


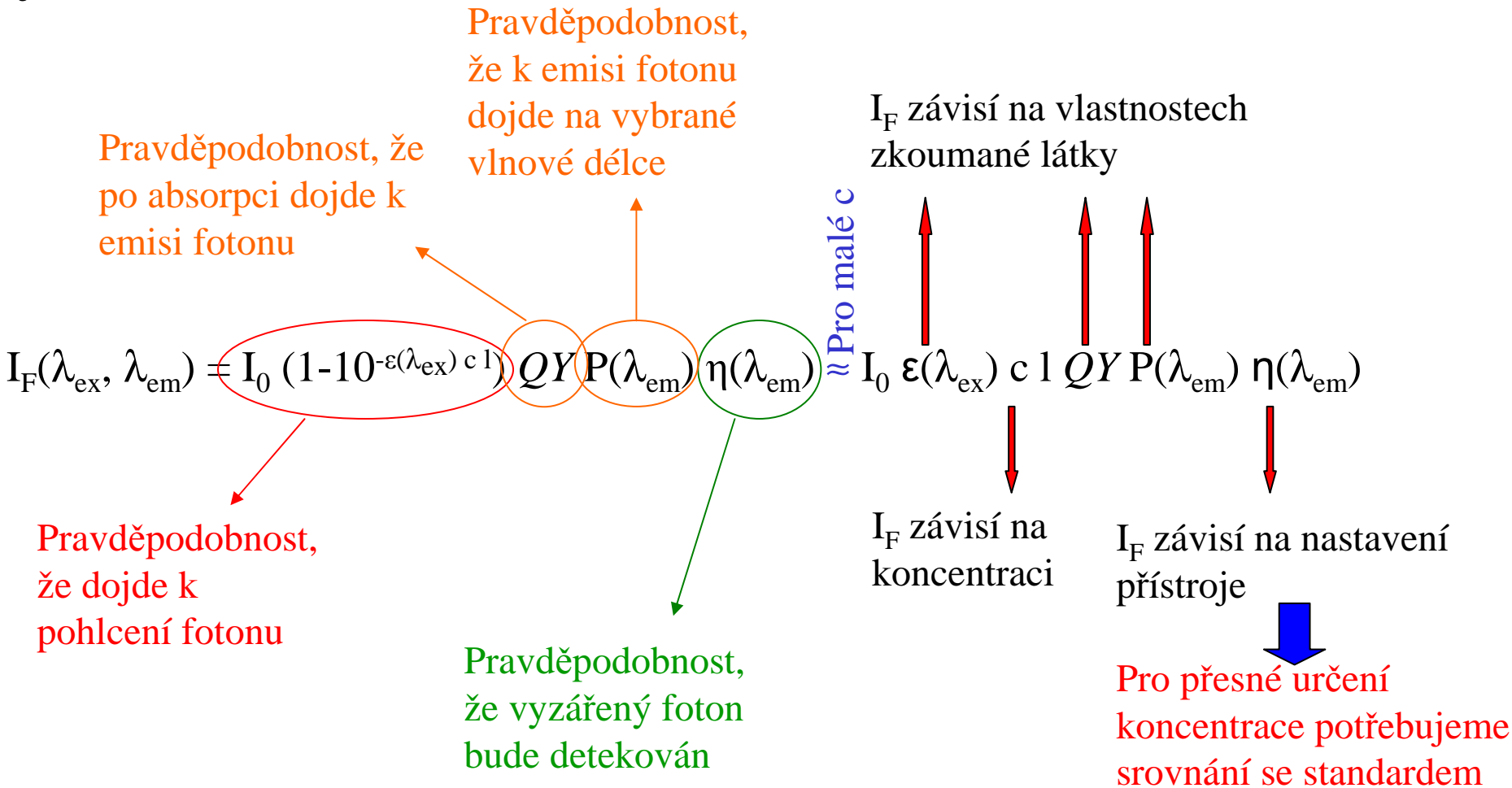
7. Měření fluorescence při excitaci kontinuálním světlem („steady-state“)



měření

Excitujeme kontinuálním světlem, měříme intenzitu emise (počet emitovaných fotonů)

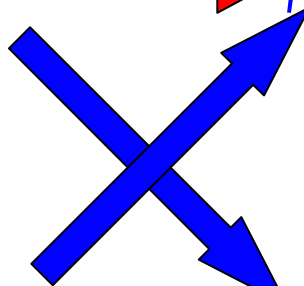
Obvykle nedetekujeme všechny fotony → intenzita se většinou udává v  jednotkách



Fluorescenční parametr, který se mění v závislosti na zkoumané vlastnosti systému



Intenzita



Excitační spektrum
Emisní spektrum



Určení např. vazebné konstanty z posunu spektra je v principu také možné, ale vyžaduje znalost kvantového výtěžku volné i navázané formy nebo kalibraci pomocí modelového systému

Optimální použití

Měřené veličiny jsou úměrné množství fluoroforu

Charakteristiky systému, které nezávisí na množství fluoroforu

Příklady

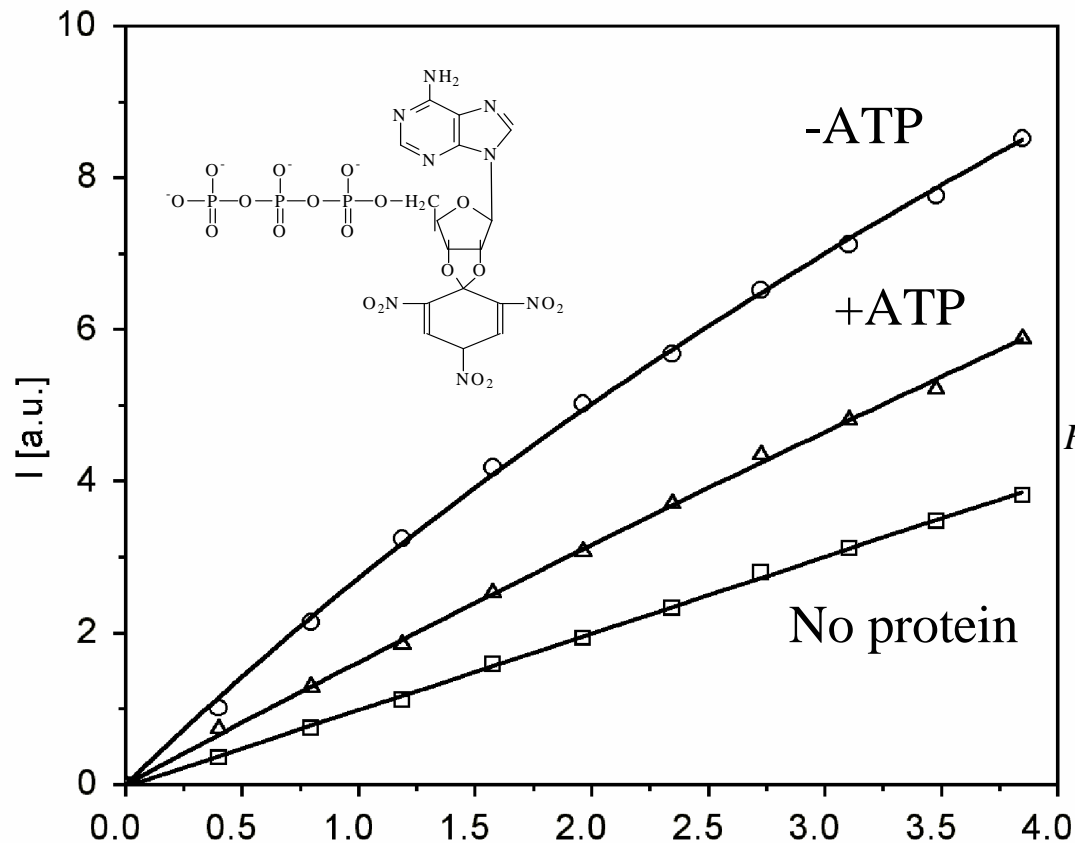
Stanovení vazebné konstanty pro interakci dvou molekul
Sledování kinetiky chemických reakcí

pH
membránový potenciál
polarita okolí
...

