



**ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ  
СПЕКТРОСКОПИЯ  
(ФЛУОРИМЕТРИЯ)**

**Люминесценция** – способность многих органических и неорганических веществ к самостоятельному свечению, которое возникает в результате различных внешних воздействий.

**Люминесценция** (англ. *luminescence*) –  
- свечение.

Термин введен **Видеманом** в 1889 году.

# Типы люминесценции

## ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

свечение под влиянием  
света (УФ- и видимого)

### Флуоресценция

$\tau = 10^{-9} - 10^{-6} \text{ с}$

### Фосфоресценция

$\tau = 10^{-3} - 10^{-1} \text{ с}$

## ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

свечение, использует  
энергию хим. реакций

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ

способность живых организмов  
светиться, достигаемая само-  
стоятельно или с помощью  
симбионтов.

**Флуоресценция** (частный случай люминесценции), широко распространена в природе и может происходить в газах, растворах и твёрдых телах.

**Флуоресценция** – испускание света молекулой-флуорофором (вторичный световой поток), возбуждённой световым излучением (первичный световой поток). Вторичный световой поток возникает при переходе молекул флуорофора из возбужденного электронного состояния ( $S_1$ ) в основное ( $S_0$ ).

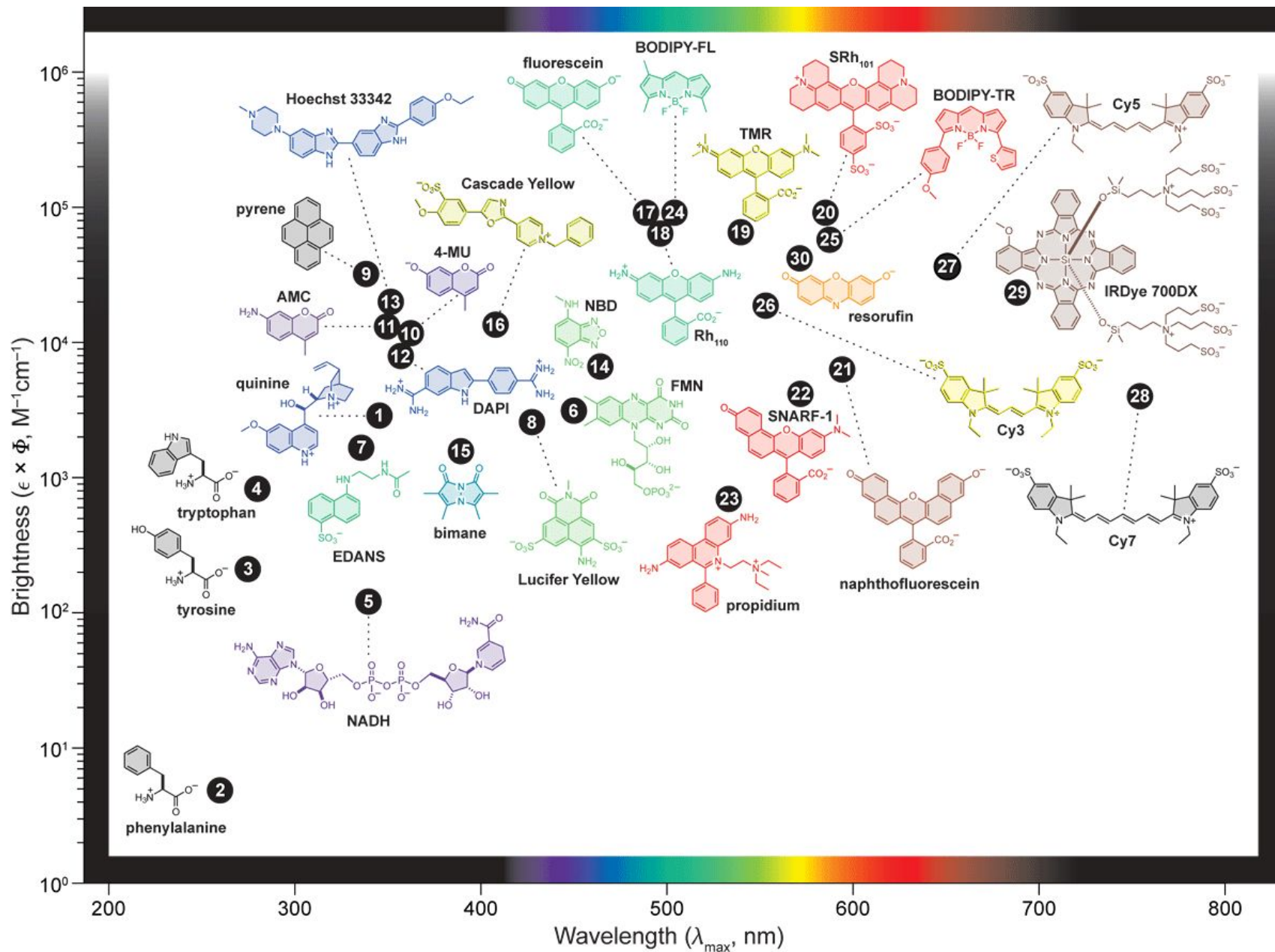
**Флуоресценция прекращается сразу при исчезновении возбуждающего светового потока. (Затухание флуоресценции в этих условиях происходит в течении наносекунд).**

**Флуорофор** – молекула или фрагмент молекулы, придающий ей флуоресцентные свойства.

Как правило, флуорофором является **карбо- или гетероциклическая структура**, которая поглощает квант светового потока с определённой энергией (определённой длины волны).

