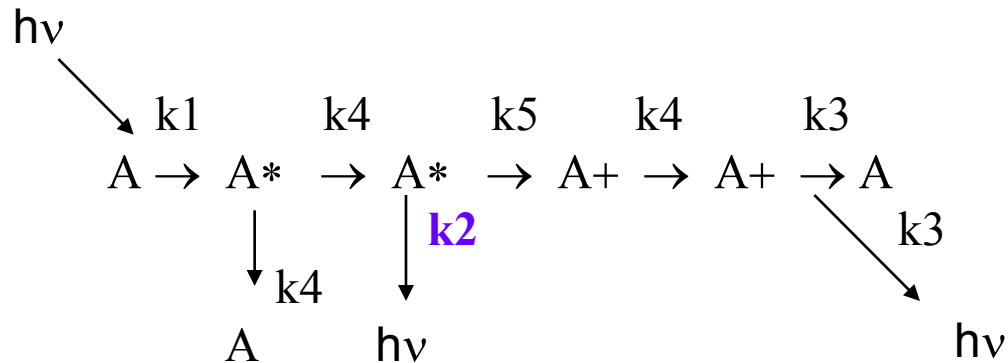
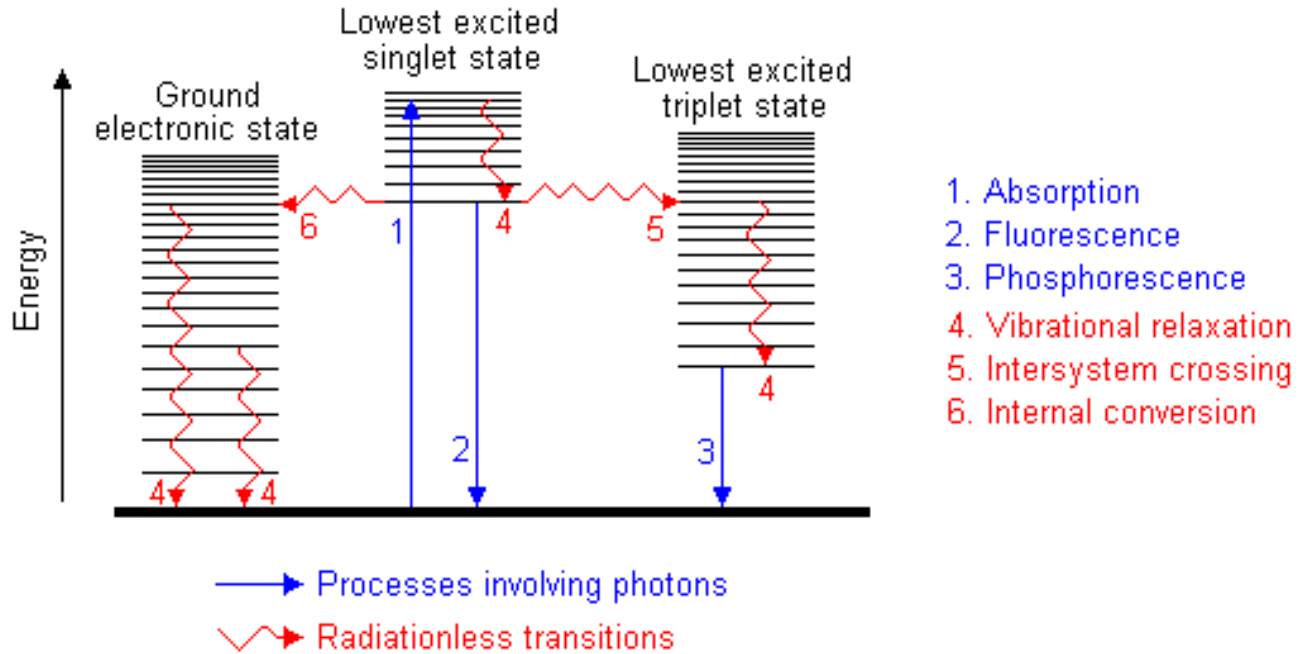
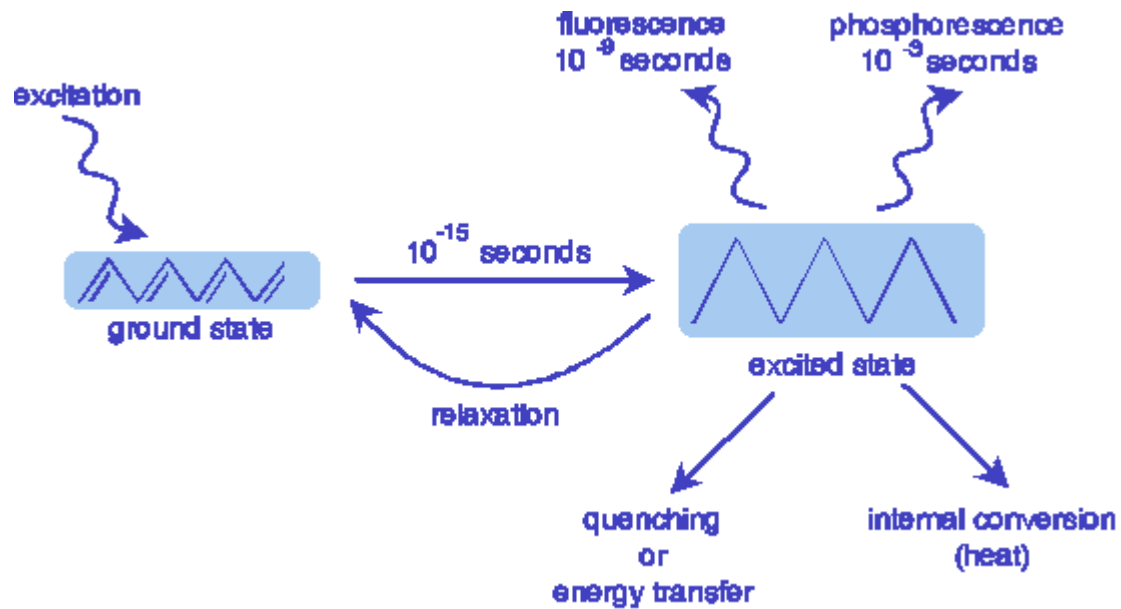


Luminiscenční spektroskopie



Luminiscenční spektroskopie



Luminiscenční spektroskopie

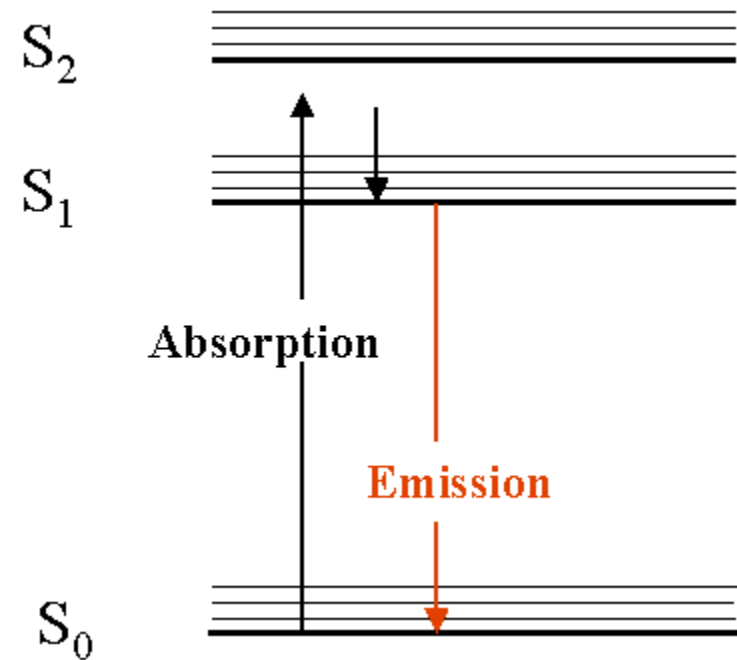
Fluorescenční spektroskopie

Fosforescenční spektroskopie

Chemiluminiscenční spektroskopie

Základní pojmy

Excitace a emise

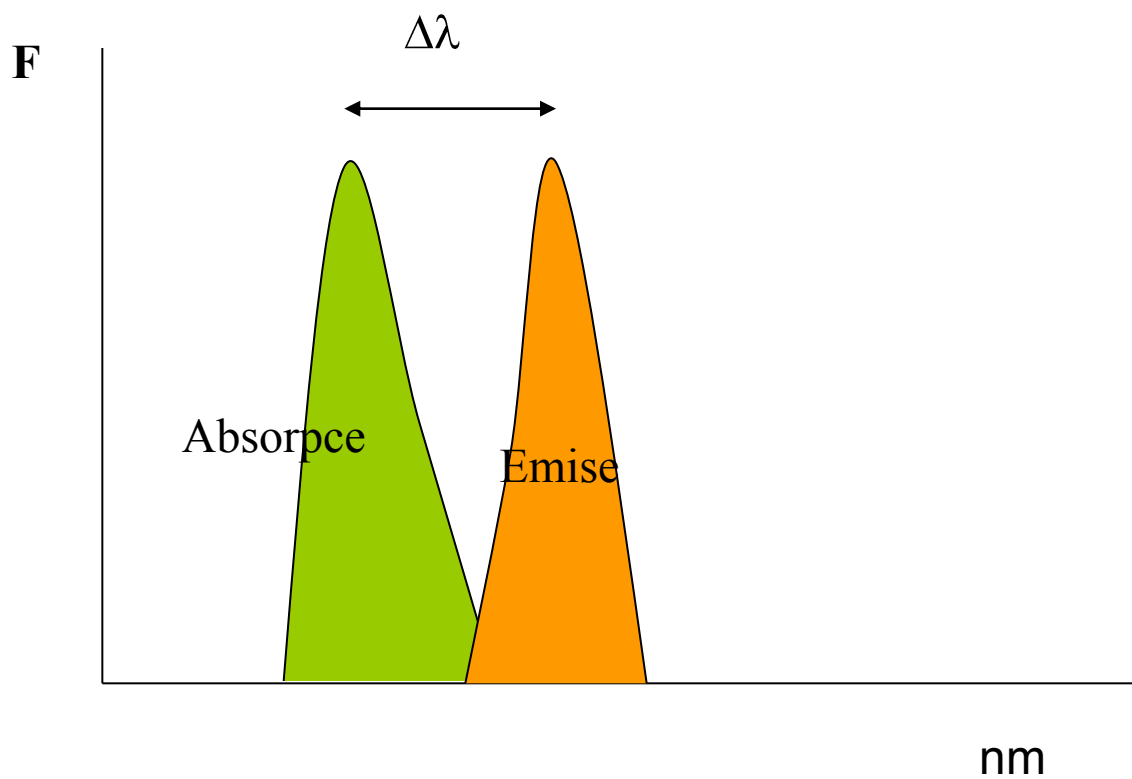


Interakce s rozpouštědlem
Singletový excitovaný stav

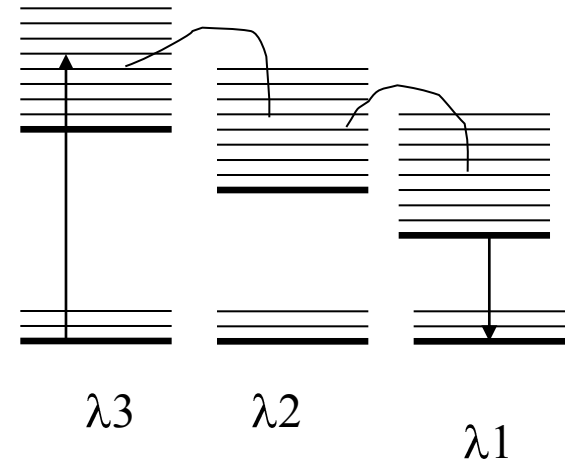
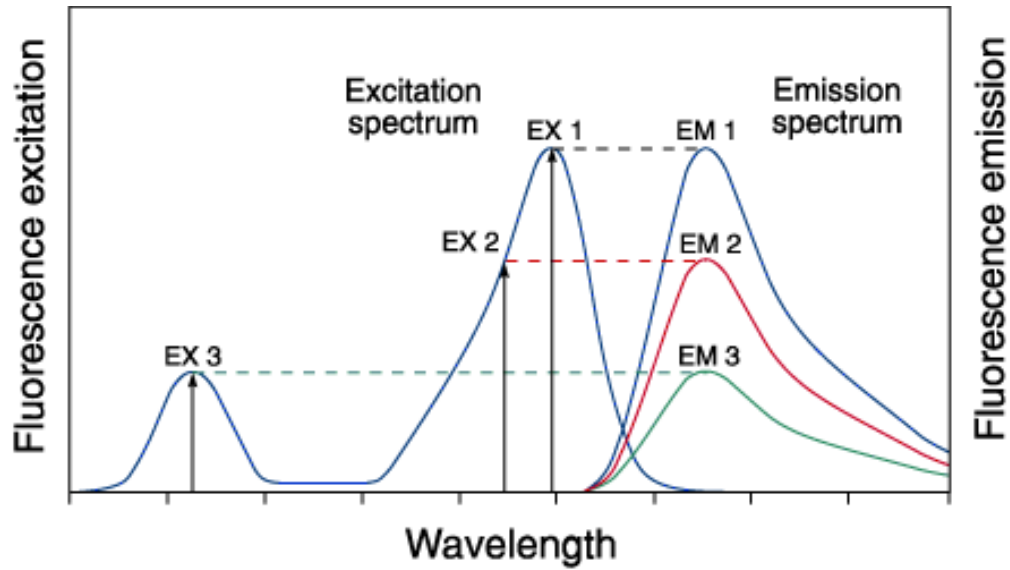
Singletový základní stav

Základní pojmy

Stokesův posun – ztráty energie po dobu excitovaného stavu

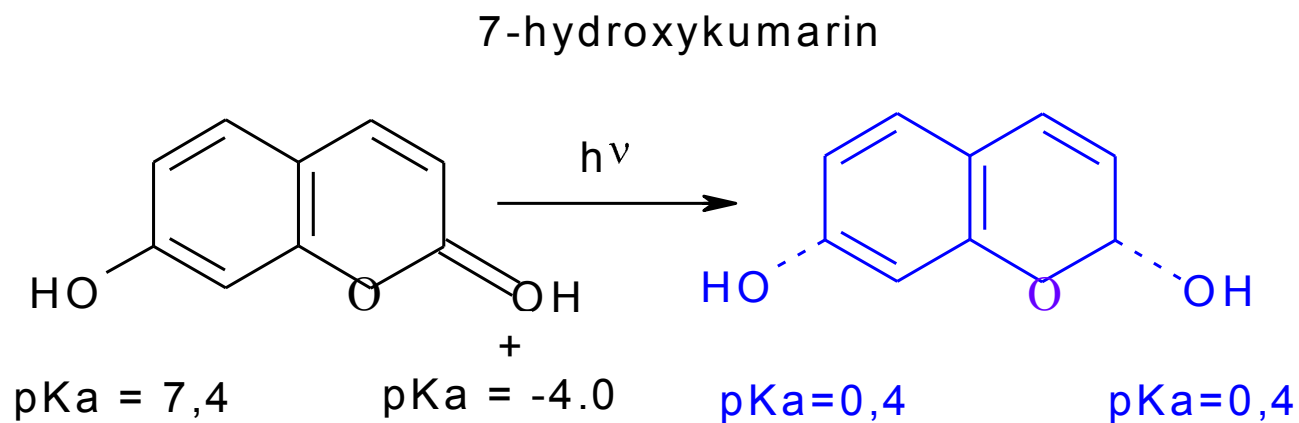


Základní pojmy



Základní pojmy

Excitovaný stav – střední doba života $10^{-7} - 10^{-9}$ s.



