

BAREVNÉ PRINCIPY 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

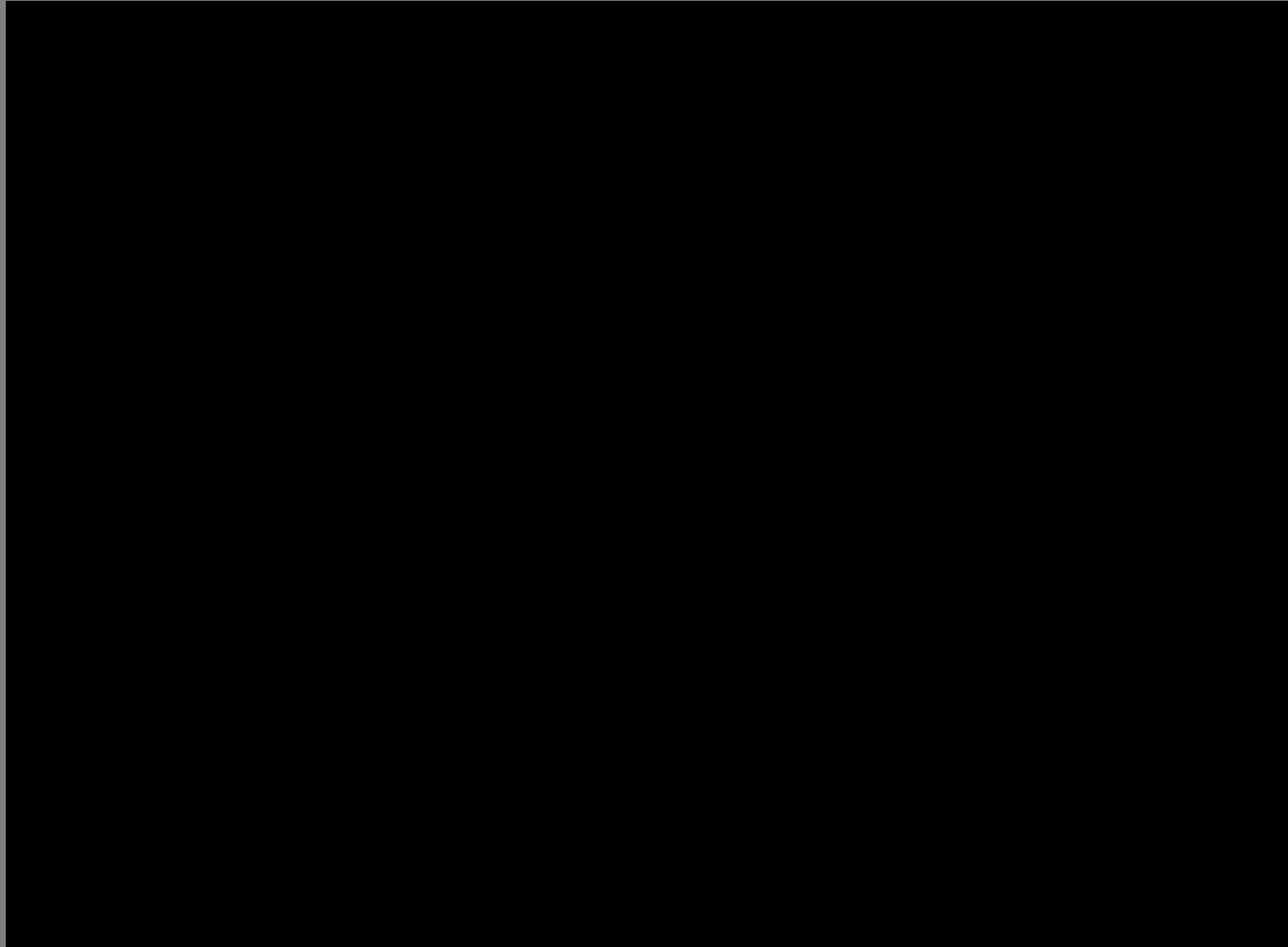
NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI
SCI

Národní centrum
pro výzkum
biomolekul

Co svítí na diskotéce?



Otázky

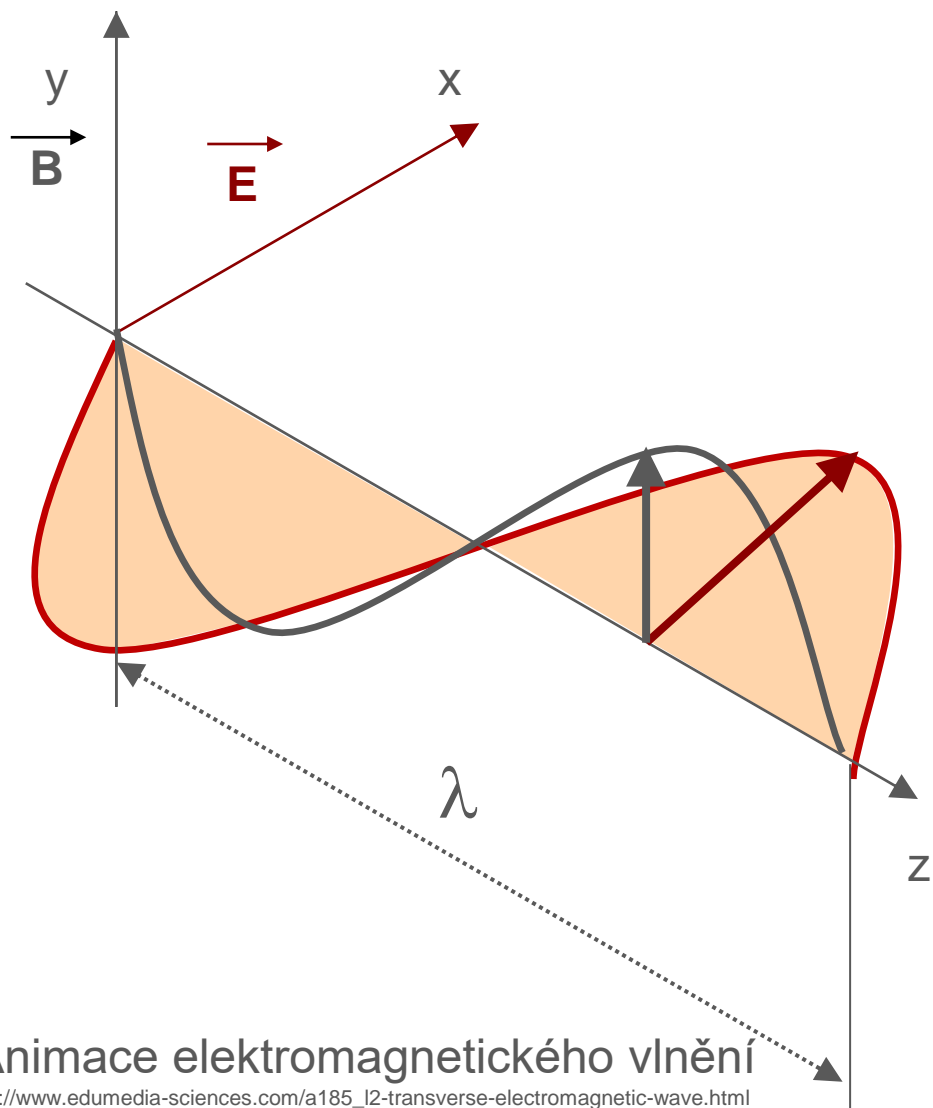
- Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?
- Jak souvisí víno se zásadním objevem v oblasti fluorescence?
- Proč jsou excitační a emisní spektra symetrická?



Světlo je elektromagnetické vlnění

- Skládá se z elektrické složky a magnetické složky, které kmitají ve fázi v na sebe kolmých rovinách.
- Světlo je charakterizováno frekvencí f a vlnovou délkou λ .
- Frekvence f určuje kolikrát za sekundu vlnění kmitne, udává se v $\text{Hz} = \text{s}^{-1}$
- Vlnová délka udává vzdálenost, kterou za jeden kmit světlo urazí, udává se v nanometrech $\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$
- Frekvence f a vlnová délka λ jsou spojeny vztahem $\mathbf{c = \lambda f}$
kde c je rychlost světla -vlnění ($c=299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$ ve vakuu)
- Energie $E = h f$, kde h je Planckova konstanta ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)

Elektromagnetická vlna



$$c = \lambda f$$

c je konstanta, pak jestliže se zvýší vlnová délka, musí se snížit frekvence, aby byl součin konstantní.

Vlnová délka λ je nepřímo úměrná frekvenci f .

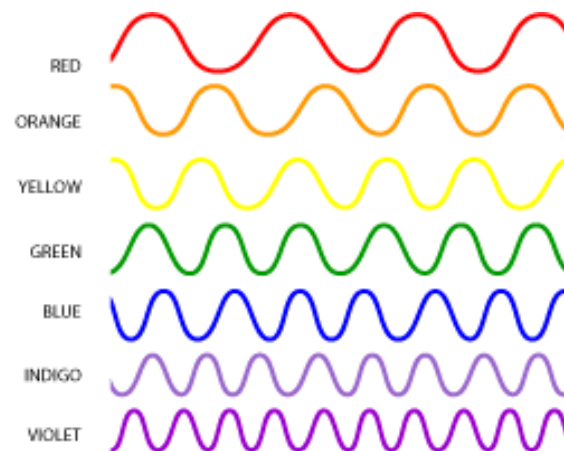
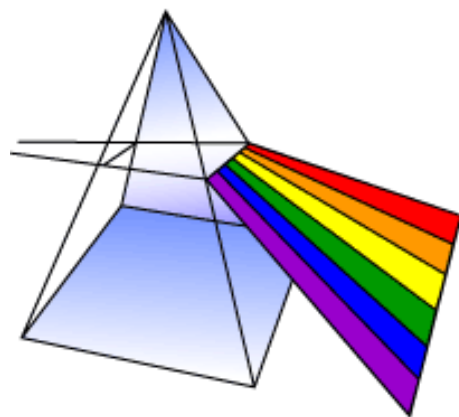
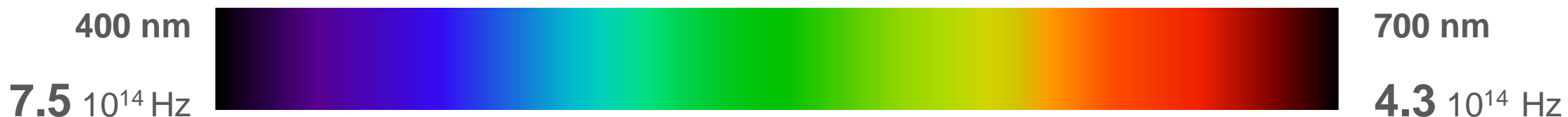
$$E = h f$$

Čím je větší frekvence, tím je větší energie záření.

