

C6200–Biochemické metody

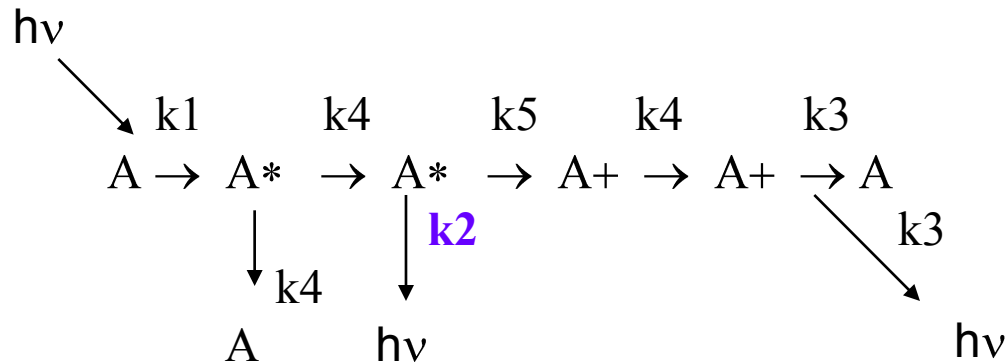
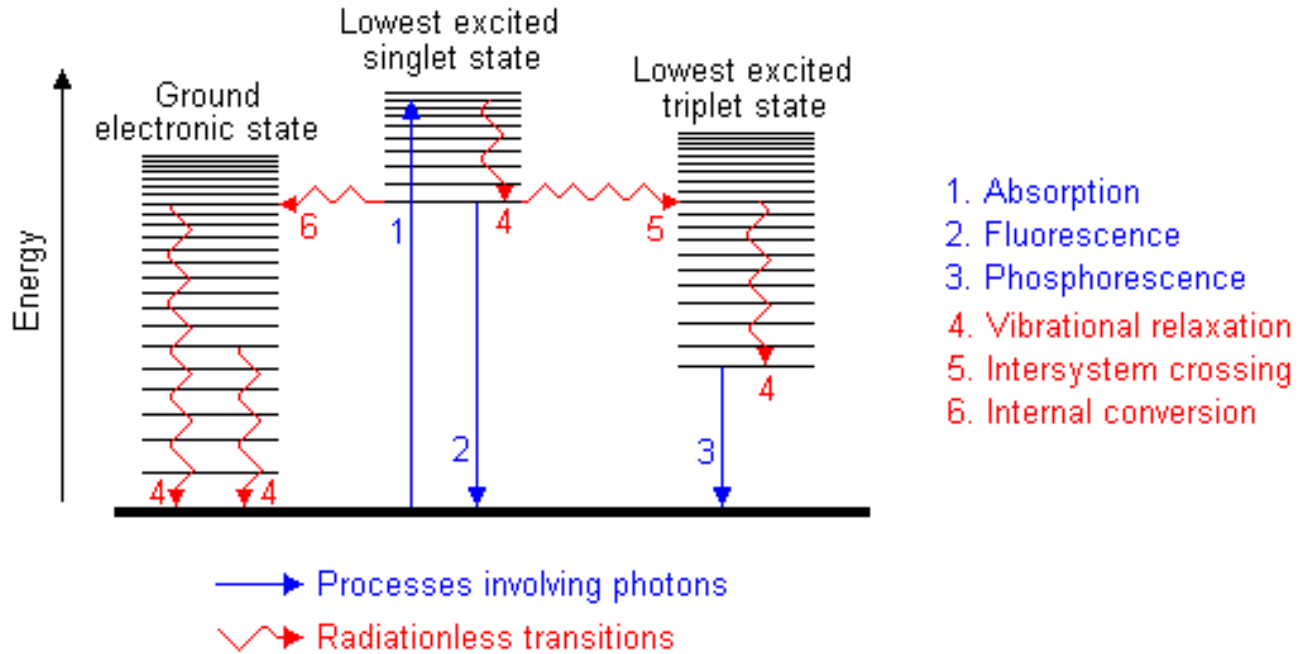
09_LUMINISCENČNÍ METODY

Petr Zbořil

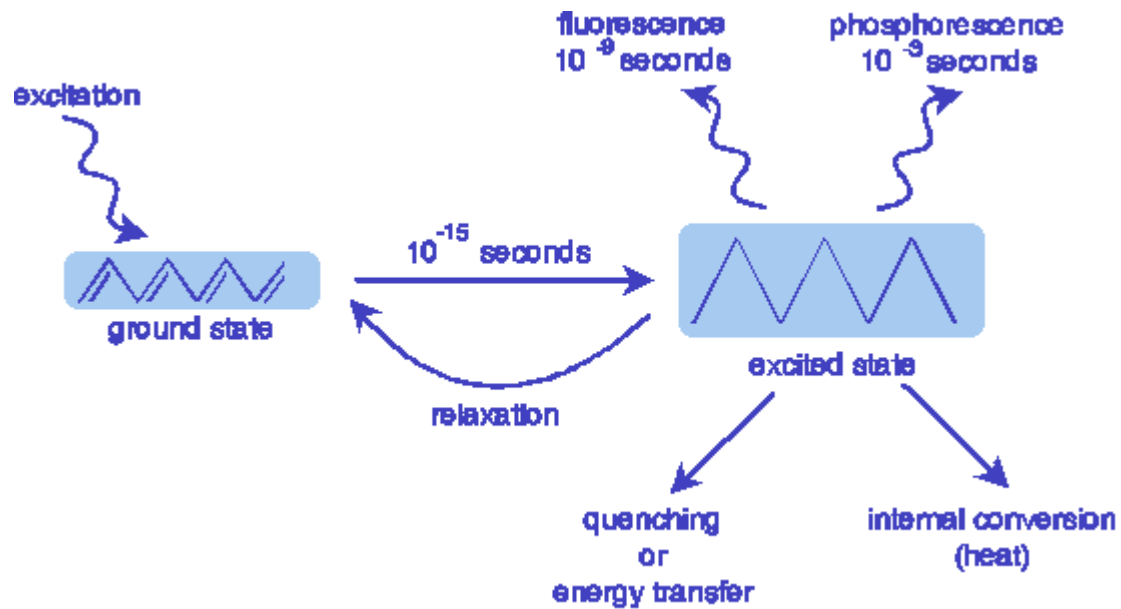
Luminiscenční pochody

- Emise záření
 - Přejchod elektronů z excitovaného stavu do základního
- Způsob dosažení excitovaného stavu
 - Absorpcí fotonu – fotoluminiscence
 - Fluorescence, fosforescence – UV, VIS
 - Radioluminiscence – scintilátory, fosforescence
 - Chemickou reakcí – chemiluminiscence
 - Včetně biochemických - bioluminiscence
 - Radioaktivním rozpadem

Luminiscenční spektroskopie

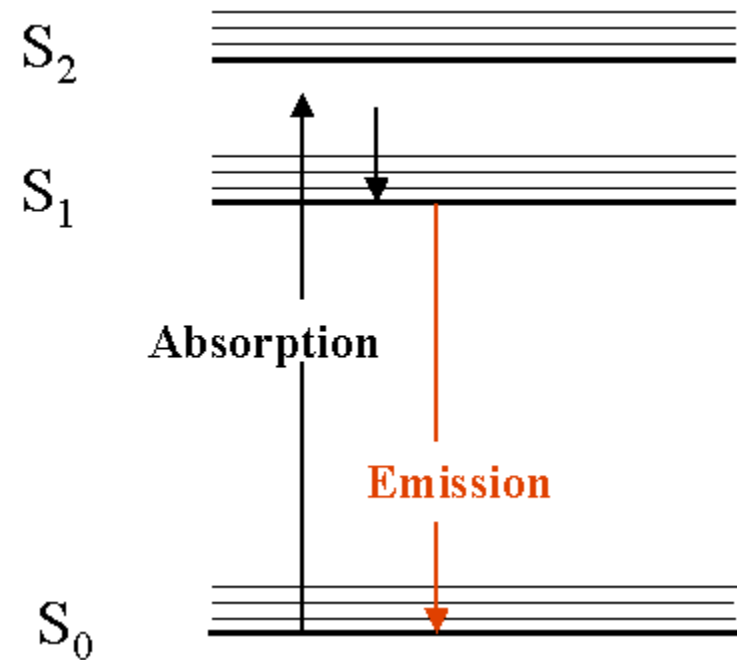


Luminiscenční spektroskopie



Základní pojmy

Excitace a emise

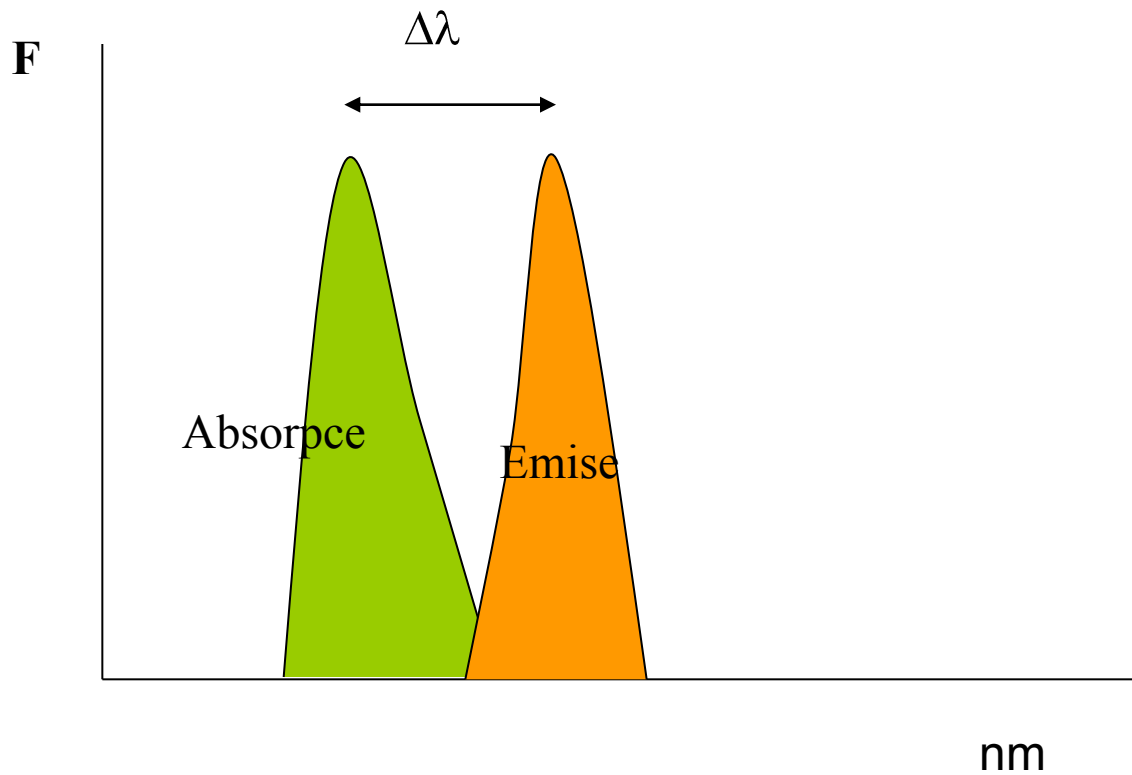


Interakce s rozpouštědlem
Singletový excitovaný stav

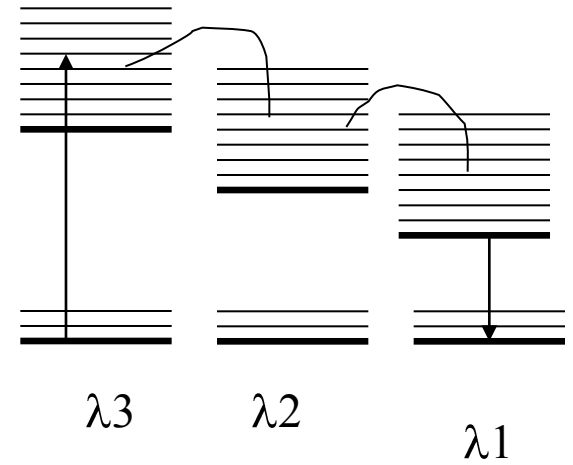
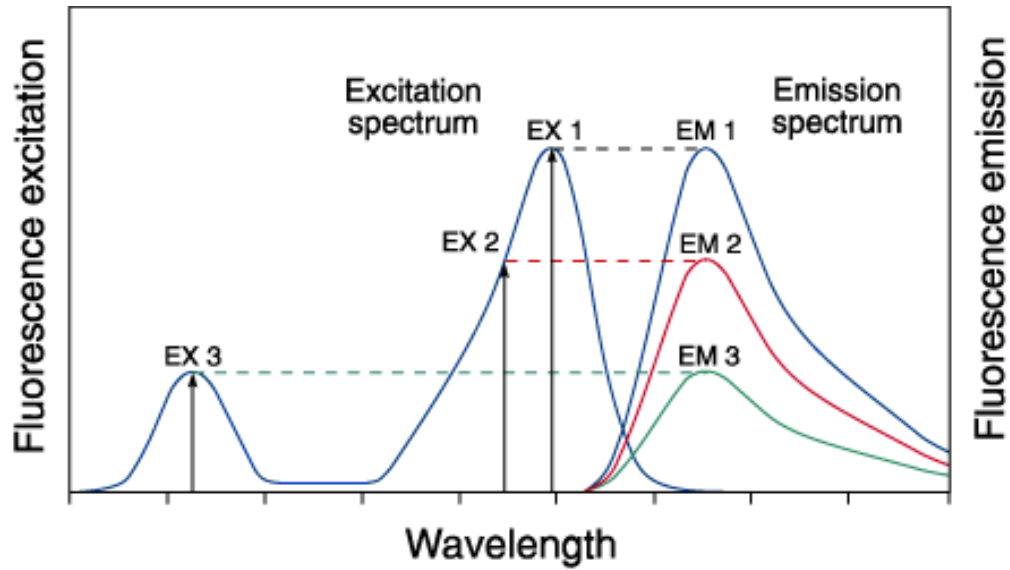
Singletový základní stav

Základní pojmy

Stokesův posun – ztráty energie po dobu excitovaného stavu



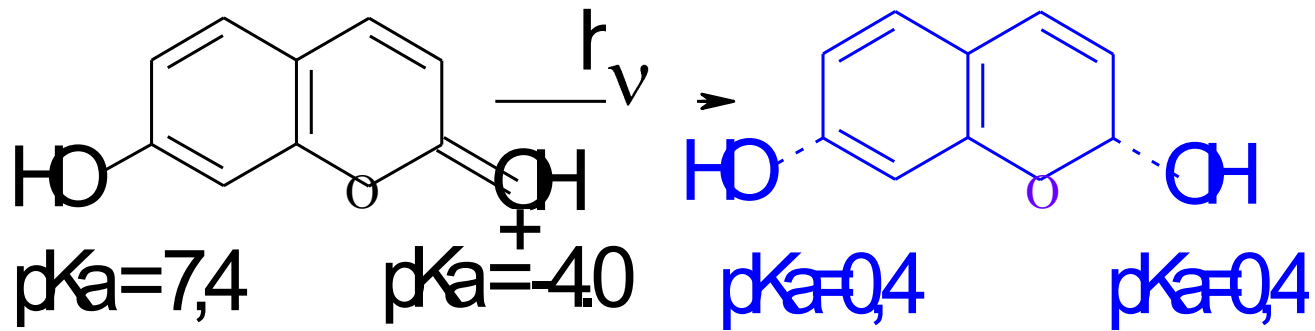
Základní pojmy



Základní pojmy

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

7-hydroxykurarin



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 $1/e I_0$

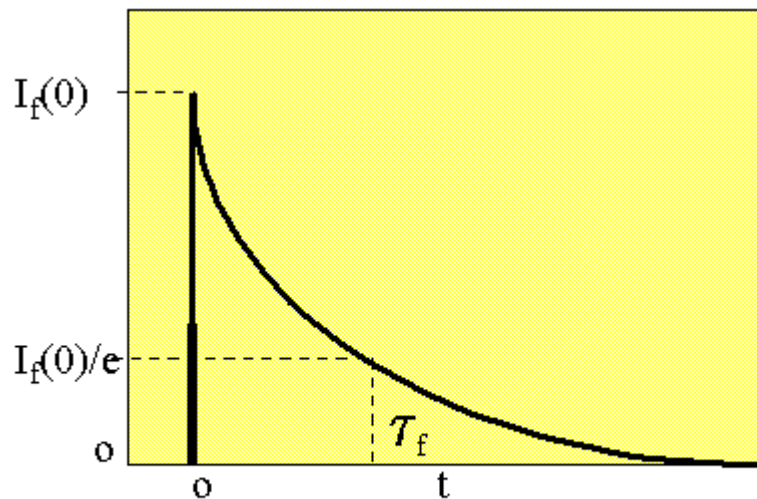
Střední doba života τ
 $\tau = 1/k_f$

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

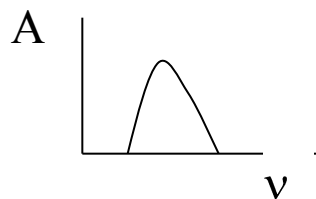
Přirozená doba života τ_0

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

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

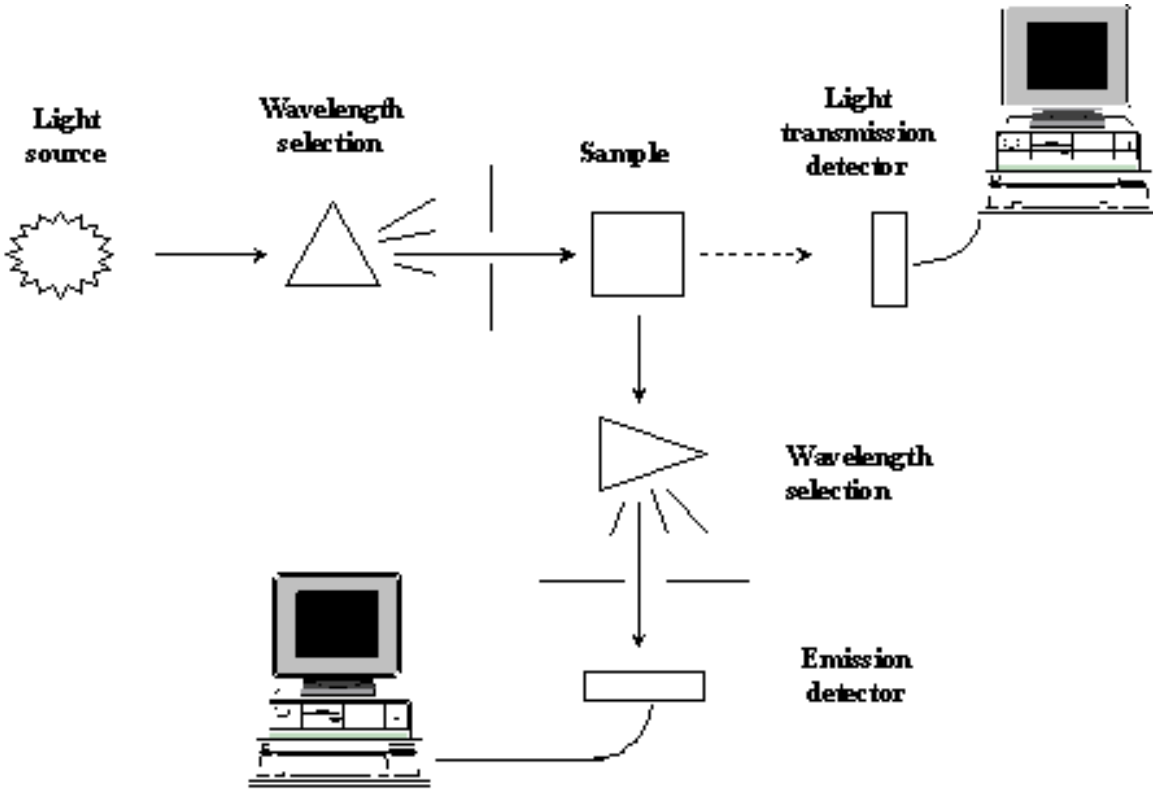
Střední doba života fluorescence

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

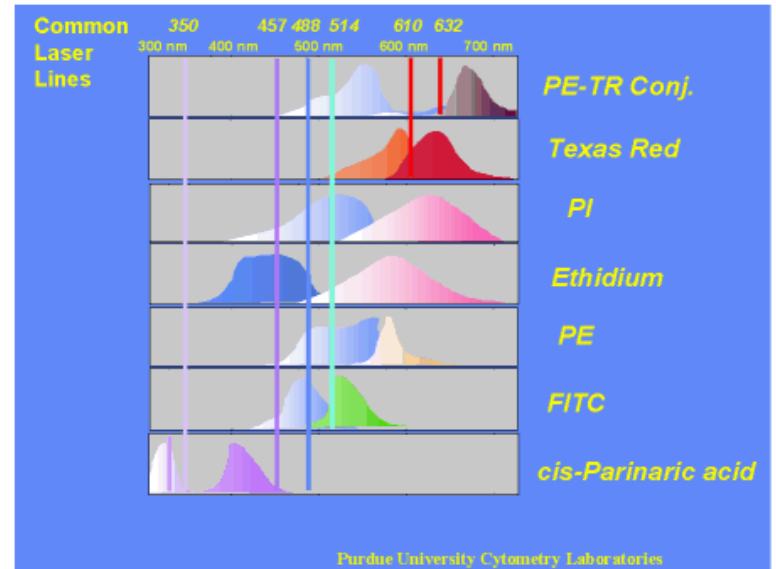
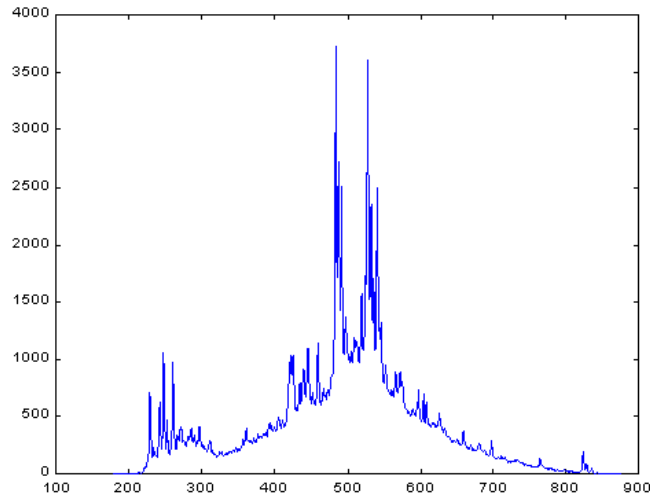
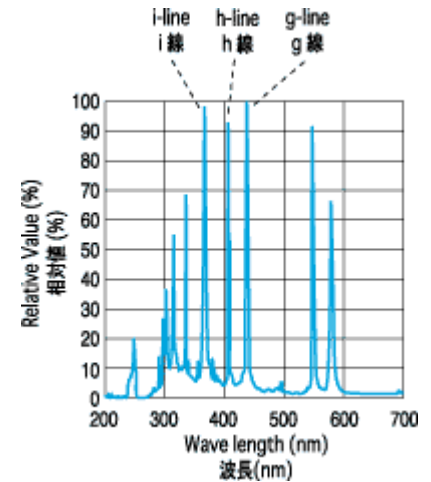
Zdroj:

Xenonová lampa

Rtuťová výbojka

Laser

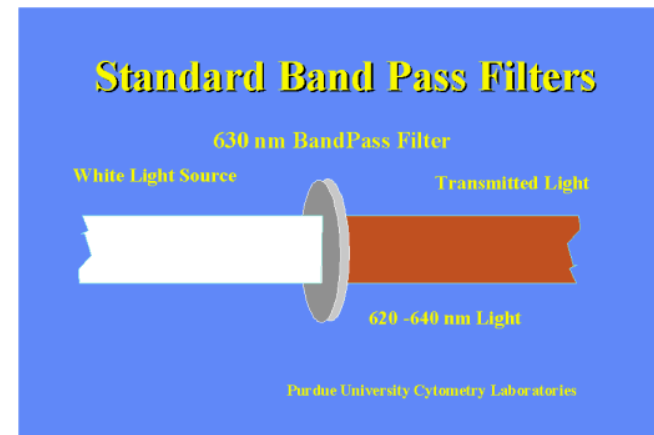
Světelné diody - LED (430, 450, 505, 592, 612 and 637 nm)



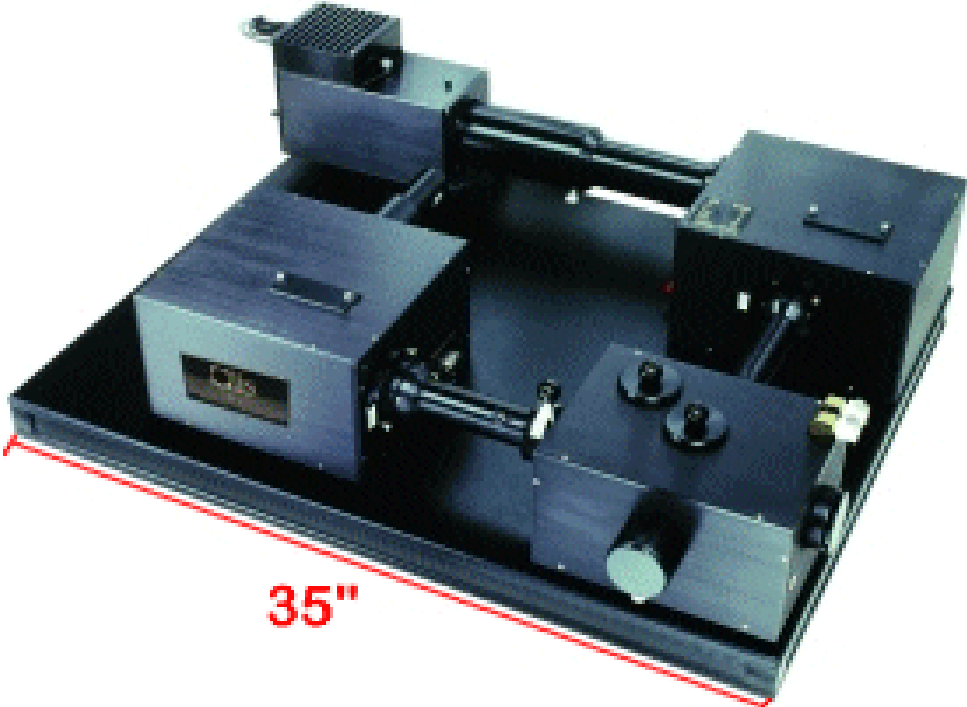
Instrumentace

Monochromátor

- mřížka
- filtry

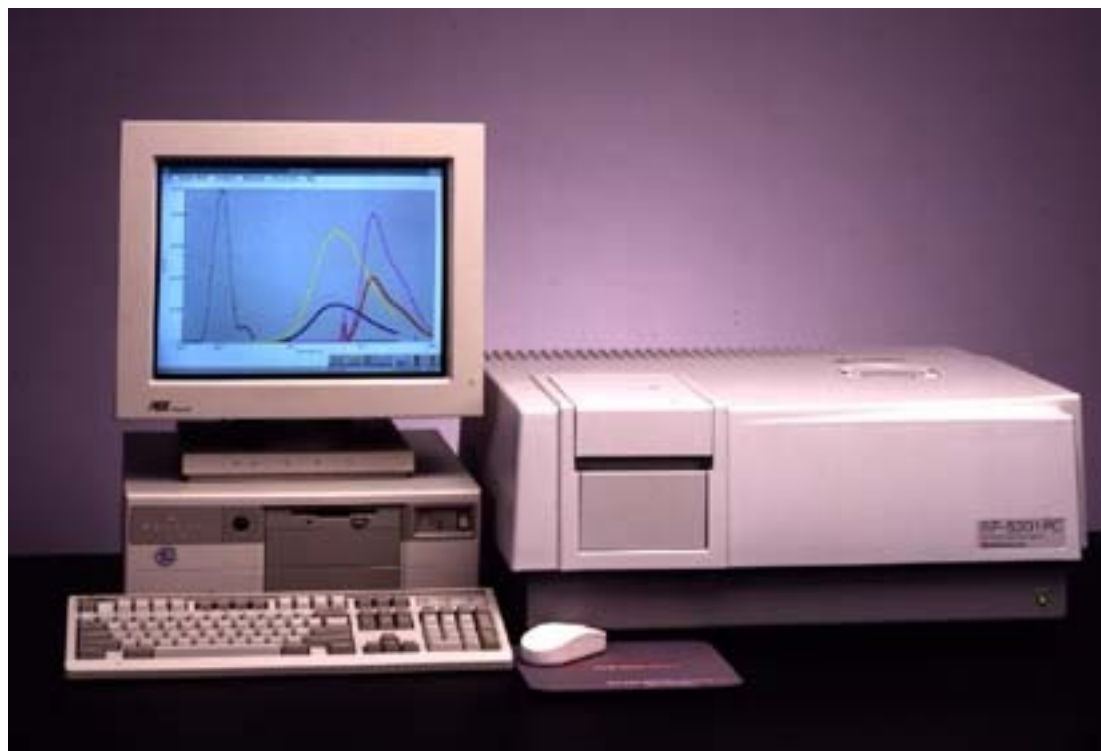


Instrumentace



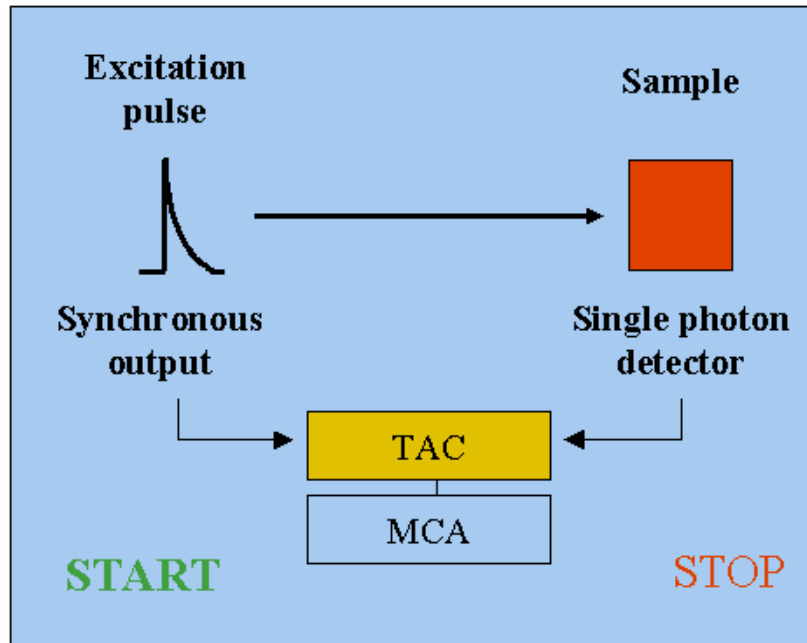
Instrumentace

RF-5301PC – spektrofluorimetr Shimadzu

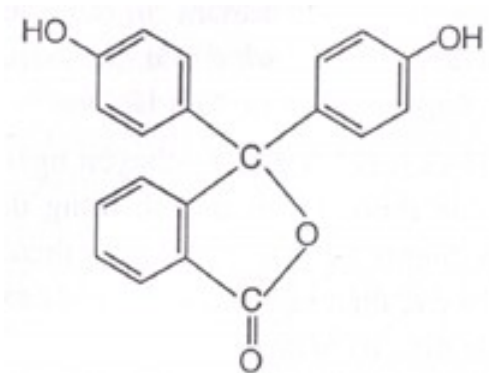


Instrumentace

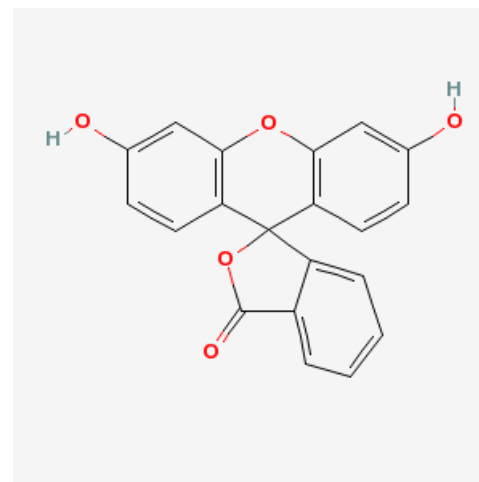
Měření střední doby života fluorescence



Podmínky fluorescence



Fenolftalein



Fluorescein

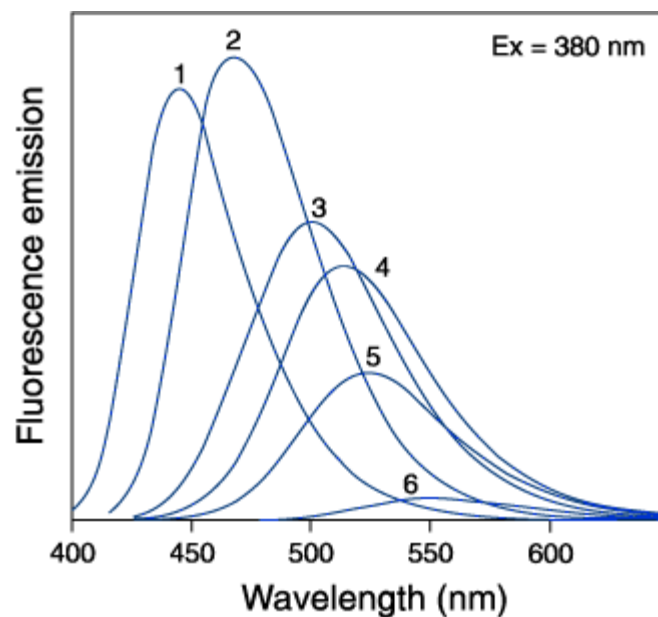
Podmínky fluorescence

Závislost na polaritě a viskozitě

Nitrobenzoxadiazol

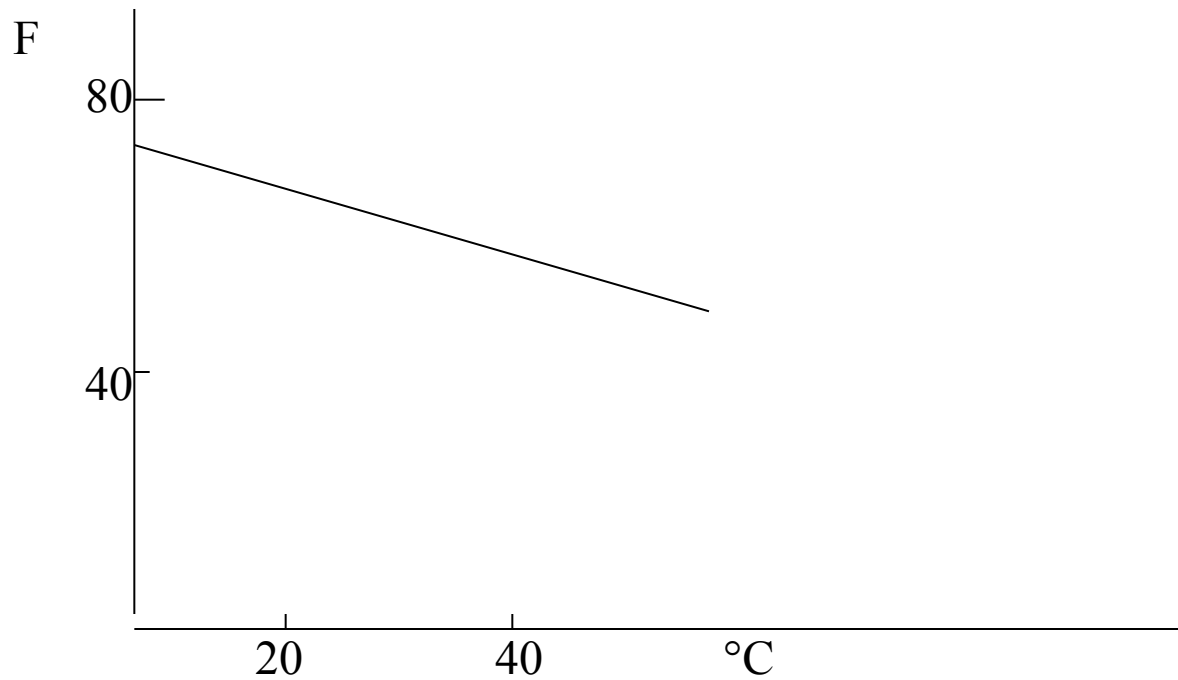
Solvent	Freq. domain (ns)	TCSPC (ns)	Literature (ns)
H ₂ O	0.92	0.97	0.93
Methanol	5.35	5.31	5.64
DMSO	7.15	7.54	7.48
Ethyl acetate	10.93	nd	10.5

Pokles polarity 6 – 1.



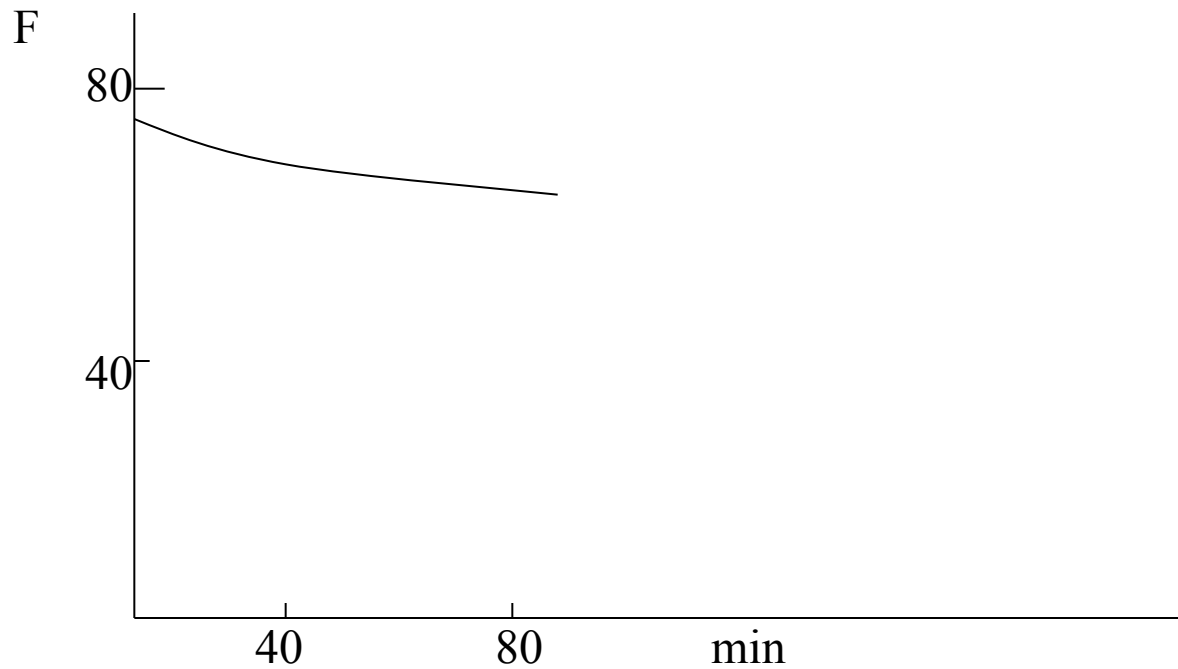
Podmínky fluorescence

Závislost fluorescence na teplotě

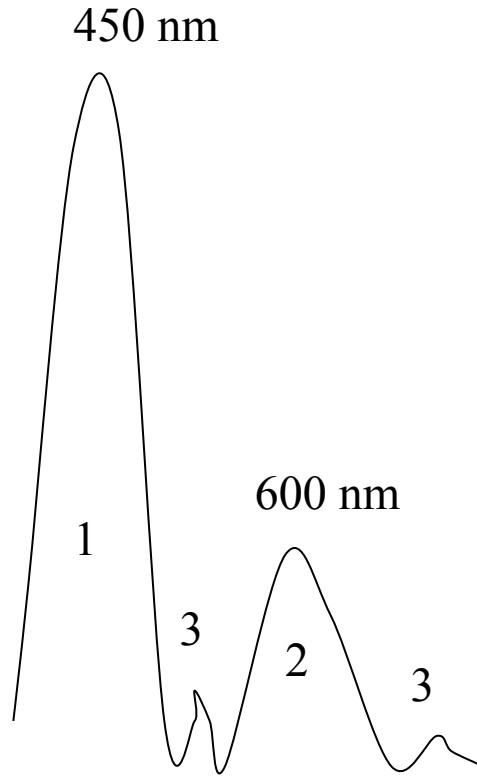


Podmínky fluorescence

Stabilita fluorescenčního signálu
chininsulfátu



Podmínky fluorescence



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

Excitace 450 nm

Emisní spektrum

Kvantitativní fluorimetrie

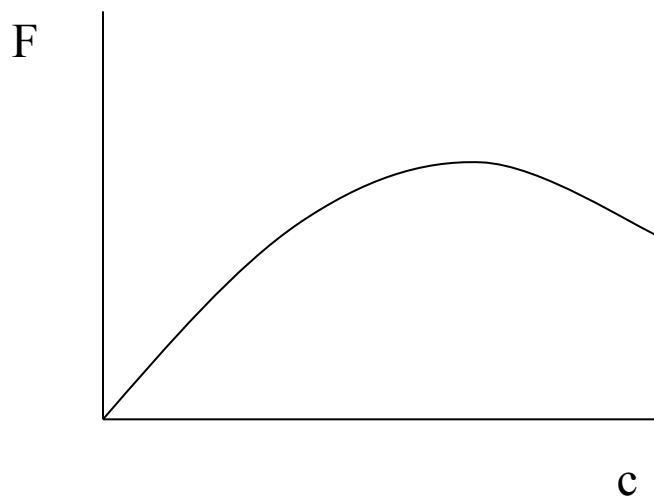
Závislost intenzity fluorescence na koncentraci látky