Základní pojmy

Kvantový výtěžek fluorescence

Φ = počet kvant emitovaných/počet kvant absorbovaných

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

k_e = rychlost emise

k_k = rychlost konverzních
procesů

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

Základní pojmy

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

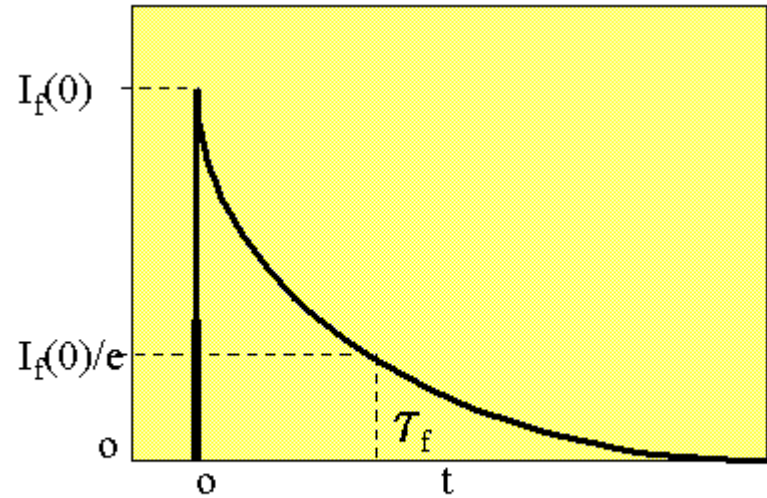
Střední doba života τ
 $\tau = 1/k_f$

$$I_f = I_0 e^{-t/\tau}$$

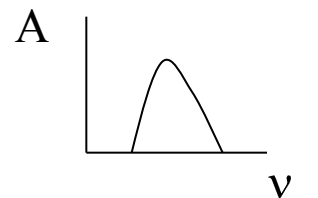
Přirozená doba života τ_0

Definovaná pro $\Phi = 1$

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



n - refrakční index rozpouštědla
 ϵ - molární abs. Koeficient
 ν - vlnčet abs. maxima



Základní pojmy

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

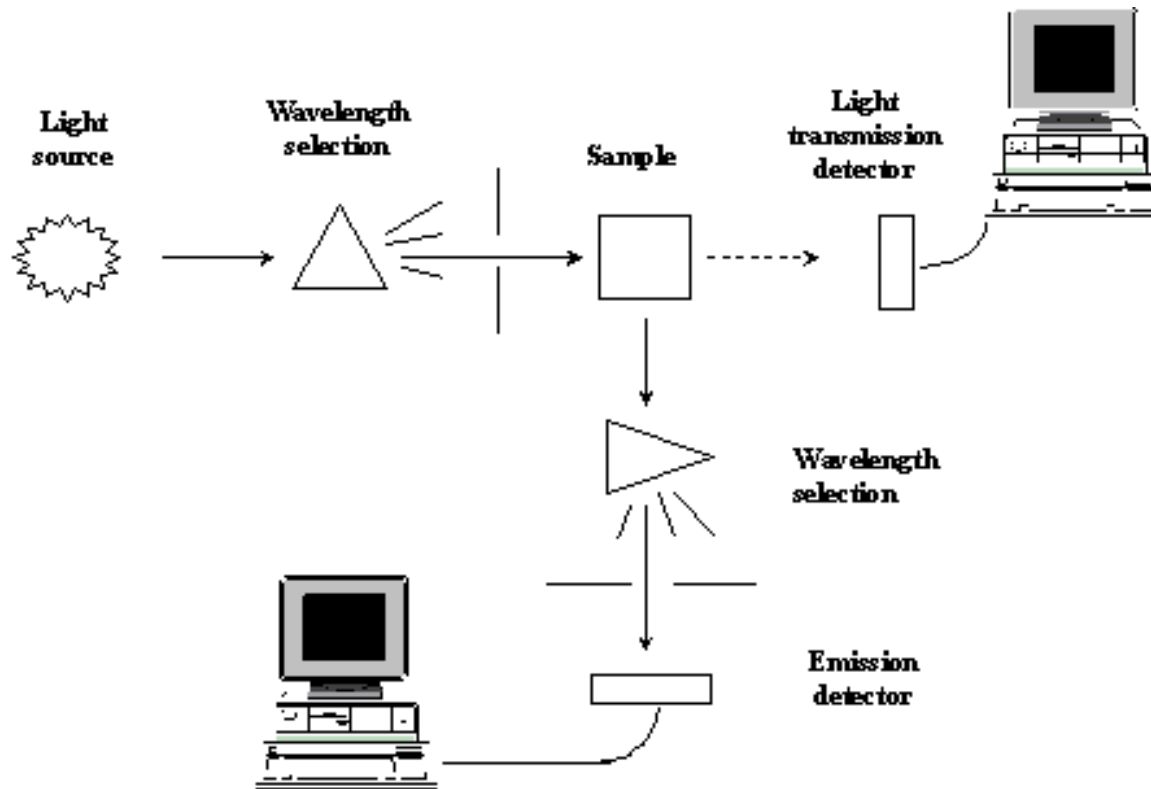
Střední doba života fluorescence

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

Biochemicky významné fluorofory

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

Instrumentace



Instrumentace

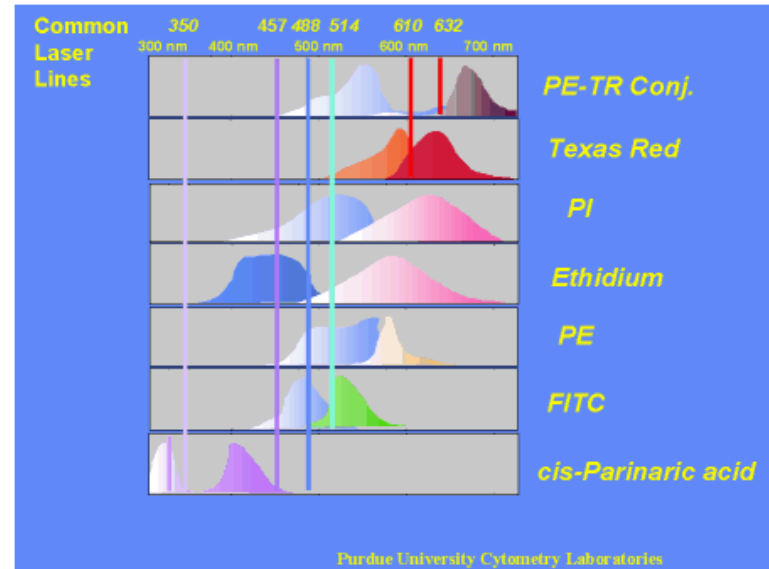
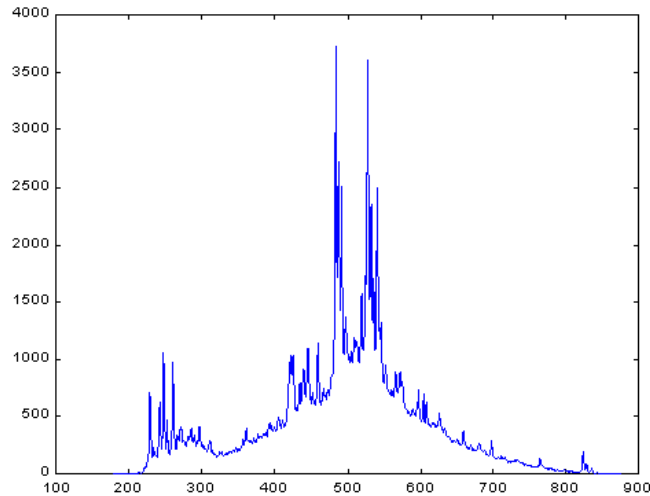
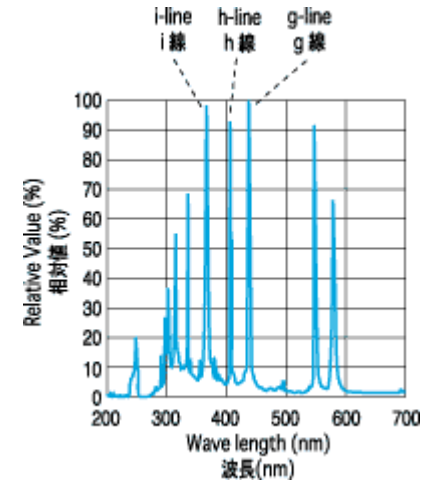
Zdroj:

Xenonová lampa

Rtuťová výbojka

Laser

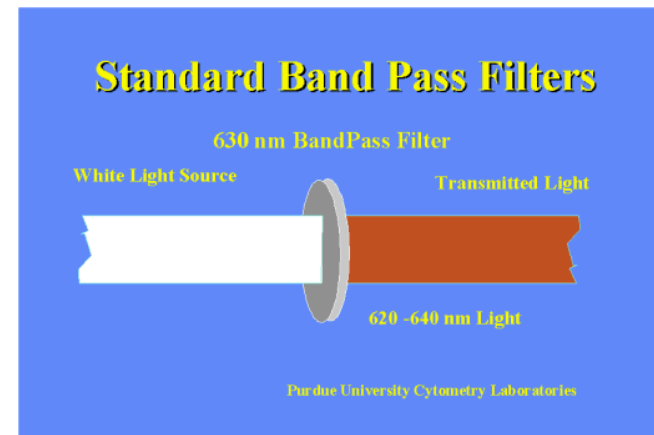
Světelné diody - LED (430, 450, 505, 592, 612 and 637 nm)



