

Luminiscenční metody

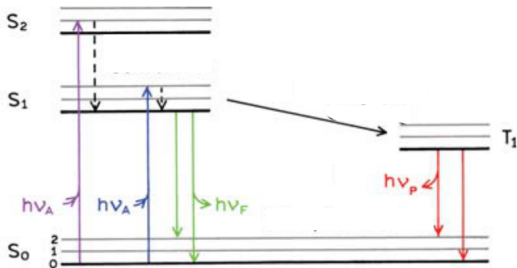
Metody biofyzikální chemie - seminář (C5856)

Jan Novotný
novotnyjan@mail.muni.cz

14. října 2015

Energetický digram

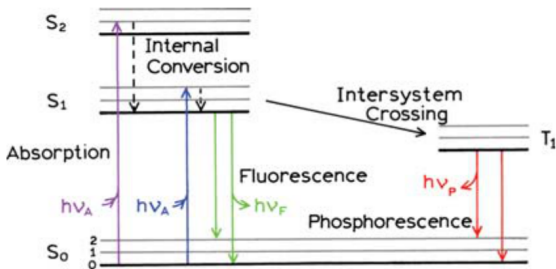
Doplňte diagram a srovnejte děje podle parametrů v příložené tabulce:



Děj	časová škála	k vs. k_{vib}	pořadí λ_{max}
Absorpce			
Fluorescence			
Fosforescence			

Energetický digram

Doplňte diagram a srovnejte děje podle parametrů v příložené tabulce:



Děj	časová škála	k vs. k_{vib}	pořadí λ_{max}
Absorpce	$10^{-15}s$	>	1
Fluorescence	$10^{-9}s$	<	2
Fosforescence	10^0s	<	3

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 4 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 4 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.
- 5 Totožné fluorescenční spektrum je pozorováno nezávisle na vlnové délce excitačního záření.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 4 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.
- 5 Totožné fluorescenční spektrum je pozorováno nezávisle na vlnové délce excitačního záření.
- 6 Resonanční přenos energie (RET, FRET) předpokládá reabsorpci fotonu mezi donorem a akceptorem.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

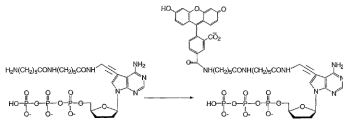
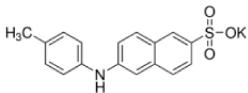
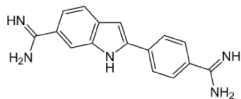
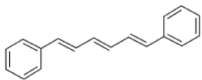
- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 4 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.
- 5 Totožné fluorescenční spektrum je pozorováno nezávisle na vlnové délce excitačního záření.
- 6 Resonanční přenos energie (RET, FRET) předpokládá reabsorpci fotonu mezi donorem a akceptorem.
- 7 Doba života fluorescence závisí nepřímo úměrně na sumě rychlostních konstant zářivých i nezářivých dějů.

Úlohy na rozjezd - rozhodněte o pravdivosti následujících tvrzení

- 1 Molekuly schopné fluorescence jsou obvykle rigidní aromatické sloučeniny s omezenou vibrační svobodou.
- 2 Fosforescence označuje emisi fotonu ze stavu o multiplicitě jedna.
- 3 Rotační korelační čas je menší pro objemnější molekuly ve viskóznějším prostředí.
- 4 Příčinou Stokesova posunu je nezářivá vibrační relaxace.
- 5 Totožné fluorescenční spektrum je pozorováno nezávisle na vlnové délce excitačního záření.
- 6 Resonanční přenos energie (RET, FRET) předpokládá reabsorpci fotonu mezi donorem a akceptorem.
- 7 Doba života fluorescence závisí nepřímo úměrně na sumě rychlostních konstant zářivých i nezářivých dějů.
- 8 Pro měření anizotropie emisního signálu se používá cirkulárně polarizovaného excitačního záření.

Úloha 1

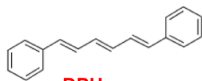
Ke strukturám uvedených fluorescenčních sond přiřaďte zkratky a biochemickou aplikaci



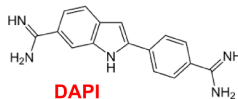
DAPI, ddATP-Dye, DPH, TNS

Úloha 1

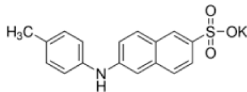
Ke strukturám uvedených fluorescenčních sond přiřaďte zkratky a biochemickou aplikaci



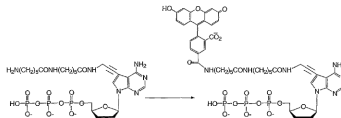
DPH
biomembrány



DAPI
vazba DNA



TNS
proteiny



ddATP-dye
sekvencování

DAPI, ddATP-Dye, DPH, TNS

Úloha 2: Fluorescenční metody

Přiřaďte vhodnou strategii využívající fluorescenční spektroskopie k následujícím úlohám:

- A) Měření hydrodynamického poloměru proteinu.
- B) DNA hybridizace.
- C) Lokalizace Trp residua (na povrchu či v nitru proteinu).
- D) Zastoupení nenasycených mastných kyselin v biomembráně.
- E) Určení asociační konstanty dimerizace eosinu.

