

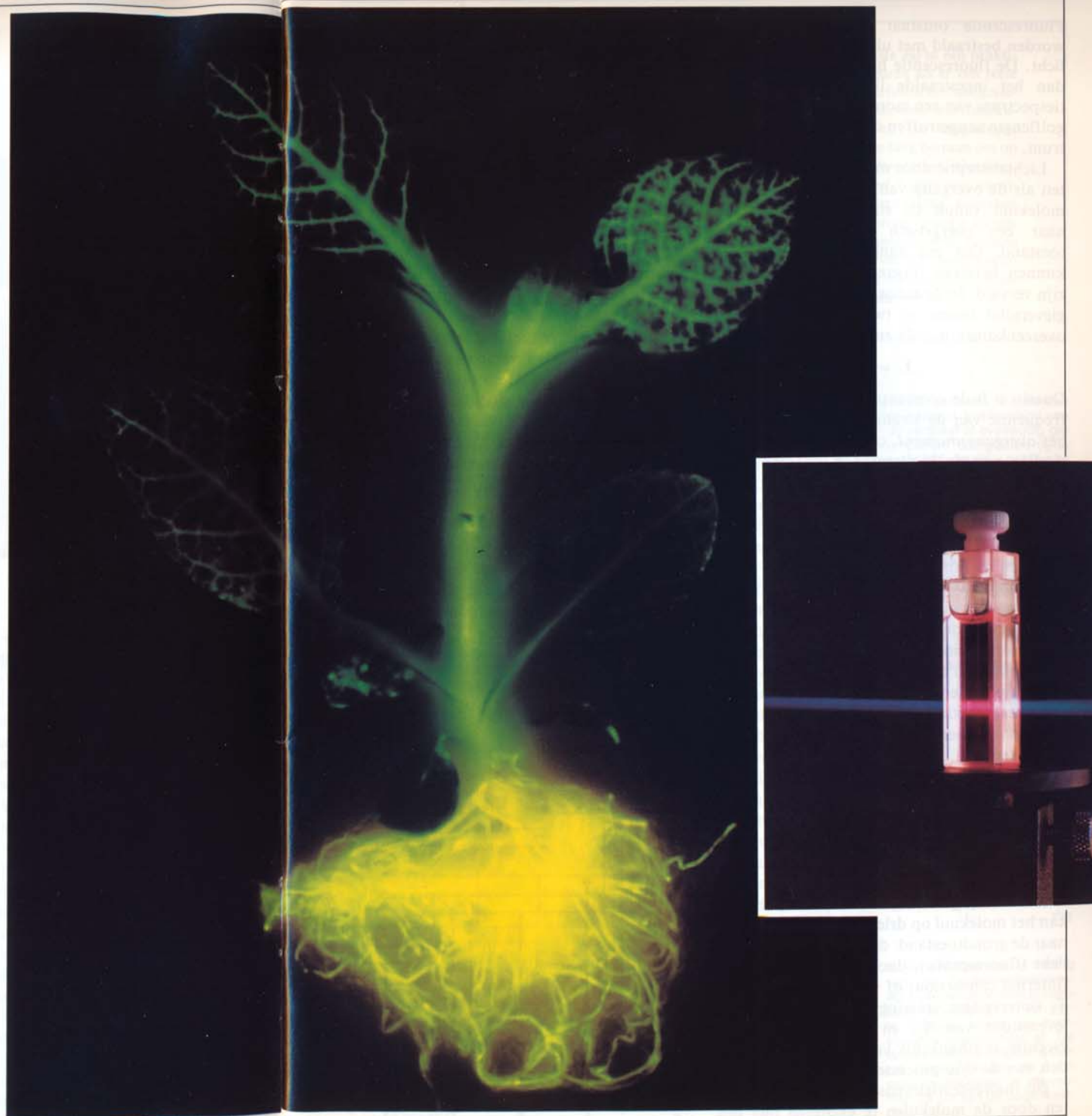
A.J.W.G. Visser
A. van Hoek

Vakgroepen Biochemie en Moleculaire Fysica
Landbouwwuniversiteit Wageningen

FLUORESCENTIE POLARISATIE

Fluorescentietechnieken zijn vaak zeer bruikbaar voor chemische, biochemische, biofysische en biologische analyses. Een afgeleide vorm van deze gevoelige techniek, gepolariseerde fluorescentie, verschaft de mogelijkheid om bijvoorbeeld eiwitten, membranen en nucleïnezuren in detail te onderzoeken. De komst van picoseconde-gepulste lasers voegde een extra dimensie toe. Het is nu mogelijk met gepolariseerde fluorescentie snelle bewegingen van biopolymeren te registreren.

Het summum van fluorescentie in een biologisch systeem is onlangs gerealiseerd door onderzoekers van de universiteit van Californië die het gen van een vuurvliegje, dat codeert voor het lichtdragende eiwit luciferase, in tabaksplantjes overbrachten. De inzet rechts toont een oplossing waar laserlicht invalt en doorheengaat. In zijwaartse richtingen zendt dit monster fluorescerende straling uit met een kleinere frequentie dan het exciterende licht. In die opstelling kunnen ook fluorescentiepolarisatiemetingen worden uitgevoerd.



Fluorescentie ontstaat wanneer molekulen worden bestraald met ultraviolet of zichtbaar licht. De fluorescentie heeft een andere kleur dan het ingestraalde licht; het fluorescentiespectrum van een monster wordt bij langere golflengte aangetroffen dan het absorptiespectrum.

