

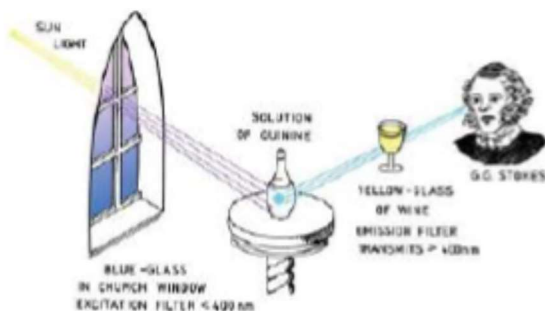
4. gaia: Igorpen espektroskopia, Fluoreszentzia.

Fluoreszentziaren oinarriak

Lehen fluoroforoa: Kinina

Lehen fluoroforoa Herschelek aurkitu zuen eta kinina zen (tonikan agertzen den molekuletako bat da, eta hori dela eta tonikak argi ultramorepean argia irradiatzen du). Aztertu zuen nola kininak propietate optiko berezi batzuk dituen.

Hala ere, kininaren lehen deskribapen zientifikoa Stokes-ek egin zuen 1852an. *“On the Change of Refrangibility of Light”* lanean “erreflexio dispersiboari” buruz hitz egin zuen kinina sulfatoan gertatzen zen fenomenoak deskribatzeko. Ondorengo esperimendua burutu zuen: argi iturri modura eguzki energia baino ezin zuen erabili eta hortaz, erradiazio jakin bat aukeratzeko “filtroak” erabili zituen. Lehendabizi argia eliza bateko leiho urdin batetik pasazten zuen, honek 400nm baino gehiagoko uhin luzerak xurgatuko zituelarik. Beraz, ondoren aurkitzen zen kinina molekuladun botilara soilik 400 nm-tatik beherako argia iritsiko litzateke. Ondoren, botilatik irteten zen argia ardo kopa hori batetik pasazten zen. Honek bigarren filtro modura jokatuko zuen, kasu honetan 400nm-tatik gorako argia baino ez duelarik utziko pasatzen. Hortaz printzipioz ez litzateke inongo erradiaziorik igaro beharko, izan ere leihoak 400 nm baino handiagoa xurgatuko du, eta kopak uhin luzera horretatik beherakoa. Hala ere, aztertu zen kininatik pasatzen zen argia ikusi egin zitekeela. Fenomeno honi deitu zitzaion **erreflexio dispersiboa** eta proposatu zuen kininari iristen zen uhin luzera baina handiagoan emititzen zuela molekula honek. Hau da, desplazamendu bat egongo zela xurgatu eta emititzen zen argi luzeraren artean.



Fluoreszentziaren λ argi intzidentearena baino handiagoa zela proposatu zuen: Stokes Desplazamendua.

Ondoren, *Adolph Von Baeyer*rek 1871an **fluoreszeina** (fluo eta erresonsantziatik) molekula sintetizatu zuen. *R.Meyer*rek 1897an “fluoroforo” hitza erabili zuen fluoreszentziari asoziatutako talde kimikoak deskribatzeko. *O.N. Witt*-ek erabilitako “kromoforo” hitzaren analogoa da.

Fluoreszentziaren gorakada *Weber*rekin etorri zen (1952), proteinetara batzeko dansilo kloruroa sintetizatu zuen eta argi polarizatua erabili zuen hauen azterketa hidrodinamikoa

burutzeko. **Sistema biologikoen azterketarako fluoreszentziaren arlo kuantitatiboa hasten da** (proteinetara batzen diren molekulek haien dinamikari buruzko informazioa ematen zuten).

Shimomura, Johnson eta Saigak 1962an GFPa (Green Fluorescence Protein) topatu zuten *Aequorea victoria* marmokan. Handik abiatuz kolore ezberdinetako proteinak lortu izan dira ondoren.

Bi aurkikuntza hauek izugarritzko gorakada ekarri zioten fluoreszentzia bidezko ikerketari.

Zergatik interesatzen zaigu fluoreszentzia?

Aplikazioak

1. Biokimika
2. Biofisika
3. Biokimika klinikoa eta diagnosia
4. Biologia zelularra
5. Biologia molekularra

Garapena

- Zunda fluoreszenteak
- Laser berriak
- Mikroskopia eta fluoreszentzia
- Mutagenesia, DNA birkonbinatua

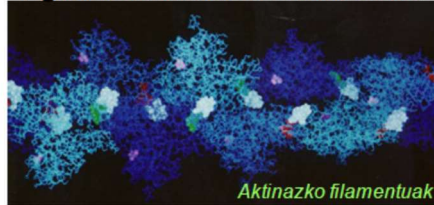
Fluoreszentzia biokimikan

Fluoreszentziaren bidez alderdi desberdin asko azter daitezke, eta hori dela eta azken 10 urteetan gorakada nabarmena aztertu da teknikan. Besteak beste ondorengo gauzetarako erabil daitezke: makromolekulen egitura-aldaketen azterketa egiteko, mugimendu molekularra aztertzeke, disolbatzaileak eragindako aldaketen azterketarako, pHaren neurketak egiteko, Ca^{2+} fluxuen neurketak egiteko, makromolekulen arteko elkarrekintzak aztertzeke, zelularen organulu zein aktibitatearen azterketa egiteko, DNAREN sekuentziaziorako...

Hainbeste erabiltzearen arrazoia: teknika sentikorra da eta merkea izan daiteke. Gainera, ez da arriskutsua (erradioaktibitatea ordezkatu duela esan daiteke) eta izaki bizidunetan erabili daiteke *in vivo*. Gainera, gaur egun erresoluzioa hobetuz doa.

Adibideak: sistema motak

Egitura molekularra eta dinamika



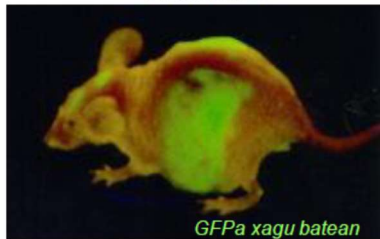
Aktinazko filamentuak

Antolamendu zelularra eta funtzioak



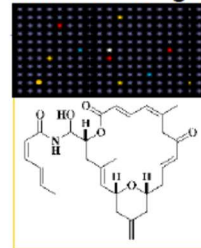
Aktinazko filamentuak
zelula endotelialetan

Animaliak



GFPa xagu batean

Eraldatutako gainazalak



High throughput
Drug discovery

Proteina baten adierazpena aztertu edo prozesu bat jarraitzeko erabil daiteke animalietan.

Farmakoen garapenerako edo mRNAren azterketa egiteko erabil daitezke adibidez.

Luminiszentzia

Sistema bat kitzikatu eta gero oinarritzko egoerara pasatzeko erlaxazio prozesua hainbat modutan eman daiteke. Baldin eta argiaren igorpena ematen bada erlaxazioan luminiszentzia emango da.

Luminiszentzia desberdinak kitzikapenaren eragile den fenomenoaren arabera bereizten dira:

- **Kimioluminiszentzia:** erreakzio kimikoa
- **Sonoluminiszentzia:** soinu-uhina
- **Termoluminiszentzia:** beroa
- **Triboluminiszentzia:** energia mekanikoa
- **Radioluminiszentzia:** erradiazio ioinizagarriak
- **Elektroluminiszentzia:** energia elektrikoa
- **Fotoluminiszentzia:** argia
 - o **Fosforeszentzia** eta **fluoreszentzia** bereiziko dira.

Zer gertatzen da molekulatan fotoi bat xurgatzen duenean?

Molekula batek fotoi bat xurgatzen duenean, trantsizio elektroniko bat emango da. Oinarritzko egoera kitzikatua baina egonkorragoa da, eta hori dela eta molekulak egoera kitzikatutik erlaxatzeko joera izango du. Erlaxatzeko moduak anitzak izan daitezke, haien sailkapena:

- 1) Igorlea → fotoluminiszentzia
 - a. Fosforeszentzia
 - b. Fluoreszentzia
- 2) Ez igorlea → behin sistema kitzikatu denean fotoirik igorri gabe bueltatzea (kasu orokorra)

Erlaxazioa normalean emango da lehen maila elektronikotik oinarritzko maila elektronikora bueltatzen denean, uhin luzera handiagoko erradiazioaren bidez.

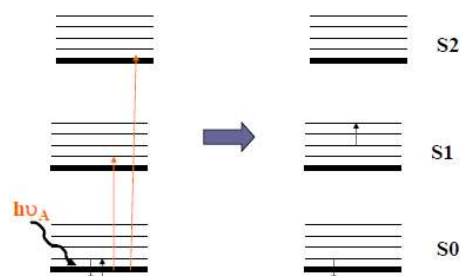
Zer da fluoreszentzia?

FLUORESZENTZIA: energia xurgatu ondoren, atomo edo molekula batek igorritako argia da.

Erlaxazioa → lehen maila elektronikotik oinarritzko maila elektronikora ematen den trantsizioa da.

Fluoroforo bati fotoi bat iristen zaionean, hau xurgatu eta egoera kitzikatura pasako da. Erlaxatzeko, hau da, oinarritzko egoerara bueltatzeko, fluoroforoek fotoi bat igorriko dute. Jasotzen den erradiazioaren eta emitituko denaren uhin luzerak ezberdinak izango dira (emititzen denaren uhin luzera handiago izango da), energia aldaketa bat ematen delako molekularen barnean.

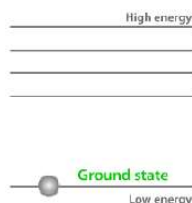
TRANTSIZIO ELEKTRONIKOAK



Fluorophore in Ground State

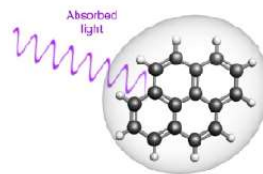


Fluorophore

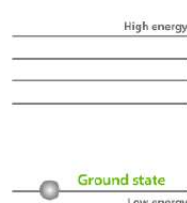


Energy levels

Absorption of Light Energy



Fluorophore

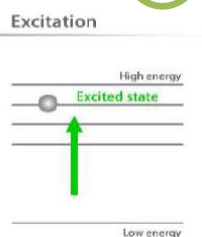


Energy levels

Excited Fluorophore



Fluorophore

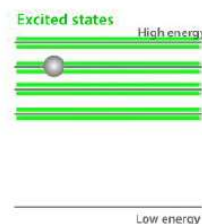


Energy levels

Energy Loss



Fluorophore

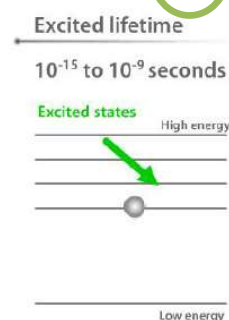


Energy levels

Energy Loss

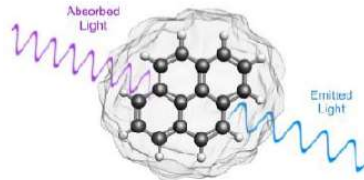


Fluorophore

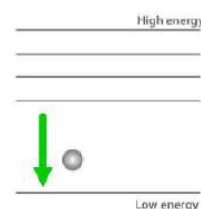


Energy levels

Fluorescence Emission



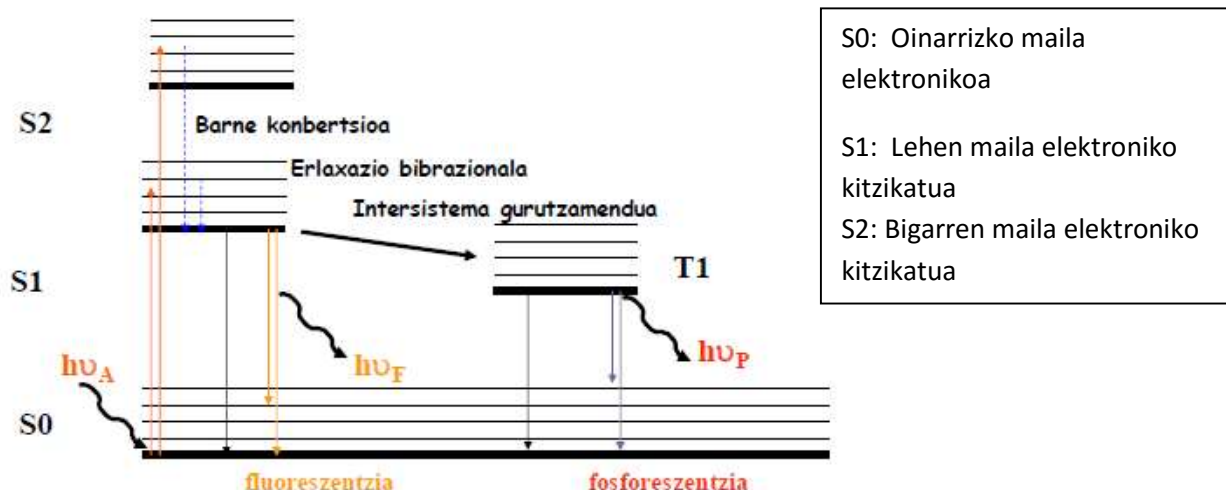
Fluorophore



Energy levels

Jablonski-ren Diagrama (1898-1980)

Igorpen prozesuetan trantsizioak maila bibrazional eta elektronikoen artean bakarrik emango dira. Sistema erradiatuz gero, erradiatutako argiaren energiaren arabera trantsizioa egongo da. Beti oinarritzko egoerara bueltatzeko joera izango du sistemak, baina hau modu ezberdinetan eman daiteke:



1. ERLAXAZIO BIBRAZIONALA, BARNE KONBERTSIOA:

Sistema S2tik S1era alda daiteke barne konbertsioaren bidez. Izan ere, maila elektroniko hauen maila bibrazional batzuk kointziditu egiten dute (S2 mailako maila bibrazional txikiak S1 mailako maila bibrazional handienekin). Elektroiak maila bibrazionala behera egiten dute, beroa disipatzen joango da, eta maila elektroniko batetik bestera pasako dira energia saltorik egin beharrik gabe. Hori dela eta, sistema bat kitzikatzeko erabiltzen den fotoiak energia gehiago izango du emitituko denak baino, izan ere, pixkanaka barne trantsizioen bidez, maila bibrazionala behera eginez, energia galduz joango da.

2. INTERSISTEMA GURUTZAMENDUA:

S bidez adierazten diren maila elektronikoak singleteak dira (spinak kontrako norbaideetan), eta T bidez adierazitakoak tripleteak (spinen norabidea ezberdina). Normalean, singleteen arteko maila elektronikoen aldaketa ematen bada ere, zenbaitetan, spinaren aldaketa eman, eta singlete egoetatik triplete egoerara pasa daiteke molekula. Honen probabilitatea hala ere oso baxua izango da, trantsizio debekatuak deritze. Tripletetik egoera basalera bueltatzeko sistemak fotoi bat igorri dezake. Prozesu honi **fosforeszentzia** deituko zaio, izan ere sistemen arteko truke bat dago.

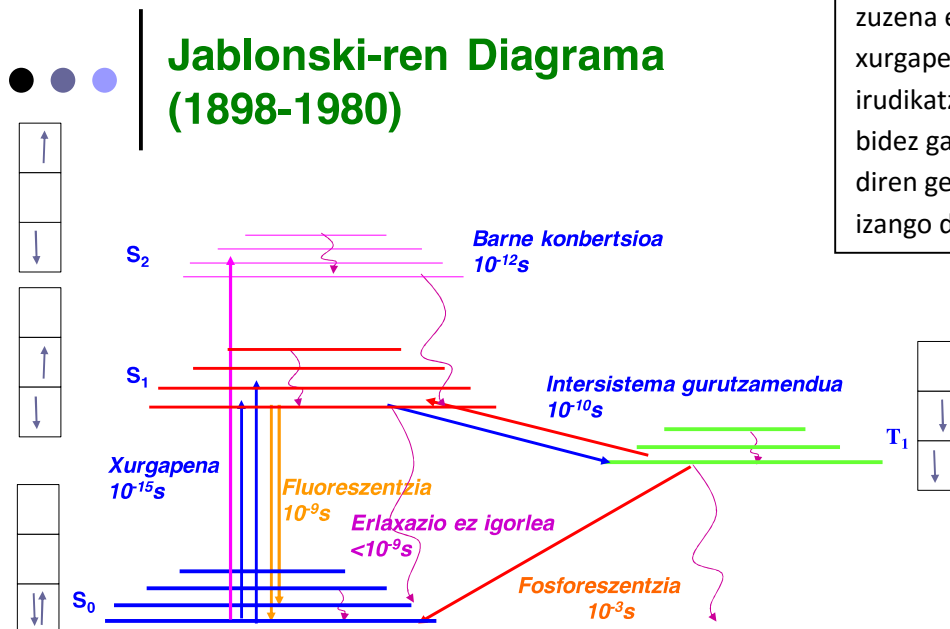
3. FLUORESZENTZIA:

Lehen maila elektroniko kitzikatutik oinarritzko egoerara bueltatzeko fotoi bat igorriko du sistemak.

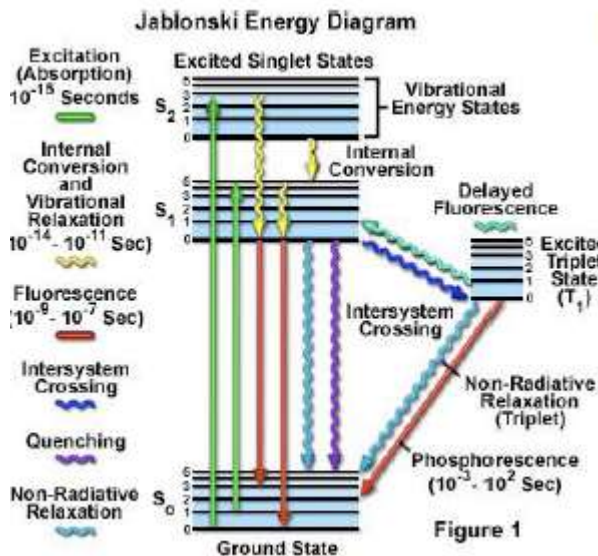
4. QUENCHING, ERLAXAZIO EZ IGORLEA

Igorpen prozesurik gabe oinarrizko egoerara bueltatuko da kitzikatutako elektroia.

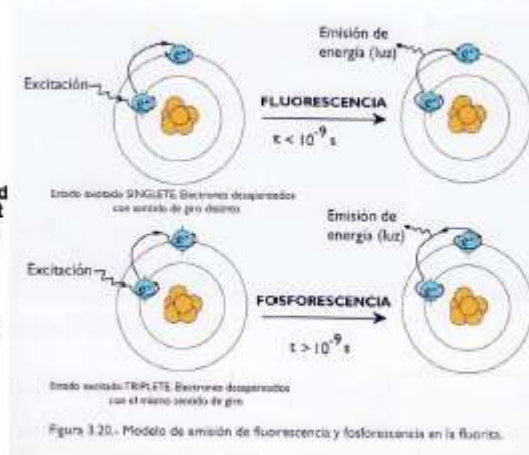
Sistemek aukera asko dituztenez egoera basalera bueltatzeko, azkarrena dena erabiliko dute. Xurgapena da azkarren ematen den prozesua. Bibrazio bidezko erlaxazioa eta intersistemen arteko gurutzamendua prozesu nahiko azkarrak dira, fosforeszentzia edo fluoreszentzia prozesuekin alderatuz. Barne trantsizioa prozesu azkarrena denez, lehen maila kitzikaturaino horrela iritsi ohi dira elektroiak. Hala ere, lehen mailatik oinarrizkora dagoen distantzia handiagoa da, eta hortaz, fluoreszentzia bidez emango da salto hau (barne trantsizio asko eman beharko lirateke, eta beraz denbora gehiago beharko litzateke). Fosforeszentzia denbora aztertuz gero, ikus daiteke prozesu inprobableena dela.



Jablonskiren diagraman gezi zuzena erabiltzen da fotoiaren xurgapen edo igorpena irudikatzeko. Energia bibrazio bidez galduz gero erabiltzen diren geziak kurbadunak izango dira.



Fluoreszentzia vs Fosforeszentzia



Zergaitik erabiltzen da fluoreszentzia?

Ingurune molekularri buruzko informazioa ematen du. Izan ere, inguruaren arabera prozesu hauek asko alda daitezke, eta gu aldaketa horiek detektatzeko gai izango gara. Zunda fluoreszenteetan eragina duten faktoreak besteak beste:

- Ioiak
- Eremu elektrikoa
- Biskositatea
- Tenperatura
- pH
- Polaritatea

Molekula batek kitzikatutako egoeran pasatzen duen denborak ere informazioa emango digu aztertzen ari garen sistemari buruz. Nanosegunduko eskala batean, prozesu dinamikoei buruzko informazioa ematen digu. Esan genezake beraz zunda fluoreszenteak kronometro molekularrak direla. Proteina guztiaren mugimeduak edo proteinen domeinuen mugimenduak ere azter daitezke.

Prozesuen denbora eskala

- o **XURGAPENA:** $\sim 10^{-15}$ seg
- o **BARNE KONBERTSIOA:** $\sim 10^{-11} - 10^{-9}$ seg
- o **ERLAXAZIO BIBRAZIONALA:** $\sim 10^{-12} - 10^{-10}$ seg
- o **FLUORESZENTZIA:** $\sim 10^{-10} - 10^{-7}$ seg
- o **FOSFORESZENTZIA:** $\sim 10^{-6} - 1$ seg
(simetriagaitik "debekatutako" trantsizio bat da)

Fluoreszentzia oso teknika sentikorra da, kontzentrazio subnanomolarrekin lan egiteko gaitasuna ematen digu, eta molekula BAKAR baten azterketa ahalbidetzen du.

Abantailak:

- ❖ Sentikortasun bikaina du – Molekula bakarra azter dezakegu –
- ❖ Segurua da
- ❖ Biomolekula eta zelulekin bateragarria: prozesu biologikoetan ez du oztoporik jartzen
- ❖ Egitura (nm) eta dinamikari (ns-min) buruzko informazioa ematen digu
- ❖ Irudikapen metodoekin bateragarria da
- ❖ Kodetzeko eta oligomerizatzeko gaitasuna aztertze balio du
- ❖ Eskala handiko baheketa sistemak ahalbidetzen ditu

Fluoroforoak

Berezkoak (naturalak) edo **sintetikoak** izan daitezke.

Hala ere, normalean berezkoek errendimendu kuantiko txikiagoa izaten dute. Egitura kimikoari dagokionez, normalean eraztun aromatikoren bat izaten dute (honek elektroien kitzikapena errazten du).

Trantsizio elektronikoak

$\pi \rightarrow \pi^*$ efizientzia kuantiko handiagoa, \uparrow fluoreszentzia
 $n \rightarrow \pi^*$ barne konbertsioa faboratzen du, \downarrow fluoreszentzia

\uparrow Loturaren konjugazioa \leftrightarrow \uparrow fluoreszentzia

Adibideak : *Berezkoak* \rightarrow NADPH, triptofanoa, klorofila, flabinak...

Zenbat eta xurgapena handiagoa izan, orduan eta handiagoa izango da fluoreszentzia ere.

Errendimendu kuantikoa

Kitzikatu diren elektroiek artean zenbat fluoreszentzia bidez erlaxatzen diren adierazten du. Hortaz, zenbat eta elektroik gehiago erlaxatu igorpen bidez, errendimendu kuantikoa handiagoa izango da. Hori dela eta, errendimendu kuantiko handia duten fluoroforoekin lan egitea komenigarria da.

Errendimendu kuantikoa (Φ)

Adierazteko beste modu bat:

$$\Phi = \frac{\text{igorritako fotoi kopurua}}{\text{xurgatutako fotoi kopurua}}$$

Vavilov araua: Φ ez da λ -ren menpekoa

$$I_f = I_{\text{abs}} \cdot \Phi$$

$$\Phi = \frac{k_F}{k_F + k_{NR}}$$

k_F fluoreszentziaren igorpen abiadura ktea

k_{NR} igorpen gabeko erlaxazio abiadura ktea

Vavilov araua: errendimendu kuantikoa ez da izango kitzikatzeko erabili den uhin luzeraren araberakoa.

Bizi denbora: τ

Oinarrizko egoerara itzuli arte, egoera kitzikatuan fluoroforo batek pasatzen duen batazbesteko denbora. Zenbat eta azkarrago erlaxatu orduan eta bizi denbora txikiagoa izango du.

$$\tau = 1 / (k_F + k_{NR})$$

Bizi- denbora naturala:

Erlaxazioa fluoreszentzia bidez soilik ematen bada erabiltzen da.

$$\tau_N = 1 / k_F$$

τ eta Φ -tik:

$$\tau_N = \tau / \Phi$$

- Zenbat eta handiagoa izan bizi denbora naturala, orduan eta txikiagoa izango da errendimendu kuantikoa. \rightarrow Zenbat eta denbora gehiago pasa fluoroforo batek egoera kitzikatuan, orduan eta probabilitate txikiagoa igorpen moduan erlaxatzeko.

$$\tau_N = \tau / \Phi$$

- **Fosforeszentzian** ez da arraroa $\Phi \approx 10^{-6}$

$T_1 \rightarrow S_0$ debekatuta dagoen spin aldaketa bat dakar ($\Delta S \neq 0$).

τ_{T_1} altua \rightarrow desakatibazio ez igorlea gertatzen da.

- Fosforeszentzian errendimendu kuantikoa oso txikia da, izan ere, trantsizio horietan ($T \rightarrow S$) denbora nahiko egoten da (debekatua delako), eta hori dela eta errendimendua jaitsi egiten da.

FLUORESZENTZIA

1. **Igorpen espektroa**
2. **Xurgapen espektroa**
3. **Iraungitzea (quenching)**, fluoroforoaren eskuragarritasuna \rightarrow quenching: elektroia oinarrizko egoerara bueltatzeko beste molekula batzuk erabiliko ditu, eta hortaz honek fluoroforoaren eskuragarritasunari buruzko informazioa emango digu, elektroiak kanpoko molekulari emateko harekin kontaktuan egon behar baita fluoroforoa ezinbestean.
4. **RET** (resonance energy transfer), fluoroforoaren eskuragarritasuna \rightarrow sistemaz kanpoko molekula batekin ematen da ere, elektroik kitzikatuak energia beste molekula edo sistema batera pasako du \rightarrow molekulen arteko distantziaren inguruko informazioa

ematen du, izan ere, transferentzia hau emateko distantzia jakin bat (minimo txiki bat) egon behar da bi molekulen artean.

5. **Igorpenaren polarizazioa (anisotropia)**, difusio errotazionala: argia igortzen den bitartean, elektroiak mugimendua dauka. Ondorioz, fluoroforoak norabide edo polaritate desberdinean igortzen du argia. Emititzen ari denargiaren mugimendu errotazionala, polaritatea edo norabidea azter daiteke → proteinen arteko elkarrekintzak, dimerizazioak... azter daitezke horrela.

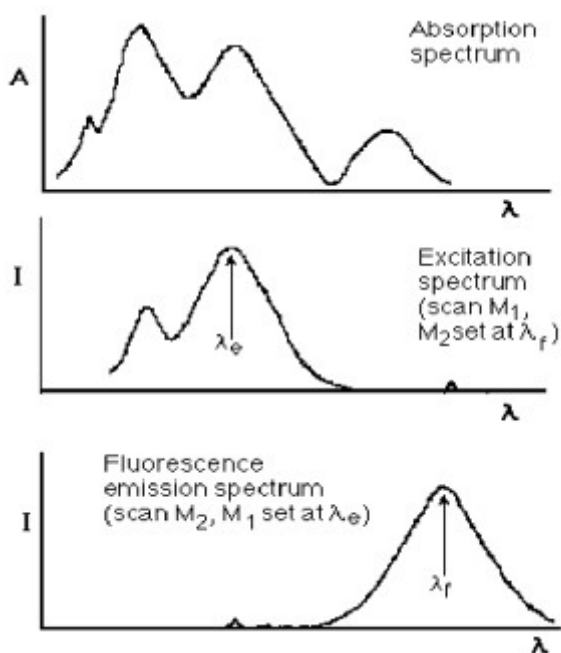
Neurketa asko egin daitezke:

- Proteina baten aldaketa konformazionala
- Elkarrekintzak (proteina-proteina, proteina-DNA, ligando-proteina...)
- Mintzen zurruntasunaren determinazioa: gogortasunaren arabera mugimendu gehiago edo gutxiago erakutsiko du fluoroforoak
- Difusio errotazionalaren konstanteen neurketak
- Mintz batetan emandako difusioaren neurketa

Neurketa guztiak aparatu berarekin egin daitezke, fluoroforo egokia aukeratuz. Bi modu daude neurketak egiteko:

- **Egoera geldikorra** → erradiazio jarraia. Lagina erradiatu egiten da etengabe eta etengabe neurtzen da fluoroforoak erradiatzen duen argia.
- **Denboran ebatzitako fluoreszentzia** → lagina erradiatu egiten da pultsu baten bidez (argi pultsu motza). Pultsua kendu eta fluoroforoaren igorpena nola aldatzen doan aztertuko da. Denborarekin igorpen intentsitatea galtzen joango da. Informazioa emango digu kitzikatutako elektroien erlaxazioari buruz.

Lortu nahi dugun informazioaren arabera metodo bat edo bestea erabiliko da.



Xurgapen espektroa → X ardatzean uhin luzerak vs. Y ardatzean xurgapenaren balorea

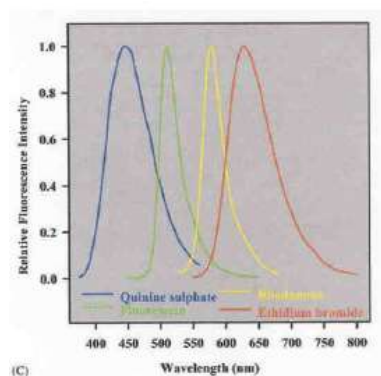
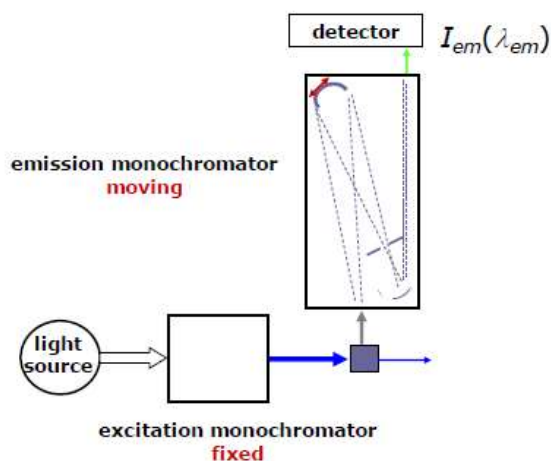
Kitzikapen espektroa → X ardatzean adierazten da nola kitzikatzen den (zein uhin luzera) vs. Y-n intentsitatea. Emisio edo igorpen uhin luzera bat finkatzen da eta aldatzen joango gara fluoroforoa kitzikatzeko erabiliko den uhin luzera.

Igorpen espektroa → Igorpen uhin luzera vs. Intentsitatea. Emisioan kitzikatu egiten da uhin luzera zehatz batean eta neurtzen dira laginetik erradiatzen diren erradiazioen uhin luzera ezberdinak.

Igorpen espektroak

Lagin bat izango dugu. Hasteko, argi iturria monokromadore batetik pasarazten da, horrela uhin luzera zehatz bat aukeratuko dugularik: eszitazio edo kitzikapen uhin luzera izango da (BAKARRA). Lagina uhin luzera horrekin baino ez da kitzikatuko, baina bere igorpenaren neurketa uhin luzera guztietan egingo da. Neurketa hau 90ºtako angeluarekin egingo da, horrela ziurtatuko dugu neurtzen ari garen erradiazioa laginak emititutakoa baino ez dela, hau da, ez dela guk geuk lagina kitzikatzeko erabilitako argia izango. Laginetik datorren erradiazioaren uhin luzera guztiak neurtzeko detektorearen aurretik monokromadore bat egongo da, argia banatu, eta uhin luzera bakoitzari dagokion argiaren intentsitatea determinatzeko.

Fluoroforo bakoitzak berezkoa den igorpen espektroa izango du. Emisio uhin luzera maximoa ezberdina izango du fluoroforo bakoitzak, eta igorpenaren zabalera ere ezberdina izan daiteke.



Igorpen espektroaren ezaugarriak:

- 1) *Kasha-ren araua* : disoluzioan, substantzia puru batek erabilitako kitzikapen uhin luzerarekiko independentea den igorpen espektro aldaezin bat aurkezten du.
- 2) Igorpen espektroa, xurgapen espektroak baino uhin luzera handiagoetara ematen da. Stokes-en desplazamendua.
- 3) Fluoreszentziatzko igorpen espektrua, xurgapen espektruko maiztasun txikieneko ($S_1 \rightarrow S_0$) bandaren irudi espekularra da.

- 1) ***Kasha-ren araua*** : disoluzioan, substantzia puru batek erabilitako kitzikapen uhin luzerarekiko independentea den igorpen espektro aldaezin bat aurkezten du.

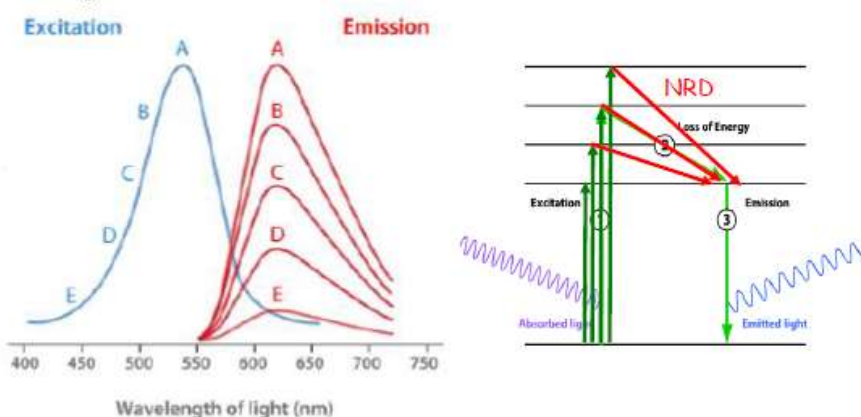
Arrazoa: kitzikatzeko erabilitako uhin luzera gorabehera, lortuko ditugun igorpen espektro guztien itxura berdina izango da (intentsitatea ez). Intentsitatea handiagoa den heinean orduan eta elektroien kitzikapena probableagoa izango da. Sistema maximora kitzikatzeko

beraz, emisio espektroan intentsitate maximoa ematen duen kitzikapen espektroko uhin luzera erabili beharko genuke.

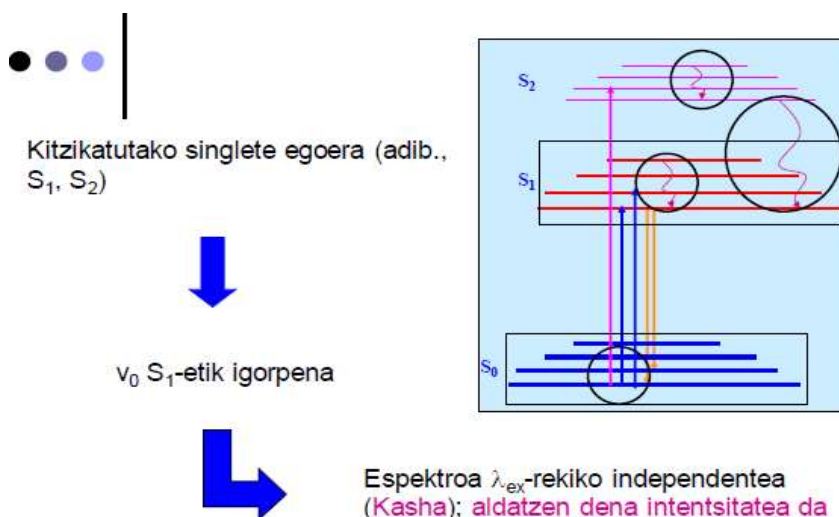
Argia erabilia partikulak kitzikatu ostean erlaxatzeko moduen artean lehia bat egongo da. Bigarren maila kitzikatutako barne konbertsioak azkarragoak dira emisio fenomenoak baino, eta beraz, kitzikatutako elektroiei guztiak lehenengo maila kitzikatutako oinarritzko maila bibrazionalera iritsiko dira barne trantsizio horien bidez → elektroiei guztiak bertara (lehen mailako maila bibrazional basalera) iritsiko dira elektroiei kitzikatzeko erabilitako uhin luzera ezberdina den arren.

Lehen maila kitzikatutik oinarritzko mailara hobe izango da igorpena. Intentsitatearen ezberdintasuna uhin luzera ezberdinekin kitzikatutako dituzten partikulen kopuruaren arabera izango da, izan ere trantsizio batzuk probableagoak izango dira beste batzuk baino.

Irudian kitzikapenerako uhin luzera desberdinak aplikatu ziren. Kitzikapen maximoa A-rekin lortu zen, elektroiei kopuru handiagoa kitzikatu zen eta horregatik hortik lortzen da igorpen intentsitate maximoa. Baina igorpenaren uhin luzera berdina mantentzen da egoera guztietan, espektroak bere itzura mantentzen du.

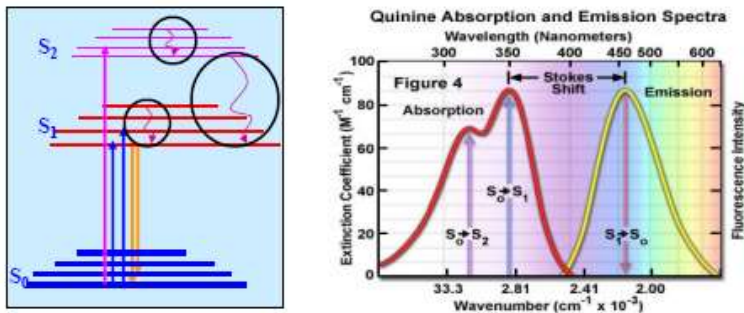


2) Igorpen espektroa, xurgapen espektroak baino uhin luzera handiagoetara ematen da. Stokes-en desplazamendua.



