

Přístrojové vybavení pro detekci absorpce a fluorescence

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

FGP

4.10.2007

Opakování barevných principů fluorescence

<http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/1Introduction/player.html>

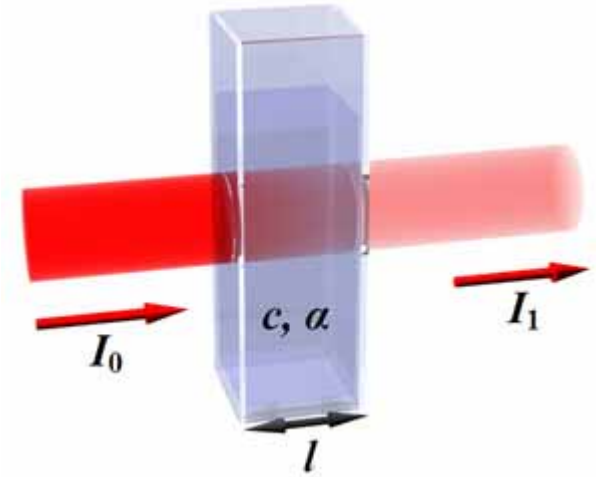
Absorpce

- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla
- **Lambert-Beerův zákon:**

Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

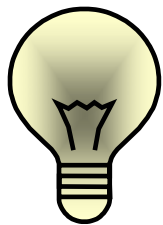
ε =molární extinční koeficient látky, c -koncentrace, l -délka optické dráhy



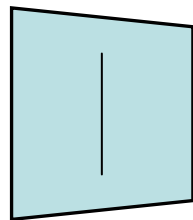
SpektroFOTOmetr

- Příklad pro měření absorpce světla vzorkem
Absorbance je měřena při různých vlnových délkách

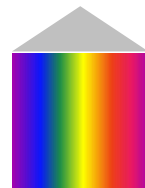
Výsledkem je absorpční spektrum látky



zdroj



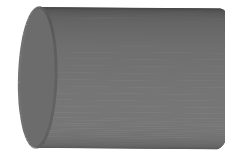
štěrbina



výběr vlnové délky



vzorek



detektor

Zdroje záření a jejich použití

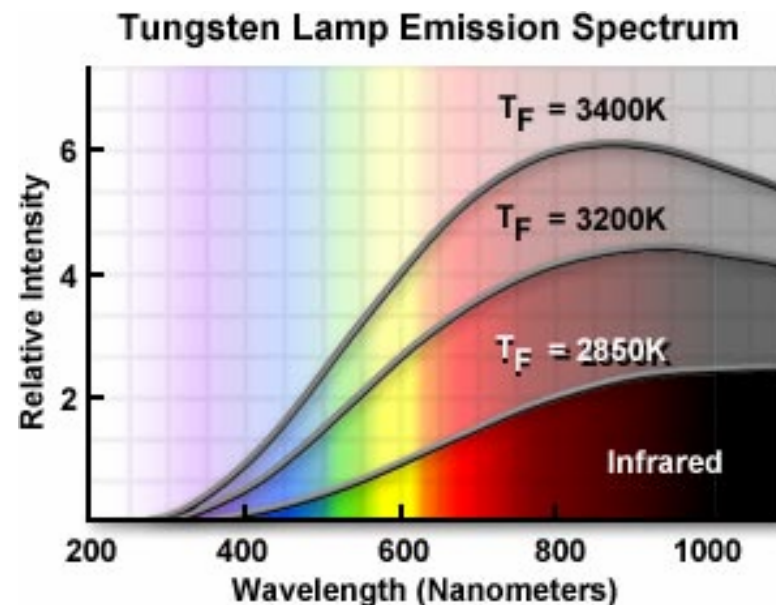
- Wolframová žárovka (měření absorpce ve viditelném spektru)
- Deuteriová lampa (měření absorpce v UV spektru)
- Xenonová výbojka (zdroj pro časově ustálenou fluorescenci)

Pulzní zdroje pro časově proměnnou fluorescenci:

- Laser
- LD a LED diody

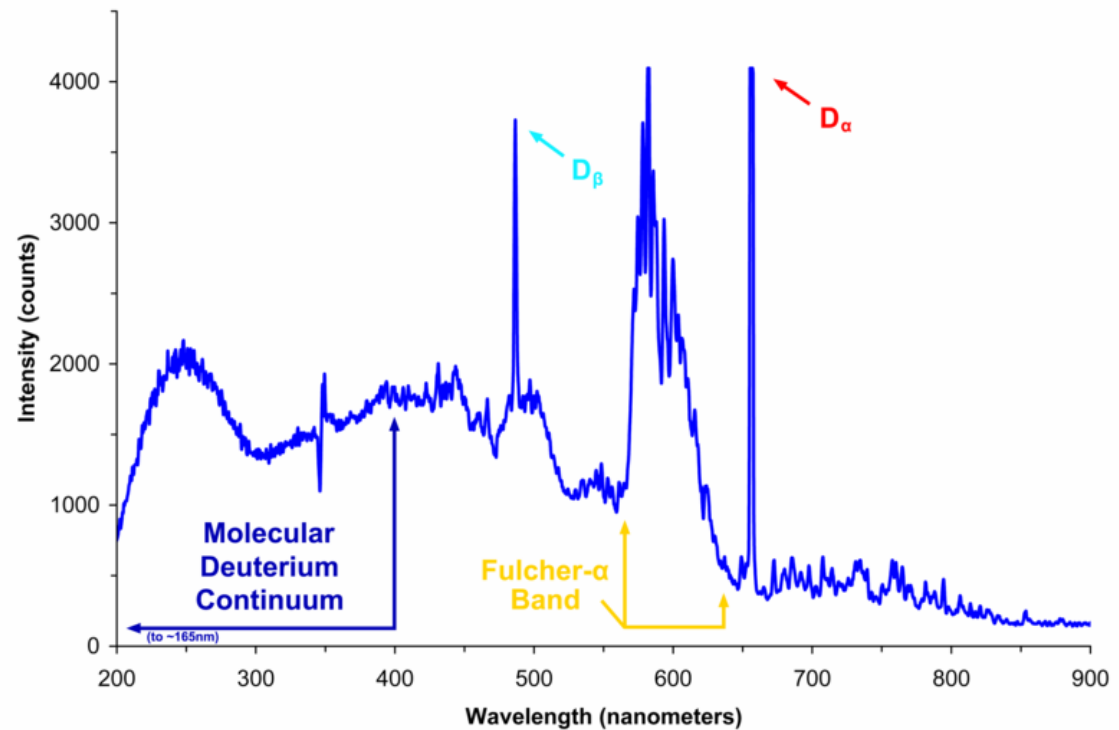
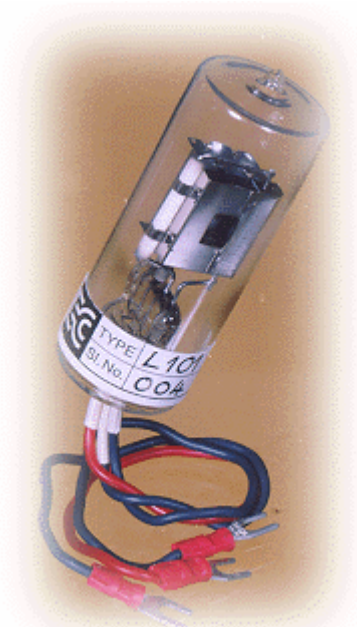
Wolframová žárovka - viditelné spektrum

Skleněná baňka naplněná inertním plynem. Uvnitř je wolframové vlákno, které je zahříváno stejnosměrným proudem. Produkuje velké množství tepla. Pouze 5-10 % energie se uvolňuje ve formě světla.



