Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Scuola Politecnica e delle Scienze di Base Area Didattica di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Dipartimento di Fisica "Ettore Pancini"



Laurea triennale in Fisica

Tecnica del conteggio di fotoni correlati temporalmente per misure di vita media di fluorescenza

Relatore: Prof. Raffaele Velotta **Candidato:** Mario Fiorino N85000668

A.A. 2016/2017

Indice

Introduzione
1 Fluorescenza
1.1 Principi generali
1.2 Diagramma di Jablonski
1.3 Fluorofori
1.4 Vita media (life time) dei fluorofori
1.5 Applicazioni più comuni
2 Time Correlated Single Photon Counting
2.1 Principi del metodo9
2.2 Strumentazione
2.2.1 Sorgente di eccitazione: laser pulsato12
2.2.2 Sistema di lenti convergenti e filtro passa alto
2.2.3 Fibra ottica
2.2.4 Monocromatore14
2.2.5 Tubo fotomoltiplicatore (PMT)14
2.2.6 Elettronica
2.3 Convoluzione del segnale ed il concetto di IRF18
2.4 Elaborazione dati19
3 Risultati e discussione
3.1 Statistica del fotoconteggio21
3.2 Test del software di riconvoluzione iterativa22
3.3 Spettri di assorbimento ed emissione dei fluorofori24
3.4 Misura di vita media di FITC e di Cumarina 125
Conclusioni
Bibliografia

Introduzione

Il presente lavoro di tesi si propone di condurre uno studio sperimentale sui fenomeni legati alla fotoluminescenza, in particolare alla fluorescenza trattata nel dominio temporale.

Nel capitolo uno è stato presentato il fenomeno della fluorescenza, prima nei suoi aspetti teorici quantistici, e poi descrivendola nei suoi aspetti più macroscopici, introducendo il concetto di vita media e le utilità nel campo scientifico.

La tecnica che ha consentito le misure di vita media, il Time correlated single photon counting, è esposta nel capitolo due. In particolare, essa viene descritta nei suoi principi di funzionamento e nei componenti strumentali utilizzati in laboratorio.

Infine, nell'ultimo capitolo si illustrano i risultati conseguiti: è stato testato il software dedicato all'analisi dati mediante simulazioni, che ne hanno confermato l'affidabilità. Successivamente, sono state eseguite misure di vita media di fluorescenza sulla molecola di FITC legata a proteina e Cumarina 1 in etanolo. I risultati ottenuti sono in pieno accordo con gli intervalli presenti in letteratura.

Capitolo 1

Fluorescenza

1.1 Principi generali

I fenomeni di assorbimento e d'emissione di radiazione sono molto frequenti in natura, e lo sfruttamento dei loro principi è assai utile tanto nell'ambito dell'indagine puramente scientifica che negli sviluppi applicativi.

Il fenomeno dell'assorbimento di radiazione in buona sostanza consiste in un aumento dell'energia del sistema molecolare; la maggior parte delle molecole trasforma l'energia assorbita in processi meccanici, non radiativi:

rotazioni, traslazioni e vibrazioni. Solo una piccola parte è in grado di trasferire questa energia con processi di decadimento radiativi: luminescenza, ovvero emissione di fotoni.

La luminescenza viene suddivisa in due categorie: fluorescenza e fosforescenza, distinzione basata esclusivamente sulla differente natura degli stati di eccitazione elettronica.

<u>Fluorescenza</u> : nello stato di singoletto eccitato, l'elettrone promosso nell'orbitale eccitato, è accoppiato con un secondo elettrone, di spin opposto, nello stato fondamentale.



Fig. 1.1 Sono schematizzati lo stato energetico fondamentale e quello eccitato, le frecce indicano lo stato di spin dell'elettrone, up e down.

Il ritorno allo stato fondamentale è una transizione, per spin consentita, ed avviene molto rapidamente con emissione di radiazione, di lunghezza d'onda maggiore rispetto a quella assorbita. Il rate di emissione è tipicamente dell'ordine di 10^8 s⁻¹, così che la vita media (comunemente indicata con il termine "life time" ed il simbolo greco tau τ) sia vicina ai 10 ns.

<u>Fosforescenza</u> : l'emissione di luce si verifica dallo stato di tripletto eccitato, nel quale l'elettrone eccitato ha lo stesso spin dell'elettrone dello stato fondamentale.



Fig. 1.2 Stato eccitato di tripletto T₁

Le transizioni allo stato fondamentale sono proibite, per tanto il rate di emissione è di circa $10^3 - 10^0$ s⁻¹. I tempi di vita media sono tipicamente dei millisecondi.

1.2 Diagramma di Jablonski

I processi che comportano assorbimento ed emissione di radiazione spesso sono schematizzati, resi così maggiormente comprensibili, dai diagrammi di Jablonski.



