

FRET

Förster resonance energy transfer

Fluorescence Resonance Energy Transfer

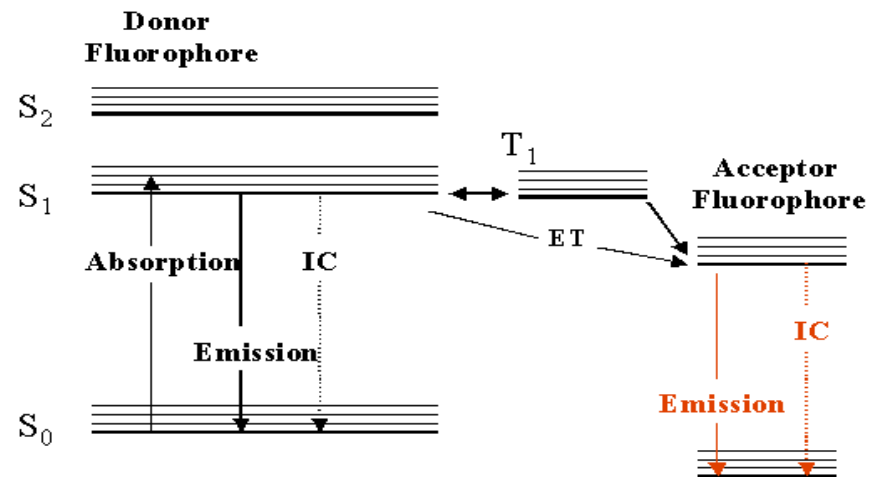
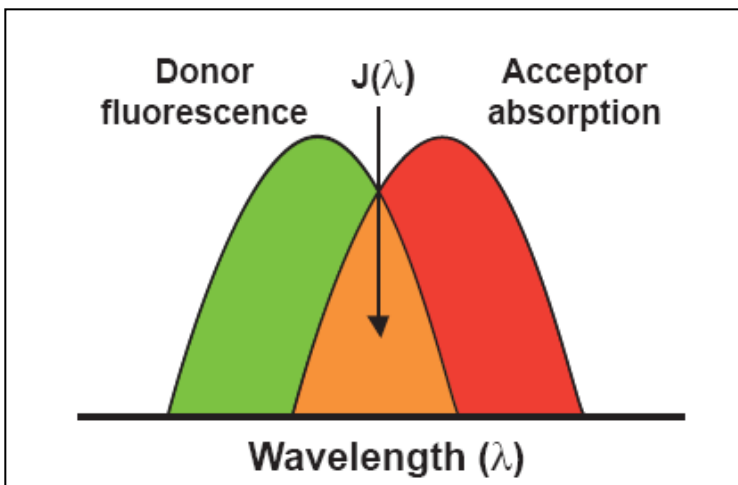
FRET

- **FRET je Förster Resonance Energy Transfer**
- **Transfer** – Försterův rezonanční energetický transfér (Theodor Förster, 1910-1974)
- Někdy nazýván také **Fluorescence Resonance Energy Transfer** (hlavně v chemické analýze a biologii, kde je sledována výsledná luminiscence)
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

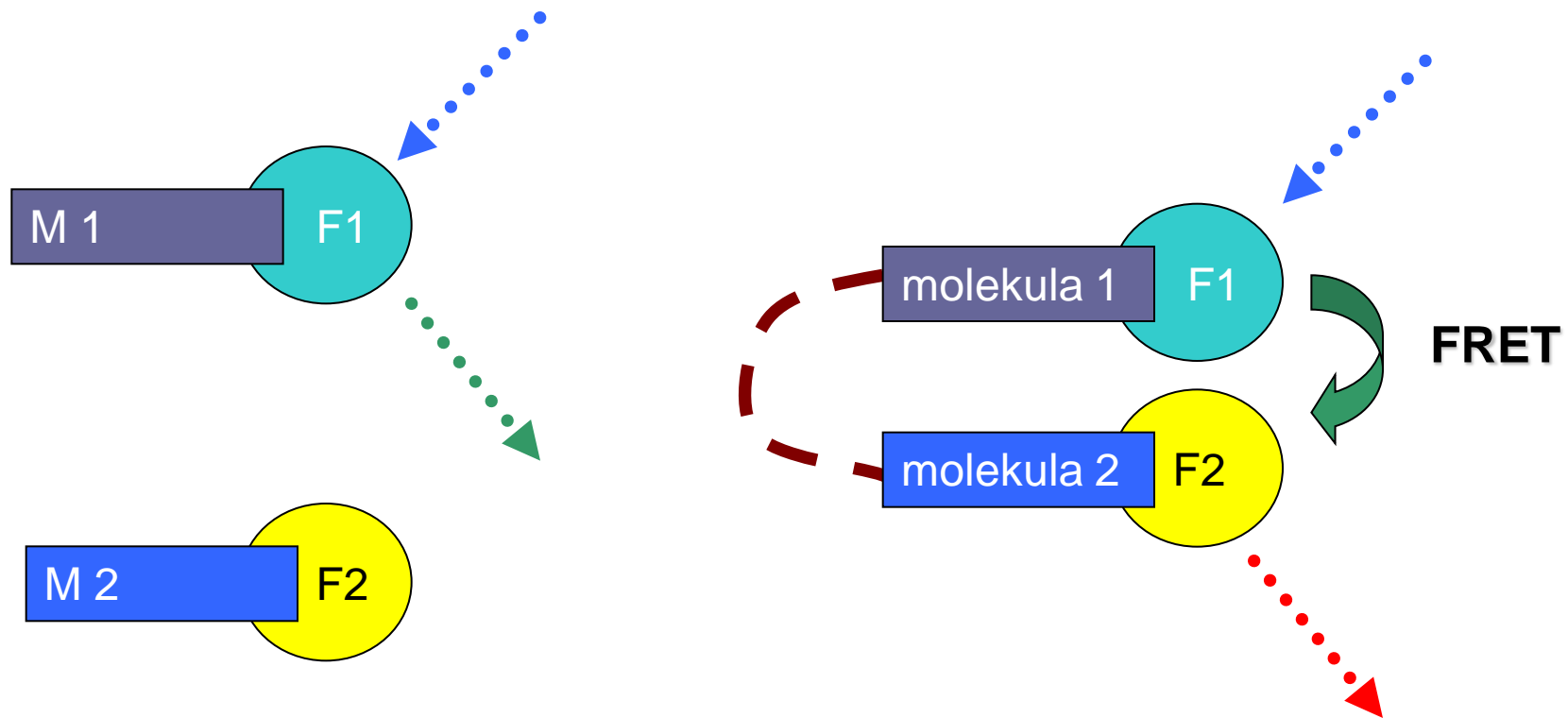
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla

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



Využití FRET: schéma



Základní vztahy

- účinnost FRET E je definována:

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

- kde τ'_D a τ_D jsou fluorescenční časy vyhasínání v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

$$E = 1 - F'_D / F_D$$

- F'_D a F jsou intensity fluorescence v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

Základní vztahy

- účinnost (E) závisí na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (r)

$$E = \frac{1}{(1 + (r/R_0)^6)}$$

- R_0 je Försterova vzdálenost při které je účinnost přenosu 50%

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

- R_0 závisí na integrálu překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru (J)
- κ^2 je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je většinou 2/3
- n je refrakční index, Q_0 je kvantový výtěžek samotného donoru

FRET

Donor	Acceptor	R_0 (Å)	Ref
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	49-56	13
IAEDANS [†]	FITC	49	13
IAEDANS [†]	5-(Iodoacetamido)fluorescein	49	13
Fluorescein	Fluorescein	44	13
EDANS	DABCYL	33	In House
Tryptophan	IAEDANS [†]	22	7
Tryptophan	Dansyl	21-24	7
Tryptophan	Pyrene	28	7
Dansyl	Fluorescein	33-41	14
Naphthalene	Dansyl	22	13
Pyrene	Coumarin	39	13
B-Phycoerythrin	Cy5	79	13

FRET

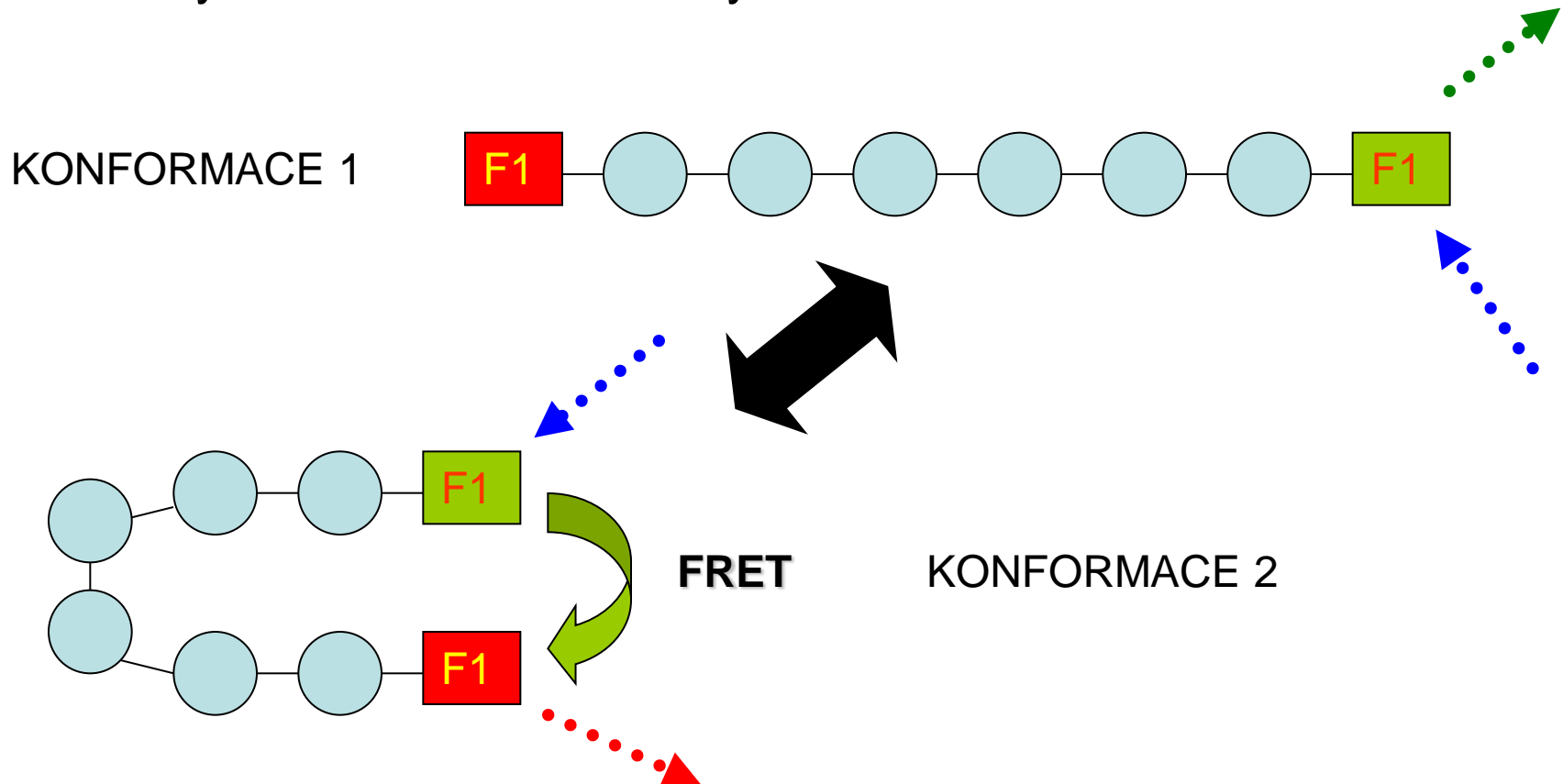
Quencher (Acceptor)	λ_{max} (in nm)	Amine-Reactive	Thiol-Reactive	Carboxy-Reactive (NH ₂ -Containing)	Recommended FRET Donor
DNP	348	DNP-X, acid; DNP-X, SE	DNP C2 maleimide	DNP C2 amine	Abz, Abz(N-Me), MCA, Trp
DABCYL	485	DABCYL; DABCYL, SE	DABCYL C2 maleimide	DABCYL C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
DABCYL Plus™	486	DABCYL Plus™ acid; DABCYL Plus™, SE	DABCYL Plus™ C2 maleimide	DABCYL Plus™ C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
QXL™ 490	488	QXL™ 490, acid; QXL™ 490, SE	QXL™ 490 C2 maleimide	QXL™ 490 C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
QXL™ 520	508, 530	QXL™ 520, acid; QXL™ 520, SE	QXL™ 520 C2 maleimide	QXL™ 520 C2 amine	FAM, FITC, Rh6G HiLyte Fluor™ 488
QXL™ 570	538, 577	QXL™ 570, acid; QXL™ 570, SE	QXL™ 570 C2 maleimide	QXL™ 570 C2 amine	Cy3, TAMRA, ROX, HiLyte Fluor™ TMR
QXL™ 610	594, 628	QXL™ 610, acid; QXL™ 610, SE	QXL™ 610 C2 maleimide	QXL™ 610 C2 amine	ROX, Texas Red®, HiLyte Fluor™ TR
QXL™ 670	665	QXL™ 670, acid; QXL™ 670, SE	QXL™ 670 C2 maleimide	QXL™ 670 C2 amine	Cy5, HiLyte Fluor™ 647

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

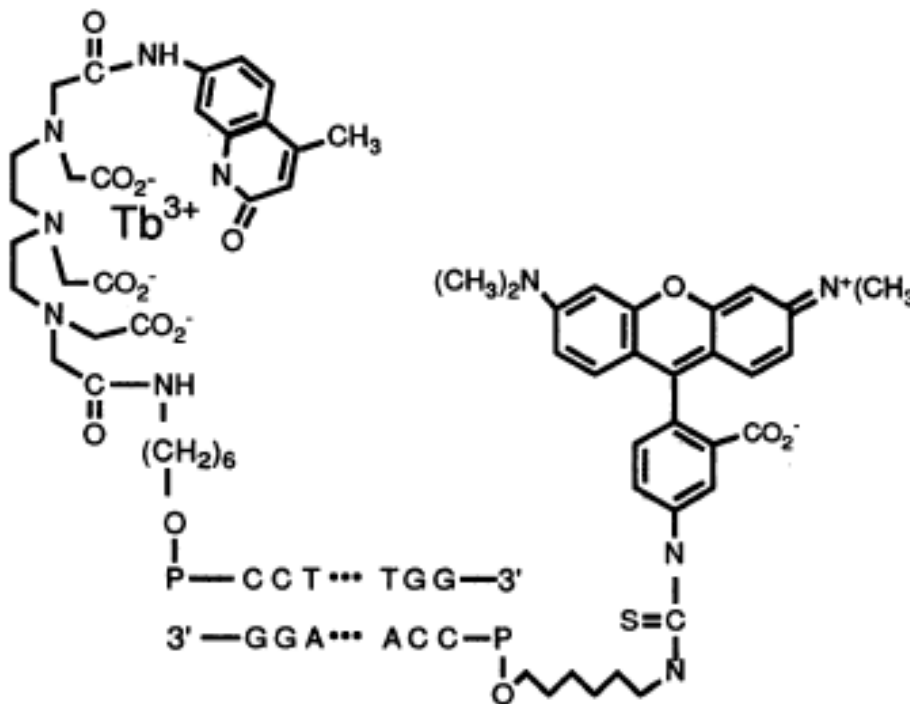
- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů



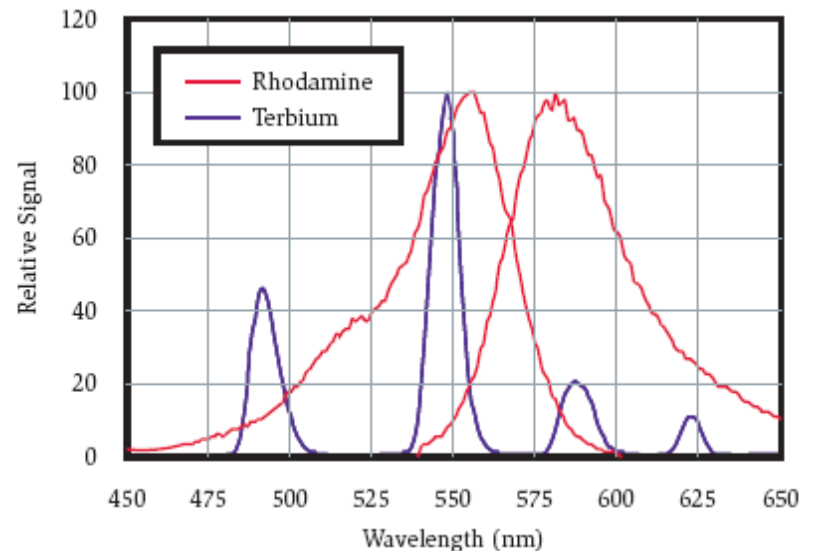
Sledování interakcí mezi vlákny DNA

DNA

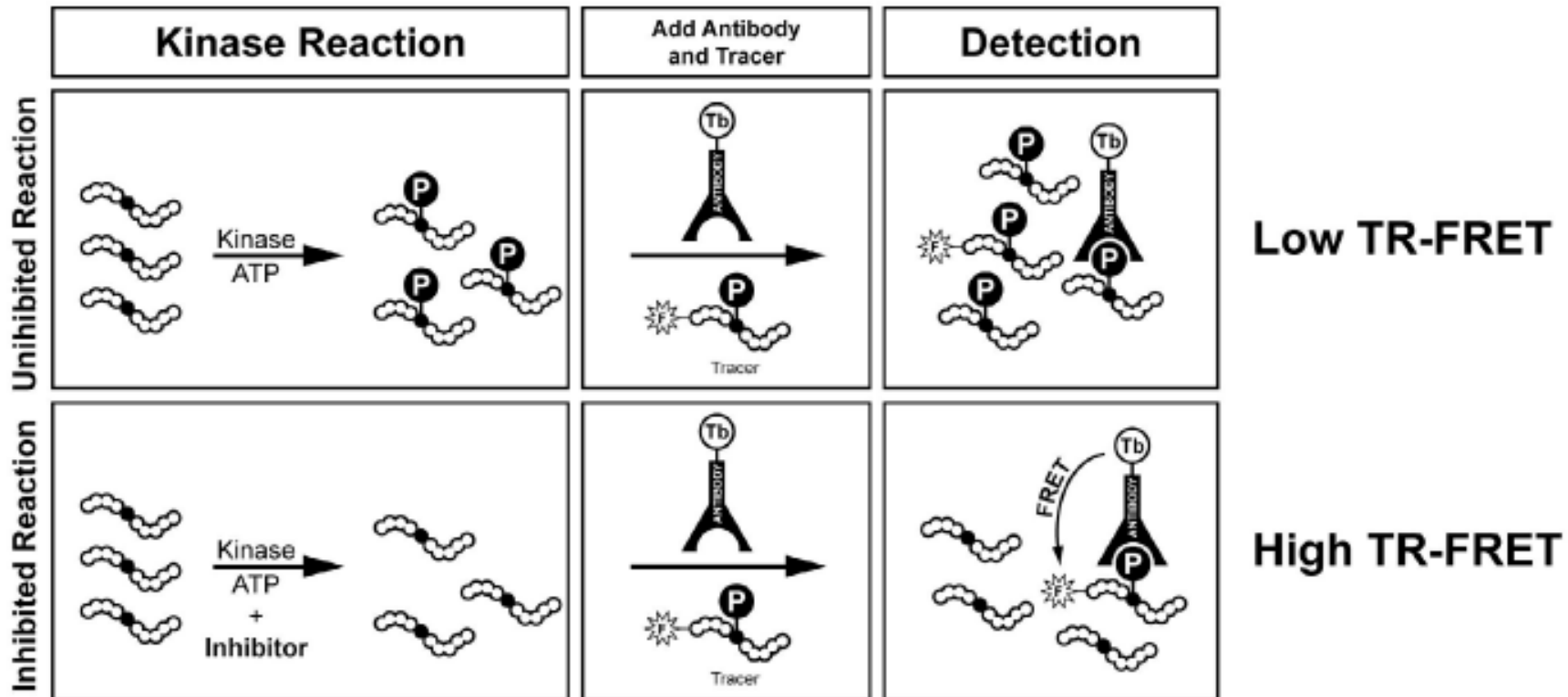
- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln³⁺



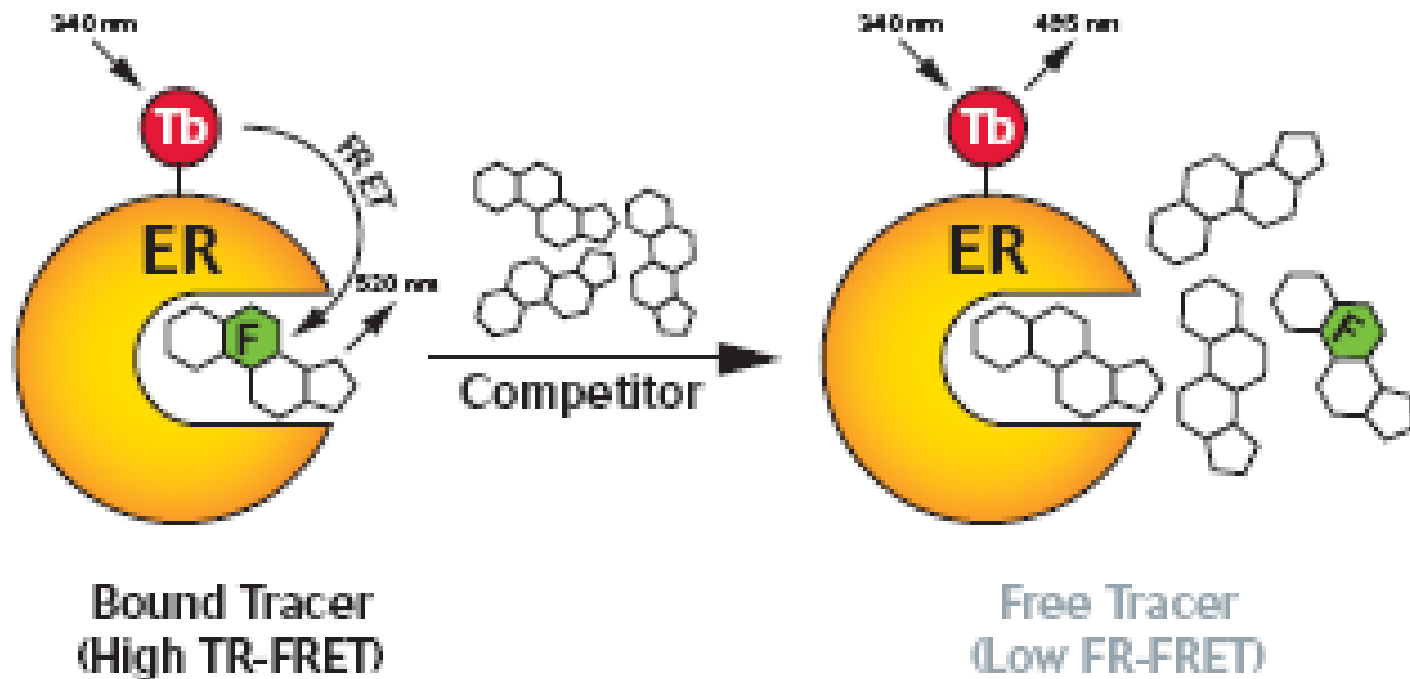
$$E = 1 - \tau'_D / \tau_D$$



Analytické aplikace FRET



Analytické aplikace FRET



BRET

- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- Využití metody FRET je při analýze někdy limitováno potřebou excitace „vnějším“ světelným zdrojem („photobleaching“, excitace jiného fluoroforu)
- v případě BRET je zdrojem světla bioluminiscenční reakce (nejčastěji se využívá luciferasa z *renilla reniformis*)
- sledování interakcí v živých organismech

Homo-FRET

- Studium interakce dvou prakticky totožných fluoroforů
- Po excitaci může dojít k přenosu energie, ale světlo emitované akceptorem bude mít stejnou vlnovou délku jako světlo vyzářené donorem
- Proto se sleduje zda dochází k polarizaci světla (využití fluorescenční anizotropie)
- Většinou se to týká studia biologických vzorků (např. proteinů)

Bimolecular fluorescence complementation

- Alternativou k FRET (nebo BRET) je BiFC
- Pro studium interakce proteinů nebo jiných biomolekul
- Dvě biomolekuly jsou označeny komponentami, které při interakci vytvoří fluoreskující komplex
- Fluoreskující komplex je vytvořen po cyklizační reakci
- Nejčastěji se využívá YFP



Chemiluminescence

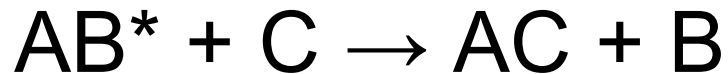
Chemiluminescence

- zdrojem excitace je chemická reakce
- Základní schéma možné reakce



- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton
- při reakci se dále uplatňují katalyzátory, kovy (a ionty kovů), vnější prostředí (zejména hydrofobicita)
- téměř vždy se jedná o **OXIDACI**

Excitovaný meziprodukt



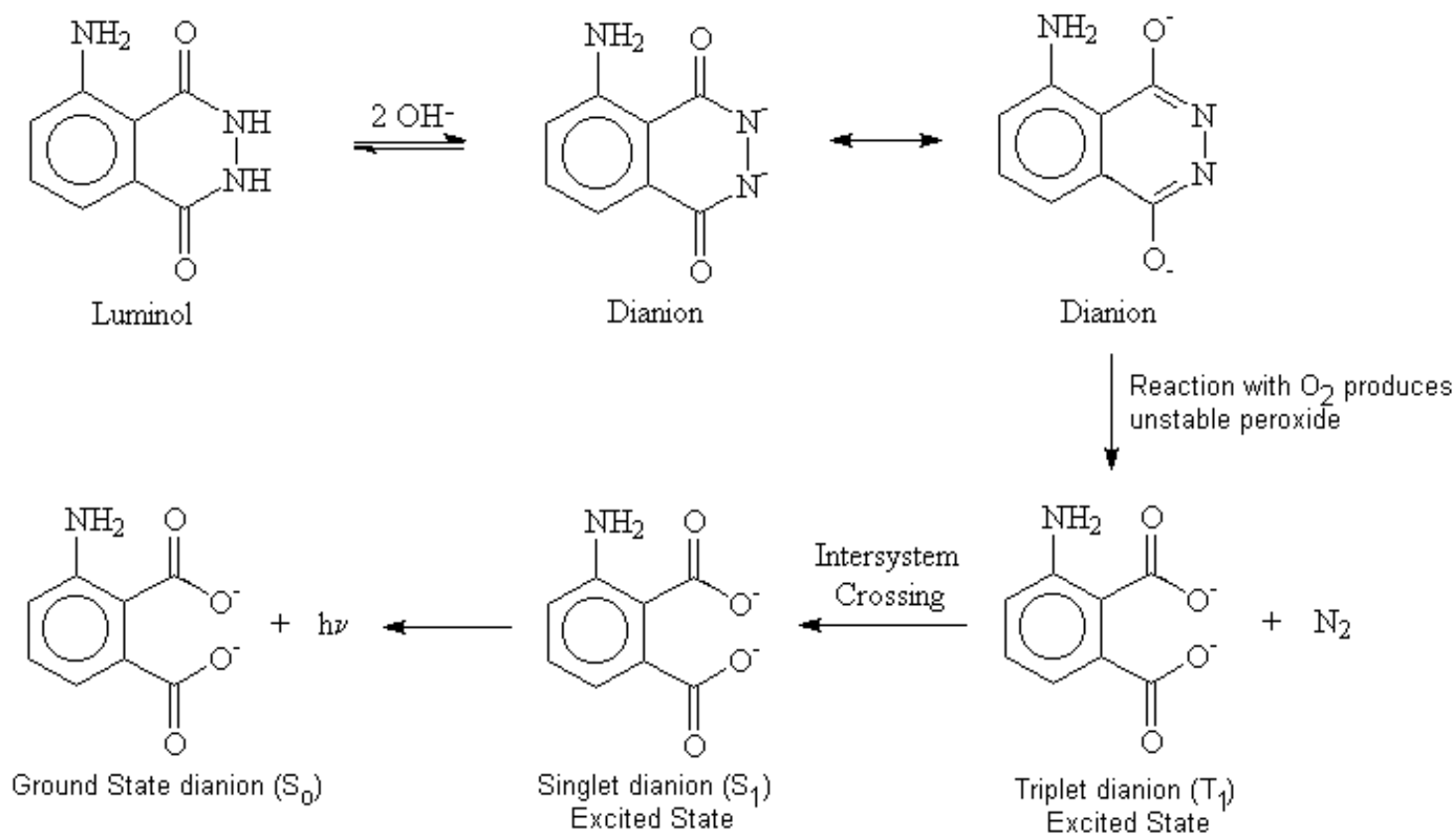
...a další možnosti de-excitace

Chemiluminiscenční reakce

- zpravidla oxidační, exotermická reakce s přebytkem energie, kterou je možné využít k excitaci molekuly (nejlépe bez „zbytečných“ energetických ztrát)
- emise fotonů musí být umožněna při návratu elektronů do základního energetického stavu
- intenzita chemiluminiscence je dána vztahem:

$$I_{CHL} = \Phi_{CL}(-dA/dt)$$

Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



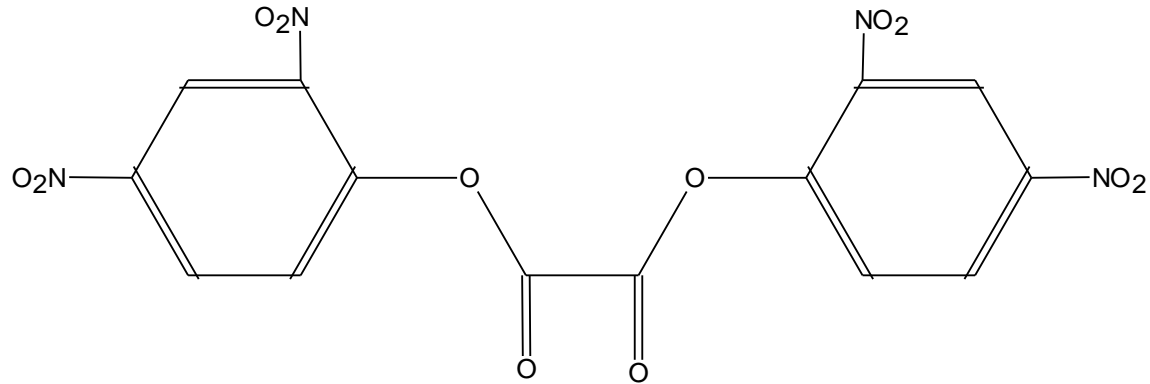
Chemiluminiscenční reakce

- 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

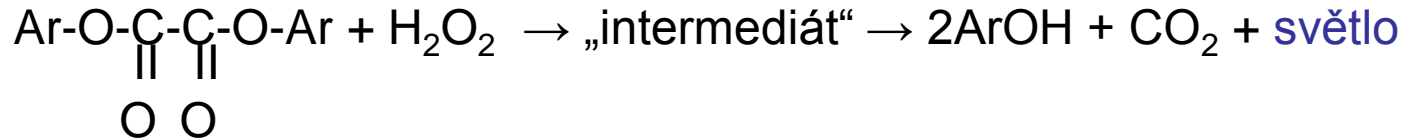


<http://people.howstuffworks.com/luminol.htm>

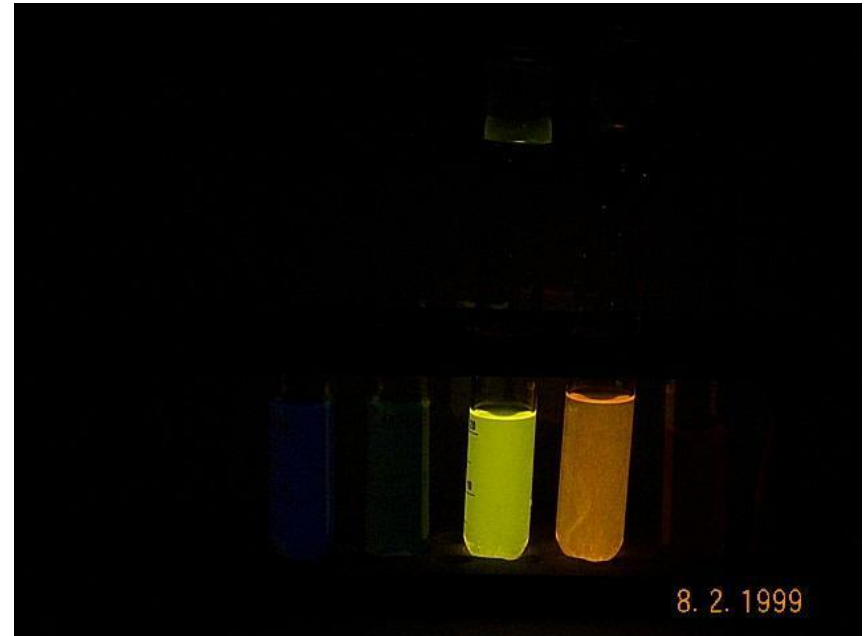
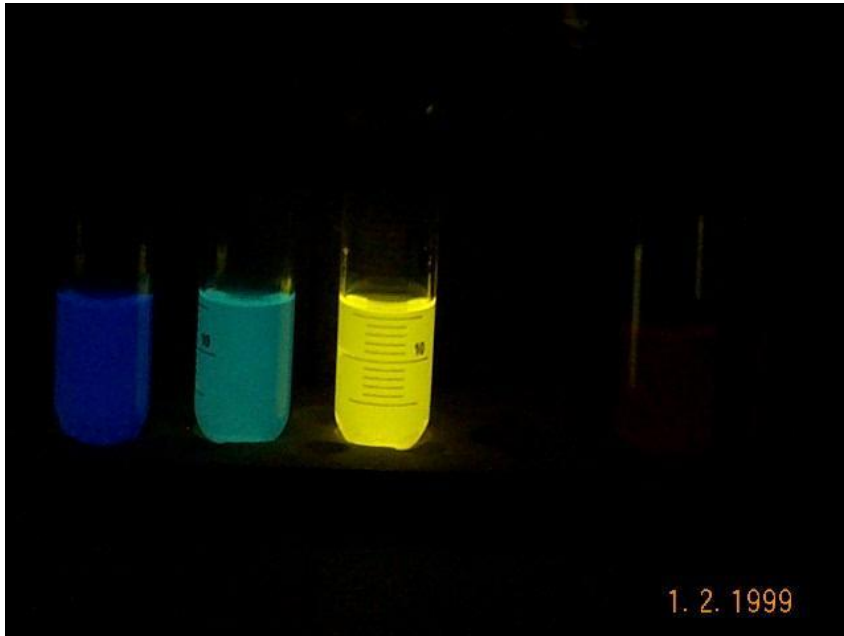
Barevná chemiluminiscenční světla



bis(2,4-dinitrophenyl)ethanedioate (DNPO)



Barevná chemiluminiscenční světla



Vhodné fluorofory: rhodamin B (červená barva), rhodamin 6G (oranžová), rubren (žlutá), 9,10 – bis fenylethynyl atracén (zelená), 9,10 – difenylatracén, další...

Chemiluminiscence v analytické chemii

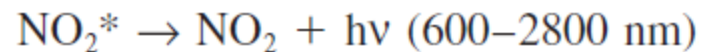
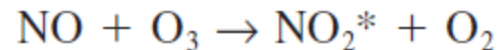
1. přímá analýza – chemiluminiscenční činidlo přímo reaguje s analytem
2. nepřímá analýza – reakce chemiluminiscenčního činidla je katalyzována/inhibována nebo jinak ovlivněna analytem

Přímá analýza

- analyt je oxidován pomocí oxidačního činidla: KMnO_4 , peroxid, O_2 , Ce^{4+} , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, tris (2,2'-bipyridin)ruthenium(III) komplex, jodistan N-bromosukcinimid
- analytem mohou být například fenoly, polyfenoly (quercetin, katechin, atd.), indoly – alkaloidy (brucin, strychnin, atd.), heterocykly (penicilin, atd.)
- Lze využít zesilovačů: polyfosfáty
 - oxidační činidla v reakcích vedoucích k CL produktům KMnO_4 (MnO_2), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, Ce^{4+} , H_2O_2 , O_2 tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(III) komplex, jodistan N-bromosukcinimid
 - nejběžnější oxidace KMnO_4 v kyselém prostředí - nejčastěji H_2SO_4 využití zesilovačů CL
 - polyfosfáty (stabilizace meziproductů)
 - kyselina mravenčí
 - formaldehyd, glutaraldehydanalyty - fenoly, polyfenoly (quercetin, katechin, diethylstilbestrol), indoly (alkaloidy - psilocin, brucin, strychnin, reserpin), heterocykly (peniciliny, cefalosporiny, fenothiaziny)

Oxidace v plynné fázi

- Jedna z nejstarších známých chemiluminiscenčních reakcí – „hoření“ bílého fosforu
- Elementární bílý fosfor se na vlhkém vzduchu oxiduje a dochází k emisi zeleného světla
- Podobnou reakcí je oxidace oxidu dusnatého ozónem
- Využívá se pro stanovení NO ve vzduchu
- Lze stanovovat i NO₂ (redukce na NO a následná oxidace)
- LOD mohou být až 1ppb NO

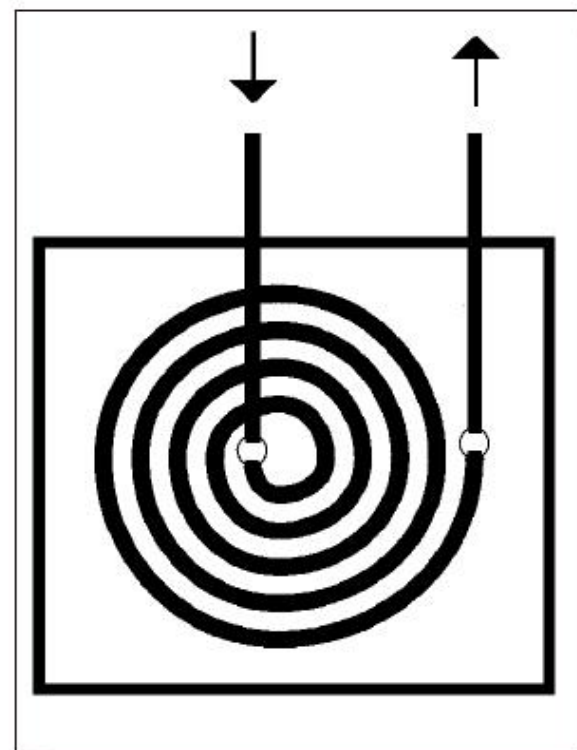
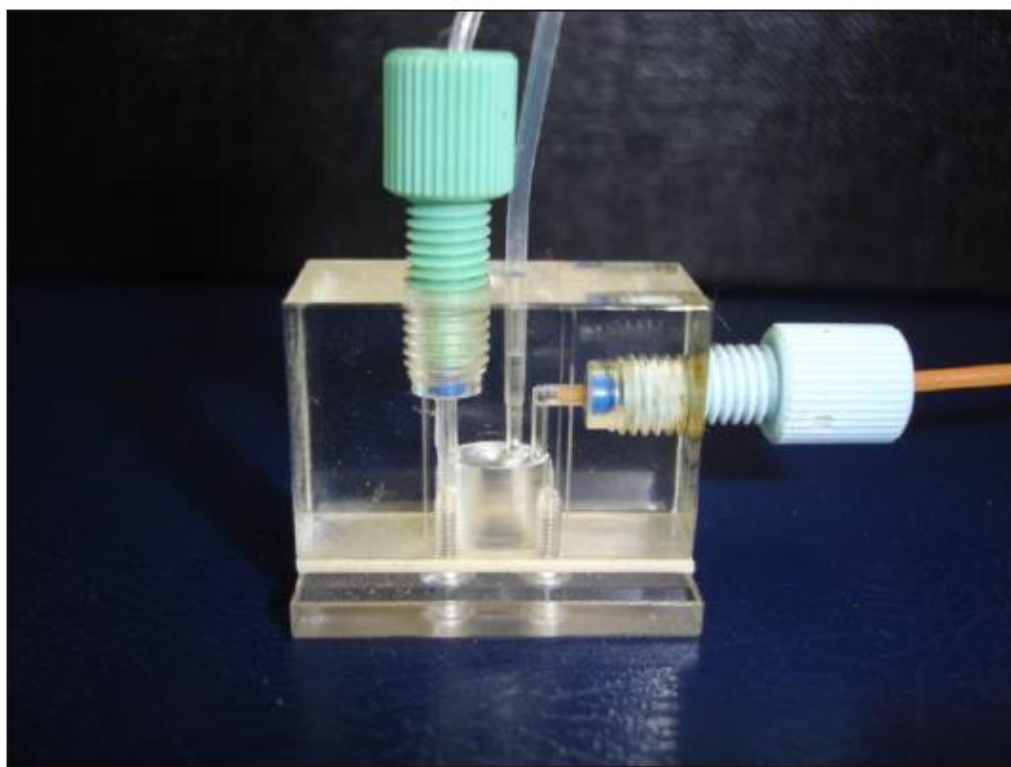


Chemiluminiscenční analýza – příklady stanovení

Analýza plynů: NO, ozón, po převedení i další
dusíkaté sloučeniny, síra a její sloučeniny



Instrumentace pro chemiluminiscenční analýzu



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



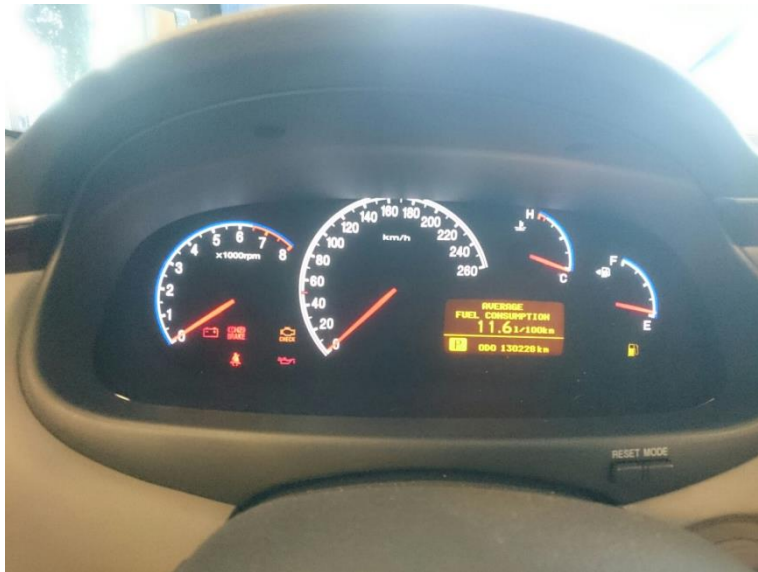
Elektroluminiscence

Elektroluminiscence

- materiál emituje světlo působením procházejícího proudu, nebo působením elektrického pole
- většinou se jedná o tzv. radiační rekombinaci (zánik páru díra-volný elektron)
- příklady elektroluminiscenčních materiálů: ZnS dopovaný Ag, nebo Cu

Electroluminescence

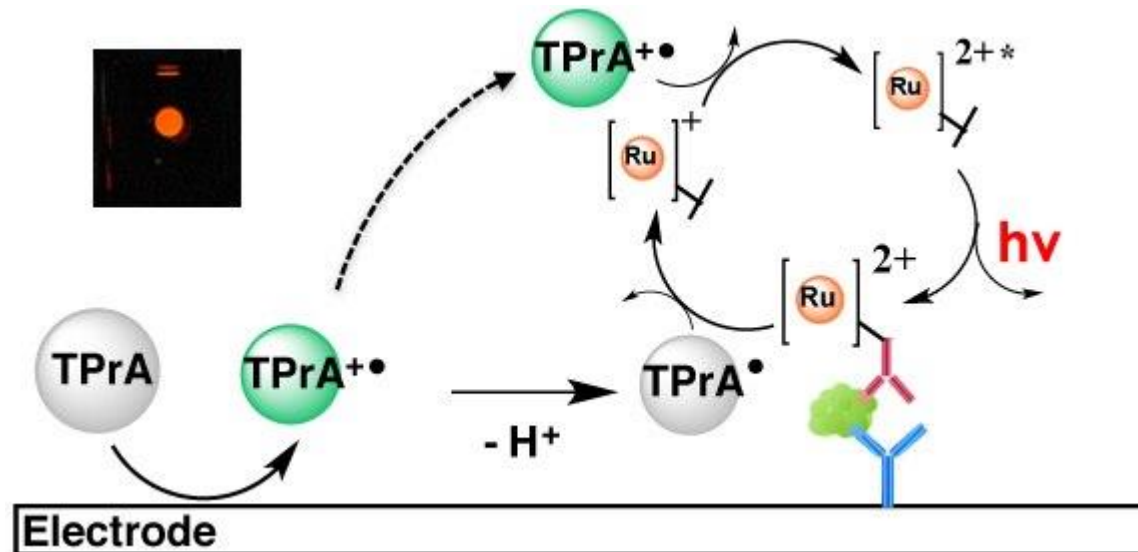
Electroluminescence je výsledkem radiační rekombinace elektronů a děr v materiálu, obvykle v polovodiči. Vzbuzené elektrony uvolňují svou energii jako fotony – světlo. Před rekombinací mohou být elektrony a díry odděleny buď dopováním materiálu za vzniku p-n přechodu (v polovodičových elektroluminiscenčních zařízeních, jako jsou světelné diody), nebo excitací nárazem vysokoenergetických elektronů urychlených silným elektrickým polem (např. s fosfory na elektroluminiscenčních displejích).



Electrogenerated chemiluminescence (ECL)

- je druh luminiscence vznikající během elektrochemických reakcí v roztocích. Při elektrogenerované chemiluminiscenci podléhají elektrochemicky generované meziprodukty vysoce exergonické reakci za vzniku elektronicky excitovaného stavu, který poté při relaxaci emituje světlo do stavu nižší úrovně.
- Tato vlnová délka emitovaného fotonu světla odpovídá energetické mezeře mezi těmito dvěma stavy. Excitace ECL může být způsobena přenosem energetických elektronů (redox) reakcemi elektrogenerovaných látek. Takové luminiscenční buzení je formou chemiluminiscence, kdy se jedna nebo všechny reaktanty vytvářejí elektrochemicky na elektrodách.
- ECL je obvykle pozorován při aplikaci potenciálu (několik voltů) na elektrody elektrochemického článku, který obsahuje roztok luminiscenčních látek (polycyklické aromatické uhlovodíky, kovové komplexy, kvantové tečky nebo nanočástice) v aprotickém organickém rozpouštědle (složení ECL). V organických rozpouštědlech mohou být jak oxidované, tak redukované formy luminiscenčních látek produkovány na různých elektrodách současně nebo na jedné elektrodě tím, že se jejich potenciál rozkládá mezi oxidací a redukcí. Excitační energie se získává rekombinací oxidovaných a redukovaných látek. Ve vodném médiu, které se většinou používá pro analytické aplikace, je obtížné dosáhnout současné oxidace a redukce luminiscenčních látek kvůli elektrochemickému štěpení vody samotné, takže se používá ECL reakce s ko-reaktanty. V pozdějším případě jsou luminiscenční částice oxidovány na elektrodě spolu s ko-reaktantem, který po některých chemických přeměnách poskytuje silné redukční činidlo (mechanismus oxidativní redukce).

- ECL se ukázala jako velmi užitečná v analytických aplikacích jako vysoce citlivá a selektivní metoda. Kombinuje analytické výhody chemiluminiscenční analýzy (absence optického signálu pozadí) se snadnou kontrolou reakce aplikací elektrodového potenciálu.
- Jako analytická technika představuje vynikající výhody oproti jiným běžným analytickým metodám díky své všestrannosti, zjednodušenému optickému nastavení ve srovnání s fotoluminiscencí (PL) a dobré časové a prostorové kontrole ve srovnání s chemiluminiscencí (CL). Zvýšené selektivity ECL analýzy je dosaženo změnou potenciálu elektrody, čímž se řídí druhy, které jsou na elektrodě oxidovány/redukovány a účastní se ECL reakce (viz. elektrochemická analýza). Obecně používají komplexy ruthenia, zejména $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ (který uvolňuje foton při $\sim 620 \text{ nm}$) regenerující se pomocí TPrA (Tripropylamin) v kapalně fázi nebo na rozhraní kapalina-pevná látka. Lze jej použít jako monovrstvu imobilizovanou na povrchu elektrody nebo jako ko-reaktant nebo běžněji jako značku a používá se v HPLC, označené Ru imunoanalýzy na bázi protilátek, sondy Ru Tagged DNA pro PCR atd., biosenzory založené na generování NADH nebo H_2O_2 , detekci oxalátů a organických aminů a mnoho dalších aplikací a lze je detekovat od pikomolární citlivosti až po dynamický rozsah o více než šesti řádech. Detekce fotonů se provádí pomocí fotonásobičů nebo křemíkové fotodiody nebo pozlacených optických senzorů. Význam detekce technik ECL pro biologické aplikace je dobře prokázán. ECL je hojně komerčně využíváno pro mnoho klinických laboratorních aplikací.



