

FRET

Förster resonance energy transfer

Fluorescence Resonance Energy Transfer

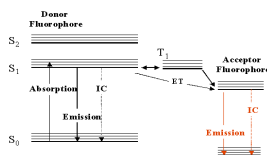
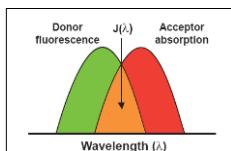
FRET

- FRET je Förster Resonance Energy Transfer
- Transfer – Försterův rezonanční energetický transfér (Theodor Förster, 1910-1974)
- Někdy nazýván také **Fluorescence Resonance Energy Transfer** (hlavně v chemické analýze a biologii, kde je sledována výsledná luminiscence)
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

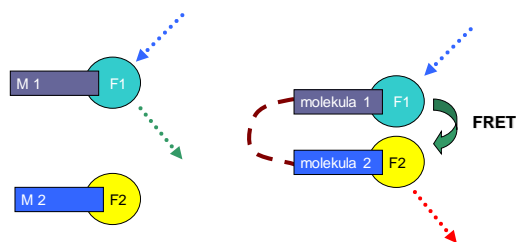
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla

Podmínky:

- a) vzdálenost mezi molekulami je menší, než 100 Å
- b) emisní spektrum donoru se překrývá se absorpčním (excitačním) spektrem akceptoru
- c) molekuly mají stejně orientovány dipólové momenty



Využití FRET: schéma



Základní vztahy

- účinnost FRET E je definována:

$$E = 1 - \tau_D' / \tau_D$$

- kde τ_D' a τ_D jsou fluorescenční časy vyhasínání v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

$$E = 1 - F_D' / F_D$$

- F_D' a F_D jsou intenzity fluorescence v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

Základní vztahy

- účinnost (E) závisí na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (r)

$$E = \frac{1}{(1 + (r/R_0)^6)}$$

- R_0 je Försterova vzdálenost při které je účinnost přenosu 50%

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

- R_0 závisí na integrálu překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru (J)
- κ^2 je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je většinou 2/3
- n je refrakční index, Q_0 je kvantový výtěžek samotného donoru

FRET

Donor	Acceptor	R_0 (Å)	Ref
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	49-56	13
IAEDANS'	FITC	49	13
IAEDANS'	5-(iodoacetamido)fluorescein	49	13
Fluorescein	Fluorescein	44	13
EDANS	DABCYL	33	In House
Tryptophan	IAEDANS'	22	7
Tryptophan	Dansyl	21-24	7
Tryptophan	Pyrene	28	7
Dansyl	Fluorescein	33-41	14
Naphthalene	Dansyl	22	13
Pyrene	Coumarin	39	13
8-Phycocerythrin	Cy5	79	13

www.anaspec.com

FRET

Quencher (Acceptor)	λ_{em} (in nm)	Amine-Reactive	Thiol-Reactive	Carboxy-Reactive (NH ₂ -Containing)	Recommended FRET Donor
DNP	348	DNP-X, acid; DNP-X, SE	DNP-C2 maleimide	DNP-C2 amine	Abz, Abz(N-Me), NCA, Trp
DABCYL	485	DABCYL; DABCYL, SE	DABCYL-C2 maleimide	DABCYL-C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
DABCYL Plus™	486	DABCYL Plus™ acid; DABCYL Plus™, SE	DABCYL Plus™ C2 maleimide	DABCYL Plus™ C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
OXL™ 490	488	OXL™ 490, acid; OXL™ 490, SE	OXL™ 490 C2 maleimide	OXL™ 490 C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
OXL™ 520	506, 530	OXL™ 520, acid; OXL™ 520, SE	OXL™ 520 C2 maleimide	OXL™ 520 C2 amine	FAM, FITC, RH6G, HiLyte Fluor™ 488
OXL™ 570	538, 577	OXL™ 570, acid; OXL™ 570, SE	OXL™ 570 C2 maleimide	OXL™ 570 C2 amine	Cy5, TAMRA, ROX, HiLyte Fluor™ 11MR
OXL™ 610	594, 628	OXL™ 610, acid; OXL™ 610, SE	OXL™ 610 C2 maleimide	OXL™ 610 C2 amine	ROX, Texas Red®, HiLyte Fluor™ TR
OXL™ 670	665	OXL™ 670, acid; OXL™ 670, SE	OXL™ 670 C2 maleimide	OXL™ 670 C2 amine	Cy5, HiLyte Fluor™ 647

www.anaspec.com

Aplikace

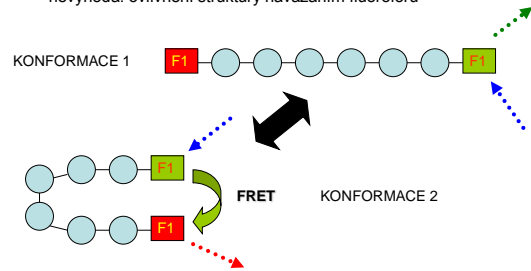
• sledování strukturálních a konformačních změn (dvě molekuly (případně dvě části molekuly) jsou označeny donorem a akceptorem a sledujeme zda dochází k výměně energie

• sledujeme: studium struktury proteinů, polynukleotidů, DNA, protein-protein interakce, DNA-protein interakce, atd.

• analytické aplikace

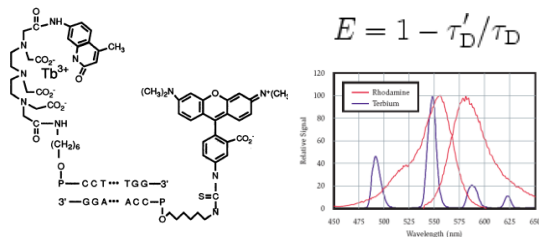
Sledování změn konformace molekuly

- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů

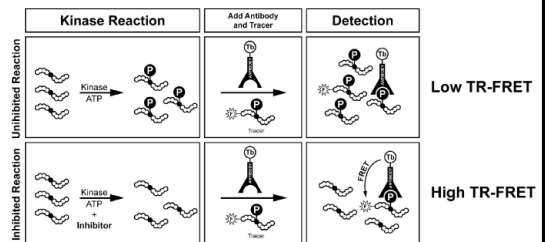


Sledování interakcí mezi vlákny DNA

- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln^{3+}

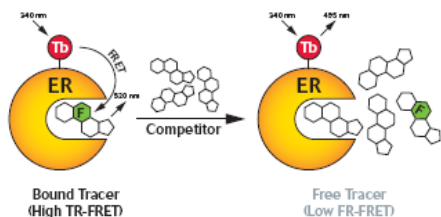


Analytické aplikace FRET



www.invitrogen.com

Analytické aplikace FRET



BRET

- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- Využití metody FRET je při analýze někdy limitováno potřebou excitace „vnějším“ světelným zdrojem („photobleaching“, excitace jiného fluoroforu)
- v případě BRET je zdrojem světla bioluminescenční reakce (nejčastěji se využívá luciferasa z *renilla reniformis*)
- sledování interakcí v živých organismech

Homo-FRET

- Studium interakce dvou prakticky totožných fluoroforů
- Po excitaci může dojít k přenosu energie, ale světlo emitované akceptorem bude mít stejnou vlnovou délku jako světlo vyzářené donorem
- Proto se sleduje zda dochází k polarizaci světla (využití fluorescenční anizotropie)
- Většinou se to týká studia biologických vzorků (např. proteinů)

Bimolecular fluorescence complementation

- Alternativou k FRET (nebo BRET) je BiFC
- Pro studium interakce proteinů nebo jiných biomolekul
- Dvě biomolekuly jsou označeny komponentami, které při interakci vytvoří fluoreskující komplex
- Fluoreskující komplex je vytvořen po cyklické reakci
- Nejčastěji se využívá YFP



Chemiluminiscence

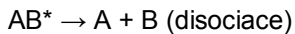
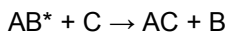
- zdrojem excitace je chemická reakce
- Základní schéma možné reakce



- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton
- při reakci se dále uplatňují katalyzátory, kovy (a ionty kovů), vnější prostředí (zejména hydrofobicita)
- téměř vždy se jedná o **OXIDACI**

http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Chemoluminescent_reaction.jpg

Excitovaný meziprodukt



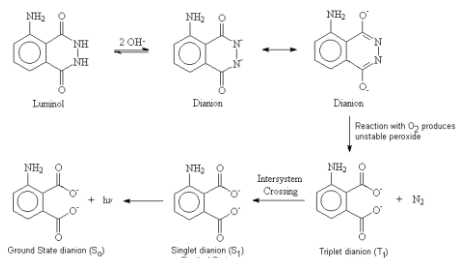
...a další možnosti de-excitace

Chemiluminiscenční reakce

- zpravidla oxidační, exotermická reakce s přebytkem energie, kterou je možné využít k excitaci molekuly (nejlépe bez „zbytečných“ energetických ztrát)
- emise fotonů musí být umožněna při návratu elektronů do základního energetického stavu
- intenzita chemiluminiscence je dána vztahem:

$$I_{CHL} = \Phi_{CL}(-dA/dt)$$

Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



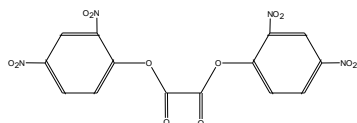
Chemiluminiscenční reakce

- reakce luminolu v zásaditém prostředí s kyslíkem (peroxid, vzdušný kyslík) → modře fluoreskující roztok
- jestliže jsou v roztoku obsaženy také Fe^{2+} , nebo Cu^{2+} (katalýza reakce) dochází k zvýšení intenzity luminiscence

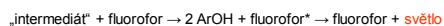
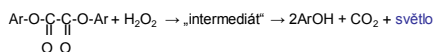


<http://people.howstuffworks.com/luminol.htm>

Barevná chemiluminiscenční světla



bis(2,4-dinitrophenyl)ethanedioate (DNPO)



23

Barevná chemiluminiscenční světla



Vhodné fluorofory: rhodamin B (červená barva), rhodamin 6G (oranžová), rubren (žlutá), 9,10 – bis fenylethynyl atracén (zelená), 9,10 – difenylatracén, další...