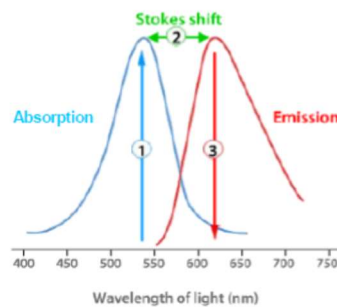
Arrazoa: maila bibrazionalen artean energia galera edo barne konbertsioa ematen delako. Energiaren parte bat disolbatzailearekin bibrazioetan galdu egiten da eta hortaz energia maila baxuagoa izango du emitituko den fotoiak. Maximoen arteko desplazamenduari deritzo Stokesen desplazamendua. Uhin luzera tarte hori konbertsio (bibrazio) bidez galdutako energia kopuruari dagokio.

Stokes-en desplazamendua.



Horren eraginez, emisio espektroa beti eskuinerantz desplazatua irudietan.

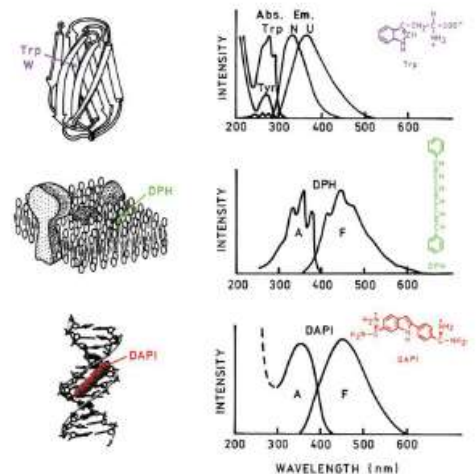
I



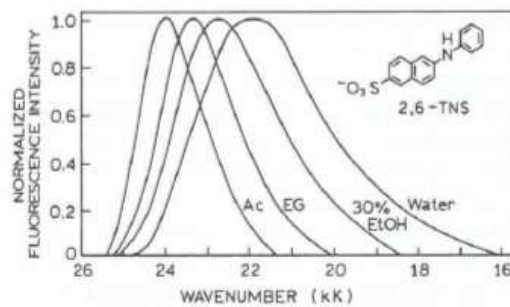
Zenbat eta desplazamendu handiagoa, orduan eta beroa bidezko xahutze handiagoa.

Disolbatzailearen efektua:

Kitzikatutako sistemek disolbatzailearekin elkarrekintzak badituzte, azken honek egoera kitzikatuaren egonkortze bat ekar dezake, hau da, energia maila baxuagoetara pasako da sistema. Hortaz, igorpen trantsizioan, erlaxatzeko orduan, trantsizio tarte hori txikitua ikusten da eta uhin luzera handitu. Ingurumenaren polaritatea handitzen bada, gorriruntz ikusiko da desplazamendu batokromikoa. Disolbatzailearekin jokatzuz beraz Stokesen desplazamenduarekin joka dezakegu.

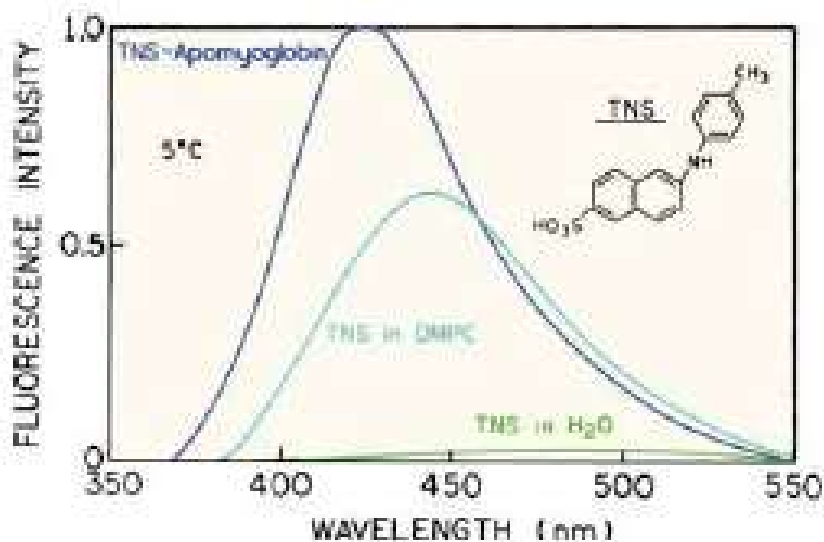


Zenbat eta handiagoa izan fluoroforoaren momentu dipolarra, orduan eta handiagoa izango da efektu hau.



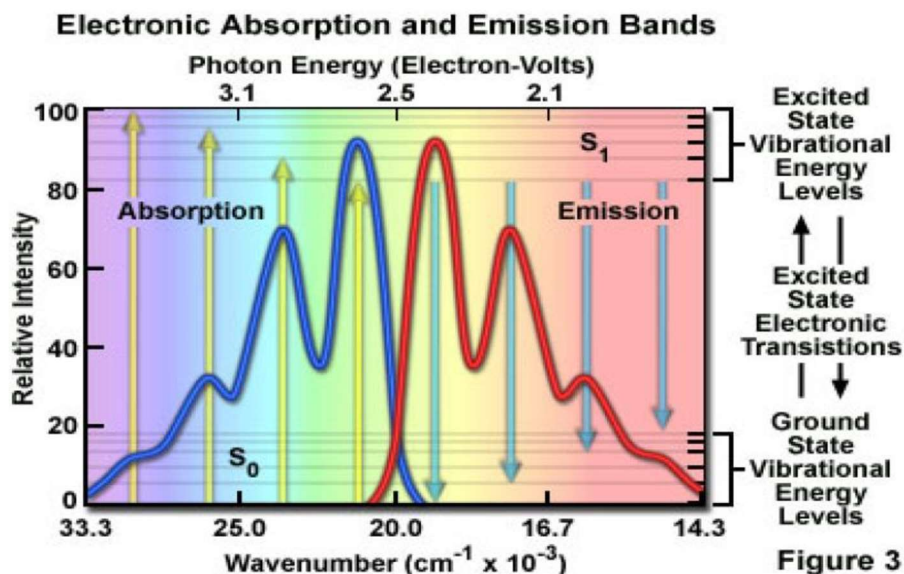
Azetonitrilo / etilenglikola / 30% EtOH / H₂O

Inguruneak efektua izango du fluoreszentzian, izan ere, badaude zenbait substantzia zeintzuek ingurune batzuetan fluoreszentzia izango duten eta beste batzuetan ez. ANSak adibidez soilik ingurune apolarretan igorriko du fluoreszentzia (uretan (berde) ez). Nahasteari Albumina gehituz gero, hau ANS-ren gune hidrofobikoetara lotuko da eta fluoreszentzia ikusiko da



TNSarekin antzeko zer edo zer pasatzen da, zenbat eta ingurune apolarragoa orduan eta emisio espekto nabariagoa ikusten da.

3) *Fluoreszentziazko igorpen espektrua, xurgapen espektruko maiztasun txikieneko ($S_1 \rightarrow S_0$) bandaren irudi espekularra da.*



Irudi honetan urdinez xurgapen espektrua (ez kitzikapeneko); gorritz igorpen espektrua, fletxa horiz xurgapenak eragindako trantsizioak eta fletxa urdinez igorpeneko trantsizioak daude adierazita. Marra beltzek S_0 eta S_1 maila elektronikoen barne maila bibrazionalei egoten diete erreferentzia. S_0 eta S_1 mailen barneko maila bibrazionalak berin daude banatuta, barne antolaketa bera dute.

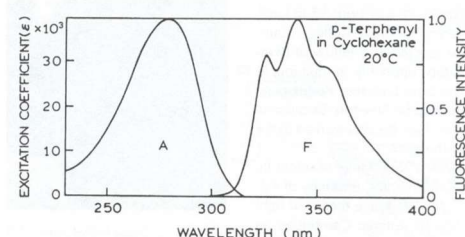
Ikus daitekeenez, trantsizio bakoitzak berezko uhin luzera du. Trantsizioak zenbat eta intentsitate gehio izan, uhin luzera baxuagoa izango du, energia gehio. Intentsitatea trantsizioa gertatzeko probabilitatearekin dago lotuta. Zenbat eta probableago izan trantsizio bat, partikula gehiok jarraituko dute bide hori, hortaz, intentsitate gehio lortuko da.

$S_{0.0} \rightarrow S_{1.4}$ trantsizioa (lehen piko) gertatzeko probabilitatea eta $S_{1.0} \rightarrow S_{0.4}$ (azken piko) trantsizioa gertatzeko probabilitatea berdinak dira. Honen ondorioz, intentsitate bera erakusten dute bi piko hauek eta berdina gertatzen da gainerakoekin. Desplazamendua simetrikoa izango da bi norabideetan. Honek, ispilu irudia edo irudi espekularra lortzea eragiten du. Trantsizioen probabilitatea bada ere, kasu bakoitzean energia desberdintasuna desberdina izango da (azken piko urdin eta lehen piko gorria kenduta). Horregatik, pikoak ispilu irudiak dira baina geziak ez.

Baina Simetria Espekularra ez da beti betetzen. Hainbat faktoreek eragina izan dezakete:

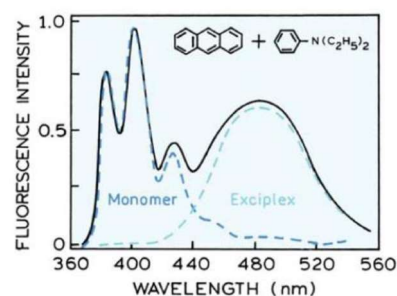
➤ **Geometrian Aldaketak**

Gerta daiteke egoera kitzikatuaren fluoroformaren egitura geometrikoa aldatzea, nukleoaren S_0 eta S_1 berordenatzea eta jatorrizko egoeran ez zeuden maila bibrazionalak agertzea. Horren ondorioz, igorpen espektruak xurgapen espektruak baino egitura bibrazional gehio izango ditu.



➤ **Egoera Kitzikatuaren Aldaketak**

Egitura kitzikatua sortu bezain laster erreakzio bat ematen da. Erreakzioak sistemaren energia aldatzen du eta honek igorpen espektruan eragina dauka. Erreakzio bitartean **Exiplex** izeneko konplexua sortzen da, soilik egoera kitzikatutik abiatuta eta uhin luzera desberdin batera igortzen du. Esperimentu batean, exiplex-eri dagokion igorpena bilatu daiteke erreakzioa ze momentutan gertatu den jakiteko. Fenomeno hau hidrokarburu aromatiko polinuklear eta aminetan gertatzen da.

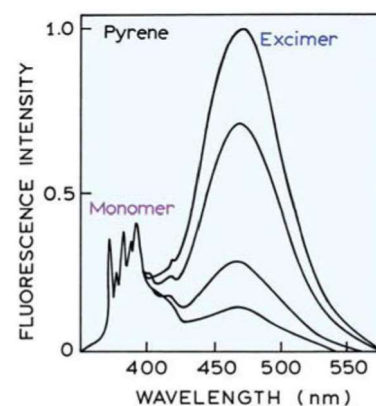


Adibidean, egoera kitzikatuaren antrazeno eta dietilanilinaren karga transferentziazko konplexua (exciplex) ikusten da.

➤ **Konplexuen Eraketa Egoera Kitzikatuaren**

Aurrekoaren antzekoa da baina karga transferentzia eman beharrean, dimero edo polimeroak eratzen dira fluoroforoa kitzikatuta dagoenean. Oligomero hauei excimero (excited state dimer) deritze eta intentsitate altuagoa erakusten dute. Gainera, desplazamendu bat dago uhin luzera altuetara. Hala ere, kitzikatuta egoteaz gain, fluoroforoak kontzentrazio altuan egon behar dira hau gertatzeko.

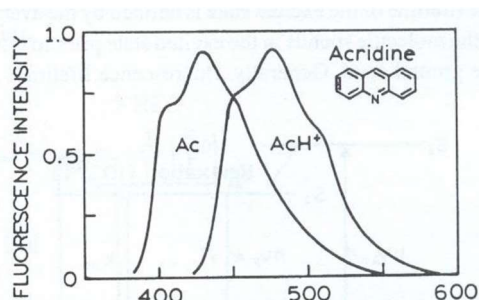
Adibidez, Pirenoa EtOhtan kitizkatuz gero, kontzentrazio baxuetan badago, irudi espekularra lortuko da. Kontzentrazioa igoz gero eta kitizkatuz, oligomeroak eratu eta xurgapen espektrua aldatuko da. Monomeroak agertzen direnean, beraz, kontzentrazioa baxua dela edo molekulen artean distantzia gehiegi dagoela esan nahi du.



➤ **Egoera Kitzikatuaren Protonazio Egoeraren Aldaketak**

Protonatuta egon ala ez eragina dauka espektruan. Baina Protonazio/Desprotonazio joera ez da beti berdina egoera kitzikatuaren eta jatorrizko egoeraren. Honen ondorioz, pH berdinaren aurrean desberdin jokatuko dute molekula erlaxatuak eta kitzikatuak.

Esaterako, akridinaren pKa aldatu egiten da egoera kitzikatuaren, igoz. Honen ondorioz, pH7-an akridina (S0 pKa=5,45) desprotonatuta egongo da baina kitizkatuz (S1 pKa=10,7) gero, pH aldatu gabe, H hartzeko joera izango du eta igorpen espektrua aldatuko zaio.



Tyr en kasuan kontrako adibidea da, kitzikatuta pKa jaisten zaio baina azken ondorioa berdina da: ez da irudi espekularrik lortzen emisio espektru desberdina lortzen delako.

Molekula baten fluoreszentzia aldatu dezakegu hurrengo faktoreak kontrolatuz:

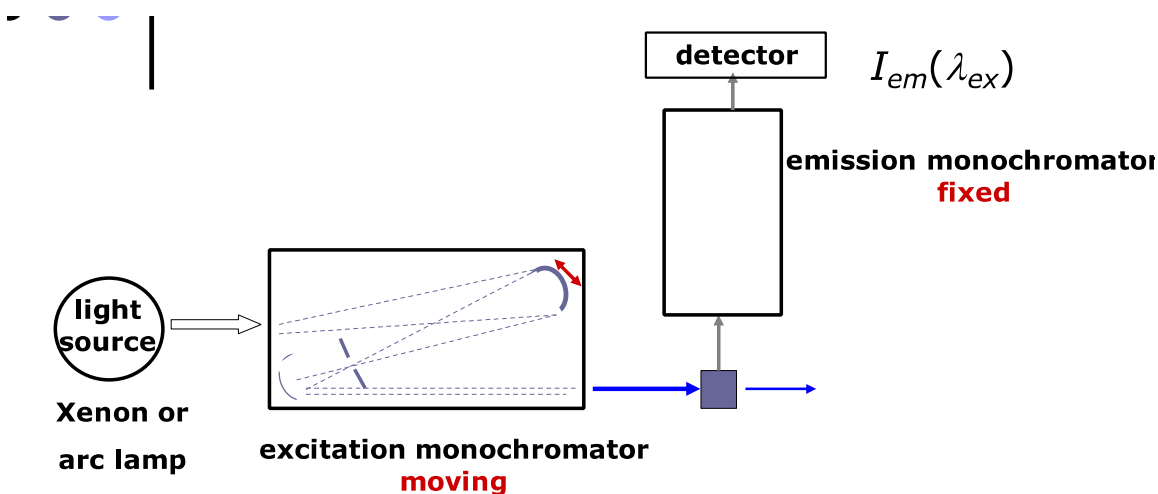
❖ **Konposatuarenak:**

- Errendimendu kuantikoa
- Egitura molekularra

❖ **Ingurunearenak:** Errendimendu kuantikoan eragiten dute.

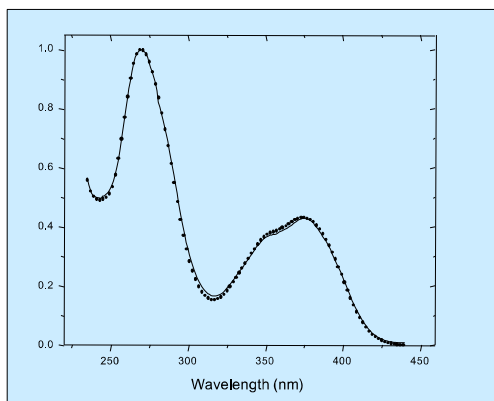
- Temperatura
 - Biskositatea eta Talka kopurua. T igotzean sistemeko partikulen mugimendua areagotzen da eta talkak gertatzeko probabilitatea handitu. Kitzikatutako partikulak talka bat pairatzen dutenean haien energia transferitzen dute, beraz ez dira fluoreszentzia igortzearen bidez erlaxatu behar. Zenbat eta talka gehio, errendimendu kuantiko baxuagoa lortuko da. Biskositatea ere talka kopuruarekin erlazionatuta dago, biskositatea altuagoa denean talka gutxiago baimentzen dira eta T igotzeak biskositatea murrizten du.
- Disolbatzailea
 - Biskositatea eta polaritatea.
- pH-a
 - Fluoroforoa protonatuta edo desprotonatuta egon, espektru desberdina igorriko du eta molekularen protonazio egoera inguruko pH-aren ondorioa izango da.
- O₂-ren presentzia
 - quenching fenomenoetan eragin handia du oxigenoak, beste metodoen bidez erlaxatzen direnez fluoroforoak, fluoreszentziaren errendimendu kuantikoa murrizten da, fluoreszentzia itzaltzen. Askotan, lagin bat aztertu baino lehen oxigenoa kentzen zaio.

Kitzikapen Espektroa



Kitzikapen espektrua lortzeko laginetik datorren uhin luzera konkretu bat finkatzen da (normalean igorpen maximoko uhin luzera hartzen da) detektatzeko eta argi iturritik erradiatzen den uhin luzera aldatuz joaten dena (kitzikapen monokromadorea aldatuz). Detektoreak uhin luzera fijo horren intensitatea neurtzen du.

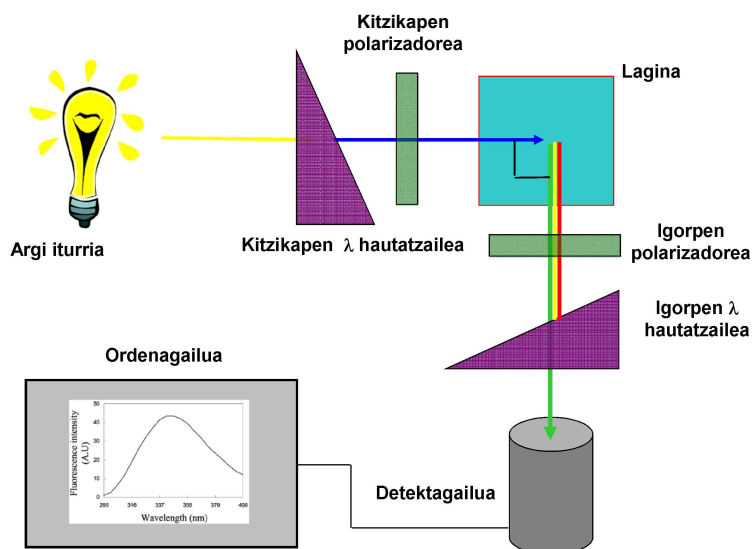
Kitzikapen espektruak orokorrean xurgapen espektruaren itxura bera hartzen du. Irudiko kasuan, trantsizio berak direnez, guztiz gainezartzen dira.



Etanolean ANS-ren xurgapen eta kitzikapen espektruak (gainezargarriak)

Oinarrizko instrumentalizazioa

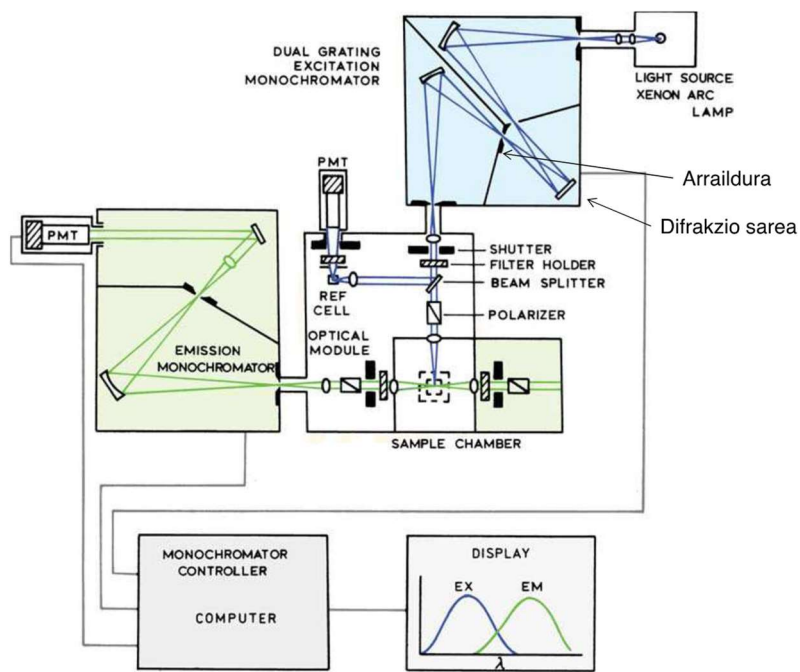
Hau izango litzateke fluorimetro baten barne eskema orokorra:



Argi iturriak argia erradiatzen du eta kitzikapen uhin hautatzaileak uhin luzera konkretua soilik baimentzen du pasatzen. Hautazkoa da laginara iritsi baino lehen edo ostean argi polarizatzaileak jartzea. Laginak emititzen duen argia 90°-ko angeluarekin detektatzen da argi iturriko uhin luzerak ekiditzeko. Ondoren igorpen uhin luzeraren hautatzailea dago eta hautatutako uhin luzeraren argia detektorera iristen da. Señalea ordenagailura bidaltzen da interpretatzeko.

Fluorimetro mota desberdinak daude (ISS PC1 ; Fluorolog-3, QuantaMaster,...) baina gehienak modularrak dira, piezak kendu eta jarri ahal zaizkie ezaugarri desberdineko fluorimetroak lortzeko.

Hurrengo irudian fluorimetroa detaile gehiagorekin ikusi daiteke, hainbat berezitasun dituelarik:



Shutter: Ate baten modukoa da. Izan ere, lanpara unero egongo da piztuta baina ez zaigu interesatzen fluoroformoaren etengabe kitzikatzea. Shutterari esker, soilik guk nahi dugunean argizatuko du argiak lagina.

Filtroak: teorian hautagailuek hautatzen dute uhin luzera konkretua baina ez dira perfektuak. Haien jardura hobetzeko eta zehazteko filtroak gaineratzen dira.

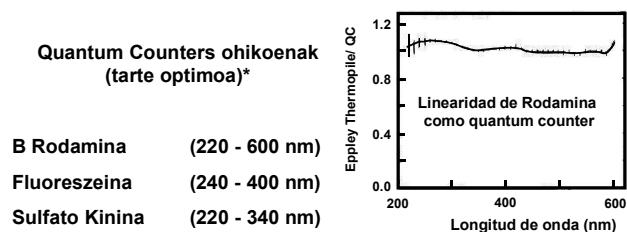
BEAM splitter: argi iturriko argia bi izpi berdinetan banatzen du. Bata erreferentzia zeldara doa zuria egiteko (barne erreferentzia deritzo) eta bestea laginara.

Monokromadorea: laginetik jasotako uhin luzerak banatzen ditu.

PMT: detektorea.

Barne Erreferentzia

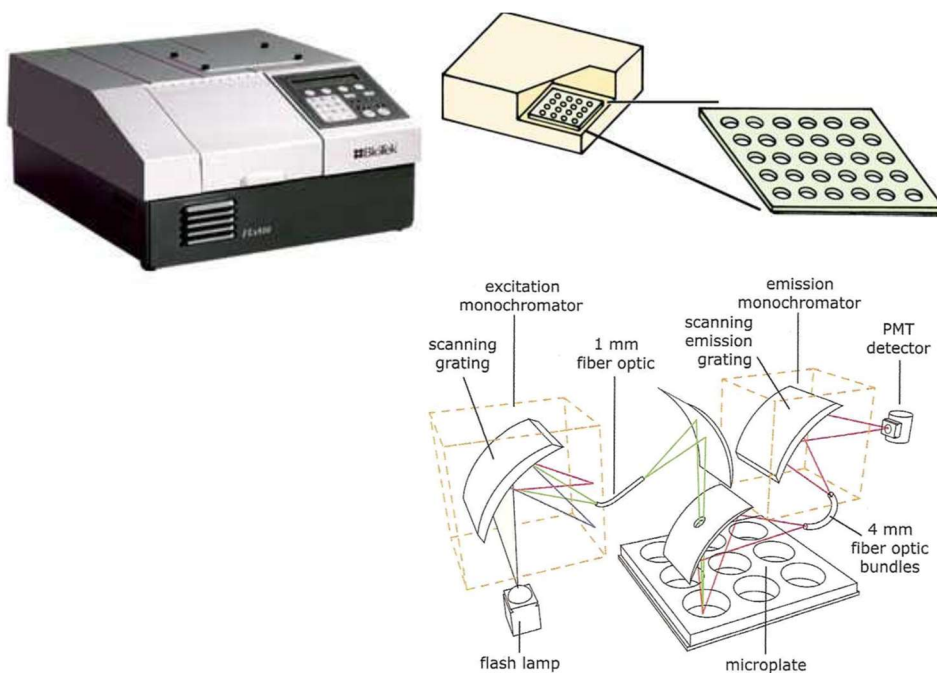
Barne erreferentzia argi iturriak izan ditzakeen akatsak kontrolatzeko balio du. Argi iturriaren argia Beam Splitter bidez bi izpi berdinetan banatu eta haietako batek erreferentzia zelda kolpatzen du. Zelda honetan errendimendu kuantiko oso altua, ia perfektua (1tetik gertu) duten molekulak daude, bakoitza berezko uhin luzera tartean:



Molekula hauek linearitatea erakusten dute haien uhin luzera tartean, balio konstantea erakustea espero da. Adibidez, argi iturria hondatu eta 400nm-tan igorpena galtzen badu, B Rodaminak argi gutxiago emitituko du uhin luzera horretatik aurrera, emisio konstantea izan ordez, eta erreferentzia detektoreak balio hau apuntatuko du. Barne erreferentzia balioak normalizaziorako erabiltzen dira, bai eta amaierako detektoreak jasotzen duen seinalea benetan laginaren igorpenarena dela ziurtatzeko.

Mikroplakak

Normalean fluorimetrotan lagindun kubetak sartzen dira baina badaude euskarri desberdinak. Adibidez, mikroplakak. Mikroplakak putzuetan bolumen txikiak aztertu eta bolumen txikiak erreakzioak gertarazi daitezke. Gainera, lagin desberdinak batera aztertzeke balio dute. Mikroplakak erabiltzen direnean ez da 90° desbideraketa erabiltzen. Horren ordez, ispilu bidez hautatzen da momentu horretan plakaren ze putzu erradiatuko den argia eta emititu den argia ere berdin izaten da isladatua eta detektorera bideratu. Metodoa motorizatuta dago banan banan putzu bakoitzaren xurgapena aztertzeke. Desberdintasun honetaz aparte hasierako eskemetan adierazitakoaren antzekoa da.



FLUORIMETROAREN OSAGAIK

a) Argi iturria

b) Uhin luzera hautatzailea

b1) Iragazki optikoak

b2) Monokromadoreak

c) Polarizatzaileak

d) Detektagailuak

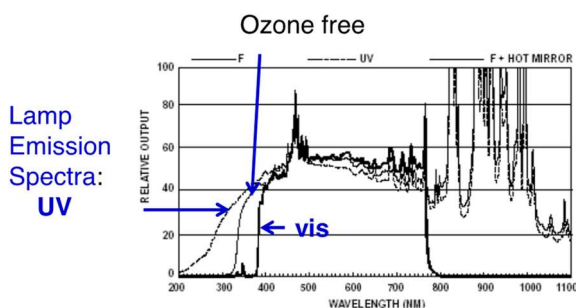
a) Argi Iturria

Lanparen bidez emititzen da lagina kolpatuko duen argia. Esperimentuaren arabera zenbait parametro izango dira kontuan lanpara egokiena hautatzeko:

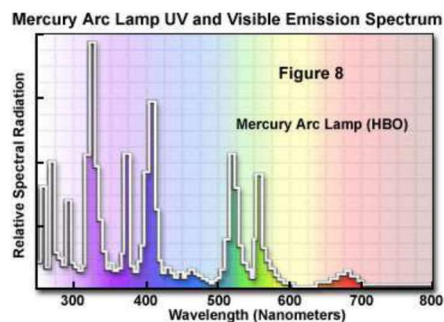
- Bizi **denbora**. Zenbat denboraz den gai lanpara argia emititzeko. Denbora bat pasata errendimendua galtzen dute eta ez dira erabilgarriak. Zenbat eta bizi denbora luzeagoa izan lanpara bat, merkeago aterako da, ez delako hainbestetan erosi behar.
- **Egonkortasuna**
- **Segurtasuna**
 - Presio altua Xe eta Hg lanparetan gasak presio eta bero altutan mantentzen dira, arriskutsua izan daitekeena. Kontuz manipulatu behar dira.
 - Beroa: hozte sistemak.
 - Intentsitate altua: ikusmena kaltetu dezake lanparak zuzenean begiratzea.

1) Xe arkua

Xenon arkua oso arrunta da espektru tarte zabala (250-700nm) hartzen duelako barne. Erradizio tarte horretan fluoroforo mota asko kitzikatzen dira eta nahiko modu onean lortu daitezke espektru jarraiak.



Xe arkua



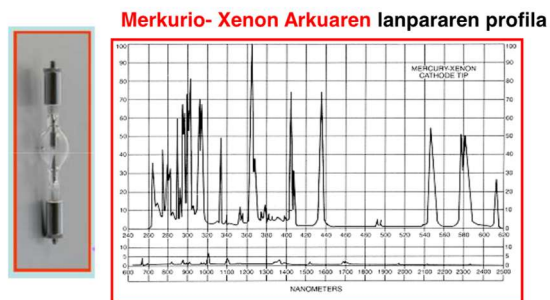
Hg presio altuetara

2) Hg presio altuetara

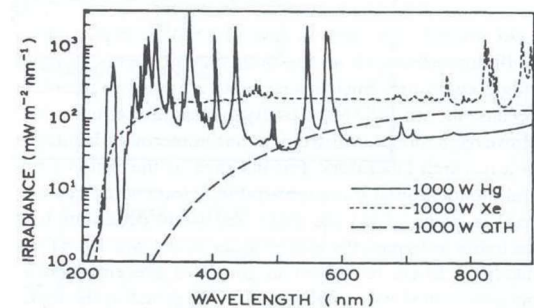
Merkuriozko lamparek ez dute hain espektru jarraia baina uhin luzera jakinetan oso intentsitate altuak lortzen dira. Mugatuta datozen uhin luzerak, espektru osoak egin baino laginak uhin luzera jakinetan aztertu nahi direnen erabiltzen dira.

3) Hg-Xe Arkua

Merkurio-Xenon lanperek ultramoreko tartean intentsitate altua lortzen dute.



Hg-Xe Arkua



Tungsteno-Halogeno

4) Tungsteno-Halogeno

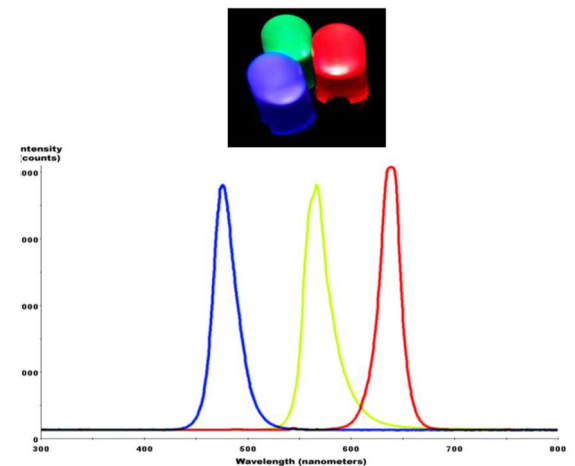
Uhin luzera handietan baliogarriak dira, adibidez infragorri esperimentuetarako baina ikusgaian ere erabili daitezke.

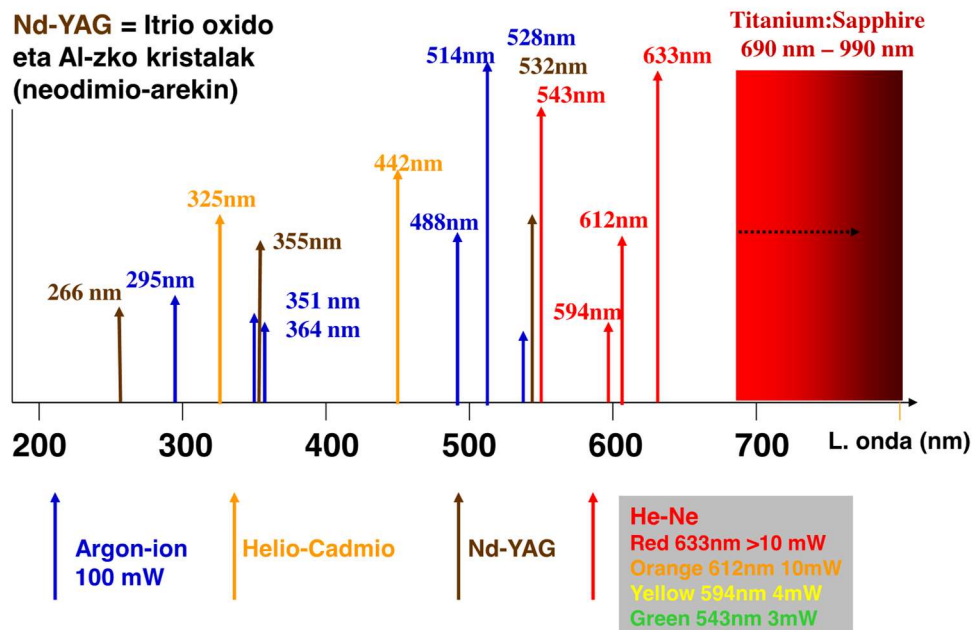
5) LED (Argia Igortzen duten Diodoak)

Uhin luzera konkretuetan argi intentsitate handia emititzen dute. LED asko daude eta, batuta, espektru tarte zabala lor dezakegu: 350-1300nm.

6) Laserrak

Uhin luzera bakarrean erradiazio oso intentsoa emititzen dute. Mikroskopia konfokatueta eta zitometroetan laserrak erabiltzen dira. Sentikortasun hobea ematen dute.



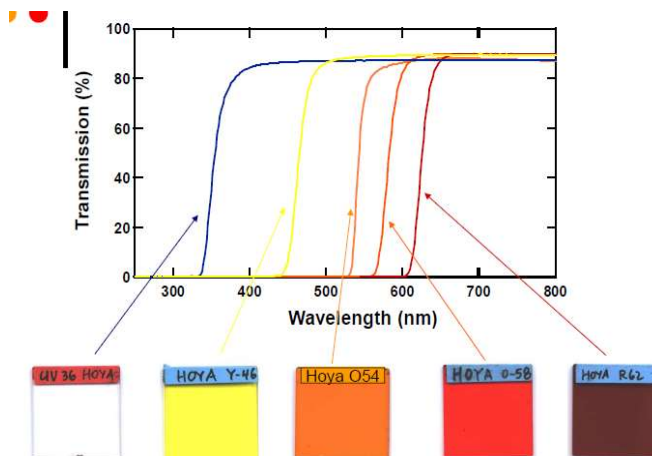


b) Uhin luzera hautatzaileak

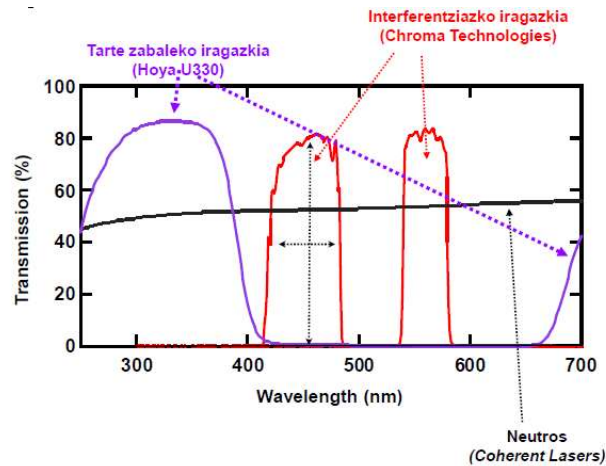
b1) Iragazki optikoak

Iragazki optikoak intereseko uhin luzerak hautatzeko erabiltzen dira, monokromadoreen osagarri bezala. Monokromadoreak perfektuak balira, iragazki optiko hauek ez lirateke beharrezkoak izango, baina badira. Adibidez, posible da lagina kitzikatzeko argia dispersatu eta detektorera iristea, nahasgarria izan daitekeena, baina iragazki hauek arazo hau konpontzen dute. Puntu desberdinetan koka daitezke, esaterako 1. monokromadorearen (kitzikapen uhin luzera hautatzen duena) ondoren edo 2. monokromadorearen (igorpen uhin luzeraren hautaketaren arduraduna) ostean.

