

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

KEEMIA INSTITUUT
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Allan Tobi

TÖÖPARAMETRITE OPTIMEERIMINE TIRF
MIKROSKOOBIGA ÜKSIKMOLEKULIDE
DETEKTEERIMISEKS

Bakalaureusetöö

Juhendaja: MSc Taavi Võsumaa

TARTU 2014

KASUTATUD TÄHISED JA LÜHENDID

α	–	Langeva valguskiire murdumisnurk
θ_c	–	Kriitiline nurk
λ_0	–	Valguskiire lainepikkus
φ_f	–	Fluorestsentsi kvantsaagis
AU	–	Suhteline ühik (ingl. k. <i>arbitrary unit</i>)
AOTF	–	Akustiliselt häälestatav optiline filter (ingl. k. <i>acusto optical tunable filter</i>)
CCD	–	Laengsidestusseadis (ingl. k. <i>charge-coupled device</i>)
CMOS	–	Komplementaarne metall-oksiid-pooljuht (ingl. k. <i>complementary metal-oxide-semiconductor</i>)
d	–	Sumblaine levimiskaugus (ingl. k. <i>decay depth</i>)
DPBS	–	Dulbecco fosfaat-puhverdatud soolalahus (ingl. k. <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
DPSS	–	Diiodidega pumbatav tahkis(laser) (ingl. k. <i>diode-pumped solid-state</i>)
EM	–	Elektronpaljunduse (ingl. k. <i>electron-multiplying</i>)
GFP	–	Roheliselt fluorestseeriv valk (ingl. k. <i>green fluorescent protein</i>)
HLA-G	–	Inimese leukotsüüdi antigeen G (ingl. k. <i>human leukocyte antigen G</i>)
LP	–	Laseri võimsus (ingl. k. <i>laser power</i>)
n	–	Refraktsiooniindeks
NA	–	Apertuurarv (ingl. k. <i>numerical aperture</i>)
PEG	–	Polüetüleenglükool
SA-PE	–	Streptavidiin-R-fükoerütriin (ingl. k. <i>Streptavidin-R-Phycoerythrin</i>)
PSF	–	Punkti hajuvusfunktsioon (ingl. k. <i>point-spread function</i>)
TIRFM	–	Täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoop (ingl. k. <i>total internal reflection fluorescence microscope</i>)

SISUKORD

KASUTATUD TÄHISED JA LÜHENDID	2
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Fluorestsentsi nähtus	6
1.1.1. Fluorestsentsi olemus ja teke	6
1.1.2. Fluorestsentsi iseloomustavad parameetrid	6
1.1.3. Fluorofoorid	7
1.2. Fluorestsentsmikroskoopia	8
1.2.1. Fluorestsentsmikroskoobi tööpõhimõte	8
1.2.2. Fluorestsentsmikroskoobi ehitus	8
1.2.3. Täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoop	10
1.2.3.1. 360-TIRF	11
1.2.3.2. TIRFM kasutamine biosensorsüsteemides	11
1.2.4. Signaal ja müra	12
1.2.5. Signaal-müra suhet mõjutavad tööparameetrid	12
1.2.5.1. Sisepeegeldusnurk	12
1.2.5.2. Laseri võimsus	13
1.2.5.3. EM võimendus	14
1.2.5.4. Säriaeg	14
1.2.6. Analoog- ja digitaalsignaali	14
1.2.7. Andmeanalüüs üksikmolekulide mõõtmisel	15
2. EKPERIMENTAALNE OSA	16
2.1. Töö eesmärk	16
2.2. Materjalid ja meetodika	16
2.2.1. Mikroskoop	16

2.2.2. Funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasid	16
2.2.3. Kasutatud fluorofoorid	17
2.2.4. Katsete ülesehitus	17
2.2.5. Üsikumolekulide detekteerimine TIRF mikroskoobiga	18
2.2.6. Andmeanalüüs	19
3. TULEMUSED JA ARUTELU	21
3.1.1. Positsiooniparameeter.....	21
3.1.2. EM võimendus.....	23
3.1.3. Laseri võimsus.....	24
3.1.4. Säriaeg	26
KOKKUVÕTE	28
KASUTATUD KIRJANDUS	29
SUMMARY	31
LISAD	32

SISSEJUHATUS

Käesolevas bakalaureusetöös varieeriti täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoobi (TIRFM) tööparameetreid, et uurida nende mõju signaal-müra suhtele. TIRFM tööparameetrite varieerimise mõju uurimisel kasutati sünteetilisi fluorestseerivaid molekule. Antud katsetest omandatud informatsiooni põhjal teostati lõppkatse streptavidiin-konjugeeritud fluorofoori ja funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasiga. Lõppkatse eesmärgiks oli leida optimaalsed TIRFM tööparameetrite väärtused Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia uurimisrühma väljaarendatavas inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G) biosensorsüsteemis kasutamiseks. Optimeeritud TIRFM tööparameetrid aitavad tõsta eelmainitud HLA-G biosensorsüsteemi tundlikkust.

TIRFM on sobiv kasutamiseks biosensorsüsteemides, kus eesmärgiks on immobiliseerida uuritav molekul tahkele pinnale, kuna TIRFM võimaldab tahkele pinnale kinnitunud märgistatud molekulide visualiseerimist hägustes või taustafluorestsentsiga lahustes. Lisaks saab TIRFM abil detekteerida üksikmolekule, mis teeb võimalikuks märgistatud üksikmolekulide loendamise. Üksikmolekulide detekteerimiseks ja loendamiseks on vajalik saavutada võimalikult madal signaal-müra suhe – selleks ongi vajalik TIRFM tööparameetrite optimeerimine. Peale madala signaal-müra suhte on üksikmolekulide detekteerimiseks ja loendamiseks oluline ka uuritavate molekulide pinnal paiknemise tihedus ja lahutus (resolutsioon), millega kujutisi vaadeldakse. Piisavalt kvaliteetsete kujutiste saavutamisel saab neid analüüsida spetsiaalsete arvutiprogrammidega, mille tulemusel on võimalik leida üksikmolekulide arvu ja analüüdi kontsentratsiooni suhe.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Fluorestsentsi nähtus

Luminesentsi alaliik fotoluminesents on nähtus, kus ultraviolettkiirguse või nähtava valguse poolt ergastatud molekul emiteerib vahetult pärast ergastamist valgust. Fotoluminesents jaguneb fluorestsentsiks ja fosforestsentsiks. Fluorestsents on aatomite ja molekulide omadus neelata kindlal lainepikkusel valgust ning väga lühikese ajavahemiku järel emiteerida kõrgemal lainepikkusel valgust – seda nähtust tuntakse ka kui Stokes'i nihe. Tavaliselt neeldub ergastatavas molekulis üks footon, kuid erandjuhuna on võimalik, et neeldub ka mitu footonit, mille tulemusena on emiteeritav valgus madalama lainepikkusega. Fluorestsentsomadustega molekule nimetatakse fluorofoorideks. Fosforestsentsi nähtus sarnaneb fluorestsentsile, kuid fosforestsentsi puhul jääb aatom või molekul palju kauemaks ergastatud olekusse ning seega kiirgab ta valgust pikema aja möödudes.^[1]

1.1.1. Fluorestsentsi olemus ja teke

Ergastamise käigus toimub fluorofoori üleminek põhiolekust ergastatud olekusse. Valguse neeldumine toimub väga kiiresti (umbes 1 femtosekundi jooksul) ja kvandilistes suurustes. Fluorofoori ergastumine footoniga on fenomen, mis toimub „kõik või mitte midagi“ põhimõttel ja leiab aset ainult kindlas lainepikkuste vahemikus, mida nimetatakse neeldumisribaks. Kui aga footoni energia ei ole ergastamiseks sobivas lainepikkuste vahemikus, siis ergastamist, ning ka fluorestsentsi nähtust, ei toimu. Enamasti kiirgab fluorestseeriv molekul või aatom valgust igas võimalikus suunas.^[1]

1.1.2. Fluorestsentsi iseloomustavad parameetrid

Fluorestsentsi seisukohast iseloomustavad fluorofoori mitmed parameetrid: neeldumis- ja kiirgusspekter, kvantsaagis, molaarne neeldumiskoeffitsient (ehk ekstinktsioonikoeffitsient), kustumine ja eluaeg. Fluorofoori neeldumis- ja kiirgusspekter varieerub olenevalt fluorofoorist. Fluorestsentsi lainepikkust ja intensiivsust mõjutab ka lahus, milles fluorofoorid on – see tuleneb lahuse komponentide ja fluorofoori molekulide vahelistest interaktsioonidest (van der Waals'i jõud).^[2]

Fluorestsentsi kvantsaagis on fluorestsentsi tekitavate footonite arvu ja neeldunud footonite arvu suhe, mis väljendub valemiga 1:

$$\varphi_f = \frac{\text{fluorestsentsi tekitavad footonid}}{\text{neeldunud footonid}}, \quad (1)$$

kus φ_f on fluorestsentsi kvantsaagis. Fluorestsentsi molaarne neeldumiskoeffitsient väljendab, kui palju valgust (fluorestseeriv) aine on võimeline kindlal lainepikkusel neelama.^[1,2]

Fluorofoori kustumist võivad põhjustada mitmed mehhanismid, nagu näiteks fluorestseeriva molekuli kokkupõrked kustutava molekuliga, uute mittefluorestseerivate komplekside moodustumine, fotopleegitus ja teised mehhanismid. Fotopleegituse efekt on nähtus, mis tuleneb footonite põhjustatud keemilistest kahjustustest ja kovalentsetest modifikatsioonidest fluorestseeriva molekuli struktuuris. Kahjustuste tulemusena kaotab fluorofoor võime fluorestseerida.^[1]

Fluorestsentsi eluiga defineeritakse järgmiselt: aeg, mis kulub ergastunud seisundis populatsiooni originaalväärtuse kahanemiseks väärtuseni $1/e$, kui ergastamisallikas on välja lülitatud. Ergastunud olekus molekuli eluiga on tavaliselt 10^{-9} - 10^{-6} sekundit.^[1,2]

1.1.3. Fluorofoorid

Fluorofoorid (ehk fluorokroomid) on keemilised ühendid, mis on võimelised valgusega ergastamise tulemusena kiirgama valgust. Fluorestsentsi nähtus esineb enamasti molekulidel, mis sisaldavad aromaatsset tuuma või mitut konjugeeritud sidet, millel on kõrge resonantsi stabiilsus. Mõlema aineklassi puhul on olemas delokaliseeritud π -elektronid, mida saab viia ergastatud olekusse.^[2] Ühed levinuimad fluorofoorid, fluorestsentsiinid ja rodamiinid, arendati välja rohkem kui 100 aastat tagasi.^[3]

Fluorofoore kasutatakse fluorestsentsmikroskoopias uuritavate molekulide märgistamiseks. Ideaalne fluorofoor on suure neeldumiskoeffitsiendiga ja fluorestsentsi kvantsaagisega, ei kahjusta kandjamolekuli ja püsib tugeva valgusvoo all kaua fotoaktiivsena. Suurem osa *in vitro* uuringutest kasutab kahte põhilist fluorofooride perekonda: tsüaniini ja rodamiini. GFP (ingl. k. *green fluorescent protein*) sarnased fluorestsentsiivad molekulid on sobivad *in vivo* katseteks.^[4]

Fluorofooridena kasutatakse ka polümeermaterjalist sfäärikulisi kuulikesi, mis on täidetud erinevate fluorestsentsiivade värvidega. Selliste kuulikeste pinda saab vajadusel katta erinevate funktsionaalsete rühmadega. Mikrokuulikeste üheks eeliseks on väga tugev vastupidavus fotopleegitusele.^[5]

