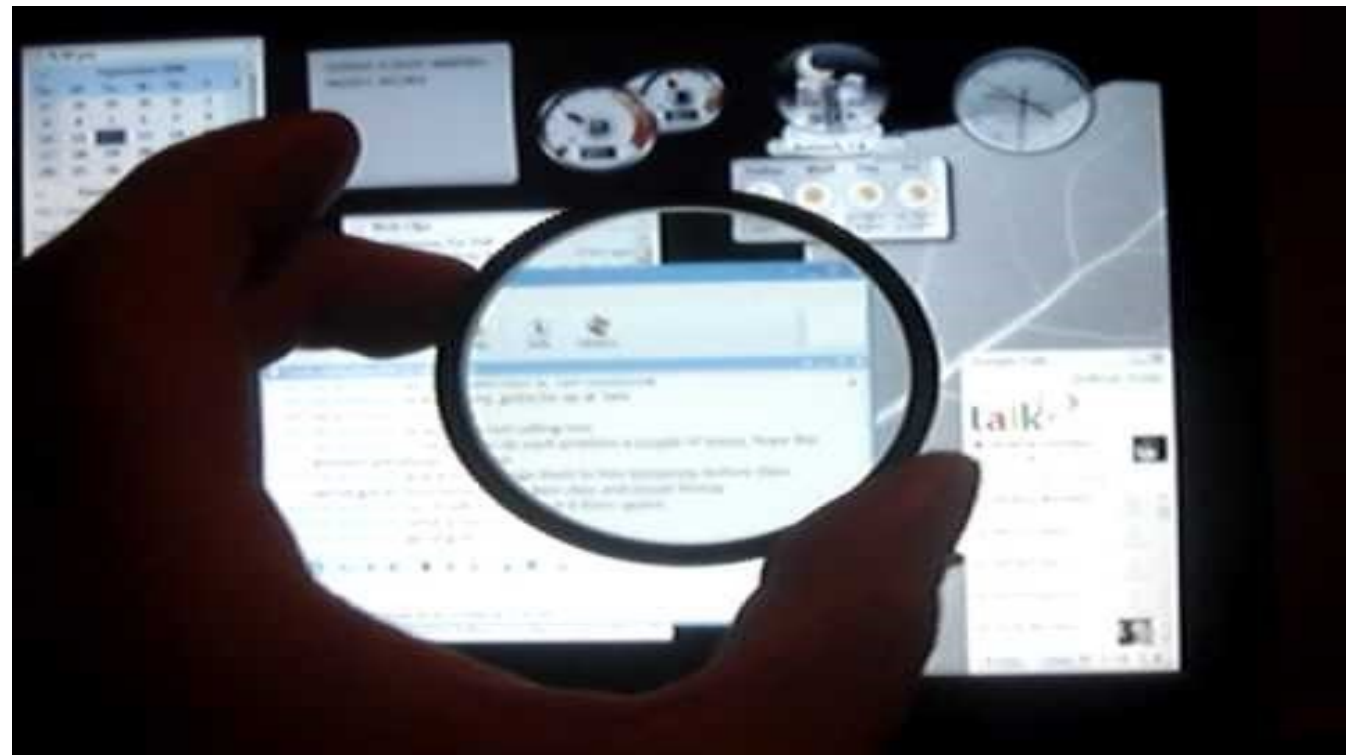


Jak Vikingové navigovali své lodě podle slunce?



Anizotropie kolem nás: monitor

- Anizotropie se projevuje u LCD monitoru
- Co je příčinou?



<http://www.youtube.com/watch?v=imQnWrLW2i0>

ANIZOTROPIE 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

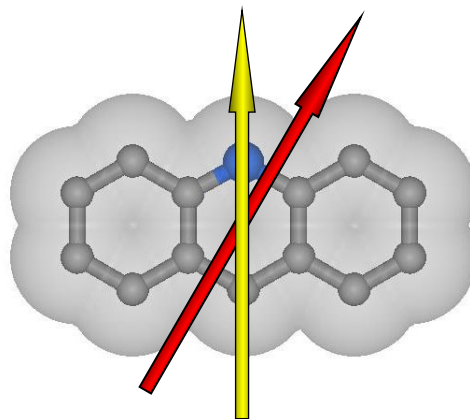
M U N I
S C I

Národní centrum
pro výzkum
biomolekul

Jev anizotropie

- Jestliže dochází k excitaci světlem kmitajícím v jedné rovině tj. lineárně polarizovaným, emise fluorescence se stává polarizovanou.
- Úroveň polarizace emise je popsána veličinou anizotropie (nestejnorodostí). Látky, které vykazují určitý stupeň nestejnorodosti, emitují polarizovanou fluorescenci.
- Co způsobuje, že je emitované světlo polarizované?

Dipólové momenty přechodu

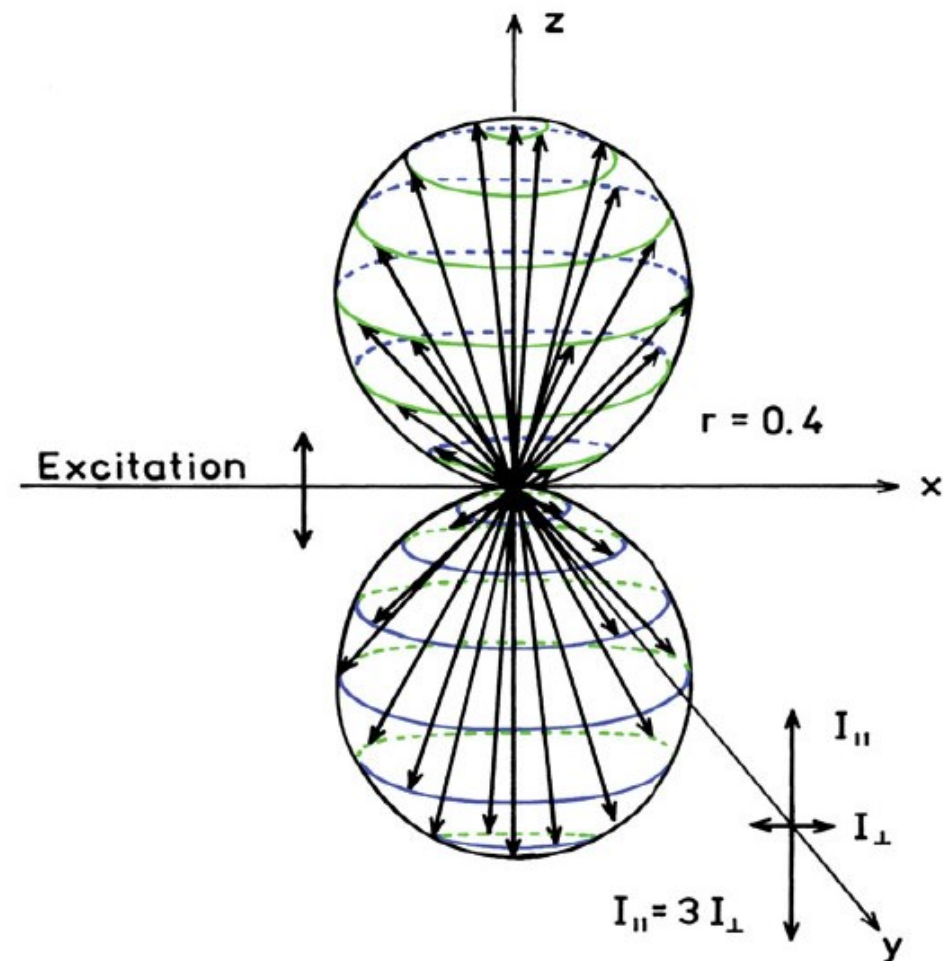


— Absorpce
— Emise

- **Dipólový moment přechodu** je kvantově mechanická záležitost. Není skutečným dipólovým momentem. Je dán okamžitým stavem elektronového obalu molekuly. Velikost dipólového momentu přechodu udává schopnost daného stavu molekuly absorbovat nebo emitovat světlo. Směr dipólového momentu přechodu udává směr, ve kterém je světlo molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno.
- Molekuly přednostně absorbují záření, jehož elektrická složka kmitá ve stejné rovině jako je **absorpční dipólový moment přechodu** elektronu do vyšší energetické hladiny.
- Molekuly přednostně emitují záření ve stejné rovině jako je **emisní dipólový moment přechodu** elektronu do nižší energetické hladiny.

