

Вежба 2

Одређивање типа гашење флуоресценције говеђег серумског албумина

Краће теоријске основе и задатак вежбе

Пренос електронске енергије подразумева нерадијациони и радијациони пренос енергије са побуђеног на непобуђени молекул. Пренос енергије може да буде интра- и интер- молекулски. Интрамолекулски нерадијациони пренос енергије је једномолекулски процес или тзв. “тамна” реакција док је интермолекулски пренос енергије бимолекулски процес који укључују остале молекулске врсте присутне у систему. Једномолекулски и бимолекулски процеси се могу дешавати истовремено тако да је укупна брзина дезактивације побуђених стања сума интра- и интер- молекулских путева дезактивације. Како су молекули донора у побуђеном стању настали фотоексцитацијом то се пренос енергије на молекуле акцептора сматра фотосензибилизацијом акцептора и гашењем донора. Уобичајено је да се молекул акцептора означава и као гасиоц, Q (*quencher*).

Штерн-Фолмерова (*Stern-Volmer*) једначина (једначина 1), описује гашење флуоресценције донора сударима са молекулима гасиоца (динамичко гашење). Константа K_{SV} је Штерн-Фолмерова константа, тзв. колизиона константа која представља однос константе брзине бимолекулског гашења и константе мономолекулског распада побуђеног молекула донора (димензије $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$). Ова константа описује осетљивост флуорофоре на гасиоца, има карактеристике константе равнотеже и указује на однос између могућих путева дезактивације побуђеног молекула донора.

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = 1 + k_q \tau [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

Штерн-Фолмерова константа се добија као нагиб праве на графику зависности $\Phi_F^0/\Phi = f[Q]$ (одсечак праве је 1). Линеарна Штерн-Фолмерова зависност параметра Φ_F^0/Φ од концентарције гасиоца указује, генерално гледано, на један тип флуорофоре чији су молекули подједнако „доступани“ молекулим агасиоца.

У многим случајевима једна иста флуорофора може да се гаси истим гасиоцем комбинацијом статичког и динамичког гашења. У том случају Штерн-Фолмерове праве постају конкавне ка у оси. У случају комбинованог гашења Штерн-Фолмерова једначина је облика:

$$\frac{I_F^0 - I_F}{I_F} = (K_{SV} + K_0)[Q] + K_{SV} K_0 [Q]^2 \quad (2)$$

K_0 – константа равнотеже формирања комплекса

K_{SV} – Штерн-Фолмерова колизиона константа

I_F^0, I_F – интензитет флуоресценције у одсуству и присуству молекула гасиоца

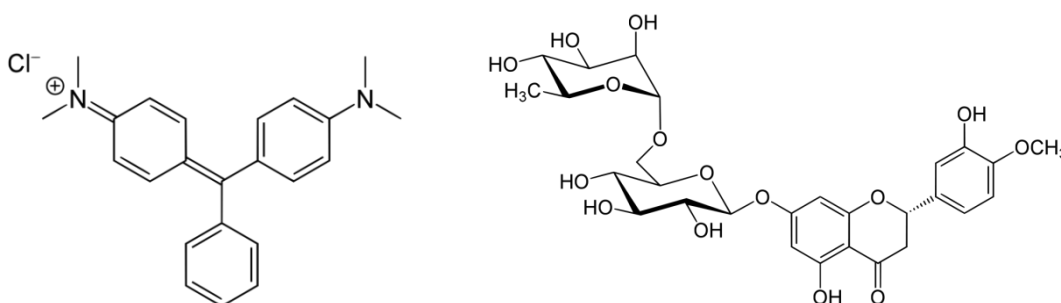
Представљањем једначин (2) у једначину облика:

$$\left(\frac{I_F^0 - I_F}{I_F} \right) / [Q] = (K_{SV} + K_0) + K_{SV} K_0 [Q] \quad (3)$$

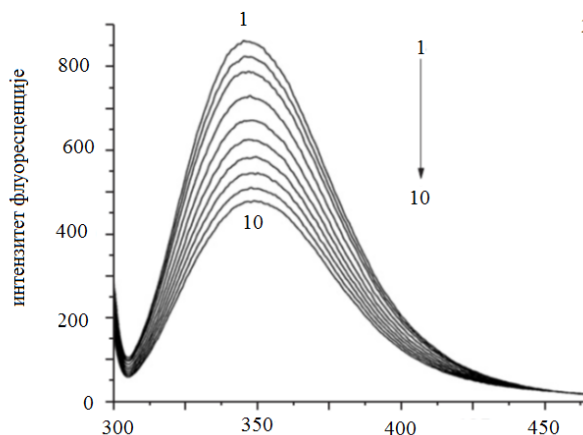
и цртањем графика зависности $\left(\frac{I_F^0 - I_F}{I_F}\right) / [Q] = f([Q])$ добија се права са одсечком ($K_0 + K_{SV}$) и нагибом ($K_0 K_{SV}$).

Статичко и динамичко гашење се разликују по различитим зависностима од температуре, вискозности растварача или временима живота молекула у побуђеном стању. Код статичког гашења време живота молекула се не скраћује јер део флуорофора који није наградио комплекс има нормалне карактеристике побуђеног стања при чему се флуоресценција флуорофоре гаси из разлога смањења укупне концентрације слободних флуорофора услед грађења комплекса. Више температуре појачавају дифузију па тиме и степен гашења сударима одн. динамичко гашење (слаби статичко гашење). Више температуре такође доводе до већег степена дисоцијације слабо везаних комплекса а тиме и слабијег статичког гашења.

