

Otázky k předmětu Optické spektroskopie 1

Testy jsou zaměřeny především na ověření porozumění probrané látce. Otázky v testech mohou být oproti těm níže uvedeným mírně modifikovány nebo zkráceny. U početných příkladů může být testová otázka na jinou veličinu z používaného vzorce (např. pokud je uveden příklad na výpočet koncentrace ze zadané absorbance, tak v testu může být otázka na výpočet absorbance ze zadané koncentrace, apod.).

Test 1

Jak souvisí energie fotonu s vlnovou délkou světla, frekvencí a vlnočtem ?

Které veličiny v korpuskulárním modelu světla odpovídají vlnové délce, intenzitě a polarizaci vlny ve vlnovém modelu ?

V jakých jednotkách můžeme vynášet spektra v optických spektroskopiích ?

Určete, jakou vlnovou délku má světelná vlna s vlnočtem 20000 cm^{-1} .

Určete, jaký je vlnočtet v jednotkách cm^{-1} pro světlo s vlnovou délkou 400 nm.

Jakému rozsahu vlnových délek odpovídá viditelná část spektra ?

V jakém rozsahu vlnových délek měříme standardně v UV/VIS/NIR spektroskopiích ? Co nás omezuje na krátkovlnné a dlouhovlnné straně spektra ?

Jaké jsou základní interakce světla a hmoty ? Charakterizujte je z hlediska změn intenzity světla, směru světla a změny energetického stavu molekuly.

Jaké jsou typické energie odpovídající energetickým přechodům v atomech a molekulách ?

Jakou vlnovou délku musí mít světlo, aby foton dokázal způsobit elektronový přechod (přivést molekulu do excitovaného stavu) spojený se změnou energie $4 \cdot 10^{-19}\text{ J}$?

Molekula pohltila foton o vlnové délce 500 nm. Jak se změnila energie molekuly ?

Které interakce mají vliv na stav (tedy vlnovou funkci a vlastní energie) molekul ?

Co je to spektrum ?

Jak souvisí naměřená spektrální čára s energiemi měřené molekuly ?

Jaký je vztah mezi strukturou molekuly a jejím spektrem ?

Co můžeme o molekulách zjistit pomocí spektroskopických měření ?

Které charakteristiky spektrální čáry nejčastěji sledujeme ?

Co omezuje možnosti měření v UV/VIS/NIR oblasti na krátkovlnné straně spektra ?

Co omezuje možnosti měření v UV/VIS/NIR oblasti na dlouhovlnné straně spektra ?

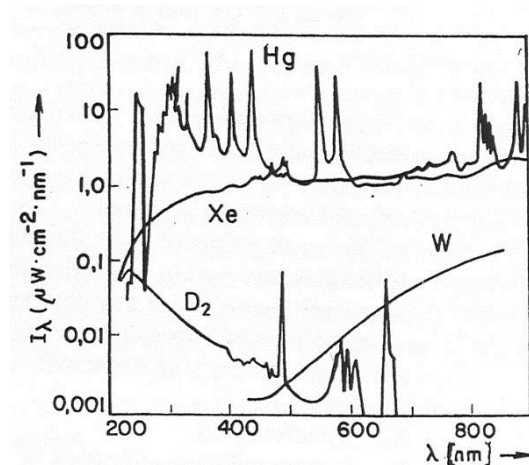
Jaké používáme zdroje světla ?

Uveďte přednosti a nevýhody laserů.

Který zdroj světla je nejlépe použitelný pro měření absorpčních spekter ve viditelné oblasti spektra ?

K čemu se využívá rtuťová lampa ?

Na obrázku jsou uvedena emisní spektra lamp využívaných jako zdroje světla v absorpční spektroskopii (Hg – rtuťová, Xe – xenonová, D₂ – deuteriová, W – žárovka). Kterou z nich si vyberete pro měření absorpčních spekter molekul ve viditelné oblasti ? Zdůvodněte.



Který zdroj světla poskytuje nejkratší pulsy ?

Jak můžeme získat harmonicky modulované světlo ?

Jak vzniká evanescentní vlna ?

