

# Přístrojové vybavení pro detekci absorpce a fluorescence

Fluorescenční metody ve vědách o živé přírodě

Ctirad Hofr

# Absorpce

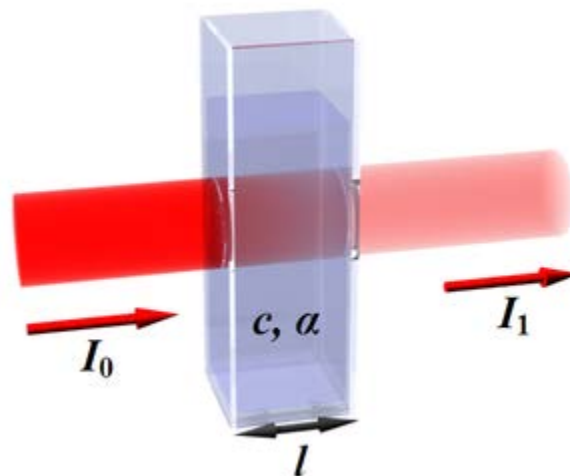
- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci monochromatického světla

- **Lambert-Beerův zákon:**

Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

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

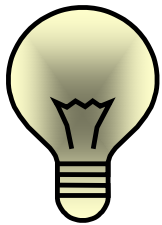
$\varepsilon$ =molární extinční koeficient látky,  $c$ -koncentrace,  $l$ -délka optické dráhy



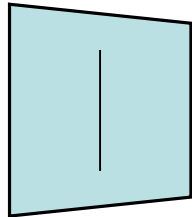
# SpektroFOTOmetr

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

Výsledkem je absorpční spektrum látky



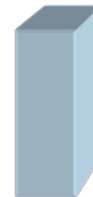
zdroj



štěrbina



výběr vlnové délky



vzorek



detektor

# Zdroje záření a jejich použití

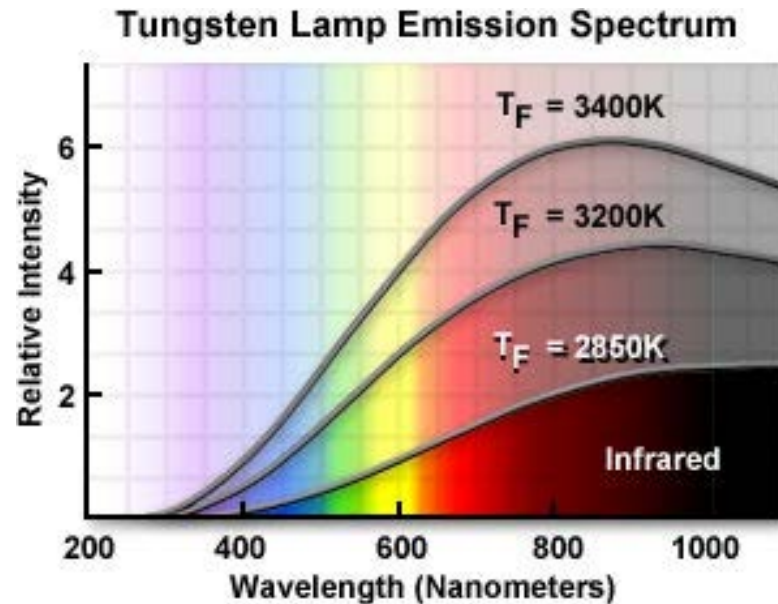
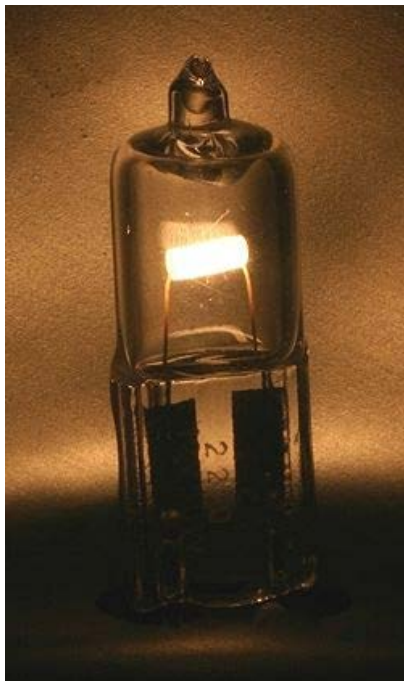
- **Wolframová žárovka** (měření absorpce ve viditelném spektru)
- **Deuteriová lampa** (měření absorpce v UV spektru)
- **Xenonová výbojka** (zdroj pro časově ustálenou fluorescenci)

## **Pulzní zdroje pro časově proměnnou fluorescenci**

- Laser
- LD a LED diody

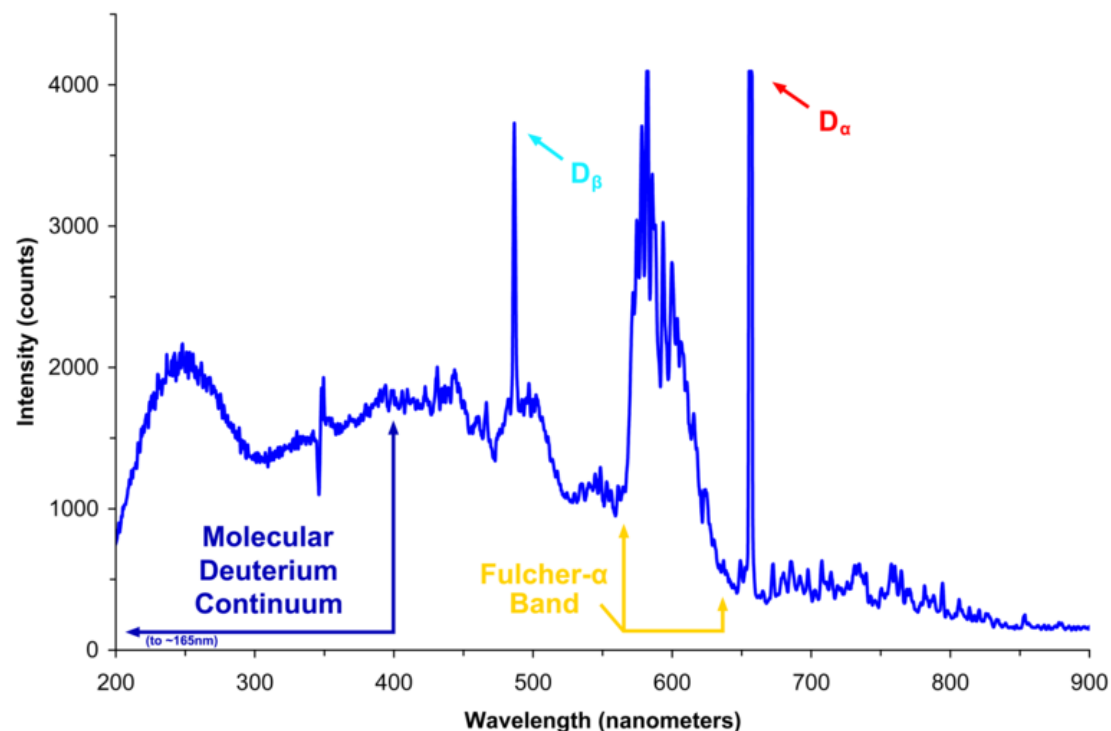
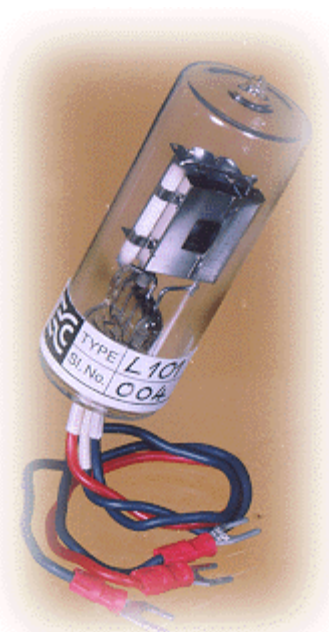
# Wolframová žárovka - viditelné spektrum