Fig.1.3 Il diagramma di Jablonski^[1]

Nella figura sovrastante con S_0 è indicato lo stato fondamentale di singoletto, con S_1 e S_2 rispettivamente il primo ed il secondo stato eccitato, sempre di singoletto. Per ognuno di questi stati elettronici esiste un certo numero di sottolivelli vibrazionali, indicati con il numero quantico 0,1,2 ... (si noti che i livelli rotazionali, che dovrebbero dividere ulteriormente ciascun sotto livello vibrazionale, dando un contributo energetico irrilevante per i nostri scopi, non sono rappresentati nello schema). Con T_1 è indicato lo stato di tripletto. Le transizioni tra gli stati sono indicate con linee verticali.

Il diagramma ci mostra come a seguito dell'assorbimento di radiazione, il fluoroforo venga portato ad un sottolivello vibrazionale eccitato dello stato S_1 o S_2 , per poi, molto rapidamente, rilassarsi allo stato vibrazionale più basso del livello S_1 ; questo processo è detto conversione interna, la sua durata è stimata intorno ai 10^{-12} s, e precede il processo di emissione fluorescente.

Tipicamente nel ritorno allo stato fondamentale S₀, il sistema si stanzia ad un sottolivello vibrazionale eccitato, per poi raggiungere l'equilibrio termico.

Nell'emissione di fluorescenza le molecole emettono fotoni di energia correlata al sottolivello vibrazionale dello stato S_0 coinvolto.

Il diagramma mostra anche che molecole nello stato S_1 possono subire una conversione di spin e portarsi allo stato di tripletto T_1 , tale processo è detto intersystem crossing; l'emissione dallo stato T_1 , come poco prima accennato, è detto fosforescenza e generalmente ci si aspetta abbia una lunghezza d'onda maggiore rispetto al caso della fluorescenza.

1.3 Fluorofori

Con il termine fluoroforo (o fluorocromo)vengono indicate le molecole che, dopo avere assorbito fotoni di una certa lunghezza d'onda, emettono fluorescenza. L'emissione fluorescente è strettamente legata all'assorbimento di radiazione, per una radiazione di lunghezza d'onda inferiore a 250 nm, il sistema ha energia sufficiente per diseccitarsi con meccanismi differenti. Più che raro, è pertanto riscontrare il fenomeno in casi di transizione per orbitale molecolare del tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$, diverso è il discorso per processi a bassa energia come $\pi \rightarrow \pi^*$ oppure $n \rightarrow \pi^*$; empiricamente la fluorescenza è molto comune in composti nei quali la transizione energetica minore è del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. [3]

Sono tipicamente fluorescenti i composti policiclici aromatici e loro derivati; in Fig. 1.4 sono esposti alcuni esempi, due dei quali, la Cumarina e la FITC, saranno utilizzate nella misura temporale di fluorescenza.



Fig.1.4 Formula in struttura chimica di cinque composti policiclici aromatici [3]

1.4 Vita media (life time) dei fluorofori

Lo studio sperimentale dei fenomeni di assorbimento ed emissione avviene su popolazioni di molecole; le caratteristiche macroscopiche di tali popolazioni vengono poi estese alle singole molecole.

Un singolo fluoroforo, una volta eccitato, ha un tempo di emissione che può variare in un intervallo che va da qualche nanosecondo fino a qualche decina di nanosecondi, a causa delle molteplici variabili (gradi di libertà del sistema) che entrano in gioco: vibrazioni, rotazioni, conversioni interne, quenching... Nonostante sia ad oggi impossibile monitorare questi fenomeni a livello di singola molecola (detti in letteratura "random events"); si è però in grado di stimare l'intervallo di tempo in cui un numero molto grande di fluorofori decade, e seguirne l'andamento complessivo.

Eccitando un campione di fluorofori con una radiazione, l'equazione che descrive il comportamento complessivo del sistema è la seguente :

$$\frac{\mathrm{d}\,\mathbf{n}(t)}{\mathrm{d}t} = -\,\mathrm{k}\,\mathbf{n}(t) \tag{1.1}$$

dove n(t) indica il numero di molecole eccitate ad un certo istante t;

k, detta costante di diseccitazione, è la somma di tutte le costanti associate ad ogni processo di rilassamento coinvolto nel sistema:

 $\mathbf{k} = \mathbf{k}_{\mathrm{f}} + \mathbf{k}_{\mathrm{ic}} + \mathbf{k}_{\mathrm{isc}} + \mathbf{k}_{\mathrm{cq}} + \dots$

 k_f costante di fluorescenza, k_{isc} costante per inter system crossing, k_{ic} costante di conversione interna, k_{cq} costante di quenching. Il processo con valore di k maggiore domina il decadimento.

In particolare con il termine quenching si indica il processo che porta ad una diminuzione dell'intensità di fluorescenza; diversi tipi di meccanismi possono provocare questa diminuzione, ma il più comune è detto quenching collisionale . Il quenching collisionale si verifica quando lo stato eccitato del fluoroforo è disattivato dal contatto con qualche altra molecola in soluzione.

La soluzione dell'equazione differenziale di primo grado (1.1) si ottiene con un'immediata integrazione ed ha la seguente forma:

$$n(t) = n(0) \exp(-kt)$$
 (1.2)

dove n(0) è il numero di molecole eccitate all'istante t = 0.

