

Politechnika Łódźka
Wydział Chemiczny
Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej

INSTRUKCJA LABORATORIUM

z przedmiotu

SPEKTROSKOPIA

dla kierunku ANALITYKA CHEMICZNA (I stopień)

Instrukcja do ćwiczenia nr 2

**"Spektroskopowa charakterystyka składu biochemicznego
komórek ludzkich"**

Opracowanie: dr hab. inż. Beata Brożek-Płuska, prof. uczelni
mgr inż. Karolina Beton-Mysur

Łódź, 2023

Spis treści

1. Cel ćwiczenia	2
2. Wprowadzenie.....	2
3. Przebieg ćwiczenia	4
4. Opracowanie sprawozdania	5

1. CEL ĆWICZENIA

Ćwiczenie ma na celu praktyczne zilustrowanie możliwości zastosowania spektroskopii i obrazowania Ramana w analizie próbek biologicznych i wykazanie, że obrazowanie Ramana jest narzędziem umożliwiającym analizę pojedynczych komórek, w tym ich organelli na podstawie identyfikacji unikalnych drgań poszczególnych grup funkcyjnych typowych dla składników komórki budujących poszczególne organelle.

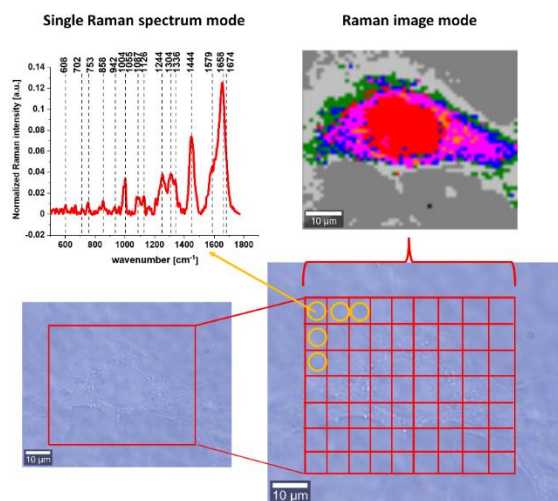
2. WPROWADZENIE

Spektroskopia Ramana jest jedną z najbardziej uniwersalnych spektroskopowych technik analitycznych, umożliwiających określenie składu chemicznego badanego materiału. U swoich podstaw wykorzystuje zjawisko nieelastycznego rozpraszania światła monochromatycznego. Energia światła rozproszonego nieelastycznie jest różna od energii światła padającego na próbkę, a wyżej opisana różnica koresponduje do odległości poziomów oscylacyjnych cząsteczek. Zarejestrowana zmiana energii może zostać przedstawiona graficznie, jako widmo ramanowskie, charakterystyczne dla danej substancji.

Spektroskopia i obrazowanie Ramana mogą być z powodzeniem wykorzystywane m.in. w analizie komórek, ponieważ w rejestracji widm nie przeszkadza woda, która tak bardzo utrudnia pomiary z wykorzystaniem spektroskopii IR. Widma Ramana dostarczają swoisty „odcisk palca” odzwierciedlający molekularny skład mierzonych komórek. Pozwala to na niedestrukcyjny pomiar np. komórek żywych i tkanek w stanie natywnym bez potrzeby uprzedniego wybarwienia lub innego przygotowywania materiału przed pomiarem.

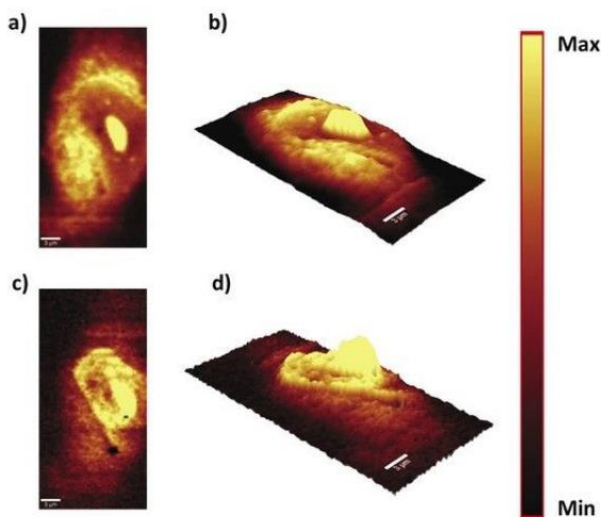
Jednym z najbardziej aktualnych zastosowań spektroskopii i obrazowania Ramana są badania nad komórkami nowotworowymi zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Ilustrację pomiaru w wykorzystaniu spektroskopii i obrazowania Ramana przedstawia Rysunek 1.



Rysunek 1: Ilustracja pomiaru z wykorzystaniem spektroskopii i obrazowania Ramana.