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



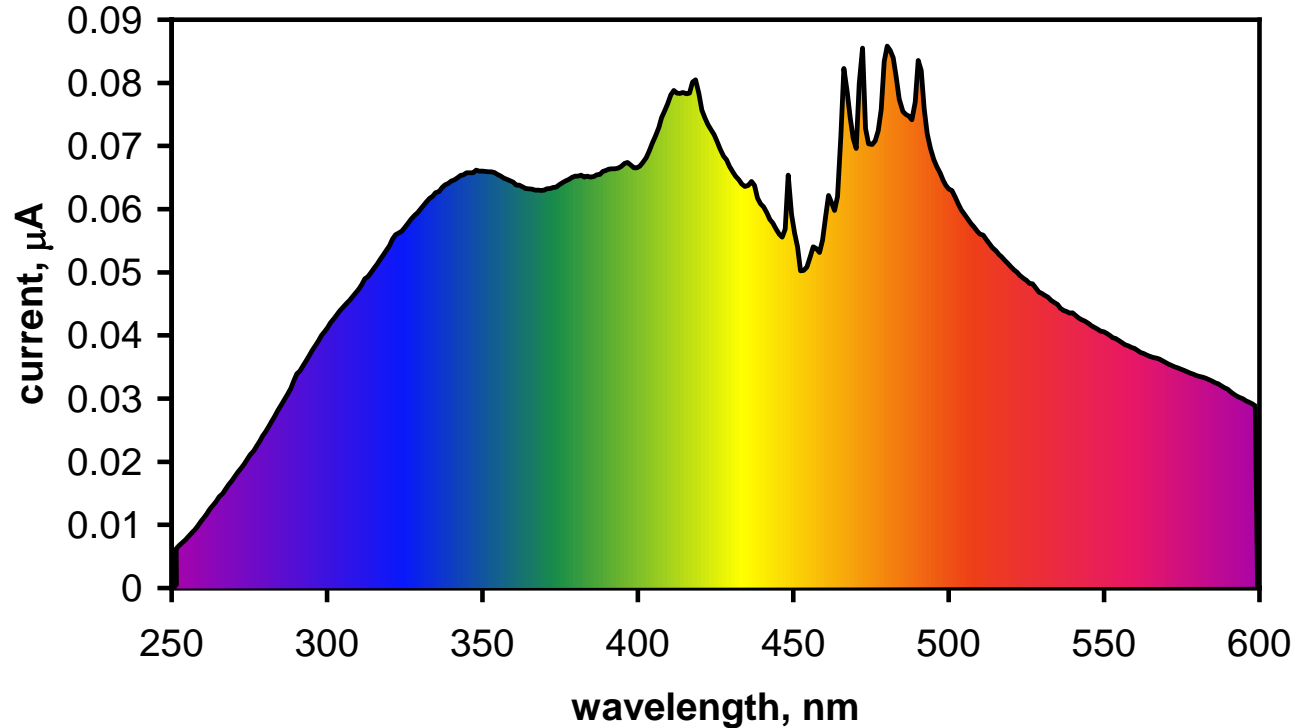
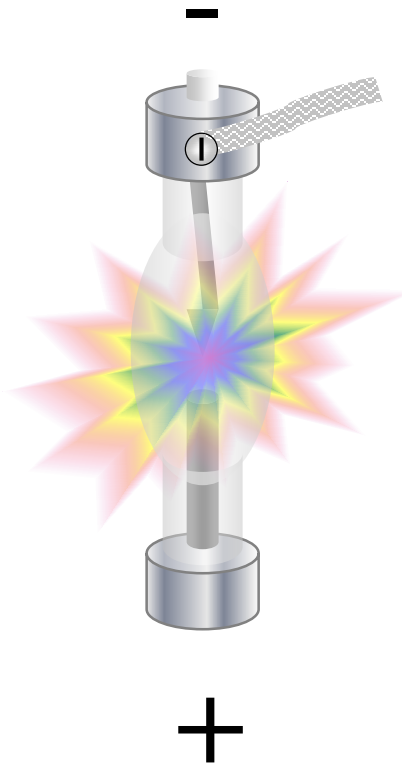
# Deuteriová lampa

- Nízkotlaký zdroj vhodný zejména pro UV oblast záření (160-400 nm)
- Plněná deuteriem v plynném stavu



# Xenonová výbojka

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



Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

# LASER

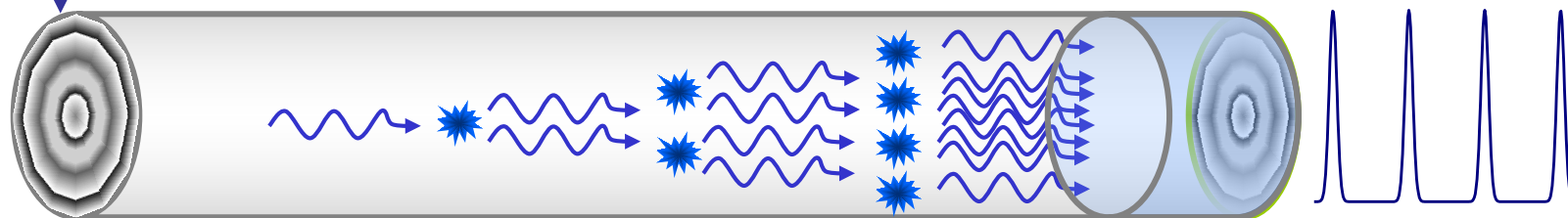
z anglického *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, tj. 'zesilování světla pomocí stimulované emise záření'

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

zrcadlo

zrcadlo  
(částečně propustné)

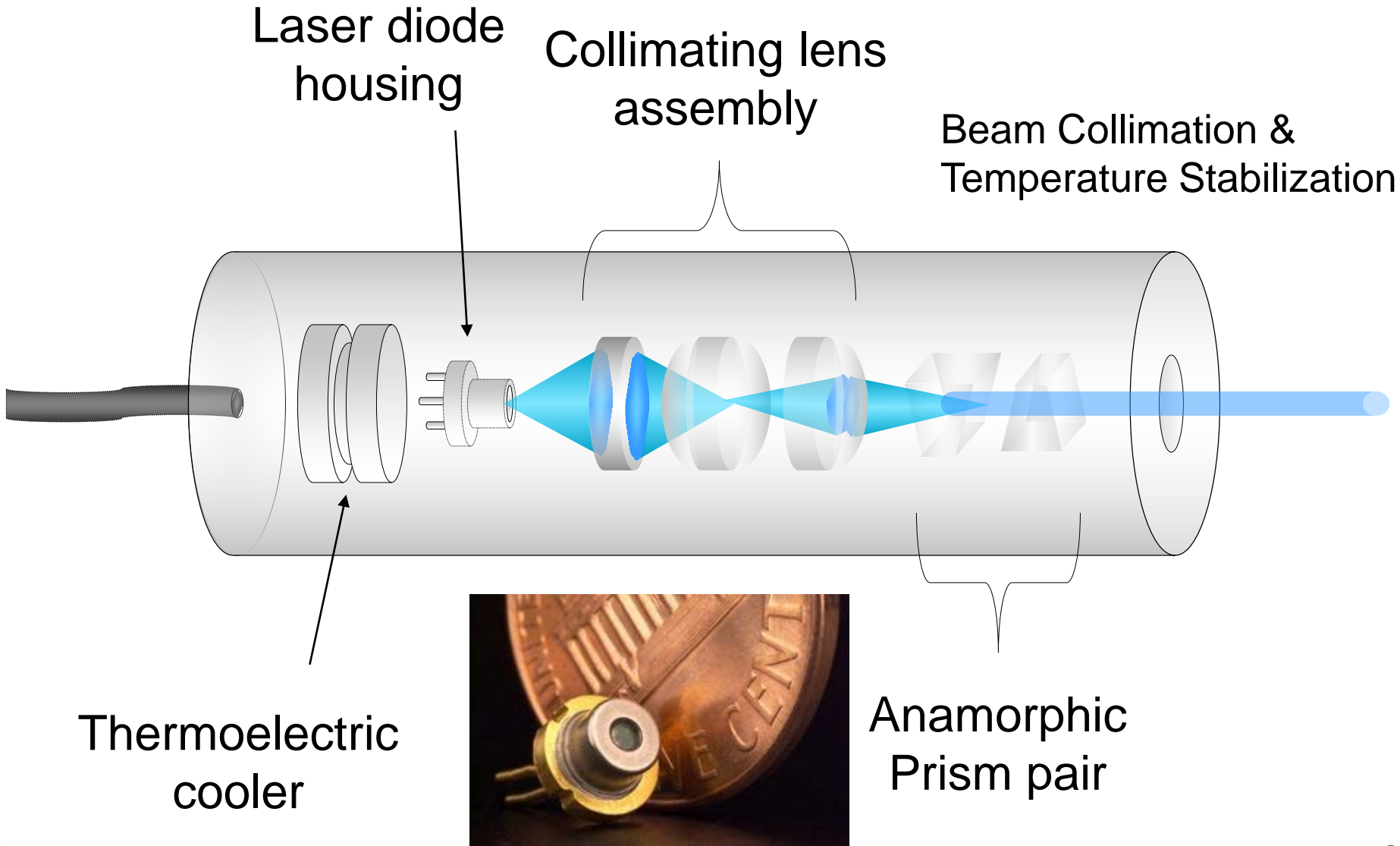
pulsy



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



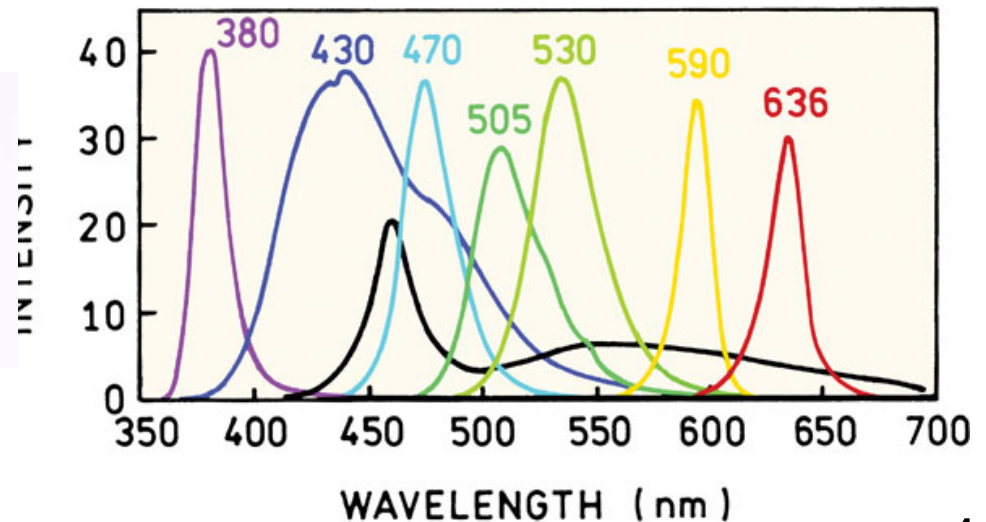
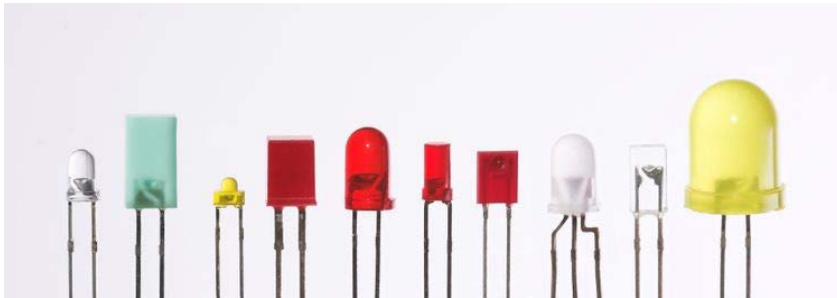
# LD - Laser Diode



