

USTÁLENÁ – STEADY STATE 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

Podvodní DISCO



<https://youtu.be/78de8loRY0M>

Videoukázku doporučila **Marie Landová**

Ustálená fluorescence

1. Definice
2. Citlivost fluorescence na okolí
3. Vlivy na fluorescenční emisní spektrum
4. Zhášení fluorescence

Ustálená a časově rozlišená fluorescence

Ustálená fluorescence – *Steady State* se měří při buzení kontinuálním zářením a dostáváme potom **časově průměrovanou střední hodnotu intenzity** nebo polarizace fluorescence.

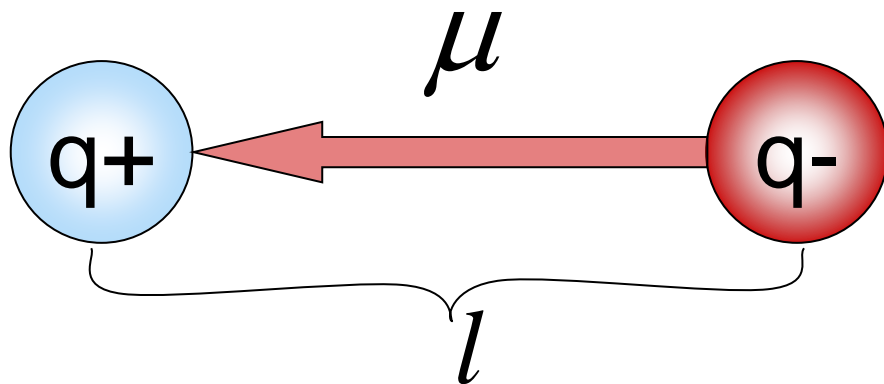
Časově rozlišená fluorescence – *Time-resolved* se měří pomocí pulzní excitace, délka pulzu je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku, nebo fázově modulovaného budícího záření a umožňuje analyzovat časové závislosti měřených parametrů, především anizotropie fluorescence.

Vliv prostředí na absorpční a emisní spektra

V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Protože molekuly mají v základním a v excitovaném stavu obecně různé **dipólové momenty** i **polarizovatelnosti**, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé **solvatace** molekul. Doba potřebná pro **molekulární relaxace** (10^{-10} s) je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu – **absorpce** (10^{-15} s) , ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu (10^{-8} s) . K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu.

Z. Fišar: <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>

Elektrický dipól



Je tvořen dvojicí nábojů o opačné polaritě ve vzdálenosti l .

Dipólový moment $\mu = q \cdot l$

vektor směřující od záporného náboje ke kladnému náboji.

Jednotkou je Debye; $1\text{D} = 3.3 \times 10^{-30} \text{ C.m}$

Molekulové dipóly

Molekula je dipólem, když se rozložení kladného a záporného náboje nepřekrývá. V případě, kdy není molekula středově symetrická je rozložení náboje nepravidelné a molekula je dipólem.

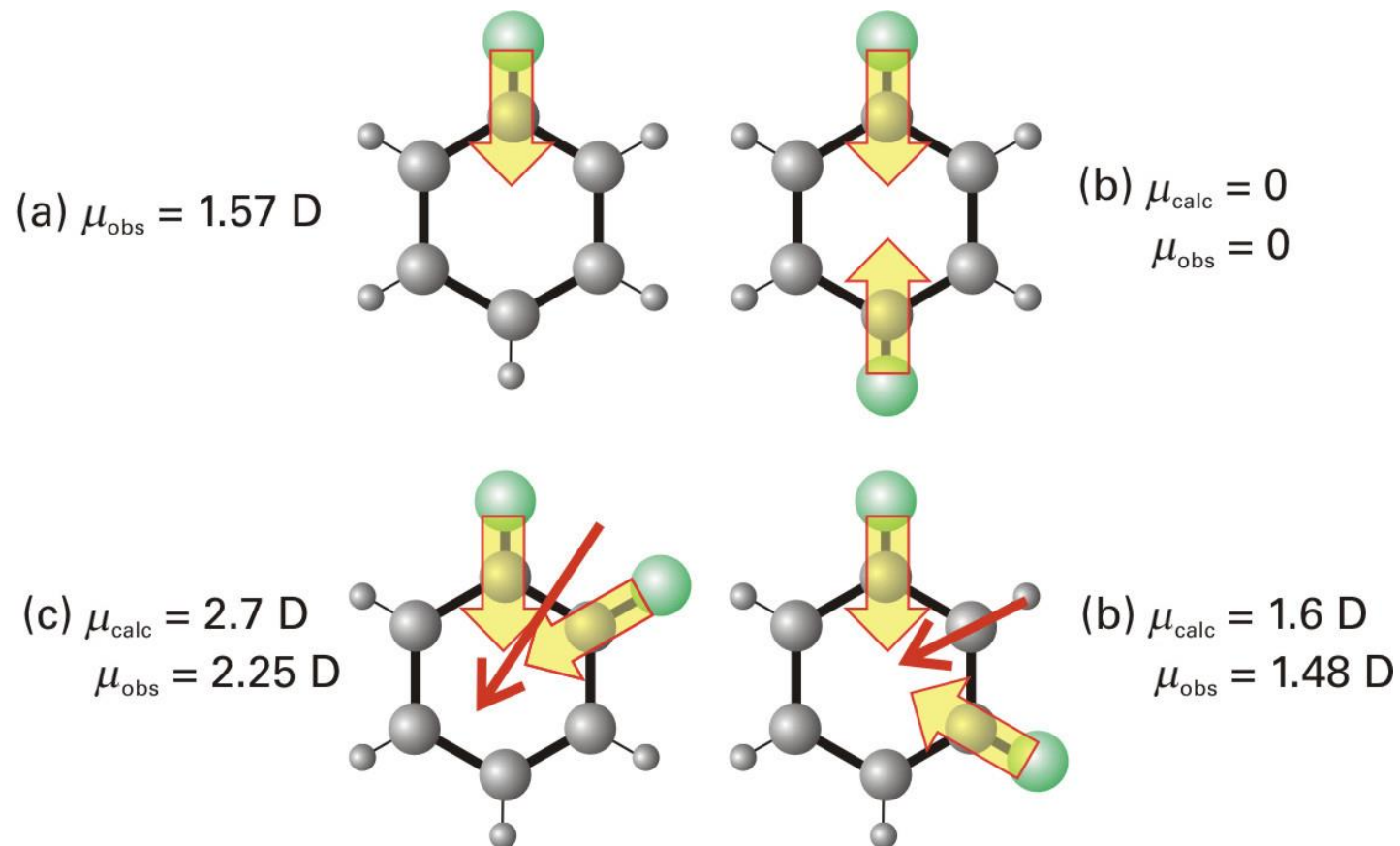
Molekula, která má dipólový moment je **polarizovaná**.

Molekuly (zpravidla zrcadlově symetrické – CO_2), které nejsou dipóly se jimi mohou stát, když se molekula nachází v elektrickém poli – vzniká **indukovaný dipól**.

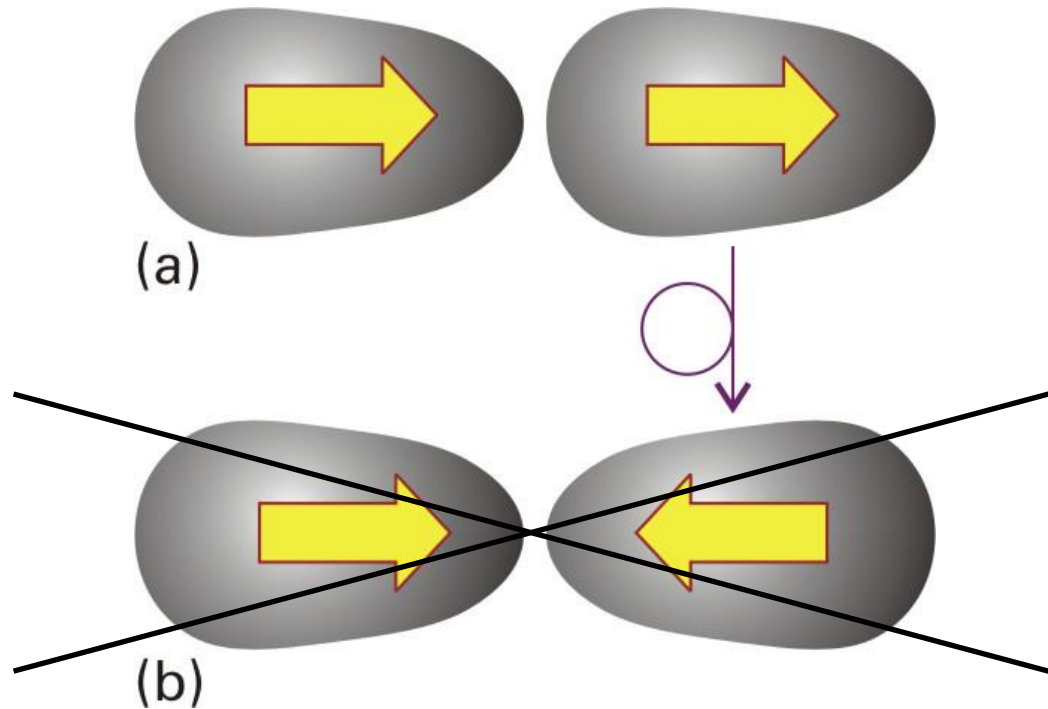
Dipólový moment molekul

Molekula je dipólem, jestliže je rozdělení náboje nepravidelné a molekula není středově symetrická.