1.2. Fluorestsentsmikroskoopia

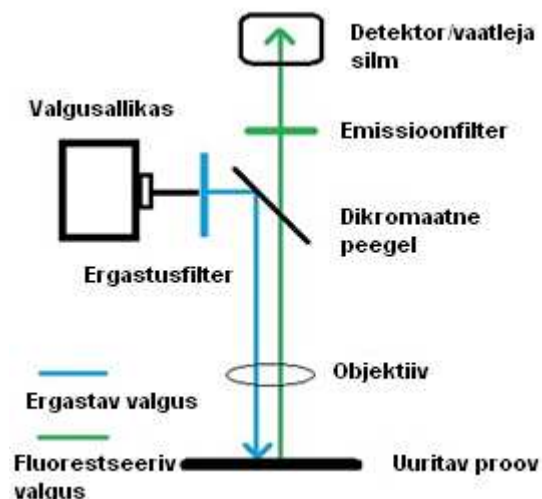
Fluorestsentsmikroskoopia põhimõte seisneb selles, et uuritav (märgistatud) molekul ergastatakse kindlal lainepikkusel valgusega ning seejärel eraldatakse spetsiaalsete filtrite abil emiteeritav valgus. Fluorestsentspektroskoopiaga võrreldes on fluorestsentsmikroskoopia eeliseks võimalus ruumilise lahutusega visualiseerida uuritav (fluorestseeriv) proov. Fluorestsentsmikroskoopia on saanud oluliseks uurimismeetodiks bioloogias, biomeditsiiniteadustes ja materjaliteaduses, kuna fluorestsentsmikroskoopia omab olulisi eeliseid traditsioonilise optilise mikroskoopia ees. Fluorofooriga märgistamise abil on võimalik mittefluorestseerivast taustast eristada rakke, rakukomponente ja isegi üksikuid molekule väga kõrge spetsiifilisusega.^[1,6]

1.2.1. Fluorestsentsmikroskoobi tööpõhimõte

Fluorestsentsmikroskoop töötab Stokes'i nihke alusel: uuritav proov valgustatakse ühel lainepikkusel valgusega ning ergastatud proovilt kiirguv fluorestsentsvalgus filtreeritakse teisel lainepikkusel. Fluorestsentsmikroskoobi tööprotsessi tulemusena peaks vaatleja silma või detektorisse jõudma ainult emiteeritav valgus, mistõttu on näha kõrge kontrastiga tumedast (mustast) taustast eristuvad fluorestseerivad struktuurid. Fluorestsentsmikroskoopides esineb erinevaid geomeetrilisi valgustamismehhanisme, kuid enim kasutust leiab epi-valgustamine. Epi-valgustamisel on üheskoos kondensaator ergastava valguse jaoks ja objektiiv fluorestseeriva valguse püüdmiseks. Epi-valgustamise vastandiks on trans-valgustamine, kus ühelt poolt mikroskoobiklaasi asub kondensaator, mis suunab ergastavat valgust, ja teiselt poolt (tavaliselt mikroskoobiklaasist allpool) objektiiv, mis püüab kinni fluorestsentsvalguse.^[6]

1.2.2. Fluorestsentsmikroskoobi ehitus

Fluorestsentsmikroskoobi põhimõtteline ehitus on järgnev: valgusallikast tulev valgus läbib ergastusfiltri ja dikromaatse peegli ning kindla lainepikkusega valgus jõuab läbi objektiivi uuritava proovini, mis ergastub. Ergastuse tulemusena tekkiv fluorestsentsvalgus läbib objektiivi, dikromaatse peegli ja emissioonifiltri, jõudes lõpuks detektori või vaatleja silmani. Moodsate fluorestsentsmikroskoopide puhul kasutatakse eelistatult epi-valgustamist, kuna see võimaldab vaadelda ka läbipaistmatuid proove.^[6] Joonisel 1 on näidatud epi-valgustusega fluorestsentsmikroskoobi põhimõtteline skeem.



Joonis 1. Epi-valgustusega fluorestsentsmikroskoobi skeem.

Ideaalne fluorestsentsmikroskoobi valgusallikas peaks olema stabiilne ja võimaldama kõrget valgustusintensiivsust kindlatel lainepikkustel. Algselt leidsid palju kasutust kaarlambid, kuid tehnoloogia areng on muutnud atraktiivseks ka uute valgusallikate (leedlambid ja laserid) kasutamise. Leedlambid on ökonoomsemad kui kaarlambid ja omavad mitmeid tehnilisi eeliseid, kuid neil on ka piiranguid: leedlampide võimsus on keskmiselt kuni 100 mW ja nende valgus ei ole tõeliselt monokromaatiline. Alternatiivina leedlampidele on saadaval laserid, mille võimsus on keskmiselt 200-300 mW ja valgus monokromaatiline.^[7]

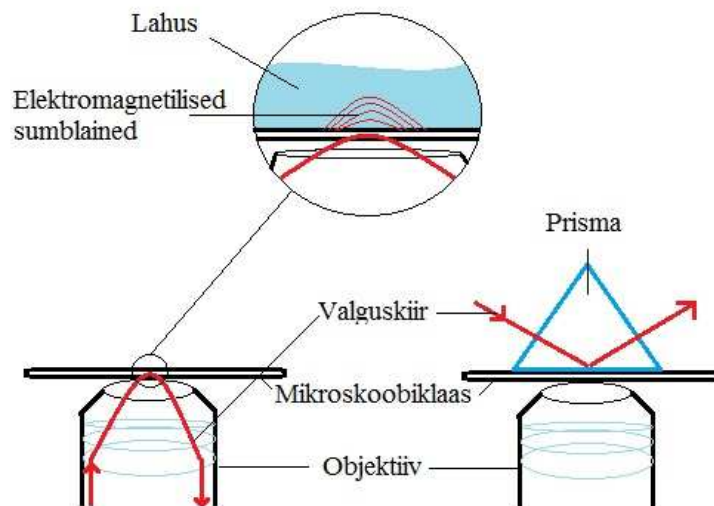
Paljud fluorestsentsmikroskoobid kasutavad plokikujulisi filtrihoidjaid, milles paiknevad ergastus- ja emissioonifilter ning dikromaatne peegel, et hõlbustada kindlate ergastus- ja kiirgusspektritega fluorofooride kasutamist. Kasutatakse ka filtrikarusselli, mille abil saab kiiresti vahetada erinevaid ergastus- ja emissioonifiltreid. Uudne filtrikomplekt laseb läbi keskmiselt vaid ühe vale lainepikkusega ergastusvalguse footoni 10 000 kohta, nii ka tagasituleva valguse puhul. Selline suhtarv on absoluutselt vajalik väikese arvu, või üksikute, fluorestseerivate molekulide uurimiseks.^[6]

Fluorestsentsmikroskoopides kasutatakse põhilise sensorsüsteemina kaamera-tüüpi detektoreid, mis lubavad emiteeritava signaali kiiret ja täpset mõõtmist laias ruumipiirkonnas. Laengsidestusseadised (CCD-d, ingl. k. *charge-coupled devices*) ja komplementaarsed metall-oksiid-pooljuht (CMOS, ingl. k. *complementary metal-oxide-semiconductor*) tehnoloogiaga kaamerad on suure jõudlusega ja sobivad just selleks ülesandeks.^[7]

1.2.3. Täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoop

Üheks fluorestsentsmikroskoopia alaliigiks on täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoopia. Täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoop (TIRFM) lubab selektiivselt ergastada pinnalähedaseid fluorofore, jättes seejuures ergastamata fluorestseerivad ühendid, mis on tahkest pinnast kaugemal kui ligikaudu 200 nm (olenevalt antud mikroskoobi võimekusest ja seadetest).^[8,9] Kui ergastusvõimeline valguskiir, mis tabab erinevate refraktsiooniindeksitega keskkondade piirpinda, murdub teatud nurga (nn. kriitilise nurga) juures, siis toimub täielik sisepeegeldumine. Täieliku sisepeegelduse tulemusena jõuab uuritavasse lahusesse või raku ainult elektromagnetiline sumblaine. Elektromagnetiline sumblaine on sama sagedusega kui valguskiir, mis seda põhjustab, ja sumblaine intensiivsus väheneb pinnast kaugemale liikudes eksponentsiaalselt. Sellest nähtusest tulenevalt on taustafluorestsents väga madal, sest sumblaine ergastab vaid pinna lähedal olevaid fluorofore.^[10]

TIRF mikroskoobid kasutavad erinevaid optilisi konfiguratsioone. Üks variant on prismaga varustatud mikroskoop, kus prisma kasutatakse valguskiire suunamiseks erinevate refraktsiooniindeksitega keskkondade piirpinnale, et kutsuda esile täielik sisepeegeldumine. Teisalt on kasutusel kõrge apertuurarvuga ($NA > 1,4$) objektiivid, mille sees valguskiir liigub.^[10] Joonisel 2 on näidatud eelpool mainitud kaks optilist konfiguratsiooni.



Joonis 2. TIRF mikroskoobi skeem. Vasakul ilma prismata, paremal prismaga TIRFM konfiguratsioon.

Välja on toodud ka täieliku sisepeegelduse tulemusena tekkivad elektromagnetilised sumblained.

1.2.3.1. 360-TIRF

360-TIRF on meetod TIRF mikroskoopias, mis tagab fluorofooride ühtlasema ergastatuse, suurendades seega veelgi süsteemi tundlikkust ja võimekust avastada fluorestseerivaid molekule. Suurem tundlikkus saavutatakse roteerides fokuseeritud laserkiiri asimuudis objektiivi läätse tagumisel fokaaltasandil – selleks kasutatakse kahe-dimensioonilist (2D) skaneerimispead. Tavalise TIRF mikroskoobi korral suunatakse laserkiir objektiivi tagumisele fokaaltasandile fikseeritud positsioonist; 360-TIRF puhul roteeritakse laserkiirt 360° konstantse raadiusega, mille tulemusena moodustub koonusekujuline illuminatsiooniväli.^[11]

Fluorofoorid neelavad eelistatult footoneid, mille elektrilised vektorid on joondatud paralleelselt fluorofoori üleminekumomendiga. Üleminekumomendil on molekulaartelje suhtes defineeritud orientatsioon. Isotroopses lahuses on fluorofoorid orienteeritud juhuslikult. Polariseeritud valgusega (näiteks laserkiir või polarisatsioonifiltri läbinud valgus) ergastatakse selektiivselt need fluorofoori molekulid, mille neeldumise ülemineku dipool on paralleelne ergastamise elektrilise vektoriga.^[1] 360-TIRF meetodi puhul roteeritakse laserit väga lühikese aja jooksul 360° ja seetõttu ergastatakse võimalikult paljusid fluorofoore ning suureneb nähtavate fluorofooride arv.

