

BAREVNÉ PRINCIPY ABSORPCE A FLUORESCENCE

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních **Biomolekul**

FGP – Funkční genomika a proteomika
NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul
Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI **SCI** **Národní centrum
pro výzkum
biomolekul**

Co svítí na diskotéce?



Kouř, 1990, Vorel, T. <https://youtu.be/fEAe1GGaIHE?si=SkJGtkB1nBlvQpHJ>

Otázky

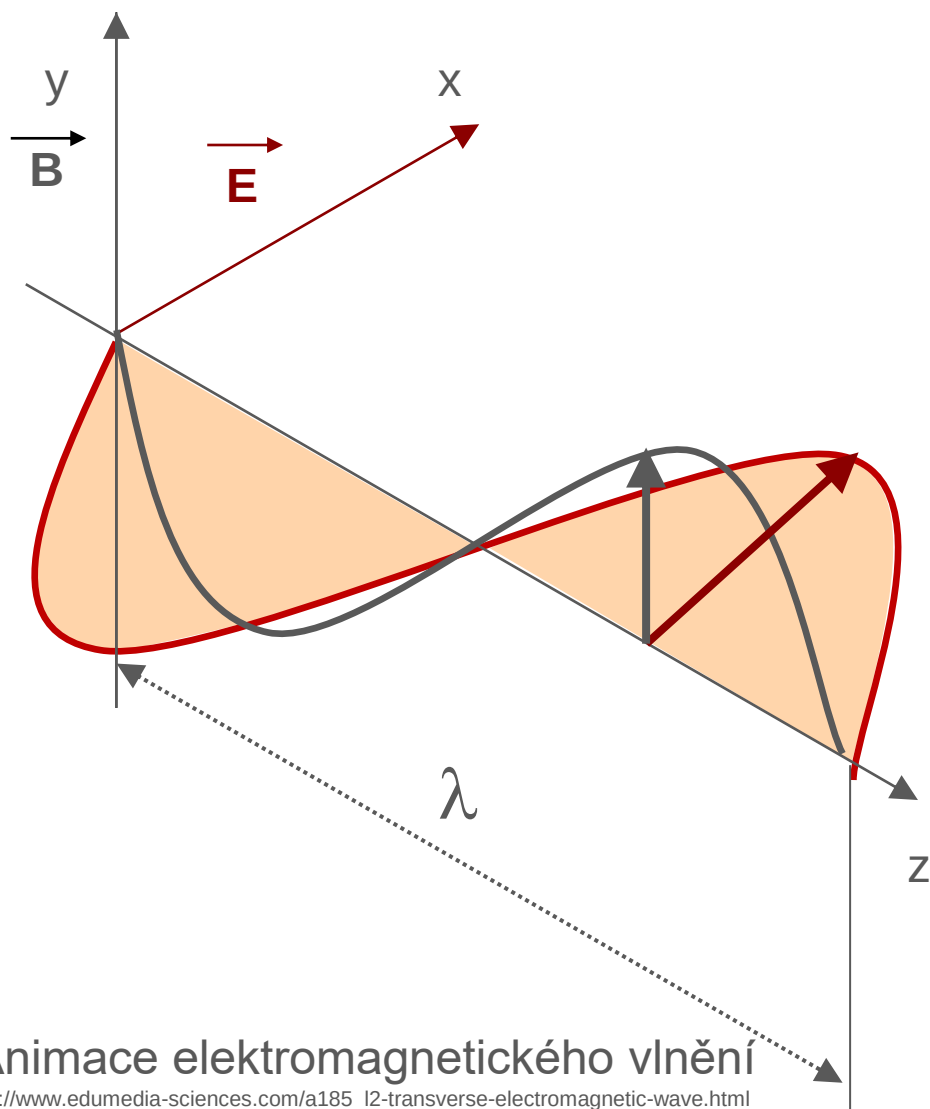
- Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?
- Jak souvisí víno se zásadním objevem v oblasti fluorescence?
- Proč jsou excitační a emisní spektra symetrická?



Světlo je elektromagnetické vlnění

- Skládá se z elektrické složky a magnetické složky, které kmitají ve fázi v na sebe kolmých rovinách.
- Světlo je charakterizováno frekvencí f a vlnovou délkou λ .
- Frekvence f určuje kolikrát za sekundu vlnění kmitne, udává se v $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$
- Vlnová délka udává vzdálenost, kterou za jeden kmit světlo urazí, udává se v nanometrech $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$
- Frekvence f a vlnová délka λ jsou spojeny vztahem $c = \lambda f$
kde c je rychlost světla -vlnění ($c=299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$ ve vakuu)
- Energie $E = h f$, kde h je Planckova konstanta ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)

Elektromagnetická vlna



$$c = \lambda f$$

c je konstanta, pak jestliže se zvýší vlnová délka, musí se snížit frekvence, aby byl součin konstantní.

Vlnová délka λ je nepřímo úměrná frekvenci f .

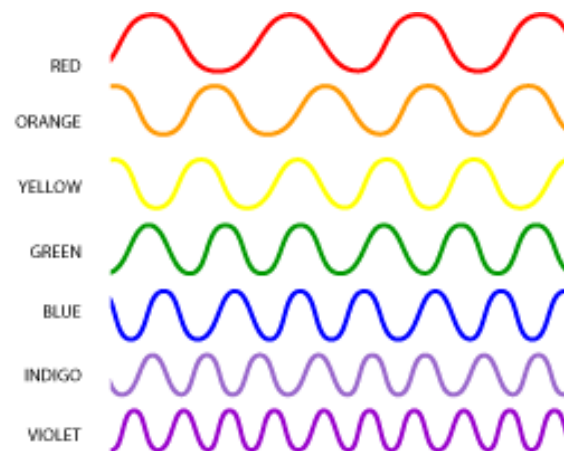
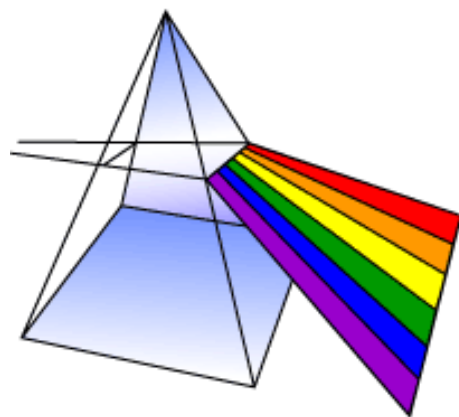
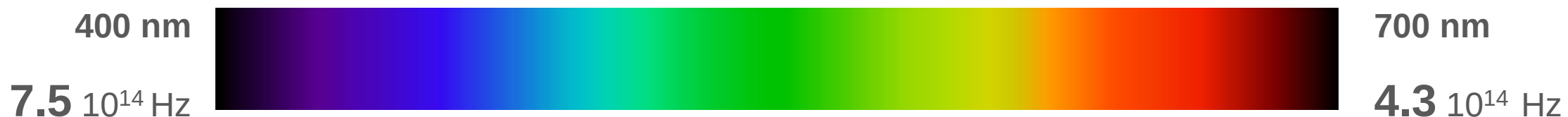
$$E = h f$$

Čím je větší frekvence, tím je větší energie záření.

Čím je větší vlnová délka λ , tím je menší energie záření.

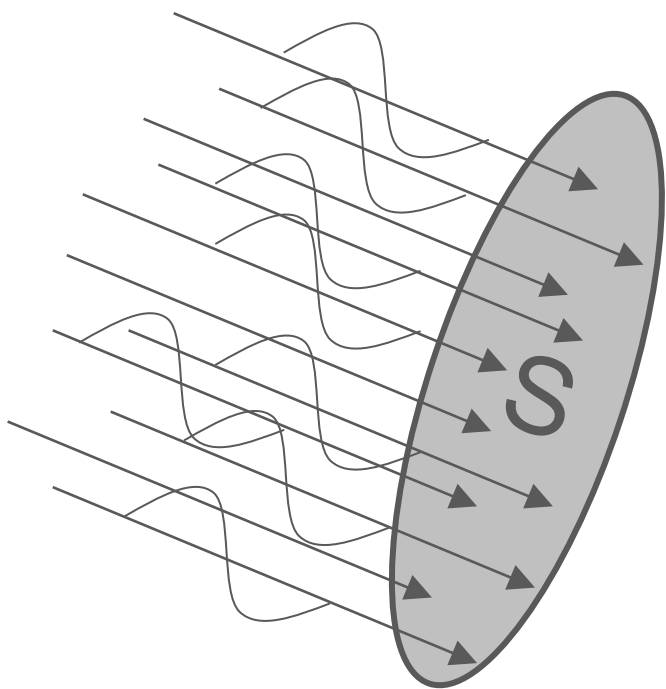
Viditelné spektrum

- Z celého spektra záření je pouze malá část viditelná.
- Viditelné spektrum je ohraničeno vlnovými délkami 400 nm a 700 nm.



Intenzita

- **Intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času



Intenzita je definována jako výkon na jednotku plochy.

$$I = \frac{P}{S}$$

Výkon je definován jako energie za jednotku času.

