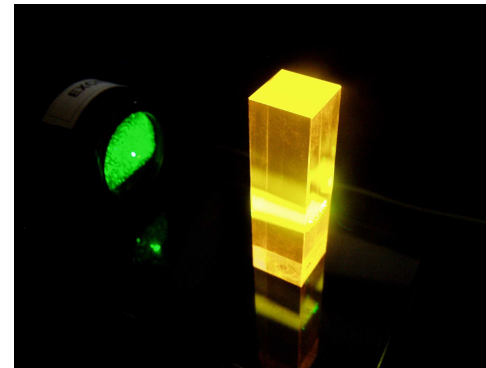
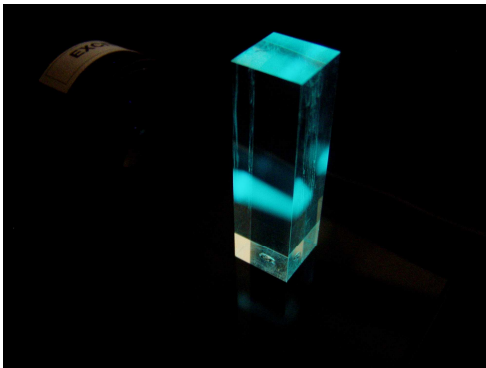


Molekulová luminiscenční spektroskopie

- absorbovaná energie (např. ve formě světelného záření) může být přeměněna na světelnou energii o jiné (většinou vyšší) vlnové délce → luminiscence
- skupina v molekule zodpovědná za luminiscenci (fluorescenci) se nazývá luminofor (fluorofor).
- molekulová luminiscenční spektroskopie je významná analytická metoda.

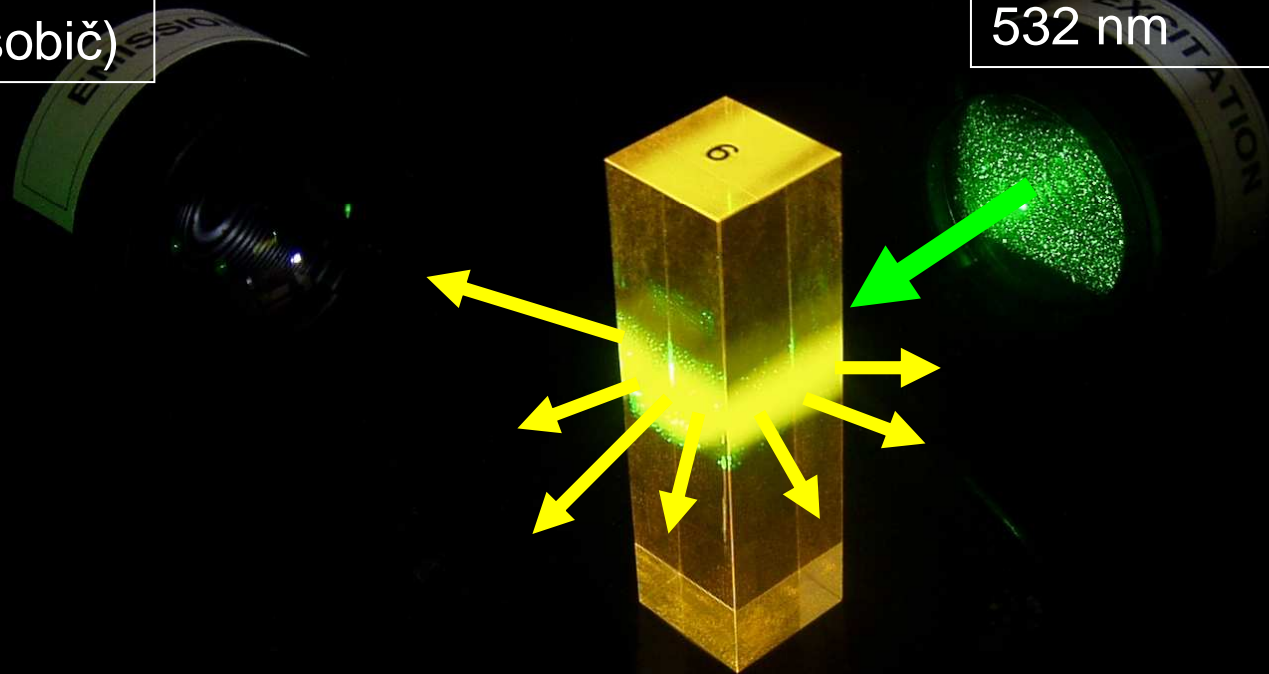


Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

- **fotoluminiscence** - absorpce energie ve formě světla
- **chemiluminiscence** a **bioluminiscence** - zdrojem energie je chemická, nebo biochemická reakce
- **elektroluminiscence** –zdrojem je el. proud
- **radioluminiscence** – zdrojem je radioaktivní záření
- **triboluminiscence** – zdrojem je mechanická energie
- **krystaloluminiscence** – krystalizace je doprovázena luminiscencí
- další zdroje (sonoluminiscence, thermoluminiscence, atd.)

detektor
emise
(fotonásobič)

excitační zdroj
(Xe lampa), $\lambda =$
532 nm



Rozdělení spektrometrických metod

- podstatou většiny spektrometrických metod je sledování interakce elektromagnetického záření s analytem za účelem studia kvality (struktury), nebo kvantity

- atomy a molekuly mohou přijímat, nebo odevzdávat energii do okolí

$$\Delta E = E_{\text{přijata}} - E_{\text{odevzdana}} = h \cdot \nu$$

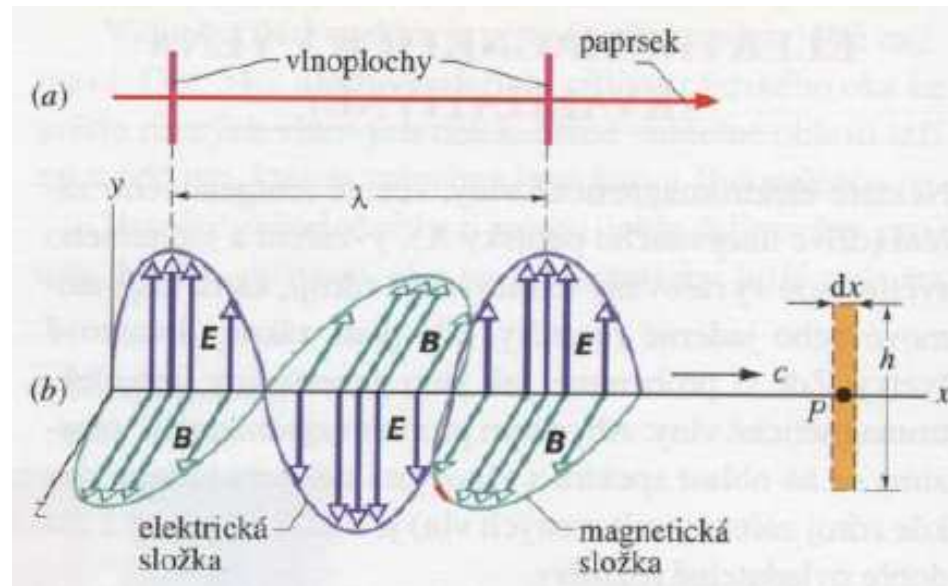
- tato energie je kvantována
- **absorpce energie**: energie je absorbována valenčními elektrony atomů (AAS), vnitřními elektrony (RTG absorpční spektrometrie), vazebnými i nevazebnými elektrony molekulových orbitalů (UV-Vis spektrometrie), případně při absorpci dochází ke změně rotačních a vibračních stavů molekuly (IČ spektrometrie)
- emise energie: excitovaný atom, nebo molekula, která byla převedena dodáním energie do vyššího (excitovaného) stavu, přechází do základního stavu a vyzáří energii
- **fluorescence** a **fosforescence...**
- zvláštním typem interakce je rozptyl (deformační srážky-Raman, Tyndálův rozptyl, atd.)

Molekulová elektronová struktura

- orbitaly a elektrony v molekule, jenž jsou ovlivněny vazebnými interakcemi jsou zodpovědné za vznik elektronových spekter ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra
- platí **Pauliho vylučovací princip**
- nejčastější metody výzkumu molekulové elektronové struktury jsou spektrofotometrie (absorbance) v oblasti UV-Vis, luminiscenční spektroskopie.

Světelné záření

- světlo je elektromagnetické vlnění, které se skládá ze dvou složek: **elektrické** a **magnetické**
- vektor elektrické složky kmitá (osciluje) kolmo na směr šíření paprsku
- vektor magnetické složky je kolmý na směr šíření paprsku a zároveň na vektor elektrické složky



Světelné záření

- světelný paprsek je charakterizován frekvencí (ν) oscilace magnetické a elektrické složky (kolikrát za sekundu je vektor složky v maximu), resp. vlnovou délkou (λ)
- rychlost světla (c) ve vakuu je 3×10^8 m/s
- pro rychlost světla platí:

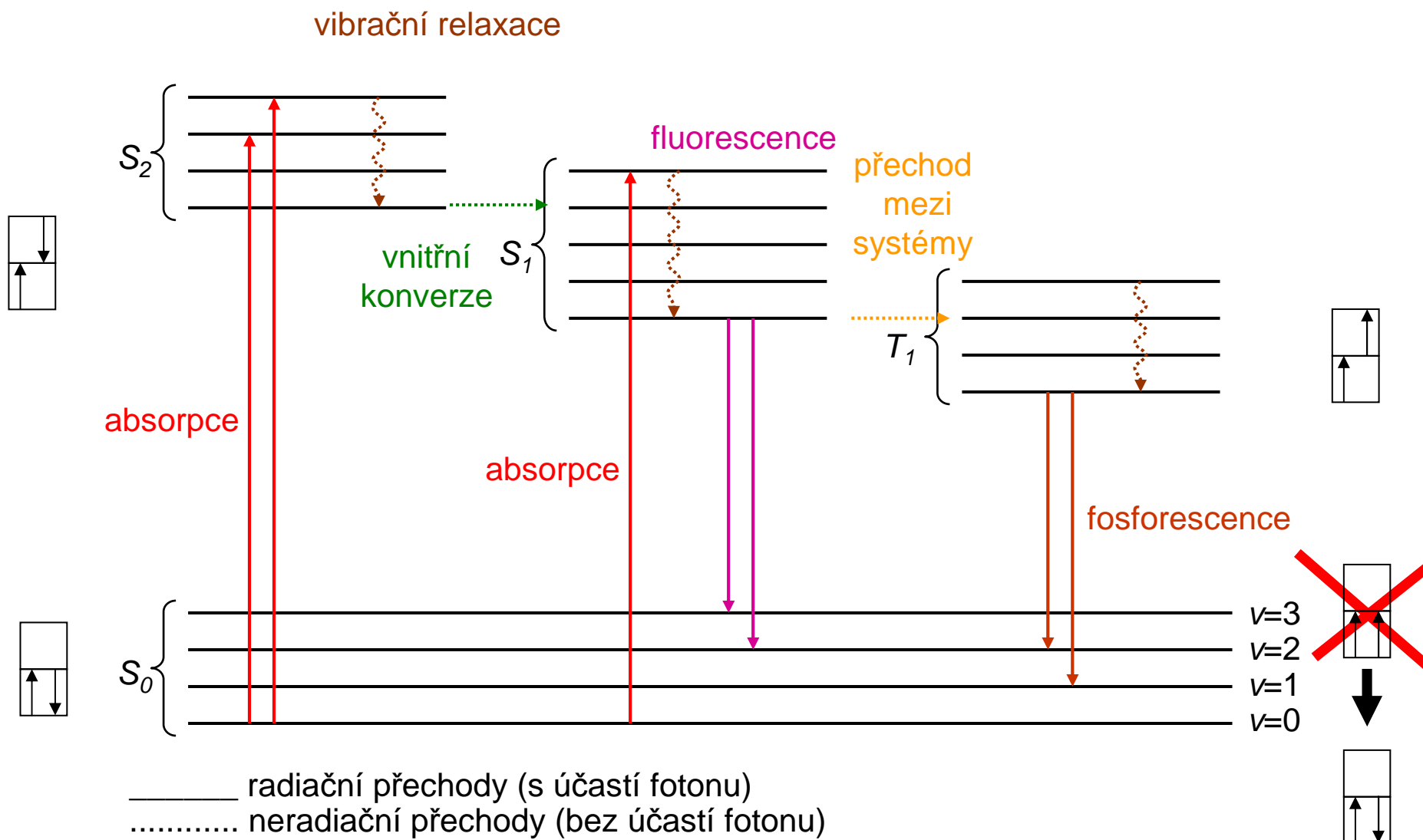
$$c = \lambda \nu$$

- elektricky nabitá částice (elektron) je schopna interakce se světelným vlněním (ovlivnění je dáno elektrickou složkou paprsku).
- přijatá energie (E) je kvantována:

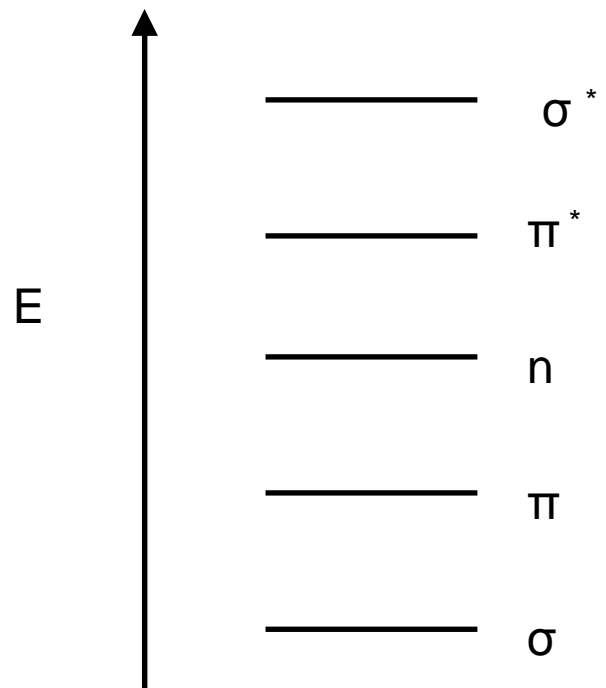
$$E = h \nu$$

- h je **Planckova konstanta** ($h = 6.625 \times 10^{-27}$)

Jablonského diagram



Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

Typy přechodů

Přechod $\sigma - \sigma^*$: jednoduché vazby (např. C-C, nebo C-H), vyžadují velkou energii (méně než 190nm, vakuová oblast)

Přechod $n - \sigma^*$: nutná přítomnost atomu s volným elektronovým párem (N, S, I, Cl, Br), absorpce kolem 200nm.

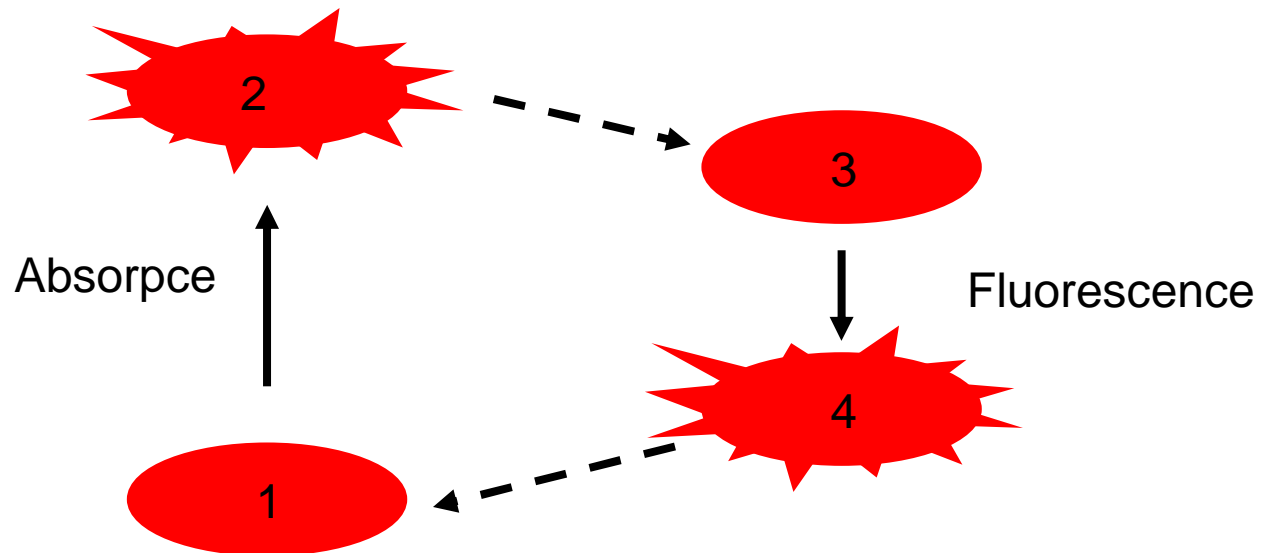
Přechod $\pi - \pi^*$: sloučeniny s dvojnými a trojnými vazbami, čím lepší konjugance vazeb, tím vyšší vlnová délka (energetická hladina nejvyššího obsazeného vazebného orbital se zvýší a energetická hladina nejnižšího nevazebného orbitalu se sníží \rightarrow nižší ΔE), delokalizované π orbitaly aromatických systémů \rightarrow rozdíl energií je nízký (absorpce ve Vis oblasti)

$n - \pi^*$: v molekule je kromě dvojných vazeb přítomen také atom s volným elektronovým párem (N, S, Cl...), nízká energie, ovlivnění $\pi - \pi^*$ přechodu

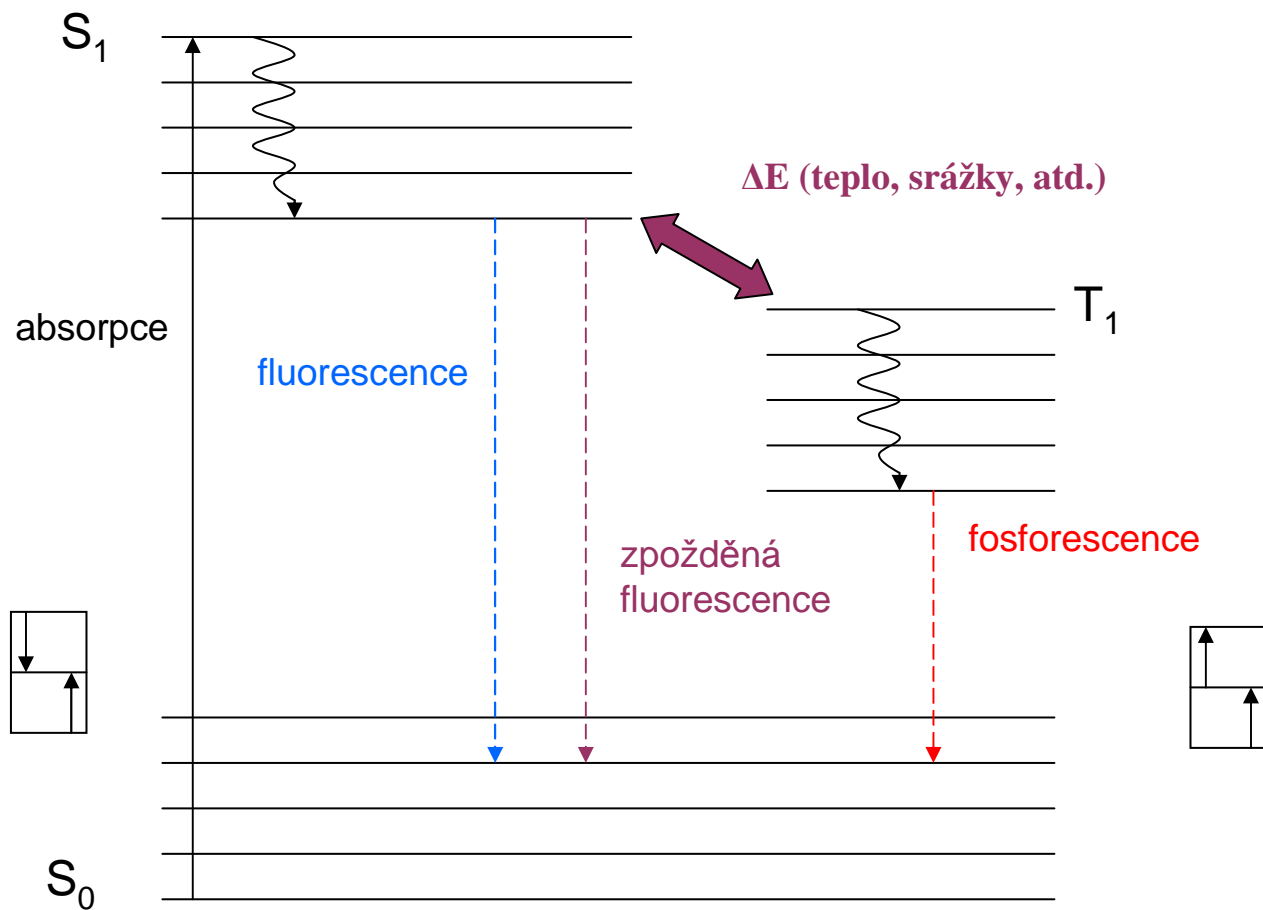
Typy elektronových přechodů v komplexech kovů

- a) přechody v rámci iontu kovu vázaného do komplexu (d-d, nebo f-f přechody): dochází ke štěpení podhladin iontu kovu vlivem ligandového pole.
- b) C-T (charge-transfer) přechody: přenos náboje mezi ligandem a iontem kovu, dochází k přechodu elektronu z orbitalu atomu s výrazně vyšší elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (buď přechod M-L, nebo L-M), tyto přechody mají vysokou intenzitu v porovnání s přechody d-d.
- c) elektronové přechody v rámci ligandu vytvořené vlivem elektrostatické interakce s iontem kovu.

