

Ustálená fluorescence (Steady State Fluorescence)

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



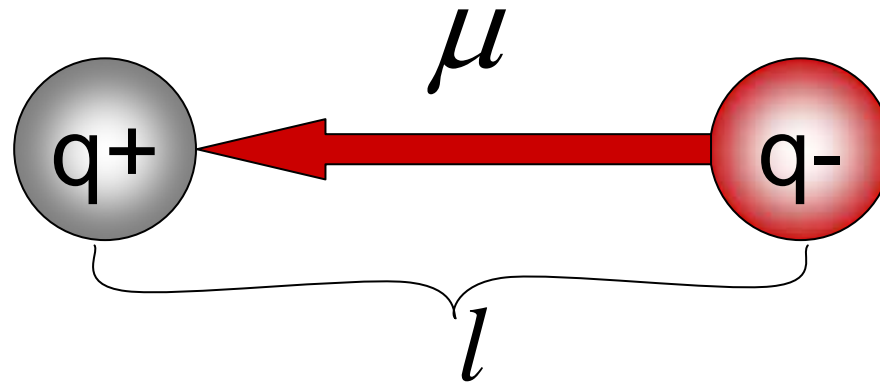
Ustálená a časově rozlišená fluorescence

- **Ustálená fluorescence** (Steady State) se měří při buzení kontinuálním zářením a dostáváme potom časovou střední hodnotu intenzity či polarizace fluorescence.
- **Časově rozlišená fluorescence** se měří pomocí pulzní excitace (délka pulzu je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku) nebo fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů, především anizotropie fluorescence.

Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé **dipólové momenty** i **polarizovatelnosti**, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé **solvatace** molekul. Doba potřebná pro **molekulární relaxace** (10^{-10} s) je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu - **absorpce** (10^{-15} s), ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu (10^{-8} s). K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu.

Elektrický dipól



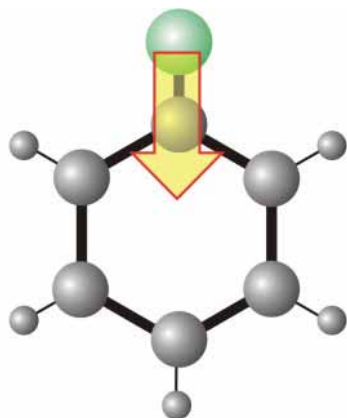
- Je tvořen dvojicí nábojů o opačné polaritě ve vzdálenosti l
- Dipólový moment $\mu = q \cdot l$
vektor směřující od záporného náboje ke kladnému náboji
Jednotkou je Debye; $1D = 3.3 \times 10^{-30} \text{ C.m}$

Molekulové dipóly

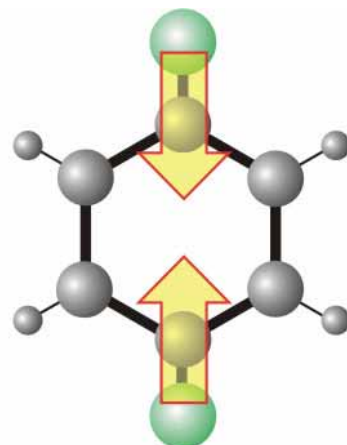
- Molekula je dipólem, když se rozložení kladného a záporného náboje nepřekrývá. V případě, kdy není molekula zrcadlově symetrická je rozložení náboje nepravidelné a molekula je dipólem.
- Molekula, která má dipolový moment je **polarizovaná**.
- Molekuly (zpravidla zrcadlově symetrické – CO_2), které nejsou dipóly se jimi mohou stát, když se molekula nachází v elektrickém poli – vzniká **indukovaný dipól**.

Dipólový moment polyatomických molekul

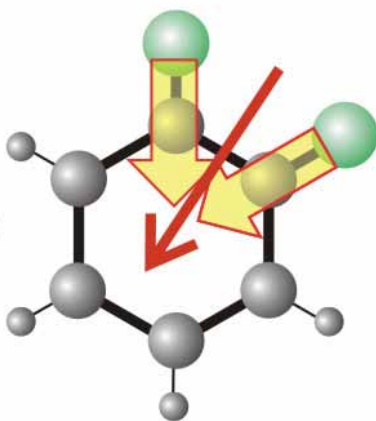
(a) $\mu_{\text{obs}} = 1.57 \text{ D}$



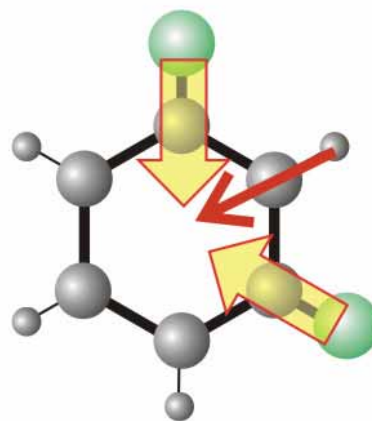
(b) $\mu_{\text{calc}} = 0$
 $\mu_{\text{obs}} = 0$



