

# PŘÍSTROJE PRO MĚŘENÍ ABSORPCE A FLUORESCENCE

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI  
SCI

Národní centrum  
pro výzkum  
biomolekul

# Zdroj světla



Co a kdy použít jako zdroj záření?

Jak vybrat světlo o dané vlnové délce?

Jak lze detekovat světlo?

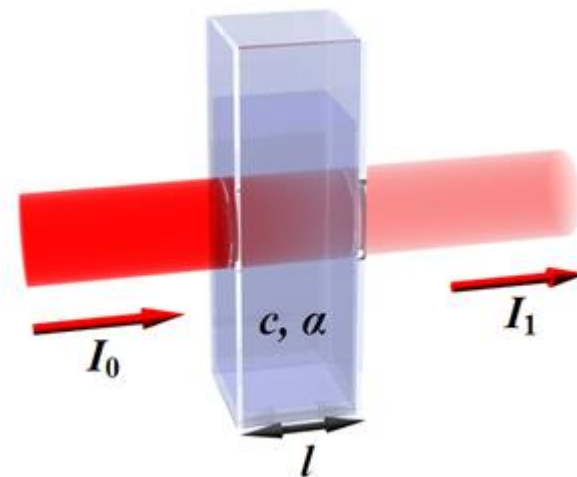
Jaký je základní princip všech přístrojů na měření fluorescence?

# Absorpce

Látka pohlcuje světlo

Pro absorpci mono- chromatického světla platí

**Lambert-Beerův zákon:**



Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

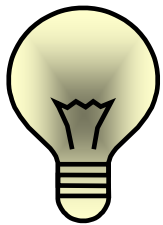
$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

# SpektroFOTometr

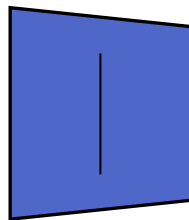
Přístroj pro měření absorpce světla vzorkem

Absorbance je měřena při různých vlnových délkách

Výsledkem je absorpční spektrum látky



zdroj



štěrbina



výběr vlnové délky



vzorek



detektor



# Zdroje záření a jejich použití

## Zdroje ustáleného kontinuálního záření

**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

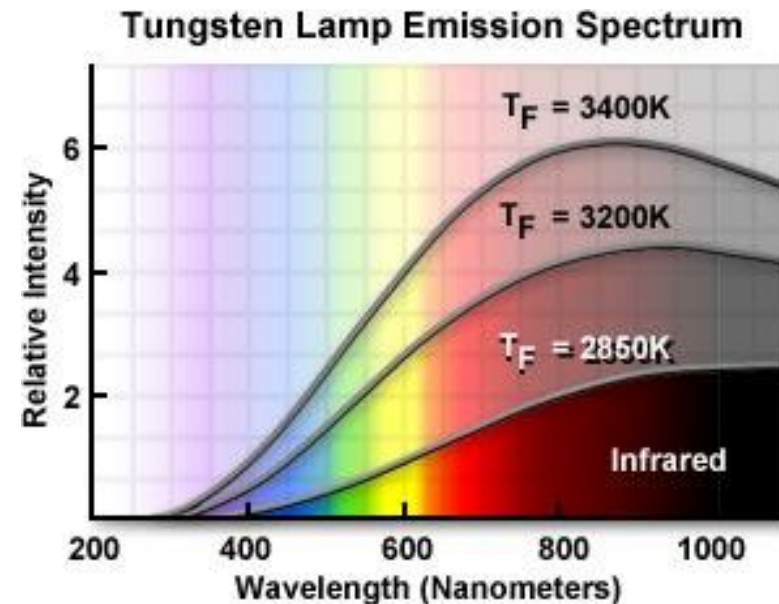
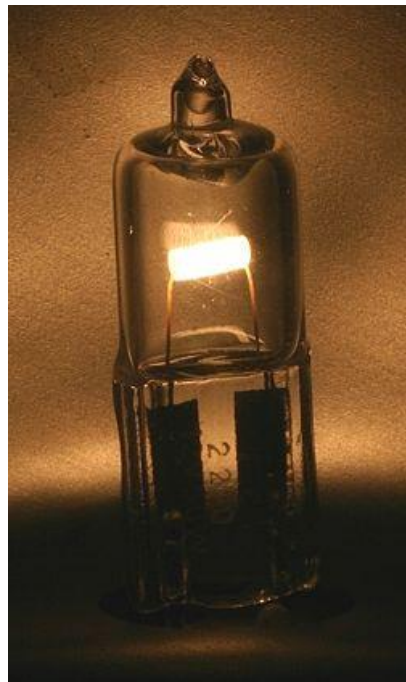
LD a LED diody

# Jak vypadá spektrum ideálního zdroje světla?



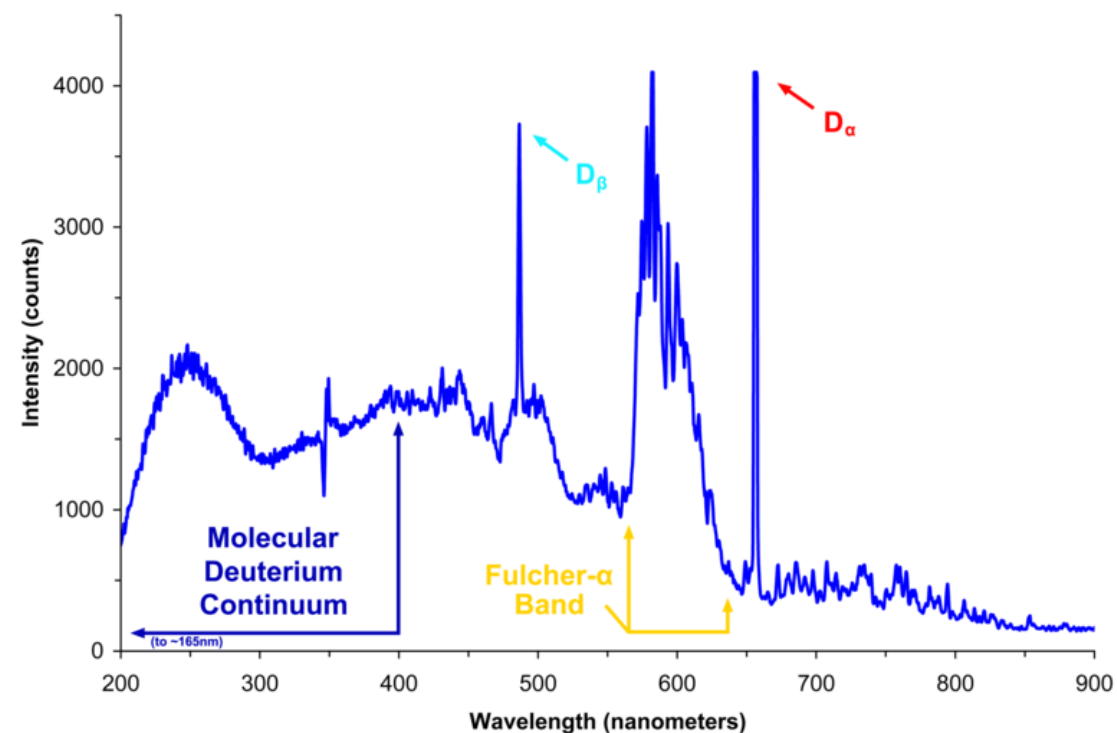
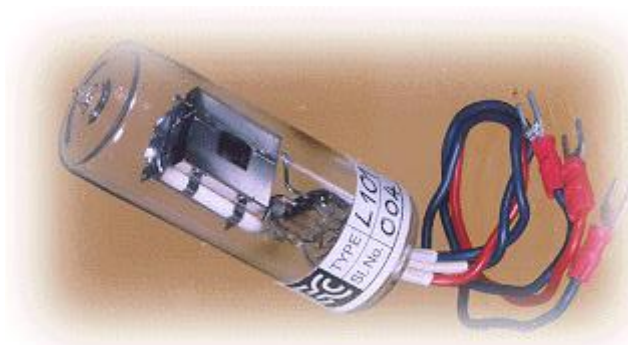
# Wolframová žárovka – viditelné spektrum

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

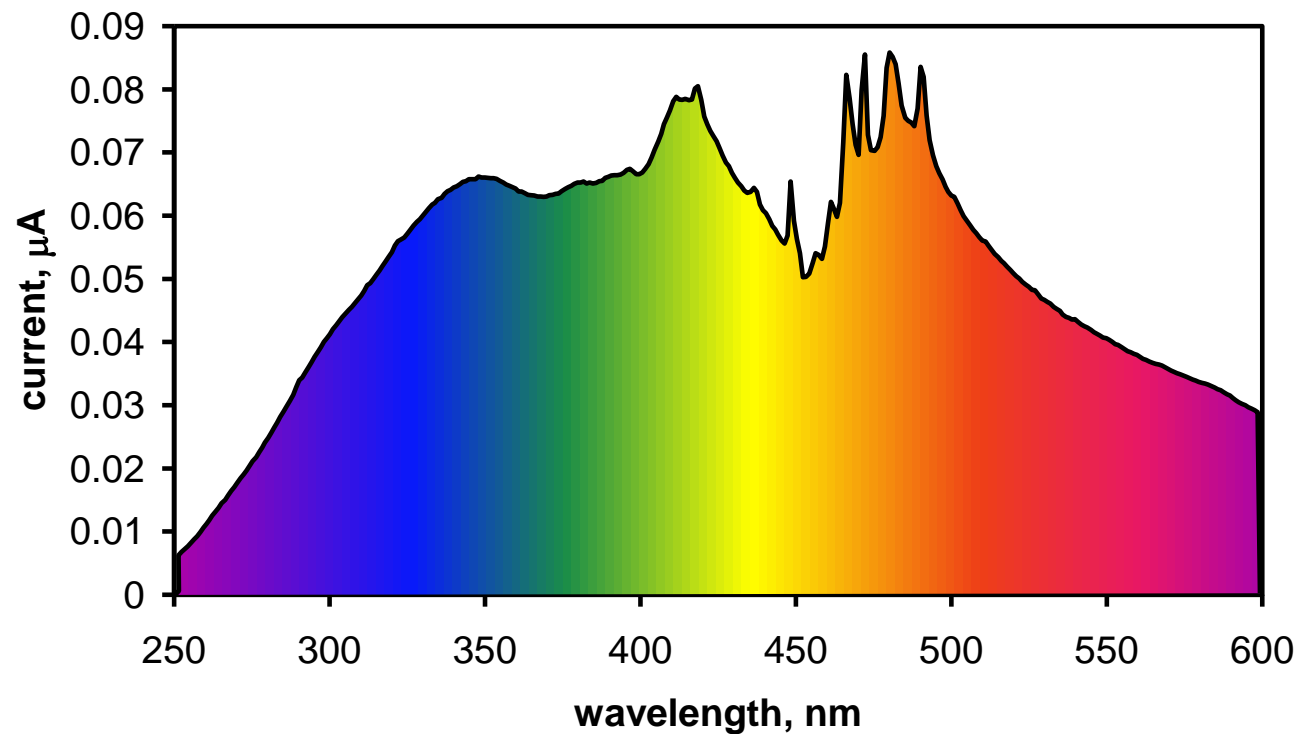
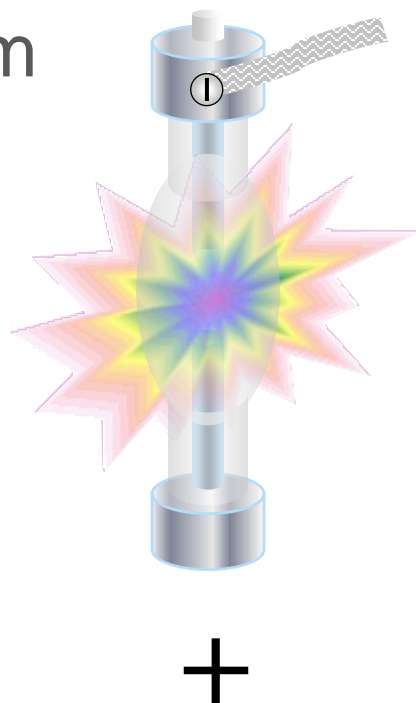
Nízkotlaký zdroj vhodný zejména pro  
UV oblast záření (160-400 nm)  
Plněná deuteriem v plynném stavu