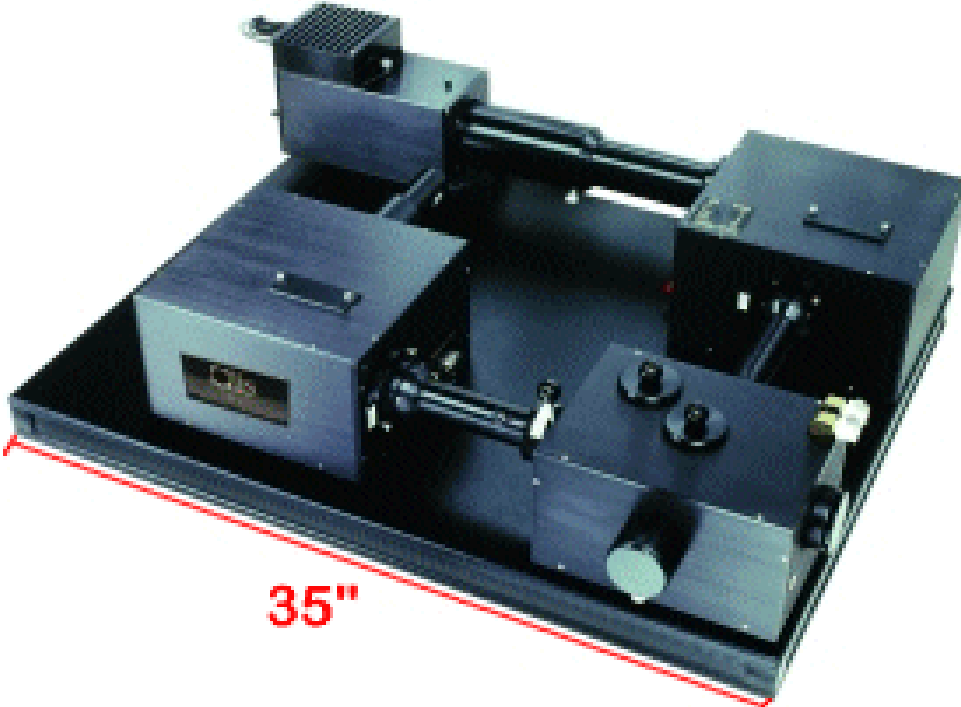
Instrumentace

Monochromátor

- mřížka
- filtry

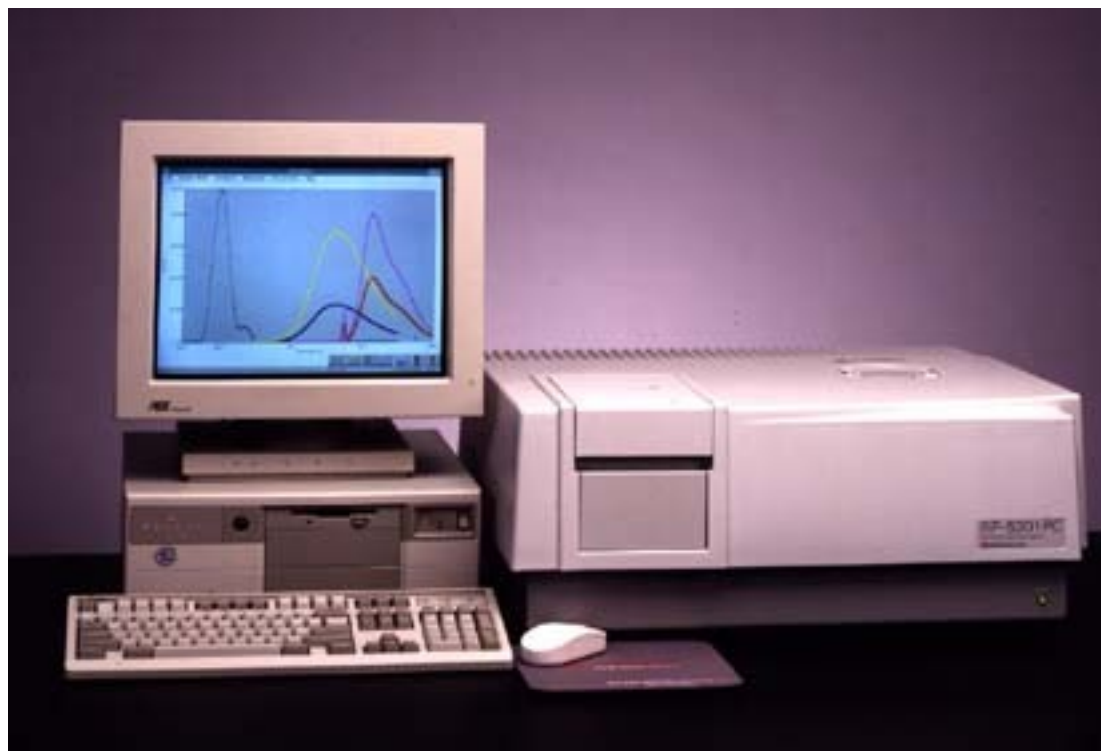


Instrumentace



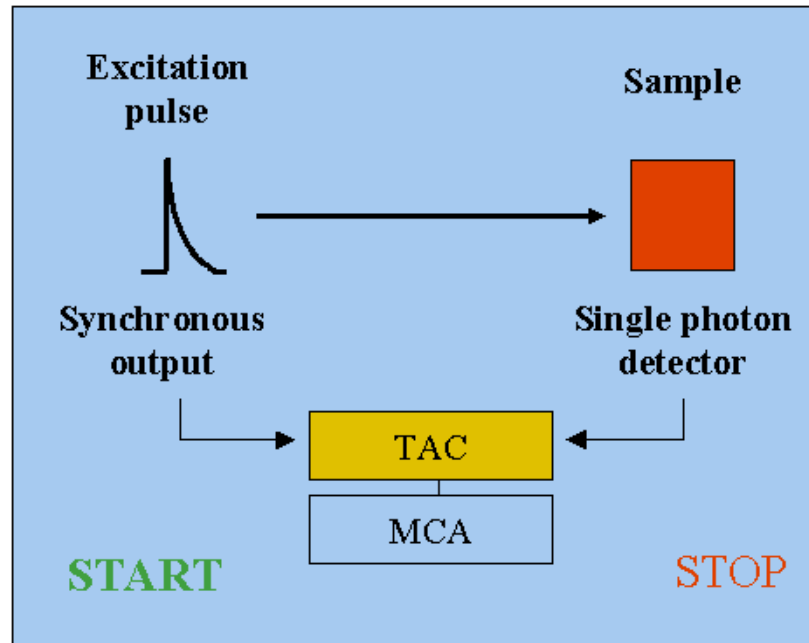
Instrumentace

RF-5301PC – spektrofluorimetr Shimadzu



Instrumentace

Měření střední doby života fluorescence



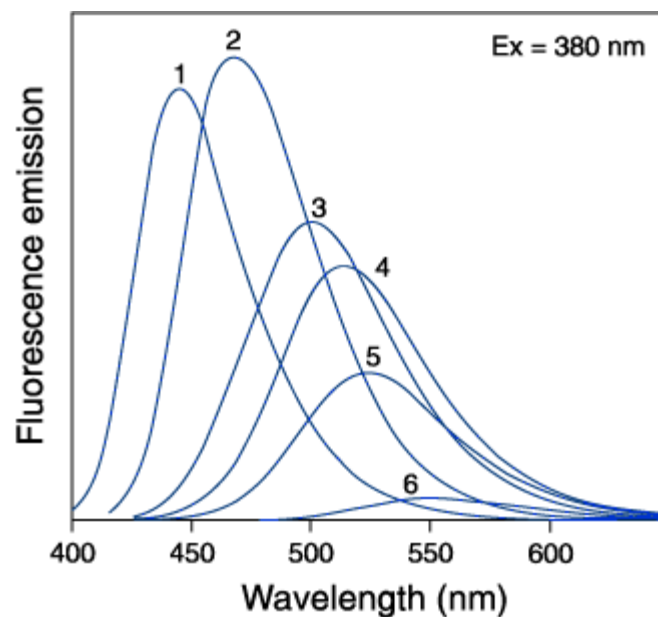
Podmínky fluorescence

Závislost na polaritě a viskozitě

Nitrobenzoxadiazol

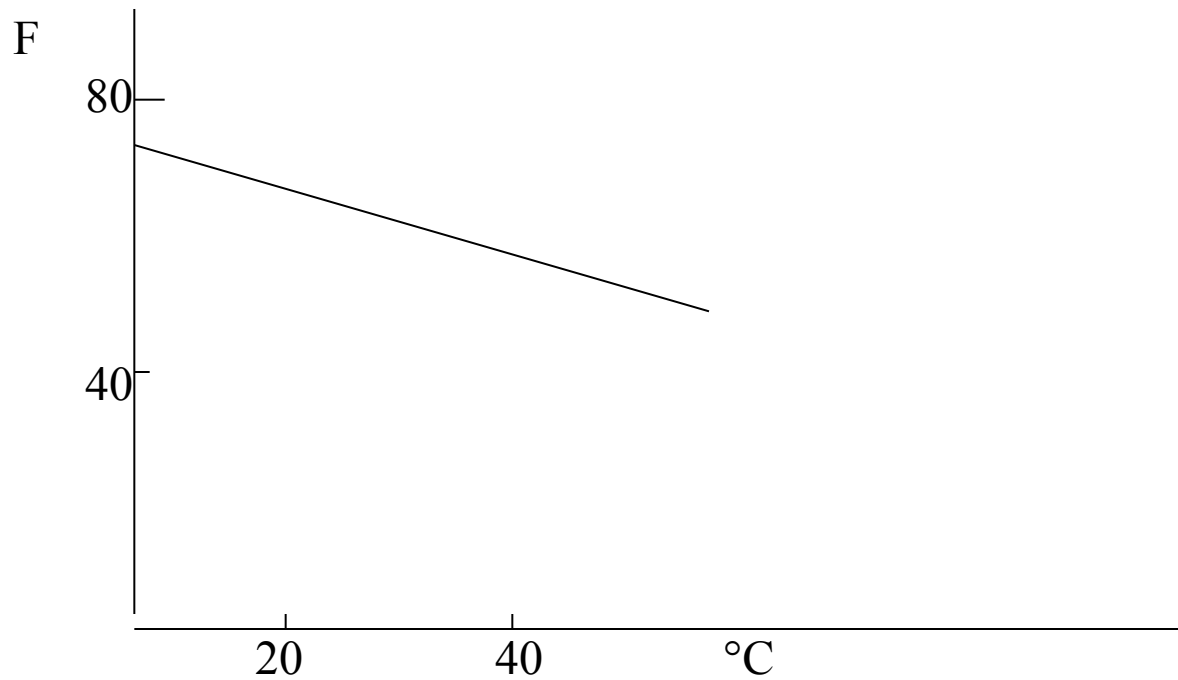
Solvent	Freq. domain (ns)	TCSPC (ns)	Literature (ns)
H ₂ O	0.92	0.97	0.93
Methanol	5.35	5.31	5.64
DMSO	7.15	7.54	7.48
Ethyl acetate	10.93	nd	10.5

Pokles polarity 6 – 1.



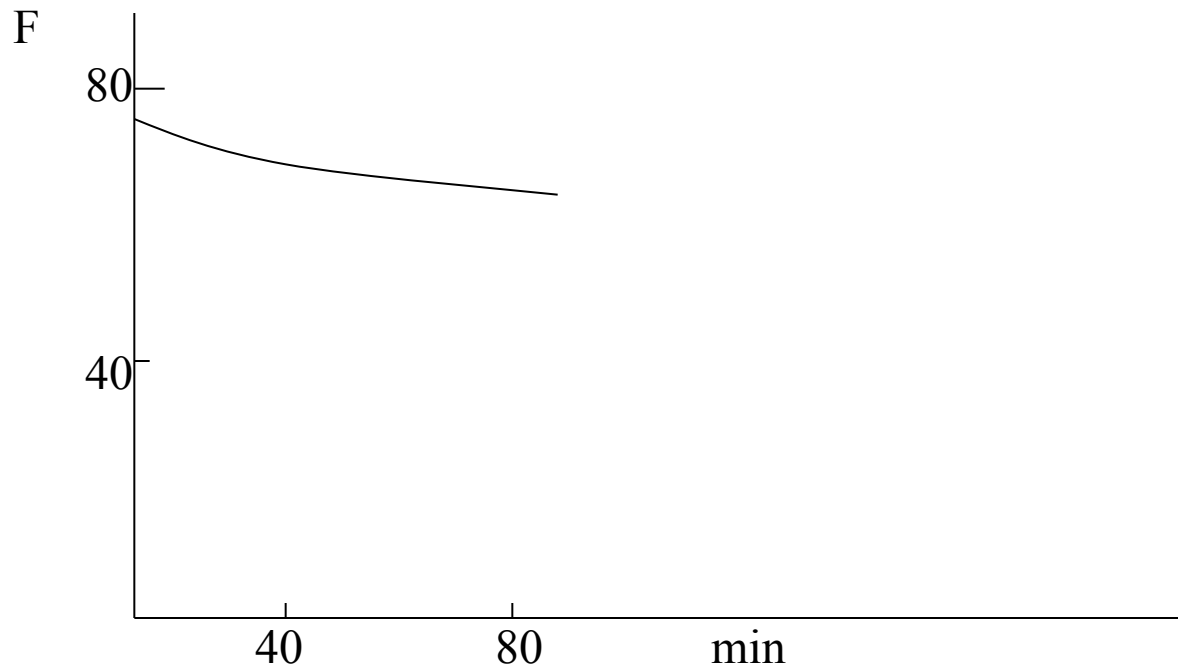
Podmínky fluorescence

Závislost fluorescence na teplotě

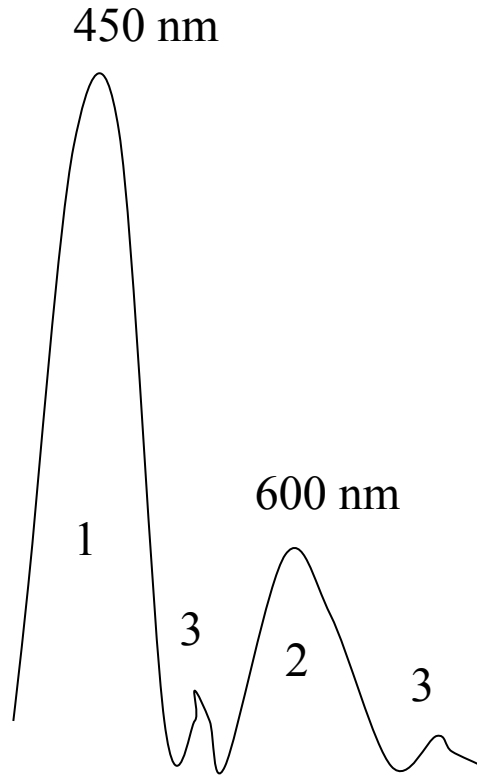


Podmínky fluorescence

Stabilita fluorescenčního signálu
chininsulfátu



Podmínky fluorescence



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

Excitace 450 nm

Emisní spektrum

Kvantitativní fluorimetrie

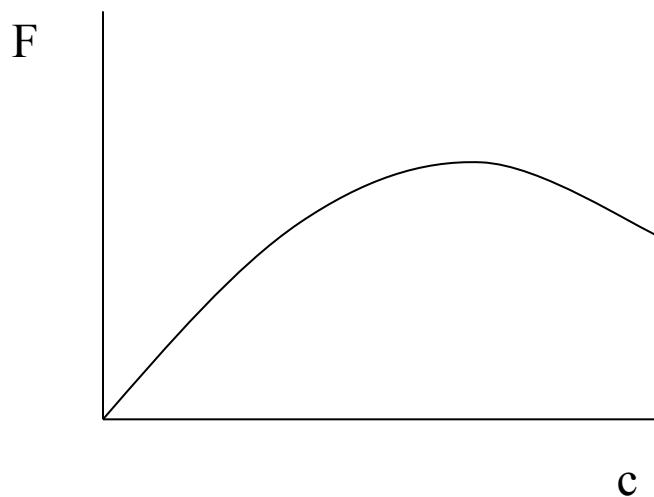
Závislost intenzity fluorescence na koncentraci látky

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

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

jestliže $c \rightarrow 0$

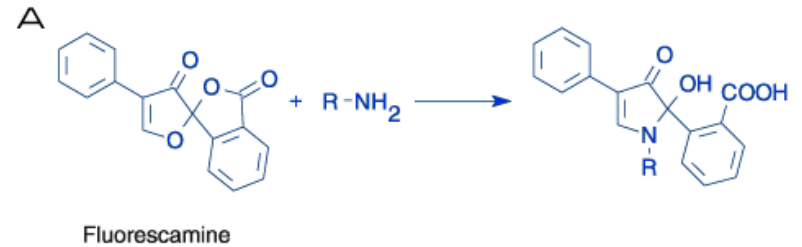
$$F = I_0 \Phi \cdot 2,3 \cdot \varepsilon d \cdot c$$



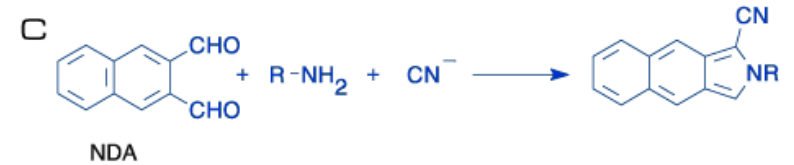
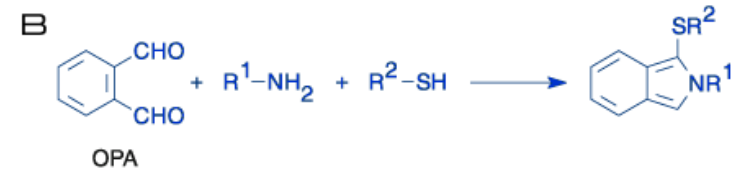
Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení koncentrace aminokyselin

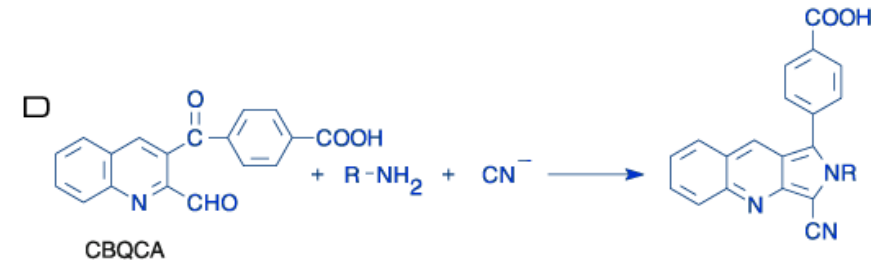
390/464 nm



340/455 nm



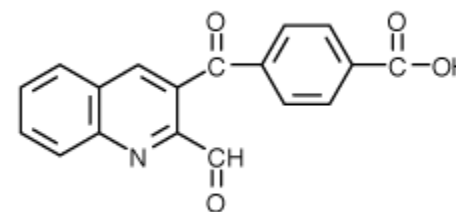
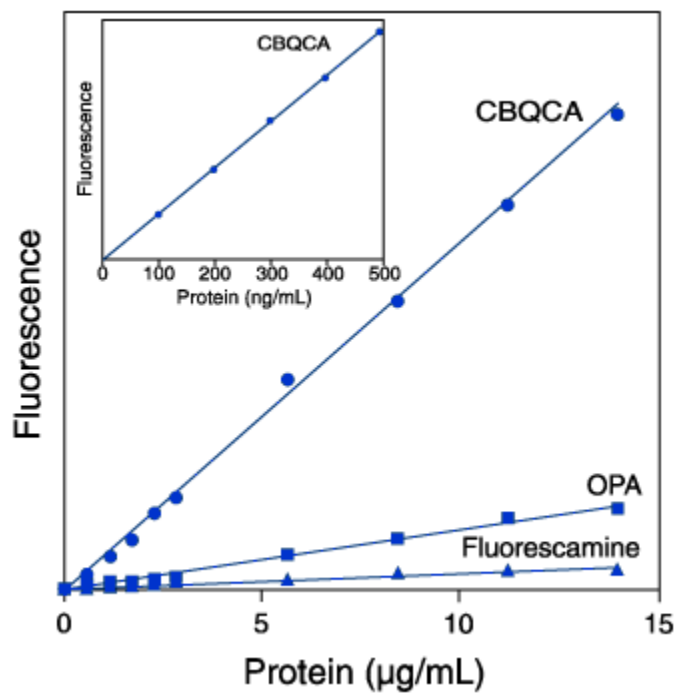
450/550 nm



Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení bílkovin

CBCQA



Kvantitativní fluorimetrie

Detekce bílkovin v gelu

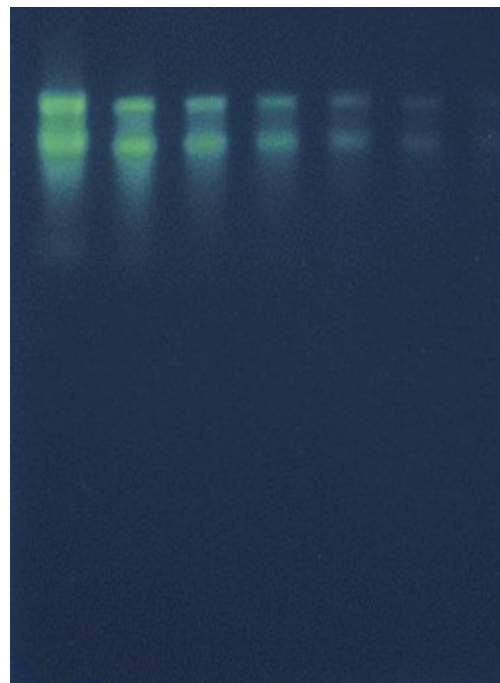
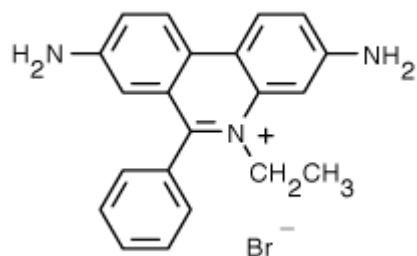
(barevně: Coomasie blue, stříbrné barvení)

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

Kvantitativní fluorimetrie

Detekce nukleových kyselin

Ethidium bromid

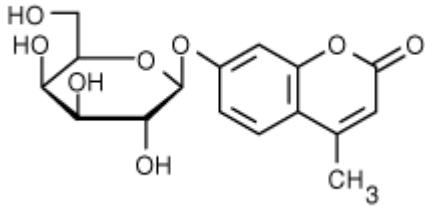


rRNA 16 a 23s barvená SYBR Green II
Molecular Probes

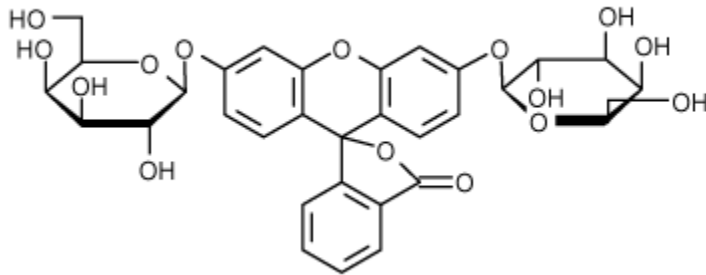
Fluorogenní substráty

Galaktosidasy

4-methylumbelliferyl- α -galaktosid

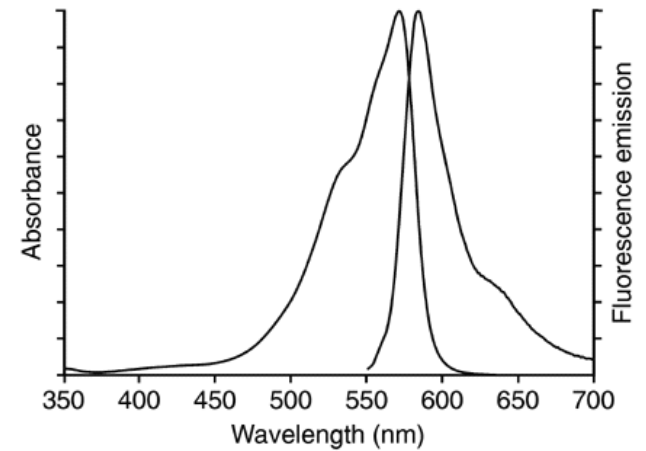
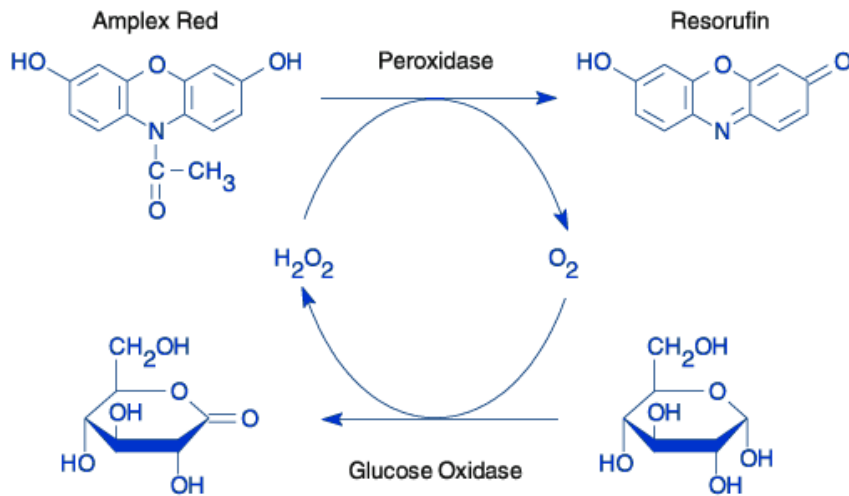


Fluorescein-digalaktosid



Fluorogenní substráty

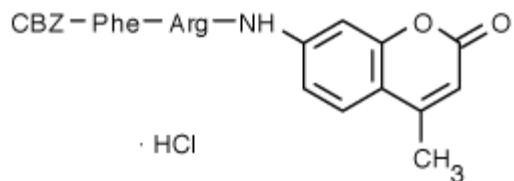
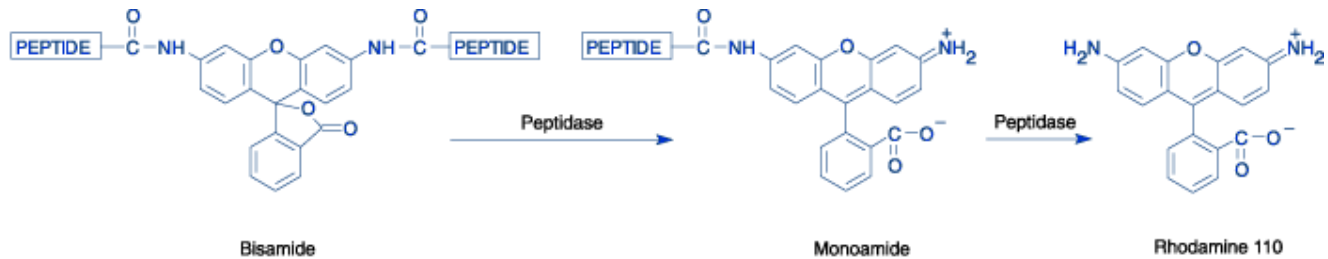
Peroxidasy – amplex red, vznik resorufinu



