Orientavimas, užtepant daleles ant paviršiaus teptuku.
- Dalelių orientavimas ištempiant plėvelę (pvz., polivinilalkoholio), kurioje jos įterptos.
- Orientavimas skysčio sraute. Laminarinės tėkmės srauto gradientu pailgos dalelės orientuojasi išilgai srauto tekėjimo krypties.
- Orientavimas magnetiniame ir elektriniame lauke. Dalelės, turinčios elektrinį arba magnetinį dipolinį momentą orientuojasi atitinkamai elektriniame arba

magnetiniame lauke. Dažnai lauku orientuotos dalelės „uždaromos“ gelyje ir tuomet galima jas tirti ir nepridėjus išorinio lauko.

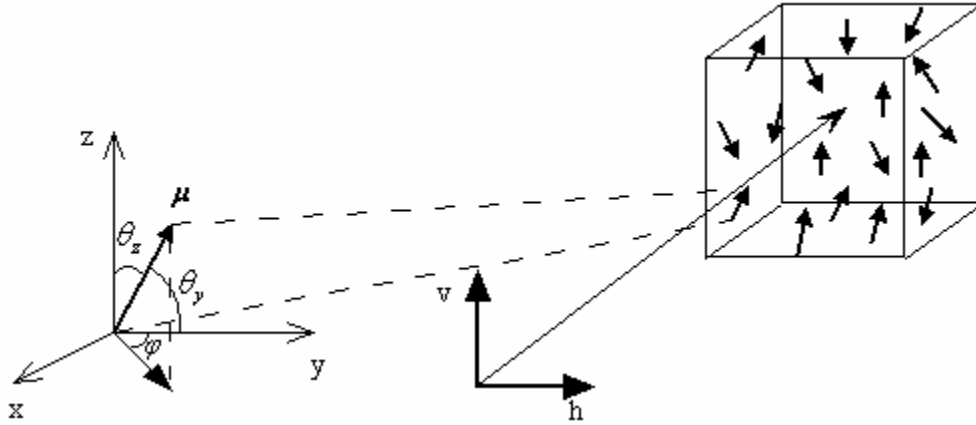


10 pav. Disko formos (A) ir pailgų (B) dalelių orientavimas suspaudžiant gelį. Paimta iš [8].

Jei krintanti į bandinį šviesa yra poliarizuota išilgai koordinatės z ir sklinda kryptimi, lygiagrečia x ašiai laboratorinėje atskaitos sistemoje, tai bandinio sugertis tai šviesai yra

$$A_x = k\mu^2 \langle \cos \theta_z \rangle \quad (13),$$

kur θ_z yra kampas tarp tiriamos molekulės dipolinio momento μ ir šviesos poliarizacijos krypties; k yra proporcingumo koeficientas, o skliausteliai $\langle \dots \rangle$ nurodo vidurkinimą pagal visas bandinyje sutinkamas dipolinio momento orientacijas. Tuomet tiesinis dichroizmas LD apibrėžiamas kaip (žr. 11 pav.).



11 pav. Tiesinio dichroizmo eksperimentas dalinai orientuotų molekulių ansamblyje. Koordinačių sistemoje (kairėje) pateikiami kampų, naudojamų formulėse, apibrėžimai.

$$LD = \Delta A = A_z - A_y \quad (14).$$

Taip apibrėžtas tiesinis dichroizmas priklauso nuo bandinio sugerties absoliutinės vertės (t.y. nuo molekulių koncentracijos) ir todėl yra skirtingas skirtingai paruoštuose bandiniuose. Todėl dažniau naudojamas redukuotas tiesinis dichroizmas

$$LD_r = \frac{\Delta A}{3A_{iso}} = \langle \cos^2 \theta_z \rangle - \langle \cos^2 \theta_y \rangle \quad (15)$$

Jei molekulių dipolinis momentas su šviesos poliarizacija sudaro kampą θ , o azimuto kampas φ yra pasiskirstęs atsitiktinai, tiesinis dichroizmas surandamas taip:

$$A_z = k\mu^2 \cos^2 \theta \quad (16),$$

$$A_y = \frac{1}{2\pi} k\mu^2 \int_0^{2\pi} \sin^2 \theta \cos^2 \varphi d\varphi = \frac{1}{2\pi} k\mu^2 \sin^2 \theta \quad (17)$$

$$LD_r = \frac{\Delta A}{3A_{iso}} = \frac{1}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (18)$$

Kaip matome iš (18) formulės, net ir orientuotas bandinys gali nepasižymėti tiesiniu dichroizmu, jeigu $\cos^2 \theta = 1/3$ arba $\theta = 54.7^\circ$. Šis kampas dažnai vadinamas magiškuoju kampu.

Realiam pasaulyje niekada nebūna taip, jog visos molekulės bandinyje būtų orientuotos vienodu kampu θ į bandinio cilindrinės simetrijos ašį z . Todėl tiesinio dichroizmo išraišką tenka papildyti taip:

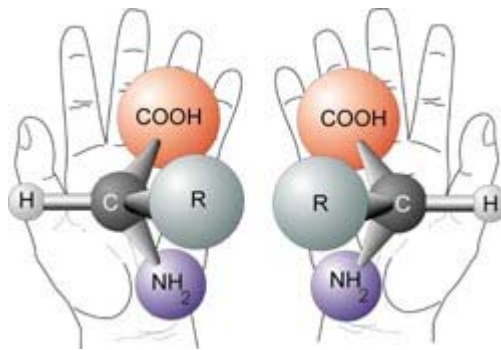
$$LD_r = \left\langle \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1) \right\rangle \phi \quad (19).$$

Čia laužtiniai skliausteliai $\langle \dots \rangle$ nurodo vidurkinimą pagal visas bandinyje sutinkamas kampo θ vertes, o ϕ yra funkcija, nurodanti objektų orientacijos laipsnį bandinyje. Jei ji lygi vienetui, visi objektai orientuoti vienodai, o jei ji lygi nuliui – objektų orientacija yra chaotiška. Realybė, kaip visada, yra kažkur per vidurį.

Kita poliarizacinės spektroskopijos rūšis – tai *cirkuliarinis (apskritiminis) dichroizmas*. Jis apibrėžiamas kaip sugerties skirtumas tarp sugerties, kai sugeriama kairiosios ir dešinėsios poliarizacijos apskritimiškai poliarizuota šviesa:

$$CD(\nu) = A_l(\nu) - A_r(\nu) = \Delta\varepsilon(\nu)cl \quad (20).$$

Čia $\Delta\varepsilon(\nu)$ yra skirtumas tarp molinio ekstinkcijos koeficiento kairei ir dešinei apskritimiškai poliarizuotai šviesai. Atskirų molekulių cirkuliarinis dichroizmas atsiranda dėl molekulių chiraliteto (pav.), t.y. simetrijos savybės, kai objekto veidrodinio atvaizdo neįmanoma sutapatinti su tuo objektu (buitinis pavyzdys – žmogaus plaštakos, kurios yra viena kitos veidrodinis atspindys, tačiau uždėjus jas vieną ant kitos, nykščiai rodo į skirtingas puses). Tokios molekulės (pvz., amino rūgštys) savo skaidrumo srityje pasižymi optiniu aktyvumu (suka šviesos poliarizacijos plokštumą), o sugerties juostoje – cirkuliariniu dichroizmu. Molekulių savitasis CD yra palyginti nedidelis (10^{-6} eilės, lyginant su izotropine sugertimi), jo spektro forma yra tokia pati, kaip sugerties spektro. Fizikinė molekulių CD prigimtis – sąveika su EM lauku ne tik per elektrinį šuolio dipolinį momentą μ , bet ir per magnetinį, m . Tam, kad molekulė pasižymėtų magnetiniu šuolio dipoliniu momentu, ir reikalingas chiralitetas (asimetrinis atomas).



12 pav. Amino rūgščių chiralitetas.

Tiriant biologinius objektus svarbesnis nei molekulinis yra kitos prigimties CD: eksitoninis bei makroskopinis. Eksitoninis CD stebimas, kai biologiniame objekte chromoforai išsidėsto fiksuotomis orientacijomis ir atstumais vienas kito atžvilgiu (pvz., pigmentai fotosintetiniame antenos komplekse arba triptofano amino rūgštys baltyme). Tuomet dėl sąveikos tarp tų chromoforų sugerties dipolinis stiprumas persiskirsto tarp naujų eksitoninių būsenų, bei atsiranda papildomas įnašas į cirkuliarinį dichroizmą. Kvantinės mechanikos metodais nesunku jį išreikšti per kompleksą sudarančių pigmentų dipolinius momentus [9]. Jei komplekse turime du pigmentus, kurių dipoliniai momentai yra μ_1 ir μ_2 , o atstumo tarp jų vektorius r_{nm} chaotiškai orientuoto tokių kompleksų ansamblio CD bus

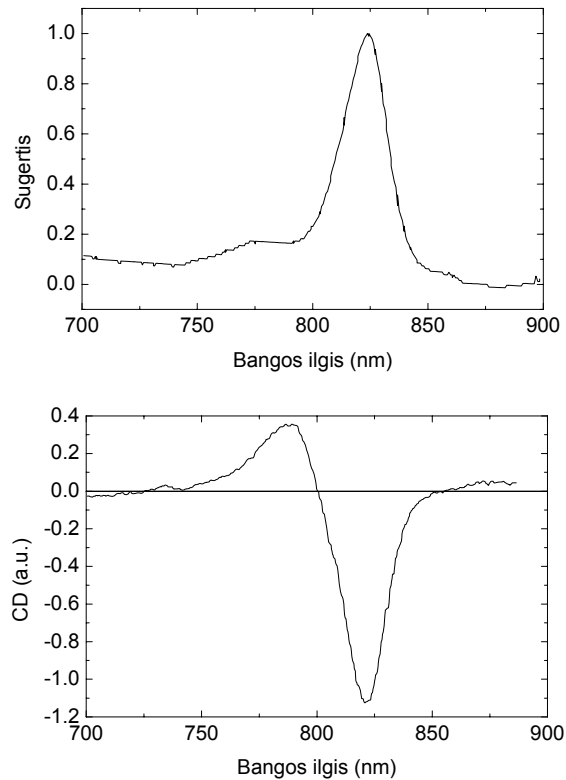
$$CD \sim r_{12} \cdot \mu_1 \times \mu_2 \quad (21).$$

Pažymėkime keletą eksitoninio CD spektro savybių:

- Spektras yra konservatyvus, t.y. jei vienoje spektro dalyje CD signalas neigiamas, tai kitoje turėsime atitinkamą teigiamą signalą (13 pav.).
- Spektrinis atsakas stebimas chaotiškai orientuotame objektų ansamblyje. Tai patogiu, nes nereikia orientuoti objektų.
- Spektras yra itin jautrus pigmentų tarpusavio orientacijoms ir atstumams. Būtent CD spektro forma itin stipriai priklauso nuo tiriamą kompleksą sudarančių pigmentų tarpusavio orientacijos ir atstumų. Todėl CD dažnai naudojama kaip patikrinimo metodika kristalinėms baltymų struktūroms tikrinti. Reikalas tas, jog baltymo atominis modelis sudaromas iš baltymo kristalo, atliekant rentgeno difrakcijos eksperimentus. Ar gyvame organizme baltymas toks pat kaip kristale, iš anksto nėra žinoma. Todėl, panaudojant baltymo kristalografinę struktūrą, apskaičiuojamas jo CD spektras ir lyginamas su *in vivo* ar *in vitro* eksperimentu, jei reikia koreguojami pastarojo duomenys.

Dar žinomas makroskopinis CD, stebimas didelių (lyginant su šviesos bangos ilgiu) matmenų objektuose, tokiuose kaip DNR, ląstelių membranos ar virusai. Šis signalas yra nekonservatyvus, analiziškai jį aprašyti labai sunku. Todėl čia apsiribosime pasakę, kad tokios rūšies CD signalas rodo, kad bandinyje egzistuoja makroskopinė, dideliais

atstumais išlaikoma tvarka, kuriai būdingas chiraliskumas. DNR spiralė gana akivaizdžiai tai iliustruoja.



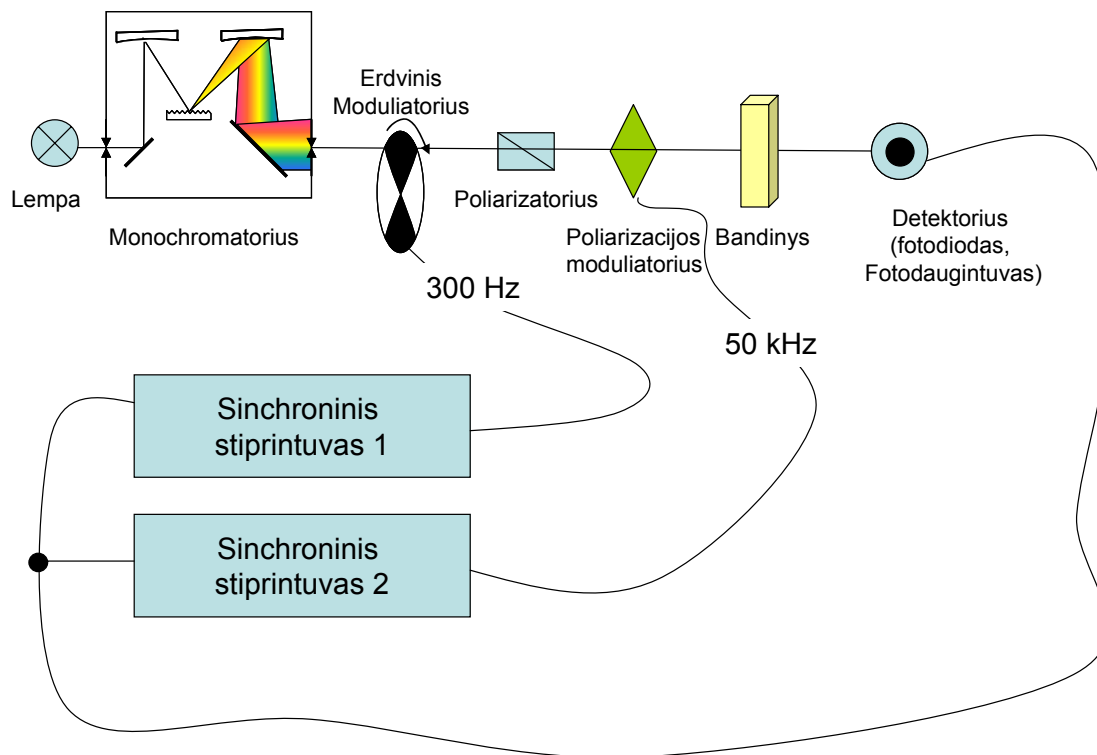
13 pav. Purpurinių bakterijų fotosintetinės šviesą surenkančios antenos fragmento B820, kurį sudaro sąveikaujanti bakteriochlorofilų pora, sugerties ir CD spektras. Atkreipkite dėmesį, jog CD signalas yra iš esmės konservatyvus, t.y. jo integralas visame bangos ilgių diapazone lygus nuliui.

Besidomintys skaitytojai daugiau informacijos apie LD ir CD spektroskopiją ras specialiojoje literatūroje [8, 9].

LD ir CD spektro matavimas

Čia aptarsime, kaip eksperimentiškai matuojamas tiesinio ir cirkulinio dichrozmo spektras. Tokio matavimo schema parodyta (14 pav.). Lempos šviesa išskaidoma į spektrines dedamąsias monochromatoriumi, tuomet poliarizatoriumi šviesa padaroma tiesiškai poliarizuota. Kadangi tiek CD, tiek LD atveju matuojama tiek bandinio sugertis, tiek poliarizacinės sugerties savybės, šviesa moduluojama erdvinio modulatoriumi (EM)

(besisukančiu disku su išpjovomis). EM užsidarymas ir atsidarymas registruojamas atskirai ir atitinkamas TTL signalas paduodamas į sinchroninio stiprintuvo atraminį įėjimą. Į signalinį įėjimą pakliūva signalas iš fotodetektoriaus. Tai vadinamoji sinchroninės detekcijos schema (angl. *lock-in detection*). Ji gera tuo, jog sinchroninis stiprintuvas aptinka tik tas detektoriaus signalo dedamąsias, kurių dažnis ir fazė atitinka EM užsidarymo ir atsidarymo dažnį (paprastai apie kelis šimtus Hz) ir fazę. Todėl, pvz., kambaryje degančios lempos šviesos, kuri neina pro EM, stiprintuvas „nematys“. Taigi, pirmuoju sinchroniniu stiprintuvu matuojame pro bandinį praėjusios šviesos stiprumą I , atitinkantį bandinio pralaidumą. Už poliarizatoriaus spindulio kelyje statomas poliarizacijos moduliatorius (PM). Tai gali būti fotoelastinis moduliatorius (kvarco kristalas, prie kurio prijungtas pjezoelektrinis keitiklis) arba pokelso elementas (kristalas, prie kurio prijungus įtampą, jame atsiranda dvigubas lūžis). Prie PM prijungiamas harmoninis signalas, atitinkantis pusės (arba ketvirčio) bangos ilgio įtampą, kuris periodiškai keičia šviesos poliarizaciją iš horizontalios į vertikalią (arba iš kairės į dešinę). Antrasis sinchroninis stiprintuvas „išrenka“ detektoriaus signalo dedamąsias, atitinkančias poliarizacijos moduliaciją; taip išmatuojamas praėjusios šviesos intensyvumo skirtumas vertikalčiai ir horizontalčiai (kairiapusiškai ir dešiniapusiškai) poliarizuotai šviesai ΔI . Atlikę eksperimentą su ir be bandinio, gauname visus reikiamus dydžius, įeinančius į (2) formulę ir apskaičiuojame LD arba CD.



14 pav. LD ir CD eksperimento schema, moduluojant šviesą ir detektuojant signalą dviem sinchroniniais stiprintuvais.

Štarko spektroskopija

Štarko (Stark) spektroskopijoje matuojama, kaip keičiasi molekulių ir jų kompleksų sugerties spektrai, molekulėms pakliuvus į elektrinį lauką. Dėl sąveikos su elektrinių laukų energijos lygmenų padėtys keičiasi. Tai galioja tiek pagrindinei, tiek sužadintai būsenai. Dėl to molekulių sugerties juostos gali pasislinkti ir/arba išplisti. Kadangi sąveikaujančių molekulių sistemoje toks išplitimas yra kitoks negu pavienėse molekulėse, Štarko spektroskopija gali suteikti informacijos apie molekulių sąveikas bandinyje.

Kokybiškai panagrinėkime, kas atsitinka su molekulės spektru, jei molekulė pakliūva į elektrinį lauką. Tiek pagrindinėje, tiek sužadintoje būsenoje molekulės turi nuolatinį dipolinį momentą (μ_g ir μ_e), kurie gali skirtis, ypač asimetriškose molekulėse, tokiose kaip, pvz., chlorofilai. Nuolatiniam elektriniame lauke F sužadintos ir pagrindinės būsenos energijos lygmenys E_g ir E_e aprašomi formulėmis

$$\begin{aligned}
E_e &= E_e^0 - \mathbf{F} \cdot \boldsymbol{\mu}_e \\
E_g &= E_g^0 - \mathbf{F} \cdot \boldsymbol{\mu}_g \\
\Delta E &= \Delta E^0 - F \Delta \mu \cos(\theta)
\end{aligned}
\tag{22}$$

Čia $\Delta \boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_e - \boldsymbol{\mu}_g$, θ yra kampas tarp \mathbf{F} ir $\Delta \boldsymbol{\mu}$, o indeksu „0” žymimi energijos lygmenys nesant lauko. Taigi, elektriniame lauke energijos lygmenys pasislenka, priklausomai nuo dipolinio momento *pokyčio* orientacijos išorinio lauko atžvilgiu. Izotropiniame bandinyje galimos visos kampo θ vertės, taigi $\cos \theta$ gali būti ir teigiamas, ir neigiamas. Jei bandinio spektro nehomogeninis išplitimas yra didesnis už elektrochrominį energijos poslinkį (biologinių pigmentų ir laboratorijoje pasiekiamų elektrinių laukų atveju taip ir yra), spektras išplinta proporcingai elektrinio lauko kvadratui. Štarko spektras

$$\Delta A(\nu) = A_F - A_{F=0}
\tag{23}$$

kuris apibrėžiamas kaip skirtumas tarp bandinio sugerties esant ir nesant elektriniam laukui, tokiu atveju primena antrąją sugerties spektro išvestinę (15A pav.).

Antrasis įnašas į Štarko spektrą atsiranda dėl to, kad pagrindinėje ir sužadintoje būsenoje skiriasi molekulių poliarizuojamumas žymimas α , t.y. $\Delta \alpha \neq 0$. Poliarizuojamumas nusako, kokį dipolinį momentą molekulėje indukuoja išorinis elektrinis laukas:

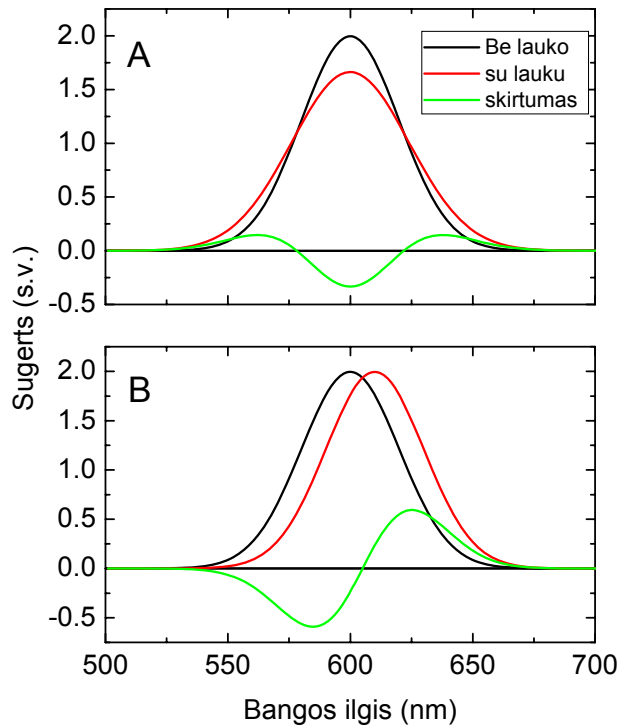
$$\boldsymbol{\mu}_{ind} = \alpha \mathbf{F}
\tag{24}$$

Ši išraiška galioja tiek pagrindinei, tiek sužadintai būsenai. Kaip jau minėjome, poliarizuojamumas šiose būsenose skiriasi, taigi skiriasi ir dipolinio momento pokytis, atsirandantis dėl išorinio lauko:

$$\Delta \boldsymbol{\mu}_{ind} = \Delta \alpha \cdot \mathbf{F}
\tag{25}$$

Pastebėkime, kad bendruoju atveju $\Delta \alpha$ yra tenzorius. Taigi, dėl molekulės poliarizuojamumo pokyčio pereinant iš pagrindinės į sužadintą būseną pakinta jos *indukuotoji* dipolinio momento dalis. Atitinkami energijos pokyčiai, sekant (22) formule yra proporcingi poliarizuojamumo pokyčiui ir lauko stiprio kvadratui F^2 . Kadangi paprastai molekulių poliarizuojamumas yra didesnis sužadintoje būsenoje, šuolio energija paprastai sumažėja ir sugerties juosta pasislenka į raudonąją pusę. Kaip matome iš 15B pav., tokiu atveju įnašas į Štarko spektrą atitinka pirmąją sugerties spektro išvestinę.

Aptarus šiuos du įnašus į Štarko spektrą, galime paminėti ir trečiąjį – tai sugerties intensyvumo padidėjimas ar sumažėjimas elektriniame lauke. Akivaizdu, kad šiuo atveju Štarko spektre turėsime įnašą, proporcingą pačiam sugerties spektrui, t.y. stebima sugerties juosta tiesiog sumažės arba padidės.



15 pav. Galimi įnašai į Štarko spektrą: esant gausinei sugerties juostai, jos išplitimas duoda įnašą, primenantį antrąją spektro išvestinę (A), o esant juostos poslinkiui, įnašas atitinka pirmąją sugerties spektro išvestinę.

Taigi, Štarko spektrą sudaro trijų įnašų, atitinkančių sugerties spektro nulinę, pirmąją ir antrąją išvestinę, tiesinė kombinacija. Ją apibūdina Liptay formulė [10]:

$$\Delta A(\nu) = (fF)^2 \left\{ A_\chi A(\nu) + \frac{B_\chi}{15hc} \nu \frac{d}{d\nu} \left(\frac{A(\nu)}{\nu} \right) + \frac{C_\chi}{30h^2c^2} \nu \frac{d}{d\nu} \left(\frac{A(\nu)}{\nu} \right) \right\} \quad (26)$$

kur A_χ nusako šuolio dipolinio momento pokytį elektriniame lauke (vadinamąjį šuolio poliarizuojamumą ir hiperpoliarizuojamumą). B_χ ir C_χ yra susiję su $\Delta\mu$ ir $\Delta\alpha$ taip:

$$B_\chi = \frac{1}{2} \left\{ 5Tr(\Delta\alpha) + (3\cos^2 \chi - 1) [3\mu \cdot \Delta\alpha \cdot \mu - Tr(\Delta\alpha)] \right\} \quad (27)$$

$$C_{\zeta} = |\Delta\boldsymbol{\mu}|^2 \left[5 + (3 \cos^2 \zeta - 1)(3 \cos^2 \chi - 1) \right] \quad (28)$$

Čia χ žymi kampą tarp šviesos poliarizacijos ir pridėto elektrinio lauko krypties, o ζ yra kampas tarp $\Delta\boldsymbol{\mu}$ ir $\boldsymbol{\mu}$; $\boldsymbol{\mu}$ šioje formulėje žymi elektroninio šuolio dipolinį momentą, o ν yra dažnis, išreikštas atvirkštiniais centimetrais. Atkreipkite dėmesį, kad elektrinis laukas F į formulę įeina pakeltas kvadratu ir padaugintas iš vadinamojo pataisos daugiklio f , kuris leidžia įskaityti tai, jog tiriamą molekulę nėra vakuume, ją supa kitos molekulės, dėl kurių molekulė „jaučia“ kitokią elektrinį lauką, negu išorinis. Kadangi kalbama apie elektrinį lauką vienos (tiriamos) molekulės ribose, f nėra aplinkos dielektrinė skvarba, kaip tai gali pasirodyti iš pirmo žvilgsnio. Egzistuoja keletas pataisos daugiklio apskaičiavimo modelių, iš kurių populiariausias (tačiau nebūtinai teisingiausias) yra tuščios erdmės modelis. Padarius prielaidą, kad molekulė yra sferos formos tuščioje erdmėje, o aplink tą sferą yra dielektrinės skvarbos ε aplinka,

$$f = \frac{\varepsilon + 2}{3} \quad (29).$$

Štarko spektro matavimas

Pirmiausia pastebėkime, kad eksperimente parinkę kampą χ tarp išorinio lauko ir šviesos poliarizacijos lygų magiškajam kampui (54.7°), (27) ir (28) formulėje atsikratome priklausomybės nuo nežinomo kampo ζ . Be to, Štarko efektas yra kvadratinis pridėto lauko atžvilgiu. Taigi, jei moduluosime pridėtą elektrinį lauką nedideliu (100 Hz – 2000 Hz) dažniu

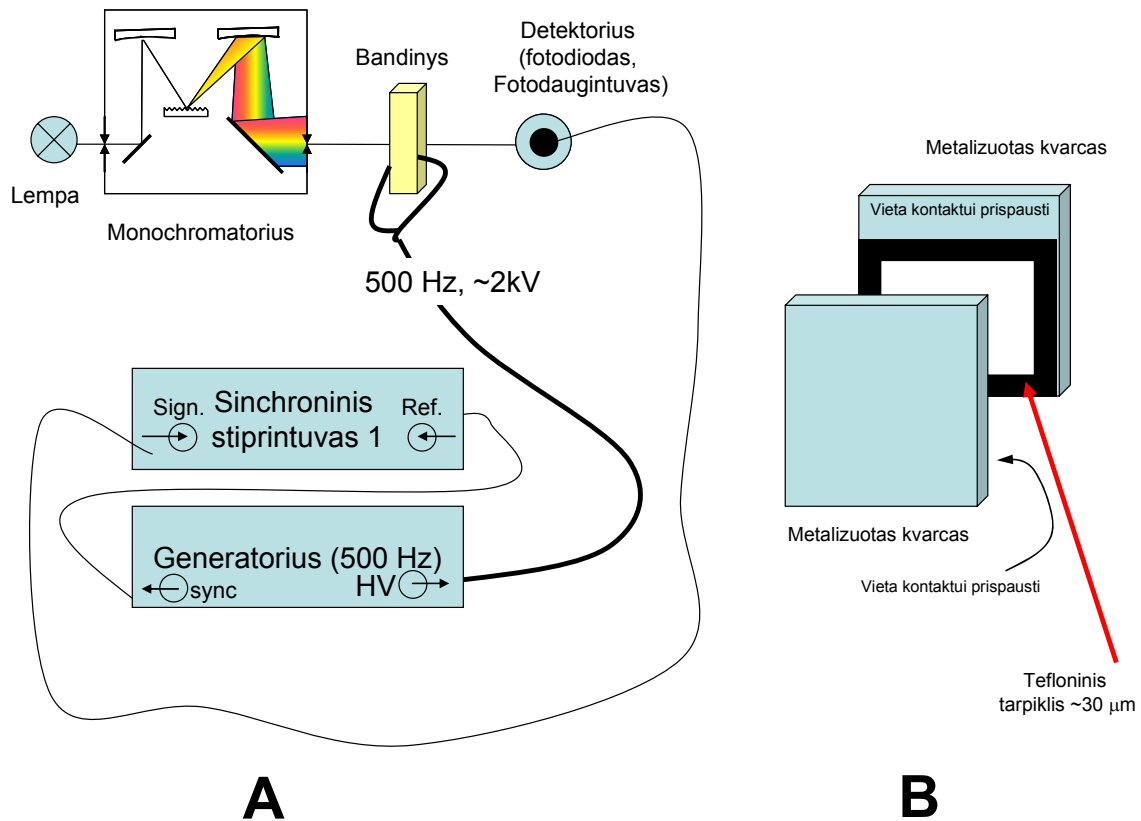
$$\mathbf{F}(\omega) = \mathbf{F}_0 \sin(\omega t) \quad (30),$$

matuojamas signalas bus moduluotas dažniais 2ω , 4ω ir t.t.:

$$\Delta A(\nu) = \Delta A(\nu, \mathbf{F}^2, 2\omega) + \Delta A(\nu, \mathbf{F}^4, 4\omega) + \dots \quad (31)$$

Taigi, Štarko spektrą galima matuoti moduluojant elektrinį lauką dažniu ω ir, kaip ir LD arba CD eksperimente, naudojant sinchroninę detekciją (16A pav.), tik, kaip matome iš (31) formulės, sinchroninį stiprintuvą šiuo atveju sinchronizuojame dvigubu generatoriaus dažniu 2ω . Matavimai paprastai atliekami žemoje temperatūroje (77K), įmerkus bandinį į skystą azotą. To reikia dėl dviejų dalykų: pirma, žemoje temperatūroje sugerties juostos tampa siauresnės (dėl sumažėjusios elektron-fononinės sąveikos

sumažėja vienalytis juostų išplitimas), antra – padidėja bandinio dielektrinio pramušimo slenkstis. Bandinys paprastai talpinamas į kiuvetę, padarytą iš dviejų metalizuotų kvarco ar stiklo plokštelių, atskirtų tarpusavyje tarpikliu iš kelių dešimčių mikronų storio teflono plėvelės. Plono bandinio reikia todėl, kad su laboratorijoje lengvai pasiekiamomis įtampomis (keli kV) būtų galima pasiekti kuo didesnę elektrinį lauką. Žinoma, tokia ploname bandinyje reikia pasiekti itin aukštas molekulių koncentracijas, kad sugertis būtų lengvai išmatuojama – juk Štarko eksperimente matuojama net ne pati sugertis, o tik nedidelis jos pokytis.



16 pav. A: Štarko spektroskopijos eksperimento schema, B: bandinio kiuvetė.

Štarko spektrai leidžia pasakyti, kiek sužadinus molekulę persiskirsto ją sudarantys krūviai, o krūvio pajudėjimas yra visų fotoindukuotų reakcijų biologinėse sistemose varančioji jėga.

Fluorescencijos spektroskopija

Fluorescencijos spektroskopijoje stebima sužadintų molekulių emisija. Kai kuriuos fluorescencijos spektrų dėsningumus jau aptarėme, nagrinėdami Jablonskio diagramą (2 pav.). Fluorescencija – itin parankus metodas biomolekulėms tirti, nes jis pasižymi dideliu atrankumu: kadangi molekulės fluorescencijos bangos ilgis iš esmės nepriklauso nuo žadinimo bangos ilgio, galima selektyviai sužadinti norimas molekules ir stebėti fluorescenciją, kurią skleidžia tik mums įdomūs pigmentai.

Sužadinus molekulę gali vykti daugelis procesų, kurie visi turi įtakos molekulės fluorescencijai:

1. *Intramolekulinė relaksacija*: molekulės branduoliai persigrupuoja, prisitaikydami prie elektronų konfigūracijos sužadintoje būsenoje. Dalis energijos taip pat perduodama virpesinėms aplinkos (tirpiklio, baltymo) modams. Čia taip pat įeina vidinė konversija iš aukštesnių singletinių sužadintų būsenų į žemiausiąją (S_1). Šis procesas įvyksta per pirmąją pikosekundę po sužadinimo.
2. *Solvatacija*: aplinka prisitaiko prie molekulės elektronų ir branduolių konfigūracijos. Solvataciją sudaro keletas dedamųjų, būtent a) dielektrinė relaksacija (sureaguoja aplinkos elektroninė dalis, įvyksta per mažiau nei 50 fs) ir b) orientacinė relaksacija (persiorientuoja aplinkos molekulės, orientuodamos savo dipolinius momentus taip, kad sistemos molekulė+aplinka energija būtų minimali).
3. *Terminė relaksacija*: sužadintos būsenos prisitaikymas prie aplinkos temperatūros. Charakterizuojama tuo, kad sužadintų būsenų ansamblui ima galioti Boltzman'o pasiskirstymas $p(E) \sim e^{-\frac{E}{kT}}$. Pirmieji du procesai lemia molekulės Stokso poslinkį.
4. *Fluorescencija*: sužadinta būsena išnyksta, molekulei spinduliuojant fotoną. Būtent dėl šio proceso ir stebime fluorescenciją.
5. *Vidinė konversija* – bespindulinė molekulės relaksacija, išsklaidant sužadinimo energiją į aplinką šilumos pavidalu.

6. *Interkombinacinė konversija* – apsiverčia sužadintos elektrono sukiny ir molekulė įgyja magnetinį momentą, susiformuoja tripletinė sužadinta būseną.
7. *Energijos pernaša*. Molekulė, sąveikaudama su kita molekule gali perduoti jai sužadinimo energiją.
8. *Gesinimas*. Galimas procesas, kai sąveika su kitomis molekulėmis pagreitina nespindulinę molekulės sužadintos būsenos relaksaciją. Šis procesas vadinamas fluorescencijos gesinimu, jo efektyvumas priklauso nuo gesiklio molekulių koncentracijos [Q].
9. *Fotoreakcija*. Kai kuriose molekulėse, sužadinus jas vyksta fotoreakcijos (krūvio pernaša, *trans-cis* izomerizacija, jungčių persigrupavimas). Sužadintos būsenos energija tokiu atveju panaudojama fotoreakcijai vykti ir sužadinta būseną išnyksta.

Visi šie (ir kai kurie kiti) procesai veikia molekulės būseną, dėl to ir jos fluorescencijos spektrą. Bandinio fluorescencijos intensyvumas, žadinant jį nuolatine šviesa yra proporcingas molekulių, esančių sužadintoje būsenoje, skaičiui. Šį skaičių aprašome tokia diferencialine lygtimi:

$$\frac{dn}{dt} = I(t) - (k_{fl} + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q] + k_{photoreact.} + k_{EET})n \quad (32)$$

kurioje $I(t)$ žymi žadinimo intensyvumą, k_{fl} – spindulinės relaksacijos spartą, k_{ic} – vidinės konversijos spartą, k_{isc} – interkombinacinės konversijos spartą, k_q – nespindulinės relaksacijos spartą, fluoroforo molekulei susidūrus su gesiklio molekule, $k_{photoreact.}$ – fotoreakcijų spartą, k_{EET} – rezonansinės energijos pernašos spartą.

Jei matuojame fluorescencijos intensyvumą, žadindami molekules nuolatine šviesa (pvz., lempa), bandinyje nusistovi pusiausvyra, t.y. $I(t) = const.$, o kairėje pusėje esanti išvestinė lygi nuliui. Tuomet molekulių skaičius sužadintoje būsenoje yra toks:

$$n = \frac{I(t)}{k_{fl} + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q] + k_{photoreact.} + k_{EET}} \quad (33).$$

Fluorescencijos intensyvumą F lemia fluorescencijos sparta, t.y. $F \sim k_{fl}n$. Taigi

$$F \sim k_{fl} \frac{I(t)}{k_{fl} + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q] + k_{photoreact.} + k_{EET}} = \Phi I(t) \quad (34).$$

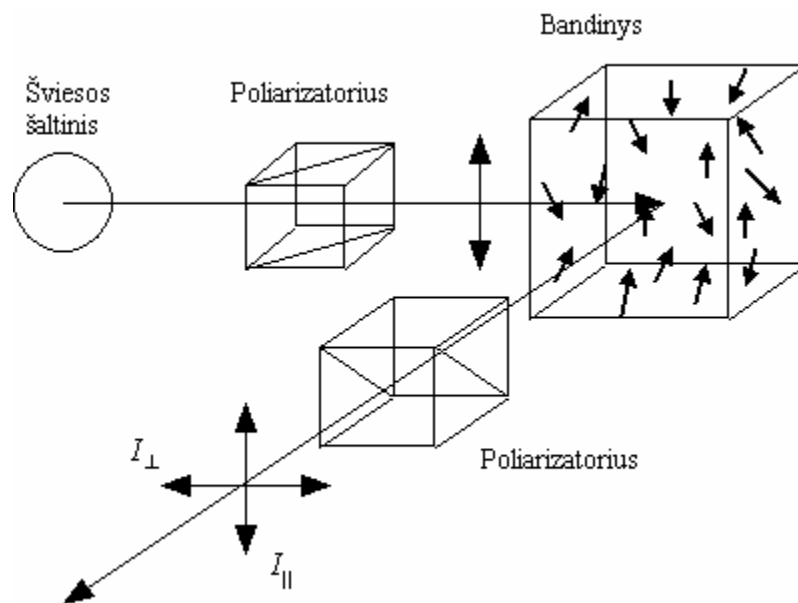
Dydis $\Phi = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ic} + k_{isc} + k_q [Q] + k_{photoreact.} + k_{EET}}$ vadinamas *fluorescencijos kvantiniu našumu*. Jis atspindi fluorescencijos dalį bendroje sužadintos būsenos procesų „puokštėje“.