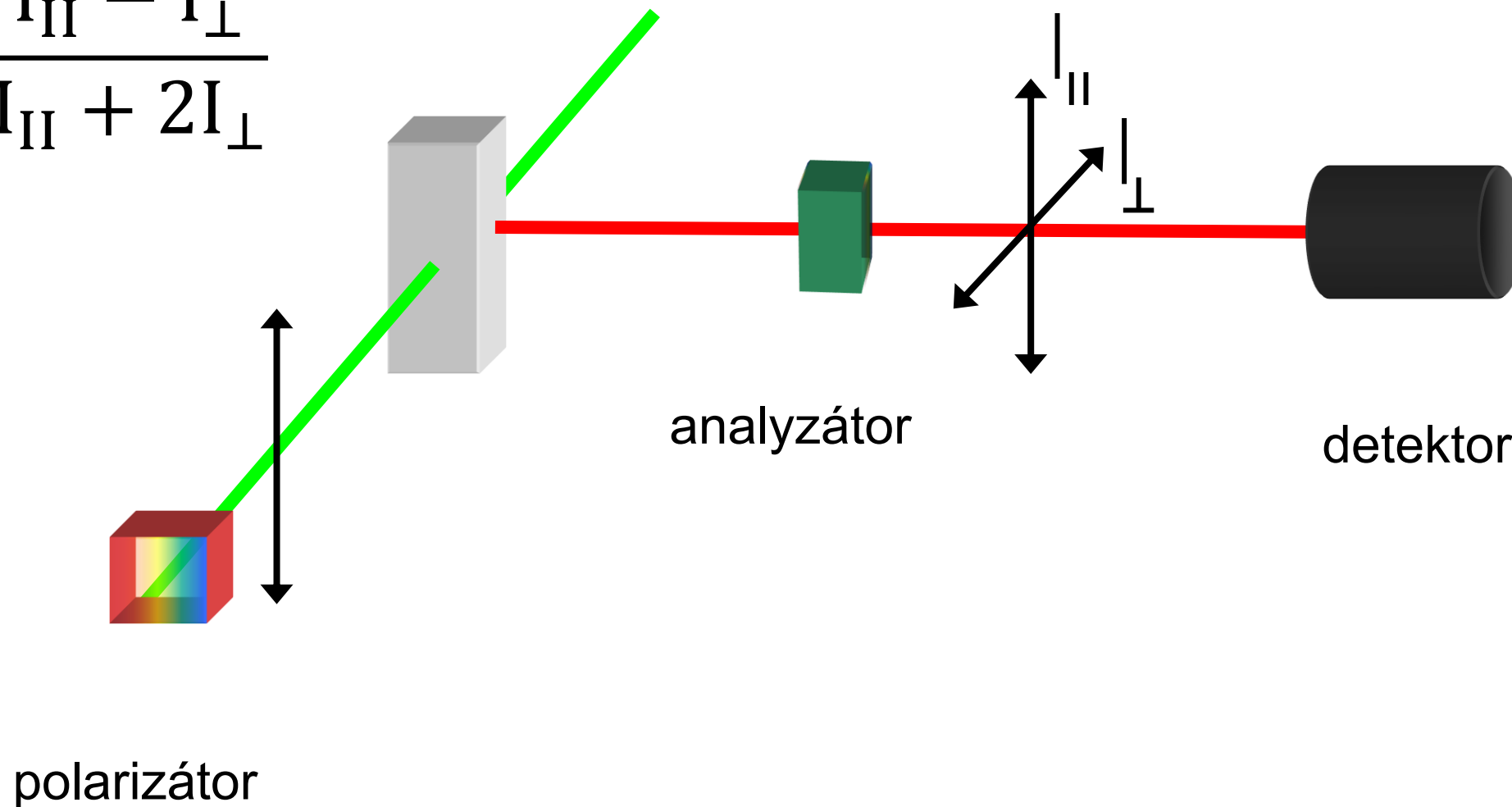
Fotoselekce

- Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace budícího záření.



Anizotropie fluorescence

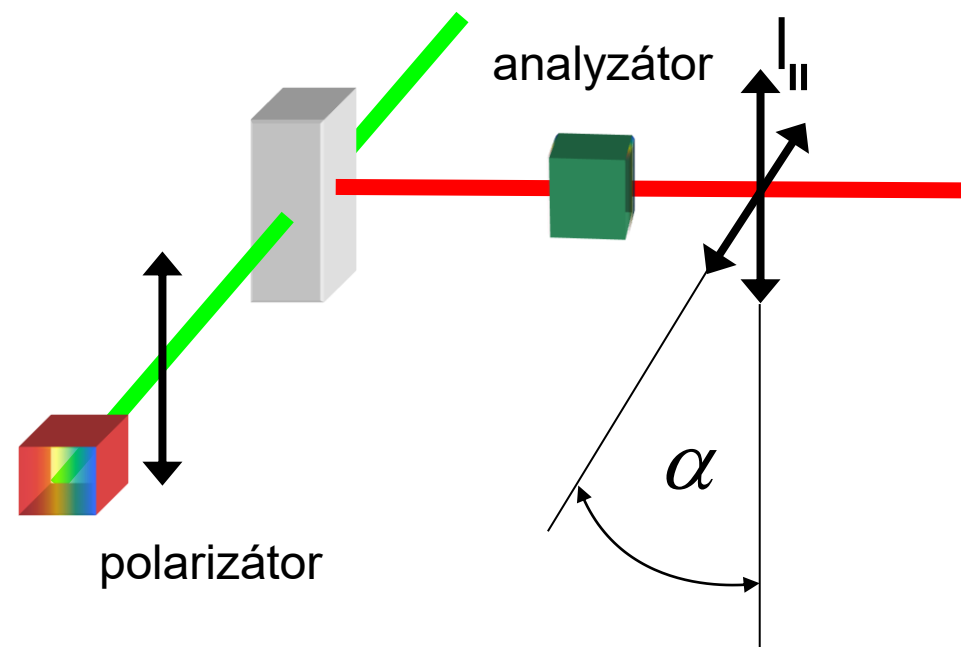
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$



Intenzita fluorescence

- Z teorie depolarizace fluorescence vyplývá, že intenzita fluorescence pozorovaná pomocí analyzátoru, který je otočen o úhel α od směru rovnoběžné polarizace je

$$I_{\alpha}(t) = \cos^2 \alpha I_{||}(t) + \sin^2 \alpha I_{\perp}(t)$$



Při jakém úhlu natočení polarizátorů α můžeme změřit celkovou intenzitu fluorescence?

Celková intenzita fluorescence

$$I_{celk} = I_{II} + 2I_{\perp}$$

$$I_{\alpha} = \cos^2 \alpha \cdot I_{II} + \sin^2 \alpha \cdot I_{\perp}$$

$$\cos \alpha = \sqrt{\frac{1}{3}} \quad \frac{\cos^2 \alpha}{\sin^2 \alpha} = \frac{1}{2} \quad \sin^2 \alpha + \cos^2 \alpha = 1$$

$$\alpha = 54,7^{\circ}$$

Celková intenzita se měří při magickém úhlu

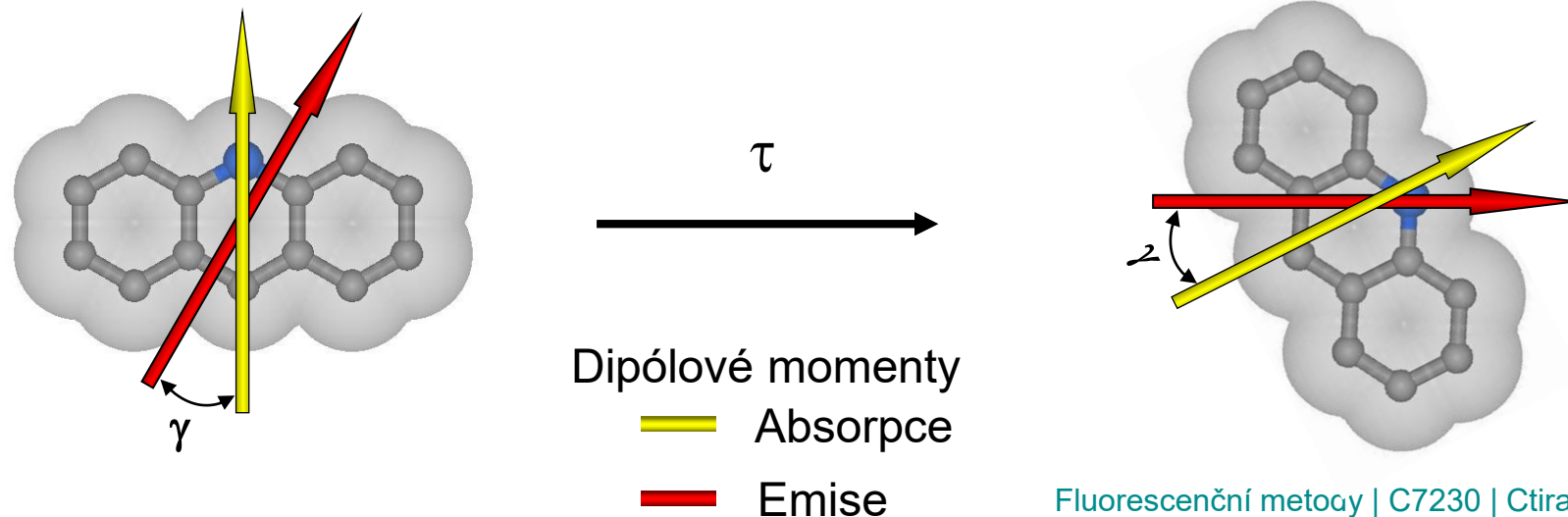
Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^{\circ}$

Časová závislost polarizované fluorescence

a pro časovou závislost anizotropie platí

$$r(t) = (3 \cos^2 \gamma(t) - 1)/5$$

kde γ je - úhel dipólové reorientace v čase od 0 do t
- úhel mezi dipólovým momentem absorpce a emise