24

Chemiluminiscence v analytické chemii

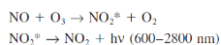
1. přímá analýza – chemiluminiscenční činidlo přímo reaguje s analytem
2. nepřímá analýza – reakce chemiluminiscenčního činidla je katalyzována/inhibována nebo jinak ovlivněna analytem

Přímá analýza

- analyt je oxidován pomocí oxidačního činidla: KMnO_4 , peroxid, O_2 , Ce^{4+} , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, tris (2,2'-bipyridin)ruthenium(III) komplex, jodistan N-bromosukcinimid
 - analytem mohou být například fenoly, polyfenoly (quercetin, katechin, atd.), indoly – alkaloidy (brucin, strychnin, atd.), heterocykly (penicilin, atd.)
 - Lze využít zesilovačů: polyfosfáty
 - oxidační činidla v reakcích vedoucích k CL produktům KMnO_4 , $(\text{MnO}_2)_2$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, Ce^{4+} , H_2O_2 , O_2 , tris(2,2'-bipyridin)ruthenium(III) komplex, jodistan N-bromosukcinimid
 - nejběžnější oxidace KMnO_4 v kyselém prostředí - nejčastěji H_2SO_4 využití zesilovačů CL
 - polyfosfáty (stabilizace meziproduktů kyselina mravenčí)
 - formaldehyd, glutaraldehyd
- analýzy - fenoly, polyfenoly (quercetin, katechin, diethylstilbestrol), indoly (alkaloidy - psilocin, brucin, strychnin, reserpin), heterocykly (peniciliny, cefalosporiny, fenothiaziny)

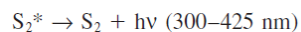
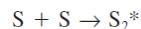
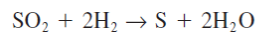
Oxidace v plynné fázi

- Jedna z nejstarších známých chemiluminiscenčních reakcí – „hoření“ bílého fosforu
- Elementární bílý fosfor se na vlhkém vzduchu oxiduje a dochází k emisi zeleného světla
- Podobnou reakcí je oxidace oxidu dusnatého ozónem
- Využívá se pro stanovení NO ve vzduchu
- Lze stanovovat i NO_2 (redukce na NO a následná oxidace)
- LOD mohou být až 1ppb NO

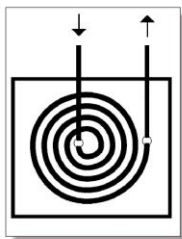
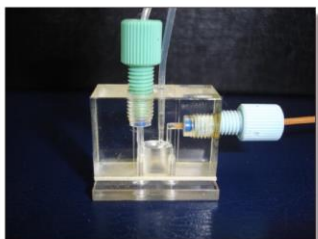


Chemiluminiscenční analýza – příklady stanovení

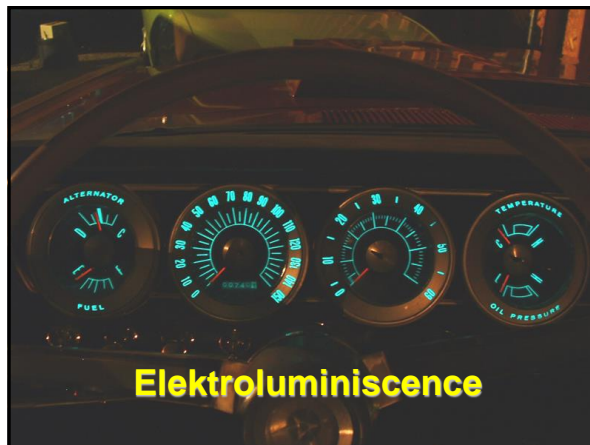
Analýza plynů: NO, ozón, po převedení i další dusíkaté sloučeniny, síra a její sloučeniny



Instrumentace pro chemiluminiscenční analýzu

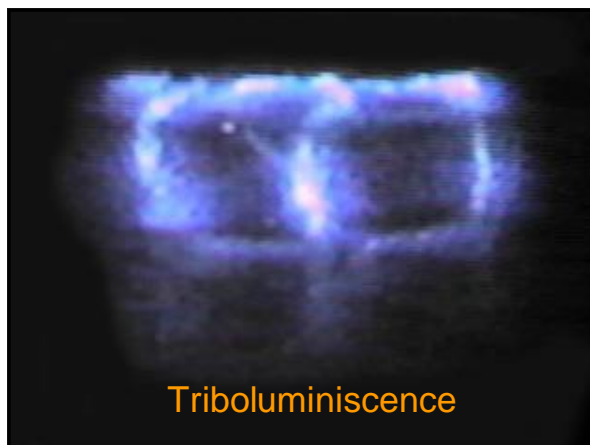


Ref. H. Sklenářová, Škola molekulové spektrometrie (2013)



Elektroluminiscence

- materiál emituje světlo působením procházejícího proudu, nebo působením elektrického pole
- většinou se jedná o tzv. radiační rekombinaci (zánik páru díra-volný elektron)
- příklady elektroluminiscenčních materiálů: ZnS dopovaný Ag, nebo Cu



Triboluminescence

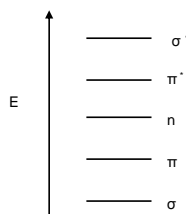
- při škrábání, drcení, nebo tření může dojít k přerušení asymetrických vazeb krystalu (cukr, diamant)
- náboj je po přerušení asymetrických vazeb nerovnoměrně rozložen
- při vyrovnání nábojů v krystalu dochází k luminiscenci

Thermoluminescence

- přírodní krystalické materiály obsahují poruchy v krystalické mřížce (např. obsahují volné ionty, které narušují elektrické pole krystalu)
- jestliže se vytvoří tzv. potenciálová díra v elektrickém poli, může se v ní usadit volný elektron (elektronová past)
- tento volný elektron může být excitován (vesmírné záření, radioaktivita) a v elektronové pasti může být jeho energie zachována i stovky, nebo tisíce let
- termoluminiscenční datování: zahříváním, nebo po ozáření silným světlem získá elektron v tzv. dlouhodobé elektronové pasti dostatek energie, aby se uvolnil
- uvolněná energie se měří
- vhodné pro datování látek, které byly v minulosti ozářeny
- nutná složitá kalibrace

Luminiscence a struktura látek

Typy přechodů



hladiny energií molekulových orbitalů

Struktura organických molekul a luminiscence – základní pravidla

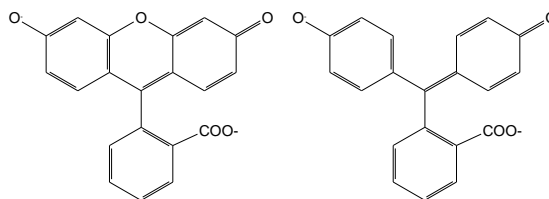
1. luminiscenci většinou nepozorujeme u uhlovdíků bez dvojných vazeb ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ přechod)
2. luminiscence je vzácná také u nearomatických uhlovdíků s dvojnými vazbami, někdy pozorujeme slabou fluorescenci molekul obsahujících karbonylovou skupinu v UV oblasti (přechod $n \rightarrow \pi^*$), nebo u vysoce konjugovaných (ale nearomatických) molekul (vitamin A)
3. většina aromatických uhlovdíků jeví dobrou luminiscenci ($\pi \rightarrow \pi^*$ přechod)

Základní pravidla

4. Aromatické systémy s přechody $n \rightarrow \pi^*$ zvyšují intenzitu fluorescence (molekuly obsahují atomy s nevázebnými elektrony – N, O, S). U jednoduchých molekul obsahujících karbonylovou skupinu (např. benzofenyly), nebo heteroatomy (pyrimidin, pyrazin) je často pozorována i fosforescence.
5. Skupiny připojené na aromatické jádro často silně ovlivňují fluorescenční vlastnosti molekuly. Tyto skupiny mohou měnit polohu nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu (týká se to jak $n \rightarrow \pi^*$, tak i $\pi \rightarrow \pi^*$ přechodů) – viz. tabulka.

skupina	vliv na Φ_F	vliv na Φ_P
alkyl	nepatrný	zvýšení
hydroxo, methoxo	zvýšení	zvýšení
Karboxylová, keto	velké snížení	velké zvýšení
Nitro, nitroso	snížení	zvýšení
amino	zvýšení	zvýšení
sulfhydrylová	snížení	-
sulfonová	nepatrný	-
kyano	zvýšení	-
X	snížení	zvýšení

6. molekuly s planární a rigidní strukturou mají vyšší kvantový výtěžek, než molekuly s velkým stupněm volnosti (konjugace takových systémů je vyšší, interakce se solventem je nižší (fluorescein x fenolftalein, různá fluorescence isomerů též molekuly).






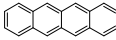
Fluorescein (výborné fluorescenční vlastnosti)

Fenolftalein (barevný, ale nefluoreskující indikátor)

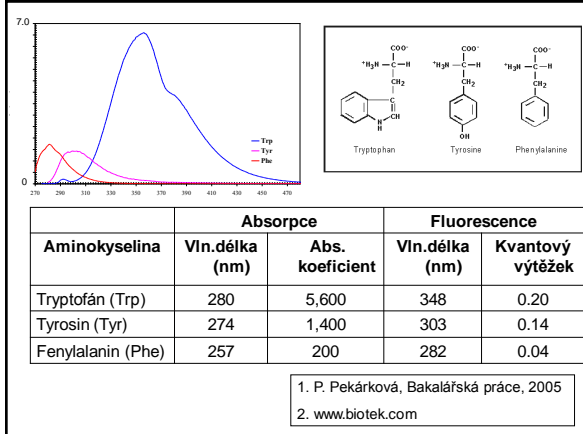
6. jestliže je na aromatickém jádře halový prvek můžeme pozorovat tzv. efekt těžkého atomu: přítomnost těžkého prvku zvyšuje pravděpodobnost přechodu na $S_0 \rightarrow T_1$, což má vliv na zvýšení Φ_p .
7. jestliže jsou aromatická jádra téže molekuly oddělena alkyovou skupinou je systém slabě, nebo vůbec konjugován (menší kvantový výtěžek, nižší vlnová délka emise).

Luminiscence a struktura

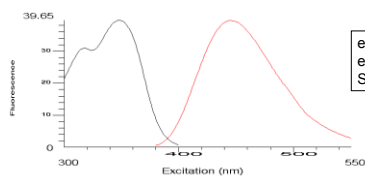
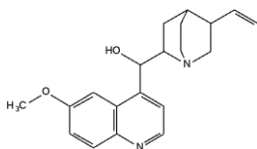
přechod $\pi \rightarrow \pi^*$ čím více je v molekule konjugovaných vazeb, tím vyšší má emitované záření vlnovou délku

Vzorec	Název	λ_{ex}	λ_{em}	Φ_F	Φ_p
	Benzén	205	278	0.11	0.26
	Nafatlén	286	321	0.29	0.1
	Antracén	365	400	0.46	<0.01
	Naftacén	390	480	0.60	-

Luminiscence organických molekul: ukázky

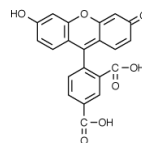


Chinin

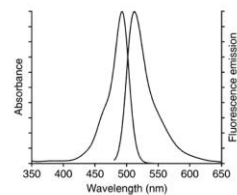


emisní maximum: 446 nm
excitační maximum: 349 nm
Stokesův posun: 97 nm

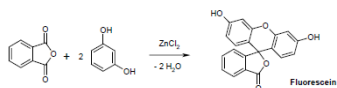
Deriváty fluoresceinu



excitační maximum: 494 nm
emisní maximum: 520 nm



Syntéza fluoresceinu



Kondenzační reakce ftalanhydridu (půl lžičky) s resorcinolem (půl lžičky)

Aplikace fluorescenční spektroskopie v hydrogeologii



Migrace podzemních vod

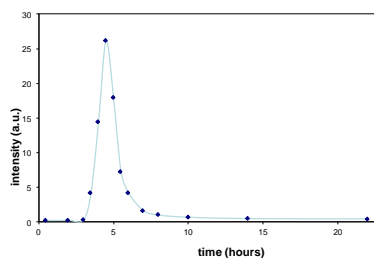
- sledování a objasnění systému podzemních řek a potoků v krasových oblastech (propadání a vývěry...)
- sledování toku vody z kontaminovaných míst (např. úložiště odpadů, skládek, atd.)



Fluorescenční „značkovače“ podzemních vod

- fluorescenční „značkovače“ (*tracer*) jsou obvykle ve vodě rozpustné, silně fluoreskující látky (fluorescein, rhodamin, eosin, erythrosin, atd.)
- jestliže dochází k velikému zředění barviva, lze použít např. hydrofobní sběrné patrony
- k detekci lze použít jak LIF, tak spektrofluorimetr vybavený lampou (i detekce několika barviv zároveň)
- lze sledovat i časový průběh průchodu barviva potokem/řekou. Z rychlosti průtoku, zředění značkovače, vzdálenosti a dalších faktorů lze usuzovat na charakter, délku, případně členitost podzemního systému.