1.2.3.2. TIRFM kasutamine biosensorsüsteemides

Elektromagnetilisi sumblaineid kasutav spektroskoopia leiab tihti rakendust biosensorsüsteemides, kus analüüt püütakse biomolekulidevahelisi interaktsioone rakendades tahkele pinnale. Enimkasutatud meetodiks elektromagnetiliste sumblainete tekitamisel on täielik sisepeegeldumine. Biosensorsüsteemides kasutamiseks on TIRF mikroskoobil mitmeid eeliseid: pinnale seostumata märgistatud molekulid, mis on lahuses, jäävad ergastamata ning seega ei anna signaali; mõõtmisi saab teostada absorbeerivas või häguses meediumis – mida on enamus bioloogilisi lahuseid. TIRF biosensorsüsteemi vastus ei sõltu analüüdi massist, mis võimaldab ka väikeste molekulide ja hapteenide avastamist.^[12]

TIRF mikroskoopi kasutatakse ka biosensorsüsteemides, kus eesmärgiks on avastada üksikuid molekule. Üheks üksikmolekulide avastamise võimaluseks on kasutada meetodeid, kus funktsionaliseeritud tahkele alusele (mikroskoobiklaasile) püütakse kinni uuritav molekul, millele lisatakse fluorestsentsmärgis. Fluorestsentsmärgis muudab uuritava molekuli TIRF mikroskoobis nähtavaks. Tulemuseks on kujutis, kus võrdlemisi

selgesti eristuvad märgistatud molekulid. TIRFM (ja ka 360-TIRF) eeliseid kombineerides on võimalik saavutada üksikmolekulresolutsioon ja seeläbi ka suurem tundlikkus.^[13]

1.2.4. Signaal ja müra

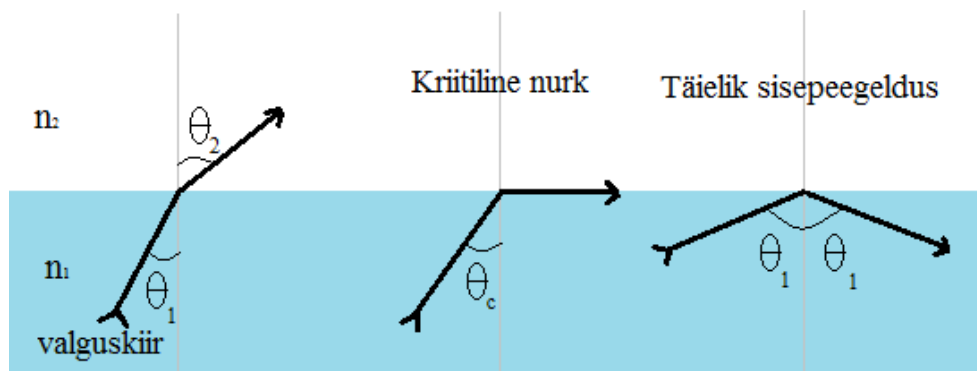
Hea signaal-müra suhte saavutamine on oluline kõikides eksperimentaalsetes süsteemides, nii ka fluorestsentsmikroskoopias. Parima võimaliku kujutise saavutamiseks peaks uuritavate molekulide (siinkohal fluorofooride) signaal olema kõrge ja taustamüra minimaalne. Taustamüra on võimalik vähendada vältides uuritavast pinnast eemalasuvate fluorofooride ergastamist – seda aitab saavutada TIRF mikroskoop. Oluline on ka katseks sobivate fluorofooride valik, millel oleks piisavalt kõrge neeldumiskoefitsient, kvantsaagis ning stabiilsus. Lisaks aitab heale signaal-müra suhtele kaasa kvaliteetne aparatuur: stabiilsed laserid, kvaliteetsed optilise tee komponendid (valguskaablid, filtrid, peeglid, läätsed), suure apertuurarvu ja hea suurendusvõimega objektiivid, millel on minimaalsed aberratsioonid ning suure tundlikkus, madala müra ja hea ajalise lahutusega detektorid (enamasti laengsidestusseadised).^[4]

Oluline on arvestada ka detektori müraallikatega. Tänapäeva fluorestsentsmikroskoopias on detektoriteks põhiliselt CCD-d, mis põhjustavad mitut tüüpi müra: stohhastilise footonemissiooni haavelmüra (ingl. k. *shot noise*), taustafootonid ja võimendusmüra (ingl. k. *electron-multiplying (EM) gain noise*) EMCCD-de puhul, lugemismüra (ingl. k. *read-out noise*), pimevool (ingl. k. *dark noise*) ja müra, mis tuleneb kaamera piiratud ruumilisest eraldusvõimest.^[14] Taustamüra võivad tekitada ka muud segavad faktorid, nagu näiteks mustus optilisel pinnal, immersioonõli ebapuhtused ja taustafluorestsents.^[15]

1.2.5. Signaal-müra suhet mõjutavad tööparameetrid

1.2.5.1. Sisepeegeldusnurk

TIRF mikroskoobiga illumineerimine põhineb kindlal fenomenil: kui valguskiir läbib kõrge refraktsiooniindeksiga materjali ja läheb madala refraktsiooniindeksiga materjali, siis osa sellest valgusest peegeldatakse tagasi ning osa valgusest murdub.^[15] Valguskiire murdumist kahe erineva refraktsiooniindeksiga materjali läbimisel on illustreeritud joonisel 3.



Joonis 3. Joonisel on näidatud valguskiire murdumine kahe erineva refraktsiooniindeksiga materjali läbimisel.

Pegeldumisnurka suurendades väheneb murduva valguse osakaal, kuni nii-nimetatud kriitilise nurgani. Alates kriitilisest nurgast muutub murduva valguse osakaal praktiliselt olematuks ning kogu valguskiir peegeldatakse tagasi ja proovi/lahusesse levib vaid sumblaine. Kriitilist nurka saab arvutada valemi 2 järgi:

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (2)$$

kus θ_c on kriitiline nurk, n_1 on suurema tihedusega materjali refraktsiooniindeks, n_2 on väiksema tihedusega materjali refraktsiooniindeks.^[15]

Täieliku sisepeegelduse tulemusena tekivad elektromagnetiline sumblaine on kõige intensiivsem kahe refraktsiooniindeksiga materjali vahel ja selle intensiivsus väheneb eksponentsiaalselt pinnast kaugenedes.^[15] Sumblaine levimiskaugus kahe erineva refraktsiooniindeksiga materjali piirpinnast väljendub valemiga 3:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi} \sqrt{\frac{1}{n_1^2 \sin^2(\alpha) - n_2^2}}, \quad (3)$$

kus d on sumblaine levimiskaugus, λ_0 on valguskiire lainepikkus, n_1 on suurema tihedusega materjali refraktsiooniindeks ja n_2 on väiksema tihedusega materjali refraktsiooniindeks ning α on langeva valguskiire murdumisnurk.^[16]

1.2.5.2. Laseri võimsus

TIRF mikroskoopides kasutatakse eelistatult gaasilampide asemel lasereid. Laserite eelisteks on valgusvoo kitsas lainepikkuste vahemik, mis on hädavajalik valguskiirte täpseks suunamiseks ja täieliku sisepeegelduse saavutamiseks, ja suur footontihedus.^[16] TIRF mikroskoobis saab varieerida kasutatava laseri võimsust (LP) vastavalt vajadusele.

Suurem laseri võimsus annab tugevama signaali fluorofooridelt, kuid tuleks arvestada ka fotopleegituse ohuga – suurema võimsusega laser pleegitab fluorofoore kiiremini.^[17]

1.2.5.3. EM võimendus

Signaali-müra suhet on võimalik parandada CCD kaamerate abil, mis kasutavad elektronpaljunduse tehnoloogiat, et võimendada footon-genereeritud laengut üle lugemismüra. EMCCD kaameratel on väga madal müratase, kõrge resolutsioon, suur kvantefektiivsus ja robustsus ülesäritusele (ingl. k. *over-exposure*), mistõttu on nad ideaalsed täitma ülesandeid, mille jaoks varasemalt kasutati traditsioonilisi kujutisvõimendeid. Kuigi uuemad CCD kaamerad on võrdlemisi vastupidavad ülesärituse suhtes, siis suure EM võimenduse kasutamisel esineb siiski kaamerate enneaegset vananemist. EM võimendus saavutatakse sekundaarsete elektronide genereerimisega, mis toimub elektronionisatsiooni abil. EMCCD kaamerad sarnanevad põhimõtteliselt laviinfotodiodidele, kus ühtetüüpi laengukandja (antud juhul elektron) initsieerib ionisatsiooni.^[18]

1.2.5.4. Säriaeg

Säriaeg on fluorestsentsmikroskoobi varieeritav tööparameeter, mis iseloomustab ajavahemikku, mille jooksul proovi kiiritatakse ning valgust detektoris registreeritakse. Säriaeg võib olla, olenevalt vajadusest, mõnest millisekundist kuni mitme sekundini. Mida lühem on säriaeg, seda eredam peaks olema valgusallikas, et piisavalt ergastada fluorofoore. Mida pikem on säriaeg ja mida rohkem valgusallikas kuvab ergastavat valgust, seda rohkem fluorofoore ergastub, kuid suurema säriajaga kaasneb ka suurem fluorofooride fotopleegitamise oht ning suurem pimevool.^[3]

1.2.6. Analoog- ja digitaalsignaal

Analoogsignaal on signaal, mis muutub pidevalt amplituudis ja ajas. Iseseisvaks muutujaks ei pruugi tingimata olla aeg, vaid see võib olla ka ruumikoordinaat. Digitaalsignaal on signaal, millel on diskreetne amplituud ja aeg. Digitaalsignaali tõlgendatakse läbi numberjärjestuste. Proovist tulenevat fluorestsentssignaali on võimalik mõõta ja töödelda kas analoog- või digitaalrežiimis: esimesel juhul tehakse kõik toimingud pideva signaaliga, teisel juhul analoogsignaal mingil hetkel digitaliseeritakse ehk muudetakse loendatavaks.^[19,20]

Fluorestsentsmikroskoopia seisukohast kujutab analoogsignaal endast fluorofooridelt mõõdetud keskmist fluorestsentsi intensiivsust. Kui üldisest fluorestsentssignalist suudetakse eristada üksikutelt fluorofooridelt tulevat signaali, siis on võimalik signaal

muuta loendatavaks ehk digitaalseks. Seda on võimalik teha fluorofoori eeldatava punkti hajuvusfunktsiooni (ingl. k. *point-spread function – PSF*) ja signaali ruumilise ning ajalise lahutuse abil. TIRF mikroskoopia jaoks on sobivam ja täpsem digitaalrežiim, kuna uuritavad objektid asuvad statsionaarselt tahkel pinnal.^[20,21]

Digitaalsignaali puhul on tundlikkus oluliselt suurem kui analoogsignaaliga, sest taustafluorestsentsi ja fluorofooride intensiivsuse kõikumised taanduvad maha – see võimaldab saada täpsemat seost signaali ja fluorofooride kontsentratsiooni vahel. Analoogsignaali puhul on müratase kõrgem ja väikesed muutused fluorofoori kogustes ei pruugi olla detekteeritavad. Teisest küljest on analoogsignaal sobivam, kui eesmärgiks on mõõta suuri fluorofooride koguseid, kus üksikute fluorofooride eristamine ei ole mikroskoobi piiratud ruumilise lahutuse tõttu enam võimalik.^[20]

1.2.7. Andmeanalüüs üksikmolekulide mõõtmisel

Andmeanalüüs üksikmolekulide mõõtmisel toimub TIRF mikroskoobi abil saadud kujutistega, kus on võimalik taustast eristada üksikmolekule. Tihtipeale kasutatakse üksikmolekulide loetlemiseks spetsiaalseid algoritme kasutavaid arvutiprogramme, sest inimese mõistus kipub nägema mustreid ka seal, kus neid tegelikult ei ole. Peale selle on käsitsi täppide loendamine ajakulukas ja ei pruugi anda objektiivseid/võrreldavaid tulemusi.^[22]

Areneva tehnoloogiaga muutub piltide resolutsioon üha paremaks, mis tähendab, et arenema peab ka pildianalüüsi meetoodika. Lisaks paremale resolutsioonile on pildidel, mis kujutavad üksikmolekule, üldjuhul madal signaali-müra suhe ning see tekitab vajaduse arvutiprogrammide järele, mis oleksid võimelised üksikute molekulide signaale edukalt taustast eristama.^[22] Üheks selliseks programmiks on vabavaraline programm ImageJ, mis sisaldab mitmeid kasulikke vahendeid pildianalüüsiks: standardsed pildifiltrid, taustaeemaldussüsteem, mis töötab ka ebahürtlase tausta puhul, jpm.^[23] ImageJ võimaldab teostada üksikmolekulide intensiivsuse analüüsi, mida saab kasutada näiteks TIRFM põhistes biosensorsüsteemides.

2. EKPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärk

Antud töö eesmärgiks on optimeerida TIRF mikroskoobi varieeritavaid tööparameetreid, et uurida nende mõju signaal-müra suhtele ja leida optimaalsed TIRFM tööparameetrite väärtused Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia uurimisrühma väljaarendatavas HLA-G biosensorsüsteemis kasutamiseks. Katsete tulemusel saadud informatsiooni saab rakendada TIRFM kasulikkuse maksimeerimiseks üksikmolekulide detekteerimisel. Tööparameetrid, mida optimeeriti, on järgnevad: positsiooniparameeter, EM võimendus, laseri võimsus ja säriaeg.

2.2. Materjalid ja meetodika

2.2.1. Mikroskoop

Katse läbiviimisel kasutati TIRF mikroskoopi (iMIC, Till Photonics GmbH). Valgusallikana kasutati Cobolt Dual Calypso™ 491/532 nm DPSS (ingl. k. *diode-pumped solid-state*) laserit võimsusega 50 mW, mille kiirgusest selekteeriti AOTF-ga (ingl. k. *acousto optical tunable filter*) 532 nm lainepikkus. Läbi Zt 532 rdcxt dikromaatse peegli suunati valgus 60x APON TIRF õliobjektiivile (Olympus), mille apertuurarv on 1,49. Laserkiire langemisnurka varieeriti Yanus II skaneerimisseade abil. Objektiivi tagasitulev valgus filtreeriti läbi ET 605±35. Detekteerimiseks kasutati iXON 885 EMCCD kaamerat (Andor).

2.2.2. Funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasid

Katsetes kasutati mikroskoobiklaase (High Precision No. 1.5H, Marienfeld), mis puhastati järgnevalt: pesu voolava destilleeritud vee ja metanooliga, 15 minutit sonikeerimist milliQ vee ja metanooliga ultrahelivannis (WiseClean®, Wisd. Laboratory Instruments), 15 minutit puhastamist plasmamasinas (ATTO, Diener Electronic) 200 W juures.

Funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasiga katses (streptavidiin-R-fükoerütriiniga katse) kasutatavat klaasi aktiveeriti aminosilaaniga (N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine 97%, Sigma-Aldrich), mis seostub kovalentselt klaasile ja võimaldab pinna edasist modifitseerimist. Silaanitud klaas kaeti omakorda PEG (polüetüleenglükool) seguga, millest 98% on metoksü-PEG ja 2% biotiin-PEG. Lõpptulemusena saadi funktsionaalsete biotiinrühmadega mikroskoobiklaasid, millele saab katse läbiviimisel selektiivselt seostuda streptavidiin.

Nii funktsionaliseerimata kui funktsionaliseeritud klaasidele kleebiti peale 4-süvendiliseks lõigatud kambrid (12 well Chamber, Ibidi), mille süvenditesse lisati hiljem lahused.

2.2.3. Kasutatud fluorofoorid

Taustafluorestsentsi tekitamiseks kasutati algselt fluorestseiini (Fluorescein, Lambert Instruments). Kasutatud fluorestseiini 10 μM alglahus oli lahustatud 0,01 M Tris puhvrts, mille pH 10, fluorestsentsi keskmiseks elueaks on 4,02 ns ja lainepikkuste maksimumideks 490/514 nm. Fluorestseiin osutus katsete käigus ebasobivaks ja asendati edasistes katsetes rodamiiniga.

Enamikes katsetes kasutati taustafluorestsentsi tekitamiseks rodamiini (Rhodamin 6G, Lambert Instruments), mille alglahus oli 5 μM ja lahustina oli kasutatud milliQ vett. Rodamiini fluorestsentsi keskmiseks elueaks on 3,97 ns ja lainepikkuste maksimumideks 524/555 nm.

Mikrokuulikeste katseseerias kasutati statsionaarsete fluorestseerivate molekulidena FluoSpheres® karboksülaad-modifitseeritud mikrokuulikesi (F-8803, Life Technologies), mis on vastupidavad fotopleegitusele ja seetõttu sobivad antud katsete läbiviimiseks. Kasutatud mikrokuulikeste keskmine diameeter oli 0,1 μm ja ergastava/kiirguva valguse lainepikkuste maksimumid 505/515 nm. Alglahuses oli tahkeid aineid 2%.

Streptavidiin-R-fükoerütriin (SA-PE) katses kasutati fluorestsentsmärgisena streptavidiiniga seotud R-fükoerütriini (Streptavidin-R-Phycoerythrin, Sigma-Aldrich), mille molekulmassiks on ~240 kDa ja ergastav/kiirguv lainepikkus 488/578 nm. Streptavidiin-R-fükoerütriin oli lahustatud 0,01 M fosfaatpuhvrts (pH 7,4), millesse oli lisatud stabilisaatorina 1% veise seerumi albumiini ja 15 mM naatriumasiidi.

2.2.4. Katsete ülesehitus

Katseseeriad mikrokuulikestega viidi läbi puhastatud mikroskoobiklaasidel. Saadud tulemuste põhjal viidi läbi sarnased katsed SA-PE ja Ago Rinkeeni töögrupis Kairi Tõnsau ja Taavi Võsumaa poolt biotiin-funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasidega. Streptavidiin-R-fükoerütriin ja antud funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasid on kasutusel töögrupi poolt väljaarendatavas HLA-G (ingl. k. *human leukocyte antigen G*) biosensorsüsteemis.

Mikrokuulikestega tehtud katsetes oli esimeseks sammuks mikroskoobiklaaside puhastamine. Kahest puhastatud mikroskoobiklaasist valiti vaatluse alusel välja parim. Puhastatud mikroskoobiklaasile kleebiti peale 4-süvendiline kamber. Järgmise sammuna

sonikeeriti mikrokuulikesi ultrahelivannis ligikaudu 5 minutit, et lõhkuda võimalikke agregate. Seejärel valmistati 1,5 ml suurustesse tuubidesse mikrokuulikesi ja rodamiini sisaldavad lahused, kus mikrokuulikeste lõppkontsentratsioon oli kõigis lahustes 1/100 000 alglahuse kontsentratsioonist ja rodamiini lõppkontsentratsioonid vahemikus 0-100 nM. Lahustina kasutati Dulbecco fosfaat-puhverdatud soolalahust (DPBS, Naxo), millesse oli lisatud 0,1% Pluronicut (F-127, Sigma-Aldrich). Erinevate rodamiini kontsentratsioonidega lahused lisati elektroonilise pipeti (Matrix Impact2) abil kambri süvenditesse, kus mikrokuulikestel lasti 2 tunni jooksul põhja sadestuda. Pärast sadestamist asetati mikroskoobiklaas koos kambri ja lahustega TIRF mikroskoobi alla, kus toimus edasine katse läbiviimine.

SA-PE katse ülesehitus oli analoogne mikrokuulikestega tehtud katsetele, aga tavalise puhastatud mikroskoobiklaasi asemel kasutati eelnevalt valmistatud funktsionaliseeritud mikroskoobiklaasi. Valmistatud lahustes olid rodamiini lõppkontsentratsioonid vahemikus 0-30 nM ja SA-PE lõppkontsentratsioon kõigis lahustes 5 pM. Sobiv SA-PE kontsentratsioon leiti varasemalt tehtud katsete põhjal. SA-PE ja rodamiini lahuseid inkubeeriti 1 tund. Edasine katse läbiviimine toimus TIRF mikroskoobiga.

2.2.5. Üksikmolekulide detekteerimine TIRF mikroskoobiga

Valmistatud lahuseid uuriti TIRF mikroskoobi abil. Mikroskoobis kasutati 60x õliobjektiivi ja 360-TIRF süsteemi, vaatevälja suuruseks oli 512x512 pikslit (68x68 µm), piksli suuruseks 133x133 nm. Ühe tööparameetri määramisel jäeti vaatluspiirkond samaks; iga järgneva tööparameetri pildiseeriade jaoks liiguti kahe vaatevälja võrra edasi. Pilt tehti iga tööparameetri muutuse järel. Ühe tööparameetri varieerimisel jäeti ülejäänud tööparameetrid konstantseks. Tööparameetrite konstantsed väärtused valiti varasemalt tehtud piloot- või analoogsete katsete põhjal. Mikrokuulikeste katsetes kasutati mikroskoobi tarkvaralist autofokuseerimist (fokuseerimise sammuga 0,05 µm), kuid SA-PE katsetes teostati fokuseerimine käsitsi, et minimeerida fotopleegitamist.

Positsiooniparameetri katsetes, kus kasutati mikrokuulikesi, muudeti positsiooniparameetrit (ingl. k. *position*) vahemikus 0°-3,000° sammuga 1,000°; vahemikus 3,000°-3,500° sammuga 0,500°; vahemikus 3,500°-4,000° sammuga 0,100°; vahemikus 4,000°-4,100° sammuga 0,050°; vahemikus 4,100°-4,300° sammuga 0,020° ja vahemikus 4,300°-5,100° sammuga 0,100°. Positsiooniparameetri sammu suurus vähenes eeldatavas optimaalse nurga piirkonnas; eeldatav optimaalse nurga piirkond tehti kindlaks

pilootkatsega. Positsiooniparameetri katsetes, kus kasutati mikrokuulikesi, oli mikroskoobi EM võimendus 30 (AU), laseri võimsus 20% ja säriaeg 100 ms. SA-PE katses varieeriti positsiooniparameetrit samas vahemikus, kuid pilte tehti vähem, et minimeerida fotopleegitust. SA-PE katses oli mikroskoobi EM võimendus 70, laseri võimsus 20% ja säriaeg 500 ms.

EM võimenduse katsetes, kus kasutati mikrokuulikesi, muudeti EM võimendust vahemikus 0-100 sammuga 10 ja vahemikus 100-300 sammuga 50. Mikrokuulikestega EM võimenduse katses oli mikroskoobi positsiooniparameeter $4,220^\circ$, laseri võimsus 20% ja säriaeg 100 ms. SA-PE katse puhul varieeriti EM võimendust vahemikus 0-200 ja mikroskoobi positsiooniparameeter oli $4,220^\circ$, laseri võimsus 20% ja säriaeg 500 ms.

Laseri võimsuse katsetes, kus kasutati mikrokuulikesi, muudeti laseri võimsust vahemikus 0-100% sammuga 5%. Laseri võimenduse katsetes oli positsiooniparameeter $4,220^\circ$, EM võimendus 30 ja säriaeg 100 ms. SA-PE katse puhul jäi vahemik samaks, kuid sammu suurendati 10% peale, EM gain oli 70, laseri võimsus 20% ja säriaeg 500 ms.

Säriaja katsetes, kus kasutati mikrokuulikesi, muudeti säriaega vahemikus 0-100 ms sammuga 10 ms ja 100-400 ms vahemikus sammuga 20 ms. Säriajakatsetes mikrokuulikestega oli mikroskoobi positsiooniparameeter $4,220^\circ$, EM võimendus 30 ja laseri võimsus 20%. SA-PE katses muudeti säriaega vahemikus 100-1000 ms sammuga 100 ms; positsiooniparameeter oli $4,220^\circ$ EM võimendus 70 ja laseri võimsus 20%.