Il tempo di vita media del fluoroforo è formalmente definito come:

$$\tau = \frac{1}{k} \tag{1.3}$$

Se una popolazione di fluorofori è eccitata, la vita media τ è il tempo necessario affinché il numero di molecole eccitate decada al 36,8 % del valore iniziale (cioè $n(\tau) = n(0) / e$).

La vita media si può anche definire come il tempo medio in cui un fluoroforo rimane nello stato eccitato; questo formalmente si può ottenere calcolando la media del tempo nello stato eccitato:

$$< t > = \frac{\int_0^\infty t n(t)dt}{\int_0^\infty n(t)dt} = \tau$$
 (1.4)

Infine si noti che l'intensità di fluorescenza è proporzionale al numero degli stati eccitati, questo fa sì che la precedente equazione differenziale (1.1) sugli stati n(t) possa riscriversi come

$$I(t) = I(0) \exp(-\frac{t}{\tau})$$
 (1.5)

dove I(0) indica l'intensità all'istante iniziale.

Le assunzioni fatte in questo paragrafo riguardano il caso di decadimento con andamento mono esponenziale, cioè in presenza di un solo tempo caratteristico, lo stesso che entra in gioco nei fenomeni di fluorescenza misurati durante il lavoro di tesi. Decadimenti che seguono leggi multi-esponenziale (almeno due vite medie distinte) sono tipicamente descritti da equazioni del tipo $n(t) = \Sigma_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$.

1.5 Applicazioni più comuni

La spettroscopia di fluorescenza presenta diversi vantaggi nell'ambito scientifico sperimentale, i più significativi sono l'alta sensibilità di rilevazione, la semplicità ed il basso costo della strumentazione.

Le applicazioni maggiormente utilizzate riguardano:

- L'analisi della struttura delle proteine (fluorescenza dei residui aromatici).
- Gli studi sul trasferimento dell'energia (trasferimento dell'energia per risonanza tra un gruppo donatore ed uno accettore).
- La distinzione di cellule tramite marcatura con anticorpi fluorescenti.

Capitolo 2

Time Correlated Single Photon Counting

2.1 Principi del metodo

La maggior parte delle misure nel dominio del tempo(Fluorescence Lifetime Measurements, DNA Sequencing, Optical Tomography, Detection and Identification of Single Molecules), attualmente, viene effettuate attraverso la tecnica del Time Correlated Single Photon Counting; questa è in grado di registrare segnali luminosi estremamente deboli con una risoluzione temporale dell'ordine del picosecondo, se non, nei casi più sofisticati, del femtosecondo (10^{-15} s) .

La tecnica consiste nel rilevamento di singoli fotoni emessi dal campione fluorescente, stimolato ripetutamente da un laser impulsato, e la misurazione dei loro tempi di arrivo rispetto ad un segnale di riferimento (il laser). Grazie agli alti tassi di ripetizione, si è in grado di accumulare un numero sufficiente di eventi da elaborare statisticamente.

L'esperimento parte con l'impulso di eccitazione del laser, che stimola il campione facendo in modo che possa emettere fluorescenza, questa tramite un sistema di lenti viene convogliata in fibra, e portata ad un monocromatore, che, dopo aver discriminato la radiazione, la invia ad un rivelatore (fotomoltiplicatore PMT) dove viene trasforma in un segnale elettronico.

Se necessario questo è ulteriormente amplificato, per poi passare attraverso un discriminatore (CDF) e dare lo stop ad un condensatore elettronico (TAC), il quale nel frattempo aveva ricevuto dal sync legato al driver del laser un segnale di start e generato una rampa di tensione. Il TAC ora contiene informazioni proporzionali al tempo Δt_i tra l'arrivo dell'eccitazione e la successiva emissione del fotone. La tensione è poi convertita in valori digitali (mediante ADC), conservati in memoria come singolo evento con la relativa informazione sul tempo rilevato. Un istogramma, il cui asse delle ascisse è suddiviso in canali temporali (Δt_i) e le cui ordinate indicano il numero di fotoni contati, è ottenuto ripetendo il processo più volte.



Fig. 2.1 Il diagramma schematizza il funzionamento complessivo della tecnica di misura TCSPC



Fig. 2.2 In funzione del tempo, è rappresentato il processo elettronico alla base del TCSPC [6]

Fondamentale per la TCSPC è la condizione per cui il tasso di rilevamento si assesti almeno intorno a 1fotone/100 impulsi del laser. Il tempo necessario all'apparato elettronico per elaborare il segnale, detto dead time, è di 100 ns(tempo molto maggiore rispetto ad un decadimento di fluorescenza), durante questo tempo non può essere rilevato nessun ulteriore fotone. Se dopo l'impulso di eccitazione viene emesso più di un fotone, sarà registrato soltanto il primo; il successivo verrà irrimediabilmente perso, comportando così una perdita di informazione sul decadimento fluorescente.

Un metodo pratico usato in laboratorio per evitare questa sovrapposizione di fotoni, detta pulse pile-up, è quello di lavorare con basse intensità del laser, così che la probabilità di rilevare più di un fotone per ciclo di eccitazione sia minore del 1%.

