

Fluorescences principi



Dr. biol. Tivs Selga

Saturs

- Fluorescence.
- Fluorescences mikroskops.
- Fluorescento krāsvielu veidi.
- Fluorescences problēmas.

Enerģijas avots

Fuorescence un luminescence.

Fluorescences ierosinātāji.

Lampas:

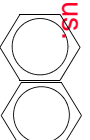
Ksenona;
ksenona /dzīvsudraba.

Lāzeri:

argons (Ar);
kriptons (Kr);
helijs-neons (He-Ne);
helijs-kadmījs (He-Cd);
kriptons-argons (Kr-Ar).

Fluorescence

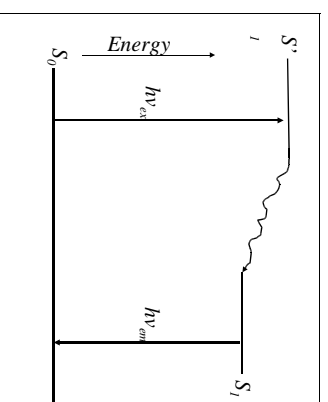
- **Hromatorfi** – molekulu komponenti, kuri absorbē gaismu.
- Tie parasti satur **aromātiskos gredzenus**.



Fluorescence

- Kas tā ir?
- Kā tā rodas?
- Izmantošanas priekšrocības.
- Izmantošanas trūkumi.

Vienkāršota Jablonska Diagramma



Fluorescence

Jo **garāks** viļņa garums, jo **mazāks** enerģijas daudzums.

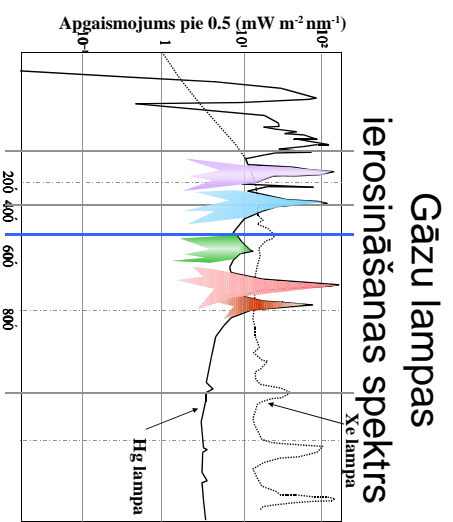
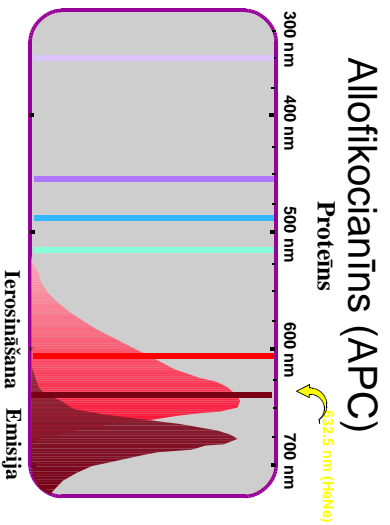
Jo **īsāks** viļņa garums, jo **lielāks** enerģijas daudzums.

Apdegumus iegūst no saules gaismas UV diapazona.

Fluorescences ierosināšanas spektrs

Intensitāte
Saisīta ar noikuma **varbūtību**.

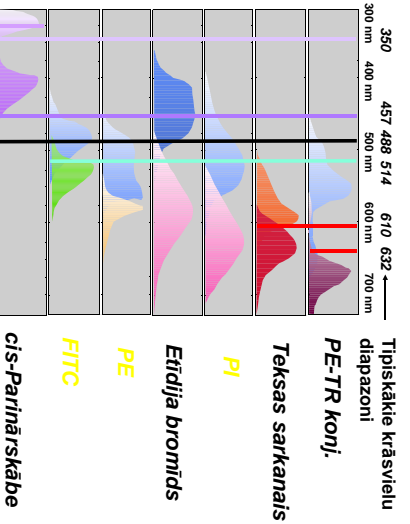
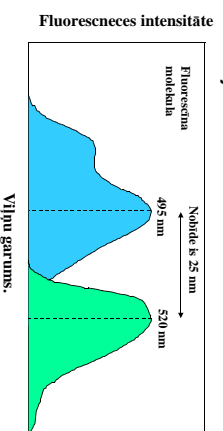
Viļņa garums
Absorbētās vai **emitētās** gaismas enerģija.