Koloredun iragazki optikoak eta banda-paseko iragazki optikoak desberdindu ditzakegu. **Koloredun iragazki optikoek** uhin luzera batetik gora argiari pasatzen uzten diote eta hortik behera, ordea, ez (xurgatu egiten dute). Mota honetako bi iragazki optiko erabiliz asko mugatu dezakegu pasatzen uzten den uhin luzera. Esaterako 300nm-tik gora argia pasatzen uzten duen iragazki bat eta 380nm-tatik behera argia xurgatzen duen beste bat konbinatuz gero, argia bakarrik 300nm-380nm tarteko uhin luzerakoa bada igaroko da.

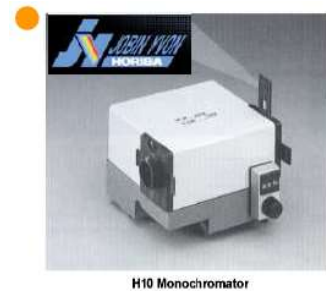


Banda-paseko iragazki optikoak, ordea, espektroko zati jakin batentzat iragazkorak dira, baina gainontzekoarentzat ez. Hauen barruan, aldi berean, beste bi azpitalde bana ditzakegu; tarte zabaleko iragazkiak eta interferentziazko iragazkiak. Lehen motakoek, izenak adierazten duen bezala, espektroko tarte zabal batean uzten diote pasatzen argiari, bigarrenak uhin luzera konkretuetan soilik egiten dutelarik.

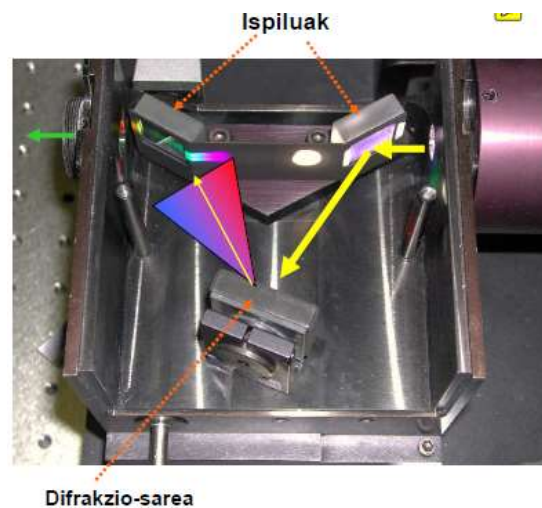


b2) Monokromadoreak

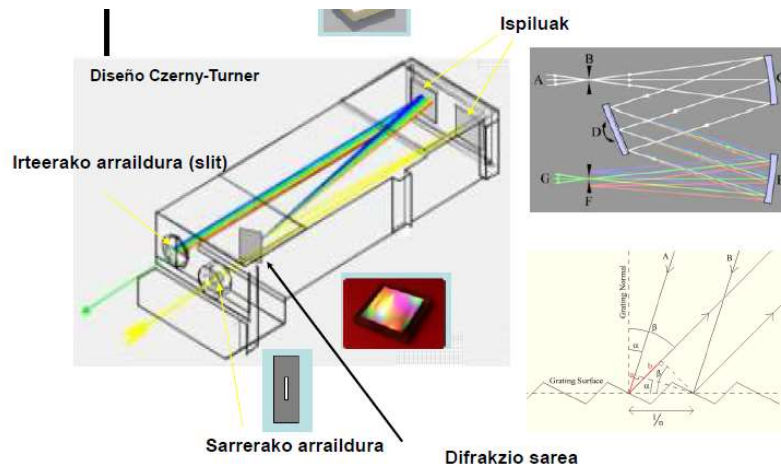
Kanpotik ondorengo itxura daukate gehienek, nahiko estandarrak dira:



Tapa kenduz gero, ordea, hau da ikusiko genukeena:

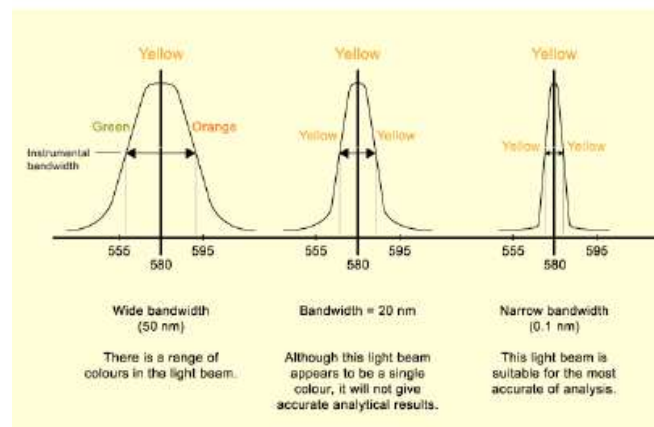


Gezi horiz argi iturritik datorren argia dago adierazia, ispilu baten bidez isladatu eta difrakzio sarera bidaltzen dena. Bertan, irradiazioa uhin luzera desberdinetan banatzen da eta hauek bigarren ispilu batera iritsiko dira (uhin luzeraren arabera angelu desberdinekin ateratzen dira izpiak difrakzio saretik), non irteera arrailduratik irtengo den uhin luzeradun argia islatuko den.

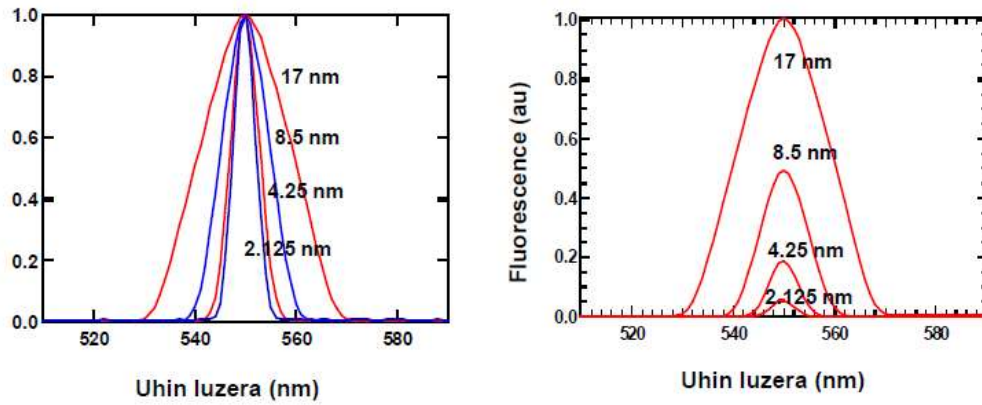


Arrailduraren (slit) tamaina

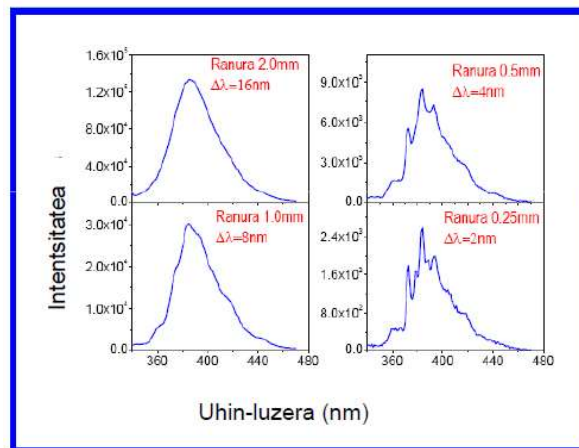
Arrailduraren tamaina aukeratu egin daiteke gure nahien arabera. Gero eta zabalagoa arraildura, orduan eta zehaztasun txikiagoa izango du hautatutako uhin luzerarekiko. Beheko irudian ezkerretik eskuinera arraildura zabalenetik estuenera lortutako espektruak agertzen dira.



Arraildura estutzeak, hala ere, muga bat dauka; pasatzen uzten duen fotoi kopurua, hain zuzen ere. Asko estutzean, pasatzen utziko duen fotoi kopurua ere txikitu egingo da eta beraz, jasotako seinalearen intentsitatea jaitsi. Beraz, arraildura estutzen doan neurrian erresoluzioak gora egiten du baina intentsitateak behera. Horregatik garrantzitsua da bien hauen arteko oreka egokia erakusten duen arraildura zabalera bat hautatzea. Aipatutako hau ondorengo irudietan argi ikus daiteke; ezkerrekoan erresoluzioaren gorakada edo espeketroaren estutzea eta eskuinean intentsitatearen gutxipena.



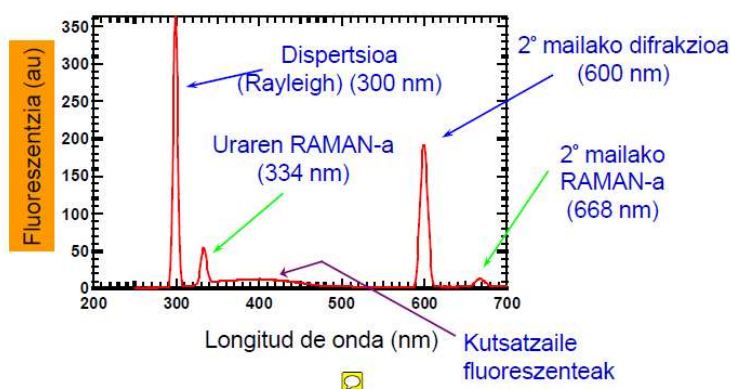
Adibide bat; pirenoaren fluoreszentzia espektroa 0-25-2mm tarteko arraildurak erabiliz.



Seinalearen ezpurutasunak

Askotan igorpen espektuan gure laginari ez dagozkion bandak ikus ditzakegu, arrazoi posible ugari direla medio. Horren adibide bat ikusiko dugu ezpurutasun horien arrazoiak zeintzuk izan daitezkeen ulertzeko.

Glikogenoaren (PBS-tan) igorpen espektro bat egiten dugu, non kitzikapena 300nm-tan egin den. Hau da lortutako igorpen espektua:



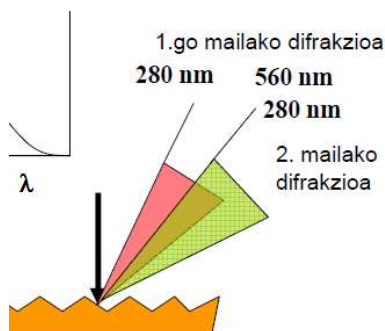
- Dispersioa (Rayleigh): kitzikatzeko erabilitako uhin luzera berdinean ikusten dugu (300nm). Seinale hau argi iturritik datorren irradiazioa indargetzaileagatik norabide guztietan dispersatua denean agertzen da, zati bat detektorera iristen baita.. Nola jakin dezakegu laginarena den edo disolbatzailearena? Beste espektru bat egin dezakegu baina gure laginik gabe, horrela badakigu espektru horretan agertzen diren seinaleak ez dagozkiola gure laginari. Hala ere, oso esanguratsua da seinaleak kitzikapen uhin luzera berdina izatea.

- Uraren RAMAN-a (334nm): beste dispersio mota bat da, disolbatzaileari (kasu honetan ura) dagokiona. Dispersio hau flexiblea da, kitzikatzeko erabilitako uhin luzeraren arabera da.

- Kutsatzaile fluoreszenteak

- 2. mailako difrakzioa (600nm) eta 2. mailako RAMAN-a (668nm) Rayleigh eta lehenengo RAMAN-aren bigarren seinaleak dira, hurrenez hurren. Aurreko bien uhin luzera bikoitzetan agertzen dira. Hau monokromadoreak, difrakzio sareak, daukan arazo baten ondorioa da.

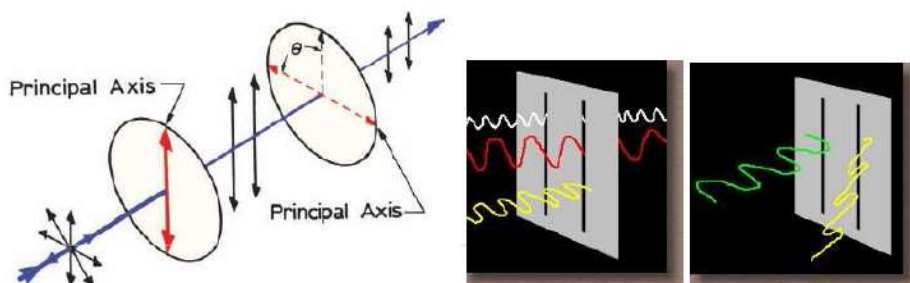
Irudian ikusten da nola proteina baten 1.go mailako difrakzioa 280nm-tan ikusten den eta bigarrena 560 nm-tan.



Berriz ere, seinalea gure laginari dagokion ala ez ziurtatzeko neurketa bera egin dezakegu baina lagina gehitu gabe.

c) Polarizatzaileak

Hautazkoak dira, hau da, fluorimetro batek izan ditzake edo ez. Polarizatzaileak argi izpi ezberdinak norabidearen arabera aukeratzen ditu. Honek esan nahi du argi iturritik irtendako argi izpi guztietatik gure intereseko norabidean oszilatzen duen argia bakarrik hautatzen dela, hau da, eremu elektromagnetikoaren angelu oszilakor bat bakarrik aukeratzen dela.



Polarizatzaile arruntenak "Glan Taylor", "Glan Thompson" eta "Polaroid" dira.

- Glan Thompson polaritzailea:

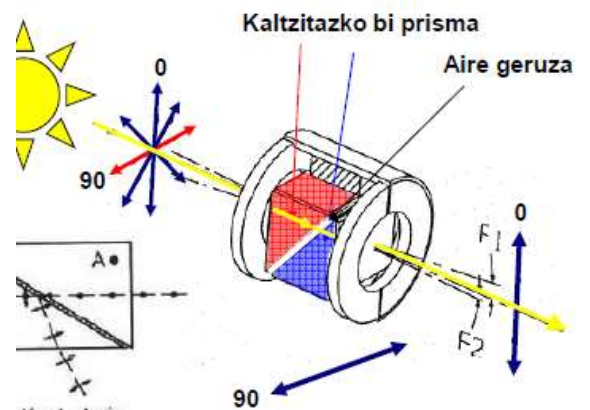
- Barnean; bi kaltzitazko prisma daude, aire geruza batez banatuak. Kaltzitazko prismak birrefrigenteak dira (iristen den izpia bi izpi perpendikular polarizatutan banatzen dituzte). Ematen diegun posizioaren arabera, argi iturritik datozen argi mota guztietan gure intereseko moduan hedatzen den argia bakarrik hautatzea lortu.

- Uhin luzera zabalean funtzionatzen dute (250-2300nm).

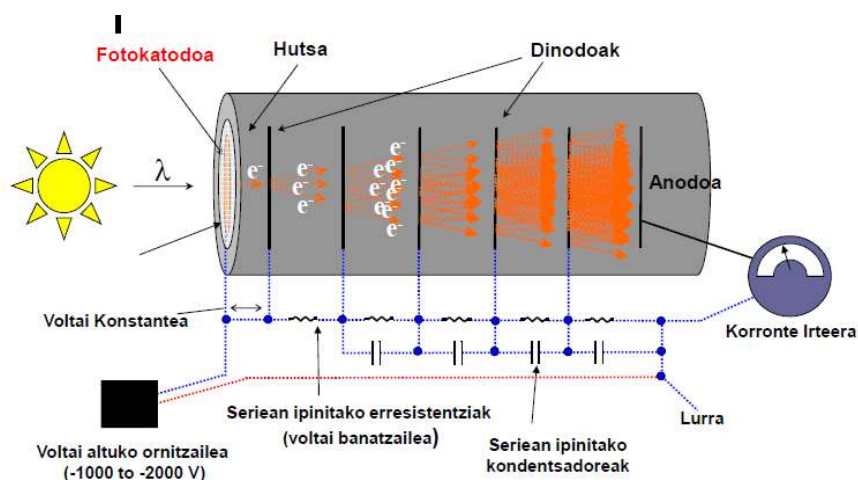
- Ez du erradiaziorik xurgatzen edo oso gutxi

- Errefrakzio indizea aldatzen da, horregatik utzi behar da aire geruza bat.

- Sheet polarizer delakoan bi xaflek eta elkarren arteko posizio erlatiboak argiaren polarizazioa ahalbidetzen du. Argazkian esaterako xafla batek ez die izpi perpendikularrei pasatzen uzten eta besteak paraleloei eta ondorioz, bata bestearen gainean jartzean, argia ezin da pasatu.

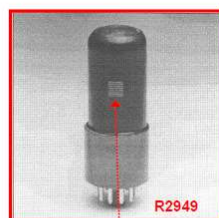


d) Detektagailuak: fotobiderkatzailea

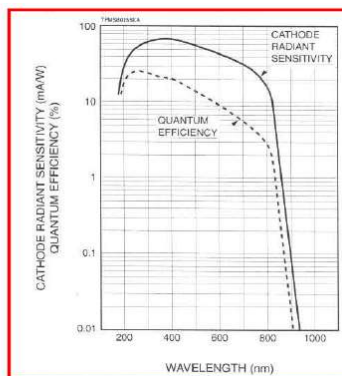


Datorren argiak talka egiten du fotokatodoarekin (argiarekiko sentikorra dena) . Talka egiten duen bakoitzean elektroio bat askatzen da. Hauek aldi berean dinodoen kontra ere egingo dute talka eta elektroio gehiago askatuko dituzte. Hortik datorkio izena detektagailuari, hasieran bat sartu baina bukaerara gehiago iristen baitira (seinalea amplifikatu egiten da).

PMT Hamatsu R928:



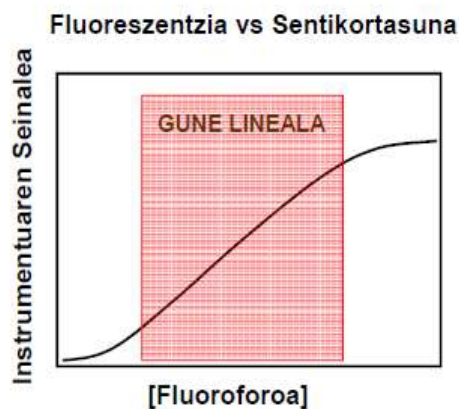
Fotokatodoaren leihoa



X ardatzean uhin luzera ezberdinak eta y ardatzean fotobiderkatzailearen efizientzia erakusten ditu grafikoak. Posible da sentikorra den leiho horrek (fotokatodoak) uhin luzera desberdinak efizientzia desberdinarekin transformatzea. Hau aztertu beharra dago, ziurtatzeko diferentziak laginari dagozkiola eta ez makinaren desberdintasun bati.

LAGINAREKIN ERLAZIONATUTAKO GAIK

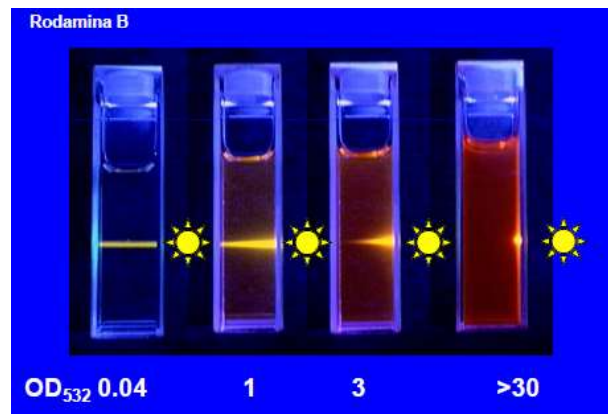
Kontzentrazioa eta intentsitatea ez dira beti proportzionalak, gune lineal bat dago non bai, baina hortik kanpo ez da proportzioa betetzen. . Hau laginaren kontzentrazioagatik edo makinaren sentikortasunagatik eragina izan daiteke. Bai fluoroforoak eta baita aparatuak ere gune linealak daukate, baina kontzentrazio jakin batzuetan (fluoroforo kontzentrazio baxuak edo oso altuak) arazoak ager daitezke. Muga hauek determinatzea ezinbestekoa da gure neurketak egin aurretik, hauetatik gora edo behera egindako behaketak ez baitira fidagarriak izango.



a) Seinalearen indargabetzea

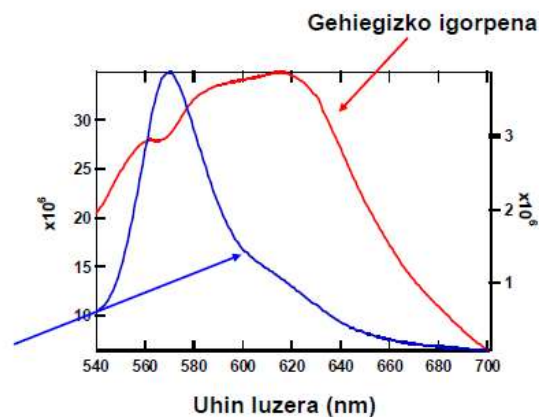
Nola eragin dezake laginaren kontzentrazioak kitzikapenean?

Adibide moduan B rodaminaren kasua (fluoroforo oso ezaguna) ikusi daiteke. Irudian eskuinetik ezkerrerantz B rodaminaren kontzentrazioa handituz doa. Kontzentrazio oso altuetan argitik datorren energia rodamina molekula batzuek bakarrik xurgatzen dute eta lagineko beste molekulei ez diete energia hartzen uzten. Kontzentrazioa asko igoz gero seinalea desagertzera hel daiteke. Honi "barne filtroaren efektua" deritzogu eta oso garrantzitsua da hau ekiditea, guk seinalearen hedapena modu homogeneo batean gertatzea nahi baitugu.



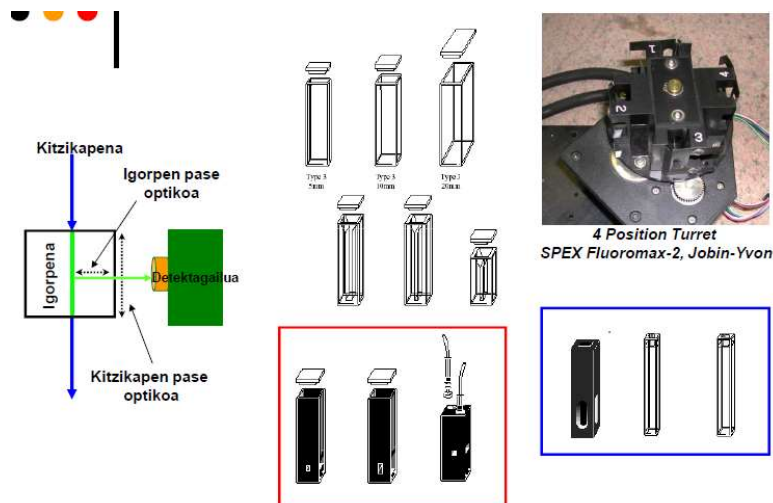
b) Fotobiderkatzailearen saturazioa

Puntu bat heltzen da non aparatua saturatu egiten den, ez duen ondo bereizten igorpen erradiazioa. Irudiaren ezkerredera daukagu, itxura zuzenez eta gorritz, gehiegizko igorpenaren ondorio den espektroa. Arazo hau ekiditeko igorpenaren intentsitatea murriztu behar da, hau modu desberdinetara egin daitekeelarik: a) Iragazkiak erabiliz, gure interesekoak ez diren uhin luzerak kentzeko b) Arraildurak estutu, erradiazioaren uhin luzerak espezifikokoagoak eta intentsitatea baxuagoa izan daitezen eta c) Beste uhin luzera batzuk erabiltzea kitzikatzeko (ez dena kitzikapen uhin luzera optimoa); horrela itxura berdina izango da, baina intentsitatea baxuagoa izango denez ez da saturatuko.

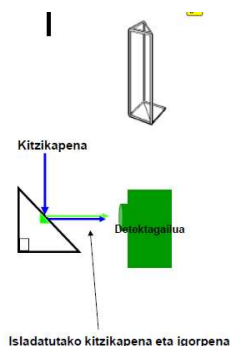


Kubetak

Kuartzozko, beira optikozko eta plastikozko kubetak erabili daitezke. Kontutan izan behar da fluoreszentziako kubetetan 4 aldeak gardenak direla normalean. Izan ere xurgapenean 2 alde bakarrik dira garrantzitsuak, baina fluoreszentzian 90 gradutan egiten direnez neurketak, laurak dira garrantzitsuak. Bolumen eta forma ezberdineko kubetak daude neurketa hauetarako.

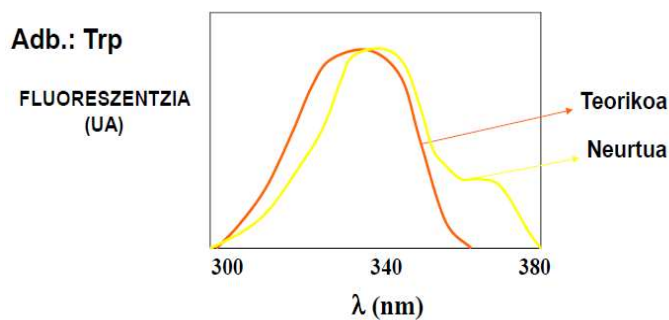


Kubeta triangeluarrek, esaterako, kitzikapena eta igorpena detektagailuan batera neurtzeko balio digute.



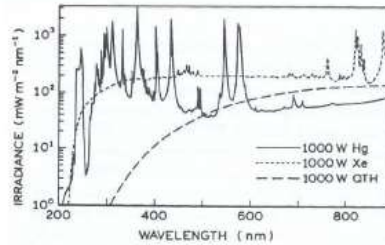
ESPREKTOAREN DEFORMAZIOAK

Batzuetan neurtzen dugun espektroa teorikotik urruntzen da edo deformatu egiten da.



Zeintzuk izan daitezke hau gertatzearen arrazoiak?

a) Lanpararen igorpena: posible da lanpararen igorpena homogeneoa ez izatea uhin luzera ezberdinetarako, hau da, uhin luzera desberdinetan fotoi kopuru desberdinak igortzea.

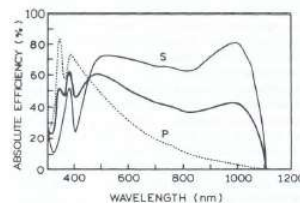


**PRESIO ALTUPEKO Xe LANPARA
BATEN ERANTZUN ESPEKTRALA**

b) Prismaren eta difrakzio sarearen transmisioa: agian ez dute guk eskatutako uhin luzera ondo hautatzen, hasieran zein bukaeran.

Difrakzio sare baten efizientzia:

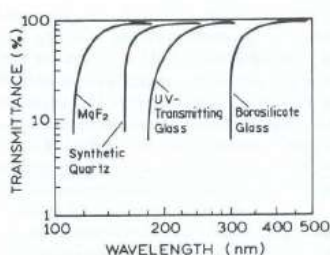
• λ eta argiaren polarizazioaren menpekoa da



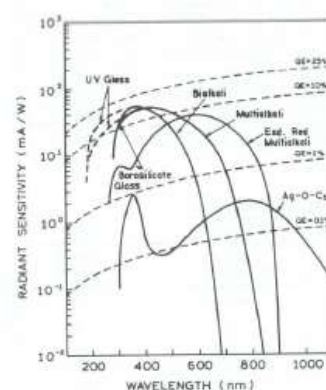
c) Fotobiderkatzailearen erantzuna

- Leihoaren transmitantzia: leiho horrek fotoiak elektroi bihurtzeko duen gaitasuna uhin luzeraren arabera alda daiteke.
- Fotokatodoaren erantzuna: hodi horretan (korrontean) ere homogeneotasuna gal daiteke uhin luzerei dagokionean.

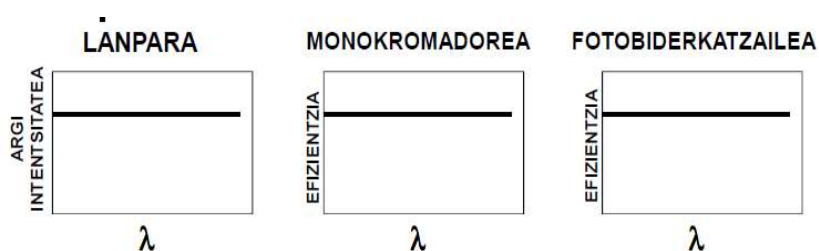
Fotokatodoen erantzun espektrala



**FOTOBIDERKATZAILE BATEN
LEIHOAREN TRANSMITANTZIA**



ESPEKTROFLUORIMETRO IDEALA



- Argi iturriak edo lanparak uhin luzera guztietako fotoiak intentsitate konstantean igorri beharko lituzke.
- Monokromadoreak uhin luzera guztietako fotoiak efizientzia berdinarekin transmititu beharko lituzke, argiaren polarizazioarekiko modu independentean.
- Detektagailuak uhin luzera guztietako fotoiak efizientzia berdinarekin detektatu beharko lituzke.

ESPEKTROEN ZUZENKETA

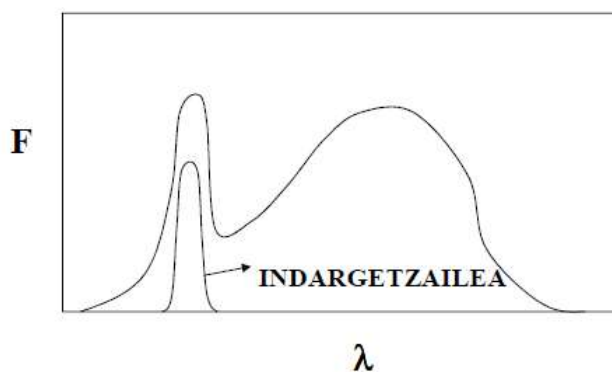
2 modutara zuzendu daitezke espektroak:

a) Igorpen espektroen zuzenketa

- "Standard" bezala ezagutzen diren substantzien espektroak eginez eta teorikoa eta lortutako alderatuz.
- Lanpara kalibratu batekin lortutakoarekin alderatuz; beste norbaitek lanpara berarekin egindako neurketa kalibratuekin konparatuz.

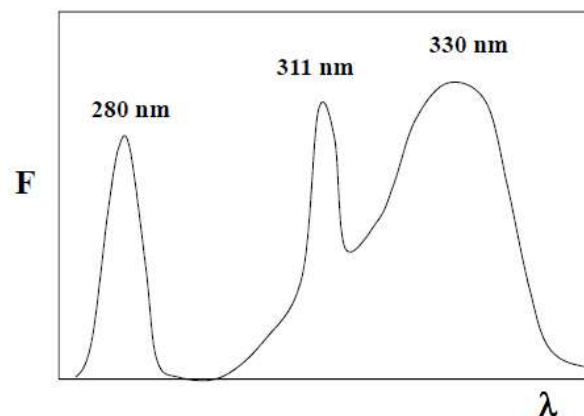
b) Lanpararen zuzenketa:

- "Quantum counter". Uhin luzera tarte zabal batean kitzikatzen dire eta errendimendu kuantiko oso altuko (ia batekoa) fluoroforen disoluzio oso kontzentratuak erabiltzen dira. Hau beti egiten da, espektrofluorimetro denek daukate erreferentzia leiho bat non fluoroforo idel horiek aurkitzen diren. Horien espektroetan dauden gorabeherak lanpararenak dira eta horrekin normaliza dezakegu gure igorpen espektrua.



Disoluzioak erabiltzen direnean lortutako seinalea gure fluoroforoarena edo nahaste horretan dagoen beste zer baitena izan daiteke. Hau identifikatzeko oinarri lerroak egin behar dira, hau da, espektruak baina fluoroforo gabe. Horrela jakin dezakegu adibidez indargetzaileak dispersioa eragiten duen (Raman) edo ez.

Seinale okerrak (gure laginarekin ez direnak) ekiditeko zenbait gauza kontutan har ditzakegu: soluzio diluituak erabiltzea ($A < 0.05$, kontzentratuek arazoak ematen baitituzte), disolbatzailearen kontrola burutzea (laginaren espeketroan disolbatzailea agertzen den edo ez identifikatu oinarri lerroak eginez), kitzikapen uhin luzerak hautatzea (ez dugu nahi hauek espeketroan ikustea eta ezta ere interferentziarik sortzea, esaterako, RAMAN-en dispersioa gure laginarekin batzea) eta azkenik, soluzioa filtratzea, suspentsioan dauden partikula kontaminanteak kentzeko.



Proteina baten fluoreszentzia intrintsekoa neurtzean, goiko grafika moduko bat lortu dezakegu. Kitzikapen uhin luzera ikus daiteke 280nm-tan (igorpen espektruaren uhin luzera tarte murriztuta ekidin daiteke), dispersioa 311nm-tan eta azkenik gure proteinaren seinalea 330 nm-tan. Laginaz gain ager daitezkeen seinale hauek ahal den neurrian ekiditeko edota agertzen direnean espektruak ulertzeko oso garrantzitsua da azken puntu hauetan azaldutako dena ulertzea.

Fluoreszentziaren oinarriak

Gregorio Weber (1916-1997) GFP proteina fluorescentea aurkitu zuen ikerlaria izan zen, fluoreszentziaren alorrean aurrerakuntza handiak egitea ahalbidetu duen proteina.

Gaur egun fluoreszentziaren erabilera anitzaren arrazoia ez dira erabiltzen diren aparatuak, eskuragarri dauden zunda fluorescente desberdin guztiengatik baizik. Guzti hauek batzen dituzten katalogoak daude, zunda molekularrak deiturikoak.

Zunda fluoreszenteak bi talde handitan bana daitezke:

- **Fluoroforo intrintsekoak** edo "berezkoak"

- **Fluoroforo estrintsekoak** edo fluoreszentziazko markaketak. Hauek markaketa desberdinak egiteko erabiltzen dira:

- "in vitro" markaketa

- Proteinen markaketa

- DNAREN markaketa

- Mintzen markaketa

- loien adierazleak

- Quantum dots

- "in vivo" markaketa

- Gehikuntza genetikoa

1. Fluoroforo intrintsekoak

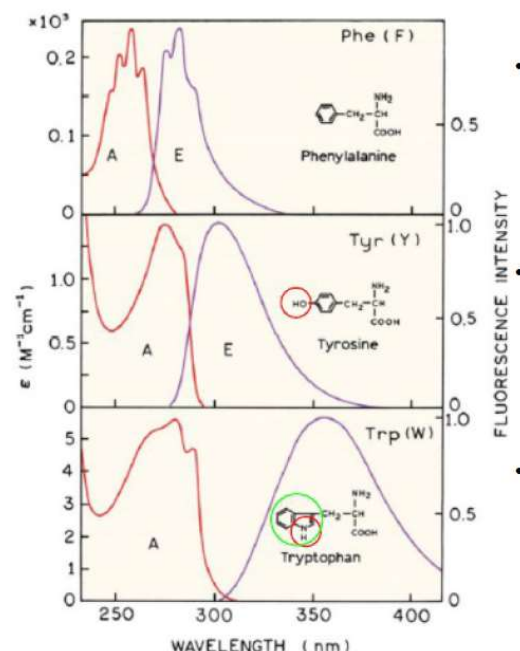
a. Aminoazidoak (proteinak)

Proteinei hauen hondar edo aminoazido aromatikoek ematen diete daukaten berezko fluoreszentzia hori, fenilalanina, tirosina eta triptofanoa direnak. Neurketak egiteko orduan, hala ere, gehien erabiltzen direnak tirosina eta triptofanoa dira.



- Tirosinak ionizatu daitekeen hidroxilo talde bat du eraztun aromatikoan eta honen egoeraren arabera aldaketak ikus daitezke fluoreszentzian.

- Triptofanoak hidrogeno zubiak eratu ditzakeen imino nitrogeno talde bat du indolean, Stokes-en desplazamendua handiagoa izatea eragiten duena.



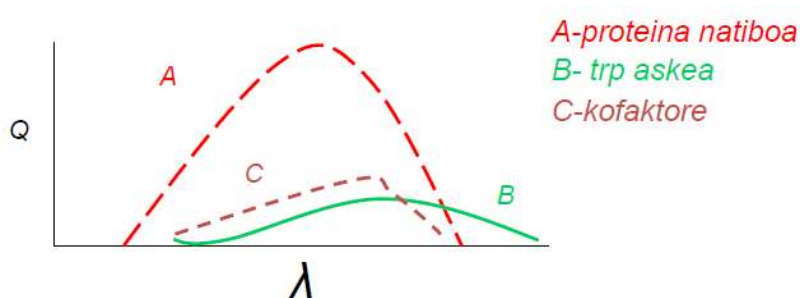
Proteinen espektro fluoreszenteak interpretatzeko arau orokorrak

Proteinaren fluoreszentzia Trp, Tyr edo Phe aminoazidoengatik sortzen da (kanpoko fluoroforo edo kofaktore fluoreszenterik ez dagoenean).

Disolbatzailearen polaritatea gutxitzen denean, triptofanoaren uhin luzera maximoaren balioa uhin luzera txikiagoetara (triptofano askeanarekin konparatuta) desplazatzen da eta intentsitatea handitzen da (desplazamendu hipokromikoa).

Beraz, proteina disolbatzaile polar batean egonda Trp-aren uhin luzera maximoa soluzioan dagoenean baino txikiagoa bada, Trp proteinaren barnealdean dagoela ondorioztatu dezakegu, hau da, ingurune apolar batean aurkitzen dela.