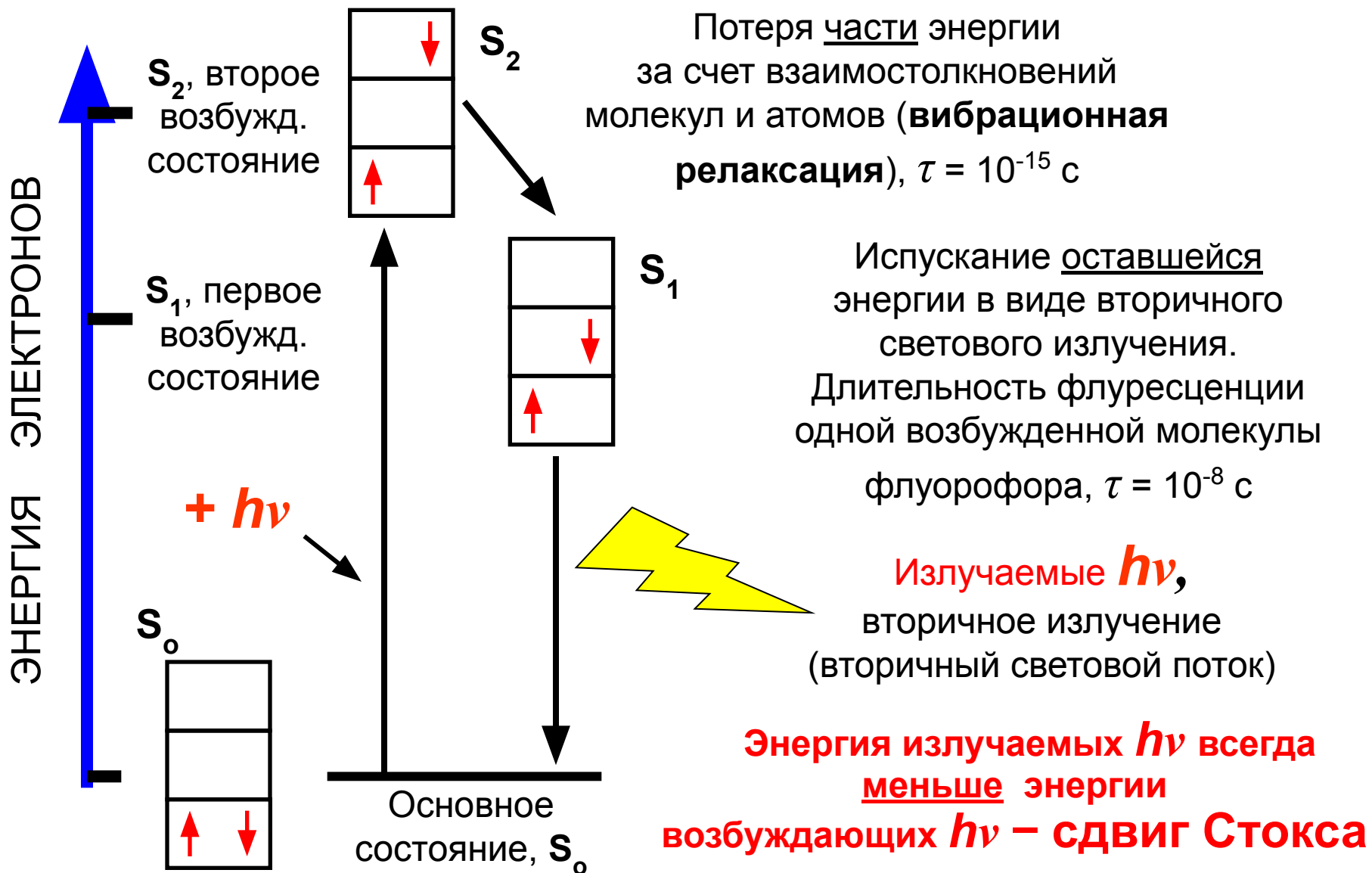
Количество энергии (длина волны) излучаемого света **зависят от химической природы флуорофора и от параметров его окружения** (вязкость, полярность и др.).

