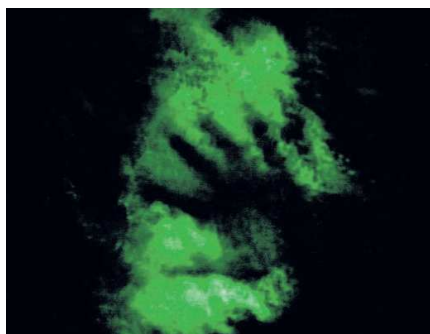


## F9600 Spektroskopické studium biopolymerů

### Luminiscence

Petr Táborský

Masarykova Univerzita  
Přírodovědecká Fakulta  
Ústav Chemie



5. dubna 2012

1

## Doporučená literatura

### Knihy:

A. Sharma, S. G. Schulman - *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*  
J. R. Lakowicz - *Principles of Fluorescence Spectroscopy*  
B. Valeur - *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*

### Časopisy:

*Journal of Fluorescence*

<http://www.springerlink.com/content/1573-4994/>

*Journal of Luminescence*

[http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws\\_home/505700/description#description](http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/505700/description#description)

*Luminescence: The Journal of Biological and Chemical*

<http://www.wiley.com/bw/journal.asp?ref=1522-7235&site=1>

### Internet:

<http://www.fluorescence-foundation.org>



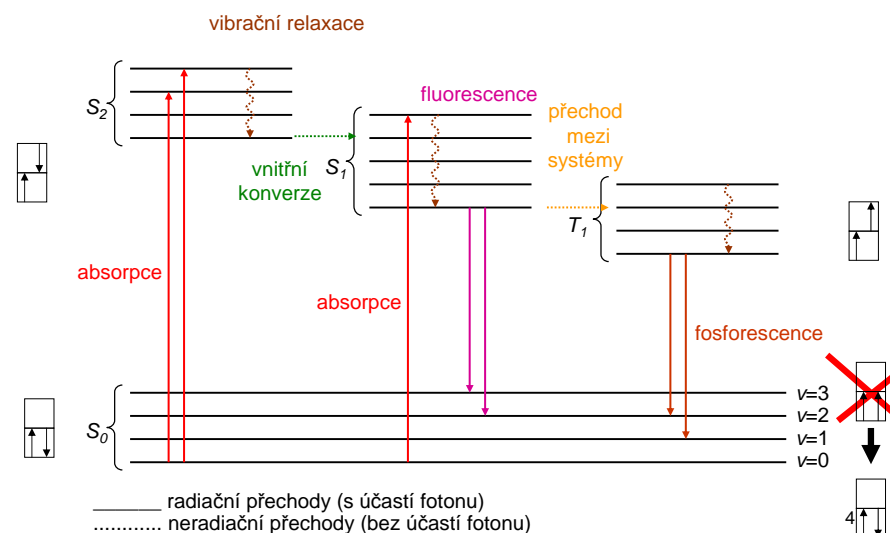
2

## Rozdělení luminiscence podle zdroje excitace

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

3

## Jablonského diagram

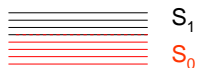


4

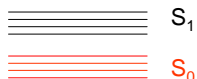
## Vnitřní konverze

Obecně jde o přechod mezi nejnižší excitovanou hladinou ( $S_1$ ) na nejvyšší vibrační hladinu nejnižší singletové hladiny ( $S_0$ ).

- a) vibrační hladiny  $S_0$  sahají až k vibračním hladinám  $S_1$ . Elektron se tak může přejít mezi  $S_1$  a  $S_0$  bez toho, aby se výrazně změnila jeho energie.



- b) vibrační hladiny  $S_0$  a  $S_1$  jsou blízko sebe a za jistých okolností může elektron přejít díky **tunelovému efektu**. Pravděpodobnost tohoto děje se zvyšuje se zmenšením vzdáleností mezi hladinami.



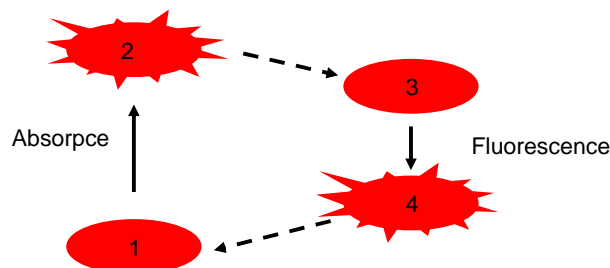
5

## Franck-Condonův princip

- molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé dipólové momenty i polarizovatelnosti (je to způsobeno elektrostatickými interakcemi s okolím molekuly – např. solvatací)
- okamžitě po absorpci není excitovaná molekula v rovnovážném stavu a do rovnovážného stavu se dostane až dojde k vyrovnání sil, které na ní působí
- doba potřebná pro molekulární relaxace je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu
- emise dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace
- okamžitě po vyzáření světla se molekula nachází v nerovnovážném stavu → vibrační relaxace na základní hladině

6

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



7

## Zpožděná fluorescence

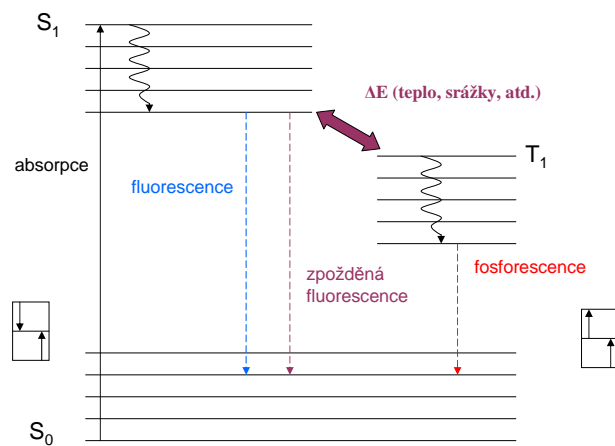
„příznaky“ zpožděné fluorescence:

1. čas vyhasínání tohoto procesu je srovnatelný s časem vyhasínání fosforescence
2. vlnová délka emitovaného záření je stejná jako u fluorescence

?

8

## Zpožděná fluorescence



9

## Princip

- jde o **termální excitaci** molekuly s nejnižší hladiny tripletového stavu zpět na nejnižší hladinu excitovaného singletového stavu (je to reverzibilní mezisystémový přechod (*reverse intersystem crossing*) mezi  $T_1$  a  $S_1$ )
- k fluorescenci dochází po návratu na  $S_1$  (proto je vlnová délka je stejná jako u „běžné“ fluorescence)
- mezisystémový přechod způsobuje zdržení celého děje (čas vyhasínání je mnohem delší, než u „běžné“ fluorescence)

10

## Typy termální excitace

- **E-typ zpožděné fluorescence** – probíhá u pevných vzorků a je doprovázen zahříváním systému, případně statistickou fluktuací elektronů mezi hladinami (jen pokud rozdíl mezi tripletovou hladinou a excitovaným singletem není příliš vysoký). Jedná se o jednofotonovou absorpci a závislost mezi intenzitou emise a intenzitou budícího záření je lineární. Poprvé byl tento jev pozorován u eosinu (E-typ).
- **P-typ zpožděné fluorescence** – k excitaci dochází po kolizi dvou molekul v tripletovém stavu. Jedna molekula v tripletovém stavu odevzdá nezářivě svoji energii druhé molekule v tripletovém stavu a ta přejde do excitovaného singletu (*triplet-triplet annihilation*). Rozdíly mezi  $S_1$  a  $T_1$  mohou být vyšší, než u typu E. Je to dvoufotonová absorpce (excitace dvou molekul), proto je intenzita fluorescenční emise přímo úměrná čtverci intenzity budícího záření. Tento jev byl poprvé pozorován u pyrenu (P-typ).

