

1. Principy fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách, monitorování prostředí a dalších oborech. V biomedicině se jedná především o identifikaci a dělení buněk v průtokové cytometrii, zobrazování buněčných složek ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu, studium změn konformací a dynamiky buněčných systémů, aplikace v různých testech jako je ELISA a další, kdy fluorescenční metody často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče. Tato práce je zaměřena na možnosti použití fluorescenční spektroskopie v lékařském výzkumu, především v oboru neurověd, kdy se využívá 1. závislosti emisních vlastností fluoroforu na prostředí, v němž se nachází; 2. přenosu elektronové excitační energie mezi donorem a fluoreskujícím akceptorem; 3. polarizované fluorescence. V první kapitole je shrnuta základní teorie fluorescence, v druhé kapitole uvádím stručný přehled fluoroforů používaných v biomedicině a třetí část je věnována popisu vybraných experimentů,

1.1. Luminiscence

Definice luminiscence:

1. Luminiscence je přebytek záření nad tepelným vyzařováním tělesa v tom případě, má-li toto přebytečné záření konečnou dobu trvání, jež podstatně převyšuje periodu světelných kmitů.
2. Luminiscence je emise světla z nějaké látky a nastává z elektronových excitovaných stavů.

Luminiscence se dělí na:

1. fluorescenci
2. fosforescenci
3. zpožděnou fluorescenci

Definice fluorescence:

1. Nastane-li emise záření z excitovaného elektronového stavu jedním či více spontánními energetickými přechody jedná se o fluorescenci.
2. Praktické kritérium: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí prakticky ihned mizí (doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s).

Definice fosforescence:

1. Uplatňuje-li se při emisi záření z excitovaného elektronového stavu metastabilní hladina jedná se o fosforescenci.
2. Praktické kritérium: fosforescence má delší dobu dohasínání než fluorescence ($\gg 10^{-8}$ s) a obvykle ji nelze pozorovat v roztocích při pokojové teplotě.

Definice zpožděné fluorescence:

Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S_1) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu.

Stokesův zákon:

Vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla ($\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$).

Vavilovovy postuláty:

1. Při stokesovském buzení fotoluminiscence, kdy frekvence excitačního záření (ν_{ex}) je větší nebo rovna frekvenci průsečíku emisního a excitačního pásu, nemůže být energetický výtěžek luminiscence větší než 1.
2. Při antistokesovském buzení, kdy je ν_{ex} menší než frekvence průsečíku emisního a excitačního pásu, energetický výtěžek luminiscence klesá s růstem tohoto rozdílu, a to tím rychleji, čím je nižší teplota.