In figura sottostante sono mostrati gli effetti su una curva di fluorescenza mono esponenziale nel caso in cui più di un fotone arrivi al rivelatore. I numeri in colonna sulla destra del lettore (0 - 0.3 - 0.72 - ...) sono il numero di fotoni "indesiderati" arrivati per ciclo di eccitazione. Si osserva che più piccolo è questo valore, più il decadimento tende alla curva a "0 fotoni/impulso", ovvero il decadimento ideale.



Fig. 2.3 Simulazione di decadimento di fluorescenza mono esponenziale in funzione del numero di fotoni "indesiderati" in arrivo [1]

2.2 Strumentazione

In questo paragrafo verrà descritta e spiegata nei suoi principi di funzionamento la strumentazione utilizzata per le misure di fluorescenza mediante la tecnica TCSPC. Fig. 2.4 ne schematizza i singoli elementi, fornendo una mappa al lettore per i sotto-paragrafi successivi.



Fig. 2.4 Setup sperimentale. Nello schema è descritto con delle frecce il percorso dei segnali in gioco che porteranno alla creazione dell'istogramma in display. Si noti una differenza tra le condizioni di start e stop descritte nella presentazione e quelle in figura nella scheda SPC-130 EM : esse sono invertite; verrà spiegato nel capitolo riservato alla TAC il come ed il perché nell'attuale elettronica si preferisca lavorare in tale modalità, detta reverse mode.

2.2.1 Sorgente di eccitazione: laser pulsato

La misura del decadimento di fluorescenza necessita di una sorgente di eccitazione che consenta al processo di verificarsi. Per le misurazioni in questione si è utilizzato un diodo laser pulsato, della PicoQuant, modello PDL 800-B; lunghezza d'onda di emissione a 406 nm, ideale per eccitare una vasta gamma di fluorofori; potenza ottica regolabile, con picco ad 1 W; ampiezza di impulso (FWHM) inferiori ai 70 ps, più che sufficiente per la misurazione di decadimenti dalla vita media sull'ordine del nanosecondo; e repetition rate

regolabile che arriva ad un massimo di 80 MHz; ciò può essere sfruttato per ridurre i tempi necessari per la misura.

Il driver del laser provvede anche a mandare il segnale di sync necessario per la misura del tempo di arrivo del fotone. Questo è collegato direttamente alla scheda madre del PC con cavo coassiale standard (50 Ohm).

2.2.2 Sistema di lenti convergenti e filtro passa alto

Lo scopo del sistema ottico è di raccogliere il raggio luminoso e convogliarlo in fibra ottica, riducendo al minimo i fenomeni di dispersione. Il sistema di lenti utilizzato è della Thorlabs lens/lcp, distanza focale 2 cm, questo è stato fotografato e mostrato in Fig. 2.5; mentre in Fig. 2.6 è schematizzato il processo di convergenza delle lenti.



Fig. 2.5 / Fig. 2.6 Foto del sistema ottico e schema del suo funzionamento.

In foto è possibile vedere anche un'ulteriore lente, esterna al sistema ottico, questa funge da filtro (cut-off)che taglia ogni radiazione al di sotto dei 410 nm. Essa verrà inserita al momento della misura di fluorescenza, filtrando il segnale fluorescente da qualsiasi residuo di radiazione del laser.

2.2.3 Fibra ottica

Una volta convogliato dalle lenti, il raggio luminoso viene messo in fibra ottica. Il cavo utilizzato è della HELLMA, codice identificativo 041.202-UVS, di lunghezza 1 metro; core dal diametro di 600 μ m ed indice di rifrazione di 1,47. Questo è disposto in modo da ridurre al minimo le curvature, ottimizzando la propagazione guidata della radiazione al monocromatore.

2.2.4 Monocromatore

Per discriminare la radiazione di fluorescenza, riducendo così la probabilità di effetti di disturbo ottico (rumore di fondo); si è utilizzato un monocromatore Czerny Turner, il cui principio è spiegato brevemente in Fig 2.7



Fig. 2.7 Schema del funzionamento del monocromatore Czerny Turner [10]

Si può vedere in colore violetto, la radiazione che attraversa la fenditura di ingresso, per poi essere raccolta da uno specchio curvo (collimatore). La luce collimata (ovvero focalizzata all'infinito) viene scomposta dalla grata di diffrazione, per poi essere raccolta da un altro specchio ricurvo, ed infine spedita alla fenditura di uscita, discriminata.

2.2.5 Tubo fotomoltiplicatore (PMT)

Lo scopo del fotomoltiplicatore è quello di captare il singolo fotone e convertirlo in segnale elettrico. I fotoni in ingresso colpiscono una superficie fotosensibile, chiamata fotocatodo, ricoperta di uno strato di materiale che induce l'effetto fotoelettrico. A causa di questo effetto vengono emessi degli elettroni, detti fotoelettroni, che guidati da una serie di elettrodi, detti dinodi, ciascuno caricato con un potenziale superiore a quello precedente, innescano il processo di moltiplicazione per emissione secondaria; fino alla produzione di un segnale in uscita. Fig. 2.8 schematizza quanto detto.



