



Люминесценция биологических объектов



Люминесценция

(*Lumen, Luminis – лат свет*). «Холодное» свечение некоторых веществ)

L-я - это излучение света телами, **избыточное** ! над тепловым излучением **при той же температуре, возбужденное** ! **внешними источниками энергии** и продолжающееся в течение времени, значительно превышающего период световых колебаний.

$$\tau_{L-ии} = 10^{-9} - 10^6 \text{ с}$$

$$\tau_{\text{света}} = 10^{-15} \text{ с}$$

Видеман + Вавилов С.И.



ВАВИЛОВ С.И.

1891 - 1951

Существенно дополнил, сказав о длительности



L-я – это **коротко:**
надтемпературное свечение

Различные виды люминесценции

Люминесцируют **возбужденные** молекулы, и в зависимости от вида возбуждения различают:

- ИоноЛ-я – вызванная ионами;
- КатодоЛ-я – вызванная электронами;

ПРИМЕР:

На TV экране



- рентгеноЛ-я – рентгеновским и γ - излучением

ПРИМЕР:

На экране
рентгеновского
аппарата



- ФотоL-я – под воздействием фотонов;
- ТрибоL-я – вызывается трением

ПРИМЕР:

1605 г.
Френсис
Бекон –
кристаллы
сахара

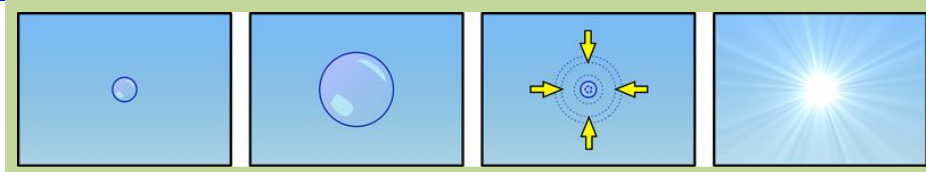


- ЭлектроL-я – вызывается электрическим полем;

• Радио L-я возникает при возбуждении атомов продуктами радиоактивного распада;

- Хемилюминесценция – излучение сопровождающее экзотермические химические реакции

• СоноL-я – под действием УЗ;



Фотолюминесценция

Возникает при возбуждении атомов светом (УФ и коротковолновая часть видимого света)

Флуоресценция – ее характеризует **кратковременное "послесвечение"**

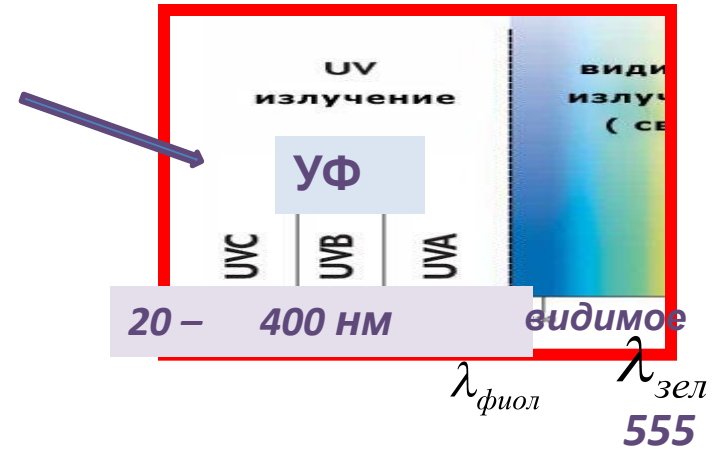
10^{-7} - 10^{-8} с после снятия возбуждения

ПРАКТИЧЕСКИ ЕГО НЕТ!