Dipolový moment středově symetrických molekul je nulový.



Interakce dipólů



Polarizované molekuly upřednostňují uspořádání s minimální energií dipólů (head to tail)

Polarizovatelnost molekul

Schopnost molekul vytvořit indukovaný dipól vlivem elektrického pole.

Velikost indukovaného dipólu je přímo úměrná intenzitě elektrického pole E

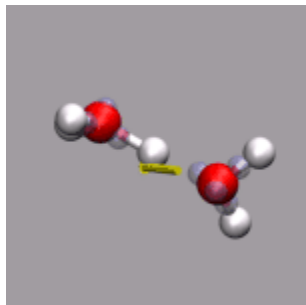
Indukovaný dipól μ^*

$$\mu^* = \alpha E$$

α je **polarizovatelnost** molekul

Čím větší je polarizovatelnost molekuly, tím větší má vliv elektrické pole na molekulu.

Změna dipólu při interakci molekul



<http://www.theochem.ruhr-uni-bochum.de/~legacy.akohlmeijer/cpmd-vmd/part3.html>

Interakční energie dvou dipólů

Interakce mezi dvěma dipóly μ_1 a μ_2

$$V = -\frac{\mu_1 \mu_2 (1 - 3 \cos^2 \theta)}{4\pi\epsilon_0 r^3}$$

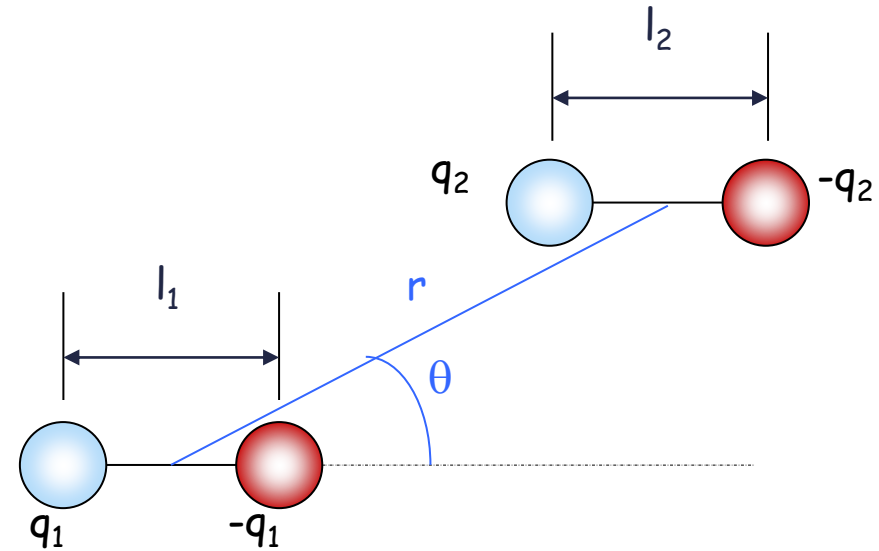
$$1 - 3 \cos^2 \theta = 0$$

$$3 \cos^2 \theta = 1$$

$$\cos^2 \theta = \frac{1}{3}$$

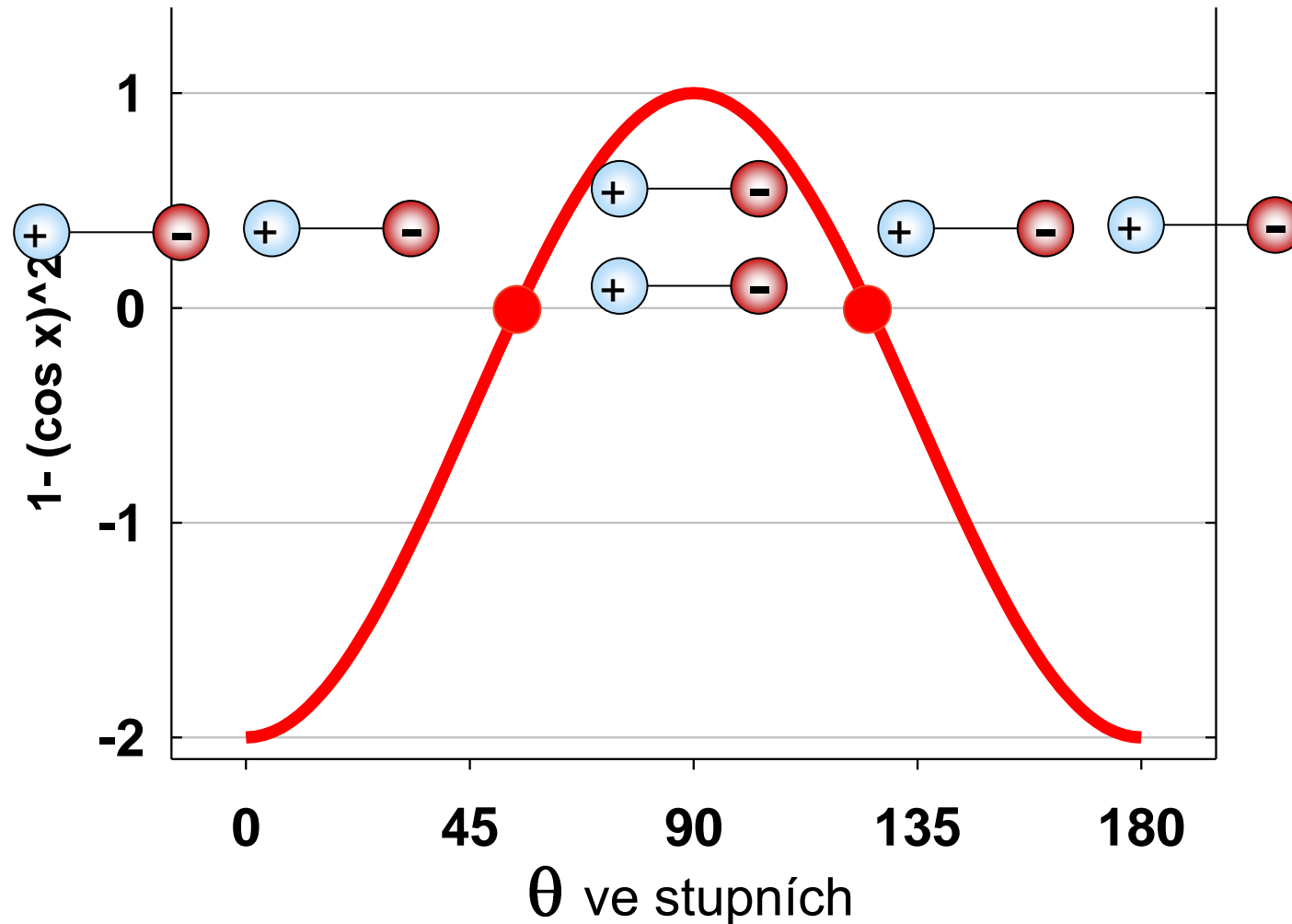
$$\cos \theta = \sqrt{\frac{1}{3}}$$

$$\theta = 54,7^\circ$$



Pro dipól-dipólovou interakci je potenciální energie V závislá na vzájemné orientaci.