Čím je větší vlnová délka λ , tím je menší energie záření.

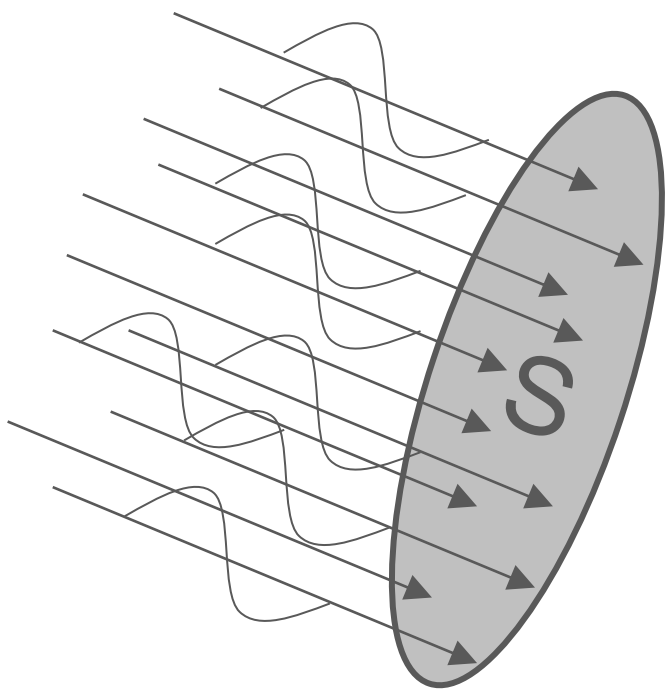
Viditelné spektrum

- Z celého spektra záření je pouze malá část viditelná.
- Viditelné spektrum je ohraničeno vlnovými délkami 400 nm a 700 nm.



Intenzita

- **Intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času



Intenzita je definována jako výkon na jednotku plochy.

$$I = \frac{P}{S}$$

Výkon je definován jako energie za jednotku času.

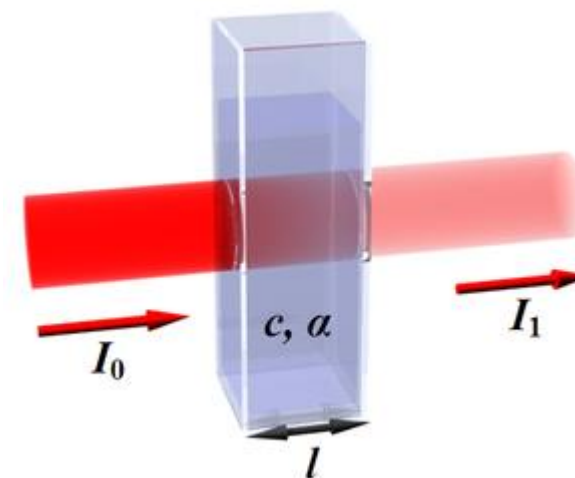
Energie fotonu je $E=hf$, takže celková intenzita pro n fotonů je

$$I = \frac{nhf}{S\Delta t}$$

V tomto modelu se fotony pouze počítají a nevnímají se jako vlny.

Absorpce

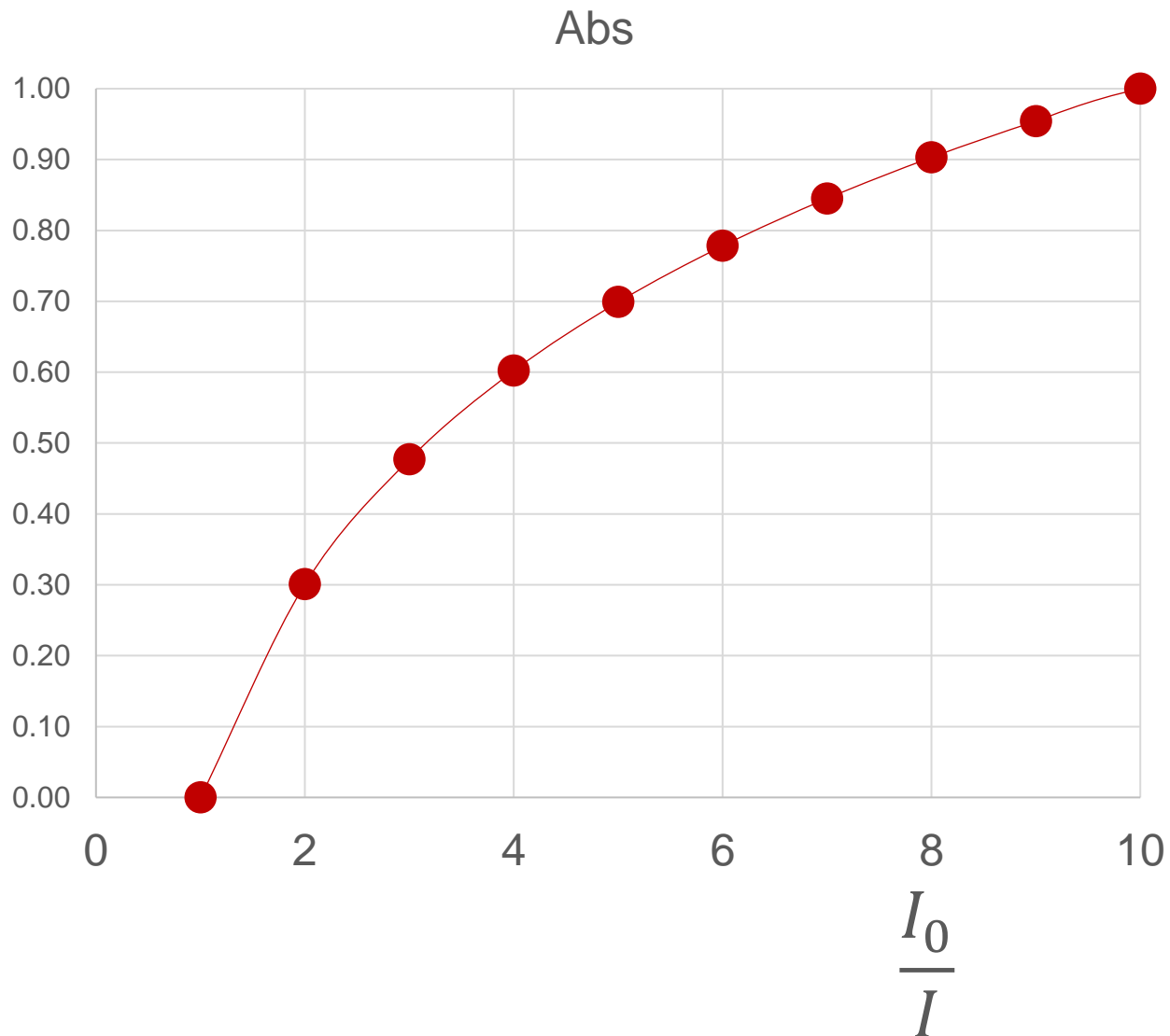
- Látka pohlcuje světlo
- Pro absorpci mono- chromatického světla platí
- **Lambert-Beerův zákon:**