Fig. 2.8 Schema del funzionamnto del PMT [6]

Il fotomoltiplicatore utilizzato è il modello H9305-03 dell'azienda giapponese Hamamatsu. Opera in un intervallo di lunghezze d'onda che va dai 185 nm fino 900 nm, le misurazioni in laboratorio si assestano tra i 400 nm fino i 550 nm.

2.2.6 Elettronica

Dall'anno 2000 in poi, tutti i componenti elettronici necessari per l'applicazione del TCSPC possono essere contenuti su una singola scheda integrata di un computer. Questo è anche il nostro caso; l'intera elettronica della misura ha fatto affidamento sulle prestazioni della scheda SPC-130-EM TCSPC della Becker & Hickl GmbH.

Il segnale fotoelettrico in uscita dal PMT viene elaborato da un discriminatore.

Discriminatore

Lo scopo del dispositivo è di eleminare i rumori di fondo e generare segnali che siano indipendenti per forma ed ampiezza dagli impulsi elettronici provenienti dal PMT, conservandone il più possibile l'informazione temporale di arrivo. Nei PMT generalmente l'ampiezza di tali impulsi varia in modo significativo.

Questo scopo non può esser semplicemente raggiunto da un discriminatore a soglia, in quanto la discriminazione viene di norma fatta sul tempo di salita del segnale (leading edge), ci sarebbero così problemi di temporizzazione quando il voltaggio di soglia viene raggiunto a tempi diversi per segnali di ampiezze diverse (incremento del timing jitter). Questo problema può essere eliminato richiedendo che una frazione costante del segnale superi un valore preselezionato; pertanto ci si avvale dell'utilizzo di un discriminatore a frazione costante (CFD).



Fig. 2.9 Sono messi a confronto un discriminatore a soglia(level trigger) e l'operazione di CDF. Nella prima immagine si vede un errore sul tempo dovuta alla differente altezza dell'impulso. Cosa che non succede nella seconda immagine dove opera un CFD. Nota: il voltaggio è rappresentato negativo poiché così esce dal PMT.^[11]

Il modo più comune di implementare il CFD è quello si dividere il segnale in due parti: una ritardata di circa metà dell'ampiezza dell'impulso; mentre l'altra è invertita. Quando le due parti sono ricombinate, il punto "zero-crossing" (dove il segnale cambia segno) è indipendente dall'ampiezza dell'impulso di input.



Fig. 2.10 Schema del funzionamento del CFD [1]

Il CFD permette anche la configurazione del livello più basso di ampiezza che l'impulso rilevato deve avere," limit lower" è il nome che viene dato a tale funzione. Così i rumori di fondo, le cui origini possono esser tanto elettroniche, si pensi ad esempio alla componente random intrinseca della moltiplicazione elettronica nel PMT, quanto ottiche, generalmente riflessioni, o legate alle condizioni ambientali in cui si opera, luce proveniente da fonti diverse da quelle del fluoroforo, possono essere soppressi.

<u>Time-to-amplitude converter (TAC)</u>

Obiettivo del TAC è quello di generare un segnale di tensione proporzionale al tempo tra l'impulso di eccitazione e l'emissione del fotone, i due impulsi sono rispettivamente il sync del driver del laser che funge da start, e l'arrivo del fotone che fa da stop. Tale segnale è ottenuto tramite il caricamento di un condensatore durante l'intervallo di tempo che separa i due impulsi.



Fig. 2.11 In figura è mostrato il meccanismo di carica/scarica del condensatore in dei segnali di start (LASER) e stop (PMT)^[11]

Ad esempio, per un condensatore che è in grado di caricarsi da 0 a 10 Volt con un tempo di 50 ns, se l'impulso di stop arriva a 25 ns, la carica si fermerà a 5 Volt. Diversamente, se il segnale di stop non arriva, il TAC continuerà a caricarsi fino a raggiungere il voltaggio massimo.

Il TAC rappresenta un'importante criticità nella TCSPC, in quanto è necessario un tempo significativo per la scarica/reset del condensatore, con l'attuale strumentazione circa 100 ns (tempo denominato dead time). La soluzione a questo problema è quella di far operare il TAC in modalità invertita, detta reverse mode, in cui il primo fotone che arriva funge da start ed il sync del driver del laser funge da stop, precisamente, il sync collegato all'impulso di eccitazione del laser che immediatamente segue quello che ha permesso al fluoroforo di emettere il fotone. In questo modo il TAC è attivato esclusivamente se il fotone emesso è rilevato. La scheda SPC-130-EM con cui sono state prese le misure opera in modalità reverse mode.

ADC – Memoria

La tensione ottenuta dal TAC viene così elaborata da un convertitore analogico digitale (ADC) che provvede a convertire il segnale di tensione in una serie di valori discreti (digitali). L'operazione è estremante rapida e non influisce sul dead time complessivo.

I singoli eventi sono registrati e conservati in memoria incrementando di "1" nella location di memoria collegata all'intervallo di tempo rilevato. Dopo molti fotoni è possibile dare forma ad un istogramma.

