



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

SIRKKU VALKAMA
HETEROGEENISEN NÄYTTEEN VISKOSITEETIN MÄÄRITYS
FLUORESENSSELINAIKAMIKROSKOOPILLA

Diplomityö

Tarkastajat: Akatemiatutkija Timo
Laaksonen ja yliopistonlehtori Elina
Vuorimaa-Laukkanen
Teknis-luonnontieteellisen tiedekunnan
dekaani on hyväksynyt tarkastajat ja
aiheen 04.01.2017

TIIVISTELMÄ

SIRKKU VALKAMA: Heterogeenisen näytteen viskositeetin määrittäminen fluoresenssielinaikamikroskoopilla

Tampereen teknillinen yliopisto

Diplomityö, 63 sivua, 2 liitesivua

Joulukuu 2018

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

Pääaine: Kemia

Tarkastajat: Akatemiatutkija Timo Laaksonen ja yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukanen

Avainsanat: fluoresenssielinaikamikroskopia, fluoresoivat roottorimolekyylit, viskositeetti, silkkiproteiini, proteiinikoaservaattit

Tässä tutkimuksessa kehitettiin menetelmää, jolla voidaan fluoresenssielinaikamikroskooppia (fluorescence lifetime imaging microscope, FLIM) ja fluoresoivia roottorimolekyylejä käyttäen määrittää heterogeenisten nesteiden paikallisia viskositeetteja. Menetelmää testattiin kahdella homogeenisella ja kahdella heterogeenisellä näytteellä ja sovellettiin silkkiproteiinikoaservaattien viskositeettien määrittämiseen erilaisista silkinäytteistä. Fluoresoivina roottorimolekyyleinä käytettiin hydrofiilistä DASPMIa ja hydrofobista BODIPYä. Näiden molekyylien fluoresenssin elinajat määritettiin seitsemässä eri viskositeetissa ja tuloksista määritettiin kalibraatiokäyrät, jotka kuvaavat roottorimolekyyliden fluoresenssin elinaikojen riippuvuutta viskositeetista.

Menetelmän avulla pystyttiin määrittämään keskenään vertailukelpoisia paikallisia viskositeetteja heterogeenisistä näytteistä. Näiden näytteiden kuvaaminen FLIM:llä onnistui parhaiten, kun näytepisara pidettiin mittauksen ajan kahden toisistaan tefloniteipillä erotetun lasilevyn välissä ja lasilevylle lisättiin näytepisaroiden lisäksi myös vesipisaroita. Silkkikoaservaateista saatiin parhaat kuvat sentrifugoidusta Tris-HCl-puskuriliuosta sisältävistä näytteistä. Kovia koaservaatteja sisältäviä FLIM-näytteitä valmistettaessa väriaineen lisääminen kannatti tehdä vasta K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäämisen jälkeen. Näytepisaran reunoille näytteen kuivuessa muodostuvia pehmeitä koaservaatteja ei pystytty mittaamaan tällä menetelmällä, sillä kuivuminen eteni liian nopeasti. Sen sijaan näytteessä valmiina olevia pehmeitä koaservaatteja voitiin kuvata. Koaservaattinäytteistä mitatuista FLIM-kuvista määritettyihin fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin sovitettiin kaksiekspotentiaaliset sovitukset. DASPMIn elinajoista lyhyempää ja BODIPYn elinajoista pidempää käytettiin elinajoja vastaavien viskositeettien laskemiseen. Koaservaateista DASPMIlla määritetyt viskositeetit olivat mittaustarkkuuden rajoissa lähes identtisiä, mutta BODIPYllä havaittiin eroja eri näytetyyppien välillä.

ABSTRACT

SIRKKU VALKAMA: Viscosity of heterogeneous sample by fluorescence lifetime imaging microscopy

Tampere University of Technology

Master of Science thesis, 63 pages, 2 Appendix pages

December 2018

Master's Degree Programme in Science and Engineering

Major: Chemistry

Examiner: Associate Professor Timo Laaksonen and University Lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen

Keywords: fluorescence lifetime imaging microscopy, fluorescent molecular rotors, viscosity, silk protein, protein coacervates

In this study, a method for determining local viscosities from heterogeneous liquids using fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and fluorescent molecular rotors was developed. The method was tested with two homogeneous and two heterogeneous samples and applied to determine the viscosities of silk protein coacervates from various silk samples. The fluorescent molecular rotors used were hydrophilic DASPMI and hydrophobic BODIPY. Fluorescence lifetimes of these molecules were determined in seven different viscosities and calibration curves that describe the viscosity dependence of the fluorescence lifetimes for these molecules were calculated from the results.

Comparable local viscosity values could be obtained from heterogeneous samples with this method. Imaging of these samples with FLIM was most successful when the sample droplet was placed between two glass plates separated by teflon tape during the measurement and water droplets were added to the glass plate in addition to the sample droplets. The best images from silk coacervates were obtained from centrifuged samples containing Tris-HCl buffer solution. When preparing FLIM samples containing salt induced "hard" coacervates, the addition of the dye should be done after adding the K_2HPO_4 salt solution. The soft coacervates formed on the edges of the sample droplets during drying of the sample could not be measured with this method because the drying progressed too quickly. Instead, it was possible to image soft coacervates that already existed in the solution. Two exponential fittings were used for fluorescence decay curves determined from FLIM images of coacervates. The shorter lifetimes of DASPMI and longer lifetimes of BODIPY were used when calculating equivalent viscosities. When taking measurement accuracy into account the viscosities calculated from lifetimes of DASPMI were nearly identical in all silk coacervate samples. Some differences between samples could be discerned when comparing viscosities calculated from lifetimes of BODIPY.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston kemian ja biotekniikan laboratoriolle. Haluan kiittää työni ohjaajia akatemiantutkija Timo Laaksosta ja yliopistonlehtori Elina Vuorimaa-Laukkasta mielenkiintoisesta diplomityöaiheesta sekä neuvoista ja keskusteluista työhöni liittyen. Kiitos, että löysitte kiireisistä aikatauluistanne huolimatta aina aikaa kysymyksilleni.

Kiitokset tohtorikoulutettava Laura Lemetille käyttämäni silkkikoaservaattien valmistamisesta sekä keskusteluista silkkikoaservaatteihin liittyen, yliopisto-opettaja Ilari Jönkkärille reometrin käytön opettamisesta sekä siitä, että pääsin joustavasti tekemään mittauksia kyseisellä laitteella, dosentti Alexander Efimoville käyttämäni BODIPYn syntetisoinnista, tutkijatohtori Nikita Durandinille neuvoista ja opastuksesta työn alkuvaiheen mittauksissa ja laboratoriomestari Anne-Maarit Tikkaselle käytännön avusta laboratoriossa.

Lisäksi haluan kiittää diplomityöntekijöitä, joiden kanssa jaoin työhuoneeni, kannustavasta ilmapiiristä sekä hyödyllisistä vinkeistä ja keskusteluista sekä ystäviäni ja perheenjäseniäni neuvoista ja tuesta työn tekemisen aikana.

Tampereella, 22.11.2018

Sirkku Valkama

SISÄLLYSLUETTELO

1. Johdanto	1
2. Kirjallisuusosa	3
2.1 Fluoresenssi	3
2.1.1 Viritystilat ja tilojen väliset siirtymät	3
2.1.2 Fluoresenssin elinaika	8
2.1.3 Ympäristön vaikutus fluoresenssiin	10
2.2 Viskositeetti	11
2.2.1 Määritelmä ja yksiköt	12
2.2.2 Mikroviskositeetti	13
2.2.3 Viskositeetin mittaaminen	13
2.3 Fluoresoivat roottorimolekyylit	17
2.3.1 DASPMI	18
2.3.2 BODIPY	19
2.4 Silkkiproteiinit ja proteiinikoaservaatit	20
2.4.1 Rakenne ja ominaisuudet	21
2.4.2 Koaservaatit	21
3. Materiaalit ja menetelmät	23
3.1 Materiaalit	23
3.1.1 Väriaineet	23
3.1.2 Kalibraationäytteet	24
3.1.3 Testiliuokset	24
3.1.4 Silkkiliuokset	25
3.2 Absorptio-, fluoresenssi- ja v eritysspektrien mittaaminen	26
3.3 Fluoresenssin elinajat aikaerotteisella yksittäisfotonilaskennalla	29
3.4 Kuvantaminen aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla	30
3.4.1 FLIM-kuvien analysointi	33
3.5 Viskositeetin mittaaminen	35

4. Tulokset	36
4.1 Väriaineiden valokemialliset ominaisuudet	36
4.2 Kalibraatio	38
4.3 Homogeeniset näytteet	40
4.4 Heterogeeniset näytteet	44
4.5 Silkkikoaservaatit	46
5. Yhteenveto	55
Lähteet	59
Liite 1. Kalibraationäytteen viskositeetit ja elinajat	64
Liite 2. Fluoresenssin vaimenemiskuvaajat	65

LYHENTEET JA MERKINNÄT

ADC	engl. analog-to-digital converter, analogi-digitaalimuunnin
BODIPY	4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni
CFD	engl. constant function discriminator, vaiheilmaisin
cgs-järjestelmä	engl. centimetre-gram-second system of units, senttimetri-gramma-sekuntti-yksikköjärjestelmä
DASPMI	4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-N-metyylipyridiniumjodidi)
FF	engl. front face, spektrofluorometrin mittausmenetelmä kiinteille näytteille
FLIM	engl. fluorescence lifetime imaging microscopy (microscope), aikaerotteinen fluoresenssimikroskopia(-mikroskooppi)
ic	engl. internal conversion
ICT	engl. intramolecular charge transfer, molekyyliin sisäinen varauksen siirto
IRF	engl. instrument response function, instrumenttifunktio
isc	engl. intersystem crossing
MCA	engl. multichannel analyser, monikanava-analysaattori
MOU	engl. main optical unit, aikaerotteisen fluoresenssimikroskoopin optinen pääyksikkö
RA	engl. right-angle, spektrofluorometrin mittausmenetelmä, jossa käytetään 90° kulmaa
S	singlettitila
SPAD	engl. single photon avalanche diode, yksittäisfotoni vyörydiodi
T	triplettitila
TAC	engl. time-to-amplitude converter, aika-amplitudi-muunnin
TCSPC	engl. time-correlated single photon counting, aikaerotteinen yksittäisfotonilaskenta
TICT	engl. twisted intramolecular charge transfer, taipunut molekyyliin sisäinen varauksen siirto
TTTR	engl. time-tagged time-resolved, aikamerkitty aikaerotteinen mittausmenetelmä
vr	vibraatiorelaksaatio, engl. vibrational relaxation
η	dynaaminen viskositeetti (Pa s)
λ	aallonpituus (m)
ν	kinemaattinen viskositeetti (m ² s ⁻¹)
ν_f	fotonin taajuus (s ⁻¹)

ρ	tiheys (kg m^{-3})
σ	leikkausjännitys (Pa)
τ_f	fluoresenssin elinaika (s)
$\langle \tau_f \rangle$	fluoresenssin amplitudipainotettu keskimääräinen elinaika (s)
ϕ_f	fluoresenssin kvanttisuhde
ω	kulmanopeus (rad s^{-1})
[A]	A:n konsentraatio
A	fluoresenssin elinajan amplitudi
A_s	syntierin pinta-ala (m^2)
a	fluoresenssin elinajan osuus
c	valon nopeus ($2,998 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$)
E	energia (J)
$\dot{\epsilon}$	muodonmuutosnopeus (s^{-1})
F	voima (N)
g	normaaliputoamiskiihtyvyys ($9,807 \text{ m s}^{-2}$)
h	Plankin vakio ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$)
h_n	nestepylvään korkeus (m)
h_s	syntierin korkeus (m)
I	intensiteetti (W m^{-2})
k	nopeusvakio
L	pituus (m)
l	syntierien seinämien välinen etäisyys rotaatioviskometrissa (m)
m	massa (kg)
$m\%$	massaprosentti
\dot{n}	kierrostaajuus (s^{-1})
q	lämpöenergia (J)
R_i	vipuvarren pituus (m)
r	säde (m),
S	kokonaisspin
T	vääntömomentti (N m)
t	aika (s)
V	tilavuus (m^3)
v	nopeus (m s^{-1})

1. JOHDANTO

Viskositeetillä on suuri merkitys monissa teollisissa ja biologisissa prosesseissa, niin makroskooppisella kuin mikroskooppisellakin tasolla. [1, s. 9; 2, s. 12671] Viskositeetti vaikuttaa esimerkiksi aineiden prosessoitavuuteen [1, s. 6] ja on yksi tärkeimmistä molekyylien diffuusionopeuteen vaikuttavista tekijöistä. Diffuusiorajoitteiset reaktiot ovat tärkeitä erityisesti solujen toiminnalle. Niinpä viskositeetilla on suuri merkitys moniin soluille tärkeisiin prosesseihin, kuten aineenvaihduntareaktioihin, kalvoproteiinien liikkumiseen solukalvoissa ja molekyylien diffuusion solukalvojen läpi. Moniin sairauksiin liittyykin viskositeetin muutoksia solujen sisällä tai soluvälitilassa. [2, s. 12671–12672; 3, s. 13714; 4, s. 6672]

Makroskooppisen viskositeetin määrittämiseen on monia toimivia ja kauan käytössä olleita menetelmiä, mutta ne eivät sovellu viskositeetin määrittämiseen mikroskooppisella tasolla, kuten solujen sisällä. Mikroviskositeetin määrittämiseen tarvitaan spektroskooppisia menetelmiä. [5, s. 256] Fluoresoivien molekyylien emissioprosessit riippuvat molekyylin ympäristön ominaisuuksista, kuten viskositeetista, poolisuudesta ja ionivahvuudesta. Tästä syystä fluoresoivia molekyyliä voidaan käyttää merkkiaineina mitattaessa tällaisia ympäristön ominaisuuksia. [6] Esimerkiksi fluoresoivat roottorimolekyylit ovat fluoresoivia molekyyliä, joilla esiintyy molekyylin sisäistä pyörimisliikettä, minkä johdosta muun muassa molekyylin fluoresenssin elin-aika ja kvanttisuhde riippuvat pyörimistä rajoittavista tekijöistä, kuten ympäristön viskositeetista tai roottorimolekyylin sitoutumisesta toisiin molekyyliin. [5, s. 254; 6, s. 230; 7, s. 2] Roottorimolekyylejä on käytetty muun muassa mikrokuplien viskositeetin määrittämiseen [8], viskositeetin muutoksen seurantaan hyytelöitymisreaktiossa [9] ja viskositeetin määrittämiseen elävän solun sisällä [4].

Tässä tutkimuksessa kehitettiin ja testattiin menetelmää heterogeenisten näytteidien paikallisten viskositeettien määrittämiseen aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla (fluorescence lifetime imaging microscope, FLIM), käyttäen kahta fluoresoivaa roottorimolekyyleä: hydrofiilistä DASPMIa (4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-N-metyylipyridiniumjodidi) ja hydrofobista BODIPYä (4,4'-difluori-4bora-3a,4a-diazas-indatseeni). Menetelmää haluttiin tässä työssä hyödyntää erityisesti silkkiproteiinnikoaservaattien viskositeettien mittaamiseen erilaisista silkkikoaservaattinäytteis-

tä.

Silkki-koaservaateit ovat mielenkiintoinen tutkimuskohde, koska silkkiproteiini on monilta ominaisuuksiltaan poikkeuksellinen luonnonpolymeeri ja proteiinien koaservoituminen on ilmiö, jonka yksityiskohtia ei vielä täysin ymmärretä. [10; 11] Silkkiproteiineilla on harvinaisen hyvät mekaaniset ominaisuudet ja lisäksi silkkiproteiini on bioyhteensopiva ja soveltuu siten lääketieteellisiin sovelluksiin. Silkki-koaservaatteja voidaankin mahdollisesti tulevaisuudessa käyttää esimerkiksi lääkeaineiden kuljettajina. [12; 13]

Menetelmän kehittämiseksi määritettiin kalibraatiosuorat, jotka kuvaavat miten valittujen roottorimolekyylien elinajat muuttuvat viskositeetin muuttuessa. Elinaika-mittaukset tehtiin aikaerotteisella yksittäisfotonilaskennalla (time-correlated single photon counting, TCSPC) ja näytteiden viskositeetit määritettiin rotaatioreometrilä. Heterogeenisten näytteiden mittaamiseen käytettiin FLIM:ä. FLIM on kuvantava laitteisto, jolla voidaan tuottaa näytteestä kaksikulotteisia kuvia, joissa kunkin pikselin väri kuvastaa keskimääräistä elinaikaa ja kirkkaus keskimääräistä intensiteettiä kyseissä näytteen kohdassa. FLIM-kuvista määritettiin elinaikoja heterogeenisten nesteiden eri osissa. Kalibraatiosuoria käyttäen voitiin näiden elinaikojen avulla laskea elinaikoja vastaavat viskositeetit kyseisissä kohdissa näytettä.

Kirjallisuusosassa käydään läpi fluoresoivien roottorimolekyylien viskositeetinmäärittämis- ja laitteiden toimintaperiaatteiden ymmärtämisen kannalta oleellista teoriaa niin viskositeetista kuin valokemiastakin. Lisäksi avataan mikroviskositeetin käsitettä ja esitellään käytetyt fluoresoivat roottorimolekyylit sekä tutustutaan silkkiproteiineihin ja proteiinien koaservoitumiseen. Tämän jälkeen esitellään työssä käytettyjä menetelmiä sekä käytetyt materiaalit ja käydään läpi myös ongelmia, joita menetelmää kehitettäessä kohdattiin ja kerrotaan miten nämä ongelmat ratkaistiin. Tämän jälkeen käydään läpi tuloksia aloittaen roottorimolekyylien ominaisuuksista ja kalibraatiosta, jonka jälkeen käydään läpi FLIM-mittauksia, ensin testiliuoksille ja lopuksi silkki-koaservaateille. Lopuksi pohditaan tuloksia, analysoidaan menetelmän toimivuutta ja annetaan ehdotuksia menetelmän jatkokehittämiseksi.

2. KIRJALLISUUSOSA

Tässä luvussa käsitellään fluoresenssiin, viskositeettiin, sen määrittämiseen fluoresenssin avulla sekä silkkiproteiineihin liittyvää teoriaa. Fluoresenssin yhteydessä kerrotaan absorptiosta ja elektronisten viritystilojen purkautumistavoista, fluoresenssin elinajasta ja molekyylin ympäristön vaikutuksesta fluoresenssiin. Viskositeettia käsiteltäessä kerrotaan viskositeetin mittaamisesta ja mikroviskositeetin merkityksestä. Lisäksi käsitellään fluoresoivia roottorimolekyylejä ja niiden hyödyntämistä viskositeetin mittaamisessa sekä esitellään tässä työssä käytetyt fluoresoivat roottorimolekyylit. Lopuksi esitellään silkkiproteiinien rakenne, kerrotaan ominaisuuksia, joiden ansiosta silkki on mielenkiintoinen materiaali sekä selitetään mitä proteiinien koaservoitumisella tarkoitetaan.

2.1 Fluoresenssi

Fluoresenssi on valokemiallinen prosessi, jossa molekyyli emittoi fotonin palautuessaan elektroniselta virittyneeltä singlettitalalta takaisin perustilaan. Fluoresenssi on satunnainen prosessi, jonka tapahtumisella on jokin tilastollinen todennäköisyys. Tämä todennäköisyys on riippuvainen molekyylistä ja sen ympäristön vaikutuksesta molekyylin virittyneeltä tilalta pois vieviin prosesseihin. [14] Fluoresenssi on monipuolinen työkalu, jota hyödynnetään muun muassa analyyttisessä kemiassa [6, s. 15; 14, s. 623], bioteknologiassa, DNA:n sekvensoinnissa, rikosteknisissä tutkimuksissa [14, s. 1] ja jopa yksittäisen molekyylin havaitsemisessa [14, s. 21]. Fluoresoivien molekyylien avulla voidaan saada tietoa molekyylin ympäristöstä, sillä fluoresenssi on hyvin herkkä ympäristön vaikutuksille, kuten pH:lle, lämpötilalle, poolisuudelle ja viskositeetille. [6, s. 11]

2.1.1 Viritystilat ja tilojen väliset siirtymät

Spektroskooppiset menetelmät perustuvat siihen, että molekyyleillä on diskreetit energiatilat. [15, s. 414] Molekyylin absorboidessa valoa fotonin energia siirtyy molekyyllille ja molekyyli virittyy korkeammalle energiatilalle. Fotonin energia E riippuu sen aallonpituudesta seuraavasti [16, s. 4]:

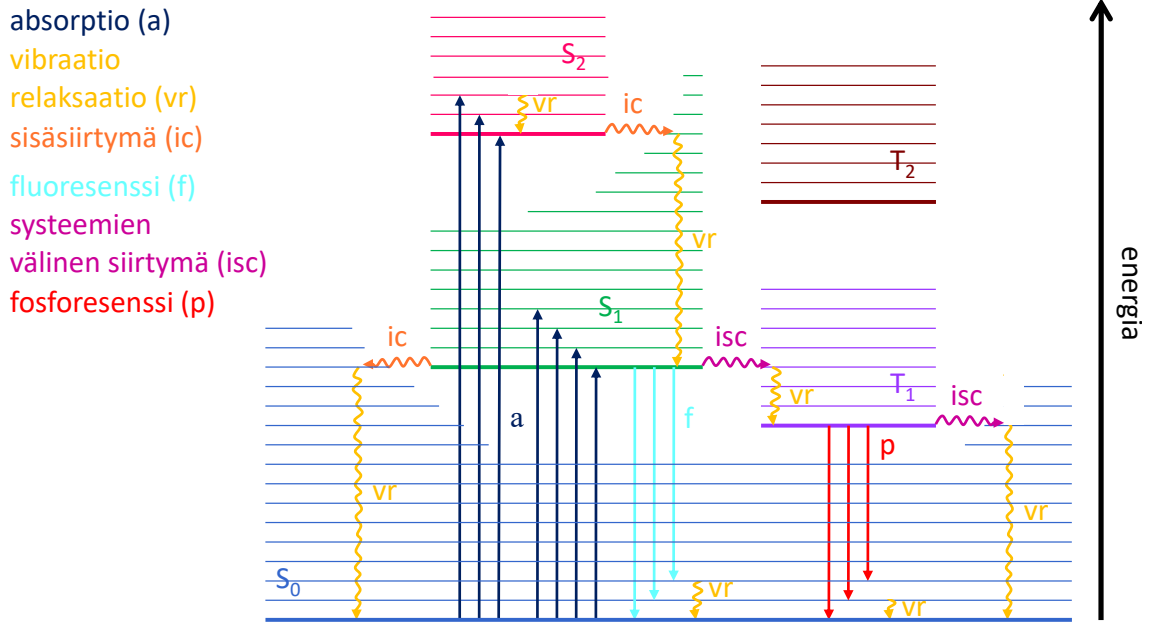
$$E = h\nu_f = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

jossa h on Plankin vakio ($6,626 \times 10^{-34}$ J s), ν_f on fotonin taajuus (s^{-1}), c on valon nopeus tyhjiössä ($2,998 \times 10^8$ m s $^{-1}$) ja λ on fotonin aallonpituus (m). Absorboidun fotonin energian täytyy vastata energiaeroa molekyylin kahden energiatilan välillä [16, s. 5]. Mikroaaltojen ja infrapunasäteilyn energia riittää virittämään molekyylin korkeammille rotaatio- ja vibraatiotiloille. Jotta fluoresenssia voi tapahtua, täytyy molekyylin virittyä korkeammalle elektroniselle energiatilalle, mikä vaatii näkyvän valon tai UV-säteilyn fotonin absorboimista. [15, s. 575; 16, s. 29]

Useimmat molekyylit ovat perus vibraatiotilalla ja elektronisella perustilalla huoneenlämmössä. [6, s. 35; 16, s. 33] Molekyylin elektroninen perustila on tyypillisesti singlettitila ja siitä käytetään merkintää $S_{0,0}$. Alaindeksin ensimmäinen nolla viittaa elektroniseen perustilaan ja jälkimmäinen nolla perus vibraatiotilaan. Molekyylin virittyneet tilat voivat olla joko singletti- tai triplettitiloja. [15, s. 584; 16, s. 9] Virittyneellä singlettitilalla olevan elektronin spin on vastakkaissuuntainen kuin perustilan ylimmälle orbitaalille jääneen elektronin spin, joten virittyneen tilan kokonaisspin S on 0. ($S = -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 0$). Tilaa kutsutaan singlettitilaksi, sillä sen kerrannaisuus on $2S + 1 = 1$. Triplettitilan kerrannaisuus on 3, jolloin sen kokonaisspin on 1, joten virittyneellä triplettitilalla olevan elektronin spin on sama kuin perustilan ylimmälle orbitaalille jääneen elektronin spin ($S = 1/2 + 1/2 = 1$). [14, s. 1; 6, s. 21–22; 16, s. 9]. Elektronin siirtyminen singlettitilojen välillä on sallittu, sillä kokonaisspiniin liittyvän valintasäännön mukaan kokonaisspinin arvo ei saa siirtymässä muuttua ($\Delta S = 0$). Niinpä myös siirtymät triplettitilojen välillä ovat sallittuja, mutta siirtymät singlettitilan ja triplettitilan välillä eivät. [6, s. 30; 14, s. 1; 16, s. 42]

Fluoresenssia ja muita molekyylien virittyessä ja vitystilan purkautuessa tapahtuvia prosesseja havainnollistetaan usein Jablonskin diagrammilla. [14, s. 3] Jablonskin diagrammissa eri energiatiloja kuvataan viivoilla. Kuvassa 2.1 on esitetty Jablonskin diagrammi, johon on merkitty eri väreillä kolme alinta elektronista singlettitilaa S_0 , S_1 ja S_2 ja kaksi alinta elektronista triplettitilaa T_1 ja T_2 . Paksut viivat kuvastavat kunkin elektronisen energiatilan alinta vibraatiotilaa ja muut viivat korkeampienergisistä vibraatiotiloja. Mitä korkeammalla energiatilaa kuvaava viiva on, sitä korkeampi on kyseisen tilan energia.

Absorboidessaan näkyvän tai ultravioletin valon fotonin, molekyyli virittyy useimmiten jollekin elektronisen S_1 - tai S_2 -tilan korkeampienergisistä vibraatiotiloista [14, s. 5], mikä voidaan esittää yhtälöllä



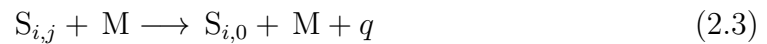
Kuva 2.1 Jablonskin diagrammi. Säteilevät siirtymät on merkitty suorilla nuolilla ja säteilemättömät aaltonuolilla. Nuolien värikoodi ja käytetyt lyhenteet on selitetty kuvassa vasemmalla. *S* viittaa singlettitilaan ja *T* triplettitilaan. Viivojen eri värit kuvaavat eri elektronisia tiloja. Paksumpi viiva kuvaa elektronisen tilan perusvibraatiotilaa ja muut viivat korkeampienergisää vibraatiotiloja.



Absorptiota havainnollistetaan kuvan 2.1 Jablonskin diagrammissa tummansinisillä nuolilla. Molekyyli voi palautua virittyneestä tilasta perustilaan säteilevillä tai säteilemättömillä siirtymillä. Säteilevissä siirtymissä emittoituu fotoni. Säteilemättömissä siirtymissä energiaa siirtyy pois molekyyliltä muilla tavoin, päätyen lopulta lämpöenergiana ympäristöön. [16, s. 50] Kuvan 2.1 Jablonskin diagrammissa säteileviä siirtymiä kuvataan suorilla nuolilla ja säteilemättömiä siirtymiä aaltonuolilla.