Kterými optickými elementy můžeme dosáhnout spektrálního rozkladu světla ?

Zapište interferenční podmínku pro difrakci světla na mřížce.

Kterými parametry je určeno spektrální rozlišení mřížkového monochromátoru ?

U monochromátoru se nastavuje šířka štěrbin (slits) – co určuje tento parametr ?

Co udává tzv. „blaze-wavelength“ u monochromátorů ?

Do čeho dáváme kapalně vzorky při měření ?

Vysvětlete princip vnějšího fotoelektrického jevu. Jaké jsou důsledky pro spektrální omezení použitelnosti detektorů světla ?

Vysvětlete princip vnitřního fotoelektrického jevu.

Vysvětlete princip fungování fotonásobiče.

Vysvětlete princip fungování mikrokanálových destiček.

Jaký je rozdíl mezi fungováním fotonásobiče v analogovém módu a ve „photon-counting“ módu ?

K čemu je ve fotonásobiči diskriminátor ?

Vyjmenujte detektory světla, které fungují na principu vnitřního fotoelektrického jevu.

Odvoďte Lambert-Beerův zákon.

Rhodamin B má na vlnové délce 590 nm extinkční koeficient $\epsilon_{590} = 100\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Jaká je koncentrace roztoku Rhodaminu B, pokud při měření v kyvetě s optickou dráhou 1 cm naměříme absorpční $A_{590} = 0,4$?

Transmitance vzorku na dané vlnové délce je 80%. Jakou naměříme na této vlnové délce absorpční ?

Nakreslete typické experimentální uspořádání v absorpční spektroskopii.

Načrtněte schéma dvoupraprskového absorpčního spektrometru.

Jaké jsou výhody dvoupraprskových absorpčních spektrometrů oproti jednopaprskovým ?

Chceme určit koncentraci roztoku 10^{-4} M Rhodaminu B, který má extinkční koeficient $100\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ na 590 nm v kyvetě s optickou dráhou 1 cm. Díky nedokonalosti monochromátoru je 99,99% intenzity na světla na 590 nm a 0,01% na delších vlnových délkách, které nejsou absorbovány Rhodaminem B. Jaká je skutečná a jaká je naměřená optická hustota roztoku ?

V jakém rozsahu absorpční obvykle měříme ?

Jak je možné měřit koncentraci vzorků, které absorbují příliš silně nebo naopak příliš slabě ?

Co je to isobestický bod ?

Uveďte hlavní myšlenky, které vedou k adiabatické a Born-Oppenheimerově aproximaci při kvantově-mechanickém popisu stavu molekul.

Nakreslete Franck-Condonův diagram a vysvětlete Franck-Condonův princip.

Na jaké časové škále se odehrává děj absorpce ?

Jaké jsou typy elektronových přechodů v molekulových orbitalech ? Seřadte je podle energií.

Jak můžeme rozlišit přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$ a $n \rightarrow \pi^*$?

Co to je vybělování (photobleaching) ?

Kdy dochází k vybělování ?

Vysvětlete princip experimentu využívajícího přechodovou absorpci.

Které molekuly absorbují v UV/VIS oblasti spektra ?

Načrtněte absorpční spektrum chlorofylu, popište osy.

Jaký typ oka mají savci ?

Jaké má lidské oko detektory světla ? Které reagují na intenzitu a které umožňují barevné vidění ?

Jaké mohou být reakce jednobuněčných organismů na světlo ?

Co je to akční spektrum ?

Test 2

Co je to luminiscence ?

Podle čeho dělíme luminiscence ?

Pomocí Jabloňského diagramu popište základní procesy, které se odehrávají při fotoluminiscenci a udejte jejich typické rychlostní konstanty.

Co je to Stokesův posuv ?

Formulujte Kašovo pravidlo a Vavilovův zákon.

Jaký je rozdíl mezi fluorescencí, zpožděnou fluorescencí a fosforescencí ?

Co to je vnitřní konverze a intersystémová konverze ?

Jaké máme typy zpožděné fluorescence a jak je můžeme experimentálně rozlišit ?

Definujte kvantový výtěžek a určete, zda závisí či nezávisí na koncentraci fluoroforu.