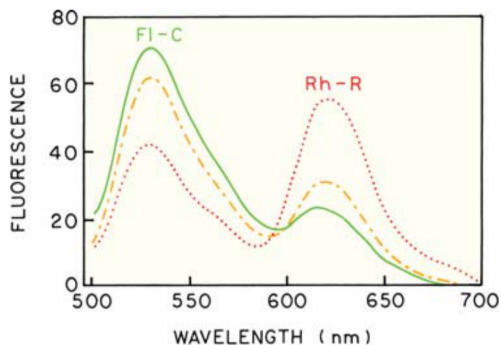
Úloha 2: Fluorescenční metody

Přiřaďte vhodnou strategii využívající fluorescenční spektroskopie k následujícím úlohám:

- A) Měření hydrodynamického poloměru proteinu. **anizotropie značky-korelační čas**
- B) DNA hybridizace. **FRET**
- C) Lokalizace Trp residua (na povrchu či v nitru proteinu). **zhášení, Stokesův posun**
- D) Zastoupení nenasycených mastných kyselin v biomembráně. **viskozita-anizotropie DPH**
- E) Určení asociační konstanty dimerizace eosinu. **emise excimeru**

Úloha 3: FRET

Pokuste se interpretovat fluorescenční experiment provedený na komplexu proteinkinázy, tvořené dvěma katalytickými (C) a dvěma receptorovými jednotkami (R). Obě jednotky jsou označeny fluorescenčními značkami: jednotka C fluoresceinem (Fl) a jednotka R rhodaminem (Rh). V nativní formě R_2C_2 lze detekovat FRET. Určete směr přenosu a vysvětlete vliv přidavku cAMP a inhibitoru PKI na podobu spektra.



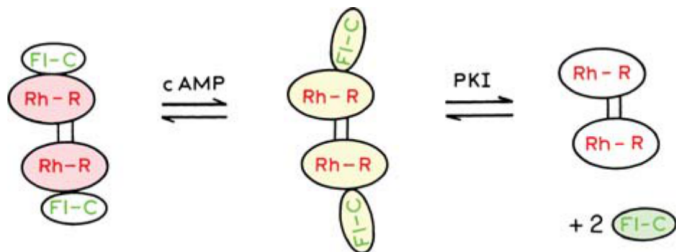
R_2C_2

$R_2C_2 + \text{cAMP}$

$R_2C_2 + \text{PKI}$

Úloha 3: FRET

Pokuste se interpretovat fluorescenční experiment provedený na komplexu proteinkinázy, tvořené dvěma katalytickými (C) a dvěma receptorovými jednotkami (R). Obě jednotky jsou označeny fluorescenčními značkami: jednotka C fluoresceinem (FI) a jednotka R rhodaminem (Rh). V nativní formě R_2C_2 lze detekovat FRET. Určete směr přenosu a vysvětlete vliv přídavku cAMP a inhibitoru PKI na podobu spektra.



Úloha 4: Kinetické parametry fluorescence

Eosinový flouorfor je charakterizován kvantovým výtěžkem 0.65 a dobou života fluorescence 3.1 ns. Vypočtete rychlostní konstantu zářivého, nezářivého přechodu a vlastní dobu života fluorescence.

Úloha 4: Kinetické parametry fluorescence

Eosinový flouorfor je charakterizován kvantovým výtěžkem 0.65 a dobou života fluorescence 3.1 ns. Vypočtete rychlostní konstantu zářivého, nezářivého přechodu a vlastní dobu života fluorescence.