(c) $\mu_{\text{calc}} = 2.7 \text{ D}$
 $\mu_{\text{obs}} = 2.25 \text{ D}$

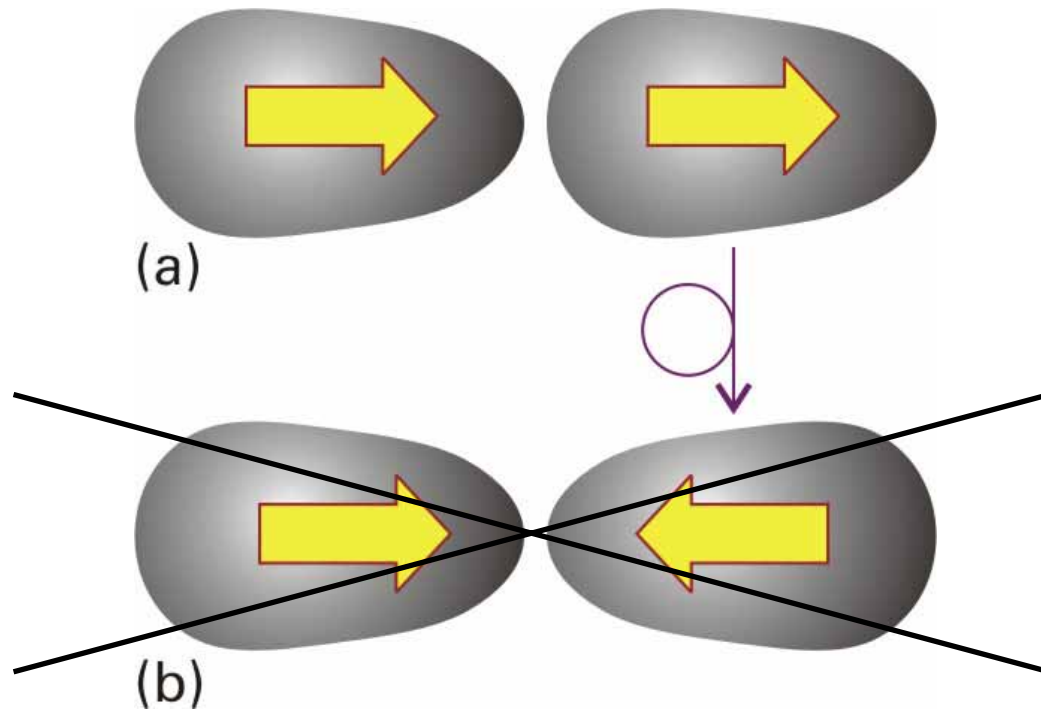


(b) $\mu_{\text{calc}} = 1.6 \text{ D}$
 $\mu_{\text{obs}} = 1.48 \text{ D}$



Interakce dipólů

- **Polarizované molekuly** upřednostňují uspořádání s minimální energií dipólů



Polarizovatelnost molekul

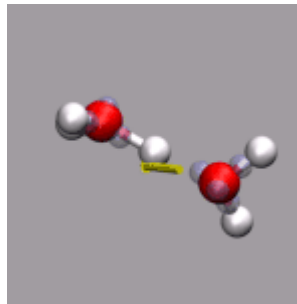
- Schopnost molekul vytvořit indukovaný dipól vlivem elektrického pole
- Velikost indukovaného dipólu je přímo úměrná intenzitě elektrického pole \mathbf{E}
- **Indukovaný dipól μ^***

$$\mu^* = \alpha \mathbf{E}$$

α je **polarizovatelnost** molekul

Čím větší je polarizovatelnost molekuly, tím větší vliv elektrického pole na molekulu.

Změna dipólu při interakci molekul

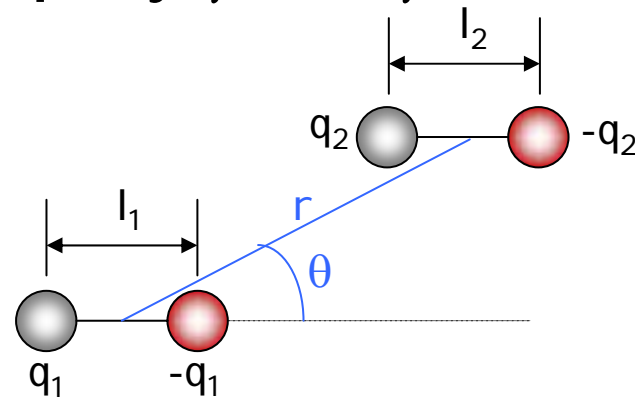


<http://www.theochem.ruhr-uni-bochum.de/~axel.kohlmeyer/cpmd-vmd/part3.html>

Interakční energie dvou dipólů

- Interakce mezi dvěma dipóly μ_1 a μ_2

$$V = -\frac{\mu_1 \mu_2 (1 - 3 \cos^2 \theta)}{4\pi\epsilon_0 r^3}$$



Pro dipól-dipólovou interakci je potenciální energie V závislá na vzájemné orientaci.

Minimální energie je při $\theta = 0^\circ$

přitažlivé interakce (opačné náboje jsou u sebe) $\theta < 54.7^\circ$

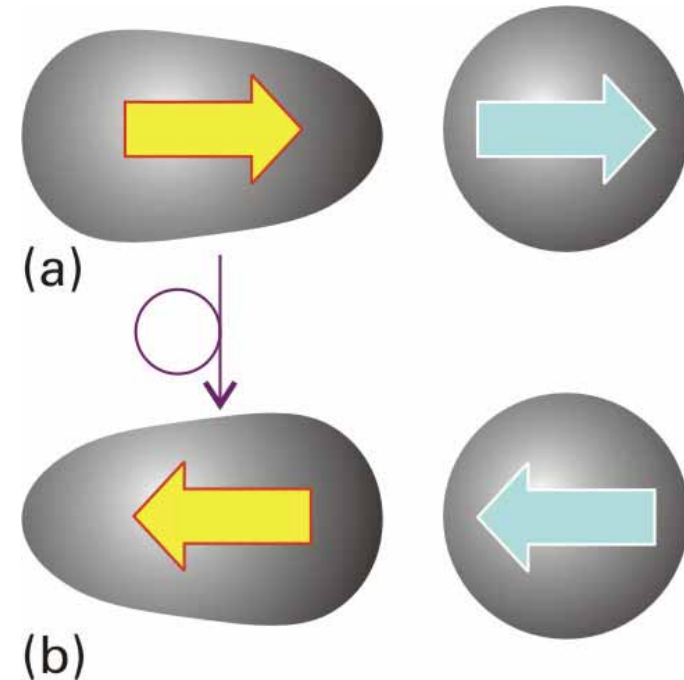
Maximální energie je při $\theta = 180^\circ$

odpudivé interakce (stejné náboje jsou u sebe) $\theta > 54.7^\circ$

⁴ Nulová potenciální energie je při „magickém“ úhlu $\theta = 54.7^\circ$

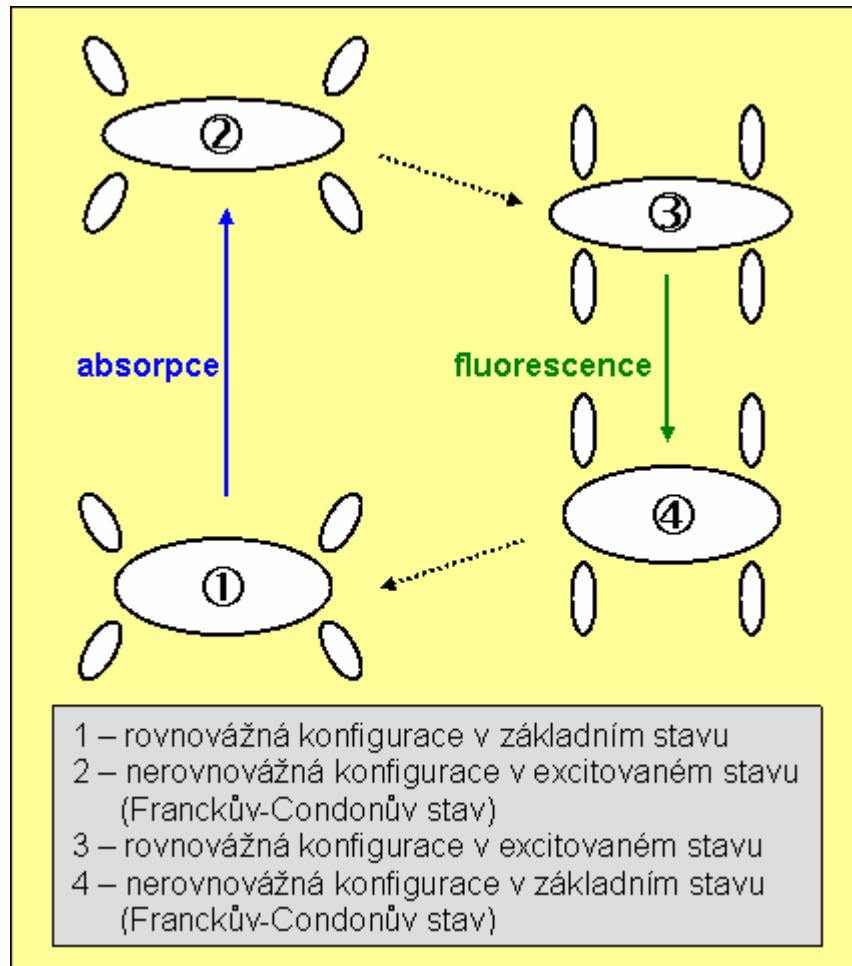
Interakce dipól-indukovaný dipól

- Polární molekula s dipólovým momentem μ_1 může indukovat dipólový moment v polarizovatelné molekule
- Indukovaný dipól interaguje s permanentním dipólem první molekuly a dochází k vzájemnému přitahování
- Indukovaný dipól (modré šipky) následuje změny v orientaci permanentního dipólu (žluté šipky)