# LED

## Light Emitting Diode

- nízký příkon
- vysoká účinnost
- dostatečně úzký spektrální rozsah



# Zdroje záření a jejich použití

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

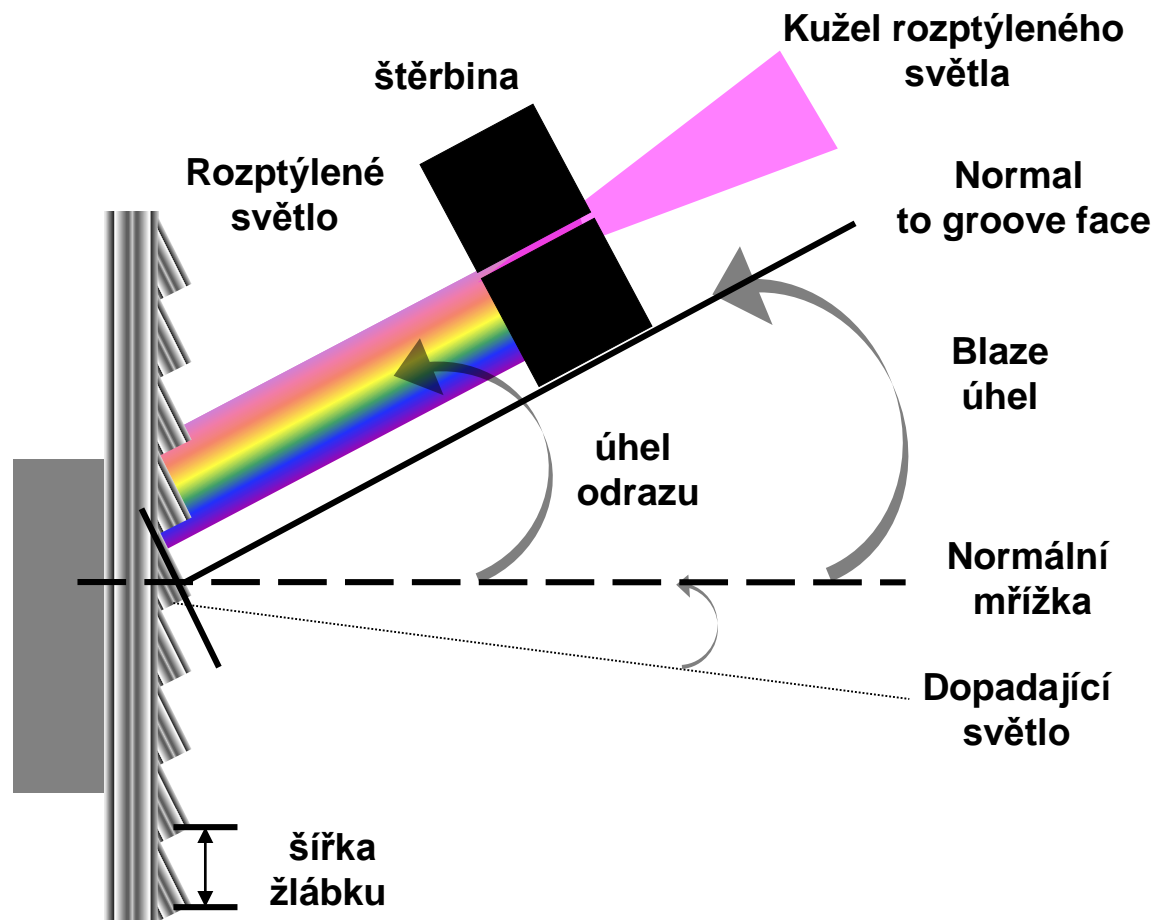


## **Pulzní zdroje pro časově proměnnou fluorescenci:**

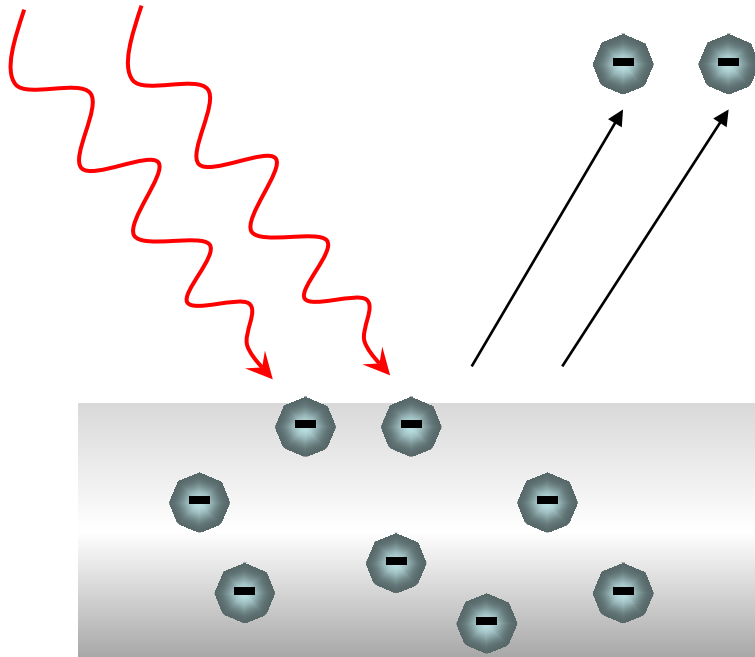
- Laser
- LD a LED diody

# Monochromátor

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



# Fotoelektrický jev



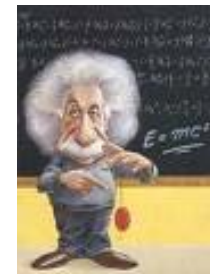
$$hf = W + E_k$$

$W$  – energie potřebná k  
vyražení elektronu

$E_k$  -Kinetická energie volného  
elektronu po vyražení

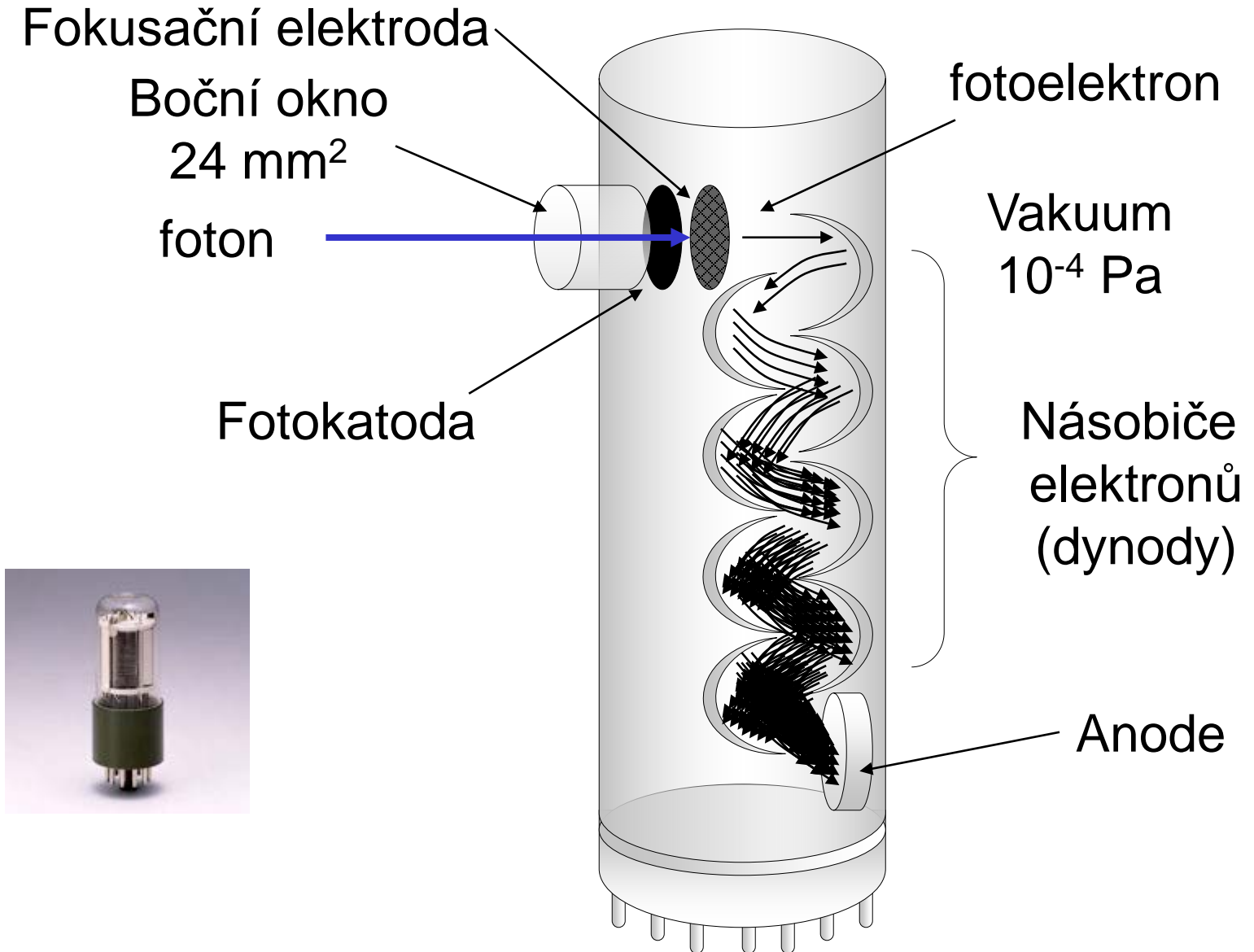
Nobelova cena

A. Einstein, 1921



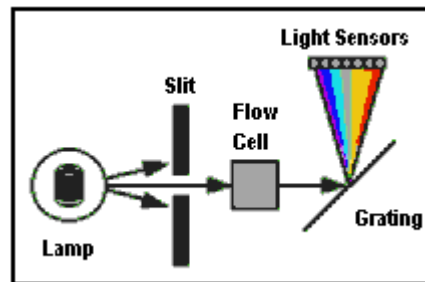
<http://www.youtube.com/watch?v=v5h3h2E4z2Q>

# Detektor – fotonásobič (PMT)



# Diode array detektor

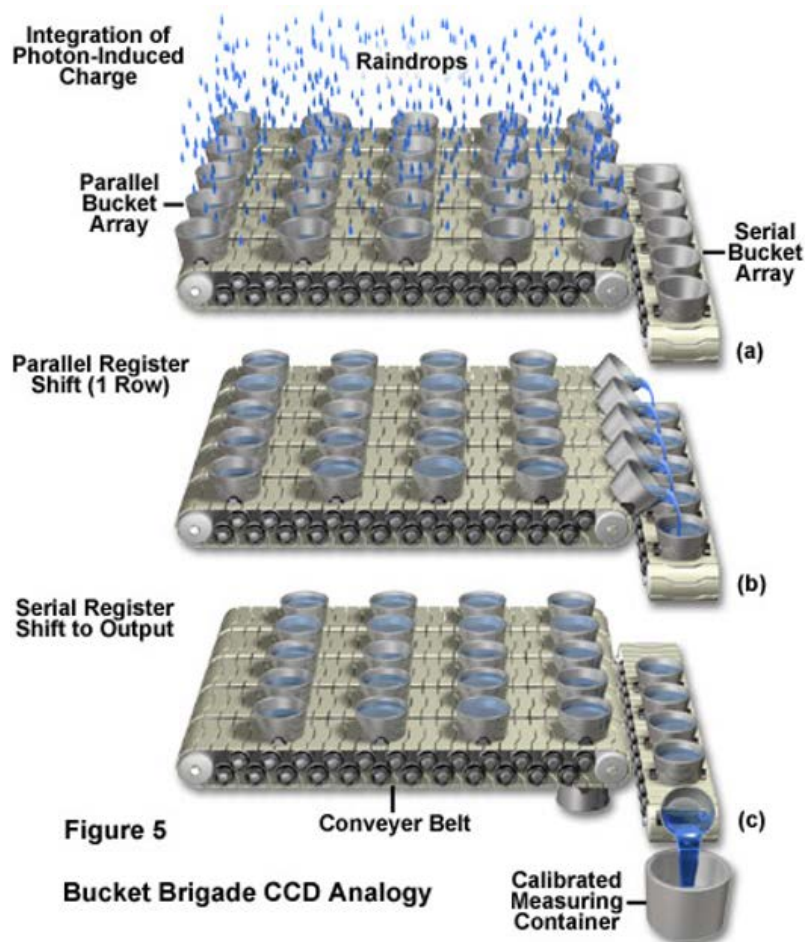
- Pás světlocitlivých diod
- Na každou diodu dopadá světlo o daném rozsahu vlnových délek
- Výhoda: najednou se snímá celé spektrum



[http://www.youtube.com/watch?v=zbTM36\\_7jlg&feature=related](http://www.youtube.com/watch?v=zbTM36_7jlg&feature=related)

# CCD detektor

## Charge Coupled Device



- světlo= fotony (kapky) dopadají na elektrody, uvolňují elektrony, které se akumulují ve formě náboje
