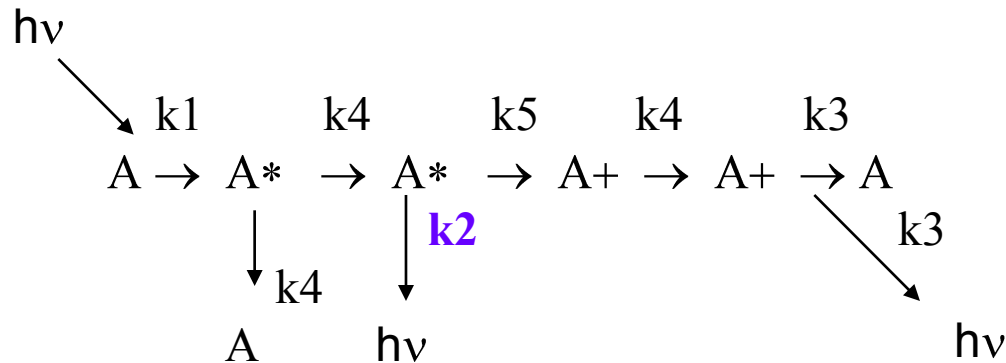
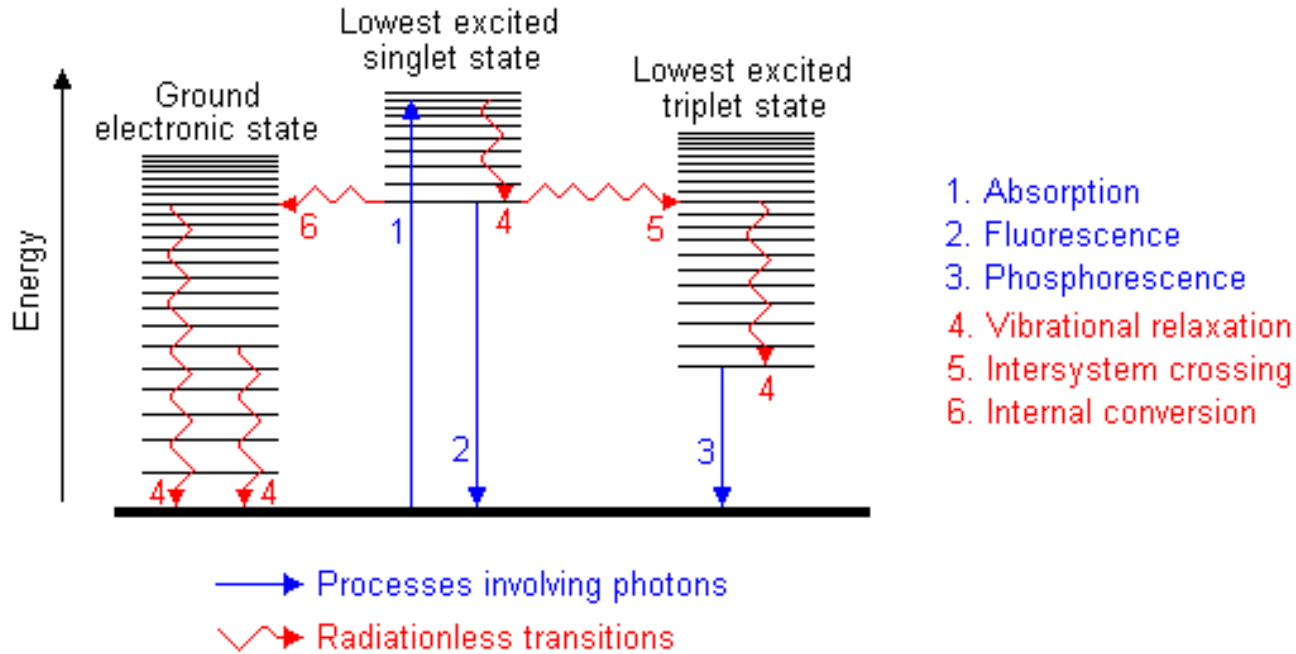
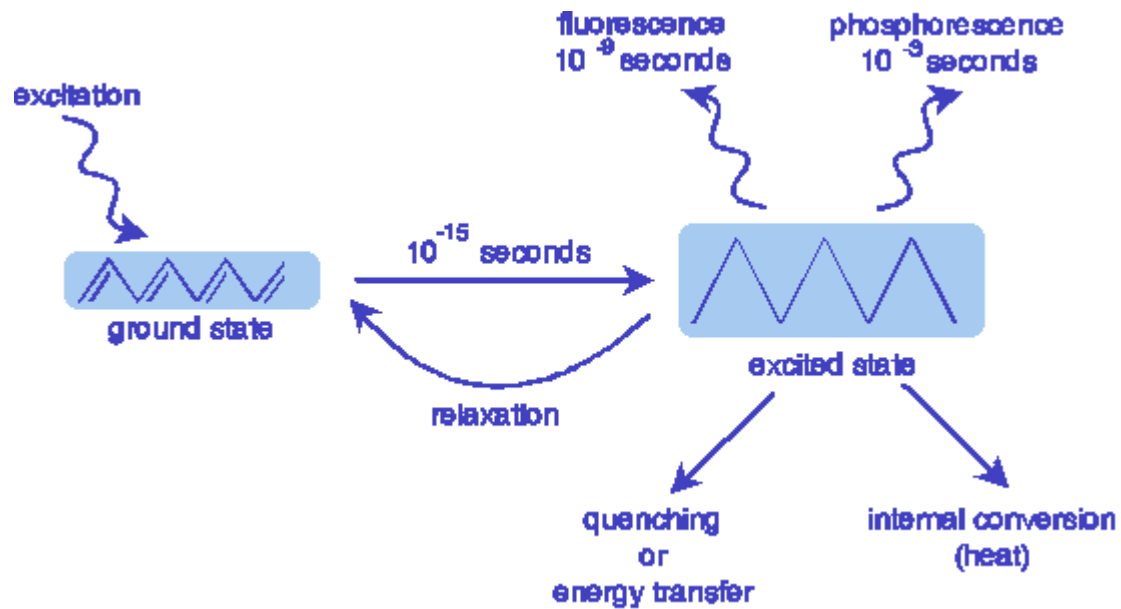