$$V = -\frac{\mu_1^2 \alpha_2}{\pi \epsilon_0 r^6}$$

Solvatace fluoroforu při absorpci a emisi v roztocích.

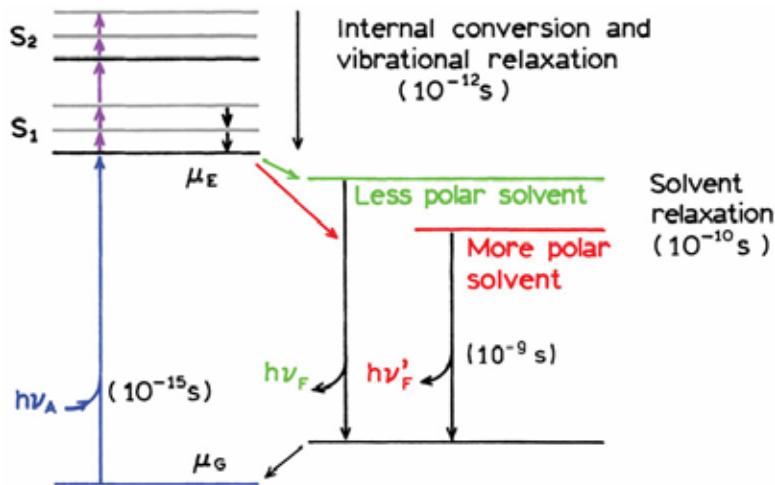


V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé **dipólové momenty** i **polarizovatelnosti**, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé **solvatace** molekul. Doba potřebná pro **molekulární relaxaci** (10^{-10} s) je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu - **absorpce** (10^{-15} s), ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu (10^{-8} s). K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu.

Faktory ovlivňující emisní spektrum a kvantový výtěžek

- **Polarita a viskozita** prostředí (rozpouštědla)
- Rychlost relaxace molekul rozpouštědla
- Konformační změny fluorescenční sondy
- Neměnnost lokálního prostředí molekuly
- Vnitřní přenos náboje (uvnitř molekuly)
- Protonový přenos a reakce excitovaných stavů
- Interakce sonda – sonda
- Změny v rychlostech zářivých a nezářivých procesů

Vliv polarity rozpouštědla

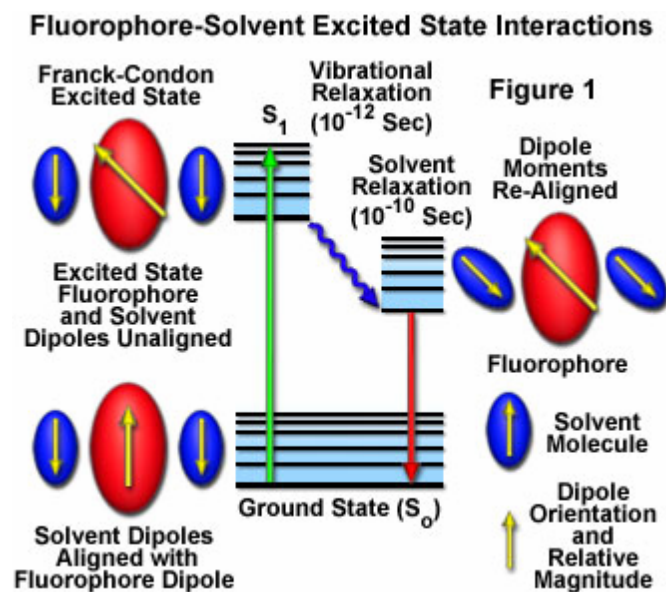


Dipólový moment molekuly v excitovaném stavu μ_E je větší než v základním stavu μ_G

Po excitaci se molekuly rozpouštědla orientují (relaxují) okolo μ_E , což snižuje energii excitovaného stavu

Čím větší je polarita rozpouštědla, tím větší je vliv orientace dipólů a tím větší energie se spotřebuje na jejich orientaci a zbude pak menší energie na emitované světlo, tj. tím větší je jeho vlnová délka.

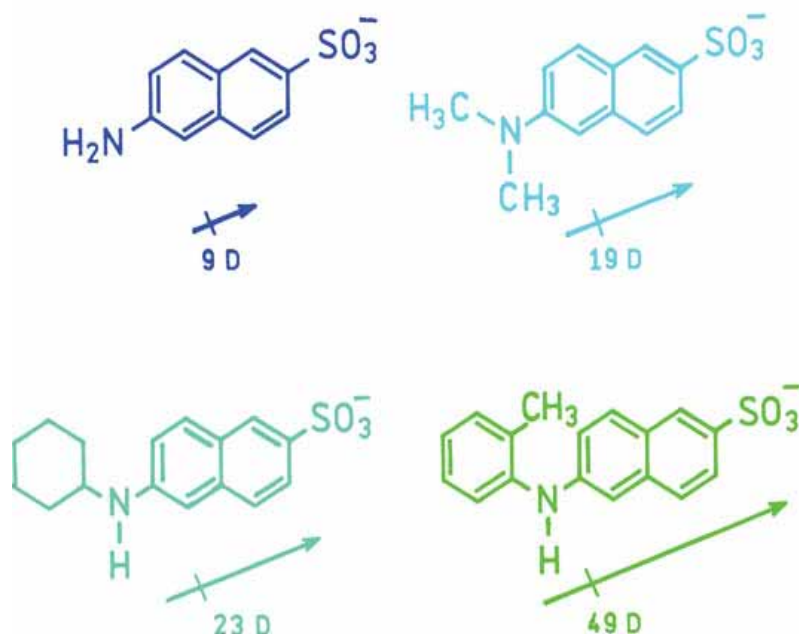
Interakce excitovaného fluoroforu a rozpouštědla



Čím větší je polarita rozpouštědla, tím větší je vliv orientace dipólů, tím menší je energie emitovaného záření a tím větší je posun λ emitovaného světla.

Nejcitlivější na polaritu rozpouštědla jsou fluorofory, které jsou
4 samy polární. Nepochybně fluorofory jsou méně citlivé.