На слици 1 приказане су структуре малахитно зеленог и хесперидина а на сликама 3 и 4 флуоресцентни спектри говеђег серумског албумина (BSA) у присуству гасиоца, хесперидина и малахитно зеленог.

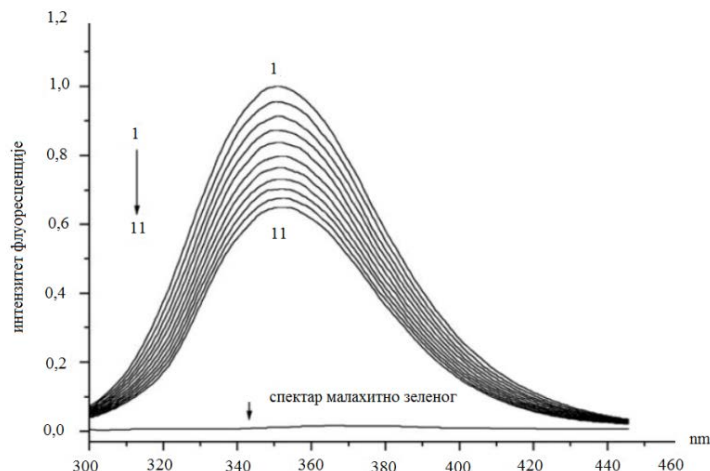


Слика 1 Структуре малахитно зеленог и хесперидина (с лева на десно)



Слика 3 Флуоресцентни спектар говеђег серумског албумина (BSA) и малахитно зеленог (MZ) ($c(\text{BSA}) = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{MZ}) = 0; 1 \times 10^{-6}; 2 \times 10^{-6}; 3 \times 10^{-6}; 4 \times 10^{-6}; 5 \times 10^{-6}; 6 \times 10^{-6}; 7 \times 10^{-6}; 8 \times 10^{-6}; 9 \times 10^{-6}; 10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, ($T = 293 \text{ K}$))

Слика 2 Флуоресцентни спектар говеђег серумског албумина (BSA) и хесперидина (H) ($c(\text{BSA}) = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $c(\text{H}) = 0; 1 \times 10^{-6}; 2 \times 10^{-6}; 4 \times 10^{-6}; 6 \times 10^{-6}; 8 \times 10^{-6}; 10 \times 10^{-6}; 12 \times 10^{-6}; 14 \times 10^{-6}; 8 \times 10^{-6}$ и $16 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, ($T = 298 \text{ K}$))



Табела 1 Вредности параметра $(I_F^0 - I_F) / I_F$ за различите концентрације гасиоца, хесперидина

Концентрација хесперидина ($\times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)	$(I_F^0 - I_F) / I_F$			
	288 К	296 К	304 К	312 К
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,18	0,27	0,16	0,24
2	0,38	0,35	0,26	0,32
4	0,57	0,54	0,33	0,46
6	0,73	0,70	0,50	0,63
8	0,93	0,88	0,84	0,80
10	1,15	1,07	1,02	0,99
12	1,37	1,26	1,21	1,16
14	1,56	1,47	1,40	1,35
16	1,78	1,69	1,60	1,53

Табела 2 Вредности параметра $(I_F^0 - I_F) / I_F$ за различите концентрације гасиоца, малахитно зеленог

Концентрација малахитно зеленог ($\times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$)	$(I_F^0 - I_F) / I_F$			
	293 К	298 К	303 К	308 К
0	0	0	0	0
1	0,04	0,04	0,04	0,04
2	0,10	0,10	0,09	0,09
3	0,16	0,15	0,15	0,15
4	0,22	0,21	0,20	0,20
5	0,28	0,26	0,25	0,25
6	0,34	0,31	0,31	0,30
7	0,40	0,37	0,36	0,36
8	0,46	0,42	0,42	0,41
9	0,52	0,48	0,47	0,46
10	0,58	0,53	0,52	0,52

Задатак вежбе је одредити тип гашења и карактеристичне параметре гашења флуоресценције говеђег серум албумина малахитно зеленим и хесперидином.

Приказ резултата мерења и дискусија

1. Користећи се вредностима датим у табелама 1 и 2 приказати Штерн-Фолмерове зависности за малахитно зеленог и хесперидина на различитим температурама.

2. На основу добијених зависности под а) одредити тип гашења флуоресценције говеђег серум албумина (динамичко, статичко, комбиновано). Продискутовати који су били критеријуми на основу којих је констатован тип гашење флуоресценције

3. Одредити Штерн-Фолмерову константу гашења, K_{SV} , уколико се утврди да се ради о динамичком гашењу.

4. Одредити константе динамичког и статичког гашења уколико се ради о комбинованом гашењу.

5. Одредити вредност константе бимолекулског гашења, k_q ако се узме да је време живота молекула донора, говјег серум албумина, у одсуству гасиоца $\tau = 10^{-8}$ s. На основу добијене вредности одредити да ли се ради о дифузионо контролисаном гашењу.

ИЗВЕШТАЈ

Штерн-Фолмерова зависност за гашење флуоресценције говеђег серум албумина хесперидином

Слика 4 Штерн-Фолмерова зависност за систем BSA-хесперидин

Штерн-Фолмерова зависност за гашење флуоресценције говеђег серум албумина малахитно зеленим

Слика 5 Штерн-Фолмерова зависност за систем BSA-малахитно зелено

Константа бимолекулског гашења

Дискусија