Pokud se posune spektrum, je vždy možné nalézt vlnovou délku, na které dochází ke změně intenzity, měření ale bývá náchylnější k artefaktům. Pomoci může kalibrace v isobestickém (excitace) nebo isoemisním (emise) bodě.

při konstantních vlnových délkách excitace i emise

Titrační experimenty



Fluorescenční sonda TNP-ATP je citlivá na polaritu svého okolí - po navázání do hydrofobní vazebné kapsy v molekule proteinu se její kvantový výtěžek zvýší

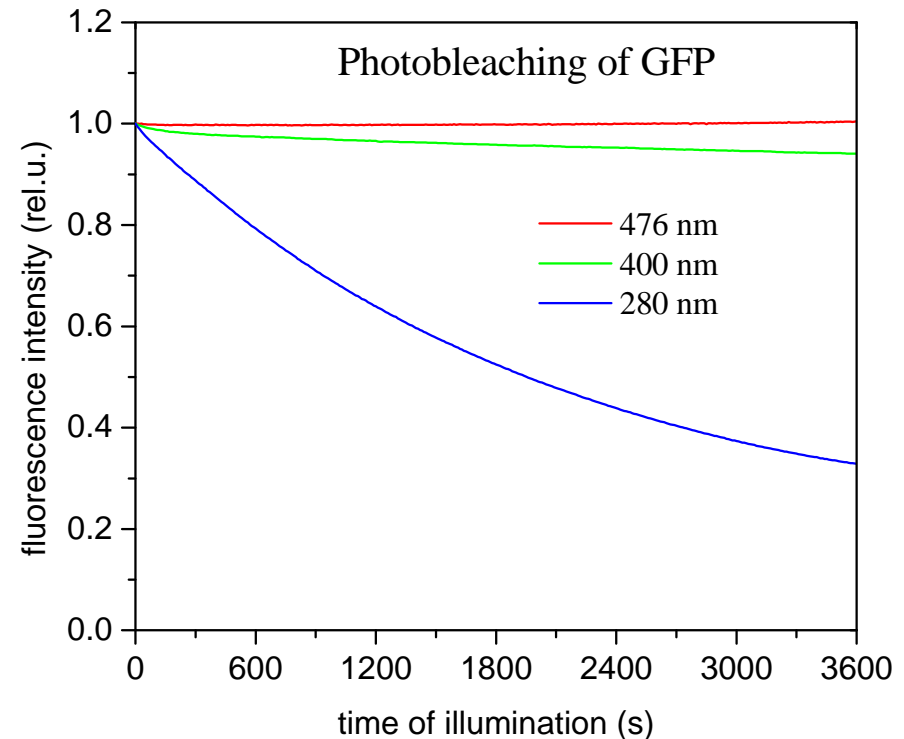
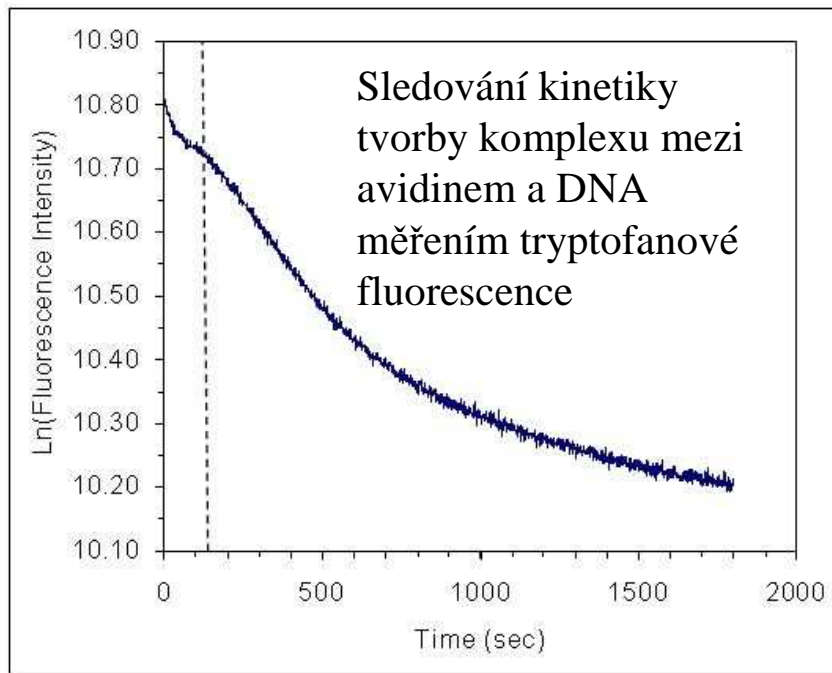
$$F^* = [P]_T + \frac{\gamma-1}{2} \left([P]_T + [E]_T + K_P - \sqrt{([P]_T + [E]_T + K_P)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right)$$

experiment - v přítomnosti ATP jsou některá vazebná místa obsazena a nemůže se do nich navázat TNP-ATP

$$F^* = [P]_T + \frac{1}{2}(\gamma-1) \left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} - \sqrt{\left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} \right)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right) \quad (\text{pro } K_A \gg K_P)$$

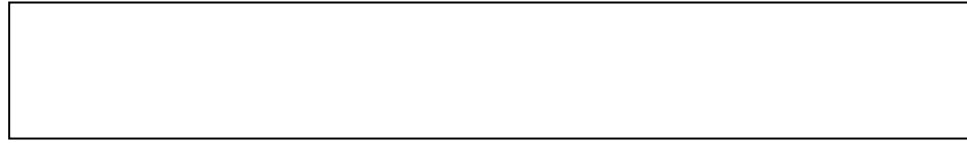
Měření intenzity při konstantních vlnových délkách excitace i emise

Měření

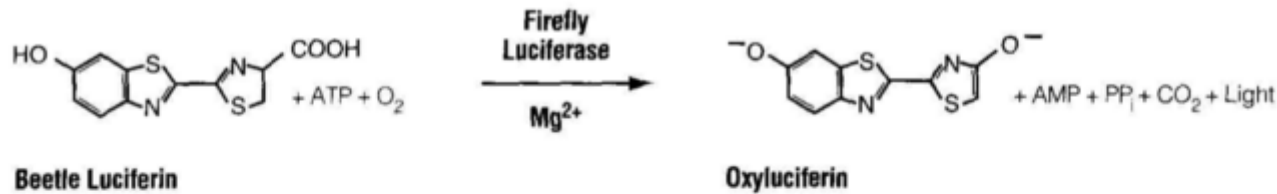


Pohodlné je sledování kinetiky na škále sekund (a delší)

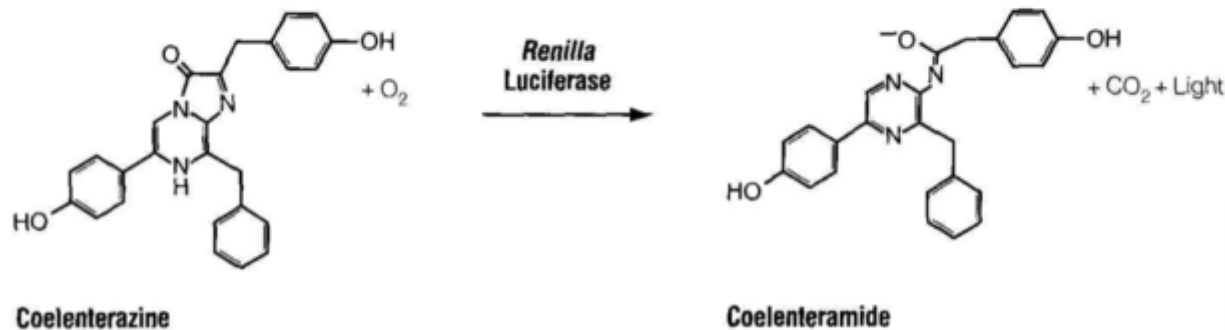
Sledování kratších časů vyžaduje náročnější vybavení pro nastartování experimentu