# Xenonová výbojka

Xenon Arc Lamp (XB0), relativně hladké spektrum

220nm – 1000nm

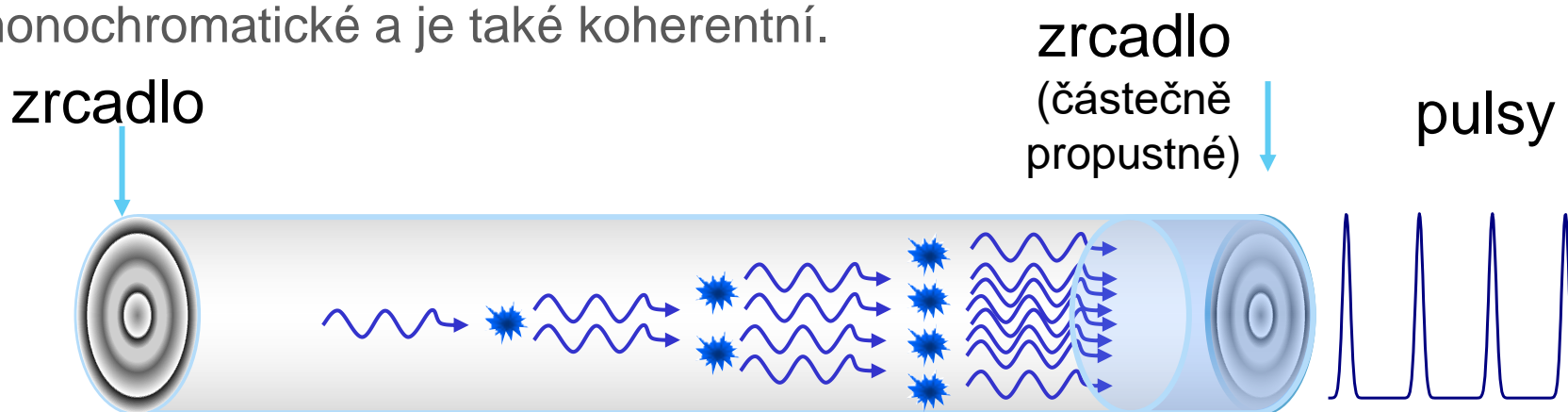


Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

Fluorescenční metody | C7230 | Ctirad Hofr – LifeB | FGP | NCBR

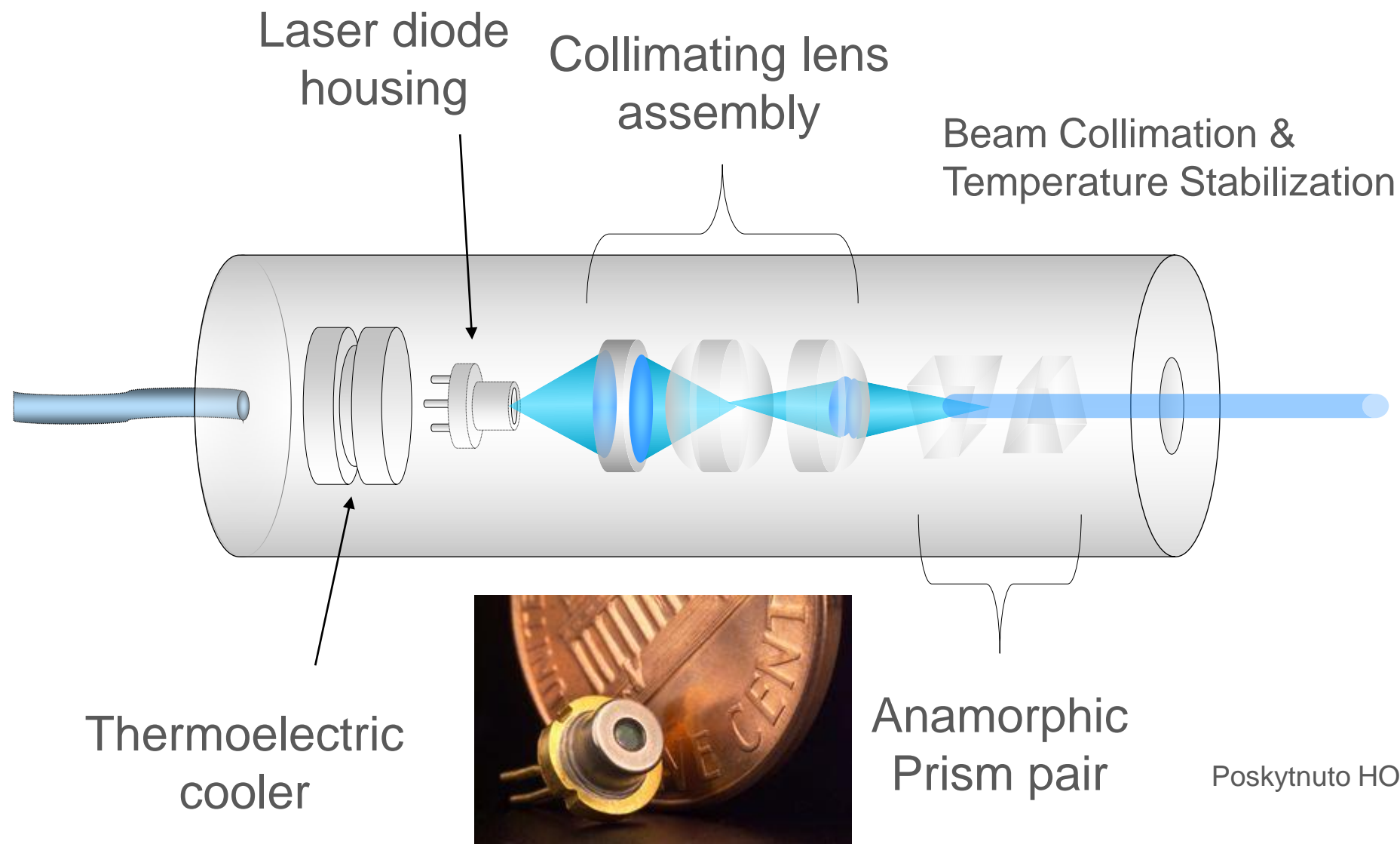
# LASER *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

'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.



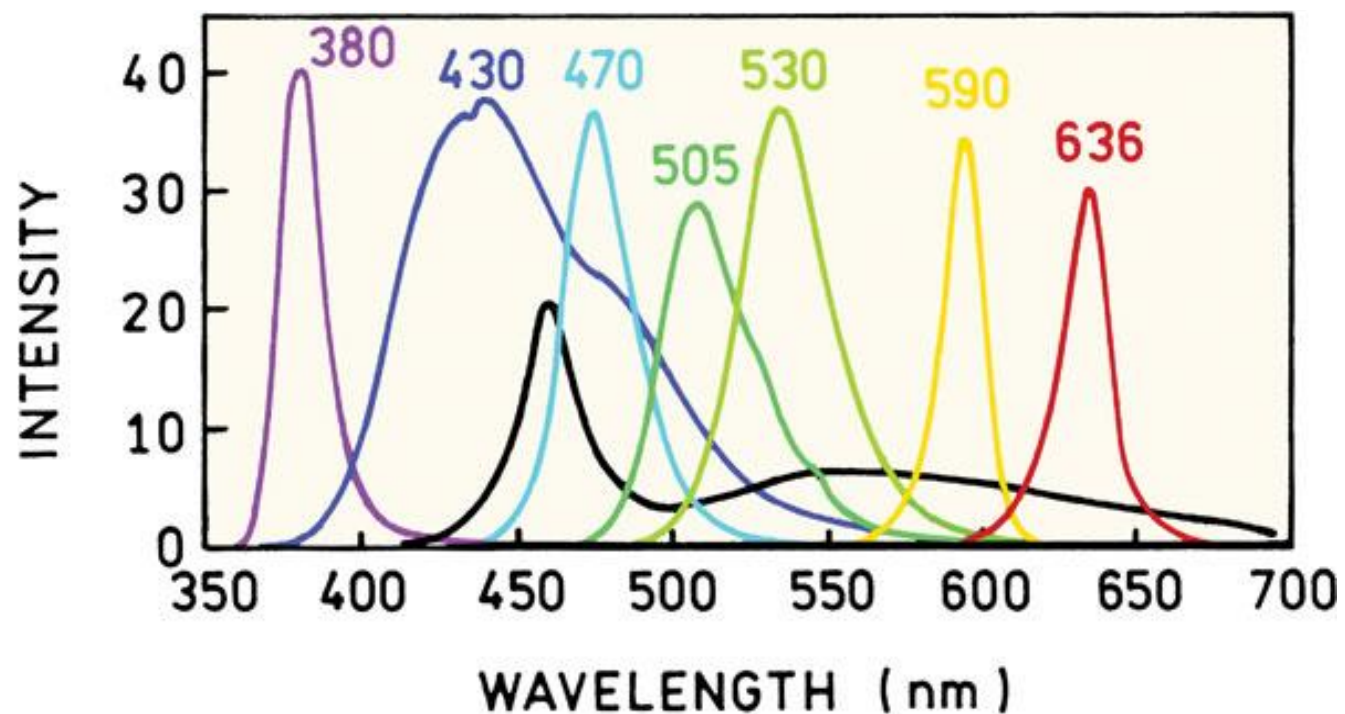
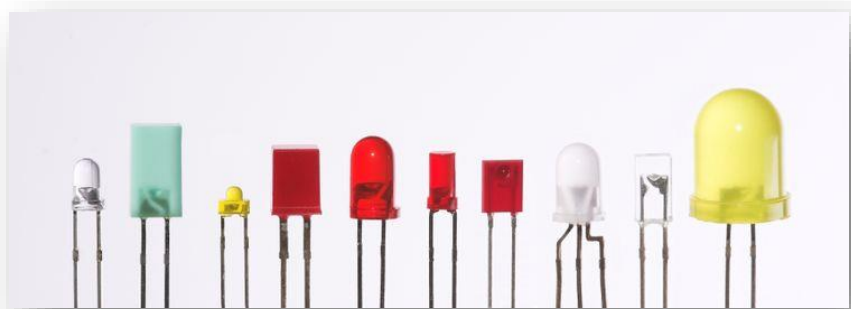
Látce je neustále dodávána energie, aby byly molekuly stále v excitovaném stavu. Fotony se odrážejí uvnitř prostoru mezi dvěma zrcadly. Fotony v pulzech procházejí částečně propustným zrcadlem. Vzdálenost pulzů je dána velikostí prostoru mezi zrcadly a rychlostí cyklu. Spektrum je čarové - pouze jedna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