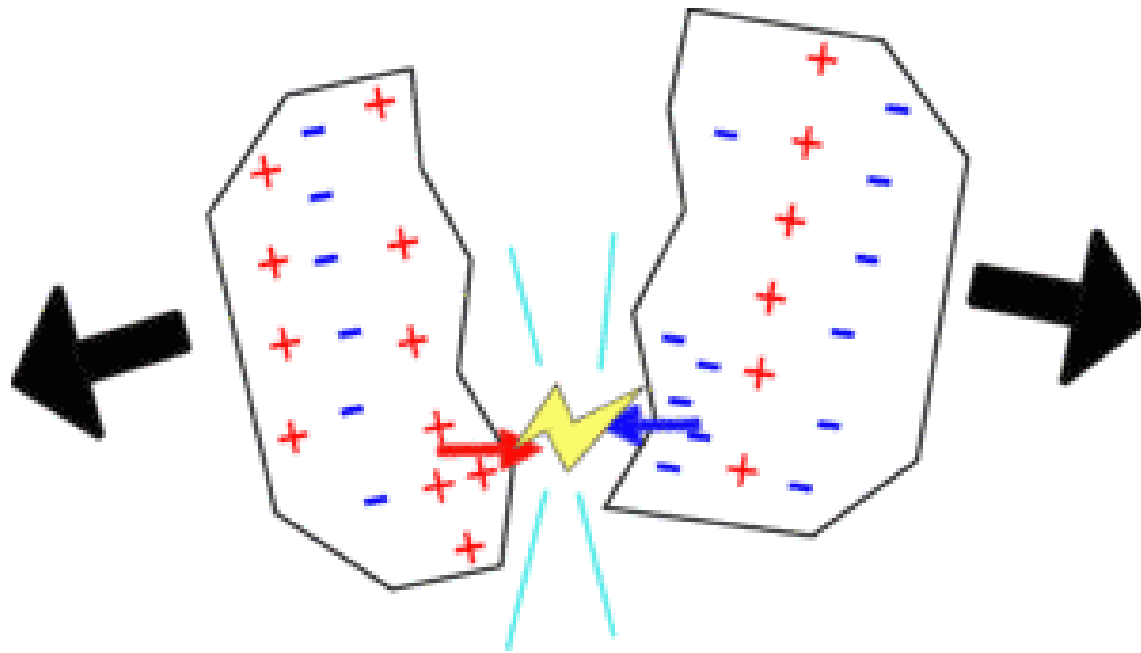


Triboluminescence

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

Triboluminescence

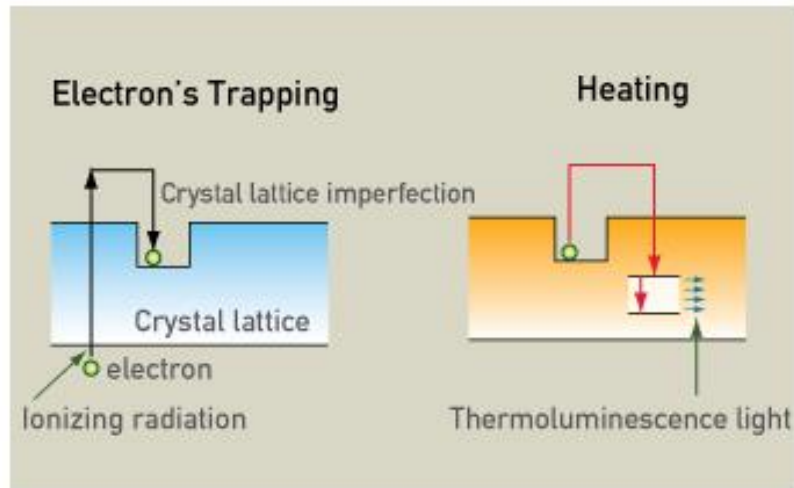


Thermoluminiscence

- přírodní krystalické materiály obsahují poruchy v krystalické mřížce (např. obsahují volné ionty, které narušují elektrické pole krystalu)
- jestliže se vytvoří tzv. potenciálová díra v elektrickém poli, může se v ní usadit volný elektron (elektronová past)
- tento volný elektron může být excitován (vesmírné záření, radioaktivita) a v elektronové pasti může být jeho energie zachována i stovky, nebo tisíce let
- termoluminiscenční datování: zahříváním, nebo po ozáření silným světlem získá elektron v tzv. dlouhodobé elektronové pasti dostatek energie, aby se uvolnil
- uvolněná energie se měří
- vhodné pro datování látek, které byly v minulosti ozářeny
- nutná složitá kalibrace

Thermoluminescence

TL-Thermoluminescence



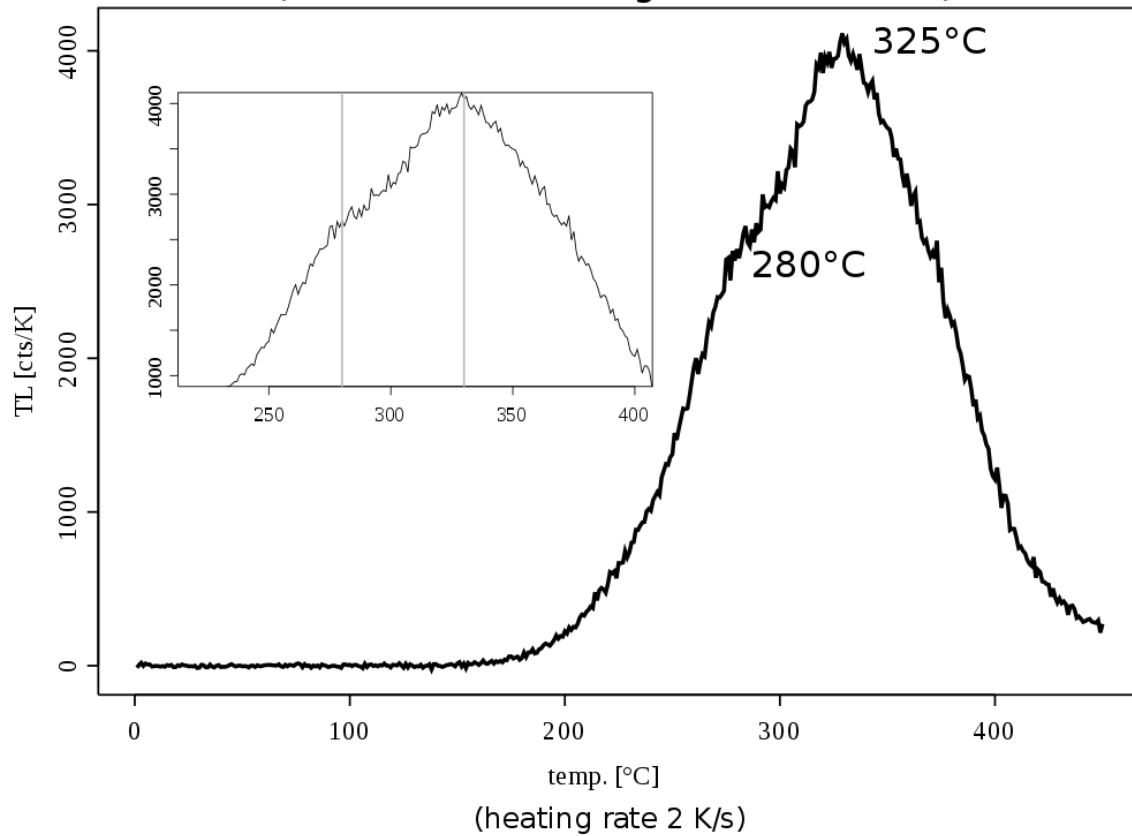
Thermoluminescence dating

Počet vyzářených fotonů je přímo úměrný době ozáření



Quartz UV NET NTL Curve

(detection wavelength: 290-370 nm)



https://www.youtube.com/watch?v=tW8q_JfmcBUhttps://www.youtube.com/watch?v=hPtCvReouCM

<https://www.youtube.com/watch?v=FDAFZuxMdyE>

<https://www.youtube.com/watch?v=rV4cwUkHXdY>

<https://www.youtube.com/watch?v=tltOOpyJP5k>

https://www.youtube.com/watch?v=IB_g2ddZZYk

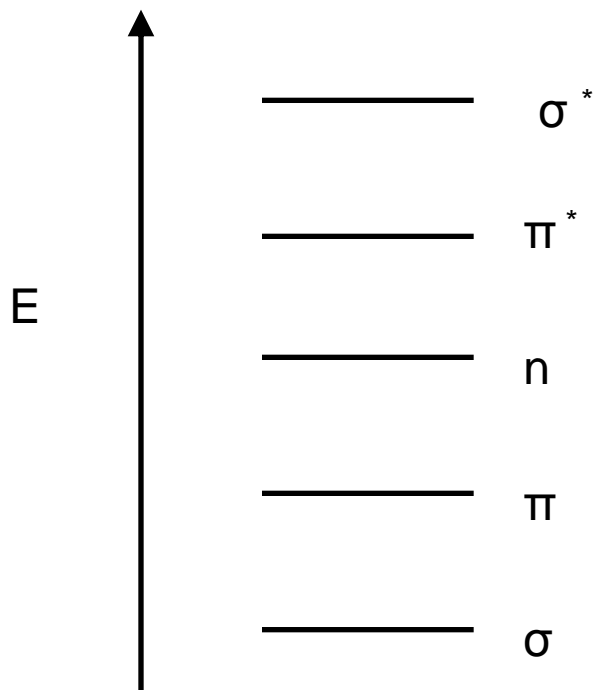
<https://www.youtube.com/watch?v=LQBjRF9mX1Y>

<https://www.youtube.com/watch?v=FGzRvYU0e3Q>

<https://www.youtube.com/watch?v=0BOjTMkyfIA>

Luminiscence a struktura látek

Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

Struktura organických molekul a luminescence – základní pravidla

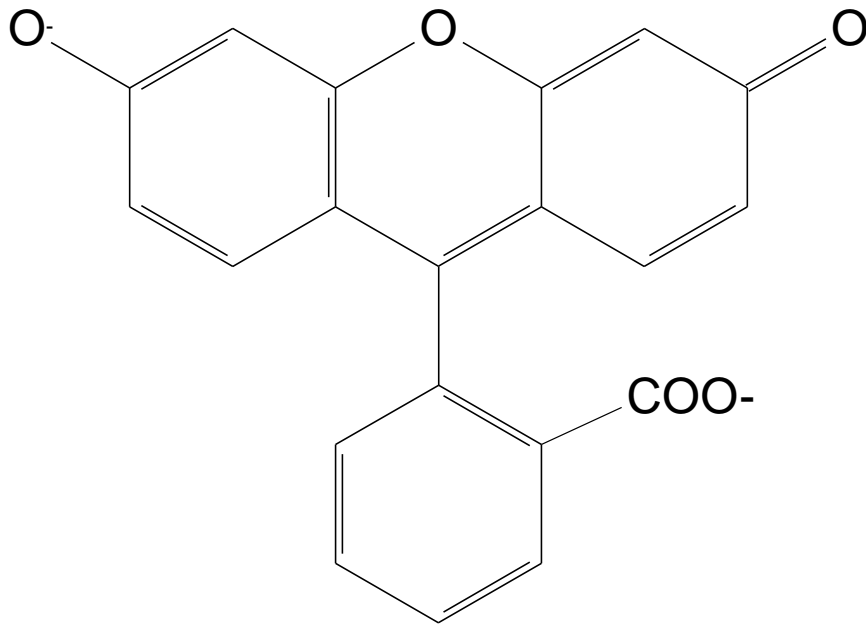
1. luminescenci většinou nepozorujeme u uhlovodíků bez dvojných vazeb ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ přechod)
2. luminescence je vzácná také u nearomatických uhlovodíků s dvojnými vazbami, někdy pozorujeme slabou fluorescenci molekul obsahujících karbonylovou skupinu v UV oblasti (přechod $n \rightarrow \pi^*$), nebo u vysoce konjugovaných (ale nearomatických) molekul (vitamín A)
3. většina aromatických uhlovodíků jeví dobrou luminescenci ($\pi \rightarrow \pi^*$ přechod)

Základní pravidla

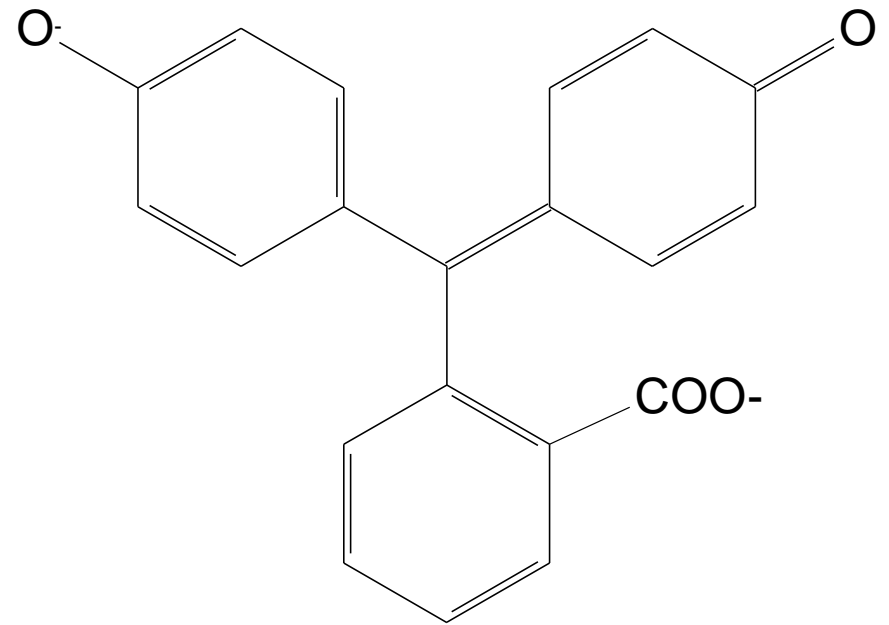
4. Aromatické systémy s přechody $n \rightarrow \pi^*$ zvyšují intenzitu fluorescence (molekuly obsahují atomy s nevazebnými elektrony – N, O, S). U jednoduchých molekul obsahujících karbonylovou skupinu (např. benzofenony), nebo heteroatomy (pyrimidin, pyrazin) je často pozorována i fosforescence.
5. Skupiny připojené na aromatické jádro často silně ovlivňují fluorescenční vlastnosti molekuly. Tyto skupiny mohou měnit polohu nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu (týká se to jak $n \rightarrow \pi^*$, tak i $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů) – viz. tabulka.

skupina	vliv na Φ_F	vliv na Φ_P
alkyl	nepatrný	zvýšení
hydroxo, methoxo	zvýšení	zvýšení
Karboxylová, keto	velké snížení	velké zvýšení
Nitro, nitroso	snížení	zvýšení
amino	zvýšení	zvýšení
sulfhydrylová	snížení	-
sulfonová	nepatrný	-
kyano	zvýšení	-
X	snížení	zvýšení

6. molekuly s planární a rigidní strukturou mají vyšší kvantový výtěžek, než molekuly s velkým stupněm volnosti (konjugace takových systémů je vyšší, interakce se solventem je nižší (fluorescein x fenolftalein, různá fluorescence isomerů též molekuly)).



Fluorescein (výborné fluorescenční vlastnosti)



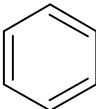
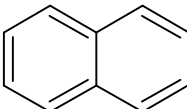
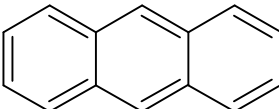
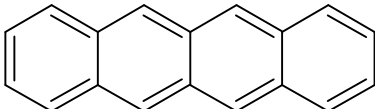
Fenolftalein (barevný, ale nefluoreskující indikátor)

6. jestliže je na aromatickém jádře halový prvek můžeme pozorovat tzv. efekt těžkého atomu: přítomnost těžkého prvku zvyšuje pravděpodobnost přechodu na $S_0 \rightarrow T_1$, což má vliv na zvýšení Φ_p .

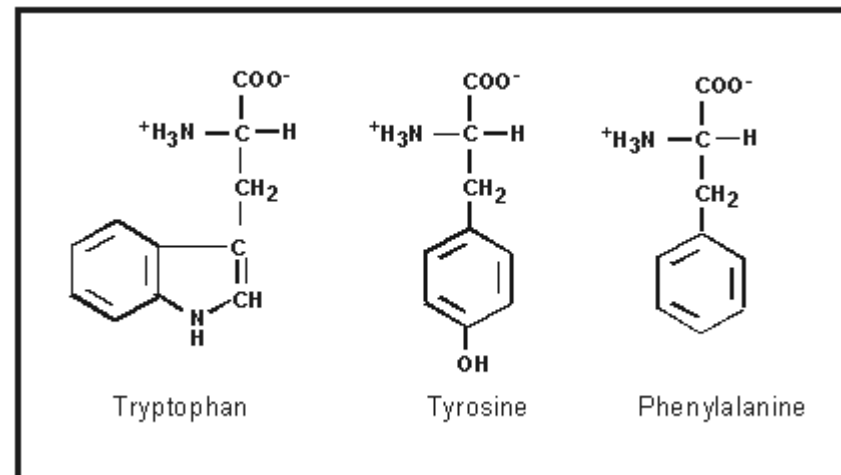
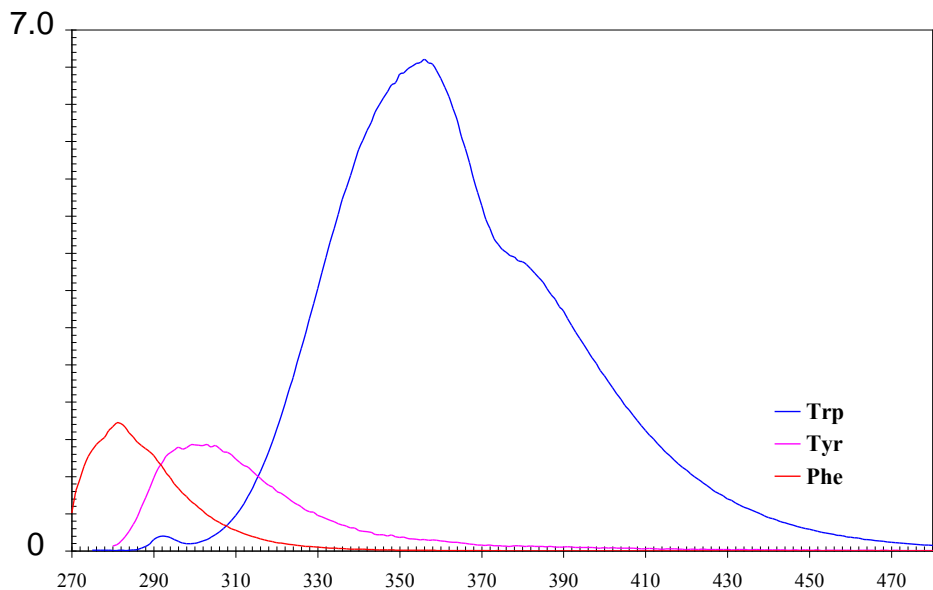
7. jestliže jsou aromatická jádra téže molekuly oddělena alkylovou skupinou je systém slabě, nebo vůbec konjugován (menší kvantový výtěžek, nižší vlnová délka emise).

Luminiscence a struktura

přechod $\pi \rightarrow \pi^*$ čím více je v molekule konjugovaných vazeb, tím vyšší má emitované záření vlnovou délku

Vzorec	Název	λ_{ex}	λ_{em}	Φ_{F}	Φ_{P}
	Benzén	205	278	0.11	0.26
	Nafatlén	286	321	0.29	0.1
	Antracén	365	400	0.46	<0.01
	Naftacén	390	480	0.60	-

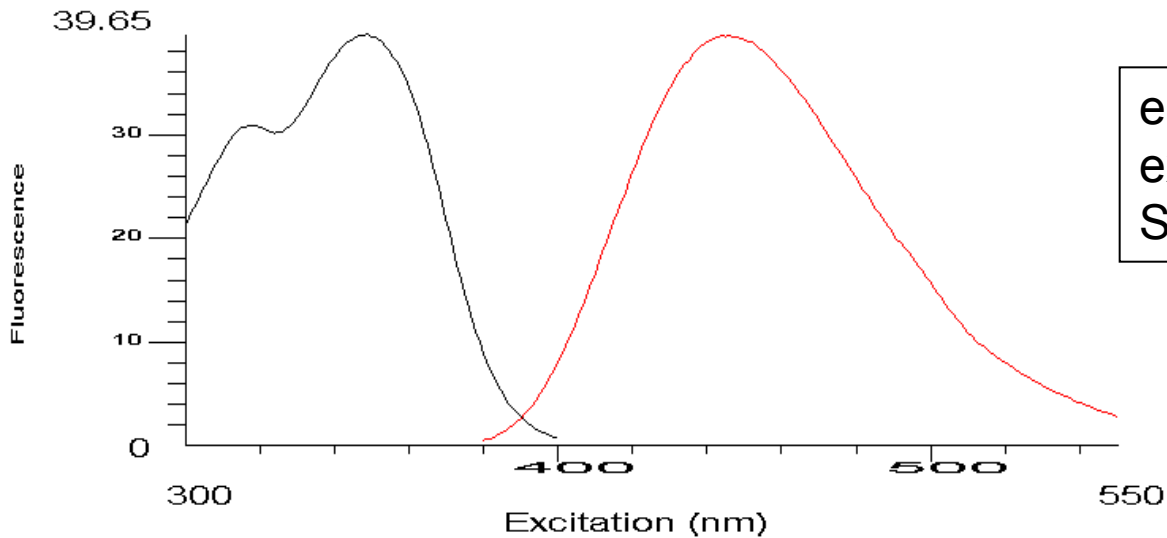
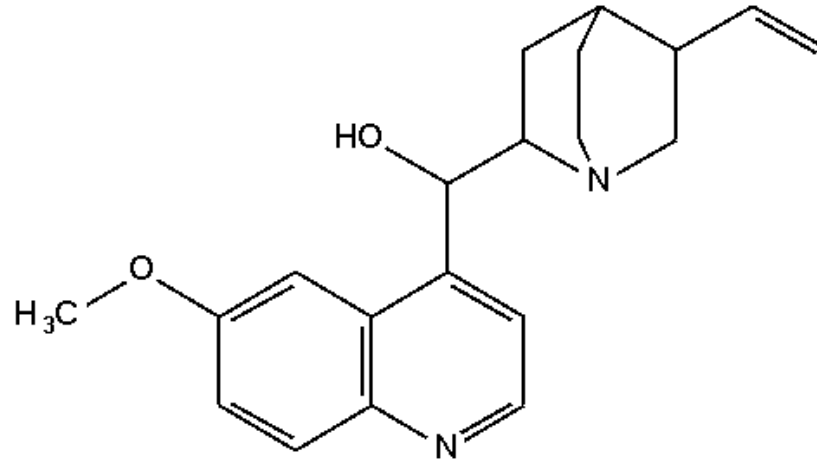
Luminiscence organických molekul: ukázky



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

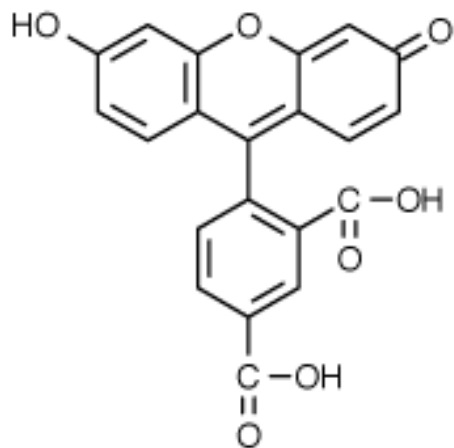
1. P. Pekárková, Bakalářská práce, 2005
 2. www.biotek.com

Chinin

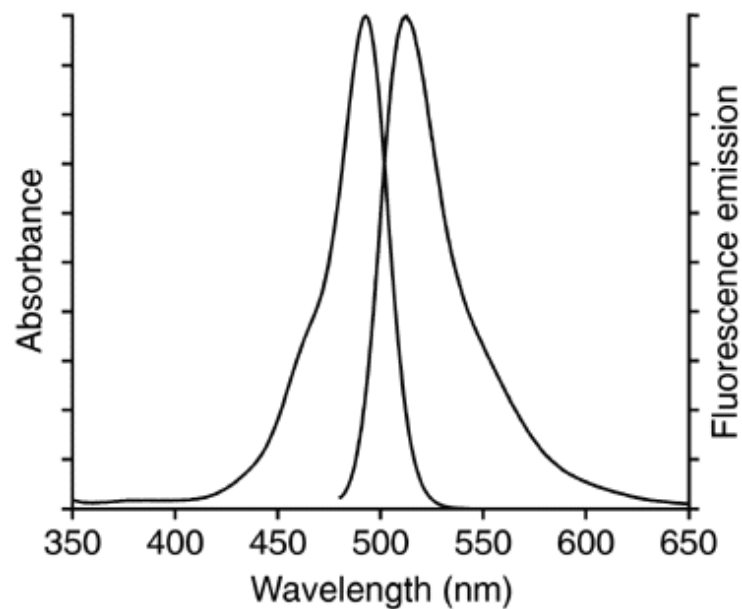


emisní maximum: **446 nm**
excitační maximum: **349 nm**
Stokesův posun: **97 nm**

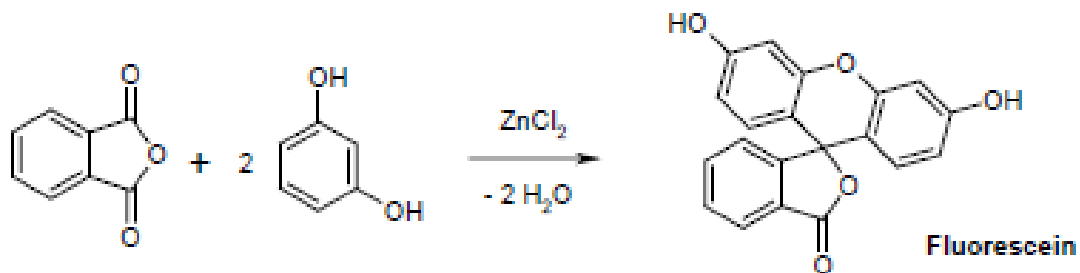
Deriváty fluoresceinu



excitační maximum: 494 nm
emisní maximum: 520 nm



Syntéza fluoresceinu



Kondenzační reakce ftalanhydridu (půl lžičky) s resorcinolem (půl lžičky)

Aplikace fluorescenční spektroskopie v hydrogeologii



Migrace podzemních vod

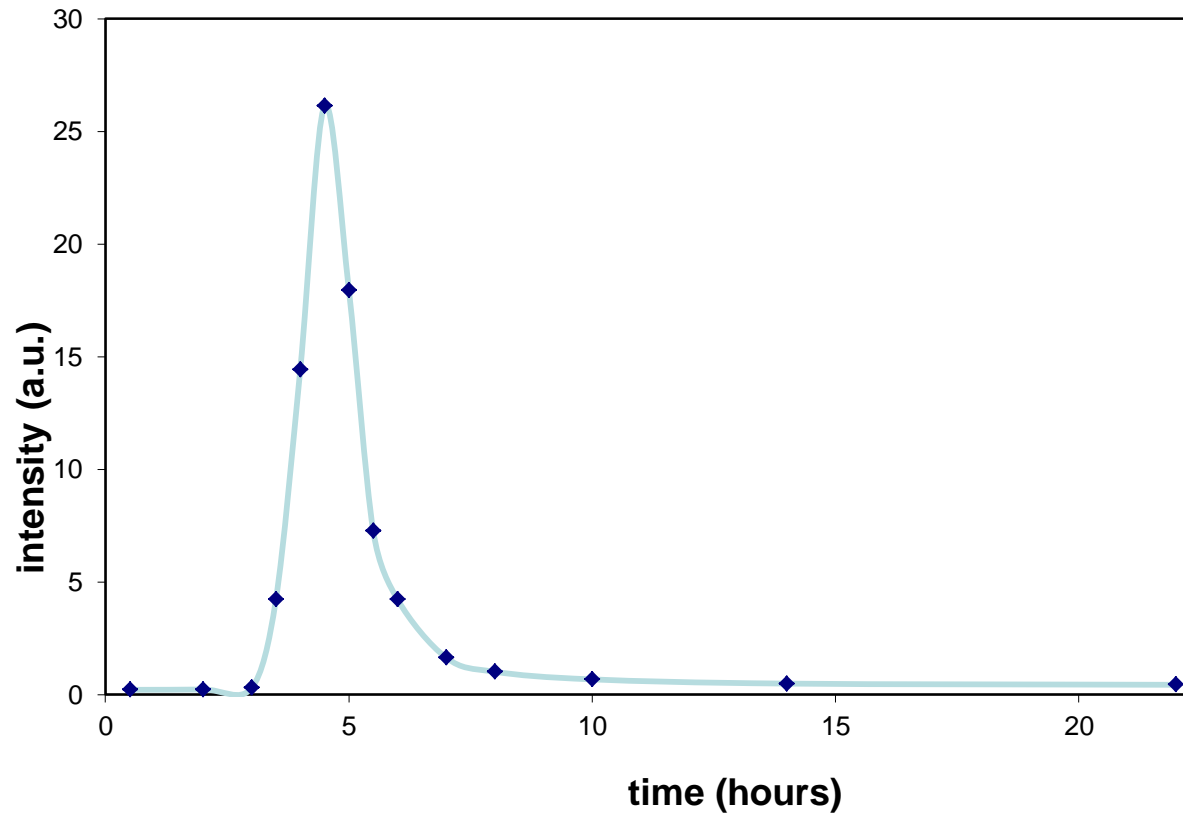
- sledování a objasnění systému podzemních řek a potoků v krasových oblastech (propadání a vývěry...)
- sledování toku vody z kontaminovaných míst (např. úložiště odpadů, skládek, atd.)



Fluorescenční „značkovače“ podzemních vod

- fluorescenční „značkovače“ (**tracer**) jsou obvykle ve vodě rozpustné, silně fluoreskující látky (fluorescein, rhodamin, eosin, erythrosin, atd.)
- jestliže dochází k velikému zředění barviva, lze použít např. hydrofobní sběrné patrony
- k detekci lze použít jak LIF, tak spektrofluorimetr vybavený lampou (i detekce několika barviv zároveň)
- lze sledovat i časový průběh průchodu barviva potokem/řekou. Z rychlosti průtoku, zředění značkovače, vzdálenosti a dalších faktorů lze usuzovat na charakter, délku, případně členitost podzemního systému.

Mapování podzemních vod



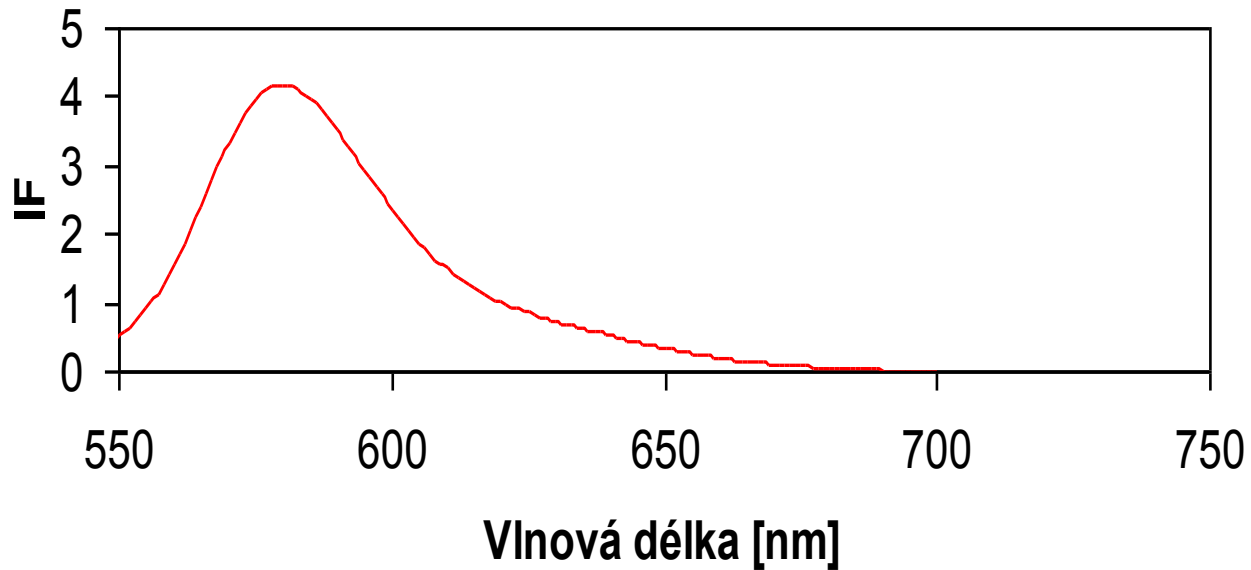
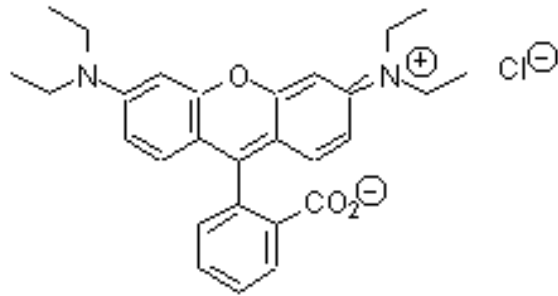
„Mapování“ podzemních vod



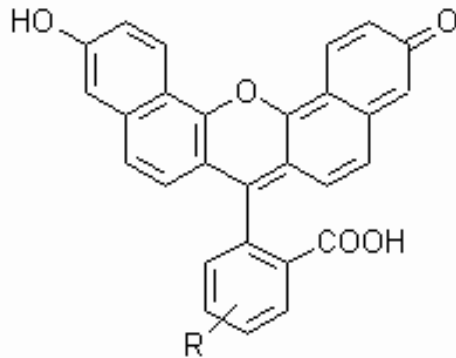
Fluorescein na Den svatého Patrika



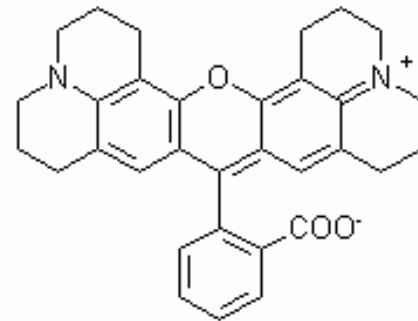
Deriváty rhodaminu



Fluorofory s emisním maximem v oblasti kolem 600nm



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



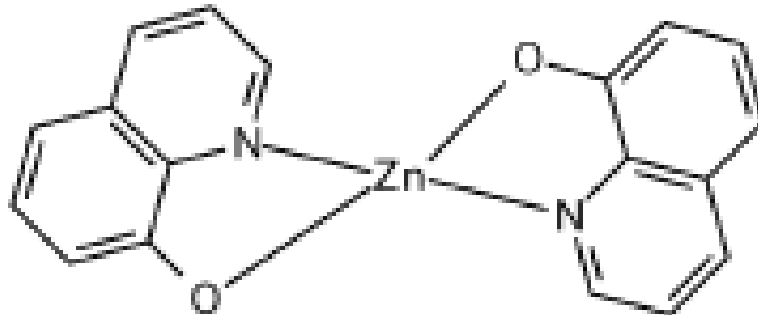
ABSORPCE 568 nm (98000)
EMISE 595 nm

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



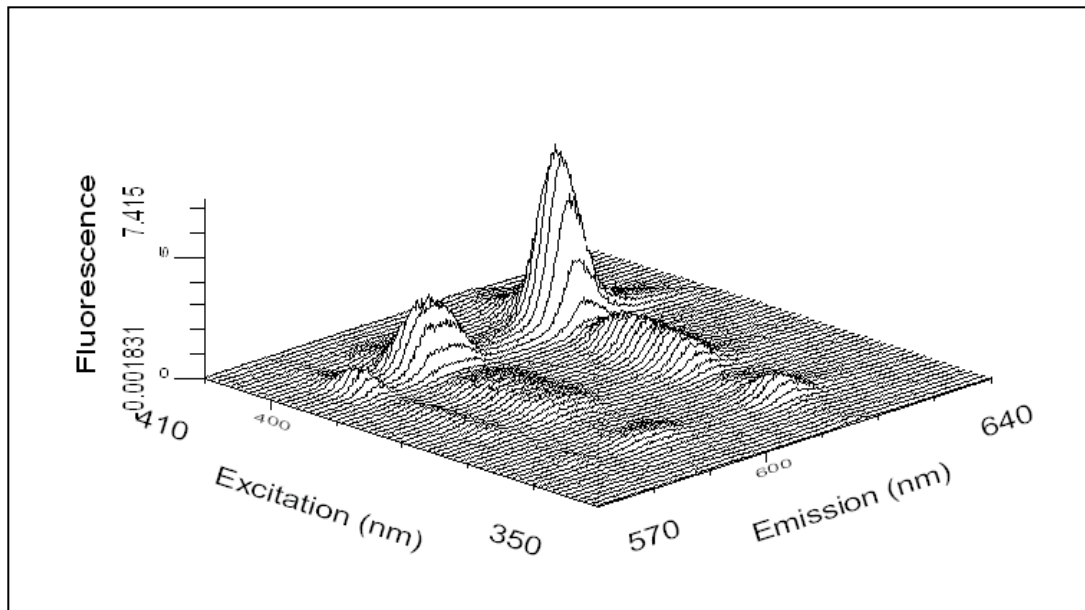
Luminiscence anorganických „species“ – luminiscence nekomplexovaných iontů v roztoku (2)

- 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)

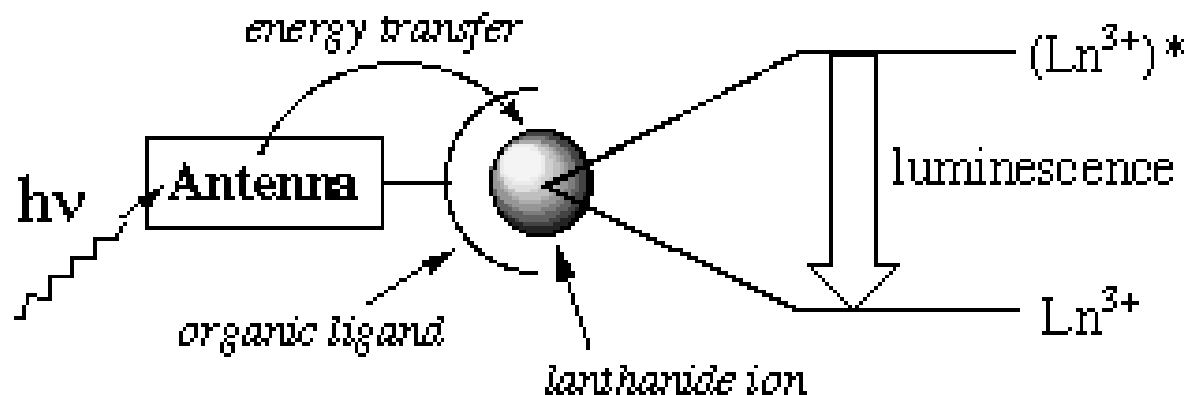
Luminiscence Lanthanoidů(III)

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



Anténový efekt (antenna effect)



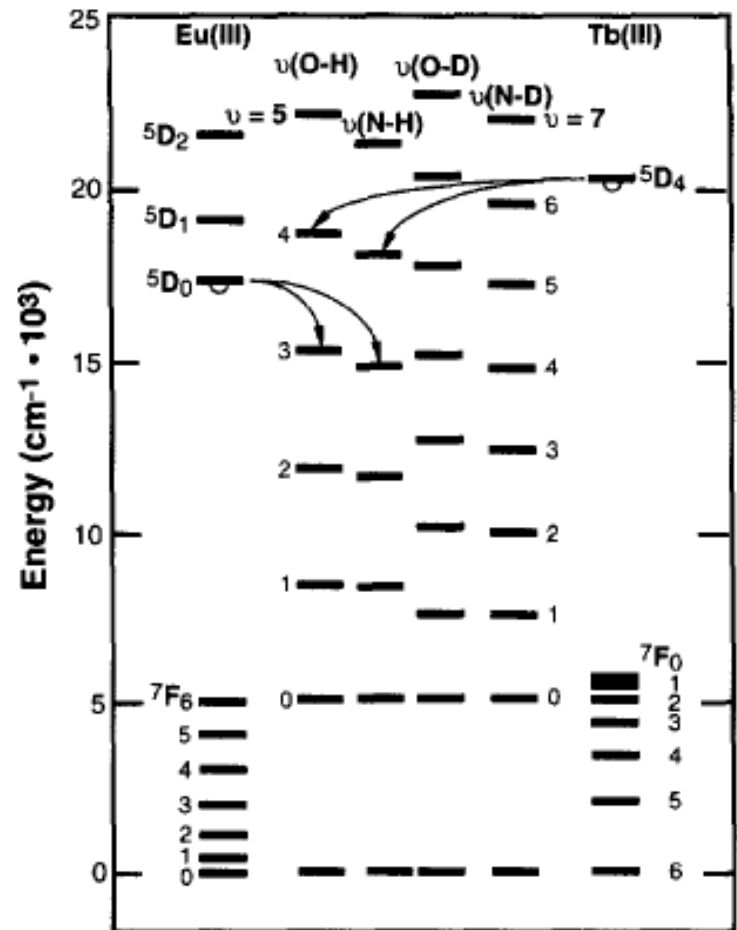
Lanthanide	Transition	Wavelength (nm)	Lifetime (ms)
Sm	$^4G_{5/2} \rightarrow ^6H_{7/2}$	594	0.0023
Eu	$^5D_0 \rightarrow ^7F_2$	616	0.11
Gd	$^6P_{7/2} \rightarrow ^7S_{7/2}$	310	2.3
Tb	$^5D_4 \rightarrow ^7F_5$	543	0.4
Dy	$^4F_{9/2} \rightarrow ^6H_{15/2}$	479	0.0024

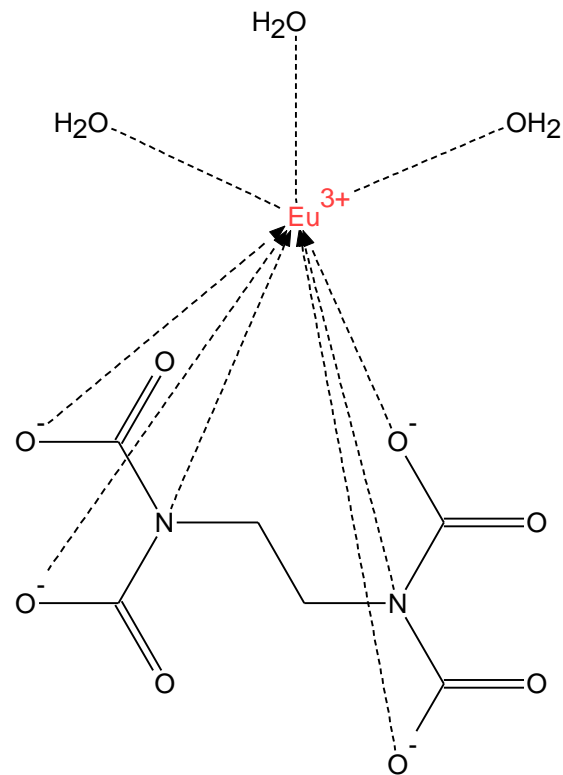
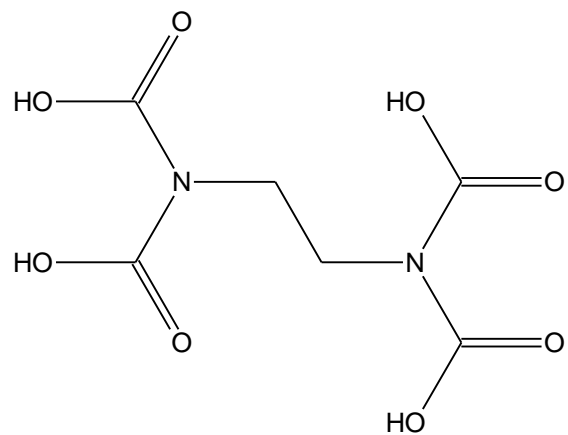
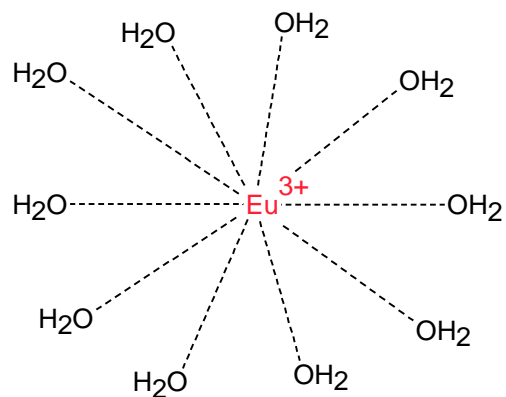
Koordinace molekuly vody do vnitřní sféry Ln^{3+}

$$q = 1.05 \times (\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} - \tau_{\text{D}_2\text{O}}^{-1})$$

$$q = 1.05 \times (\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} - 0.7)$$

$$q = 1.11 \times (\tau_{\text{H}_2\text{O}}^{-1} - \tau_{\text{D}_2\text{O}}^{-1} - k_{\text{XH}})$$





$\text{Eu}(\text{EDTA})^-$, pH = 10.0, $q = 3$, CN = 6

EDTA^+ $[\text{Eu}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$, pH = 1.5, $q = 9$, CN = 0

Komplexy s nefluoreskujícími ligandy (3)

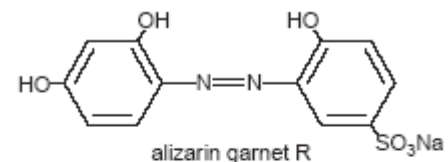
Většinou jde o tzv. C-T (charge-transfer) přechody: přenos náboje mezi ligandem a iontem kovu, dochází k přechodu elektronu z orbitalu atomu s výrazně vyšší elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (buď přechod M-L, nebo L-M), tyto přechody mají vysokou intenzitu v porovnání s přechody d-d.

Komplexy s nefluoreskujícími ligandy

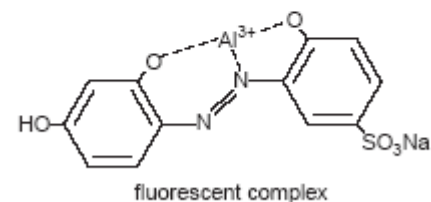
- jde o poměrně specifické chelatční reakce
- iontem je často diamagnetický kov
- vznik fluoreskujících komplexů je často používán v analytické chemii pro svoji specifitu

Komplexy s nefluoreskujícími ligandy – příklady

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} a další
Flavonal	Zr^{2+} , Sn^{4+}
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd^{2+}
1,10 - fenntrolin	Ln^{3+}
Různá azobarviva	Al^{3+} , Be^{2+} , In^{3+} , $\text{Hf}(\text{IV})$, $\text{Th}(\text{IV})$, Sc^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Sn}(\text{IV})$, Y^{3+}
Benzoin	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}



(a)

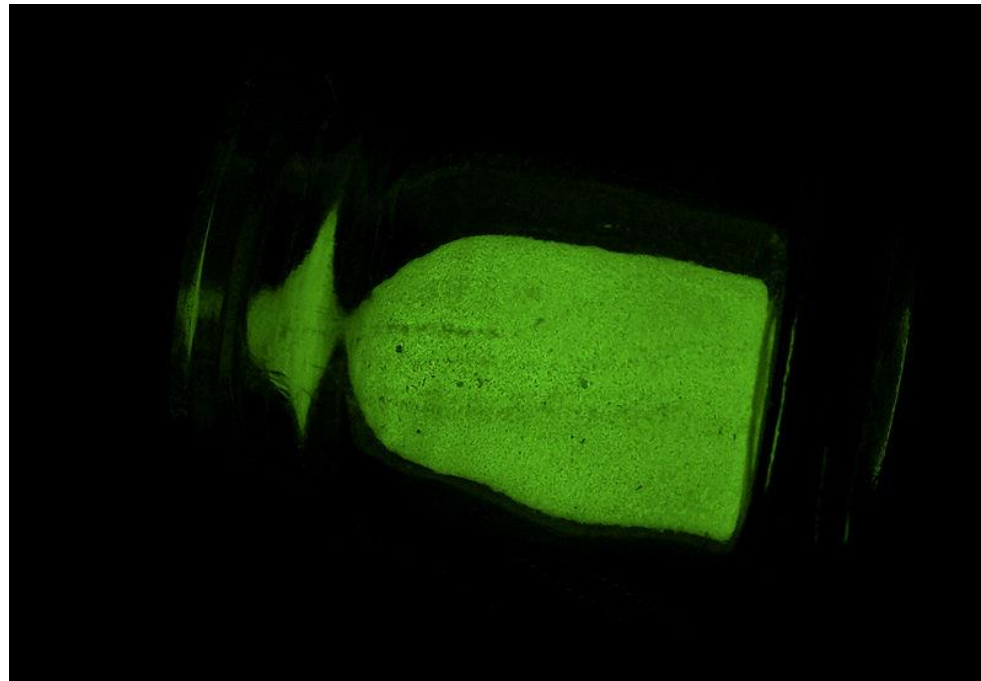


(b)

Luminiscence pevných látek

- luminiscence většiny molekul v pevném stavu je podobná luminiscenci v roztoku
- vibrační přechody jsou omezeny, proto není luminiscence pevných vzorků tolik závislá na teplotě a píky emisního spektra jsou zpravidla ostřejší
- zvláštním příkladem „inorganic condensed matters“ (fosfory)

Anorganické luminiscenční materiály „fosfory“



Luminescence of **localized centers** and **semiconductors**

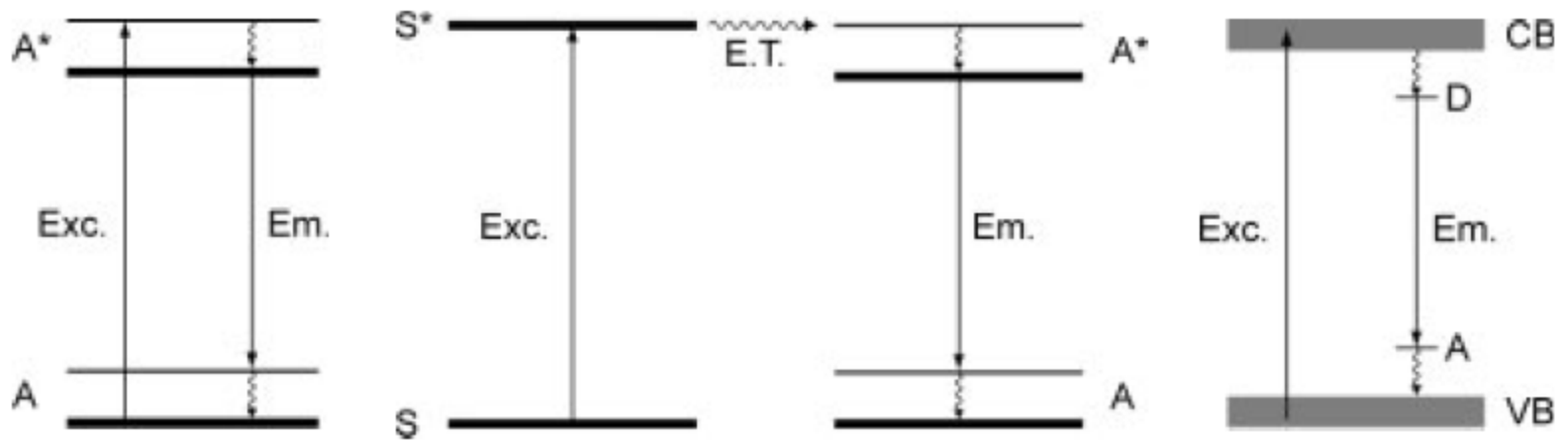


Fig. 1. Schemes illustrating the underlying physical processes of luminescence on isolated centers (left, middle) and in semiconductors (right).