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

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

jestliže $c \rightarrow 0$

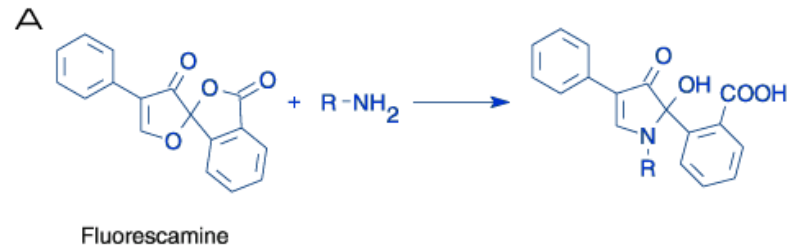
$$F = I_0 \Phi \cdot 2,3 \cdot \varepsilon d \cdot c$$



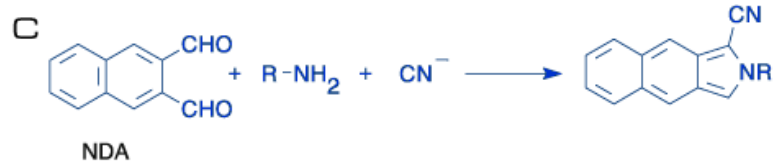
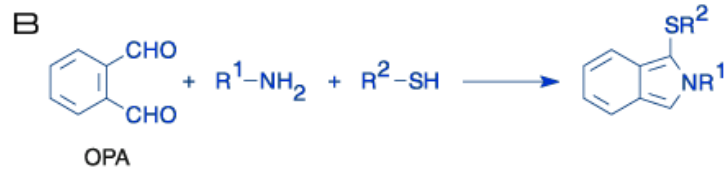
Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení koncentrace aminokyselin

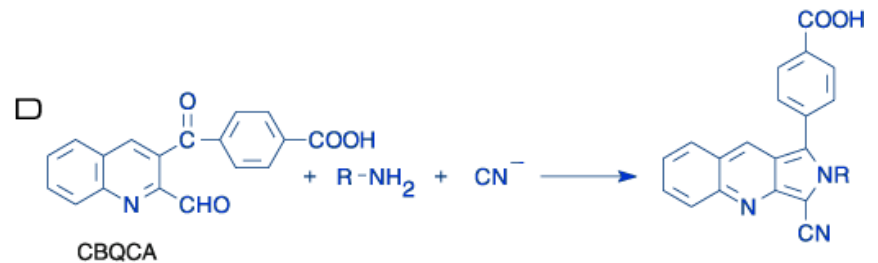
390/464 nm (395/475)



340/455 nm



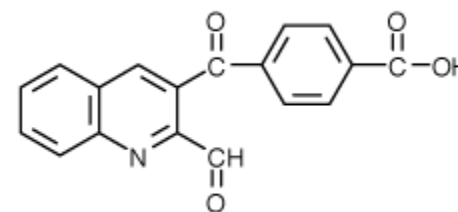
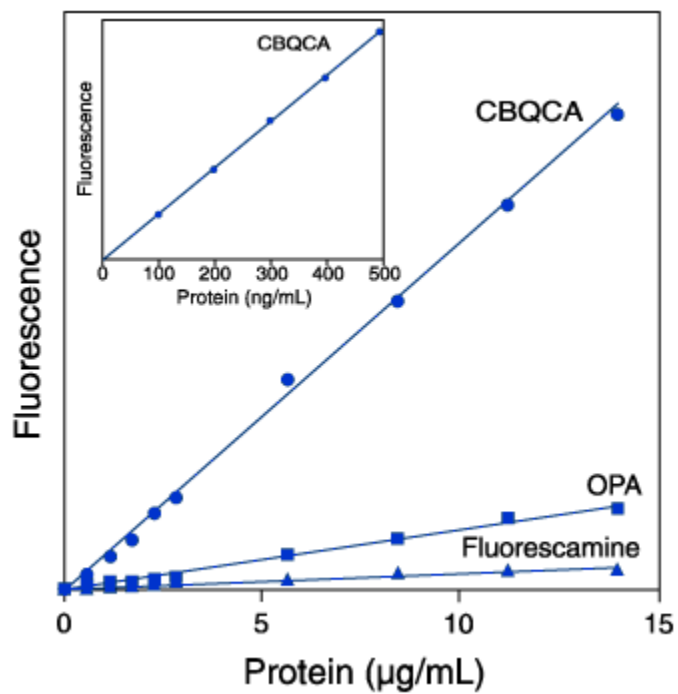
450/550 nm



Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení bílkovin

CBCQA



Kvantitativní fluorimetrie

Detekce bílkovin v gelu

(barevně: Coomasie blue, stříbrné barvení)

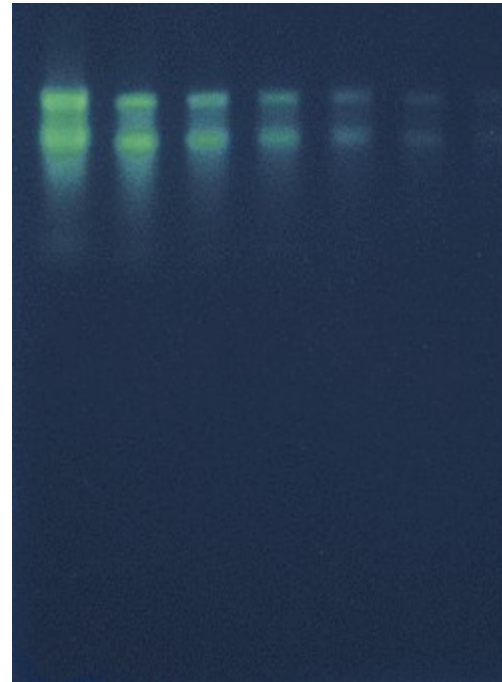
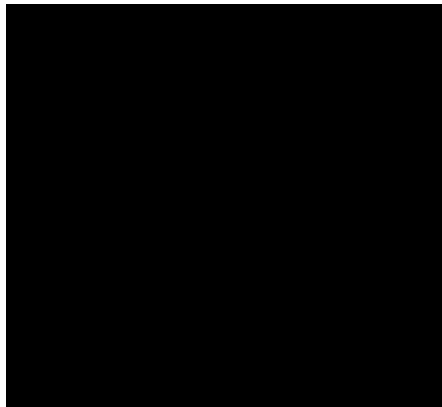
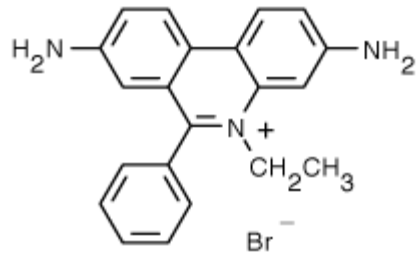
Fluorimetricky: SYPRO Orange (Molecular probes) – citlivost 1 – 2 ng

Kvantitativní fluorimetrie

Detekce nukleových kyselin

Ethidium bromid – ds DNA

SYBR Green – (ss DNA), RNA



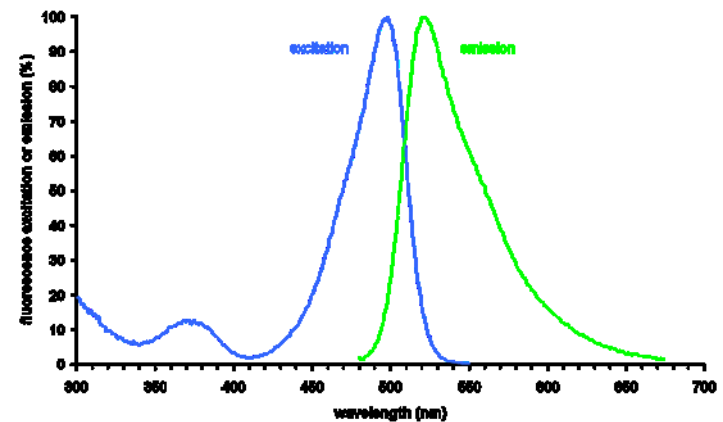
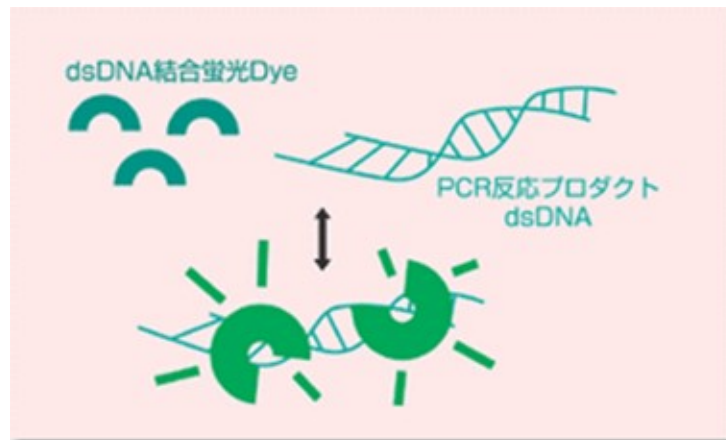
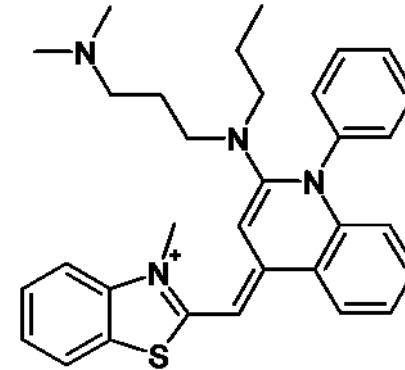
rRNA 16 a 23s barvená SYBR Green II
Molecular Probes

Kvantitativní fluorimetrie

**SYBR green – asymetrické cyaninové
Barvivo**

**Interkaluje přednostně do ds DNA, méně
ss DNA , nejménš RNA**

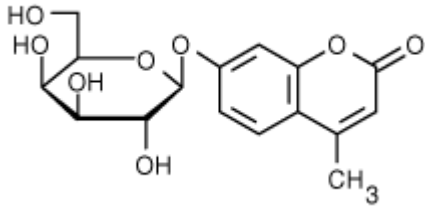
**Absorbuje modré $\lambda_{\max} = 497 \text{ nm}$
emituje zelené $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$**



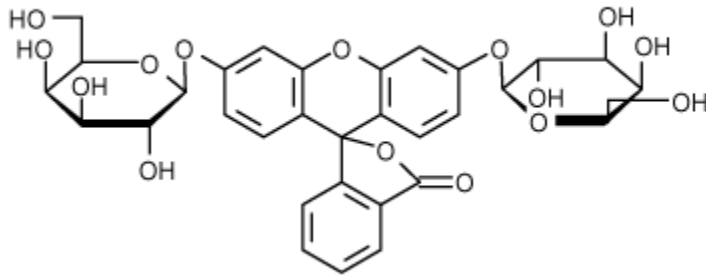
Fluorogenní substráty

Galaktosidasy

4-methylumbelliferyl- α -galaktosid

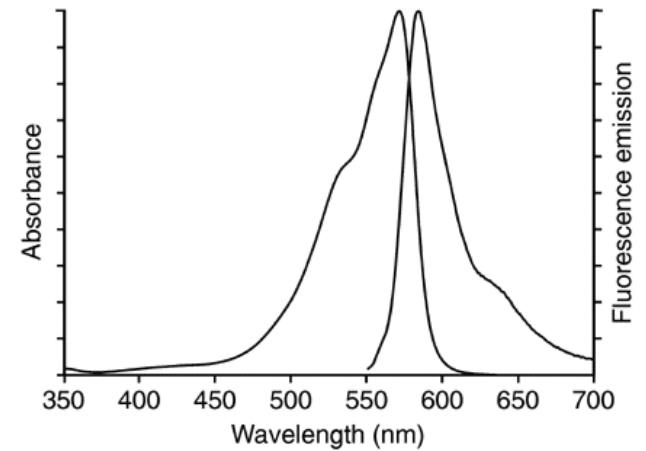
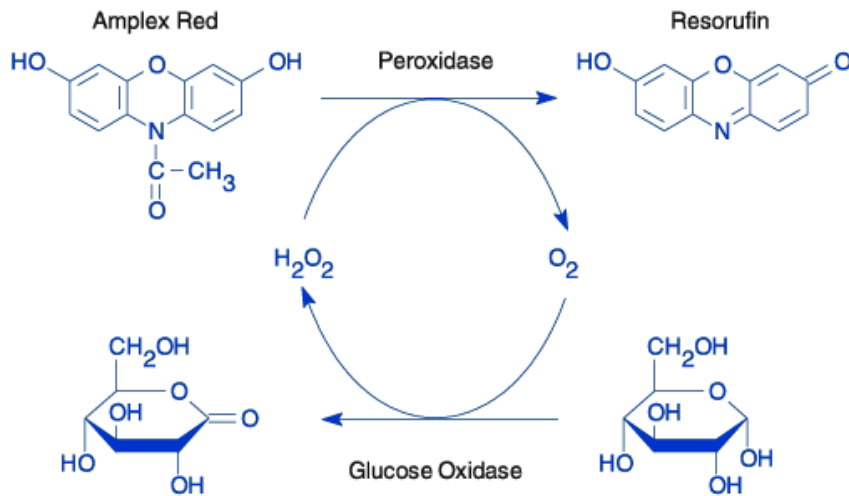


Fluorescein-digalaktosid



Fluorogenní substráty

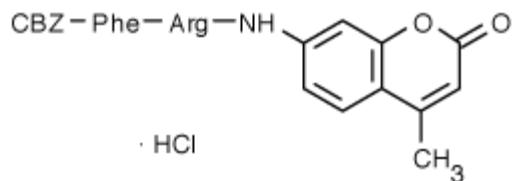
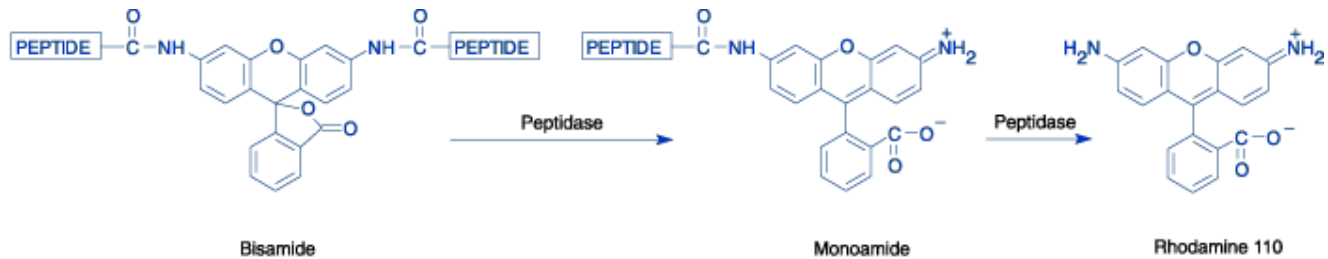
Peroxidasy – amplex red, vznik resorufinu