Fluorogenní substráty

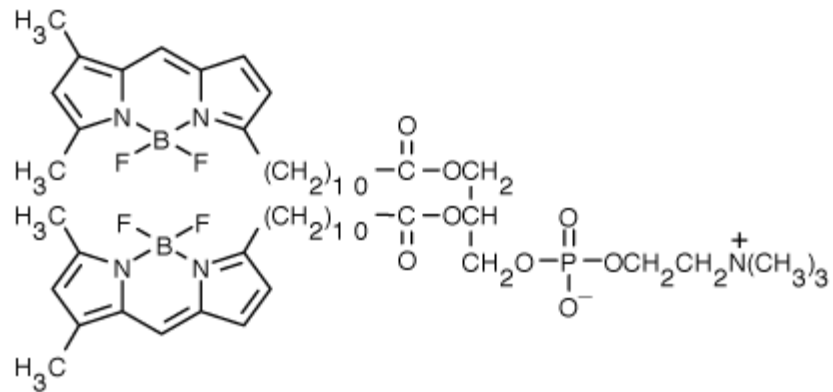
Proteinasy, peptidasy

1) Fluorescenční konjugáty proteinů a peptidů



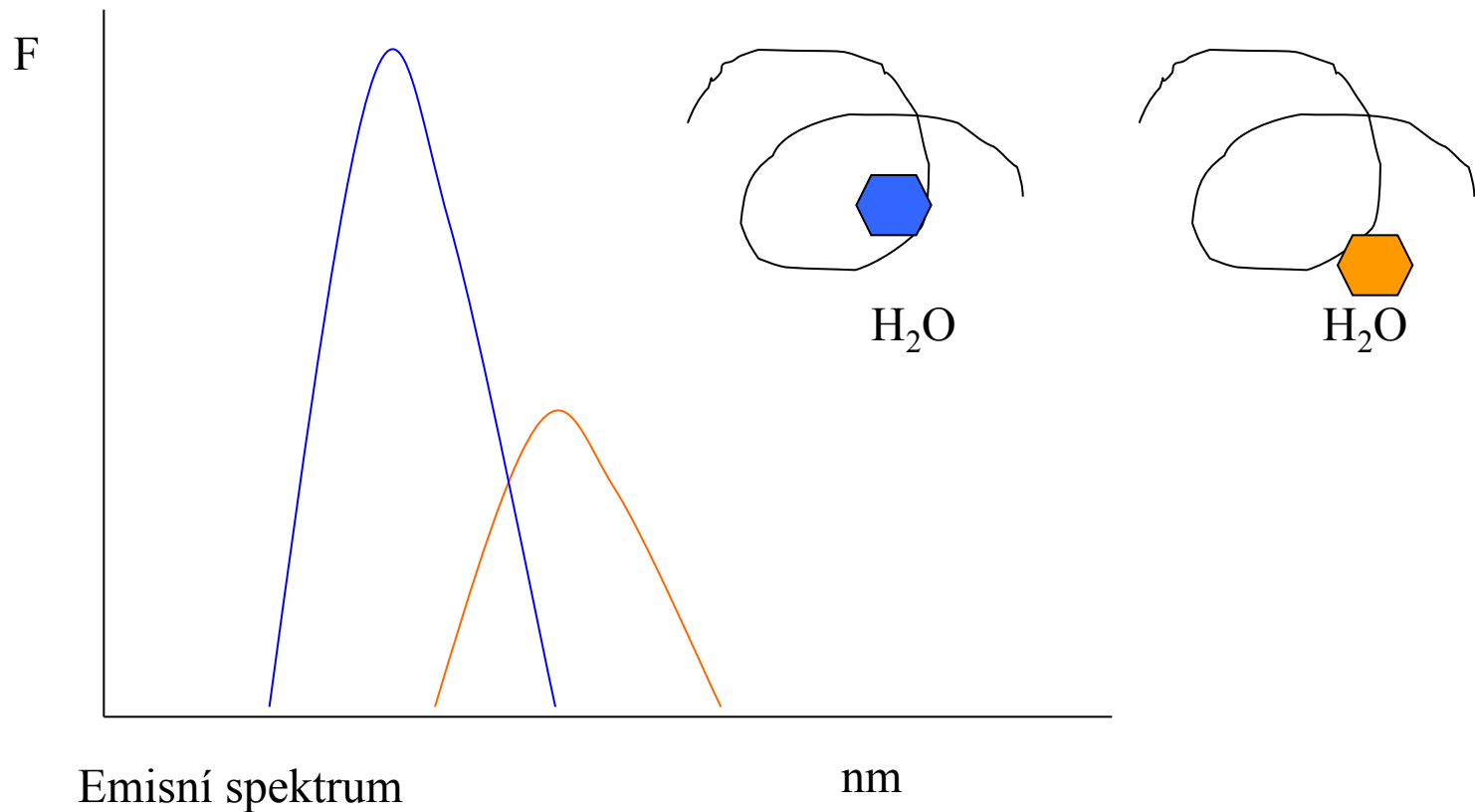
Fluorogenní substráty

Fosfolipasa A

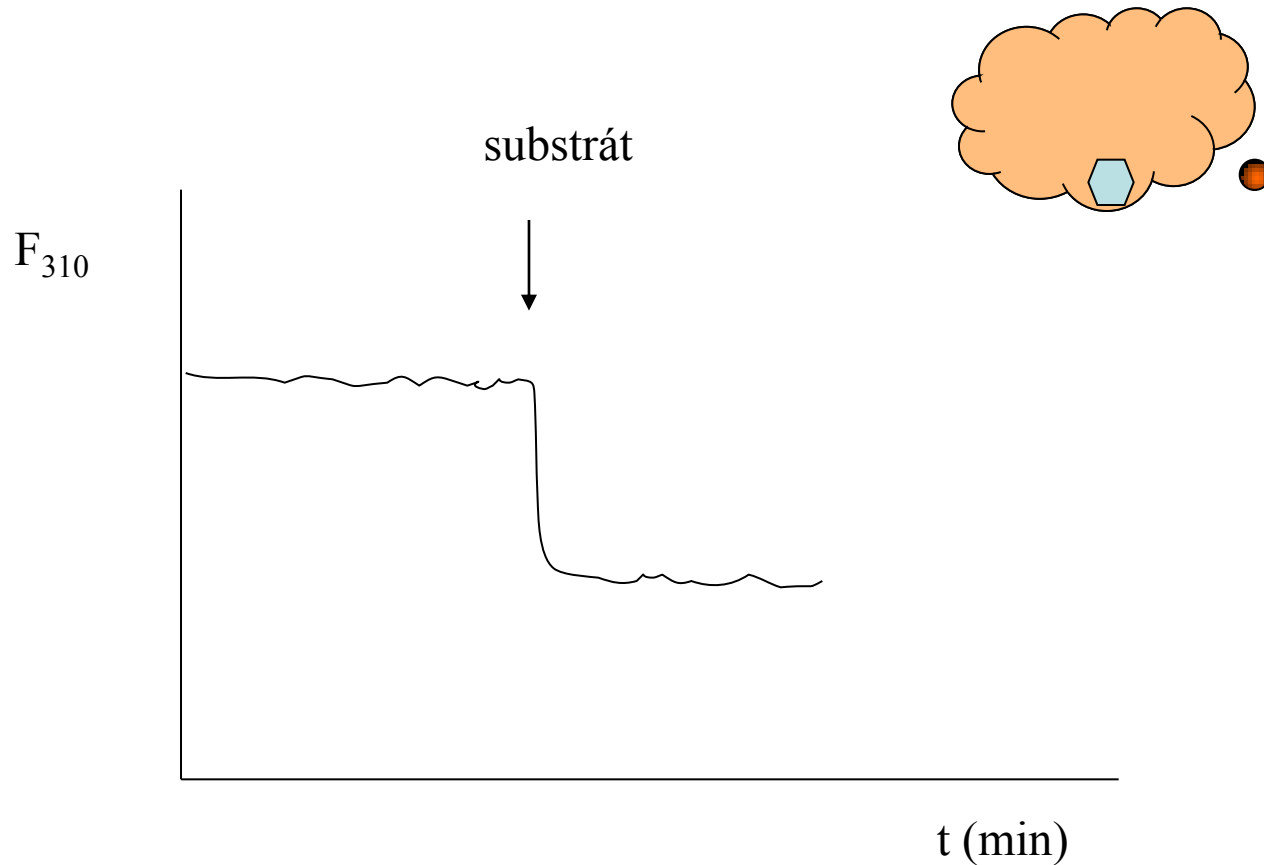


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

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

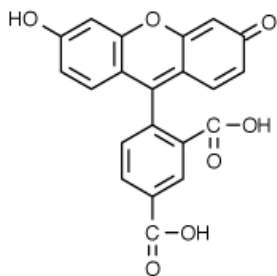


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

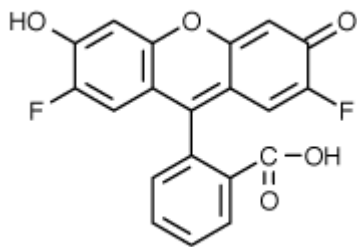


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

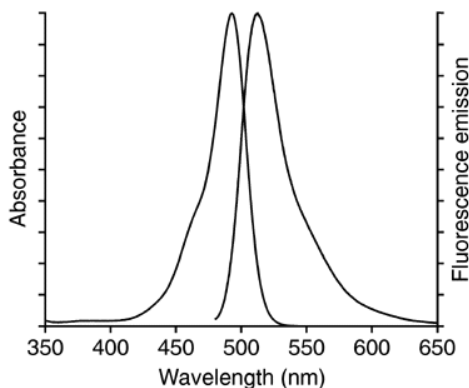
Fluorescenční konjugáty



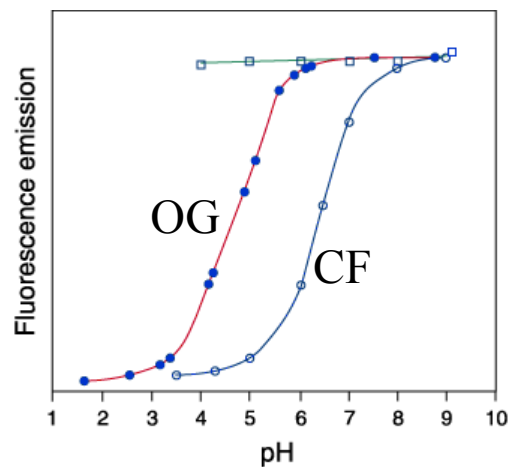
Karboxyfluorescein –
(494/520 nm)



Oregon Green - (496/524 nm)



Absorpce/emise
fluoresceinu
při pH 9

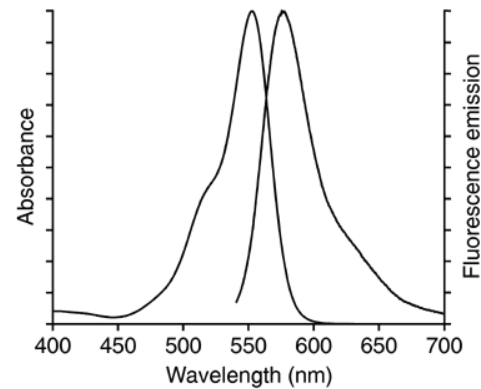
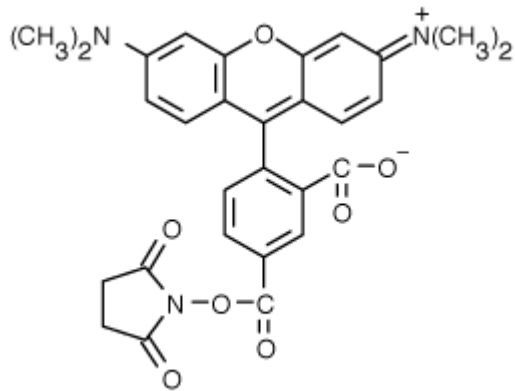


CF-karboxyfluorescein
OG oregon green

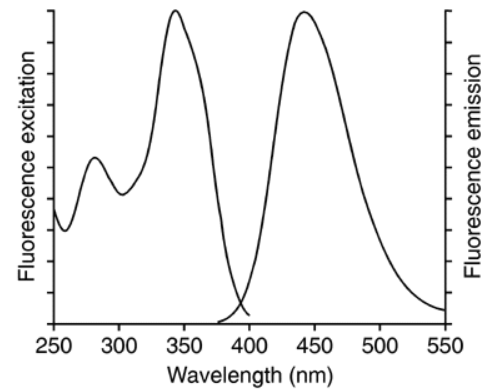
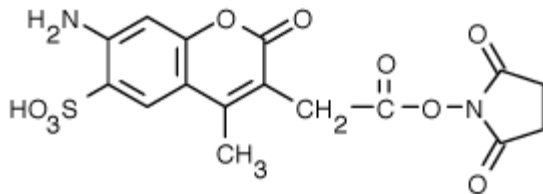
Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Fluorescenční konjugáty

Teramethylrhodamin – 545/580 nm)

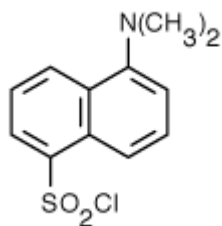


Kumariny – 350/450 nm)

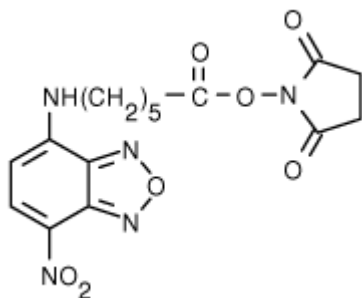
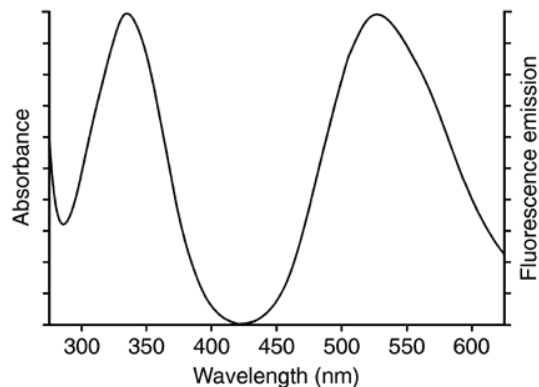


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

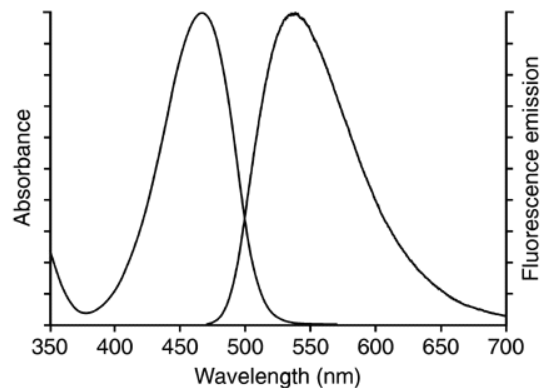
Fluorescenční konjugáty



Dansyl

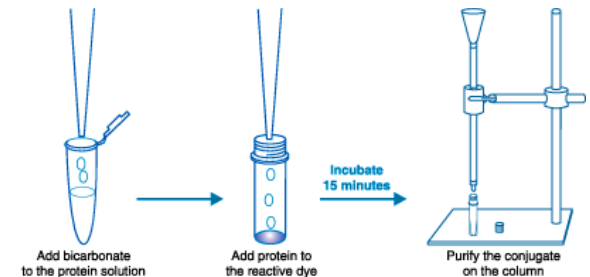
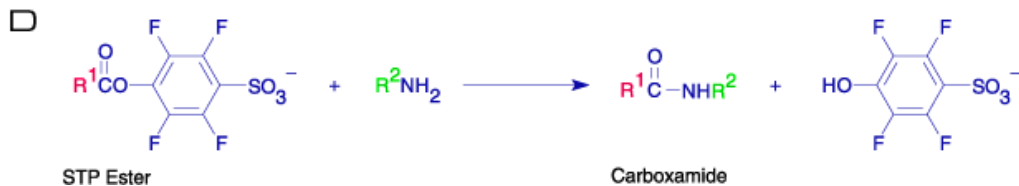
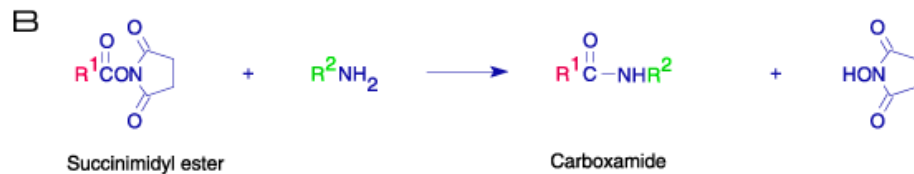
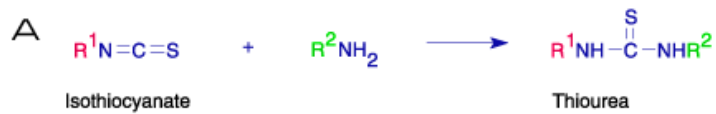


Benzoxadiazol –N-sukcinimid



Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Fluorescenční konjugáty

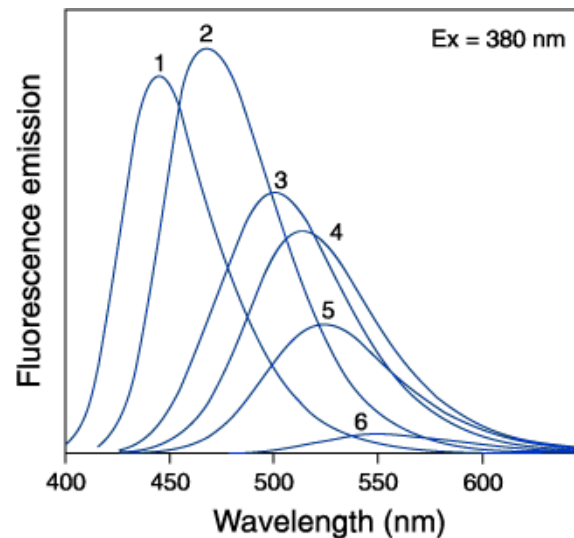
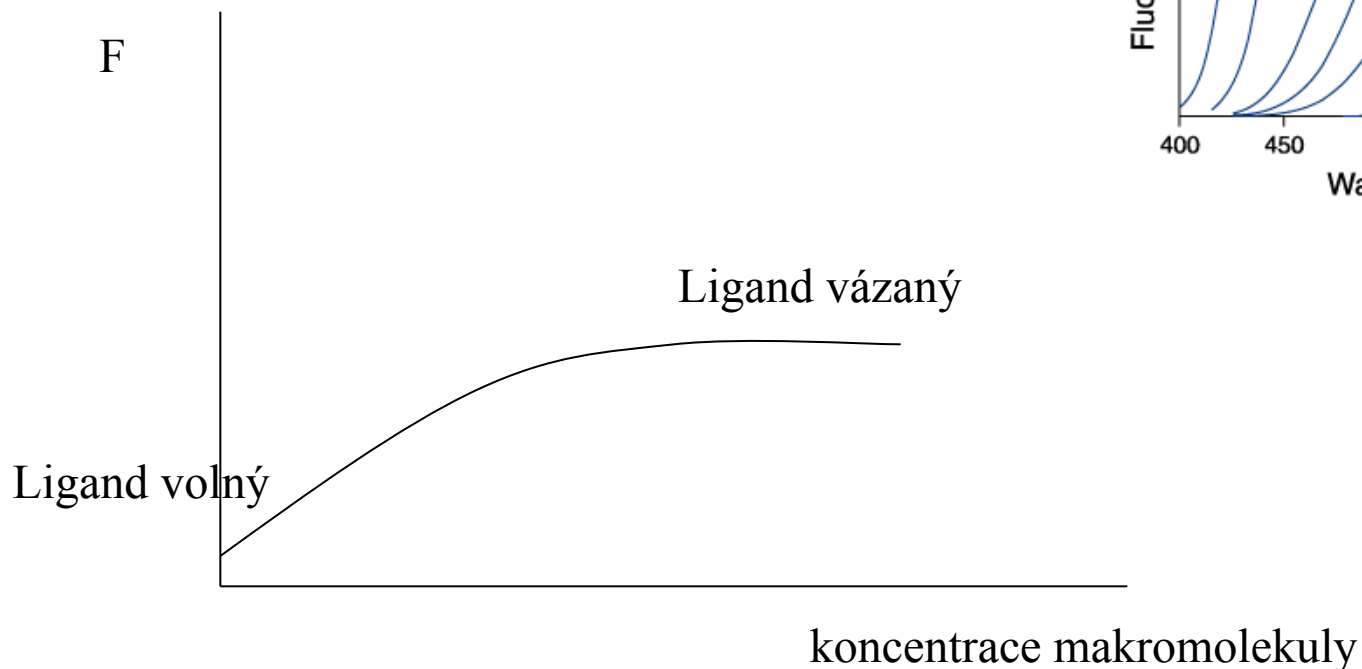


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí



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

Interakce makromolekul s ligandy



Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

$$F = F_f + F_b$$

$$F = C_f \cdot \Phi_f + C_b \cdot \Phi_b$$

$$F = (C - C_b) \Phi_f + C_b \cdot \Phi_b$$

$$F = C\Phi_f - C_b\Phi_f + C_b \cdot \Phi_b$$

$$F = F_0 + C_b (\Phi_b - \Phi_f)$$

$$C_b = (F - F_0) / (\Phi_b - \Phi_f)$$

F_f, F_b – fluorescence volné, vázané frakce

Φ_b, Φ_f – kvant. Výtěžek fluorescence vázaného, volného ligandu

C_b, C_f – koncentrace vázaného, volného Ligandu

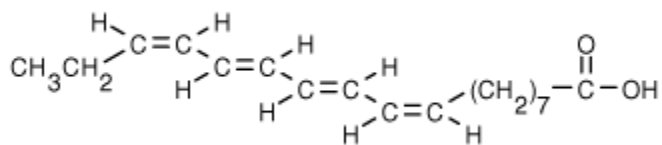
C – celková koncentrace ligandu

F – celková fluorescence

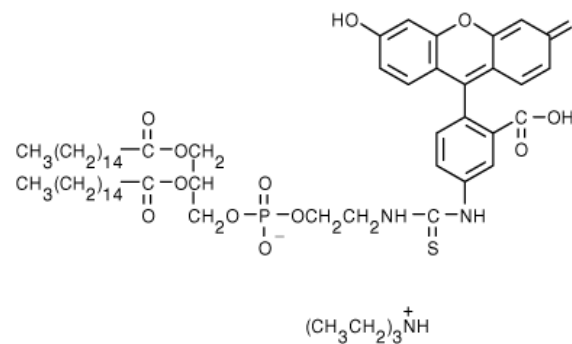
Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Interakce makromolekul s ligandy