# LD - Laser Diode



# LED – Light Emitting Diode

- nízký příkon
- vysoká účinnost
- dostatečně úzký spektrální rozsah



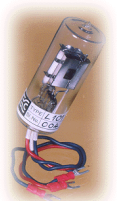
# Zdroje záření a jejich použití

## Zdroje ustáleného kontinuálního záření

**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

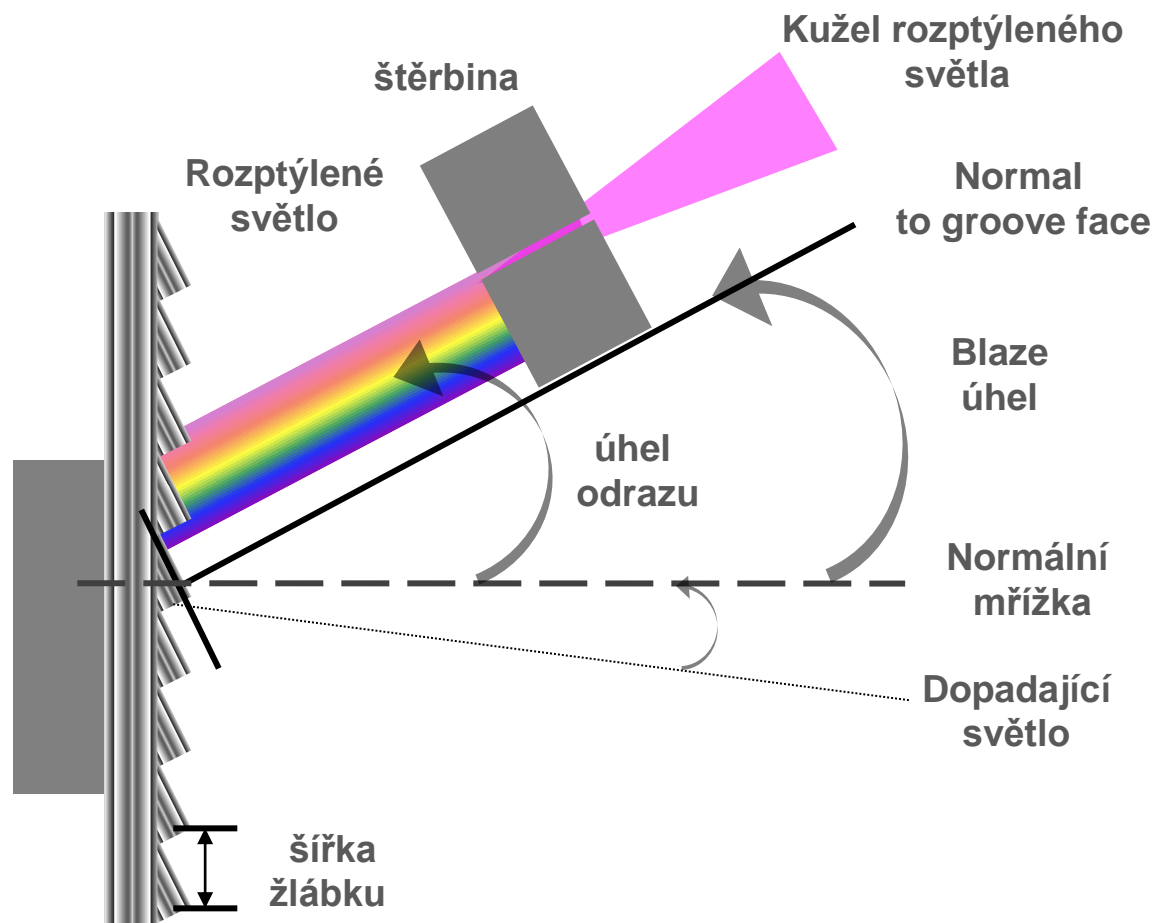
LD a LED diody

# Jak vybrat světlo o určité vlnové délce?



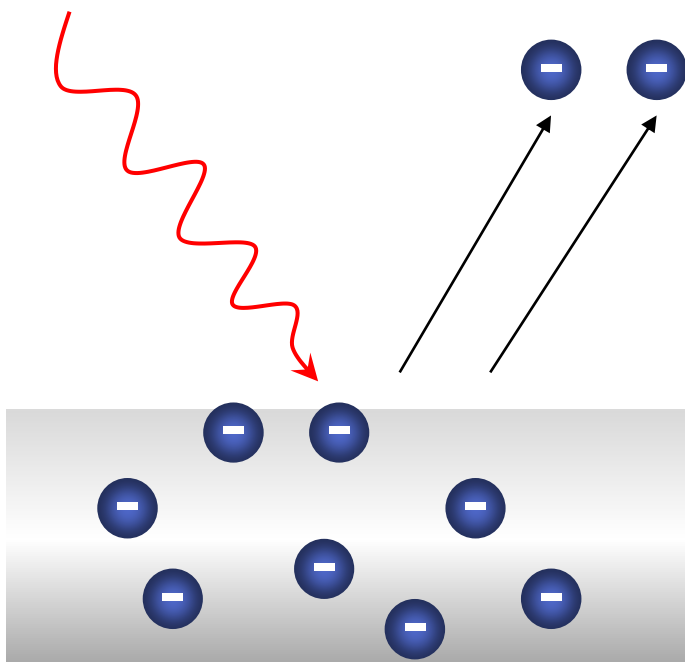


# Monochromátor



Využívá rozptylu světla na mřížce vybírá ze spektra vlnovou délku nebo přesněji rozsah vlnových délek.

# Fotoelektrický jev



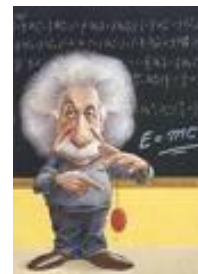
$$hf = W + E_k$$

$W$  – energie potřebná  
k vyražení elektronu

$E_k$  -Kinetická energie volného  
elektronu po vyražení

Nobelova cena

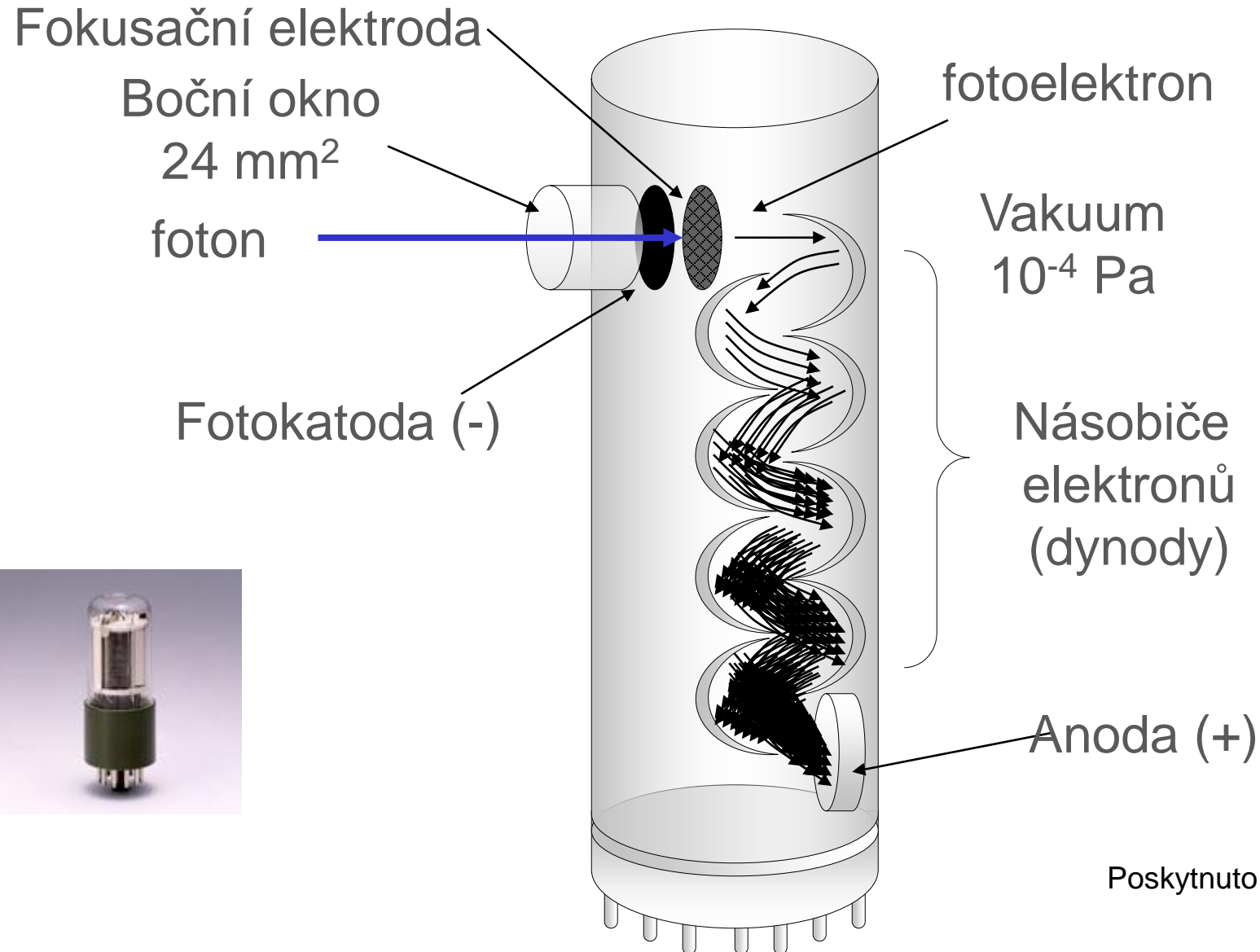
A. Einstein, 1921



Fotoelektrický jev je proces, kdy světlo dopadající na kov vyvolá vyražení elektronů. Tyto vyražené elektrony se nazývají fotoelektrony. Emise fotoelektronů a jejich kinetická energie závisí na frekvenci světla. Proces, při kterém jsou fotoelektrony vyraženy z povrchu kovu působením světla, se označuje jako fotoemise.