- 1 – rovnovážná konfigurace v základním stavu
- 2 – nerovnovážná konfigurace v excitovaném stavu (Franckův-Condonův stav)
- 3 – rovnovážná konfigurace v excitovaném stavu
- 4 – nerovnovážná konfigurace v základním stavu (Franckův-Condonův stav)



Zpožděná fluorescence



Vliv prostředí na luminiscenci

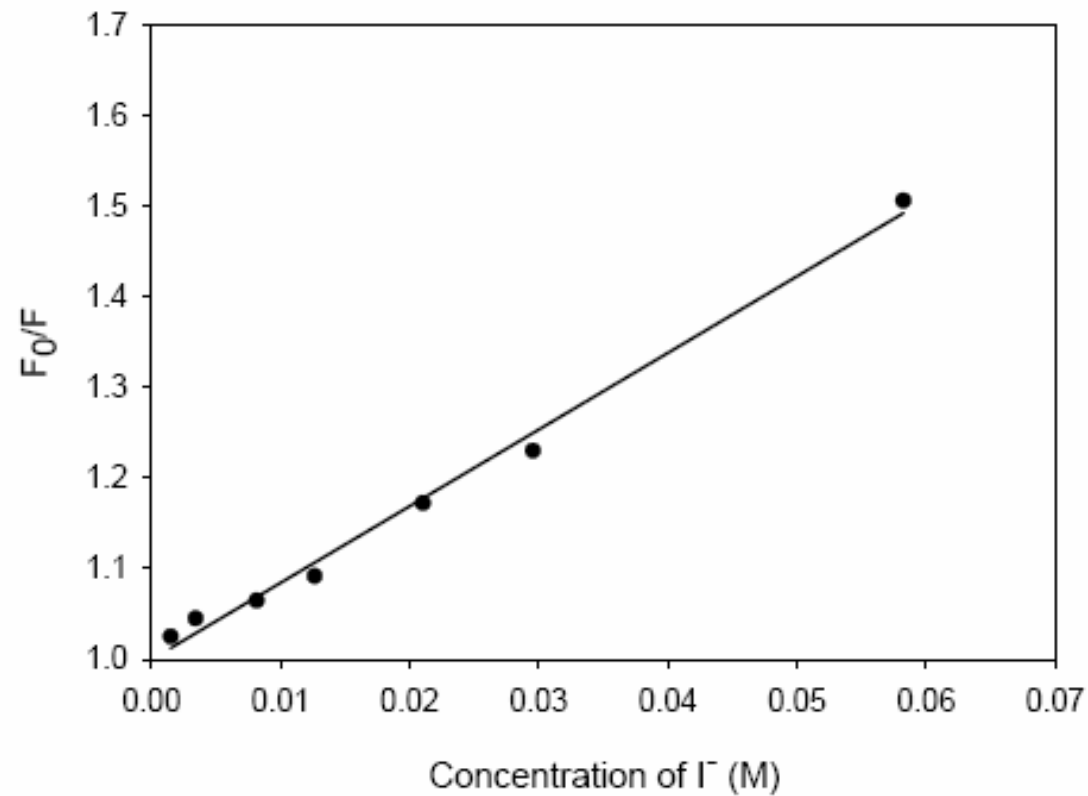
Dynamické zhášení luminiscence

- k interakci mezi zhášečem a potenciálním fluoroforem dojde po excitaci, kdy excitovaná molekula vytvoří „komplex“ s jinou částicí (molekulou, „species“), který nefluoreskuje – dojde k vytvoření nových hladin a dojde k deexcitaci vnitřní konverzí. Typická je např. tvorba komplexu s kyslíkem rozpuštěným v rozpouštědle (oxidace), I⁻, Cs⁺, akrylamidem, atd.

$$F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$$

- Stern-Volmerova rovnice: F_0 je intenzita fluorescence bez zhášedla, F je intenzita fluorescence se zhášedlem, K_{SV} je Stern-Volmerova zhášecí konstanta, Q je koncentrace zhášedla
- dynamické zhášení snižuje τ

Dynamické zhášení



Zhášení fluorescence fluoresceinu za přítomnosti I^-

Zhášení luminiscence

- statické zhášení: ke „komplexaci“ dochází v základním stavu (vytvoří se nefluoreskující komplex). Luminiscence jsou pak schopny jen disociované molekuly, ale rychlost disociace je malá ve srovnání s se zářivými přechody (- zářivé přechody jsou neefektivní). Typický příklad – komplexace těžkým kovem (snížení fluorescence kys. salicylové po komplexaci Fe(III).)

$$F_0/F = 1 + K_a[Q]$$

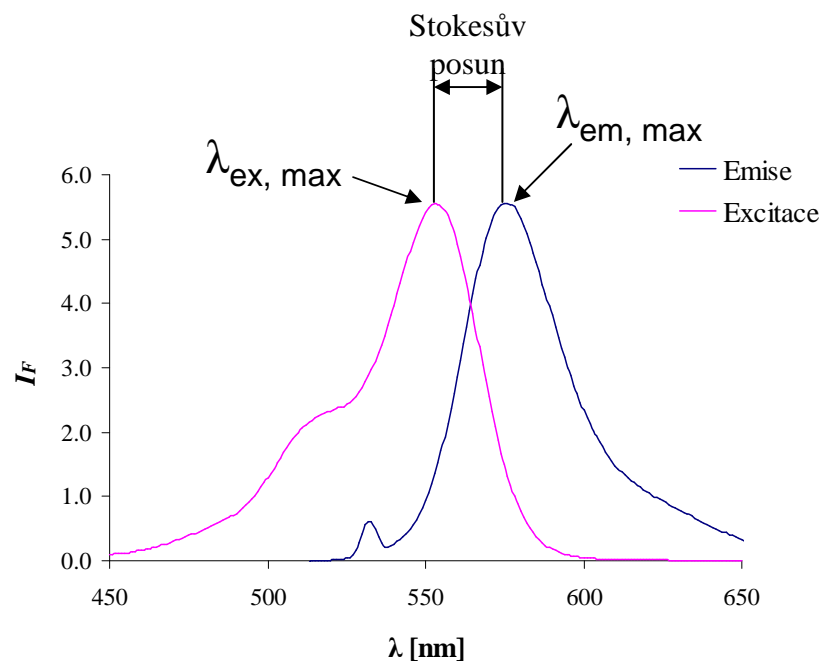
Luminiscence molekuly je charakterizována:

emisní spektrum (emisní maximum), excitační
spektrum (excitační maximum), Stokesův
posun, kvantový výtěžek, čas vyhasínání
luminiscence

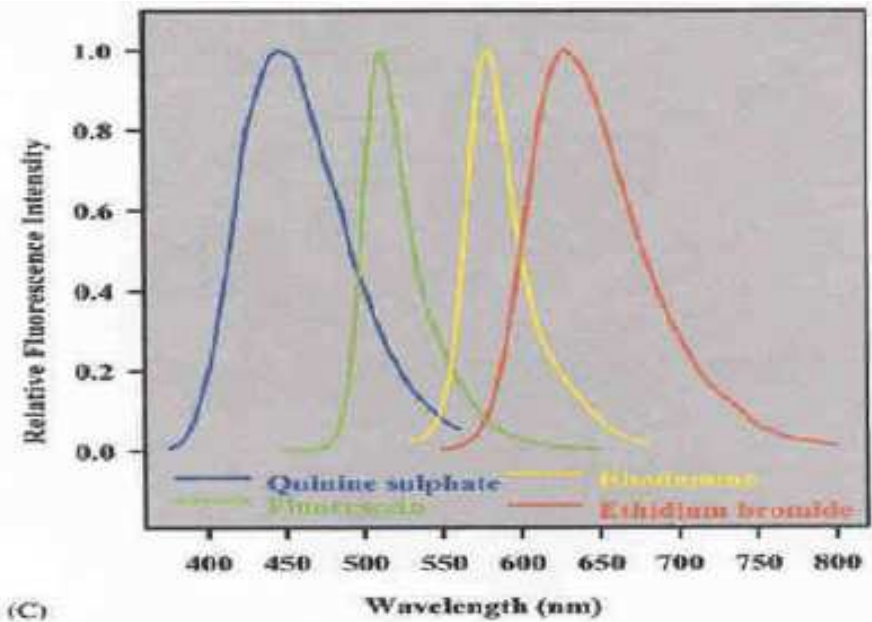
Emisní a excitační spektra

emisní spektrum (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{ex} .

excitační (aktivační, „absorpční“) spektrum: závislost absorpce luminoforu (fluoroforu) na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{em} .

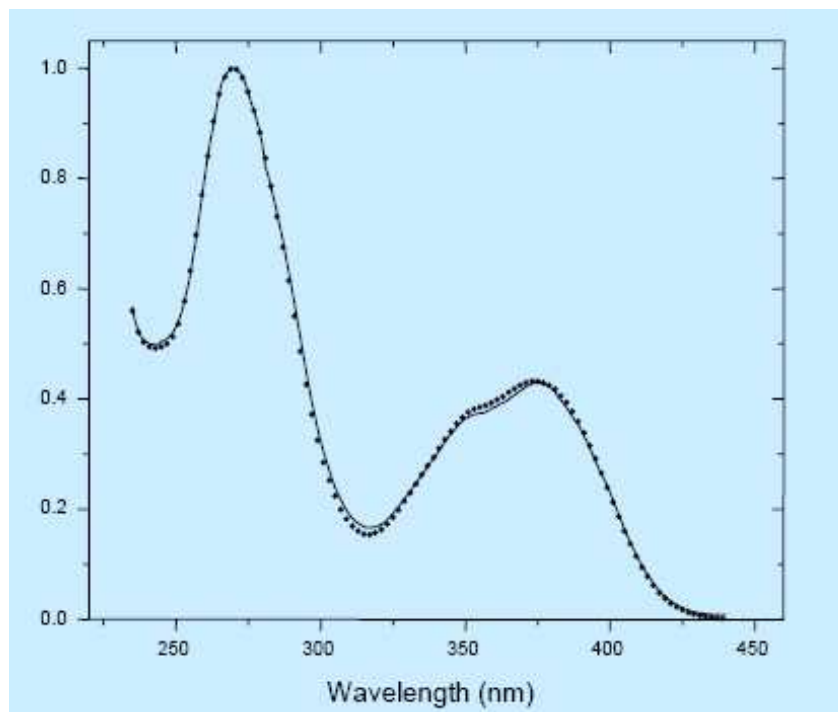
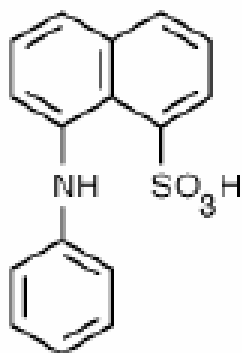


Emisní spektrum



(C)

Excitační spektrum



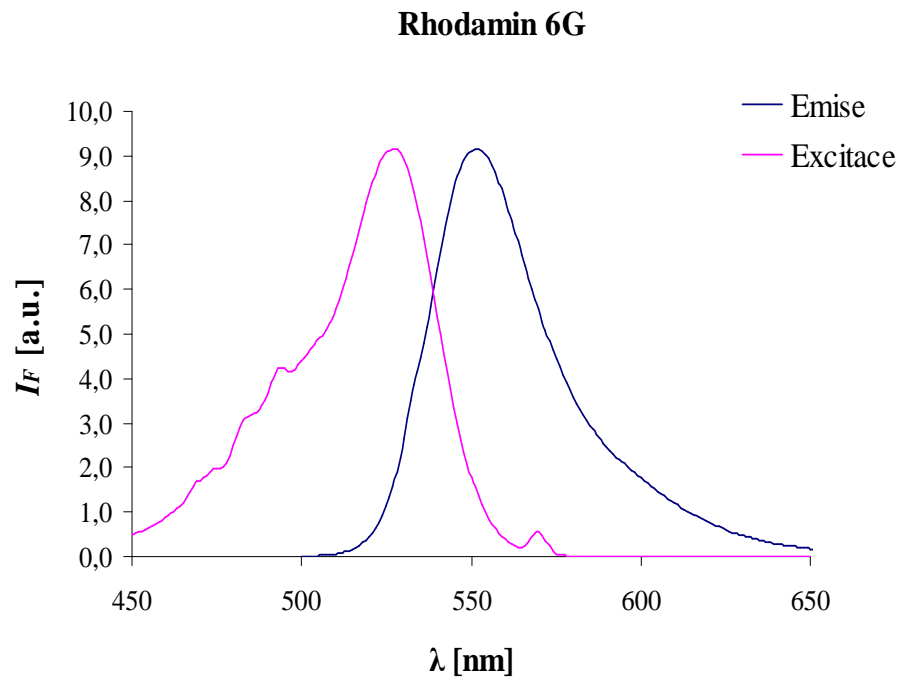
Excitační a absorpční spektrum mají podobný tvar, jestliže absorbuje pouze ta část molekuly odpovědná také za fluorescenci

Emisní a excitační spektra

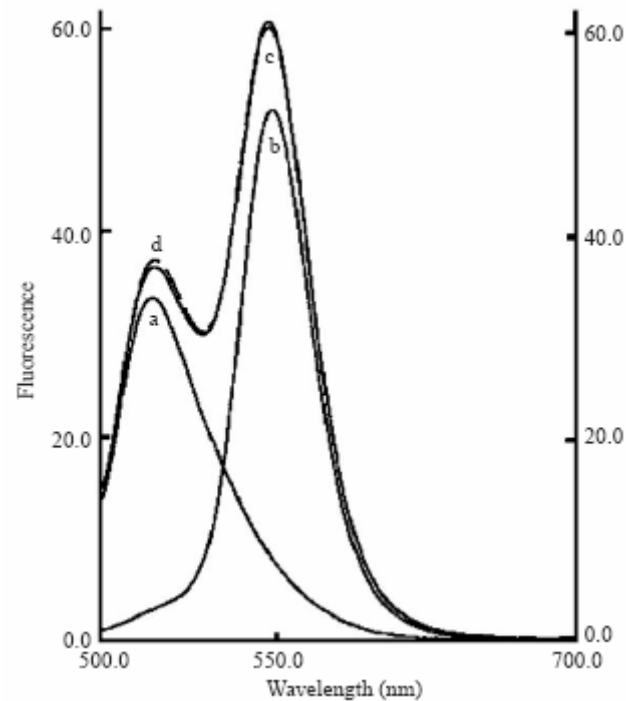
- **Stokesův posun**: rozdíl mezi emisním a excitačním maximem (v nm)
- **Kashovo pravidlo**: **tvar** emisního spektra není ovlivněn vlnovou délkou excitace a lze excitovat zářením s kteroukoli vlnovou délkou z excitačního spektra
- **nejvyšší intenzita luminiscence**: excitace vlnovou délkou rovnou excitačnímu maximu
- **fosforescenční spektra jsou posunuta k vyšším vlnovým délkám**, neboť přechod z T_1 do S_0 je spojen s menším rozdílem energie, než přechod z S_1 do S_0

Zrcadlové pravidlo

- emisní a excitační spektra [organických látek](#) mají podobný tvar, ale jsou zpravidla zrcadlově obrácené

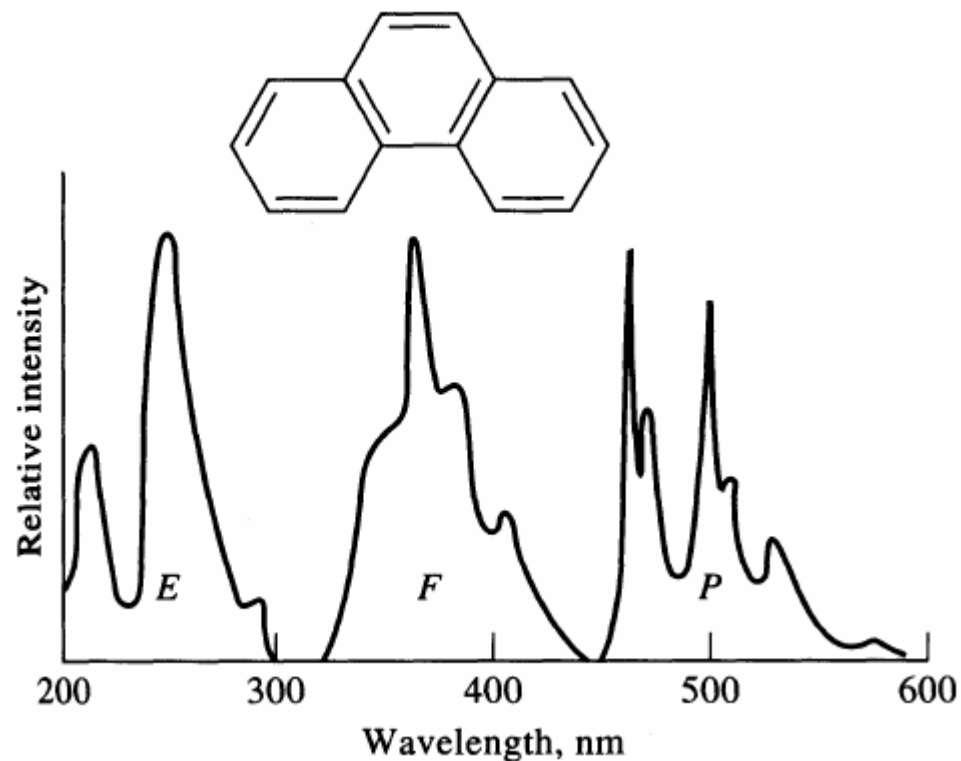


Emisní spektra



Aditivní pravidlo: fluoreskuje-li po ozáření ve vzorku více nezávislých fluoroforů, výsledná emise je součtem příspěvků emisí těchto látek. Toto pravidlo však platí pouze pro molekuly, které spolu nevyměňují energii...