Lichtabsorptie door molekulen is op te vatten als de overgang van een elektron van het molekuul vanuit de stabiele grondtoestand naar een energetisch hogere aangeslagen toestand. Om een aangeslagen toestand te kunnen bereiken moeten twee voorwaarden zijn vervuld. In de eerste plaats moet het energieverval tussen de twee toestanden (ΔE) overeenkomen met de energie van de straling:

$$\Delta E = h\nu$$

Daarin is h de constante van Planck en ν de frequentie van de straling. Ten tweede moet het *overgangsmoment*, of *dipoolmoment*, een eindige waarde bezitten. Het overgangsmoment berust op het verplaatsen van elektronen in een molekuul gedurende de overgang van de grondtoestand naar de aangeslagen toestand. Een dipoolmoment heeft behalve een grootte ook een richting. Zo ook heeft het overgangsmoment van een optische absorptie-overgang een vaste oriëntatie in het molekuul. Bij verreweg de meeste aromatische molekulen, waar in dit artikel het accent op ligt, ligt de richting van de overgangsmomenten van de absorptiebanden in het vlak van het molekuul.

Lichtabsorptie is een zeer snel proces dat verloopt binnen een femtoseconde, dat is 10^{-15} seconde, een miljoenste van een miljardste seconde. Een aangeslagen molekuul komt na aanslag altijd via een stralingsloos proces, dat bekend staat als *internal conversion*, binnen een aantal picoseconden (1 picoseconde = 10^{-12} seconde) in het laagste vibratieniveau van de eerste aangeslagen singlettoestand (S_1) terecht. Vanuit deze toestand kan het molekuul op drie manieren terugkeren naar de grondtoestand: door het uitzenden van licht (fluorescentie), door stralingsloos verval (internal conversion) of via de triplettoestand T_1 (intersystem crossing, fosforescentie). De levensduur van S_1 , en dus van de fluorescentie, is afhankelijk van de relatieve snelheden van de drie processen.

De fluorescentielevensduur kan men bepalen door de molekulen te exciteren met een

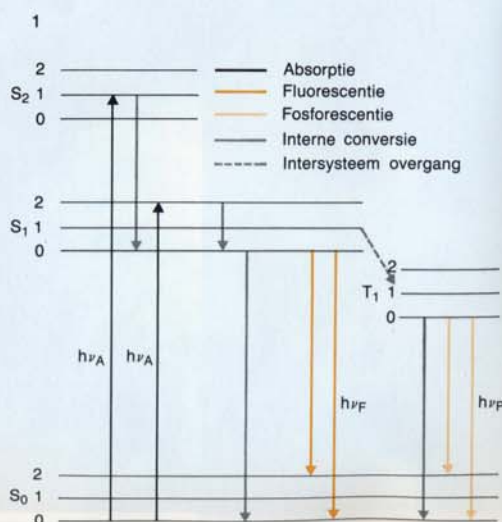
kortdurende lichtpuls en de afname van de fluorescentie als functie van de tijd te bepalen. Levensduren kunnen, afhankelijk van het type molekuul, variëren van 0,1 tot ongeveer 300 nanoseconden (1 nanoseconde = 10^{-9} seconde = 1 miljardste seconde).

Polarisatie en anisotropie

Een fluorescente oplossing zendt altijd enigszins gepolariseerd licht uit. Dit kan goed worden waargenomen door het monster al met gepolariseerd licht te bestralen en de sterkte van de fluorescentie als functie van de polarisatierichting te meten. Wanneer men de analysator, een polarisatiefilter met een intensiteitsmeter, over 90° draait, dan verandert de intensiteit van de fluorescentie. Deze polarisatie van de fluorescentie in kleurstoffen is al in 1920 ontdekt door F. Weigert. In de jaren twintig zijn deze waarnemingen door V. Levshin, P. Soileillet en F. Perrin met theoretische berekeningen ondersteund en verklaard.

We kunnen de twee meetbare intensiteitscomponenten definiëren als $I_{||}$ en $I_{\perp}$, respectievelijk de componenten die evenwijdig en loodrecht gepolariseerd zijn ten opzichte van de polarisatierichting van het excitatielicht. Vervolgens worden twee grootheden gedefinieerd, te weten de polarisatiegraad:

$$p = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}}$$



Gestimuleerde emissie

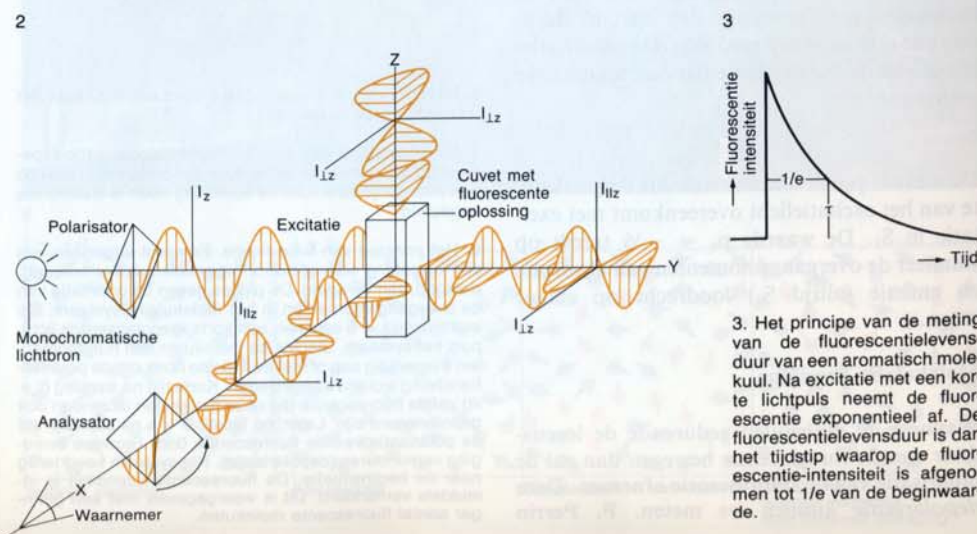
Aan molekulen of atomen kunnen energetische veranderingen worden aangebracht door het toevoegen van energie uit een elektrische stroom, met warmte of door straling. Door zo'n excitatie kan een molekuul in een *aangeslagen toestand* geraken. Met die energie kunnen daarna verschillende dingen gebeuren. Het molekuul kan die energie op één of andere wijze overdragen naar andere molekulen, een foton uitzenden (spontane emissie) of na nog een excitatie (stimulatie) met een foton, twee fotonen emitteren (gestimu-

leerde emissie). Dat laatste zal in een praktische situatie alleen gebeuren als er een reële kans is dat een stimulatiefoton een aangeslagen molekuul vindt; er moeten vele molekulen aangeslagen zijn en de aangeslagen toestand moet voldoende lang bestaan om op zo'n foton te kunnen 'wachten'. Gestimuleerde emissie heeft heel bijzondere eigenschappen die voor laserwerking essentieel zijn. Voortplantingsrichting, energie en polarisatie van de twee geëmitteerde fotonen zijn exact gelijk aan die van het stimulatiefoton. Het is een zeer snel mechanisme, vergelijkbaar met het absorptieproces.