Závislost potenciální energie na poloze dipólů



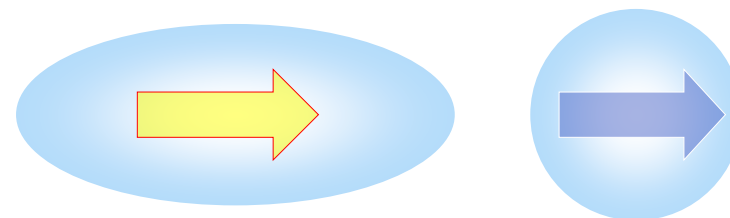
Minimální energie je při $\theta = 0^\circ$
přitažlivé interakce (opačné náboje
jsou u sebe) $\theta < 54.7^\circ$

Maximální energie je při $\theta = 90^\circ$
odpudivé interakce (stejné náboje
jsou u sebe) $\theta > 54.7^\circ$

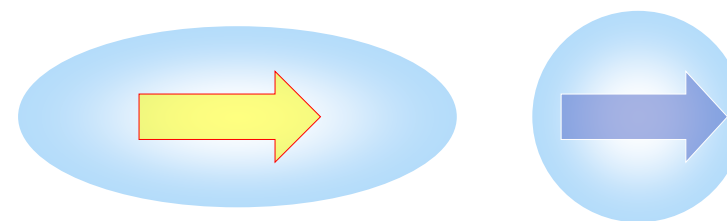
Nulová potenciální energie je při
„magickém“ úhlu $\theta = 54.7^\circ$

Interakce dipól-indukovaný dipól

Polární molekula s dipólovým momentem μ_1 může indukovat dipólový moment v polarizovatelné molekule



Indukovaný dipól interaguje s permanentním dipólem první molekuly a dochází k vzájemnému přitahování



Indukovaný dipól (modré šipky) následuje změny v orientaci permanentního dipólu (žluté šipky)

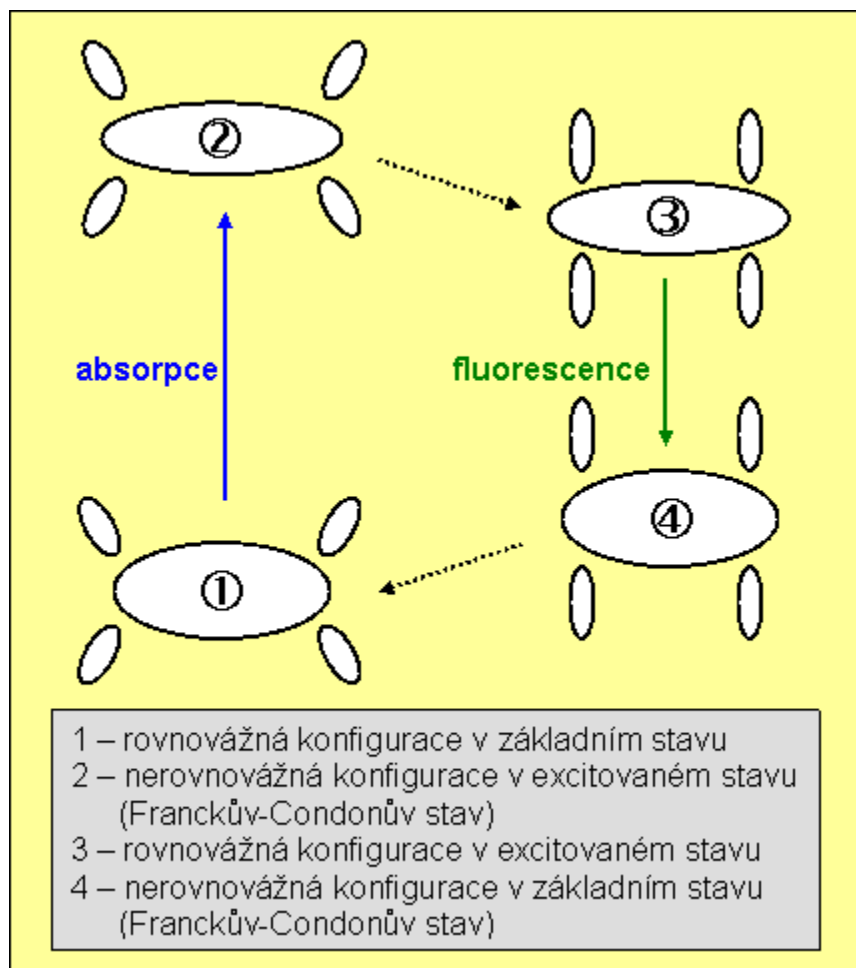
$$V = -\frac{\mu_1^2 \alpha_2}{\pi \epsilon_0 r^6}$$

Co se stane s fluoroforem v roztoku?



<http://mentalfloss.com/article/62220/what-do-they-use-dye-chicago-river-green-st-patricks-day>

Solvatace fluoroforu po absorpci a před emisí fluorescence

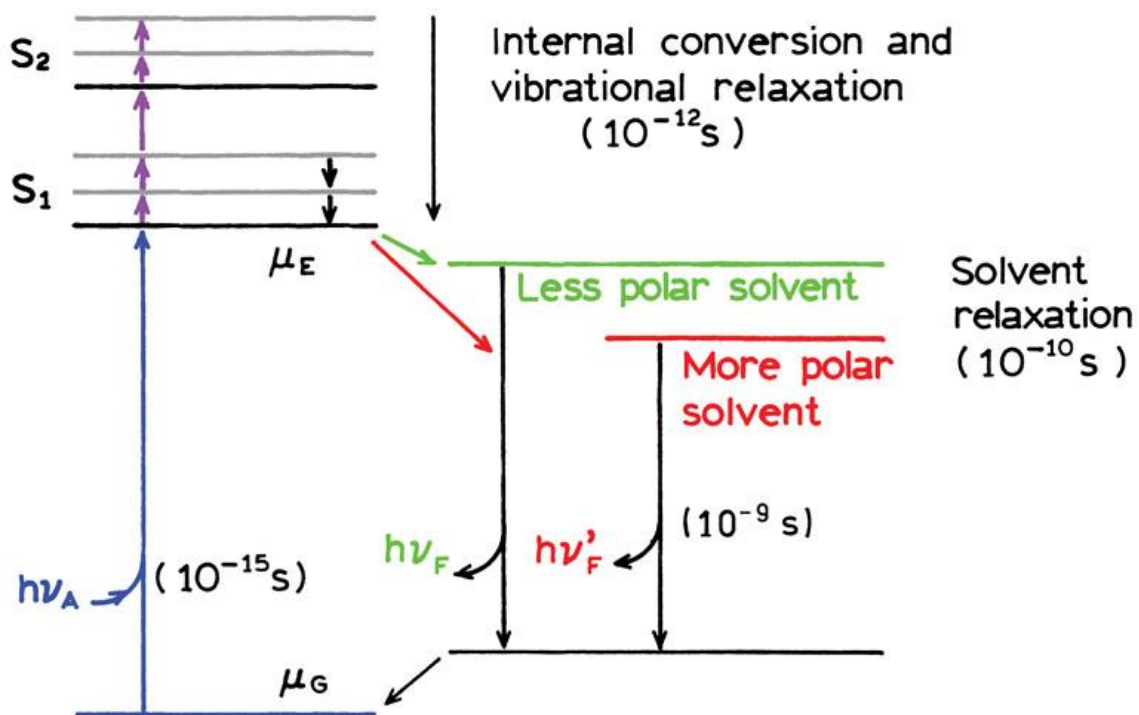


V roztocích dochází vlivem elektrostatických interakcí dipól-dipól, nebo dipól-indukovaný dipól mezi molekulami fluoroforu a rozpouštědla k solvataci fluoreskujících molekul. Protože molekuly mají v **základním** a v **excitovaném** stavu obecně **různé dipólové momenty** i **polarizovatelnosti**, dochází při měření fluorescence v roztocích ke změnám v optických spektrech vlivem různé **solvatace** molekul. Doba potřebná pro **molekulární relaxace** (10^{-10} s) je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu - **absorpce** (10^{-15} s), ale obvykle kratší, než doba excitovaného stavu (10^{-8} s). K emisi proto dochází ze stavu, kdy již bylo dosaženo rovnovážné konfigurace. Protože část absorbované energie se spotřebuje na relaxaci molekul rozpouštědla kolem molekuly fluoroforu v excitovaném i základním stavu, je energie emitovaného fluorescenčního záření menší, než by odpovídalo čistě elektronovému přechodu.

Faktory ovlivňující emisní spektrum a kvantový výtěžek

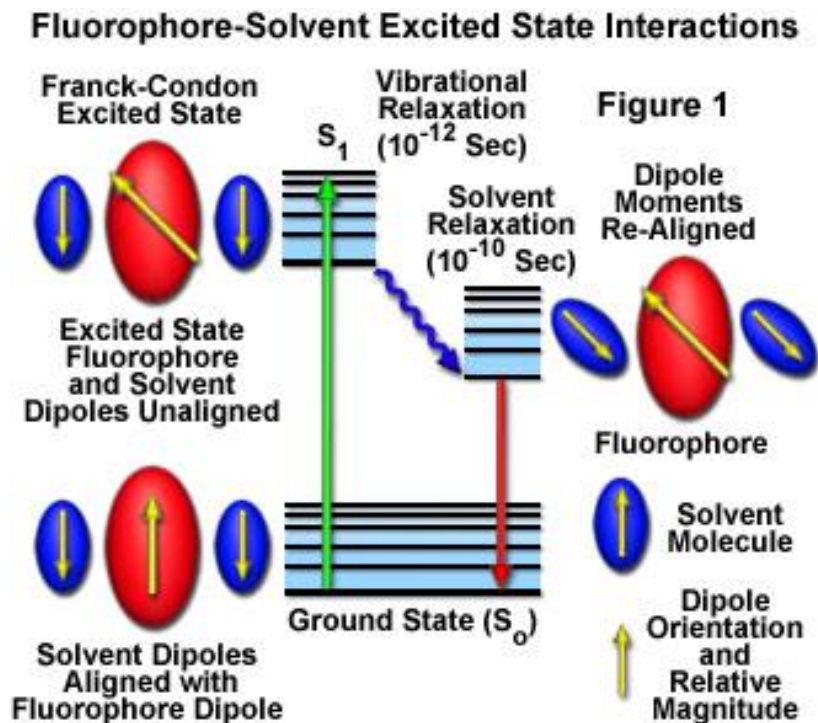
- **Polarita** prostředí (rozpouštědla)
- Viskozita prostředí – rozpouštědla
- Rychlost relaxace molekul rozpouštědla
- Konformační změny fluorescenční sondy
- Neměnnost lokálního prostředí molekuly
- Vnitřní přenos náboje (uvnitř molekuly)
- Protonový přenos a reakce excitovaných stavů
- Interakce sonda – sonda
- Změny v rychlostech zářivých a nezářivých procesů

Vliv polarity rozpouštědla



- Dipólový moment molekuly v excitovaném stavu μ_E je větší než v základním stavu μ_G .
- Po excitaci se molekuly rozpouštědla orientují (relaxují) okolo μ_E , což snižuje energii excitovaného stavu.
- Čím **větší** je **polarita rozpouštědla**, tím větší je vliv orientace dipólů a tím **větší energie se spotřebuje** na jejich orientaci a zbude pak **menší energie na emitované světlo**, tj. tím větší je jeho vlnová délka.