# Флуорофоры

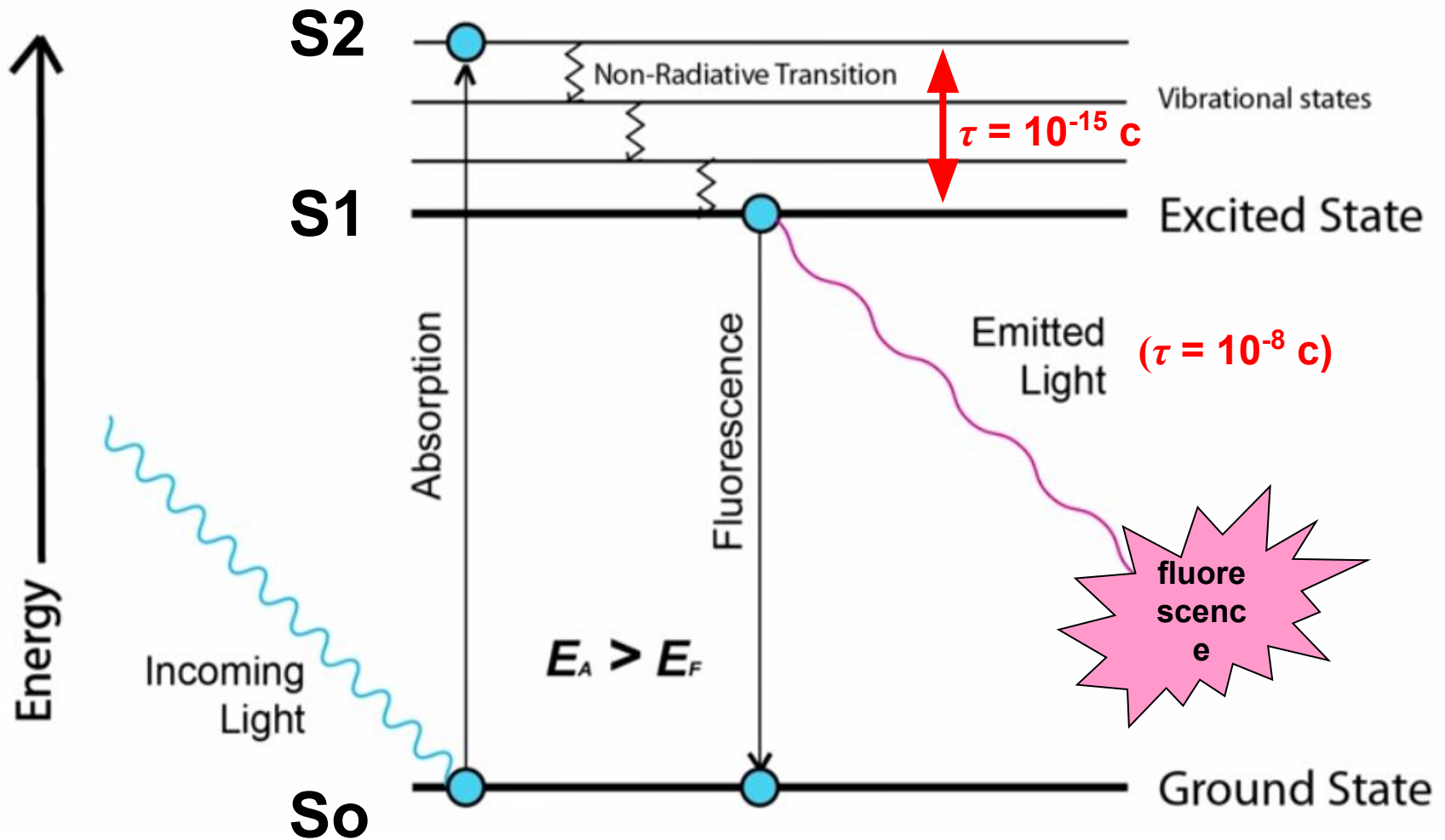


# Природа флуоресценции

(диаграмма Яблонского - энергия электронов в основном и возбужденном состояниях при флуоресценции)

