

C6200–Biochemické metody

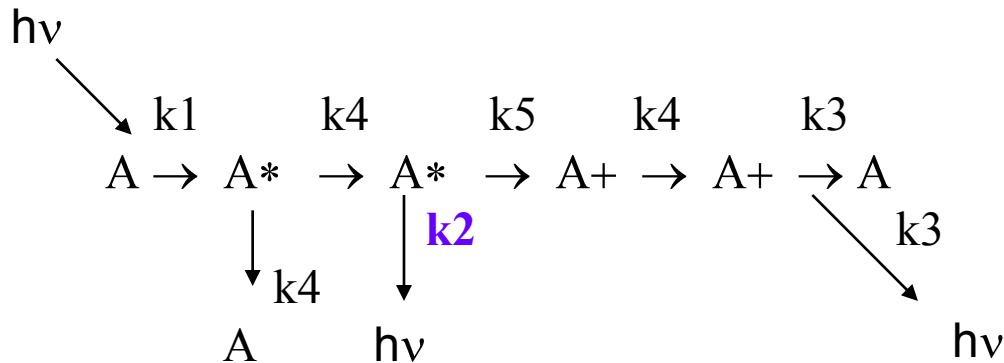
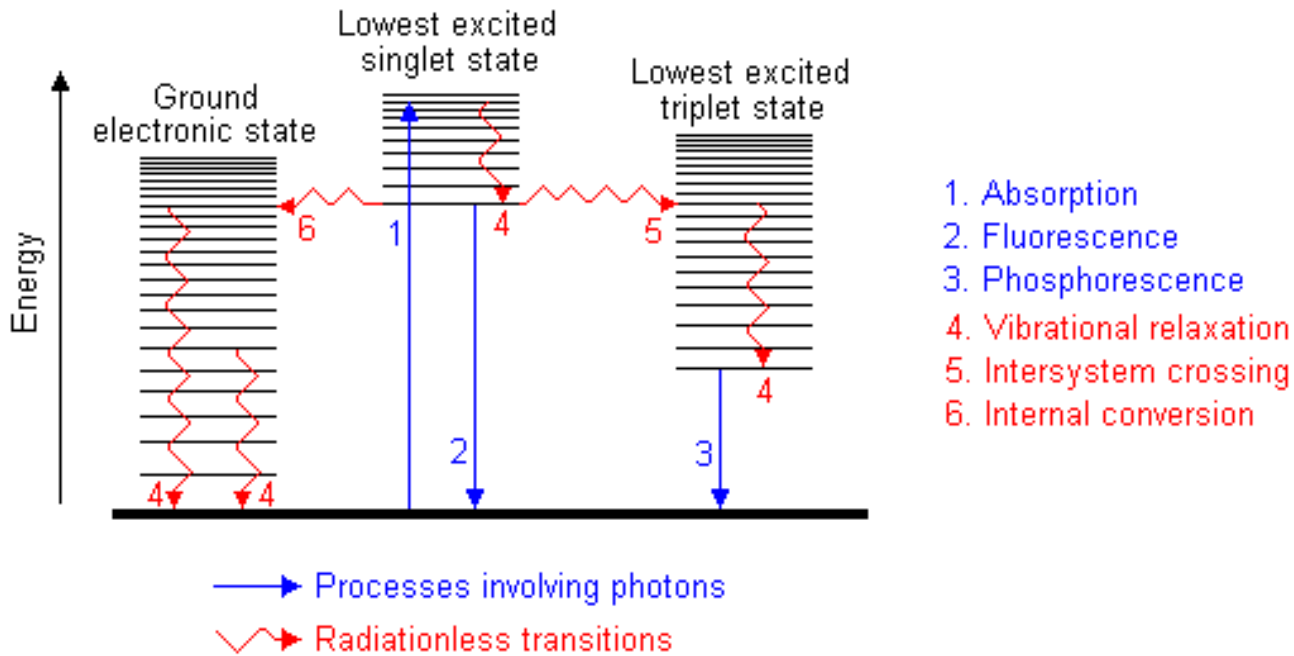
# 09\_LUMINISCENČNÍ METODY

Petr Zbořil

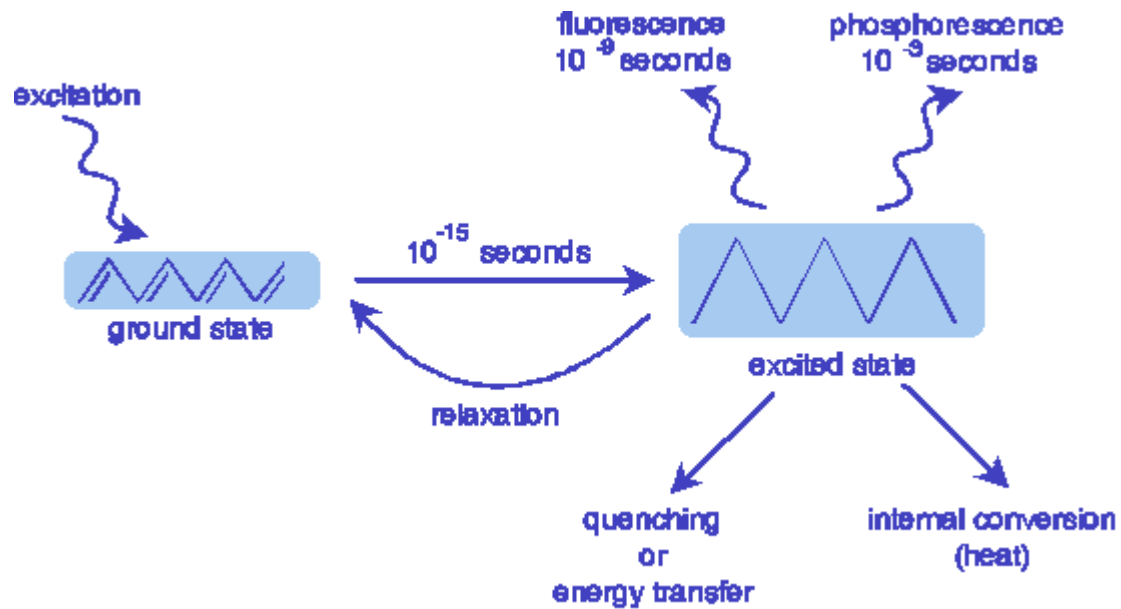
# Luminiscenční pochody

- Emise záření
  - Přejchod elektronů z excitovaného stavu do základního
- Způsob dosažení excitovaného stavu (elektronu či atomu – ionty a radikály)
  - Absorpcí fotonu – fotoluminiscence
    - **Fluorescence, fosforescence – UV, VIS**
    - Radioluminiscence – scintilátory, fosforescence
    - XRF – RTG fluorescence
  - Chemickou reakcí – chemiluminiscence
    - Včetně biochemických - bioluminiscence
  - Radioaktivním rozpadem (excitace jádra)

# Fluorescence a fosforescence

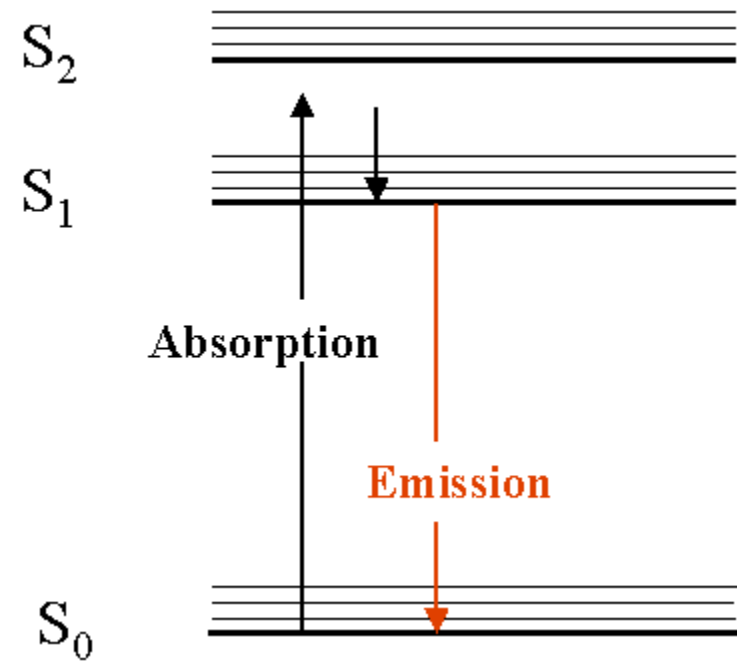


# Fluorescence a fosforescence



# Základní pojmy

Excitace a emise

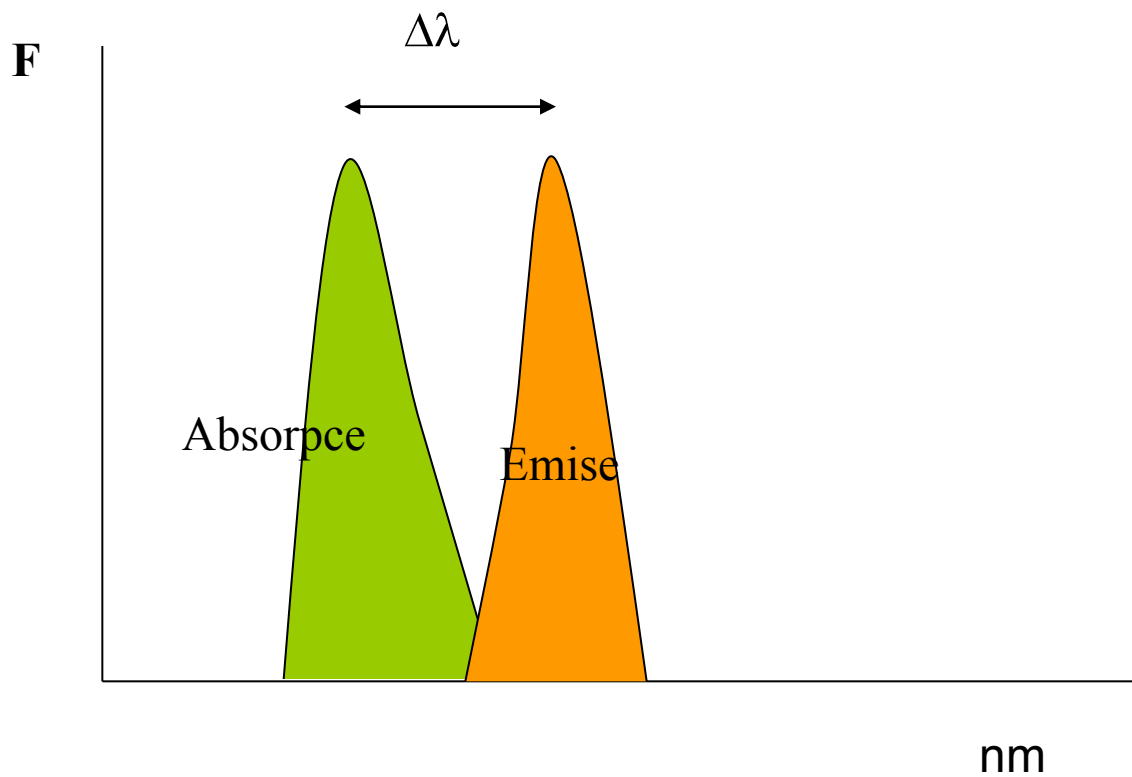


Interakce s rozpouštědlem  
Singletový excitovaný stav

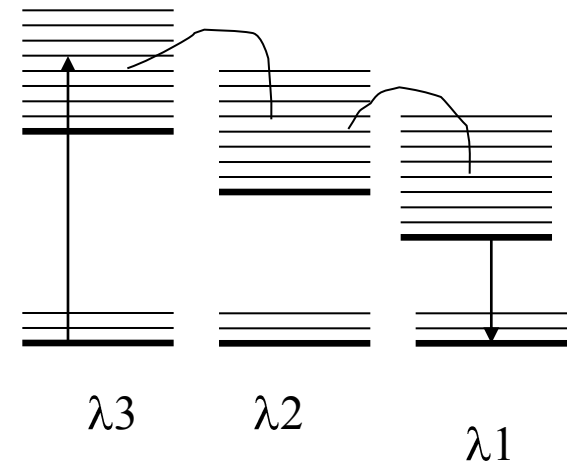
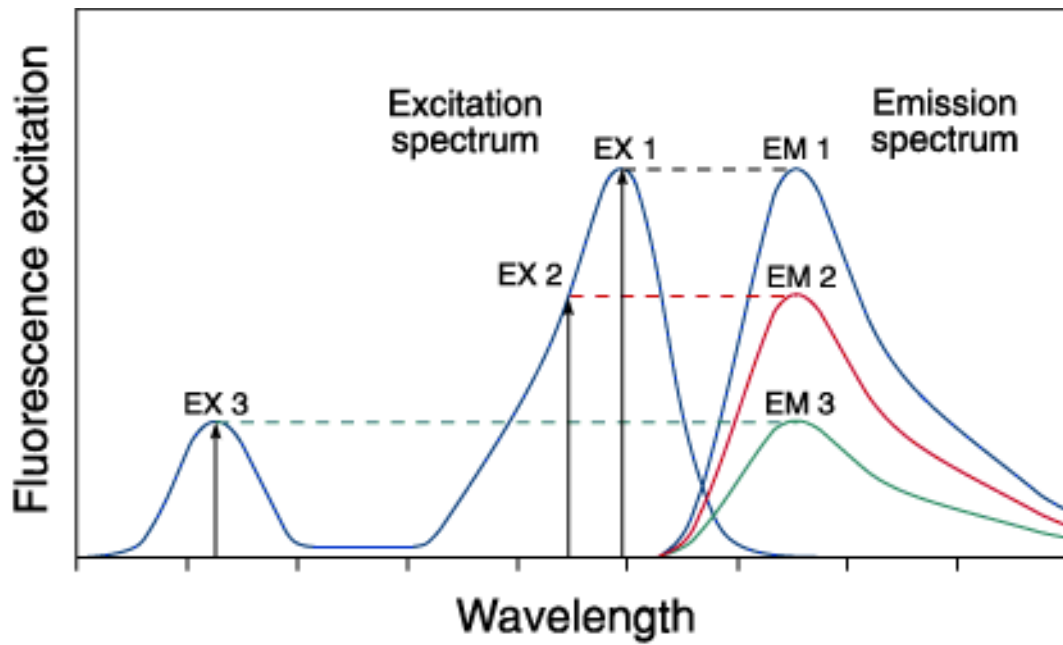
Singletový základní stav

# Základní pojmy

Stokesův posun – ztráty energie po dobu excitovaného stavu



# Základní pojmy



# Základní pojmy

Kvantový výtěžek fluorescence

$\Phi$  = počet kvant emitovaných/počet kvant absorbovaných

$$\Phi = k_e / (k_e + \sum k_k)$$

$k_e$  = rychlost emise

$k_k$  = rychlost konverzních  
procesů

Intenzita fluorescence látky =  $f(\epsilon, \Phi, N)$

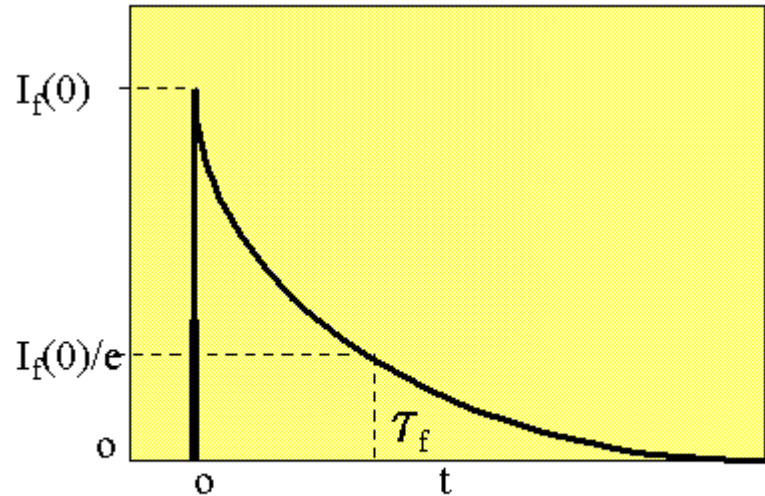


# Základní pojmy

Doba života excitovaného stavu  
Doba potřebná k poklesu fluorescence na hodnotu  $1/e$   $I_0$

Střední doba života  $\tau$

$$I_f = I_0 e^{-t/\tau} \quad \ln(I_0/I_f) = t/\tau$$



Přirozená doba života  $\tau_0$

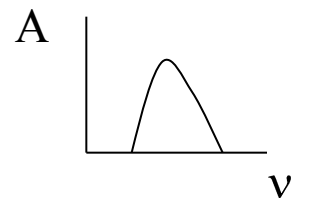
Definovaná pro  $\Phi = 1$

$$\tau_0 = 2,88 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \nu_A^2 \cdot \int_0^{\infty} \epsilon(\nu) d\nu$$

$n$  - refrakční index rozpouštědla

$\epsilon$  - molární abs. koeficient

$\nu$  - vlnčet abs. maxima



# Základní pojmy

$$\Phi = \tau/\tau_0$$

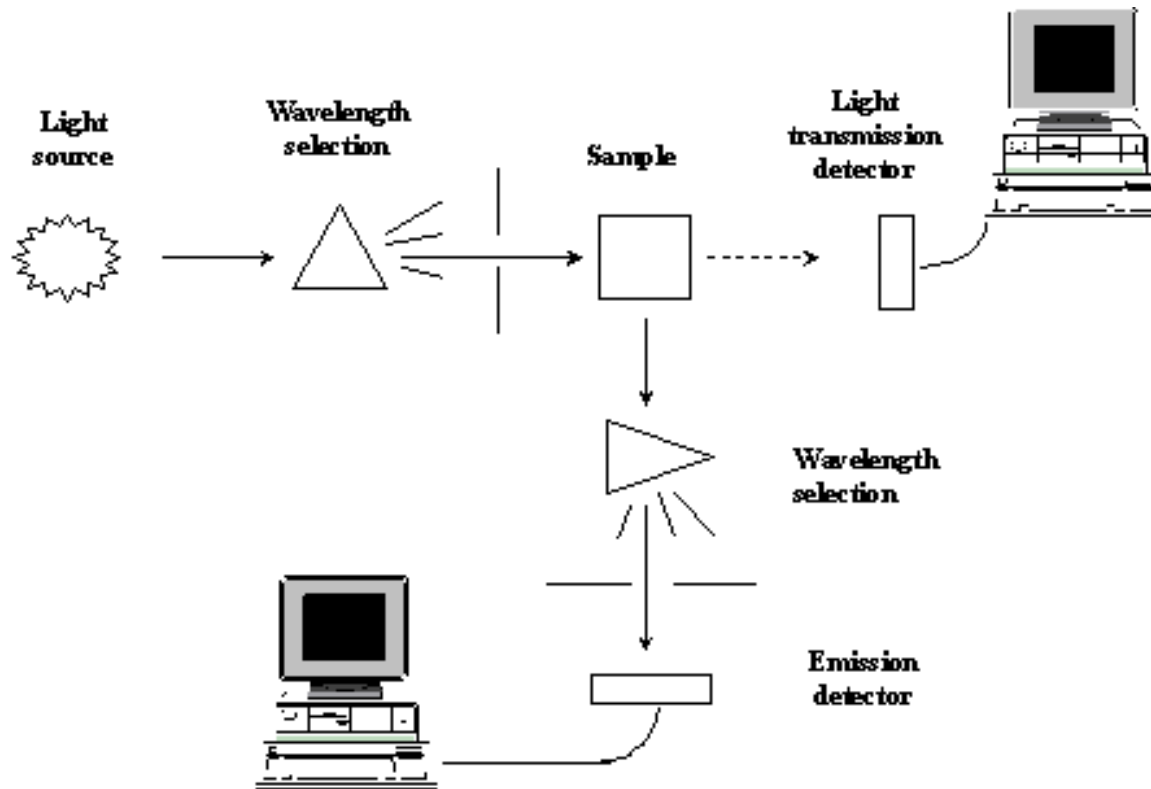
Střední doba života fluorescence

Fluorescein	4,6 ns
Chininsulfát	15 – 40 ns
NADH	0,5 ns

# Biochemicky významné fluorofory

	$\lambda_{exc}$	$\lambda_{em}$	Q (25°C)
Tyrosine	275	303	0.14
Tryptophane	287	348	0.13
Indole	287	348	0.45
NADH	350	460	0.03
Riboflavine	450	535	-
Chlorophylle	436	670	0.30 (acétone)
Quinine	250	450	0.51 (1M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Pyridoxamine	324	392	0.11 (pH=8.2)
Vitamine A	325	470	- (ethanol)
Aminobenzoate	294	345	-

# Instrumentace



# Instrumentace

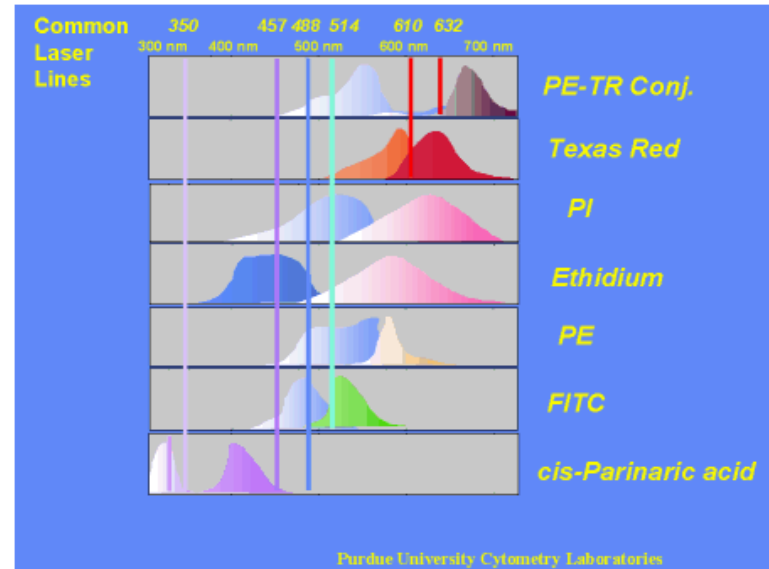
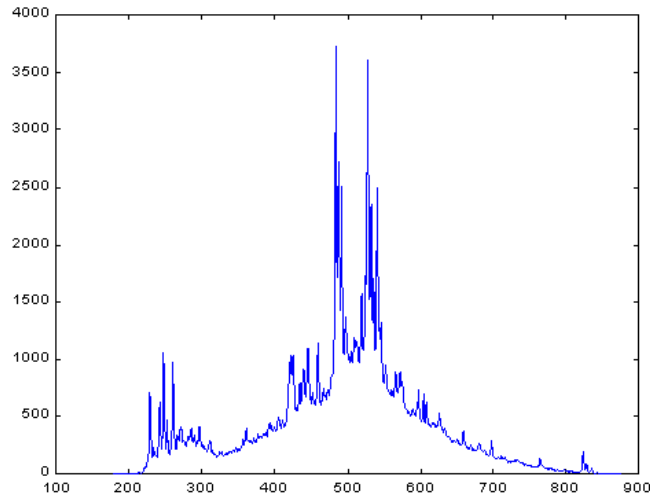
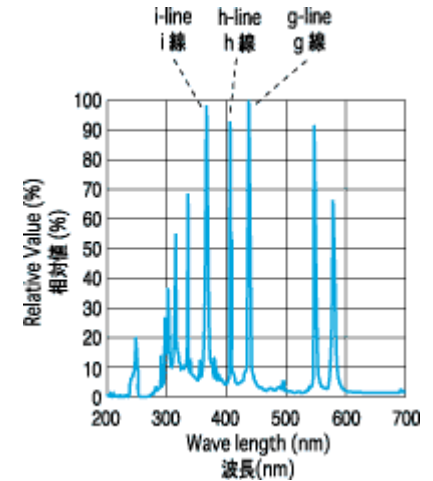
Zdroj:

Xenonová lampa – O<sub>3</sub>!