Fluorogenní substráty

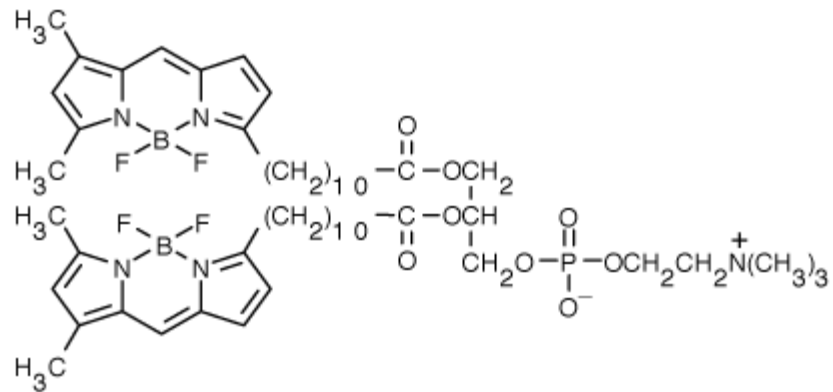
Proteinasy, peptidasy

1) Fluorescenční konjugáty proteinů a peptidů



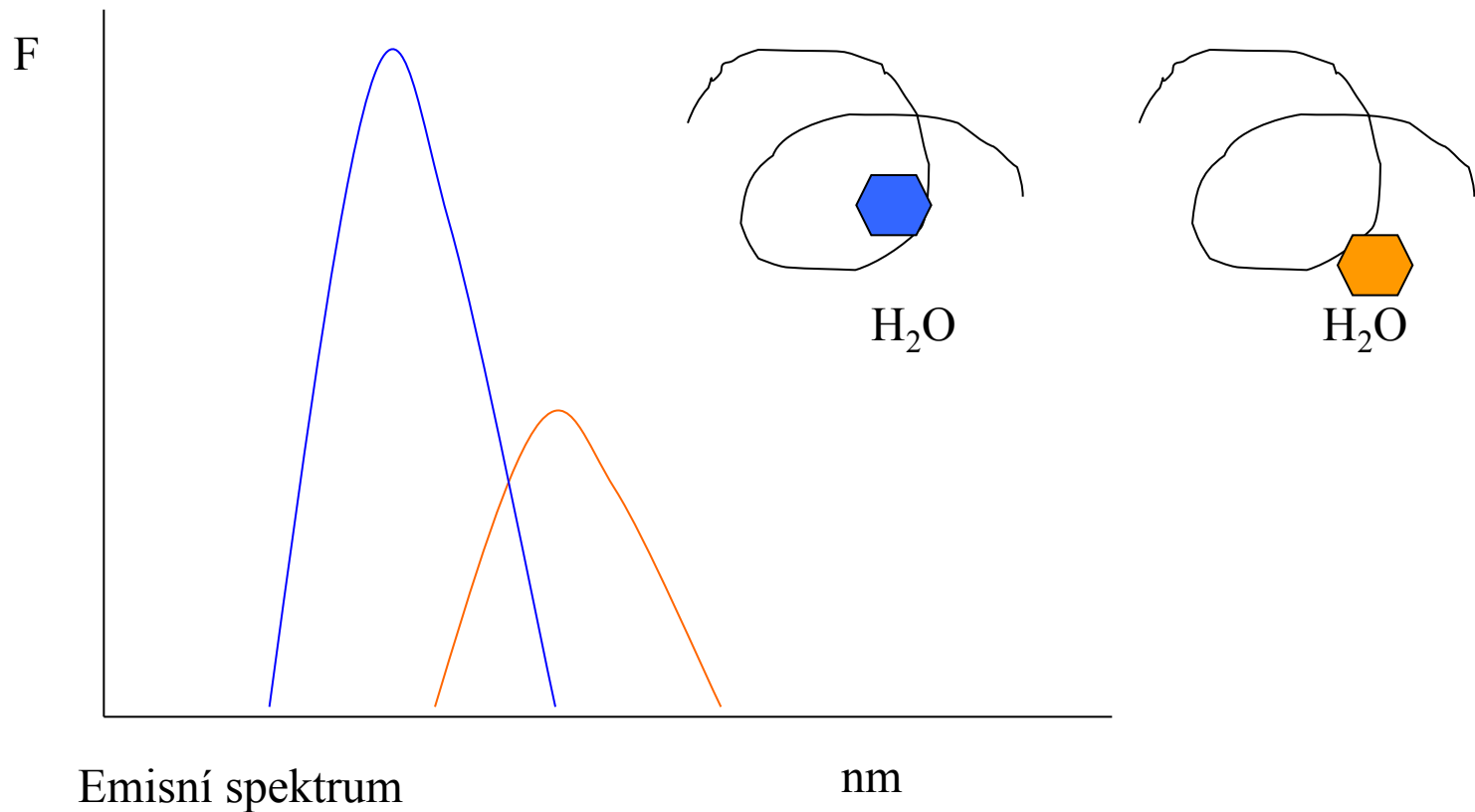
Fluorogenní substráty

Fosfolipasa A

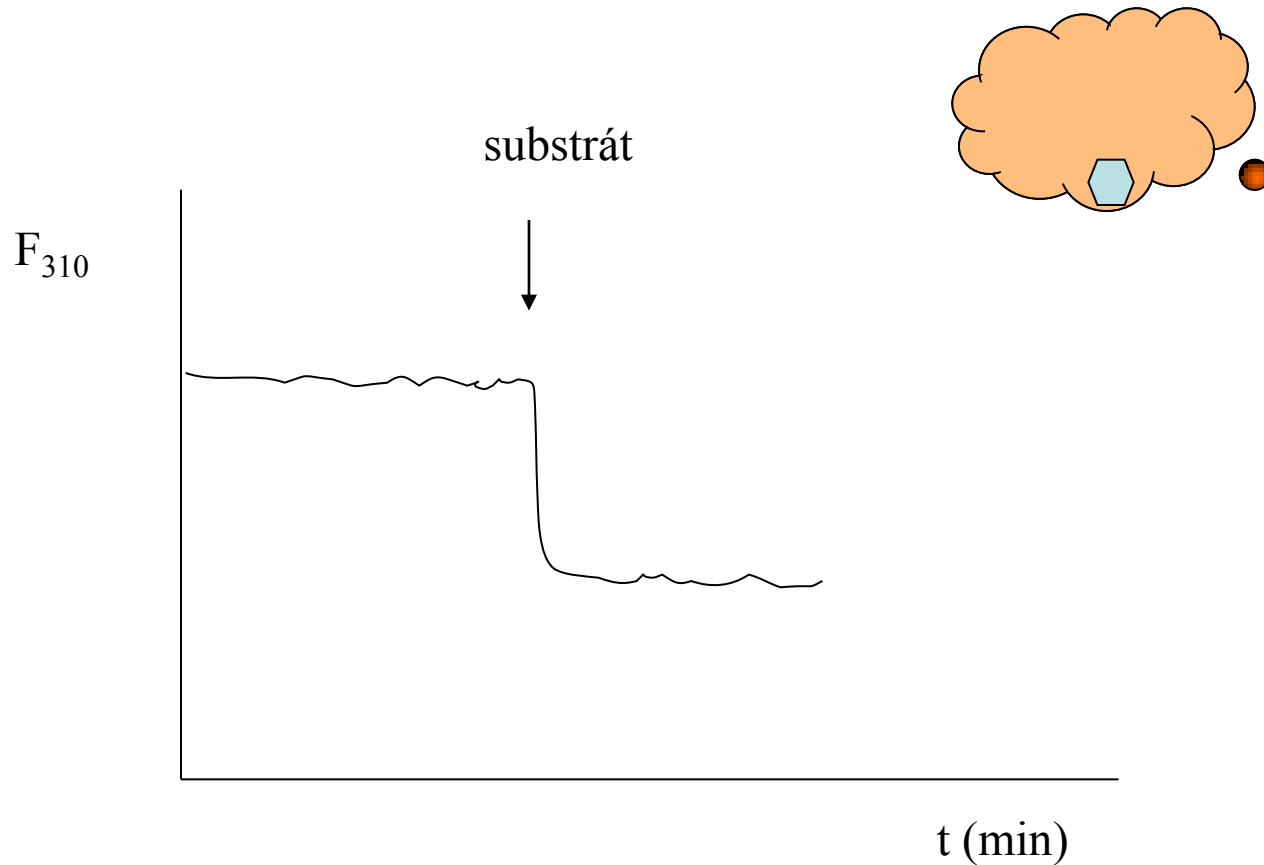


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

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

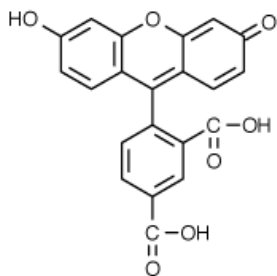


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

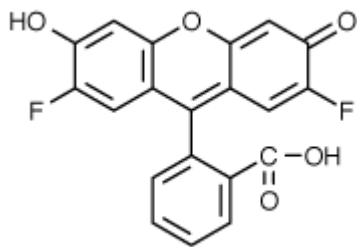


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

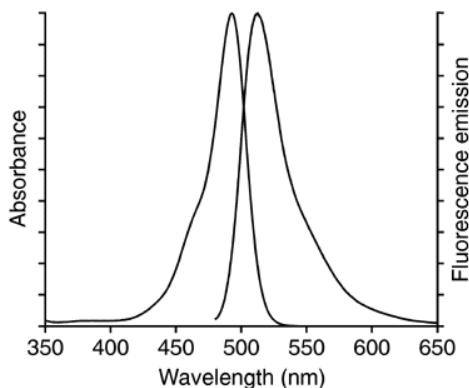
Fluorescenční konjugáty



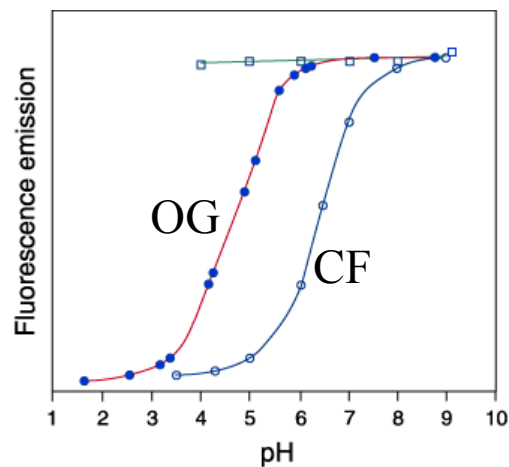
Karboxyfluorescein –
(494/520 nm)



Oregon Green - (496/524 nm)



Absorpce/emise
fluoresceinu
při pH 9

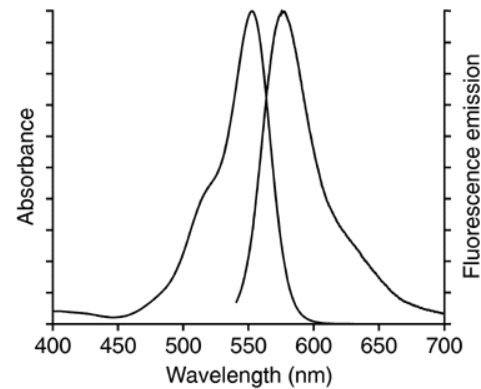
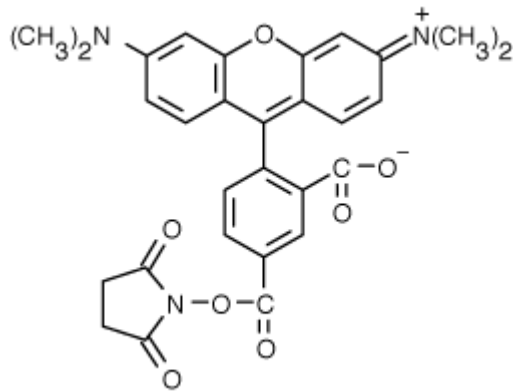


CF-karboxyfluorescein
OG oregon green

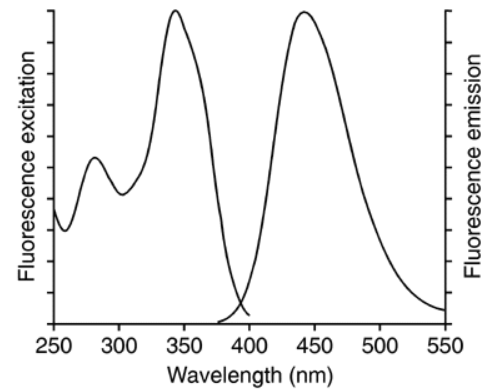
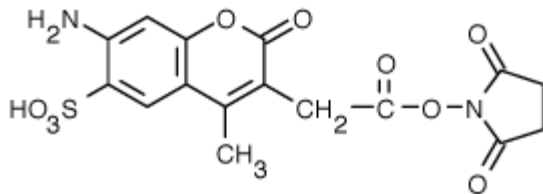
Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Fluorescenční konjugáty

Teramethylrhodamin – 545/580 nm)

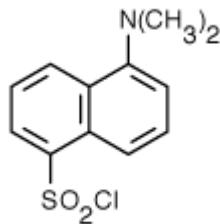


Kumariny – 350/450 nm)

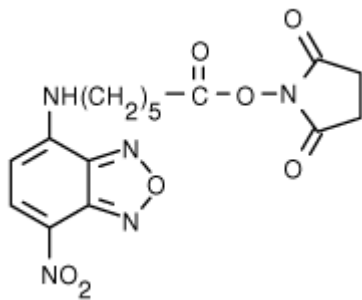
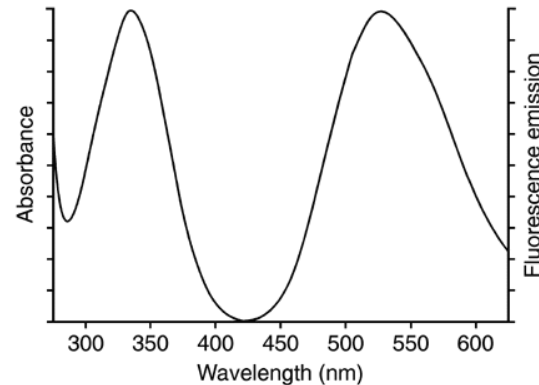


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

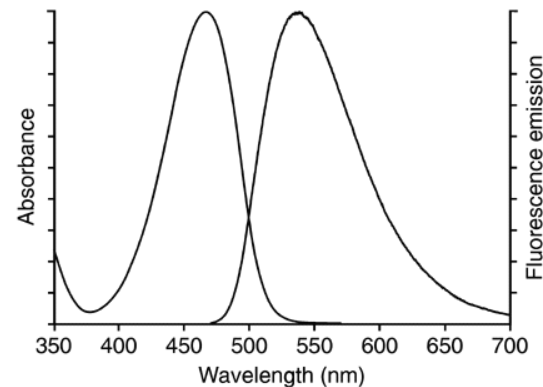
Fluorescenční konjugáty



Dansyl

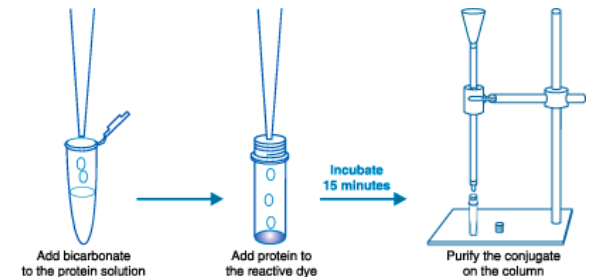
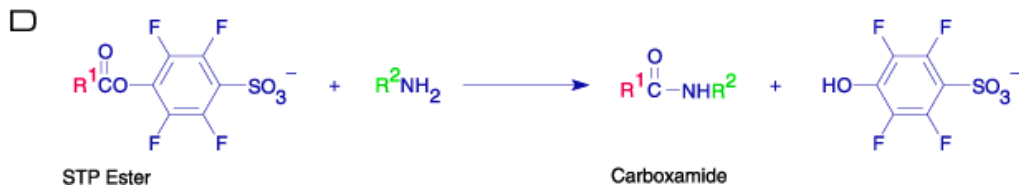
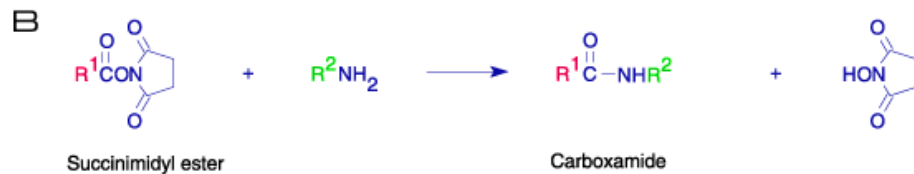
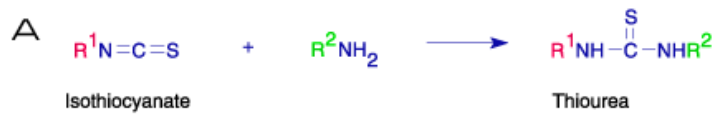


Benzoxadiazol –N-sukcinimid



Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Fluorescenční konjugáty

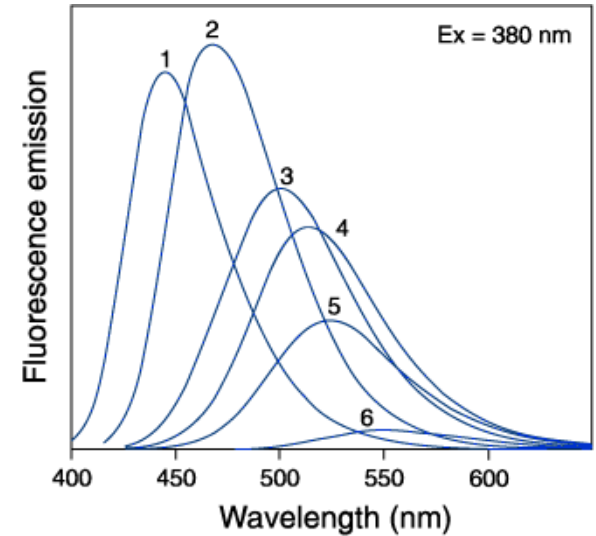
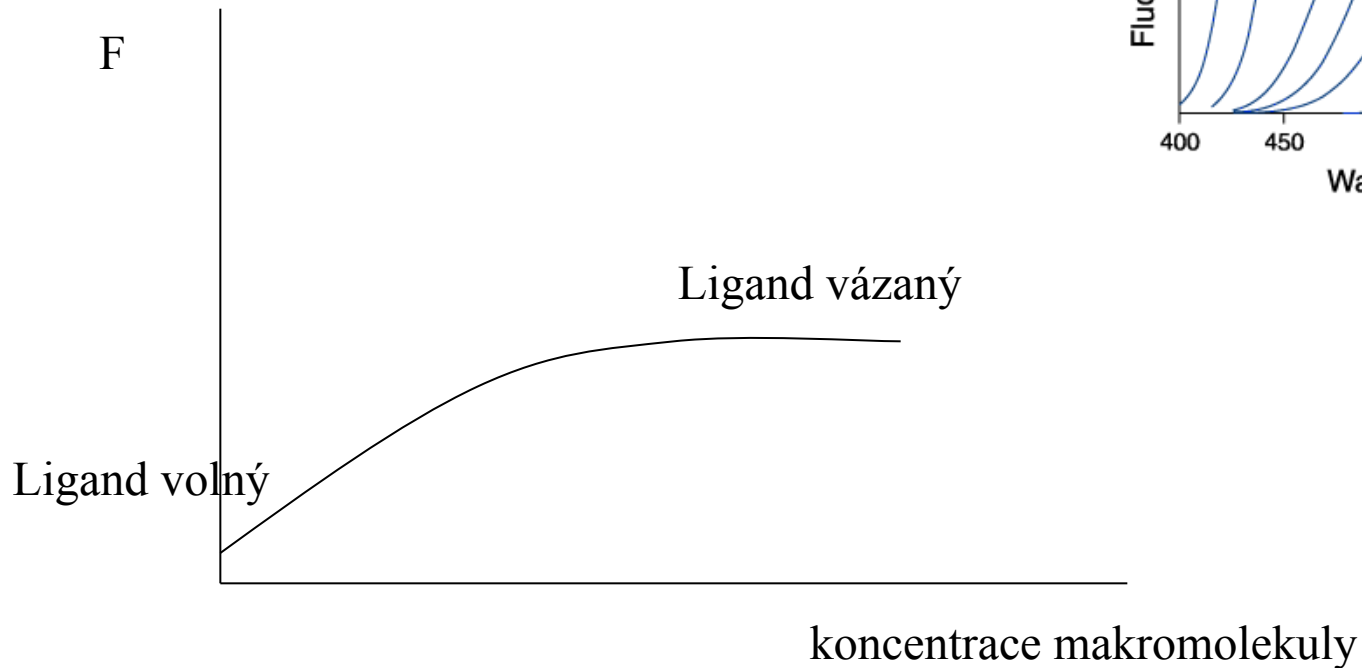


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí



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

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

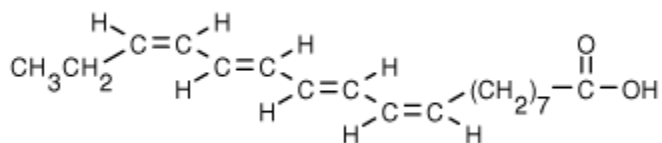
C – celková koncentrace ligandu

F – celková fluorescence

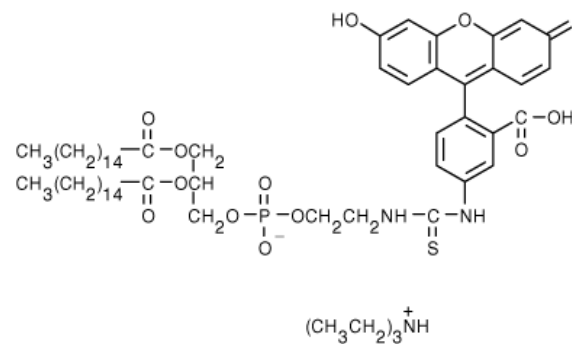
Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Interakce makromolekul s ligandy

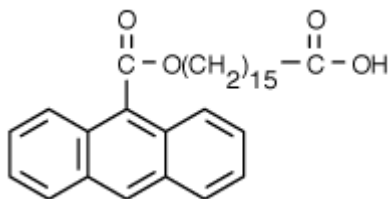
Použití fluorescenčních analogů



Kys. cis-parinarová



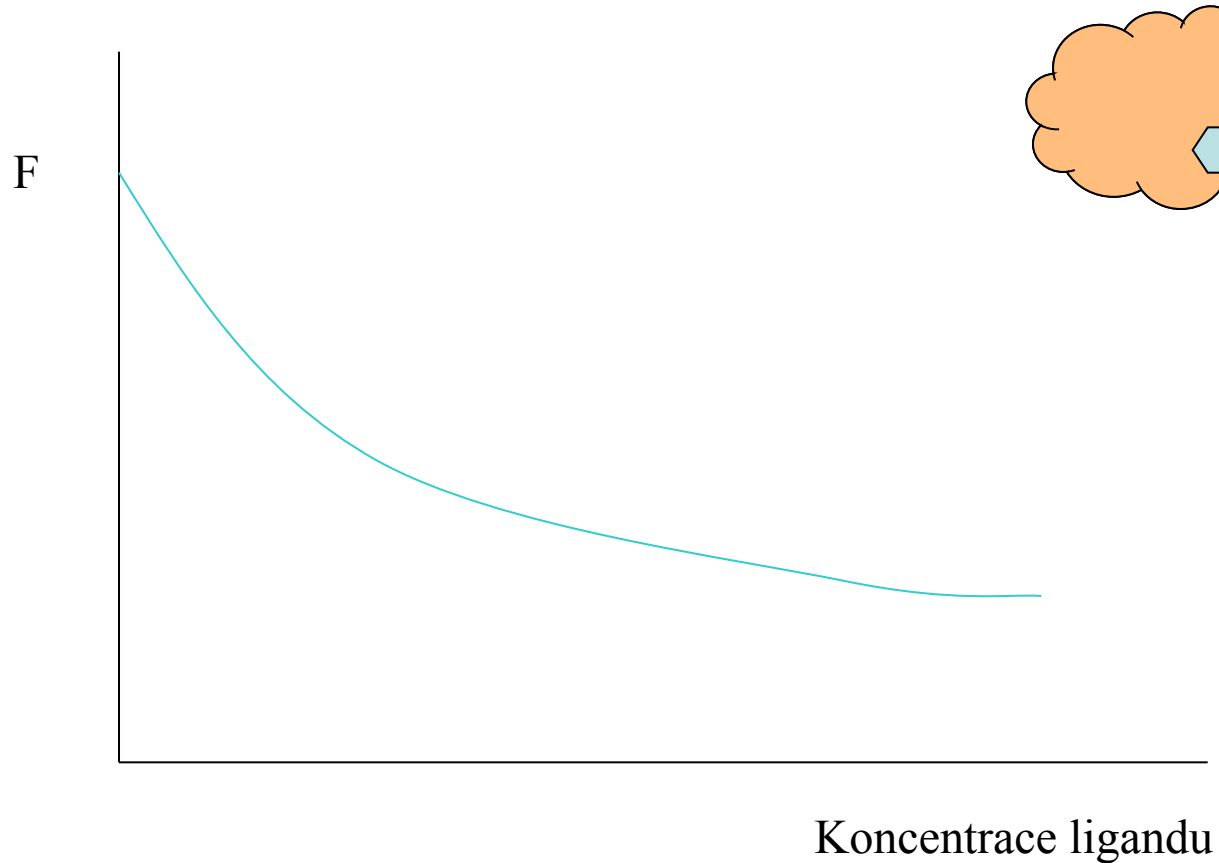
Fluorescein-PE



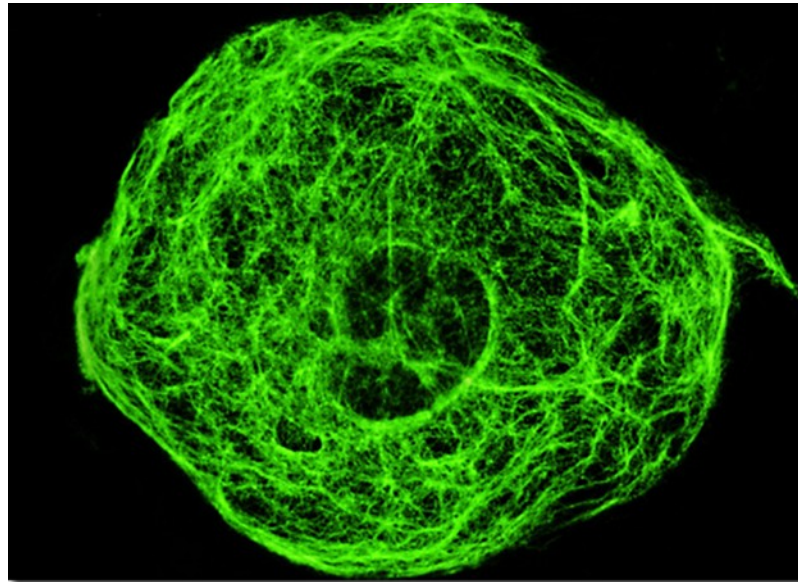
Anthroyloxypalmitát

Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Použití značené makromolekuly
Fluorescence značené bílkoviny