Maximální hodnota anizotropie

$$r_0 = \frac{(3 \cos^2 \gamma - 1)}{5}$$

Ze vztahu plyne, že za nepřítomnosti depolarizace (např. ve zředěných zmrzlých roztocích za nepřítomnosti depolarizačních mechanismů a za předpokladu, že jsou přechodové momenty absorpce a emise rovnoběžné) je mezní hodnota anizotropie fluorescence buzené polarizovaným zářením dána pouze fotoselekcí

$$r_0^{max} = \frac{2}{5} = 0,4$$

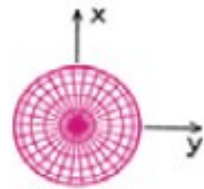
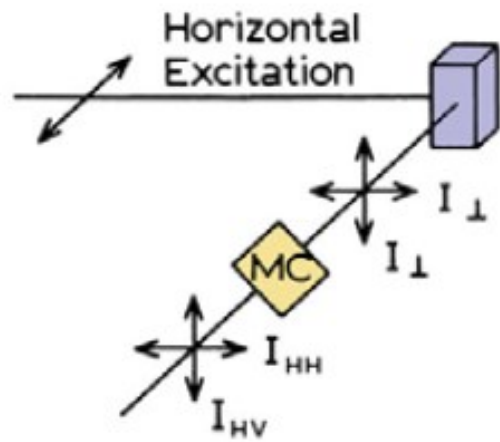
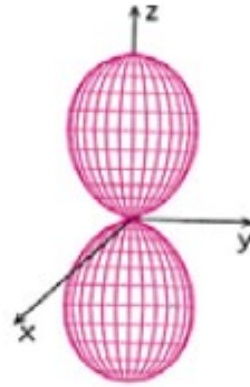
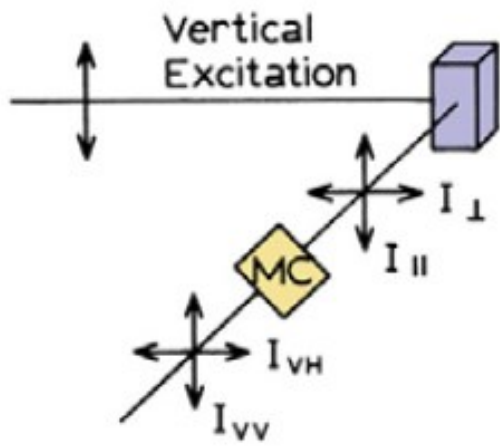
Měření anizotropie při ustálené fluorescenci

- Anizotropie - měří polarizovanou emisi
- Polarizátor je na dráze excitačního světla a dělá z něj rovinně polarizované
- Polarizátor (analyzátor) je na dráze emitovaného světla – fluorescence
- Měří se intenzita fluorescence při natočení polarizátoru vertikálně a analyzátoru vertikálně (VV), následně při natočení polarizátoru vertikálně a analyzátoru horizontálně (VH)
- Ze změřených intenzit se vypočítá hodnota anizotropie $\langle r \rangle$

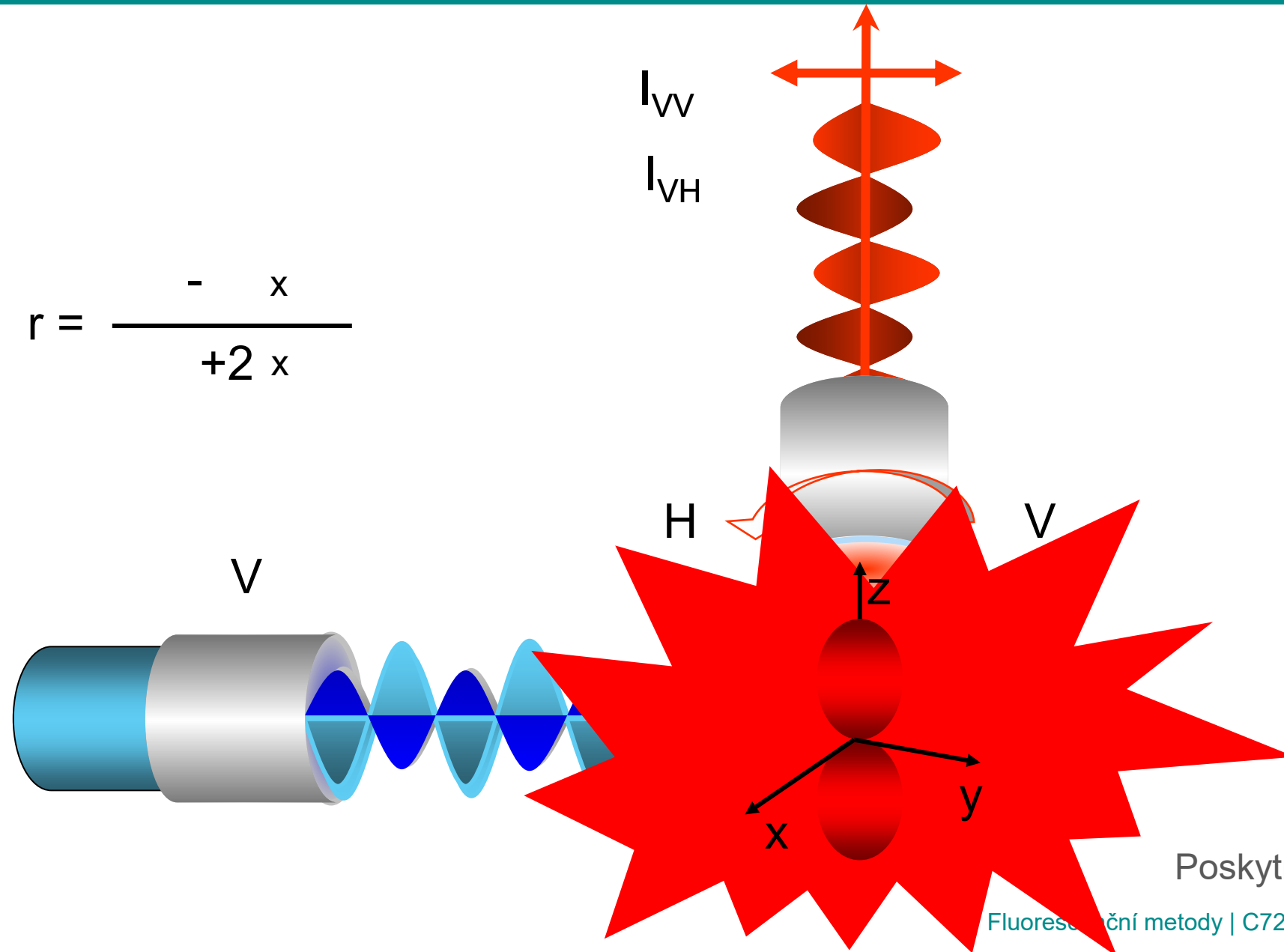
<http://www.youtube.com/watch?v=imQnWrLW2i0>

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2 \cdot I_{VH}}$$

L a T uspořádání měření



Měření anisotropie fluorescence



Kdo první využíval anizotropie světla?

Polarization of fluorescence



Polarizers have been in use for a very long time - the Vikings used a “sunstone” (now thought to have been composed of the mineral cordierite, a natural polarizing material) to observe the location of the sun on foggy or overcast days. Since scattered sunlight is highly polarized compared to light coming along the direction to the sun, the distribution of the sky’s brightness could be observed through the sunstone and hence the sun’s position could be localized and, if the time of day were known, the compass directions.

Courtesy of Prof. David Jameson

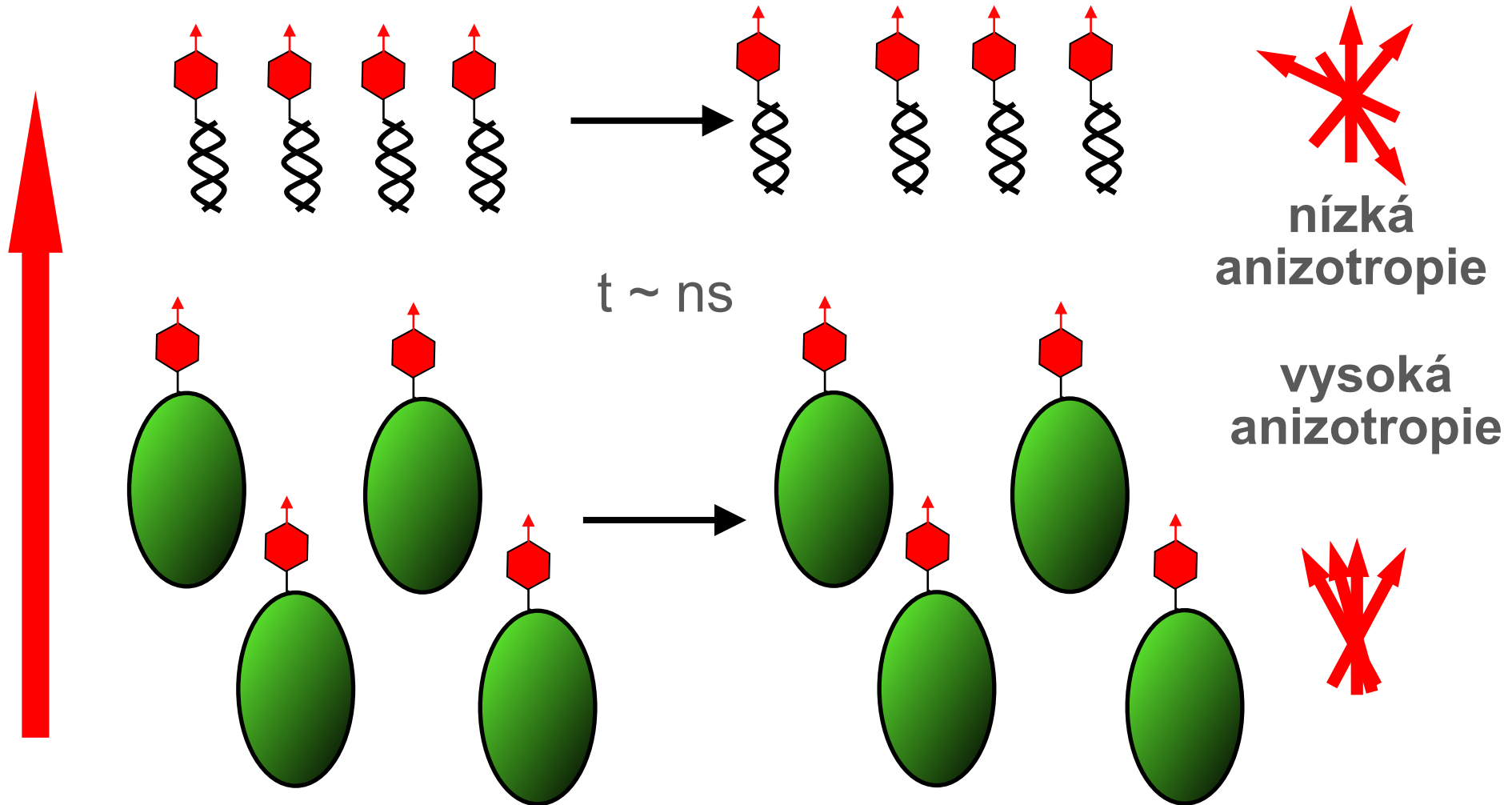
https://youtu.be/NTpWDp_3W_4?t=180 3. minuta