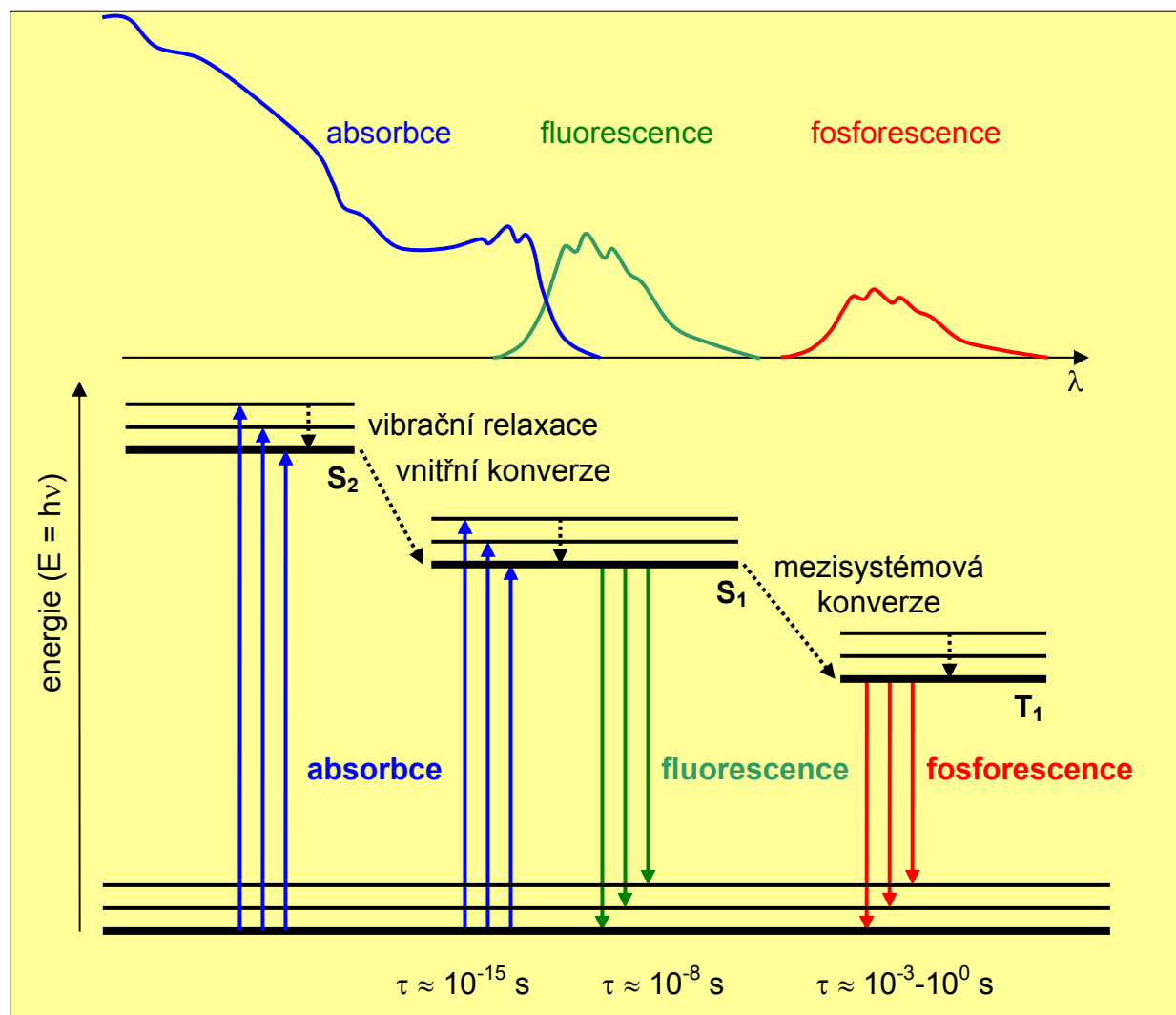
Většina složitých organických molekul nefluoreskuje; intenzivní fluorescenci vykazují některé aromatické sloučeniny (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly) nazývané **fluorofory** nebo **fluorescenční barviva**. Typické fluorofory jsou např.:

- chinin (tonik)
- fluorescein, rhodamin B (nemrznoucí směsi, fluorescenční značení)
- POPOP (scintilátory)
- akridinová oranž (DNA)
- umbeliferon (ELISA)
- antracén, perylén (znečištění životního prostředí oleji)

Charakteristické je teplotní zhášení luminiscence, tj. snižování kvantového výtěžku s teplotou.

Na Obr. 1.1 je zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly a tvar absorpčních a emisních spekter (λ - vlnová délka). Po absorpci světelného kvanta budícího záření (viz modré šipky) přechází elektrony ze singletního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů S_1, S_2, \dots a tripletních stavů T_1, T_2, \dots . Molekula obvykle přejde ze rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 do některé z vibračních hladin excitovaných stavů. K deexcitaci molekuly dochází buď **zářivými** přechody (luminiscence; viz zelené a červené šipky) nebo **nezářivými** přechody (vnitřní konverze, mezisystémová konverze, vibrační relaxace; viz černé tečkované šipky). Doba trvání τ jednotlivých procesů je pro absorpci řádově 10^{-15} s, pro fluorescenci 10^{-8} s, pro fosforescenci je mnohem delší než 10^{-8} s (obvykle milisekundy až sekundy), pro vibrační relaxaci 10^{-12} - 10^{-13} s, pro vnitřní konverzi 10^{-6} - 10^{-12} s, pro mezisystémovou konverzi 10^{-4} - 10^{-12} s.

Obr. 1.1 Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy složité molekuly (forma Jablonského diagramu).



Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S₁ do některé z vibračních hladin základního stavu S₀.

Fosforescence je zářivý přechod z vyššího (T₁) do energeticky nižšího stavu o rozdílné multiplicitě (S₀).

