

# Luminiscencia

Jozef Hritz

jozef.hritz@ceitec.muni.cz

Nápad na praktickú aplikáciu: Kontrola čistoty mäsa na bytúнку

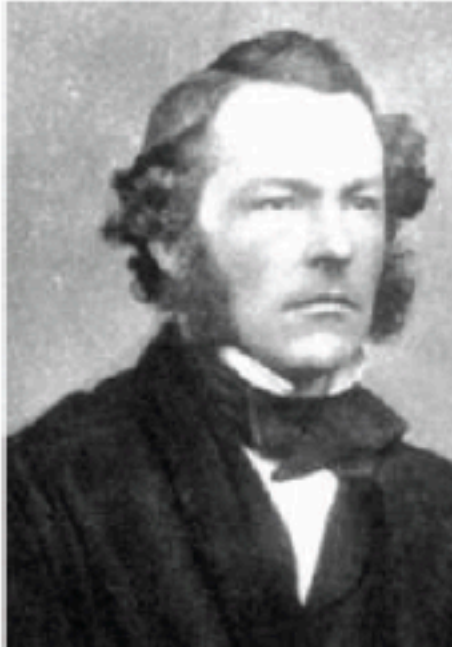
# Základné pojmy

Luminiscenciou nazývame emisiu svetla atómu, alebo molekuly, ktorá sa odohráva z excitovaného stavu elektrónu

Luminiscencia sa formálne delí na fluorescenciu a fosforescenciu v závislosti na charaktere elektronového excitovaného stavu.

Fluoroforom nazývame látku schopnú absorbovať a emitovať svetlo.

# Objav Fluorescencie



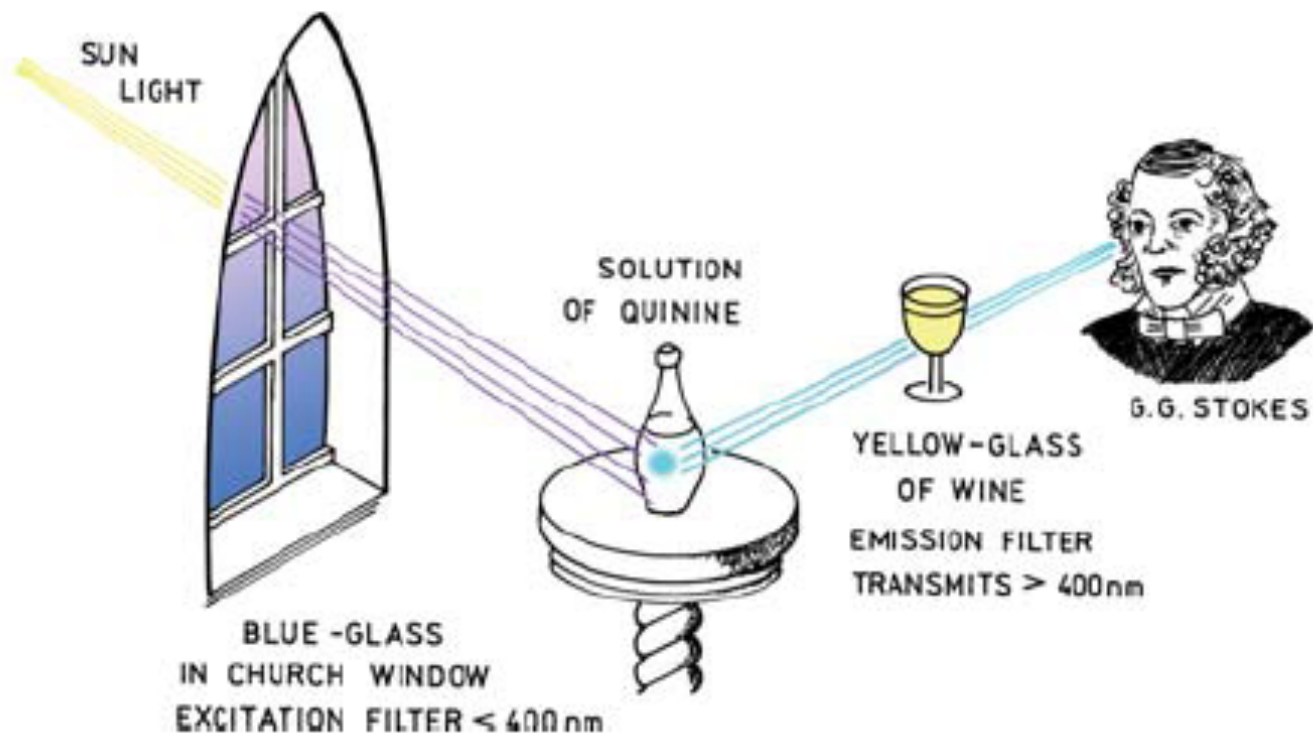
XXX. *On the Change of Refrangibility of Light.* By G. G. STOKES, M.A., F.R.S.,  
Fellow of Pembroke College, and Lucasian Professor of Mathematics in the  
University of Cambridge.

Received May 11,—Read May 27, 1852.

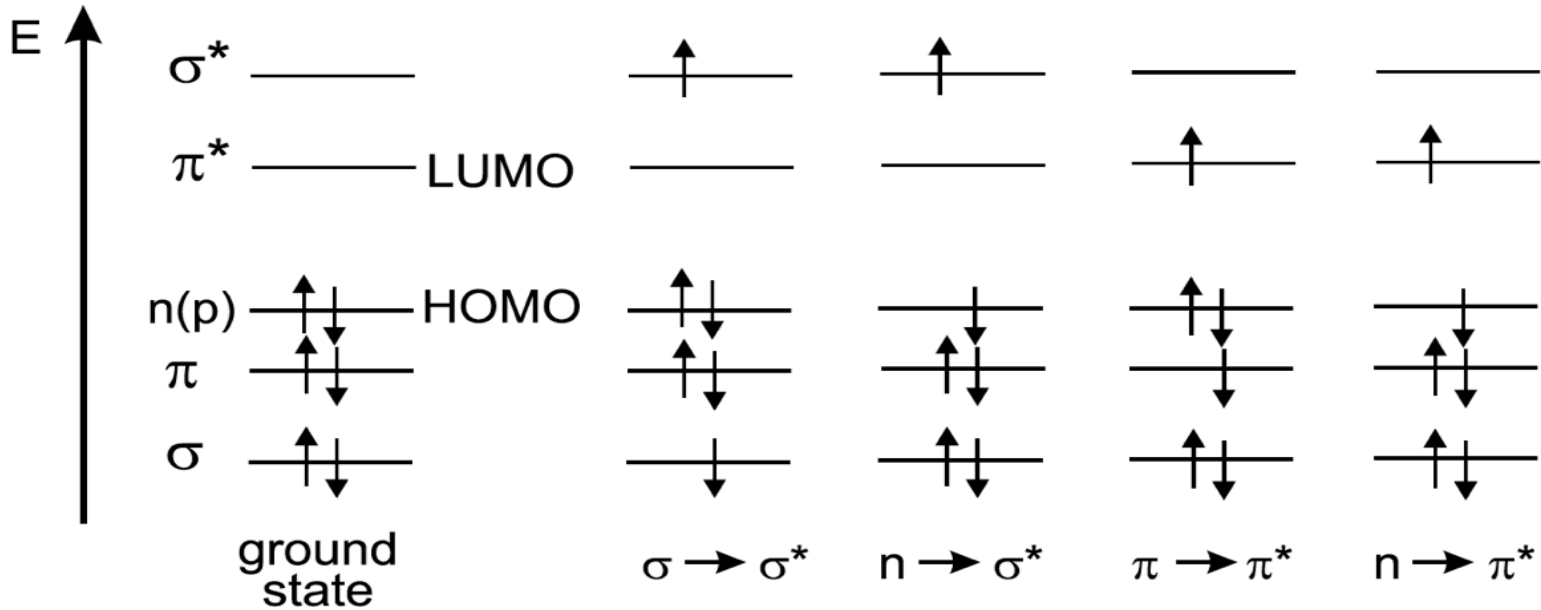
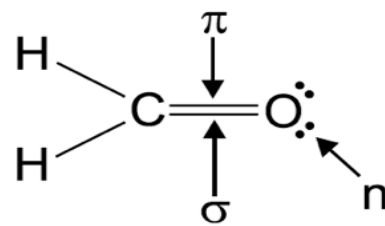
1. THE following researches originated in a consideration of the very remarkable phenomenon discovered by SIR JOHN HERSCHEL in a solution of sulphate of quinine, and described by him in two papers printed in the Philosophical Transactions for 1849, entitled 'On a Case of Superficial Colour presented by a Homogeneous Liquid internally colourless,' and 'On the Epipolic Dispersion of Light.' The solution of quinine, though it appears to be perfectly transparent and colourless, like water, when viewed by transmitted light, exhibits nevertheless in certain aspects, and under certain incidences of the light, a beautiful celestial blue colour. It appears from the experiments of Sir JOHN HERSCHEL that the blue colour comes only from a stratum of fluid of small but finite thickness adjacent to the surface by which the light enters.