<http://www.nordskip.com/vfog.html>

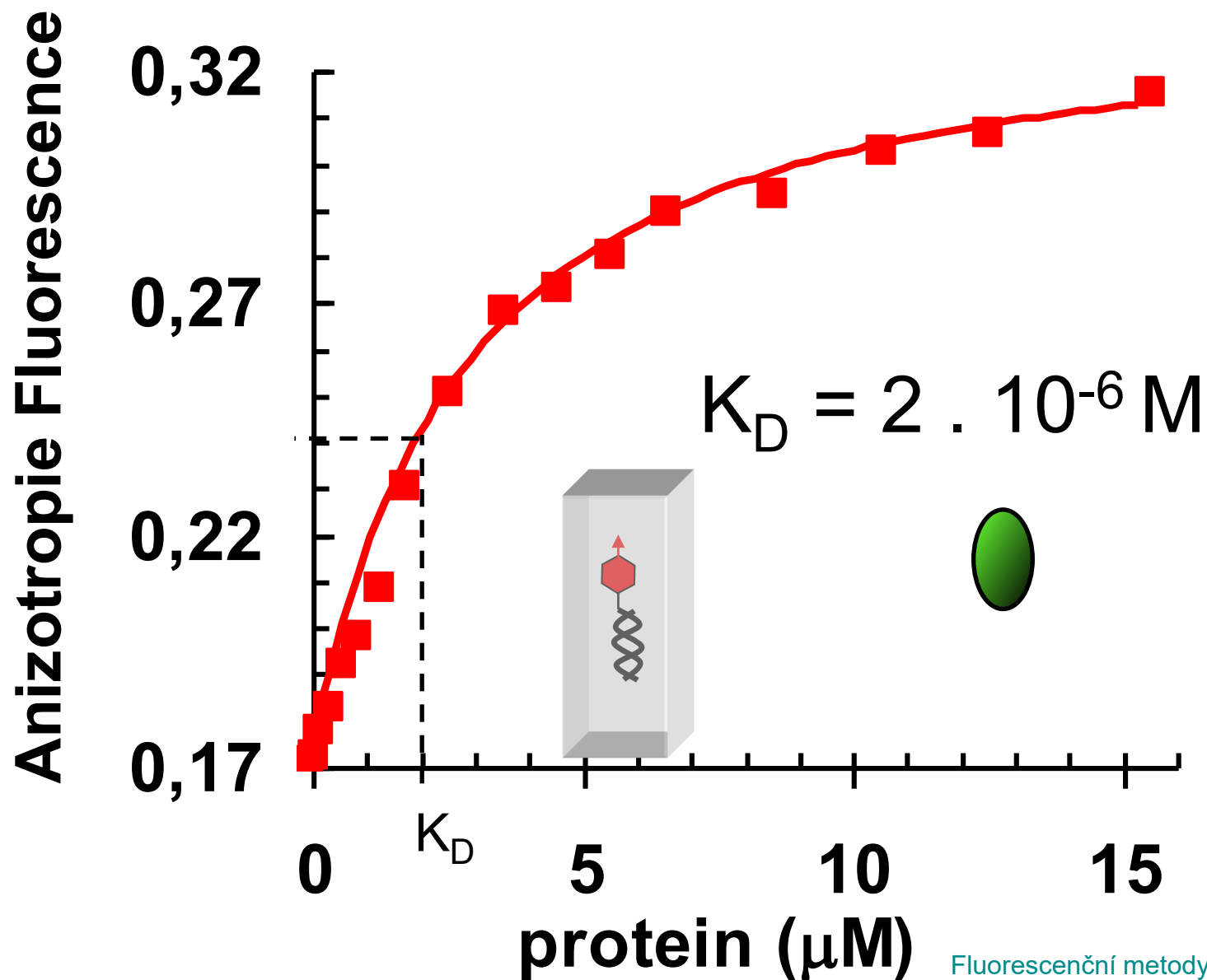
Princip sledování vazby makromolekul

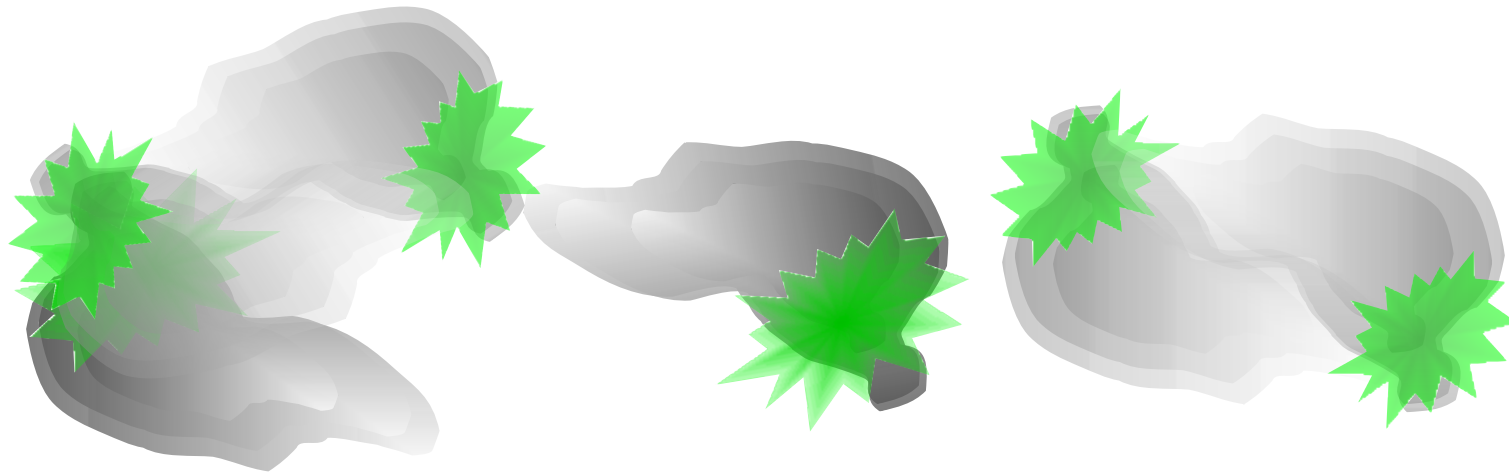
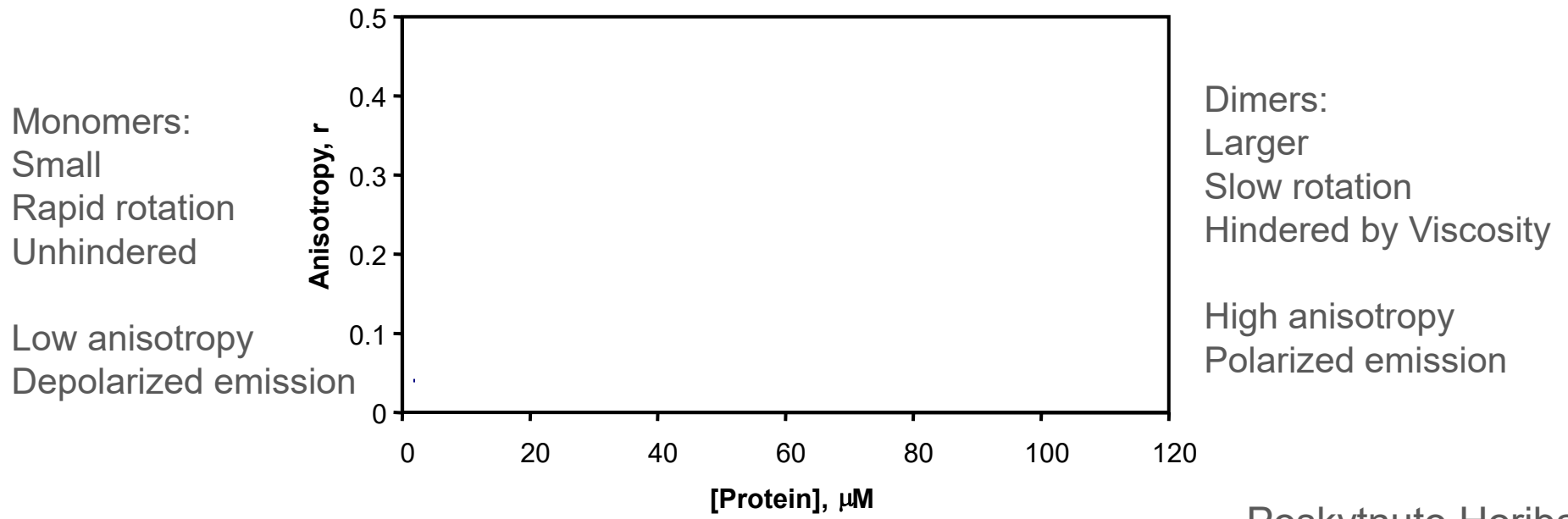
Excitace

