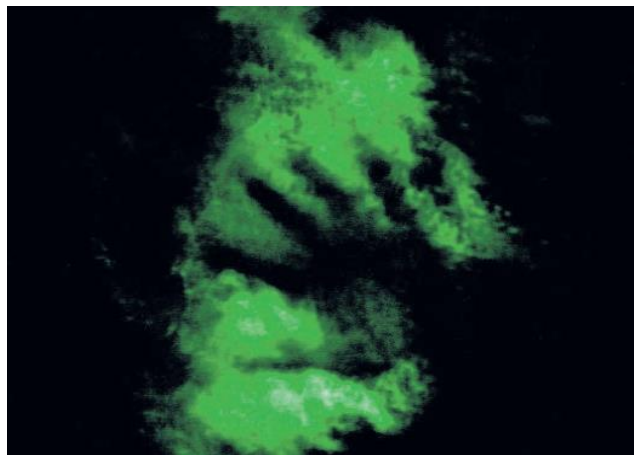
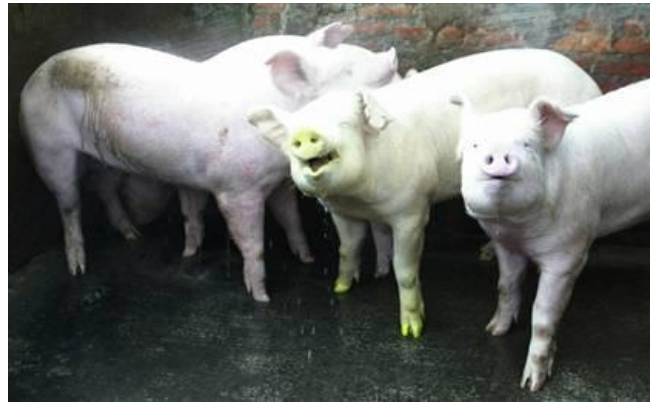
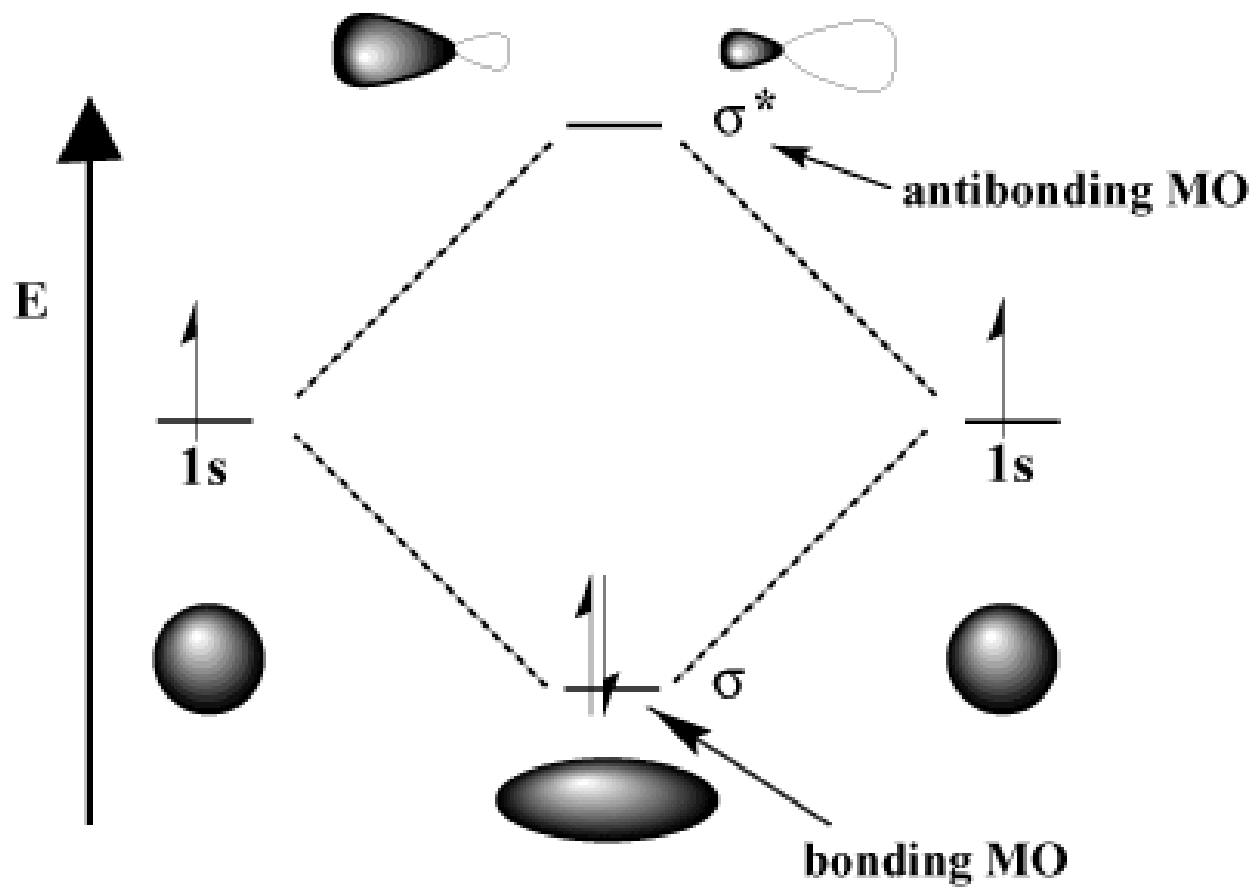