Näkyvän valon tai UV-säteilyn fotonin absorption jälkeen tapahtuu yleensä ensimmäisenä säteilemätön vibraatiorelaksaatio (vr) virittyneen elektronisen energiatilan alimmalle vibraatiotilalle. Vibraatiorelaksaatiossa energiaa siirtyy virittyneeltä molekyyliltä sen lähistöllä oleviin molekyyleihin molekyyliden törmätessä toisiinsa. Tämä prosessi on sitä nopeampi, mitä enemmän törmäyksiä virittynyt molekyyli kokee aikayksikössä. Nesteissä vibraatiorelaksaatio tapahtuu tyypillisesti 10^{-13} – 10^{-9} sekunnissa. [16, s. 51] Jos molekyyli on virittynyt S_1 -tilaa korkeammalle elektroniselle energiatilalle, tapahtuu toisenlainen nopea säteilemätön siirtymä, jota kutsutaan systeemin sisäiseksi siirtymäksi tai sisäsiirtymäksi (internal conversion, ic). Sisä-

siirtymä virittyneiden elektronisten tilojen välillä tapahtuu tyypillisesti 10^{-14} – 10^{-11} sekunnissa. [16, s. 51–52] Sisäsiirtymässä elektronisen viritystilan energia muuttuu molekyylin vibraatioenergiaksi. Sisäsiirtymä voi tapahtua elektronisten energiatilojen välillä, jos niillä on sama kerrannaisuus ja jos niillä on vibraatiotilat, joiden energiat ovat lähellä toisiaan. Tyypillisesti sisäsiirtymä tapahtuu ylemmän elektronisen energiatilan alimmalta vibraatiotilalta. Sisäsiirtymän jälkeen molekyyli on jollakin alemman elektronisen energiatilan korkeammalla vibraatiotilalla ja relaksoituu nopeasti sen alimmalle vibraatiotilalle vibraatiorelaksaation takia. [6, s. 37; 16, s. 51] Vibraatiorelaksaatio voidaan esittää yhtälöllä:

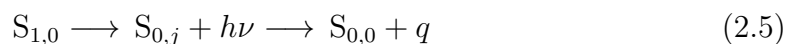


jossa M on molekyyli, johon virittynyt molekyyli törmää ja q on vapautunut lämpöenergia. Sisäsiirtymä ja sen jälkeen tapahtuva vibraatiorelaksaatio voidaan vastavasti esittää yhtälöllä:



jossa tilojen $S_{i,0}$ ja $S_{h,k}$ energiat ovat hyvin lähellä toisiaan ja S_i -tila on korkeampienerginen kuin S_h -tila.

Vibraatiorelaksaatio ja sisäsiirtymä S_2 -tilalta S_1 -tilalle ovat tavallisesti paljon nopeampia prosesseja kuin fluoresenssi, joka tapahtuu noin 10^{-12} – 10^{-6} sekunnissa, joten ne ehtivät lähes aina tapahtua ennen fluoresenssia [16, s. 52]. Niinpä fluoresenssi tapahtuukin muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta $S_{1,0}$ -tilalta, riippumatta siitä mille tilalle molekyyli on alun perin virittynyt. Tästä syystä molekyylin fluoresenssin ominaisuudet, polarisaatiota lukuun ottamatta, eivät riipu viritysaallonpituudesta [6, s. 37–38; 14, s. 5–7; 16, s. 52]. Fluoresoidessaan molekyyli emittoi fotonin ja siirtyy jollekin S_0 -tilan vibraatiotiloista ja sen jälkeen vibraatiorelaksaation avulla $S_{0,0}$ -tilalle. Tämän fluoresenssin jälkeen tapahtuvan vibraatiorelaksaation takia fluoresenssin emissiospektrissä voi näkyä vibraatiotiloista johtuvia rakenteita. [14, s. 5] Fluoresenssi voidaan esittää yhtälöllä 2.5:

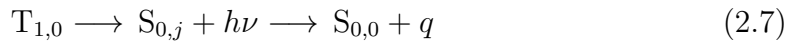


Fluoresenssin sijaan molekyyli voi siirtyä S_1 -tilalta perustilaan muillakin tavoilla. Sisäsiirtymä S_1 -tilalta S_0 -tilalle on mahdollinen ja tapahtuu tyypillisesti 10^{-9} – 10^{-7}

sekunnissa [16, s. 51], mikä on hitaampi kuin sisäsiirtymä S_2 -tilalta S_1 -tilalle, ja yleensä hitaampi kuin fluoresenssi, sillä energiaero S_2 - ja S_1 -tilojen välillä ei ole niin suuri, kuin S_1 - ja S_0 -tilojen välillä. [6, s. 37] Toinen vaihtoehto on systeemien välinen siirtymä (intersystem crossing, isc) S_1 -tilalta T_1 -tilalle, mikä voidaan esittää yhtälöllä 2.6:



Kuten aikaisemmin todettiin, tämä on kokonaisspiniin liittyvän valintasäännön mukaan kielletty ja niinpä se on suhteellisen hidas prosessi ja tapahtuu noin 10^{-11} – 10^{-8} sekunnissa [16, s. 52]. Systeemien välisiä siirtymiä tapahtuu, jos singletti- ja triplettitiloilla on toistensa piirteitä, minkä aiheuttaa spinratakenttä. Esimerkiksi bromin ja jodin kaltaiset suuret atomit lisäävät spinratakenttää ja siten nopeuttavat sisäsiirtymiä, lisäten niiden todennäköisyyttä. [15, s. 587; 16, s. 66–67 ja s. 83] Vibraatiorelaksaatio johtaa myös systeemien välisen siirtymän jälkeen molekyylin siirtymiseen T_1 -tilan alimmalle vibraatiotilalle. [6, s. 41] $T_{1,0}$ -tilalta molekyyli voi emittoida fotonin ja siirtyä $S_{0,j}$ -tilalle fosforesenssiksi kutsutulla säteilevällä siirtymällä, mikä voidaan esittää yhtälöllä 2.7:



Tämä prosessi on hidas ja tapahtuu noin 10^{-3} – 10^2 sekunnissa, sillä säteilevä siirtymä T_1 -tilalta S_0 -tilalle on kielletty, niin kuin aiemmin todettiin. Tästä syystä erityisesti huoneenlämpöisissä nesteissä, joissa molekyylien välisiä törmäyksiä tapahtuu paljon, säteilemätön systeemien välinen siirtymä T_1 -tilalta S_0 -tilalle ja sen jälkeinen vibraatiorelaksaatio $S_{0,0}$ -tilalle, ovat todennäköisempiä tapoja palata takaisin perustilaan. Lämpötilan lasku vähentää törmäyksiä ja siten lisää fosforesenssin mahdollisuutta. [6, s. 41]

Kvanttisuhde kuvaa sitä, kuinka tehokkaasti absorboituneet fotonit saavat aikaan jonkin tietyn tapahtuman. Niinpä fluoresenssin kvanttisuhde on emittoituvien fotonien määrä jaettuna absorboitujen fotonien määrällä.

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} = k_f \tau_f \quad (2.8)$$

jossa ϕ_f on fluoresenssin kvanttisuhde, k_f fluoresenssin nopeusvakio, k_{nr} säteilemättömien siirtymien yhteenlaskettu nopeusvakio ja τ_f fluoresenssin elinaika [6, s. 46;

14, s. 8–9]. Seuraavaksi kerrotaan lisää fluoresenssin elinajasta ja nähdään myös perustelu yhtälön 2.8 oikeanpuolimmaiselle osalle.

2.1.2 Fluoresenssin elinaika

Fluoresenssin elinaika τ_f (s) on keskimääräinen aika, jonka molekyyli pysyy virittyneessä tilassa ennen kuin se fluoresoi ja palaa perustilaansa [14, s. 9]. Käytännössä tämä on S_1 -tilan elinaika [6, s. 38], sillä kuten aiemmin todettiin, fluoresenssi tapahtuu yleensä tältä viritystilalta. Virittyneen tilan elinaika on virittyneeltä tilalta poisvievien prosessien nopeusvakioiden summan käänteisluku [6, s. 43]. S_1 -tila voi purkautua muun muassa fluoresenssin, sisäsiirtymän tai systeemien välisen siirtymän avulla, kuten luvussa 2.1.1 kerrottiin. Niinpä fluoresenssin elinaika τ_f , saadaan yhtälöllä:

$$\tau_f = \frac{1}{k_f + k_{nr}} \quad (2.9)$$

jossa k_f on fluoresenssin nopeusvakio ja k_{nr} on S_1 -tilalta pois vievien säteilemättömien siirtymien yhteenlaskettu nopeusvakio. [6, s. 43] Tämän yhtälön avulla voidaan perustella aiemmin yhtälössä 2.8 esitetty yhteys fluoresenssin elinajan ja kvanttisuhteen välillä.

Fluoresenssin elinajalle voidaan johtaa toinenkin määritelmä lähtemällä liikkeelle S_1 -tilan nopeusyhtälöstä. Kaikki S_1 -tilalta pois vievät prosessit ovat ensimmäisen kertaluokan reaktioita, joiden reaktionopeudet riippuvat vain S_1 -tilan konsentraatiosta. Niinpä S_1 -tilan purkautumisen nopeusyhtälö [16, s. 53] on

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -(k_f + k_{nr})[S_1] \quad (2.10)$$

Kun yhtälöstä 2.10 erotetaan muuttujat ja sijoitetaan siihen yhtälö 2.9, saadaan yhtälö

$$\frac{1}{[S_1]} d[S_1] = -\frac{1}{\tau_f} dt \quad (2.11)$$

Integroimalla yhtälön 2.11 vasen puoli S_1 -tilan alkukonsentraatiosta $[S_1]_0$ konsentraatioon ajanhetkellä t $[S_1]_t$ ja oikea puoli ajasta $t = 0$ aikaan t , saadaan

$$\ln([S_1]_t) - \ln([S_1]_0) = -\frac{t}{\tau_f} \quad (2.12)$$

josta logaritmin laskusääntöjen mukaan saadaan

$$\ln\left(\frac{[S_1]_t}{[S_1]_0}\right) = -\frac{t}{\tau_f} \quad (2.13)$$

ja logaritmin määritelmän mukaan

$$\frac{[S_1]_t}{[S_1]_0} = e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad (2.14)$$

Tästä voidaan ratkaista yhtälö S_1 -tilan konsentraatiolle ajanhetkellä t :

$$[S_1]_t = [S_1]_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad (2.15)$$

Fluoresenssin intensiteetti kullakin ajanhetkellä t on verrannollinen S_1 -tilassa olevien molekyylien konsentraatioon ajanhetkellä t . Verrannollisuuskerroin on fluoresenssin nopeusvakio. [6, s. 43] Niinpä intensiteetti ajanhetkellä t on

$$I(t) = k_f [S_1]_t = k_f [S_1]_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}} = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}} \quad (2.16)$$

missä I_0 on intensiteetti ajanhetkellä $t = 0$, eli heti valon absorboimisen jälkeen. Yhtälöstä 2.16 nähdään, että fluoresenssin elinaika τ_f on se aika, jossa fluoresenssin intensiteetti on pudonnut e^{-1} -kertaiseksi maksimi intensiteetistä, eli intensiteetistä I_0 . [16, s. 54]

Jos näyte fluoresoi n :llä eri elinajalla, saadaan fluoresenssin intensiteetti ajanhetkellä t laskettua kaavalla:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.17)$$

jossa A_i on elinajan i amplitudi ajanhetkellä $t = 0$ [6, s. 172; 14, s. 141]. Kunkin elinajan osuus voidaan laskea amplitudien avulla kaavalla:

$$a_i = \frac{A_i}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad (2.18)$$

Elinajan osuuksien summa on yksi. Elinajan osuuksien avulla voidaan laskea amplitudipainotettu keskimääräinen elinaika $\langle \tau_f \rangle$ kaavalla [6, s. 172–173] :

$$\langle \tau_f \rangle = \sum_{i=1}^n a_i \tau_i \quad (2.19)$$

Fluoresenssin elinaika on tyypillisesti noin 10 ns:n luokkaa [14, s. 1]. Molekyylin fluoresenssin elinaikaan vaikuttaa kuitenkin myös molekyylin ympäristö. Elinajan muutoksia seuraamalla voidaankin saada tietoa fluoresoivan molekyylin paikallisesta kemiallisesta ympäristöstä. [14]

2.1.3 Ympäristön vaikutus fluoresenssiin

Fluoresoivan molekyylin ympäristö vaikuttaa voimakkaasti sen emissioprosesseihin. Muun muassa lämpötila ja paine, ympäristön poolisuus, pH, viskositeetti ja sähköinen potentiaali sekä ionien tai sammuttajamolekyyliden läsnäolo tai sitoutuminen ympäröiviin molekyyliin voivat vaikuttavat fluoresenssiin. [6, s. 11] Nämä vaikutukset voivat näkyä muun muassa vertailtaessa molekyylin absorptio-, fluoresenssi- ja virityspektrejä keskenään. Esimerkiksi virityspektri on identtinen absorptiospektrin kanssa, jos fluoresoivia molekyyliä on näytteessä vain yhdenlaista tyyppiä perustilassa. Jos taas näytteessä on useampia fluoresoivia molekyyliä, tai yhtä molekyyliä esiintyy erilaisissa muodoissa, kuten kasaumina, komplekseina tai tautomeereinä, viritys- ja absorptiospektrit eivät ole identtisiä. [6, s. 53]

Fluoresenssissa emittoituvan fotonin energia on tyypillisesti pienempi kuin absorboituneen fotonin energia, sillä osa absorboituneen fotonin energiasta muuttuu lämmöksi prosesseissa, joita tapahtuu ennen fluoresenssia ja fluoresenssin jälkeen, ennen kuin molekyyli on palannut perustilaansa. Niinpä fluoresenssimaksimin aallonpituus on pidempi kuin ensimmäisen absorptiomaksimin. Tätä aallonpituuksien välistä eroa kutsutaan Stokesin siirtymäksi. Stokesin siirtymään vaikuttaa myös liuotinmolekyylin uudelleenjärjestäytyminen virittyneen molekyylin ympärillä. Uudelleenjärjestäytymistä tapahtuu usein molekyylien virittyessä korkeammalle energiatilalle, sillä tyypillisesti fluoresoivan molekyylin dipolimomentti on virittyneessä tilassa suurempi kuin perustilassa, jolloin liuotinmolekyylin uudelleenjärjestäytyminen vähentää virittyneen tilan energiaa ja stabiloi siten virittyneitä tilaa. Tämä vähentää fluoresenssissa emittoituvan fotonin energiaa ja siten kasvattaa Stokesin siirtymää. Poo-

lisemmassa liuottimessa liuotinmolekyylien uudelleenjärjestäytyminen on voimakkaampaa. Niinpä ympäristön poolisuuden kasvaessa Stokesin siirtymä kasvaa. Tyypillisesti pooliset fluoresoivat molekyylit ovat poolittomia herkempiä ympäristön poolisuuden muutoksille. [6, s. 38 ja 54; 14, s. 205–206; 16, s. 62]

Tämän tutkimuksen kannalta oleellisin fluoresoivien molekyylien ominaisuus, on niiden herkkyys ympäristön viskositeetille. Försterin ja Hoffmanin yhtälö 2.20 [17] yhdistää fluoresenssin kvanttisuhteen ja viskositeetin seuraavaasti:

$$\phi_f = z\eta^\alpha \quad (2.20)$$

jossa z ja α ovat vakioita. [18, s. 11635] Kun tähän yhtälöön sijoitetaan yhtälö 2.8 ja ratkaistaan fluoresenssin elinaika, saadaan yhteys viskositeetin ja fluoresenssin elinajan välille:

$$\tau_f = \frac{z\eta^\alpha}{k_f} \quad (2.21)$$

Ottamalla logaritmit yhtälön 2.21 kummaltakin puolelta saadaan:

$$\log \tau_f = \log \left(\frac{z}{k_f} \right) + \alpha \log \eta \quad (2.22)$$

josta nähdään, että fluoresenssin elinajan logaritmi on suoraan verrannollinen viskositeetin logaritmiin. [2; 5] Tämä pätee useimmiten jollain tietyllä viskositeettialueella, joka riippuu molekyylistä. Hyvin matalissa ja hyvin korkeissa viskositeeteissa elinajan ja viskositeetin logaritmien riippuvuus siis poikkeaa lineaarisesta. [19] Tämän yhtälön perusteella voidaan kuitenkin kalibroida menetelmä, jolla viskositeetin voi tiettyjen viskositeettirajojen sisällä laskea fluoresoivan molekyylin elinajasta.

2.2 Viskositeetti

Viskositeetti kuvaa aineen kykyä vastustaa virtaamista. [1, s. 1; 20, s. 53] Virtaamista vastustaa aineen sisäinen kitka [21, s. 32], joka nesteissä aiheutuu molekyylien välisistä koheesivoimista, eli nestettä kasassa pitävistä voimista, ja kaasuisissa molekyylien törmäyksistä. [20, s. 53] Mitä voimakkaammin molekyylit vetävät toisiaan puoleensa, sitä enemmän energiaa tarvitaan, jotta molekyylit saadaan liikkumaan toistensa suhteen ja sitä korkeampi on aineen viskositeetti.

Viskositeetti riippuu voimakkaasti lämpötilasta ja heikosti paineesta. [1, s. 1; 20, s. 53] Nesteiden viskositeetti laskee lämpötilan noustessa, koska korkeammassa lämpötilassa molekyyleillä on enemmän kineettistä energiaa, jonka avulla ne voivat helpommin voittaa viereisten molekyylien aiheuttaman vetovoiman ja pääsevät näin liikkumaan vapaammin. Kaasuissa tilanne on päinvastainen, sillä korkeammassa lämpötilassa molekyylit törmäilevät toisiinsa enemmän, minkä takia kaasu kokonaisuudessaan vastustaa virtausta enemmän. [20, s. 53] Viskositeettiarvojen yhteydessä tuleekin aina ilmoittaa missä lämpötilassa arvo on mitattu. Paineen kasvaessa viskositeetti kasvaa, koska tiheys kasvaa paineen kasvaessa, mutta nesteissä vaikutus alkaa tyypillisesti näkyä vain hyvin korkeissa paineissa ja kaasuissakin vasta melko korkeissa paineissa [20, s. 53].

2.2.1 Määritelmä ja yksiköt

Newtonin viskositeettimallin mukaan fluidien muodonmuutosnopeus $\dot{\epsilon}$ (s^{-1}) on suoraan verrannollinen leikkausjännitykseen σ (Pa) [6, s. 226; 20, s. 52], eli

$$\sigma = \eta \dot{\epsilon} \quad (2.23)$$

jossa verrannollisuuskerroin η on dynaaminen (absoluuttinen) viskositeetti. Fluideja, joille tämä laki pätee, kutsutaan newtonilaisiksi fluideiksi. Ei-newtonilaisilla fluideilla yhteys leikkausjännityksen ja muodonmuutosnopeuden välillä on monimutkaisempi ja viskositeetti vaihtelee esimerkiksi leikkausjännityksen mukaan. [20, s. 52]

Jossain tilanteissa on käytännöllistä [20, s. 53] käyttää aineen dynaamisen viskositeetin sijaan aineen kinemaattista viskositeettia ν , joka on aineen dynaaminen viskositeetti jaettuna aineen tiheydellä ρ (kg m^{-3}):

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad (2.24)$$

Kaavojen 2.23 ja 2.24 perusteella nähdään, että dynaamisen viskositeetin yksiköksi saadaan Pa s ja kinemaattisen viskositeetin yksiköksi $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Useissa teksteissä dynaamiselle viskositeetille käytetään kuitenkin edelleen vanhaa cgs-järjestelmän yksikköä poisi (P) [1, s. 2–5], joka on

$$1 \text{ P} = \frac{1 \text{ g}}{\text{cm s}} = \frac{0,001 \text{ kg}}{0,01 \text{ m s}} = \frac{0,1 \text{ kg}}{\text{m s}} = \frac{0,1 \text{ kg m s}}{\text{m}^2 \text{ s}^2} = \frac{0,1 \text{ N s}}{\text{m}^2} = 0,1 \text{ Pa s} \quad (2.25)$$

Veden viskositeetti huoneenlämmössä on noin 1 senttipöisi ja nesteiden viskositeetti-
tiarvot ilmoitetaankin usein cP:na. SI-järjestelmässä 1 cP on 1 mPa s. Esimerkik-
si oliiviöljyn viskositeetti 20 °C:ssa on noin 82 mPa s [1, s. 553] ja glyserolin noin
1400 mPa s [22].

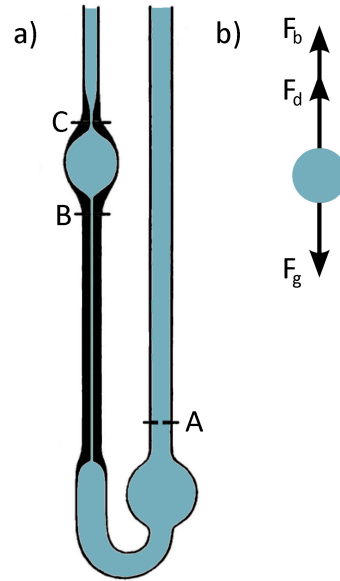
2.2.2 Mikroviskositeetti

Viskositeetilla on suuri merkitys monissa teollisissa ja biologisissa prosesseissa. [1,
s. 9; 2, s. 12671] Viskositeetti vaikuttaa esimerkiksi aineiden prosessoitavuuteen [1,
s. 6] ja polymeerien tuotannossa polymeroitumisreaktion etenemistä voidaan seurata
viskositeetin avulla, sillä polymeeriketjun pidentyessä polymeeriliuoksen viskositeet-
ti kasvaa. Soluissa monien prosessien nopeus riippuu reagenttien diffuusionopeudes-
ta ja viskositeetti on yksi tärkeimmistä diffuusionopeuteen vaikuttavista tekijöistä.
Muun muassa monet aineenvaihduntareaktiot, kalvoproteiinien liikkuminen solu-
kalvoissa ja molekyylien diffuusio solukalvojen läpi riippuvat viskositeetista. Moniin
sairauksiin liittyykin viskositeetin muutoksia solujen sisällä tai soluvälitilassa. [2,
s. 12672; 3, s. 13714; 4, s. 6672; 23]

Monimutkaisemmissa, heterogeenisissa materiaaleissa, kuten solun sisällä, bulkkivis-
kositeetti ei riitä kuvaamaan viskositeetin vaikutusta, sillä mikrotasolla viskositeetti
voi vaihdella eri mikroympäristöjen välillä. Niinpä onkin tarpeen pystyä määrit-
tämään heterogeenisten materiaalien paikallisia viskositeetteja. [2, s. 12671] Näitä
mikroympäristöjä tarkasteltaessa on kuitenkin kyse niin pienistä alueista, että ter-
min viskositeetti käyttäminen on hieman kyseenalaista, sillä viskositeetti on makros-
kooppien parametri ja se menettää merkityksensä molekyylylasolla. [6, s. 226] Ter-
mi mikroviskositeetti, jota usein käytetään puhuttaessa mikrotason viskositeetista,
onkin jossain määrin harhaanjohtava. Mikroviskositeetilla viitataan yhden partik-
kelin kokemaan liikkumista vastustavaan voimaan, jonka aiheuttaa vuorovaikutus
lähiympäristön molekyylien kanssa. Käytettäessä fluoresoivia molekyyliä viskosi-
teettimerkkiaineina olisikin parempi puhua mikroviskositeetin sijaan ekvivalentista
viskositeetista, eli siitä bulkkiviskositeetista, jossa molekyylin vaste on samanlainen.
[6, s. 228] Tässä työssä, kuten monissa muissakin vastaavan aihepiirin teksteissä,
puhutaan kuitenkin mikroviskositeetista tai paikallisesta viskositeetista.

2.2.3 Viskositeetin mittaaminen

Makroskooppien tason viskositeetin mittaamiseen on paljon toimivia menetelmiä,
jotka useimmiten perustuvat mekaanisiin menetelmiin. [2, s. 12671; 4, s. 6672; 5,



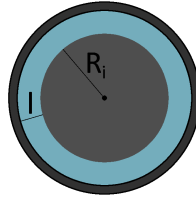
Kuva 2.2 Esimerkkejä viskometreistä. a) Kaaviokuva Ostwald-viskometristä. Muokattu lähteestä [24]. b) Kaaviokuva palloviskometrissä palloon vaikuttavista voimista, joita ovat noste F_b , nesteen vastus F_d ja painovoima F_g .

s. 245; 18, s. 11634]. Perinteiset mittausmenetelmät ovat perustuneet joko nesteen liikkumisnopeuden määrittämiseen tai jonkin esineen liikkumisnopeuden määrittämiseen nesteessä.

Esimerkiksi kapillaariviskometreillä mitataan nesteen virtausnopeutta kapillaarisissa. Kapillaariviskometreistä tunnetuin on Ostwald-viskometri, josta on esitetty kaaviokuva kuvassa 2.2 a). Ostwald-viskometri täytetään mitattavalla nesteellä kuvan 2.2 a) merkkiin A asti. Tämän jälkeen neste imetään ylös kuvassa vasemmanpuoleiseen putkeen. Kun neste päästetään valumaan takaisin alas kapillaaria pitkin, mitataan kuinka kauan kestää, että nesteen pinta on laskenut merkin C tasolta merkin B tasolle. Nesteen valumiseen kuluneesta ajasta t (s) saadaan laskettua viskositeetti kaavalla

$$\eta = K \rho_n t = \frac{\pi g h_n r_k^4 \rho_n t}{8 L_k V} \quad (2.26)$$

jossa K on viskometrin mitoista riippuva vakio, ρ_n on nesteen tiheys (kg m^{-3}) ja t on mitattu aika. Vakio K koostuu normaalista putoamiskiihtyvyydestä g ($9,807 \text{ m s}^{-2}$), kapillaarin säteestä r_k (m), kapillaarin pituudesta L_k (m), viskometrissä olevan nesteen tilavuudesta V (m^3) ja nestepylvään korkeudesta h_n (m), joka riippuu ajanhetkestä t . [1, s. 13]



Kuva 2.3 Kaaviokuva rotaatioviskosimetrinä, jossa mittasysteemi koostuu kahdesta sisäkkäisestä sylinteristä, joiden välissä tutkittava neste on. Sisempi sylinteri, jonka säde on R_i , pyörii ulomman pysyessä paikallaan. Sylinterien seinämien välinen etäisyys on l .

Palloviskosimetrissä viskositeetin mittaamiseen käytetään palloa, jonka annetaan pudota nesteessä. Palloon tällöin vaikuttavat voimat on merkitty kuvaan 2.2 b). Pallo putoaa painovoiman F_g vaikutuksesta aluksi kiihtyvällä nopeudella. Putoamista vastustavia voimia ovat noste F_b ja nesteen aiheuttama vastus F_d . Pallon nopeuden kasvaessa vastus kasvaa ja ennen pitkää nosteen ja vastuksen summa on yhtäsuuri kuin palloon vaikuttava painovoima. Tällöin kiihtyvyys on nolla ja pallon putoamisnopeus ei enää muutu. Saavutettua nopeutta kutsutaan rajanopeudeksi. Rajanopeuden avulla voidaan laskea nesteen viskositeetti kaavalla 2.27, kun pallon oleelliset mitat ja nesteen tiheys tiedetään. [1, s. 72]

$$\eta = \frac{K_p(\rho_p - \rho_n)}{v_r} = \frac{2gr_p^2(\rho_p - \rho_n)}{9v_r\pi} \quad (2.27)$$

jossa arvoon K_p on koottu systeemin vakioiden vaikutus, ρ_p on pallon tiheys, ρ_n on nesteen tiheys ja v_r (m s^{-1}) on rajanopeus. Systeemin vakiot ovat gravitaatiovakio g ja pallon säde r_p . [1, s. 72] Tällä kaavalla laskettua viskositeettiarvoa täytyy korjata muun muassa astian seinien aiheuttaman vaikutuksen takia, mitä varten on kehitetty erilaisia korjaustermejä [1, s. 72–73].