Fluorescence a fosforescence



Čas vyhasínání fosforescence – 10^{-4} až několik s

Čas vyhasínání fluorescence – 10^{-12} až 10^{-6}

Fosforescence: posun emise k vyšším vlnovým délkám

Základní vztahy

$$A = c l \varepsilon = \log (\Phi_0 / \Phi) \quad (\text{Lambert-Beerův zákon})$$

A – absorbance, c – koncentrace, ε – absorpční koeficient, l – tloušťka květy, Φ_0 - záření vyslané na vzorek, Φ - záření prošlé vzorkem

$$F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-c l \varepsilon})$$

F – fluorescenční signál (fotony/s), k – podíl emitovaných fotonů, které dorazí na detektor, φ – výtěžek luminiscence

$$F = k \varphi \Phi_0 2.3 c l \varepsilon$$

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

„Čas života“ (lifetime) fluoroforu

- nestudujeme jednu molekulu s fluoroforem, ale mnoho molekul s populací elektronů na excitovaných hladinách
- na základě studia systému z mnoha molekulami určujeme „čas života“ určité molekuly s fluoroforem

$$dn^*/dt = -n^* \Gamma + f(t)$$

n^* je počet excitovaných částic, t je čas, Γ je rychlostní konstanta emise fluorescence, $f(t)$ je časová jednotka (čas excitace)

- jestliže k excitaci dojde v čase $t = 0$, pak:

$$dn^*/dt = -n^* k$$

pro počet excitovaných molekul lze rovnici zapsat takto:

$$n^*(t) = n^*(0) \exp -k t$$

jestliže:

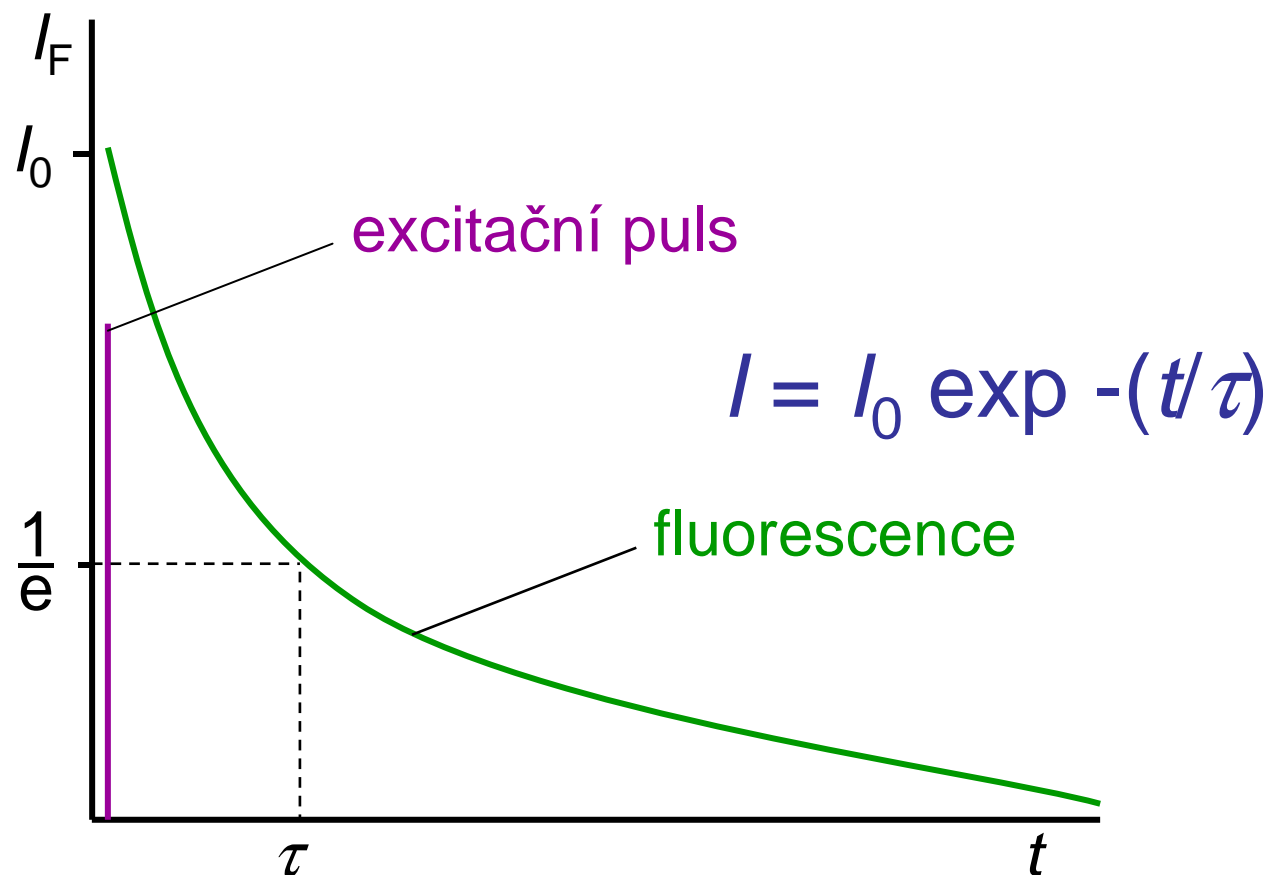
$$\tau = k^{-1}$$

pak:

$$n^*(t)/n^*(0) = e^{-t/\tau}$$

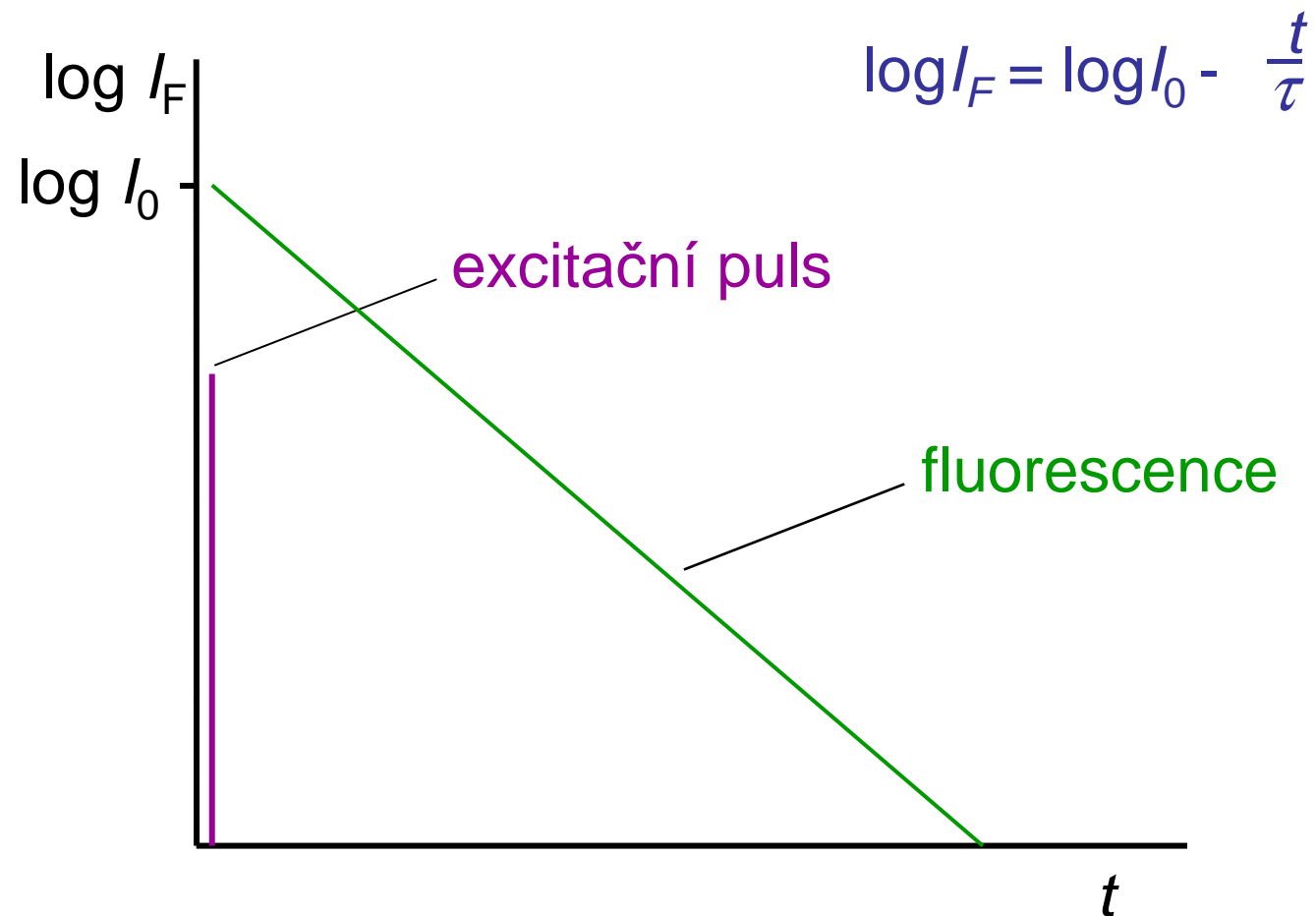
τ je tedy čas, kdy $1/e$ molekul (36.8%) je v základním stavu

Časově rozlišená luminiscence



- **Doba života** (luminescence lifetime): $\tau = 1/k_F$
 - kvalitativní a strukturní analýza, studium polohy fluoroforu

Časově rozlišená luminiscence



Výtěžek luminiscence

- obecná definice: $\varphi = k_f / (k_f + k_i + k_x)$

k_f rychlost emisního procesu (fluorescence)

k_i rychlost nežářivých přechodů (teplo, relaxace...)

k_x rychlost mezisystémových přechodů

- jestliže rychlost deaktivčních procesů je pomalá ve srovnání s k_f potom kvantový výtěžek je vysoký

- kvantový výtěžek:

$$\varphi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I)$$

- energetický výtěžek:

$$\varphi_e = E_{em}/E_{abs} = hv_{em}/hv_{ex}$$

$\varphi_e < \varphi_k$ (Stokesův posun)

Stanovení kvantového výtěžku

1) absolutní stanovení (primární metody)

- chemický aktinometr
- kalorimetrie
- kalibrované zdroje záření, korekce spekter, atd.

2) relativní stanovení (sekundární metody)

- srovnání s fluorescenčním standardem

Stanovení kvantového výtěžku

$$\text{kvantový výtěžek: } \varphi_k = N_{em}/N_{abs}$$

- pro stanovení kvantových výtěžků používáme **fluorescenční standardy** (tj. látky s definovaným kvantovým výtěžkem)
- potřebujeme znát molární absorpční koeficienty (nebo hodnoty absorbancí při stejné koncentraci) stanovované látky i standardu pro vlnovou délku excitačního záření
- změříme a porovnáme plochy (F) emisních spekter

$$\varphi_x = \varphi_{st} \frac{F_x}{F_{st}} \times \frac{\epsilon_{st}}{\epsilon_x}$$

Molekulová luminiscence: instrumentace I

- **Fluorimetr a spektrofluorimetr: základní uspořádání přístrojů**
- **Součásti (spektro)fluorimetru**

excitační zdroje

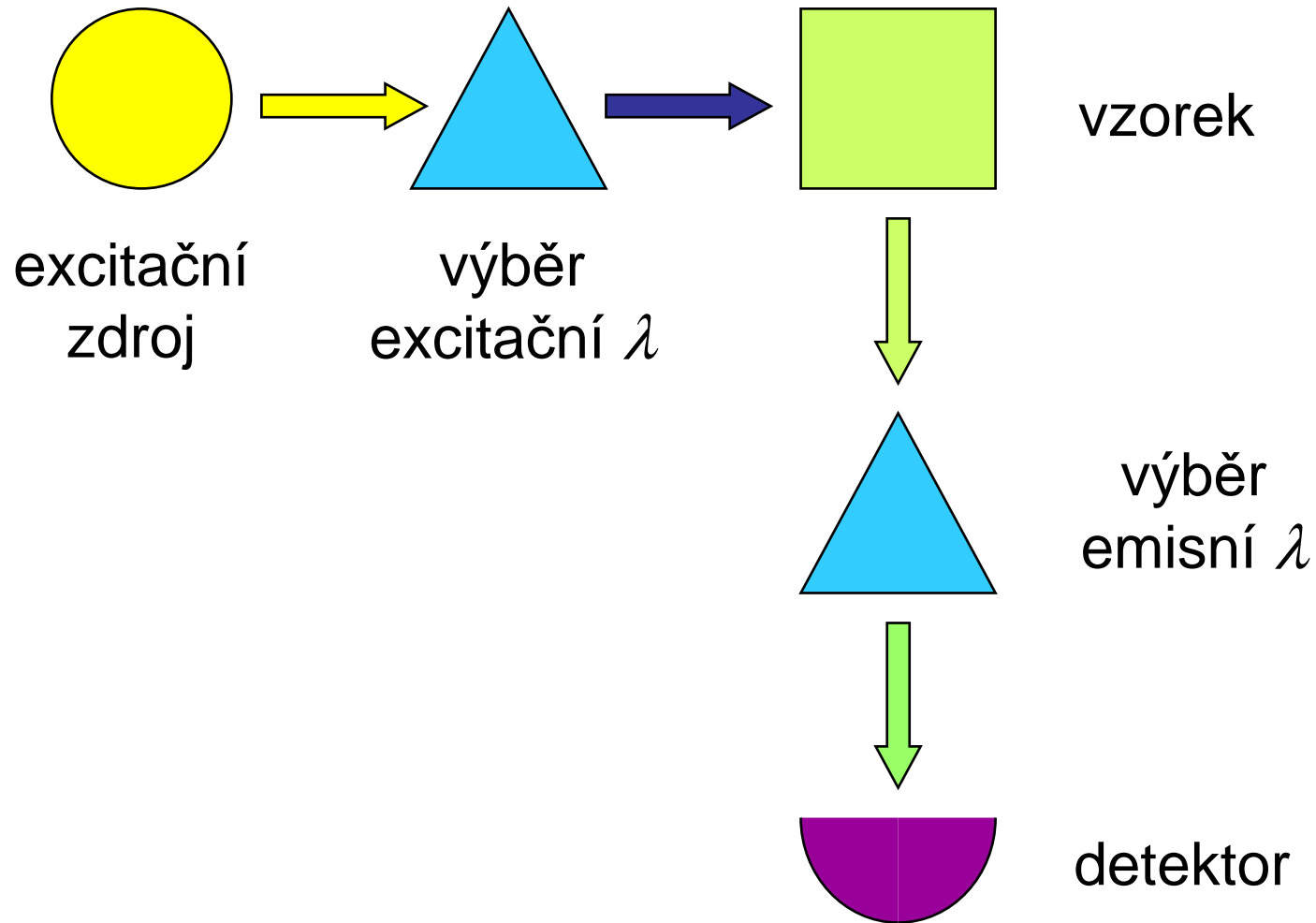
monochromátory

polarizační filtry

cely

detektory

Schema měření fluorescence



Schema měření fluorescence (pokr.)

- **Fluorimetr vs. spektrofluorimetr**

Fluorimetr - neslouží k záznamu spekter
- filtry pro výběr vlnové délky

Spektrofluorimetr - záznam spektra
(emisního nebo excitačního)
- využit(y) monochromátor(y)

- **Polarizační fluorescence**

mezi monochromátory a vzorkem mohou být
začleněny polarizační filtry

Součásti (spektro)fluorometru

- **Excitační zdroje**
výbojky, LED, lasery
- **Monochromátory**
filtry, hranoly, mřížky
- **Polarizační filtry**
- **Cely**
- **Detektory**
fotonásobiče, lavinové fotodiody, CCD

Měření a prezentace dat

- **Jednoduchý sken**

- emisní spektrum ($\lambda_{\text{exc}} = \text{konst.}$, sken λ_{em})
- excitační spektrum ($\lambda_{\text{em}} = \text{konst.}$, sken λ_{exc})

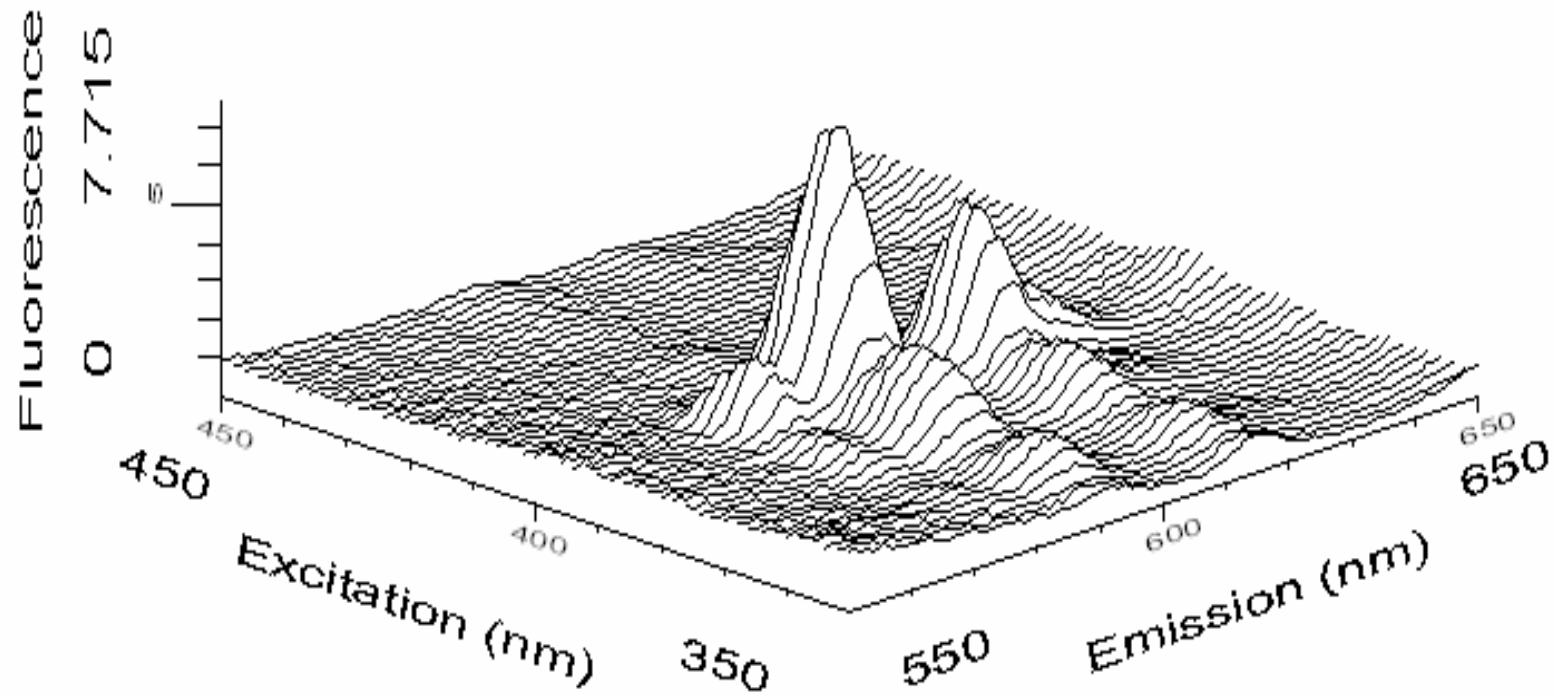
- **Synchronní sken**

- současný sken λ_{em} a λ_{exc} , $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}} = \text{konst.}$

- **3D spektra**

- množina excitačních/emisních spekter
- ze 3D spektra lze získat emisní, excitační spektrum nebo rozdílové spektrum odpovídající synchronnímu skenu

Příklad 3D spektra



Luminiscence Eu^{3+}

Srovnání absorpční a luminiscenční spektroskopie v oblasti UV-Vis

Spektroskopie v oblasti UV-Vis

$$A = c l \varepsilon = \log(I_0/I)$$

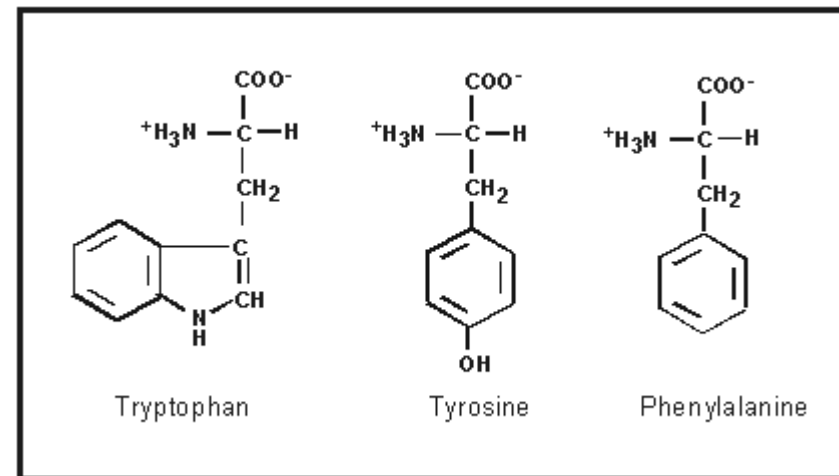
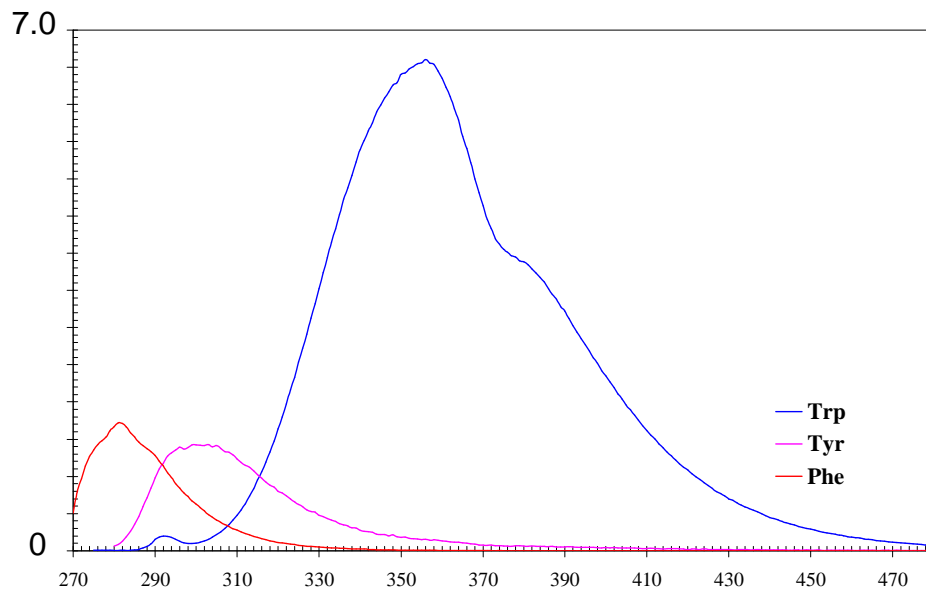
Absorpční spektroskopie: měření poměru dvou světelných toků
+ přesnost (odolnost vůči změnám abs. hodnoty světelného toku Φ_0)
- citlivost (nepatrný rozdíl mezi I_0/I při nízké koncentraci analytu)

Luminiscenční spektroskopie

$$F \sim k \varphi I_0 \cdot 2.3 c \times \varepsilon$$

Luminiscenční spektroskopie: měření vyzářené energie
+ vysoká citlivost při použití citlivého detektoru (i jednotlivé fotony)
- přesnost (fluorescence je přímo úměrná excitačnímu světelnému toku (I_0);
projevuje se u ní negativně kolísání excitačního zdroje aj.