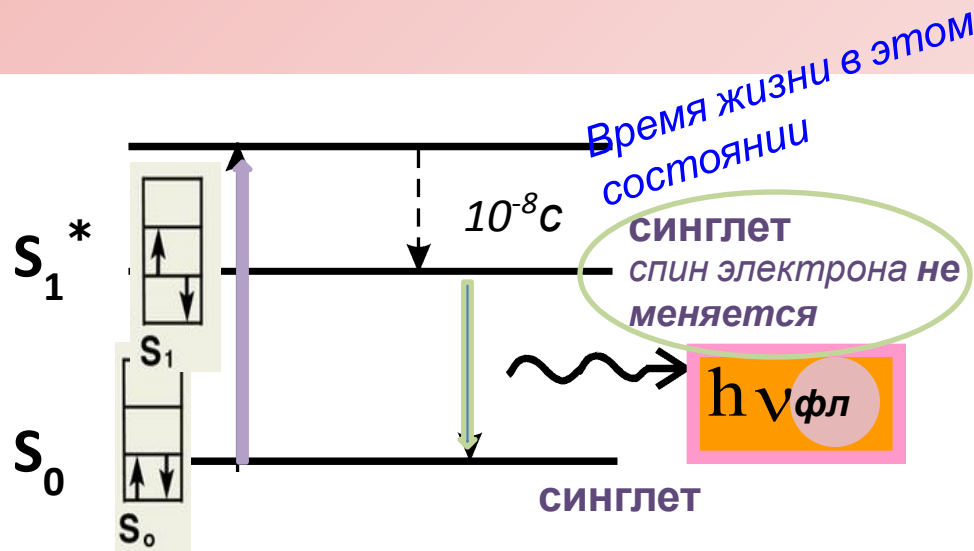
Свечение прекращается после снятия возбуждения

Фосфоресценция – ее характеризует **длительное "послесвечение"**

В физиологических условиях практически не наблюдается.



Флуоресценция – это испускание кванта света при переходе возбужденного электрона между **синглетными** уровнями (спин электрона **не** меняется). Это **разрешенный** по спину излучательный переход.



Свечение **прекращается** после снятия возбуждения.

Тоник облучают



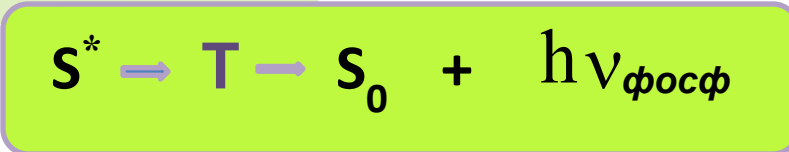
Ярко флуоресцирующее лекарственное соединение **хинин**. В кислых р-рах синяя область 475 нм.

Фосфоресценция

–это испускание кванта света при переходе возбужденного электрона из триплетного состояния в синглетное (спин электрона **меняется**). Это запрещенный по спину излучательный переход.



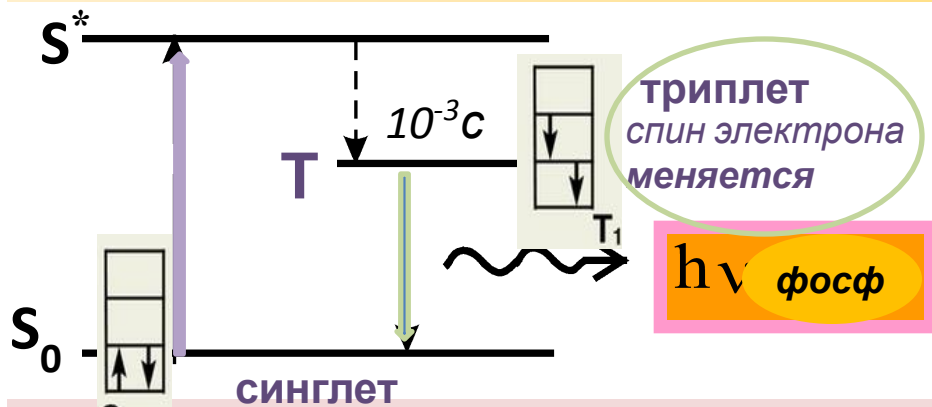
Энергия, поглощенная веществом, высвобождается **медленно** в виде света.