\* I confess I do not like this term. I am almost inclined to coin a word, and call the appearance *fluorescence*, from fluor-spar, as the analogous term *opalescence* is derived from the name of a mineral.

Fluorescenciou nazývame jav pri ktorom je svetlo emitované atómom alebo molekulou po ohraničenej dobe nasledujúcej po absorpcii elektromagnetického žiarenia



**Figure 1.6.** Experimental schematic for detection of the Stokes shift.

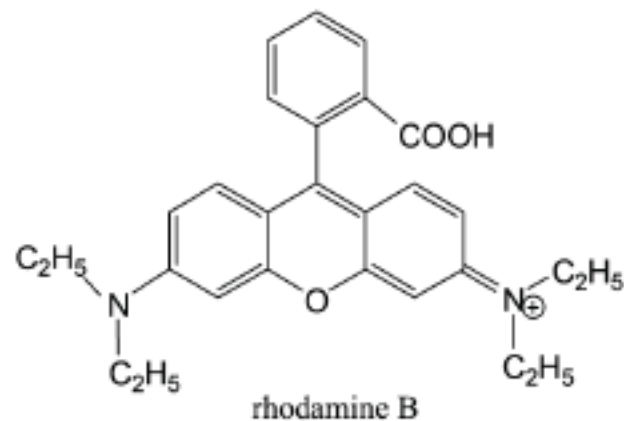
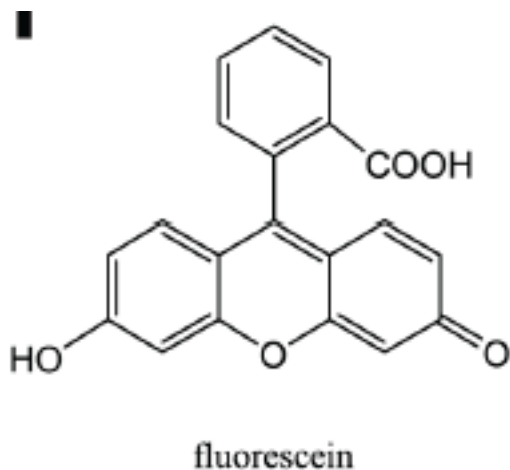


$\sigma^*$ - $\sigma$  malokedy vedú ku luminiscencii. Veľmi vysoká energia ( $\lambda < 250\text{nm}$ ) vedie zväčša ku disociácii molekúl

Emisie sú najčastejšie pre prechody  $\pi^*$ - $\pi$ , niekedy aj  $\pi^*$ - $n$

# Typické fluorofóry

- Molekuly obsahujúce konjugované  $\pi$  elektróny



# Energetické hladiny v molekule

$$E_{n,v,J} = E_n + E_v + E_J$$

$E_n$  -elektrónová energia

$E_v$  -vibračná energia

$E_J$  -rotačná energia

Kvalitatívne porovnanie jednotlivých energetických komponent:

$$E_n(\text{UV-VIS}) \gg E_v(\text{IR}) \gg E_J(\text{MW})$$

# Čo určuje tvar absorbčného spektra?

## Frank-Condonov princíp:

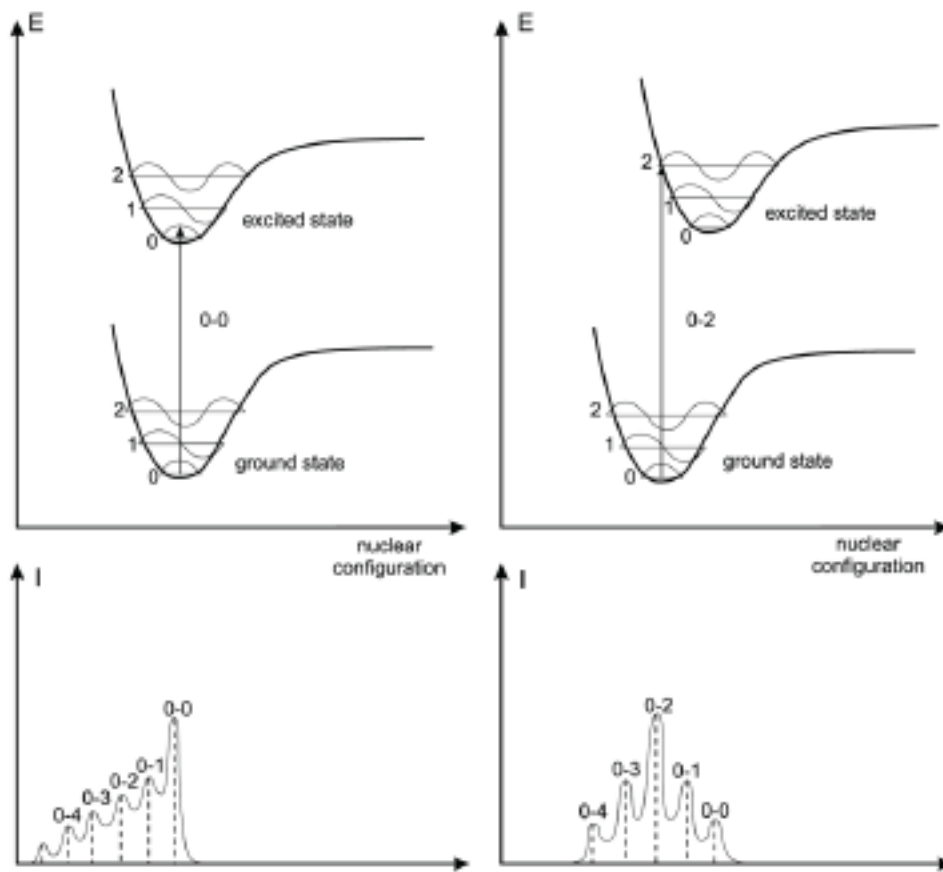
Vertikálne prechody elektrónu, ktoré sa odohrávajú na omnoho rýchlejšej časovej škále ako pohyb jadier atómov. Pravdepodobnosť prechodu závisí od prekryvu vibračných vlnových funkcií