Fluorescencijos poliarizacija ir anizotropija.

Tiek kalbant apie sugertį, tiek apie fluorescenciją, molekulė paprastai nagrinėjama kaip taškinis dipolis⁴. Taigi, molekulės spinduliuojamos šviesos poliarizacija priklauso nuo molekulės orientacijos. Fluorescencijos dipolinis momentas bendruoju atveju skiriasi nuo sugerties, tačiau yra pigmentu, kur jie labai artimi. Poliarizuotos fluorescencijos nagrinėjimas panašus į tiesinio dichroizmo nagrinėjimą, jį galima rasti literatūroje [11]. Skirtumas tik tas, kad fluorescencijos molekulių nereikia orientuoti – poliarizuota žadinimo šviesa ir taip išrenka iš bandinio molekules, kurių dipolinis momentas lygiagretus šviesos poliarizacijai.

Poliarizacinis fluorescencijos eksperimentas parodytas 17 pav. Jame bandinys žadinamas vertikaliai poliarizuota šviesa, o fluorescencija matuojama pro poliarizatorių, orientuotą lygiagrečiai arba statmenai žadinančios šviesos poliarizacijai.

⁴ Tai galioja ne visada. Tais atvejais, kai sužadinta elektroninė molekulės būsena yra išsigimusi, t.y. susideda iš keleto vienodą energiją turinčių būsenų, dipolinis artinys tokiai molekulei netinka.



17 pav. Poliarizacinis fluorescencijos eksperimentas.

Iš šių dviejų fluorescencijos intensyvumų apskaičiuojama jos anizotropija:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (35)$$

Jei molekulės bandinyje orientuotos netvarkingai ir nejuda (pvz., užšalęs tirpalas), galima parodyti, kad jų fluorescencijos anizotropija lygi 0.4. Jei molekulės juda, dipoliai persiorientuoja ir fluorescencija depoliarizuojasi sparta, lygia rotacinės difuzijos spartai:

$$r(t) = r(0)e^{-\frac{t}{\tau_{rot}}} \quad (36)$$

Taip pat anizotropija gali mažėti, molekulėms keičiantis energijos dėl rezonansinės energijos pernašos – sužadimui migruojant netvarkingai vienas kito atžvilgiu išsidėsčiusiais dipoliais, informacija apie dipolio orientaciją prarandama. Taigi, poliarizuotą fluorescenciją galima panaudoti energijos pernašai ir molekulių rotacinei difuzijai tirti.

Išsami biologinių objektų fluorescencijos metodų apžvalga ir teorinis pagrindimas pateikiamas [11].

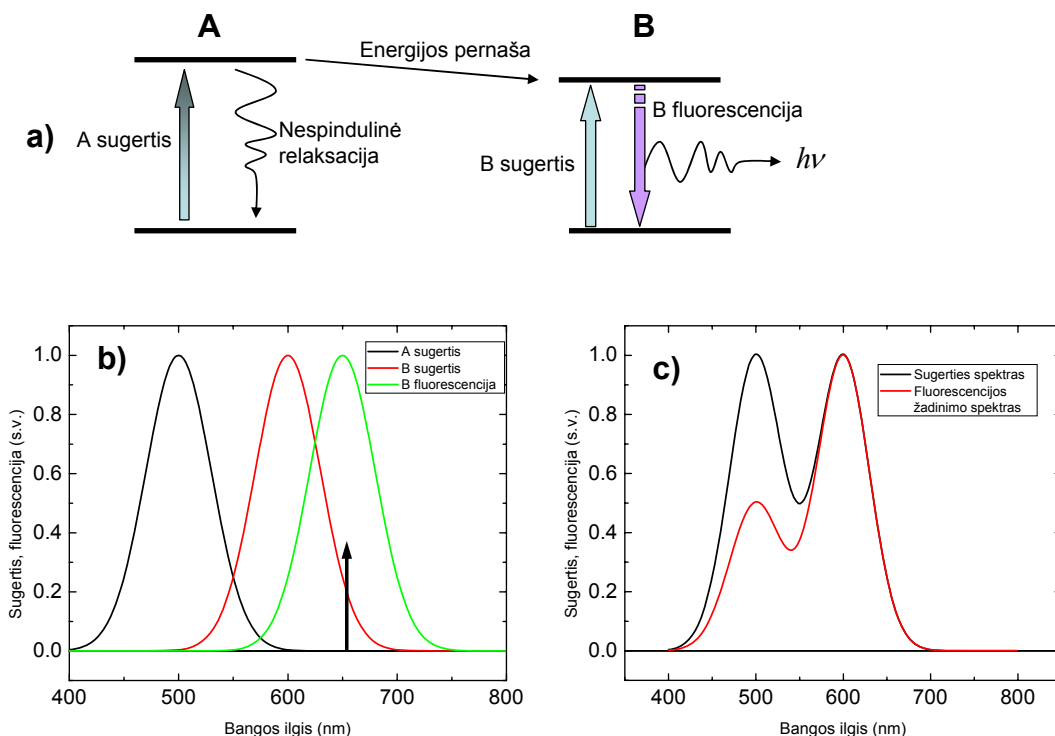
Fluorescencijos žadinimo spektroskopija

Jei žadiname bandinį tam tikro *fiksuoto* bangos ilgio šviesa ir matuojame, kaip molekulės liuminescencijos intensyvumas priklauso nuo *detekcijos* bangos ilgio, gauname *emisijos spektrą*. Kitu atveju, jei fiksuojame *detekcijos* bangos ilgį ir matuojame liuminescencijos intensyvumo priklausomybę nuo *žadinančios šviesos bangos ilgio*, išmatuojame vadinamąjį *fluorescencijos žadinimo spektrą*. Aptarsime pagrindines tokio spektro savybes ir informaciją, kuri iš jo galime gauti.

Pačiu paprasčiausiu atveju, kai galioja Kaša taisyklė, o fluorescencijos spektrinis pasiskirstymas bei kvantinis našumas nepriklauso nuo žadinimo bangos ilgio, vienalyčiame molekulių tirpale fluorescencijos žadinimo spektras sutampa su sugerties spektru. Tai natūralu: žadinant ties tais bangos ilgiais, kur molekulė daugiau sugeria, sužadiname molekules efektyviau ir registruojame intensyvesnę fluorescenciją. Galėtų kilti klausimas: o kam tada matuoti tą žadinimo spektrą, jei jis nesiskiria nuo sugerties spektro? Iš tikro, kai šie spektrai vienodi, prasmės matuoti žadinimo spektrą, nedaug. Tačiau biologiniai objektai yra sudėtingi, juos sudaro daug sąveikaujančių molekulių ir tokiu atveju žadinimo spektras nebesutampa su sugerties spektru, todėl gali suteikti papildomos informacijos. Parodysime tai, pasinaudodami pavyzdžiu. Tarkime, kad bandinyje yra dviejų rūšių molekulės, A ir B, vienos sugeriančios šviesą ties 500 nm, kitos – ties 600 nm, ir sąveikaujančios tarpusavyje taip, kad tarp jų vyksta energijos pernaša. B molekulių fluorescencijos maksimumas yra ties 650 nm (18b pav.). Tokių molekulių spektrai pavaizduoti Apav. Tarkime, kad pernašos efektyvumas yra 0.5 (t.y. pusė sužadintų A molekulių atiduoda sužadimus B molekulėms). Likę A molekulių sužadiniai relaksuoja nespinduliniu būdu (t.y. A molekulių fluorescencija neregistruojama).

Tokio molekulių ansamblio schemos energetinė diagrama ir joje vykstantys procesai pavaizduoti 18a pav. Jei matuosime jo fluorescencijos žadinimo spektrą, detektuodami emisiją ties B molekulės fluorescencijos maksimumu (rodyklė 18b pav.), tai žadindami molekulę A matysime santykinai dvigubai mažiau fluorescencijos, nei žadindami molekulę B. Taip bus dėl to, kad pusė molekulių A grįš į pagrindinę būseną, taip ir neperdavę energijos molekulėms B, ir šios ne fluorescuos. Taigi, žadinimo spektre

A molekūlės juosta bus dvigubai silpnesnė už B molekūlės juostą (18c pav.). Matome, kad fluorescencijos žadinimo spektras leidžia nustatyti energijos pernašos efektyvumą.



18 pav. a) Dviejų molekulių, tarp kurių vyksta energijos pernaša, energetinė diagrama. b) A ir B molekulių sugerties (juoda ir raudona linija) bei B molekūlės fluorescencijos (žalia linija) spektrai. Rodyklė rodo bangos ilgį, ties kuriuo detektuojama fluorescencija, matuojant fluorescencijos žadinimo spektrą. c) molekulių sistemos sugerties spektras (juoda linija) bei atitinkamas fluorescencijos žadinimo spektras.

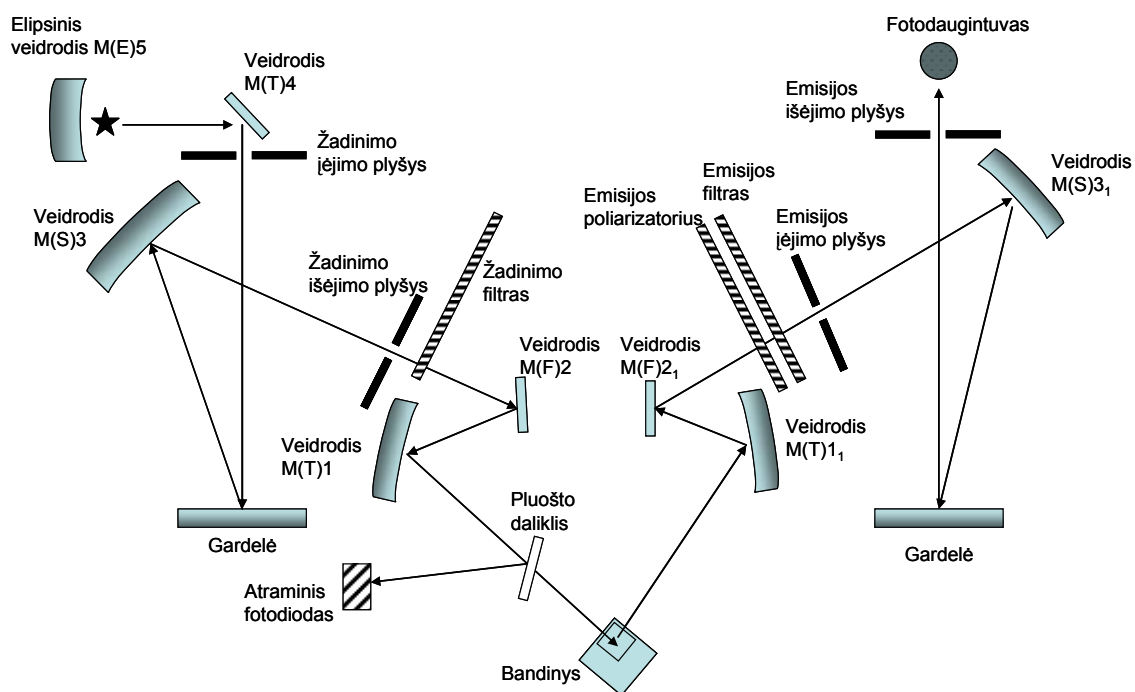
Kita žadinimo spektrų taikymo sritis – tai sudėtingų sistemų, kurias sudaro daugelis chromoforų, analizė. Išmatavus sugerties tokios sudėtingos sistemos sugerties ir fluorescencijos spektrus dažnai lieka neaišku, kurios sugerties juostos atitinka kurias fluorescencijos juostas (t.y., kur sugeria, o kur fluorescuoja tam tikri sudėtingo bandinio pigmentai). Čia vėl ateina į pagalbą žadinimo spektrai: matuodami jų serijas ties skirtingais detekcijos bangos ilgiais, galime atrinkti, kurios sugerties juostos „sukabintos“ su kuriomis fluorescencijos juostomis.

Dar viena sritis, kur žadinimo spektrai yra nepakeičiami – tai pavienių molekulių spektrų matavimas. Fluorescenciniai mikroskopai leidžia registruoti fluorescenciją iš pavienių molekulių. Atskiestame tokių molekulių tirpale, molekūlės matomos kaip

šviečiantys taškai, kurių dydį riboja difrakcija (žr. 37 pav.). Vienos molekulės sugerties spektro išmatuoti spektrofotometru negalime. Tokiais atvejais matuojami jų žadinimo spektrai, kurie vienai molekulei visuomet sutaps su sugerties spektru [12].

Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimas

Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimą išnagrinėsime, remdamiesi fluorimetro Perkin Elmer LS55 optine schema kaip pavyzdžiu. Žinoma, šiai schemai egzistuoja begalė alternatyvų, apie kurias galima pasiskaityti [11].



19 pav. Fluorimetro principinė optinė schema.

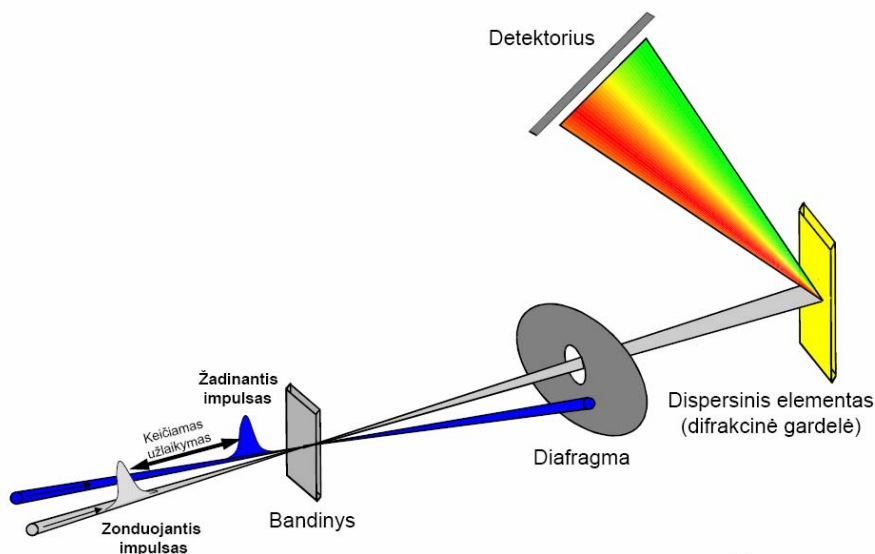
Fluorimetro šviesos šaltinis - ksenono lempa. Šviesa surenkama ir fokusuojama elipsoidiniu veidrodžiu M(E)5 ir toroidiniu veidrodžiu atspindima į žadinančios šviesos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Monochromatorius sudarytas iš įėjimo plyšio, gardelės, sferinio veidrodžio ir išėjimo plyšio. Pro monochromatoriaus išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa, kurios centrinį bangos ilgį nusako gardelės pasukimo kampas. Gardelę sukioja žingsninis variklis. Didžioji žadinančio pluošto dalis toroidiniu veidrodžiu M(T)1 fokusuojama į bandinį, o maža dalis jo energijos pluošto dalikliu

atspindima į atraminį fotodiodą. Detektoriaus atsakas koreguojamas diodo signalo verte. Korekcijos koeficientas nustatomas pagal standartinio dažiklio (rodamino analogo), korekcinę kreivę, įrašytą prietaiso atmintyje. Rodamino dažai sugeria šviesą nuo 230 iki 630 nm bei spinduliuoja apie 650 nm bangos ilgio šviesą su beveik pastoviu kvantiniu efektyvumu.

Bandinio išspinduliuota šviesa fokusuojama toroidiniu veidrodžiu $M(T)1_1$ į emisijos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Emisijos monochromatorių, kaip ir žadinančiosios šviesos monochromatorių, sudaro įėjimo plyšys, sferinis veidrodis $M(S)3_1$, gardelė ir išėjimo plyšys. Pro emisijos monochromatoriaus (taip pat kaip ir pro žadinimo monochromatoriaus) išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa, kurios bangos ilgį nustato gardelės kampas, valdomas žingsniniu varikliuku. Žadinimo ir emisijos monochromatoriai gali skenuoti savo srityse nepriklausomai, sinchroniškai ar tik pažymėtus taškus jų srityse. Skenuojant žadinimo monochromatorių, gaunamas fluorescencijos žadinimo spektras, o detekcijos monochromatorių – emisijos spektras.

Kinetinė spektroskopija

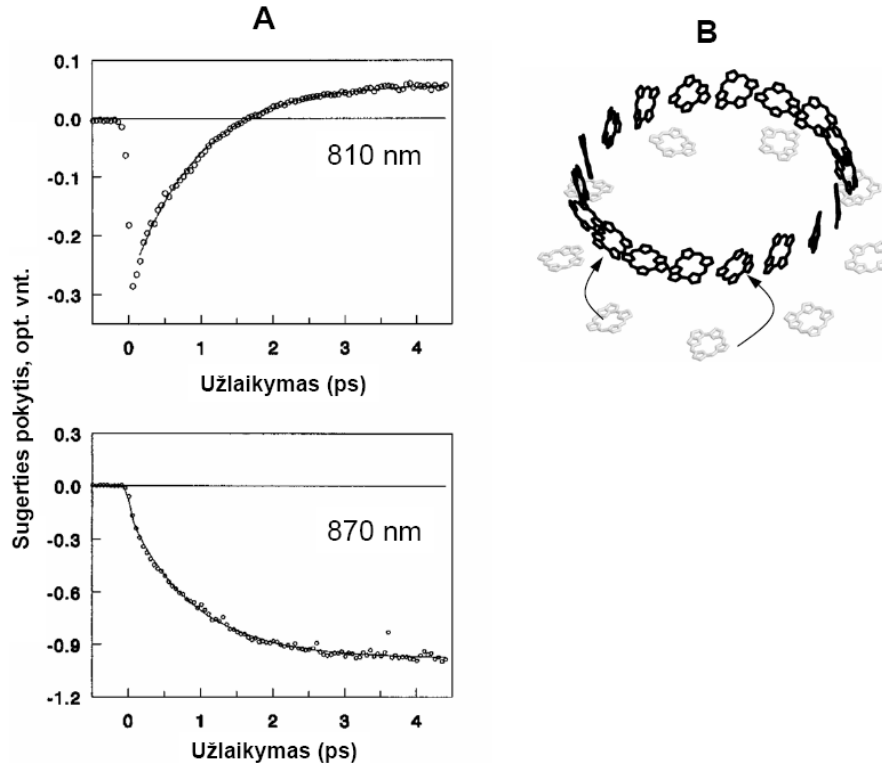
Šviesos sukelti virsmai biologinėse molekulėse gali būti labai greiti: pvz., sužadavimo energijos pernaša tarp chlorofilų užtrunka apie 1 ps (o dažnai ir mažiau), pirminiai krūvio atskyrimo vyksmai reakciniame centre įvyksta vos per keletą pikosekundžių, o *trans-cis* izomerizacija bakteriorodopsine irgi netrunka nė pikosekundės. Stebint tokius sparčius procesus net labai greiti elektroniniai prietaisai praktiškai yra bejėgiai. Tam, kad galėtume stebėti ultrasparčiąsias biologines reakcijas, panaudojami vadinamieji kinetinės spektroskopijos metodai, kurių pagrindinis įrankis yra greičiausias objektas pasaulyje – šviesa. Reakcijoms stebėti panaudojami šiuolaikinių lazerių impulsai (žybsniai), kurių trukmė gali siekti 10 fs (10^{-14} s). Nuodugnai šie metodai aprašomi kinetinės spektroskopijos literatūroje, čia mes aptarsime tik patį principą ir pateiksime pavyzdį.



20 pav. Laiko skyros skirtuminės sugerties eksperimentas.

Vienas iš plačiausiai naudojamų metodų – tai kinetinis skirtuminės sugerties matavimas. Eksperimente naudojami du ultratrumpieji lazerio impulsai: pirmuoju (apibrėžto bangos ilgio, kuris parenkamas taip, kad sužadintų norimą molekulę) pigmentas sužadinamas, o kitas impulsas, kuris ateina praėjus tam tikram laiko tarpui po

pirmojo, matuoja dėl pirmojo impulso poveikio atsiradusį sugerties spektro pokytį, kitaip tariant, sugerties skirtumą tarp sužadinto ir nesužadinto bandinio. Pirmasis impulsas vadinamas žadinančiuoju, o antrasis – zonduojančiu, o ši spektroskopijos metodika vadinama žadinimo-zondavimo spektroskopija. Laiko tarpą tarp šių dviejų impulsų galima keisti, keičiant atstumą, kurį vieno iš impulsų šviesa praeina iki bandinio (per 1 ns šviesa nusklinda 30 cm). Tokio eksperimento principinė schema pavaizduota 20 pav.



21 pav. A: Skirtuminės sugerties eksperimentas fotosintetinės purpurinės bakterijos *Rhodospseudomonas acidophila* šviesą surekančioje antenoje LH2. Viršuje – skirtuminės sugerties kinetika ties bangos ilgiu atitinkančiu B800 bakteriochlorofilų (struktūroje pavaizduoti pilka spalva) žiedą. Apačioje – signalas ties B850 chlorofilų (juoda spalva) sugertimi (B): LH2 komplekso struktūra. Rodyklės rodo stebimą energijos pernašos procesą.

Vienas iš pagrindinių signalų, stebimų skirtuminės sugerties eksperimente - vadinamasis bandinio praskaidrėjimo signalas. Sužadinus pigmentą, jis pakeičia savo elektroninę būseną, o kartu pasikeičia ir jo sugerties spektras, taigi ten, kur jis sugėrė būdamas nesužadintas, jis nebesugeria. Dėl to ties bangos ilgiais, kur šis pigmentas paprastai sugeria šviesą, stebimas sugerties sumažėjimas. Jei šis pigmentas perduoda sužadinimo energiją kitam, mažesnės energijos pigmentui, jo sugertis atsistato, o pigmento, gavusio energiją – sumažėja. Taigi, stebint įvairių pigmentų sugerties kitimą,

galima sekti energijos pernašą fotosintetiniuose kompleksuose ir nustatyti jos greičius. Tokio eksperimento pavyzdys, kurį atliko J.Kennis su bendraautoriais [13], pateiktas 21A pav. Žadinančio impulso bangos ilgis buvo nustatytas ties 810 nm, kad sužadintų pigmentų žiedą, 21B pav. pavaizduotą pilka spalva. Sužadinus šiuos pigmentus, jų sugertis iš karto sumažėja (t.y., išmatuotas sugerties skirtumas tampa neigiamas – žr. viršutinę kreivę 21A pav.), tačiau per maždaug 900 fs jis išnyksta (t.y. sugertis atsistato). Sugertis ties 870 nm, kur sugeria juoda spalva pavaizduoti pigmentai, pradžioje išlieka nepakitusi (tai natūralu – juk šių pigmentų žadinantis impulsas neveikia), tačiau per tiek pat laiko (900 fs), jau čia atsiranda neigiamas sugerties pokytis (praskaidrėjimas). Taip yra todėl, kad ties 810 nm sugeriantys pigmentai (pilka spalva) perduoda sužadinimo energiją pigmentams, sugeriantiems ties 870 nm (juoda spalva).

Kinetinės spektroskopijos metodais galima matuoti ne tik sugerties, bet ir fluorescencijos signalus. Sužadinus bandinį trumpu lazerio impulsu, stebima jo fluorescencija, taip gaunant informacijos apie sužadintos būsenos dinamiką.

Optinė mikroskopija ir jos biologiniai taikymai

Ivadas

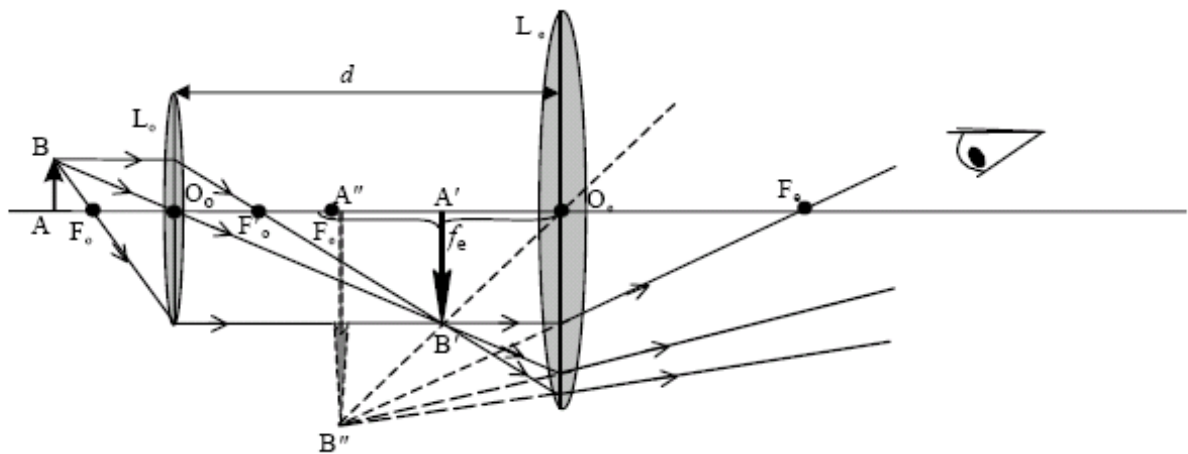
Jau senovės graikų filosofai, prieš daugiau kaip du tūkstančius metų, suprato, kad juos supančios medžiagos yra nevienalytės ir gali būti išskaidytos į labai mažas, akimi nematomas dalis. Žmogaus akis yra gana sudėtingas organas, galintis suteikti žmogui įvairios informacijos apie jį supantį pasaulį. Akis suteikia informaciją tokią kaip šviesos intensyvumas, spalva, atstumas iki regimo objekto, objektų judėjimas ir kt. Tačiau šio organo galimybės yra ribotos. Vienas iš akies trūkumų, analizuojant mus supantį pasaulį, yra ribota skiriamoji geba, t.y. mažiausias atstumas tarp stebimo objekto elementų, kuriam esant tie elementai dar gali būti atskiriami vienas nuo kito. Akis dar gali atskirti objektus nutolusius vienas nuo kito apie 0,1 mm, kai stebima optimaliu atstumu (apie 25 cm). Tačiau pasaulyje egzistuoja daug objektų, kurie yra daug mažesni nei gali skirti akis (mikroorganizmai, daugelio augalų ir gyvūnų ląstelės, smulkūs kristalai, metalų ir mikrostruktūrų detalės ir kt.). Todėl privalėjo atsirasti kitokie vizualinės informacijos gavimo būdai, kurie šiuo metu ir naudojami mikroskopinių struktūrų ir biologinių objektų optinių metodų tyrimams. Vienas iš pagrindinių įrankių šiose tyrimuose yra mikroskopas (gr.: *μικρόν* (*micron*) = mažas + *σκοπεῖν* (*skopein*) žiūriu, stebiu).

Tobulėjant technologijoms, atsirado įvairių mikroskopinių tyrimo metodų. Mikroskopai naudojami daugelyje sričių, tarp jų mikrobiologijoje, elektronikoje, mikrochirurgijoje, tiriant maisto produktų kokybę, nustatant medikamentų klastotes bei mažus medžiagų paviršių defektus. Šiuo metu yra įvairių mikroskopinių tyrimo metodų, tačiau nėra nė vieno universalus, kuris leistų visapusiškai stebėti mikroobjekto charakteristikas. Todėl norint visapusiškai apibudinti tiriamą objektą tenka remtis įvairių mikroskopinių tyrimų duomenimis.

Paprasčiausio mikroskopo konstrukcija

Pagrindinės mikroskopo optinės sistemos sudėtinės dalys yra objektyvas L_o ir okuliaras L_e . Sistemos dalis supančios terpės turi vienodą lūžio rodiklį. Dažniausiai lęšiai

parenkami taip, kad okuliario židinio nuotolis būtų didesnis už objektyvo, t.y. $f_e > f_o$. Stebimas objektas AB padedamas prieš objektyvą šiek tiek didesniu nei jo židinio nuotolis f_o atstumu. Tuomet stebėtojas per okuliarą kaip per lupą regi tikro, apverstos bei padidinto objekto atvaizdo $A'B'$, dažniausiai susidarančio netoli okuliario židinio F_e (nes akis būna neįtempta, kai objektyvo suformuotas atvaizdas yra okuliario židinio plokštumoje), dar labiau padidintą atvaizdą $A''B''$. Jei atvaizdas $A'B'$ susidarys okuliario židinio F_e dešinėje (arčiau okuliario), tai regimas atvaizdas $A''B''$ bus menamas ir apverstas objekto atžvilgiu. Jei $A'B'$ susidarys okuliario židinio F_e kairėje, nutolęs nuo okuliario atstumu ne didesniu nei $2f_e$, tai atvaizdas $A''B''$ bus tikras ir neapverstas. Tokios suderintos optinės sistemos panaudojamos mikrofotografijai bei darant mikroprojekcijas. Pagrindinės mikroskopą apibūdinančios charakteristikos yra mikroskopo skyra ir didinimas, sąlygotos mikroskopo optinę sistemą sudarančių lęšių parametru.



22 pav. Šviesos spindulių eiga mikroskope.

Optinio mikroskopo charakteristikos

Viena svarbiausių mikroskopo savybių yra jo tiesinis didinimas. Mikroskopo, sudaryto iš objektyvo ir okuliario didinimas skaičiuojamas dauginant abiejų dalių (L_e ir L_o) didinimus. Šiuolaikinių optinių mikroskopų didinimas gali siekti iki 1500 kartų.

Mikroskopo didinimą galima apskaičiuoti pasinaudojus tokia formule:

$$N = N_o \cdot N_e = \frac{l}{f_e} \left(\frac{\Delta + f_o}{p} \right) \quad (37);$$

čia Δ - objektyvo optinis ilgis (atstumas nuo židinio iki atvaizdo), p – atstumas tarp objekto ir objektyvo, l – geriausio matymo nuotolis.

Jei objektyvo židinyje yra mažas palyginus su mikroskopo optiniu ilgiu ($\Delta + f_o \cong \Delta$), o objektas yra beveik objektyvo židinyje ($p \cong f_o$), tuomet, žinant geriausio matymo atstumą, didinimą galima apskaičiuoti pagal formulę

$$N = \frac{l \cdot \Delta}{f_e \cdot f_o} \quad (38).$$

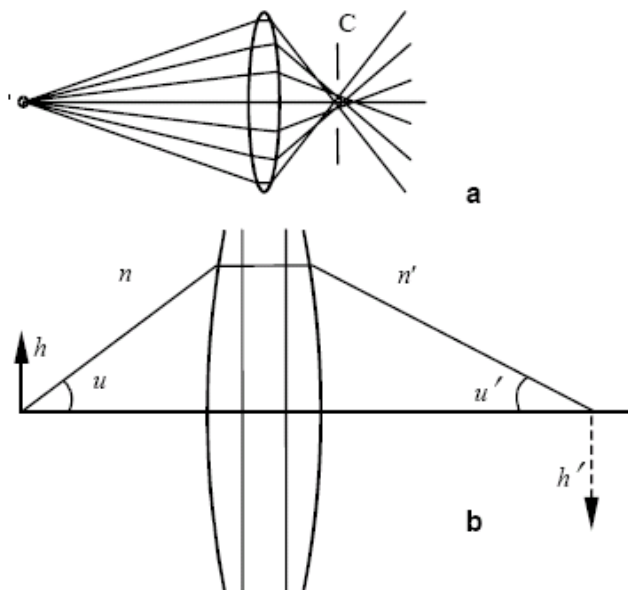
Matyti, kad didinimą galima padidinti mažinant objektyvo ir okuliario židinio nuotolius. Taip ir yra daroma gaminant naujus mikroskopus. Šiuolaikiniuose mikroskopuose naudojamos objektyvo ir okuliario optinės sistemos, sudarytos iš kelių lęšių. Tai daroma norint sumažinti sferinių ir spalvinių iškreipimų (aberacijų) efektus. Taip pat naudojamas pastovus ir reguliuojamas intensyvumo šviesos šaltinis.

Viena iš pagrindinių aberacijų, veikiančių mikroskopo kuriamo vaizdo kokybę, yra sferinė aberacija, atsirandanti todėl, kad lęšiai nėra be galo ploni ir nevienodai laužia spindulius, einančius netoli jų optinės ašies (paraksialinius) bei pro lęšio kraštą (marginalinius). Šią aberaciją nagrinėjęs E. Abė dar XIX amžiuje suformulavo gero atvaizdo sąlygą (Abės sinusų sąlyga):

$$\frac{h'}{h} = \frac{n \cdot \sin u}{n' \cdot \sin u'};$$

čia h ir h' – objekto ir jo atvaizdo ilgiai, n ir n' – terpių iš objekto ir atvaizdo pusės lūžio rodikliai, u ir u' apertūros kampai (23 pav.).

Ši sąlyga nusako plokštumų poras, kurioms gaunamas plokštumos elementų atvaizdas be aberacijų. Tokia jungtinių plokštumų pora vadinama *aplanatinių plokštumų* pora. Taigi mikroskope ryškus daikto atvaizdas sukuriamas tada, kai daiktas yra mikroskopo optinės sistemos aplanatiniame taške.



23 pav. Sferinė aberacija (a); objektyvo aplanatiniai taškai, kuriuose tenkinama Abės sinusų sąlyga.

Dar viena svarbi mikroskopo charakteristika yra skiriamoji geba. Ji nusako koku atstumu esančius vienas nuo kito objektus dar galima išskirti. Labai arti esančių objektų atvaizdai susilieja, pasireškia difrakcija, didinat objektus, jų išskirti vis tiek nepavyks.

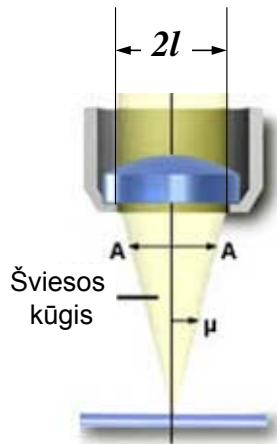
Panagrinėkime objektyvą, surenkantį šviesą iš taškinio šaltinio. Jei objektyvas apvalus, o jo spindulys l , tai jį pasiekiantis šviesos kiekis bus proporcingas objektyvo plotui πl^2 . Išreiškę jį per apertūrinį kampą μ , t.y. kampą, kuriuo objektyvas matomas iš taškinio šaltinio surandame, kad objektyvą pasiekiančios šviesos intensyvumas yra

$$I \sim \pi l^2 \sim \sin^2 \mu \quad (39).$$

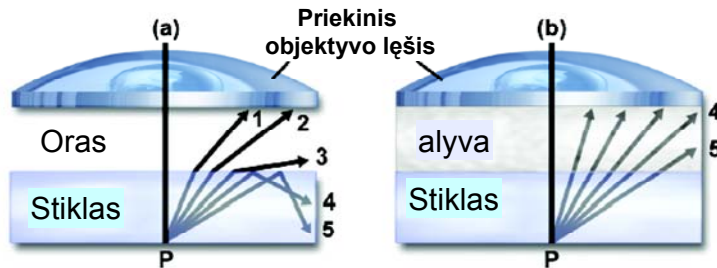
Dydis

$$A = n \cdot \sin u \quad (40)$$

vadinamas objektyvo skaitine apertūra (kartais žymima NA nuo angl. *numerical aperture*). Ji nusako taškinio šviesos šaltinio spinduliuojamą galią, kurią sugeba surinkti objektyvas. Formulėje (40) n – terpės, esančios tarp objekto ir objektyvo lūžio rodiklis. Kaip matome iš 25 pav., imersijos terpė padidina surenkamos šviesos kiekį, pašalindama spindulių lūžį, dėl kurio dalis šviesos „sauso“ objektyvo nepasiekia



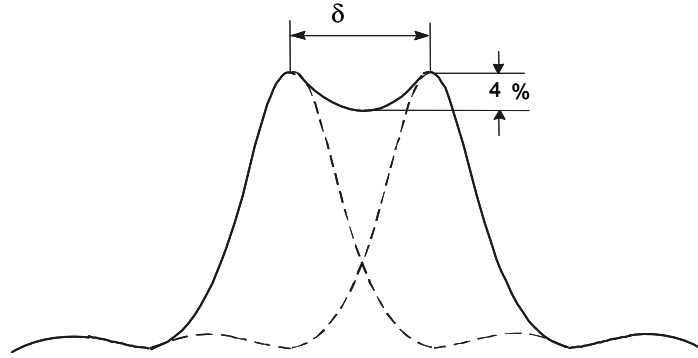
24 pav. Skaitinė objektyvo apertūra ir apertūrinis kampas



25 pav. Imersijos alyvos poveikis objektyvo surenkamos šviesos kiekiui.