Řešení

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \rightarrow \Gamma = \frac{\Phi}{\tau}$$

Rychlostní konstanty:

$$\Gamma = \frac{0.65}{3.1} = 0.21 \text{ ns}^{-1}, k_{nr} = \frac{1}{\tau} - \Gamma = \frac{1}{3.1} - 0.21 = 0.11 \text{ ns}^{-1}$$

Úloha 5: Perrinova rovnice

Za předpokladu exponenciálního poklesu intenzity $I(t)$ a anizotropie $r(t)$ fluorescenčního signálu odvoďte vztah mezi anizotropií r , dobou života τ a rotačním korelačním časem θ . Při výpočtu vyjděte z definice časově váženého průměru anizotropie r :

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t)I(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt}$$

Úloha 5: Perrinova rovnice

Za předpokladu exponenciálního poklesu intenzity $I(t)$ a anizotropie $r(t)$ fluorescenčního signálu odvoďte vztah mezi anizotropií r , dobou života τ a rotačním korelačním časem θ . Při výpočtu vyjděte z definice časově váženého průměru anizotropie r :

$$r = \frac{\int_0^{\infty} r(t)I(t)dt}{\int_0^{\infty} I(t)dt}$$

Řešení

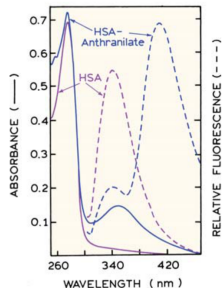
$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad r = r_0 e^{-\frac{t}{\theta}}$$

$$r = \frac{I_0 r_0 \int_0^{\infty} e^{-t\left(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\theta}\right)} dt}{I_0 \int_0^{\infty} e^{-\frac{t}{\tau}} dt} = \frac{r_0 \left(\frac{1}{\tau} + \frac{1}{\theta}\right)^{-1}}{\tau} = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}}$$

Úloha 6: FRET

Lidský sérový albumin obsahuje jediné Trp residuum na pozici 214. Vzorek byl kovalentně označen na Cys 34 athranilovým fluoroforem. Försterova vzdálenost R_0 pro FRET přenos z Trp na anthranoyl je 30.3Å. Za použití emisního spektra vypočtete vzdálenost mezi oběma aminokyselinami v molekule.

$$k_{RET} = \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 .$$

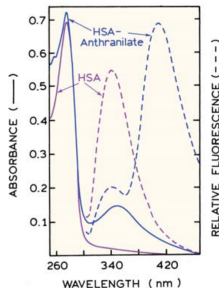


Úloha 6: FRET

Lidský sérový albumin obsahuje jediné Trp residuum na pozici 214. Vzorek byl kovalentně označen na Cys 34 anthranilovým fluoroforem. Försterova vzdálenost R_0 pro FRET přenos z Trp na anthranoyl je 30.3\AA . Za použití emisního spektra vypočtete vzdálenost mezi oběma aminokyselinami v molekule.

Pro rychlostní konstantu rezonančního přenosu platí

$$k_{RET} = \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6.$$



Řešení

$$\Phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{RET}} = \frac{\Gamma}{\Gamma + \Gamma \left(\frac{R_0}{r} \right)^6} = \frac{r^6}{R_0^6 + r^6}$$

Kvantový výtěžek Φ pro vlnovou délku 340 nm: emise albuminu s akceptorem/emise volného albuminu = $0.2/0.55$

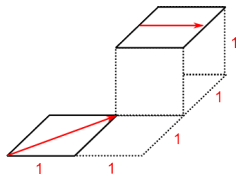
$$\Phi = 0.364 = \frac{r^6}{30.3^6 + r^6} \Rightarrow r = \frac{30.3}{1.75^{\frac{1}{6}}} = 27.6\text{\AA}$$

Úloha 6: Dipolární interakce - test orientační závislosti

Efektivita rezonančního přenosu závisí kromě spektrálního překryvu donoru a akceptoru na vzdálenosti a vzájemné orientaci přechodových momentů. Tyto momenty interagují jako dva dipóly podle angulárního vztahu:

$$\mu_A \cdot \mu_B - 3(\mu_A \cdot \mathbf{r})(\mu_D \cdot \mathbf{r})$$

Vypočtete hodnotu orientačního faktoru κ^2 pro přiložený model.

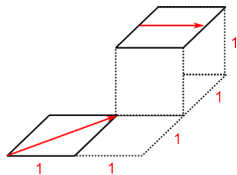


Úloha 6: Dipolární interakce - test orientační závislosti

Efektivita rezonančního přenosu závisí kromě spektrálního překryvu donoru a akceptoru na vzdálenosti a vzájemné orientaci přechodových momentů. Tyto momenty interagují jako dva dipóly podle angulárního vztahu:

$$\mu_A \cdot \mu_B - 3(\mu_A \cdot \mathbf{r})(\mu_B \cdot \mathbf{r})$$

Vypočtěte hodnotu orientačního faktoru κ^2 pro přiložený model.



Řešení

$$\kappa^2 = \left(-\frac{1}{\sqrt{2}}\right)^2$$

Použitá a doporučená literatura

Joseph R. Lakowicz: **Principles of Fluorescence Spectroscopy**

Jihad Rene Albani: **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**

P. Atkins, J. de Paula: **Physical Chemistry**

Příště: - UV-VIS Absorpční spektroskopie