Absorbancia  $10^{-15}\text{s}$

Vibrácie atómov  $10^{-12}\text{s}-10^{-10}\text{s}$

Termálna relaxácia  $10^{-15}\text{s}-10^{-12}\text{s}$

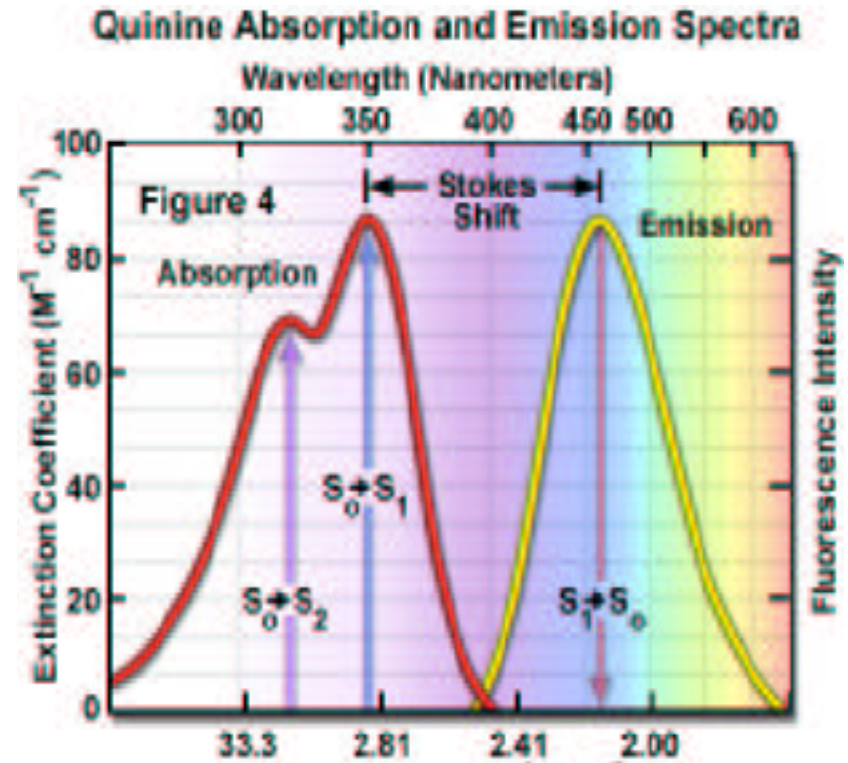
Fluorescenčná emisia  $10^{-9}\text{s}$



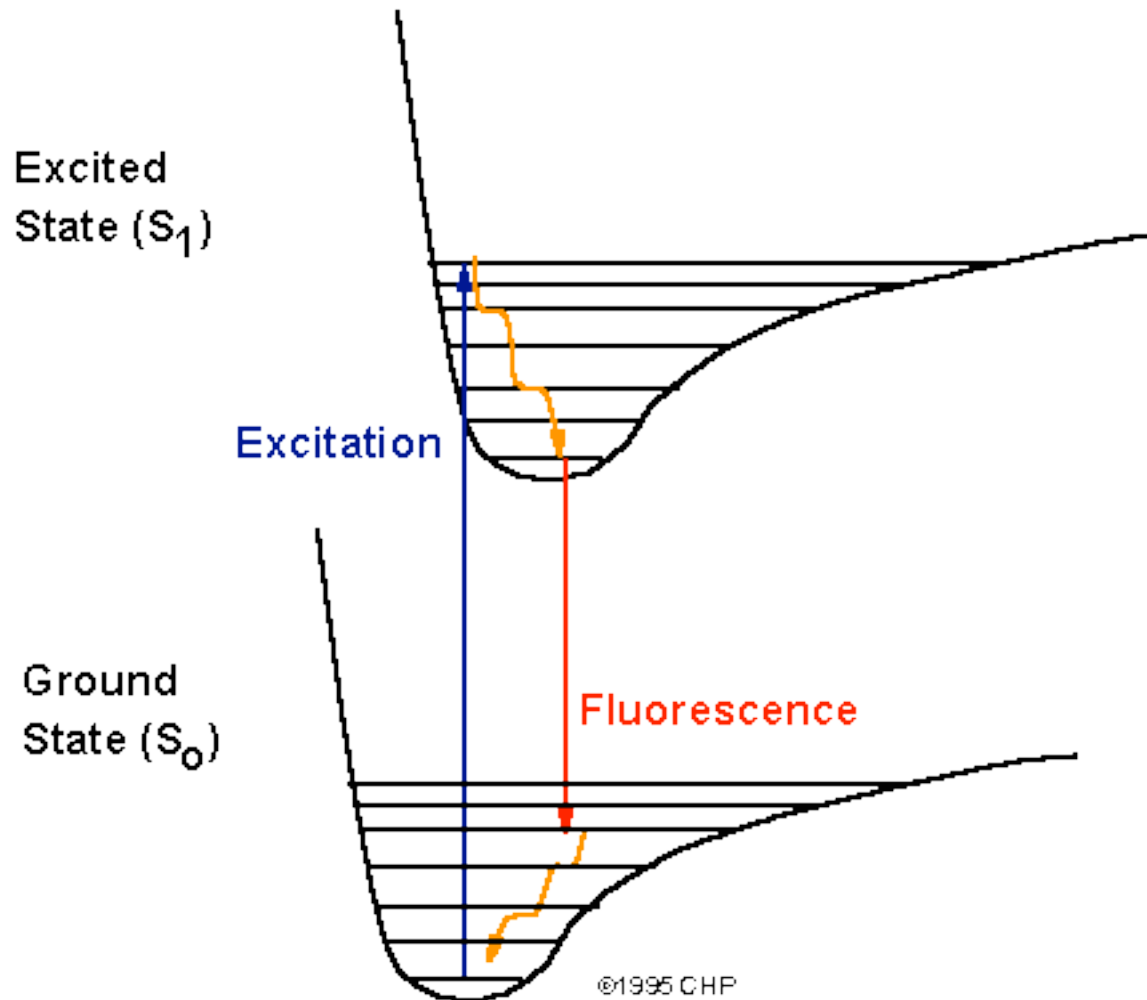


# Typické charakteristiky fluorescenčných spektier

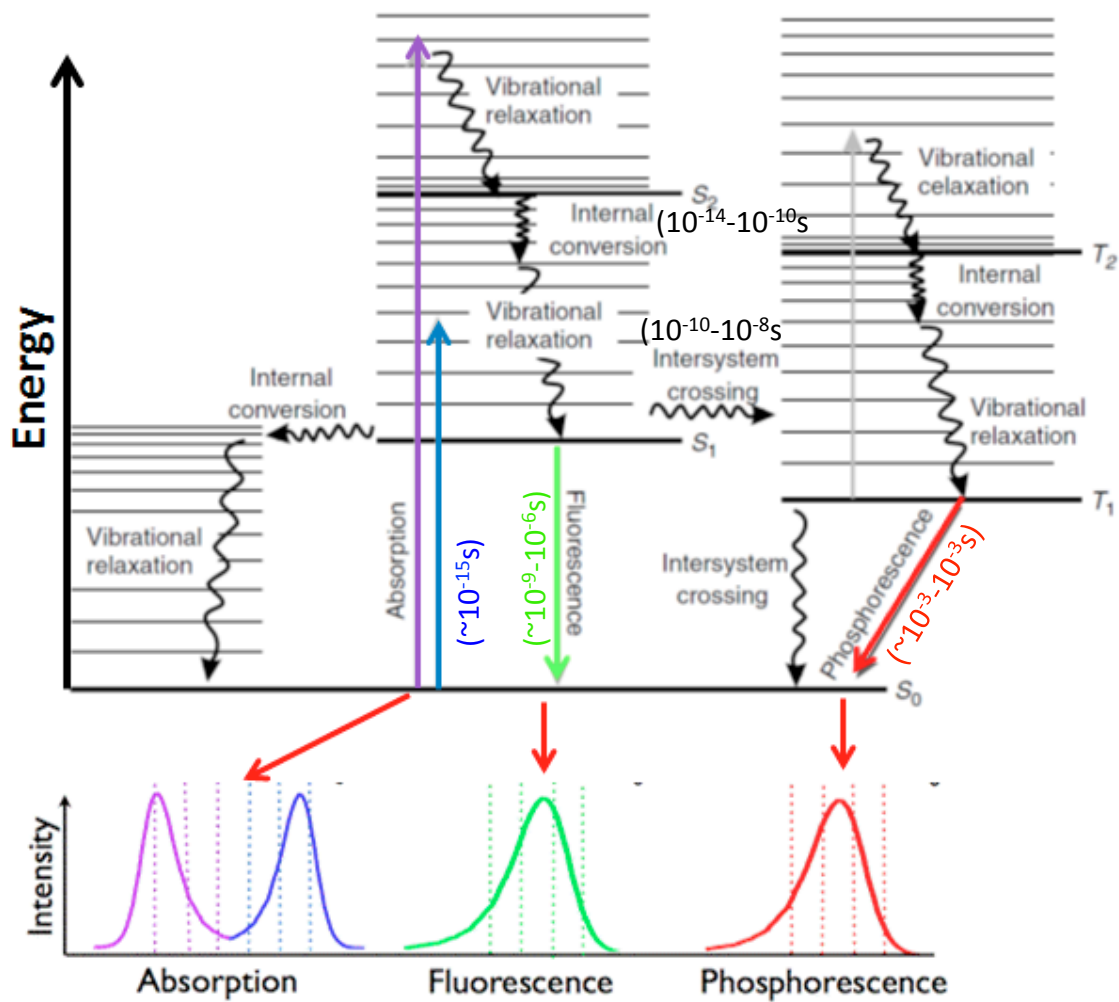
- Stoksov posun
- Nezávislosť emisného spektra na excitačnej vlnovej dĺžke
- Excitačné spektrum “rozumne sa správajúcich molekúl” je prakticky totožné s absorpčným spektrom