11

## Vliv prostředí na luminiscenci

12

## Vliv vnějšího prostředí na fluorescenci

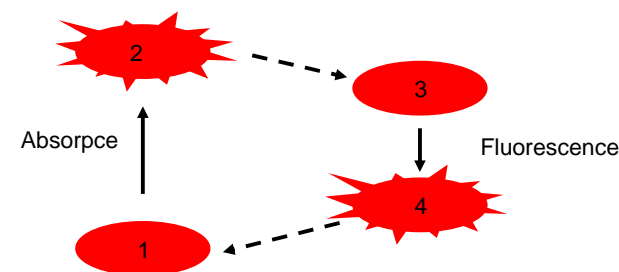
- okolní prostředí (rozpouštědlo, pH, atd.) má ve fluorescenční spektroskopii větší vliv na výslednou podobu spekter, než spektrofotometrie (UV-Vis)



- větší vliv okolí na molekuly v excitovaném stavu

13

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



14

## Vliv rozpouštědla

- možnosti interakcí mezi molekulou analytu a rozpouštědla: dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól, vodíkové můstky...
- rozpouštědla, která tvoří vodíkové můstky mají vliv na  $n-\pi^*$  přechody (tato rozpouštědla se chovají jako velmi slabé Brønstedovy kyseliny a atomy s nevazebnými elektrony jako zásady a částečně přijímají proton)
- polarita rozpouštědla nejvíce ovlivňuje  $\pi-\pi^*$  (polární rozpouštědla snižují energii  $\pi^*$ )

15

## Vliv polárního rozpouštědla

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/jablonski/solventeffects/index.html>

16

## Nativní fluorescence proteinů – vliv polaroty okolního prostředí

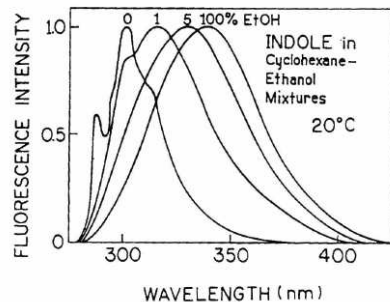


Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

17

## Zhášení luminiscence (luminescence quenching)

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

18

## Dynamické zhášení luminiscence

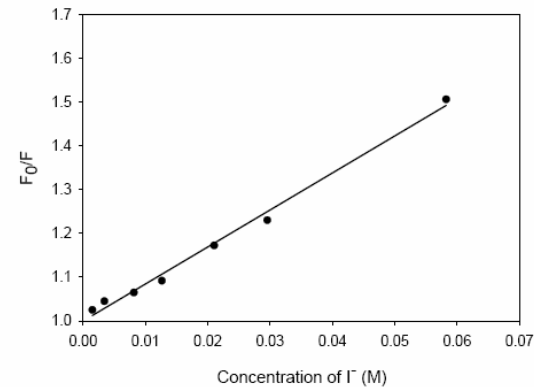
- k interakci mezi zhášečem a potenciálním fluoroforem dojde po excitaci, kdy excitovaná molekula vytvoří „komplex“ s jinou částicí (molekulou, „species“), který nefluoreskuje – dojde k vytvoření nových hladin a dojde k deexcitaci vnitřní konverzí. Typická je např. tvorba komplexu s kyslíkem rozpuštěným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

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

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

19

## Dynamické zhášení



Zhášení fluorescence fluoresceinu za přítomnosti I<sup>-</sup>

20

# Zhášení luminiscence

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

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

21

# Luminiscence molekuly je charakterizována:

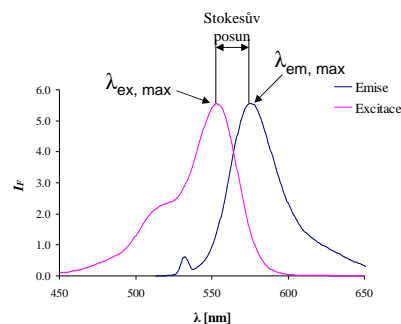
emisní spektrum (emisní maximum), excitační spektrum (excitační maximum), Stokesův posun, kvantový výtěžek, čas vyhasínání luminiscence

22

# Emisní a excitační spektra

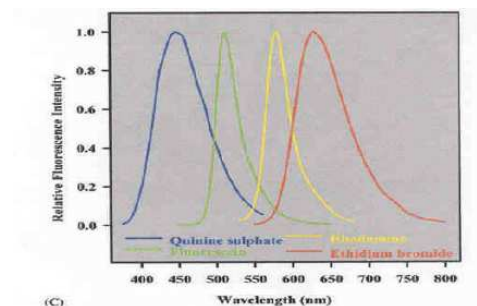
**emisní spektrum** (fluorescenční resp. fosforescenční spektrum): závislost intenzity luminiscence na vlnové délce. Měří se při konstantní  $\lambda_{ex}$ .

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



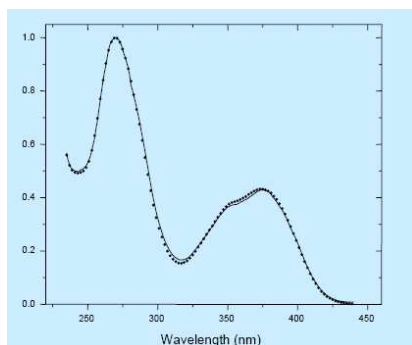
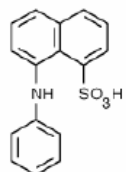
23

# Emisní spektrum



24

## Excitační spektrum



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

25

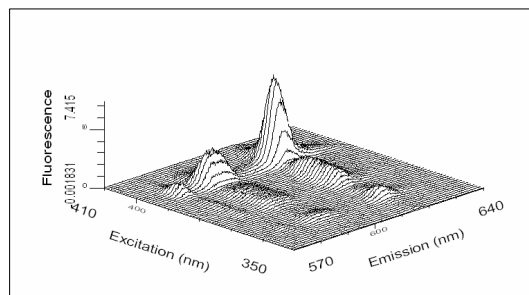
## Emisní a excitační spektra

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

26

## 3D luminiscenční spektra

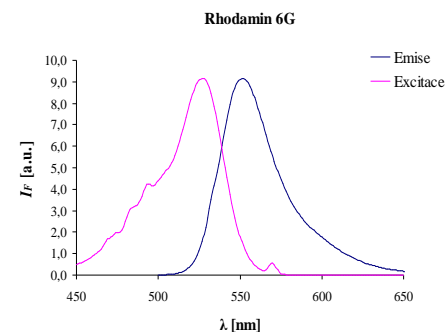
- emisní vs. excitační spektra
- emise (resp. excitace) vs. Čas
- synchronní sken



27

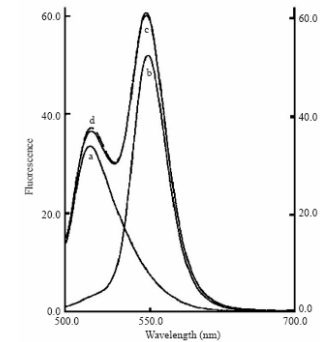
## Zrcadlové pravidlo

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



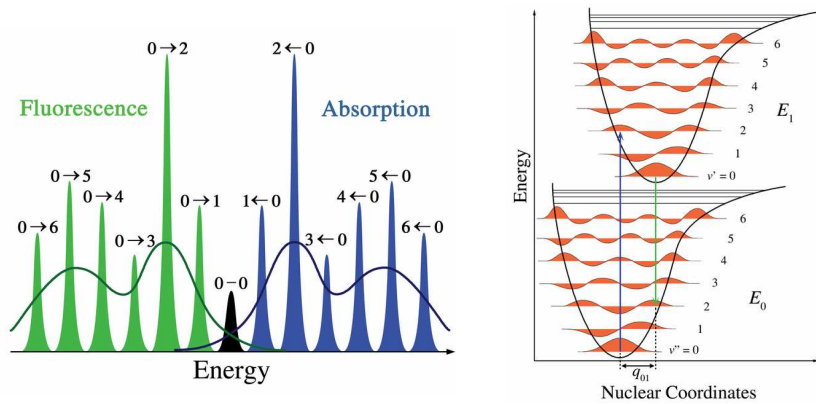
28

## Emisní spektra



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

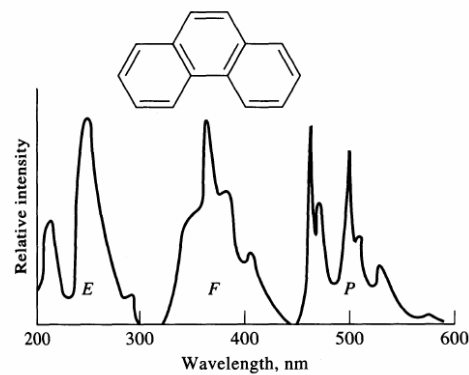
30



<http://en.wikipedia.org>

29

## Fluorescence a fosforescence



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

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

Fosforescence: posun emise k vyšším vlnovým délkám

31

## Základní vztahy

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

$A$  – absorbance,  $c$  – koncentrace,  $\varepsilon$  – absorpční koeficient,  $l$  – tloušťka kvety,  $\Phi_0$  - záření vyslané na vzorek,  $\Phi$  - záření prošlé vzorkem