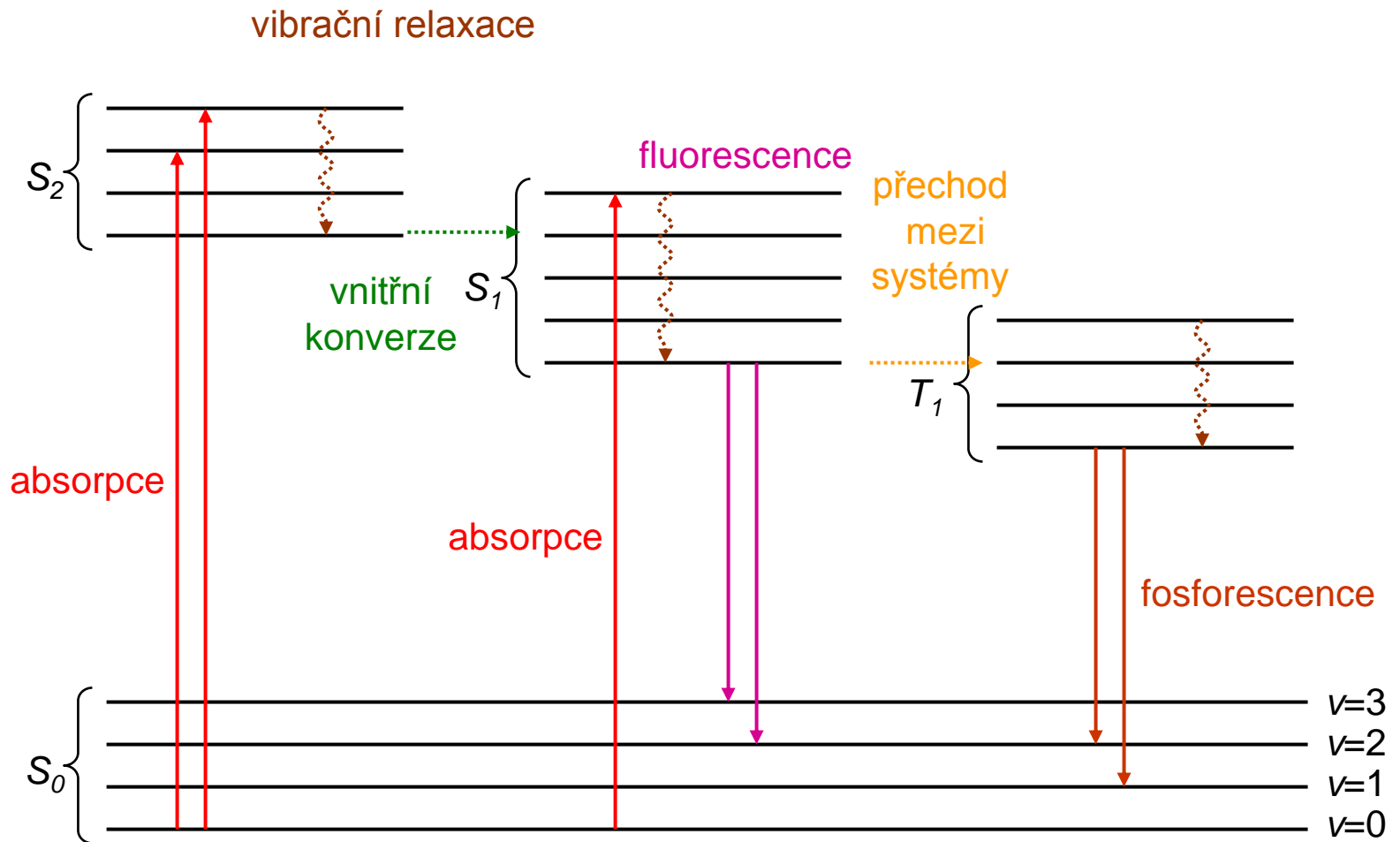
Úvod do luminiscenční spektrometrie

Petr Tábořský



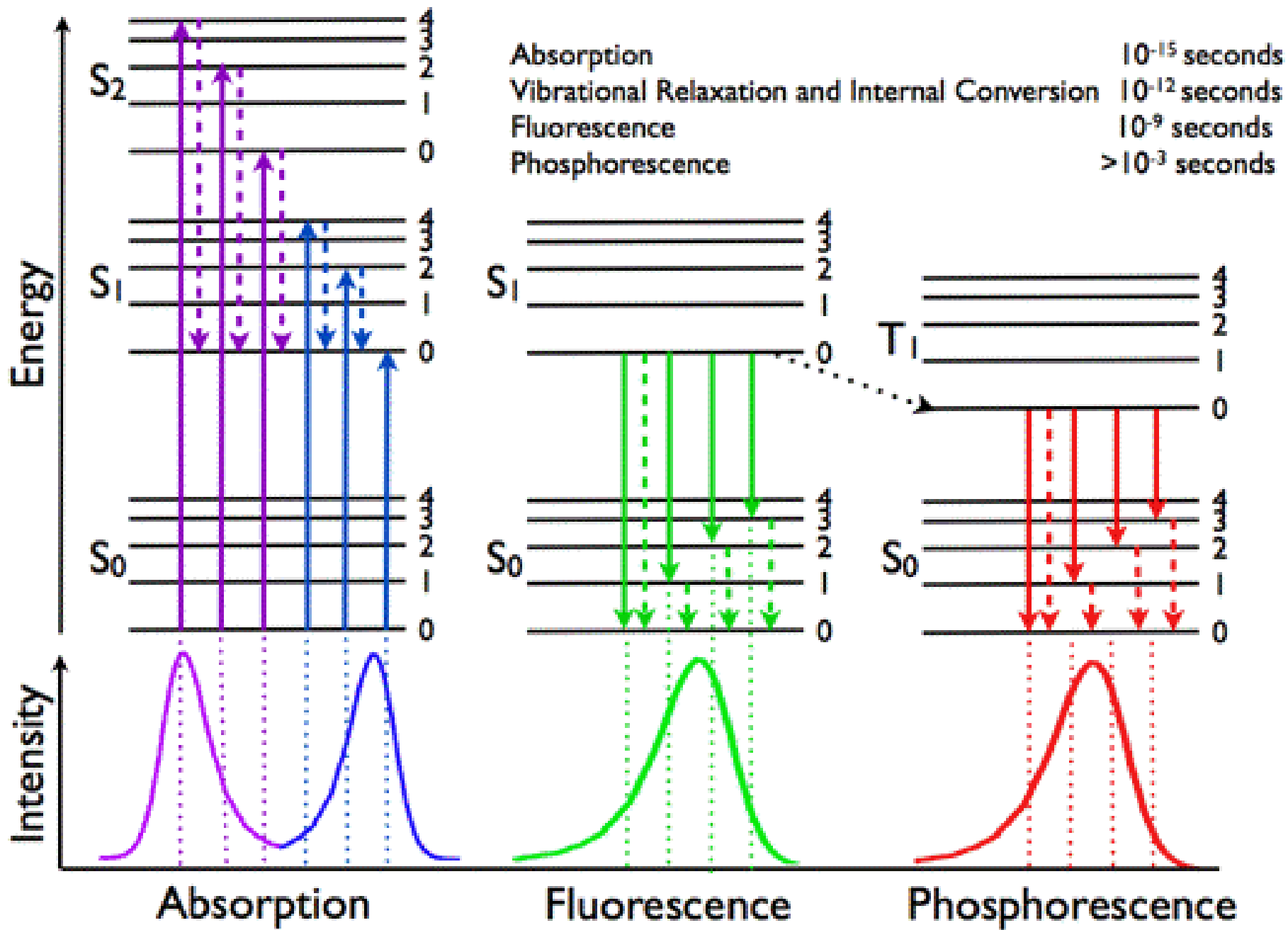


Jablonského diagram

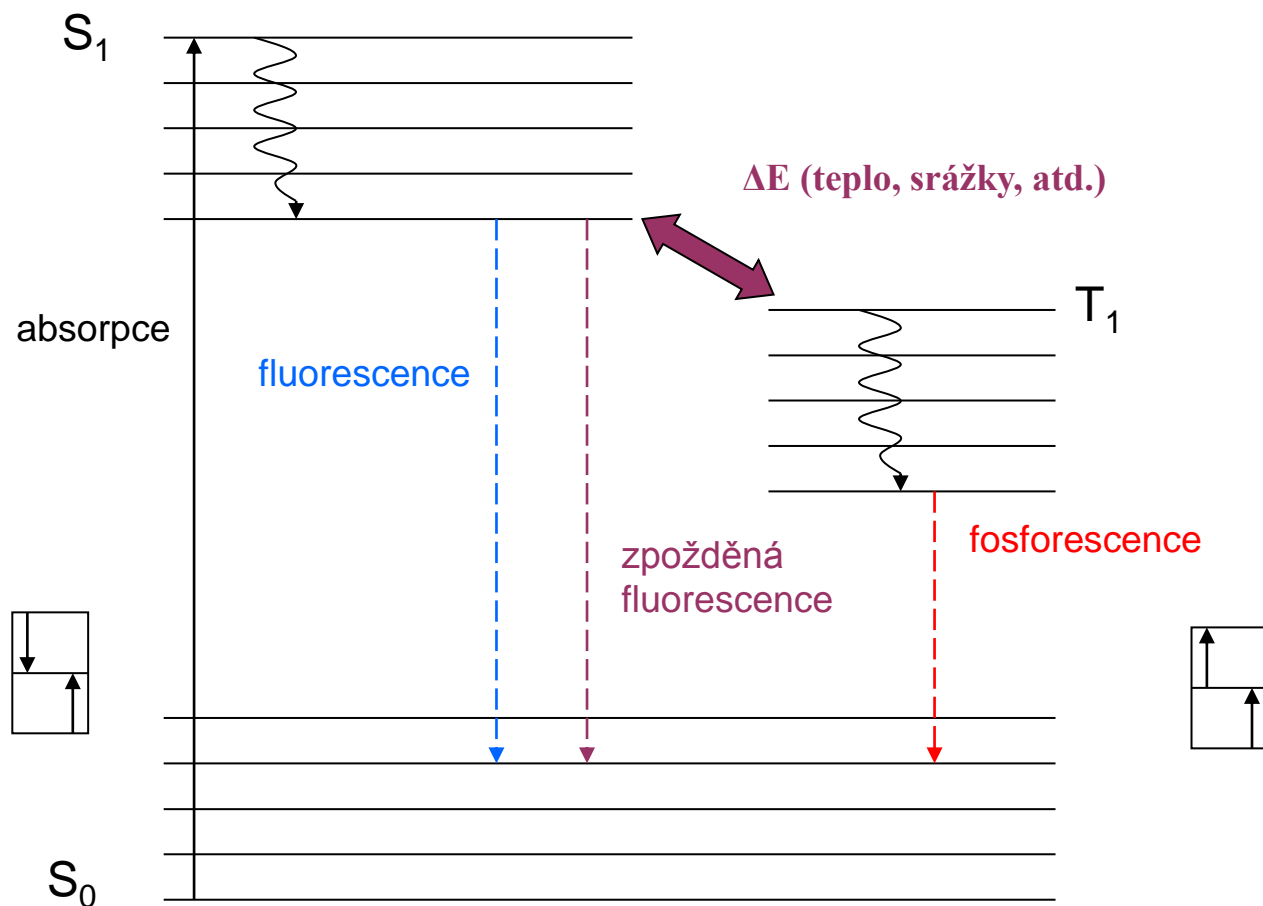


_____ radiální přechody (s účastí fotonu)

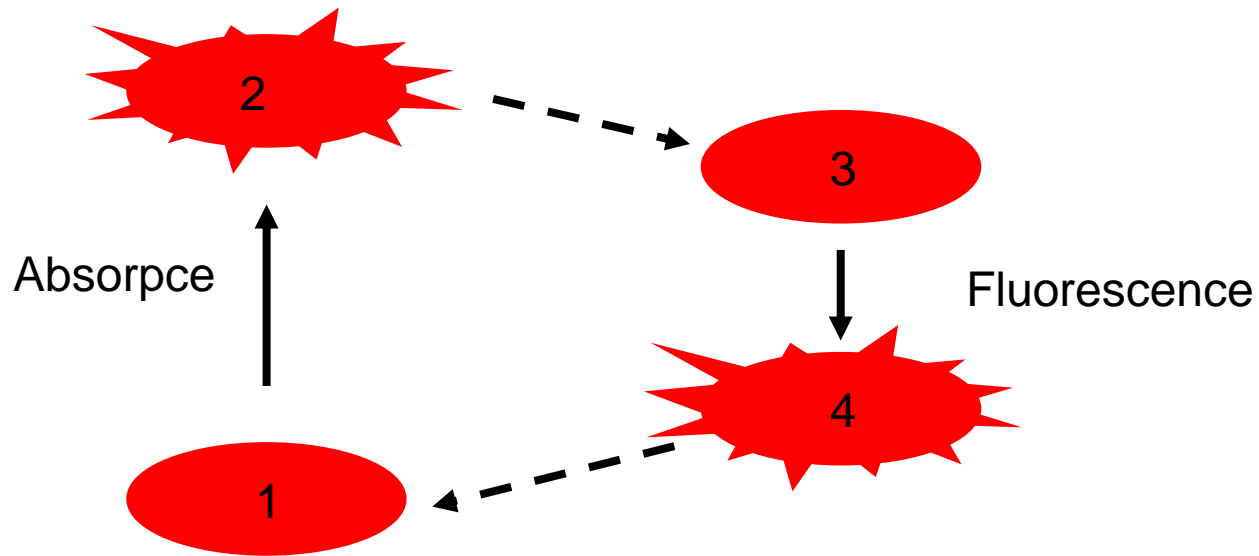
..... neradiální přechody (bez účastí fotonu)



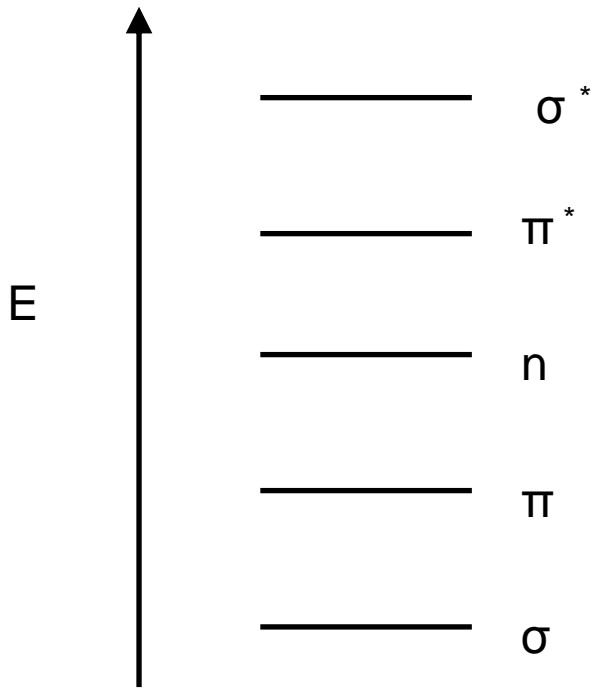
Zpožděná fluorescence



- 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)



Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

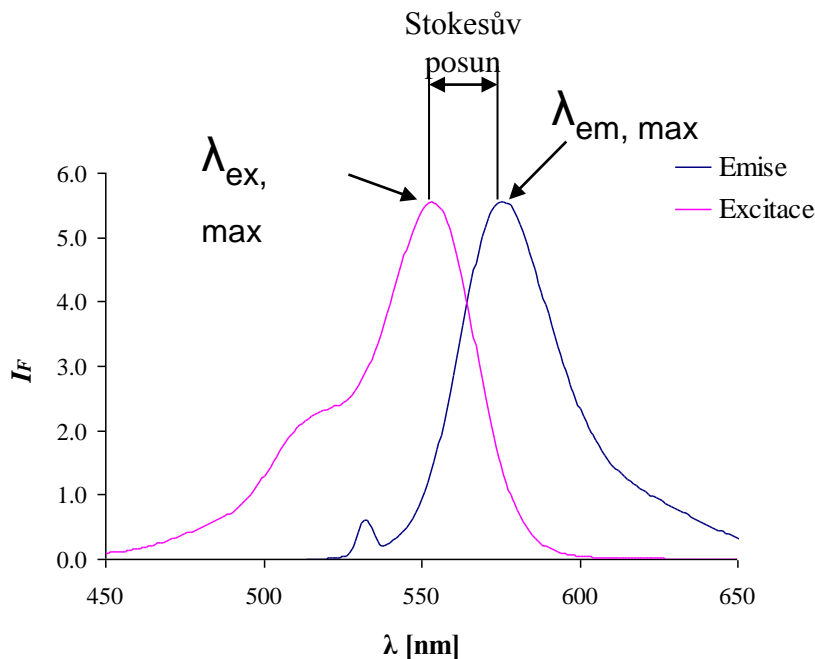
Luminiscence molekuly je charakterizována:

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

Emisní a excitační spektra

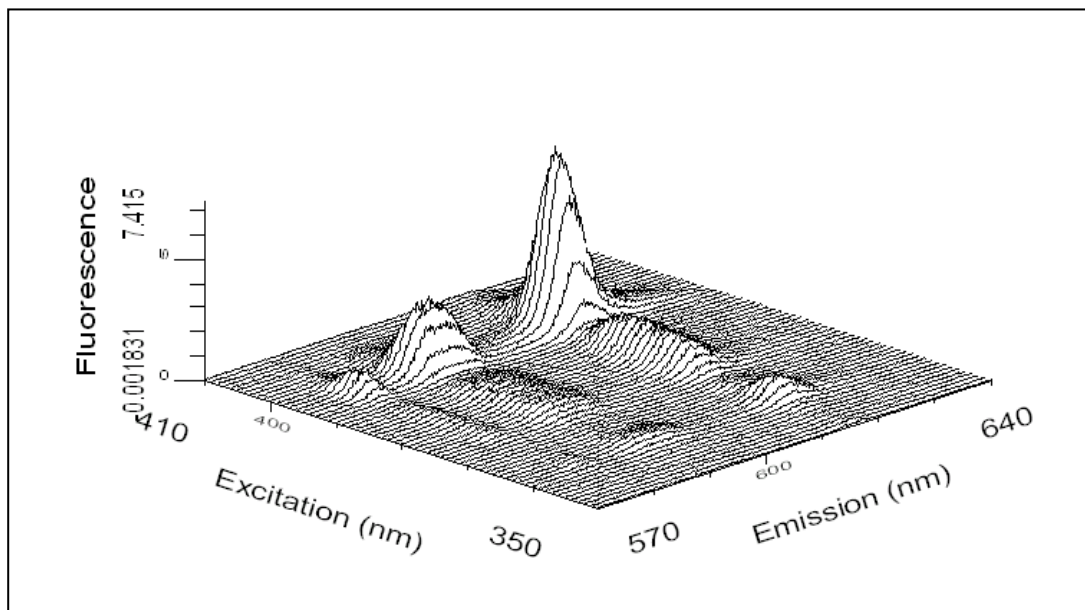
emisní spektrum (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní λ_{ex} .

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

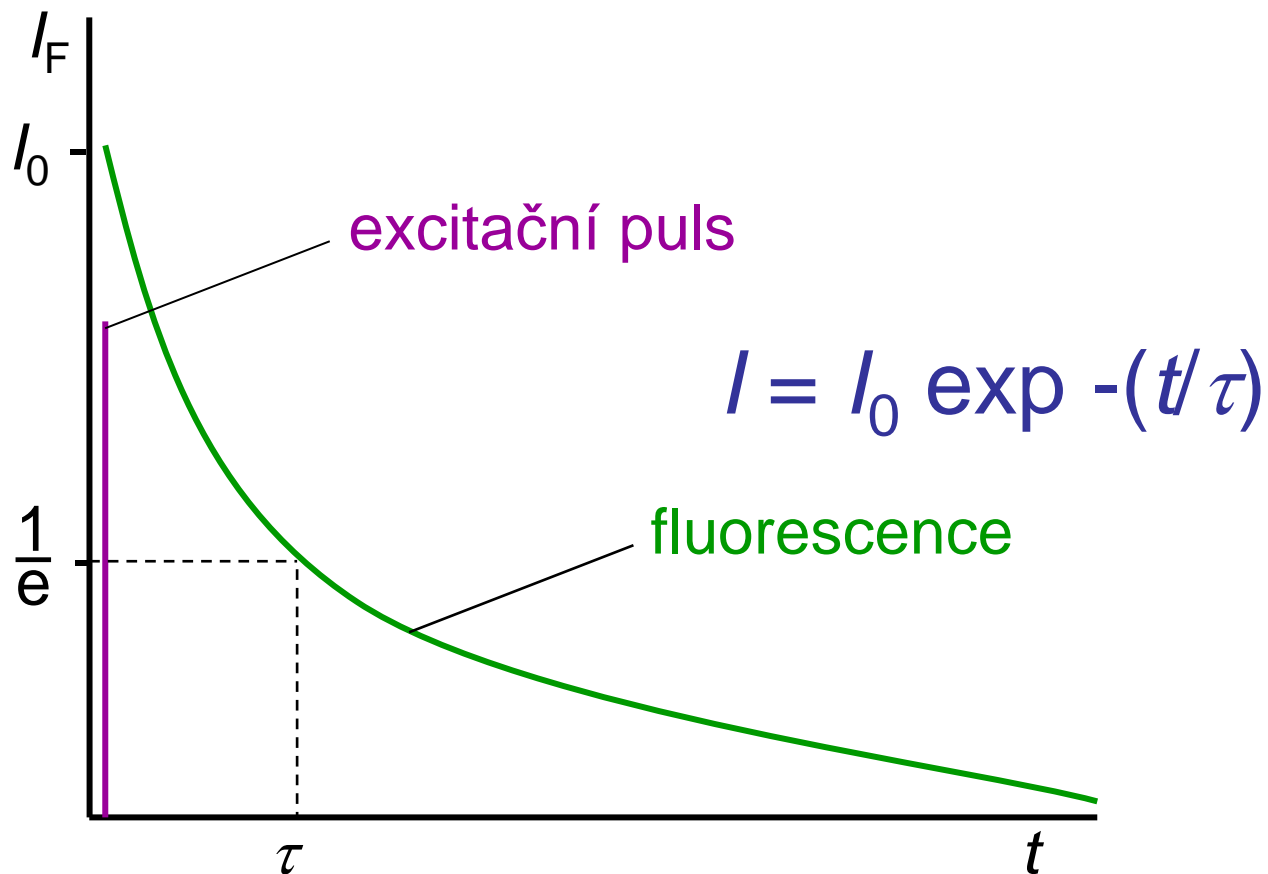


3D luminiscenční spektra

- emisní vs. excitační spektra
- emise (resp. excitace) vs. Čas
- synchronní sken



Časově rozlišená luminiscence



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

Základní vztahy

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

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

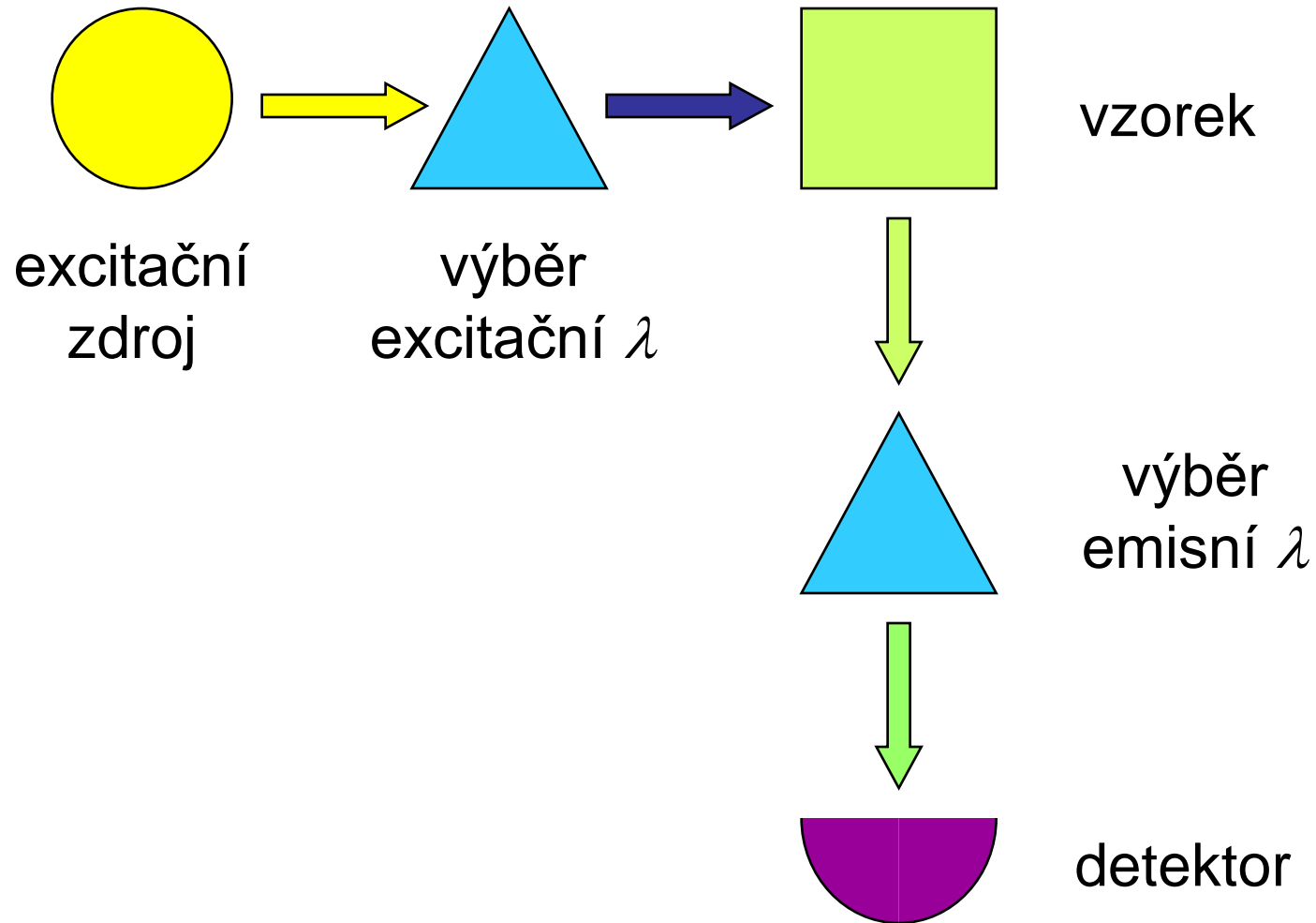
$$F = k \varphi \Phi_0 (1 - 10^{-c/\varepsilon})$$

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

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

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

Schema měření fluorescence



Výtěžek luminiscence

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

k_f rychlost emisního procesu (fluorescence)

k_i rychlost nezářivých 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:

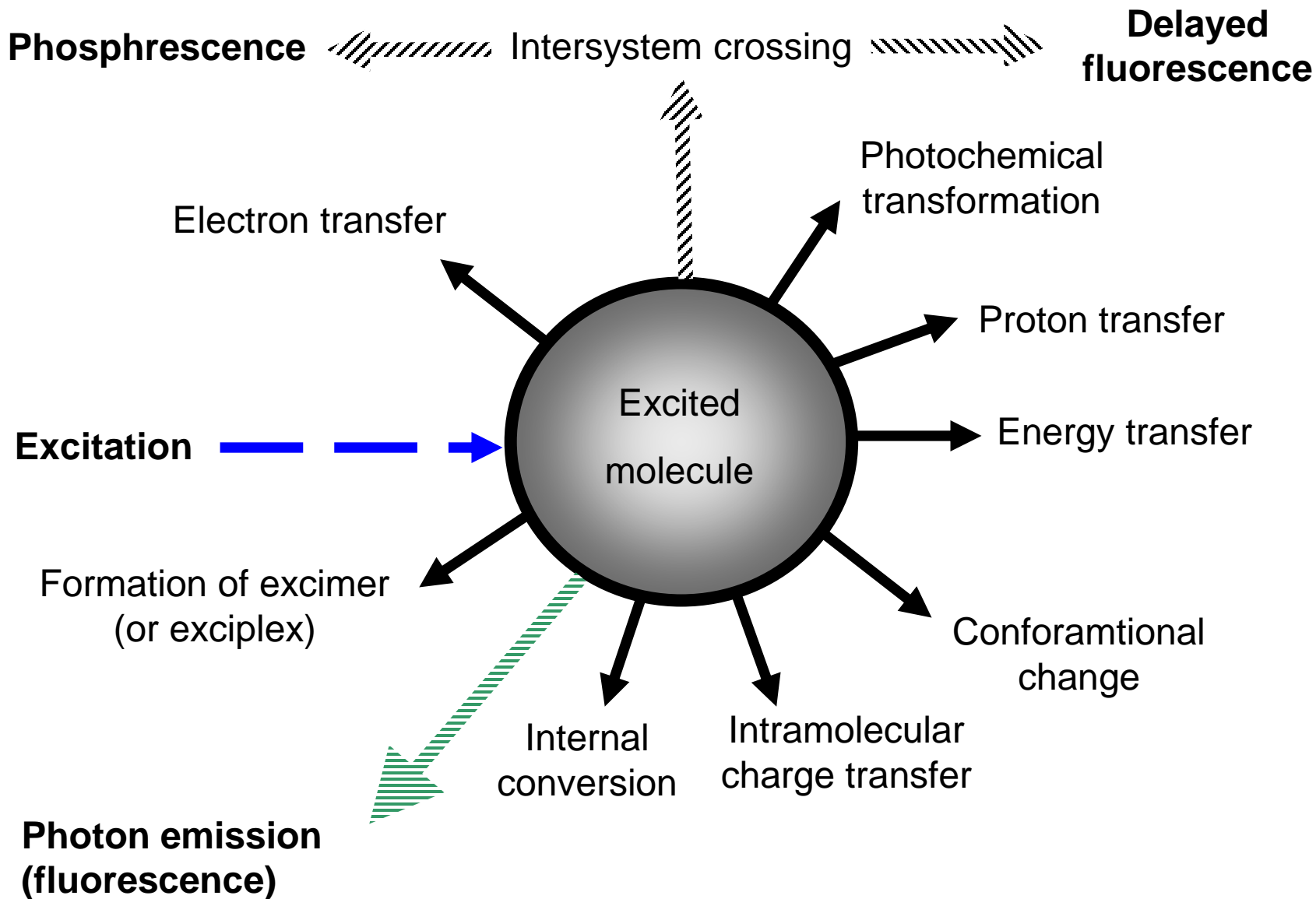
$$\varphi_k = N_{em}/N_{abs} = I_{em}/I_{abs} = I_{em}/(I_0 - I)$$

$$\varphi_e < \varphi_k \quad (\text{Stokesův posun})$$

- energetický výtěžek:

$$\varphi_e = E_{em}/E_{abs} = h\nu_{em}/h\nu_{ex}$$

Possible de-excitation pathways of excited molecules



Zhášení luminiscence

(luminescence quenching)

- luminiscenci konkuruje jiný děj, který vede k poklesu intenzity luminiscence
- všechny možné procesy zhášení ještě nejsou zcela vysvětleny
- dynamické (někdy též kolizní) a statické zhášení

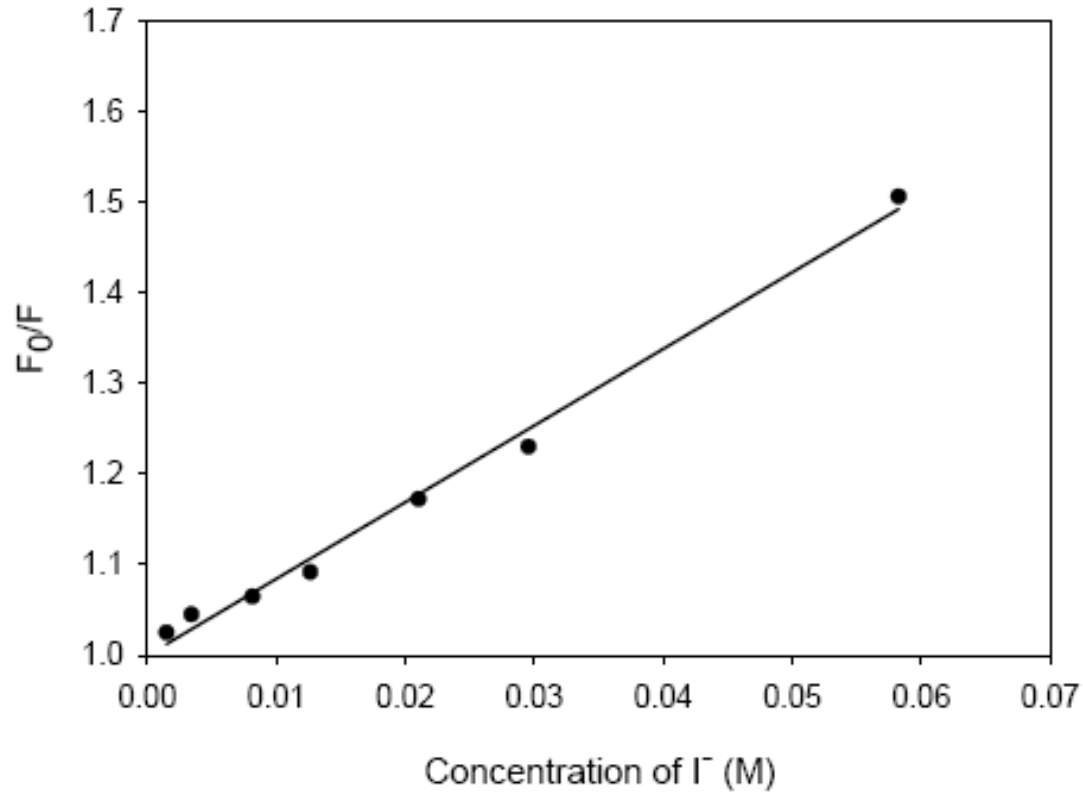
Dynamické zhášení luminiscence

- 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^-

Statické 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).)

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

Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

$$F = k \varphi \Phi_0 \cdot 2.3 c / \varepsilon$$

Vysoká citlivost metody:

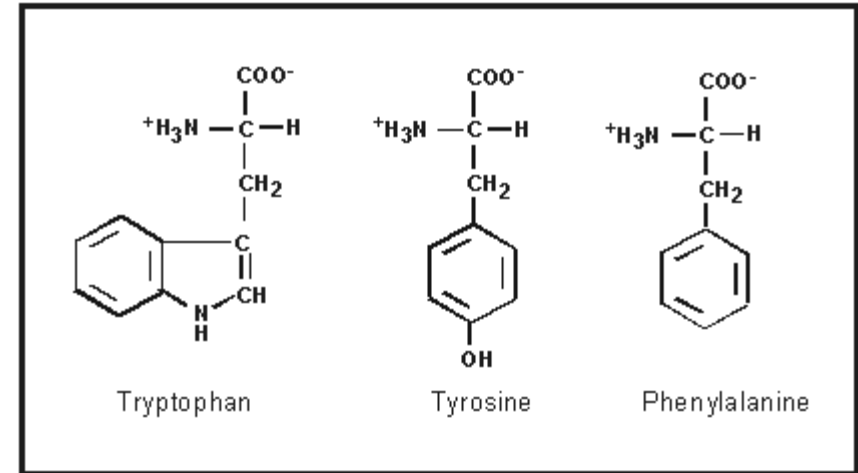
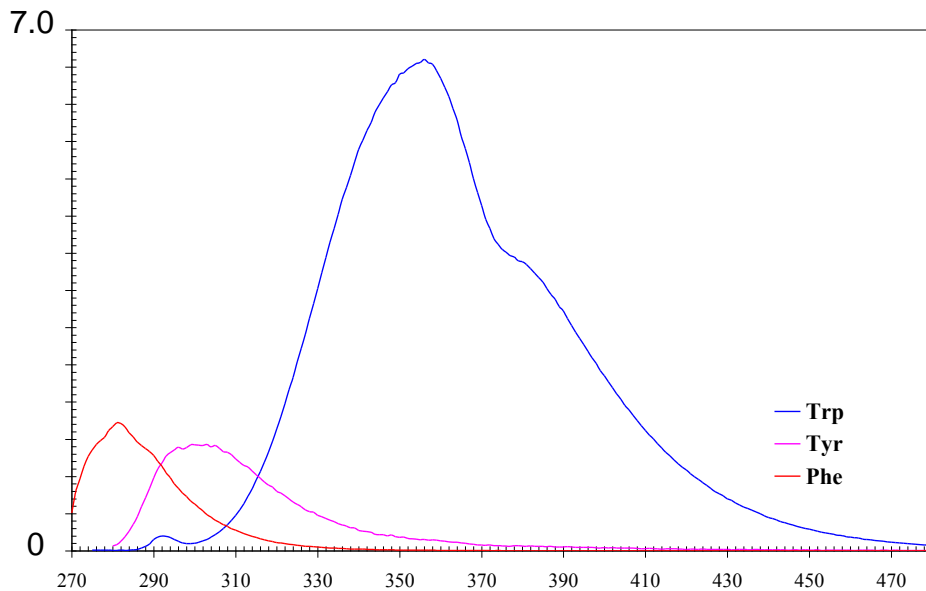
- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

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
- **thermoluminiscence** – zdrojem je tepelná energie
- **radioluminiscence** – zdrojem je radioaktivní záření
- **triboluminiscence** – zdrojem je mechanická energie
- **krystaloluminiscence** – krystalizace je doprovázena luminiscencí
- další zdroje (sonoluminiscence, atd.)

Fotoluminiscence

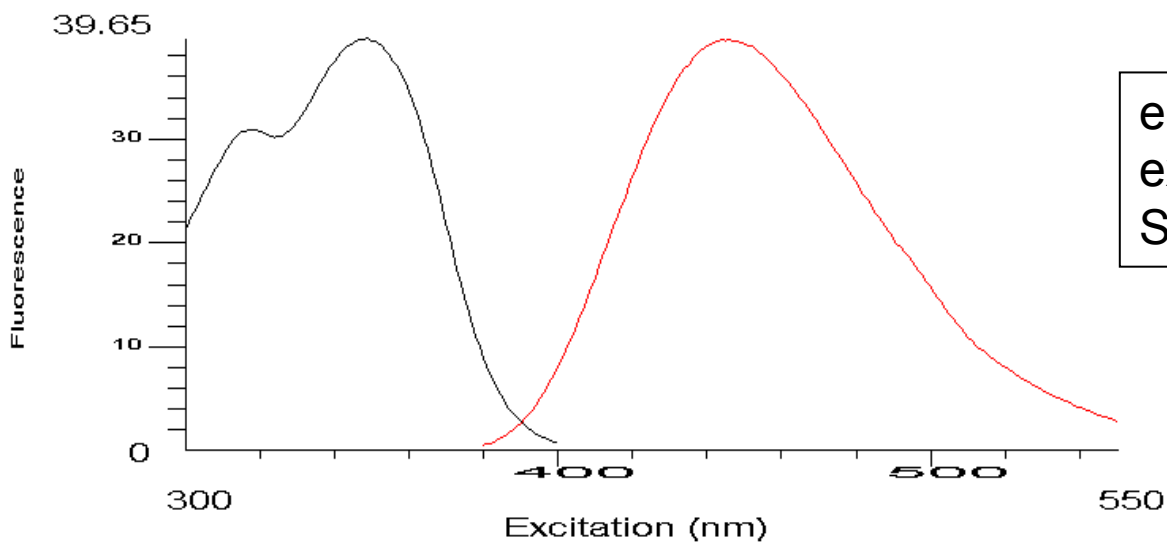
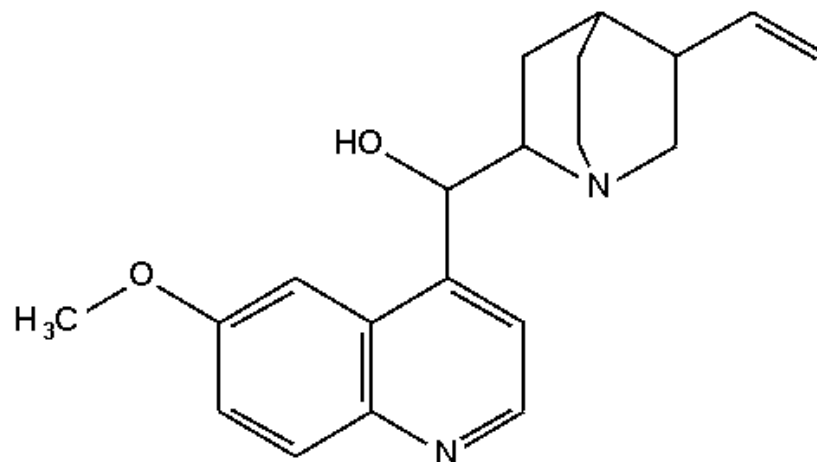