Rotaatioviskosimetri on uudempi viskosimetrityyppi, joka perustuu esineen pyörittämiseen tutkittavassa nesteessä. Esineen pyörimisnopeuden ja pyörittämiseen tarvittavan vääntömomentin avulla voidaan laskea nesteen viskositeetti. [1, s. 61; 20, s. 480–481] Mittausysteemi voi esimerkiksi koostua sylinterin muotoisesta astiasta, johon mitattava neste laitetaan ja sylinterin muotoisesta esineestä, jota nesteessä pyöritetään. Kun pyöritettävä sylinteri lasketaan astiaan, jää sylinterien seinämien väliin ohut kerros mitattavaa nestettä. Kuvassa 2.3 nähdään kaaviokuva tällaisesta systeemistä.

Sisemmän sylinterin pyörittämiseen tarvittava vääntömomentti voidaan laskea kaa-

valla

$$T_{tarvittu} = FR_i \quad (2.28)$$

jossa F on leikkausvoima (N) ja R_i on vipuvarren pituus (m), joka on sisemmän sylinterin säde. [20, s. 54] Leikkausvoima F on leikkausjännityksen σ (Pa) ja voiman vaikutus pinta-alan tulo. Pinta-ala, johon leikkausvoima F vaikuttaa on sisemmän sylinterin pinta-ala A_s (m²), joten voima F voidaan laskea kaavalla

$$F = \sigma A_s = \eta A_s \dot{\epsilon} = \eta A_s \frac{v_t}{l} \quad (2.29)$$

jossa l on sylinterien seinämien välinen etäisyys (m), v_t on tangentiaalinen nopeus. [20, s. 51] Kun sijoitetaan yhtälö 2.29 yhtälöön 2.28 ja ratkaistaan viskositeetti, saadaan

$$\eta = T_{tarvittu} \frac{l}{R_i A_s v_t} \quad (2.30)$$

Tangentiaalinen nopeus $v_t = \omega R_i$, jossa ω on kulmanopeus (rad s⁻¹). Sisemmän sylinterin pinta-ala $A_s = 2\pi R_i h_s$, jossa h_s on sylinterin korkeus. [20, s. 54] Sijoittamalla nämä yhtälöön 2.30 [20, s. 480–481] saadaan

$$\eta = T_{tarvittu} \frac{l}{2\pi\omega R_i^3 h_s} \quad (2.31)$$

Kulmanopeus $\omega = 2\pi\dot{n}$, jossa \dot{n} on kierrosten määrä aikayksikössä. [20, s. 54] Kaavalla 2.31 voidaan siis laskea nesteen viskositeetti, kun tiedetään sisemmän sylinterin pyörimisnopeus, nopeuden ylläpitämiseen tarvittu vääntömomentti ja sylinterien mitat.

Nämä bulkkiviskositeetin mittaamiseen kehitetyt menetelmät eivät sovellu viskositeetin määrittämiseen mikroskooppisella tasolla, vaan siihen tarvitaan spektroskooppisia tai mikroskooppisia menetelmiä. [5, s. 245] Tällaisia menetelmiä ovat muun muassa aikaerotteinen anisotropia, fluoresenssin palautuminen valovalkaisun jälkeen ja roottorimolekyyliden fluoresenssin mittaaminen [2, s. 12671; 5, s. 246; 6, s. 227].

2.3 Fluoresoivat roottorimolekyylit

Fluoresoivat roottorimolekyylit ovat fluoresoivia molekyyliä, joilla esiintyy molekyylin sisäistä pyörimisliikettä, minkä johdosta molekyylin emissioprosessit riippuvat ympäristön viskositeetista [6, s. 230] tai muista pyörimistä rajoittavista tekijöistä, kuten sitoutumisesta toisiin molekyyliin. [5, s. 254] Tyypillisesti pyöriminen johtaa näiden molekyylien viritystilojen purkautumiseen säteilemättömillä prosesseilla, jolloin fluoresenssia tapahtuu vähemmän ja fluoresenssin intensiteetti on matala. Viskoosissa ympäristössä pyöriminen hidastuu ja fluoresenssin todennäköisyys kasvaa. [3, s. 13707; 5, s. 246] Fluoresenssin intensiteetin lisäksi ympäristön viskositeetti vaikuttaa näillä molekyyleillä fluoresenssin elinaikaan ja emissiospektriin. Pyörimisen hidastuessa kestää pidempään, ennen kuin molekyylin virittyessään sama energia on kulunut säteilemättömiin prosesseihin, mikä antaa molekyyllille pidemmän aikavälin, jolloin fotonin emittoiminen on mahdollista. Tästä johtuen fluoresenssin elinaika pitenee viskositeetin kasvaessa. Tällaisia molekyyliä voidaan käyttää niiden ympäristön mikroviskositeetin määrittämiseen. [5, s. 246; 25] Esimerkiksi mikrokuplien viskositeetteja [8], viskositeetteja elävän solun sisällä [4; 18; 26] ja viskositeetin muutosta hyttelöitymisreaktiossa [9] on määritetty tällaisilla molekyyleillä. On tärkeää muistaa, että fluoresoivan molekyylin kokema mikroviskositeetti ei välttämättä vastaa liuoksen bulkkiviskositeettia [2, s. 12671; 27]. Yksi syy tähän on vapaan tilavuuden vaikutus [6, s. 232].

Sekä roottorimolekyylien intensiteetti että elinaika riippuvat viskositeetista, joten kumpaa tahansa voi teoriassa käyttää viskositeetin määrittämiseen. Elinajan käyttäminen on kuitenkin käytännöllisempää, erityisesti paikallisen viskositeetin määrittämiseen, sillä elinaika ei riipu roottorimolekyylien konsentraatiosta, niin kauan kun ei muodostu kasaumia tai eksimeerejä eikä tapahdu itsesammutusta. [5, s. 249][s. 14987]wu13 Intensiteettiä käytettäessä väriainekonsentraatio pitäisi pysyä määrittämään tarkasti. Tämä on kuitenkin hankalaa, erityisesti jos roottorimolekyylit eivät jakaudu tasaisesti näytteeseen, mikä on esimerkiksi heterogeenisiä näytteitä tutkittaessa hyvin todennäköistä. [2, s. 12673] Intensiteetin käyttämiseen tällaisissa tapauksissa on kehitetty menetelmä, jossa käytetään kahta toisiinsa yhdistettyä fluoresoivaa molekyyliä, joista toisen intensiteetti riippuu viskositeetista ja toisen vain väriaineen konsentraatiosta. Tällaista menetelmää on käytetty esimerkiksi lähteissä [28] ja [29]. Tämä menetelmä vaatii mittauksia kahdella eri emissioaallonpituusalueella ja mahdollisesti myös kahdella eri viritysaallonpituudella, jotta molekyylien intensiteetit voidaan erottaa toisistaan. Muun muassa tämä tekee menetelmästä monimutkaisen elinaikaa hyödyntäviin menetelmiin verrattuna. [4; 28; 29] Tässä tutkimuksessa intensiteetin käyttäminen ei onnistuisi myöskään siitä syystä, että FLIM-laitteistolla mitattu fluoresenssin intensiteetti ei ole vertailukelpoinen,

sillä muun muassa fokusointi vaikuttaa intensiteettiin.

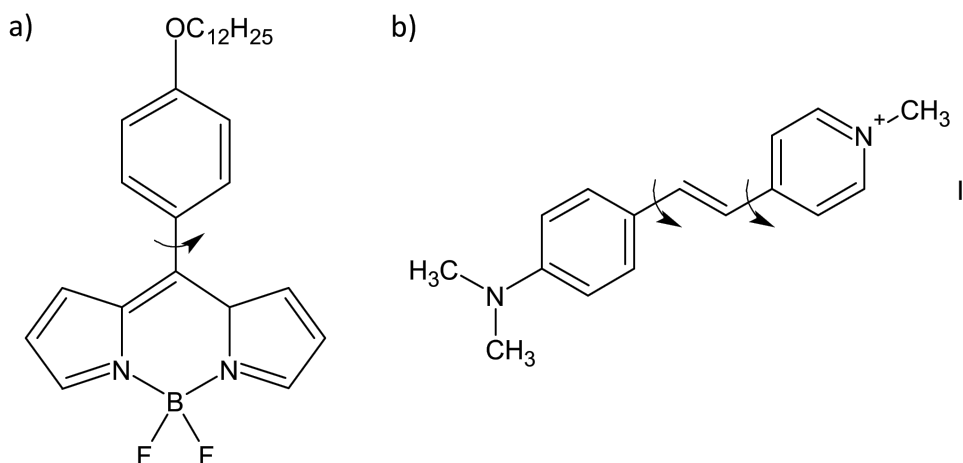
FLIM-mittauksiin hyvin sopivan fluoresoivan roottorimolekyylin elinajan tulee olla voimakkaasti riippuvainen viskositeetista, sen elinaikojen tulee olla tarpeeksi pitkiä, jotta ne voidaan mitata FLIM:llä ja fluoresenssin intensiteetin tulee olla tarpeeksi korkea, jotta mittauksen aikana ehditään havaita tarpeeksi monta fotonia luotettavan fluoresenssin vaimenemiskuvaajan määrittämiseksi. [5, s. 250–251] Tässä työssä käytettiin kahta fluoresoivaa roottorimolekyyliä, DASPMIa ja BODIPYä, jotka esitellään seuraavaksi.

2.3.1 DASPMI

DASPMI, 4-(4-(dimetyyliamino)styryyli)-N-metyyliipyridiniumjodidi, on hydrofiilinen fluoresoiva roottorimolekyyli [9, s. 12067], jonka fluoresenssi riippuu ympäristön poolisuudesta ja viskositeetista. [26, s. 4068; 30, s. 4803] DASPMIn rakennekaava on esitetty kuvassa 2.4 b).

DASPMIn toimiminen viskositeettimerkkiaineena perustuu TICT-mekanismiin (twisted intramolecular charge transfer). Molekyylien virittyessä ne siirtyvät korkeammalle energiatilalle, jota kutsutaan TICT-mekanismista puhuttaessa paikallisesti viritetyneeksi tilaksi (locally excited, LE). Molekyyli voi emittoida fotonin tältä tilalta tai molekyylissä voi tapahtua varauksen siirto, jolloin viritetyneen tilan energia laskee. Tätä viritettyä tilaa kutsutaan ICT-tilaksi (intramolecular charge transfer). Molekyyli siirtyy ICT-tilaan nopeasti virityksen jälkeen. Varauksen siirtoon voi vielä liittyä molekyylin kolmiulotteisen muodon muuttumista, jolloin puhutaan TICT-tilasta. [3, s. 13710; 14, s. 219–220] Muun muassa varauksen siirron takia DASPMIn Stokesin siirtymä on suuri. Kuvaan 2.4 b) on merkitty sidokset, joiden suhteen DASPMI-molekyyli voi taipua. [9, s. 12069]

Kun viskositeetti kasvaa, molekyylin taipuminen hidastuu, eikä TICT-tila välttämättä pääse muodostumaan, mikä vaikuttaa molekyylin fluoresenssiin. Pooliset liuotinmolekyylit stabiloivat ICT- ja TICT-tiloja, jolloin niiden energia voi olla matalampi kuin LE-tilan energia. Poolittomissa liuoksissa tilanne voi olla toisinpäin. [14, s. 207] Joillain molekyyleillä TICT on fluoresoiva tila. Tällöin molekyylin spektrin muoto muuttuu viskositeetin muuttuessa. [6, s. 64; 7]. DASPMIn TICT-tila ei ole fluoresoiva [30, s. 4804]. Viskositeetin kasvu aiheuttaa DASPMIn elinajan pitenemistä ja fluoresenssin intensiteetin kasvua pidemmillä aallonpituuksilla. Ympäristön poolisuuden kasvu sen sijaan aiheuttaa punasiirtymää DASPMIn fluoresenssispektrissä ja sinisiirtymää absorptiospektrissä sekä kvanttisuhteen pienenemistä ja



Kuva 2.4 Tutkimuksessa käytettyjen fluoresoivien roottorimolekyylien rakennekaavat. a) BODIPYn rakennekaava. b) DASPMIn rakennekaava. Kuvaan on merkitty nuolilla sidokset, joiden suhteen molekyylit voivat pyöriä tai taipua [9, s. 12069].

fluoresenssin elinajan lyhentymistä. Poolisuuden ja viskositeetin vaikutuksia fluoresenssiin on vaikea erottaa toisistaan, mistä syystä DASPMI ei ole ihanteellinen viskositeettimerkkiaine. [26, s. 4068–4069]

DASPMIa on käytetty muun muassa solututkimuksissa, sillä se ei ole myrkyllinen soluille [26, s. 4068] ja se kertyy solussa mitokondrioon. [31, s. 7681] Mitokondrion kalvopotentiaali vaikuttaa DASPMIn fluoresenssiin, joten DASPMIa voidaan käyttää tämän kalvopotentiaalin määrittämiseen. [26, s. 4068–4069]

2.3.2 BODIPY

BODIPY-molekyylit ovat 4,4'-difluori-4bora-3a,4a-diaza-s-indatseeni-rakenteeseen perustuvia roottorimolekyylejä. Lisäämällä tähän rakenteeseen erilaisia ryhmiä voidaan muokata muun muassa molekyylin emissioaallonpituutta ja elinaikaa. BODIPY-väriaineilla on tyypillisesti korkea fluoresenssin kvanttisuhde, mutta pieni Stokesin siirtymä, jonka takia ne ovat herkkiä itsesammutukselle. Ympäristön poolisuus ja pH eivät yleensä vaikuta BODIPY-molekyyliden fluoresenssiin. [14; 32] Kuvassa 2.4 a) nähdään tässä tutkimuksessa käytetyn BODIPYn rakennekaava. Tässä työssä BODIPY-lyhenteellä viitataan nimenomaan tähän molekyyliin, eikä BODIPY-molekyyliden ryhmään, ellei lauseyhteys anna ymmärtää toisin.

Käytetyn BODIPYn toiminta viskositeettimerkkiaineena perustuu siihen, että molekyyli voi pyöriä kuvaan 2.4 a) merkityn yksinkertaisen sidoksen suhteen [9, s. 12069]. Viskositeetin ollessa matala, molekyylin virittynyt tila voi purkautua säteilemättömästi tämän pyörimisen johdosta, minkä seurauksena fluoresenssin intensiteetti on

matala ja elinaika lyhyt. Viskositeetin kasvaessa pyöriminen hidastuu ja säteilemättömän relaxoitumisen osuus pienenee ja fluoresenssin intensiteetti kasvaa ja elinaika pitenee. [3, s. 13711; 33] BODIPYä on käytetty muun muassa hydrofobisten alueiden viskositeetin mittaamiseen solun sisällä [2; 18].

Tutkimuksissa on osoitettu, että lämpötila ei vaikuta kuvan 2.4 a) BODIPY-molekyylin ja sen kaltaisen, vähän lyhyemmän hiilivetyketjun omaavan molekyylin fluoresenssiin. [19, s. 14988; 33, s. 5773-5774; 34, s. 5283] Niinpä tässä tutkimuksessa käytetyn BODIPYn fluoresenssi ei riipu lämpötilasta, pH:sta eikä poolisuudesta ja lisäksi BODIPYn kvanttisuhde on suurempi kuin DASPMIn, mistä syistä BODIPY on DASPMIa ideaalisempi viskositeettimerkkiaine. Lisäksi BODIPYn elinajat ovat DASPMIn elinaikoja pidempiä ja elinajoissa tapahtuu suurempia muutoksia viskositeetin muuttuessa. BODIPY on tosin hydrofobinen [9, s. 12067; 18, s. 11639] ja lisäksi DASPMIa herkempi itsesammutukselle. Erityisesti itsesammutus voi vaikuttaa BODIPYllä määritettyjen tulosten luotettavuuteen esimerkiksi silkkiproteiini-koaservaatteja tutkittaessa.

2.4 Silkkiproteiinit ja proteiinikoaservaatit

Silkkiproteiinit ovat joukko luonnonpolymeerejä, joita muun muassa hämähäkit ja silkkiperhosen toukat tuottavat. Eri lajit tuottavat erilaisia silkkejä ja monet hämähäkit voivat jopa tuottaa useampaa erilaista silkkiä. [35, s. 866 ja 871] Silkkiperhosen toukkien koteloista saatuja silkkikuituja on vuosituhansien [36, s. 530] ajan käytetty tekstiiliteollisuudessa ja haavojen ompeleissa. [37, s. 89] Nykyään silkin sovelluskohdeiden määrä on lisääntymässä niin lääketieteellisissä kuin muissakin teknologisissa sovelluksissa, sillä silkki on herättänyt tutkijoiden mielenkiinnon lääketieteellisten sovellusten kannalta suotuisien sekä poikkeuksellisten mekaanisten ominaisuuksiensa takia. [36, s. 530; 37, s. 89; 38]

Silkkiperhosen toukkien silkkiä on hyvin saatavilla, mutta hämähäkkien kasvatus silkintuotantoa varten on silkkiperhosten kasvatusta hankalampaa, sillä hämähäkit vaativat paljon enemmän kasvatustilaa, koska ne suhtautuvat lajikumppaneihinsa usein aggressiivisesti. Lisäksi hämähäkit eivät tuota silkkiä niin paljoa ja niiden verkot koostuvat usein useammista erilaisista silkeistä, mikä toisi valmistukseen ylimääräisen vaiheen, jossa erilaiset silkit pitäisi saada erotettua toisistaan. Niinpä hämähäkkien silkkien tuottamisessa hyödynnetään bioteknologiaa, erityisesti geeniteknikkaa, jonka avulla esimerkiksi bakteereja voidaan saada tuottamaan silkkiproteiineja tai ainakin pätkiä niistä. [13; 36, s. 529; 37, s. 88-89; 38, s. 244] Geenitekniikka mahdollistaa myös tuotettavien proteiinien rakenteen muokkaamisen, minkä avulla proteiinien ominaisuuksia voidaan hienosäätää haluttuun suuntaan, esimerkiksi

lisäämällä proteiineihin erilaisia funktionaalisia ryhmiä. [37, s. 88-89; 38]

2.4.1 Rakenne ja ominaisuudet

Silkkiproteiinit ovat isoja, mutta rakenteeltaan suhteellisen yksinkertaisia proteiineja. [35, s. 865] Tyypillisesti silkkiproteiinien rakenne koostuu noin sadan aminohapon kokoisista varautuneista päätyryhmistä, joiden välissä on jopa tuhansia aminohappoja sisältävä aminohappoketju, jossa on sekä jäykkiä, kiteisiä osia että pehmeämpiä, vähemmän järjestäytyneitä osia. [36, s. 528 ja s. 530; 35, s. 867–871; 38, s. 244] Kiteisissä osissa yleisimmät aminohapot ovat alaniini (Ala), glysiini (Gly) ja seriini (Ser) ja ketjun aminohappojärjestyksessä on toisteisuutta, jonka ansiosta ketju muodostaa β -laskoksia. Pehmeissä osissa on paljon glysiiniä ja ketju muodostaa erilaisia kierrerakenteita, kuten 3_{10} -kierteitä. [35, s. 871; 38, s. 244].

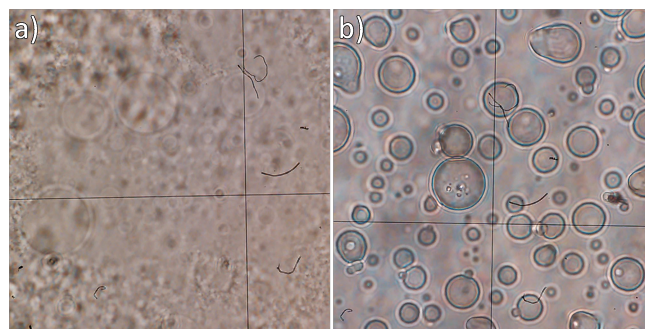
Vaikka silkkiproteiinin rakennepalikat ovat suhteellisen yksinkertaisia, proteiinin modulaarinen rakenne antaa sille poikkeuksellisia ominaisuuksia. Kiteiset osat antavat silkkiproteiinille korkean vetolujuuden ja pehmeät osat antavat elastisuutta [38, s. 244]. Silkkikuidun lujuus on verrattavissa teräkseen ja sitkeys voi olla jopa parempi kuin parhaimpien synteettisten kuitujen, kuten Kevlarin. [35, s. 865] Kiteiset osat ovat hydrofobisia. Pehmeät, vähemmän järjestäytyneet osat ovat hydrofiilisiä, ja lyhyempiä kuin kiteiset osat [39, s. 163]. Varautuneet päätyryhmät parantavat silkkiproteiinin vesiliukoisuutta ja vaikuttavat proteiinin kykyyn itsejärjestäytyä liuoksessa pH:n muutosten aiheuttamien rakennemuutosten avulla. [35, s. 867] Silkki on bioyhteensopiva eikä aiheuta voimakkaita tulehdus- tai immuunireaktioita. [40, s. 385] Silkki on myös biohajoava [13, s. 23], sen hajoamisnopeus on säädeltävissä rakennetta muuttamalla ja hajoamistuotteet ovat myrkyttömiä aminohappoja ja peptidejä. [40, s. 387] Lisäksi silkkimateriaaleja voi steriloida tavallisimmalla sterilointitekniikoilla, toisin kuin monia synteettisiä biohajoavia polymeerejä, jotka eivät ole tarpeeksi lämmön- ja kosteudenkestäviä. [40, s. 384] Näiden monien hyödyllisten ominaisuuksien takia silkkiproteiinien käyttömahdollisuuksia monenlaisissa sovelluksissa, kuten lääkeaineenkuljettajina, kudosteknologiassa, implanteissa ja elektroniikassa on tutkittu paljon. [35, s. 865; 36, s. 531]

2.4.2 Koaservaatit

Makromolekyylejä sisältävissä liuoksissa voi sopivissa olosuhteissa tapahtua faasierottuminen yhdestä nestefaasista kahdeksi nestefaasiksi. Tällöin erottuu tiheämpi, runsaasti makromolekyylejä sisältävä faasi ja vähemmän tiheä, lähinnä liuotinnmolekyylejä sisältävä faasi. Biologisten makromolekyyliden neste-neste-faasierottumisesta

käytetään myös termiä koaservoituminen. [11, s. 2] Kompleksi koaservoitumisella tarkoitetaan koaservoitumista, jonka esivaiheena on kompleksien muodostuminen polyelektrolyyttien välillä, minkä jälkeen kompleksit kertyvät yhteen muodostaen tiheämmän faasin. [11, s. 2; 12, s. 7821 ja 7826; 41, s. 39] Monet polypeptidit ja proteiinit ovat polyelektrolyyttejä.

Faasierottuminen tapahtuu, kun olosuhteiden muutos aiheuttaa sen, että makromolekyyleille on energettisesti edullisempaa kertyä yhteen kuin olla tasaisesti jakautuneena liuoksessa. Muun muassa makromolekyylien konsentraatio, liuoksen pH, ionivahvuus ja muut liuoksen makromolekyylit vaikuttavat siihen voiko faasierottumista tapahtua vai ei. [11, s. 2; 12, s. 7821; 41, s. 39] Niinpä koaservoituminen voidaan käynnistää muun muassa lisäämällä makromolekyyliin liuokseen suolaa. [11] Kuvassa 2.5 nähdään kaksi valomikroskooppikuvaa silkkiproteiinikoaservaateista. Kuvassa 2.5 a) on pehmeitä koaservaatteja, joita muodostuu proteiinikonsentraation ollessa sopiva ja kuvassa 2.5 b) on suolalla tuotettuja kovia koaservaatteja.



Kuva 2.5 Koaservaatteja valomikroskoopin okulaarin läpi otetuissa valokuvissa. Objektiveina käytettiin satakertaisesti suurentavaa öljyimmersion-objektiveja. a) Pehmeitä koaservaatteja. b) Suolan avulla tuotettuja kovia koaservaatteja.

Koaservaatteja voi olla mahdollista käyttää bioaktiivisten molekyylien suojaamiseen tai kapseloimiseen, millä olisi paljon elintarviketeollisuuden ja lääketieteeseen liittyviä sovelluskohteita. Esimerkiksi lääkeaineiden kuljetus ja erilaisten bioaktiivisten molekyylien, kuten entsyymien pakkaaminen ovat potentiaalisia koaservaattien käyttökohteita tulevaisuudessa. [12, s. 7821; 41]

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

Väriaineiden absorptio-, fluoresenssi- ja vuritysspektrejä erilaisissa nesteissä mitattiin spektrofotometrillä ja spektrofluorometrillä. Kalibraationäytteen ja homogeenisten testinäytteen viskositeetit määritettiin reometrillä ja väriaineiden fluoresenssin vaimeneminen näissä nesteissä mitattiin aikaerotteisella yksittäisfotonilaskennalla (time-correlated single photon counting, TCSPC). Aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla (fluorescence lifetime imaging microscope, FLIM) tuotettiin kaksikulotteisia kuvia erilaisten näytteen fluoresenssin elinajoista ja intensiteeteistä. Kuvista määritettiin elinaikoja, joista voitiin kalibraatiosuorien avulla laskea elinaikoja vastaavat viskositeetit.

3.1 Materiaalit

Viskositeettimerkkiaineina käytettiin kahta fluoresoivaa roottorimolekyyliä, DASP-Mia ja BODIPYä, jotka esiteltiin aiemmin luvussa 2.3. Menetelmän kalibroimisessa käytettiin lähteiden [4] ja [42] esimerkin mukaisesti vesi-glyseroli- ja metanoli-glyseroliliuossarjoja. Menetelmää testattiin muutamilla homogeenisilla ja heterogeenisillä nesteillä, joita olivat parafiiniöljy ja ruokosokeriliuos sekä parafiiniöljy-vesi emulsio ja dipalmitoyylifosfatidyylikoliini (1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC) liposomiliuos. Lopuksi menetelmää sovellettiin silkkikoaservaatien viskositeettien määrittämiseen erilaisista silkinäytteistä. Tutkimuksessa käytettiin Milli-Q laitteistolla (Millipore) puhdistettua vettä.

3.1.1 Väriaineet

Tutkimuksessa käytetty DASPMI hankittiin Thermo Fisher Scientific:lta. Käytetyn BODIPY:n syntetisoi Tampereen teknillisen yliopiston Kemian ja biotekniikan laboratorion Dos. Alexander Efimov, käyttäen Wagnerin ja Lindseyn menetelmää [43]. Kummastakin väriaineesta valmistettiin perusliuokset liuottamalla jauhemainen väriaine sopivaan liuottimeen. DASPMI liuotettiin veteen ja BODIPY metanoliin. DASPMI-perusliuoksen konsentraatio oli 3,00 mM ja BODIPY-perusliuoksen

1,79 mM. Kummastakin väriaineesta valmistettiin myös laimennokset, joiden konsentraatiot olivat DASPMI-liuoksissa 60,1 μM ja BODIPY-liuoksissa 35,8 μM . BODIPYn fluoresenssin kvanttisuhde on suurempi kuin DASPMIn, joten mittauksissa käytetyt BODIPY-konsentraatiot ovat yleensä DASPMI-konsentraatioita pienempiä.

3.1.2 Kalibraationäytteet

DASPMIn kalibraationäytesarja koostui 80–96-massaprosenttisista glyseroli-vesiliuoksista sekä puhtaasta vedestä ja glyserolista ja BODIPYn 65–93-massaprosenttisista glyseroli-metanoliliuoksista sekä puhtaasta metanolista ja glyserolista. Jokaisesta liuoksesta tehtiin kolme rinnakkaista näytettä. Liuoksien valmistukseen käytettyjen aineiden määrät ja glyserolin laskennalliset massaprosenttiosuudet on koottu taulukoon 3.1. Spektroskopisissa mittauksissa glyseroli-vesiliuosten DASPMI-konsentraatio oli noin 3 μM ja glyseroli-metanoliliuosten BODIPY-konsentraatio noin 1,2 μM . Nesteet sekoitettiin toisiinsa varovasti kääntelemällä, jotta liuoksiin ei muodostuisi ilmakuplia.

3.1.3 Testiliuokset

Menetelmän testaamisessa käytettyjä homogeenisiä nesteitä olivat parafiiniöljy (Merck KGaA) ja 70-massaprosenttinen ruokosokeriliuos. Spektroskopisissa mittauksissa sokeriliuoksen DASPMI-konsentraatio oli noin 6 μM ja parafiiniöljyn BODIPY-konsentraatio noin 3,6 μM .