1. Een energieniveau-diagram waarin verschillende overgangen zijn getekend. De horizontale lijnen zijn elektronenniveaus waarop verschillende vibratieniveaus ($0, 1, 2$) zijn gesuperponeerd. In de singlettoestanden (S_0, S_1, S_2) zijn de spins van de elektronen gepaard; deze toestanden zijn diamagnetisch. In de triplettoestand (T_1) zijn twee elektronen ongepaard; deze toestand is paramagnetisch. De gekleurde, verticale lijnen geven de emissieovergangen aan. De gestippelde lijnen wijzen op stralingsloze overgangen (internal conversion, intersystem crossing). De golflengte van de overgangen neemt van links naar rechts steeds toe.

2. Een opstelling voor het meten van fluorescentiepolarisatie. Monochromatisch licht passeert een polarisator, die één polarisatielichting doorlaat. Het excitatielicht loopt, evenwijdig aan de z-richting gepolariseerd, in het tekenvlak (yz-vlak). Het excitatielicht wekt in een monster fluorescentie op, die gepolariseerd langs de x-richting wordt waargenomen. De polarisatie van de fluorescentie wordt

via een polarisator (analysator) gemeten. Er worden twee intensiteitscomponenten bepaald. In één stand van de analysator wordt alleen de verticaal of evenwijdig gepolariseerde fluorescentiecomponent doorgelaten ($I_{||}$ in het xz-vlak). Door de analysator 90° om de x-richting te draaien wordt de andere component doorgelaten ($I_{\perp}$ in het xy-vlak). De totale fluorescentie kan gelijk worden gesteld aan $I_{||} + 2 I_{\perp}$. Dit is in te zien als eerst wordt geëxciteerd met licht gepolariseerd langs de z-richting (I_z) en daarna met licht gepolariseerd langs de x-richting (I_x) (er is geen I_y -component voor een transversale golf in de y-richting). De totale fluorescentie kan worden gevonden door alle fluorescentiecomponenten langs de drie Cartesische assen bij elkaar op te tellen. Voor I_z geldt: langs de y-as $I_{||}$ en $I_{\perp}$, langs de x-as $I_{||}$ en $I_{\perp}$ en langs de z-as $I_{||}$ en $I_{\perp}$; totaal $2 I_{||} + 4 I_{\perp}$. Voor I_x geldt analoog: totaal $2 I_{||} + 4 I_{\perp}$. Het totale resultaat is dus $4 I_{||} + 8 I_{\perp}$. De totale fluorescentie heeft dus tweemaal zoveel loodrecht gepolariseerde intensiteit als evenwijdig gepolariseerde.



3. Het principe van de meting van de fluorescentielevensduur van een aromatisch molekuul. Na excitatie met een korte lichtpuls neemt de fluorescentie exponentieel af. De fluorescentielevensduur is dan het tijdstip waarop de fluorescentie-intensiteit is afgenomen tot $1/e$ van de beginwaarde.

en de anisotropie:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

Door vergelijking zien we dat:

$$r = \frac{2p}{3 - p}$$

Gebruik van de anisotropie in plaats van de polarisatiegraad heeft het voordeel dat uitdrukkingen, die rekenschap geven van het verschil in polarisatie tijdens de levensduur van de fluorescentie aanzienlijk vereenvoudigen. Bovendien is de noemer van de uitdrukking voor r , $I_{||} + 2I_{\perp}$, precies gelijk aan de totale fluorescentie van het monster (zie afb. 4 voor uitleg).

Fotoselectie

Om gepolariseerde fluorescentie te verklaren moeten we een aantal begrippen verduidelijken. Daartoe gaan we uit van een *isotrope* oplossing in een cuvet, wat wil zeggen dat de molekulen willekeurig verdeeld zijn: alle oriëntaties zijn even waarschijnlijk. Wanneer men exciteert met een lineair gepolariseerde lichtpuls, dan absorberen die molekulen het makkelijkst licht die hun overgangsmoment evenwijdig of bijna evenwijdig aan de polarisatie-richting van het licht hebben staan. Dit noemen we *fotoselectie*, omdat uit een isotrope, moleculaire verdeling bepaalde molekulen selectief worden aangeslagen; er wordt een *anisotrope* verdeling gecreëerd. Als gedurende de levensduur van de aangeslagen toestand de molekulen niet bewegen, dan zal de fluorescentie ook gepolariseerd zijn. De polarisatiegraad van de fluorescentie ligt dan tussen twee grenswaarden:

$$-\frac{1}{3} \leq p_0 \leq \frac{1}{2}$$

De waarde $p_0 = \frac{1}{2}$ komt voor als de golflengte van het excitatielicht overeenkomt met excitatie in S_1 . De waarde $p_0 = -\frac{1}{3}$ treedt op wanneer de overgangsmomenten van absorptie en emissie (altijd S_1) loodrecht op elkaar staan.