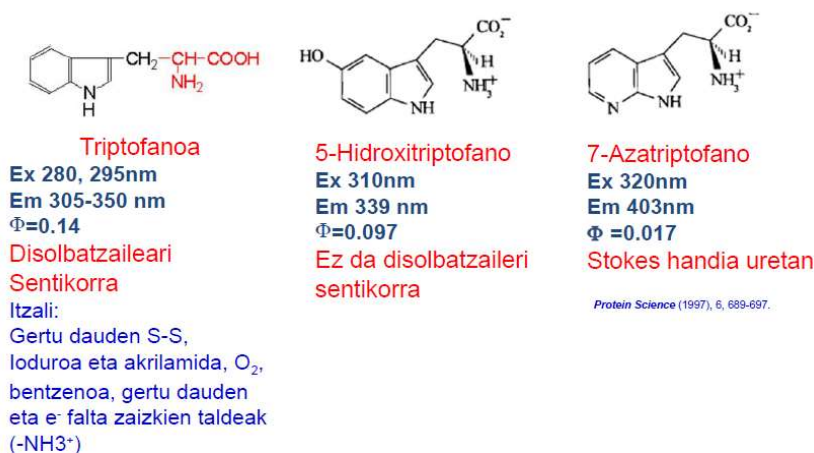
Adibidea



Proteina baten 3 Trp-en fluoreszentziaren intentsitatea 3 Trp askeen fluoreszentzia intentsitateen batura baino askoz handiagoa da eta uhin luzera maximoa txikiagoa. Honek adierazten digu egitura natiboa duenean triptofanoak proteinaren barnealdean aurkitzen direla, ingurune apolarrean. C-kofaktorea gehitzean, ordea, proteinaren espektruak Trp askeen antz gehiago hartzen du, intentsitatea jaisten baita eta uhin luzera maximoa handitu. Honek adierazten digu C-kofaktore honek proteinaren konformazio aldaketa bat eragiten duela, Trp-ren bat disolbatzaile polarrerantz esposatua geratzea eragiten duena.

Triptofanoaren eratorriak

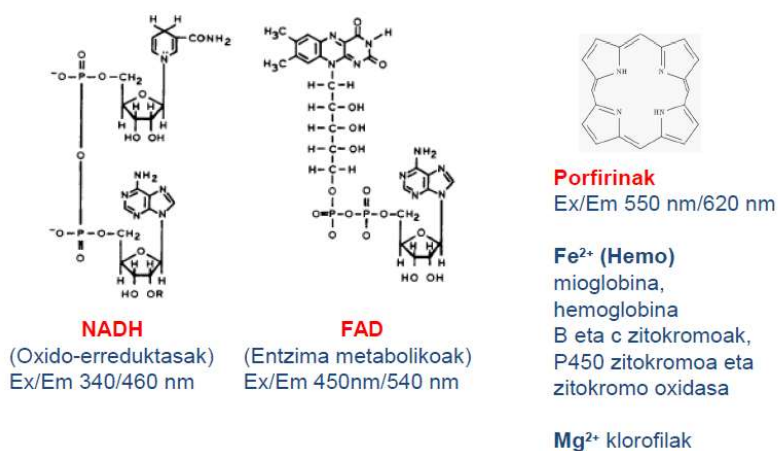
Triptofanotik abiatuaz hainbat molekula eratorri dira, ezaugarri desberdinak dituztenak. Esaterako, igorpen uhin luzera maximoa aldatuta izan dezakete, Stokes-en desplazamendua emendatua... Eratorritako espezie hauekin lan eginez informazio desberdin asko lor daiteke.



Esate baterako, eratorritako triptofano hauetako batzuk kitzikapen espektro desberdina daukate (hau da uhin luzera desberdinak behar dituzte kitzikate). Beheko irudiko adibidearen kasuan kitzikapen espektroak gorriarantz desplazatuta daude. Honetaz baliatuaz, proteinari gure intereseko triptofanoak eralda diezazkiogu eta ondoren hauek modu selektiboan kitzikatu. Horrela, gure interesekoak diren triptofanoak bakarrik neurtzea lor dezakegu, proteinako triptofano guztiak neurtu beharrean.

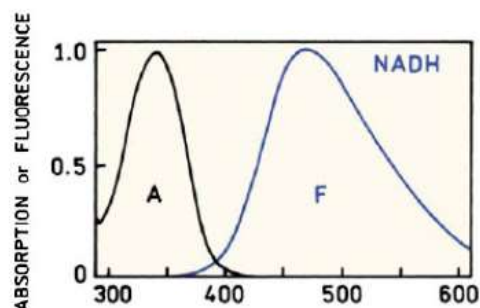
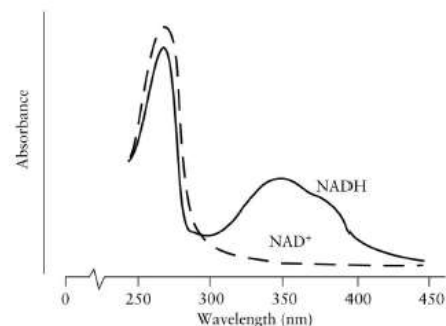
b. Fluoroforo naturalak: kofaktoreak

Proteinez gain, kofaktoreek ere zunda intrintseko bezala funtzionatzen dute. Hauek egiturak (eraztun aromatikoak eta lotura bikoitz ugariak) fluoreszentziaren agerpena ahalbidetzen dute. Fluoroforo hauek ehun baten fluoreszentziaren arduradunak dira.



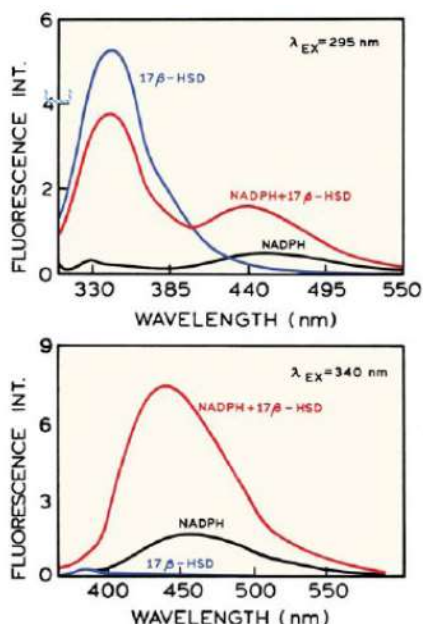
NADH (nikotinamidaren eraztun erreduzitua)

- NADH da xurgapena eta fluoreszentzia daukana, NAD⁺ ez da fluoreszentea.
- Uretan NADH-aren $\tau=0.4\text{ns}$ -koa da (adeninak iraungitzen duelako-aurreraxeago ikusi).
- Proteina batera batzerakoan ordea, errendimendu kuantikoa 4 aldiz handitzen da eta $\tau=1.2\text{ ns}$ ingurukoa izatera pasatzen da.
- Intentsitatea ingurunearen arabera txikitu edo handitu daiteke.



NADPHaren baturaren eragina

NADPH-aren egitura eta funtzioa NADH-aren oso antzekoa da. Adibide honetan 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasari lotzean ematen diren aldaketak ikusten dira.



295nm-tara kitzikatzean (proteinen kitzikapen uhin luzera) proteinen fluoreszentzia (triptofanoei dagokiena) eta NADPH-proteina konplexuarena ikus daitezke. Izan ere, nahiz eta proteinen kitzikapen uhin luzera izan, honek erresonantzia bidez hartutako energia pasatzen dio NADPH-ari.

340nm-tara kitzikatzean (NADPH-aren kitzikapen uhin luzera), ordea, NADPH-aren fluoreszentzia proteinari lotuta dagoenean da ikusten duguna. Grafikoan ikusi daiteke disoluzioan dagoen NADPH-ak lotutakoak baino askoz fluoreszentzia gutxiago igortzen duela, lehen esan bezala adeninak iraungitzen baitu efektua.

Berez, NADH eta NADPH-aren eratzunak kitzikatuak izaten dira nahiz eta disoluzioan egon, baina "gertu" dagoen adenina batek iraungi egiten du. Proteinari lotzean, ordea, konformazio aldaketa bat ematen da eta eratzuna eta adenina urrunago geratzen direnez, iraungitze hori gelditu eta fluoreszentzia askoz gehiago igorri dezake.

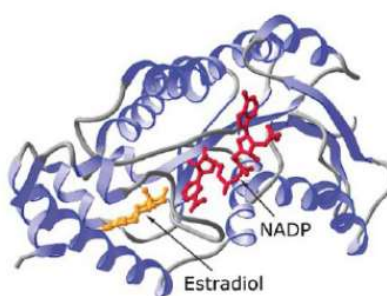
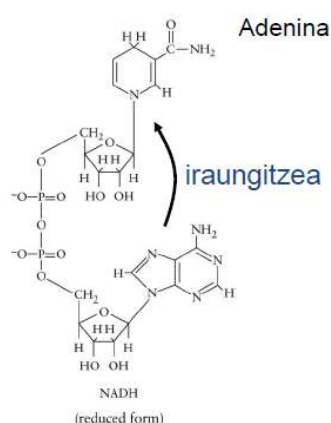


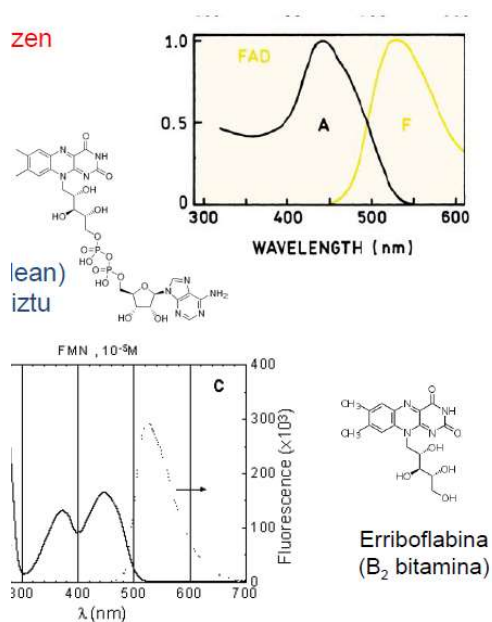
Figure 3.5. Structure of 17β -hydroxysteroid hydrogenase (β -HSD) with bound NADPH. From [28].

FAD, ERIBOFLABINA, FMN

Kasu honetan FADH-k (forma erreduzituak) ez du fluoreszentziarik igortzen

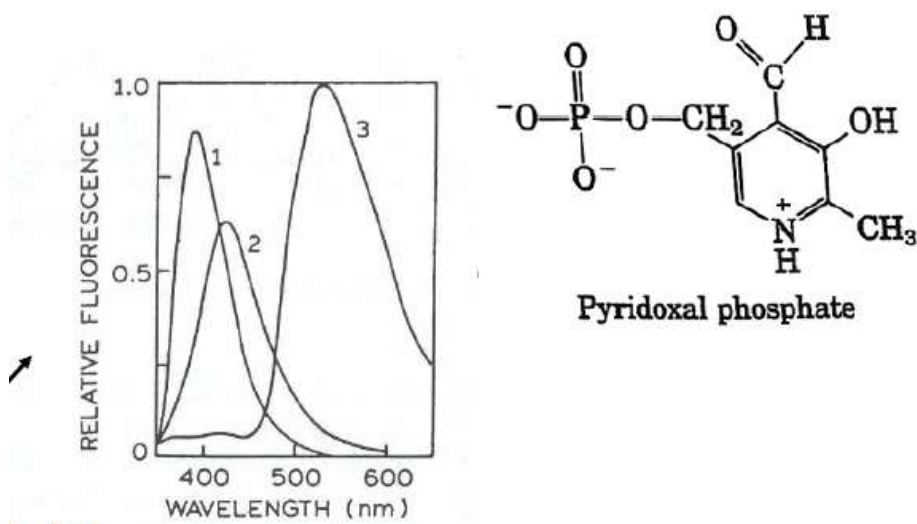
- FAD (flavin adenina dinukleotidoa): $\tau \sim 2.3$ nseg
- FMN (flabina mononukleotidoa): $\tau \sim 4.7$ nseg

Flabinak proteinari batzean (normalean) fluoreszentziaren intentsitatea murrizten du (NAD(P)H-arekin gertatzen zen justu kontrakoa)



PIRIDOXIL FOSFATOA

- Lys-ari batzen zaio Schiff base baten bidez
- Bere espektroa ingurune proteikoaren menpekkoa da



c. Proteina fluoreszenteak

1. Fikobiliproteinak

- Fluoreszentzia intentsoko proteinak dira, alga gorri eta zianobakteriek (berde-urdinak) dituztenak.
- Xurgapen altua daukate 470-650 nm-tan (argi ikuskorrean).
- Fikobilisometan fluoreszentzia oso txikia da FRET gertatzen delako baina *in vitro* oso fluoreszenteak dira.
- Errendimendu kuantiko oso altua daukate.
- Proteina egonkorak dira.
- Uhin luzera altuetan kitzikatzen/emititzen dute.
- Erabilpen posible ugari dituzte: immunozitokimikan, fluxu zitometrian, partikula bakarreko

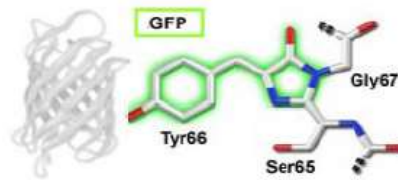
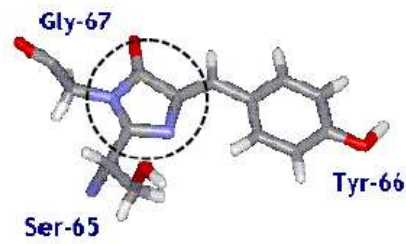
Protein	Subunit Composition	Approx. mol. wt.	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Total bilins per protein	$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)
Allophycocyanin	$(\alpha\beta)_3$	100,000	700,000	6	650	660
R-Phycocyanin	$(\alpha\beta)_3$	110,000	1,000,000	9	555, 618	642
B-Phycoerythrin	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240,000	2,400,000	34	543, 562	576
R-Phycoerythrin	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240,000	2,200,000	34	495, 536, 565	576

detekzio fluoreszentzian.

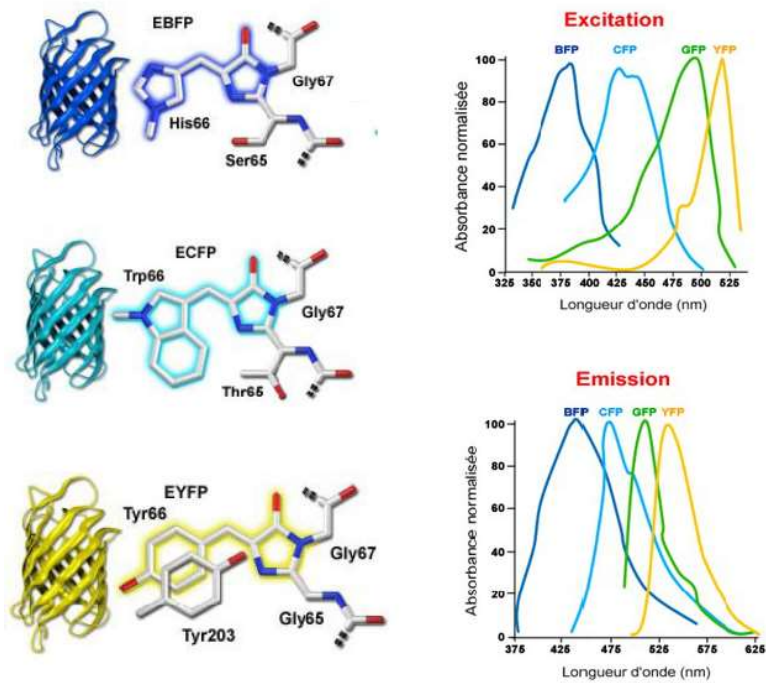
2. Green Fluorescent Protein (GFP)

Weber-ek topatu zuen lehenengoz *Aequorea victoria* marmokan.

- Proteinak β -kupel egitura dauka eta fluoreszentzia barrualdean aurkitzen diren 3 aminoazidok (Ser-65, Tyr-66 eta Gly-67) ematen diote. Proteina tolesterakoan fluoroforoa modu espontaneoan eratzen da (3 aminoazido hauek elkartzean).
- *A. victoria*-ren GFP-a: Tenperatura baxuetan heltzen da. Kitzikapena 395nm-tan ematen da eta igorpena, berriz, 509nm-tan. Proteinaren MW 25-30 kDa-ekoa da.
- 1995 Ole Thastrup-ek hobetutako GFP bat diseinatu zuen, EGFP (Enhanced GFP) deitua izan zena. Eraldatutako proteina hau 37°C-tan tolesten da, tenperatura baxuetan tolestearen "arazoa" konponduz. Horrela, GFP-aren erabilera ugaztun zeluletan ahalbidetu zen. EGFP honen kitzikapen maximoa 487nm-tan ematen da eta 507nm-tan igortzen du fluoreszentzia. Bere $\epsilon=55,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ da eta errendimendu kuantikoa 0.60koa.

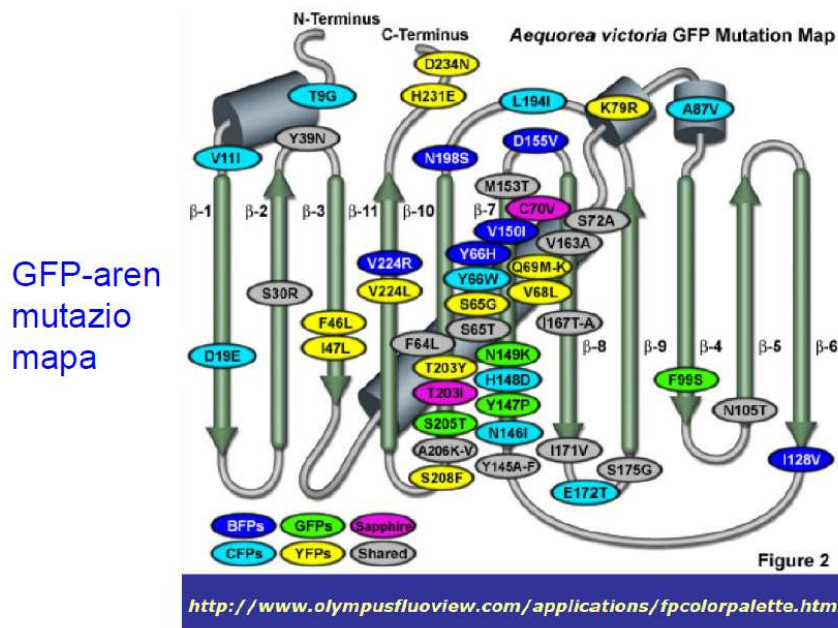


EGFP honetatik abiatuta milaka mutazio egin zaizkio gure intereseko kitzikapen eta emisio uhin luzerak dituzten molekulak izateko.



GFP-a zelulak zein izaki bizidunak markatzeko erabili daiteke.

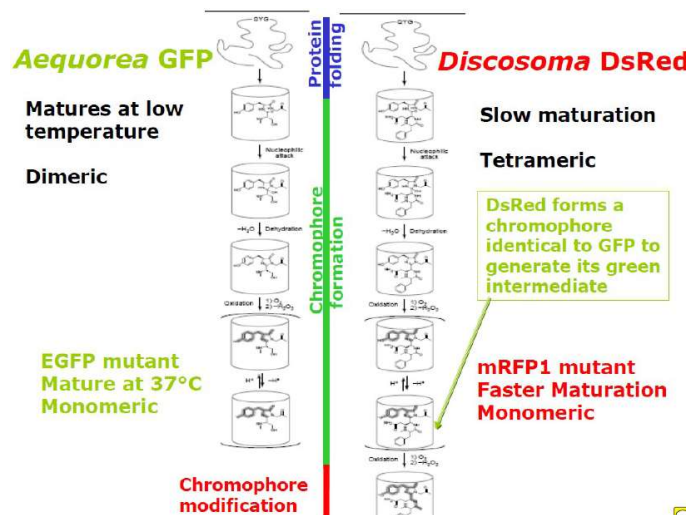
Hurrengo irudian aurrez aipatutako mutazio ugari horien mapa ikusi daiteke:



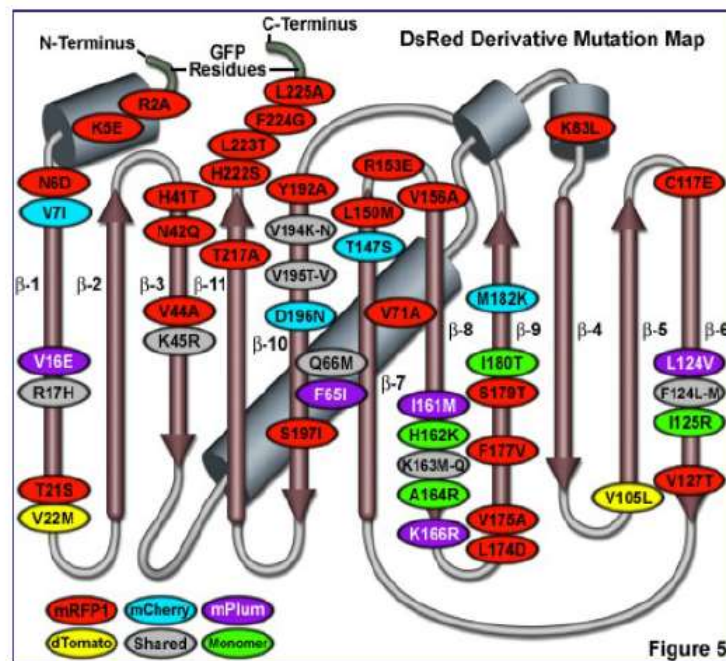
3. Proteina fluoreszente gorria

Matz et al-ek purifikatu zuten *Discosoma striata*-tik 1999an eta DsRed FP deitu zioten. Kitzikapena 558nm-tan ematen da eta igorpena 583nm-tan. Proteina honen tolesdura geldoa da eta gainera kromoforo berde bat sortzen da tolesdura horren bitartekari bezala. Horrez gain, oligomeroak era ditzake. Oligomerizazio honek arazoak ekarri ditzake neurketak egiteko orduan (esaterako proteina-proteina interakzioak oztopatu ditzake) eta bitartekari berdea nahasgarria izan daiteke.

Arazo hauei aurre egiteko mutazio bat sartu zitzaion DsRed FP-ari, zeinek azkarrago heltzea eta monomero moduan egitea eragiten duen. Azkarrago helduta bitartekari berdearen arazoa murrizten da eta monomero moduan egiteak, oligomeroak sor ditzaketen arazoak ekiditea.

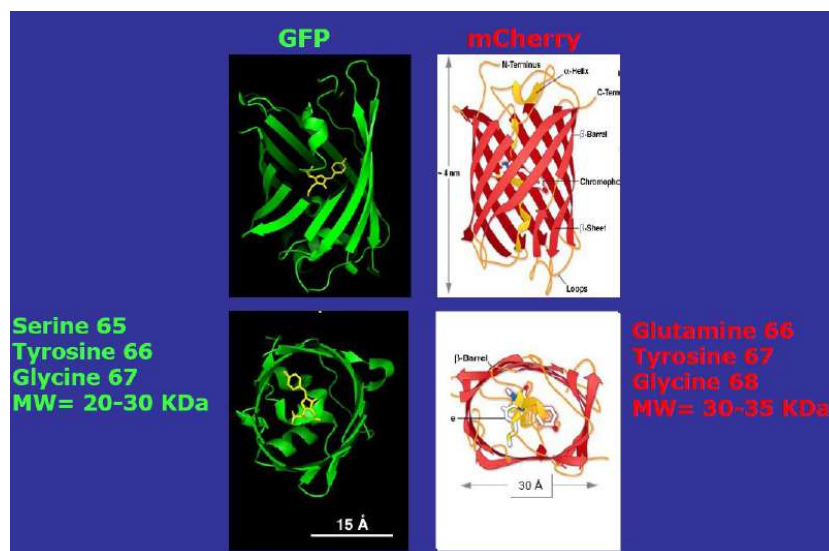


DsRed-en mutazio mapa:



"Kolare" desberdinetkao proteinak erabilita zelulako osagai desberdinak marka daitezke aldi berean eta mikroskopia konfokala erabiliz behatu.

Beste adibide bat mCherry da:



2. Fluoroforo estrintsekoak

Laginari gehitzen zaizkion zunda sintetiko edo erreaktibo kimiko eraldatuak dira. Elkarrekintza ez-kobalente edo kobalente bidez lotu daitezke molekulara.

▪ Proteinen markaketa

a. Elkarrekintza ez kobalentea

Esaterako ANS-ak (1,8-ANS, azido 1-anilinonaftaleno-8-sulfonikoa edo bis-ANS) intereseko molekularekin elkarrekiteko modua da. ANS-a 1950. urtean hasi zen garatzen. Uretan dagoenean ez du ia fluoreszentziarik igortzen, baina ingurune hidrofobo batera pasatzean, ordea, bere errendimendu kuantikoa asko igotzen da. Horregatik proteina baten barrunbe apolarrari batuz gero, fluoreszentzia igortzen du.

Irudian ikusten da nola ANS kontzentrazioa igotzen den neurrian, BSA-aren igorpena txikitzen den eta ANS-arena handitu (FRET-a gertatzearen ondorioz).

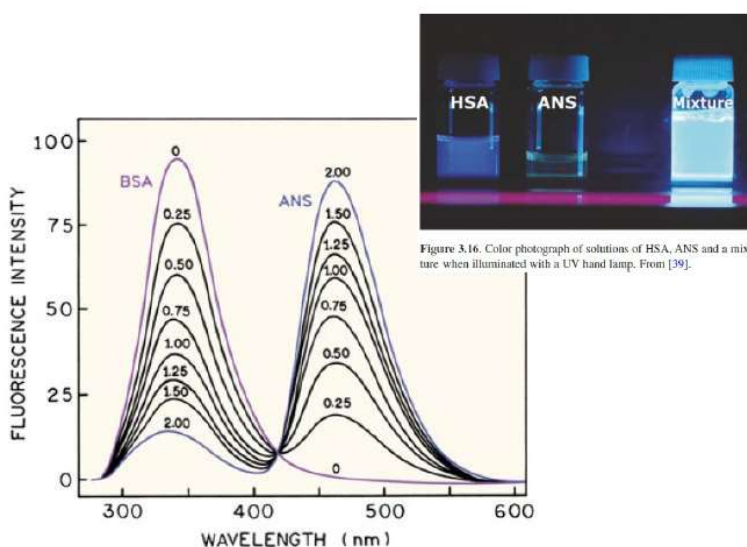
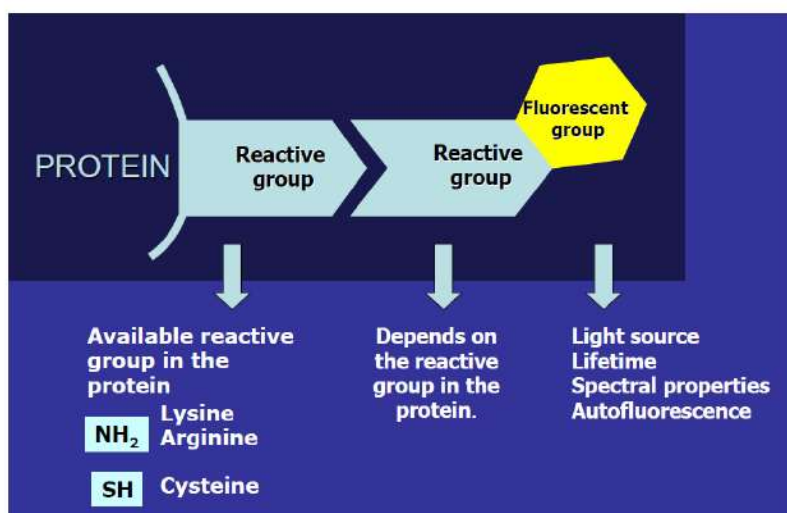


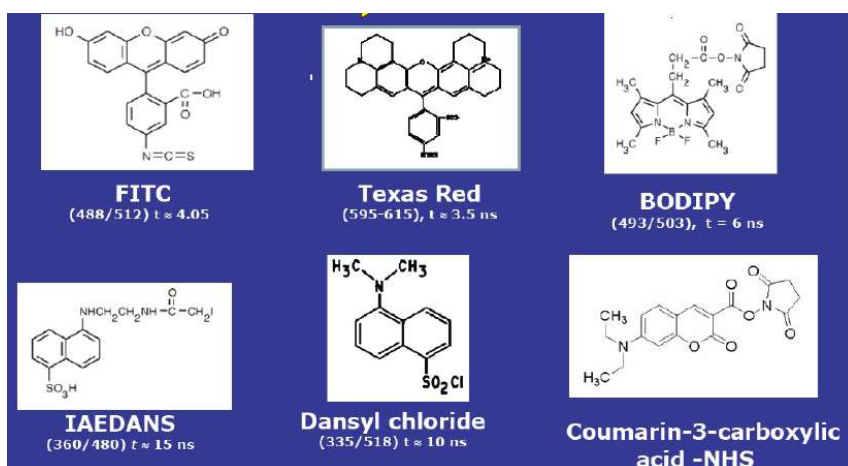
Figure 3.15. Fluorescence emission spectra of bovine serum albumin (BSA) in the presence of increasing ANS concentration. The numbers indicate the average number of ANS molecules bound per BSA molecule. Excitation at 280 nm.

b. Elkarrekintza kobalentea



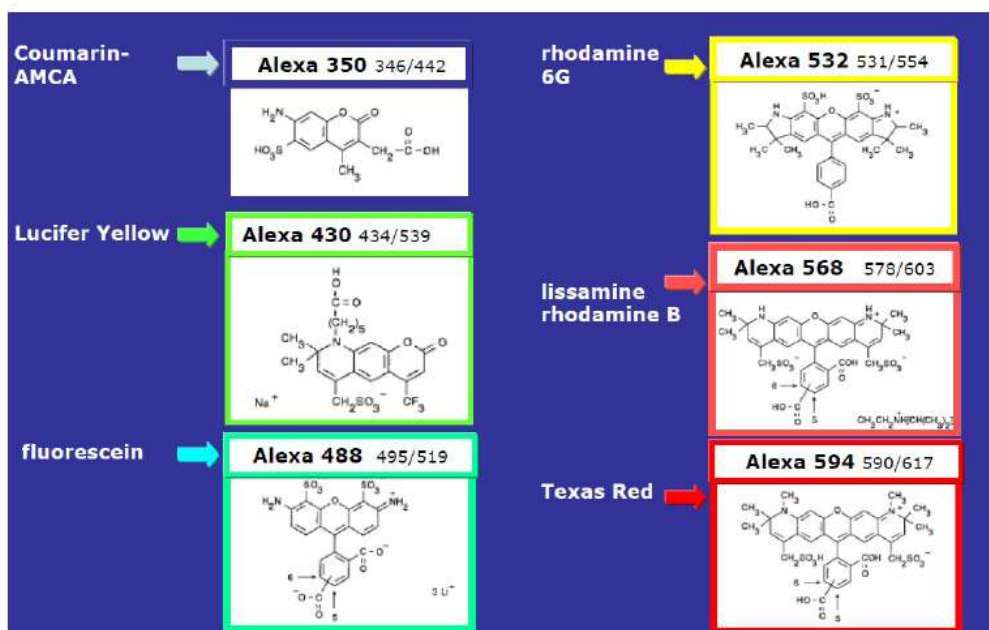
Garrantzitsua da markaketak gure molekularen funtzio biologikoa ez duela aldatzen ziurtatzea. Batura kobalente hau gertatu ahal izateko proteinak talde errektibo bat eduki behar du. Hau amina talde bat (lisina edo argininarena edo N-terminalekoa) edo zisteina baten SH taldea izan daitezke. Talde errektibo horren arabera gure zundak talde errektibo osagarri (horrekin erreakzionatuko duena) bat eta fluoreszentzia emango dion talde bat izango ditu.

Zunda fluoreszente asko daude eta beharrezko ezaugarrien arabera bat edo beste hautatzen da.

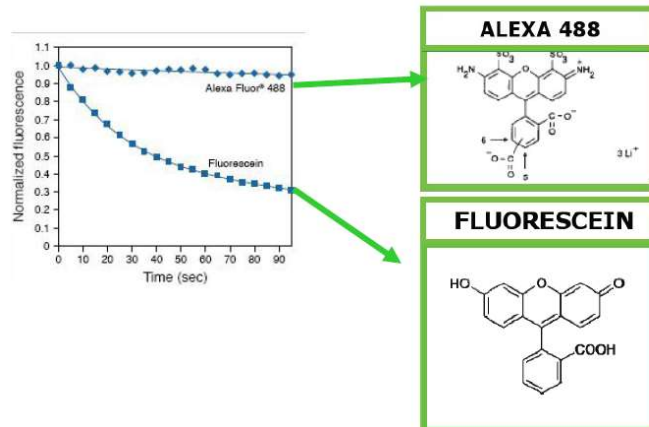


Zundak Φ handiagorekin eta fotoegonkorragoak: Alexa Seriea

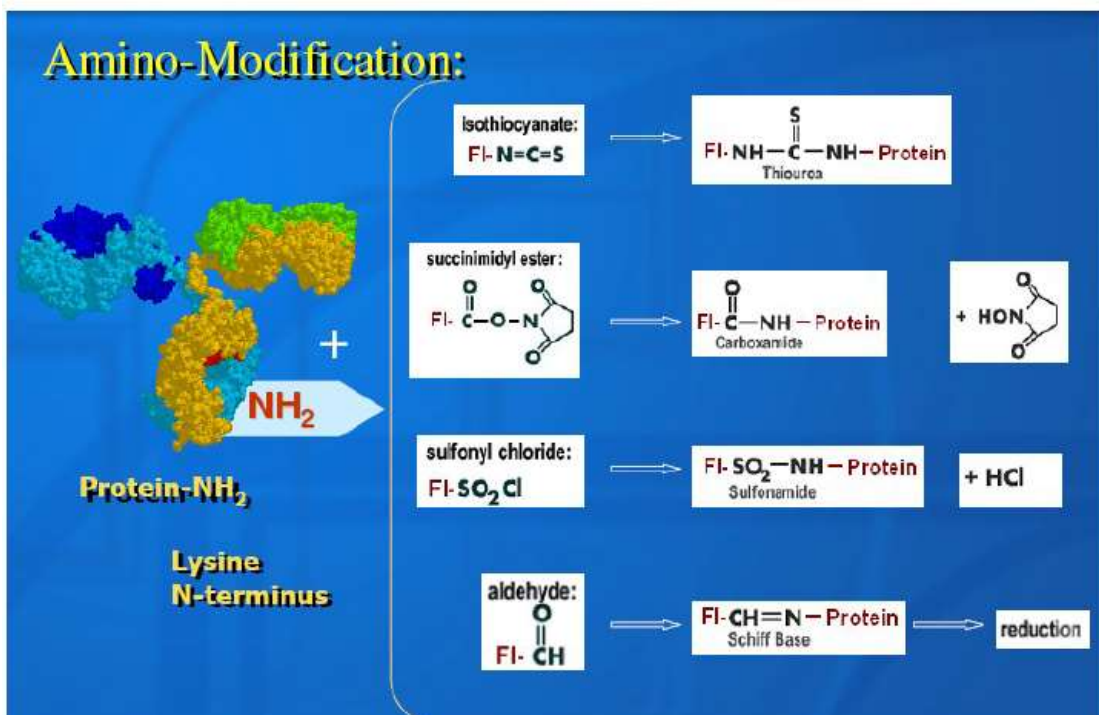
Zeuden zunda fluoreszenteen errendimendua eta fotoegonkortasuna hobetuz, Alexa seriea deiturikoa sortu da. Hauek seinale sentikorra eta egonkorra ematen dute. Ondorioz, oso ugariak ez diren molekula biologikoak eta egituren detekzio selektiborako oso egokiak dira. Hurrengo irudian ezkerretara lehen erabiltzen ziren zundak ageri dira eta eskuinean zunda hori ordezkatu duen Alexa serieko zunda berria. Alexa zundak beraien analogoek baino intentsitate gehiago ematen dute eta egonkorragoak dira. Gainera, ez dira pH-arekiko sentikorrak pH 4-10 tartean.

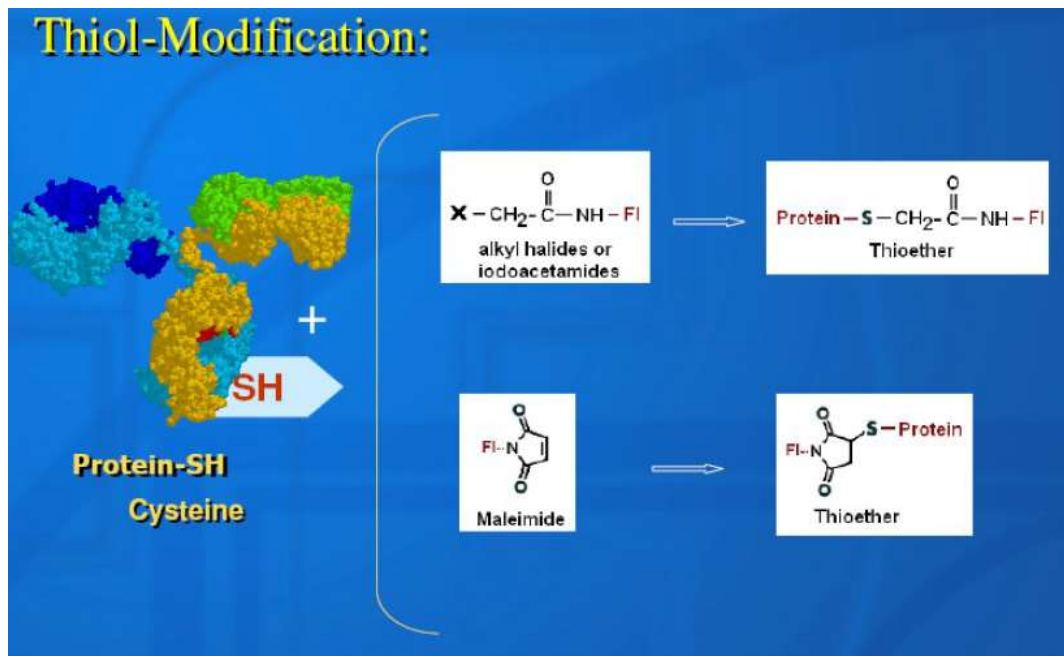


Hurrengo irudian ikusi daiteke nola fluoreszeinak denborak aurrera egin ahala emititzeko gaitasuna galtzen duen, baina Alexak ez (fotoegonkortasun hobea).