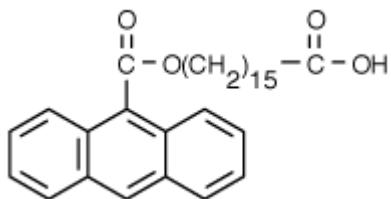
Použití fluorescenčních analogů



Kys. cis-parinarová



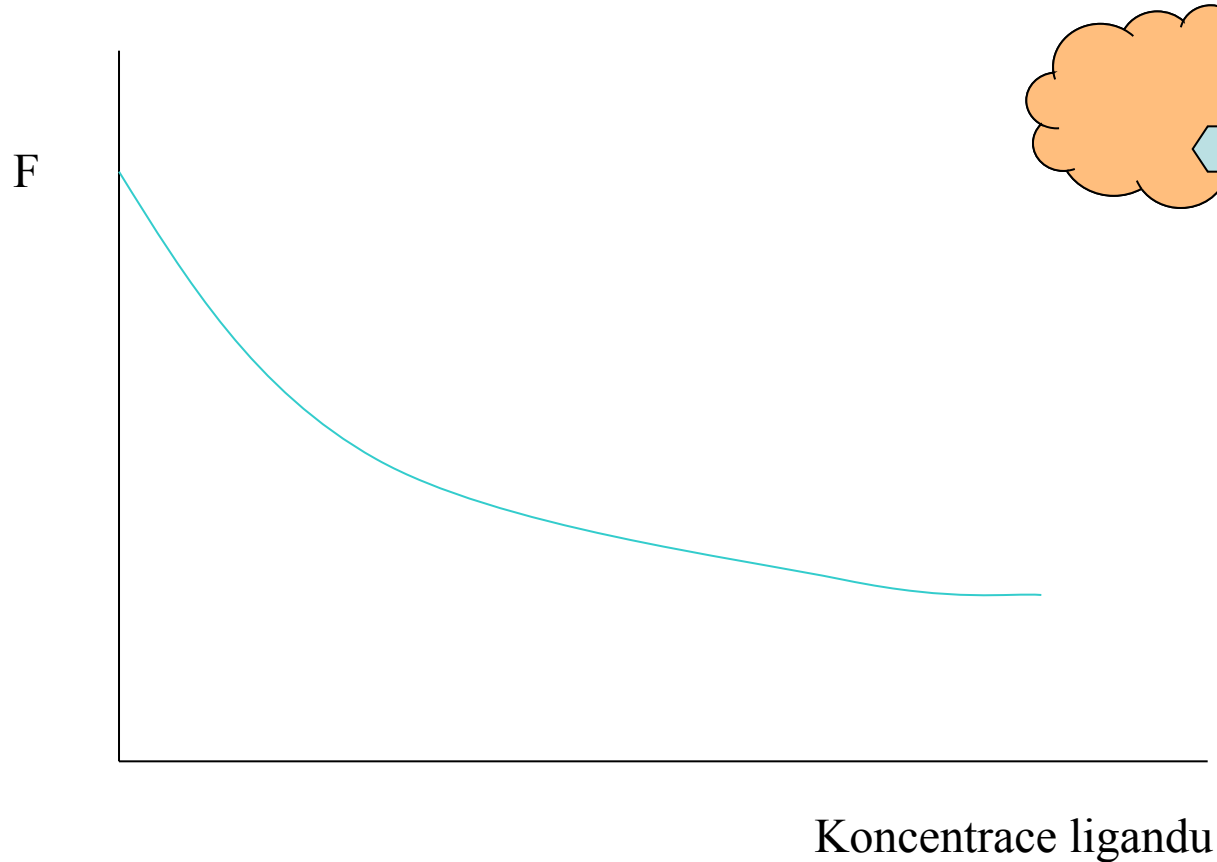
Fluorescein-PE



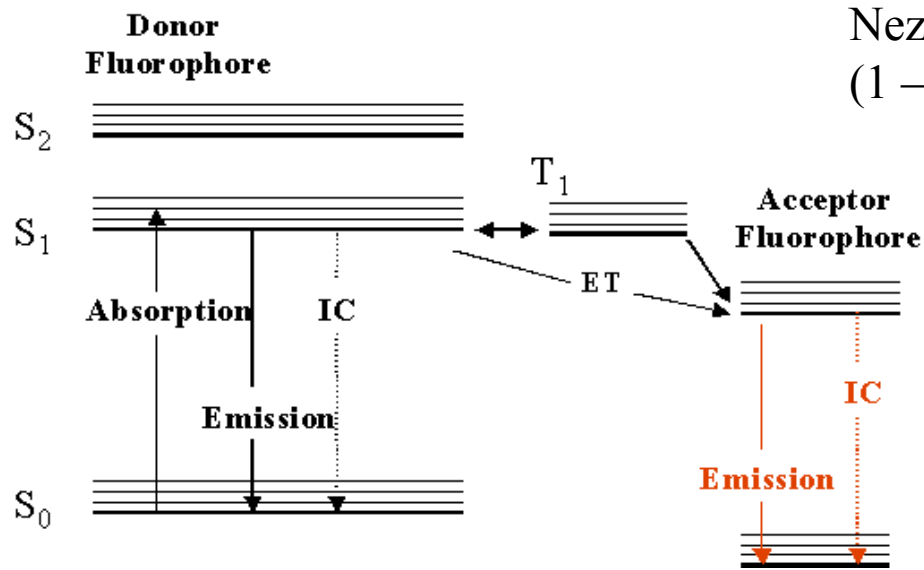
Anthroyloxypalmitát

Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Použití značené makromolekuly
Fluorescence značené bílkoviny

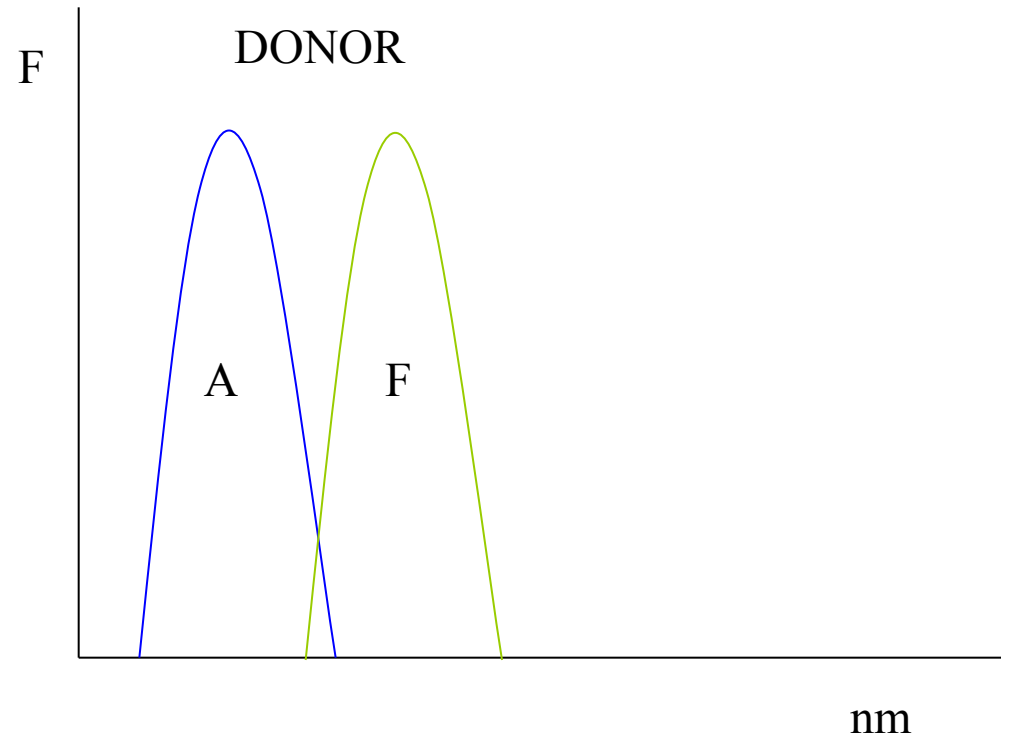
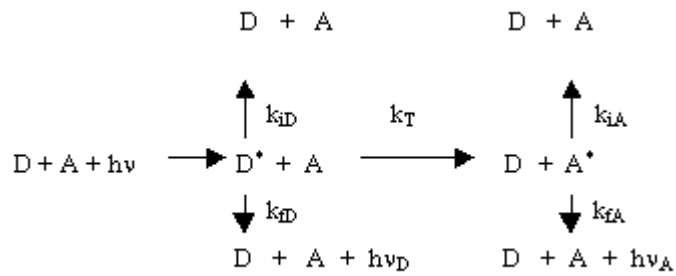


Fluorescenční rezonanční transfer energie (Försterův přenos)

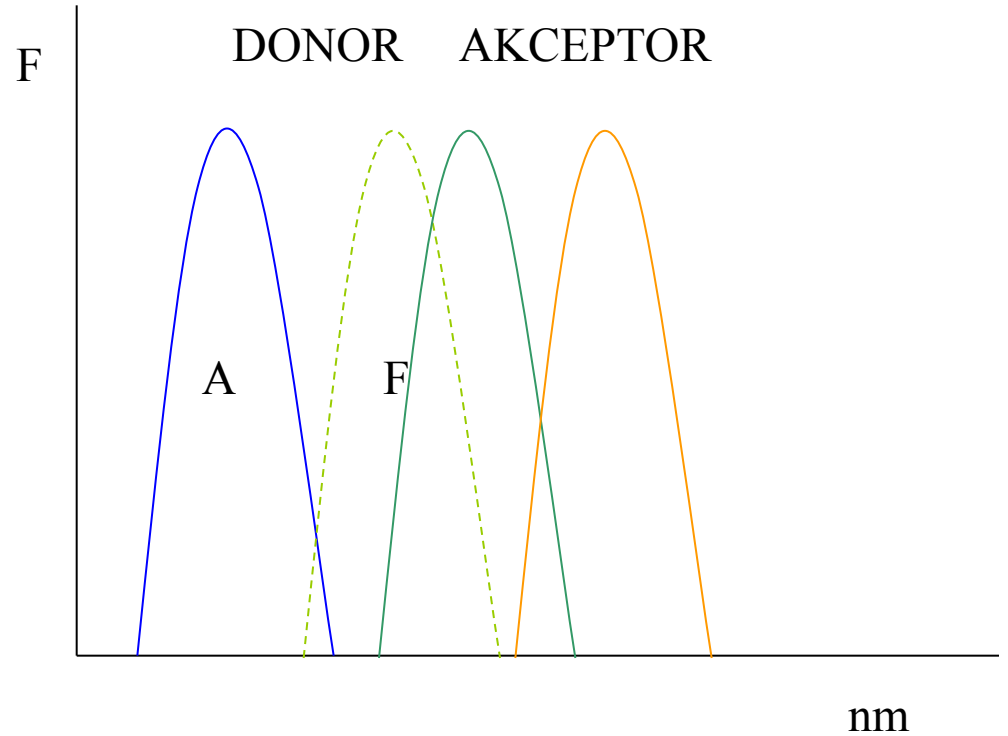
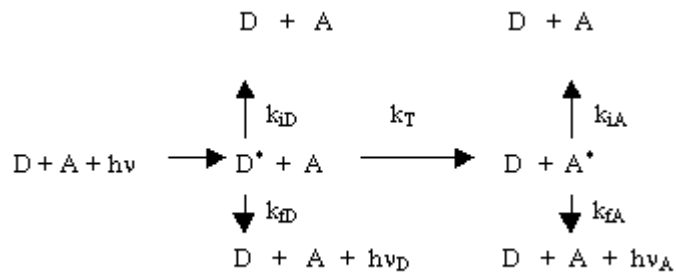


Nezářivý přenos energie z donoru na akceptor
(1 – 10 nm)

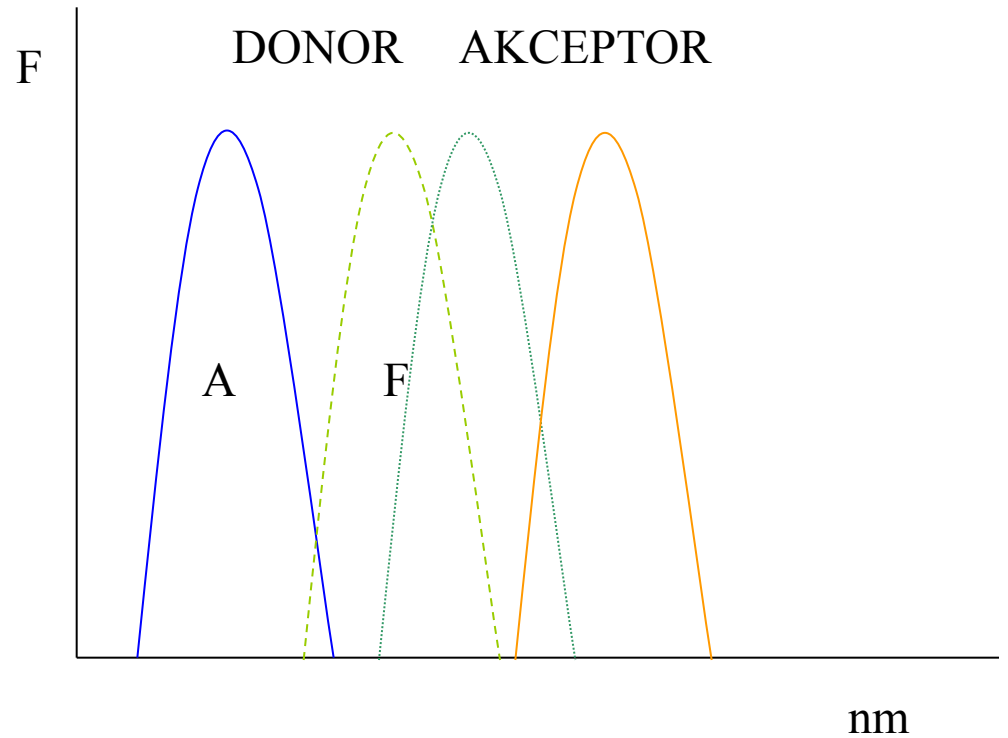
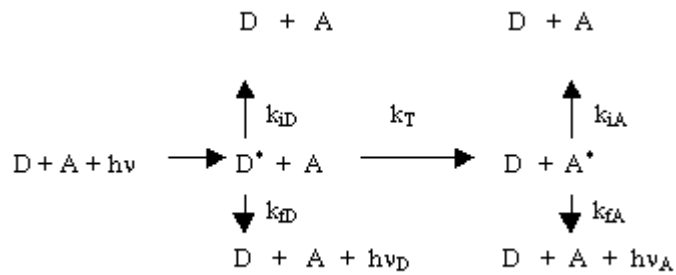
Fluorescenční rezonanční transfer energie