Банка в темноте



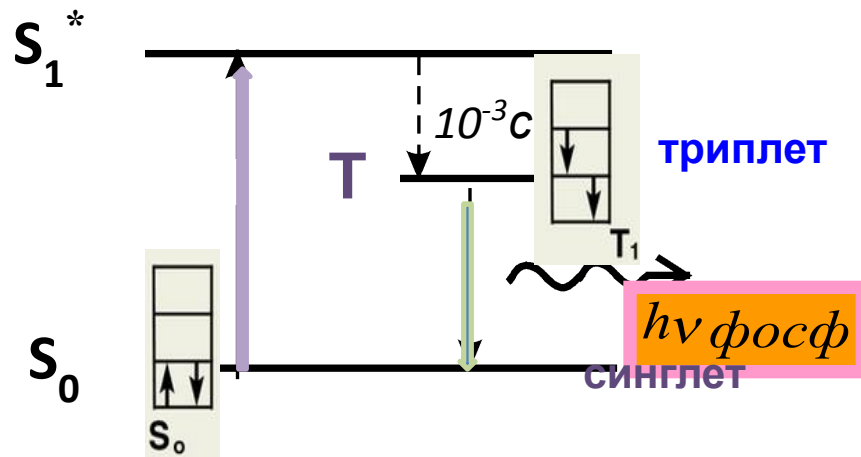
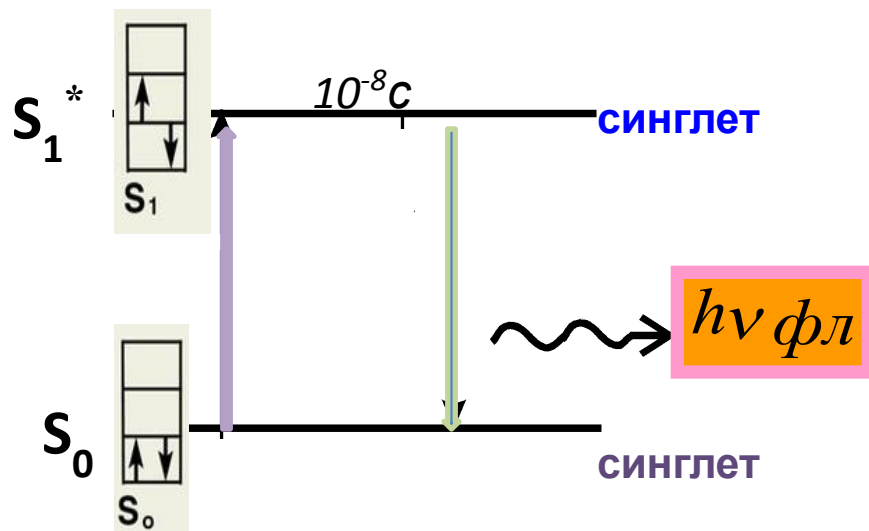
Облучили
ВИДИМЫМ СВЕТОМ и УФ



Свечение сохраняется после снятия возбуждения

ВОПРОС:

Назовите три *отличия* синглета от триплета

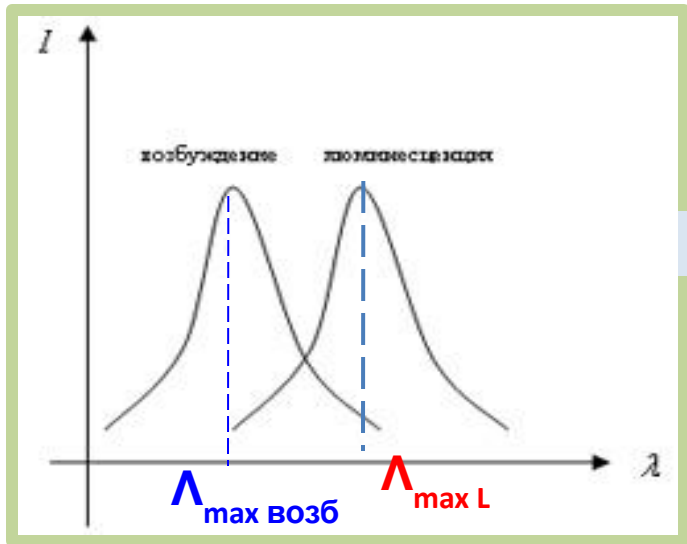


ОТВЕТ:

1. *Время жизни в триплете больше*
2. *Энергия в триплете меньше*
3. *В триплете спин меняется*

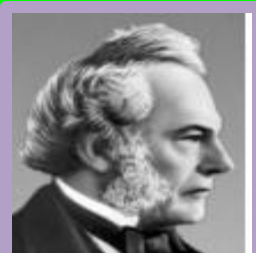
Закон Стокса для фотолюминесценции

Спектр люминесценции сдвинут в сторону больших длин волн относительно спектра, вызвавшего эту люминесценцию.