Interakce excitovaného fluoroforu a rozpouštědla



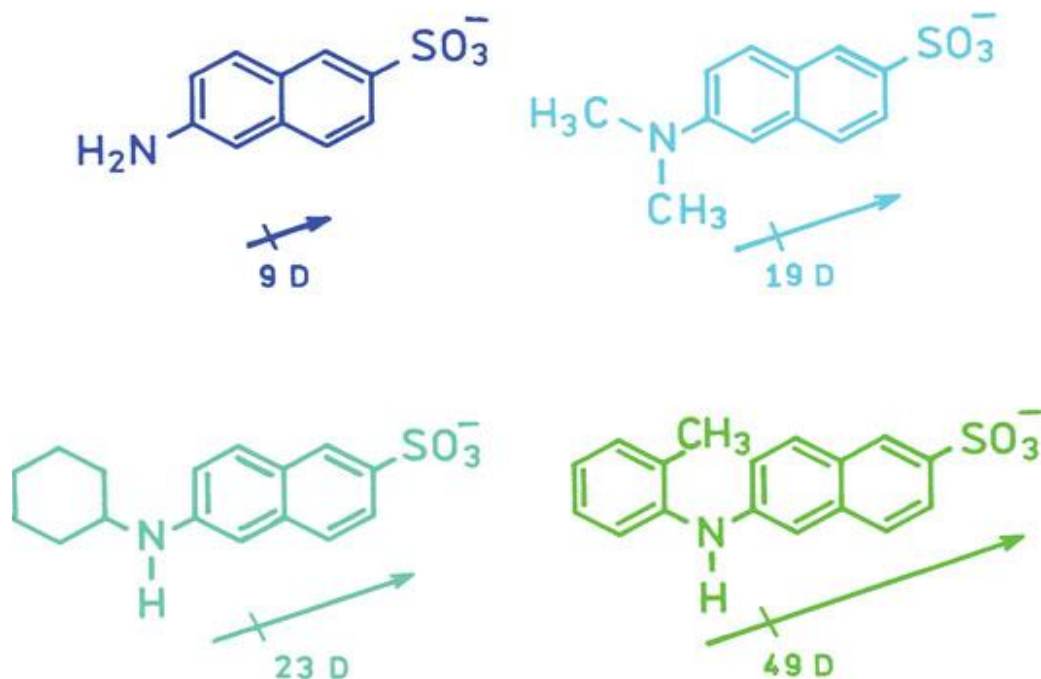
Čím větší je polarita rozpouštědla, tím větší je vliv orientace dipólů, tím menší je energie emitovaného záření a tím větší je posun λ emitovaného světla.

Nejcitlivější na polaritu rozpouštědla jsou fluorofory, které jsou samy polární. Nepochybně fluorofory jsou méně citlivé.

Dipólový moment a tvar molekul

Změna dipólového momentu je větší u delších fluoroforů.

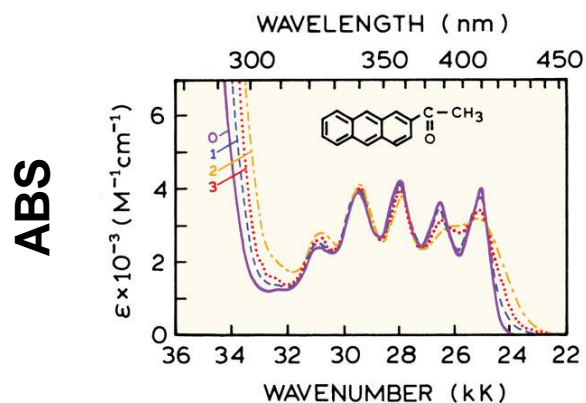
Aminonaftalenové deriváty s fenylovou skupinou vykazují větší citlivost na rozpouštědlo a větší dipólové momenty v excitovaném stavu pravděpodobně díky větší separaci náboje podél delšího aromatického systému.



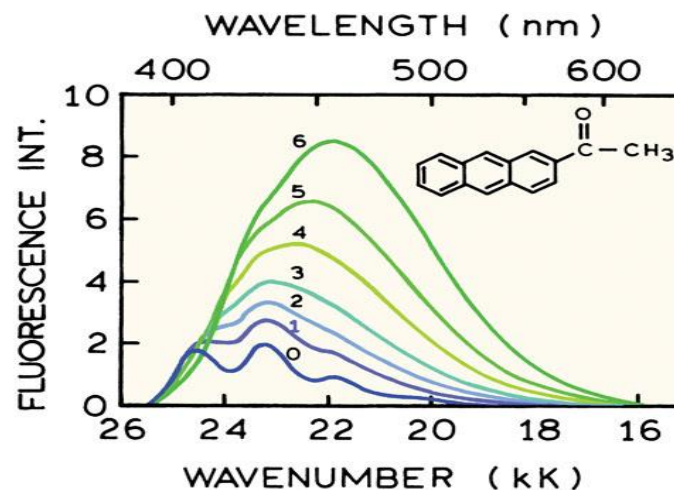
Změna dipólového momentu po excitaci je větší u delších molekul.

Rozdílný vliv polaroty rozpouštědla na absorpční a emisní spektrum

2-acetylantracen



Absorpční spektrum 2-acetylantracenu v čistém hexanu (0), 200mM roztoku metanolu v hexanu (1) a čistém metanolu (2).

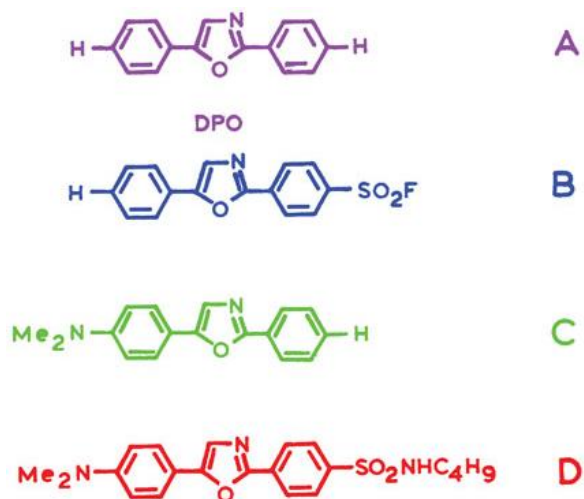


Zvyšování molární koncentrace metanolu v hexanu v rozsahu 0-340 mM (0 -> 6)

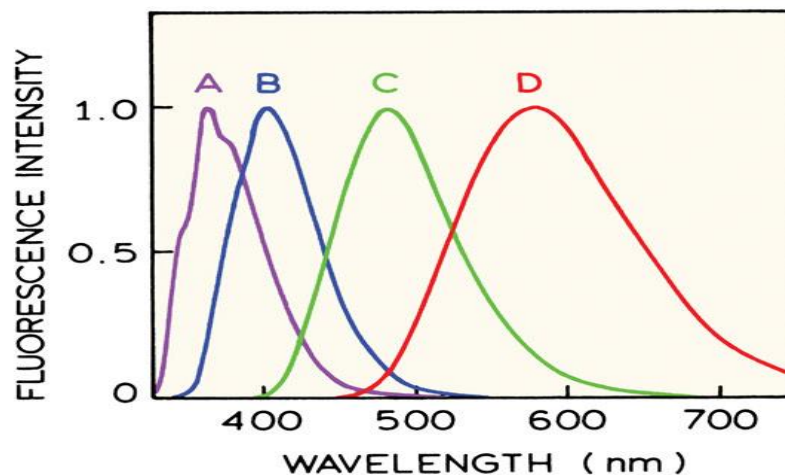
Se zvyšující se polaritou rozpouštědla se mění fluorescenční spektrum mnohem více než absorpční spektrum.

Sondy na sledování polarity okolí

Deriváty DOP (2,5-difenyloxazolu)



a jejich emisní spektra



Přidání polárních skupin k fluoroforu zvyšuje jeho citlivost na polaritu rozpouštědla.