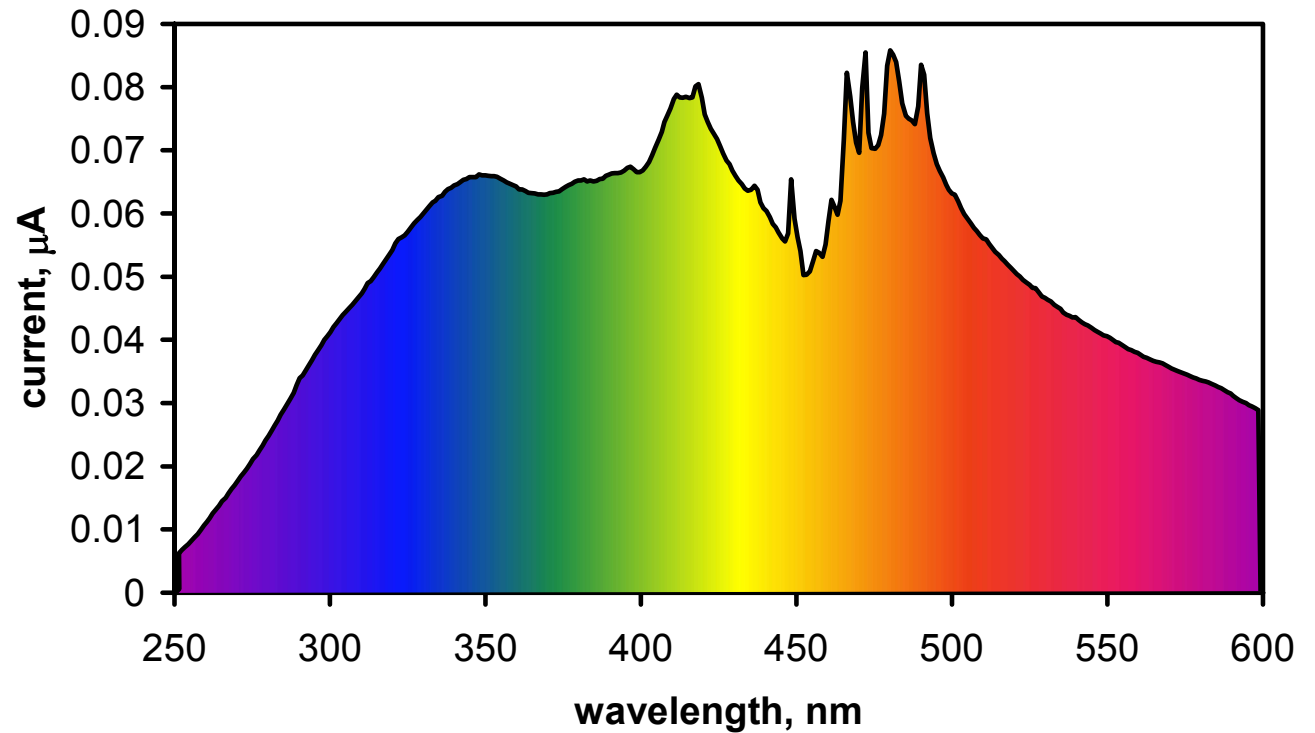
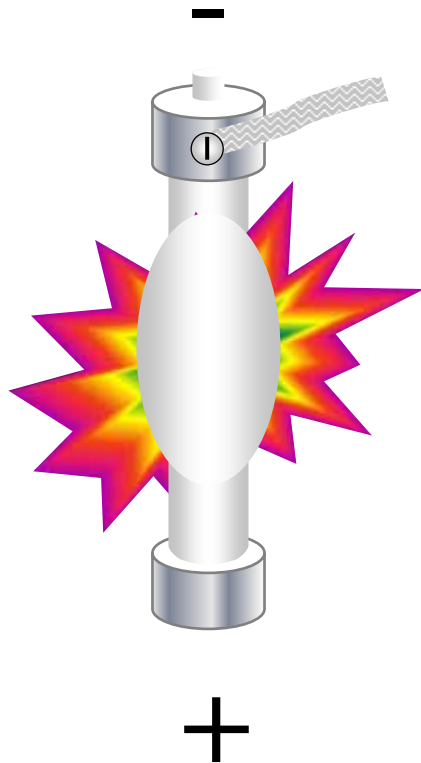
Deuteriová lampa

- Nízkotlaký zdroj vhodný zejména pro UV oblast záření (160-400 nm)



Xenonová výbojka

Xenon Arc Lamp (XB0), relativně hladké spektrum
220nm – 1000nm



Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

LASER Princip

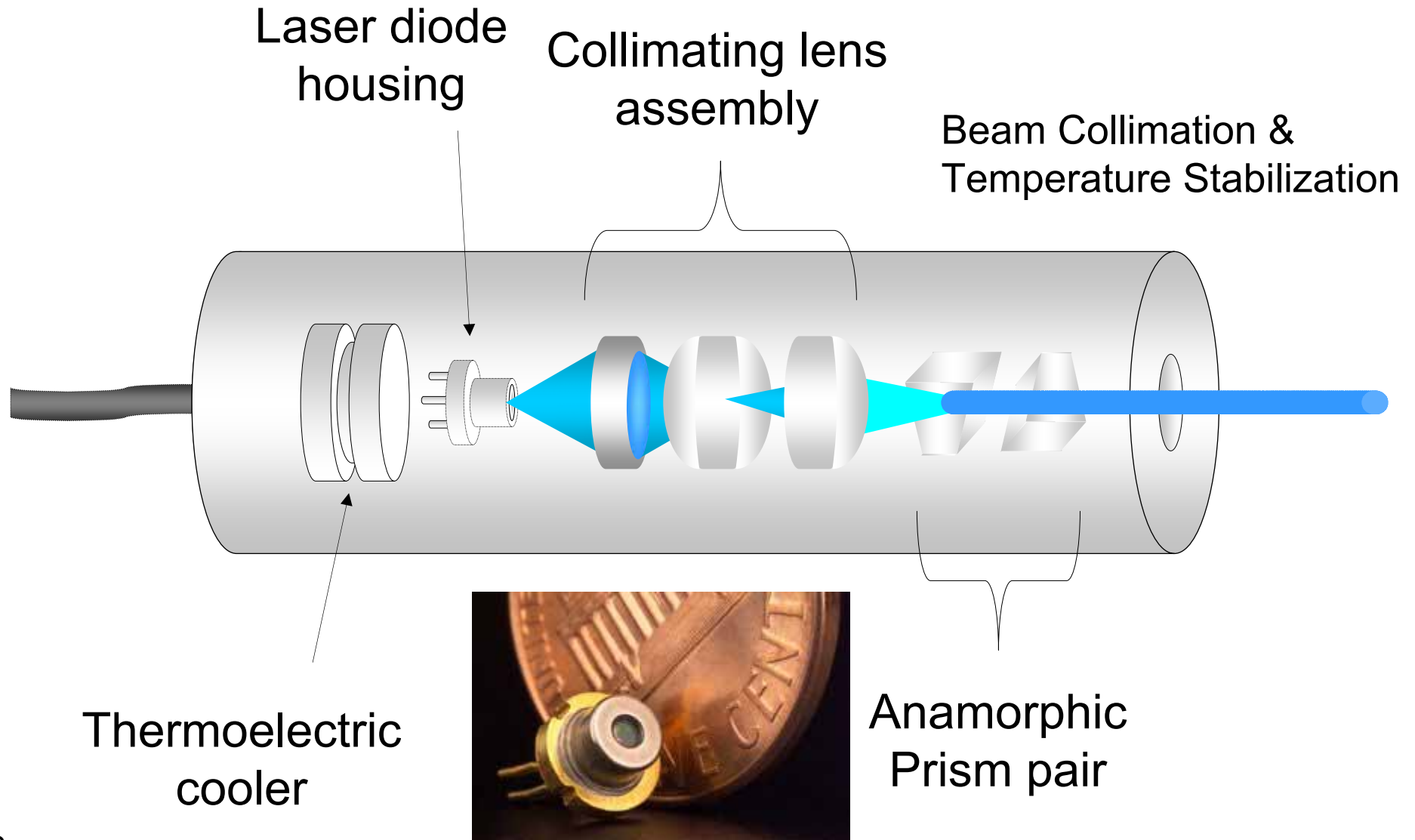
z anglického *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, tj. 'zesilování světla pomocí stimulované emise záření'