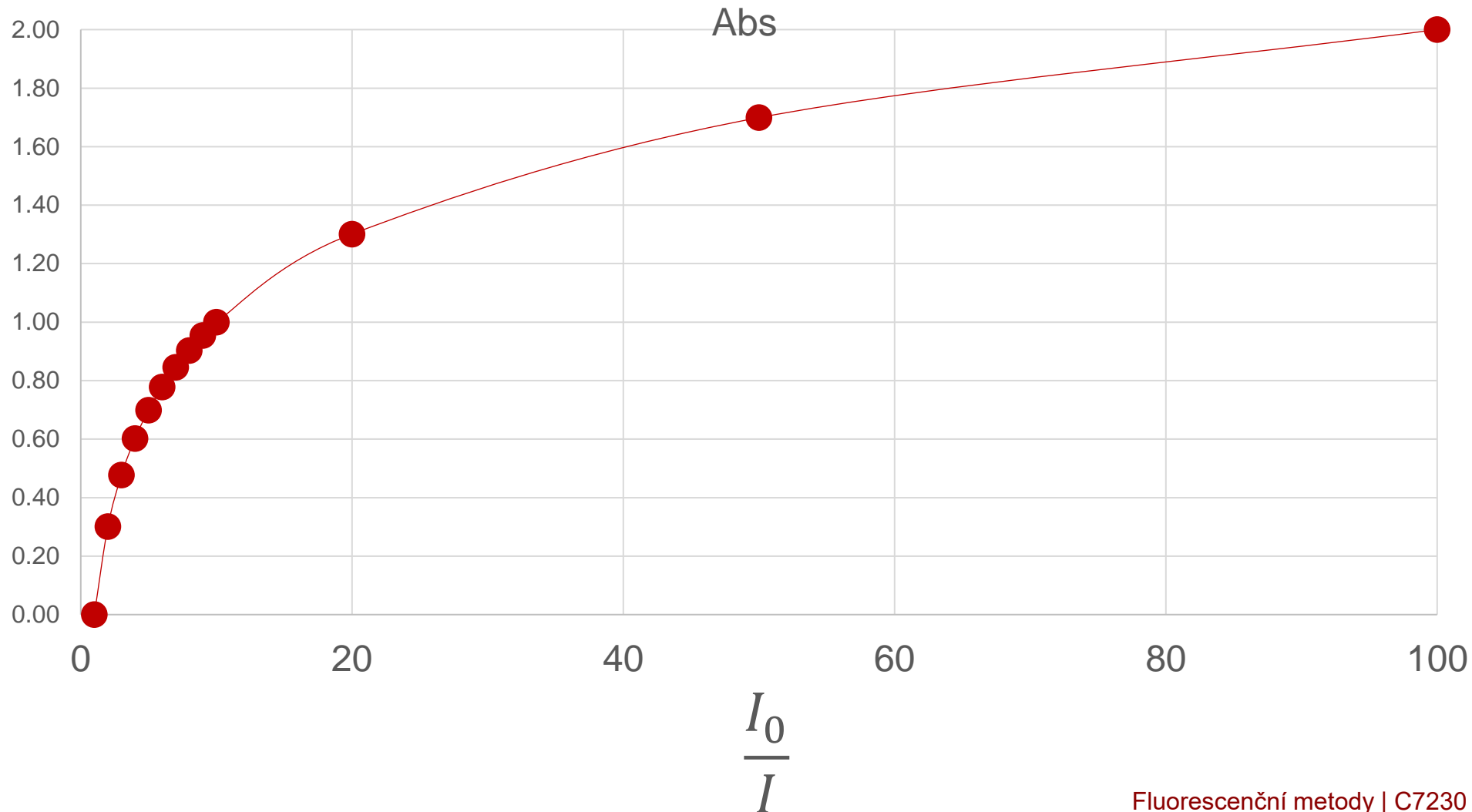
- Absorbance je přímo úměrná koncentraci a tloušťce vrstvy roztoku

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

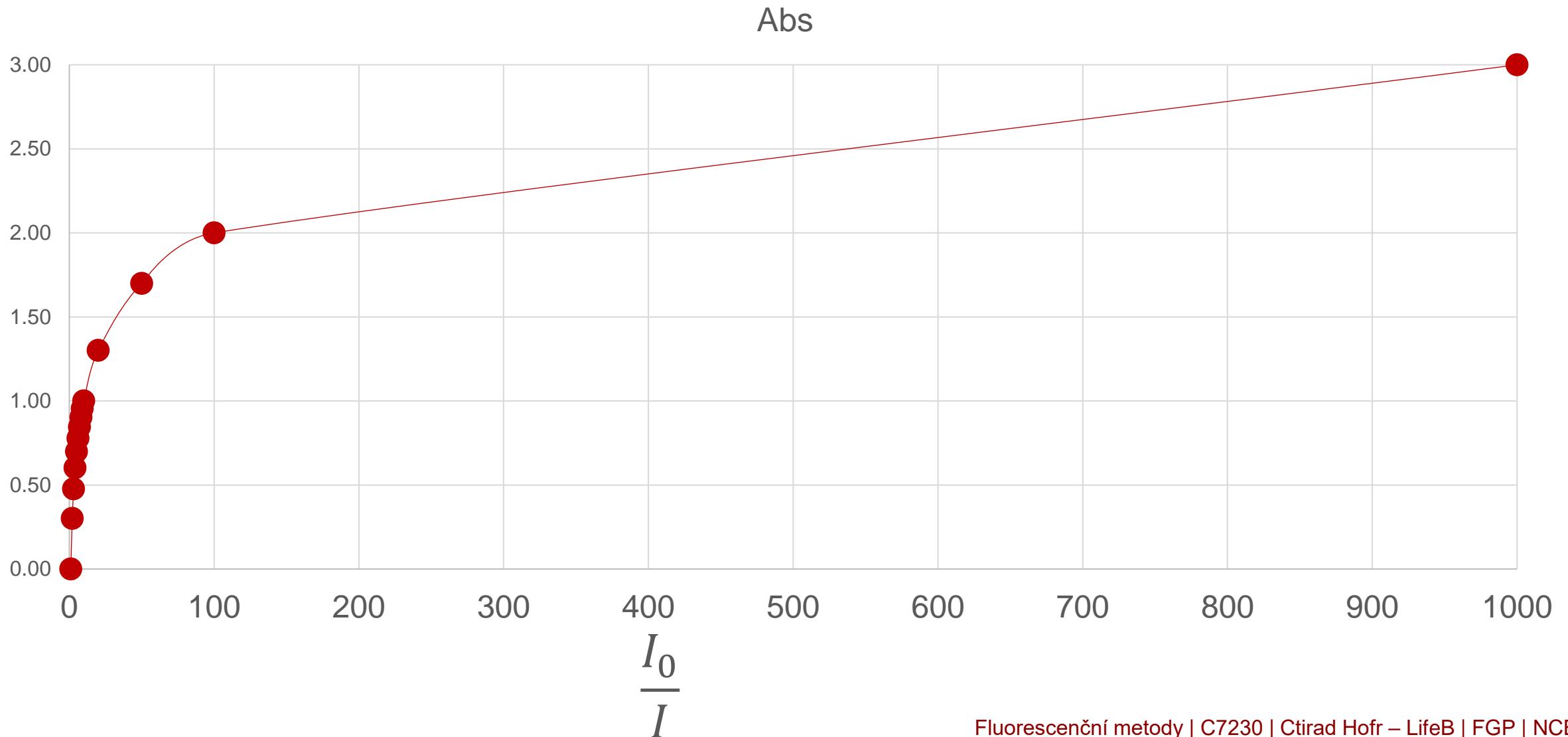
Absorbance 1 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Absorbance 2 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Absorbance 3 a poměr dopadajícího a prošlého světla



Luminiscence

- Emise světla z nějaké látky; nastává z elektronových excitovaných stavů
- Podle původu dělíme luminiscenci na

1. fotoluminiscence

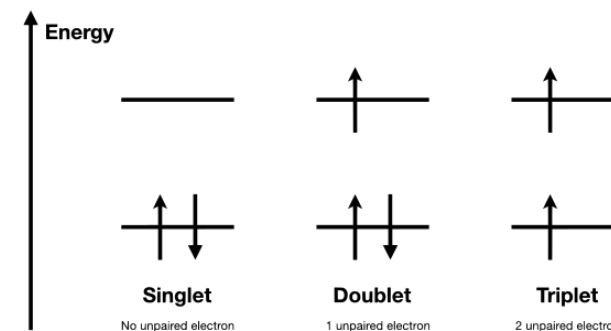
2. chemiluminiscence

1. **fluorescence**

2. **fosforescence**

FLUOrescence

- Emise z excitovaných singletových stavů
- Prakticky: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání τ (Lifetime) je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi – je řádově **1 – 10 nanosekund**
- pozn. : světlo urazí za 1 ns 30 cm

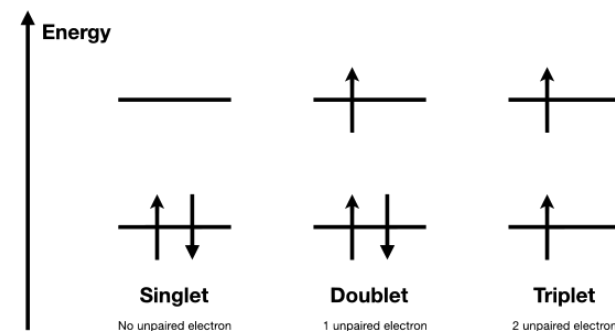


FOSFOrescence

- Emise z excitovaných (zakázaných) tripletových stavů
- Prakticky: **fosforecence** má mnohem delší dobu dohasínání než **fluorescence**

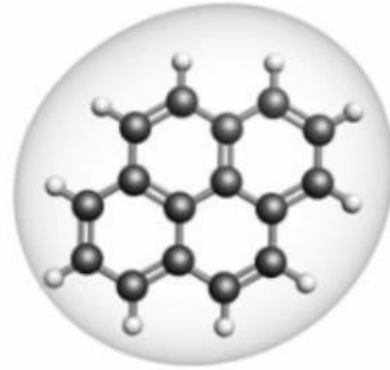
Doba dohasínání řádově
milisekundy až sekundy

pozn. : světlo urazí za tu dobu 300 až 300 000 km



Komentovaný úvod – fluorofor

Definition of Fluorescence



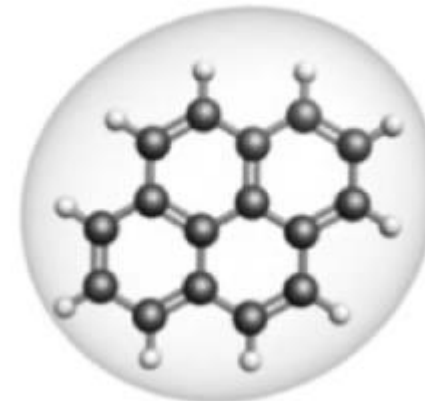
Fluorophore molecule

molecular
probes®

Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?