Parafiiniöljy-vesiemulsio valmistettiin sekoittamalla noin 2 ml parafiiniöljyä, noin 10 ml vettä ja hieman natriumlauryylisulfaattia (SDS). SDS (Fluka Chemie GmbH) on pinta-aktiivinen aine, jota lisättiin seokseen stabiloimaan emulsiota. Emulsioon lisättiin 7,7 μl BODIPY-perusliuosta FLIM-mittauksia varten.

Liposomeja valmistettiin DPPC:stä (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). 2,30 ml:aan kloroformia liuotettiin 2,32 mg DPPC:tä. 1 ml:aan lipidiliuosta lisättiin 20 μl BODIPY-perusliuosta, minkä jälkeen kloroformi haihdutettiin pois typpikaasun avulla. Tämän jälkeen astiaan, jonka reunoille lipidikalvo jäi, lisättiin 0,5 ml vettä. Nestettä sonikoitiin 3 minuutin ajan, minkä jälkeen lisättiin 0,5 ml vettä ja sonikoitiin vielä 5 minuuttia.

Taulukko 3.1 DASPMin ja BODIPYn kalibraatioliuosten valmistukseen käytettyjen aineiden määrät sekä liuosten laskennalliset glyserolin massaprosenttiosuudet. DASPMin glyseroli-vesiliuosten tiedot ovat taulukon vasemmanpuoleisessa osassa ja BODIPYn glyseroli-metanoliliuosten tiedot oikeinpuoleisessa osassa. m_{gly} -% on tavoiteltu glyserolin massaprosenttiosuus, m_{gly} on glyserolin punnittu massa, V_{H_2O} ja V_{CH_3OH} käytetyt veden ja metanolin määrät ja laskettu m_{gly} -% on laskennallinen glyserolin massaprosenttiosuus.

DASPMI				BODIPY			
m_{gly} -%	m_{gly} (g)	V_{H_2O} (ml)	laskettu m_{gly} -%	m_{gly} -%	m_{gly} (g)	V_{CH_3OH} (ml)	laskettu m_{gly} -%
0	0	10	-	0	0	10	-
80	9,5764	2,400	80,00	65	6,7885	4,620	65,01
	9,5787	2,400	80,00		6,7929	4,625	65,00
	9,5878	2,400	80,02		6,7869	4,620	65,00
84	10,1750	1,940	84,02	72	7,7975	3,835	71,99
	10,1653	1,940	84,00		7,7967	3,835	71,99
	10,1676	1,940	84,01		7,7964	3,835	71,99
88	10,7600	1,470	88,00	79	8,8667	2,980	79,00
	10,7477	1,470	87,99		8,8574	2,975	79,01
	10,7501	1,470	87,99		8,8645	2,980	78,99
92	11,3598	0,990	92,00	86	10,0038	2,060	85,99
	11,3664	0,990	92,00		10,0164	2,060	86,01
	11,3582	0,990	92,00		10,0060	2,060	86,00
96	11,9818	0,500	96,00	93	11,2710	1,075	92,98
	11,9778	0,500	96,00		11,2674	1,070	93,01
	11,9831	0,500	96,00		11,2840	1,075	92,99
100	10 ml	0	-	100	10 ml	0	-

3.1.4 Silkkiliuokset

Silkkiliuokset saatiin Aalto yliopistosta (Biotuotteiden ja biotekniikan laitos, Laura Lemetti, Pezhman Mohammadi, Markus Linder). Silkkiproteiinit tuotettiin *Escherichia coli* -bakteereissa. Proteiinien rakenne koostui kolmesta osasta. Päätyryhmänä sekä N- että C-terminuksessa oli hiilihyaatteihin sitoutuva moduuli (carbohydrate-binding module, CBM) ja näiden välissä oli joko ADF3 tai AQ12 silkkiproteiinisekvenssi. ADF3 on patkä luonnossa esiintyvistä silkkiproteiinisekvenssistä ja AQ12 on keskiarvotettu versio luonnossa esiintyvistä sekvenssistä. Osassa silkinäytteistä oli liuottimena pelkkä Milli-Q vesi ja osassa oli lisäksi Tris-HCl-puskuria, jolloin liuoksen pH oli hieman neutraalimpi.

Silkinäytteitä säilytettiin -80°C :ssa. Näytteet jäädytettiin nopeasti nestetypellä, sillä matalat lämpötilat lisäävät proteiinien kasautumista, jolloin hidas jäädytys aiheuttaisi enemmän kasaumia näytteeseen. Näytteet sulatettiin huoneenlämmössä. Osa näytteistä sentrifugoitiin ennen FLIM-mittauksia. Sentrifugoitaessa käytettiin

5000 rpm kierrosnopeutta ja näytteitä sentrifugoitiin kunnes liuos kirkastui.

Näytteissä oli pehmeitä koaservaatteja valmiina ja kovia, suolalla indusoituja koaservaatteja tuotettiin lisäämällä näytteisiin K_2HPO_4 -suolaliuosta. Tätä varten valmistettiin 2 M K_2HPO_4 -suolaliuos. Suolaliuosta lisättiin silkkiliuoksiin tilavuudeltaan 1:1, jolloin lopullisen liuoksen K_2HPO_4 -konsentraatio oli 1 M. Suolaliuosta lisätessä pieni määrä silkkiproteiinia sakkautui, mutta tarttui hyvin pipetin kärkeen, jolloin sakkua ei merkittävästi jäänyt näyteliuokseen.

Silkinäytteisiin käytettiin väriaineiden laimennettuja perusliuoksia, sillä silkinäytteet olivat tilavuudeltaan niin pieniä, että tarpeeksi pienien perusliuosmäärien mittaaminen ei olisi ollut käytännöllistä. Väriaineiden laimennettuja perusliuoksia lisättiin silkinäytteisiin noin 1 μ l 20 μ l:aa kohden. Väriaine lisättiin aina vasta sentrifugoinnin jälkeen, mutta K_2HPO_4 -suolaliuoksen ja väriaineen lisäämisjärjestyksen merkitystä testattiin. Taulukkoon 3.2 on koottu mitatut silkinäytetyypit.

Taulukko 3.2 Kumpaakin väriainetta käyttäen mitattiin tämän taulukon mukaiset silkkikoaservaattinäytetyypit. Silkkikoaservaattinäytteissä oli liuottimena joko puhdas vesi tai Tris-HCl-puskuriliuos. Osa kummankin liuotintyyppin näytteistä sentrifugoitiin. Sekä sentrifugoiduista että sentrifugoimattomista näytteistä mitattiin niin pehmeitä kuin koviakin koaservaatteja. Lisäksi testattiin, onko väriaineen ja K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäämisjärjestyksellä merkitystä tuloksiin.

Väriaine	Liuotin	Sentr.	Koas. tyyppi	Väriaineen lisäys
DASPMI/ BODIPY	H ₂ O	ei	pehmeä	ennen suolaa jälkeen suolan
		kyllä	pehmeä	
	Tris-HCl	ei	pehmeä	ennen suolaa jälkeen suolan
		kyllä	pehmeä	

3.2 Absorptio-, fluoresenssi- ja virityspektrien mittaaminen

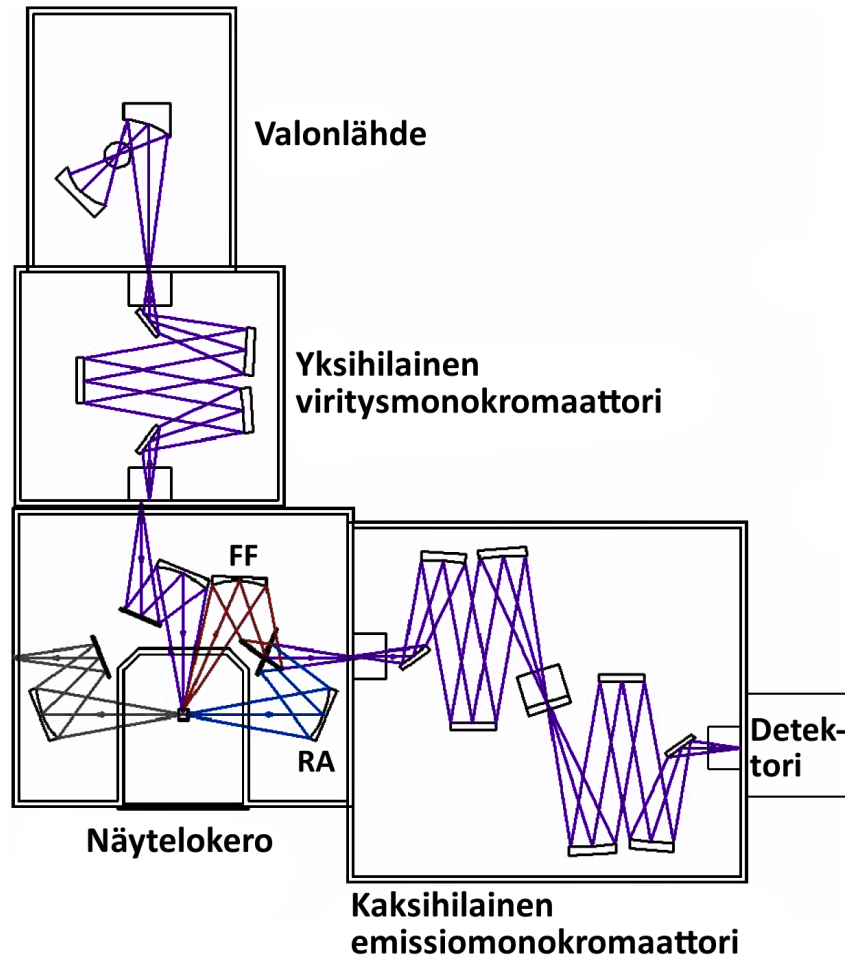
Väriaineiden absorptio-, fluoresenssi- ja virityspektrit mitattiin noin 10^{-6} M:ksi laimennetuista perusliuoksista. Tavoitteena oli saada konsentraatio niin pieneksi, että väriainemolekyylien keskinäiset vuorovaikutukset eivät vaikuttaisi spektreihin. Kalibraationäytteistä mitattiin absorptio- ja fluoresenssispektrit. Kaikki spektrien

mittaukset tehtiin samana tai seuraavana päivänä väriaineen lisäyksen ja liuosten valmistuksen jälkeen. Mittausten vertailukelpoisuuden varmistamiseksi kummankin väriaineen kohdalla yhden kalibraationäytteen absorptiospektri mitattiin kahtena peräkkäisenä päivänä. Esimerkiksi väriaineiden kasautuminen näkyisi muutoksena absorptiospektrissä.

Absorptiospektrit mitattiin UV-3600 spektrofotometrillä (Shimadzu, Japani). Kalibraationäytteiden absorptiospektrejä mitattaessa käytettiin mittausten sujuvoittamiseksi rinnakkaisille näytteille samaa referenssiä. Referenssiksi valittiin kolmesta rinnakkaisesta näytteestä se, jonka laskennallinen glyserolin massaprosenttiosuus oli lähimpänä tavoiteltua massaprosenttiosuutta. Muissa absorptiospektrimittauksissa käytettiin yleisen käytännön mukaisesti referenssinä väriaineetonta näyteliuosta.

Fluoresenssi- ja viritysspektrit mitattiin Fluorolog-3 spektrofluorometrillä (HORIBA scientific, Jobin Yvon Technology). Fluorolog-3 spektrofluorometri koostuu valonlähteestä, viritysmönokromaattorista, referenssidetektorista, näytekammioista, emissiomönokromaattorista ja emissiodetektorista. Spektrofluorometriä ohjataan tietokoneella SpectrAcq säätöyksikön välityksellä. [44, s. 2-1 & 15-1] Laitteen keskeiset osat sekä valon kulkureitit on esitetty kuvassa 3.1.

Viritysväloän lähteenä Fluorolog-3:ssa on 450 W xenon lamppu, joka tuottaa valoa 240 nm:stä 600 nm:iin [44, s. 12-1]. Yksihilaisen viritysmönokromaattorin avulla tää valosta voidaan rajata aallonpituudet, joita päästetään näytteelle tietyllä hetkellä [44, s. 2-1]. Viritysväloän leveyden avulla säädellään, kuinka leveä aallonpituusalue kerrallaan päästetään läpi [44, s. 5-10]. Näytteen emittoima välo kerätään tietystä kulmasta näytteelle tulevaan viritysväloön nähden. Läpinäkyvien nestemäisten näytteiden emittoima välo kerätään 90° kulmasta, jotta heijastuva viritysvälo ei häiritä mittauksia. Tätä kutsutaan right-angle -menetelmäksi (RA-menetelmä). [44, s. 5-6] Väloän kulku näin mitattaessa on merkitty kuvaan 3.1 sinisellä. Kiinteiden näytteiden ja sameiden nestemäisten näytteiden emittoima välo kerätään paljon pienemmästä kulmasta, niin että saadaan kerättyä näytteen pinnalta emittoituvaa väloa. Tätä menetelmää kutsutaan front-face -menetelmäksi (FF-menetelmä) ja väloän kulku tällä menetelmällä mitattaessa on merkitty kuvaan 3.1 punaisella. [44, s. 5-6] Näytteen emittoima välo ohjataan emissiomönokromaattoriin, joka säätölee emissiodetektorille pääsevän väloän aallonpituutta. [44, s. 2-1] Mönokromaattoriin tulevan väloän aallonpituudet erotetaan toisistaan kahden hilan avulla. Kahta hilaa käytettäessä erottelukyky ja resoluutio paranevat merkittävästi ja hajaväloän määrä vähenee. [44, s. 2-2] Emissioräoän leveyden avulla säädellään emissiodetektorille pääsevän aallonpituusalueen leveyttä. [44, s. 5-10] Emissiodetektorina Fluorolog-3:ssa on R928P-valomönostinputki. [44, s. 2-2]



Kuva 3.1 Kaaviokuva Fluorolog-3 spektrofluorometrin rakenteesta. Valon kulkua on havainnollistettu värillisin viivoin. Siniset viivat kuvastavat valon kulkua RA-menetelmällä mitattaessa ja punaiset FF-menetelmällä mitattaessa. Violetilla on merkitty valon kulku kohdissa, joissa valon kulkureitti ei riipu mittausmenetelmästä. Kuva on muokattu lähteestä [44].

Fluoresenssispektriä mitattaessa viritysmönokromaattori päästää läpi vain tiettyä viritysaallonpituutta ja emissiomönokromaattori käy läpi aallonpituudet halutulta mittausväliltä. Viritysspektriä mitattaessa tehdään toisinpäin: näytteen emittoimasta valosta seurataan vain yhtä aallonpituutta ja näytettä viritetään vuorotellen kaikilla mittausalueen aallonpituuksilla. Näin nähdään kuinka fluoresenssin intensiteetti vaihtelee viritysaallonpituutta vaihdettaessa. [44, s. 18-2]

Koska viritysvälin intensiteetti vaihtelee mittauksen aikana ja mittausten välillä, osa valonlähteestä tulevasta valosta ohjataan referenssidetektorille, jolla tarkkaillaan viritysvälissä tapahtuvia intensiteetin muutoksia. Näin emissiodatasta voidaan korjata viritysvälän intensiteetin vaihtelun vaikutus. [44, s. 11-1] Tämän ansiosta spektrit ovat vertailukelpoisia, vaikka niiden mittausten välillä olisi pitkä aika ja

lampun intensiteetti olisi lampun vanhenemisen takia ehtinyt laskea. Fluoresenssispektriin vaikuttavat myös monokromaattorien ja muiden optisten komponenttien ominaisuudet. Näidenkin vaikutus pystytään korjaamaan Fluorolog-3:lla automaattisesti. [44, s. 11-1]

DASPMIn fluoresenssispektrit mitattiin 495–800 nm:n alueelta, 483 nm:n viritysaallonpituudella. Samaa viritysaallonpituutta käytettiin kaikkiin kalibraationäytteiden fluoresenssispektrien mittauksiin, sillä sitä käytettiin myös kaikissa FLIM-mittauksissa. Sen sijaan BODIPYn fluoresenssispektri laimennetusta perusliuoksesta mitattiin 470 nm:n viritysaallonpituudella, 480–800 nm:n alueelta, jotta koko emissio-
piikki saatiin näkyviin. Kaikki spektrit mitattiin RA-menetelmällä. DASPMIn viritysspektrit mitattiin 200–550 nm:n alueelta 610 nm:n monitorointiaallonpituudella ja BODIPYn 200–520 nm:n alueelta 530 nm:n monitorointiaallonpituudella.

3.3 Fluoresenssin elinajat aikaerotteisella yksittäisfotonilaskennalla

Fluoresenssin elinaikojen määrittämiseen käytettiin aikaerotteista yksittäisfotonilaskentaa. Yksittäisfotonilaskennassa näytettä viritetään laserpulsseilla ja mitataan aika, joka kuluu virityksestä emissioon havaitsemiseen. Oleellista on, että yksi virityspulssi johtaa korkeintaan yhteen emittoituvaan fotonin, sillä detektoreilla ja muulla elektroniikalla on kunkin fotonin havaitsemisen jälkeen niin kutsuttu kuollut aika, jonka aikana ne prosessoivat fotonihavaintoa, eivätkä voi samalla havaita uutta fotonia. [14, s. 104–105] Todennäköisyys sille, että yksi pulssi johtaa useampaan kuin yhteen emittoituvaan fotonin voidaan pitää tarpeeksi alhaisena säätämällä laserin tehoa ja toistotaajuutta tarpeeksi alhaiseksi. [45, s. 4-4]. Tyypillisesti säädöt tehdään niin, että emittoituneita fotoneja on keskimäärin yksi sataa virityspulssia kohden. Fluoresenssin vaimenemiskuvaaja saadaan, kun näytettä viritetään useilla peräkkäisillä virityspulsseilla: Virittymisestä emissioon kuluvat ajat mitataan ja kootaan histogrammiin, jossa x-akselina on virityksestä emissioon kulunut aika ja y-akselilla fotonien lukumäärä. Tämän histogrammin muoto lähestyy fluoresenssin vaimenemiskuvaajaan muotoa havaittujen fotonien määrän kasvaessa. [14, s. 104–105]

Näissä mittauksissa käytetty TCSPC-laitteisto koostuu viritysjärjestelmästä, näytekammiosta, monokromaattorista, detektorista sekä säätö- ja tiedonkäsittelyelektronikasta. Viritysjärjestelmä koostuu pulssipuolijohdelasereista, laserien virta- ja säätöyksikkö PDL 800-B:stä sekä laservalon ohjaamiseen tarvittavista optisista komponenteista. Tässä tutkimuksessa viritysvälikomponentteina käytettiin LDH-P-C-485-laseria

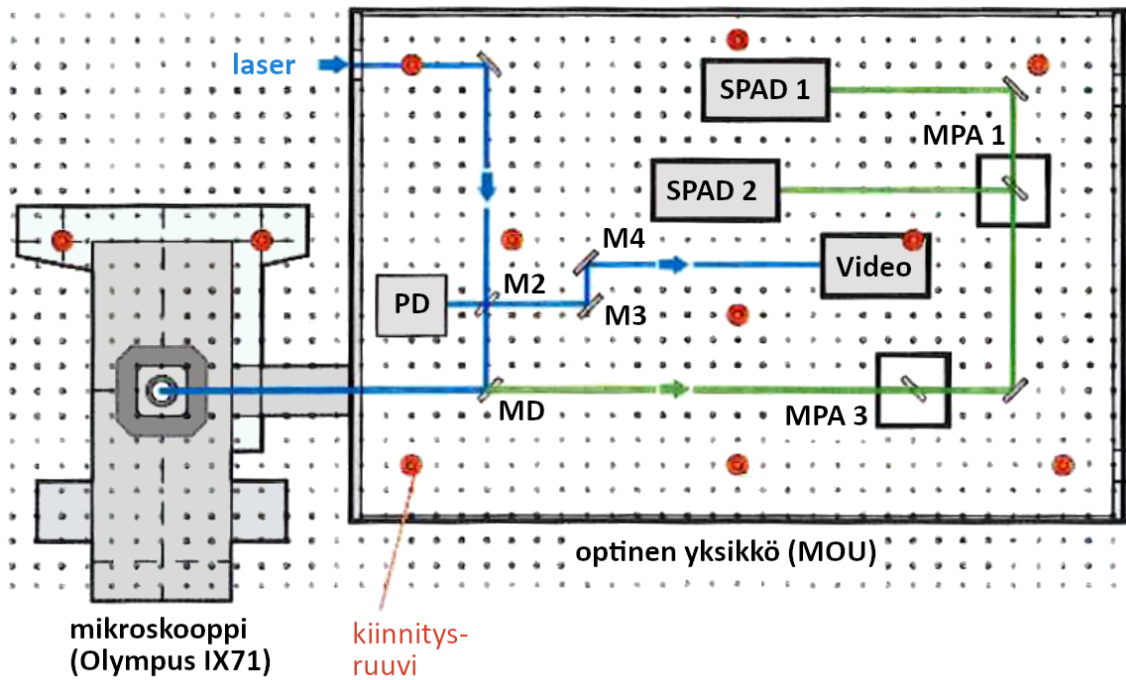
(PicoQuant GmbH), jonka emissioaallonpituus on 483 nm. Detektorina käytettiin Hamamatsu R2809U valomonistinputkea. Tiedonkäsittelyelektronikan keskeisin laite on PicoHarp 300 -yksikkö (PicoQuant GmbH). PicoHarp 300 -yksikössä vaihtelevasti (constant function discriminator, CFD) määrittää virityspulssin ja emittoituneen fotonin saapumisajat ja välittää nämä tiedot aika-amplitudi-muuntimelle (time-to-amplitude converter, TAC), joka tuottaa lineaarisesti ajan kuluessa kasvavan jännitteen CFD:n välittämien aloitus- ja lopetussignaalien välisenä aikana. Tämä jännite kuvastaa aikaeroa virityspulssin ja emittoituneen fotonin välillä. Analogi-digitaalimuunnin (analog-to-digital converter, ADC) muuttaa tämän jännitteen numeroarvoksi, joka välitetään monikanava-analysoitsijalle (multichannel analyser, MCA). MCA tallentaa tiedot histogrammin muodostamista varten. [6, s. 173; 14, s. 104–105] TCSPC-laitteistoa ohjataan tietokoneella.

DASPMIa sisältävät näytteet mitattiin 615 nm:n ja BODIPYä sisältävät 520 nm:n monitorointiaallonpituuksilla. Kaikki mittaukset tehtiin huoneenlämmössä. Kunakin mittauspäivänä mitattiin laitteen instrumenttifunktio (instrument response function, IRF), jota käytettiin tehtäessä sovituksia päivän aikana mitattuihin fluoresenssin vaimenemiskuvauksiin. IRF:n avulla huomioidaan laitteen ideaalisesta poikkeavan toiminnan vaikutus tuloksiin. Tärkein tekijä IRF:ssä on se, että virityspulssi ei ole ideaalisen terävä, vaan sillä on jokin äärellinen leveys. [46, s. 4–5] Elinajat määritettiin fluoresenssin vaimenemiskuvauksista sovittamalla niihin yhtälön 2.17 mukainen yhtälö DecFit-ohjelmalla (© Nikolai V. Tkachenko).

3.4 Kuvantaminen aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla

Näytteiden paikallisia fluoresenssin intensiteettejä ja elinaikoja mitattiin aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla MicroTime 200 (PicoQuant GmbH). Tällä laitteistolla voidaan tuottaa näytteestä kaksiulotteisia kuvia, joissa kunkin pikselin väri kuvastaa keskimääräistä elinaikaa ja kirkkaus keskimääräistä intensiteettiä kyseisessä kohdassa näytettä. Lisäksi silkinäytteistä otettiin valomikroskooppikuvia valokuvaamalla näytettä tämän laitteiston mikroskoopin okulaarin läpi.

Tässä työssä käytetty FLIM-laitteisto voidaan jakaa neljään kokonaisuuteen, jotka ovat viritysjärjestelmä, optinen yksikkö (main optical unit, MOU), Olympus IX71 -mikroskooppi sekä säätö- ja tiedonkäsittelyelektronikka. [47, s. 6] Viritysjärjestelmä on yhteinen käytetyn TCSPC-laitteiston kanssa. MOU sisältää detektorit ja optiikan, jolla viritysväli ohjataan mikroskooppiin ja mikroskooppista detektoreille. Detektorit ovat PDM sarjan yksittäisfotoni vyörydiodeja (single photon avalanche diode, SPAD), joiden mittausalue on 400–900 nm. [47, s. 19] Mikroskooppi ohjaa



Kuva 3.2 Kaaviokuva MOU:n rakenteesta. Viritysvalon kulkua on havainnollistettu sinisillä viivoilla ja näytteestä emittoituneen valon kulkua vihreillä viivoilla. Video tarkoittaa CCD-kameraa, PD valodiodia ja SPAD 1 sekä SPAD 2 detektoreja. Kuvaan on merkitty myös peilejä ja säteenjakajia. Kuva on muokattu lähteestä [47].

viritysvalon näytteeseen ja näytteestä lähtevän valon takaisin MOU:hun. Mikroskooppi toimii myös valomikroskooppina, jonka avulla näytettä voidaan tarkkailla ja näytteestä voidaan valita mitattava kohta. Elinaikojen määrittämiseen käytetään PicoHarp 300 -yksikköä, kuten TCSPC-laitteistossakin. Laitteistoa ohjataan tietokoneella SymPhoTime-ohjelmistolla (PicoQuant GmbH).

Kuvassa 3.2 on esitetty kaaviokuva MOU:n rakenteesta. Kuvassa 3.2 Video viittaa CCD-kameraan, PD valodiodiin ja SPAD 1 sekä SPAD 2 detektoreihin. Lisäksi kuvaan on merkitty oleellimmat peilit ja säteenjakajat. Näytteestä emittoituneen valon reitti on merkitty kuvaan vihreällä ja viritysvalon reitit on merkitty sinisellä. Viritysvalo ohjataan MOU:hun valon polarisaation säilyttävää optista kuitua pitkin. Valo kulkee suodattimen läpi M2 säteenjakajalle, joka ohjaa noin 10–20 % valon intensiteetistä valodiodille PD, joka mittaa viritysintensiteetin. Loppuosa valosta ohjataan puoliläpäisevälle peilille MD, joka ohjaa valon mikroskooppiin. Mikroskoopin peili suuntaa valon objektiivin, joka fokuoisi valon näytteeseen. Sekä näytteestä emittoituva valo, että takaisin sironnut viritysvalo ohjataan mikroskoopin optiikan läpi takaisin MOU:hun. [47, s. 15] Puoliläpäisevä peili MD heijastaa sironneen viritysvalon takaisin M2-säteenjakajaan, joka ohjaa valon peilien M3 ja M4 kautta CCD-kameralle. CCD-kamera lähettää videosignaalia tietokoneelle. Tätä käytetään

avuksi fokuoinnissa. [47, s. 15–17] Emittoitunut valo läpäisee MD-peilin ja kulkee suodattimen läpi. Suodattimen jälkeen säteenjakajat MPA 3 ja MPA 1 ohjaavat valon detektoreille SPAD 1 ja SPAD 2. [47, s. 15–16]

FLIM:iä käytettäessä PicoHarp 300 -yksikkö käyttää aikamerkittyä aikaerotteista (time-tagged time-resolved, TTTR) mittaumenetelmää elinaikojen määrittämiseen. TTTR-menetelmässä kuhunkin fotonin liittyvät tiedot tallennetaan erikseen, sen sijaan että tallennettaisiin vain histogrammi, kuten perinteisessä TCSPC-mittauksessa. Näin kuhunkin fotonin liittyen voidaan tallentaa lisätietoja. TTTR-menetelmässä jokaiselle havaitulle fotonille tallennetaan kaksi aikaa, joista toinen on aika virityspulssin ja fotonin havaitsemisen välillä ja toinen on aika mittauksen alkuketken ja fotonin havaitsemisen välillä. Mittauksen aikana näytettä skannataan mikroskoopin piezo-skannerilla. Kun skannerin tallentama paikkatieto yhdistetään fotonien aikatietojen kanssa, voidaan luoda kaksiulotteinen kuva, josta nähdään fluoresenssin intensiteetin ja elinajan paikallinen vaihtelu näytteessä. [46, s. 11–12; 47, s. 22–24]

Viritysvaio tarkennetaan haluttuun kohtaan näytettä mikroskoopin säätöjen avulla. Tarkennuksen laatua voidaan arvioida silmämääräisesti mikroskoopin okulaarin kautta sekä CCD kameran tietokoneelle lähettämän videokuvan ja fluoresenssin intensiteetin avulla. CCD kameran videokuvassa nähdään intensiteettijakauman hienorakenne. Fokusoiminto on hyvä, jos hienorakenne erottuu videokuvassa selkeästi ja on muodoltaan symmetrinen, kun intensiteetti on korkea. Mittauksia varten viritysvaion intensiteetti lasketaan niin matalaksi, että hienorakenne ei erotu videokuvasta. Heikko emissiointensiteetti voi johtua huonosta fokuoinnista, kun taas korkea intensiteetti on useimmiten merkki hyvin onnistuneesta fokuoinnista. Koska havaittu emissiointensiteetti riippuu myös fluoresoivan aineen konsentraatiosta mittauskohdassa, täytyy tarkkailla nimenomaan intensiteetin muutosta fokusta säädettäessä, eikä niinkään intensiteetin numeroarvoa.