Difrakcija yra bet koks šviesos nukrypimas nuo tiesaus sklidimo, nepaaiškinamas atspindžiu ir lūžiu. Be galo mažo taško atvaizdas, praėjęs mikroskopo optinę sistema, bus šviesus diskas (vadinamasis Erio (Airie) diskas), apsuptas tamsiais ir šviesiais žiedais. Šio disko skersmuo bus lygus $d = 1.22 \cdot \lambda / n \cdot \sin u$. Tai ir lemia mikroskopo skiriamąją gebą. Ją galima apibudinti kaip mažiausią atstumą (δ), kuriuo nutolusius objektus dar galima atskirti viena nuo kito. Dar arčiau esančių objektų atskirti jau nebeįmanoma, nes jų kuriami difrakciniai vaidai persikloja. Tokiu atveju bus matomas tik vienas taškas, objektų atvaizdai bus susilieję. Pagal Relėjaus sąlygą (mažiausias santykinis apšvietimo pokytis, kurį gali skirti akis yra 4%), kai objektas yra netoli objektyvo židinio:

$$\frac{1}{R} = \delta = 0.42d = \frac{0.51\lambda}{n \cdot \sin u};$$



26 pav. Artimų taškų atspindėtos šviesos intensyvumo pasiskirstymas ribiniu atveju

čia n – terpės tarp objekto ir objektyvo lūžio rodiklis, u – apertūrinis kampas (pusė kampo tarp šviesos pluošto kūgio kraštinių spindulių, sklindančių iš objekto mikroskopinių elementų ir patenkančių į objektyvą).

Taigi mikroskopo skiriamąją gebą (R), kuri yra atvirkščiai proporcinga δ , galime padidinti didindami skaitinę apertūrą arba mažindami naudojamos šviesos bangos ilgį. Kadangi akis sugeria šviesą tik ribotoje bangos ilgių srityje, šviesos bangos ilgio mažinti be galo negalime. Norint matyti dar smulkesnius darinius reikėtų naudoti kitokias registravimo priemones.

Galima įvertinti mažiausią išskiriamą atstumą tarp tiriamo objekto elementų. Maksimalus galimas apertūrinis kampas yra apie 70° , ribinis matomos šviesos bangos ilgis apie 450nm , aplinkos lūžio rodiklis $1,5$ (naudojant imersinį skystį), tada mikroskopo ribinis atstumas tarp išskiriamų elementų bus $0,2\mu\text{m}$ (naudojant orą vietoj imersinio skysčio $0,3\mu\text{m}$). Nors šis atstumas nuo didinimo nepriklauso, tačiau praktiškai gali jį riboti.

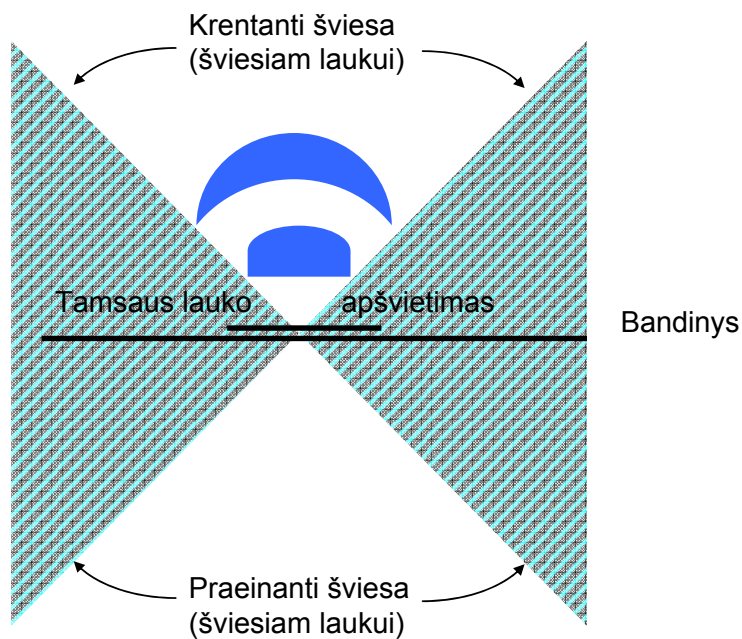
Visiškai įvertinant skiriamąją gebą, reikia žinoti mikroskopo naudingą didinimą. Buvo nustatyta, kad jis lygus $500A \div 1000A$. Naudojant mažesnę didinimą nei $500A$ neišnaudojamos visos objektyvo galimybės, o naudojant didesnę nei $1000A$ nebeišryškėja naujų struktūrinių elementų (matomas tik susidarantis difrakcinis vaizdas).

Kadangi dėl difrakcijos ribojama optinio mikroskopo skiriamoji riba, ląstelės smulkiųjų dalių ir kitų smulkių struktūrų tyrimam jie nenaudojami. Objekto struktūra pastebima pro mikroskopą tik jei jos elementai (arba aplinka) tarpusavyje skiriasi šviesos

sugertimi, lūžio rodikliu ar atspindžiu. Norint išskirti šiuos elementus buvo sukurta daug įvairių stebėjimo metodų. Jie parenkami atsižvelgiant į objekto pobūdį.

Šviesaus ir tamsaus lauko mikroskopija

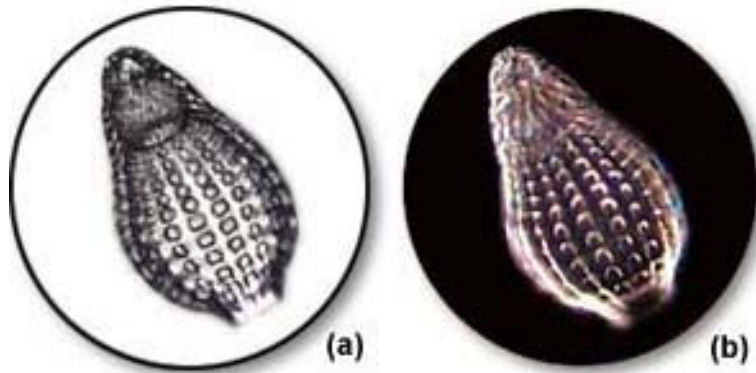
Pirmiausia aptarkime mikroskopijos rūšis, kuriose objektas, sąveikaudamas su apšvietimo šviesa, keičia jos amplitudę ir/arba kryptį. Tokios mikroskopijos rūšys apibendrintos 27 pav.



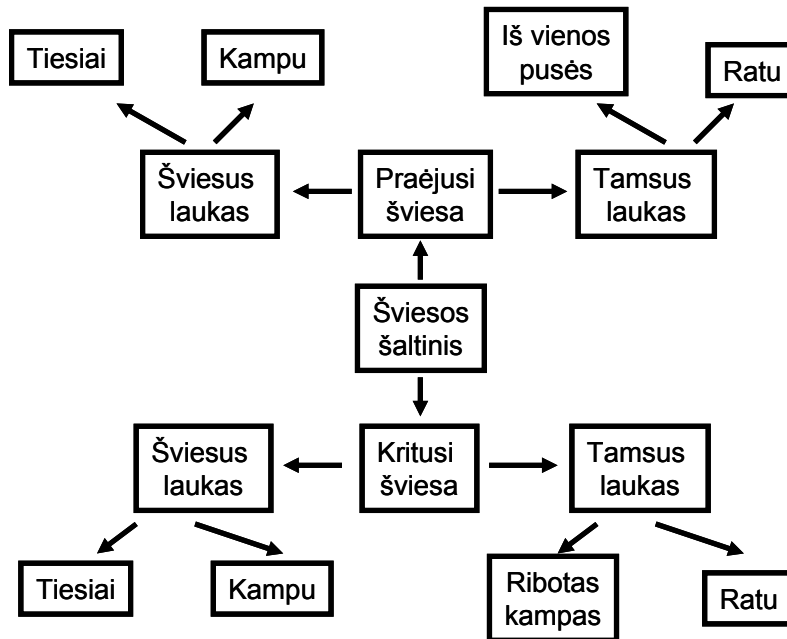
27 pav. Šviesaus ir tamsaus lauko apšvietimas mikroskopuose

Bandinys gali į objektyvą atspindėti iš viršaus į jį krentančią šviesą arba praleisti iš apačios ateinančią. Abiem šiais atvejais metodas vadinamas šviesaus lauko mikroskopija. Jei į bandinį krentanti šviesa šiaip jau nepasiektų objektyvo, tačiau išsisklaidžiusi ar atsispindėjusi nuo bandinio ji pakliūva į objektyvą, toks metodas vadinamas tamsaus lauko mikroskopija. Abiem šiais atvejais bandinį galima apšviesti tiek kampu, tiek iš visų pusių, taigi galimų mikroskopo ir bandinio apšvietimo konfigūracijų yra daug. Jos parodytos schemoje 29 pav. Aišku, kad tiriant nepermatomus bandinius, jų iš apačios apšviesti neišeina ir belieka apšvietimas iš viršaus.

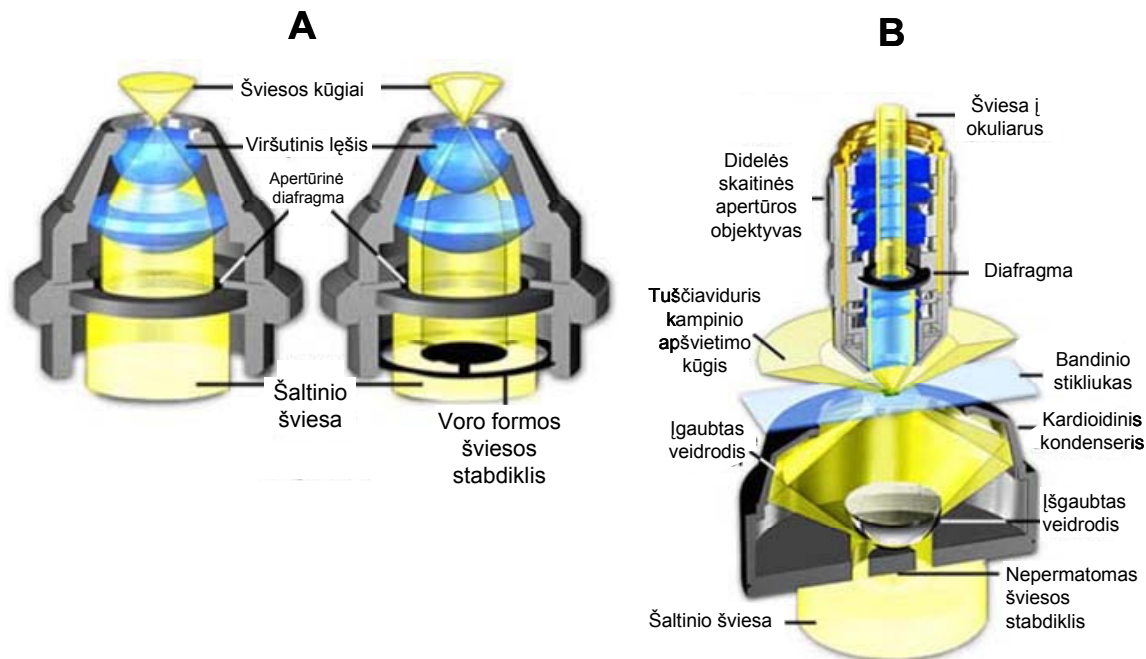
Tamsus laukas kartais leidžia pasiekti geresnį kontrastą nei šviesus (28 pav.), ypač tiriant objektus „su aštriais kampais“, nes tada vaizdo neužgožia foninė šviesa, o „aštrūs kampai“ efektyviai sklaido ar difraguoja šviesą į objektyvą. Techninė tamsaus lauko mikroskopo realizacija parodyta 30 pav. Centrinė ateinančio šviesos pluošto dalis užblokuojama, o kondenserio lęšiai arba veidrodžiai suformuoja „tuščiavidurį“ šviesos kūgį, kuris, jei nesąveikauja su bandiniu, „apeina“ mikroskopo objektyvą. Tik šviesa, kuri lūžta, sklaidosi ar difraguoja, patenka į objektyvą.



28 pav. Pirmuonies *Radiolaria* mikronuotrauka šviesiame lauke (a) ir tamsiame lauke (b). Matome, kad „galvos“ detalės geriau išsiskiria naudojant tamsaus lauko apšvietimą. Pagal www.olympusmicro.com



29 pav. Šviesaus ir tamsaus lauko apšvietimo būdai mikroskopuose



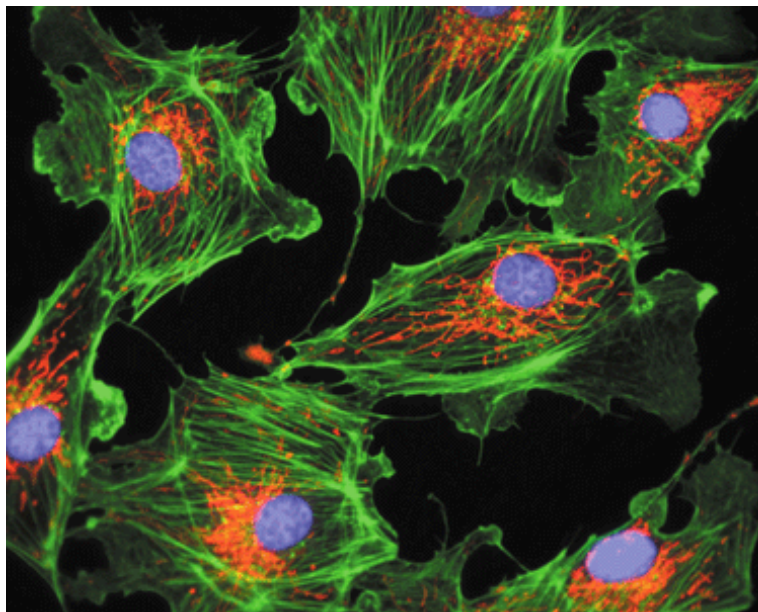
30 pav. Mikroskopo apšvietimo schema (kondensieris), leidžianti išgauti tamsaus lauko apšvietimą. A) Nedidelės skaitinės apertūros objektyvui; B) Didelės (>0.5) skaitinės apertūros objektyvui.

Apie šviesaus ir tamsaus lauko mikroskopijos panaudojimą informacijos rasite specialioje literatūroje [14, 15]. Ten pat nuodugniai apžvelgiamos kitos optinės mikroskopijos rūšys, tokios kaip fazinio kontrasto mikroskopija ir diferencinio interferencijos kontrasto (DIC) mikroskopija. Čia toliau susitelksime ties fluorescencijos mikroskopija ir jos taikymais, nes turbūt būtent ši mikroskopijos šaka plačiausiai taikoma biologinių objektų tyrimams.

Fluorescencijos mikroskopija

Vienas iš būdų, kuriais sužadintos molekulės gali prarasti sužadinimo energiją, yra fluorescencija, t.y. energijos atidavimas, išspinduliuojant fotoną. Molekulių fluorescencijos spektrai paprastai aiškinami ir interpretuojami naudojantis Jablonskio diagrama (žr. 2 pav. ir skyrelį apie biomolekulių spektroskopiją). Biologiniams bandiniams tirti fluorescencijos mikroskopija dažnai naudojama todėl, kad šis metodas yra lankstus: molekulių grupes, kurias stebime, galime pasirinkti ir pagal žadinimo (sugertis), ir pagal fluorescencijos bangos ilgį. Fluorescencijos mikroskopijai būdingas ir labai didelis kontrastas, palyginti su kitomis mikroskopijos rūšimis, nes panaudojant

specialius optinius elementus vaizdui formuoti atrenkama tik tam tikro bangos ilgio šviesa. Jei registruojama paties biologinio objekto molekulių fluorescencija (tai gali būti kolagenas, triptofanas, NADH, endogeniniai pigmentai, tokie, kaip, pvz., chlorofilai ir kt.), tokia fluorescencija vadinama autofluorescencija. Jei biologinis objektas nudažomas specialiais fluorescuojančiais dažikliais, turime vadinamąją sensibilizuotąją fluorescenciją. Dažikliai tokiu atveju vadinami sensibilizatoriais. Įvairių sensibilizatorių panaudojimas patogus tuo, kad įvairūs dažikliai selektyviai jungiasi prie tam tikrų ląstelės organelių, tam tikrų baltymų, ima fluorescuoti, susijungę su tam tikrais jonais ir pan. Taigi, juos galima naudoti kaip „reporterius“, pranešančius apie medžiagų judėjimą, koncentraciją ir lokalizaciją bandinyje. Paveikslėlyje (31 pav.) parodytos jaučio plaučių arterijos endotelio ląstelės, kuriose trimis skirtingais dažikliais nudažytos skirtingos ląstelės organelės.



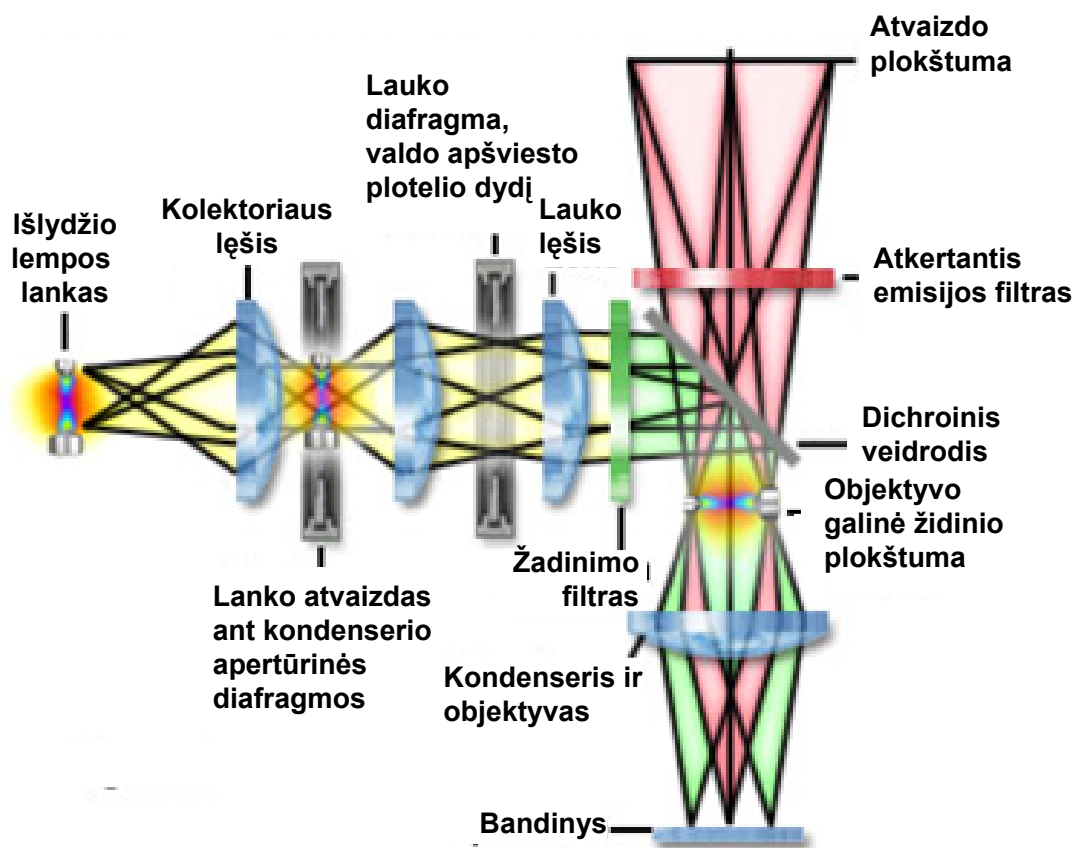
31 pav. Jaučio plaučių arterijos endotelio ląstelės. Branduoliai nudažyti markeriu DAPI, fluorescuojančiu mėlyna spalva, mitochondrijos – CMXRos (fluorescuoja raudonai), o aktino skaidulos – faloidinu, prie kurio prijungtas žaliai šviečiantis markeris eozinas.

Fluorescencinio mikroskopo konstrukcija: optinė schema

Paprasciausio fluorescencinio mikroskopo optinė schema parodyta 32 pav. Išlydžio lempos lanko šviesa surenkama kolektoriaus lęšių ir lanko atvaizdas suformuojamas ant apertūrinės kondenserio diafragmos. Reguluojant šios diafragmos diametrą, galime

valdyti šviesos kiekį, kuriuo apšviečiame bandinį. Toliau šviesos pluoštas kolimuojamas ir sukolimuoto pluošto kelyje statoma lauko diafragma, kuri leidžia parinkti, kurią mikroskopo darbinio lauko dalį apšvies lempos šviesa. Lauko lęšis vėl suformuoja išlydžio lanko atvaizdą objektyvo galinėje židinio plokštumoje, o objektyvas šią šviesą vėl kolimuoja, t.y. bandinys apšviečiamas beveik lygiagrečiu pluošteliu. Tokia apšvietimo schema vadinama Köhler'io apšvietimu. Pakeliui į bandinį žadinimo filtru parenkamas norimas žadinimo bangos ilgis ir žadinimo šviesa atspindima dichroiniu veidrodžiu, t.y. veidrodžiu, kurio danga padaryta taip, jog atspindėtų žadinimo bangos ilgį bei praleistų fluorescencijos bangos ilgį.

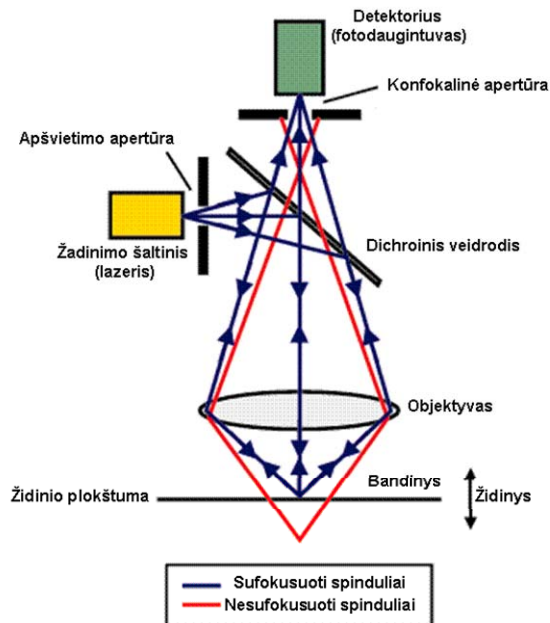
Bandinio išspinduliuotą šviesą surenka objektyvas, kuris suformuoja bandinio atvaizdą atvaizdo plokštumoje. Ši plokštuma paprastai yra 16 arba 20 cm nuo objektyvo; yra ir vadinamieji į begalybę sukoreguoti objektyvai, kurių atvaizdas formuojamas begaliniam atstume nuo jo, t.y. už objektyvo spinduliai sklinda lygiagretūs. Tada atvaizdas formuojamas papildomu lęšiu. Kadangi lyginant su žadinimo bangos ilgiu, išfluorescuotos šviesos bangos ilgis yra didesnis (Stokso dėsnis), tai *tik fluorescencijos, bet ne žadinimo* šviesa praeina pro dichroini veidrodį. Kad žadinimo šviesa į atvaizdo plokštumą visai nepatektų, užtikrina atkertantis fluorescencijos filtras. Atvaizdo plokštumoje statomas registravimo įrenginys (paprastai CCD kamera), kuriuo ir registruojamas fluorescencijos vaizdas. Kadangi apšviečiamas visas bandinys iš karto, o fluorescencija surenkama iš viso bandinio ploto, tokia apšvietimo schema vadinama plataus lauko apšvietimu.



32 pav. Principinė optinio fluorescencinio mikroskopo su plataus lauko žadinimu schema. Pagal www.olympusmicro.com.

Konfokalinis skenuojantis mikroskopas

Klasikinė plataus lauko fluorescencijos mikroskopo schema tinka tuomet, kai bandinys yra labai plonas, pvz., ląstelių monosluoksnis ant petri lėkštelės. Tačiau vaizdinant storesnius objektus susiduriama su problema: žadinimo šviesa sužadina ne tik molekules, esančias objektyvo židinyje, bet ir esančias aukščiau bei žemiau jo. Šios molekulės taip pat fluorescuoja ir nesufokusuota fluorescencijos šviesa pakliūva į registracijos sistemą. Dėl to stebimas neryškus, „išsiterlojęs“ vaizdas. Šį trūkumą pašalinti leidžia skenuojantis konfokalinis fluorescencijos mikroskopas. Jo principinė schema parodyta 33 pav.



33 pav. Principinė konfokalinio fluorescencinio mikroskopo. Pagal www.olympusmicro.com.

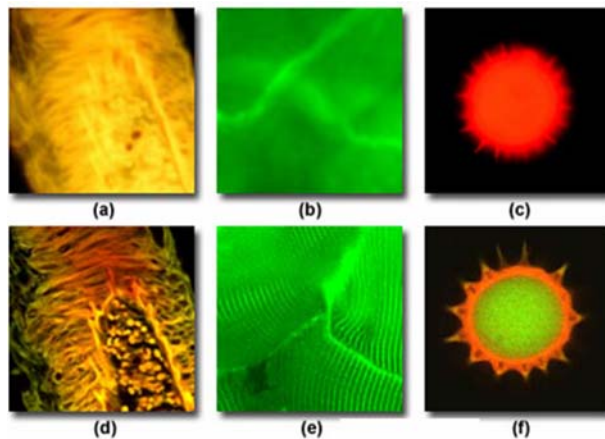
Konfokaliniame mikroskope bandinys apšviečiamas ne plačiu lygiagrečių spindulių pluoštu, kaip standartiniame plataus lauko mikroskope, o sufokusuotu lazerio spinduliu, t.y. vietoje didelio ploto fluorescencija žadinama tik viename bandinio taške (34 pav.). Objektyvo atvaizdo plokštumoje įdedama ribojanti apertūra (apie 100 μm diametro skylutė). Šiuo atveju žadinimo spindulys taip pat sužadina fluorescenciją molekulių, esančių virš objektyvo židinio taško bei po juo, tačiau jų išspinduliuota šviesa į detektorius nepakliūva, nes toje erdvės vietoje, kur yra ribojanti apertūra, ji nėra sufokusuota. Sufokusuota yra tik objektyvo židinyje esančių molekulių išspinduliuota šviesa, ji ir praeina pro skylutę, už kurios statomas jautrus detektorius – griūtinis fotodiodas arba fotodaugintuvas. Taigi detektorius registruoja tik židinio taške išspinduliuotą šviesą.



34 pav. Bandinio apšvietimas plataus lauko (kairėje) ir konfokaliniame mikroskope. Pagal www.olympusmicro.com.

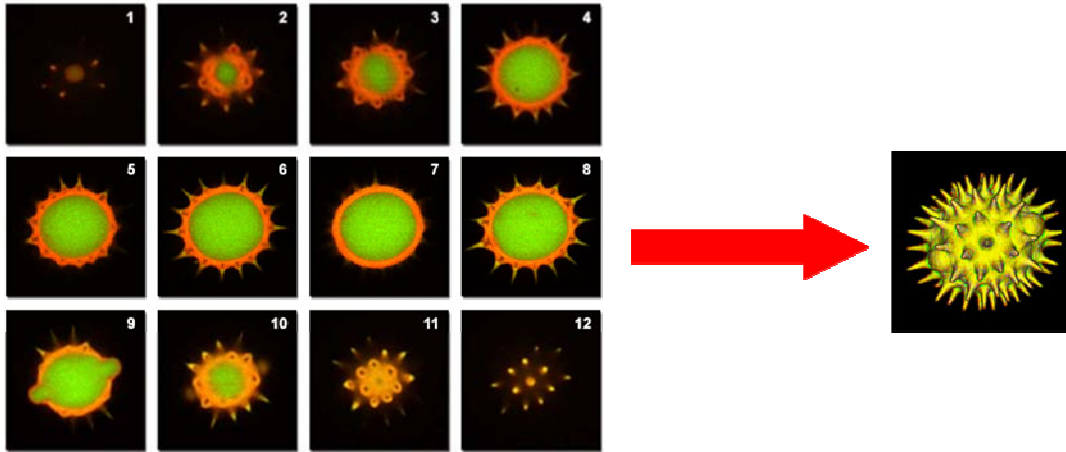
Kadangi konfokalinėje schemoje registruojama šviesa tik iš vieno židinio taško, vaizdas gaunamas judinant bandinį arba žadinantį lazerio spindulį. Bandinys skenuojamas preciziniu pjezoelektriniu trijų koordinačių staliuku, o lazerio spindulys paprastai nukreipiamas galvanometriškai valdomais veidrodžiais. Tokiau išvardinsime keletą konfokalinės mikroskopijos privalumų, lyginant su plataus lauko mikroskopija.

1. Atsikratoma šviesos, ateinančios ne iš objektyvo židinio ir gaunami ryškesni vaizdai. Paveikslėlyje (35 pav.) parodyta keleto biologinių bandinių fluorescencijos vaizdai, užregistruoti plataus lauko ir konfokaliniu mikroskopu. Akivaizdu, kad atsikračius šviesos, ateinančios iš bandinio sluoksnių, esančių ne židinyje, vaizdai gaunami detalesni.



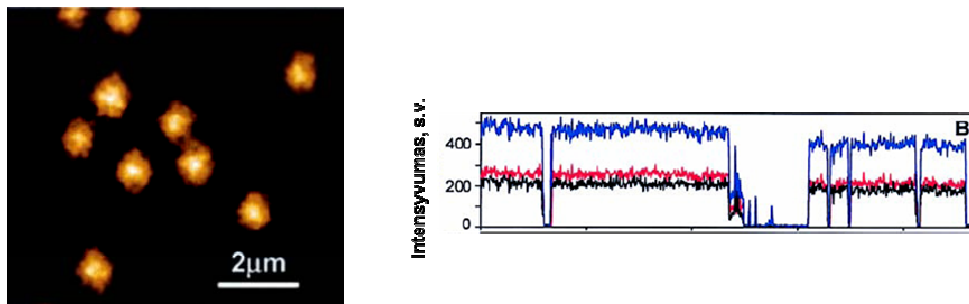
35 pav. Skirtumas tarp vaizdų, gautų plataus lauko (viršuje) ir konfokaliniu skenuojančiu (apačioje) mikroskopu: a, d: žmogaus kaulų čiulpai; b, e: triušio raumuo, nudažytas fluoresceinu; c, f: saulėgražos žiedadulkė. Pagal www.olympusmicro.com.

2. Galima daryti optinius bandinio pjūvius z kryptimi. Keičiant fokusavimo gylį, konfokalinis mikroskopas išrenka vis kitas bandinio plokštumas, iš kurių vaizdų, pasinaudojant specializuota programine įranga galima rekonstruoti trimatį bandinio vaizdą (36 pav.)



36 pav. Trimačio saulėgražos žiedadulkės vaizdo rekonstrukcija iš z pjūvių, užregistruotų konfokalinio skenuojančio mikroskopo. Pagal www.olympusmicro.com.

3. Erdvinis šviesos filtravimas labai sumažina triukšmus ir gaunamas geresnis signalo ir triukšmo santykis. Todėl konfokalinio fluorescencinio mikroskopo galima stebėti net pavienes molekules. Tam molekulių tirpalas praskiedžiamas tiek, kad i mikroskopo darbinį lauką patektų tik keletas ar kelios dešimtys molekulių (pav.). Žinoma, tai nereiškia, kad optinio mikroskopo skyra leidžia išskirti arti esančias molekules, bet jei jos viena nuo kitos toli, kiekviena jų atrodys kaip šviečiantis taškas, kurio matmenis riboja difrakcija. Kad tai pavienės molekulės, o ne molekulių grupė, galima nustatyti iš jų fluorescencijos išblyškimo dinamikos: kai molekulė pereina į nefluorescuojančią būseną (pvz., tripletinę), užgęsta visas stebimas fluorescencijos signalas.



37 pav. Pavienių molekulių grupės vaizdas, užregistruotas konfokalinio optinio mikroskopo (dešinėje). Kairėje parodyta fluorescencijos intensyvumo dinamika, iš kurios matome, kad molekulėms išblykstant, fluorescencijos signalas užgęsta visas iš karto, o ne laipsniškai, kaip tai būtų molekulių ansamblyje.

4. Kadangi vienu metu registruojama fluorescencija iš vieno objekto taško, galima ją registruoti su papildomais parametrais: išskleidę spektrą difrakcine gardele, turėsime spektrinį vaizdinimą, t.y. mikroskopijos vaizdus, kuriuose kiekviename taške turėsime ne vieną intensyvumo vertę, o intensyvumą kaip bangos ilgio funkciją. Jei žadinimui naudosis impulsinį lazerį, o fotodaugintuvo signalą prijungsime prie laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo aparatūros, galėsime registruoti fluorescencijos gesimo kinetiką kiekviename taške ir turėsime vadinamąjį fluorescencijos gyvavimo trukmės vaizdinimą (*angl. Fluorescence lifetime imaging, FLIM*).

Žinoma, konfokalinio mikroskopo privalumai gaunami ne veltui: kadangi toks mikroskopas vienu metu registruoja šviesą tik iš vieno bandinio taško, vaizdo registravimas užtrunka daug ilgiau negu naudojant įprastinį plataus lauko mikroskopą. Tačiau pastebėjime, kad konfokalinį mikroskopą perdaryti į plataus lauko mikroskopą yra elementaru: tereikia išmesti diafragmą ir detektorių pakeisti į CCD kamerą.

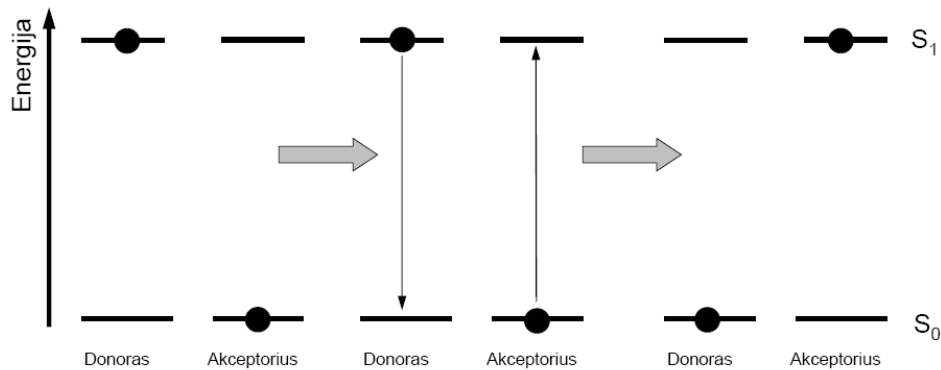
Dėl šio savo lankstumo konfokaliniai fluorescenciniai mikroskopai tapo universaliais biologinių objektų tyrimo įrankiais, plačiai taikomais įvairiose gyvybės mokslų srityse, pradedant patologija ir baigiant molekuline biologija.

Försterio rezonansinė energijos pernaša (FRET)

Rezonansinė energijos pernaša, kurią pirmasis aprašė T. Förster'is tapo labai svarbiu įrankiu, taikomu tiriant biomolekulių sąveikas. Šio proceso esmė yra ta, jog sužadinta molekulė (donoras) savo sužadinimo energiją gali perduoti kitai, šalia esančiai molekulei (akceptoriumi). Pernašos sparta labai stipriai priklauso nuo atstumo tarp donoro ir akceptoriumo molekulių, todėl ja naudojantis galima išmatuoti atstumus tarp molekulių, pvz., nustatyti, kada fermentas susijungia su substratu. Kai energijos pernaša vyksta efektyviai, sužadinę donoro molekulę matysime akceptoriumo fluorescenciją, nes donorai atiduos energiją akceptoriumams ir šie ims šviesti.

Sužadinimo energijos pernašą įprasta aprašyti Försterio formule, kuri išvedama kvantinės mechanikos metodais: iš auksinės Fermi taisyklės skaičiuojama tikimybė, kad

sužadinus donoro molekulę, sužadimas bus perduotas akceptorius molekulei (o donoras sugrįš į pagrindinę būseną). Toks procesas schematiškai pavaizduotas 38 pav. Čia mes detaliamai nenagrinėsime Försterio formulės išvedimo (jis išsamiai aprašytas literatūroje [16, 17]), tik aptarsime jos galiojimo sąlygas, užrašysime pačią formulę ir paanalizuosime, ką ji reiškia. Išvedant šią formulę laikomasi tokių prielaidų:



38 pav. Försterio energijos pernaša: sužadinta donoro molekulė atiduoda energiją akceptorius molekulei, o pati sugrįžta į pagrindinę būseną.

- Įvykus energijos pernašai, koreliacija su pradine būseną (kurioje akceptorius buvo sužadintas) prarandama, t.y. sistemoje nėra „atminties“.
- Donoro ir akceptorius molekules yra tiek toli viena nuo kitos, kad jų elektronų orbitalės nepersikloja (realiai tokie atstumai turėtų būti apie 10 Å ir daugiau).
- Molekulės sąveikauja kaip dipoliai, o jų sąveika yra pakankamai silpna, kad molekules būtų galima aprašyti jų atskiromis būsenos funkcijomis.
- Donoro sužadinta būseną yra energetiškai relaksavusi, t.y. sužadintoje būsenoje nevyksta jokia dinamika (tokiu atveju donoro fluorescencijos spektras yra toks pat kaip nuostovusis fluorescencijos spektras, ir gęsta monoeksponentiškai su charakteringu laiku τ_D).