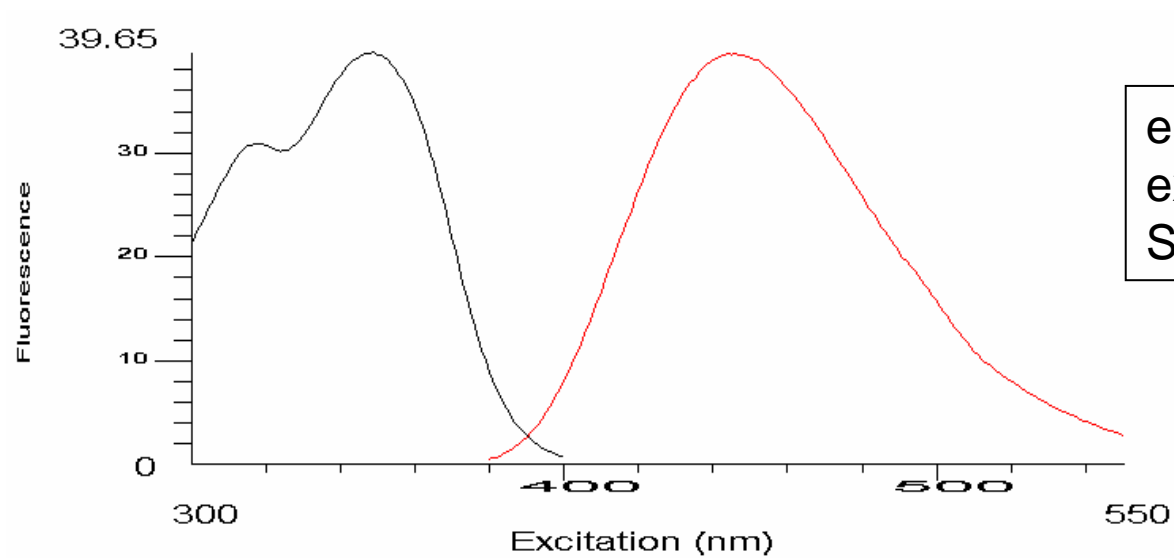
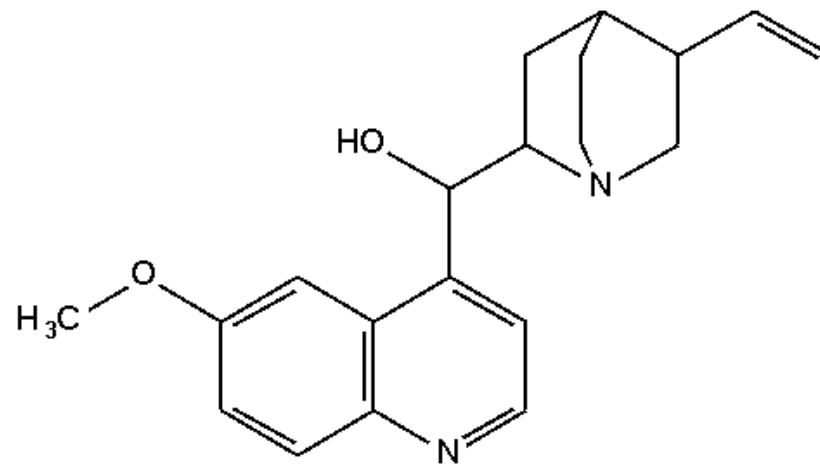
Luminiscence organických molekul: ukázky



Aminokyselina	Absorpce		Fluorescence	
	Vln.délka (nm)	Abs. koeficient	Vln.délka (nm)	Kvantový výtěžek
Tryptofán (Trp)	280	5,600	348	0.20
Tyrosin (Tyr)	274	1,400	303	0.14
Fenylalanin (Phe)	257	200	282	0.04

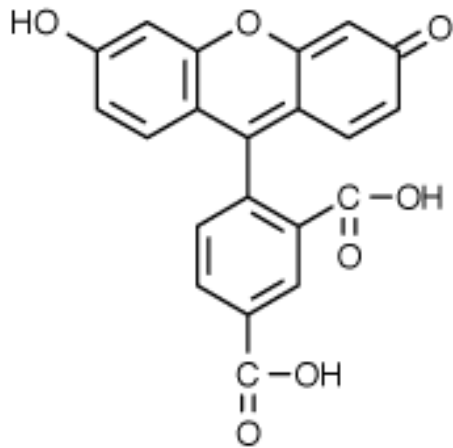
1. P. Pekárková, Bakalářská práce, 2005
 2. www.biotek.com

Chinin

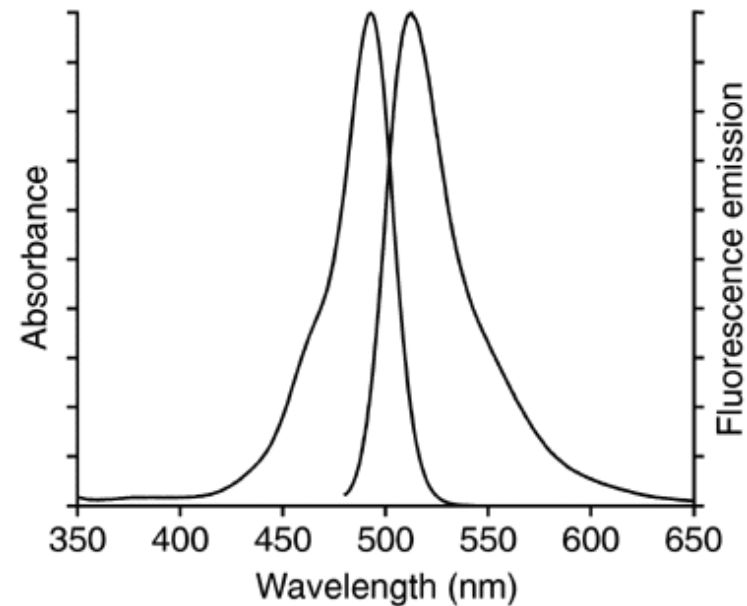


emisní maximum: **446 nm**
excitační maximum: **349 nm**
Stokesův posun: 97 nm

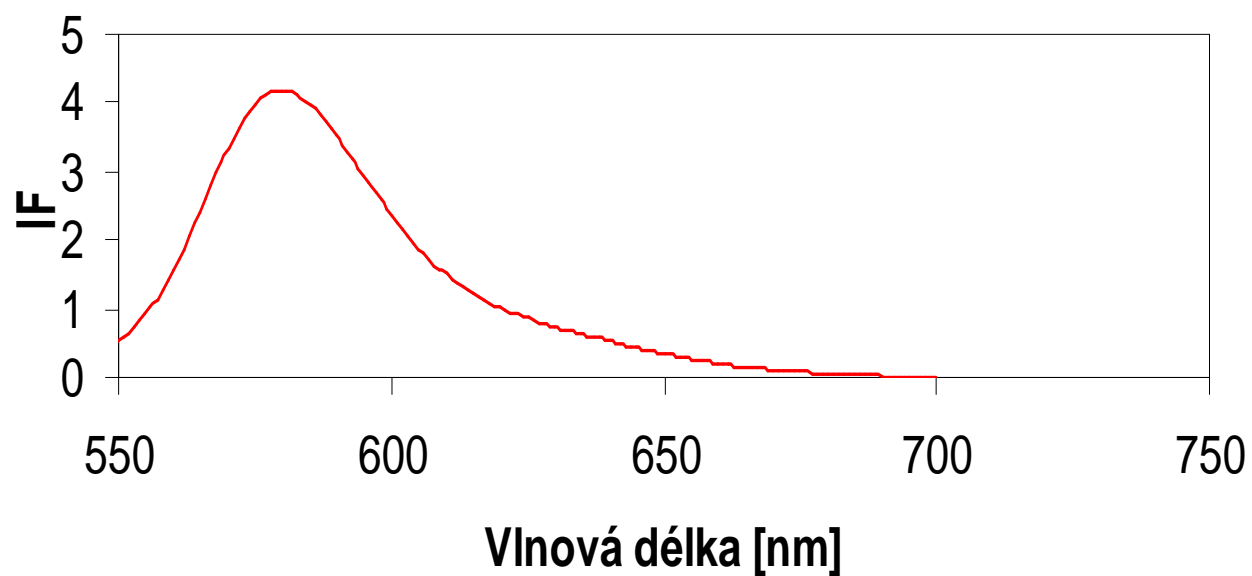
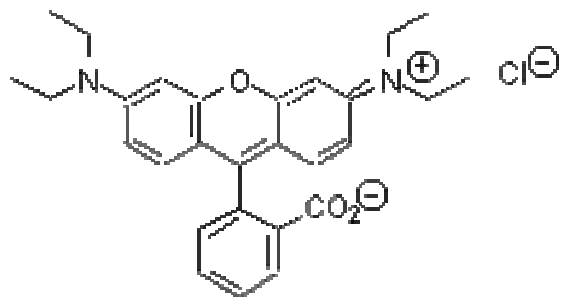
Deriváty fluoresceinu



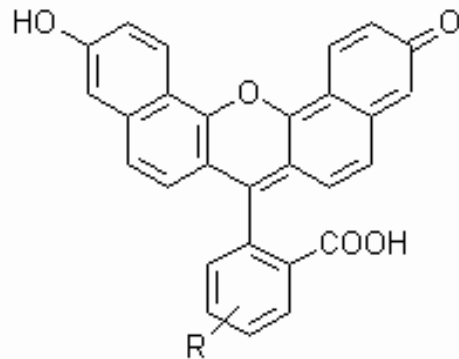
excitační maximum: 494 nm
emisní maximum: 520 nm



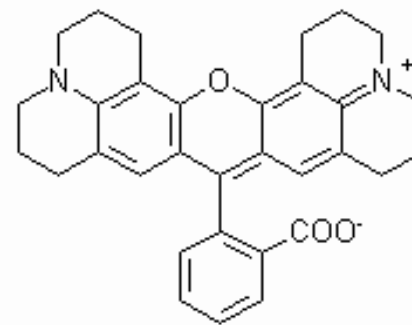
Deriváty rhodaminu



Fluorofory s emisním maximem v oblasti kolem 600nm



R = COOH ABSORPCE 598 nm (49000)
EMISE 668 nm



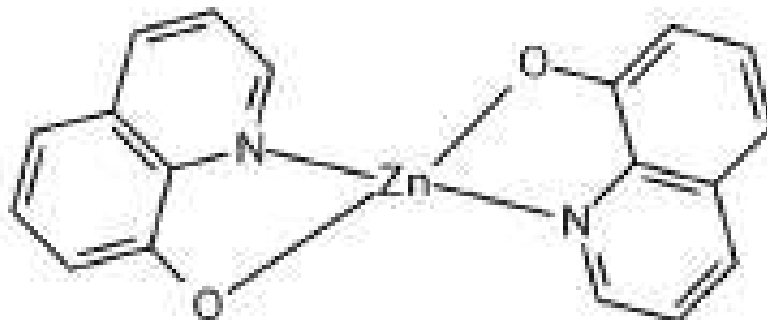
ABSORPCE 568 nm (98000)
EMISE 595 nm

Luminiscence anorganických „species“ v roztoku

1. slabě fluoreskující ligand má komplexaci lepší fluorescenční vlastnosti (nebo obráceně...)
2. ionty kovů (zejména f-prvky), nebo jejich „species“ jeví fluorescenci (někdy také fosforescenci) v roztoku i bez komplexace
3. „anorganická“ luminiscence pochází z komplexů z nefluoreskujícími ligandy

Zlepšení luminiscečních vlastností po komplexaci (1)

- kov nijak neovlivňuje fluorescenční vlastnosti, jen stabilizuje organické ligandy tak, aby byl upřednostněn zářivý proces deexcitace
- kov může také v některých případech zhaset luminiscenci
- obou jevů lze využít pro analytické stanovení, nejedná se však o příliš selektivní metodu



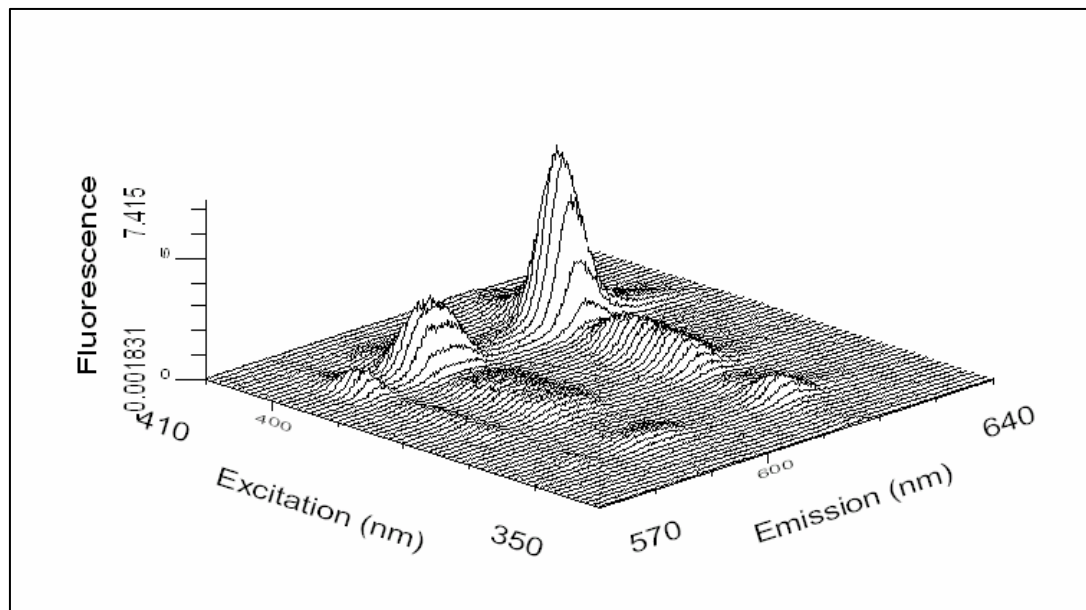
Luminiscence anorganických „species“ – luminiscence nekomplexovaných iontů v roztoku (2)

- lanthanité ionty (např. Eu^{3+} , Tb^{3+} , Gd^{3+} , a další)
- některé aktinoidy (např. UO_2^+ , $\text{Th}(\text{I})$)
- závisí i na okolí „species“ – pH, komplexace, teplota, atd.
- jedná se o přechody mezi f-f, případně d-f elektronovými přechody
- pro emisní spektra jsou obvyklé ostré píky, čas vyhasínání luminiscence je extrémně dlouhý (až ms)

Luminiscence Lanthanoidů(III)

Některé komplexy Ln(III) mají velmi neobvyklé spektrální vlastnosti:

- dlouhý čas vyhasínání luminiscence
- Stokesův posun může být i více než 100 nm
- emisní spektrum obsahuje ostré píky



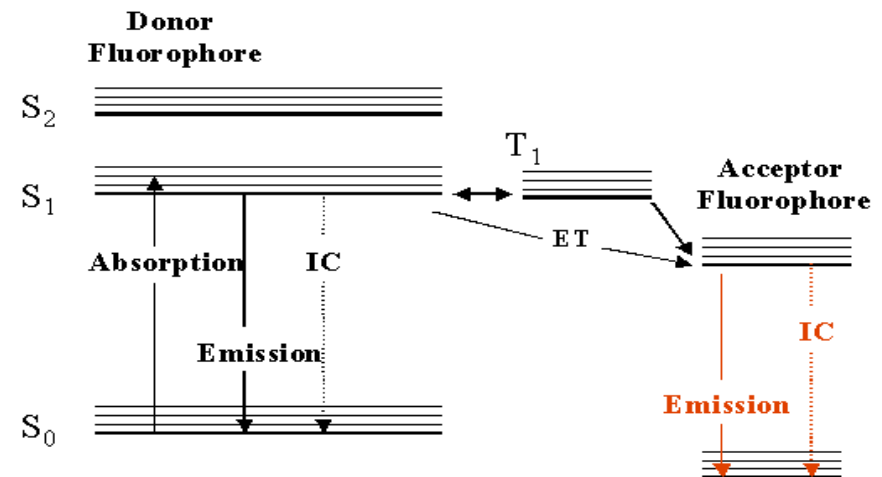
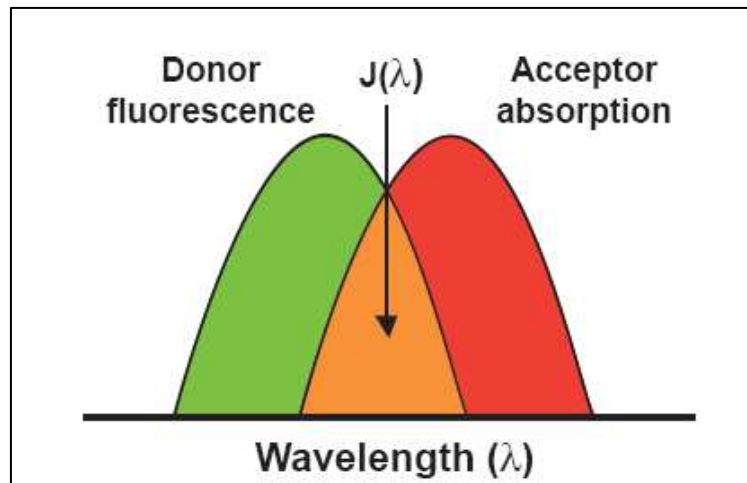
FRET

- **FRET je Fluorescence Resonance Energy Transfer** – Fluorescenční rezonanční energetický transfér
- podle objevitele Förster nazýván také **Förster Resonance Energy Transfer**
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

