

MUNI  
SCI

## Princip fluorescence



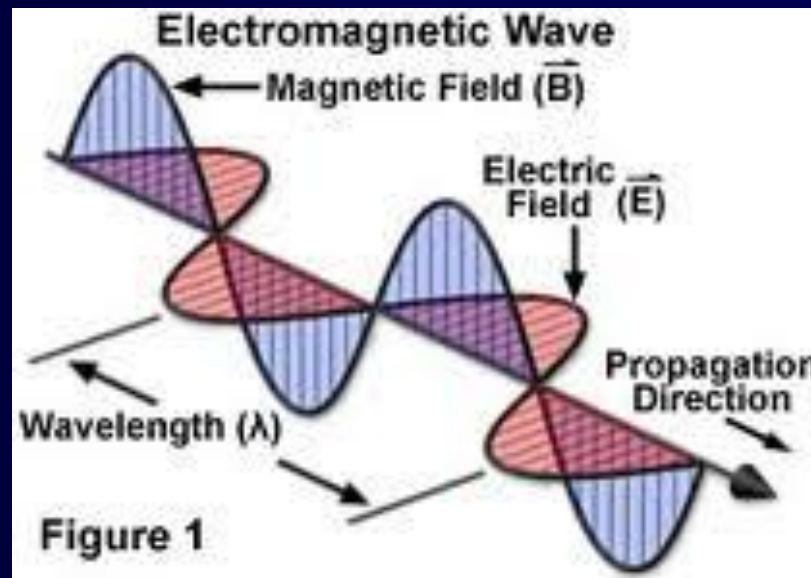
doc. RNDr. Jakub Neradil, Ph.D.  
Ústav experimentální biologie PŘF MU

# Program přednášky:

- světlo
- definice a princip fluorescence
- fluorochromy
  - značky
  - sondy

# „Viditelné“ světlo

- elektromagnetické vlnění o vlnové délce 400 - 700 nm
- elementární částice = **foton** - představuje **kvantum** elektromagnetické energie (světla)
- duální povaha - vlnová i částicová (dle metody studia)



# „Viditelné“ světlo

vlnová délka ( $\lambda$ ) – délka jednoho kmitu (400-700 nm)

frekvence ( $f$ ) – počet kmitů za sekundu ( $4-8 \cdot 10^{14} \text{ s}^{-1}$  [Hz])

platí vztahy:

Vztah mezi vlnovou délkou a frekvencí:

$$c = \lambda * f \quad f = c / \lambda \quad \lambda = c / f$$

rychlost světla -  
konstantní

Energie fotonu:

$$E = h * f \quad E = h * c / \lambda$$

Planckova konstanta  
 $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J*s}$

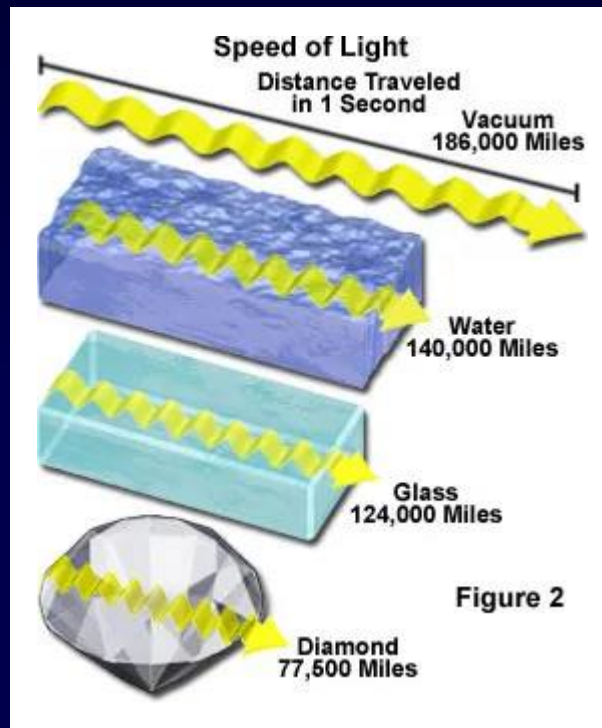
# „Viditelné“ světlo

Rychlost světla (c)

$c = 300.000 \text{ km} \cdot \text{s}^{-1}$   
konstantní ve vakuu

1676 - Ole Rømer  
pozorování měsíce Io  
200 000 km/s

1983 - Generální  
konference  
pro míry a váhy  
definice metru v SI ->  
299 792 458 m/s



km/s

300 000

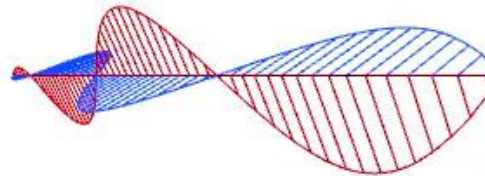
225 000

200 000

125 000

- snížení rychlosti -> zkrácení vl. délky
- frekvence stejná -> barva stejná

## Electromagnetic Radiation



Spectral Color: Infrared

Electric Vector

Magnetic Vector

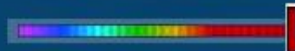
Filled: 48%



Amplitude



Wavelength: 800 nm



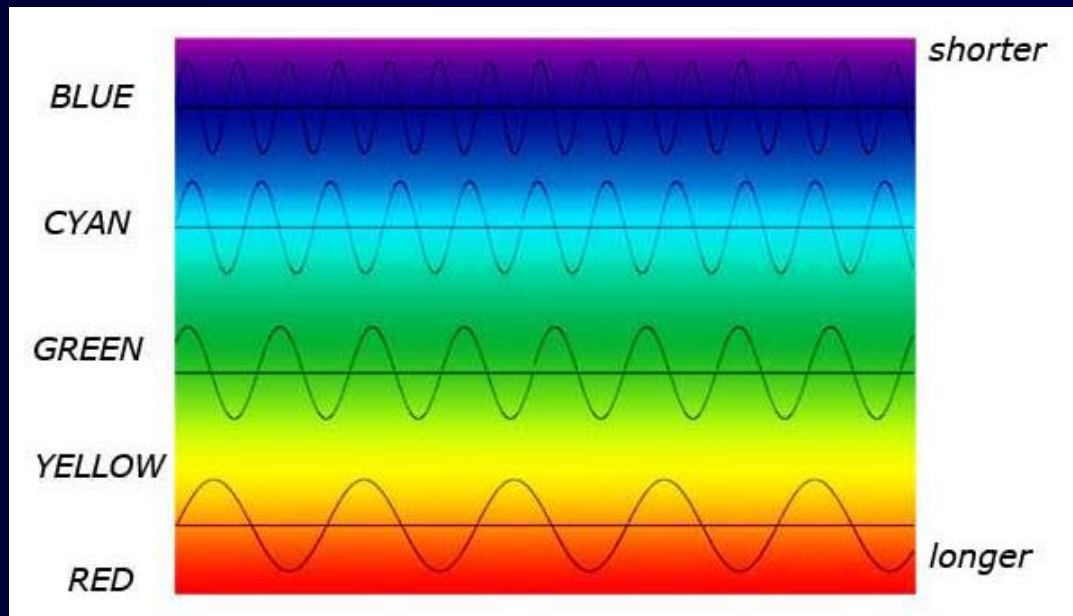
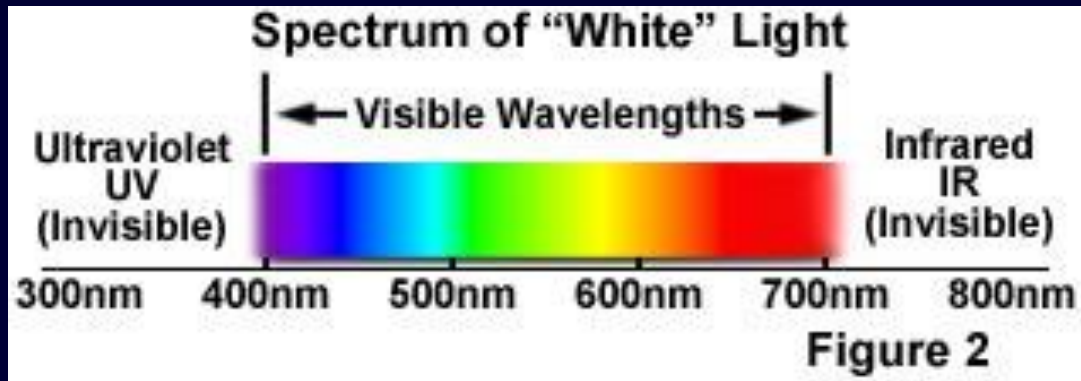
Show Wave Color



vlnová délka → barva  
amplituda → jas

[www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/electromagnetic/](http://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/electromagnetic/)

# vlnová délka ~ barva světla



480 THz  
635 nm

510 THz  
590 nm

540 THz  
560 nm

610 THz  
490 nm

670 THz  
450 nm

750 THz  
400 nm



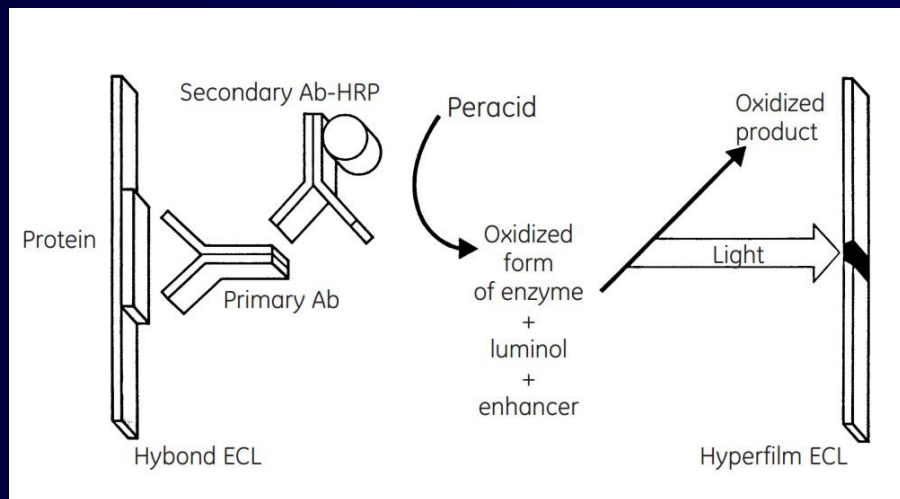
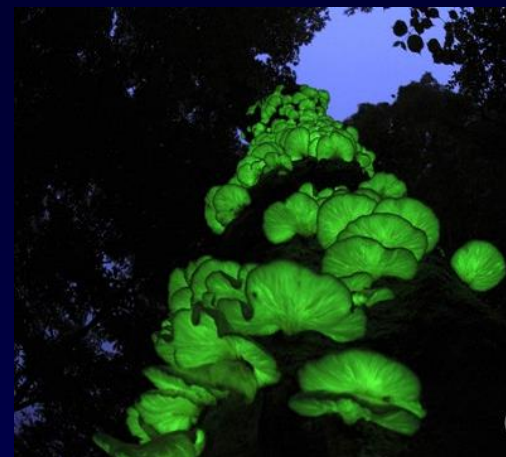


# LUMINISCENCE

jev při kterém vysílá látka do prostoru světlo

dělení dle indukce

**chemiluminiscence** : vyvoláno chemickou reakcí  
např. oxidace luciferinu luciferázou u světlušky,  
tlející dřevo – václavka, ECL detekční činidlo pro western blotting