Mapování podzemních vod



P. Taborsky, analýza, 2007.

51

„Mapování“ podzemních vod

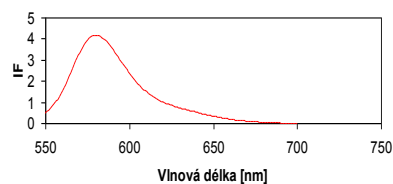
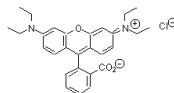


52

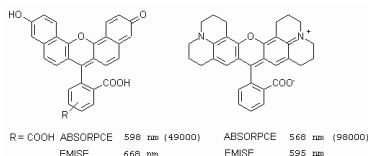
Fluorescein na Den svatého Patrika



Deriváty rhodaminu



Fluorofory s emisním maximem v oblasti kolem 600nm

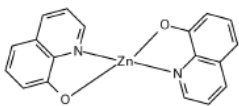


Luminiscence anorganických „species“ v roztoku

1. slabě fluoreskující ligand má komplexaci lepší fluorescenční vlastnosti (nebo obráceně...)
2. ionty kovů (zejména f-prvky), nebo jejich „species“ jeví fluorescenci (někdy také fosforescenci) v roztoku i bez komplexace
3. „anorganická“ luminiscence pochází z komplexů z nefluoreskujícími ligandy

Zlepšení luminescenčních vlastností po komplexaci (1)

- kov nijak neovlivňuje fluorescenční vlastnosti, jen stabilizuje organické ligandy tak, aby byl upřednostněn zářivý proces deexcitace
- kov může také v některých případech zhasět luminescenci
- obou jevů lze využít pro analytické stanovení, nejedná se však o příliš selektivní metodu



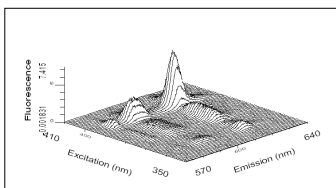
Luminescence anorganických „species“ – luminescence nekomplexovaných iontů v roztoku (2)

- lanthanité ionty (např. Eu^{3+} , Tb^{3+} , Gd^{3+} , a další)
- některé aktinoidy (např. UO_2^{2+} , $\text{Th}(\text{I})$)
- závisí i na okolí „species“ – pH, komplexace, teplota, atd.
- jedná se o přechody mezi f-f, případně d-f elektronovými přechody
- pro emisní spektra jsou obvykle ostré píky, čas vyhasínání luminescence je extrémně dlouhý (až ms)

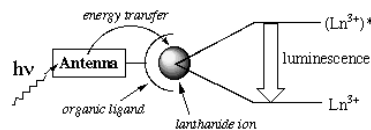
Luminescence Lanthanoidů(III)

Některé komplexy Ln(III) mají velmi neobvyklé spektrální vlastnosti:

- dlouhý čas vyhasínání luminescence
- Stokesův posun může být i více než 100 nm
- emisní spektrum obsahuje ostré píky



Anténový efekt (antenna effect)



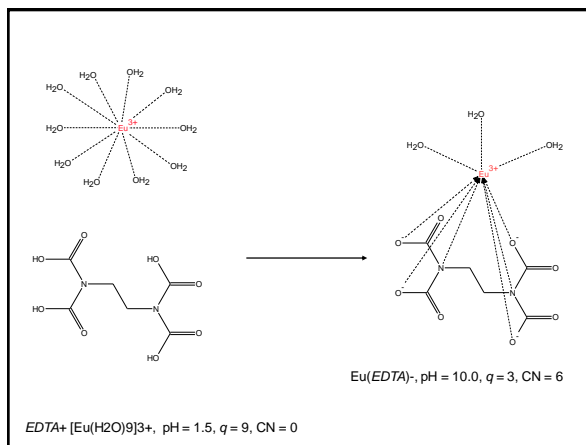
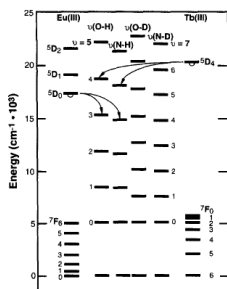
Lanthanide	Transition	Wavelength (nm)	Lifetime (ms)
Sm	${}^4\text{G}_{5/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{5/2}$	594	0.0023
Eu	${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_3$	616	0.11
Gd	${}^3\text{P}_0 \rightarrow {}^3\text{S}_2$	310	2.3
Tb	${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_5$	543	0.4
Dy	${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^6\text{H}_{15/2}$	479	0.0024

Koordinace molekuly vody do vnitřní sféry Ln³⁺

$$q = 1.05 \times (\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1})$$

$$q = 1.05 \times (\tau_{H_2O}^{-1} - 0.7)$$

$$q = 1.11 \times (\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1} - k_{NH})$$



Komplexy s nefluoreskujícími ligandy (3)

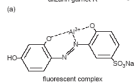
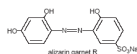
Většinou jde o tzv. C-T (charge-transfer) přechody: přenos náboje mezi ligandem a iontem kovu, dochází k přechodu elektronu z orbitalu atomu s výrazně vyšší elektronovou hustotou do orbitalu jiného atomu s menší elektronovou hustotou (buď přechod M-L, nebo L-M), tyto přechody mají vysokou intenzitu v porovnání s přechody d-d.

Komplexy s nefluoreskujícími ligandy

- jde o poměrně specifické chelatční reakce
- iontem je často diamagnetický kov
- vznik fluoreskujících komplexů je často používán v analytické chemii pro svoji specifitu

Komplexy s nefluoreskujícími ligandy – příklady

Komplexující činidlo	Iont kovu
8-hydroxychinolin	Al^{3+} , Be^{2+} , Zn^{2+} , Li^+ , Mg^{2+} a další
Flavonal	Zr^{2+} , Sn^{4+}
2-(o-hydroxyfenyl)benzoaxazol	Cd^{2+}
1,10 - fenntrolin	Ln^{3+}
Různá azobarviva	Al^{3+} , Be^{2+} , In^{3+} , Hf(IV) , Th(IV) , Sc^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sn(IV) , Y^{3+}
Benzoin	$\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$, Zn^{2+}



Luminiscence pevných látek

- luminiscence většiny molekul v pevném stavu je podobná luminiscenci v roztoku
- vibrační přechody jsou omezeny, proto není luminiscence pevných vzorků tolik závislá na teplotě a píky emisního spektra jsou zpravidla ostřejší
- zvláštním příkladem „inorganic condensed matters“ (fosfory)

Anorganické luminiscenční materiály „fosfory“



Princip

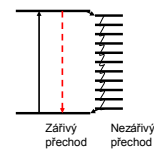
Anorganický fosfor obsahuje:

Aktivátor (activator) – zpravidla iont kovu, např. Cr^{3+} , Eu^{3+} , Nd^{3+} , a další

Aktivátor absorbuje energii (např. UV záření), dojde k excitaci a následně luminiscenční emisi, ionty aktivátoru jsou rozptýlené v matici

Maticе/matrice (host lattice) – většinou průhledná krystalická látka, např. Al_2O_3 , Y_2O_3 , atd.

Pro luminiscenční vlastnosti je klíčový aktivátor, matice ovlivňuje hlavně účinnost celého procesu (dobrý „host“ neodebírá aktivátoru energii)

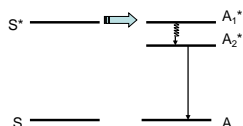


$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Sb}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$

Matrice může obsahovat dva i více iontů (např. „lampový fosfor“ $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3\text{F}:\text{Sb}^{3+}, \text{Mn}^{2+}$)

Ultrafialové záření je absorbováno pouze Sb^{3+} a přijatá energie je pak vyzářena ve formě světla (emise modrého světla) nebo předána na Mn^{2+} (energetický přenos) a pak vyzářena ve formě žlutého světla. Sb^{3+} tedy funguje jako zesilovač pro Mn^{2+} .

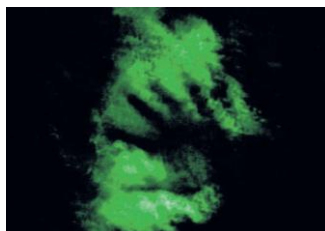
$\text{Sb}^{3+} + \text{foton} \rightarrow (\text{Sb}^{3+})^*$
 $(\text{Sb}^{3+})^* \rightarrow \text{Sb}^{3+} + \text{foton}$
 nebo $(\text{Sb}^{3+})^* + \text{Mn}^{2+} \rightarrow \text{Sb}^{3+} + (\text{Mn}^{2+})^*$
 $(\text{Mn}^{2+})^* \rightarrow (\text{Mn}^{2+}) + \text{foton}$



$\text{YVO}_4:\text{Eu}^{3+}$

- Matrice také může někdy sloužit jako „zesilovač“ (**sensitizer**)
- Ultrafialové záření excituje vanadyl (**host lattice**), ale energie je předána na Eu^{3+}
- Podobným příkladem je $\text{ZnS}:\text{Ag}^+$

Jihlavské podzemí



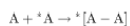
<http://www.youtube.com/watch?v=mQWh8Oc0kDU>



Místnost s fosforeskujícím nátěrem na hradě Špilberk

Excimery a exciplexy

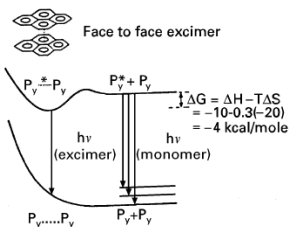
- excimer (excitovaný dimer) se tvoří, jestliže spolu reagují dvě excitované částice



- jestliže se jedná o dvě různé excitované „species“, tak vzniká exciplex



Excimery a exciplexy



Excimery a exciplexy

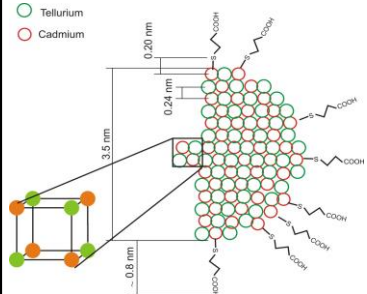
- zářivá deexcitace excimeru (fluorescence)
- nezářivá deexcitace
- excimer reaguje s jinou molekulou (např. Diels-Alderova reakce)

Kvantové tečky (quantum dots)

- agregovaný shluk stovek až tisíců atomů
- jejich vodivostní a spektrální vlastnosti jsou velmi odlišné od chování samotných atomů – tvorba nových degenerovaných orbitalů
- polovodičové nanokrystaly
- „laditelná“ fluorescence
- nejčastěji jde o kovové atomy (např. Cd, Au, Zn) rozptýlené v přebytku jiných atomů (S, Se, As, atd.)

Struktura kvantových teček

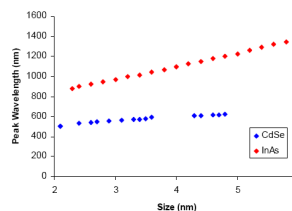
- Tellurium
- Cadmium



- velikost částice: 3,5 nm
- CdTe – kubická krystalová mřížka
- délka vazeb:
Cd-S = 0,2 nm
Cd-Te = 0,24 nm
- počet krystalových jednotek v jedné nanočástici:
~ 203
- přibližná molekulová hmotnost:
~ 200 000 g/mol

Fluorescenční vlastnosti kvantových teček

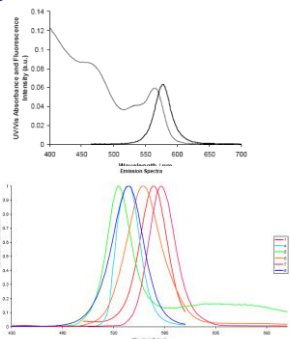
- podle složení atomů a postupu přípravy lze ovlivnit jejich emisní a excitační spektra



Evaluation of the Suitability of Quantum Dots as Fluorescence Standards, A. Knight, J. Gaunt, T. Davidson, V. Chechik a S. Windsor, REPORT 2004

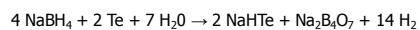
Fluorescenční vlastnosti kvantových teček

- „laditelná“ fluorescence
- úzké emisní pásy
- široké pásmo absorpce
- špatná rozpustnost
- použití: fluorescenční standardy, optické prvky, značení biomolekul...