- Většina molekul látky musí být v excitovaném stavu
- Po absorpci světla dojde ke stimulaci molekuly a ta vyzáří dva fotony
- Fotony následně způsobí emisi dvojnásobného množství fotonů
- Všechny fotony mají stejnou energii, i vlnovou délku a emitované světlo má stejnou barvu – je monochromatické a je také koherentní



- Látce je neustále dodávána energie, aby byly molekuly neustále excitovány
- Fotony se odrážejí uvnitř prostoru mezi dvěma zrcadly
- Fotony v pulzech procházejí částečně propustným zrcadlem
- Vzdálenost pulzů je dána velikostí prostoru mezi zrcadly a rychlostí cyklu
- Spektrum je čarové - pouze jedna vlnová délka

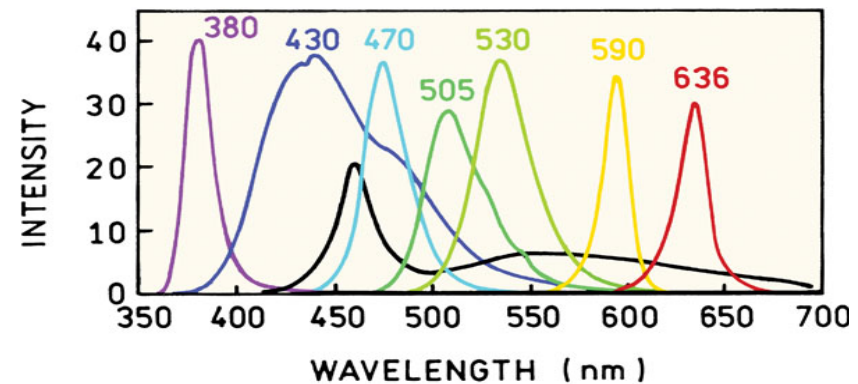
LD - Laser Diode



LED

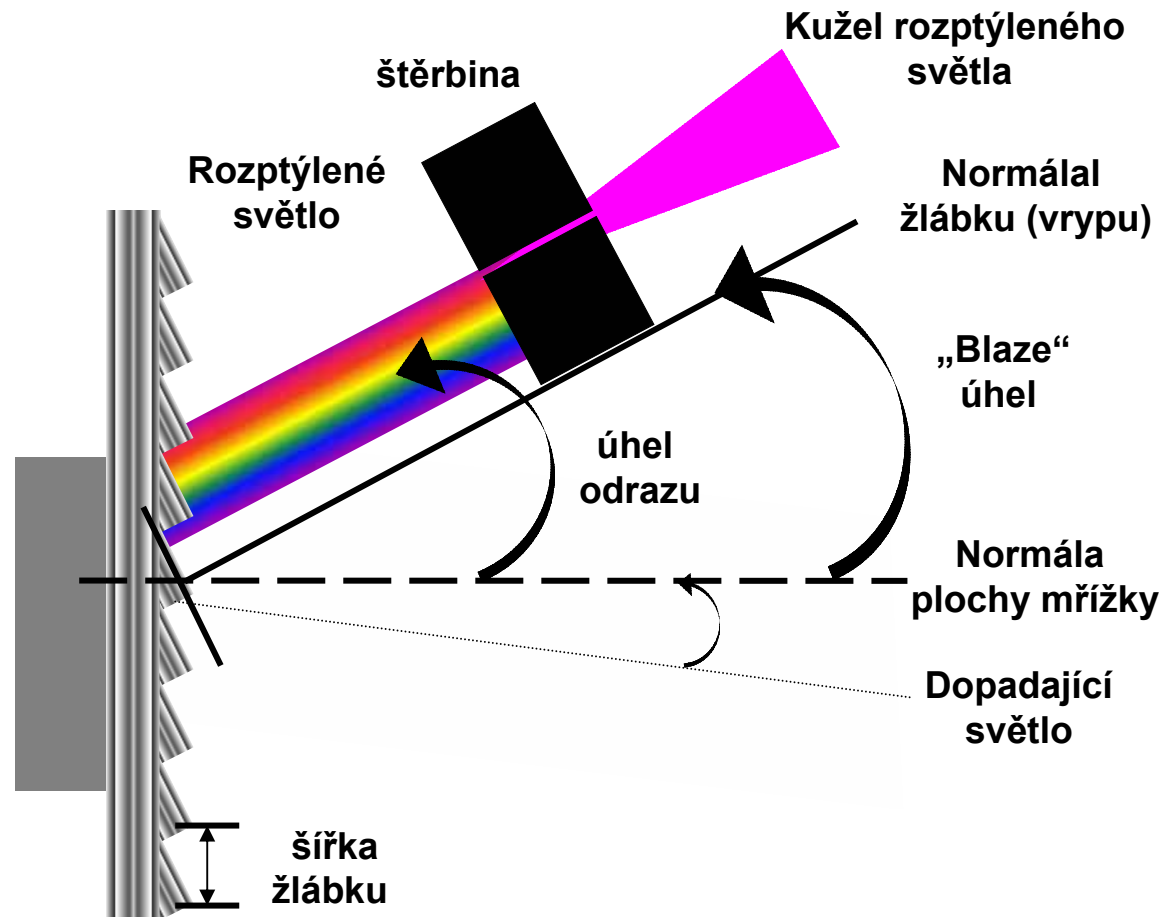
Light Emitting Diode

- nízký příkon
- vysoká účinnost
- úzký spektrální rozsah

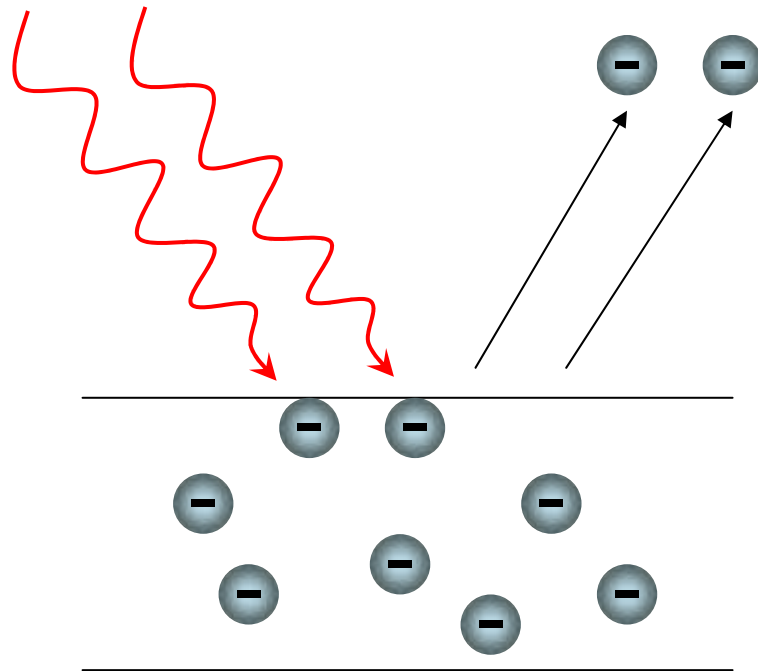


Monochromátor

Využívá rozptylu světla a vybírá ze spektra vlnovou délku nebo jejich rozsah



Fotoelektrický jev



$$hf = W + E_k$$

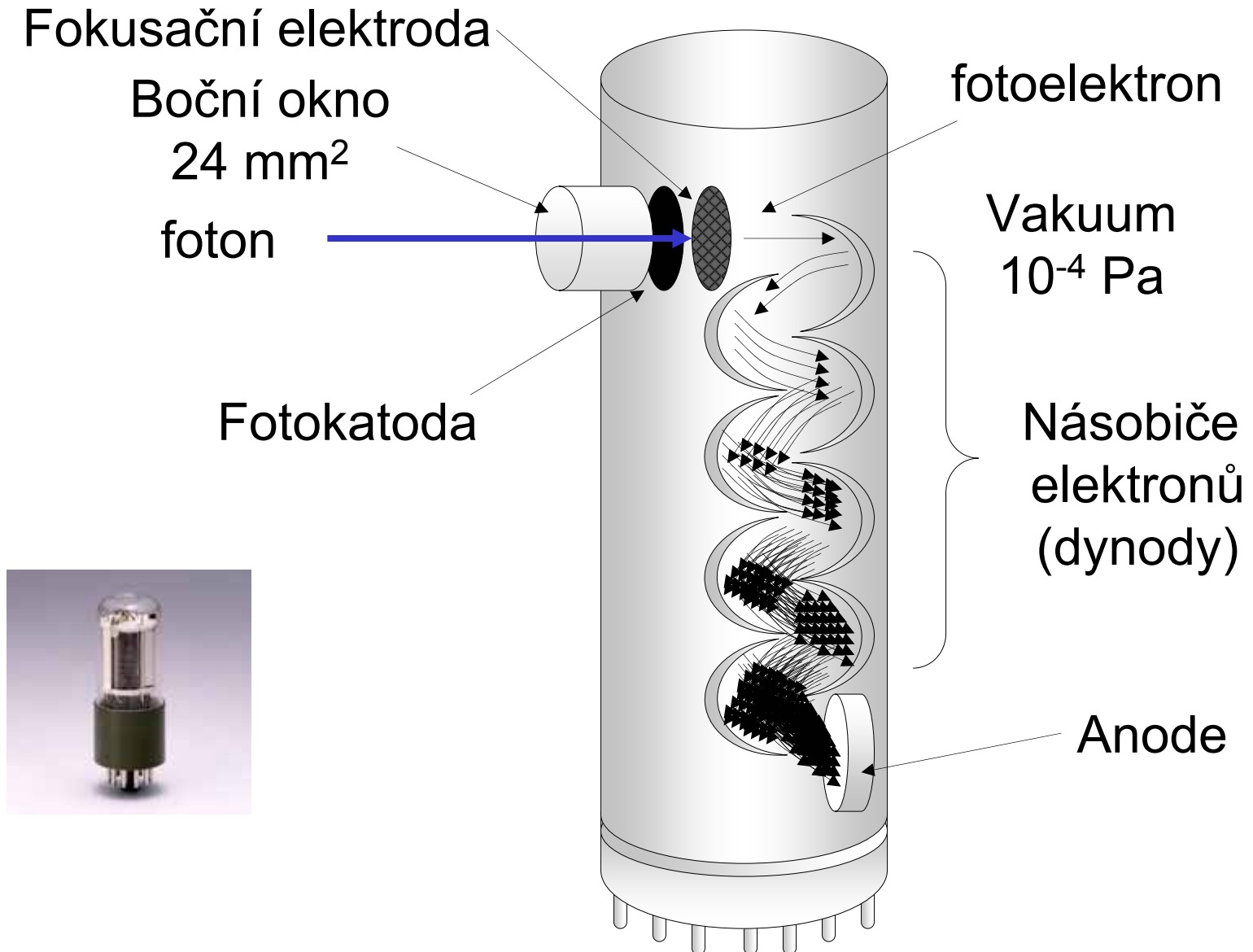
W – energie potřebná k
vyražení elektronu z látky

E_k -Kinetická energie volného
elektronu po vyražení

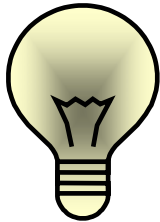
Nobelova cena
A. Einstein, 1921



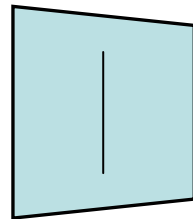
Detektor - fotonásobič



Animované schéma spektrofotometru



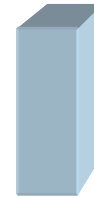
Wolframová
žárovka(Vis)/
deuteriová lampa
(UV)