- molekula je **planární**
- molekula je **aromatická**

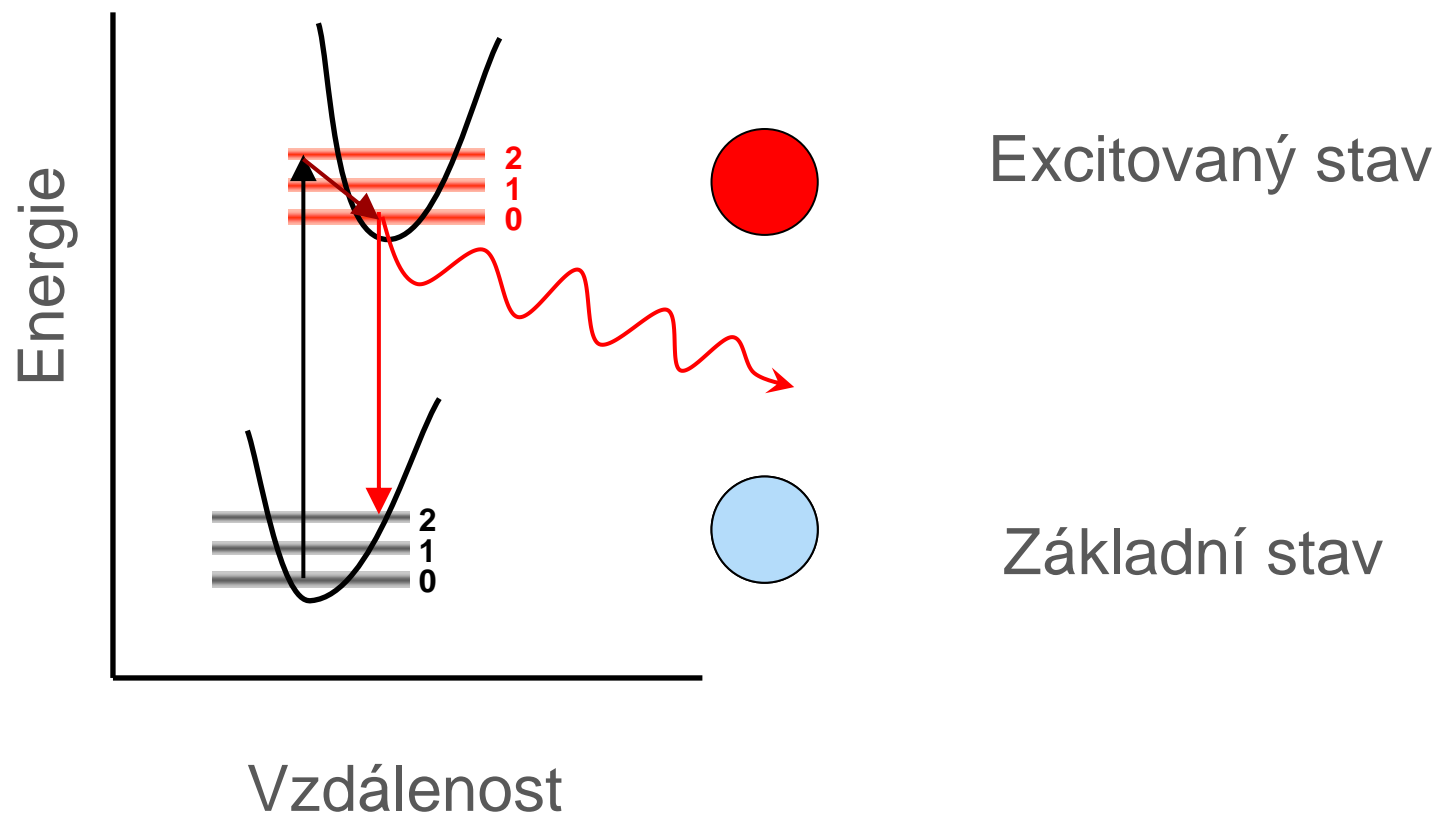
obsahuje systém konjugovaných vazeb



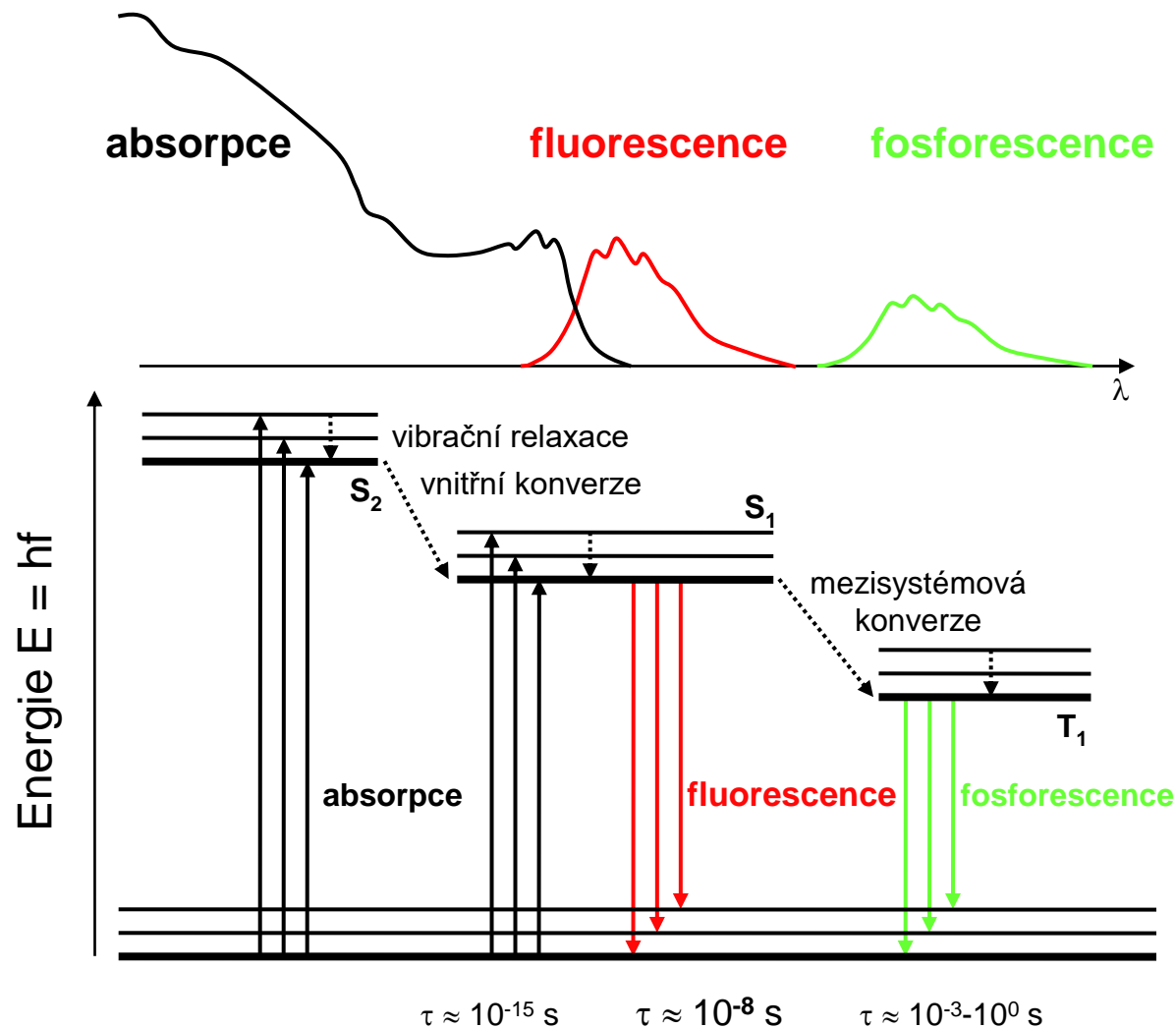
Frank-Condonův princip o nepohyblivosti „lenosti“ jader při absorpci

Absorpce fotonu elektronem – excitace elektronů molekuly je velmi rychlý proces v řádu femtosekund (10^{-15} s). Protože atomové jádro je mnohem těžší než elektron, během absorpce fotonu se nepohybuje. Po absorpci fotonu - excitaci se celá molekula nachází v nestabilním stavu - „je horká“ a vibruje, aby se zbavila energie - „ochladila se“.