Přidání polárnějších skupin také zvyšuje Stokesův posun.

Větší vzdálenost polárních skupin způsobuje posun emisního spektra k vyšším vlnovým délkám.

Proč je emisní spektrum citlivější na polaritu prostředí než absorpční spektrum?

Protože absorpce je rychlejší než emise a ta je zase pomalejší než relaxace molekul

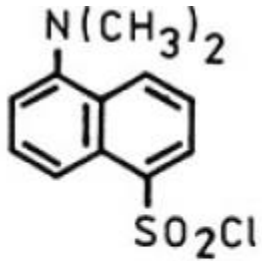
časová posloupnost:

Absorpce (10^{-15}s) \rightarrow **relaxace okolí** (10^{-10}s) \rightarrow **emise** (10^{-8}s)

Absorpce nemůže zachytit změny v lokálním prostředí molekuly, protože proběhne rychleji než k nim dojde před absorpcí a po ní je okolí molekuly stejné.

naproti tomu při emisi už je molekula fluoroforu obklopena relaxovaným – změněným prostředím.

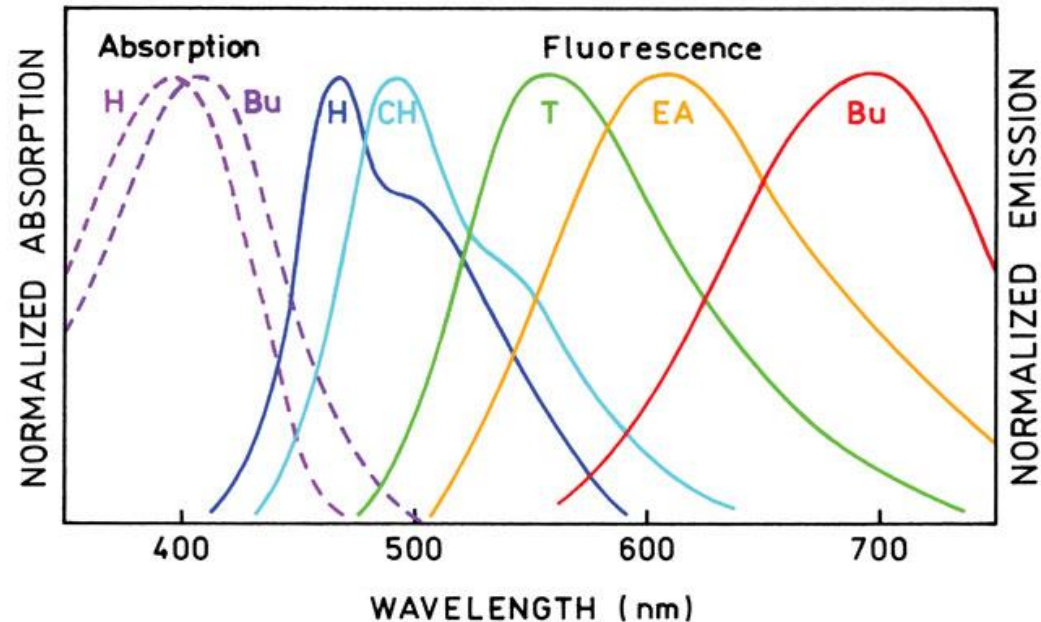
Závislost emisního spektra na polaritě rozpouštědla



DNS-Cl

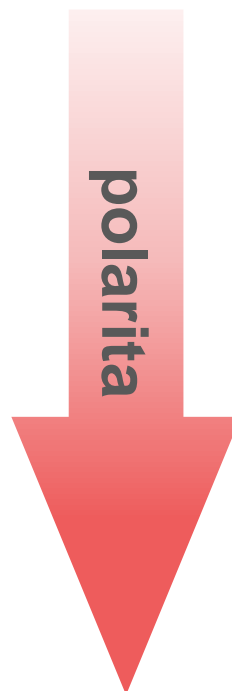
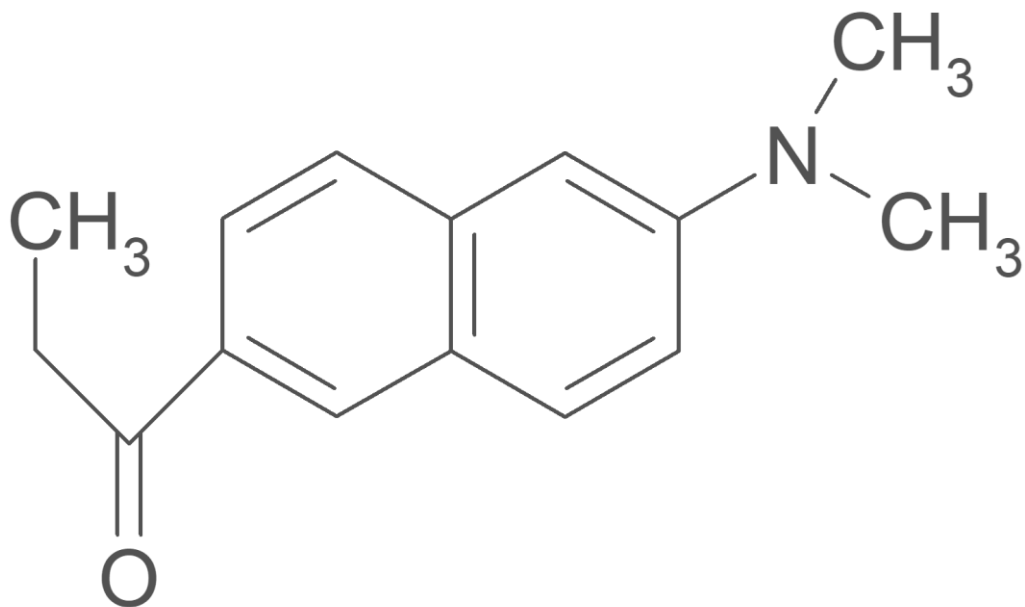
Podle zvyšující se polarity:

H – hexan
CH- cyklohexan
T- toluen
EA – etylacetát
Bu – n-butanol

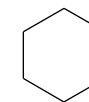


Prodan v různém prostředí - rozpouštědle

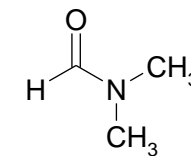
Prodan (*N,N*-Dimethyl-6-propionyl-2-naphthylamine)



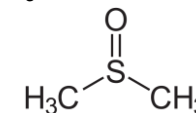
C - Cyklohexan



D - dimetylformamid

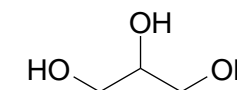


DMSO –dimetylsufloxid



E - Etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

G – Glycerol



Změna emisního spektra po vazbě molekul

Citlivosti fluorescenčních sond na okolní prostředí se využívá při sledování vazby a kvantifikaci množství biologických molekul.

Kvantový výtěžek se často zvyšuje při vazbě fluoroforů na proteiny nebo DNA. Toho se využívá při sledování vazby.

- ANS na HSA
- DAPI na DNA
- Prodan na protein
- EtBr na DNA

Fluorescence ANS po vazbě na sérový albumin

Změna polaroty prostředí způsobuje posun fluorescenčního spektra do viditelné oblasti spektra z původní fluorescence v UV oblasti.



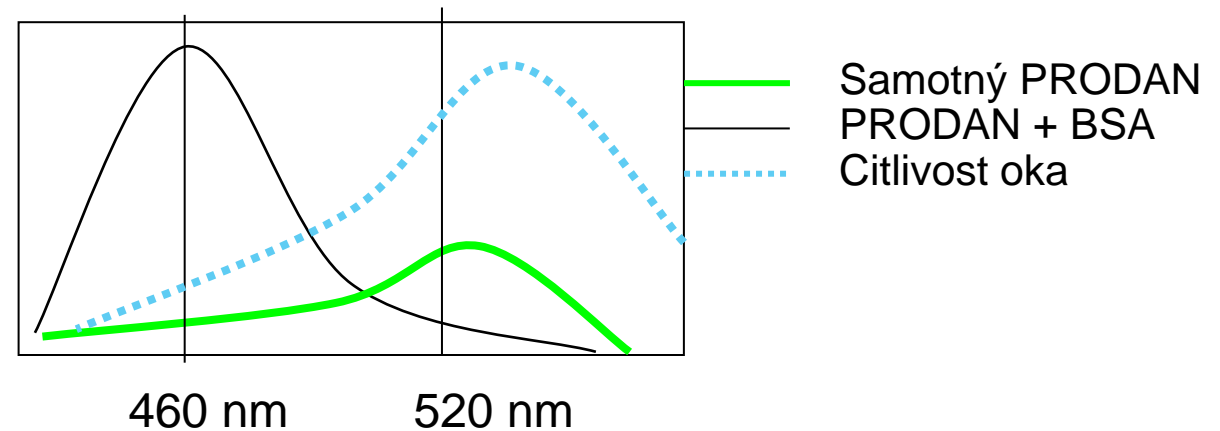
ANS (1-anilinonaftalén-8-sulfonát sodný):