Rtuťová výbojka

Laser

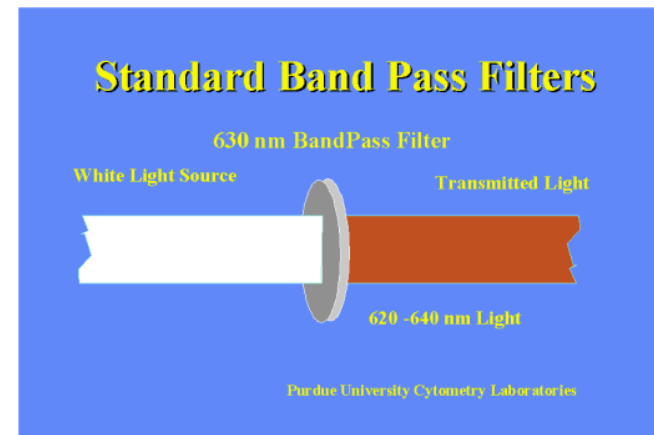
Světelné diody - LED (430, 450, 505, 592, 612 a 637 nm)



# Instrumentace

Monochromátor

- mřížka
- filtry

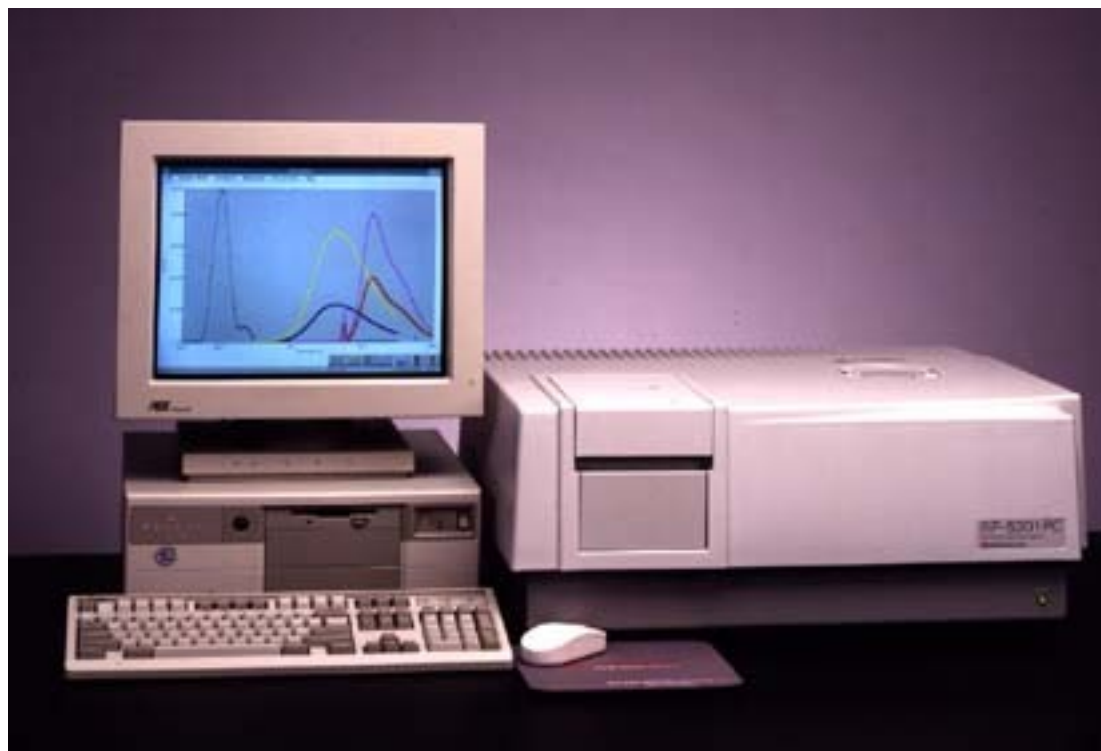


# Variace přístrojů

- Základní typ
- Scintilační – čítač fotonů
- Časosběrné (time-resolved)
- Polarizační
- Destičkové – seriová měření
- Vybavení světlovodnými vlákny
- Cytometry
- Fluorescenční mikroskopie
- Další speciální – oximetry

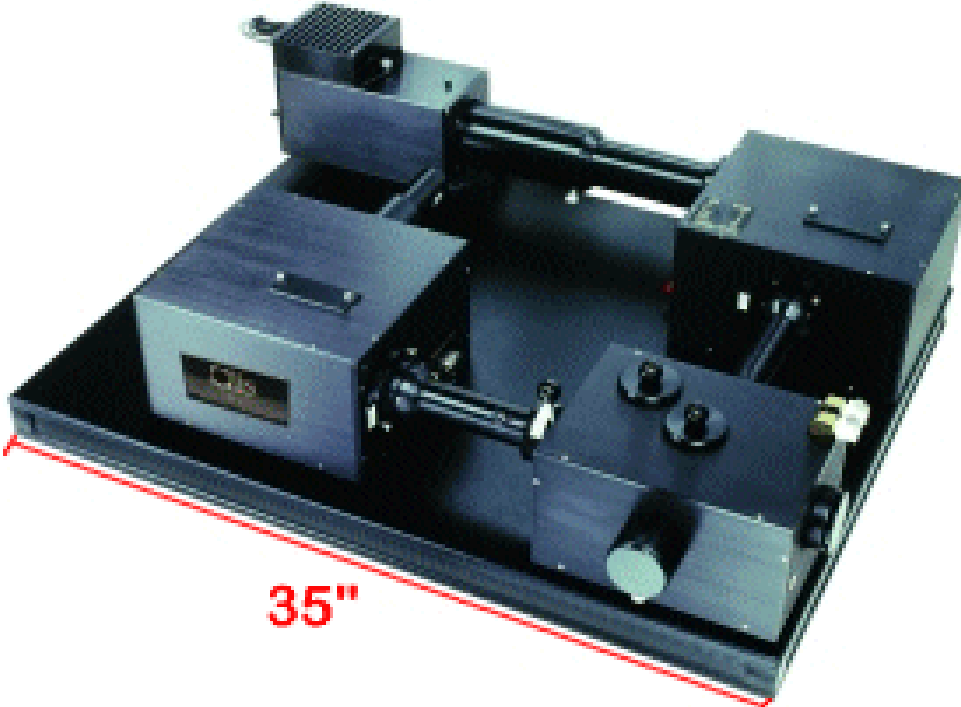
# Instrumentace

**RF-5301PC – spektrofluorimetr Shimadzu**





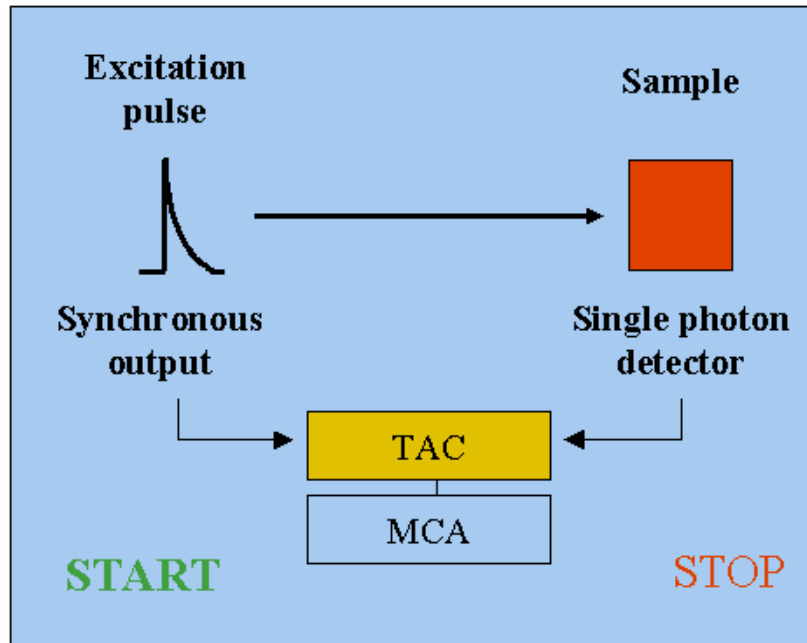
# Instrumentace



35"

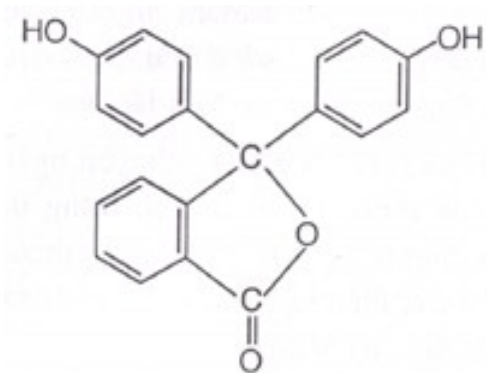
# Instrumentace

Měření střední doby života fluorescence

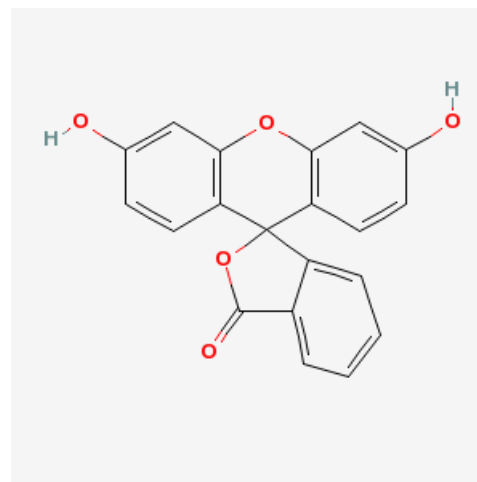


# Podmínky fluorescence

## Struktura



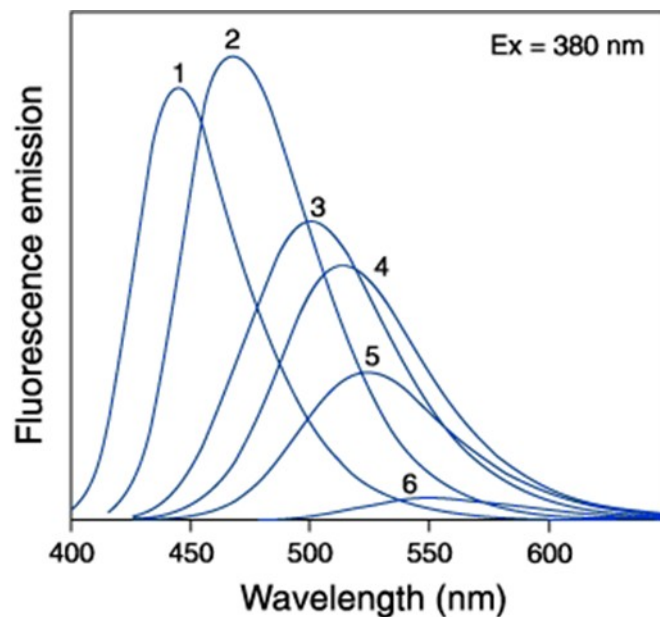
**Fenolftalein**



**Fluorescein**

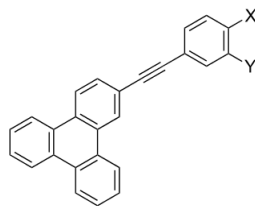
# Vliv okolí fluoroforu

- Vliv polarity
- Emisní spektra aduktu badanu (B6057 - 6-Bromoacetyl-2-dimethylaminonaftalen) s 2-merkaptoetanolem
- 1) toluen
- 2) chloroform
- 3) acetonitril
- 4) etanol
- 5) metanol
- 6) voda

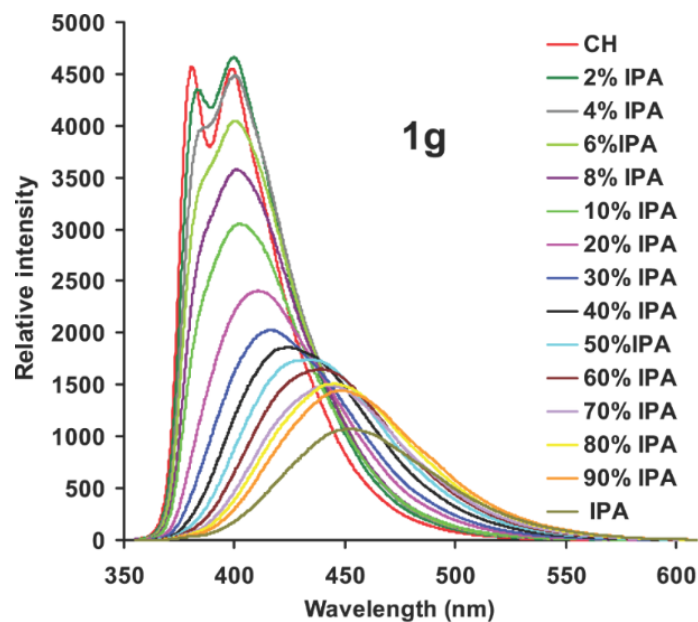


# Vliv okolí fluoroforu

- Vliv polarity
- Emisní spektra derivátů g v cyklohexan-isopropanol

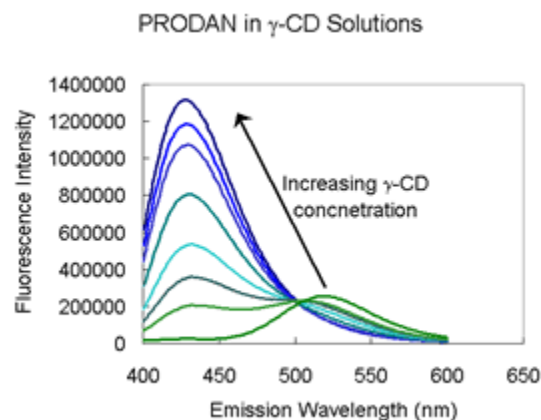
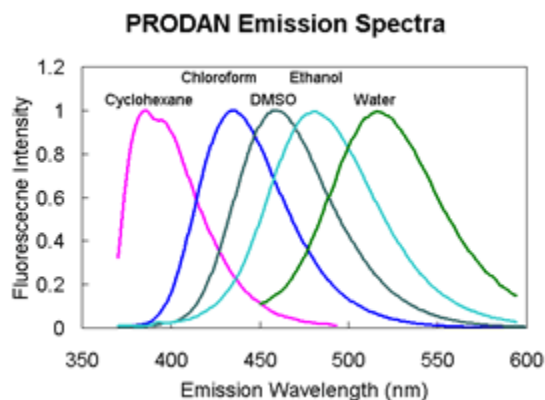
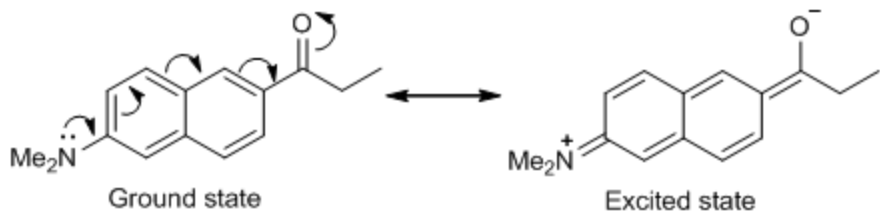


**1a** X = Y = H; **1b** X = H, Y = CF<sub>3</sub>; **1c** X = CN, Y = H;  
**1d** X = COMe, Y = H; **1e** X = COPh, Y = H;  
**1f** X = Y = OC<sub>10</sub>H<sub>21</sub>; **1g** X = NMe<sub>2</sub>, Y = H



# Vliv okolí fluoroforu

- Vliv polarity
- Spektra PRODANu v rozpouštědlech a v cyklodextrinu



$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_1[CD]} + \frac{1}{F_\infty - F_0} \quad (1)$$

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{(F_\infty - F_0)K_1K_2[CD]^2} + \frac{1}{F_\infty - F_0} \quad (2)$$

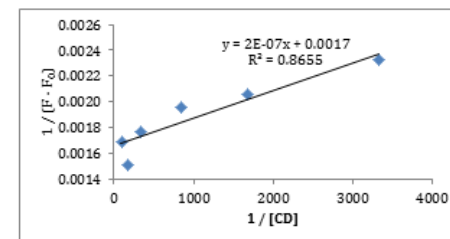


Figure 6

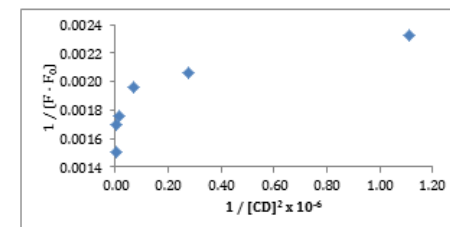


Figure 7

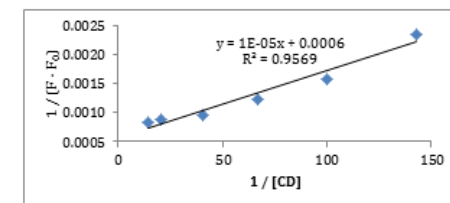


Figure 8

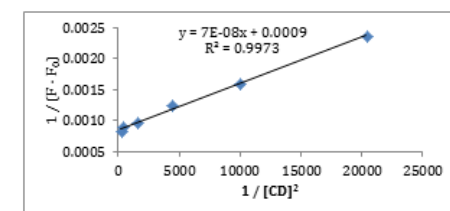
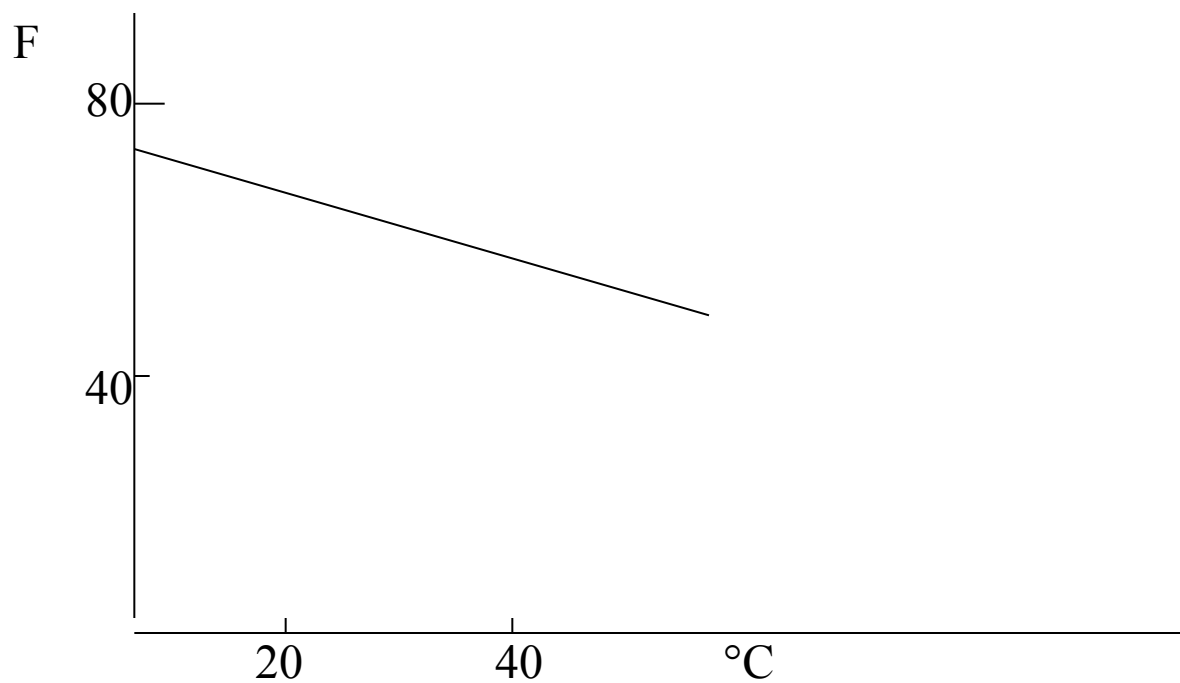


Figure 9

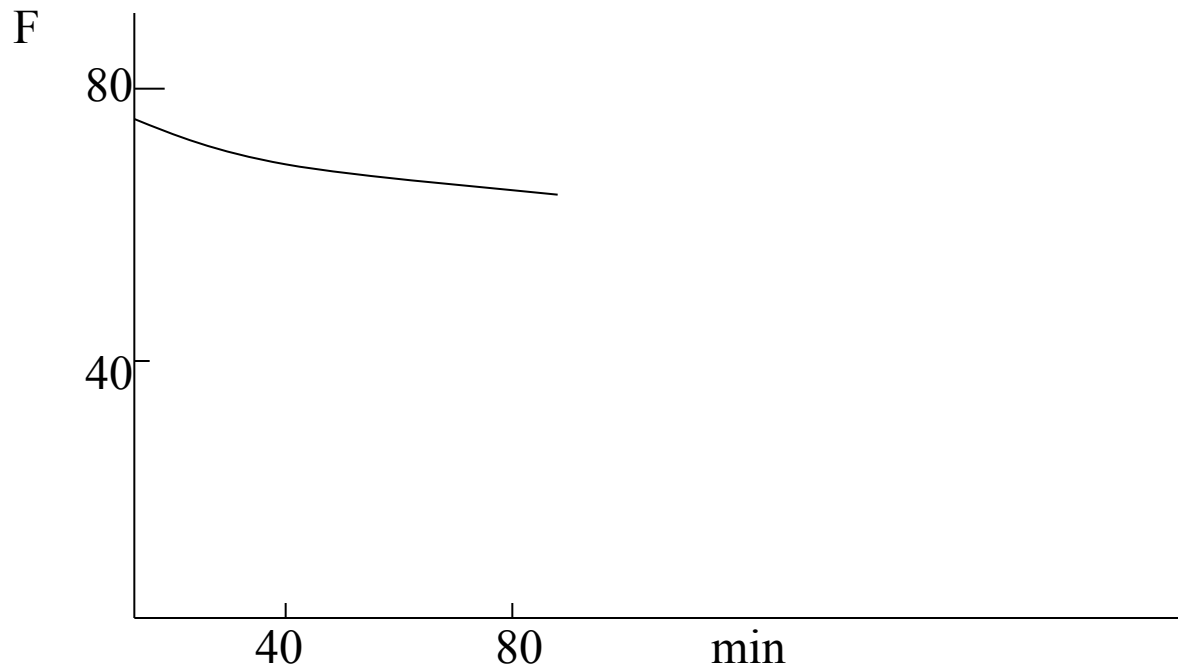
# Vliv okolí fluoroforu

Závislost fluorescence na teplotě (viskositě)