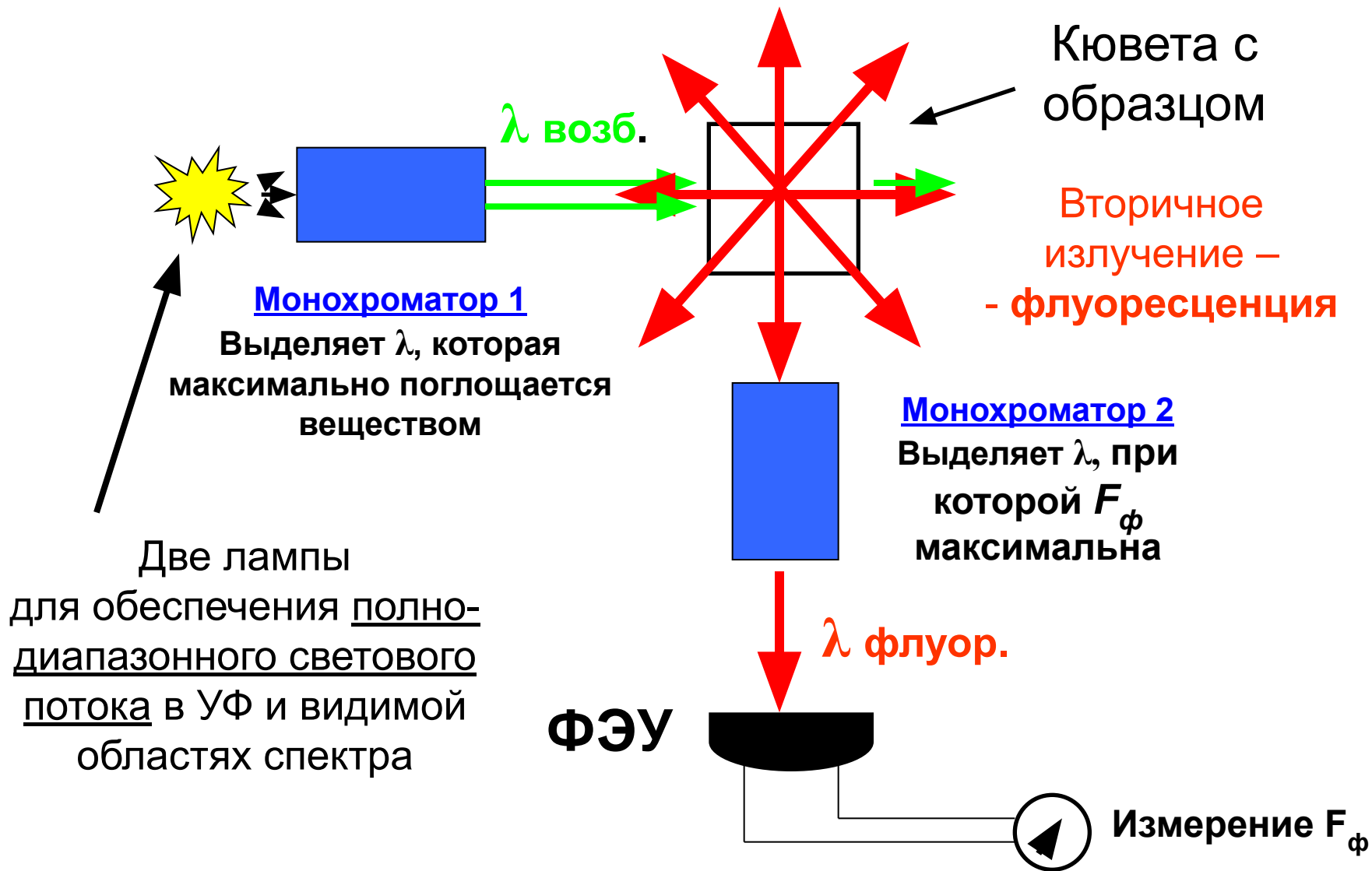


# Диаграмма Яблонского





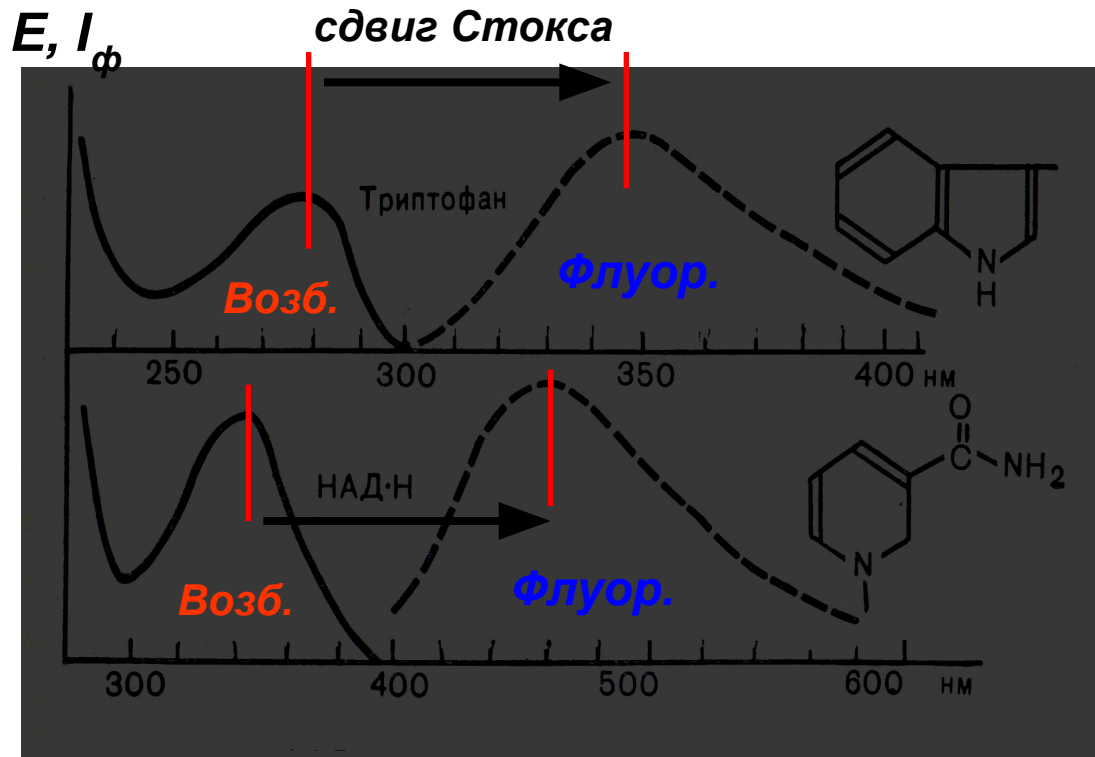
# Устройство спектрофлуориметра (вид сверху)