Luminiscenční spektroskopie



Luminiscenční spektroskopie



Luminiscenční spektroskopie

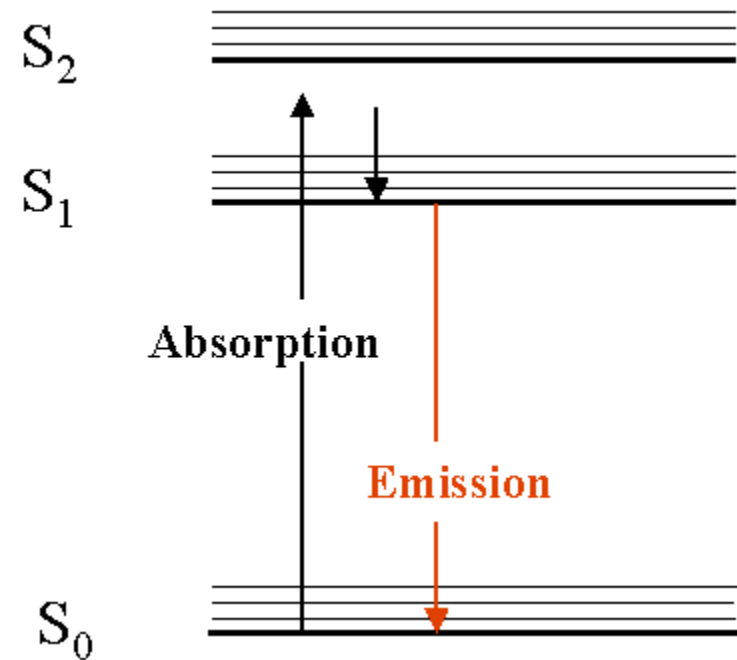
Fluorescenční spektroskopie

Fosforescenční spektroskopie

Chemiluminiscenční spektroskopie

Základní pojmy

Excitace a emise

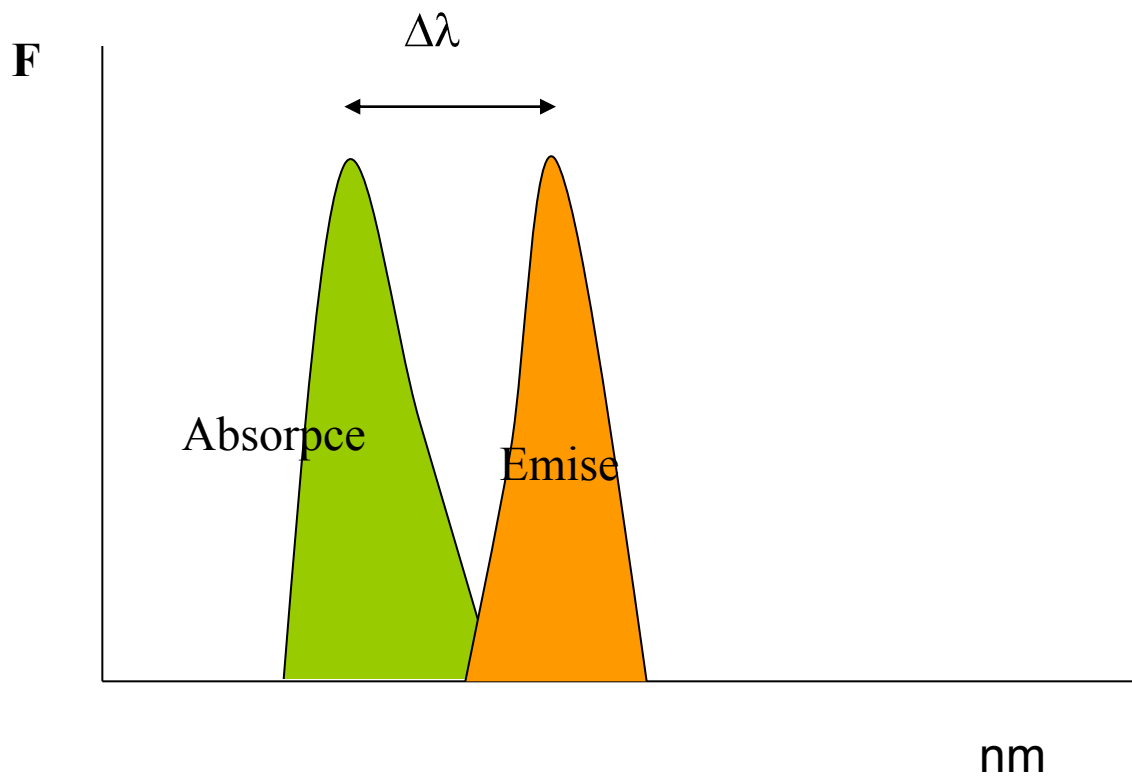


Interakce s rozpouštědlem
Singletový excitovaný stav

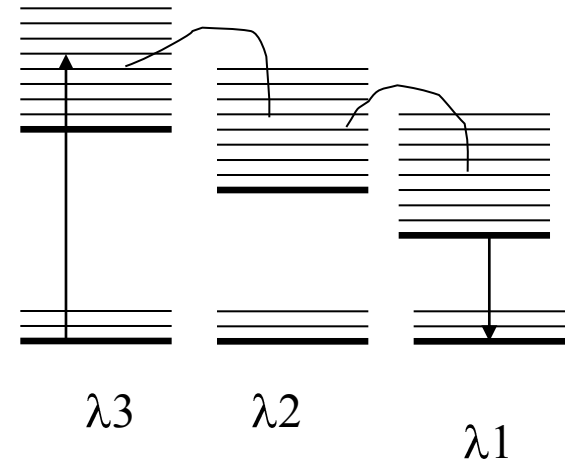
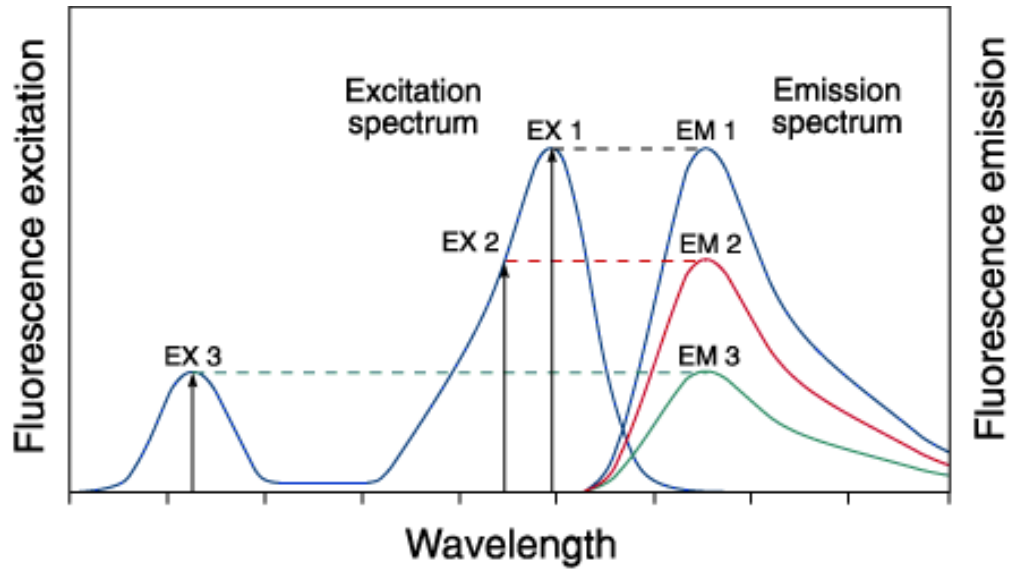
Singletový základní stav