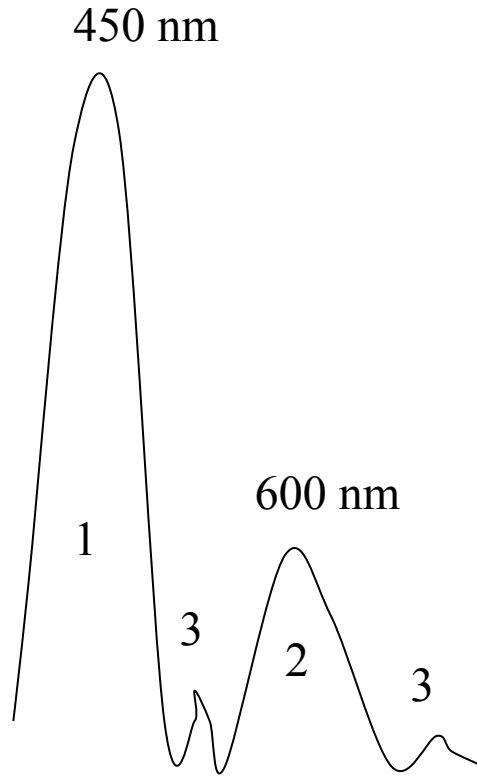
# Podmínky fluorescence

Stabilita fluorescenčního signálu  
chininsulfátu





# Podmínky fluorescence



Emisní spektrum

- 1 Rayleighův rozptyl (Tyndalův rozptyl)
- 2 Fluorescenční emise
- 3 Ramanův rozptyl

Excitace 450 nm

# Aplikace

- Stanovení koncentrací a změn – rychlost
- Proteinová dynamika a denaturace
- Rychlá solvatační kinetika
- Dynamika skládání bílkovin
- Struktura a flexibilita membrán
- Vazba antigen-protilátka, cytologie
- Fluorescenční mikroskopie
- Selektivní detekce u chromatografie a elektroforesy
- Detekce při sekvenaci DNA, RT PCR
- FISH
- Stanovení  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  nebo  $\text{H}_2\text{O}_2$  uvnitř buněk a organel
- Měření membránových potenciálů

# Kvantitativní fluorimetrie

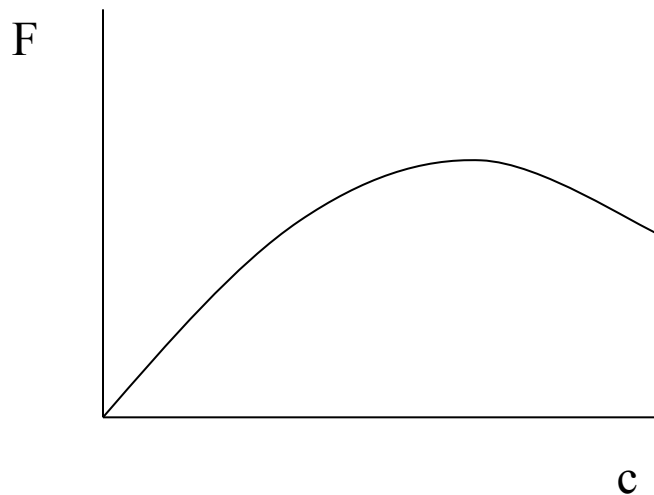
Závislost intenzity fluorescence na koncentraci látky

$$F = f(I, \varepsilon, c, \Phi)$$

$$F = I_0 \Phi [1 - 10^{-\varepsilon cd}]$$

jestliže  $c \rightarrow 0$

$$F = I_0 \Phi \cdot 2,3 \cdot \varepsilon d \cdot c$$



# Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení koncentrace aminokyselin

20.000 Kč/g

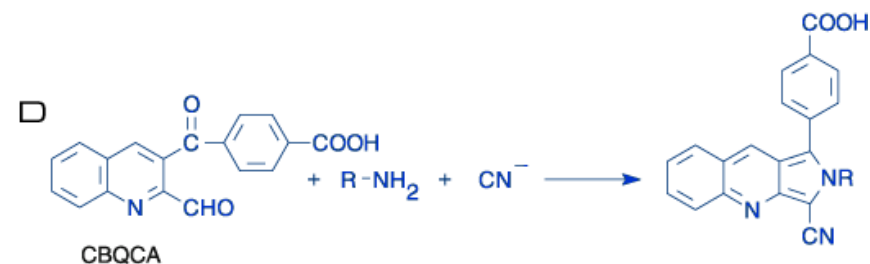
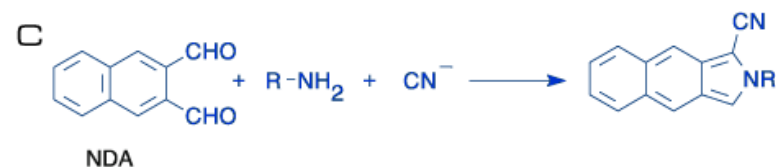
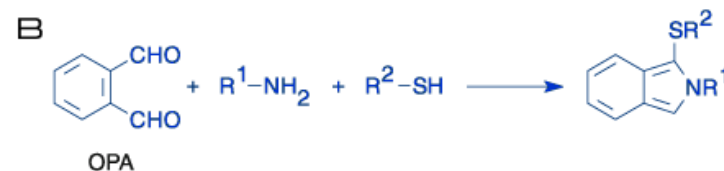
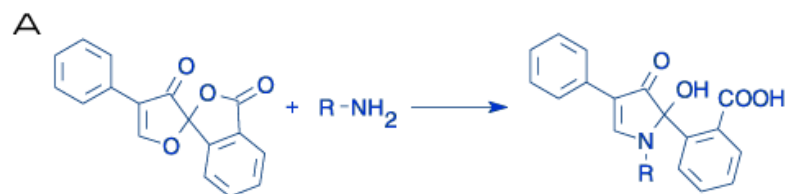
390/464 nm (395/475)

340/455 nm

2,3-Naphthalenedicarboxaldehyde |

3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-  
2-carboxaldehyde

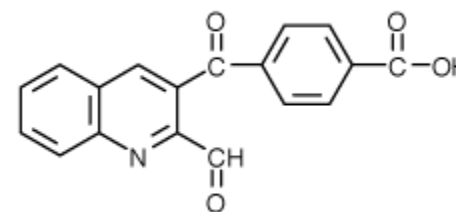
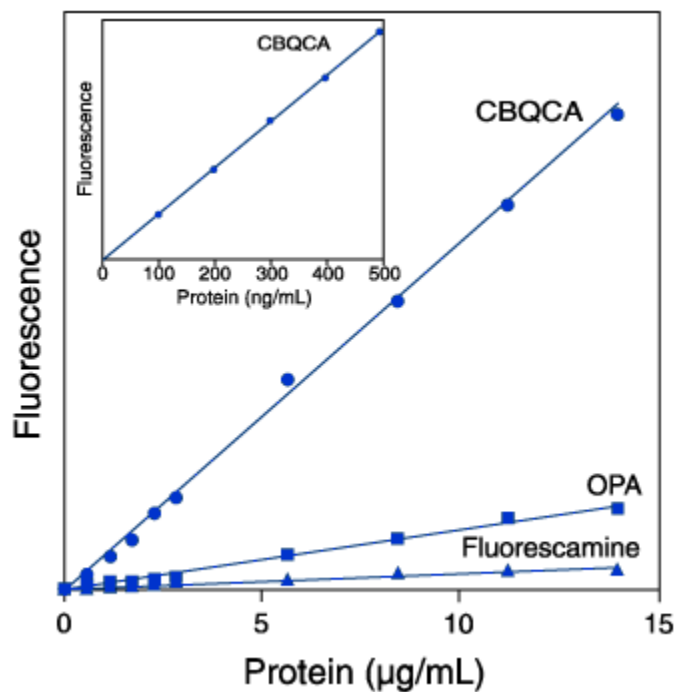
450/550 nm



# Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení bílkovin

CBCQA - 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde

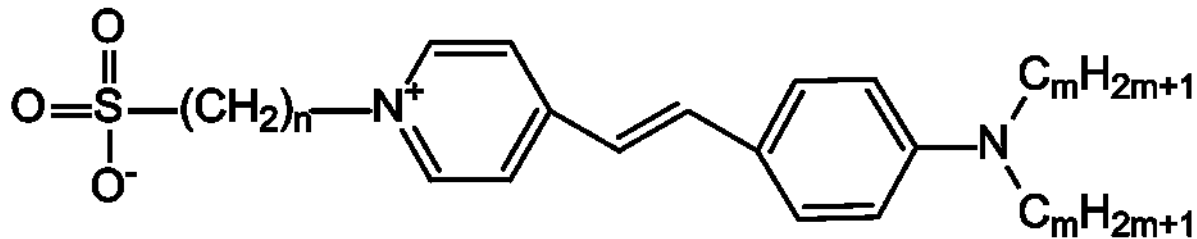


# Kvantitativní fluorimetrie

Detekce bílkovin v gelu

(barevně: Coomasie blue, stříbrné barvení)

Fluorimetricky: SYPRO Orange (Molecular probes) – citlivost 1 – 2 ng

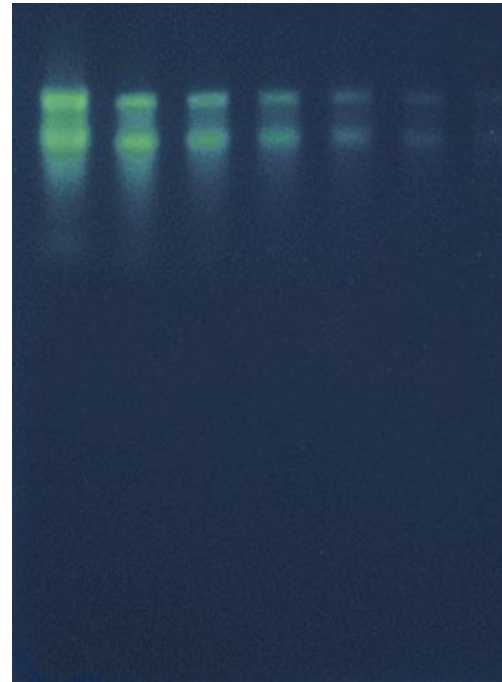
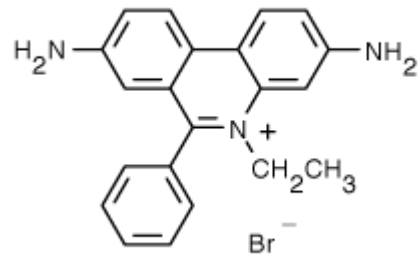


# Kvantitativní fluorimetrie

## Detekce nukleových kyselin

Ethidium bromid – ds DNA

SYBR Green – (ss DNA), RNA



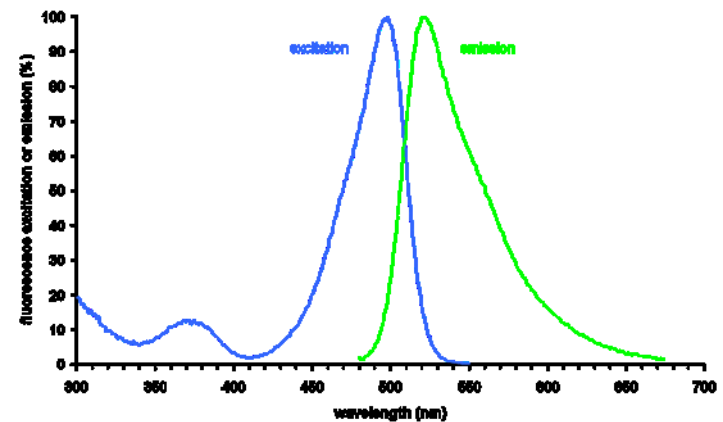
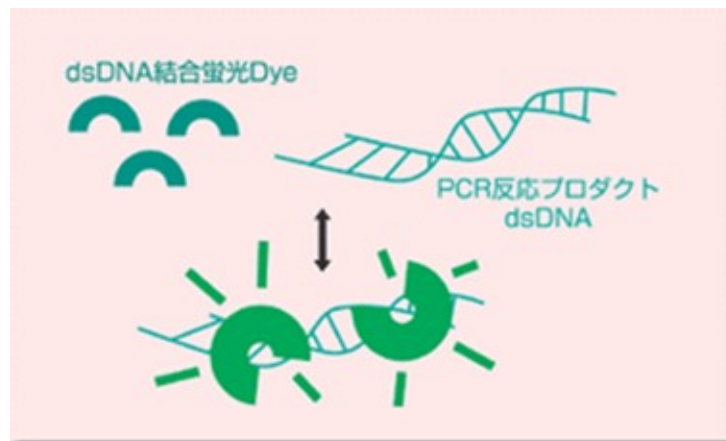
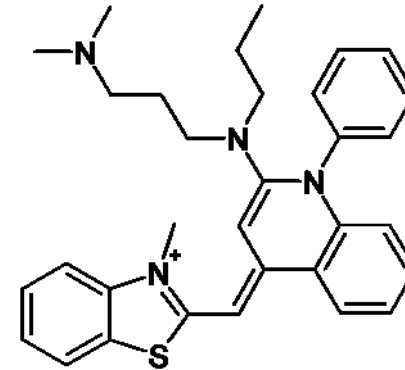
rRNA 16 a 23s barvená SYBR Green II  
Molecular Probes

# Kvantitativní fluorimetrie

**SYBR green I – asymetrické cyaninové  
Barvivo**

**Interkaluje přednostně do ds DNA, méně  
ss DNA , nejméně RNA**

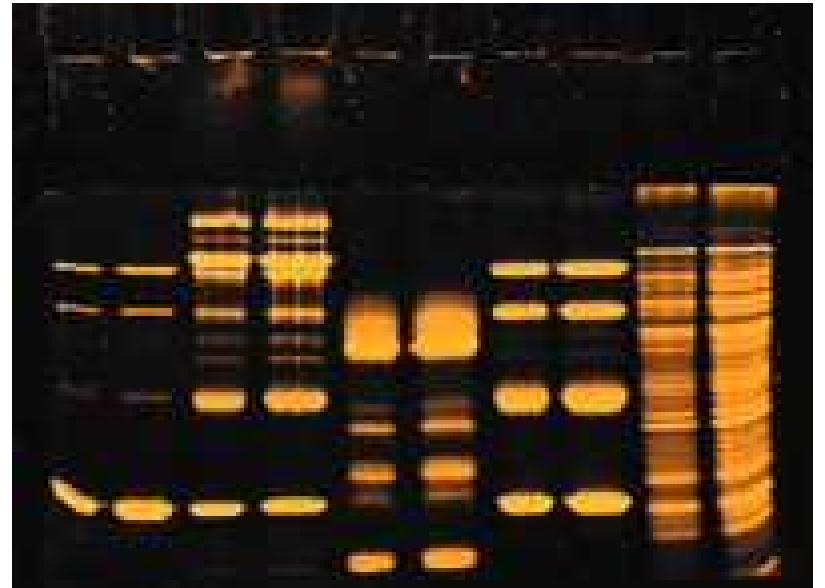
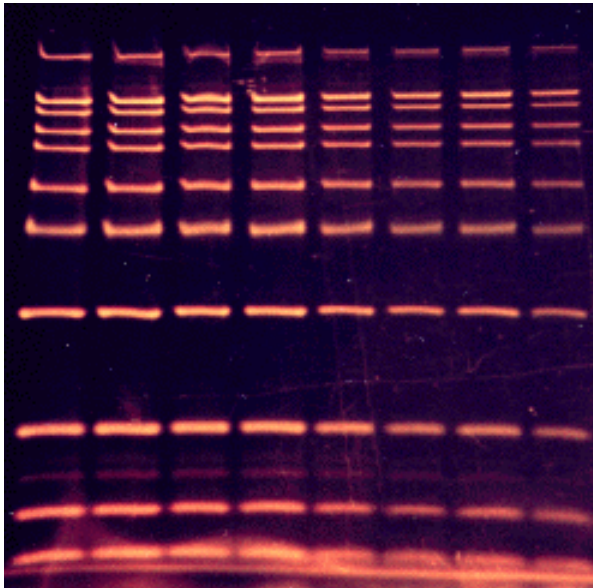
**Absorbuje modré  $\lambda_{\max} = 497$  nm  
emituje zelené  $\lambda_{\max} = 520$  nm**





# Kvantitativní fluorimetrie

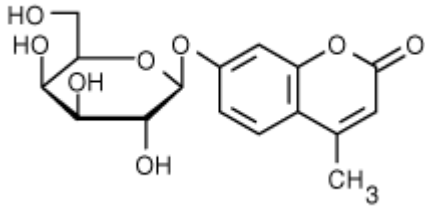
**Detekce bílkovin  
SYPRO Orange**



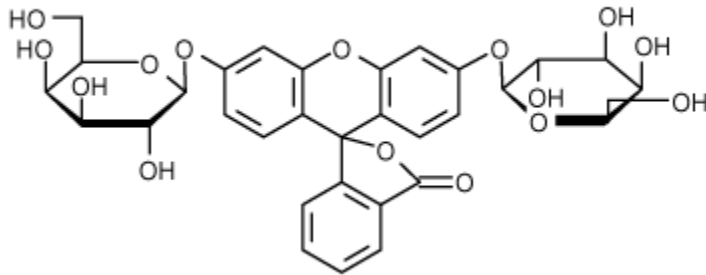
# Fluorogenní substráty

## Galaktosidasy

4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -galaktosid

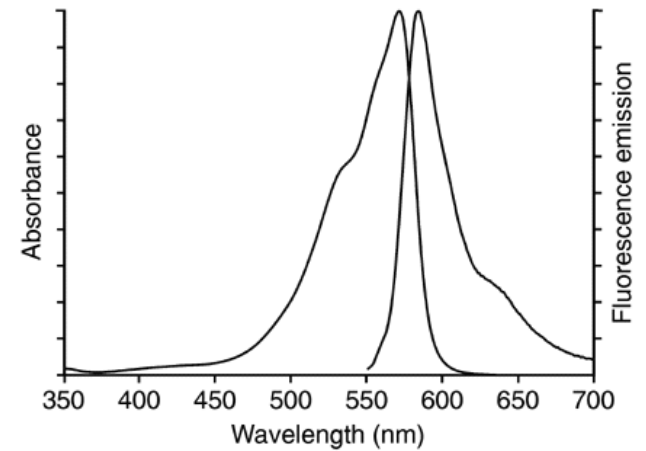
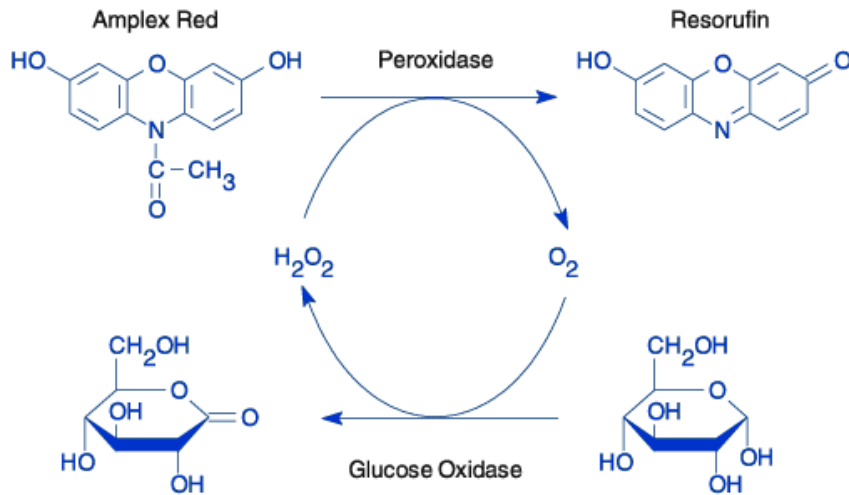


Fluorescein-digalaktosid



# Fluorogenní substráty

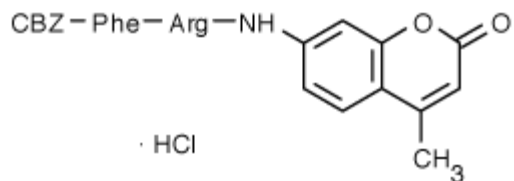
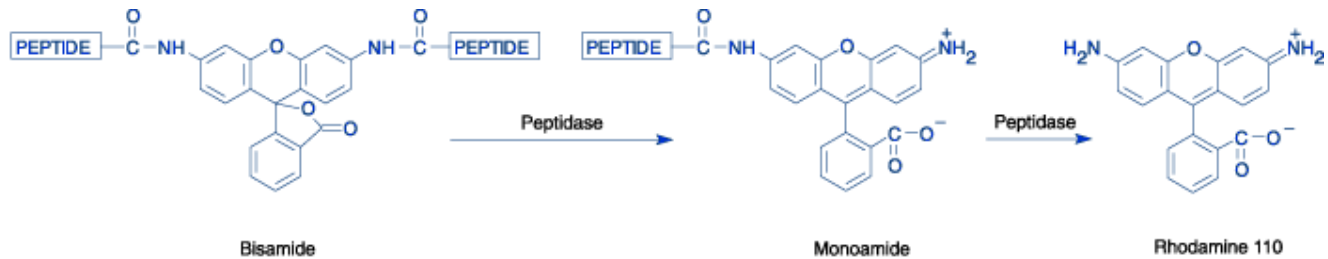
Peroxidasy – amplex red, vznik resorufinu



# Fluorogenní substráty

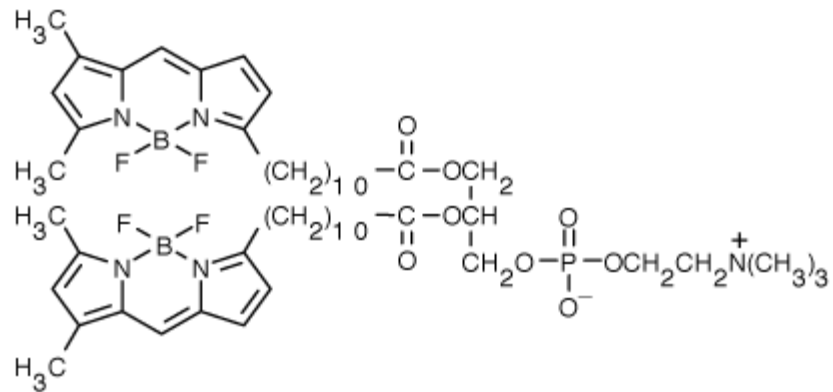
## Proteinasy, peptidasy

### 1) Fluorescenční konjugáty proteinů a peptidů



# Fluorogenní substráty

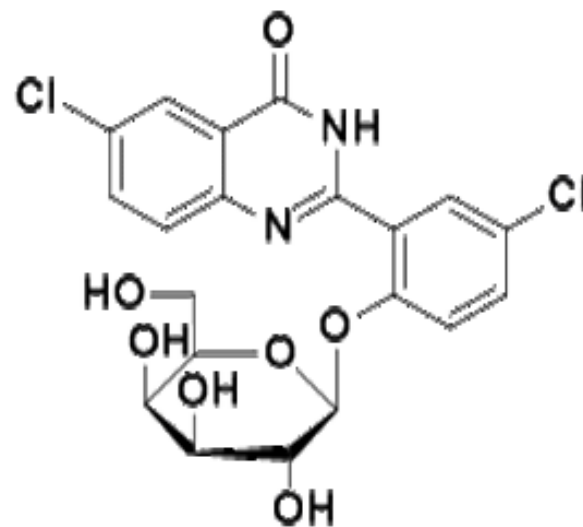
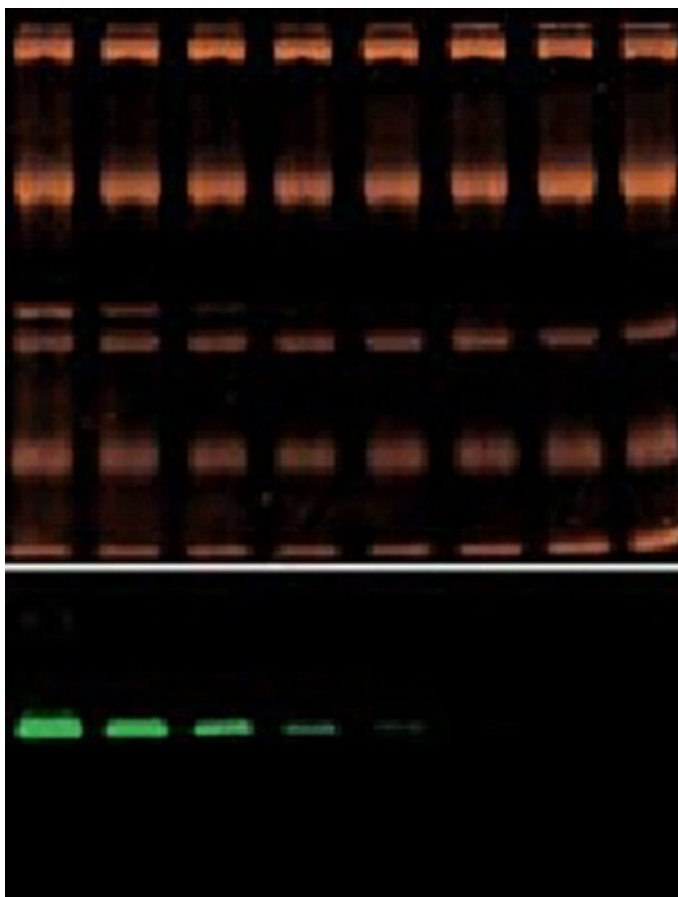
## Fosfolipasa A