- MW = 321,33
- rozpouštědlo pro zásobní roztok: dimethylformamid (DMF)
- rozpouštědlo pro spektroskopická měření: metanol (MeOH)
- dlouhovlnné absorpční maximum v metanolu: $\lambda_{\text{exmax}} = 372 \text{ nm}$ (molární extinkční koeficient: $7800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)
- fluorescenční emisní maximum v metanolu: $\lambda_{\text{emmax}} = 480 \text{ nm}$
- kvantový výtěžek fluorescence je závislý na okolním prostředí a je zvláště citlivý na přítomnost vody; emise je závislá na rozpouštědle
- podrobný popis vlastností ANS lze nalézt v práci [Slavík J.: Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. Biochim. Biophys. Acta 694, 1-25 (1982)]

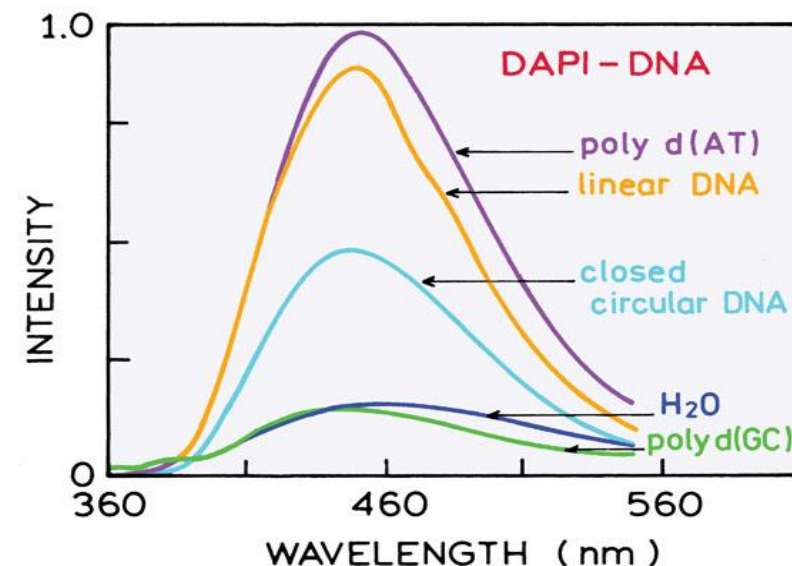
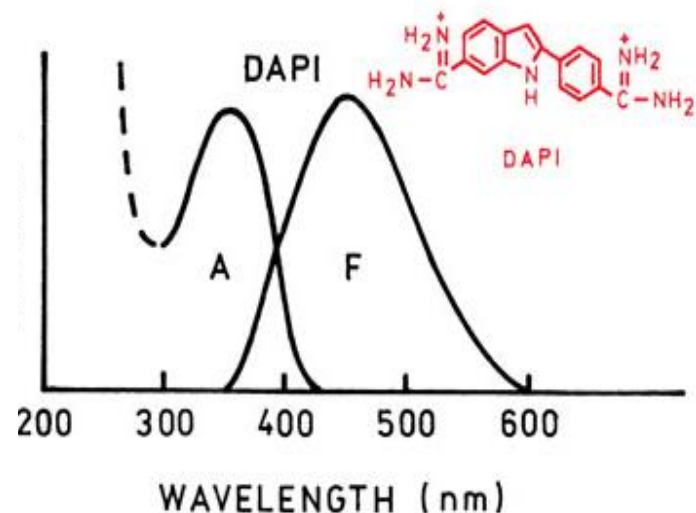
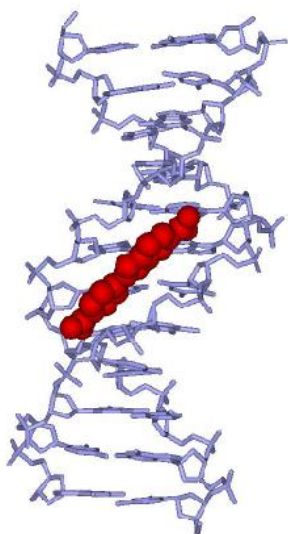
Co se stane, když se naváže PRODAN na BSA?

Posune se maximum vlnové délky z 520 nm zelené světlo na 460 nm modré světlo a přesto, že se zvýší intenzita emise, nepozorujeme ji, protože lidské oko má nižší citlivost na modré světlo než zelené světlo.

Postupnou vazbu PRODANu na BSA lze lépe sledovat jako úbytek emise volného fluoroforu.



Vazba DAPI na DNA



DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)

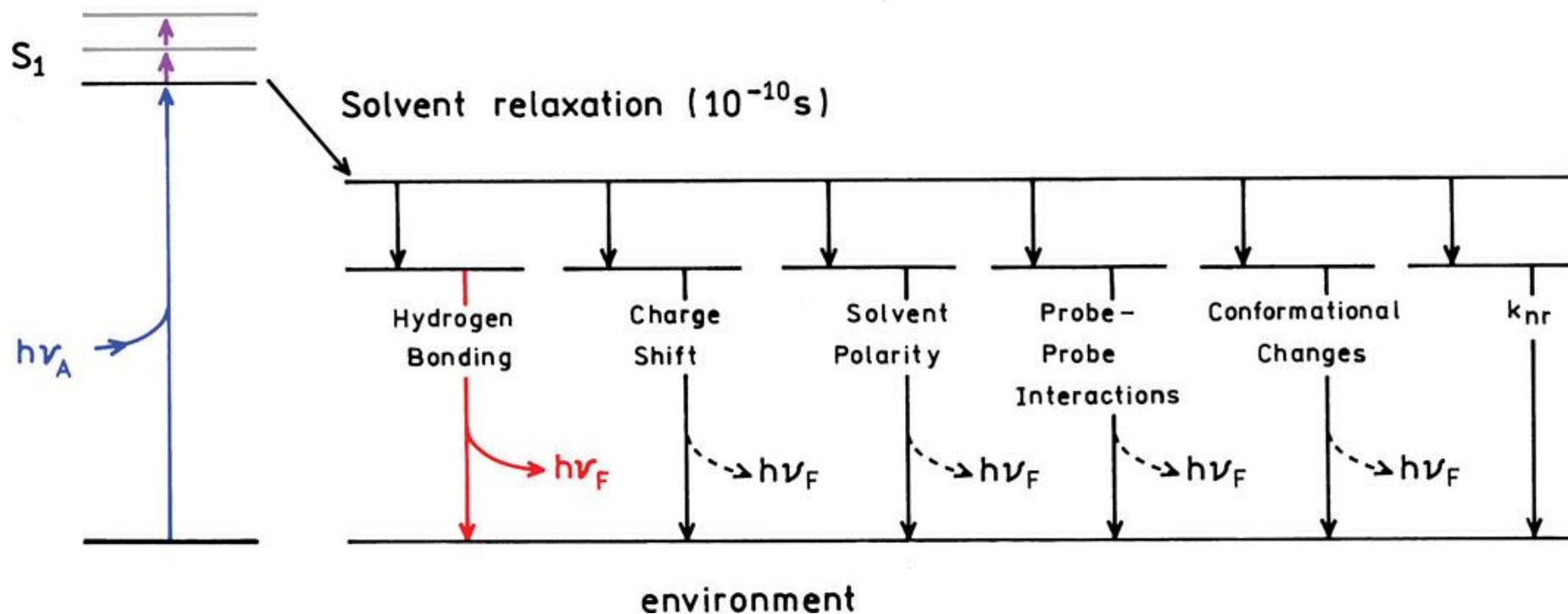
Ex. 355 nm / Em. 461 nm

Vazba do malého žlábků.

Největší nárůst intenzity při vazbě v blízkosti AT bohatých oblastí.

Použití při značení DNA u preparátů pro fluorescenční mikroskopii
– citlivost řádově ng DNA.