- po ukončení expozice (integračního času) je akumulovaný náboj z každého pixelu (bodu na detektoru) postupně po řadách přesunut na krajní detekční seriové pole (registru)

c) Náboj z každého pixelu je pak změřen a převeden na el. napětí

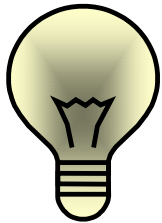
**Výsledkem je obraz světlých pixelů a tmavých pixelů podle velikosti napětí tj. podle počtu fotonů, které dopadly do daného bodu**



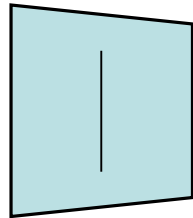
# Jak pracuje CCD



# Animované schéma spektrofotometru



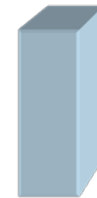
Wolframová  
žárovka(Vis)/  
deuteriová lampa  
(UV)



štěrbina



mřížkový  
monochromátor



Kyveta z  
UV/Vis  
propustného  
skla



Fotonásobič

<http://www.youtube.com/watch?v=pxC6F7bK8CU>

# Nanodrop



## NanoDrop 1000 Specifications

<b>Sample size</b>	1 microliter
<b>Path lengths</b>	1mm and 0.2mm
<b>Light Source</b>	Xenon flash lamp
<b>Detector Type</b>	2048-element linear silicon CCD
<b>Wavelength range</b>	220-750 nm
<b>Wavelength accuracy</b>	1nm
<b>Wavelength resolution</b>	3nm (FWHM at Hg 546 nm)
<b>Absorbance Precision</b>	0.003 absorbance (1mm path)
<b>Absorbance Accuracy</b>	2% (at .76 absorbance at 257 nm)
<b>Absorbance Range</b>	0.02-75 (10mm equivalent absorbance)
<b>Detection Limit</b>	2 ng/microliter (dsDNA)
<b>Maximum Concentration</b>	3700 ng/microliter (dsDNA)
<b>Measurement Cycle Time</b>	10 seconds
<b>Dimensions (footprint)</b>	20cm X 14cm
<b>Weight</b>	1.6 kg