- Emisné spektrum je vo väčšine prípadoch takmer zrkadlovým obrazom absorpčného/excitačného spektra



# Kasha's Rule



# Jablonského diagram



# Kvantový výťažok

$$\Phi = \frac{\textit{počet emitovaných fotónov}}{\textit{počet absorbovaných fotónov}}$$

$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_i + k_{ec} + k_{ic} + k_{pd} + k_d}$$

$k_f$  = fluorescenčná rýchlostná konštanta

$k_i$  = medzi-systémová výmenná rýchlostná konštanta

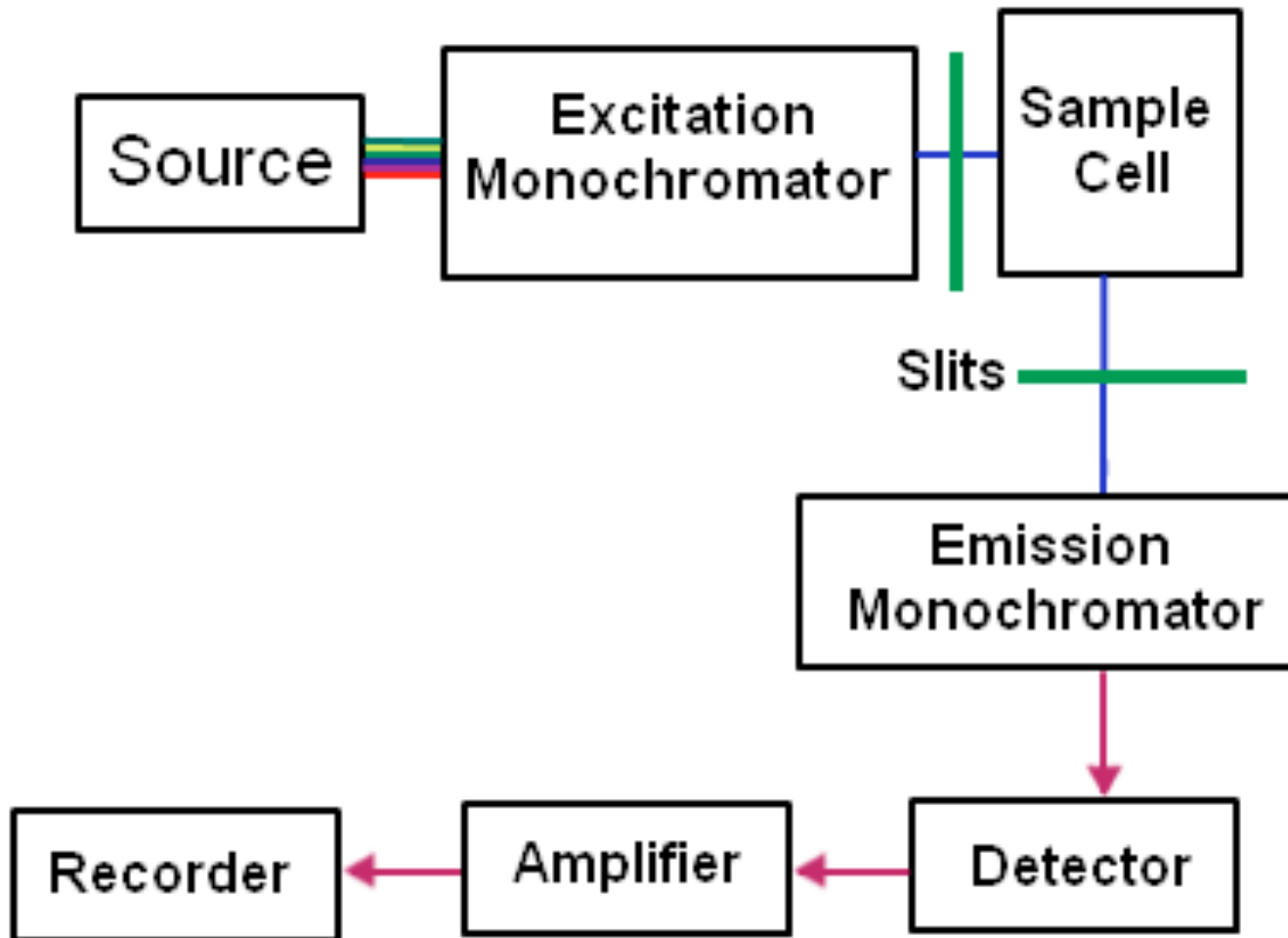
$k_{ec}$  = rýchlostná konštanta externej konverzie