Základní pojmy

Stokesův posun – ztráty energie po dobu excitovaného stavu



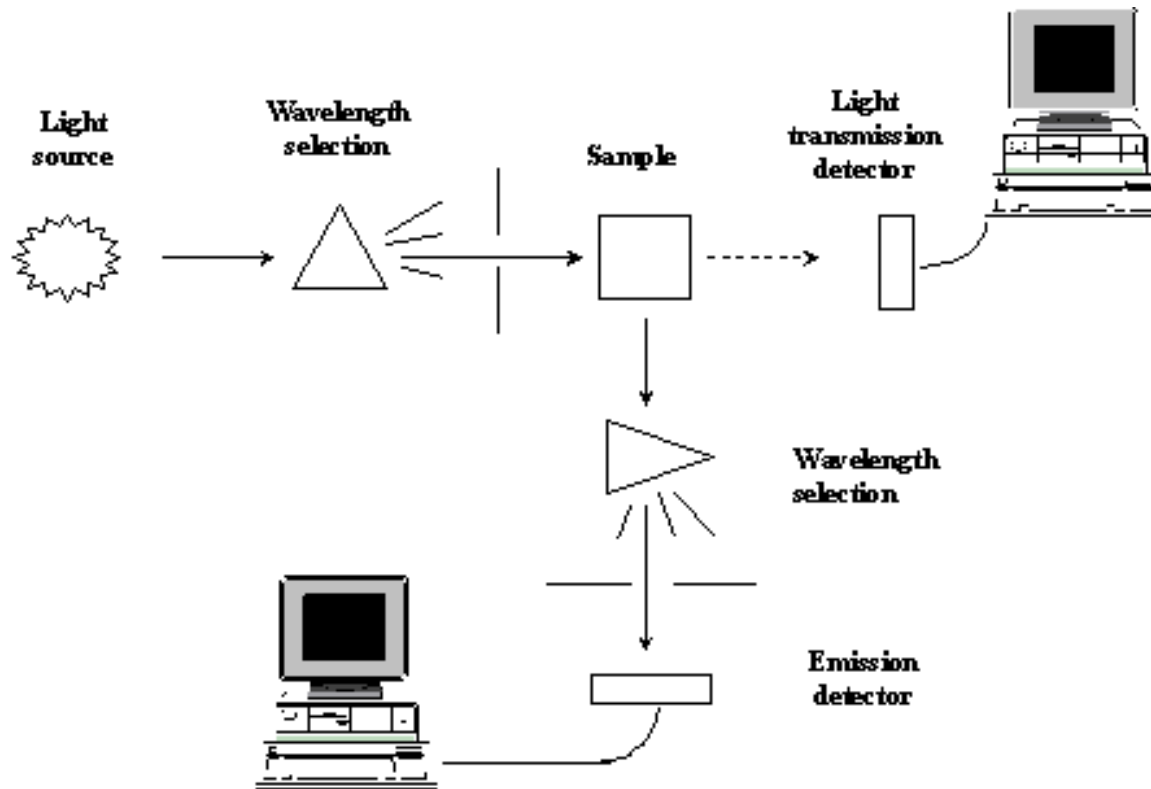
Základní pojmy



Biochemicky významné fluorofory

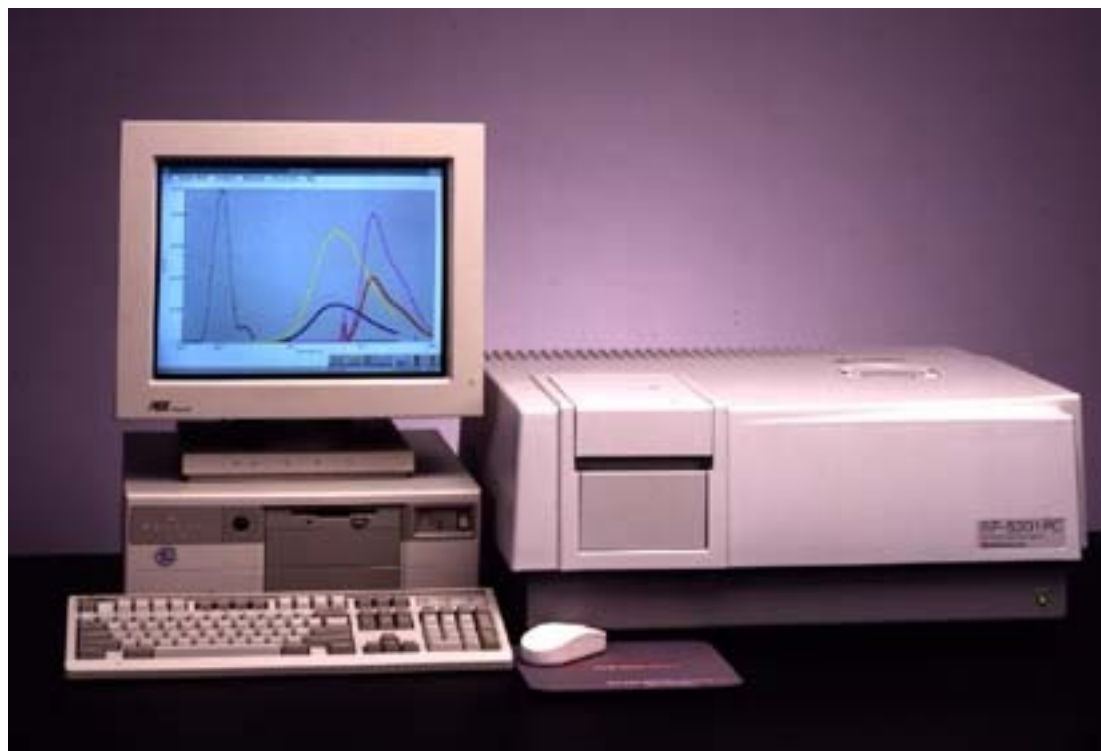
	λ_{exc}	λ_{em}	Q (25°C)
Tyrosine	275	303	0.14
Tryptophane	287	348	0.13
Indole	287	348	0.45
NADH	350	460	0.03
Riboflavine	450	535	-
Chlorophylle	436	670	0.30 (acétone)
Quinine	250	450	0.51 (1M H ₂ SO ₄)
Pyridoxamine	324	392	0.11 (pH=8.2)
Vitamine A	325	470	- (ethanol)
Aminobenzoate	294	345	-