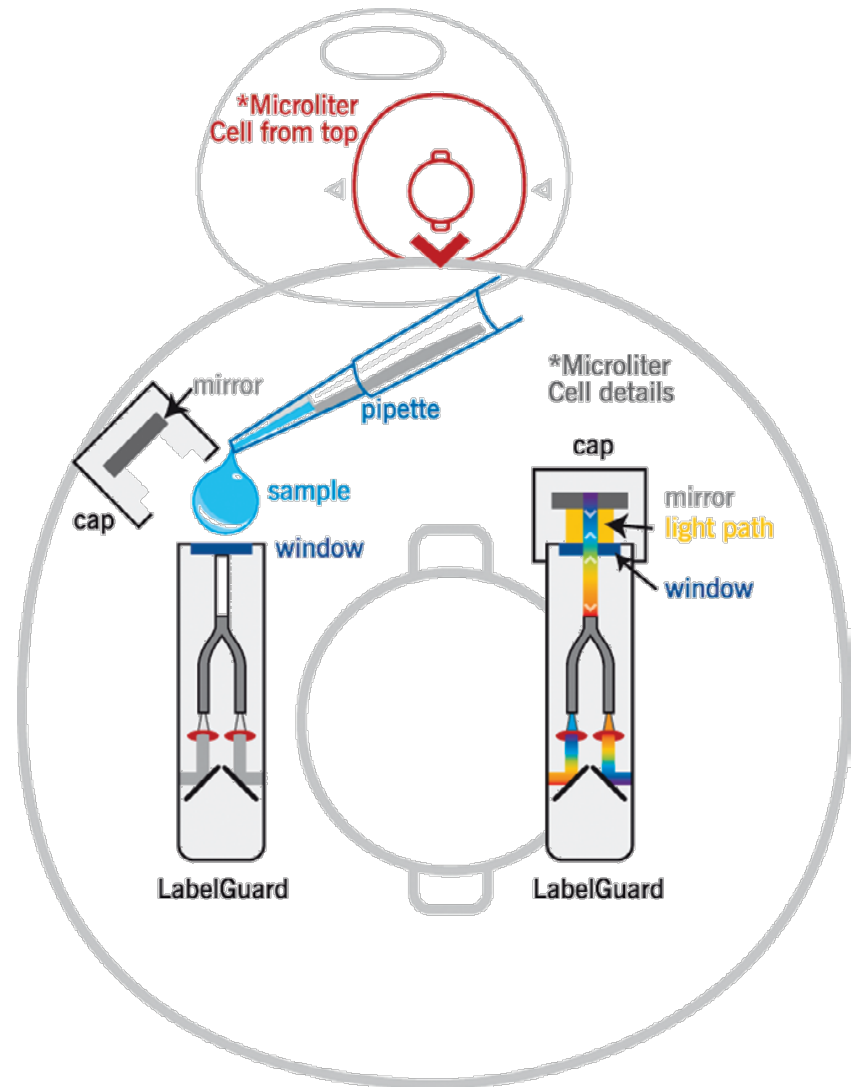
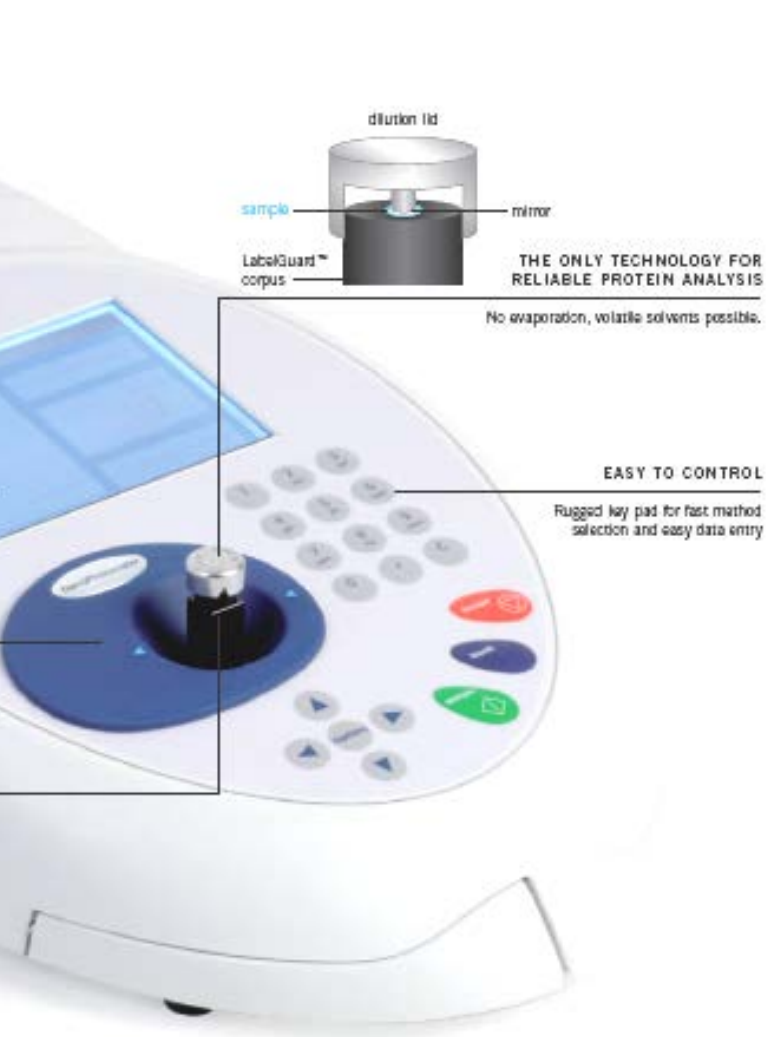
<http://www.nanodrop.com/LikeItsHotVideo.aspx>

# The NanoPhotometer™

Complete solution for submicroliter and standard volume applications



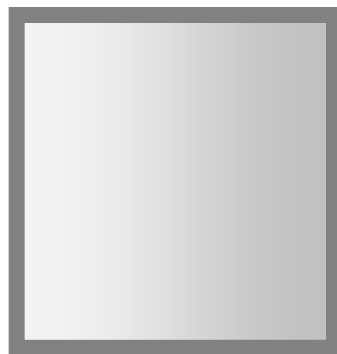
# Nanophotometer



# Geometrie při měření absorbance



Dopadající  
světlo



Kyveta  
shora



Procházející  
světlo

# Použitelný rozsah pro měření absorbance

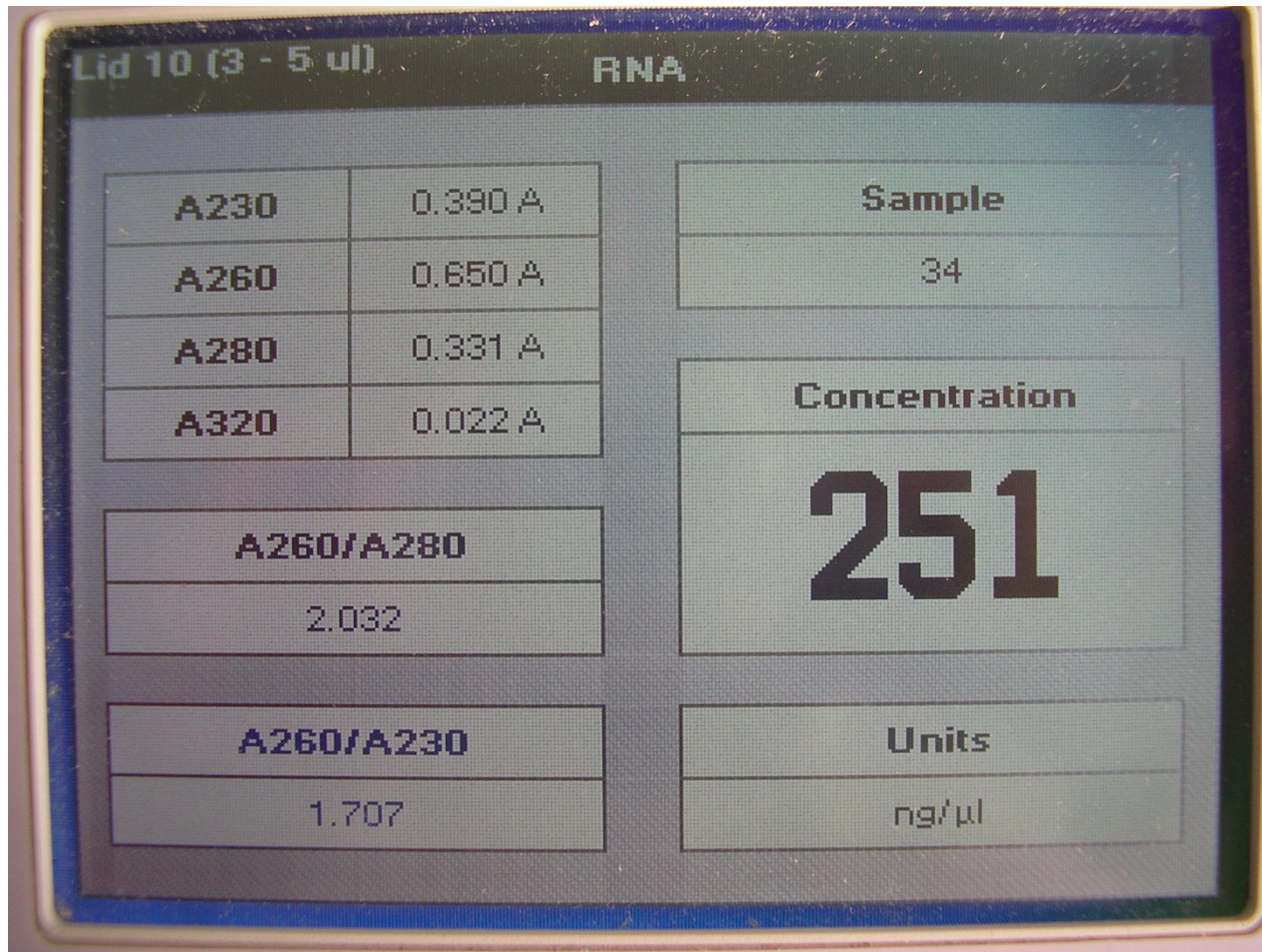
Rozsah s lineární odezvou: tj. že platí  $ABS = c\epsilon l$