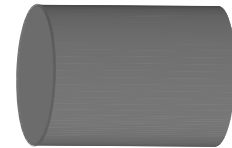
štěrbina



mřížkový
monochromátor



Kyveta z
UV/Vis
propustného
skla



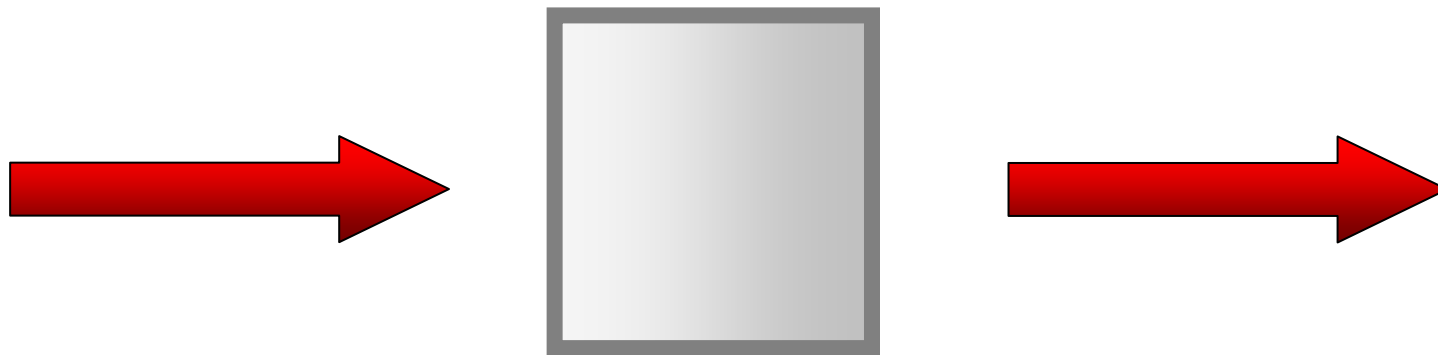
Fotonásobič

http://www.shsu.edu/%7Echm_tgc/sounds/DB.mov

Kapesní spektrofotometr

http://www.cranedigital.com/html/works/animation/hach_assm.html

Geometrie při měření absorbance



Dopadající
světlo

Kyveta
shora

Procházející
světlo

Použitelný rozsah pro měření absorbance

Rozsah s lineární odezvou: tj. že platí $ABS = c\epsilon l$

$$ABS = 0.0 - 1.0$$

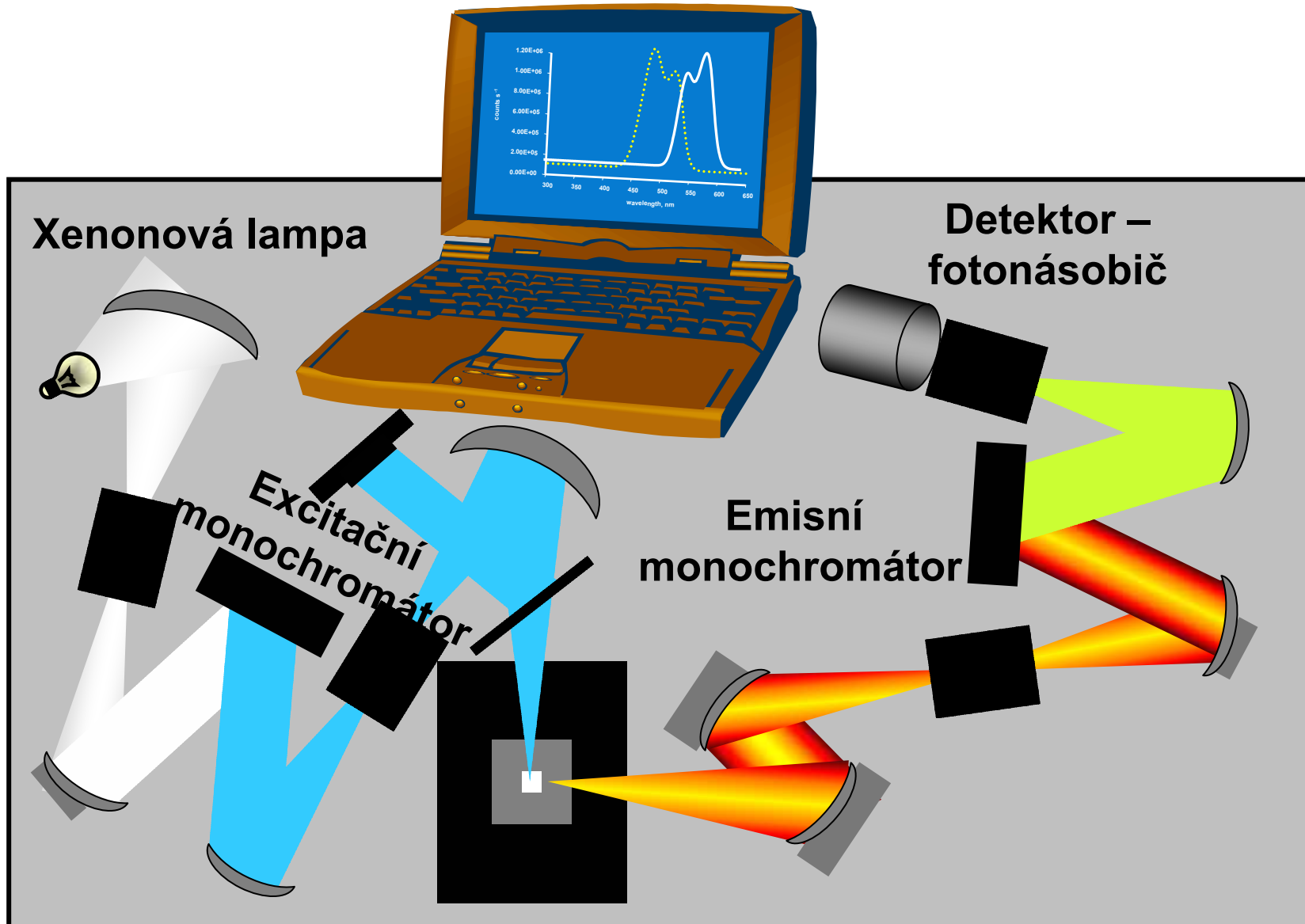
Nejpřesnější oblast: tzn. na hodnoty se
můžeme nejvíce spolehnout při

$$ABS = 0.3 - 0.7$$

Přístroje pro měření fluorescence

- Přístroje založené na měření fluorescence lze rozdělit do čtyř základních typů:
 1. **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
 2. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
 3. **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
 4. **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací
- Existují však i další přístroje, které jako detekci používají fluorescenci.

SpektroFLUOROmetr

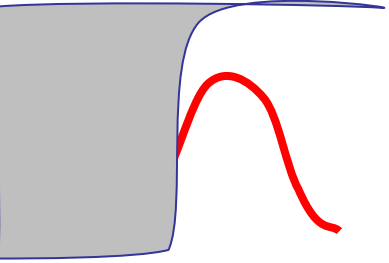
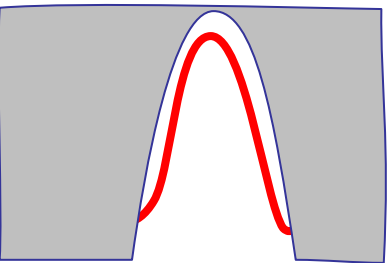
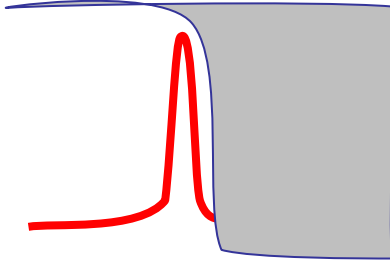
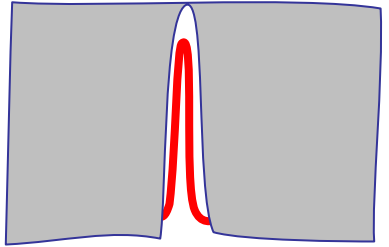
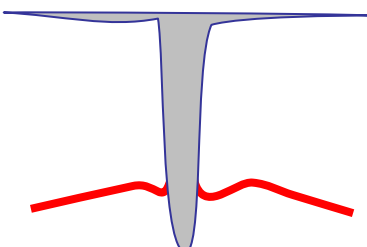



Filtry

Výhody ve srovnání s monochromátorem:

Levné, kompaktní, vysoce účinné, vysoce propustné

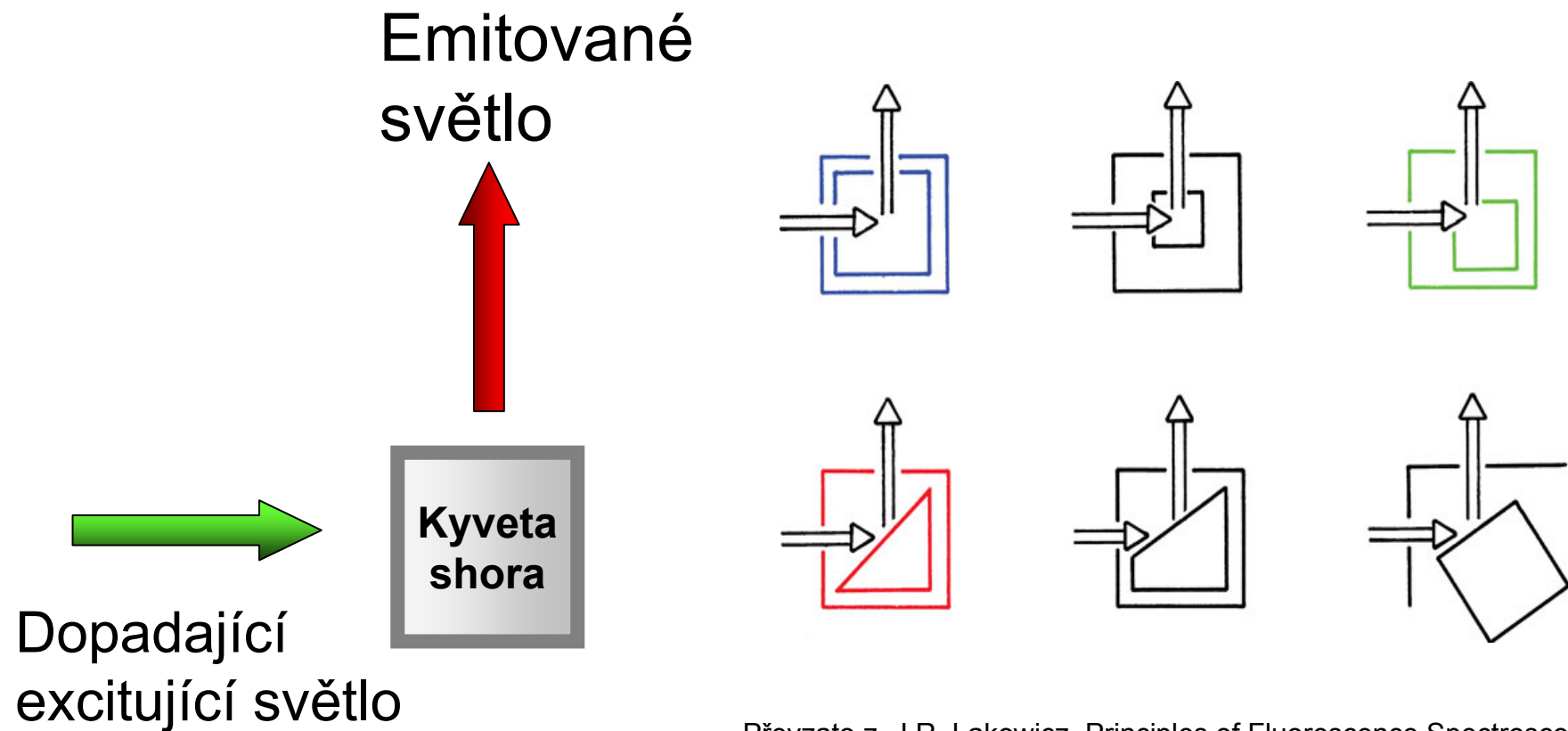
Nevýhody: nejsou nastavitelné, často se specifickými požadavky, přístroj jich pojme limitované množství (karusel), mají vnitřní fluorescenci