Instrumentace



Instrumentace

RF-5301PC – spektrofluorimetr Shimadzu



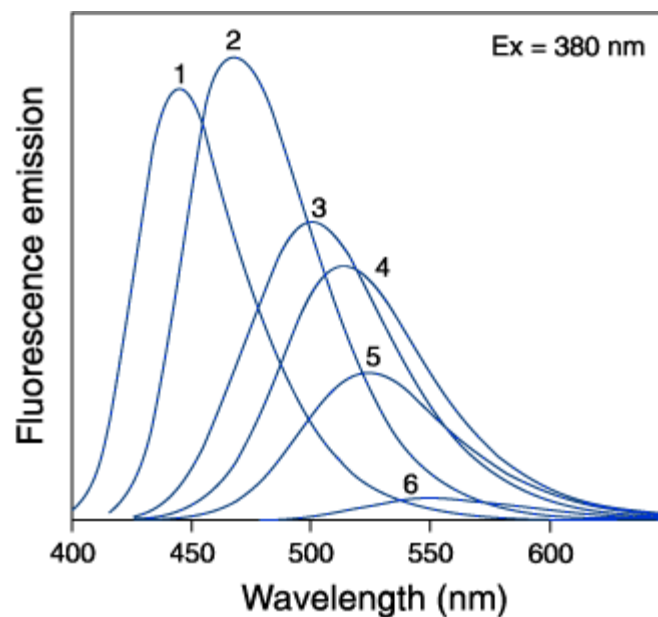
Podmínky fluorescence

Závislost na polaritě a viskozitě

Nitrobenzoxadiazol

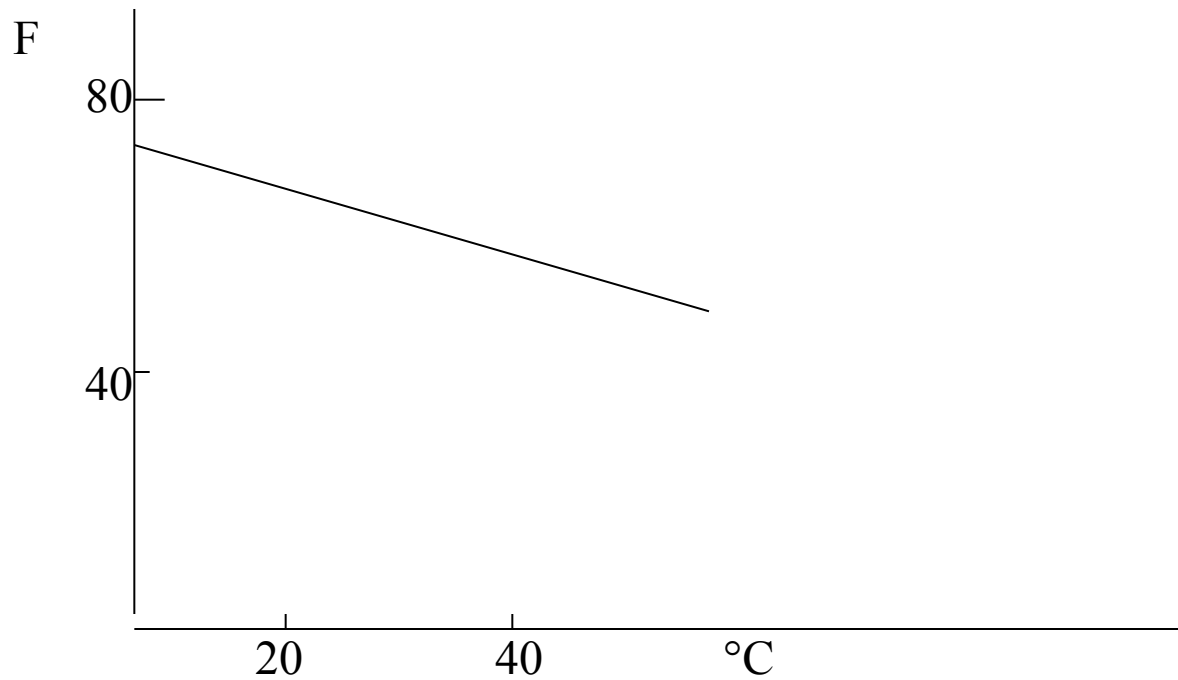
Solvent	Freq. domain (ns)	TCSPC (ns)	Literature (ns)
H ₂ O	0.92	0.97	0.93
Methanol	5.35	5.31	5.64
DMSO	7.15	7.54	7.48
Ethyl acetate	10.93	nd	10.5

Pokles polarity 6 – 1.