$$ABS = 0.1 - 1.0$$

Nejpřesnější oblast: tzn. na hodnoty se  
můžeme nejvíce spolehnout v intervalu

$$ABS = 0.3 - 0.7$$

# Co sledovat při měření?

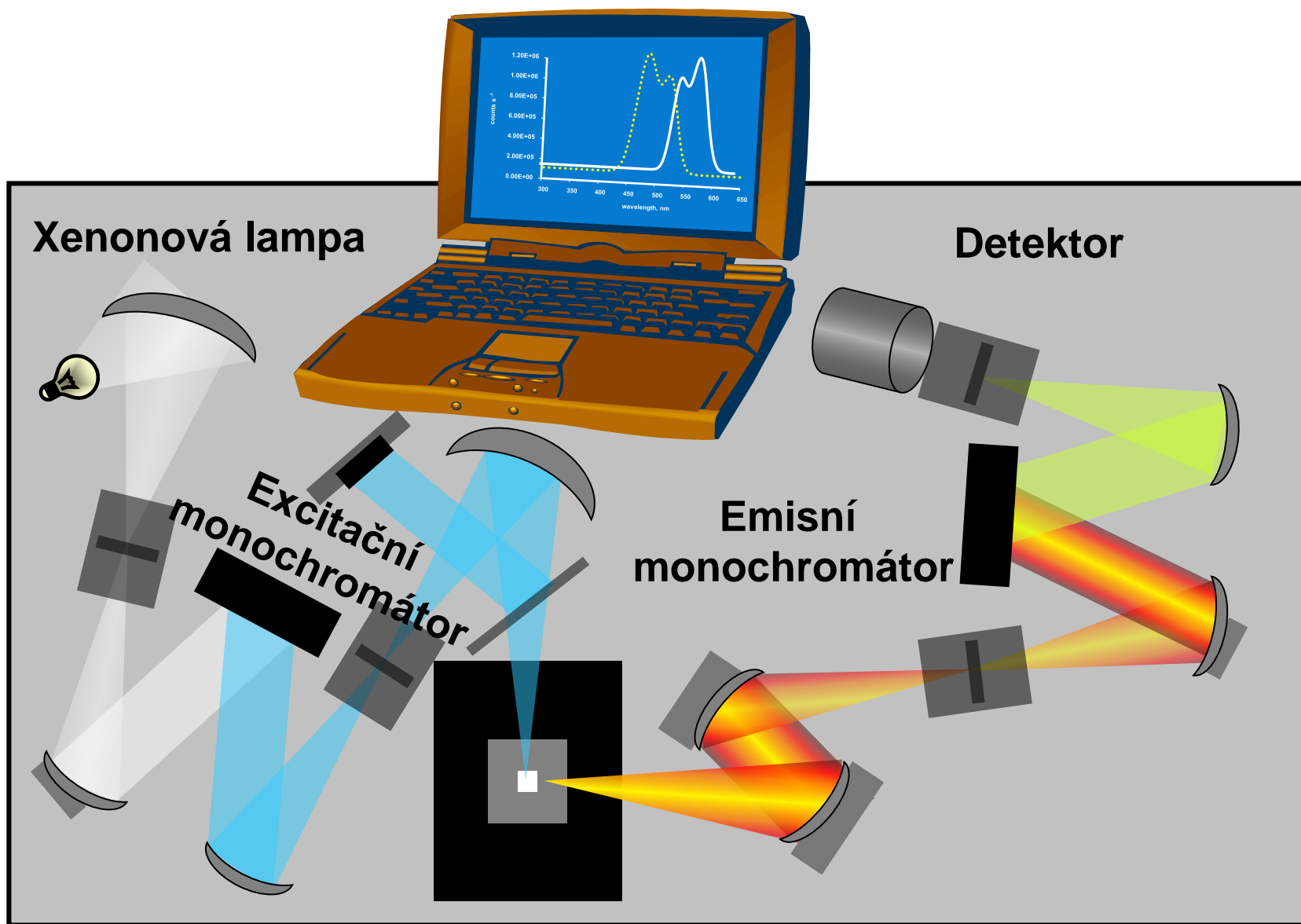




# Přístroje pro měření fluorescence

1. **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
2. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
3. **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
4. **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací

# SpektroFLUOROmetr

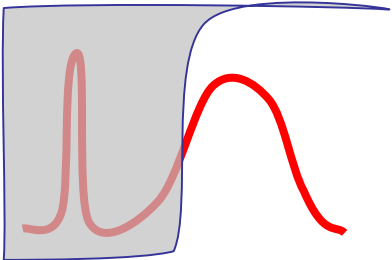
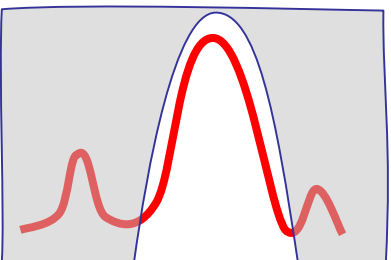
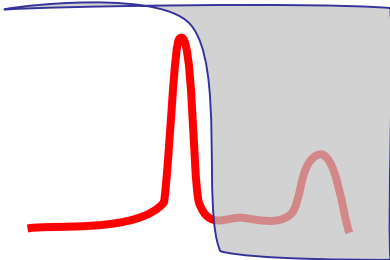
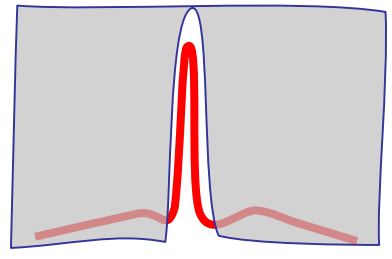
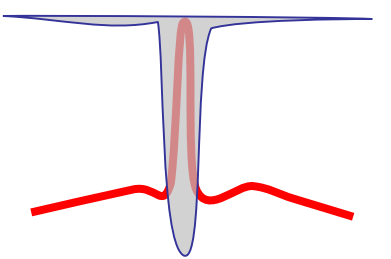
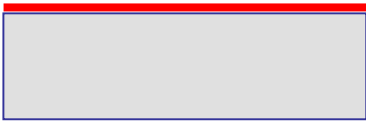


# Filtry

**Výhody** ve srovnání s monochromátorem:

Levné, kompaktní, vysoce účinné, vysoce propustné

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

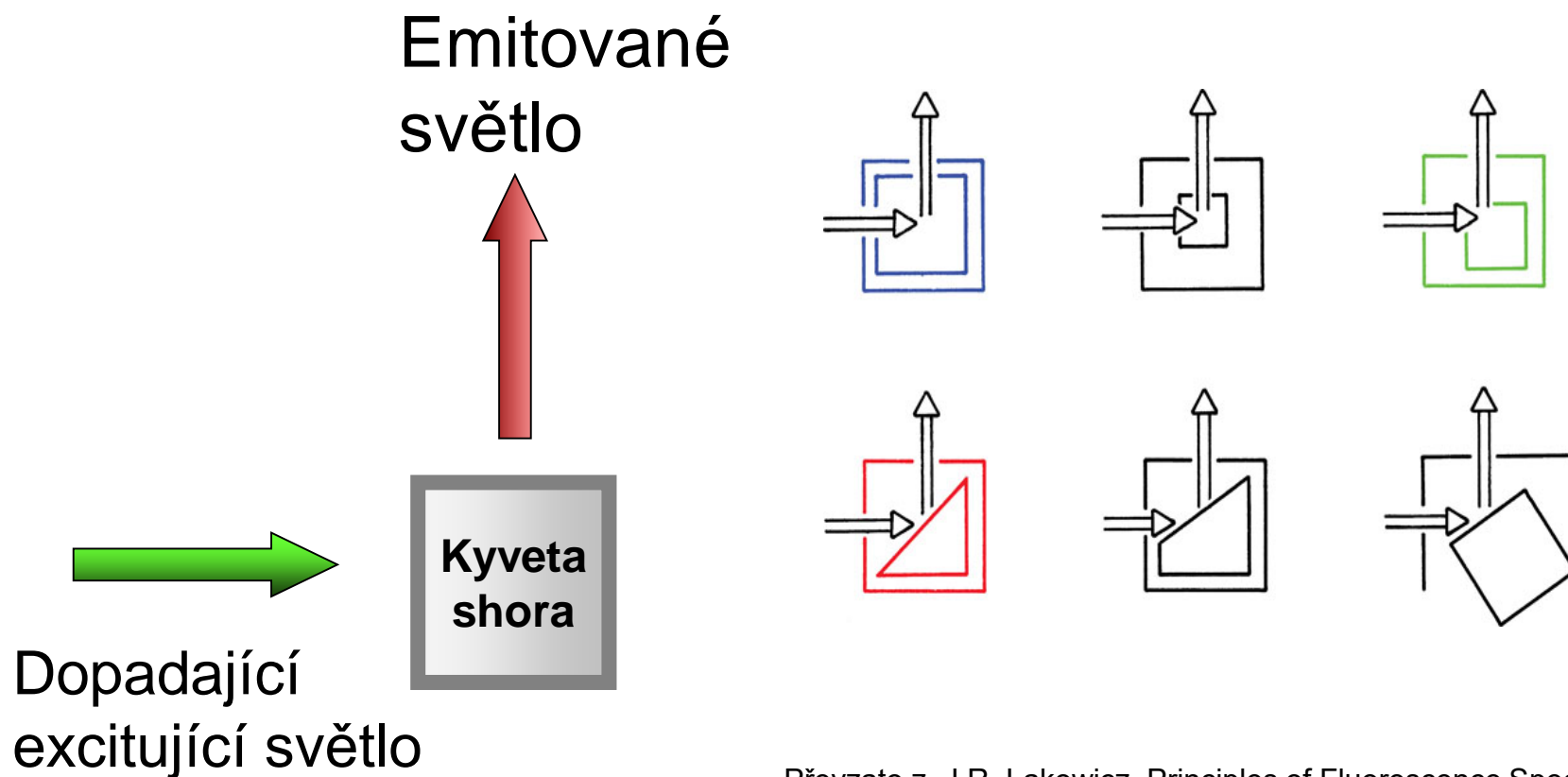
Cut-off or long pass	Band-pass	Short-pass
		