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

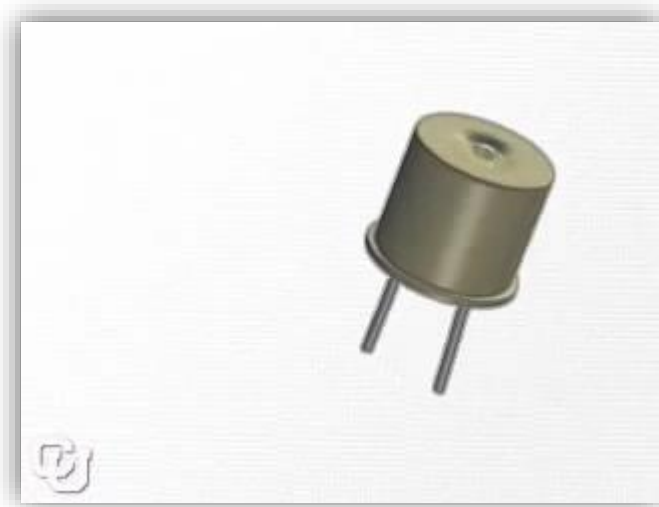
# Detektor – fotonásobič – PhotoMultiplier Tube – PMT



Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

# Fotodioda

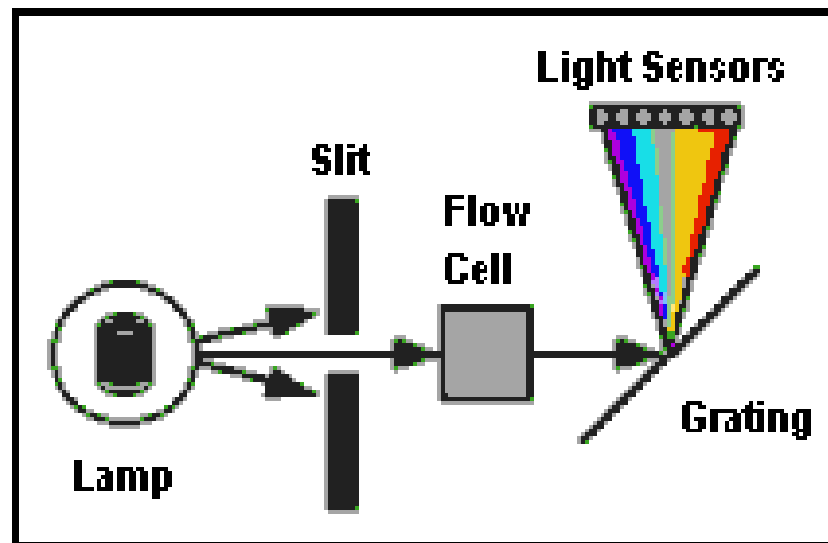
Polovodičová součástka, přeměňuje světlo na elektrický proud. Když foton zasáhne diodu, vytvoří se pár elektron-díra. Pokud absorpce proběhne v blízkosti přechodu, tyto nosiče jsou přeneseny elektrickým polem a vytváří se fotoproud.



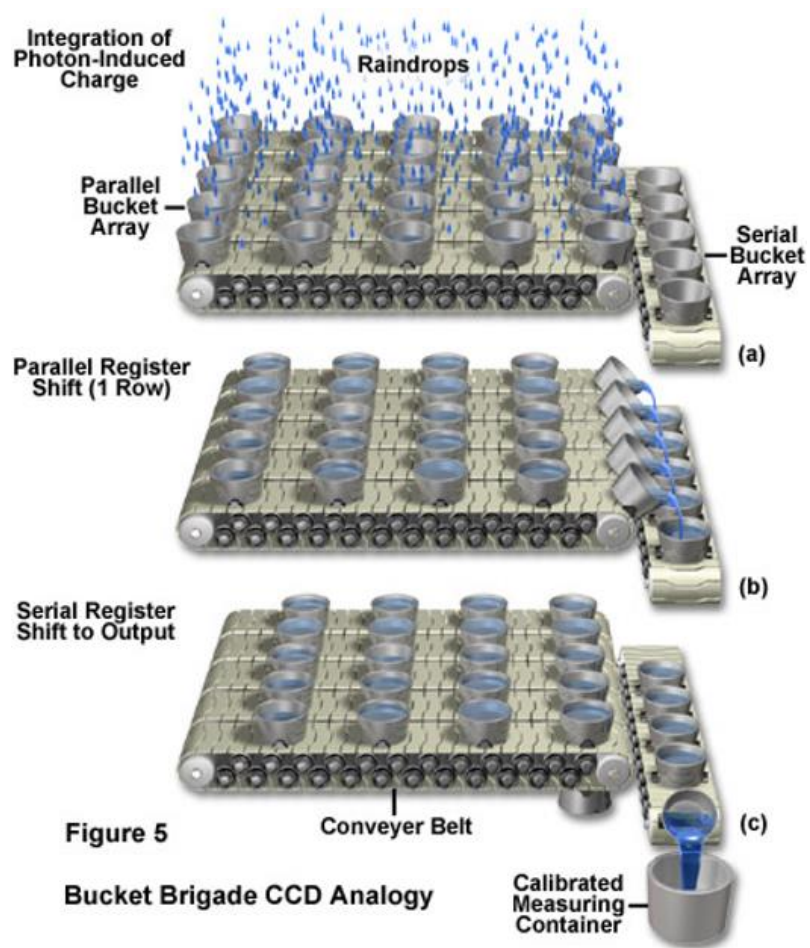
# Diode array detektor

Pás světlocitlivých diod. Na každou diodu dopadá světlo o daném rozsahu vlnových délek.

Výhoda: najednou se snímá celé spektrum



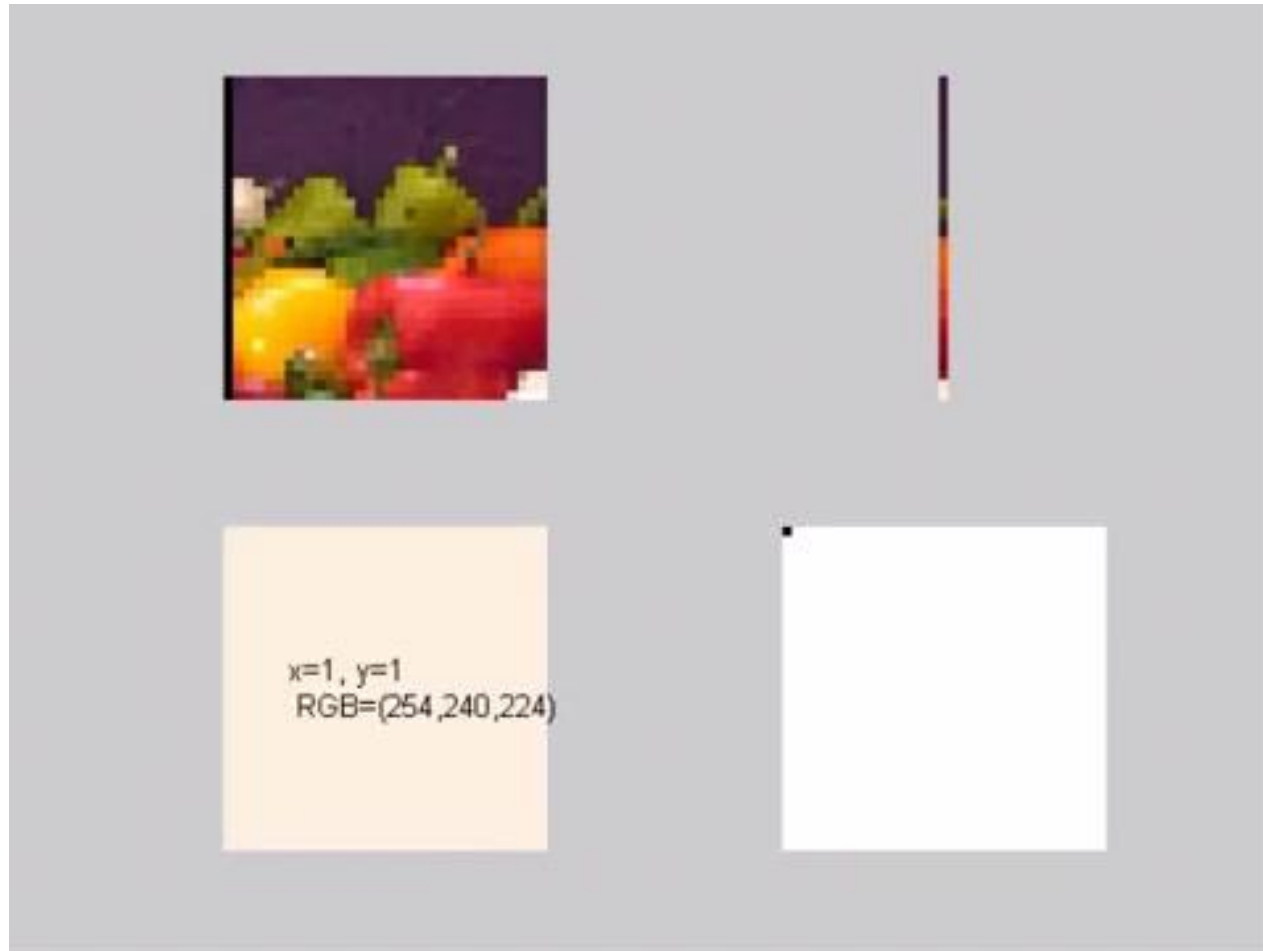
# CCD detektor – Charge Coupled Device



- 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 sériové pole (registru)
- 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



# CMOS senzor – Complementary metal-oxide semiconductor

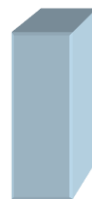
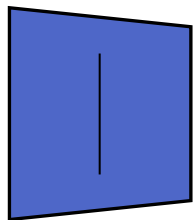
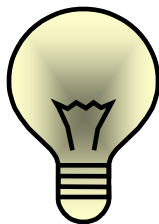


Signál je měřen přímo v každém obrazovém bodu.

