

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

JAROSLAVA GELETIČOVÁ

STUDIUM MOLEKULÁRNÍCH PARAMETRŮ
OVLIVŇUJÍCÍCH DYNAMICKÉ ZHÁŠENÍ
FLUORESCENCE



Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph. D.

Olomouc 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem vytvořila tuto bakalářskou práci samostatně pod vedením Doc. RNDr. Martina Kubaly Ph. D. a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny zdroje použité při zpracování práce.

V Olomouci dne 10. května 2011

Poděkování

Na úvod práce by autorka ráda vyjádřila poděkování následujícím lidem za spolupráci při tvorbě práce a za konzultaci výsledků: RNDr. Tomáši Fürstovi, Ph. D. z katedry matematické analýzy a aplikací matematiky a hlavně vedoucímu práce, Doc. RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph. D. z katedry biofyziky.

Obsah

Souhrn	3
Abstract	4
1 Úvod	5
2 Zhášení fluorescence	6
2.1 Statické zhášení fluorescence	6
2.2 Dynamické zhášení fluorescence	7
2.3 Kombinace statického a dynamického zhášení fluorescence	9
3 Nelineární efekty při zhášení fluorescence	11
3.1 Sféra akce	11
3.2 Teorie reakcí řízených difúzí	12
3.3 Teorie přechodových jevů	16
4 Mechanismy zhášení	18
5 Faktory ovlivňující zhášení fluorescence	20
5.1 Vliv teploty na zhášení fluorescence	20
5.2 Vliv elektrostatických interakcí na zhášení fluorescence	21
5.3 Vliv difúze na zhášení fluorescence	22

6	Materiál a metody	24
6.1	Chemikálie	24
6.2	Vlastní měření	24
6.2.1	Měření absorpčních spekter	25
6.2.2	Měření kinetiky dohasínání fluorescence	25
6.2.3	Měření steady-state intenzity fluorescence	26
7	Výsledky a diskuze	27
7.1	Absorpční spektra	27
7.2	Stern-Volmerův graf	28
7.3	Nelineární efekty při zhášení fluorescence	32
7.4	Zhášení HSA akrylamidem a KI	36
8	Závěr	39
	Literatura	39

Souhrn

Zhášení fluorescence je metoda, kterou je možné aplikovat na velké množství problémů. Tato práce shrnuje dostupnou teorii zhášení včetně reakcí řízených difúzí nebo reakcí ovlivněných přechodovými jevy. V experimentální části ověřujeme platnost teoretických modelů. Provedené experimenty poukázaly na to, že je potřeba kontrolovat iontovou sílu v roztoku.

Abstract

Quenching of fluorescence is widely used method, which can be applied for study of many problems. This work summarizes available theory including diffusion-controlled reactions and transient effects. In the experimental part of this work we verify theoretical models. Experiments revealed that it is important to control ionic strength in the solution as a parameter in the fluorescence quenching experiment.

Kapitola 1

Úvod

Jedním z cílů této práce je seznámit se s problematikou zhášení fluorescence. Zhášení fluorescence je obecně proces, kdy dochází k poklesu intenzity fluorescence vzorku v důsledku molekulárních interakcí. Ve skutečnosti se nejedná jen o jediný proces, ale o celou skupinu procesů, které se liší mechanismem zhášení. Základní dělení těchto mechanismů je na statické a dynamické zhášení, přičemž v rámci této práce se budeme blíže zabývat dynamickým zhášením.

Samotné zhášení fluorescence nám může poskytovat celou řadu informací o vzorku. Například účinnost zhášení bude různá pro exponovaný fluorofor a pro fluorofor nalézající se na místě, které je špatně dostupné pro molekuly zhášedla. Z toho vyplývá, že pomocí zhášení fluorescence jsme schopni zkoumat strukturu látek, popřípadě jejich konformační změny.

Cílem této práce bylo

1. Zpracovat přehled problematiky a seznámit se s různými teoretickými modely.
2. Provést modelové experimenty a diskutovat na základě experimentálních dat platnost teoretických modelů.

Kapitola 2

Zhášení fluorescence

Experimenty využívající zhášení fluorescence se začaly používat pro biochemické aplikace koncem 60. let 20. století, základy této teorie však vznikly již kolem 20. let minulého století. Dnes je tato metoda využívána ke studiu proteinů, membrán a dalších makromolekulárních sloučenin. Využití zhášení fluorescence je rovněž výhodné při studiu difúze molekul zhášedla přes membrány nebo při sledování přístupu fluoroforu vázaného v proteinu nebo membráně.

Zhášení je způsobeno molekulárními interakcemi. Tyto interakce jsou zejména reakce v excitovaném stavu, srážky s molekulami anebo formování komplexů v základním stavu. Pro případ statického zhášení je vytvářen komplex mezi fluoroforem a zhášedlem, který není schopen emitovat fluorescenci. Statické zhášení neovlivňuje dobu života excitovaného stavu, ale snižuje počet molekul schopných emitovat fluorescenci, což se projeví pozorovaným poklesem intenzity fluorescence. Statické zhášení není závislé na difúzi narozdíl od dynamického zhášení. V případě dynamického zhášení dochází k srážkám mezi excitovaným fluoroforem a molekulami zhášedla, které způsobí nezářivý přechod do základního stavu. Dynamické zhášení probíhá bez trvalých změn ve struktuře fluoroforu. Může dojít i ke zkombinování statického a dynamického zhášení, ale touto problematikou se budeme zabývat později.

2.1 Statické zhášení fluorescence

Zpracováno podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 242]. Pokud dochází k formování komplexu, který po absorpci záření není schopen emitovat foton, tak mluvíme o statickém zhášení. K intenzitě fluorescence přispívají pouze ty molekuly fluoroforu, jež nejsou vázány v kom-

plexu. Intenzitu fluorescence můžeme popsat pomocí disociační konstanty komplexu:

$$K_S = \frac{[F - Q]}{[F][Q]} \quad (2.1)$$

kde $[F - Q]$ je koncentrace komplexu. Označme celkovou koncentraci fluoroforu jako $[F_T]$, přičemž v nepřítomnosti zhasědla platí $[F_T] = [F]$. V přítomnosti zhasědla platí:

$$[F_T] = [F] + [F - Q]. \quad (2.2)$$

Pokud do rovnice 2.2 dosadíme z rovnice 2.1 získáme následující výraz pro disociační konstantu:

$$K_S = \frac{[F_T] - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_T]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (2.3)$$

Pokud uvážíme, že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu $[F]$, dostaneme Stern-Volmerovu rovnici ve tvaru

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q], \quad (2.4)$$

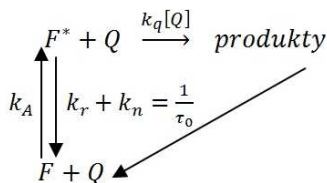
kde F_0 je intenzita fluorescence v nepřítomnosti zhasědla a platí $[F_T] = F_0$.

Ze Stern-Volmerovy rovnice plyne, že Stern-Volmerova zhasěcí konstanta K_{SV} je rovna disociační konstantě K_S .

Při statickém zhasění tedy dochází k poklesu intenzity fluorescence v důsledku snížení koncentrace molekul schopných emitovat fluorescenci. Stav fluoreskujících molekul (tzn. těch, které nejsou v komplexu se zhasědlem) však zůstává nezměněn a nedochází tedy ke změně střední doby života excitovaného stavu těchto molekul ($\tau = \tau_0$).

2.2 Dynamické zhasění fluorescence

Dynamické zhasění podle [Lakowicz, J.R., 1999, str. 239-241] může popsat pomocí následujícího schématu:



Obrázek 1 - Schéma dynamického zhasění podle [Valeur, B., 2006, str. 73]. O dyna-

mickém zhášení mluvíme tehdy, pokud dochází ke srážkám fluoroforu, který je v excitovaném stavu, s molekulami zhášedla a v důsledku toho přejde fluorofor zpět do základního stavu bez vyzáření fotonu. Pravděpodobnost srážek je úměrná koncentraci zhášedla $[Q]$.

Časovou evoluci koncentrace $[F^*]$ po excitaci δ - pulzem můžeme popsat pomocí Stern - Volmerovy rovnice

$$\frac{d[F^*]}{dt} = -(k_r + k_n + k_q [Q]) [F^*] = -\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right) [F^*], \quad (2.5)$$

kde k_r je rychlostní konstanta pro zářivé přechody, k_n je rychlostní konstanta pro nezářivé přechody v nepřítomnosti zhášedla, k_q je bimolekulární zhášecí konstanta a počáteční podmínky jsou $[F^*]_0$ je koncentrace fluoroforu $[F^*]$ v čase $t=0$.

Po integraci dostaneme výraz

$$[F^*] = [F^*]_0 \exp\left\{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right) t\right\}. \quad (2.6)$$

Intenzita fluorescence je dána

$$I(t) = k_r [F^*] = k_r [F^*]_0 \exp\left\{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right) t\right\} = I(0) \exp\left\{-\left(\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]\right) t\right\}, \quad (2.7)$$

kde k_r je rychlostní konstanta zářivých přechodů. Doba života excitovaného stavu za přítomnosti zhášedla je popsána rovnicí

$$\tau = \frac{1}{\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]} = \frac{\tau_0}{1 + k_q \tau_0 [Q]}, \quad (2.8)$$

kde τ_0 je doba života excitovaného stavu bez zhášedla. Za přítomnosti zhášedla je kvantový výtěžek fluorescence dán jako

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_n + k_q [Q]} = \frac{k_r}{\frac{1}{\tau_0} + k_q [Q]}. \quad (2.9)$$

Zatímco kvantový výtěžek fluorescence bez zhášedla je

$$\Phi_0 = k_r \tau_0. \quad (2.10)$$

Stern-Volmerova rovnice pro dynamické zhášení je

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]. \quad (2.11)$$

Charakteristické hodnoty bimolekulární zhášecí konstanty jsou v intervalu $10^9 - 10^{10} M^{-1} s^{-1}$. Nízká hodnota bimolekulární zhášecí konstanty značí nepřístupnost fluoroforu. Naopak vysoké hodnoty naznačují, že dochází k vazebné interakci. Obecně platí $k_q = k_D P$, k_D je

difúzní rychlostní konstanta pro bimolekulární reakce a P je efektivita zhášení. Pro případ dynamického zhášení a pro standardní zhášedla je hodnota efektivita zhášení blízka jedné.