Galiojant šioms prielaidoms, energijos pernašos sparta iš donoro į akceptorius išreiškiama taip:

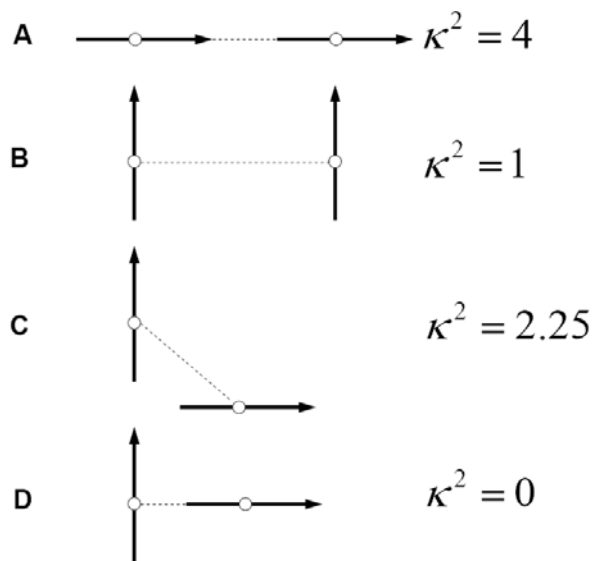
$$k_{DA} = \frac{9 \cdot \ln(10) \cdot \kappa^2 c^4 \phi_D}{80 \cdot \pi n^4 N_{av} \tau_D R^6} \int F_D(\omega) \alpha_A(\omega) \frac{d\omega}{\omega^4} \quad (41).$$

Šioje formulėje n yra aplinkos lūžio rodiklis, c – šviesos greitis (m/s), ϕ_D – donoro fluorescencijos kvantinis našumas, τ_D – donoro fluorescencijos gyvavimo trukmė (s), N_{av} – Avogadro skaičius. $F_D(\omega)$ ir $\alpha_A(\omega)$ yra atitinkamai donoro fluorescencijos ir akceptorius sugerties spektrai, išreikšti kaip ciklinio šviesos dažnio funkcija. Fluorescencijos spektras normuojamas į vienetą, t.y. $\int F_D(\omega)d\omega = 1$. Sugerties spektras – tai dekadinis molinis ekstinkcijos koeficientas, išreikštas $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. Geometrinis daugiklis κ aprašo priklausomybę nuo molekulių dipolinių momentų tarpusavio orientacijos ir padėties:

$$\kappa = \left\{ (\boldsymbol{\mu}_A \boldsymbol{\mu}_D) - \frac{3}{R^2} (\boldsymbol{\mu}_A \mathbf{R})(\boldsymbol{\mu}_D \mathbf{R}) \right\} \quad (42).$$

Šioje formulėje $\boldsymbol{\mu}_A$ ir $\boldsymbol{\mu}_D$ žymi normuotus akceptorius sugerties ir donoro fluorescencijos šuolio dipolinius momentus, o R – atstumą tarp tų dipolinių momentų centrų.

Aptarsime, kas yra šuolio dipolinis momentas, įeinantis į (42) išraišką. Aprašant molekulių tarpusavio sąveikas bei jų sąveikas su išoriniu elektriniu lauku (šviesa) dažniausiai naudojamas dipolinis artinys, t.y. daroma prielaida, kad visi molekulėje esantys krūviai (tiek protonų, tiek elektronų) kolektyviai elgiasi kaip dipolis – darinys iš vieno teigiamo ir vieno neigiamo taškinio krūvio, atskirtų tam tikru atstumu. Dviejų tokių dipolių tarpusavio sąveikos energiją nesunku apskaičiuoti iš elektrostatikos (skaičiuojama visų keturių krūvių tarpusavio sąveikos energija ir išreiškiama per dipolinius momentus) – jos rezultatas ir pateiktas (42) išraiškoje. Daugiklis κ gali įgyti vertes nuo -2 iki 2, o κ^2 atitinkamai – nuo 0 iki 4. Keletas galimų dipolių orientacijų ir jas atitinkančios daugiklio κ^2 vertės pateiktos 39 pav.



39 pav. Rezonansinės energijos pernašos spartos priklausomybė nuo donoro ir akceptoriaus molekulių šuolio dipolinių momentų tarpusavio orientacijos

Pažymėkime, kad molekulių rezonansinei sąveikai reikalingas (ir į Försterio formulę įeina) ne nuolatinis molekulės dipolinis momentas pagrindinėje ar sužadintoje būsenoje, bet *šuolio dipolinis momentas*, t.y. molekulės dipolinio momento „virpėjimas“ elektriniame lauke, vykstant kvantiniam šuoliui iš pagrindinės į sužadintą būseną. Šiek tiek paaiškinsime jį, panaudodami klasikinę analogiją, kuri sako, kad sąveika vyksta taip: molekulei atsidūrus kintamame elektriniame lauke (pvz., šviesoje), jos dipolinio momento krūviai ima virpėti aplink dipolio centrą. Jei lauko dažnis ir dipolio nuosavasis virpėjimo dažnis sutampa, energija efektyviai perduodama iš lauko į dipolį, t.y. molekulė sugeria šviesą ir pereina į aukštesnės energijos būseną.

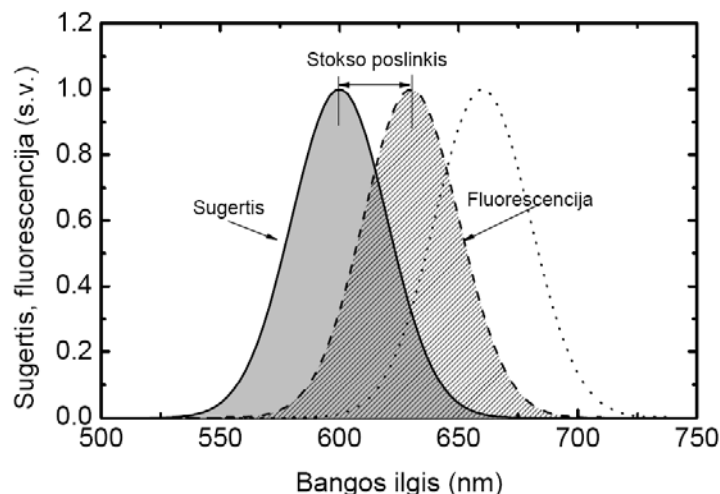
Tokio kintamojo elektrinio lauko šaltinis gali būti ne tik šviesa (fotonai), bet ir kita sužadinta molekulė, esanti arti aptariamiosios, ir sąveikaujanti su ja savo krūviais. Dvi greta esančios molekulės gali indukuoti viena kitos dipolinio momento virpesius. Jei molekulių dipolių virpėjimo dažniai (kurių kvantinis analogas yra sužadinimo energijos) sutampa, energija iš vieno osciliatoriaus (molekulės) perduodama kitam.

Taigi, molekulės gebėjimas keisti savo elektroninę būseną elektrinio lauko poveikyje (kaip jau minėta, tokio lauko šaltinis gali būti ir kita molekulė) nusakomas molekulės *šuolio dipoliniu momentu*. Šuolio dipolinis momentas yra molekulės savybė; ji priklauso nuo molekulės konformacijos (erdvinės struktūros) ir aplinkos (pvz., tirpiklio

arba baltymo, kuriame yra molekulė). Kadangi elektroninis šuolis vyksta sugeriant fotoną, šuolio dipolinis momentas tiesiogiai susijęs su molekulės sugerties intensyvumą aprašančiu ekstinkcijos koeficientu. Molinis ekstinkcijos koeficientas yra proporcingas šuolio dipolinio momento kvadratui. Jei šuolio dipolinis momentas lygus nuliui – molekulė su elektriniu lauku rezonansiškai nesąveikauja (t.y. negali jo sugerti arba išspinduliuoti), priešingu atveju egzistuoja elektrinio lauko sugerties ir/arba spinduliavimo tikimybė.

Iš klasikinės virpančių dipolių analogijos nesunku suprasti, kodėl molekulių orientacija svarbi jų sąveikai ir energijos pernašai: juk jei vienos molekulės dipolio galuose esantys priešingo ženklo krūviai virpa tiesėje, statmenoje kitos molekulės dipolinio momento ašiai (žr. 39D pav.), abu antrosios molekulės krūviai traukiami ir stumiami simetriškai į priešingas puses, ir traukos bei stūmos atstojamoji lygi nuliui. Ir priešingai, jei molekulių dipoliai orientuoti „galva prie uodegos“ (žr. 39A pav.), pajudėję vienos molekulės krūviai kitos molekulės dipolį veiks itin asimetriškai (t.y., atstojamoji jėga bus didelė) ir orientacinę sąveikos dalį aprašantis daugiklis įgis maksimalią vertę, lygią dvejetui.

Försterio formulėje (41), be orientacijos daugiklio κ ir konstantų įeina donoro fluorescencijos ir akceptorius sugerties spektrų sanklotos integralas. Tai iš esmės yra energijos tvermės dėsnio išraiška: energija efektyviai perduodama tada, kai akceptorius sugeria toje spektro dalyje, kur donoras spinduliuoja. Molekulių sugerties ir spinduliavimo spektrams būdingas vadinamasis Stokso poslinkis, t.y. fluorescencijos spektro maksimumas visuomet šiek tiek pasislinkęs į raudonąją pusę, palyginti su sugerties maksimumu. Taip atsitinka dėl to, kad sužadinus molekulę (t.y. įvykus sugerčiai) dalis energijos visuomet prarandama: atiduodama į aplinką (pvz., baltymą) arba paverčiama į molekulės branduolių virpesius. Todėl energijos pernaša efektyviausiai vyksta ne tarp identiškų, ekvivalentinių molekulių, o „į pakalnę“, t.y. iš šiek tiek aukštesnės energijos donoro į kiek žemesnės energijos akceptorį (40 pav). Tai suprantama ir iš bendrųjų termodinamikos pozicijų: sistema donoras-akceptorius stengiasi užimti kuo žemesnės energijos būseną.



40 pav. Donoro bei akceptoriaus sugerties bei fluorescencijos spektrai ir jų vaidmuo energijos pernašos procese. Efektyviausiai pernaša vyksta, kai donoro fluorescencijos spektras sutampa su akceptoriaus sugerties spektru.

Irašius į Försterio formulę (41) tipiškus fluorescuojančių molekulių parametrus, (Gauso formos sugerties spektro maksimumas – ties 680 nm, plotis – 24 nm, fluorescencijos gyvavimo trukmė – 4 ns, fluorescencijos kvantinis našumas – 0.33, molinis ekstinkcijos koeficientas – $100000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, Stokso poslinkis – 500 cm^{-1} , orientacijos daugiklis – vienetą, atstumas – 15 \AA), lengvai surandame energijos pernašos greitį lygų maždaug 1.5 ps. Atkreipsime dėmesį, kad šis rezultatas labai smarkiai priklauso nuo atstumo tarp molekulių (į formulę (41) R įeina pakeltas net šeštuoju laipsniu), todėl, jei pigmentai yra dar arčiau, nesunkiai galima ir energijos pernaša greitesnė nei 500 fs.

Pažymėkime, kad nors į Försterio formulę (41) įeina donoro spinduliavimo ir akceptoriaus sugerties spektrai, tai nereiškia, kad energijos pernaša vyksta donorui išspinduliuojant, o akceptoriumi sugeriant realų fotoną. Juk donoro sužadintos būsenos relaksacijos trukmė – kelios ns (jei tai chlorofilo pigmentas), todėl, jei energija būtų pernešama spinduliniu būdu, sužadinus donorą, būtent tiek reikėtų laukti, kol sužadinimas atsidurtų ant akceptoriaus. O, kaip jau sakėme, fotosintetinė energijos pernaša vyksta maždaug 1 ps greičiu (arba dar greičiau). Čia energija perduodama dėl rezonansinės molekulių tarpusavio sąveikos, realūs fotonai nespinduliuojami.

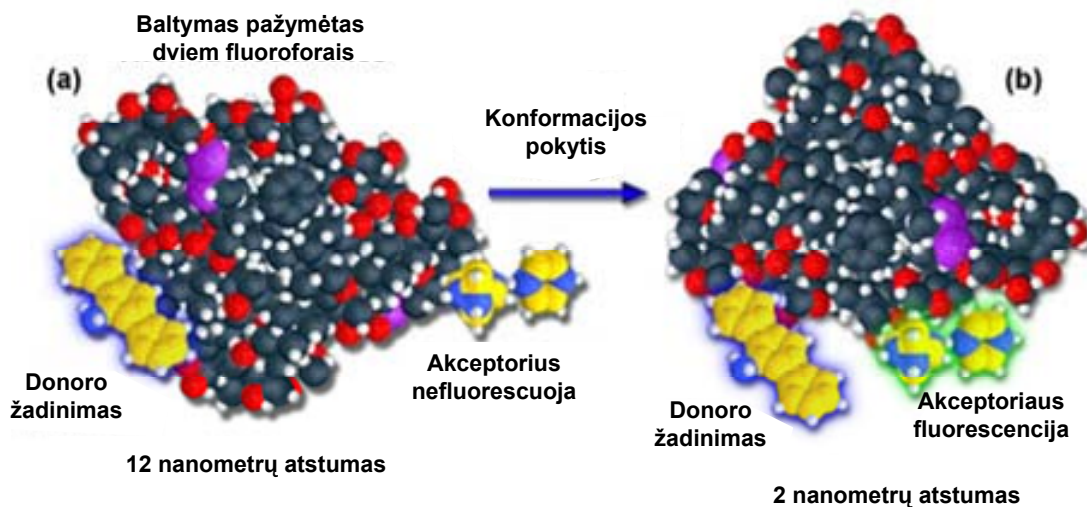
Försterio formulę paprastumo dėlei dažnai užrašoma taip:

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_D} \left[\frac{R_0}{R} \right]^6 \quad (43),$$

Kur R_0 – vadinamasis Förster‘io radiusas, savyje talpinantis donoro ir akceptoriaus parametrus, išreikštai užrašytus (41) formulėje.

Formulė (43) rodo, kad energijos pernašos sparta labai smarkiai priklauso nuo atstumo tarp fluoroforų. Todėl ja galima naudotis kaip įrankiu, leidžiančiu nustatyti, kurioje ląstelės vietoje sąveikauja tiriami baltymai, ir kaip toli jie nutolę vienas nuo kito. Kadangi Förster‘io energijos pernaša efektyviai vyksta, molekulėms suartėjus 1-10 nm atstumu, būtent tokius atstumus (pastebėkime, kad jų neriboja difrakcija) leidžia aptikti FRET mikroskopija. Ji leidžia tirti šiuos biologinių vyksmų biologiniuose objektuose:

1. Sąveikas tarp atskirų fluoroforais pažymėtų molekulių, t.y. matyti, kada dvi skirtingos molekulės suartėja tarpusavyje.
2. Molekulių konformacinius pokyčius, t.y. matyti, kaip DNR ar baltymo fragmentai, keičiantis šių molekulių erdvinei konformacijai, suartėja tarpusavyje. Tokios sąveikos tyrimo schema, panaudojant FRET mikroskopiją, parodyta 41 pav.



41 pav. FRET mikroskopijos panaudojimas baltymo konformaciniam pokyčiui tirti. Pagal www.olympusmicro.com.

41 pav. parodyta, kaip FRET mikroskopijos būdu galima stebėti baltymo konformacinį pokytį. Pažymėjus atskirus šio baltymo domenus dviem fluoroforais ir žadinant donorą, tame bangos ilgyje, kur fluorescuoja akceptorius, fluorescencijos nematysime, jei šie

pigmentai yra palyginti toli vienas nuo kito (12 nm, žr. 41a pav.). Kai baltymas, sąveikaudamas su kitais baltymais ar dėl kitų aplinkos poveikių pakeičia savo konformaciją, abu fluoroforai suartėja tokiu atstumu, kad tarp jų ima vykti efektyvi energijos pernaša ir, žadinant donorą, stebima fluorescencija ties tuo bangos ilgiu, kur fluorescuoja akceptorius. Žinant donoro ir akceptoriaus molekulinis parametrus, galima iš (41) formulės apskaičiuoti atstumą tarp jų.

Žinoma aibė donoro-akceptoriaus dažiklių porų, tarp kurių gali vykti energijos pernaša. Tai paprasčiausiai dažiklių poros, tenkinančios šias dvi sąlygas: 1) egzistuoja bangos ilgis, kur donoro sugertis yra daug efektyvesnė už akceptoriaus (tai leidžia efektyviai sužadinti donorą, nesužadinant akceptoriaus) ir 2) donoro fluorescencijos spektras smarkiai persikloja su akceptoriaus sugerties spektru (tai užtikrina efektyvią energijos pernašą). Pažymėtina, kad tokią porą galima suformuoti ne tik iš organinių dažiklių, bet ir iš fluorescuojančių baltymų (medūzos *Aequoria victoria*) žaliojo fluorescuojančiojo baltymo (GFP) genetiškai modifikuotų variantų BFP (fluorescuoja mėlynojoje spektro srityje), YFP (geltonojoje), DsRFP (raudonojoje) ir kt. Kai kurios donorų-akceptorių poros FRET mikroskopijai pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Dažiklių poros FRET mikroskopijai

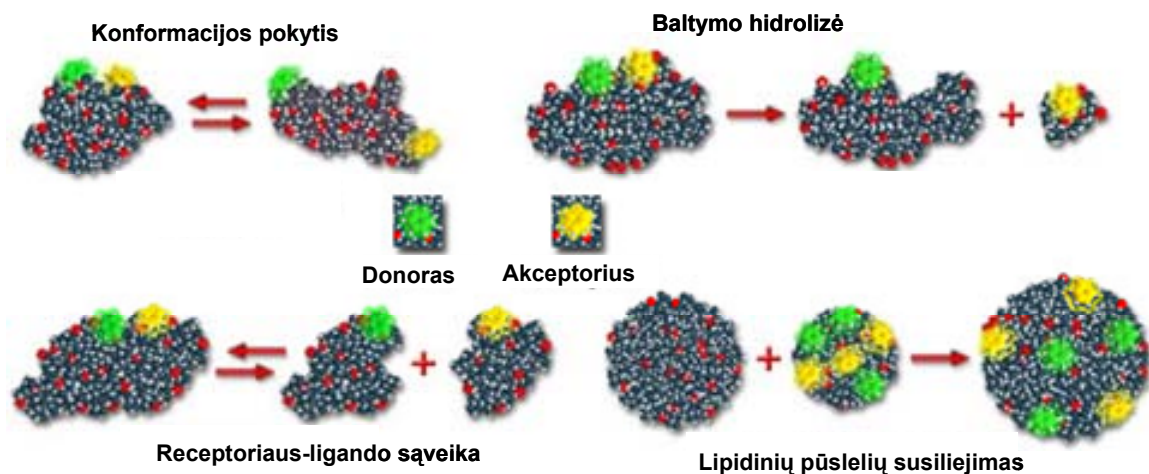
Donoras	Akceptorius	Förster'io radiusas (nm)
Triptofanas	Dansilas	2.1
Dansilas	FITC	3.3-4.1
BFP	DsRFP	3.1-3.3
Dansilas	Oktadecilrodaminas	4.3
CFP	GFP	4.7-4.9
CF (karboksifluoresceino sukcinimidilo esteris)	Texas Red	5.1
Fluoresceinas	Tetrametilrodaminas	4.9-5.5
Cy3	Cy5	>5.0
GFP	YFP	5.5-5.7
Rodaminas 6G	Malachito žaluma	6.1

Šaltinis: www.olympusmicro.com

Be konformacinių pokyčių, FRET mikroskopija leidžia stebėti ir kitus vyksmus biologiniuose objektuose. Šiems vyksmams bendra tai, kad jų metu keičiasi atstumas tarp donoro ir akceptorius porų. Tai gali būti

- Molekulių susijungimo reakcija, pvz., receptoriaus ir ligando sąveika;
- Molekulių skilimo reakcija, pvz., baltymo hidrolizė;
- Lipidinių pūslelių susiliejimas ar pūslelės įsiterpimas į membraną.

Visos šios reakcijos schematiškai parodytos 42 pav.



42 pav. Įvairūs biologiniai vyksmai, kurių tyrimui naudojama FRET mikroskopija. Pagal www.olympusmicro.com.

Laiko skyros vaizdinimas (FLIM) ir vaizdinimas su spektrine skyra

Konfokalinis mikroskopas surenka fluorescenciją tik iš vieno bandinio tūrio elemento (pagal analogiją su dvimačio vaizdo elementu, pikseliu, toks elementas kartais vadinamas vokseliu). Užuoť tiesiog registravus fluorescencijos intensyvumą tame taške, galima registruoti fluorescenciją su papildomais parametrais. Dažniausiai šie parametrai yra laikas, kai kiekviename taške registruojama fluorescencijos gesimo kinetika arba bangos ilgis, kai kiekviename taške registruojamas fluorescencijos spektras. Tokiu būdu gerokai praturtėja registruojamo vaizdo duomenys: kiekviename erdvės taške vietoje vieno skaičiaus turime funkciją, t.y. fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo laiko arba nuo bangos ilgio.

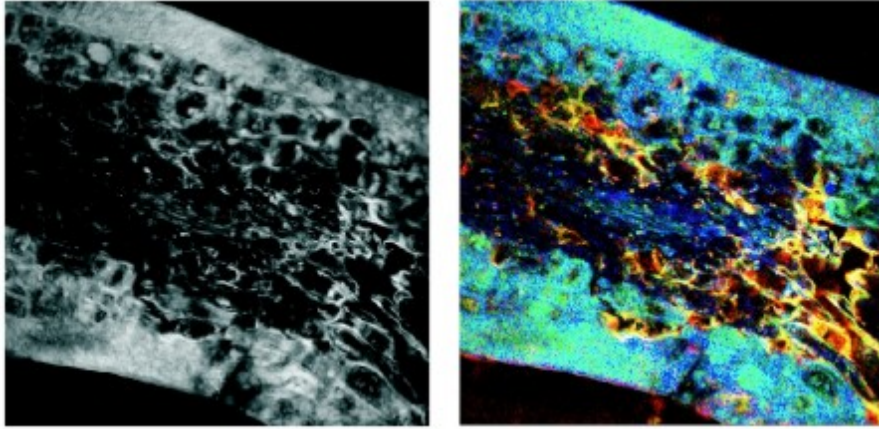
Fluorescencijos vaizdinimui su laiko skyra (*angl. fluorescence lifetime imaging, FLIM*) paprastai naudojama laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo metodika bei

aparaturą, aptariama kinetinės spektroskopijos kurse. Tam mikroskopo žadinimo šaltinis keičiamas impulsiniu lazeriu, o detektoriaus signalas prijungiamas prie laiko-įtampos keitiklio START įėjimo (išsamų šios metodikos aprašymą rasite kinetinės spektroskopijos kurso metodinėse priemonėse bei specialiojoje literatūroje, pvz., [11, 18]). Registruojant laiką, praėjusi tarp lazerio išspinduliuoto pikosekundinio impulso bei užregistruoto fluorescencijos fotono, gaunama histograma, atitinkanti fluorescencijos gesimo kinetiką stebimame taške. Molekulės sužadintos būsenos gyvavimo trukmė priklauso nuo aplinkos, kurioje yra ta molekulė, nes ją veikia šie nuo aplinkos priklausantys faktoriai:

- Vidinė konversija (virpesinė relaksacija);
- Solvatacija;
- Energijos pernaša;
- Krūvio pernaša;
- Fotoreakcijos;

Taigi, fluorescencijos gesimo kinetika yra jautri aplinkai, kuriose yra molekulės, ir gali būti naudojama kaip įrankis tai aplinkai tirti. Jos ypatumai ir privalumai, lyginant su įprasta konfokaline mikroskopija, išvardinami toliau.

1. Geresnis vaizdų kontrastas, ypač jei stebima biologinių objektų autofluorescencija. 43 pav parodytas obuolio skiltelės autofluorescencijos vaizdas. Kairėje matome integralinį fluorescencijos intensyvumą, o dešinėje – dirbtinėmis spalvomis pavaizduotą fluorescencijos gesimo trukmę. Matome, kad FLIM vaizde akivaizdžiai atsiskiria ne tik daugiau detalių, bet funkcinio požiūriu skirtingos bandinio dalys.

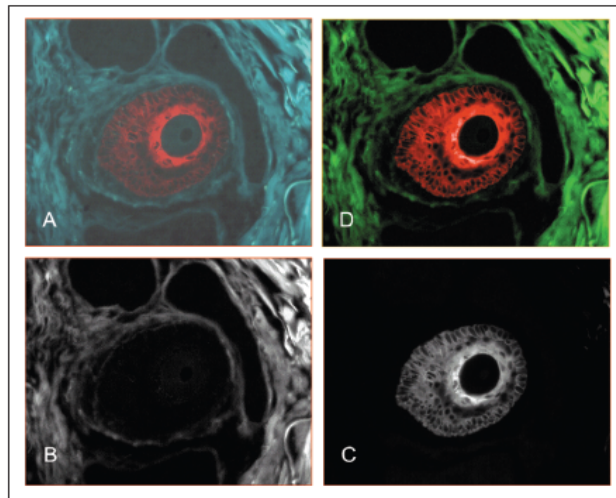


43 pav. obuolio pjūvio autofluorescencijos intensyvumo vaizdas (kairėje) ir FLIM vaizdas (dešinėje) www.picoquant.com.

2. Kadangi FLIM vaizdina ne pagal integralinį intensyvumą, o pagal fluorescencijos gyvavimo trukmę, gautų vaizdų kontrastas beveik *nepriklauso* nuo fluoroforų koncentracijos, taigi, šiuo metodu matuojamas iš principo kitoks vaizdas nei įprastinės konfokalinės mikroskopijos būdu.
3. Fluorescencijos gyvavimo trukmė gali būti įvairus gesiklių, pvz., įvairių jonų indikatorius. Todėl FLIM mikroskopijos metodais galima matuoti atskirų ląstelės dalių pH (pvz., panaudojant dažiklį BCECF-AM) arba Cl^- jonų koncentracijas (pvz., dažiklis MQAE). Gesiklių koncentracijos nustatomos iš Stern'o-Volmer'io formulės.
4. FRET mikroskopijoje vaizdinimas su laiko skyra suteikia papildomų galimybių: juk matuojant donoro fluorescencijos gesimą, tiesiogiai stebima energijos pernašos sparta, o ne galutinė išėiga, kaip tai yra stebint FRET nuostoviosios fluorescencijos mikroskopijos metodais. Turint laiko skyros informaciją, galima atskirti, kuri dalis donorų perdavė energiją akceptoriumi ir koku atstumu jie buvo vienas nuo kito. Taip pat FLIM leidžia panaudoti tokias dažiklių poras, kurių sugerties spektrai persikloja, t.y. kartu sužadinas ir donoras, ir akceptorius. Tuomet išmatuotą fluorescencijos laiko skyros vaizdą sudaro dviejų vaizdų superpozicija: tiesiogiai sužadinti akceptoriai ir akceptoriai, gavę energiją iš sužadintų donorų. Matematiniais metodais atskyrus šiuos du vaizdus, galima stebėti

energijos pernašą net tokiais atvejais, kai įprastinė FRET mikroskopija jos užregistruoti neleistų.

Kitas būdas suteikti fluorescencijos mikroskopijai papildomą dimensiją – tai vaizdinimas su spektrine skyra, t.y. fluorescencijos spektro matavimas kiekviename bandinio taške. Tam konfokaliniame mikroskope prieš detektorių statomas gardelinis arba prizminis monochromatorius, arba derinamo bangos ilgio skystųjų kristalų juostinis filtras. Pakeitus detektorių į CCD liniuotę arba CCD matricą, galima registruoti visą ir spektrą iš karto. Vaizdinimo su spektrine skyra privalumas akivaizdus: turtingesnė informacija leidžia atskirti įvairių signalų sudarančių dalių įnašus. Tai ypač svarbu, norint atsikratyti nespecifiško bandinio autofluorescencijos įnašo ir išskirti tik mus dominančių dažiklių fluorescenciją. 44 pav. parodytas kaip spektrinis fluorescencijos vaizdas, užregistruotas iš audinio, nudažyto kraujagyslėms specifišku antikūniu, leidžia atskirti autofluorescencijos ir mus dominančio dažiklio signalus.



44 pav. Audinio bandinys, nudažytas kraujagyslėms specifiniais antikūniais, sujungtais su kvantiniais taškais. A – užregistruoto vaizdo RGB atvaizdas; B – matematiniais metodais atskirtas autofluorescencijos signalas; C – atskirtas kvantinių taškų fluorescencijos signalas. D – abiejų signalų kombinacija pseudospalvomis, žaliai pavaizduojant autofluorescenciją, o raudonai – kvantinių taškų signalą.

Be to, gebėjimas registruoti spektrus iš kiekvieno mikroskopo vaizdo taško leidžia atlikti mikrospektroskopiją, t.y. atskirų biologinio objekto dalių fluorescencinę spektroskopiją. Tokie objektai gali būti net pavienės molekulės, pvz., fermentas, besijungiantis prie substrato. Tokį vyksmą galima stebėti FRET mikroskopijos būdu, stebint, kaip susijungus

dviems molekulėms pasikeičia emisijos spektras – sumažėja donoro ir padidėja akceptorius spektro įnašas.

Tiek laiko skyros, tiek spektrinės skyros fluorescencijos vaizdams analizuoti būtina speciali vaizdų analizės programinė įranga, „atmaišanti“ spektrines ir laikines dedamąsias vaizduose vienas nuo kitų.

Fluorescencijos atsistatymas po fotoišblyškimo (FRAP) ir fluorescencijos gesimas dėl fotoišblyškimo (FLIP)

Fluorescencinė mikroskopija neapsiriboja statinių vaizdų registravimu. Esami jautrūs vaizdo detektoriai – CCD kameros leidžia registruoti fluorescuojančių biologinių objektų dinamiką realiu laiku – stebėti, kaip juda ląstelės organelės arba kaip keičiasi ląstelių forma, dalijasi ląstelės ir pan. Be to egzistuoja dvi tarpusavyje susiję metodikos, leidžiančios stebėti difuzinę/dreifinę fluorescenciškai pažymėtų makromolekulių ir mažų fluoroforų dinamiką. Metodikoje, sutrumpintai vadinamoje FRAP (nuo angl. *fluorescence recovery after photobleaching* – fluorescencijos atsistatymas po fotoišblyškimo), maža bandinio sritis, dažniausiai kelių mikronų diametro apšvitinama labai intensyvia lazerio šviesa, suardant visas toje srityje esančias fluoroforų molekules. Dėl to fluorescencija toje srityje išnyksta. Po šio fluorescenciją sunaikinančio impulso, stebima, kaip laikui bėgant fluorescencija atsistato. Auganti fluorescencija tiesiogiai rodo fluoroforų transportą į apšvitintą sritį dėl difuzijos ar aktyvios pernašos.

Kita panaši metodika, vadinama FLIP (nuo angl. *fluorescence loss in photobleaching* – fluorescencijos gesimas dėl fotoišblyškimo), stebi ne vieną kurią nors objekto (pvz., ląstelės) sritį, o visą ląstelę. Ilgai švitinant vieną jos sritį, visos ląstelės fluorescencija galų gale užgęsta, jei tik fluoroforo molekulės gali pasiekti švitinamą vietą. Toks eksperimentas leidžia patikrinti ar atskiros biologinio objekto dalys yra fiziškai sujungtos viena su kita.

Skenuojančio zondo mikroskopai

Optiniai mikroskopai – puikūs biologinių objektų tyrimo prietaisai, tačiau jų erdvinę skyrą riboja difrakcija. Ir nors žinoma keletas triukų, kaip šį ribojimą apeiti (vienas iš jų – mūsų aptarta FRET mikroskopija), vis dėlto, norint pažinti biologinių objektų dalis, kurių matmenys mažesni už šviesos bangos ilgį, reikia kitokių įrankių. Vieni iš tokių – skenuojančio zondo mikroskopai, kuriuos toliau ir aptarsime [19].

Veikimo principai

Skenuojančio zondo mikroskopai (SZM) yra instrumentų klasė, naudojama tiriant medžiagų paviršių savybes. Šių mikroskopų skyra prasideda mikronų eilės matmenimis ir baigiant atomų matmenimis. Pagrindiniai skenuojančiojo zondo mikroskopo komponentai yra **zondas** ir **skeneris**. Zondas – tai dalis, kuri tiesiogiai sąveikauja su bandiniu; būtent zondas ir registruoja įvairias bandinio paviršiaus savybes. Skeneris itin tiksliai valdo zondo padėtį, tiek lygiagrečiai paviršiui, tiek vertikalia kryptimi.

Zondas

Suartinus dvi medžiagas vieną su kita, vyksta daugelis atominio lygio sąveikų. Šios sąveikos ir sudaro skenuojančio zondo mikroskopijos pagrindą. SZM zondai yra specialiai kuriam tam, kad būtų kuo jautresni šioms sąveikoms. Suartinus zondą ir bandinį, sąveikos keliamas poveikis koreliuoja su atstumu tarp zondo ir bandinio. Šio poveikio dydis kinta, priklausomai nuo atstumo tarp zondo ir bandinio, taigi SZM tirtia bandinio paviršiaus topografiją, skenuojant zondą bandinio paviršiumi ir registruojant poveikio dydį kaip skersinių koordinačių funkciją.

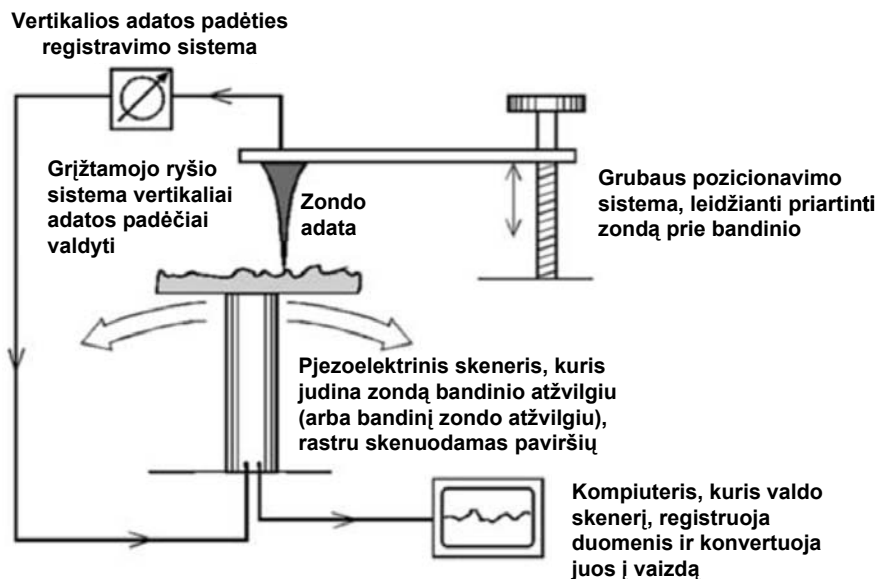
Skeneris

Medžiaga, kuri leidžia judinti zondą bandinio atžvilgiu, pasiekiant (sub) nanometrinių tikslumą, yra pjezoelektrinė keramika. Tokios keramikos strypas, prijungus elektros įtampą, pakeičia savo matmenis. Matmenų pokytis yra tiesiogiai proporcingas prijungtai

įtampai. Preciziškai valdant įtampą, galima pasiekti keletą nanometrų ar dar geresnį mechaninio poslinkio tikslumą.

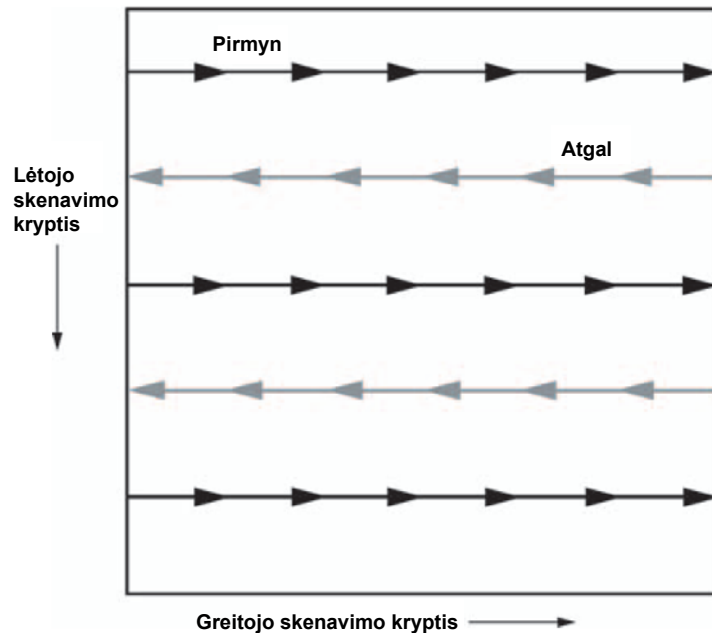
Skenavimas: nustatyta signalo vertė, detektoriaus signalas ir paklaidos signalas

Norint užregistruoti SZM vaizdą, skeneris prineša zondo galiuką prie bandinio paviršiaus tiek, kad zondas pradėtų jausti sąveiką su paviršiumi. Šiame režime zondas generuoja sąveikos dydį atitinkantį signalą, vadinamą **detektoriaus signalu**. Kad detektoriaus signalas turėtų prasmę, nustatoma pradinė jo vertė, kurios atžvilgiu toliau ir registruojamas vaizdas. Skeneriui atvežant zondą prie paviršiaus, detektoriaus signalas nuolat registruojamas ir sustojama, kai pasiekama jo nustatyta vertė. Tuomet pradedamas skenavimas. Skeneris traukia zondą, paeiliui praeidamas įvairias bandinio eilutes zigzagu ir padengdamas stačiakampį bandinio paviršiaus plotą. Tai vadinamasis rastrinis skenavimas. Zondui judant įvairiomis bandinio vietomis, keičiasi atstumas tarp zondo ir bandinio, taigi skiriasi ir atitinkamas detektoriaus signalas. Šis signalas kiekviename rastro taške lyginamas su nustatyta verte. Skirtumas tarp šių dviejų verčių vadinamas **paklaidos signalu**. Šis signalas ir yra SZM duomenys, iš kurių vėliau sugeneruojamas bandinio paviršiaus topografijos vaizdas.



45 pav. Principinė skenuojančiojo zondo mikroskopo schema.

Duomenys gali būti registruojami zondui judant iš kairės į dešinę („pirmyn“) ir iš dešinės į kairę („atgal“). Gebėjimas registruoti judant abiem kryptimis yra svarbus, siekiant išvengti eksperimentinių artefaktų. Kryptis „iš kairės į dešinę“ (pirmyn-atgal) vadinama greitojo skenavimo kryptimi, o jai statmena kryptis – lėtojo skenavimo kryptimi (46 pav). Skenuojama paprastai zigzagu, t.y. vienos eilutės pabaiga sutampa su kitos pradžia. Tačiau linijos paprastai yra tokios tankios, kad yra praktiškai lygiagrečios.



46 pav. Rastrinis skenavimas skenuojančiojo zondo mikroskope.

SZM vaizdas

SZM zondui skenuojant bandinio paviršių, paklaidos signalas interpretuojamas kaip eksperimentinių taškų serija, atitinkanti tam tikras koordinatas. Iš šių taškų programinė įranga generuoja vaizdą, kurį nubraižo kontūrinio žemėlapiu arba trimačio paviršiaus, nuspalvinto pseudospalvomis formatu. Kiekvienos eilutės taškų skaičius ir eilučių skaičius lemia vaizdo skyrą greitąja ir lėtąja skenavimo kryptimis.