Kaikkissa mittauksissa käytettiin satakertaisesti suurentavaa öljyimmersio-objektiivia. Viritysvaionlähteenä käytettiin samaa laseria kuin TCSPC-mittauksissa. Näytteestä emittoituvaa valo kulki HQ510LP-suodattimen läpi, joka päästää läpi aallonpituudet 510 nm:stä ylöspäin. Niinpä monitorointiaallonpituusalue oli 510–900 nm. Mittaukset tehtiin huoneenlämmössä. Homogeeniset näytteet lisättiin mikroskoopin näytepidikkeeseen asetetun mikroskooppilasin päälle. Käytetyt näytepisarat olivat pieniä ja kuivuivat nopeasti mikroskooppilasilla. Tämä ei kuitenkaan ollut ongelma homogeenisia näytteitä mitattaessa, sillä muutama kuva riitti antamaan tarpeeksi kattavan kuvan näistä näytteistä. Heterogeenisista näytteistä taas haluttiin useampia kuvia ja lisäksi kuvattavan kohdan etsimiseen kului enemmän aikaa. Heterogeeniset näytteet



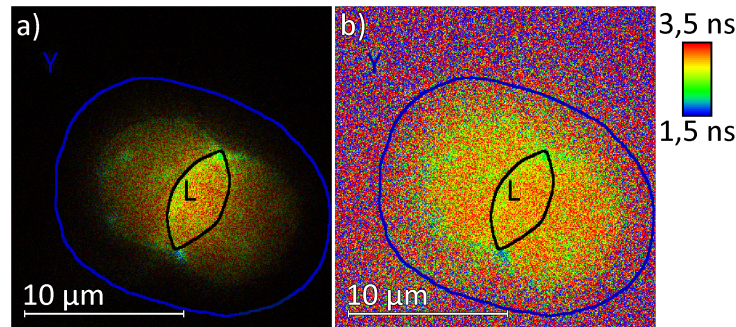
Kuva 3.3 Näyte- ja vesipisaroita kahden teflonteippirenkaalla toisistaan erotetun mikroskooppilasin välissä. Tällaista käytettiin heterogeenisiä näytteitä mitattaessa näytteen kuivumisen hidastamiseksi. Mittauksissa käytettiin myös suljettuja teflonteippirenkaita.

kuivuivatkin lasilevyllä niin nopeasti, että niistä oli vaikea saada kunnollisia mitaustuloksia. Niinpä liuottimen haihtumisen hidastamiseksi kokeiltiin erilaisia tapoja. Esimerkiksi mikroskooppilasilille lisättiin näytepisaran lisäksi myös vesipisaroita tai käytettiin kahta mikroskooppilasia, joiden väliin näyte laitettiin. Kuten kuvasta 3.3 nähdään, mikroskooppilasin väliin laitettiin teflonteipistä tehtyjä renkaita, jotta päällimmäinen lasi ei aiheuttaisi painetta näytteeseen. Teflonteipin kiinnittäminen pohjimmaiseen mikroskooppilasiin värittömän kynsilakan avulla havaittiin hyväksi tavaksi varmistaa, että teflonteippirengas ei liiku ja tuhoa näytepisaroita kiinnitettäessä mikroskooppilaseja näytepidikkeeseen. Parhaiten näytteiden kuivuminen hidastui, kun näytepisarat laitettiin kahden teflonteippirenkaalla toisistaan erotetun lasilevyn väliin ja lasilevyllä lisättiin näytteiden lisäksi muutama vesipisara. Mittauksissa käytettiin sekä avoimia että suljettuja teflonteippirenkaita. Jättämällä rengas avoimeksi voitiin hieman nopeuttaa näytteen kuivumista.

3.4.1 FLIM-kuvien analysointi

FLIM-kuvien analysointiin käytettiin SymPhoTime-ohjelmaa. Tällä ohjelmalla kuvista voi rajata erilaisia alueita, jolloin ohjelma määrittää fluoresenssin vaimenemiskuvaajan kyseisellä alueella kaikkien alueen pikselien vaimenemiskuvaajien summana. FLIM-kuvista määritettiin fluoresenssin vaimenemiskuvaajia alueilta, joissa väri oli tasainen. Myös intensiteettieroja hyödynnettiin rajauksia tehtäessä. Pallomaiset silkkikoaservaattit toimivat pallolinssinä, mikä aiheutti kuviin heijastuksen, jonka takia koaservaattit näyttivät kuvissa ympyrän sijasta kahdelta toisensa leikkaavalta ympyrältä, kuten kuvasta 3.4 nähdään. Useimmiten koaservaatin alueella väriltään tasaisin ja intensiteetiltään korkein kohta oli ympyröiden leikkaus, joten väriaineiden fluoresenssin vaimenemiskuvaajat koaservaateissa määritettiin tältä leikkausalueelta. Kuvassa 3.4 tällainen leikkausalue on rajattu mustalla ääriiviivalla ja sitä merkitään kirjaimella L. Lisäksi kuvaan on merkitty alue Y, joka on esimerkki siitä

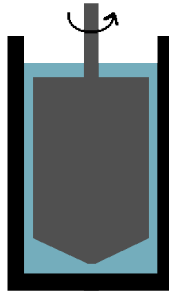
minkäläinen alue rajattiin määrittäessä fluoresenssin vaimenemiskuvaajaa koaservaatin ympäristöstä. Käytännössä ympäristön vaimenemiskuvaajaa määrittäessä valittiin kuvista tasaisen tummat alueet. Intensiteettimoduloidussa kuvassa 3.4 a) näkyy pikselien elinaikaerojen lisäksi myös intensiteettieroja. Kuvassa 3.4 b) näkyy vain elinaikaerot. FLIM-kuvissa, joissa ei ole intensiteettimodulointia, voi näkyä sini-punaista taustaa. Tässä taustassa sininen väri aiheutuu heijastuneesta viritysvälöstä ja punainen väri sähköisestä taustasta.



Kuva 3.4 a) Intensiteettimoduloitu kuva koaservaattista. b) Sama kuva ilman intensiteettimodulointia. Väriaineiden elinajat koaservaateissa määritettiin heijastuksesta johdettujen ympyröiden leikkausalueilta määritetyistä fluoresenssin vaimenemiskuvaajista, kuten kuviin mustilla ääriviivoilla rajatusta alueesta L. Väriaineiden elinaikojen määrittämiseen koaservaattien ympäristössä käytettiin kuvien alueen Y tapaan rajatuilta alueilta määritettyjä fluoresenssin vaimenemiskuvaajia. Kumpikin kuva on esitetty samalla elinaikaasteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuva on mitattu satakertaisesta suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitoriaallonpituusalueita.

FLIM-kuvista määritettyjen fluoresenssin vaimenemiskuvaajien analysointiin käytettiin DecFit-ohjelmaa. Kaikkiin vaimenemiskuvaajiin tehtiin sovitukset käyttäen samaa TCSPC:lla mitattua IRF:ää. DASPMilla kaikkiin vaimenemiskuvaajiin sovitettiin kaksiekspotentiaaliset sovitukset. BODIPYllä kaksiekspotentiaalista sovitus käytettiin kaikkiin heterogeenisistä näytteistä määritettyihin vaimenemiskuvaajiin, kun taas homogeenisen parafiiniöljyn vaimenemiskuvaajiin sopi yksiekspotentiaalinen sovitus.

Jos fluoresenssin intensiteetti oli liian matala, kuvista rajatun alueen koolla oli merkittävä vaikutus elinaikaan. Mitä suuremmalta alueelta fluoresenssin vaimenemiskuvaajan tällaisissa kuvissa määritettiin, sitä suuremman elinajan DecFit-ohjelmalla tehty sovitus antoi. Jos taas intensiteetti oli liian korkea, saattoi konsentraatio olla niin korkea, että tapahtui itsesammutusta, mikä vääristää elinajan lyhyemmäksi.



Kuva 3.5 Kaaviokuva viskositeettimittauksissa käytetystä kuppigeometriasta. Mitattaessa laite pyöritti mittapäätä mitta-astian pysyessä paikallaan. Sekä mitta-astia että mittapäätä olivat vaakasuuntaiselta poikkileikkaukseltaan ympyrän muotoisia. Kuva on muokattu lähteestä [48].

3.5 Viskositeetin mittaaminen

Kalibraationäytteiden ja homogeenisten testinäytteiden viskositeettien mittaamiseen käytettiin Anton Paar MCR301 reometriä (Anton Paar GmbH). Anton Paar MCR301 on rotaatioreometri ja viskositeetin mittaaminen sillä perustuu luvussa 2.2.3 esiteltyyn periaatteeseen. Laite mittaa vääntömomenttia, joka tarvitaan tietyn leikkausnopeuden ylläpitämiseen, kun mittapäätä pyöritetään tutkittavassa nesteessä. Tämän vääntömomentin avulla voidaan laskea nesteen dynaaminen viskositeetti kaavalla 2.31. Anton Paar MCR301 reometriä ohjataan tietokoneen välityksellä. Mittauksissa käytettiin kuppigeometriaa, jota havainnollistetaan kaaviokuvassa 3.5. Kuvassa 3.5 nähdään mittapään poikkileikkaus pystysuunnassa. Vaakasuunnassa sekä mittapään että mitta-astian poikkileikkaus on ympyrän muotoinen.

Mittaukset tehtiin 20 °C lämpötilassa 100 s⁻¹ leikkausnopeudella. Laite mittasi yhtä mittapistettä niin kauan, että tulos vakiintui tiettyyn arvoon. Useimmista näytteistä mitattiin 5–20 mittapisteen sarjoja 2–4 kappaletta. Mitattujen sarjojen pituus ja määrä riippuivat siitä, kuinka lähellä mittapisteen arvot olivat toisiaan ja vaikuttiko siltä, että mittapisteen arvot kasvoivat mittauksen aikana. Jos tulos ei ensimmäisen mittasarjan aikana tasaantunut tiettyyn viskositeettiarvoon, mitattiin uusi mittasarja. Pidempiä mittasarjoja mitattiin silloin kun vaikutti siltä, että viskositeettiarvo kasvoi mittauksen aikana. Kalibraatioliuosten viskositeetit mitattiin kahden kuukauden sisällä spektroskooppisista mittauksista. Lisäksi mitattiin homogeenisten testinäytteiden viskositeetit noin kaksi viikkoa spektroskooppisten mittausten jälkeen.

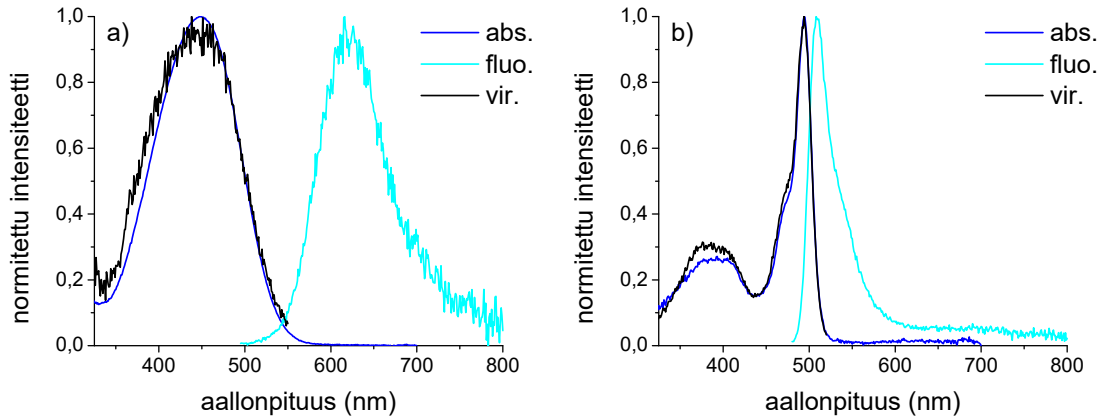
4. TULOKSET

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää menetelmä heterogeenisten nesteiden paikallisten viskositeettien määrittämiseen fluoresoivien roottorimolekyylien elinaikojen avulla. Paikalliset elinajat määritettiin aikaerotteisella fluoresenssimikroskoopilla. Tätä varten täytyi selvittää valittujen roottorimolekyylien valokemiallisia ominaisuuksia ja niiden muutoksia viskositeetin muuttuessa. Roottorimolekyylien absorptio-, fluoresenssi- ja viritysspektrejä mitattiin spektrofotometrillä ja spektrofluorometrillä. Menetelmän kalibroimiseksi roottorimolekyylien absorptio- ja fluoresenssispektrit sekä fluoresenssin vaimeneminen mitattiin seitsemässä eri viskositeetissa. Kalibraationäytteiden viskositeetit määritettiin reometrillä ja roottorimolekyylien fluoresenssin vaimeneminen näissä ja muutamissa testiliuoksissa määritettiin TCSPC:lla. Mitattujen viskositeettien ja elinaikojen avulla määritettiin kalibraatiosuorat, joiden avulla voitiin laskea heterogeenisistä näytteistä mitatuista FLIM-kuvista määritettyjä elinaikoja vastaavat viskositeetit.

4.1 Väriaineiden valokemialliset ominaisuudet

DASPMIn absorptio-, fluoresenssi- ja viritysspektrit vedessä ja BODIPYn metanolissa on esitetty kuvassa 4.1. DASPMIn absorptiomaksimin aallonpituus on 448 nm ja BODIPYn 494 nm. Kuvista 4.1 a) ja 4.1 b) nähdään, että kummankin väriaineen absorbanssi 483 nm:n aallonpituudella on riittävä, jotta tätä aallonpituutta voidaan käyttää viritysaallonpituutena TCSPC- ja FLIM-mittauksissa. DASPMIn fluoresenssispektri mitattiin 483 nm:n ja BODIPYn 470 nm:n viritysaallonpituudella. DASPMIn fluoresenssimaksimin aallonpituus on 616 nm ja BODIPYn 508 nm. Viritysspektrejä mitattaessa käytettiin DASPMilla 610 nm:n ja BODIPYllä 530 nm:n monitorointiaallonpituutta. Kuvista 4.1 a) ja 4.1 b) nähdään, että fluoresenssin intensiteetti on tarpeeksi hyvä viritysspektrien mittaamiseen näillä monitorointiaallonpituuksilla.

Absorptio- ja viritysspektrejä vertaamalla nähdään, että kummallakin väriaineella spektrit vastaavat hyvin toisiaan, joten näytteissä on vain yhdenlaista fluoresoivaa muotoa väriaineista, eikä esimerkiksi molekyylien kasautumista tapahdu. Kuvista



Kuva 4.1 a) DASPMIn normitetut absorptio-, fluoresenssi- ja viritysspektrit laimennetusta DASPMI-perusliuoksesta. Fluoresenssispektri mitattiin 483 nm:n viritysaallonpituudella ja viritysspektri 610 nm:n monitorointiaallonpituudella. b) BODIPYn normitetut absorptio-, fluoresenssi- ja viritysspektrit laimennetusta BODIPY-perusliuoksesta. Fluoresenssispektri mitattiin 470 nm:n viritysaallonpituudella ja viritysspektri 530 nm:n monitorointiaallonpituudella.

4.1 a) ja 4.1 b) nähdään myös, että DASPMIn Stokesin siirtymä on paljon suurempi kuin BODIPYn, niin kuin luvussa 2.3 kerrottiin. Niinpä BODIPY on DASPMIa herkempi itsesammutukselle, jota voi tapahtua, kun väriaineen konsentraatio on korkea.

Väriaineiden absorptio- ja fluoresenssispektrit mitattiin myös 1 M K_2HPO_4 -suolaliuoksessa ja puhtaassa glyserolissa. Lisäksi viritysspektrit mitattiin puhtaassa glyserolissa. Nämä mitattiin, sillä suolaliuosta käytettiin silkkikoaservaattimittauksissa ja glyserolia kalibraatiomittauksissa. Suolalla ei ole vaikutusta DASPMIn absorptiospektriin, mutta fluoresenssispektri siirtyy hieman lyhyemmille aallonpituuksille. Fluoresenssimaksimien ero puhtaan veden ja suolaliuoksen välillä on noin 10 nm. Puhtaassa glyserolissa absorptio- ja viritysspektrit siirtyvät pidemmille aallonpituuksille ja DASPMIn absorptio- ja viritysmaksimit ovat noin 35 nm pidemmällä aallonpituudella kuin puhtaassa vedessä. Sen sijaan fluoresenssimaksimi siirtyy noin 10 nm lyhyemmälle aallonpituudelle, samoin kuin suolaliuoksessakin. Suolalla ei havaittu olevan vaikutusta BODIPYn absorptio- tai fluoresenssispektreihin. Puhtaassa glyserolissa kaikki BODIPYn spektrit siirtyvät pidemmille aallonpituuksille puhtaassa metanolissa mitattuihin spektreihin verrattuna, mutta muutos on hyvin pieni ja maksimien paikat muuttuvat alle 10 nm kaikissa spektreissä. Lisäksi absorptiospektin muoto muuttuu ja absorbanssi laskee. Todennäköisin syy tälle on, että BODIPY ei leviä glyseroliin tasaisesti ja muodostaa kasaumia. BODIPYn matala absorbansiarvo ja absorptiopiikin leveneminen puhtaassa glyserolissa näkyvät selvästi myös

kalibraationäytteistä mitatuissa spektreissä kuvassa 4.2.

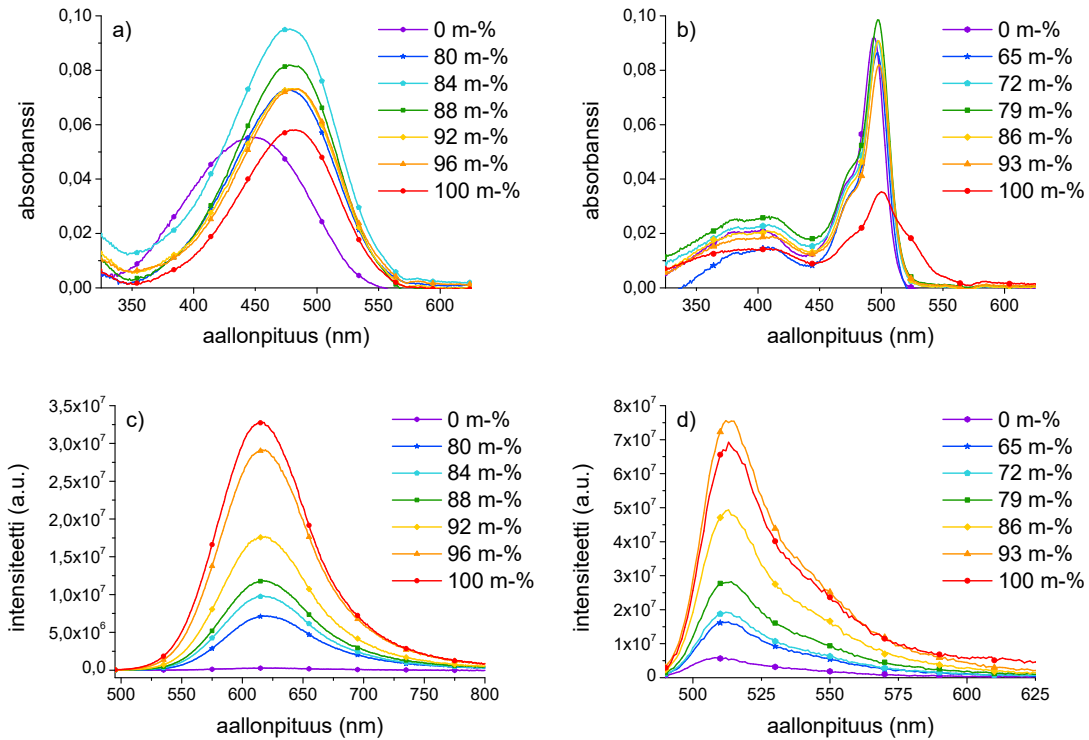
4.2 Kalibraatio

Kalibraationäytteistä mitattiin näytteiden viskositeetit ja väriaineiden absorptio- ja fluoresenssispektrit sekä TCSPC:lla fluoresenssin vaimeneminen. Fluoresenssin vaimenemiskuvajista määritettiin väriaineiden elinajat. Näytteistä mitattujen elinajkojen ja viskositeettien kymmenkantaisten logaritmien avulla määritettiin DASP-MIn ja BODIPYn kalibraatiosuorat.

Viskositeettimittauksista laskettiin mittasarjojen keskiarvot. Glyceroli-metanoliliuoksien kohdalla huomattiin, että samasta näytteestä otettujen peräkkäisten mittasarjojen keskiarvo kasvoi. Niinpä näytteen viskositeettiä otettiin ottaa systemaattisesti ensimmäisen mittasarjan keskiarvo. Glyceroli-vesiliuoksien kohdalla ei havaittu samanlaista mittasarjojen keskiarvon kasvua, eikä keskiarvoissa ollut suurta vaihtelua mittasarjojen välillä, joten näiden liuosten viskositeettiä otettiin kaikkien liuoksesta mitattujen mittasarjojen keskiarvot. Nämä keskiarvot on taulukoitu liitteessä 1.

Kunkin näytteen absorptiospektri korjattiin vähentämällä kaikista absorbanssiarvoista näytteen absorbanssi 700 nm:n aallonpituudella, jotta voitiin tasoittaa nollatasossa mittausten aikana tapahtuneita vaihteluja. Rinnakkaisten näytteiden korjatuista absorbanssiarvoista laskettiin keskiarvot, joista saatiin keskimääräiset absorptiospektrit kullekin massaprosenttisuudelle. Nämä spektrit on esitetty kuvissa 4.2 a) ja 4.2 b).

Kuvista nähdään, että absorptiomaksimi siirtyy kummallakin väriaineella pidemmille aallonpituuksille viskositeetin kasvaessa, joskin BODIPYllä muutos on hyvin pieni. DASPMin absorptiomaksimin selkeä siirtyminen johtuu liuottimen poolisuuden vähenemisestä siirryttäessä vedestä glyseroliin. Absorbanssimaksimien arvoissa on selviä eroja eri viskositeeteissa, erityisesti DASPMin, mutta ei suoraa riippuvuutta viskositeettiin. DASPMin absorbanssimaksimin arvo nousee glyserolin massaprosenttisuuden noustessa 84 m-%:iin asti ja laskee sen jälkeen, palaten lähes samaan arvoon kuin puhtaassa vedessä. BODIPYllä absorptiomaksimin arvon vaihtelussa ei ole vastaavaa säännönmukaisuutta ja absorbanssi on samaa luokkaa kaikissa näytteissä puhdasta glyserolia lukuun ottamatta. Tästä poikkeavasta absorptiospektristä ja sen syistä kerrottiin luvussa 4.1. Muissa tapauksissa pienet vaihtelut absorbanssiarvoissa voivat johtua konsentraatioeroista, sillä väriaineliuoksia käytettiin hyvin pieniä määriä, eikä pienten tilavuuksien mittaaminen ole kovin tarkkaa.



Kuva 4.2 a) DASPMIn keskimääräiset absorptiospektrit kullakin massaprosenttiosuudella. b) BODIPYn keskimääräiset absorptiospektrit. c) DASPMIn keskimääräiset fluoressisspektit. d) BODIPYn keskimääräiset fluoressisspektit. Spektrit ovat rinnakkaisista kalibraationäytteistä mitattujen spektrien keskiarvoja. Viritysaallonpituus fluoressisspektrejä mitattaessa oli 483 nm.

Absorptiospektreistä määritettiin kunkin näytteen absorbanssi fluoressisspektrejä mitattaessa käytetyllä 483 nm:n viritysaallonpituudella. Kunkin näytteen fluoressisspekttri korjattiin jakamalla intensiteettiä näillä absorbansseilla. Näin korjattuja fluoressisspektrejä vertaamalla nähtiin, oliko rinnakkaisten näytteiden fluoressisseissa absorptiosta riippumattomia eroja ja saatiin poistettua konsentraatioerojen vaikutus. Rinnakkaisten näytteiden fluoressisspektreistä laskettiin keskiarvot samoin kuin absorptiospektreistä. DASPMIn fluoressisspektrien keskiarvot on esitetty kuvassa 4.2 c) ja BODIPYn kuvassa 4.2 d).

Viskositeetin kasvaessa DASPMIn ja BODIPYn fluoressinsin intensiteettien odotettiin kasvavan kuten luvussa 2.3 kerrottiin. Kuvista 4.2 c) ja 4.2 d) nähdään, että intensiteetit kasvavat, lukuun ottamatta sitä, että BODIPYn fluoressinsin intensiteetti on hieman matalampi puhtaassa glyserolissa kuin 93 m-% glyserolissa. Tämä johtuu BODIPYn alhaisesta absorbanssista puhtaassa glyserolissa.