Moleculaire beweging

Wanneer de molekulen gedurende de levensduur van de fluorescentie bewegen dan zal de polarisatie van de fluorescentie afnemen. Deze *depolarisatie* kunnen we meten. F. Perrin

heeft aangetoond dat de polarisatiegraad in verband kan worden gebracht met de snelheid van rotatie van het molecuul:

$$\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\phi}\right)$$

Hierin is p de waargenomen polarisatiegraad, p_0 de grenswaarde van de polarisatiegraad, τ de levensduur van de fluorescentie en ϕ staat in verband met de rotatiediffusieconstante D via de Stokes-Einsteinrelatie:

$$\phi = \frac{1}{6D} = \frac{\eta V}{RT}$$



4. Het hart van de Wageningse meetopstelling, waar het laserlicht op de cuvet valt.

5. Meetopstelling voor een fluorescentiepolarisatie-experiment. De laser en de optica voor de lichtbundel staan op een trillingvrije tafel. Om de opstelling heen is elektronica opgesteld.

6. Het principe van fotoselectie. Er wordt uitgegaan van een oplossing waarin bolvormige molekulen willekeurig, isotroop, zijn verdeeld. De pijltjes geven de oriëntatie van de overgangsmomenten in het moleculaire systeem. Op een tijdstip $t = 0$ exciteert een korte, gepolariseerde lichtpuls het systeem. Slechts de molekulen met hun momenten evenwijdig aan of met een kleine hoek om de polarisatie-richting worden aangeslagen. Korte tijd na aanslag ($t = dt$) zal de fluorescentie die deze molekulen uitzenden ook gepolariseerd zijn. Later, op tijdstip $t = \tau$ na aanslag, zal de polarisatie van de fluorescentie door Brownse beweging verminderen (depolarisatie). Het systeem keert terug naar de beginsituatie. De fluorescentie-intensiteit is inmiddels verminderd. Dit is weergegeven met een geringer aantal fluorescente molekulen.

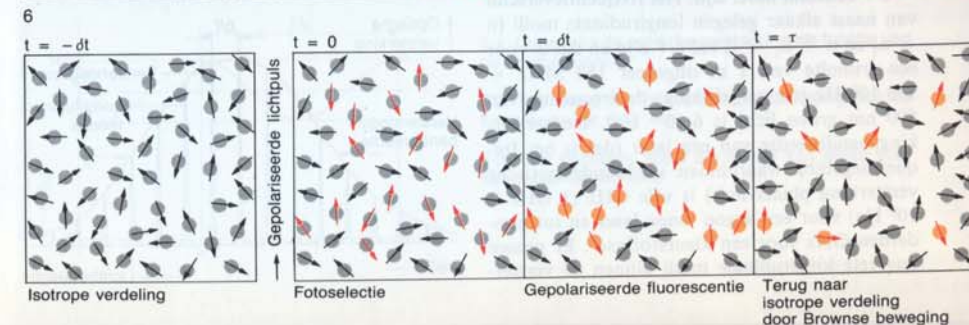
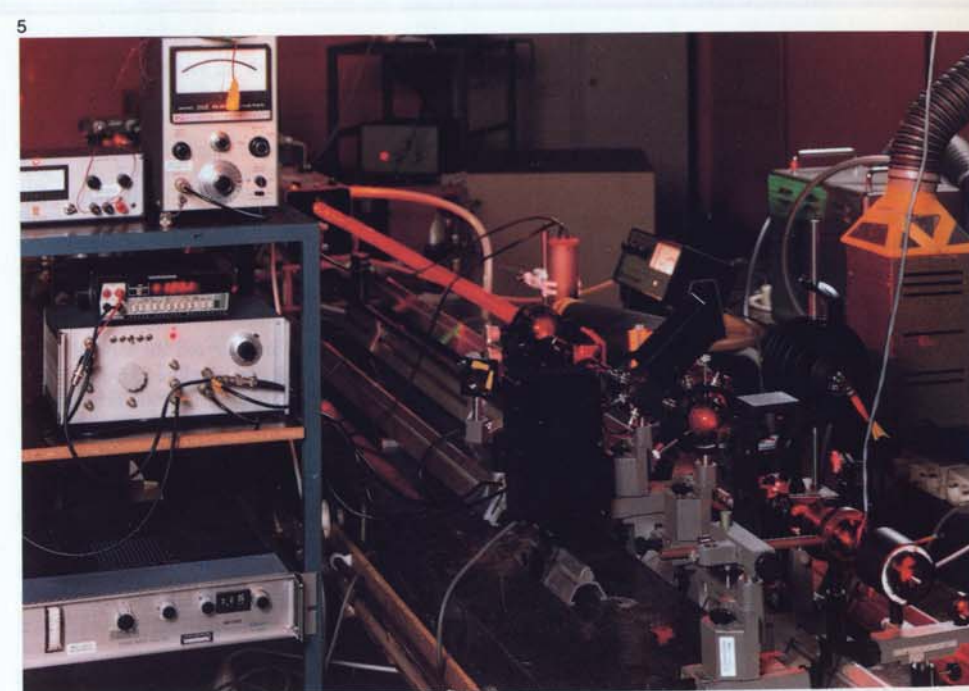
waarin η de viscositeit van het oplosmiddel is, V het molekulaire volume, T de absolute temperatuur en R de gasconstante. De rotatiesnelheid van het molecuul hangt dus, heel begrijpelijk, af van de viscositeit (stropigheid) van de oplossing, van het volume van het molecuul en van de temperatuur.

Wanneer een monster met een korte lichtpuls wordt geëxciteerd dan neemt de anisotropie van de oplossing af volgens een exponentiële functie:

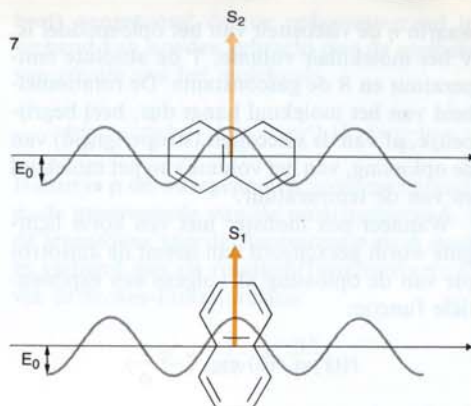
$$r(t) = r(0) \exp\left(-\frac{t}{\phi}\right)$$

Dus door $r(t)$ semilogaritmisch tegen de tijd uit te zetten, kan uit de helling ϕ^{-1} worden bepaald.