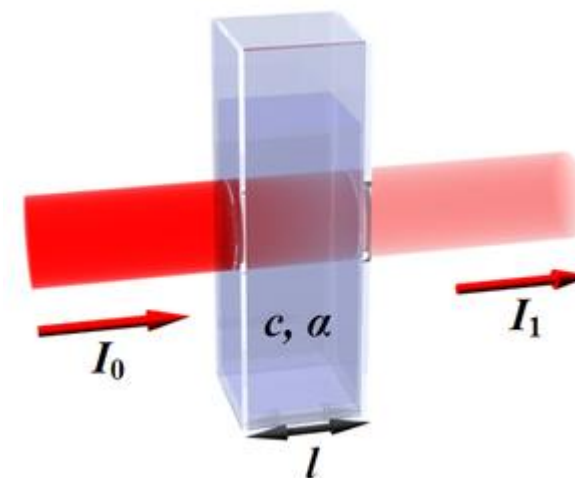
Energie fotonu je $E=hf$, takže celková intenzita pro n fotonů je

$$I = \frac{nhf}{S\Delta t}$$

V tomto modelu se fotony pouze počítají a nevnímají se jako vlny.

Absorpce

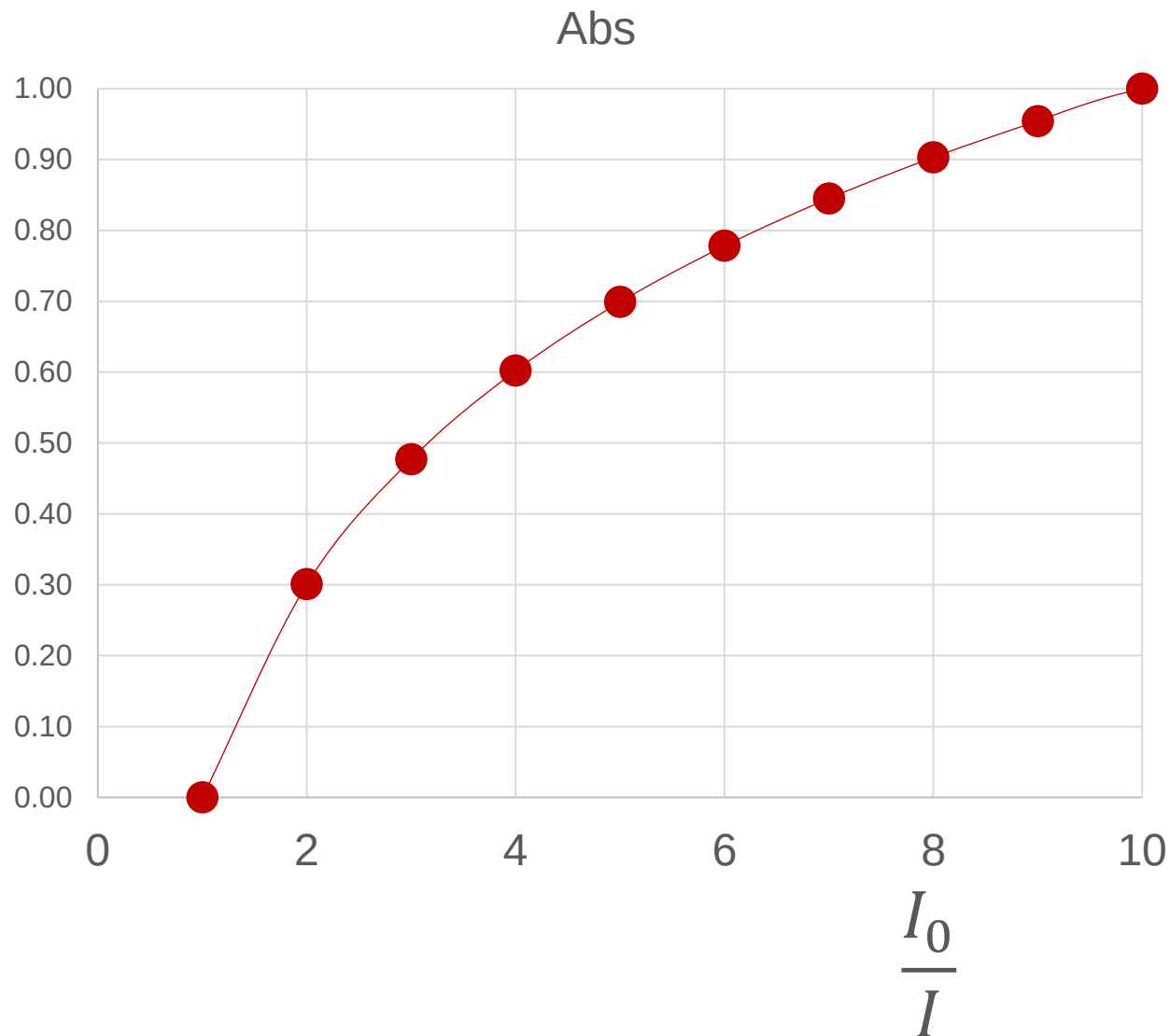
- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci mono- chromatického světla platí
- **Lambert-Beerův zákon:**



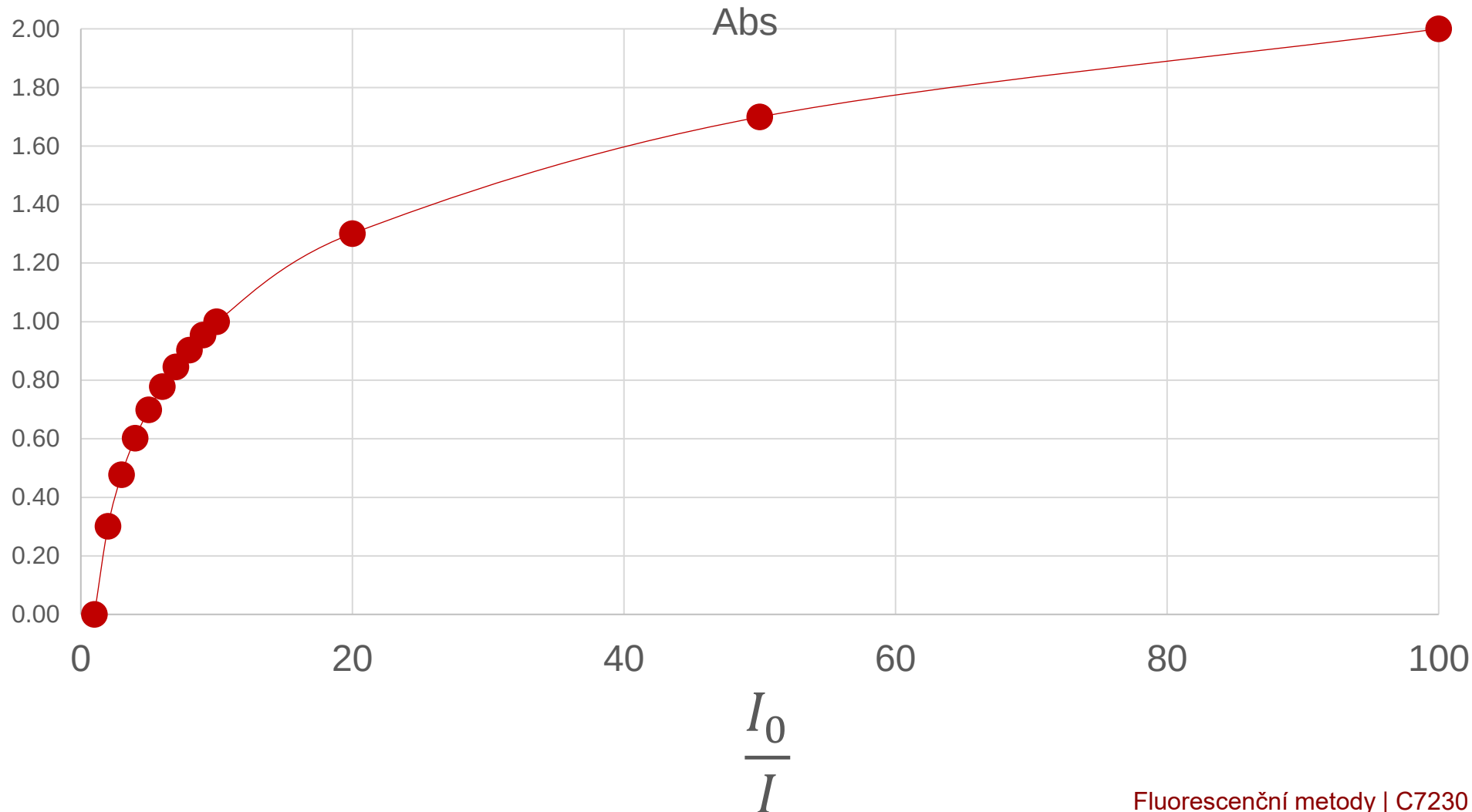
- Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