Závislost dipólového momentu na tvaru molekul



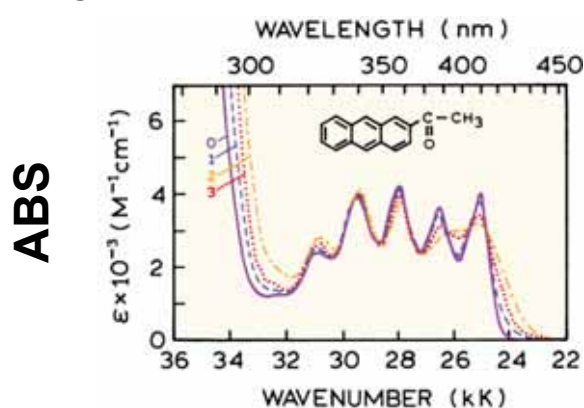
Změna dipólového momentu je větší u delších fluoroforů

Aminonaftalenové deriváty s fenylovou skupinou vykazují větší citlivost na rozpouštědlo a větší dipólové momenty v excitovaném stavu pravděpodobně díky větší separaci náboje podél delšího aromatického systému.

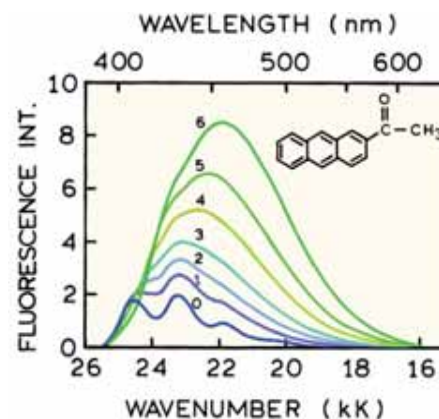
Změna dipólového momentu po excitaci je větší u delších molekul.

Rozdíl vlivu polaroty rozpouštědla na absorpční a emisní spektrum

2-acetylantracen



Absorpční spektrum 2-acetylantracenu v čistém hexanu (0), 200mM roztoku metanolu v hexanu (1) a čistém metanolu (2).



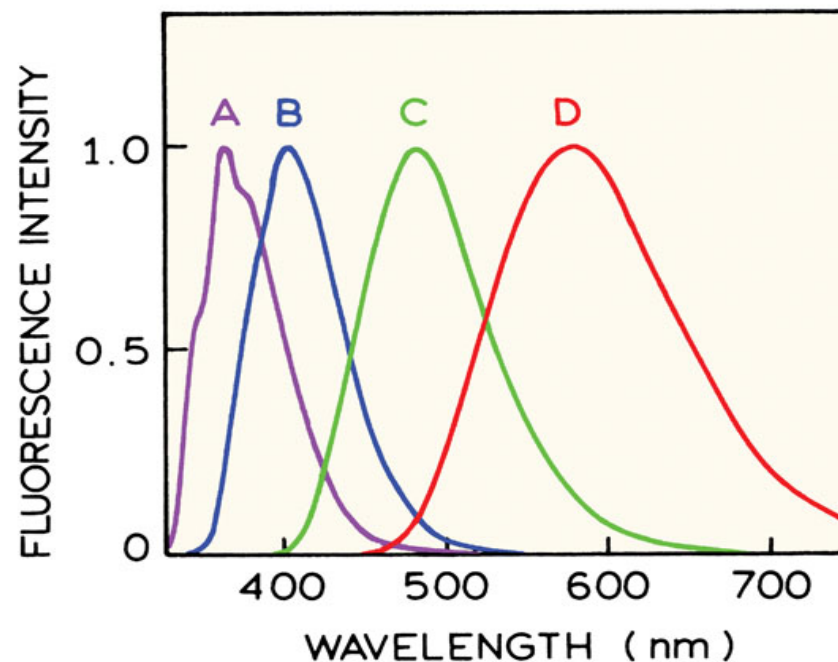
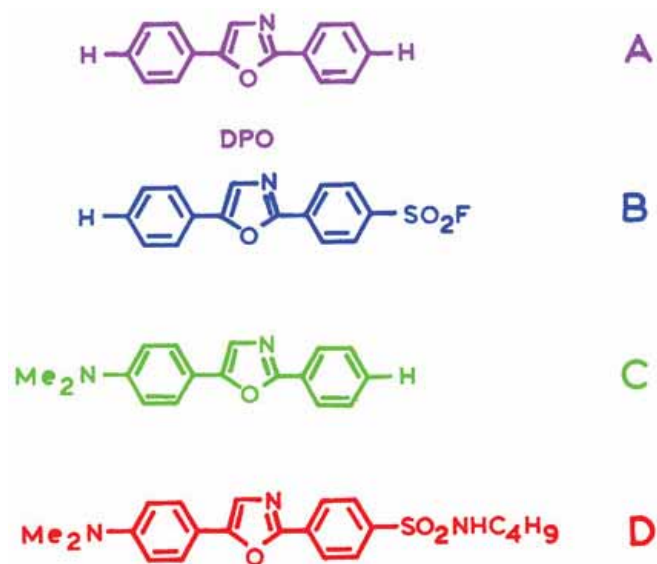
Zvyšování molární koncentrace metanolu v hexanu v rozsahu 0-340 mM (0 -> 6)

Se zvyšující se polaritou rozpouštědla se mění fluorescenční spektrum mnohem více než absorpční spektrum.

Sondy na sledování polarity okolí

- Přidání polárních skupin k fluoroforu zvyšuje jeho citlivost na polaritu rozpouštědla
- Přidání polárnějších skupin také zvyšuje Stokesův posun

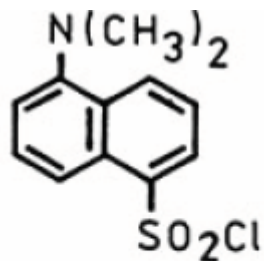
Deriváty DOP (2,5-difenyloxazolu) a jejich emisní spektra



Proč je emisní spektrum citlivější na polaritu prostředí než absorpční spektrum?

- Protože absorpce je rychlejší než emise a ta je zase pomalejší než relaxace molekul
- Časová posloupnost:
Absorpce (10^{-15}s) \rightarrow relaxace okolí (10^{-10}s) \rightarrow emise (10^{-8}s)
- Absorbce nemůže zachytit změny v lokálním prostředí molekuly, protože proběhne rychleji než k nim dojde.
- Před absorpcí a po ní je okolí molekuly stejné.
- Naproti tomu při emisi už je molekula fluoroforu obklopena relaxovaným (změněným) prostředím.