$k_{ic}$  = rýchlostná konštanta internej konverzie

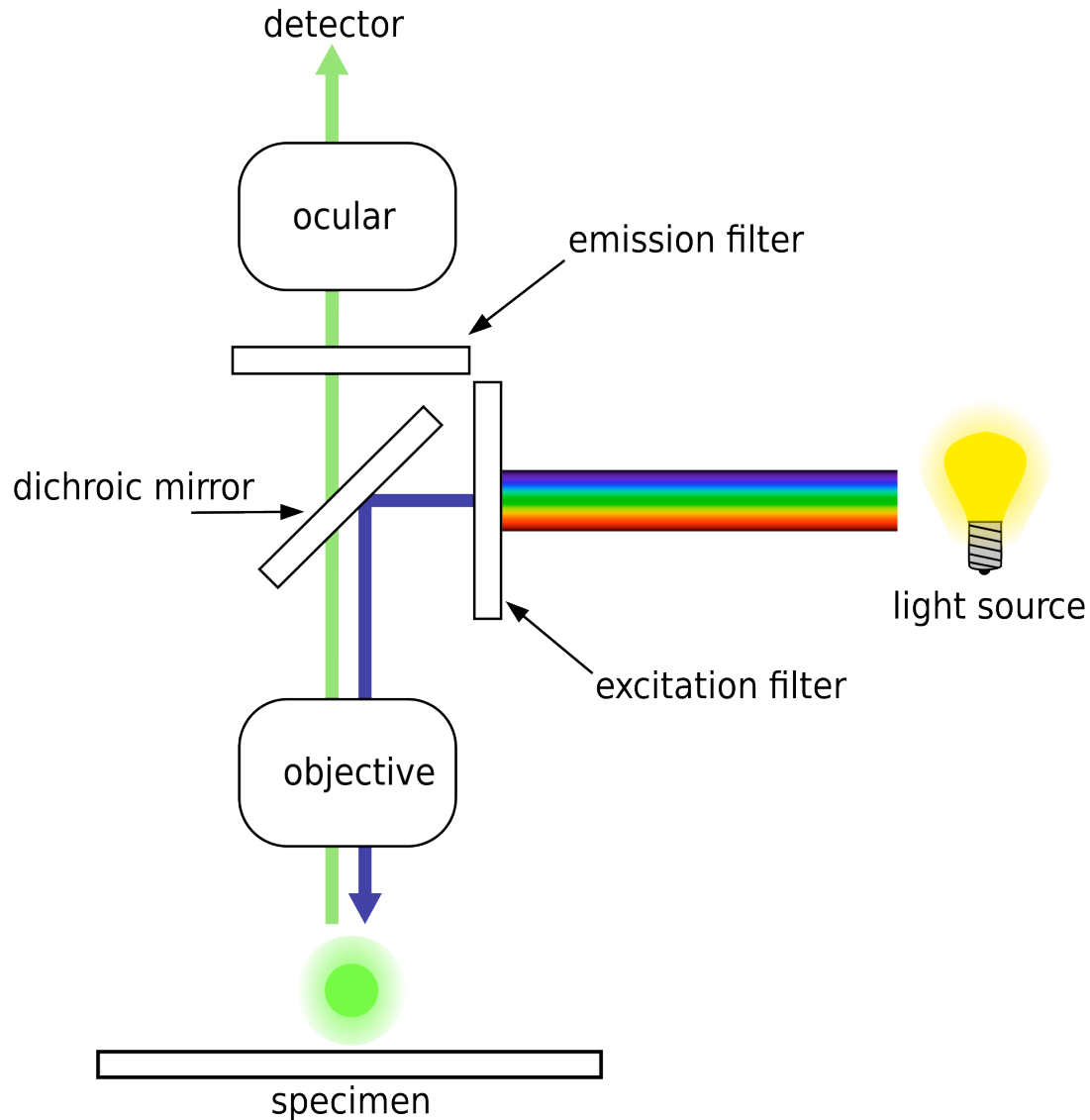
$k_{pd}$  = predisociačná rýchlostná konštanta

$k_d$  = disociačná rýchlostná konštanta

# Fluorescenční spektrofotometer

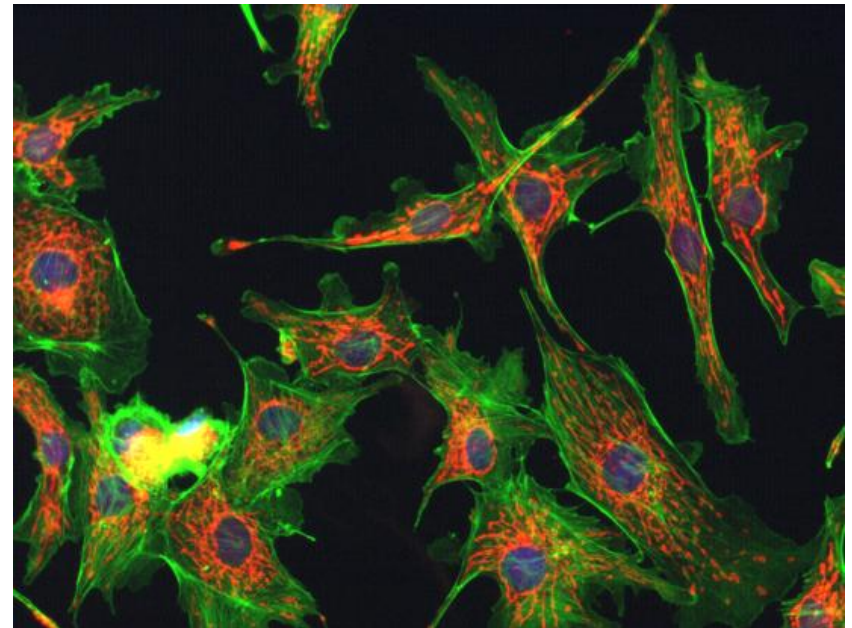
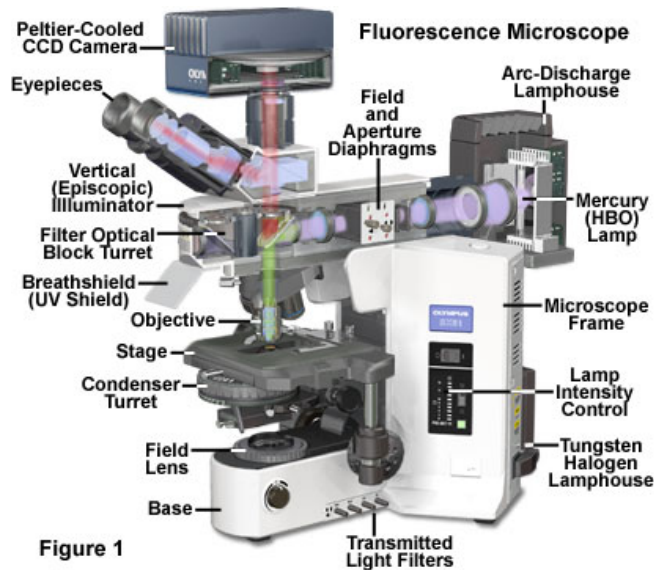