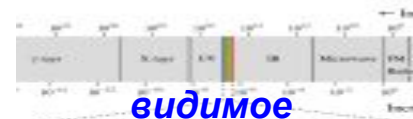
УФ

Видим.



Стокс Дж.
1819-1903(Кембридж)

На законе
Стокса
основаны все
методы
измерения L-
и



УФ

400 нм

760 нм

$\lambda_{кр}$

$\lambda_{фиол}$

$\lambda_{возб}$

$\lambda_{фиол}$

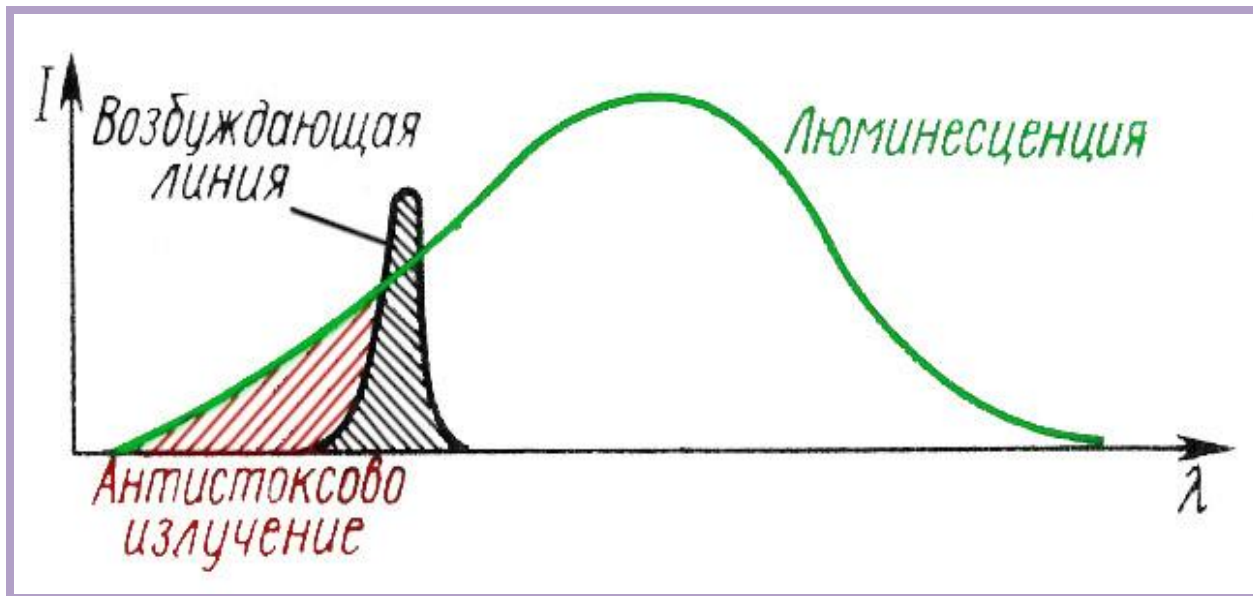
λ_L

$\lambda_{зел}$



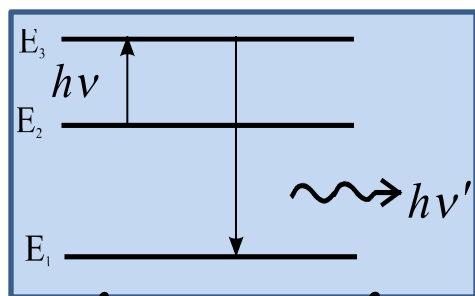
Колба с раствором флуоресцеина.

Свет L- ии характеризуется большей длиной волны, чем свет возбуждающий.