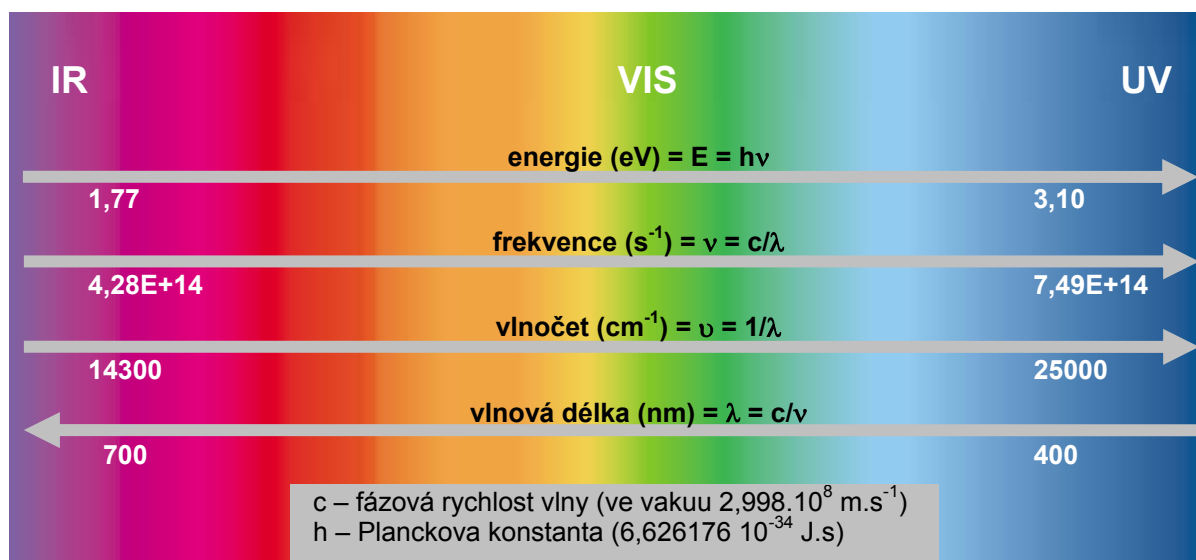
Zpožděná fluorescence je zářivý přechod z téhož singletního stavu (S₁) jako při fluorescenci, ale s delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Doba dohasínání zpožděné fluorescence je přibližně rovna době dohasínání fosforescence měřené za stejných podmínek. Emisní spektrum zpožděné fluorescence je totožné s emisním spektrem okamžité fluorescence.

1.2. Charakteristiky fluorescence

Hlavní charakteristiky fluorescence jsou:

1. **intenzita** – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času
2. **spektrální složení** – spektrální hustota fotonového toku na jednotkový interval vlnových délek nebo frekvencí
3. **polarizace** – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny
4. **doba dohasínání** – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi; úzce souvisí s pochody vedoucími k nezářivé deaktivaci tohoto stavu
5. **koherenční vlastnosti** – vztahy mezi fázemi světelných vln

Obr. 1.2 Základní spektrální charakteristiky.



Emisní spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření.

Excitační spektrum je závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (nebo energii, vlnočtu, či frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.

Kashovo pravidlo:

Před emisí fluorescenčního kvanta dochází obvykle k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 .

Vavilovův zákon:

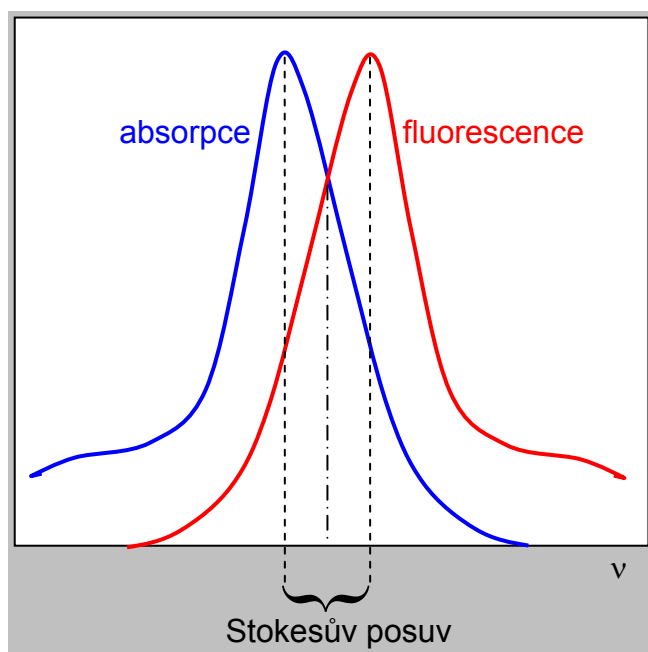
Kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření.

Z toho vyplývá obecná vlastnost fluorescence: **Emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace.**

Zákon zrcadlové symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem:

Zrcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem (Obr. 1.3) platí pro velké množství organických molekul a je způsobena tím, že absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu. Po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu S_0 na vyšší vibrační hladinu stavu S_1 , poté dochází k rychlé vibrační relaxaci na rovnovážnou vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 (v čase 10^{-12} - 10^{-13} s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu S_0 a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu S_0 . Rozdílu v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu se říká **Stokesův posuv**. Výjimky z pravidla zrcadlové symetrie jsou obvykle důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném stavu oproti uspořádání ve stavu základním.