Cut-off or long pass	Band-pass	Short-pass
		
Clean-up	Notch	N.D Snížení intenzity
		

Zdroje a filtry barevně

http://probes.invitrogen.com/resources/education/tutorials/3Light_Sources_Filters/player.html

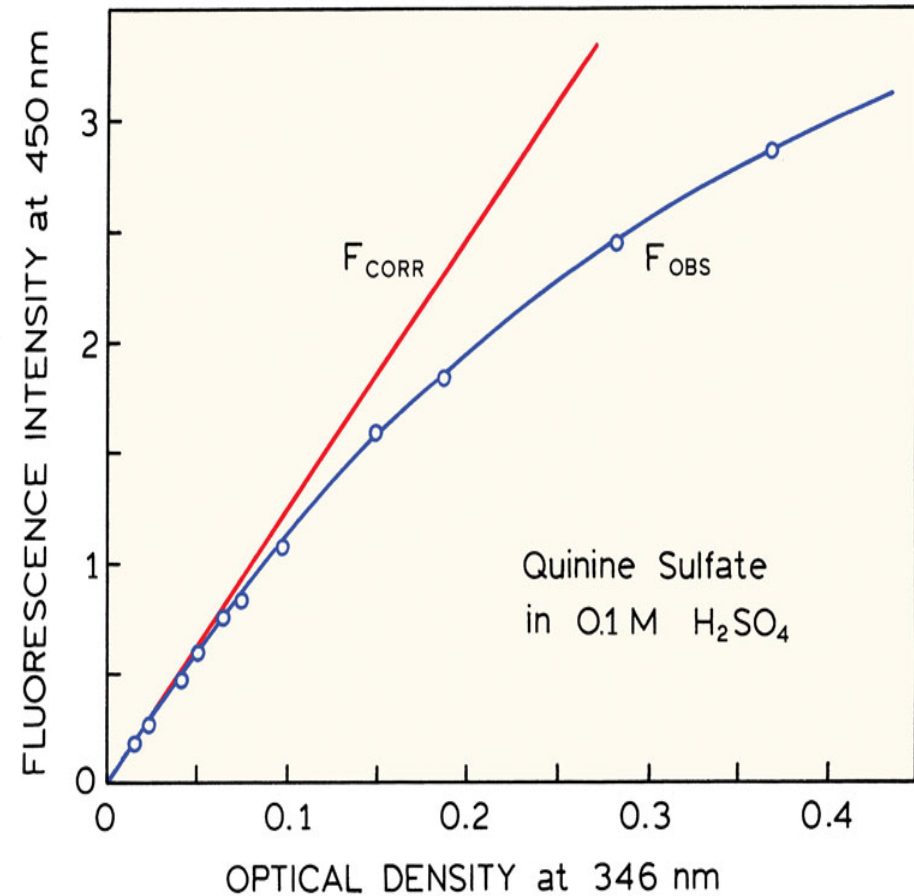
Geometrie při měření fluorescence



Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

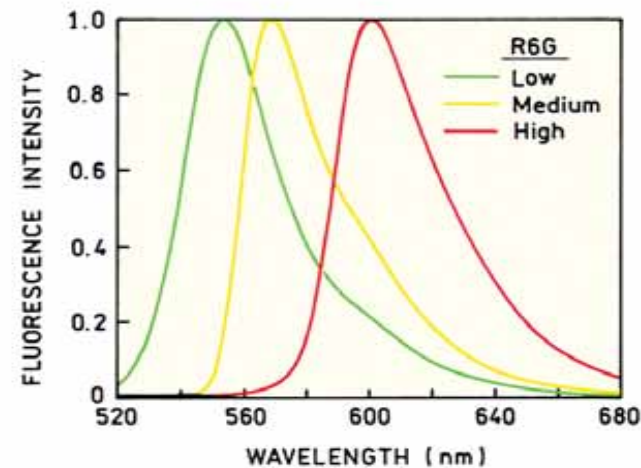
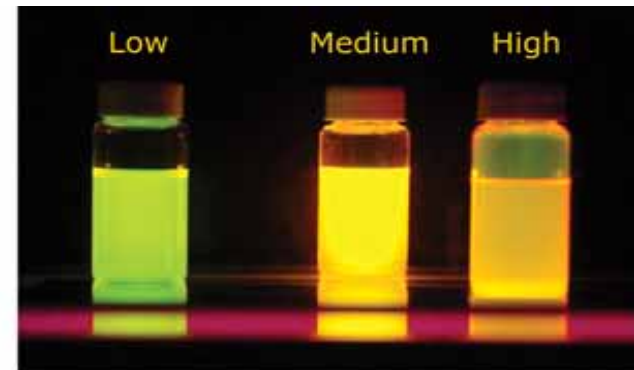
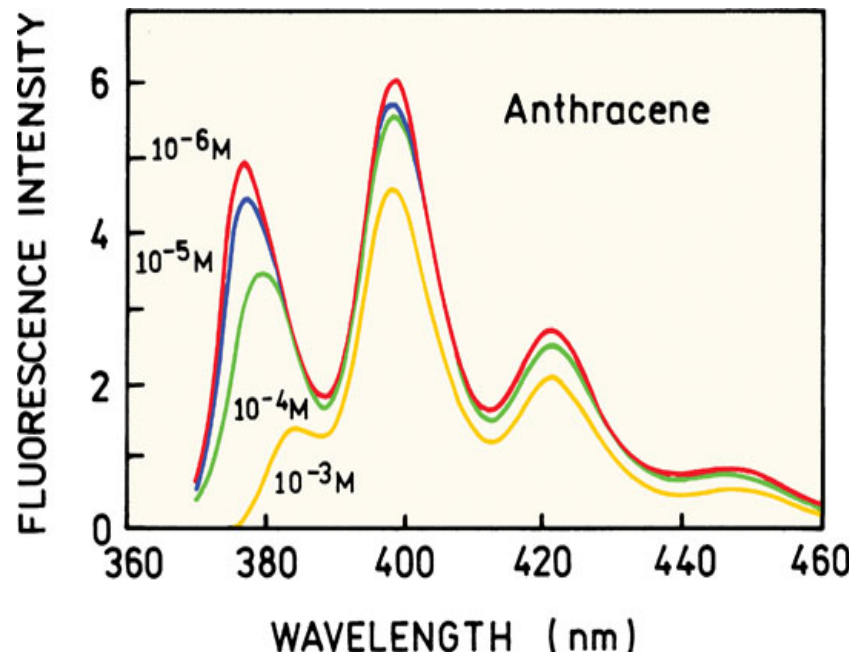
Efekt vnitřního filtru

Intenzita fluorescence se při určité hodnotě absorbance (zpravidla od Abs kolem 0,1) začíná chovat nelineárně. To je způsobeno tím, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část budícího záření je absorbována povrchovými vrstvami. Tato chyba se projevuje jen u silněji absorbujících roztoků, ale při přesném měření kvantových výtěžků je nutno ji vždy uvažovat a korigovat.