Антистоксовая

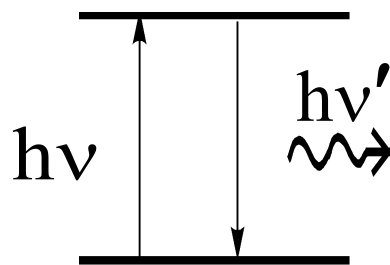
L-я (атом уже находится в возбужденном состоянии)



$$h\nu' > h\nu \quad \nu' > \nu$$

$$\lambda' < \lambda$$

Резонансная L-я

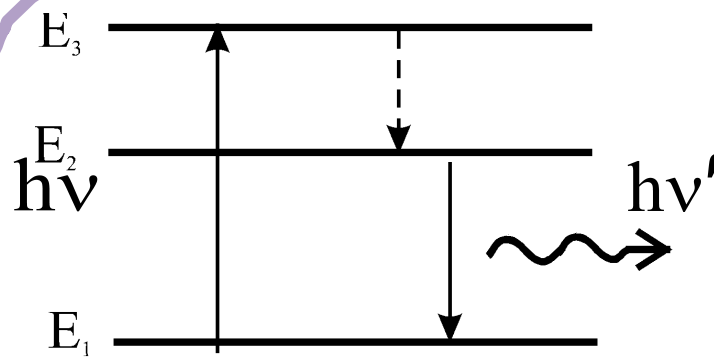


$$h\nu' = h\nu$$

$$\nu' = \nu$$

$$\lambda' = \lambda$$

Стоксовая L-я



$$h\nu' < h\nu \quad \nu' < \nu$$

$$\lambda' > \lambda$$

Характеристики L-ии

Форма спектра L-ии

Положение максимума λ_m

ax L

Квантовый выход люминесценции (φ)

Это КПД L-ии

ВОПРОС:

Для флуоресценции



$$\varphi = 0,9$$

Как это понимать?

ОТВЕТ:

На 10 погл-х квантов
высветилось 9

ВОПРОС:

Для белков $\varphi=0,03$

На 100 погл-х высветилось 3

$$I_L = 2,3 I_0 \varphi D$$

$$D = \chi C l$$

$$\varphi = \frac{N_{изл}}{N_{погл}}$$

Это отношение числа
излучаемых фотонов
($N_{изл}$) к числу
поглощенных фотонов
($N_{погл}$)

Люминесцентный качественный и количественный анализ.

L- анализ – это метод **исследования** различных объектов, основанный на наблюдении **их люминесценции**.

(по характерному для них свечению)

Качественный анализ – это метод, позволяющий обнаруживать и идентифицировать вещества в смесях по форме спектра **L-ии**

Отвечает на
вопрос:

Какое?

Определение:

- **наличия** или отсутствия веществ;
- Изучение **структуры** молекул
- Химические превращения.

Количественный анализ –это метод,

позволяющий определять **концентрацию** вещества в
смесях по интенсивности спектра **L-и**

Отвечает на вопрос: **Сколько?**

Чувствительность метода 10^{-10} г/см³

ВОПРОС: Как понимаете?

Ответ:

Можно обнаруживать **массу вещества 0, 1 нг**

Виды L-ии биологических объектов

Под воздействием УФ

**Собственное
свечение**
(Первичная L-я)

→ **Витамины** B_1, A, E, B_6
зел. УФ. син

→ **Белки**

→ Триптофан

→ Тирозин

→ Фенилаланин

Белки содержат 3 собственных флуоресцирующих хромофора:

Вторичная L-я (возникает после соответствующей химической модификации имеющихся веществ)

Под действием L-х красителей = люминофоров. Это вещества, способные превращать поглощаемую ими энергию в люминесценцию.

ПРИМЕР: • **Витамины** B_{12}, C, D
• Наркотические вещества морфин и героин после обработки серной кислотой с послед. выщелачиванием дают **синюю** фл. Опр. до **0,02** мкг наркотика в крови.

Макроанализ

Это наблюдение невооруженным глазом **L-ии** объектов, облученных **УФ** излучением.

Контроль качества фармакологических препаратов.

Контроль качества пищевых продуктов.
Проводят по собственной L-ии

ПРИМЕР: При длительном хранении молока и сливок рибофлавин окисляется в люмихром. Цвет **L-ии** меняется от **желто-зеленого** к **синему**.