Delay lines

La strumentazione usata per la TCSPC è stata progettata nel suo complesso in modo da tener conto degli inevitabili tempi di ritardo dei suoi singoli componenti: mi riferisco al fatto che il segnale elettronico necessita 1 ns per percorrere 30 cm, per un metro di fibra ottica sono necessari circa 5.5 ns, il PMT ha tempi di risposta dell'ordine di 1,4 ns... tempi non trascurabili se si intende misurare vite medie di qualche nanosecondo attraverso l'uso di un sistema sincronizzato.

2.3 Convoluzione del segnale ed il concetto di IRF

Matematicamente la convoluzione è un'operazione tra due funzioni di una variabile, f(x) e g(x) definite da R in R, che consiste nell'integrare il prodotto tra la prima e la seconda traslata di un certo valore:

$$(f * g)(x) \coloneqq \int_{-\infty}^{+\infty} f(\varepsilon)g(x - \varepsilon)d\varepsilon = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x - \varepsilon)g(\varepsilon)d\varepsilon \qquad (2.1)$$

Spesso rappresentata più semplicemente con il simbolismo

$$(f * g)(x) = f(x) \otimes g(x)$$
(2.1.b)

Nel nostro caso la misura dell'intensità di decadimento è una convoluzione con l'impulso di eccitazione. Nel capitolo uno è stata definita intensità del decadimento di fluorescenza teorica, caratterizzata dal parametro vita media τ , con la formula:

$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$
(2.2)

Il reale decadimento di fluorescenza è una convoluzione con il profilo dell'impulso di eccitazione (il laser), indicato con P(t),

$$I(t)_R = I(t) \mathscr{D} P(t) . \tag{2.3}$$

Il decadimento di fluorescenza misurato è una convoluzione del decadimento reale $I(t)_R$ con la risposta del rilevatore R(t)

$$I(t)_M = I(t)_R \mathscr{D}R(t) \tag{2.4}$$

Quindi ricordando equazione (2.3) e sostituendola opportunamente nella (2.4) otteniamo:

$$I(t)_{M} = I(t) \otimes P(t) \otimes R(t) = I(t) \otimes IRF(t)$$
(2.5)

IRF acronimo della sigla inglese "instrument response function" indica la risposta dello strumento all'impulso di eccitazione, ovvero la risposta dello strumento ad un campione di vita media τ uguale a zero. Quando vengono effettuate le misurazioni, il primo campione su cui viene indirizzato il laser è il solvente (nelle misurazioni effettuate etanolo puro e acqua distillata) che non contiene ancora fluorofori, questi saranno immessi in un secondo momento per la misura del decadimento di fluorescenza. Pertanto, per IRF si intende la risposta del rivelatore all'eccitazione del laser, agente sul campione a vita media zero (ovvero il background in cui sarà immesso il fluoroforo).

L'istogramma dell'IRF aspettato è una gaussiana, piuttosto stretta, la cui ampiezza dipende tanto dalle caratteristiche dell'impulso incidente quanto quelle del rivelatore(PMT) e dell'elettronica.

2.4 Elaborazione dati

Il software utilizzato per determinare la curva di fit del decadimento è reperibile fluortools.com/software/decayfitun.

La tecnica per determinare la curva di fit si basa sull'equazione (2.4), ovvero

$$I(t)_M = I(t) \otimes IRF(t)$$

dove $I(t)_M$ rappresenta i dati raccolti, cioè l'istogramma associato alla fluorescenza del campione, IRF(t) la misura della risposta dello strumento all'impulso di eccitazione, e I(t) la curva di fit da determinare.

La procedura di fitting si basa su:

$$\chi^{2} = \sum_{i=1}^{n} [N_{m}(t_{i}) - N_{c}(t_{i})]^{2} \frac{1}{\sigma_{i}^{2}}$$
(2.6)

n è il numero di canali, che nelle misurazioni qui presentate ha un valore di 10³.

 $N_m(t_i)$ il numero di conteggi misurati nei relativi canali Δt_i

 $N_c(t_i)$ il decadimento calcolato dal software

 σ_i la deviazione standard.

Durante l'elaborazione una certa legge di decadimento "artificiale", simulata cioè dal software sulla base di un modello, I(t), è convoluta con l'IRF(t) misurato; il risultato ottenuto è poi confrontato con i dati raccolti $N_m(t_i)$. Questa procedura è detta riconvoluzione iterativa.

L'accuratezza della misura è data dalla deviazione standard del numero di fotoni contati in ogni canale temporale. Sulla base della statistica di Poissoin che governa il fenomeno, abbiamo che

$$\sigma_i = \sqrt{N_m(t_i)} \tag{2.7}$$

Poiché il valore di χ^2 dipende da un numero molto grande di dati, per valutarne la bontà si preferisce lavorare sul χ^2 ridotto

$$\chi_R^2 = \frac{\chi^2}{\nu} \tag{2.8}$$

v è il numero di gradi di libertà, quando il valore di n è molto grande (come negli esperimenti effettuati) allora si approssima $v \operatorname{con} n$.