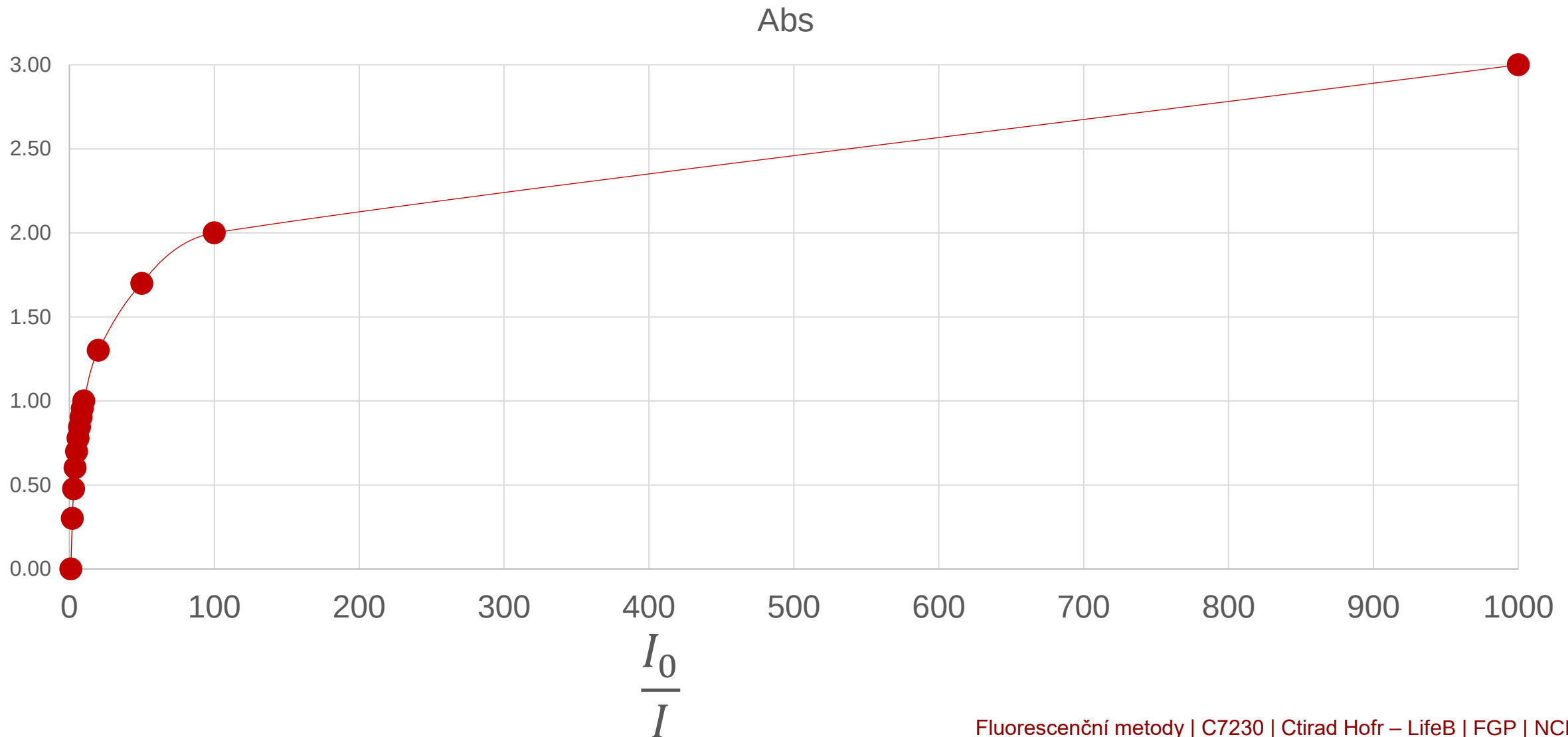
Absorbance 1 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Absorbance 2 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Absorbance 3 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Luminiscence

- Emise světla z nějaké látky; nastává z elektronových excitovaných stavů
- Podle původu dělíme luminiscenci na

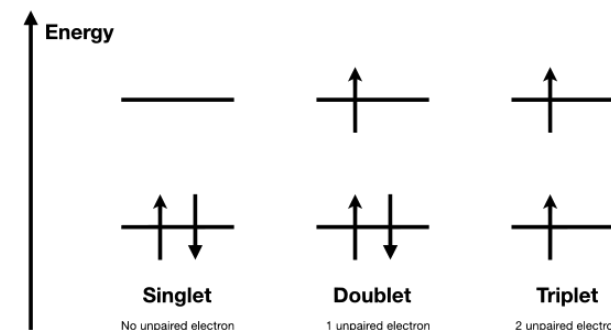
1.fotoluminiscence

2. chemiluminiscence

1.fluorescence

2.phosphorescence

- Emise z excitovaných singletových stavů
- Prakticky: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání τ (Lifetime) je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi – je řádově **1 – 10 nanosekund**
- pozn. : světlo urazí za 1 ns 30 cm

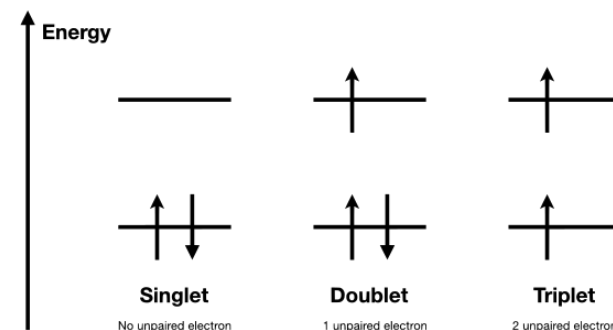


FOSFOrescence

- Emise z excitovaných (zakázaných) tripletových stavů
- Prakticky: **fosforescence** má mnohem delší dobu dohasínání než **fluorescence**

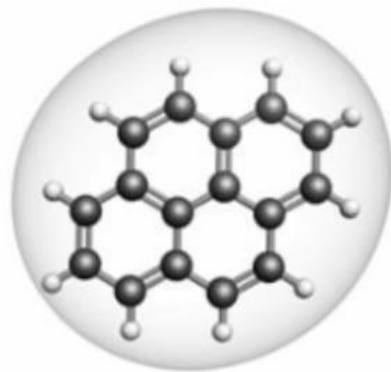
Doba dohasínání řádově
milisekundy až sekundy

pozn. : světlo urazí za tu dobu 300 až 300 000 km



Komentovaný úvod – fluorofor

Definition of Fluorescence



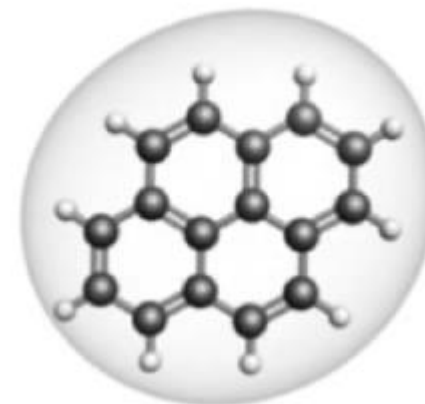
Fluorophore molecule

molecular
probes®

Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?