# Спектры возбуждения и спектры флуоресценции

**Спектр возбуждения** - зависимость количества поглощенного света от длины волны (то же, что спектр поглощения).

**Спектр флуоресценции** – интенсивность флуоресценции ( $I_{\phi}$ ), измер. при различных длинах волн.



**Сдвиг Стокса** – энергия кванта флуоресценции всегда меньше энергии кванта возбуждения –  
- **тах. флуоресценции сдвинут в длинноволновую область**



**Спектры возбуждения (поглощения), как и спектры флуоресценции **могут существенно меняться** при изменении концентрации раствора, его кислотности или щелочности (pH), природы растворителя, температуры и ряда других факторов.**

# Основные закономерности флуоресценции

1. Флуоресценция происходит при любой длине волны возбуждающего света.

2.  $Q$  (квантовый выход флуоресценции):

$$Q = \frac{\text{число квантов флуоресценции}}{\text{число поглощенных квантов}}$$

3. **Закон Вавилова:**  $Q$  не зависит от длины волны возбуждающего света.

## Зависимость интенсивности флуоресценции ( $F_{\phi}$ ) от концентрации вещества

$$F_{\phi} = I_o \times Q \times C$$

$I_o$  – интенсивность возбуждающего света;

$Q$  – квантовый выход;

$C$  – концентрация вещества

Флуоресцентный анализ на порядок чувствительней, чем спектрофотометрия.

Интенсивность флюоресценции ( $F_{\phi}$ ) флуорофора линейно зависит от его концентрации (С) только в области малых концентраций ( $10^{-11}$  -  $10^{-4}$  моль/л).

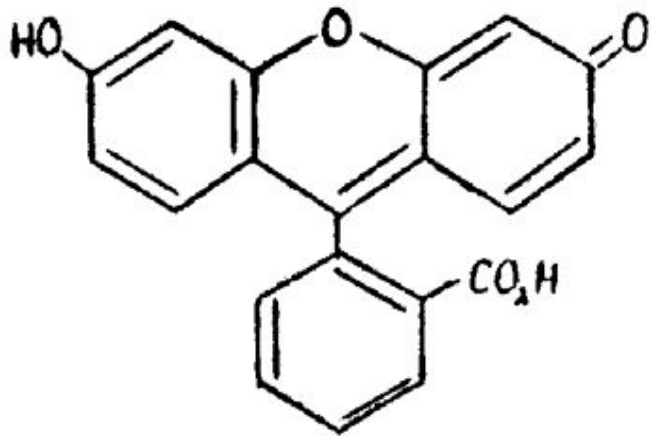
При увеличении концентрации раствора флуорофора линейность нарушается вследствие тушения флюоресценции (уменьшения ее интенсивности). В таких условиях анализ сопряжен с большой погрешностью.

## Классификация флуорофоров:

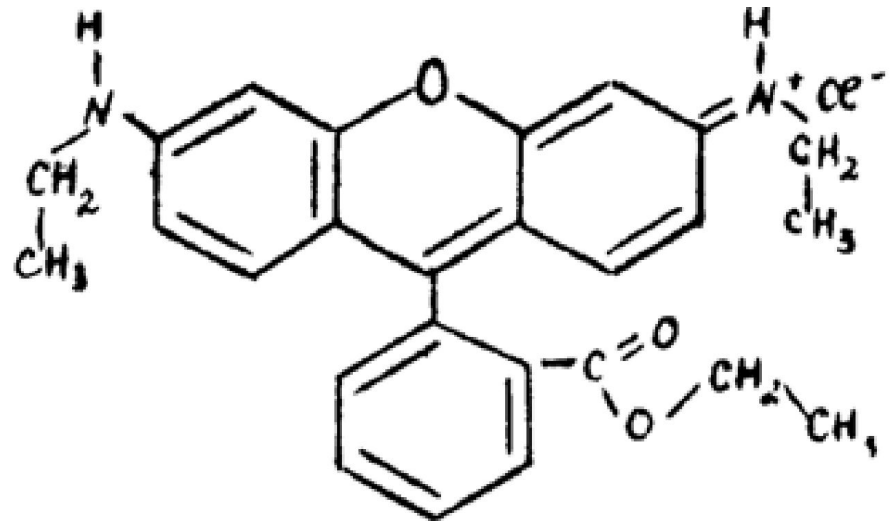
- 1. Биологические флуорофоры.** Пиридиновые нуклеотиды (кофакторы), ароматические аминокислоты в составе белков (90% флуоресценции обеспечивается триптофаном), некоторые витамины (рибофлавин), аллофикоцианин, фикоционин, фикоэритроцианин, белок зелёной флуоресценции (**green fluorescent protein - GFP**), клонирован из тропической медузы, стал распространённым инструментом – репортером (меткой) экспрессии интересующих генов.
- 2. Флуоресцентные красители.** Продукты органического синтеза: флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), родамин, кумарин и пр. Безусловно, все красители обладают хорошей водорастворимостью, фотостабильностью и нетоксичны для клеток.