Aminokyselina	Absorpce		Fluorescence	
	Vln.délka (nm)	Abs. koeficient	Vln.délka (nm)	Kvantový výtěžek
Tryptofán (Trp)	280	5,600	348	0.20
Tyrosin (Tyr)	274	1,400	303	0.14
Fenylalanin (Phe)	257	200	282	0.04

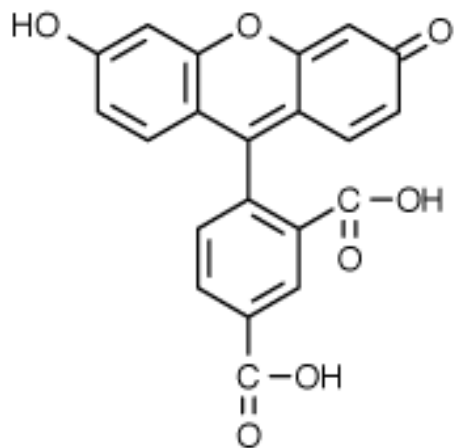
1. P. Pekárková, Bakalářská práce, 2005
 2. www.biotek.com

Chinin

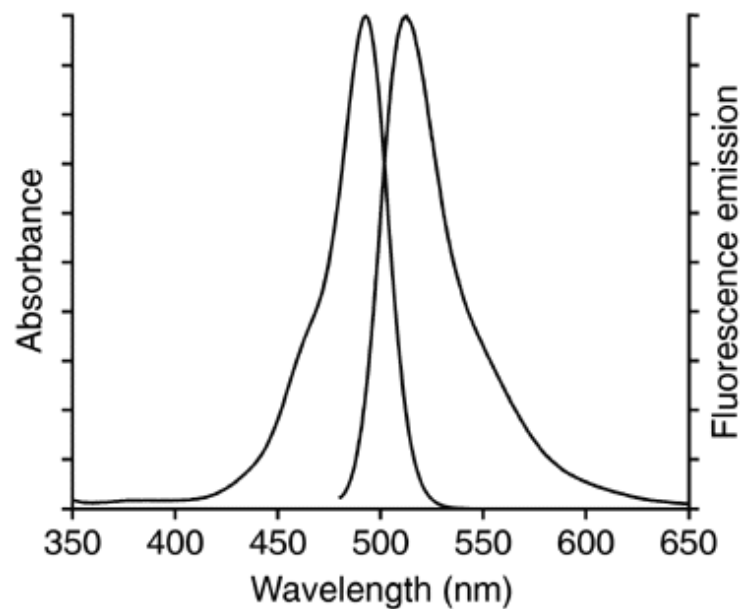


emisní maximum: **446 nm**
excitační maximum: **349 nm**
Stokesův posun: **97 nm**

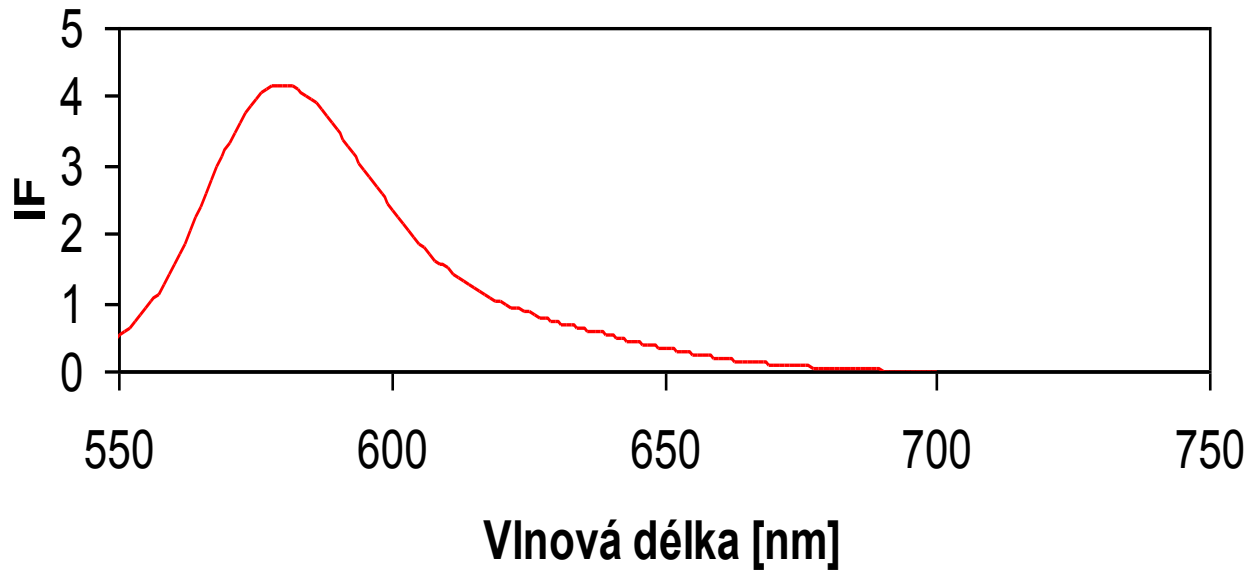
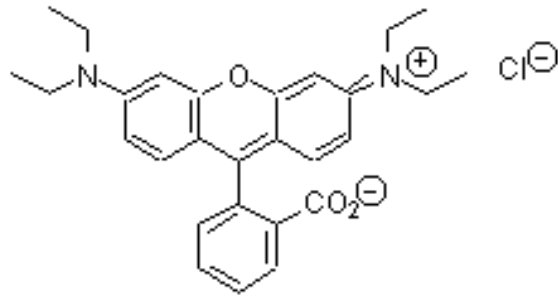
Deriváty fluoresceinu



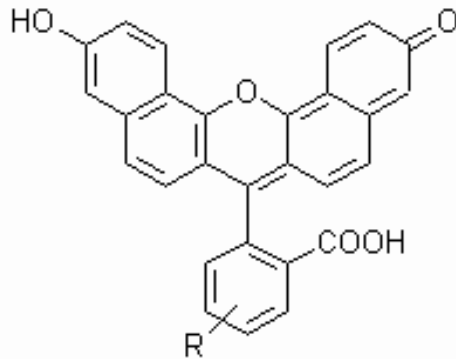
excitační maximum: 494 nm
emisní maximum: 520 nm



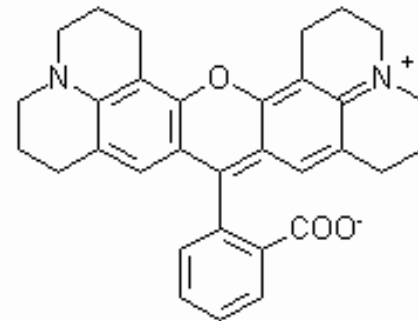
Deriváty rhodaminu



Fluorofory s emisním maximem v oblasti kolem 600nm

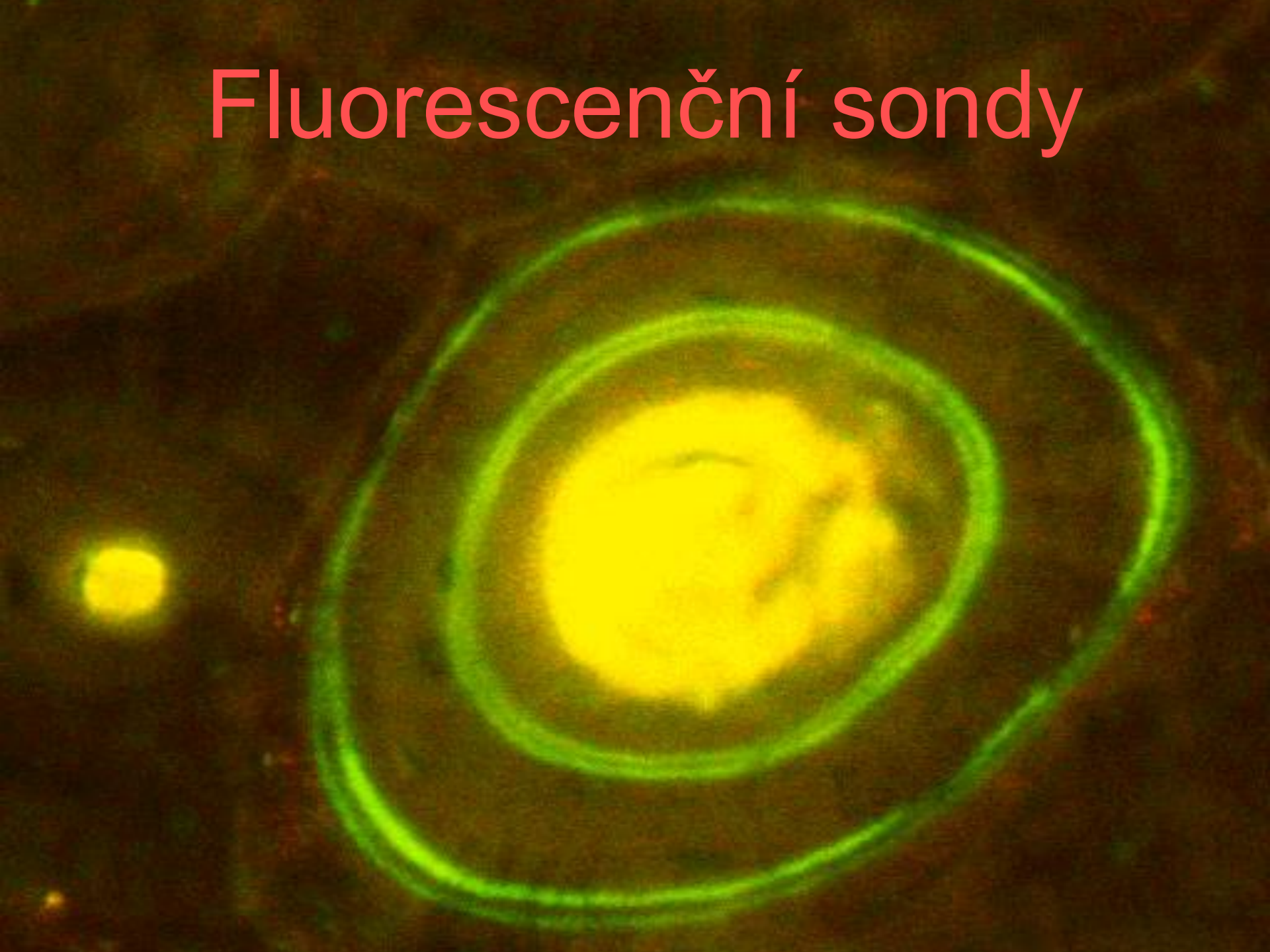


R = COOH ABSORPCE 598 nm (49000)
EMISE 668 nm



ABSORPCE 568 nm (98000)
EMISE 595 nm

Fluorescenční sondy



Fluorescenční sondy

- vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám, iontům, atd. váží nekovalentní vazbou
- změna fluorescenční vlastností (intenzita emise, posun emisního maxima, změna času vyhasínání)
- Princip: různý vliv na Franck-Condonův excitovaný stav