Bimolekulární zhášecí konstantu je možné svázat s molekulárními parametry pomocí Smoluchovského rovnice, která má následující tvar

$$k_q = 4\pi N_A (R_F + R_Q) (D_F + D_Q). \quad (2.12)$$

V této rovnici vystupuje Avogadrova konstanta N_A , kolizní poloměry molekul fluoroforu a zhášedla R_F, R_Q a difúzní koeficienty fluoroforu a zhášedla D_F, D_Q .

V případě samotného dynamického zhášení je Stern-Volmerův graf lineární, jeho průsečík na ose y je vždy roven jedné a jeho směrnice odpovídá Stern-Volmerově zhášecí konstantě K_{SV} . Pokud jsme ale obdrželi lineární Stern-Volmerův graf, tak to nemusí znamenat, že se jedná o dynamické zhášení, protože i statické zhášení je v tomto grafu popsáno lineární závislostí. Mezi látky způsobující dynamické zhášení patří akrylamid, molekulární kyslík, jodid, oxid dusnatý a bromistanový aniont.

2.3 Kombinace statického a dynamického zhášení fluorescence

Existuje mnoho případů, kdy dochází k dynamickému zhášení během formování komplexu s tímž zhášedlem. Díky takovéto kombinaci zhášení je schopná emitovat fluorescenci jen nezkomplexovaná část fluoroforu, která nebyla zhasnuta srážkami se zhášedlem.

Statické zhášení je popsáno Stern-Volmerovu rovnicí ve tvaru

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{(1 + K_S [Q])}, \quad (2.13)$$

kde K_S je Stern-Volmerova konstanta pro statické zhášení.

A navíc dochází i k dynamickému zhášení popsanému Stern-Volmerovou rovnicí

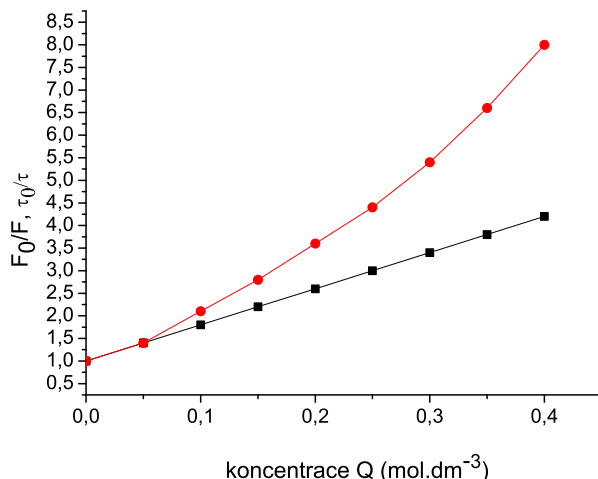
$$\frac{F'_0}{F'} = (1 + K_D [Q]), \quad (2.14)$$

K_D je Stern-Volmerova zhášecí konstanta pro dynamické zhášení.

Pro výslednou kombinaci obou zhášení dostaneme

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_S [Q]) (1 + K_D [Q]) = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2. \quad (2.15)$$

Současně dynamické i statické zhášení se projeví kvadratickým zakřivením Stern-Volmerova grafu směrem nahoru.



Obrázek 2 - Stern-Volmerův graf zobrazující kombinaci statického a dynamického zhášení podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 243]. Červeně je zde zobrazen poměr intenzit $\frac{F_0}{F}$ a černě je zobrazen poměr dob života excitovaného stavu $\frac{\tau_0}{\tau}$.

Lineární je potom modifikovaný Stern-Volmerův graf závislosti $\frac{(\frac{F_0}{F}-1)}{[Q]}$ na $[Q]$. V tomto případě je zhášení popsáno pomocí zdánlivé zhášecí konstanty K_{App} , která je dána rovnicí

$$K_{App} = K_D + K_S = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]. \quad (2.16)$$

Průsečík tohoto modifikovaného grafu s osou y je roven právě zdánlivé zhášecí konstantě a jeho směrnice je $K_D K_S$.

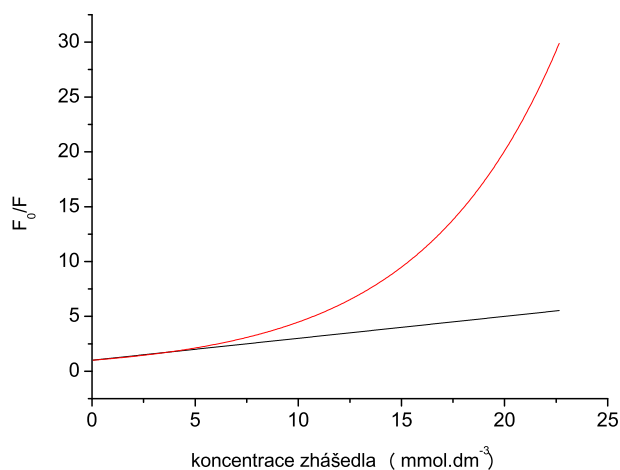
K současnému statickému a dynamickému zhášení dochází například při zhášení FAD nebo NADH adeninovou složkou. Flavinová fluorescence je zhášena oběma procesy. Vzhledem k tomu, že tyto aromatické sloučeniny mají nestabilní strukturu vlivem konjugovaného postavení vazeb, tak je komplex v základním stavu také nestabilní a výsledkem je právě kombinace statického a dynamického zhášení.

Kapitola 3

Nelineární efekty při zhášení fluorescence

3.1 Sféra akce

V případě vysoké koncentrace zhášedla můžeme pozorovat zakřivení Stern-Volmerova grafu ve směru nahoru. Tuto situaci zobrazuje obr. 3.



Obrázek 3 - Stern-Volmerův graf zobrazující zakřivení ve směru nahoru, které je charakteristické pro sféru akce. Červeně je zde zobrazena křivka $\frac{F_0}{F} \exp(V [Q])$ a černě je zde zobrazen poměr intenzit $\frac{F_0}{F}$.

Při vysokých koncentracích roste pravděpodobnost toho, že se nějaká molekula zhášedla bude nalézat během excitace dostatečně blízko fluoroforu a nedovolí mu emitovat

fluorescenci. Podle [Valeur, B., 2006, str. 84] budeme předpokládat existenci koule o objemu V , kde je pravděpodobnost zhašení rovna jedné. Tuto kouli označme sférou akce. Dále je možné uvažovat Poissonovo rozdělení pravděpodobnosti nalezení n molekul zhašedla v objemu V . Tato pravděpodobnost je

$$P_n = \frac{\langle n \rangle^n}{n!} e^{-\langle n \rangle}, \quad (3.1)$$

kde $\langle n \rangle = V [Q] N$ ($N = \frac{N_A}{1000}$) je průměrný počet molekul ve sféře.

Pravděpodobnost nalezení všech molekul zhašedla mimo objem V je

$$P_0 = e^{-\langle n \rangle} = e^{-V[Q]N_A}. \quad (3.2)$$

Sestavíme-li poměr intenzit $\frac{F_0}{F}$, získáme následující výraz

$$\frac{F_0}{F} = e^N = e^{V[Q]N_A}. \quad (3.3)$$

Je zřejmé, že tento výraz se liší od Stern-Volmerovy rovnice, která je lineární. Pokud jsou ale hodnoty koncentrace zhašedla malé (blízké nule), tak lze exponenciální funkci nahradit řadou, přičemž získáme následující výraz

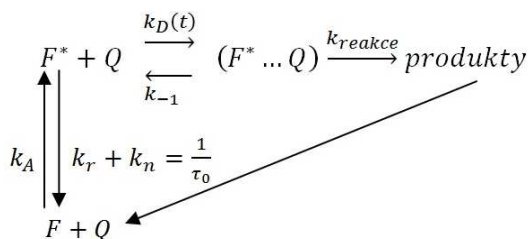
$$e^{V[Q]N_A} \approx 1 + V [Q] N_A. \quad (3.4)$$

Což není nic jiného než Stern-Volmerova rovnice.

V literatuře se uvádí charakteristické hodnoty $N_A V = 1-3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Objem koule je možné určit ze vztahu $V = \frac{4}{3} \pi R^3$. Dosazením do uvedených vztahů získáme poloměr sféry akce přibližně 10^{-10} m .

3.2 Teorie reakcí řízených difúzí

Zpracováno podle [Valeur, B., 2006, str. 80- Box 4.1]. Uvažujme reakci fluoroforu F a zhašedla Q , která je popsána následujícím schématem



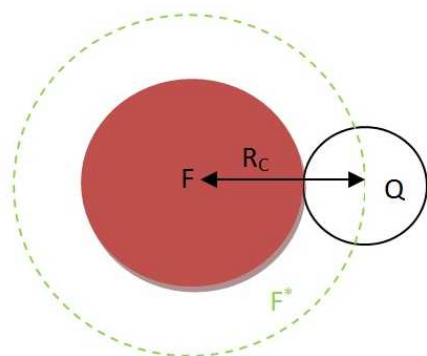
Obrázek 4 - Schéma popisující reakci zhašedla s fluoroforem, která je řízená difúzí. V tomto případě je rychlostní konstanta charakterizující difúzi řízených proces zhašení $k_D(t)$ závislá na čase.

Budeme uvažovat difúzní rychlostní konstantu $k_D(t)$ závislou na čase. Potom intenzita po excitaci delta pulzem je

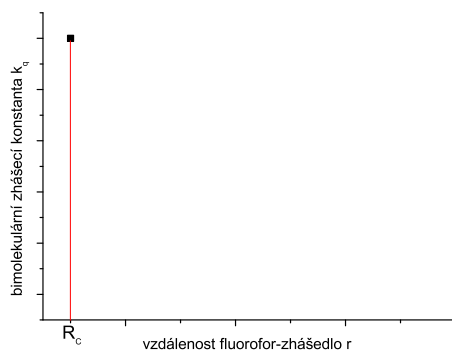
$$F(t) = F(0) \exp \left\{ -\frac{t}{\tau_0} + [Q] \int_0^t k_D(t') dt' \right\}. \quad (3.5)$$

Smoluchovského teorie

Teorie je založená na předpokladu, že pravděpodobnost proběhnutí reakce mezi molekulou fluoroforu a zhášedlem je rovna 1, pokud jsou molekuly F a Q ve vzdálenosti R_c (absolutní vazebná podmínka). Rychlostní konstanta k_{reakce} dosahuje hodnoty ∞ a rychlostní konstantu disociace k_{-1} můžeme zanedbat. Výsledkem vazebné podmínky je nulová koncentrace nezkomplexovaného zhášedla $[Q] = 0$ na povrchu sféry s poloměrem R_c . Tuto situaci popisují obrázky 5 a 6.



Obrázek 5 - Vytvořeno podle [Zelent, B. a kolektiv, 1996]. Tento obrázek ilustruje konstrukci Smoluchovského teorie. Zobrazuje vzájemnou polohu fluoroforu a zhášedla.