Emise

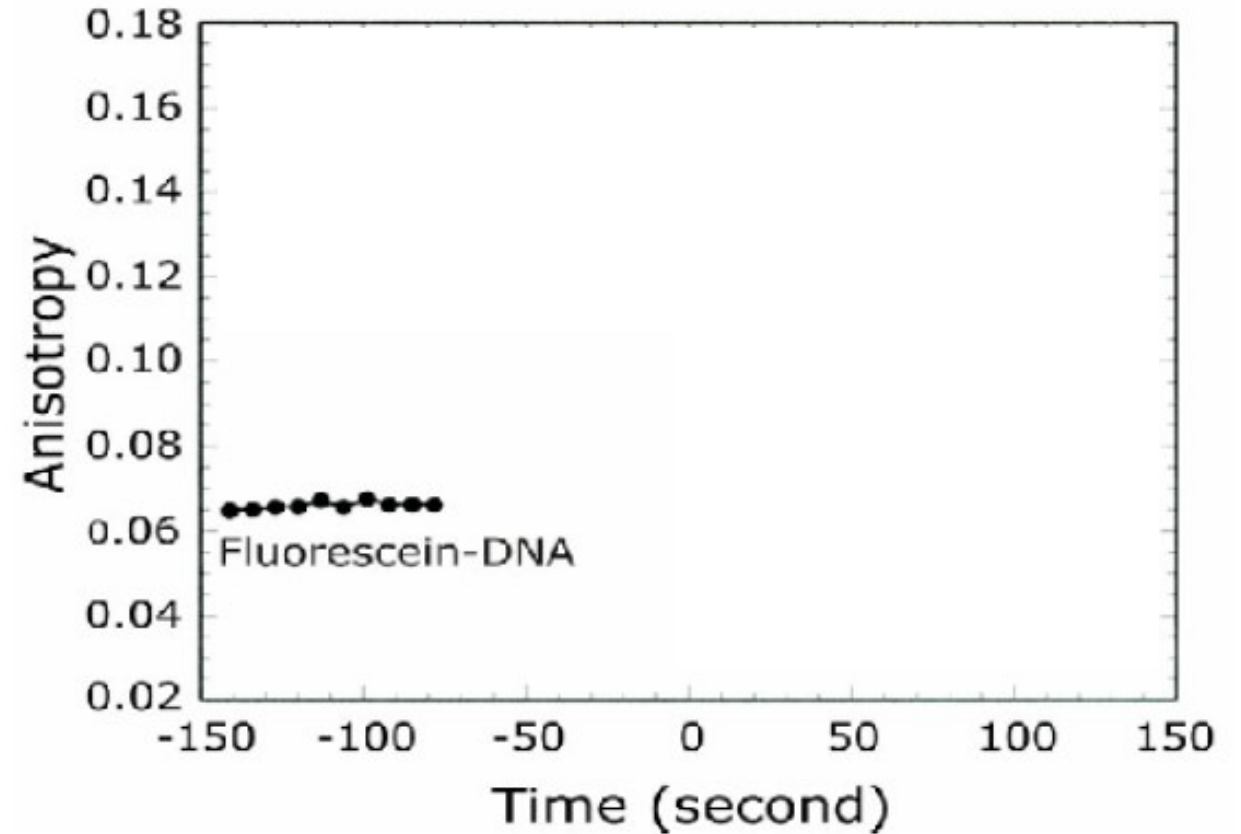


AF detekce interakce protein-DNA





Sledování rozplétání DNA



Časově rozlišená anizotropie fluorescence

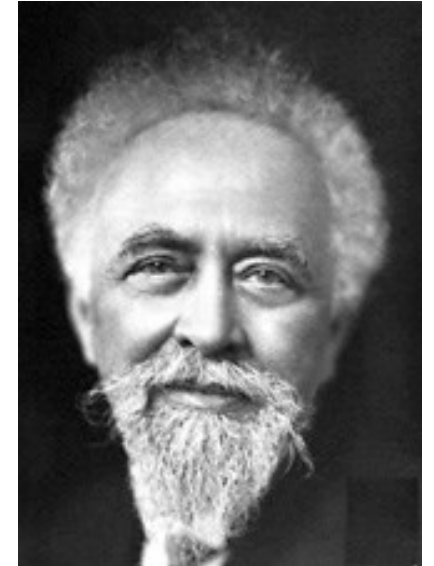
- Měření časově rozlišené anizotropie fluorescence při pulzním buzení poskytuje mnohem více informací o rotačních pohybech fluoroforu, než ustálená fluorescence
- Ustálená fluorescence poskytuje zprůměrované hodnoty měřených parametrů a pro jejich interpretaci je nutno provádět řadu měření při různých teplotách; oproti tomu metodou časově rozlišené anizotropie fluorescence získáme potřebné údaje již z měření při konstantní teplotě
- Při použití metody časově rozlišené anizotropie fluorescence se měří časově závislé paralelní složky intenzity $I_{||}(t)$ a perpendikulární $I_{\perp}(t)$. Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ přitom nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^{\circ}$

Jaké informace může dát časově rozlišená anizotropie fluorescence?

- Pokud jsou doba dohasínání fluorescence τ a rychlost molekulární reorientace srovnatelné, potom bude polarizace fluorescence modulována molekulárním pohybem a analýza časové závislosti emisní anizotropie bude poskytovat informaci o anizotropii systému, v němž se fluorofor nachází.
- Měření polarizace fluorescence poskytuje informace o molekulární orientaci a pohyblivosti a procesech, které je modulují, např.:
 1. interakce protein-DNA
 2. interakce ligand-receptor
 3. flexibilita biopolymerů
 4. fluidita membrán
 5. proteolýza
 6. kontrakce svalů
 7. aktivita proteinkináz

Perrinova rovnice pro vztah anizotropie a rotace sférických molekul

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + \left(\tau / \phi \right)}$$



r_0 anizotropie v čase 0

τ doba dohasínání fluorescence

ϕ rotační korelační čas – popisuje rotaci molekul

je to čas, za který se molekula otočí o 1 radián $\sim 57.3^\circ$

Kdy nám může dát časově rozlišená anizotropie informací o pohybu molekul?

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + (\tau/\phi)}$$

$$\tau = 10 \text{ ns}$$

$$\phi_1 = 0.1 \text{ ns}$$

$$\phi_2 = 10 \text{ ns}$$

$$\phi_3 = 1000 \text{ ns}$$

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = ?$$

0.0009
0.5
0.99

Když se pohyb molekul děje v čase srovnatelném s dobou dohasínání fluorescence

$$\phi \sim \tau$$

Použití Perrinovy rovnice pro stanovení vlastností molekul

$$\frac{\langle r \rangle}{r_0} = \frac{1}{1 + \left(\tau/\phi\right)} = 1 + 6D_r\tau = 1 + \frac{kT\tau}{V\eta}$$

r_0 - anizotropie v čase 0

τ - doba dohasínání fluorescence

ϕ - rotační korelační čas

D_r - rotační difúzní konstanta

V - objem molekuly

η - viskozita prostředí

k - Boltzmanova konstanta ($=1.38 \cdot 10^{-23} \text{JK}^{-1}$)

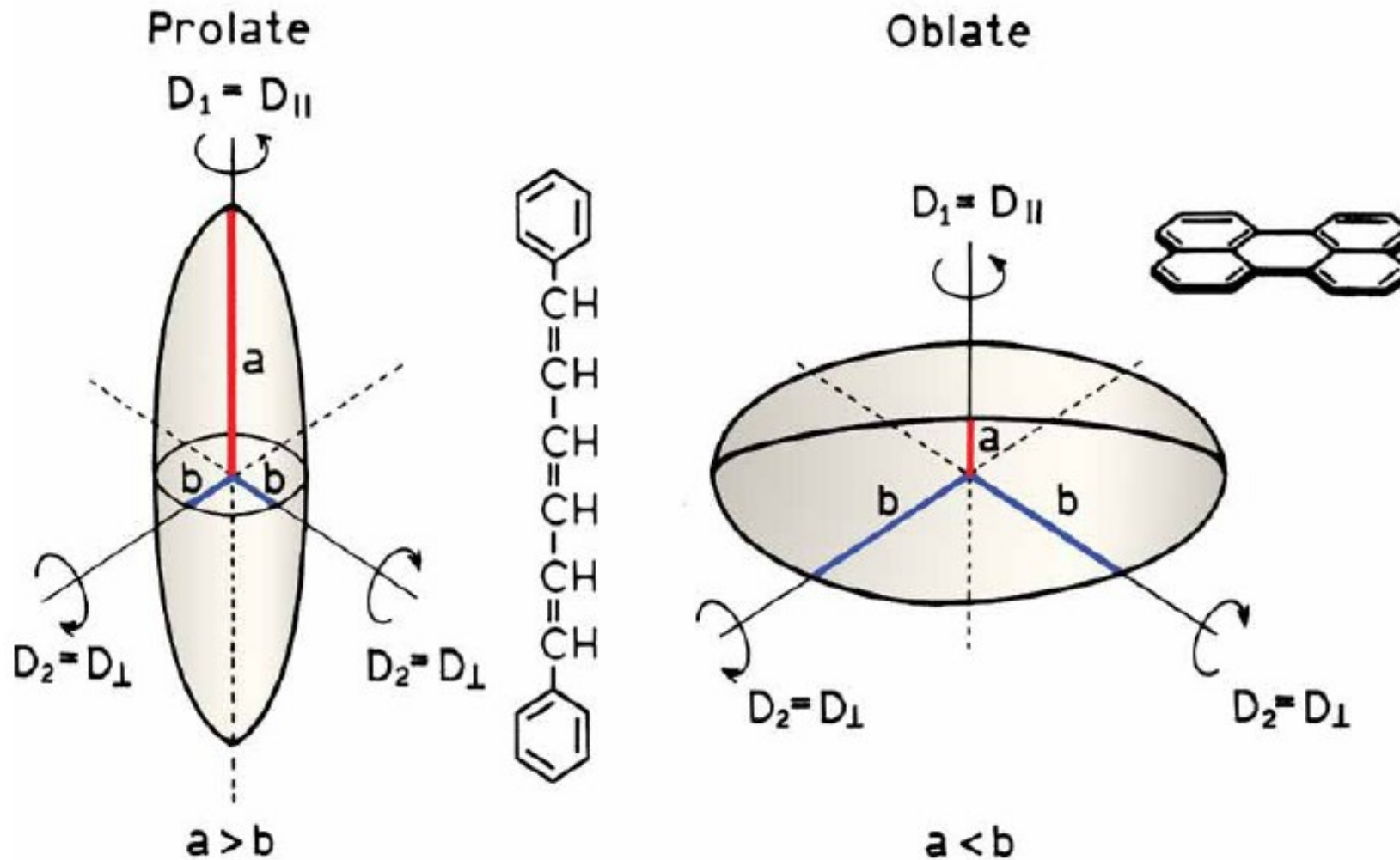
T - absolutní teplota v Kelvinech

Jak souvisí rychlost vozu a anizotropie fluorescence?