# Fluorogenní substráty

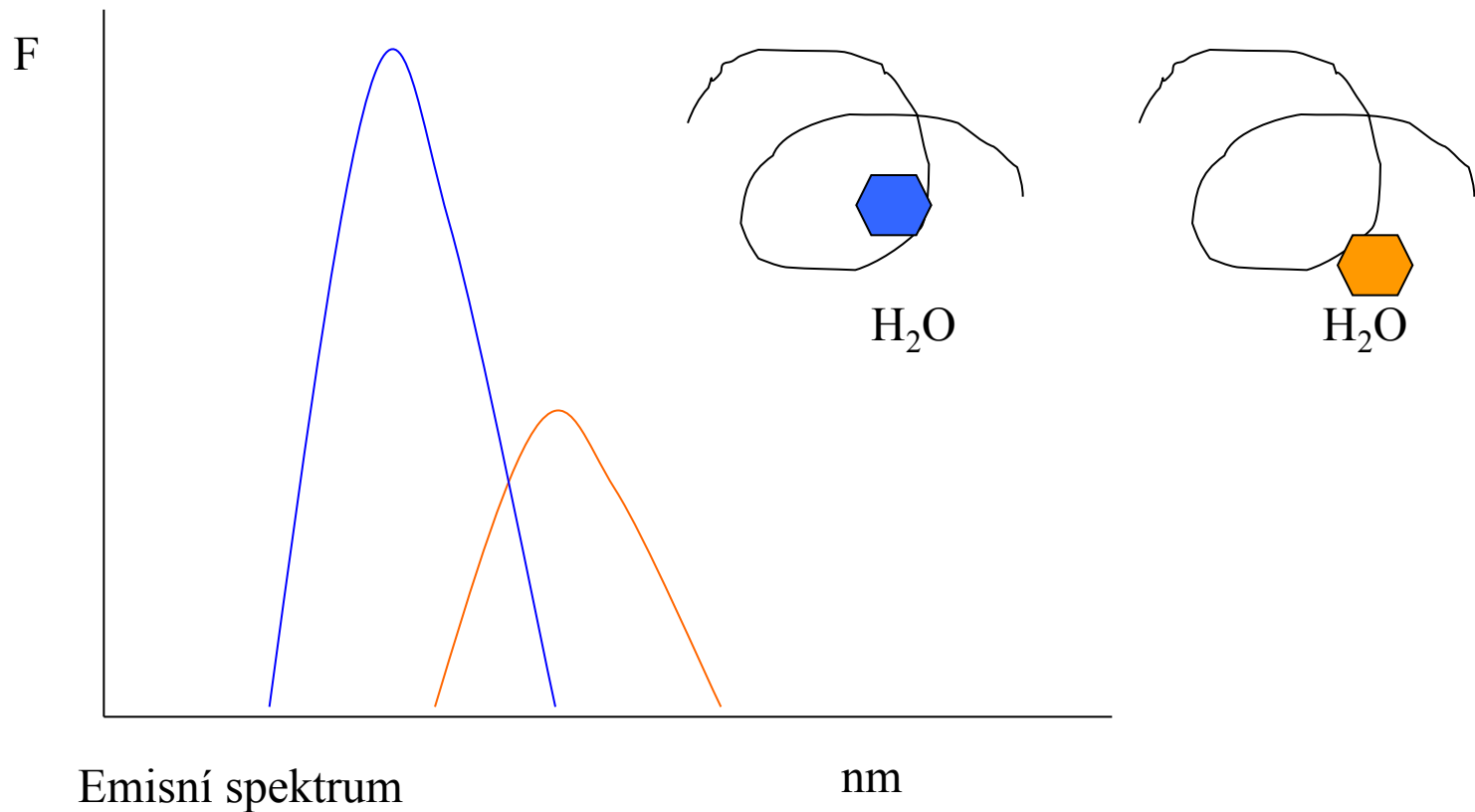
Barvení bílkovin – horní část – Sypro Tangerine

Produkty reakce s fluorogenním substrátem  $\beta$ -glukuronidasy ELF 97

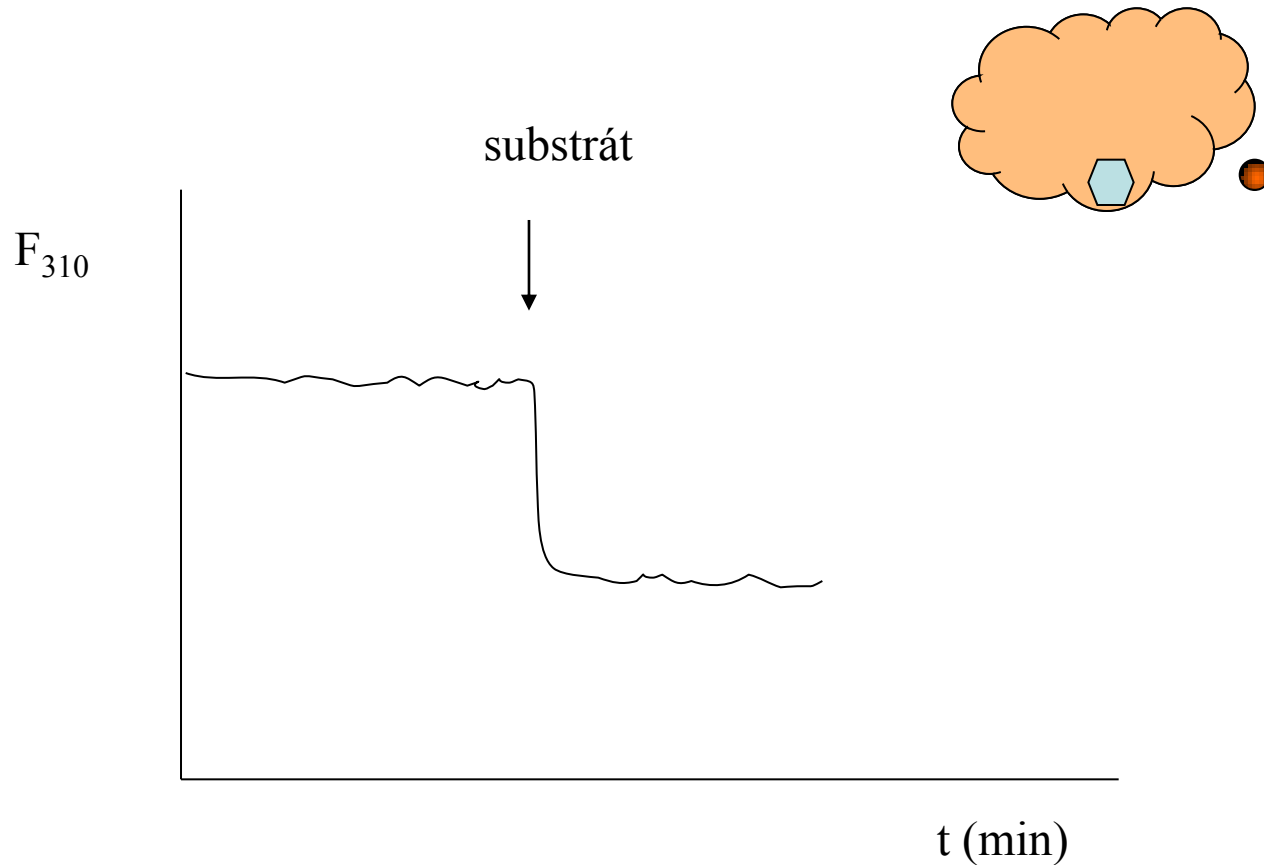


# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

**Přirozené fluorofory (Tyr, Try)** – fluorescence závislá na polaritě prostředí obklopující fluorofor



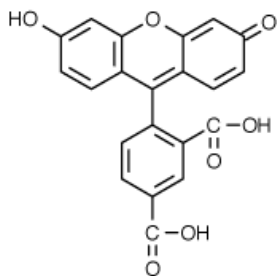
# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí



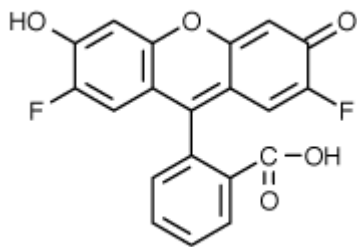


# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

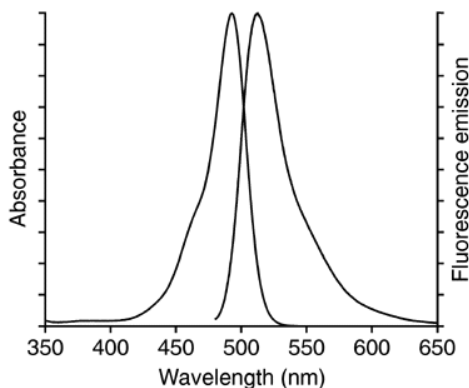
Fluorescenční konjugáty



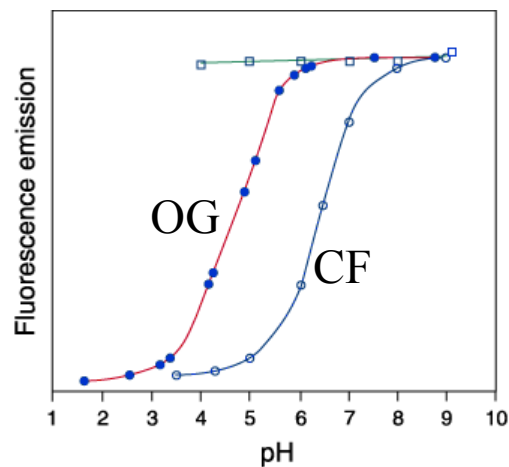
Karboxyfluorescein –  
(494/520 nm)



Oregon Green - (496/524 nm)



Absorpce/emise  
fluoresceinu  
při pH 9

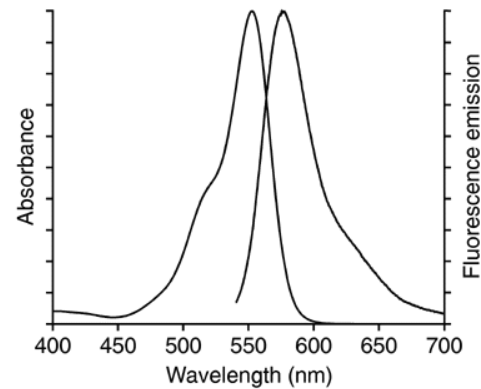
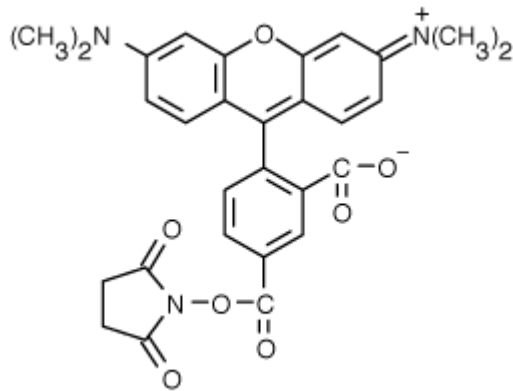


CF-karboxyfluorescein  
OG oregon green

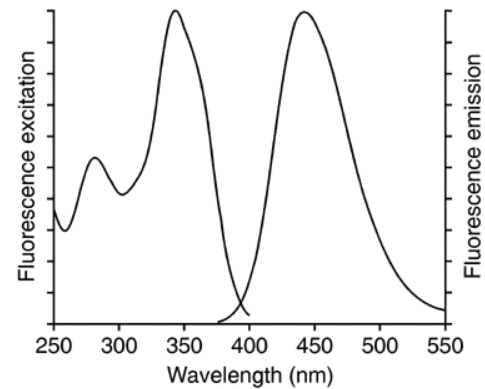
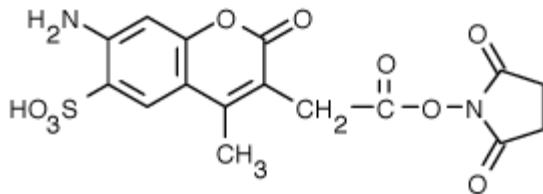
# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Fluorescenční konjugáty

Teramethylrhodamin – 545/580 nm)



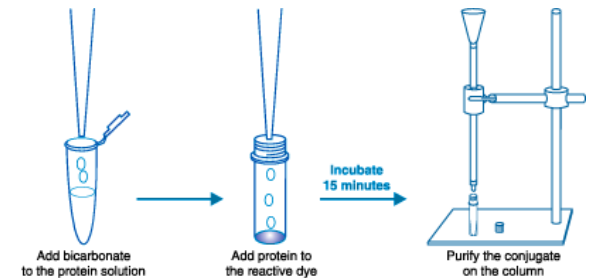
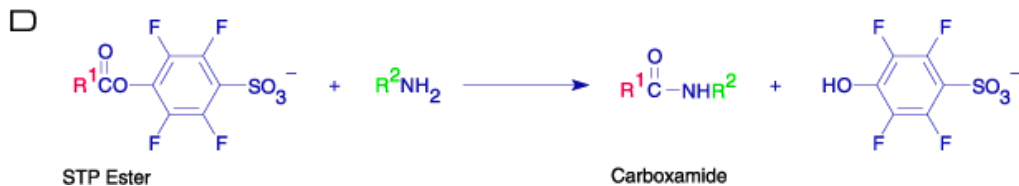
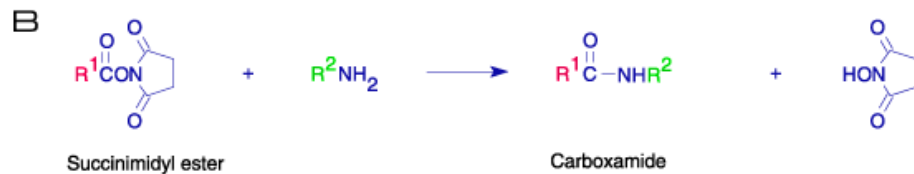
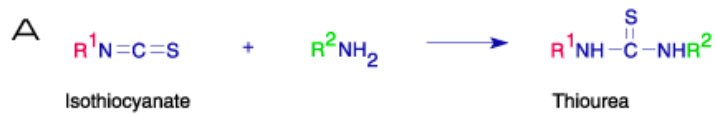
Kumariny – 350/450 nm)





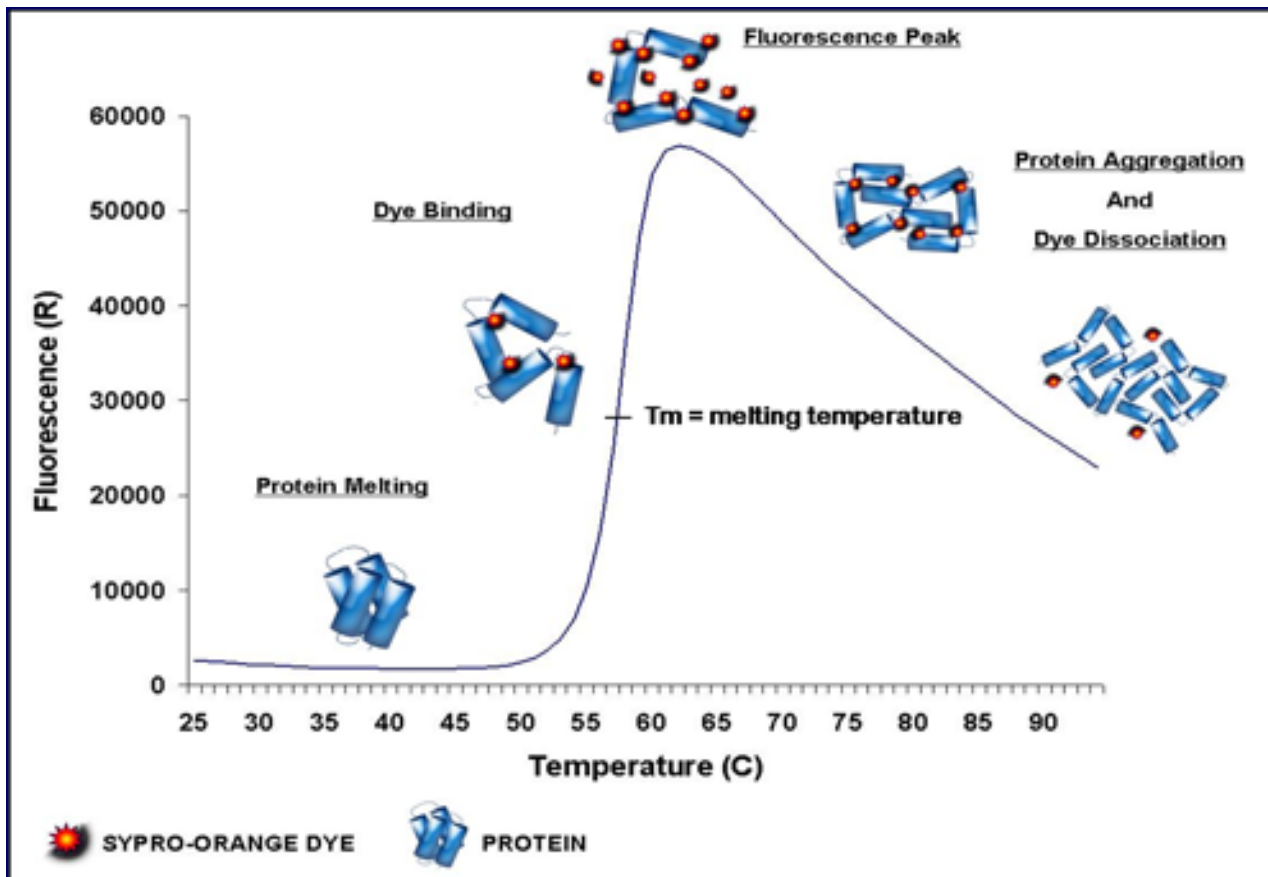
# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

## Fluorescenční konjugáty

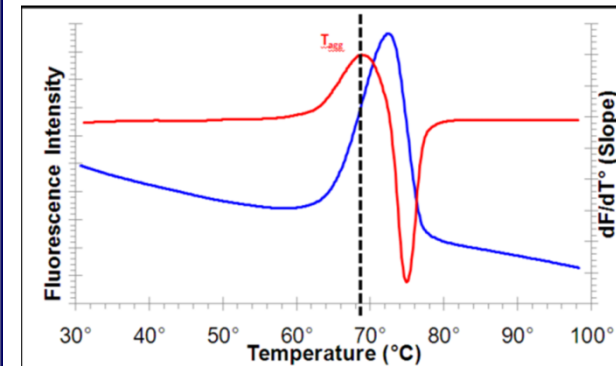


# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

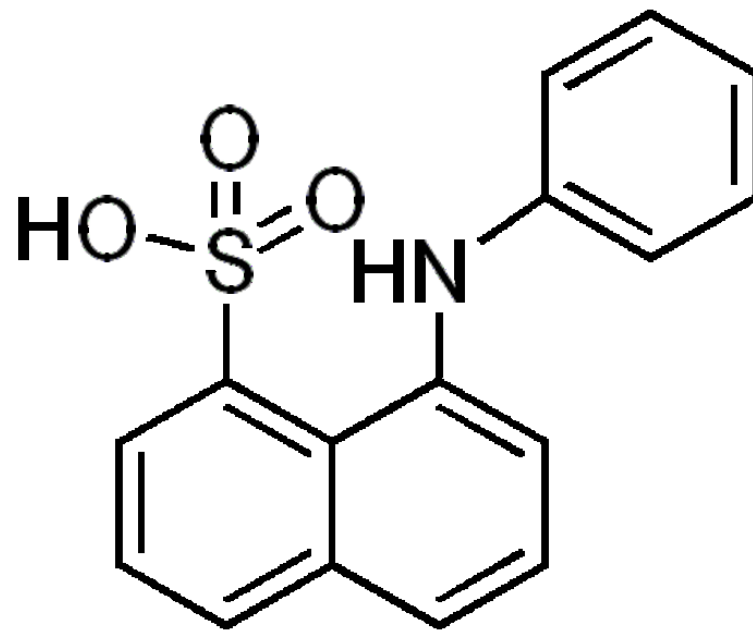
- Termický posun – DSF
  - Stabilita – mutanti, úpravy, ligandy ...