Fluorofor má ve vodném roztoku kvantový výtěžek $QY = 0,030$ a střední dobu života $\tau = 0,749$ ns. V metanolu se kvantový výtěžek zvýší na $0,079$ a střední doba života prodlouží na $\tau = 1,918$ ns. Je tato změna výsledkem ovlivnění zářivých či nezářivých procesů ?

Které základní charakteristiky luminiscence můžeme sledovat ?

Určete, zda dané fluorescenční parametry závisí či nezávisí na koncentraci fluoroforu: Intenzita fluorescence, kvantový výtěžek, tvar emisního spektra, doba života excitovaného stavu

Jaké je základní experimentální uspořádání ve fluorescenční spektroskopii ?

V jakých situacích a proč používáme při měření fluorescence osvětlení zepředu ?

Jaké jsou výhody T-uspořádání ?

Udejte rozdíly v experimentálním uspořádání mezi absorpční a fluorescenční spektroskopií.

Jaké využíváme zdroje světla ve fluorescenční spektroskopii ?

Jaké máme typy filtrů (podle spektrální propustnosti) ?

Jak fungují dichroické filtry ?

Co to je G-faktor ?

Jak můžeme experimentálně určit G-faktor ?

Jaké zdroje světla používáme při „steady-state“ fluorescenčních experimentech ?

Proč většinou udáváme intenzitu detekované fluorescence v relativních jednotkách ?

Ke stanovení jakých charakteristik typicky využíváme měření intenzity fluorescence ?

Ke stanovení jakých charakteristik typicky využíváme měření fluorescenčních spekter ?

Co je to chemiluminiscence ?

K čemu se používá technika stopped-flow ?

Co je to excitační spektrum ?

Co je to emisní spektrum ?

Jaké jsou základní parametry, které sledujeme ve spektrech ?

Níže uvedená tabulka udává hodnoty získané při měření emisního spektra.

Vlnová délka (nm)	Intenzita fluorescence (rel.j.)
500	0,40
505	0,80
510	0,95
515	1
520	0,95
525	0,85
530	0,65

Přepočítejte, jak bude vypadat normované spektrum na škále vlnočtů.

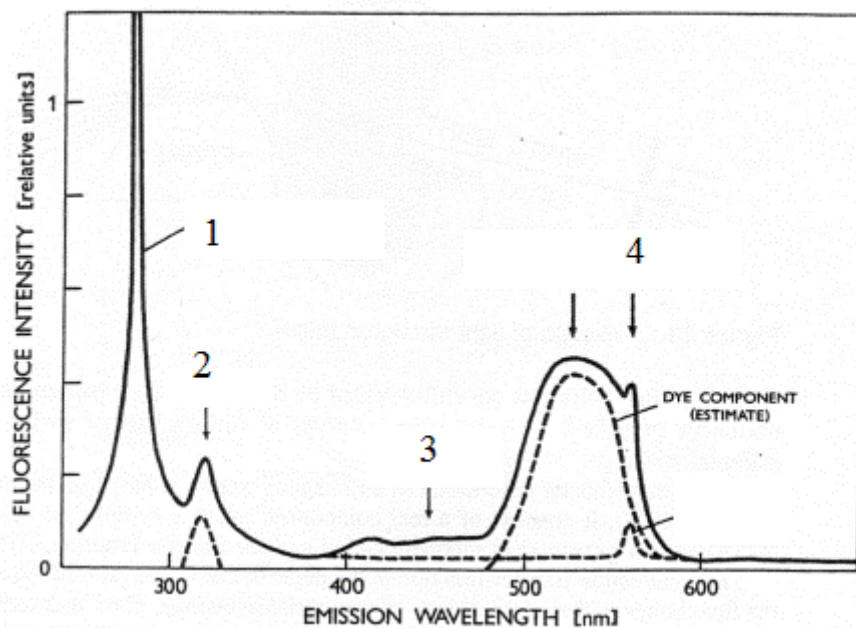
Jak je definován kvantový výtěžek ?

Jak obvykle měříme a počítáme kvantový výtěžek ?

K čemu je dobré poměrové měření ?