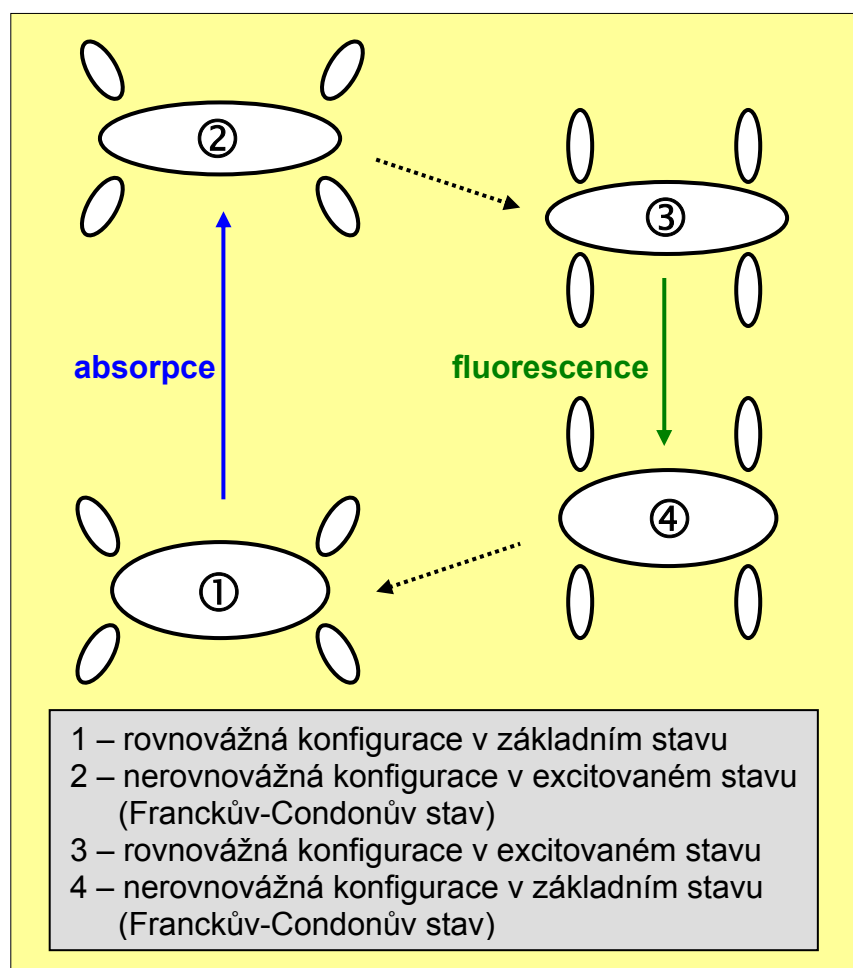
Obr. 1.3 Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního pásu.



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 (Obr. 1.4). 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 je mnohem delší, než je rychlost elektronového přechodu, ale obvykle kratší, než doba života excitovaného stavu. 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.

Obr. 1.4 Solvatace fluoroforu při absorpci a emisi v roztocích.



Proces fluorescence je cyklický. Pokud není fluorofor nevratně zničen v excitovaném stavu (jev fotovybělování, **fotobleaching**), potom tentýž fluorofor může být opakovaně excitován a emitovat fluorescenční záření. To je základ vysoké citlivosti fluorescenčních technik.

Kvantový výtěžek

Definice kvantového výtěžku fluorescence (v ustáleném stavu):

1. **Kvantový výtěžek** je poměr počtu světelných kvant emitovaných a absorbovaných fluoroforem za sekundu.
2. Nepřímo lze kvantový výtěžek definovat jako poměr pozorované střední doby dohasínání fluorescence (τ) a vnitřní (radiační) doby života excitovaného stavu bez zhášecích mechanismů (τ_0).

Intenzita fluorescence

Intenzita fluorescence je úměrná intenzitě absorpce násobené kvantovým výtěžkem fluorescence. Jestliže fluorescenci měříme pod „magickými“ úhly $54^\circ 44' 8''$ nebo $125^\circ 15' 51''$ ke směru excitačního paprsku, potom není její intenzita ovlivněna případnou anizotropií emise systému. Při použití citlivých fotonásobičů pro detekci fluorescenčního záření a při buzení intenzivním světlem lze detekovat koncentrace rozpuštěných látek až 10^{-12} mol/l, což je alespoň o 4 řády vyšší citlivost, než pro absorpční měření. Protože kvantový výtěžek fluorescence roztoků složitých molekul je obvykle nezávislý na vlnové délce

budícího záření, je excitační spektrum fluorescence zředěných roztoků přesnou replikou jejich absorpčního spektra a lze tak spektrofluorimetricky získat absorpční spektrum fluoreskující látky při daleko nižších koncentracích, než při přímém měření absorpce na spektrofotometru.