- molekula je **planární**
- molekula je **aromatická**

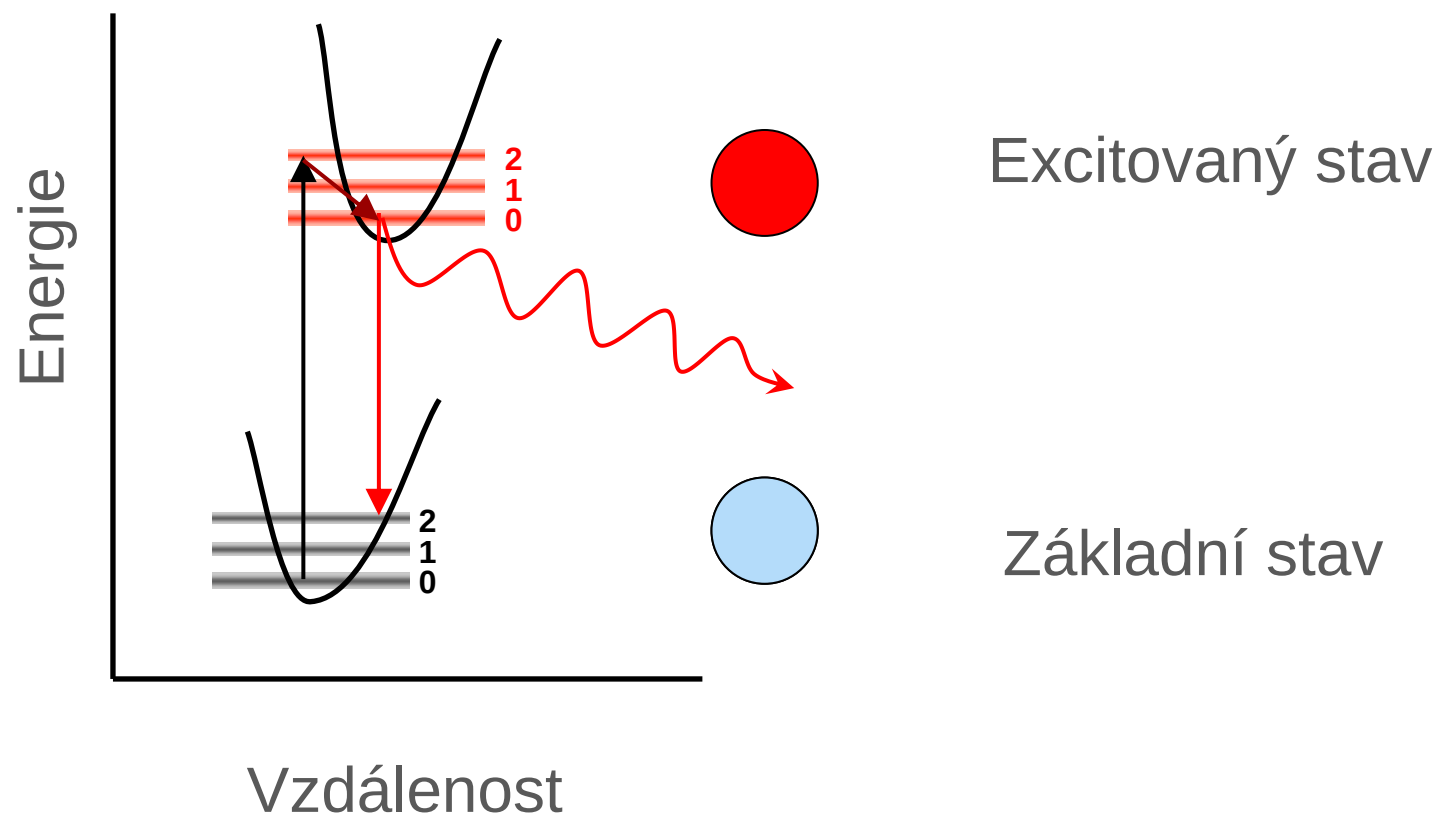
obsahuje systém konjugovaných vazeb



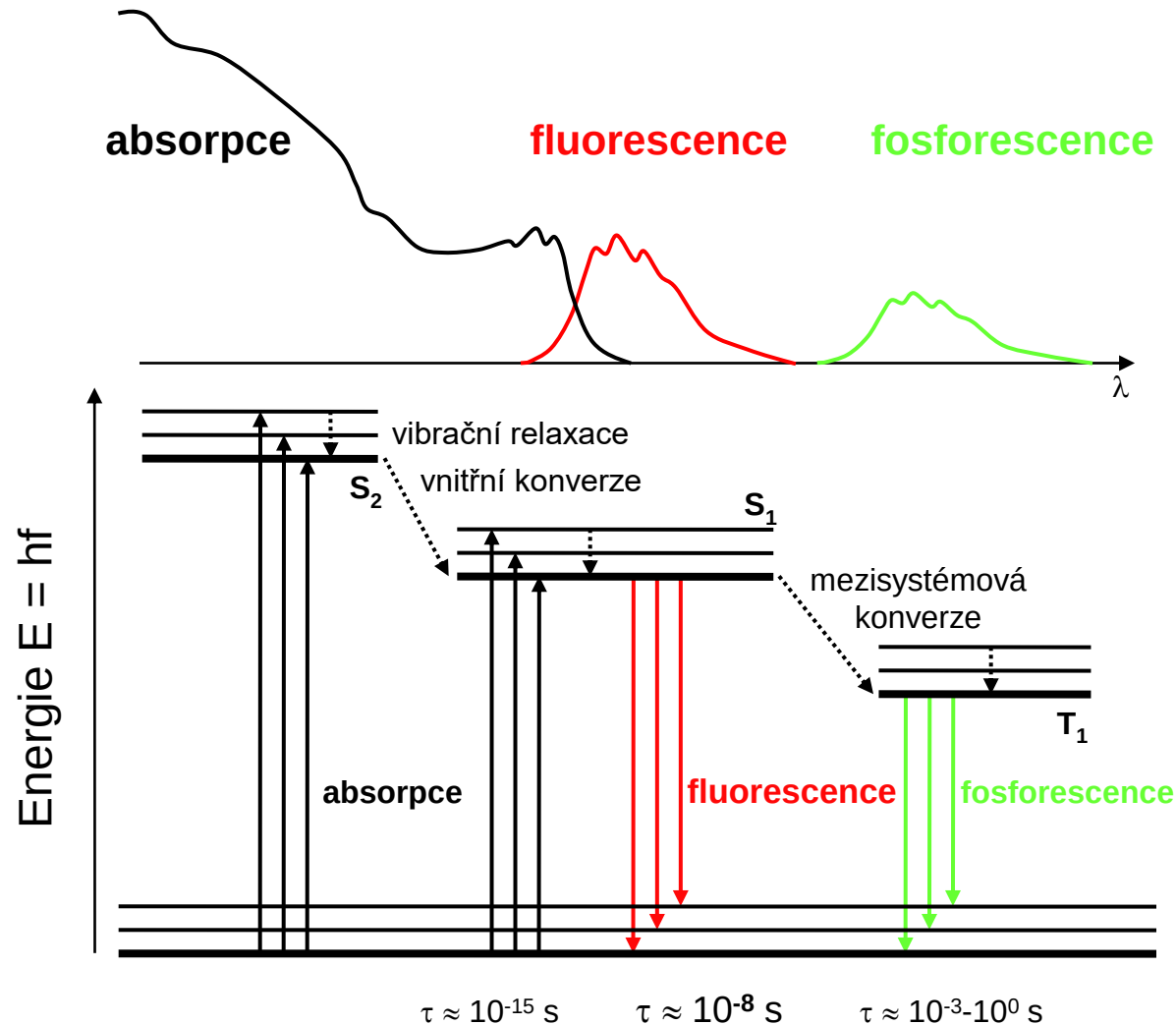
Frank-Condonův princip o nepohyblivosti „lenosti“ jader při absorpci

Absorpce fotonu elektronem – excitace elektronů molekuly je velmi rychlý proces v řádu femtosekund (10^{-15}s). Protože atomové jádro je mnohem těžší než elektron, během absorpce fotonu se nepohybuje. Po absorpci fotonu - excitaci se celá molekula nachází v nestabilním stavu - „je horká“ a vibruje, aby se zbavila energie - „ochladila se“.

Absorpce a emise energie molekulou

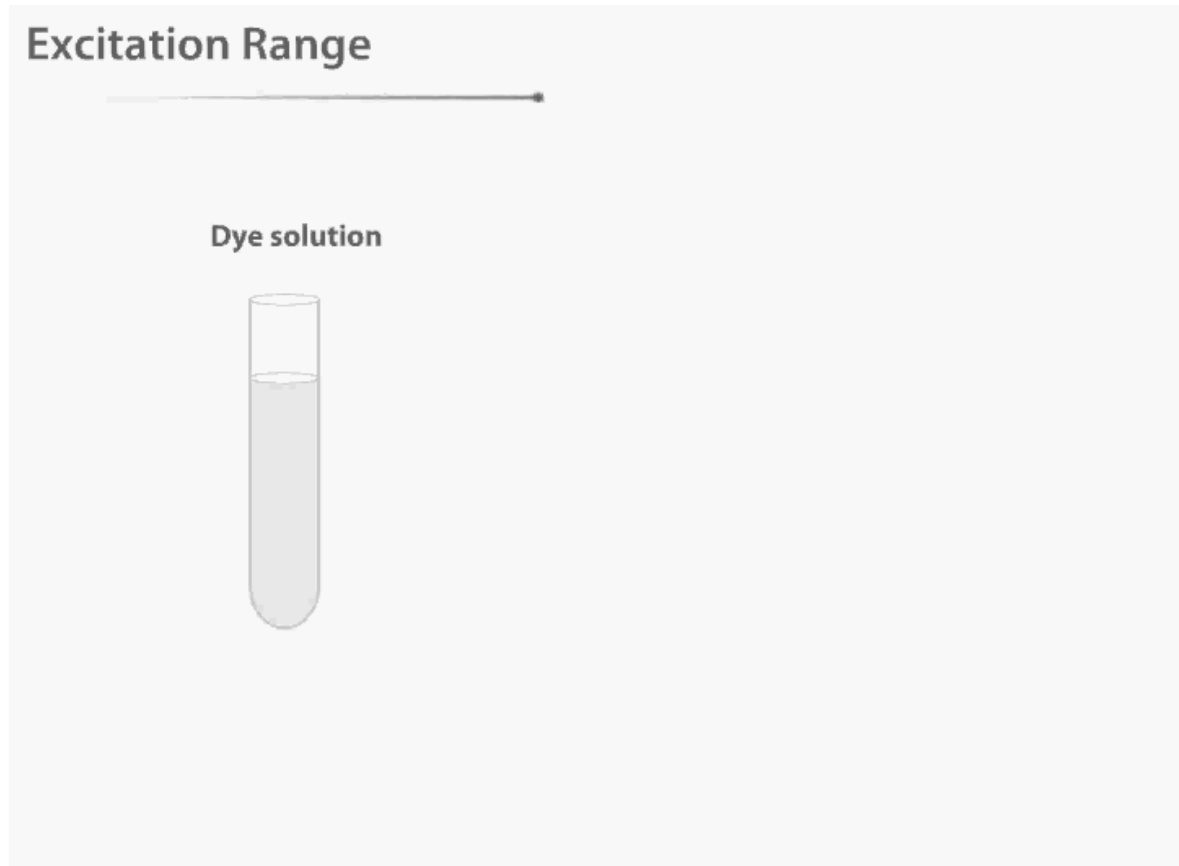


Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronovými vibračními stavy molekuly



- Délka svislé šipky udává velikost změny energie při přechodu.
- Vodorovná osa udává dobu přechodu – čím delší čas potřebný na přechod, tím více vpravo. Delší čas = nižší pravděpodobnost přechodu.