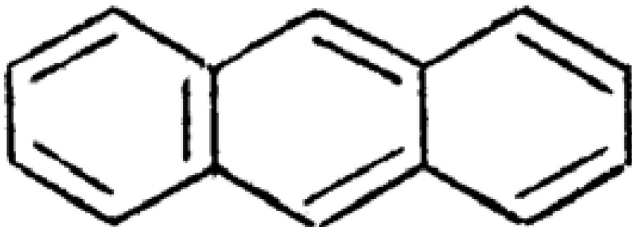
## Структурные формулы некоторых флуорофоров



**Флуоресцеин**



**Родамин 6G**



**Антрацен**

Большинство малых органических флуорофоров, нашедших практическое применение в биологии – производные кумарина, флуоресцеина и родамина.

3. Особой группой флуоресцентных соединений являются **квантовые точки** (полупроводниковые нанокристаллы). При уменьшении физических размеров частиц полупроводника до нанометровых ( 1-30 нм) они начинают проявлять свойства, отличные от объёмных полупроводников. В частности, речь идёт о квантовых эффектах. При взаимодействии квантовой точки с электромагнитным излучением светового диапазона образуется **экситон** (лат. *excito* — «возбуждаю»). Экситон – водородоподобная квазичастица (электрон и дырка). Рекомбинация экситонов (процесс «гибели» электрон-дырочной пары в полупроводнике) приводит к высвобождению энергии.

Благодаря этому частицы нанометровых размеров, образованные из таких полупроводниковых веществ, как селенид кадмия (CdSe), **способны поглощать свет и флуоресцировать.**

**Квантовые точки одного и того же химического строения, в зависимости от своих размеров, дают флуоресценцию с разной длиной волны при возбуждении одним и тем же источником света.**

**Преимуществами квантовых точек над органическими флуоресцентными красителями являются высокие квантовые выходы флуоресценции и высокая устойчивость к фотообесцвечиванию. Т.о., для работы с квантовыми точками не требуется особой аппаратуры, можно обойтись обычным флуоресцентным микроскопом.**

Материалы, из которых изготавливаются квантовые точки (Cd, Pb и др.) **ТОКСИЧНЫ** для клеток. Для уменьшения токсичности применяется многоступенчатый дизайн квантовых точек. Полупроводниковое ядро покрывается двойной защитной оболочкой из родственного материала (для CdSe - сульфид цинка) и гидрофильной полимерной оболочки, которая увеличивает растворимость квантовой точки в водной среде и даёт возможность химически привязывать к её поверхности другие молекулы.

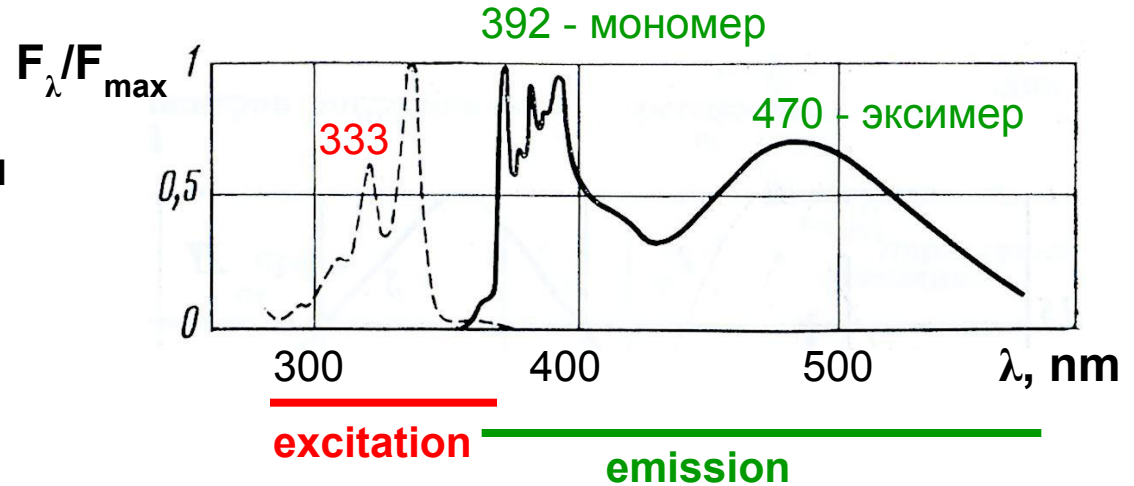
**Флуоресцентные вещества, применяемые в биологии, можно условно разделить на две большие группы:**

**1. Флуоресцентные метки** - служат для идентификации исследуемой молекулы или её пространственного положения. Метка должна быть химически стабильной и давать стабильную флуоресценцию, которая мало зависит от внешних факторов и минимально меняется во времени. Метка действует как пассивный «маяк», который сигнализирует о месте нахождения молекулы, к которой привязана. Наиболее распространёнными метками в современной клеточной и мол. биологии являются флуоресцентные белки. Мечение **белком зелёной флуоресценции** является сегодня рутинной процедурой, используемой при изучении структуры и функций белков в различных модельных организмах.