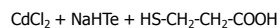


Příprava kvantových teček rozpustných ve vodě

1. stupeň:



2. stupeň:



CdTe nanočástice se vytvoří po několikahodinovém zahřívání.



Zdroje světla

vlastní - za vlastní zdroje označujeme taková tělesa nebo látky, v jejichž struktuře dochází ke vzniku světla. Za vlastní zdroj světla tedy můžeme považovat např. Slunce, žárovku, plamen atd.

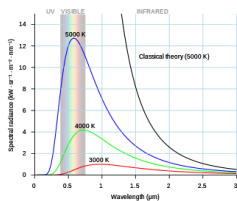
nevlastní - látky, které samy světlo nevytvářejí, ale pouze odrážejí a rozptylují dopadající světlo, se označují jako nevlastní zdroje. Mezi nevlastní zdroje lze zařadit např. Měsíc, mraky, všechny osvětlené předměty apod. Tyto zdroje lze dále rozlišovat jako: reflektory - odražeče, neprůhledné, pro dané záření refraktory - "ohybače" / "lamače", čiré, stínítka / matnice, polopřůhledné difuzéry.

Přírodní zdroje

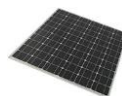
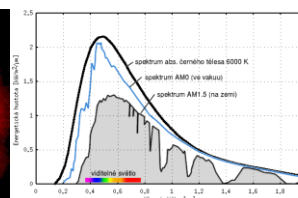
- K přírodním zdrojům patří například:
- Kosmická tělesa
 - Primární zdroje - Slunce, hvězdy: Skutečně světlo vytvářejí.
 - Sekundární zdroje - Měsíc: Pouze odráží světlo z jiných zdrojů, samy nesvílí.
- Chemické reakce - oheň, chemiluminiscence
- Biologické zdroje
 - Primární zdroje - bioluminiscence: světlušky, různí mořští živočichové, houby
 - Sekundární zdroje - odrazy očí viditelné ve tmě nebo při záblesku: nebo iridescence i obecně
- Elektrické výboje - elektrický proud v plynech (oblouk, výboj, blesk)
- Tektonické jevy - žhnoucí láva

Záření černého tělesa

- **Absolutně černé těleso, černé těleso** a nebo **černý zářič** je ideální těleso, které pohlcuje veškeré záření všech vlnových délek dopadající na jeho povrch. Absolutně černé těleso je současně ideální zářič, ze všech možných těles o stejné teplotě vyzářá největší množství zářivé energie. Celkové množství energie, které se vyzáří z povrchu absolutně černého tělesa za jednotku času a rozložení intenzity záření podle vlnových délek závisí jen na jeho teplotě. Záření Slunce se poměrně dobře blíží záření absolutně černého tělesa s teplotou přibližně 5800 Kelvinů, reální záření odpovídá záření absolutně černého tělesa s teplotou 2,7 K. Tento fyzikální pojem zavedl Gustav Kirchhoff v roce 1862.



Slunce



Teplotní zdroje světla

Inkandescence je jev vyzařování světla, způsobeného tepelným buzením. V těchto zdrojích vzniká světlo jako jedna ze složek elektromagnetického záření vyvolaného vysokou teplotou povrchu nějakého tělesa.



Patří sem oheň (svíčka, lampa), v němž září: rozžhavené částice (nejčastěji uhlíku), slabě i žhavé plyny.



Elektroinkandescence

- Vzniká průchodem elektrického proudu pevnou vodivou látkou s vysokou teplotou tání např. platina, wolfram, atd. Pevná látka se rozžhává na požadovanou teplotu, při které dochází k emisi viditelného záření
- Klasická žárovka svítí díky rozžhavenému (obvykle wolframovému) vláknku, v němž jsou elektrony vázány v atomech vláknka tepelně excitovány z nižších orbitálních hladin na vyšší; fotony zde vznikají při přeskokách elektronů mezi hladinami.
- Společnou vlastností teplotních zdrojů je:
 - velmi nízká účinnost přeměny jiného druhu energie na světlo (8%)
 - velký podíl energie vyzářené v podobě tepla (hlavní část – 92%)
- spojité rozložení světla ve spektru podle fyzikální křivky teplotního zářiče
- subjektivně příjemné vnímání světla lidským okem
- závislost barvy světla na teplotě zářiče
- závislost účinnosti zdroje na teplotě zářiče.



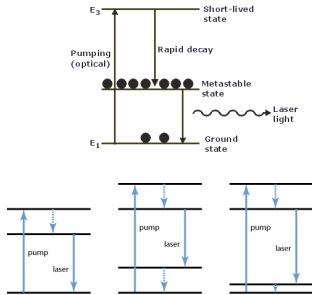
Elektrické zdroje světla s nespojitým spektrem

- Na rozdíl od teplotních zdrojů zde vzniká světlo jinými mechanismy. Obvykle jde o proud fotonů jednotlivě vyzářených při návratu elektronů z nestabilních poloh ve vyšších hladinách do stabilní polohy v nižší hladině v elektronovém obalu nějakého atomu. Protože energie uvolňovaná vracejícími se elektrony je kvantovaná velikostí „skoku“ mezi hladinami, mají i energie fotonů nespojitý průběh, rozdělený do tzv. emisních spektrálních čar nebo pásů.

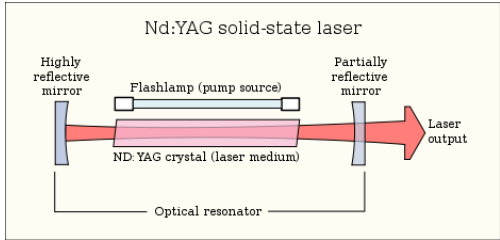
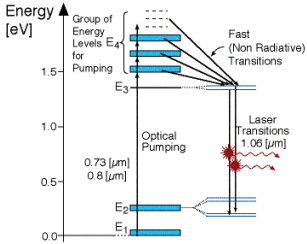
LASER



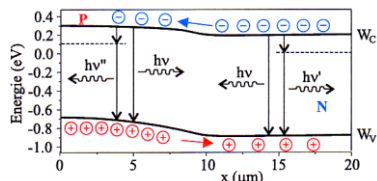
Princip laseru



Princip laseru



LED



Na rozdíl od žárovky fungují LED a LD na principu elektroluminiscence polovodičových materiálů. Zde vzniká světlo v důsledku přeskoků elektronů z vyšších energetických pásů do nižších. Rozdíl energie mezi dnem vodivostního a vrchem valenčního pásu pak odpovídá energii vyzářené ve formě fotonu. K tomuto jevu obecně dochází u všech diod, ale pouze v některých případech dojde ke vzniku světelného záření, jinak se elektrická energie mění na tepelnou nebo naopak vzniká neviditelné ultrafialové záření.

Při průchodu elektrického proudu diodou v propustném směru se energie elektronu při mezpásové rekombinaci může uvolnit ve formě fotonu o energii $W = h \cdot \nu$, kde h je Planckova konstanta a ν je frekvence fotonu. K přechodu může dojít také prostřednictvím příměsových hladin v zakázaném pásu. Emitované záření má pak o něco menší energii $h \cdot \nu$, resp. větší vlnovou délku.

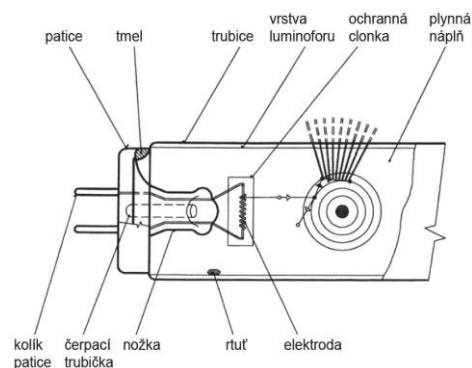
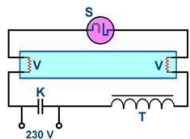
Halogenové žárovky

- Halogenové žárovky jsou zdokonalené klasické žárovky. V prostředí baňky jsou halogeny, které pomáhají snižovat odpařování vláknka, a dosahuje se tak vyšší účinnosti. Halogenové žárovky mají světlo podobné klasickým žárovkám.
- O 25-30 % nižší spotřeba energie oproti normální žárovce
- Rychlý start, delší životnost



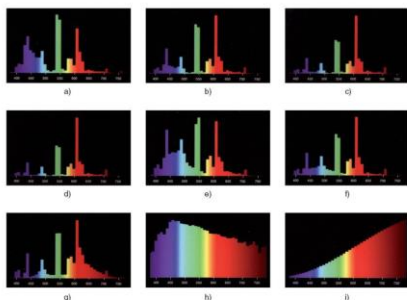
Zářivky

- Zářivka je tvořena především dlouhou trubicí, která je naplněna směsí rtuťových par a argonu. Na koncích trubice jsou elektrody, které jsou pokryty bariérou. Z katody, která je rozžhavena asi na 900 °C emitují elektrony a směřují k opačné nabité anodě. Elektrické pole je urychluje. Díky tomu, že je trubice vakuovaná (tlak uvnitř je asi 400 Pa), je dráha elektronů, než narazí do nějakého atomu, dostatečně dlouhá, aby elektron získal dostatečnou energii k vyražení dalšího elektronu z atomu. Takto dochází k lavinovité ionizaci a vzniká tzv. doutnavý výboj.
- Někdy energie elektronu nestačí na ionizaci, ale dojde k excitaci – elektron se dostane na vyšší hladinu a posléze zase sestoupí na základní hladinu a následuje emise fotonu
- Emitované fotony mají vln. délku 254 nm (UV světlo)
- Stěny zářivky jsou pokryty luminiscenčním materiálem, který je excitován fotony a emitovány jsou fotony s vyšší vlnovou délkou (viditelné záření)



Zdroj <http://www.earch.cz/>

Zářivky - luminifory



a – žárovka 865 chladná bílá s třísámkovým luminoforem
 b – žárovka 840 neutrální bílá s třísámkovým luminoforem
 c – žárovka 832 teple bílá s třísámkovým luminoforem
 d – žárovka B27 typu Interna s třísámkovým luminoforem
 e – žárovka 965 chladná bílá (střívní) de luxe
 f – žárovka 940 neutrální bílá de luxe
 g – žárovka 930 teple bílá de luxe
 h – denní světlo 665
 i – slázná žárovka

Úsporné kompaktní zářivky, tzv. „úsporky“

- Fungují jako žárovky
- Úspora 80 % energie, volba barvy světla
- (údajně) delší vydrž
- Pomalý náběh, obsahuje rtuť a lanthanoidy (nutnost recyklace)
- Neekologická výroba!