Localized centers

Transitions between ion levels (f-f transitions, charge transfer, etc.). Excitation and emission can be both localized to the same center

Princip

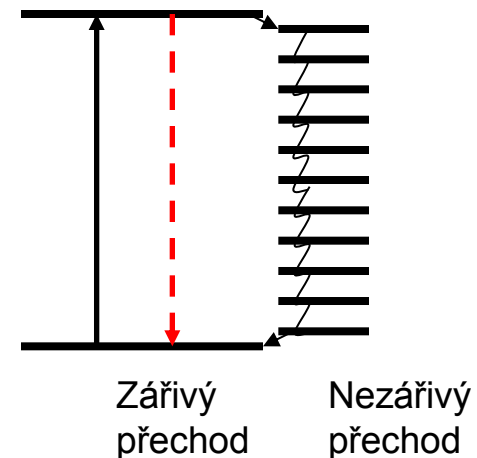
Anorganický fosfor obsahuje:

Aktivátor (*activator*) – zpravidla iont kovu, např. Cr^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , a další

Aktivátor absorbuje energii (např. UV záření), dojde k excitaci a následné luminiscenční emisi, ionty aktivátoru jsou rozptýlené v matici

Matice/matrice (*host lattice*) – většinou průzračná krystalická látka, např. Al_2O_3 , Y_2O_3 , atd.

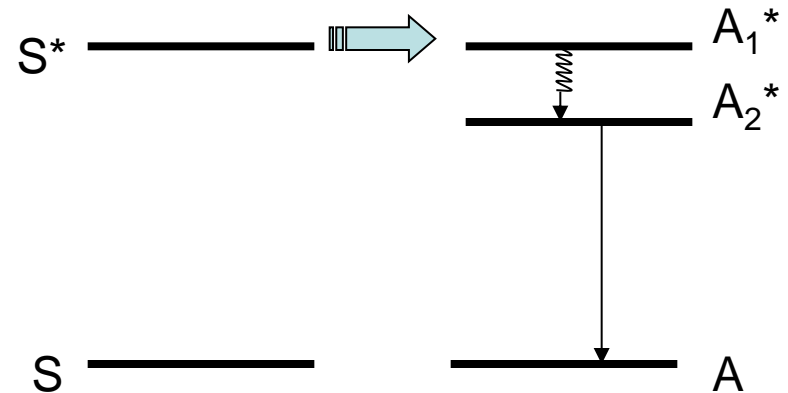
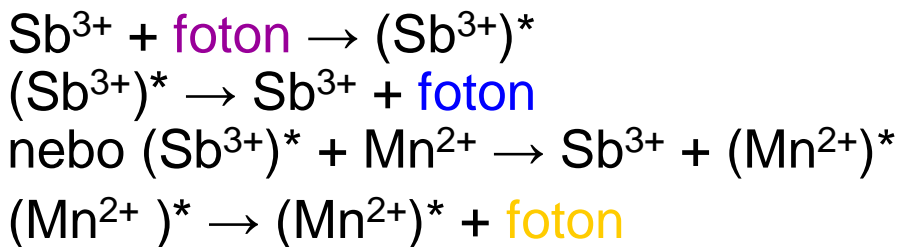
Pro luminiscenční vlastnosti je klíčový aktivátor, matice ovlivňuje hlavně účinnost celého procesu (dobrý „host“ neodebírání aktivátoru energii)



$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Sb}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$

Matrice může obsahovat dva i více iontů (např. „**lampový fosfor**“ $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Sb}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$)

Ultrafialové záření je absorbováno pouze Sb^{3+} a přijatá energie je pak vyzářena ve formě světla (emise modrého světla) nebo předána na Mn^{2+} (energetický přenos) a pak vyzářena ve formě žlutého světla. Sb^{3+} tedy funguje jako zesilovač pro Mn^{2+} .





- Matrice také může někdy sloužit jako „zesilovač“ (**sensitizer**)
- Ultrafialové záření excituje vanadyl (**host lattice**), ale energie je předána na Eu^{3+}
- Podobným příkladem je $\text{ZnS}:\text{Ag}^+$

Solid luminescent materials

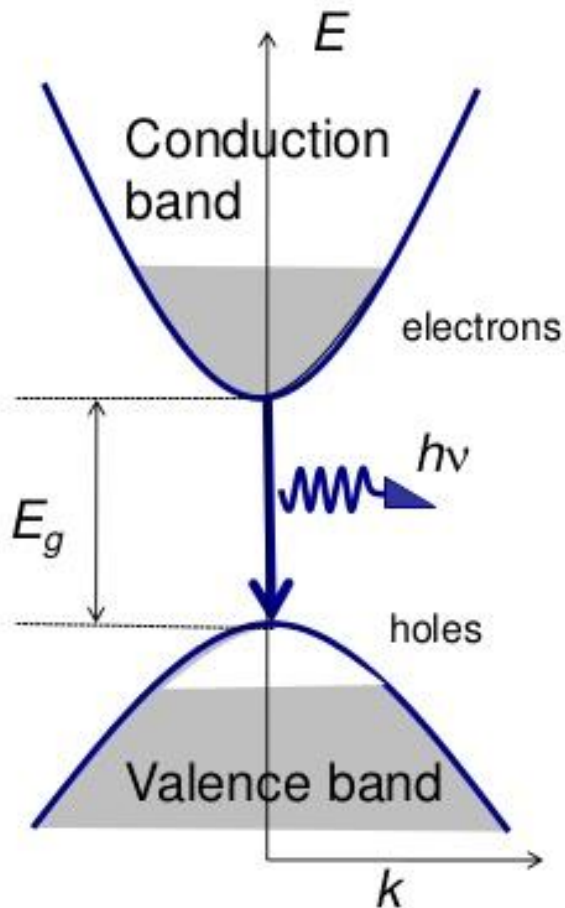
Year	Kind of discovery	Excitation source	Type of luminescent material	Emission color
~1600	Stone of Bologna	sunlight	BaSO ₄ (BaS)	yellow
1858	Geißler's tube	gas-discharge (Hg)		UV
1859	Becquerel	gas-discharge (Hg)	ZnS	yellow-white
1895	X-rays (by Röntgen)		none (photographic plate)	
1896	X-ray intensifier (by Pupin)	X-ray	CaWO ₄	blue
1896	Fluorescent lamp (by Edison)	gas-discharge (Hg)	CaWO ₄	blue
1897	Braun's tube	cathode-ray	CaWO ₄	blue
1916	Neon discharge lamp (by Claude)	gas-discharge (Ne)	none	red
1925	Black-and-white television	cathode-ray	ZnS:Ag ⁺ ; (Zn,Cd)S:Ag ⁺	blue; yellow
1937	Neon discharge lamp (by Claude)	gas-discharge (Ne)	CaWO ₄ ; Zn ₂ SiO ₄ :Mn ²⁺	blue; green
1938	Fluorescent lamp	gas-discharge (Hg)	MgWO ₄ ; (Zn,Be) ₂ SiO ₄ :Mn ²⁺	blue-green; green-red
1941	Radar screen	cathode-ray	(Zn,Cd)S:Cu ⁺ ,Al ³⁺	green
1946	Insect lamps	gas-discharge (Hg)	CaWO ₄	blue
1960	Color television	cathode-ray	ZnS:Ag ⁺ ; (Zn,Cd)S:Cu ⁺ ,Al ³⁺ ; (Zn,Cd)S:Ag ⁺	blue; green; red
1960	Laser (by Maiman)	gas-discharge (Hg)	Al ₂ O ₃ :Cr ³⁺	red
1972	Computed tomography (by Houndsfield)	X-ray	NaI:Tl ⁺	green
1972	Rare-earth phosphors	gas-discharge (Hg)	Sr ₃ (PO ₄) ₅ Cl:Eu ³⁺ ; LaPO ₄ :Ce ³⁺ ,Tb ³⁺ ; Y ₂ O ₃ :Eu ³⁺	blue; green; red

Examples of the most important „phosphors“

Emission colour	Application			
	Cathode Ray Tube	Plasma Display Panel	Fluorescent Lamp	X-ray-Intensifying / Scintillation
blue	ZnS:Ag ⁺ ,Cl ⁻	BaMgAl ₁₀ O ₁₇ :Eu ²⁺	BaMgAl ₁₀ O ₁₇ :Eu ²⁺ Sr ₄ Al ₁₄ O ₂₅ :Eu ²⁺ Sr ₃ (PO ₄) ₅ Cl:Eu ²⁺	NaI:Tl ⁺ Ba(F,Br):Eu ²⁺ (storage phosphor) LaBr ₃ :Ce ³⁺ Bi ₄ Ge ₃ O ₁₂ Gd ₂ SiO ₅ :Ce ³⁺ / Lu ₂ SiO ₅ :Ce ³⁺ LuAlO ₃ :Ce ³⁺ YTaO ₄ :Nb ⁵⁺
green	ZnS:Cu ⁺ ,Au ⁺ ,Al ³⁺ ZnS:Cu ⁺ ,Al ³⁺	BaAl ₁₂ O ₁₉ :Mn ²⁺ Zn ₂ SiO ₄ :Mn ²⁺ BaMgAl ₁₀ O ₁₇ :Eu ²⁺ ,Mn ²⁺	GdMgB ₅ O ₁₀ :Ce ³⁺ ,Tb ³⁺ LaPO ₄ :Ce ³⁺ ,Tb ³⁺ CeMgAl ₁₁ O ₁₉ :Tb ³⁺	CsI:Tl ⁺ Gd ₂ O ₂ S:Tb ³⁺
yellow			Y ₃ Al ₅ O ₁₂ :Ce ³⁺	
red	Y ₂ O ₂ S:Eu ³⁺	Y ₂ O ₃ :Eu ³⁺	Y ₂ O ₃ :Eu ³⁺ (Y,Gd)(P,V)O ₄ :Eu ³⁺	
white			Ca ₅ (PO ₄) ₃ (F,Cl):Sb ³⁺ ,Mn ²⁺	

Interband Semiconductor Luminescence

Direct-gap materials



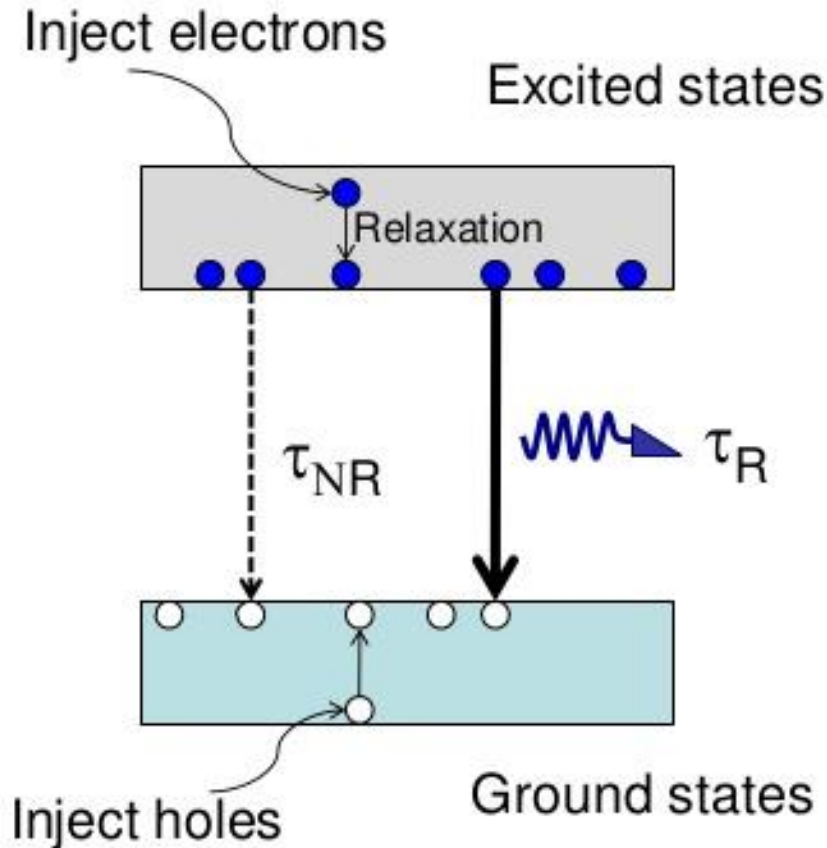
Photons emitted when electrons at the bottom of the conduction band recombine with holes at the top of the valence band.

Since momentum of the photon is negligible compared to that of the electron, e and h have same k -vector.

Energy of luminescence close to energy-gap.

Examples: GaAs, GaN, GaInP

Luminescence from a semiconductor



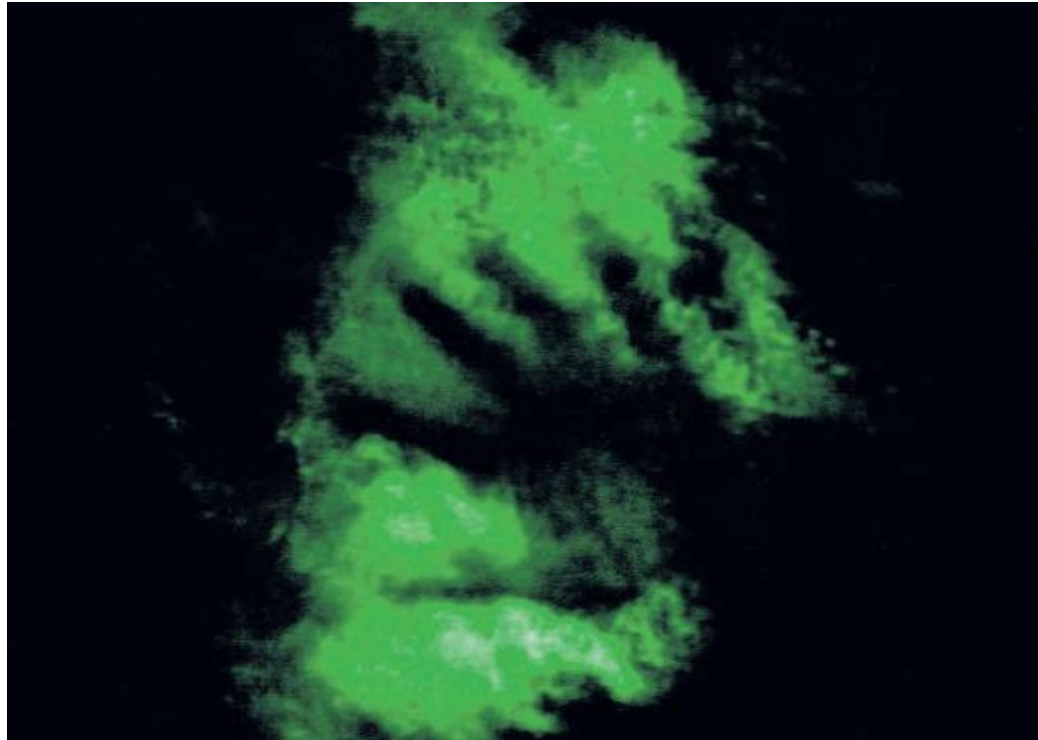
Rapid relaxation and thermalisation
Applies for electrons and holes.

Recombination of electrons and
holes can result in luminescence.

This often different from absorption.

Radiative and non-radiative processes
compete.

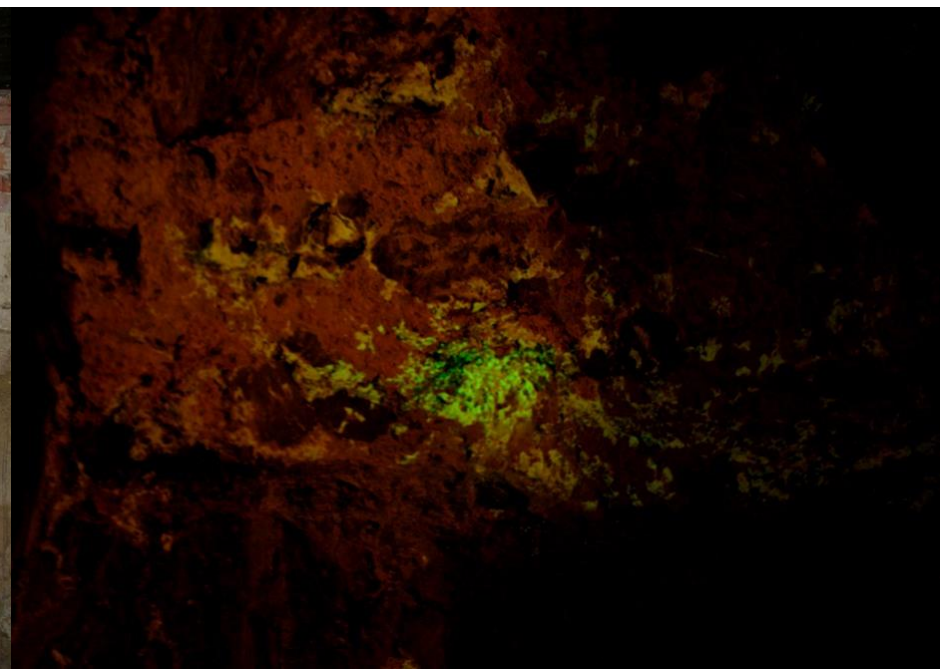
Jihlavské podzemí



<http://www.youtube.com/watch?v=mQWh8Oc0kDU>



Místnost s fosforeskujícím nátěrem na hradě Špilberk



Excimery a excioplexy

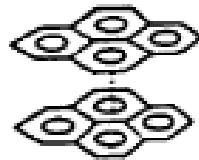
- excimer (excitovaný dimer) se tvoří, jestliže spolu reagují dvě excitované částice



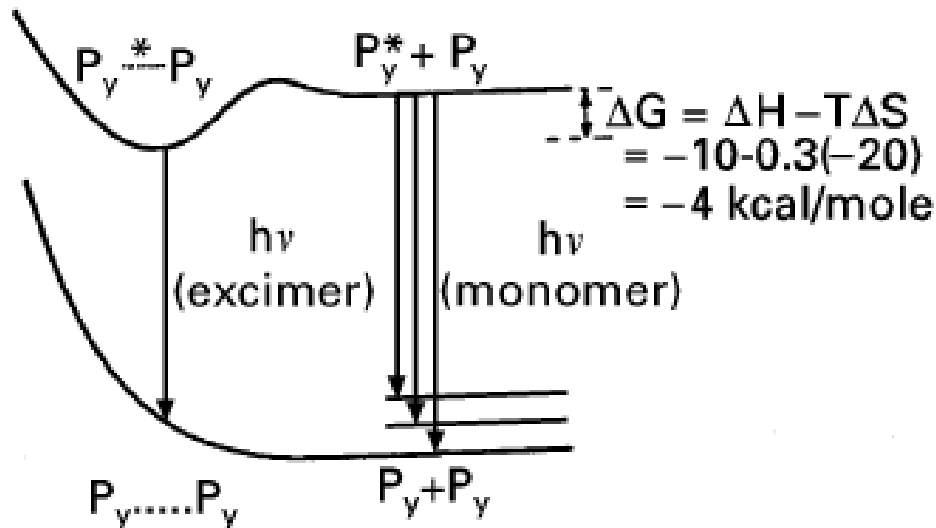
- jestliže se jedná o dvě různé excitované „species“, tak vzniká excioplex



Excimery a exciptyxy



Face to face excimer



Excimery a excioplexy

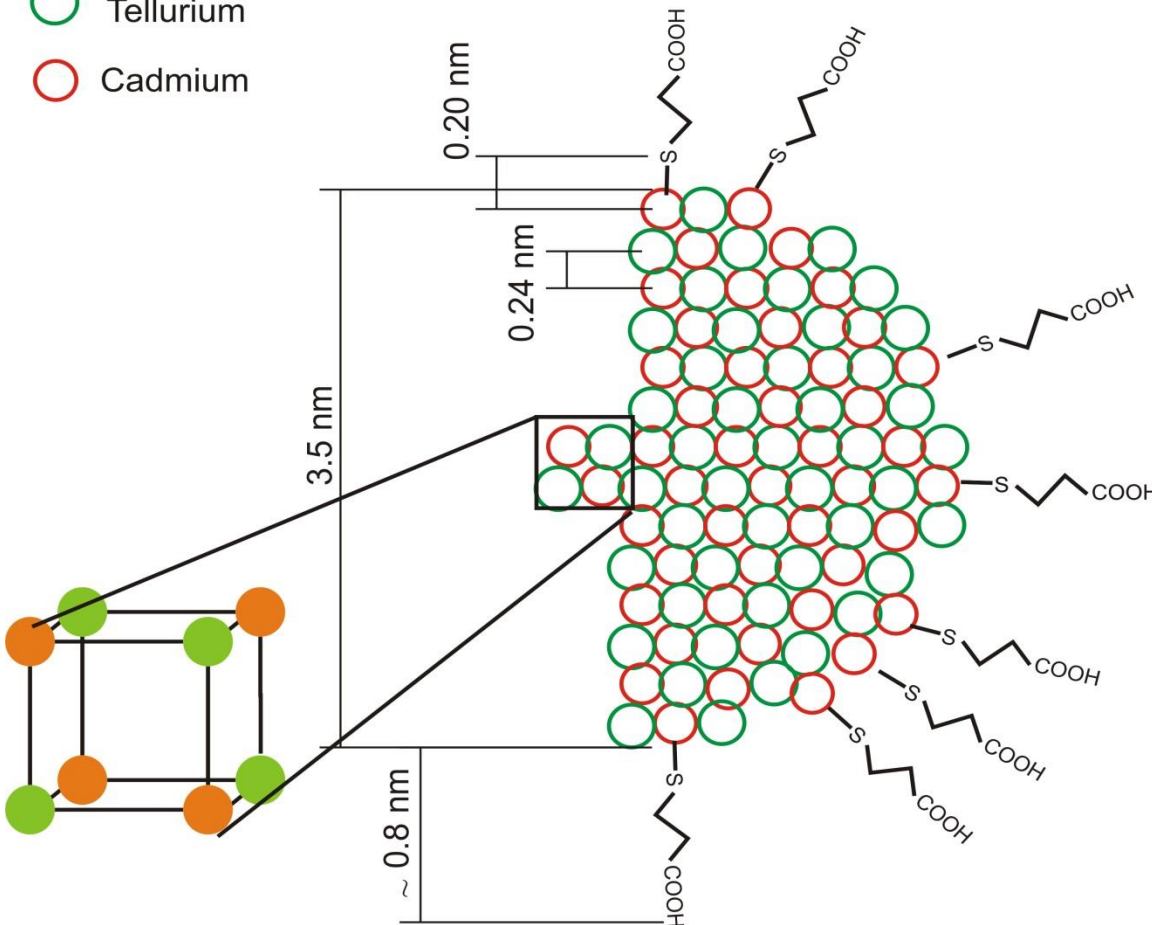
- zářivá deexcitace excimeru (fluorescence)
- nezářivá deexcitace
- excimer reaguje s jinou molekulou (např. Diels-Alderova reakce)

Kvantové tečky (quantum dots)

- agregovaný shluk stovek až tisíců atomů
- jejich vodivostní a spektrální vlastnosti jsou velmi odlišné od chování samotných atomů – tvorba nových degenerovaných orbitalů
- polovodičové nanokrystaly
- „laditelná“ fluorescence
- nejčastěji jde o kovové atomy (např. Cd, Au, Zn) rozptýlené v přebytku jiných atomů (S, Se, As, atd.)

Struktura kvantových teček

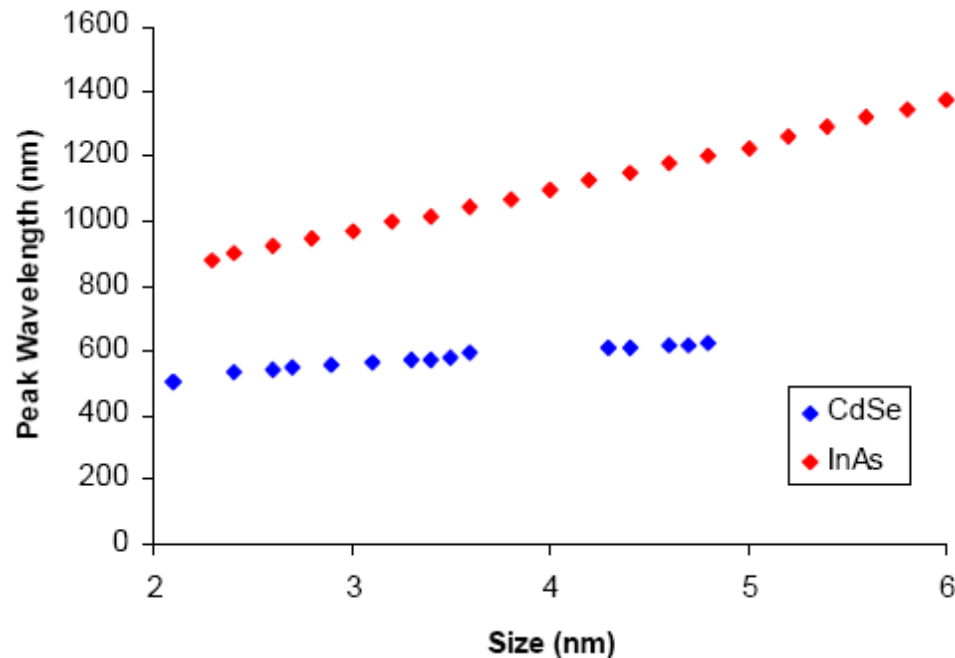
-  Tellurium
-  Cadmium



- velikost částice: 3,5 nm
- CdTe – kubická krystalová mřížka
- délka vazeb:
Cd-S = 0,2 nm
Cd-Te = 0,24 nm
- počet krystalových jednotek v jedné nanočástici:
~ 203
- přibližná molekulová hmotnost:
~ 200 000 g/mol

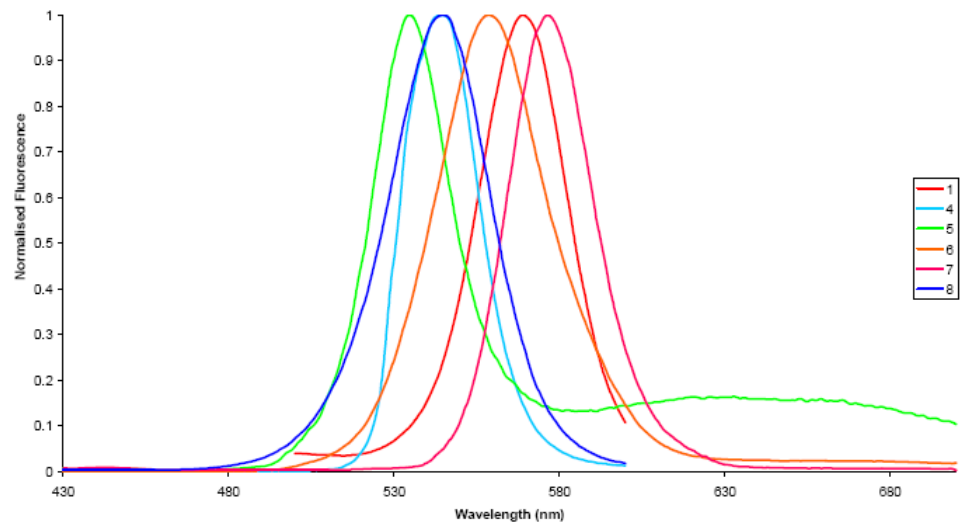
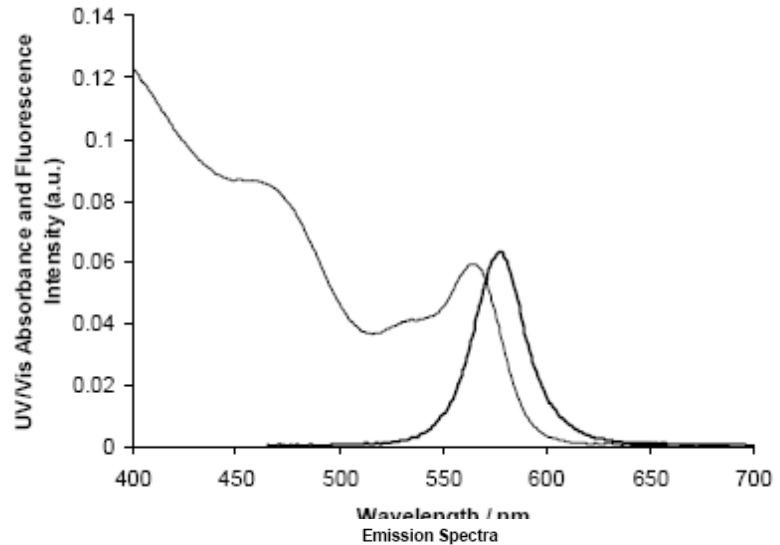
Fluorescenční vlastnosti kvantových teček

- podle složení atomů a postupu přípravy lze ovlivnit jejich emisní a excitační spektra



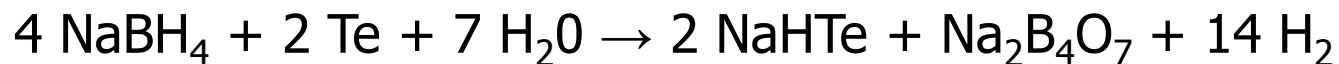
Fluorescenční vlastnosti kvantových teček

- „laditelná“ fluorescence
- úzké emisní pásy
- široké pásmo absorpce
- špatná rozpustnost
- použití: fluorescenční standardy, optické prvky, značení biomolekul...



Příprava kvantových teček rozpuštěných ve vodě

1. stupeň:



2. stupeň:



CdTe nanočástice se vytvoří
po několikahodinovém zahřívání.



Zdroje světla

vlastní - za vlastní zdroje označujeme taková tělesa nebo látky, v jejichž struktuře dochází ke vzniku světla. Za vlastní zdroj světla tedy můžeme považovat např. Slunce, žárovku, plamen atd.

nevlastní - látky, které samy světlo nevytvářejí, ale pouze odráží a rozptylují dopadající světlo, se označují jako nevlastní zdroje. Mezi nevlastní zdroje lze zařadit např. Měsíc, mraky, všechny osvětlené předměty apod. Tyto zdroje lze dále rozlišovat jako:

- reflektory - odražeče, neprůhledné, pro dané záření

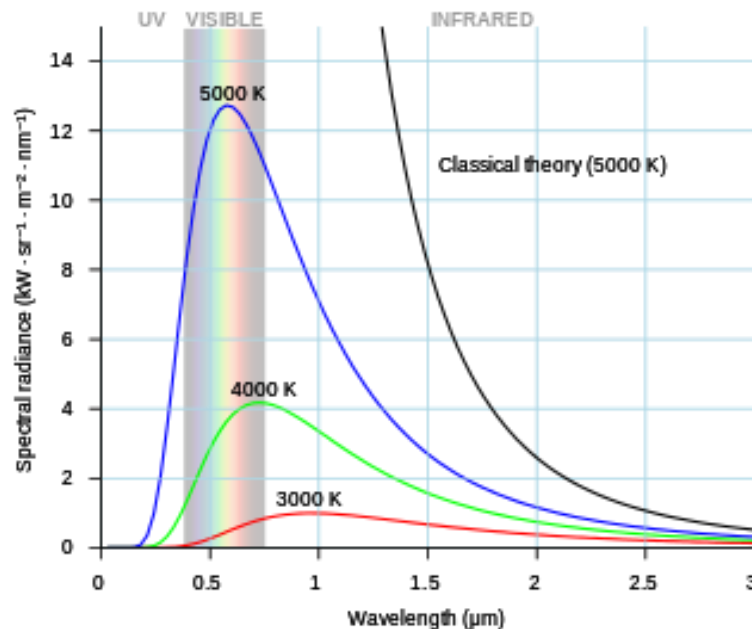
- refraktory - "ohýbače" / "lamače", čiré, stínítka / matnice, poloprůhledné difuzéry.

Přírodní zdroje

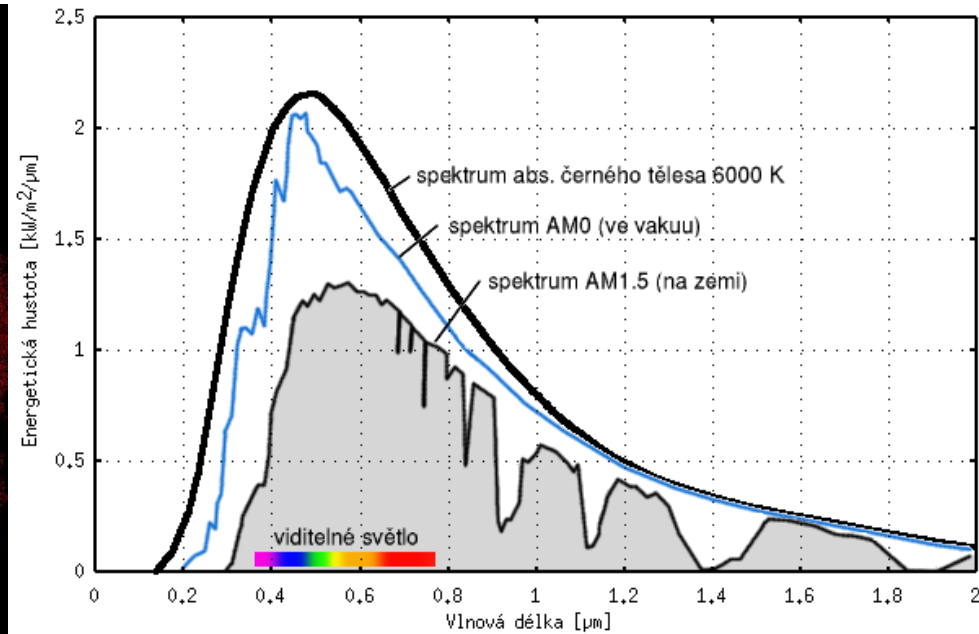
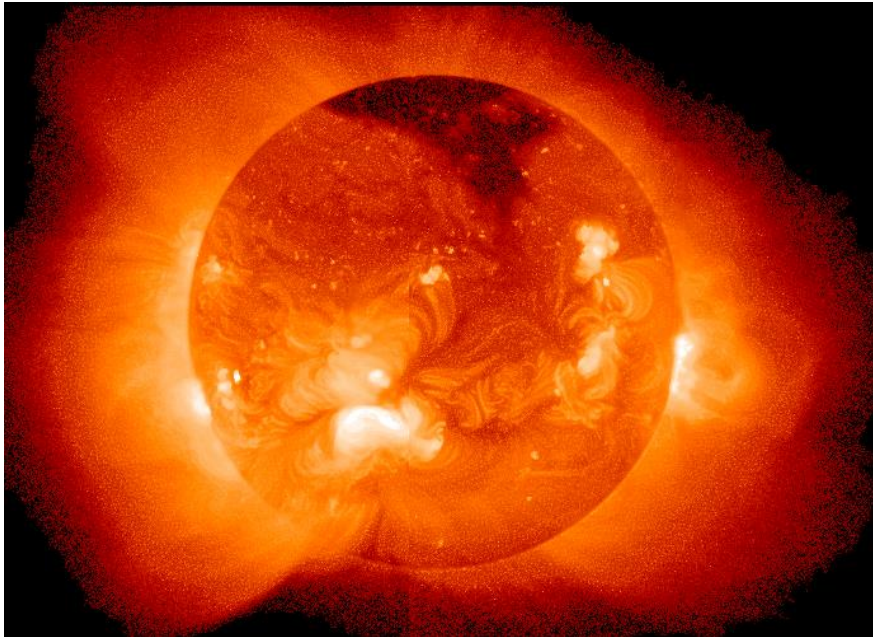
- K přírodním zdrojům patří například:
- Kosmická tělesa
 - Primární zdroje - Slunce, hvězdy: Skutečně světlo vytvářejí.
 - Sekundární zdroje - Měsíc: Pouze odráží světlo z jiných zdrojů, samy nesvítí.
- Chemické reakce - oheň, chemiluminiscence
- Biologické zdroje
 - Primární zdroje - bioluminiscence: světlušky, různé mořští živočichové, houby
 - Sekundární zdroje - odrazy očí viditelné ve tmě nebo při záblesku: nebo iridescence i obecně
- Elektrické výboje - elektrický proud v plynech (oblouk, výboj, blesk)
- Tektonické jevy - žhnoucí láva

Záření černého tělesa

- **Absolutně černé těleso, černé těleso** a nebo **černý zářič** je ideální těleso, které pohlcuje veškeré záření všech vlnových délek, dopadající na jeho povrch. Absolutně černé těleso je současně ideální zářič, ze všech možných těles o stejné teplotě vysílá největší možné množství zářivé energie. Celkové množství energie, které se vyzáří z povrchu absolutně černého tělesa za jednotku času a rozložení intenzity záření podle vlnových délek závisí jen na jeho teplotě. Záření Slunce se poměrně dobře blíží záření absolutně černého tělesa s teplotou přibližně 5800 Kelvinů, reliktní záření odpovídá záření absolutně černého tělesa s teplotou 2,7 K. Tento fyzikální pojem zavedl Gustav Kirchhoff v roce 1862.



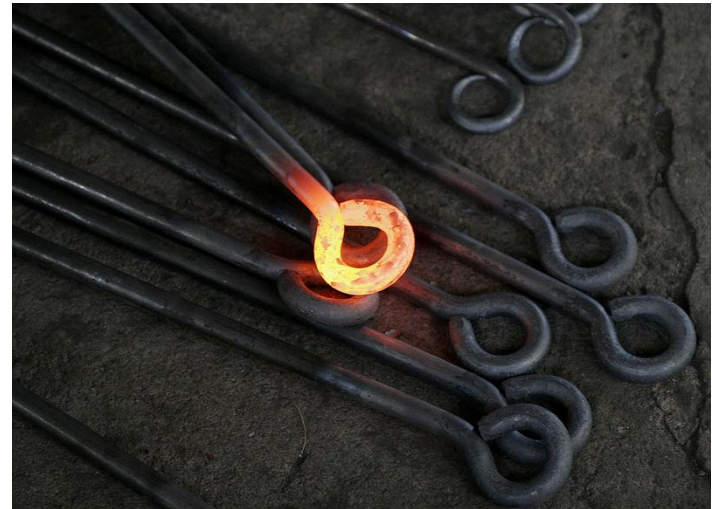
Slunce



Teplotní zdroje světla

Inkandescence je jev vyzařování světla, způsobeného tepelným buzením. V těchto zdrojích vzniká světlo jako jedna ze složek elektromagnetického záření vyvolaného vysokou teplotou povrchu nějakého tělesa.

Patří sem oheň (svíčka, lampa), v němž září: rozžhavené částice (nejčastěji uhlíku), slabě i žhavé plyny.



Elektroinkandescence

- Vzniká průchodem elektrického proudu pevnou vodivou látkou s vysokou teplotou tání např. platina, wolfram, atd. Pevná látka se rozžhaví na požadovanou teplotu, při které dochází k emisi viditelného záření
- Klasická žárovka svítí díky rozžhavenému (obvykle wolframovému) vláknku, v němž jsou elektrony vázané v atomech vlákna tepelně excitovány z nižších orbitálních hladin na vyšší; fotony zde vznikají při přeskokách elektronů mezi hladinami.
- Společnou vlastností teplotních zdrojů je:
 - velmi nízká účinnost přeměny jiného druhu energie na světlo (8%)
 - velký podíl energie vyzářené v podobě tepla (hlavní část – 92%)
 - spojitě rozložení světla ve spektru podle fyzikální křivky teplotního zářiče
 - subjektivně příjemné vnímání světla lidským okem
 - závislost barvy světla na teplotě zářiče
 - závislost účinnosti zdroje na teplotě zářiče.



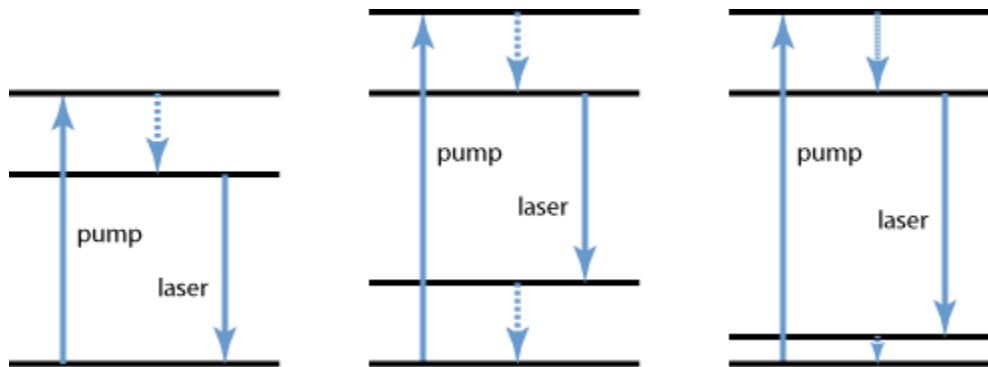
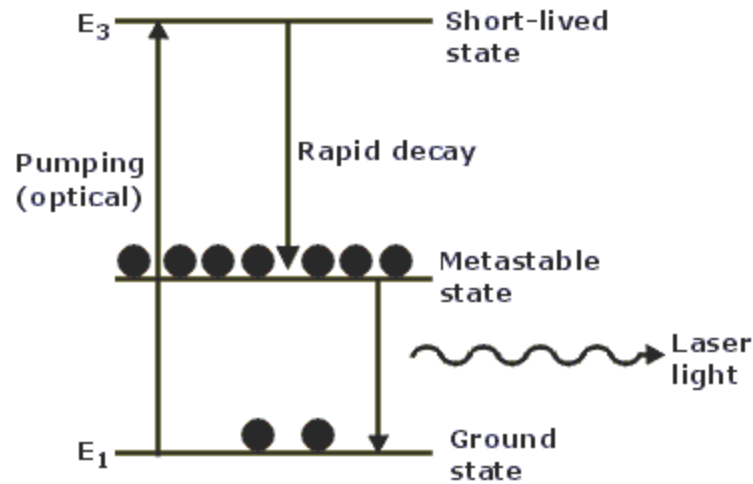
Elektrické zdroje světla s nespojitým spektrem

- Na rozdíl od teplotních zdrojů zde vzniká světlo jinými mechanismy. Obvykle jde o proud fotonů jednotlivě vyzářených při návratu elektronů z nestabilních poloh ve vyšších hladinách do stabilní polohy v nižší hladině v elektronovém obalu nějakého atomu. Protože energie uvolňovaná vracejícími se elektrony je kvantovaná velikostí „skoku“ mezi hladinami, mají i energie fotonů nespojitý průběh, rozdělený do tzv. emisních spektrálních čar nebo pásů.

LASER

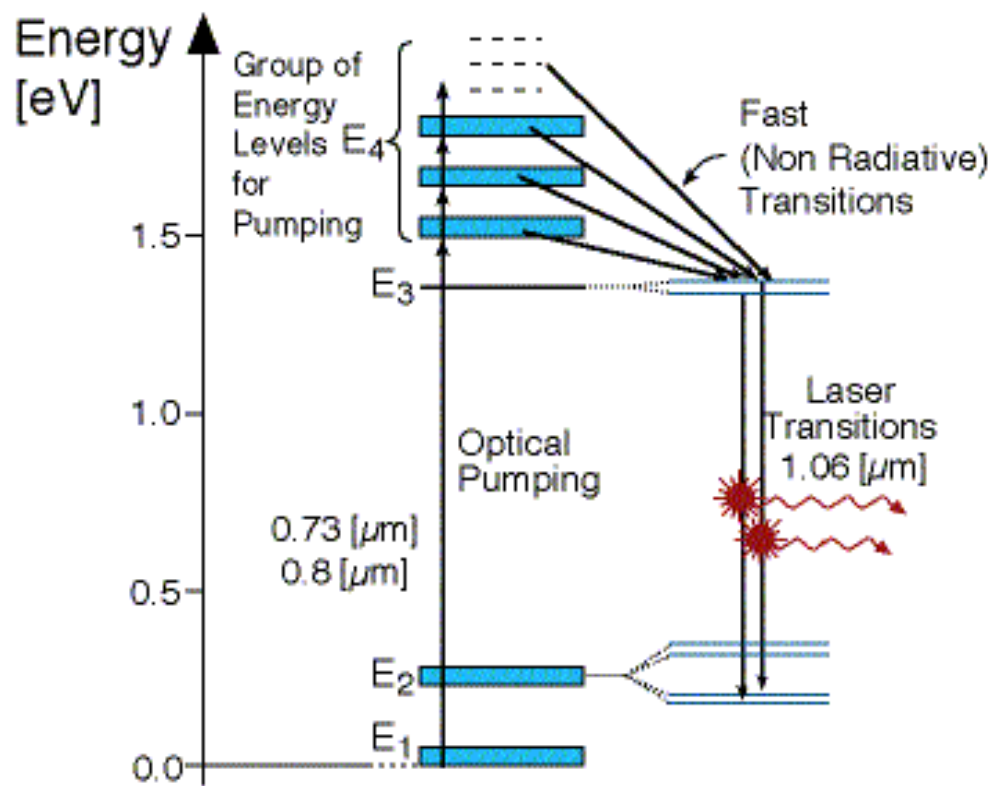


Princip laseru

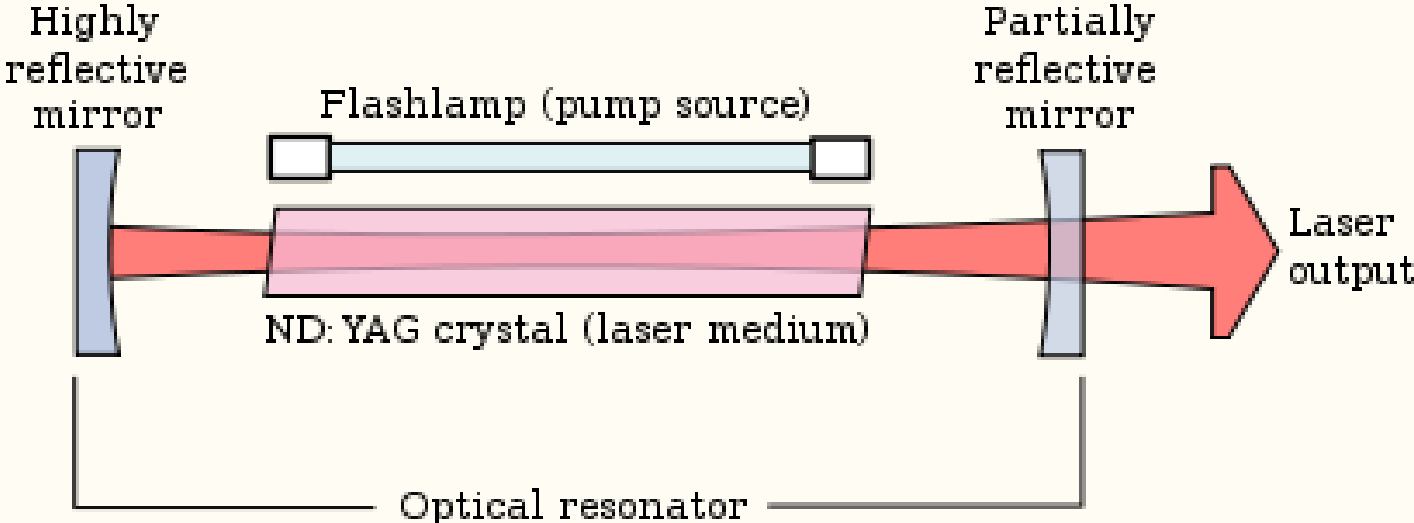


Princip laseru

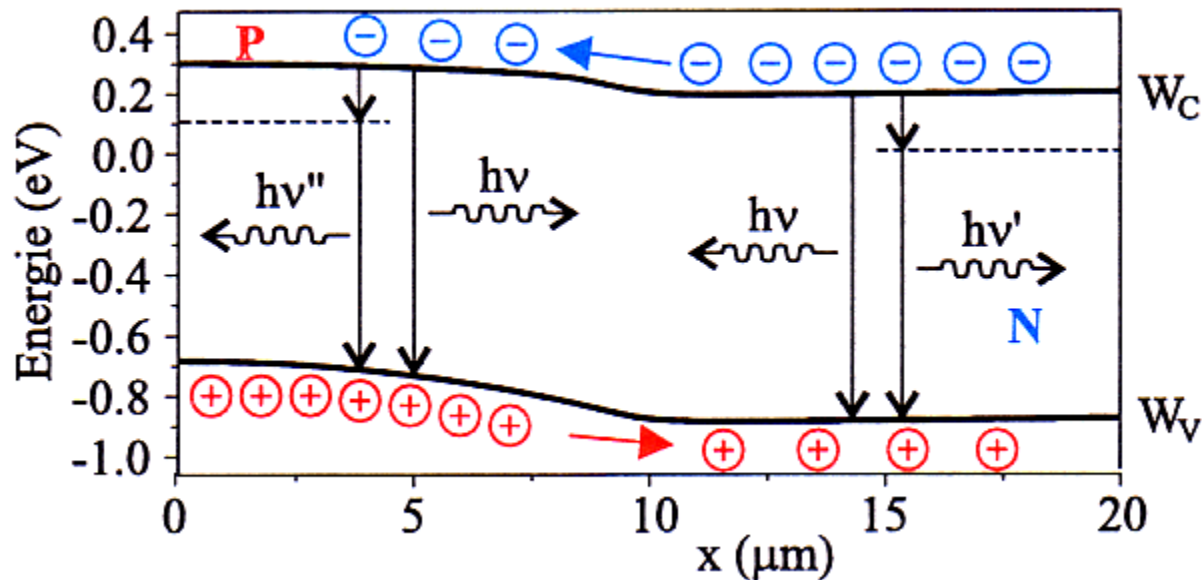




Nd:YAG solid-state laser



LED



Na rozdíl od žárovky fungují LED a LD na **principu elektroluminiscence** polovodičových materiálů. Zde vzniká světlo v důsledku přeskoků elektronů z vyšších energetických pásů do nižších. Rozdíl energie mezi dnem vodivostního a vrchem valenčního pásu pak odpovídá energii vyzářené ve formě fotonu. K tomuto jevu obecně dochází u všech diod, ale pouze v některých případech dojde ke vzniku světelného záření, jinak se elektrická energie mění na tepelnou nebo naopak vzniká neviditelné ultrafialové záření.