Z koordinatės grįžtamasis ryšys

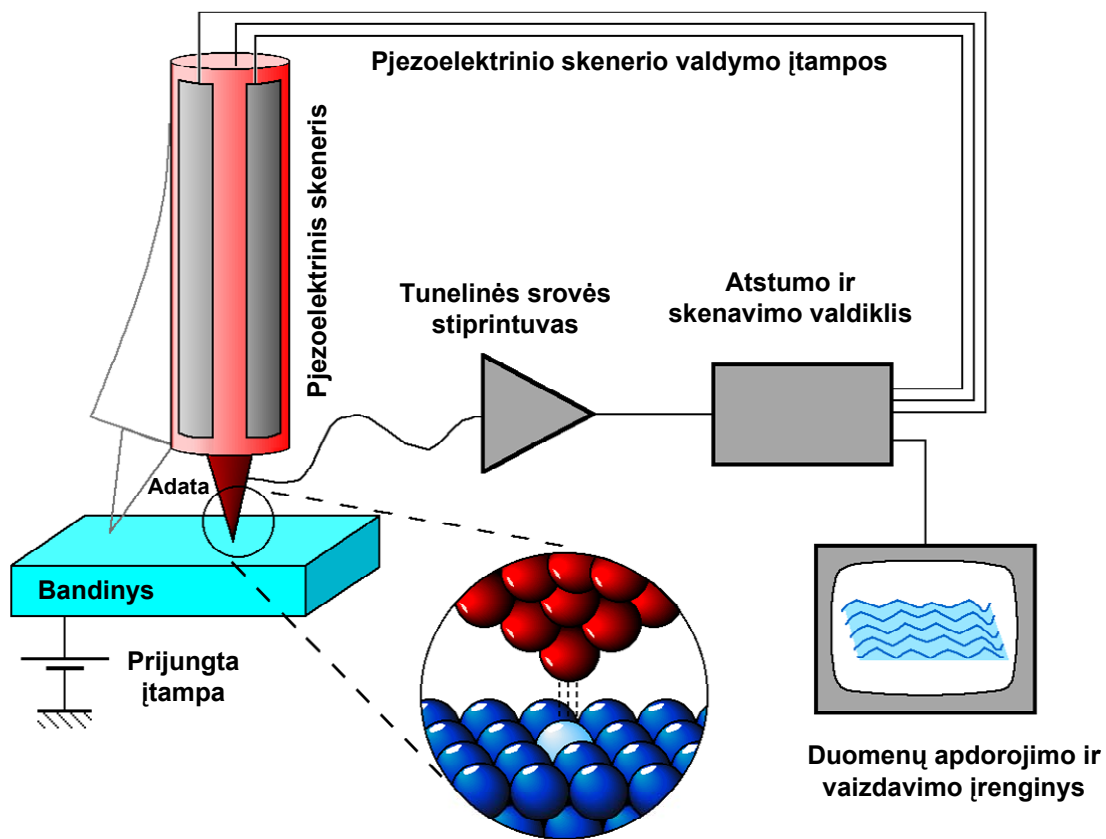
SZM naudojamas metodas, vadinamas Z koordinatės grįžtamoju ryšiu, kuris užtikrina, kad zondas tiksliai sektų paviršiaus topografiją. Šio metodo esmė ta, kad detektoriaus signalas nuolat lyginamas su nustatyta verte, o jei jie nesutampa, į skenerį paduodama įtampa, dėl kurios zondas atsideda arčiau prie bandinio paviršiaus arba toliau nuo jo. Taip paklaidos signalas sumažinamas iki nulio. Ši įtampa dažnai naudojama kaip duomenys SZM vaizdui generuoti.

Skenuoti galima su įjungtu arba išjungtu Z koordinatės grįžtamoju ryšiu. Kai grįžtamasis ryšys išjungtas, vaizdas generuojamas iš paklaidos signalo, o kai įjungtas – pagal įtampą, valdančią skenerio Z koordinatę. Išjungus Z koordinatės grįžtamąjį ryšį, skenuoti galima greičiau, tačiau tuomet tikslią informaciją galime gauti tik apie labai lygų paviršių. Norint tiksliai išmatuoti nereguliarios topografijos paviršius, tenka dirbti su įjungtu grįžtamoju ryšiu.

Skenuojantis tunelinis mikroskopas (STM)

Tai pirmasis iš skenuojančiojo zondo mikroskopų. Jame zondas yra laidus adatas, o matuojama tunelinė srovė, kuri labai smarkiai priklauso nuo atstumo tarp adatos galiuko ir tiriamo paviršiaus. Tunelinė srovė teka, kai elektronas peršoka iš atomo, esančio ant adatos galiuko, į atomą esantį ant bandinio. Tokio šuolio tikimybė eksponentiškai auga, atomams priartėjant vienas prie kito. Taigi, iš principo šis mikroskopas gali pasiekti atominę skyrą. STM tinka laidžių medžiagų ir puslaidininkių paviršiams matuoti. Už STM išradimą, kurį 1981 metais IBM Ciuricho padalinyje padarė Gerd Binnig ir Heinrich Rohrer, 1986 metais paskirta fizikos Nobelio premija.

STM trūkumas biologijos požiūriu yra tas, jog tam, kad tekėtų tunelinė srovė, būtina, jog bandinys būtų laidus elektrai. Biologiniai bandiniai dažniausiai tokie nebūna, todėl jiems charakterizuoti dažniau naudojami kiti skenuojančio zondo mikroskopai.



47 pav. Skenuojančio tunelinio mikroskopo schema.

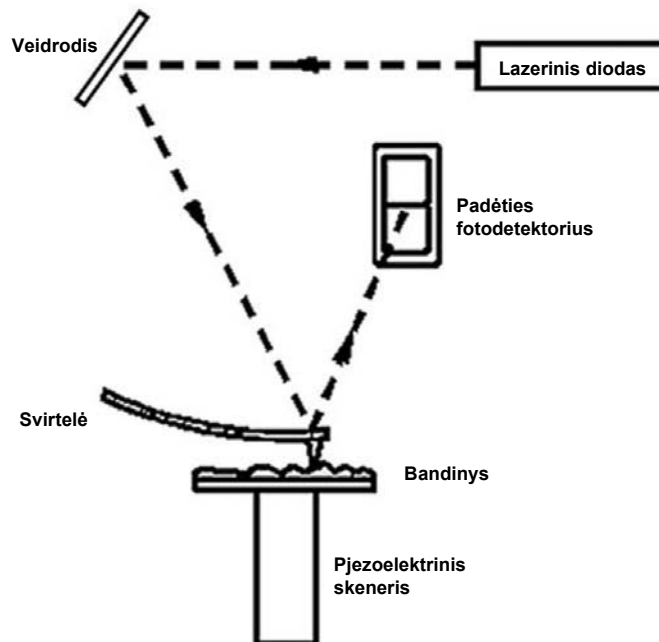


48 pav. Silicio kristalo paviršius, nuskenuotas tunelinio mikroskopy. Matyti pavieniai silicio atomai, išsidėstę į gardelę.

Atominės jėgos mikroskopas (AJM)

Atominės jėgos mikroskopai (AJM) išaugo iš STM ir šiuo metu yra daug labiau paplitę negu jų pirmtakai. Skirtingai nuo STM, AJM galima tirti ir izoliatorius, ir puslaidininkius, ir laidininkus.

AJM zondas yra adata, kurios ilgis paprastai neviršija $5\ \mu\text{m}$, o smaigalio skersmuo mažesnis už $10\ \text{nm}$. Adata tvirtinama prie laisvojo svirtelės galo. Svirtelės ilgis paprastai yra $100\text{-}500\ \mu\text{m}$. Jėga, kuria adatos galo atomai sąveikauja su bandiniu, išlenkia svirtelę. Tą išlenkimą lengva registruoti pagal atspindį nuo svirtelės viršaus. Pirmųjų AJM zondai buvo deimanto gabaliukai, priklijuoti prie aukso folijos juostelės, dabartiniai dažniau gaminami litografijos metodais. Svirtelės atsilenkimas ir yra AJM detektoriaus signalas. Jį sukelti gali keletas rūšių jėgos, o kuri iš jų dominuoja, paprastai priklauso nuo atstumo tarp zondo ir bandinio. Šios bazinės schemas variacijos panaudojamos, nustatant įvairus AJM darbo režimus, kurie skiriasi iš esmės tuo, kurią sąveiką zondas jaučia ir kaip ta sąveika registruojama.



49 pav. Atominės jėgos mikroskopo schema.

Daugelis AJM svirtelės atsilenkimą registruoja optiškai. Klasikinėje schemoje (49 pav.), šviesos pluoštas, kurį spinduliuoja lazerinis diodas, apšviečia svirtelės „nugarėlę“ ir atsispindi ant padėčiai jautraus fotodetektoriaus. Atsilenkus svirtelei, pluošto padėtis ant fotodetektoriaus pakinta. Svirtelės ilgio santykis su atstumu tarp svirtelės bei padėties detektoriaus leidžia šį pokytį registruoti kaip norime tiksliai. Galima tai paaiškinti, panaudojant analogiją su veidrodžiu, atspindinčiu „saulės zuikutį“ ant sienos. Jei tik siena yra toli nuo veidrodžio, net ir nedidelis veidrodžio kampo pokytis sukels didelį (erdviškai) atsipindėtos šviesos dėmės poslinkį. Tokia detekcijos schema leidžia registruoti angstromo dalių vertikalios svirtelės poslinkius, kuriuos sukelia svirtelės skenavimas bandinio paviršiuje.

Kai AJM užregistruoja svirtelės atsilenkimą, pagal jį galima generuoti bandinio topografinį vaizdą su Z koordinatės grįžtamuju ryšiu arba be jo. Tai atitinka vadinamąjį „pastovaus aukščio“ arba „pastovios jėgos“ AJM matavimo režimą. Matuojant pastovios jėgos režimu (grįžtamasis ryšys įjungtas), registravimo greitį riboja grįžtamojo ryšio atsako laikas, tačiau tada tiksliai kontroliuojama sąveikos tarp zondo ir bandinio jėga. Dėl to šiuo režimu dažniausiai ir naudojamosi. Pastovaus aukščio režimas (be grįžtamojo ryšio) gali būti naudojamas matuojant atomo matmenų aukščio variacijas lygiuose paviršiuose, t.y. tada, kai atsilenkimai yra labai maži. Taip pat šis režimas būtinas tada, kai norma realiu laiku matyti paviršiaus topografijos pokyčius ir skenuoti reikia labai greitai.

AJM darbo režimai

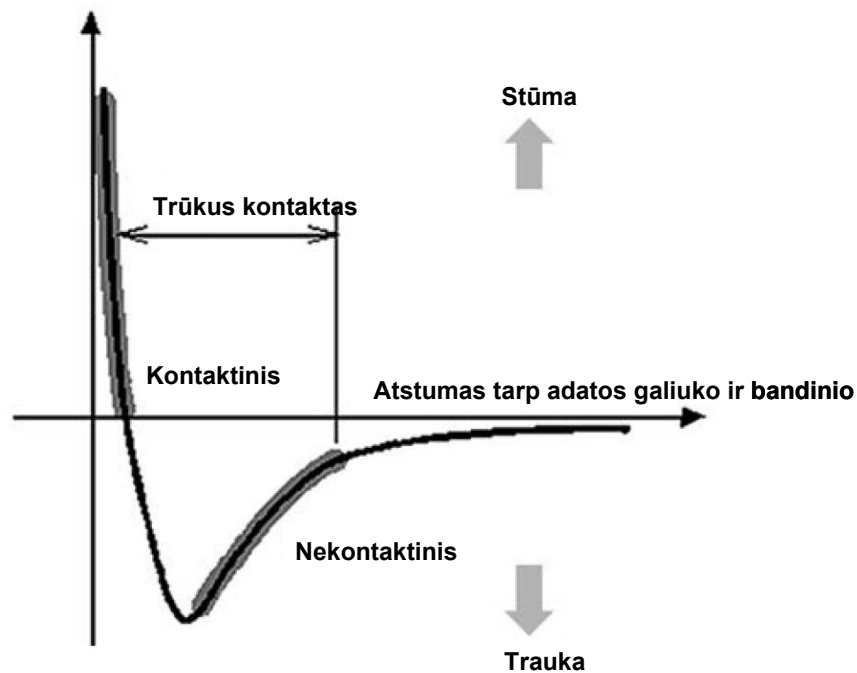
Kontaktinis režimas. AJM dirbant kontaktiniu režimu, adata visą laiką remiasi į bandinio paviršių. Tokiais atvejais imama adata ant svirtelės su maža tamprumo konstanta, mažesne nei atomus tarpusavyje jungiančios jėgos. Skeneriui švelniai braukiant bandinio paviršiumi, kontaktinė jėga išlenkia svirtelę ir ši prisitaiko prie bandinio paviršiaus topografijos.

Adatos galiuko atomo ir bandinio atomo sąveikos potencinė energija parodyta 50 pav. Tai tipinis tarpatominės (ar tarpmolekulinės) sąveikos potencialas: atomams artėjant, jie ima traukti vienas kitą dėl dispersinių jėgų (indukuotų dipolinių momentų sąveikos).

Toliau jiems artėjant vienas prie kito, atomų elektronų orbitalės ima persikloti ir pradeda dominuoti elektrostatinė stūmos jėga. Taigi, potencinės energijos kreivė ties tam tikru atstumu pereina nulį ir greitai tampa teigiama (t.y. atsiranda stūmos jėga).

Stūmos režime kreivės labai stati, t.y. net nedidelis koordinatės pokytis sąlygoja didelį jėgos pokytį. AJM mikroskope tai reiškia, jog lengviau išlinkti svirtelėi negu dar labiau suartėti adatos galiuko ir bandinio atomams. Net jei naudojama visai nelanksti svirtelė, šis atstumas nepasikeis, o deformuosis arba svirtelė, arba bandinys arba abu.

Be jau minėtų jėgų, AJM adatą veikia ir dar dvi: kapiliarinė jėga ir pačios svirtelės veikimo jėga. Kapiliarinė jėga atsiranda dėl skysčio sluoksnio, dengiančio bandinį (atmosferos aplinkoje tai dažniausiai vanduo). Dėl kapiliarinių jėgų vanduo „prilimpa“ prie adatos ir stipriai traukia ją prie paviršiaus. Šios jėgos dydis priklauso nuo atstumo tarp bandinio ir adatos. Svirtelės sukurta jėga – tai tiesiog sulenktos spyruoklės tamprumo jėga, kuria svirtelė per adatą veikia bandinį.



50 pav. Atomų sąveikos potencinė energija ir AJM darbo režimai

Kai adata kontaktuoja su bandiniu, kapiliarinė jėga yra pastovi, nes atstumas tarp adatos ir paviršiaus yra pastovus, o sumažinti jo nebeįmanoma (čia darome prielaidą, kad

vandens sluoksnelis tolygiai dengia visą tiriamą paviršių). Tuomet kinta jėga, kuria svirtelė veikia bandinį.

Nekontaktinis režimas. Nekontaktinis AJM režimas – tai vienas iš virpančios svirtelės režimų. Dirbant šiuo režimu, AJM svirtelė virpinama šalia bandinio paviršiaus. Atstumas tarp bandinio ir adatos nekontaktiniame AJM režime siekia dešimtis ir šimtus angstromų, o potencinės energijos sritis, kurioje yra adatos ir bandinio atomai pavaizduota 50 pav. Šiame režime tarpatominė sąveika tarp svirtelės ir bandinio yra trauka (atsirandanti dėl van der Waalso sąveikų). Nekontaktiniame režime sistema virpina svirtelę dažniu, artimu jos rezonansiniam dažniui (paprastai 100-400 kHz), o virpėjimo amplitudė siekia kelias dešimtis ar šimtus angstromų. Dėl sąveikos su paviršiumi jėgos keičiasi svirtelės rezonansinis dažnis arba virpėjimo amplitudė. Adatos ir bandinio trauka paprastai silpnesnė nei stūma, patiriama kontaktiniame režime, todėl ją palaikyti daug sunkiau. Be to, svirtelės naudojamos nekontaktiniam AJM turi būti stangresnės nei tos, kurios naudojamos kontaktiniam režimui. Dėl šių dviejų veiksnių, detektoriaus signalas nekontaktiniame režime yra sunkiau registruojamas ir tenka naudoti jautrias detekcijos schemas.

Nekontaktiniame režime visuomet naudojamas Z koordinatės grįžtamasis ryšys. Sistema nuolat stebi svirtelės virpesių dažnį ar amplitudę ir stengiasi išlaikyti juos pastovius, kompensuodama bandinio paviršiaus topografijos kitimą poslinkiu Z kryptimi. Z koordinatės valdymo įtampa, generuojama grįžtamojo ryšio grandinėje ir sudaro nekontaktinio AJM duomenis.

„Tapšnojimo“ režimas (TappingMode) . Šį režimą sugalvojo ir užpatentavo „Veeco instruments“. Jame, kaip ir nekontaktiniame režime, svirtelė virpa, tačiau skirtumas yra tas, jog kiekvieno virpesių periodo metu ji pasiekia kontaktą su bandiniu. Kintant bandinio paviršiaus topografijai, keičiasi adatos judėjimo amplitudė. Topografinis vaizdas gaunamas stebint šį pokytį ir stengiantis išlaikyti jį kaip galima mažesnę Z koordinatės grįžtamojo ryšio cikle. Dirbant su biologiniais bandiniais, šis režimas tapo itin populiarus, nes jis padeda išvengti problemų, susijusių su kitais AJM režimais. Kadangi šiame režime neveikia paviršinės jėgos, nepažeidžiami bandiniai ir metodas

geriau tinka „minkštai“ biologinei medžiagai. Būtent su tokiomis medžiagomis, kurių tirti neleidžia kontaktinis ir nekontaktinis AJM, „tapšnojimo“ režimas leidžia pasiekti geriausių rezultatų.

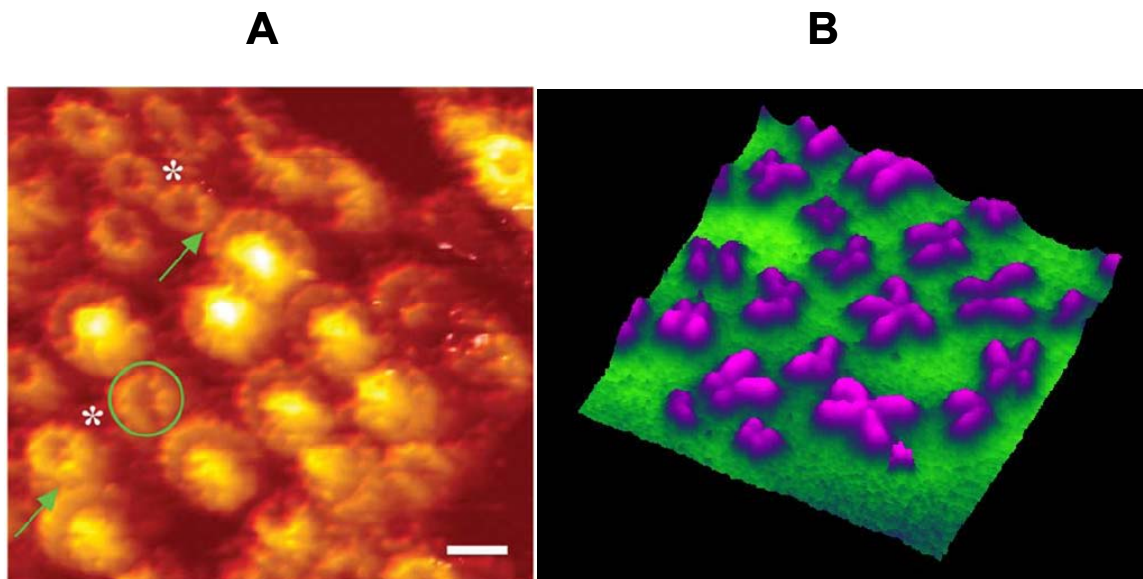
Dar vienas svarbus šio režimo privalumas – tai sugebėjimas išvengti bandinį dengiančio skysčio ar dujų sluoksnio įtakos, kuri visuomet atsiranda, dirbant įprastinės atmosferos sąlygomis. Svirtelės virpėjimo amplitudė, dirbant „tapšnojimo“ režime siekia kelias dešimtis nanometrų, todėl adata neįklimpsta šiame skysčio sluoksnyje. Dirbant nekontaktiniu režimu, virpėjimo amplitudė daug mažesnė ir adata dažnai įklimpsta skystyje, jei tik neskenuojama ypač lėtai.

Dažniausiai „tapšnojimo“ AJM režimas daug efektyvesnis už nekontaktinį, bet ypač tai pasakytina apie taikymus, kai reikia tirti didelius plotus, o bandinio paviršius varijuoja palyginti smarkiai. Šis režimas taip pat gali būti atliekamas dujose ir korozijos nesukeliančiuose skysčiuose.

Sukamojo rezonanso režimas. Šiame režime naudojama tuo, kad, skenuojant adatą bandiniu, svirtelę veikia sukimo jėga. Todėl padaroma taip, kad svirtelė virpa sukamuju judesiu aplink savo ašį, o virpesių dažnis artimas rezonansiniam. Skenuojant paviršių, dėl sąveikos su juo keičiasi virpėjimo dažnis. Šis metodas įdomus tuo, kad leidžia charakterizuoti medžiagos paviršiaus anizotropiją (juk svirtelė sukiojasi tik viena kryptimi).

Yra ir daugiau AJM darbo režimų, besiskiriančių savo grįžtamojo ryšio schema ir detektoriaus signalu. Tai fazės vaizdinimas, jėgos spektroskopija ir kt.

Keletas pavyzdžių, kur AJM buvo panaudotas biologinių objektų vaizdinimui pateikta 51 pav. Tai purpurinių bakterijų fotosintetinės membranos vaizdas, kuriame matyti fotosintetinės antenos LH2 ir LH1, pastaroji supa reakcinį centrą [20]. Toks membranos modelis buvo pasiūlytas ir iki šio darbo, remiantis rentgeno kristalografijos bei spektroskopijos duomenimis, tačiau AJM leido pirmą kartą pademonstruoti, kad *in vivo* bakterijų fotosintetinės membranos organizacija yra būtent tokia. Kitame paveikslėlyje parodytas žmogaus chromosomų vaizdas mitozės metu. Atlikta chromosomų analizė, tarpusavyje kombinuojant optinę leido identifikuoti net genetines anomalijas [21].

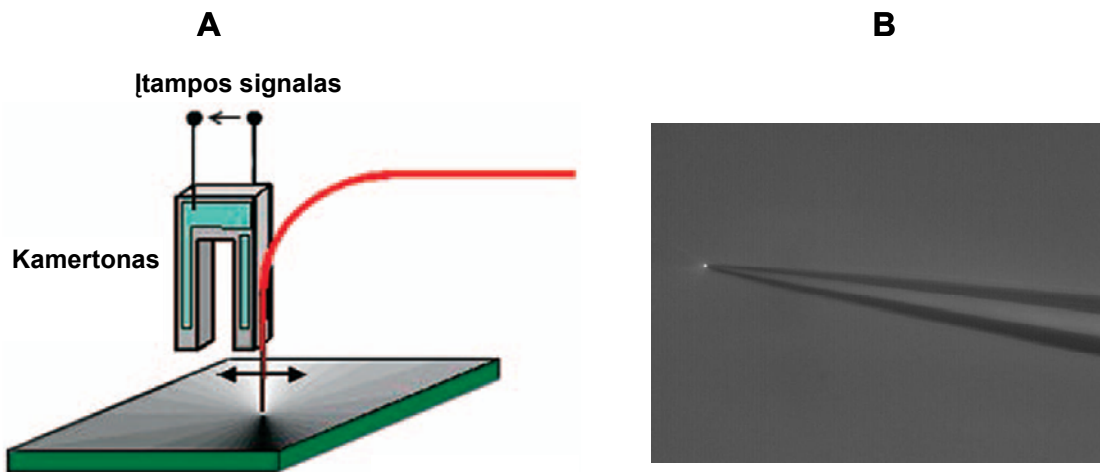


51 pav. Biologinių objektų vaizdai, užregistruoti atominės jėgos mikroskopu. A: purpurinių bakterijų fotosintetinė membrana. Dideli pilnaviduriai žiedai – tai šviesą surenkanti antena LH1, supanti reakcinį centrą, maži žiedai – šviesą surenkanti antena LH2; B: Žmogaus chromosomos per mitozę.

Skenuojantis artimojo lauko optinis mikroskopas (SNOM)

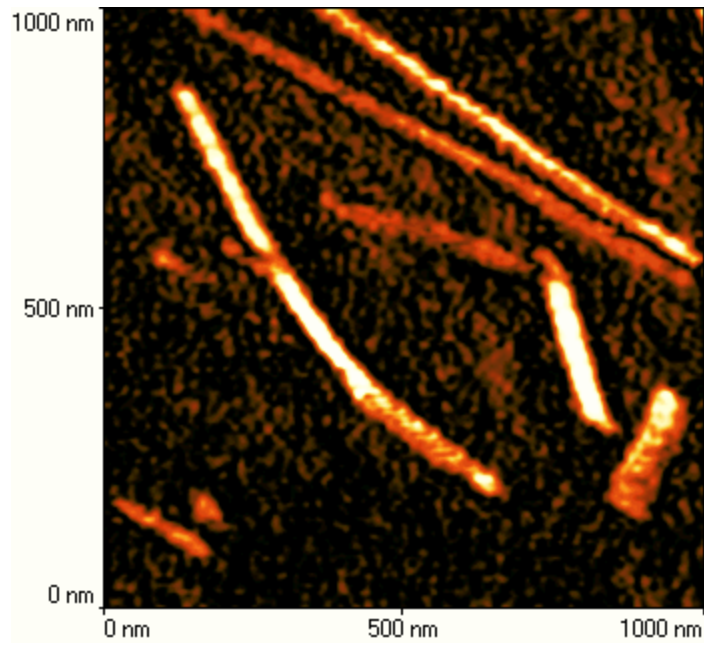
Skenuojantis artimojo lauko optinis mikroskopas (angl. *scanning near field optical microscope*, SNOM) – tai skenuojančiojo zondo ir optinio mikroskopo kombinacija, leidžianti optiniais metodais tirti struktūras, kurių matmenys mažesni už šviesos bangos ilgį. Šio mikroskopo zondas yra ištemptas vienamodis šviesolaidis, ant kurio užgarinta metalinė atspindinti danga. Šviesolaidžio gale paliekama kelių dešimčių nanometrų apertūra, pro kurią išeina šviesa. Jei dirbama artimojo lauko režime, t.y. šviesolaidis prikišamas atomo matmenų neviršijančiu atstumu prie bandinio, sužadinas tik tas bandinio plotas, kurio dydis atitinka šviesolaidžio apertūros dydį. Kadangi fluorescuoja tik sužadintos bandinio molekulės, tokio mikroskopo skyros neriboja difrakcija. Žinoma, už tai tenka sumokėti ištemptame šviesolaidyje patiriamais šviesos nuostoliais, tačiau jei lazerinis šaltinis, kuriuo žadinamas bandinys, yra pakankamai intensyvus, iš šviesolaidžio išėjusios šviesos kiekis yra pakankamas, kad efektyviai sužadintų bandinio fluorescenciją.

SNOM gali dirbti ne vien fluorescencijos, bet ir šviesaus lauko ar fazinio kontrasto režimu: tuomet šviesa *surenkama* pro ištemptą šviesolaidį su gale esančia apertūra.



52 pav. Artimojo lauko skenuojantis optinis mikroskopas. A – vertikalios pozicionavimo schema, panaudojant kamertoną su talpinu .

Techninis sprendimas, kaip išlaikyti šviesolaidį atominių matmenų atstumu nuo bandinio paviršiaus, yra panašus į AJM: zondas tvirtinamas prie pjezoelektrinio kamertono, (jie gaminami, pvz., iš kristalinio kvarco, o rezonansinis dažnis yra ultragarso srityje ir siekia dešimtis kHz), kuris žadinamas dažniu, artimu rezonansiniam dažniui. Šviesolaidžiui priartėjus prie bandinio paviršiaus, dėl sąveikos su juo šis dažnis pasikeičia. Dažnio pokytis ir yra detektoriaus signalas, kurį stengiamasi sumažinti Z koordinatės grįžtamojo ryšio cikle. pav. parodyta SNOM mikroskopu užregistruotas tabako mozaikos virusų, kurių storis – 18 nm, vaizdas.



53 pav. Tabako mozaikos viruso vaizdas, užregistruotas artimojo lauko skenuojančiu optiniu mikroskopu.

Elektroninė mikroskopija

Iš kvantinės mechanikos žinoma, kad vakuume judantys elektronai elgiasi kaip bangos. Jie sklinda tiesiomis trajektorijomis, o jų bangos ilgi, galime nustatyti iš de Broglie formulės, siejančios dalelės impulsą ir jos de Broglie bangos ilgį:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{mv} \quad (44).$$

Čia h – Planck'o konstanta, p – elektrono impulsas, o m ir v – jo masė ir greitis. 10 kV įtampos pagreitinto elektrono bangos ilgis yra apie 0.1 angstromo. Taigi, jei elektroninio mikroskopo, kaip ir optinio, skyrą riboja difrakcija, jis leidžia stebėti angstromų matmenų detales.

Be to, elektroną, judantį elektromagnetiniame lauke, nusakomame elektrine (lauko stipris \mathbf{E}) ir magnetine (indukcija \mathbf{B}) dedamąja, veikia Lorencio jėga:

$$\mathbf{F} = e(\mathbf{E} + [\mathbf{v}, \mathbf{B}]) \quad (45),$$

t.y., tinkamai parinkus lauką, galima pasiekti, kad elektronų pluoštas jame užlinks arba lūš, kaip lūžta šviesa, keliaudama per dviejų medžiagų, pvz., oro ir stiklo, ribą.

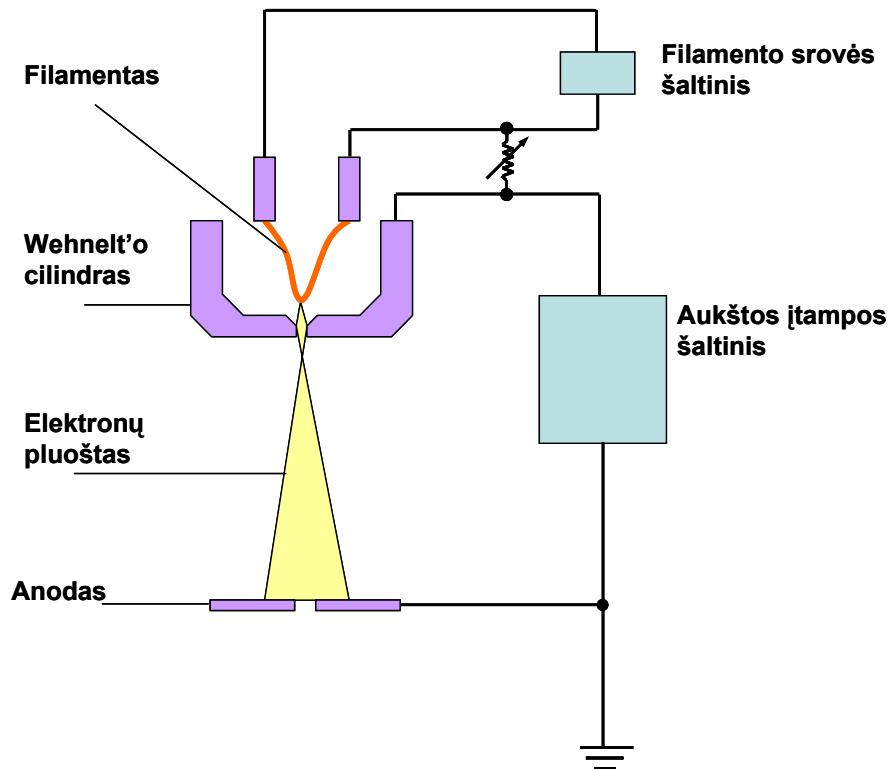
Dr. Ernst Ruska 1931 metais panaudojo šias dvi elektronų savybes ir sukonstravo pirmąjį elektroninį mikroskopą, už kurį buvo 1986 metais apdovanotas fizikos Nobelio premija. Jo sukurto mikroskopo skyra siekė 100 nm, o šiuolaikiniai elektroniniai mikroskopai pasiekia 0.1 nm skyrą ir didinimą, viršijantį milijoną kartų.

Optiniai mikroskopai sudaryti iš šviesos šaltinio ir optinių lęšių sistemos. Taigi, pagal analogiją, elektroninį mikroskopą sudaro a) elektronų šaltinis ir b) elektronų lęšiai. Aptarsime abiejų šių elementų konstrukciją ir veikimą.

Elektronų šaltinis. Elektronų šaltinis elektroniniame mikroskope yra elektronų patranka, sudaryta iš katodo (filamento), Wehnelt'o cilindro ir anodo (54 pav.). Iš esmės tai yra vakuuminis triodas, tik labai didelių matmenų ir su anodo įtampa, siekiančia dešimtis kilovoltų. Filamentas – tai sulenkta volframo viela, per kurią tekanti srovė įkaitina ją iki maždaug 2700 °C. Įkaitus metalui, vyksta termioninė emisija, t.y. laisvieji

metalo elektronai dėl terminio sužadavimo palieka filamentą ir sudaro elektronų debesį aplink jį.

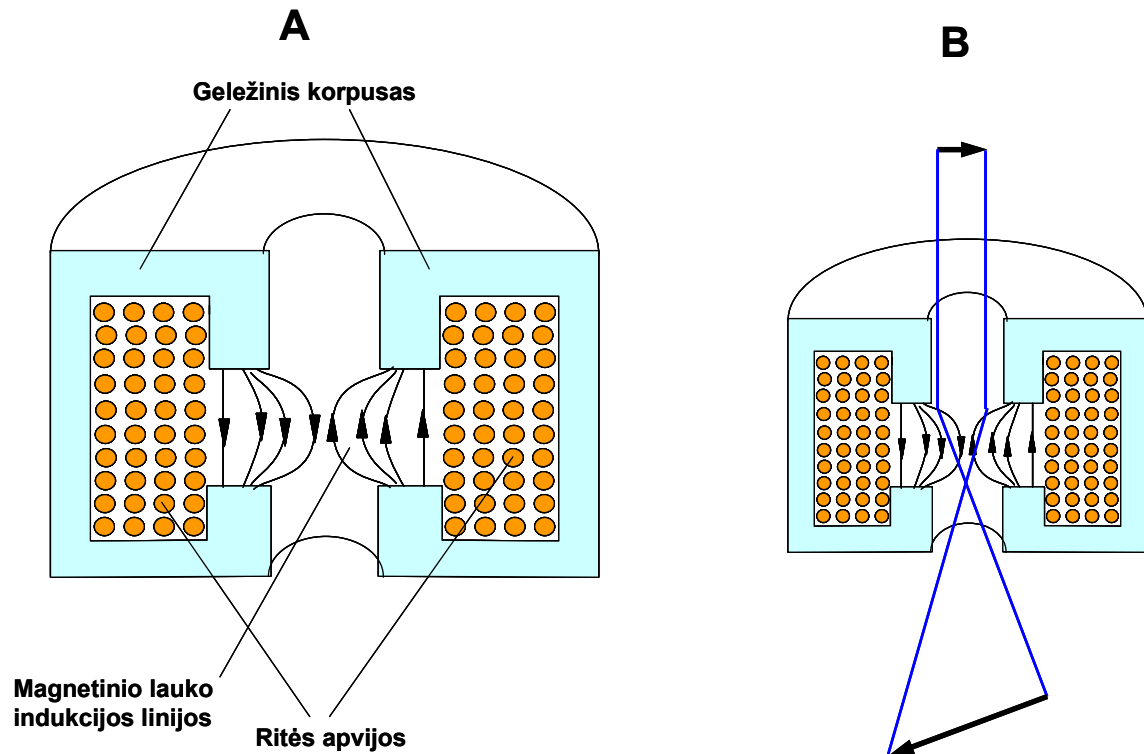
Tarp filamento ir anodo prijungiama itin aukšta teigiama įtampa, kuri „ištraukia“ elektronus iš erdvės aplink filamentą ir greitindama „tempia“ link anodo. Anode yra skylė, pro kurią elektronai išlekia jau kelių šimtų tūkstančių kilometrų per valandą greičiu. Pakeliui elektronų pluoštas praeina pro Wehnelt'o cilindru, prie kurio prijungta neigiama įtampa leidžia sufokusuoti elektronus į siaurą pluoštelį.



54 pav. Elektronų patrankos, naudojamos elektroniniuose mikroskopuose, sandara.

Elektronų lęšis. Elektronų lęšį sudaro ritė, patalpinta į minkštosios geležies (feromagnetinį) apvalkalą, kurio viduryje išpjauta skylė (55A pav.). Feromagnetinis korpusas sukcentruoja magnetinį lauką ties išpjova. Ritės apvijomis tekanti srovė aplink save kuria magnetinį lauką, kuris ritės centre silpniausias (dėl cilindrinės ritės simetrijos), o šalia išpjovos – stipriausias. Taigi, elektronai, pralekiantys šalia korpuso kraštų, nukreipiami stipriau nei tie, kurie lekia pro ritės centrą. Bendras rezultatas yra tas, jog lygiagretus elektronų pluoštas surenkamas į vieną tašką, t.y. tokio elektromagnetinio lęšio poveikis elektronų pluoštui yra panašus kaip optinio lęšio poveikis šviesos pluoštui.

Tačiau yra ir skirtumų. Kaip rodo Lorencio jėgos formulėje (45) esanti elektrono greičio ir magnetinės indukcijos vektorinė sandauga, elektronai nukreipiami kryptimi, statmena jų greičiui bei magnetinio lauko indukcijai, t.y. ritėje jie juda spirale. Todėl atvaizdas gaunamas pasuktas originalo atžvilgiu (55B pav.). Ši savybė būdinga tik elektromagnetiniams lęšiams. Kita tik jiems būdinga savybė – tai, jog keičiant srovės, tekančios rite, stiprumą, galima keisti lęšio židinio nuotolį.