# Fotoluminiscence

záření je vyvoláno jiným zářením

a) fluorescence

b) fosforescence

**fluorochrom = fluorofor**

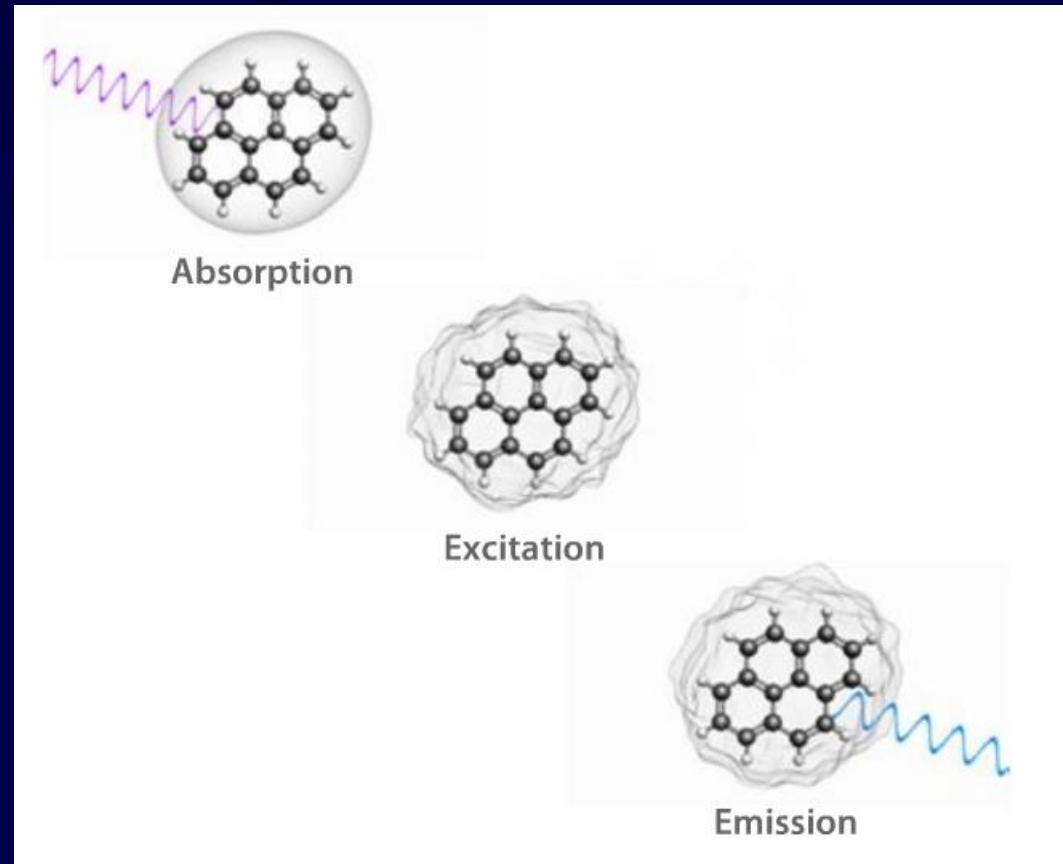
látka schopná fluorescence

**excitační záření**

luminiscenci vyvolává

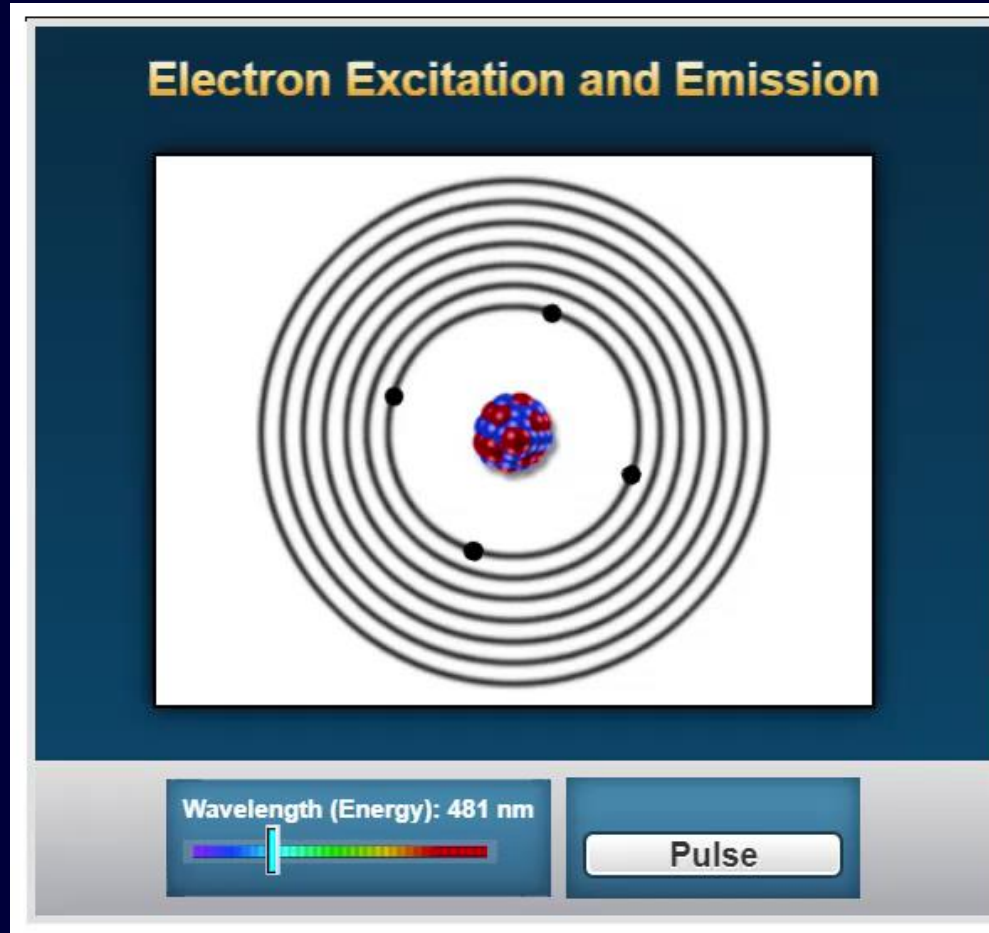
**emisní záření**

vysílané látkou



# Podstata fluorescence

## Excitace a emise



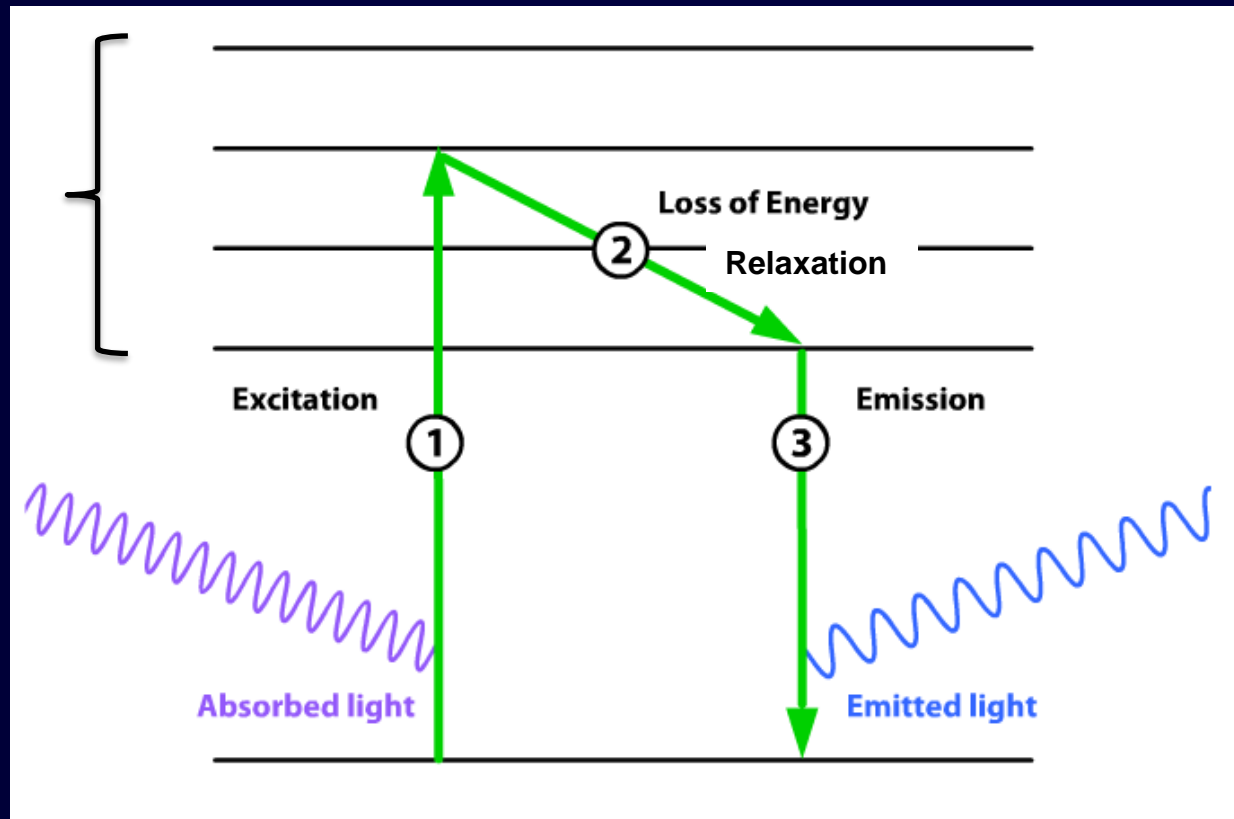
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/fluorescence/exciteemit>

# Podstata fluorescence Jablonskiho diagram

vyšší  
energetické  
hladiny

excitační  
záření

základní  
energetická  
hladina



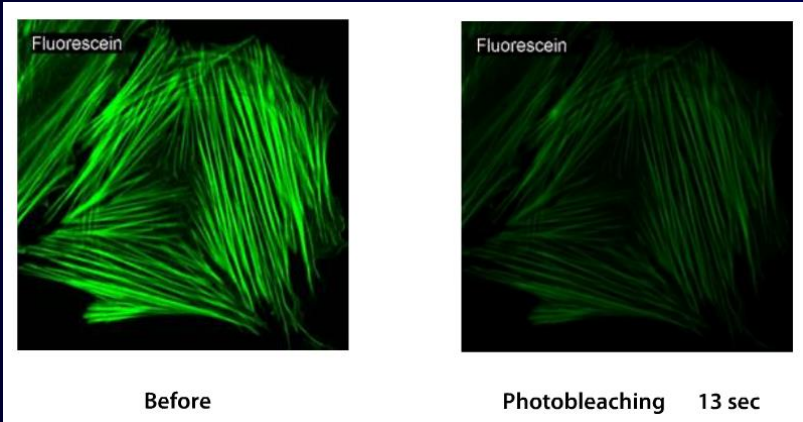
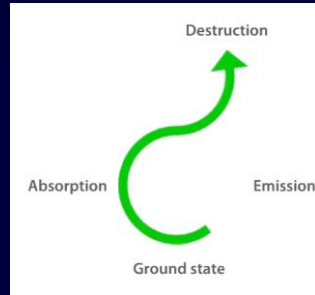
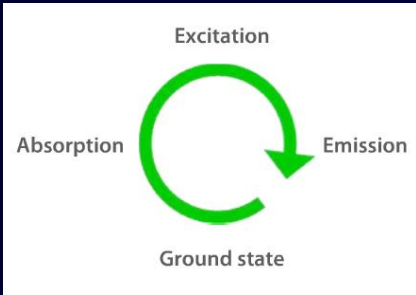
emisní  
záření