Při průchodu elektrického proudu diodou v propustném směru se energie elektronu při mezipásové rekombinaci může uvolnit ve formě fotonu o energii $W = h \cdot \nu$, kde h je Planckova konstanta a ν je frekvence fotonu. K přechodu může dojít také prostřednictvím příměsových hladin v zakázaném pásu. Emitované záření má pak o něco menší energii $h \cdot \nu'$, resp. větší vlnovou délku

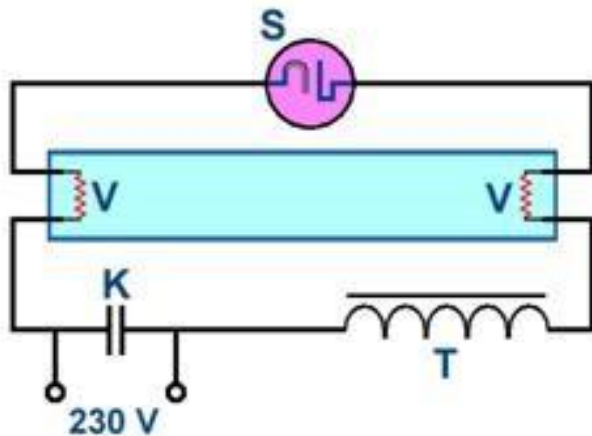
Halogenové žárovky

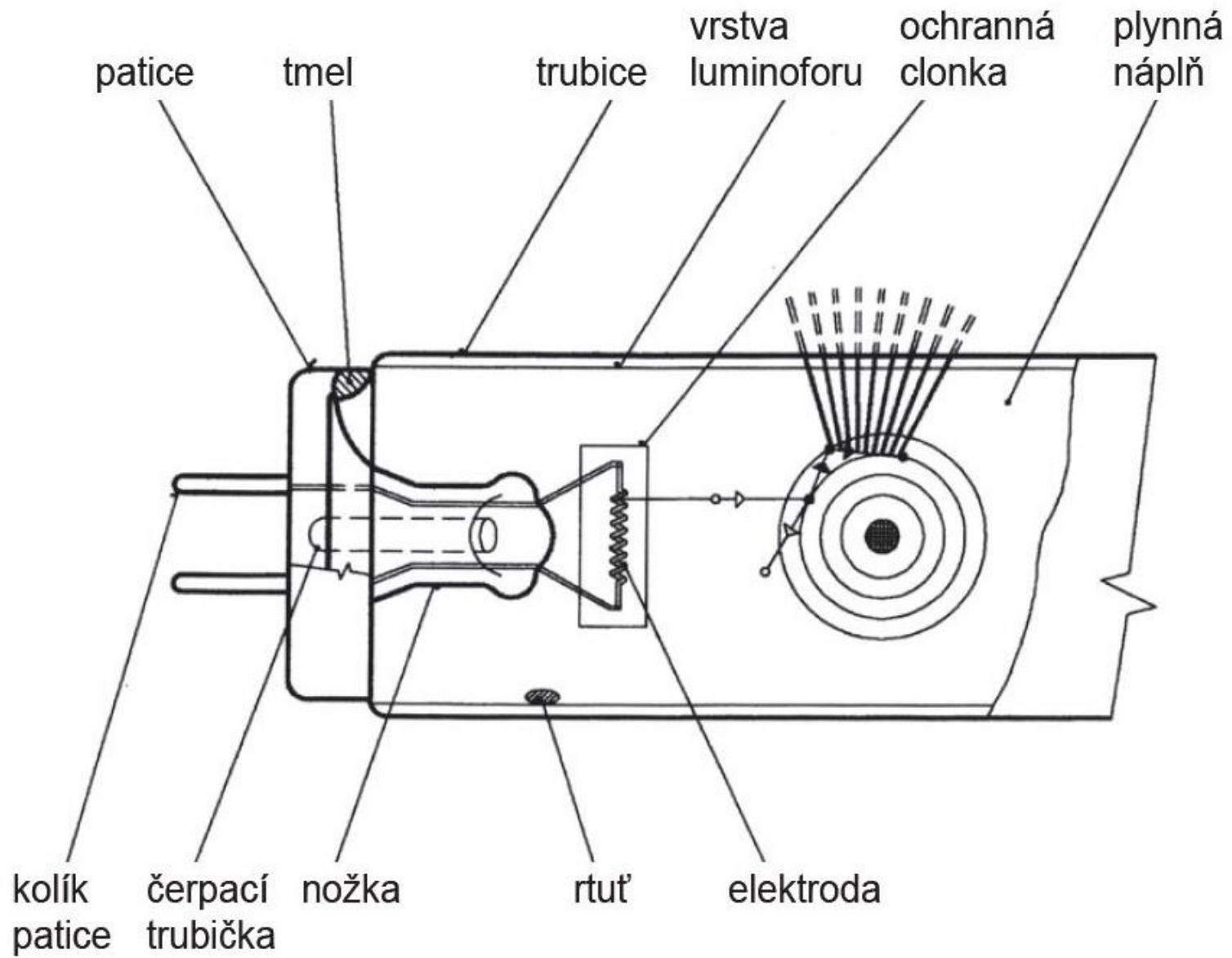
- Halogenové žárovky jsou zdokonalené klasické žárovky. V prostředí baňky jsou halogeny, které pomáhají snižovat odpařování vlákna, a dosahuje se tak vyšší účinnosti. Halogenové žárovky mají světlo podobné klasickým žárovkám.
- O 25-30 % nižší spotřeba energie oproti normální žárovce
- Rychlý start, delší životnost



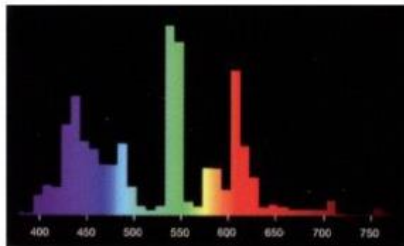
Zářivky

- Zářivka je tvořena především dlouhou trubicí, která je naplněna směsí rtuťových par a argonu. Na koncích trubice jsou elektrody, které jsou pokryty bariem. Z katody, která je rozžhavena asi na $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ emitují elektrony a směřují k opačně nabitě anodě. Elektrické pole je urychluje. Díky tomu, že je trubice vakuovaná (tlak uvnitř je asi 400 Pa), je dráha elektronů, než narazí do nějakého atomu, dostatečně dlouhá, aby elektron získal dostatečnou energii k vyražení dalšího elektronu z atomu. Takto dochází k lavinovité ionizaci a vzniká tzv. doutnavý výboj.
- Někdy energie elektronu nestačí na ionizaci, ale dojde k excitaci – elektron se dostane na vyšší hladinu a posléze zase sestoupí na základní hladinu a následuje emise fotonu
- Emitované fotony mají vln. délku 254 nm (UV světlo)
- Stěny zářivky jsou pokryty luminiscenčním materiálem, který je excitován fotony a emitovány jsou fotony s vyšší vlnovou délkou (viditelné záření)

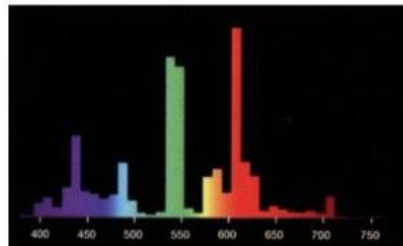




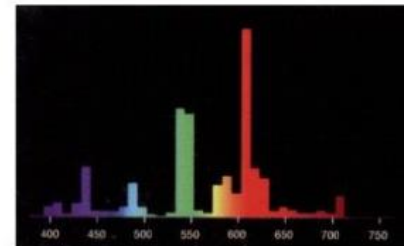
Zářivky - luminifory



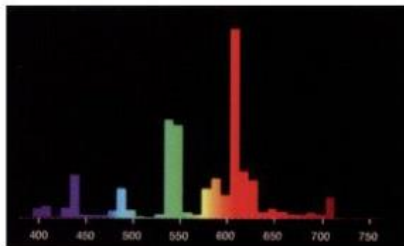
a)



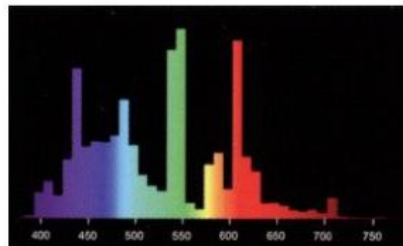
b)



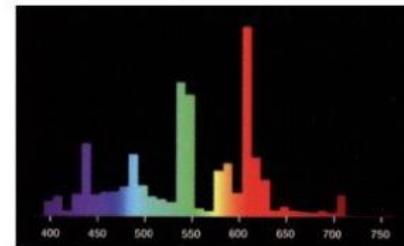
c)



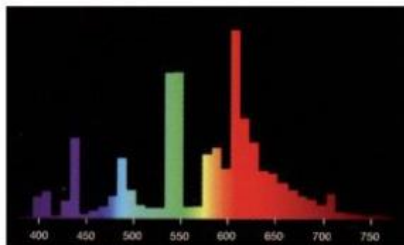
d)



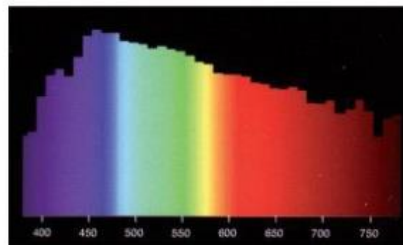
e)



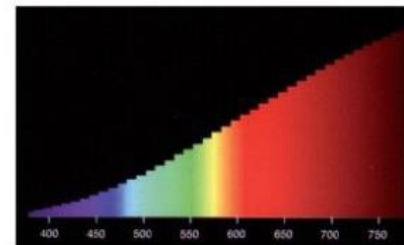
f)



g)



h)



i)

a – žářivka 865 chladně bílá s třípásmovým luminoforem
b – žářivka 840 neutrálně bílá s třípásmovým luminoforem
c – žářivka 830 teple bílá s třípásmovým luminoforem
d – žářivka 827 typu Internat s třípásmovým luminoforem
e – žářivka 965 chladně bílá (denní) de luxe

f – žářivka 940 neutrálně bílá de luxe
g – žářivka 930 teple bílá de luxe
h – denní světlo D65
i – běžná žářovka

Úsporné kompaktní zářivky, tzv. „úsporky“

- Fungují jako zářivky
- Úspora 80 % energie, volba barvy světla
- (údajně) delší výdrž
- Pomalý náběh, obsahuje rtuť a lanthanoidy (nutnost recyklace)
- Neekologická výroba!



Svíčka



Použití luminiscenční spektroskopie v analytické chemii

Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

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

Vysoká citlivost metody:

- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

Luminiscenční stanovení

- nativní luminiscence
- tvorba luminiscenčních komplexů
- luminiscenční značky
- luminiscenční sondy
- propojení s dalšími metodami

Vnitřní a vnější luminiscence

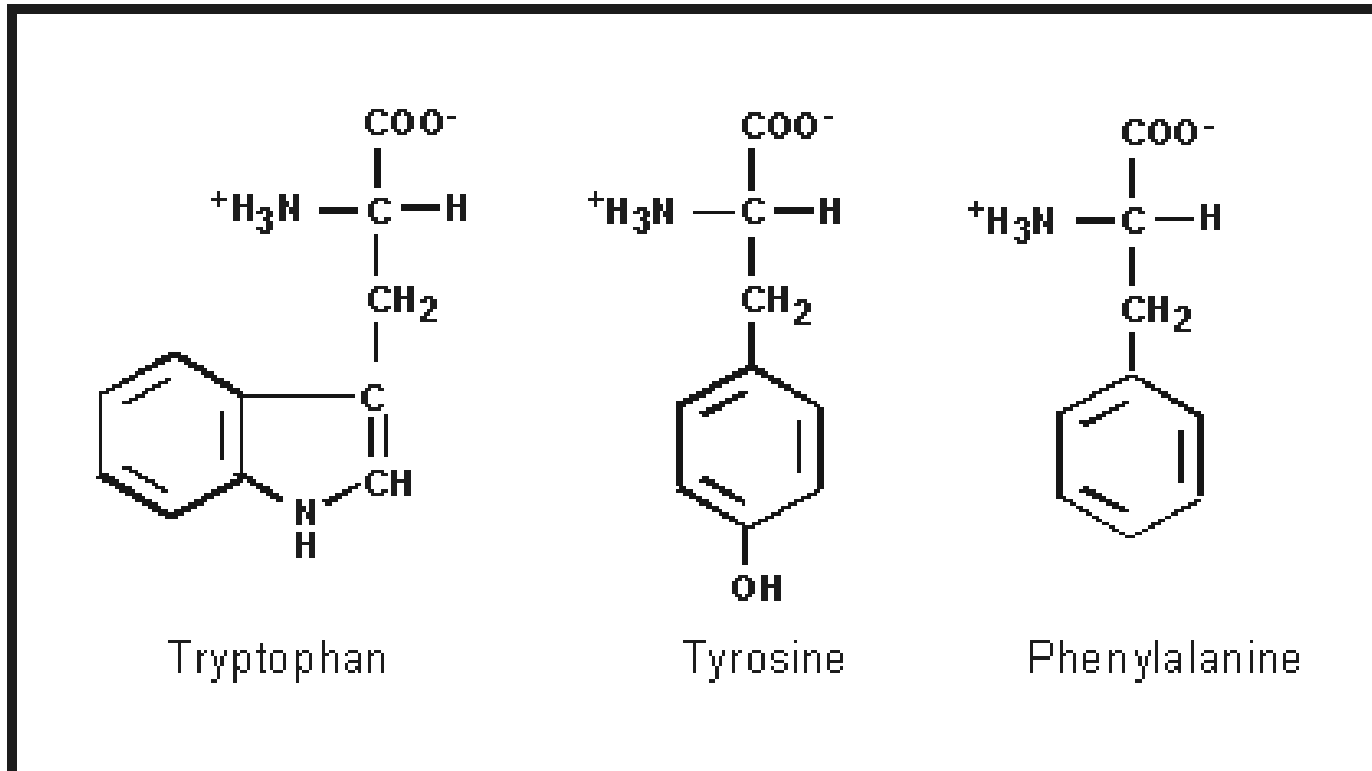
- vnitřní/**intrinsic** (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látké
- vnější/**extrinsic** luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo(barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně se na něj naváže

Nativní luminiscence

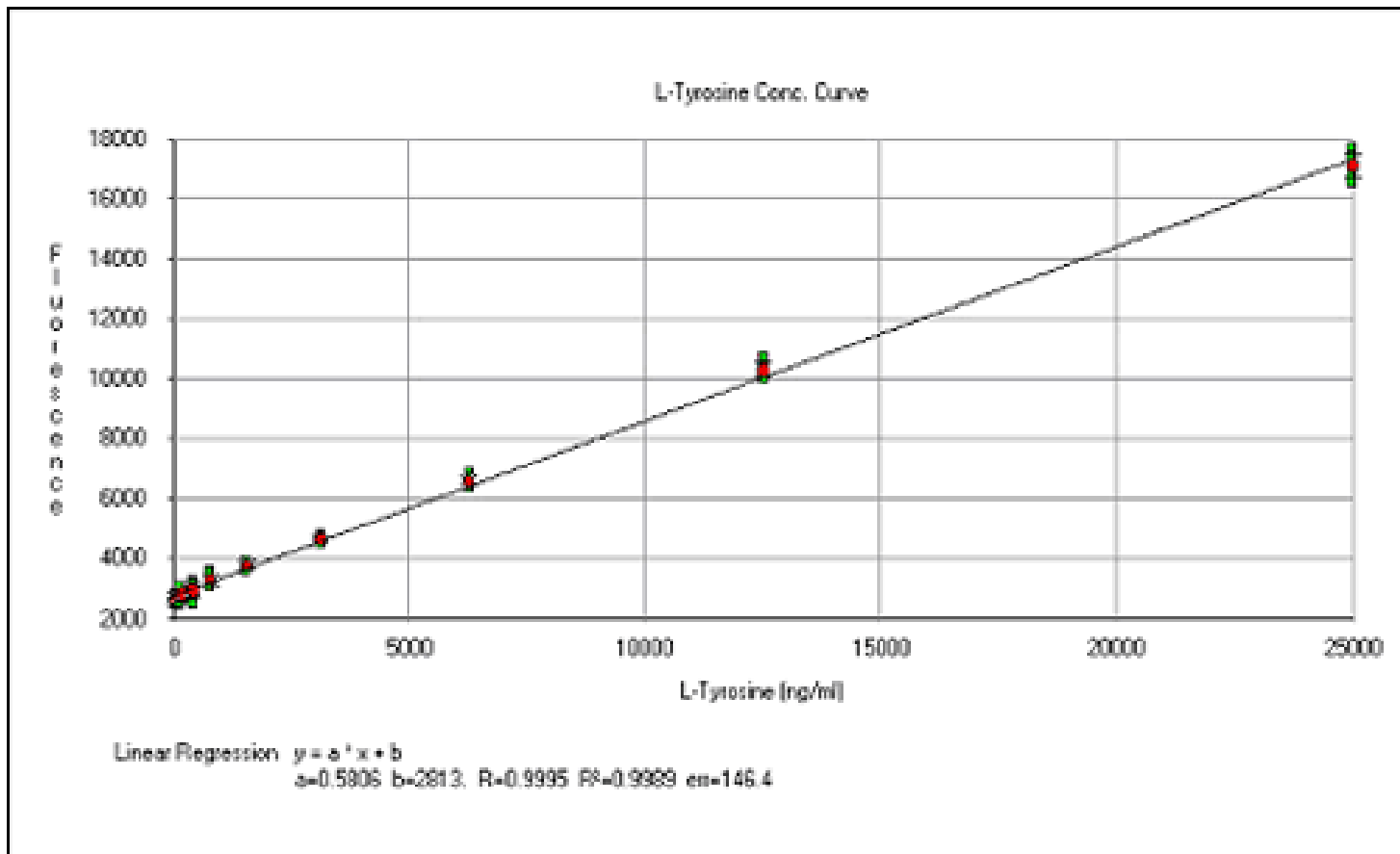
Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

sloučenina	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)
indole group	270-290	330-350
LSD	325	365
quinine	347	448
papaverine	315	347
berberine	352 a 432	548
caffeine	270	303
purine	265	380
adenosine	272	390
cytosine	267	313
uracil	258	309
3-hydroxocoumarin	316	372
riboflavin	370 a 440	565
GFP	400 a 475	510
nicotineamids	470	515
cyanocobalamin	275	305
calciferol	348	420
retinol	325	470

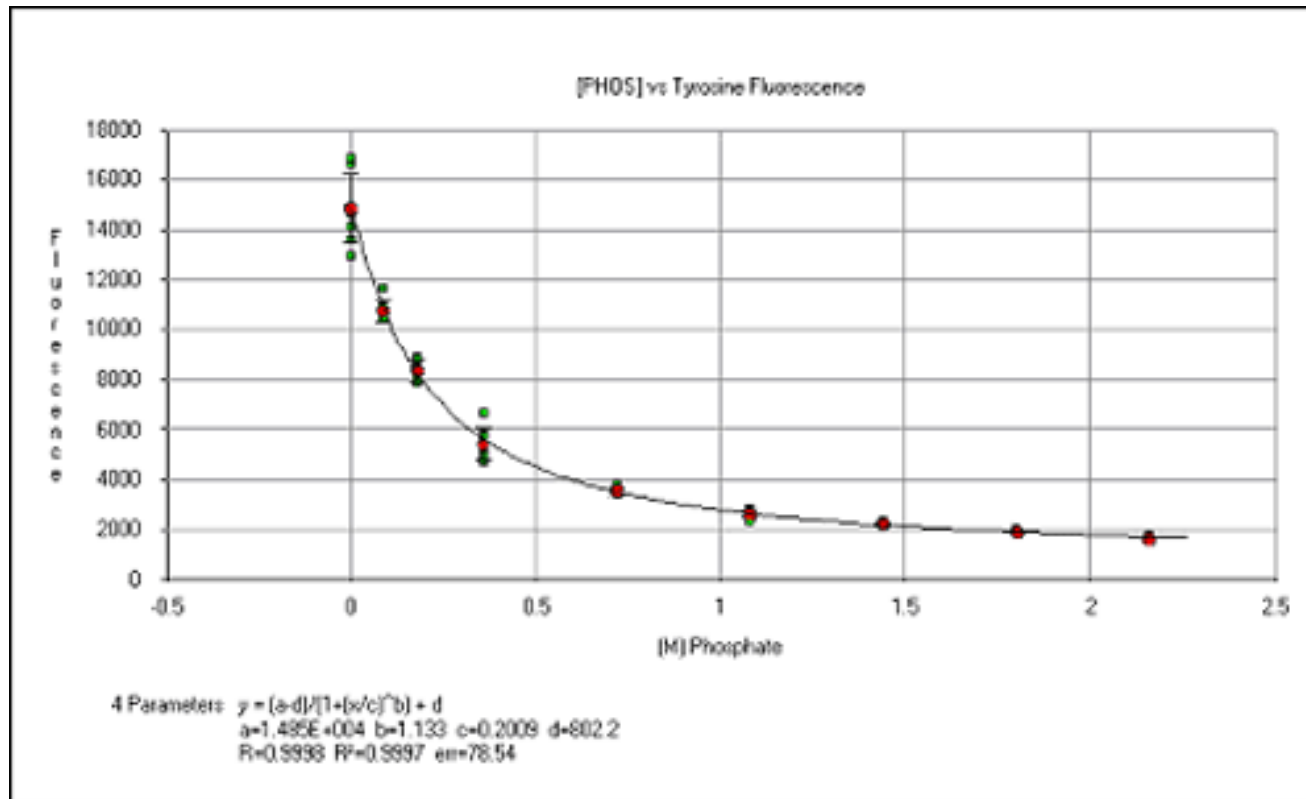
Peptidy, proteiny, AK



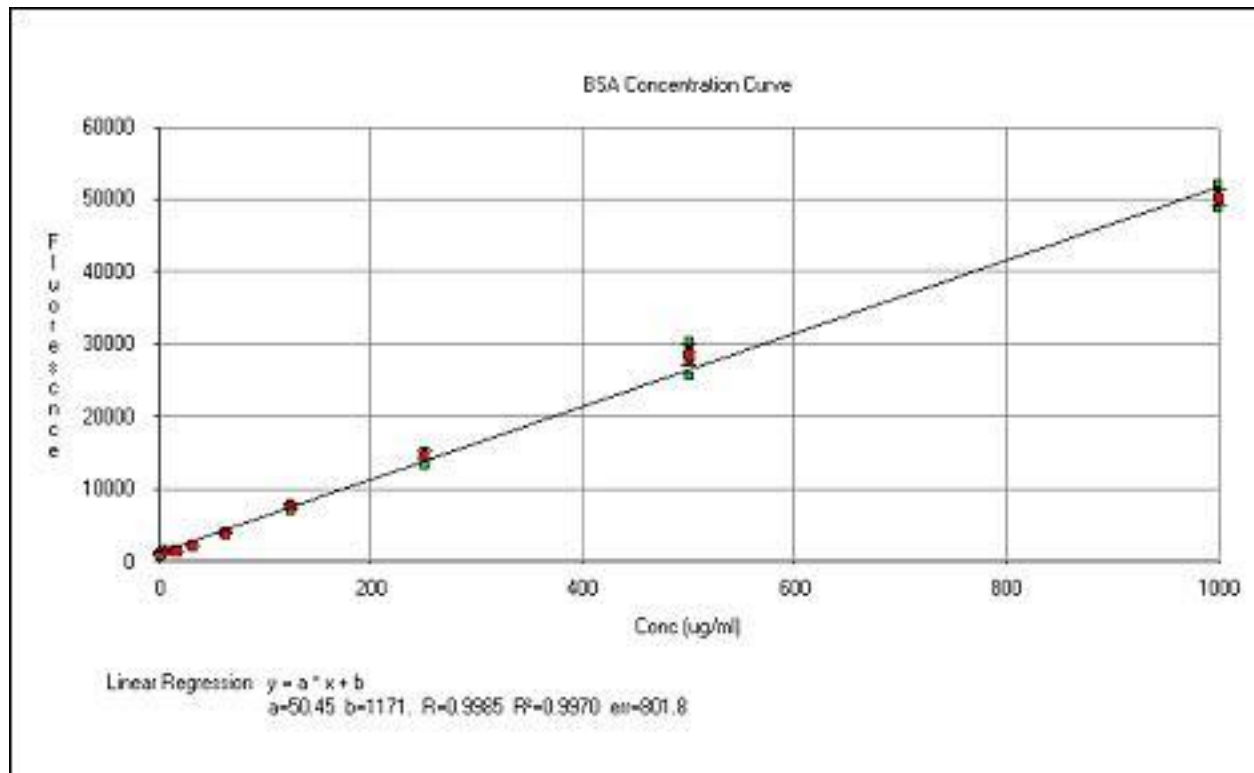
Stanovení aminokyselin



Stanovení aminokyselin



Stanovení proteinů



Nativní fluorescence proteinů – vliv polariry okolního prostředí

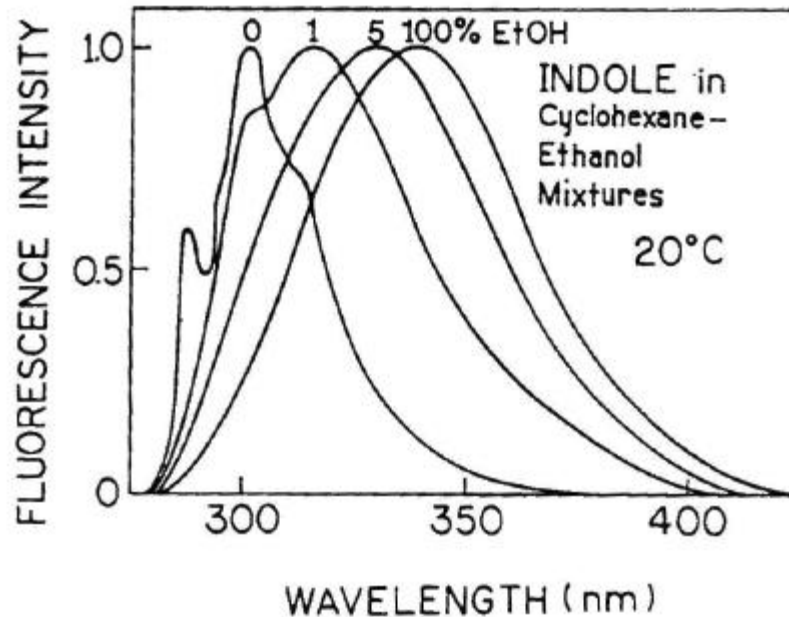
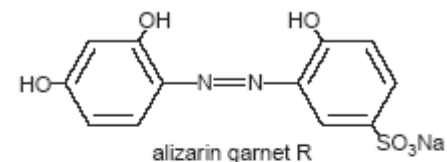


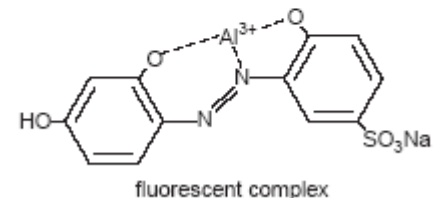
Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

Stanovení anorganických iontů

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} a další
Flavonal	Zr^{2+} , Sn^{4+}
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd^{2+}
1,10 - fenntrolin	Ln^{3+}
Různá azobarviva	Al^{3+} , Be^{2+} , In^{3+} , Hf(IV) , Th(IV) , Sc^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sn(IV) , Y^{3+}
Benzoin	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}



(a)



(b)

Fluorescenční značky a sondy

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

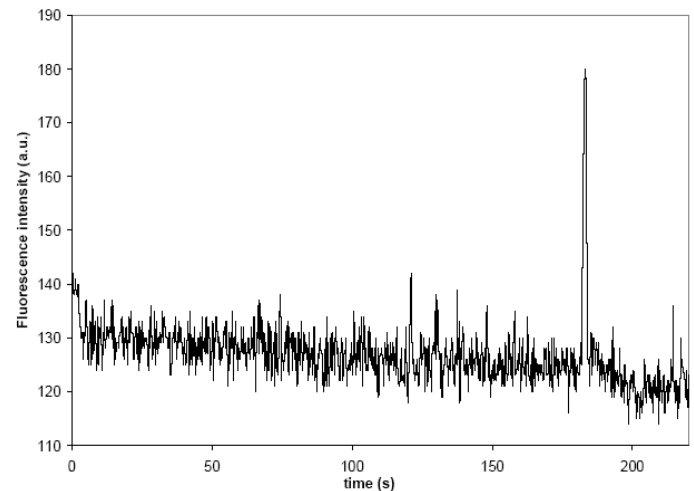
Derivatizace fluoroforem

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

Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

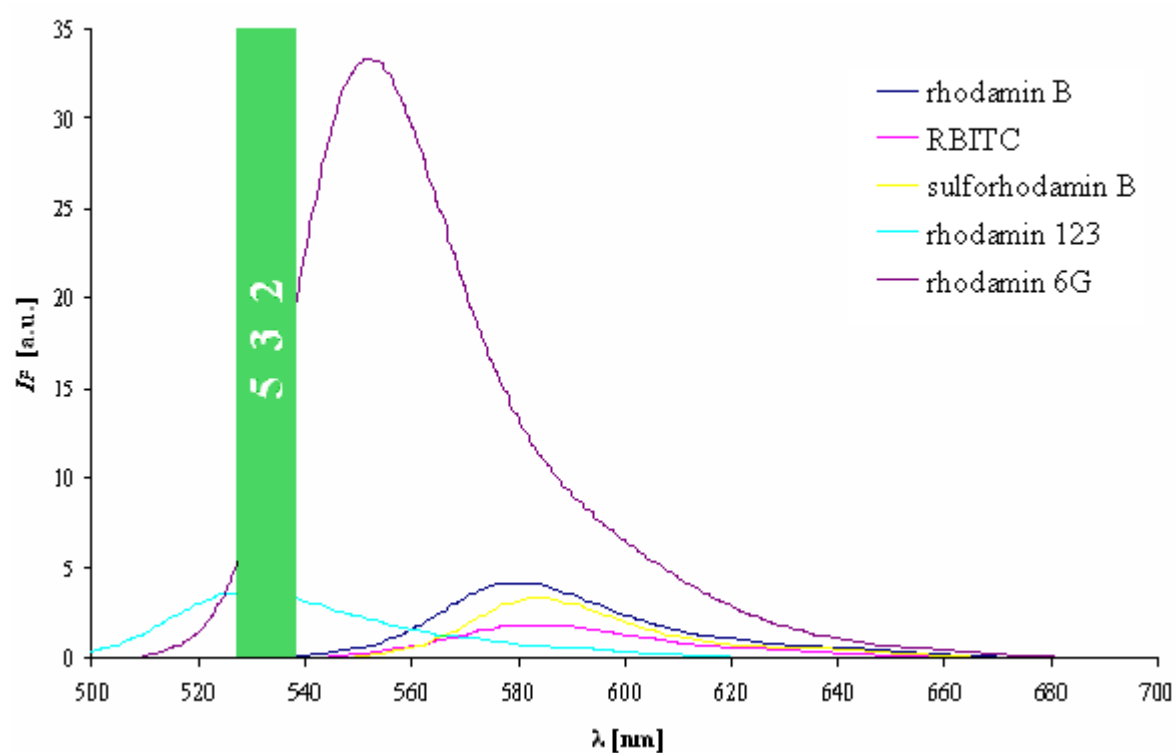
spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

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

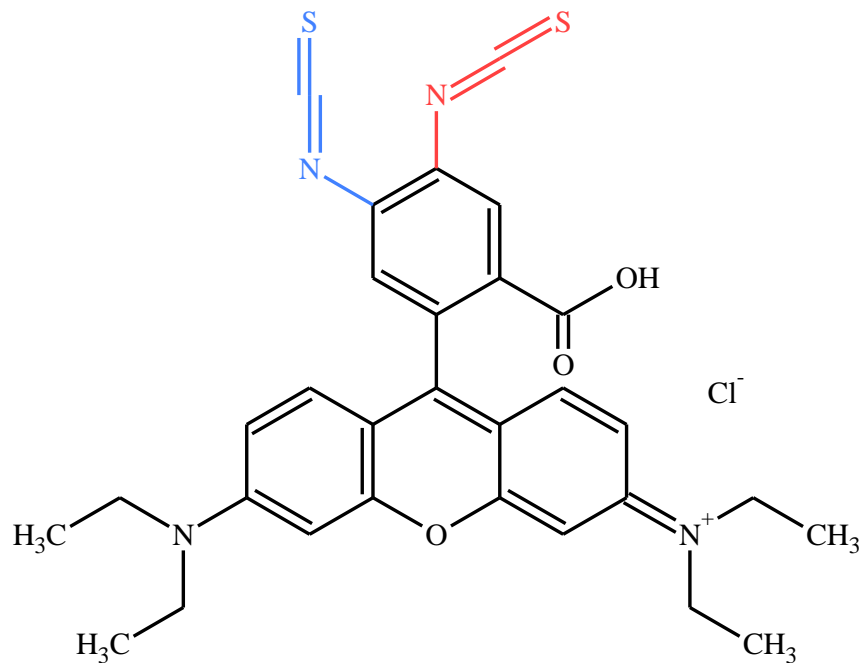
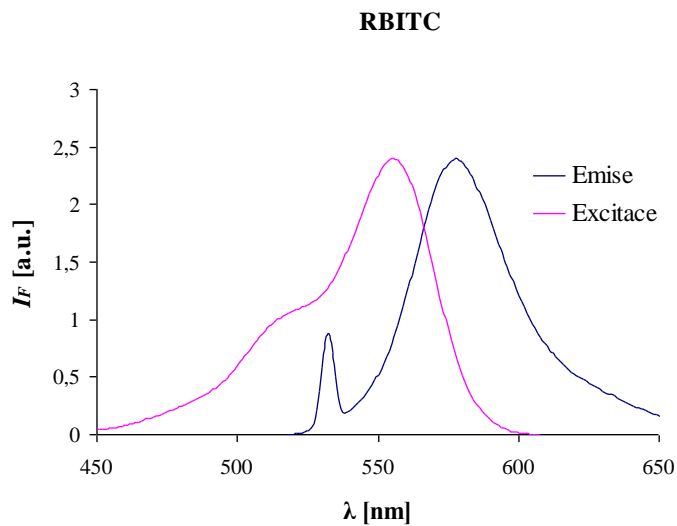
podmínky reakce (pH, koncentrace...)

hydrofobicita

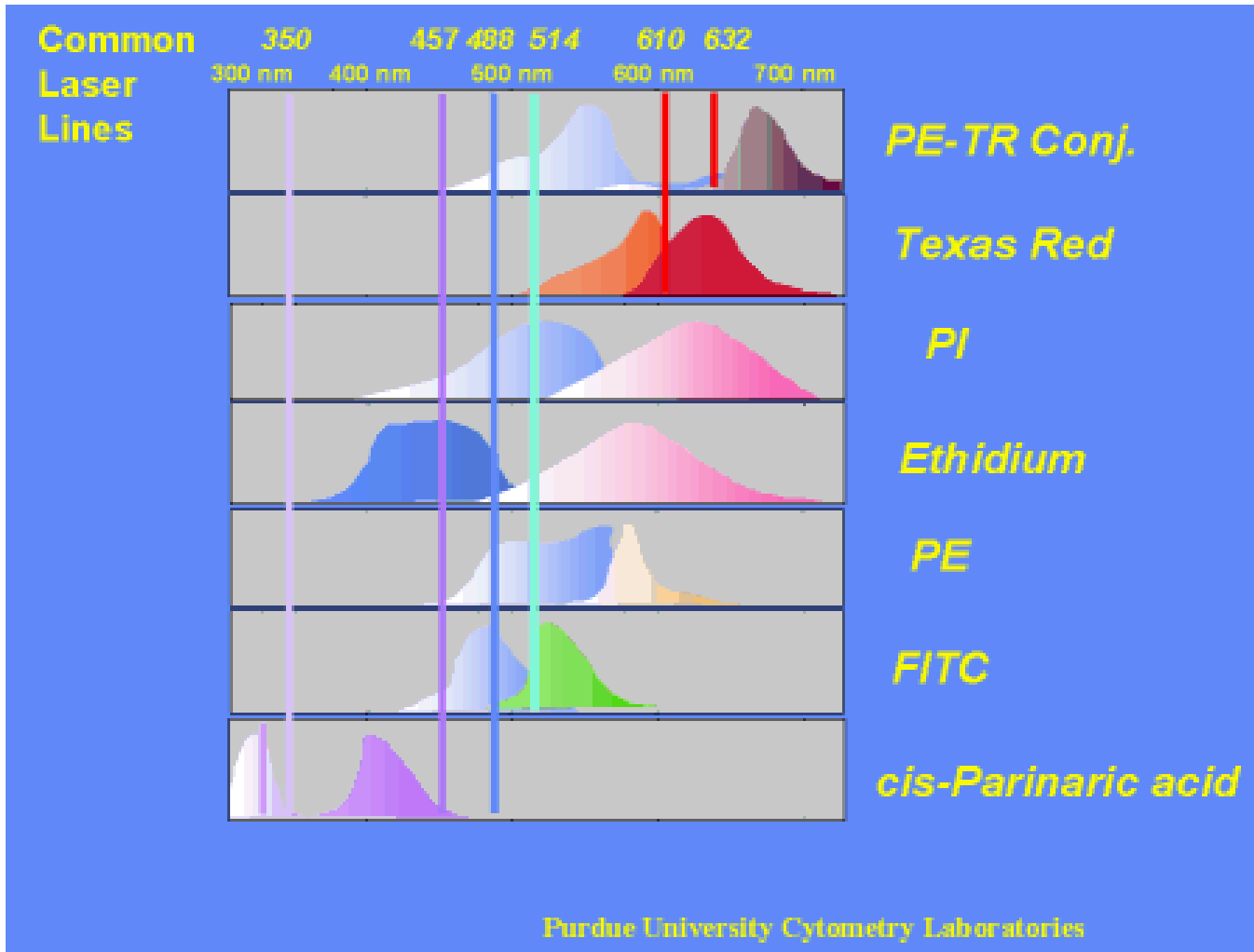
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti

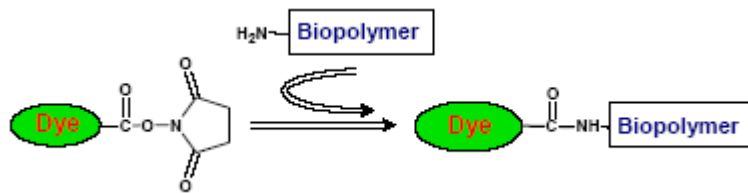


Výběr fluorescenčních barviv



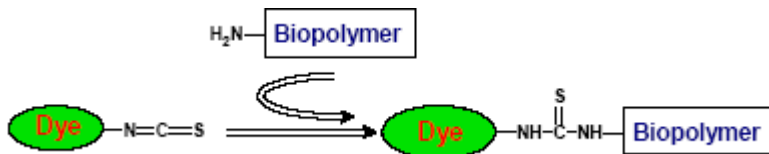
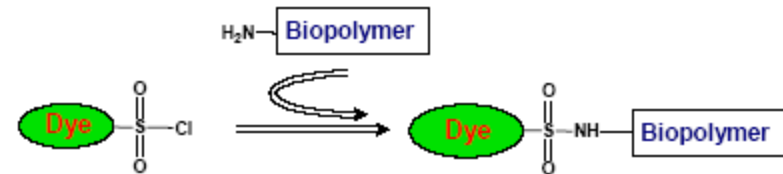
Fluorescenční značky – vazebná místa

amino-reaktivní značky



sukcinimidyl estery (Rh6GSE)

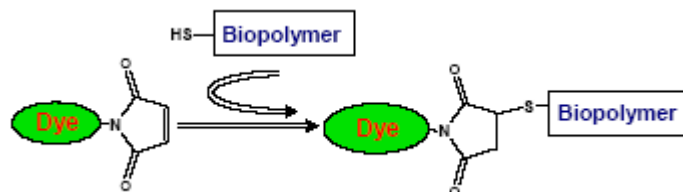
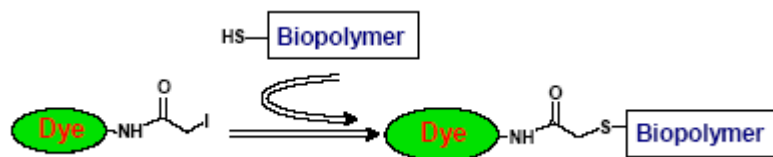
sulfonyl chloridy



isothiokyanáty (FITC, RBITC)

Fluorescenční značky – vazebná místa

thiol-reaktivní značky



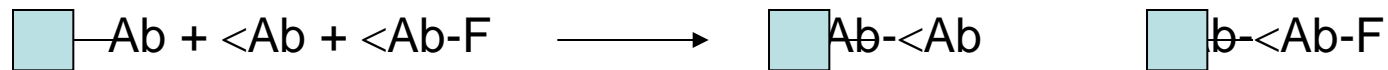
Fluorescenční metody v imunoanalýze

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

Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

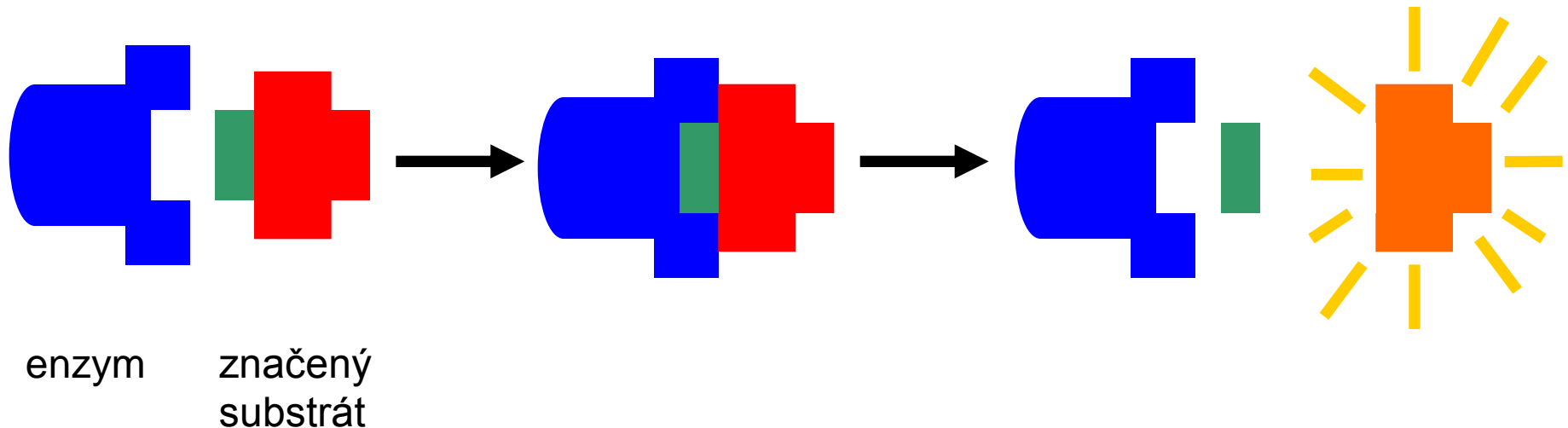
- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- může být použita i **TR-FIA** (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním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



ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

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.