Obrázek 6 - Tento graf popisuje závislost bimolekulární zhášecí konstanty na vzdálenosti fluoroforu a zhášedla zobrazené na obrázku 5. Zobrazená funkce má rovnici

$k_q(r) = \kappa \delta(r - R_C)$. Smoluchovského teorie předpokládá nekonečnou hodnotu specifické zhášecí konstanty κ . Tuto závislost popisuje Dirackova delta funkce. Zpracováno podle [Zelent, B. a kolektiv, 1996].

Hodnotu $k_D(t)$ lze určit ze změny koncentrace zhášedla Q v koncentračním gradientu, které je v kontaktu s fluoroforem F. Změna koncentrace zhášedla Q závisí na jeho radiální distribuci a pravděpodobnosti $p(r, t)$. Pokud je uvažován roztok zhášedla Q, pak je možné radiální distribuční funkci popsat pomocí Fickovy rovnice:

$$\frac{\partial p(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 p(r, t), \quad (3.6)$$

kde r je vzdálenost mezi molekulami F a Q, D je difúzní koeficient molekul F, Q. Tento difúzní koeficient lze vypočítat pomocí Einstein-Smoluchovského rovnice ve tvaru

$$D = D_F + D_Q = \frac{kT}{f\eta\pi} \left(\frac{1}{R_F} + \frac{1}{R_Q} \right), \quad (3.7)$$

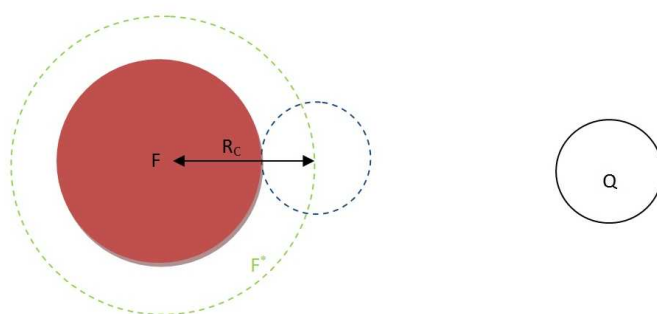
kde k je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota, f je koeficient závislý na typu vazby mezi molekulami F, Q (pro statické vazebné podmínky je roven 6 a pro dynamické vazebné podmínky je roven 4) a η je dynamická viskozita roztoku.

Pro počáteční podmínku homogenního rozdělení distribucí zhášedla Q, lze zapsat Smoluchovského rovnicí pro roztok

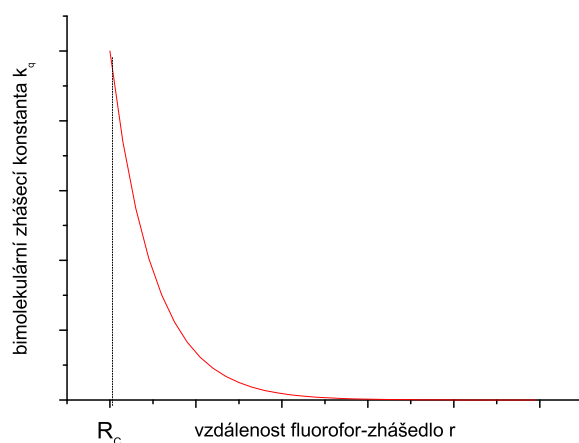
$$k_D^S(t) = 4\pi R_c D N \left[1 + \frac{R_c}{(\pi D t)^{1/2}} \right]. \quad (3.8)$$

Collins-Kimballova teorie

Tato teorie oproti Smoluchovského teorii očekává konečnou hodnotu k_{reakce} pro molekuly F i Q ve vzdálenosti $r = R_c$. Pro větší vzdálenosti hodnota k_{reakce} exponenciálně klesá k nule a tedy zhášedlo je volné, nereaguje s fluoroforem. Zachováme předpoklad, že rychlostní konstantu disociace k_{-1} můžeme zanedbat. Dále předpokládáme, že hodnota k_{reakce} je přímo úměrná pravděpodobnosti nalezení molekuly Q ve vzdálenosti $(R_c, R_c + \delta r)$ od molekuly F. Této situaci odpovídá obrázek 7.



Obrázek 7 - Zpracováno podle [Zelent, B. a kolektiv, 1996]. Tento obrázek ilustruje situaci, kterou popisuje Collins-Kimballova teorie.



Obrázek 8 - Tento graf popisuje závislost bimolekulární zhášecí konstanty na vzdálenosti fluoroforu a zhášedla zobrazené na obrázku 7. Zobrazená křivka pro bimolekulární zhášecí konstantu má rovnici $k_q(r) = k_a \exp\left(-\frac{r-R_c}{r_e}\right)$, kde k_a je hodnota bimolekulární zhášecí konstanty ve vzdálenosti největšího přiblížení, r_e je charakteristický parametr pro interakci definovanou poklesem bimolekulární zhášecí konstanty v závislosti na vzdálenosti. Collins-Kimballova teorie předpokládá exponenciální pokles bimolekulární zhášecí konstanty ve vzdálenostech větších než R_c . Zpracováno podle [Zelent, B. a kolektiv, 1996].

Smoluchovského rovnici pak lze přepsat do tvaru

$$k_D^{SCK}(t) = \frac{\beta k_{reakce}}{\beta + k_{reakce}} \left[1 + \frac{k_{reakce}}{\beta} \exp\{\alpha^2 Dt\} \operatorname{erfc}(\alpha\sqrt{Dt}) \right], \quad (3.9)$$

$$\alpha = \frac{\beta k_{reakce}}{\beta + k_{reakce}}; \beta = 4\pi N R_c D,$$

kde $erfc$ označuje doplňkovou chybovou funkci, která je definována jako

$$erfc(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-u^2} du.$$

3.3 Teorie přechodových jevů

V této kapitole využijeme poznatků z [Valeur, B., 2006, str. 79, 82-83], že difúzní koeficient a bimolekulární zhášecí konstanta jsou závislé na čase. Bimolekulární zhášecí konstanta je popsána Smoluchovského rovnicí, která je uvedena jako rovnice 3.9. Odezva na δ - pulz pro případ zhášení limitovaného difúzí je

$$f(t) = f(0) \exp \left\{ -\frac{t}{\tau_0} + [Q] \int_0^t k_q(t') dt' \right\} \quad (3.10)$$

Což lze přepsat do tvaru

$$f(t) = f(0) \exp(-at - 2b\sqrt{t}), \quad (3.11)$$

$$a = \frac{1}{\tau_0} + 4\pi DR_c N [Q], \quad b = 4\sqrt{D\pi} NR_c^2 [Q].$$

Pokud měření probíhá v roztocích s nízkou viskozitou po velmi krátké časy, pak hrají přechodové jevy významnou roli. Pro vysoce viskózní média jsou tyto jevy zanedbatelné. Za podmínek kontinuálního osvětlení je možné snadno určit steady-state intenzitu jako konečnou sumu odezvy na excitaci δ -pulzem. V tomto případě můžeme nahradit sumu integrálem. Vytvořením poměrů intenzit bez zhášedla a se zhášedlem, je možné získat rovnici

$$\frac{F_0}{F} = \frac{1 + 4\pi\tau_0 DR_c [Q] N}{Y}, \quad (3.12)$$

kde $Y = \frac{b\sqrt{\pi}}{\sqrt{a}} \exp\left(\frac{b^2}{a}\right) erfc\left(\frac{b}{\sqrt{a}}\right)$.

Přechodové jevy do Stern-Volmerovy rovnice započítávají pomocí faktoru Y . V Stern-Volmerově grafu se přechodové jevy projeví jako malé zakřivení grafu ve směru nahoru.

S využitím následujícího vztahu z [Bartsch, H. J., 2006, str. 618]

$$erfc(x) = 1 - erf(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-t^2} dt \approx \frac{e^{-x^2}}{2x} \left[1 - \frac{1}{2x^2} + \frac{1.3}{(2x^2)^2} + \dots \right] \quad (3.13)$$

lze v rovnici 3.12 nahradit doplňkovou chybovou funkcí řadou

$$\operatorname{erfc}\left(\frac{b}{\sqrt{a}}\right) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_{\frac{b}{\sqrt{a}}}^{\infty} e^{-t^2} dt \approx \frac{\sqrt{a}e^{-\frac{b^2}{a}}}{2b} \left[1 - \frac{a}{2b^2} + \dots\right]. \quad (3.14)$$

Vyjádření faktoru Y se pak značně zjednoduší na

$$Y = \frac{b\sqrt{\pi}}{\sqrt{a}} \exp\left(\frac{b^2}{a}\right) \operatorname{erfc}\left(\frac{b}{\sqrt{a}}\right) \approx \frac{b\sqrt{\pi}}{\sqrt{a}} e^{-\frac{b^2}{a}} \left(\frac{\sqrt{a}}{2b} e^{-\frac{b^2}{a}} \left[1 - \frac{a}{2b^2}\right]\right) = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \left(1 - \frac{a}{2b^2}\right) \quad (3.15)$$

Dosazením tohoto výrazu do rovnice 3.12 dostaneme

$$\begin{aligned} \frac{F_0}{F} &= \frac{2}{\sqrt{\pi}} (1 + 4\pi\tau_0 DR_c N [Q]) \left[\frac{2b^2}{2b^2 - a}\right] = \\ &= \frac{2}{\sqrt{\pi}} (1 + 4\pi\tau_0 DR_c N [Q]) \left[\frac{2(4\sqrt{D\pi}R_c^2 [Q] N)^2}{2(4\sqrt{D\pi}R_c^2 [Q] N)^2 - \frac{1}{\tau_0} - 4\pi DN R_c [Q]}\right]. \end{aligned} \quad (3.16)$$

Přechodové jevy se projevují v kinetice dohasínání fluorescence v roztocích s nízkou viskozitou na časové škále do 10 ps, [Lakowicz, 2006, 3. ed., strana 345].

Kapitola 4

Mechanismy zhášení

Intersystémová konverze

Excitovaný fluorofor je v singletním stavu a srážka se zhášedlem způsobí jeho přechod do tripletního stavu. Tripletní stav má větší dobu života excitovaného stavu než singletní stav, proto může dojít k účinnému zhášení jiným mechanismem. Často dochází k nezářivému přechodu do základního stavu a energie je přeměněna na teplo. Mezi zhášedla způsobující intersystémovou konverzi patří například molekulární kyslík a jodid.