# Průběh fluorescence

1. **excitace** elektronů fotony ze základní energetické hladiny do excitovaného stavu  
trvání  $10^{-15}$  s
2. **excitovaný stav**  
pokles na nejnižší hladinu excitace (relaxace)  
ztráta energie ve formě tepla  
trvání  $10^{-14} - 10^{-11}$  s
3. **emise** světla => fluorescence  
trvání  $10^{-7} - 10^{-9}$  s = doba dohasínání

recyklace

photobleaching



### Photobleaching

Unbleached Image

Photobleached Image

**Choose A Specimen:**

Actin Filaments (FITC) ▾

**Time Elapsed: 0 seconds**

Shutter

Pause

**Color Channels:**

Red

Green

Blue

All

Add

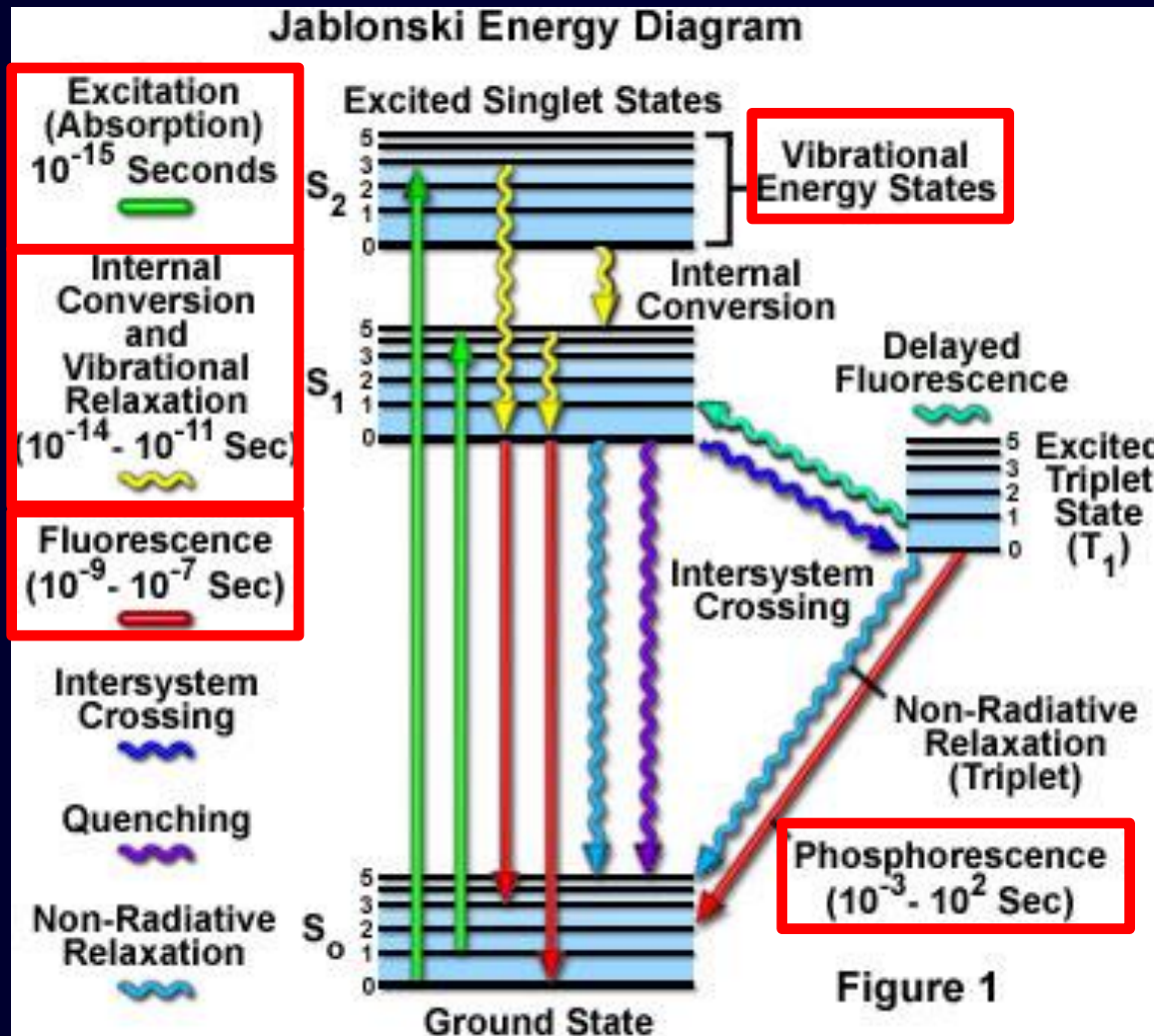
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/fluorescence/photobleaching/>

# Princip fluorescence



<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/fluorescence-basics/fluorescence-fundamentals/light-spectrum-fluorescence.html>

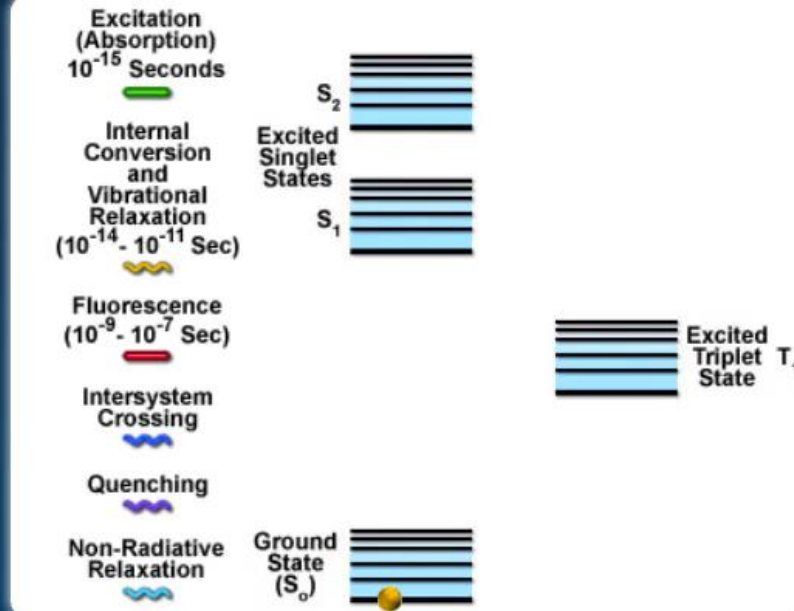
# Podstata fluorescence a fosforescence Jablonského diagram



fosforescence  
doba dohasínání  
 $10^{-3} - 10^2$  s



# Jablonski Energy Diagram



Excitation Wavelength 525 nm



Tutorial Speed



Fluorescence Emission

Start

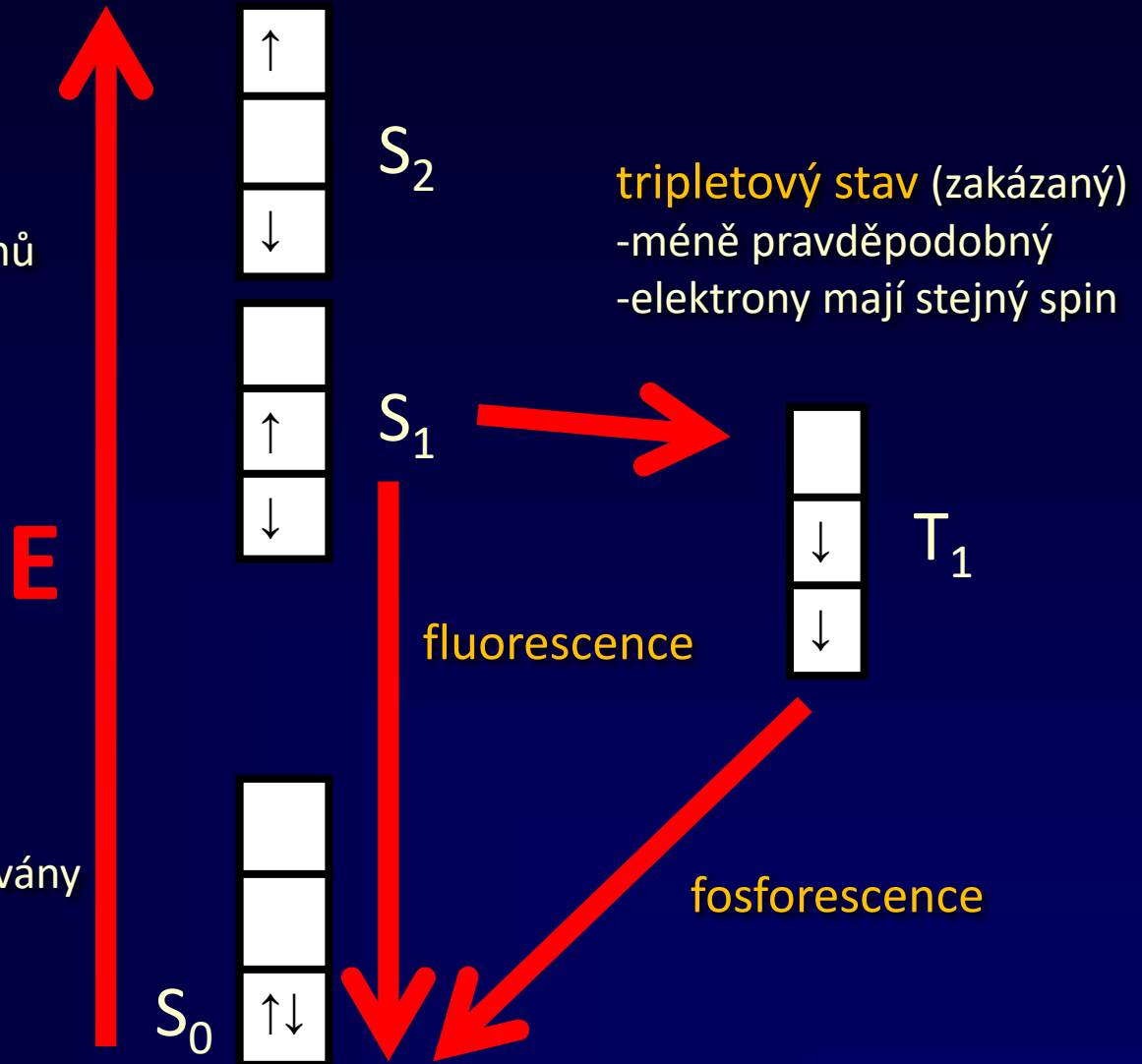
<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/java/jablonski/jabintro/>

### excitovaný singletový stav

- elektrony obsazují vyšší energetické hladiny
- porušuje se párování elektronů na jednotlivých hladinách
- spin se při excitaci nemění

### základní singletový stav

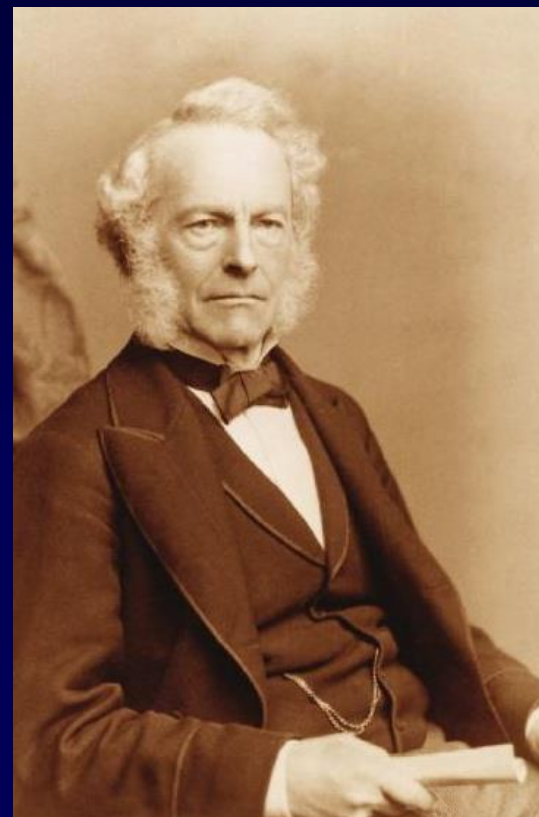
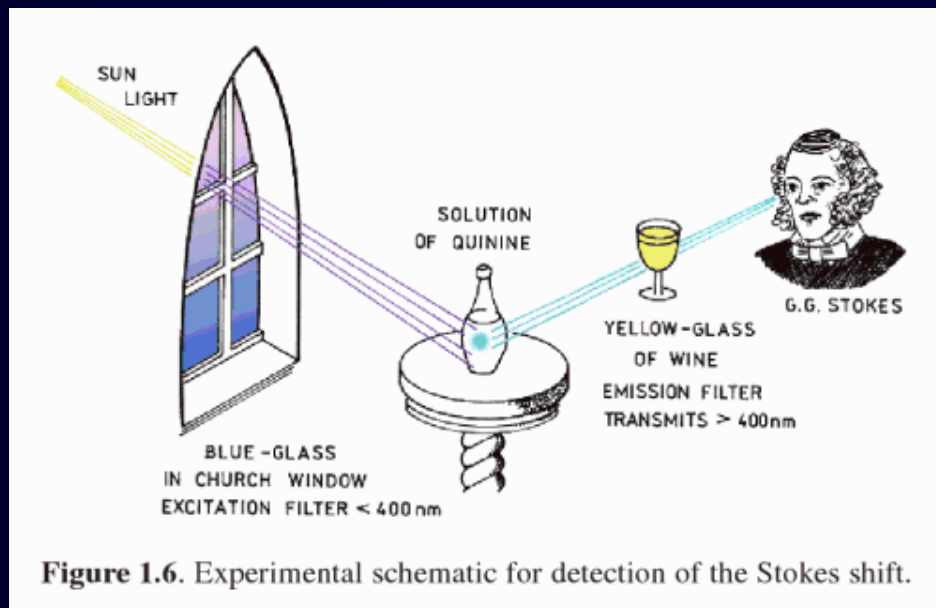
- všechny elektrony jsou spárovány
- mají opačný spin
- velikost  $+1/2, -1/2$



**Spin** je kvantová vlastnost elementárních částic - vnitřní moment hybnosti částice. Spiny částic přispívají k celkovému momentu hybnosti soustavy.