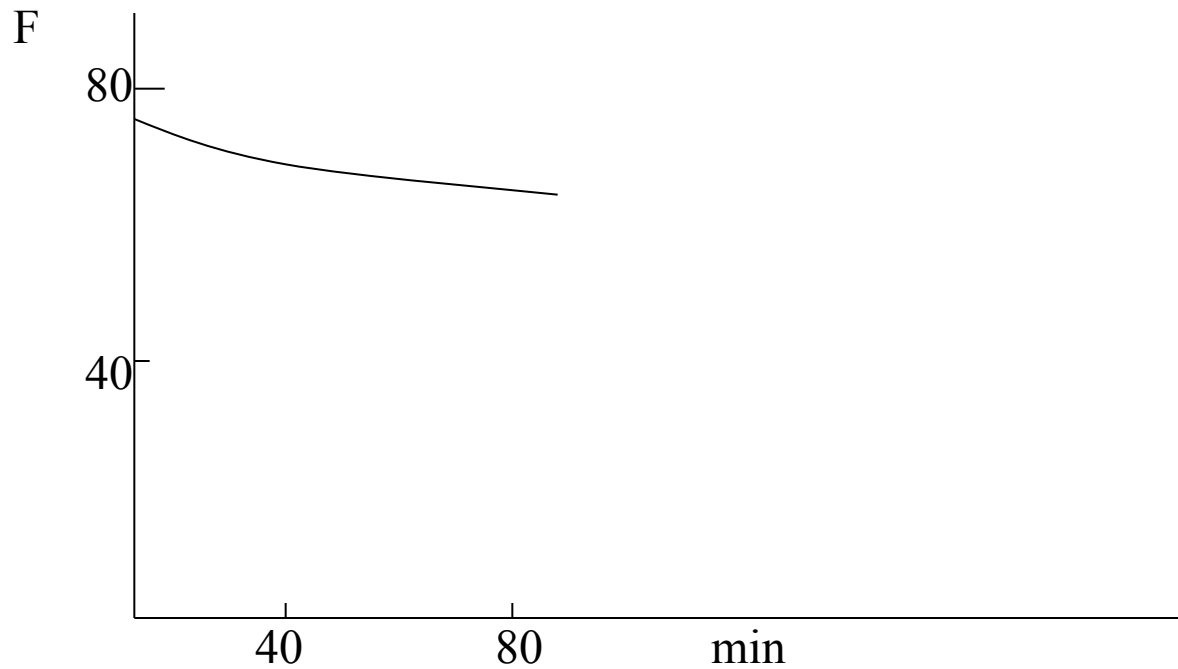
Podmínky fluorescence

Závislost fluorescence na teplotě

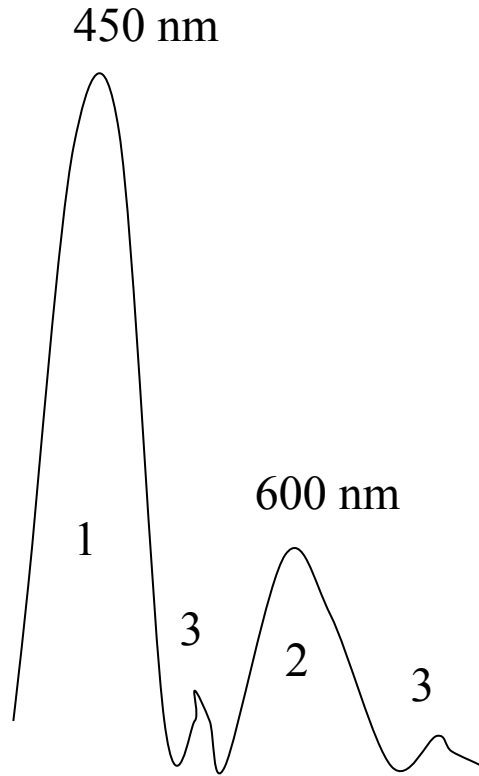


Podmínky fluorescence

Stabilita fluorescenčního signálu
chininsulfátu



Podmínky fluorescence



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

Excitace 450 nm

Emisní spektrum

Kvantitativní fluorimetrie

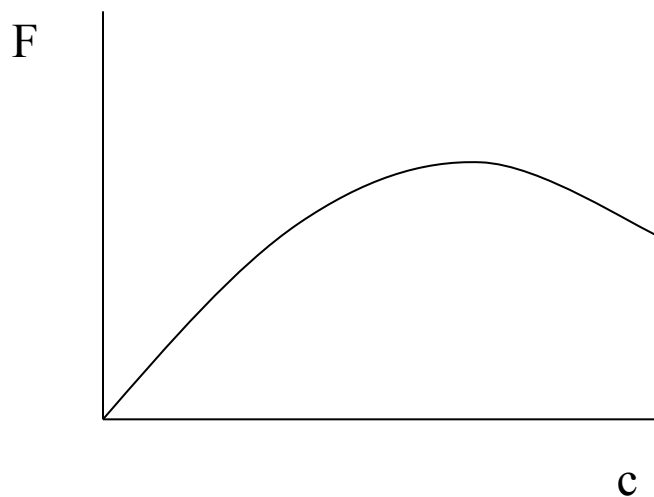
Závislost intenzity fluorescence na koncentraci látky

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

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

jestliže $c \rightarrow 0$

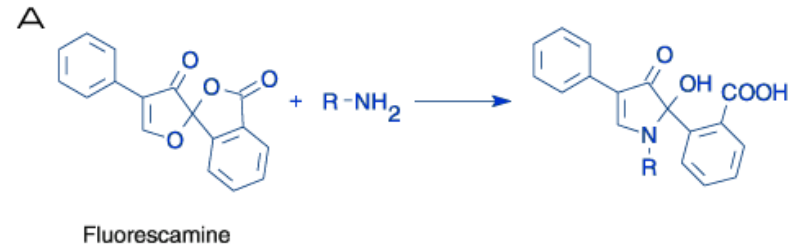
$$F = I_0 \Phi \cdot 2,3 \cdot \varepsilon d \cdot c$$



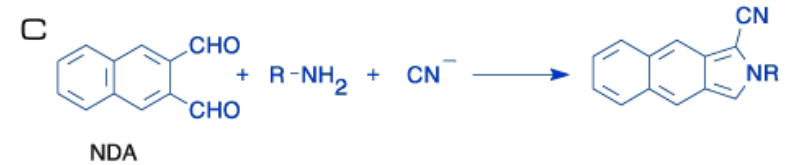
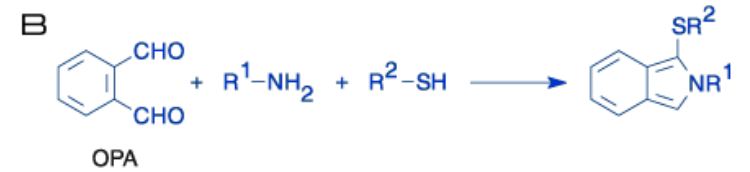
Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení koncentrace aminokyselin

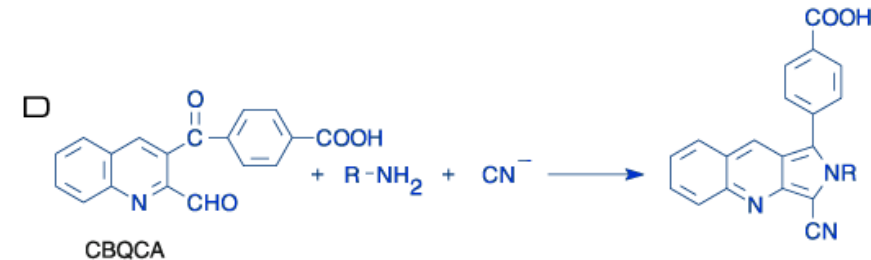
390/464 nm



340/455 nm



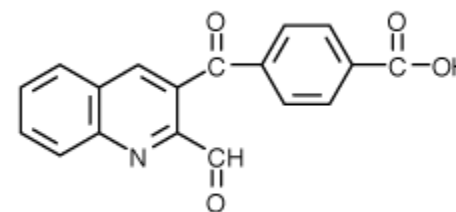
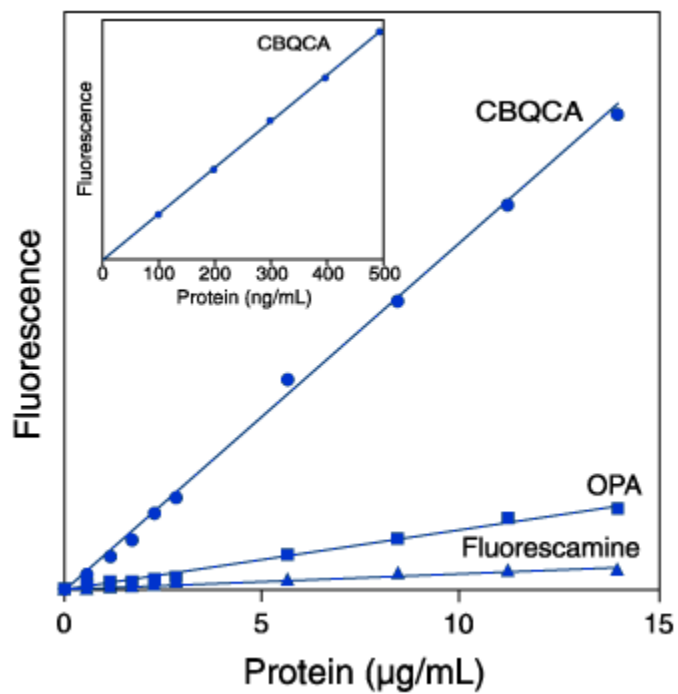
450/550 nm



Kvantitativní fluorimetrie

Stanovení bílkovin

CBCQA



Kvantitativní fluorimetrie

Detekce bílkovin v gelu

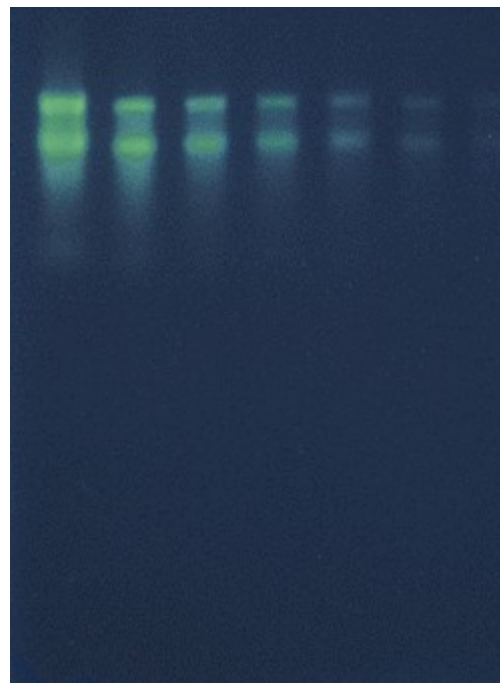
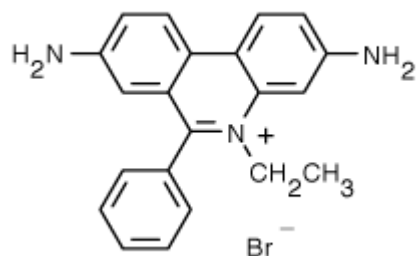
(barevně: Coomasie blue, stříbrné barvení)