<b>Clean-up</b>	<b>Notch</b>	<b>N.D</b> Snížení intenzity
		

# Zdroje světla a filtry barevně

## **Molecular Probes Tutorial Series—Overview of Filters and Light Sources**

<https://www.youtube.com/watch?v=xJGmARfBasU>

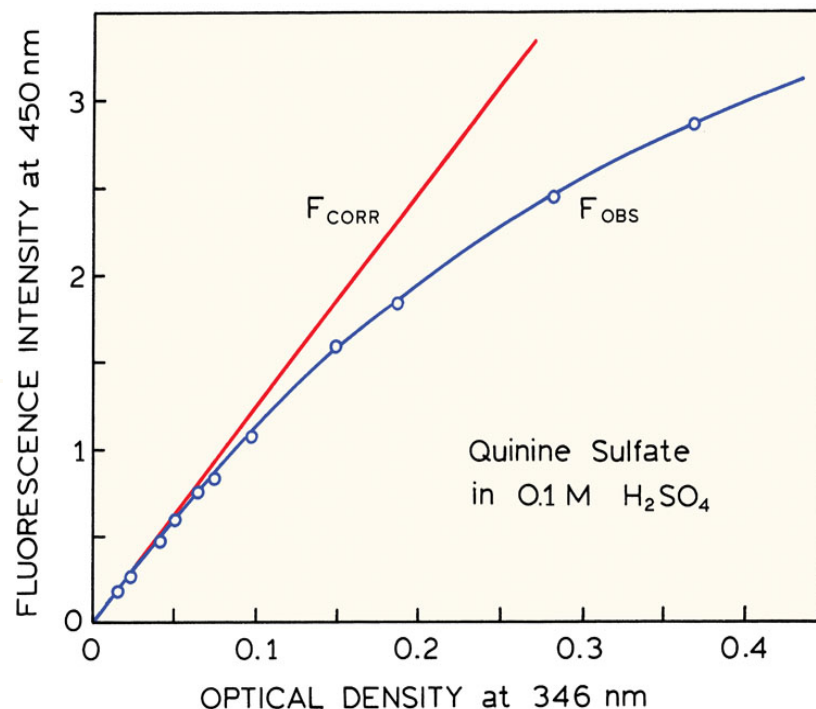
# Geometrie při měření fluorescence



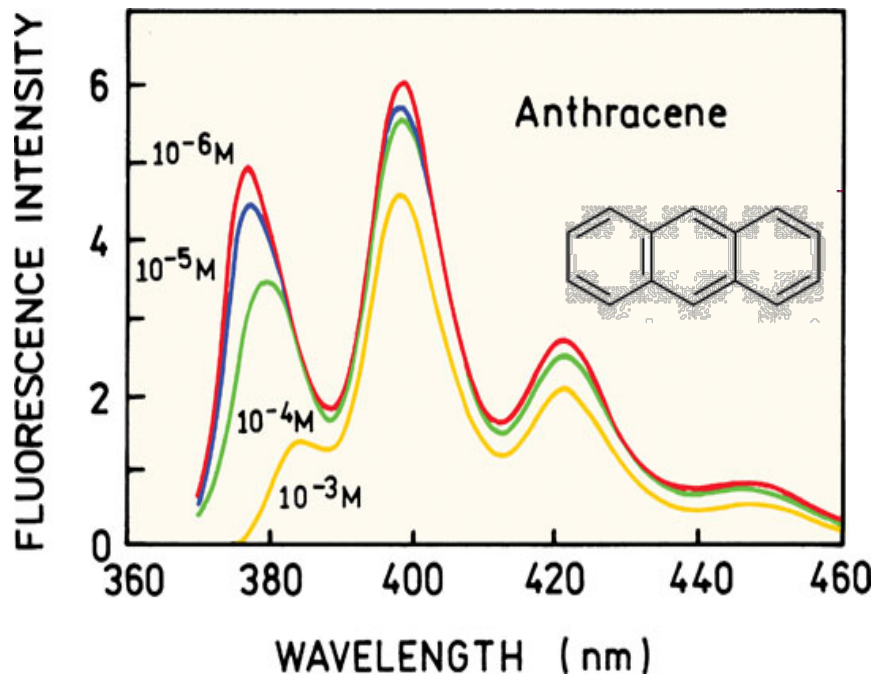
Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

# Efekt vnitřního filtru

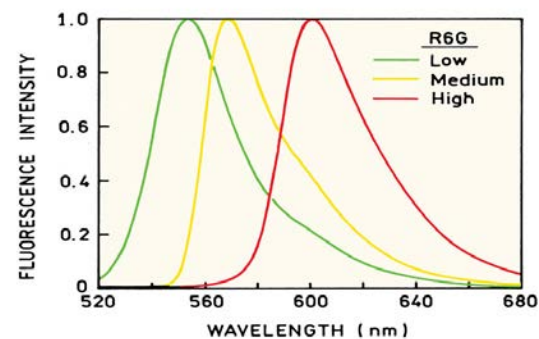
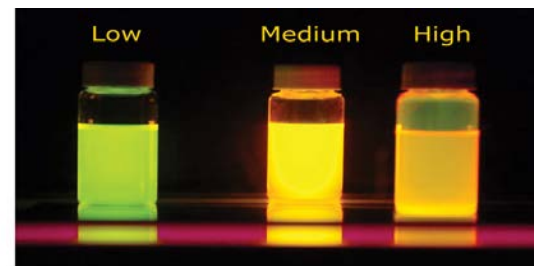
Intenzita fluorescence se při určité hodnotě absorbance (zpravidla od Abs kolem 0,1) začíná chovat nelineárně. To je způsobeno tím, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část budícího záření je absorbována povrchovými vrstvami.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



# Vliv koncentrace fluoroforu na tvar a polohu jeho emisního spektra

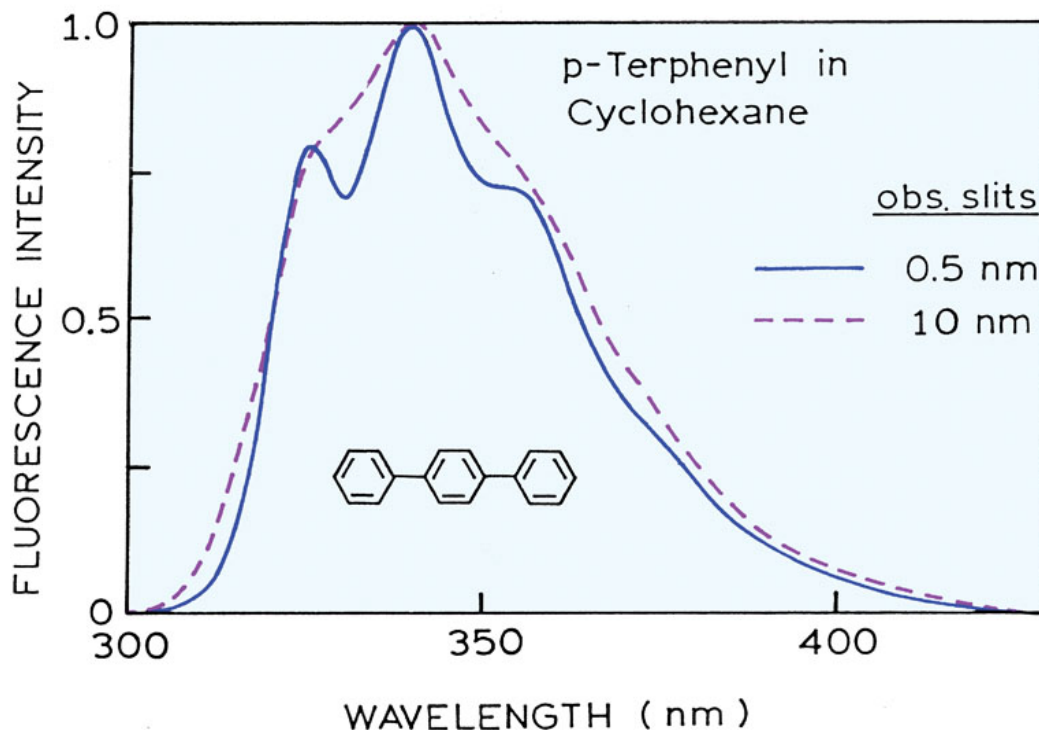


Vysoká koncentrace způsobuje snížení emisního signálu u nižších vlnových délek u antracenu. To je způsobeno zpětnou absorpcí fluorescence antracemem v oblasti, kde se spektrum absorpční a emisní nejvíce překrývají tj. v oblasti 370-400 nm.



Největší vliv koncentrace na emisní spektrum je pozorován u fluoroforu s malým Stokesovým posunem – velkým překryvem absorpčního a emisního spektra. Obrázek u ukazuje tři koncentrace Rhodaminu 6G vzrůstající zleva do prava a příslušnou změnu barvy emitovaného světla. Tento efekt pozorujeme díky reabsorpci kratších vlnových délek z emisního spektra. To posouvá celé spektrum k delším vlnovým délkám při vyšších koncentracích fluoroforu.

# Vliv nastavení šířky štěrbin na tvar spektra



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



# Časté chyby při přípravě fluorescenčních vzorků

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

# Dokumentační systém

„inteligentní temná komora“

Umožňuje stanovit hodnotu lokální optické absorpce i fluorescence

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

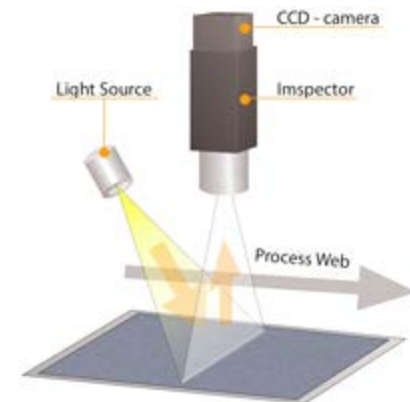
Zdrojem selektivního budícího záření jsou LED diody na bočních stranách