Fluorescence

Enerģijas nobīde.

Enerģijas starpība starp zemāko absorbcijas maksimumu un augstāko emisijas maksimumu.



Viļņu garums.

Gaismas avots-lāzeris

Lāzeris

Ierosināšanas spektrs

- | Argons | Ar | 353-361, 488, 514 nm |
|--------------|-------|----------------------|
| Kriptions-Ar | Kr-Ar | 488, 568, 647 nm |
| Heliji-Neons | He-Ne | 543 nm, 633 nm |
| He-Cadmiji | He-Cd | 325 - 441 nm |

Parameteri

- Ierosināšanas koeficients.
 - ϵ atliecas uz noteiktu viļņu garumu (parasti **absorbācijas maksimumu**).
- Kvantu iznākums.
 - Q_p ir integrēto fotonu emisija noteiktā fluorescences diapazonā.
- Ierosināšanas enerģijas subpiesātinājuma gadījumā fluorescences intensitāte ir proporcionāla produkta ϵ un Q_p .

Excitation Saturation

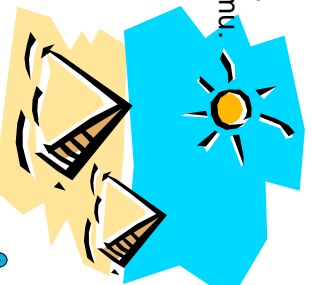
- Molekulas, kuras atrodas ierosinātā stāvoklī ilgāku laiku, spēj fosforiscēt (līgstoši sprdēt).
- Krāsviela koncentrācijas palielināšana parasti pastiprina emitēto signālu, ja gaismas avota enerģija nav limitējošais faktors.

Fotonu daudzums?

- Intensitāte ir $1/e^2$, ja 1 mW enerģijas 488 nm diapazonā fokusē uz Gausa apli, kura rādiuss ir 0,25 μm , lieojot objektīvu ar skaitlisko apertūru 1,25.
- Ar šādu enerģiju, krāsvielai **FITC** katrā laika momentā 63 % molekulu būs ierosinātā stāvoklī.

Gaismas izkliede

- Molekulas un ļoti mazas daļiņas neabsorbē gaismu. Tās gaismu izkliedē spektra redzamajā daļā.

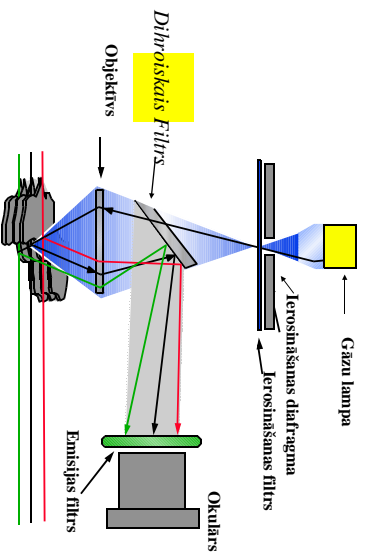


Debesis izskatās zilas, jo gāzu molekulas izkliedē gaismu zilajā spektra daļā vairāk nekā sarkanajā spektra daļā.

Ierosināšanas - emisijas maksimumi

Fluorofors	Ie _{maksimālais}		EM _{maksimālais}		Maksimāla ierosināšana %
	nm	nm	nm	nm	
FITC	496	518	87	0	0
Bodipy	503	511	58	1	1
Tetra-M-Rho	554	576	10	61	0
L-Rhodamine	572	590	5	92	0
Texas Red	592	610	3	45	1
CY5	649	666	1	11	98