2.2.6. Andmeanalüüs

Andmeanalüüsiks kasutati vabavara programmi ImageJ. TIRF mikroskoobis tehtud piltidest moodustati pildivirnad (ingl. k. *image stacks*), millega teostati pilditöötlus ning signaali mõõtmised. Algselt teostati täppide automaatne detektsioon ja analüüs, kus täppide detekteerimiseks kasutati ImageJ „Triangle“ lävisegmentise (ingl. k. *thresholding*) algoritmi ja kujutiste analüüsimiseks Taavi Võsumaa poolt koostatud ImageJ skripti. Täppide automaatne detekteerimine ja analüüsimine osutus mõningate piltide suure taustasignaali tõttu ebatäpseks, mistõttu otsustati pilditöötlus ja analüüs läbi viia manuaalselt.

Täppide taustast eristamiseks teostati kujutiste kontrasti ja ereduse korrigeerimine. Töödeldud piltidel selekteeriti käsitsi 10 fluorestseerivat mikrokuulikese või SA-PE molekuli (piltidel valgete täppidena tumedal taustal) ja nendega teostati signaali mõõtmine,

kus registreeriti selekteeritud täppide intensiivsuse keskmine, mediaan, standardhälve, miinimum- ja maksimumväärtus. Samad mõõtmised teostati ka taustasignaali analüüsimisel; taustasignaali mõõtmiseks valiti kujutisel piirkond, kus ei esinenud statsionaarsetele fluorofooridele vastavaid täppe. Peale täppide ja tausta signaali mõõdeti veel ka kaamera mürataset: pildi koguintensiivsus, kui laseri võimsus oli 0.

ImageJ mõõtmistulemused viidi üle Microsoft Excelisse, kus teostati graafikute vormistamine. Kõverate joonestamisel kasutati punktidenä intensiivsuste mediaanväärtusi. Graafikule joonestati 4 kõverat: täppide intensiivsus, tausta intensiivsus, kaameramüra ning täppide ja tausta intensiivsuste suhe.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

Antud uurimustöö raames teostati katsed mikrokuulikeste ja SA-PE-ga, kus varieeriti ainult ühte tööparameetrit korraga, jättes seejuures teised tööparameetrid konstantseks. Konstantsed tööparameetrid olid mikrokuulikeste ja SA-PE katsete puhul mõnevõrra erinevad, et võtta arvesse fluorofooride erinevaid omadusi. Järgnevates alapeatükkides on väljatoodud teostatud katsete tulemused ja vastav arutelu.

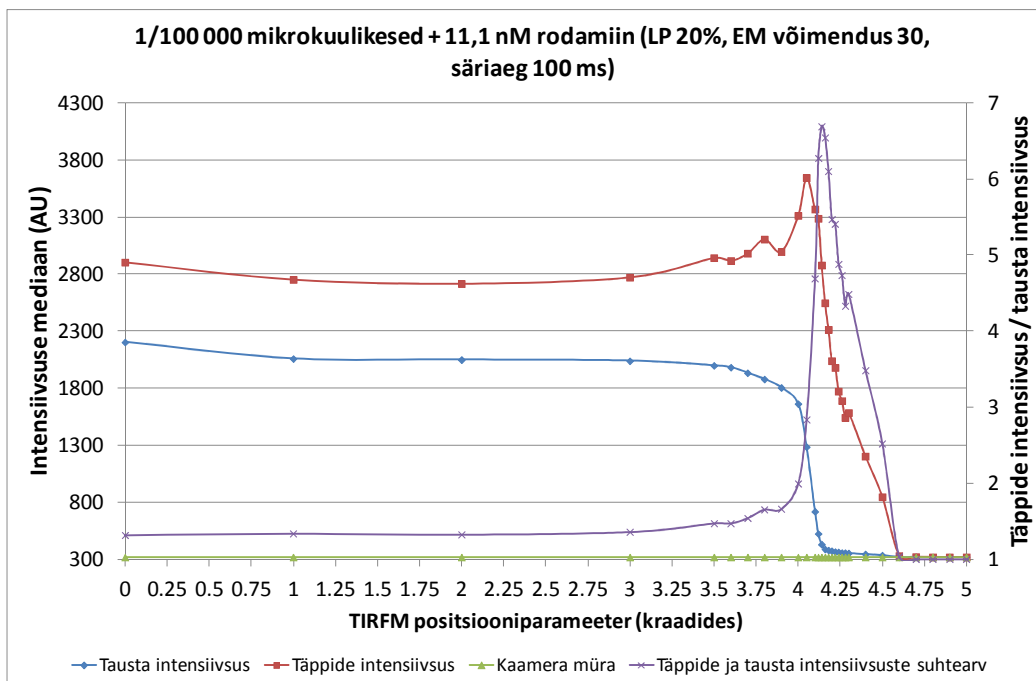
3.1.1. Positsiooniparameeter

Positsiooniparameeter väljendab skaneerimisseade, milleks antud juhul on Yanus II, sisepeegli nurka. Skaneerimisseade sees paikneva peegli kaldenurk on seotud laserkiire langemisnurgaga, mida mõjutavad mitmed tegurid laserkiire liikumisteedel. Positsiooniparameetri ja laserkiire langemisnurga sõltuvuse korrigeerimine teostatakse TIRFM kalibreerimise käigus. Positsiooniparameetri 0° korral on mikroskoop epi-valgustusega ehk sisepeegeldumist praktiliselt ei toimu. Alates teatud positsiooniparameetri väärtusest saavutatakse kriitiline nurk, millest edasi on mikroskoop TIRF režiimil. Kriitilist nurka on võimalik arvutada valemiga 3.

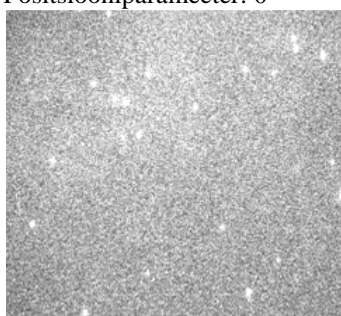
Kuna optimaalne langemisnurk oleneb teguritest, mis on iga individuaalse katse puhul natukene erinevad, siis ühte kindlat optimaalset arvu on praktiliselt võimatu määrata. Küll aga on võimalik määrata positsiooniparameetri väärtuste vahemik, kuhu optimaalne positsiooniparameetri väärtus väga suure tõenäosusega jääb. Optimaalne sisepeegeldusnurk (ja seega ka optimaalne positsiooniparameeter) oleneb mitmetest faktoritest, sealhulgas ka uuritava lahuse refraktsiooniindeksist, mistõttu saab antud katsetest saadud infot rakendada vaid sarnase lahusega proovides.

Joonisel 4 on väljatoodud mikrokerakestega tehtud katse graafik. Graafikult on näha, et täppide ja tausta intensiivsuste suhtarv on kõrgeima väärtusega positsiooniparameetri $4,140^\circ$ korral, mis tähendab, et antud katsetingimuste puhul on täpid kõige paremini taustast eristatavad just selle nurga juures. Joonises 4 sisalduvad mikroskoobipildid, mis on tehtud positsiooniparameetritega 0° ja $4,200^\circ$, demonstreerivad TIRF režiimi vajalikkust kõrge taustafluorestsentsiga proovide puhul. Lisaks sellele on näha, et kuigi graafiku põhjal on optimaalseks positsiooniparameetri väärtuseks $4,140^\circ$, siis ka positsiooniparameetri nurga $4,200^\circ$ korral on pinnalähedased üksikmolekulid selgesti taustast eristatavad. Mitmete korduskatsete põhjal on võimalik väita, et optimaalne

positsiooniparameeter antud refraktsiooniindeksiga proovilahuse jaoks asub vahemikus $4,100^\circ$ kuni $4,250^\circ$.



Positsiooniparameeter: 0°



Positsiooniparameeter: $4,200^\circ$



Joonis 4. Ülemisel pildil on positsiooniparameetri graafik, kus kõveratena on näidatud täppide ja tausta intensiivsus, kaamera müra ning täppide ja tausta intensiivsuste suhtarv. Allpool on väljatoodud antud katses kasutatud TIRF mikroskoobiga tehtud pildid, mis vastavad positsiooniparameetritele 0° (vasakul) ja $4,200^\circ$ (paremal).

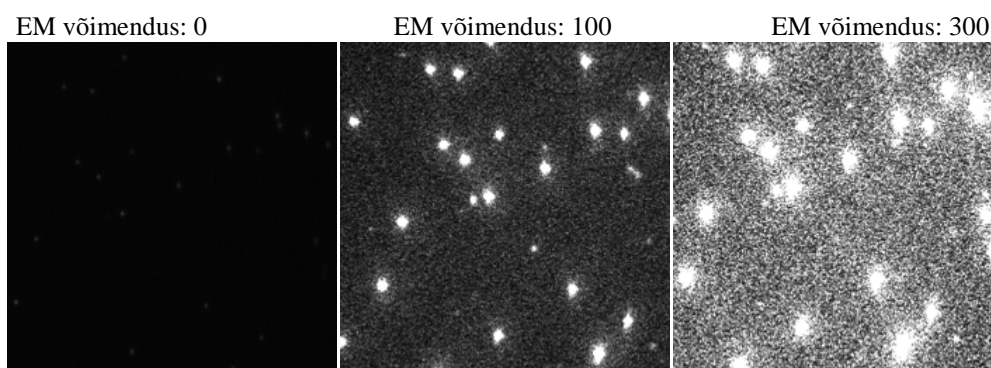
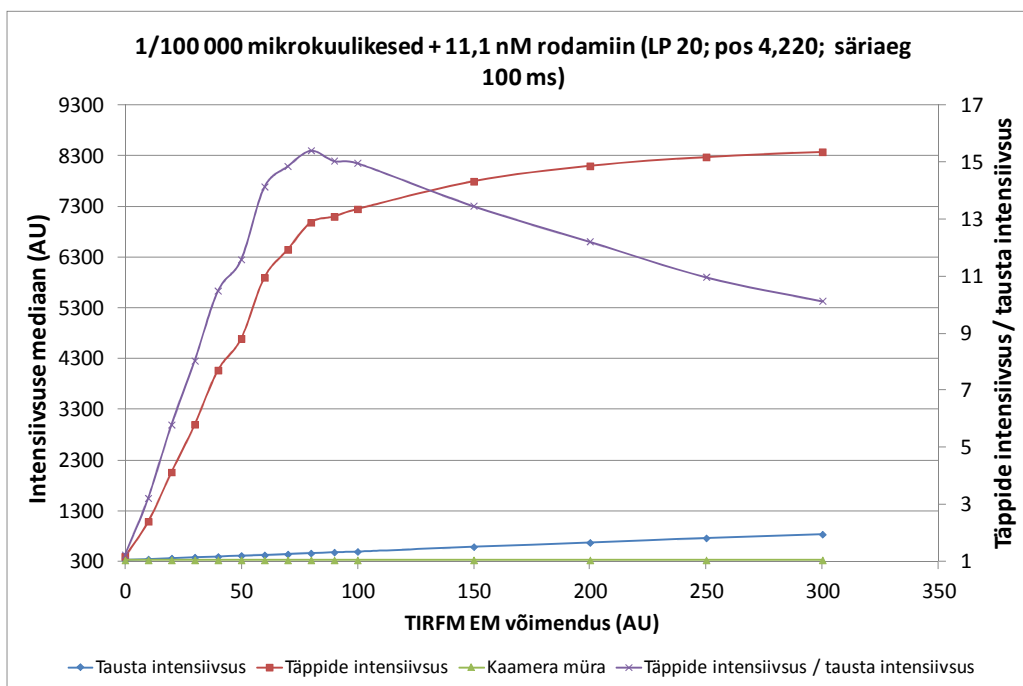
Positsiooniparameetri katse tehti ka funktsionaliseeritud klaaside ja SA-PE molekulidega. Kuna PE molekulide puhul lisandus fotopleegituse oht, siis kasutati mikrokuulikestega tehtud katsetest saadud andmeid, et vältida üleliigsete piltide tegemise vajadust. SA-PE katsete puhul püstitati hüpotees, et optimaalne positsiooniparameetri väärtus asub $4,200^\circ$ läheduses. SA-PE katsest saadud tulemused kinnitasid püstitatud hüpoteesi (vt. lisa 1). Tehtud katsete põhjal on soovitatav kõnealusel HLA-G biosensorsüsteemis kasutada positsiooniparameetri väärtust $4,200^\circ$.