Fluorescenční sondy pro využití v analytické chemii, medicíně a biologii

- kromě měření emisních spekter se využívá zejména fluorescenční mikroskopie, zhášení (emise i času vyhasínání)
- fluorescenční indikátory: sondy citlivé na určitou látku (většinou anion, či kation)
- sondy pro polaritu prostředí
- membránové sondy
- fluorescenční sondy pro nukleové kys.
- další
- www.molecularprobes.com

Fluorescenční značky

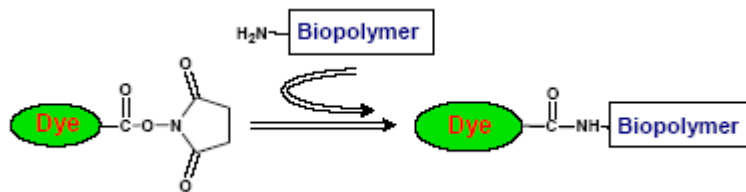
Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové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

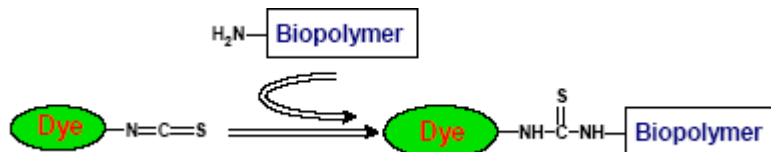
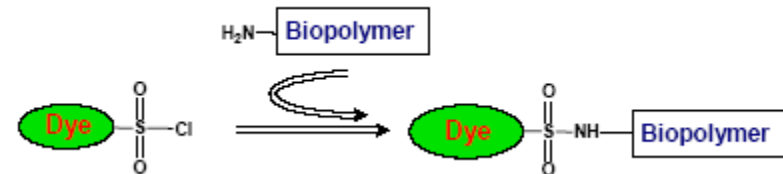
Fluorescenční značky – vazebná místa

amino-reaktivní značky



sukcinimidyl estery (Rh6GSE)

sulfonyl chloridy

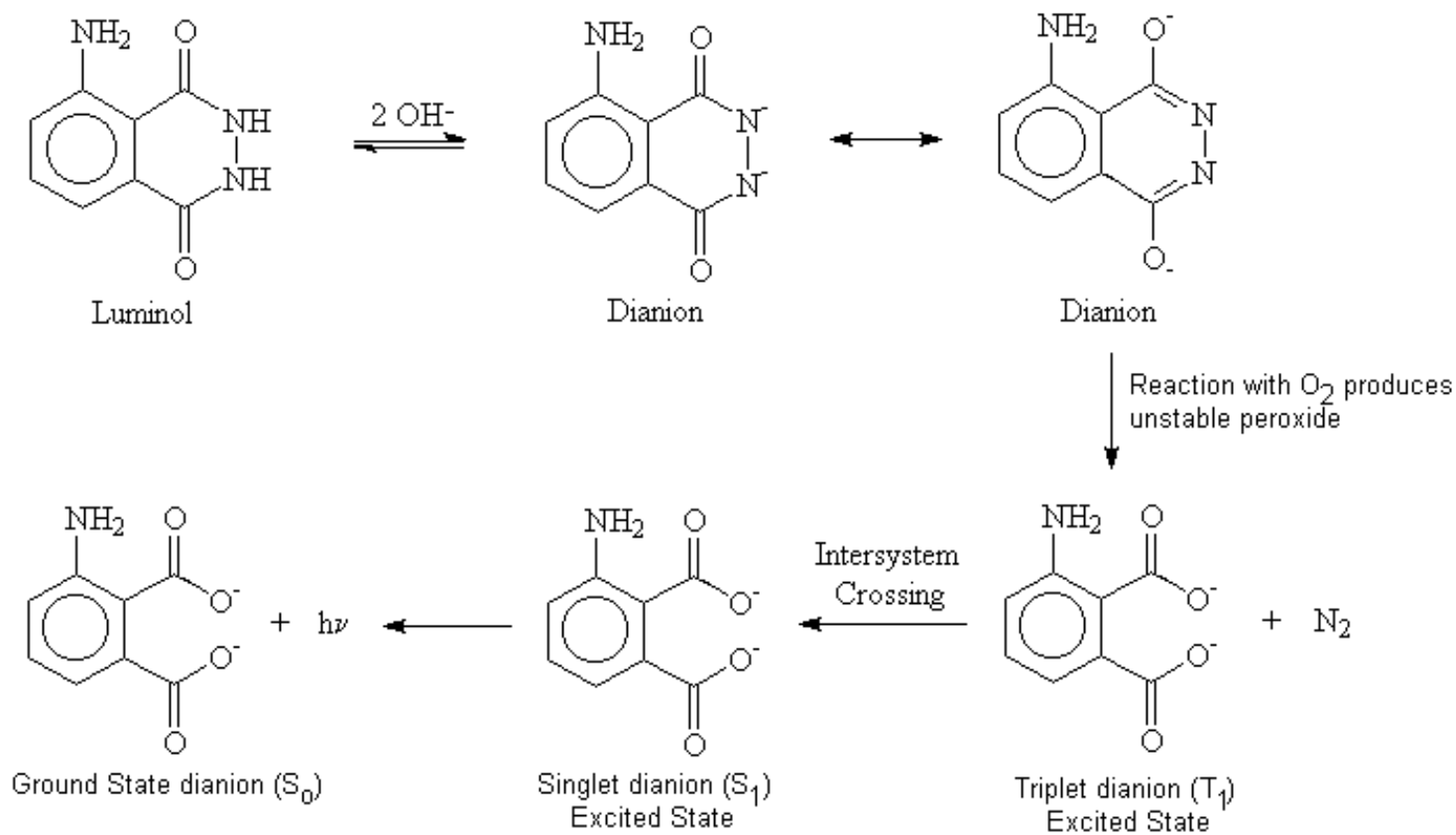


isothiokyanáty (FITC, RBITC)



Chemiluminescence

Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



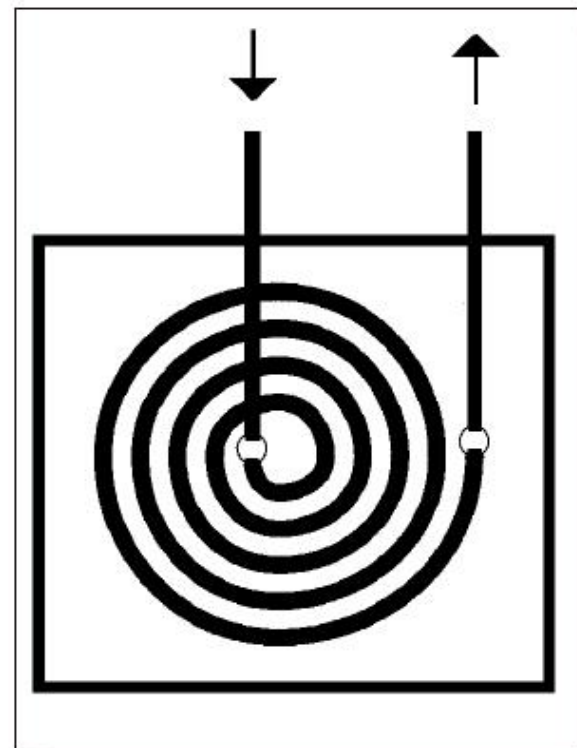
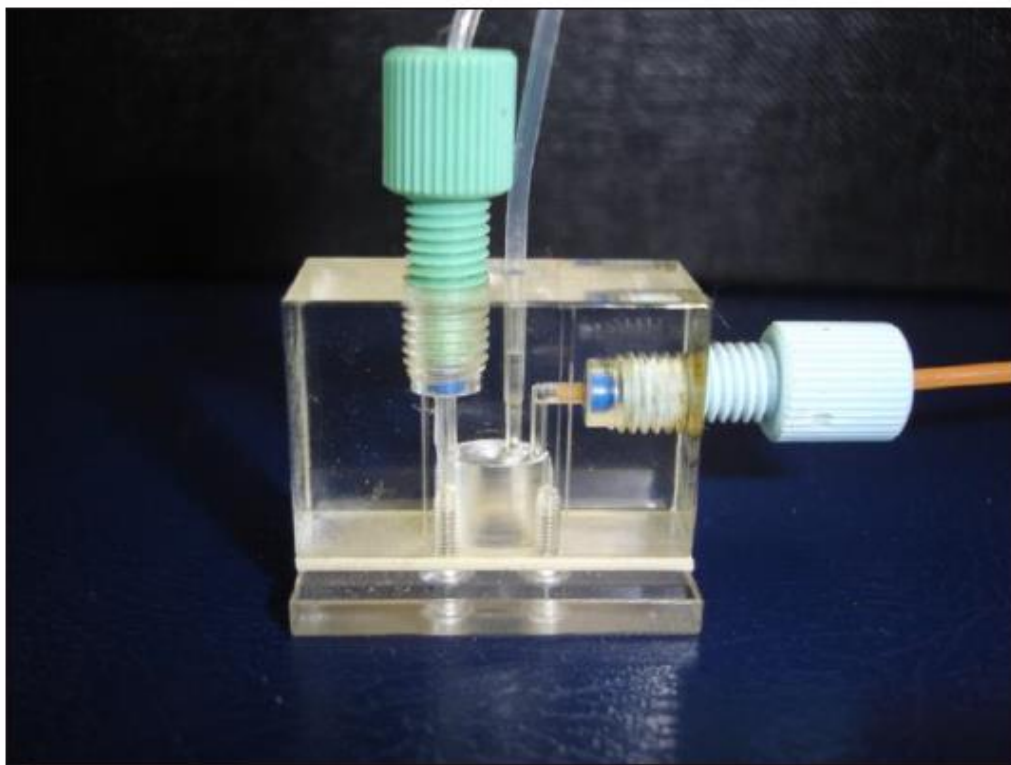
Chemiluminiscenční reakce

- 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>

Instrumentace pro chemiluminiscenční analýzu



Ref: H. Sklenářová, Škola molekulové spektrometrie (2013)