<https://youtu.be/hkywIVCQOeo?t=97>



# Animované schéma spektrofotometru

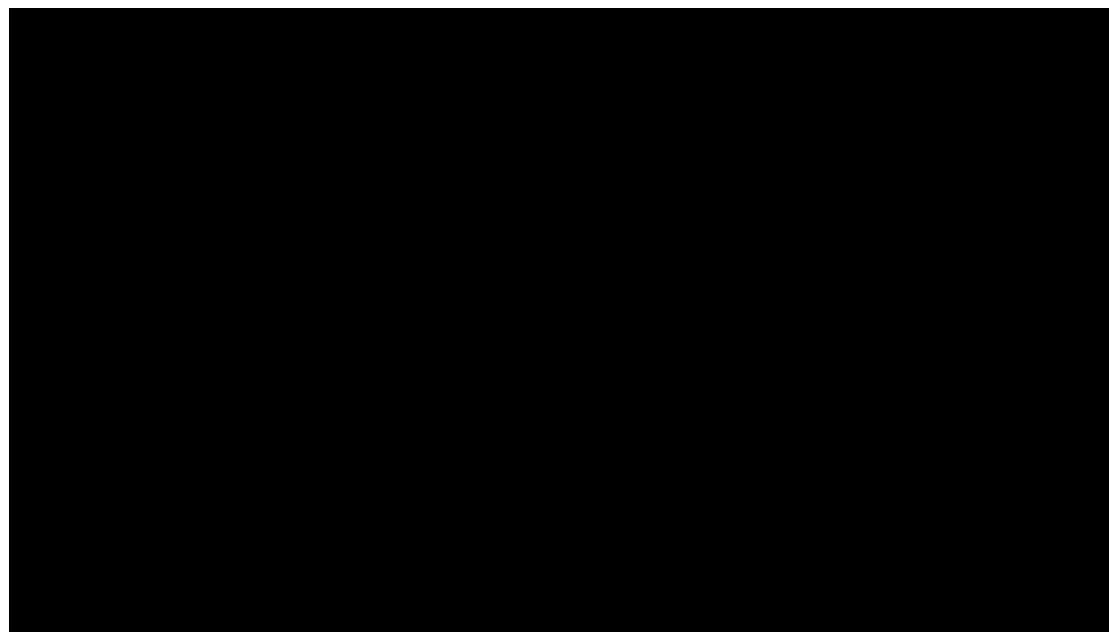


štěrbina

mřížkový  
monochromátor

Kyveta z UV  
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>

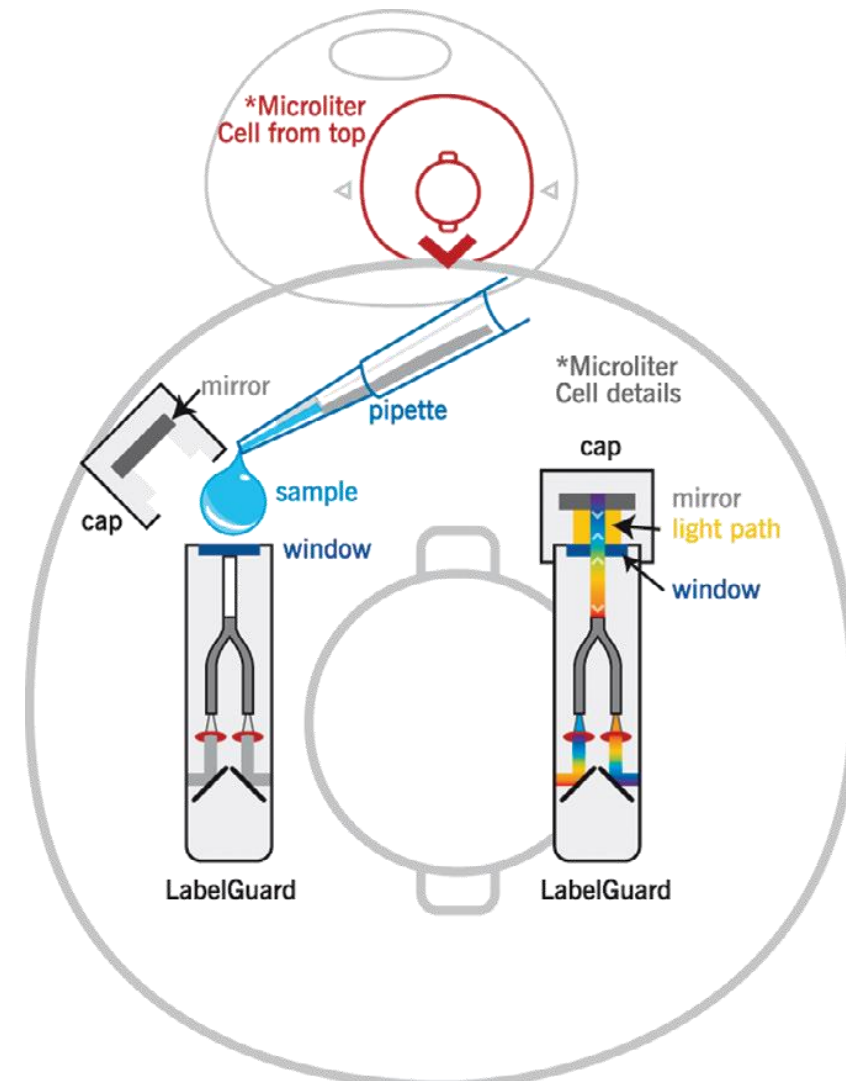
# NanoPhotometer

## The NanoPhotometer™

Complete solution for submicroliter and standard volume applications



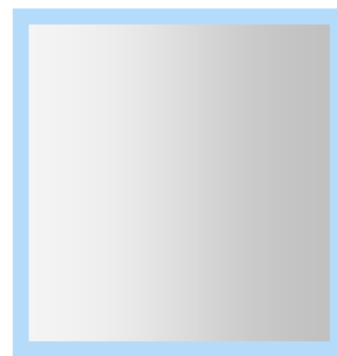
# NanoPhotometer



# Geometrie při měření absorbance



Dopadající  
světlo



Kyveta  
shora



Procházející  
světlo

# Použitelný rozsah pro měření absorbance

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

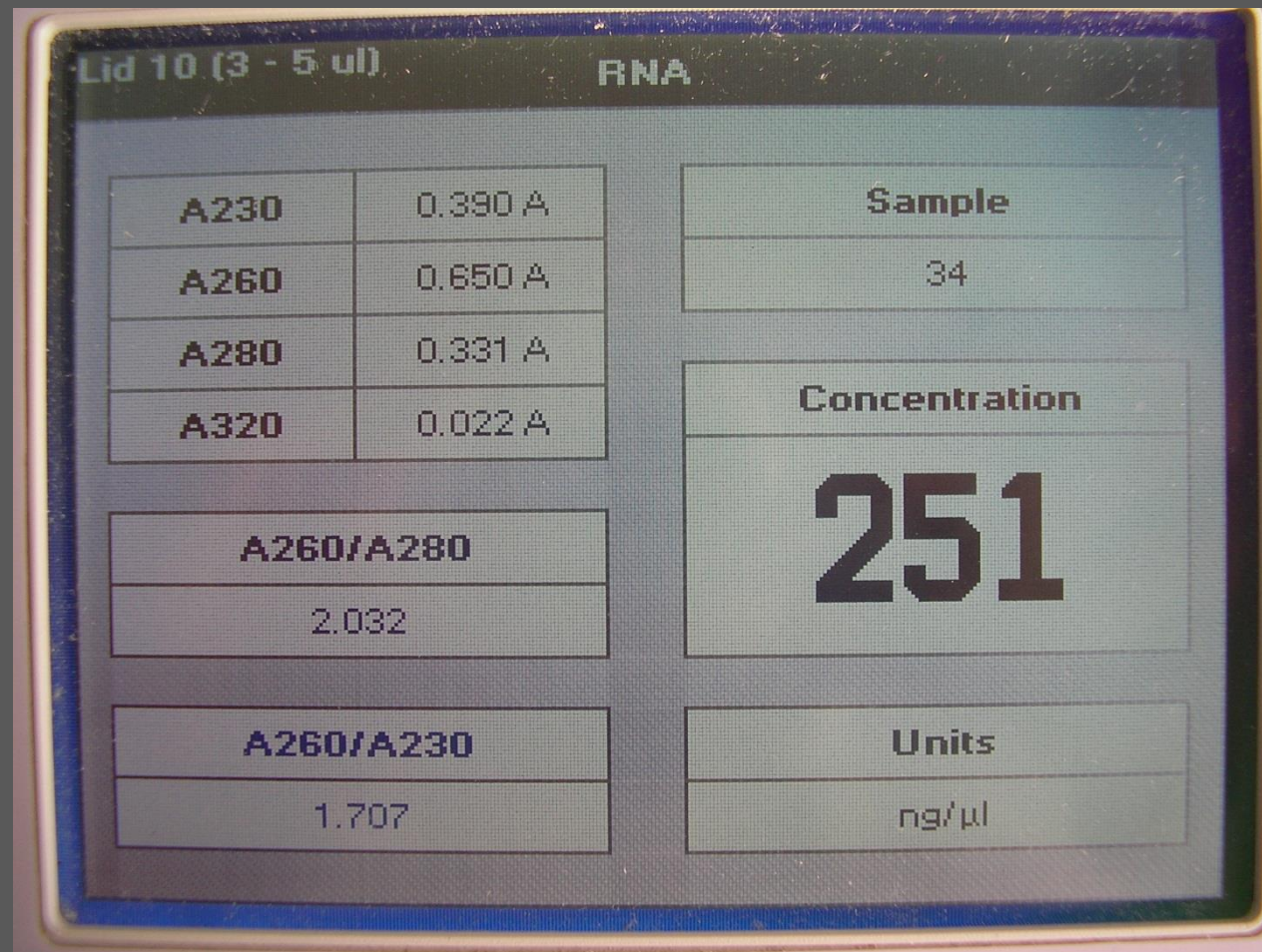
$$ABS = 0.1 - 1.0$$

Nejpřesnější oblast: tzn. na hodnoty se můžeme nejvíce spolehnout

v intervalu

$$ABS = 0.3 - 0.7$$

# Co sledovat při měření?



# Přístroje pro měření fluorescence

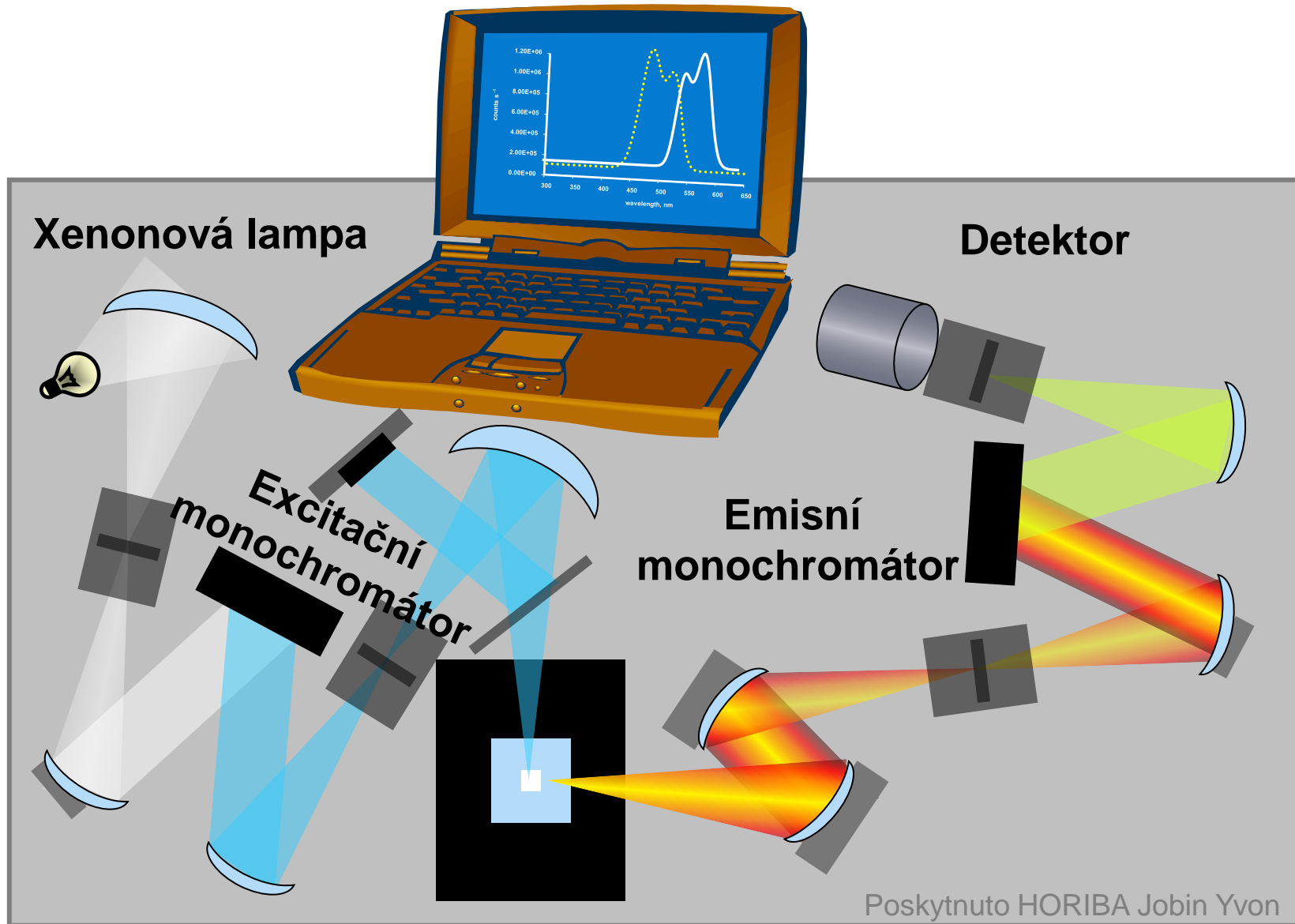
1. **spektrofluorometry** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
2. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
3. **fluorescenční mikroskopy**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