# Fluorescenčný mikroskop

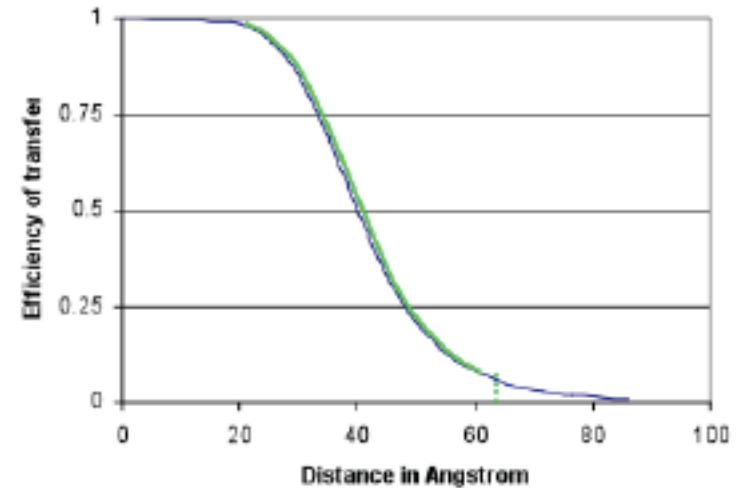
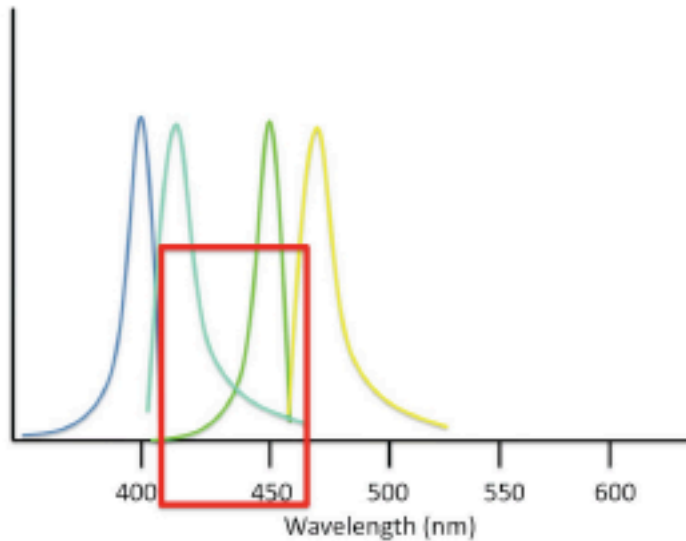


# Fluorescence microscopy

- Subcellular fluorescence imaging
  - Combined with recombinantly-expressed fluorophores (GFP, etc.—Roger Tsien) has revolutionized biology.



# Försterov Rezonančný Transfer Energie (FRET)



$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

$R_0$ -Försterov polomer/vzdialenosť



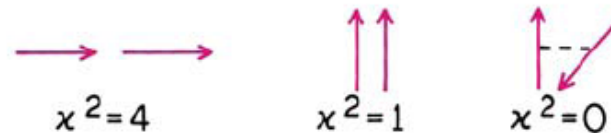
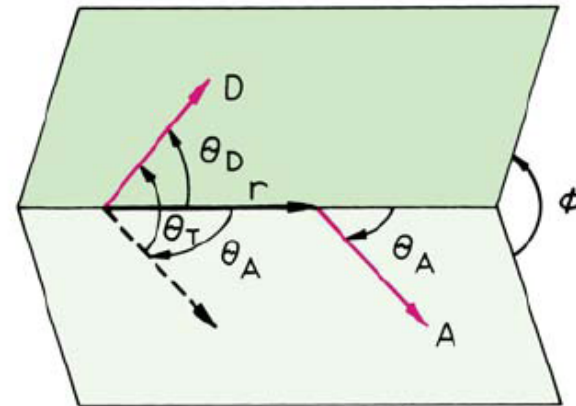
# Efektívnosť FRET

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_D}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

$r$  – vzdialenosť medzi akceptorom a donorom

$\kappa^2$  – popisuje vzájomnú relatívnu orientáciu tranzitných dipólov donoru a akceptora.

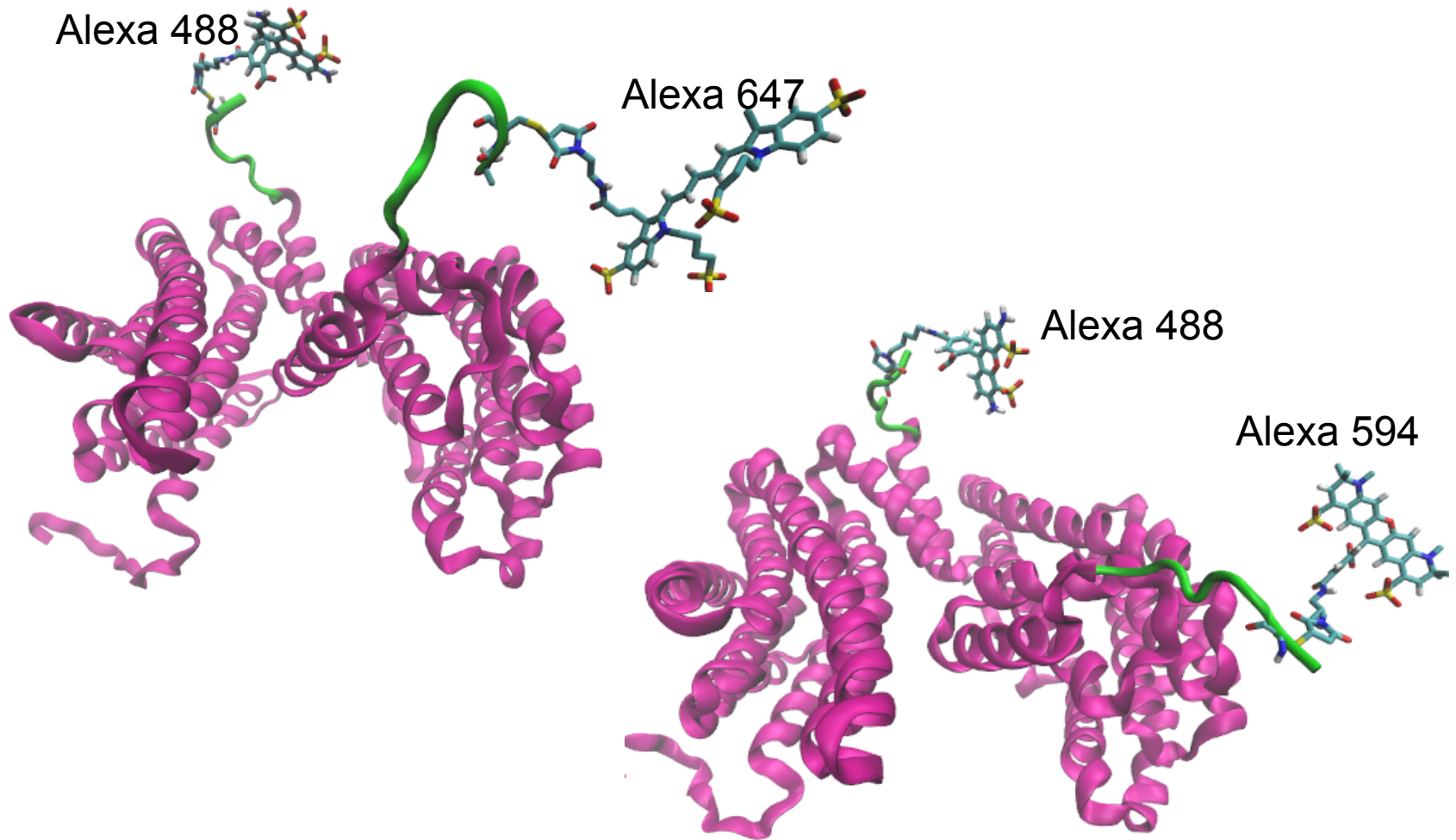
Pre flexibilný náhodný pohyb akceptora a donora sa  $\kappa^2=2/3$