Přenos elektronu indukovaný světlem

Tento mechanismus je častý u zhášedel bohatých na elektrony nebo naopak s nedostatkem elektronů. V případě zhášedla bohatého na elektrony dochází při reakci s excitovaným fluoroforem k přenosu elektronu na fluorofor. Vzniká tedy redukovaný fluorofor a oxidované zhášedlo. V případě zhášedla s nedostatkem elektronů proces probíhá analogicky, ale vzniká oxidovaný fluorofor a redukované zhášedlo. Tento mechanismus je častý například ve fotosyntéze nebo při zhášení antracenu diethylanilinem.

Přenos protonu indukovaný světlem

Obecně jsou acidobazické vlastnosti látek v základním a excitovaném stavu různé. Existují případy, kdy jsou zásady nebo kyseliny silnější v excitovaném stavu než ve stavu základním. V takových případech může dojít k přenosu protonu vlivem excitace fluoroforu.

Tvorba excimerů a exciplexů

Excimery jsou excitované dimery, které mohou vznikat při srážce excitované molekuly se shodnou molekulou v základním stavu. Exciplexy jsou pak excitované komplexy vytvořené při srážce excitované molekuly s jinou molekulou v základním stavu. Tvorba exciplexů a excimerů je řízena difúzí. Dále je ovlivňována koncentrací látek, teplotou a viskozitou

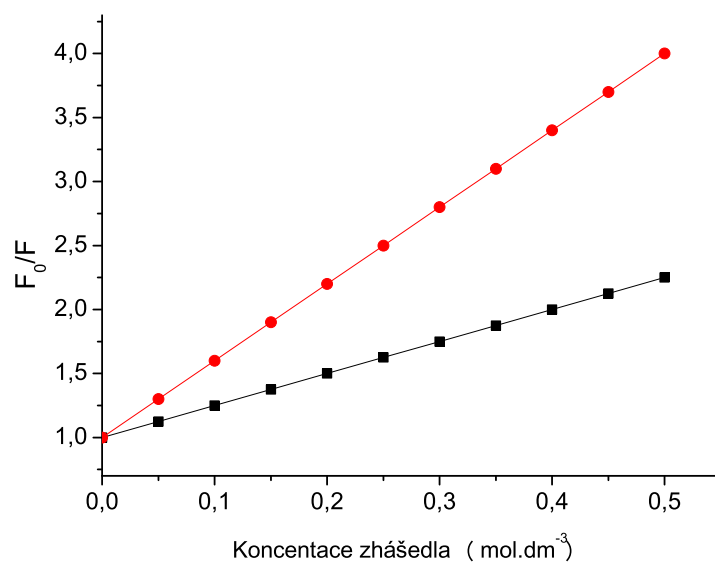
prostředí. Excimery i exciplexy mohou přecházet do základního stavu zářivým i nezářivým přechodem.

Kapitola 5

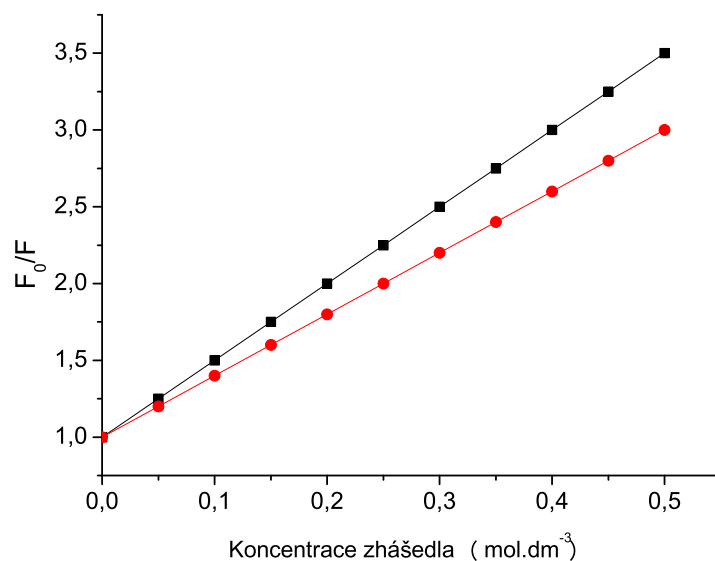
Faktory ovlivňující zhášení fluorescence

5.1 Vliv teploty na zhášení fluorescence

Vliv teploty na zhášení je výhodné sledovat pomocí změn ve Stern-Volmerově grafu.



Obrázek 9 - Vytvořeno podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 240]. Tento Stern-Volmerův graf zobrazuje změny efektivity dynamického zhášení vlivem teploty, přičemž červeně jsou zobrazeny hodnoty získané za zvýšené teploty.



Obrázek 10 - Podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 240]. Tento Stern-Volmerův graf opět zobrazuje změny, ke kterým dochází u statického zhašení vlivem rostoucí teploty. Červeně jsou zobrazeny hodnoty při zvýšené teplotě.

Zvýšení teploty způsobí zvýšení difúzních koeficientů a tedy zvýší efektivitu dynamického zhašení, které je způsobené právě srážkami molekul zhašedla s fluoroforem. V případě statického zhašení bude nárůst teploty znamenat zvýšení disociace slabě vázaného komplexu, který způsobuje zhašení. Efektivita zhašení bude tedy klesat s rostoucí teplotou.

5.2 Vliv elektrostatických interakcí na zhašení fluorescence

Minimalizace efektů elektrostatické interakce mezi molekulami zhašedla a fluoroforu se často provádí pomocí udržování vysoké iontové síly roztoku. Uvažujeme-li fluorofor navázaný na makromolekulu ve shodě s [Eftink, M. R., 1991, str. 71]. Srovnáním zhašení s nabitými nebo neutrálními zhašedly jsme schopni získat informace o elektrostatickém potenciálu v blízkosti fluoroforu. Různé hodnoty iontové síly mohou být využity k popisu vzdálenosti mezi náboji lokalizovaných v blízkosti fluoroforu a počtu těchto nábojů, jak je uvedeno v [Ando, T. a Asai, H., 1980]. Zdánlivá zhašecí konstanta je pro nabitě zhašedlo podle [Ando, T. a Asai, H., 1980] popsána rovnicí

$$\ln k_{q,elec} = \ln k_0 + \frac{z_Q z_M e_0^2}{T R_0 k_B} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) + \frac{z_Q z_M e_0^2}{k t \epsilon} \frac{1}{R_0} \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{R_0 - a}{\lambda}\right)}{1 + \frac{a}{\lambda}}\right), \quad (5.1)$$

kde a je nejmenší možná vzdálenost obou molekul, k_0 je zhášecí konstanta bez elektrostických interakcí, z_M, z_Q je náboj makromolekuly a zhášedla, e_0 je elementární náboj, ϵ je dielektrická konstanta, R_0 je nejmenší interakční vzdálenost fluoroforu a zhášedla a λ je Debyeův poloměr, který je definován jako

$$\lambda = \left(\frac{1000 k T \epsilon}{8 \pi N_A e_0^2}\right) \frac{1}{\sqrt{\mu}}. \quad (5.2)$$

V této rovnici vystupuje iontová síla μ . Hodnotu iontové síly jsme schopni určit pomocí vztahu

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i r_i^2, \quad (5.3)$$

kde c_i je koncentrace daného iontu a r_i je náboj iontu. Rovnici 5.1 lze za podmínek $R_0 \approx a$ a $a \ll \lambda$ můžeme aproximovat na

$$\log k_{q,elec} \approx \log k_0 + 0,434 \frac{z_Q z_M e_0^2}{T R_0 k_B} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) + C z_Q z_M \sqrt{\mu}, \quad (5.4)$$

kde C je konstanta rovna 1,02 pro vodné roztoky při 25°C.

Rovnice 5.4 se v literatuře často označuje jako Scatchardova rovnice. V [Ando, T. a Asai, H., 1980] také autoři diskutovali fakt, že zvolené podmínky pro aproximaci rovnice 5.1 nejsou vhodné. Tuto skutečnost podložili i experimentálními výsledky, a proto se tímto řešením problematiky elektrostických interakcí nebudeme dále zabývat.

5.3 Vliv difúze na zhášení fluorescence

Proces dynamického zhášení může být difúzí limitován, proto má difúze nezanedbatelný vliv na tento typ zhášení. V dříve uvedených vztazích se často vyskytuje právě difúzní koeficient D (např. rovnice 3.9, 3.11, 3.14). Hodnota difúzního koeficientu může být určena například pomocí Einstein-Smoluchovského rovnice (rovnice 3.7), která má následující tvar

$$D = D_F + D_Q = \frac{kT}{f \eta \pi} \left(\frac{1}{R_F} + \frac{1}{R_Q}\right),$$

kde k je Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota, f je koeficient závislý na typu vazby mezi molekulami F a Q (pro statické vazebné podmínky je roven 6 a pro

dynamické vazebné podmínky je roven 4) a η je dynamická viskozita roztoku. Z této rovnice plyne, že hodnota difúzního koeficientu je přímo úměrná teplotě, proto s rostoucí teplotou poroste i difúzní koeficient. Dále je difúzní koeficient úměrný převrácené hodnotě dynamické viskozity. Poznamenejme, že dynamická viskozita je parametr, který je také závislý na teplotě. Dynamická viskozita vody je popsána vztahem

$$\eta = A \cdot 10^{\frac{B}{T-C}}, \quad (5.5)$$

kde T je termodynamická teplota a A , B , C jsou koeficienty s následujícími hodnotami $A = 2,414 \cdot 10^{-5}$ Pa.s, $B=247,8$ K a $C=140$ K.

Předchozí část se zabývá vlivem elektrostatických interakcí na dynamické zhášení fluorescence, přičemž výsledné rovnice nepopisují závislost na difúzním koeficientu, i když dynamické zhášení je proces limitovaný difúzí. Tato skutečnost může být důvodem, proč experimenty přesně nesouhlasí s touto teorií. Řešením tohoto problému by mohlo být nalezení vztahu mezi iontovou silou a difúzním koeficientem, který dosud nebyl objasněn. Je tedy možné, že vliv elektrostatických interakcí na difúzí řízený proces zhášení bude ve výsledku menší než vliv iontové síly na tentýž proces.

Kapitola 6

Materiál a metody

6.1 Chemikálie

V experimentální části byly použity různé fluorofory, rozpouštědla a byl zkoumán vliv dvou zhášedel způsobujících dynamické zhášení fluorescence. Zásobní roztok fluoresceinu v etanolu (Sigma) byl o koncentraci 1 mM. Dalším fluoroforem byl albumin z lidského séra (HSA, human serum albumin, Sigma) ve vodě o celkové koncentraci 20 μM . Jako poslední fluorofor byl používán N-acetyl-L-tryptofanamin (NATA, Sigma) ve vodném roztoku o koncentraci 150 μM .

