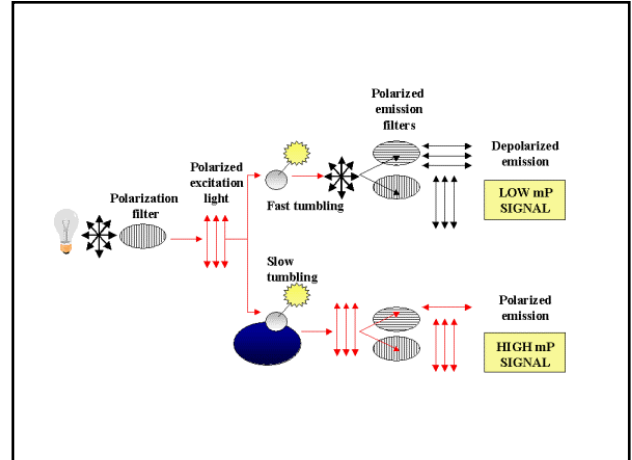


## Polarizovaná fluorescence a fluorescenční anizotropie



## Fluorescenční anizotropie

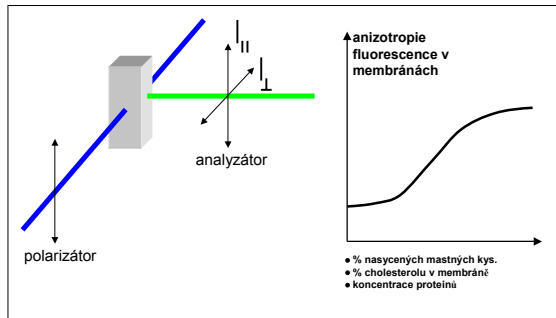
- je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace (**fotoselektce**)
- je-li průměrná rotační relaxační doba (charakterizující rotační difúzi v roztocích) 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

## Fluorescenční anizotropie

- 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

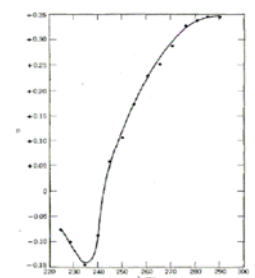
$$\text{stupeň polarizace } p = \frac{(I_{||} - I_{\perp})}{(I_{||} + I_{\perp})}$$

$$\text{anizotropie } r = \frac{(I_{||} - I_{\perp})}{(I_{||} + 2 I_{\perp})}$$

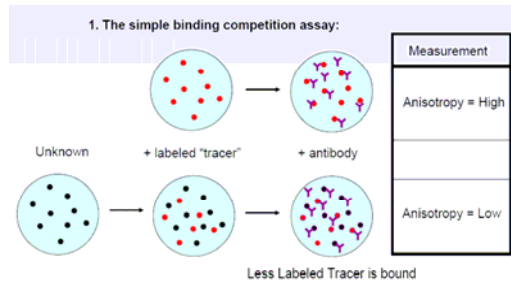


## Polarizační spektra

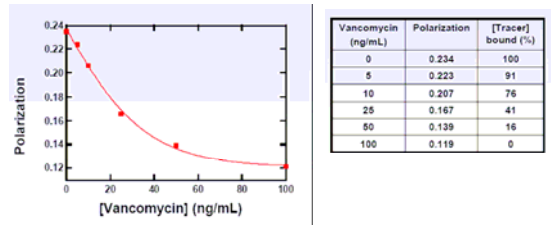
Polarizační spektra fluorescence jsou závislosti stupně polarizace nebo anizotropie na vlnové délce při konstantní vlnové délce excitujícího nebo emitovaného záření.



## Imunoanalýza – polarizace luminiscence



## Polarizace luminiscence - aplikace



Vancomycin – kalibrační křivka

## Fluorescenční korelační spektroskopie

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

## Fluorescenční korelační spektroskopie - aplikace

- 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

## Aplikace fluorescenční spektroskopie v hydrogeologii



## Migrace podzemních vod

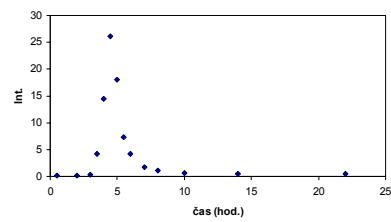
- sledování a objasnění systému podzemních řek a potoků v krasových oblastech (propadání a vývěry...)
- sledování toku vody z kontaminovaných míst (např. úložiště odpadů, skládek, atd.)



## Fluorescenční „značkovače“ podzemních vod

- fluorescenční „značkovače“ (**tracer**) jsou obvykle ve vodě rozpustné, silně fluoreskující látky (fluorescein, rhodamin, eosin, erythrosin, atd.)
- jestliže dochází k velikému zředění barviva, lze použít např. hydrofobní sběrné patrony
- k detekci lze použít jak LIF, tak spektrofluorimetr vybavený lampou (i detekce několika barviv zároveň)
- lze sledovat i časový průběh průchodu barviva potokem/řekou. Z rychlosti průtoku, zředění značkovače, vzdálenosti a dalších faktorů lze usuzovat na charakter, délku, případně členitost podzemního systému.

## Příklad



Závislost intenzity fluorescence fluoresceinu na čase ve vzorcích vody odebraných z potoka v Moravském Krasu - 50g fluoresceinu bylo rozpuštěno v potoce před propadáním nedaleko jeskyně Byčí skála a odběrem vody z okolních potoků byla prokázána propojenost systému podzemních vod.

Děkuji za pozornost...

