

A fluoreszcencia és alkalmazásainak története

History of fluorescence and its applications

Riszter Gergő Attila PhD hallgató

Semmelweis Egyetem – Szerves Vegytani Intézet

riszter93@gmail.com

Initially submitted May 10, 2023; accepted for publication Oct,30,2023

Abstract

Fluorescence is present in many forms in the contemporary research and applied sciences in the industry or medicine too. The fields involved include physics, chemistry, biology and material science. The history of fluorescence goes back to many centuries and there are research activities also in our days to develop methods and devices.

Kulcsszavak: fluoreszcencia, flureszcens festékek, fluoreszcens mikroszkóp, zölden fluoreszkáló fehérje

Key words: fluorescence, fluorescent dyes, fluorescent microscope, green fluorescent protein

A jelenség maga a fotolumineszcencia egyik formája, mely során az anyagot adott (látható vagy nem látható) hullámhosszú fénnel besugározzuk és az így létrejött gerjesztett állapot magasabb hullámhosszú, de alacsonyabb energiájú fotonok kibocsátásával tér vissza a nyugalmi állapotába.

Rokon tulajdonságot mutat a foszforeszcenciával. A különbséget sokáig csak besugárzást követő emittálás idejében látták, a fizikai magyarázatra, amiben a spin multiplicitásnak van szerepe, csak később került sor. Míg a foszforeszcenciánál a gerjesztett triplett állapotból történik az emittálás, amit egy internal crossing (ISC) elnevezésű lépésen keresztül elektron spin átfordulással ér el, a flureszcenciánál gerjesztett szingulett állapotból jut vissza az anyag a nyugalmi szingulett állapotba [1].

Már jóval a tényleges magyarázat előtt akadtak szemtanúi a jelenségnek. Az elsők között említendő a spanyol orvos és botanikus, Nicolás Monardes (1493-1588), aki 1565-ben lejegyezte, hogy egy mexikói fából (*Lignum nephriticum* – texasi vesefa) készült főzet megfelelő körülmények között opálos kék színt ad [2]. Később rájöttek, hogy a növényben található többféle flavonoidok egyike az adott körülmények között a fluoreszcenciát kiváltó vegyületté oxidálódott, ami a **matlanine** nevet kapta. Az elnevezés az azték kék (matlali) szóból eredeztethető, ugyanis az aztékok ezt a főzetet diuretikumként (vizelethajtó) használták már korábban is vesebaj esetén [3] Monardes volt az első, aki a jelenséget analitikai célokra alkalmazta, ugyanis a **hamisított főzetek** nem adták vissza a jegyzett kék színt [2].

Robert Boyle (1627-1691), angol–ír fizikus és kémikus 1664-ben Monardes munkáját követve lejegyezte, hogy sok főzet elkészítése után a fa elvesztette színadó tulajdonságát. Továbbá felfedezte, hogy a sav hozzáadásakor megszűnt a szín és a lúg hozzáadása visszahozta azt, ezáltal ő volt az első, aki leírt egy **sav-bázis fluoreszcens indikátort** [4].

1833-ban a skót fizikus Sir David Brewster (1781-1868) növény levél alkoholos extraktumával foglalkozott, amikor azt észlelte, hogy a megvilágító fehér fény a zöld oldaton

áthaladva vörös fénysugarat eredményez. A jelenséget a klorofill, a növények zöld színanyagának, fluoreszcenciája okozta. Hasonló észrevételt tett bizonyos fluorit kristályok esetén, amelyek megvilágítása kék fénysugarat okozott [5]. Ekkoriban a fénytöréssel vélték magyarázni fluoreszcenciát.

Sir John Herschel (1792-1871), angol polihisztor, **kinin-szulfát** savas oldatának vizsgálatakor kék színt észlelt a folyadék felszínén, míg a többi rész színtelen maradt. 1845-ben a görög felszín szó után **epipolikus diszperzió**nak nevezte el észrevételét. A kristályokon tapasztalt kék színnel megerősítette álláspontját, míg a mexikói fa főzet esetét apró kristályokon történő diszperzióval magyarázta az oldatban [6].

