

Fluorescence

Co to je?

- Fyzikálně-chemický děj – typ luminiscence
- Dělí se na elektroluminiscenci, fotoluminiscenci, radioluminiscenci a chemiluminiscenci.
- Fluorescence patří mezi fotoluminiscenční záření, které je vyvoláno buď účinkem jiného dopadajícího záření nebo účinkem dopadajících částic.

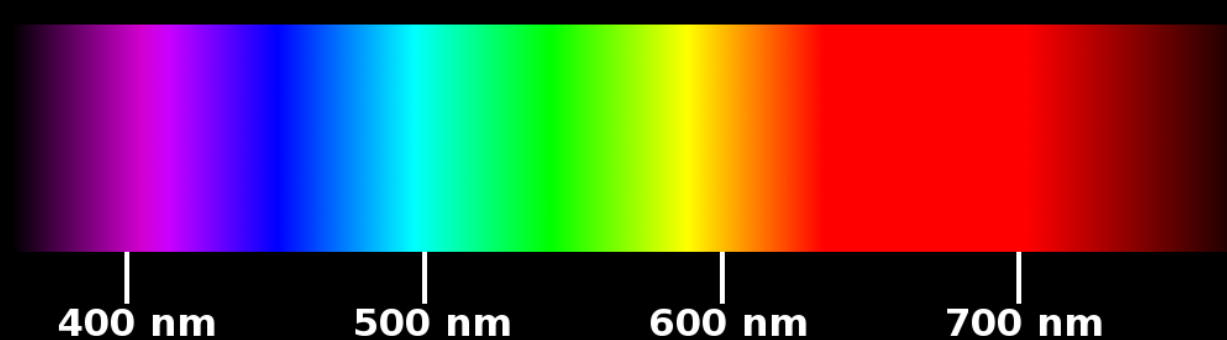


Jak to funguje ?

- Fluorescence je sekundární záření, které je charakterizováno vyzářením energie ve velmi krátké době, řádově 10^{-9} s až 10^{-6} s.
- Mechanismus vzniku fluorescence je dán schopností látky pohlcovat excitační elektromagnetické záření a schopností nashromážděnou energii následně vyzářit v podobě charakteristického emisního záření.
- Typické příklady excitačního záření je viditelné světlo, ultrafialové světlo, Röntgenovy paprsky nebo radiace; v posledně jmenovaném případě mluvíme o tzv. radioluminiscenci.
- Častěji než u anorganických látek lze fluorescence pozorovat u organických látek, z nichž nejvíce využívanými jsou sloučeniny obsahující aromatické cykly.

Na čem fluorescence záleží ?

- intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
- spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
- polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
- doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi
- koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln



Fluorescenční barviva

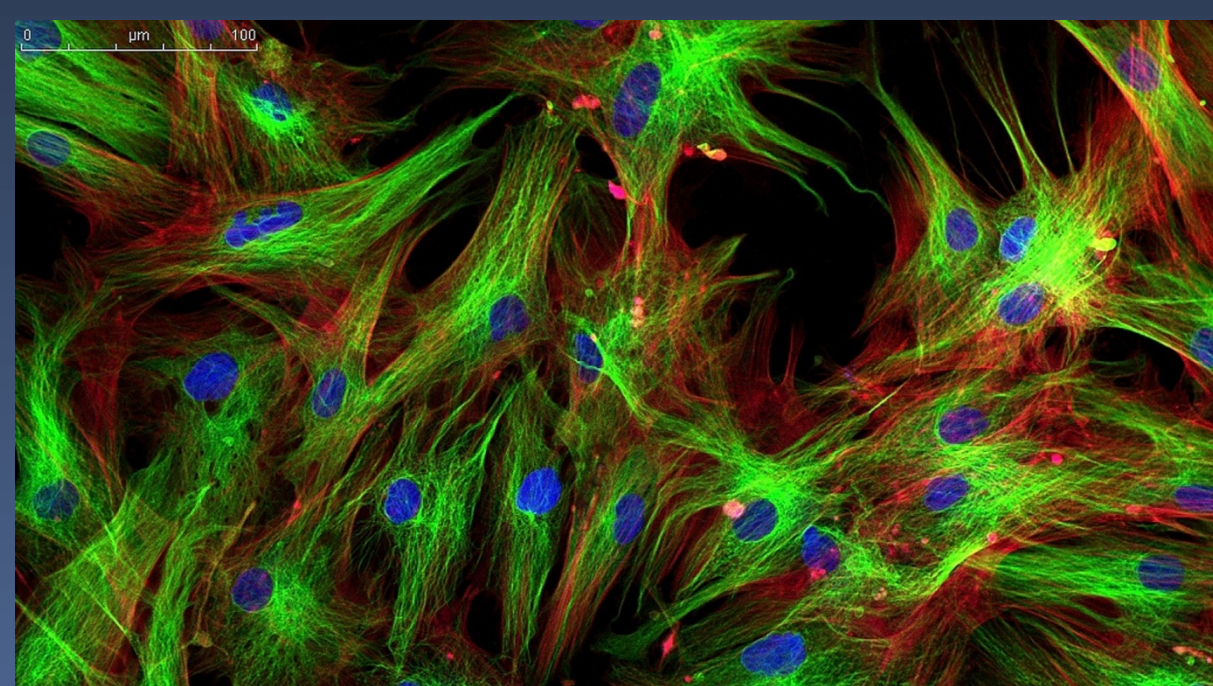
- Fluorescenční barviva (fluorofory, fluorochromy) jsou chemické sloučeniny, které obsahují ve své molekule reaktivní skupinu, která je schopna reagovat s nukleofilními skupinami (NH_2 , OH , SH).
- Pomocí těchto barviv se zkoumá struktura substrátu

- Obecně se fluorofory dělí na:
 - a) vnitřní (vlastní, intrinsic)
 - b) vnější (nevlastní, extrinsic)



K čemu se využívá?

- Fluorescence se v medicíně využívá v laboratorních analytických metodách.
 - K tomu se používají přístroje, které jsou na měření fluorescence založené.
- Dělení přístrojů:**
 - spektrofluorimetrie**
Měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky.
 - fluorescenční mikroskopy**
Umožňují pozorovat fluorescence dvojrozměrných nebo trojrozměrných mikroskopických objektů. Pokud kupříkladu na jednu protilátku navážeme fluorescein (emituje zelené světlo při excitaci modrým světlem) a na jinou rhodamin (emituje červené světlo při excitaci žluto-zeleným světlem), pak můžeme porovnávat vzájemné pozice různých molekul ve stejné buňce apod.
 - fluorescenční skener**
Měří fluorescence dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy).
 - průtokové cytometry**
Měří fluorescence velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací.



Zpracovaly- Eliška Červinková,
Dominika Kleščová (K11C)

a) vnitřní fluorescence

- Vnitřní fluorescence buněk je dána přítomností vnitřních fluoroforů, mezi které patří proteiny, vitamín A, cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin či chlorofyl.
- Proteiny vyzařují fluorescenční záření v UV oblasti spektra. Hlavními fluorofory v proteinech jsou aromatické aminokyseliny, jejichž absorpční i emisní pás leží mezi 240 a 300 nm.
- Ostatní uvedené látky vyzařují ve viditelné oblasti spektra (modrá, žlutá či červená).

b) vnější fluorescence

- Vnější fluorofory jsou používány častěji než vnitřní. Přidávají se ke studovanému vzorku.

- Dělení podle typu vazby:

1. fluorescenční sondy

Jsou používány ke studiu změn konformace bílkovin, tloušťky membrán, membránového potenciálu apod. Fluorescenční sondy se používají pro účely FISH (= fluorescenční in situ hybridizaci), což je cytogenetická metoda, která umožňuje obarvení chromozomů. K jejich identifikaci a vizualizaci se používá např.: akridinová oranž, ethidium bromid, DAPI a další. Nejznámější a nejpoužívanější fluorescenční sondou pro vizualizaci veškeré jaderné DNA je DAPI.

2. fluorescenční značky

Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů. Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou FITC a TRITC. Nevýhodou FITC je, že jeho citlivost je značně ovlivněna hodnotou pH. Nová skupina fluorescenčních značek se nazývá BODIPY. Tyto značky nejsou závislé na polaritě prostředí a pH.