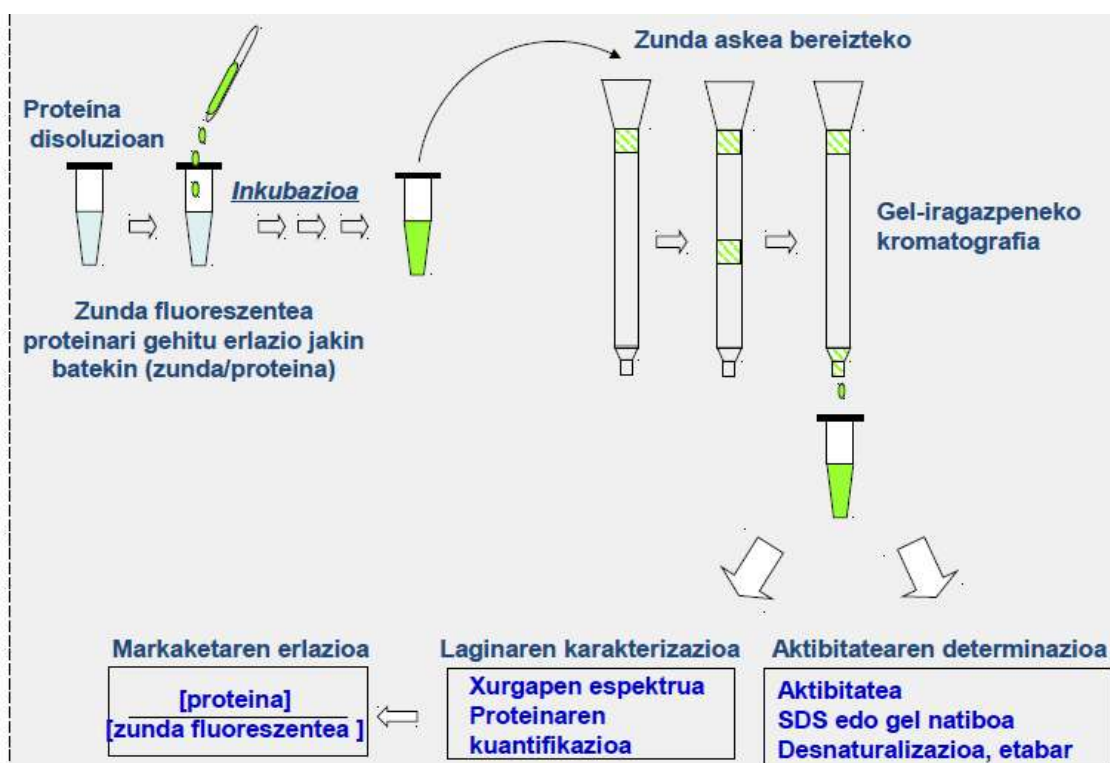
Zein amina markatu nahi dugun arabera pH batean edo bestean burutuko dugu gure erreakzioa. Lisinak eraldatu nahi badira pH 8.5-9.5 artean finkatuko dugu, baina N-termina markatzeko bada, ordea, pH neutrotik gertu (pKa 7-koa baitauka).

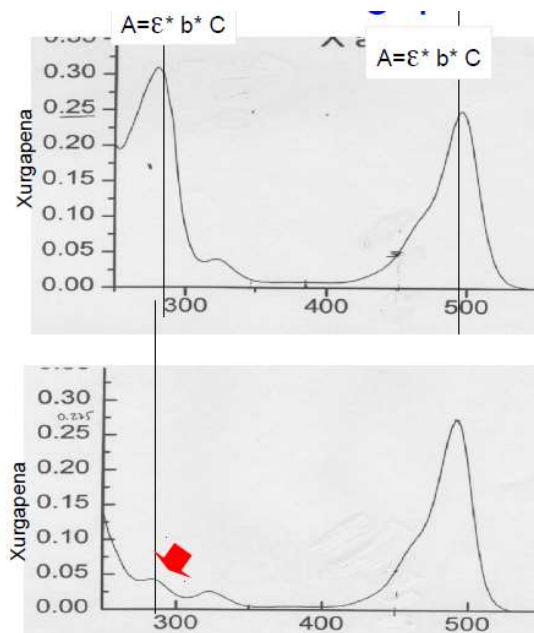




Markaketa protokoloa

Irudian ikusi daitekeen bezala lotu ez den zunda banatzeko gel iragazpeneko kromatografia erabiltzen da. Bereizketa horren ondoren, garrantzitsua da aktibitatearen determinazioa burutzea; proteinaren egonkortasuna aldatu den ala ez, aktibitate berdina daukan... Laginaren karakterizazioa ere egingo da ondoren, hori baita markaketa egitearen helburu teorikoa; xurgapen espektrua, proteinaren kuantifikazioa...





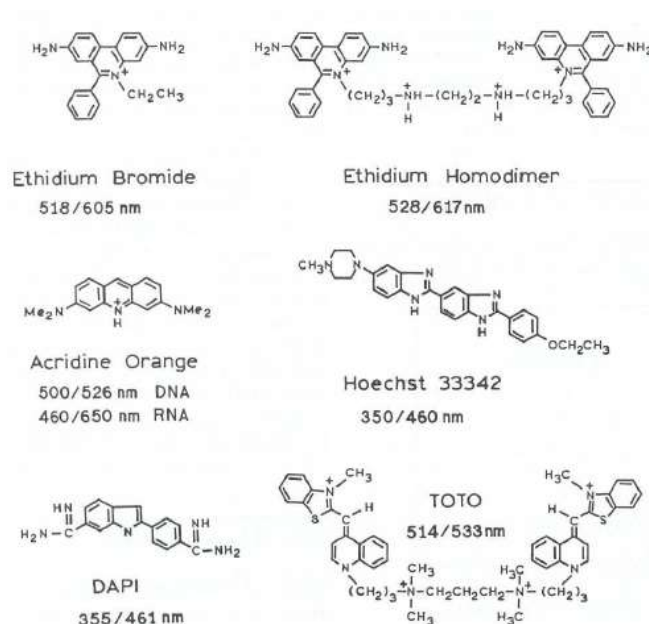
Markaketa nola joan den jakiteko proteina kontzentrazioaren eta zundaren arteko erlazioa atara dezakegu. Bien xurgapen espektruak ere egin daitezke, ezkerreko bi irudietan ikusten den bezala. Goiko irudian 280nm-tan proteinaren xurgapena ikusi daiteke eta 500nm inguruan zundarena. Beheko irudian, ordea, ez da proteinari dagokion pikoa ikusten, disoluzioan zunda bakarrik dagoela adieraziz. SDS edo gel natiboak ere egin daitezke proteina eta zunda ikusteko.

■ DNA markaketa

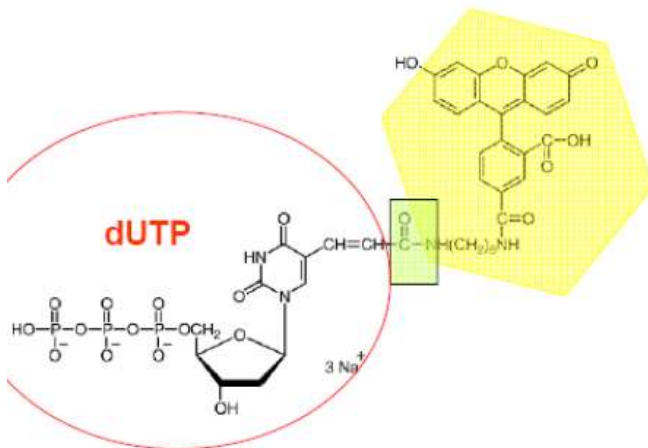
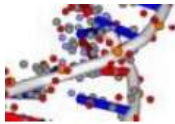
DNarentzako zundak

Orain arte **etidio bromuroa (EB)** izan da DNA markatzeko erabilitako zundarik ugariena. Gaur egun, ordea, gutxiago erabiltzen da, arriskutsua dela ikusi baita (DNA harizpi bien artean tartekatzen delako, laginean, baina baita pertsonetan ere). Disoluzioan fluoreszentziarik ez daukala kontsideratzen dugu, dsDNA-ra lotzean bere errendimendu kuantikoa 30 aldiz handiagotzen baita. (Uretan $\tau = 1.7\text{ns}$ eta DNari batuta $\tau = 20\text{ns}$).

DAPI (Hoechst 33342) beste batzuen artean, DNA markatzeko beste zunda fluoreszente mota bat da.



DNA-ren markaketarako **baseen analogo fluoreszenteak** ere erabil daitezke. Hauek oso erabilgarriak izan daitezke qPCR (PCR kuantitatibo)-etarako, fluoreszentzia neurtuz mota bakoitzeko zenbat base gehitu diren ikusi baitezakezu.



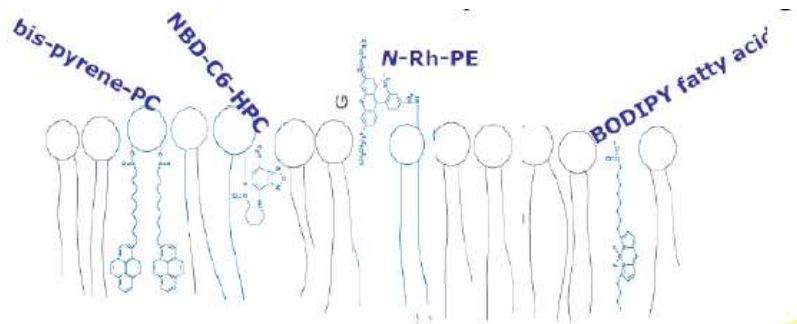
No	Dye	MW	Abs (nm)	Em (nm)
1	DAPI	-	350	456
	AMCA	450	353	442
	CB	600	396	410
2	DEAC	350	432	472
3	FITC	600	491	515
	OG-488	510	495	521
	A-488	650	493	517
	RGr	620	515	530
4	R6G	550	524	552
	Cy3	750	550	570
	TAMRA	640	547	573
5	TAMRA	640	547	573
	TxR	800	583	603
	Cy3.5	1100	581	596
6	Cy5	800	649	670
7	Cy5.5	1100	675	694
8	Cy7	1000	743	767

▪ Mintzen markaketa

Zunda ezberdinak daude mintzen markaketa ahalbidetzen dutenak:

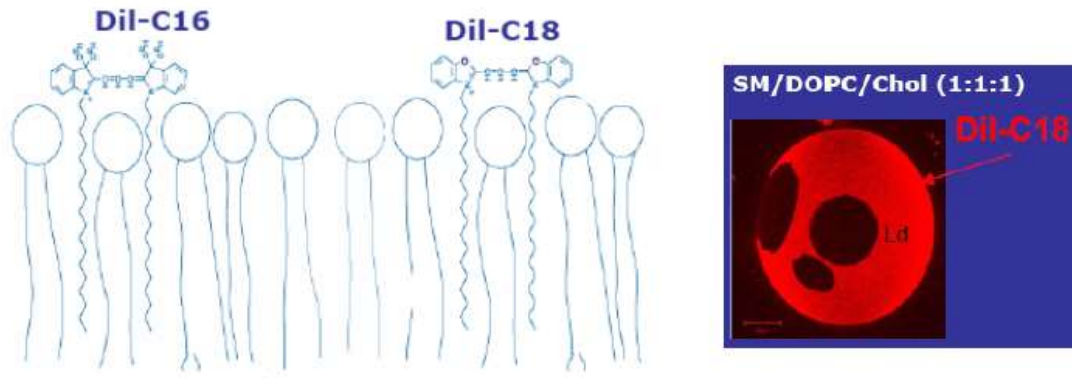
- Gantz azido eta fosfolipidoen analogoak

Analogoak berezko lipidoen berdinak dira, baina zunda txertatu batekin.

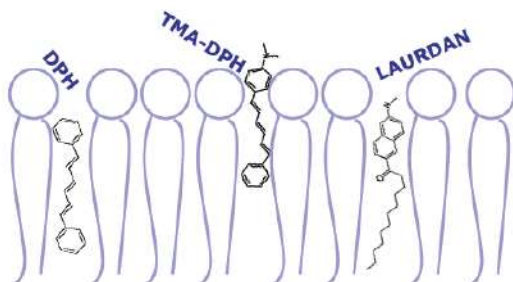


- Di-alkil-karbozianina (Dil) eta Di-alkil-aminoestirilo (DiA)

Hauek mintz fluidotan bakarrik txerta daitezke, zundak ezin baitira sartu leku zurrunetan. Beheko eskuineko irudian, esaterako, liposoma baten leku zurrunagoak beltzez agertzen dira, zundak ezin izan direnez sartu ez baitute fluoreszentziarik emititzen.



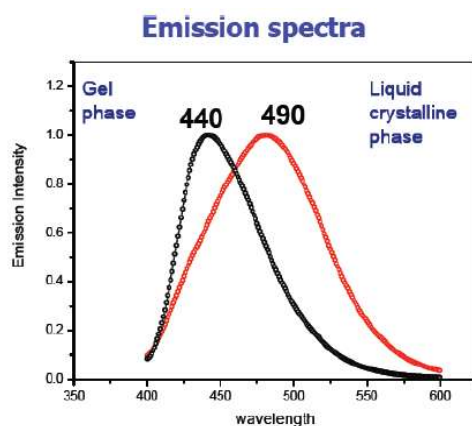
- Molekula apolar edo anfipatikoak

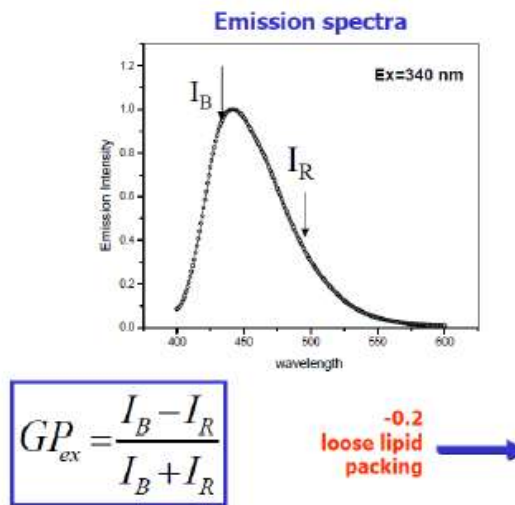


DPH edo TMA-DPH bezalako zunda hidrofobikoak daude, baina bereziena Laurdan da, anfipatikoa dena.

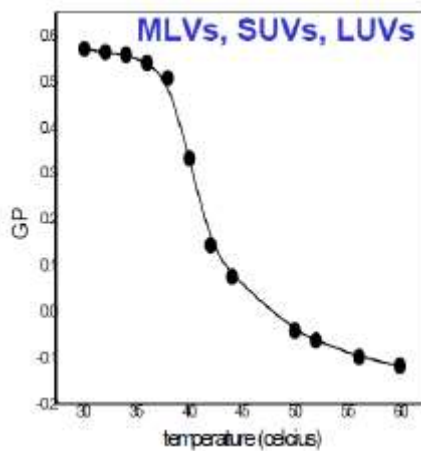
- Laurdanoa:

Ezaugarri berezi bat dauka; inguruko lipidoen arabera emisio uhin luzera maximoa aldatu egiten da.





I_B -k laurdanoa gel fasean edo ingurune zurrunean dagoela adierazten du eta I_R -k, ordea, fase likidoan. Balore horiek erabiliz goian adierazitako GP_{ex} koefizientia kalkula dezakegu. Koefiziente honen balore txiki edo negatiboek I_R handia dela adierazten dute eta beraz, laurdanoa ingurune likidoan dagoela.



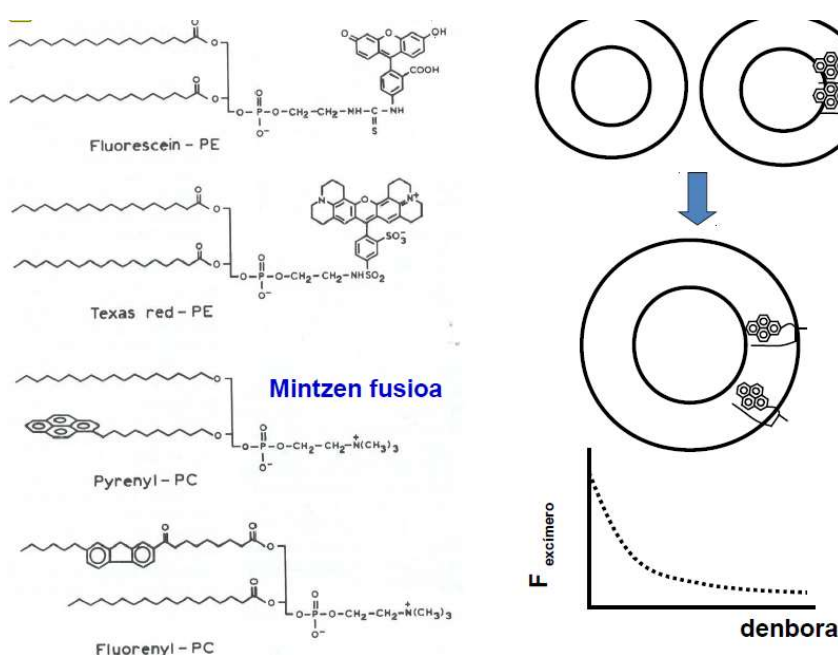
Grafikoan ikusi daiteke nola tenperatura igotzen dugun neurrian GP-a jaitsi egiten den, hau da, gel fasetik likidorako trantsisizio nola gertatzen den.

Ezaugarri hauengatik laurdanoa mintzen, besikulen...zurruntasuna neurtzeko oso erabilgarria da.

- Fosfolipidoen analogoak

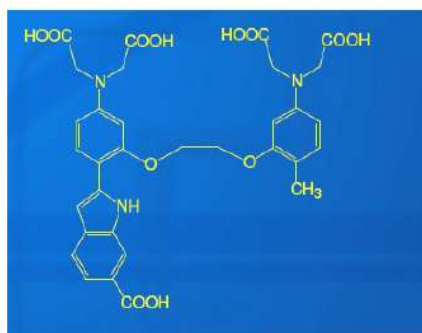
Liposomen fusioa aztertzeko erabilgarriak dira. Nola? Liposomak hartzen ditugu eta batzuk fluoreszentzia gabe uzten ditugu. Beste batzuk, ordea, Pyrenyl PC kontzentrazio altuetan jartzen ditugu. Pyrenyl PC-ek kontzentrazio altuetan extimeroak osatzen dituzte, espektru berezi bat ematen dutenak.

Orduan bi liposomak batzen direnean liposoma handiagoak sortzen dira non Pyrenyl-PC kontzentrazio baxuagoa dagoen. Hori dela eta extimero gutxiago sortuko dira eta fluoreszentziari begiratzuz behatu ahal izango dugu (liposomen fusioaren jarraipena posible eginez).



■ Ioientzako zundak

Ioien presentzia detektatzeko eta batzuk kuantifikatzeko gaitasuna daukaten zundak dira.



Katioiak

H⁺, Ca²⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺

Anioiak

Cl⁻, PO₄²⁻, Zitratoa, ATP,

Nola aukeratu dezakegu zunda egokia?

Zundak biltzen dituzten katalogoak daude.

- Disoziazio konstatea (K_d)

Erabilitako kontzentrazio tarteekin (zunda zein kontzentrazio tartetan den sentikorra jakin behar dugu) eta pH-arekin bateragarria izan behar du. Beraz kalibrazioa garrantzitsua da: zundaren K_d -a pH-arekiko, tenperaturarekiko, biskositatearekiko...dependentzia ezagutzeko eta kontutan hartzeko.

- Neurketa

Kontutan hartu behar dugu neurketak kualitatiboa (badago edo ez?) edo kuantitatiboa (zenbat dago?) izan behar duen.

- loien zundak espektruen desplazamendua agertzen dute: neurketa erratiometrikoak (aurrerago azaldu).

- Erabilgarri dauden argi iturriaren arabera ere bat edo beste hautatu ahal izango dugu

- Adierazlearen forma

- Zundaren karga, polaritatea...gure sistemarekin bateragarriak diren jakin behar dugu.

pH-arentzako zundak

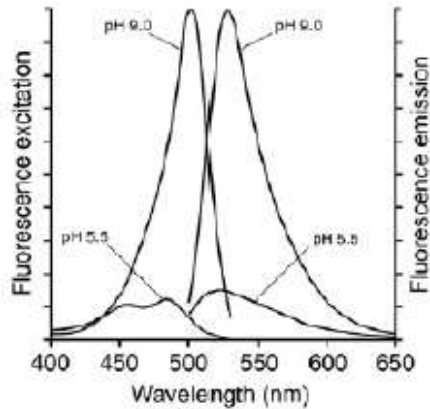
pH-aren arabera uhin luzera desberdinetan kitzikatzen dira. Uhin luzera horiek neurtuz (desberdinak) eta ratioak kalkulatzuz, pH kalkula dezakegu.

Taulan agertzen den LysoSensor Yellow/Blue, esaterako, baliagarria da lisosomak aztertzeko.

Probe	pH Range	Measurement Mode
SNARF indicators	6.0-8.0	Em. ratio 580/640 nm
HPTS (pyranine)	7.0-8.0	Exc. ratio 450/405 nm
BCECF	6.5-7.5	Exc. ratio 490/440 nm
Fluoresceins and Carboxyfluoresceins	6.0-7.2	Exc. ratio 490/450 nm
Oregon Green dyes	4.2-5.7	Exc. ratio 510/450 nm
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	3.5-6.0	Em. ratio 450/510 nm

BCECF zunda

pH intrazelularren markatzaile fluoreszente bezala oso erabilia da, bere pKa 6.98 ingurukoa izanik, bateragarria delako pH fisiologikoarekin.



pH azidoetan igorpen txikiagoak eta basikoetan askoz handiagoak erakusten ditu zunda honek.

Zunda hauek *In vivo* eta *in vitro* erabil daitezke. Adibide bezala, azalean gehitu eta azalaren geruza desberdineko pH-a kalkulatzeko erabiliak izan dira. Zenbat eta sakonago orduan eta pH-a neutroagoa dela ondorioztatu zen (azidoagotik hasita).

Kaltzioarentzat zundak

- FURA (Fura-2, Fura-4F, Fura-5F, Fura-6F, Fura-FF)
- INDO (Indo-1, Indo 5F)

Erratiometrikoak

- FLUO (Fluo-3, Fluo-4, Fluo5F, Fluo-5N, Fluo-4N)
- RHOD (Rhod-2, Rhod-FF, Rhod-5N)
- Calcium Green, Calcium Orange, Calcium Crimson
- Oregon Green 488-BAPTA

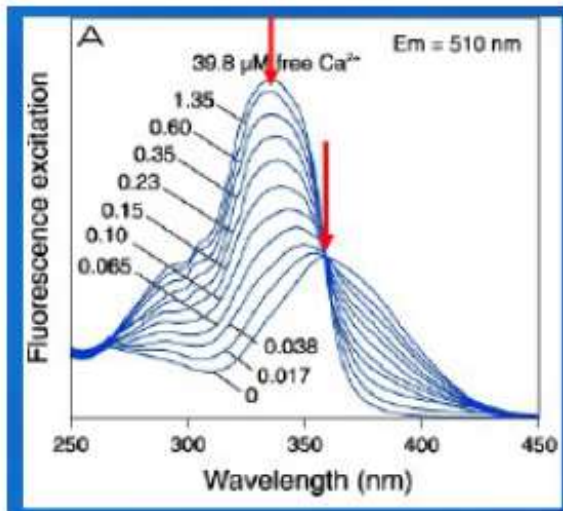
Ez
Erratiometrikoak

- Kitzikapen erratiometrikoa: FURA-2

Erratiometrikoak esan nahi du bi uhin luzera ezberdinen ratioa edo zatiketa egiten dela.

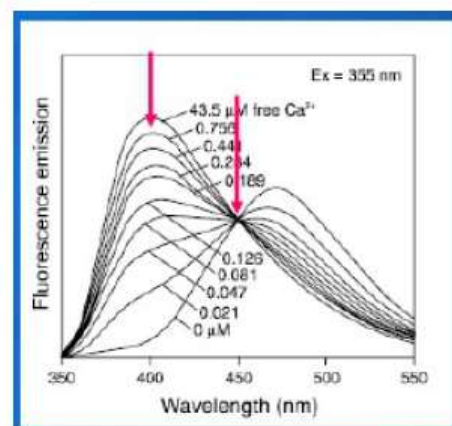
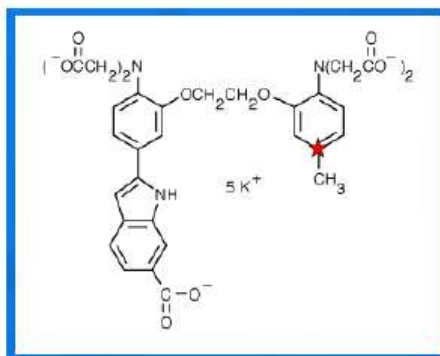
FURA-2 neurketa mota hau egiteko oso erabilgarria den zunda da. Mikroskopian asko erabiltzen da eta kitzikapenaren desplazamendu ona erakusten du Ca^{2+} arekin. Erlazioa edo ratioa 340-350/380-385nm artean egiten da.

Fura-2 ona da zelula barneko neurketetarako, Kd bateragarria baitauka. Hala ere, badaude beste Fura batzuk beste tarte batzuetan direnak kaltzioarekiko sentikorrak.



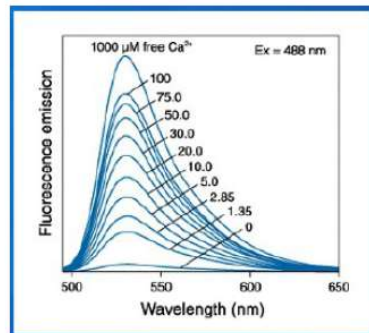
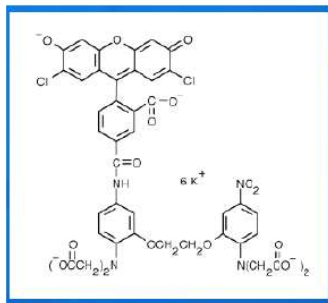
Indicator	$K_d(\text{Ca}^{2+})$
Fura-2	0.14 μM
Fura-5F	0.40 μM
Fura-4F	0.77 μM
Fura-6F	5.30 μM
Fura-FF (5,6)	35 μM

Fura zundak kitzikapen ratioan oinarritzen dira, baina igorpenean ere oinarritu gaitzeko, esaterako Indo-1 edo Indo-5F bezala. Indo-1 oso erabilia da fluxu zitometrian eta erlazioa 450 eta 405nm artean ateratzen da.



- Ez erratiometrikoa: Calcium Green-5N

Neurketa ez erratiometrikoetan zuzenean hartzen da kontutan uhin luzera maximoaren intentsitatea. Kaltzioa lotuta ez dagoenean ez dauka ia fluoreszentziarik, baina kaltzio kontzentrazioak gora egiten duen neurrian, fluoreszentziak ere hala egiten du. Afinitate txikia du eta beraz erabilera mugatua. Hala ere, kaltzio askapenaren zinetika azkarrek aztertzeke erabiltzen da.



"in vivo"

markaketa

Markaketa teknikak

GFP
FLASH-EDT2

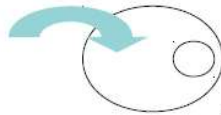
Lokalizazioa *in vivo*

FRET analysis
BiFC analysis
Multicolor BiFC analysis

Elkarrekintza *in vivo*

Barneraketa Mekanikoa

Proteina Markatuak
DNA Markatua
Materiale Genetikoa

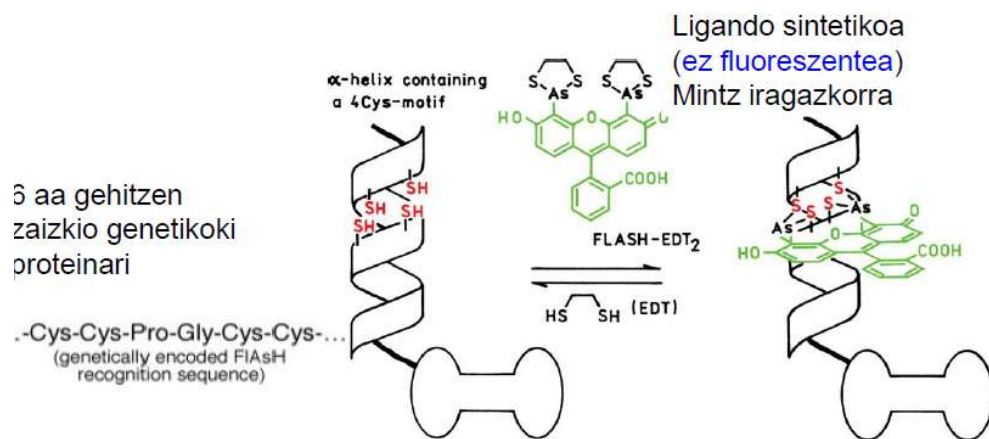


- GFP proteina:

Adierazpen plasmido batean GFP sekuentziaren ondoan txertatzen da gure intereseko proteina. Zelula edo organismo batean txertatzean gure molekula GFP proteinari lotuta adieraziko da eta beraz, intereseko proteina horren jarraipena egin ahal izango dugu. Fusio proteinak erabiliz egiten den markaketa hau homogeneoa da, proteina guztiak adieraziko baitira GFP-ari lotuta.

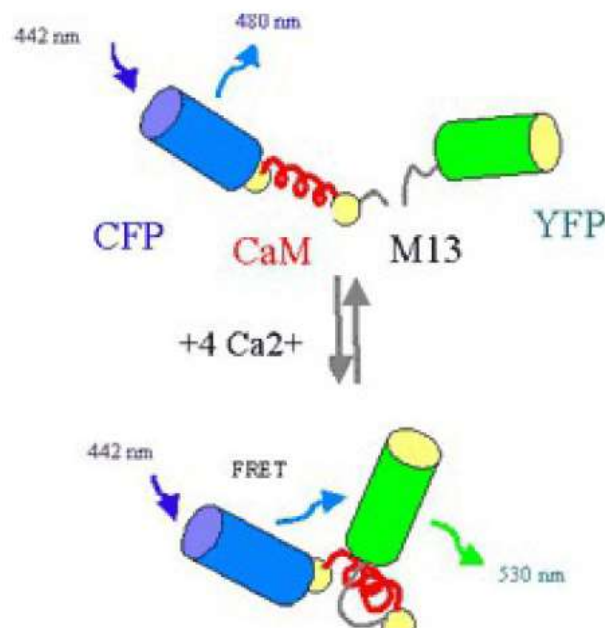
- FLASH-EDT2 Markaketa (FLASH tag)

6 aminoazidoko sekuentzia bat txertatu behar zaio intereseko proteinari. Hauek alfa helize batean kokatu eta disulfuro zubiak sortzen dituzte. FLASH-EDT2 (ligandoa) botatzean eta 6aa-ko sekuentzia hortara batzean, bere errendimendu kuantikoa asko handitzen da (aske dagoenean ez dau fluoreszentea) eta fluoreszentsia emititzen du.



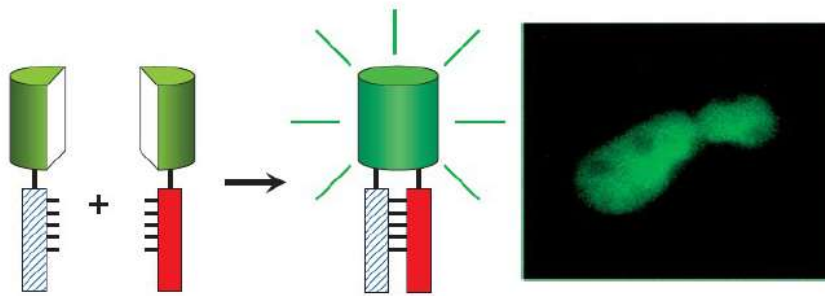
- FRET (Föster resonance energy transfer)

Kalmodulinaren konformazioaren arabera CFP eta YFP zundak elkartu edo urrundu egiten dira. Kaltzioa gehitzean zundak gertu gelditzen dira kalmodulinak hartzen duen formagatik. Urrun daudenean emisioa 480 nm-tan ikusiko dugu, argi urdina. Gertu daudenean, ordea, zunda urdina kitzikatzen dugu, baina honek energia transferitzen dio berdeari eta berdearen emisioa 530nm-tan ikusiko dugu. FRET agerpen hau neurtuz, kaltzioaren presentzia detektatu dezakegu.



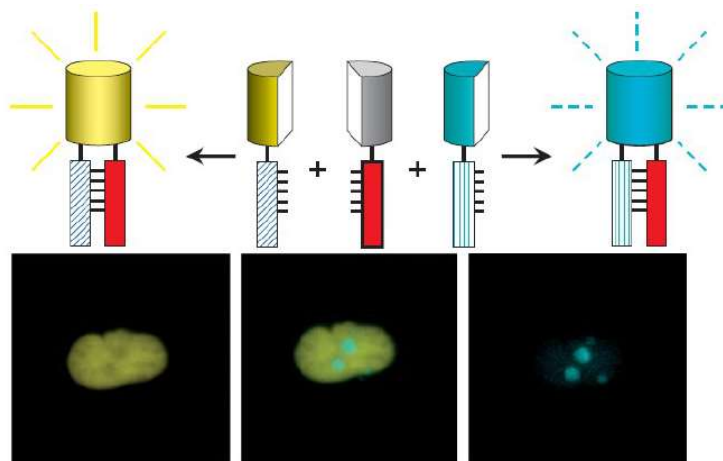
- BiFC analysis (Biomolecular Fluorescence Complementation)

Bi proteinen arteko elkarrekintza bat ikusteko erabiltzen da teknika hau. Fluoroforo baten egituraren erdia proteina bati ematen zaio eta beste erdia beste bati. Proteinak aske daudenean ez dugu fluoreszentziarik ikusiko, baina elkartzean zunda ere elkartuko denez, fluoreszentzia igorriko du.



- Kolore anitzeko BiFC analisia

Proteina batek beste bi proteina ezberdinekin dituen elkarrekintzak aztertzeko (zeinekin non eta noiz) erabiltzen da teknika hau. Intereseko proteinari zunda bat gehitzen zaio eta beste bi proteinei beste bana, desberdinak. Gure intereseko proteina horren zunda beste biekiko osagarria izango da, baina elkartzean uhin luzera ezberdinetan (kolore ezberdinarekin) igortzen dute fluoreszentzia. Horrela, koloreei soilik begiratuta elkarrekintzak desberdindu ditzakegu.



Barneraketa mekanikoa

Proteina markatuak, DNA markatua edo materiale genetikoa zeluletan barneratzeko teknika ezberdinak daude.

- Elektroporazioa

Zunda eta zelula nahastu egiten dira, lagina boltai altuko pultsu laburretara esposatuz. Pultsu horien ondorioz mintza permeabilizatzen da, konposatuen sarrera ahalbidetuz. Zelula batzuek bakarrik txertatzen dute DNA berria eta proteina adierazi. Beraz, markaketa ez da homogenea eta zelula transfektatuak aukeratu egin behar dira.

- Mikroinjekzioa

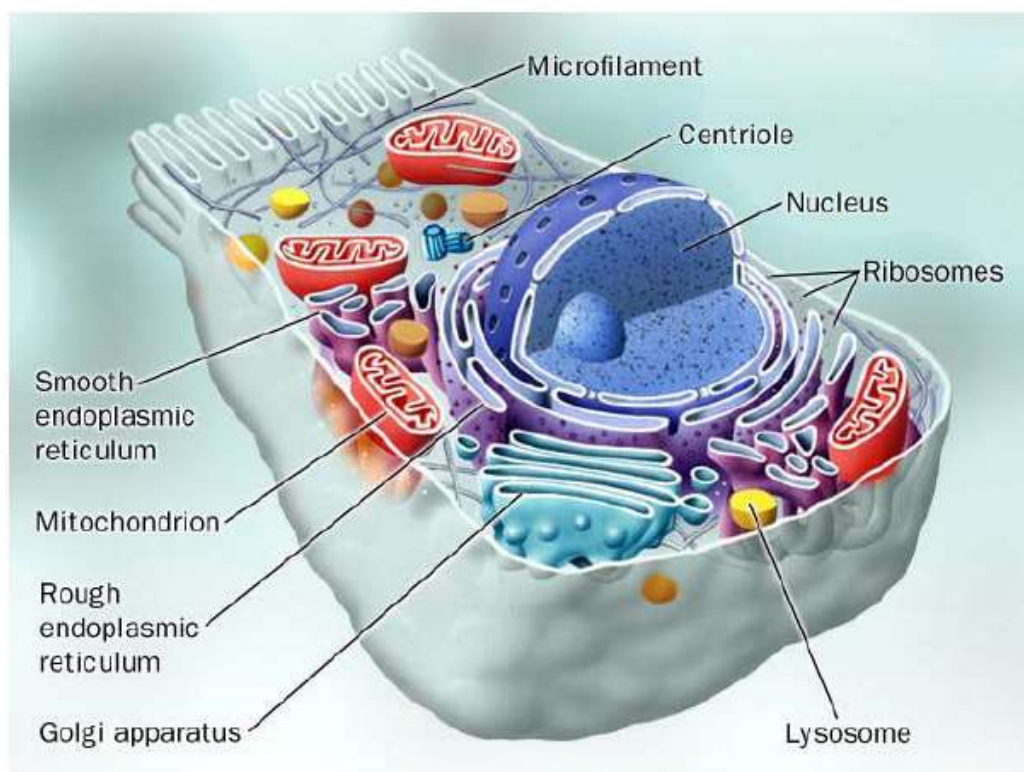
Mikroskopia bat erabiltzen da zelulak maneiatzeko eta zeluletan DNA exogeno baten barneraketa emateko. Berriz ere markaketa ez da homogenea eta zelula transfektatuak aukeratu egin behar dira.