Sir George Gabriel Stokes (1819-1903), ír fizikus és matematikus, 1852-ben publikált írásában többek között kinin és fluorit kristályok vizsgálata után **diszperzív reflexió**nak („szétszóródó visszaverődés”) nevezte és kimondta, hogy a szórt fény hullámhossza, mindig nagyobb lesz, mint az besugárzóé. A kinin oldat vizsgálatkor a napfényt egy prizmával alkotóira bontotta. A látható fény tartományában (380-700 nm) nem érzékelt fényjelenséget, viszont amikor azonban a teszt üveg az ibolyán túli nem látható tartományba ért (<380 nm) a folyadék kéken (~450 nm) fényleni kezdett. Tiszteletére a megállapítását ma **Stokes-törvénynek** nevezzük. Szintén róla lett elnevezve az a paraméter ami az abszorpciós és emissziós spektrumok maximumainak távolságát adja meg (Stokes shift). Ő volt az első, aki használta a fluoreszcencia kifejezést is [7].

Edmond Becquerel (1820-1891), francia fizikus, aki a foszforeszcencia úttörője volt, többek között a **foszforoszkóppal**, megalkotott egy belső felületén lumineszcens anyaggal bevont elektromos kisülési csövet. Ez az alapja a ma is használt fluoreszcens csöveknek, avagy fluoreszcens lámpáknak [8].

Victor Pierre (1819-1886) jött rá kísérletei során, hogy a **fluoreszcens spektrum** az adott anyagra jellemző tulajdonság, miután egykomponensű oldatokat, illetve keverékeket is vizsgált. Ugyancsak vizsgálta a fluoreszcencia pH függését is, milyen hatásai akadnak a savaknak és bázisoknak [9].

Friedrich Göppelsröder (1837-1919) az alumínium kimutatására alkalmazott fluoreszcens komplexálást 1868-ban. A kelátkomplex képző morin alumínium jelenlétében, megnövekedett fluoreszcenciát eredményezett, ami egy széles körben elfogadott módszerré vált a **fém meghatározására** [10]. Ekkor használták először a fluoreszcens analízis kifejezést.

A szintetikus festékanyagok története 1856-ig nyúlik vissza, amikor is a mindössze 18 éves William Henry Perkin (1838-1907) a kinin szintézise közben, ami a malária ellen alkalmazott szer, akaratlanul állította elő a később **mauve** névre keresztelt **lila festékanyagot** [11].

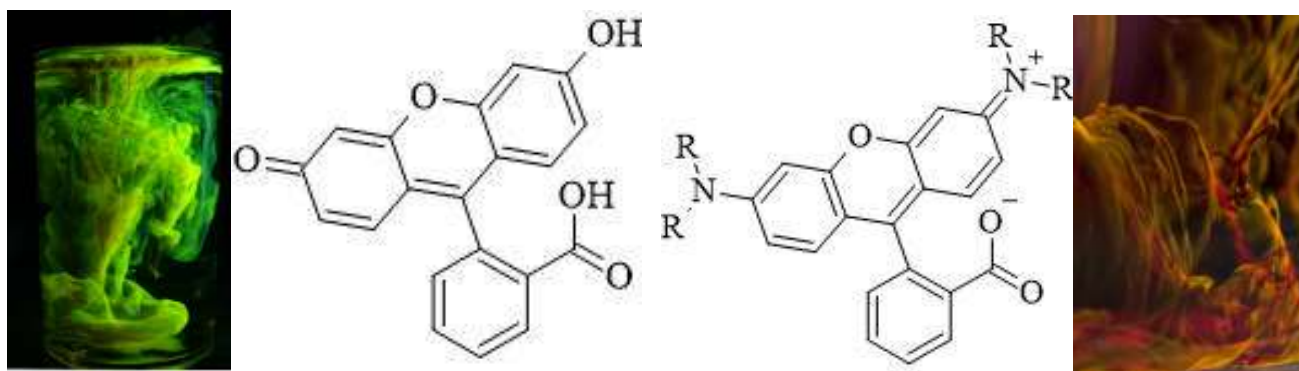
Adolf von Baeyer (1835-1917), német kémikus, 1871-ben szintetizálta a ma **fluoreszcein** (1. ábra) néven ismert sárgás-zöld fluoreszcens vegyületet, ami az alapjául szolgált mára az egyik legnagyobb festékesaládnak, a **xantén-származékoknak**, amik közé tartoznak pl. a rodaminok vagy az Alexa Fluor® színezékek [12]. Baeyer 1905-ben a szerves kémia és a vegyipar fejlesztésében végzett szolgálatai elismeréseként, a szerves festékekkel és **hidroaromás vegyületekkel** kapcsolatos munkájáért kémiai Nobel díjat kapott.