Absorpce a emise energie molekulou

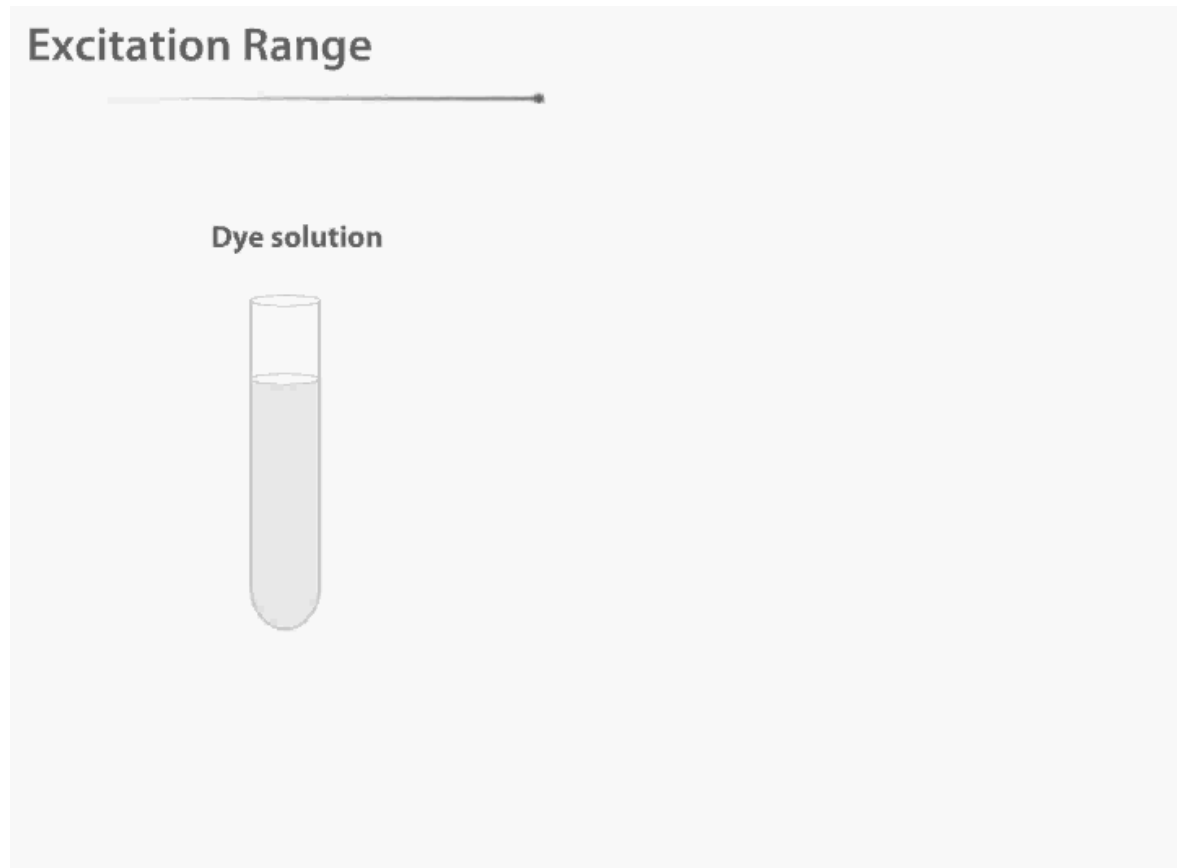


Zářivé a nezářivé přechody mezi elektronovými vibračními stavy molekuly



- Délka svislé šipky udává velikost změny energie při přechodu.
- Vodorovná osa udává dobu přechodu – čím delší čas potřebný na přechod, tím více vpravo. Delší čas = nižší pravděpodobnost přechodu.

Vznik absorpčního ~ excitačního spektra

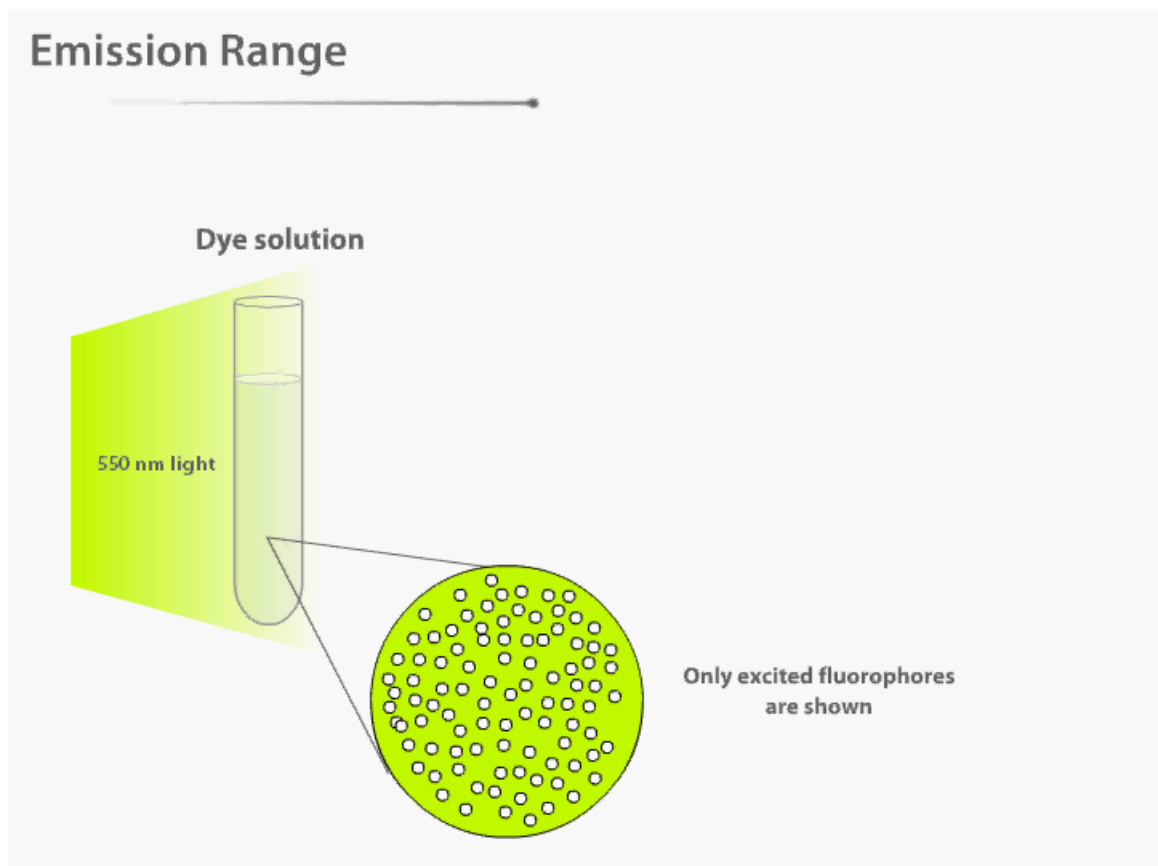


Výukový materiál společnosti Invitrogen

Excitační ~ absorpční spektrum udává pravděpodobnost, že při dané vlnové délce dojde k excitaci fluoroforu = jeho elektronů **dopadajícím světlem.**

Spektrum = pravděpodobnost přechodu

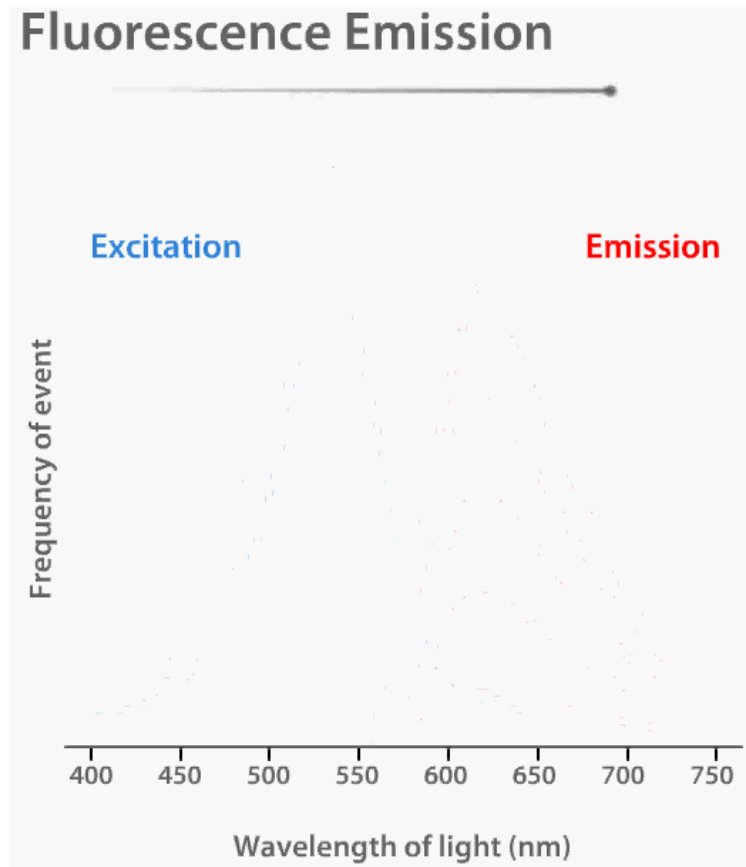
Vznik emisního spektra



Výukový materiál společnosti Invitrogen

- Emisní spektrum určuje pravděpodobnost, že dojde k emisi fluorescence o dané vlnové délce = barvě. Emisní spektrum závisí na fluoroforu a je typickou charakteristikou fluoroforu.

Nezávislost tvaru emisního spektra na excitačním světle



- Tvar emisního spektra se nemění, když se mění vlnová délka excitačního světla.
- Mění se pouze intenzita.



Stokesův posun

- Emitované světlo má vždy menší energii – větší vlnovou délku λ než je energie absorbovaného světla – menší λ .
- Rozdíl mezi maximem absorpčního a maximem fluorescenčního emisního spektra je specifická charakteristika daného fluoroforu.
- Stokesův posun = $\lambda_{em} - \lambda_{ex}$

Vznik Stokesova posunu



Tepelná nebo disipační energie na molekulární úrovni označuje tepelnou energii obsaženou ve vibracích atomů a molekul. Teplo je celkovou vibrační energií všech atomů a molekul tvořících látku. Když molekuly získají více tepla, dodává jim více energie, což způsobuje jejich rychlejší vibrace a zvětšuje mezimolekulární prostor mezi nimi.