- Biolistika

- Arto transgenikoa eratzeko metodo erabiliena da (normalean landareekin erabiltzen da teknika hau).
- DNA urre/tungsteno partikula finen gainean gehitzen da.
- Kailu ehunaren aurka jaurtitzen dira eta DNA exogenoaren barneraketa ematen da.
- Markaketa ez da homogenea eta zelula transfektatuak aukeratu egin behar dira.

Organuluen markaketa

Katalogoak daude organuluak nahi duzun koloreekin markatzeko. Behin organuluak markatu dituzula, proteina GFP-arekin markatu dezakezu eta kolokalizazioari begiratuz, zure proteinaren lokalizazioa ezagut dezakezu.



Iraungitzea (Quenching)

Orain arte molekulen barnean ematen diren erlaxazio motak aztertu ditugu eta orain, aldiz, molekulen artean eman daitezkeen erlaxazio mota edo aukerak aztertuko ditugu. Iraungitzea fluoreszentiaren intentsitatearen gutxipen bat dakarren prozesua da, eta bi talde nagusi daude:

- Molekula egoera kitzikatuan dagoen bitartean ematen dena. Talkak eragindako iraungitzea, energiaren transferentzia, karga transferentziazko erreakzioak
- Molekula egoera basalean dagoenean ematen dena, konplexuak eratuz.

Orokorrean bost motako prozesu daude:

1. Egoera kitzikatuan gertatutako prozesuren baten eraginez.
2. Berrantolaketa molekularra
3. Erresonantzia bidezko energia transferentzia (RET)
4. Talkak eragindako iraungitzea edo dinamikoa (QD)
5. Konplexuen eraketa egoera basalean edo iraungitze estatikoa (QE)

Talkak eragindako iraungitzea, dinamikoa (QD)

Kitzikatuta dagoen fluoroforoak talka egiten du beste atomo edo molekula batekin, eta horrek erlaxazio ez igorlea eragingo dio, hau da, fotoirik igorri gabe erlaxatzea. Ondorioz, fluoreszentiaren intentsitate jaitsiera bat egongo da. Iraungitzaile ohikoenak O_2 , I^- , CS^+ eta akrilamida dira. Prozesu hau aztertzeko **Stern-Volmer-en ekuazioa** erabiltzen da:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q]$$

F_0 = fluoreszentzia intentsitatea iraungitzaile gabe

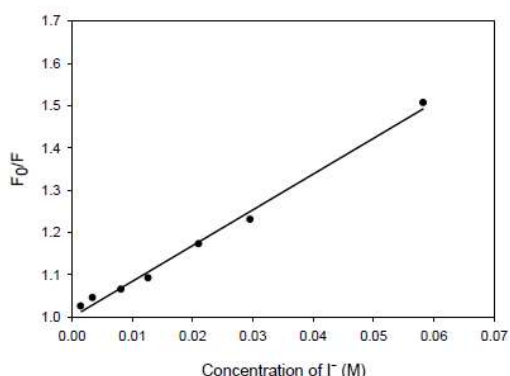
F = fluoreszentiaren intentsitatea iraungitzailearekin

$[Q]$ = iraungitzailearen kontzentrazioa eta

K_{sv} = **Stern-Volmer-en iraungitze Ktea**

F_0/F frakzioaren balioa iraungitzailearen kontzentrazioaren araberakoa izango da. F_0/F vs $[Q]$ irudikapena egiten badugu, ateratako zuzenaren malda K_{sv} izango da. K_{sv} , K_D moduan ere adierazi daiteke (konplexuaren disoziazio konstantea), eta azken hau bi faktoreren menpekkoa da. Alde batetik, iraungitzearen abiadura konstante biomolekularra (K_q), zeina fluoroforo eta iraungitzailearen difusio koefizienteen araberakoa izango den. Bestetik, iraungitzailearik gabeko egoera kitzikatuaren bizi denbora (T_0). Beraz, zuzenaren maldaren balioa fluoroforo eta iraungitzailearen difusio eta egoera-kitzikatuaren bizi-denboraren menpekkoa izango da.

Adibidez, fluoreszeinaren kasua ioduroaren (I^-) presentzian:



$$K_{SV} = K_D \sim 8 \text{ M}^{-1}$$

$$K_D = k_q \tau_0$$

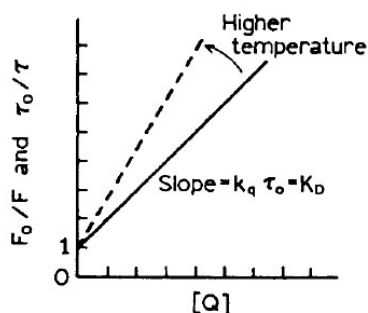
fluoreszeina/ioduroa

$$\tau = 4 \text{ ns}$$

$$k_q \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

Esan bezala, iraungitze dinamikoan zuzenaren malda (K_D) difusio eta kitzikapenaren bizi denboraren arabera da, eta beraz, molekulen difusioan eragina daukan edozerrek eragina izango du. Tenperaturak eragin handia dauka molekulen difusioan, hau handituz, eta ondorioz K_q -ren balioa aldatu egingo da. Beraz, iraungitze dinamikoaren aurrean bagaude, tenperatura igoz maldaren eta iraungitzearen handipen ba ikusi beharko da.

Biskositatea handitzeak ere eragina izango du, izan ere, talkak gertatzea oztopatuko du, iraungitzea gutxituz. Gainera, iraungitze dinamikoaren kasuan F_0/F T_0/T erlazioa berdina izango da iraungitzaile edo iraungitzailearik gabe, hau da iraungitzailearen kontzentrazioaren arabera izango da fluoroforoaren bizi denbora, baina xurgapen espektroak berdinak izango dira (fluoroforoak berdin kitzikatuko dira). Faktore guzti hauek prozesu honen ezaugarri bereizgarriak dira.

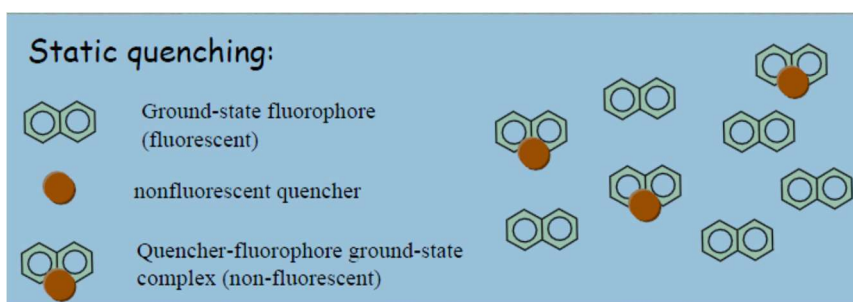


$$F_0/F = \tau_0/\tau$$

$$\tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

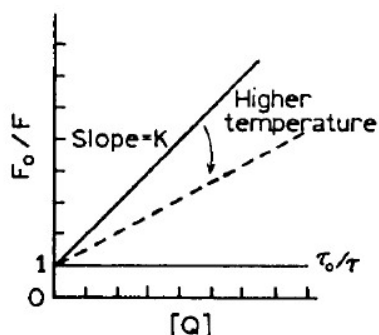
Konplexuen eraketa egoera basalean, iraungitze estatikoa (QE)

Kasu honetan fluoroforo eta iraungitzailearen arteko elkarrekintzak egoera basalean ematen dira, konplexu egonkorak eratuz, eta behin konplexua eratuta fluoroforoa ez da kitzikagarria izango. Ondorioz, fluoreszentzia intentsitatea jaitsiko da.



Kasu honetan iraungitzaileak ez du fluoroforoaren bizi denbora aldatzen. Iraungitzailearekin lotuta dagoenean ez da kitzikatuko, baina ez badago lotuta beti denbora berdinez kitzikatuko da. Beraz, hau dinamiko eta estatikoaren artean bereizteko modu bat izango da.

Tenperaturari dagokionez, temperatura igotzean dinamikoan iraungitze prozesua handitzen den moduan, estatikoan gutxitu egiten da, tenperaturak konplexuen eraketan eragina izango duelako hauen disoziazioa eraginez. Ondorioz, molekula gutxiago egongo dira konplexuak eratzen eta iraungitzea gutxitu egingo da (K_s , konplexuaren asoziazio konstantea eta malda txikitu). Beraz, kasu honetan K_s ez da difusioaren araberakoa izango, baizik eta asoziazioaren menpekkoa.



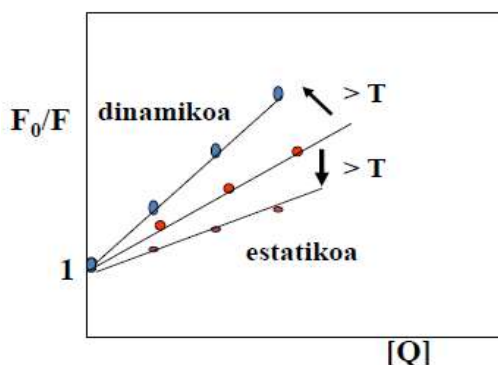
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q]$$

$$K_s = \frac{[FQ]}{[F][Q]}$$

Kasu honetan, biskositateak ez du eraginik izango iraungitze prozesuan. Bizi denbora ere ez da aldatuko iraungitzailearen presentzian, fluoreszentzia jaitsieraren arrazoia kitzikatzea daitezkeen fluoroforo gutxiago daudela delako, baina kitzikapen maila berdina dute. Eta azkenik, xurgapen espektroari erreparatuz, iraungitzailearekin edo gabe ezberdinak izango direla ikusiko dugu, iraungitzailearen presentzian fluoroforoak kitzikagarritasuna galduko duelako eta ez du fluoreszentziarik igorriko.

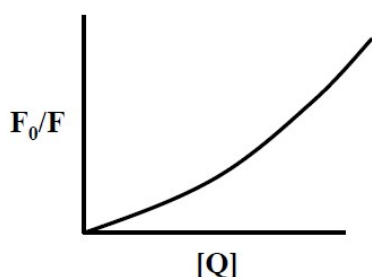
- **Laburbilduz:** hainbat faktore eta beren eragina erreparatuz, iraungitze dinamiko edo estatikoa den jakin daiteke.

Faktorea	Iraungitze dinamikoa	Iraungitze estatikoa
Tenperatura igotzea	handitu	gutxitu
Biskositatea igotzea	txikitu	Eraginik ez
Bizi denbora	aldatu	Ez da aldatuko
Xurgapen espektroa	berdinak	ezberdinak



Iraungitze konbinatua

Kasu honetan bi prozesuak ematen dira, estatikoa eta dinamikoa. F_0/F vs $[Q]$ irudikapena egiten badugu goranzko kurba bat azalduko da. Hau, prozesuen biderkaketa egin eta berrekeak bat lortzen delako gertatzen da.



F_0/F versus $[Q]$
Gorantza kurbatuta dagoen kurba

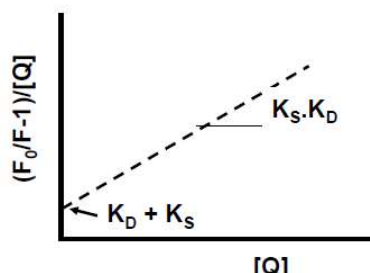
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{app}[Q]$$

$$F_0/F = (1 + k_q \tau_0 [Q]) (1 + K_s [Q])$$

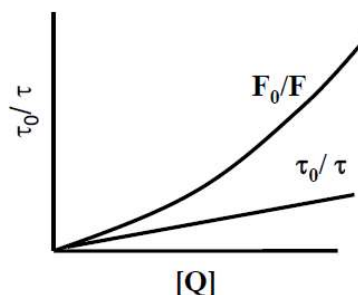
$[Q]^2$
→ Kurbatura gorantza

Konstante aparentea (K_{app}) erabiliz zuzen bat lortuko dugu, bertatik konstanteen balioak lortuz. Konstante aparentea lortzeko:

$$\begin{aligned} \frac{F_0}{F} &= (1 + K_D [Q])(1 + K_S [Q]) \\ &= 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \\ &= 1 + K_{app}[Q] \\ K_{app} &= \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} \\ \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} &= K_D + K_S + K_D K_S [Q] \end{aligned}$$

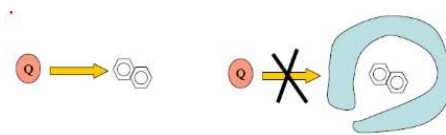


Eta bizi denbora irudikatuz ere zuzen bat lortuko dugu.

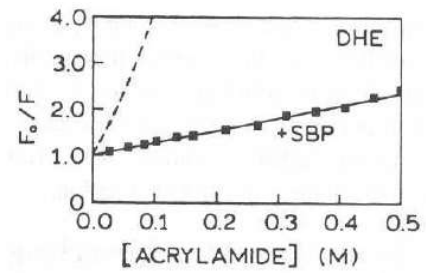


Eskuragarritasunaren eragina

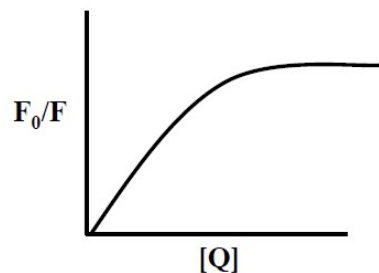
Fluoroforoaren eskuragarritasunak eragin handia dauka iraungitze prozesuen efizientzian. Gainontzeko faktore guztiak konstante mantenduz, iraungitzea eskuragarritasun honen menpekoa izango da, fluoroforoa iraungitzailetik babestua badago iraungitzailearen efektua oztopatuko delako.



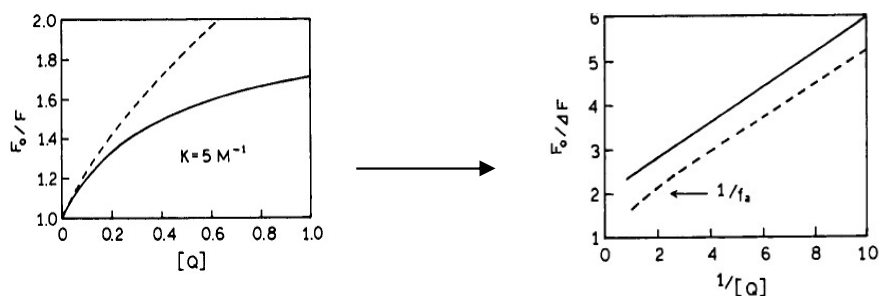
Adibidez, grafikoan kasu konkretu bat ikusi daiteke, non dihidroesterola soluzioa edo SBP-ari batuta dagoen. Goiko zuzena (bertikalena) soluzioan dagoen dihidroesterolari dagokio, eta iraungitzea askoz ere efizienteagoa dela ikus daiteke. Behekoan aldiz, SPB proteinari lotuta dagoenari dagokio, ez da hain eskuragarri egongo eta ikusten a prozesua motelagoa dela.



Eskuragarritasun ezberdineko fluoroforoak ditugun kasuan, grafikoan talka bidezko iraungutze ez lineala ikusiko dugu, bi fase egongo balira bezala. Hau fluoroforo batzuk eskuragarri daudelako eta beste batzuk ez daudelako eskuragarri gertatzen da. Beraz, lehenengo eskuragarri daudenak iraungiko dira, zuzen bat emanez, baina behin horiek bukatu direla eskuragarri-ez daudenak soilik geratuko dira eta ez da iraungitzerik emango, kurba eraginez.

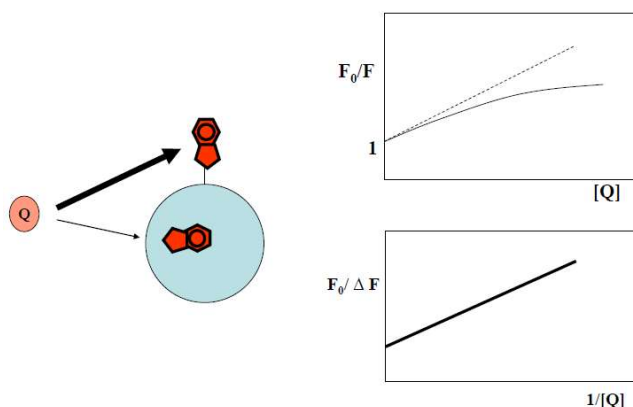


kasu honetan, beste irudikapen bat egingo da eraldapen baten bidez, modu lineal batean jartzeko eta informazioa atera ahal izateko: **Stern-Volmer-en irudikapen eraldatua**. Honek eskuragarri dagoen fluoroforo frakzioari buruzko informazioa emango digu, b puntua $(f_a)^{-1}$ izanik, eta malda $(f_a K_a)^{-1}$.



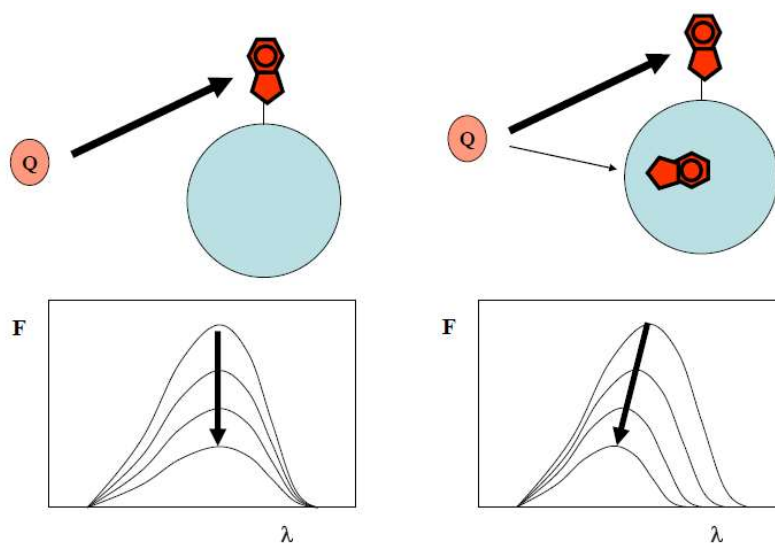
$$(F_0/\Delta F) \text{ vs } 1/[Q] \quad \Delta F = F_0 - F$$

Adibidez, trisptofano eskuragarritasun ezberdina duten proteinen kasua:

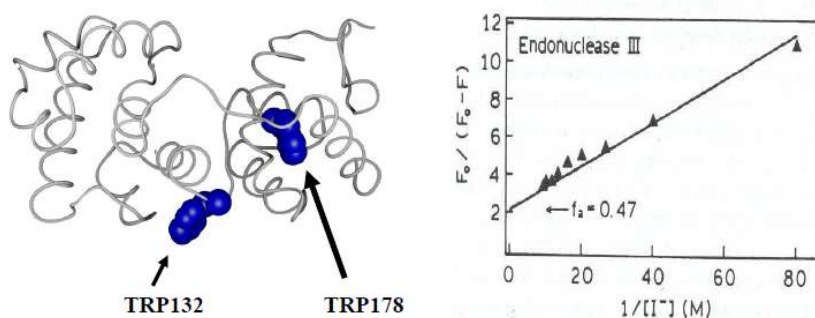


Eskuragarri dagoen fluoroforo bakarria daukagun kasuan, igorpen espektroa egitean zenbat eta iraungitzaile gehiago izan igorpen gutxiago ikusiko dugu. Eskuragarri zein ez-eskuragarri dauden fluoroforo ezberdinak ditugun kasuan aldiz, bi prozesu ikusiko ditugu. Alde batetik zenbat eta iraungitzaile gehiago izan igorpen gutxiago nabarituko dugu.

Eta bestetik, espektroaren desplazamendua. Desplazamendu honen arrazoia ondorengoa da: eskuragarri dagoen fluoroforoa kanpoaldeko ingurune polarrean egongo da, eta babestuta daudenak aldiz barnealdeko ingurune apolar batean. Beraz, iraungitzaile kontzentrazioa igotzean, eskuragarri daudenak kitzikatu eta fluoreszentzia igorriko dute, baina babestutakoen aportazioa geroz eta handiagoa izango da. Hauek ingurune apolar batan daudenez, uhin luzera txikiagoan xurgatuko dute, espektroa desplazatuz. Desplazamendu ha ez da gertatuko fluoroforo bat daukagun kasuan.

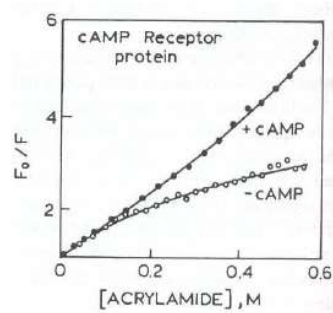
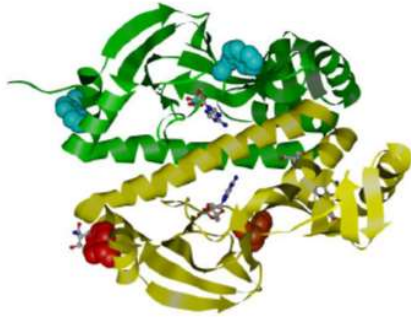


Adibidea: endonukleasa III proteina. Trp132 fluoroforoa eskuragarri dauka eta Trp178 babestua eta beraz, ioduro iraungitzailea gehitzean eskuragarritasun ezberdina izango dute biek. Iraungitako zatikia 0,5 da eta honek adierazten digu bi fluoroforoak igortzen dutela iraungitailerik gabe.

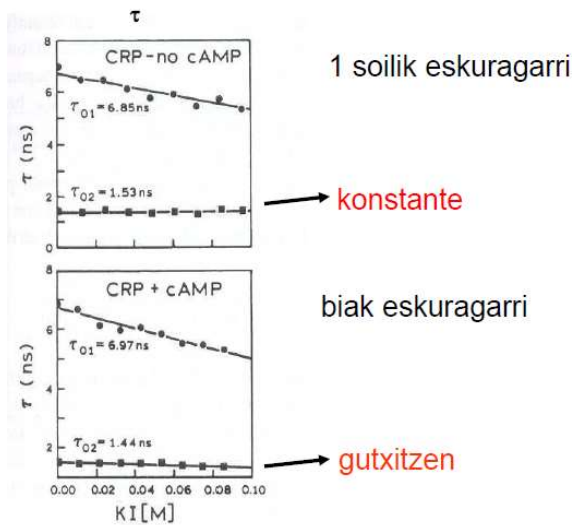


Adibidea: CRP proteina (AMPC hartzailea).

Kasu honetan Trp13 eta Trp85 ditugu, eta konformazio aldaketa bat ematen da. AMPc-ren presentzian zuzen bat lortzen da, eta AMPc-rik gabe aldiz bi faseko kurba. Hemendik ondorioztatzen da AMPc-rik gabe bi fluoroforoetatik bat dagoela eskuragarri, eta AMPc-ren presentzian konformazio aldaketa baten bidez biak geratzen dira eskuragarri, zuzen bat lortuz.



Bizi denborak neurtuz gero ere gauza bera ikusten da:



AMPC-ren presentzia bi fluoroforoen bizi denborak gutxitzen dira. AMPC-rik gabe aldiz, baten bizi denbora gutxitu eta bestea konstante mantentzen da.

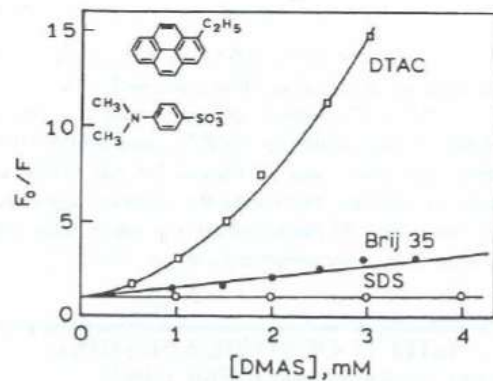
Karga elektrikoaren eragina

Ingurunea kargatuta egoteak eragina dauka iraungitze prozesuetan, eta frogatzeko hainbat esperimendu egin dira.

❖ *Karga ezberdineko hiru lipido ingurune ezberdin*

1-etil-pireno fluoroforoa eta iraungitzailea (negatiboki kargatutako DTAC) hiru lipido ingurune lipidiko ezberdinetan jarri dira, karga ezberdineko mizeletan. Ingurune bat positiboki kargatua (DTAC), bestea negatiboki kargatua (SDS) eta azkena mistoa (Brij35).

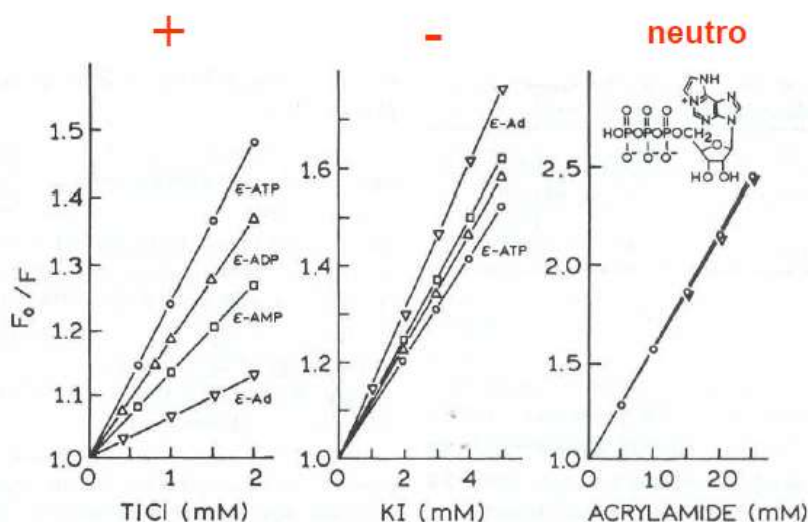
Mizela negatiboen kasuan ikusi da iraungitzearen efizientzia ez dela aldatzen iraungitzaile kontzentrazio ezberdinetan, baina bai mizela positiboen kasuan. Mizela mistoetan aldiz erdiko egoera bat lortzen da.



Honekin ondoriozta daiteke karga elektrostatikoko negatiboak fluoroforoa iraungitzailearekin kontaktuan jartzea oztopatzen duela, aldentze prozesu bat eman eta iraungitzea gutxituz. Karga positiboak berriz, erakarpen indar bat eragiten du, iraungitze prozesuan lagunduz.

❖ Fosforilazio maila ezberdineko -ATParen iraungitzea

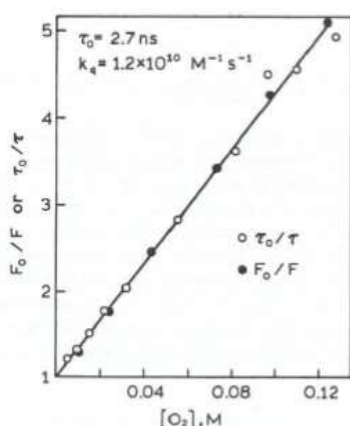
Fosforilazio maila ezberdineko ATP molekulak ditugu (-1,-2,-3), zeinek zenbat eta fosfato gehiago izan karga negatiboagoa izango duten. Eta iraungitzaile ezberdinak erabiliko ditugu. Alde batetik karga positiboko iraungitzaileak erabiltzean (Talioa, Tl^+), zenbat eta fosfato talde gehiago izan orduan eta iraungitze efizienteagoa gertatuko da. Bestetik, karga negatiboko iraungitzaileak erabiltzean (I^-), zenbat eta fosfato talde gehiago izan orduan eta efizientzia baxuagoarekin gertatuko da iraungitzea. Azkenik, karga neutroko iraungitzaileak erabiltzean (akrilamida) ez da ezberdintasunik emango, iraungitzea berdin gertatuko da fosfato talde ezberdinekin.



Hainbat adibide

❖ O_2 -k eragindako Trp-ren iraungitzea

Oxigenoak triptofanoaren fluoreszenzian nola eragiten duen aztertu da, fluoreszentzia aldaketa eta bizi denborak neurtuz. Bizi denborak neurtzean ikusi da F_0/f eta T_0/T irudikatzean bi zuzenak malda berdina dutela. Hau da, bien maldak proportzionalki aldatu dira, eta beraz, iraungitze dinamikoa izango da.



$$K_D = k_q \tau_0$$

$$K_D = 32.5 M^{-1}$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_D [O_2]$$

$$[O_2] = 1/K_D = 0.031 M$$

%50 iraungitzen da

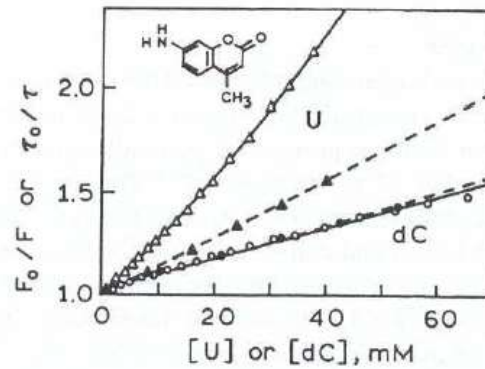
• O_2 -ak Trp-a iraungitzen du → lagina degasifikatzea komeni da

❖ Kumarinaren iraungitzea

Kumarinaren fluoreszentzia neurtzeko bi sustantzia ezberdin jarri dira kontzentrazio ezberdinetan, uridina eta deoxizitidina. Uridinaren kasuan bi zuzen ezberdin azaltzen dira, bata F_0/f -ri dagokiona eta bestea T_0/T -ri dagokiona. Gainera, kurba nabari da batean eta beraz, iraungitze konbinatua da. Deoxizitidinaren kasuan aldiz bi maldak berdinak dira, hau da, iraungitze dinamikoa.

Uridina erabiliz (τ_0/τ ▲ ; F_0/F Δ)

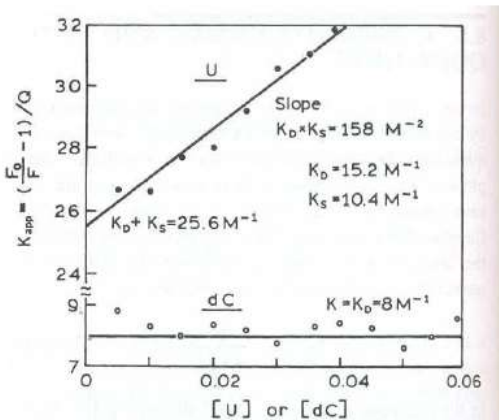
Deoxizitidina erabiliz (τ_0/τ • , F_0/F ○)



Mekanismoa konbinatua denean konstante aparentea erabiliz egingo dugu irudikapena, hau da, $K_{app} = (\frac{F_0}{f} - 1)/[Q]$ vs $[Q]$. Kasu honetan zuzenaren malda $K_D K_S$ izango da eta y ardatzeko ebaki puntua $K_D + K_S$.

U malda = $K_D \cdot K_S = 158 \text{ M}^{-2}$ b = $K_S + K_D = 25.6 \text{ M}^{-1}$

dC $K = K_D = 8 \text{ M}^{-1}$



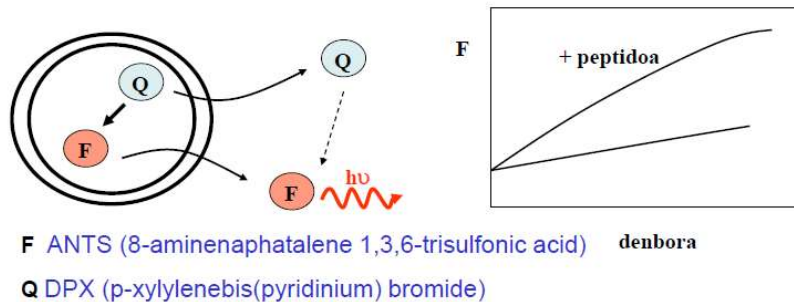
Iraungitze prozesuen aplikazioak

Iraungitze prozesuetan oinarrituz beste hainbat informazio lortu edo beste hainbat prozesu jarraitu daitezke. Bestak beste:

❖ Mintz batean zeharreko difusioaren neurketa

Kasu honetan mintzaren iragazkortasun maila neurtzeko iraungitze prozesuak baliagarriak dira. Hipotesia da erabiliko dugun peptidoak poroak sortuko dituela mintzean. Beraz, peptido horretan DPX iraungitzailea eta ANTS fluoroforoa sartzen dira liposoma batean enkapsulatuta eta peptidoak poroak sortzen baditu mintzean, hauek liposomatik irten eta fluoreszentzia neurtu ahalko dugu.

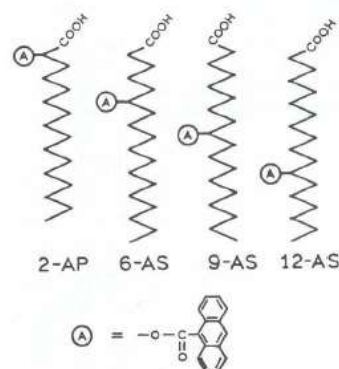
Hori da ondorengo grafikoan ikus daitekeena: pixkanaka eta konstante igotzen doan zuzeneko kasuan ez dago peptidorik. Azkarrago igotzen den fluoreszentziaren kasuan peptidoa dago, peptidoak poroak eratu dituelako mintzean eta fluoroforoak askatu, fluoreszentzia igorpena handituz.



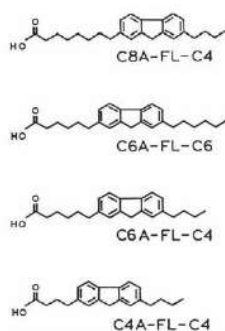
❖ Fluoroforoaren mintz barneko kokapenaren azterketa

Honen bidez jakin nahi da fluoroforoa mintzaren barnean zein posizio edo kokapenean dagoen. Iraungitze prozesuak iraungitzaile eta fluoroforoaren arteko elkarrekintzen araberakoa denez, bien arteko distantzia edo posizioak eragina izango du.

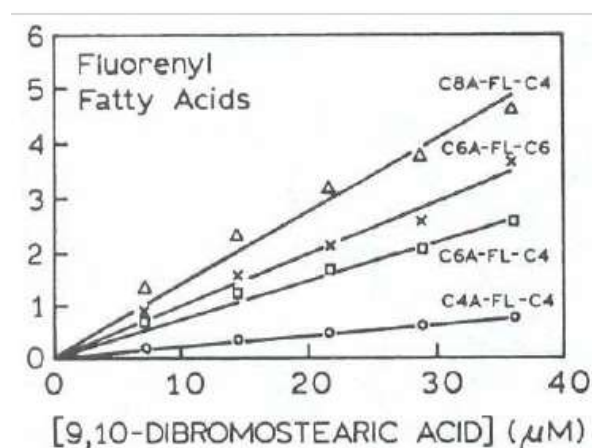
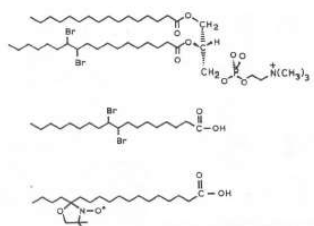
Zundak erabiliko dira, baina zunda bakoitzean fluoroforo (A) eta iraungitzailearen arteko distantzia ezberdina izango da. Iraungitzailea azido 9,10-dibromoestearikoa izango da eta bromo atomoak izango dira iraungitze prozesuaren eragile. Iraungitze prozesuaren efizientzia maximoa fluoroforo eta iraungitzailea kokapen berdinean edo elkarrengandik gertu daudenean ematen da. Beraz, hau jakinda, alderantzizko prozesua ere egin daiteke: fluoreszentziak neurtuz distantziak kalkula daitezke, eta kokapenak lortu.



zundak



Lipidoen batutako iraungitzaileak



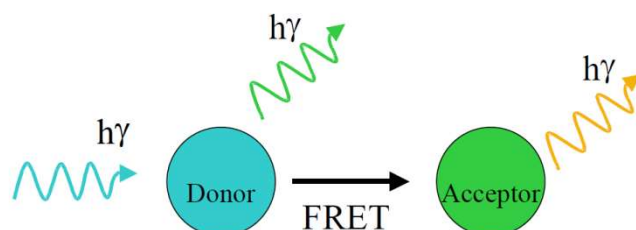
FRET (FÖSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER)

RET (Resonance Energy Transfer) izena hartzen du orokorrean, eta horretan oinarritzen diren prozesu desberdinak izango ditugu. Horietako bat FRET izango da, izen hau hartzen du, Förster izan baitzen fenomeno hau erabiltzen lehenengoa.

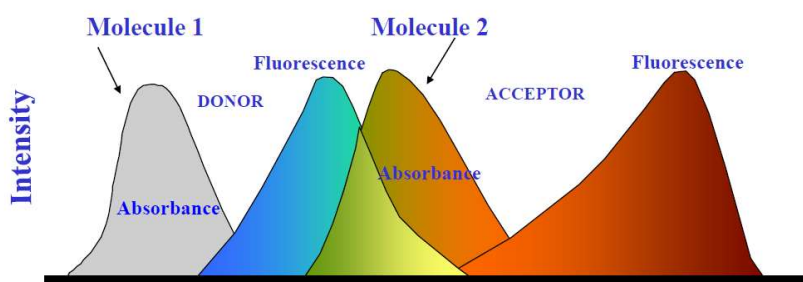
Prozesu honetan, fotoi bat xurgatzen duen emaille bat izango dugu, molekula hau kitzikatu eta egoera kitzikatura pasako da. Molekula kitzikatu hau, fotoia igorrita erlaxatu daiteke, edo fotoia hartzaile batek hartu (energia moduan transferitu), hau da, hartzaileak emailetik xurgatuko du energia.

Fotoia igorriko duena hartzailea izango da, eta hau erlaxatzean emango da hurrengo fotoiaren askapena. Bien artean erresonantzia bidezko transferentzia ematen da, eta transferentzia hau ez da igorlea izango.

