



Scenariusz wypracowany w ramach projektu „Fizyka-Pasja-Społeczeństwo”

Autor:

Beata Wielgus-Kutrowska

Tytuł zajęć:

Stacjonarna i czasorozdzielcza spektroskopia elektronowa w badaniach cząsteczek biologicznych

Numer zadania: 6

Cel: Czego uczeń się dowie? Jakie umiejętności zdobędzie lub rozwinie?

Uczniowie zapoznają się ze specyfiką badania cząsteczek biologicznych metodami stacjonarnej i czasorozdzielczej spektroskopii elektronowej (absorpcyjnej i fluorescencyjnej).

Dowiedzą się co to jest widmo absorpcji i fluorescencji i w jaki sposób się je mierzy. Poznają zasadę działania spektrofotometru i spektrofluorymetru. Dowiedzą się w jaki sposób mierzy się zaniki fluorescencji.

Przekonają się, że w zależności od budowy chemicznej, substancje absorbują i emitują promieniowanie o różnej energii, a wydajność fluorescencji może zależeć od środowiska (otoczenia) w jakim znajduje się cząsteczka. Zaobserwują, że fluorescencja wybranego ligandu (np. ryboflawiny) zależy od tego czy jest w stanie wolnym, czy związany z białkiem (aktywnym biologicznie).

Nauczą się także obsługi pipet automatycznych. Umiejętność tą wykorzystają przygotowując samodzielnie roztwory do pomiarów.

Zajęcia skierowane do uczniów ~~grupy przedszkolnej~~ /klasy 1-3 liceum (niepotrzebne skreślić).

Czas potrzebny na realizację scenariusza: 120 min.

Etapy realizacji zajęć (wraz z krótkim opisem):

1. Nauka obsługi pipet automatycznych (zakresy 0,5-10 μ l; 10-100 μ l, 100-1000 μ l)

2. Omówienie budowy spektrofotometru oraz zasady pomiaru widm absorpcji

Wyjaśnienie uczniom jaka jest rola najważniejsze elementów spektrofotometru:

- lampa halogenowa (Vis) i lampa deuterowa (UV)
- monochromator - komora pomiarowa, w której umieszczamy kuwetę z badaną próbką oraz kuwetę kontrolną zawierającą czysty rozpuszczalnik (w tym przypadku wodę)
- detektor - komputer sterujący pomiarem i rejestrujący dane

Omówienie pojęcia absorbancji będącej miarą tego jak silnie próbka absorbuje promieniowanie o danej długości fali.

Wyjaśnienie, że widmo absorpcji próbki to zależność absorbancji od długości fali promieniowania padającego na próbkę (promieniowania wychodzącego z monochromatora).

3. Ustawienie parametrów rejestracji widm absorpcji

Krótkie omówienie z uczniami programu obsługującego rejestrację widm oraz ustawienie odpowiednich parametrów.

4. Wykonanie linii bazowej (baseline correction) na kuetach z wodą dla powyższych parametrów.

Na tym etapie należy wyjaśnić uczniom, że linia bazowa jest robiona po to, by uwzględnić ewentualne różnice w układzie optycznym spektrofotometru na drodze wiązki światła przechodzącej przez próbkę badaną i kontrolną oraz w absorpcji samych kuwet.

5. Pomiar widm absorpcji roztworu ligandu oraz białka

Uczniowie samodzielnie przygotowują odpowiednie roztwory do pomiarów absorpcyjnych ligandu i białka. Następnie rejestrują widma absorpcji. Przed wykonaniem widma, obserwując zabarwienie danego roztworu, powinni spróbować przewidzieć, przy jakiej długości fali powinna wystąpić maksymalna absorpcja przygotowanego przez nich roztworu.

6. Omówienie budowy spektrofluometru oraz zasady pomiaru widm emisji fluorescencji

Wyjaśnienie uczniom jaka jest różnica w budowie spektrofotometru i spektrofluorymetru (dwa monochromatory – wzbudzenia i emisji, zamiast jednego) oraz omówienie zasady działania fotopowielacza.

7. Pomiar widm emisji fluorescencji wodnego roztworu ligandu oraz białka

Uczniowie samodzielnie przygotowują odpowiednie roztwory do pomiarów widm fluorescencyjnych.

Na podstawie widma absorpcji ligandu uczniowie wybierają długość fali wzbudzenia fluorescencji, ustawiają parametry pomiaru widma i rejestrują widma fluorescencji roztworów.