Se solo errori statistici hanno condizionato la misura, il valore di χ_R^2 dovrebbe essere uno; si tenga però presente che, essendo la tecnica del TCSPC estremamente complessa, gli errori sistematici facilmente possono incidere sul valore del χ^2 dal 10% al 20 %. ^[1]

Capitolo 3

Risultati e discussione

3.1 Statistica del fotoconteggio

La statistica di Poisson descrive la probabilità che un certo numero di eventi indipendenti si ripetano in un dato intervallo temporale. Il fenomeno del fotoconteggio è condizionato da tale statistica. Il suddetto aspetto è stato verificato attraverso il processo di misura nel modo seguente: si è scelto un intervallo di canali il cui numero di conteggi fosse più o meno lo stesso, il rumore di fondo, ed elaborato un istogramma il cui risultato è mostrato in Fig.3.1



Fig.3.1 In figura si osserva il profilo dell'istogramma dei fotoconteggi misurati(in totale 243) confrontato con la distribuzione aspettata di Poisson $P_{4,1}(n)$

L'istogramma risulta del tutto compatibile con la distribuzione di valore medio 4.1, confermando l'assunto che il rumore di fondo è soggetto alla statistica di Poisson.

3.2 Test del software di riconvoluzione iterativa

Il software DecayFit è stato testato simulando un segnale sperimentale ottenuto da un IRF, scegliendo un'onda triangolare, ed un'esponenziale $a \exp(-t/\tau)$, il segnale S(t) in questo caso sarà il seguente:

$$S(t) = \int_{0}^{t} at' e^{-(t-t')/\tau} dt' \qquad 0 \le t \le \tau_{p}$$

$$S(t) = \int_{0}^{\tau_{p}} at' e^{-(t-t')/\tau} dt' \qquad t > \tau_{p} \qquad (3.1)$$

Con valori a = 1, $\tau = 4$, $\tau_p = 0.3$ (3.2)

I risultati sono riportati nel grafico in Fig. 3.2.



Fig.3.2 Simulazione in assenza di fluttuazioni. In blu IRF, in rosso il decadimento, in nero la curva di fit elaborata dal software, nel grafico secondario, i residui. Valore del χ^2_R =0.09. Valore della vita media τ = 4.01 ns.

Il tempo di vita media ottenuto $\tau = (4.01 \pm 0.01)$ è in perfetto accordo con il valore atteso. Come ci si aspettava, le curve di decadimento e di fit sono sostanzialmente sovrapposte. Il valore del $\chi^2_R = 0.09$ così basso è legato al fatto che nella simulazione non sono entrate in gioco fluttuazioni .

Al fine di riprodurre un segnale più realistico, influenzato dalla statistica di Poisson, è stato implementato un programma che ha consentito di raffinare la simulazione mediante l'estrazione di numeri casuali dalla distribuzione seguita dai canali del decadimento ottenuto dalla (3.1) e (3.2). Il grafico mostra i risultati ottenuti.



Fig. 3.3 Simulazione con fluttuazioni.In blu IRF, in rosso il decadimento, in nero la curva di fit elaborata dal software, nel grafico secondario, i residui. Valore del $\chi_R^2 = 1.05$. Valore della vita media $\tau = 4.02$ ns.

Anche nel caso in cui sono state introdotte fluttuazioni statistiche, il software ha restituito un fit in ottimo accordo con i parametri dati in input, restituendo i valori $\tau = (4.02 \pm 0.02)$ ns e $\chi_R^2 = 1.05$.

3.3 Spettri di assorbimento ed emissione dei fluorofori

I florofori utilizzati sono FITC e Cumarina 1, i cui spettri di assorbimento ed emissione sono riportati rispettivamente in Fig.3.4 e Fig 3.5.



Fig.3.4 Spettro di assorbimento ed emissione della FITC.Assorbimento massimo lunghezza d'onda 495 nm, emissisone 519 nm. ^[15]



Fig.3.5 Spettro di assorbimento ed emissione della cumarina 1.Assorbimento massimo lunghezza d'onda 375 nm, emissisone 445nm. [15]

3.4 Misura di vita media di FITC e di Cumarina 1

Come spiegato nel capitolo due la necessità che il tasso di rilevamento fotoni/impulsi eccitazione sia inferiore all'1/100 è imprescindibile; impostare il laser su un rate di 40 MHz comporta che la cadenza ottimale di conteggio sia dell'ordine di 10⁵ Hz o inferiore. Modulando l'intensità del laser, tutte le misurazioni sono state eseguite con cadenze di conteggio sull'ordine di 10⁴ Hz; portando la probabilità del fenomeno pulse pile-up al di sotto del 0.01%.

Il rumore ambiente e quello elettronico sono inevitabili in un processo fisico di misura; un discriminatore impostato su valori troppo bassi lascerebbe passare informazioni estranee al fenomeno di fluorescenza, se troppo alti, la probabilità di perdita di informazione inciderebbe sulla misura. Di conseguenza tensione di soglia del conteggio e guadagno del rilevatore sono stati ottimizzati per minimizzare questo aspetto.