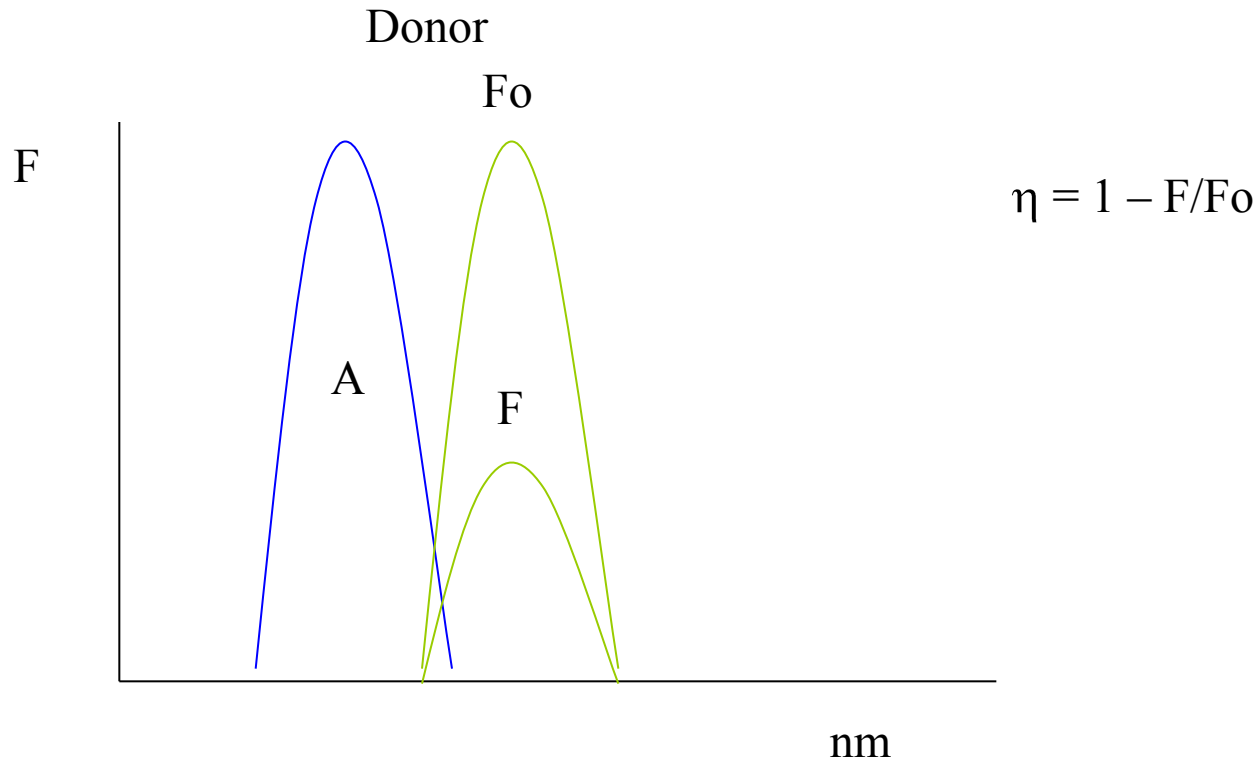
Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie

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

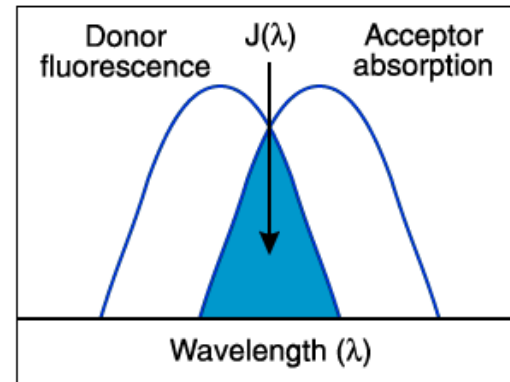
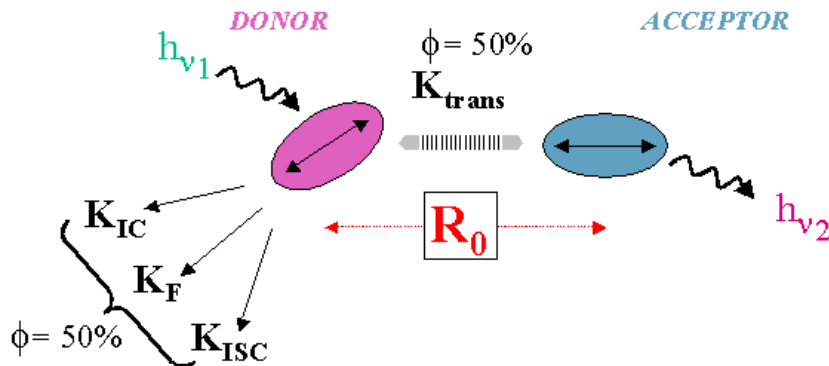
$$R_0^6 = \sqrt{1,66 \cdot 10^{-33} \cdot \tau \cdot J / n^2 \nu_0^2}$$

τ – doba života exc. stavu

J – překryvový integrál

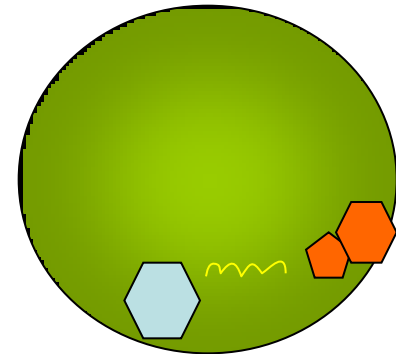
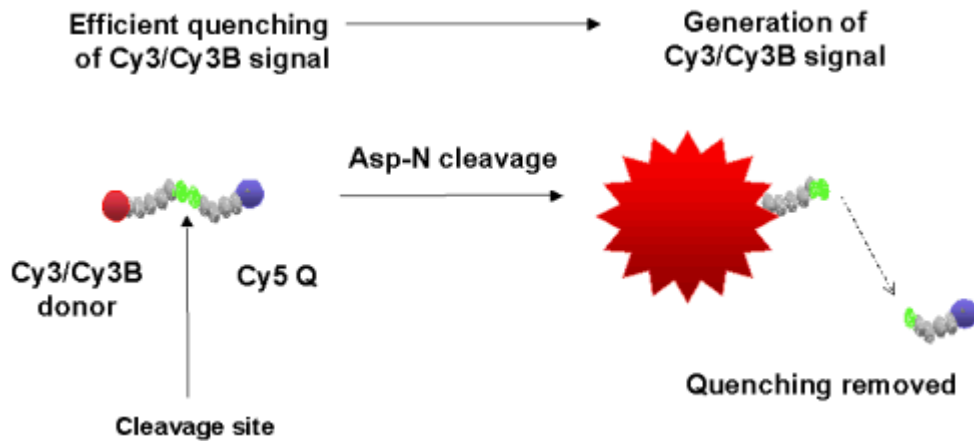
n – refraktivní index rozpuštědla

ν – vlnočet emise donoru

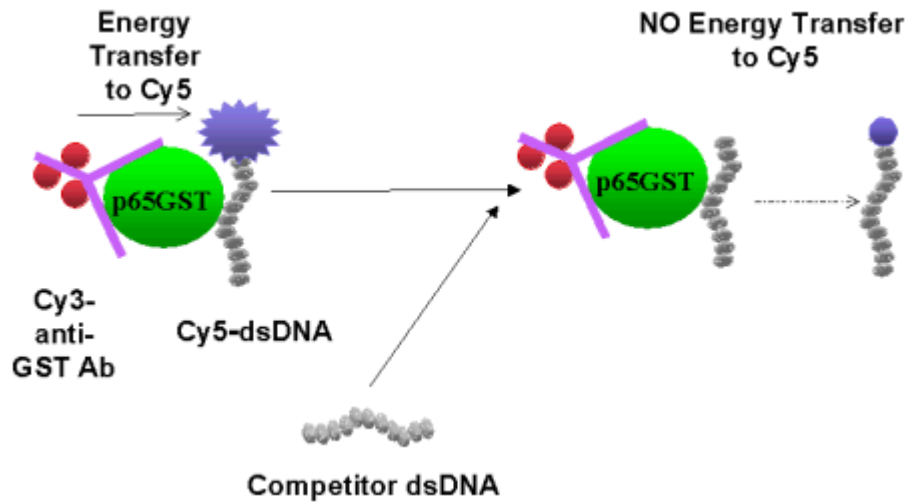


Fluorescenční rezonanční transfer energie

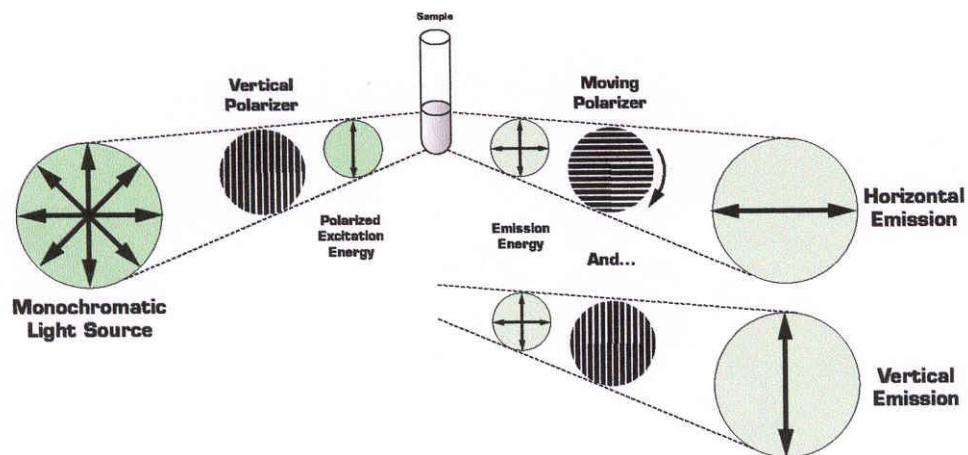
Použití – změření vzdálenosti mezi dvěma molekulami v bílkovině
Tryptofan (290/340) vs. NADH (340/450 nm)



Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční anizotropie



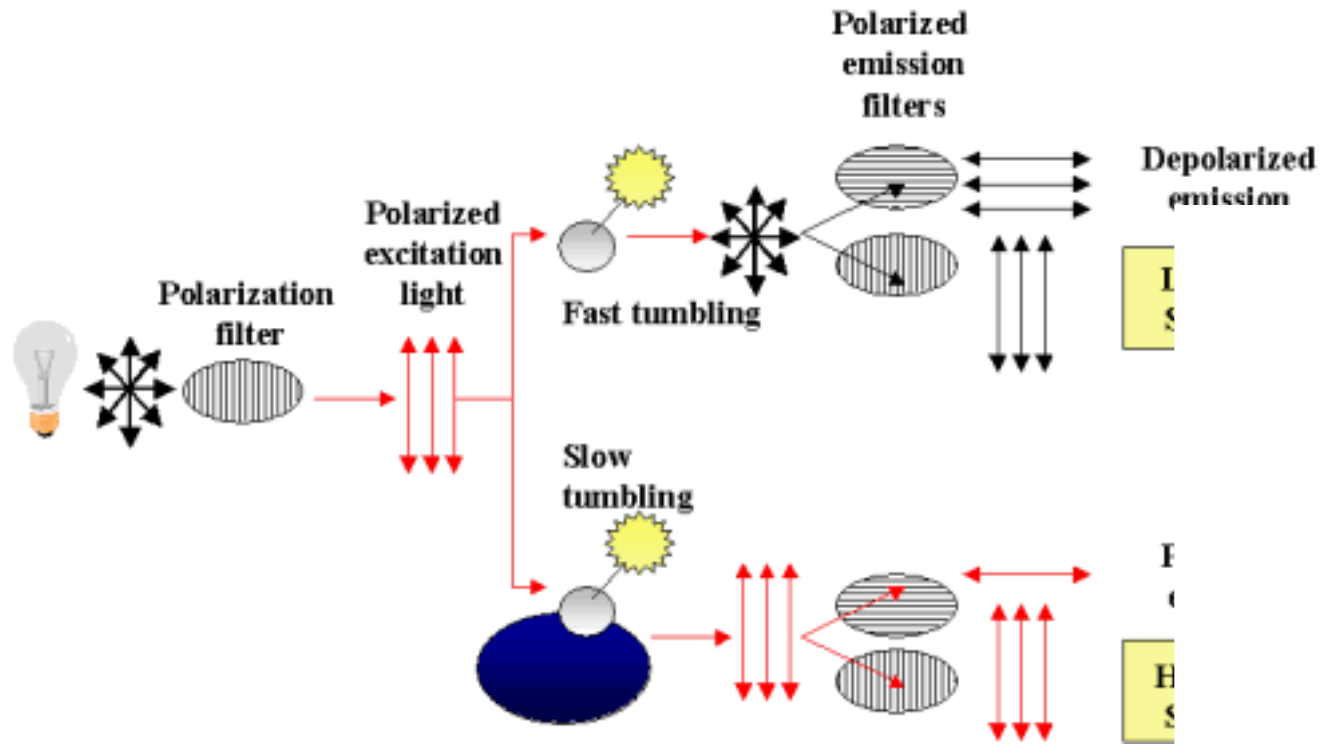
Fluorescenční anizotropie

Polarizační filtry

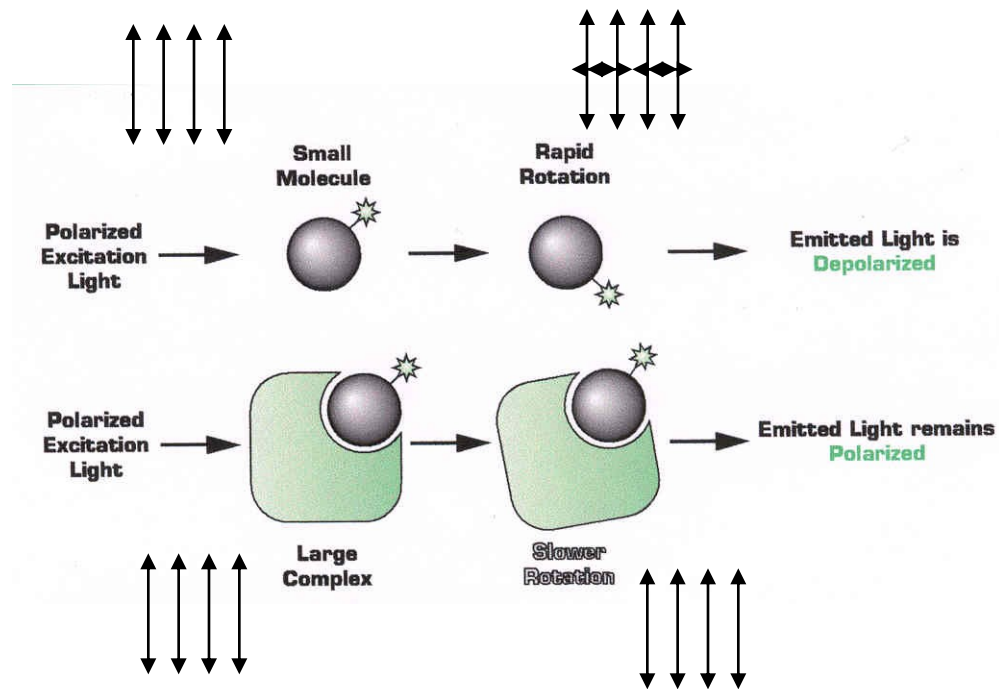


Auto-Polorizer Accessory

Fluorescenční anizotropie



Fluorescenční anizotropie

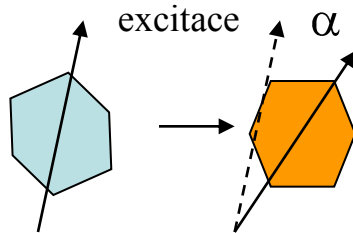


Fluorescenční anizotropie

$$\text{Fluorescenční anizotropie } r = \frac{I_v - I_h}{I}$$

$$I = I_v + 2I_h$$

Rotační relaxační čas



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

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

τ , střední doba života fluorescence
 ρ , rotační relaxační čas molekuly
 r_0 – anizotropie nepohyblivé molekuly