PROTEOSTAT® Thermal shift stability assay kit



# Fluorescenční sondy



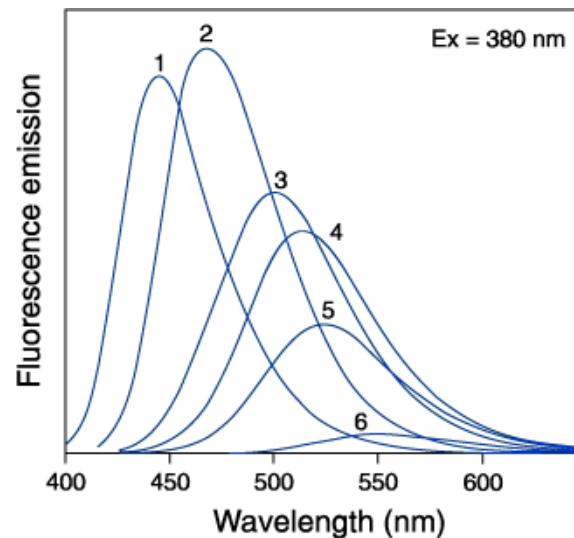
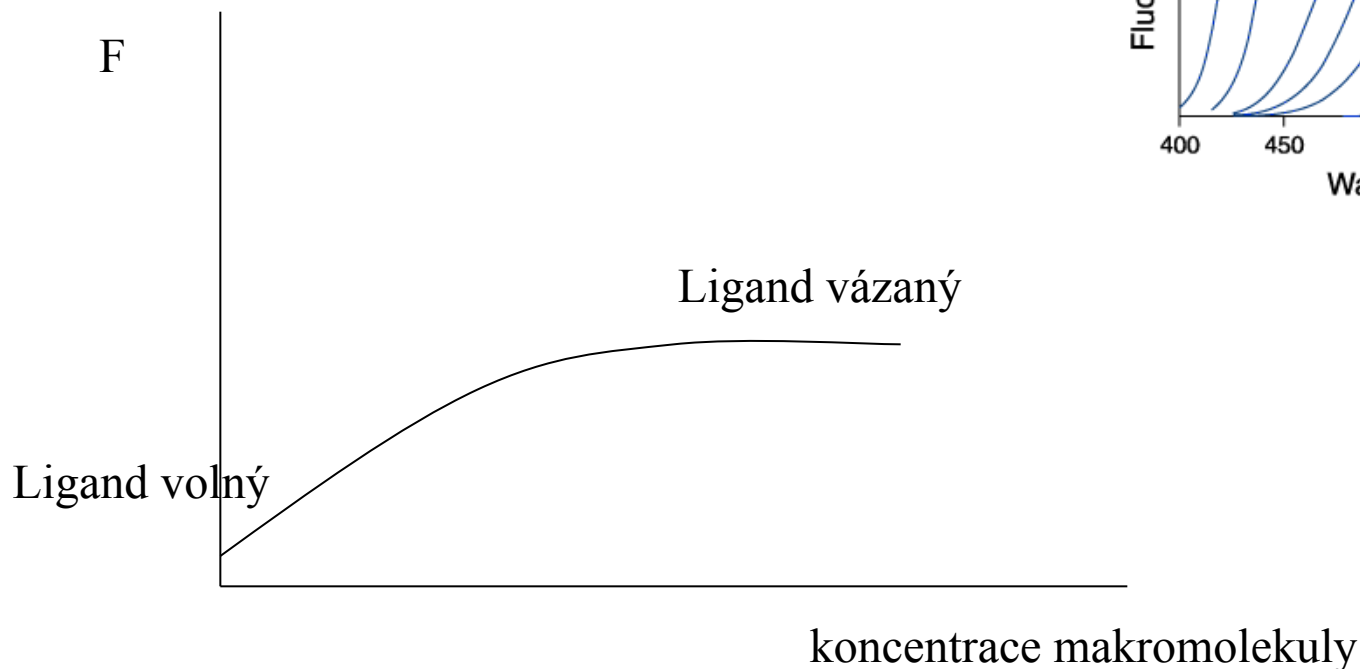
- ANS – 1,8-anilinonaftalensulfonát

# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí



$$K_d = L_f \cdot M_f / LM$$

Interakce makromolekul s ligandy



# Použití fluorimetrie ke sledování vazby

$$F = F_f + F_b$$

$$F = [L_f] \cdot \Phi_f + [L_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = ([L_t] - [L_b]) \Phi_f + [L_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = [L_t] \cdot \Phi_f - [L_b] \cdot \Phi_f + [L_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = F_o + [L_b] \cdot (\Phi_b - \Phi_f)$$

$$[L_b] = (F - F_o) / (\Phi_b - \Phi_f)$$

$F_f, F_b$  – fluorescence volné,  
vázané frakce

$\Phi_b, \Phi_f$  – kvant. Výtěžek fluorescence  
vázaného, volného ligandu

$[L_b], [L_f]$  – koncentrace vázaného,  
volného ligandu

$[L_t]$  – celková koncentrace ligandu

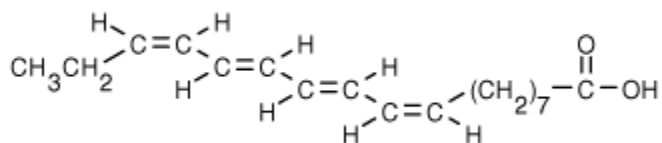
$F$  – celková fluorescence



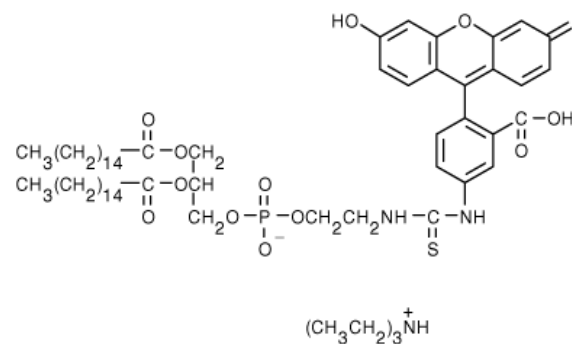
# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Interakce makromolekul s ligandy

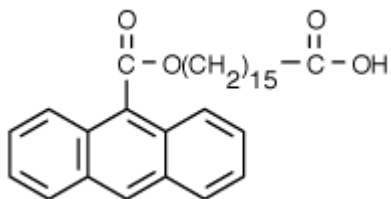
Použití fluorescenčních analogů



Kys. cis-parinarová



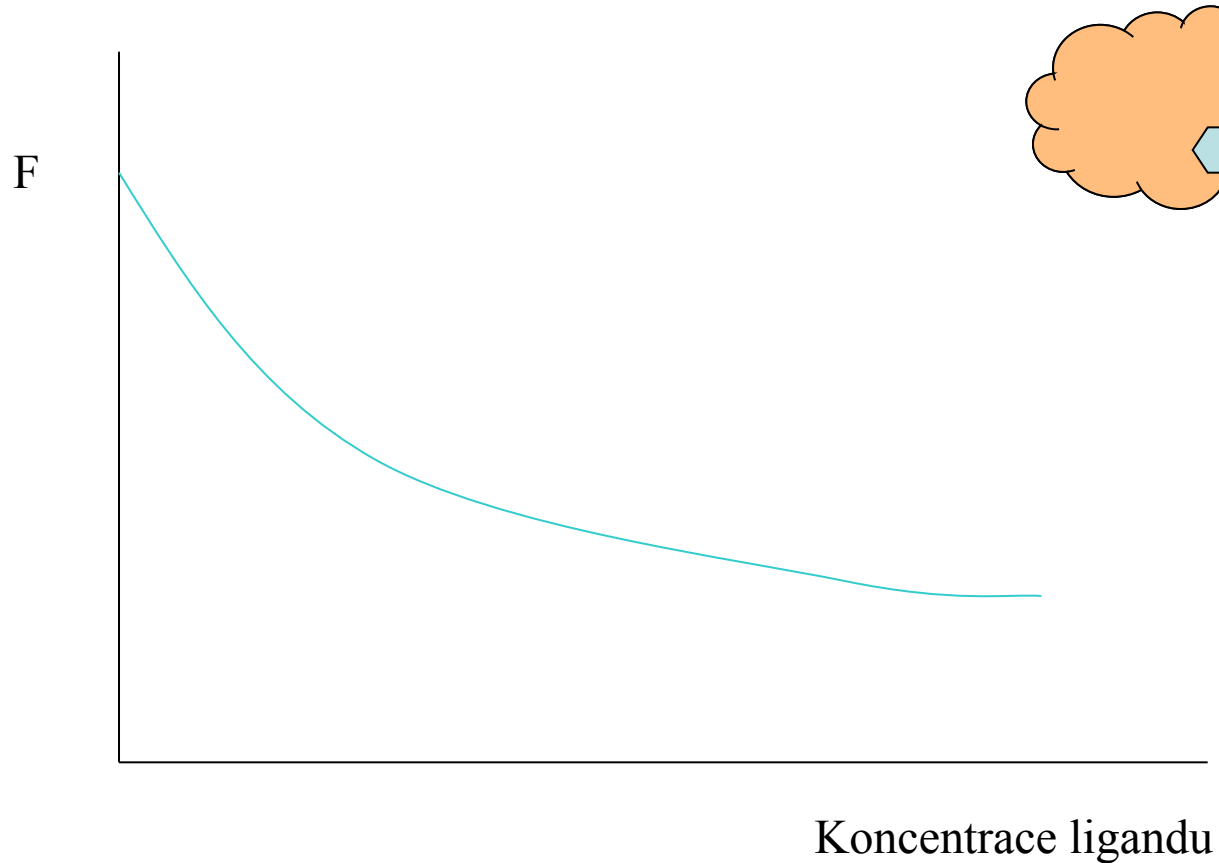
Fluorescein-PE



Anthroyloxypalmitát

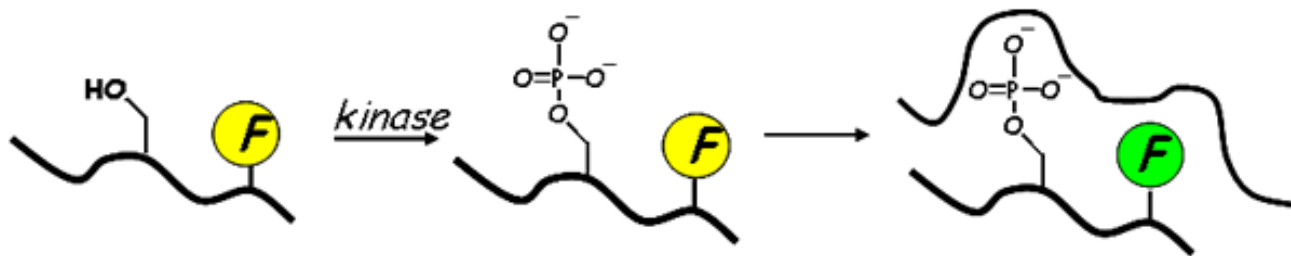
# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Použití značené makromolekuly  
Fluorescence značené bílkoviny

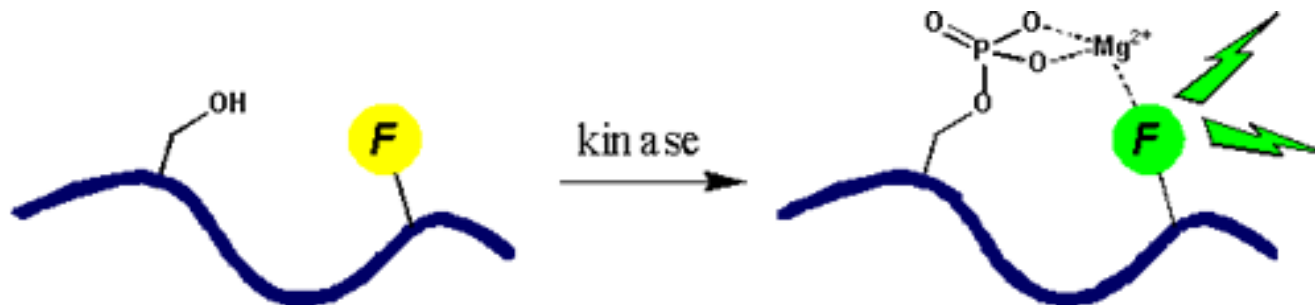


# Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

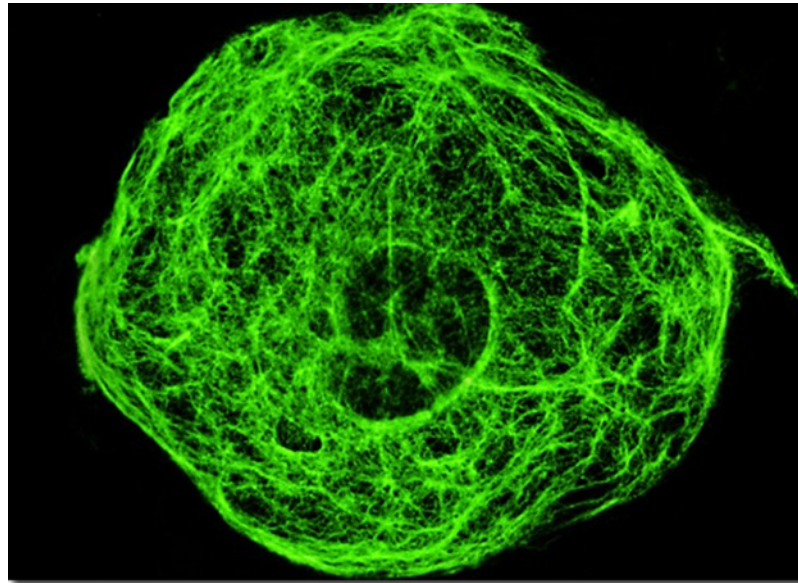
- Fosforylace proteinů



- Vliv chelatace – rigidnější struktura



# Fluorescence a cytochemie

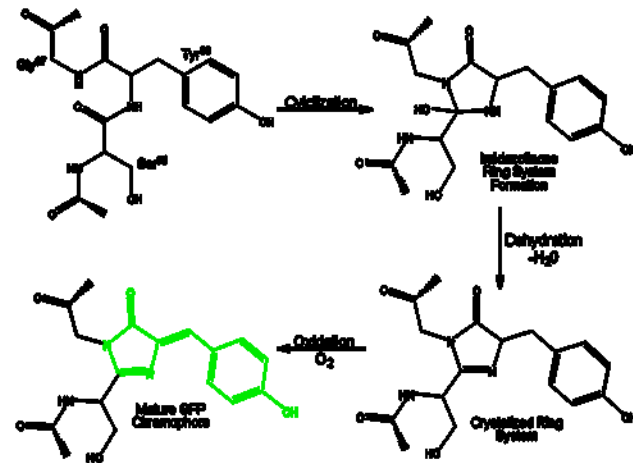


- Značení bílkovin, protilátek
- Značení nukleotidů, primerů

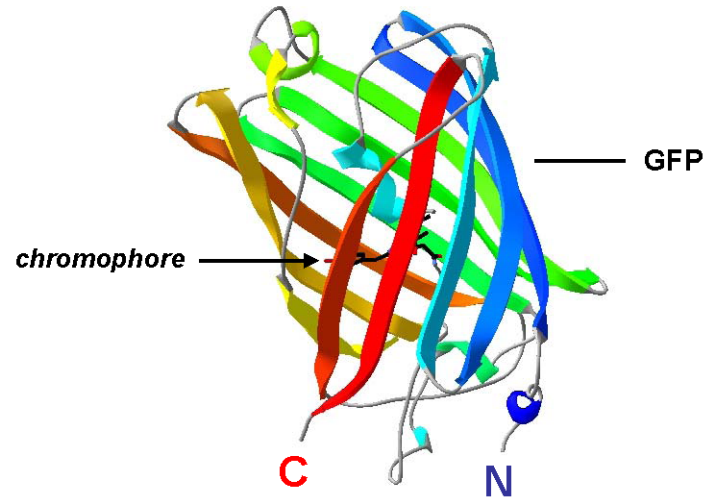
# Fluoreskující proteiny

- GFP 395 (475) – 509 nm

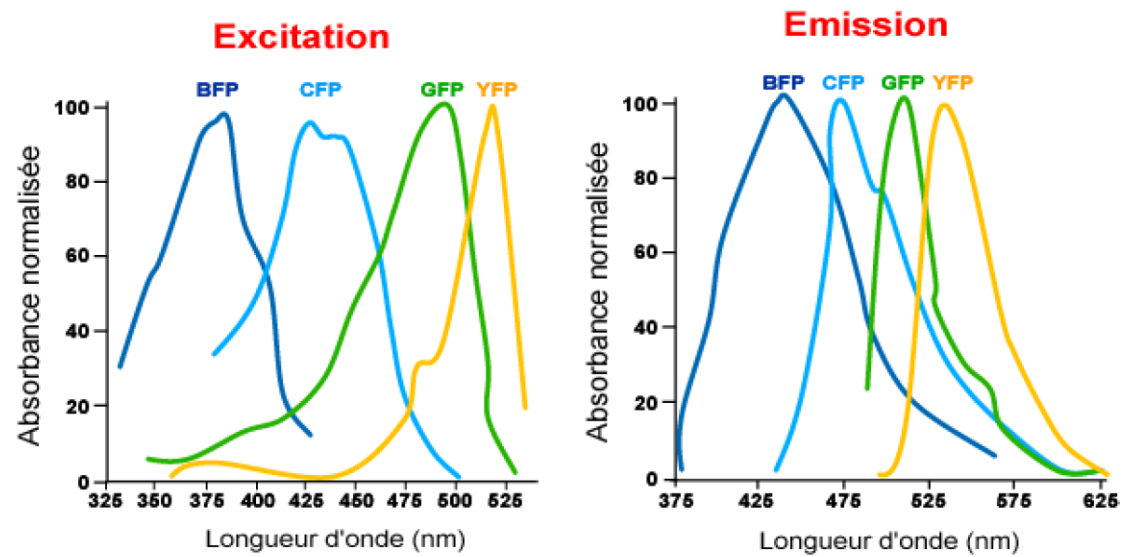
- *Aequorea victoria* i jiné
- 238 AA
- Fluorofor reakcí 3 AA
- Lokalizace proteinů
- Reportér (exprimovaný gen)
- Mutanty – změna barvy
  - – YFP (T203Y), CFP (Y66W)



A



B

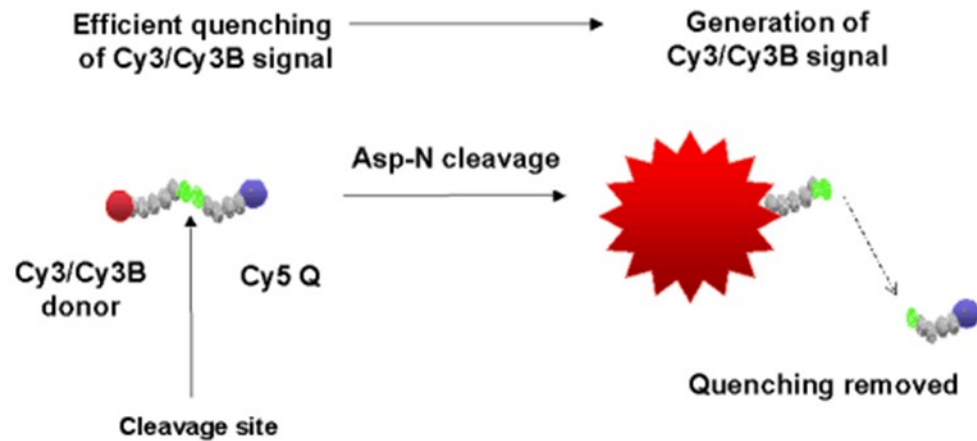
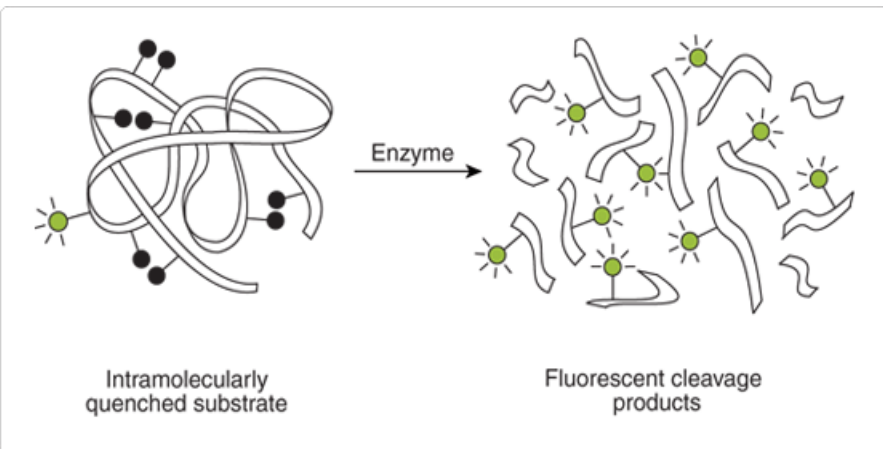


# Přenos energie

- Energie excitovaného stavu
  - Vyzáření většiny, disipace menší části
  - Disipace větší části – vyzáří málo ev. nic
  - Odevzdání sousední molekule nefluoreskující
    - Zhášení (quenching – Q)
      - Jiná látka – zhášedlo (quencher) – I, O<sub>2</sub>,
      - Identická molekula – samo(auto)zhášení (selfquenching)
  - Odevzdání sousední molekule (skupině) fluoreskující, ta pak emituje vlastní záření (jiná  $\lambda$ )
    - FRET

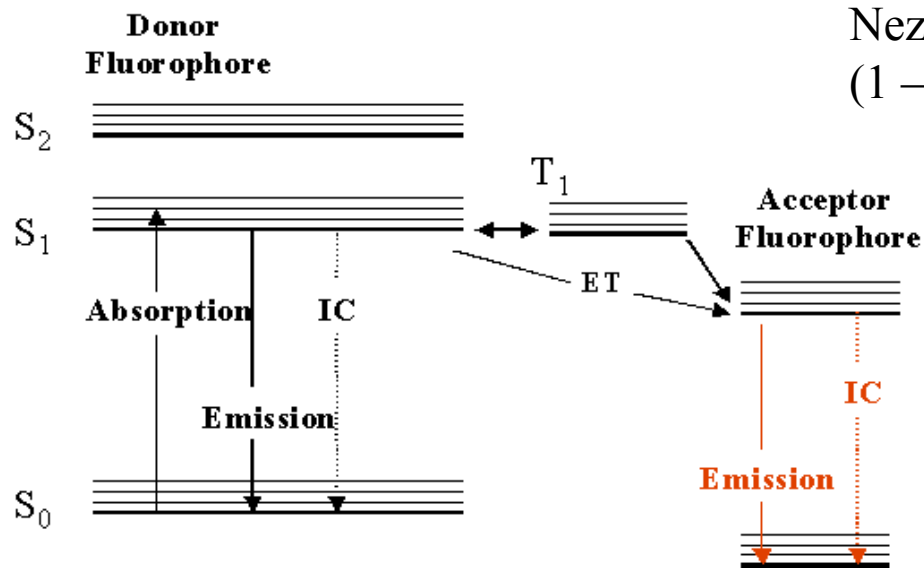
# Využití zhášení

- Stanovení enzymové aktivity



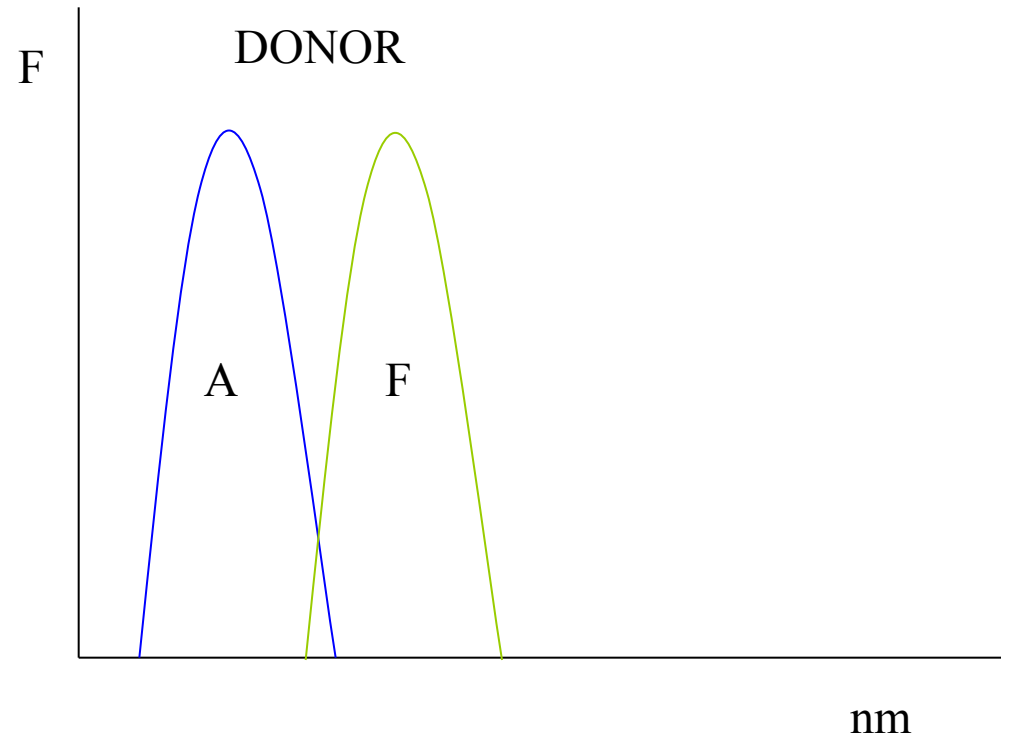
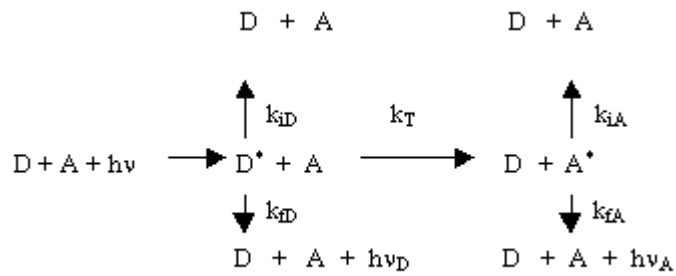