Efekt vnitřního filtru je chyba vznikající při měření intenzity fluorescence v důsledku skutečnosti, že vrstvy vzorku vzdálenější od roviny dopadu budícího záření na vzorek jsou excitovány nižší intenzitou světla, neboť část budícího záření je absorbována povrchovými vrstvami. Tato chyba se projevuje jen u silněji absorbujících roztoků, ale při přesném měření kvantových výtěžků je nutno ji vždy uvažovat a korigovat.

Doba života excitovaného stavu

Doba života excitovaného stavu (τ) je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Obecně je doba života fluorescence kolem 10^{-8} s. Při jednoduchém exponenciálním dohasínání se 63% molekul vrátí do základního stavu v čase $t < \tau$ a 37% v čase $t > \tau$. Doba života fluoroforu za nepřítomnosti neradiačních zhášecích procesů se nazývá **vnitřní** (též přirozená, radiační) doba života (τ_n). Vnitřní dobu života lze v principu spočítat z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a fluorescenčního spektra. Za určitých podmínek lze vnitřní dobu života spočítat také jako poměr změřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence.

Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence bez změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů. **Srážkové (dynamické) zhášení** nastává, když je fluorofor v excitovaném stavu deaktivován (tj. navrací se nezárivě do základního stavu) při srážce s molekulou zhášedla. Molekuly nejsou při tomto procesu chemicky změněny na rozdíl od **statického zhášení**, kdy se po kontaktu fluoroforu a zhášedla vytváří nefluorescenční komplex. **Samozhášení** je zhášení fluoroforu jím samotným; nastává při jeho vysokých koncentracích nebo při vysoké denzitě značení.

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

$$(1.1) \quad \Phi_0/\Phi = \tau_0/\tau = 1 + k_q \tau_0 C_q$$

kde je Φ_0 – kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedla, Φ - totéž za přítomnosti zhášedla o koncentraci C_q , τ_0 – doba dohasínání fluorescence bez zhášedla, τ - doba dohasínání v přítomnosti zhášedla, k_q – bimolekulární zhášecí konstanta (= bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí vynásobená účinností zhášení).

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

Fotovybělování (photobleaching) je jev odlišný od zhášení fluorescence, neboť při něm dochází k nevratné destrukci excitovaného fluoroforu. Tento jev často omezuje možnost použití intenzivnějšího buzení fluorescence.

Excimerová luminiscence

Excimer je excitovaný dimer; v případě dvou různých molekul se jedná o exiplex.

Emisní pás excimerové fluorescence je posunut k větším vlnovým délkám ve srovnání s fluorescencí izolovaných molekul. Objevuje se někdy spolu s koncentračním zhášením.

Polarizovaná fluorescence

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 (**fotoselekce**). Je-li průměrná rotační relaxační doba (charakterizující rotační difúzi v roztocích) mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom také výsledná fluorescence bude polarizována. Bude-li naopak průměrná rotační relaxační doba mnohem kratší než doba dohasínání fluorescence, potom anizotropie systému klesne ještě před emisí na limitní hodnotu (v izotropním systému o malé viskozitě až na nulu). Pokud jsou doba dohasínání fluorescence 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.:

- fluidita membrán
- interakce ligand-receptor
- proteolýza
- interakce protein-DNA
- kontrakce svalů
- aktivita proteinkináz

Ustálená a časově rozlišená fluorescence

Parametry fluorescence lze měřit buď v ustáleném stavu, nebo s časovým rozlišením jejich průběhu. **Ustálená fluorescence** se měří při buzení kontinuálním zářením a dostáváme potom časovou střední hodnotu intenzity či polarizace fluorescence. **Časově rozlišená fluorescence** 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.

1.3. Anizotropie fluorescence

Veličiny charakterizující polarizaci fluorescence:

1. Stupeň polarizace

$$(1.2) \quad p = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$$

kde I_{\parallel} a I_{\perp} jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé ke směru polarizace budícího záření.