Svíčka



Použití luminiscenční
 spektroskopie v analytické
 chemii

Použití luminiscenční spektroskopie v analytické chemii

Luminiscenční analýza

Kvantitativní analýza:

$$F = k \phi \Phi_0 2.3 c l \epsilon$$

Vysoká citlivost metody:

- použití laserů
- odezva na relativně malé změny v okolí

Luminiscenční stanovení

- nativní luminiscence
- tvorba luminiscenčních komplexů
- luminiscenční značky
- luminiscenční sondy
- propojení s dalšími metodami

Vnitřní a vnější luminiscence

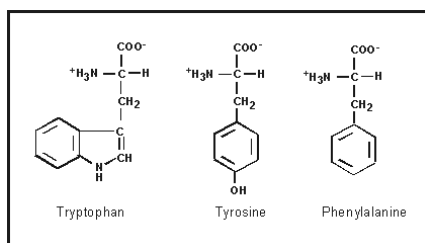
- vnitřní/*intrinsic* (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látké
- vnější/*extrinsic* luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo(barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně se na něj naváže

Nativní luminiscence

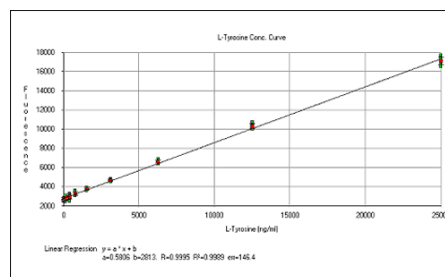
Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) noradrenaline (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

sloučenina	λ_{em}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)
indole group	270-290	330-350
LSD	325	365
quinine	347	448
papaverine	315	347
berberine	352 a 432	548
caffeine	270	303
purine	265	380
adenosine	272	390
cytosine	267	313
uracil	258	309
3-hydroxocoumarin	316	372
riboflavin	370 a 440	565
GFP	400 a 475	510
nicotinamids	470	515
cyanocobalamin	275	305
calciferol	348	420
retinol	325	470

Peptidy, proteiny, AK

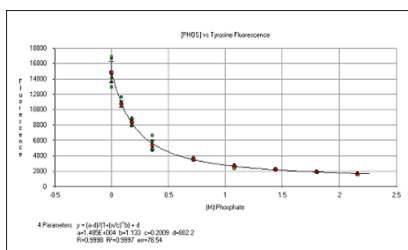


Stanovení aminokyselin



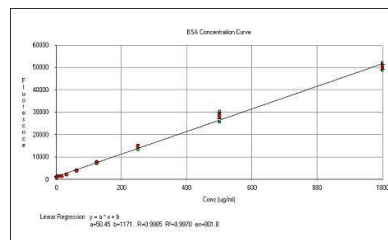
www.biotek.com

Stanovení aminokyselin



www.biotech.com

Stanovení proteinů



www.biotech.com

Nativní fluorescence proteinů – vliv polaritý okolního prostředí

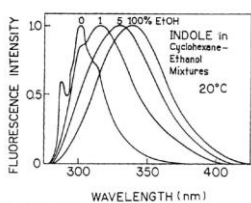
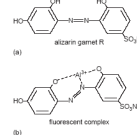


Figure 16.5. Emission spectra of indole in cyclohexane, ethanol, and their mixtures at 20 °C. From Ref. 23.

Stanovení anorganických iontů

Komplexující činidlo	Ion kovů
8-hydroxychinolin	Al ³⁺ , Be ²⁺ , Zn ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ a další
Flavonol	Zr ²⁺ , Sn ⁴⁺
2-(o-hydroxyfenyl) benzoaxazol	Cd ²⁺
1,10 - fenntrolin	Ln ³⁺
Různá azobarviva	Al ³⁺ , Be ²⁺ , In ³⁺ , Hf(IV), Th(IV), Sc ³⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Sn(IV), Y ³⁺
Benzoin	B ₄ O ₇ ²⁻ , Zn ²⁺



Fluorescenční značky a sondy

- **fluorescenční značky** (fluorescent labels) jsou vnější (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou
- **fluorescenční sondy** (fluorescent probes) jsou vnější fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti.

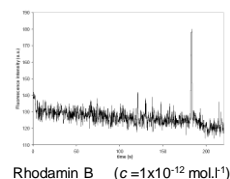
Derivatizace fluoroforem

Vnitřní (nativní) x vnější luminiscence

luminiscenční značky a sondy

Molekuly bez vlastní (vnitřní, nativní, přirozené) luminiscence lze derivatizovat luminiscenčními značkami

Omezení: lze detekovat i jednotlivé molekuly („single molecule detection“) obsahující silné luminofory, problém je jejich navázání na analyt...



Výběr fluorescenčních značek

kritéria pro výběr:

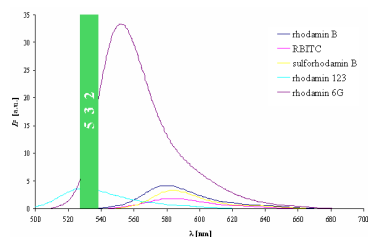
spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.)

vazebné místo ($-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ skupina a další)

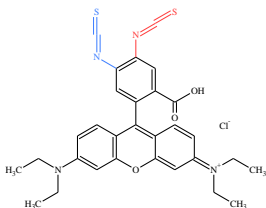
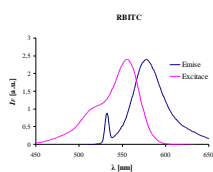
podmínky reakce (pH, koncentrace...)

hydrofobicita

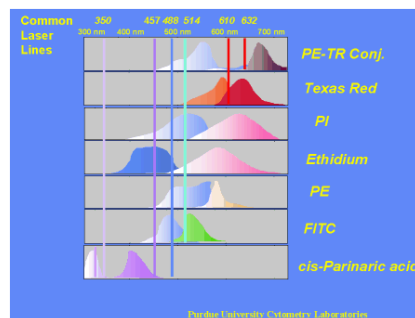
Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



Výběr luminiscenčního barviva – spektrální vlastnosti



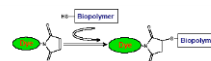
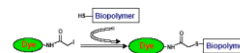
Výběr fluorescenčních barviv



Fluorescenční značky – vazebná místa amino-reaktivní značky



Fluorescenční značky – vazebná místa thiol-reaktivní značky



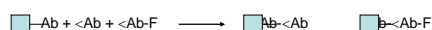
Fluorescenční metody v imunoanalýze

Imunoanalytické metody:

- dříve hlavně tvorba precipitátů
- dnes značené hlavně různým způsobem značené reaktanty (antigeny a protilátky)
- radiometricky, enzymaticky, fluorescenčně (luminiscenčně) značené reaktanty
- enzymové metody mohou mít luminiscenční detekci

Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

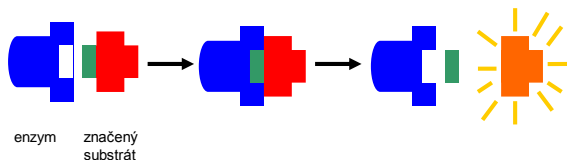
- poprvé použity v roce 1964
- často ovlivněna fluorescencí matrice a samotného vzorku
- může být použita i TR-FIA (Time Resolved Fluorescence Immuno Assay). Tato metoda využívá jako značek chelátů s lanthanitých kationtů (Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} a dalších)
- FIA lze provádět v homogenním i heterogenním prostředí, v kompetitivním i nekompetitivním uspořádání



ukázka kompetitivní FIA v heterogenním prostředí

Fluorogenní substráty – stanovení enzymatické aktivity

Princip: volný fluorofor má jiné luminiscenční vlastnosti, než když je navázaný na biomolekulu. Fluorofor je na biomolekulu navázan vazbou, kterou štěpí stanovovaný enzym.

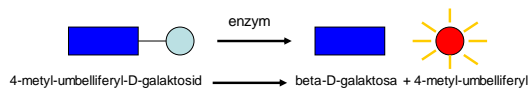


Fluorimetrická EIA

- Enzymoimunoanalýza v homogenním (EIA) a heterogenním prostředí (ELISA)

Existuje několik možností:

- antigen je značen enzymem
- antigen značený enzymem se sráží s protilátkou
- nesražený antigen s enzymem lze stanovit takto:

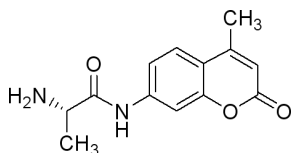


Dělení fluorescenční imunoanalytických metod

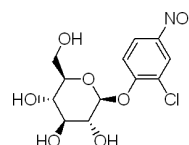
- Fluorescence Immuno Assay (FIA)
- Fluorescence Polarization Immuno Assay (FPIA)
- Time Resolved Fluorescence Immuno Assay (TR-FIA)
- Elektroluminiscenční, chemiluminiscence a další
- Enzymatické metody s luminiscenční detekcí

Radiometrická vs. fluorescenční detekce v imunoanalýze

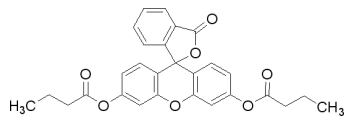
- dříve byla nejcitlivější metodou RIA, ale s příchodem levných laserů je rozšířenější luminiscenční detekce
- detekční limity obou metod jsou srovnatelné (až $10^{-12} \text{ g.l}^{-1}$), ale luminiscenční detekce je bezpečnější a levnější



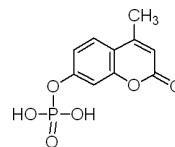
L-Alanine 7-amido-4-methylcoumarin: fluorogenní substrát pro stanovení Aminopeptidáz



2-Chloro-4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside: fluorogenní substrát pro stanovení β -Glucosidase

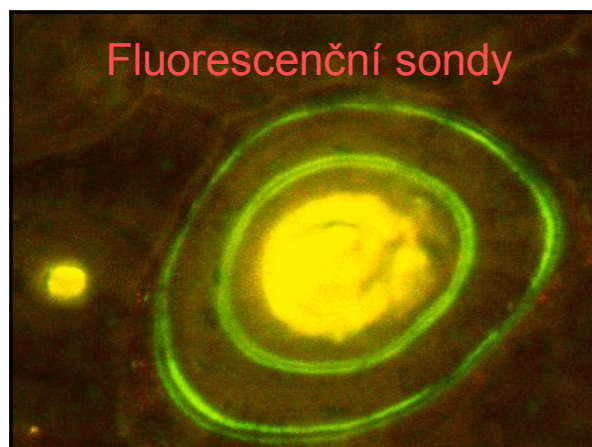
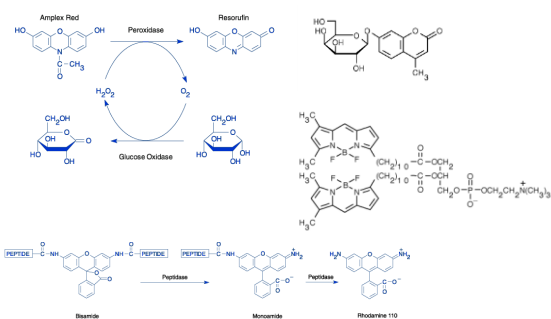


Fluorescein dibutyrate: fluorogenní substrát pro stanovení esteráz a lipáz



4-Methylumbelliferyl phosphate: fluorogenní substrát pro stanovení fosfatázy

Fluorogenní substráty



Fluorescenční sondy

- vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám, iontům, atd. váží nekovalentní vazbou
- změna fluorescenční vlastností (intenzita emise, posun emisního maxima, změna času vyhasínání)
- Princip: různý vliv na Franck-Condonův excitovaný stav

Fluorescenční sondy pro využití v analytické chemii, medicíně a biologii

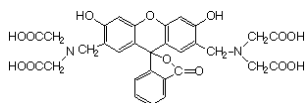
- kromě měření emisních spekter se využívá zejména fluorescenční mikroskopie, zhášení (emise i času vyhasínání)
- fluorescenční indikátory: sondy citlivé na určitou látku (většinou anion, či kation)
- sondy pro polaritu prostředí
- membránové sondy
- fluorescenční sondy pro nukleové kys.
- další
- www.molecularprobes.com

Indikátory pro anorganické ionty

• **disociační konstanta** – musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu (koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu)

• pro sondy, u kterých dochází k nárůstu intenzity fluorescence platí vztah:

$$c_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$



Indikátory pro anorganické ionty

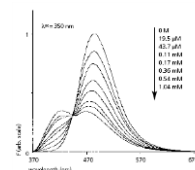
pro sondy, které vykazují spektrální posun se používá:

$$c_a = K_d (S_F(\lambda_2) / S_B(\lambda_2)) (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

kde $R = I(\lambda_1) / I(\lambda_2)$ je poměr intenzit pro dvě excitační vlnové délky λ_1 a λ_2 , R_{\min} a R_{\max} jsou poměry pro sondu volnou a plně obsazenou analytem,

$S_F(\lambda_2) / S_B(\lambda_2) = \epsilon_F \Phi_F / \epsilon_B \Phi_B$, ϵ - extinkční koeficienty, Φ - kvantové výtěžky sondy

excitované při λ_2 .