Vznik absorpčního ~ excitačního spektra

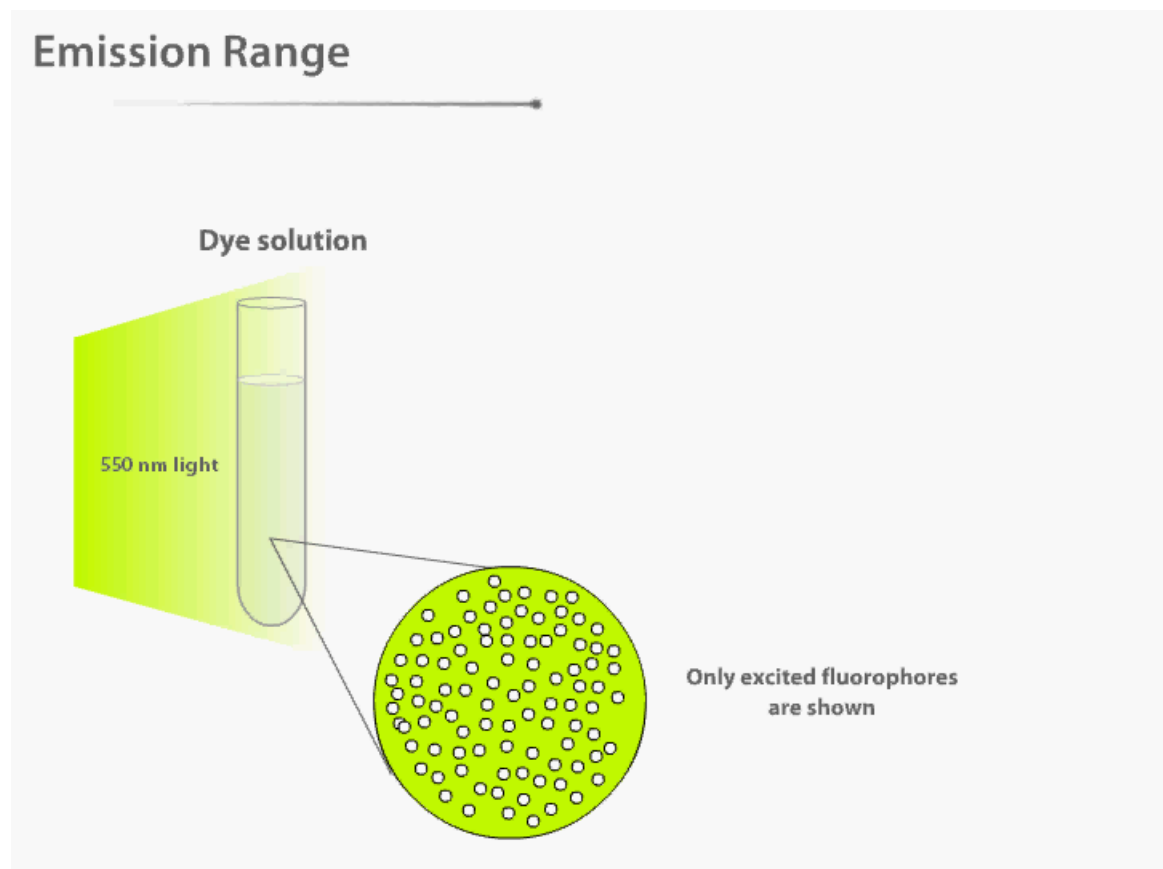


Výukový materiál společnosti Invitrogen

Excitační~ absorpční spektrum udává pravděpodobnost, že při dané vlnové délce dojde k excitaci fluoroforu = jeho elektronů **dopadajícím světlem.**

Spektrum = pravděpodobnost přechodu

Vznik emisního spektra

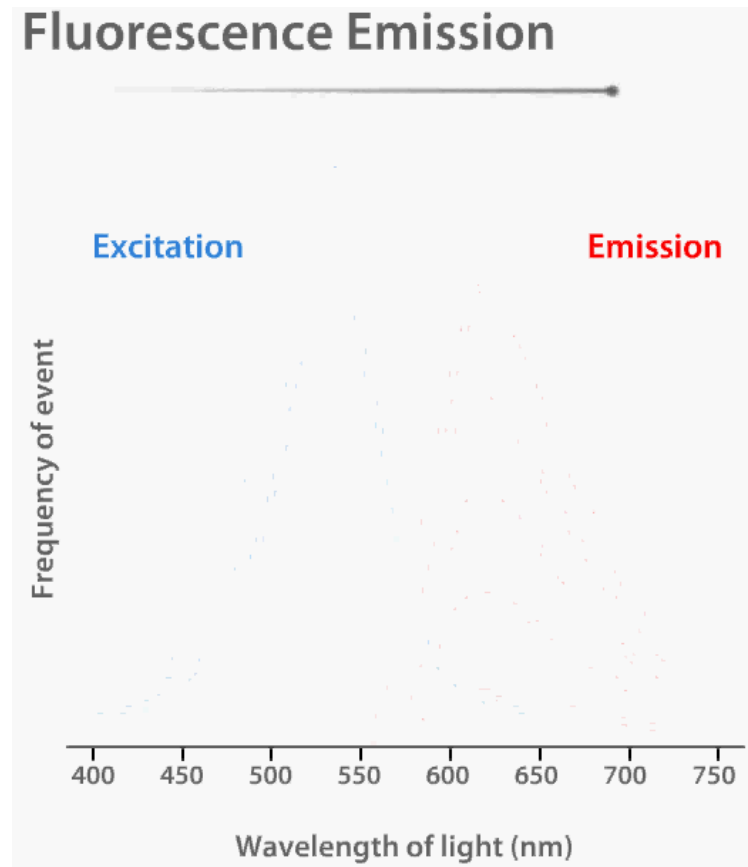


Výukový materiál společnosti Invitrogen

- Emisní spektrum určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. Emisní spektrum závisí na fluoroforu a je typickou charakteristikou fluoroforu.

https://youtu.be/SGFlr1jFNBM?si=Y_lq-AfMxdP9_m9f&t=388

Nezávislost tvaru emisního spektra na excitačním světle



- Tvar emisního spektra se nemění, když se mění vlnová délka excitačního světla.
- Mění se pouze intenzita.

<https://youtu.be/oVxpaUfTuXI?si=Eovpb1IgNiLmGiBy&t=79>



Stokesův posun

- Emitované světlo má vždy menší energii – větší vlnovou délku λ než je energie absorbovaného světla – menší λ .
- Rozdíl mezi maximem absorpčního a maximem fluorescenčního emisního spektra je specifická charakteristika daného fluoroforu.
- Stokesův posun = $\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{ex}}$

Vznik Stokesova posunu



Tepelná nebo disipační energie na molekulární úrovni označuje tepelnou energii obsaženou ve vibracích atomů a molekul. Teplo je celkovou vibrační energií všech atomů a molekul tvořících látku. Když molekuly získají více tepla, dodává jim více energie, což způsobuje jejich rychlejší vibrace a zvětšuje mezimolekulární prostor mezi nimi.

[Moving Molecules - The Kinetic Molecular Theory of Heat | Cool Cosmos \(caltech.edu\)](http://coolcosmos.caltech.edu/)