# Fluorescenční rezonanční transfer energie (Försterův přenos)

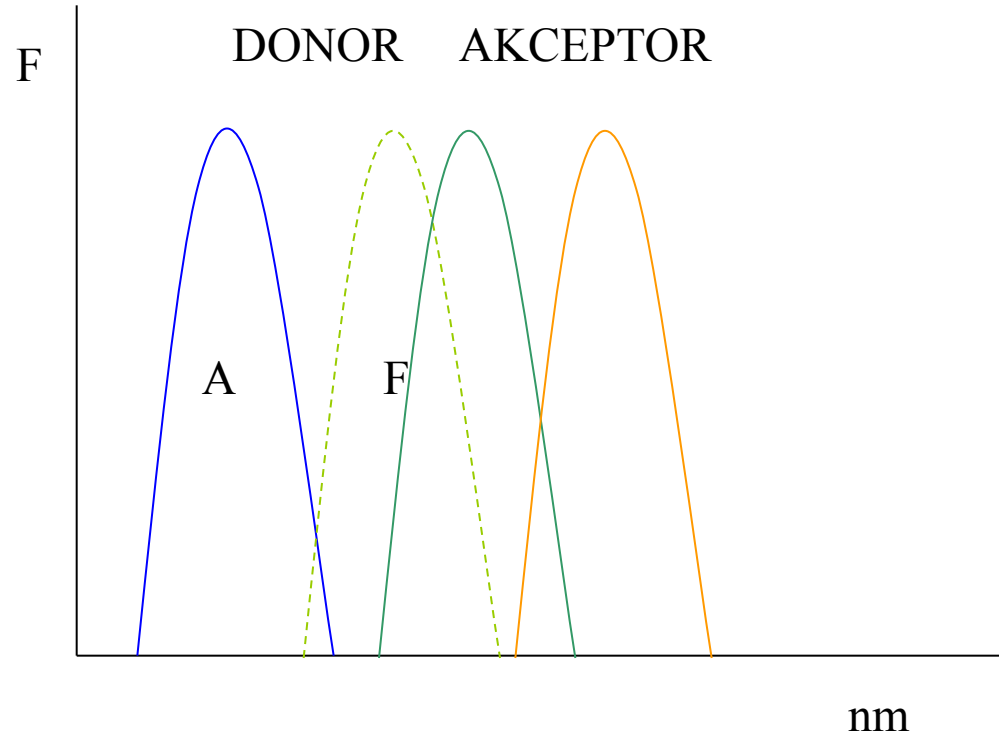
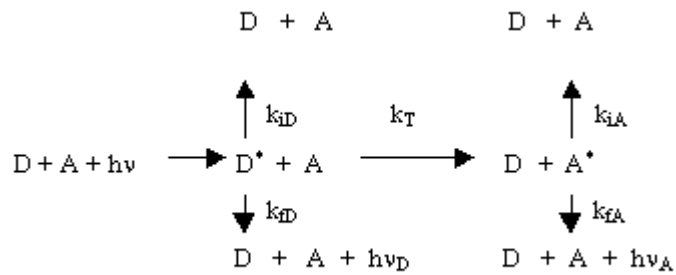


Nezářivý přenos energie z donoru na akceptor  
(1 – 10 nm)

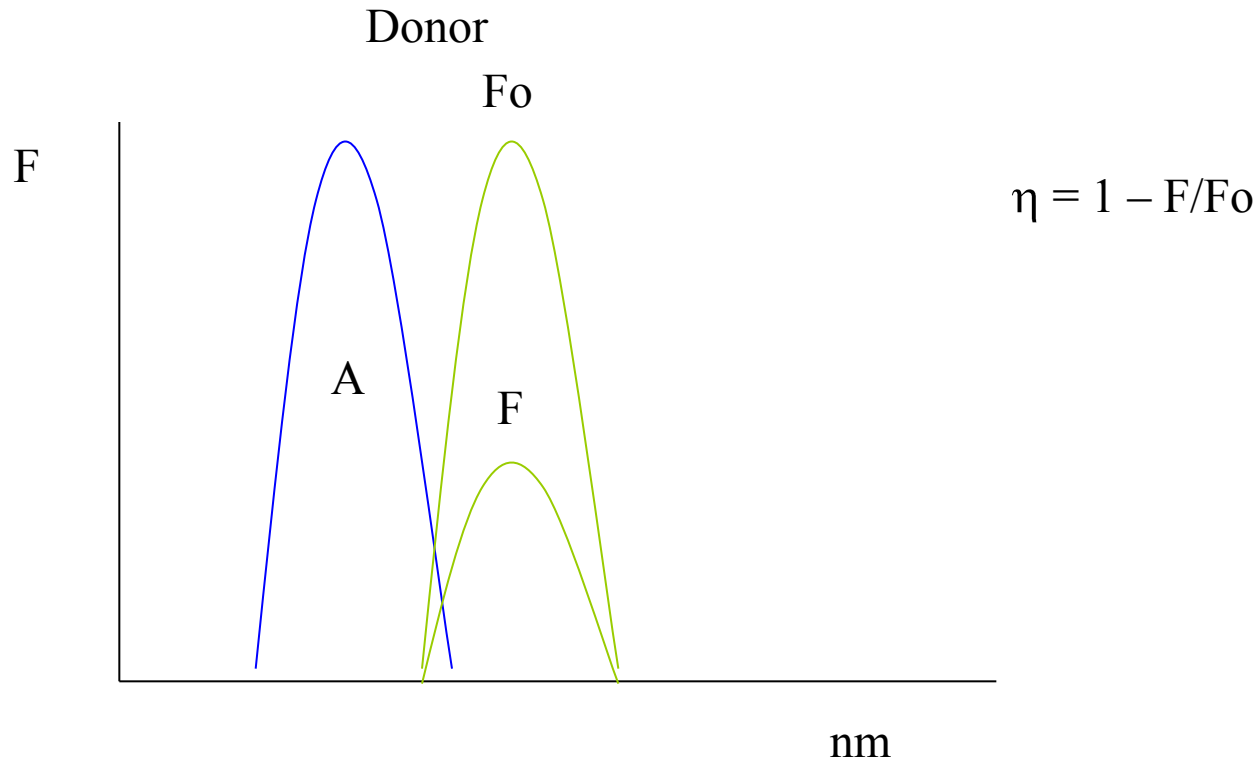
# Fluorescenční rezonanční transfer energie



# Fluorescenční rezonanční transfer energie



# Fluorescenční rezonanční transfer energie



# Fluorescenční rezonanční transfer energie

$$\eta = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$$

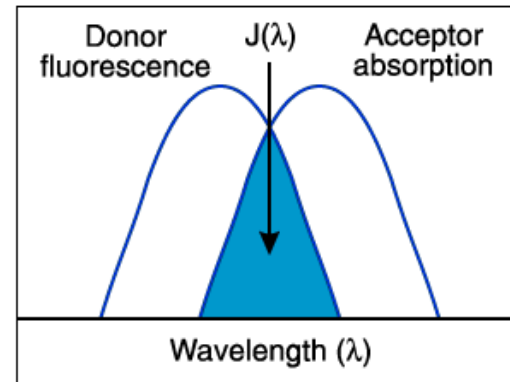
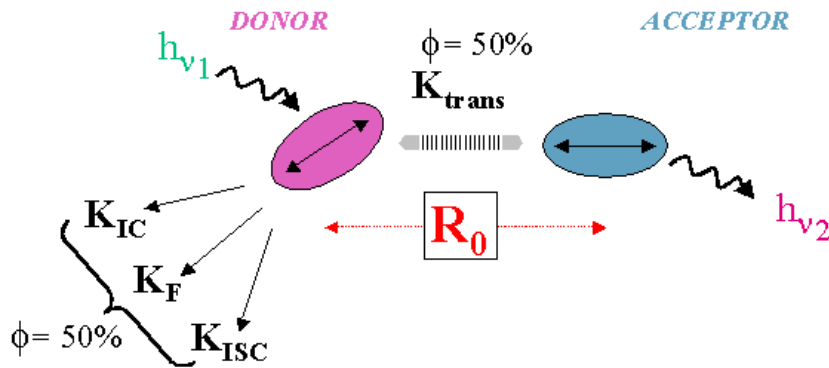
$$R_0^6 = \sqrt[6]{1,66 \cdot 10^{-33} \cdot \tau \cdot J / n^2 \nu^2}$$

$\tau$  – doba života exc. stavu

$J$  – překryvový integrál

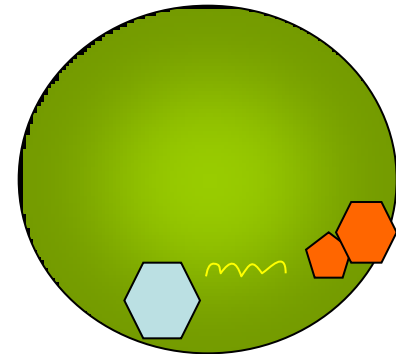
$n$  – refraktivní index rozpuštědla

$\nu$  – vlnočet emise donoru

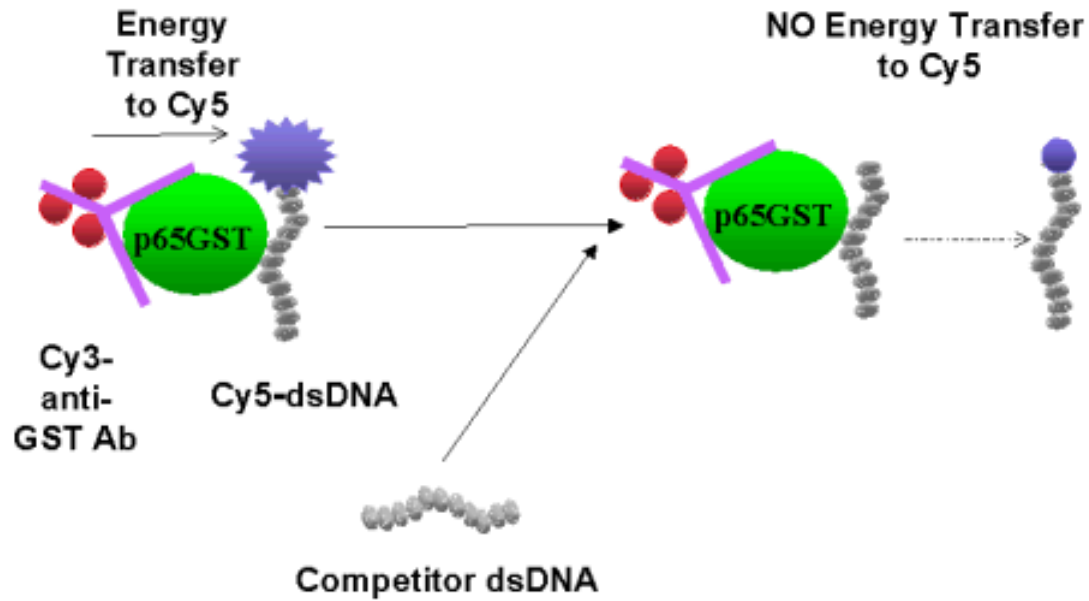


# Fluorescenční rezonanční transfer energie

Použití – změření vzdálenosti mezi dvěma molekulami v bílkovině  
Tryptofan (290/340) vs. NADH (340/450 nm)

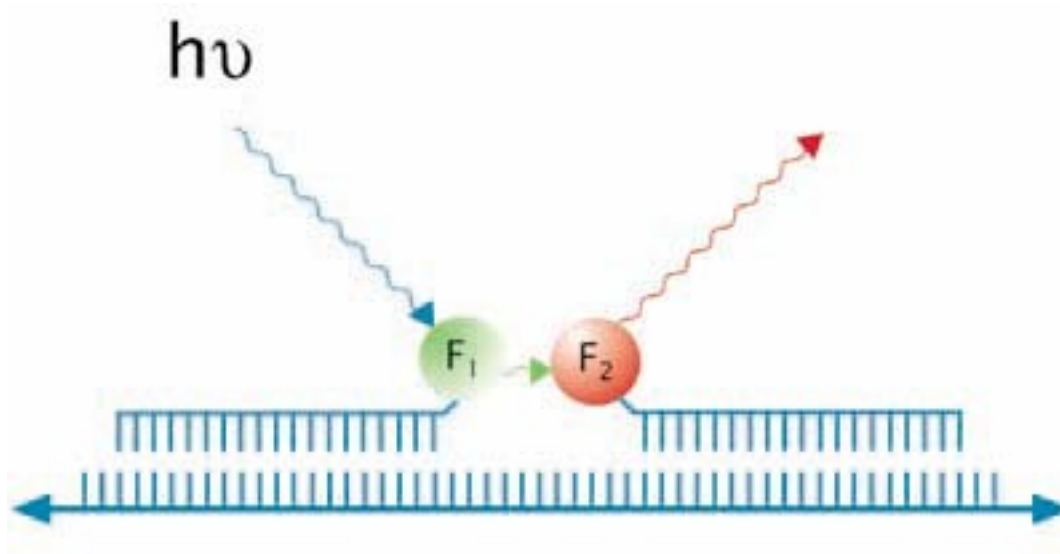


# Fluorescenční rezonanční transfer energie



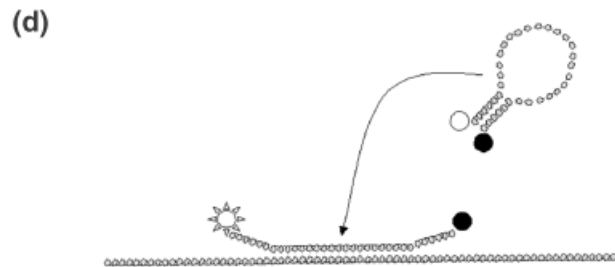
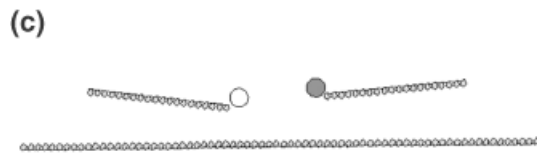
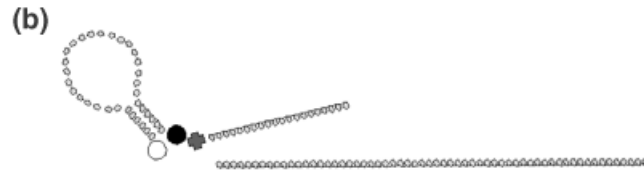
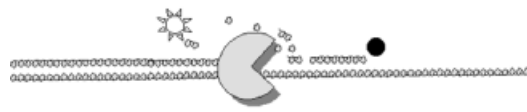
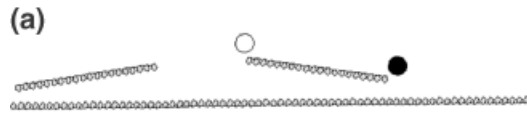
# Hybridizační sondy

Fluorescenční *in situ* hybridizace – **FISH**

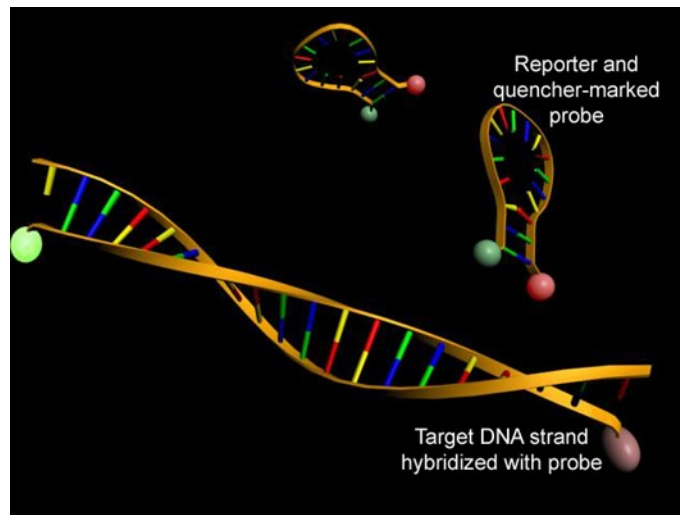
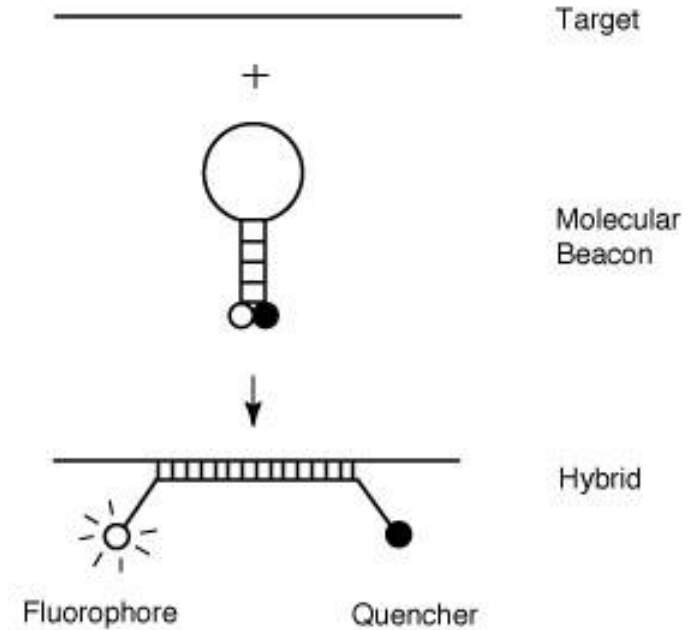
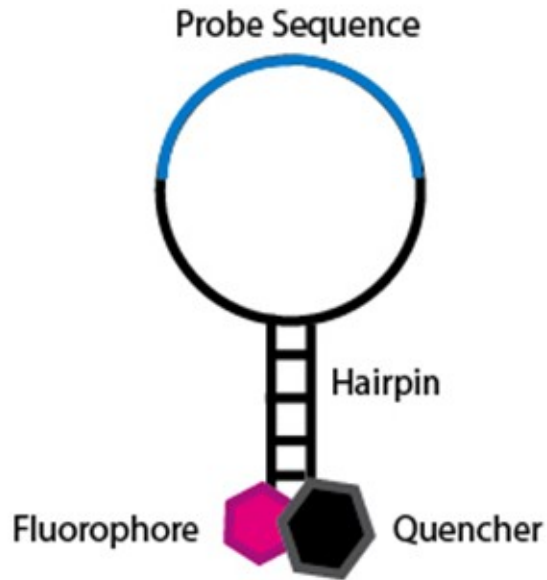




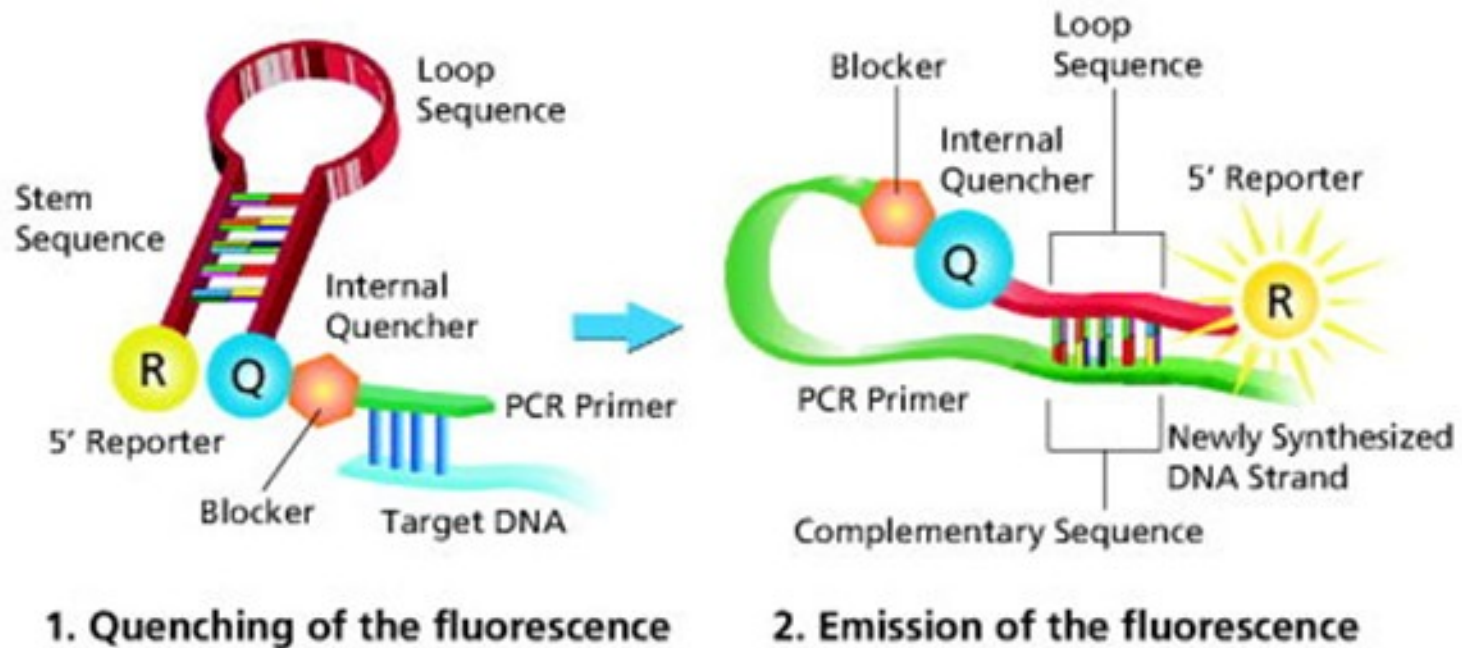
# Hybridizační sondy



# Molekulové majáky

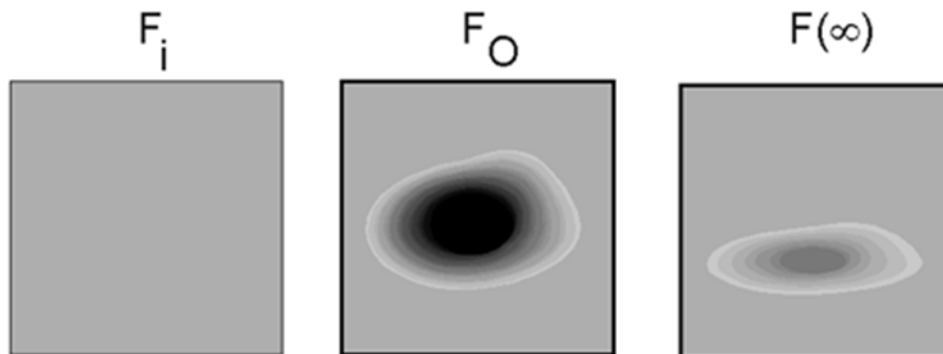
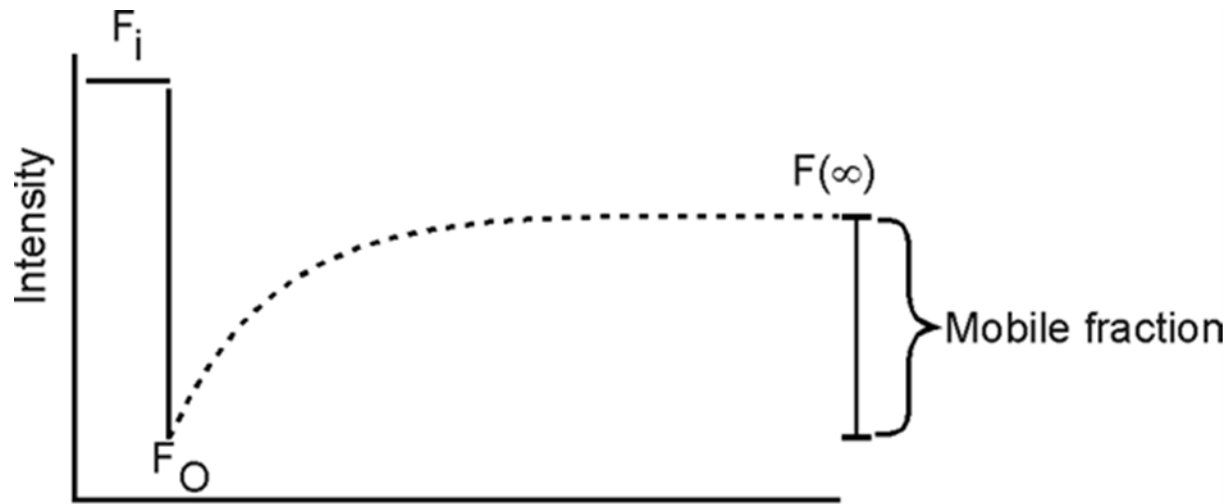