Jako zhášedlo byl použit roztok KI (Lachema) ve vodě nejčastěji o koncentraci zásobního roztoku 1 M a vodný roztok akrylamidu (Biorad) o koncentraci 1 M. K roztoku KI byl podle [Zelent, B. a kolektiv, 1998] přidán vodný roztok thiosíranu disodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sigma Aldrich) o koncentraci 1 mM, aby bylo zabráněno tvorbě aniontů I_3^- , které by mohly experiment ovlivnit.

Pro udržení stálého pH byl použit fosfátový pufr ze sodných solí o celkové koncentraci 10mM. Použitý monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného byl z Lachema a heptahydrát hydrogenfosforčnanu disodného byl také z Lachema. Pufrační oblast tohoto pufru je okolo pH 7. Experimentálně bylo pH určeno pomocí pH-metru (typ pH 330i, WTW, Německo). Tato hodnota pH byla 6,83.

6.2 Vlastní měření

Tato práce nejčastěji používá titrační experimenty ke studiu parametrů ovlivňujících zhášení. Pro experimenty s fluoresceinem byly použity plastové kyvety a pro experimenty

s NATA a HSA byly použity křemenné kyvety s optickou dráhou 1 cm.

6.2.1 Měření absorpčních spekter

Pro měření absorpčních spekter byl použit spektrofotometr UV 550 (Unicam, Velká Británie) a program Vision 32. Absorpční spektra byla měřena v oblasti 250 - 500 nm rychlostí 120 nm/min a při spektrální šířce štěrbin 1 nm. Absorpční spektra pro jednotlivá zhasedla byla měřena v roztoku s fosfátovým pufrem a proto byla určena absorpce samotného pufru, která byla dále použita jako pozadí (baseline).

6.2.2 Měření kinetiky dohasínání fluorescence

Pro měření kinetiky dohasínání fluorescence byl použit spektrofotometr pro časově korelované čítání fotonů FluoTime 200 (PicoQuant GmbH, Německo) včetně příslušejícího měřícího softwaru PicoHarp 300. Jako světelný zdroj pro excitaci fluoresceinu byla použita laserová dioda o vlnové délce 445 nm, pro excitaci NATA byla použita dioda pro UV oblast o vlnové délce 298 nm. Experimenty byly prováděny za různých teplot, které byly udržovány pomocí termostatu F30C (Julabo Laborortechnik, Německo). Pro všechna měření bylo zachováno nastavení frekvence excitačních pulzů 10 MHz, časové rozlišení 16 ps na kanál. V případě NATA byly použity obě štěrbin s šířkou 16 nm a vlnová délka emise byla 350 nm. Měření bylo ukončeno uplynutím zadaného časového intervalu nebo dosažením 10000 fotonů v jednom z kanálů. Funkce přístrojové odezvy (IRF - instrument response function) byla v případě excitace světlem o vlnové délce 445 nm změřena pomocí rozptylu světla v destilované vodě a v případě excitace světlem o vlnové délce 298 nm byl použit roztok Ludoxu.

Naměřené kinetiky dohasínání byly vyhodnoceny pomocí softwaru PicoQuant FluoFit verze 4.2.1. Tento program umožňuje fitování naměřené kinetiky dohasínání fluorescence multiexponenciální funkcí, která má obecný tvar

$$F(t) = \int_t^{-\infty} IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt', \quad (6.1)$$

kde $IRF(t')$ je funkce přístrojové odezvy, A_i jsou amplitudy jednotlivých komponent a τ_i jsou střední doby života excitovaných stavů jednotlivých komponent.

Při této analýze kinetiky dohasínání byly sledovány parametry redukovaný χ_R^2 , náhodilost rozložení residuí a autokorelační funkce. V případě χ_R^2 byla požadována jeho hodnota blízká jedné.

Takto získané hodnoty intenzit byly navíc opraveny vzhledem k ředění fluoroforu a byly

vytvořeny Stern-Volmerovy grafy. V případě více-exponenciálního dohasínání fluorescence byla použita intenzitně vážená hodnota doby života excitovaného stavu k vytvoření Stern-Volmerova grafu.

Pro určení bimolekulární zhasací konstanty byly použity doby života excitovaného stavu zjištěné pomocí metody TCSPC.

6.2.3 Měření steady-state intenzity fluorescence

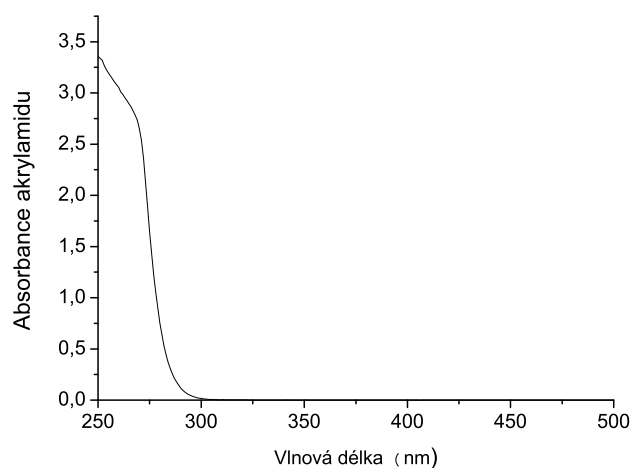
Pro měření steady-state intenzit byl použit fluorescenční spektrofotometr F4500 (Hitachi, Japonsko) v režimu fotometrie. Teplota byla udržována pomocí termostatu F12-ED (Julabo Laborortechnik, Německo). Měření bylo prováděno pro NATA v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm při vlnové délce excitace 298 nm a vlnové délce emise 350 nm. Dále pro experimenty s HSA byly použity křemenné kyvety s 1 cm optickou drahou a vlnovou délkou excitace 298 nm a vlnovou délkou emise 340 nm. Šířka štěrbin byla nastavena na 5,0 nm pro excitaci i emisi a rychlost snímání byla zvolena 240 nm/min. Hodnoty steady-state intenzit byly opět korigovány na ředění fluoroforu a byly vytvořeny příslušné Stern-Volmerovy grafy.

Kapitola 7

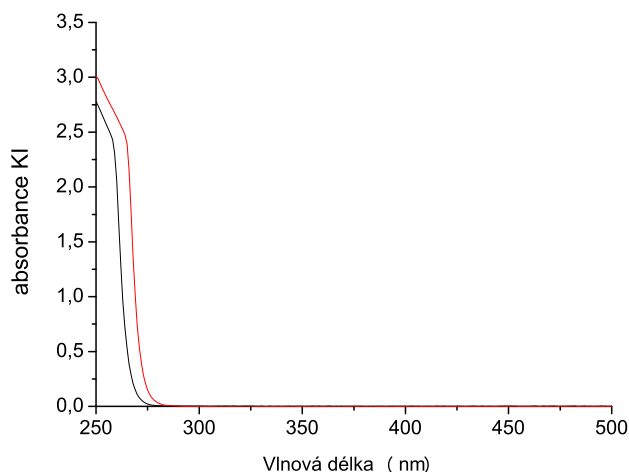
Výsledky a diskuze

7.1 Absorpční spektra

Jako první bychom v této části chtěli prezentovat absorpční spektra jednotlivých zlášedel, která byla dále použita pro zkoumání vlivu molekulárních parametrů na zlášení fluorescence.



Obrázek 11 - Absorpční spektrum akrylamidu ve fosfátovém pufru o výsledné koncentraci 100 mM.

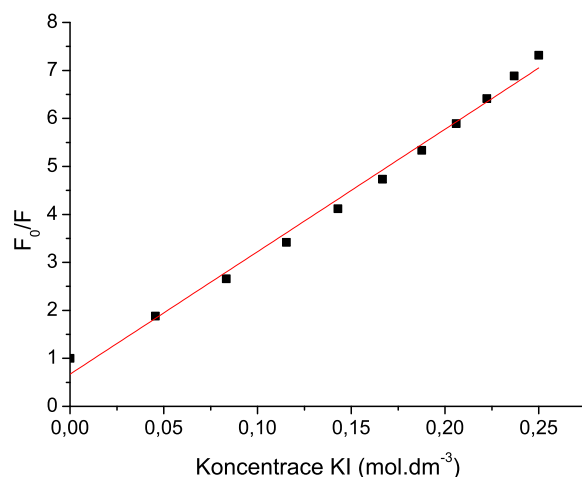


Obrázek 12 - Absorpční spektrum vodného roztoku KI ve fosfátovém pufru. Černě je zobrazen roztok KI v pufru o výsledné koncentraci 0,66 M a červeně je zobrazen roztok KI ve fosfátovém pufru s přidáním thiosíranu disodného o koncentraci 1 mM.

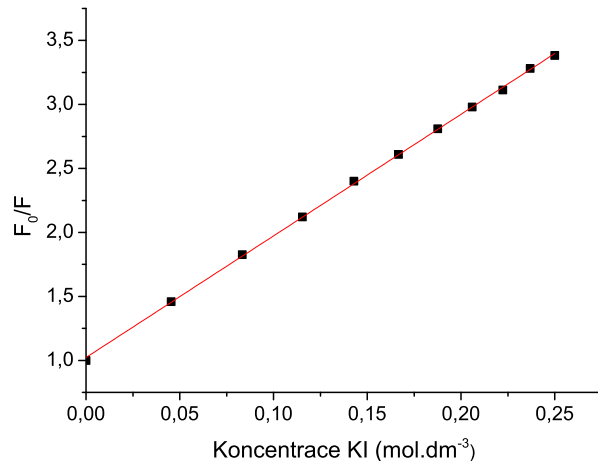
Z uvedených absorpčních spekter je zřejmé, že námi zvolená zhášedla v oblasti kolem 298 nm neabsorbují. Jejich použití je v tomto případě vhodné, protože nezatěžují experimenty efekty spojenými s vlastní absorpcí.

7.2 Stern-Volmerův graf

V této části budou uvedeny některé Stern-Volmerůvy grafy pro dynamické zhášení fluorescence. Teorie udává pro dynamické zhášení fluorescence lineární závislost F_0/F nebo τ_0/τ na koncentraci zhášedla. Oba tyto případy budeme prezentovat v této kapitole.