Klasyczna analiza wyników uzyskanych na drodze obrazowania polega na obliczeniu wartości całki (pola powierzchni pod pasmem) w zakresach wybranych pasm występujących na widmach. Rezultatem tej analizy są rysunki w skali kolorystycznej, gdzie dana wartość całki zakodowana jest kolorem według wybranej skali. W jej wyniku uzyskuje się macierz trójwymiarową, gdzie x i y informują o położeniu każdego piksela na mapie, natomiast wymiar z zawiera informację o wartości całki wybranego pasma w danym punkcie (należy pamiętać, że każdy punkt na mapie reprezentowany jest przez jedno widmo).

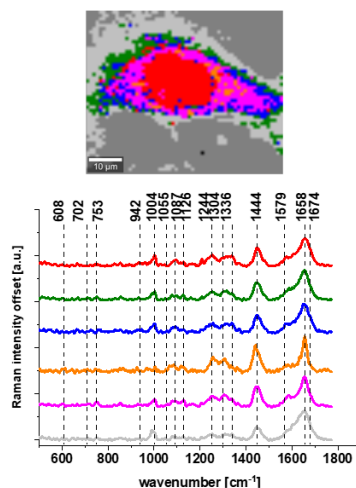


Dystrybucja wybranych składników komórki wykonana na podstawie analizy intensywności ramanowskiej pasm związanych z drganiami rozciągającymi C-H w zakresie $2800\text{--}3020\text{ cm}^{-1}$ (a, b) oraz drgań rozciągających O-P-O w zakresie $1080\text{--}1118\text{ cm}^{-1}$ (c, d). Komórka śródbłonna, linia EA.hy926. Parametry pomiarowe: linia lasera 532 nm, czas integracji 0,5 s, rozmiar obrazowanego obszaru $16,7\times 34,1\text{ }\mu\text{m}^2$, rozdzielczość przestrzenna $0,32\text{ }\mu\text{m}$ (rozmiar obrazu 52×106 punktów)

Rysunek 2: Klasyczna analiza pasm Ramana na podstawie ich intensywności.

Ref. *Spektroskopia oscylacyjna – od teorii do praktyki*, praca zbiorowa pod redakcją K. Małek, Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2016.

Analiza skupień (CA, ang. cluster analysis) to metoda grupowania obiektów do siebie podobnych. W przypadku stosowania analizy skupień, jako metody eksploracji danych zarejestrowanych za pomocą obrazowania w podczerwieni lub ramanowskiego, jako obiekt rozumiane jest pojedyncze widmo reprezentowane przez jeden piksel na obrazie. W rezultacie wynikiem jest uzyskanie wielu grup określanych mianem „klas”. **Przez klasę rozumiana jest grupa widm o podobnym profilu spektralnym.**



Rysunek 3: Analiza Skupień – na podstawie analizy widm Ramana komórki ludzkiej linii komórkowej jelita, wynik własny.

3. PRZEBIEG ĆWICZENIA

1. Zapoznaj się z podstawowymi informacjami dotyczącymi możliwości zastosowania spektroskopii Ramana w biochemicznej charakterystyce komórek ludzkich.
2. Zapoznaj się z podstawowymi informacjami dotyczącymi przygotowania próbki linii komórkowej do analizy spektroskopowej.
3. Zarejestruj widma i mapy Ramana przygotowanych próbek z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu Ramana.
4. Dokonaj analizy map z zastosowaniem odpowiednich filtrów, dedykowanych do śledzenia substancji charakterystycznych dla budowy komórek ludzkich oraz Analizy skupień (zgodnie ze wskazówkami prowadzącego).
5. Dokonaj analizy otrzymanych wyników, w tym porównania opracowania danych z zastosowaniem filtrów oraz Analizy skupień.
6. Przygotuj sprawozdanie z wykonanego ćwiczenia.

4. OPRACOWANIE SPRAWOZDANIA

Sprawozdanie z ćwiczenia nr 2 powinno zawierać:

- a) Stronę tytułową zawierającą:
 - Imię i Nazwisko oraz numer indeksu autora sprawozdania,
 - Imię i Nazwisko prowadzącego ćwiczenie,
 - Nazwę przedmiotu w ramach, którego zostało zrealizowane ćwiczenie,
 - Datę wykonania ćwiczenia,
 - Datę oddania sprawozdania,
 - Numer i tytuł ćwiczenia.
- b) Cel wykonanego ćwiczenia.
- c) Wstęp teoretyczny dotyczący budowy komórek ludzkich (w zależności od zastosowanych w ćwiczeniu komórek, np. żołądka, jelita grubego, itd.).
- d) Opis wykorzystanej w ćwiczeniu aparatury wraz z zastosowanymi liniami wzbudzenia laserowego.
- e) Wydruki i analizę map ramanowskich zarejestrowanych w trakcie zajęć.
- f) Wnioski wpływające z wykonanego ćwiczenia.
- g) Wykaz literatury wykorzystanej do sporządzenia sprawozdania.

Termin oddania sprawozdania: **2 tygodnie** od daty wykonania ćwiczenia.

Sprawozdanie należy złożyć w sekretariacie MITR,
ul. Wróblewskiego 15, budynek C2.