Reakce katalyzovaná enzymem luciferázou

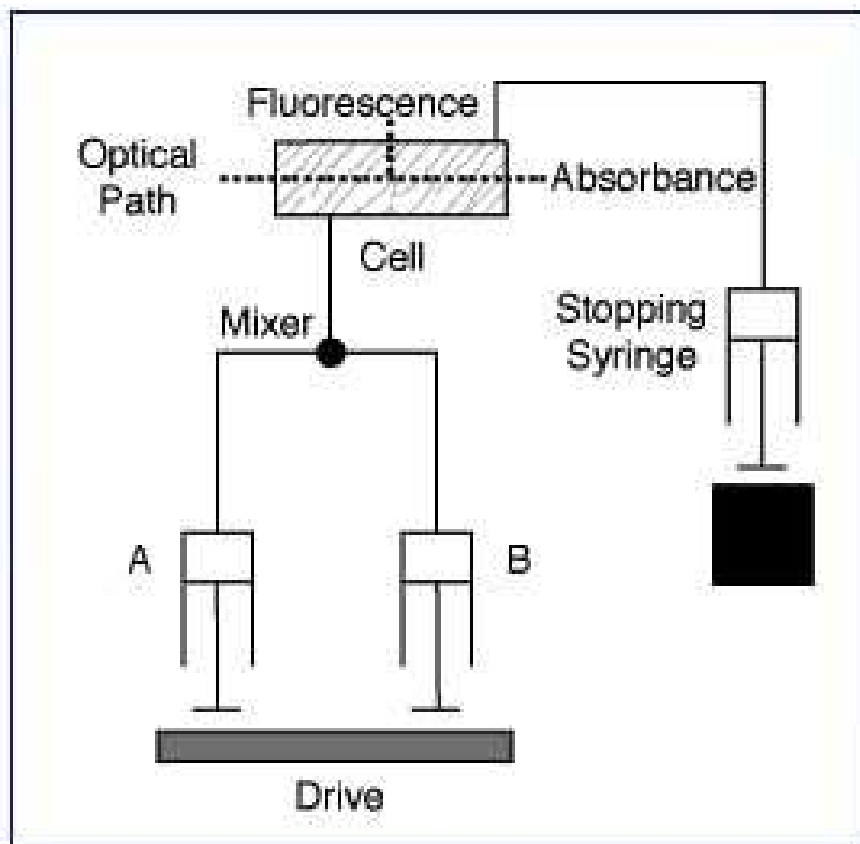


Stanovení ATP
nebo O₂



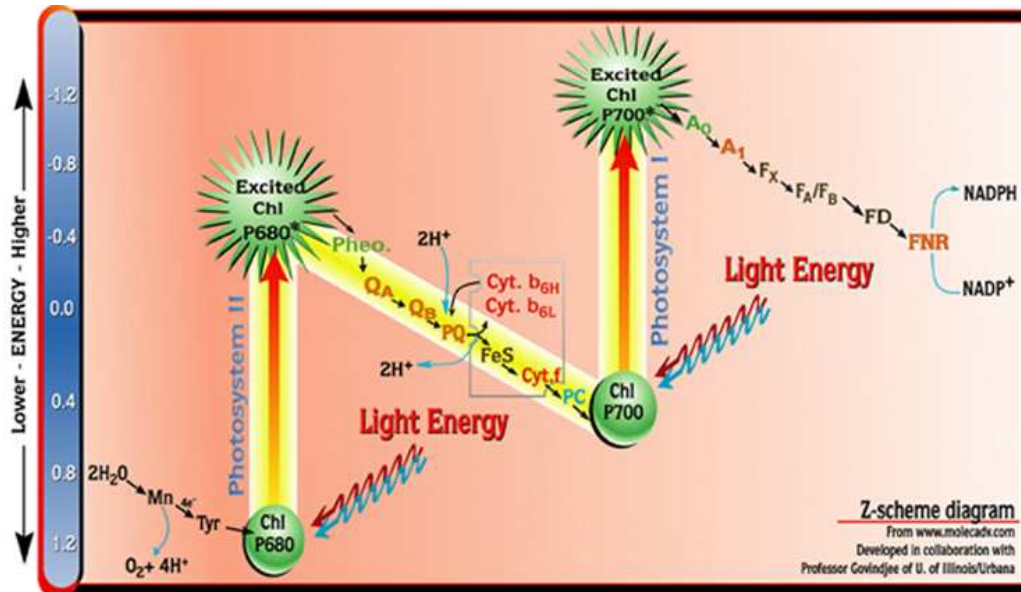
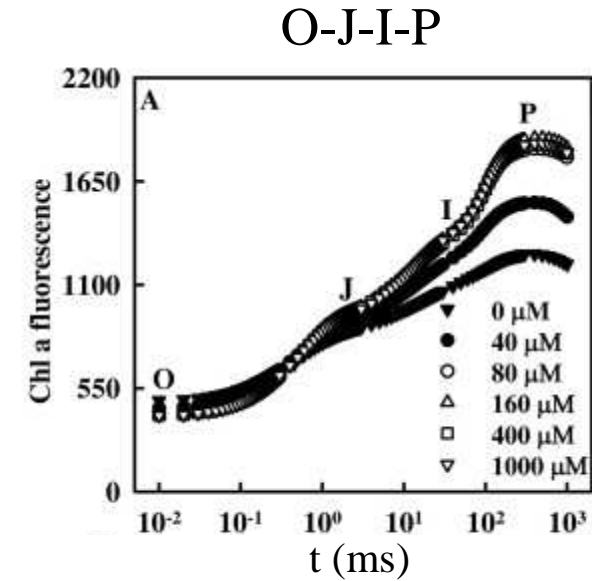
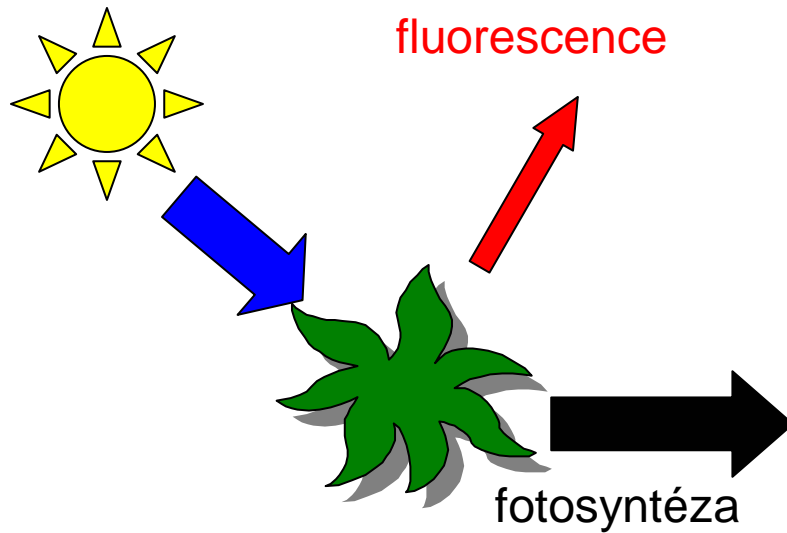
Jednodušší aparatura
(není potřeba zdroj
světla, není nutné
odfiltrovat excitující
světlo)

časová škála ms



Malé množství dvou roztoků je před měřením pomocí stlačeného vzduchu vstříknuto do komůrky, kde dojde k jejich rychlému promíchání, čímž je nastartována měřená reakce.

Nárůst chlorofylové fluorescence



Excitační a emisní spektra

Závislost intenzity na vlnové délce excitace – **spektrum** (obvykle stejné jako absorpční spektrum)

Závislost na vlnové délce emise – **spektrum**

Synchronní spektrum

spektrum (3D, EEM)

Charakteristiky spektra – I, λ_{\max} (ν_{\max}), FWHM

Vlnové délky λ či vlnočty ν ?

Počet fotonů detekovaných na vlnové délce λ (vlnočtu ν) je b úměrný šířce detekovaného spektrálního pásu (bandpass)

$\Delta\lambda$ (nebo $\Delta\nu$)

$$F_{\lambda}(\lambda_F)\Delta\lambda_F = F_{\nu}(\nu_F)\Delta\nu_F$$

$\Delta\nu_F$ musí být kladné a je tedy definováno jako $1/\lambda_F - 1/(\lambda_F + \Delta\lambda_F)$.