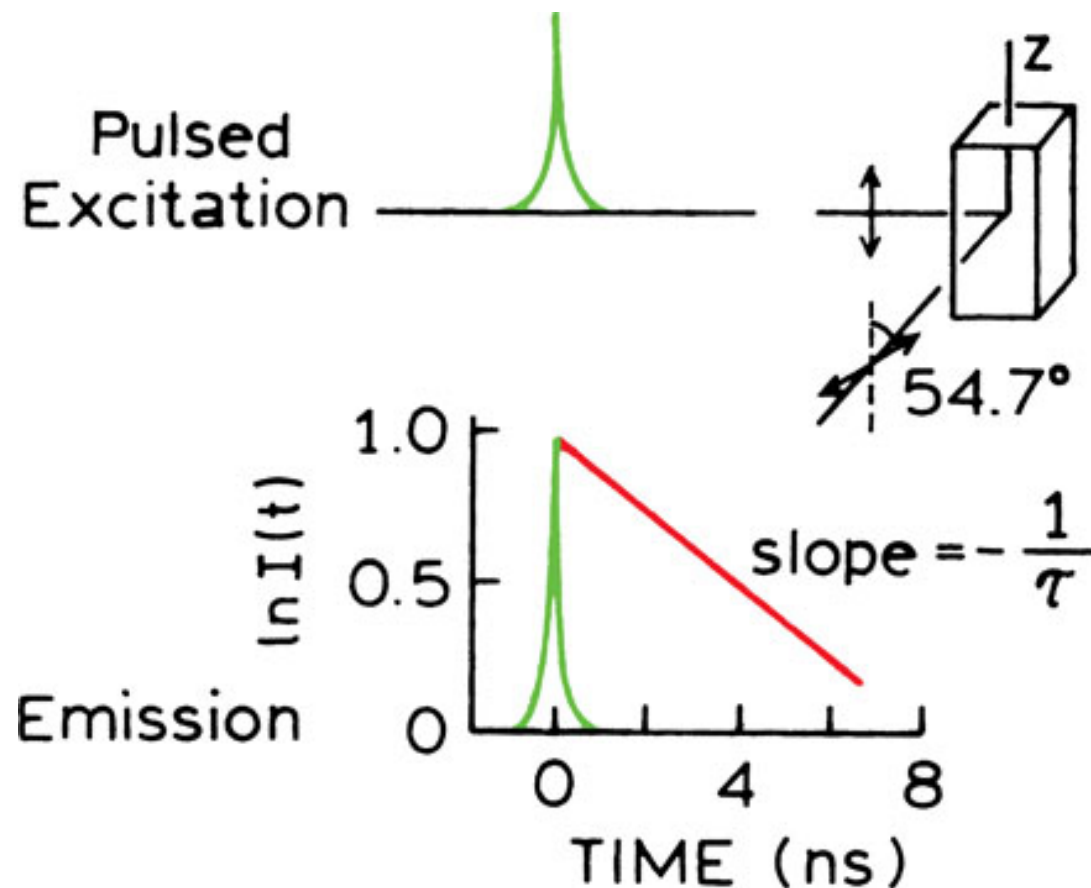
Obě jsou závislé na viskozitě prostředí.

Časová závislost je složitější pro molekuly složitějších tvarů



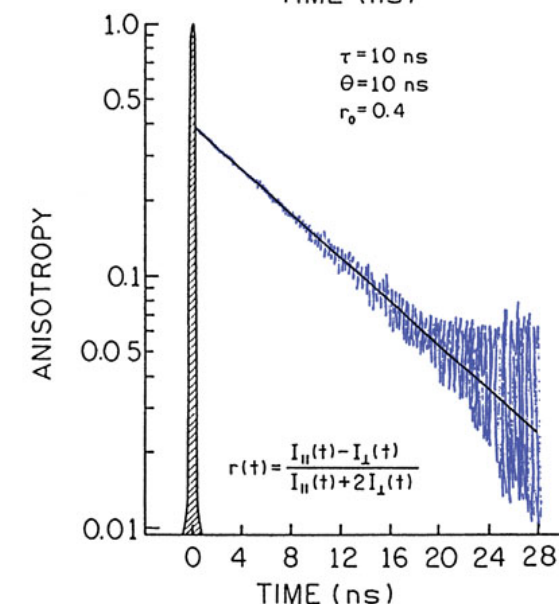
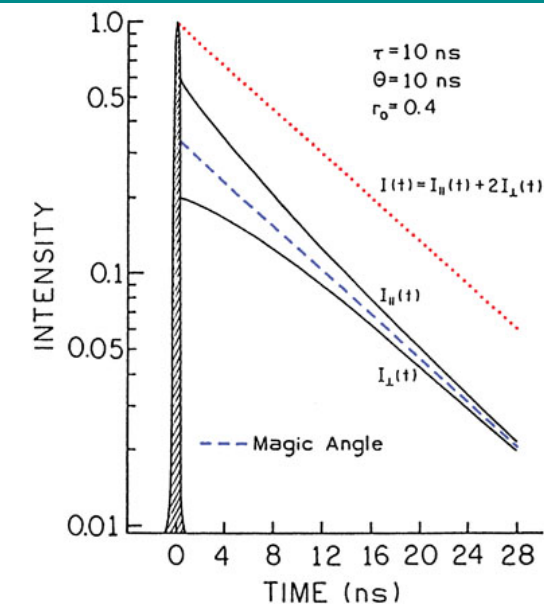
Měření časově rozlišené anizotropie fluorescence

- Vzorek je excitován krátkým pulzem s trváním mnohem kratším než doba dohasínání τ



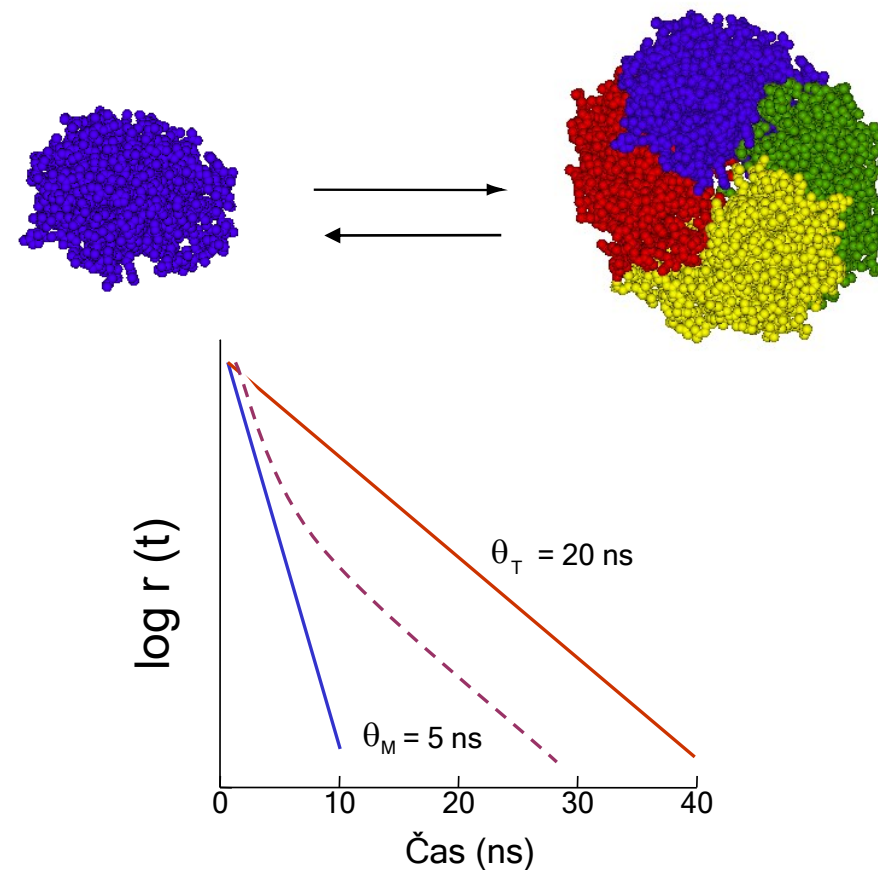
Časově rozlišená anizotropie

- Závislost anizotropie je vypočtena z časové závislosti vertikálně a horizontálně polarizované emise.
- V případě, že jsou absorpční a emisní momenty přechodu rovnoběžné, je počáteční anizotropie $r_0=0.4$
- Vertikálně polarizovaná emise klesá rychleji, protože počet molekul vyzařujících v tomto směru ubývá rotací a také dohasínáním.
- Horizontálně polarizovaná emise klesá pomaleji, protože populace molekul se zvyšuje o molekuly, které se dostávají rotací z vertikální polohy do horizontální.