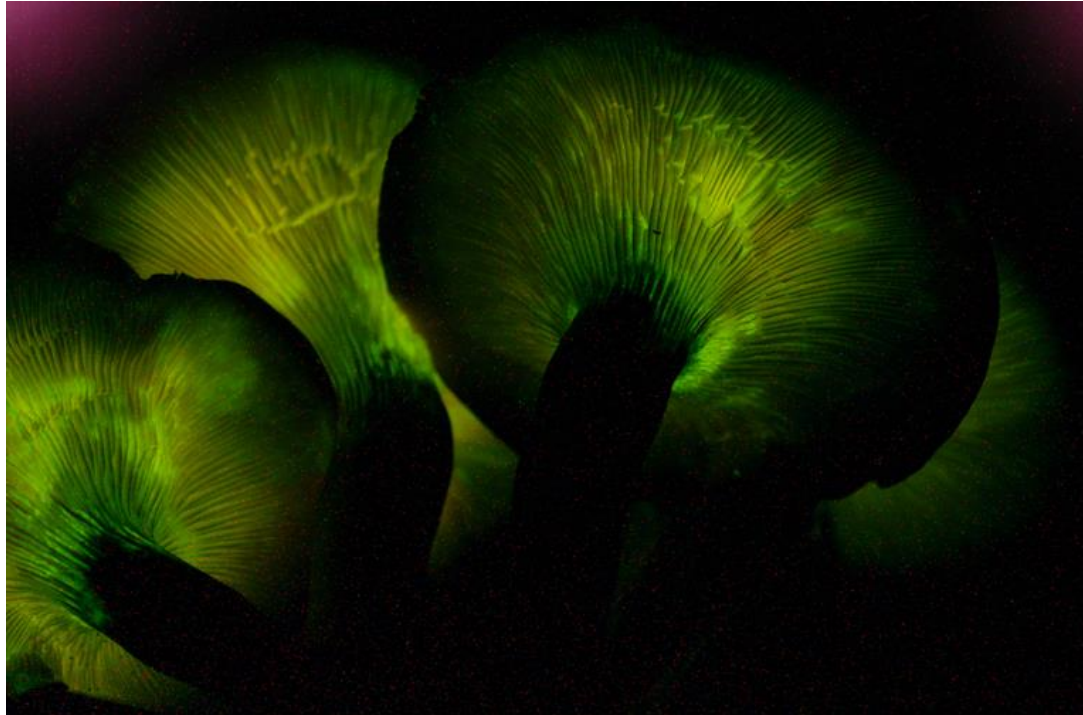
Bioluminescence



Bioluminiscence

- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo (suchozemští a mořští živočichové, houby)
- v roce 1887 profesor Raphael 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. Zatím nebyl objeven žádný sladkovodní živočich jevící bioluminiscenci...
- bioluminiscence živočichů je z evolučního hlediska vysvětlována různými důvody: hledání partnera (světlušky), lákání kořisti (např. ryba zubatka, některé druhy světlušek), maskování (žraloček brazilský), zastrašení nepřátel (ryba stříbrnáč, medusy z čeledi klanonožců)
- bioluminiscence hub (např. některé druhy václavek, „Jack-O-Lantern“, helmovky)

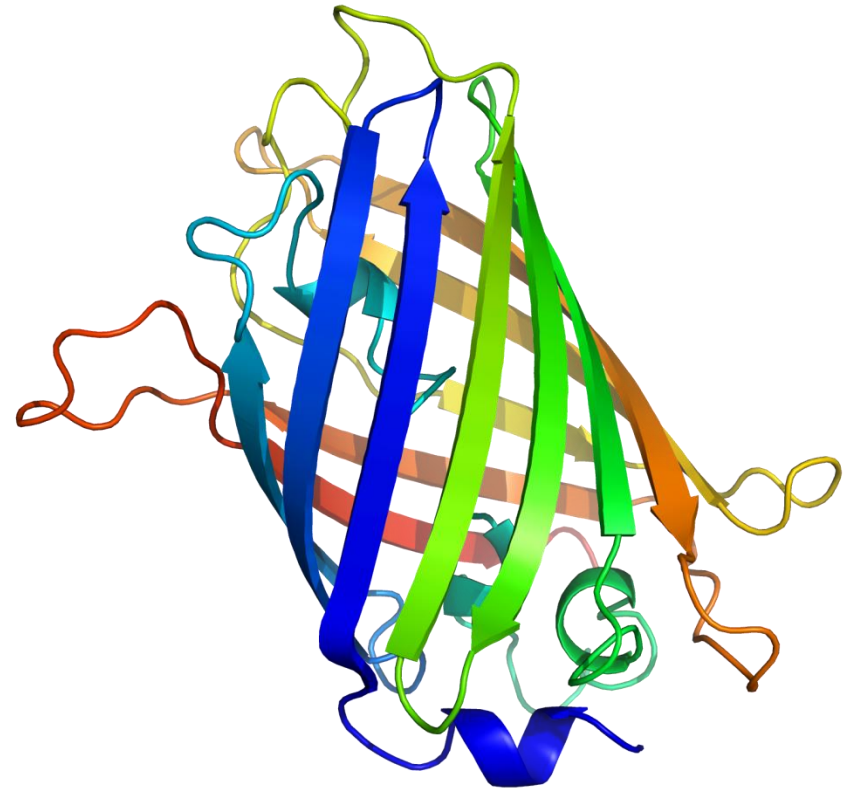
Bioluminiscenční houby



- známo je asi 70 druhů hub jevících bioluminiscenci
- některé rostou i v ČR (václavky a helmovky)
- nejčastěji dřevokazné houby
- někdy není jasné jaký má produkce světla pro houbu význam...

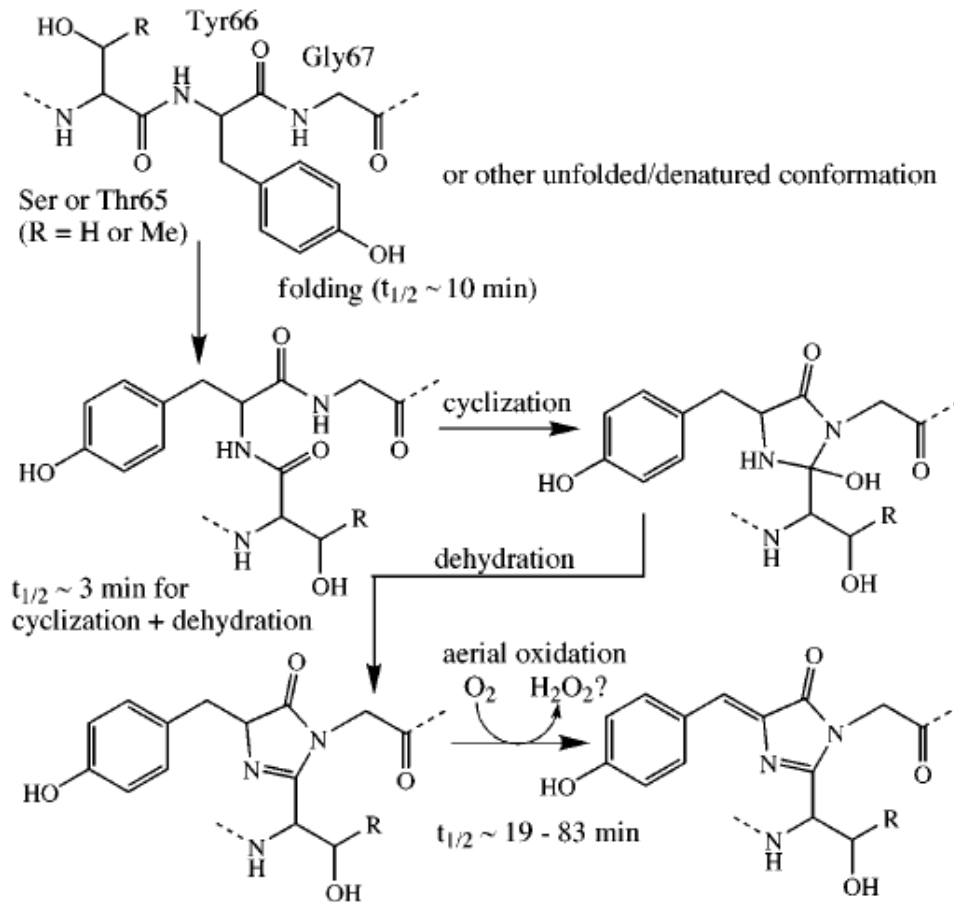
Struktura GFP

- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- V roce 2008 byla udělena Nobelova cena „za objev a výzkum zeleně fluoreskujícího proteinu“ (Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien)
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...
- Klíčová sekvence (Ser-Tyr-Gly) se nachází „uvnitř plechovky“
- Protein má celkem 238 aminokyselin (26,9 kDa)



Struktura GFP

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

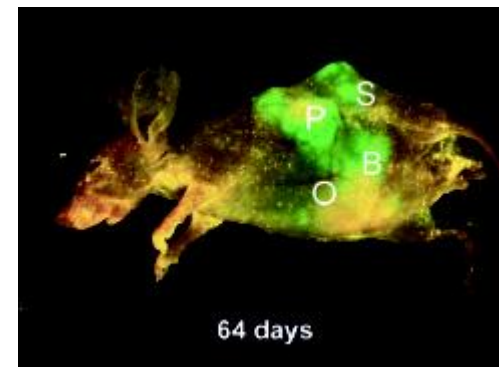
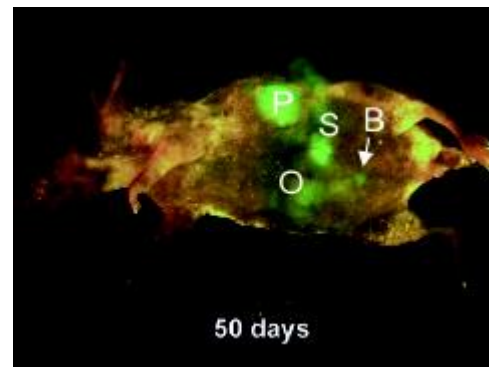
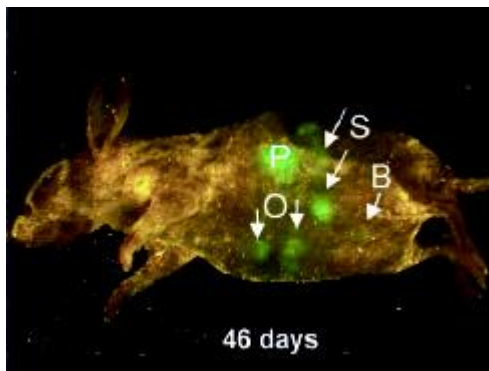




GFK – Green Fluorescent Králík

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





Triboluminescence

Triboluminescence

- při škrábání, drcení, nebo tření může dojít k přerušení asymetrických vazeb krystalu (cukr, diamant)
- náboj je po přerušení asymetrických vazeb nerovnoměrně rozložen
- při vyrovnání nábojů v krystalu dochází k luminiscenci