1887-ben Karl Noack könyvében „*Verzeichniss fluoreszierender Substanzen nach der Farbe des Fluoreszenzlichtes geordnet: mit literaturnachweisen*” már 660 fluoreszcens vegyületet jegyzett le.

A **fluoreszcein biológiai alkalmazására** több évtizedet kellett várni. Albert Coons (1912-1978) és munkatársai a reumás lázért felelős baktérium elleni antitesttel dolgoztak. Felismerte a lehetőséget az antitestekhez kapcsolt fluoreszcens molekulákban, melyek a sejtekben vagy szövetekben lehetővé tennék a fehérjékhez való kötődés detektálását, megjelenítését. Ennek nyomán elsőként ki is dolgoztak egy módszert 1941-ben, mellyel a fluoreszceint antitesthez kapcsolták és állati szövetben láthatóvá tették a fehérje kötődést. Megszületett az **immunfluoreszcencia** [13].

1952-ben Gregorio Weber (1916-1942) 1-(dimetil-amino)naftalin-5-szulfonil-kloridot (danzil-kloridot) kapcsolt fehérjékhez. Polarizáció során vizsgált fehérje hidrodinamikát, ami megalapozta a későbbi **kvantitatív fluoreszcens méréseket** [14].

A fluoreszcein alkalmazásának egyik hátránya az **autofluoreszcencia** jelenségében keresendő. Bizonyos biológiai sejtstruktúrák mint a mitokondrium vagy a lizoszóma, fény hatására sugárzást emittálnak, megnövelve a háttérzajt a fluoreszcenciás meghatározásnál, amennyiben az emittált hullámhosszok közel állnak egymáshoz, vagy átfednek. Magának a fluoreszceinnek a rövid hullámhosszú, zöld tartományba eső sugárzása rossz jel/zaj arányt adott az autofluoreszcencia miatt. A festékanyagok fejlesztése ezért eltolódott a nagyobb hullámhosszú, vörös fényt (500-600 nm) emittáló vegyületek irányába. Az első festékcsalád a fluoreszceinnel rokon **rodaminok** (1. ábra) lettek, melyek nagyobb fotostabilitással és pH toleranciával is rendelkeztek [15].

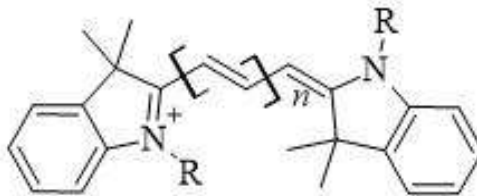


1. ábra A fluoreszcein szerkezete (balra) és a rodamin származékok alapszerkezete (jobbra) és színelkülönbsége (wikipedia)

A rodamin festékek ellenben rosszul oldódtak, és problémás volt az önkioltása (quenching) is az antitest-konjugációkor, mely során elveszik a fluoreszcens intenzitás egy része.

A következő festékcsalád Alan Waggoner nevéhez fűződik. A **cianin származékokkal** (2. ábra) jobb víz oldhatóságot, kisebb mértékű kioltást és szélesebb emittált hullámhossz

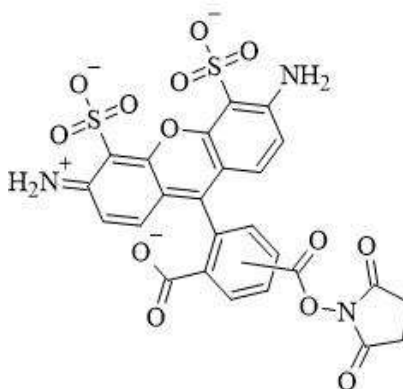
tartományt (560-800 nm) értek el. A tulajdonságok a két heterociklusos gyűrű módosításával, vagy az összekötő polimetin szénlánc hosszával változtathatóak [16].