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

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

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

zjednodušený vztah pro nízké koncentrace

32



## „Čas života“ (lifetime) fluoroforu

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

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

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

33

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

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

pro počet excitovaných molekul lze rovnicí zapsat takto:

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

jestliže:

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

pak:

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

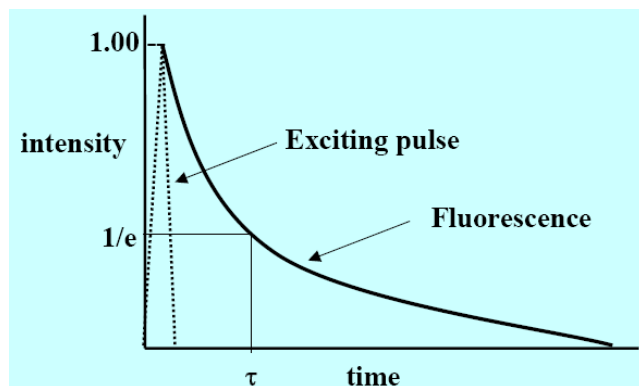
$\tau$  je tedy čas, kdy 1/e molekul (36.8%) je v základním stavu

34

## Čas života luminiscence

křivka vyhasínání má pro stejné „species“ exponenciální průběh

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



35

## Výtěžek luminiscence

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

$k_f$  rychlost emisního procesu (fluorescence)

$k_i$  rychlost nezářivých přechodů (teplo, relaxace...)

$k_x$  rychlost mezisystémových přechodů

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

- **kvantový výtěžek:**

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

$\phi_e < \phi_k$  (Stokesův posun)

- **energetický výtěžek:**

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

36

INTERNATIONAL UNION OF PURE  
AND APPLIED CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY DIVISION  
COMMISSION ON PHOTOCHEMISTRY\*

REFERENCE MATERIALS FOR  
FLUORESCENCE MEASUREMENT

Prepared for publication by

DAVID F. EATON

E. I. du Pont de Nemours & Co., C R & D, Experimental Station,  
Bldg 328, Wilmington, DE 19898, USA

37

## Stanovení kvantového výtěžku

### 1) absolutní stanovení (primární metody)

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

### 2) relativní stanovení (sekundární metody)

- srovnání s fluorescenčním standardem

38

## Stanovení kvantového výtěžku

### Chemický aktinometr

- roztok šřavelanu železitého absorbuje všechno záření o vlnové délce menší než 490nm
- absorbované záření se velikou účinností redukuje Fe(III) na Fe(II)
- titračně lze určit kolik Fe(III) se přeměnilo na Fe(II) a následně spočítat kolik fotonů prošlo systémem
- uspořádání chemického aktinometru pro určení kvantového výtěžku: květa se vzorkem je obklopena aktinometrickým roztokem, kromě malého okénka, které propustí do vzorku excitační záření. Emitované záření je pak zachyceno do aktinometrického roztoku.

39

TABLE I. Recommended Fluorescence Quantum Yield References In Various Emission Ranges.<sup>†</sup>

Region	Compound	Solvent	$\Phi_f$	Ref.
270-300 nm	Benzene	Cyclohexane	0.05±0.02	a
300-380 nm	Tryptophan*	H <sub>2</sub> O (pH 7.2)	0.14±0.02	b
300-400 nm	Naphthalene	Cyclohexane	0.23±0.02	c
315-480 nm	2-Aminopyridine	0.1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.60±0.05	d
360-480 nm	Anthracene	Ethanol	0.27±0.03	a,e
400-500 nm	9,10-Diphenylanthracene	Cyclohexane	0.90±0.02	f, g
400-600 nm	Quinine Bisulfate	1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.546	e, g
600-650 nm	Rhodamine 101	Ethanol	1.0±0.02	h
600-650 nm	Cresyl Violet	Methanol	0.54±0.03	i

40

# Stanovení kvantového výtěžku

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

- pro stanovení kvantových výtěžků používáme **fluorescenční standardy** (tj. látky s definovaným kvantovým výtěžkem)
- potřebujeme znát molární absorpční koeficienty (nebo hodnoty absorpční při stejné koncentraci) stanovované látky i standardu pro vlnovou délku excitačního záření
- změříme a porovnáme plochy (F) emisních spekter
- pro různá rozpouštědla je třeba počítat s indexem lomu (voda/ethanol  $\approx$  5 %, voda/DMSO  $\approx$  20 %, atd.)

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{F_x}{F_{st}} \times \frac{\epsilon_{st}}{\epsilon_x} \times \frac{n_x^2}{n_{st}^2}$$

41

# Stanovení kvantového výtěžku - problémy

- vnitřně filtrační efekt (samoabsorpce)
- různá citlivost detektoru pro různé vlnové délky
- proměnlivá intenzita excitačního zdroje
- korekce na refrakční index
- polarizační efekt
- nečistoty ve standardech
- rozptyly (Raman, Tyndal)

42

# Luminiscence a struktura látek

43

## Typy přechodů

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

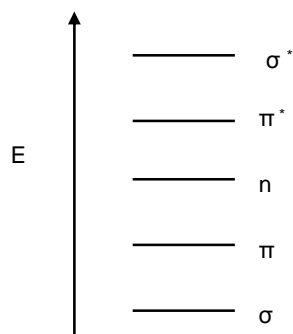
**Přechod  $n - \sigma^*$**  : nutná přítomnost atomu s volným elektronovým párem (N, S, I, Cl, Br), absorpce kolem 200nm.

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

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

44

## Typy přechodů – org. látky



hladiny energií molekulových orbitalů

45

## Struktura organických molekul a luminiscence – základní pravidla

1. luminiscenci většinou nepozorujeme u uhlovodíků bez dvojných vazeb ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$  přechod)
2. luminiscence 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 luminiscenci ( $\pi \rightarrow \pi^*$  přechod)

46

## Základní pravidla

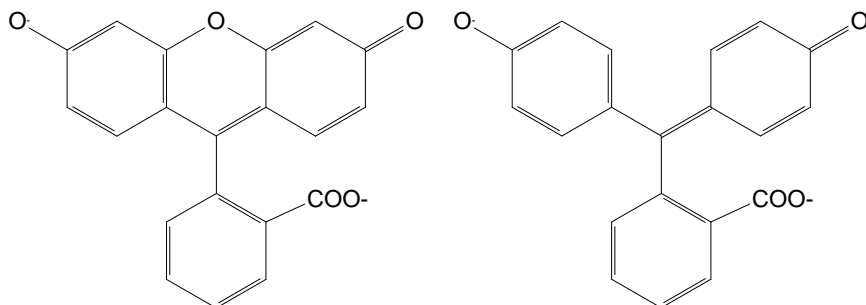
4. Aromatické systémy s přechody  $n \rightarrow \pi^*$  zvyšují intenzitu fluorescence (molekuly obsahují atomy s nevázebnými elektrony – N, O, S). U jednoduchých molekul obsahujících karbonylovou skupinu (např. benzofenony), nebo heteroatomy (pyrimidin, pyrazin) je často pozorována i fosforescence.
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.