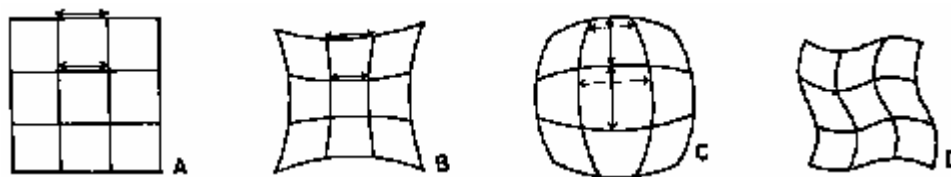


55 pav. A: Elektronų lęšio konstrukcija. B: vaizdo formavimas elektronų lęšiu.

Pastebėkime, kad elektromagnetiniai lęšiai visuomet yra tik glaudžiamieji, t.y. lygiagrečius elektronų pluoštelių fokusuojantys židinio taške, o iš židinio taško išspinduliuotus pluoštelių kolimuojantys.

Elektromagnetiniams lęšiams būdingos tos pat aberacijos kaip ir optiniams: chromatinė (židinio nuotolis priklauso nuo elektronų bangos ilgio, t.y. nuo greičio), sferinė (elektronai einantys pro lęšio kraštus fokusuojasi kitoje vietoje, nei tie, kurie eina netoli lęšio centro), astigmatizmas (tai, kas buvo apskritimas originale tampa elipse atvaizde). Be to, dėl elektromagnetinių lęšių savybių, atsiranda vadinamoji distorsija

(vaizdo iškraipymas), kuri gali turėti keletą formų: statinės, pagalvės arba sigmoidinę (žr. 56 pav.). Sigmoidinė distorsija būdinga tik elektromagnetiniams lęšiams.



56 pav. Distorsijos elektroniniame mikroskope. A – neiškraipytas vaizdas; B – statinės distorsija; C – pagalvės; D – sigmoidinė.

Problemos, susiję su chromatine aberacija, sprendžiamos kaip galima labiau stabilizuojant elektronų greitinimo įtampą ir naudojant plonus bandinius. Sudėtingiausia techninė problema – sferinė aberacija. Ją spręsti galima tik mažinant lęšių apertūras, tačiau tai riboja mikroskopų skiriamąją gebą ir naudingą didinimą.

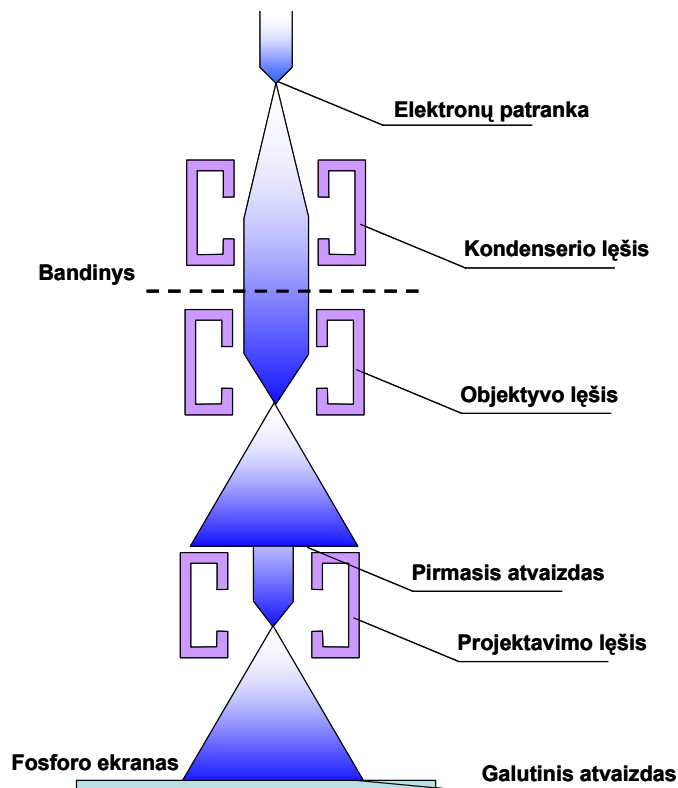
Jau aptarėme svarbiausias elektroninio mikroskopo sudedamąsias dalis – elektronų patranką ir elektronų lęšius. Be jų, svarbi elektroninio mikroskopo dalis yra vakuumo palaikymo sistema. Reikalas tas, jog elektronai kaip bangos elgiasi tik būdami vakuume. Medžiaga elektronus sklaido itin stipriai: ore 100 kV įtampos pagreitintas elektronų pluoštas visiškai sustoja, nukeliavęs vos 2 cm atstumą. Todėl visa elektroninio mikroskopo kolona, pradedant elektronų patranka ir baigiant bandiniu, yra vakuume, kurio slėgis neviršija $3 \cdot 10^{-5}$ Pa. Dėl tos pačios priežasties pralaidumo režime veikiančio elektroninio mikroskopo bandiniai turi būti ploni, ne storesni negu 0.5 μm .

Pralaidumo elektroninis mikroskopas

Pralaidumo elektroniniai mikroskopai (angl. *Transmission Electron Microscope, TEM*) apšviečia bandinį lygiagrečiu elektronų pluoštu, tuomet suformuotą atvaizdą padidina ir suprojektuoja ant fosforo ekrano. Jų veikimą galima palyginti su peršvietimo režimu dirbančio šviesaus lauko mikroskopo. TEM principinė schema parodyta 57 pav. Iš elektronų patrankos išėjęs elektronų pluoštas kolimuojamas kondenserio lęšiu ir apšviečia bandinį. Pro bandinį praėję elektronai suformuoja vaizdą, kuris dviem etapais padidinamas objektyvo ir projektavimo lęšiu bei suprojektuojamas ant fosforo ekrano.

Fosforo vaizdą galima fiksuoti CCD kamera arba ant fotografinės juostelės (elektronų pluoštas šiai turi tokį pat poveikį kaip ir šviesa). Elektronų pluoštas su bandiniu gali sąveikauti šiais pagrindiniais būdais:

1. Dalis elektronų sustabdoma (absorbuojama), priklausomai nuo bandinio storio ir medžiagos tankio. Šis sąveikos mechanizmas atsakingas už vadinamąjį amplitudinį vaizdo kontrastą.
2. Dalis elektronų išsklaidoma mažais kampais, o sklaidos efektyvumas priklauso nuo bandinio sudėties. Tai vadinamasis fazinis vaizdo kontrastas.
3. Jei bandinys yra kristalas, elektronai nuo jo efektyviai išsklaidomi tik tam tikromis kryptimis, atitinkančiomis kristalo simetriją ir struktūrą. Tai vadinamoji elektronų difrakcija, atsakinga už difrakcinį vaizdo kontrastą.
4. Dalis elektronų „atsispindi“ nuo bandinio, t.y. yra išsklaidomi atgal.
5. Į bandinį pataikęs elektronas gali išmušti iš bandinio papildomus elektronus, vadinamus antriniais elektronais.
6. Į bandinį pataikęs elektronas gali priversti bandinį spinduliuoti rentgeno spindulius (tai vadinamasis *bremsstrahlung* arba stabdymo spinduliavimas). Rentgeno spindulių spektras priklauso nuo cheminių elementų, sudarančių bandinį.
7. Apšaudymas elektronais gali sukelti bandinio liuminescenciją, tai vadinamoji katodoliuminescencija. Būtent dėl jos šviečia fosforo ekranas, naudojamas tiek elektroniniuose mikroskopuose, tiek senesiuose kineskopus turinčiuose televizoriuose.
8. Galiausiai, kai kurie elektronai gali sklisti toliau, praradę dalį savo energijos. Juos galima registruoti vadinamuoju energijos nuostolių spektrometru, atitinkančiu prizmę ar gardele, naudojamą optinėje mikroskopijoje.



57 pav. TEM mikroskopo principinė schema.

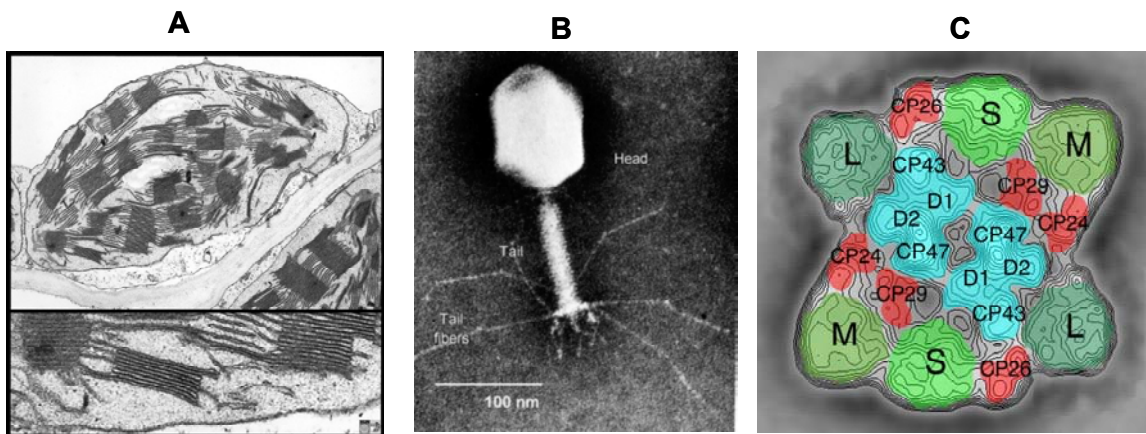
Pralaidumo elektroniniame mikroskope, dirbant su biologiniais bandiniais vaizdą daugiausiai formuoja amplitudės ir fazės kontrastas, o tiriant kristalinius bandinius – fazės kontrastas bei difrakcija.

Bandinių parengimas. Bandinys pralaidumo elektroniniam mikroskopui turi pasižymėti tam tikromis savybėmis: būti atsparus vakuumui, esančiam mikroskopo kolonoje, skersiniai matmenys neturi viršyti maždaug 3 mm, o storis – 0.5 μm . Tradicinis biologinių bandinių parengimas elektroninei mikroskopijai atliekamas taip: bandinys apdorojamas chemiškai, pašalinant vandenį ir fiksuojant bandinį taip, kad jis išliktų kiek įmanoma artimesnis jo natūraliai būklei. Tuomet bandinys dedamas į sukietėjančią dervą. Sukietėjusi derva pjaustoma ultramikrotomu (vibracinis peilis su stiklo ar deimanto ašmenimis), atpjaunant maždaug 0.5 μm storio sluoksnelius. Šios plonytės nuopjovos uždedamos ant bandinio laikiklio, paprastai 3 mm diametro varinių grotelių, padengtų 0.1 μm storio anglies plėvele. Tiriant baltymus, dažnai naudojamas „neigiamo nudažymo“ metodas, t.y. baltymai parengiami sunkiųjų metalų druskų tirpaluose. Tirpalui išdžiūvus, sunkiojo metalo druska nusėda ant baltymų paviršiaus ir

įsiterpia į išorines ertmes, bet į molekulių vidų neprasiskverbia. Sunkiųjų metalų elementai turi daug elektronų, todėl su elektronų pluoštelių sąveikauja daug efektyviau nei biologinė medžiaga, kurią sudaro lengvi atomai. Taip išgaunamas geresnis kontrastas.

Dar vienas biologinių bandinių parengimo triukas – tai vadinamoji užšaldymo ir nuskėlimo metodika, kai biologinis bandinys staigiai užšaldomas skystame azote, tuomet nuskeliamas ir pagaminama gauto paviršiaus replika, vakuume užgarinant ant jo sunkųjį metalą. Ši metodika dažnai naudojama biologinių membranų tyrimams. Kartais naudojama ir tiesiog užšaldymo metodika, kai plonas baltymo tirpalo sluoksnis užšaldomas amorfiniame lede.

Tipniai pralaidumo elektroninės mikroskopijos taikymai. TEM naudojamas tiriant baltymų struktūrą. Pirmasis baltymas, kurio struktūra buvo išaiškinta iki atominio lygio – tai fotosintetinė augalų antena LHCII [22]. Žinoma, tokie tyrimai yra labai sudėtingi, nes norint atlikti elektronų difrakcijos eksperimentą, pirmiausia reikia užauginti baltymo dvimatį kristalą. Be baltymų, TEM leidžia tirti baltymų superkompleksus, virusus ir ląstelių organoidus (58 pav.). Apibendrinant galima pasakyti, kad TEM mikroskopija dažniausiai taikoma tirti itin mažų biologinių objektų struktūrai, pasiekiant nanometrų skyrą, kai šie bandiniai išlaiko vakuumą, cheminę fiksaciją ir apšaudymą elektronais⁵.



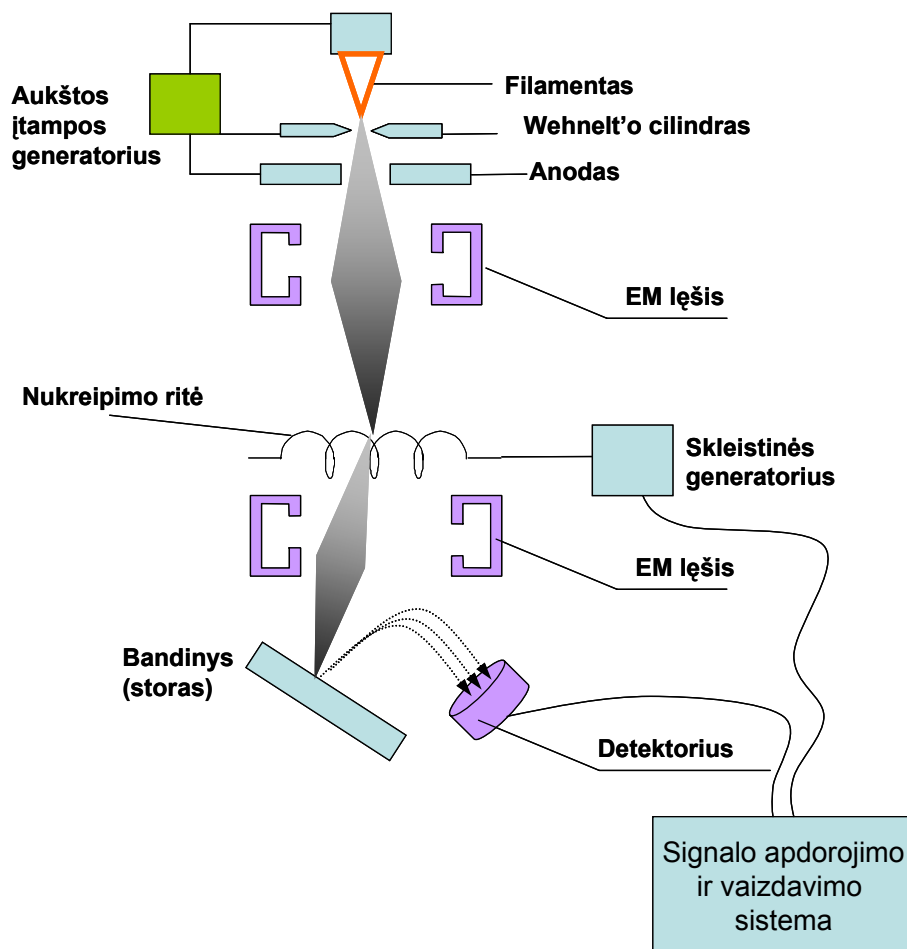
58 pav. Vaizdai užregistruoti TEM mikroskopu: A – tabako chloroplastas; B – bakteriofagas T4 (virusas); C – antrosios augalų fotosistemos PSII superkompleksas (šis vaizdas buvo sumodeliuotas, ištyrus ir suvidurkinus daugelio tokių kompleksų rezultatus [9]).

⁵ Tipinė elektronų pluošto srovė TEM mikroskopuose siekia $1 \text{ pA} = 10^{-12} \text{ A}$. Tai reiškia, kad kas sekundę bandinį pasiekia apie 6 milijonai elektronų per sekundę.

Skenuojantis elektroninis mikroskopas

Kalbėdami apie TEM, lyginome jį su pralaidumo režimu dirbančiu šviesaus lauko optiniu mikroskopu. Kita elektroninio mikroskopo variacija, skenuojantis elektroninis mikroskopas (SEM), pagal panašią analogiją atitiktų konfokalinį skenuojantį mikroskopą. Skenuojančio elektroninio mikroskopo schema parodyta 59 pav. Čia elektronų pluoštas į bandinį krenta sufokusuotas iki vieno ar kelių nanometrų dydžio skersmens, o jo padėtį ant bandinio valdo nukreipimo ritė, panašiai kaip televizoriaus kineskope. Atgal nuo bandinio išsklaidytus arba antrinius elektronus, atsirandančius dėl bandinio apšaudymo, registruoja detektorius. Tai gali būti scintiliaciniai detektoriai, kuriuose antriniai elektronai pataiko į fosforo ekraną, o išspinduliuotus fotonus registruoja fotodaugintuvas. Taip pat dažnai naudojami puslaidininkiniai detektoriai, kurių atsakas kinta, kai į juos krenta išoriniai elektronai. Registruojamo detektoriaus signalo stiprumas priklauso nuo bandinio sandaros toje vietoje, kur pataiko sufokusuotas elektronų pluoštelis. Detektoriaus signalas registruojamas sinchronizuotai su nukreipimo skeistinės signalu, taip generuojant skenuojamo paviršiaus vaizdą. Pagrindiniai skirtumai tarp SEM ir TEM yra šie:

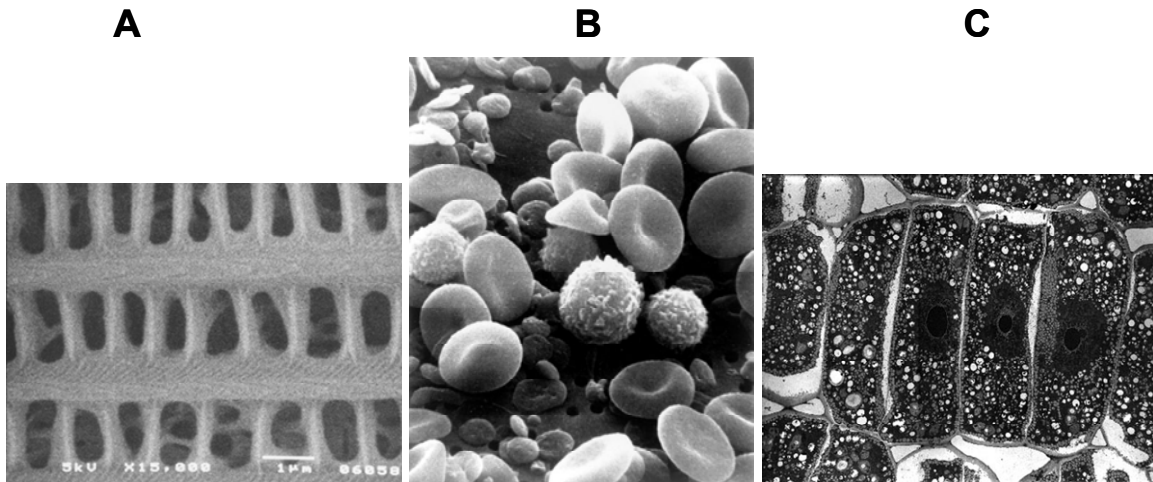
1. TEM atvejų elektronų pluoštas erdvėje yra fiksuotas, o SEM atveju – juda.
2. SEM Bandinys neturi būti itin plonas, nes SEM tiria jo paviršių. Taip pat neribojamas bandinio dydis – jį riboja tik vakuuminės bandinio kameros dydis.
3. Greitinimo įtampos nėra tokios aukštos kaip TEM, nes elektronams nebūtina prasiskverbti pro bandinį. Tipinės SEM anodo įtampos siekia nuo kelių šimtų voltų iki 30 kV.
4. Kadangi elektronų energijos nedidelės, nereikalingas ir itin aukštas vakuumas – SEM dažniausiai užtenka difuzinių ar turbomolekulinių siurblių.



59 pav. Skenuojančio elektroninio mikroskopo schema.

Taigi, SEM taikomas įvairiems paviršiams tirti. Kadangi ši metodika nereikalauja sudėtingo bandinių parengimo, dažnai ji geriau tinka biologiniams bandiniams. Žinoma, yra ir trūkumų: kadangi biologiniai bandiniai paprastai yra nelaidūs elektros srovei, nuo elektronų pluošto jie išielektrina neigiamai ir ima stumti skenuojamą elektronų pluoštą. Todėl dažnai, siekiant aukštų skyrų, bandiniai padengiami laidaus metalo, dažniausiai aukso, sluoksneliu (apie 10 nm). Tai padeda pagerinti vaizdus ir dėl to, kad sunkus metalas, toks kaip auksas, gerai emituoja antrinius elektronus ir gaunami didesnio intensyvumo vaizdai.

Apibendrinant galima teigti, kad TEM ir SEM atveria galimybę pažinti biologinius objektus ir tirti jų struktūros detales, mažesnes už šviesos bangos ilgį. Nors TEM būdinga didesnė skyra, SEM nereikalauja tokio sudėtingo bandinių parengimo, aukšto vakuumo ir dažnai lengviau pritaikomas biologiniams bandiniams nei TEM.



60 pav. Vaizdai, užregistruoti SEM. A – drugelio sparno struktūra, suteikianti sparnui lengumą ir „žaidžiančias“ difrakcines spalvas; B – žmogaus kraujas; C – kukurūzo šaknies meristeminis audinys.

Branduolių magnetinio rezonanso metodai

Branduolių ir elektronų sukiniai

Daugelio atomų branduoliai (ir elektronai) turi sukininį judėjimo kiekio momentą, aprašomą sukinio kvantiniu skaičiumi I (šis skaičius gali būti sveikasis, pusinis ir visada yra didesnis už nulį). Sukininis judėjimo kiekio momentas pasižymi šiomis savybėmis:

1. Jei sukinio kvantinis skaičius yra I , tai sukininio judėjimo kiekio momento absoliuti vertė yra $\hbar\sqrt{I(I+1)}$.

2. Judėjimo kiekio momento projekcija į bet kurią ašį gali turėti vertes $m_I\hbar$, kur

$$m_I = I, I-1, \dots, -I \quad (46)$$

3. Jei $I > 0$, dalelė turi magnetinį momentą, kurio dydis pastovus; jį nusako m_I vertė.

Kitaip tariant, branduolys elgiasi lyg mažas magnetas, pvz., kompasos rodyklė. Taigi, tam tikros ašies atžvilgiu, sukinio judėjimo kiekio momentas gali turėti $2I+1$ skirtingų orientacijų. Protono, elektrono ar neutrono sukinys yra lygus $\frac{1}{2}$, taigi orientacijų gali būti dvi. Branduolių, sudarytų iš daugelio nukleonų, sukinio kvantinis skaičius gali būti lygus ir vienetui, ir daugiau. Toks branduolys yra, pvz., ^{14}N . Jo sukinys gali orientotis į ašį trimis būdais. Kalbėdami apie BMR, daugiausia nagrinėsime **pusinio sukinio** branduolius. Jie gali turėti dvi orientacijas į išorinę ašį, vadinamas α ($m_I = +1/2(\uparrow)$) ir β ($m_I = -1/2(\downarrow)$). Biologinę medžiagą sudarančių elementų izotopai, kurie turi pusinius sukinius yra ^1H (protonas), ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . Tačiau daugelyje branduolių protonų ir neutronų sukiniai yra „susiporavę“ ir tokie branduoliai kaip ^{12}C , ^{16}O sukininio judėjimo kiekio momento bei magnetinio momento neturi, t.y. jis lygus 0. Dėl šios priežasties BMR tokių branduolių „nemato“.

Branduolių energija magnetiniame lauke

Tarkime, kad išorinio magnetinio lauko, kuriame yra aptariamas branduolys, kryptis sutampa su koordinačių sistemos z ašimi. Magnetinio momento projekcija į šią ašį proporcinga judėjimo kiekio momento projekcijai:

$$\mu_z = \gamma J_z = \gamma \hbar m_I \quad (47)$$

γ vadinamas branduolio giromagnetiniu santykiu. Tai empirinis dydis, nustatomas iš eksperimento. Jis dažnai išreiškiamas per vadinamąjį **branduolinį magnetoną**, μ_N ir branduolio **g-faktorių**, g_I , kurio absoliutinė vertė artima vienetui.

$$\gamma\hbar = g_I\mu_N \quad (48),$$

$$\mu_N = \frac{e\hbar}{2m_p} = 5 \times 10^{-27} \text{ JT}^{-1} \quad (49)$$

Lentelėje pateikiami kai kurių biologijai svarbių branduolių sukinių ir magnetinių momentų parametrai.

Izotopas	Paplitimas gamtoje %	Sukinio kvantinis skaičius	g-faktorius
^1H	99.98	$\frac{1}{2}$	5.586
^2H	0.02	1	0.0857
^{13}C	1.11	$\frac{1}{2}$	1.405
^{14}N	99.64	$\frac{1}{2}$	0.404

Kadangi branduoliniame magnetone, lyginant su Boro magnetonu, vardiklyje įeina protono, o ne elektrono masė, branduolių magnetiniai momentai apie 2000 kartų mažesni už elektronų.

Paprasčiausias MR eksperimentas

Branduolio, kurio magnetinio momento projekcija į z ašį yra μ_z energija magnetiniame lauke, kurio indukcija B , lygi magnetinio momento projekcijos ir magnetinio lauko indukcijos sandaugai:

$$E_{m_I} = -\mu_z B = -\gamma\hbar B m_I \quad (50)$$

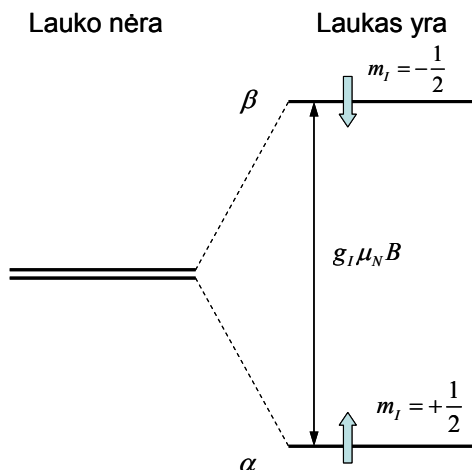
Taigi, kiek galimų projekcijų į z ašį, tiek bus galimų energijos verčių, kurias branduolys gali įgyti išoriniame magnetiniame lauke. Kaip jau minėjome, tokių verčių yra $2I+1$ (I – branduolio sukinio kvantinis skaičius). Šios energijos dažnai išreiškiamos, panaudojant vadinamąjį Larmoro dažnį ν_L , ir susiejant jį su energija pagal Planck'o formulę:

$$E_{m_l} = -m_l h \nu_L \quad (51),$$

kur

$$\nu_L = \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (52).$$

Kuo stipresnis magnetinis laukas, tuo didesnis Larmoro dažnis (61 pav). Protonams 12T magnetiniame lauke būdingas apie 500 MHz Larmoro dažnis.



61 pav. Branduolių su pusiniu sukiniu būsenos išoriniame magnetiniame lauke.

Jei nagrinėjame branduolį su pusiniu sukiniu, energijų skirtumas tarp jo α ir β būsenų yra

$$\Delta E = E_\beta - E_\alpha = \frac{1}{2} \gamma \hbar B - \left(-\frac{1}{2} \gamma \hbar B \right) = \gamma \hbar B = h \nu_L \quad (53).$$

Branduolių α būsenoje energija kiek žemesnė, todėl magnetiniame lauke jų visuomet bus šiek tiek daugiau. Jei branduolių ansamblį apšvitinsime elektromagnetiniu lauku, kurio dažnis ν , rezonanso (efektyvaus apsikeitimo energija tarp EM lauko ir branduolių) sąlyga bus

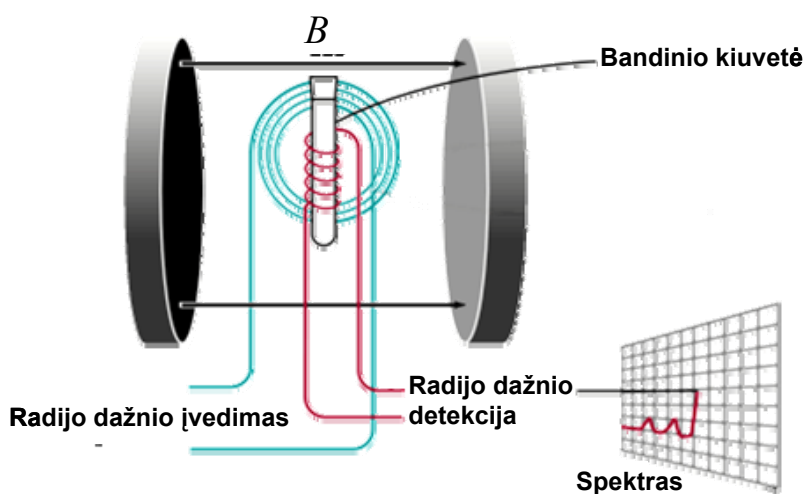
$$h\nu = \gamma \hbar B = h \nu_L \quad (54),$$

t.y. EM laukas su branduolių ansambliu stipriausiai sąveikauja tada, kai jo dažnis lygus tų branduolių Larmoro dažniui. Tuomet sukiniai dėl išorinio EM lauko „verčiasi“ iš α būsenos į β .

Taigi, paprasčiausios formos **branduolių magnetinis rezonansas** (BMR) – tai molekulių savybių tyrimas, įvedant jas į išorinį nuolatinį magnetinį lauką ir stebint, ties kuriais kintamo EM lauko dažniais vyksta efektyvi EM bangų sugertis. Kadangi eksperimentiškai pasiekiamų magnetinių laukų ribose branduolių Larmoro dažniai

atitinka radijo dažnius, tai BMR yra radijo dažnio metodika. Ji skirstoma pagal tai, kokie branduoliai tiriami (protonų magnetinis rezonansas, ^{13}C magnetinis rezonansas ir kt.)

Principinė BMR spektrometro schema pavaizduota 62 pav. Bandinio kiuvetė dedama tarp galingo magneto (rimtam darbui naudojami superlaidūs magnetai, generuojantys 10T ir daugiau) polių ir sukama apie 15 Hz dažniu, kad susividurkintų visi bandinio nehomogeniškumai ir visi branduoliai patirtų tokį pat išorinį lauką. Nors superlaidūs magnetai reikalauja skysto He temperatūros (4K), bandinys paprastai yra temperatūros, artimos kambario temperatūrai ar šiek tiek žemesnės.



62 pav. BMR spektrometro principinė schema.

Aplink bandinį esančios dvi ritės skirtos spinduliuoti radijo dažnio EM laukui ir jam registruoti. Pastebėkime, kad branduolių Larmoro dažnis yra proporcingas magnetinio lauko indukcijai ((54) formulė), taigi BMR spektrometre galime varijuoti tiek EM lauko dažnį, tiek nuolatinį magnetinį lauką, abiem atvejais registruodami tokį pat BMR spektrą.

Kuo stipresnis nuolatinis magnetinis laukas, tuo didesnę BMR signalą registruosime. Taip yra todėl, kad α ir β būsenų užpildos N_α ir N_β tenkina Boltzmann'o pasiskirstymą ir jų santykis

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \approx 1 - \frac{\Delta E}{kT} \quad (55)$$

EM bangų sugerties tikimybę nusako santykis tarp šių užpildų skirtumo ir viso branduolių skaičiaus (juk jei α ir β būsenų bus po lygiai, EM laukas po lygiai sukinių „apvers“ ir į vieną, ir į kitą pusę ir lauko sugerties neturėsime):

$$\frac{N_{\alpha} - N_{\beta}}{N_{\alpha} + N_{\beta}} = \frac{N_{\alpha} - N_{\alpha} \left(1 - \frac{\Delta E}{kT}\right)}{N_{\alpha} + N_{\alpha} \left(1 - \frac{\Delta E}{kT}\right)} = \frac{\frac{\Delta E}{kT}}{2 - \frac{\Delta E}{kT}} \approx \frac{\Delta E}{2kT} = \frac{\gamma \hbar B}{2kT} \quad (56)$$

Taigi, EM lauko sugerties tikimybė proporcinga B . Be to, detektorius registruoja sugertą EM lauko energiją, o kiekvieno sugerto EM lauko fotono energija irgi proporcinga B . Taigi, BMR signalas proporcingas B^2 .

Cheminiis poslinkis

Iš to, ką kol kas aptarėme, neaišku, kodėl BMR taip gerai tinka (bio)molekulių struktūrai tirti. Reikalas tas, jog branduolys jaučia ne tą magnetinį lauką, kurį kuria magnetas, bet *lokalųjį lauką*, t.y. tą, kuris yra branduolio vietoje. O tas laukas gali pasikeisti, nes aplink branduolį juda elektronai, t.y. teka elektros srovė, kuri irgi kuria savo magnetinį lauką (63 pav.). Elektronų orbitiniai momentai išoriniame lauke, kurio indukcija B , pakinta proporcingai išoriniam laukui, o tai savo ruožtu lemia nedidelį lauko pokytį δB branduolio vietoje. Įprasta šį pokytį išreikšti taip:

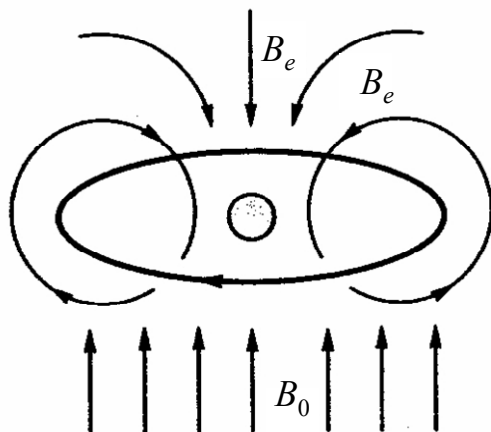
$$\delta B = -\sigma B \quad (57).$$

Čia bedimensinė konstanta σ yra *ekranavimo konstanta*, apibūdinanti tiriamą branduolį. Ji priklauso nuo elektronų, supančių tą branduolį, konfigūracijos, kitaip tariant, skirtingose cheminėse grupėse esančių branduolių ekranavimo konstantos skiriasi. Visas magnetinis laukas tam tikro branduolio vietoje

$$B_{loc} = B + \delta B = (1 - \sigma)B \quad (58)$$

ir atitinkamas Larmoro dažnis

$$\nu_L = \frac{\gamma B_{loc}}{2\pi} = (1 - \sigma) \frac{\gamma B}{2\pi} \quad (59).$$

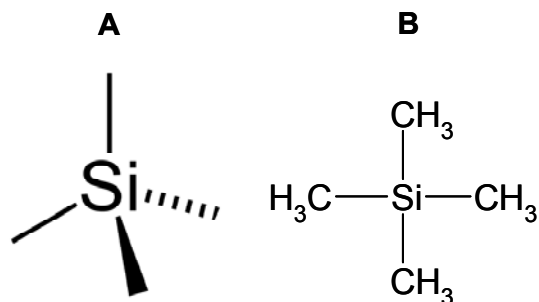


63 pav. Elektronų ekranavimas ir lokalis magnetinis laukas branduolio vietoje.

Taigi, branduolių, esančių skirtingose aplinkose, Larmoro dažniai gali smarkiai skirtis, ir BMR spektre matysime daugelį sugerties linijų, atitinkančių tuos dažnius. Užuoat nurodžius įvairių branduolių ekranavimo konstantas, įprasta išreikšti rezonansinius dažnius, panaudojant empirinį dydį, vadinama *cheminiu poslinkiu*.

Cheminiu poslinkiu vadinamas skirtumas tarp Larmoro dažnių tiriamame branduolyje ir „etaloniniame“ branduolyje. Jei tiriame protonų magnetinį rezonansą, etalonas yra tetrametilsilanas, TMS (pav.). Jis visas „apkibęs“ vienodos cheminės konfigūracijos protonais, todėl jo stiprus BMR signalas, be to, šis junginys lengvai tirpsta įvairiuose tirpikliuose, su jais nereaguodamas. Dėl šių priežasčių patogų jį naudoti kaip Larmoro dažnio etaloną. Matuojant ^{13}C BMR signalus, etalonui naudojamas šio izotopo rezonansas TMS, o jei tiriami ^{31}P BMR spektrai, etalonas yra ^{31}P rezonansas 85 procentų fosforo rūgšties vandeniniame tirpale.

Pastebėkime, kad tam skirtingų konfigūracijų branduolių Larmoro dažniai skiriasi tuo labiau, kuo didesnis išorinis magnetinis laukas, nes vietinis laukas proporcingas išoriniam ((58) formulė).



64 pav. Tetrametilsilano erdvinė struktūra (A) ir pusiau struktūrinė cheminė formulė (B).