Závislost emisního spektra na polaritě rozpouštědla



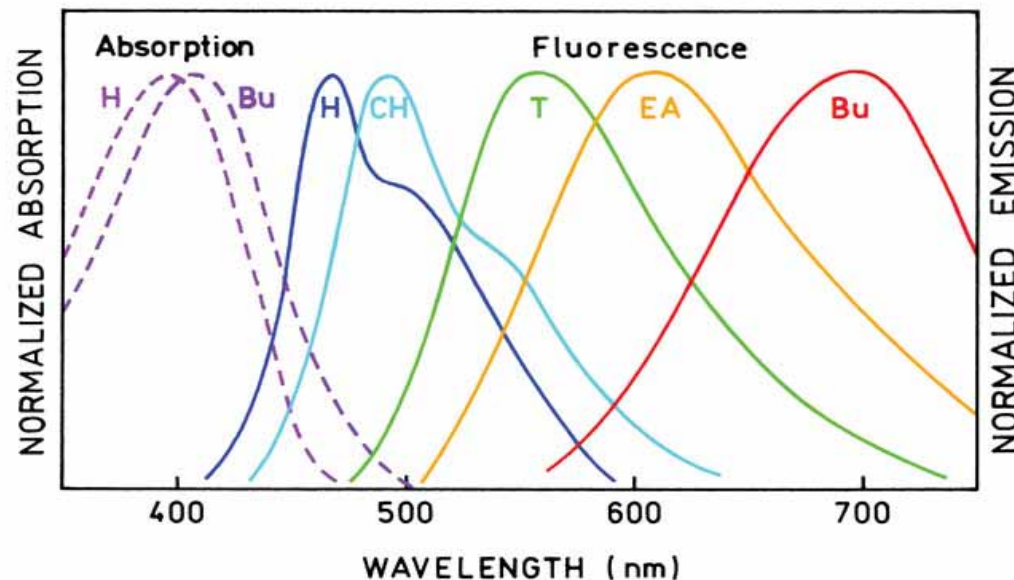
DNS-Cl



polarita

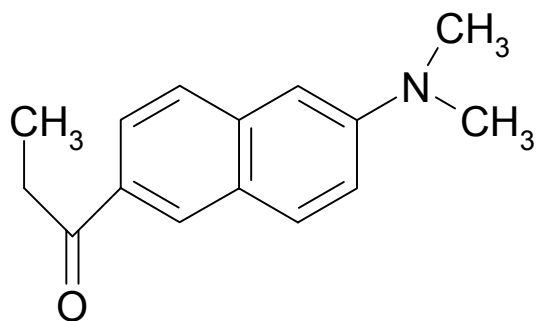
Podle zvyšující se polarity:

H – hexan
CH- cyklohexan
T- toluen
EA – etylacetát
Bu – n-butanol



Praktická ukázka

- Prodan (*N,N*-Dimethyl-6-propionyl-2-naphthylamine)



polarita

C - Cyklohexanol

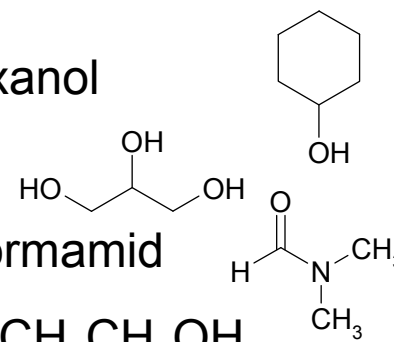
G – Glycerol

D - dimetylformamid

E - Etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

V - Voda

Bu - n- Butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$



Změna emisního spektra po vazbě molekul

Citlivosti fluorescenčních sond na okolní prostředí se využívá při sledování vazby a kvantifikaci množství biologických molekul.

Kvantový výtěžek se často zvyšuje při vazbě fluoroforů na proteiny nebo DNA. Toho se využívá při sledování vazby.

ANS na HSA

Prodan na protein

DAPI na DNA

EtBr na DNA

Zvýšení intenzity fluorescence ANS po vazbě na lidský sérový albumin



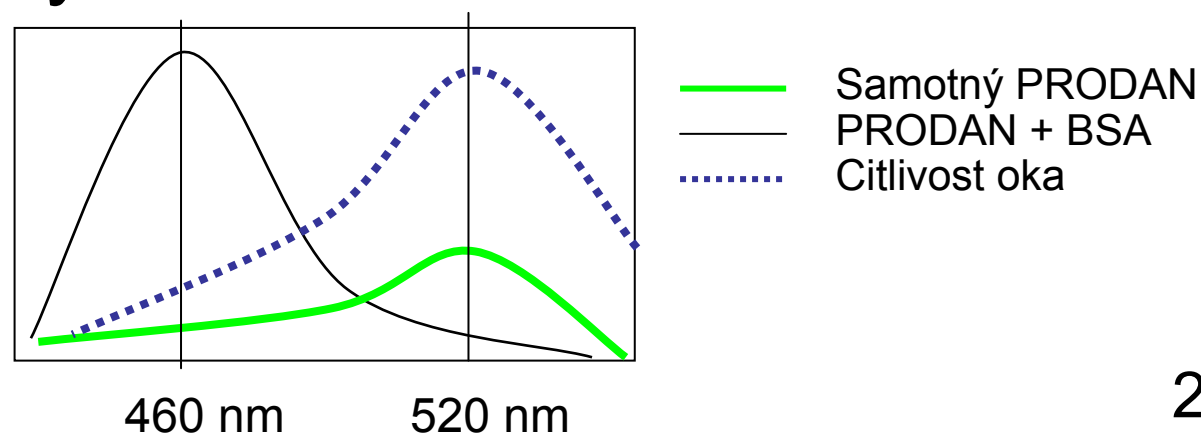
ANS (1-anilinonaftalén-8-sulfonát sodný):

- MW = 321,33
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{exmax}} = 372 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $7800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{emmax}} = 480 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle
- podrobný popis vlastností ANS lze nalézt v práci [Slavík J.: Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* 694, 1-25 (1982)]

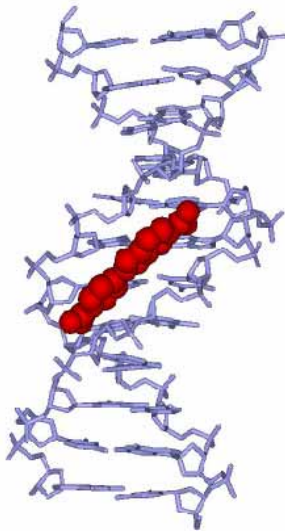
Co se stane, když se naváže PRODAN na BSA?

Posune se maximum vlnové délky z 520 nm na 460 a přesto, že se zvýší intenzita emise, nepozorujeme ji, protože oko má nižší citlivost na světlo s $\lambda=460$ nm.