# Jak se podílel komár na vývoji přístrojů?



# SpektroFLUOROmetr



# Filtry

**Výhody** ve srovnání s monochromátorem:

Levné, kompaktní, vysoce účinné, vysoce propustné

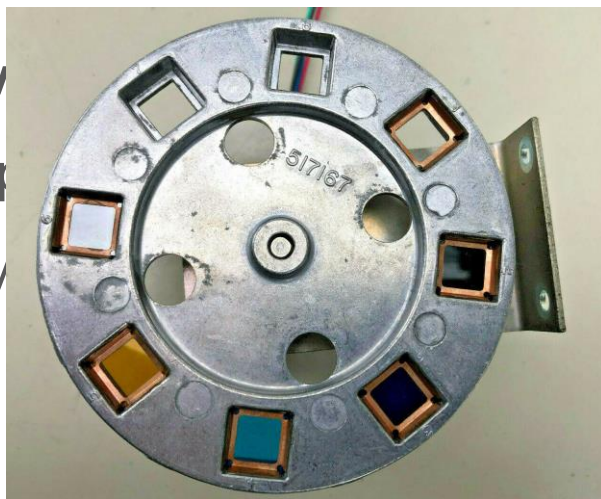
**Nevýhody**

často se s

požadavky

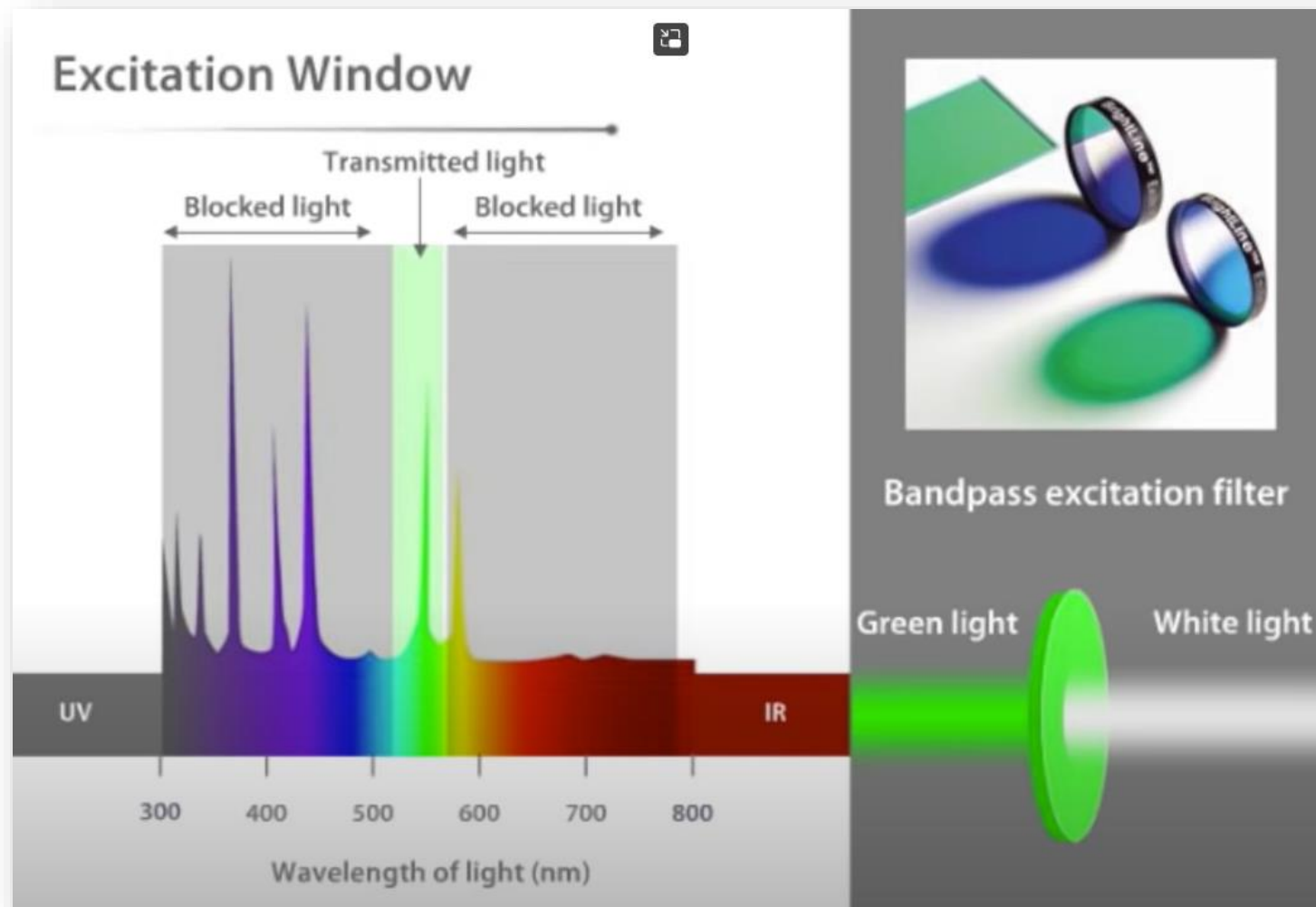
limitované

mají vnitřn



Long-pass	Band-pass	Short-pass
Clean-up	Notch	N.D Snížení intenzity

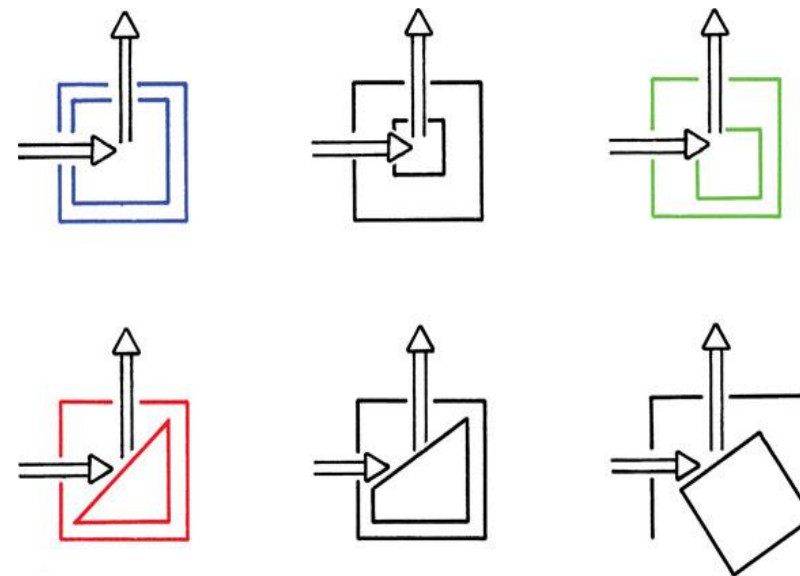
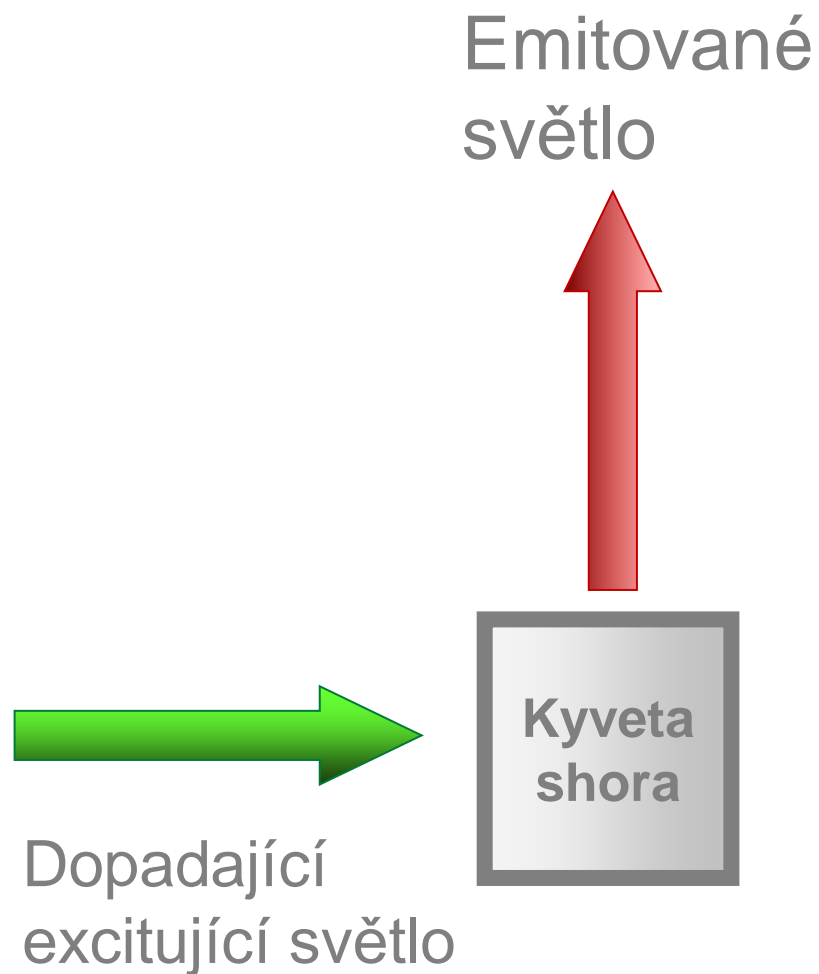
# Zdroje světla a filtry barevně



Tutorial – Overview of Filters and Light Sources

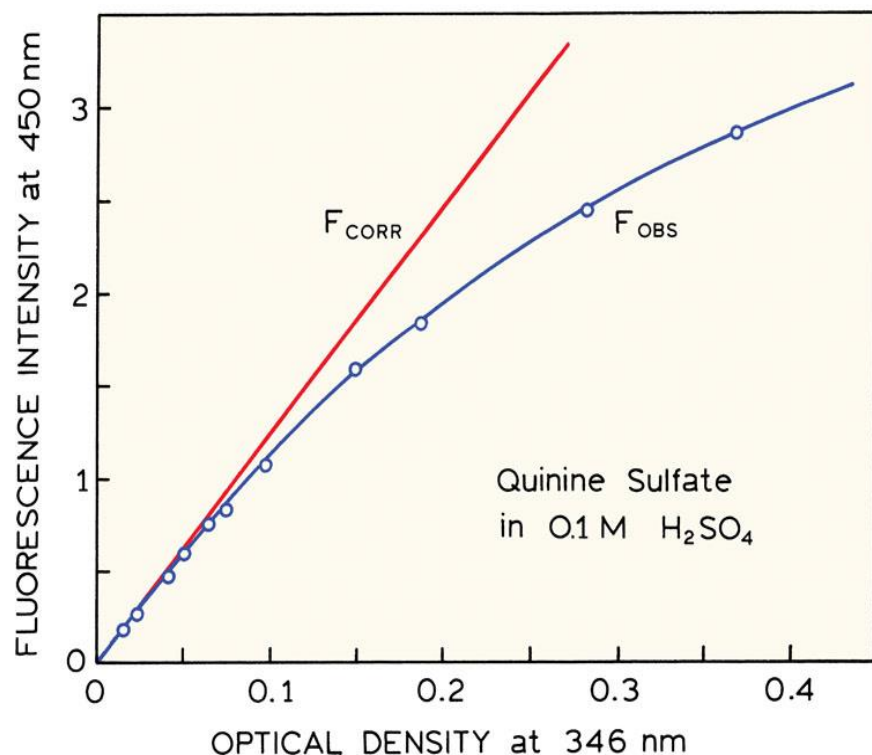
<https://www.youtube.com/watch?v=xJGmARfBasU>