[Moving Molecules - The Kinetic Molecular Theory of Heat | Cool Cosmos \(caltech.edu\)](#)

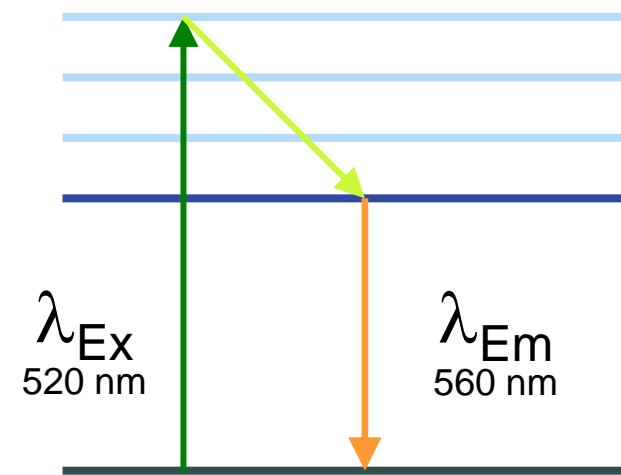
Stokesův zákon

Vlnová délka emitovaného světla je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla

$$\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$$

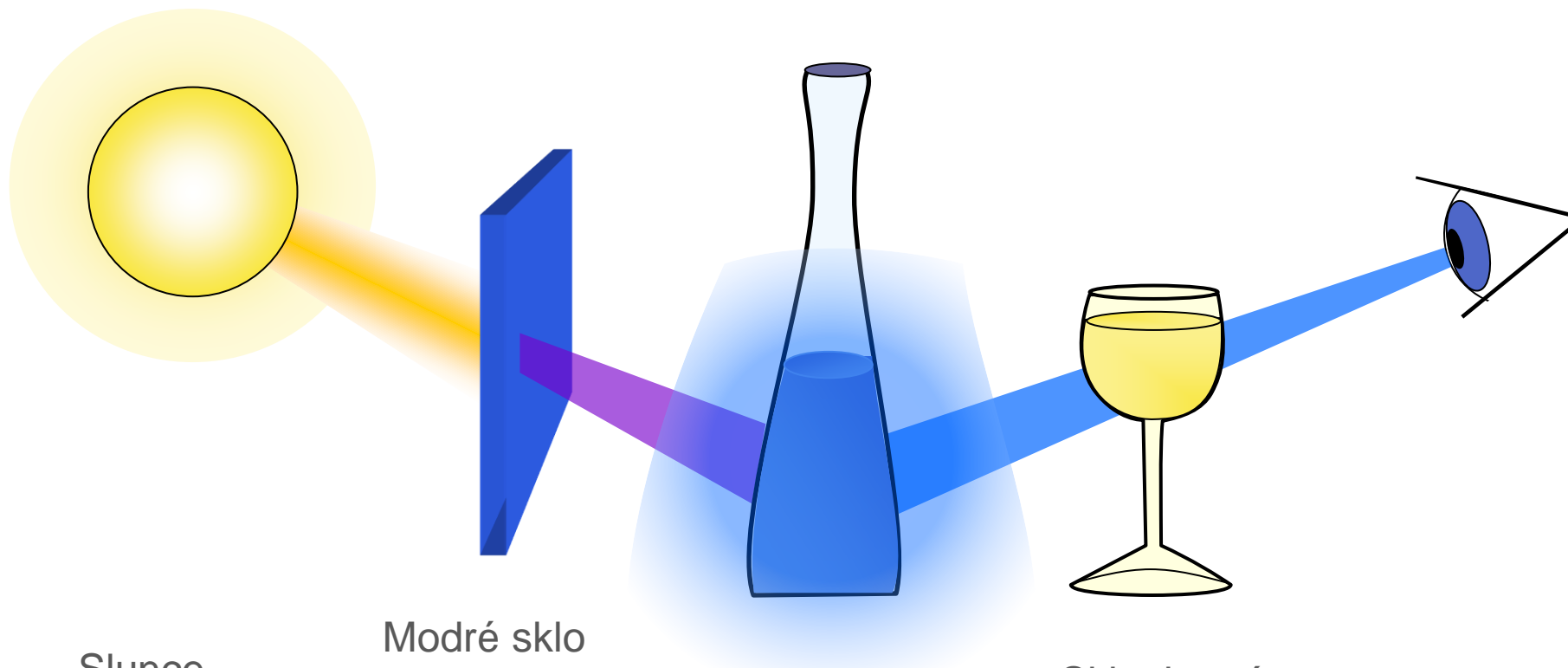
Změna vlnové délka je způsobena tím, že po absorpci záření často dochází k částečné ztrátě energie molekulu – tepla při přechodu z vyšších excitovaných elektronových stavů do metastabilního nejnižšího excitovaného stavu.

Důsledek – Energie fluorescenčního – emitovaného světla je nižší, než energie absorbovaná excitačním zářením.



Experiment Sira G. G. Stokese

1852, Cambridge



Slunce

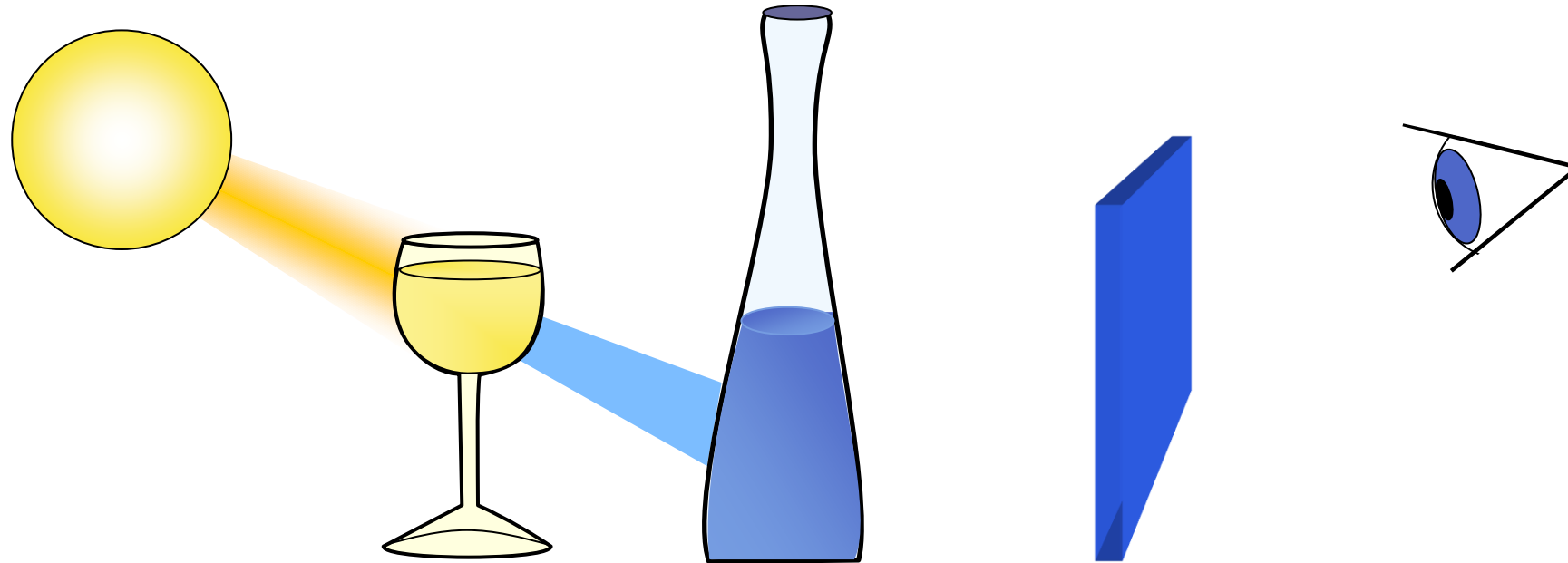
Modré sklo
okna v kostele
Propouští světlo s
 $\lambda < 400 \text{ nm}$
Excitační filtr

Roztok
chininu

Sklenice vína
Propouští světlo s
 $\lambda > 400 \text{ nm}$
Emisní filtr

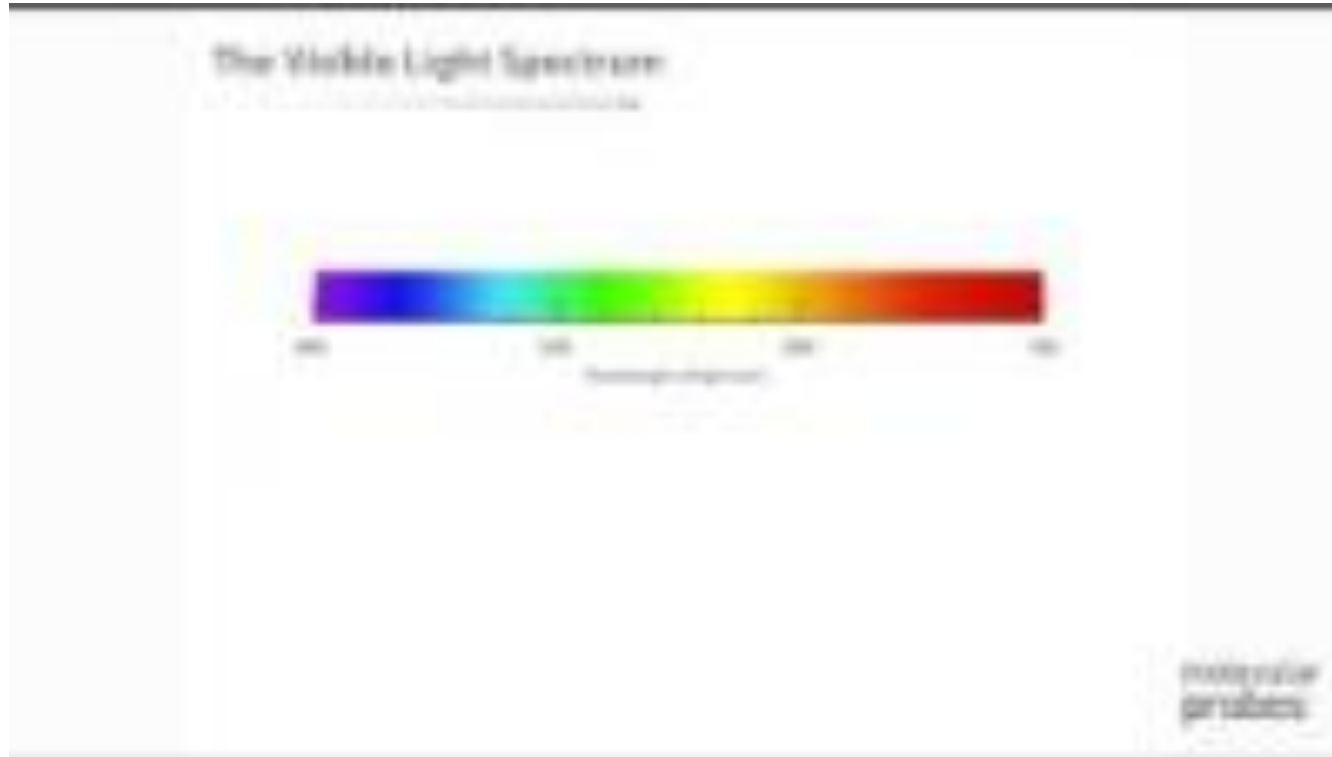
G.G. Stokes

Co se stane, když zaměníme filtry?