Esimerkit TCSPC:lla mitatuista DASPMIn ja BODIPYn fluoressinsin vaimenemis-

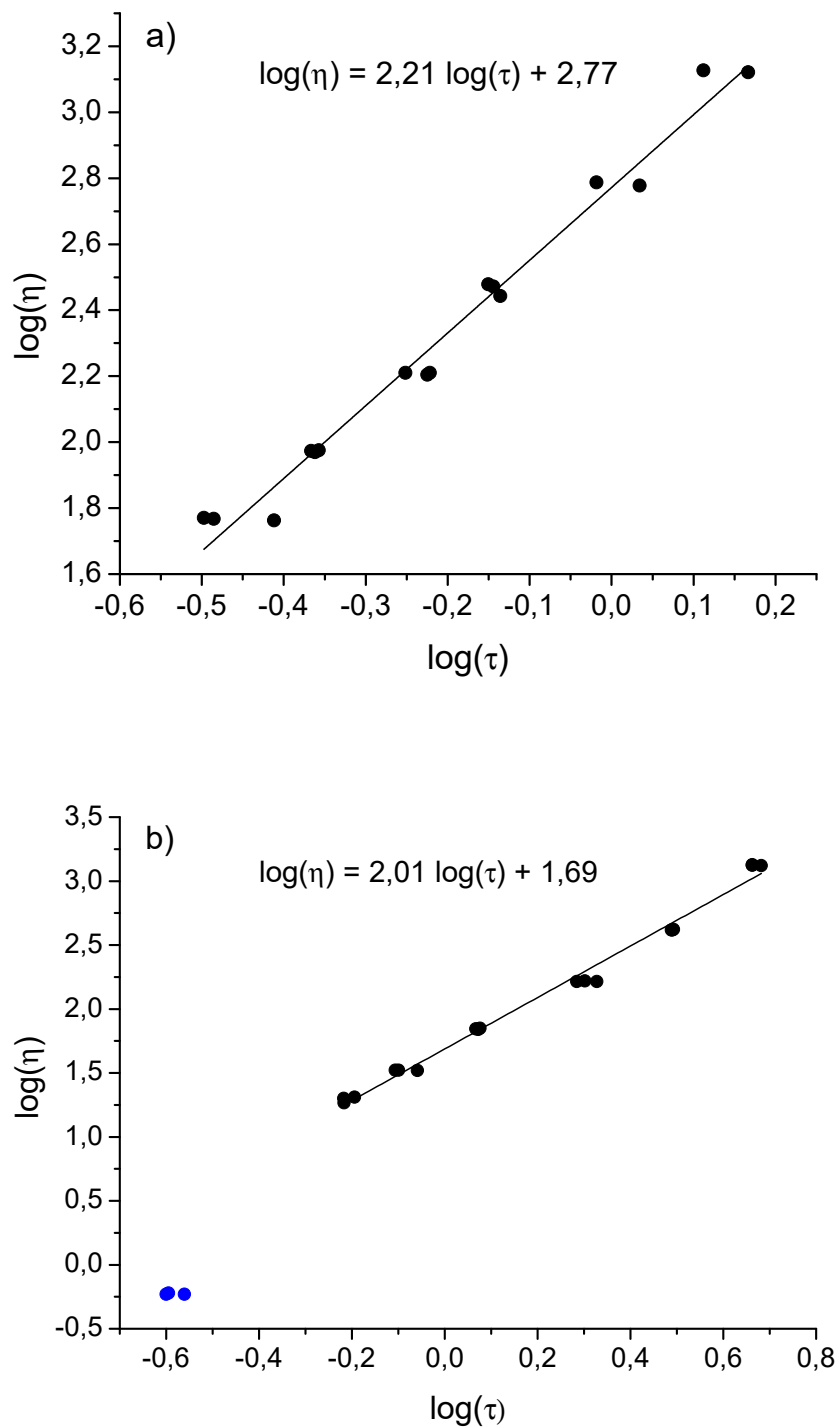
kuvaajista kalibraationäynteissä on esitetty liitteessä 2. Liitteen 2 kuvasta nähdään, että DASPMIn elinaika puhtaassa vedessä on niin lyhyt, että sitä ei voitu määrittää TCSPC:lla. Kuvaajien muodoista nähdään, että fluoresenssin vaimeneminen on kummallakin väriaineella yksiekspontiaalista näissä näynteissä. Vaimenemiskuvaajiin tehtiin sovitus DecFit-ohjelmalla. Matalissa viskositeeteissa mitatuissa DASPMIn fluoresenssin vaimenemiskuvaajissa on olkapäät, joiden takia kaksiekspontiaallinen sovitus sopi matemaattisesti vaimenemiskuvaajiin paremmin. Tämä olkapää johtuu kuitenkin instrumenttifunktiosta, eikä vaimeneminen todellisuudessa noudata kaksiekspontiaalista yhtälöä. Niinpä kummankin väriaineen elinajat määritettiin yksiekspontiaalisilla sovituksilla. Nämä elinajat on koottu liitteen 1 taulukkoon. Tämä poikkeaa DASPMIn osalta monista muista tutkimuksista, kuten esimerkiksi lähteestä [9], jossa vastaavanlaisen kalibraatiosuoran tekemisessä käytettiin DASPMilla kolme-eksponantiaalisia sovituksia. Kummallakin väriaineella yksiekspontiaallinen sovitus sopi sitä paremmin, mitä korkeampi näytteen viskositeetti oli.

Elinajan ja viskositeetin logaritmien välillä on yhtälön 2.22 mukainen yhteys. Niinpä näytteiden viskositeettiarvojen kymmenkantaiset logaritmit piirrettiin kuvaajiin elinaikojen kymmenkantaisten logaritmien funktiona ja kuvaajiin sovitettiin suorat lineaarista regressioanalyysi -menetelmää käyttäen. Tuloksena saadut kalibraatiosuorat on esitetty kuvassa 4.3. Kuvasta 4.3 b) nähdään, että BODIPYn fluoresenssin elinajan riippuvuus viskositeetista ei ole lineaarinen alhaisissa viskositeeteissa. Niinpä puhdas metanoli jätettiin pois BODIPYn kalibraatiosuoraa määritettäessä. DASPMIn kalibraatiosuoran R^2 -arvo on 0,9816 ja BODIPYn 0,9901, joten mittaus tulokset sopivat suorille hyvin. Kalibraatiosuorien avulla laskettujen viskositeettien yksikkö on mPa s ja laskettaessa elinajan yksikkönä käytetään ns.

DASPMIn elinaika nousee noin 0,34 ns:sta 1,36 ns:iin viskositeetin noustessa noin 58 mPa s:sta 1330 mPa s:iin ja BODIPYn elinaika nousee noin 0,62 ns:sta 4,67 ns:iin viskositeetin noustessa noin 20 mPa s:sta 1330 mPa s:iin. Niinpä sama viskositeetin muutos aiheuttaa BODIPYllä suuremman elinajanmuutoksen kuin DASPMilla, jolloin BODIPYn elinajan avulla voidaan havaita viskositeettimuutoksia tarkemmin.

4.3 Homogeeniset näytteet

DASPMIn fluoresenssin elinaika 70-massaprosenttisessa ruokasokeriliuoksessa määritettiin sekä TCSPC- että FLIM-menetelmillä. BODIPYn elinajat määritettiin vastaavasti parafiiniöljyssä. Sekä käytetyn sokeriliuoksen että parafiiniöljyn viskositeetit mitattiin reometrillä. Taulukkoon 4.1 on koottu määritetyt elinajat, elinaikoja



Kuva 4.3 a) DASPMin kalibraatiosuora. b) BODIPYn kalibraatiosuora. Viskositeetin yksikkönä käytetään mPas ja elinajan yksikkönä ns.

Taulukko 4.1 Homogeenisten näytteiden TCSPC- ja FLIM-menetelmillä määritettyjen elinaikojen keskiarvot τ_f ja niistä kalibraatiosuorien avulla lasketut viskositeetit η_l sekä reometrillä 20 °C:ssa mitatut viskositeetit η_m ja viskositeettien kirjallisuusarvot η_v 20 °C:ssa.

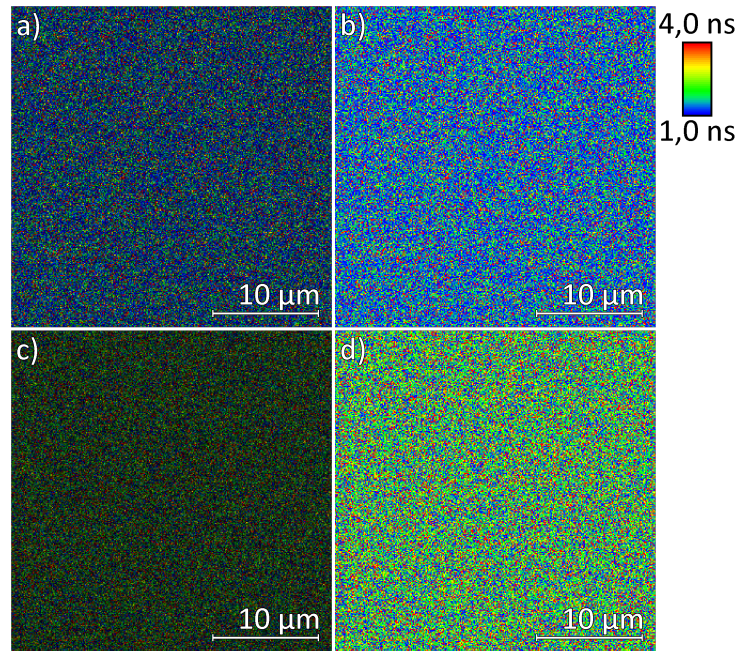
		TCSPC		FLIM		η_m	η_v
		τ_f (ns)	η_l (mPa s)	τ_f (ns)	η_l (mPa s)	(mPa s)	(mPa s)
Parafini- öljy		$1,45 \pm 0,01$	102	$1,77 \pm 0,04$	154	34,4	30–40 [49]
Sokeri- liuos	τ_1	$1,29 \pm 0,03$	1044	$1,54 \pm 0,05$	1530	484	481,561 [50]
	τ_2	$0,36 \pm 0,03$	61,4	$0,45 \pm 0,04$	103		
	$\langle \tau \rangle$	$0,74 \pm 0,03$	308	$0,90 \pm 0,05$	466		

vastaavat viskositeetit, reometrillä mitatut viskositeetit sekä viskositeettien kirjallisuusarvot.

Sokeriliuoksesta mitattiin reometrillä 20 mittapisteen sarja ja parafiniöljystä 5 ja 10 mittapisteen sarjat. Kummankin aineen viskositeetti-arvot pysyivät melko vakioina mittasarjojen ajan ja liuosten viskositeetti-arvoiksi valittiin mittasarjojen keskiarvot. Nämä keskiarvot on esitetty taulukossa 4.1.

TCSPC-menetelmällä mitattuihin fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin kokeiltiin erilaisia sovituksia. DASPMIn fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin sopi parhaiten kaksieksponentiaalinen sovitus ja BODIPYn kuvaajiin yksieksponentiaalinen sovitus. Sovitusten mukaisista elinajoista laskettiin keskiarvot kummallekin väriaineelle. Nämä keskiarvot sekä niistä lasketut viskositeetit on esitetty taulukossa 4.1. DASPMille laskettiin myös amplitudipainotetut keskimääräiset elinajat $\langle \tau \rangle$ kustakin mittauksesta. Amplitudipainotettujen keskimääräisten elinaikojen keskiarvo ja sitä vastaava viskositeetti on myös esitetty taulukossa 4.1. DASPMIn elinajan τ_1 keskimääräinen osuus oli noin 41 % ja elinajan τ_2 noin 59 %.

Sekä sokeriliuoksesta että parafiniöljystä otettiin FLIM:llä kuvia niin näytepisaroiden keskeltä kuin reunoistakin. Kuvassa 4.4 on esitetty esimerkkikuvat sokeriliuoksen ja parafiniöljyn FLIM-kuvista. Sokeriliuoksen FLIM-kuvista määritettyihin DASPMIn fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin sovitettiin kaksieksponentiaaliset sovitukset ja parafiniöljyn FLIM-kuvista määritettyihin BODIPYn kuvaajiin yksieksponentiaaliset sovitukset. Pisaroiden reunoista määritetyt fluoresenssin elinajat olivat vähän pidempiä kuin pisaroiden keskiosista määritetyt elinajat. Kummankin näytteen viskositeetin määrittämisessä käytettiin vain kahta ensimmäistä näytepisaroiden keskeltä mitattua kuvaa, sillä kummankin näytteen kohdalla elinajat vaikuttivat hieman pitenevän, mitä kauemmin näytepisara oli lasilevyllä. Fluore-



Kuva 4.4 Kuvissa a) ja b) nähdään esimerkki sokeriliuoksen FLIM-kuvista ja kuvissa c) ja d) parafiiniöljyn FLIM-kuvista. Väriaineena käytettiin DASPMia sokeriliuosta kuvattaessa ja BODIPYä parafiiniöljyä kuvattaessa. Vasemmanpuoleisessa sarakkeessa ovat intensiteettimoduloidut kuvat ja oikeanpuoleisessa vastaavat kuvat ilman intensiteettimodulointia. Kaikki kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersio-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.

senssin vaimenemiskuvaajat määritettiin kaikissa neljässä kuvassa koko kuvan alueelta, koska kuvat olivat kauttaaltaan tasaisen värisiä, kuten kuvassa 4.4 esitetyistä esimerkkikuvista nähdään. Vaimenemiskuvaajien avulla määritetyistä elinajoista laskettiin keskiarvot, joiden avulla laskettiin näytteiden viskositeetit. Nämä elinaikojen keskiarvot sekä niistä lasketut viskositeetit on esitetty taulukossa 4.1. Lisäksi DASPMIn amplitudipainotettujen keskimääräisten elinaikojen keskiarvo sekä siitä laskettu viskositeetti on myös mainittu taulukossa 4.1. DASPMIn elinajan keskimääräiset osuudet FLIM-mittauksissa olivat samat kuin TCSPC-mittauksissakin, eli noin 41 % τ_1 :lle ja noin 59 % τ_2 :lle.

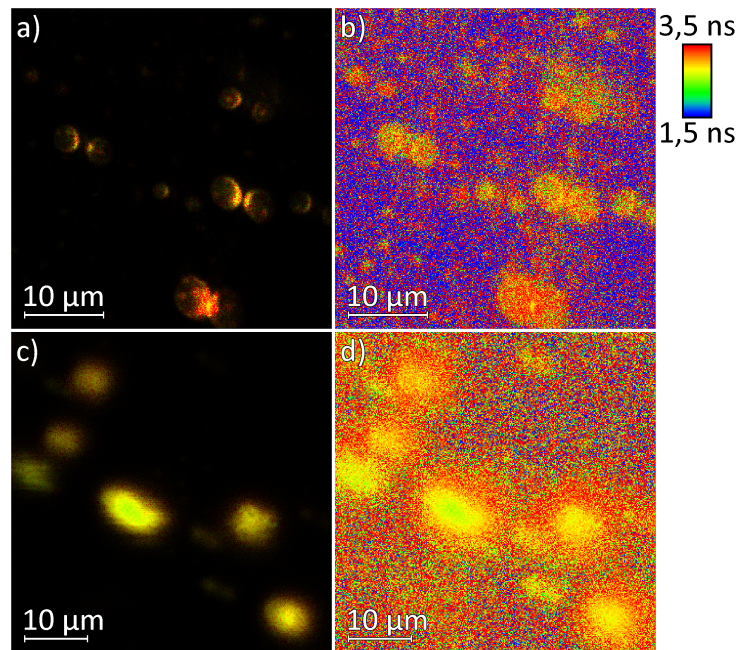
FLIM:llä määritetyt elinajat, ja siten niitä vastaavat viskositeetit, olivat suurempia, kuin TCSPC:lla määritetyt arvot. Tämä johtuu muun muassa siitä, että FLIM-mittauksissa näytepisaran ja lasilevyn välinen rajapinta vaikuttaa tuloksiin. Kummallakin menetelmällä määritetyistä BODIPYn elinajoista lasketut viskositeettiarvot olivat suurempia kuin parafiiniöljyn bulkkiviskositeettiarvo. Tämä voi selittyä sillä, että parafiiniöljyssä on pitkiä hiilivetyketjuja, joita kalibraatiossa käytetyissä metanoli-glyseroli-liuoksissa ei ollut. Nämä voivat estää pitkän hiilivetyketjun

omaavaa BODIPY-molekyyliä pyörimistä enemmän kuin saman viskositeetin omaava liuos, jossa vastaavia pitkiä ketjuja ei ole. DASPMIn pidempi elinaika τ_1 voi johtua DASPMIn vuorovaikutuksesta sokerimolekyylien kanssa, eikä se siten kuvaa viskositeettia. DASPMIn amplitudipainotettuja keskimääräisiä elinaikoja vastaavat viskositeetit olivat sen sijaan lähellä sokeriliuoksen bulkkiviskositeettia.

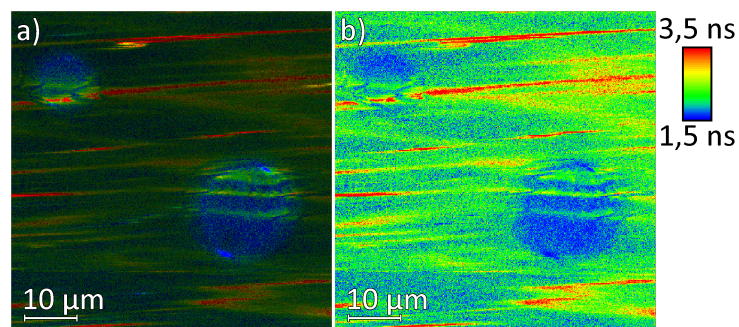
4.4 Heterogeeniset näytteet

Emulsioita ja liposomeja kuvattiin FLIM:llä. Kuvaan 4.5 on koottu esimerkkejä näistä näytteistä mitatuista FLIM-kuvista. Kuvan 4.5 mittauksissa väriaineena käytettiin BODIPYä. Kuva 4.5 a) on intensiteettimoduloitu kuva parafiiniöljy-vesiemulsiosta ja kuva 4.5 c) intensiteettimoduloitu kuva DPPC-liposomiliuoksesta. Kuvat 4.5 b) ja 4.5 d) ovat näitä vastaavat kuvat ilman intensiteettimodulointia. Kuvissa nähdään selkeitä väri- ja kirkkauseroja, joiden avulla lienneet emulsiopisarot ja liposomit erottuvat liuottimesta. Kuvien 4.5 a) ja 4.5 c) selkeät intensiteettierot johtuvat siitä, että BODIPY hydrofobisena mmolekyylinä kertyy parafiiniöljypisaroihin ja liposomeihin. Kuvissa 4.5 b) ja 4.5 d) näkyy väriero liuottimen ja lienneiden välillä. Väri liuottimen alueella johtuu suurimmalta osin taustasta, eikä BODIPYn elinajasta liuottimessa. Kuvista emulsiopisaroiden tai liposomien kohdalta rajatuista alueista määritetyt fluoresenssin vaimenemiskuvaajat olivat muodoltaan kaksiekspotentiaalisia. Tämä voi johtua siitä, että BODIPY-konsentraatio näissä alueissa oli niin suuri, että tapahtui itsesammutusta.

Heterogeenisissä nestemäisissä näytteissä yksi merkittävä ongelma on se, että näytteessä tapahtuu liikehdintää koko ajan lämpöliikkeen ja näytteen kuivumisesta johtuvan virtauksen takia. Niinpä kuvattavat kohteet, kuten liposomit, liikkuvat mittauksen aikana. Jos liikkuminen on nopeaa, kuvattava kohde saattaa liikkua kokonaan pois kuvasta mittauksen aikana. Jos liikkuminen ei ole aivan niin nopeaa, mutta kohde kuitenkin liikkuu mittauksen aikana, niin elinaika vääristyy ja on todellista elinaikaa pidempi. Tätä on nähty aiemmin muun muassa Parosen ja Rauhalan tutkimuksissa [51; 52]. Kuvassa 4.6 nähdään esimerkki siitä, miltä näytteessä mittauksen aikana liikkuvat kohteet voivat FLIM-kuvissa näyttää. Kuvattavat kohteet voivat tarttua lasilevyn pintaan, jolloin ne pysyvät paikallaan niin kauan, että niistä voi saada kuvan. Kontakti lasilevyn kanssa voi kuitenkin vaikuttaa elinaikaan, sillä osa väriaineesta on kontaktissa lasilevyn kanssa, jolloin niiden kokema ympäristö on erilainen. Toinen ongelma heterogeenisiä näytteitä mitattaessa oli näytteen nopea kuivuminen. Näytteen kuivuessa väriaineen elinaika kasvoi. Luvussa 3.4 esiteltiin ratkaisuja kuivumisen hidastamiseen.



Kuva 4.5 Kuivissa a) ja b) nähdään esimerkki parafiiniöljy-vesi emulsion FLIM-kuvista ja kuvissa c) ja d) esimerkki liposomiliuoksen FLIM-kuvista. Väriaineena kummassakin mitauksessa käytettiin BODIPYä. Vasemmanpuoleisessa sarakkeessa ovat intensiteettimoduloidut kuvat ja oikeanpuoleisessa vastaavat kuvat ilman intensiteettimodulointia. Kaikki kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.



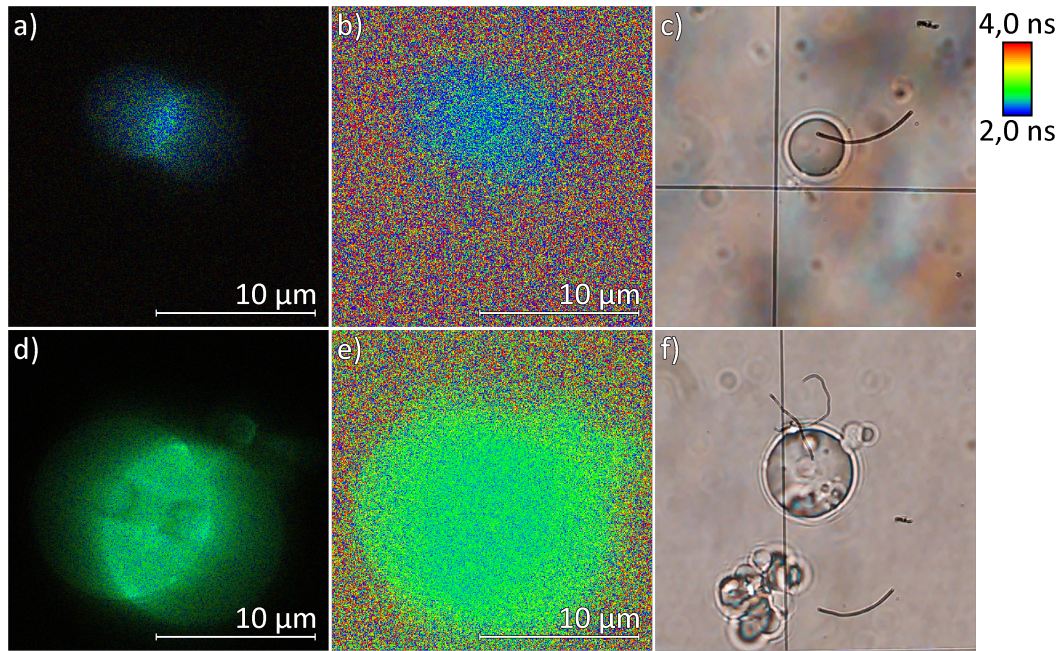
Kuva 4.6 Parafiini-vesiemulsiosta mitattu kuva, jossa näkyy liikkuvien kohteiden aiheuttamia viivoja, joiden elinaika on pitkä. a) Intensiteettimoduloitu FLIM-kuva. b) Vastaava FLIM-kuva ilman intensiteettimodulointia. Kumpikin kuva on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.

4.5 Silkkikoaservaattit

Silkkikoaservaatteja erilaisissa silkkinäytteissä kuvattiin FLIM:llä. Mielenkiintoinen asia, joka silkkiproteiinikoaservaateista havaittiin mittauksia tehtäessä oli se, että koaservaatteja muodostui uudestaan, kun pisara liuotinta lisättiin mikroskooppilaisille kuivuneen näytepisaran päälle. Koaservaattien yhdistymistä toisiinsa ja pehmeiden koaservaattien muodostumista näytepisaran reunoilla pisaran kuivuessa havaittiin valomikroskooppilla, mutta näitä ei voitu mitata FLIM:llä, sillä muutokset tapahtuivat liian nopeasti. Kovat koaservaattit säilyivät hyvin seuraavaan päivään jääkaappilämpötilassa, mutta pehmeät koaservaattit eivät.

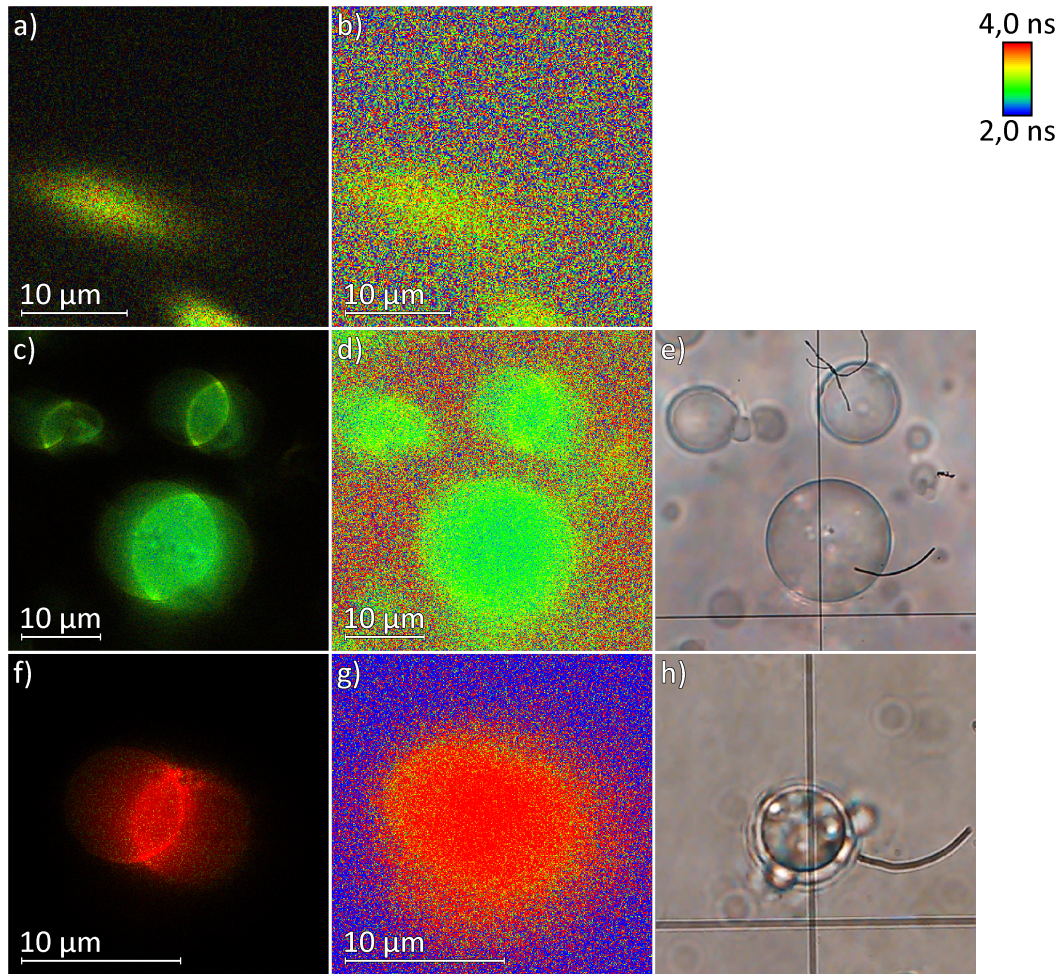
Esimerkkejä FLIM:llä mitatuista kuvista on esitetty kuvissa 4.7, 4.9, 4.8, 4.10 ja 4.11. Kaikissa näissä kuvissa vasemmanpuoleisena on intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, keskellä vastaavat FLIM-kuvat ilman intensiteettiä ja oikealla FLIM-mittauksen jälkeen otetut valomikroskooppikuvat mitatusta näytteen kohdasta, jos kyseisestä kohdasta on sellainen saatu kuvattua. FLIM-kuvaa vastaavia valomikroskooppikuvia ei aina saatu otettua, sillä erityisesti pehmeitä koaservaatteja kuvattaessa näytteessä saattoi tapahtua merkittäviä muutoksia FLIM-mittauksen aikana.

Kuvissa 4.7 ja 4.8 on esitetty esimerkkikuvia FLIM:llä kuvatuista koaservaateista puhtaassa vedessä. Kuvassa 4.7 väriaineena on käytetty DASPMIa ja kuvassa 4.8 BODIPYä. Paras kuva, joka saatiin pehmeistä koaservaateista vedessä, on kuva 4.8 a), jossa väriaineena on käytetty BODIPYä. Kuva on otettu sentrifugoimattomasta näytteestä ja siinä nähdään liikkuva pehmeä koaservaatti. Ongelmana pehmeiden koaservaattien kanssa oli se, että näytteissä oli vähän koaservaatteja ja ne, jotka onnistuttiin kuvaamaan, eivät usein erottuneen intensiteetin eivätkä elinajan perusteella ympäristöstään. Pehmeitä koaservaatteja muodostui näytepisaran reunoilla pisaran kuivuessa, mutta FLIM:llä näitä koaservaatteja ei pystytty mittaamaan, sillä kuivuminen eteni liian nopeasti. Sen sijaan kovia koaservaatteja vedessä saatiin kuvattua kummallakin väriaineella. Kuvissa 4.7 a)–c) nähdään DASPMIa väriaineena käyttäen kuvattu kova koaservaatti. Tämä kuva mitattiin sentrifugoimattomasta näytteestä, johon väriaine laitettiin ennen K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäystä. Kuvissa 4.7 d)–f) on vastaavasti kuvat kovasta koaservaatista sentrifugoidussa näytteessä, johon väriaine laitettiin K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäyksen jälkeen. BODIPYä käyttäen mitatut FLIM-kuvat ja valomikroskooppikuva kovista koaservaateista sentrifugoimattomassa näytteessä, johon väriaine laitettiin ennen K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäystä, ovat kuvissa 4.8 c)–e) ja vastaavasti kuvat kovasta koaservaatista sentrifugoidussa näytteessä, johon väriaine laitettiin suolaliuoksen lisäyksen jälkeen, ovat kuvissa 4.8 f)–h).