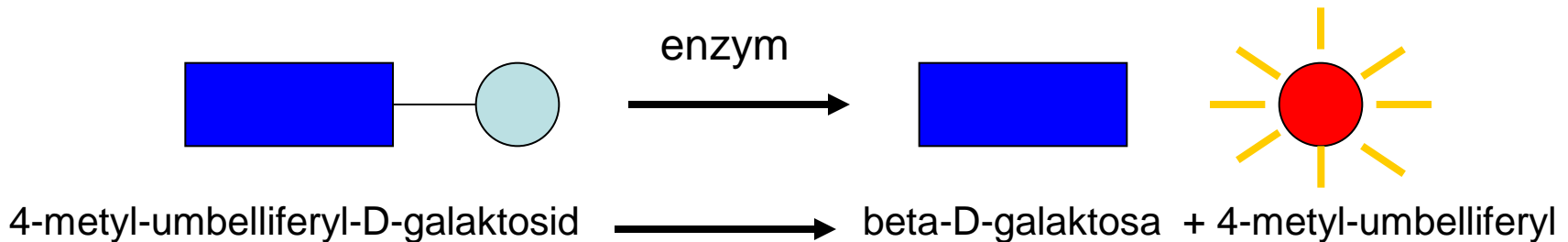


Fluorimetrická EIA

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

Existuje několik možností:

- antigen je značen enzymem
- antigen značený enzymem se sráží s protilátkou
- nesražený antigen s enzymem lze stanovit takto:

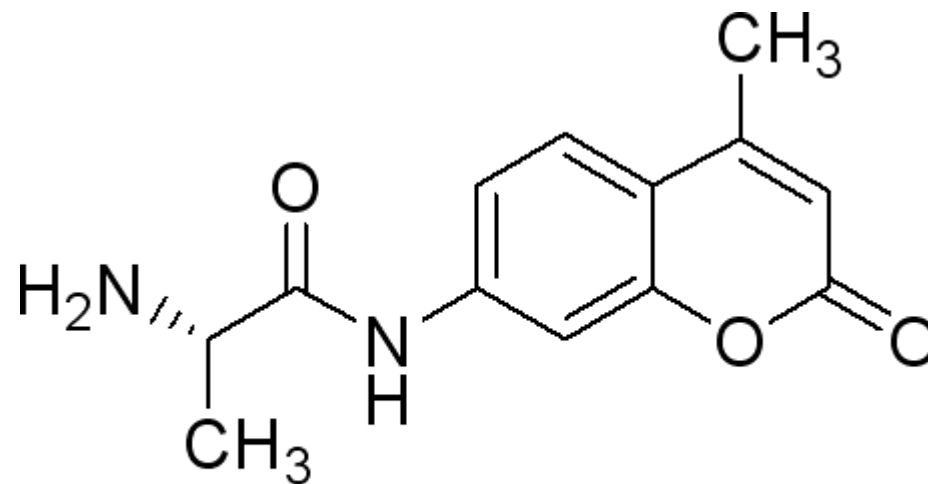


Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

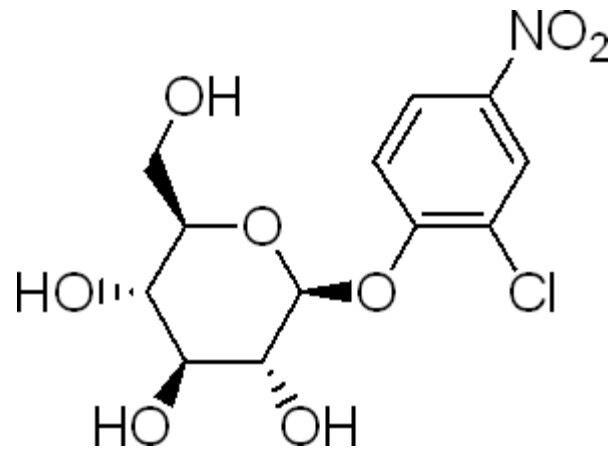
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí

Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

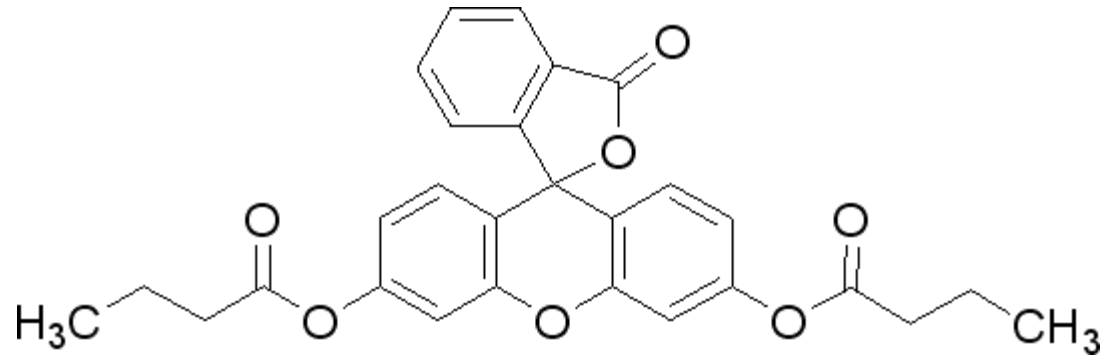
- dříve byla nejcitlivější metodou RIA, ale s příchodem levných laserů je rozšířenější luminiscenční detekce
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až 10^{-12} g.l⁻¹), ale luminiscenční detekce je bezpečnější a levnější



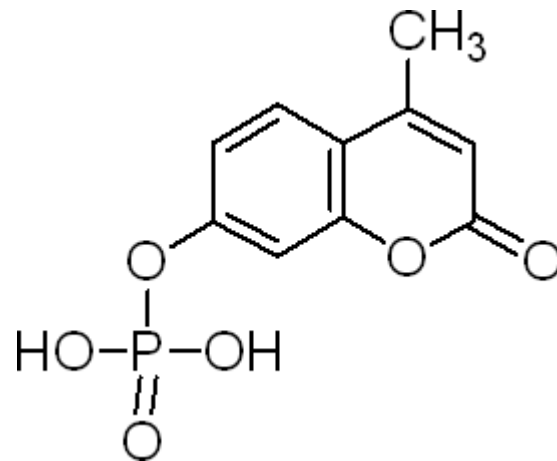
L-Alanine 7-amido-4-methylcoumarin: fluorogenní substrát
pro stanovení Aminopeptidáz



2-Chloro-4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside: fluorogenní substrát
pro stanovení β -Glucosidase

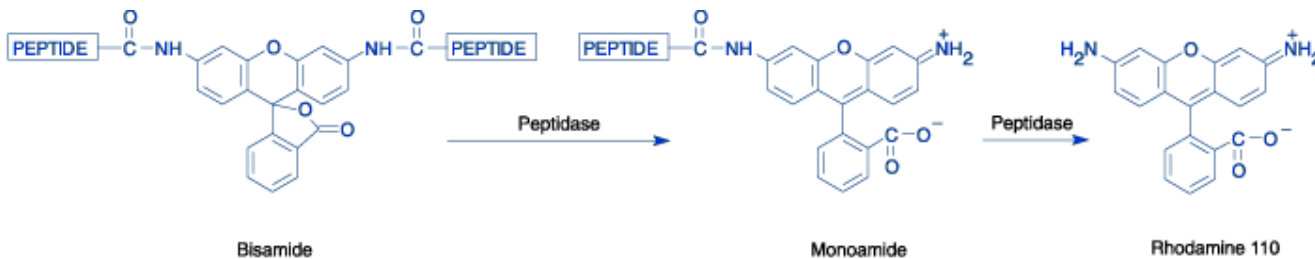
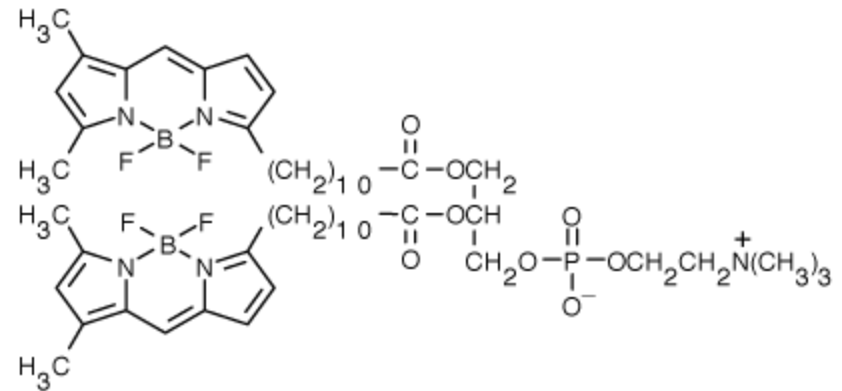
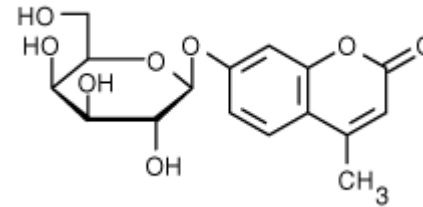
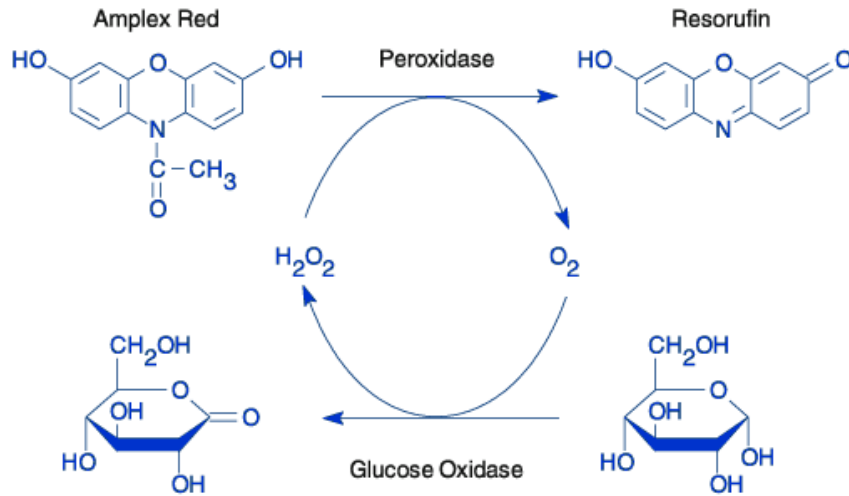


Fluorescein dibutylate: fluorogenní substrát pro stanovení esteráz a lipáz



4-Methylumbelliferyl phosphate: fluorogenní substrát pro stanovení fosfatázy

Fluorogenní substráty



Použití luminiscenční spektroskopie v analytické chemii

Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

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

Vysoká citlivost metody:

- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

Luminiscenční stanovení

- nativní luminiscence
- tvorba luminiscenčních komplexů
- luminiscenční značky
- luminiscenční sondy
- propojení s dalšími metodami

Vnitřní a vnější luminiscence

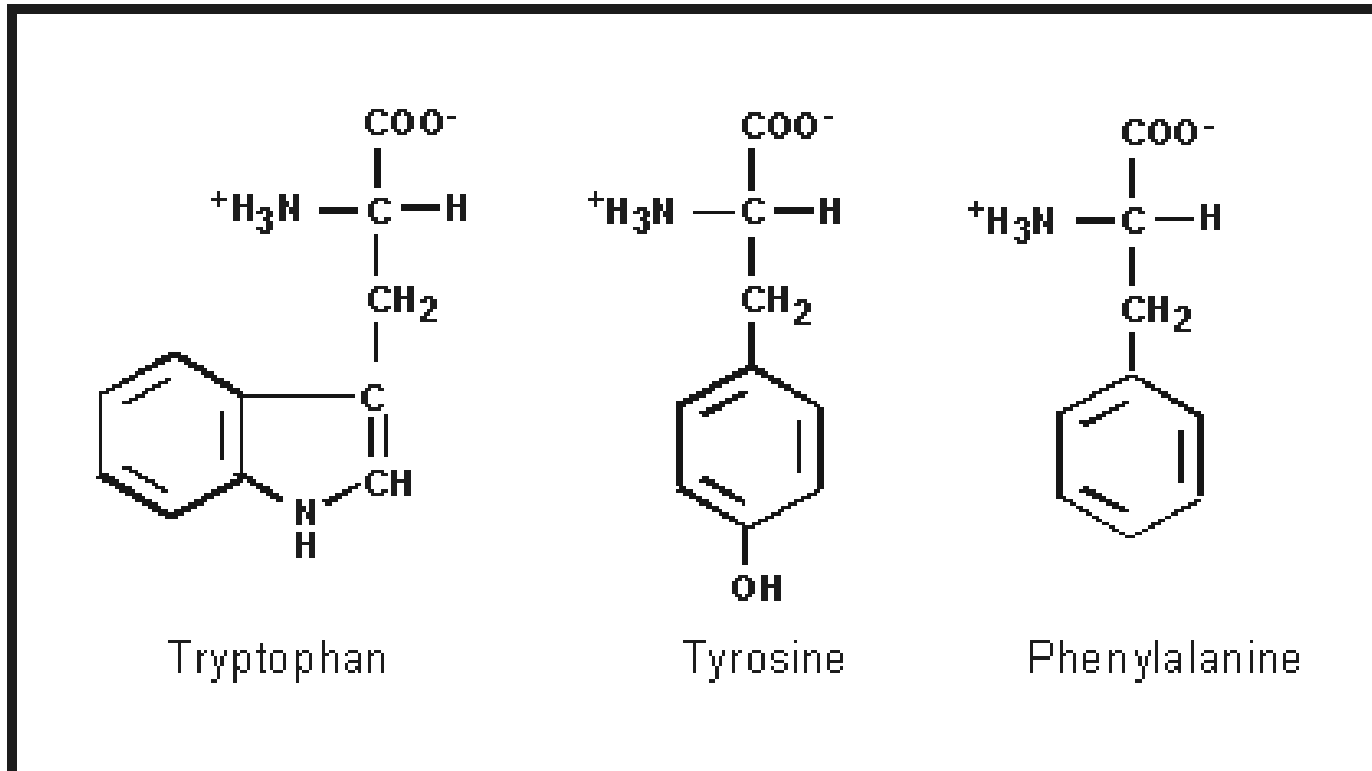
- vnitřní/**intrinsic** (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látké
- vnější/**extrinsic** luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo(barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně se na něj naváže

Nativní luminiscence

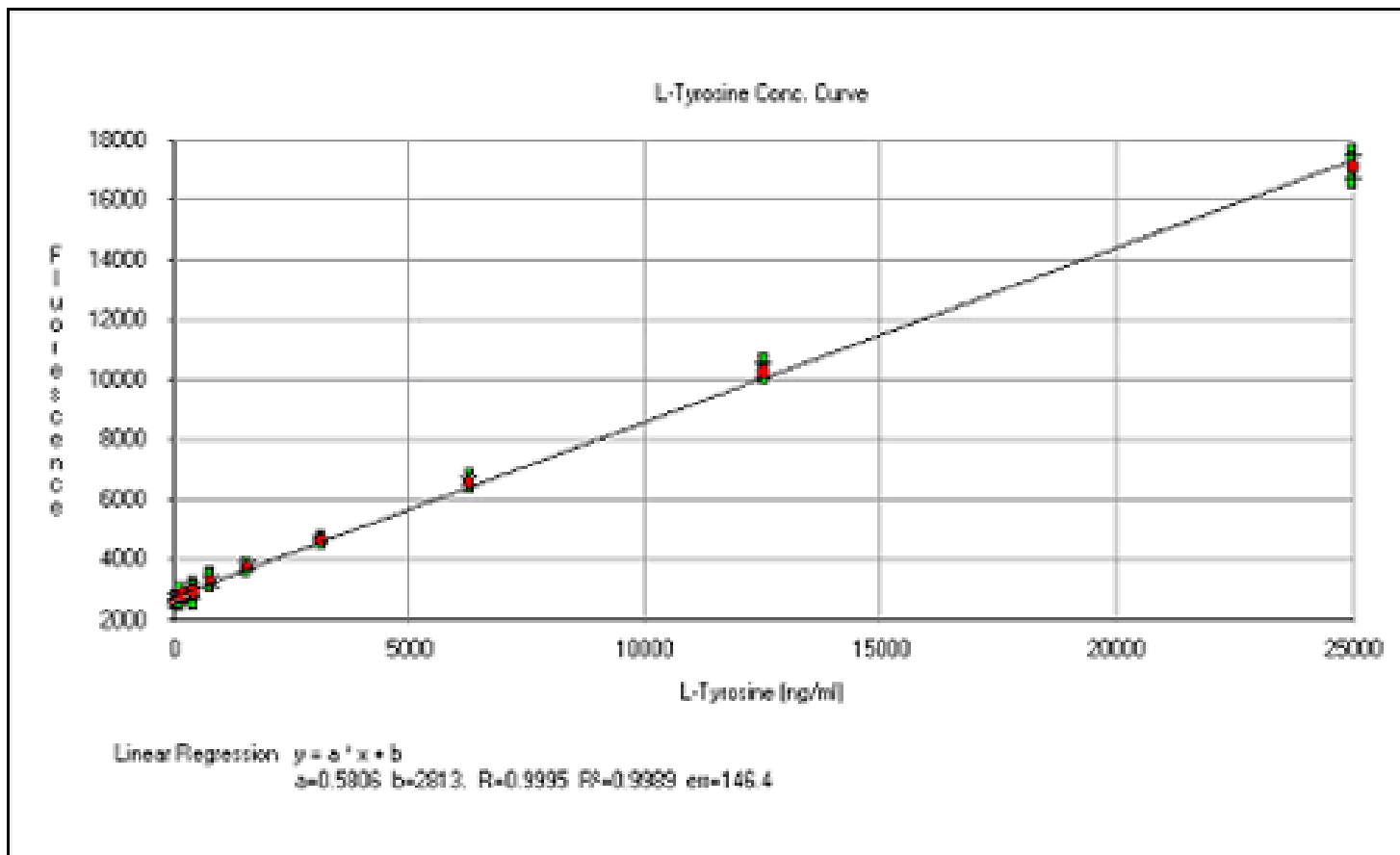
Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

sloučenina	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)
indole group	270-290	330-350
LSD	325	365
quinine	347	448
papaverine	315	347
berberine	352 a 432	548
caffeine	270	303
purine	265	380
adenosine	272	390
cytosine	267	313
uracil	258	309
3-hydroxocoumarin	316	372
riboflavin	370 a 440	565
GFP	400 a 475	510
nicotineamids	470	515
cyanocobalamin	275	305
calciferol	348	420
retinol	325	470

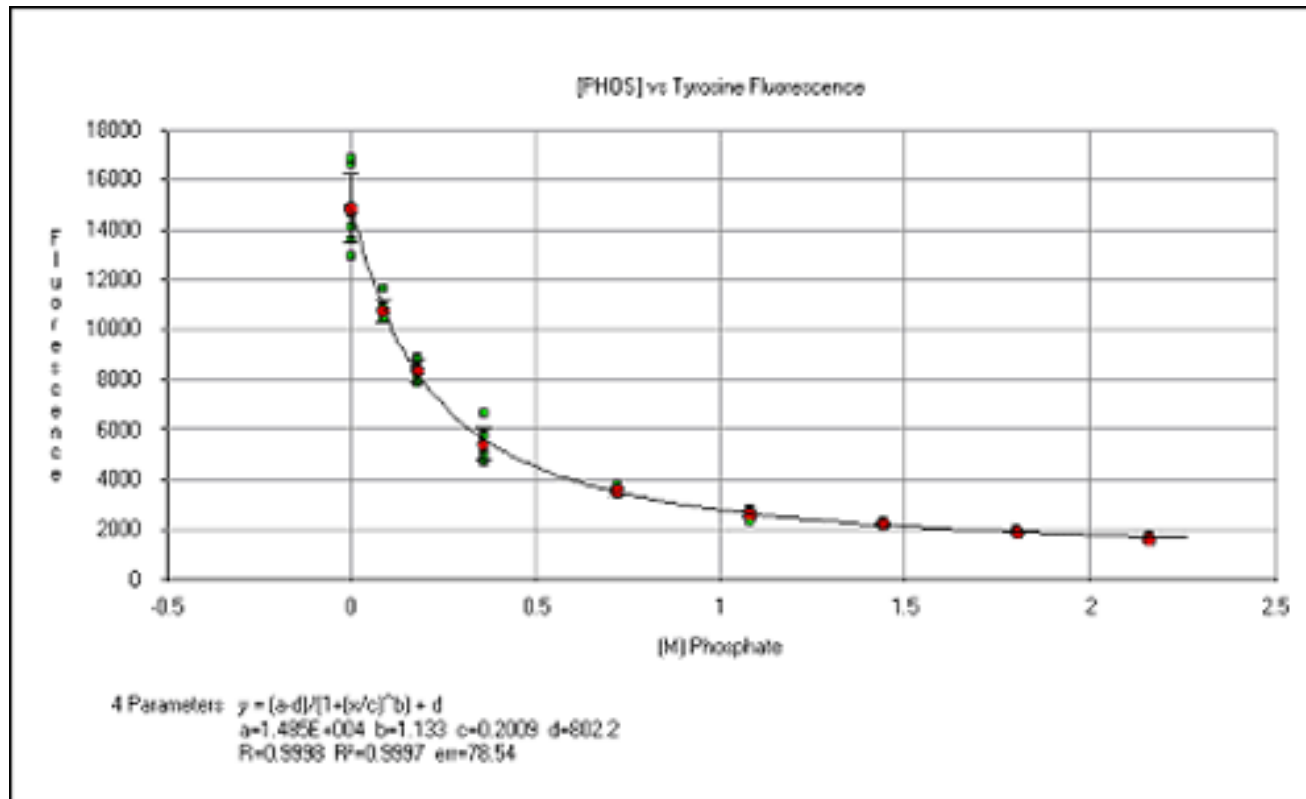
Peptidy, proteiny, AK



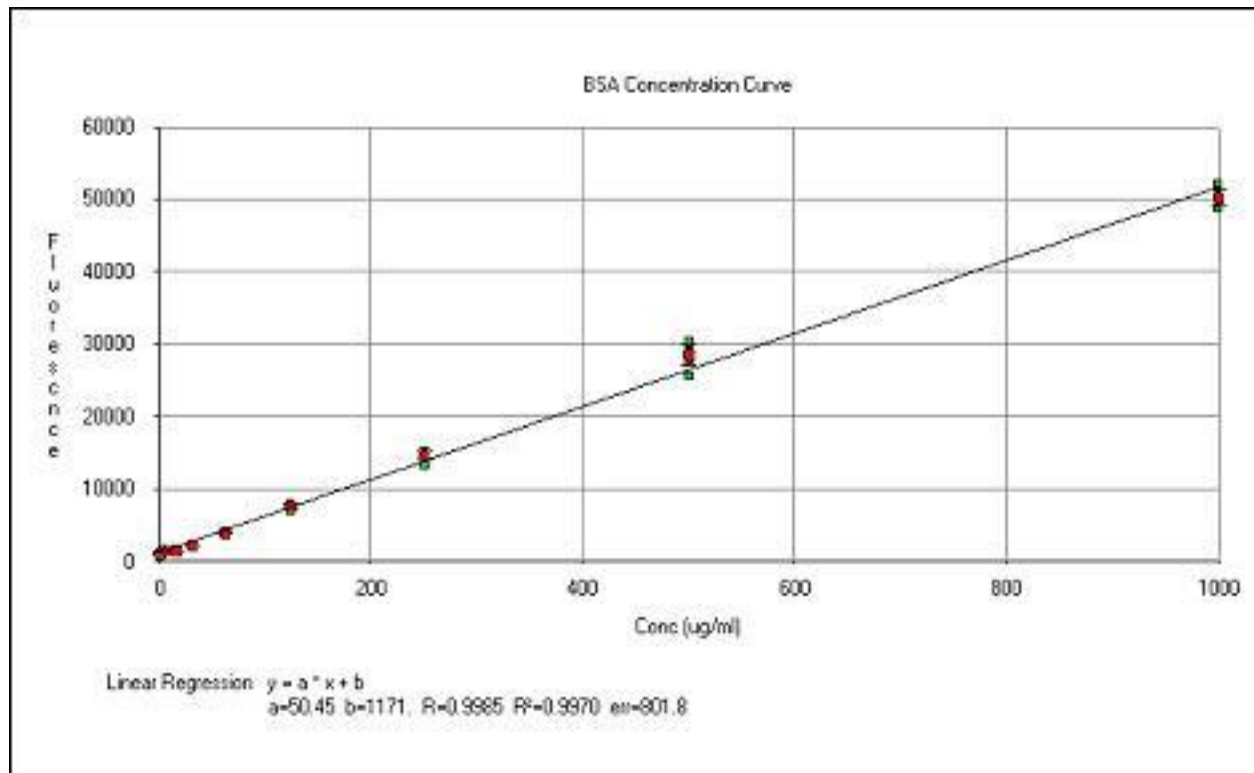
Stanovení aminokyselin



Stanovení aminokyselin



Stanovení proteinů



Nativní fluorescence proteinů – vliv polariry okolního prostředí

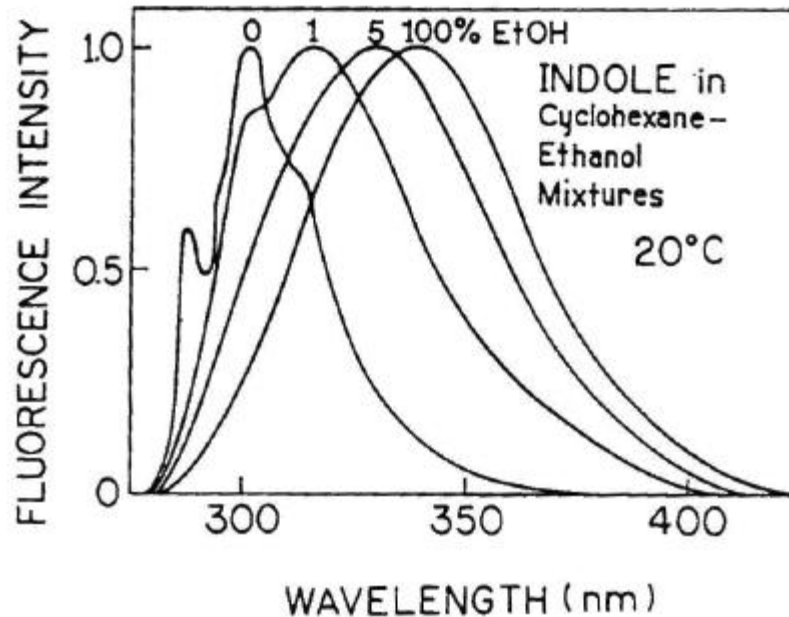
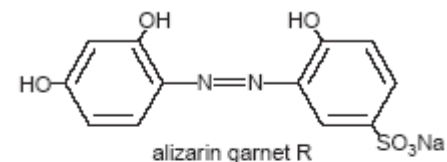


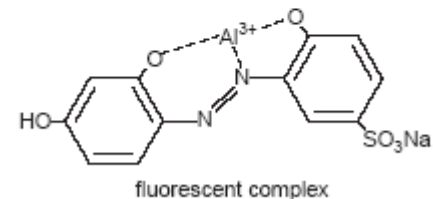
Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

Stanovení anorganických iontů

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} a další
Flavonal	Zr^{2+} , Sn^{4+}
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd^{2+}
1,10 - fenntrolin	Ln^{3+}
Různá azobarviva	Al^{3+} , Be^{2+} , In^{3+} , $\text{Hf}(\text{IV})$, $\text{Th}(\text{IV})$, Sc^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , $\text{Sn}(\text{IV})$, Y^{3+}
Benzoin	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}



(a)



(b)

Fluorescenční značky a sondy

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

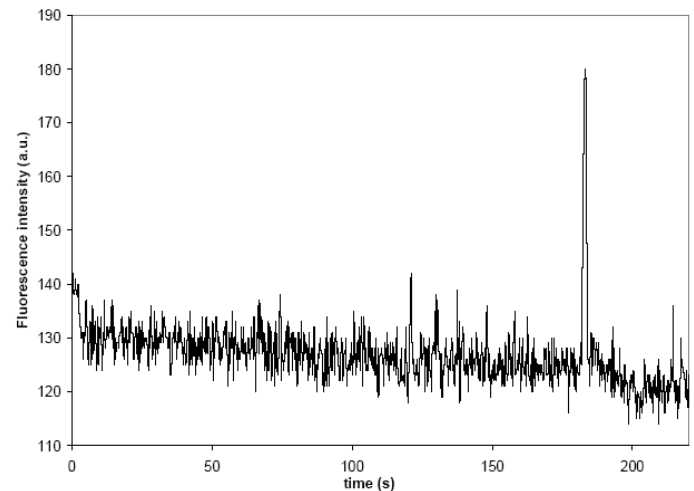
Derivatizace fluoroforem

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

Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

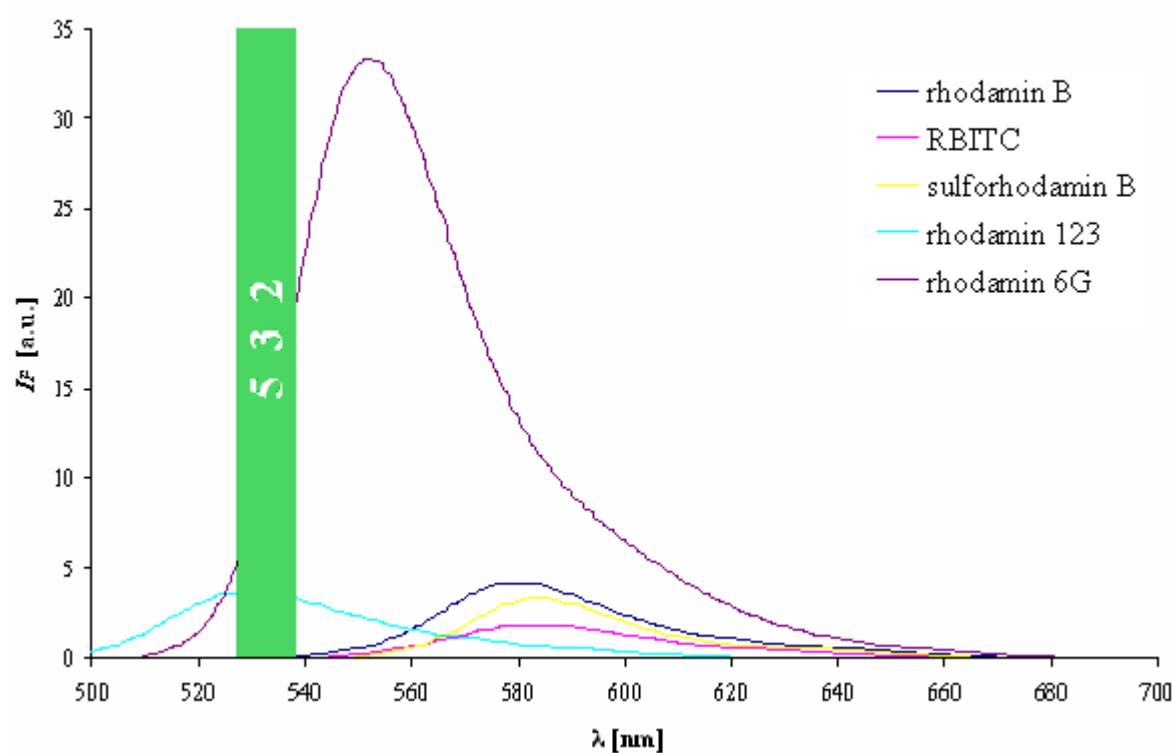
spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

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

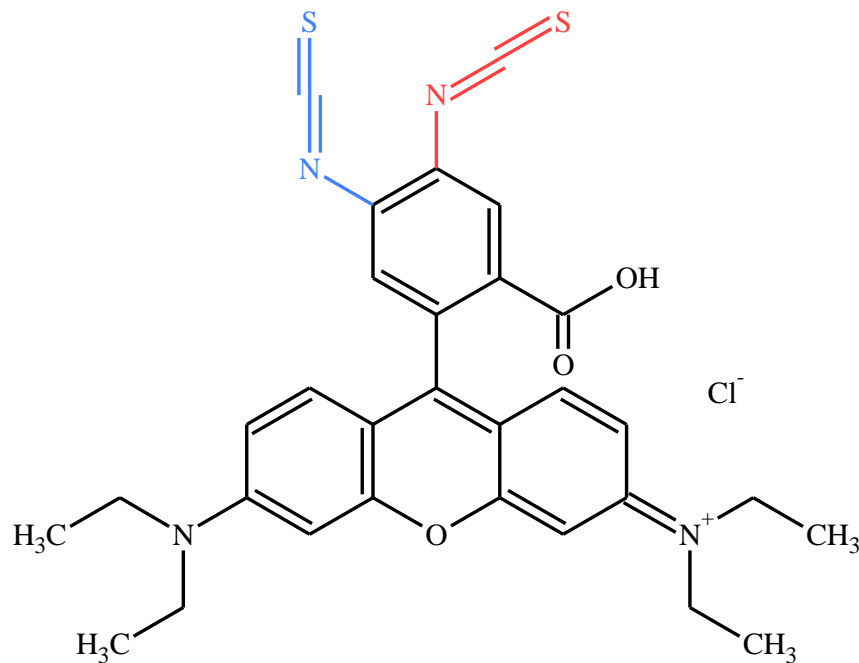
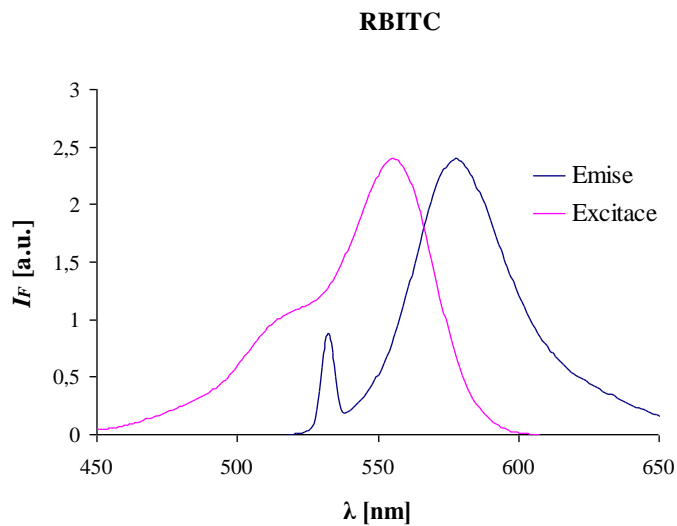
podmínky reakce (pH, koncentrace...)

hydrofobicita

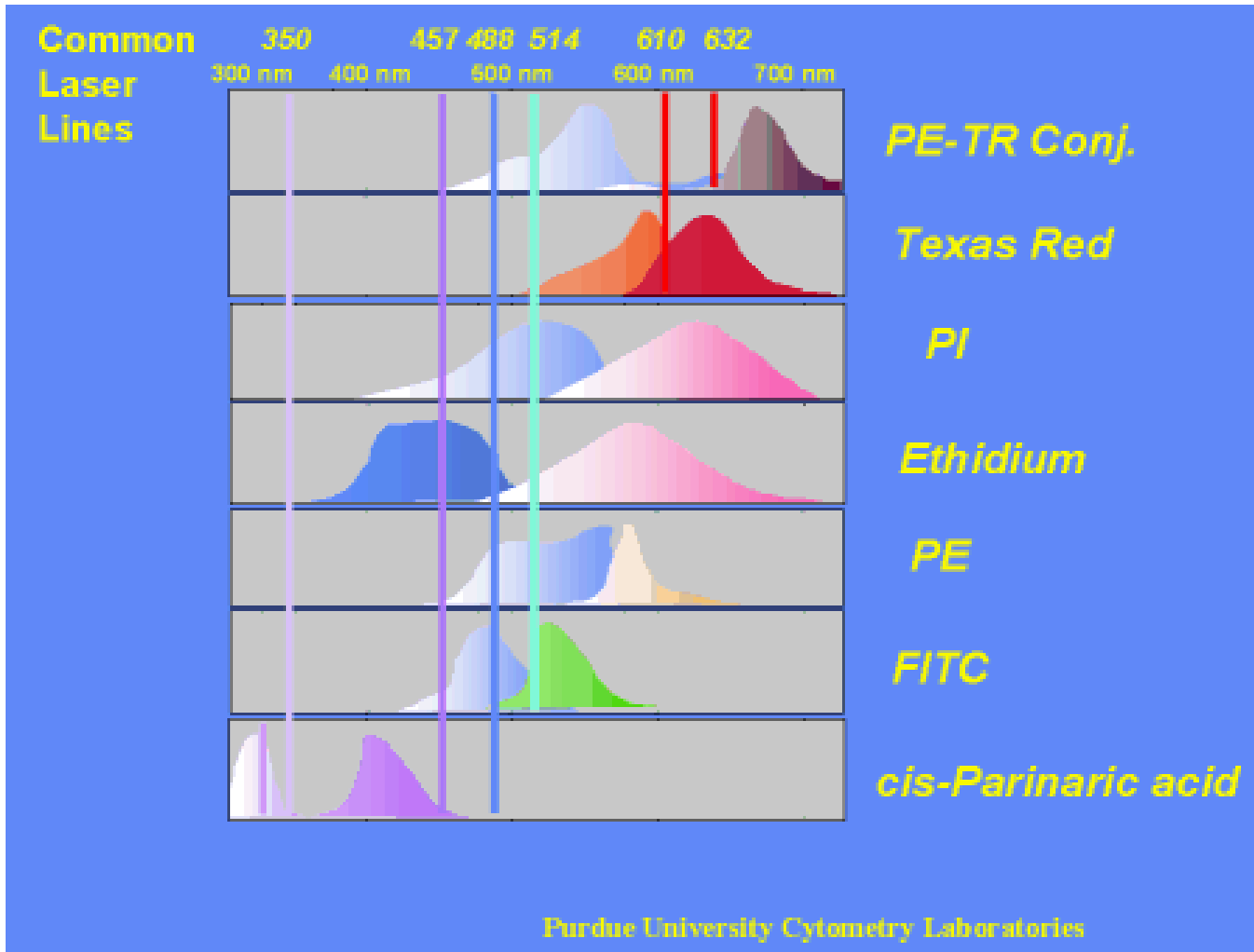
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti

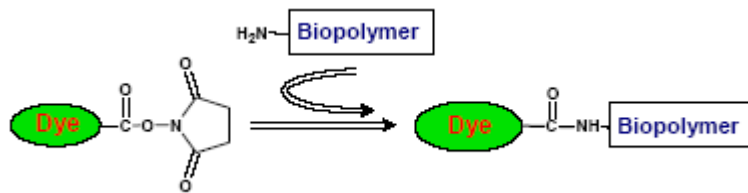


Výběr fluorescenčních barviv



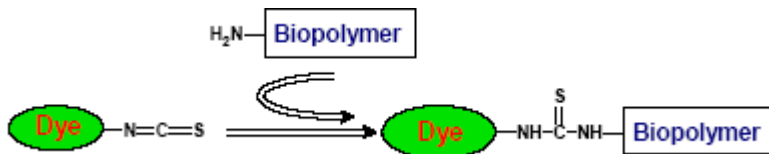
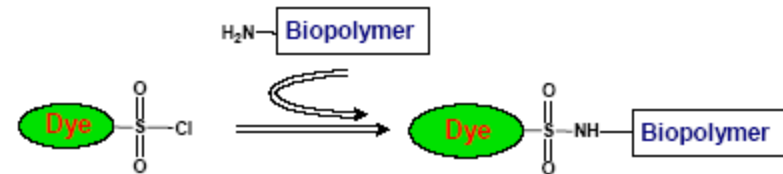
Fluorescenční značky – vazebná místa

amino-reaktivní značky



sukcinimidyl estery (Rh6GSE)

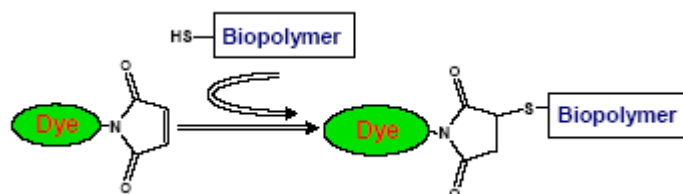
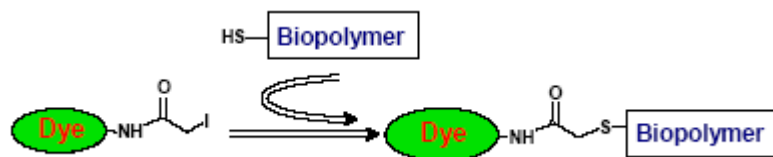
sulfonyl chloridy



isothiokyanáty (FITC, RBITC)

Fluorescenční značky – vazebná místa

thiol-reaktivní značky



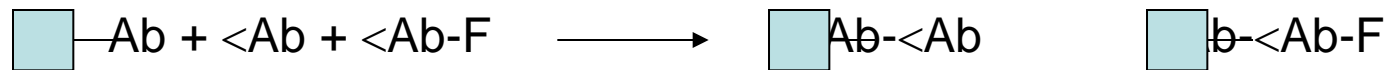
Fluorescenční metody v imunoanalýze

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

Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

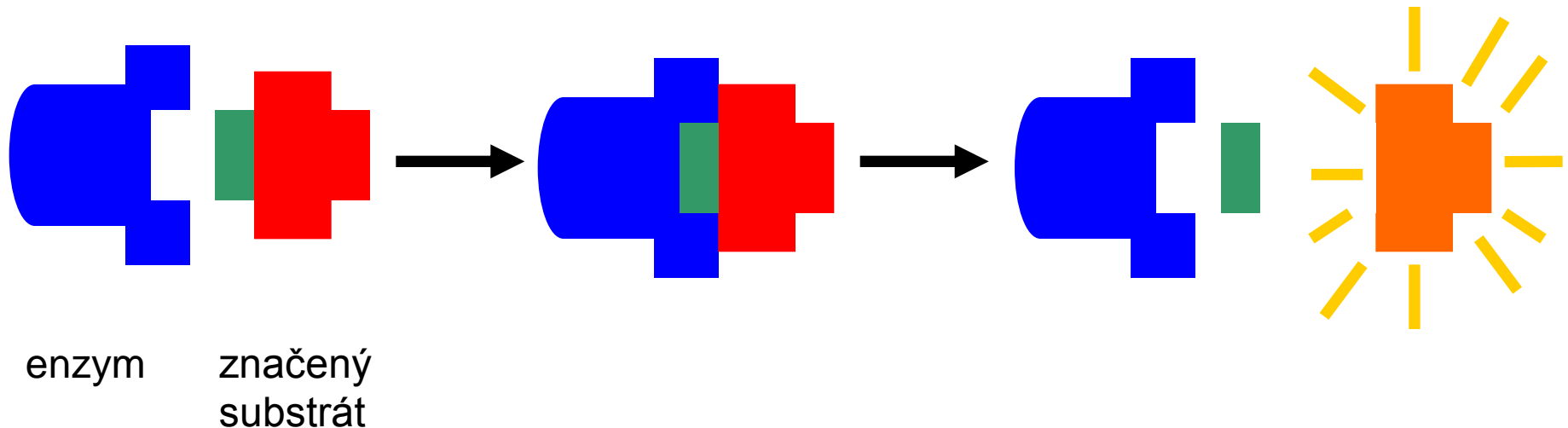
- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- může být použita i **TR-FIA** (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním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



ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

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.

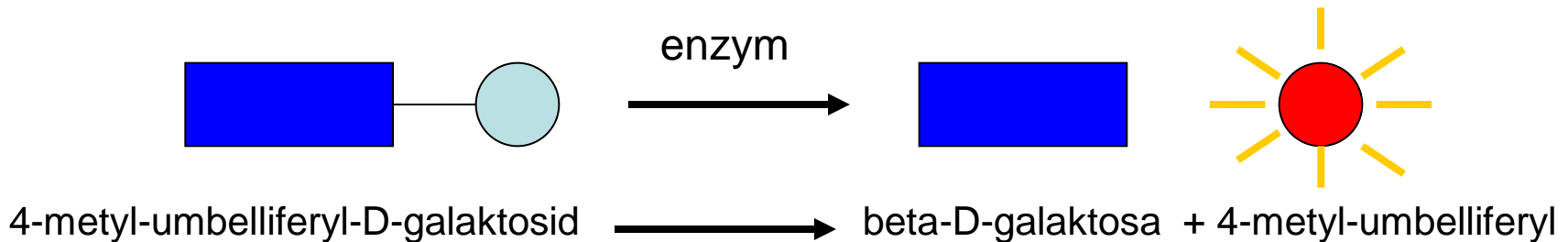


Fluorimetrická EIA

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

Existuje několik možností:

- antigen je značen enzymem
- antigen značený enzymem se sráží s protilátkou
- nesražený antigen s enzymem lze stanovit takto:

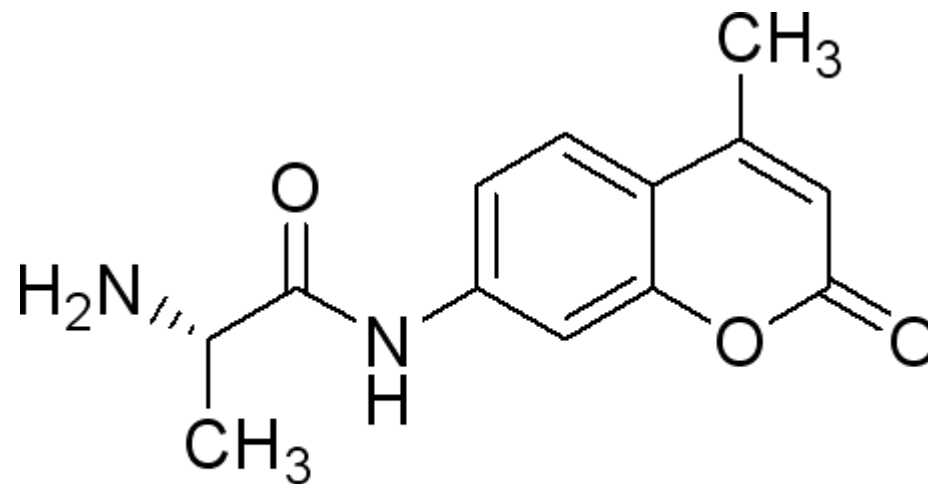


Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

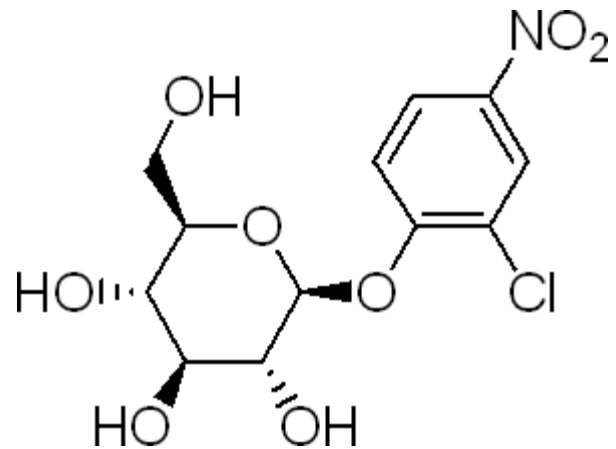
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí

Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

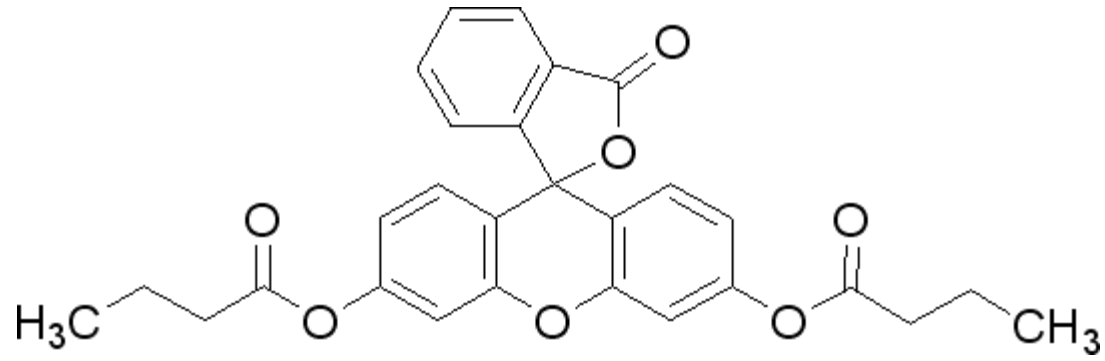
- dříve byla nejcitlivější metodou RIA, ale s příchodem levných laserů je rozšířenější luminiscenční detekce
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až 10^{-12} g.l⁻¹), ale luminiscenční detekce je bezpečnější a levnější



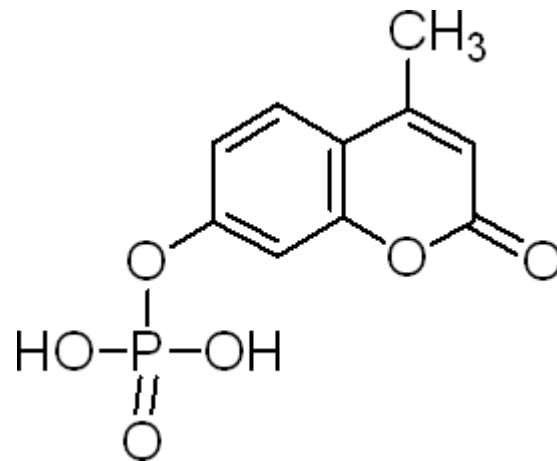
L-Alanine 7-amido-4-methylcoumarin: fluorogenní substrát
pro stanovení Aminopeptidáz



2-Chloro-4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside: fluorogenní substrát
pro stanovení β-Glucosidase

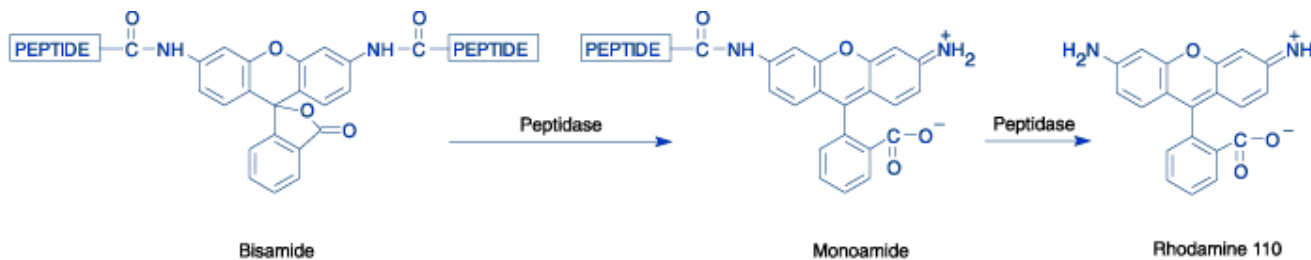
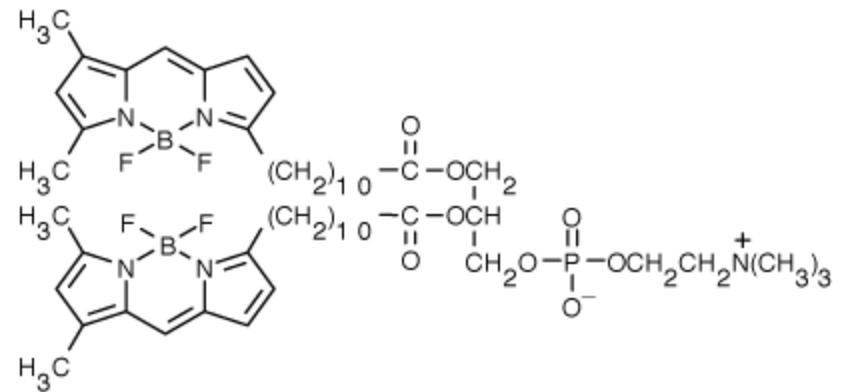
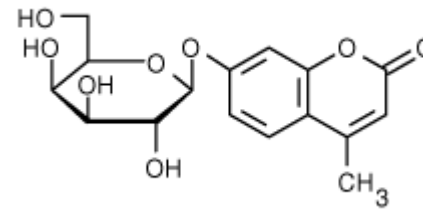
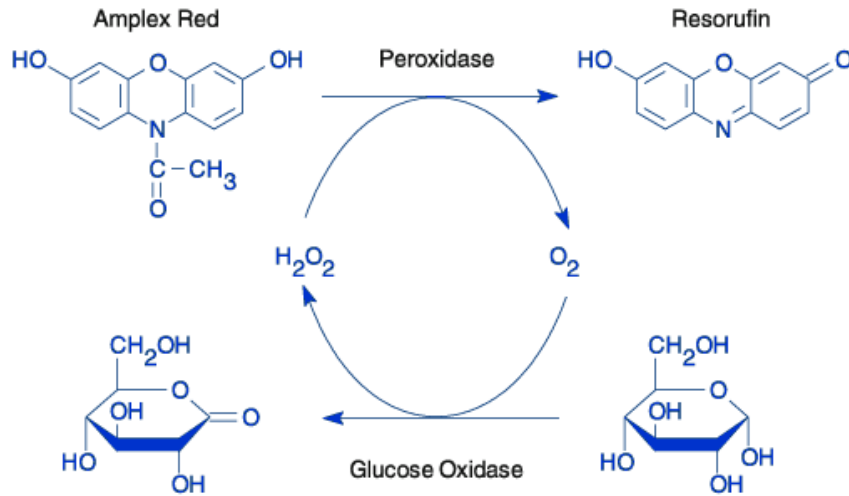