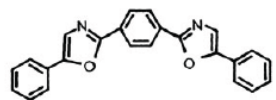
Při záměně filtrů , tj. jestliže dáme sklenici vína do dráhy slunečních paprsků, procházející světlo nemá dost krátkou vlnovou délku tj. dostatečnou energii a již nemůže roztok chininu excitovat.

Animovaný úvod do principů fluorescence

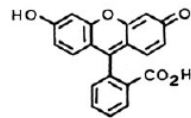


- <https://www.youtube.com/watch?v=SGFlr1jFNBM>

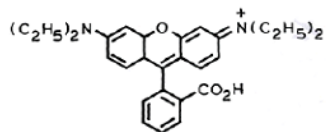
Příklady fluoroforů



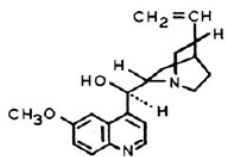
POPOP



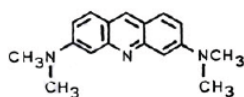
Fluorescein



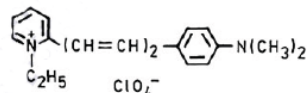
Rhodamine B



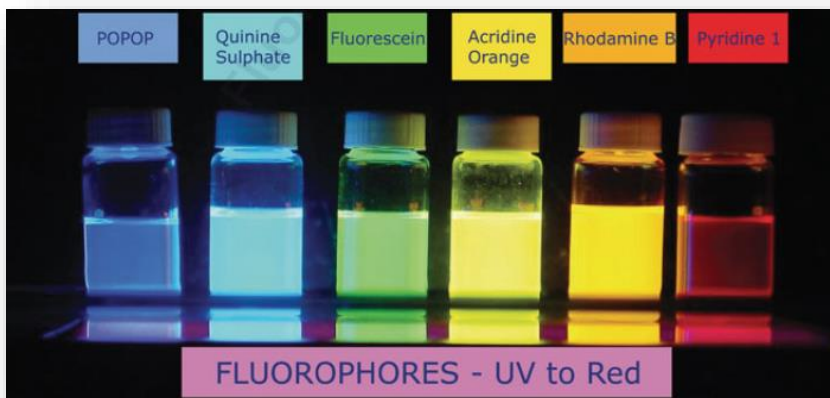
Quinine



Acridine Orange



Pyridine 1



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

- **Fluorofory** nebo **fluorescenční barviva** jsou molekuly, které fluoreskují. Fluorescenci vykazují zejména aromatické sloučeniny – polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly).
- chinin, fluorescein, rhodamin B – nemrznoucí směsi pro chlazení motoru, fluorescenční značení brzdové kapaliny
- POPOP – scintilátory
- Acridinová oranž, ethidium bromid – DNA
- Umbeliferon – ELISA
- Antracén, perylén – znečištění životního prostředí oleji

Využití fluorescence v geografii



Fluorescein byl použit k důkazu, že řeky Rýn a Dunaj jsou propojeny podzemními proudy.

Kvantový výtěžek

Kvantový výtěžek Q je poměr počtu emitovaných a absorbovaných fotonů.

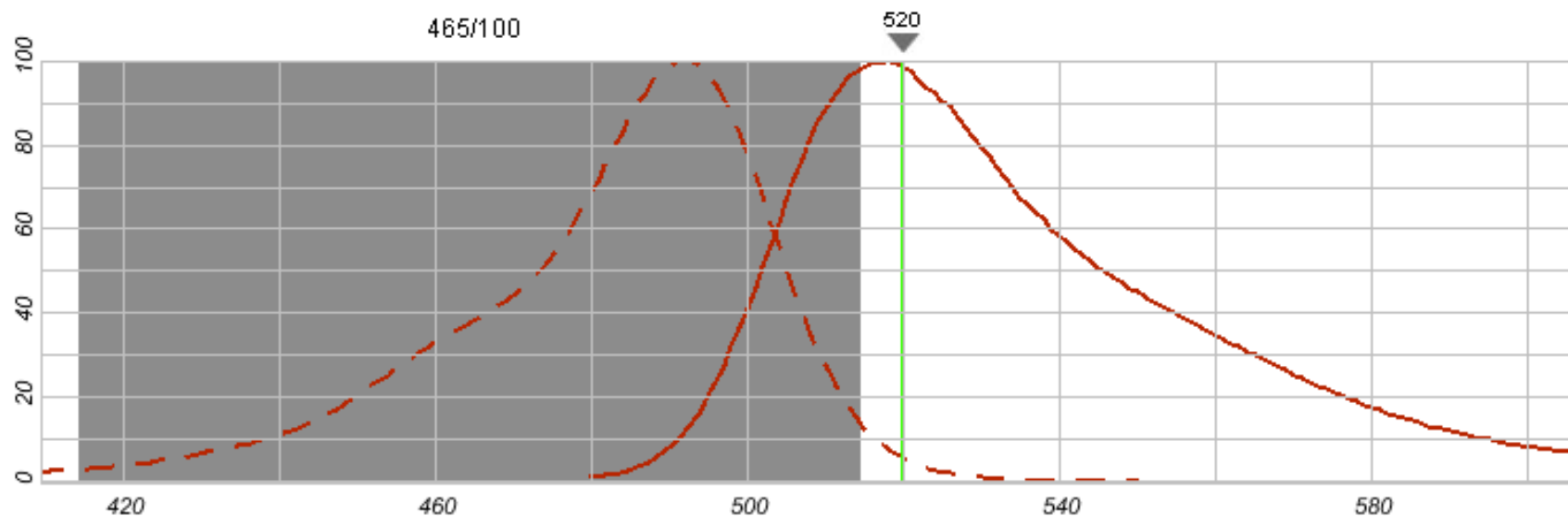
- Udává účinnost s jakou budící fotony vyvolávají fluorescenci.
- Kvantový výtěžek může být maximálně 1.
- Ve skutečnosti je nižší díky nezářivým přechodům molekul z excitovaného stavu do základního stavu.

- Největší kvantové výtěžky mají rhodaminové flourofory (~ 1) a fluorescein (0.95)
http://www.iss.com/resources/reference/data_tables/FL_QuantumYieldStandards.html
- Charakteristické je snižování kvantového výtěžku s teplotou – teplotní zhášení fluorescence.

Excitační spektrum

Závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce při neměnné - konstantní vlnové délce emitovaného záření.

λ_{Ex} scan $\lambda_{Em} = \text{konst.}$



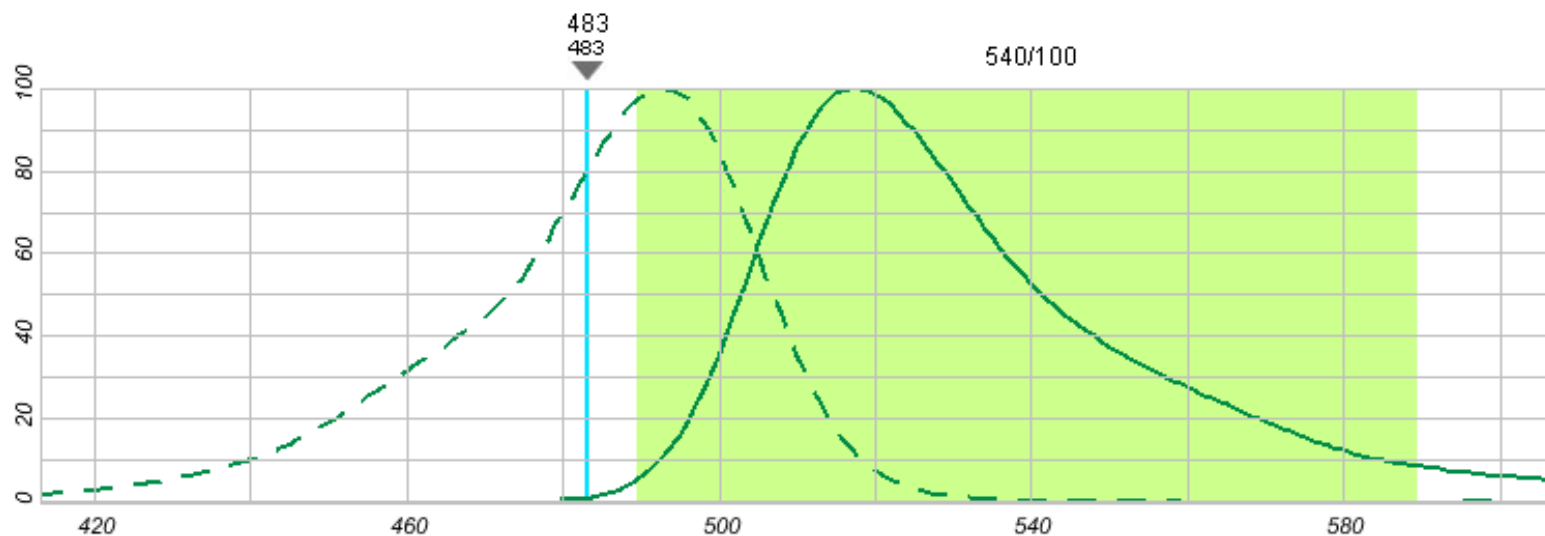
Nepřekrývá se rozsah s konstantní λ .

Emisní spektrum

Intenzita fluorescence při různých vlnových délkách emitovaného záření při neměnné - konstantní vlnové délce excitujícího světla.