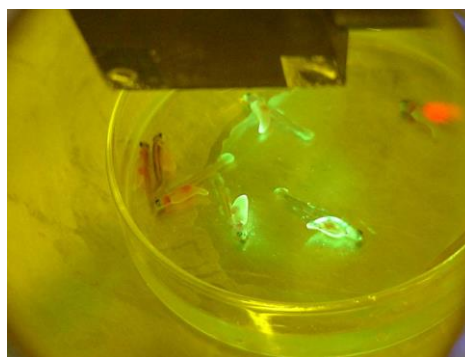
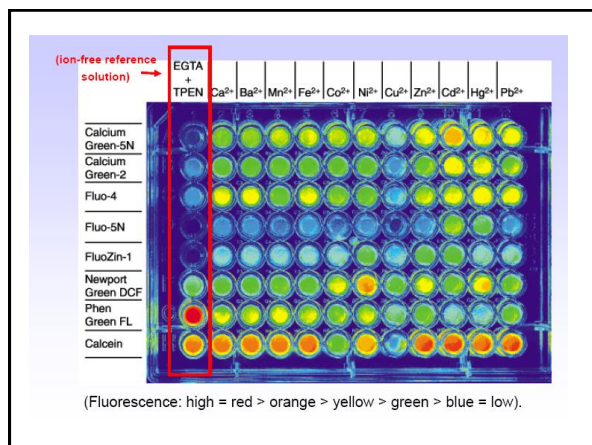
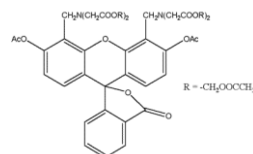


Indikátory pro anorganické ionty

- nejčastěji indikátory Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ nebo K^+
- indikátory jsou zpravidla chelatační činidla
- různé obchodní názvy (např. Fura-2, Calcium Green, Indo, atd.)

Stanovení Ca^{2+}

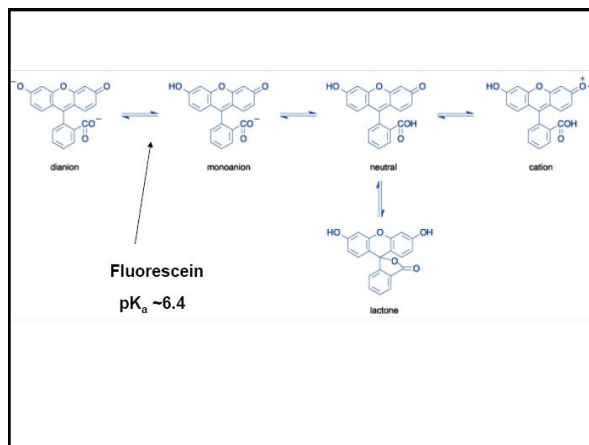
- stanovení Ca^{2+} pomocí fluorexonu (calceinu)
- analytické stanovení Ca^{2+} (i v přítomnosti Mg^{2+}) – vymizení fluoreskujícího komplexu Ca^{2+} -fluorexon při titraci pomocí EDTA v zásaditém prostředí



Calceinem značený losos...

Indikátory pH

- použití pH indikátorů: kam nemůžeme dát pH elektrodu – např. buňky, živé tkáně, atd.
- buněčné pH se pohybuje mezi 6.8 – 7.4
- možnost měřit pH na dvě desetinná místa

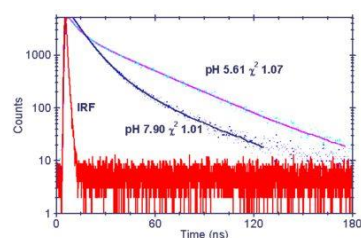


Indikátory pH

fluorofor	rozsah pH	způsob měření
SNAFL indikátory	7,2-8,2	Ex 490/540 nebo Em 540/630
SNARF indikátory	6,0-8,0	Em 580/640
HPTS (pyranin)	7,0-8,0	Ex 450/405
BCECF	6,5-7,5	Ex 490/440
Fluoresceiny a karboxyfluoresceiny	6,0-7,2	Ex 490/450
LysoSensor Green DND-189	4,5-6,0	Em 520
Oregon Green indikátory	4,2-5,7	Ex 510/450 nebo Ex 490/440
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	3,5-6,0	Em 450/510

„lifetime“ pH indikátory

- čas vyhasínání ovlivněn hodnotou pH
- výhoda: při měření tau nezáleží na koncentraci indikátoru

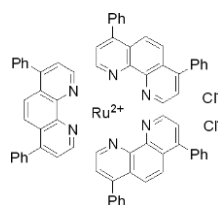


Sondy pro detekci plynů rozpuštěných v biologických kapalinách

- nejčastěji detekce O₂, nebo NO
- „lifetime“ sondy
- nejčastěji na principu oxidace centrálního iontu obsaženého v sondě, nebo dynamickém zhasnutí kyslíkem
- luficerin, luminol...

Rutheniové sondy

Ukázka: kyslíkové sondy používané k detekci kyslíku v kůži (www.molecularprobes.com)



Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride (abs. λ_{max} 455 nm, luminescence λ_{max} 613 nm)

Sondy pro měření polaroty prostředí

- Často se mění i kvantový výtěžek a doba vyhasínání fluorescence
- Polarita prostředí ovlivňuje většinu fluoroforů (např. tryptofánu)
- Polarita blízkého okolí fluoroforu může být dána konformací biomolekuly

Příklad sondy pro studium polaroty prostředí

Typickými sondami pro dynamickou polaritu jsou **1-anilinonafthalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-p-toluidinonafthalén-6-sulfonát (TNS)**. S rostoucí polaritou prostředí se emisní spektrum posouvá k vyšším vlnovým délkám.

Fluoresceční vlastnosti ANS v různých prostředích

rozpuštěnl o	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (nm)	kvantový výtěžek	doba dohasínání (ns)
oktanol	464	0,646	12,3
propanol	466	0,476	10,2
metanol	476	0,216	6,05
voda	515	0,004	0,55

Membránové fluorescenční sondy

- membránové struktury obvykle neobsahují fluorofory (většinou se jedná o nepolární uhlovodíkové řetězce – zbytky mastných kyselin), proto se jejich vlastnosti zkoumají pomocí sond
- transport a metabolismus lipidů v živých buňkách
- recyklace synaptosomů
- přenos signálu zprostředkovaný lipidy
- membránový potenciál
- interakce léčiv s membránou
- transport membránou
- mikroviskozita membrán a teplotní fázové přechody

Rozdělení membránových sond

1. fluorescenčně značené lipidy
2. malé lipofilní organické fluorofory

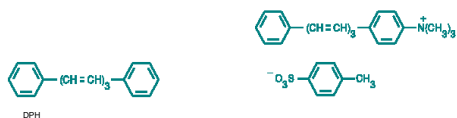
Fluorescenčně značené lipidy

- **masná kyselina** je označena vhodným fluoroforem (nitrobenzoxadiazol (NBD), BODIPY, pyrén nebo dansyl)
- **fosfolipid** jsou značený buď v oblasti polárních hlaviček (dansyl, NBD, BODIPY, fluorescein, tetrametylrhodamin, Oregon blue, Oregon green, Texas red a dalšími), nebo v oblasti zbytků mastných kyselin (DPH, NBD, pyrén, BODIPY)
- značení **sfgolipidů, steroidů, triglyceridů, lipopolysacharidů**

Malé lipofilní, nebo amfifilní organické fluorofory

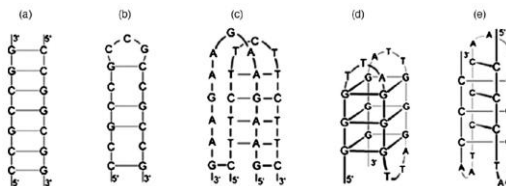
- malé molekuly, které podávají informaci o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita a uspořádání lipidů.
- typickým příkladem je nepolární sonda **DPH** (1,6-difeny-1,3,5-hexatrien) – je ve vodě nerozpustná, fluoreskuje jen v nepolárním prostředí biologických membrán

Ukázky nepolárních malých sond



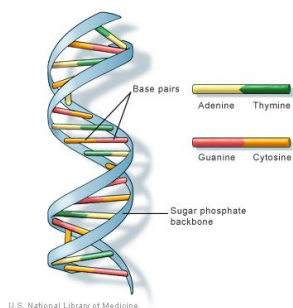
Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA (nukleové báze jeví jen slabou luminiscenci)

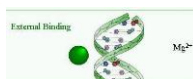


a) Duplex-dvošroubovice (antiparalelní, intermolekulární), b) hairpin-vlasečka (antiparalelní, intramolekulární), c) triplex (paralelní, intermolekulární), d) G-kvadruplex (antiparalelní, intramolekulární), e) i-motiv (intramolekulární)

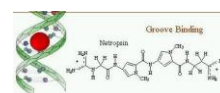
Dvošroubovicová DNA (helix, duplex, B-DNA, atd.)



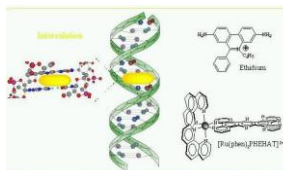
Vazebné možnosti



„vnější vazba“ – atmosféra + iontů kolem – nabitě DNA

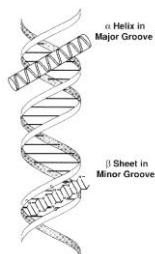


„vazba ve žlábků“ – van der Waalsův kontakt s léčivem ve žlábků



„interkalace“ – vmezení planárního aromat. systému mezi páry bází

Interakce ve žlábcích



Velký žlábek:

interaguje s α helixy. Helix se orientuje podél osy žlábků, postranní řetězce tvoří H-vazby s bázemi, event. kontakty s fosfát. skupinami.

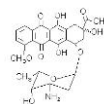
Malý žlábek:

interaguje s β skládanými listy. List leží podél osy žlábků, tvoří H-vazby k dusíkům amino skupin a k fosfátům.

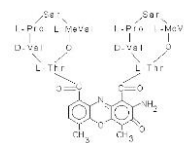
Interkalace

= interakce s DNA – léčivo (planární aromatická molekula) se váže mezi 2 sousední páry bází, aniž přeruší W-C páry \Rightarrow deformace cukr fosfátové páteře

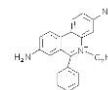
Pt^{II} interkalátory



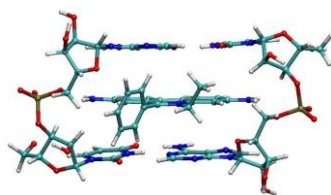
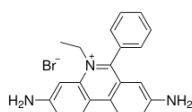
daunomycin
(skupina antracyklinů)



aktinomycin D
(peptidové antibiotikum s phenoxazonovým arom. systémem)



ethidium bromid



Ethidium bromid interkalovaný mezi pár adenin-uracil

- ethidium bromid: ve vodě fluoreskuje jen slabě, při interakci s DNA se intenzita fluorescence zvýší 30x a čas vyhasínání se zvýší z 1.7 ns na 20 ns.