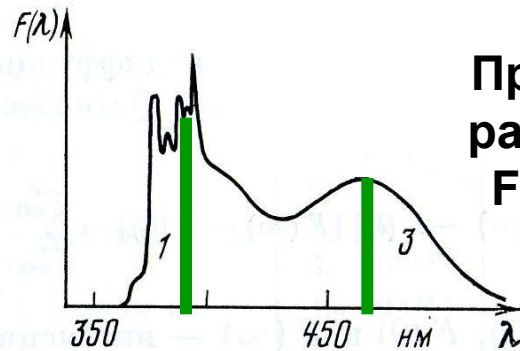
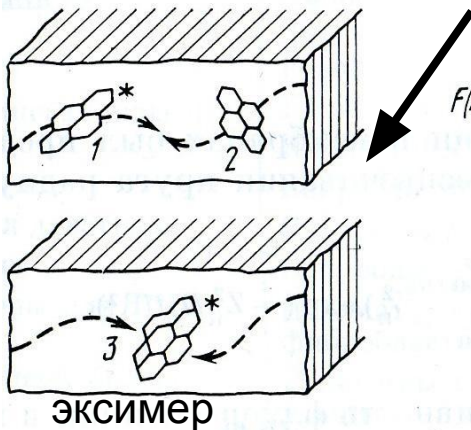
**2. Флуоресцентные зонды.** Это молекулярная конструкция, которая может существовать в **двух состояниях: «выключенном» и «включённом».** Эти состояния различаются между собой определёнными параметрами флуоресцентной эмиссии (чаще всего квантовым выходом флуоресценции, позицией максимума в спектре эмиссии или временем жизни возбуждённого состояния). **Переход между состояниями «выключен» и «включён» зависит от наличия в среде тех молекул, которые зонд должен распознавать.**

# Применение флуоресцентного зонда ПИРЕН для изучения поступательного движения молекул в биомембране (оценка вязкости липидного бислоя)

Спектры **возбуждения** и **флуоресценции** пирена



Образование эксимера пирена из его мономеров



Пирен свободно диффундирует в толще липидного бислоя. При увеличении «текучести» мембраны, **чаще образуются эксимеры** и  $F_{470}$  начинает преобладать над  $F_{392}$ .

Пирен в липидном бислое

## **Тушение (гашение) флуоресценции.**

**Тушение флуоресценции происходит вследствие того, что излучаемая флуорофором энергия передается молекулам других веществ, находящимся в этом же растворе: интенсивность флуоресценции снижается, вплоть до её полного подавления.**

**Для тушения требуется контакт между молекулами флуорофора и тушителя. При этом тушитель должен диффундировать к флуорофору в течение времени нахождения флуорофора в возбужденном состоянии.**

**В результате столкновения энергия возбуждения переходит в кинетическую энергию сталкивающихся частиц или в энергию возбуждения партнера. Эффективность тушения зависит от частоты столкновений, испытываемых возбужденным атомом.**