# Stokesův posun

- Vlnová délka excitujícího světla je menší než emitovaného ( $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ )
- Energie excitujícího světla je větší než emitovaného ( $E_{ex} > E_{em}$ )
- V rámci relaxace v excitovaných stavech dochází ke ztrátě energie



Sir G.G. Stokes



*On the Change of Refrangibility of Light. By G. G. Stokes, M.A., F.R.S., Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the University of Cambridge. Phil. Trans. Royal Society of London (1852) pp. 463-562. Received May 11, — Read May 27, 1852.*

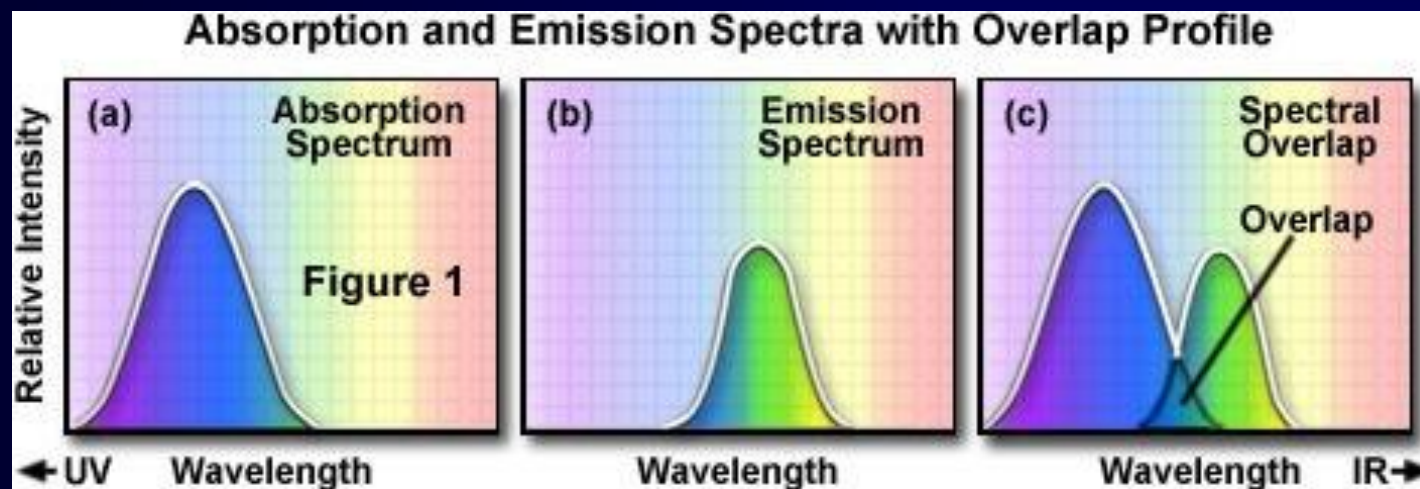
# Vlastnosti fluorochromů - absorbční a emisní spektrum

- Absorbční (excitační) spektrum

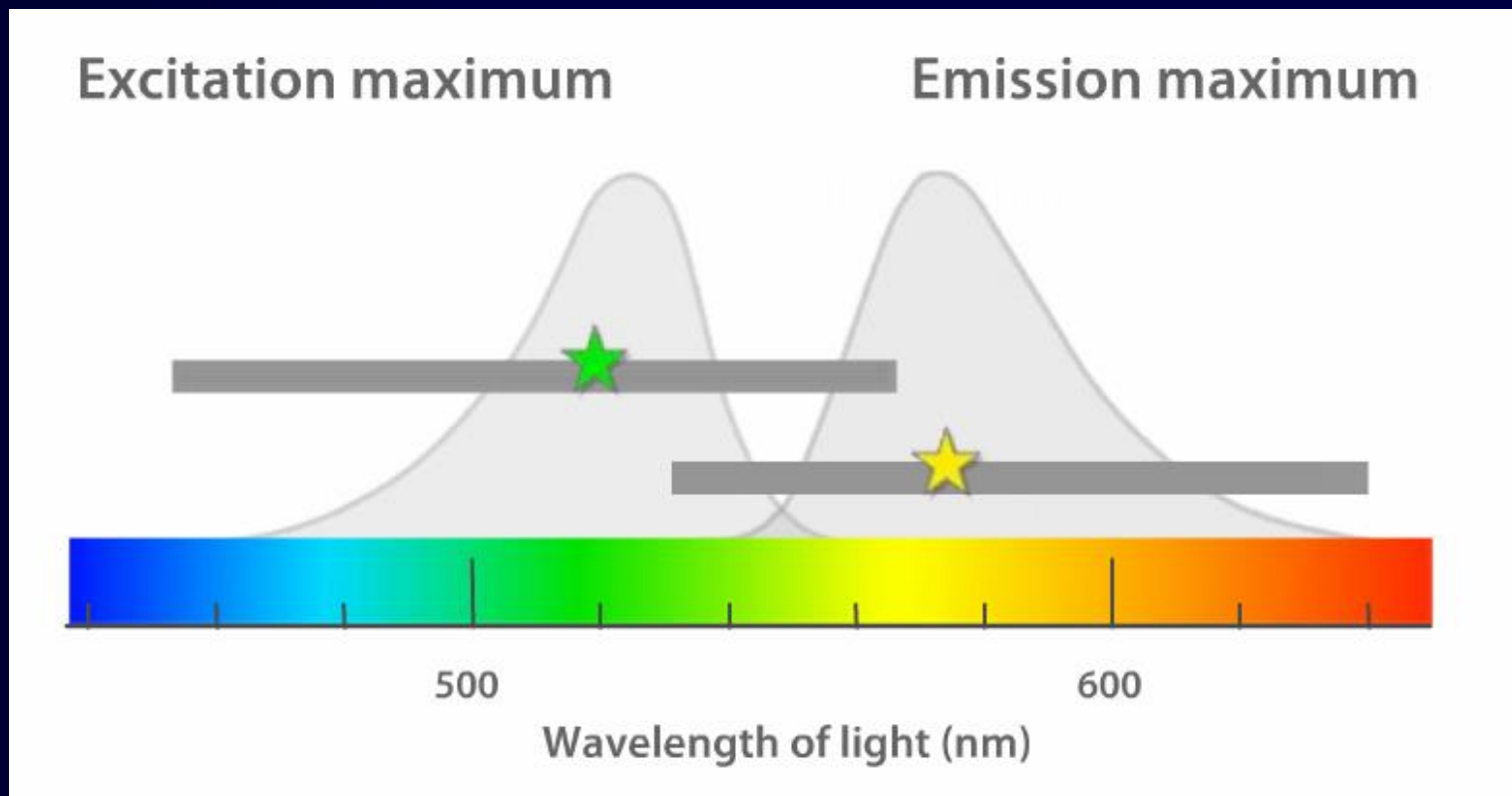
závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce (měřeno při konstantní emisní vlnové délce)

- Emisní spektrum

závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitace

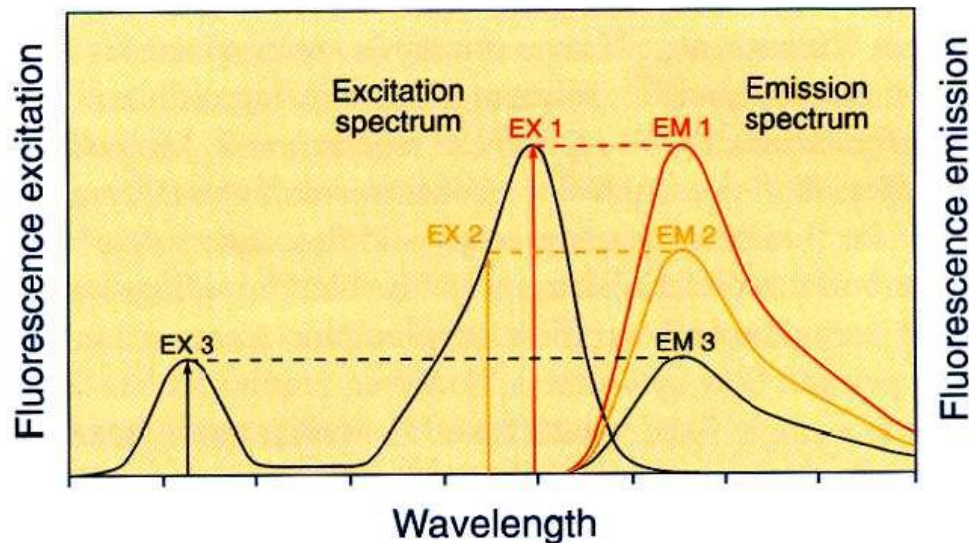


- obě spektra mají své maxima
- excitační maximum
- emisní maximum
- vzdálenost mezi nimi – Stokesův posun

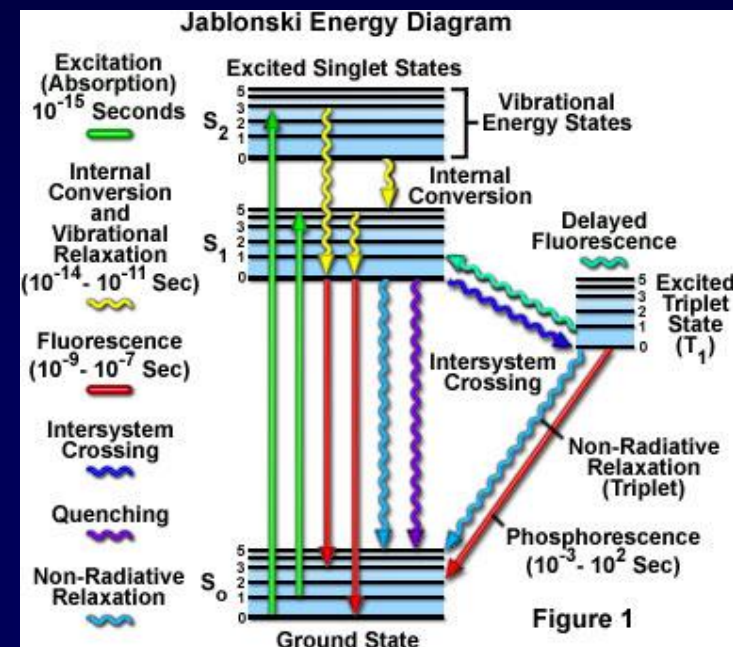


## Emisní spektrum určitého fluorochromu

- je nezávislé na vlnové délce excitace
- emise z nejnižšího excitovaného stavu ( $S_1$ )
- mění se pouze intenzita fluorescence
- intenzita emisního spektra odpovídá amplitudě excitace