3.1.2. EM võimendus

Mikrokuulikestega läbiviidud EM võimenduse katsete tulemustest on näha, et mida suurem on EM võimendus, seda suurem on signaali miinimumi ja maksimumi vahe ehk dünaamiline ulatus (ingl. k. *dynamic range*). Seda tähelepanekut toetab ka teoreetiline lähenemine: kuna elektronide paljundamisel tõuseb igas järgnevas etapis elektronide arv eksponentsiaalselt, siis kasvab kiiremini algupäraselt suurem signaal (ehk pinnalähedaste fluorofooride signaal). Sellegipoolest ei saa kasutada maksimaalset EM võimendust, kuna piiravaks faktoriks muutub signaali üleküllastus. Lisaks mängib praktilise poole pealt olulist rolli ka tõsiasi, et suure EM võimenduse kasutamine põhjustab EMCCD kaamera enneaegset vananemist.

Joonisel 5 väljatoodud graafikul on näha, et täppide ja tausta intensiivsuste suhtearv hakkab langema, kui toimub täppide signaali üleküllastus (ligikaudu intensiivsuse 7200 AU juures). Suhtearvu langus on tingitud dünaamilise ulatuse vähenemisest, mis tuleneb sellest, et täppide intensiivsus läheneb platoole, kuid tausta intensiivsus liigub jätkuvalt tõusvas joones. Erinevate rodamiini kontsentratsioonidega tehtud katsete analüüsimisel leiti, et mida suurem on rodamiini kontsentratsioon (fluorestsentsi signaal), seda kiiremini küllastub ka intensiivsuse signaal. Praktiline järeldus nendest katsetest: tuleks kasutada võimalikult suurt EM võimendust, mille korral signaal ei ole veel küllastunud, ning tuleks arvestada, et mida suurem on fluorofooride kontsentratsioon, seda varem signaal küllastub.

SA-PE-ga tehtud EM võimenduse katse kinnitas üldjoontes mikrokuulikestega tehtud katsetest saadud informatsiooni, kuid SA-PE molekulide ebastabiilsem iseloom ja oluliselt väiksem vastupidavus fotopleegitusele muutis tulemuste analüüsi mõnevõrra keerukamaks. Antud katsetulemuste põhjal on võimalik väita, et optimaalne EM võimendus HLA-G biosensorsüsteemis oleks 70 (vt. lisa 2).

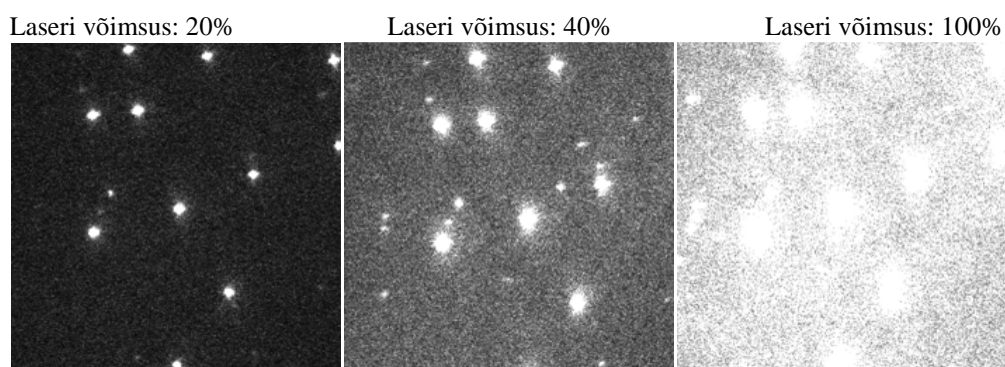
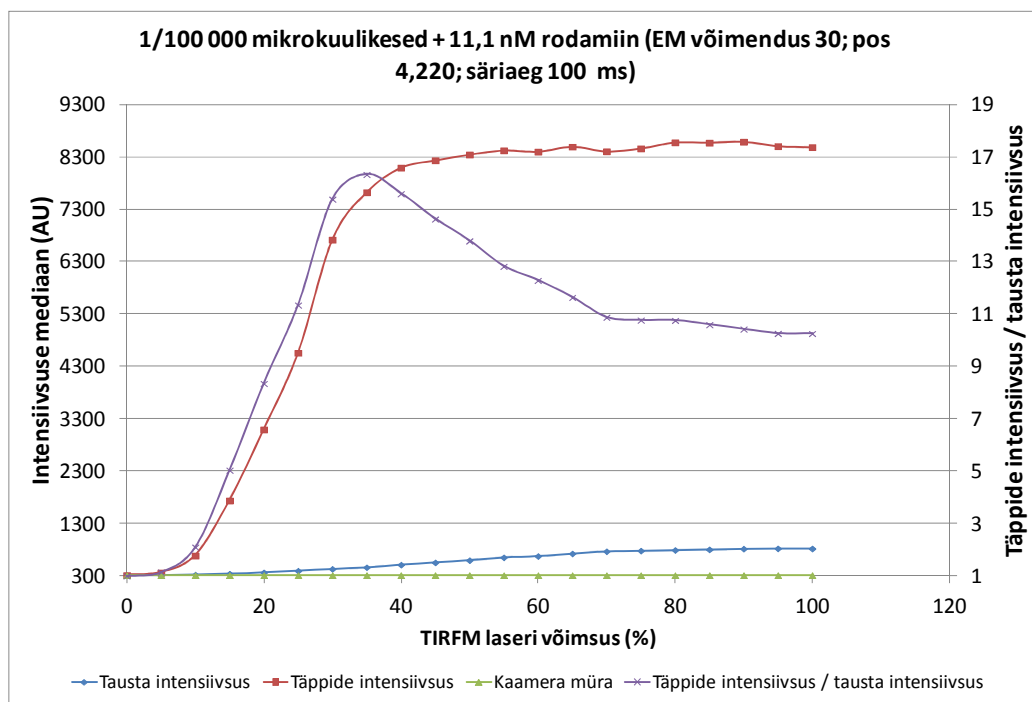


Joonis 5. Ülemisel pildil on EM võimenduse graafik, kus kõveratena on näidatud täppide ja tausta intensiivsus, kaamera müra ning täppide ja tausta intensiivsuste suhtearv. Allpool on väljatoodud antud katses kasutatud TIRF mikroskoobi pildid, mis vastavad EM võimendustele 0, 100 ja 300 (vasakult paremale).

3.1.3. Laseri võimsus

Mikrokuulikestega läbiviidud laseri võimsuse katsete tulemused näitavad, et mida suurem on laseri võimsus, seda parem täppide ja tausta signaali suhe on võimalik saavutada. Nagu võis täheldada ka EM võimenduse katsete puhul, muutub siiski limiteerivaks faktoriks täppide signaali üleküllastus. Samuti on näha, et suuremate fluorofoori (rodamiini) kontsentratsioonide korral on vajalik kasutada väiksemat laseri võimsust.

Joonisel 6 väljatoodud graafikul on näha, et täppide intensiivsuse üleküllastumisel hakkab täppide ja tausta intensiivsuse suhtearv langema. Suhtearvu kõvera languse põhjustab dünaamilise ulatuse vähenemine, nagu ka EM võimenduse puhul.



Joonis 6. Ülemisel pildil on laseri võimsuse graafik, kus kõveratena on näidatud täppide ja tausta intensiivsus, kaamera müra ning täppide ja tausta intensiivsuste suhtarv. Allpool on väljatoodud antud katses kasutatud TIRF mikroskoobi pildid, mis vastavad laseri võimsustele 20%, 40% ja 100% (vasakult paremale).

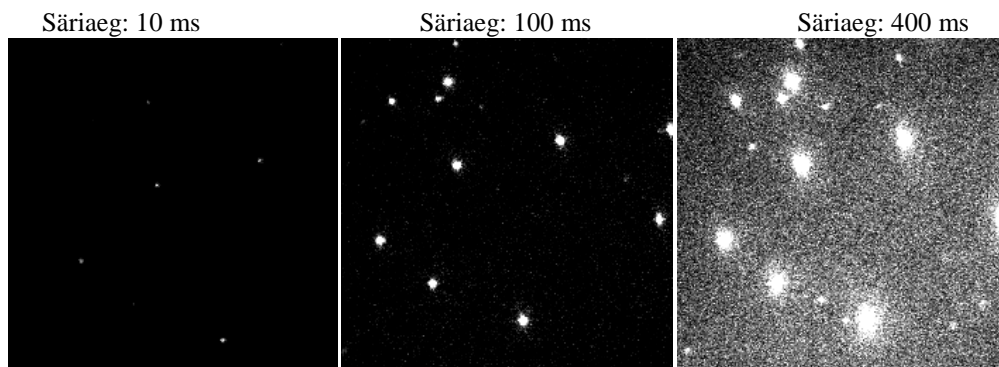
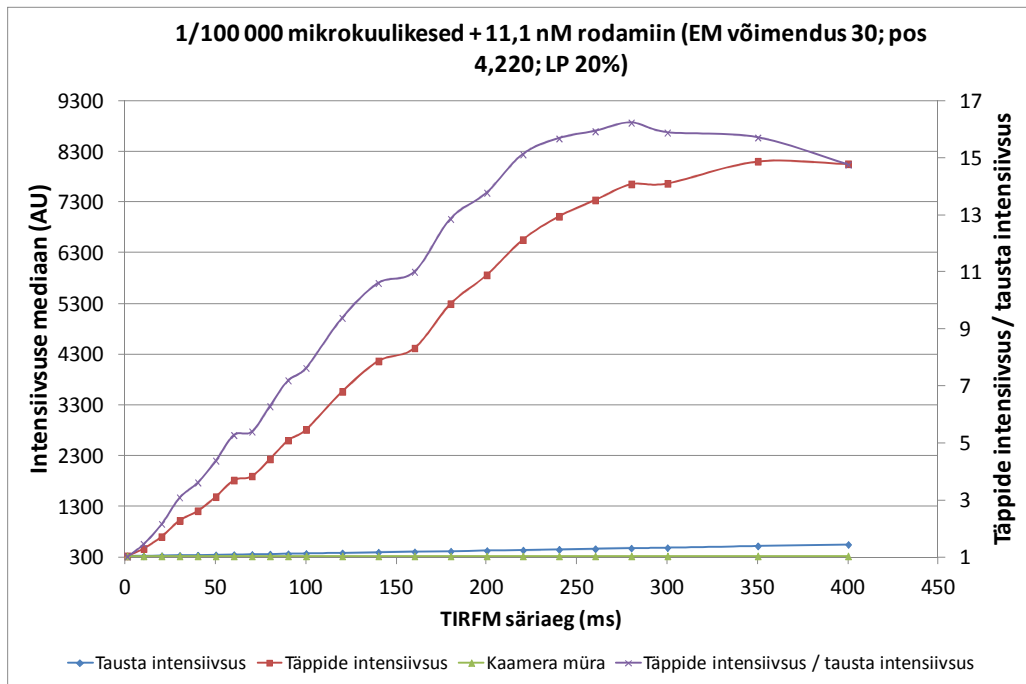
SA-PE-ga tehtud laseri võimsuse katse analüüsimisel oli näha, et täppide intensiivsuse üleküllastus saabus kõigi rodamiini kontsentratsioonide korral varem kui mikrokuulikestega tehtud katsetes – seda võib põhjustada asjaolu, et SA-PE katses kasutati mikrokuulikest katsetest erinevaid, SA-PE-le sobivamaid konstantseid tööparameetreid. SA-PE katses kasutatud konstantsete tööparameetrite väärtused olid suuremad kui mikrokuulikest katsetes, mistõttu suurenes ka tausta intensiivsus. Lisaks sellele on mikrokuulikest neeldumiskoeffitsient suurem kui SA-PE-l. Nendest asjaoludest tulenevalt toimus SA-PE katse puhul täppide signaali üleküllastumine väiksema laseri võimsuse korral. SA-PE katse tulemuste põhjal on soovitatav HLA-G biosensorsüsteemis kasutada

laseri võimsust 20% (10 mW). Suuremate laseri võimsuste korral esinev täppide intensiivsuse kõvera langus pärast üleküllastumise saavutamist on tingitud fotopleegituse mõjust. SA-PE-ga tehtud laseri võimsuse katse graafik on väljatoodud lisas 3.