# Основные факторы, вызывающие тушение флуоресценции

## 1. Увеличение температуры - температурное тушение.

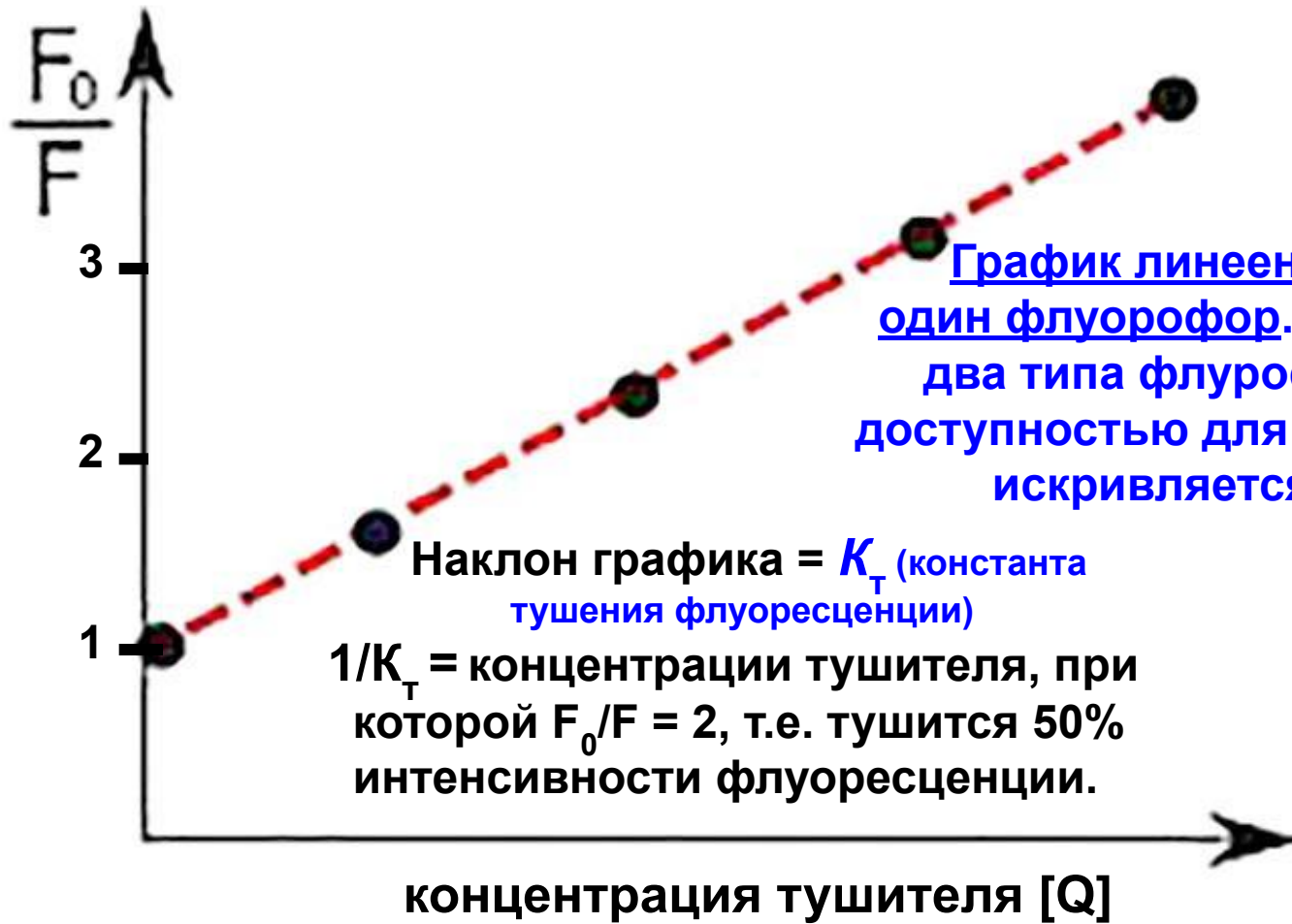
С повышением температуры частота столкновений возбужденных атомов с другими частицами возрастает, эффект тушения с ростом температуры также усиливается. В области комнатных температур выход флуоресценции обычно уменьшается на несколько % с повышением температуры на 1 °С.

## 2. Высокие концентрации - концентрационное тушение флуоресценции.

Тушение проявляется при больших концентрациях частиц, когда длина свободного пробега мала, а частота столкновений, соответственно, велика. Тушение флуоресценции, вызванное столкновением молекул флуорофора и тушителя, приводит к сокращению среднего времени жизни возбужденного состояния.

**3. Присутствие в растворе посторонних примесей, которые могут изменить рН раствора, что также приводит к тушению флуоресценции.** Для большинства флюоресцирующих веществ характерен свой интервал значений рН раствора, при которых возникает флюоресценция (рН-оптимум для флуоресценции).

# Тушение флуоресценции описывается уравнением Штерна-Фольмера, имеющего свое графическое представление - график Штерна-Фольмера



$F_0$  и  $F$  - интенсивность флуоресценции в отсутствии и в присутствии тушителя ( $Q$ ) соответственно;  $Q$  - тушитель (англ. *quencher*).

Для того, чтобы в полной мере реализовать высокую чувствительность, свойственную флуориметрии, необходимо:

- возбуждать флуоресценцию при максимуме поглощения;
- регистрировать флуоресценцию при длине волны, при которой интенсивность флуоресценции максимальна.

Для количественно анализа требуется **калибровочный график** ( $F_{\phi}$  от  $C$ ) или **стандарт** (раствор флуорофора с известной концентрацией).

# Применение флуориметрии

1. Высокочувствительный и высокоспецифичный количественный анализ (в том числе, в энзимологии).
2. Качественный анализ – **спектры возбуждения и флуоресценции уникальны.**
3. Возможность работы с суспензиями живых клеток и субклеточных структур (**мутность пробы не имеет значения**).  
**Главное – избегать условий, при которых происходит тушение флуоресценции.**
4. С использованием флуоресцентных зондов и меток – можно изучать структуру биомолекул (белков и нуклеиновых кислот), свойства биомембран, оценивать трансмембранные потенциалы, активность транспортных и др. процессов и состояний в различных живых системах.
5. В клинической биохимии – быстрый анализ содержания стероидных гормонов, катехоламинов и порфиринов, выявлять наличие биомаркёров многих заболеваний.
6. В хирургии на месте четко отграничивать интактную и патологически изменённую ткань (опухоль).