Aromatische molekulen in oplossing roteren zeer snel, de rotatiecorrelatietijd kan in dit geval in de orde van 10 tot 100 picoseconden liggen. Als de levensduur van de fluorescentie van een bepaald molecuul 10 nanoseconden bedraagt en de rotatiecorrelatietijd is 100 picoseconden, dan betekent dit dat het zo'n honderd keer ronddraait. De polarisatie van de fluorescentie zal dan zijn verdwenen, er treedt volledige depolarisatie op.



7. Overgangsmomenten in naftaleen. De overgangen, die corresponderen met $S_0 - S_1$ en $S_0 - S_2$ absorpties, zijn loodrecht op elkaar in het moleculaire vlak gepolariseerd. Er zijn twee situaties geschetst. In de eerste situatie is de polarisatie van het exciterende licht (E_0) evenwijdig aan het $S_0 - S_1$ overgangsmoment. In een systeem van willekeurig verdeelde, bewegingsloze naftaleenmolekullen zal de polarisatiegraad de limietwaarde van $p_0 = 1/2$ bereiken wanneer in de eerste absorptieband wordt geëxciteerd. In de tweede situatie worden alleen naftaleenmolekullen met het $S_0 - S_2$ overgangsmoment evenwijdig aan E_0 beschouwd. Fotoselectie via excitatie in de tweede absorptieband zal leiden tot $p_0 = -1/3$. De grootte van S_1 en S_2 zijn niet in verhouding weergegeven. S_2 zou veel langer moeten zijn.



Lasers

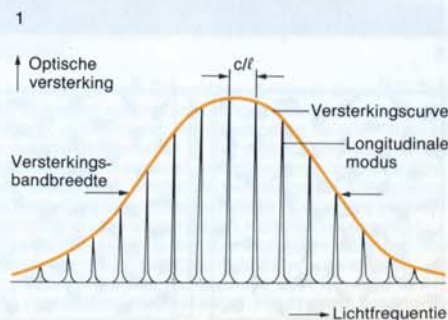
Een laser is een optische oscillator. De algemene oscillatievoorwaarden zijn dat binnen het oscillerend systeem de versterking groter dan of gelijk aan 1 moet zijn en dat meekoppeling plaats vindt. Gestimuleerde emissie (Intermezzo I) zorgt voor de optische versterking, terwijl meekoppeling wordt bewerkstelligd door de spiegels van de trilholt op een zodanige afstand te zetten dat er precies een geheel aantal golflengten tussen past. Als de totale lengte van de trilholt ℓ is, en λ de golflengte, passen die er dus $n = \ell/\lambda$ maal in. In een trilholt van totaal 1 m lengte passen dan bijvoorbeeld $2 \cdot 10^6$ golflengten van 500 nm groen licht.

Nu lijkt het misschien op het eerste gezicht alsof de lengte van de trilholt heel exact moet zijn om laserwerking te kunnen krijgen, maar dat valt nogal mee. De eis is namelijk dat n een geheel getal is en er kunnen dus een heleboel frequenties f zijn (longitudinale modi genaamd) waarvoor aan die oscillatievoorwaarden wordt voldaan. Uit $\lambda = c/f$ en $n = \ell/\lambda$ volgt dat $f/n = c/\ell$ constant moet zijn. Het frequentieverschil van naast elkaar gelegen longitudinale modi ($n = n_1$ en $n = n_1 + 1$) zal c/ℓ zijn en dat is voor een trilholt van 1 m ongeveer 150 MHz = $150 \cdot 10^6$ Hz (ter vergelijking: de frequentie van 500 nm groen licht is $6 \cdot 10^{14}$ Hz). De versterkingsbandbreedte van een laser (dat is het frequentiegebied waarbinnen voldoende optische versterking plaatsvindt) is vele GHz (1 GHz is 10^9 Hz) voor een argon ionen laser en tot honderden GHz voor een kleurstoflaser. Er passen dus vele longitudinale modi binnen de verster-

kingsbandbreedte en de lengte van de trilholt is dus in dit geval niet kritisch.

Met zoveel mogelijk longitudinale modi kunnen dan weer korte lichtpulsjes gemaakt worden door met een modulator ervoor te zorgen, dat de modi een vaste fase-relatie ten opzichte van elkaar hebben. Men noemt dat proces het mode-locken van de laser.

Een eenvoudige manier om dit mode-locken uit te leggen biedt de ringlaser. De trilholt bestaat uit drie spiegels, een versterkermiddel, een optische diode om één voortplantingsrichting van het licht in de trilholt te selecteren en een optische modulator. Deze heeft een transmissie als functie van de tijd als geschetst in afb. I-2. Alle fotonen in de trilholt hebben dezelfde rondlooptijd ℓ/c , ook die fotonen uit gestimuleerde emissie. Een foton dat op tijdstip t_0 langs de modulator komt zal een kans van 100% hebben om door de modulator te geraken. Ook



De depolarisatie zal afnemen wanneer de viscositeit van het oplosmiddel toeneemt. Ook wanneer een fluorescente molecuul star is gebonden in een veel groter biologisch macromolecuul verwachten we op grond van de grotere molecuulmassa een geringere depolarisatie.

Dank zij pionierswerk van G. Weber in het begin van de jaren vijftig passen onderzoekers polarisatie van de fluorescentie nu veelvuldig toe op diverse biologische systemen. De gevoeligheid van de meettechniek laat metingen toe aan zeer verdunde monsters.

We zijn tot nu toe steeds uitgegaan van bolvormige deeltjes. Het is gemakkelijk in te zien dat in langwerpige, sigaarvormige deeltjes (zoals bijvoorbeeld het spiereiwit myosine) twee soorten rotaties mogelijk zijn. Het tijdsverloop van de anisotropie is in dit geval een complexe functie.