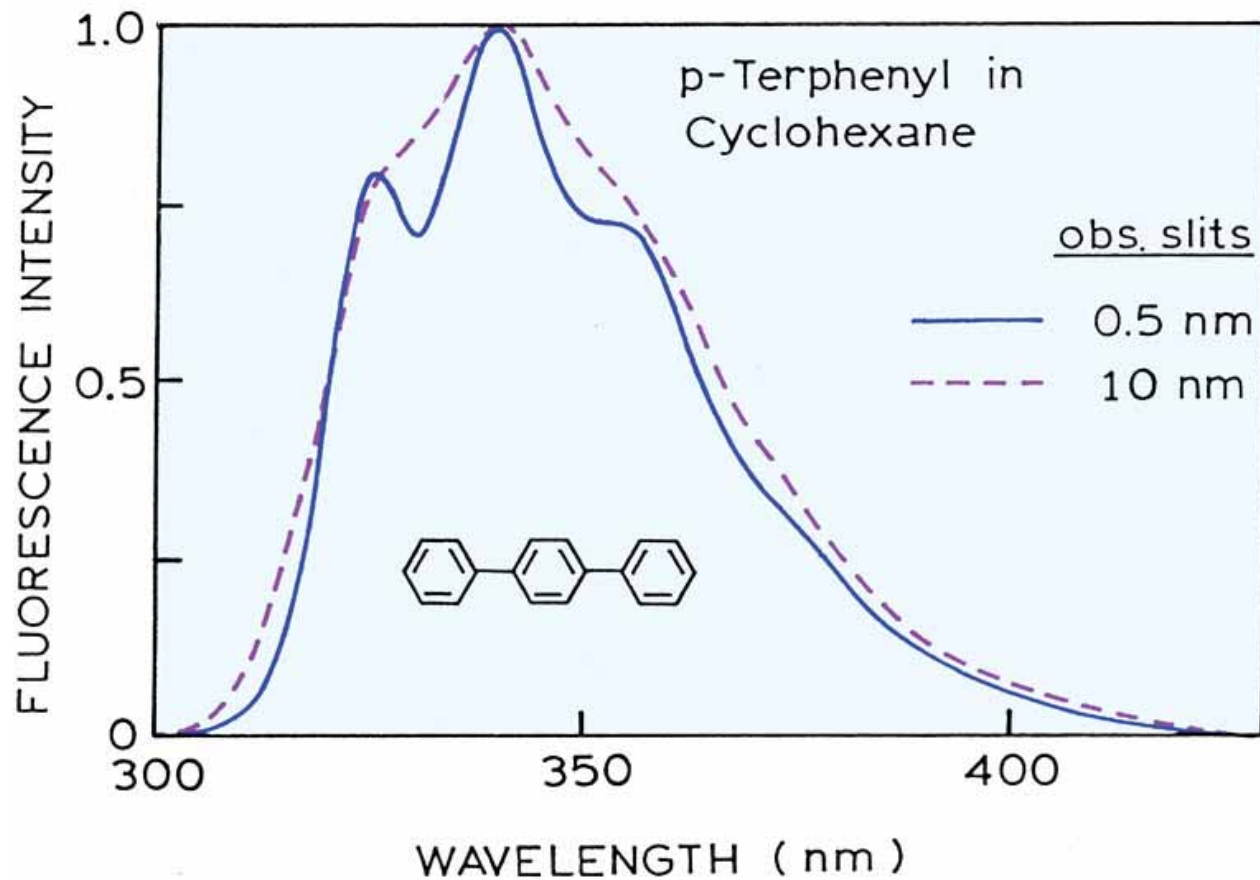
Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

Vliv koncentrace na tvar a polohu maxima emisního spektra



Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

Vliv nastavení šířky štěrbin na tvar spektra



Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

Časté chyby při přípravě fluorescenčních vzorků

- **Koncentrace je příliš vysoká** – použijte zředěné roztoky s Abs pod 0.05
- **Kontaminace rozpouštědla nebo kyvety**
- vždy ověřujte pozadí tj. změřte fluorescenční spektrum samotné kyvety pouze s rozpouštědlem
- **Pevné částice v roztoku** – přefiltrujte roztok

Dokumentační systém

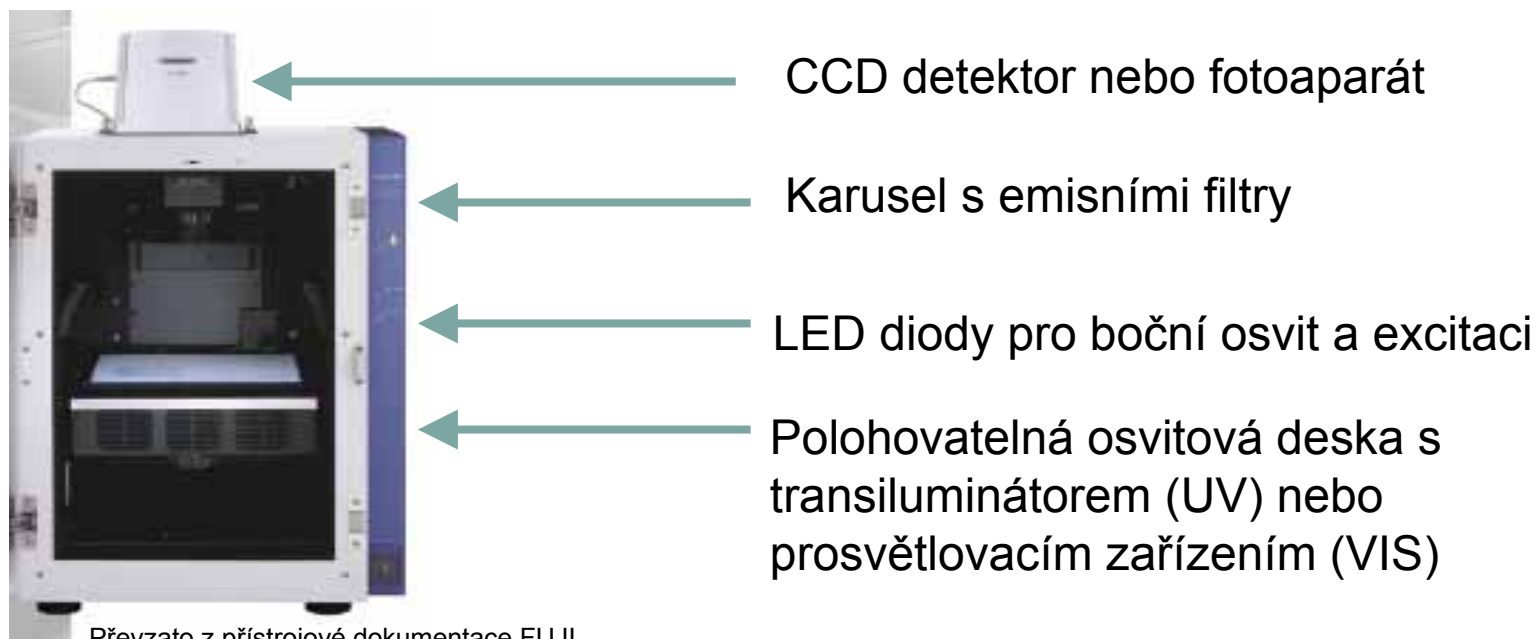
„inteligentní temná komora“

Umožňuje stanovit hodnotu lokální optické absorpce i fluorescence

Zdrojem univerzálního budícího záření je zpravidla transiluminátor, který emituje v UV oblasti.