# Geometrie při měření fluorescence



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

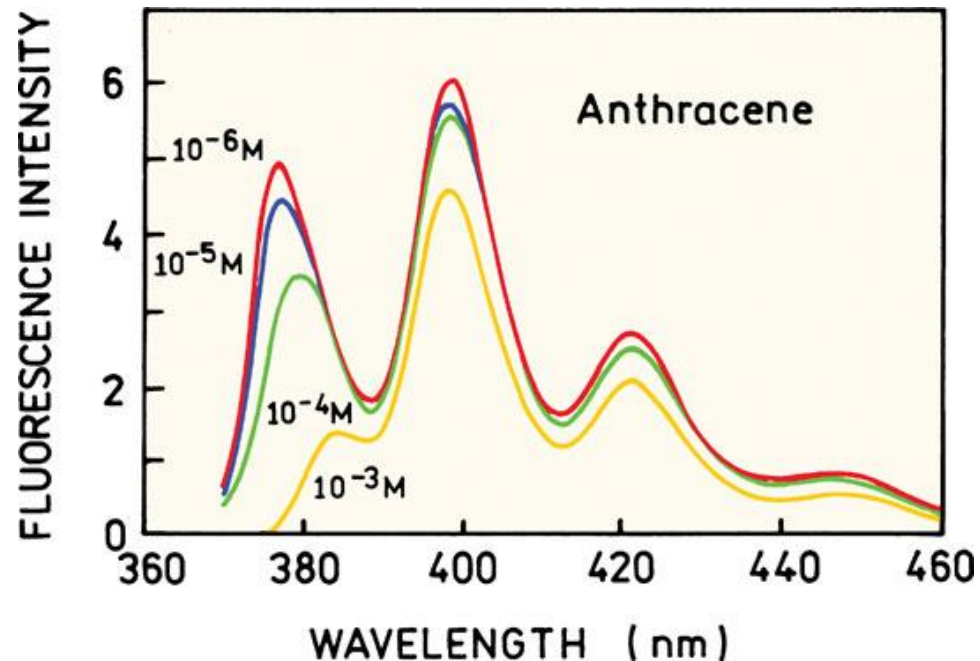
# Efekt vnitřního filtru



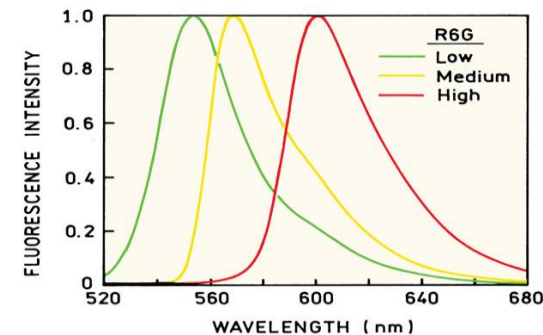
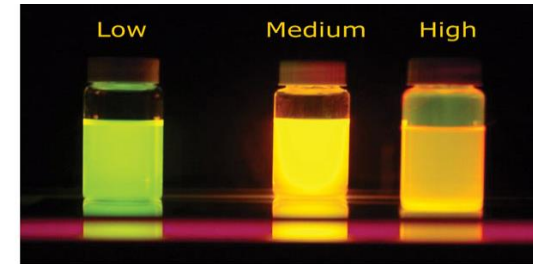
Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer, 2006

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 emisního spektra

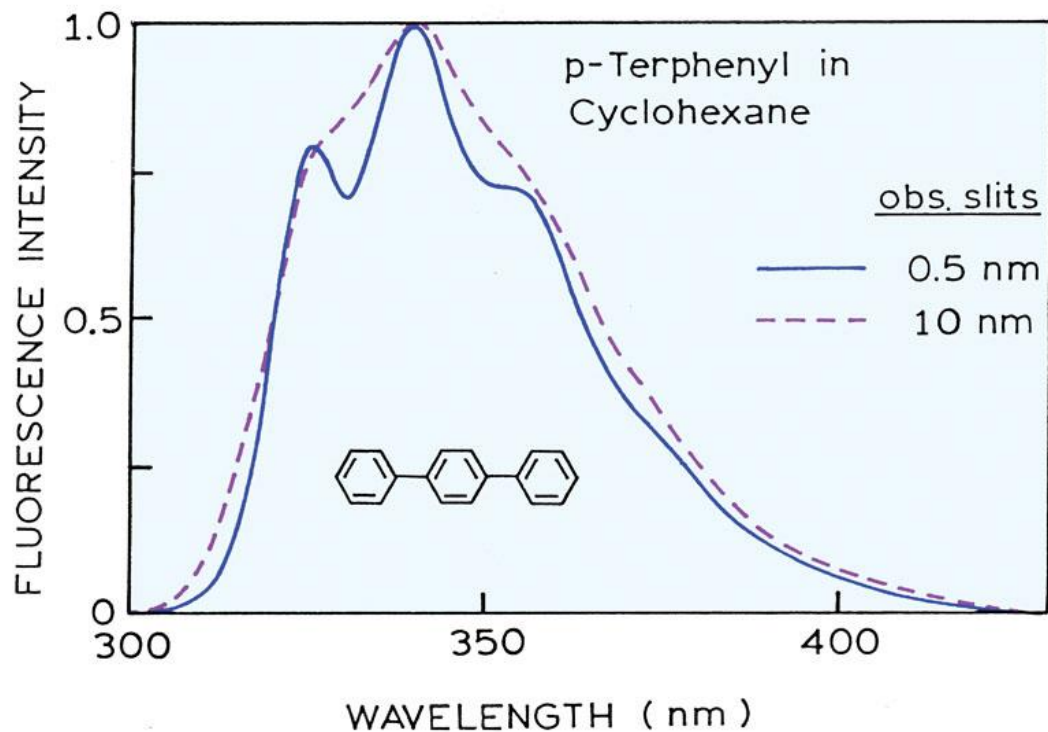


Vysoká koncentrace způsobuje snížení emisního signálu u nižších vlnových délek u antracenu. To je způsobeno zpětnou absorpcí fluorescence antracenu v oblasti, kde se spektrum absorpční a emisní nejvíce překrývají tj. v oblasti 370-400 nm.



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 měření fluorescenčních vzorků

- Koncentrace fluoroforu je příliš vysoká – používejte zředěné roztoky s Abs pod 0.05. Vyhněte se efektu vnitřního filtru.
- Kontaminace rozpouštědla nebo kyvety zbytkovou fluorescencí - 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.

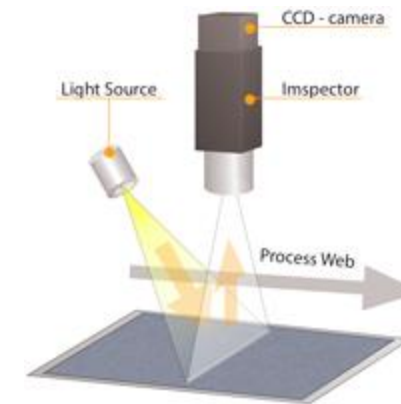
Zdrojem selektivního budícího záření jsou LED diody na bočních stranách.

Emise je sledována (digitálním) fotoaparátem nebo chlazeným CCD detektorem.

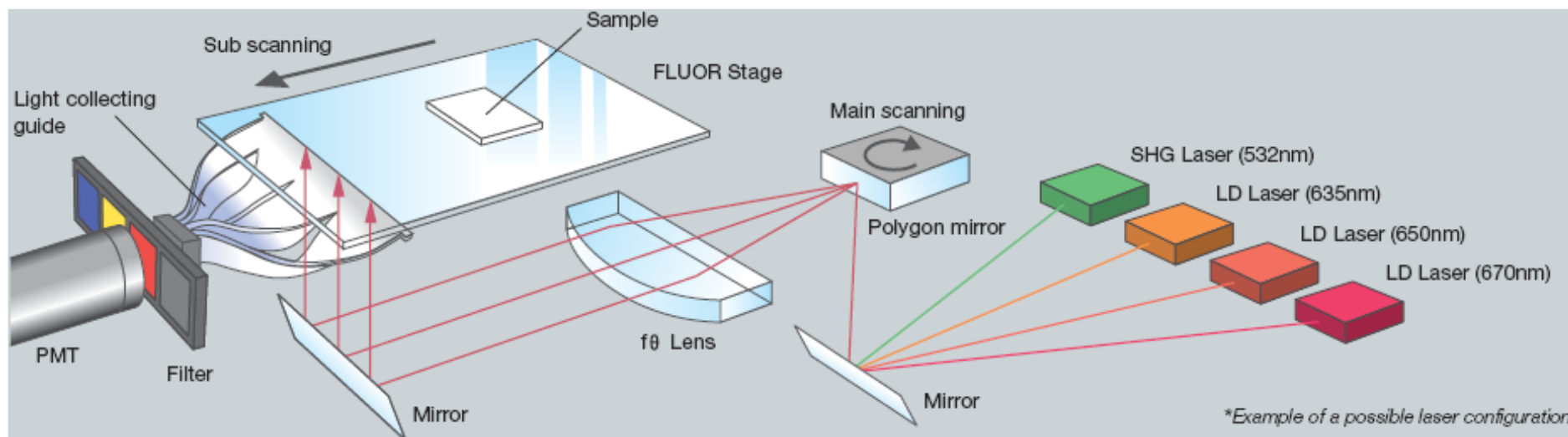
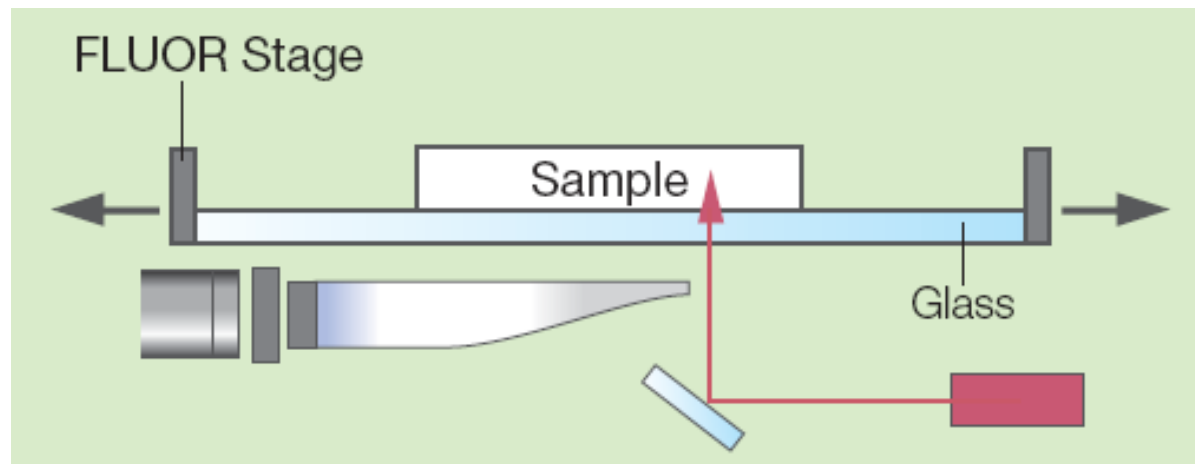
# Fluorescenční scanner

Snímá oblast a sleduje závislost intenzity emise fluorescence při daném excitačním záření.