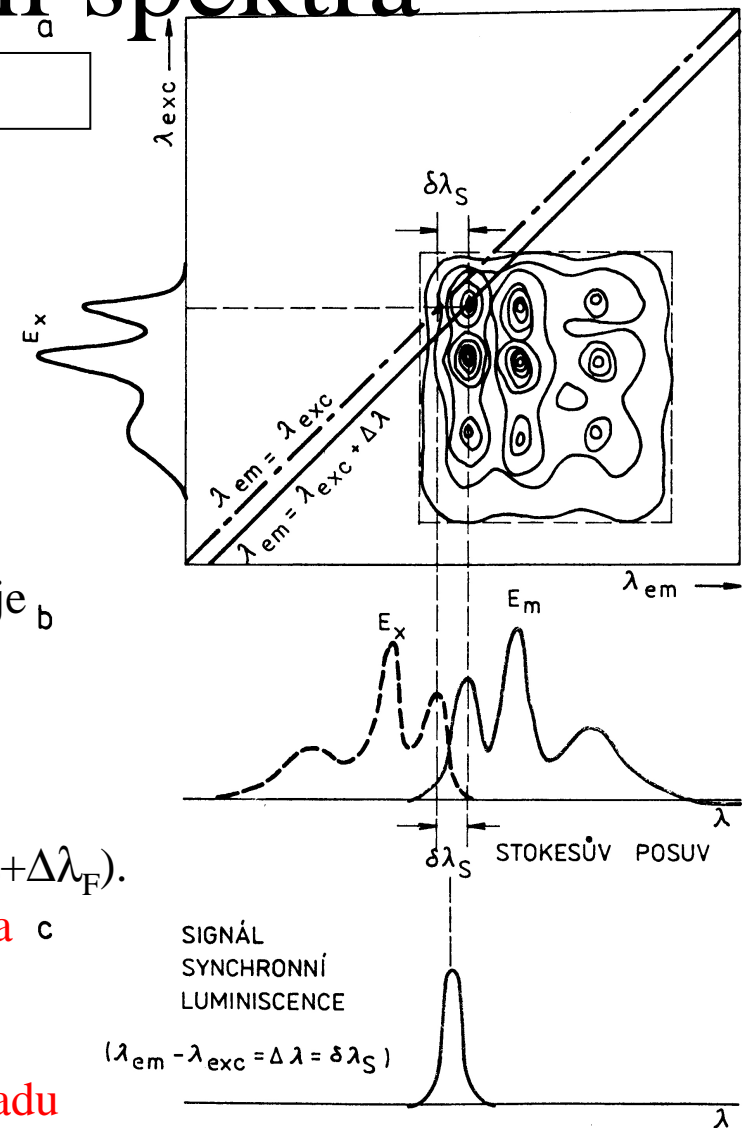
Potom dostáváme

$$F_{\lambda}(\lambda_F)\lambda_F(\lambda_F + \Delta\lambda_F) = F_{\nu}(\nu_F)$$

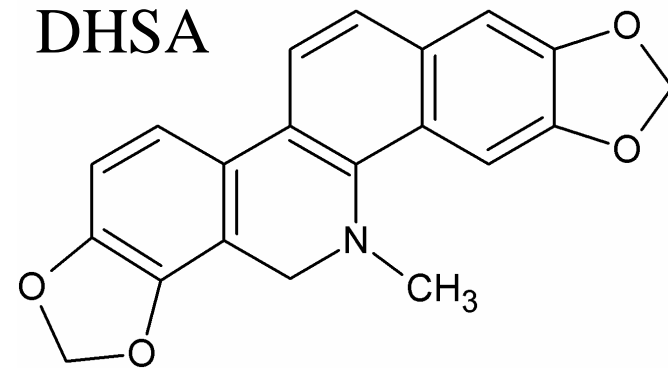
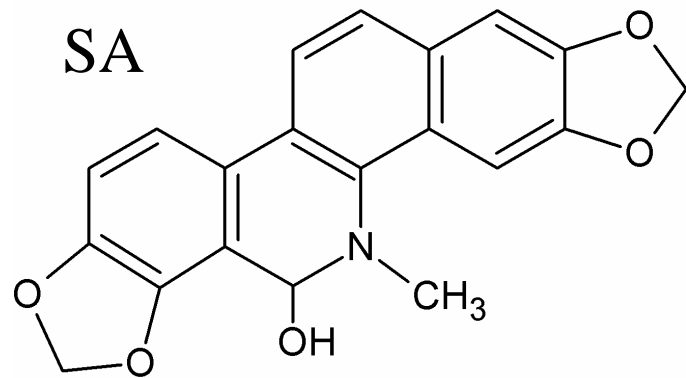
Protože $\Delta\lambda_F \ll \lambda_F$, můžeme psát

$$F_{\lambda}(\lambda_F)\lambda_F^2 = F_{\nu}(\nu_F)$$

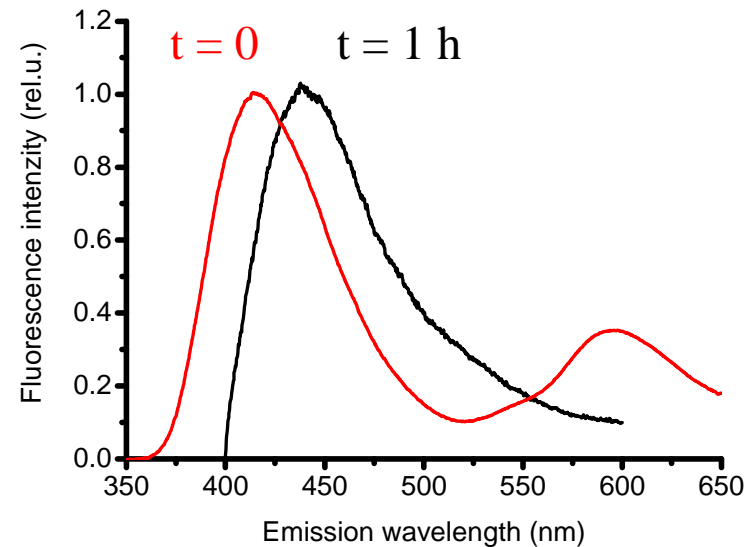
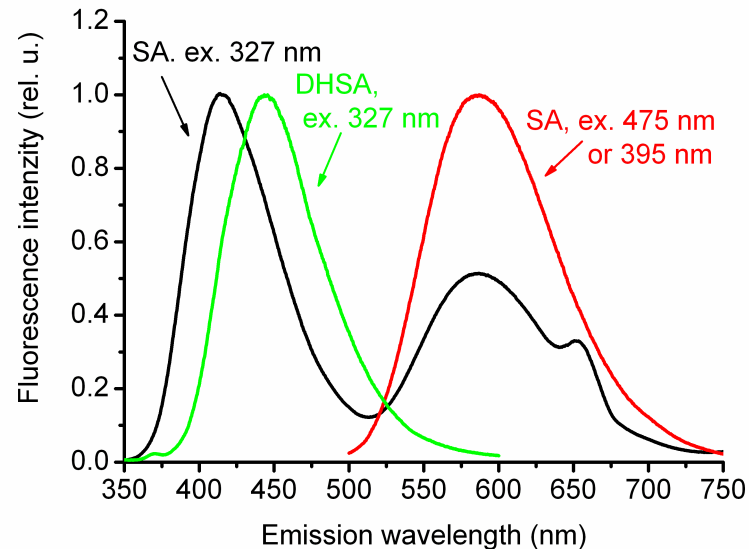
Při měření spekter za použití mřížkového monochromátoru je konstantní $\Delta\lambda$, pro řadu teoretických výpočtů je vhodnější škála vlnočtů, neboť $\nu \sim E$



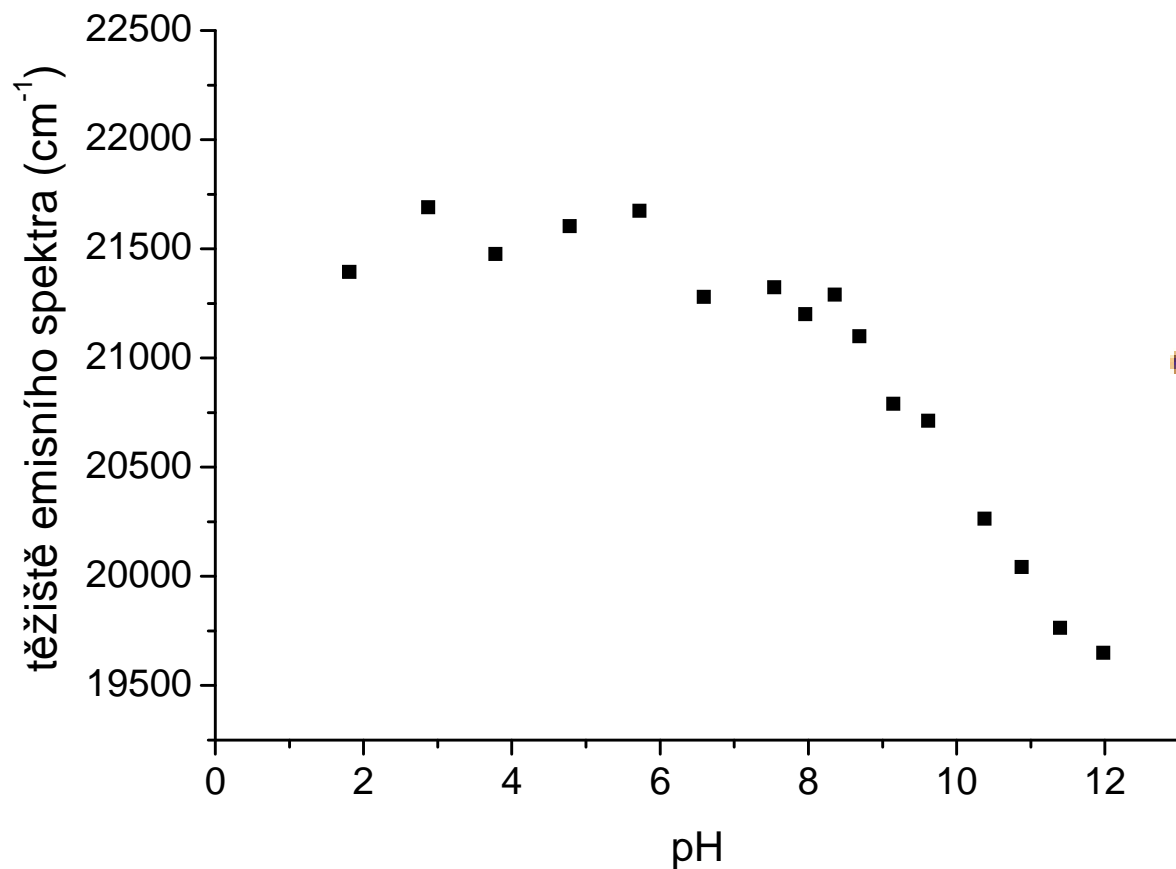
Excitační a emisní spektra



Sledování metabolizace SA na DHSA jaterními buňkami



Určení acidobazické rovnovážné konstanty pK_A z posunů spektra



$$c_B = \frac{c_{gA} \frac{QY_A}{QY_B} 10^{pK_A - pH} + c_{gB}}{\frac{QY_A}{QY_B} 10^{pK_A - pH} + 1}$$