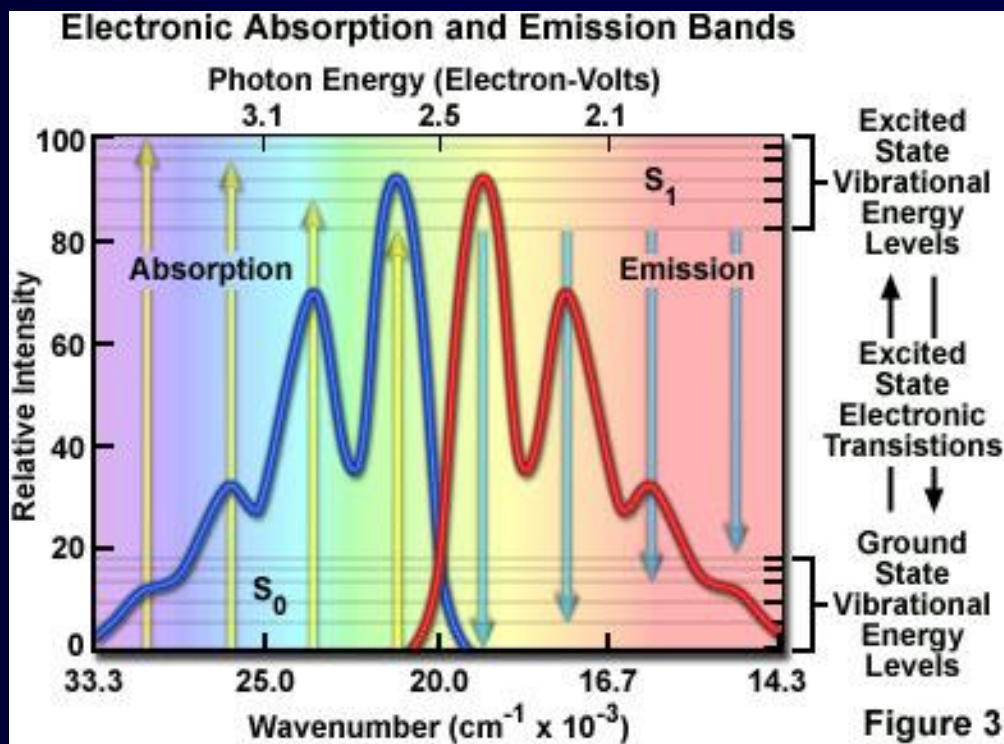


*Figure 2. Excitation of a fluorophore at three different wavelengths (EX 1, EX 2, EX 3) does not change the emission profile but does produce variations in fluorescence emission intensity (EM 1, EM 2, EM 3) that correspond to the amplitude of the excitation spectrum.*

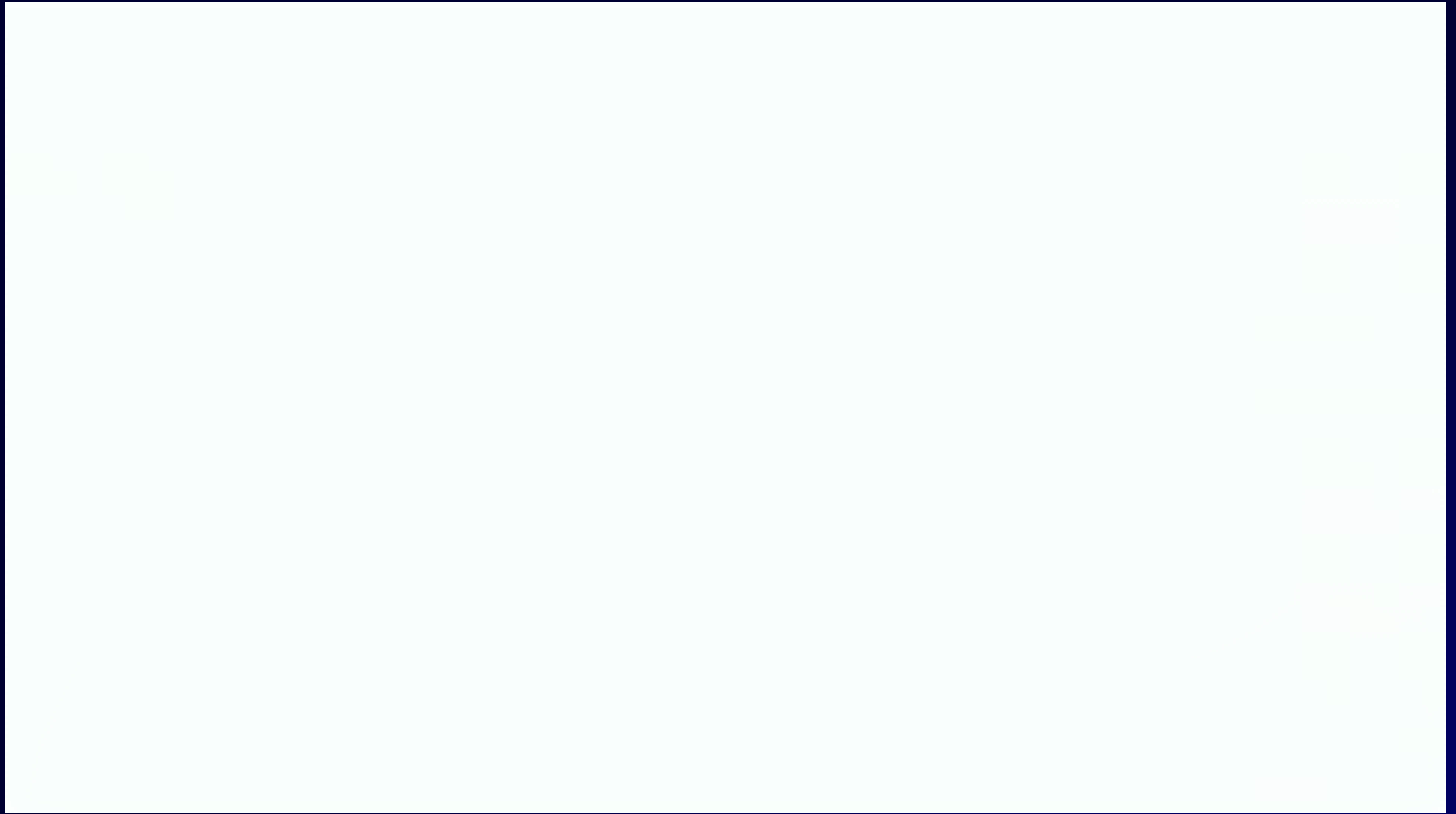


# Symetrie mezi absorpčním a emisním spektrem

- struktura vibračních hladin základního i excitovaných stavů je stejná
- absorpce (excitace) a emise do odpovídajících hladin nastává se stejnou pravděpodobností
- absorpční a emisní spektra zrcadlově symetrická



# Excitační a emisní spektrum



<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/fundamentals-of-fluorescence-microscopy/Using-filters-to-capture-your-signal.html>

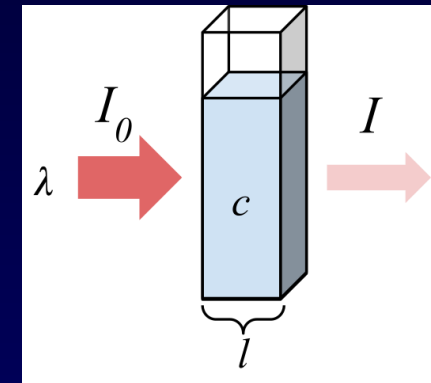


# Vlastnosti fluorochromů - Molární extinkční koeficient (molární absorptivita)

- vyjadřuje míru schopnosti látky absorbovat světlo

## Lambert-Beerův zákon

$$A = -\log I / I_0 = \log I_0 / I = \varepsilon \cdot c \cdot l$$



- $A$  – absorbance (bez jednotek)
- $I / I_0$  – transmittance ( $T$ , propustnost)
- $\varepsilon$  – molární extinkční koeficient ( $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
- $c$  – molární koncentrace ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )
- $l$  – dráha (cm)

## Vlastnosti fluorochromů - Kvantový výtěžek fluorescence (Quantum Yield = QY)

$$QY = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

- vyjadřuje míru schopnosti excitačního vlnění vyvolat fluorescenci
- maximálně = 1 (teoreticky; energetické ztráty)

# Standards pro určení kvantového výtěžku fluorescence

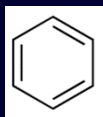
Quantum Yield [Q.Y.] Standards	Q.Y. [%]	Conditions for Q.Y. Measurement	Excitation [nm]
Cy3	4	PBS	540
Cy5	27	PBS	620
Cresyl Violet	53	Methanol	580
Fluorescein	95	0.1 M NaOH, 22°C	496
POPOP	97	Cyclohexane	300
Quinine Sulfate	58	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 22°C	350
Rhodamine 101	100	Ethanol	450
Rhodamine 6G	95	Water	488
Rhodamine B	31	Water	514
Tryptophan	13	Water, 20°C	280
L-Tyrosine	14	Water	275

## fluorochrom = fluorofor

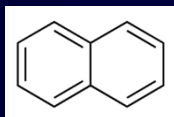
### látka schopná fluorescence

- často obsahuje polycyklické nenasycené sloučeniny a atomy (s více elektrony – např. P, S)
- čím více benzenových jader, tím více roste absorpční maximum

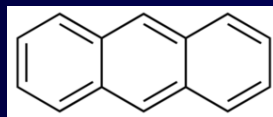
benzen  
262 nm



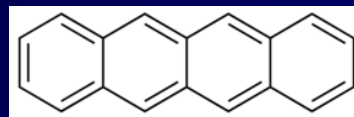
naftalen  
272 nm



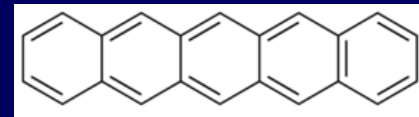
antracen  
375nm



tetracen  
475nm



pentacen  
580nm



# Fluorescence látek a skupiny fluoroforů

## Vlastní (vnitřní) fluorescence látek

Přirozeně se vyskytující fluorofory/fluorochromy  
aminokyseliny, kofaktory enzymů, chlorofyl, „přírodní“ fluorescenční proteiny (green fluorescent protein,...)

## Nevlastní (vnější) fluorescence látek

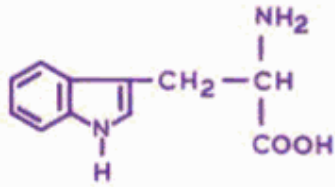
- **Přímá vazba fluorochromu na molekuly nebo buněčné struktury**
- použití **sondy**  
-> označení DNA, buněčné stěny, plazmatické membrány, organel...  
-> detekce mitochondriální aktivity - respiračního vzplanutí, koncentrace  $H^+$  (pH indikátory), membránový potenciál..