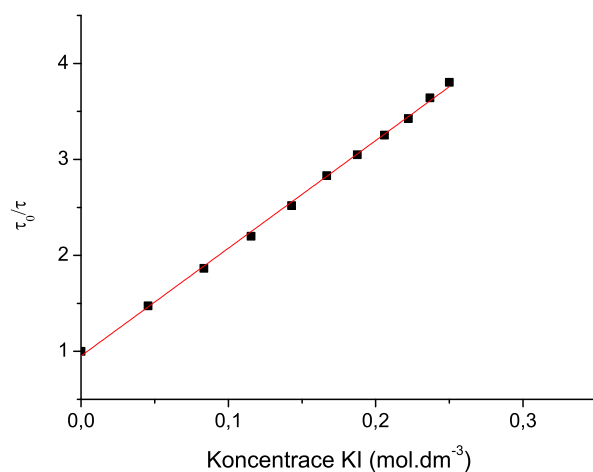
Obrázek 13 - Stern-Volmerův graf pro zhášení NATA vodným roztokem KI o koncentraci zásobního roztoku 0,5 M. Během experimentu byla udržována konstantní teplota (22°C), ale hodnota iontové síly nebyla fixována. Hodnota koeficientu determinace lineárního trendu byla $R^2=0,99168$. Tato hodnota je sice velmi blízká nule, ale za určitých podmínek jsme schopni dosáhnout lepší shody s lineárním trendem.



Obrázek 14 - Stern-Volmerův graf pro zhášení NATA vodným roztokem KI o koncentraci 0,5 M. Během experimentu byla udržována konstantní iontová síla (0,5 M roztok NaCl) a teplota (22°C). Hodnota koeficientu determinace byla $R^2=0,99964$.

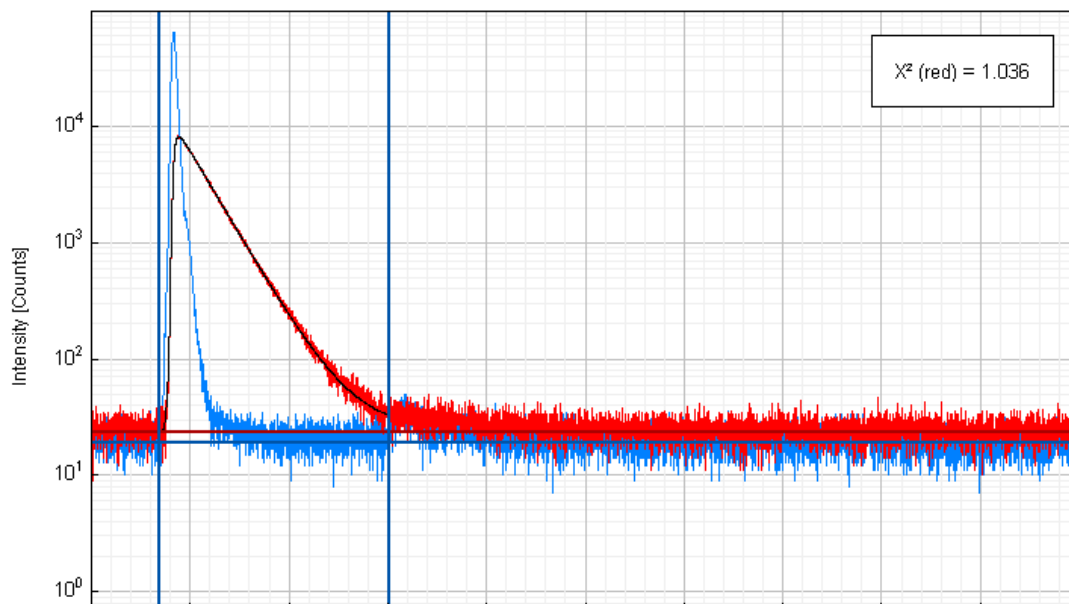
Výsledky reprezentované v obrázcích 13 a 14 vypovídají o vlivu iontové síly na zhášení fluorescence pro záporně nabitě zhášedlo KI. Pozorované rozdíly jsou velmi malé a není z nich možné usuzovat na konkrétní závislosti jednotlivých parametrů.

Dále zde prezentujeme lineární závislost poměrů dob života excitovaného stavu.

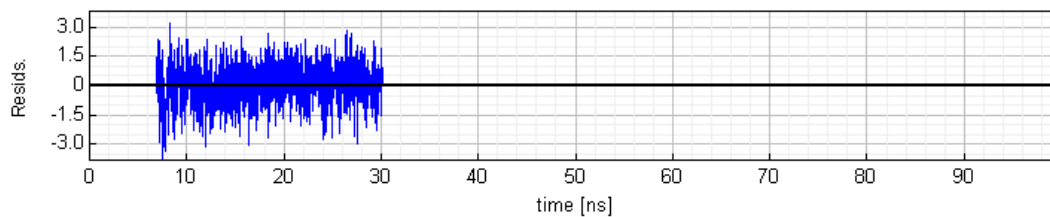


Obrázek 15 - Stern-Volmerův graf popisující zhášení NATA vodným roztokem KI o koncentraci 0,5 M. Během experimentu byla udržována konstantní teplota, a to na 22°C. Hodnota koeficientu determinace byla $R^2=0,99879$.

Pro úplnost zde uvedeme kinetiku dohasínání fluorescence pro fluorofor NATA bez zhášedla a po přidání 300 μl zhášedla (0,5 M roztok KI). Tyto kinetiky prezentujeme včetně náhodnosti rozložení residuů a χ^2 .

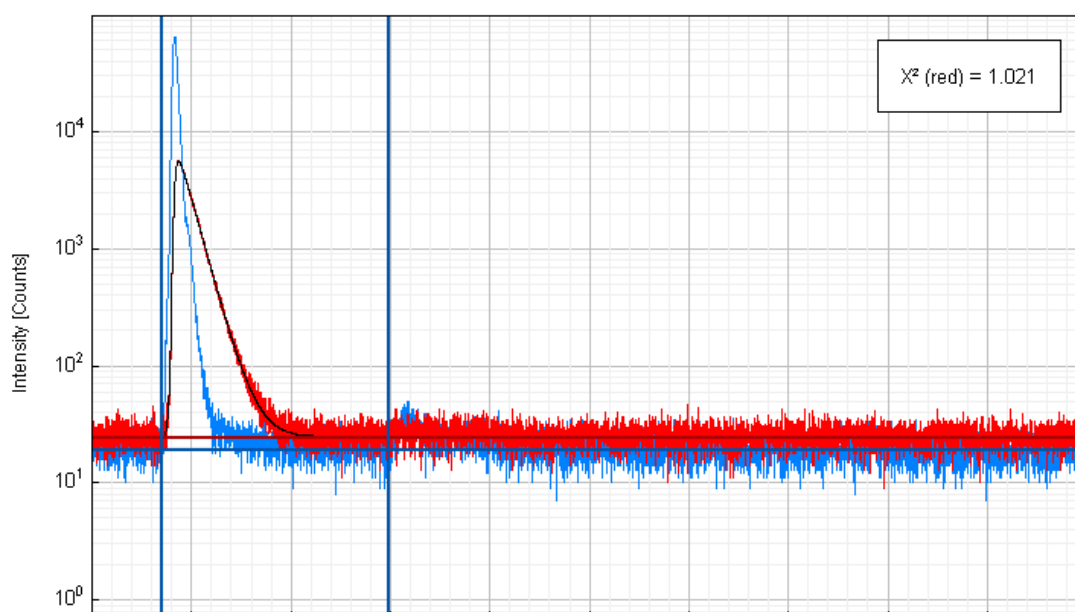


Obrázek 16 - Kinetika dohasínání fluoroforu NATA při teplotě 22°C. Hodnota χ^2 byla 1,036 a intenzitně vážená doba života excitovaného stavu byla $\tau_0=2,98$ ns.

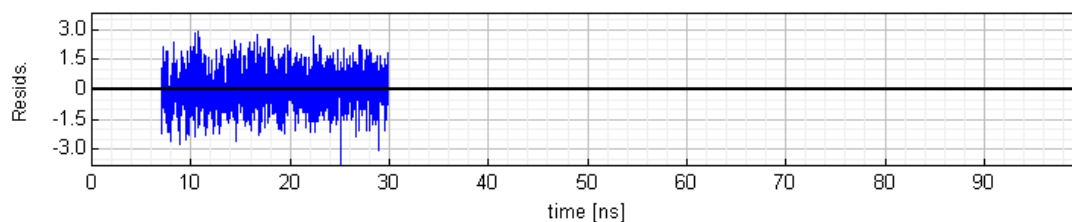


Obrázek 17 - Graf zobrazující náhodnost rozložení residuí pro kinetiku dohasínání NATA při teplotě 22°C.

Jak je zřejmé residua tohoto fitu jsou náhodně rozložena kolem nuly a hodnota χ^2 je také blízká 1.



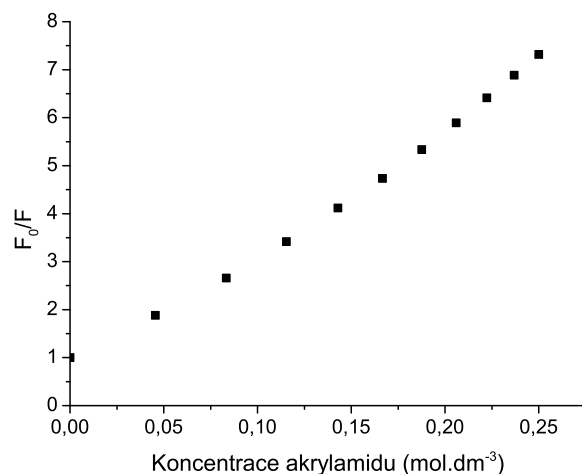
Obrázek 18 - Kinetika dohasínání fluoroforu NATA po přidání zhášedla (0,14 M KI ve vodě) při teplotě 22°C. Hodnota χ^2 byla 1,021 a intenzitně vážená doba života excitovaného stavu byla $\tau_4=1,17$ ns.



Obrázek 19 - Graf náhodnosti rozložení residuí pro NATA zhášené KI.

7.3 Nelineární efekty při zhášení fluorescence

Zakřivení Stern-Volmerova grafu ve směru nahoru bylo pozorováno při zhášení NATA pomocí 0,5 M zásobního roztoku akrylamidu ve vodě. Kvalitativně stejné výsledky tohoto experimentu byly popsány v [Eftink, M. R., Ghiron, C. A., 1976]. V této kapitole bude nejvhodnější teoretický model přiřazen k pozorovanému nelineárnímu efektu.