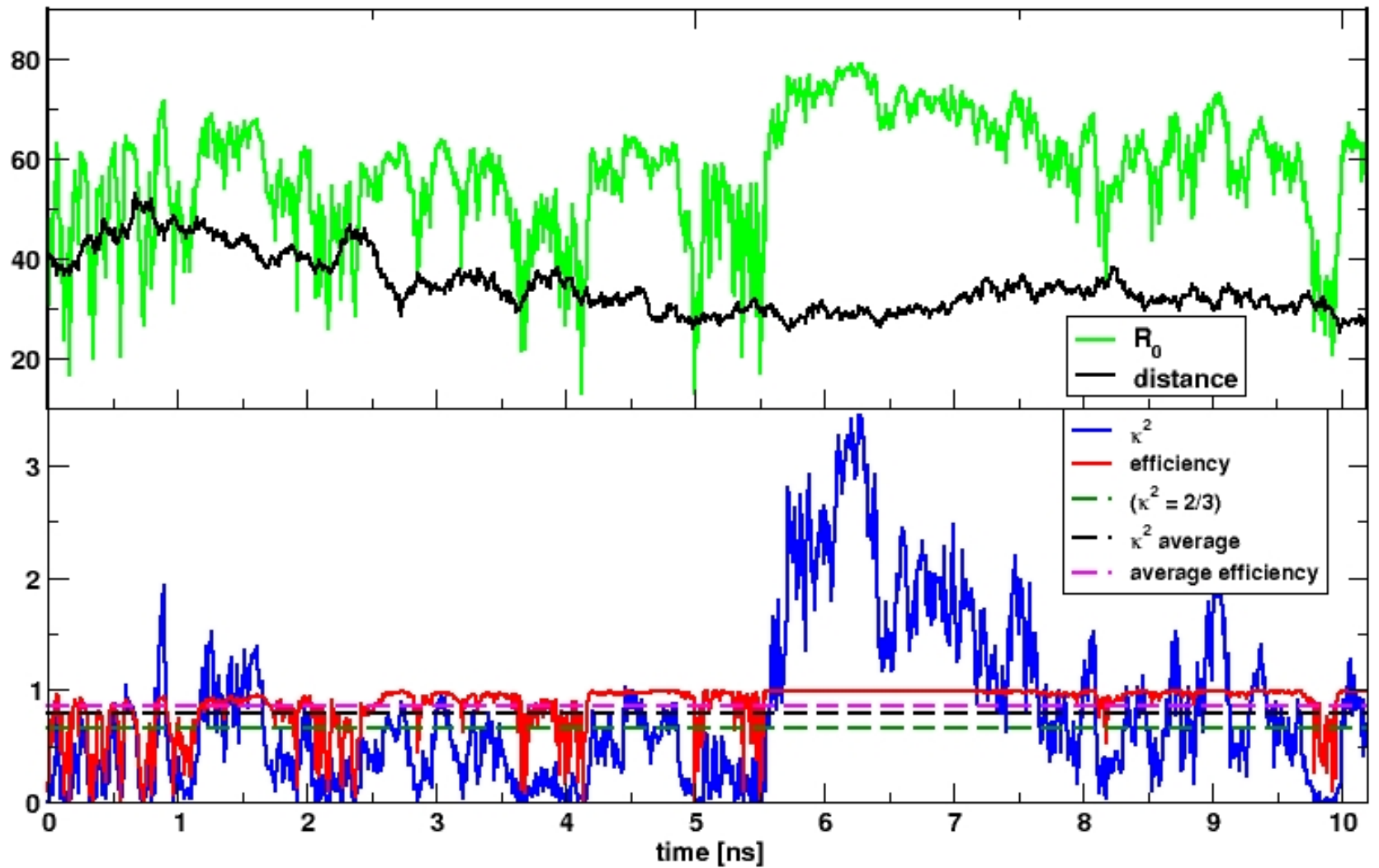


$$x^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

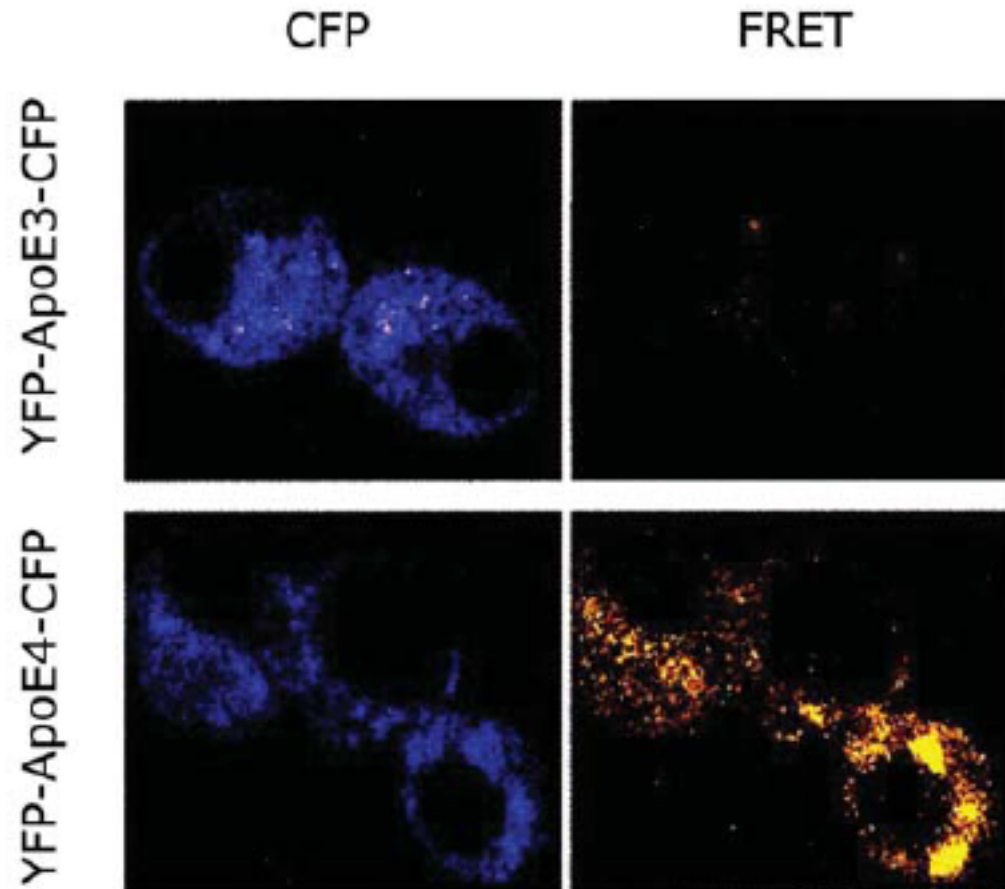
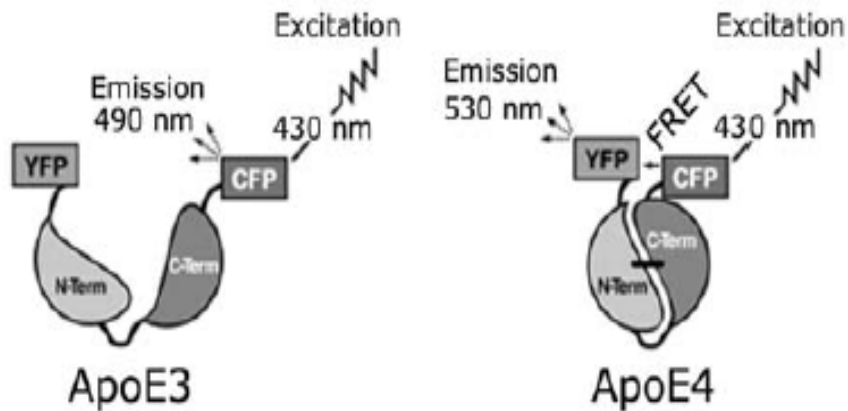
$$x^2 = (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$$