- **Nepřímá vazba fluorochromu**

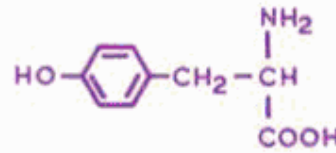
- použití **značky**

navázání na imunoglobulin (protilátku) nebo úsek nukleové kyseliny, phalloidin, annexin V... -> následné označení buněčné struktury

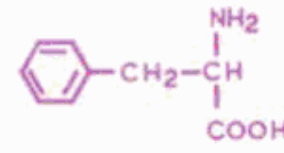
# Přirozeně se vyskytující fluorofory - aminokyseliny



Tryptophan



Tyrosine



Phenylalanine

hlavní zdroj fluorescence proteinů v UV spektru

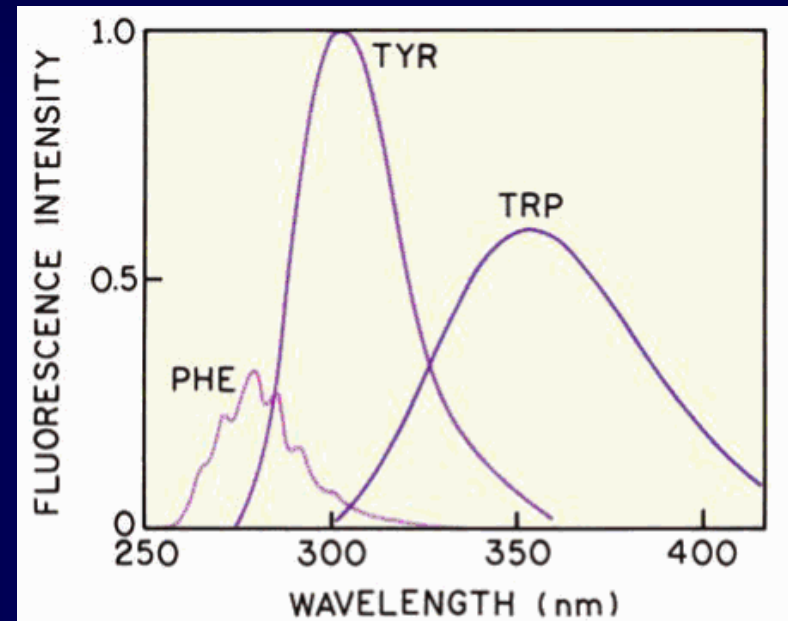
-indolová skupina Trp

Trp v sekvencích jen 1%

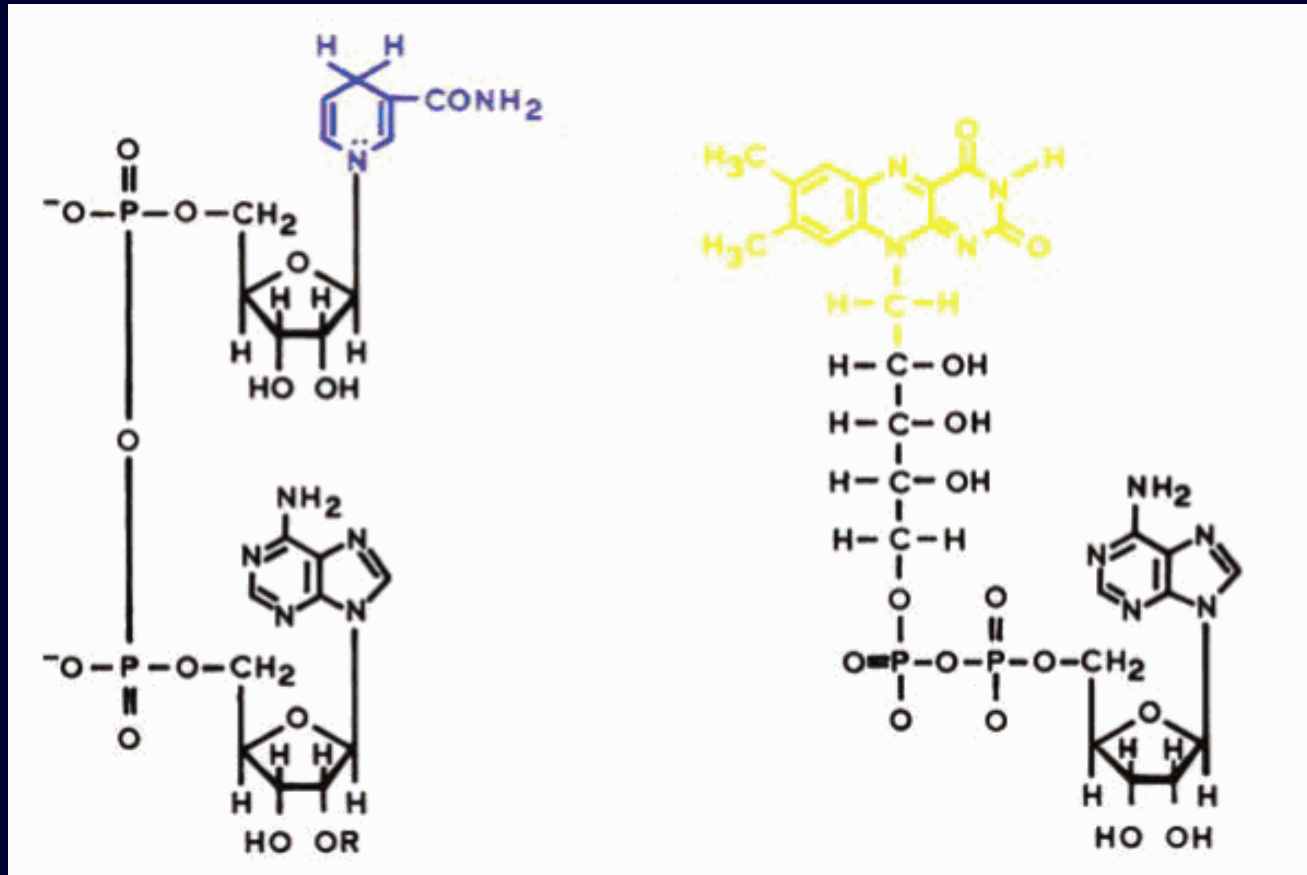
metabolicky náročná syntéza

Table 2: fluorescent properties of some amino acids

amino acid	Lifetime (Nanoseconds)	Excitation		Emission	
		Wavelength	Molar absorptivity	Wavelength	Quantum yield
Tryptophan	2.6	280	5,600	348	0.20
Tyrosine	3.6	274	1,400	303	0.14
Phenylalanine	6.4	257	200	282	0.04



# Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

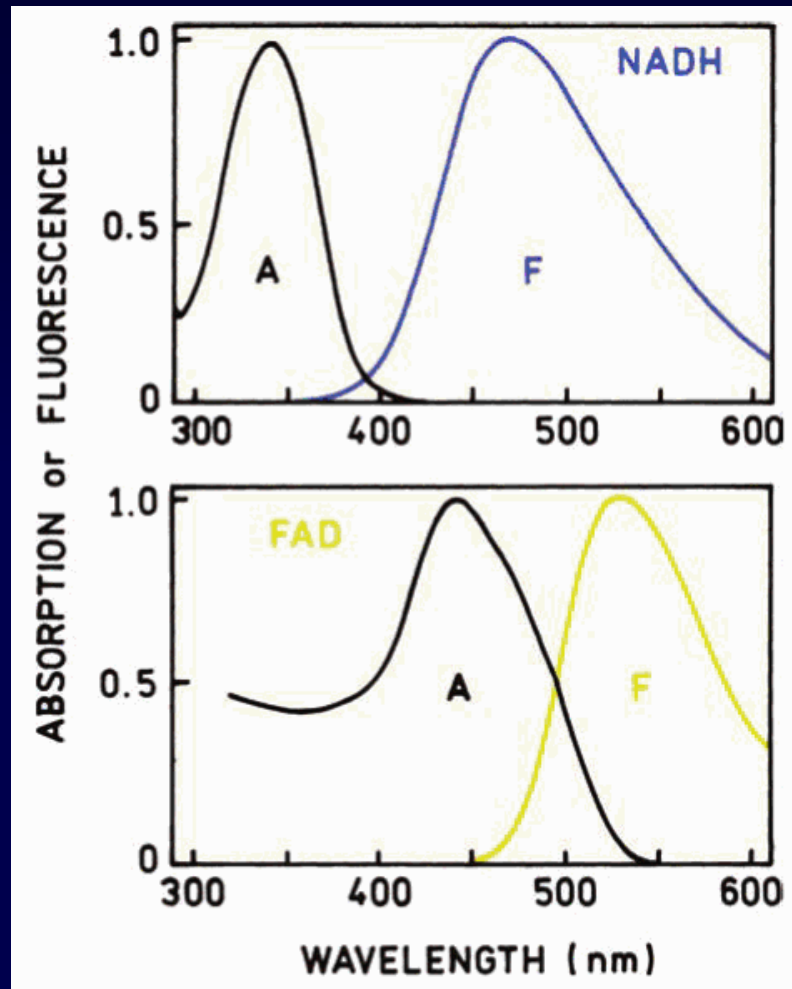
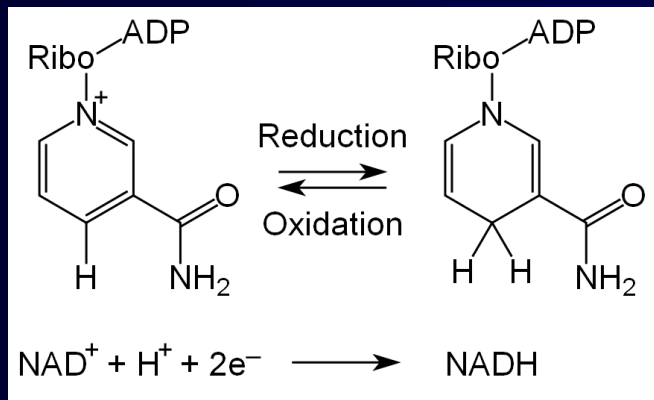


Nikotinamid adenin  
dinukleotid (NADH)

Flavin adenin  
dinukleotid (FAD)

# Přirozeně se vyskytující fluorofory - kofaktory

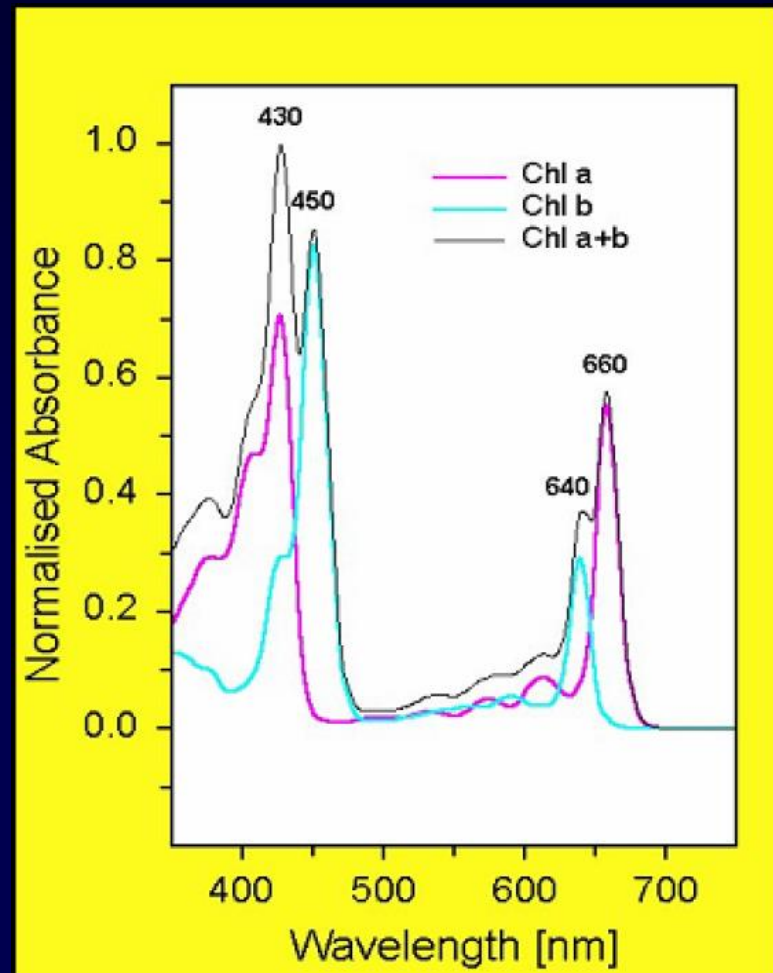
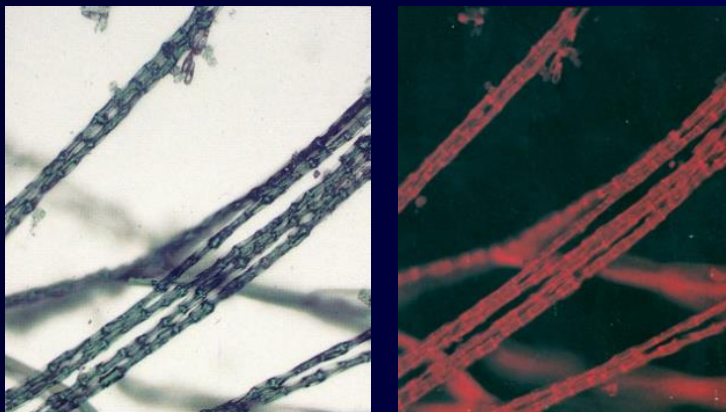
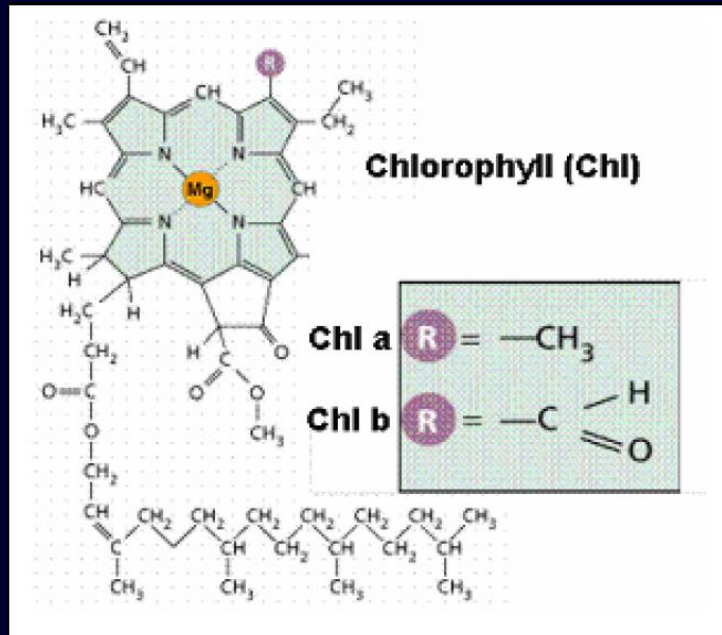
- $\text{NAD}^+$  není fluorescenční
- fluorochrom = redukovaný nikotinamidový ring





# Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

- porfyrinové jádro + Mg

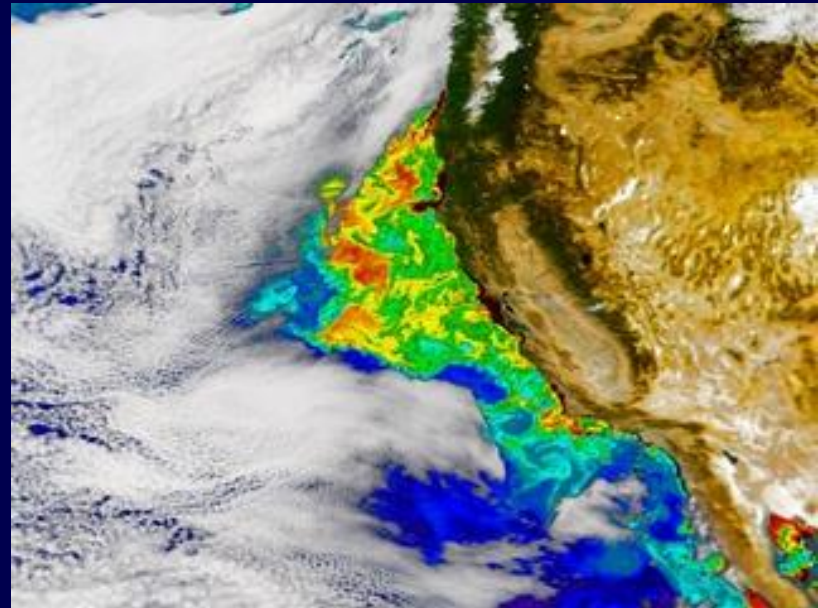
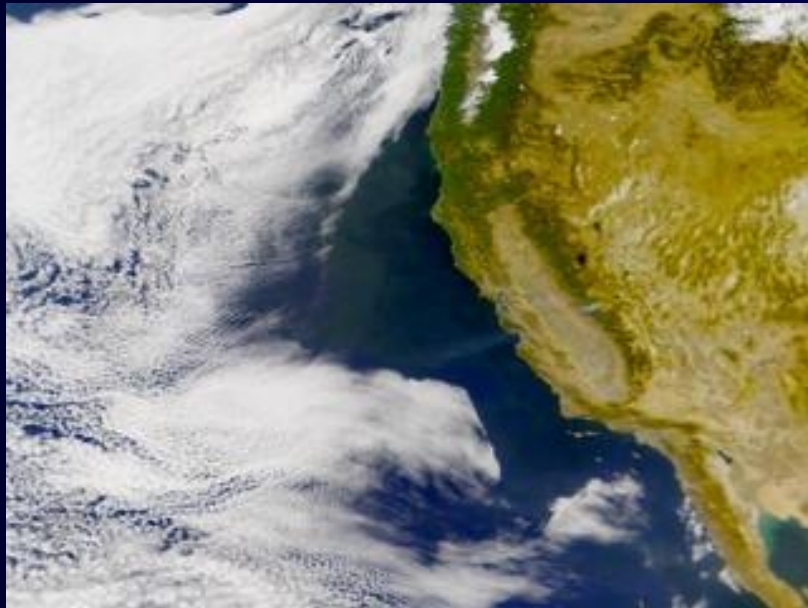
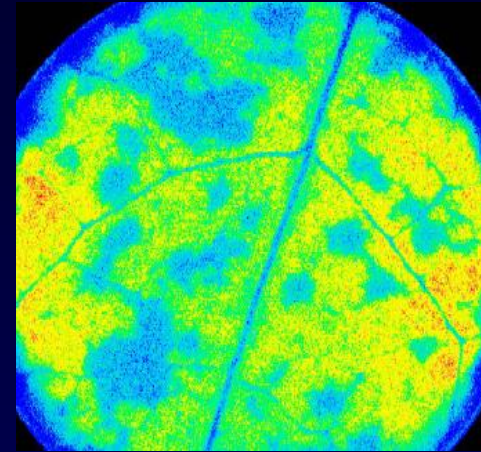


Stokesův posun až 200nm

# Přirozeně se vyskytující fluorofory – chlorofyl

využití:

- hodnocení výskytu fytoplanktonu ve vodě
- studium fotosyntézy
- fyziologický stav rostlin – stres (pokles fl.)



## Nevlastní (vnější) fluorescence

Nepřímá vazba fluorochromu – ZNAČKY

značky jsou vázány k molekulám (proteiny, peptidy, oligonukleotidy..) **kovalentní vazbou**

**proteiny** – vazba na aminové ( $\text{NH}_2$ -), thiolové (SH-) skupiny nebo histidinové řetězce

**požadavky**

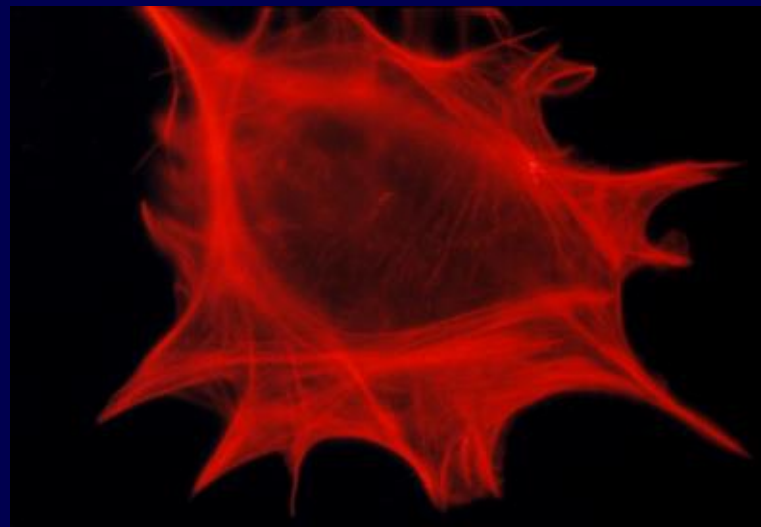
- vysoká intenzita fluorescence
- stabilita při ozařování
- minimální vliv na biologické vlastnosti vzorku

# Rhodaminy

- historicky nejpoužívanější fluorescenční značky
- převážně na protilátky
- ve formě derivátů
- vysoký kvantový výtěžek 0,3-0,8
- photobleaching

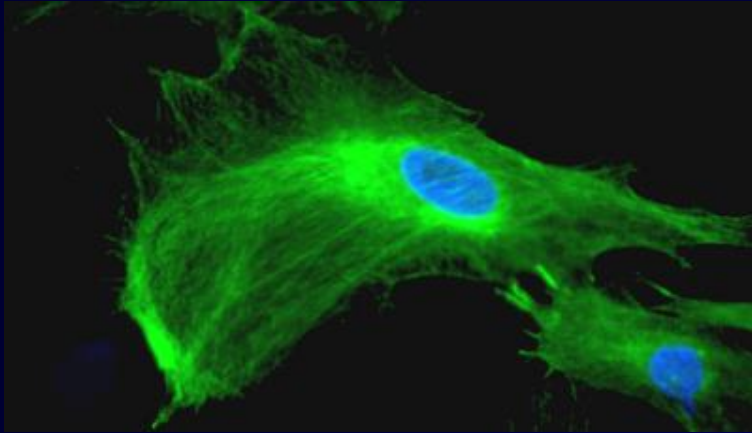
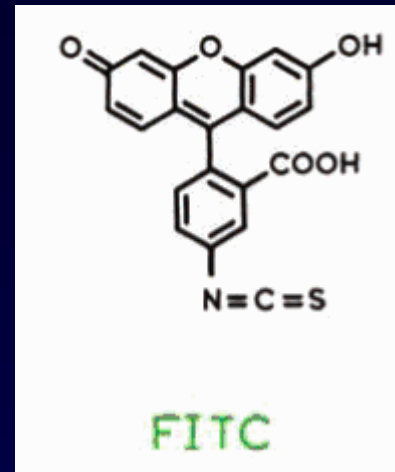
## tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC)

ex. – 541nm, em. – 572nm



# Fluorescein isothiocyanate (FITC)

ex. - 495 nm, em. - 521 nm



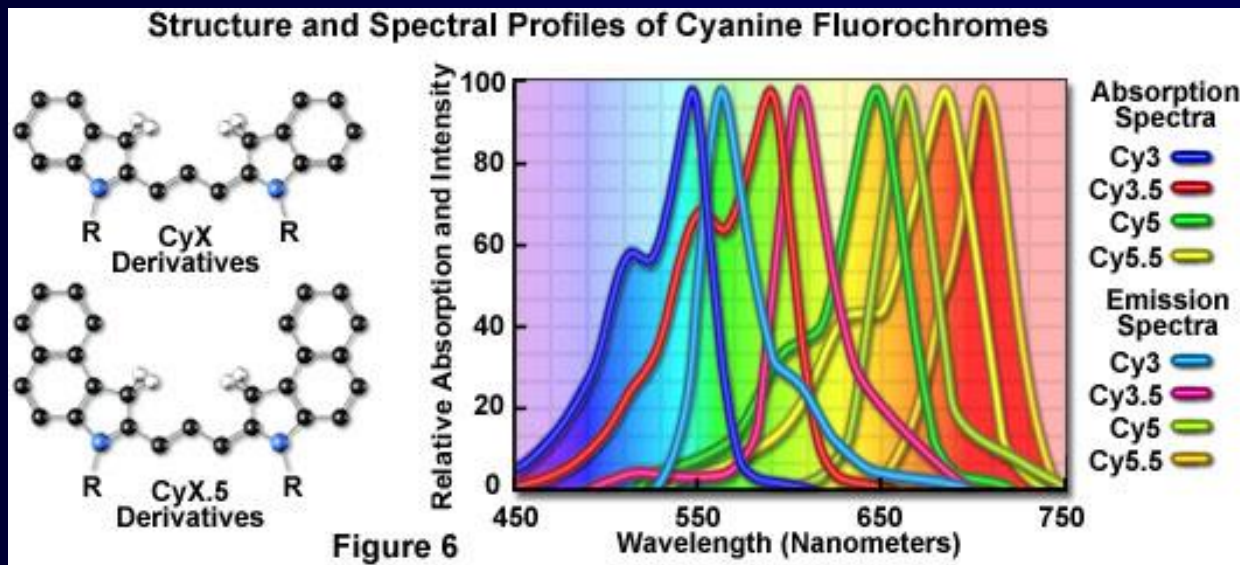
Chicago river - St. Patrick's Day - **fluorescein**