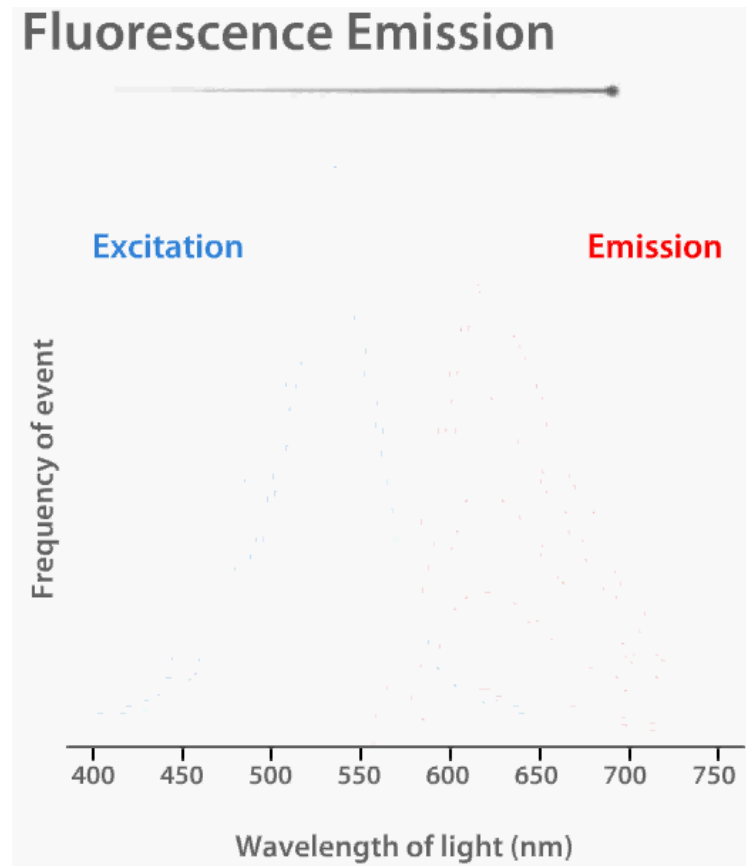
λ_{Ex} konst

$\lambda_{Em} = \text{scan}$



Nepřekrývá se rozsah s konstantní λ .

Neměnnost tvaru emisního spektra při různém excitačním světle



Výukový materiál společnosti **Invitrogen**

Tvar emisního spektra je nezávislý na vlnové délce excitace.

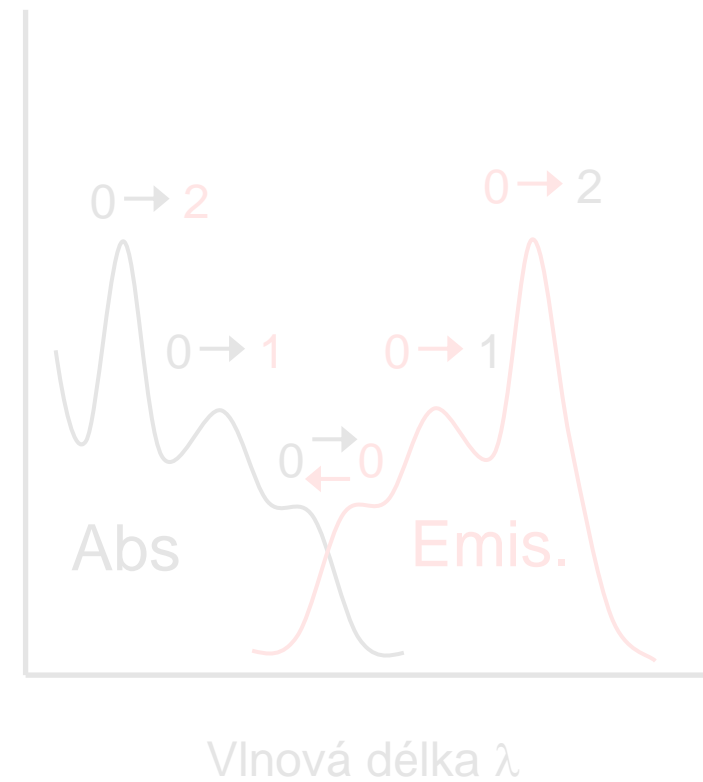
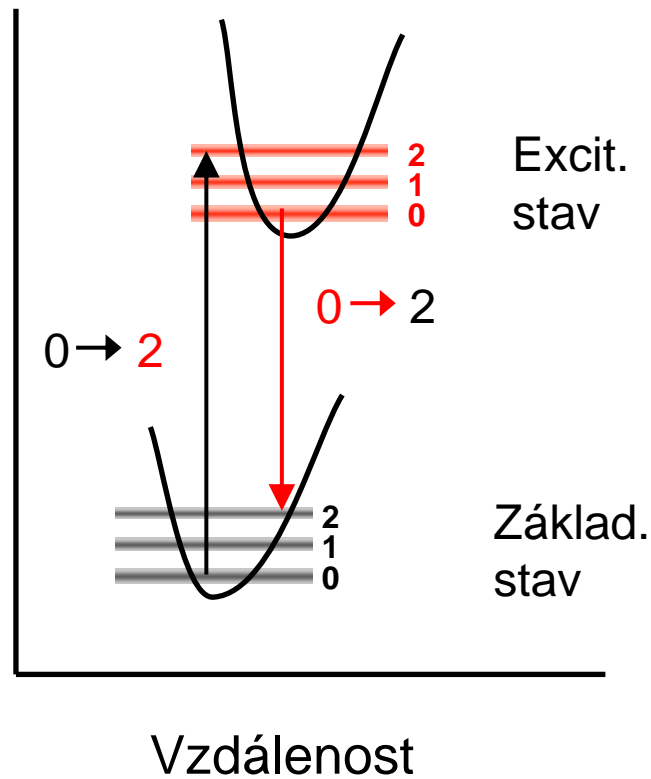
Neměnnost tvaru fluorescenčního spektra je důsledkem toho, že doba trvání excitovaného stavu a kvantový výtěžek složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

Zákon zrcadlové symetrie mezi excitačním a emisním spektrem

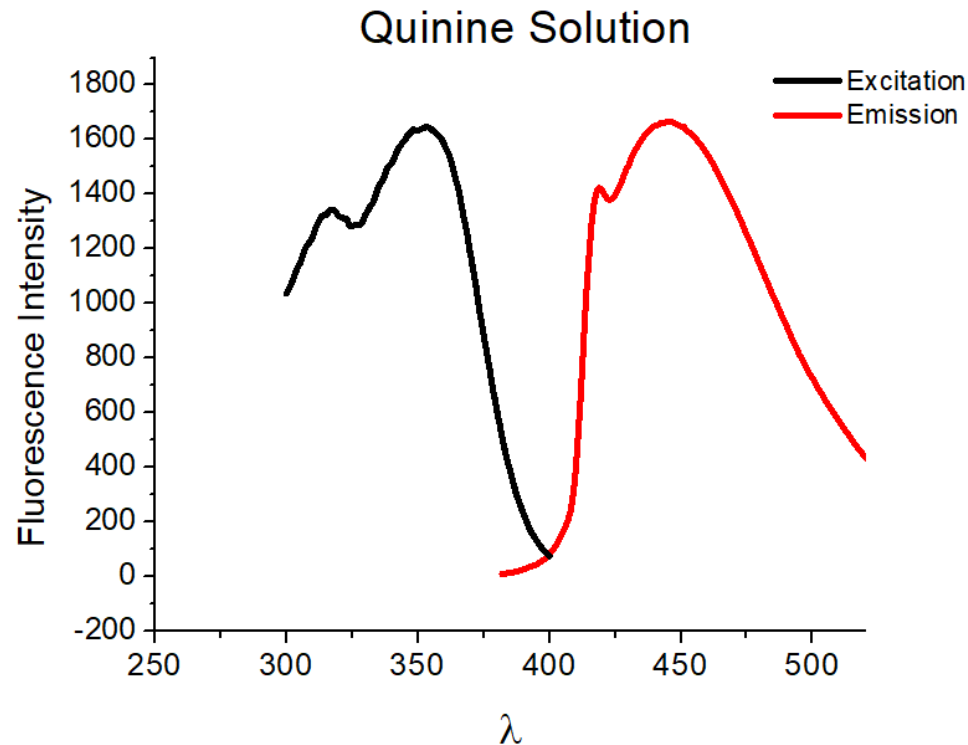
Struktura vibračních hladin u základního a excitovaného stavu elektronu je stejná, proto absorpce a emise z odpovídajících si vibračních hladin může nastat se stejnou pravděpodobností. To má za následek zrcadlovou symetrii absorpčního spektra a emisního fluorescenčního spektra.

Praktické využití: Při velmi malé koncentraci vzorku můžeme z fluorescenčního emisního spektra zjistit jak asi vypadá absorpční spektrum, aniž by se použilo o několik řádů větší množství vzorku.

Zrcadlová symetrie excitačního a emisního spektra



Excitační a fluorescenční emisní spektrum reálného roztoku



Při měření reálných vzorků se zrcadlová symetrie narušuje vlivem ionizace fluoroforu při různém pH, komplexace fluoroforu s dalšími molekulami v roztoku, nebo jednoduchým příspěvkem dalších nefluorescenčních molekul k absorpčnímu ~ excitačnímu spektru.

Odpovědi

- Jak poznáme ze struktury, že molekula může být fluorescenční?
planární, aromatická
- Jak souvisí víno se zásadním objevem v oblasti fluorescence?
víno je emisní filtr
- Proč jsou excitační a emisní spektra symetrická? Jaké je rozdělení energetických hladin po excitaci.
stejně

Příště – jak se měří fluorescence?

- Co je potřeba, abychom mohli změřit spektrum fluoroforu?
- Jak můžeme detekovat fluorescenční molekuly v gelu?