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

Kvantitativní fluorimetrie

Detekce nukleových kyselin

Ethidium bromid

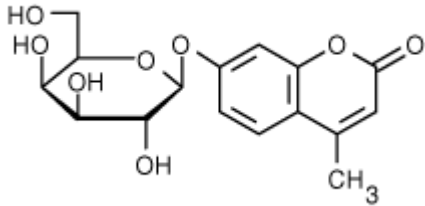


rRNA 16 a 23s barvená SYBR Green II
Molecular Probes

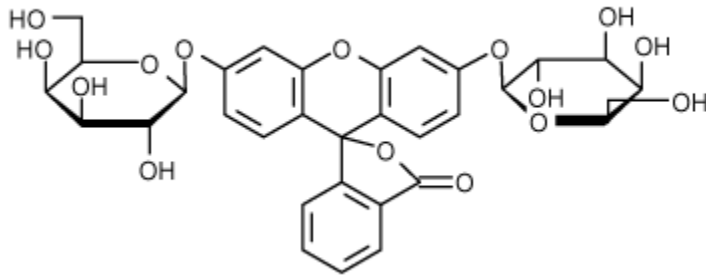
Fluorogenní substráty

Galaktosidasy

4-methylumbelliferyl- α -galaktosid

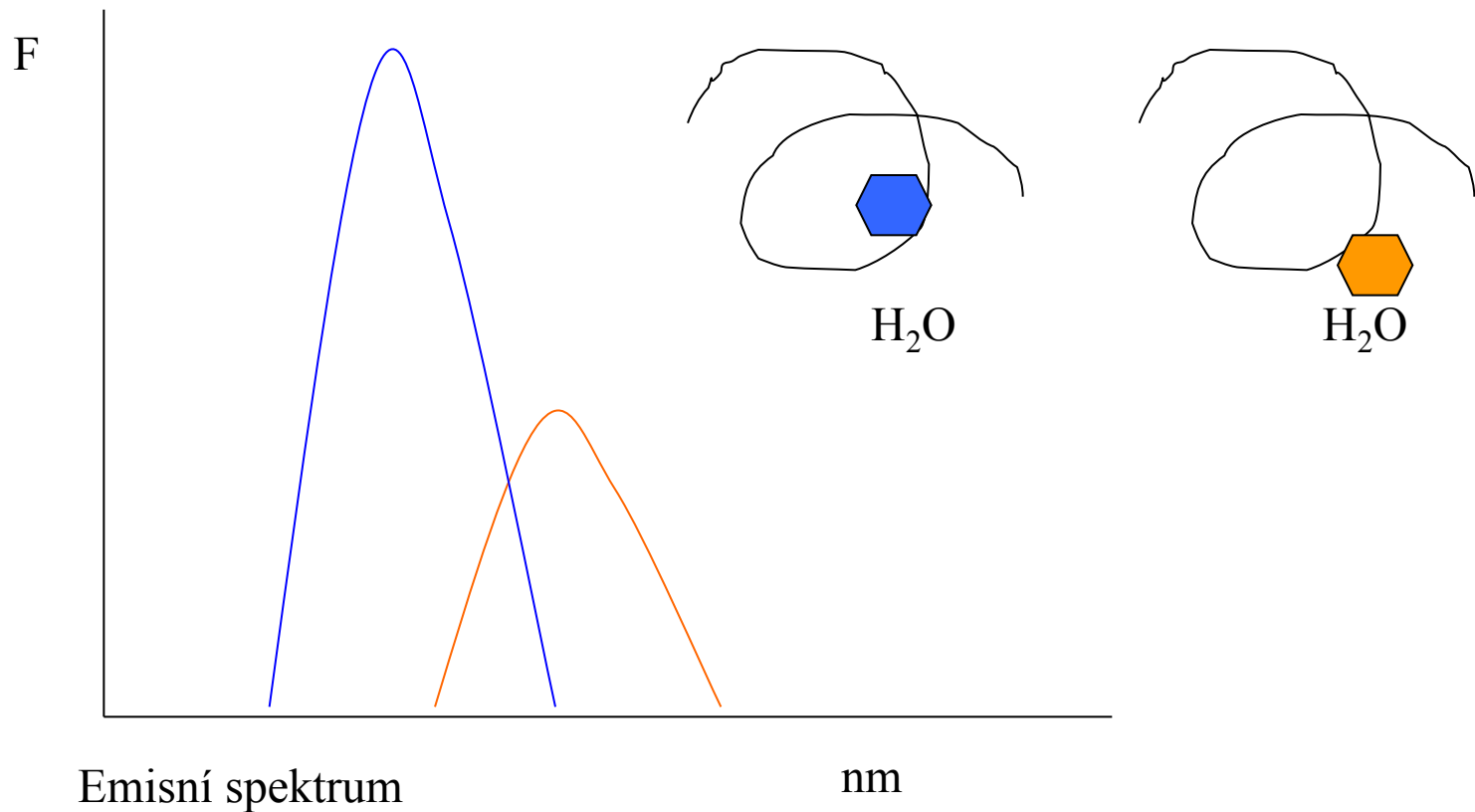


Fluorescein-digalaktosid

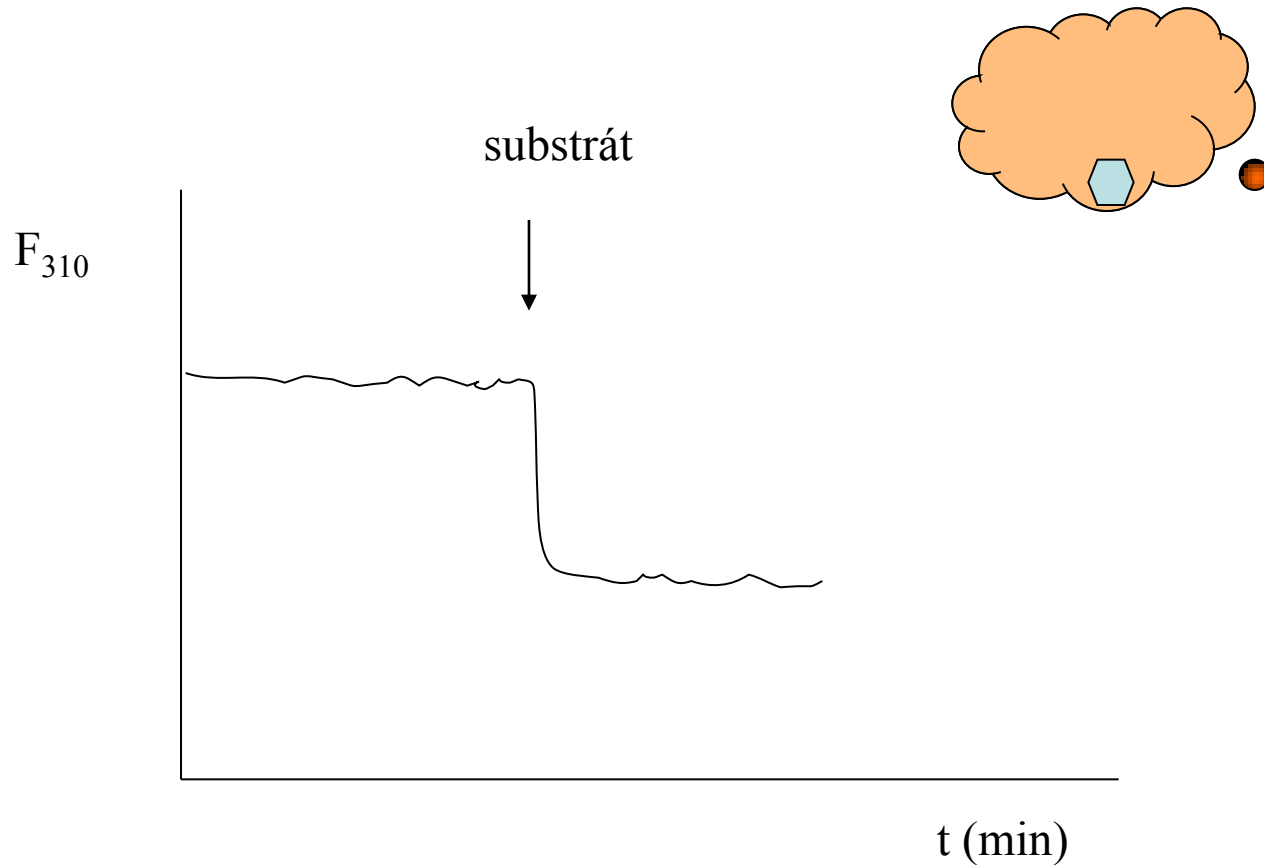


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

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



Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

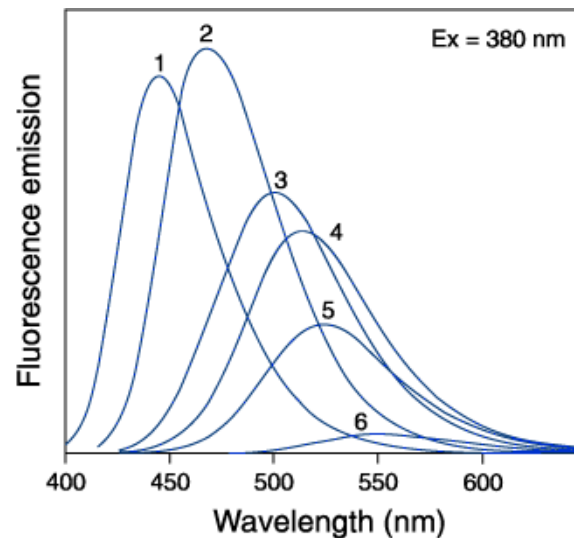
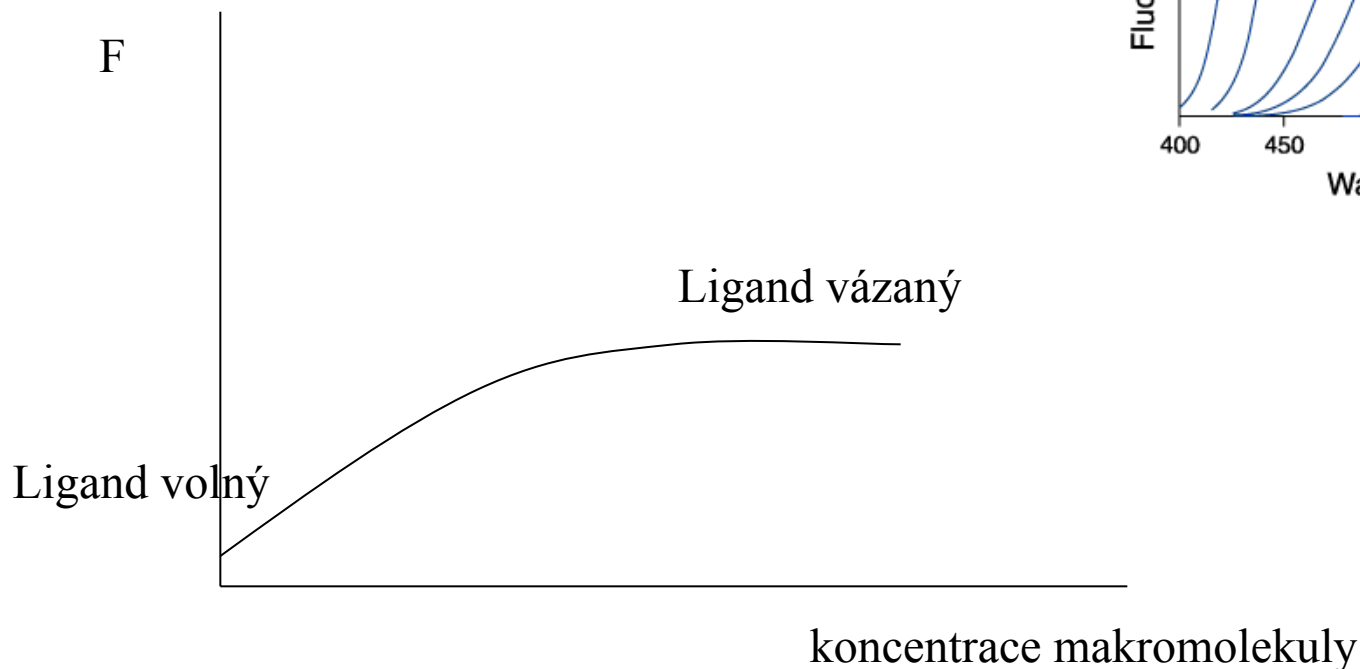


Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí



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

Interakce makromolekul s ligandy



Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

$$F = F_f + F_b$$

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

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

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

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

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

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

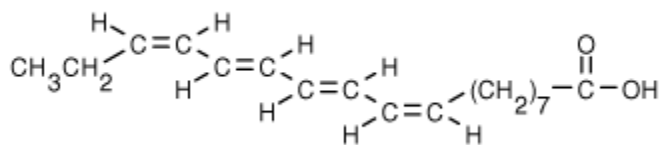
C – celková koncentrace ligandu

F – celková fluorescence

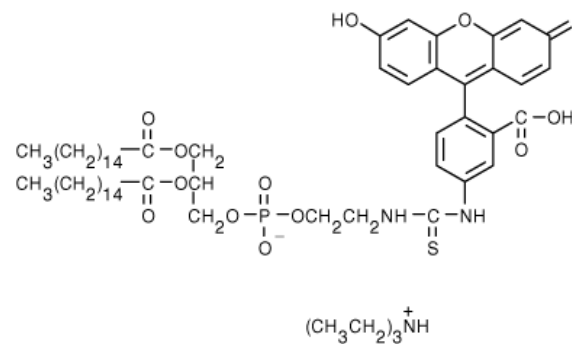
Použití fluorimetrie ke sledování struktury biopolymerů a interakcí