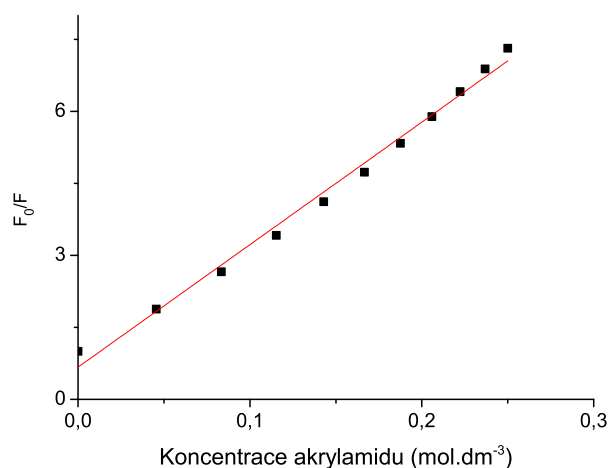


Obrázek 20 - Stern-Volmerův graf pro zhášení NATA 0,5 M vodným roztokem akrylamidu. Hodnoty intenzit byly upraveny vzhledem k poklesu intenzity způsobené ředěním fluoroforu.

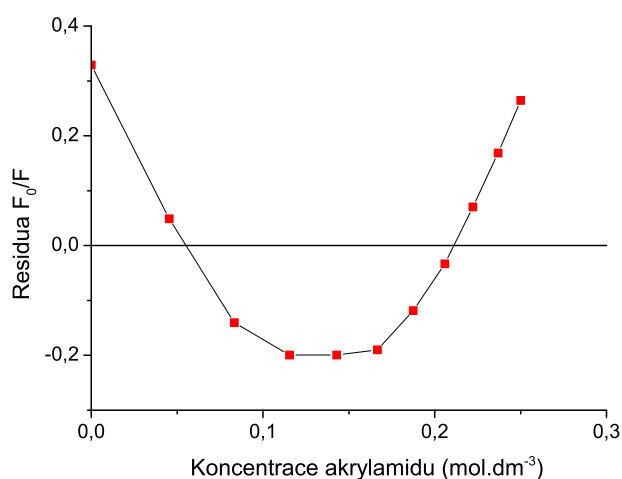
Experimentální data z obrázku 20 budou fitována křivkami, které odpovídají jednotlivým teoriím uvedeným v předchozích kapitolách. U jednotlivých modelů uvedeme rovnici regrese, náhodilost rozložení residuů a index determinace jako parametry sledující kvalitu fitu.

Stern-Volmerova teorie - lineární závislost

Jako první lze diskutovat lineární závislost poměrů intenzit na koncentraci akrylamidu. Tento model odpovídá samotnému dynamickému zhášení, přičemž zanedbáváme efekty spojené s difúzí, iontovou silou a přechodovými jevy.



Obrázek 21 - Experimentální data pro zhášení NATA vodným roztokem akrylamidu proložená lineárním trendem. Regresní přímka má rovnici $y=ax+b$, kde $a=0,67$; $b=25,52$ a index determinace byl $R^2=0,99162$.

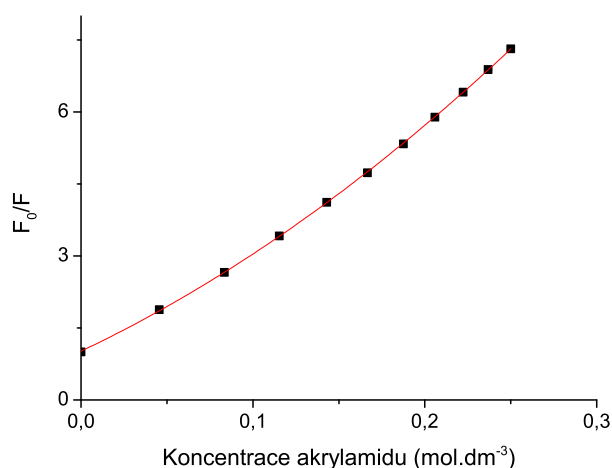


Obrázek 22 - Graf rozložení residuí pro lineární trend. Z tohoto grafu je patrné, že residua jsou korelovaná.

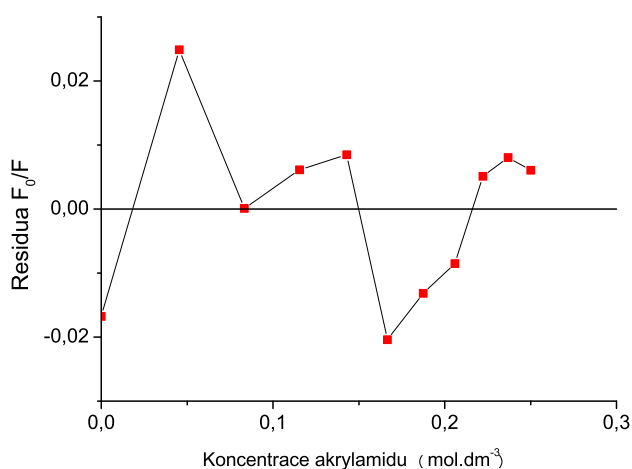
S přihlédnutím k obrázku 22 je patrné, že lineární model není vhodný. Vysoká korelace residuí, jednoznačně vyžaduje použití složitějšího modelu. Z této skutečnosti vyplývá, že námi získaná data jsou ovlivněna nelineárními efekty, které je nutné zohlednit. Proto je vhodné přistoupit ke kvadratickému modelu.

Kombinace statického a dynamického zhášení - kvadratická závislost

Kvadratické zakřivené ve Stern-Volmerově grafu ve směru nahoru je pozorováno v případě, pokud by se jednalo o kombinaci statického a dynamického zhášení. Experimentálně je možné rozlišit statické a dynamické zhášení například pomocí změny teploty. Popis změn ve Stern-Volmerově grafu způsobených teplotou pro jednotlivé typy zhášení byl proveden v teoretické části této práce.



Obrázek 23 - Graf proložení experimentálních data pro zhášení NATA vodným roztokem akrylamidu kvadratickou funkcí. Tato kvadratická funkce je popsána rovnicí $y = a + bx + cx^2$. Hodnoty jednotlivých parametrů křivky jsou $a=1,02$; $b=16,95$; $c=32,91$ a $R^2=0,99996$.



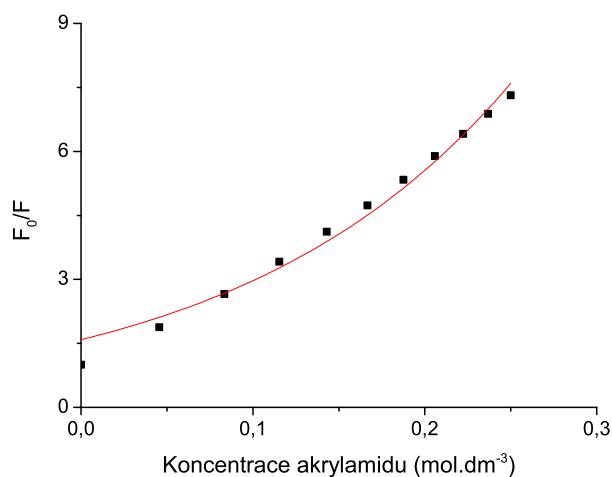
Obrázek 24 - Graf rozložení residuí pro kvadratickou závislost poměru intenzit na koncentraci zhášedla.

Vzhledem k dobré shodě reprezentované indexem determinace a náhodností rozložení residuí můžeme kvadratický trend brát jako vyhovující. Odchytky toho trendu od experimentálních dat jsou tak malé, že mohly být způsobené šumem.

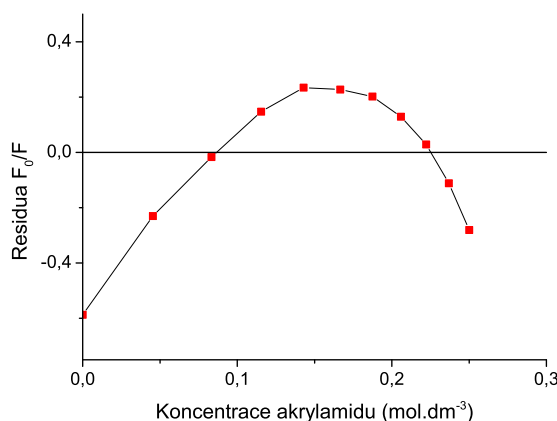
Pomocí koeficientů získaných z kvadratického fitu můžeme určit hodnoty Stern-Volmerových konstant pro statické a dynamické zhášení. Tyto hodnoty jsou pro dynamické zhášení $K_D=14,71 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}$ a pro statické zhášení $K_S=2,24 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}$. Dále pomocí kinetiky dohasínání NATA uvedené jako obrázek 16 lze určit bimolekulární zhášecí konstantu pro dynamické zhášení akrylamidem. Takto určená bimolekulární zhášecí konstanta má hodnotu $k_q=4,93.10^9 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Literatura [Eftink, M. R., Ghiron, C. A., 1976] udává hodnotu bimolekulární zhášecí konstanty pro zhášení indolu akrylamidem přibližně $7,1.10^9 \text{ dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Obě tyto hodnoty si řádově odpovídají a jejich rozdíl může být způsoben použitím rozdílných fluoroforů.

Sféra akce - exponenciální závislost

Jako poslední model budeme uvažovat zakřivení Stern-Volmerova grafu vlivem sféry akce. Zakřivení vlivem sféry akce je teoreticky reprezentováno exponenciální závislostí poměrů intenzit na koncentraci zhášedla.



Obrázek 25 - Graf proložení experimentálních data pro zhášení NATA vodným roztokem akrylamidu exponenciální funkcí, která reprezentuje vliv sféry akce. Exponenciální funkce, kterou jsme prokládali experimentální data měla tvar $y = A \exp\left(-\frac{x}{b}\right)$, kde $A=1,59$; $b=-0,16$ a $R^2=0,98457$.