Emise je sledována (digitálním) fotoaparátem nebo chlazeným CCD detektorem

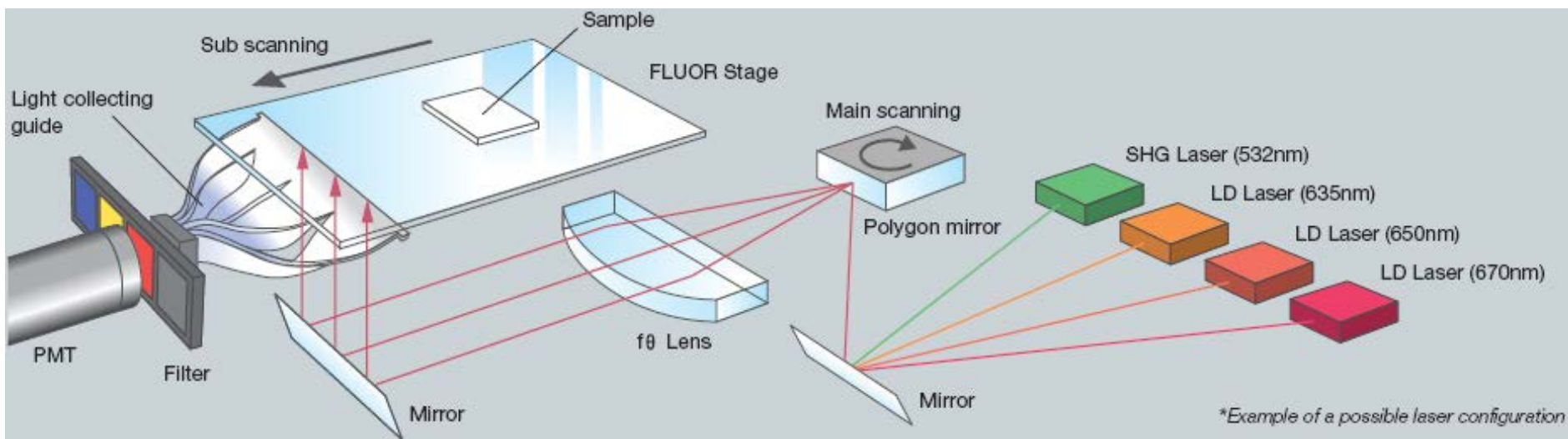
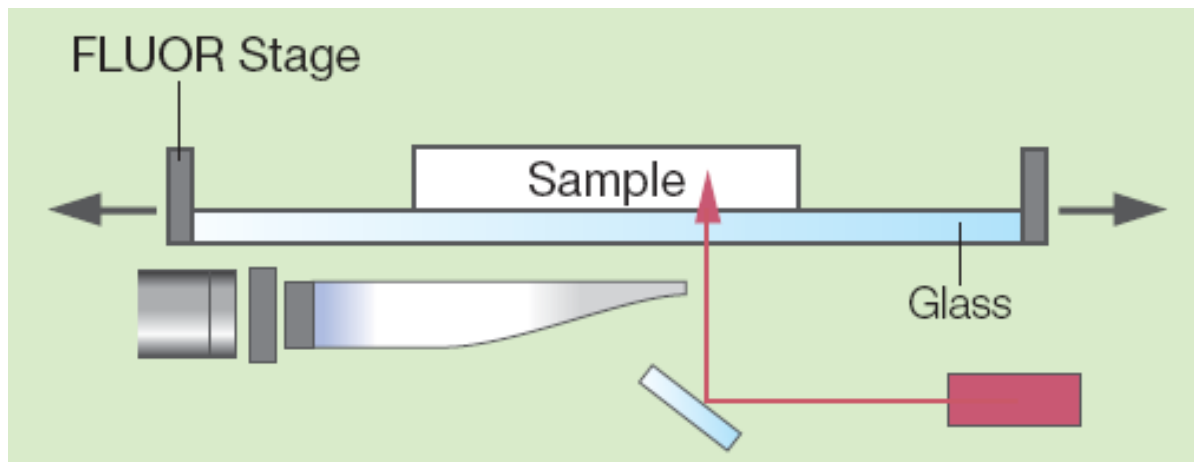


# Fluorescenční scanner

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



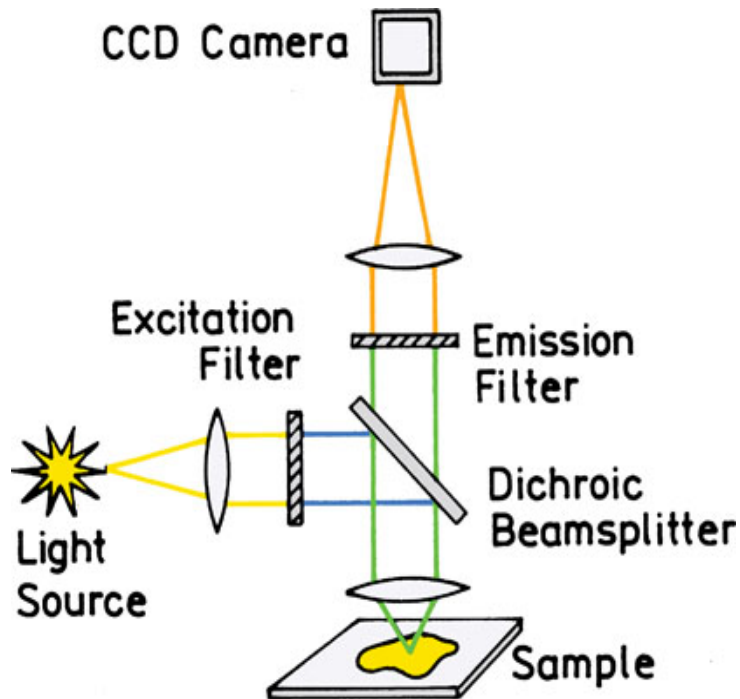
# Fluorescenční scanner - schéma



# Fluorescenční mikroskop

Hlavní rozdíl oproti spektrometrům :

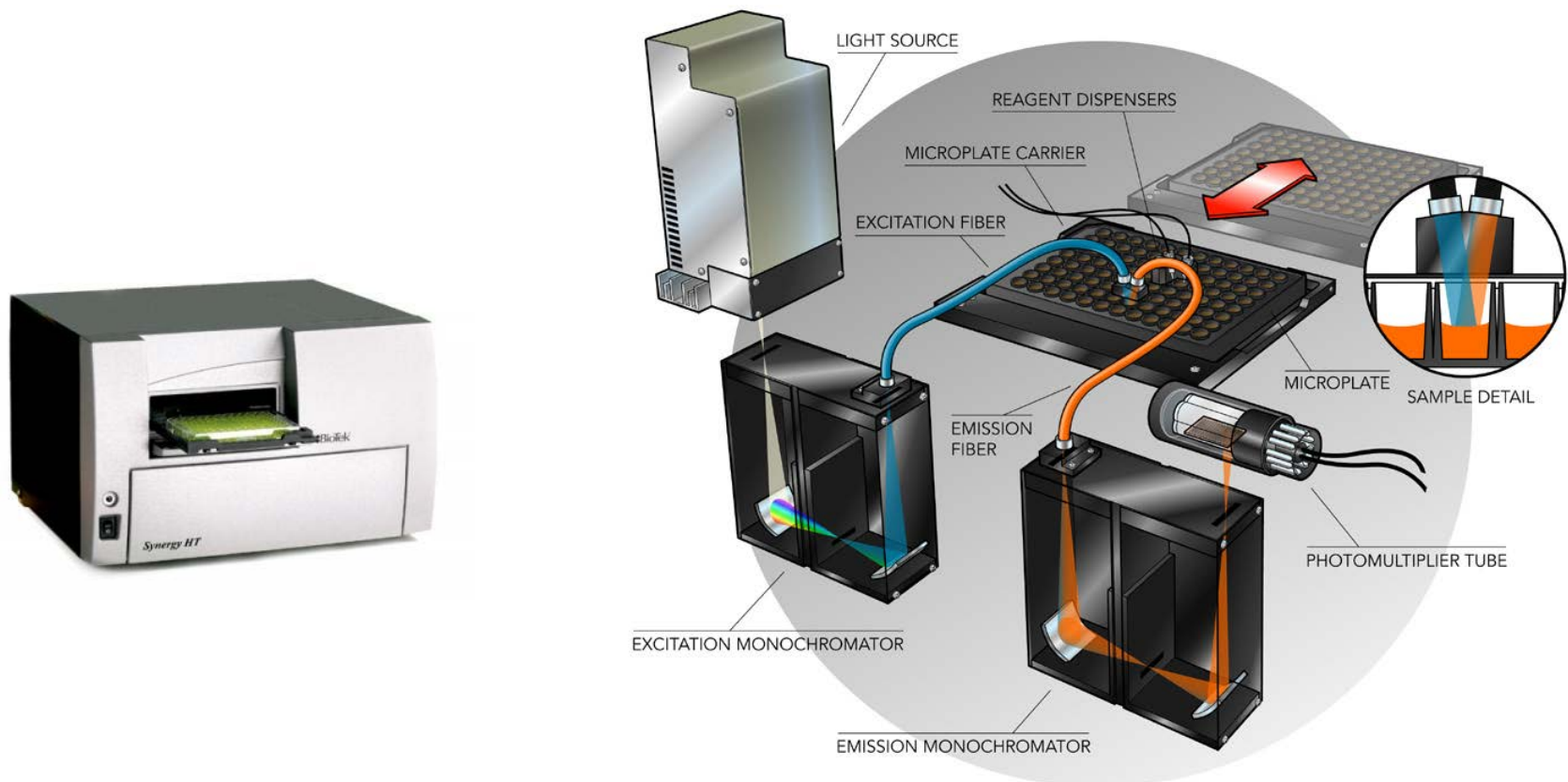
nepoužívá monochromátory, ale **excitační a emisní filtr**



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

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

# Čtečka mikrodestiček



Převzato z přístrojové dokumentace  
Biotek

# Literatura

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

Poděkování

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