Диагностика кожных заболеваний (Проводят по собственной L-ии) : под **УФ** свечение волос, кожи, ногтей при поражении их грибком и лишаем (**Ярко зеленая окраска**)



Лампа **Вуда** = лампа черного света (дает **УФ**)

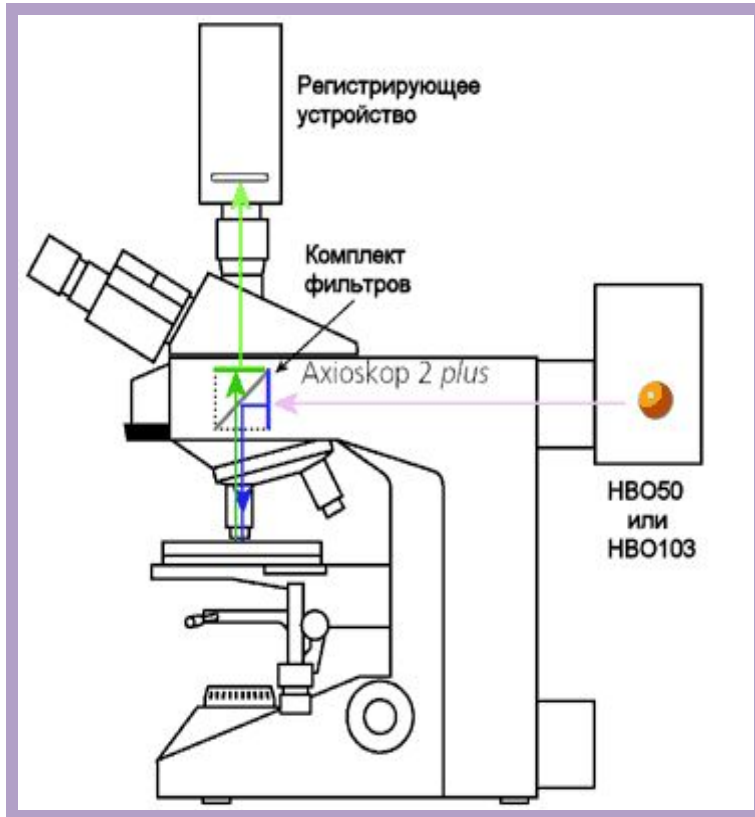


Люминесцентная микроскопия

Это метод исследования, основанный на изучении под микроскопом **L- го** свечения объекта, возникающего *при его освещении УФ.*



Устройство L-го микроскопа



3. Вторичный светофильтр
Между объективом и окуляром-
выделяет свет L-ии

Λ_L

Цвет: Зеленый,
желтый

4. Наблюдают с помощью **ФЭУ** или визуально

1. Источник для проведения фотовозбуждения:

Ртутно-кварцевая лампа
сверхвысокого давления (УФ)

Поэтому линзы конденсора и объектива....

Из кварца.

Чтобы увидеть L-ю нужны светофильтры.

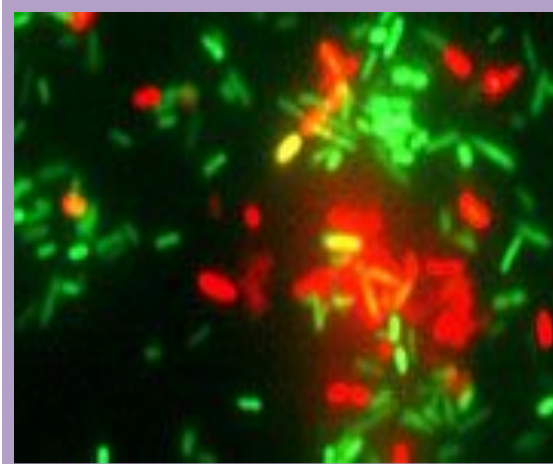
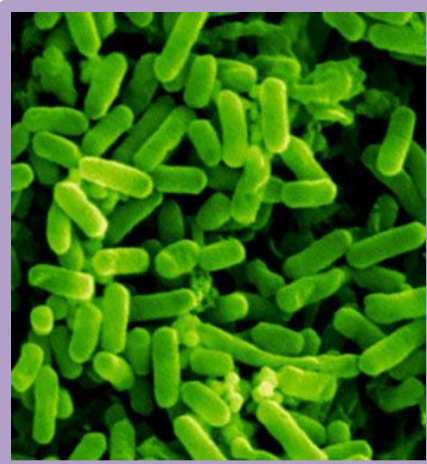
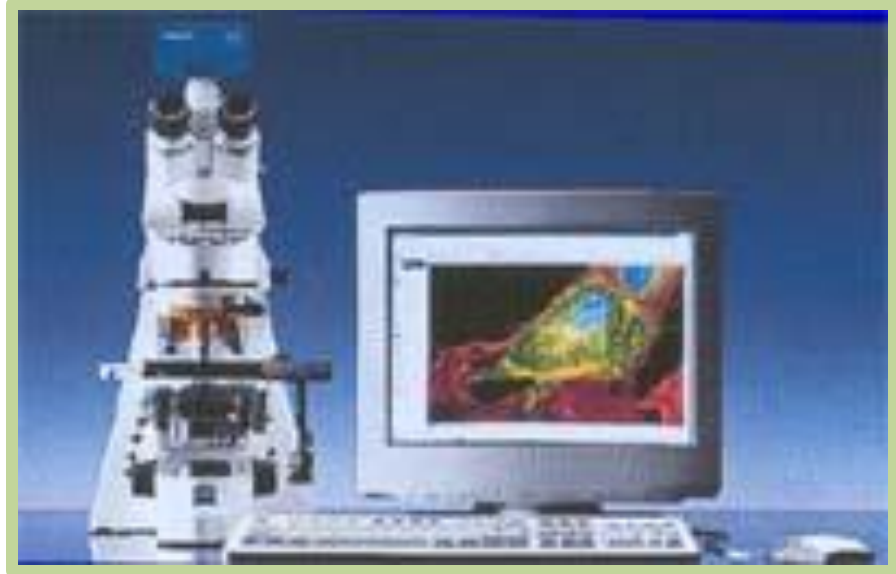
2. Первичный светофильтр
перед конденсором