# MD simulácie Hanky Zigovej

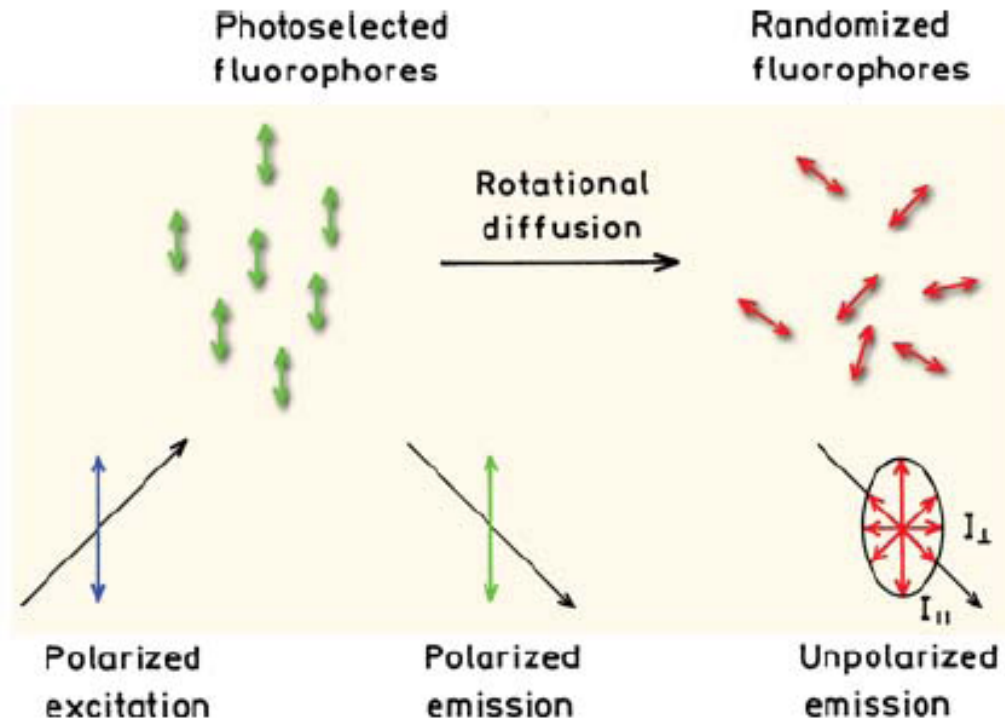




# Monitorovanie skladania proteínov in vivo



# Fluorescenčná anizotropia



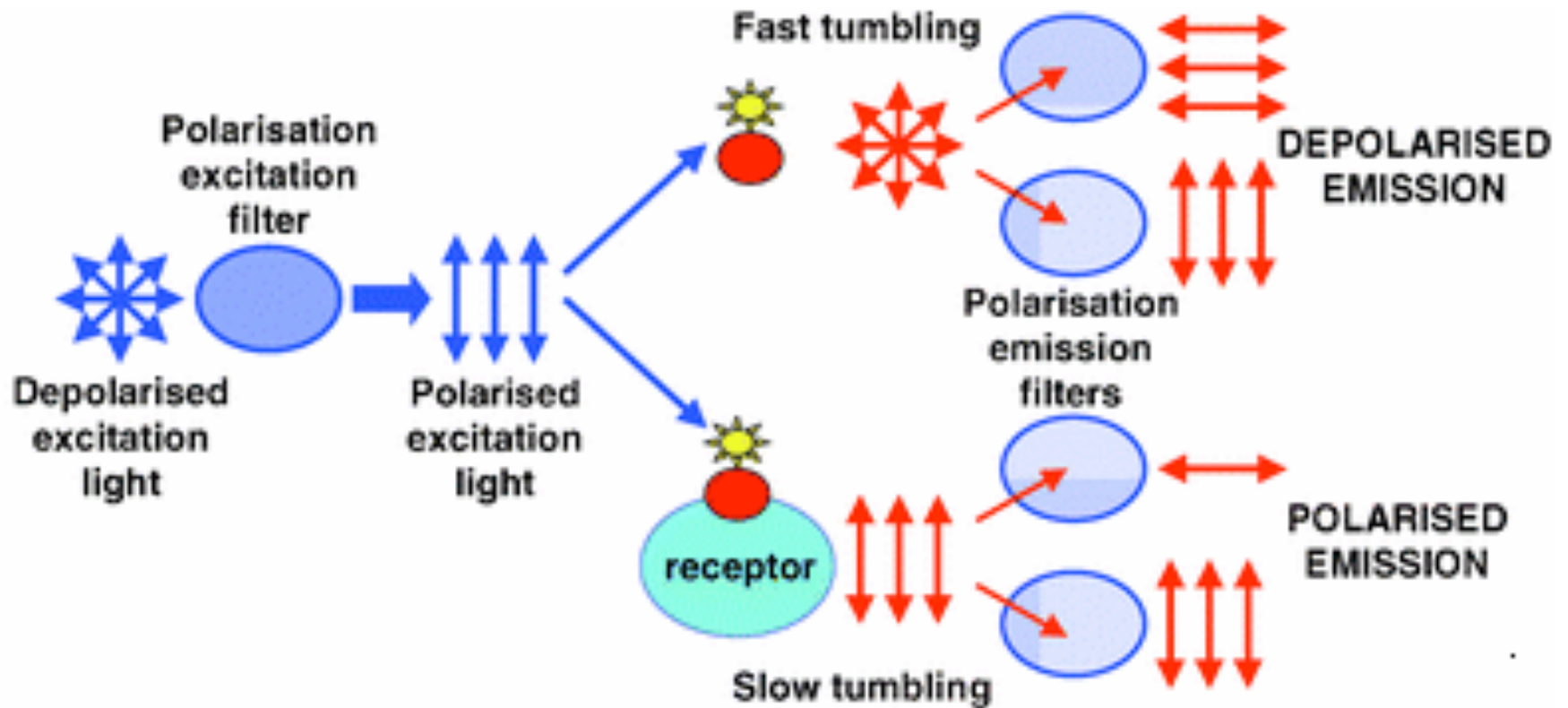
Anizotrópia

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Polarizácia:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

# Viazanie ligandu do receptoru



# Ďalšie čítanie

- Lakowicz, J. R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy

<http://xibalba.lcg.unam.mx/~rgalindo/bioquimica/BQPosgrado2011/V PurificacionEspectroscopia/PrinciplesofFluorescenceSpectroscopy3rd.pdf>