Stanovení kvantového výtěžku

$$QY = \frac{N_{em}}{N_A}$$

$$I_F(\lambda_{ex}, \lambda_{em}) = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{ex}) c l}) QY P(\lambda_{em}) \eta(\lambda_{em}) \approx I_0 \varepsilon(\lambda_{ex}) c l QY P(\lambda_{em}) \eta(\lambda_{em})$$

Pro určení kvantového výtěžku musíme proměřit celé emisní spektrum

Jelikož nedetekujeme všechny fotony (η), musíme provést o známém QY

$$QY = QY_s \frac{I}{I_s} \frac{A_s}{A} \frac{n^2}{n_s^2}$$

I ... integrální intenzita

A ... absorbance

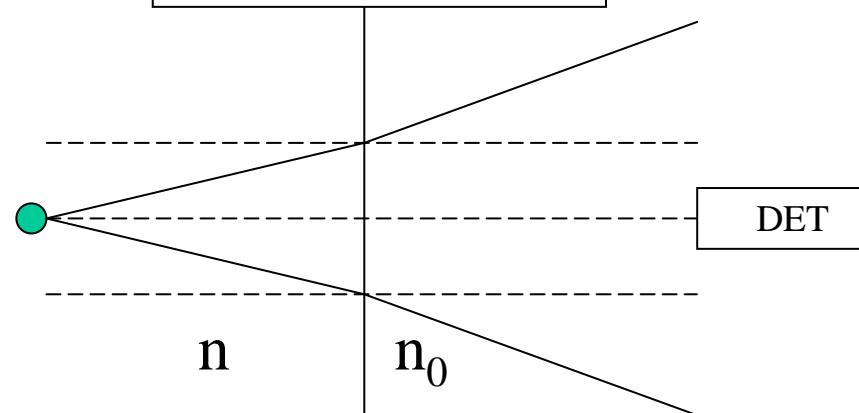
n ... index lomu rozpouštědla

$QY < 1$, pro fosforescenci $QY \ll 1$

Měření pomocí srovnání se standardem

(integrace přes celé emisní spektrum !)

nebo pomocí určení příspěvku nezářivých přechodů v mikrokolorimetru.

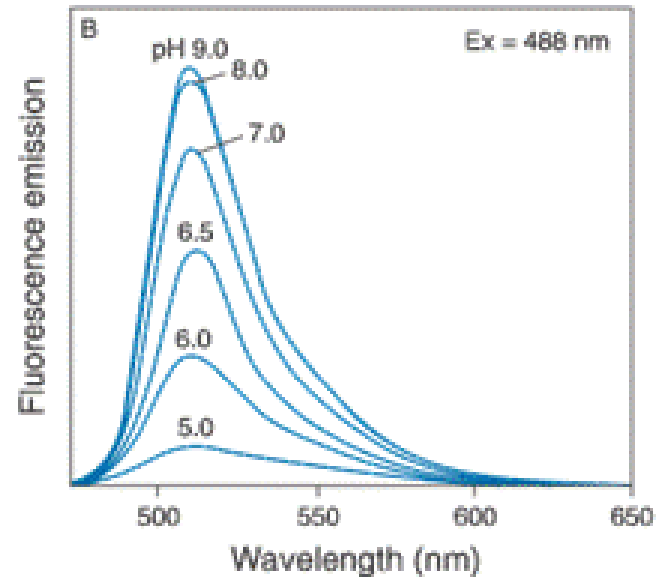
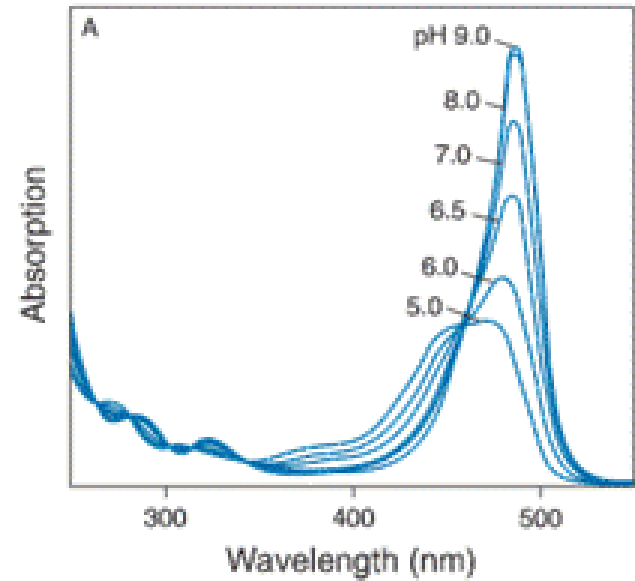
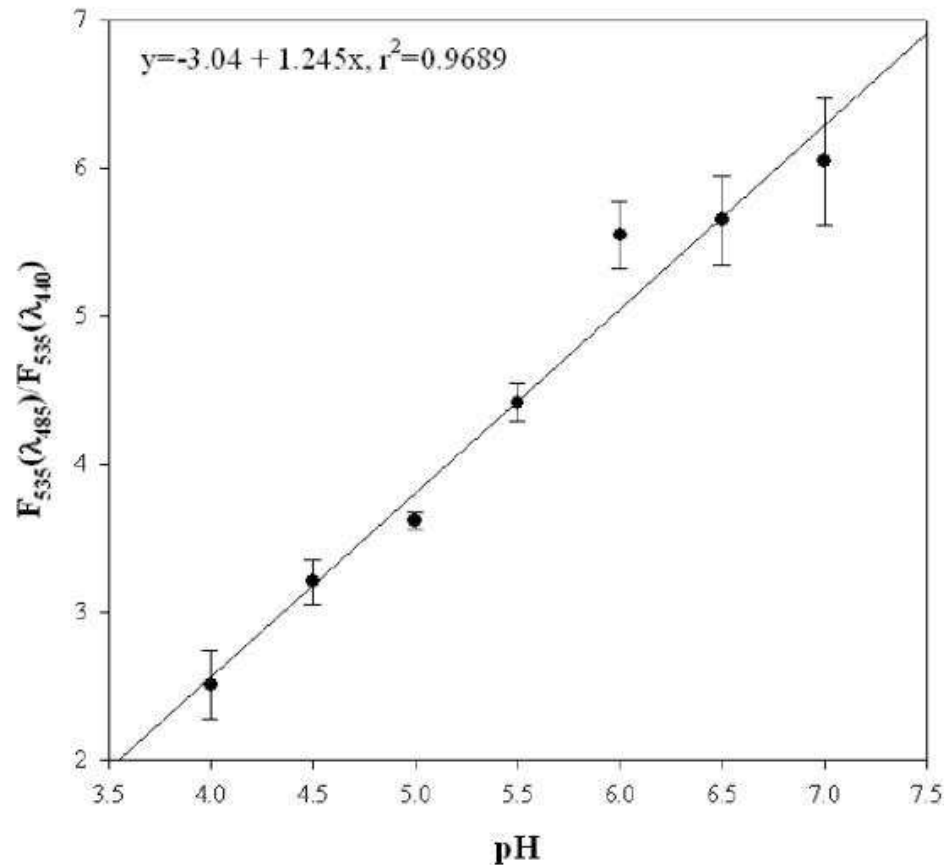


Intenzita z bodového zdroje v prostředí o indexu lomu n pozorovaná v prostředí o indexu lomu n_0 je modifikovaná faktorem $(n/n_0)^2$.