# Hybridizační sondy

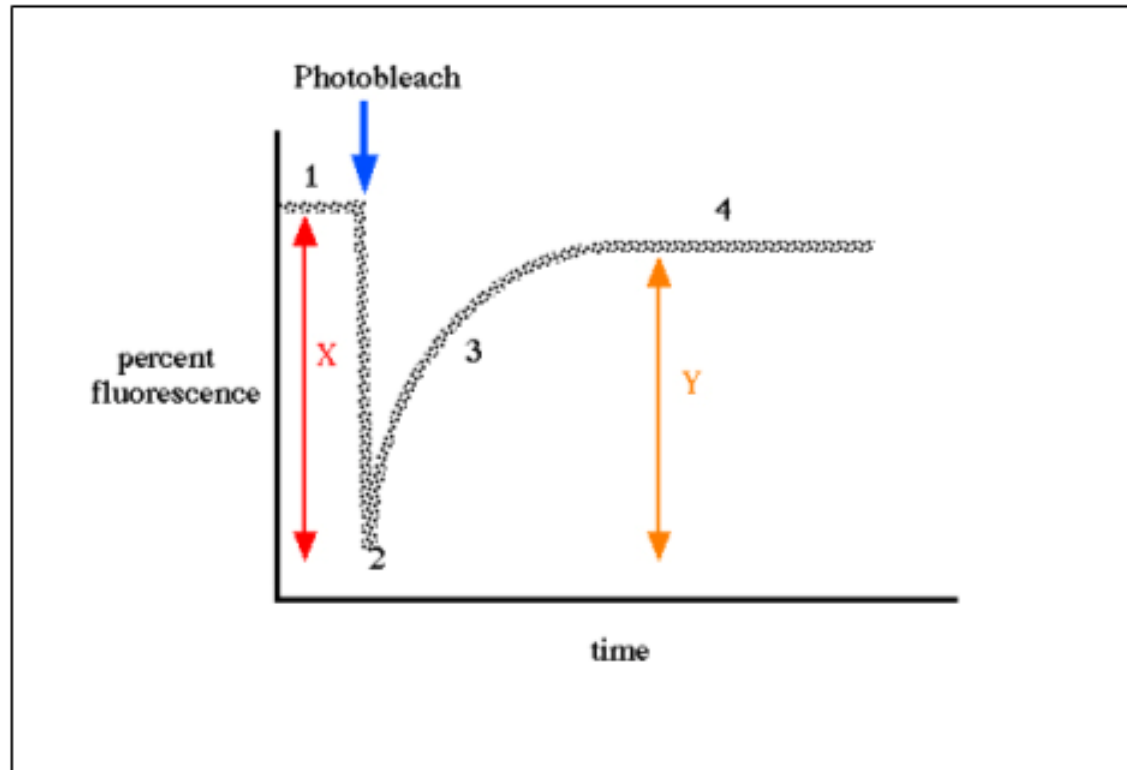


# Dynamika membrán

- Fluorescence recovery after photobleaching

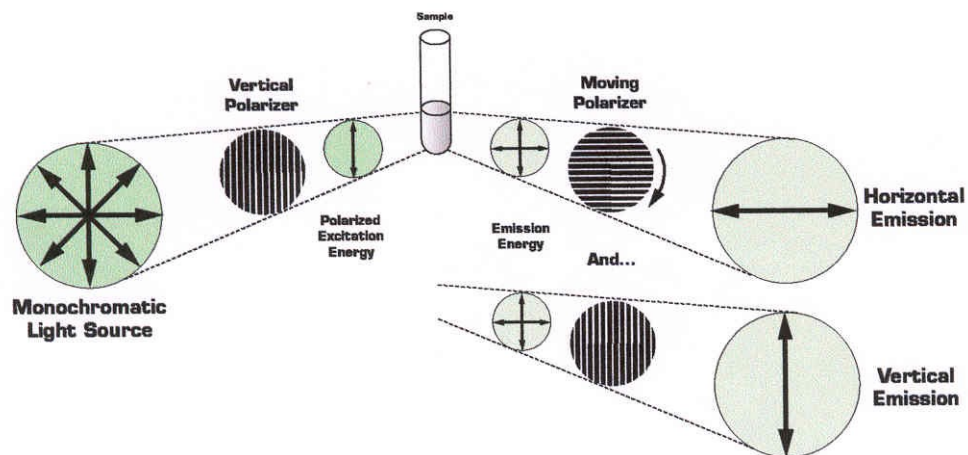


# Dynamika membrán



- FRAP
  - Rychlost – průběh obnovení
  - Výtěžek (recovery)

# Fluorescenční anizotropie



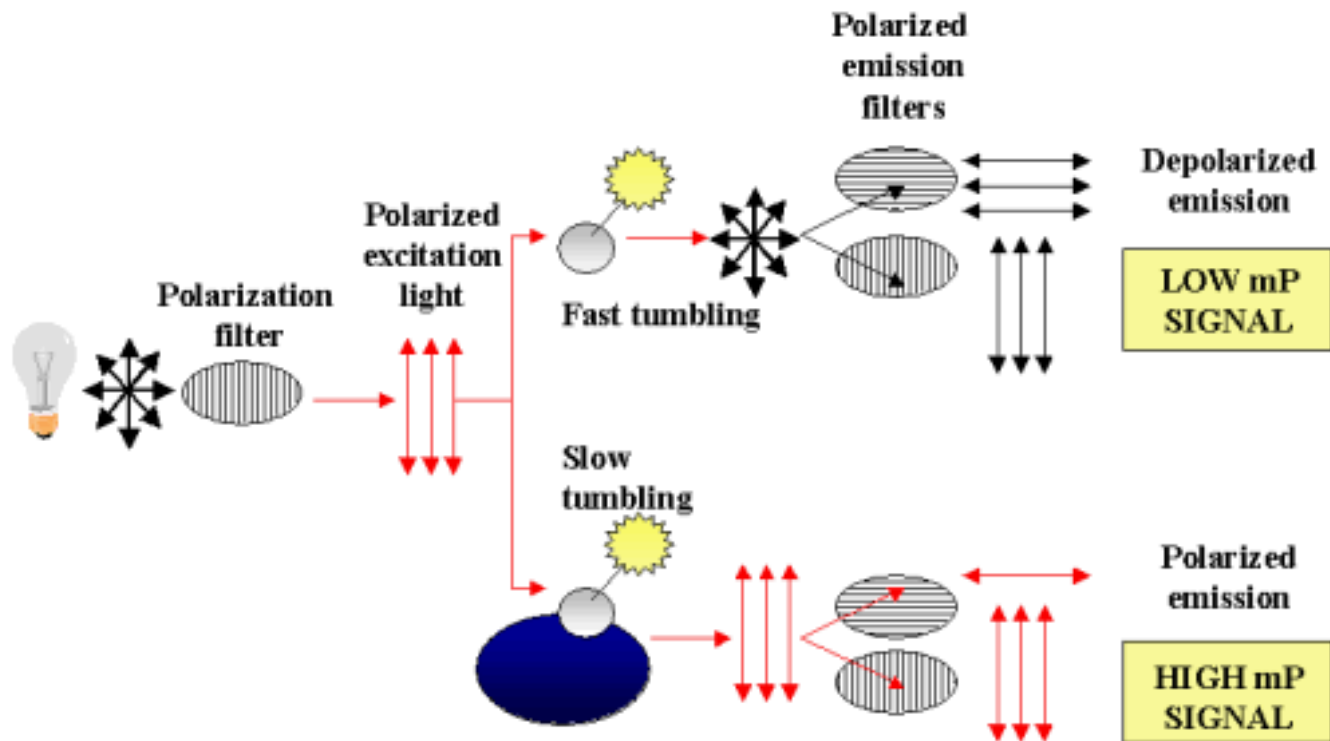
# Fluorescenční anizotropie

Polarizační filtry



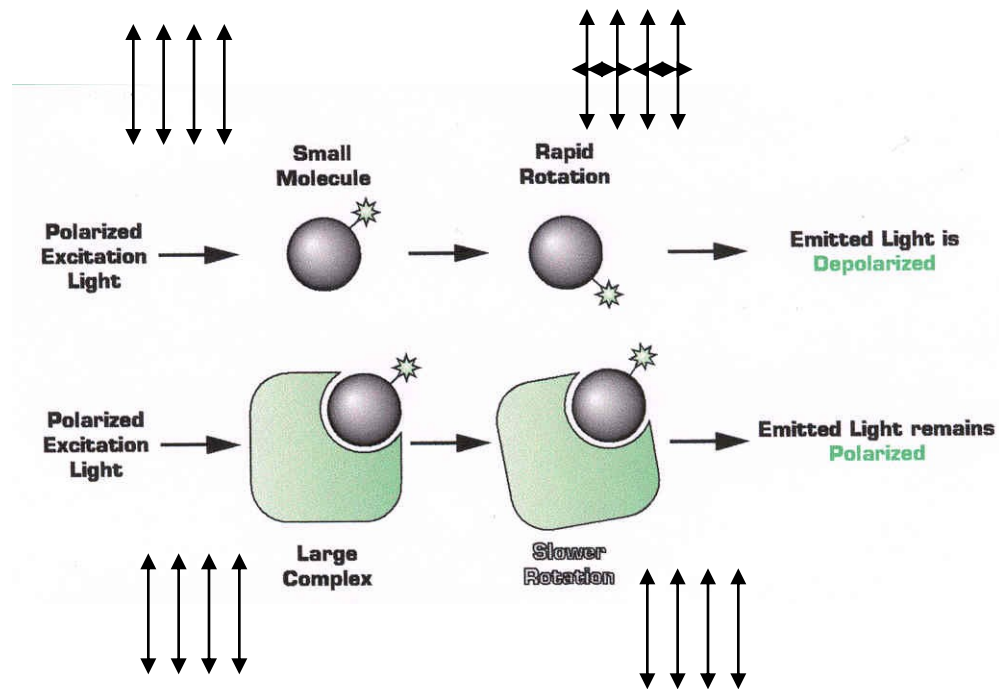
**Auto-Polorizer Accessory**

# Fluorescenční anizotropie





# Fluorescenční anizotropie

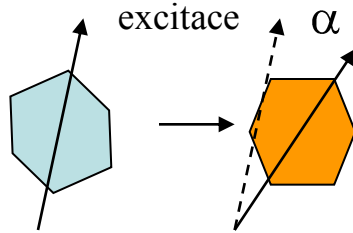


# Fluorescenční anizotropie

Polarizace fluorescence  $\mathbf{p} = \frac{I_h - I_v}{I_h + I_v}$

Fluorescenční anizotropie  $\mathbf{r} = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$

Rotační relaxační čas



$$r_0 = (3 \cos^2 \alpha - 1) / 5$$

$$r_0 / r = 1 + 3\tau / \rho$$

$\tau$ , střední doba života fluorescence

$\rho$ , rotační relaxační čas molekuly

$r_0$  – anizotropie nepohyblivé molekuly

$$\rho = V\eta / RT$$

$V$  objem

$\eta$  viskozita

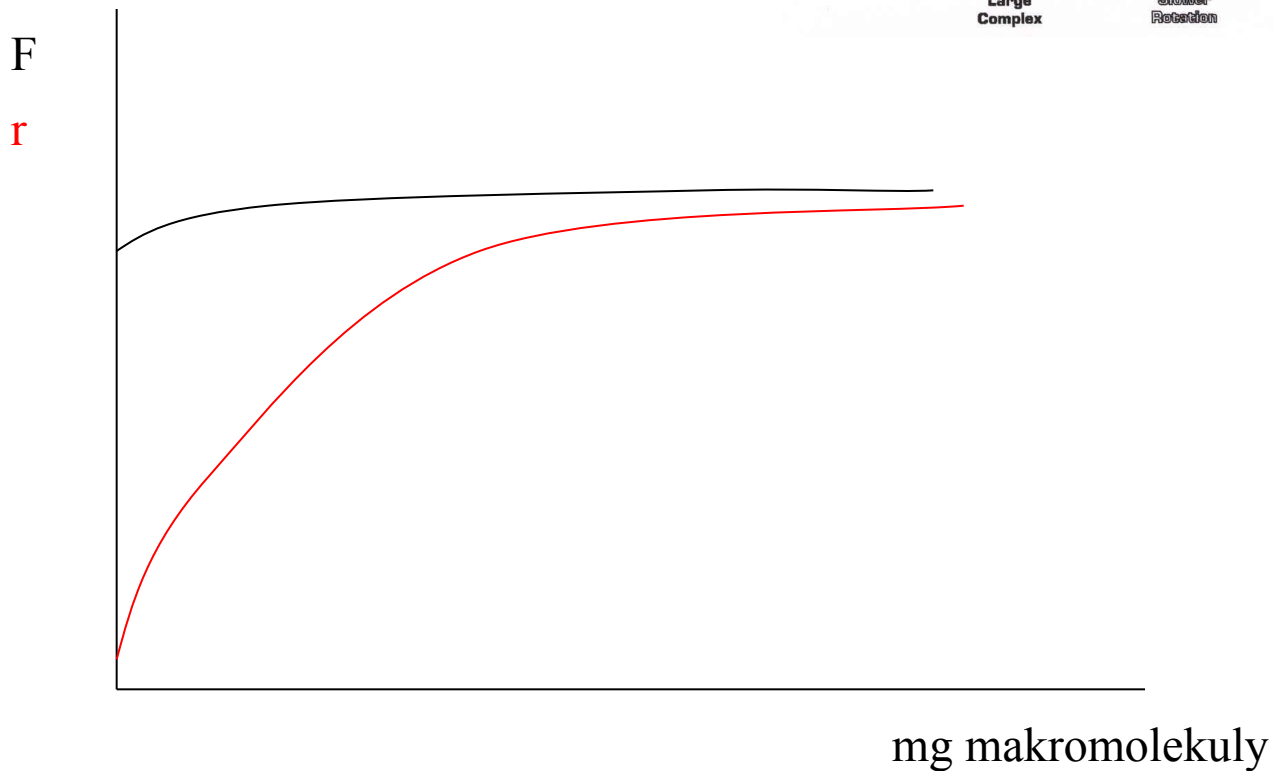
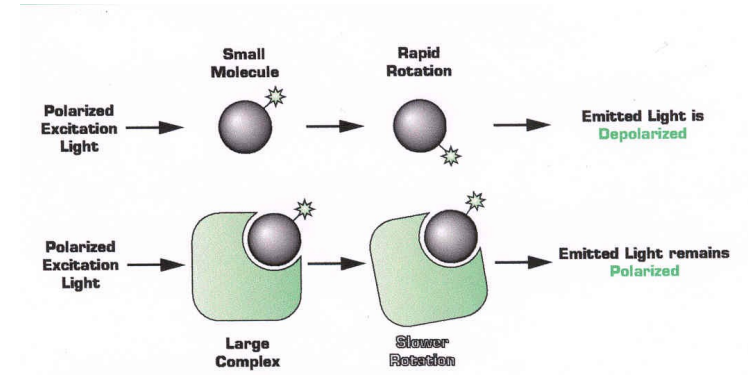
$$r_0 / r = 1 + 3\tau RT / V\eta$$

# Fluorescenční anizotropie

Využití:

Interakce makromolekuly s ligandem  
- bílkovina, NA, membrána

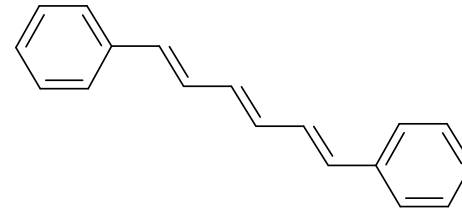
E – S (K, I), Ag – Ab, hormon – receptor



# Fluorescenční anizotropie

Využití:

Měření viskozity prostředí

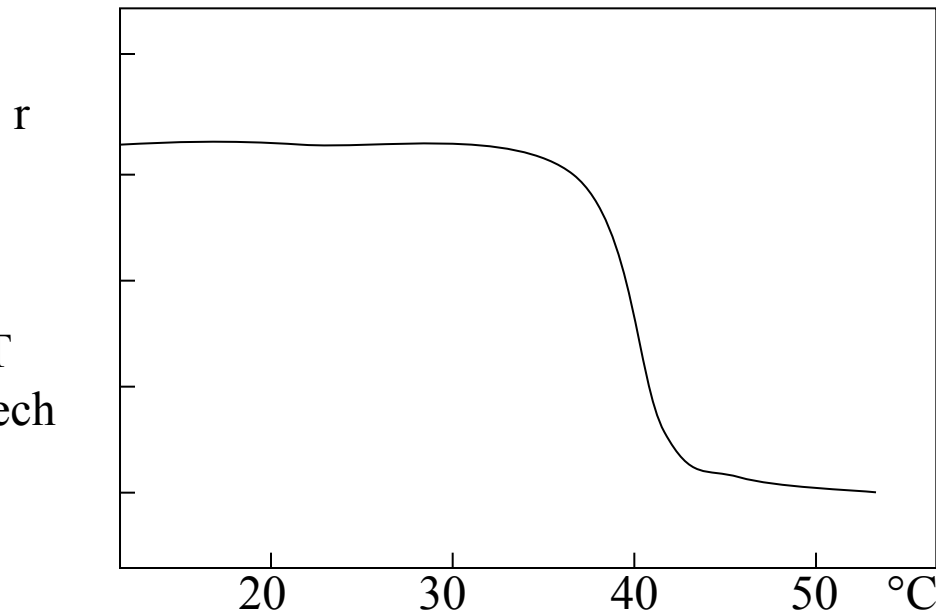


$$r_0/r = 1 + 3\tau RT/V\eta$$

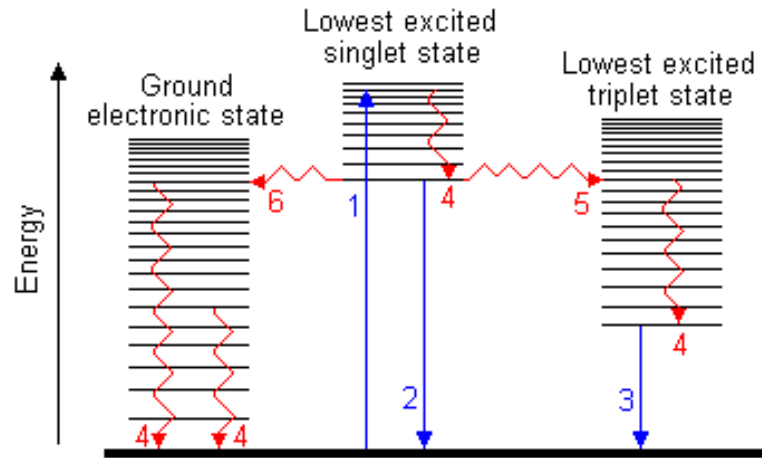
$$r_0/r = 1 + K/\eta$$

$$\eta = 2,4r/(0,362 - r)$$

Fl. anizotropie DPHT  
Vázaného v liposomech  
DPPC



# Fosforescence

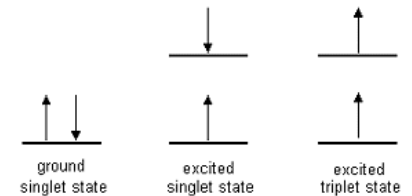
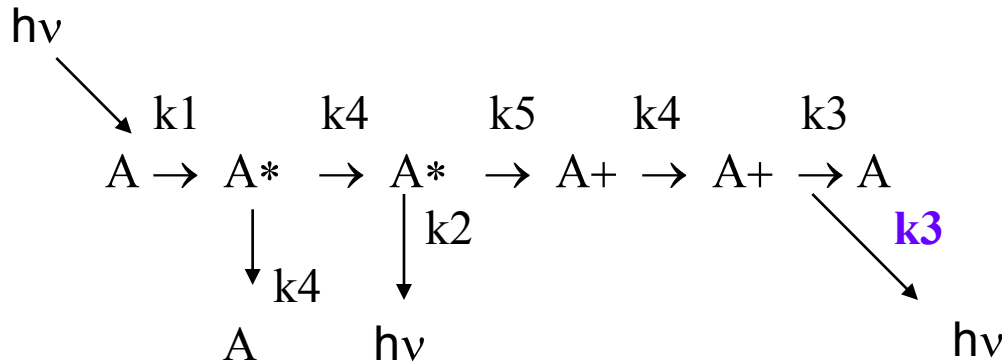


1. Absorption
2. Fluorescence
3. Phosphorescence
4. Vibrational relaxation
5. Intersystem crossing
6. Internal conversion