47

skupina	vliv na $\Phi_F$	vliv na $\Phi_P$
alkyl	nepatrný	zvýšení
hydroxo, methoxo	zvýšení	zvýšení
Karbonylová, keto	velké snížení	velké zvýšení
Nitro, nitroso	snížení	zvýšení
amino	zvýšení	zvýšení
sulfhydrylová	snížení	-
sulfonová	nepatrný	-
kyano	zvýšení	-
X	snížení	zvýšení

48

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)

49

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

50

## Luminiscence a struktura

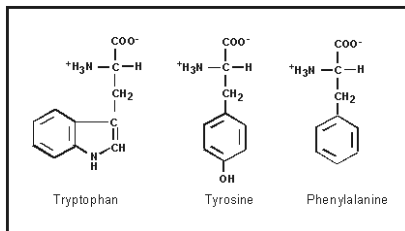
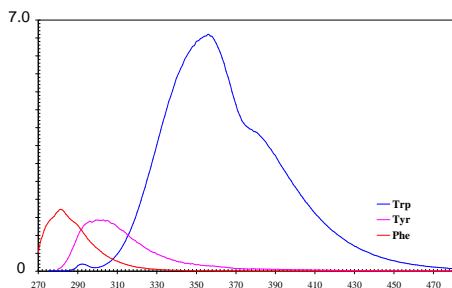
přechod  $\pi \rightarrow \pi^*$  čím více je v molekule konjugovaných vazeb, tím vyšší má emitované záření vlnovou délku

Vzorec	Název	$\lambda_{\text{ex}}$	$\lambda_{\text{em}}$	$\Phi_F$	$\Phi_P$
	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	-

51

## Luminiscence organických molekul: ukázky

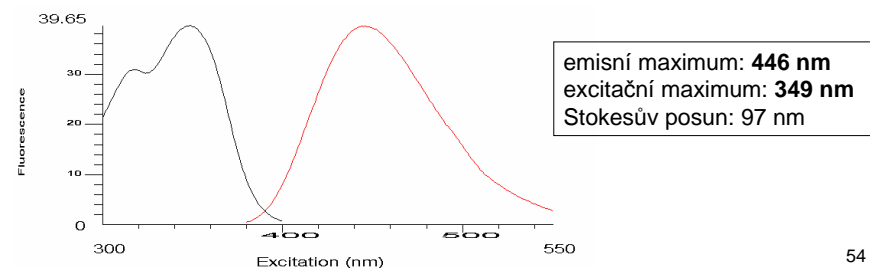
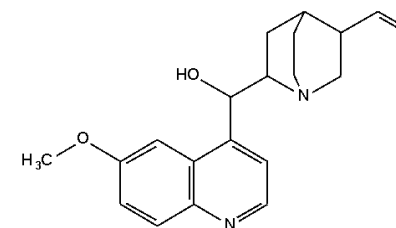
52



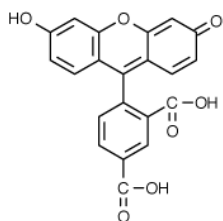
Aminokyselina	Absorpce		Fluorescence	
	Vln.délka (nm)	Abs. koeficient	Vln.délka (nm)	Kvantový výtěžek
Tryptofán (Trp)	280	5,600	348	0.20
Tyrosin (Tyr)	274	1,400	303	0.14
Fenylalanin (Phe)	257	200	282	0.04

1. P. Pekárková, Bakalářská práce, 2005  
 2. www.biotek.com 53

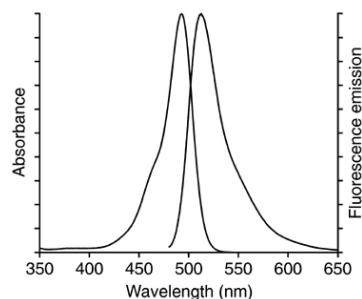
## Chinin



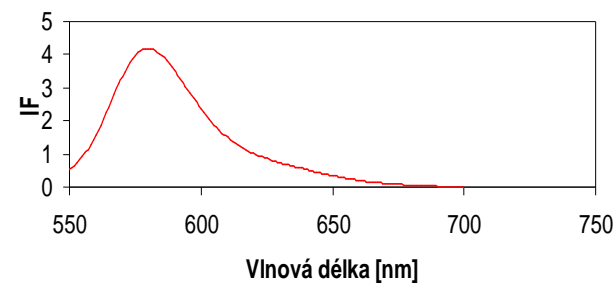
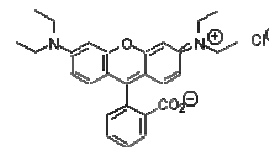
## Deriváty fluoresceinu



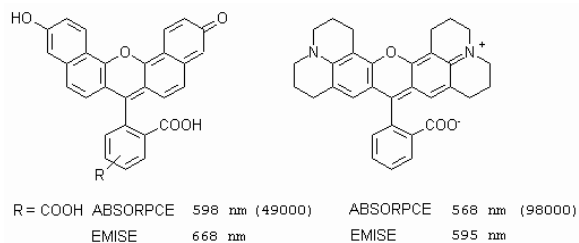
excitační maximum: 494 nm  
 emisní maximum: 520 nm



## Deriváty rhodaminu



## Fluorofory s emisním maximem v oblasti kolem 600nm



57

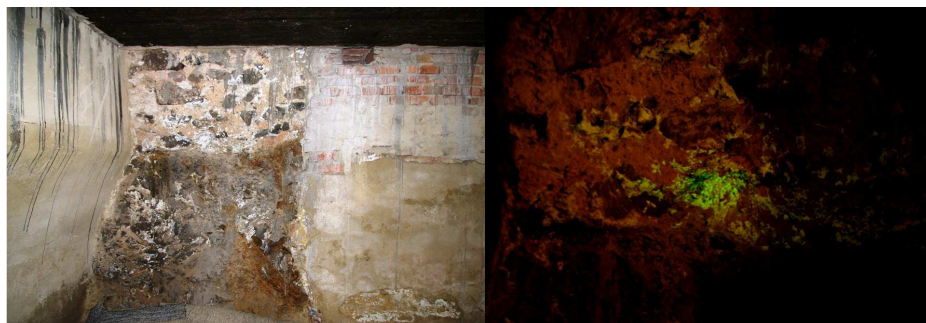
## Anorganická luminiscence Základní typy přechodů - komplexy

- **Metal** Centered (MC)
- **Ligand** Centered (LC)
- **Ligand** to **Metal** Charge Transfer (LMCT)
- **Metal** to **Ligand** Charge Transfer (MLCT)
- **Ligand** to **Ligand** Charge Transfer (LLCT)
- **Metal** to **Metal** Charge Transfer (MMCT)
- **Intraligand** Charge Transfer (ILCT)

58



Místnost s fosforeskujícím nátěrem na hradě Špilberk



## Excimery a exciplexy

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

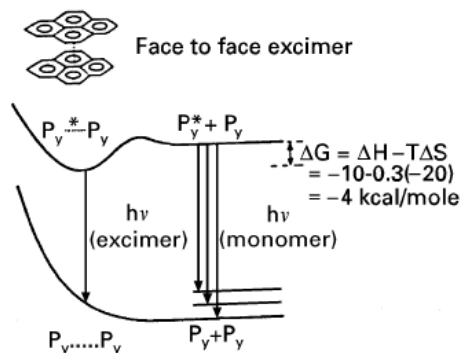


- jestliže se jedná o dvě různé excitované „species“, tak vzniká exciplex



60

## Excimery a excioplexy



61

## Excimery a excioplexy

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

62

## Použití luminiscenční spektroskopie v analytické chemii

63

## Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

$$F = k \phi \Phi_0 2.3 c l \epsilon$$

Vysoká citlivost metody:

- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

64



# Luminiscenční stanovení

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

65

# Vnitřní a vnější luminiscence

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

66

# Nativní luminiscence

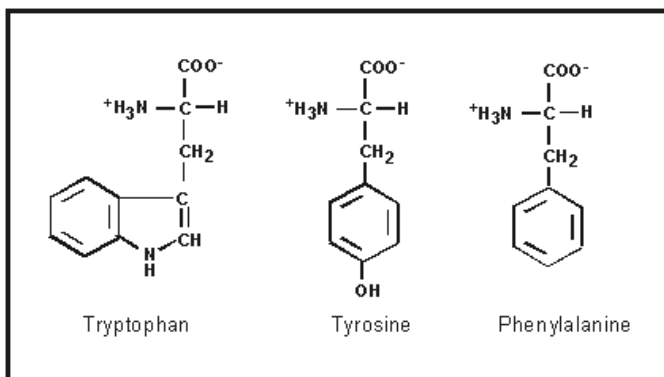
Class	Compounds <sup>a</sup>
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B <sub>2</sub> (F) vitamin B <sub>6</sub> (F) vitamin B <sub>12</sub> (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	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)

67

sloučenina	$\lambda_{ex}^{max}$ (nm)	$\lambda_{em}^{max}$ (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