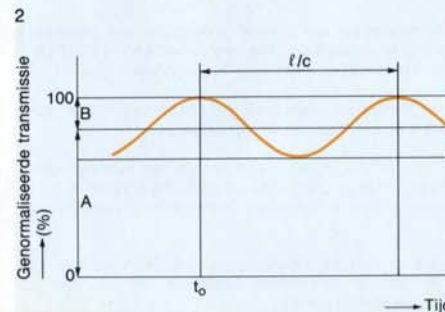
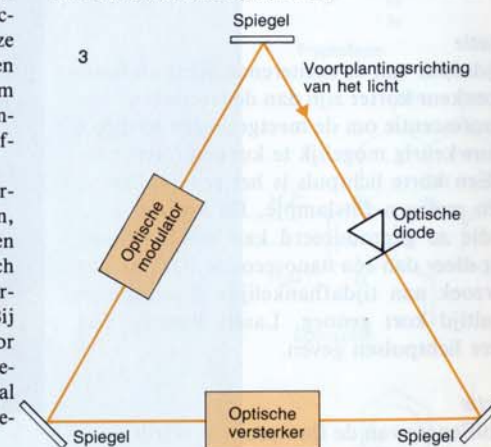
Meettechniek

Als een monster wordt bestraald met een lichtpuls, zal de intensiteit van de fluorescentie exponentieel afnemen. Bij het beschouwen van

gestimuleerde emissie uit dat foton, dat immers op tijdstippen $t_0 + k(\ell/c)$ langs komt, zal een 100% transmissiekans hebben ($k = 1, 2, 3, 4$ enz.). Fotonen echter, die op een ander tijdstip dan $t_0 + k(\ell/c)$ langs de modulator komen, zullen een kleinere transmissiekans hebben. Door het herhalende mechanisme van deze selectie zullen enige tijd na het aanbrengen van deze situatie slechts op tijdstip $t_0 + k(\ell/c)$ fotonen langs de modulator komen, een continu stroom van pulsjes licht dus. Deze duren bij een argon-ionen-laser ongeveer 200 ps en bij een kleurstoflaser ongeveer 5 ps.

Bij de argon-ionen-laser wordt de inversie verkregen uit een boogontlading in verdund argon, waarbij met een spanning van 600 V en een stroom van 50 A continu zo'n 30 kW elektrisch vermogen wordt gedissipeerd. Het uitgangsvermogen is dan bijvoorbeeld maximaal 30 W. Bij de kleurstoflaser wordt inversie verkregen door de uitgangsbundel van de argon laser te focuseren in een heel klein plekje van een straal kleurstof in oplossing. Dan wordt het mode-

locken overigens niet bewerkstelligd met een modulator, maar door de trein korte pulsjes van de argon laser na mode-locken in de trilholt met de kleurstof te 'pompen'. Een voorwaarde voor dit 'synchroon pompen' is dat de lengten van de twee trilholt exact gelijk zijn.



II-1. Curve van de optische versterking als functie van de lichtfrequentie.

II-2. Intensiteit van het optisch modulatiesignaal als functie van de tijd.

II-3. Een ringlaser, zoals die model kan staan voor een mode-locked-laser.

één molekuul dat door één foton wordt geëxciteerd zal de *waarschijnlijkheid* voor het afgeven van een fluorescentiefoton als functie van de tijd beschreven kunnen worden met een curve gelijkvormig aan die van afbeelding 3. Dit statistisch gebeuren wordt gebruikt voor het registreren van de vervalsnelheid van de fluorescentie.

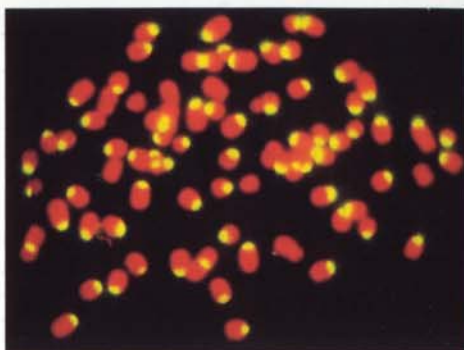
Met een fotomultiplicatorbuis en detectie-elektronica wordt gemeten hoeveel tijd er verloopt tussen de lichtpuls en het optreden van een fluorescentiefoton. De uitkomst van de meting wordt in een geheugen vastgelegd. Door de meting vele malen te herhalen wordt de curve opgebouwd. Aangezien de detectie-elektronica slechts één foton per exciterende lichtpuls kan verwerken, kan met een vrij kleine energie per puls worden volstaan. Met een tijdsduur van het fluorescentieverval in het nanosecondegebied kunnen kort na elkaar lichtpulsen worden gegeven zodat de uiteindelijke meettijd meevalt, in de praktijk enkele minuten per curve.

Excitatie

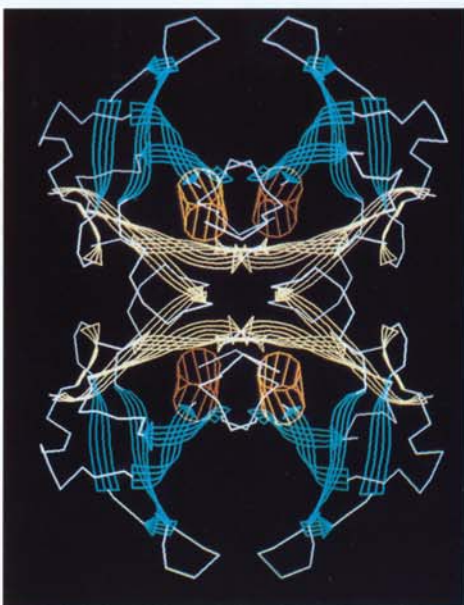
De tijdsduur van de exciterende lichtpuls moet bij voorkeur korter zijn dan de levensduur van de fluorescentie om de meetgegevens zo direct en nauwkeurig mogelijk te kunnen interpreteren. Een korte lichtpuls is het eenvoudigst te maken met een flitslampje. De kortste lichtflits die zo geproduceerd kan worden duurt echter meer dan één nanoseconde. Dat is voor onderzoek aan tijdafhankelijke fluorescentie niet altijd kort genoeg. Lasers kunnen veel kortere lichtpulsen geven.