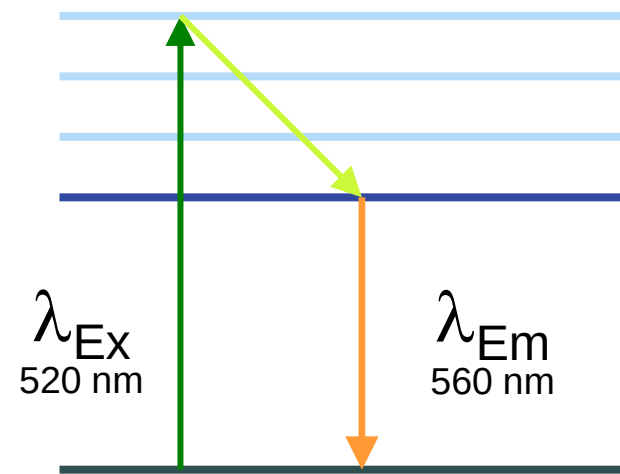
Stokesův zákon

Vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla

$$\lambda_{\text{em}} \geq \lambda_{\text{ex}}$$

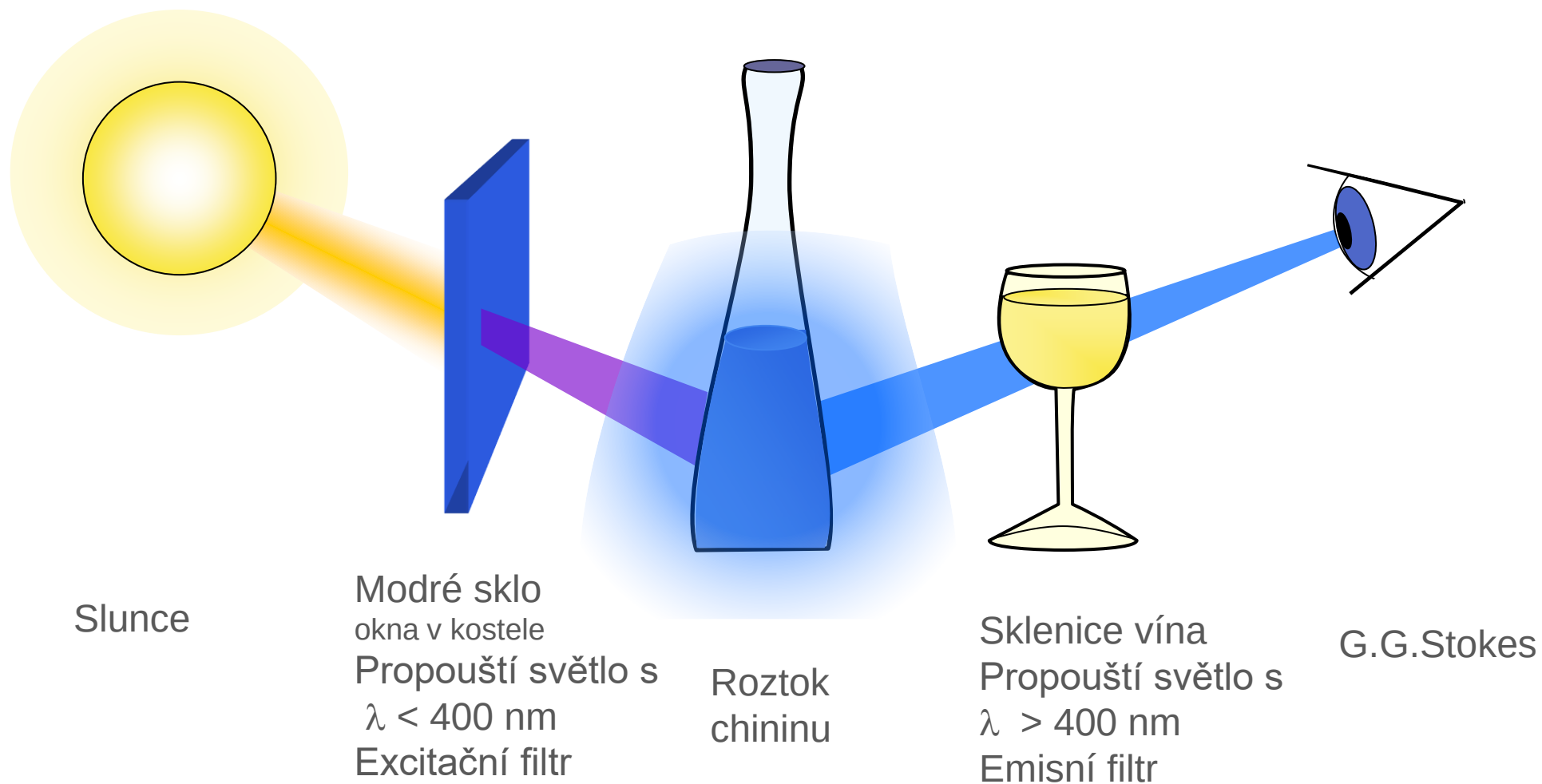
Změna vlnové délky je způsobena tím, že po absorpci záření často dochází k částečné ztrátě energie molekul – tepla při přechodu z vyšších excitovaných elektronových stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu.

Důsledek – Energie fluorescenčního – emitovaného světla je nižší, než energie absorbovaná excitačním zářením.

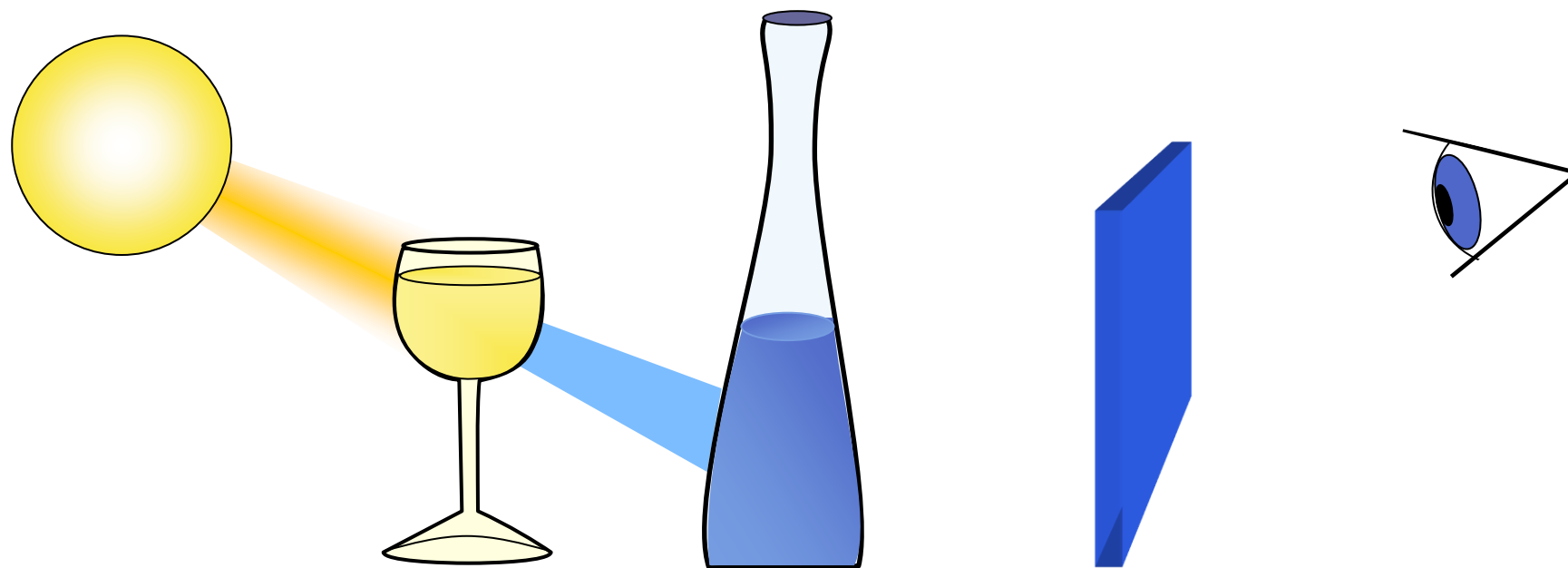


Experiment Sira G. G. Stokese

1852, Cambridge

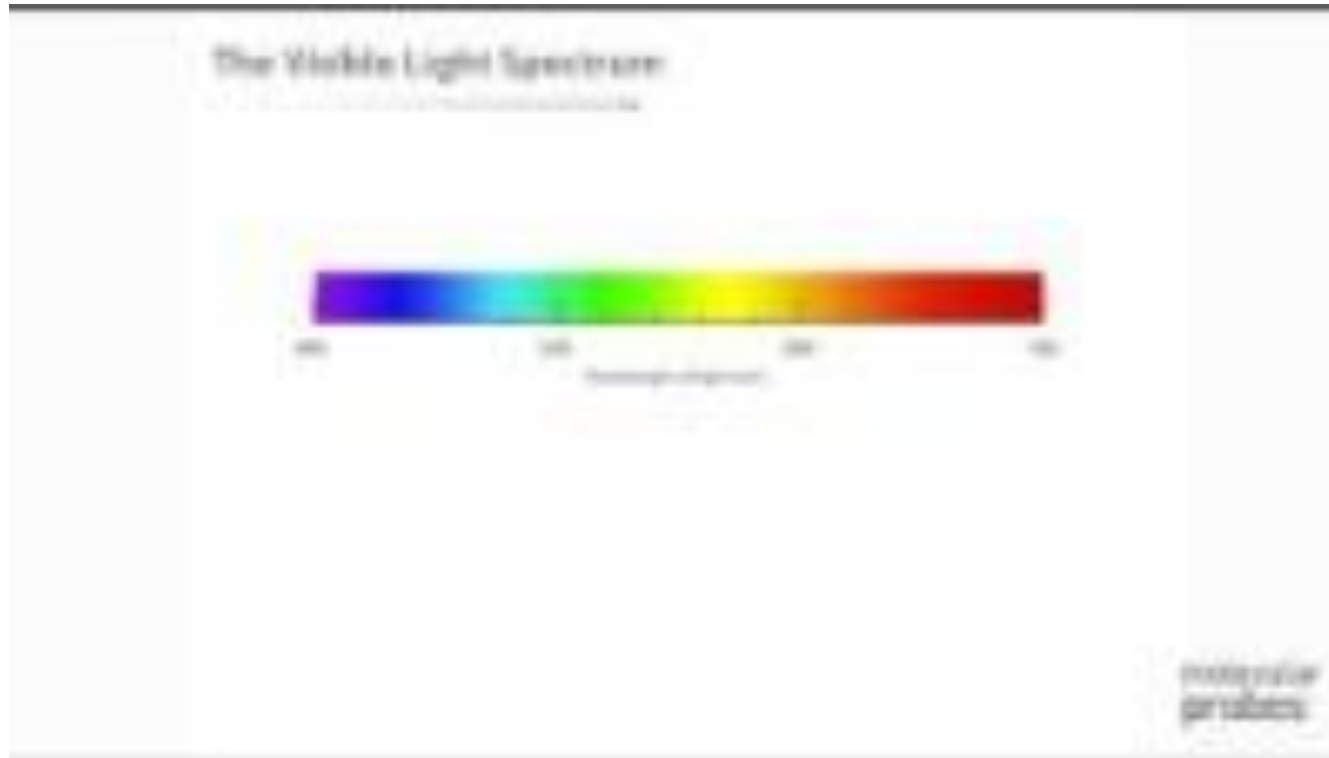


Co se stane, když zaměníme filtry?



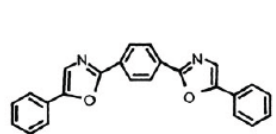
Při záměně filtrů , tj. jestliže dáme sklenici vína do dráhy slunečních paprsků, procházející světlo nemá dost krátkou vlnovou délku tj. dostatečnou energii a již nemůže roztok chininu excitovat.