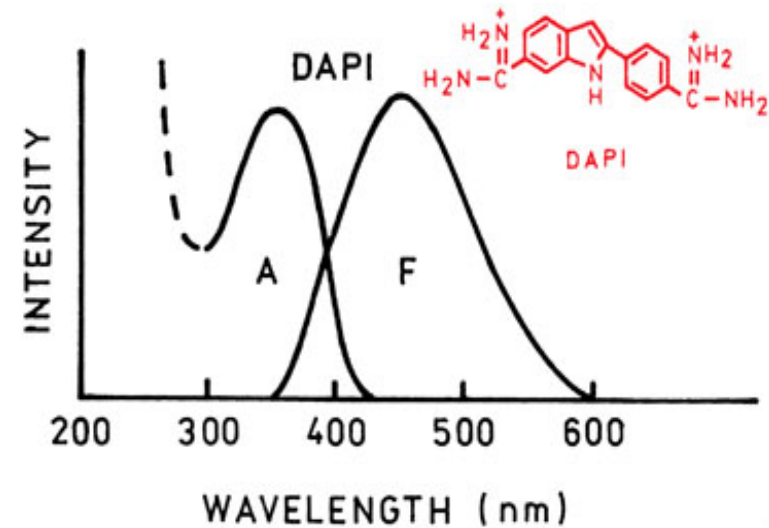
Postupnou vazbu PRODANu na BSA lze lépe sledovat jako úbytek emise volného fluoroforu



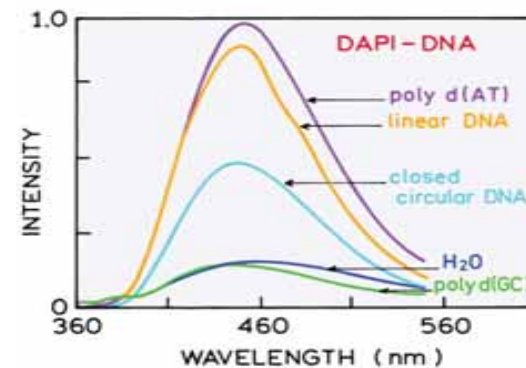
Vazba DAPI na DNA



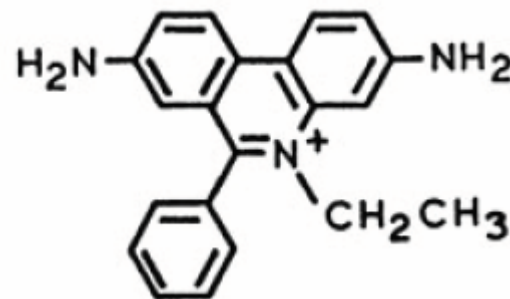
DAPI



- DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- Ex. 355 nm / Em. 461 nm
- Vazba do malého žlábků
- Největší nárůst intenzity při vazbě v blízkosti AT bohatých oblastí



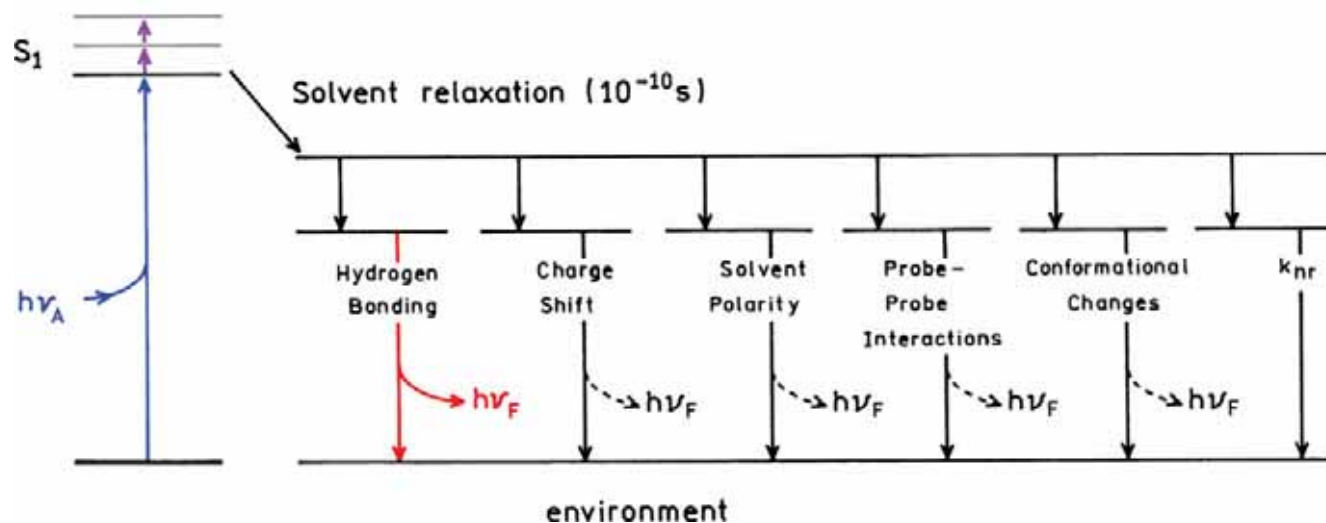
Vazba EtBr na DNA



Vlastnosti sondy ethidium bromidu:

- MW = 394,31
- dobře rozpustný ve vodě
- ve vodě fluoreskuje málo, po navázání k DNA se fluorescence zvyšuje asi 30 krát
- doba dohasínání fluorescence ve vodě je asi 1,7 ns, po vazbě k dvouřetězcové DNA se zvyšuje na 20 ns
- vazba k DNA se uskutečňuje interkalací (vmezeřováním) rovinného aromatického kruhu mezi páry bazí dvouřetězcové DNA
- absorpční maximum v DNA: $\lambda_{\text{exmax}} = 523 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum v DNA: $\lambda_{\text{emmax}} = 604 \text{ nm}$