Fluorescence a cytochemie

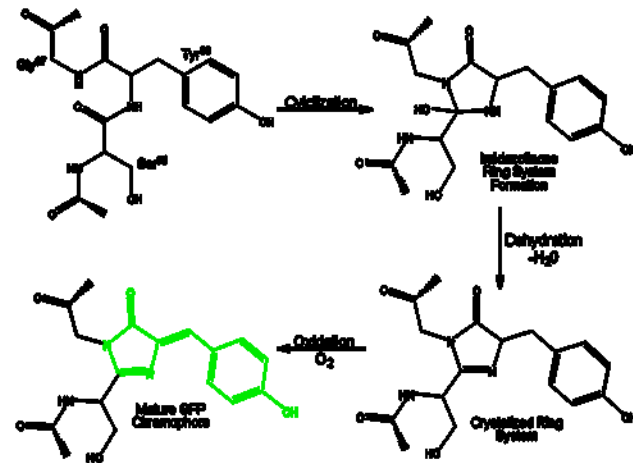


- Značení bílkovin, protilátek
- Značení nukleotidů, primerů

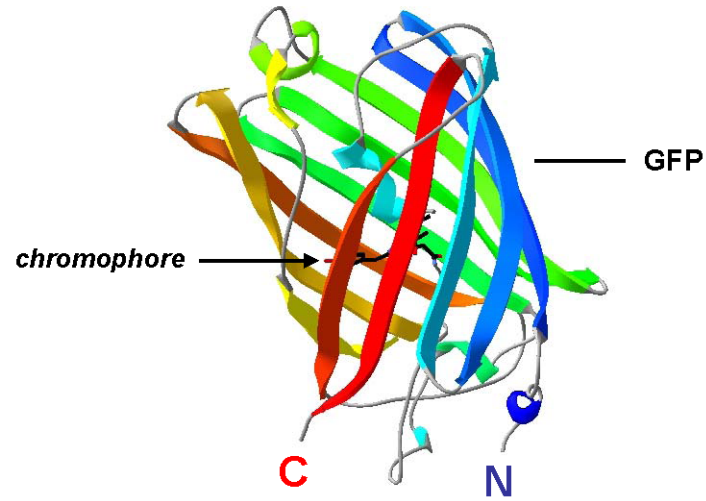
Fluoreskující proteiny

- GFP 395 (475) – 509 nm

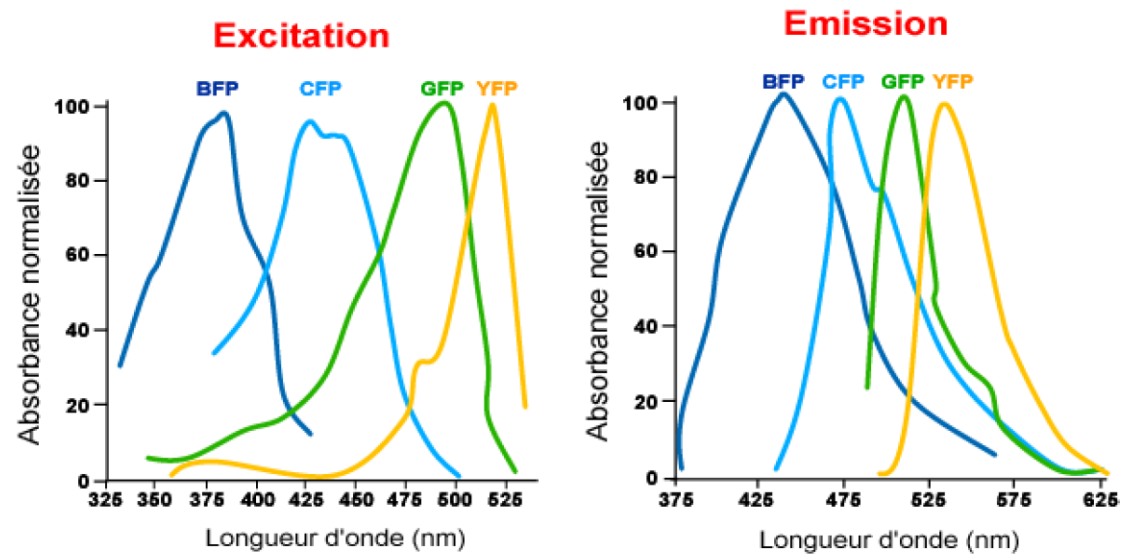
- *Aequorea victoria* i jiné
- 238 AA
- Fluorofor reakcí 3 AA
- Lokalizace proteinů
- Reportér (exprimovaný gen)
- Mutanty – změna barvy
 - – YFP (T203Y), CFP (Y66W)



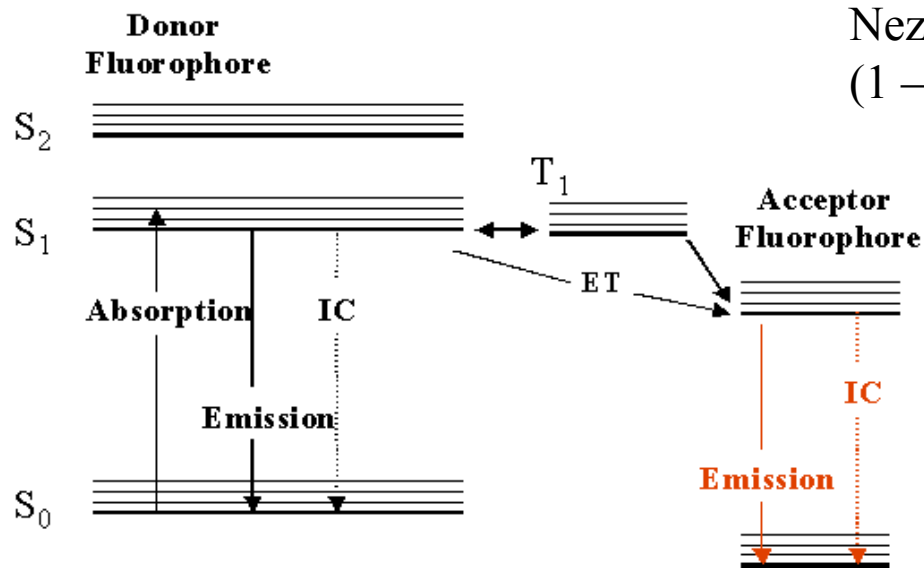
A



B

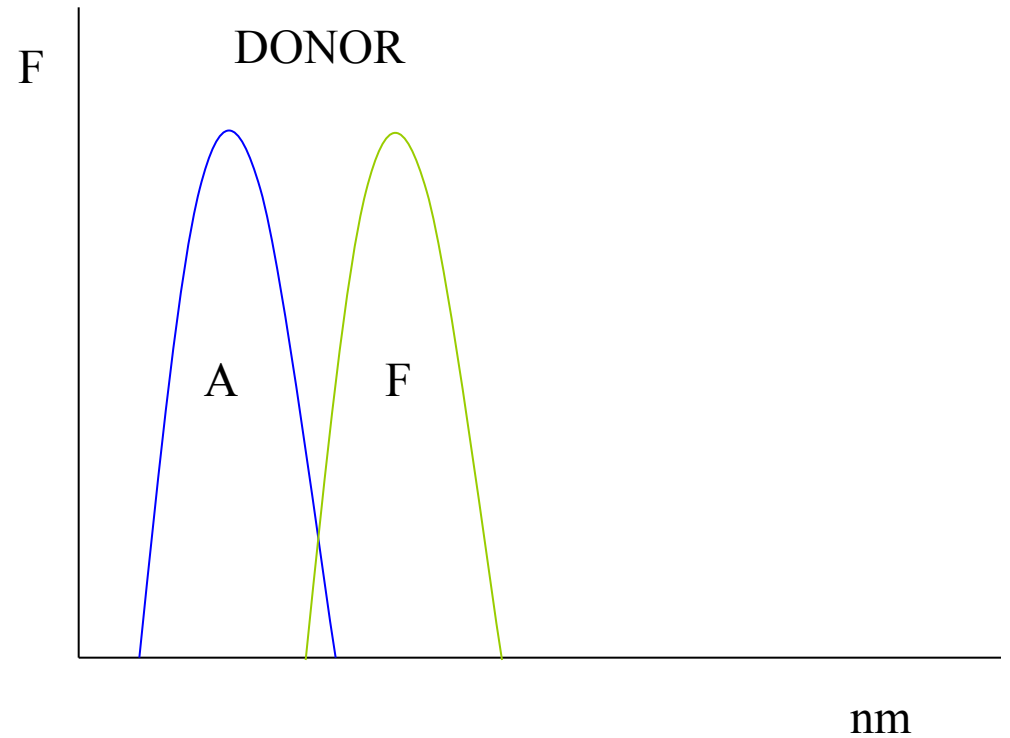
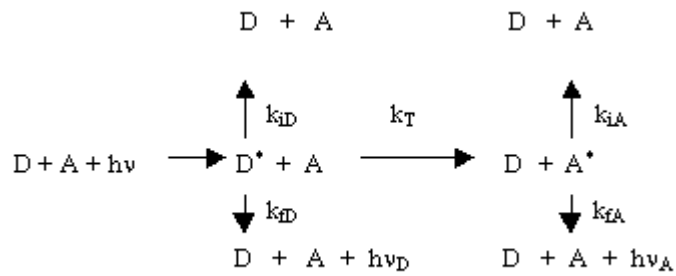


Fluorescenční rezonanční transfer energie (Försterův přenos)

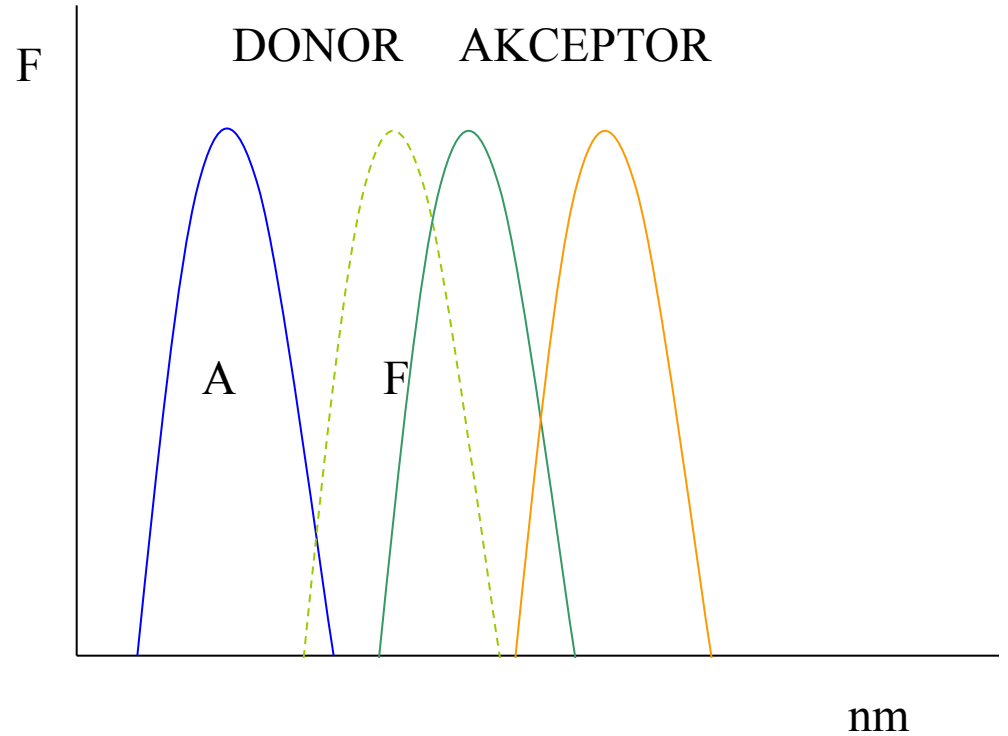
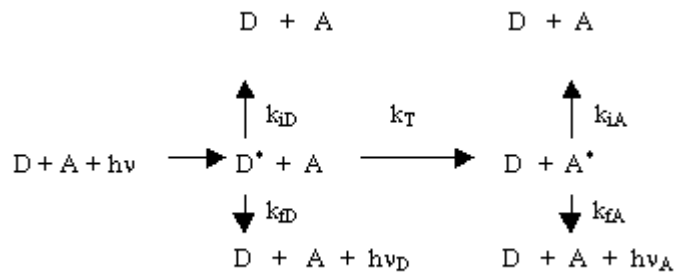


Nezářivý přenos energie z donoru na akceptor
(1 – 10 nm)

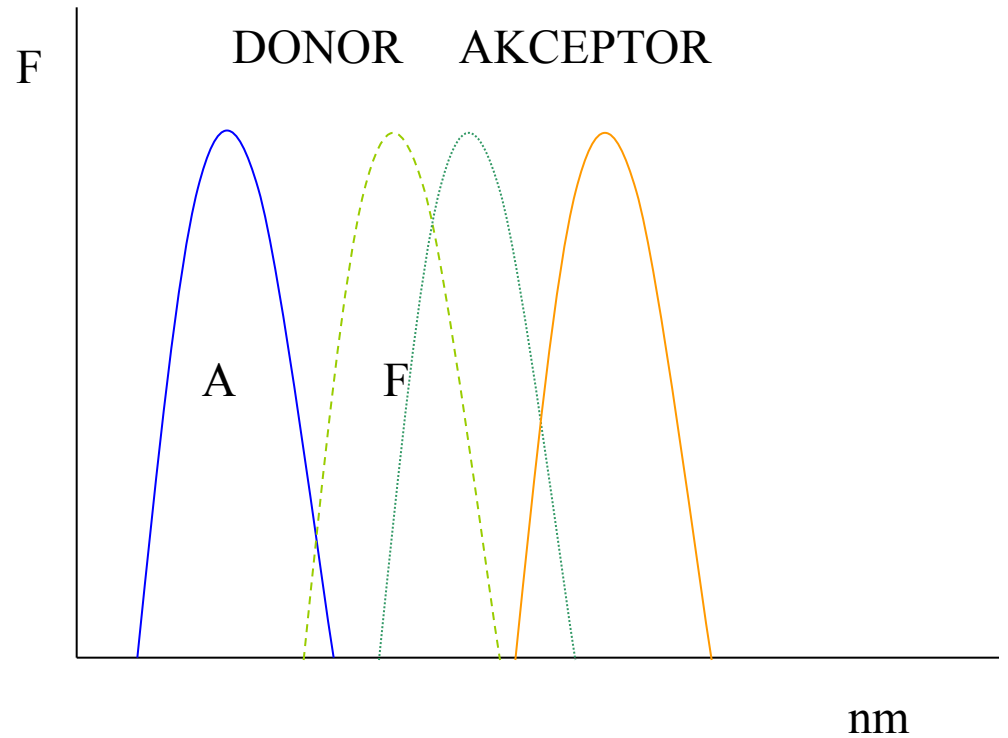
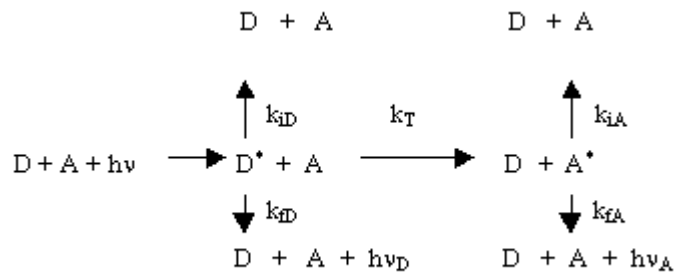
Fluorescenční rezonanční transfer energie



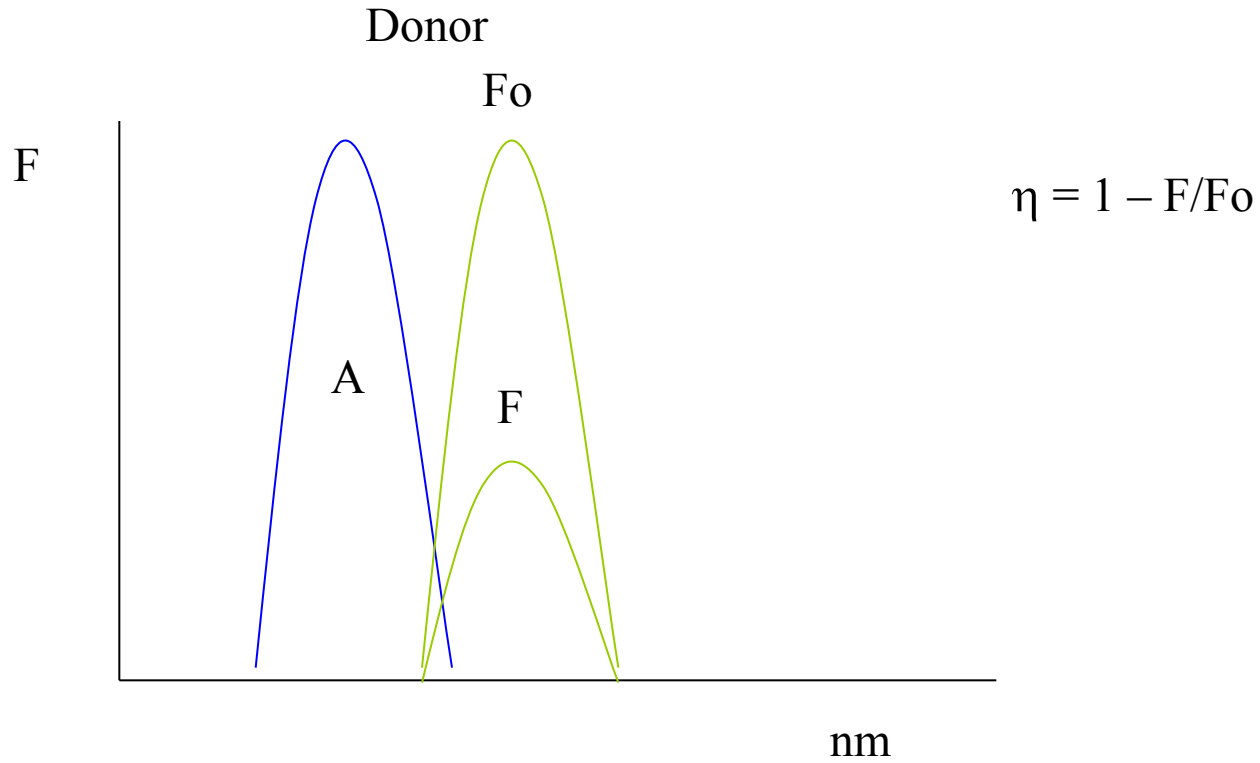
Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie



Fluorescenční rezonanční transfer energie

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

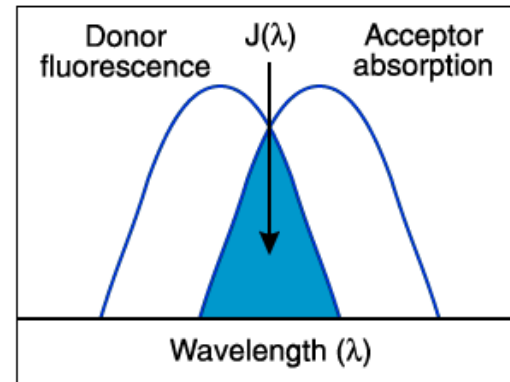
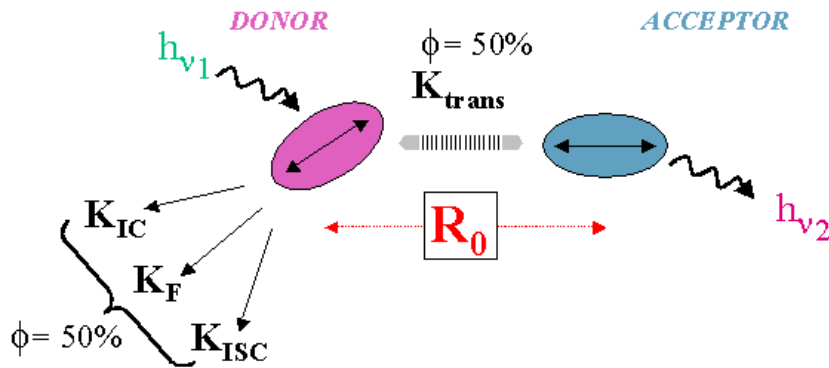
$$R_0^6 = \sqrt{1,66 \cdot 10^{-33} \cdot \tau \cdot J / n^2 \nu_0^2}$$

τ – doba života exc. stavu

J – překryvový integrál

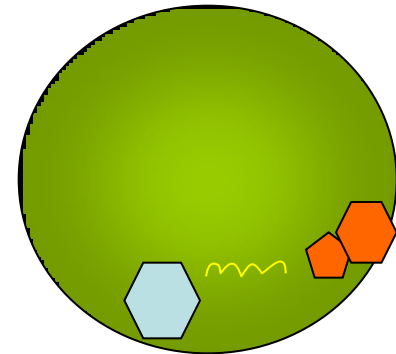
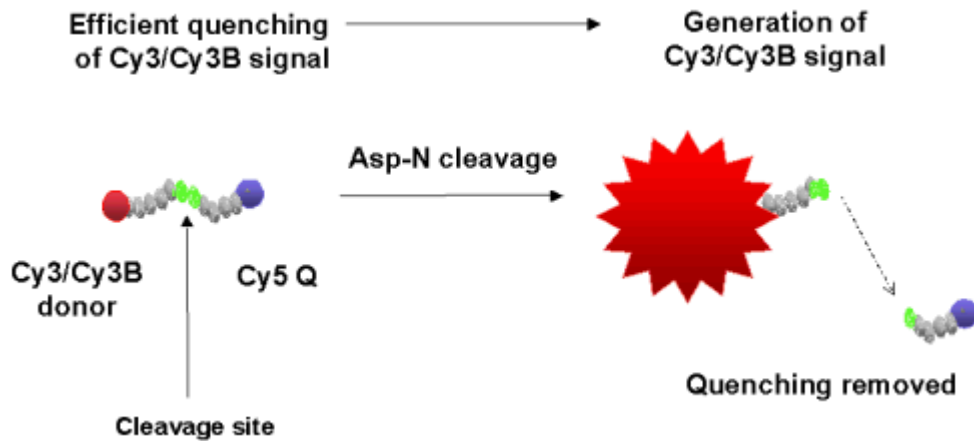
n – refraktivní index rozpuštědla

ν – vlnočet emise donoru

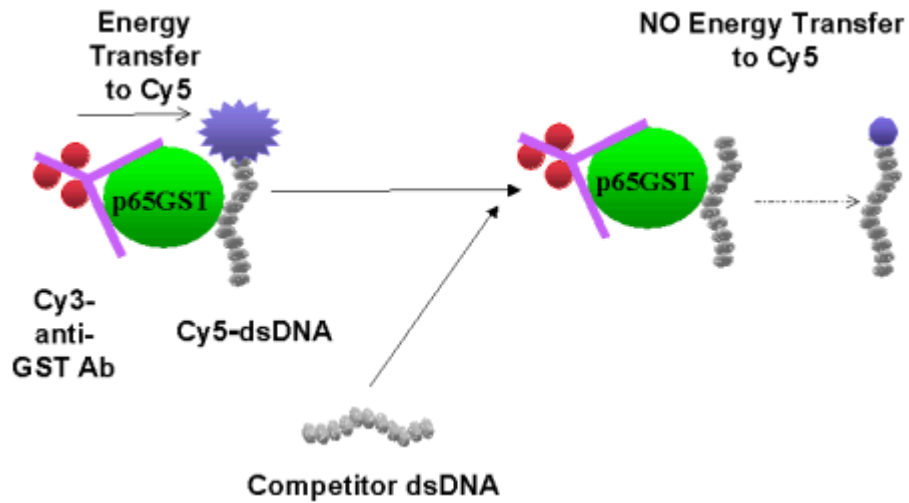


Fluorescenční rezonanční transfer energie

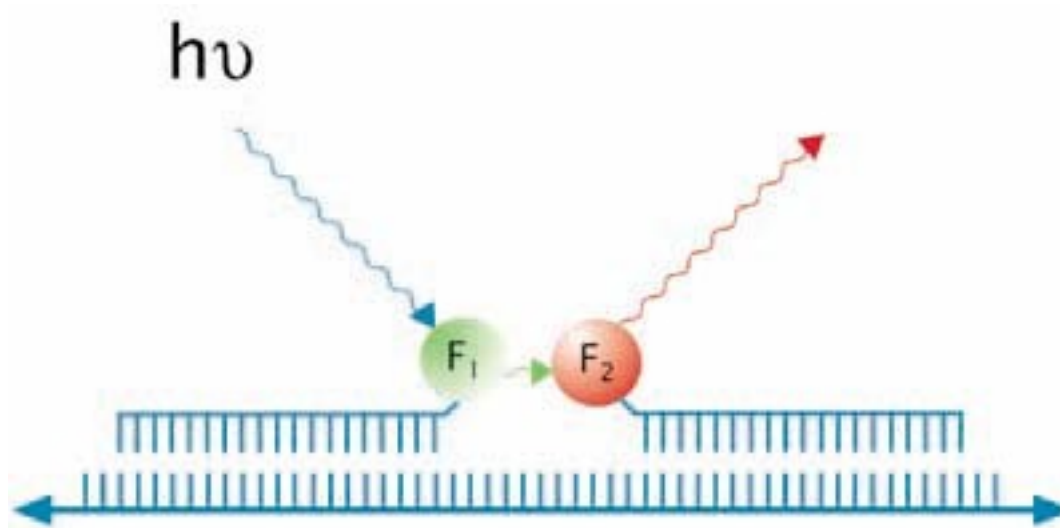
Použití – změření vzdálenosti mezi dvěma molekulami v bílkovině
Tryptofan (290/340) vs. NADH (340/450 nm)



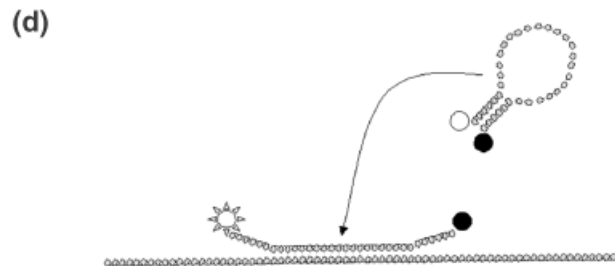
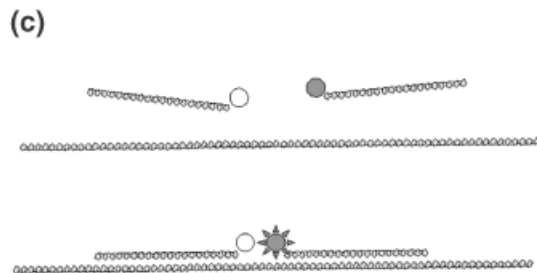
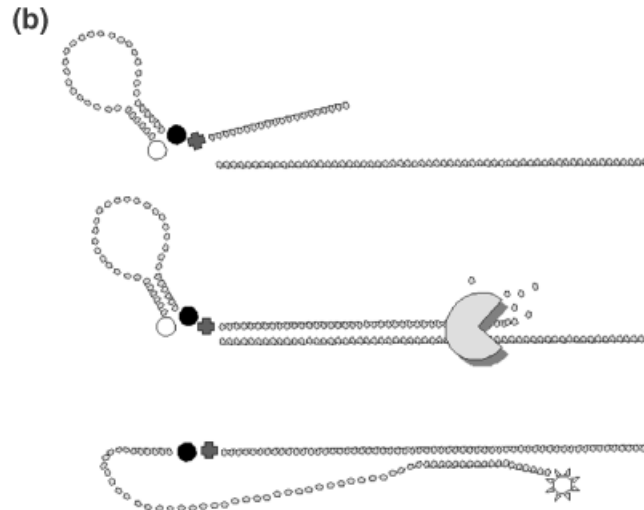
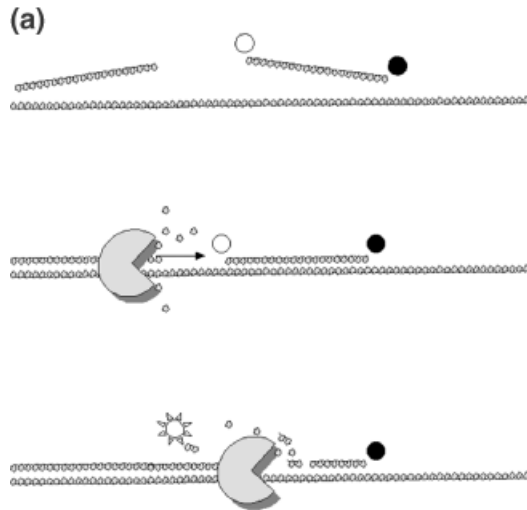
Fluorescenční rezonanční transfer energie



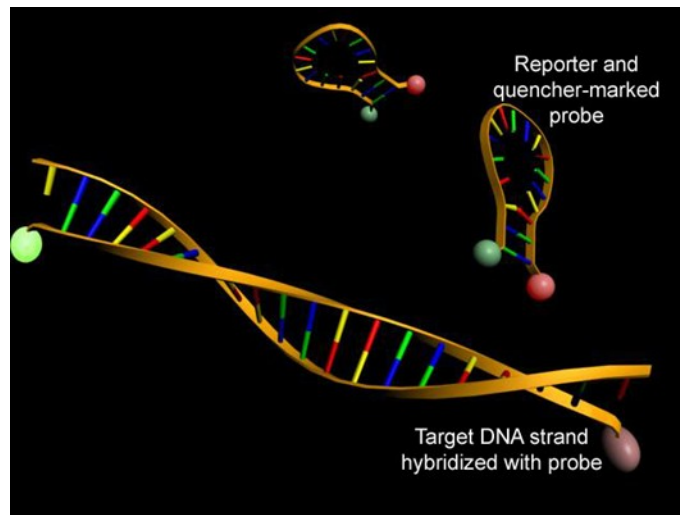
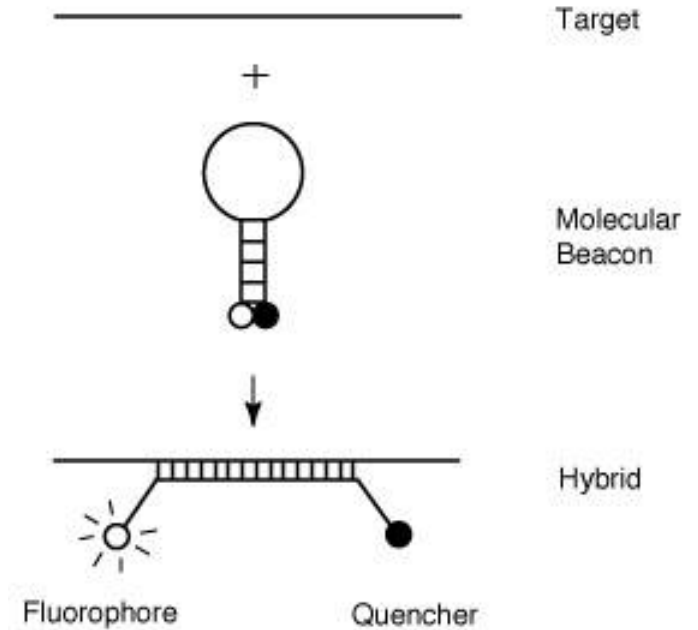
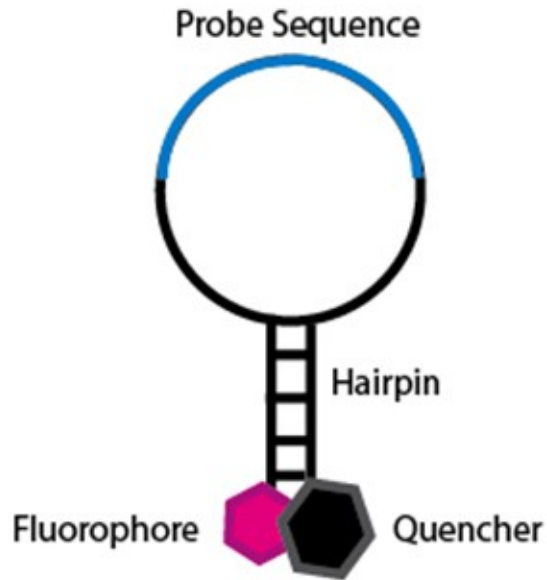
Hybridizační sondy