2. Anizotropie fluorescence

$$(1.3) \quad r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 I_{\perp})$$

3. Depolarizační faktor

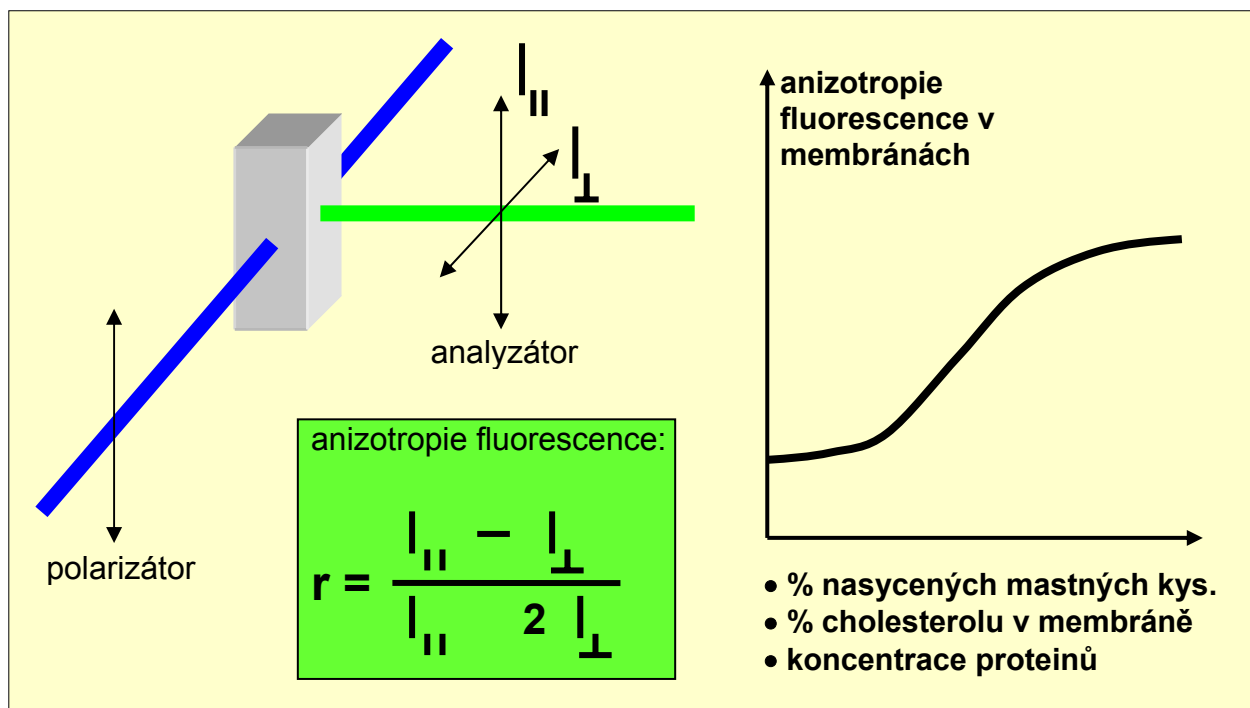
$$(1.4) \quad \delta = I_{\perp}/I_{\parallel}$$

Uvedené veličina lze mezi sebou převádět:

$$(1.5) \quad r = 2 p/(3 - p) = (1 - \delta)/(1 + 2 \delta)$$

$$(1.6) \quad p = 3 r/(2 + r) = (1 - \delta)/(1 + \delta)$$

Obr. 1.5 Uspořádání při měření polarizované fluorescence.



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

$$(1.7) \quad I_{\alpha}(t) = \cos^2 \alpha I_{\parallel}(t) + \sin^2 \alpha I_{\perp}(t)$$

a pro časovou závislost anizotropie platí

$$(1.8) \quad r(t) = (3 \cos^2 \gamma(t) - 1)/5$$

kde γ je úhel dipólové reorientace v čase od 0 do t.

Ze vztahu (1.7) vyplývá, že bude-li analyzátor otočen o „magický“ úhel $54,74^{\circ}$ ($=54^{\circ}44'8''$), potom je

$$(1.9) \quad I_{54,7}(t) = I_{\parallel}(t) + 2 I_{\perp}(t)$$

V roztocích, kde je doba dohasínání fluorescence srovnatelná s rotační relaxační dobou je nutno měřit celkovou intenzitu fluorescence pomocí analyzátoru otočeného o $54,7^\circ$, čímž se získají hodnoty dohasínání fluorescence neovlivněné molekulárními rotacemi.

Ze vztahu (1.8) 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

$$(1.10) \quad r_0 = 2/5$$

a mezní hodnota stupně polarizace

$$(1.11) \quad p_0 = 1/2$$

Rozptýlené světlo je zcela polarizováno ($r = 1$).

Mezi hodnotami polarizace fluorescence buzené nepolarizovaným zářením (p_{nepol}) a polarizovaným zářením (p_{pol}) platí vztah

$$(1.12) \quad p_{\text{nepol}} = p_{\text{pol}}/(2 - p_{\text{pol}})$$

Polarizační spektra

Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.