Další mechanismy spektrálního posunu



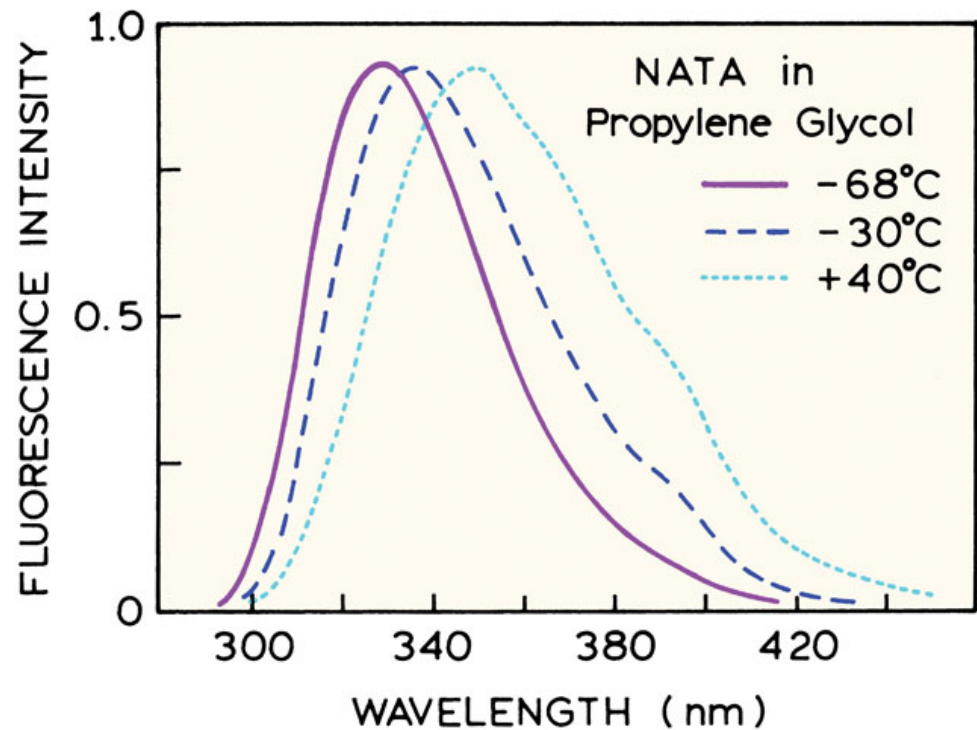
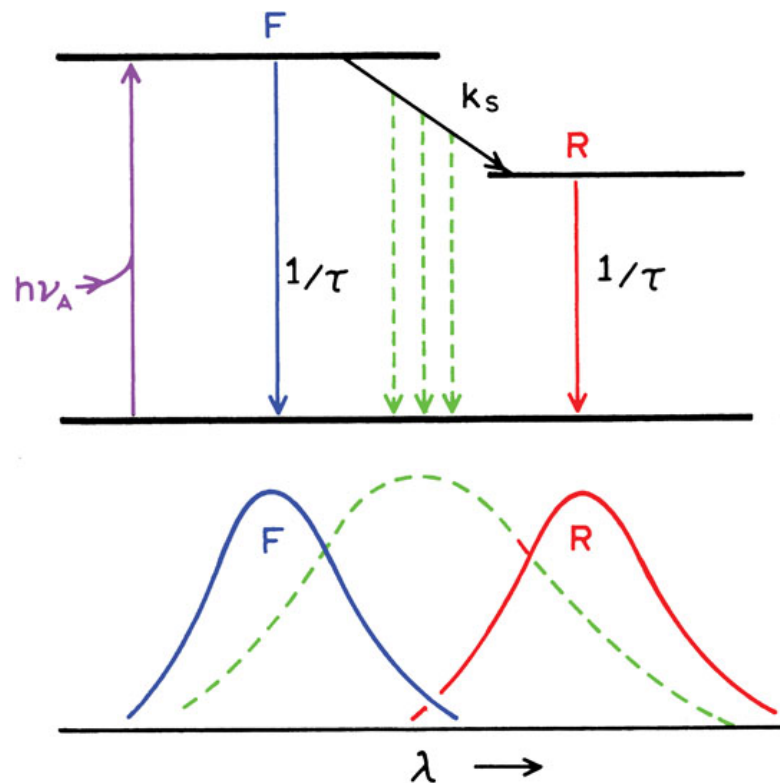
- Vodíkové můstky v rozpouštědle
- Vnitřní přenos náboje (uvnitř molekuly)
- Rychlost relaxace molekul rozpouštědla
- Interakce sonda – sonda
- Konformační změny fluorescenční sondy
- Změny v rychlostech zářivých a nezářivých procesů

Čárkované šipky znamenají, že přechody mohou být zářivé nebo nezářivé

Vliv teploty na emisní spektrum

- Snížení teploty zpravidla způsobuje zvyšování viskozity rozpouštědla a tím se zvyšuje také čas potřebný k orientaci molekul rozpouštědla
- Čím nižší je teplota, tím méně molekul se vrací do základního stavu s relaxovanými okolními molekulami rozpouštědla – tím méně se energie spotřebovává a tím je posun menší

Závislost emisního spektra na teplotě



4 Snížení teploty prodlužuje čas potřebný k relaxaci rozpouštědla.

Snížení teploty má podobný vliv jako snížení polarizace rozpouštědla 29

Interakce sonda-sonda excimerová fluorescence

Molekuly fluoroforu mohou se sebou vzájemně vytvářet excitovaný komplex excimer.

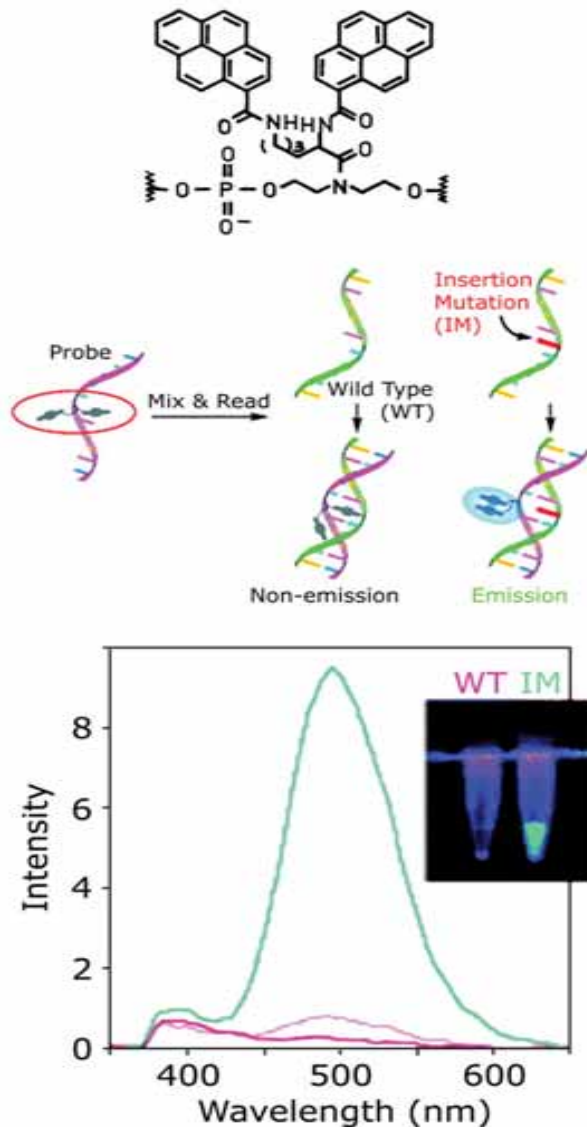
Excimer je zkráceně **excitovaný dimer**.

V případě dvou různých molekul se jedná o **exiplex**.

Pro vytvoření excimeru je nutné, aby byly molekuly v kontaktu.

Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k větším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul.

Použití excimerů při detekci inserčních mutací DNA



- Oligonukleotid s připojenými pyrenovými zbytky na místě jedné báze
- Když se váže na WT nemutovanou DNA, jeden pyrenový zbytek se interkaluje, druhý je vně dvoušroubovice
- Když se váže na DNA s mutací, která obsahuje jednu bázi navíc, dojde k vytvoření excimeru.
- Excimerová emise ukazuje, že se jedná o inserčního mutantu

Zhášení fluorescence

- **Zhášení fluorescence** lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence (tzn. intenzitu fluorescence) beze změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů.
- **Srážkové (dynamické) zhášení** nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. navrací se nezářivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od
- **statického zhášení**, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří nefluorescenční komplex.
- **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké denzitě značení.

Dynamické zhášení

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno **Sternovou-Volmerovou rovnicí**:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

kde je F_0 – kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla,

F - totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci C_q , τ_0 – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla, τ - doba dohasínání v přítomnosti zhášedla, k_q – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

Hodnota k_q udává koncentraci zhášedla, při které se sníží intenzita fluorescence na polovinu.

