

Spektroskopia i mikroskopia fluorescencyjna tworzą zbiór nowych metod i technik badawczych wykorzystywanych w różnych dziedzinach nauki i technologii. Wynika to m.in. z ich wysokiej czułości związanej zwykle ze znacznym długofalowym przesunięciem widma emisji w stosunku do długości fali światła wzbudzącego, co umożliwia łatwe odfiltrowanie sygnału fluorescencyjnego. Zjawisko fluorescencji zostało z powodzeniem wykorzystane w programie genomycznym i stanowi podstawowe narzędzie w obrazowaniu tkanek i komórek.

Jakie ograniczenia niesie ze sobą zastosowanie technik fluorescencyjnych?

Po pierwsze, w skutecznych aplikacyjnie fluoroforów posiada umiarkowaną, niezbyt wysoką wydajność kwantową emisji. Do czego sto napotykaamy w układach naturalnych takie kłopoty z sygnałem tła natury fluorescencyjnej.

Po drugie fluorofory wystawione na działanie światła wzbudzącego podlegają fotodegradacji. Fluorofory w przebiegu w stanie wzbudzenia elektronowego podlegają silnie działaniu tlenu molekularnego oraz reakcjom chemicznym. Okazuje się, że fotodegradacja zachodzi głównie w stanach wzbudzonych molekuł. Najbardziej problematyczne dane w biosensingu ale te najtrudniejsze w realizacji są pomiary fluorescencyjne z bardzo cienkich warstw na powierzchniach. Z jednej strony pomiary powierzchniowe wymagają bardzo małej objętości badanej próbki, z drugiej jednak strony rejestrowane sygnały fluorescencyjne mają niskie natężenie.

Te ograniczenia i trudności w badaniach fluorescencyjnych można według nas pokonać wykorzystując zalety które wnosi plazmonika. Podobnie do wzmocnionej na powierzchniach metalicznych spektroskopii Ramana (SERS) fluorescencja także wykazuje wzmocnienie w obecności srebrnych nanocząstek zdeponowanych odpowiednio na powierzchni substratu. Dzieje się tak z uwagi na dwa równoległe występujące efekty: wzmocnienie lokalnego pola elektrycznego oraz oddziaływanie wzbudzonych fluoroforów z małymi cząstkami metalicznymi. W pierwszym przypadku oddziaływanie padającego światła z małymi cząstkami metali szlachetnych prowadzi do powstania zlokalizowanych plazmonów (kolektywne oscylacje elektronów) związanych z lokalnymi polami elektrycznymi. Prowadzi to do związania stałej szybkości wzbudzenia. Drugi efekt objawia się w przyspieszonej emisji fluorescencji z krótszym czasem życia fluorescencji, co może mieć miejsce tylko wtedy gdy związka się stała szybkości na dezaktywację promienistą molekuł (w literaturze jest to efekt RDE - radiative decay engineering). Wykorzystanie efektu RDE zapewnia także wiązki fotostabilność próbek, ponieważ fluorofory przebywają krócej w stanach wzbudzonych. Efekty lokalnego wzmocnienia pól elektrycznych oraz RDE wnoszą znaczny wkład do wzmocnienia natężenia obserwowanej fluorescencji. Ostatnio zarówno my jak i kilka innych grup badawczych zorientowało się, że jeszcze wiązki wzmocnienia natężenia fluorescencji można uzyskać przemieszczając się plazmonom (travelling plasmons). Mówimy wtedy zwykle o platformach plazmonicznych. Zaprojektowanie i przygotowanie takich odpowiednich powierzchni dla rejestracji i analizy wzmocnionej fluorescencji jest obecnie niezwykle ważne. Korzyści, które niesie to ze sobą to wielokrotnie wiązki natężenia sygnału fluorescencyjnego oraz wiązki fotostabilność próbek.

Chcielibyśmy zastosować i sprawdzić użyteczność trzech różnych podejść do przygotowania odpowiednich substratów (platform plazmonicznych):

1. Elektrochemiczna depozycja fraktali srebrnych na szkle
2. Samozagregowane koloidy srebrne na szkle (SACS) i powierzchniach metalicznych
3. Depozycja periodycznych nanostruktur srebrnych

Każda z wymienionych metod zostanie zbadana pod kątem uzyskanych wzmocnień fluorescencji przy pomocy wybranych fluoroforów, przy uwzględnieniu odpowiednio zoptymalizowanej preparatyki. Nasze próby przeprowadzimy wykorzystując także modelowe testy immunologiczne, co pozwoli na późniejsze lepsze przygotowanie bardziej zaawansowanych aplikacji. W ostatniej fazie projektu zastosujemy wzmocnioną plazmonowo fluorescencję do ultraczułej detekcji metaloproteinazy MMP-9, enzymu pojawiającego się w nadmiernych ilościach w przebiegu różnych chorób o podłożu onkologicznym.

Uważamy, że nasz projekt zawiera zarówno ważne elementy o charakterze poznawczym jak i potencjalnie aplikacyjnym. Stowarzyszenie oddziaływa plazmonowych i fluorescencji dynamicznie się rozwija, czego wyrazem są ciągłe prace nad nowymi substratami mającymi zdolność do wzmocnienia fluorescencji. Nasze badania mają zapewnić lepsze zrozumienie oddziaływa fluorofor – plazmon i umożliwić lepszą kontrolę nad wytwarzaniem platform plazmonicznych o zaplanowanych własnościach. Praktycznym efektem naszego projektu ma być opracowanie i wykonanie konkretnych platform plazmonicznych, które pozwolą na uzyskiwanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników, w szczególności ci pozwolą wzmocnić fluorescencję o co najmniej 2 rzędy wielkości w porównaniu do standardowego substratu ze szkła. Zaprezentujemy także wzmocnioną fluorescencję na modelowych testach wykonanych na naszych platformach plazmonicznych. W ostatniej fazie tego projektu zastosujemy nasze platformy do czułej detekcji metaloproteinazy MMP-9 i badania jej aktywności biologicznej.