Il campione su cui è stata effettuata la misura è la molecola di FITC, isotiocianato di fluoresceina, legata all'anticorpo IgG anti-mouse, con concentrazioni di 100 μ g/mL. La radiazione di fluorescenza, di lunghezza d'onda di 516 nm, opportunamente raccolta dal sistema di lenti e in fibra è stata prima discriminata dal monocromatore, trasformata dal PMT in segnale elettronico ed elaborata dal sistema elettronico. I fotoni rilevati sono stati inseriti in un istogramma con canali temporali di ampiezza 50 ps.



Nel grafico sono mostrati i risultati in scala logaritmica.

Fig. 3.6 Grafico fluorescenza FITC.

In blu IRF, in rosso il decadimento del fluoroforo misurato, in nero la curva di fit elaborata dal software, nel grafico secondario, i residui. Valore del $\chi_R^2 = 1.77$. Valore della vita media $\tau = 4.0$ ns.

La curva di decadimento presenta un profilo mono esponenziale, con l'accentuarsi di fluttuazioni dove il numero di conteggi è minore. La curva di fitting elaborata dal software sembra non riesca ad adattarsi perfettamente alla salita, tra i 5 ed i 6 ns, questo influisce lievemente sull'inclinazione della intera curva (dai 6 ns in poi) e porta i valori del $\chi_R^2 = 1.77$. Un calcolo del χ_R^2 per i soli valori corrispondenti all'intervallo che va dai 6 ai 24 ns, ha portato al seguente valore del $\chi_R^2 = 1.25$.

In definitiva il tempo di vita media stimato è $\tau_{\text{FITC}} = (4.0 \pm 0.1)$ ns.

Il risultato è pienamente compatibile con l'intervallo di valori riscontrati in letteratura per quanto riguarda la vita media della fluorescenza della FITC legata a proteine^[13].</sup>

Il secondo campione su cui è stata effettuata la misura di fluorescenza è la molecola di Cumarina 1, concentrazione 5 mg/mL in etanolo. La radiazione di fluorescenza, di lunghezza d'onda di 454 nm è raccolta dall'apparato sperimentale come decritto nel precedente paragrafo.



Fig. 3.7 Grafico fluorescenza Cumarina 1.

In blu IRF, in rosso il decadimento del fluoroforo misurato, in nero la curva di fit elaborata dal software, nel grafico secondario, i residui. Valore del $\chi_R^2 = 1.71$ Valore della vita media $\tau = 2.4$ ns

Anche qui la curva di decadimento ha un profilo mono esponenziale. Anche in questo caso la curva di fit presenta qualche criticità all'altezza della salita, molto minore rispetto al caso precedente; il valore del $\chi_R^2 = 1.71$. Il calcolo di questo, relativo ai soli valori corrispondenti all'intervallo compresa tra i 1,5 ed i 18 ns ha potato al seguente valore di $\chi_R^2 = 1.21$.

Il tempo di vita media stimato è $\tau_{C1} = (2.4 \pm 0.1)$ ns.

In questo caso l'accordo sui valori trovati in letteratura $\tau_{C1} = (3.10 \pm 0.02)$ ns ^[14] risulta leggermente minore, questo è dovuto all' aver lavorato in condizioni di alte concentrazioni di cumarina, di circa due ordini di grandezza maggiori rispetto a quelle utilizzate in [14], a causa della scarsa intensità del segnale di fluorescenza riscontrato in laboratorio. La riduzione della vita media è imputabile ad un effetto di quenching collisionale come descritto nel capitolo uno.

Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi è stata esaminata la tecnica TCSPC per la determinazione della vita media di due florofori standard: FITC e Cumarina 1.

Dapprima è stata esaminata la statistica del fotoconteggio, poi è stato testato con successo il software decayfit, mediante simulazioni opportunamente costruite, consentendo di comprendere più a fondo l'algoritmo di riconvoluzione iterativa su cui il software si fonda.

Infine l'ottimizzazione dell'apparato sperimentale ha consentito di effettuare delle misure sui sopracitati florofori, ottenendo risultati sostanzialmente nell'intervallo di valori riscontrati in letteratura.

Bibliografia

[1] Joseph R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Springer.

[2] D.V.O' Connor and D. Phillips, "Time-Correlated Single Photon Conting", Academic Press.

[3] people.unica.it slide del docente Flaminia Cesare Marincola.

[4] fisica.unipg.it slide del docente Marisa Valdata

[5] Dispense dei docenti Martin Hof e Radek Machan della Czech Technical University of Prague.

[6] Manuale Hamamatsu photon counting_TPHO9001E03

[7] Peter Atkins, Julio De Paula, Chimica Fisica, Zanichelli.

[8] Single-Photon Counting Detectors, Andreas Bulter, Springer

[9] boselec.com/products/documents

[10] Documentazione dal sito chemicool.com

[11] Michael Wahl, Technical Note: Time-correlated single photon counting, PicoQuant GmbH.

[12] DecayFit - Fluorescence Decay Analysis Software 1.4, FluorTools, <u>www.fluortools.com</u>.

[13] Hungerford, Graham, et al. "Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin." Photochemical & Photobiological Sciences 6.2 (2007): 152-158.

[14] Jones, Guilford, William R. Jackson, and Arthur M. Halpern. "Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes." Chemical Physics Letters 72.2 (1980): 391-395.

[15] fluorophores.tugraz.at