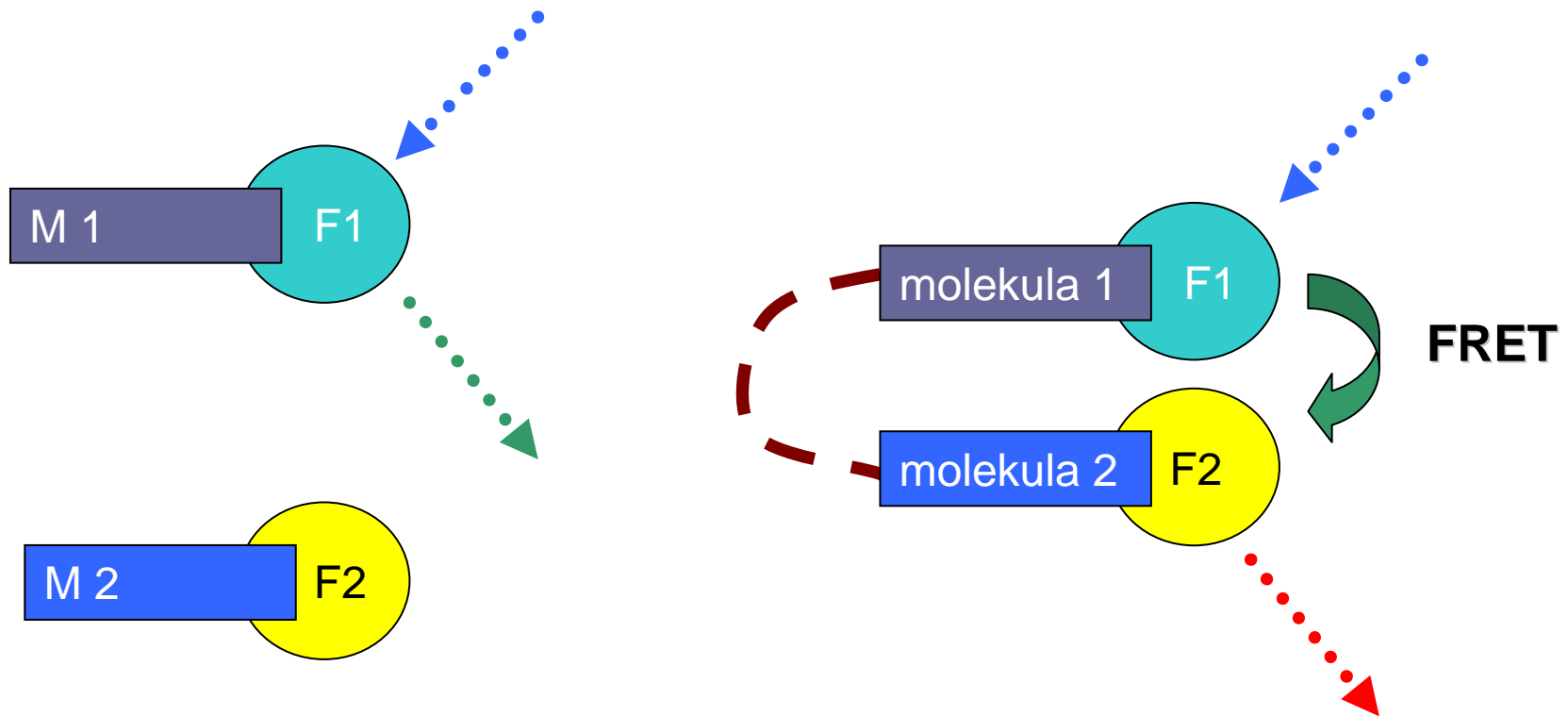
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyžáří přijatou energii ve formě světla

Podmínky:

- a) vzdálenost mezi molekulami je menší, než 100 Å
- b) emisní spektrum donoru se překrývá se absorpčním (excitačním) spektrem akceptoru
- c) molekuly mají stejně orientovány dipólové momenty



FRET: schéma

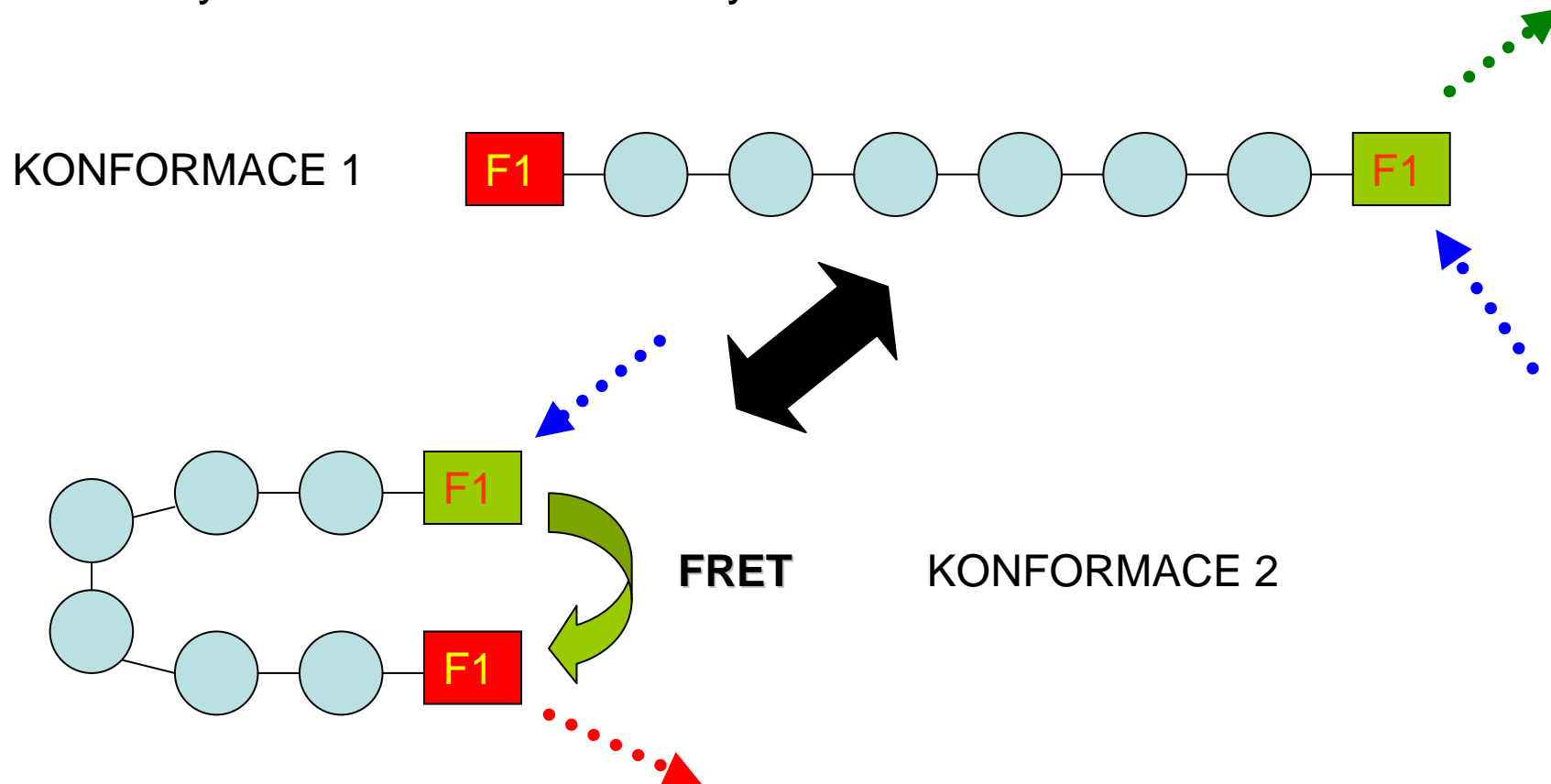


Aplikace

- sledování strukturních a konformačních změn (dvě molekuly (případně dvě části molekuly) jsou označeny donorem a akceptorem a sledujeme zda dochází k výměně energie
- sledujeme: studium struktury proteinů, polynukleotidů, DNA, protein-protein interakce, DNA-protein interakce, atd.
- analytické aplikace

Sledování změn konformace molekuly

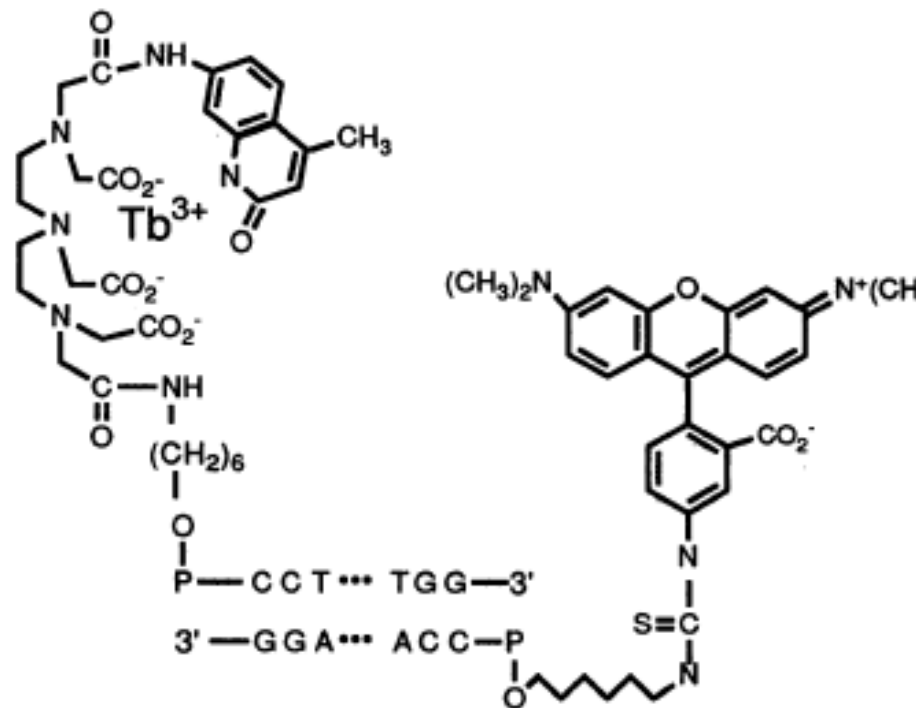
- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů



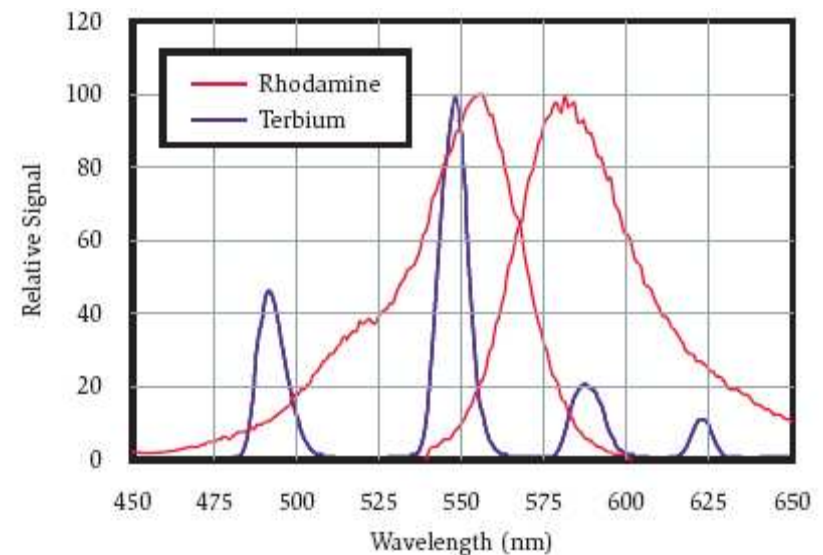
Sledování interakcí mezi vlákny DNA

DNA

- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln³⁺



$$E = 1 - \tau'_D / \tau_D$$





Chemiluminescence

Chemiluminescence

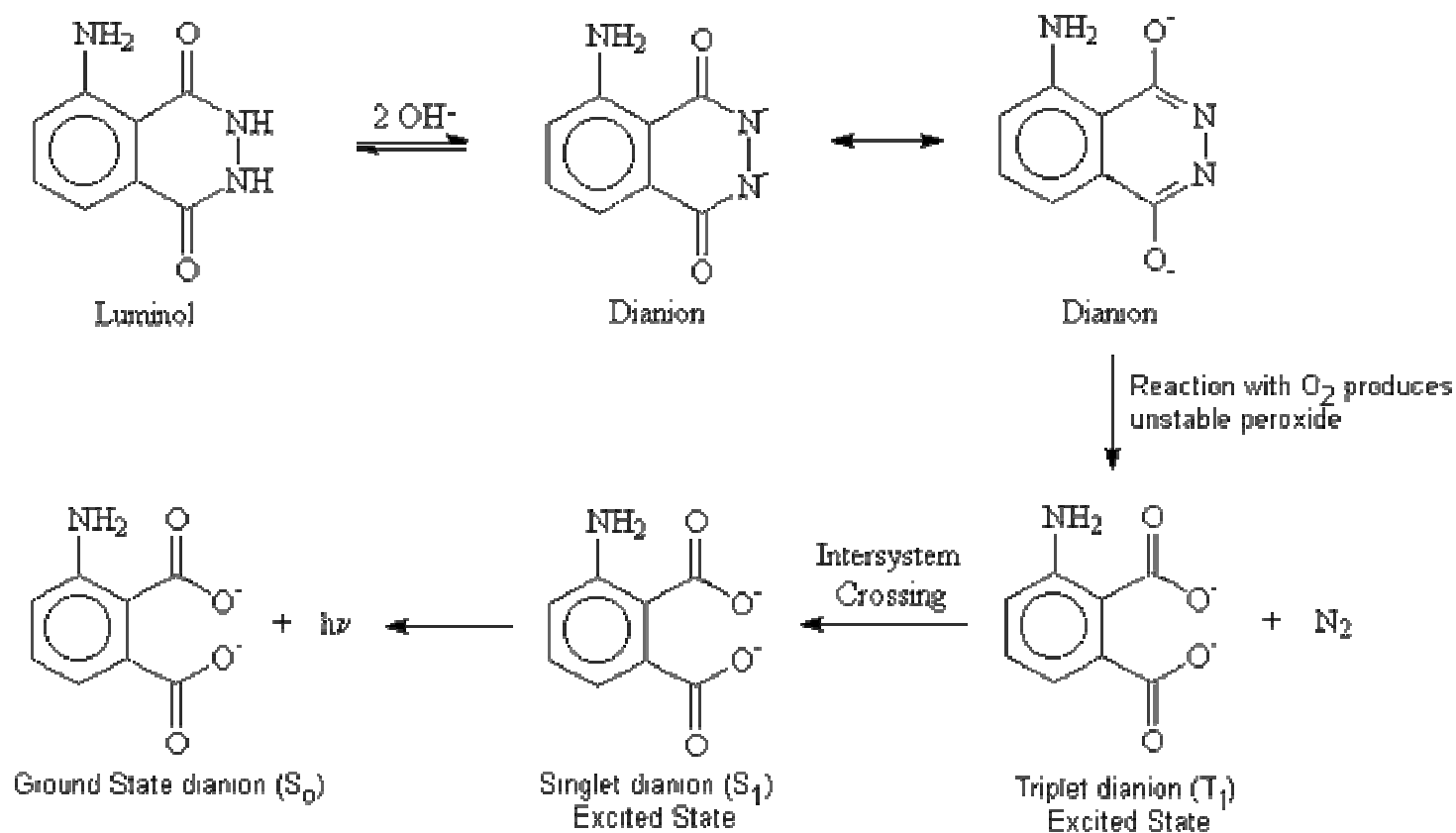
- zdrojem excitace je chemická reakce



- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton

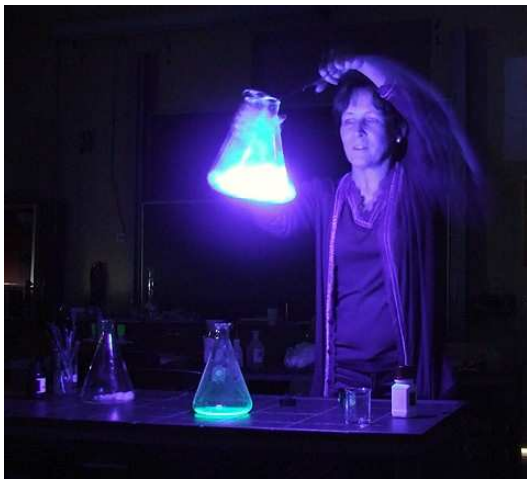
http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Chemoluminescent_reaction.jpg

Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



Chemiluminiscenční reakce

- reakce luminolu v zásaditém prostředí s kyslíkem (peroxid, vzdušný kyslík) → modře fluoreskující roztok
- jestliže jsou v roztoku obsaženy také Fe^{2+} , nebo Cu^{2+} (katalýza reakce) dochází k zvýšení intenzity luminiscence



<http://people.howstuffworks.com/luminol.htm>

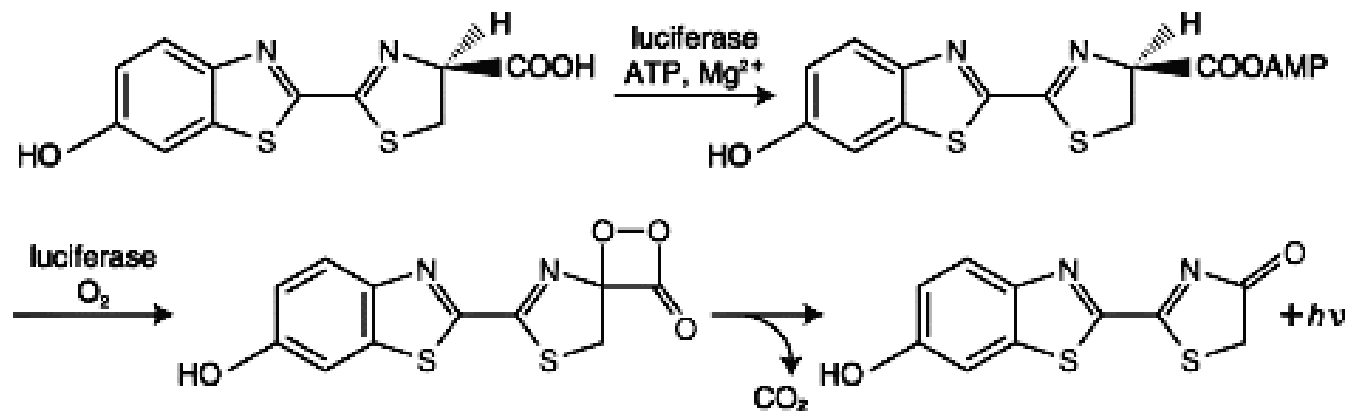
Bioluminescence

- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo
- v roce 1887 profesor DuBoise izoloval ze světlušek dvě látky: luciferin a luciferázu
- na zemi světélkují zejména brouci z čeledi Lampyriade (světlušky) a někteří kovaříci (např. *Pyrophorus noctilucus*)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakatice, ryby, paryby, atd.
- bioluminescence živočichů je vysvětlována různými důvody: hledání partnera (světlušky), lákání kořisti (např. ryba zubatka, některé druhy světlušek, žraloček brazilský), zastrašení nepřátel (ryba stříbrnák, medusy z čeledi klanonožců).

Světlušky...



Luciferin



Luciferin

- luciferin se za přítomnosti katalyzátoru luciferázy a oxiduje kyslíkem na oxyluciferin
- přeměna 1 molekuly luciferinu na oxyluciferin je doprovázena emisí 1 fotonu (namodralé světlo)
- u tohoto děje se 1 molekula ATP přemění na ADP
- u některých organismů je tzv. fotoprotein – kyslík, luciferin a luciferáza se nacházejí blízko sebe, ale teprve změna konformace fotoproteinu spustí chemickou reakci („aktivátorem“ jsou většinou ionty Ca^{2+})

Bioluminescence medusy *A. Victoria*

Většina mořských živočichů jevících bioluminiscenci emituje namodralé světlo (základem je oxidace luciferinu). U medusy *Aequorea Victoria* však byla pozorována **zelená** luminiscence...