Za předpokladu, že přechodové momenty absorpce a emise nejsou rovnoběžné, ale svírají úhel β , je mezní hodnota stupně polarizace fluorescence buzené polarizovaným zářením snížena dle vztahu

$$(1.13) \quad p_0 = (3 \cos^2\beta - 1)/(\cos^2\beta + 3)$$

Zobecněný vztah (1.8) pro časovou závislost anizotropie potom je

$$(1.14) \quad r(t) = (3 \cos^2\beta - 1)(3 \cos^2\gamma(t) - 1)/5$$

kde je β pevný úhel mezi absorpčním a emisním přechodovým momentem a $\gamma(t)$ je úhel, o který se natočí emisní dipól za dobu od 0 do t .

Měření stupně polarizace excitačních spekter potom umožňuje oddělit překrývající se absorpční pásy, které odpovídají různým elektronovým přechodům s různými úhly β .

Perrinovy rovnice (pro sférické částice)

V případě kulovité částice, kdy depolarizační rotace jsou symetrické a izotropní, má časová závislost anizotropie fluorescence fluoroforu exponenciální průběh

$$(1.15) \quad r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_r)$$

kde τ_r je **rotační korelační čas** ($\tau_r = 1/6D_r$) zavedený pomocí **rotační difúzní konstanty** D_r , pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah

$$(1.16) \quad D_r = kT/6V\eta$$

kde je V – objem částice, η – viskozita prostředí, k – Boltzmannova konstanta ($=1,380662 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T – absolutní teplota.

Při měření ustálené fluorescence (buzení kontinuálním zářením) měříme časovou střední hodnotu anizotropie

$$(1.17) \quad r = r_0 (1 + (\tau/\tau_r))^{-1}$$

kde je r_0 – mezní hodnota anizotropie, τ - doba života fluorescence, τ_r - rotační korelační čas. Tato **Perrinova rovnice** se používá v různých formách, např. s použitím rovnice (1.16)

$$(1.18) \quad r_0/r = 1 + \tau/\tau_r = 1 + 6D_r\tau = 1 + kT\tau/V\eta$$

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 polarizace fluorescence získáme potřebné údaje již z měření při konstantní teplotě.

Při použití metody časově rozlišené anizotropie fluorescence se měří časově závislé složky intenzity $I_{||}(t)$ a $I_{\perp}(t)$. Celková intenzita $I(t) = I_{||}(t) + 2 I_{\perp}(t)$ přitom nezávisí na rotačním pohybu fluoroforu a měří se pod „magickým“ úhlem $54,7^\circ$ (viz výše).

Časový průběh anizotropie fluorescence $r(t)$ je v těchto experimentech (pulzní buzení) závislý pouze na rotačním pohybu fluoroforu. Lze získat informace o velikosti, tvaru a ohebnosti částice. Pro sférické částice dohasíná anizotropie exponenciálně

$$(1.19) \quad r(t) = r_0 \exp(-t/\tau_r)$$

kde je r_0 – hodnota anizotropie v čase nula, τ_r - rotační korelační čas pro tuhou kouli. Pro asymetrické nebo flexibilní fluorofory je analýza dohasínání anizotropie fluorescence složitější a je popsána v literatuře uvedené v sekci Odkazy.

1.4. Přenos excitační energie

Přenos elektronové energie se uskutečňuje mechanismy zářivými nebo nezářivými.

K **zářivému (triviálnímu) přenosu** energie dochází, když excitovaná molekula donoru emituje záření, které je následně reabsorbováno molekulou akceptoru.

K excitaci **nezářivým přenosem** energie (**fluorescenční rezonanční přenos energie, FRET**) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které v budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie tedy nedochází k emisi světla donorem.

Rezonanční přenos energie lze charakterizovat rychlostní konstantou (k_{DA}), která vyjadřuje pravděpodobnost přenosu; určující složkou je dipól-dipólový přenos energie, pro nějž byl odvozen Försterův vzorec (v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra) např. v této formě

$$(1.20) \quad k_{DA} = (1/\tau_D) (R_0/R_{DA})^6$$

kde je τ_D – doba dohasínání fluorescence donoru, R_0 – vzdálenost ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly, R_{DA} – vzdálenost mezi donorem a akceptorem. Rezonanční přenos energie je tedy silně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru.

1.5. Spektrofluorimetrie

Přístroje založené na měření fluorescence jsou čtverého typu:

1. **spektrofluorimetrie** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
2. **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
3. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
4. **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací

Existují však i další přístroje, které jako detekci používají fluorescenci.