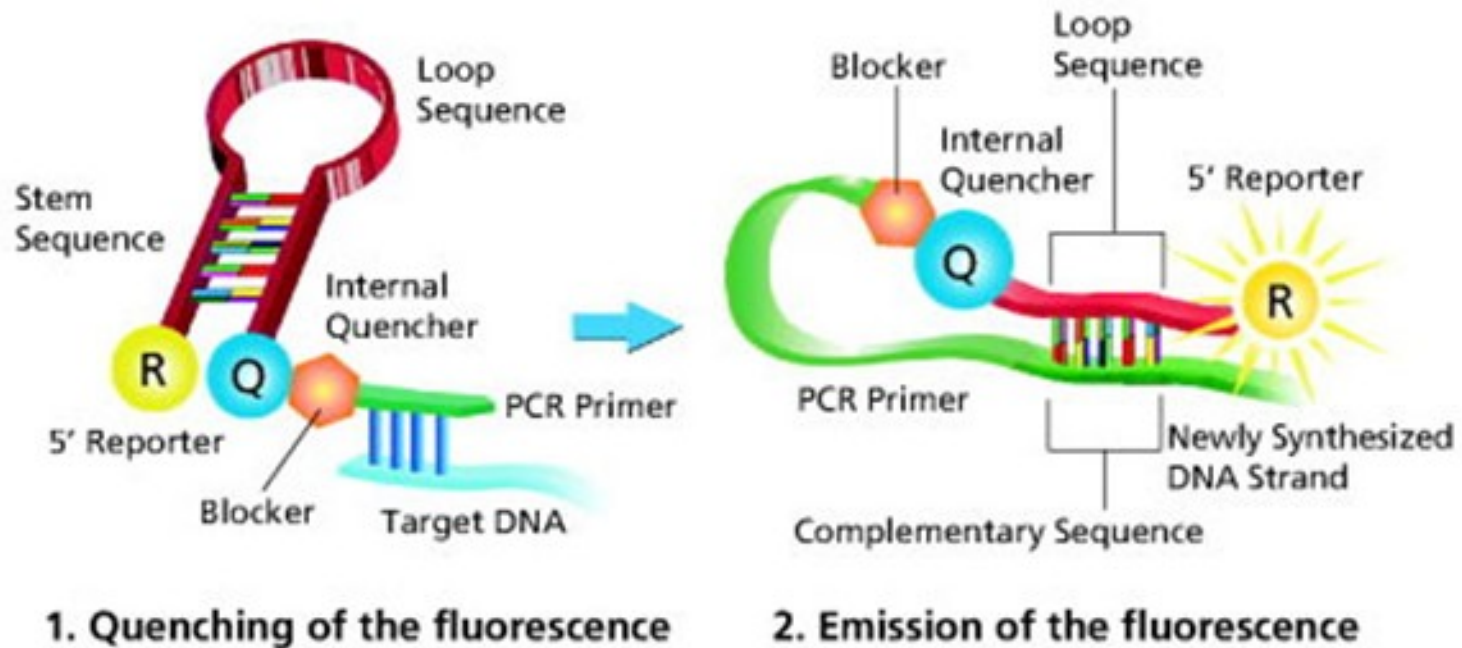
Hybridizační sondy



Molekulové majáky

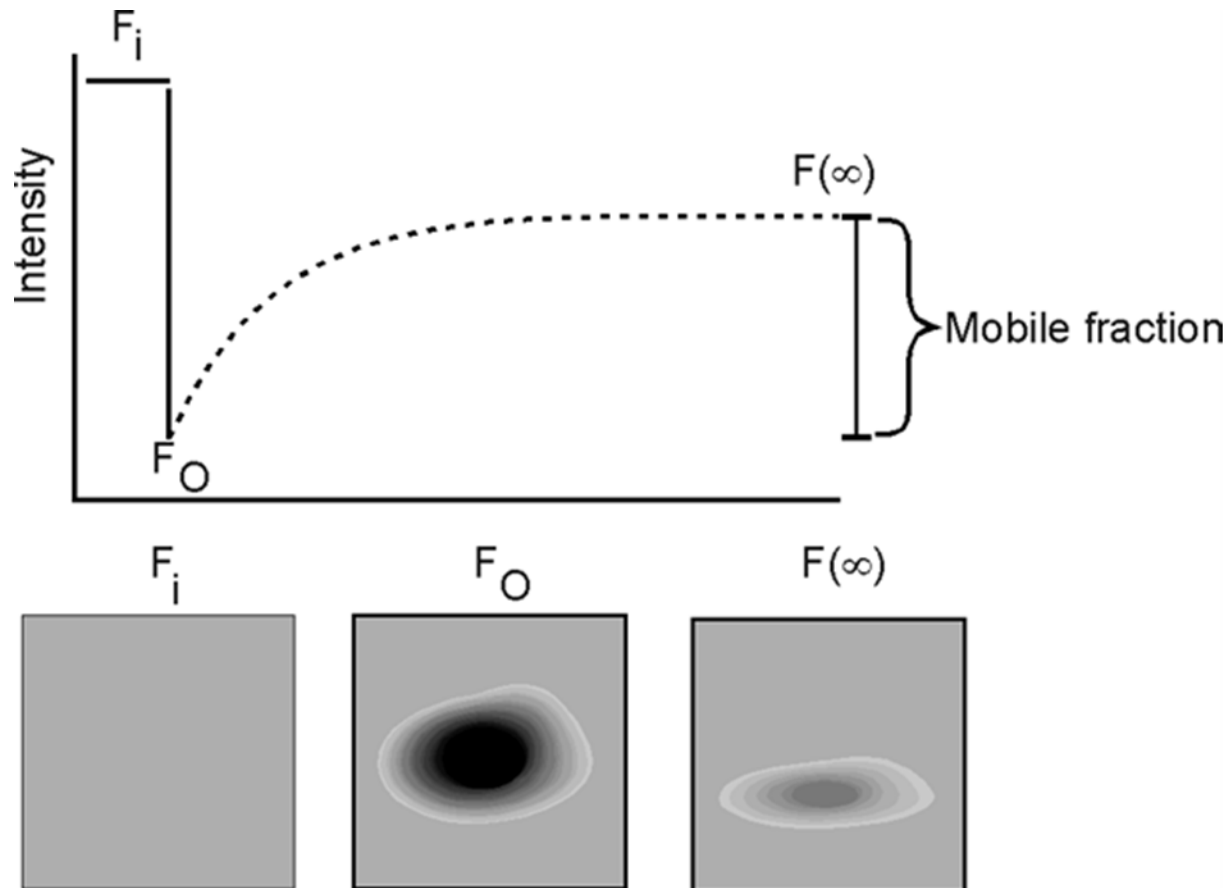


Hybridizační sondy

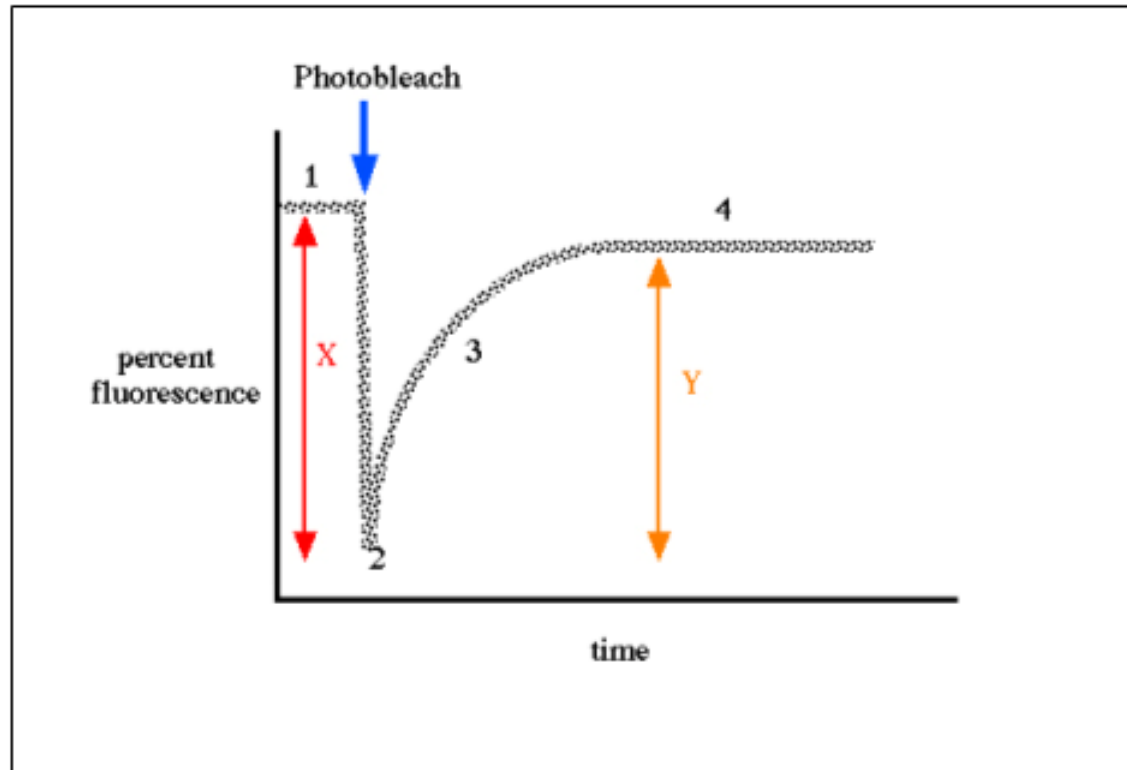


Dynamika membrán

- Fluorescence recovery after photobleaching

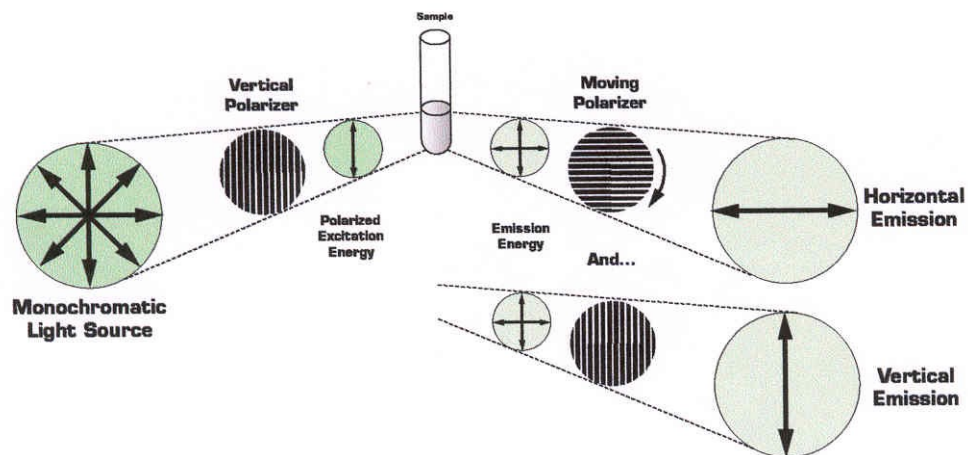


Dynamika membrán



- FRAP
 - Rychlost – průběh obnovení
 - Výtěžek (recovery)

Fluorescenční anizotropie



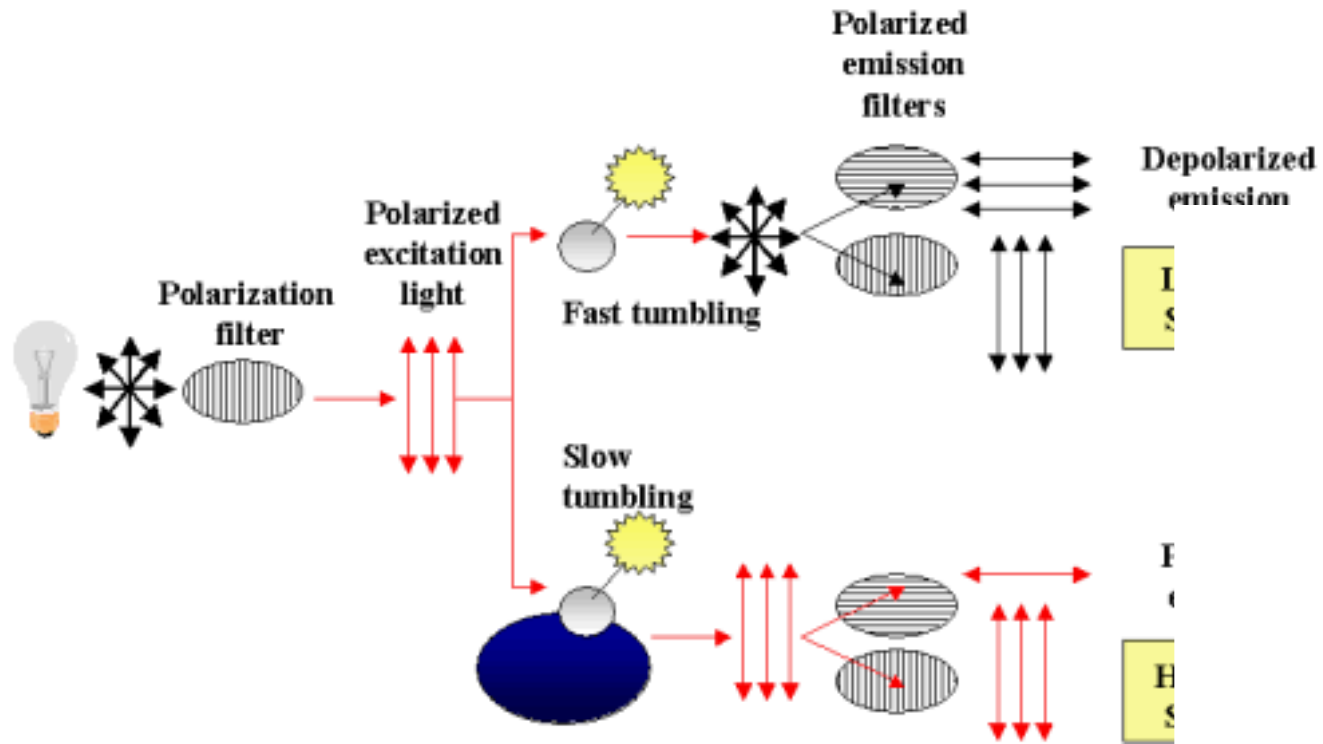
Fluorescenční anizotropie

Polarizační filtry

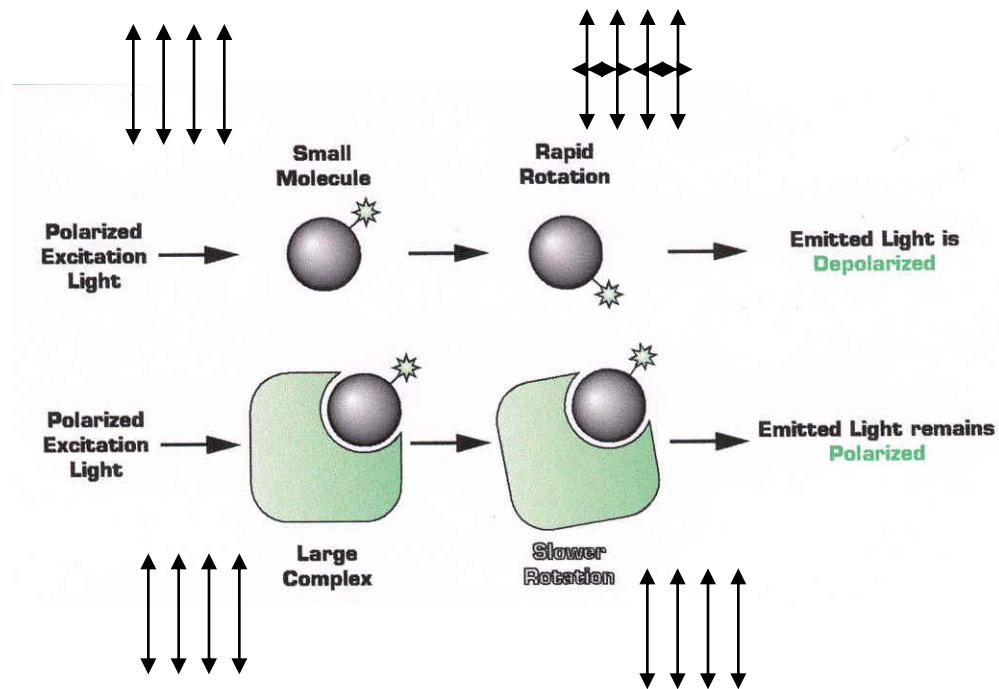


Auto-Polorizer Accessory

Fluorescenční anizotropie



Fluorescenční anizotropie

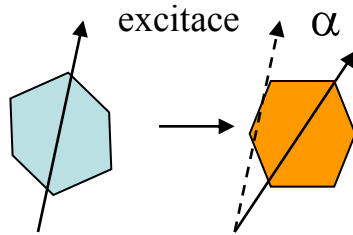


Fluorescenční anizotropie

Polarizace fluorescence $\mathbf{p} = \frac{I_h - I_v}{I_h + I_v}$

Fluorescenční anizotropie $\mathbf{r} = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$

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

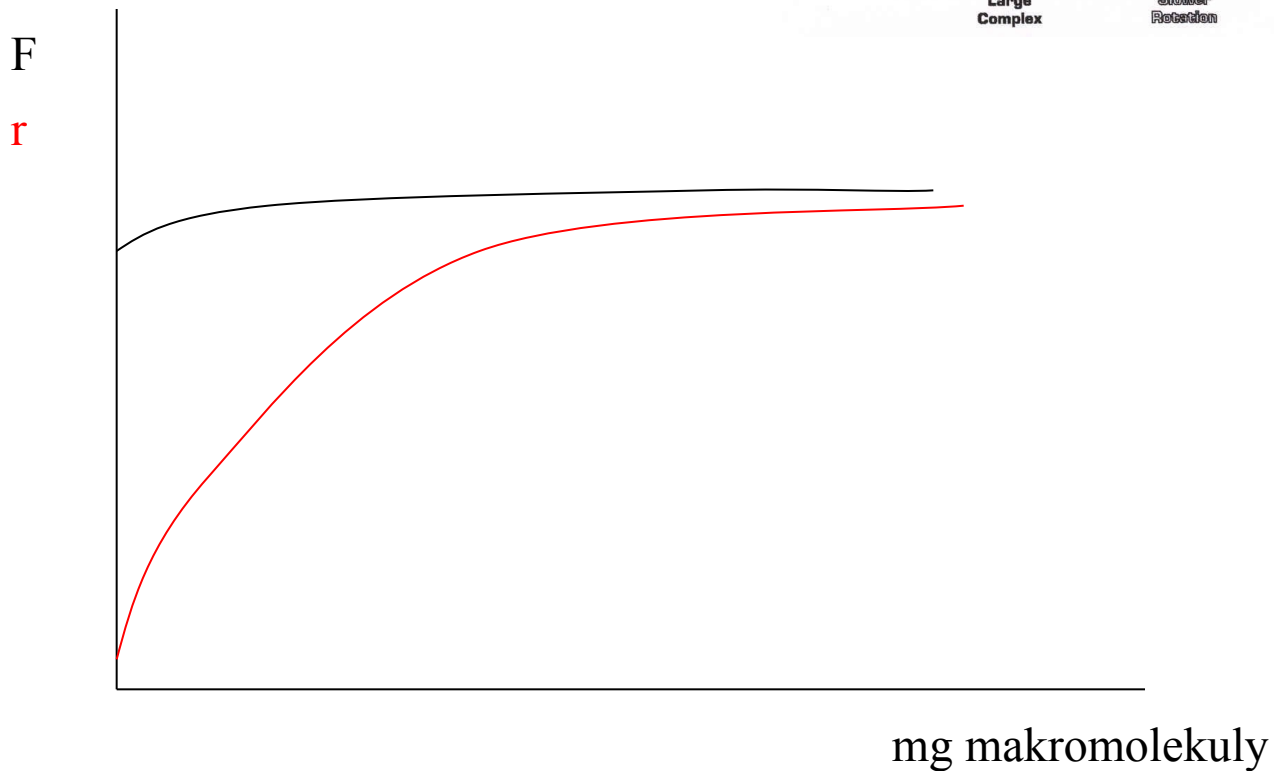
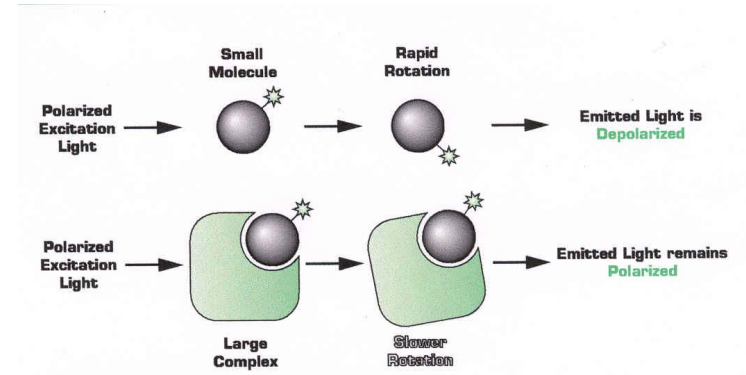
$$r_0 / r = 1 + 3\tau RT / V\eta$$

Fluorescenční anizotropie

Využití:

Interakce makromolekuly s ligandem

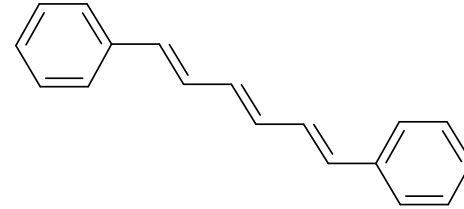
E – S (K, I), Ag – Ab, hormon - receptor



Fluorescenční anizotropie

Využití:

Měření viskozity prostředí

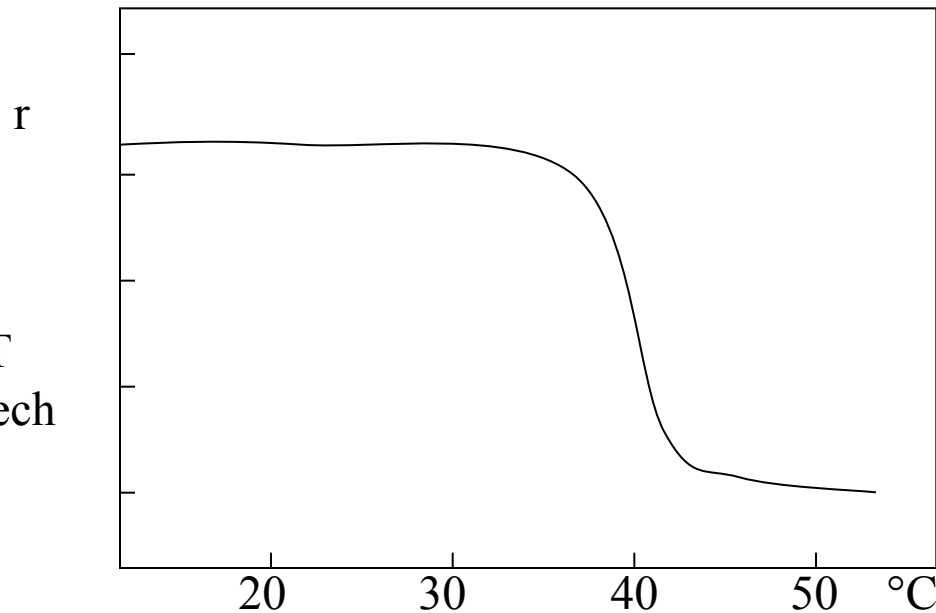


$$r_o/r = 1 + 3\tau RT/V\eta$$

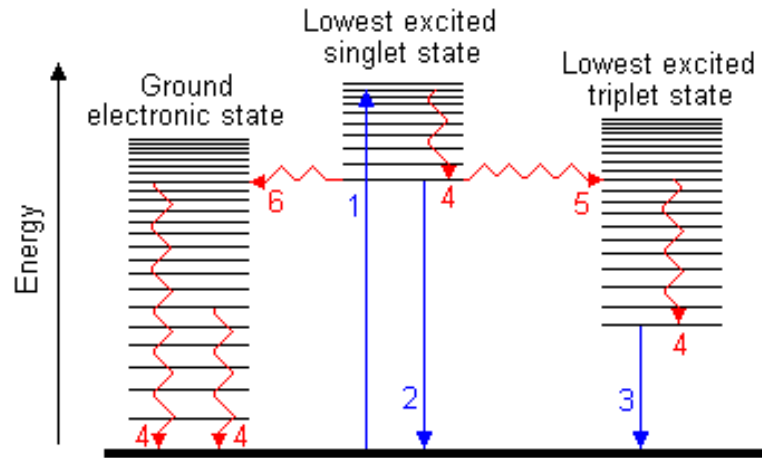
$$r_o/r = 1 + K/\eta$$

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

Fl. anizotropie DPHT
Vázaného v liposomech
DPPC



Fosforescence

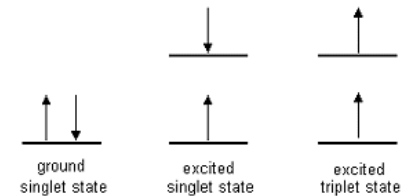
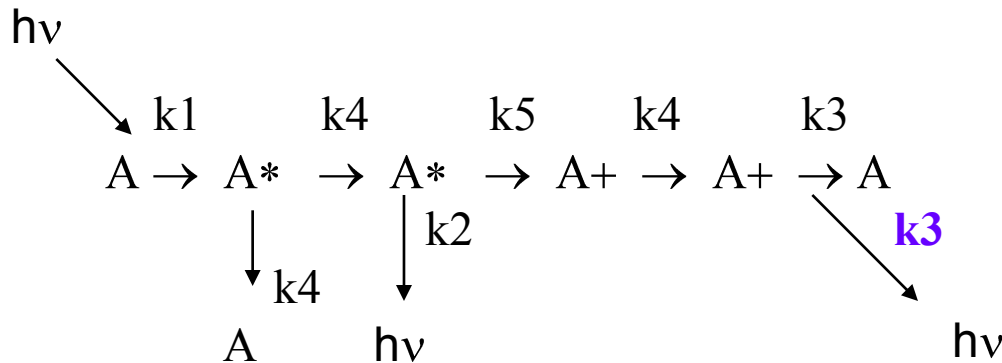


1. Absorption
2. Fluorescence
3. Phosphorescence
4. Vibrational relaxation
5. Intersystem crossing
6. Internal conversion