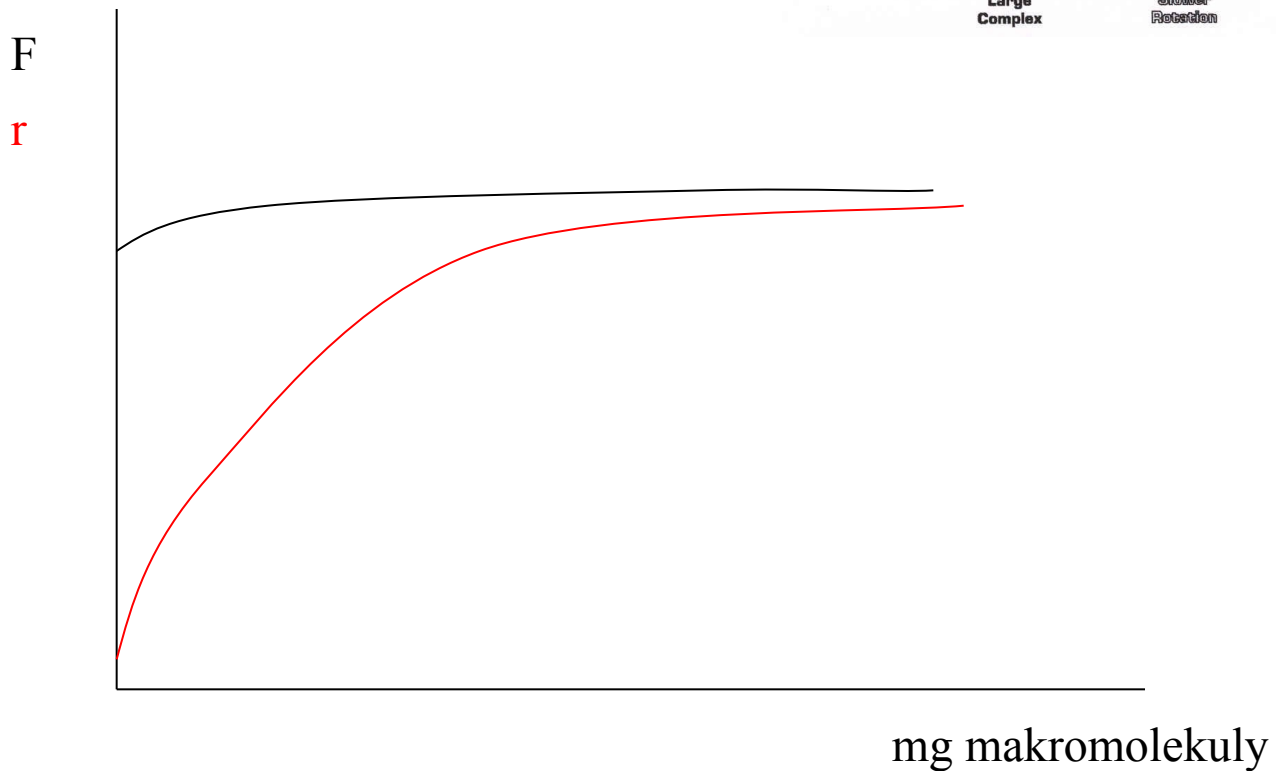
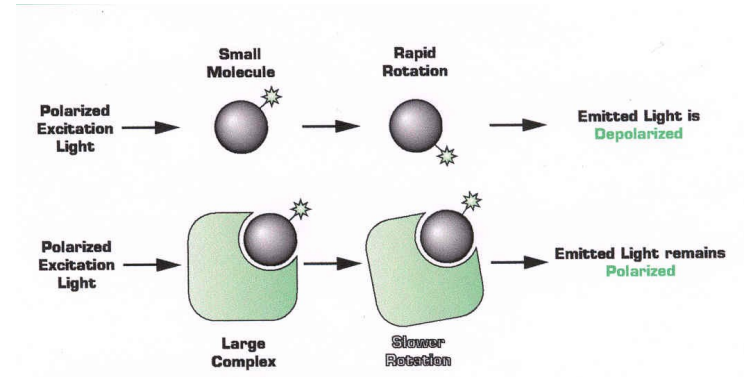
$$\rho = V\eta/RT$$

V objem
 η viskozita

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

Fluorescenční anizotropie

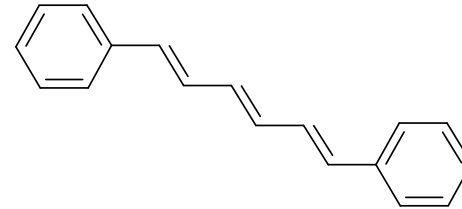
Využití:
Interakce makromolekuly s ligandem



Fluorescenční anizotropie

Využití:

Měření viskozity prostředí

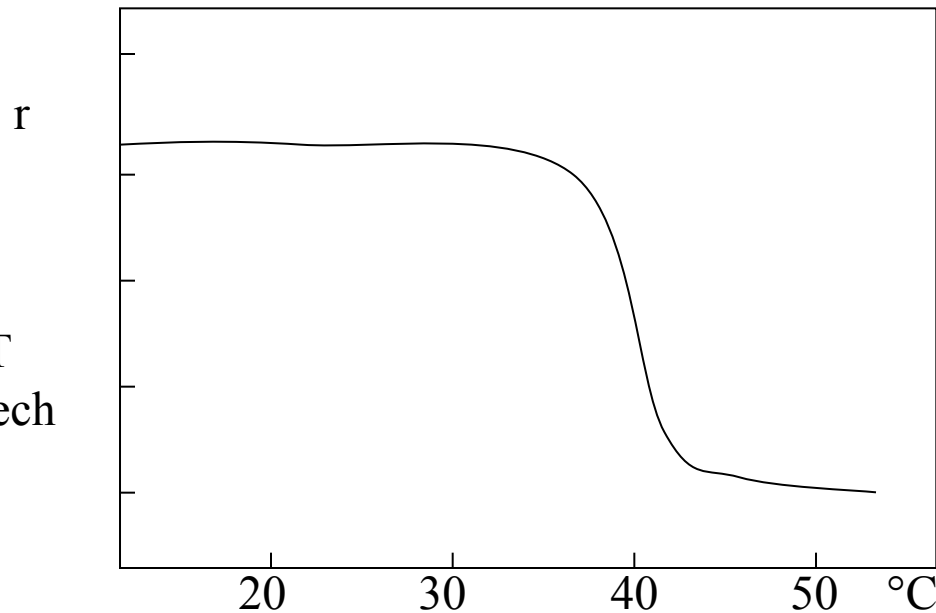


$$r_o/r = 1 + 3\tau RT/V\eta$$

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

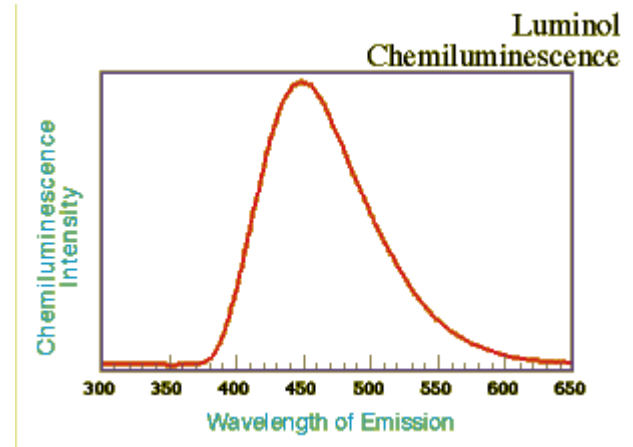
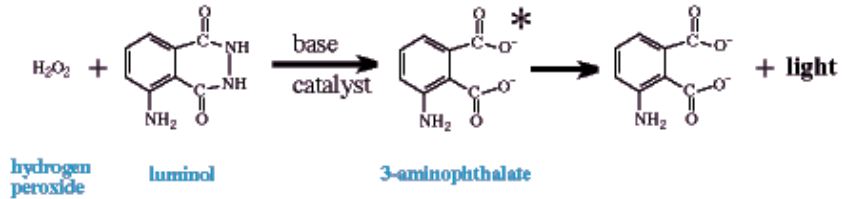
$$\eta = 2,4r/(0,362 - r)$$

Fl. anizotropie DPHT
Vázaného v liposomech
DPPC

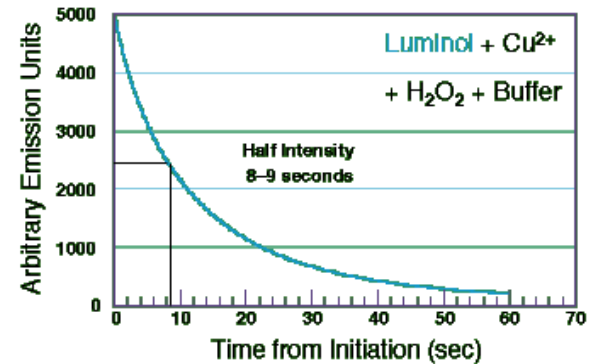


Chemiluminescence

Luminol

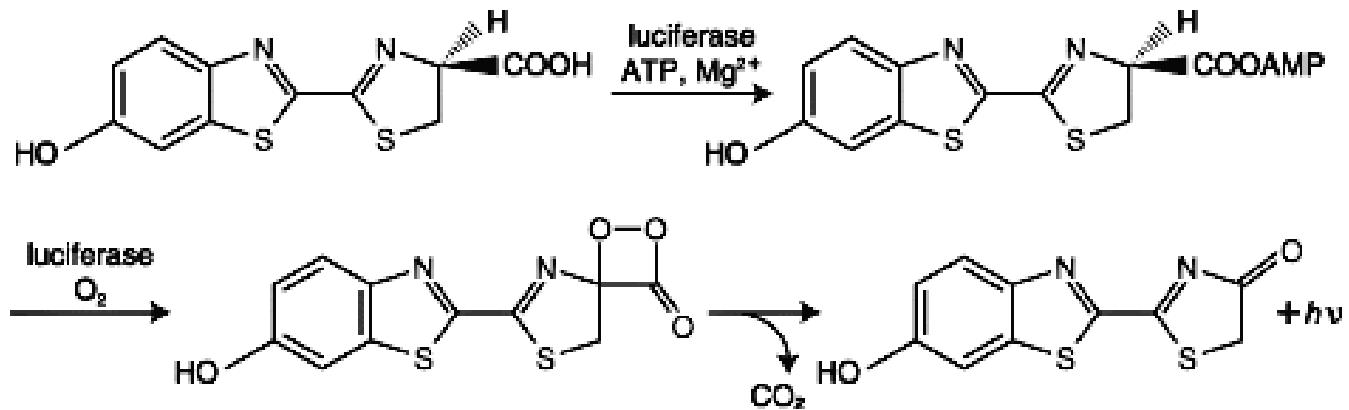


Luminol Emission Time Profile



Chemiluminescence

Luciferin



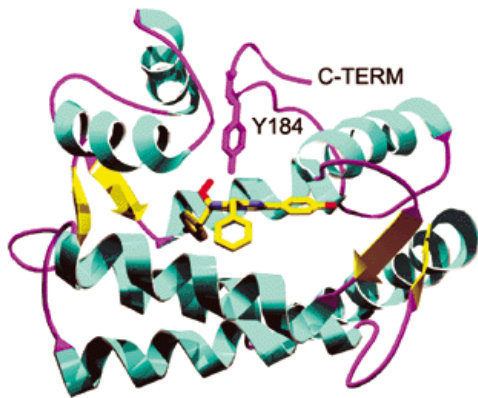
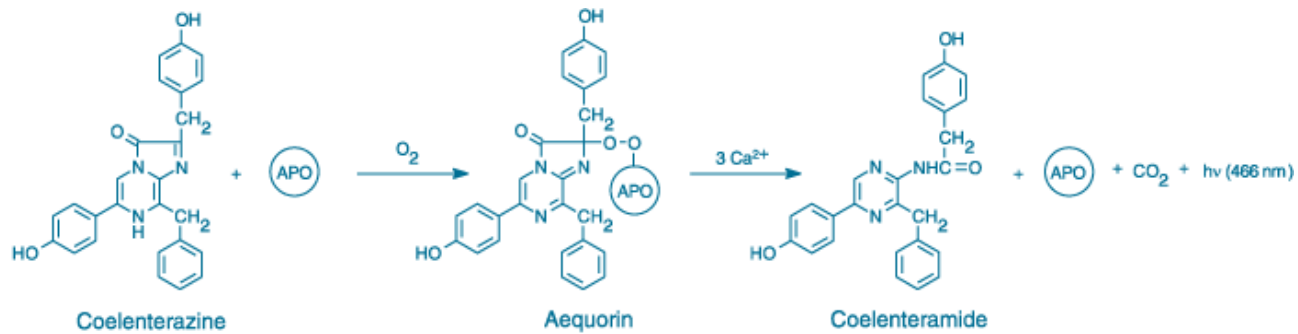
Chemiluminescence

Aequorin – *Aequoria victoria*



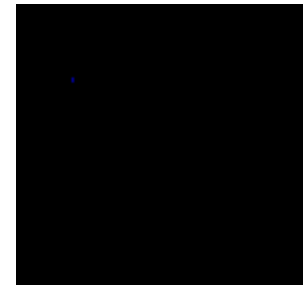
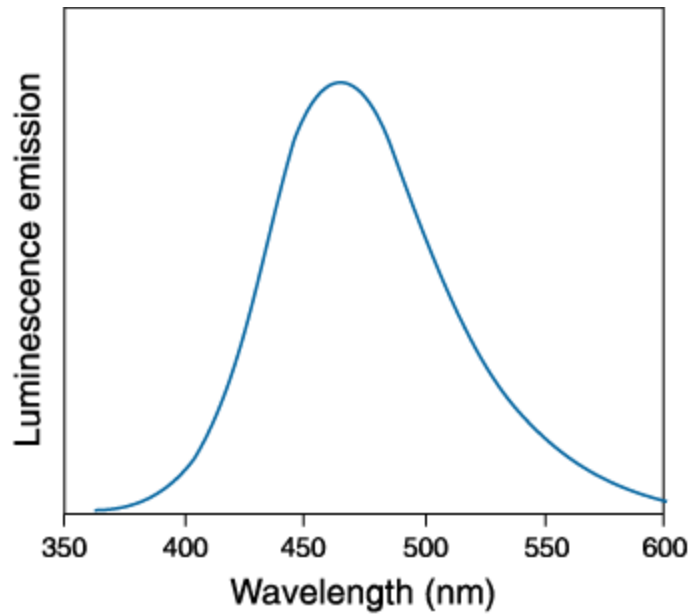
Chemiluminescence

Aequorin – *Aequoria victoria*



Chemiluminescence

Aequorin – *Aequoria victoria*



Průnik vápníku do mitochondrií
Aktivuje oxidaci