Bečva - zkoumání toku - **fluorescein**

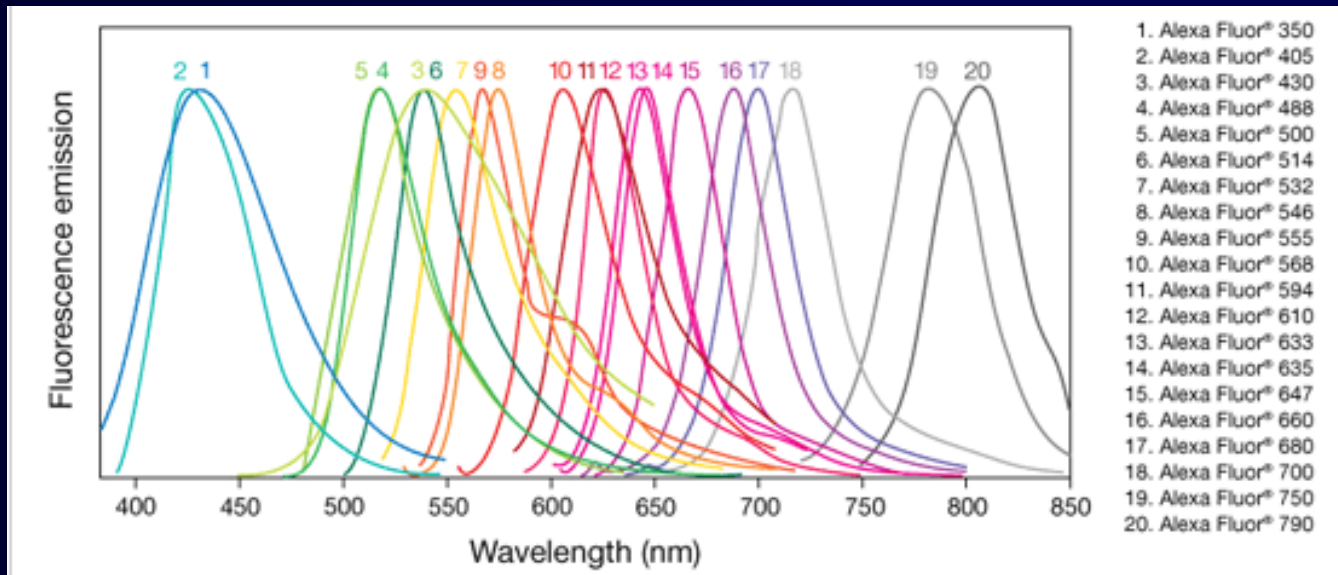
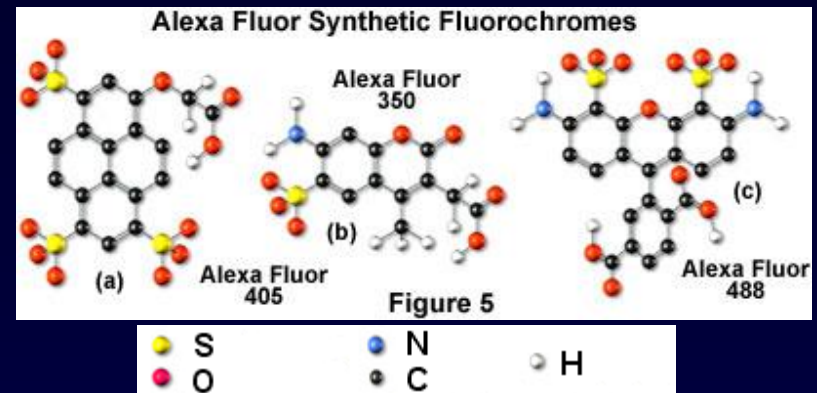
# Cy značky (Cyanine dyes)

- zástupci Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7
- částečně nasycené heterocykly + další aromatická jádra
- ex. a em. spektra podobná klasickým fluoroforům
- kratší Stokesův posun (~30nm)
- fotostabilní
- vyšší kvantový výtěžek



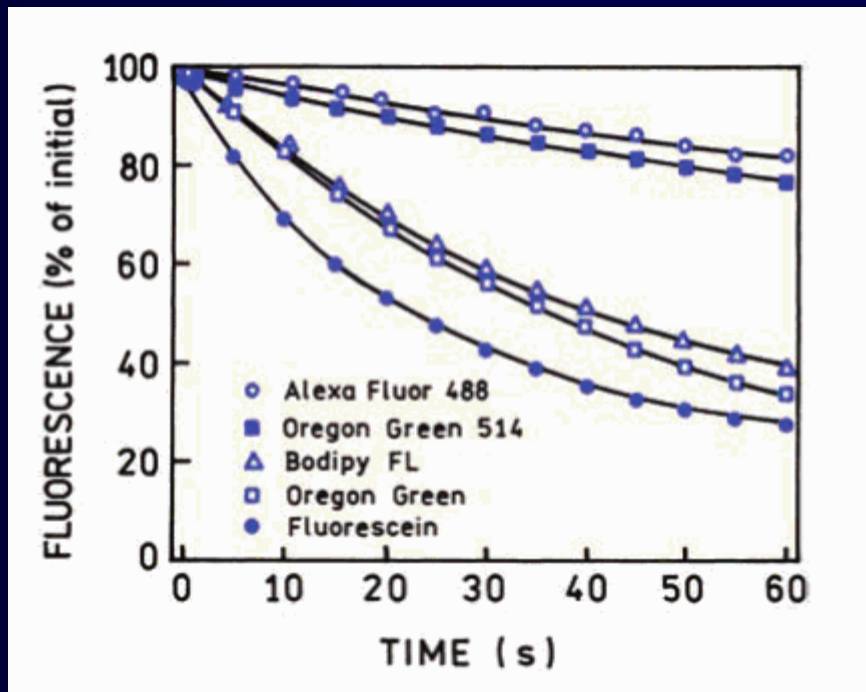
# Alexa Fluor Dyes (Molecular Probes)

- sulfonovaný derivát rhodaminu
- vyšší kvantový výtěžek ~ svítivost
- zesílená fotostabilita (↓ photobleaching)
- pH stabilita
- dlouhodobě stabilní
- využití – živé buňky, tkáňové řezy, fixované preparáty
- velký výběr rozsahu ex. a em. maxim
- od UV po near-infrared oblast
- označení podle vlnové délky zdroje excitačního záření



## Fotostabilita fluorochromů

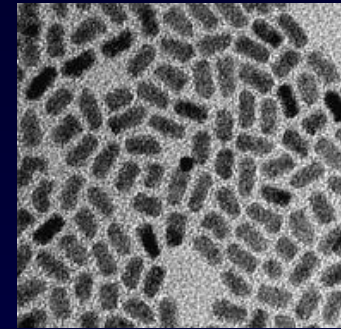
- každý fluorofor podléhá vysvícení v průběhu souvislého osvětlení
- ve FM silná intenzita dopadajícího záření
- nejstabilnější – značky Alexa Fluor
- není znám princip předpovědi stability dle struktury





# Quantum dots

- fluorofory (značky) = po absorpci fotonů emitují světlo o větší vlnové délce
- anorganické nanokrystaly
- velikost 10-20nm (GFP 4,2 x 2,4 nm)



složení:

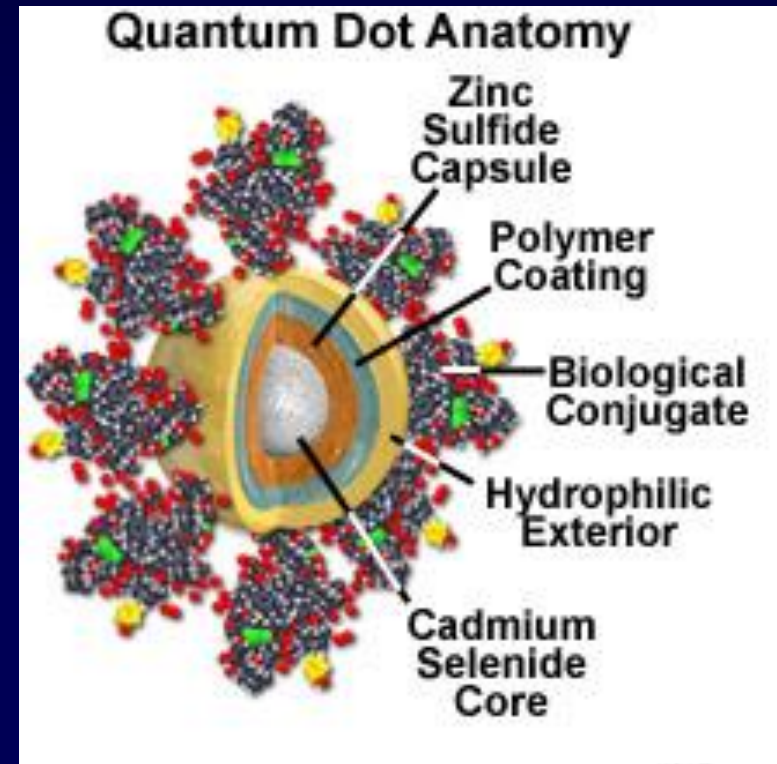
**jádro:** několik 100x-1000x molekul

polovodičového materiálu (Cd, Se, Te)

**obal:** polovodič (ZnS), stabilizuje jádro, zlepšuje optické a fyzikální vlastnosti

**plášť:** amfifilní polymer, umožňuje vazbu dalších molekul

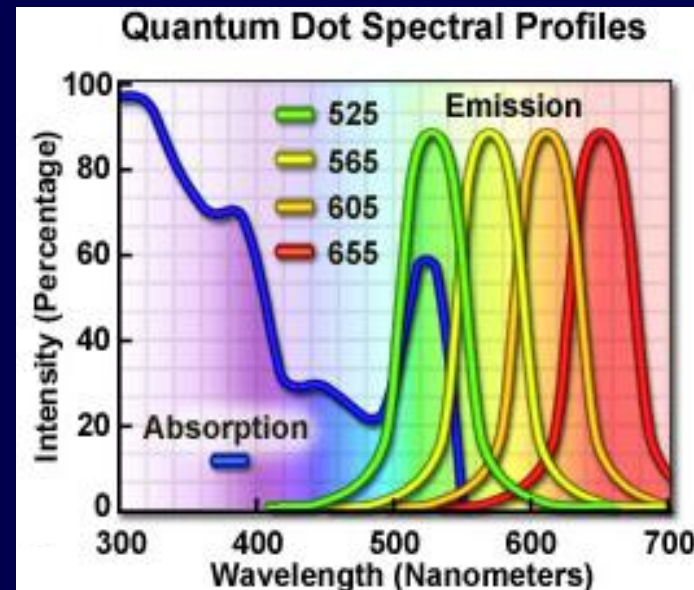
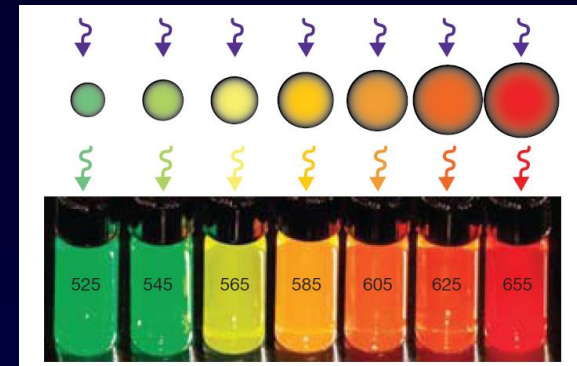
**vnější plášť:** polyethylene glycol (PEG) – snižuje nespecifickou vazbu



# Quantum dots

## Vlastnosti:

- vlnová délka emise závisí na velikosti částice
- umožňují vícebarevnou detekci jedním excitačním zdrojem
- možnost konjugace s primárními i sekundárními protilátkami nebo streptavidinem
- více molekul IgG na jednu částici
- vyšší jas než klasické fluorofory
- násobně vyšší stabilita
- velký Stokesův shift



# Quantum dots

- vazba na protilátku – srovnání s „klasickým“ konjugátem