Spektrofluorimetrie mají zdroj budícího záření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Pro měření ustálené fluorescence se běžně používají vysokotlaké výbojky, přístroje pro měření časově rozlišené fluorescence využívají jako zdroj budícího záření obvykle pulzní laser. Budící záření prochází excitačním monochromátorem a dopadá na vzorek (obvykle temperovaná kyveta s roztokem). Nejčastěji ve směru kolmém k budícímu paprsku se měří emitované fluorescenční záření, které nejprve prochází emisním monochromátorem a je detekováno pomocí fotonásobiče. Používá se uspořádání s jedním emisním monochromátorem (uspořádání „L“) nebo se dvěma protilehlými emisními monochromátory (uspořádání „T“). Při měření polarizované fluorescence jsou za excitační monochromátor a před emisním monochromátorem zařazeny polarizátory, které jsou otočné kolem osy paprsku jimi procházejícího.

Při měření **emisních** spekter fluorescence je excitační monochromátor nastaven na pevnou vlnovou délku budícího záření. Při měření **excitačních** spekter je pevně nastavena vlnová délka na emisním monochromátoru. Kromě vlnových délek excitace a emise se běžně nastavují ještě šířky štěrbin obou monochromátorů, které ovlivňují citlivost a spektrální rozlišení daného měření.

Polarizovaná fluorescence roztoků se měří ve směru kolmém ke směru budícího paprsku, který je polarizován ve svislém směru. Je přitom nutno provádět korekci na vliv emisního monochromátoru spektrofluorimetru na polarizaci jím procházejícího záření. **Anizotropie** fluorescence se určuje ze vztahu

$$(1.21) \quad r = (I_{\parallel}^V - G I_{\perp}^V) / ((I_{\parallel}^V + 2 G I_{\perp}^V))$$

kde I_{\parallel}^V a I_{\perp}^V jsou složky světelné intenzity rovnoběžné nebo kolmé k směru (vertikálnímu) polarizace budícího záření a G je korekční faktor, který lze změřit při excitačním záření polarizovaném vodorovně jako poměr $I_{\perp}^H / I_{\parallel}^H$. U fluoroforů s dlouhou dobou života v roztocích o malé viskozitě je faktor G při měření excitačního spektra konstantní.

Pro analýzu neznámých vzorků nebo směsí fluoroforů se používá měření **úplné fluorescence** (též **excitačně emisní matice**, **maticové skenování**). Excitačně emisní matice vzniká spojením excitačního a emisního spektra směsi fluoroforů do trojrozměrného obrazu, kde je na jedné ose excitační vlnová délka, na druhé ose je emisní vlnová délka a na svislé ose je vynesena intenzita fluorescence.

Synchronní luminiscence může být vhodná pro analýzu směsí látek; tato metoda je založena na současném běhu obou monochromátorů, přičemž je nastaven konstantní rozdíl vlnových délek mezi excitačním a emitovaným záření (synchronní excitace) – výsledkem je konvoluce emisního a excitačního spektra.

Metody měření relaxačních časů

Pro měření časově rozlišené fluorescence se používají jednak pulzní metody, jednak metoda fázového posuvu. Pulzní metody používají k excitaci fluoroforu pulzní lasery nebo výbojky a fluorescence se detekuje ve známých časových úsecích od krátkodobé excitace. Metoda fázového posuvu používá k buzení fluorescence modulované světlo a měří se fázový posuv fluorescence vůči excitačnímu záření. Pro měření v dohasínání pikosekundovém oboru se používají další speciální metody, zde neuváděné.

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) je technika při níž jsou měřeny spontánní fluktuace intenzity fluorescence v mikroskopickém objemu (kolem 10^{-15} l) určeném fokusovaným excitačním laserovým paprskem. Malé, rychle difundující fluorofory způsobují rychlé fluktuace intenzity fluorescence – oproti konvenční fluorimetrii nedochází ke způměrování těchto difúzně závislých fluktuací. Časová závislost intenzity fluorescence je potom analyzována pomocí dočasné autokorelační funkce, která obsahuje informaci o rovnovážných koncentracích, reakčních kinetikách a difúzních rychlostech molekul ve vzorku. Mezi aplikace fluorescenční korelační spektroskopie patří:

- fragmentace nukleových kyselin
- hybridizace nukleových kyselin
- tvorba produktů PCR
- laterální oddělení lipidů v dvojvrstvách
- difúze molekul v jádře a cytoplazmě
- interakce protein-protein
- vazebná rovnováha pro léčiva a jiné ligandy
- shlukování (clustering) membránových receptorů