2. ábra A cianin származékok általános szerkezete

Továbbra is problémát jelentett a **fluoreszcencia intenzitásának csökkenése** fehérjéhez, antitesthez kötődés során, amit a festékmolekulák egymással történő konjugációja során kialakuló nem fluoreszcens aggregátumok képződésével magyaráztak. A megoldást a **szulfonálás** jelentette, ami a negatív töltések révén (SO_3^- csoportok) csökkentette az egymással való kölcsönhatást, aggregátum képződést, valamint növelte a vízzoldhatóságot is, ami néhány magasabb hullámhosszon emittáló festéknél továbbra is problémát jelentett. (A nagy delokalizált rendszerek, aromás benzolgyűrűk vagy konjugált kettős kötések sorozata, amik hozzájárulnak az abszorbeált és emittált hullámhossz változáshoz, általában a lipofilitást növelik, szemben a hidrofíl jelleggel.) A vegyületcsalád a Cy® márkanevvel vált ismertté [17].

A rodamin család tagjai - a cianin festékek sikere után - is átestek a szulfonáláson, hasonló pozitív eredményeket produkálva. Nőtt a **fotostabilitás**, csökkent a kioltás, javult az oldhatóság. Az első származékok óta sok új festéket sikerült előállítani lefedve a spektrumot a kéktől a közeli infra hullámhossz tartományban. Az ebbe a vegyületcsaládba tartozó színezékek az Alexa Fluor® (3.ábra) nevet viselik [18].



3. ábra Egy példa, az Alexa Fluor®

488 szerkezete

A szulfonálás sem a tökéletes megoldás, nehézségek továbbra is akadnak, mint például a negatív töltések miatt kevésbé specifikus kötések létrejötte a biomolekulákban, így mind a mai napig dolgoznak új festékek előállításán.

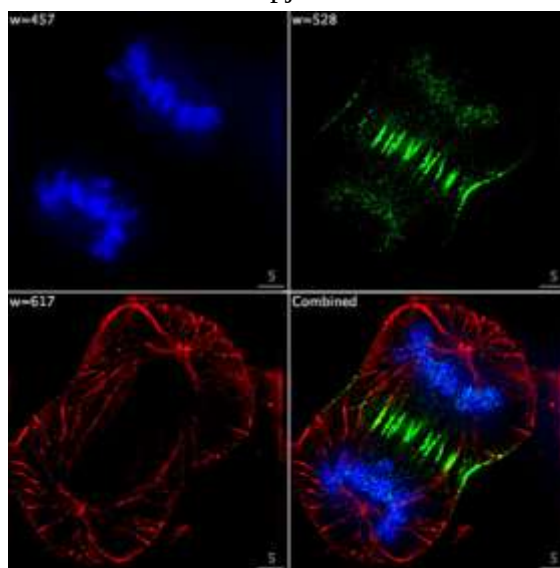
A fluoreszcencia alkalmazásakor meg kell említeni a **fluoreszcens mikroszkópot**. Ez egy olyan optikai mikroszkópos technika, amely fluoreszcenciát és foszforeszcenciát használ szerves vagy szervetlen anyagok tulajdonságainak tanulmányozására, előbbi elsősorban a

sejtbíológiaiában. A vizsgálni kívánt mintáknak a fény által gerjesztett emisszióját képezi le. A sejtekben, szövetekben megtalálható szerves molekulák többsége maguk is rendelkeznek fluoreszcens tulajdonsággal, de festékanyagokat is lehet alkalmazni.

Története 1904-ben kezdődik, amikor August Köhler (1866-1948) megalkotta az ultraibolya abszorpciós mikroszkópot. A vizsgálatait során feljegyezte a fluoreszcencia jelenségét is a látható fény tartományban, annak ellenére, hogy az eszköz az ultraibolya tartományra volt fókuszálva.

1908-ban egy módosított eszközt készített Henry Siedentopf (1872-1940) segítségével, amely az első önálló fluoreszcens mikroszkópnak tekinthető. Heinrich Lehmann egy speciális szűrő segítségével a látható fénytől mentes ultraibolya hullámhossz tartományú spektrumot ért el, mint alkalmazott fényforrás.