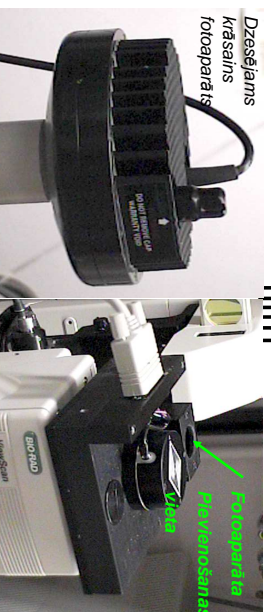
Fluorescences mikroskops



Fluorescences Microscopi ar:
krāsainu video (CCD) 35 mm fotoaparāti



Fotoaparāti un emisijas filtri



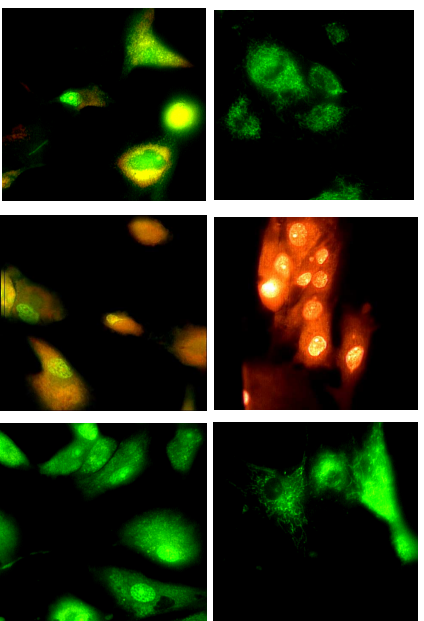
Luminiscences mikroskopa uzbūve

- Luminiscences mikroskopa LOMO sastāvdaļas un darbības principi.
- Mikroskopa izjaukšana un salikšana.

Autofluorescences iespējas

- Lauksaimnieciski pētījumi
- Paleontoloģija.
- Pētījumi "in vivo".

Attēlu veidi un krāsvielas



Proteīnu krāsvielas

Probe	Excitation	Emission
FITC	488	525
PE	488	575
APC	630	650
PerCP™	488	680
Cascade Blue	450	
Coumerin-phalloidin	350	450
Texas Red™	610	630
Tetramethylrhodamine-amines	575	
CY3 (indotrimethinecyanines)	540	575
CY5 (indopentamethinecyanines)	640	

DNS krāsvielas

- AO:
 - **metahromatiska** krāsviela:
 - koncentrācijas atkarīga emisija:
 - divpavedienu nukleīnskābes – zaļas:
 - vienpavediena nukleīnskābes – sarkanas.
- AT/GC saistošās krāsvielas:
 - AT bagātos rajonus: DAPI, Hoechst, quinacrine;
 - GC bagātos rajonus: antibiotics bleomycin, chromamycin A₃, mithramycin, olivomycin, rhodamine 800.

Nukleīnskābju krāsvielas

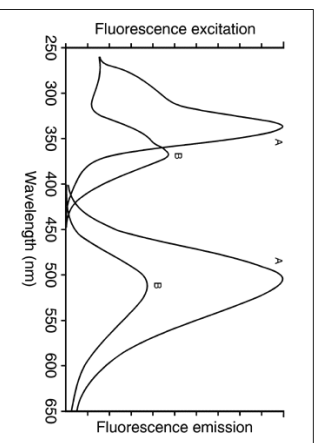
- Hoechst 33342 (AT rich) (uv) 346 460
- DAPI (uv) 359 461
- POPO-1 434 456
- YOYO-1 491 509
- Acridine Orange (RNA) 460 650
- Acridine Orange (DNA) 502 536
- Thiazole Orange (vis) 509 525
- TOTO-1 514 533
- Ethidium Bromide 536 620
- Pl (uv/vis) 536 620
- 7-Aminoactinomycin D (7AAD) 555 655

Jonu krāsvielas

- INDO-1 E_x 346 E_m 460
- QUIN-2 E_x 350 E_m 490
- Fluo-3 E_x 488 E_m 525
- Fura -2 E_x 330/360 E_m 510

Fura -2

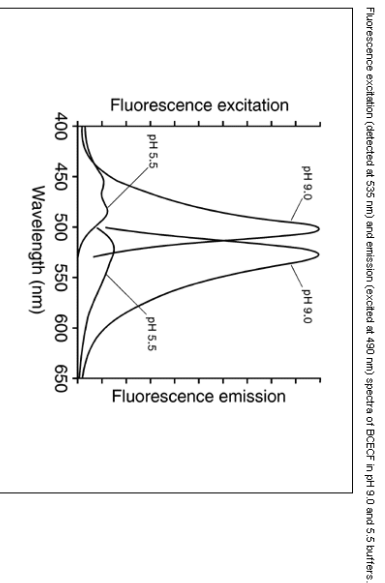
Fluorescence excitation (detected at 510 nm) and emission (excited at 360 nm) spectra of Ca²⁺-saturated (A) and Ca²⁺-free (B) fura-2 in pH 7.2 buffer.