→ Processes involving photons
~→ Radiationless transitions

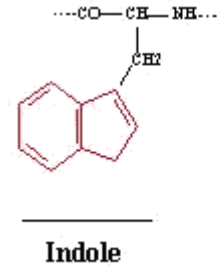
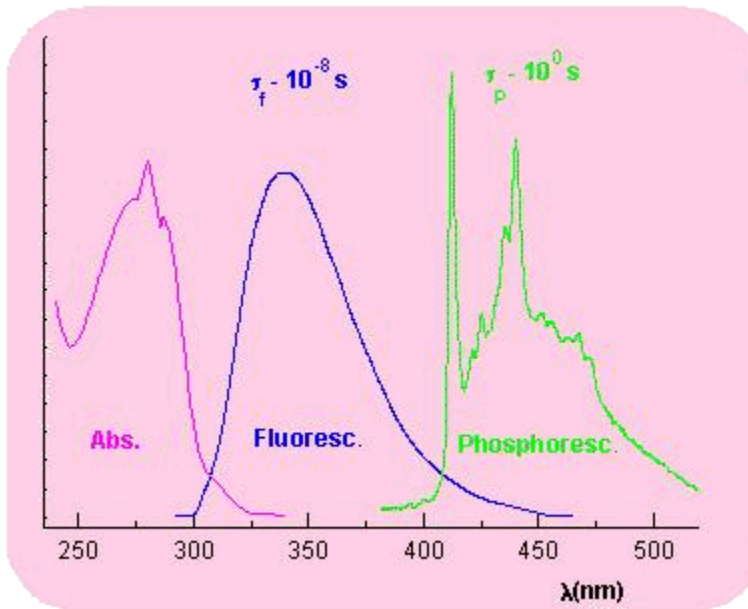
Multiplicita

$$M = 2S + 1$$



Fosforescence

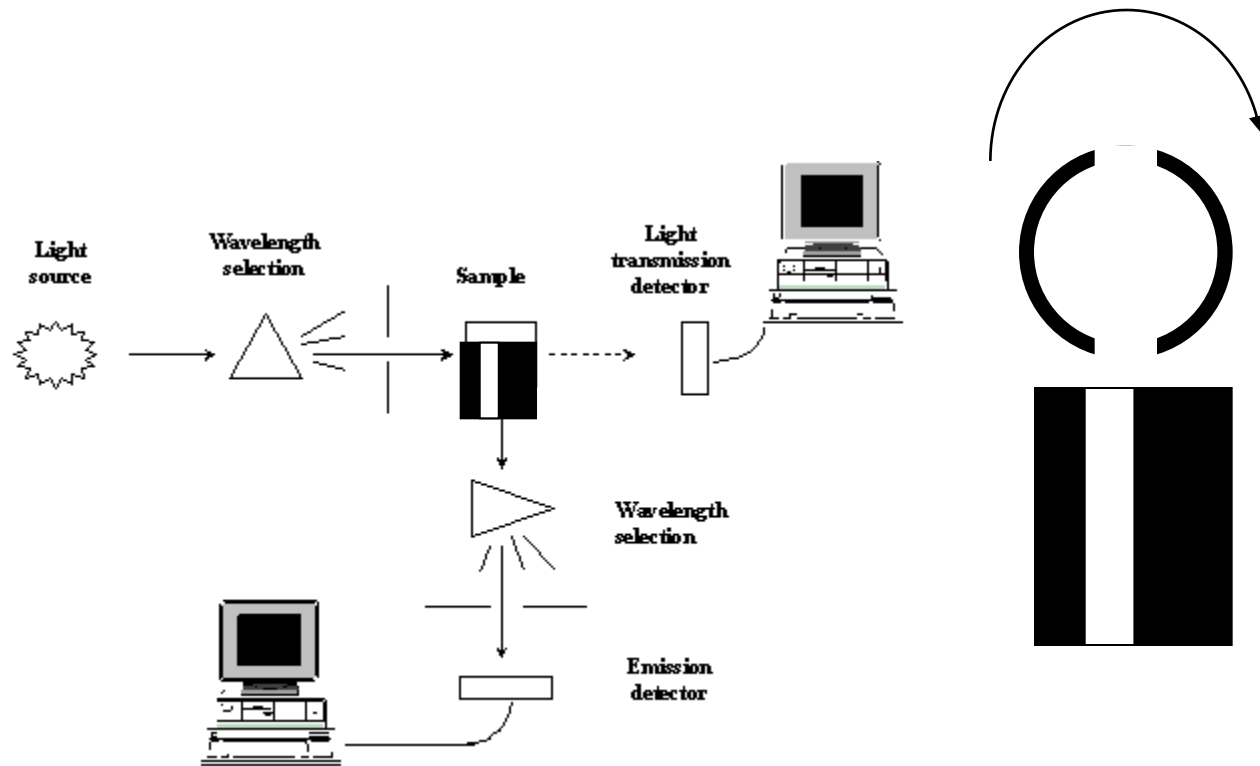
Střední doba života τ $10^{-4} - 100$ s



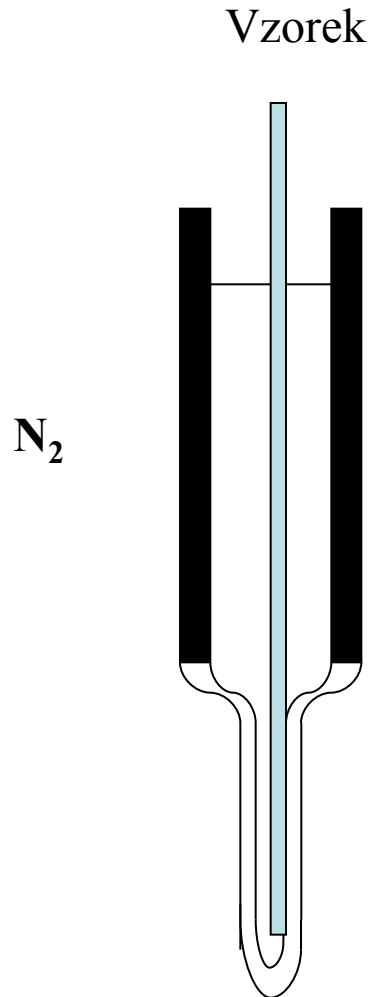
Tryptophan

Fosforescence

Experimentální uspořádání



Fosforescence



Rozpouštědla
rigidní skla bez krystalů
(ethanol, metanol, voda:ethylenglykol., atd

Fosforescence

Aplikace fosforescence

	exc	em	(sec)
Tyrosine	300	405	5.3
Tryptophane	295	440	1.5
DOPA	270	420	0.4
Phenylalanine	270	420	-
Ac. benzoïque	240	400	2.4
Ac. aminobenzoïque	310	430	3.2
Ac. indolylacétique	300	440	7.1
Ac. salicylique	315	430	6.2
Quinine	340	500	1.3
Naphtalène	290	505	
Codéine	275	505	0.3
Caféine	285	440	2.0

Fosforescence

Fosforescence alkalické fosfatasy

3 Try, pouze Try 109 fosforeskuje

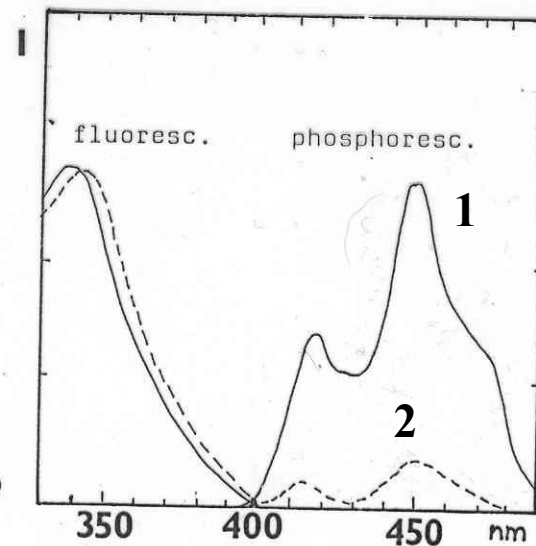
1 – nativní enzym

2 – enzym po odstranění Zn

Phosphatase
alcaline

Spectra de fluor.
et de phosphoresc.
de tryptophane

Cioni et al. (1989)
Eur. J. Biochem.



Chemiluminescence

- Při reakci musí vznikat dostatek energie, aby došlo k excitaci elektronů. Proto musí být reakce exotermní a obvykle je to oxidace.
- Energie se využije pro excitaci elektronů, uvolní-li se jako teplo chemiluminescence se neobjevuje.
- Excitovaný produkt musí být schopný ztrácet svoji energii buď ve formě fotonu, nebo ji převádět na fluoreskující sloučeniny. Přímá emise fotonu z excitovaného produktu obvykle poskytuje krátké záblesky světla, zatímco transfer energie na fluoreskující sloučeniny se většinou projevuje jako dlouhodobá (v minutách) světelná emise.

Chemiluminescence

- Přístrojové vybavení:
- od jednoduchých luminometrů až po vysoce automatizované chemiluminiscenční analyzátory, ve kterých se provádí imunochemické reakce s chemiluminiscenční detekcí.
- Standardní luminometry se do určité míry podobají fluorimetrům. Před měřicí kyvetou ovšem nemají žádný zdroj světla ani filtr. Uspořádání za kyvetou odpovídá fluorimetrům (filtr, fotonásobič). Téměř všechny luminometry mají také nastřikovací zařízení, protože u zábleskové chemiluminescence je nutné provést měření ihned po nástřiku reagensů. Některé luminometry měří luminiscenci v mikrotitračních destičkách.

Chemiluminescence

- Jednoduchý luminometr



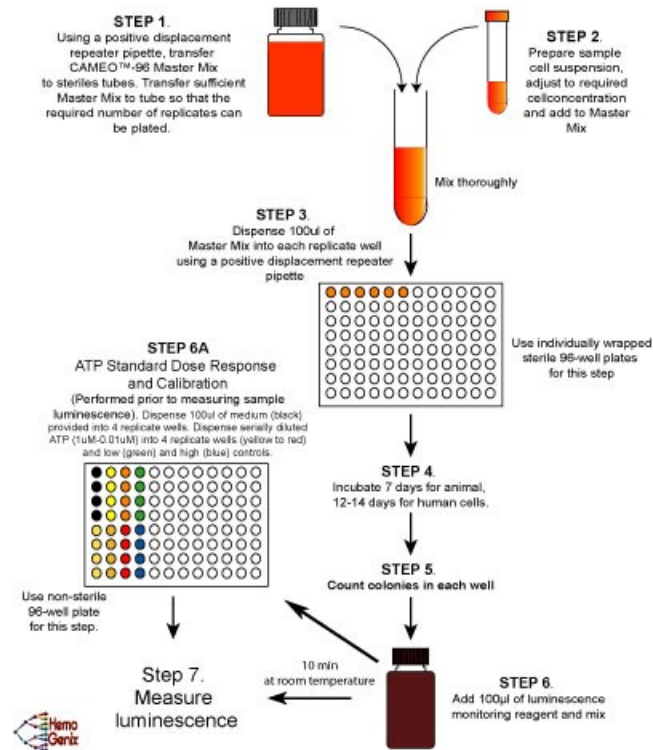
Chemiluminescence

- Luminometr na destičky



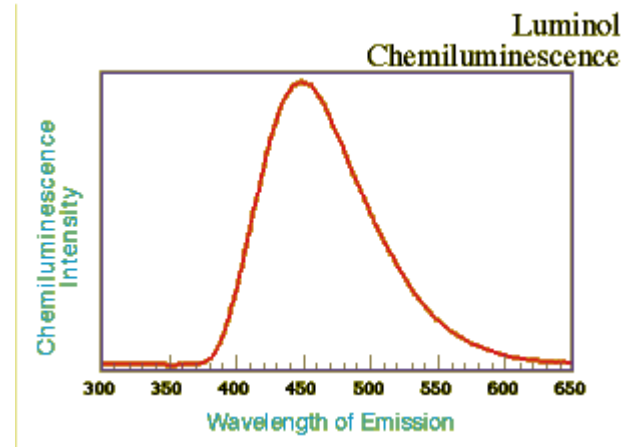
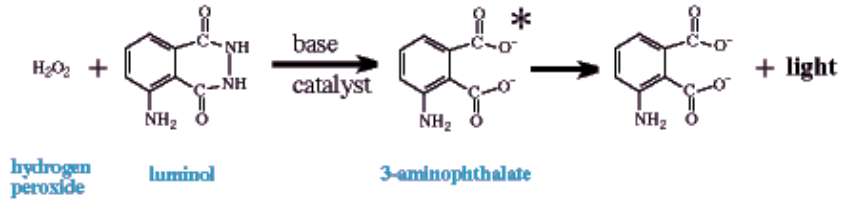
Chemiluminescence

CAMEO™-96 KIT PROTOCOL

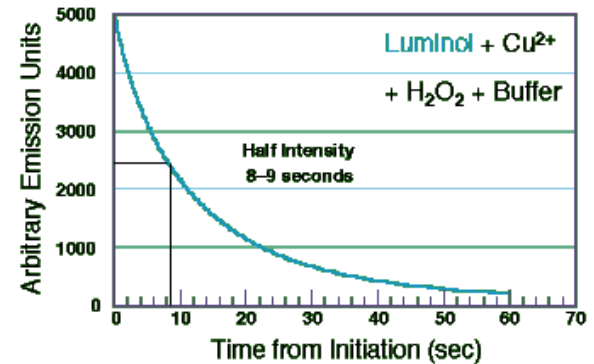


Chemiluminescence

Luminol

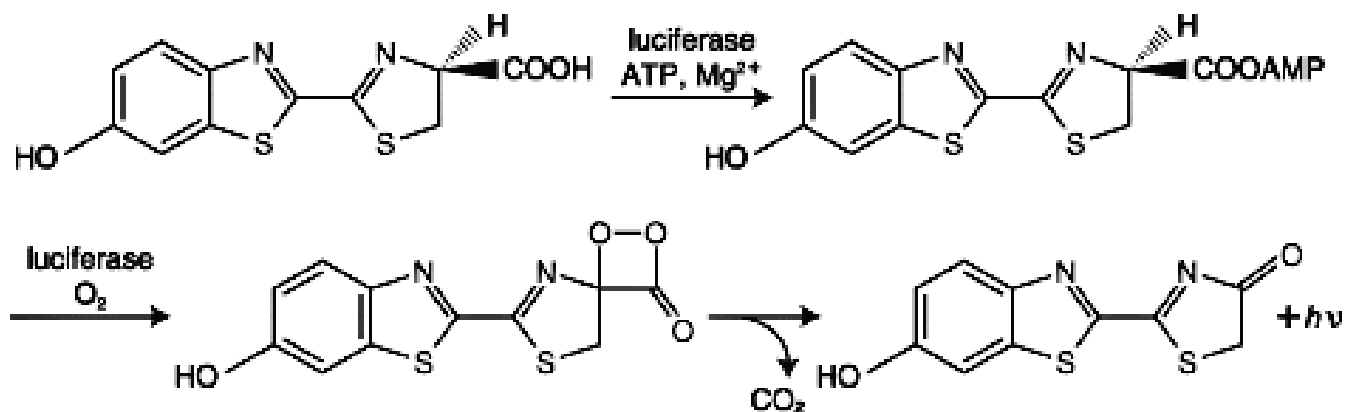


Luminol Emission Time Profile

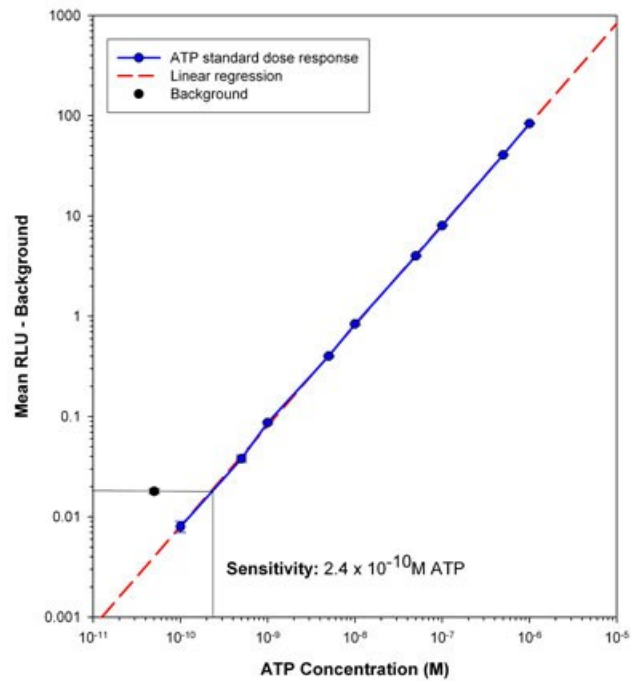


Chemiluminescence

Luciferin světlušky



Chemiluminescence



Chemiluminescence

Aequorin – *Aequorea victoria*

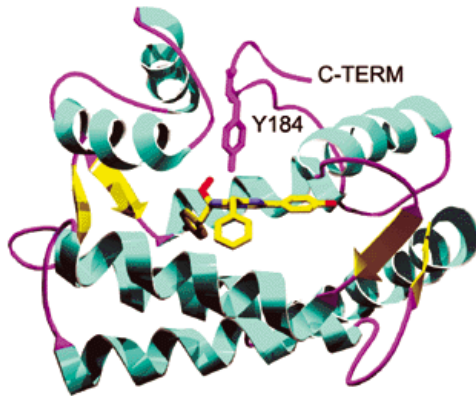
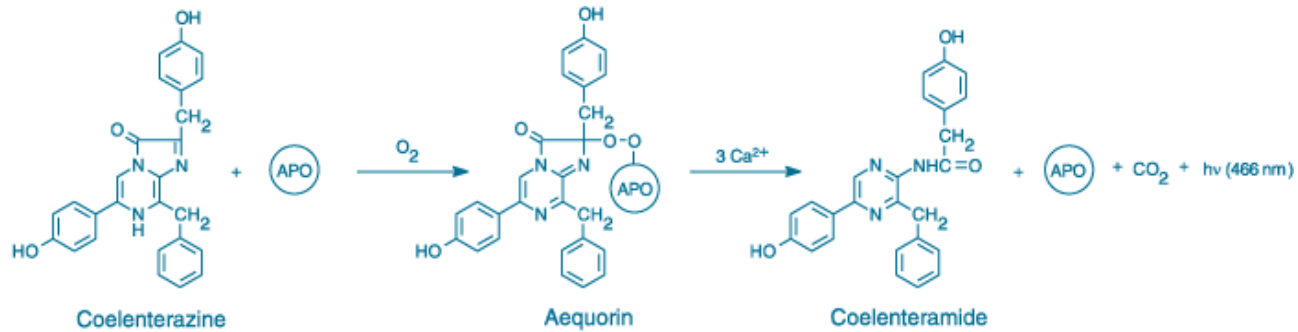
GFP – fluorescence

Aequorin - chemiluminescence



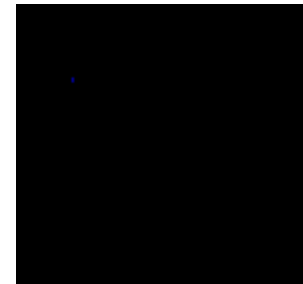
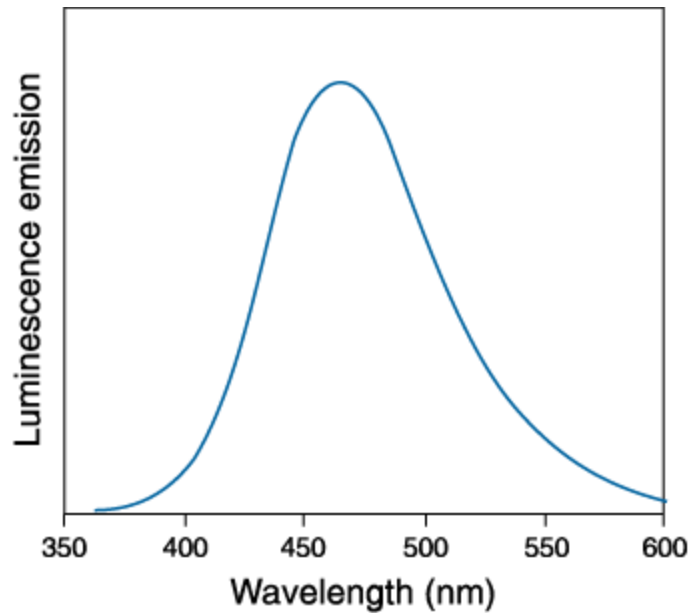
Chemiluminescence

Aequorin – *Aequoria victoria*
Prostetická skupina - typ luciferinu



Chemiluminescence

Aequorin – *Aequoria victoria*



Průnik vápníku do mitochondrií
Aktivuje oxidaci