Změna rotačního korelačního času při multimerizaci proteinu

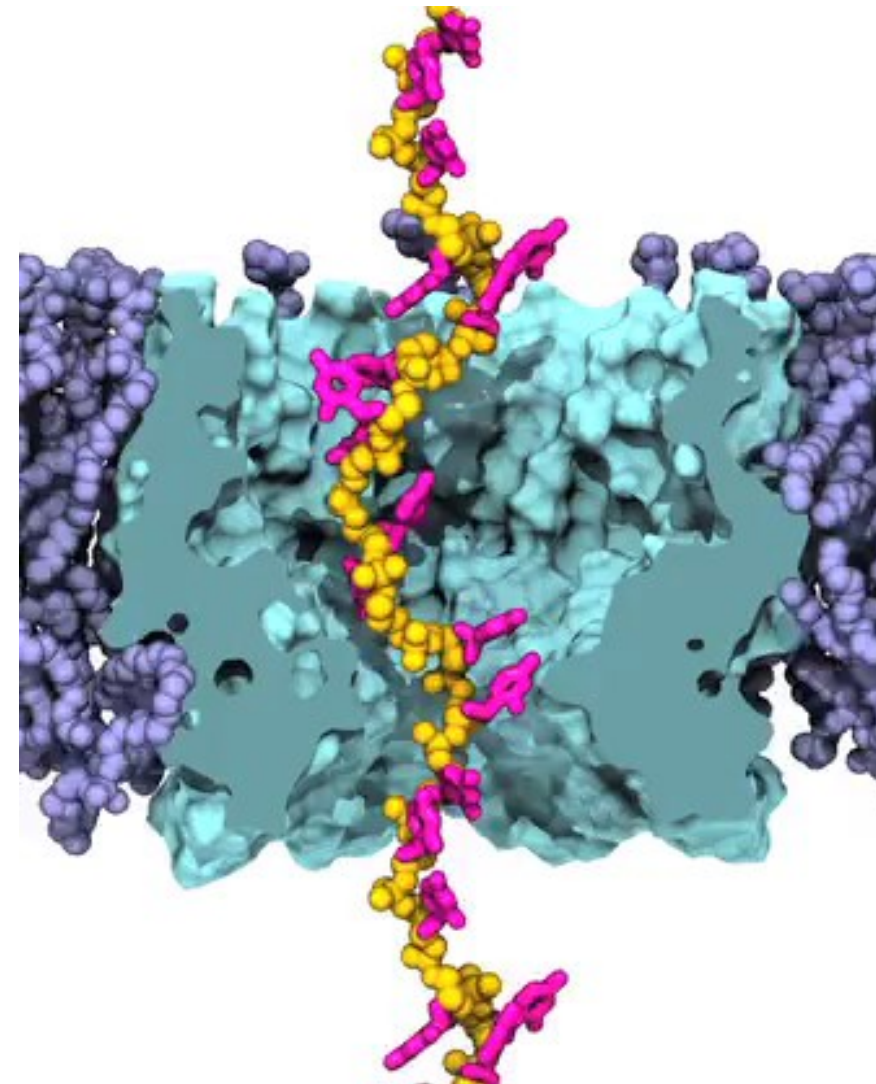
- Časové závislosti anizotropie fluorescence lze použít při sledování změny dynamiky systému molekul
- Sledování multimerizace fosfofruktokinázy



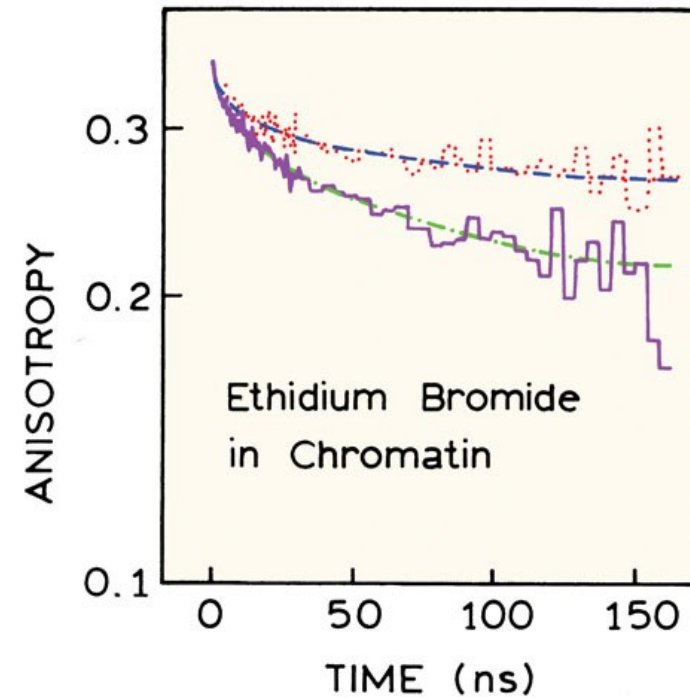
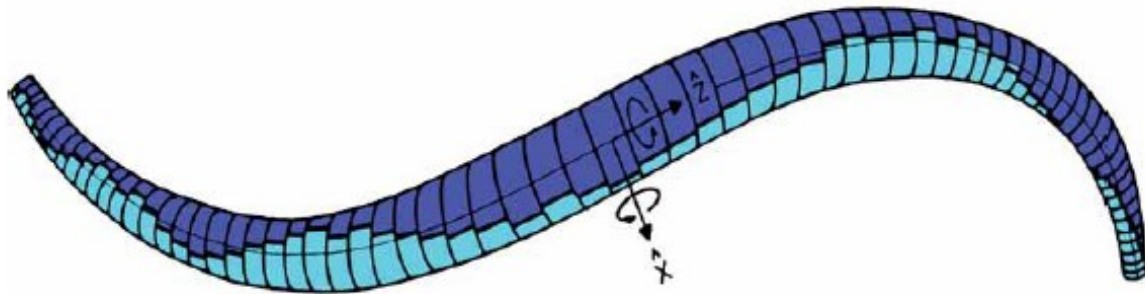
Flexibilita DNA

- Jak závisí ohebnost DNA na okolních podmínkách?
- Jaký je nejmenší průměr póru, kterým může DNA projít?

<http://bionano.physics.illinois.edu/node/26>

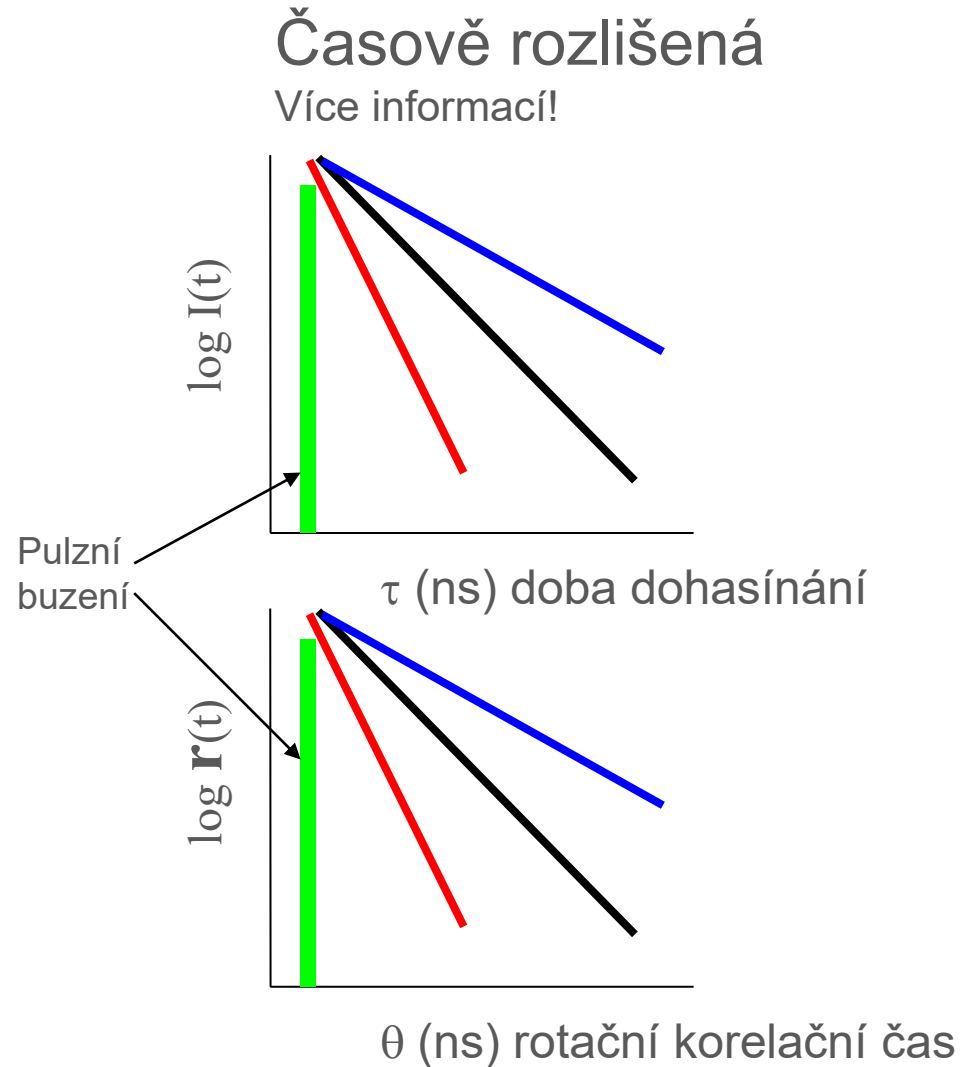
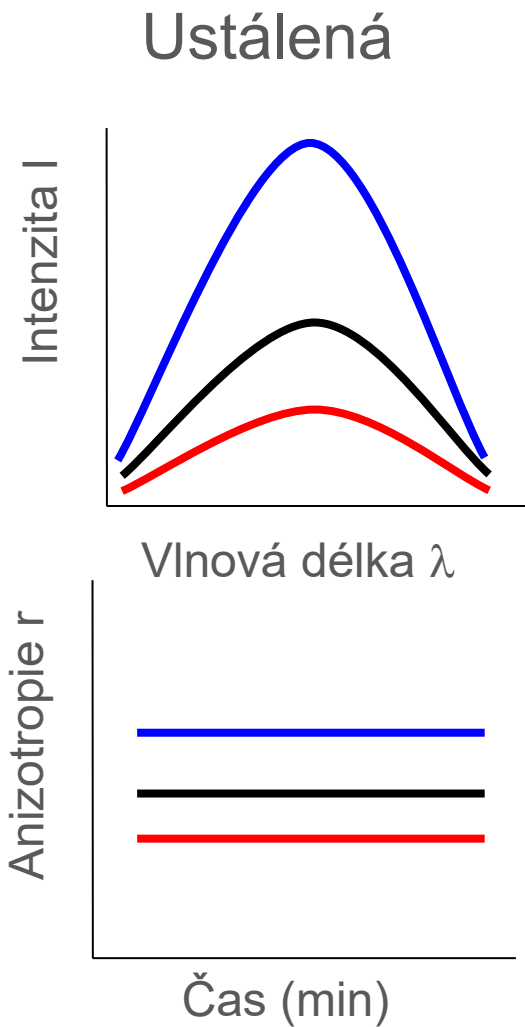