měření

Poměr intenzit fluorescence na dvou vlnových délkách nese informace o tvaru spektra, ale nevyžaduje změření celého spektra

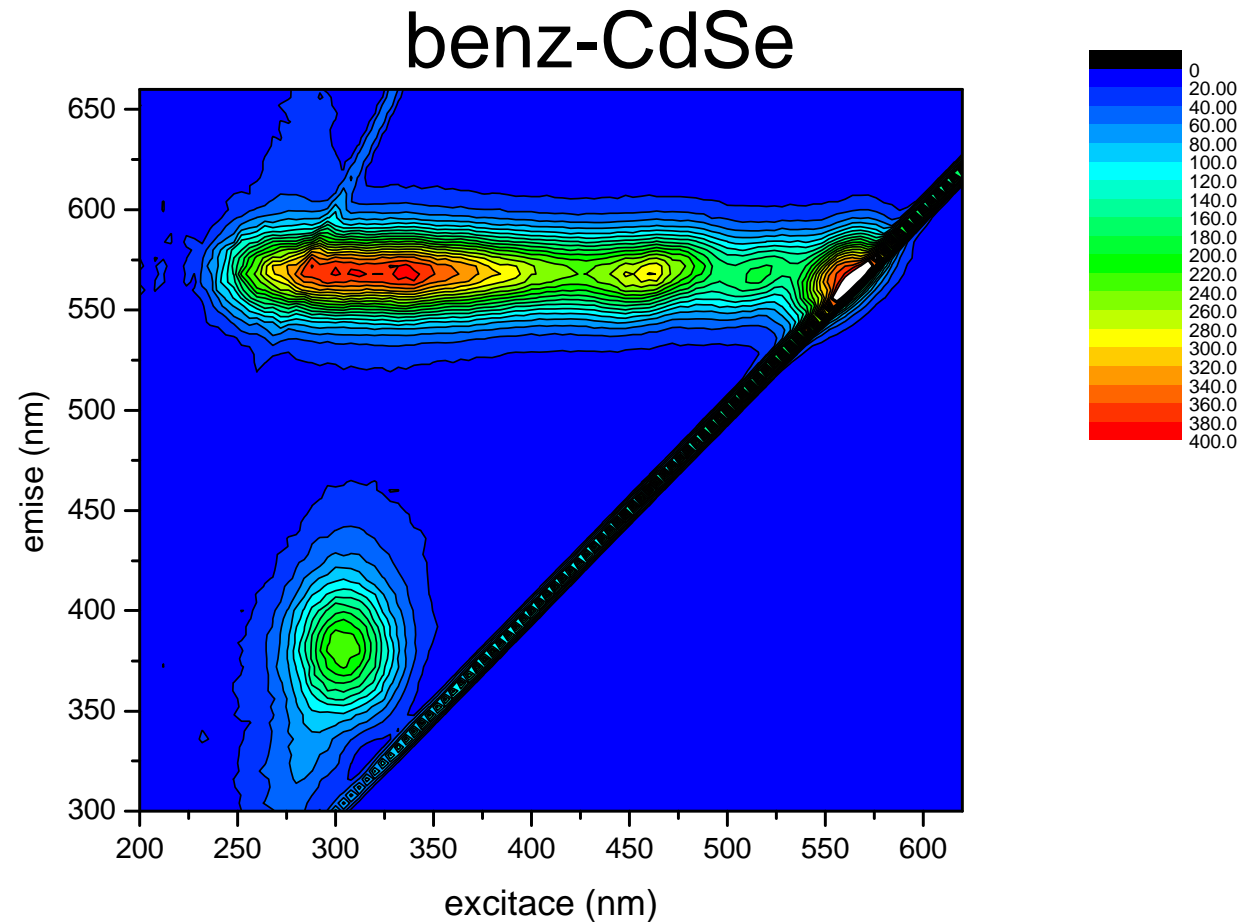
S výhodou využíváno ve fluorescenční



Absorpční a emisní spektra fluoresceinu

3D spektra

Kompletní informace o fluorescenčních charakteristikách látky
Měření je časově náročné a bývá prováděno s nižším rozlišením
Snazší identifikace většího množství peaků

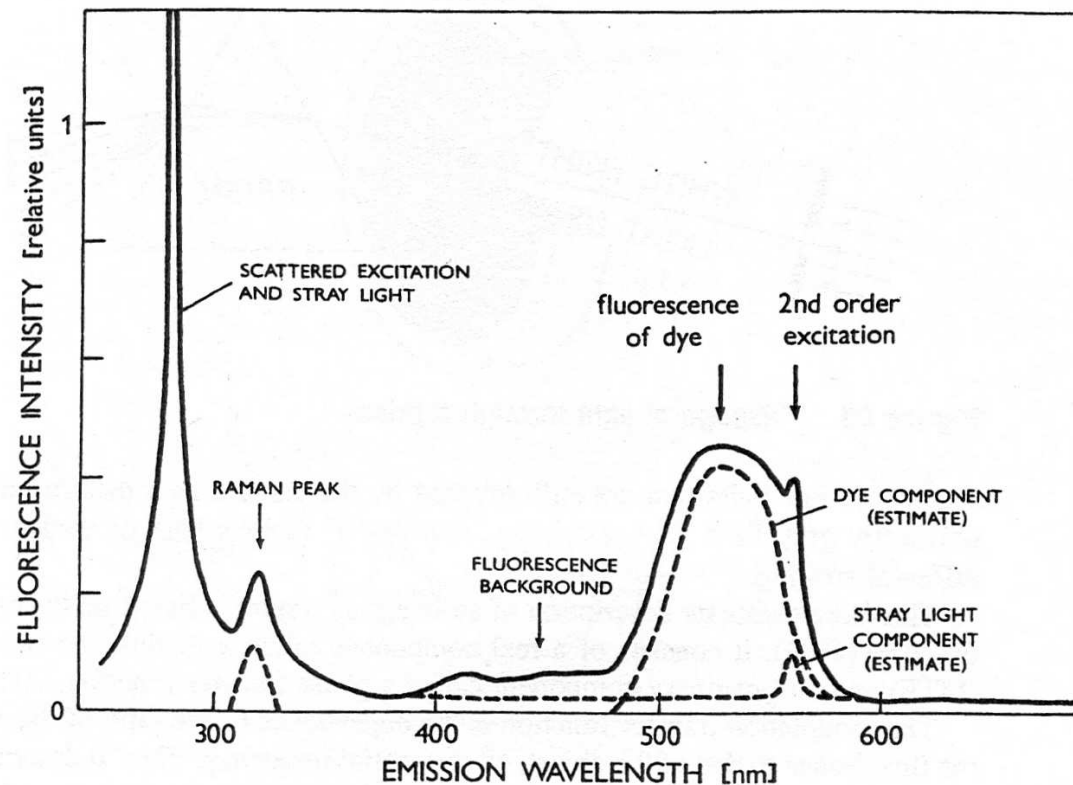
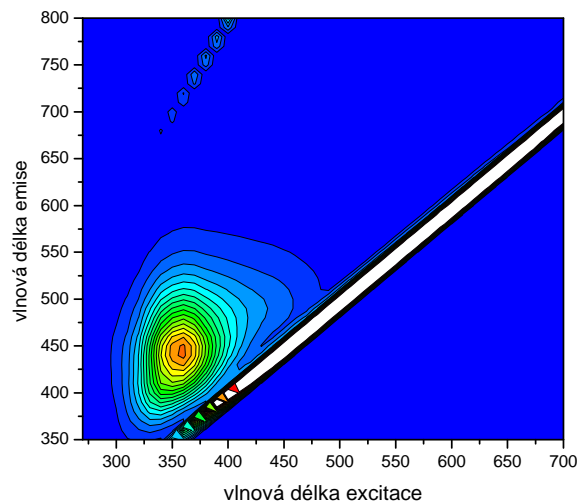
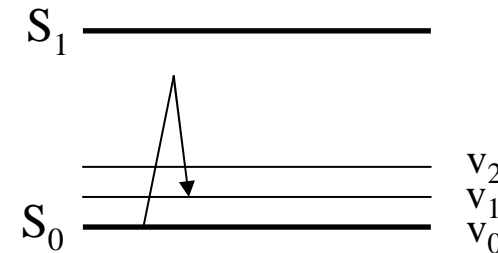