Fluorescein dibutylate: fluorogenní substrát pro stanovení esteráz a lipáz

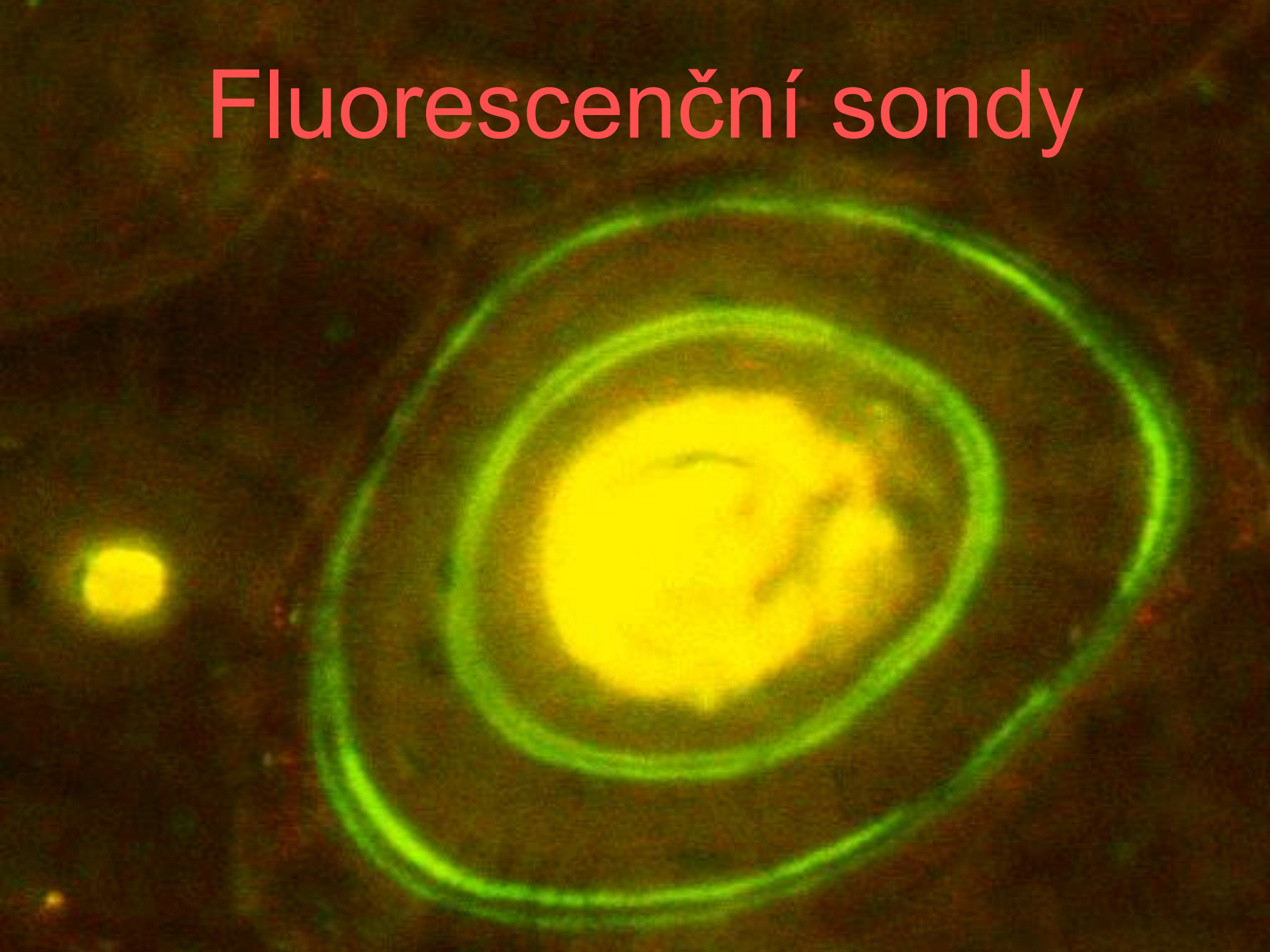


4-Methylumbelliferyl phosphate: fluorogenní substrát pro stanovení fosfatázy

Fluorogenní substráty



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

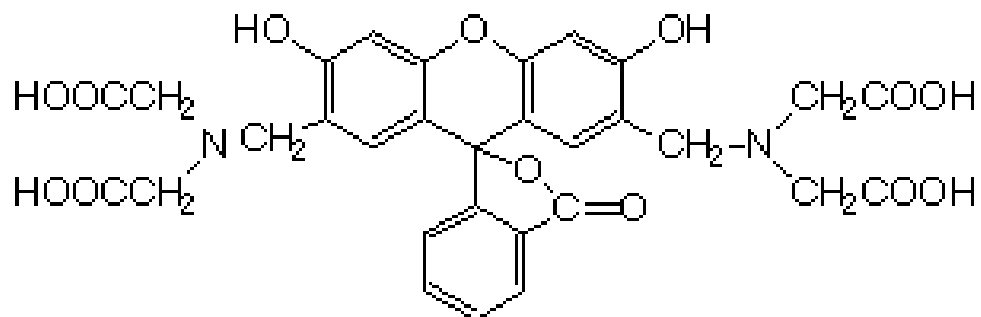
Fluorescenční sondy pro využití v analytické chemii, medicíně a biologii

- 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

Indikátory pro anorganické ionty

- **disociační konstanta** – musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu (koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu)
- pro sondy, u kterých dochází k nárůstu intenzity fluorescence platí vztah:

$$C_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$



Indikátory pro anorganické ionty

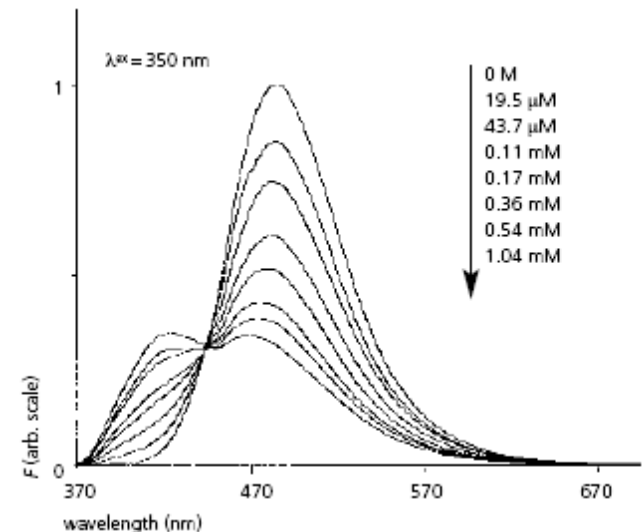
pro sondy, které vykazují spektrální posun se používá:

$$c_a = K_d (S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2)) (R - R_{\min})/(R_{\max} - R)$$

kde $R = I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$ je poměr intenzit pro dvě excitační vlnové délky λ_1 a λ_2 , R_{\min} a R_{\max} jsou poměry pro sondu volnou a plně obsazenou analytem,

$S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2) = \varepsilon_F \Phi_F / \varepsilon_B \Phi_B$, ε - extinkční koeficienty, Φ - kvantové výtěžky sondy

excitované při λ_2 .

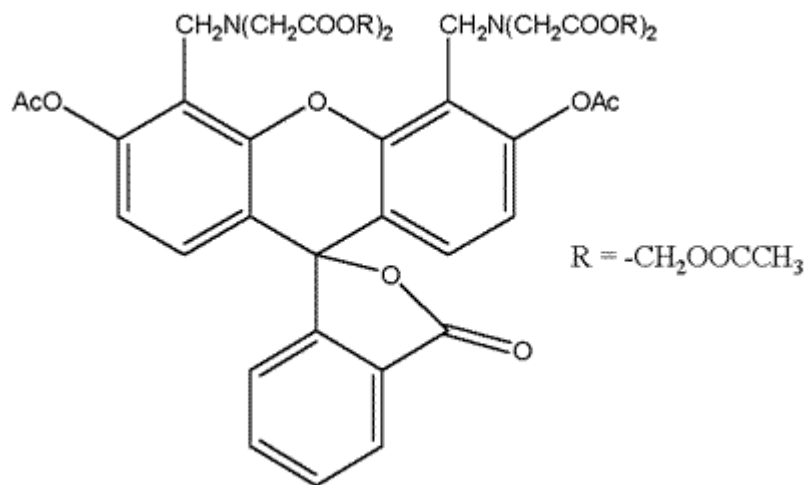


Indikátory pro anorganické ionty

- nejčastěji indikátory Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ nebo K^+
- indikátory jsou zpravidla chelatační činidla
- různé obchodní názvy (např. Fura-2, Calcium Green, Indo, atd.)

Stanovení Ca^{2+}

- stanovení Ca^{2+} pomocí fluorexonu (calceinu)
- analytické stanovení Ca^{2+} (i v přítomnosti Mg^{2+}) – vymizení fluoreskujícího komplexu Ca^{2+} -fluorexon při titraci pomocí EDTA v zásaditém prostředí



(ion-free reference solution) →

EGTA
+
TPEN

Ca²⁺ | Ba²⁺ | Mn²⁺ | Fe²⁺ | Co²⁺ | Ni²⁺ | Cu²⁺ | Zn²⁺ | Cd²⁺ | Hg²⁺ | Pb²⁺

Calcium
Green-5N

Calcium
Green-2

Fluo-4

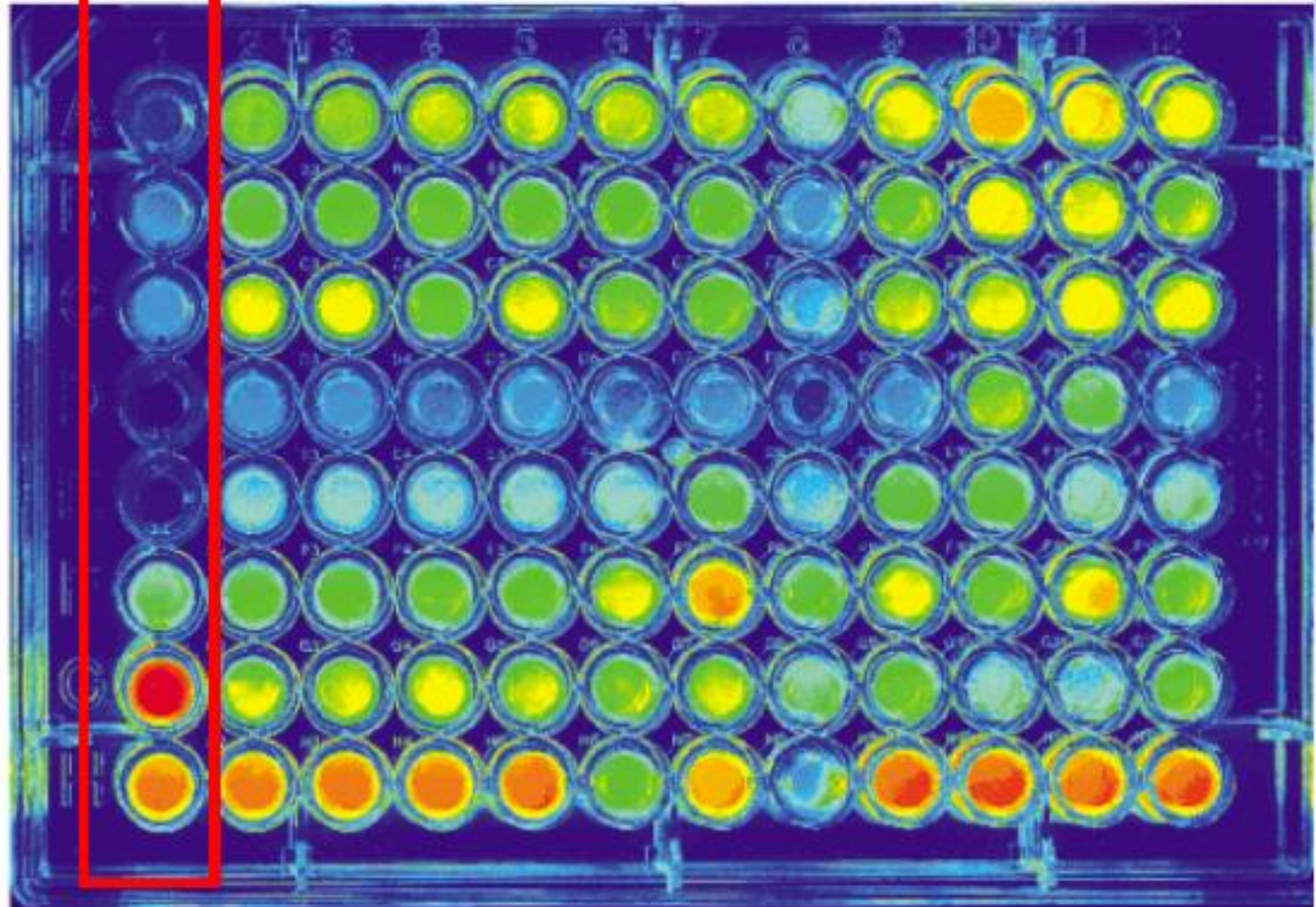
Fluo-5N

FluoZin-1

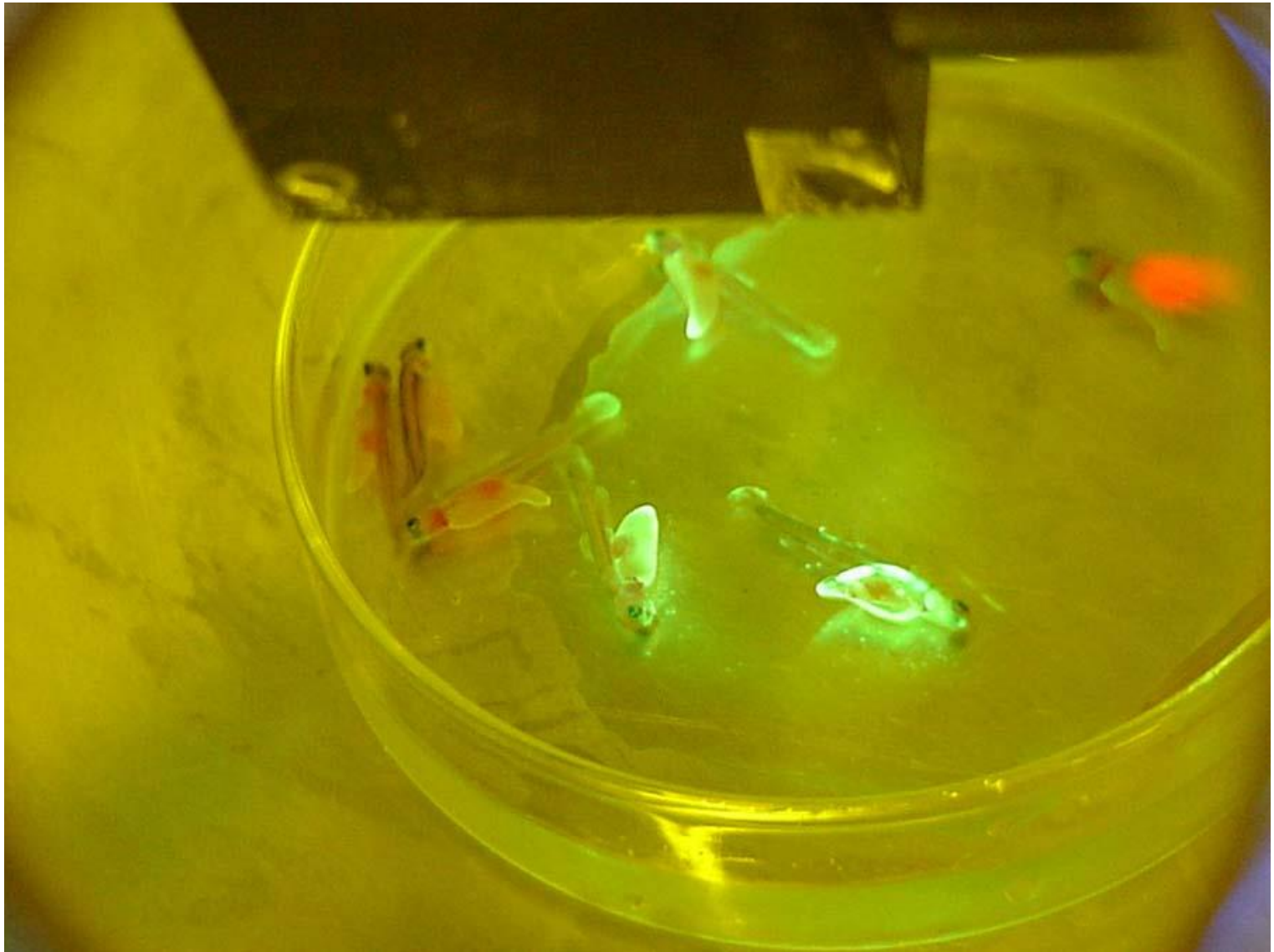
Newport
Green DCF

Phen
Green FL

Calcein



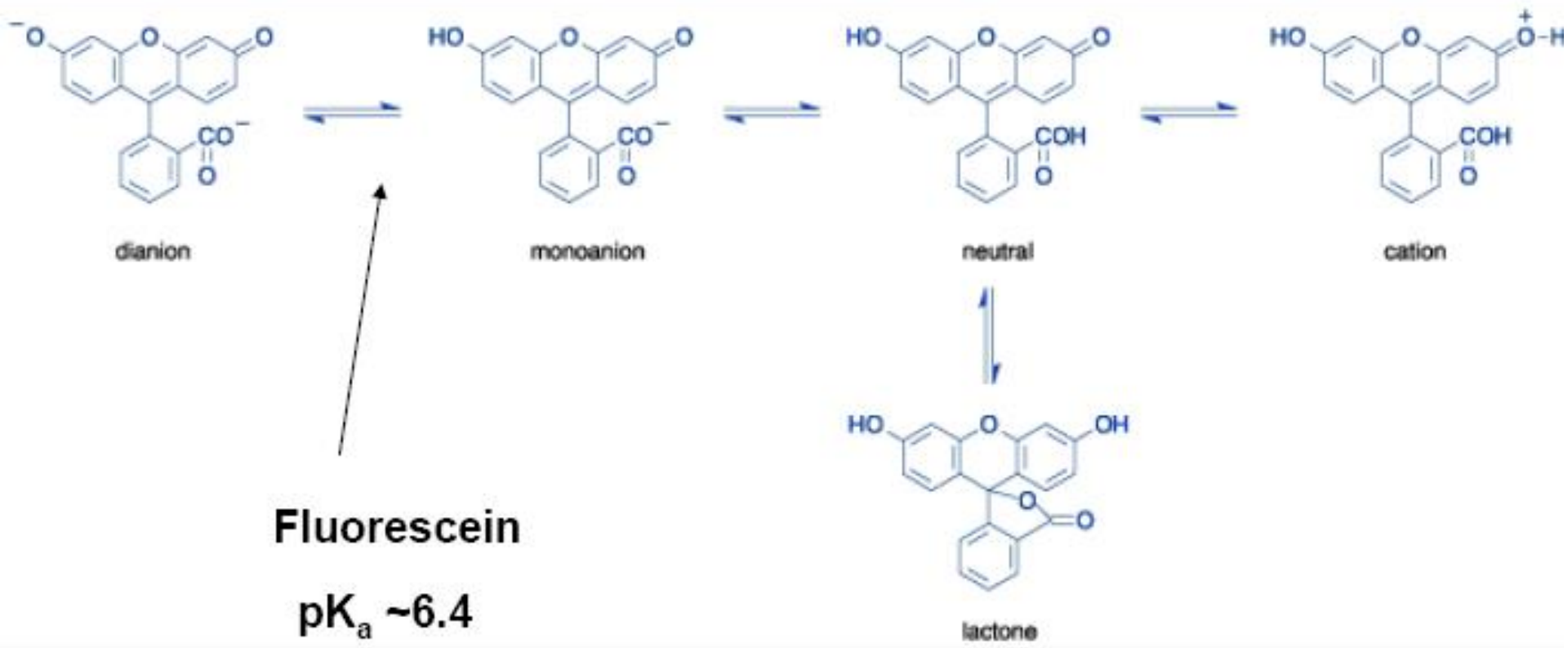
(Fluorescence: high = red > orange > yellow > green > blue = low).



Calceinem značený losos...

Indikátory pH

- použití pH indikátorů: kam nemůžeme dát pH elektrodu – např. buňky, živé tkáně, atd.
- buněčné pH se pohybuje mezi 6.8 – 7.4
- možnost měřit pH na dvě desetinná místa

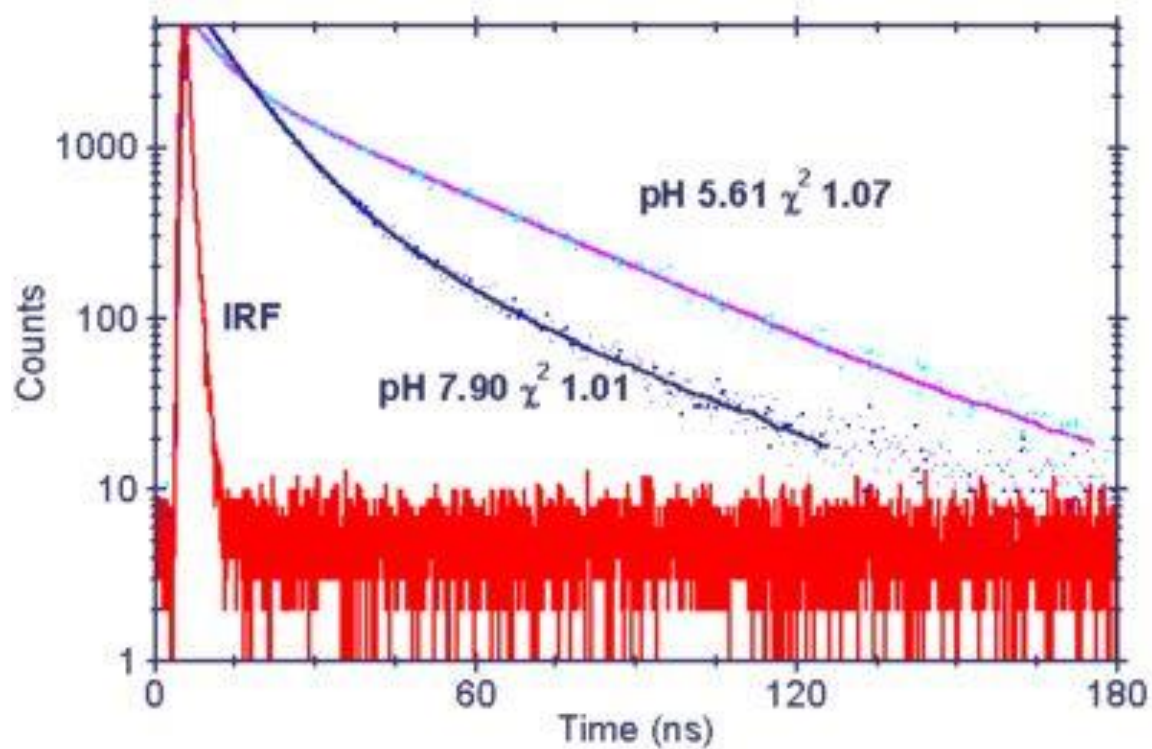


Indikátory pH

fluorofor	rozsah pH	způsob měření
SNAFL indikátory	7,2-8,2	Ex 490/540 nebo Em 540/630
SNARF indikátory	6,0-8,0	Em 580/640
HPTS (pyranin)	7,0-8,0	Ex 450/405
BCECF	6,5-7,5	Ex 490/440
Fluoresceiny a karboxyfluoresceiny	6,0-7,2	Ex 490/450
LysoSensor Green DND-189	4,5-6,0	Em 520
Oregon Green indikátory	4,2-5,7	Ex 510/450 nebo Ex 490/440
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	3,5-6,0	Em 450/510

„lifetime“ pH indikátory

- čas vyhasínání ovlivněn hodnotou pH
- výhoda: při měření tau nezáleží na koncentraci indikátoru

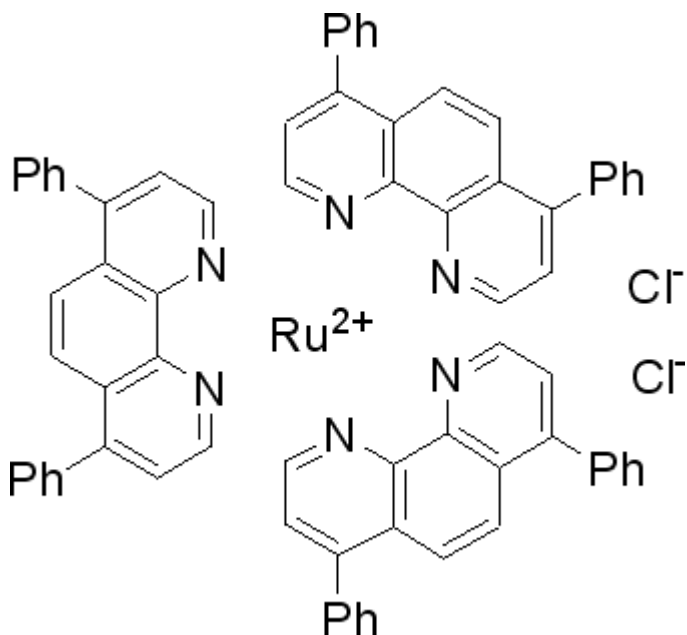


Sondy pro detekci plynů rozpuštěných v biologických kapalinách

- nejčastěji detekce O_2 , nebo NO
- „lifetime“ sondy
- nejčastěji na principu oxidace centrálního iontu obsaženého v sondě, nebo dynamickém zhášení kyslíkem
- luciferin, luminol...

Rutheniové sondy

Ukázka: kyslíkové sondy používané k detekci kyslíku v kůži (www.molecularprobes.com)



Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride (abs. λ_{max} 455 nm, luminescence λ_{max} 613 nm)

Sondy pro měření polarity prostředí

- Často se mění i kvantový výtěžek a doba vyhasínání fluorescence
- Polarita prostředí ovlivňuje většinu fluoroforů (např. tryptofánu)
- Polarita blízkého okolí fluoroforu může být dána konformací biomolekuly

Příklad sondy pro studium polarity 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.

Fluoresceční vlastnosti ANS v různých prostředích

rozpouštědlo	λ_{em}^{max} (nm)	kvantový výtěžek	doba dohasínání (ns)
oktanol	464	0,646	12,3
propanol	466	0,476	10,2
metanol	476	0,216	6,05
voda	515	0,004	0,55

Membránové fluorescenční sondy

- membránové struktury obvykle neobsahují fluorofory (většinou se jedná o nepolární uhlovodíkové řetězce – zbytky mastných kyselin), proto se jejich vlastnosti zkoumají pomocí sond
- transport a metabolismus lipidů v živých buňkách
- recyklace synaptosomů
- přenos signálu zprostředkovaný lipidy
- membránový potenciál
- interakce léčiv s membránou
- transport membránou
- mikroviskozita membrán a teplotní fázové přechody

Rozdělení membránových sond

1. fluorescenčně značené lipidy
2. malé lipofilní organické fluorofory

Fluorescenčně značené lipidy

- **mastná kyselina** je označena vhodným fluoroforem (nitrobenzoxadiazol (NBD), BODIPY, pyrén nebo dansyl)
- **fosfolipid** jsou značený buď v oblasti polárních hlaviček (dansyl, NBD, BODIPY, fluorescein, tetrametylrhodamin, Oregon blue, Oregon green, Texas red a dalšími), nebo v oblasti zbytků mastných kyselin (DPH, NBD, pyrén, BODIPY)
- značení **sphingolipidů, steroidů, triglyceridů, lipopolysacharidů**

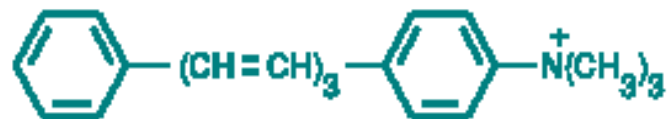
Malé lipofilní, nebo amfifilní organické fluorofory

- malé molekuly, které podávají informaci o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita a uspořádání lipidů.
- typickým příkladem je nepolární sonda **DPH** (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) – je ve vodě nerozpustná, fluoreskuje jen v nepolárním prostředí biologických membrán

Ukázky nepolárních malých sond

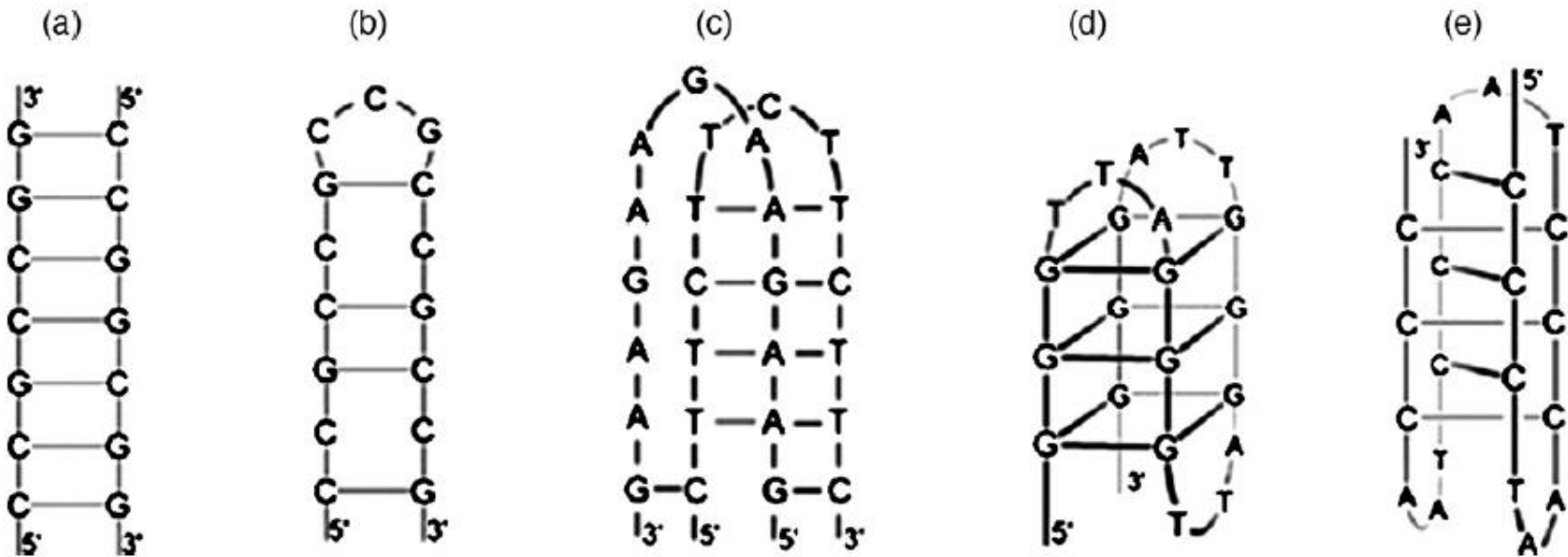


DPH



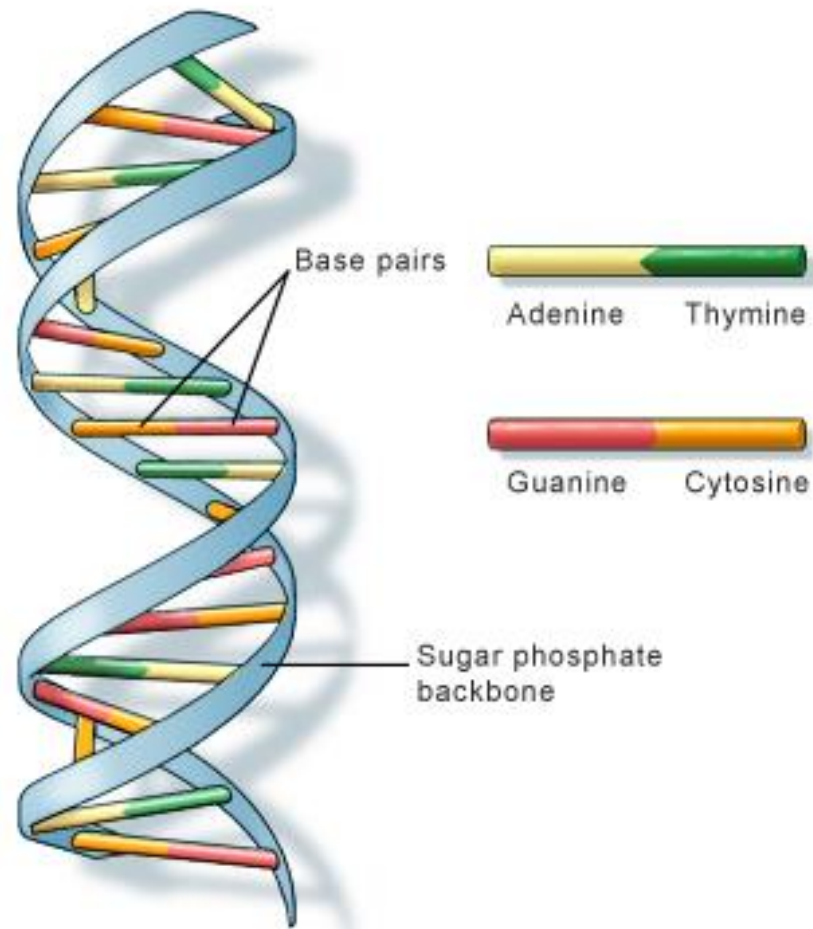
Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA (nukleové báze jeví jen slabou luminiscenci)

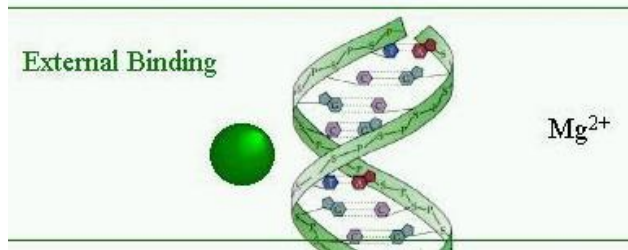


a) Duplex-dvoušroubovice (antiparalelní, intermolekulární), b) hairpin-vlásenka (antiparalelní, intramolekulární), c) triplex (paralelní, intermolekulární), d) G-kvadruplex (antiparalelní, intramolekulární), e) i-motiv (intramolekulární)

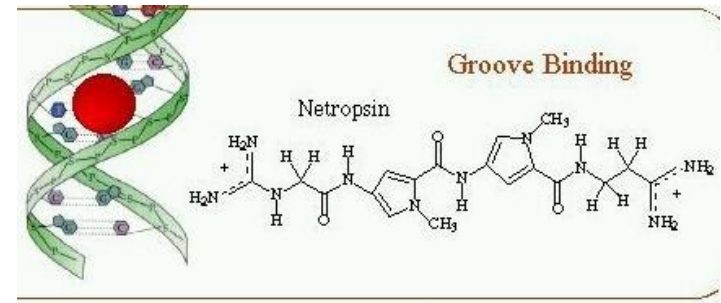
Dvoušroubovicová DNA (helix, duplex, B-DNA, atd.)



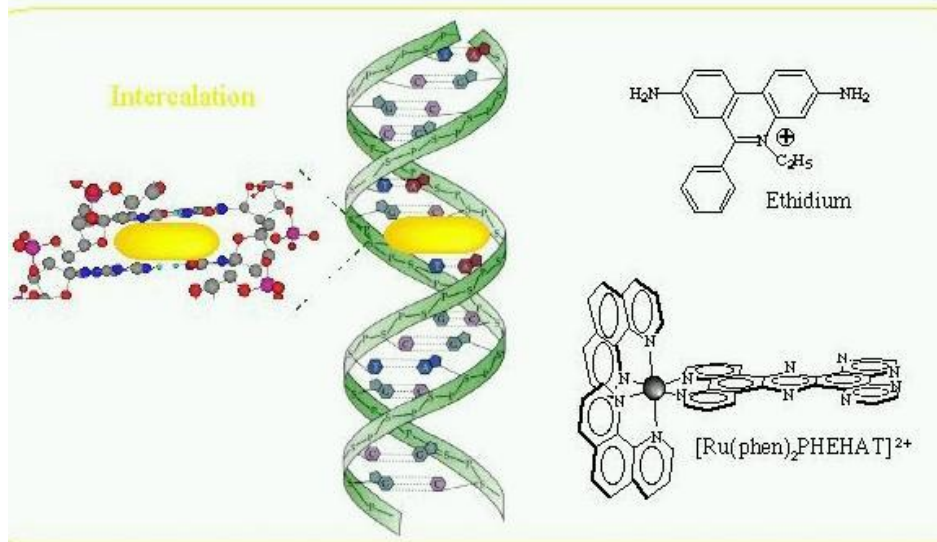
Vazebné možnosti



„vnější vazba“ – atmosféra + iontů kolem – nabitá DNA

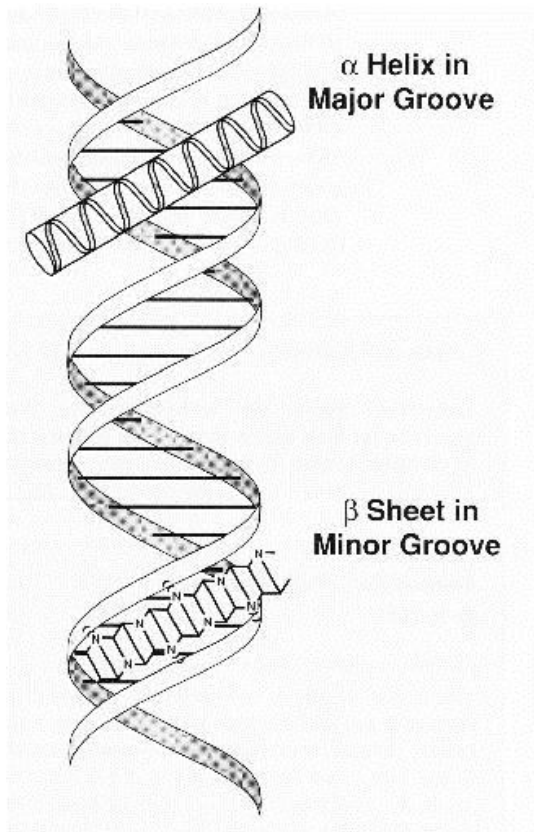


„vazba ve žlábků“ – van der Waalsovský kontakt s léčivem ve žlábků



„interkalace“ – vmezeření planárního aromat. systému mezi páry bází

Interakce ve žlábcích



Velký žlábek:

interaguje s α helixy. Helix se orientuje podél osy žlábků, postranní řetězce tvoří H-vazby s bázemi, event. kontakty s fosfát. skupinami.

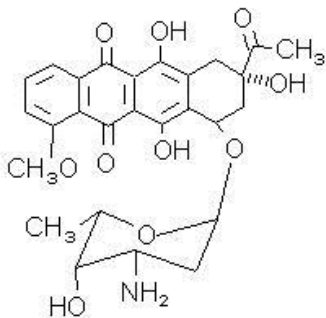
Malý žlábek:

interaguje s β skládanými listy. List leží podél osy žlábků, tvoří H-vazby k dusíkům amino skupin a k fosfátům.

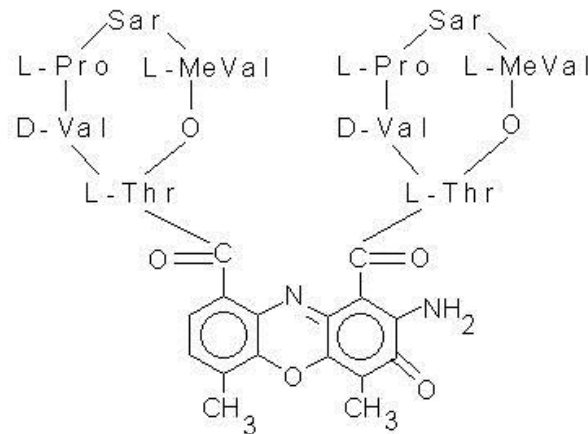
Interkalace

= interakce s DNA – léčivo (planární aromatická molekula) se váže mezi 2 sousední páry bazí, aniž přeruší W-C páry \Rightarrow deformace cukr fosfátové páteře

Př. interkalátory



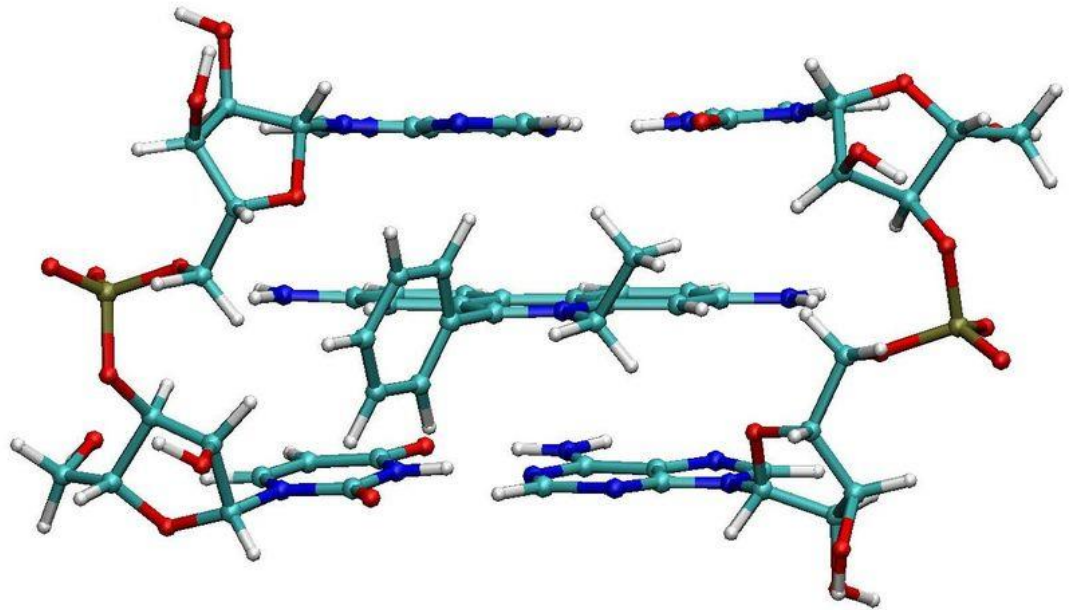
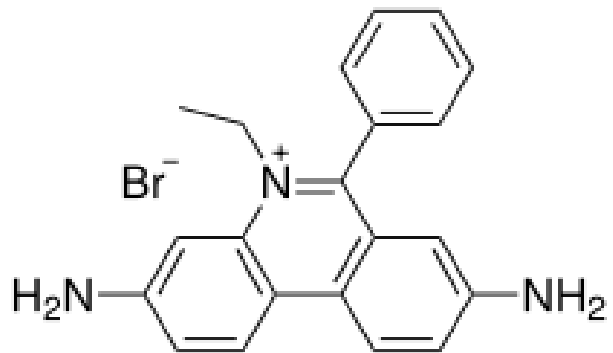
daunomycin
(skupina
antracyklinů)



aktinomycin D
(peptidové antibiotikum s
phenoxazonovým aromat.
systémem)



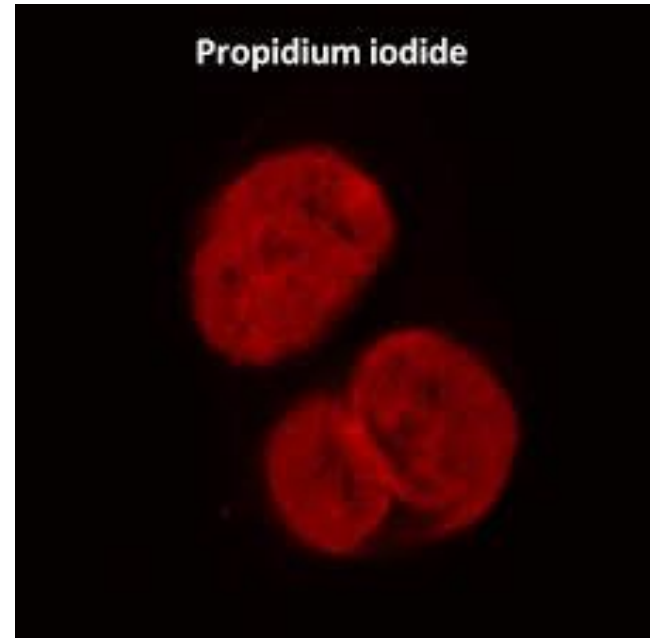
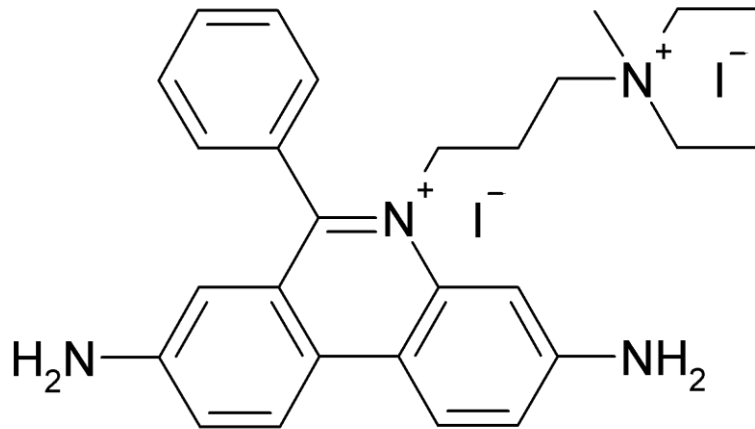
ethidium bromid



Ethidium bromid interkalovaný mezi pár adenin-uracil

- ethidium bromid: ve vodě fluoreskuje jen slabě, při interakci s DNA se intenzita fluorescence zvýší 30x a čas vyhasínání se zvýší z 1.7 ns na 20 ns.