Kuva 4.7 Kuvia koaservaateista vedessä. Väriaineena käytetty DASPMIa. a)–c) Kova koaservaatti sentrifugoimattomassa näytteessä. d)–f) Kova koaservaatti sentrifugoidussa näytteessä. Vasemmassa sarakkeessa ovat intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, keskimäisessä FLIM-kuvat ilman intensiteettimodulointia ja oikeassa FLIM-kuvia vastaavat valomikroskooppikuvat. FLIM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersionobjektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.

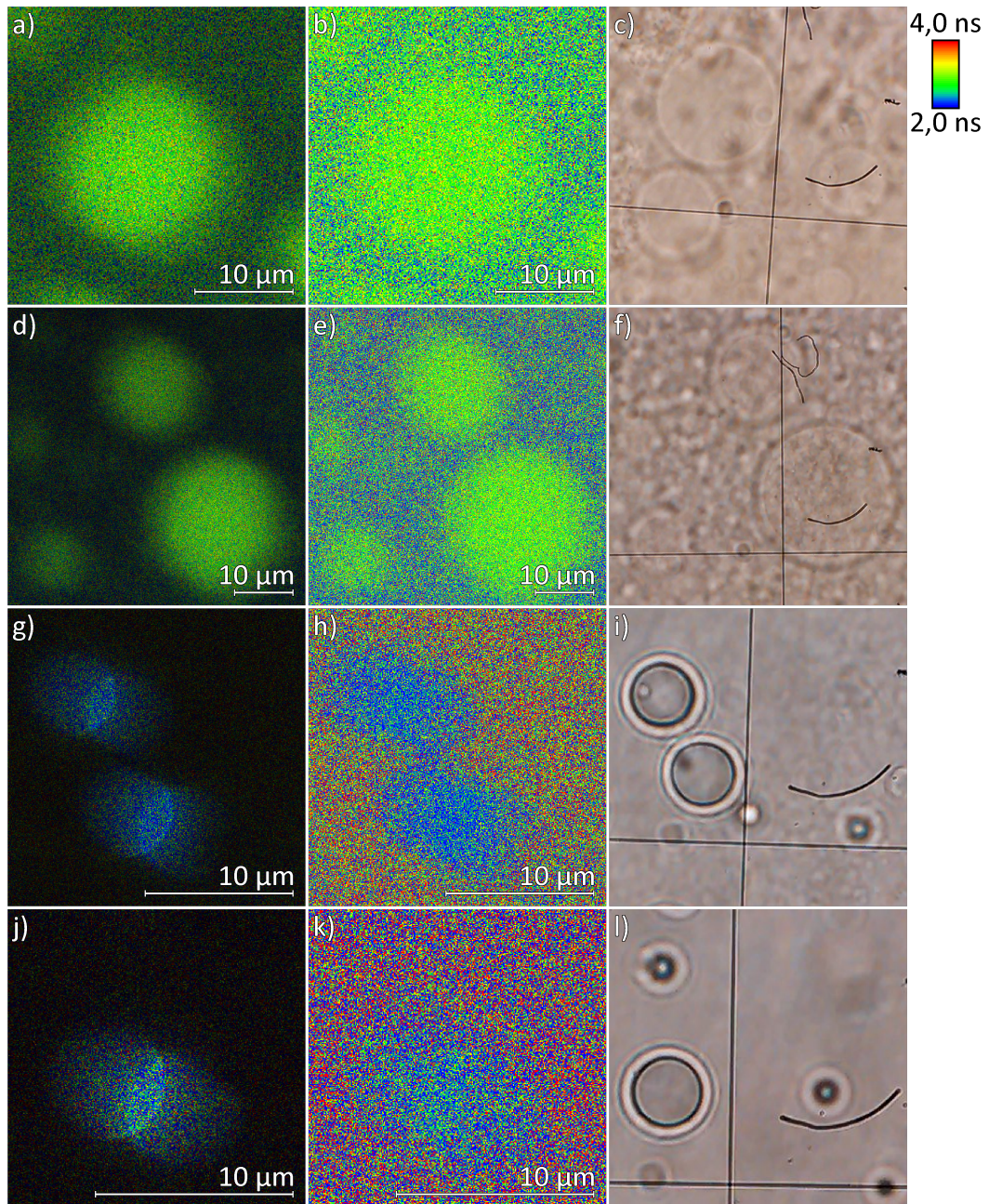
Esimerkkikuvat FLIM:llä kuvatuista Tris-HCl-puskuriliuoksessa olevista koaservaateista on esitetty kuvissa 4.9 ja 4.10. Kuvassa 4.9 väriaineena on käytetty DASPMIa ja kuvassa 4.10 BODIPYä. Tris-HCl-puskuria sisältävistä silkinäytteistä saatiin kummallakin väriaineella kuvia myös pehmeistä koaservaateista. DASPMIa väriaineena käyttäen kuvattuja pehmeitä koaservaatteja nähdään kuvissa 4.9 a)–c) sentrifugoimattomassa näytteessä ja kuvissa 4.9 d)–f) sentrifugoidussa näytteessä. Kovia koaservaatteja sentrifugoimattomassa näytteessä, johon väriaine on laitettu ennen K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäystä, nähdään kuvissa 4.9 g)–i) ja kova koaservaatti sentrifugoidussa näytteessä, johon väriaine lisättiin suolaliuoksen lisäyksen jälkeen, nähdään kuvissa 4.9 j)–l). BODIPYä käyttäen mitatuissa kuvissa 4.10 a) ja b) nähdään sentrifugoimattomasta näytteestä kuvattuja pehmeitä koaservaatteja ja kuvissa 4.10 c)–e) sentrifugoidusta näytteestä kuvattuja pehmeitä koaservaatteja. Kuvissa 4.10 f)–h) nähdään kova koaservaatti, joka on mitattu sentrifugoimattomasta näytteestä, johon väriaine lisättiin ennen suolaliuoksen lisäystä ja kuvissa 4.10 i)–k) kova koaservaatti, joka on mitattu sentrifugoidusta näytteestä, johon väriaine lisättiin myöskin ennen suolaliuoksen lisäystä. Kuvista 4.9 ja 4.10 nähdään, että niin valomikroskooppikuvissa kuin FLIM-kuvissakin kovat koaservaatit ovat pehmeitä



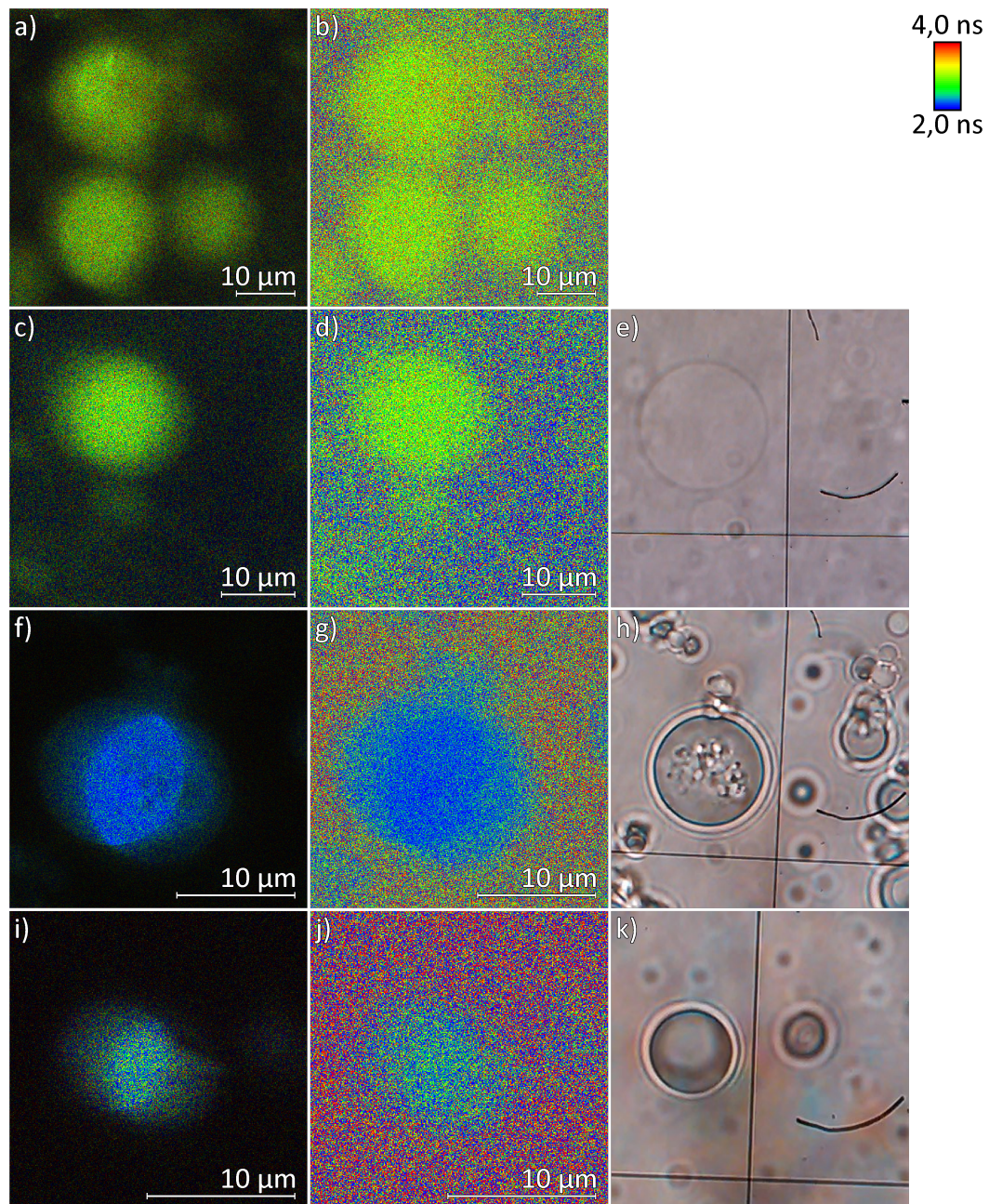
Kuva 4.8 Kuvia koaservaateista vedessä. Väriaineena käytetty BODIPYä. a) ja b) Pehmeitä koaservaatteja sentrifugoimattomassa näytteessä. c)–e) Kovia koaservaatteja sentrifugoimattomassa näytteessä. f)–h) Kova koaservaatti sentrifugoidussa näytteessä. Vasemmalla sarakeessa ovat intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, keskimmaisessä FLIM-kuvat ilman intensiteettimodulointia ja oikeassa FLIM-kuvia vastaavat valomikroskooppikuvat. FLIM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesta suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.

koaservaatteja terävärajaisempia.

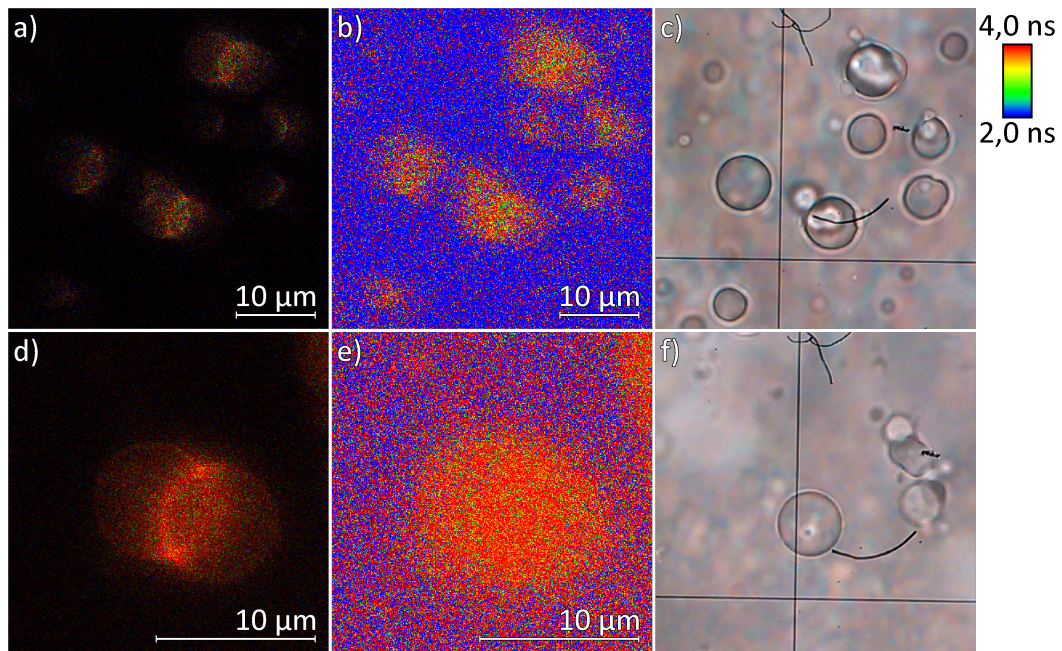
Kuvassa 4.11 nähdään tyypillinen ero kuvien intensiteeteissä, kun väriaine laitetaan näytteeseen ennen suolan lisäämistä verrattuna siihen, että väriaine laitetaan suolan jälkeen. Kuvassa 4.11 a) kirkkaimpien kohtien intensiteetti on noin puolet matalampi kuin kuvassa 4.11 d) ja silti koaservaatit kuvassa 4.11 a) eivät näytä niin kirkkailta kuin kuvassa 4.11 d). Huonompi intensiteetti johtuu todennäköisesti siitä, että suolaa lisättäessä osa silkkiproteiineista sakkautuu ja jos väriaine on tällöin liuoksessa, osa siitä lähtee sakan mukana pois näytteestä.



Kuva 4.9 Kuvia koaservaateista Tris-HCl-puskuriliuoksessa. Väriaineena käytetty DASPMia. a)–c) Pehmeä koaservaatti sentrifugoimattomassa näytteessä. d)–f) Pehmeitä koaservaatteja sentrifugoidussa näytteessä. g)–i) Kovia koaservaatteja sentrifugoimattomassa näytteessä. j)–l) Kova koaservaatti sentrifugoidussa näytteessä. Vasemmassa sarakeessa ovat intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, keskimmaisessa FLIM-kuvat ilman intensiteettimodulointia ja oikeassa FLIM-kuvia vastaavat valomikroskooppikuvat. FLIM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmissio-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.



Kuva 4.10 Kuvia koaservaateista Tris-HCl-puskuriliuoksessa. Väriaineena käytetty BO-DIPYä. a) ja b) Pehmeitä koaservaatteja sentrifugoimattomassa näytteessä. c)–e) Pehmeitä koaservaatteja sentrifugoidussa näytteessä. f)–h) Kova koaservaatti sentrifugoimattomassa näytteessä. i)–k) Kova koaservaatti sentrifugoidussa näytteessä. Vasemmassa sarakeessa ovat intensiteettimoduloidut FLIM-kuvat, keskimmaisessä FLIM-kuvat ilman intensiteettimodulointia ja oikeassa FLIM-kuvia vastaavat valomikroskooppikuvat. FLIM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmissio-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.



Kuva 4.11 Kuvia koaservaateista vedessä. Sentrifugoidut näytteet, joihin on lisätty suolaa. Väriaineena käytetty BODIPYä. a)–c) Väriaine lisätty näytteeseen ennen suolan lisäämistä. d)–f) Väriaine lisätty näytteeseen suolan lisäämisen jälkeen. FLIM-kuvat on esitetty samalla elinaika-asteikolla, joka on esitetty kuvassa oikealla. Kuvat on mitattu satakertaisesti suurentavalla öljyimmersion-objektiivilla käyttäen 483 nm viritysaallonpituutta ja 510–900 nm monitorointiaallonpituusalueita.

Koaservaateissa valomikroskooppikuvissa näkyvät sisäiset rakenteet näkyivät FLIM-kuvissa intensiteetin vaihteluina, mutta eivät elinajan vaihteluina. Vaimenemiskuvaajista määritettyjen elinaikojen numeroarvot ovat kuitenkin keskimäärin suurempia koaservaateilla, joissa on sisäisiä rakenteita, kuin niillä joissa tällaisia rakenteita ei näy. Kuvissa nähdään selkeästi pallomaisten koaservaattien aiheuttamat heijastukset. Heijastuksia nähtiin myös Rauhalan tutkimuksessa [52].

FLIM-kuvista koaservaattien alueelta määritettyihin fluoresenssin vaimenemiskuvaajiin parhaiten sopiva sovitin vaihteli yksiekspotentiaalisesta kolme-eksponentiaaliin, vaikka vaimenemiskuvaajat määritettiin mahdollisimman tasavärisiltä alueilta. Yksiekspotentiaaliset sovitukset sopivat keksimäärin parhaiten vaimenemiskuvaajiin, jotka oli määritetty alueista, joiden kokonaisintensiteetti jäi hyvin matalaksi. Tällaisissa tapauksissa tausta vaikuttaa todennäköisesti hyvin paljon määritetyn elinajan arvoon, eivätkä nämä elinajat siten ole kovin luotettavia. Niinpä tällaiset kuvat jätettiin huomiotta tuloksia laskettaessa. Kolme-eksponentiaalisissa sovituksissa lyhin elinaika oli tavallisesti melko lähellä laitteen erotuskyvyn alarajaa, tai jopa sitä lyhyempi, eikä siten välttämättä edustanut ainakaan BODIPY-molekyylien elinaikaa. Niinpä päädyttiin siihen, että luotettavimmat ja vertailukelpoisimmat tu-

lokset saadaan käyttämällä systemaattisesti kaksiekspontiaalisia sovituksia. Koaservaattien ympäristöistä määritetyt elinajat olivat suurempia, kuin koaservaateista määritetyt elinajat. Tämä johtuu todella matalasta fluoresenssin intensiteetistä koaservaatin ympäristössä, sillä intensiteetin ollessa huono tausta vaikuttaa sovituksesta saatuun elinajan arvoon.

Kaksiekspontiaalisissa sovituksissa pidempien elinaikojen vaihtelut samasta näytteestä mitattujen koaservaattien välillä olivat keskimäärin suhteellisesti pienempiä kuin lyhyempien elinaikojen vaihtelut, erityisesti BODIPYllä. Lyhyt elinaika voi BODIPYn tapauksessa johtua myös itsesammutuksesta, jolloin se ei kuvasta näytteen viskositeettiä. Niinpä BODIPYn elinaikojen avulla määritetyt viskositeetit laskettiin käyttäen kaksiekspontiaalisesta sovituksesta saaduista elinajoista pidempää. Sen sijaan DASPMIn elinaikojen avulla määritetyt viskositeetit laskettiin käyttäen elinajoista lyhyempää. Pidemmällä elinajalla lasketut viskositeetti-arvot olivat useamman tuhannen mPa s luokkaa. Tämä korkea elinaika johtuu todennäköisesti positiivisen varauksen omaavan DASPMIn sitoutumisesta negatiivisesti varautuneiden silkkiproteiinien kanssa, eikä siten kuvasta ympäristön viskositeetin vaikutusta. Lisäksi pidemmät elinajat olivat selkeästi pidempiä, kuin DASPMIn elinaika glyserolissa, jolloin kalibraatiosuora ei välttämättä anna luotettavaa tulosta, koska tämän tutkimuksen perusteella ei tiedetä, kuinka korkeissa viskositeeteissa lineaarinen riippuvuus vielä pätee. Niinpä lyhyemmän elinajan käyttäminen viskositeetin laskemiseen DASPMilla on perusteltua.

Taulukkoon 4.2 on koottu erilaisista silkkikoaservaattinäytteistä mitatut DASPMIn elinajat ja niistä määritetyt viskositeetit. Lisäksi taulukossa kerrotaan elinaikojen osuudet. Elinajat ja osuudet ovat kustakin näytetyypistä mitatuista kuvista määritettyjen koaservaattien elinaikojen ja osuuksien keskiarvoja ja viskositeetti on määritetty tästä elinajan keskiarvosta. Vastaavat tulokset on esitetty taulukossa 4.3 BODIPYlle.

DASPMIn elinaikoja vertailtaessa nähdään, että kaikissa näytetyypeissä pehmeiden koaservaattien pidempi elinaika τ_1 on pidempi kuin kovien koaservaattien pidempi elinaika. Sen sijaan lyhyemmät elinajat ovat kahta poikkeusta lukuun ottamatta pidempiä kovissa koaservaateissa. Koska koaservaatin viskositeetti lasketaan DASPMIn lyhyemmästä elinajasta, koville koaservaateille lasketut viskositeetti-arvot ovat pääasiassa pehmeiden koaservaattien arvoja suurempia. Viskositeettien erot eivät kuitenkaan ole kovin suuria. Pehmeiden koaservaattien τ_1 elinajat ovat suurempia puskuriliuoksessa kuin puhtaassa vedessä. τ_2 elinaika sentrifugomattomassa puskuriliuoksessa poikkeaa kahden muun näytetyypin τ_2 elinajasta ja viskositeetin arvo on poikkeuksellisen suuri. Kovien koaservaattien elinajat pysyvät melko samoina riippu-

Taulukko 4.2 DAPSMIn keskimääräiset elinajat τ_f erilaisten näytetyyppien silkkikoaservaateissa sekä lyhyemmän elinajan τ_2 mukaan lasketut viskositeetit η_l . Lisäksi on annettu elinaikojen keskimääräiset virheet sekä keskimääräiset osuudet a [%]. Viskositeettiarvot on pyöristetty lähimpään 5:llä jaolliseen kokonaislukuun.

		Pehmeä			Kova			
		τ_f (ns)	[%]	η_l (mPa s)	Väriaine	τ_f (ns)	[%]	η_l (mPa s)
H₂O								
Ei sentr.	τ_1	2,65 ± 0,12 [51]			Ennen	2,21 ± 0,08 [54]		
	τ_2	0,49 ± 0,14 [49]				0,53 ± 0,11 [46]		
	τ_1				Jälkeen	2,45 ± 0,08 [43]		
	τ_2					0,54 ± 0,08 [57]		
Sentr.	τ_1	—	[—]	—	Ennen	2,15 ± 0,07 [42]		
	τ_2	—	[—]	—		0,57 ± 0,07 [58]		
	τ_1				Jälkeen	2,37 ± 0,07 [47]		
	τ_2					0,58 ± 0,08 [53]		
Tris-HCl								
Ei sentr.	τ_1	2,95 ± 0,05 [42]			Ennen	2,30 ± 0,06 [43]		
	τ_2	0,62 ± 0,05 [58]				0,58 ± 0,06 [57]		
Sentr.	τ_1	2,99 ± 0,06 [43]			Ennen	2,20 ± 0,17 [42]		
	τ_2	0,50 ± 0,06 [57]				0,44 ± 0,14 [58]		
	τ_1				Jälkeen	2,33 ± 0,08 [46]		
	τ_2					0,51 ± 0,08 [54]		

matta näytetyypistä, paitsi että väriaineen lisääminen suolaliuoksen jälkeen näyttää hieman pidentävän τ_1 elinaikoja näytteissä, joissa liuottimena on puhdas vesi. Puskuriliuoskessa kovien koaservaattien τ_1 elinajat vastaavat toisiaan, kun virherajat otetaan huomioon. DAPSMIn τ_2 elinaika kovia koaservaatteja sisältävässä sentrifugoidussa puskuriliuos-näytteessä on selkeästi muita τ_2 elinaikoja lyhyempi. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että koaservaattien koko oli tässä näytteessä keskimäärin pienempi kuin muissa näytteissä.

Sentrifugoimattomissa näytteissä BODIPYn τ_1 elinaika on pidempi pehmeissä kuin kovissa koaservaateissa. Sentrifugoiduissa näytteissä tilanne on suurimmalta osin päinvastainen. Myös BODIPYllä sentrifugoitu Tris-HCl-puskuriliuosnäyte, johon väriaine on lisätty ennen suolaa, poikkeaa hieman muista näytteistä. Väriaineen lisääminen suolaliuoksen jälkeen pidentää τ_1 elinaikoja huomattavasti kaikissa tapauksissa, mutta erityisesti sentrifugoiduissa näytteissä. BODIPYn τ_2 elinajat vaihtelevat paljon, mutta vaihteluissa ei ole havaittavissa systemaattisuutta.

BODIPYn elinaikojen mukaan lasketut koaservaattien viskositeettiarvot ovat huomattavasti suurempia kuin vastaavat viskositeetit DAPSMIn elinaikojen mukaan laskettuna. Mahdollinen selitys tälle on, että BODIPY olisi koaservaattien sisällä

Taulukko 4.3 BODIPYn keskimääräiset elinajat τ_f erilaisten näytetyyppien silkkikoaservaateissa sekä pidemmän elinajan τ_1 mukaan lasketut viskositeetit η_l . Lisäksi on annettu elinaikojen keskimääräiset virheet sekä keskimääräiset osuudet a [%]. Viskositeetti-arvot on pyöristetty lähimpään 5:llä jaolliseen kokonaislukuun.

		Pehmeä		Kova			
		τ_f (ns)	[%] η_l (mPa s)	Väriaine	τ_f (ns)	[%]	η_l (mPa s)
H₂O							
Ei sentr.	τ_1	$3,25 \pm 0,10$ [41]	525	Ennen	$2,45 \pm 0,06$ [60]		295
	τ_2			$0,46 \pm 0,09$ [59]	Jälkeen		
	τ_1	$2,90 \pm 0,09$ [33]	415	Jälkeen	$2,65 \pm 0,11$ [40]		345
	τ_2			$0,49 \pm 0,06$ [67]			
Sentr.	τ_1	$2,90 \pm 0,09$ [33]	415	Ennen	$3,28 \pm 0,22$ [40]		530
	τ_2			$0,49 \pm 0,06$ [67]			
	τ_1	$3,06 \pm 0,06$ [40]	465	Jälkeen	$4,27 \pm 0,25$ [47]		905
	τ_2			$0,51 \pm 0,06$ [60]			
Tris-HCl							
Ei sentr.	τ_1	$3,15 \pm 0,07$ [43]	490	Ennen	$2,48 \pm 0,07$ [41]		305
	τ_2	$0,55 \pm 0,07$ [57]			$0,66 \pm 0,06$ [59]		
Sentr.	τ_1	$3,06 \pm 0,06$ [40]	465	Ennen	$2,38 \pm 0,09$ [44]		280
	τ_2			$0,51 \pm 0,06$ [60]			
	τ_1	$3,06 \pm 0,06$ [40]	465	Jälkeen	$4,19 \pm 0,22$ [35]		870
	τ_2			$0,51 \pm 0,06$ [60]			

kohdissa, joissa on enemmän proteiineja ja DASPMI olisi kohdissa, joissa on enemmän vettä. Tämä olisi mielekästä, sillä DASPMI on BODIPYä hydrofilisempi.

5. YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli kehittää menetelmä, jolla voidaan määrittää heterogeenisten nesteiden paikallisia viskositeetteja fluoresoivien roottorimolekyylien elinaikojen avulla, käyttäen FLIM-laitteistoa. Lisäksi haluttiin selvittää voiko menetelmää soveltaa silkkikoaservaattien viskositeettien määrittämiseen erilaisista näytteistä ja nähdäänkö menetelmän avulla eroja silkkikoaservaattien välillä. Fluoresoivina roottorimolekyyleinä käytettiin hydrofiilistä DASPMIa ja hydrofobista BODIPYä.