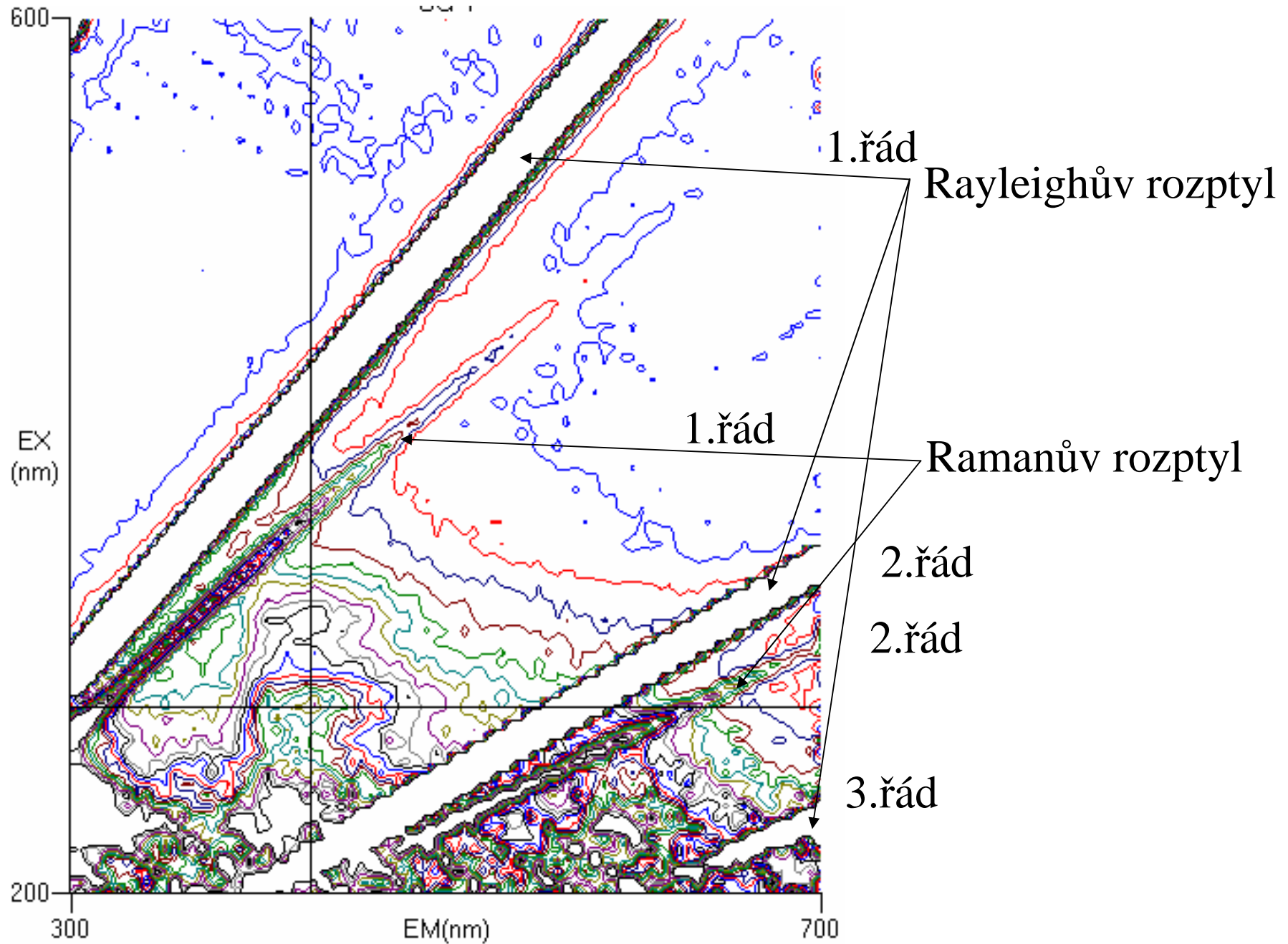
Artefakty ve steady-state spektrech

Excitace kontinuálním světlem

I při měření spektra 1 fluoroforu pozorujeme více peaků. Jsou to především:

a jeho druhá harmonická
 rozptyl
 Signál





1.řád

Rayleighův rozptyl

1.řád

Ramanův rozptyl

2.řád

2.řád

3.řád

600

EX (nm)

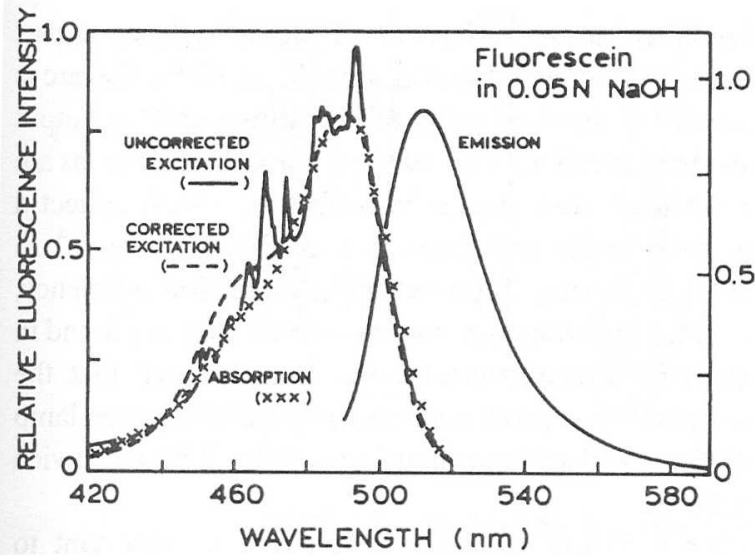
200

300

EM (nm)

700

Je třeba provést na emisní spektrum zdroje (v excitačním spektru), na spektrální citlivost detektoru, popř. použitý filtr (v emisním spektru), na signál pozadí (nečistoty, Ramanův rozptyl)