Další mechanismy spektrálního posunu

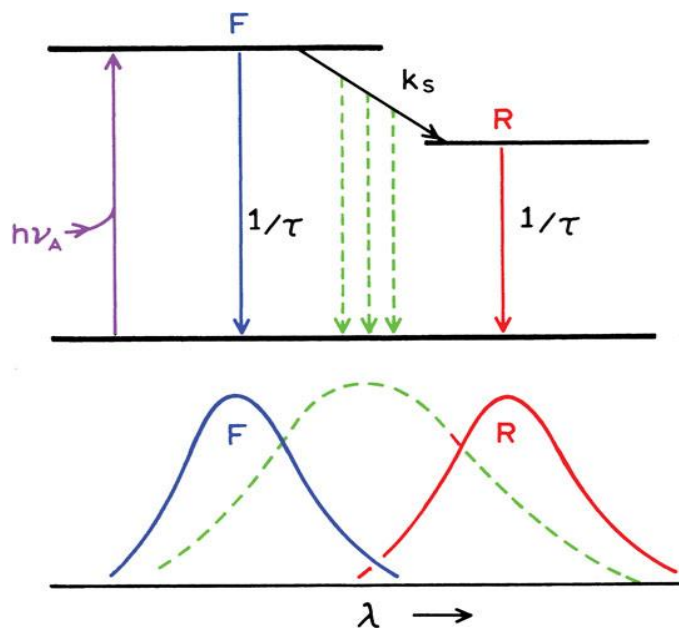


- Vodíkové můstky v rozpouštědle
 - Vnitřní přenos náboje (uvnitř molekuly)
 - Rychlost relaxace molekul rozpouštědla
 - Interakce sonda – sonda
 - Konformační změny fluorescenční sondy
 - Změny v rychlostech zářivých a nezářivých procesů
- * Čárkované šipky znamenají, že přechody mohou být zářivé nebo nezářivé

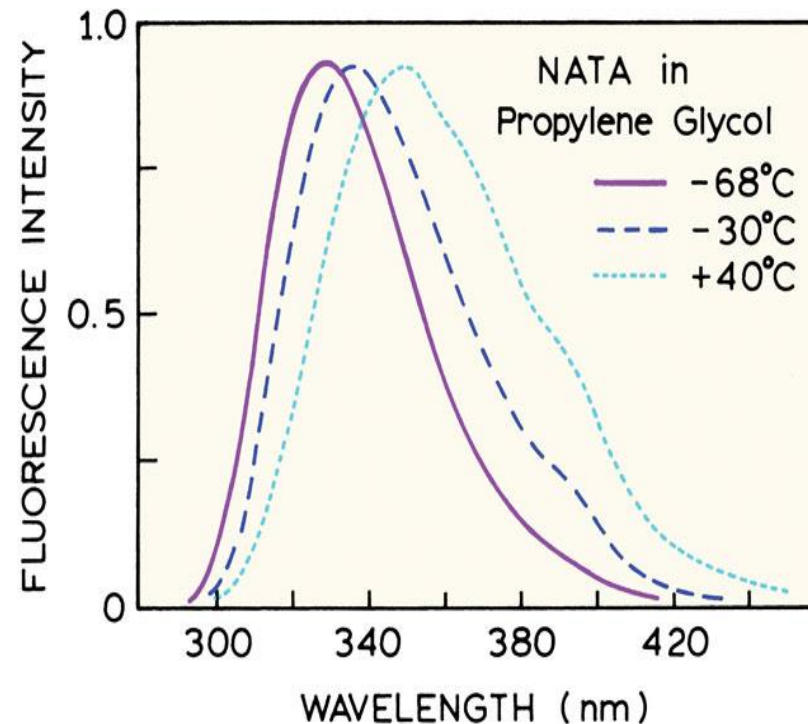
Závislost emise fluorescence na teplotě

- Snížení teploty zpravidla způsobuje zvyšování viskozity rozpouštědla a tím se zvyšuje také čas potřebný k orientaci molekul rozpouštědla
- Čím nižší je teplota, tím méně molekul se vrací do základního stavu s relaxovanými okolními molekulami rozpouštědla – tím méně se energie spotřebovává a tím je posun menší

Závislost emisního spektra na teplotě



Snížení teploty prodlužuje čas potřebný k relaxaci rozpouštědla.



Snížení teploty má podobný vliv jako snížení polaroty rozpouštědla.

Interakce sonda-sonda excimerová fluorescence

Molekuly fluoroforu mohou se sebou vzájemně vytvářet excitovaný komplex excimer.

Excimer je zkráceně **excitovaný dimer**.

V případě dvou různých molekul se jedná o **exi**plex.

Pro vytvoření excimeru je nutné, aby byly molekuly v kontaktu.

Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k delším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul.

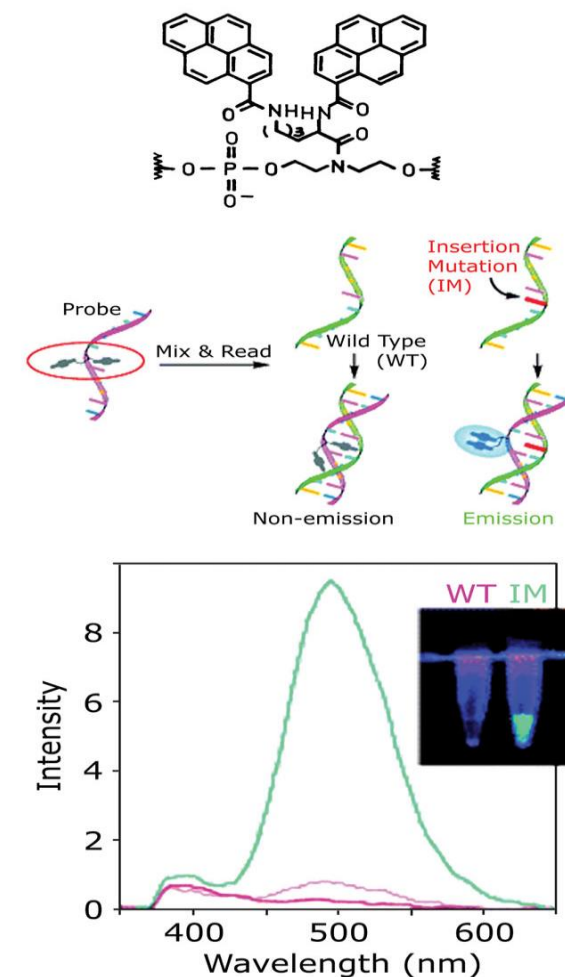
Použití excimerů při detekci inserčních mutací

Oligonukleotid s připojenými pyrenovými zbytky na místě jedné báze

Když se váže na WT nemutovanou DNA, jeden pyrenový zbytek se interkaluje, druhý je vně dvoušroubovice

Když se váže na DNA s mutací, která obsahuje **jednu bázi navíc**, dojde k vytvoření excimeru.

Excimerová emise ukazuje, že se jedná o inserčního mutantu.



Dynamické zhášení

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno **Sternovou-Volmerovou rovnicí**:

$$F_0/F = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

kde je F_0 – intenzita fluorescence nebo kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla,

F - totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci C_q , τ_0 – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla, τ - doba dohasínání za přítomnosti zhášedla, k_q – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

Hodnota k_q udává koncentraci zhášedla, při které se sníží intenzita fluorescence na polovinu.

Nejčastějším zhášedlem fluorescence i fosforescence je molekulární **kyslík** (O_2). Dále fluorescenci zhášejí (v důsledku mezisystémové konverze) atomy halogenů jako je **bróm** a **jód**. Často používaným zhášedlem je také akrylamid.

Statické zhášení

Vytváří se **komplex fluoroforu a zhášedla**, který už nefluoreskuje
Platí pro něj také Sternova-Volmerova rovnice:

$$F_0/F = 1 + K_a \tau_0 C_q$$

Kde K_a je asociační konstanta fluoroforu a zhášedla

Typickými statickými zhášedly jsou:

Báze nukleových kyselin
Guanin
Nikotinamid
Těžké kovy

Rozdílná teplotní závislost dynamického a statického zhášení

Dynamické zhášení

Statické zhášení

Oba druhy zhášení ukazují stejnou závislost na koncentraci zhášedla.

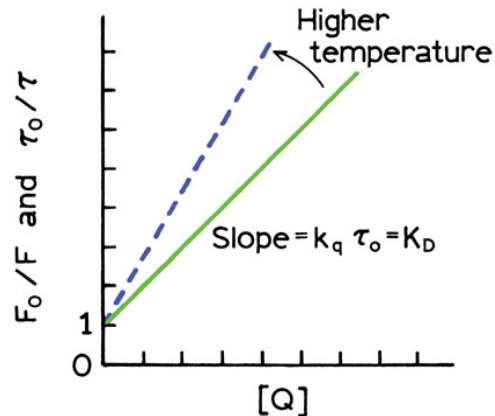
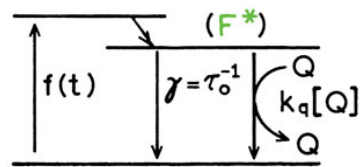
Při statickém zhášení se pouze „zneviditelní“ část fluoroforů, které vytvoří komplexy.

Nemění se doba dohasínání fluorescence τ .

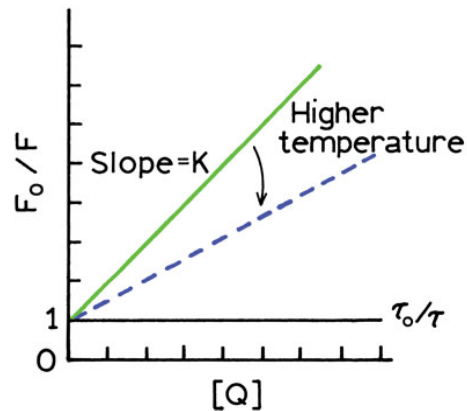
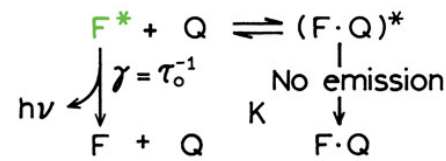
Při dynamickém zhášení se doba dohasínání

mění $\tau_0 > \tau$.