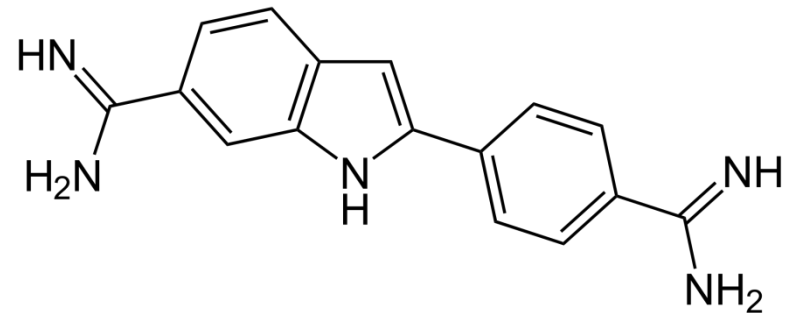
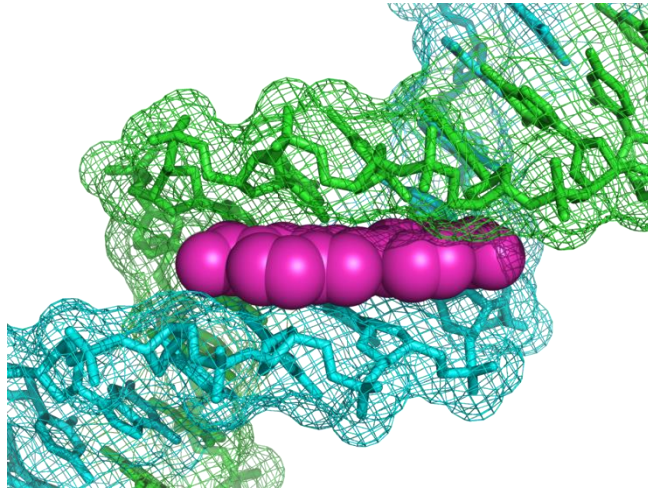
Propidium iodid

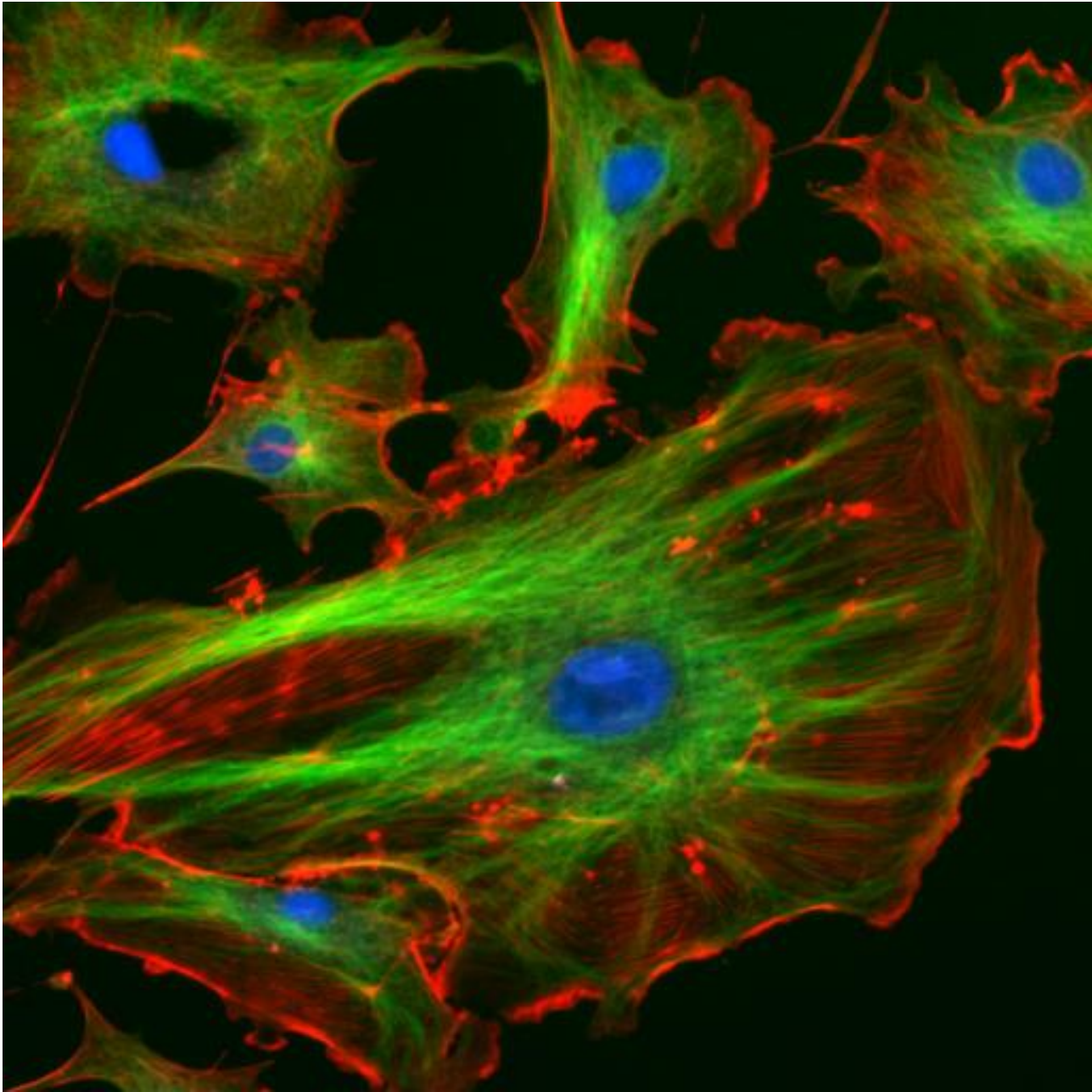


- Interkalační DNA sonda (493/636 nm)
- Neprochází membránou

DAPI

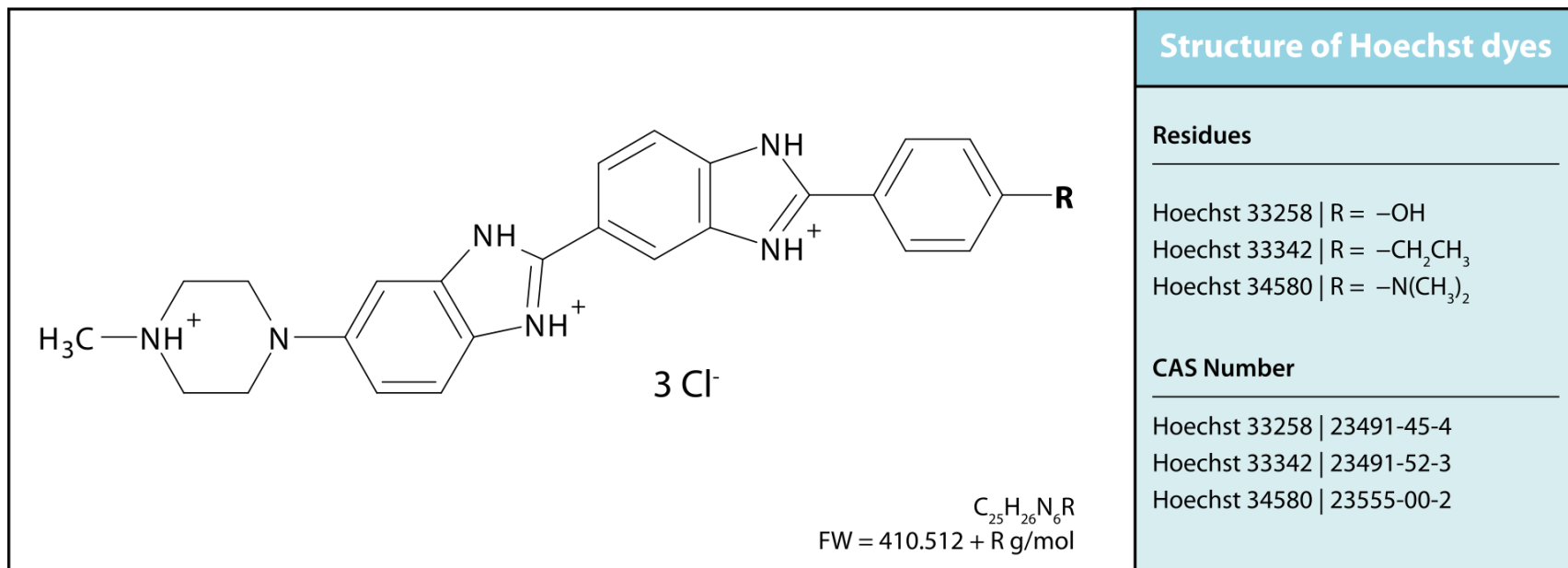
- 4',6-diamidin-2-fenylindol
- váže se na AT bohaté oblasti v DNA (poměru 1 molekula DAPI na 3 AT-páry)
- schopnost procházet buněčnou membránou a vázat se do jádra
- po vazbě DAPI na DNA se až 20× zesiluje intenzita fluorescence
- vazba do malého žlábků
- excitační / emisní - 358 nm / 461 nm
- váže se i na RNA (slabší fluorescence, emise – 500 nm)





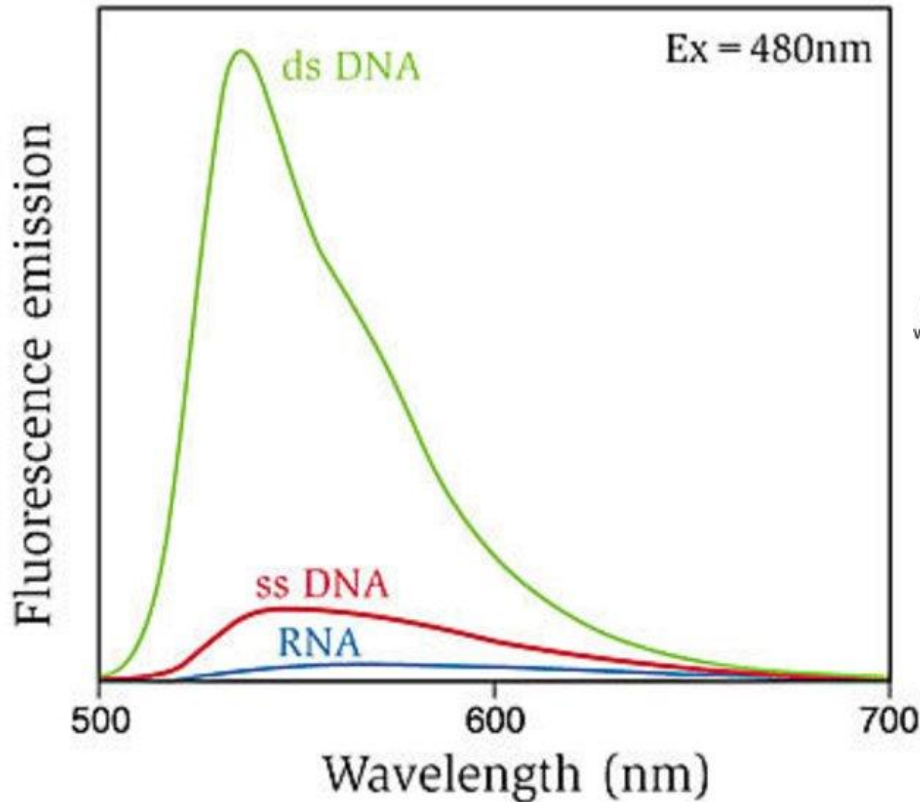
Hoechst Dyes

- strukturně podobná barviva **Hoechst 33258**, **Hoechst 33342** a Hoechst 34580
- 350/460 nm (s DNA), bez DNA kolem 510-540 nm
- intenzita je závislá i na pH
- vazba do malého žlábků *dsDNA* mezi A-T
- buněčný cyklus (nízká toxicita)

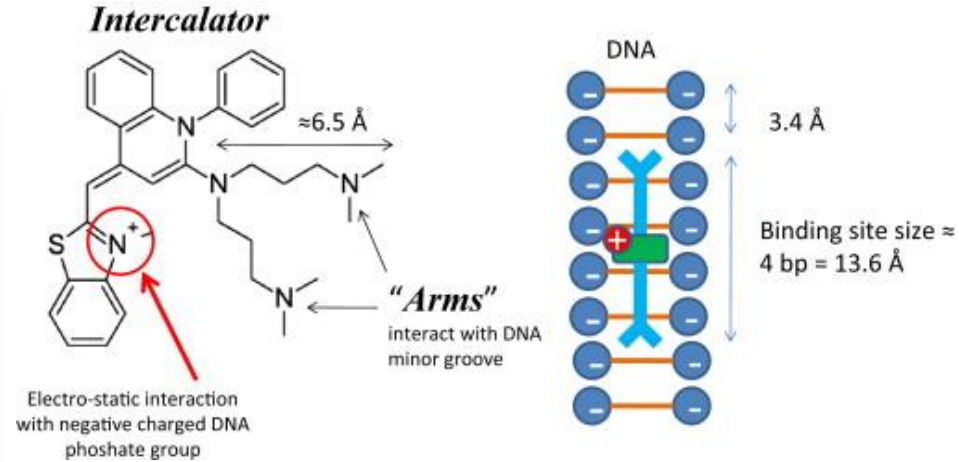


PicGreen dyes

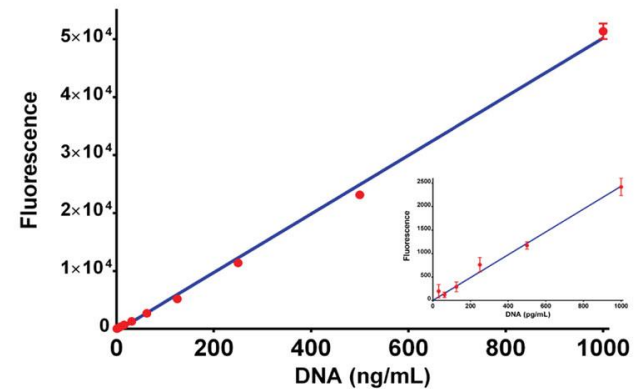
Figure 2 - dsDNA specificity



Fluorescence enhancement of the PicoGreen® Quantitation Reagent upon binding dsDNA, ssDNA and RNA.



- ultracitlivé stanovení DNA



Příklady sond pro NK

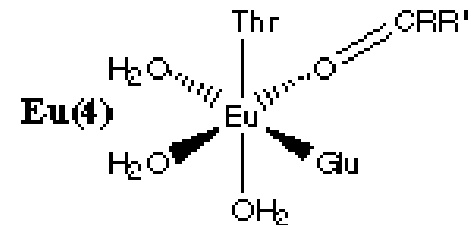
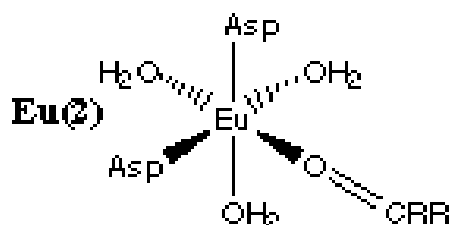
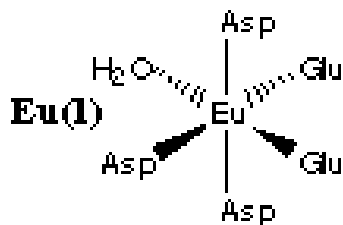
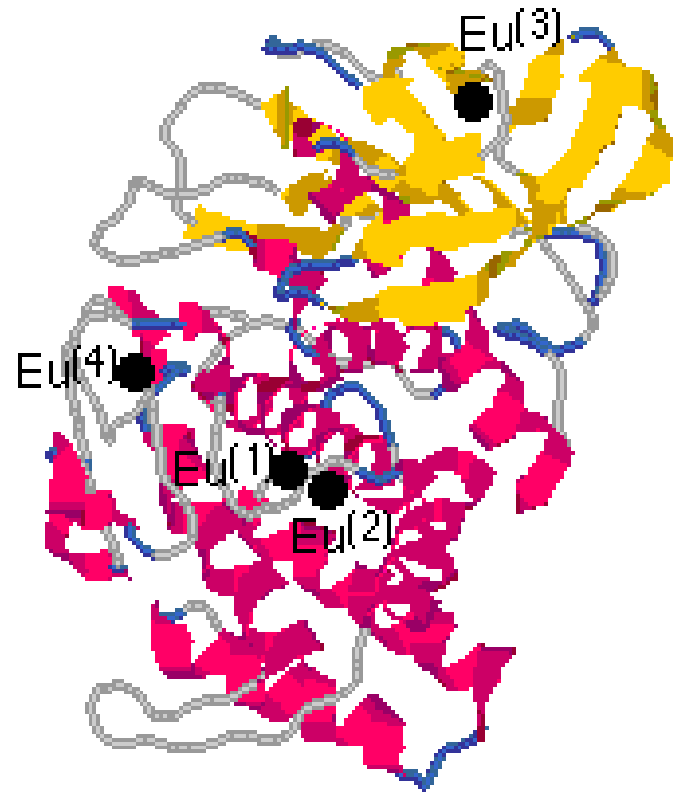
fluorofor	$\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
Propidium jodid	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
DAPI	358	461	částečně prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
Hoechst 33342	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...
PicoGreen	502	523	ultracitlivá kvantifikace roztoků dsDNA
OliGreen	498	518	ultracitlivá kvantifikace roztoků ssDNA a oligonukleotidů
RiboGreen	500	520	ultracitlivá kvantifikace roztoků RNA
TOTO-1	514	533	neprostupuje membránu; vysoká afinita pro nukleové kyseliny
SYTO 85 orange	567	583	prostupuje membránou

Studium vazných míst biomolekul

- „calcium binding sites“ – místa v proteinech, kde se váže Ca^{2+}
- při studiu interakcí je možné nahradit vápenaté ionty Ln^{3+} (nejčastěji Eu^{3+} , nebo Tb^{3+})
- Ln^{3+} mají podobné vlastnosti jako Ca^{2+} , ale mají výborné luminiscenční vlastnosti
- podobný iontový poloměr
- koordinační číslo Ca^{2+} (až 8) je podobné kordinačnímu číslu Ln^{3+} (až 9)
- preference koordinace „tvrdými donory“
- Ln^{3+} váže 10^5 silněji než Ca^{2+}
- Ln^{3+} ligandová výměna je 100x pomalejší, než výměna Ca^{2+}
- jestliže Ln^{3+} nahradí Ca^{2+} v katalytickém místě, rychlost reakcí poklesne

Studium vazebných míst Ca^{2+}

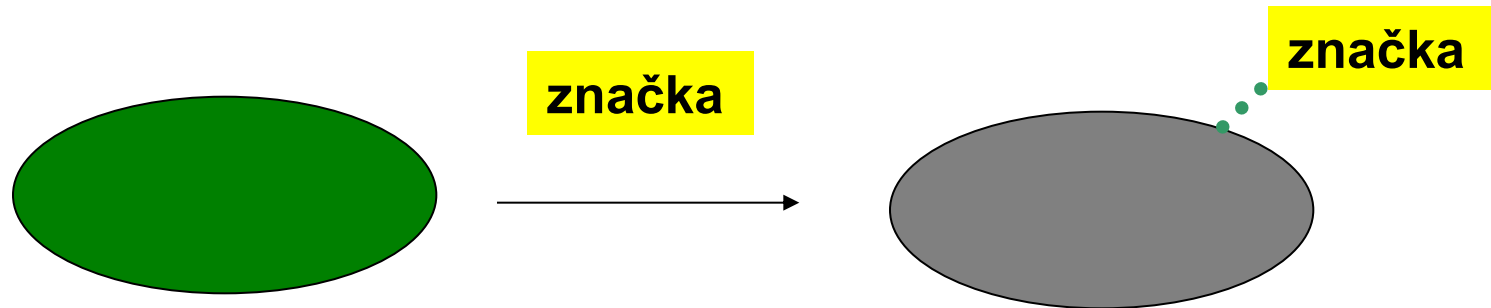
- protein thermolysin
- z luminiscenčních spekter a časů vyhasínání lze určit polohu Eu^{3+} (resp. Ca^{2+}) v biomolekule



Vnější fluorofory: shrnutí

Vnější fluorofory

- **značky** (derivatizace, „labels“, „tags“) – kovalentní vazba
- **sondy** (indikátory, „probes“) – různé typy nekovalentních interakcí

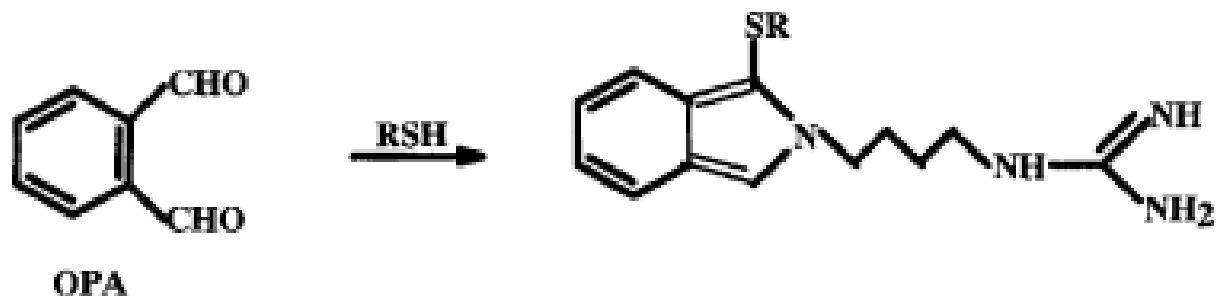


Důvody pro použití značek a sond

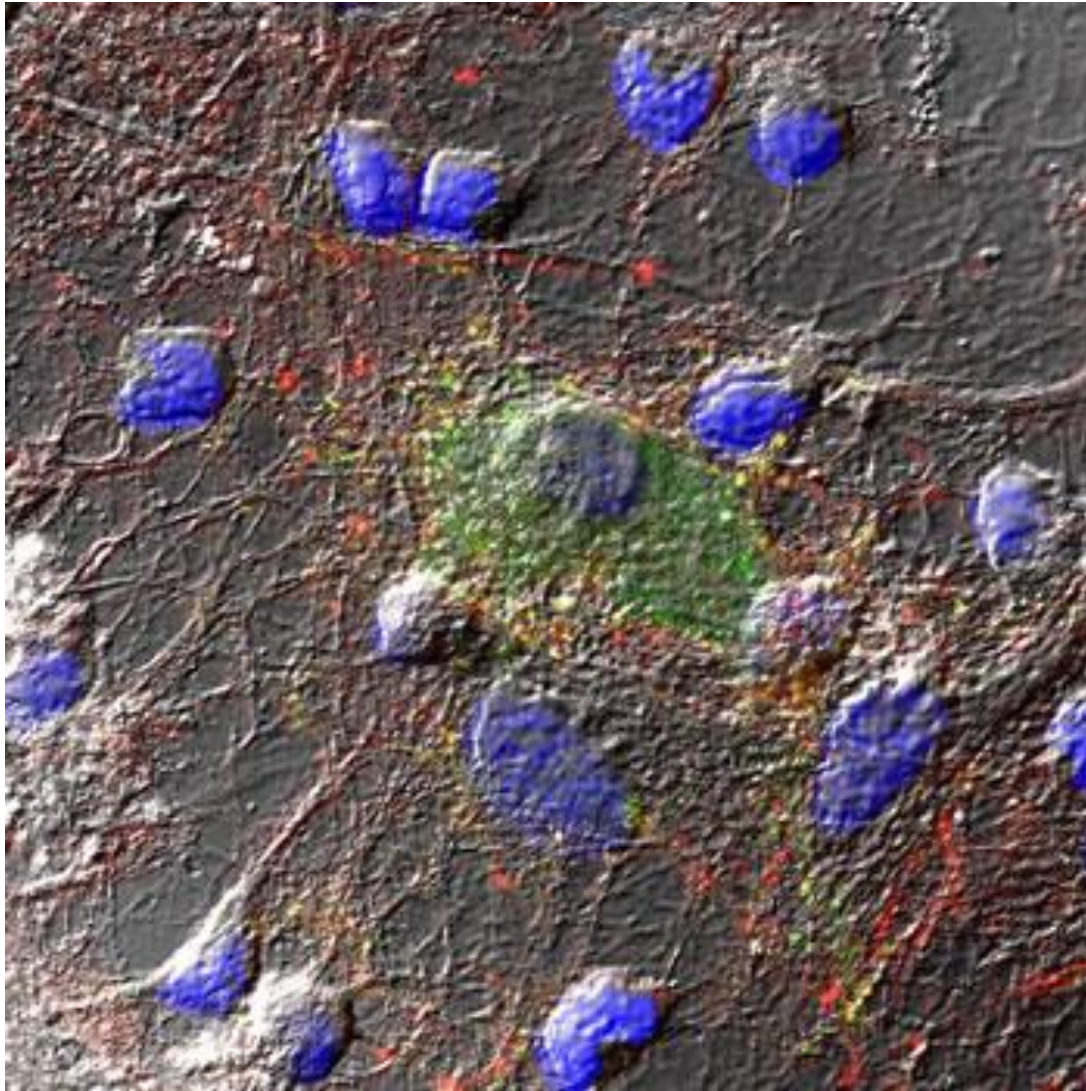
- zvýšení citlivosti
- **získání informace** o koncentraci analytu, o struktuře látky, o funkci molekuly v systému...
- **odvozené metody** (FRET, FIA, EIA, atd.)
- **kombinace** značek a sond (FISH, fluorescenční mikroskopie)

Značky

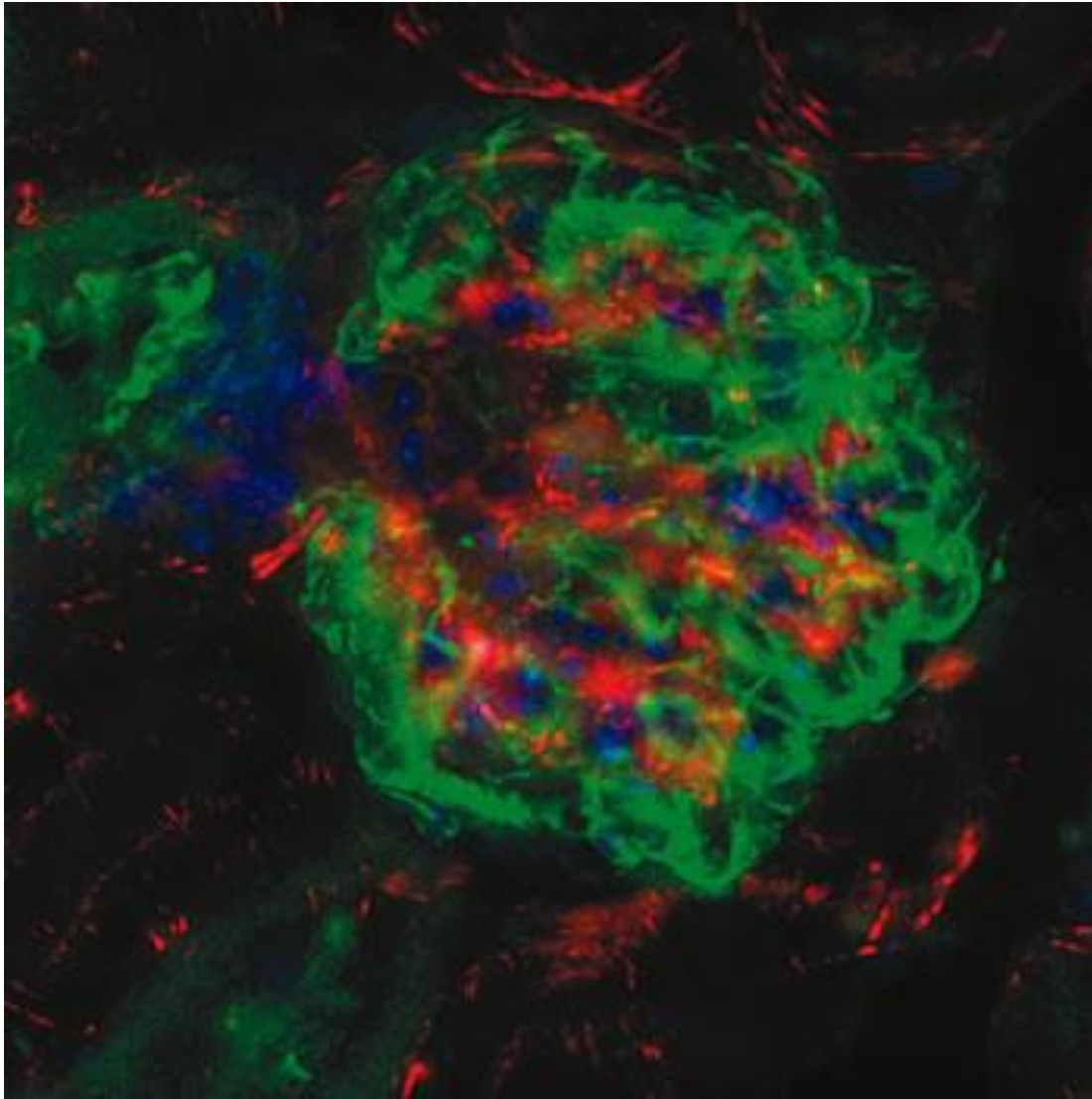
- značení molekul: „steady state“ luminiscenční spektroskopie, časově rozlišená luminiscence, luminiscenční detekce ve spojení se separačními technikami, fluorescenční mikroskopie, fluorescenční anizotropie...
- značení peptidů, proteinů, protilátek, antigenů, enzymů, NK, membrán, buněk, tkání, celých organismů...
- použití také „in vivo“
- využití: chemie, fyzika, biologie, medicína...



Ukázka derivatizačního činidla pro LIF – HPLC (CE)



převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

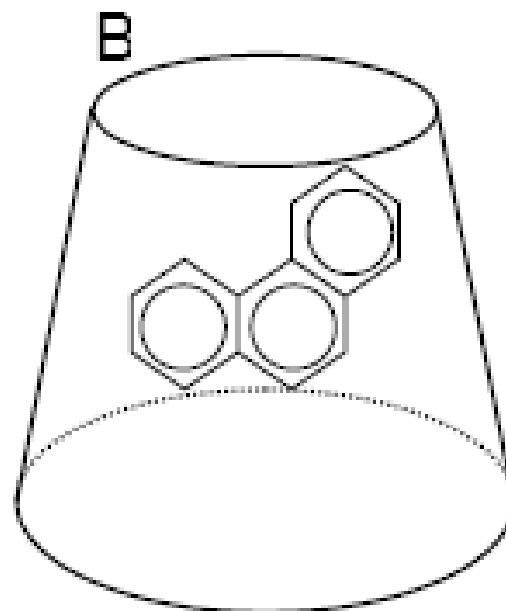
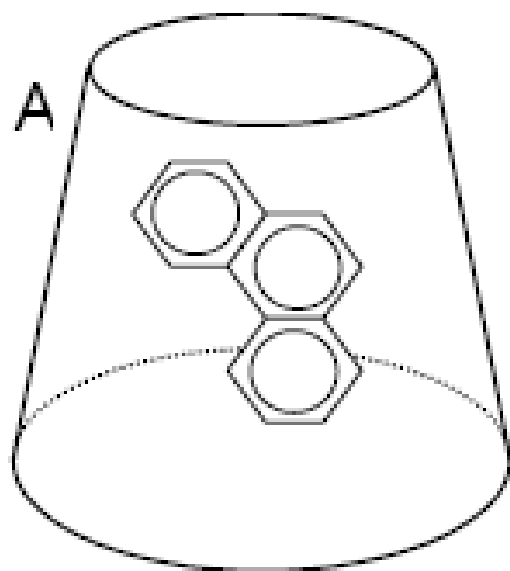


Myší játra značená různými fluorofory...

převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

Sondy

- využití: analytická chemie – detekce menších částic (ionty, malé molekuly), biologie a medicína (snadnější přístup např. do buněk)
- různé detekční systémy (mikroskopie, spektroskopie, „steady state“, časově rozlišena, atd.)
- použití „in vivo“
- membrány opticky aktivních senzorů



Axialní, nebo ekvatoriální inkluze

Fluorescenční optické senzory

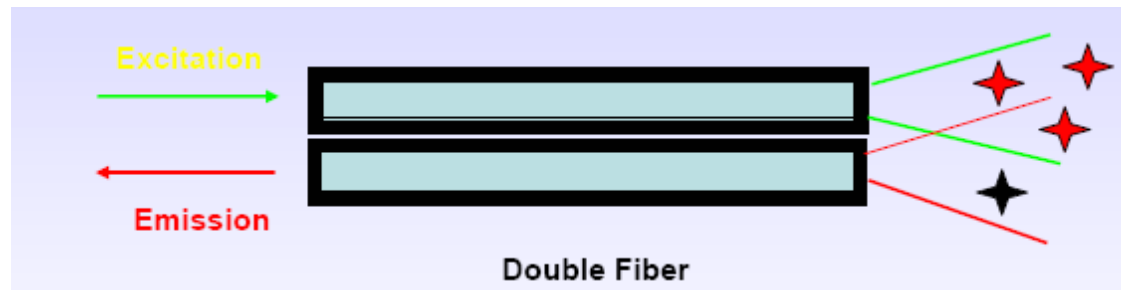
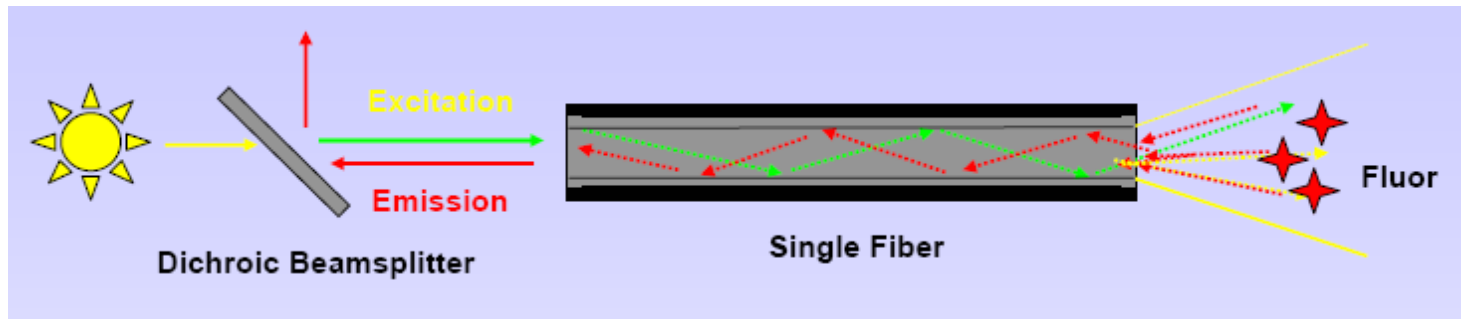
Fluorescence-based optical
sensors

Fluorescenční optické senzory

- alternativa k optickým senzorům s chromofory
- pasivní a aktivní optické senzory
- senzory iontů, molekul
- různé typy interakcí...

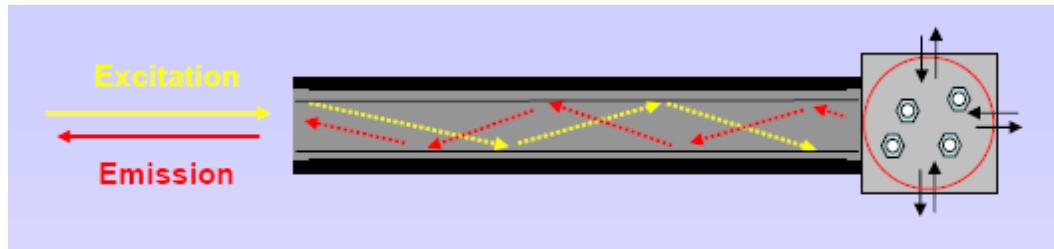
Pasivní senzory

- pasivní senzory excitují a sbírají světlo s roztoku, nebo povrchu, se kterým jsou v kontaktu

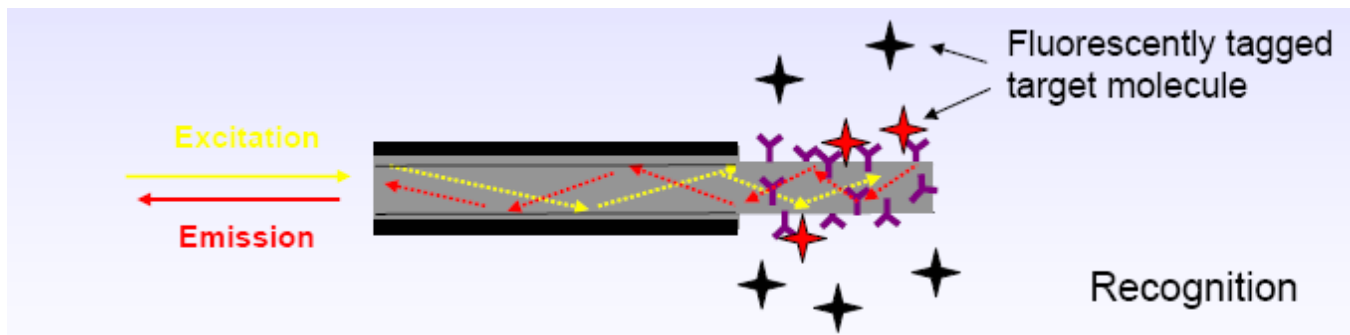


Aktivní senzory

- v koncové části senzoru je polopropustná, nebo propustná membrána, za kterou se nachází fluorofor, který může reagovat s analytem v roztoku



- např. v senzoru se mohou nacházet např. značené protilátky

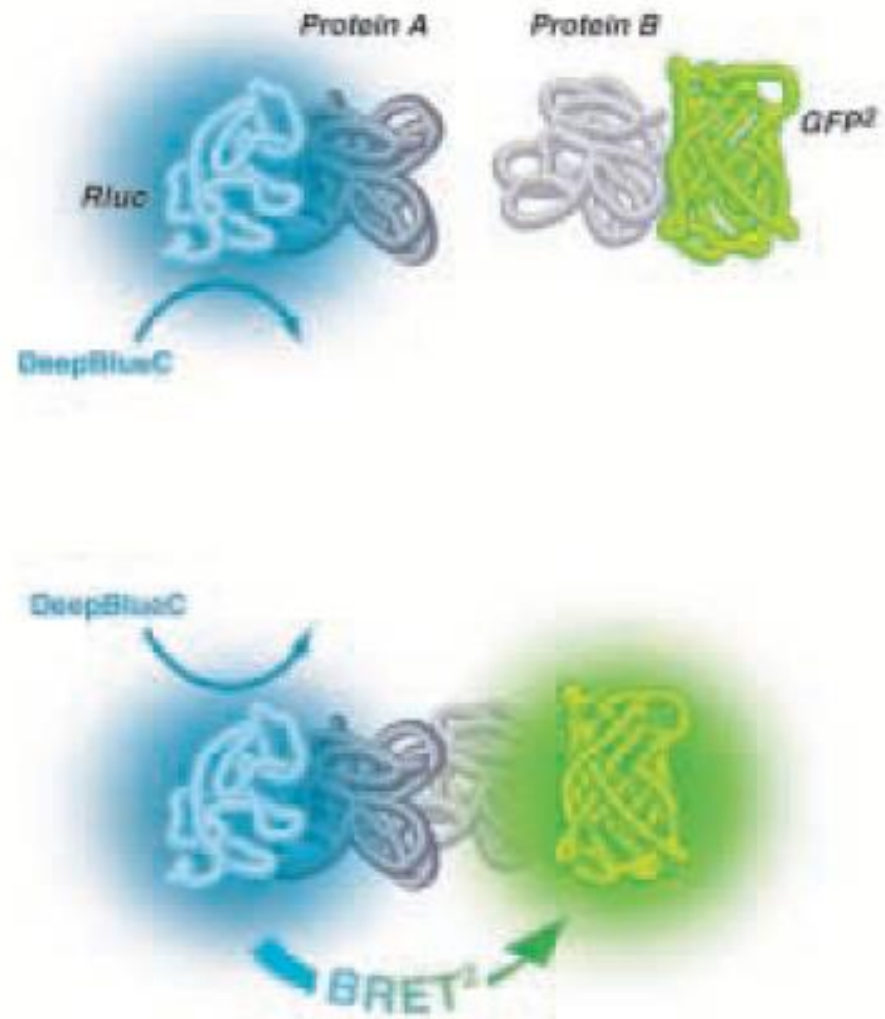


Odvozené techniky

- FRET
- BRET
- FISH
- FIA
- EIA
- a další

BRET

- podobně jako u FRET záleží na vzdálenosti mezi fluorofory – jestliže je dostatečně krátká, probíhá výměna energie (dojde k vyzáření světla druhým fluoroforem)
- u metody BRET je donorem energie luciferázou katalyzovaná oxidace coelenterazinu (z mořského koníka *Renilla*)
- jestliže je v blízkosti GFP, dojde k přenosu a následnému vyzáření zeleného světla
- možné i použití jiných molekul, např. derivátu coelenterazinu DeepBlueC (Packar Bioscience, USA)



Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



není Fish jako FISH...

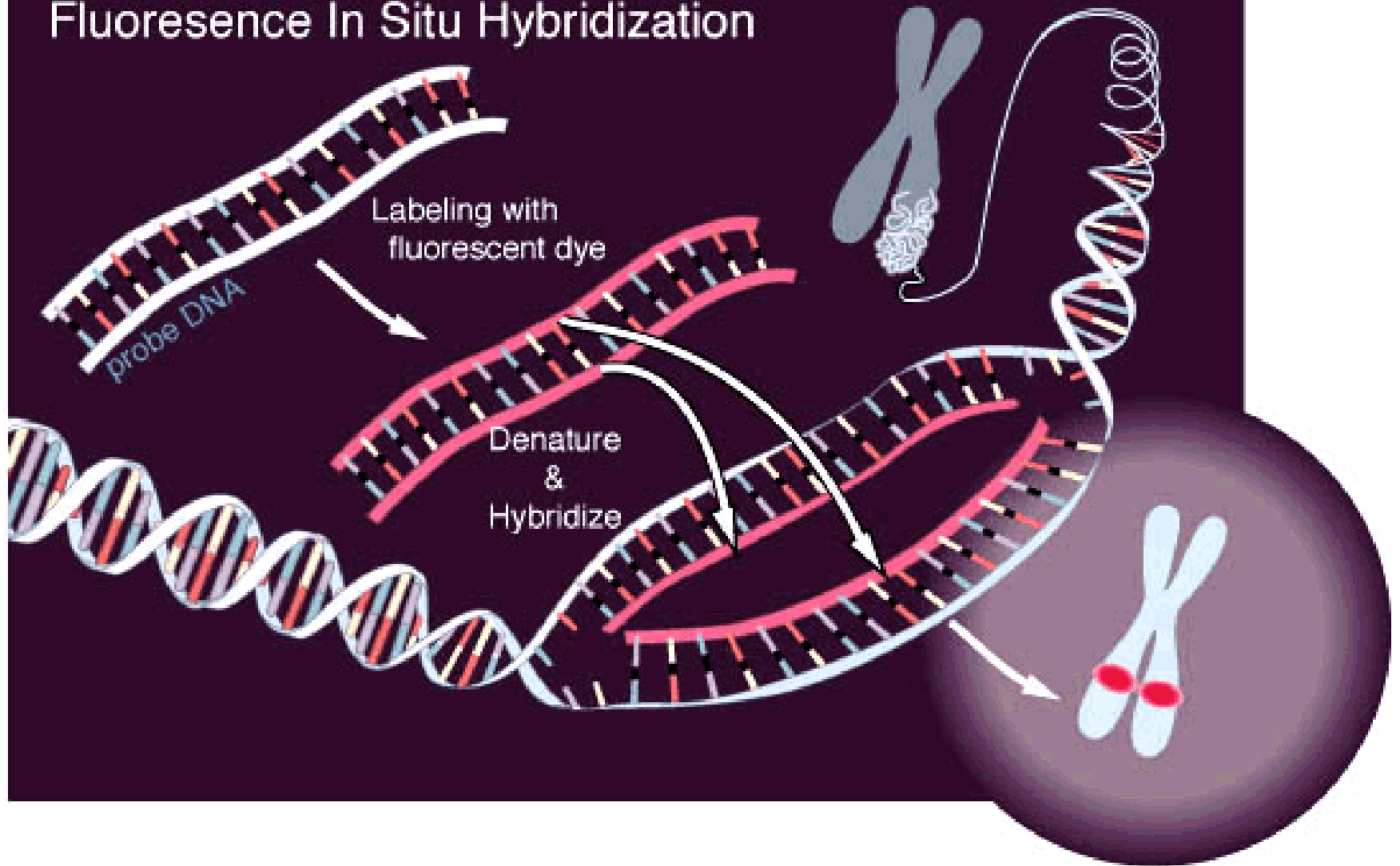
FISH

- Fluorescence In Situ Hybridization je cytogenetická metoda, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromosomech
- tato metoda je určena k mapování genů a sledování chromosomálních abnormalit, atd.
- pro detekci se využívá fluorescenční mikroskopie

FISH

- krátký jednovláknový (single stranded) úsek DNA, který je komplementární k hledané sekvenci, je označen fluorescenční značkou
- v rozpletených úsecích DNA dochází k navázání na komplementární části
- dochází k nalezení a označení části sekvence, která kóduje zkoumaný úsek

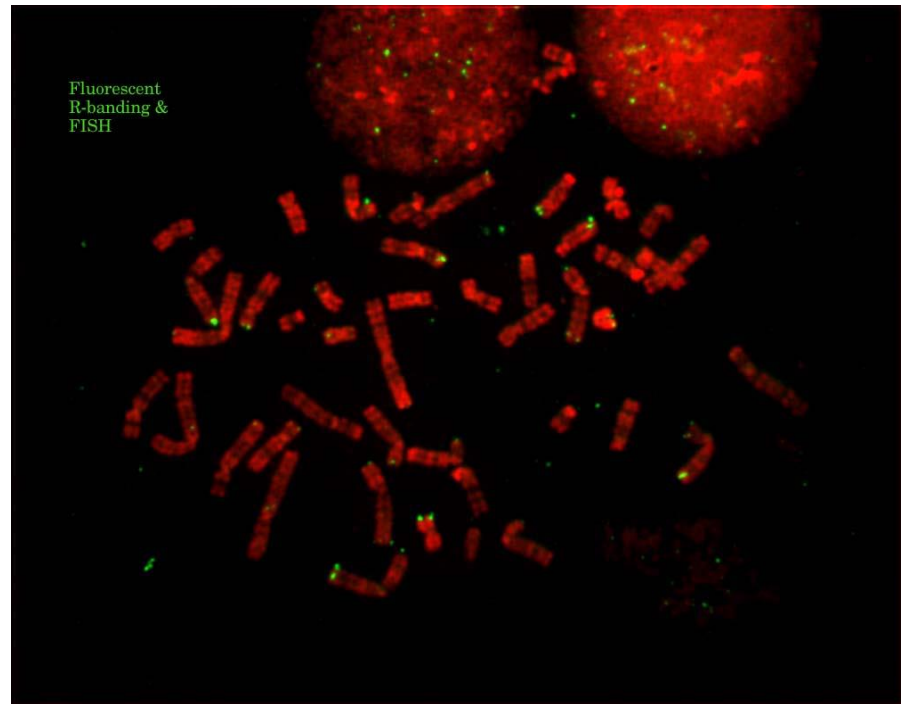
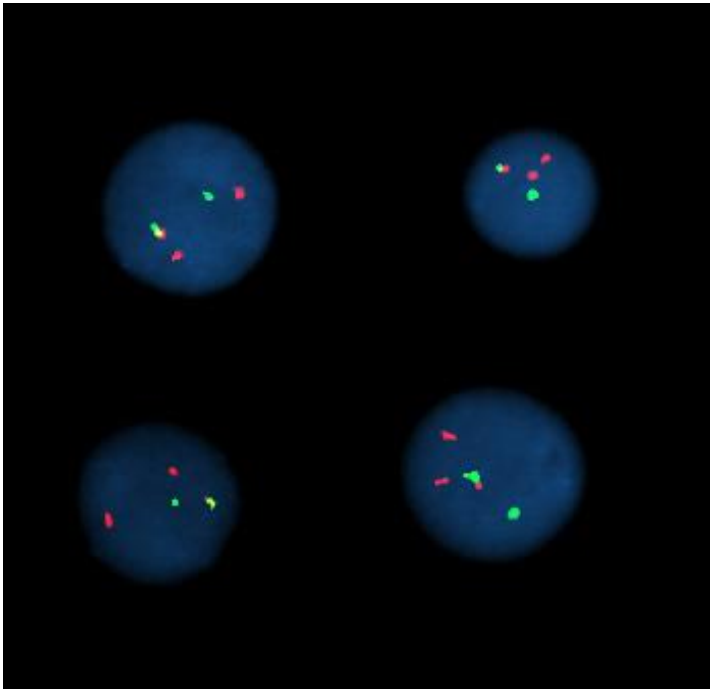
Fluorescence In Situ Hybridization



Typy FISH

- **Locus specific probes:** jestliže izolujeme malý kousek genu a chceme vědět v kterém chromosomu se nachází
- **Centrometric repeat probes:** chromosomy obsahují opakující se sekvence. Jedním typem sondy lze obarvit velkou část chromosomu. Každý chromosom může mít jinou barvu...
- **Whole chromosome probes:** soubor více sond, které hybridizují chromosom po celé jeho délce. Tvorba tzv. spektrálního karyotu