Roottorimolekyyleille määritettiin kalibraatiosuorat, jotka kuvaavat niiden fluoresenssin elinajan riippuvuutta viskositeetista. Kalibraationäytteistä TCSPC:lla määritettyjen fluoresenssin elinaikojen logaritmien ja näytteiden reometrillä mitattujen viskositeettien logaritmien välillä oli selkeä lineaarinen riippuvuus kummallakin väriaineella ja määritettyjen kalibraatiosuorien R^2 -arvot olivat yli 0,98:n. Lineaarinen riippuvuus pätee DASPMIlla ainakin 60–1330 mPa s viskositeettialueella ja BODIPYllä 20–1330 mPa s viskositeettialueella. Näitä kalibraatiosuoria käyttäen voitiin laskea viskositeetteja FLIM-kuvista määritetyistä elinajoista. Vaikka kalibraatiosuorat sopivat mitattuun dataan hyvin, voisi suorien luotettavuutta lisätä mittaamalla näytteiden viskositeetit ja fluoresenssin elinajat näytteissä ajallisesti lähempänä toisiaan. Lisäksi voitaisiin lisätä näytteitä ja selvittää myös kuinka matalissa ja korkeissa viskositeeteissa riippuvuus pysyy lineaarisena.

Homogeenisista testinäytteistä mitattiin elinajat sekä FLIM:llä että TCSPC:lla. Näitä tuloksia vertailemalla nähtiin, että FLIM:llä saadaan korkeampia elinajoja kuin TCSPC:lla, ja siten myös korkeampia viskositeetteja. Nämä erot johtuvat muun muassa siitä, että TCSPC:lla mitattaessa näyte mitataan kyvetissä, kun taas FLIM:llä mitattaessa näyte on pisara mikroskooppilasilla, jolloin lasin ja näytepisararan rajapinta vaikuttaa tuloksiin. Niinpä se, että kalibraatiomittaukset on tehty TCSPC:lla voi aiheuttaa systemaattista virhettä tuloksiin. Tästä syystä olisi perusteltua määrittää kalibraatiosuorat FLIM:llä. Laskettaessa sokeriliuoksen viskositeetti DASPMIn amplitudipainotteisen keskimääräisen elinajan avulla, saatiin tulokseksi nesteen bulkkiviskositeettia lähellä oleva viskositeettiarvo. Lisää mittauksia erilaisissa homogeenisissa nesteissä täytyy kuitenkin tehdä, ennen kuin voidaan sanoa, päteekö tämä yleisesti DASPMIille homogeenisissa nesteissä. DASPMIn elin-

aika riippuu myös nesteen poolisuudesta, mikä tulee myös pitää mielessä tuloksia tulkittaessa.

Heterogeenisten näytteiden mittaamisessa oli tiettyjä haasteita. Ensinnäkin kuvattavat kohteet, kuten liposomit tai koaservaatit, liikkuvat jatkuvasti näytteessä lämpöliikkeen ja näytteen kuivumisen aiheuttaman nesteen virtauksen takia. Tällaisia liikkuvia kohteita ei voida kuvata FLIM:llä, sillä ne liikkuvat mittauksen aikana pois kuvattavalta alueelta tai väriaineen elinaika vääristyy liikkeen johdosta. Niinpä FLIM:llä voidaan kuvata vain sellaisia kohteita, jotka ovat jääneet kiinni lasilevyyn tai johonkin näytteessä olevaan paikallaan pysyvään tai hyvin hitaasti liikkuvaan kohteeseen. Lisäksi näytepisaran nopea kuivuminen tuotti ongelmia heterogeenisiä näytteitä mitattaessa. Asettamalla näytepisara kahden lasilevyn väliin pystyttiin hidastamaan näytepisaran kuivumista huomattavasti. Mikroskooppilasit kannattaa erottaa toisistaan jollakin, kuten teflonteipistä tehdyllä renkaalla, jotta päällimmäinen lasilevy ei paina näytepisaraa. Vesipisaroiden lisääminen lasilevylle näytepisaroiden kanssa hidasti näytepisaran kuivumista myös hieman.

Heterogeenisistä näytteistä mitatuista kuvista nähdään, että fluoresenssin intensiteetti kummallakin väriaineella on suurempi näytteiden viskooseimmissa osissa. Tämä johtuneekin sekä väriaineiden fluoresenssin intensiteetin kasvamisesta viskositeetin kasvaessa että väriaineiden kertymisestä näihin viskoosimpiin osiin tai niiden pinnalle. Näissä näytteen osissa väriaineiden intensiteetti on niin hyvä, että niistä voidaan määrittää fluoresenssin vaimenemiskuvaaajia, joista saadaan määritettyä todenmukaisia elinaikoja. Niinpä näiden osien viskositeetit pystyttiin määrittämään. Sen sijaan esimerkiksi koaservaattien ympäristön viskositeetin määrittäminen ei onnistunut näitä väriaineita käyttäen. BODIPYä oli todennäköisesti hyvin vähän koaservaattien ympäristössä, sillä BODIPY on hydrofobinen molekyyli. Sen sijaan DASPMIa todennäköisesti oli ympäristössä, mutta koska DASPMIn elinaika on vedessä niin lyhyt, että sitä ei voi mitata käytetyllä laitteistolla, ei DASPMInkaan avulla voitu määrittää ympäristön viskositeettia. Niinpä viskositeettierot ympäristön ja koaservaattien välillä voitaisiin erottaa paremmin sellaisella fluoresoivalla roottorimolekyylillä, joka on vesiliukoinen ja jonka elinaika vedessä on tarpeeksi pitkä, jotta se voidaan mitata FLIM:llä.

Menetelmän avulla pystyttiin erottamaan kovat koaservaatit ympäristöstään ja pehmeätkin koaservaatit erottuivat ympäristöstään erityisesti puskuriliuosnäytteissä. Lisäksi pystyttiin näkemään selkeitä värieroja pehmeiden ja kovien silkkikoaservaattien välillä. Parhaimmat kuvat silkkikoaservaateista saatiin Tris-HCl-puskuriliuosista ja sentrifugoiduista näytteistä. Kovista koaservaateista saatiin parempia kuvia, kun väriaine lisättiin näytteisiin K_2HPO_4 -suolaliuoksen lisäyksen jälkeen.

Koaservaateista pystyttiin määrittämään elinaikoja, joiden avulla voitiin laskea keskenään vertailukelpoisia viskositeetteja. Elinajat laskettiin fluoresenssin vaimenemiskuvaajista kaksiekspontiaalisten sovitusten avulla. Viskositeetin laskemisessa käytettiin DASPMIn elinajoista lyhyempää ja BODIPYn elinajoista pidempää. DASPMilla pidempi elinaika johtuu todennäköisesti DASPMI-molekyylien sitoutumisesta proteiinimolekyyleihin, jolloin se ei kuvaa ympäristön viskositeettia. Tämä voitaisiin tarkistaa aikaerotteisella fluoresenssianisotropialla. BODIPYllä pidempi elinaika on luotettavampi, koska se vaihteli lyhyempää elinaikaa vähemmän samasta näytteestä mitattujen koaservaattien välillä ja lisäksi lyhyempi elinaika voi liittyä itsesammutukseen.

FLIM-kuvien analysoinnissa tulee ottaa huomioon, että fluoresenssin intensiteetin ollessa matala, kuvista rajatun alueen koolla on merkittävä vaikutus elinaikaan. Mitä suuremmalta alueelta fluoresenssin vaimenemiskuvaajan tällaisissa kuvissa määritti, sitä suuremman elinajan DecFit-ohjelmalla tehty sovitus antoi. Tämä johtuu taustan vaikutuksesta. FLIM-kuvista määritettyihin fluoresenssin vaimenemiskäyriin tehtyjä sovituksia olisikin voitu parantaa, jos sovituksia tehtäessä olisi voitu huomioida taustan vaikutus. Lisäksi FLIM-kuvissa havaittiin heijastuksia. Heijastuksien vähentämiseksi FLIM:llä mitattaessa voidaan skannata näytettä liikkumalla aina vain yhteen suuntaan sen sijaan, että skannattaessa liikutaan joka toisella rivillä oikealta vasemmalle ja joka toisella vasemmalta oikealle, kuten tämän tutkimuksen mittauksissa tehtiin.

DASPMIa käytettäessä kovien koaservaattien viskositeetti on useimmiten korkeampi kuin vastaavasta näytteestä mitatun pehmeän koaservaatin viskositeetti. Pehmeiden koaservaattien viskositeetti oli keskimäärin noin 130 mPa s ja kovien koaservaattien viskositeetti noin 150 mPa s. Tämä ero on kuitenkin mittaustarkkuuden huomioon ottaen hyvin pieni. BODIPYä käytettäessä pehmeiden koaservaattien viskositeetti oli sen sijaan kovien koaservaattien viskositeettia suurempi monissa näytetyypeissä. Laskettaessa keskiarvot BODIPYn pehmeiden ja kovien koaservaattien viskositeeteilla kaikissa näytetyypeissä, pehmeiden koaservaattien viskositeetti oli noin 470 mPa s ja kovien noin 500 mPa s, mutta vaihtelu kovien koaservaattien välillä oli hyvin suuri. Kummallakaan väriaineella ei havaittu selkeitä viskositeettieroja vedessä ja Tris-HCl-puskuriliuoksessa mitattujen koaservaattien välillä. Sen sijaan sentrifugoiduissa vesinäytteissä kovien koaservaattien viskositeetit olivat korkeampia kuin sentrifugoimattomissa vesinäytteissä. Lisäksi kaikissa näytteissä, joihin väriaine lisättiin suolaliuoksen jälkeen, koaservaattien viskositeetiksi saatiin suurempia arvoja, kuin vastaavissa näytteistä, joihin väriaine lisättiin ennen suolaliuosta.

Viskositeettien määrittäminen FLIM:llä roottorimolekyylien elinaikoja käyttäen vai-

kuttaa lupaavalta menetelmältä paikallisten viskositeettien määrittämiseen heterogeenisista nesteistä. Kummallakin väriaineella määritetyt viskositeetti-arvot ovat keskenään vertailukelpoisia, mutta ne eivät vastaa tarkasti toisiaan eivätkä näytteen todellista viskositeettia. Kalibraatiosuoria ja mittaustapoja sekä FLIM-kuvien ja fluoresenssin vaimenemiskuvaajien analysointimenetelmiä kehittämällä on kuitenkin mahdollista saada yhä vertailukelpoisempia tuloksia.

LÄHTEET

- [1] Dabir S. Viswanath, Nidamarty V. K. Dutt, Tushar K. Ghosh, Dasika H. L. Prasad, and Kalipatnapu Y. Rani. *Viscosity of Liquids: Theory, Estimation, Experiment, and Data*. 1st ed. Springer-Verlag, 2007. 660 p.
- [2] Marina K. Kuimova. *Mapping viscosity in cells using molecular rotors*. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 14, no. 37, (2012), pp. 12671–12686.
- [3] Seung-Chul Lee, Jeongyun Heo, Hee Chul Woo, Ji-Ah Lee, Young Hun Seo, Chang-Lyoul Lee, Sehoon Kim, and O-Pil Kwon. *Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Sensors*. In: *Chemistry - A European Journal*, vol. 24, no. 52, (2018), pp. 13706–13718.
- [4] Marina K. Kuimova, Gokhan Yahioğlu, James A. Levitt, and Klaus Suhling. *Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging*. In: *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 21, (2008), pp. 6672–6673.
- [5] Bruno Pignataro. *Molecules at Work: Selfassembly, Nanomaterials, Molecular Machinery*. 1st ed. John Wiley & Sons, Incorporated, 2012. xxiv, 417 p.
- [6] Bernard Valeur. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. xiv, 387 p.
- [7] Mark A. Haidekker and Emmanuel A. Theodorakis. *Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors*. In: *Journal of Biological Engineering*, vol. 4, (2010), pp. 1–14.
- [8] Neveen A. Hosny, Graciela Mohamedi, Paul Rademeyer, Joshua Owen, Yilei Wu, Meng-Xing Tang, Robert J. Eckersley, Eleanor Stride, and Marina K. Kuimova. *Mapping microbubble viscosity using fluorescence lifetime imaging of molecular rotors*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, no. 23, (2013), pp. 9225–9230.
- [9] Graham Hungerford, Archie Allison, David McLoskey, Marina K. Kuimova, Gokhan Yahioğlu, and Klaus Suhling. *Monitoring sol-to-gel transitions via fluorescence lifetime determination using viscosity sensitive fluorescent probes*. In: *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 35, (2009), pp. 12067–12074.
- [10] Laura Lemetti, Sami-Pekka Hirvonen, Dmitrii Fedorov, Piotr Batys, Maria Sammalkorpi, Heikki Tenhy, Markus B. Linder, and A. Sesilja Aranko. *Molecular crowding facilitates assembly of spidroin-like proteins through phase separation*. In: *European Polymer Journal* (2018). URL: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.10.010>.

- [11] Pezhman Mohammadi, A. Sesilja Aranko, Laura Lemetti, Zoran Cenev, Quan Zhou, Salla Virtanen, Christopher P. Landowski, Merja Penttilä, Wolfgang J. Fischer, Wolfgang Wagermaier, and Markus B. Linder. *Phase transitions as intermediate steps in the formation of molecularly engineered protein fibers*. In: *Communications Biology*, vol. 1, no. 1, (2018), pp. 1–12.
- [12] Paulo D.S. Peixoto, Guilherme M. Tavares, Thomas Croguennec, Aurélie Nicolas, Pascaline Hamon, Claire Roiland, and Saïd Bouhallab. *Structure and Dynamics of Heteroprotein Coacervates*. In: *Langmuir*, vol. 32, no. 31, (2016), pp. 7821–7828.
- [13] Tamara B. Aigner, Elise DeSimone, and Thomas Scheibel. *Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials*. In: *Advanced Materials*, vol. 30, no. 19, (2018), pp. 1–28.
- [14] Joseph R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer US, 2006. xxvi, 954 p.
- [15] Thomas Engel and Philip Reid. *Physical chemistry*. Prentice Hall, Pearson Education, 2010. xviii, 1067 p.
- [16] Brian Wardle. *Principles and Applications of Photochemistry*. 1st ed. John Wiley & Sons, Incorporated, 2009. xiv, 250 p.
- [17] Theodor Förster and Gerhard Hoffmann. *Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme*. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 75, no. 1-2, (1971), pp. 63–76.
- [18] James A. Levitt, Marina K. Kuimova, Gokhan Yahioglu, Pei Hua Chung, Klaus Suhling, and David Phillips. *Membrane-bound molecular rotors measure viscosity in live cells via fluorescence lifetime imaging*. In: *Journal of Physical Chemistry C*, vol. 113, no. 27, (2009), pp. 11634–11642.
- [19] Yilei Wu, Martin Štefl, Agnieszka Olzyńska, Martin Hof, Gokhan Yahioglu, Philip Yip, Duncan R. Casey, Oscar Ces, Jana Humpolíčková, and Marina K. Kuimova. *Molecular rheometry: direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging*. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 36, (2013), p. 14986.
- [20] Yunus A. Çengel and John M. Cimbala. *Fluid Mechanics: Fundamentals and Applications*. New York, NY : McGraw-Hill cop., 2014. xxii, 1000 p.
- [21] Gregory Falkovich. *Fluid Mechanics: A Short Course for Physicists*. Cambridge University Press, 2011. xii, 167 p.
- [22] *Physical Properties of Glycerine and Its Solutions*. Saatavissa: https://www.aciscience.org/docs/Physical_properties_of_glycerine_and_its_solutions.pdf. Glycerine Producers Association, 1963. 27 p.

- [23] Lyubov E. Shimolina, Maria A. Izquierdo, Ismael López-Duarte, James A. Bull, Marina V. Shirmanova, Larisa G. Klapshina, Elena V. Zagaynova, and Marina K. Kuimova. *Imaging tumor microscopic viscosity in vivo using molecular rotors*. In: *Scientific Reports*, vol. 7, (2017). 41097, pp. 1–11.
- [24] Wilhelm Ostwald. *Ostwaldscher Zähigkeitsmesser*. Wikimedia Commons, Saatavissa (viitattu 15.11.2018): https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ostwaldscher_Zähigkeitsmesser.jpg.
- [25] Rafik O. Loutfy and Bradley A. Arnold. *Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors*. In: *Journal of Physical Chemistry*, vol. 86, no. 21, (1982), pp. 4205–4211.
- [26] Radhan Ramadass and Jürgen Bereiter-Hahn. *How DASPMI reveals mitochondrial membrane potential: Fluorescence decay kinetics and steady-state anisotropy in living cells*. In: *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 8, (2008), pp. 4068–4076.
- [27] Aron B. Goins, Hugo Sanabria, and M. Neal Waxham. *Macromolecular crowding and size effects on probe microviscosity*. In: *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 11, (2008), pp. 5362–5373.
- [28] Mark A. Haidekker, Thomas P. Brady, Darcy Lichlyter, and Emmanuel A. Theodorakis. *A ratiometric fluorescent viscosity sensor*. In: *Journal of the American Chemical Society*, vol. 128, no. 2, (2006), pp. 398–399.
- [29] Katherine Luby-Phelps, Swati Mujumdar, Ratnakar B. Mujumdar, Lauren A. Ernst, William Galbraith, and Alan S. Waggoner. *A novel fluorescence ratiometric method confirms the low solvent viscosity of the cytoplasm*. In: *Biophysical Journal*, vol. 65, no. 1, (1993), pp. 236–242.
- [30] Mireia Segado, Enrico Benassi, and Vincenzo Barone. *A “Twist” on the Interpretation of the Multifluorescence Patterns of DASPMI*. In: *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 11, no. 10, (2015), pp. 4803–4813.
- [31] Radhan Ramadass and Jürgen Bereiter-Hahn. *Photophysical properties of DASPMI as revealed by spectrally resolved fluorescence decays*. In: *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 111, no. 26, (2007), pp. 7681–7690.
- [32] Aurimas Vyšniauskas, Ismael López-Duarte, Nicolas Duchemin, Thanh Truc Vu, Yilei Wu, Ekaterina M. Budynina, Yulia A. Volkova, Eduardo Peña Cabrera, Diana E. Ramírez-Ornelas, and Marina K. Kuimova. *Exploring viscosity, polarity and temperature sensitivity of BODIPY-based molecular rotors*. In: *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, no. 37, (2017), pp. 25252–25259.

- [33] Aurimas Vyšniauskas, Maryam Qurashi, Nathaniel Gallop, Milan Balaz, Harry L. Anderson, and Marina K. Kuimova. *Unravelling the effect of temperature on viscosity-sensitive fluorescent molecular rotors*. In: *Chemical Science*, vol. 6, no. 10, (2015), pp. 5773–5778.
- [34] Ismael López-Duarte, Thanh Truc Vu, M. Angeles Izquierdo, James A. Bull, and Marina K. Kuimova. *A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells*. In: *Chemical Communications*, vol. 50, no. 40, (2014), pp. 5282–5284.
- [35] Davoud Ebrahimi, Olena Tokareva, Nae Gyune Rim, Joyce Y. Wong, David L. Kaplan, and Markus J. Buehler. *Silk-Its Mysteries, How It Is Made, and How It Is Used*. In: *ACS Biomaterials Science and Engineering*, vol. 1, no. 10, (2015), pp. 864–876.
- [36] Fiorenzo G. Omenetto and David L. Kaplan. *New opportunities for an ancient material*. In: *Science*, vol. 329, (2010), pp. 528–532.
- [37] Katarzyna Jastrzebska, Kamil Kucharczyk, Anna Florczak, Ewelina Dondajewska, Andrzej Mackiewicz, and Hanna Dams-Kozłowska. *Silk as an innovative biomaterial for cancer therapy*. In: *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, vol. 20, no. 2, (2015), pp. 87–98.
- [38] Jonathan A. Kluge, Olena Rabotyagova, Gary G. Leisk, and David L. Kaplan. *Spider silks and their applications*. In: *Trends in Biotechnology*, vol. 26, no. 5, (2008), pp. 244–251.
- [39] Fatemeh Mottaghitlab, Mehdi Farokhi, Mohammad Ali Shokrgozar, Fatemeh Atyabi, and Hossein Hosseinkhani. *Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system*. In: *Journal of Controlled Release*, vol. 206, (2015), pp. 161–176.
- [40] Tuna Yucel, Michael L. Lovett, and David L. Kaplan. *Silk-based biomaterials for sustained drug delivery*. In: *Journal of Controlled Release*, vol. 190, (2014), pp. 381–397.
- [41] Dimitrios Priftis, Katie Megley, Nicolas Laugel, and Matthew Tirrell. *Complex coacervation of poly(ethylene-imine)/polypeptide aqueous solutions: Thermodynamic and rheological characterization*. In: *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 398, (2013), pp. 39–50.
- [42] Ana Rei, Graham Hungerford, and Maria Isabel C. Ferreira. *Probing local effects in silica sol-gel media by fluorescence spectroscopy of p-DASPMI*. In: *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 112, no. 29, (2008), pp. 8832–8839.

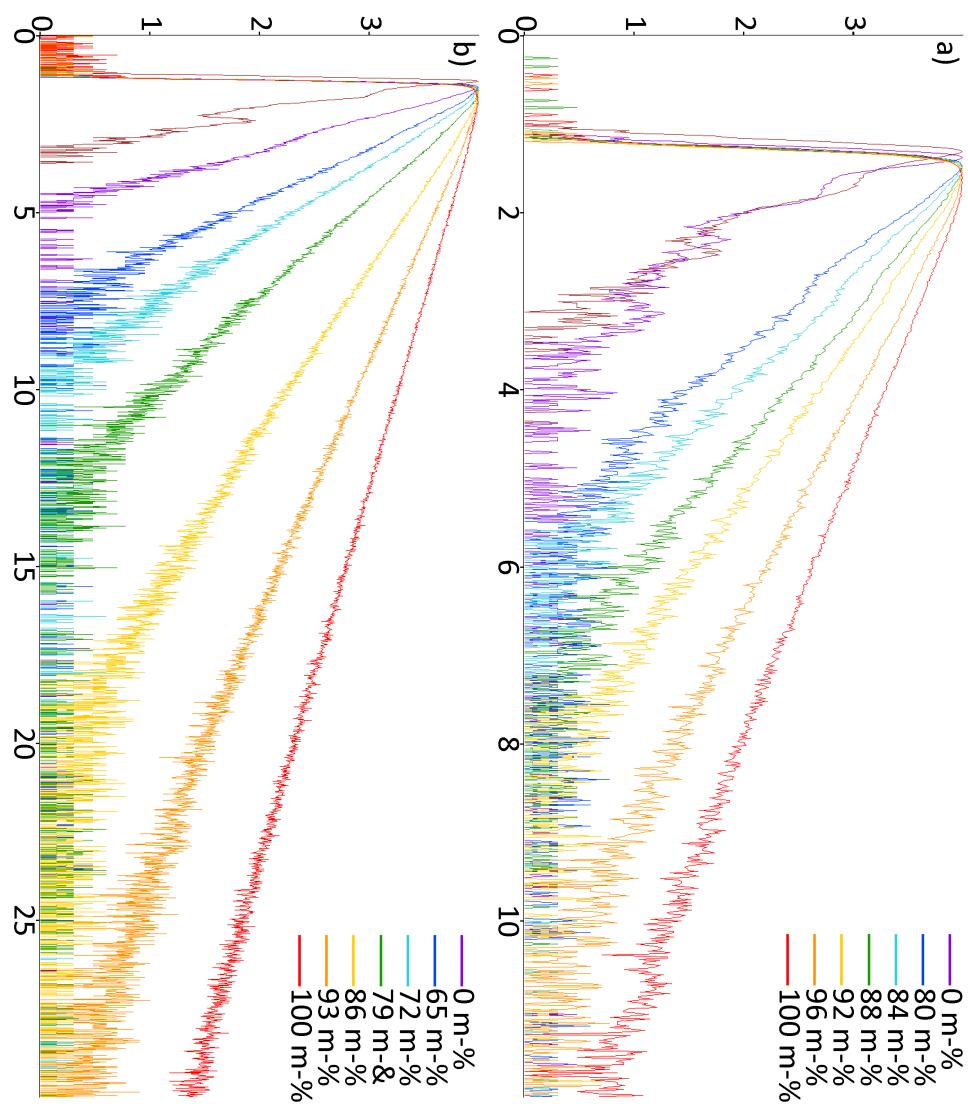
- [43] Richard W Wagner and Jonathan S Lindsey. *Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays*. In: *Pure & Appl. Chem*, vol. 68, no. 7, (1996), pp. 1373–1380.
- [44] HORIBA Instruments Incorporated. *Fluorolog-3 with FluorEssence, Operation Manual*. Jobin Yvon Technology, HORIBA Scientific. 2014.
- [45] Sohail Ahmed, Sudhaharan Thankiah, Radek Machán, Martin Hof, Andrew H. A. Clayton, Graham Wright, Jean-Baptiste Sibarita, Thomas Korte, and Andreas Herrmann. *Practical Manual for Fluorescence Microscopy Techniques*. 2016.
- [46] Michael Wahl. *Time-Correlated Single Photon Counting, Technical Note*. 2014.
- [47] PicoQuant. *MicroTime 200 Fluorescence Lifetime Microscope, User's Manual and Technical Data, Part I. Hardware*. version 4.2. PicoQuant GmbH.
- [48] Käyttäjänimi Cjp24. *Couette rotational rheometer - Plate plate and cone plate systems*. Wikimedia Commons, Saatavissa (viitattu 5.11.2018): https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Couette_rotational_rheometer_-_Plate_plate_and_cone_plate_systems.png.
- [49] *Safety Data Sheet, Paraffin highly liquid Ph Eur, BP, NF, JP*. Toimitettu tuotteen mukana, Versio 3.3. Merck KGaA, 2016.
- [50] David R. Lide. *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-reference Book of Chemical and Physical Data*. 89th ed. Boca Raton (FL) : CRC Press, 2008. 2736 p.
- [51] Petra Paronen. *Vesikkeli-elävä solu -systeemien tutkiminen fluoresenssinäikamikroskopiolla*. Diplomityö. Tampereen teknillinen yliopisto, kemian ja biotekniikan laitos, 2016. 63 p.
- [52] Hanna Rauhala. *Fluoresenssiperusteinen emulsioiden viskositeetin määrittäminen*. Diplomityö. Tampereen teknillinen yliopisto, kemian ja biotekniikan laitos, 2018. 47 p.

LIITE 1. KALIBRAATIONÄYTTEIDEN VISKOSITEETIT JA ELINAJAT

Taulukko 1 Reometrillä 20 °C:ssa mitattujen viskositeettien keskiarvot η_m DASPMin ja BODIPYn kalibraationäytteille sekä väriaineiden elinajat τ_f näissä näytteissä. m_{gly} -% on näyteliuoksen tavoiteltu glyserolin massaprosenttiosuus.

DASPMI			BODIPY		
m_{gly} -%	η_m (mPa s)	τ_f (ns)	m_{gly} -%	η_m (mPa s)	τ_f (ns)
0		-	0	0,587	0,27
	0,972	-		0,601	0,25
		-		0,587	0,25
80	57,9	0,39	65	20,4	0,64
	58,5	0,33		20,0	0,61
	58,9	0,32		18,5	0,61
84	94,1	0,43	72	33,0	0,87
	93,1	0,43		33,2	0,80
	94,4	0,44		33,2	0,78
88	160	0,60	79	70,7	1,19
	162	0,56		69,9	1,17
	162	0,60		69,3	1,18
92	301	0,71	86	163	2,13
	277	0,73		166	2,00
	296	0,72		164	1,92
96	495	1,00	93	414	3,09
	600	1,08		419	3,11
	612	0,96		414	3,08
100	1320	1,47	100	1320	4,81
	1340	1,29		1340	4,60
	754	1,30		1330	4,59

LIITE 2. FLUORESENSIN VAIMENEMISKUVAAJAT



Kuva 1 Esimerkit TCSPC:lla mitatuista fluoresenssin intensiteetin vaimenemiskuvaajista kalibraationäytteissä. a) DASPMin vaimenemiskuvaajia kalibraationäytteissä. b) BO-DIPYn vaimenemiskuvaajia kalibraationäytteissä. Kummassakin kuvassa ruskea käyrä on mitattu instrumenttifunktio. Massaprosenttisuudet viittaavat glyserolin massaprosenttisuuksiin näytteissä. Mittauksissa käytettiin 483 nm:n viritysaallonpituutta.