Bioluminescence medusy *A. Victoria*

- medusa obsahuje protein aequorin, který se skládá s apoproteinu (apoaequorin) a prostetického proteinu (coelenterazine), který je podobný luciferinu
- v přítomnosti O_2 a při vysoké hladině Ca^{2+} dojde k oxidaci coelenterazinu na excitovaný coelenteramid a CO_2
- relaxací coelenteramidu do základního stavu se uvolňuje modré světlo ($\lambda = 469 \text{ nm}$)
- uvolněné světlo může být absorbováno dalším proteinem obsaženým v těle medusy – GFP

„Green fluorescent protein“

- absorpční maxima GFP jsou 395 a 475 nm ~ může dojít k absorpci světla uvolněného z aequorinu
- absorbované světlo excituje GFP a dochází k vyzáření **zeleného** světla ($\lambda = 509$ nm)

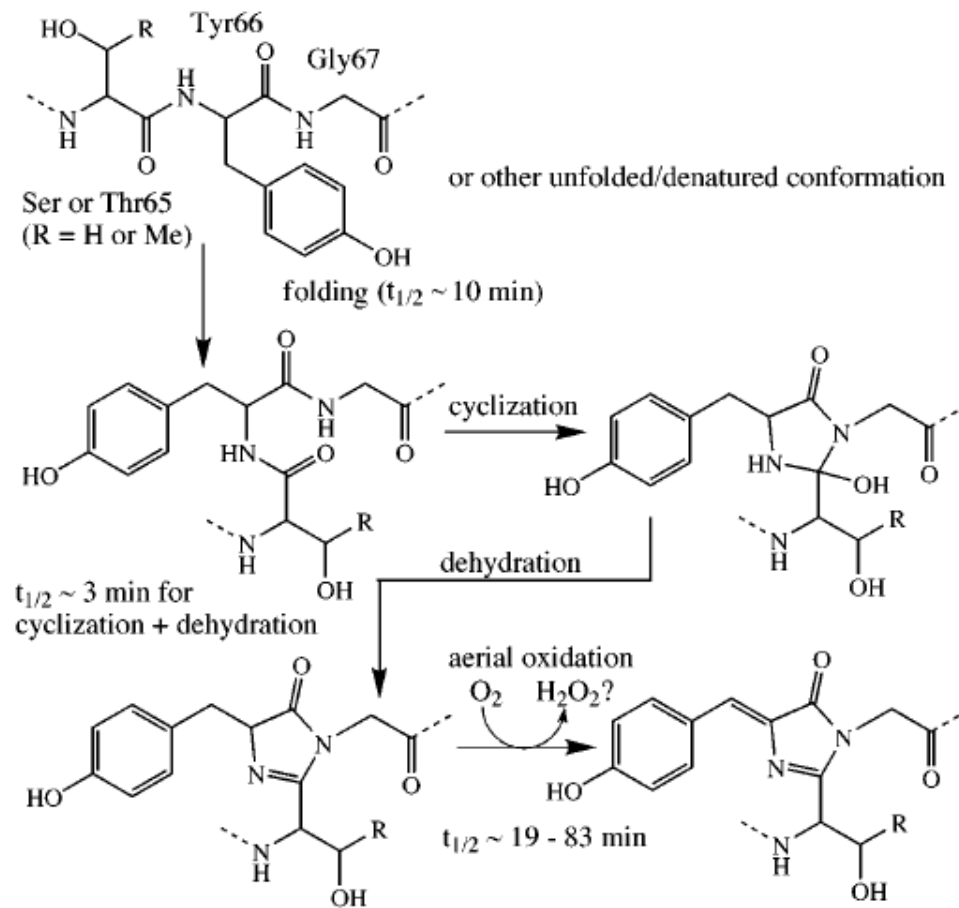


Struktura GFP

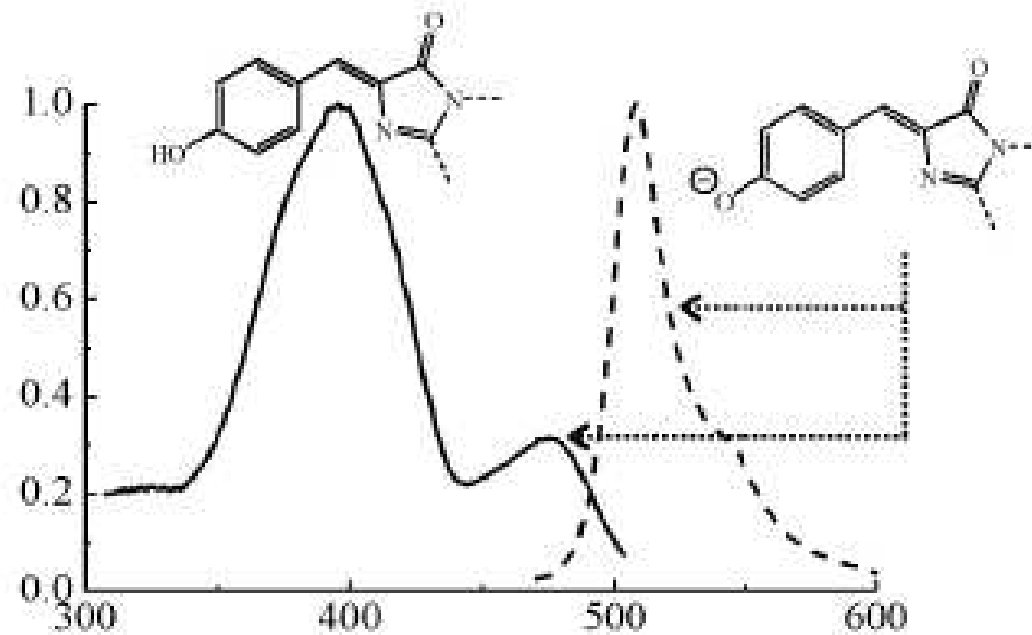
- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...

Struktura GFP

- GFP vzniká cyklizací, dehydratací a oxidací vzdušným kyslíkem sekvence proteinu obsahujícím Ser-Tyr-Gly



Fluorescenční vlastnosti GFP



„Divoký“ typ GFP – směs fenolového a fenolátového derivátu

Hlavní excitační pík - 395 nm (emisní maximum - 508 nm)

Minoritní excitační pík - 475 nm (emisní maximum – 503 nm)

Použití GFP v chemii a biologii

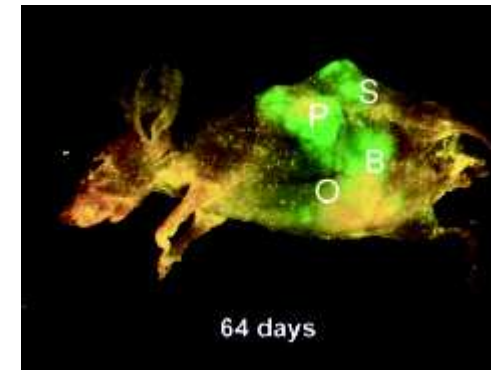
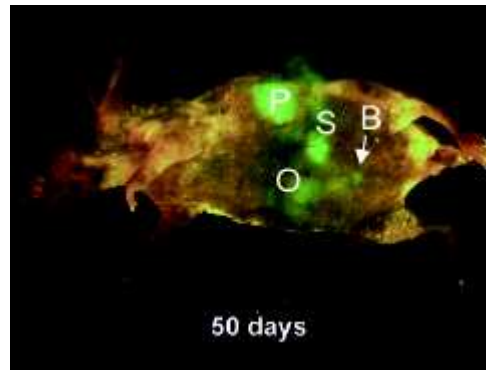
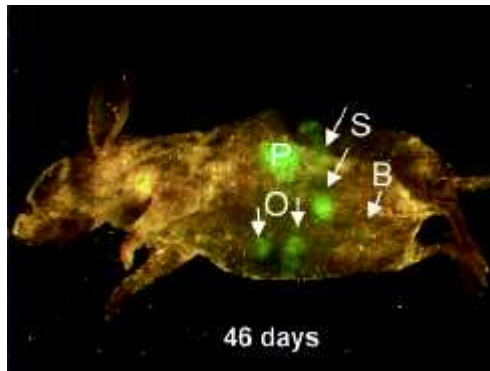
- lze připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly), který má vlastnosti stejné jako ostatní proteiny, ale je mnohem lépe detegovatelný
- genové inženýrství – sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...
- FRET



GFK – Green Fluorescent Králík

Použití GFP v chemii a biologii

- nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru



Spojení separačních technik a fluorescence

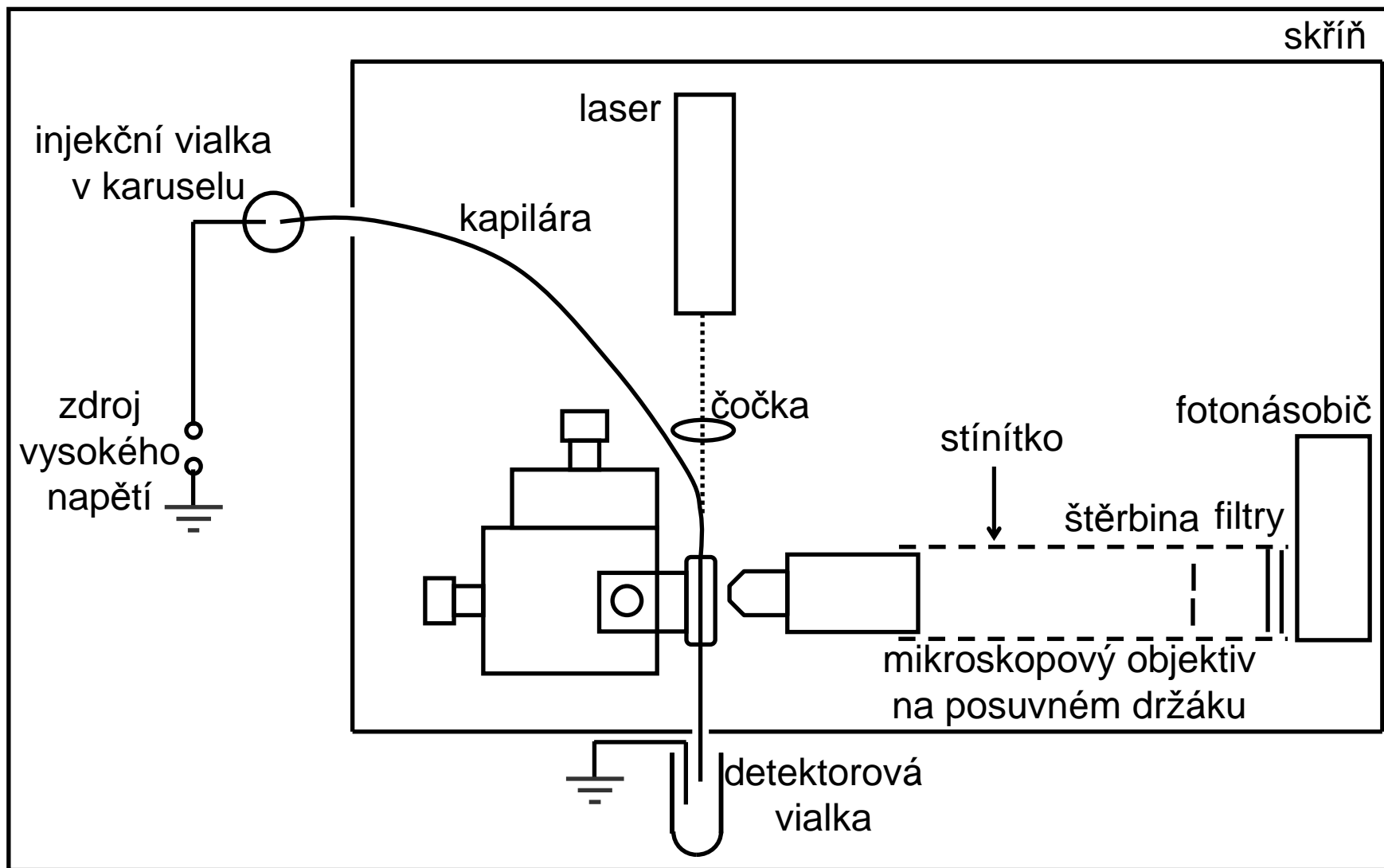
Kolonové separační techniky - HPLC, CE, ITP, atd.

Planární Techniky – 2D elektroforéza (detekce bílkovin v gelu
Coomasie blue, SYPRO Orange)

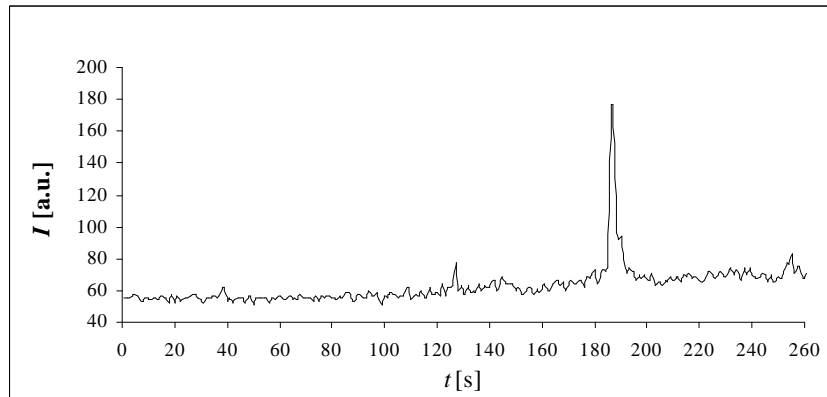
Laser nejčastěji jako zdroj excitačního záření (LIF)

kompatibilita laserového paprsku s mikrokolonovými technikami

- dostatečný světelný tok i při rel. malém výkonu laseru (~mW)
- vyšší toky způsobují bělení
- pro danou třídu analytů, resp. derivátů zvolen vhodný laser podle vlnové délky, nebo možnost derivatizace
- jednoduchá sestava

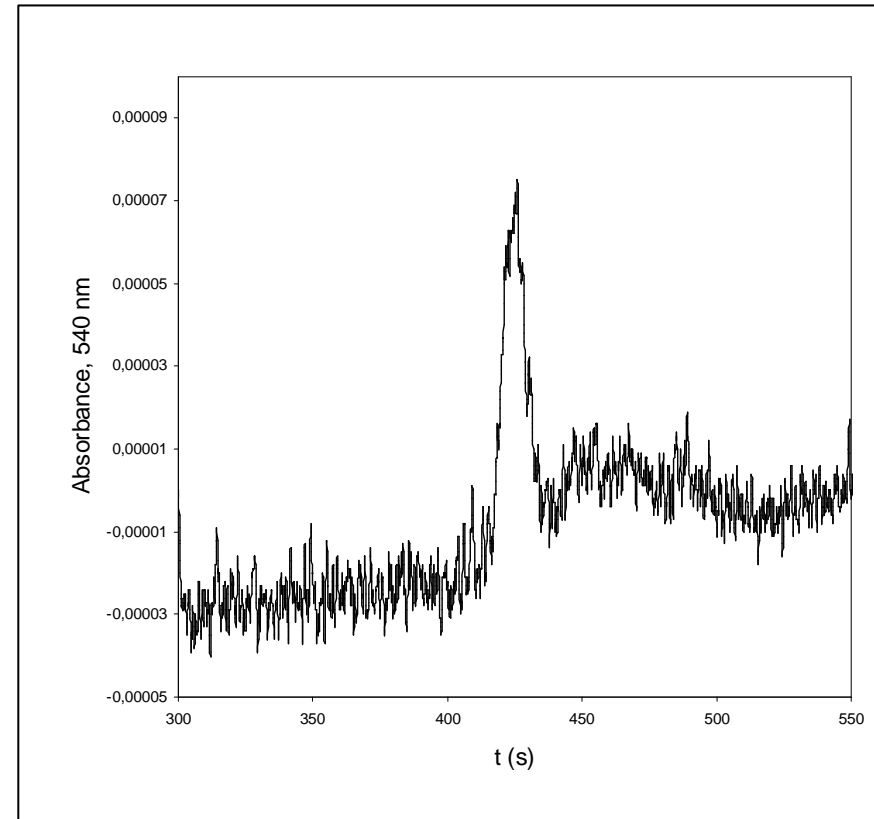


Srovnání LIF a UV-Vis detekce u CE



Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-12}$ mol/l, excitace: 532 nm, 5 mW; emise: > 560 nm, kapilára: 50 mm *i.d.*, 375 mm *o.d.*, $l = 30/37$ cm, dávkování: $U = 5$ kV, $t_i = 10$ s nebo $Dh = 2$ cm, $t_i = 30$ s, separace: 0,02 mol/l fosfát v 10% MeOH, pH 10; $U = 10$ kV.

LOD $\sim 2 \times 10^{-13}$ mol/l ... $\sim 10^2$ molekul



Analyt: Rhodamin B, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol/l
(při obdobném dávkování)

Nepřímá LIF detekce

- menší citlivost, než přímá, ale stanovovaná látka nemusí mít fluorofor
- vhodné pro stanovení jednoduchých látek
- obdoba nepřímá UV-Vis detekce

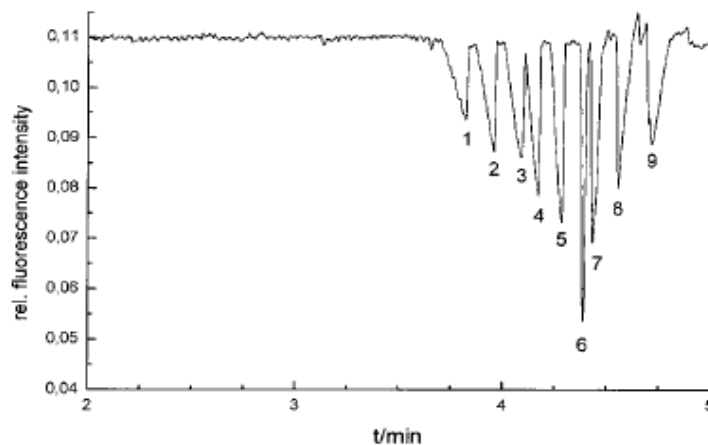


Figure 1. Separation of anions with a coated capillary and IF detection. Peak identification: 1, bromide ($250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 2, sulfate ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 3, nitrite ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 4, nitrate ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 5, heptamolybdate ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 6, azide ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 7, thiocyanate ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 8, chlorate ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 9, system peak. Separation buffer, $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ lysine, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HPTS, pH 9.9; coated capillary, 71.5 (54.0) cm length, $75 \mu\text{m}$ ID; separation voltage, -30 kV ; fluorescence detection, $\lambda_{\text{ex}} = 452 \text{ nm}$; sample injection, 25 mbar, 3 s.

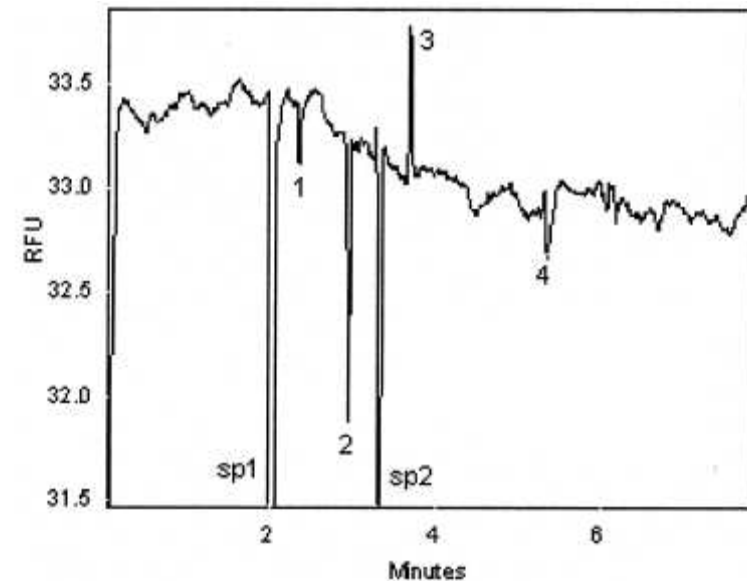


Figure 1. Electropherogram of four arsenic species with indirect LIF detection. Peak identification: 1. 2.0 mg/L As(III); 2. 2.0 mg/L DMA; 3. 1.72 mg/L MMA; 4. 2.28 mg/L As(V); sp1 and sp2. two system peaks. CZE conditions: $50 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ ID fused silica capillary, effective length is 40 cm; 2.0 mM bicarbonate + 10^{-7} M fluorescein (pH 9.28) as buffer; $+20 \text{ kV}$ as the applied voltage.