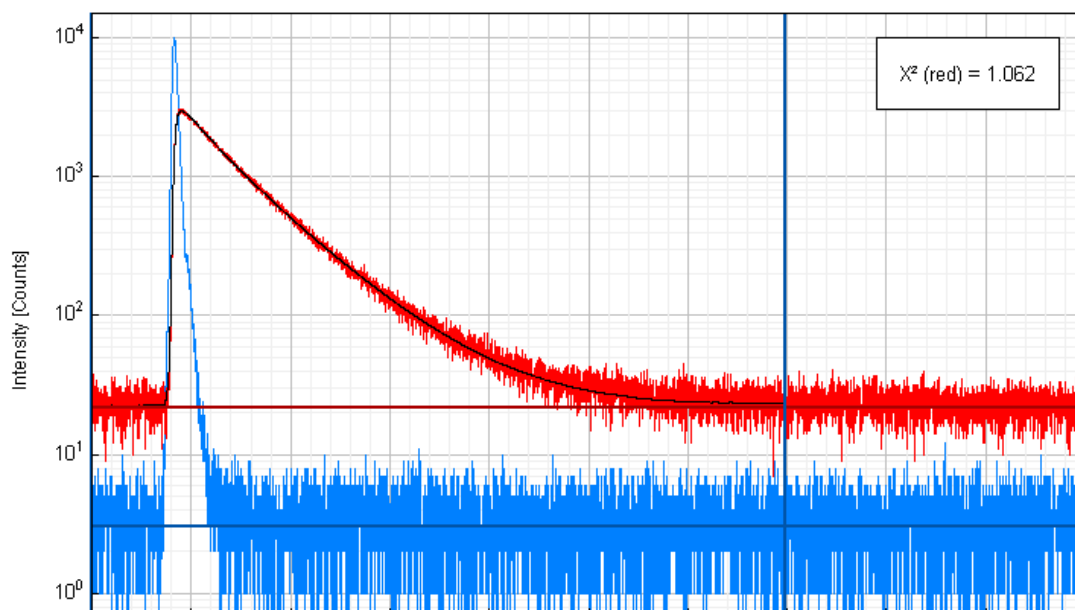
Obrázek 26 - Graf rozložení residuí pro exponenciální trend. Je zřejmé, že rozložení residuí není náhodné, ale je korelované.

Exponenciální závislost poměrů intenzit na koncentraci zhašedla není vhodná z důvodu korelace rozložení residuí. Index determinace získaný pro tento diskutovaný model připouští malé odchylky od daného trendu. Vzhledem ke korelaci residuí bychom tento model mohli považovat za méně vyhovující než kvadratický model.

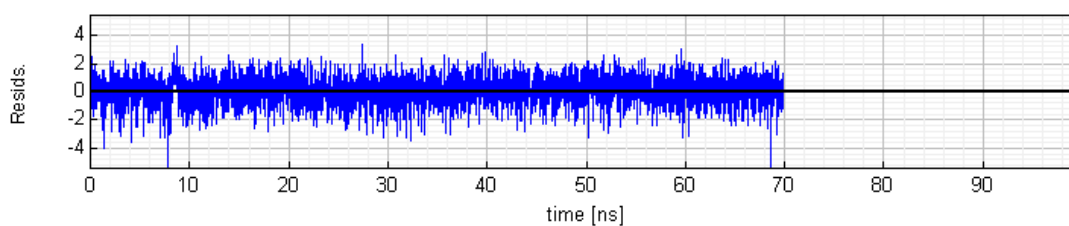
Závěrem této části shrneme dosud získané poznatky. Celkové zhašení NATA roztokem akrylamidu je výsledkem kombinace statického a dynamického zhašení, i když KI je v literatuře uváděn výhradně jako zhašedlo způsobující dynamické zhašení fluorescence. S přihlédnutím k poměrně nízké koncentraci zhašedla je možné, že efekt sféry akce je tak malý, že jej nejsme schopni kvalitativně rozlišit od kombinovaného zhašení.

7.4 Zhašení HSA akrylamidem a KI

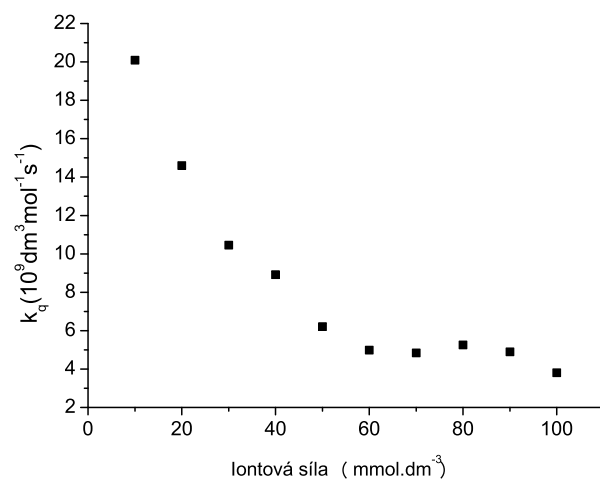
Pomocí tohoto experimentu lze sledovat změny v efektivitě zhašení vlivem iontové síly. Například HSA je jednotryptofanový protein, který nese záporný náboj. Přičemž očekáváme změny efektivitě zhašení při použití záporně nabitého KI jako zhašedla. Oproti tomu při zhašení nenabitým akrylamidem jsou očekávány minimální změny. Dále je očekáván pokles efektivitě zhašení při zhašení KI, protože elektrostatická repulze by měla být oslabena rostoucí iontovou silou. Naopak při zhašení akrylamidem, který nenese žádný náboj bude mít elektrostatická interakce zanedbatelný vliv, a proto rostoucí iontová síla nebude ovlivňovat interakci mezi zhašedlem a fluoroforem.



Obrázek 27 - Kinetika dohasínání fluoroforu HSA při teplotě 22°C. Hodnota χ^2 byla 1,062 a intenzitně vážená doba života excitovaného stavu byla $\tau_0=6,26$ ns.



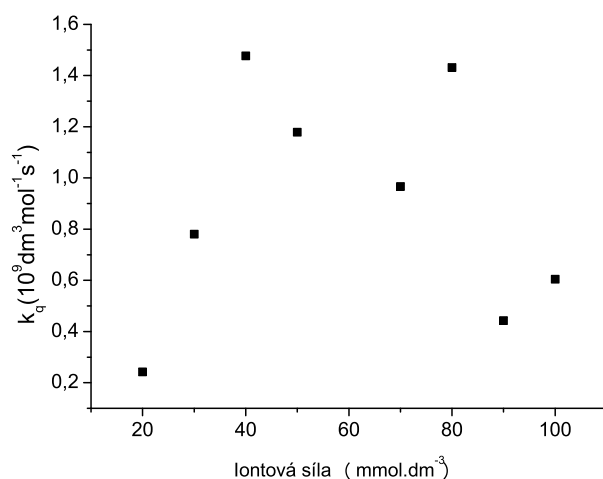
Obrázek 28 - Graf zobrazující náhodnost rozložení residuí pro kinetiku dohasínání HSA při teplotě 22°C.



Obrázek 29 - Graf závislosti bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle roztoku.

Jako fluorofor byl použit vodný roztok HSA a jako zhášedlo byl použit KI o různých koncentracích (10-100 mM). Hodnota intenzitně vážené doby života excitovaného stavu byla zjištěna pomocí TCSPC jako 6,26 ns. Jednotlivé hodnoty bimolekulárních zhášecích konstant byly korigovány na zředění fluoroforu a byly zprůměrovány.

Jak je patrné z obrázku 29 efektivita zhášení roste s rostoucí iontovou silou pro nabitě zhášedlo. Hodnoty bimolekulární zhášecí konstanty jsou poměrně velké (charakteristické hodnoty k_q jsou v řádech $10^9 - 10^{10} \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$), proto se nejedná o proces řízený difúzí. Při nízkých hodnotách iontové síly pravděpodobně dochází ke zkombinování statického a dynamického zhášení.



Obrázek 30 - Graf závislosti bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle roztoku. Jako fluorofor byl použit vodný roztok HSA a jako zhášedlo byl použit akrylamid o různých koncentracích (10-100 mM). Jednotlivé hodnoty bimolekulárních zhášecích konstant byly korigovány na zředění fluoroforu a byly zprůměrovány. Hodnota intenzitně vážené doby života excitovaného stavu HSA byla určena pomocí metody TCSPC jako 6,26 ns.

Vzhledem k tomu, že experimentální data zobrazená v obrázku 30 kolísají, je zřejmé, že hodnoty bimolekulární zhášecí konstanty informují o změnách přístupnosti zhášedla k molekule fluoroforu. Z těchto změn přístupnosti lze usuzovat, že dochází ke změnám konformace vlivem rostoucí iontové síly.

Kapitola 8

Závěr

Hlavním předmětem této bakalářské práce je dynamické zhášení fluorescence a parametry, které jej ovlivňují. Tato práce používá modelové experimenty pro validaci teoretických modelů. Prokázali jsme vliv iontové síly při zhášení NATA roztokem KI. Tento výsledek je významný i proto, že iontová síla je parametr, který je v literatuře často opomíjený. Detailní vyhodnocení vlivu iontové síly na dynamické zhášení zatím nebylo možné, vzhledem k velkému množství ovlivňujících parametrů. Například [Millis, R., 1957] a [Stokes, R. H., 1957] uvádějí nezanedbatelný vliv protiiontů, které jsou v roztoku přítomny při udržování konstantní iontové síly. Experiment s HSA demonstruje další efekt a sice vliv iontové síly na konformaci proteinů. Reálného zkoumání vlivu iontové síly na dynamické zhášení fluorescence komplikuje také absence ucelené teorie, nicméně výsledky prezentované v této práci představují dobrý výchozí bod pro další experimenty.

Literatura

- [1] ANDO, T., ASAI, H. (1980): *Charge effects on the dynamic Quenching of fluorescence of 1, N-ethenoadenosine oligophosphates by iodide, thalium and acrylamide*. Journal of Biochemistry (Tokyo) **88**, 265-276.
- [2] BARTSCH, H. J. (2006): *Matematické vzorce*. Academia, Praha. ISBN 80-200-1448-9.
- [3] EFTINK, M. R., GHIRON, C. A. (1976): *Fluorescence quenching of indole and model micelle systems*. Journal of physical chemistry **80**, 486-493.
- [4] EFTINK, M. R. (1991): *Fluorescence quenching: theory and applications*, in LAKOWICZ, J. R. (Ed.) *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 2: Principles*. Plenum, New York. ISBN 0-306-43875-5.
- [5] LAKOWICZ, J. R. (1999): *Principles of fluorescence spectroscopy*. Second edition. Plenum, New York. ISBN 0-306-46093-9.
- [6] MILLIS, R. (1957): *The self diffusion of chloride ion in aqueous alkali chloride solutions at 25° C*. Journal of physical chemistry **61**, 1631-1634.
- [7] STOKES, R. H. (1957): *Tracer diffusion of iodide ion in aqueous alkali chloride solutions at 25° C*. Journal of physical chemistry **61**, 1634-1636.
- [8] VALEUR, B. (2006): *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-vch, Weiheim. ISBN 3-527-29919-X.
- [9] ZELENT, B. a kolektiv (1996): *Distance-dependent fluorescence quenching of p-bis[2-(5-phenyloxayolyl)]benzene by various quenchers*. Biophysical chemistry **100**, 18592-18602.
- [10] ZELENT, B. a kolektiv (1998): *Time-resolved and steady-state fluorescence quenching of N-acetyl-L-tryptophanamide by acrylamide and iodide*. Biophysical chemistry **73**, 53-75.