pH indikatori

- | Probe | Excitation | Emission |
|--|------------|----------|
| • SNARF-1 | 488 | 575 |
| • BCECF | 488 | 525/620 |
| [2', 7'-bis-(carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein] | 440/488 | 525 |

BCECF



Krāsvielas oksidācijas noteikšanai

Probe	Oxidant	Excitation	Emission
• DCFH-DA	(H ₂ O ₂)	488	525
• HE	(O ₂ ⁻)	488	590
• DHR 123	(H ₂ O ₂)	488	525

DCFH-DA - dichlorofluorescein diacetate
 HE - hydroethidine
 DHR-123 - dihydrorhodamine 123

Organelļu krāsvielas

Probe	Site	Excitation	Emission
BODIPY	Golgi	505	511
NBD	Golgi	488	525
DPH	Lipid	350	420
TMA-DPH	Lipid	350	420
Rhodamine 123	Mitochondria	488	525
DIO	Lipid	488	500
dil-Cn-(5)	Lipid	550	565
dil-O-Cn-(3)	Lipid	488	500

BODIPY - borate-dipyrromethene complexes
 NBD - nitrobenzoxadiazole
 DPH - diphenylhexatriene
 TMA - trimethylammonium

GFP- kā krāsviela

- GFP – *Zaļais fluorescētais proteīns*:
 - ierosināšanas maksimums pie 395 un 470 nm (kvantu iznākums ir 0.8). Emisijas maksimums pie 509 nm;
 - satur p-hidroksibenzilidēna-imidazolonu hromatoforu, kurš veidojas pie Ser- Tyr- Gly, oksidējot primārās sekvences pozīcijas no 65 līdz 67;
 - nav nepieciešama papildus krāsošana;
 - var pētīt dzīvas šūnas.

Multiemisija

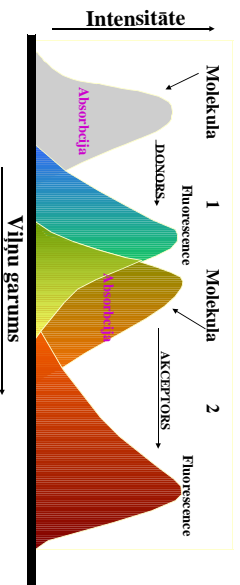
- Ar vienu ierosinātāju var lietot daudzas krāsvielas.
- Iespējami vairāki ierosināšanas diapazoni.
- Var kombinēt krāsvielas ar vienu ierosināšanu bet dažādu emisiju:
 - piem., kalceīns AM un etdija bromīds (**ierosināšana 488 nm**);
 - emisija **530 nm** un **617 nm**.

Enerģijas pārnešana

- Efektīva starp **10-100 Å**.
- Emisijas un ierosināšanas spektri lielā mērā var pārklāties.

Fluorescence

Rezonances enerģijas
pārmešana



Fotobalošanas piemērs

- **FITC** - pie $4,4 \times 10^{23}$ fotoniem $\text{cm}^{-2}\text{sec}^{-1}$, **FITC** balo ar kvantu iznākumu Q_p of 3×10^{-5} .
- Tādējādi **FITC** balo ar konstantu ātrumu $4,2 \times 10^3 \text{ sec}^{-1}$, pēc 240 μsec apgaismojuma sagalabāsies 37 % no molekulām.
- Vienā parauga vietā 16 kārtīga skanēšana novedīs pie 6 % – 50 % izbalošanas.

Fotobalošana

- **Neatgriezeniska ierosinātā hromatofora destruktīcija.**
- Fotobalošanas samazināšanas metodes.
 - Apskatīt/fotografēt/skenēt īsāku laiku.
 - Izmantot lielu palielinājumu ar objektīvu, kuram ir liela SA.
 - Lietot emisijas filtrus ar plašu diapazonu.
 - Samazināt fluorescences ierosināšanas intensitāti.
 - Izmantot “**pretbalošanas**” reaģentus (tikai fiksetās šūnās).

Pretbalošanas līdzekļi

- Daudzi līdzekļi balstās uz skābekļa koncentrācijas samazināšanu, lai neveidotos skābeklis singleta stāvoklī.
- **Visbiežāk izmanto antioksidantus, piemēram,** hidrokvīnonu, p-fenilēndiamīnu, u.c.
- Samazina O_2 koncentrāciju, izmantojot skābekļa singletu piesaistītājus, tādus kā: karotīnoīdi, askorbāts, histidīns, reducētais glutations, urīnskābe u.c.