Sledování pohybu DNA po interkalaci EtBr



- Po zvýšení iontové síly (čárkovaně) dochází ke zpevnění struktury DNA
- První část křivky dohasínání fluorescence popisuje torzní pohyb DNA
- Pozdější část křivky popisuje ohyb DNA struktur

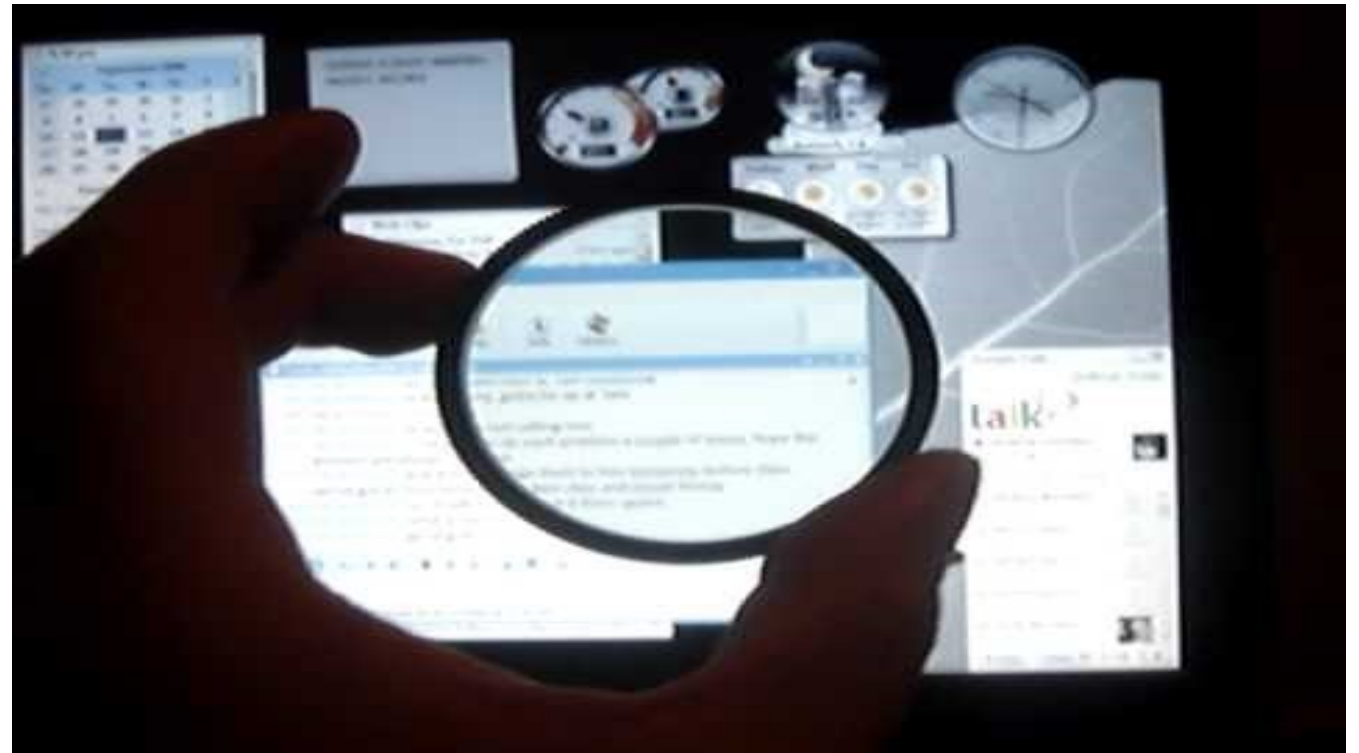
Srovnání ustálené a časově rozlišené intenzity a anizotropie fluorescence



- 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.

Anizotropie kolem nás: monitor

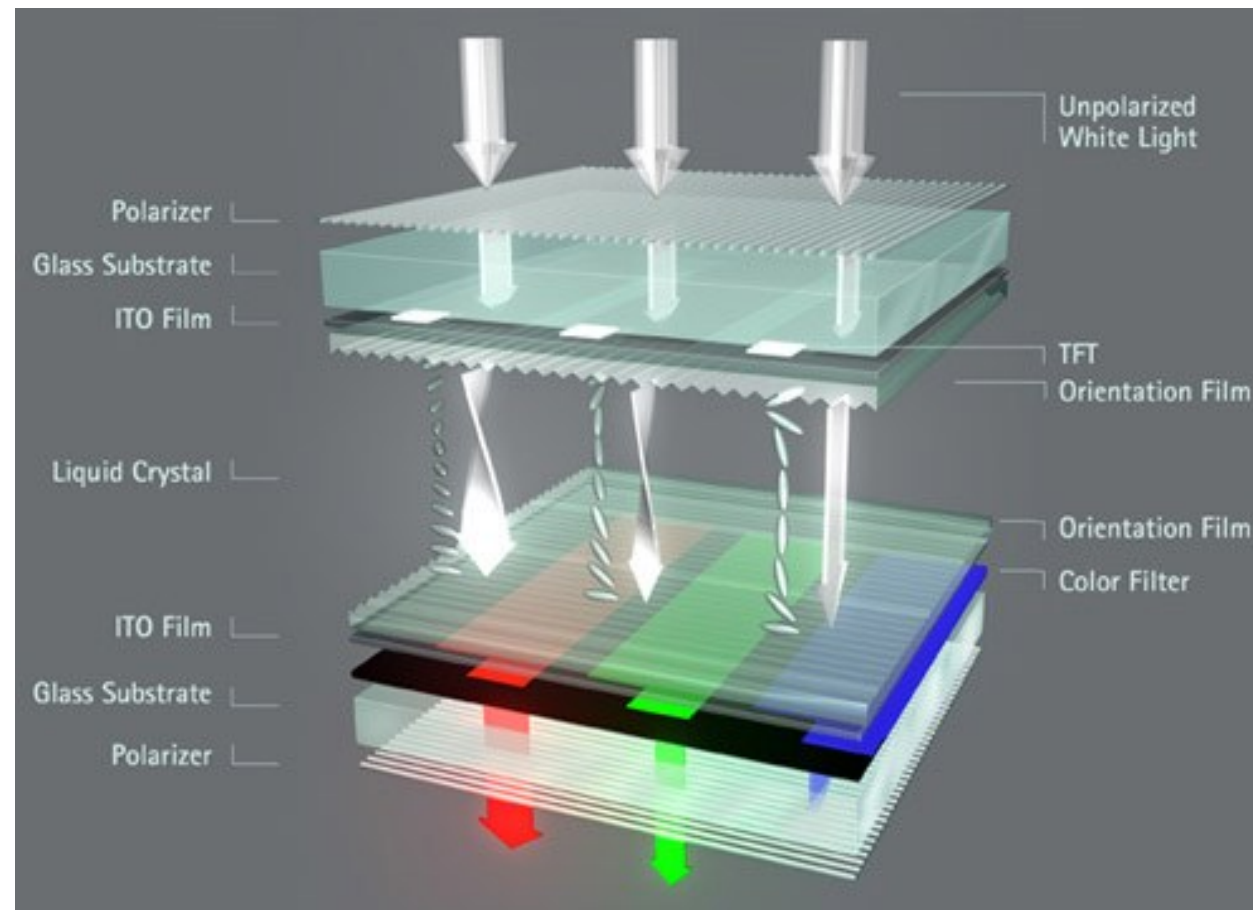
- Anizotropie se projevuje u LCD monitoru
- Co je příčinou?



<http://www.youtube.com/watch?v=imQnWrLW2i0>

Princip LCD

- LCD liquid crystal display



Příště: Absorpční spektroskopie při analýze biomolekul v praxi