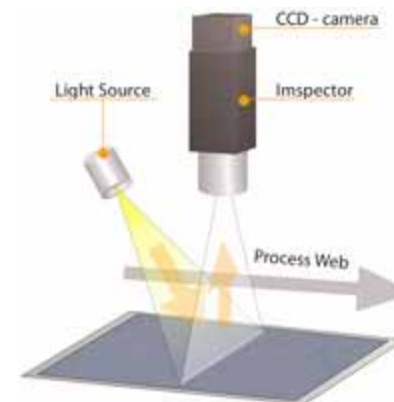
Zdrojem selektivního budícího záření jsou LED diody na bočních stranách

Emise je sledována (digitálním) fotoaparátem nebo chlazeným CCD detektorem

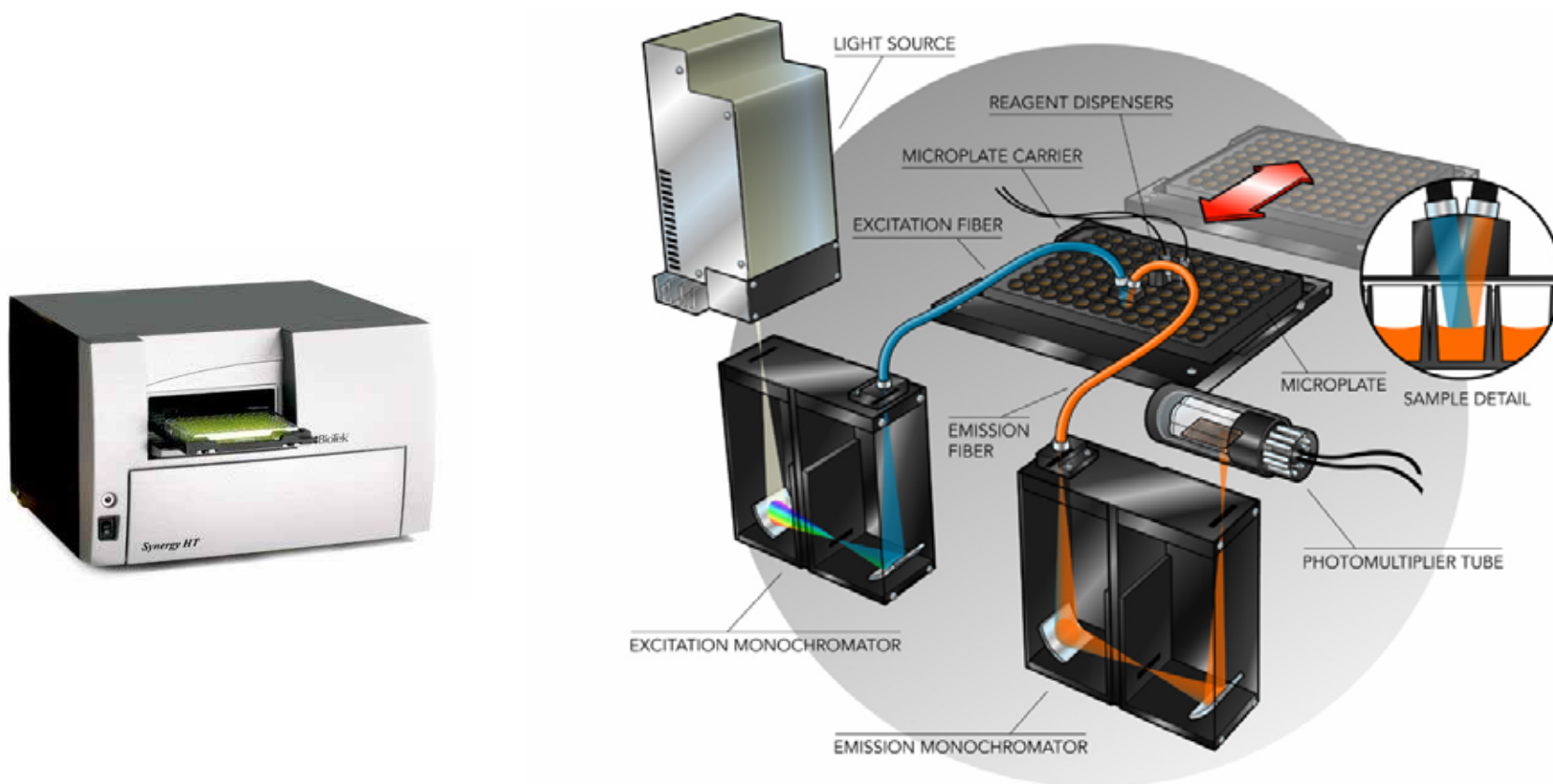


Fluorescenční scanner

- Snímá oblast a sleduje závislost intenzity emise fluorescence při daném excitačním záření (zdrojem je zpravidla laser)
- Používá se k detekci fluorescenčně značených a barvených molekul po elektroforetické separaci



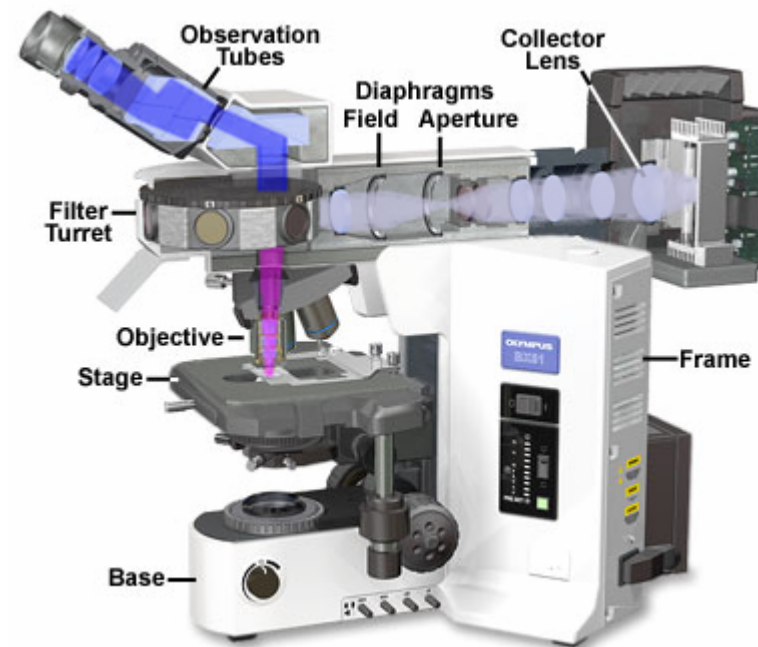
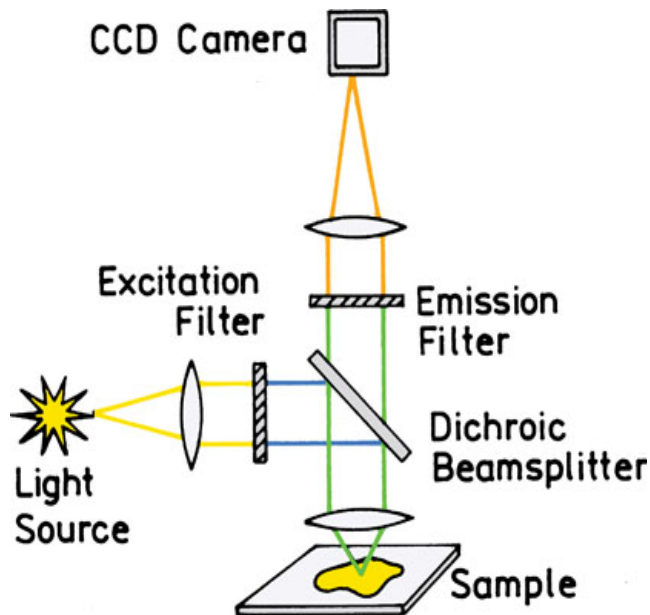
Čtečka mikroděstiček



Převzato z přístrojové dokumentace Biotek

Fluorescenční mikroskop

Hlavní rozdíl oproti spektrometrům :
nepoužívá monochromátory, ale **excitační a emisní filtr**



Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy,
Third Edition, Springer, 2006

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/fluorescence/index.html>

Praktické ukázky a soutěžní srovnání přístrojů

- Merění absorpčního, fluorescenčního emisního a excitačního spektra
- Vizualizace fluorescenčně značené DNA po elektroforetické separaci