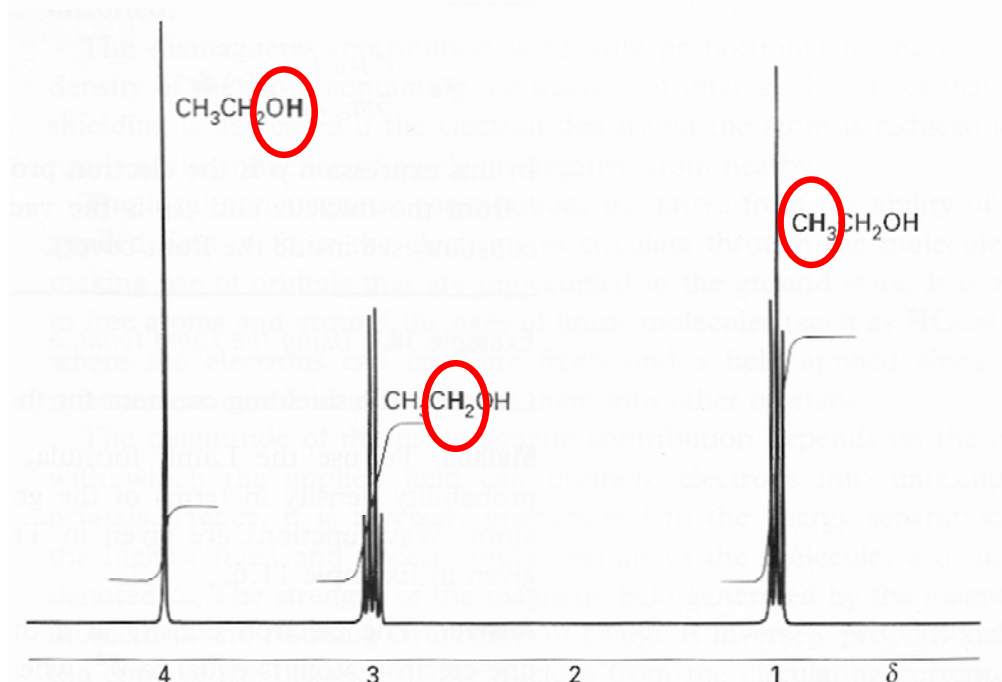
Cheminiai poslinkiai paprastai nusakomi vadinamojoje δ skalėje, apibrėžiamoje taip:

$$\delta = \frac{\nu - \nu^0}{\nu^0} \times 10^6 \quad (60)$$

ir išreiškiami milijoninėmis dalimis (angl. *parts per million, ppm*). Šioje formulėje ν^0 – etalono Larmoro dažnis. δ skalė patogi tuo, kad yra santykinė ir joje nusakyti cheminiai poslinkiai nepriklauso nuo nuolatinio magnetinio lauko indukcijos B ((60) formulėje jai proporcingas ir skaitiklis, ir vardiklis), todėl galima nesunkiai palyginti rezultatus, gautus naudojant skirtingus prietaisus.

Skirtingų branduolių grupių rezonansai

Pasinaudosime tuo, ką žinome apie cheminius poslinkius analizuodami etanolio , protonų BMR spektrą, parodytą 65 pav. Šio junginio struktūrinė formulė yra $CH_3 - CH_2 - OH$, t.y. turime tris CH_3 grupės protonus, kurių cheminis poslinkis yra apie 1 ppm, du CH_2 protonus (linijų grupė ties poslinkiu 3 ppm) ir vieną OH grupės protoną ($\delta=4$ ppm). Pastebėkime, kad įvairiose grupėse esančių protonų skaičių galime įvertinti iš atitinkamų linijų integralų, kurie etanolio spektre išlaiko santykį 3:2:1.



65 pav. Etanolio protonų magnetinio rezonanso spektras. Trys linijų grupės su skirtingais cheminiais poslinkiais atitinka trijų cheminių grupių (CH_3 , CH_2 ir OH) protonus, o linijų integralai (pavaizduoti laiptelio formos plonomis linijomis) apytiksliai rodo protonų, esančių atitinkamose konfigūracijose, skaičių. Raudonais apskritimais apibrauktos grupės, kurių protonai sąlygoja atitinkamą linijų grupę.

Ekranavimo konstantas apskaičiuoti *ab initio* ar kitais kvantinės chemijos metodais yra labai sudėtingas uždavinys, sėkmingai išspręstas tik atomams ir mažoms molekulėms (H_2O , CH_4). Taigi, spektrų interpretacijos dažniausiai atliekamos, lyginant tiriamą junginį su jau žinomų struktūrų junginiais bei naudojantis sukauptais empiriniais duomenimis. Kokybiškai galima teigti, jog ekranavimo konstantą sudaro bent trys dalys:

$$\sigma = \sigma(\text{viet.}) + \sigma(\text{molek.}) + \sigma(\text{tirp.}) \quad (61),$$

t.y. ekranavimas atsirandantis dėl tiriamą branduolį supančių elektronų įtakos, dėl kitų tiriamos molekulės elektronų įtakos bei tirpiklio molekulių įtakos (vandenilinių jungčių susidarymas, solvatacija).

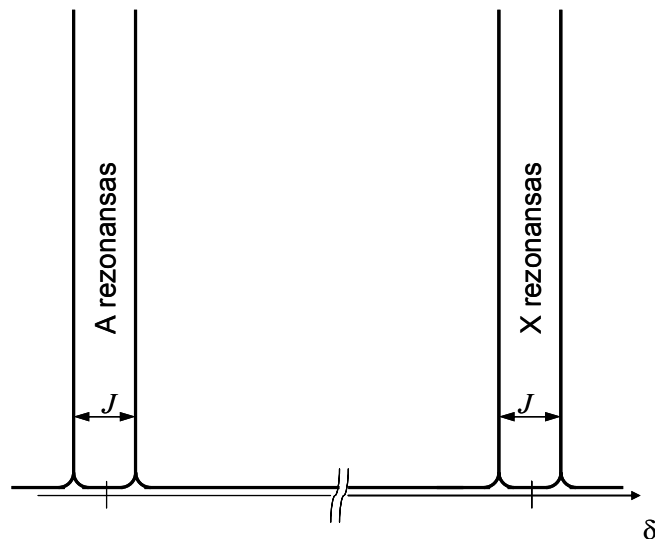
Smulkioji BMR spektro sandara: sukinių sąveika

Rezonansinių linijų skilimas į keletą atskirų linijų, parodytas 65 pav. vadinamas *smulkiaja spektro sandara*. Jis atsiranda todėl, kad kiekvienas magnetinis branduolys yra magnetas, įtakoiantis magnetinį lauką, kurį patiria kiti branduoliai. Tokios sukinių

sąveikos stiprumas nusakomas *skaliarine sąveikos konstanta* J ir išreiškiamas hercais (sąveikos energiją ir dažnį sieja Planck'o formulė). Sąveikos konstantos nepriklauso nuo išorinio lauko, nes jas kuria branduolių sukiniai, kurie yra pačių branduolių savybė. Sąveika yra abipusė, t.y. jei vieno branduolio rezonansinė linija suskyla dėl sąveikos su kitu branduoliu, tai antrojo branduolio rezonansinė linija irgi patiria tokį pat suskilimą. Aptarsime tokio suskilimo ypatybes.

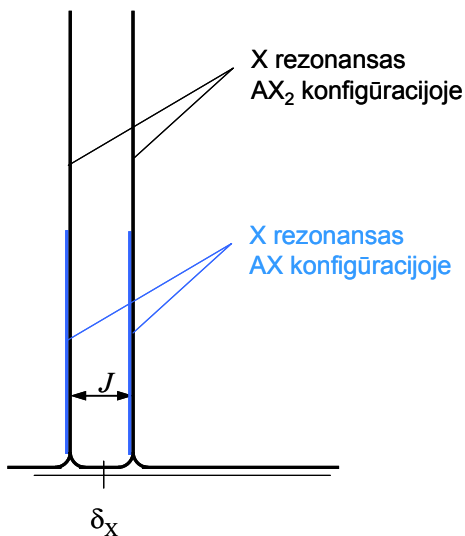
Pažymėkime du branduolius, kurių cheminiai poslinkiai smarkiai skiriasi, lotyniškos abėcėlės raidėmis iš skirtingų abėcėlės galų, pvz., A ir X. Jei cheminiai poslinkiai panašūs, žymėsime tokius branduolius abėcėlėje artimomis raidėmis, pvz., A ir B.

Tarkime, kad X branduolio sukiny yra α . Tuomet A branduolio sukinių veiks bendras laukas, nulemtas šio branduolio ekranavimo konstantos bei sąveikos su X branduolio sukiniu. Dėl šios sąveikos A linijos Larmoro dažnis spektre pasislinks per $\frac{1}{2}J$, lyginant su dažniu, kuriuo ji rezonuotų nesant sukinių sąveikos. Jei X sukiny yra β , A linijos Larmoro dažnis pasislinks per $-\frac{1}{2}J$. Kadangi bandinyje X branduolių α ir β būsenose yra daug ir maždaug po lygiai, tai vietoje vienos A linijos turėsime dubletą (pav.). Lygiai taip pat X rezonansas suskils dėl sąveikos su dviem skirtingomis A sukinių orientacijomis.



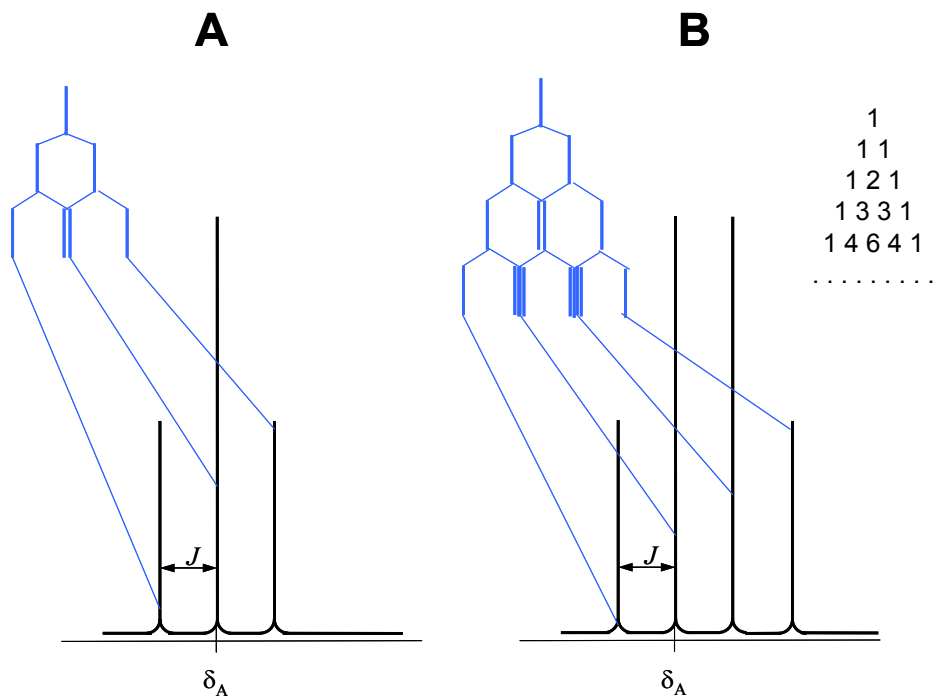
66 pav. AX grupės spektro skilimas. Kiekvienas rezonansas skyla į dvi linijas, energijos atstumas tarp kurių atitinka sukinių sąveikos energiją J . Linijos išsidėsto aplink rezonanso padėtį, kurią turėtų „išjungę“ sukinių tarpusavio sąveiką.

Čia pažymėkime, kad *ekvivalentiškų branduolių grupė rezonuoja kaip vienas branduolys* (šį teiginį detaliai aptarsime vėliau), tik atitinkamos linijos intensyvumas yra tiek kartų didesnis, kiek branduolių yra toje grupėje. Todėl jei grupės apibendrinta struktūra yra AX_n (pvz., CH_2 , CH_3 grupės protonai), Tai X rezonansas bus toks pat, kaip ir AX konfigūracijos atveju, tik n kartų stipresnis (67 pav.)



67 pav. X rezonansas AX_2 konfigūracijoje yra toks pat dubletas, kaip AX, nes ekvivalentiškai branduoliai elgiasi kaip vienas branduolys. Tačiau bendra AX_2 konfigūracijos branduolių sugertis yra du kartus didesnė už AX.

A rezonansas AX_n atveju skiriasi nuo AX. Dėl konkretumo panagrinėkime AX_2 konfigūraciją. A rezonansas čia suskyla į J atstumu atsiskyrusį dubletą dėl saveikos su vienu X branduoliu, o to dubleto kiekviena linija savo ruožtu dar skyla į dvi linijas, atstumas tarp kurių vėlgi yra J . Tokio skilimo rezultatas yra tas, jog spektre matomos trys A rezonansą atitinkančios linijos, kurių intensyvumų santykis yra 1:2:1 (taip yra todėl, kad centrinę dažnį gauname dviem būdais, pav.). A_nX_2 konfigūracijos A rezonansas taip pat bus 1:2:1 tripletas, tik jo intensyvumas bus n kartų didesnis. Taip pat samprotaudami, surasime, kad AX_3 konfigūracijos A rezonansinė linija skils į keturias linijas, kurių intensyvumų santykiai yra 1:3:3:1, o atsiskyrimo atstumai – J . Kadangi A branduolys tik vienas, X rezonansas išliks dubletas, atsiskyręs J atstumu. Apibendrindami šiuos samprotavimus, galime teigti, kad n ekvivalentiškų $\frac{1}{2}$ sukinio branduolių padalija šalia esančio branduolio rezonansą į $n+1$ linijų, kurių intensyvumo pasiskirstymą nusako *Paskalio trikampis* (pav.). Šio trikampio eilutės skaičius gauname sudėję virš duotojo esančio skaičiaus esančių skaičių porą.



68 pav. A rezonansas AX₂ (A) ir AX₃ konfigūracijoje (B). Linijų intensyvumus nusako Paskalio trikampis.

Turėdami aptartus dėsningumus galvoje, galime paaiškinti etanolio BMR spektro, parodyto 65 pav. smulkiąją sandarą. Trys CH₃ grupės protonai padalija CH₂ grupės protonų rezonansą į 1:3:3:1 kvartetą. Atitinkamai du CH₂ grupės protonai dalija CH₃ rezonansą į tripletą 1:2:1. Abiem atvejais energijų skirtumas tarp linijų yra toks pat, *J*. OH grupės protonas turėtų padalinti kiekvieną liniją į dar vieną dubletą, tačiau OH protonai yra labilūs, jie greitai migruoja nuo vienos molekulės prie kitos. Todėl jų kuriamas efektas susividurkina į nulį.

Sukinių sąveikos fizikinė prigimtis

Panagrinėkime AX tipo pusinio sukinių branduolių konfigūraciją. Akivaizdu, kad joje galimos keturios sukinių būsenos:

$$\alpha_A\alpha_X \quad \alpha_A\beta_X \quad \beta_A\alpha_X \quad \beta_A\beta_X.$$

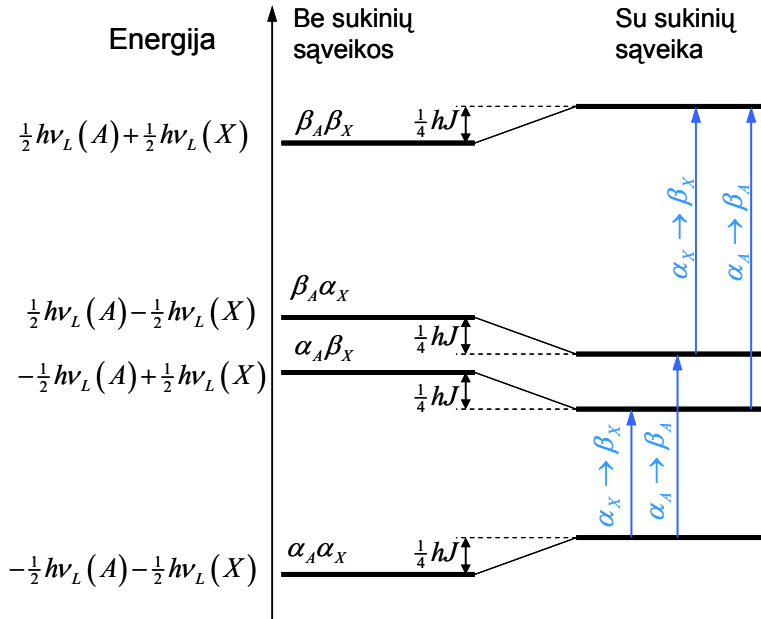
Sukinių sąveikos energija išoriniame lauke priklauso nuo sukinių orientacijos:

$$E = -\gamma(1-\sigma_A)\hbar B m_A - \gamma(1-\sigma_X)\hbar B m_x = -h\nu_A m_A - h\nu_X m_x \quad (62)$$

Įskaičius sukinių sąveiką, energijos išraiškoje atsiranda papildomas narys, priklausantis nuo sukinių tarpusavio orientacijos, t.y. sandaugos $m_A m_X$ ir proporcingas hJ :

$$E = -h\nu_A m_A - h\nu_X m_X + hJ m_A m_X \quad (63)$$

Kadangi sukinių projekcijos kvantiniai skaičiai m pusinio sukinių branduoliams gali būti $\pm 1/2$, tai keturios galimos α ir β kombinacijos dėl sukinių sąveikos energijų skalėje pasislenka per $1/4 hJ$ (69 pav.).



69 pav. AX sukinių konfigūracijos energijos lygmenys ir galimi šuoliai su sukinių sąveika.

„Verčiantis“ vienam iš sukinių, sukinių kvantiniai skaičiai keičiasi per vieneta, toks šuolis atitinka žydras rodykles 69 pav. Taigi, AX konfigūracijos rezonansinės linijos yra dubletai (žr. t.p. 66 pav.).

Sukinių sąveikos energija priklauso nuo atstumo tarp nagrinėjamų branduolių. Ji gali būti tiek teigiama (trauka), tiek neigiama (stūma). Dviejų branduolių, atskirtų N cheminių jungčių atstumu, sąveika žymima $^N J$, o indeksais nurodoma, kokie tai branduoliai. Taigi $^2 J_{CH}$ yra sąveika tarp ^{13}C ir H branduolių, atskirtų dviem cheminėmis jungtimis (pvz., konfigūracija $^{13}C-C-H$). $^1 J_{CH}$ sąveikos energijos atitinka 120-250 Hz dažnį, $^2 J_{CH}$ 0-10 Hz. Trimis ir daugiau cheminių jungčių atskirtų branduolių sąveiką dar galima registruoti, bet aukštesnių eilių sąveikas paprastai galima ignoruoti. $^1 J_{CH}$ sąveikos stiprumas priklauso nuo elektronų hibridizacijos, taigi, ši sąveika leidžia registruoti erdvinę molekulių konformaciją.

Sukinių sąveika atsiranda dėl magnetinės molekulę sudarančių elementariųjų dalelių sąveikos. Tiesioginė magnetinių dipolių sąveika, kai vieną branduolį tiesiog veikia kito branduolio sukinių kuriamas magnetinis laukas, yra aprašoma formule

$$B_{br} = \frac{g_I \mu_N \mu_0}{4\pi R^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) m_I \quad (64).$$

Čia m_I – lauką kuriančio branduolio sukinių projekcijos kvantinis skaičius, R – atstumas nuo to branduolio, o θ – kampas tarp vektoriaus, jungiančio branduolius ir magnetinio lauko krypties (z ašies). Padauginę šį magnetinį lauką iš sukinių magnetinio momento, būdingo atstumu R esančiam branduoliui, gausime šių branduolių dipolinės sąveikos energiją. Kai branduolius skiria 0.3 nm atstumas, ji siekia 10^4 Hz. Tačiau skysčiuose molekulių orientacijos, o kartu ir kampas θ labai greitai keičiasi laikui bėgant: jas veikia rotacinė difuzija. Todėl narys (64) skliaustuose susividurkina į nulį.

Taigi tiesioginė dipolinė sukinių sąveika (64) svarbi kietuosiuose kūnuose ir tiriant dideles makromolekules (tokios yra biologinės molekulės), kur rotacinė difuzija yra lėta. Tirpaluose svarbesnis yra *poliarizacinės sąveikos* mechanizmas, kai sąveika sklinda per jungtyse esančius elektronus. Juk jei branduolio sukinyje „priverčia“ elektrono sukinių orientuotis tam tikru būdu (pvz. būti α orientacijos), tai kitas tos pačios orbitalės elektronas dėl Pauli principo bus β orientacijos, be to, dėl elektrostatinės elektronų stūmos jis bus kitame jungties gale. Taigi, β orientacijos elektronas sąveikaus su kitame jungties gale esančiu branduoliu, atitinkamai pakeisdamas jo Larmoro dažnį.

Ekvivalentiški branduoliai

Branduolių grupė vadinama *chemiškai ekvivalentiškais*, jei šie branduoliai a) susiję tarpusavyje molekulės simetrijos operacija ir b) jiems būdingi vienodi cheminiai poslinkiai. Šie branduoliai bus *magnetiškai ekvivalentiški*, jei jų sukinių sąveikos su visais kitais molekulės branduoliais yra vienodos. Pavyzdžiui, CH_2F_2 molekulės protonai yra chemiškai ir magnetiškai ekvivalentiški, tačiau $\text{CH}_2=\text{CF}_2$ molekulės protonai yra ekvivalentiški tik chemiškai, bet ne magnetiškai. Taip yra todėl, kad vienas iš jų patiria *cis*, o kitas *trans* sąveiką su kiekvienu iš F atomų.

Magnetiškai ekvivalentiškų branduolių savybė yra ta, jog nors jų sukiniai ir sąveikauja, šie branduoliai rezonuoja kaip vienas branduolys, t.y. BMR spektro linijos nesuskyla. Šios savybės priežastis yra ta, jog visi šie sukiniai elgiasi kaip viena grupė, ir sukinių persiorientavimas yra *kolektyvinis*, t.y. sukiniai dėl EM lauko poveikio nepersiorientuoja vienas kito atžvilgiu. Nevykstant tokiam persiorientavimui, neįmanoma EM lauku aptikti ir sukinių sąveikos. Parodysime kad A_2 ekvivalentiškų branduolių grupėje esančios sukinių sąveikos „nesimato“ BMR spektre.

Dviejų pusinio sukinio branduolių grupės energijos lygmenys parodyti 70 pav. Du branduoliai su pusiniais sukinais iš viso gali turėti keturias konfigūracijas, kurias nusako bendras sistemos judėjimo kiekio momentas I ir jo projekcija į z ašį, M_I :

Sukiniai lygiagretūs, $I = 1$:	$M_I = +1$	$\alpha\alpha$
	$M_I = 0$	$\alpha\beta + \beta\alpha$
	$M_I = -1$	$\beta\beta$
Sukiniai antilygiagretūs, $I = 0$:	$M_I = 0$	$\alpha\beta - \beta\alpha$.

Magnetiniame laukia tokios sistemos energijos lygmenys išsidėsto taip, kaip parodyta 70 pav. dešinėje. Būsenu, kurių sukinio projekcija į z ašį lygi nuliui, energija nesikeičia. Įskaičius sukinių sąveiką, energija pasikeičia dydžiu, proporcingu sukinių skaliarinei sandaugai:

$$E = \frac{hJ}{\hbar^2} \mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 \quad (65)$$

Kadangi

$$\mathbf{I}^2 = \mathbf{I}_1^2 + \mathbf{I}_2^2 + 2\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 \quad (66),$$

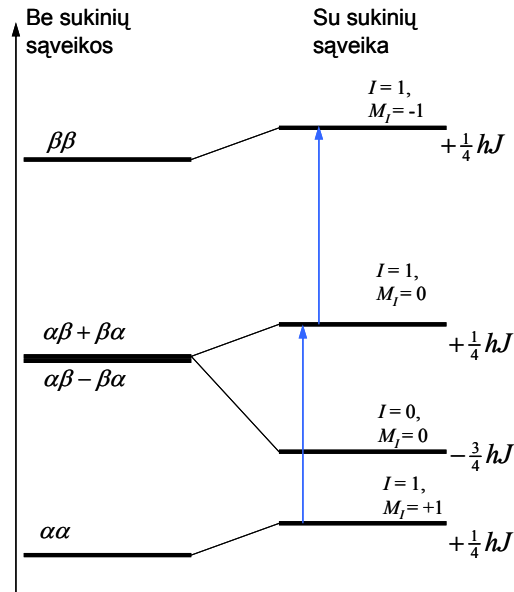
tai pasinaudoję kvantmechaninėmis judėjimo kiekio momento išraiškomis, turime

$$\mathbf{I}_1 \cdot \mathbf{I}_2 = \frac{1}{2} \{I(I+1) - I_1(I_1+1) - I_2(I_2+1)\} \hbar^2 \quad (67).$$

Pusinio sukinio branduoliams $I_1 = I_2 = \frac{1}{2}$, todėl

$$E = \frac{1}{2} hJ \left\{ I(I+1) - \frac{3}{2} \right\} \quad (68).$$

Kai sukinių lygiagretūs, $I = 1$ ir sąveika lygi $E = +\frac{1}{4}hJ$; antilygiagretiems sukiniams $I = 0$ ir $E = -\frac{3}{4}hJ$ - tai ir parodyta 70 pav. kairėje pavaizduotose energijos lygmenų padėtyse.



70 pav. A_2 ekvivalentiškų branduolių sukinių konfigūracijos energijos lygmenys ir galimi šuoliai su sukinių sąveika. Nors dėl sukinių sąveikos energijos lygmenys suskyla, atstumai tarp lygmenų, tarp kurių leidžiami šuoliai ($\Delta I=0, \Delta M_I = \pm 1$), išlieka nepakitę ir spektro linijos nesuskyla.

Vykstant sąveikai su EM lauku, gali vykti tokie šuoliai, kurių metu sukinių judėjimo kiekio momentas nepakinta ($\Delta I=0$), o projekcijos kvantinis skaičius gali keistis vienetu. Taip yra todėl, kad EM lauko fotonas turi vienetinį sukinių, o sąveikos metu tenkinamas judėjimo kiekio momento tvermės dėsnis. Klasikine kalba kalbant, magnetinis laukas negali perorientuoti dviejų vienodų branduolių vienas kito atžvilgiu. Dėl šių atrankos taisyklių telieka du galimi šuoliai (žydros rodyklės 70 pav.), kurių abiejų energijos pokytis vienodas ir BMR spektro linija nesuskyla.

Pastebėkime, kad realūs BMR spektrai dažnai daug sudėtingesni nei aptarti iki šiol. Mes aptarėme tik ribinį atvejį, kai cheminių poslinkių skirtumai yra daug didesni už sukinių sąveikos energijas. Tokie spektrai vadinami *pirmosios eilės spektrais*, jie leidžia lengvai atskirti BMR spektro linijų grupes kaip atskirų cheminių molekulių grupių įnašą. Taip būna toli gražu ne visada, dažnai sukinių sąveikos stiprumas palyginamas su

skirtumais tarp branduolių cheminių poslinkių. Tai vadinamieji *antrosios eilės spektrai*, juos daug sunkiau interpretuoti. Vienas iš būdų juos įveikti – registruoti BMR spektrus prie didesnių magnetinių laukų, nes rezonansiniai dažniai priklauso nuo išorinio lauko, o sukinių sąveikos stiprumas – ne.

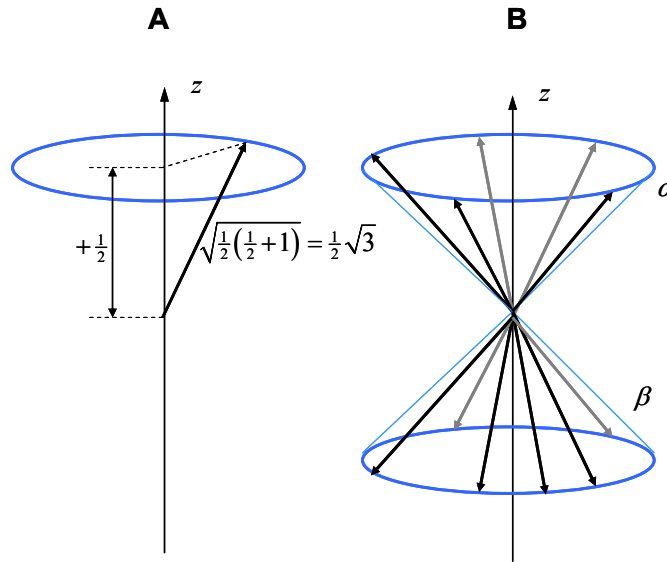
Atliekant BMR eksperimentus, skiriami *dažnai pasitaikantys sukiniai* ir *retai pasitaikantys sukiniai*. Organiniuose junginiuose dažnai pasitaikančio sukinių atvejis būtų protonai, o retai pasitaikančio – ^{13}C branduoliai, kurių natūralus procentas gamtoje tėra 1.1%. Tiriant ^{13}C branduolius, nebūtina atsižvelgti į jų tarpusavio sąveiką, nes maža tikimybė, kad molekulėje arčiau kaip trijų cheminių jungčių atstumu bus keli tokie branduoliai. ^{13}C NMR spektruose anglies linijos suskyla dėl sąveikos su visais aplink juos esančiais protonais ir spektras tampa labai sudėtingas. Siekiant išvengti šios komplikacijos, dažnai naudojama *sukinių atrišimo* metodika. Ją naudojant, pvz., CH_3 protonai paveikiami antru intensyviu EM lauku, kurio dažnis suderinamas su protonų Larmoro dažniais. Protonų sukiniai ima „vartytis“ ir ^{13}C branduolys jaučia jų vidutinę orientaciją. Todėl jo rezonansas nebeskyla ir vietoje 1:3:3:1 kvarteto registruojama viena spektro linija.

Impulsinis ir daugiamatis BMR

Modernūs BMR spektroskopijos metodai leidžia aptikti energijų skirtumus ΔE tarp sukinių būsenų daug sudėtingiau nei tik paprasčiausias rezonansinių BMR dažnių matavimas. Galime panaudoti branduolių sistemos analogiją su varpu: varpą galime veikti vienu garso dažniu ir žiūrėti, kad jis susižadina efektyviausiai – tuomet turėsime įprastinį spektro matavimą. Pastebėkime, kad tokiu atveju daug laiko praleisime registruodami nulinį atsaką, nes žadinsime varpą dažniais, nesutampančiais su jo virpesinėmis modomis. Tačiau jei trenksime į varpą plaktuku, gausime skambesį, į kurio dažnių spektrą įeis *visi* varpo savieji dažniai. Toliau aptarsime impulsinio BMR metodikas ir pamėginsime išsiaiškinti, kaip branduolių ansamblis gali būti žadinamas „plaktuko smūgiui“ ekvivalentiškais EM laukais ir kaip atsako registravimas gali suteikti naudingą informaciją apie BMR spektrus.

Įmagnetėjimo vektorius ir magnetinis laukas

Panagrinėkime bandinį, kurį sudaro daug vienodų pusinio sukinio branduolių ($I = \frac{1}{2}$). Jų sukinnis judėjimo kiekio momentą, kaip jau kalbėjome, galime pažymėti kaip $\sqrt{I(I+1)}$ ilgio vektorių, kurio projekcija į z ašį yra m_I . Pagal neapibrėžtumo principą, x ir y projekcijų mes negalime žinoti tuo pat metu, kaip ir z , todėl manykime, kad sukinnio vektoriai guli kažkur ant kūgio, kurio simetrijos ašis yra z ašis (71 pav.). Projekcijos vertė yra $\frac{1}{2}$, o viso vektoriaus ilgis $-\frac{1}{2}\sqrt{3}$, taigi vektorius su z ašimi sudaro 55° kampą.



71 pav. A: Pusinio sukinnio orientacija ir projekcija į z ašį. Kadangi pagal neapibrėžtumo principą x ir y projekcijų kartu su z žinoti negalima, sukinnio vektorius guli kažkur ant žydrai apibraukto kūgio. B – sukinnų ansamblis, kai nėra išorinio lauko. Visi sukinniai guli ant dviejų kūgių paviršiaus, išsidėstę atsitiktiniais kampais, o α ir β orientacijos sukinnų yra maždaug po lygiai.

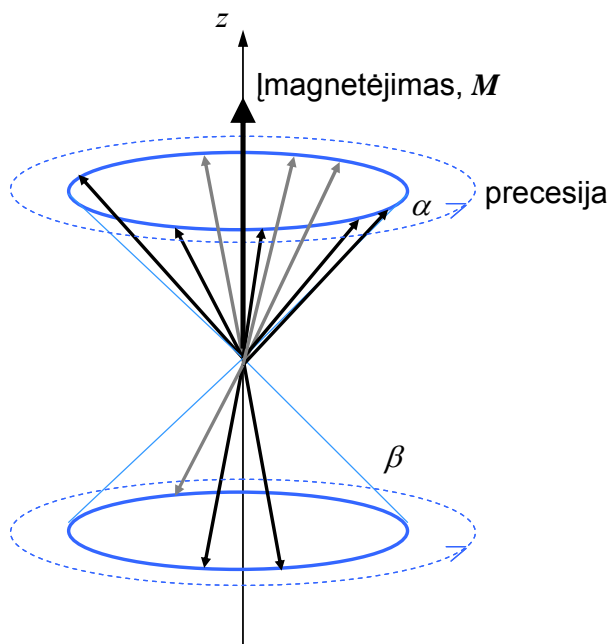
Nesant išorinio magnetinio lauko, tikimybė branduoliams būti α ir β orientacijų yra vienoda, todėl bendras branduolių ansamblio įmagnetėjimas (tūrio vieneto magnetinis momentas) lygus nuliui. Įjungus magnetinį lauką, α ir β orientacijų energijos išsiskiria (β orientacijos energija tampa didesnė už α) ir mažesnės energijos branduolių tampa daugiau, t.y. būsenų užpildos tenkina Boltzman'o pasiskirstymą:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{-\frac{h\nu_L}{kT}} = 1 - \frac{h\nu_L}{kT} + \dots \quad (69)$$

Magnetiniame lauke sukinnius veikia jėgos momentas τ , kurio kryptis statmena tiek magnetinio lauko kryptčiai, tiek sukinnio magnetinio momento kryptčiai:

$$\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B} \quad (70),$$

t.y., kai magnetinis laukas ir sukiny yra lygiagretūs, jėgos momentas išnyksta. Tačiau sukinio projekcija į z ašį yra kvantuota, todėl galima įsivaizduoti, kad magnetiniame lauke sukinio vektorius precesuoja (t.y. sukasi) aplink magnetinio lauko kryptį⁶. Šios precesijos energija papildo sukinio energiją, o jos dažnis atitinka Larmoro dažnį, kuris didėja, didinant magnetinį lauką. 10 T magnetiniame lauke protonų Larmoro dažnis yra apie 430 MHz. Taigi, magnetiniame lauke branduolių ansamblis juda kūgio paviršiumi Larmoro dažniu, o dėl užpildų skirtumo bandinyje atsiranda atstojamasis įmagnetėjimas, nukreiptas magnetinio lauko kryptimi (pav.).

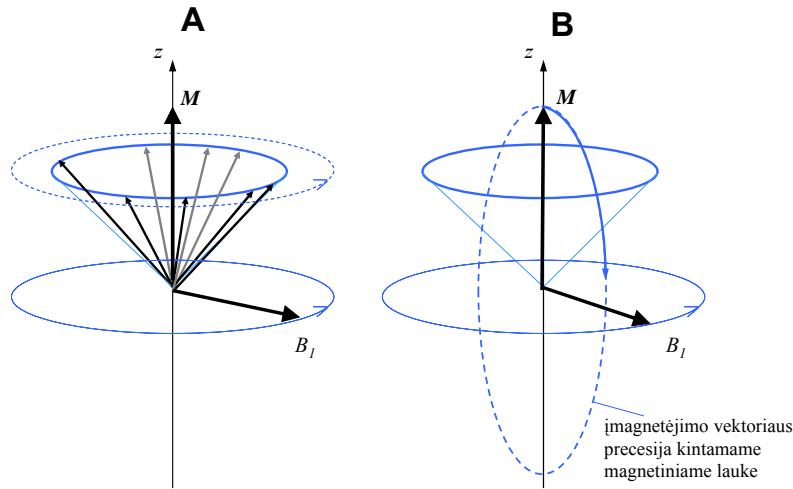


72 pav. Sukinių ansamblis, išoriniame lauke. Sukiniai ima precesuoti Larmoro dažniu aplink magnetinio lauko kryptį, o žemesnės energijos branduolių tampa daugiau nei aukštesnės. Dėl to bandinyje atsiranda bendras įmagnetėjimas M .

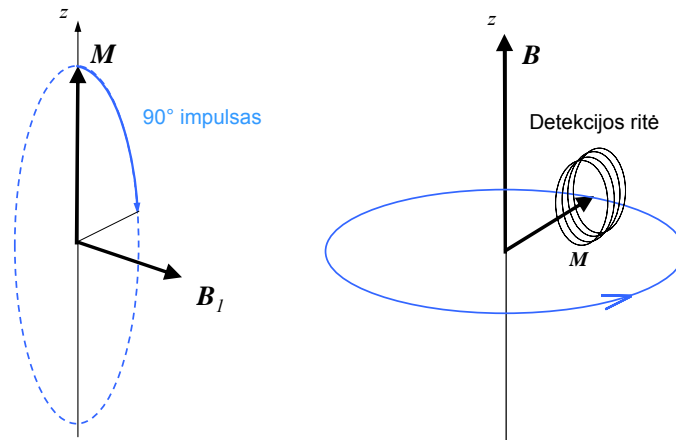
Tarkime, kad tokį sukinų ansamblį, esantį magnetiniame lauke, apšvitiname radijo dažnio lauku, kurio poliarizacija apskritiminė, esanti xy plokštumoje, o indukcija B_1 . Jei šio lauko dažnis atitinka sukinų Larmoro dažnį, t.y. kintamasis magnetinis sukasi kartu su sukinų precesija, sukiniai „matys“ tokį lauką kaip nuostovųjį lauką B_1 . Taigi, kaip ir nuostoviam lauke, sukiniai ir įmagnetėjimo vektorius ims precesuoti aplink šio

⁶ Šis vaizdinys nėra visai tikslus. Jis atsirado iš hipotezės, kad sukinių lemia elektrono ar branduolio sukimas. Realiai branduoliai ir elektronai nesisuka, tačiau vaizdumo dėlei šią analogiją naudoti leistina.

„nuostovaus“ lauko kryptį (73 pav). Tarkime, kad kintamąjį lauką laikome įjungtą tol, kol įmagnetėjimo vektorius atsidurs xy plokštumoje (jis priklauso nuo pastoviojo lauko indukcijos B_0 , esant 430 MHz Larmoro dažniui tai atitinka kelias μs), toks lauko impulsas vadinamas 90° arba $\pi/2$ impulsu. Po tokio impulso bandinio įmagnetėjimo vektorius sukasi xy plokštumoje Larmoro dažniu (maždaug 430 MHz) nejudančio stebėtoju (radijo dažnio detekcijos ritės) atžvilgiu. Dėl to ritėje indukuojamas srovės signalas, kuris gali būti sustiprinamas ir registruojamas.