Detectie

De golflengte van de fluorescentie wordt geselecteerd met een monochromator of optisch filter. In de detectieketen is ook een draaibaar polariserend optisch element (analysator) opgenomen om een te meten polarisatie-richting te selecteren. Fluorescentiefotonen detecteert men met een fotomultiplicatorbuis. Als er één fluorescentiefoton invalt, produceert deze buis een stroompulsje. Met elektronica-apparatuur wordt dan de tijd gemeten vanaf het moment waarop een puls op het monster valt, totdat er zo'n stroompulsje optreedt. Doordat er vele honderdduizenden lichtpulsen per seconde voor excitatie beschikbaar zijn, kan deze meting zeer snel en vaak herhaald worden, zodat



8



9

8. Fluorescentie wordt veel toegepast om biologisch materiaal te detecteren. Hier een voorbeeld van DNA in muizechromosomen met een fluorescerend label.

9. Een model van het eiwit prealbumine, in een vorm waarin vier eiwitmolekulen verenigd zijn.

10. Het vuurvliegje bezit van nature het fluorescerende luciferase. Het gen dat voor dit proteïne codeert is nu ingebouwd in een tabaksplant. Het resultaat staat op pag. 299.

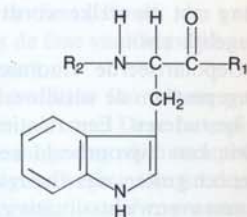
11. Drie stoffen die als fluorescentielabel bruikbaar zijn: het aminozuur tryptofaan; lumazine en 1,6 - difenyl - 1,3,5 - hexatrieen (DPH).

er nauwkeurige bepalingen mogelijk zijn. De elektronica moet overigens zeer precies ontworpen zijn: de te meten tijdsverschillen liggen in zo'n orde van grootte dat de verschillen in lengte van de elektronische circuits van invloed kunnen zijn op de meetresultaten. Soms moeten daarom vertraginglijnen worden toegepast, extra draadlussen die ervoor zorgen dat pulsjes op tijd ergens aankomen. Een stroomdraad van 20 cm vertraagt een elektrische puls met ongeveer 1 ns. Alle gemeten waarden worden uiteindelijk digitaal verwerkt, nadat ze een analoog-digitaalconverter zijn gepasseerd.

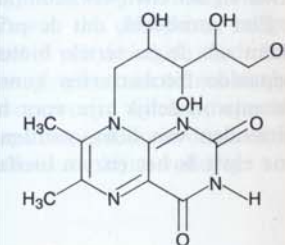
10



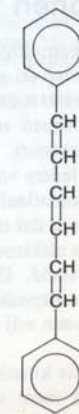
11



Tryptofaan



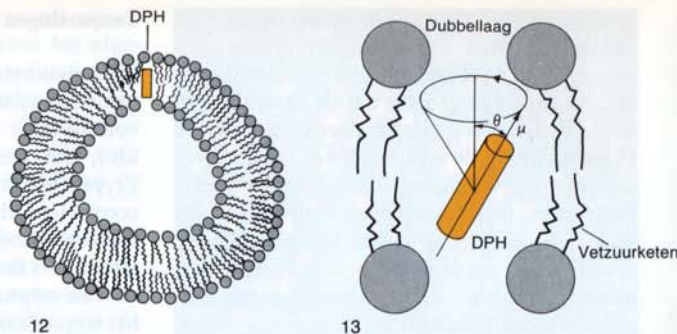
Lumazine

1,6 - difenyl -
1,3,5 - hexatrieen (DPH)

Toepassingen

Het vetzuurtransporterende eiwit albumine uit menselijk serum is een compact, nagenoeg bolvormig eiwit (molekulaire gewicht 68000 dalton), dat één aminozuur tryptofaan bevat. Tryptofaan is een aminozuur dat goed fluoresceert. Het is daardoor een soort natuurlijk fluorescentielabel in een eiwitmolekuul. Anisotropie-vervalmetingen, waarbij de fluorescentie van tryptofaan is gebruikt, laten zien dat het tryptofaan star is gebonden in het eiwit en de bewegingen van het hele eiwit volledig

12 en 13. Vesikels zijn kleine, in het laboratorium makkelijk te bereiden membraanbolletjes die als modelsysteem voor biologische membranen kunnen dienen (zie het artikel van Hoekstra in dit nummer van Natuur & Techniek). Hier is een doorsnede van een vesikel met het fluorescentielabel DPH afgebeeld. In een detail van zo'n dubbellaag wordt de beweging van de probe binnen een kegel aangegeven. Deze beweging leidt tot depolarisatie van de fluorescentie. Het overgangsmoment μ staat in de lengterichting van de label DPH.



volgt. De gevonden correlatietijd van 26 nanoseconden bij 20°C is in goede overeenstemming met die welke wordt berekend voor een dergelijk eiwit.

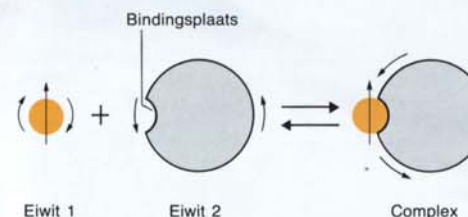
Gepolariseerde fluorescentie kan worden toegepast om de wisselwerking tussen eiwitten te bestuderen. Een relatief klein, fluorescent eiwit kan bijvoorbeeld een complex vormen met een groter, niet-fluorescent eiwit (afb. 14). In een evenwichtssituatie zijn er dan in principe twee fluorescentiebronnen: het ongebonden eiwit en het eiwit-eiwitcomplex.