3.1.4. Säriaeg

Mikrokuulikestega tehtud säriaja katsed näitasid, et mida suurem on säriaeg, seda parem on täppide eristatavus taustast. Ka säriaja puhul on ainukeseks limiteerivaks faktoriks signaali üleküllastus, kui kasutada mikrokuulikesi. Joonisel 7 on näha täppide ja tausta intensiivsuste suhtearvu kõvera võrdlemisi ühtlast tõusu, kuni täppide signaali küllastumiseni. Pikem säriaeg aitab vältida liikuvate fluorofooride esinemist täppidena, kuna pikema säriaja jooksul on ajutiselt vaatevälja sattunud fluorofooril rohkem aega eemalduda. Võrdlemisi tuhmide fluorofooride, suure taustafluorestsentsi ja proovi hajuvuse korral on soovitatav kasutada lühikest säriaega, kuna suurema säriajaga suureneb ühtlasi ka pimevool. Antud katse puhul taustsignaali suurenemist pimevoolu tõttu ei täheldatud (dünaamiline ulatus oli piisavalt suur).

SA-PE-ga tehtud säriaja katse tulemuste põhjal tundub, et optimaalne säriaeg SA-PE puhul on 200 ms, kuid see ei ühildu mikrokuulikestega tehtud katsete tulemustega. Lisas 4 väljatoodud graafikul on näha, et peale katsepunkti „200 ms“ hakkab suhtearvu kõver langema, kuigi üleküllastust ei esine. Võttes arvesse säriaja iseloomu ja asjaolu, et seeriapildid on tehtud ühest kohast ning uuritud säriaja vahemik üsna lai (10-1000 ms), võib suhtearvu kõvera langust põhjustada fotopleegituse efekt. Optimaalse säriaja leidmiseks oleks vajalik teostada täiendavaid katseid sobivama meetodikaga.



Joonis 7. Ülemisel pildil on säriaaja graafik, kus kõveratena on näidatud täppide ja tausta intensiivsus, kaamera müra ning täppide ja tausta intensiivsuste suhtearv. Allpool on väljatoodud antud katses kasutatud TIRF mikroskoobi pildid, mis vastavad säriaegadele 10 ms, 100 ms ja 400 ms (vasakult paremale).

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli varieerida täieliku sisepeegelduse fluorestsentsmikroskoobi (TIRFM) tööparameetreid, et uurida nende mõju signaal-müra suhtele ja leida optimaalsed TIRFM tööparameetrite väärtused Tartu Ülikooli Bioorgaanilise keemia uurimisrühma väljaarendatavas inimese leukotsüüdi antigeen G (HLA-G) biosensorsüsteemis kasutamiseks.

Antud uurimustöös teostati katseseeria spetsiaalsete fluorestseerivate mikrokuulikestega, uurimaks TIRFM tööparameetrite varieerimise mõju signaal-müra suhtele. Mikrokuulikestega teostatud katsete tulemuste alusel teostati katsed HLA-G biosensorsüsteemis kasutatavate materjalidega. TIRFM tööparameetrid, mida uuriti ja optimeeriti, olid järgnevad: positsiooniparameeter, elektronpaljunduse (EM) võimendus, laseri võimsus ja säriaeg.

Uurimustöö tulemusena leiti optimaalsed TIRFM tööparameetrid HLA-G biosensorsüsteemis kasutamiseks, et suurendada biosensorsüsteemi tundlikkust. Uuritud TIRFM tööparameetrite optimaalsed väärtused on järgmised: positsiooniparameeter $4,200^\circ$, EM võimendus 70 ja laseri võimsus 20% (10 mW). Teostatud katsete tulemuste alusel optimaalset säriaega ei olnud võimalik määrata; vajalik oleks läbi viia täiendavad säriaega katsed. Peale TIRFM tööparameetrite optimeerimise HLA-G biosensorsüsteemi jaoks, analüüsiti ka TIRFM tööparameetrite varieerimise mõju signaal-müra suhtele ning katsete teostamisel esinenud nähtuseid.

Käesoleva uurimustöö raames teostatud katsete meetodikaga oli võimalik välja selgitada ühe tööparameetri optimaalsed väärtused antud seadistuse korral, kuid veel täpsemate TIRFM tööparameetrite väärtuste määramiseks tuleks teostada kompleksne uurimustöö, kus varieeritakse kõiki tööparameetreid paralleelselt. Sellise uurimustöö tulemusena oleks võimalik esitada dünaamiline kompleksmudel, mis võtab üheaegselt arvesse kõiki varieeritavaid tööparameetreid.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Lakowicz, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed; Springer Science+Business Media, LLC: New York, 2006, p. 1-12, 27-29, 70.
2. Willard, H., Merritt, L. Jr., Dean, J., Settle, F., Jr. *Instrumental Methods of Analysis*, 7th ed; Wadsworth, Inc.: Belmont, California, 1988, p. 197-201.
3. Pawley, J. *Handbook of biological confocal microscopy*, 2nd ed; Springer Science+Business Media, Inc.: New York, 1995, p. 141-142, 267.
4. Joo, C., Balci, H., Ishitsuka, Y., Buranachai, C., Ha, T. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 51-76.
5. Facts, Q. FluoSpheres® Fluorescent Microspheres. *Red*, 580(605), F8786.
6. Lichtman, J. W., Conchello, J. A. Fluorescence microscopy. *Nature Methods*, **2005**, *2(12)*, 910-919.
7. Davies, R., Graham, J., & Canepari, M. Light sources and cameras for standard in vitro membrane potential and high-speed ion imaging. *Journal of microscopy*, **2013**, *251(1)*, 5-13.
8. Axelrod, D. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*, **1981**, *89(1)*, 141-145.
9. Navratil, M., Mabbott, G. A., Arriaga, E. A. Chemical microscopy applied to biological systems. *Analytical chemistry*, **2006**, *78(12)*, 4005-4020.
10. Axelrod, D. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic*, **2001**, *2(11)*, 764-774.
11. Lin, J., Hoppe, A. D. Uniform Total Internal Reflection Fluorescence Illumination Enables Live Cell Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy. *Microscopy and Microanalysis*, **2013**, *19(02)*, 350-359
12. Borisov, S. M., Wolfbeis, O. S. Optical biosensors. *Chemical reviews*, **2008**, *108(2)*, 423-461.
13. Jain, A., Liu, R., Xiang, Y. K., & Ha, T. Single-molecule pull-down for studying protein interactions. *Nature protocols*, **2012**, *7(3)*, 445-452.
14. Holden, S. J., Uphoff, S., Hohlbein, J., Yadin, D., Le Reste, L., Britton, O. J., Kapanidis, A. N. Defining the limits of single-molecule FRET resolution in TIRF microscopy. *Biophysical journal*, **2010**, *99(9)*, 3102-3111.

15. Schwarz, J. P., König, I., Anderson, K. I. Characterizing system performance in total internal reflection fluorescence microscopy. *Cell Migration*, Humana Press, **2011**, p. 373-386.
16. Groves, J. T., Parthasarathy, R., Forstner, M. B. Fluorescence imaging of membrane dynamics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2008**, *10*, 311-338.
17. Ding, Y., Xi, P., Ren, Q. Hacking the optical diffraction limit: Review on recent developments of fluorescence nanoscopy. *Chinese Science Bulletin*, **2011**, *56(18)*, 1857-1876.
18. Robbins, M. S., Hadwen, B. J. The noise performance of electron multiplying charge-coupled devices. *Electron Devices, IEEE Transactions on*, **2003**, *50(5)*, 1227-1232.
19. Cha, P. D., Molinder, J. I. *Fundamentals of Signals and Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, 2006, p. 2, 266.
20. Tessler, L. A., Mitra, R. D. Sensitive single-molecule protein quantification and protein complex detection in a microarray format. *Proteomics*, **2011**, *11(24)*, 4731-4735.
21. Yoo, H., Song, I., & GWEON, D. G. Measurement and restoration of the point spread function of fluorescence confocal microscopy. *Journal of microscopy*, **2006**, *221(3)*, 172-176.
22. Nicholson, W. V., & Glaeser, R. M. Review: automatic particle detection in electron microscopy. *Journal of structural biology*, **2001**, *133(2)*, 90-101.
23. Collins, T. J. ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, **2001**, *43(1 Suppl)*, 25-30.

Optimization of TIRF microscope operating variables for single-molecule detection

Allan Tobi

SUMMARY

The aim of the present Bachelor's thesis was to vary the operating variables of a total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM) in order to study their effects on the signal-to-noise ratio. Moreover, the aim was to find optimal TIRFM operating variables to be used in a human leukocyte antigen G (HLA-G) biosensor which is being developed by the research group working at the Tartu University Chair of Biochemistry.

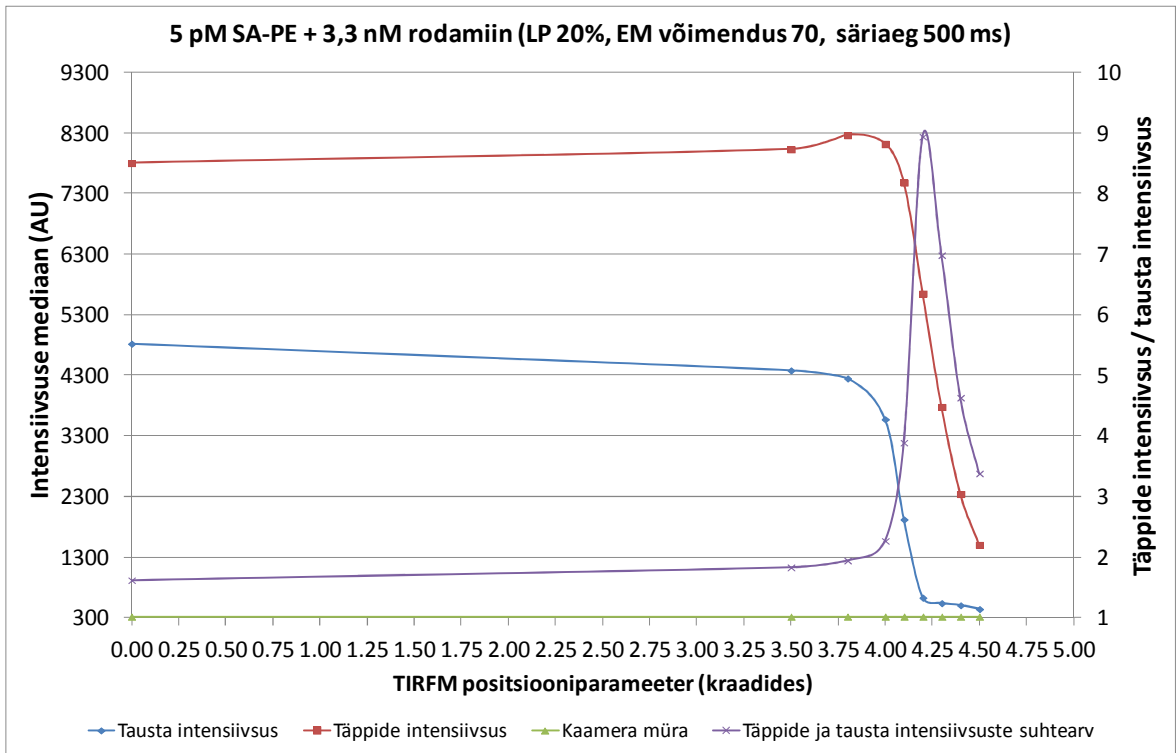
A series of experiments was conducted using special fluorescent microspheres to study the effects of varying TIRFM operating variables on the signal-to-noise ratio. The information obtained from the experiments with microspheres was used to conduct another experiment of the same nature with materials being used in the HLA-G biosensor. TIRFM operating variables that were studied and optimized: position, electron-multiplying (EM) gain, laser power and exposure time.