73 pav. A: BMR eksperimente be nuolatinio lauko B_0 kuriančio įmagnetėjimą M z ašies kryptimi, bandinį veikia apskritimiškai poliarizuotas kintamasis magnetinis laukas B_1 , kurio vektorius guli xy plokštumoje. B: jei kintamojo lauko dažnis sutampa su sukinių Larmoro precesijos dažniu (t.y. ir B_1 lauko, ir sukinių precesija vyksta kartu), bandinio sukiniai jį „mato“ kaip pastovų magnetinį lauką ir įmagnetėjimo vektorius ima precesuoti aplink B_1 kryptį.



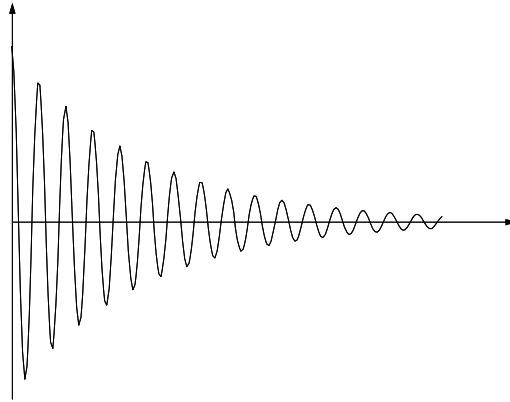
74 pav. Kairėje: paveikus bandinį tam tikros trukmės radijo dažnio magnetiniu lauku, įmagnetėjimo vektorius atsisuka į xy plokštumą. Tokios magnetinio lauko impulsas vadinamas $\pi/2$ arba 90° impulsu. Dešinėje: po tokio impulso įmagnetėjimo vektorius sukasi Larmoro dažniu xy plokštumoje ir gali indukuoti signalą detekcijos ritėje.

Laisvasis indukcijos gesimas ir jo Furjė transformacija

Laikui bėgant, atskiri sukiniai „išsivaikšto“, nes jų Larmoro precesijos dažniai skiriasi. Todėl įmagnetėjimo vektorius mažėja ir signalas ritėje silpsta eksponentiškai su laiko konstanta T_2 :

$$M_y(t) = M_0 \cos(2\pi\nu_L t) e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (71).$$

Tai vadinamasis *laisvojo indukcijos gesimo (LIG, angl. free-induction decay)* signalas, kurio tipinė forma pavaizduota 75 pav.



75 pav. Paprastas laisvojo indukcijos gesimo (LIG) signalas.

Iki šiol kalbėjome apie siauros dažnių juostos EM lauko impulsą, tačiau tie patys samprotavimai galioja ir impulsui, kurio dažnių juosta plati. Iš Furjė transformacijos teorijos žinome, kad impulso dažnių juostos plotis atvirkščiai proporcingas jo trukmei. Taigi, jei apšvitinsime bandinį trumpu galingu EM lauko impulsu, atitinkančiu 90° sukinių posūkį, beveik visi bandinio sukiniai (kartu ir įmagnetėjimo vektorius) atsidurs xy plokštumoje. Tuomet bus generuojamas LIG signalas, kurio gesimas savyje turės visų sukinių dažnius. Atlikę jo Furjė transformaciją, gausime visas BMR spektro linijas, t.y. BMR spektrą:

$$I(\nu) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \operatorname{Re} \int_0^{\infty} S(t) e^{i2\pi\nu t} dt \quad (72)$$

Taigi, trumpas EM lauko impulsas veikia kaip jau minėtas plaktuko smūgis, sužadinantis visas bandinio sukinių modas ir leidžiantis jas registruoti vienu metu. Bandinio LIG

signalo priklausomybė nuo laiko yra gana sudėtinga, nes ją sudaro tarpusavyje interferuojančios visos sukininės bandinio modos, svyruojančios s120 kirtingais dažniais (76 pav.).



76 pav. LIG signalas etanolyje, kurio Furjė spektras parodytas 65 pav.

BMR linijų plotis ir dinaminiai procesai bandinyje

Kaip jau minėjome, Furjė transformacija nustato sąryšį tarp EM impulso spektrinio pločio ir jo trukmės. Tai universalus dėsnis, jis galioja ir laukui, kurį spinduliuoja bandinys – kuo trumpesnė spinduolio egzistavimo trukmė, tuo platesnė linija bus registruojama BMR spektre. Taigi, BMR spektro linijų plotis suteikia informacijos apie dinaminčius procesus, veikiančius bandinio branduolius.

Įmagnetėjimo vektoriaus signalas po 90° impulso gęsta dėl dviejų skirtingų priežasčių. Pirma, po apšvitinimo impulsu bandinyje yra po lygiai α ir β būsenos branduolių (t.y. įmagnetėjimo vektorius guli xy plokštumoje). Išjungus EM lauką (pasibaigus impulsui), toks pasiskirstymas nebetenkina termodinaminės pusiausvyros sąlygos, nes pastoviajame magnetiniame lauke α branduolių turi būti daugiau nei β . Taigi, būsenų užpildos grįžta į pusiausvyrą, o įmagnetėjimas irgi pasiekia savo pusiausvyrą vertę M_0 :

$$M_z(t) - M_0 \sim e^{-\frac{t}{T_1}} \quad (73).$$

Kadangi šio proceso metu branduolių energija atiduodama į aplinką („gardelė“), tokia relaksacija vadinama *sukinio-gardelės relaksacija* (arba *išilgine relaksacija*, nes relaksuoja įmagnetėjimo vektoriaus dedamoji, lygiagreti nuolatiniam magnetiniam

laukui), o T_1 – sukinių-gardelės relaksacijos trukmė. Fizikinė šios relaksacijos prigimtis yra magnetinio lauko fluktuacijos, kurias sukuria judantys molekulių branduoliai. Dėl šių fluktuacijų branduolių būseną gali keisti iš α į β ir galų gale nusistovi termodinaminė pusiausvyra.

Antrasis relaksacijos procesas yra sukinių „išsivaikščiojimas“ xy plokštumoje, kuris vysta dėl to, jog sukiniai procesuoja skirtingais greičiais. Iškart po 90° impulso visi sukiniai yra sulygiuoti maždaug viena kryptimi ir įmagnetėjimo vektorius yra didelis. Tačiau toks sutvarkytas sukinių ansamblis nėra pusiausvyras ir po tam tikro laiko jų kryptys xy plokštumoje tampa atsitiktinės (t.y. sukiniai atsitiktiniu būdu pasiskirsto kūgyje aplink z ašį), net jei nėra sukinių-gardelės relaksacijos. Kadangi nebėra specifinės orientacijos xy plokštumoje, išnyksta ir įmagnetėjimo vektoriaus dedamoji šioje plokštumoje. Ši relaksacija, susijusi su sukinių „išsivaikščiojimu“ taip pat vyksta eksponentiškai, o jos charakteringa trukmė žymima T_2 :

$$M_x(t) \sim e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (74)$$

Kadangi ši relaksacija susijusi su sukinių orientacija vienas kito atžvilgiu, T_2 dar vadinama *sukinio-sukinio relaksacijos trukme* arba *skersinės relaksacijos trukme*.

Kadangi įmagnetėjimo y dedamoji gęsta su charakteringa trukme T_2 , atitinkama spektrinė linija išplinta ir jos plotis pusaukštyje tampa

$$\Delta\nu_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{\pi T_2} \quad (75).$$

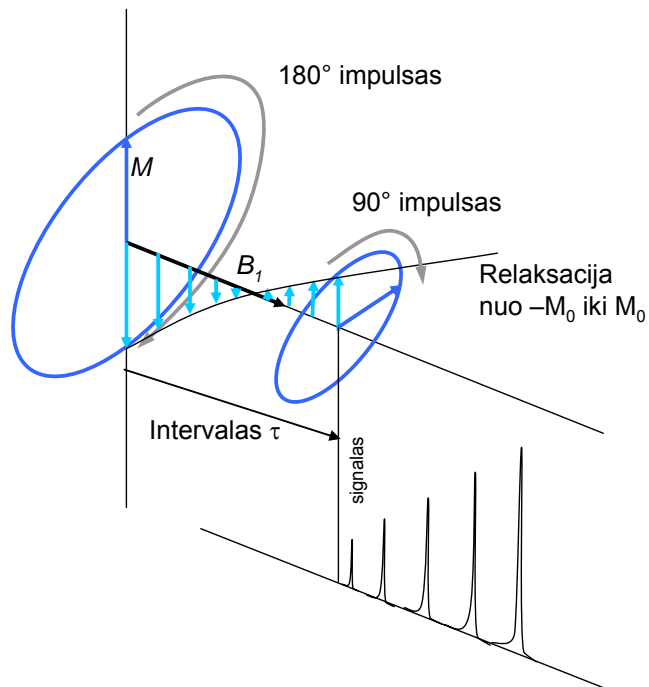
Tuo lengva įsitikinti, apskaičiavus eksponentiškai gęstančio harmoninio signalo Furjė spektrą. Tipinės T_2 vertės siekia keletą sekundžių, taigi atitinkamas BMR spektro linijų išplitimas yra apie 0.1 Hz. Tai vadinamasis vienalytis linijos išplitimas. Be jo, linijos išplinta dar ir dėl to, kad kiekviena bandinio molekulė yra šiek tiek skirtingoje aplinkoje (pvz., skiriasi tirpiklio molekulių orientacijos, arba magnetas nėra tobulas ir jo kuriamas laukas nėra idealiai vienalytis). Tai vadinamasis *nevienalytis linijos išplitimas*, kuris dažniausiai yra didesnis už vienalytį. Dėl jo BMR eksperimento metu registruojamas ne tikroji skersinės relaksacijos trukmė, o efektinė. Tuomet lieka galioti (75) formulė, tačiau efektinė trukmė žymima žvaigždute:

$$T_2^* = \frac{1}{\pi \Delta \nu_{\frac{1}{2}}} \quad (76).$$

BMR spektro linijos gali išplisti ir dėl greitų molekulinės konformacinių pakitimų, kurie veikia branduolių cheminius poslinkius, t.p. dėl apsikeitimo protonais su tirpikliu, pvz., – OH grupėje protonui persokant į tirpiklį, o kitam tirpiklio protonui užimant jo vietą. Jei iš tirpiklio ateina kitos būsenos protonas, nei išėjo iš molekulinės, ir šis procesas vyksta labai greitai, OH protono rezonansas „susividurkina“ ir spektre stebima viena nesuskilusi linija. Apibendrinami pasakykime, kad bet kokie dinaminiai sukinių procesai bandinyje veikia BMR spektrinių linijų plotį.

Išilginės relaksacijos trukmės matavimas

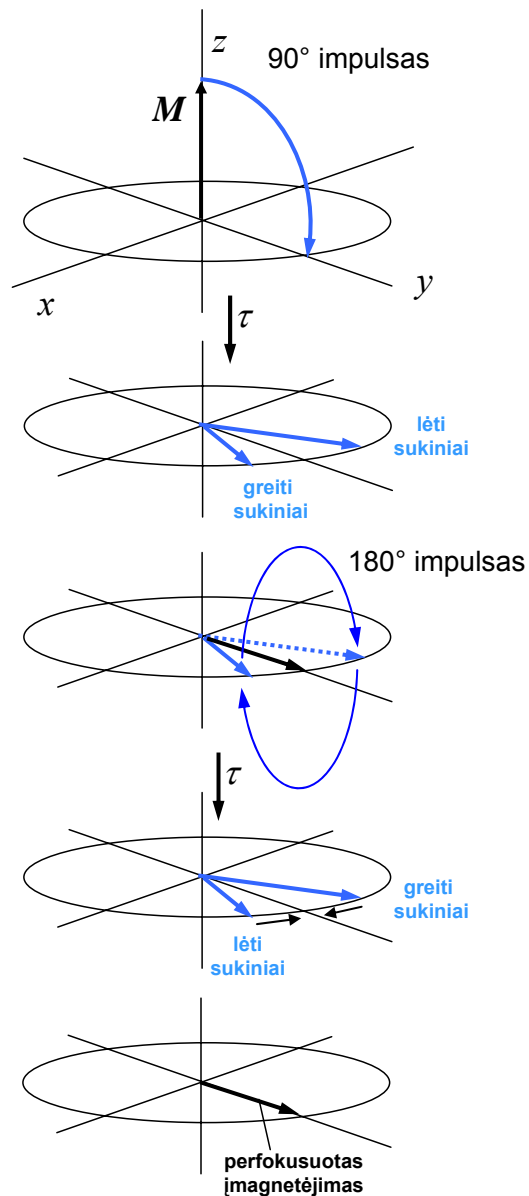
Skersinės relaksacijos trukmę impulsinio BMR eksperimente matuojame tiesiogiai, registruodami LIG signalą. Tuo tarpu išilginės relaksacijos trukmę užregistruoti galime panaudoti *apgrąžos atstatymo metodą*. Tam bandinys apšvitinamas 180° impulsu. Toks impulsas yra B_1 kintamojo magnetinio lauko impulsas, kuris trunka du kartus ilgiau nei 90° impulsas, ir kurio metu įmagnetėjimo vektorius nuprecesuoja tiek, kad rodo –z kryptimi (77 pav.). Šiuo atveju signalo neregistruojame, nes xy plokštumoje esanti įmagnetėjimo vektoriaus dedamoji, kurią registruoja detektoriaus ritės, lygi nuliui. Į sukiniams pradėjus relaksuoti į α būseną, įmagnetėjimas mažėja, artėdamas prie vertės M_0 . Po laiko tarpsnio τ bandinys apšviečiamas 90° impulsu, kuris pasuka įmagnetėjimo vektorius į xy plokštumą, ir šis pradeda generuoti laisvojo indukcijos gesimo signalą, kurio spektrą ir registruoja detektorius. Taip išmatuoto spektro intensyvumas priklauso nuo įmagnetėjimo vektoriaus, pasukto į xy plokštumą, dydžio. Šis vektorius eksponentiškai mažėja iki pusiausvyrosios vertės M_0 , taigi jo modulis, kartu ir signalo intensyvumas, priklauso nuo laiko tarpsnio τ . Taip galime išmatuoti išilginės relaksacijos trukmę T_1 , eksponente aproksimuodami spektrų seriją, gautą esant skirtingoms vėlinimo τ vertėms.



77 pav. T_1 matavimas panaudojant impulsų seką 180° - τ - 90° .

Sukinių aidas

Siekiant išmatuoti tikrąją skersinės relaksacijos trukmę T_2 (o ne efektinę T_2^*), reikia imtis dar sudėtingesnių triukų, manipuliuojant įmagnetėjimo vektoriumi. Tam naudojamas *sukinių aidas*, kuris yra akustinio aido analogas: bandinyje suformuojamas įmagnetėjimo impulsas, jam leidžiama evoliucionuoti, o vėliau jis atspindimas ir detektuojamas. Įvykių seka pailiustruota 78 pav.



78 pav. Magnetinio lauko impulsų seka, sukianti sukinių aidą.

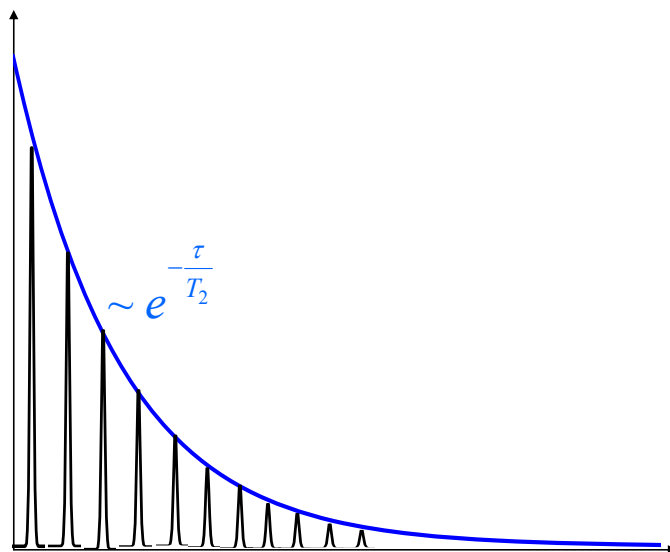
Pirmiausia bandinys paveikiamas 90° impulsu ir įmagnetėjimo vektorius pasukamas į xy plokštumą. Kadangi sukinių Larmoro dažniai skiriasi, jie precesuoja šioje plokštumoje skirtingais greičiais (vieni greičiau nei vidutiniškai, kiti lėčiau) ir pradeda „išsivaikščioti“. Signalas dėl šio proceso gęsta su charakteringąja trukme T_2^* . Bendrąjį bandinio įmagnetėjimą nagrinėsime kaip aibės įmagnetėjimo vektorių sumą, kurią sudaro įmagnetėjimai, susiję su *sukinių paketu*, kurių Larmoro precesijos dažniai sutampa, atstojamaisiais magnetiniais momentais.

Praėjus laiko intervalui τ , bandinys paveikiamas 180° impulsu, kuris apsuka sukinių paketų įmagnetėjimo vektorius: lėtieji sukinių paketai atsiranda ties kampais, kur buvo greitieji ir atvirkščiai. Po tokio apsisukimo įmagnetėjimo vektoriai toliau precesuoja ir po dar vieno laiko intervalo τ jie sugrįžta į y kryptį. Toks pakartotinis sukinių susigrupavimas vadinamas *perfokusavimu*. Kai sukiniai vėl grįžta į y kryptį, stebimas signalas, kuris vėl gęsta su charakteringąja trukme T_2^* . Tai ir yra vadinamasis sukinių aidas. Svarbus jo požymis yra tas, jog jo signalo intensyvumas nepriklauso nuo vietinių laukų, kurie abiejų intervalų τ metu yra pastovūs. Juk jei sukiniai nuprecesuoja toliau pirmojo intervalo metu, jie lygiai tiek pat „parprecesuos“ atgal antrojo intervalo metu. Taigi, pastovūs lauko nevienalytišumai sukinių aido signalo intensyvumo neveikia. Tačiau jeigu vietiniai laukai fluktuuoja ties atskirais branduoliais (o tai, prisiminkime, ir yra tikroji T_2 relaksacija), garantijos, kad vieno ir kito intervalo τ metu fluktuacijos kompensuosis, nėra. Taigi, tikrosios skersinės relaksacijos poveikis negali būti perfokusuojamas ir sukinių aido intensyvumas gęsta su charakteringąja trukme T_2 .

Realaus eksperimento metu naudojama *Carr-Purcell-Meiboom-Gill impulsų seka* (CPMG seka). Ją sudaro 180° impulsų serija, spinduliuojama po pradinio 90° impulso:

$$90_x^\circ - [\tau - 180_y^\circ - \tau - Aidas] - [\tau - 180_y^\circ - \tau - Aidas] - [\tau - 180_y^\circ - \tau - Aidas] - \dots$$

Žymėjimas 180_y° rodo, kad šių radijo dažnio impulsų fazė yra paslinkta 90° pradinio impulso atžvilgiu. Aido amplitudė vykstant sukinių relaksacijai gęsta su charakteringąja trukme T_2 , taigi T_2 vertė surandama, aproksimuojant gautą aido gesimo kreivę eksponentine funkcija (79 pav.). Taip sukinių aido metodika leidžia išvengti nevienalytiškumo įtakos, atskiriant skersinės relaksacijos trukmę T_2 nuo efektinės T_2^* .



79 pav. Eksponentinis sukinių aido gesimas, naudojant CPMG impulsų seką, leidžia išmatuoti skersinės relaksacijos trukmę.

Dvimatis BMR

BMR spektras yra labai turtingas ir, jei bandinį sudaro daug protonų, labai sudėtingas. Net pirmosios eilės spektrai yra sudėtingi, nes skirtingų cheminių grupių smulkiosios sandaros linijos gali persikloti tarpusavyje. Sudėtingumą pavyktų sumažinti, jei informaciją pavyktų pavaizduoti ant dviejų koordinačių ašių, kurios padėtų atskirti skirtingų grupių rezonansus ir cheminius poslinkius. Tai pasiekti leidžia *dvimatis BMR*.

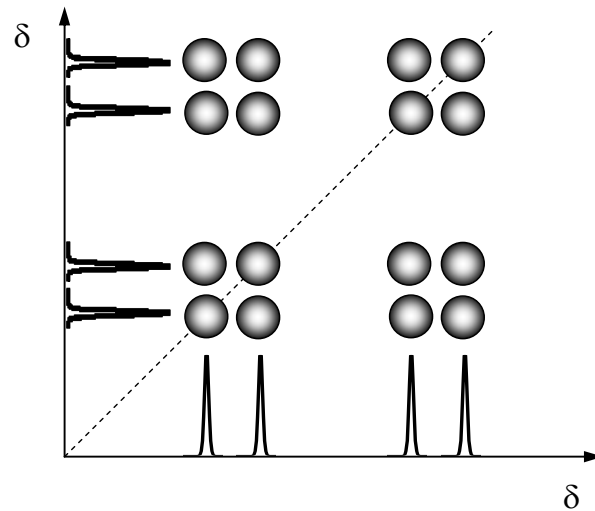
Kaip matėme anksčiau, sukinių aido eksperimento metu perfokusuojami tie sukiniai, kurių magnetinė aplinka nesikeičia. Taigi, jei du sukiniai yra aplinkose, sąlygojančiose skirtingus cheminius poslinkius, jie bus perfokusuoti ir sukels sukinių aido signalą. Taigi, cheminių poslinkių įtakos galima atsikratyti, registruojant sukinių aidą. Tuo tarpu sukinių sąveikos atsikratyti padeda sukinių „atšimo metodai“ (kintamas RD laukas). Tinkamai parinkus radijo dažnio impulsų sekas galima išskleisti cheminius poslinkius vienoje koordinačių ašyje, o sukinių sąveikas – kitoje. Taip ženkliai supaprastėja BMR spektrų interpretavimas.

Turbūt populiariausia dvimačio BMR sritis yra *koreliacinė spektroskopija* (angl. COrelation SpectroscopY, COSY), kurioje naudojama tokia impulsų seka:

$$90_x^\circ - t_1 - 90_x^\circ - \text{registravimas}(t_2)$$

Signalas registruojamas, esant skirtingoms vėlinimo trukmėms t_1 , kaip ir sukinių aido eksperimente. Tuomet atliekama dvimatė Fourier transformacija laikų t_1 ir t_2 atžvilgiu.

Tipiškas tokio eksperimento rezultatas AX branduolių sistemai parodytas 80 pav. Nors detali jo analizė sudėtinga, kai kurios išvados yra akivaizdžios (bent jau paprastais atvejais).



80 pav. AX sukinių sistemos dvimatis BMR spektras.

Ant įstrižainės stebimos linijos atitinka keturias įprastinio BMR spektro linijas, taigi, jos jokios naujos informacijos nesuteikia (žr. 66 pav.). Įdomi informacija slypi nediagonaliuose maksimumuose: per juos išvestos vertikalios ir horizontalios linijos rodo, kuriuos branduolius tarpusavyje sieja sukinių sąveika. Nors sąveikaujančios AX sistemos atveju ši informacija yra triviali, interpretuojant sudėtingesnius BMR spektrus ji gali būti neįkainojama. Spektras, kurio vienmatė BMR realizacija vienareikšmiškai interpretuoti neleidžia, gali būti gana lengvai interpretuojamas dvimačiu atveju. Todėl dvimatis BMR yra nepakeičiamas, tiriant sudėtingos sandaros, tarp jų ir biologines molekules [1].

BMR tomografija

BMR tomografija (angl. *Magnetic resonance imaging*, MRI) per kelis pastaruosius dešimtmečius tapo nepakeičiamu biologinės ir medicininės diagnostikos įrankiu. Jos pradžia turbūt reikėtų laikyti 1971 metus, kai Raymond Damadian parodė, kad auglių ir sveikų audinių sukinių relaksacijos trukmės skiriasi ir magnetinio rezonanso metodai gali būti taikomi diagnostikai. Tomografijos eksperimentai pirmą kartą atlikti su mažais mėgintuvėlyje patalpintais bandiniais 1973 metais, o žmogaus kūno BMR vaizdai pirmą kartą gauti 1980 metais. Tuomet prirėkdavo 5 minučių, norint užregistruoti vieną vaizdą. Dar po šešerių metų, 1986, vaizdo užregistravimo laikas sutrumpėjo iki 5 sekundžių. Paskutiniame XX a. dešimtmetyje sukurta funkcinė BMR tomografija (fMRI), leidžianti realiu laiku stebėti smegenų veiklą, valdant mąstymą bei motorines funkcijas.

2003 metais pasaulio medicinos ir mokslo centruose jau veikė apie 10000 BMR tomografų, ir buvo atliekama apie 75 milijonai diagnostinių procedūrų per metus. Šie skaičiai nuolat auga, kaip ir BMR tomografijos teikiamos galimybės. Čia kartu dirba įvairių sričių mokslininkai: fizikai ir elektronikos inžinieriai tobulina aparatūrą, duomenų apdorojimo specialistai stengiasi iš užregistruotų vaizdų išgauti kuo detalesnę informaciją, programuotojai ir vaizdų analizės specialistai tobulina sudėtingą programinę įrangą, o biologai, chemikai bei medikai sugalvoja vis naujų BMR tomografijos taikymų.

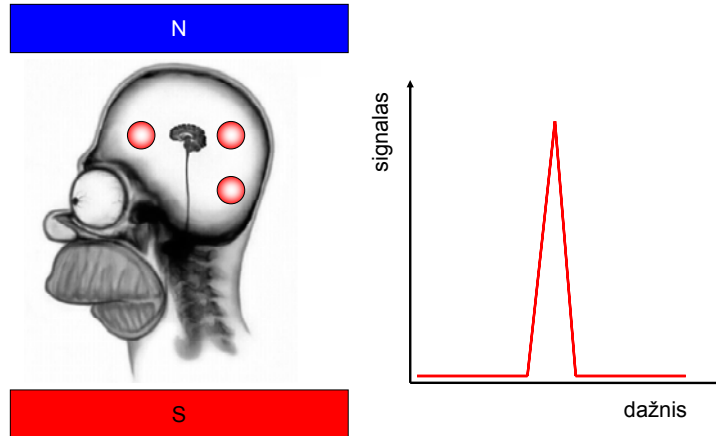
Erdvinis dažnio kodavimas: BMR tomografijos principas

BMR tomografijoje registruojami protonai, kurių daug turi vanduo ir lipidai – dvi organizme itin paplitusios medžiagos. Būtent šių medžiagų koncentracijų pasiskirstymą ir registruoja BMR tomografai. Jų veikimo principas grindžiamas pagrindine magnetinio rezonanso formule (52), teigiančia, kad sukinių Larmoro dažnis tiesiog proporcingas magnetiniam laukui, kuriame yra tas sukiny:

$$\nu_L \sim B \quad (77)$$

Įsivaizduokime, kad tiriamo objektą, kuriame yra trys atskiros sritys su protonais (pav.). Jei patalpinsime tokį objektą į pastovų magnetinį lauką, BMR spektre matysime vieną protonų signalo smailę (tarkime, kad cheminių poslinkių skirtumai skirtingose srityse yra

maži). Tam, kad BMR spektras suteiktų erdvinę informaciją, reikia sukurti *magnetinio lauko gradientą*, t.y. pasiekti, kad magneto kuriamas magnetinis laukas nebūtų vienalytis, o tolygiai keistųsi erdvėje. Tokiu atveju skirtingose erdvės vietose esantys protonai yra veikiami skirtingų magnetinių laukų ir rezonuoja ties skirtingais dažniais. Rezonansinės linijos intensyvumas atitinka tuo dažniu rezonuojančių protonų skaičių.



81 pav. Kairėje: objektas su trimis protonų turinčiomis sritimis pastoviam magnetiniame lauke. Dešinėje: atitinkamas protonų magnetinio rezonanso spektras.

Jei magnetas sukuria tiesinį magnetinio lauko gradientą

$$B(x) = B_0 + xG_x \quad (78),$$

tai atitinkamose x koordinatėse esančių protonų Larmoro dažniai bus

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi}(B_0 + xG_x) = \nu_0 + \frac{\gamma}{2\pi} xG_x \quad (79).$$

Iš šios priklausomybės galime surasti atitinkamų protonų koordinates:

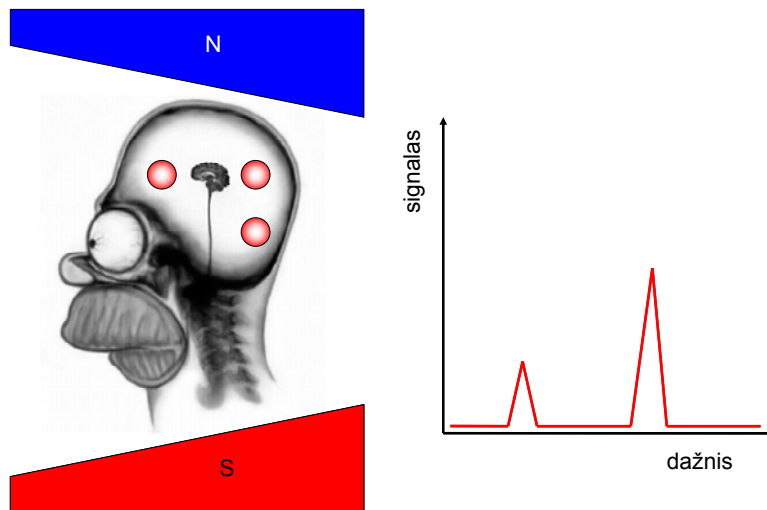
$$x = 2\pi \frac{(\nu - \nu_0)}{\gamma G_x} \quad (80).$$

Tai vadinamasis dažninis erdvės kodavimas – principas, kuriuo pagrįstas visų BMR tomografijos metodų veikimas. Vaizdai gaunami, sukuriant magnetinio lauko gradientą G_f daugeliu krypčių ir registruojant atitinkamus BMR spektrus (83 pav.). Tam naudojama dviejų gradientų, nukreiptų statmenomis kryptimis (x ir y), tiesinė kombinacija:

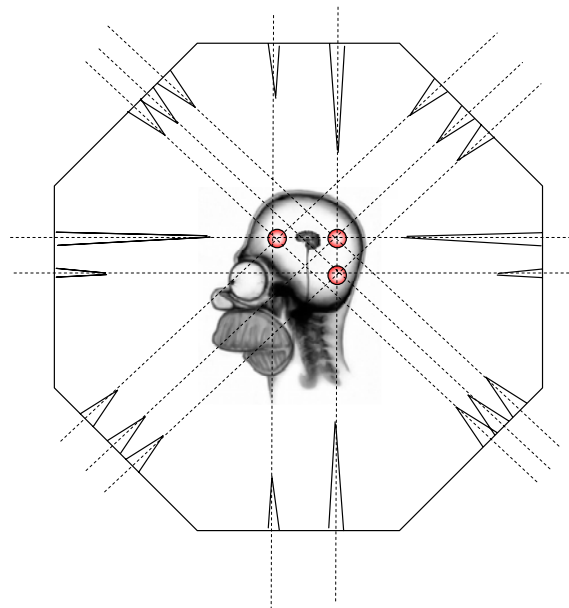
$$\begin{aligned} G_y &= G_f \sin \theta, \\ G_x &= G_f \cos \theta, \end{aligned} \quad (81).$$

Kad tokių projekcijų registravimas leistų užregistruoti norimą tiriamo objekto pjūvį, reikia sugebėti išrinkti objekto plokštumą, kurios vaizdą. Tai padaroma naudojant specialiai pritaikytą EM lauko impulsų bei nuolatinio magnetinio lauko

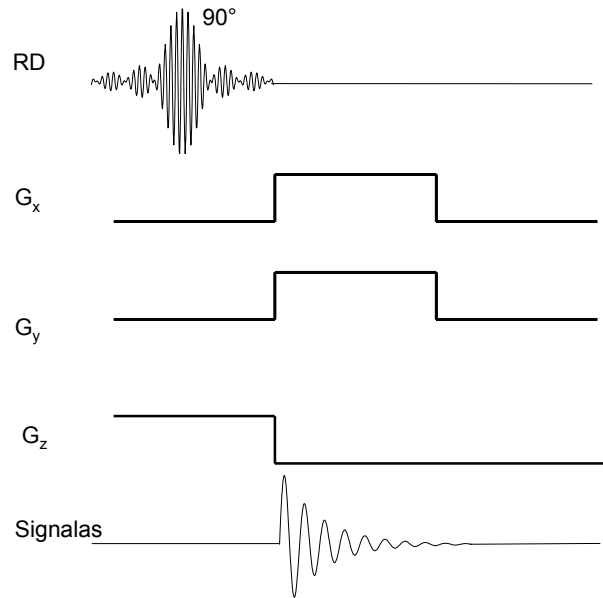
įjungimo/išjungimo seką (84 pav.). Pjūvio sukinius išrenka $\text{sinc}(t)$ formos 90° impulsas (ši forma naudojama todėl, kad jos dažnių spektras yra stačiakampis, t.y. žymiai geriau apibrėžtas negu stačiakampio RD lauko impulso), o tuomet sukuriamas norimas gradientas ir registruojamas LIG signalas. Užregistravus projekcijas, iš jų sugeneruojamas tiriamo objekto atvaizdas. Matematinė operacija, leidžianti iš projekcijų atstatyti originalo vaizdą, vadinama atvirkštine Radono transformacija [23].



82 pav. Dažninio kodavimo principas. Kairėje: objektas su trimis protonų turinčiomis sritimis magnetinio lauko gradiente. Skirtingi protonai jaučia skirtingą magnetinį lauką ir rezonuoja ties skirtingais dažniais.



83 pav. BMR tomografijos principas: BMR spektrai registruojami, sukūrus magnetinio lauko gradientą įvairiomis kryptimis.



84 pav. Impulsų seka, leidžianti registruoti vieno bandinio pjūvio vaizdo projekciją.

Nors tokia projekcijų registravimo schema lengvai suprantama ir tinkama pedagoginiams tikslams, tačiau praktikoje beveik netaikoma, kaip ir tolydžiai derinamo dažnio BMR spektrų registravimas. Vietoje jos naudojamos Furjė BMR tomografijos metodai, analogiški impulsiniam BMR. Kontrastui pagerinti naudojami ir sukinių aido bei perfokusavimo metodai, analogiški naudojamiems spektroskopijoje. Besidomintys skaitytojai apie juos informacijos ras specialioje BMR tomografijos literatūroje [24].

85 pav. parodytas BMR tomografu užregistruotas aksialinis galvos pjūvis, kurio dešinėje pusėje matoma patologija.



85 pav. Aksialinis galvos pjūvis. Dešinėje pusėje aiškiai matoma patologija.

Literatūra

1. P.W. Atkins, *Physical Chemistry*. 1994, Oxford: Oxford University Press. 1031.
2. R.L. Christensen, The Electronic States of Carotenoids, in *The Photochemistry of Carotenoids*, H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, and R.J. Cogdell, Editors. 1999, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. p. 137-160.
3. M.P. Allen, C.S. French, and J.S. Brown, Native and extractible forms of chlorophyll in various algal groups, in *Comparative biochemistry of Photoreactive Systems*, J.P. Allen, Editor. 1960, Academic Press: New York. p. 33-51.
4. W.L. Butler and D.W. Hopkins, *Photochemistry and Photobiology*, 1970. **12**: p. 439-450.
5. W.L. Butler and D.W. Hopkins, *Photochemistry and Photobiology*, 1970. **12**: p. 451-456.
6. A.E. Martin, *Spectrochimica Acta*, 1959. **14**: p. 97-103.
7. S.C.M. Otte, J.C. van der Heiden, N. Pfennig, and J. Amesz, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991. **1143**: p. 84-90.
8. J. Amesz and A.J. Hoff, *Biophysical Techniques in Photosynthesis*. 1996, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. 426.
9. H. van Amerongen, L. Valkunas, and R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons*. 2000, Singapore: World Scientific.
10. W. Liptay, Dipole moments and polarizabilities of molecules in excited electronic states, in *Excited States*, C.E. Lim, Editor. 1974, Academic Press: New York. p. 128-190.
11. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Second Edition. 2nd ed. 1999, New York: Kluwer Academic. 698.
12. A.M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Kohler, T.J. Aartsma, and J. Schmidt, *Science*, 1999. **285**(5426): p. 400-402.
13. J.T.M. Kennis, A.M. Streltsov, S.I.E. Vulto, T.J. Aartsma, T. Nozawa, and J. Amesz, *Journal of Physical Chemistry B*, 1997. **101**(39): p. 7827-7834.
14. D.B. Murphy, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. 2001, New York: Wiley-Liss. 368.
15. M. Abramowitz, *Microscope Basics and Beyond*. Vol. 1. 1987, New York: Olympus Corporation Publishing. 50.
16. T. Förster, Delocalized excitation and excitation transfer, in *Modern Quantum Chemistry*, O. Sinanoglu, Editor. 1965, Academic Press: New York. p. 93-137.
17. E. Gaiþauskas and L. Valkūnas, *Lazerinės spektroskopijos pagrindai*. 1995, Vilnius: Fizikos institutas. 111.
18. C. Rullière, *Femtosecond laser pulses: principles and applications*. 2nd ed. 2005, New York: Springer. 426.
19. I. Veeco Instruments, *A Practical Guide to SPM: Scanning Probe Microscopy 2005*: Veeco Corporate Headquarters.
20. S. Bahatyrova, R.N. Frese, C.A. Siebert, J.D. Olsen, K.O. van der Werf, R. van Grondelle, R.A. Niederman, P.A. Bullough, C. Otto, and C.N. Hunter, *Nature*, 2004. **430**(7003): p. 1058-1062.

21. T.J. McMaster, T. Hickish, T. Min, D. Cunningham, and M.J. Miles, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1994. **76**(2): p. 93-95.
22. W. Kuhlbrandt, D.N. Wang, and Y. Fujiyoshi, *Nature*, 1994. **367**: p. 614-621.
23. A.C. Kak and M. Slaney, *Principles of Computerized Tomographic Imaging*. 2001: Society of Industrial and Applied Mathematics. 329.
24. J.P. Hornak, *The basics of MRI*. 2007. <http://www.cis.rit.edu/htbooks/mri/>. Accessed: 2007.06.03.