Emaillearen fluoreszentzia aztertuta, honen intentsitatea eta bizi denbora murriztu egiten dira hartzailearen presentzian. Hartzailea behatzen badugu berriz, fluoreszentzia handitu egingo da.



Erresonantzia bidezko energiaren transferentzia (RET) emateko, akoplamendu energetiko bat egon behar da bi molekulen artean, emaillearen igorpen espektroa eta hartzailearen kitzikapen espektroa gainjarri behar dira zati batean, hau da, uhin luzera berdinetan egon behar dute. Batera gertatzen da emaille eta hartzailearen arteko energia transferentzia.



Goiko irudian, *molecule 1* emaille izango da, eta *molecule 2* hartzailea. Xurgapen eta igorpen espektroak behatu daitezke bietan, eta baten igorpena eta bestearen xurgapena gainjarriak daudela ikusi daiteke, akoplamendua eman ahal izateko.

Energia transferentzia honetarako beste baldintza bat, bien arteko elkarrekintza bat egon behar duela izango da, elkarrekintza energia hau dipolo-dipolo motakoa izango da. Posizio konkretu batean egon behar dute bi dipoloek transferentzia hau gertatu ahal izateko, molekulen arteko distantziaren eta dipoloen arteko orientazio erlatiboaren araberakoa izango da.

Prozesu hau, besteekin egongo da lehian, eta honen errendimendua definitzeko, abiadura konstantea (K_T) definitu beharko da:

$$k_T = (1/\tau_d)(R_0/R)^6$$

τ_d = Emaileren bizi-denbora hartzailerik gabe.

R = Hartzaile eta emaila arteko distantzia.

R_0 = Föster distantzia kritikoa. Emailetik hartzailera energiaren %50-a transferitzeko dagoen distantzia kritikoa. Distantzia hori handiagoa bada, errendimendua txikitu egingo da.

Kontuan izan behar da, bi molekulen arteko distantziak eragin handia duela abiaduraren konstantean.

Energia transferentziaren efizientzia (E)

Efizientzia, aurretik aipatutako abiadura konstantea eta erlaxatzeko dituzten mekanismo guztien arteko zatiketa izango da, hau da, erlaxatzeko modu guztien abiadura konstantean jarriko dira izendatzailean.

$$E = \frac{k_T}{k_T + \sum_{i \neq T} k_i} \quad k_T = (1/\tau_d)(R_0/R)^6$$

$$R_0 = 0.211(n^{-4}Q_d\kappa^2J)^{1/6} \text{ \AA}$$

K_T = Transferentziaren abiadura konstantea.

K_i = Beste prozesu bidezko erlaxazio prozesuen abiadura konstantea.

n = Medioaren errefrakzio indizea (1.2-1.4).

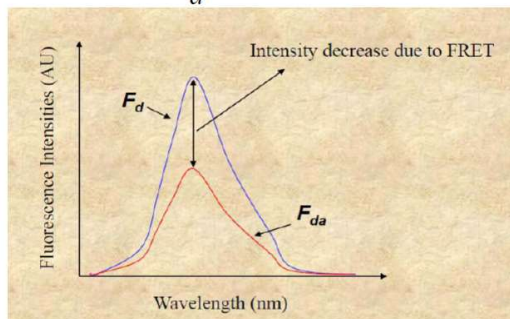
Q_d = Emaileren errendimendu kuantikoa hartzailerik gabe.

K^2 = Dipolo-dipolo elkarrekintzaren orientazio faktorea.

J = Gainezarketa espektralaren integral normalizatua.

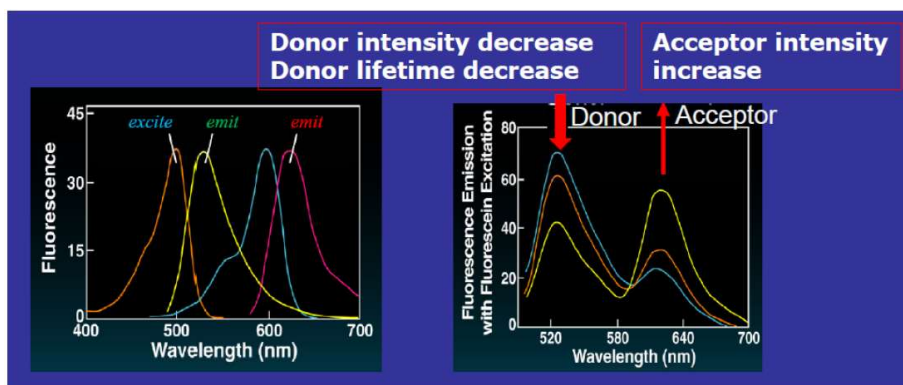
Esperimentalki kalkulatu daiteke efizientzia, bizi-denbora eta errendimendua neurtuta. Bi parametro hauek hartzaile gabe eta hartzailearekin neurtuko ditugu.

$$E = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad \text{edo} \quad E = 1 - \frac{\Phi_{da}}{\Phi_d}$$



Irudiko espektro urdina emalea bakarrik izango da, hartzailerik gabe. Hartzailea gehitzen dugunean (gorria), emalearen intentsitatea jaitsi egiten dela ikusiko dugu, beste modu batera ari baita erlaxatzen. Balio hauetatik, FRET-en efizientzia jakin ahal izango dugu.

Irudi honetan, ezkerrekoa kitzikapen eta igorpen espektroak izango dira, eta espektroaren zati bat solapatu egiten dela ikus dezakegu. Eskuinekoan berriz, hasiera batean emalearen intentsitatea altuagoa dela ikus dezakegu, lehen aipatu bezala hartzaile gabe dagoelako izango da, eta hartzailearekin aldatzen doala ikus daiteke, intentsitatea jaitsiz. Zenbat eta hartzaile gehiago jarri, fluoreszentzia gehiago jaitsiko da.



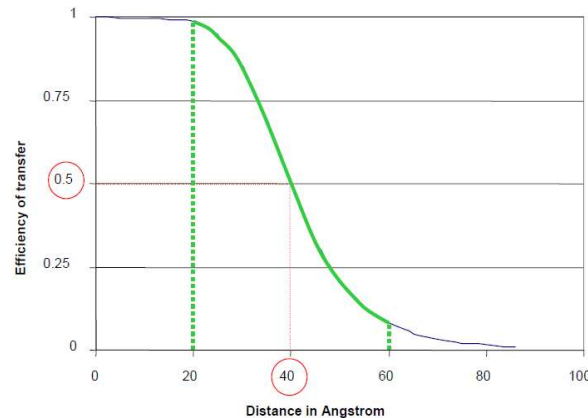
Lehen aipatu bezala, molekulen arteko distantzia oso garrantzitsua da FRET fenomenoan gertatzeko, energia transferentziaren efizientzia **distantziaren** menpekoa da.

$$R = \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6} R_0$$

R = Emale eta hartzailearen arteko distantzia.

R_0 = Förster distantzia.

Grafiko honetan, denboraren baitan efizientzia nola aldatzen den ikus daiteke. R_0 lortzeko, efizientzia erdia dugun balioa jakin beharko dugu. Elkarrekintza zuzena egon behar da erresonantzia mota hau gertatzeko, normalean 10-100 Å-eko distantzia, distantzia txikiagoa izanik ez dugu ezer ikusiko.



$$R_0 = 40 \text{ Å.}$$

$$E = 50\%, R = R_0$$

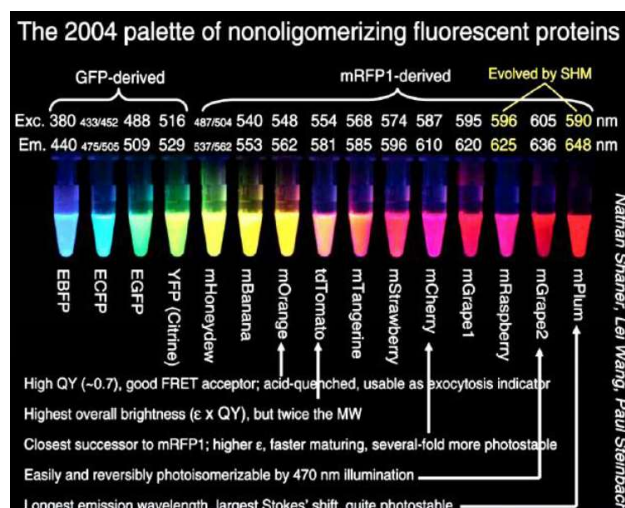
FRET-aren erabilera proteinen azterketan

Prozesu hau, hainbat informazio lortzeko aplikatu daiteke. Ikerlari batzuek, entzima baten (fosfoglicerato kinasa) konformazio aldaketa aztertzeko erabili zuten teknika hau. Proteina hartu eta mutagenesi zuzenduaren bidez, zisteina (Cys) pareak gehitu zizkieten. Pare hauen distantziaren arabera, FRET fenomenoak emango da edo ez.

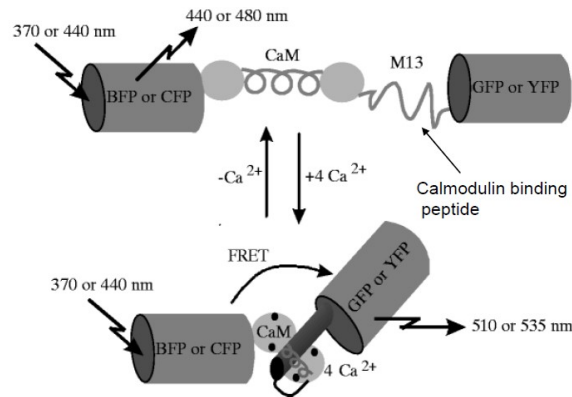
Hartzaile eta emale bat hartu zituzten, eta haien arteko FRET-a ezaguna zelarik, hainbat bizi denbora kalkulatu zituzten, eta honekin batera, aminoazidoen arteko distantzia, bai proteina natibo eta baita mutatuan ere. Informazio guztia prozesatuta, trantsizio egoera bat zegoela ohartu ziren mutatu eta natiboaren artean, erdibideko egoera bat zegoen. Proteina konformazioz aldatzen doan heinean, distantzia ere aldatuz doa.

FRET esperimentuak GFP eratorriak erabiliz

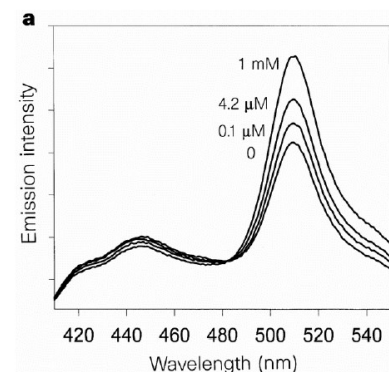
Esperimentalki horrelako erresonantziak lortzeko, gure interesekoak izango diren emale eta hartzaileak hautatzen dira. Fluoroforo desberdinak izango ditugu interesen arabera, hauek mutazio bidez lortuak izango dira.



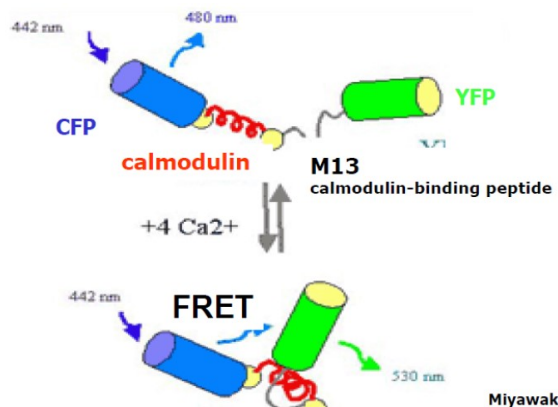
Adibidea: Proteina bat hartu (kalmodulina), eta bi domeinutan bi fluoroforo jarri zizkiten. Domeinu horiek elkarren urrun daudenean, fluoroforo urdinaren igorpena ikusiko dugu (BFP), eta kaltzioa gehitu eta konformazio aldaketaren ondorioz, oso gertu geratzen direnez domeinuak, fluoroforoa kitzikatzen jarraituz gero, jaitsiera bat ikusiko dugu proteina urdinean (emailea). Berdean berriz (GFP), igorpen bat azaltzen hasiko da (hartzailea).



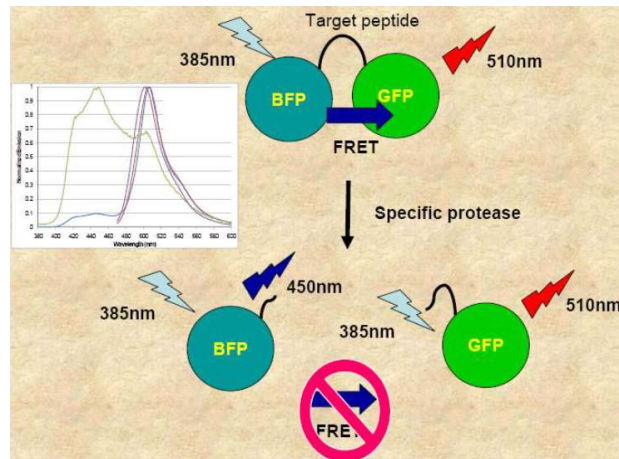
Grafikoan 520 nm-ko igorpena aztertzen ari gara, hau da, hartzailearena, kaltzio kontzentrazioa igotzen dugun heinean. Erresonantziaren efizientzia handitu egiten dela ikusten dugu, konformazio aldaketa ematen ari den heinean.



Gaur egun kaltzio detektatzeko erabiltzen da prozesu hau, kaltzioa egonda konformazio aldaketa emango baita, bestela ez da konformazio aldaketarik egongo, eta proteina urdinaren igorpena ikusiko dugu bakarrik.

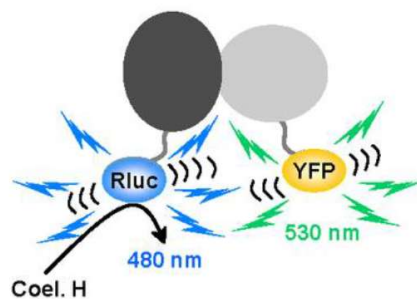


Proteasa baten aktibitatea aztertu nahi badugu, domeinu guztiak lotuta daudenean, FRET fenomenoak ikusi dezakegu. Peptidoa proteasarekin moztuz gero, fluoroforoak ez dira gertu egongo, eta haien arteko distantzia handitzen denez, erresonantziaren efizientzia jaitsi egingo da. Kasu honetan, proteina berdearen igorpenaren arabera, proteasaren aktibitatea neurtu ahal izango dugu, urdina kitzikatzen baita.



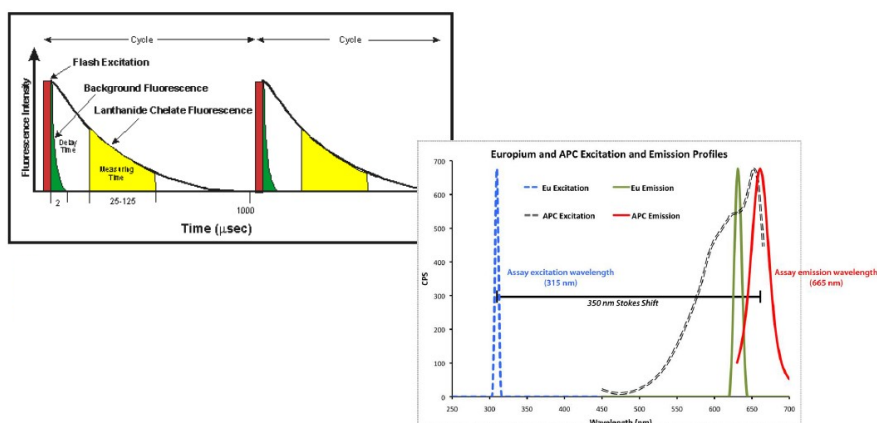
BRET (Bioluminescence resonance energy transfer)

Beste modu bateko erresonantzia da hau. Kasu honetan, emaila kitzikatzeko ez da fotoirik erabiltzen, emaila entzima bat izango da (luciferasa bat), eta beharrezko substratua gehituta, produktu fluoreszente bat eratuko da.



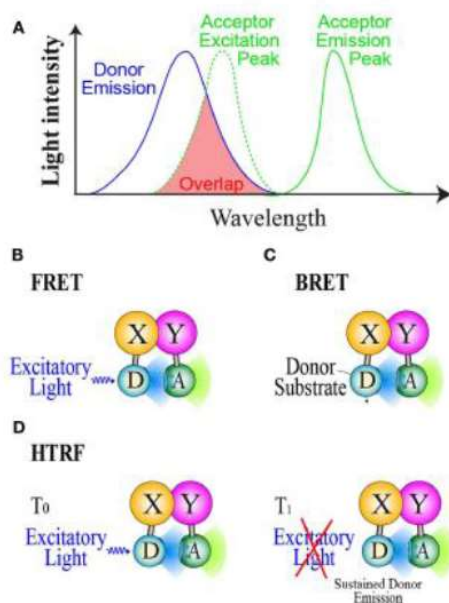
Homogeneous Time Resolved fluorescence (HTRF)

Kasu honetan, fluoroforoak bereziak dira (lantanoa). Argi pulsu batekin kitzikatzen da sistema momentu motz batean, eta ondoren, laserra itzali egiten da. Kitzikatutako sistemak, nolabaiteko zarata izango du eta denboran zehar, zarata hori jaitsi egingo da. Lantanoek denbora luzean iraungo dutela izango da ezaugarrietako bat.



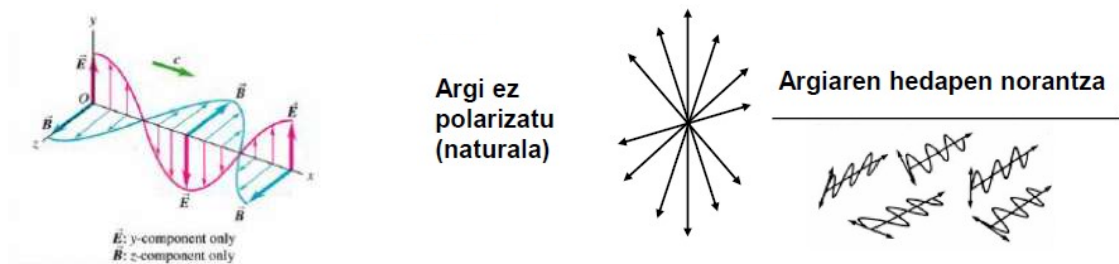
RET teknika ezberdinak

Denek behar dute emailearen igorpen eta hartzailearen arteko akoplamendu edo solapamendu bat.



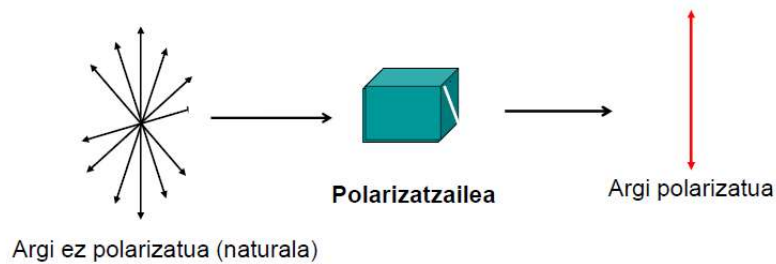
Polarizazioa eta Anisotropia

Argia eremu elektromagnetiko baten oszilazioa da, hedapenaren norabidearekiko plano perpendikularrean ematen dena. Kasu honetan eremu elektrikoa hartuko dugu kontuan, eta honek norabide edo angelu ezberdineko oszilazioa har dezake.



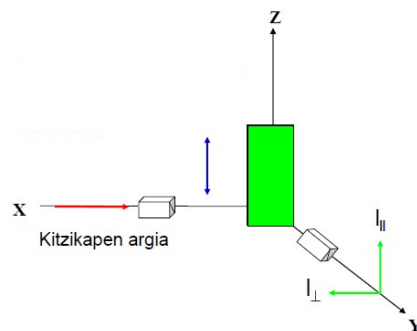
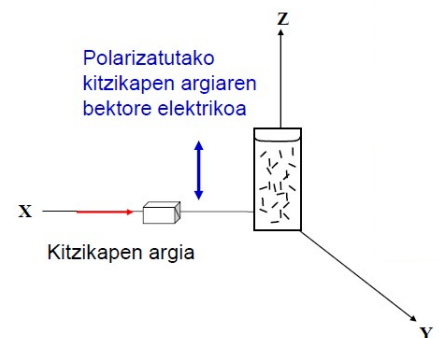
Polarizatzaileak bektore elektrikoaren osilazio norabide bakar bat duen erradiazioa aukera dezakeen gailu optikoa da. Polarizagailutik pasatzen den argia polarizatua izango da, guk hautatutako planoan. Eta bi mota bereizten dira:

- Dikroikoak. Polarizazioaren plano bat xurgatzen dute. Iragazkaitzak dira itxuraz. Adibidez, H motako Polaroid pelikula.
- Kaltzitako kristalak (CaCO_3). Polarizazio bi planoak modu ezberdinean dispersatzen ditu. Adibidez, Nicol, Wollaston prisma, Glan-Foucault, Glan-Thompson, Glan-Taylor.

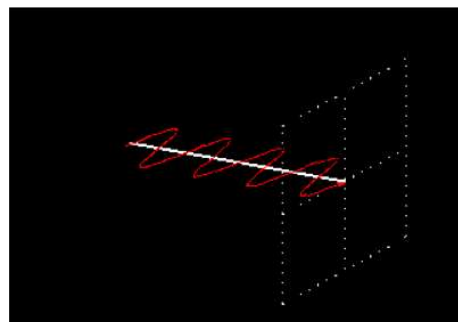
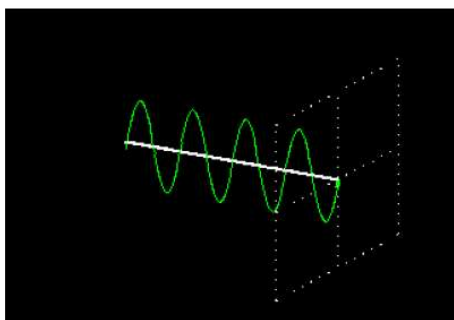


Adibidez, kasu honetan, lagina kitzikatuko duen argia x ardatzari dagokion norabidean sartuko da polarizatzailean, eta polarizazioa z ardatzari dagokion oszilazio norabidean ematea aukeratu da. Beraz, lagina kitzikatu ostean z ardatzari dagokion norabidean igorriko da argi polarizatua.

Lagineko fluoroforoek kitzikapen argia xurgatuko dute, eta ondoren fluoreszentzia igorri. Beraz, bi polarizatzaile erabiliko dira. Lehen laginaren aurrean kokatuko da, aukeratutako ardatzarekin bat datozen fluoroforoak soilik kitzikatzea eta argi polarizatua igortzea eraginez. Bigarrena aldiz laginaren ondoren egongo da kokatua, eta honek kitzikatu diren molekulek igorritako fluoreszentziaren intentsitatea eta norabidea aztertuko du. Norabidea z ardatzarekiko paralelo edo perpendikularra izan daiteke. Beheko irudietan berdea oszilazio paraleloari dagokio eta gorria berriz perpendikularri.



Beheko irudiko argiak, ardatz zuriarekiko eratzen ari dira. Ezkerrekoaren kasuan, z ardatzarekiko paralelki eratzen den argi polarizatua da. Eskuinekoa berriz, perpendikularri.



Beraz, **polarizazioa** bi magnitudetan neurtzen da, paraleloki datozen fotoiak eta perpendikularri datozenak neurtuz, hau da, bi erradiazio horien diferentzia erradiazio totalaren (paralelo + perpendikularra) bidez zatituz. Ondorengo ekuazioaren bidez definitzen da:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Balio posibleak:

- ✓ Kitzikatutako argi guztia z ardatzarekiko plano paraleloan igortzen bada, plano perpendikularrean ez da fotoirik igorriko, argi hori guztiz polarizatua dago (perpendikularra=0). Kasu honetan polarizazioa maximoa izango da, $P=1$.
- ✓ Kitzikatutako argi guztia plano perpendikularrean igortzen bada, plano paraleloan ez da fotoirik igorriko (paraleloa=0). Kasu honetan despolarizazioa maximoa izango da, $P=-1$.

$$P = \frac{1-0}{1+0} = 1$$

$$P = \frac{0-1}{0+1} = -1$$

Beraz, polarizazio balioak beti 1 eta -1 tartean egongo dira. Hala ere, soluzioan ez dira 1 eta -1 balioak lortzen.

Anisotropia antzekoa da, baina kasu honetan erradiazio totalan paraleloari bi aldiz perpendikularra gehitzen zaizkio, fotoiek har ditzaketen hiru ardatzen norabideak kontuan hartuz. Modu honetan emaitzak zehatz edo errealagoak izango dira. Anisotropia aproposagoa da, batez ere neurketak normalizatu nahi direnean, konparaketak egiteko.

Balio posibleak:

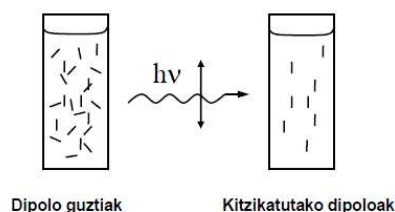
- ✓ Polarizazio maximoan, $r=1$
- ✓ Despolarizazio maximoan,

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad r = \frac{1-0}{1+0} = 1 \quad r = \frac{0-1}{0+2} = -0.5 \quad r=-0.5$$

Beraz, anisotropia balioak beti 1 eta -0,5

tartean egongo dira. Hala ere, balio teorikoak dira, ez dira inoiz balio hauek ateratzen.

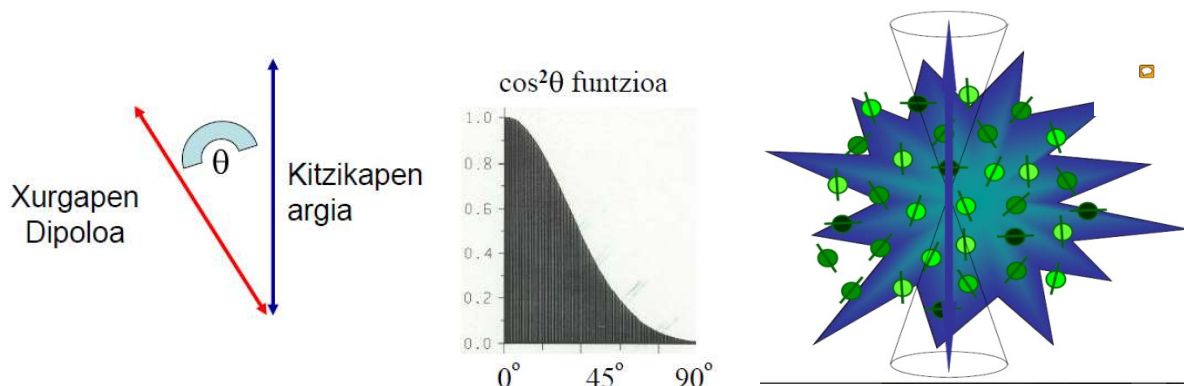
Hala ere, polarizatzailearen bidez **fotohautaketa** prozesuan ematen da, izan ere, aukeratutako ardatz edo bektoreekin bat datorren momentu dipolarra daukaten molekula kitzikagarriak soilik kitzikatuko dira. Baina prozesua ez da baldintza zehatz batean ematen, hau da, momentu dipolar eta argi polarizatuaren norabidearen artean angelu bat egon daiteke.



Molekulak nahaste batean izanda, disoluzioan daudenez, kokapen berezia izango dute, eta molekulak kitzikatzean, polarizatutakoekin lerrotatuak daudenak izango dira. Nahaste guzti hori argi polarizatuarekin kitzikatuz, z ardatzarekin paraleloan daudenak soilik kitzikatuko dira.

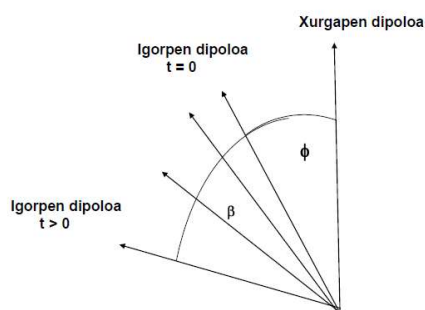
Bektore eta momentu dipolarraren norabidea berdina bada molekula kitzikatzeko probabilitatea totala izango da, eta zenbat eta bien arteko angelua handiagoa izan probabilitatea gutxituz joango da, azkenik 90ºtik aurrera xurgapena gertatuko ez delarik (probabilitatea zero izango da). Hau da, xurgapenaren probabilitatea, kitzikapen argiaren eta dipoloaren arteko angeluaren kosinuaren berreketarekiko ($\cos^2\theta$) proportzionala da. Beraz,

fotohautaketa prozesua argi polarizatu eta molekulen momentu dipolarraren arteko angeluaren arabera izango da.



Eta aldi berean, angelu hori molekularen errotazioaren arabera da. Molekulak ardatzaren inguruan mugitzen ez badira, dipoloak berdinak edo paraleloak izango dira. Molekulak argia jaso eta igortzen duen bitartean ez badu errotaziorik jasaten argia dipoloaren norabide berdinean emitituko da, beraz argia paraleloki igorriko da eta polarizazioa totala izango da, non anisotropiaren balioa 0,4 izango den. Errotazioa ematen bada aldiz, argia ez da norabide berdinean igorriko, eta errotazio horren arabera angelu bat sortuko da xurgapen eta momentu dipolarraren artean, zeinak polarizazioaren probabilitate eta balioa gutxituko duen.

Igorpen dipoloa denbora eta errotazioaren arabera izango da. Guzti horrek ondorioak izango ditu anisotropiaren neurketan.



Beraz, anisotropia balio maximoa galtzearen arrazoiak fotohautaketaren galera eta dipolo arteko errotazioa dira. r_0 (anisotropia fundamental) balio ideala litzateke, non ez dagoen errotaziorik eta polarizazioa maximoa den. Angeluaren arabera honen balioa aldatuz joango da, eta balio negatiboak ere izan ditzake.

$$r_0 = \frac{2}{5} \frac{(3 \cos^2 \beta - 1)}{2}$$

r-k balio negatiboak izan ditzake:

β	r_0
0	0.40
45	0.10
54.7	0.00
90	-0.20

r_0 =anisotropia fundamental, difusio errotazional gabe lortzen dena. Glizerola edo polietilenglikola T baxuetara (bitrifikatuak).

Errotazioaren eragina anisotropian:

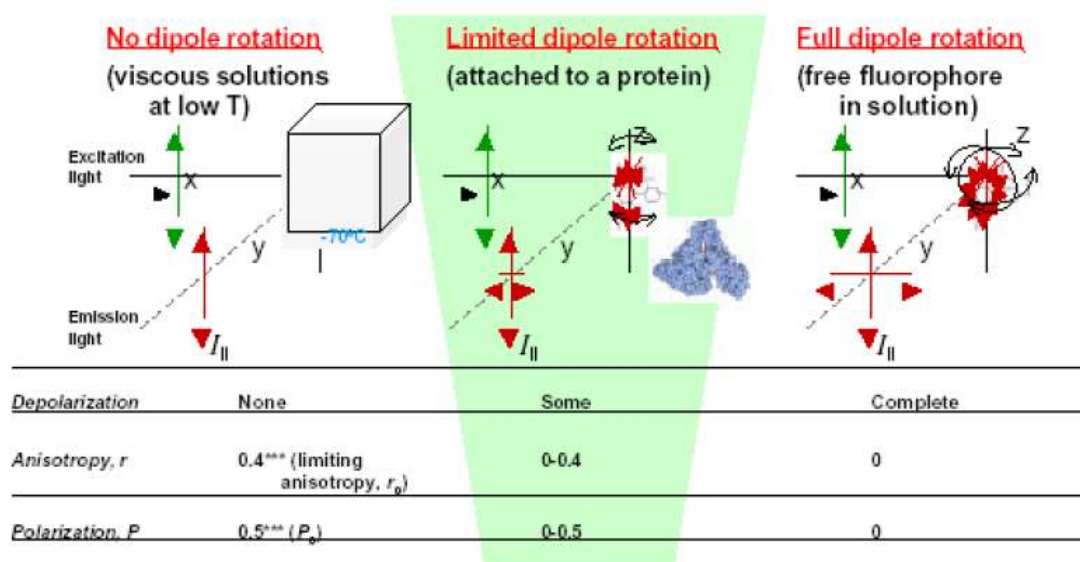
Errotazioak eragin zuzena dauka anisotropian.

- ❖ Errotaziorik ez. Igorpena paraleloki emango da eta beraz polarizazioa maximoa izango da ($r=0,4$).
- ❖ Errotazio mugatua. Dipoloak mugimendu bat du, ez oso azkarra, eta tarteko balioak lortuko dira, emititzen duen argia ez da hain polarizatua egongo.
- ❖ Errotazio handia. Igorritako argia ez da polarizatua egongo eta beraz, polarizazio eta anisotropia balioak 0 izango dira.

Mugimenduak, argiaren polarizazio eta anisotropia baldintzatzea lortuko du.

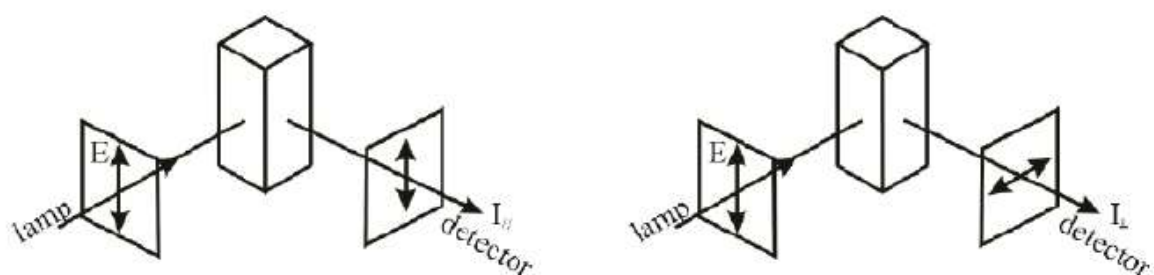
FLUORESCENCE ANISOTROPY

Dipole rotation during the timescale of fluorescence



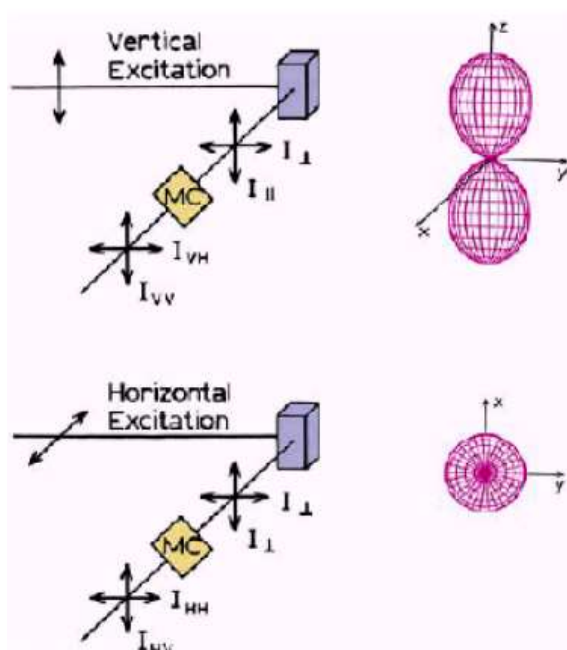
Polarizazio eta anisotropiaren neurketa

Esan bezala, bi polarizatzailerik daude, bata laginaren aurretik eta bestea ondoren (hauen posizioa alda daiteke). Monokromadoretik datorren argia ardatz bertikalean jaso eta igortzen bada intentsitate paraleloak lortuko ditugu, eta argia modu bertikalean jaso eta perpendikularrean igortzen bada, intentsitate perpendikularra lortuko da. Bi motatako kanalak dituzten fluorimetroak daude. Alde batetik, L motako kanalak dituztenak, zeinek detektagailu bakarria duten. Bestetik, T motako kanalak dituztenak, zeinek bi detektagailu dituzten.



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

Lau neurketa egiten dira: bi intentsitate paralelo eta bi intentsitate perpendikular. Bakoitzetik bi neurtzen dira, optikaren efizientzia argiaren polarizazioaren arabera delako, eta horrela difrakzio sarearen erroreak ekiditeko.



$$I_{VV} = I_{//}$$

$$I_{VH} = I_{\perp}$$

$$I_{HH} = I_{\perp}$$

$$I_{HV} = I_{\perp}$$

Eta neurketak egin ondoren zuzenketa faktoreak erabiltzen dira, formula aldatu eta G balore bat sartuz.

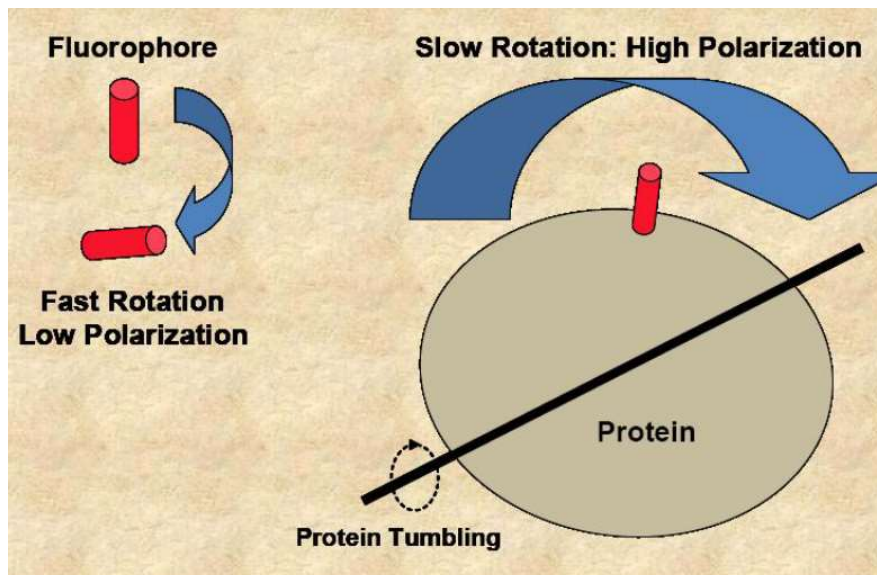
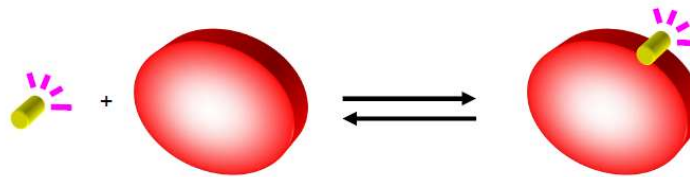
$$r = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2 G I_{VH}}$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Esan bezala, anisotropia molekularen errotazioaren arabera da, eta errotazio hau erradioaren menpekua, baita fluoroforoari lotuta dagoen konplexu edo mikroingurunearen arabera da. Erradioak errotazioaren abiaduran dauka eragina, zenbat eta erradio handiagoa errotazioa motelagoa izango da.