Een voorbeeld, dat de principes illustreert komt uit de bacteriële bioluminescentie. Uit bepaalde fotobacteriën kunnen eiwitten, die verantwoordelijk zijn voor het opwekken en uitzenden van licht, worden geïsoleerd. Het ene eiwit is het enzym luciferase (molekulaair

gewicht 80000 dalton), dat verantwoordelijk is voor de chemische excitatie tijdens een oxydatiereactie. Het andere eiwit (molekulaair gewicht 20000 dalton) 'maakt' de bioluminescentie en wordt lumazine-proteïne genoemd. Het bevat lumazine, een sterk fluorescerende verbinding. Het fluorescentiespectrum van lumazine-proteïne is identiek aan het bioluminescentiespectrum.

De interactie tussen lumazine-proteïne en luciferase kan worden bestudeerd door het anisotrope fluorescentieverschijnsel van lumazine-proteïne te analyseren. Er kunnen condities worden gekozen waarbij volledige associatie optreedt. Hierbij wordt alleen de rotatie-correlatietijd van het complex gemeten. De rotatie-correlatietijd van vrij lumazine-proteïne is exact bekend. In een mengsel van de twee ei-

14. Interactie tussen een groot en een klein eiwit. Alleen het kleinere eiwit is fluorescent. In een evenwichtsmengsel zijn er dan twee fluorescente species.



14

witten is het anisotropieverschijnsel te beschrijven met correlatietijden, die in een bepaalde verhouding voorkomen. Uit één enkele analyse zijn dus de relatieve concentraties te meten. Het grote voordeel van deze methode is de gevoeligheid. Zeer lage concentraties van de eiwitten (nanomolen tot picomolen) kunnen worden aangetoond. Met andere technieken is dit niet mogelijk.

Membranen

Membranen vormen de scheidingswanden tussen celorganellen binnen een cel, of tussen cellen onderling. De bouwstenen van de dubbellaag worden gevormd door lipidemolekulen, waarvan verschillende typen in de natuur voorkomen. De interne structuur van zo'n lipide dubbellaag is niet star, maar vertoont grote

flexibiliteit. Voor metingen in membranen gebruikt men bij voorkeur *fluorescente probes*, fluorescerende stoffen die van nature niet aanwezig zijn en zich in dit geval oriënteren langs de vetzuurketens. Eén van de meest gebruikte probes is difenylhexatriene (DPH).

Om na te gaan wat voor soort beweging dit molecuul uitvoert, kunnen kunstmatige membranen bestaand uit één bepaald lipide worden gebruikt. Dit zijn zogenaamde vesikels, die zo groot zijn dat ze op de tijdschaal van het experiment (circa 50 nanoseconden) praktisch onbeweeglijk zijn. Dergelijke kunstmatige membranen hebben een karakteristieke overgangstemperatuur. Beneden die kritische temperatuur is er sprake van een geordende structuur, een kristallijne fase. Boven de overgangstemperatuur is de fase van de membraan ongeordend (vloeibaar).

DPH zal in de kristallijne fase alleen rond zijn lange as kunnen roteren. Deze beweging zal in een anisotrope omgeving niet tot depolarisatie leiden. De enige beweging, die tot depolarisatie aanleiding geeft, is een zogenaamde beperkte rotatie langs een kegeloppervlak. De as van de kegel ligt in de lengterichting van de vetzuurketens. Zowel de uitwijking, uitgedrukt in de tophoek θ van de kegel, als de frequentie van de beweging kunnen uit een analyse van het anisotropieverschijnsel worden bepaald. Boven de overgangstemperatuur in de vloeibare fase is de depolarisatie bijna volledig.

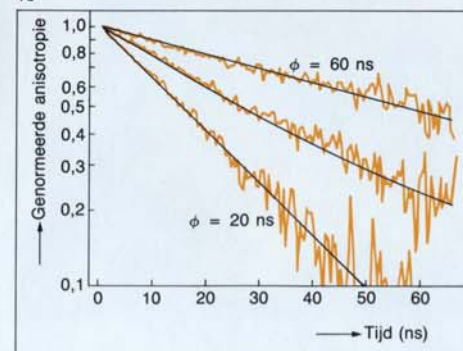
Fotonen tellen

Een fotomultiplicatorbuis is een verzameling elektroden in een vacuümbehuizing. Op de eerste elektrode (kathode) vindt de omzetting van fotonen naar (foto-)elektronen plaats (foto-emissie). Met een elektronisch circuit wordt iedere volgende elektrode van een hogere potentiaal voorzien dan zijn voorganger. Door dat elektrische veld worden vrijgemaakte elektronen naar de volgende elektrode versneld. Daar aangekomen hebben ze dan een bepaalde kinetische energie die weer elektronen vrij kan maken (secundaire emissie).

Als de kinetische energie voldoende groot is, kan meer dan één elektron vrijkomen,

waardoor multiplicatie van ladingdragers optreedt. Zo kan een fotomultiplicatorbuis als respons op één foton uiteindelijk 10^6 tot 10^8 elektronen leveren. Die vormen een stroompulsje waarvan de tijdsduur (enkele ns) wordt bepaald door looptijdverschillen van de elektronen. Het tellen van die stroompulsjes geeft een maat voor de lichtintensiteit (photon counting). Het tijdstip van het stroompulsje is, afgezien van de looptijd in de buis, een maat voor het moment van verschijnen van het foton. Deze techniek van lichtmeting werkt alleen bij lage intensiteiten, omdat de pulsjes van verschillende fotonen voldoende in de tijd gescheiden moeten zijn om ze elektronisch te kunnen verwerken.

15



15. Fluorescentie-anisotropie-erval van lumazine-eiwit, alleen ($\phi = 20$ ns) of geassocieerd met het enzym luciferase ($\phi = 60$ ns). De middelste curve is voor een evenwichtsmengsel van beide eiwitten. Computeranalyse van de laatste curve toont aan dat 52% van vrij lumazine-eiwit en 48% van het complex aanwezig zijn.

Bronvermelding illustraties

Bruce Coleman Ltd, Uxbridge, Engeland: no. 10.
University of California, San Diego, VS: pag. 298-299.
IBM Research Centre, Winchester, Engeland: no. 9.
Prof dr JS Ploem, RU Leiden: no. 8
De overige illustraties zijn afkomstig van de auteur.