Interakce makromolekul s ligandy

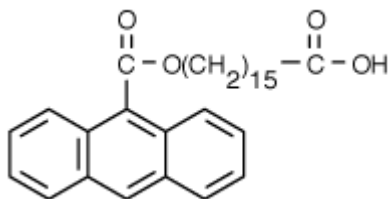
Použití fluorescenčních analogů



Kys. cis-parinarová



Fluorescein-PE



Anthroyloxypalmitát

Vazba ligandu - Scatchardův model



$$K_{as} = [L_b] / ([M_f] \cdot [L_f]) = [L_b] / ([M_t](n-v) \cdot [L_f])$$

$$[L_b] / [M_t] = v, \quad [L_b] = v \cdot [M_t], \quad K_{as} = v / (n-v) \cdot [L_f]$$

$$K_{as} \cdot (n-v) = v / [L_f] \quad K_{as} \cdot n - K_{as} \cdot v = v / [L_f]$$

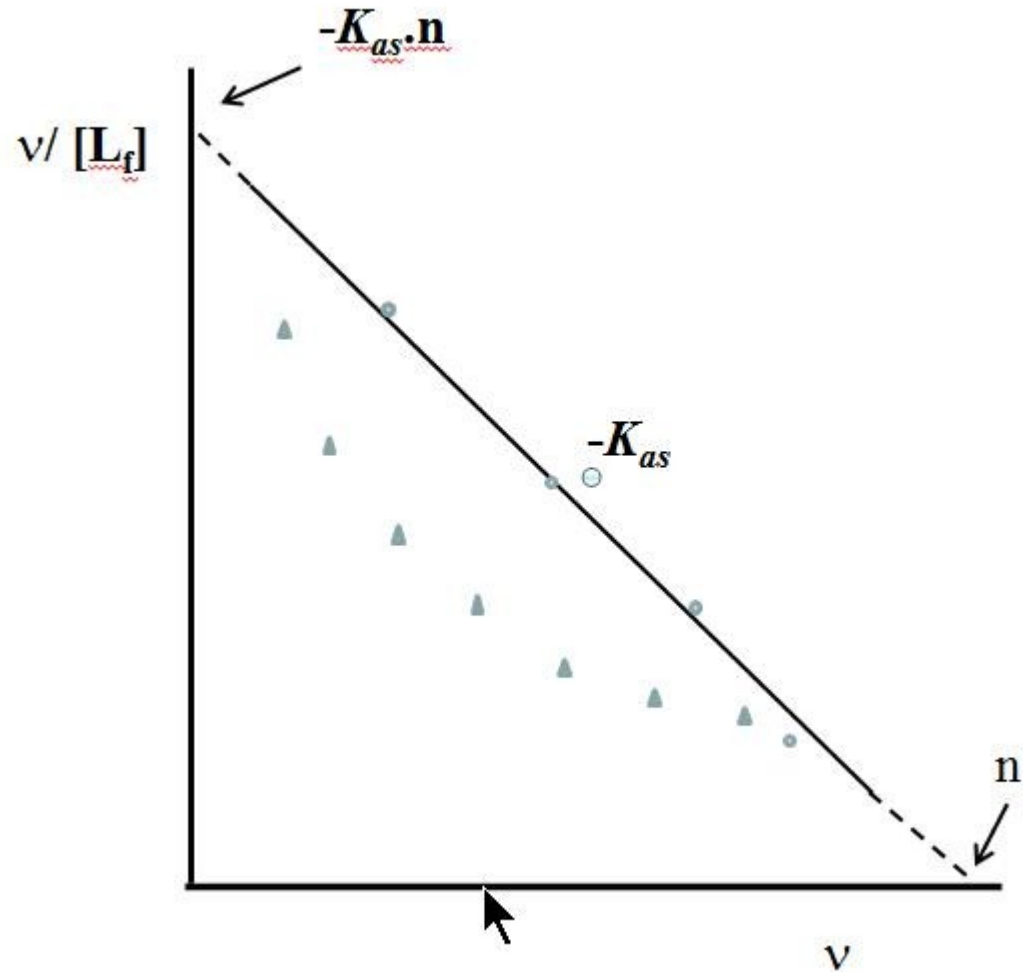
Scatchardův model

Grafické

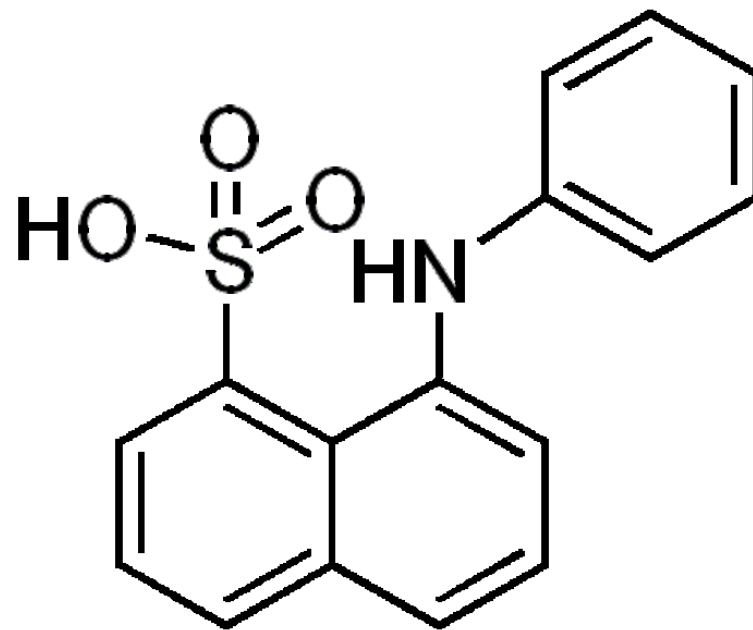
Znázornění

odpovídá \circ

nesedí \triangle



Fluorescenční sondy



- ANS – 1,8-anilinonaftalensulfonát

Použití fluorimetrie ke sledování vazby

$$F = F_f + F_b$$

$$F = [\mathbf{L}_f] \cdot \Phi_f + [\mathbf{L}_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = ([\mathbf{L}_t] - [\mathbf{L}_b]) \Phi_f + [\mathbf{L}_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = [\mathbf{L}_t] \cdot \Phi_f - [\mathbf{L}_b] \cdot \Phi_f + [\mathbf{L}_b] \cdot \Phi_b$$

$$F = F_o + [\mathbf{L}_b] \cdot (\Phi_b - \Phi_f)$$

$$[\mathbf{L}_b] = (F - F_o) / (\Phi_b - \Phi_f)$$

F_f, F_b – fluorescence volné,
vázané frakce

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

$[\mathbf{L}_b], [\mathbf{L}_f]$ – koncentrace vázaného,
volného ligandu

$[\mathbf{L}_t]$ – celková koncentrace ligandu

F – celková fluorescence