Příklady sond pro NK

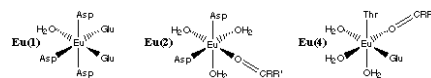
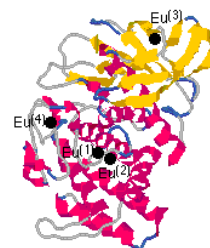
fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezeřování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
Propidium jodid	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
DAPI	358	461	částečné prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
Hoechst 33342	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...
PicoGreen	502	523	ultračisticí kvantifikace roztoků dsDNA
OliiGreen	498	518	ultračisticí kvantifikace roztoků ssDNA a oligonukleotidů
RiboGreen	500	520	ultračisticí kvantifikace roztoků RNA
TOTO-1	514	533	neprostupuje membránu; vysoká afinita pro nukleové kyseliny
SYTO 85 orange	567	583	prostupuje membránou

Studium vazných míst biomolekul

- „calcium binding sites“ – místa v proteinech, kde se váže Ca^{2+}
- při studiu interakcí je možné nahradit vápenaté ionty Ln^{3+} (nejčastěji Eu^{3+} , nebo Tb^{3+})
- Ln^{3+} mají podobné vlastnosti jako Ca^{2+} , ale mají výborné luminiscenční vlastnosti
- podobný iontový poloměr
- koordinační číslo Ca^{2+} (až 8) je podobné koordinačnímu číslu Ln^{3+} (až 9)
- preference koordinace „tvrdými donory“
- Ln^{3+} váže 10^5 silněji než Ca^{2+}
- Ln^{3+} ligandová výměna je 100x pomalejší, než výměna Ca^{2+}
- jestliže Ln^{3+} nahradí Ca^{2+} v katalytickém místě, rychlost reakcí poklesne

Studium vazebných míst Ca^{2+}

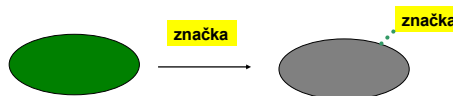
- protein thermolysin
- z luminiscenčního spektra a časů vyhasínání lze určit polohu Eu^{3+} (resp. Ca^{2+}) v biomolekule



Vnější fluorofory: shrnutí

Vnější fluorofory

- **značky** (derivatizace, „labels“, „tags“) – kovalentní vazba
- **sondy** (indikátory, „probes“) – různé typy nekovalentních interakcí

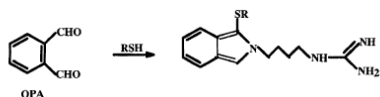


Důvody pro použití značek a sond

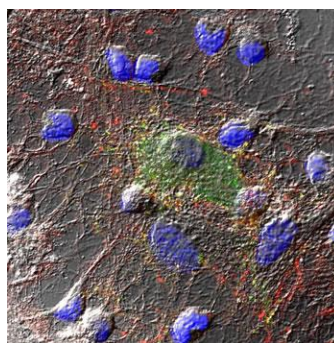
- **zvýšení citlivosti**
- **získání informace** o koncentraci analytu, o struktuře látky, o funkci molekuly v systému...
- **odvozené metody** (FRET, FIA, EIA, atd.)
- **kombinace značek a sond** (FISH, fluorescenční mikroskopie)

Značky

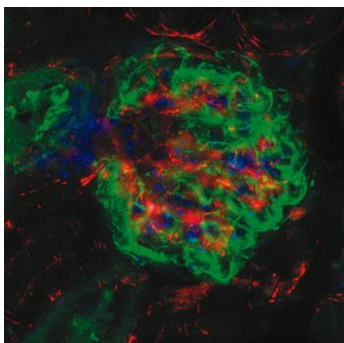
- značení molekul: „steady state“ luminiscenční spektroskopie, časově rozlišená luminiscence, luminiscenční detekce ve spojení se separačními technikami, fluorescenční mikroskopie, fluorescenční anizotropie...
- značení peptidů, proteinů, protilátek, antigenů, enzymů, NK, membrán, buněk, tkání, celých organismů...
- použití také „in vivo“
- využití: chemie, fyzika, biologie, medicína...



Ukázka derivatizačního činidla pro LIF – HPLC (CE)



převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

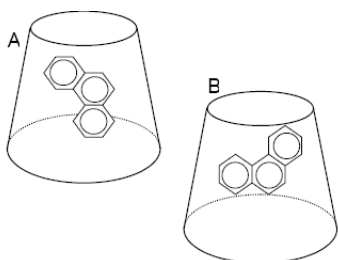


Myší játra značená různými fluorofory...

převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

Sondy

- využití: analytická chemie – detekce menších částic (ionty, malé molekuly), biologie a medicína (snadnější přístup např. do buněk)
- různé detekční systémy (mikroskopie, spektroskopie, „steady state“, časově rozlišena, atd.)
- použití „in vivo“
- membrány opticky aktivních senzorů



Axialní, nebo ekvatoriální inkluze

Fluorescenční optické senzory

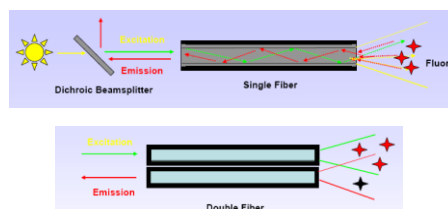
Fluorescence-based optical sensors

Fluorescenční optické senzory

- alternativa k optickým sensorům s chromofory
- pasivní a aktivní optické senzory
- senzory iontů, molekul
- různé typy interakcí...

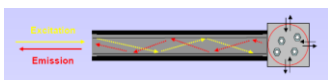
Pasivní senzory

- pasivní senzory excitují a sbírají světlo s roztoku, nebo povrchu, se kterým jsou v kontaktu

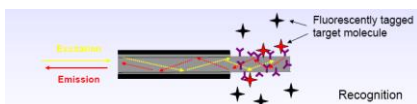


Aktivní senzory

- v koncové části senzoru je polopropustná, nebo propustná membrána, za kterou se nachází fluorofor, který může reagovat s analytem v roztoku



- např. v senzoru se mohou nacházet např. značené protilátky

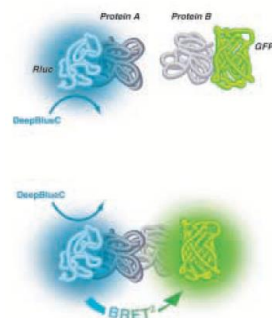


Odvozené techniky

- FRET
- BRET
- FISH
- FIA
- EIA
- a další

BRET

- podobně jako u FRET záleží na vzdálenosti mezi fluorofory – jestliže je dostatečně krátká, probíhá výměna energie (dojde k vyzáření světla druhým fluoroforem)
- u metody BRET je donorem energie luciferázou katalyzovaná oxidace coelenterazinu (z mořského koníka *Renilla*)
- jestliže je v blízkosti GFP, dojde k přenosu a následnému vyzáření zeleného světla
- možné i použití jiných molekul, např. derivátu coelenterazinu DeepBlueC (Packar Bioscience, USA)



Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



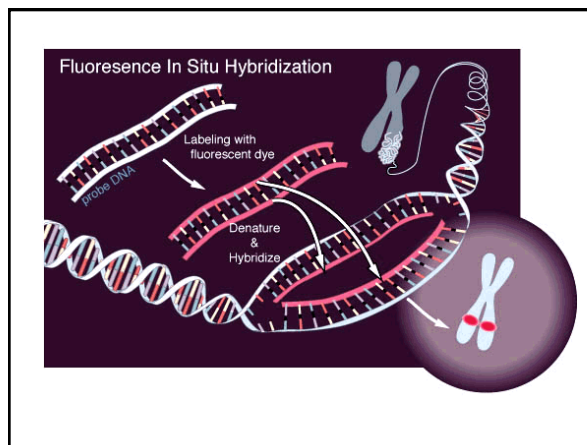
není Fish jako FISH...

FISH

- Fluorescence In Situ Hybridization je cytogenetická metoda, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromosomech
- tato metoda je určena k mapování genů a sledování chromosomálních abnormalit, atd.
- pro detekci se využívá fluorescenční mikroskopie

FISH

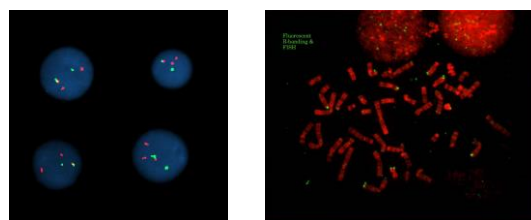
- krátký jednovláknový (single stranded) úsek DNA, který je komplementární k hledané sekvenci, je označen fluorescenční značkou
- v rozpletených úsecích DNA dochází k navázání na komplementární části
- dochází k nalezení a označení části sekvence, která kóduje zkoumaný úsek

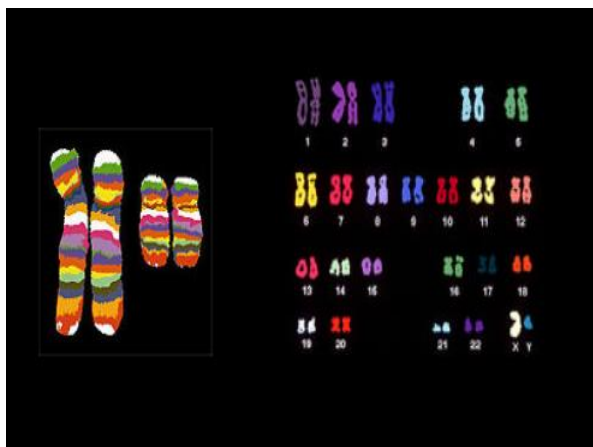


Typy FISH

- **Locus specific probes:** jestliže izolujeme malý kousek genu a chceme vědět v kterém chromosomu se nachází
- **Centromeric repeat probes:** chromosomy obsahují opakující se sekvence. Jedním typem sondy lze obarvit velkou část chromosomu. Každý chromosom může mít jinou barvu...
- **Whole chromosome probes:** soubor více sond, které hybridizují chromosom po celé jeho délce. Tvorba tzv. spektrálního karyotu

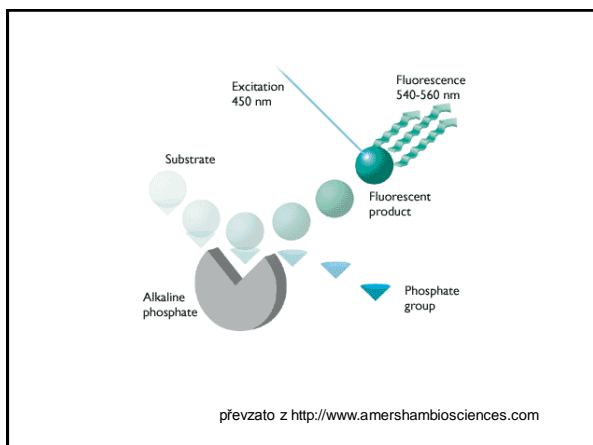
Ukázky FISH



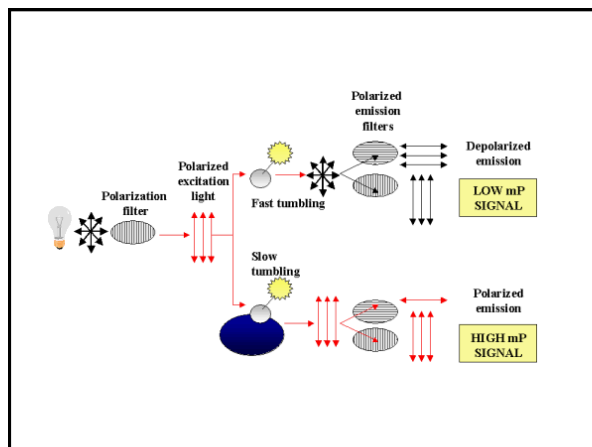


Bioanalytické metody

- FIA
- EIA



Polarizovaná fluorescence a fluorescenční anizotropie



Fluorescenční anizotropie

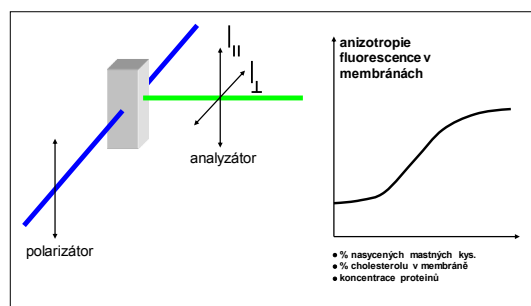
- je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace (**fotoselekce**)
- je-li průměrná rotační relaxační doba (charakterizující rotační difúzi v roztocích) mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom také výsledná fluorescence bude polarizována
- bude-li naopak průměrná rotační relaxační doba mnohem kratší než doba dohasínání fluorescence, potom anizotropie systému klesne ještě před emisí na limitní hodnotu (v izotropním systému o malé viskozitě až na nulu)
- pokud jsou doba dohasínání fluorescence a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází

Fluorescenční anizotropie

- Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.:
- fluidita membrán
- interakce ligand - receptor
- proteolýza
- interakce protein - DNA
- kontrakce svalů
- aktivita proteinkináz

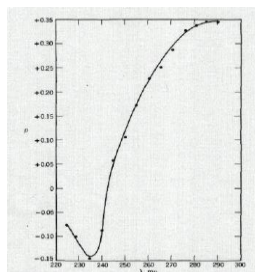
$$\text{stupeň polarizace } p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

$$\text{anizotropie } r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$$

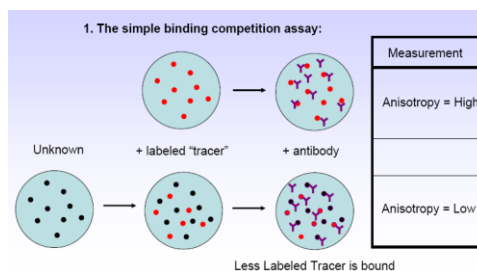


Polarizační spektra

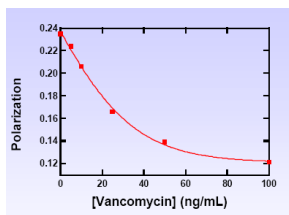
Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.



Imunoanalýza – polarizace luminiscence



Polarizace luminiscence - aplikace



Vancomycin – kalibrační křivka

Vancomycin (ng/mL)	Polarization	[Tracer] bound (%)
0	0.234	100
5	0.223	91
10	0.207	76
25	0.167	41
50	0.139	16
100	0.119	0

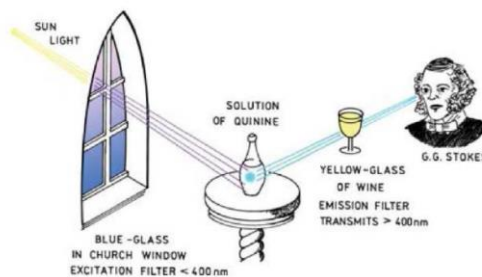
Fluorescenční korelační spektroskopie

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je technika při níž jsou měřeny spontánní fluktuační intenzity fluorescence v mikroskopickém objemu (kolem 10-15 l) určeném fokusovaným excitačním laserovým paprskem. Malé, rychle difundující fluorofory způsobují rychlé fluktuační intenzity fluorescence – oproti konvenční fluorimetrii nedochází ke způměrování těchto difúzně závislých fluktuačních. Časová závislost intenzity fluorescence je potom analyzována pomocí dočasně autokorelační funkce, která obsahuje informaci o rovnovážných koncentracích, reakčních kinetikách a difúzních rychlostech molekul ve vzorku

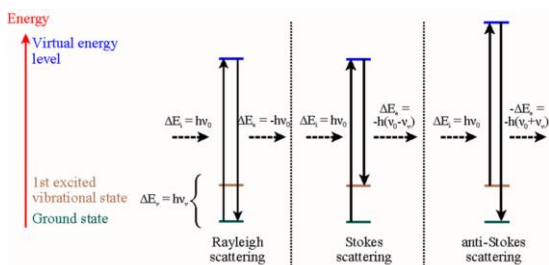
Fluorescenční korelační spektroskopie - aplikace

- fragmentace nukleových kyselin
- hybridizace nukleových kyselin
- tvorba produktů PCR
- laterální oddělení lipidů v dvojvrstvách
- difúze molekul v jádře a cytoplazmě
- interakce protein-protein
- vazebná rovnováha pro léčiva a jiné ligandy
- shlukování (clustering) membránových receptorů

Stokesův posun



Ramanův a Rayleighho rozptyl



Rayleighho rozptyl

- **Rayleighův rozptyl** je rozptyl světla na molekulách plynu případně na jiných částicích podstatně menších než vlnová délka
- při Rayleighově rozptylu se frekvence záření (vlnová délka) nemění
- světlo rozptyluje přímo molekuly (vzduchu, plynu, atd.) a intenzita rozptýleného světla silně závisí na jeho vlnové délce (je nepřímo úměrná její čtvrté mocnině)
- to znamená, že modré světlo s krátkou vlnovou délkou se rozptyluje více než světlo **červené**

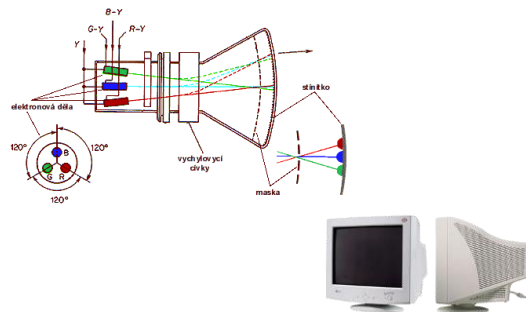


„Klasický televizor“ - CRT

Cathod Ray Tube - katodová trubice paprsků
princip fungování

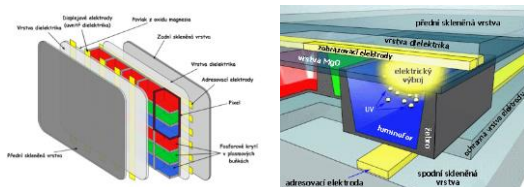
vakuumová elektronika
elektronové paprsky jsou vysílány z **elektronového děla** (u barevného monitoru tři děla - RGB)
o správné usměrnění svazku paprsků se starají **vychylovací cívy**
před dopadem na obrazovku procházejí paprsky **maskou**
maska zajišťuje, že paprsky dopadnou na správné místo v tzv. **luminiscenční vrstvě** - náteru
svčících bodů (stínítku)
existují různé typy masek i způsobů nanesení luminoforu - Delta, Inline, Trinitron, Flatron, Quintron,
Cuntron® a další
úhlopříčka - vzdálenost dvou protilehlých vrcholů obrazovky, udává se v palcích (viditelná úhlopříčka je
obvykle menší)
15", 17", 19", 21" - úhlopříčky běžně používaných monitorů
rozlšení - počet zobrazitelných pixelů, udává se jako počet řádků na řádku krát počet řádků, většinou je
poměr šířky a výšky obrazovky 4:3
800 × 600, 1024 × 768, 1280 × 1024, 1600 × 1280 - optimální rozlšení pro příslušné délky
úhlopříčky
velikost (rozteč) luminiscenčních bodů - dnes bývá kolem 0,25 mm
obnovovací frekvence (Refresh Rate, V-Sync)
udává jak rychle dokáže monitor překreslit všechny pixely na všech řádcích - paprsek putuje po
řádcích zleva doprava a odshora dolů
dobrá ergonomická hranice je 75 Hz, při níž je celá obrazovka překreslena 75-krát za sekundu

CRT



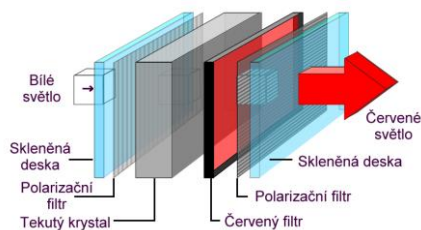
Plazmová televize

Mezi skleněné desky je umístěno **velké množství** vzájemně
oddělených **buněk naplněných plynem**. Po přivedení napětí
na **elektrody** v buňce dojde k **výboji** a vznikne **ultrafialové** (okem
neviditelné) záření, které dopadá na **vrstvu luminoforu**, která
vyzařuje **světlo dané barvy**. **Intenzita** (jas) každého bodu se
ovládá **množstvím výbojů** za jednotku času.

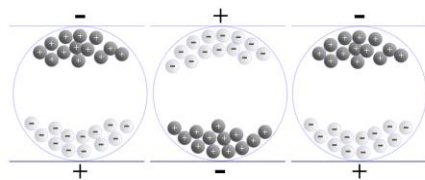


LCD

U LCD (Liquid Crystal Display) obrazovky je **každý pixel** tvořen **trojicí subpixelů**.
Zezadu je displej **prosvěcován zdrojem bílého světla** (zářivka, výbojka, nebo
LED diody). Před každý subpixelem je **barevný filtr** tvořící základní **barvy RGB**.
Viz například **červený subpixel**.

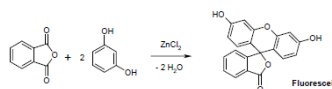


"Elektronický papír"



"Elektronický papír" používá k zobrazování mikrokapsule obsahující černé a bílé kulčky s elektrickým nábojem. Přivedením impulsu napětí na elektrody se opačné póly přiláhnou a kulčky se přesunou. Tak vzniká obraz až do další změny. Na změnu stavu je zapotřebí jen zanedbatelné množství energie a zobrazovač nepotřebuje podsvícení - navíc je dobře čitelný i na přímém slunci. Změna je ale příliš pomalá (řádově 0,5 s), proto se tyto zobrazovače používají například v elektronických čtečkách knih nebo v digitálních hodinách, kde není potřeba zobrazovat rychlé změny.

Syntéza fluoresceinu

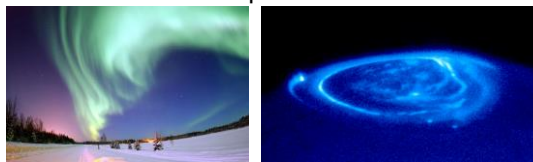


Kondenzační reakce ftalanhydridu (půl lžičky) s resorcinolem (půl lžičky)

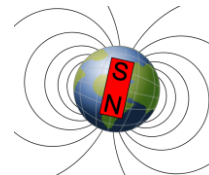
Fluorescein na Den svatého Patrika



Jak vzniká polární záře?



Na Slunci vznikají vířivem nerovnosti v magnetickém poli sluneční skvrny. U těchto skvrn vznikne jedná masivní protuberance (erupce). Mrak částic slunečního větru tvořený protony, elektrony a alfa částicemi letí vesmírem (rychlostí řádově 0,1 % rychlosti světla) a pokud se na své cestě setká s magnetickým polem Země, tak ho ono pole většinu odrazí dál do vesmíru, ale část ho zachytí a stlačí po spirálách směrem k magnetickým pólům Země. Tam sluneční vítr interaguje s atmosférou a vzniká polární záře. Urychlené částice narážejí do molekul plynů v atmosféře a excitují je. Po následné de-excitaci jsou vyzářeny fotony (kyslík – 557,7 nm).





Děkuji za pozornost...