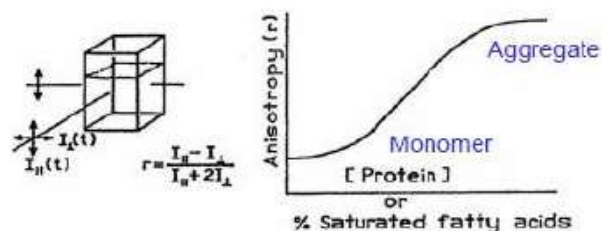
Honen aplikazioak:

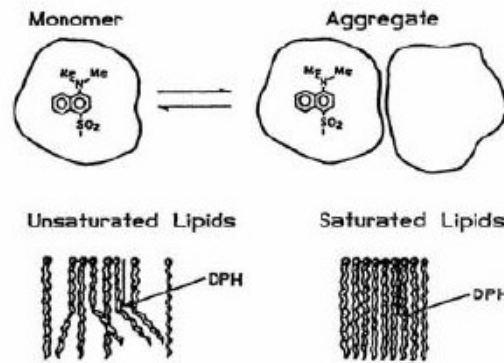
- ✓ Aldaketa konformazionalak
- ✓ Molekula zenbat eta handiagoa izan polikiago errotatuko du
- ✓ Ingurunearen biskositatea. Hau oso erabilgarria den mintzetarako: azter daiteke molekula bat aske edo txertatuta dagoen, baita mintzaren zurruntasuna. Fluoroforo askeak azkarrago errotatzen du mintzean txertatuta baino. Fluoroforo askea dugunean, polarizazioa baxua izango da, baina makromolekula bat gehitzen goazen heinean, mantsotzen joango da, eta anisotropia edo polarizazioa handitzen doala ikusiko dugu.



Adibidez: agregazio prozesuen azterketa

Agregazio prozesu bat jarraitu dezakegu anisotropia neurtuta. Beheko grafikoan ikus daitekeen moduan, monomero batek anisotropia txikiagoa izango du polimero batek baino. Gantz azidoak gehitzen doaz, eta anisotropiaren igoera ikus daiteke fluoroforoa gehitzen den heinean.



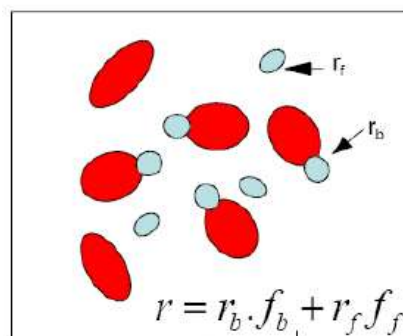
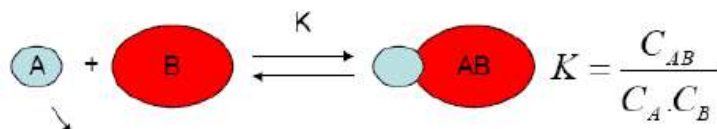


Fluorescence polarization, protein association and membrane microviscosity.

Anisotropy is a measure of rotational motions during excited state lifetime.

Adibidez: Ligando eta proteinen arteko asoziazio errakzioen azterketa

Prozesuaren anisotropia neurtuz asoziazio konstanteak zehaztu daitezke. Hala ere, kontuan hartu behar da fluoroforo askeen eta lotuen anisotropia batura izango dela anisotropia totala.



Assuming $F_b = F_f$ (quantum yield unchanged)

Fluorescently labeled

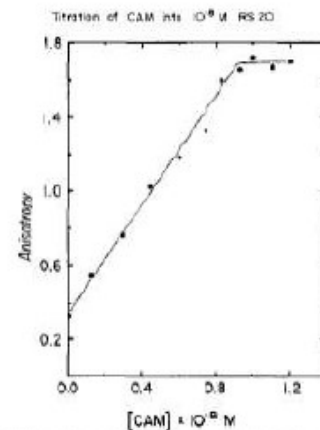
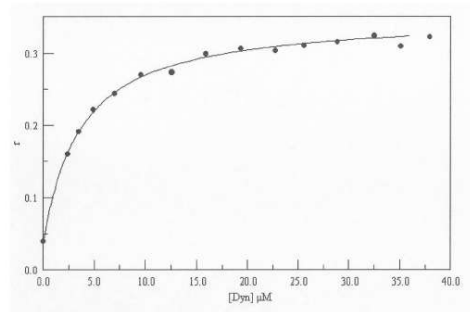


FIGURE 4: Fluorescence anisotropy titration of peptide binding to calmodulin. RS20 was dissolved at 10^{-6} M (from dry weight) in 0.15 M KCL and 0.025 M MOPS, pH 7.0. containing 10^{-4} M Ca^{2+} and 0.02 M PEG 2000. The PEG 2000 was added to minimize adsorption of the peptide to glass. Calmodulin was dissolved in the same solvent and added as indicated on the plot. Fluorescence anisotropy was measured as described (McDowell et al., 1985) with excitation at 300 nm and tryptophan emission isolated from Rayleigh and Raman scattering by use of a Schott WG 340 cutoff filter. The anisotropy of tryptophan emission of the free peptide was 0.033 and of the fully bound peptide 0.170.

Beheko grafikoan ikusten da zenbat eta proteina gehiago gehitu fluoroforo gehiago egongo direla lotuta eta anisotropia handituz.



1 mikromolar mant-GTP γ S (GTP-aren analogo fluoreszente ez hidrosolugarria) eta dinaminaren (GTP-ari batzen zaion proteina bat) kontzentrazio desberdinak. Datu esperimentaletatik $K_d = 8.3$ mikromolar dela kalkula daiteke.

Nola kalkulatu asoziazio konstantea? Uhin luzera bat finkau behar da, non peptido askeen eta batuen prozesuen efizientzia ez den aldatuko. Bi espektro lortuko ditugu (proteina askea eta batua). Kasu honetan, MLCK peptidoa CaMri nola lotzen den aztertzen da, eta uhin luzera 340nm-tan finkatu da. Eta ondorengo ekuazioa erabiliz, asoziazio konstantea lortu daiteke:

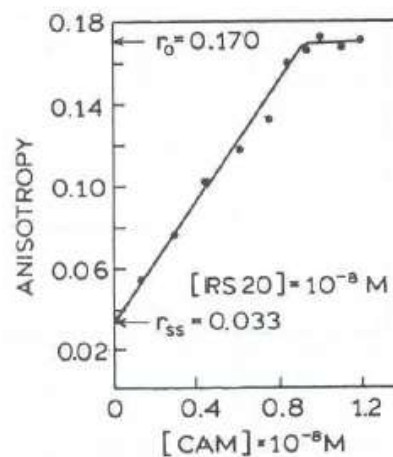
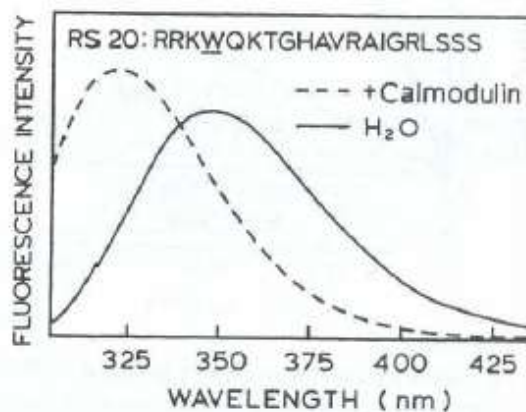
Batutako frakzioa (B):

$$r = r_a f_a + r_b f_b$$

$$f_B = (r - r_F) / (\Delta r - r_F)$$

Behin f_B ezagututa, asoziazio konstantea kalkula daiteke.

$$K = F_B / F_F$$



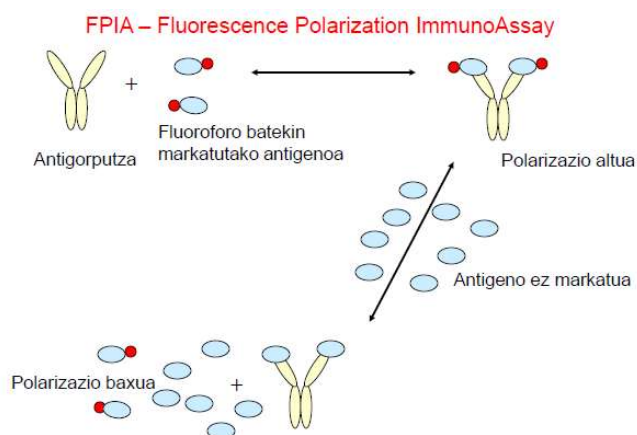
Adibidez: proteinen dimero-monomero orekaren azterketa

Proteina baten elkarrekintza mailaren ikerketa, agregazioa. Proteina dimerizatzen doan heinean erradioa handitu, errotazio txikitu eta anisotropia handituko da. Monomeroek dimeroei baino azkarrago errotatuko dute.



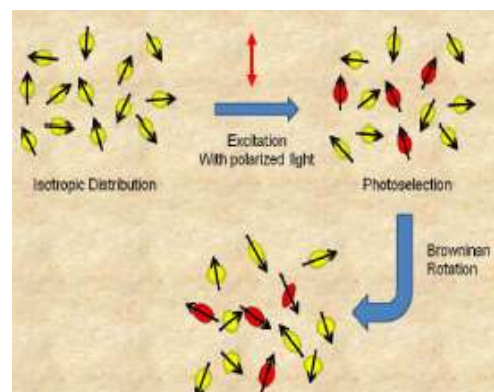
FPIA (Fluorescence Polarization ImmunoAssay)

Antigorputzetan oinarritzen den teknika bat da hau. Detektatu nahi dugun molekularekin espezifikoki lotuko den antigorputz bat izango dugu, laginaren kontzentrazioa jakitea baimenduko diguna. Antigenoa fluoroforo batekin markatzen badugu eta sistema saturatzen badugu, antigeno eta antigorputza batuta daudeneko anisotropia jakin bat lortuko dugu. Hau Antigeno ez markatua gehitzen badiogu, ostera, propietateak aldatu egingo dira. Zenbat eta antigeno gehiago bota, orduan eta gehiago jaitsiko da aztertzen ari garen zundaren polarizazioa, lehia bat egongo delako fluoreszentzia duen molekula desplazatuz. Polarizazioaren jaitsiera hori antigeno kontzentrazioaren arabera izango denez, laginaren kontzentrazioa zein den ondoriozta dezakegu.



DIFUSIO ERROTAZIONALA: Perrin ekuazioa

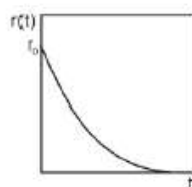
Dakigunez, polarizazioa molekulen errotazioaren arabera da. Difusio errotazionalak depolarizazioa eragiten du. Egoera kitzikatuaren bizi-denboran zehar gertatzen da eta fluoroforoaren igorpen dipoloa desplazatzen du. Fluoroforoaren mugimenduak anisotropiaren jaitsiera dakar eta beraz, igorpena depolarizatuago egongo da.



Gainera, erlazio bat dago egoera kitzikatuan igarotzen duen denboraren eta igorpenaren artean. Beraz, anisotropia nola handitzen den jakinik, molekularen mugimendu errotazionala nolakoa den ezagutu daiteke; hau da, anisotropiaren neurketak korrelazio errotazionalaren denbora neurtzeko erabil daitezke.

Denboran zehar molekula esferiko baten anisotropia neurtzen bada, funtzio monoexponentzial bat jarraitzen duela ikusten da, honako ekuazioa jarraituz:

$$r(t) = r_0 \exp[-t/\theta] = r_0 \exp[-6D\tau]$$



Decay is monoexponential for a sphere

$$\theta = 1/6D$$

θ korrelazio errotazionalaren denbora da eta D difusio errotazionalaren koefizientea.

Ikusten denez, anisotropia denboran zehar modu esponentzialean jaisten den parametroa da eta aldaera hori denboran zehar korrelazio errotazionalaren denboraren arabera izango da (θ).

θ -ren balioak lortzeko logaritmoak hartzen dira kontuan:

$$r = r_0 \cdot e^{-t/\theta} \longrightarrow \ln = \ln r_0 - \frac{t}{\theta}$$

Horrela $\ln[r(t)]$ vs denboraren grafikaren malda: $-t/\theta$ izango da.

Modu geldikorrean (ez denboran zehar) fluoreszentzia aztertuta honako ekuazioa lortzen da:

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau / \theta)} = \frac{r_0}{1 + (6D\tau)}$$

τ : bizi-denbora

θ : korrelazio errotazionalaren denbora.

D : difusio errotazionalaren koefizientea

r_0 : disoluzio kristalino baten anisotropia.

$$r_0 / r = 1 + (\tau / \theta) = 1 + 6D\tau$$

Azken ekuazio honetan ikusten da anisotropia fundamentalak eta anisotropiaren arteko erlazioa θ eta τ -ren arabera dela.

- $\theta \gg \tau$ denean: errotazioa geldoa izango da $\rightarrow r_0 = r$

Molekula ia ez da mugitzen xurgapen eta igorpen artean, denbora asko behar baitu molekula horrek errotatzeko. Molekulak ezin duenean errotatu, anisotropia fundamentalaren balioa lortzen dugu.

- $\theta \ll \tau$ denean: errotazio azkarra $\rightarrow r = 0$

Molekulak abiadura handian errotatuko du eta anisotropiaren balioa 0 izango da. Izan ere, molekula zorizko orientazio batera iristen da eta perpendikularki zein paraleluki igortzen duena berdina izango da, ez dago polarizazio garbirik nahaste horretan.

- $\theta \cong \tau$: anisotropiaren balioa errotazioarekiko sentikorra da. Esperimentu batzuk egiten dira hainbat ezaugarri lortzeko.

Perrin ekuazioa

Bizi-denbora (τ) ezagutzen badugu, egoera geldikorrean korrelazio errotazionalaren denbora (θ) kalkula dezakegu Perrin ekuazioaren bidez.

$$\frac{r_0}{r} = \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau}{r_0 \theta}$$

$$\theta = \frac{\eta V}{RT} = \frac{\eta M}{RT} \left(\bar{v} + \bar{n} \right)$$

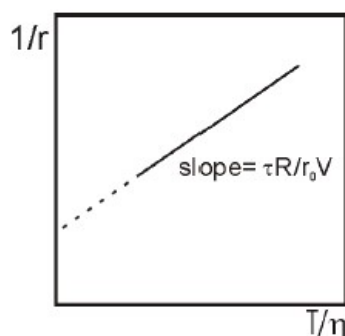
\bar{v} bolumen espezifiko eta
 \bar{n} hidratazio maila (g H₂O / g proteina).
 θ : korrelazio errotazionalaren denbora.

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{RT\tau}{r_0 \eta V}$$

Perrin Ekuazioa

Korrelazio errotazionalaren denbora medioaren biskositatea, molekularen tamaina, R gasen konstante eta tenperaturaren arabera izango da.

Ekuazio honen bidez, esaterako, proteina baten bolumena kalkula daiteke, anisotropia tenperatura eta/edo medioaren biskositate desberdinetara neurtuz. Saio hauetan proteina θ , τ -ren atzekoa duen fluoroforo estrinseko batekin markatzen da. T/η balio tarte batean anisotropia neurtzen da eta $1/r$ vs T/η irudikapena erabiltzen da, zuzen bat eraikiz. Zuzenaren ekuazioa honakoa izango da:



$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau / \theta)} = \frac{r_0}{1 + (6D\tau)}$$

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau RT}{r_0 \eta V}$$

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

T eta η aldagaiak izanik, ordenatuaren ebaki puntua $1/r_0$ izango da eta hau jakinik, proteinaren bolumena lortu dezakegu, ekuazioaren malda $\tau R/r_0 V$ izango delako.

Aplikazioak

Aplikazioei dagokionez, anisotropiak erabilpen ugari ditu.

Alorra	Informazioa
Espektroskopia	Egoera kitzikatuen bereizketa
Polimeroak	Katearen dinamika Polimeroaren inguruko biskositate lokala Orientazioa(polimero solidoentzat)
Mizela sistemak	Mizela barneko mikrobiskositatea Zurruntasun maila eta ordena parametroak
Mintz biologikoak	Zurruntasun maila eta ordena parametroak Tenperatura eta fase trantsizioak
Proteinak	Ezaugarri hidrodinamikoak Desnaturalizazioa Elkarrekintzak
Immunologia	Antigeno-antigorputz elkarrekintzak

ARIKETA

4. DENS-aren (azido 2-dietilmino-5-naftalensulfoniko) bizitza denbora 30ns-etakoa da. DENS-ren anisotropia fundamentalaren (r_0) balioa 0.3-koa bada eta DENS proteina bati batuta badago korrelazio errotazionalaren denbora (θ) 30ns-takoa izanik. Egoera geldikorrean, zein anisotropia balio neurtuko litzateke esperimentalki?

Imaginatuz orain DENS-arekin markatutako proteina 160.000 Da-etako pisu molekularra duen antigorputz bati batuta dagoela eta korrelazio errotazionalaren denbora (θ) 100ns-takoa dela. Zein izango da DEN-arekin markatutako proteinaren anisotropia?

$$1. \quad r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\theta}\right)} = \frac{0.3}{1 + \left(\frac{30}{30}\right)} = 0.15$$

$$2. \quad r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{\tau}{\theta}\right)} = \frac{0.3}{1 + \left(\frac{30}{100}\right)} = 0.23$$

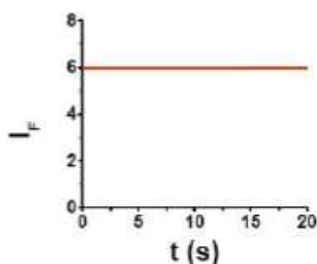
Ikusten denez, anisotropia handiagoa da flouoroforoa molekula handiago bati lotuta dagoenean. Zenbat eta azkarrago errotatua (libre badago azkarrago errotatuko du) anisotropiaren balioa txikiagoa izango da, polarizazioa mantentzeko zailtasunak izango dituelako.

Denboran ebatzitako fluoreszentzia

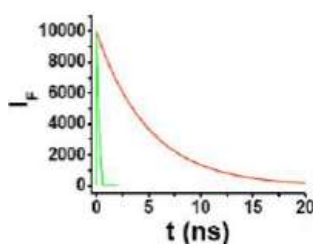
Fluoreszentzia

Fluoreszentzia **jarraia** izan daiteke, etengabe lagina argizatzen bada. Hau da, denboran zehar lagina kitzikatu egiten da modu jarrai batean. **Denboran ebatzitako** fluoreszentzia ere izan daiteke. Kasu honetan, pultsu bakar batez bidez kitzikatzen da lagina, intentsitate altu batean denbora oso laburrean, argia itzali eta ondoren fluoreszentzian emandako aldaketak (igorpenaren gainbehera) aztertzen dira denboran zehar.

Jarraia



Denboran ebatzita



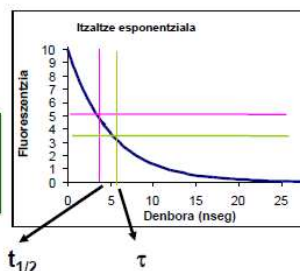
Bizi-denbora (τ)

Bizi-denbora molekula batek egoera kitzikatuan pasatzen duen batz besteko denbora da. Parametro hau neurtzeko fluoreszentziaren intentsitatea aztertu behar da. Denboran zehar, fluoreszentziaren intentsitatea modu esponentzial batean txikitzen dela ikusten da, fluoreszentziaren seinalea itzaltzen ari delako.

Itzaltze esponentziala:

$$F(t) = F_0 \cdot \exp(-t/\tau)$$

$t_{1/2}$ laginaren erdia irauungi da,
 τ laginaren 63 %



$I = I_0 \cdot e^{(-t/\tau)}$ ekuazioa betetzen da.

Denbora bizi-denboraren berdina denean ($t=\tau$) $\rightarrow I = I_0 \cdot e^{-1} = I_0/e$

Hau da, bizi denbora fluoreszentziaren intentsitatea $1/e$ edo %36,08-ra gutxitzeko behar den denbora da izango da (ez da intentsitatearen erdia lortzeko behar duen denbora izango).

Denbora honetan zehar fluoroforoak ingurunearekin elkarrekiten du (barreiatu, errotatu, irauungi) eta fluoroforoak nahastean dituen elkarrekintzen arabera bizi-denbora aldatu daiteke, zeinak informazioa emango duen.

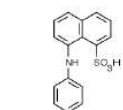
Bizi-denbora ezagutzea oso erabilgarria izan daiteke hainbat kasutan. Egoera geldikorrean denboran ematen diren fenomenoaren batzuk besteko bat ematen da. Beraz, modu jarraian kitzikatzean lortzen ez den informazio asko eskura daiteke modu honetan; esaterako, proteina baten 2 triptofanoren arteko ezberdintasuna egon daiteke, edo konformazio desberdina duten proteina populazio artean. Gainera, metodo honek espektro gainezarriak dituzten fluoroforoen arteko ezberdintasuna egitea baimenduko digu. Horrez gain, iraungitzeak aztertzeak lagungarria izan daiteke, iraungitze dinamikoa ala estatikoa baten aurrean gauden ezberdintzeko. Dinamikoan erlaxazioak bizi-denborari eragiten dio, honen balioa aldatuz. Estatikoan, ordea, bizi-denbora konstante mantentzen da.

FRET fenomenoak aztertzeak ere erabilgarria izan daiteke. Halako fenomeno batean intentsitatearen %50eko jaitsiera ikusten badugu, bi arrazoi posible egon daitezke:

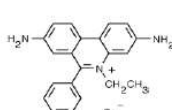
- Molekulen %100ak FRET jasan dute baina efizientzia %50era jaitsi da (fluoroforoa bakarrik dagoenean baino τ txikiagoa)
- Molekulen %50ak jasan du FRET baina %100eko efizientzia mantendu dute (fluoroforoa bakarrik dagoenean lortzen den τ berdina)

Beraz, molekulen bizi-denbora berdina ala ezberdina duten aztertzen badugu bi kasuetako zein den jakin dezakegu.

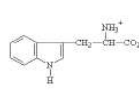
Fluoroforo baten bizi-denbora eta errendimendu kuantikoa ingurunearen arabera aldatzen dira, hau da, egoera ezberdinetan bizi denborak aldatzen joango dira ingurunearekiko sentikorra den parametroa delako.



ANS:
~100 ps uretan
8 – 10 ns proteinari
batuta



Etidio Bromuroa:
1.8 ns uretan,
22 ns DNA-ri batuta eta
27 ns tRNA-ri batuta

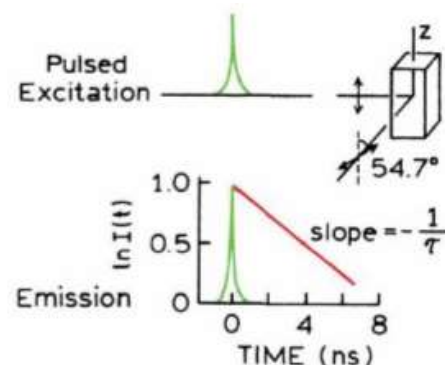


Proteinetan, Trp-ren τ
~0.1 ns eta ~8 ns
artean aldatzen da

Bizi-denbora neurtzeko bi modu daude:

1. Denboraren domeinuan

Lagina intentsitate altuko eta iraupen laburreko argi pultsuaz ($t < \tau$) kitzikatzen da eta denboran igorritako fotoi kopurua neurtzen da. Fluoreszentziaren gutxipena esponentziala denez, adierazpena linealizatzeko logaritmoak hartu eta grafikoa eraikitzen da. Maldatik bizi-denboraren balioa lor daiteke.

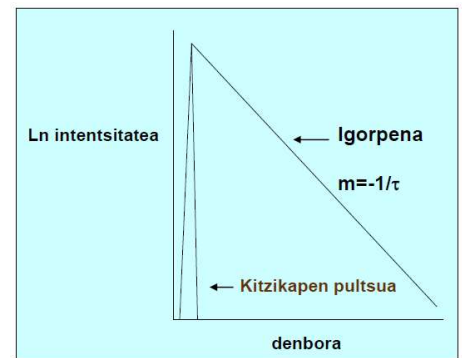


$$I(t) = I_0 \exp(-t / \tau)$$

$$\ln(I(t)) = \ln(I_0) - (t / \tau)$$

Normalizazio faktore bat (α) kontuan hartu beharko da.

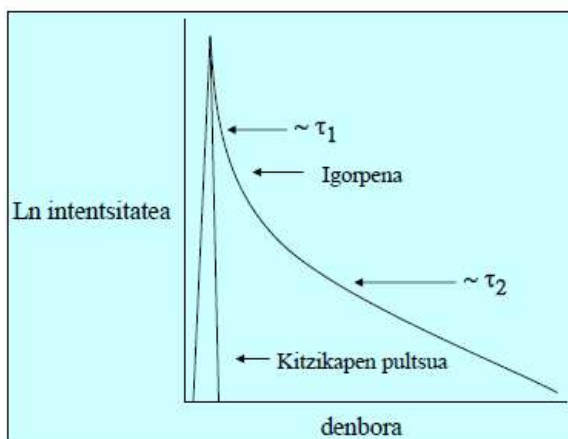
$$I_t = \alpha e^{-t/\tau}$$



I_t = t denboran intentsitatea,
 α = normalizazio faktorea (faktore pre-esponentziala)
 τ = bizi-denbora.

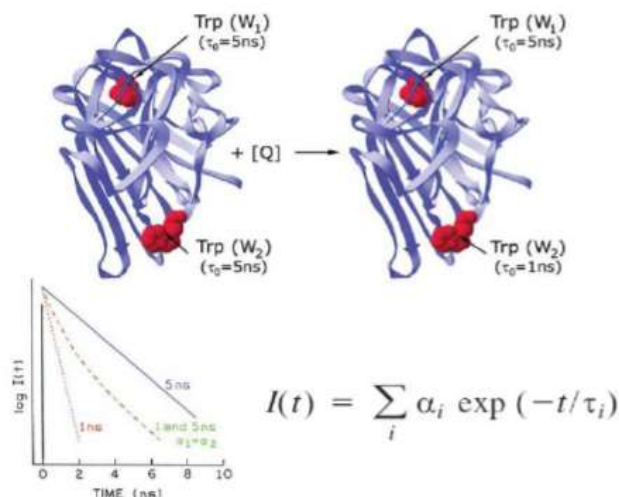
Esperimentalki iraungitze esponentzial sinple batean puntu itxurako adierazpenak lotzen dira eta hauek ondoren lerro batez lotu daitezke maldaren kalkulurako. Maldatik bizi denbora jakin daiteke. Saio hauetarako fluorimetro bereziak behar izaten dira.

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i}$$



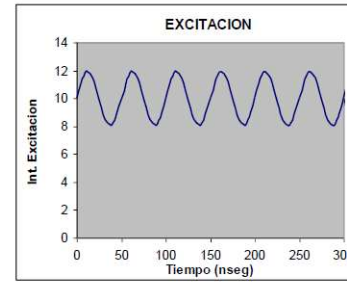
Ordea, nahaste batean bizi denbora ezberdineko fluoroforoak ditugunean, intentsitatea neurtuz gero iraungitzea multiesponentziala bihurtzen da, guztiek bizi-denbora kontuan hartzen baita. Beraz, logaritmoak lortu eta grafikoa burutzean lerro zuzenak beharrean kurbak lortzen baditugu, gutxienez bi bizi-denbora ezberdineko fluoroforoak daudela ondorioztatu dezakegu. Kasu hauetan bizi denbora ordenagailu bidez kalkulatzen da.

Demagun fluoreszentzia igortzen duten bi triptofano hondar dituen proteina bat dugula, baina bietako bat ez dagoela iraungitzailearentzat eskuragarri. Kasu honetan, eskuragarri ez dagoenak bizi denbora mantenduko du, aldez, iraungitzailearekin kontaktuan dagoenaren bizi-denbora aldatu egingo da. Beraz, nahastean bi bizi-denbora ezberdin dituzten fluoroforoak izango ditugu. Intentsitatea aztertzerako orduan iraungitze multiesponentziala (kurbak) lortzen direla ikusiko dugu.



2. Maiztasunaren domeinuan

Kasu honetan kitzikapena ez da denbora motz batean eta intentsitate altuan burutzen. Kasu honetan argi iturri jarrai bat (laser bat edo xenon arku-lanpara bat) erabiltzen da eta iturriaren intentsitatea maiztasun altuan, eta intentsitate hori aldatuz doa modu sinusoidalean. Uhin luzera berdina izango da denbora guztian, aldatzen dena igortzen diren fotoi kopurua izango da.



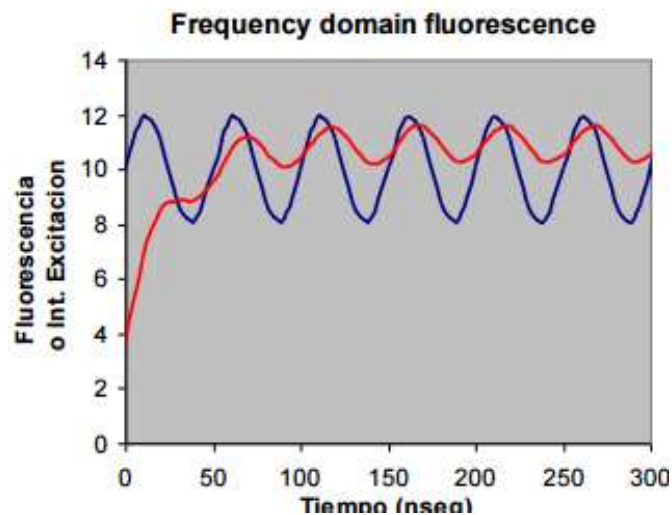
20 MHz-tara modulaturatutako argia

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot \text{Maiztasuna (Hz)}$$

Kasu honetan, igorpenaren intentsitateak ere antzeko modu sinusoidal bat jarraituko du, fluoreszentziaren igorpenaren intentsitatea eta kitzikapenaren intentsitatea erlazionatuta daudelako (bat igotzen bada bestea ere igoko da). Igorpen eta kitzikapen espeketroak aztertzen baditugu bi gauza gertatzen direla ikus daiteke.

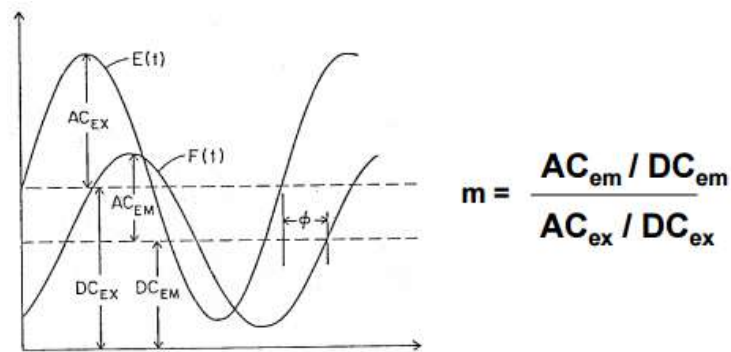
Alde batetik, kitzikapen argiaren intentsitatearen eta igorpen argiaren intentsitatearen artean **desfase** bat dago (piko gorria eta urdina ez datoz bat). Hau da, kitzikapen eta igorpen arteko fase desplazamendu bat ematen da fluoreszentziaren bizi-denbora dela eta, kitzikapena ematen denetik igorpena eman arte denbora bat pasatzen baita. Desfase hori kitzikapenetik igorpena ematen den arteko denborarekin eta beraz bizi-denborarekin erlazionatuta egongo da (desplazamendua ω eta τ menpekoa da).

Beste alde batetik, igorpenaren intentsitatea txikiagoa dela ikusten da.



Beraz, modulazio horren ondorioz eragin nabarmen bat geratuko dira emisioan: igorpena desfasatuta egongo da kitzikapen argiarekin alderatuta, kitzikapen egoeratik erlaxatzeko denbora bat behar baitu.

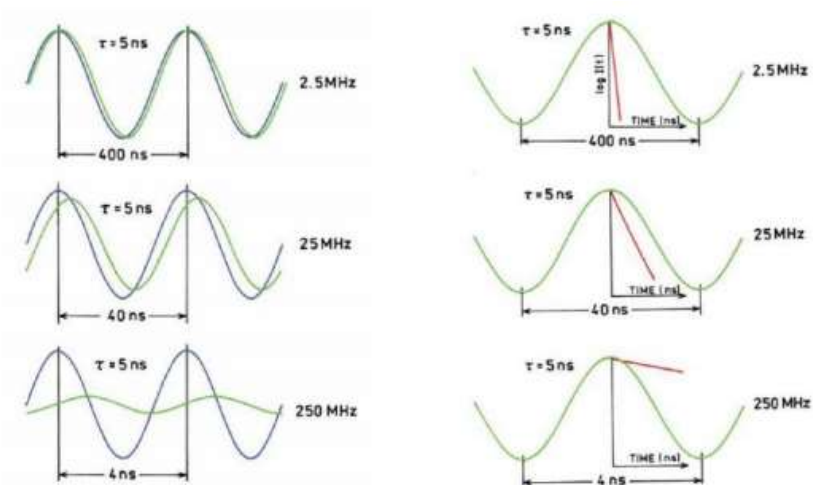
Kitzikapen argiarekiko fasean desplazaturiko igorpen modularra:



Kitzikatzeko erabiltzen den argiaren intentsitatearen aldaerak eta igorpen erradiazioaren aldaketak konparatzen dira.

Kitzikapen $E(t)$ eta igorpen $F(t)$ uhinak izango dira eta bien arteko desfasea ϕ izango da (bi kitzikapen denboren arteko desfasea). Gainera, kitzikapen eta igorpen uhinek erlazionaturiko AC eta DC mailak aurkezten dira. m , modulazio balioa da, zeina bizi denbora kalkulatzeko erabiltzen den.

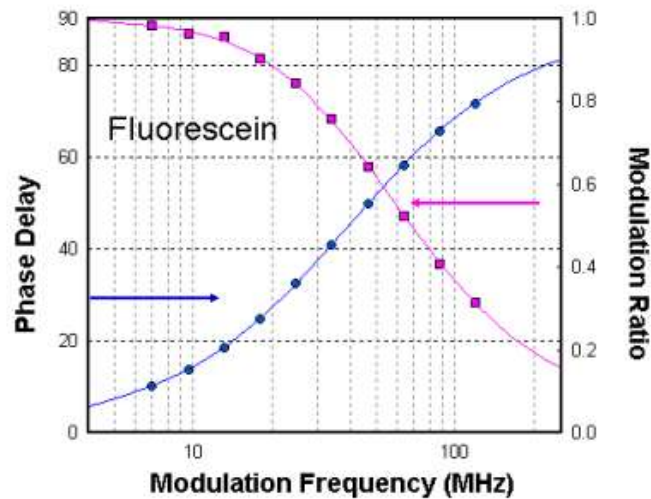
Kitzikapenerako erabilitako argiaren intentsitatearen maiztasuna handituz, igorpen seinalea geroz eta desfasatuagoa dagoela eta igorpen seinale horren modulazio frekuentzia txikitzen doala ikus dezakegu



Maiztasuna handitzen den heinean desfasea handitzen da (90°) eta m txikitu (0)

Jarraian agertzen den grafikoan modulu eta fasearen balioak adierazten dira. X ardatzean, kitzikatzeko erabiltzen den argiaren oszilazioaren frekuentzia azaltzen da. Bi Y ardatz daude, lehenengoan desfasea eta bestean modulazioa adierazten da.

Biak batzen diren puntua fluoroforoaren bizi denboraren arabera izango da.



Zenbat eta bizi denbora txikiagoa izan, frekuentzia handiagoa beharko da bi grafikak elkar gurutzatzeko. Azterketa mota honekin, gurutzaketa zein maiztasunekin gertatzen den ikus dezakegu eta hainbat formula erabiliz, bizi denbora zein den lortu dezakegu.

Frekuentzia handitzen den heinean, ϕ 90º-rantza doa eta m berriz 0 1-rantz.

Modulazio edo frekuentzia desberdinak erabilita, 2 triptofanodun (bi fluoroforodun) proteinaren analisia egin da. Fluoroforoetako bat indargetzailearentzat eskuragarri egongo da eta bestea ez. Indargetzailearentzat eskuragarri dagoen fluoroforoaren kasuan bizi denbora aldatu egingo da proteina indargetzailearekin kontaktuan dagoenaren kasuan edo kontaktuan ez dagoenaren kasuan. Aldiz, indargetzailearekin kontaktuan ez dagoen fluoroforoaren kasuan, bizi denbora ez da aldatuko proteina indargetzailearekin kontaktuan badago edo ez.