Na podstawie wykonanych widm stwierdzają, że wybrany ligand w środowisku wodnym wykazuje właściwości fluorescencyjne, które ulegają zmianie po związaniu z białkiem. Przykładowo wiązanie ryboflawiny przez białko wiążące ryboflawinę wygasza fluorescencję tego ligandu.

8. Pomiar widm emisji fluorescencji białka w obecności czynnika denaturującego

Uczniowie samodzielnie przygotowują roztwór białka zawierający związek denaturujący (na przykład chlorowodorek guanidyny).

Rejestrują widmo emisji fluorescencji. Widmo białka zdenaturowanego wygląda inaczej niż widmo w białka rozcieńczonego wodą. Dodatkowo może pojawić się fluorescencja charakterystyczna dla uwolnionego ligandu, na przykład dla ryboflawiny jest to pasmo z maksimum przy 529 nm.

9. Omówienie zasady pomiaru zaników fluorescencji

Wyjaśnienie uczniom zasady pomiaru zaniku fluorescencji oraz omówienie najważniejszych elementów układu pomiarowego: laser półprzewodnikowy (482 nm) jako źródło monochromatycznego promieniowania wzbudzającego, atenuatory osłabiające wiązkę światła laserowego oraz emitowanego (by uzyskać warunki zliczania pojedynczych fotonów), układ elektroniczny mierzący nanosekundowe przedziały czasu upływającego pomiędzy sygnałem START (błysk lasera) a STOP (emisja fotonu).

Omówienie funkcji opisującej zanik natężenia fluorescencji (zanik eksponencjalny) oraz pojęcia czasu życia fluorescencji (średni czas przebywania cząsteczki w stanie wzbudzonym, czas po którym natężenie początkowe maleje e razy).

Wyjaśnienie co to jest funkcja odpowiedzi aparatury (IRF), po co i jak się ją mierzy (rozpraszanie na wodnym roztworze krzemionki)

10. Pomiar zaniku fluorescencji ligandu

Uczniowie samodzielnie przygotowują roztwór ligandu do pomiarów zaniku fluorescencji. Następnie rejestrują zanik fluorescencji próbki, wybierając długość fali emisji odpowiadającą maksimum fluorescencji ligandu (ta informacja pochodzi z wcześniej przeprowadzonych pomiarów stacjonarnych) oraz profil IRF (należy zwrócić uwagę uczniów na fakt, że w przypadku profilu IRF długość fali emisji jest równa długości fali wzbudzenia).

11. Wyznaczenie czasu zaniku fluorescencji ligandu

Uczniowie analizują uzyskany zanik w programie FluoFit w celu wyznaczenia czasu życia stanu wzbudzonego ligandu. Stosują model monoeksponencjalny z uwzględnieniem IRF (rekonwolucja) lub bez (tzw. tail-fitting). Przykładowo, dla ryboflawiny, w obu przypadkach, wyznaczony czas zaniku fluorescencji wynosi 4.8 ns.

Spis materiałów potrzebnych do realizacji scenariusza (z uwzględnieniem etapów realizacji):

- pipety automatyczne i tipsy – etapy 1, 4-5, 7-8, 10
- spektrofotometr dwuwiązkowy UV-Vis – etapy 2-5
- spektrofluorymetr do pomiarów stacjonarnych – etapy 6-8
- spektrofluorymetr czasorozdzielczy (do pomiarów zaników fluorescencji) – etapy 9-11
- kwarcowe kувety absorpcyjne o drodze optycznej 1 cm, objętość pomiarowa 1 ml; 2 szt. – etapy 2-5
- kwarcowa kувeta fluorescencyjna o drodze optycznej 1 cm, objętość pomiarowa 2,5 ml – etapy 6-10
- woda dejonizowana – etapy 4-5, 7, 10
- 6 M roztwór chlorowodoru guanidyny, pH 7.0 – etap 8
- stężony roztwór ligandu, którego fluorescencja zależy od tego czy jest w stanie wolnym, czy związany z białkiem (np. ryboflawina) – etapy 5, 7, 10
- białko wiążące ligand (np. wodny roztwór białka jaja kurzego), – etapy 5, 7-8
- kolorowe plansze: koło barw i spektrum światła widzialnego, schemat poziomów energetycznych cząsteczek (diagram Jabłońskiego) – etapy 2-8

Słowa kluczowe:

absorpcja, fluorescencja, spektroskopia elektronowa, spektrofotometr, widmo absorpcji i emisji, zaniki fluorescencji, czas życia fluorescencji

Ciekawostki powiązane z zajęciami:

oko pszczoły jest czułe na inny zakres promieniowania elektromagnetycznego niż oko ludzkie – kosztem czerwieni pszczoły widzą w ultrafiolecie