Выделяет область спектра, которая
вызывает L-ию

Цвет: Фиолетовый, УФ

$\Lambda_{\text{возб}}$

E. Coli = кишечная палочка



3. Флуоресцентные зонды и метки

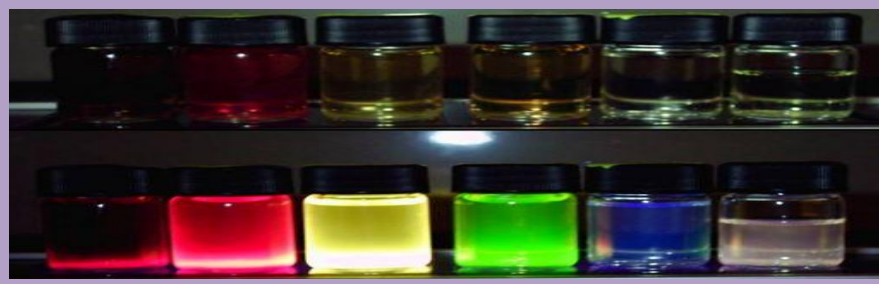
Это *люминофоры*, добавляемые к нелюминесцирующим веществам и связываемые с мембранами

Флуоресцентные зонды
(нековалентная связь с БМ)

это молекула, которая встраивается в структуру клетки, **не меняя химических связей.**
(Нековалентная связь с мембраной)

Флуоресцентные метки
(химическая связь)

Это люминофоры, **ковалентно** связанные с какими-либо молекулами, то есть путем **образования химических связей.**



ПРИМЕР: Флуоресцентные зонды

Определение времени циркуляции крови
и области с пониженным кровоснабжением.

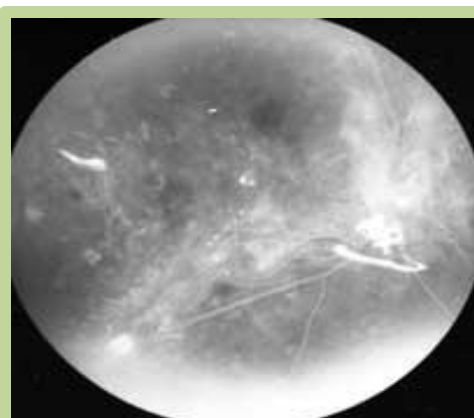
Определение скорости кровотока

Внутривенно вводят флуоресцеин
зеленая флуоресценция в тканях глаз, слизистой оболочке рта, на губах.

**Определение проницаемости
капилляров кожи**



Л-ю вызывают **УФ** и
наблюдают в **ВИДИМОЙ**
области.