FRET

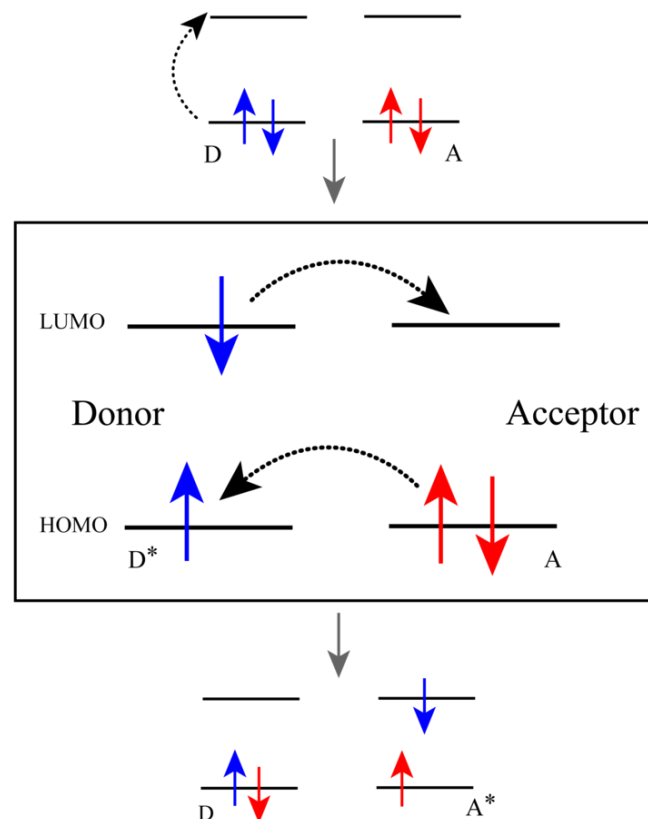
- **FRET je Fluorescence Resonance Energy Transfer** – Fluorescenční rezonanční energetický transfér
- podle objevitele Förster nazýván také **Förster Resonance Energy Transfer**
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

Dexter electron transfer

- theoretically proposed by D. L. Dexter in 1951
- NOT that DEXTER from TV series!
- so called **Dexter energy transfer**
- is a (fluorescence) quenching mechanism in which an excited electron is transferred from one molecule (a donor **D**) to a second molecule (an acceptor **A**) via non radiative way
- wavefunction overlap between acceptor and donor is required
- only short distances (typically within 10 Å)

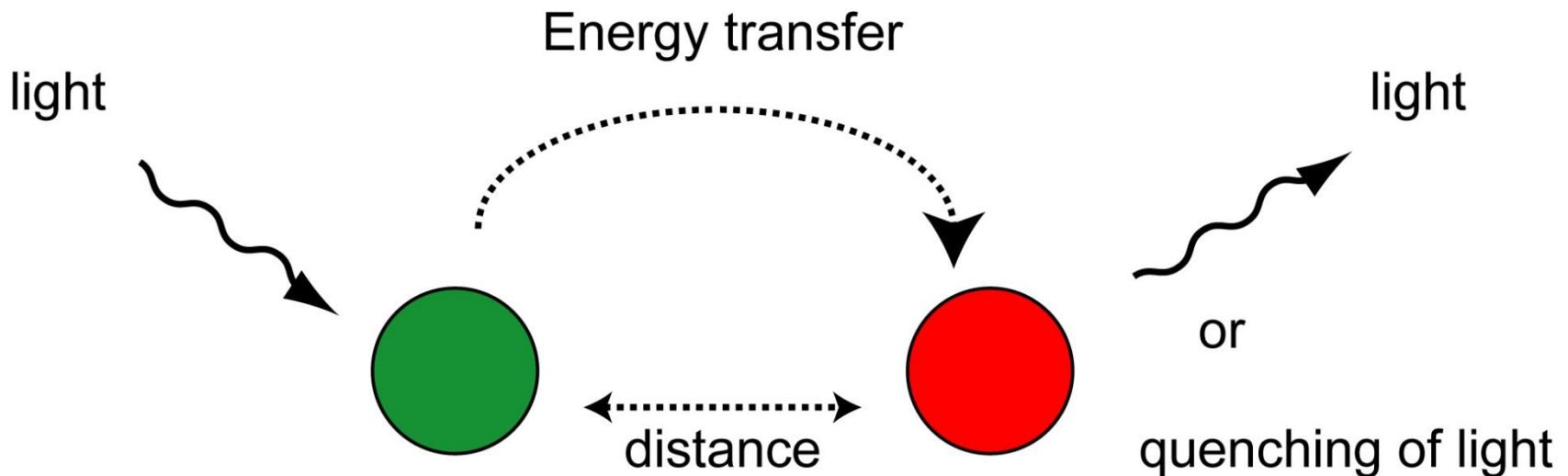
$$k_{ET} \propto J \exp \left[\frac{-2r}{L} \right] \quad J = \int f_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

- Rate of ET is proportional to J spectral overlap
- r is the separation of D from A
- L is sum of Van der Waals radii of the D and the A



Förster resonance energy transfer

- so called fluorescence resonance energy transfer (**FRET**)
- **Theodor Förster** was german physical chemist

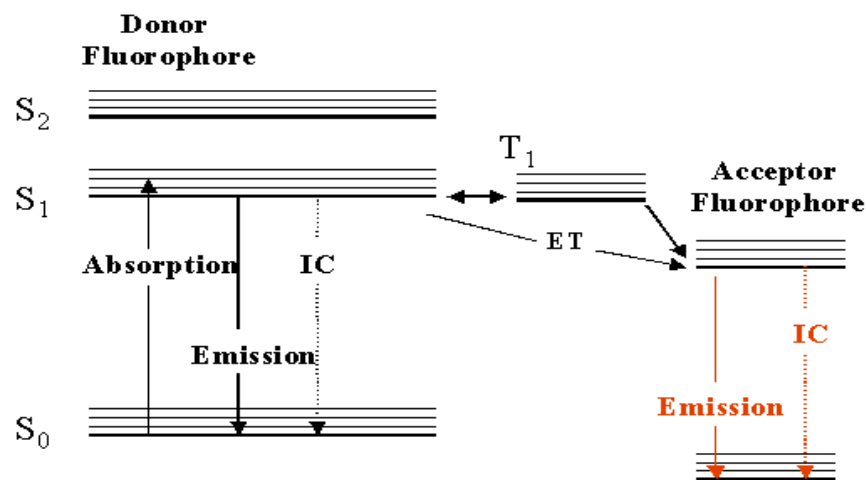
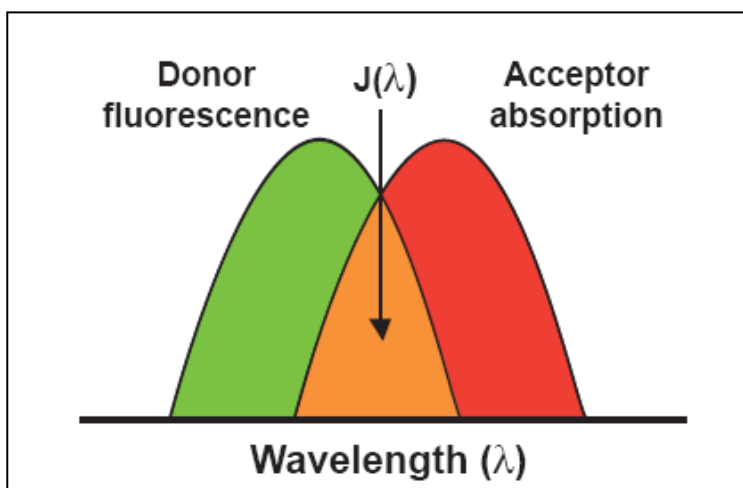


- **ET** between two chromophores (donor **D** and acceptor **A**) with appropriate spectral properties
- **D** may transfer energy to an **A** through nonradiative dipole-dipole coupling
- efficiency of this **ET** is inversely proportional to the sixth power of the distance between donor and acceptor
- The method (FRET) is often used in analytical chemistry and biochemistry

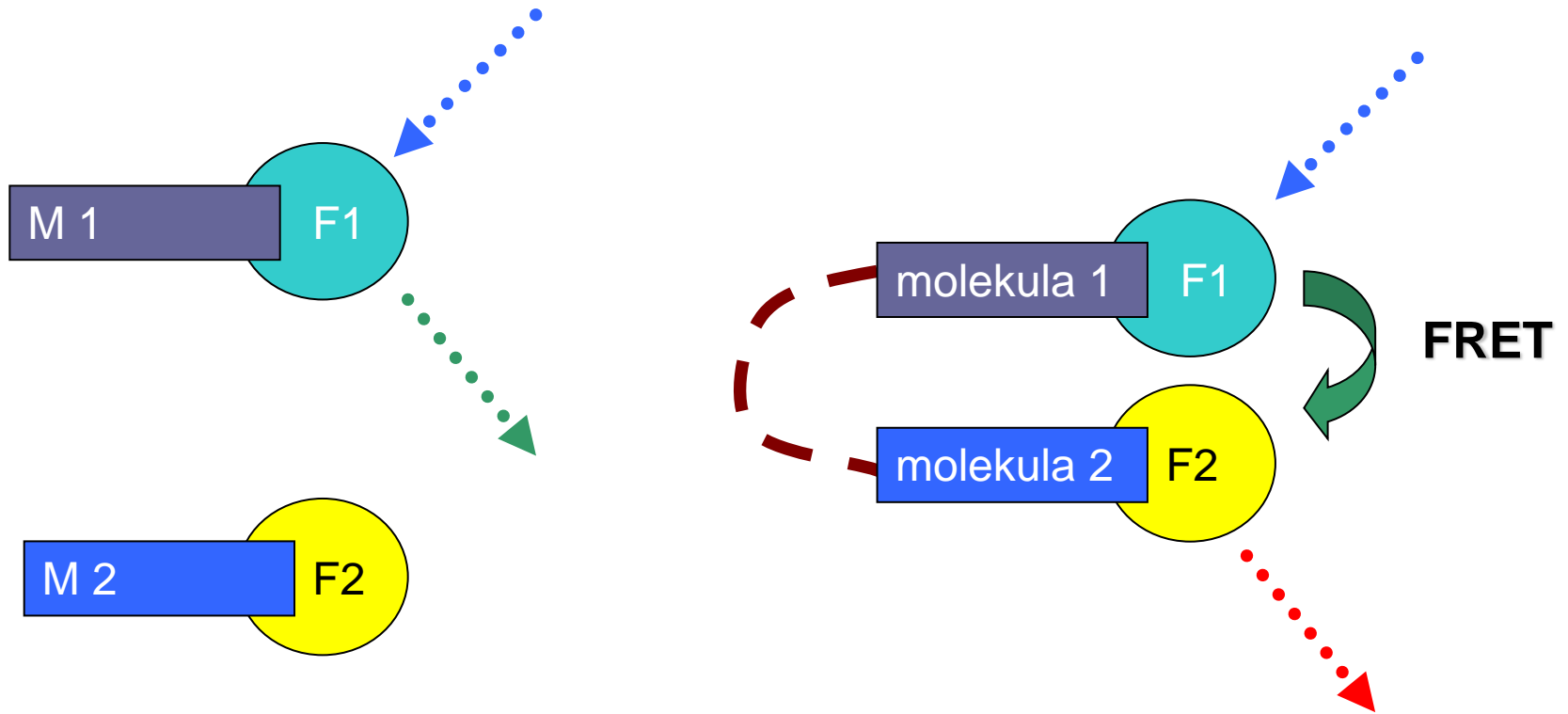
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla

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