As a result of the study, optimal TIRFM operating variables were found for use in the HLA-G biosensor in order to improve its sensitivity. The optimal values for the TIRFM operating variables were as follows: position 4,200°, EM gain 70 and laser power 20% (10 mW). The optimal value for exposure time could not be determined based on the experiments that were carried through; additional exposure time experiments would be needed. In addition to the optimization of TIRFM operating variables for the HLA-G biosensor, the effects of varying TIRFM operating variables in regard to the signal-to-noise ratio, as well as the effects that affected the outcome of the experiments, were analyzed.

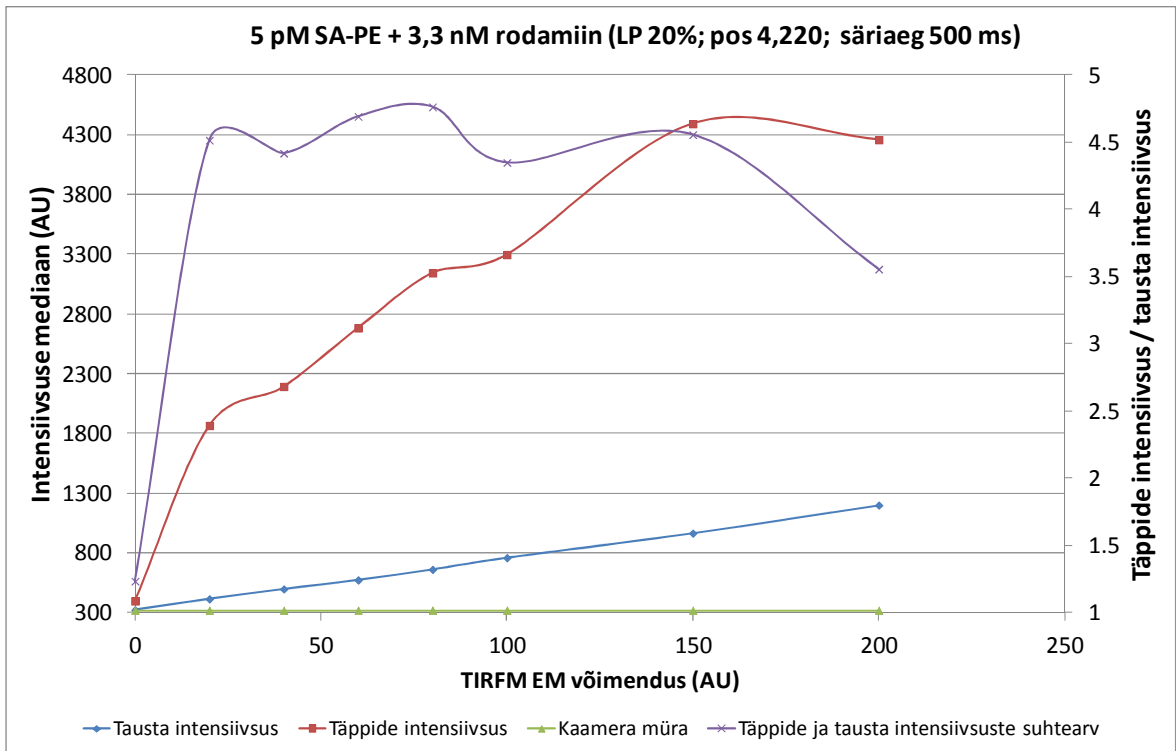
The methods used in these experiments are adequate to ascertain the optimal values for one operating variable given the current set-up. Although, for more accurate and optimal TIRFM operating variable values a complex study, where all operating variables are varied together, would have to be carried out. A study of this nature would result in a dynamic complex model which would take into account all of the operating variables.

LISAD

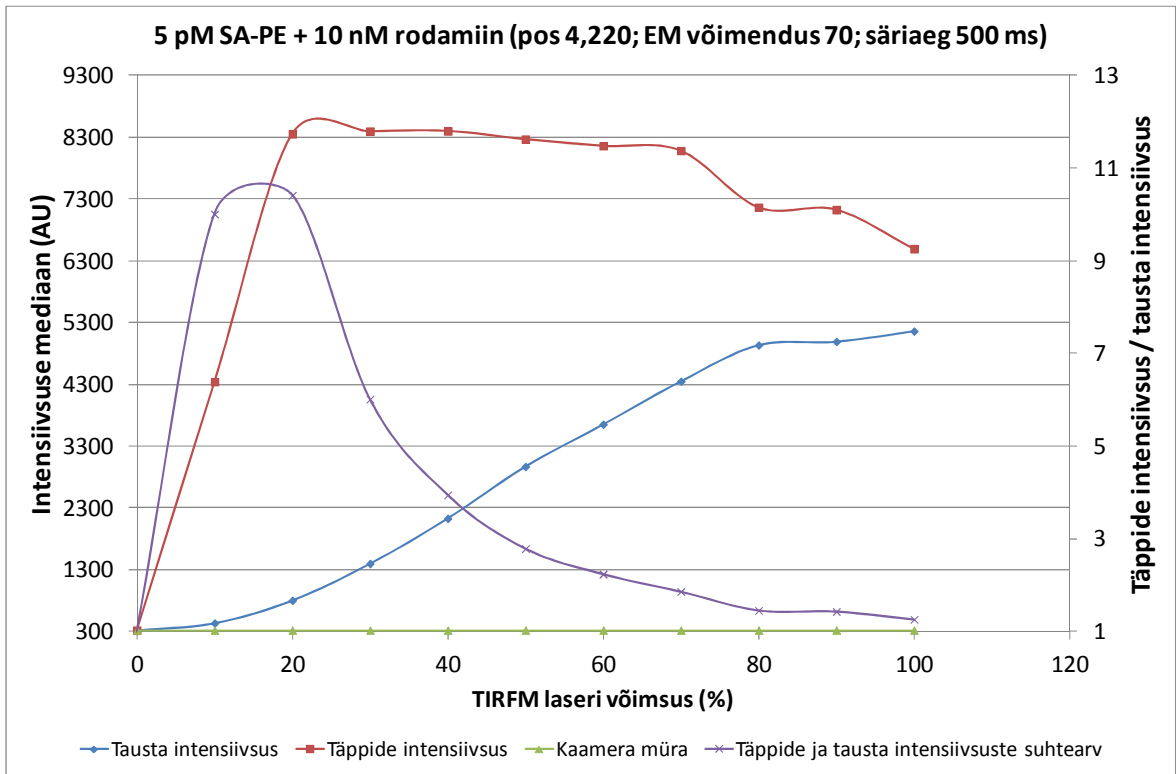
Lisa 1. SA-PE-ga tehtud positsiooniparameetri katse tulemusi väljendav graafik.



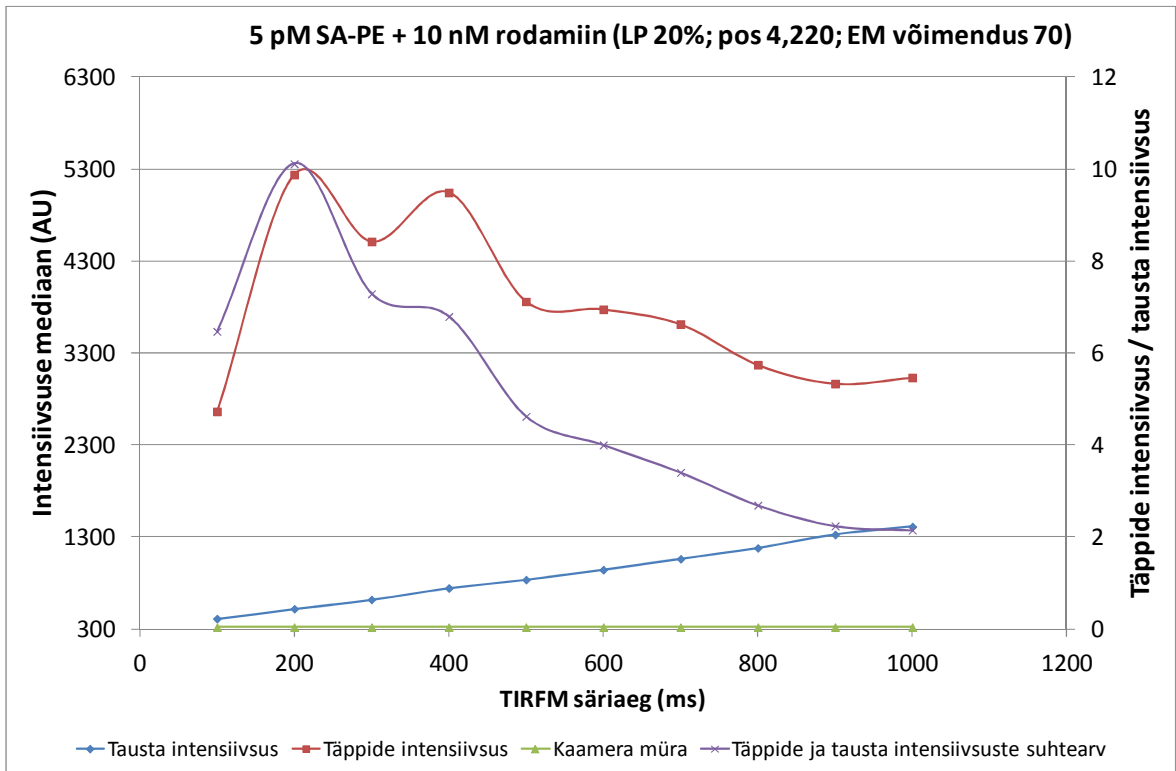
Lisa 2. SA-PE-ga tehtud EM võimenduse katse tulemusi väljendav graafik.



Lisa 3. SA-PE-ga tehtud laseri võimsuse katse tulemusi väljendav graafik.



Lisa 4. SA-PE-ga tehtud säriaaja katse tulemusi väljendav graafik.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Allan Tobi,

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose "Tööparameetrite optimeerimine TIRF mikroskoobiga üksikmolekulide detekteerimiseks",

(lõputöö pealkiri)

mille juhendaja on Taavi Võsumaa (MSc),

(juhendaja nimi)

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2014** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **29.05.2014**