Фл-я ангиография
сетчатки. **Выход**
флуоресцеина из
поврежденных сосудов

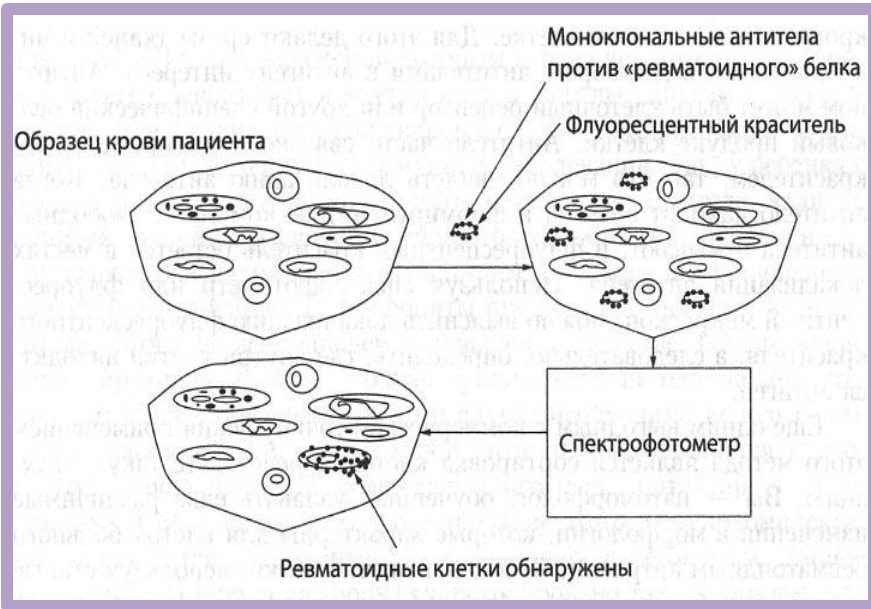


Глазное дно после
лазерокоагуляции
сетчатки.

ПРИМЕР: Флуоресцентные метки

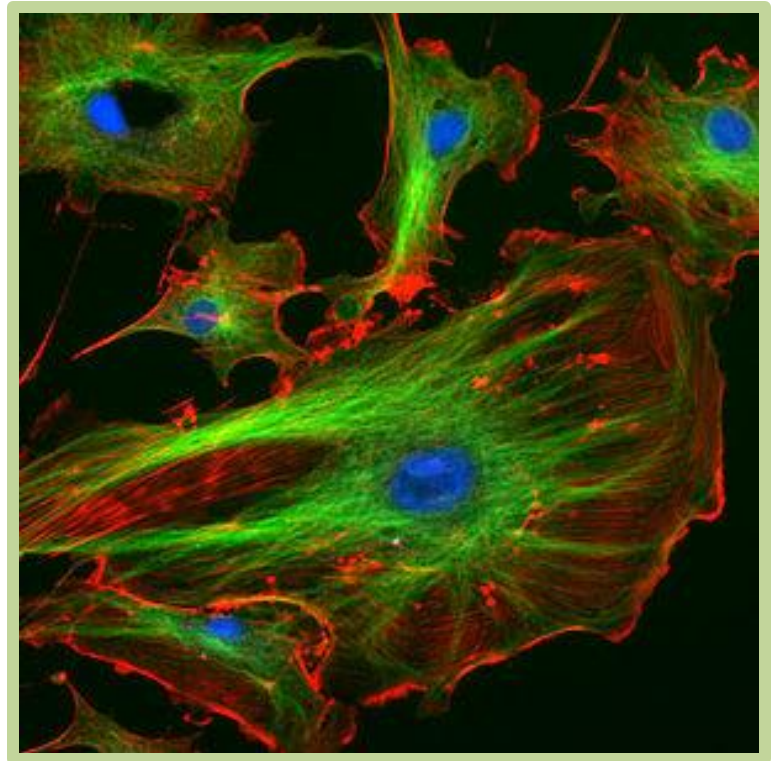
Использование **флуоресцентно меченных** антител в **иммунологических исследованиях крови**.

•Иммуоцитохимия



Использование связанных с флуоресцентной меткой моноклональных антител для выявления клеток, пораженных ревматоидным артритом

•Применение в клеточной биологии



Эндотелиальные клетки. Ядра клеток – голубой цвет; микротрубочки – зеленые – фл-но меченые антитела; Актиновые микрофиламенты – красные- меченые флуоресцеином