Nejčastějším zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární **kyslík** (O_2). Dále fluorescenci zhášejí (v důsledku mezisystémové konverze) atomy halogenů jako je **bróm** a **jód**. Často používaným zhášedlem je také akrylamid.

Statické zhášení

- Vytváří se komplex fluoroforu a zhášedla, který již nefluoreskuje
- Platí pro něj také Sternova-Volmerova rovnice:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + K_a \tau_0 C_q$$

Kde K_a je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla

Typickými statickými zhášedly jsou:

Báze nukleových kyselin

Nikotinamid

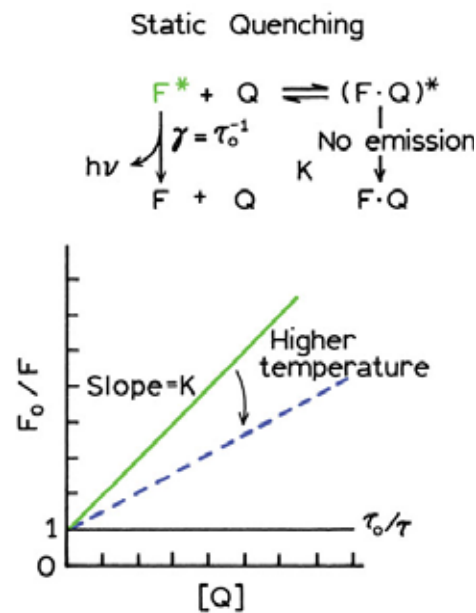
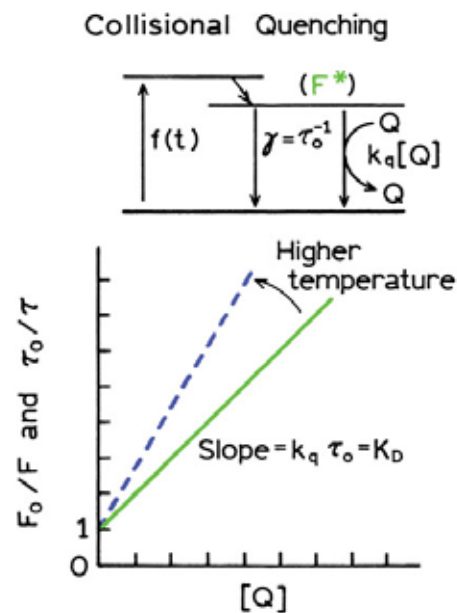
Těžké kovy

Guanin

Rozdílná závislost dynamického a statického zhášení

Dynamické zhášení

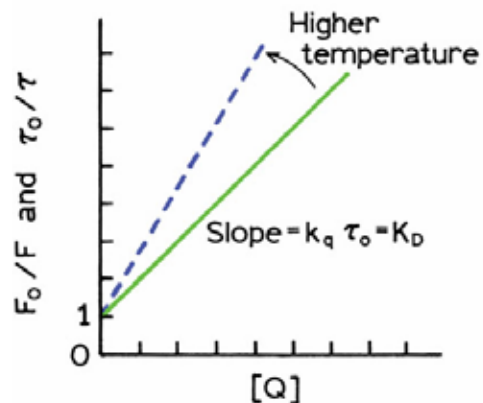
Statické zhášení



- Oba druhy zhášení ukazují stejnou závislost na koncentraci zhášedla.
- Při statickém zhášení se pouze „zneviditelní“ část fluoroforů, které vytvoří komplexy. Nemění se doba dohasínání fluorescence τ .
- Při dynamickém zhášení se doba dohasínání mění

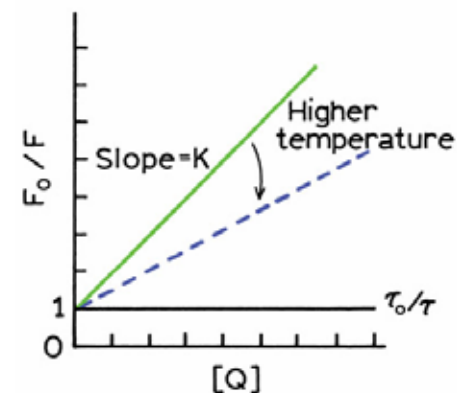
Závislost obou druhů zhášení na teplotě

Dynamické zhášení



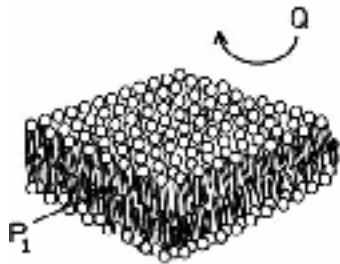
- Dynamické zhášení se s rostoucí teplotou zvyšuje. Zvyšuje se pohyblivost molekul zhášedla, které takto za stejný čas „uhasí“ více molekul fluoroforu.

Statické zhášení

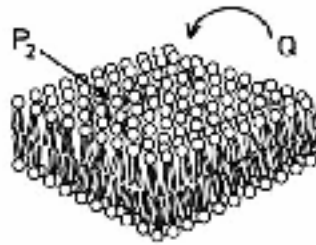
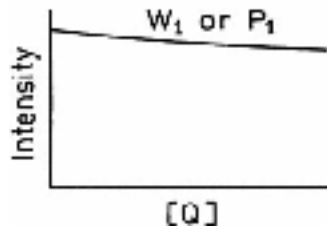
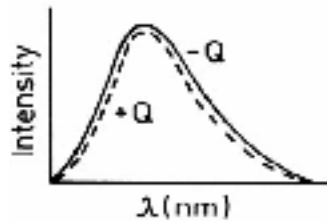


- Statické zhášení se s rostoucí teplotou snižuje, protože dochází snadněji k disociaci slabě vázaných komplexů fluoroforu a zhášedla.

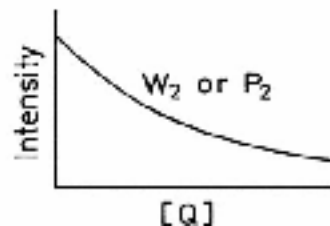
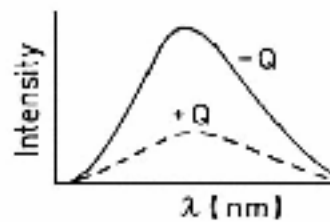
Využití zhášení při lokalizaci fluoroforu



Zanořen v membráně



Vystaven na povrchu



V membráně

- Jestliže je fluorofor P1 zanořen v membráně, je pro zhášedlo Q nedostupný a ke zhášení téměř nedochází. S rostoucí koncentrací zhášedla se intenzita fluorescence téměř nemění.

Na povrchu

- Jestliže je fluorofor P2 na povrchu, dochází k účinnému zhášení. S rostoucí koncentrací zhášedla intenzita fluorescence velmi výrazně klesá.

Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R.Lakowitzem.