Animovaný úvod do principů fluorescence

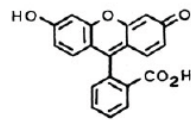


- <https://www.youtube.com/watch?v=SGFlr1jFNBM>

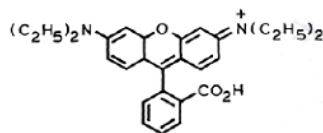
Příklady fluoroforů



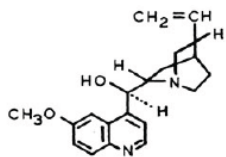
POPOP



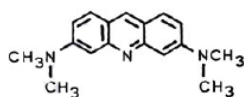
Fluorescein



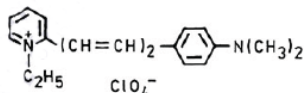
Rhodamine B



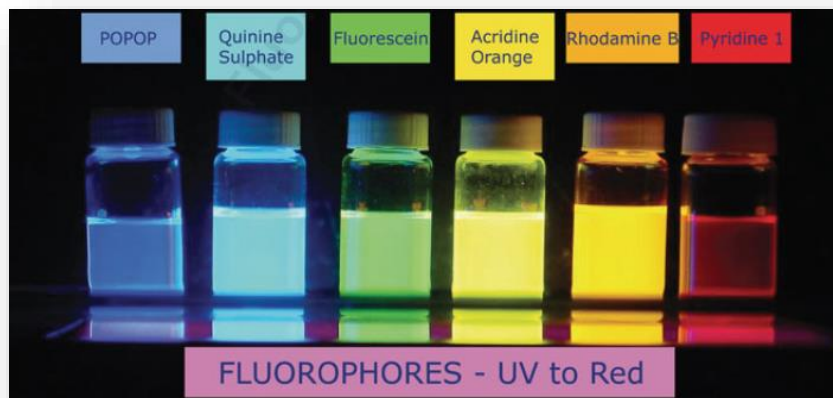
Quinine



Acridine Orange



Pyridine 1



J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

- **Fluorofory** nebo **fluoreoscenční barviva** jsou molekuly, které fluoreskují. Fluorescenci vykazují zejména aromatické sloučeniny – polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly).
- chinin, fluorescein, rhodamin B – nemrznoucí směsi pro chlazení motoru, fluorescenční značení brzdové kapaliny
- POPOP – scintilátory
- Acridinová oranž, ethidium bromid – DNA
- Umbeliferon – ELISA
- Antracén, perylén – znečištění životního prostředí oleji

Využití fluorescence v geografii



Fluorescein byl použit k důkazu, že řeky Rýn a Dunaj jsou propojeny podzemními proudy.

Kvantový výtěžek

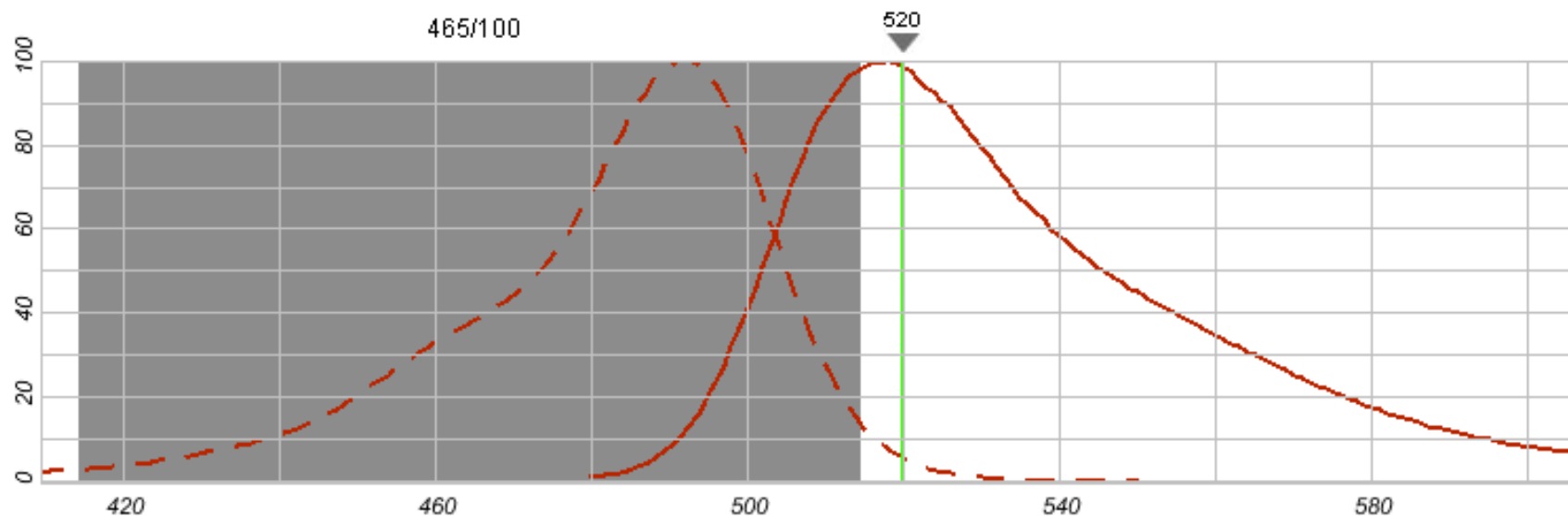
Kvantový výtěžek Q je poměr počtu emitovaných a absorbovaných fotonů.

- Udává účinnost s jakou budící fotony vyvolávají fluorescenci.
- Kvantový výtěžek může být maximálně 1.
- Ve skutečnosti je nižší díky nezářivým přechodům molekul z excitovaného stavu do základního stavu.
- Největší kvantové výtěžky mají rhodaminové flourofory (~ 1) a fluorescein (0.95)
http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/FL_QuantumYieldStandards.html
- Charakteristické je snižování kvantového výtěžku s rostoucí teplotou – teplotní zhášení fluorescence.

Excitační spektrum

Závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce při neměnné - konstantní vlnové délce emitovaného záření.

λ_{Ex} scan $\lambda_{\text{Em}} = \text{konst.}$



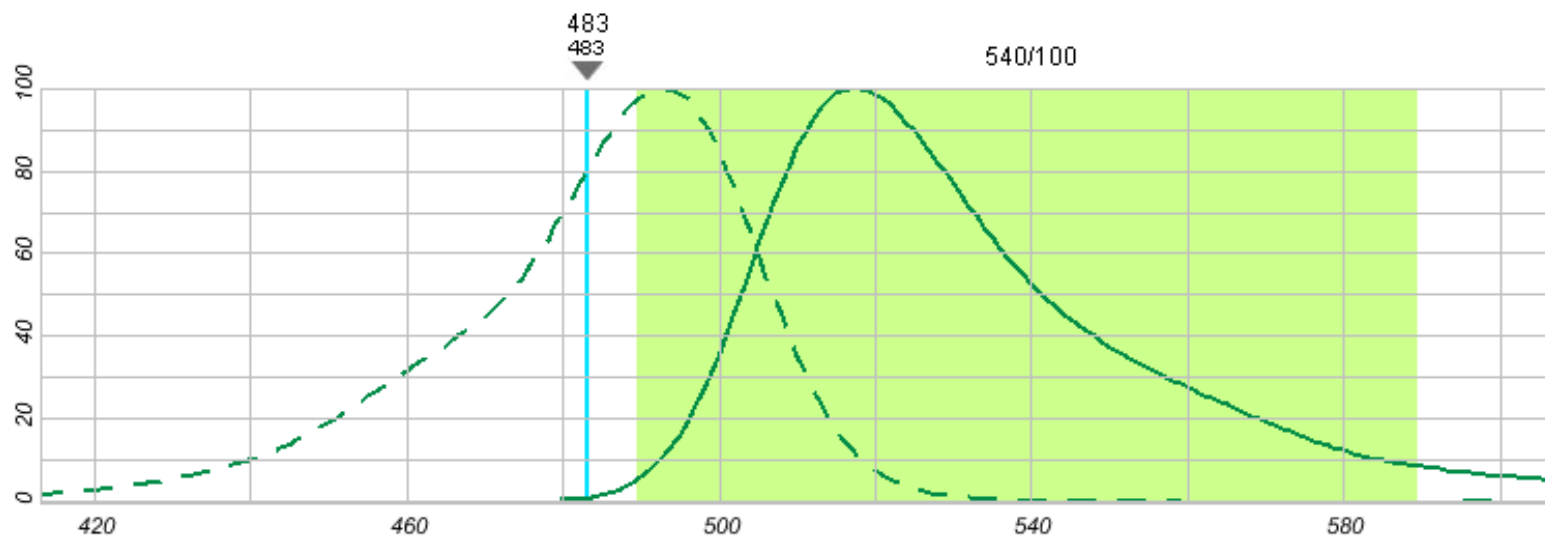
Nepřekrývá se rozsah s konstantní λ .

Emisní spektrum

Intenzita fluorescence při různých vlnových délkách emitovaného záření při neměnné - konstantní vlnové délce excitujícího světla.