Fluorescenční značky a sondy

- **fluorescenční značky** (fluorescent labels) jsou nevlastní (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou
- **fluorescenční sondy** (fluorescent probes) jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti.

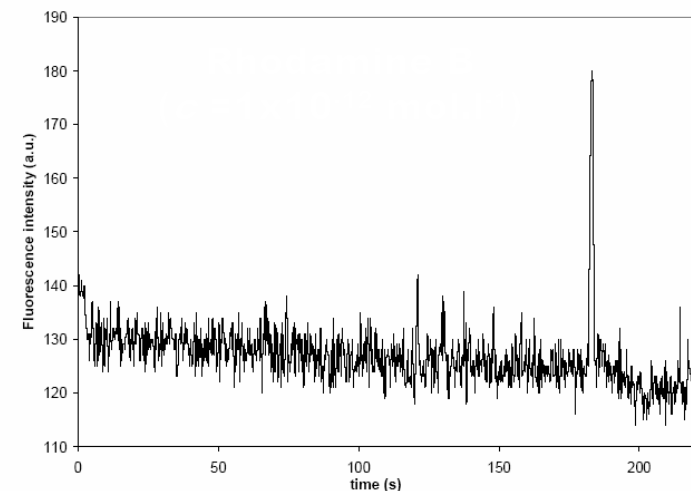
Derivatizace fluoroforem

Vnitřní (nativní) x vnější luminiscence

luminiscenční značky a sondy

Molekuly bez vlastní (vnitřní, nativní, přirozené) luminiscence lze derivatizovat luminiscenčními značkami

Omezení: lze detekovat i jednotlivé molekuly („single molecule detection“) obsahující silné luminofory, problém je jejich navázání na analyt...



Rhodamin B ($c = 1 \times 10^{-12} \text{ mol.l}^{-1}$)

Fluorescenční značky

Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd.

Použití luminiscenčních značek:

- analytické stanovení (např. v kombinaci se sep. metodou)
- fluorescenční mikroskopie
- FRET – měření vzdálenosti funkčních skupin
- flow cytometry
- fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)
- značení buňek a tkání
- fluorescenční „imunoassays“, klinická diagnostika

Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

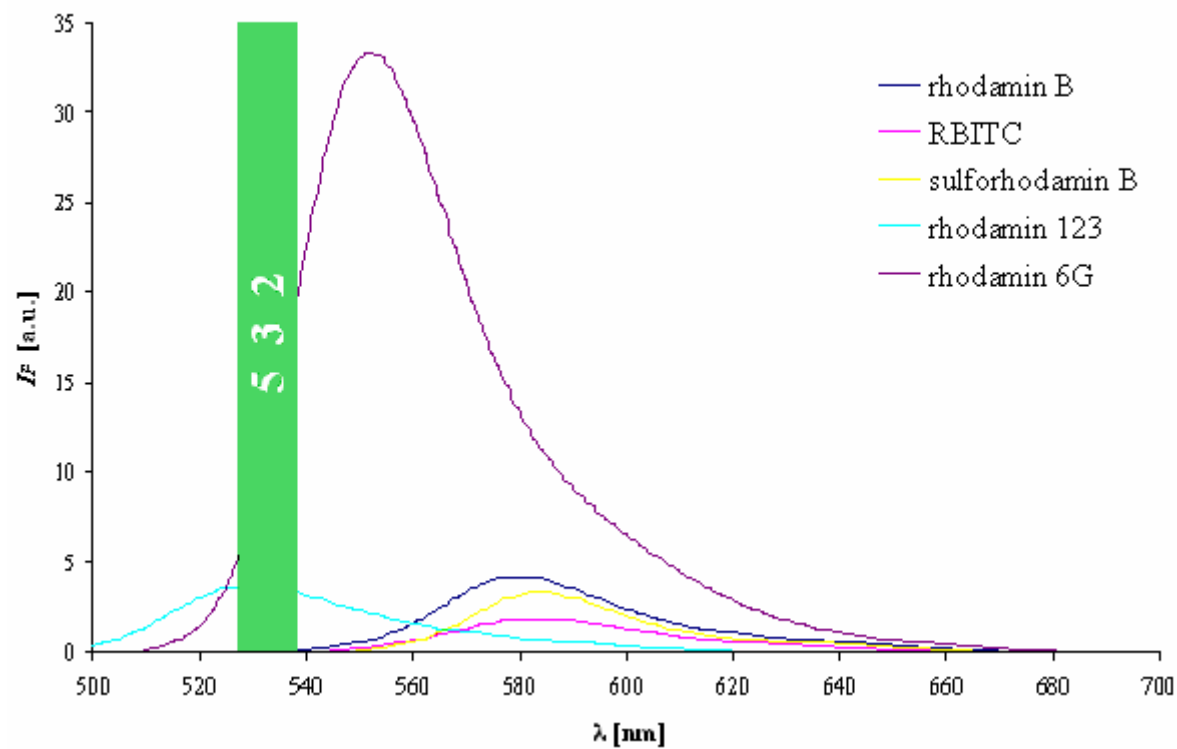
spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

vazebné místo (-NH₂, -SH skupina a další)

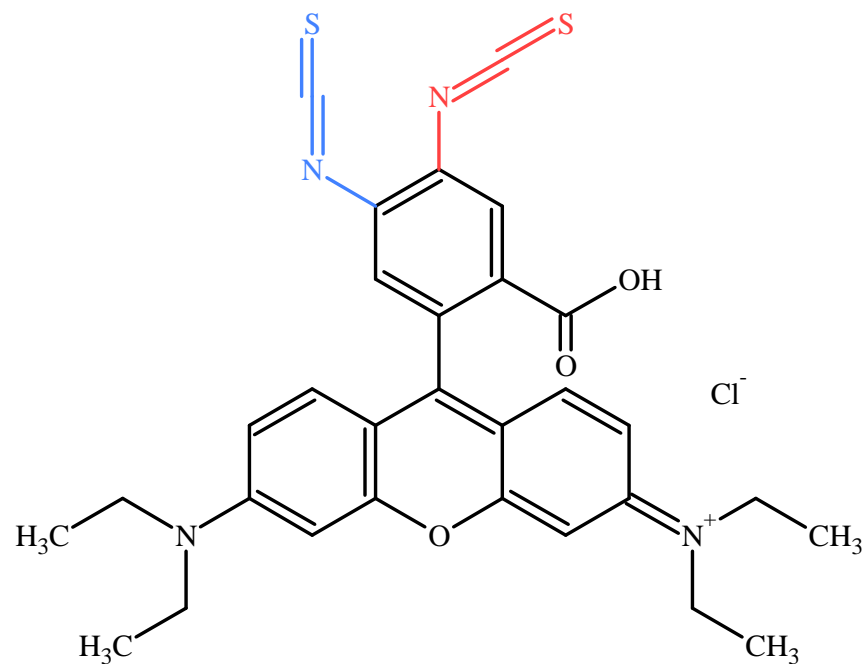
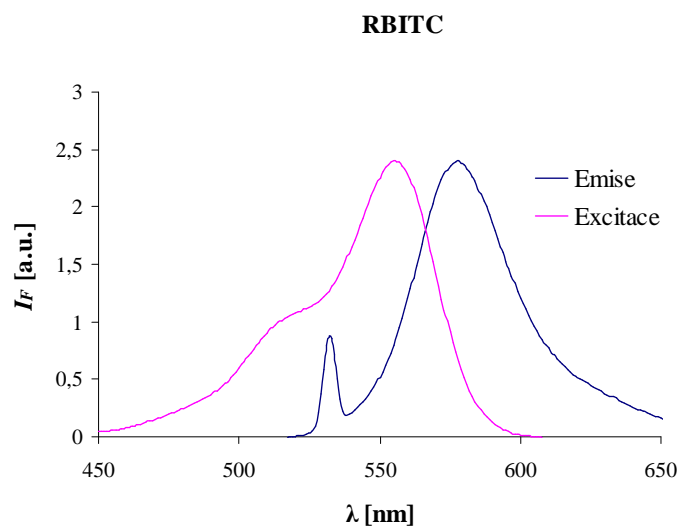
podmínky reakce (pH, koncentrace...)

hydrofobicita

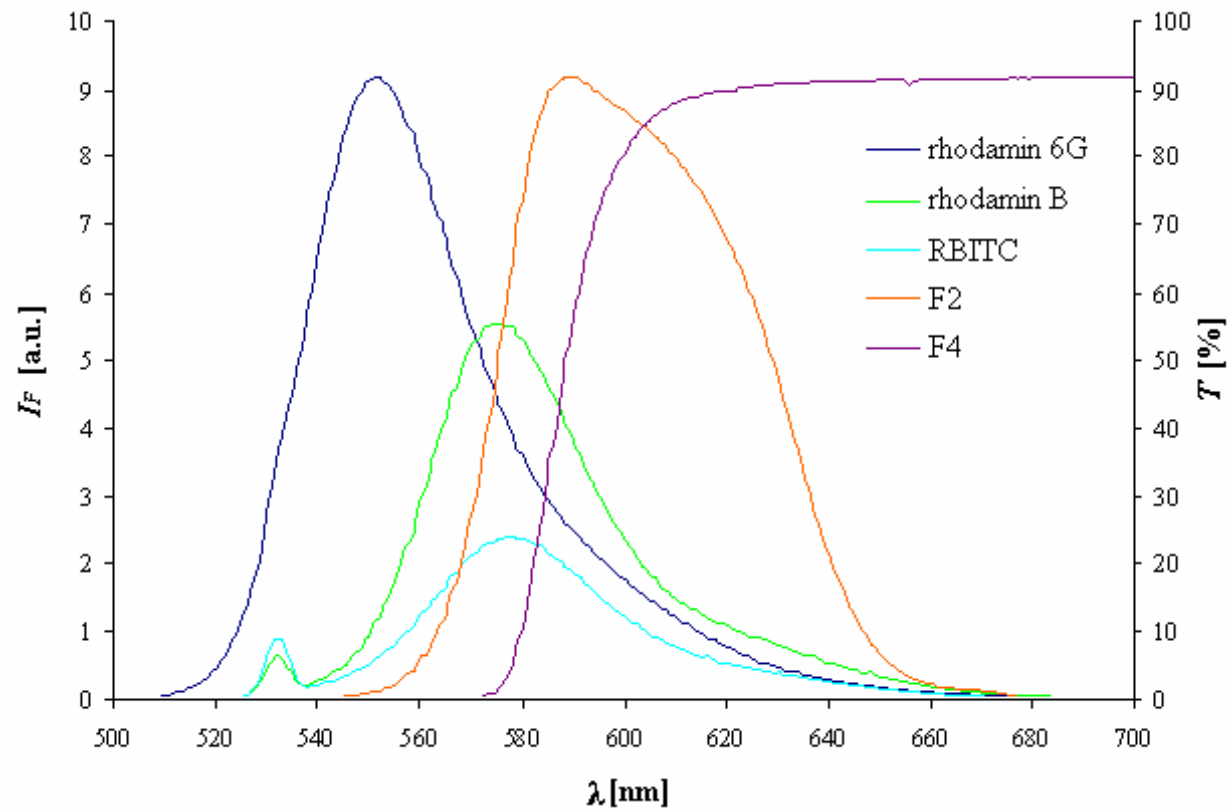
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



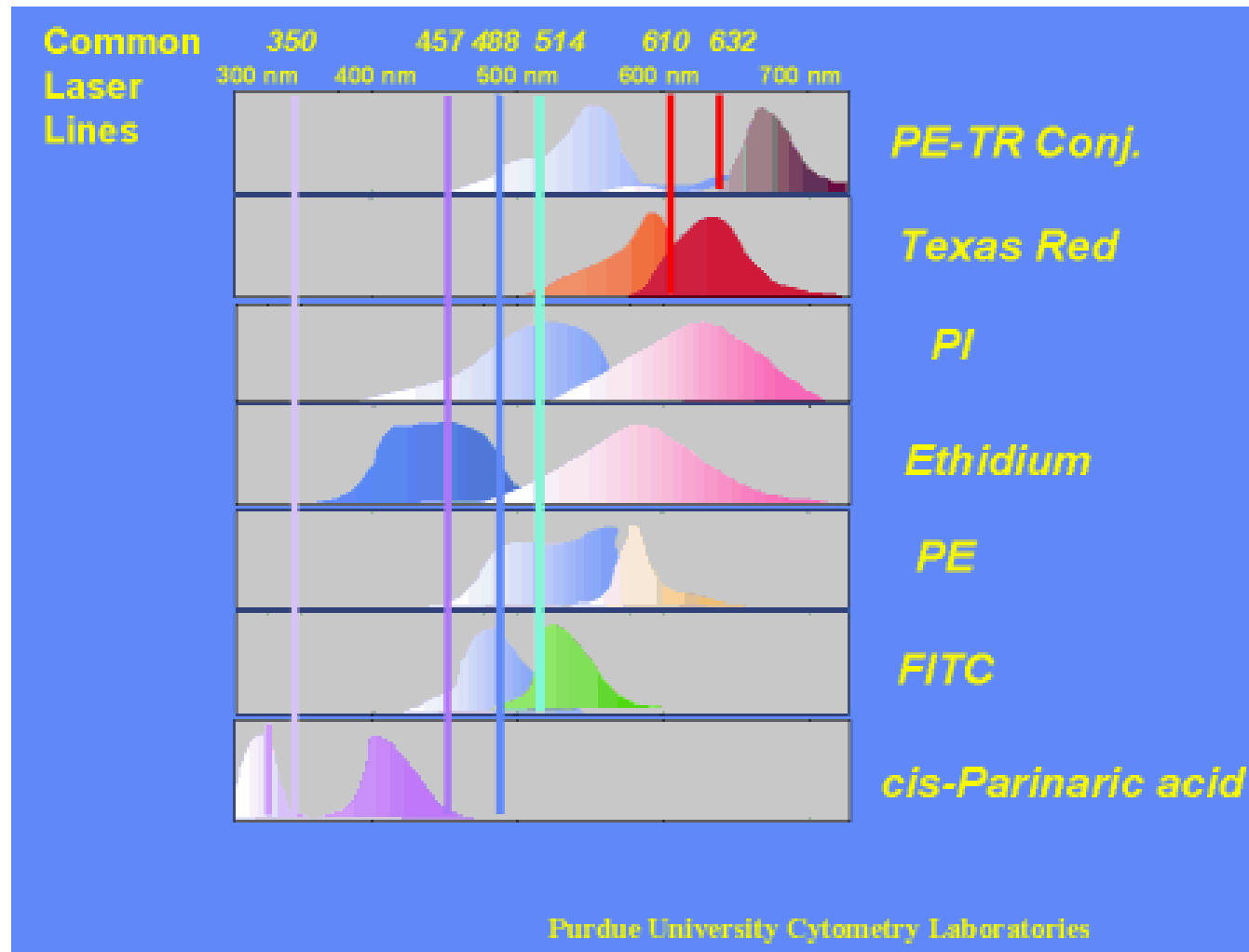
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti

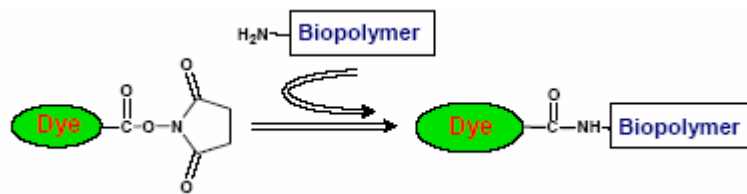


Výběr fluorescenčních barviv



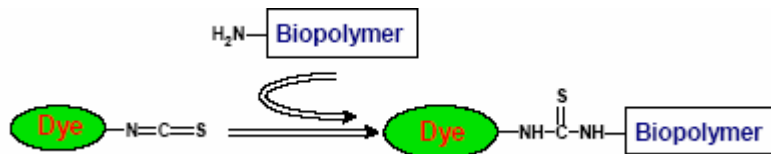
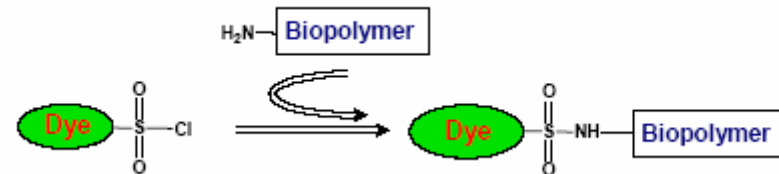
Fluorescenční značky – vazebná místa

amino-reaktivní značky



sukcinimidyl estery (Rh6GSE)

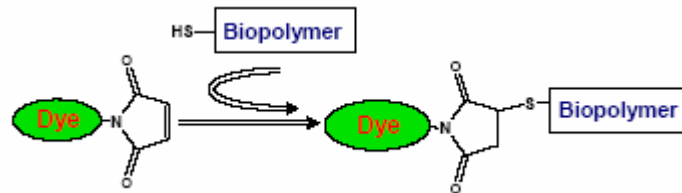
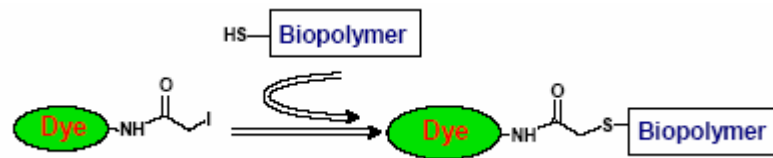
sulfonyl chloridy



isothiokyanáty (FITC, RBITC)

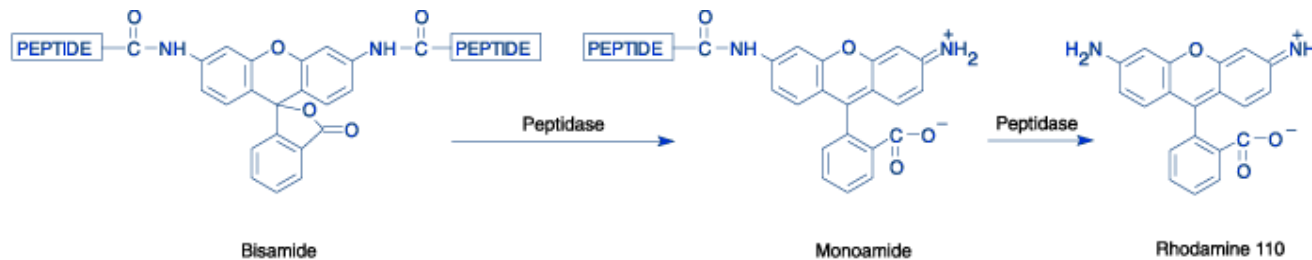
Fluorescenční značky – vazebná místa

thiol-reaktivní značky

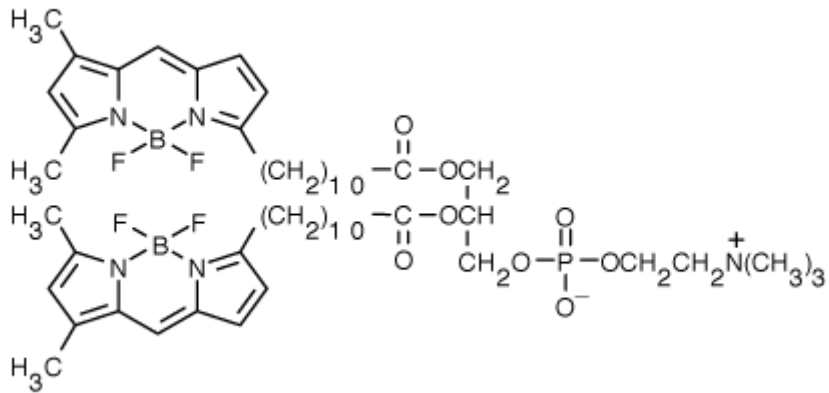
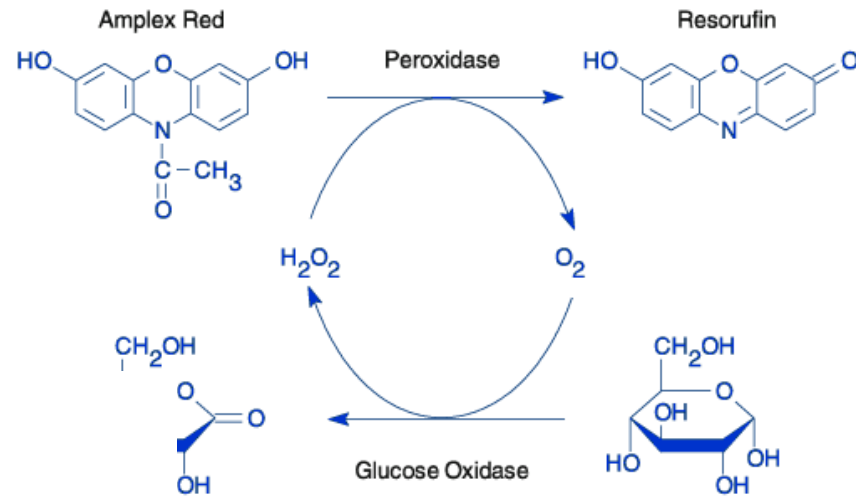
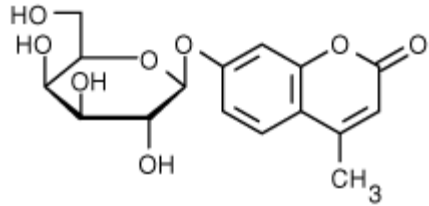


Fluorogenní substráty – stanovení enzymatické aktivity

Princip: volný fluorofor má jiné luminiscenční vlastnosti, než když je navázaný na biomolekulu. Fluorofor je na biomolekulu navázán vazbou, kterou štěpí stanovovaný enzym.