Carl Reichert (1851-1922) felismerte a lehetőséget Lehmann munkásságában és támogatta a fluoreszcens mikroszkóp fejlesztését, aminek részleteit Otto Heimstaedt jegyezte le 1911-ben. 1914-ben Stanislav Von Prowazek (1875-1915) többféle fluoreszcens festéket és gyógyszert adott sejtkultúráknak, és fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálta az indukált emissziót. [19]. A 4. ábrán egy modern fluoreszcens mikroszkóp felvétele látható. A különböző színek oka, hogy a fluoroforokat külön-külön leképezik gerjesztési és emissziós szűrőkkel, a végső ábrát a külön-külön leképezett felvételek átfedésével kapjuk.



4. ábra. Elterő hullámhosszokon készített fluoreszcens mikroszkópos felvételek és a kombinált kép (wikipédia)

Egy másik fontos felfedezésként még említést kell tenni a GFP mozaikszóval jelzett zölden fluoreszkáló fehérjéről. 1955-ben Davenport és Nicol publikált egy tanulmányt [20], amely a hidromedúza néven ismert alosztály eozinofiljeinek (fehérvérsejtek egyik csoportja) fotogén szövetét írja le.

1962-ben Osamu Shimomura (1928-2018), Frank H. Johnson (1908-1990) és Yo Saiga biolumineszcens medúzából (*Aequorea victoria*) vett mintákból izolálták a fotogén tulajdonságért felelős komponenst, egy fehérjét, ami ultraibolya, vagy kék fénnel besugározva zöld színnel világít[21]. A fehérjeláncban három egymást követő aminosav közötti kölcsönhatás során alakul ki a kromofór rész, amelyet körbe vesz a fehérje, ezzel ellenállóvá téve. Jelentősége, hogy egyfajta jelzőrendszerként lehetővé teszi a sejtek növekedésének nyomon követését. Egy 1994-ben megjelent publikáció bemutatja prokarióta

és eukarióta sejtekben a GFP-t kódoló gén funkcionális expresszálhatóságát (génkifejeződését), vagyis a DNS-ben tárolt információ meg tud jelenni a sejtek tulajdonságaiban. [22]. Egy évvel később 1995-ben egy-pontos mutációval (egy aminosav cserével) Roger Y. Tsien (1952-2016) és munkatársai jelentős javulást értek el a GFP spektrális tulajdonságaiban, mint megnövekedett fluoreszcencia és fotostabilitás [23]. Gyakorlati jelentősége például a rákkutatásban van, a sejtnövekedés, sejtburjánzás detektálásban, az áttétképződés nyomon követésében. A fontosságát mutatja, hogy 2008-ban Shimomura, Tsien és Martin Chalfie (1947-) kémiai Nobel-díjat kaptak a GFP felfedezéséért és fejlesztéséért.

Látható, hogy jelentős és eredményes múltat tudhat maga mögött a fluoreszcencia és az ehhez kapcsolódó kutatások, de a lehetőség a fejlődésre még mindig adott. A biológiai képalkotás, a festékanyagok és módszerek fontosságát jellemzi, hogy a ACS Publications 2023 áprilisában újonnan induló folyóiratot is szentel e területnek, „Chemical and Biomedical Imaging” címmel.

Felhasznált irodalom:

- [1] BRASLIVSKY, S. E. et al.: Glossary of Terms used in Photochemistry, 3rd edition (IUPAC recommendations 2006), Pure Appl. Chem. 2007, 79, 293465. <https://doi.org/10.1351/pac200779030293>
- [2] ACUNA, A. U.; AMAT-GUERRI, F.: Early History of Solution Fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolas Monardes. In Fluorescence of Supermolecules, Polymers and Nanosystems; Springer Series on Fluorescence, Vol. 4; Berberan-Santos, M. N., Ed.; Springer Verlag: Berlin, 2008; pp 320. https://doi.org/10.1007/4243_2007_006
- [3] ACUNA, A. U.; AMAT-GUERRI, F.; MORCILLO, P.; LIRAS, M.; RODRIGUEZ, B.: Org. Lett. 2009, 11, 3020–3023 <https://doi.org/10.1021/ol901022g>
- [4] BOYLE, R., “Experiments and Considerations Touching Colours” H. Herringman, Anchor, New Exchange, London, 1664. Reprinted by Johnson Reprint Corp., New York, 1964.
- [5] BREWSTER, D.: Trans. R. Soc. Edinburgh 1834, 12, 538–545 <https://doi.org/10.1017/S0080456800031203>
- [6] HERSCHEL, J. F. W.: Philos. Trans. 1845, 143145, 147–153
- [7] STOKES, G. G.: Philos. Trans. 1852, 142, 463–562. <https://doi.org/10.1098/rstl.1852.0022>
- [8] HARVEY, E. N.: A History of Luminescence from the Earliest Times until 1900; The American Philosophical Society: Philadelphia, PA, 1957; Reprinted by Dover publications. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.14249>
- [9] PIERRE, V.: “Ueber die Anwendung der Fluorescenz zur Erkennung von fluorescirenden Stoffe ” [On the use of fluorescence for the detection of fluorescent compounds] . Sitzber. Böhm. Ges. Wiss. Prag. 1862, 2, 6682; 8285.

- [10] GÖPPELSRÖDER, F.: “Ueber eine fluorescirende Substanz aus dem Kubaholze (Fortsetzung) and über Fluoreszenzanalyse” [On a fluorescent substance extracted from Cuba wood and on fluorescence analysis]. *J. Prakt. Chem.* 1868, 104, 10–27. <https://doi.org/10.1002/prac.18681040102>
- [11] BALL, P.: Perkin, the mauve maker. *Nature* 440, 429 (2006). <https://doi.org/10.1038/440429a>
- [12] LAVIS, L. D., RAINES, R. T.: Bright building blocks for chemical biology., *ACS Chem. Biol.*, **9**, 855–866 (2014). <https://doi.org/10.1021/cb500078u>
- [13] COONS, A. H.: The beginnings of immunofluorescence., *J. Immunol.*, **87**, 499–503 (1961). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.87.5.499>
- [14] WEBER G.: Polarization of the fluorescence of macromolecules. II. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochem J.* 1952 May;51(2):155-67. <https://doi.org/10.1042/bj0510155>
- [15] MCKAY, I. C., FORMAN, D., WHITE, R. G.: A comparison of fluorescein isothiocyanate and lissamine rhodamine (RB 200) as labels for antibody in the fluorescent antibody technique, *Immunology*, **43**, 591–602 (1981).
- [16] ERNST, L. A., GUPTA, R. K., MUJUMDAR, R. B., WAGGONER, A. S.: (1989). Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry*, 10(1), 3–10., <https://doi.org/10.1002/cyto.990100103>
- [17] MUJUMDAR, R. B., ERNST, L. A., MUJUMDAR, S. R., LEWIS, C. J., WAGGONER, A. S.: Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters., *Bioconjugate Chemistry*, **4**, (1993). <https://doi.org/10.1021/bc00020a001>
- [18] PANCHUK-VOLOSHINA N., HAUGLAND R.P., BISHOP-STEWART J., BHARGAVA M.K., MILLARD P.J., MAO F., LEUNG W.Y., HAUGLAND R.P.: Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates, *J Histochem Cytochem.* 1999 Sep;47(9):1179-88. <https://doi.org/10.1177/002215549904700910>
- [19] KASTEN, F. H. (1989). The Origins of Modern Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes. *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry*, 3–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417760-4.50008-2>
- [20] DAVENPORT D.; NICOL J. A. C.: Luminescence in Hydromedusae 1955, *Proc. R. Soc. Lond. B*144: 399–411. <https://doi.org/10.1098/rspb.1955.0066>
- [21] SHIMOMURA O., JOHNSON F.H., SAIGA Y.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol.* 1962 Jun;59:223-39. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>

[22] CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W.W., PRASHER D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 1994 Feb 11;263(5148):802-5. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>

[23] HEIM R., CUBITT A.B., TSIEN R.Y.: "Improved green fluorescence", Nature, (Feb 1995) 373 (6516): 663–4. <https://doi.org/10.1038/373663b0>