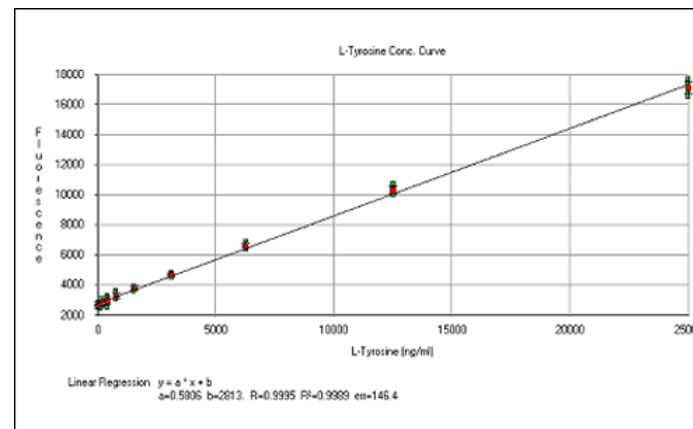
68

# Peptidy, proteiny, AK



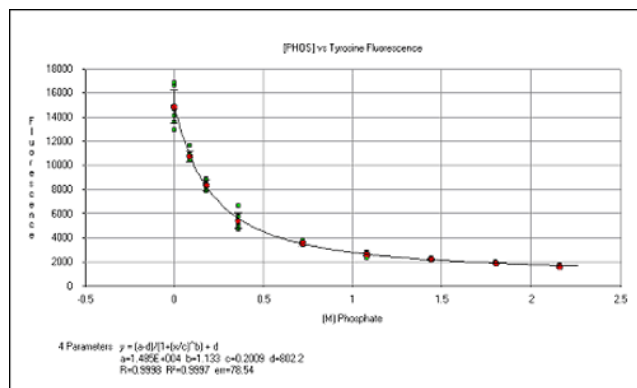
69

# Stanovení aminokyselin



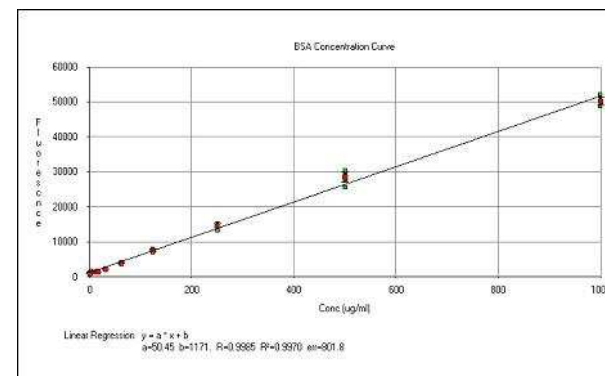
www.biotek.com 70

# Stanovení aminokyselin



www.biotek.com 71

# Stanovení proteinů



www.biotek.com 72

## Nativní fluorescence proteinů – vliv polariry okolního prostředí

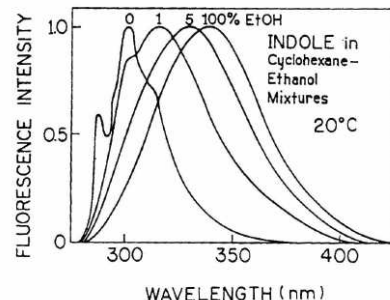
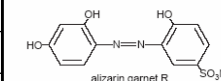


Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

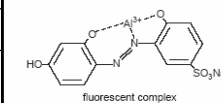
73

## Stanovení anorganických iontů

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al <sup>3+</sup> , Be <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Li <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> a další
Flavonal	Zr <sup>2+</sup> , Sn <sup>4+</sup>
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd <sup>2+</sup>
1,10 - fenntrolin	Ln <sup>3+</sup>
Různá azobarviva	Al <sup>3+</sup> , Be <sup>2+</sup> , In <sup>3+</sup> , Hf(IV), Th(IV), Sc <sup>3+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Sn(IV), Y <sup>3+</sup>
Benzoin	B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup> , Zn <sup>2+</sup>



(a)



(b)

74

## 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.

75

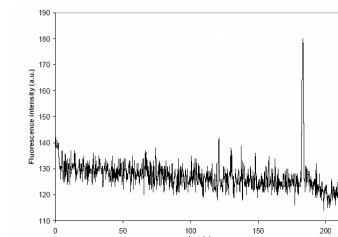
## Derivatizace fluoroforem

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 = 1x10<sup>-12</sup> mol.l<sup>-1</sup>)

76

# Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

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

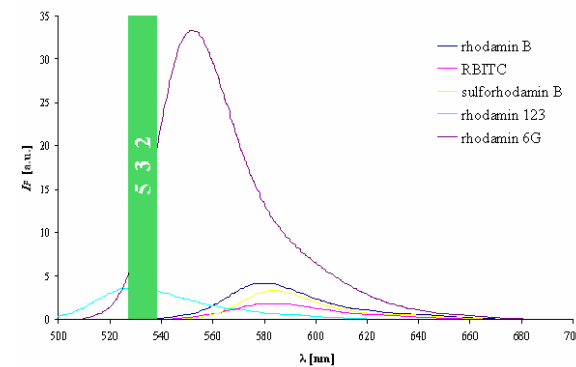
**vazebné místo** (-NH<sub>2</sub>, -SH skupina a další)

**podmínky reakce** (pH, koncentrace...)

**hydrofobicita**

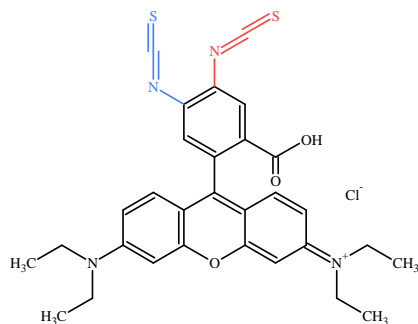
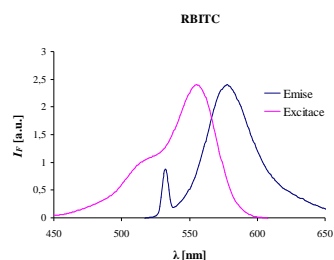
77

# Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



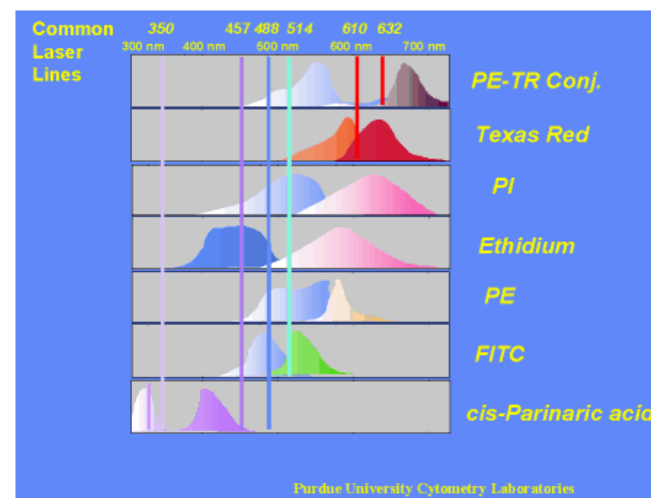
78

# Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



79

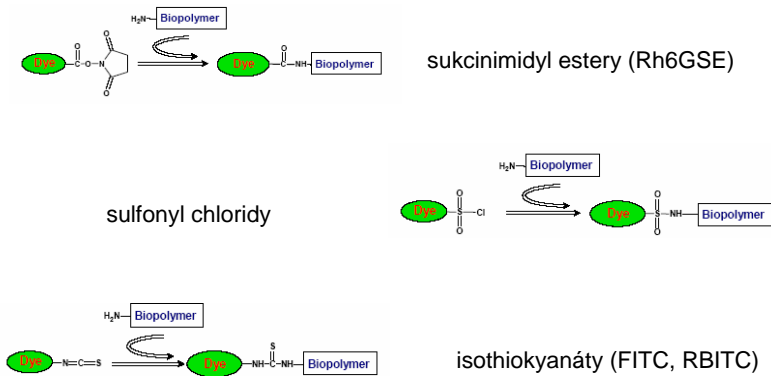
# Výběr fluorescenčních barviv



Purdue University Cytometry Laboratories

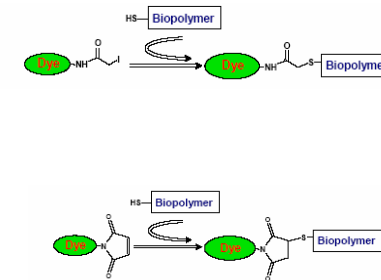
80

## Fluorescenční značky – vazebná místa amino-reaktivní značky



81

## Fluorescenční značky – vazebná místa thiol-reaktivní značky



82

## Fluorescenční metody v imunoanalýze

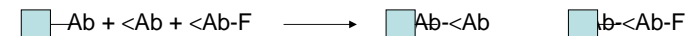
### Imunoanalytické metody:

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

83

## 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 ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$  a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním prostředí, v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání

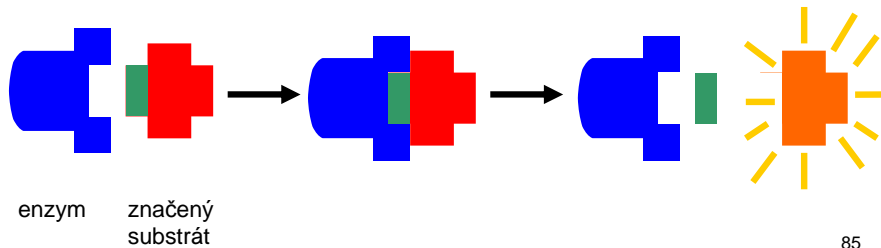


ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

84

## 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.

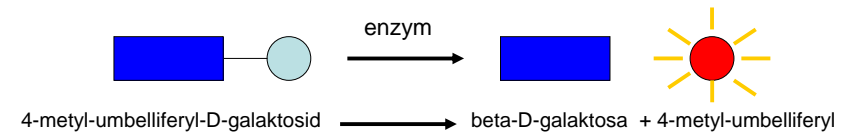


## Fluorimetrická EIA

- 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:

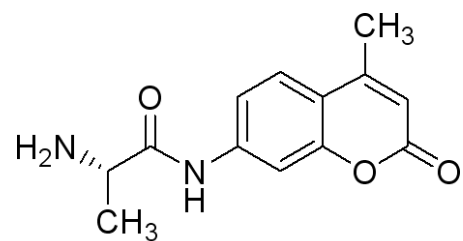


## Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

- 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

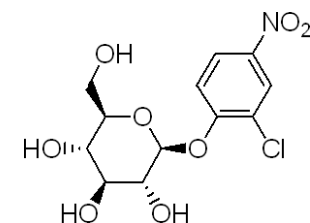
## Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

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



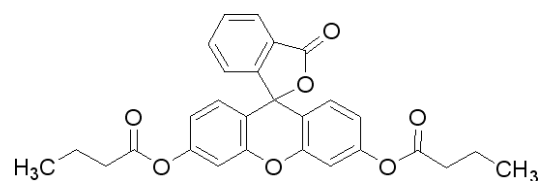
L-Alanine 7-amido-4-methylcoumarin: fluorogenní substrát pro stanovení Aminopeptidáz

89



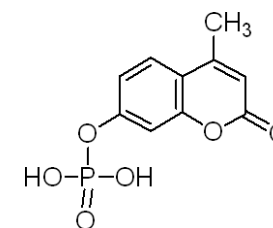
2-Chloro-4-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside: fluorogenní substrát pro stanovení  $\beta$ -Glucosidase

90



Fluorescein dibutylate: fluorogenní substrát pro stanovení esteráz a lipáz

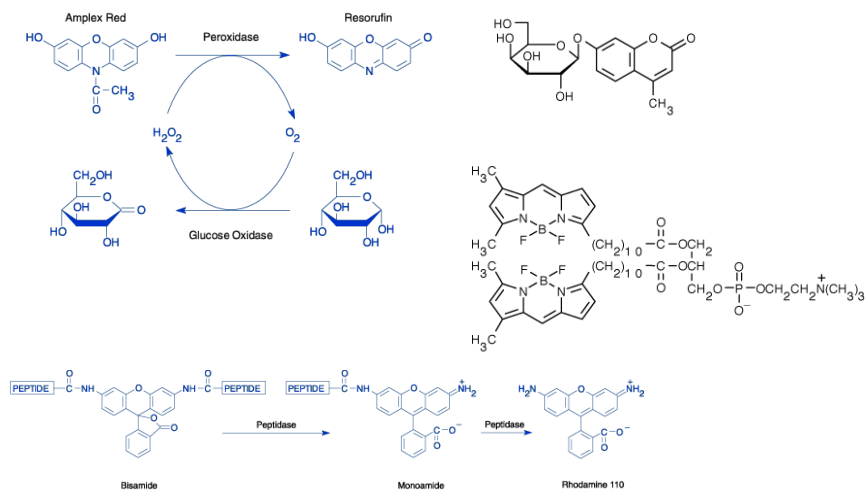
91



4-Methylumbelliferyl phosphate: fluorogenní substrát pro stanovení fosfatázy

92

## Fluorogenní substráty



93



## 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

95

## 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](http://www.molecularprobes.com)

96

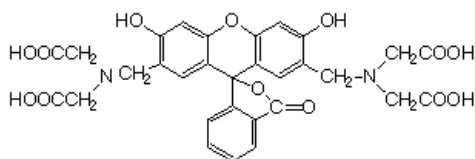


## Indikátory pro anorganické ionty

- **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:

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



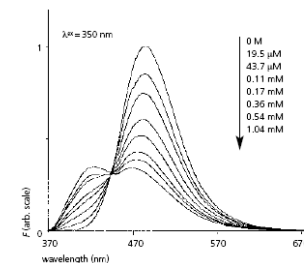
97

## 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  $\lambda_1$  a  $\lambda_2$ ,  $R_{\min}$  a  $R_{\max}$  jsou poměry pro sondu volnou a plně obsazenou analytem,  $S_F(\lambda_2) / S_B(\lambda_2) = \epsilon_F \Phi_F / \epsilon_B \Phi_B$ ,  $\epsilon$  - extinkční koeficienty,  $\Phi$  - kvantové výtěžky sondy excitované při  $\lambda_2$ .