Fluorogenní substráty



Fluorescenční metody v imunoanalýze

Imunoanalytické metody:

- dříve hlavně tvorba precipitátu
- dnes značené hlavně různým způsobem značené reaktanty (antigeny a protilátky)
- radiometricky, enzymaticky, fluorescenčně (luminiscenčně) značené reaktanty
- enzymové metody mohou mít luminiscenční detekci

Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

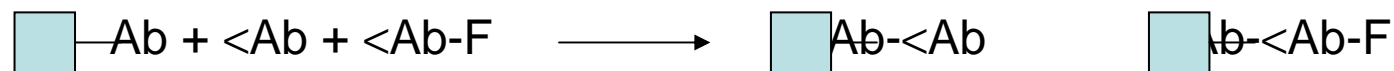
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí

Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

- dříve byla nejcitlivější metodou RIA, ale s příchodem levných laserů je rozšířenější luminiscenční detekce
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až 10^{-12} g.l⁻¹), ale luminiscenční detekce je bezpečnější a levnější

Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- řešením je **TR-FIA** (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním prostředí, v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání

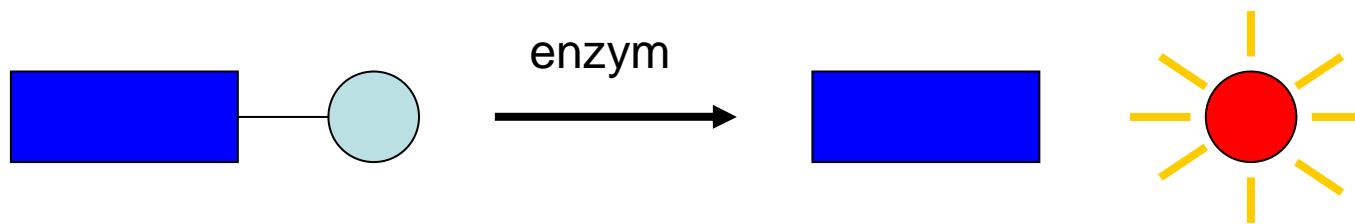


ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

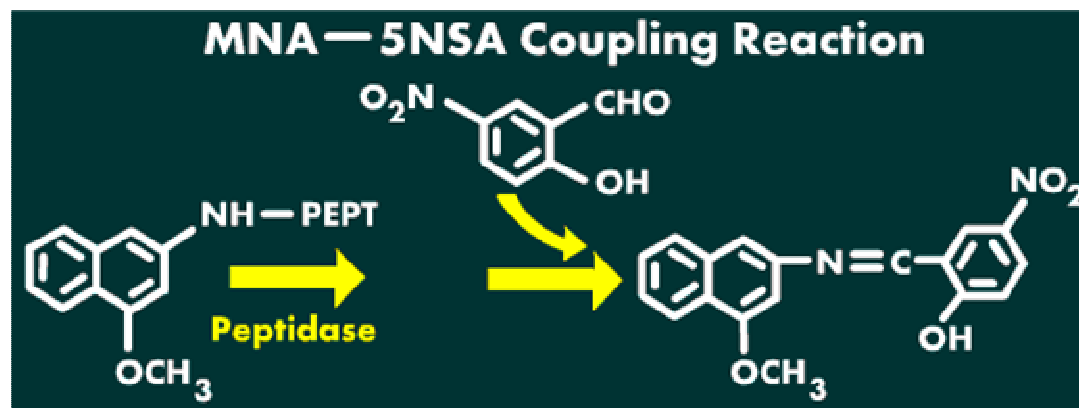
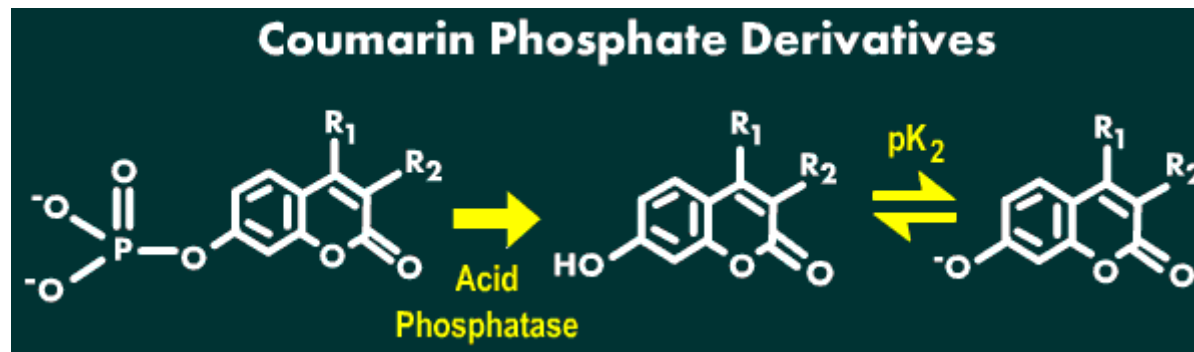
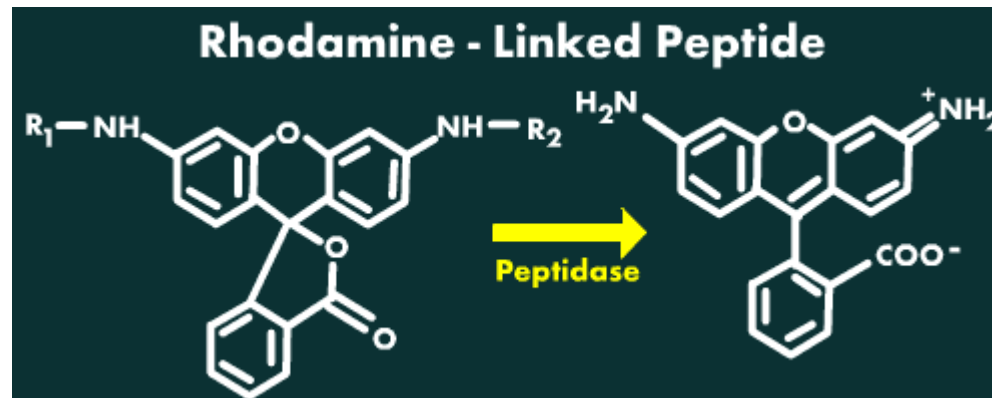
Fluorimetrická EIA

- Enzymoimunoanalýza v homogenním (EIA) a heterogenním prostředí (ELISA)

substrát je značen látkou, která po uvolnění vazby k substrátu fluoreskuje. Stanovujeme enzym, který štěpí vazbu mezi substrátem a značkou.



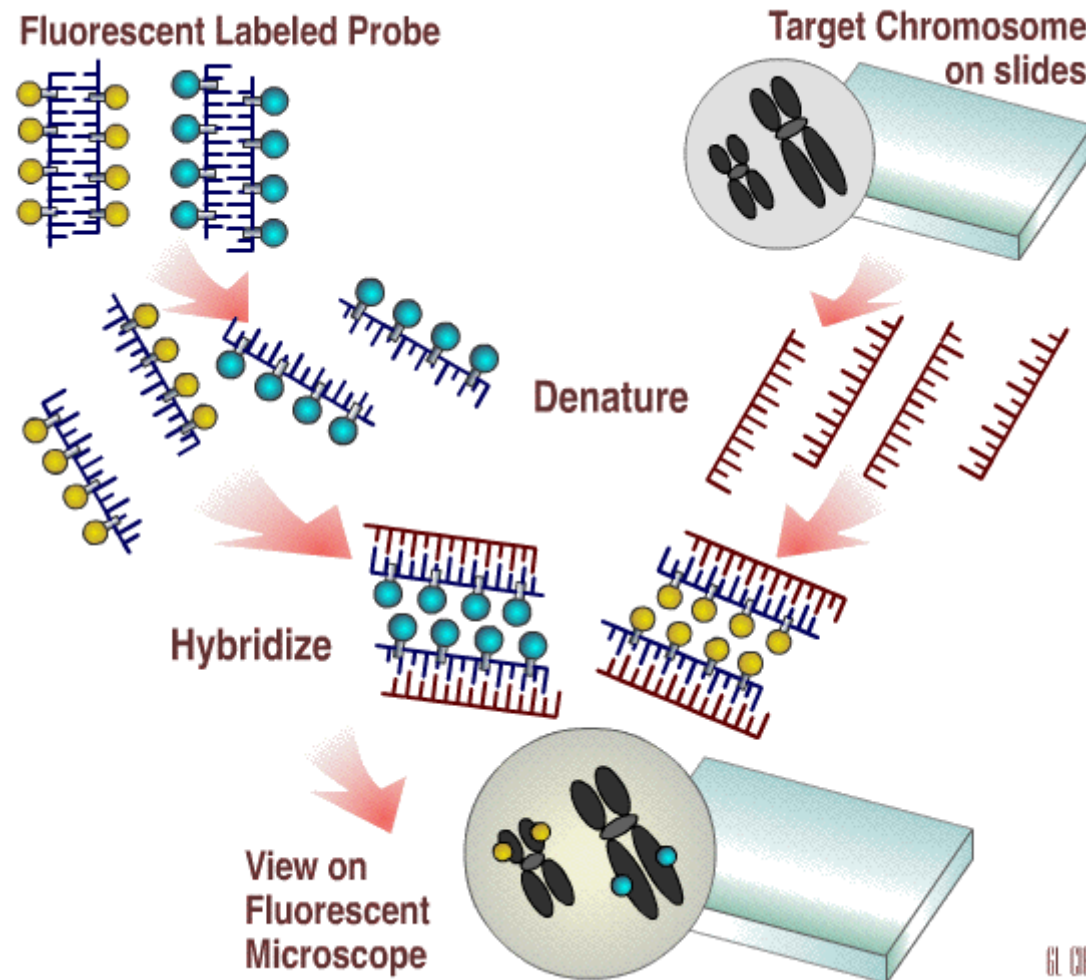
4-metyl-umbelliferyl-D-galaktosid \longrightarrow beta-D-galaktosa + 4-metyl-umbelliferyl



Fluorescenční sondy pro biologické a bioanalytické aplikace

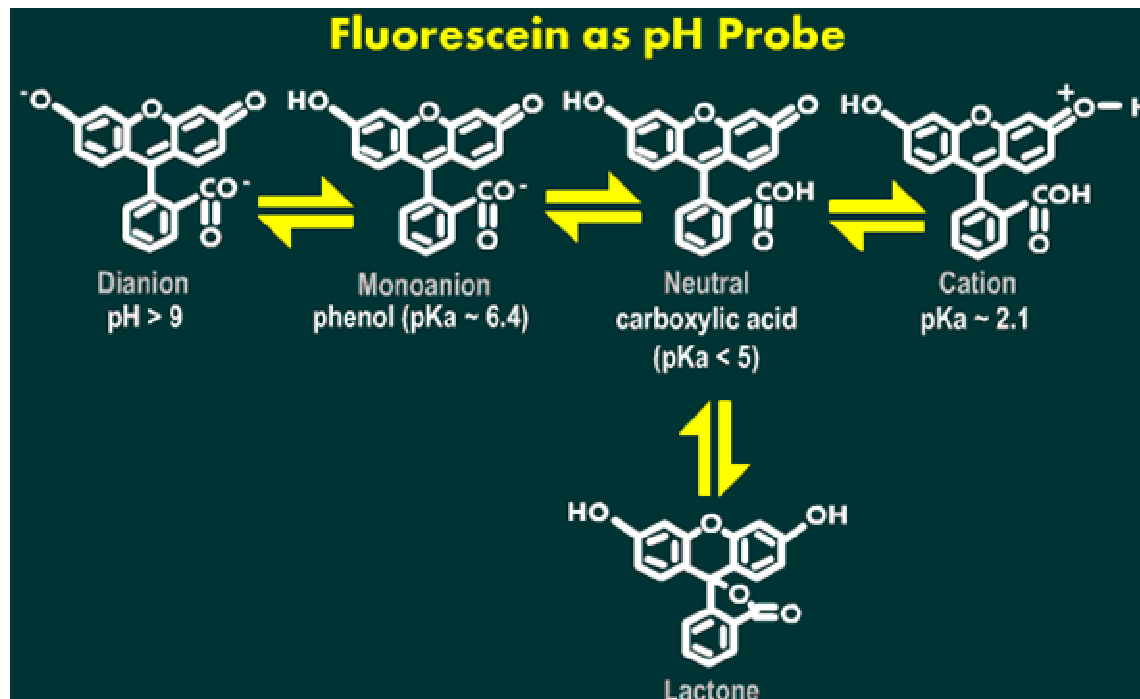
- sondy pro polaritu prostředí
- membránové sondy
- fluorescenční sondy pro nukleové kys.
- fluorescenční indikátory: sondy citlivé na určitou látku (většinou anion, či kation)
- další

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

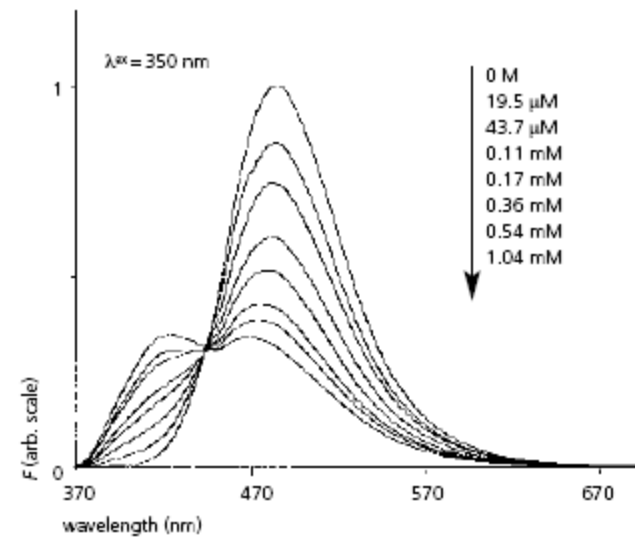
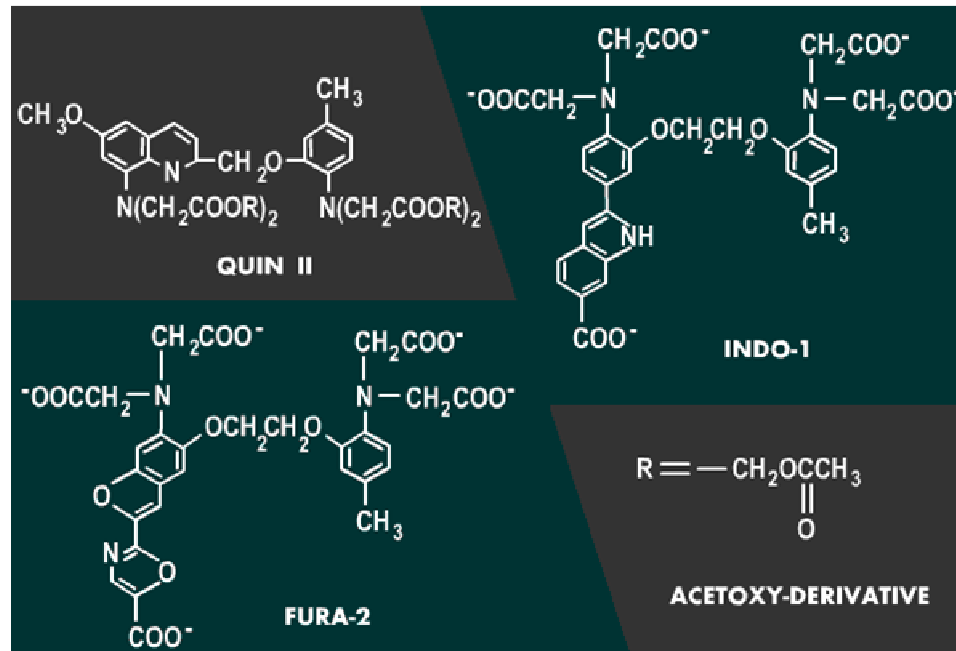


Fluorescenční indikátory: sondy citlivé na určitou látku (většinou anion, či kation)

- sondy na citlivé stanovení pH (H_3O^+) v buňkách (většinou *acetoxymethyl estery* fluoroforů)
- sondy citlivé na koncentraci kationtů Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , atd.
- sondy citlivé na O_2



Ukázky sond citlivých na Ca²⁺

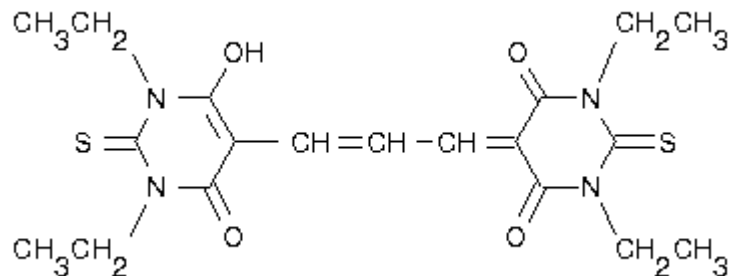


Sondy pro měření polaroty prostředí

- Typickými sondami pro dynamickou polaritu jsou **1-anilinaftalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-*p*-toluidinaftalén-6-sulfonát (TNS)**. S rostoucí polaritou prostředí se emisní spektrum posouvá k vyšším vlnovým délkám.
- Často se mění i kvantový výtěžek a doba vyhasínání fluorescence
- Polarita prostředí ovlivňuje většinu fluoroforů (např. tryptofánu)

Membránové fluorescenční sondy

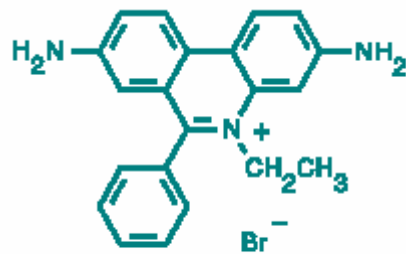
- princip: nepolární sondy se dostávají do, ve kterých převládají nepolární řetězce mastných kyselin (buněčná membrána)
- umožňují sledovat např. transport a metabolismus lipidů membránou, membránový potenciál, přenos signálu stěnou membrány atd.
- tyto sondy jsou nejčastěji analogy přirozeně se vyskytujících lipidů, případně malé lipofilní molekuly



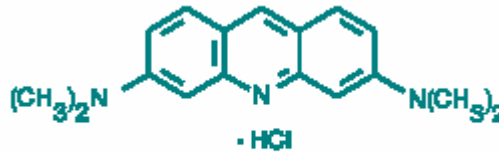
bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol – ukázka sondy na měření potenciálu membrán

Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA
- Různé principy interakce, např.
„vmezeření“ barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)



ethidium bromid



akridinová oranž