Collisional Quenching

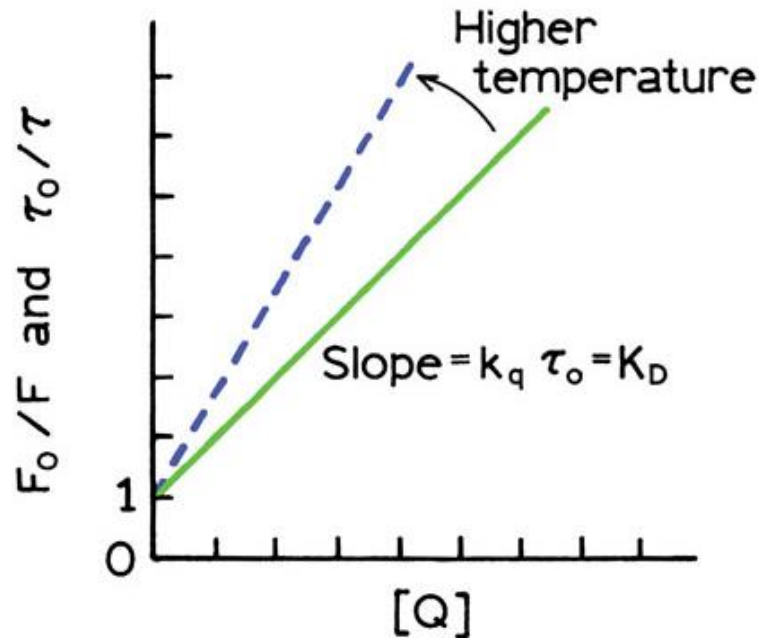


Static Quenching



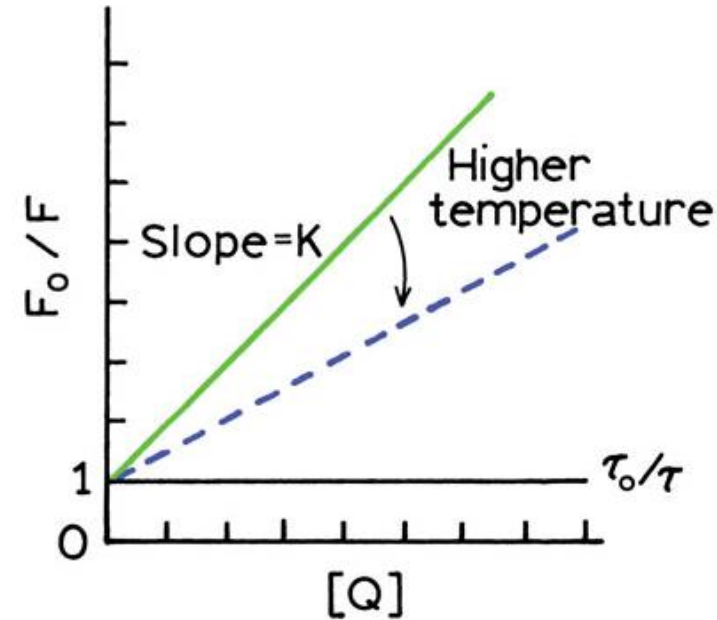
Závislost obou druhů zhášení na teplotě

Dynamické zhášení



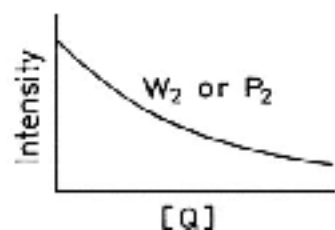
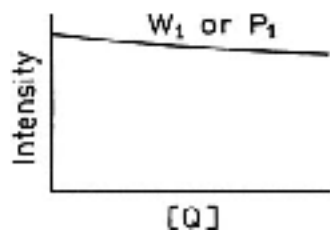
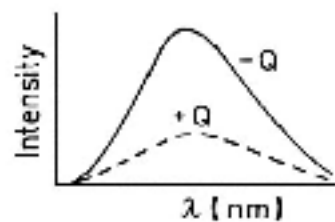
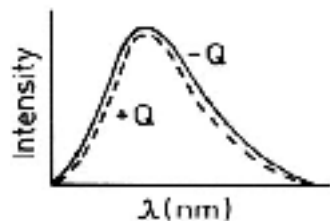
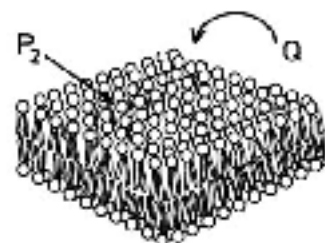
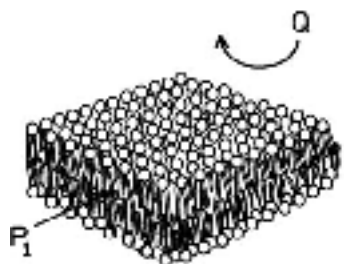
Dynamické zhášení se s rostoucí teplotou zvyšuje. Zvyšuje se pohyblivost molekul zhášedla, které takto za stejný čas „uhasí“ více molekul fluoroforu.

Statické zhášení



Statické zhášení se s rostoucí teplotou snižuje, protože dochází snadněji k disociaci slabě vázaných komplexů fluoroforu a zhášedla.

Využití zhášení při lokalizaci fluoroforu



V membráně

Jestliže je fluorofor P1 zanořen v membráně, je pro zhášedlo Q nedostupný a ke zhášení téměř nedochází.

S rostoucí koncentrací zhášedla se intenzita fluorescence téměř nemění.

Na povrchu

Jestliže je fluorofor P2 na povrchu, dochází k účinnému zhášení.

S rostoucí koncentrací zhášedla intenzita fluorescence velmi výrazně klesá.

Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy.
Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.

Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH

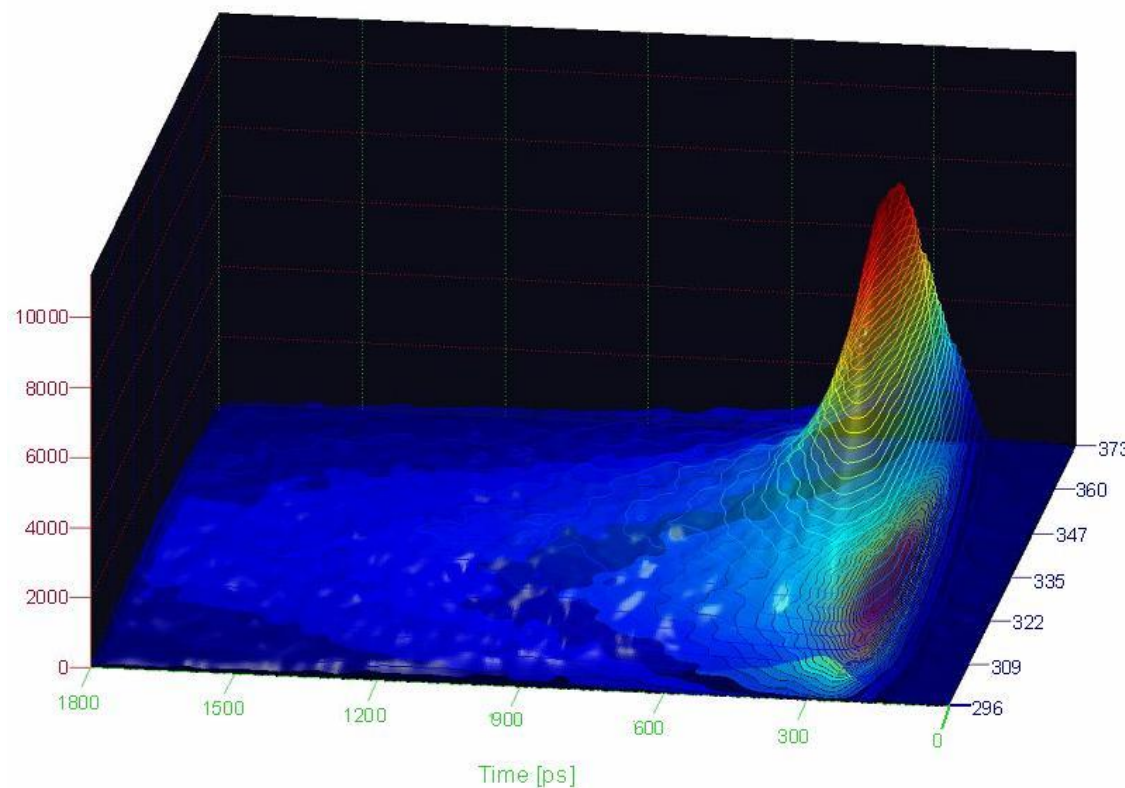
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfišar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

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

Příště – časově rozlišená fluorescence

Co navíc nám řekne časově rozlišená fluorescence než ustálená fluorescence?



Spectraviewer – tips & tricks



Fluorescence SpectraViewer