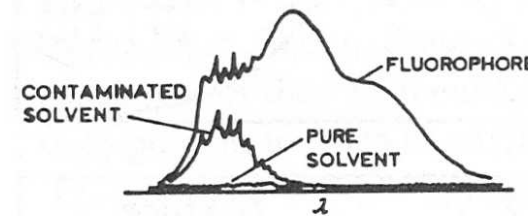
1. FLUOROPHORE CONCENTRATION TOO HIGH



Use dilute solutions
OD \leq 0.05

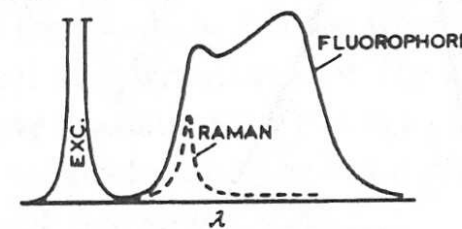
Efekt
vnitřního
filtru

2. CONTAMINATED SOLVENT AND/OR CUVETTE



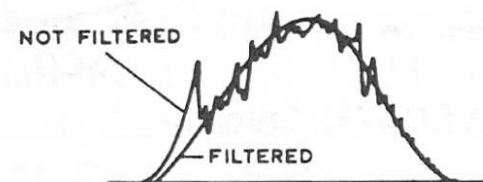
Always check
background
from solvent

3. SCATTERED LIGHT

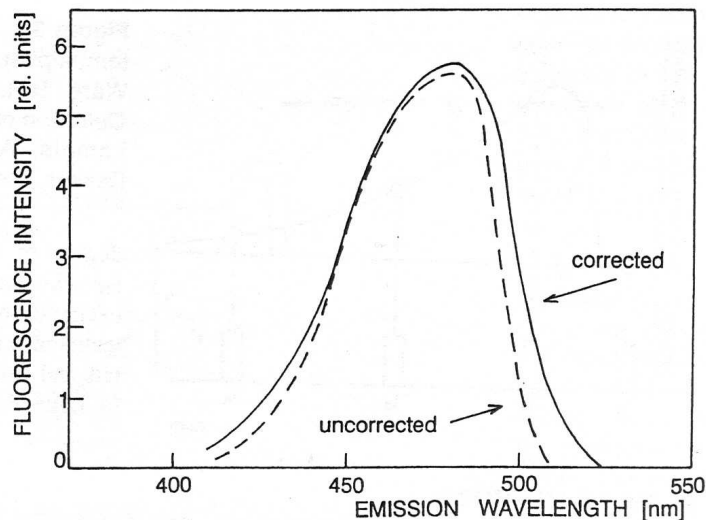


Use proper λ_{EXC} ,
filters, polarization,
and concentration
of fluorophore

4. PARTICLES IN SOLUTION



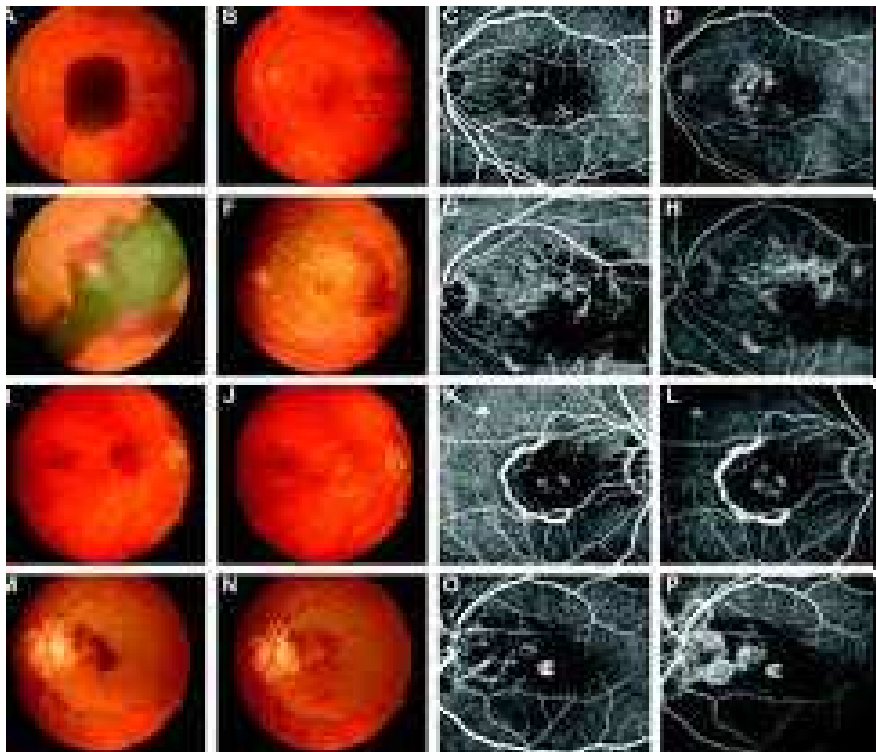
Filter solution
through proper
size filter



Zobrazování

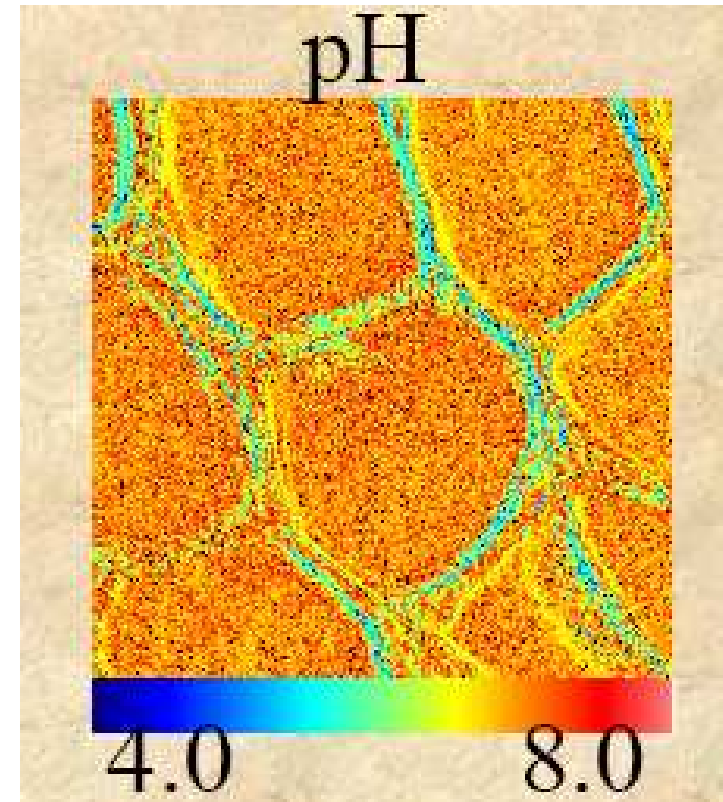
Možnost zobrazovat objekty v měřítcích od nm po tisíce km

Selektivní zvýraznění určité části objektu



Zobrazení cévního řečiště na sítnici pomocí fluoresceinu

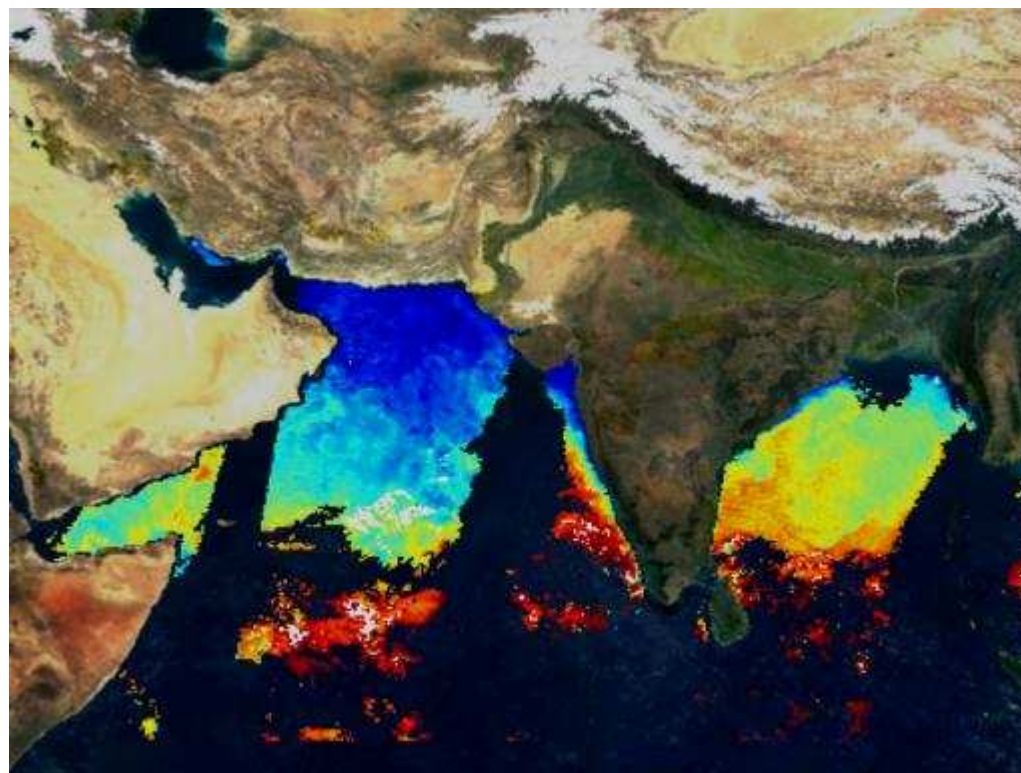
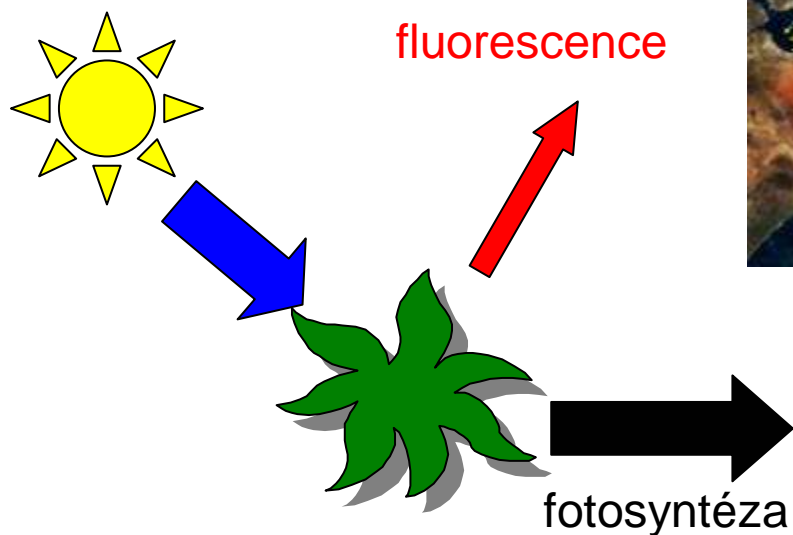
 zobrazování



Měření pH pomocí poměrového měření

Zobrazování

Monitorování fluorescence chlorofylu v planktonu v Arabském moři
(modrá - vysoká intenzita fluorescence planktonu ve stresových podmínkách)



www.ioccg.org/gallery/terra/asia.html

Shrnutí

Steady-state - buzení kontinuálním světlem

Intenzita při pevných vlnových délkách excitace a emise - titrační experimenty, kinetika

Spektrální závislosti - excitační, emisní, synchronní, kompletní (3D, EEM) spektrum

Artefakty ve steady-state spektrech (Rayleighův rozptyl a jeho druhá harmonická, Ramanův rozptyl, signál pozadí)

Zobrazování (selektivní zvýraznění, funkční zobr.)