→ Processes involving photons  
~→ Radiationless transitions

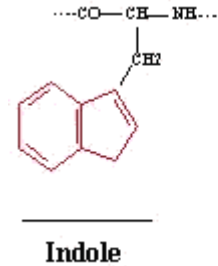
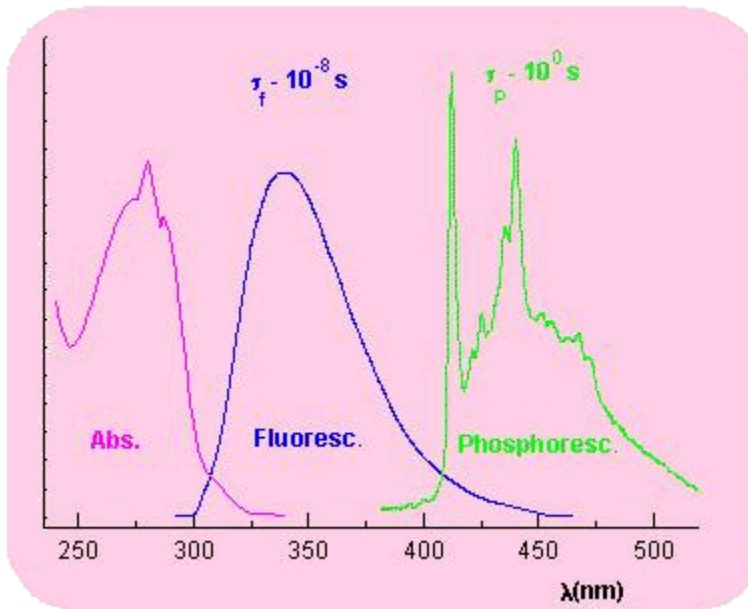
Multiplicita

$$M = 2S + 1$$



# Fosforescence

Střední doba života  $\tau$   $10^{-4} - 100$  s



Tryptophan

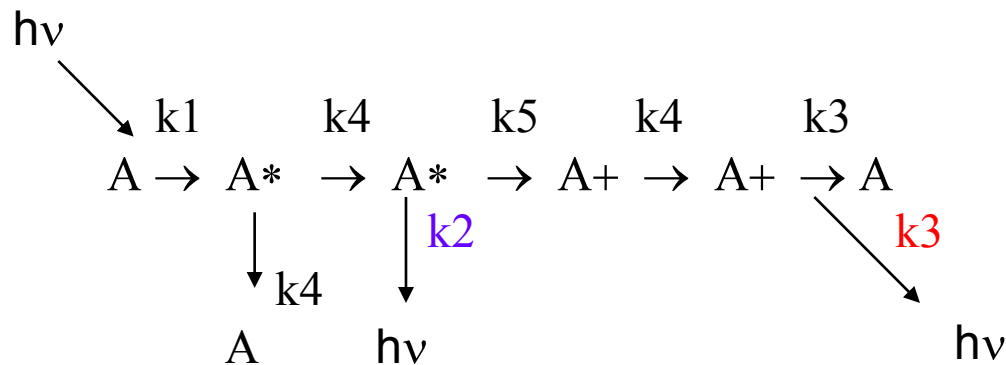
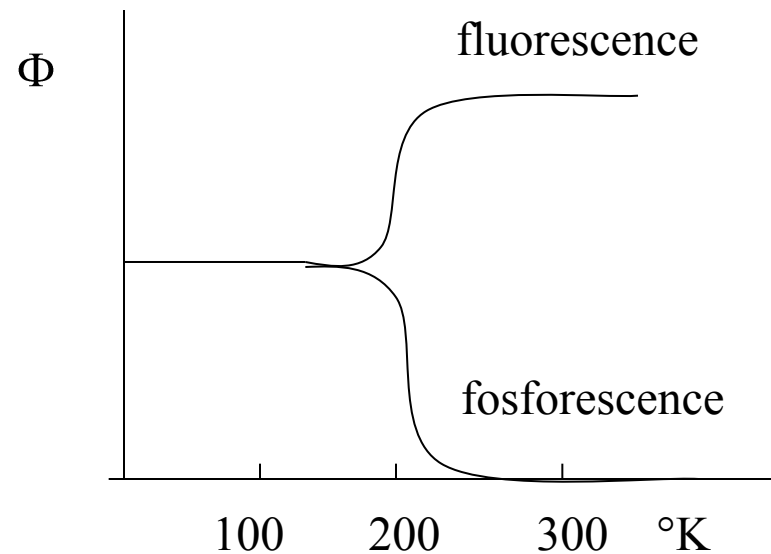
# Fosforescence

Kvantový výtěžek fosforescence

$$\Phi_p = k_3 / (k_3 + k_2 + k_4)$$

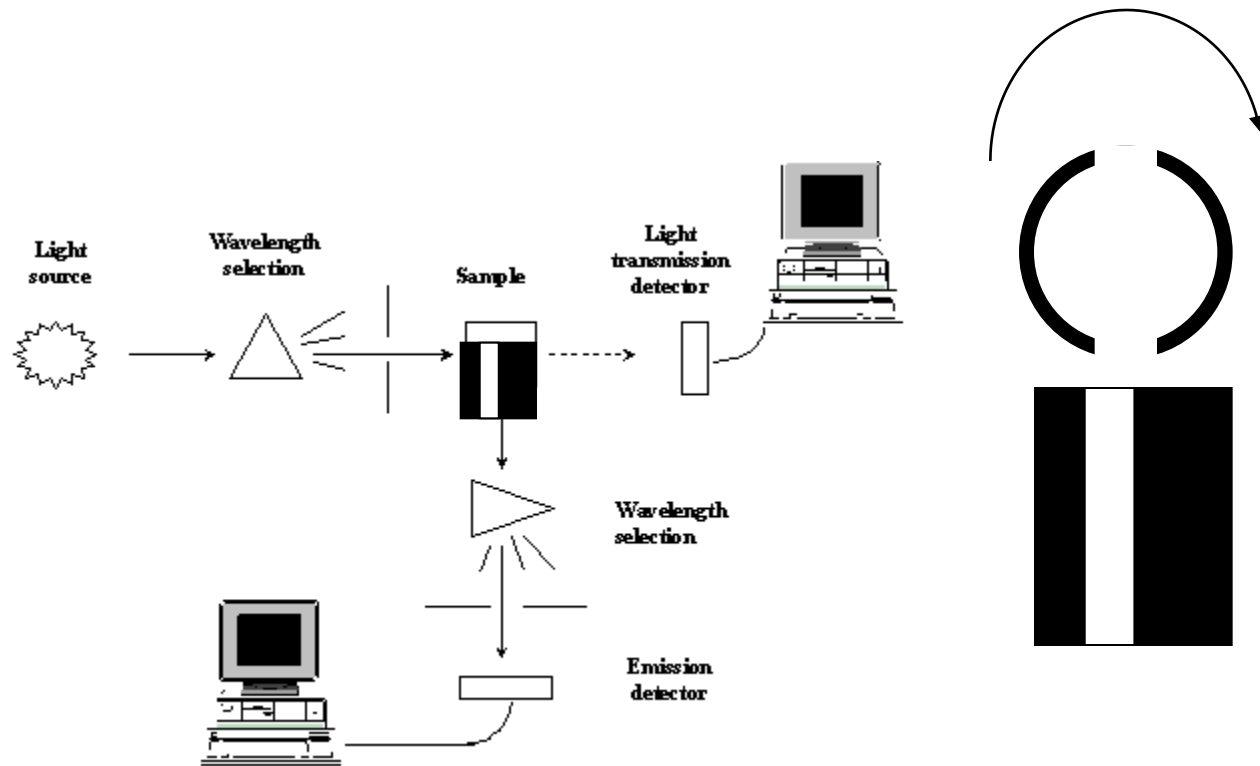
$$\Phi_f = k_2 / (k_3 + k_2 + k_4)$$

$$\Phi_f / \Phi_p = k_2 / k_3$$



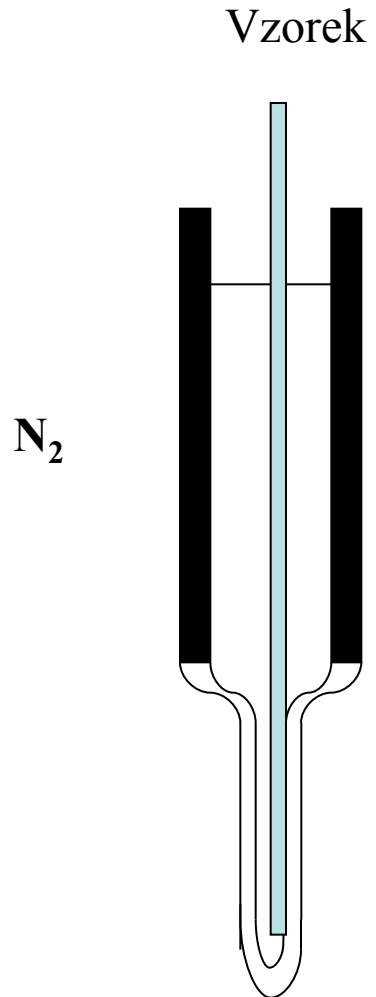
# Fosforescence

Experimentální uspořádání





# Fosforescence



Rozpouštědla  
rigidní skla bez krystalů  
(ethanol, metanol, voda:ethylenglykol., atd

# Fosforescence

## Aplikace fosforescence

	exc	em	(sec)
Tyrosine	300	405	5.3
Tryptophane	295	440	1.5
DOPA	270	420	0.4
Phenylalanine	270	420	-
Ac. benzoïque	240	400	2.4
Ac. aminobenzoïque	310	430	3.2
Ac. indolylacétique	300	440	7.1
Ac. salicylique	315	430	6.2
Quinine	340	500	1.3
Naphtalène	290	505	
Codéine	275	505	0.3
Caféine	285	440	2.0

# Fosforescence

Fosforescence alkalické fosfatasy

3 Try, pouze Try 109 fosforeskuje

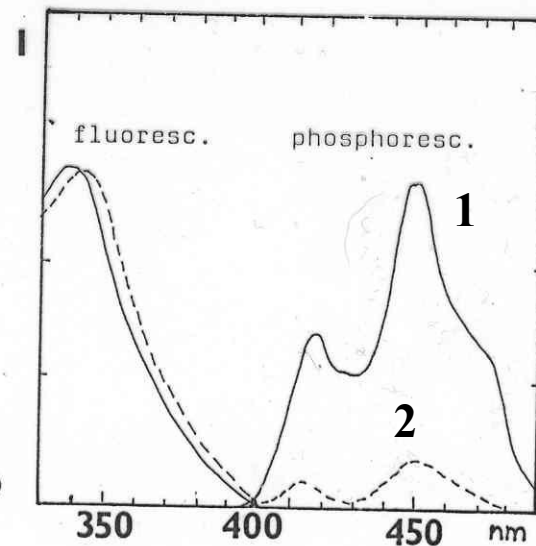
1 – nativní enzym

2 – enzym po odstranění Zn

Phosphatase  
alcaline

Spectra de fluor.  
et de phosphoresc.  
de tryptophane

Cioni et al. (1989)  
Eur. J. Biochem.



# Chemiluminescence

- Při reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Proto musí být reakce exotermní a obvykle je to oxidace.
- Energie se využije pro excitaci elektronů, uvolní-li se jako teplo chemiluminescence se neobjevuje.
- Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu, nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise.

# Chemiluminescence

- Přístrojové vybavení:
- od jednoduchých luminometrů až po vysoce automatizované chemiluminiscenční analyzátory, ve kterých se provádí imunochemické reakce s chemiluminiscenční detekcí.
- Standardní luminometry se do určité míry podobají fluorimetrům. Před měřicí kyvetou ovšem nemají žádný zdroj světla ani filtr. Uspořádání za kyvetou odpovídá fluorimetrům (filtr, fotonásobič). Téměř všechny luminometry mají také nastřikovací zařízení, protože u zábleskové chemiluminescence je nutné provést měření ihned po nástřiku reagensů. Některé luminometry měří luminiscenci v mikrotitračních destičkách.

# Chemiluminescence

- Jednoduchý luminometr



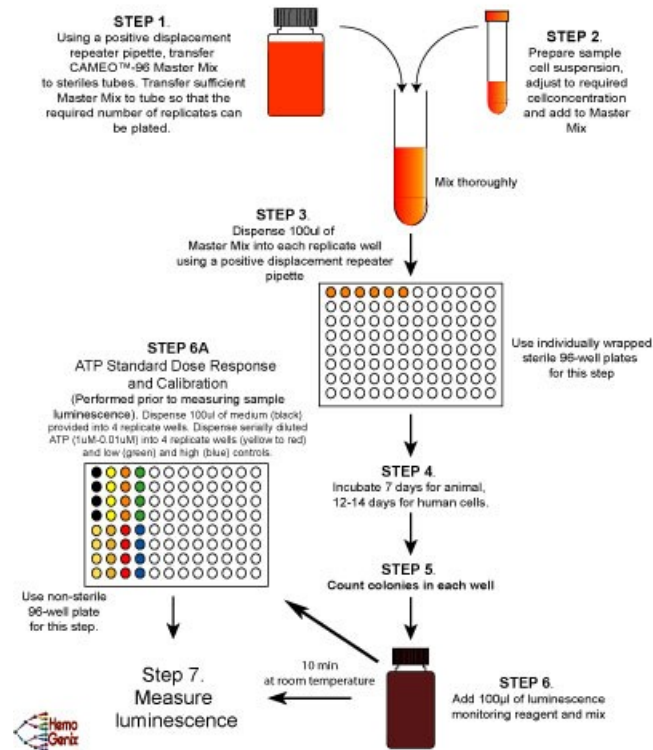
# Chemiluminescence

- Luminometr na destičky



# Chemiluminescence

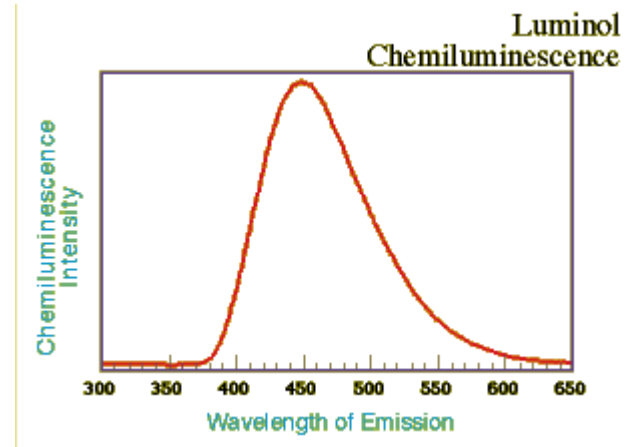
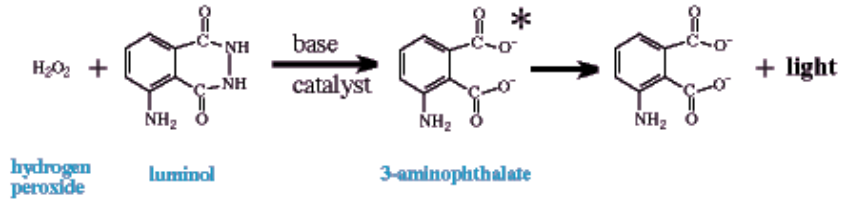
## CAMEO™-96 KIT PROTOCOL



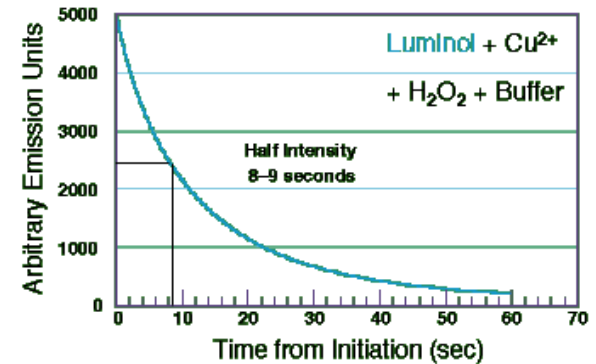


# Chemiluminescence

## Luminol

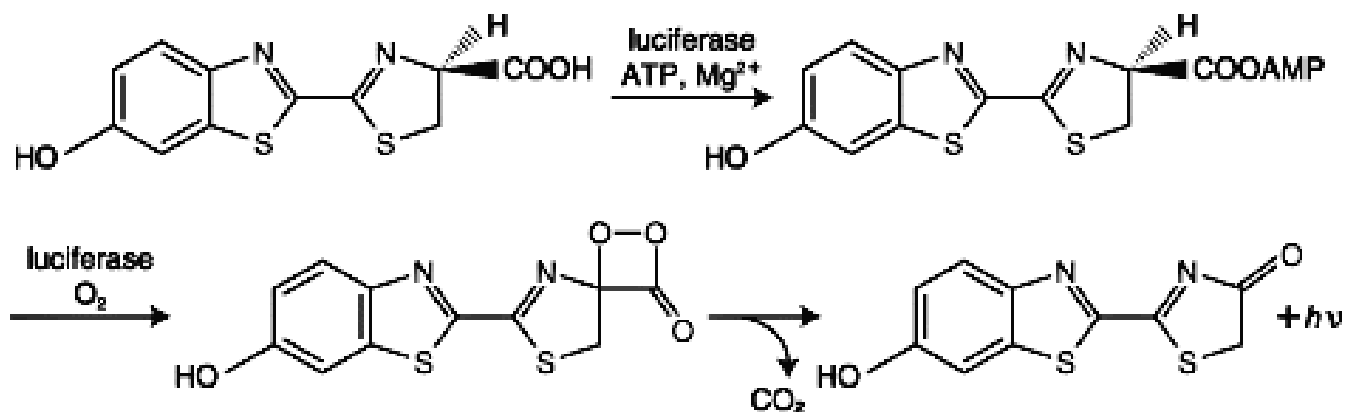


## Luminol Emission Time Profile

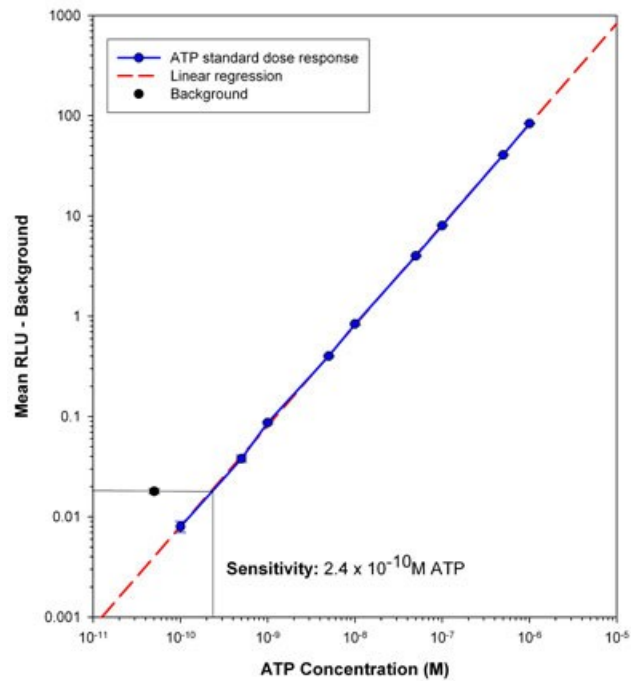


# Chemiluminescence

## Luciferin světlušky



# Chemiluminescence



# Chemiluminescence

**Aequorin – *Aequorea victoria***

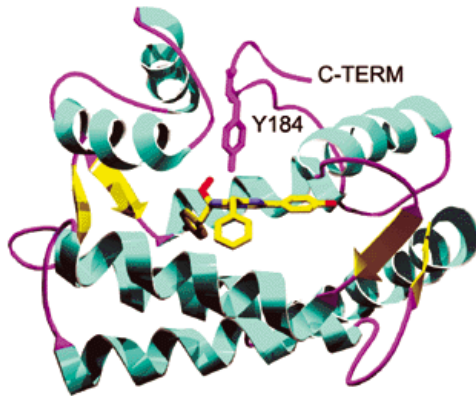
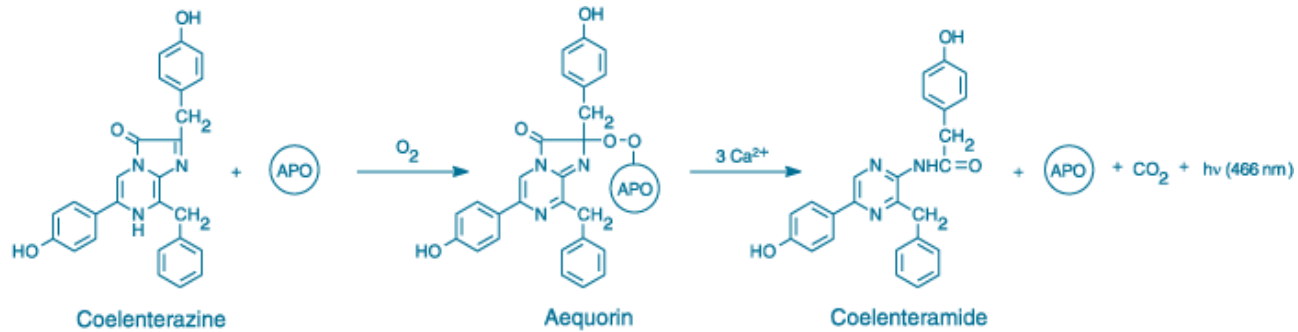
Aequorin – chemiluminescence

- fuze s GFP – fluorescence



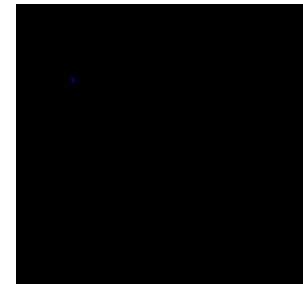
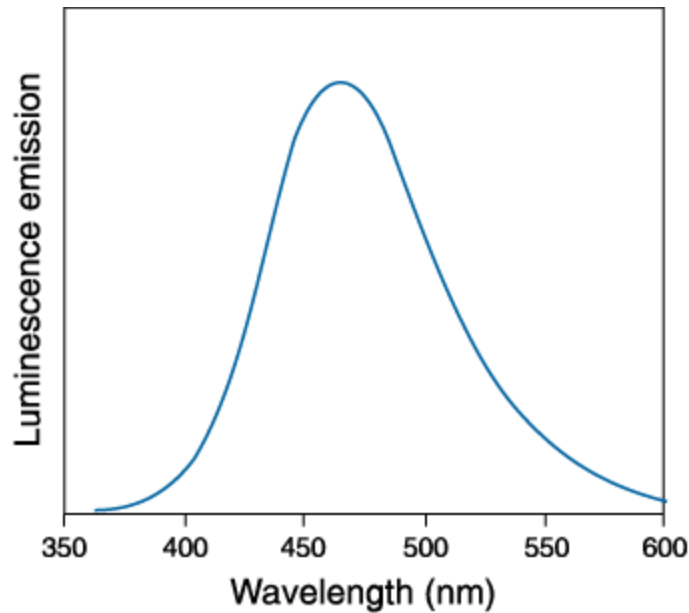
# Chemiluminescence

**Aequorin – *Aequoria victoria***  
**Prostetická skupina - typ luciferinu**



# Chemiluminescence

## Aequorin – *Aequoria victoria*



Průnik vápníku do mitochondrií  
Aktivuje oxidaci