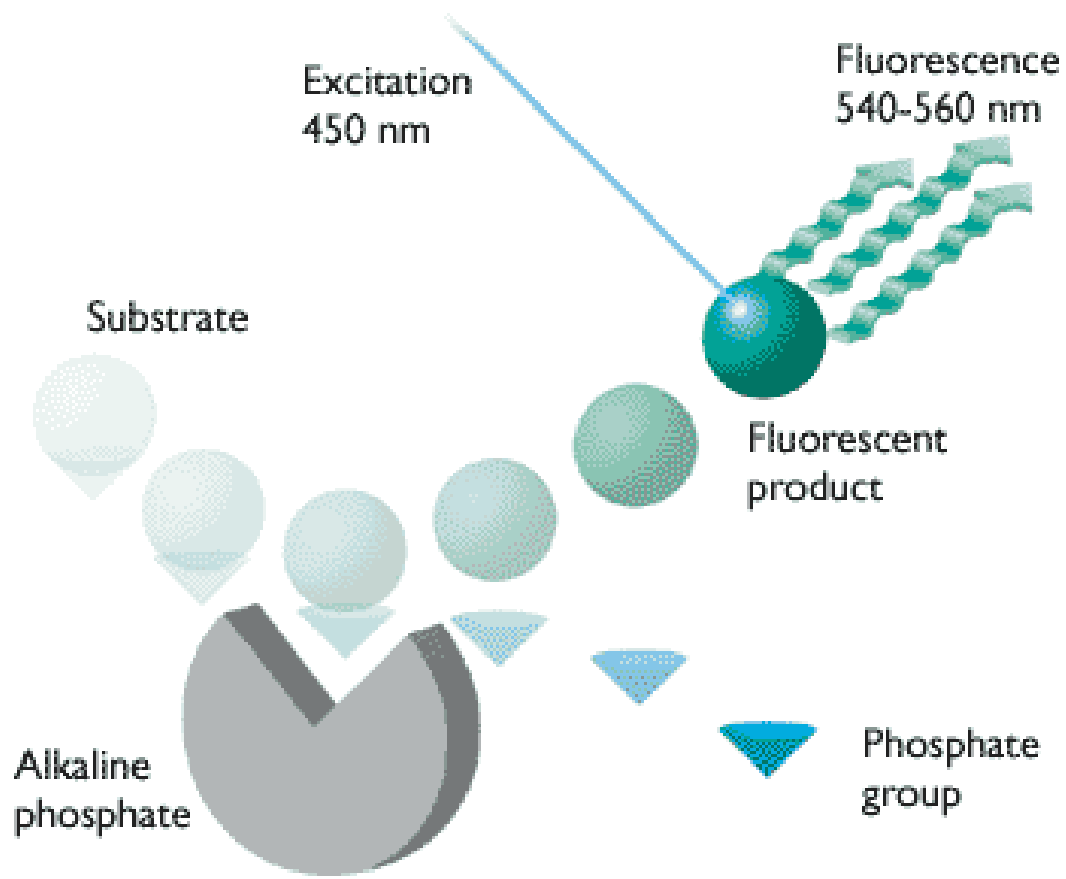
Ukázky FISH





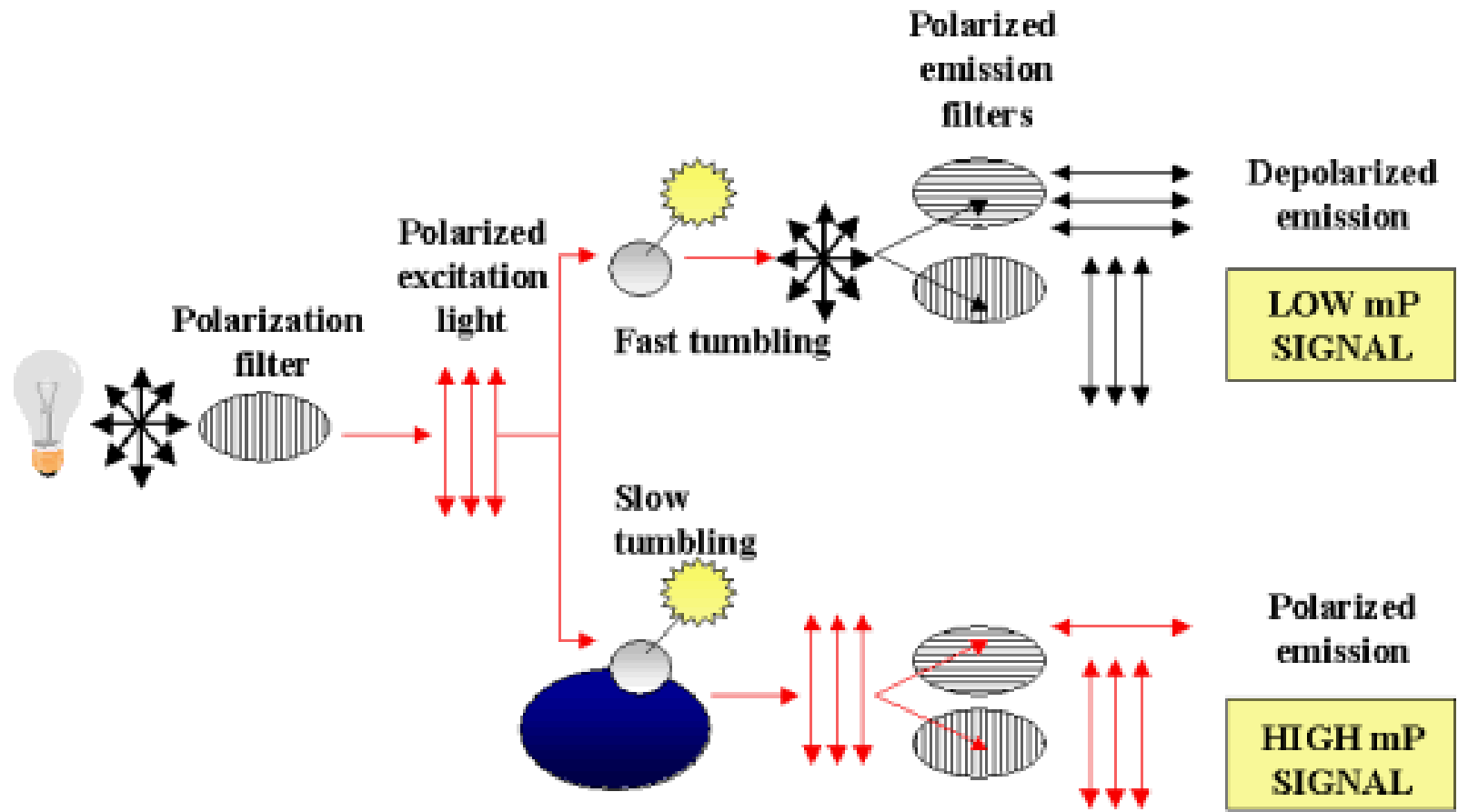
Bioanalytické metody

- FIA
- EIA



převzato z <http://www.amershambiosciences.com>

Polarizovaná fluorescence a fluorescenční anizotropie



Fluorescenční anizotropie

- je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace (**fotoselekce**)
- je-li průměrná rotační relaxační doba (charakterizující rotační difúzi v roztocích) mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom také výsledná fluorescence bude polarizována
- bude-li naopak průměrná rotační relaxační doba mnohem kratší než doba dohasínání fluorescence, potom anizotropie systému klesne ještě před emisí na limitní hodnotu (v izotropním systému o malé viskozitě až na nulu)
- pokud jsou doba dohasínání fluorescence a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází

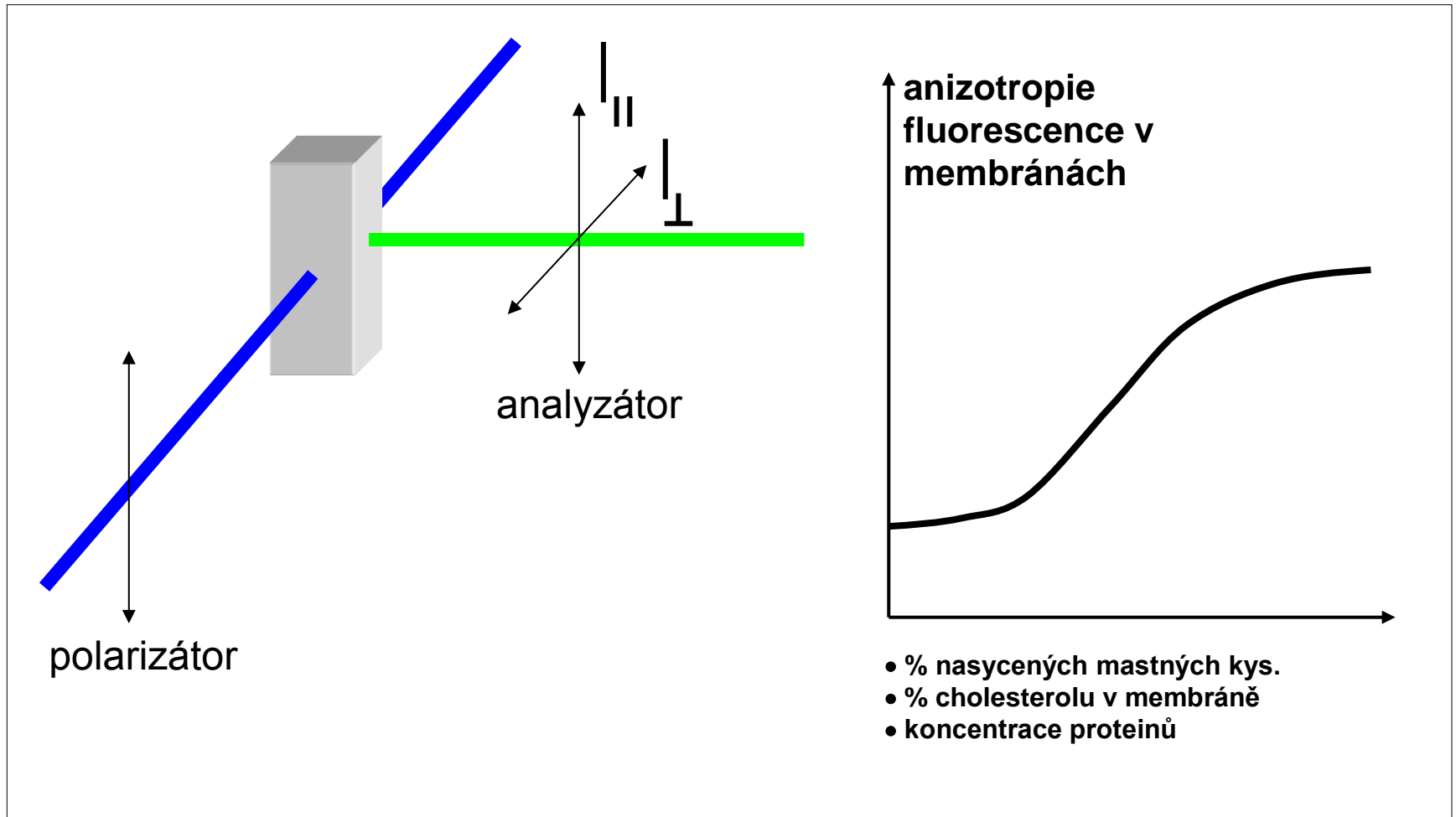
Fluorescenční anizotropie

- Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.:
- fluidita membrán
- interakce ligand - receptor
- proteolýza
- interakce protein - DNA
- kontrakce svalů
- aktivita proteinkináz

stupeň polarizace $p = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + I_{\perp})$

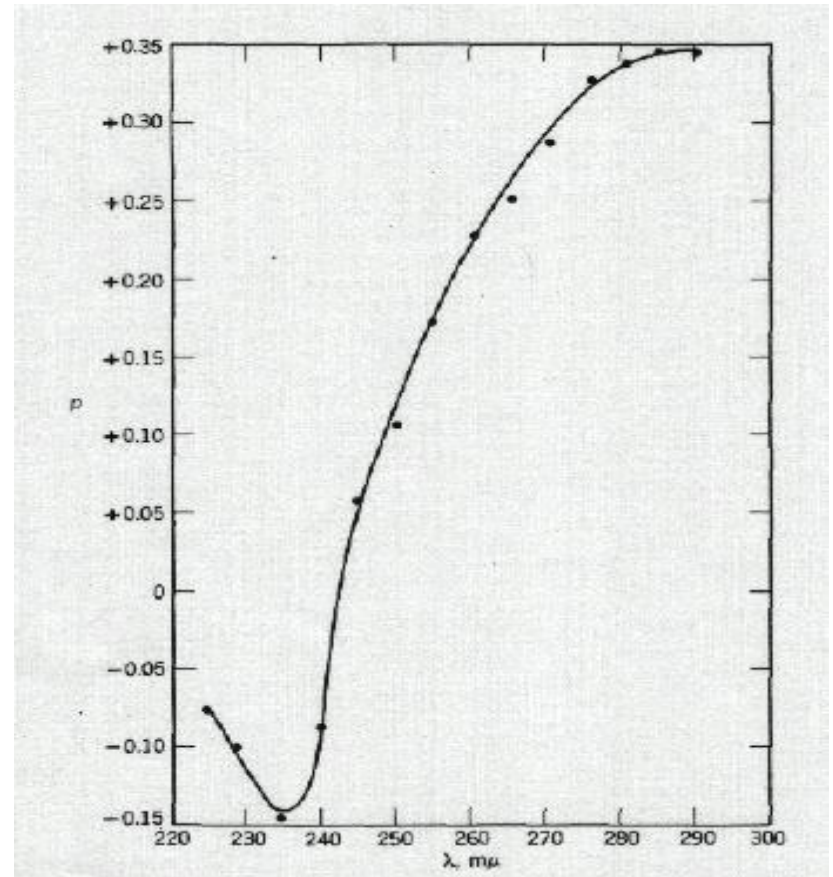
anizotropie

$r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2 I_{\perp})$



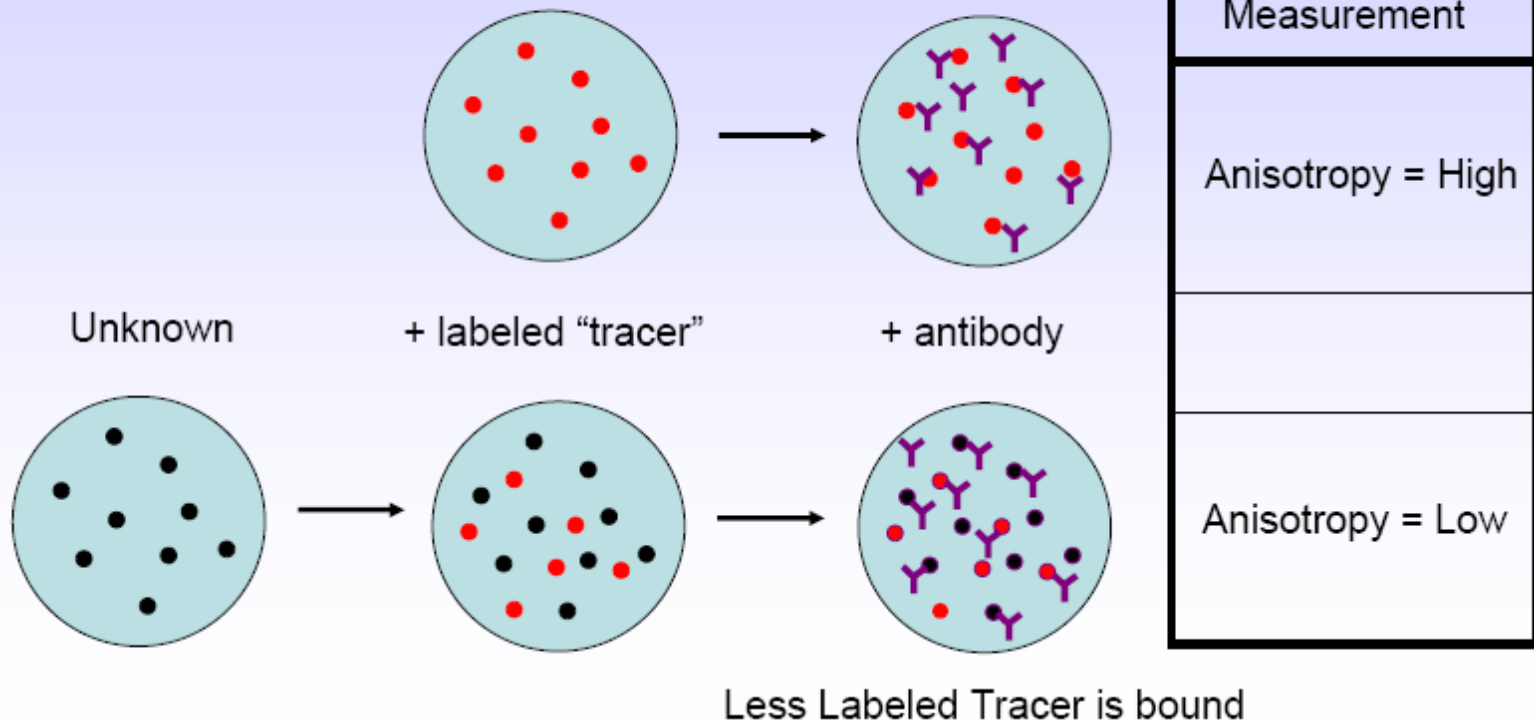
Polarizační spektra

Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.

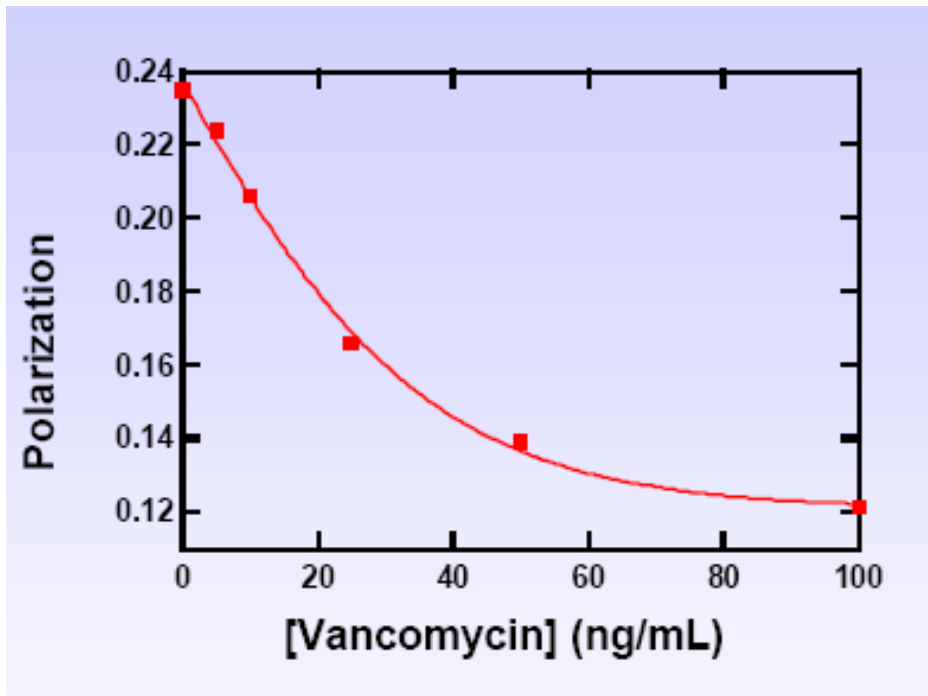


Imunoanalýza – polarizace luminiscence

1. The simple binding competition assay:



Polarizace luminiscence - aplikace



Vancomycin (ng/mL)	Polarization	[Tracer] bound (%)
0	0.234	100
5	0.223	91
10	0.207	76
25	0.167	41
50	0.139	16
100	0.119	0

Vancomycin – kalibrační křivka

Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je technika při níž jsou měřeny spontánní fluktuace intenzity fluorescence v mikroskopickém objemu (kolem 10-15 l) určeném fokusovaným excitačním laserovým paprskem. Malé, rychle difundující fluorofory způsobují rychlé fluktuace intenzity fluorescence – oproti konvenční fluorimetrii nedochází ke způměrování těchto difúzně závislých fluktuací. Časová závislost intenzity fluorescence je potom analyzována pomocí dočasné autokorelační funkce, která obsahuje informaci o rovnovážných koncentracích, reakčních kinetikách a difúzních rychlostech molekul ve vzorku

Fluorescenční korelační spektroskopie - aplikace

- fragmentace nukleových kyselin
- hybridizace nukleových kyselin
- tvorba produktů PCR
- laterální oddělení lipidů v dvojvrstvách
- difúze molekul v jádře a cytoplazmě
- interakce protein-protein
- vazebná rovnováha pro léčiva a jiné ligandy
- shlukování (clustering) membránových receptorů

Aplikace fluorescenční spektroskopie v hydrogeologii



Migrace podzemních vod

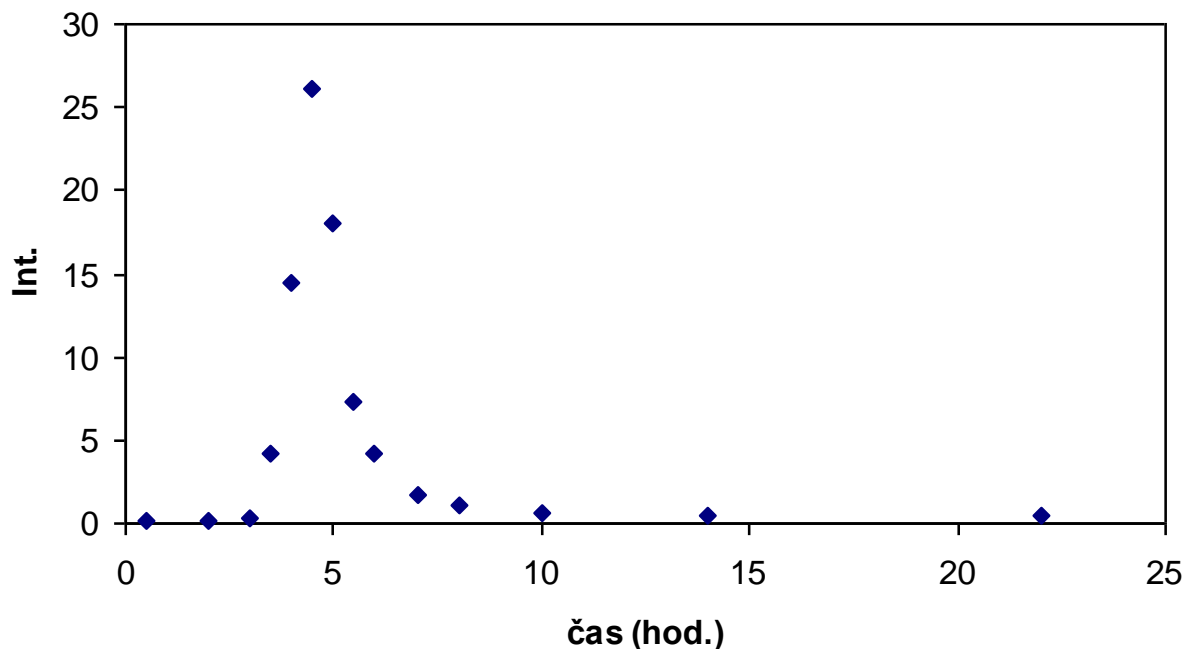
- sledování a objasnění systému podzemních řek a potoků v krasových oblastech (propadání a vývěry...)
- sledování toku vody z kontaminovaných míst (např. úložiště odpadů, skládek, atd.)



Fluorescenční „značkovače“ podzemních vod

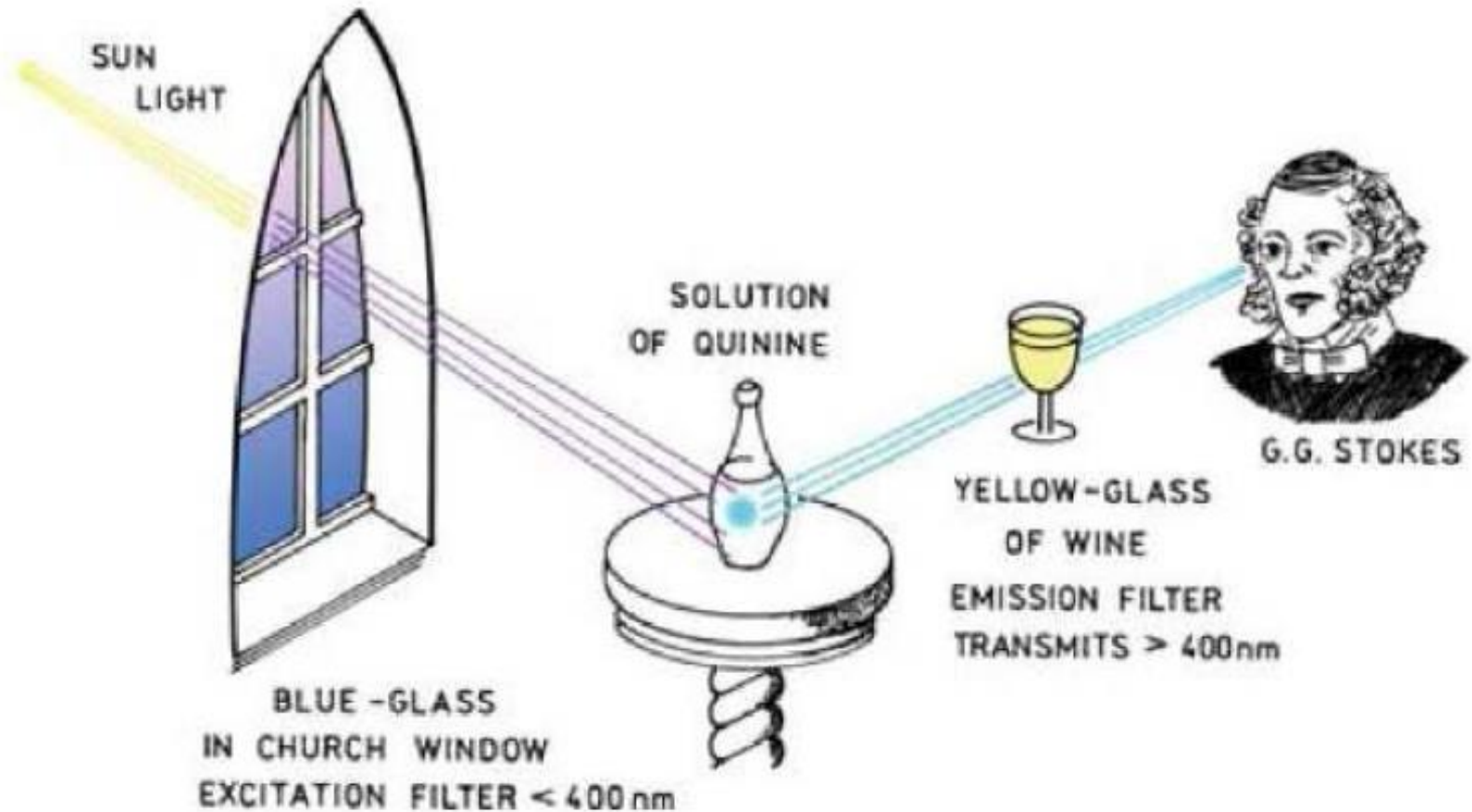
- fluorescenční „značkovače“ (**tracer**) jsou obvykle ve vodě rozpustné, silně fluoreskující látky (fluorescein, rhodamin, eosin, erythrosin, atd.)
- jestliže dochází k velikému zředění barviva, lze použít např. hydrofobní sběrné patrony
- k detekci lze použít jak LIF, tak spektrofluorimetr vybavený lampou (i detekce několika barviv zároveň)
- lze sledovat i časový průběh průchodu barviva potokem/řekou. Z rychlosti průtoku, zředění značkovače, vzdálenosti a dalších faktorů lze usuzovat na charakter, délku, případně členitost podzemního systému.

Příklad

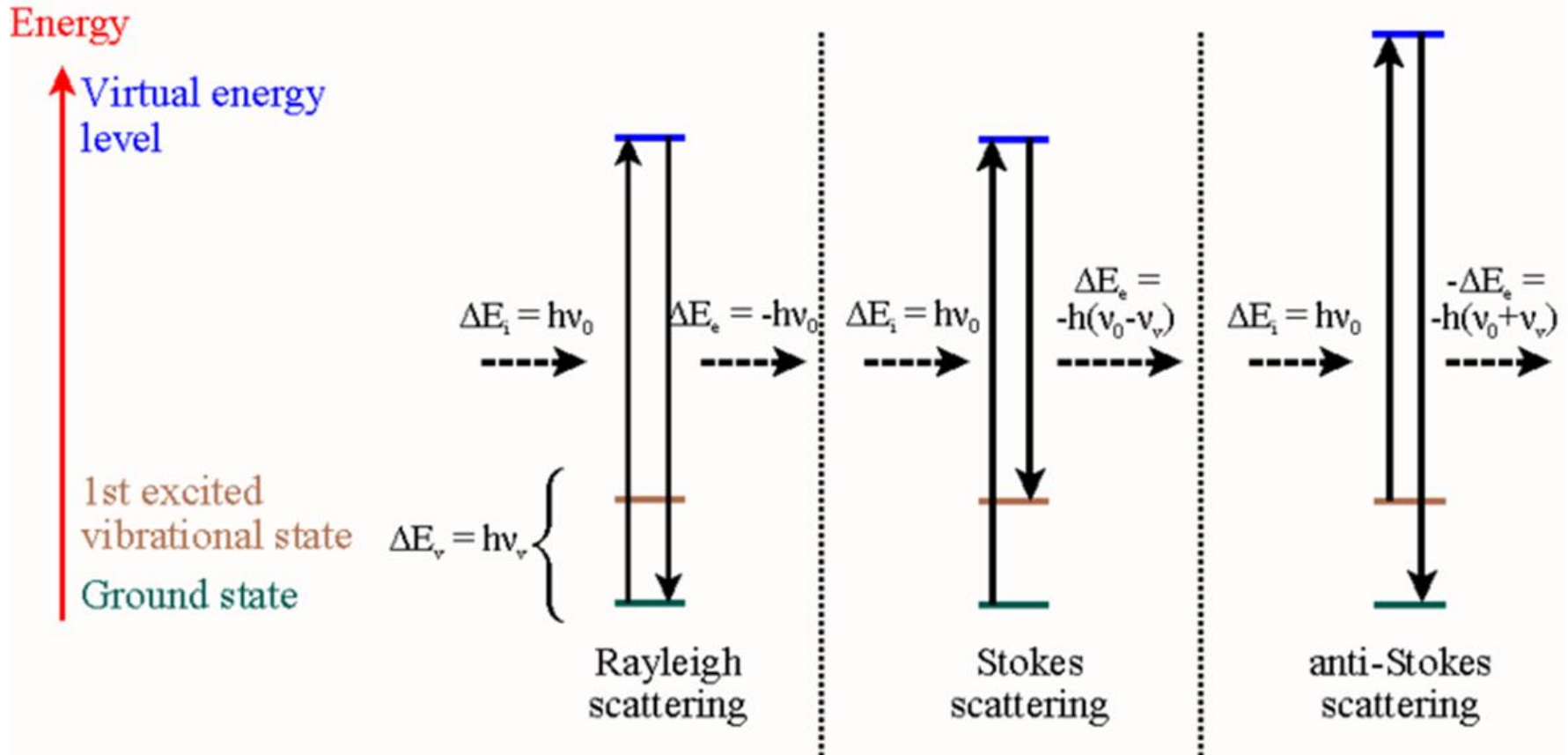


Závislost intenzity fluorescence fluoresceinu na čase ve vzorcích vody odebraných z potoka v Moravském Krasu - 50g fluoresceinu bylo rozpuštěno v potoce před propadáním nedaleko jeskyně Byčí skála a odběrem vody z okolních potoků byla prokázána propojenost systému podzemních vod.

Stokesův posun



Ramanův a Rayleigho rozptyl



Rayleighův rozptyl

- **Rayleighův rozptyl** je rozptyl světla na molekulách plynu případně na jiných částicích podstatně menších než vlnová délka
- při Rayleighově rozptylu se frekvence záření (vlnová délka) nemění
- světlo rozptylují přímo molekuly (vzduchu, plynu, atd.) a intenzita rozptýleného světla silně závisí na jeho vlnové délce (je nepřímo úměrná její čtvrté mocnině)
- to znamená, že modré světlo s krátkou vlnovou délkou se rozptyluje více než světlo **červené**



„Klasický televizor“ - CRT

Cathod Ray Tube - katodová trubice paprsků

princip fungování

vakuová elektronka

elektronové paprsky jsou vystřelovány z **elektronového děla** (u barevného monitoru tři děla - RGB)

o správné usměrnění svazku paprsků se starají **vychylovací cívky**

před dopadem na obrazovku procházejí paprsky **maskou**

maska zajistí, že paprsky dopadnou na správné místo v tzv. **luminiscenční vrstvě** - nátěru svítících bodů (stínítku)

existují různé typy masek i způsobů nanesení luminoforu - Delta, Inline, Trinitron, Flatron, Quntrix, QuintrixF a další

úhlopříčka - vzdálenost dvou protilehlých vrcholů obrazovky, udává se v palcích (viditelná úhlopříčka je obvykle menší)

15", 17", 19", 21" - úhlopříčky běžně používaných monitorů

rozlišení - počet zobrazitelných pixelů, udává se jako počet pixelů na řádku krát počet řádků, většinou je poměr šířky a výšky obrazovky 4:3

800 × 600, 1024 × 768, 1280 × 1024, 1600 × 1280 - optimální rozlišení pro příslušné délky

úhlopříčky

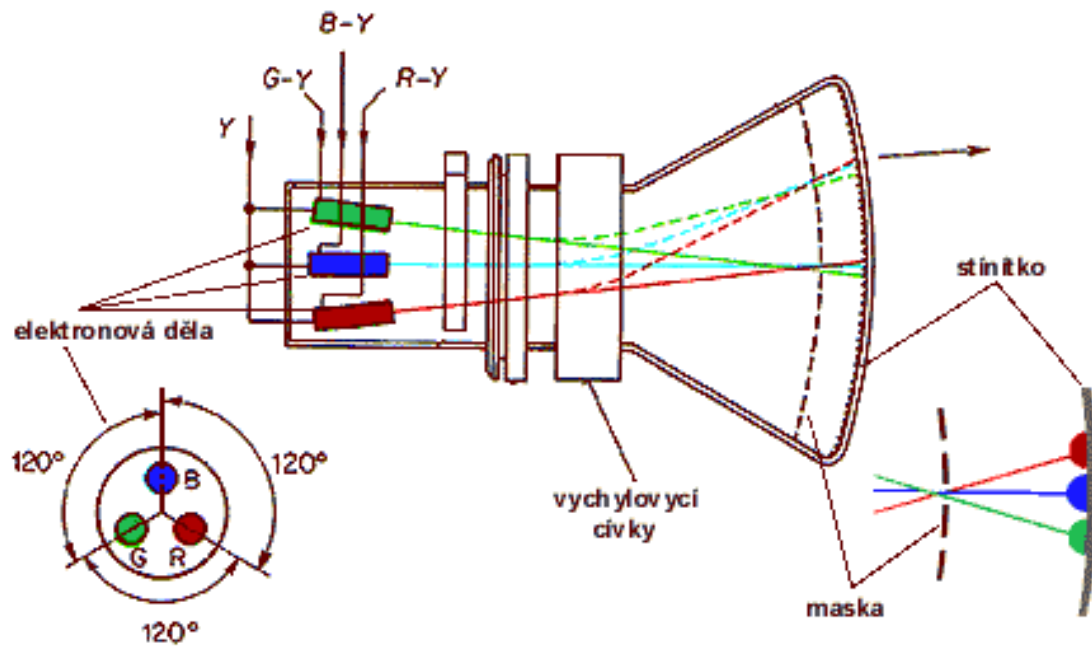
velikost (rozteč) luminiscenčních bodů - dnes běžně kolem 0,25 mm

obnovovací frekvence (Refresh Rate, V-Sync)

udává jak rychle dokáže monitor překreslit všechny pixely na všech řádcích - paprsek putuje po řádcích zleva doprava a odshora dolů

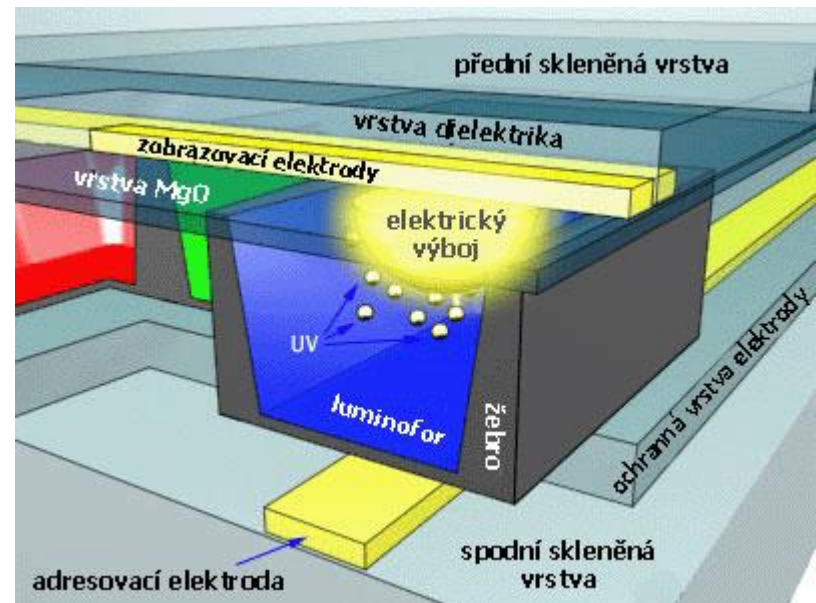
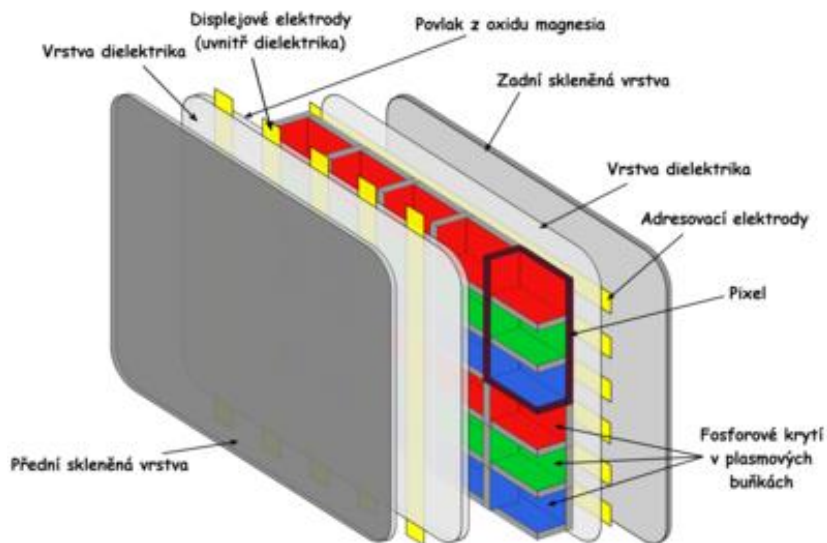
dolní ergonomická hranice je 75 Hz, při níž je celá obrazovka překreslena 75-krát za sekundu

CRT



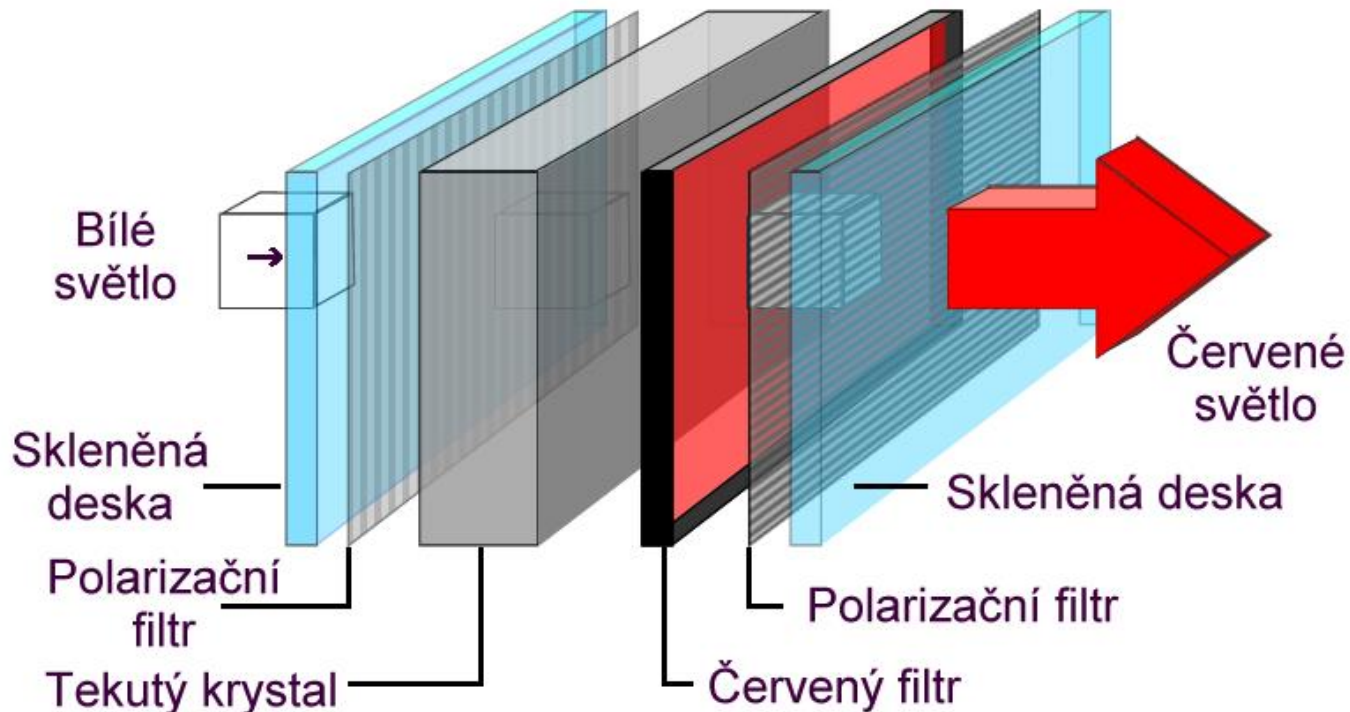
Plazmová televize

Mezi skleněné desky je umístěno **velké množství** vzájemně oddělených **buněk naplněných plynem**. Po přivedení napětí na **elektrody** v buňce dojde k **výboji** a vznikne **ultrafialové** (okem neviditelné) záření, které dopadá na **vrstvu luminoforu**, která vyzařuje **světlo dané barvy**. **Intenzita** (jas) každého bodu se ovládá **množstvím výbojů** za jednotku času.

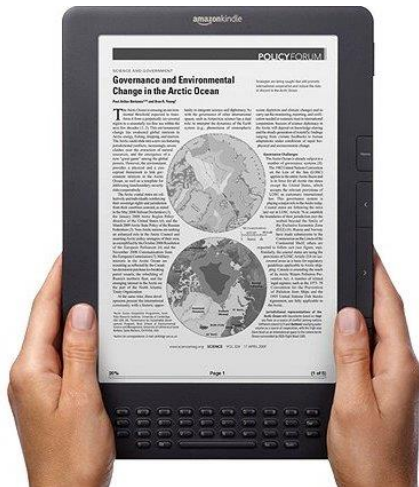
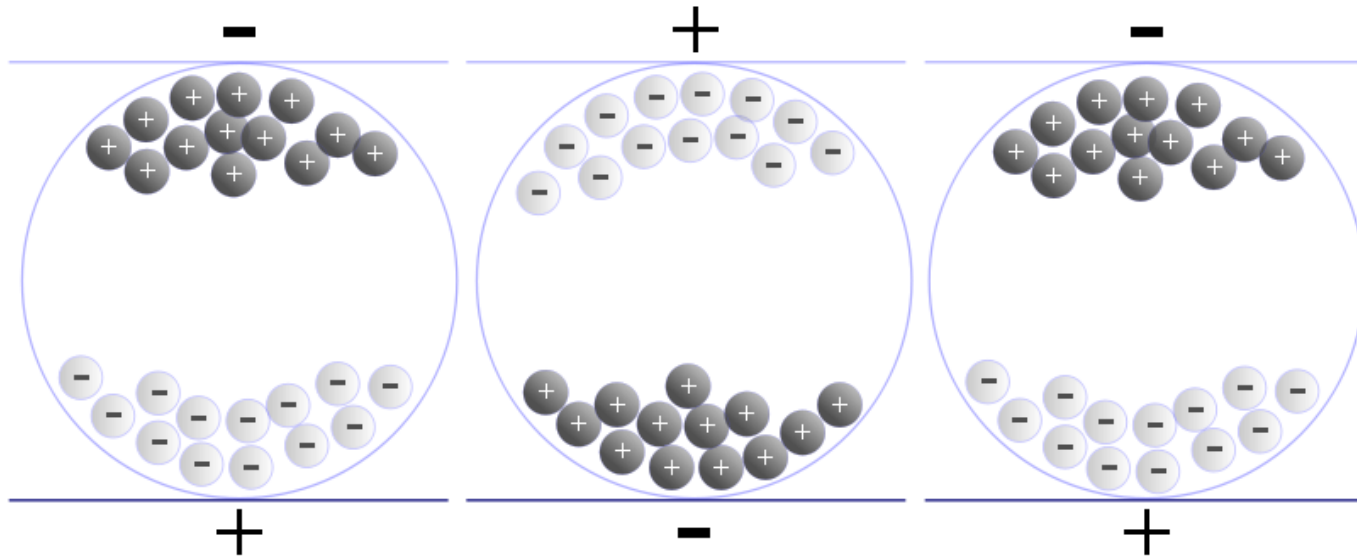


LCD

U LCD (Liquid Crystal Display) obrazovky je **každý pixel** tvořen **trojicí subpixelů**. Zezadu je displej **prosvěcován zdrojem bílého světla** (zářivka, výbojka, nebo LED diody). Před každý subpixelem je **barevný filtr** tvořící základní **barvy RGB**. Viz například **červený subpixel**:

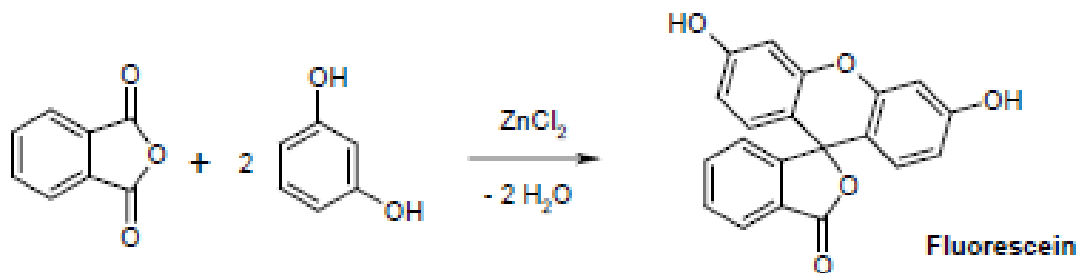


"Elektronický papír"



"Elektronický papír" používá k zobrazování mikrokapsule obsahující černé a bílé kuličky s elektrickým nábojem. Přivedením impulzu napětí na elektrody se opačné póly přitáhnou a kuličky se přeskupí. Tak zůstanou až do další změny. Na změnu stavu je zapotřebí jen zanedbatelné množství energie a zobrazovač nepotřebuje podsvícení - navíc je dobře čitelný i na přímém slunci. Změna je ale příliš pomalá (řádově 0,5 s), proto se tyto zobrazovače používají například v elektronických čtečkách knih nebo v digitálních hodinkách, kde není potřeba zobrazovat rychlé změny.

Syntéza fluoresceinu

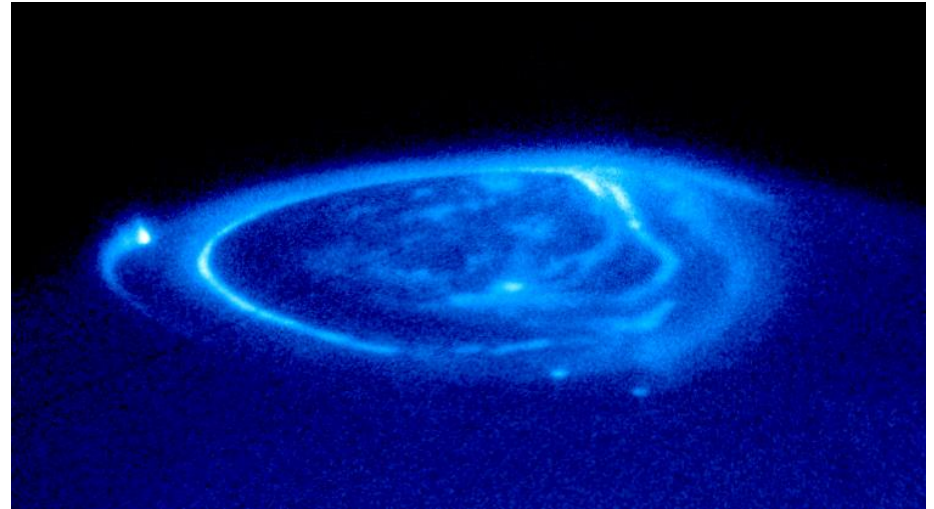


Kondenzační reakce ftalanhydridu (půl lžičky) s resorcinolem (půl lžičky)

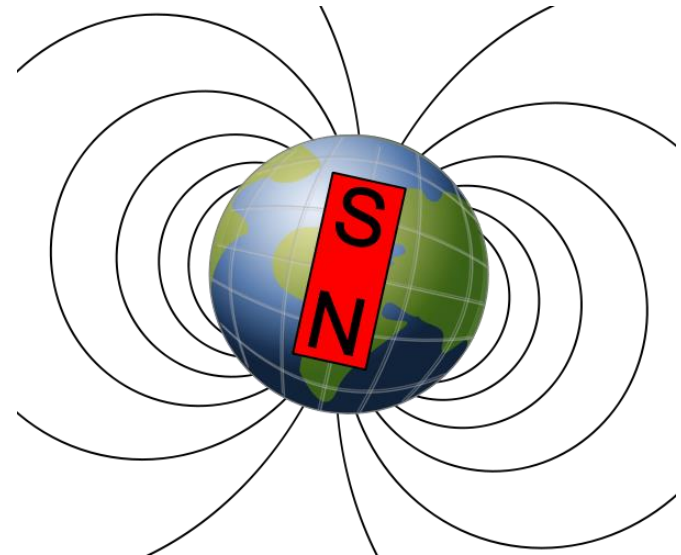
Fluorescein na Den svatého Patrika



Jak vzniká polární záře?



Na Slunci vznikají vlivem nerovností v magnetickém poli sluneční skvrny. U těchto skvrn vznikne jedna masivní protuberance (erupce). Mrak částic slunečního větru tvořený protony, elektrony a alfa částicemi letí vesmírem (rychlostí řádově 0,1 % rychlosti světla) a pokud se na své cestě setká s magnetickým polem Země, tak ho ono pole většinu odrazí dál do vesmíru, ale část ho zachytí a stáčí po spirálách směrem k magnetickým pólům Země. Tam sluneční vítr interaguje s atmosférou a vzniká polární záře. Urychlené částice narážejí do molekul plynů v atmosféře a excitují je. Po následné de-excitaci jsou vyzářeny fotony (kyslík – 557,7 nm).





Děkuji za pozornost...