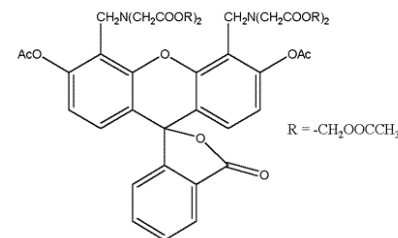
## Indikátory pro anorganické ionty

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

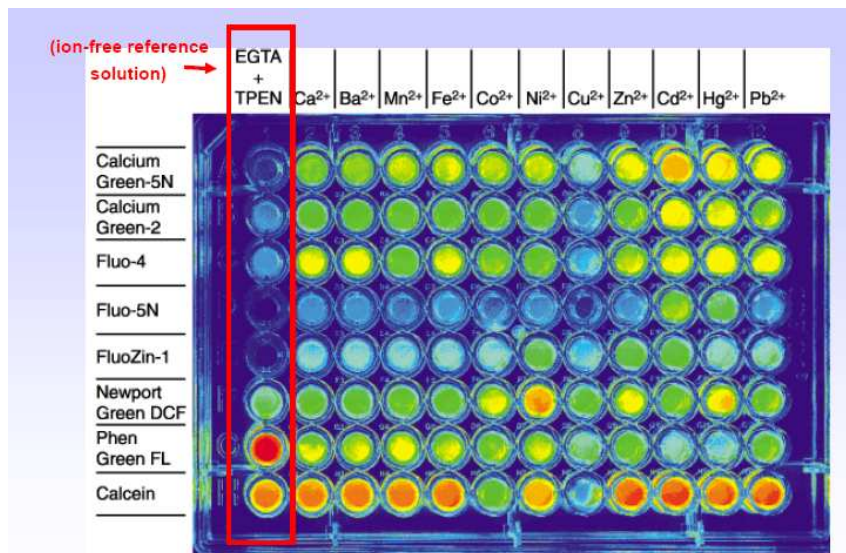
99

## Stanovení $\text{Ca}^{2+}$

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

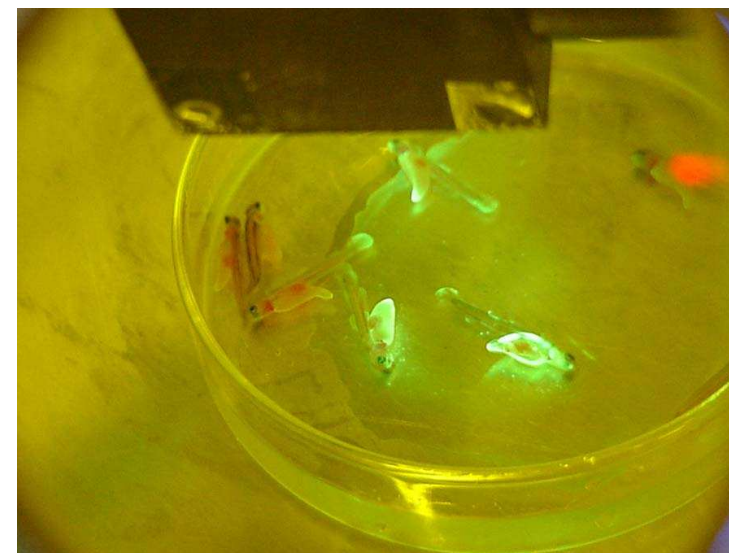


100



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

101



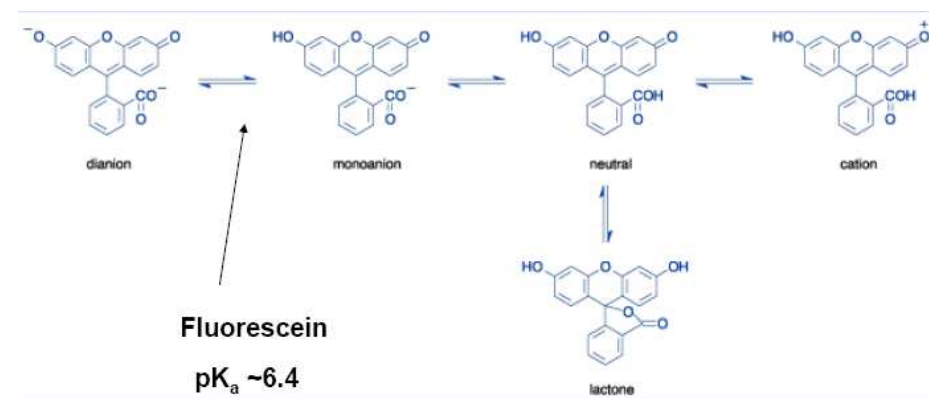
Calceinem značený losos...

102

## 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

103



104

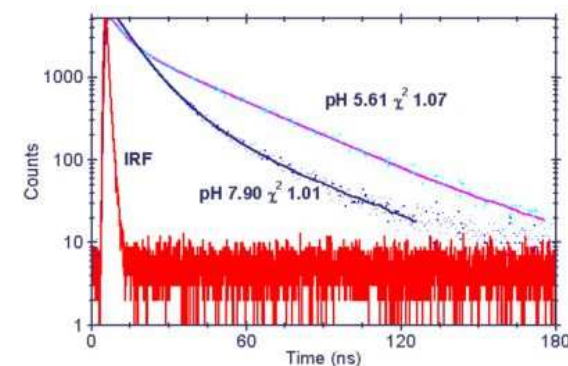
## Indikátory pH

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

105

## „lifetime“ pH indikátory

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



106

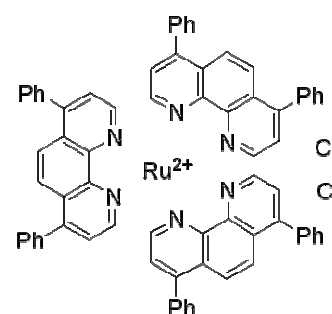
## Sondy pro detekci plynů rozpuštěných v biologických kapalinách

- nejčastěji detekce O<sub>2</sub>, nebo NO
- „lifetime“ sondy
- nejčastěji na principu oxidace centrálního iontu obsaženého v sondě, nebo dynamickém zhášení kyslíkem
- luficerin, luminol...

107

## Rutheniové sondy

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



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

108

## 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

109

## 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.

Fluorescenční vlastnosti ANS v různých prostředích

rozpuštědlo	$\lambda_{em}^{max}$ (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

110

## 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

111

## Rozdělení membránových sond

1. fluorescenčně značené lipidy
2. malé lipofilní organické fluorofory

112

## 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 **sfgingolipidů, steroidů, triglyceridů, lipopolysacharidů**

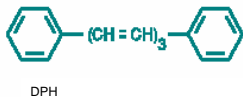
113

## Malé lipofilní, nebo amfifilní organické fluorofory

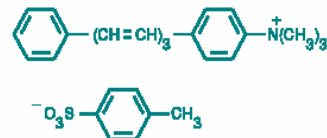
- malé molekuly, které podávají informaci o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita a uspořádání lipidů.
- typickým příkladem je nepolární sonda **DPH** (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) – je ve vodě nerozpustná, fluoreskuje jen v nepolárním prostředí biologických membrán

114

## Ukázky nepolárních malých sond



DPH



115

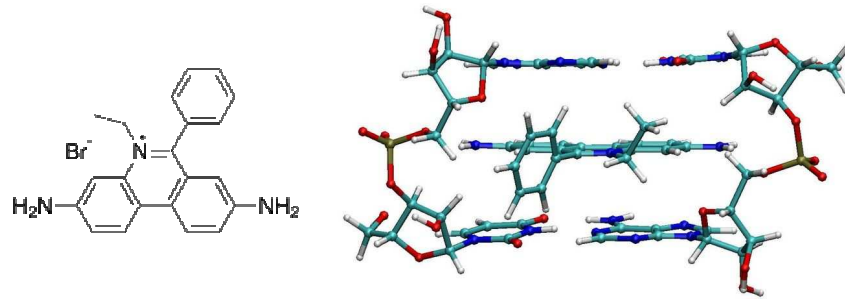
## Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA (nukleové báze mají jeví slabou luminiscenci)
- Různé principy interakce, např. „vmezeření“ (interkalace) barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)

116

## 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



### 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.

117

118

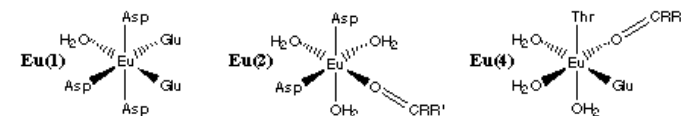
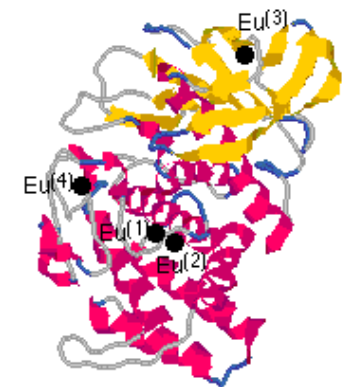
## Studium vazných míst biomolekul

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

119

## Studium vazebných míst $\text{Ca}^{2+}$

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



120

# FRET

## Fluorescence Resonance Energy Transfer

121

# FRET

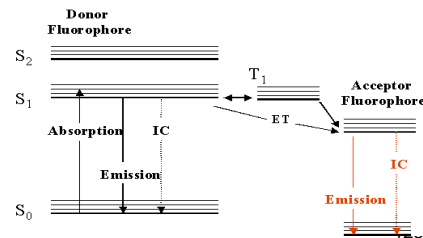
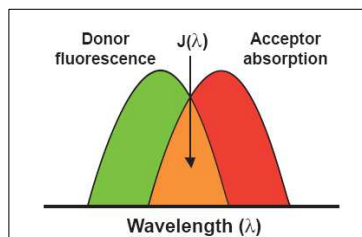
- **FRET je Fluorescence Resonance Energy Transfer** – Fluorescenční rezonanční energetický transfér
- podle objevitele Förster nazýván také **Förster Resonance Energy Transfer**
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

122

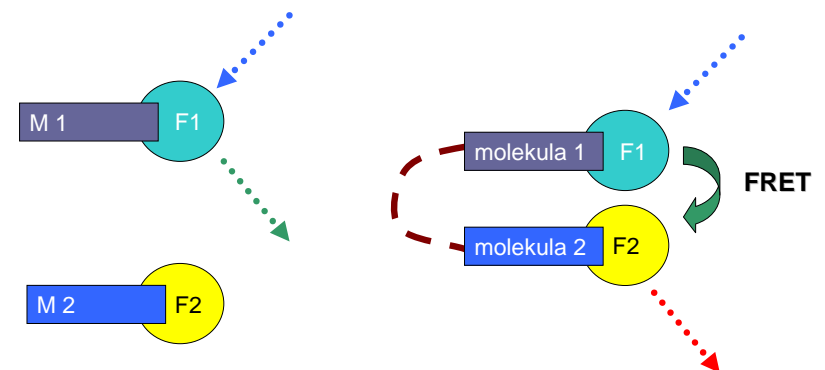
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla

Podmínky:

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



## FRET: schéma



124

## Základní vztahy

- účinnost FRET  $E$  je definována:

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

- kde  $\tau_D'$  a  $\tau_D$  jsou fluorescenční časy vyhasínání v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

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

- $F_D'$  a  $F_D$  jsou intenzity fluorescence v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

125

## 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 ( $J$ )
- $\kappa^2$  je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je většinou 2/3
- $n$  je refrakční index,  $Q_0$  je kvantový výtěžek samotného donoru

126

## FRET

Donor	Acceptor	$R_0$ (Å)	Ref
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	49-56	13
IAEDANS <sup>†</sup>	FITC	49	13
IAEDANS <sup>†</sup>	5-(Iodoacetamido)fluorescein	49	13
Fluorescein	Fluorescein	44	13
EDANS	DABCYL	33	In House
Tryptophan	IAEDANS <sup>†</sup>	22	7
Tryptophan	Dansyl	21-24	7
Tryptophan	Pyrene	28	7
Dansyl	Fluorescein	33-41	14
Naphthalene	Dansyl	22	13
Pyrene	Coumarin	39	13
8-Phycocerythrin	Cy5	79	13

## FRET

Quencher (Acceptor)	$\lambda_{\text{exc}}$ (in nm)	Amine-Reactive	Thiol-Reactive	Carboxy-Reactive (NH <sub>2</sub> -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



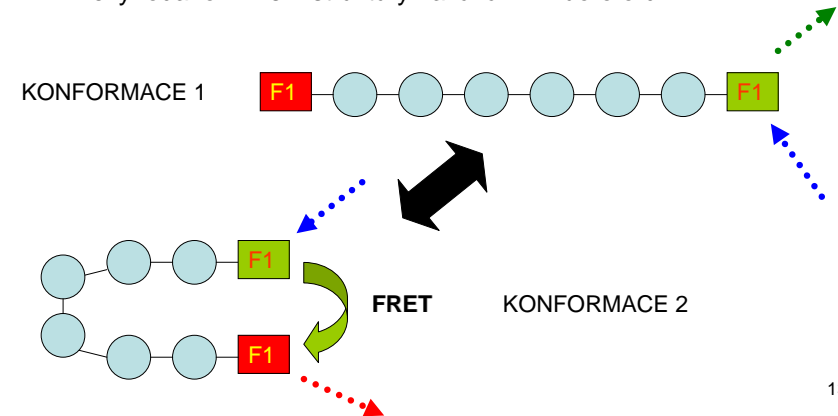
# Aplikace

- 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

129

# Sledování změn konformace molekuly

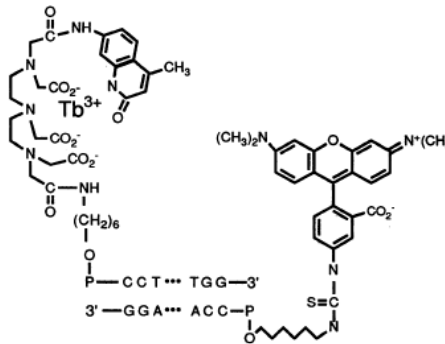
- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů



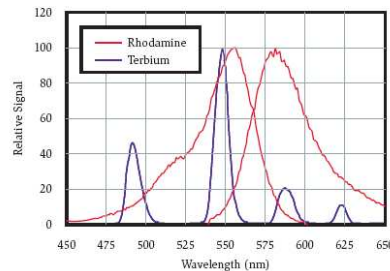
130

# Sledování interakcí mezi vlákny DNA

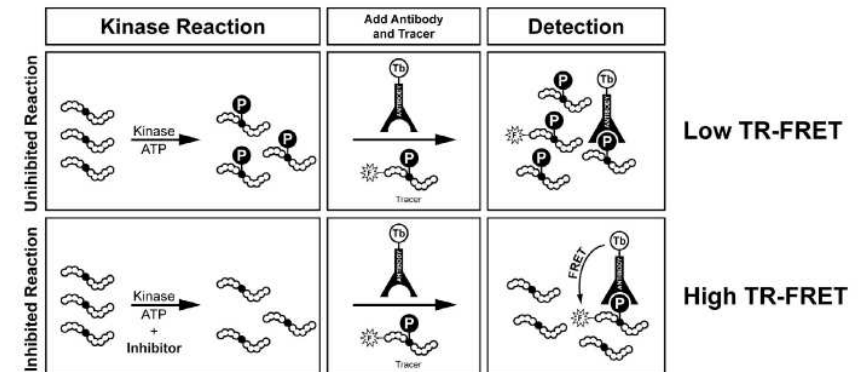
- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln<sup>3+</sup>



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



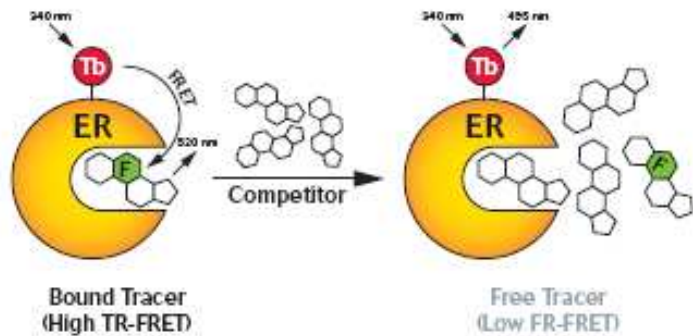
# Analytické aplikace FRET



www.invitrogen.com

132

## Analytické aplikace FRET



133

## Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



není Fish jako FISH...

134

## 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

135

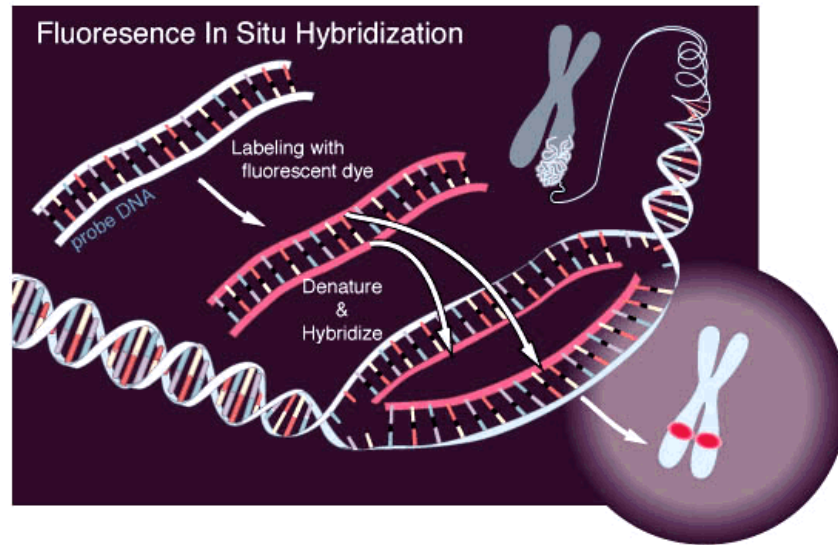
## FISH

- 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

136

## Typy FISH

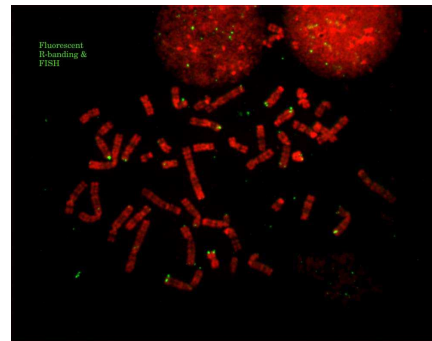
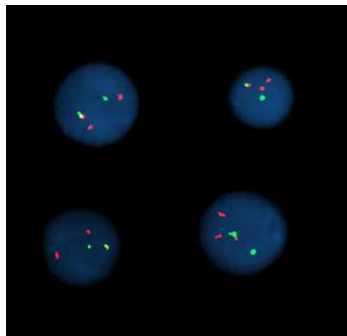
- **Locus specific probes:** jestliže izolujeme malý kousek genu a chceme vědět v kterém chromosomu se nachází
- **Centromeric repeat probes:** chromosomy obsahují opakující se sekvence. Jedním typem sondy lze obarvit velkou část chromosomu. Každý chromosom může mít jinou barvu...
- **Whole chromosome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



137

138

## Ukázky FISH



139