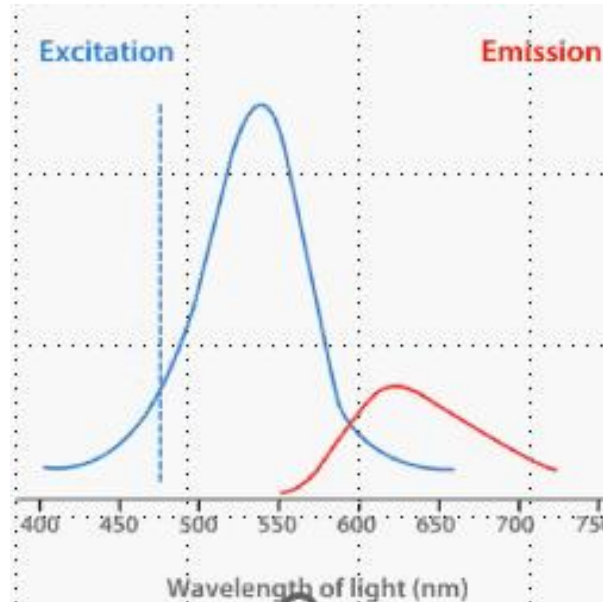
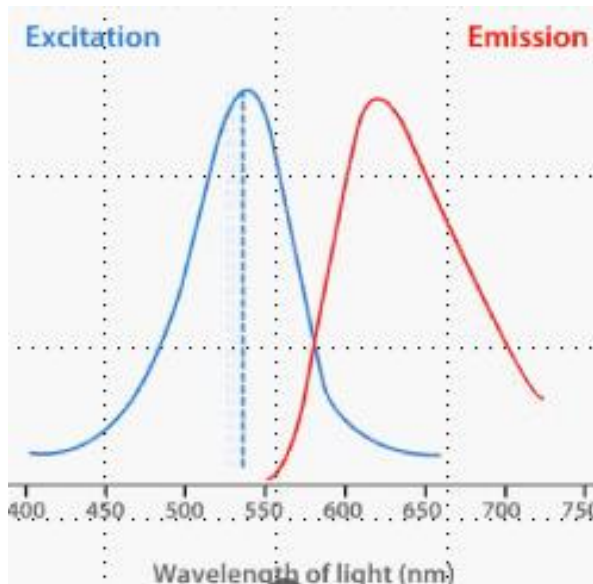
λ_{Ex} konst

$\lambda_{Em} = \text{scan}$



Nepřekrývá se rozsah s konstantní λ .

Neměnnost tvaru emisního spektra při různém excitačním světle



Výukový materiál společnosti Invitrogen

<https://youtu.be/oVxpaUfTuXI?si=Eovpb1lgniLmGiBy&t=79>

Poloha emisního maxima se nemění při změně excitační vlnové délky.

Tvar emisního spektra je nezávislý na vlnové délce excitace.

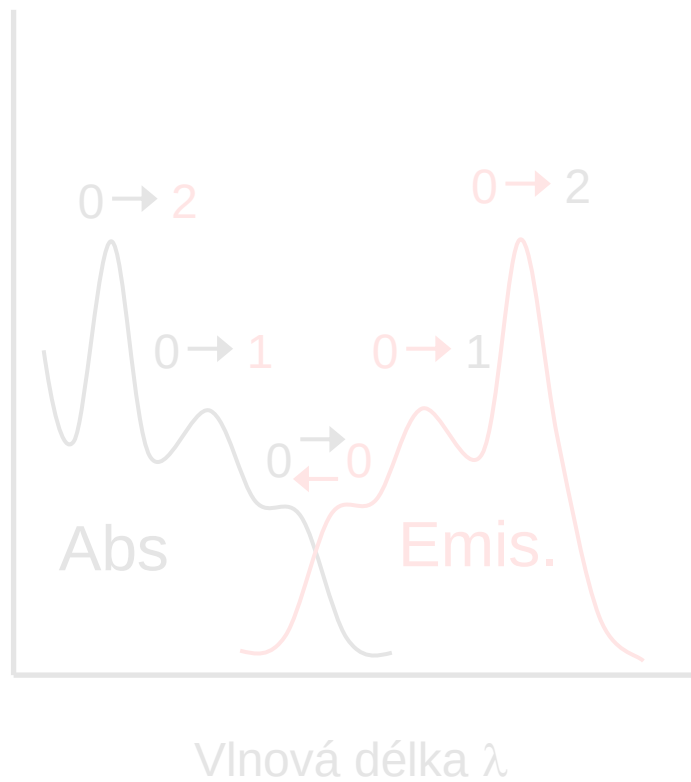
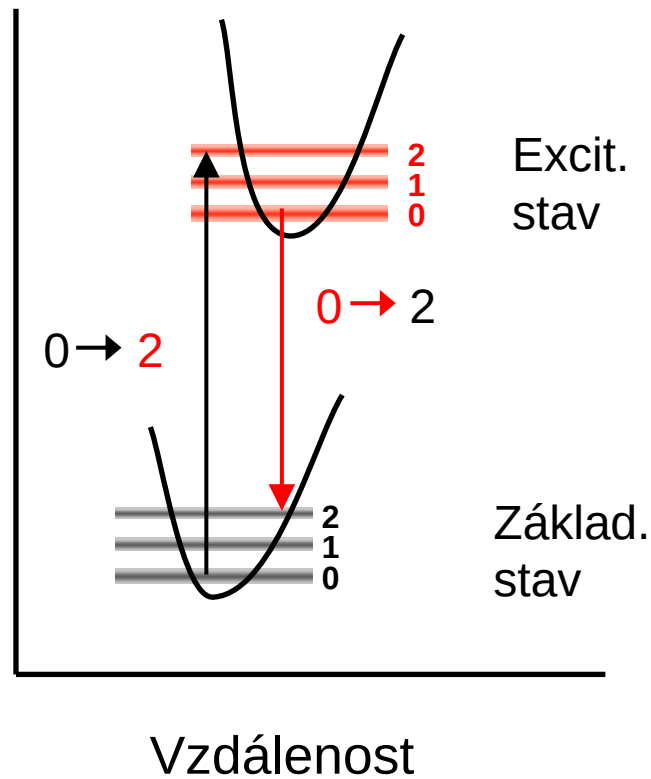
Neměnnost tvaru fluorescenčního spektra je důsledkem toho, že doba trvání excitovaného stavu a kvantový výtěžek složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

Zákon zrcadlové symetrie mezi excitačním a emisním spektrem

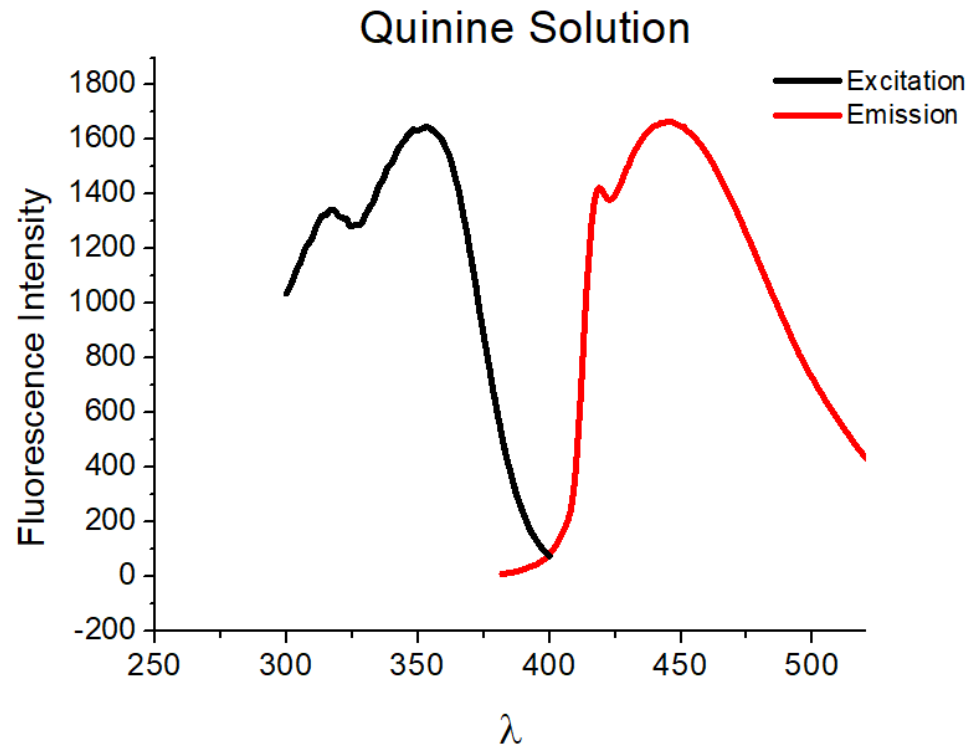
Struktura vibračních hladin u základního a excitovaného stavu elektronu je stejná, proto absorpce a emise z odpovídajících si vibračních hladin může nastat se stejnou pravděpodobností. To má za následek zrcadlovou symetrii absorpčního spektra a emisního fluorescenčního spektra.

Praktické využití: Při velmi malé koncentraci vzorku můžeme z fluorescenčního emisního spektra zjistit jak asi vypadá absorpční spektrum, aniž by se použilo o několik řádů větší množství vzorku.

Zrcadlová symetrie excitačního a emisního spektra



Excitační a flourescenční emisní spektrum reálného roztoku



Při měření reálných vzorků se zrcadlová symetrie narušuje vlivem ionizace fluoroforu při různém pH, komplexace fluoroforu s dalšími molekulami v roztoku, nebo jednoduchým příspěvkem dalších nefluorescenčních molekul k absorpčnímu ~ excitačnímu spektru.

Odpovědi

- Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?
planární, aromatická
- Jak souvisí víno se zásadním objevem v oblasti fluorescence?
víno je emisní filtr
- Proč jsou excitační a emisní spektra symetrická? Jaké je rozdělení energetických hladin po excitaci.
stejně

Příště – jak se měří fluorescence?

- Co je potřeba, abychom mohli změřit spektrum fluoroforu?
- Jak můžeme detekovat fluorescenční molekuly v gelu?