Používá se k detekci fluorescenčně značených a barvených molekul po elektroforetické separaci



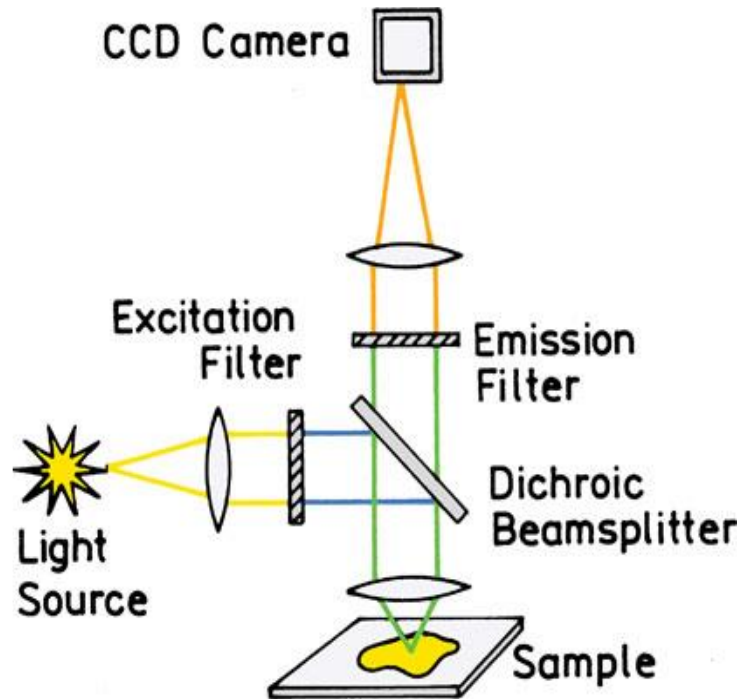
# Fluorescenční scanner - schéma



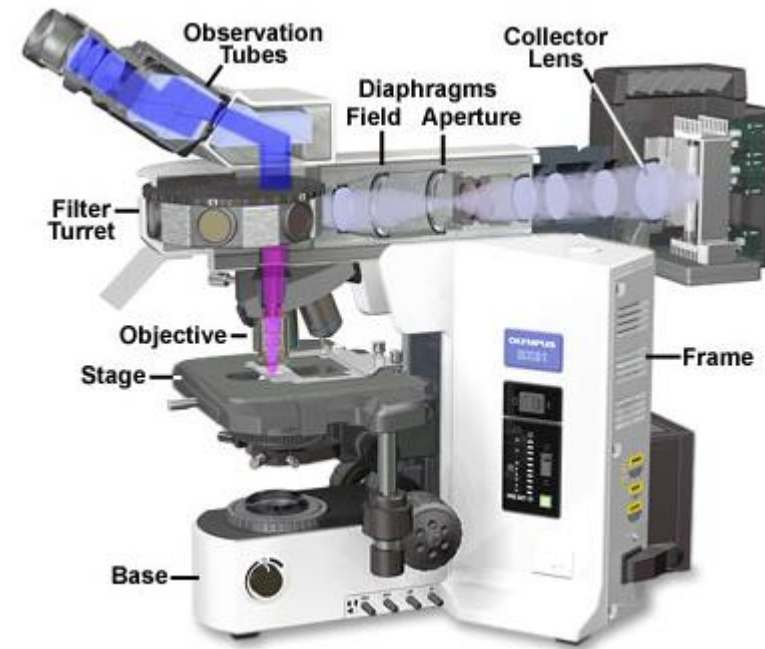
Převzato z produktové dokumentace firmy FujiFilm

# 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

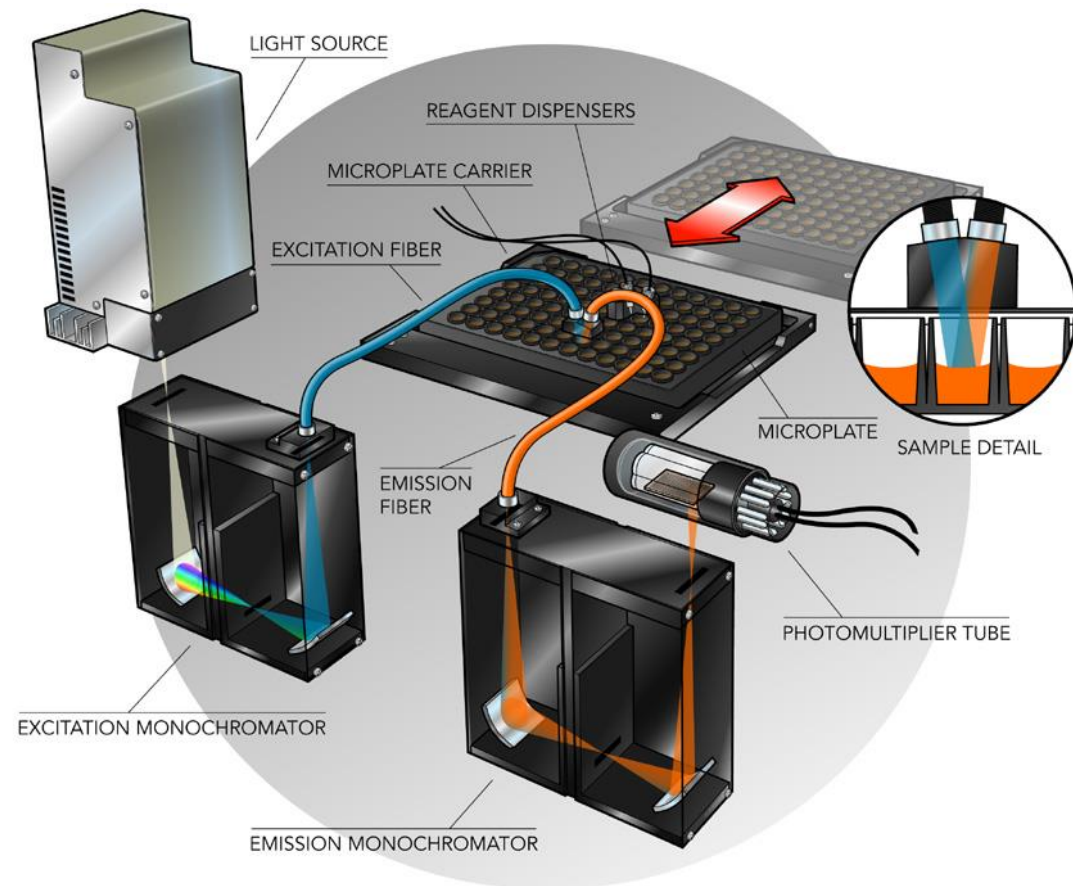


<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/fluorescence/index.html>

# Čtečka mikrodestiček



Převzato z přístrojové dokumentace  
Biotek



# Shrnutí

Co a kdy použít jako zdroj záření?

**Lampa-laser-LED**

Jak vybrat světlo o dané vlnové délce?

**Monochromátor, filtry**

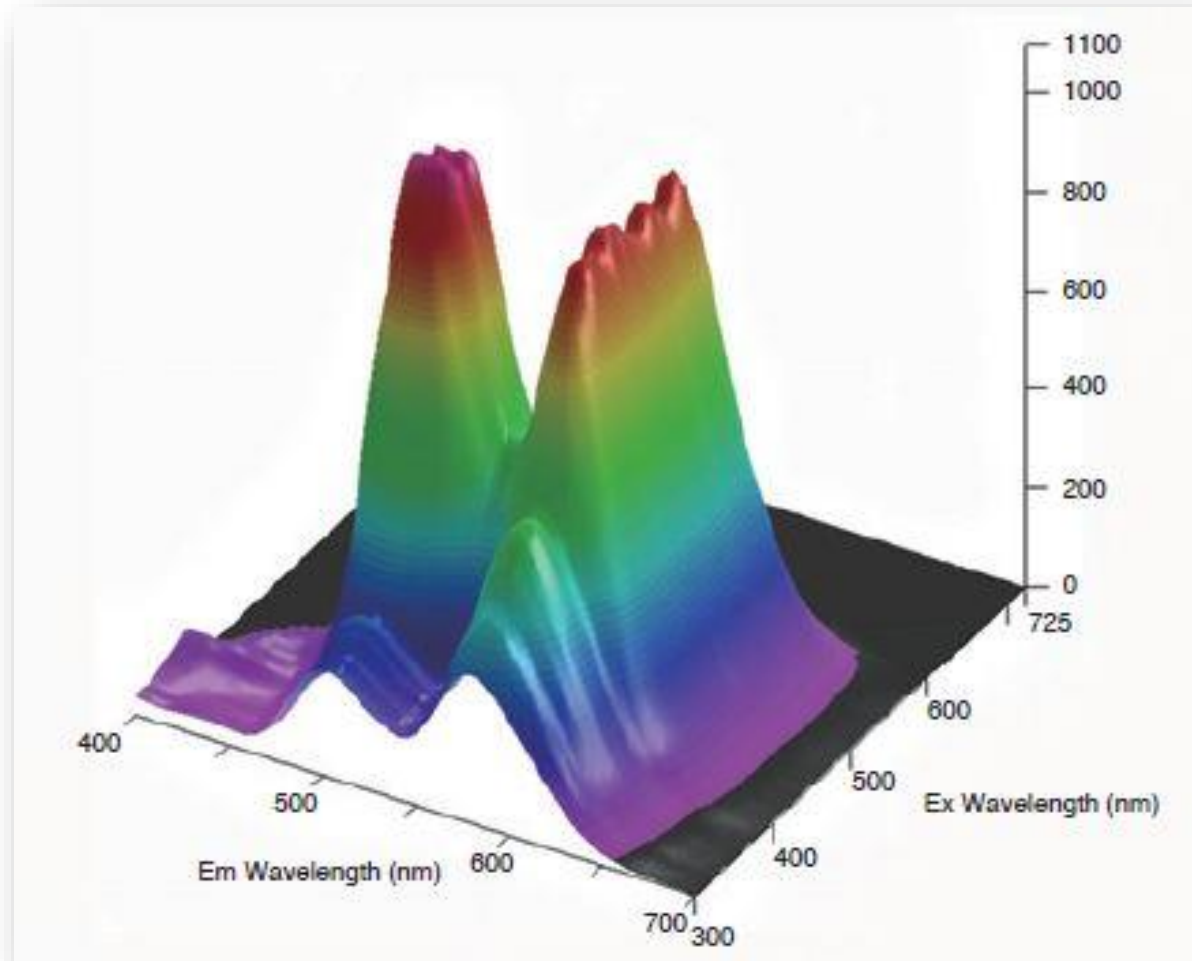
Jak lze detekovat světlo?

**PMT, DA, CCD**

Jaký je základní princip všech přístrojů na měření fluorescence?

**Stejný**

# Příště – Jak se měří ustálená fluorescence





# Úloha 1

## DNA Calculator

You can use DNA Calculator to:

- Calculate basic physical and chemical parameters of a nucleic acid molecule.
- Calculate the mass or volume required to prepare a nucleic acid solution of specified molar concentration. Conversely, you can calculate the molarity of a nucleic acid solution prepared by dissolving a certain amount of it in a specified volume of a solvent.
- Calculate nucleic acid concentration from absorbance and vice versa.
- Calculate base-pair molarity of dsDNA solutions.

### Sequence input and settings

*Open a sequence file (txt, fasta or GenBank format) or paste a sequence in the area below.*

Choose File No file chosen

Clear

Paste a sequence here and click outside this area!

*Set the nucleic acid parameters:*

DNA | RNA

single strand | double strand

linear | circular

5' hydroxyl | 5' phosphate | 5' triphosphate



<http://www.molbiotools.com/dnacalculator.html>