K čemu je měření 3D (kompletních) fluorescenčních spekter ?

Na obrázku níže je ukázané naměřené emisní spektrum, přičemž přerušovanou čarou je vyznačeno vlastní spektrum měřené látky. Vysvětlete původ signálů označených číslicemi 1,2,3,4.



Které artefakty odstraňujeme při korekci excitačních spekter ?

Které artefakty odstraňujeme při korekci emisních spekter ?

Co je to efekt vnitřního filtru ?

Jak využíváme fluorescenci při zobrazování ?

Jaké zdroje světla používáme při měření kinetiky dohasínání fluorescence v časové doméně ?

Jak měříme kinetiku dohasínání fluorescence s hradlovanou detekcí ?

Vysvětlete princip měření kinetiky dohasínání fluorescence metodou časově korelovaného čítání jednotlivých fotonů.

Kinetika dohasínání fluorescence byla nafitována funkcí $I(t) = 0,8 \exp(-t/2\text{ns}) + 0,2 \exp(-t/5\text{ns})$. Určete střední dobu života váženou amplitudami (τ_A) a váženou intenzitami (τ_I).

Čím je limitována rychlost měření v metodě časově korelovaného čítání jednotlivých fotonů ?

Co je to „pile-up“ efekt ?

Co ovlivňuje přesnost měření v metodě časově korelovaného čítání jednotlivých fotonů ?

Proč při vyhodnocování dat získaných metodou TCSPC děláme dekonvoluci funkce přístrojové odezvy (IRF) ?

Jak v praxi určujeme funkci přístrojové odezvy (IRF) ?

Které matematické metody nejčastěji používáme k fitování dat z měření kinetik dohasínání fluorescence ?

Podle čeho posuzujeme kvalitu fitu ?

Které detektory používáme při metodě TCSPC ? Udejte jejich výhody a nevýhody.

K čemu se využívá detekce metodou „up-conversion“ ? Vysvětlete její princip.

Jak v praxi určíme DAS (decay-associated spectra) a co nám tato metoda umožňuje ?

Jak v praxi určíme TRES (time-resolved emission spectra) a co nám tato metoda umožňuje ?

V čem je specifický záznam dat metodou TTTR (time-tagged time-resolved) ?

Jaký zdroj světla používáme při měření doby života excitovaného stavu ve fázové doméně ?

Z kterých naměřených parametrů můžeme určit dobu života excitovaného stavu při měření ve fázové doméně?

Co je indikátorem toho, že kinetika dohasínání daného fluoroforu je jednoexponenciální ?

Při frekvenci harmonické modulace světla $f = 30 \text{ MHz}$ bylo zjištěno, že emise má fázový posun $\Phi = 45^\circ$. Jaká je doba života excitovaného stavu měřeného fluoroforu ? Jaká je demodulace emise, pokud je kinetika dohasínání jedno-exponenciální ?

Jaký je rozumný rozsah modulačních frekvencí použitelných při měření ve fázové doméně s ohledem na dobu života měřeného fluoroforu ?

Jak hodnotíme kvalitu fitu při měření ve fázové doméně ?

Nakreslete schéma experimentálního uspořádání pro měření dob života ve fázové doméně v MHz oblasti.

Objasněte princip a výhody kroskorelační detekce.

Které hardwarové parametry omezují možnosti měření ve fázové doméně v MHz oblasti ?

V čem se liší experimentální uspořádání ve fázové doméně při měření v GHz oblasti ?

Jak měříme fázově rozlišená spektra a co nám umožňují sledovat ?

Udejte výhody a nevýhody měření dob života excitovaného stavu v časové nebo fázové doméně.

Které vlastnosti musíme brát do úvahy při výběru fluoroforu ?

V jakých řádech se pohybuje kvantový výtěžek přirozených bází nukleových kyselin ?

Které aminokyseliny emitují fluorescenci v oblasti spektra nad 250 nm ?

Jaké jsou výhody využití tryptofanu jako fluoroforu při zkoumání vlastností proteinů ?

Jaký je rozdíl mezi fluorescenční značkou a sondou ?

Které fluorescenční parametry můžeme využít ke sledování vlastností zkoumaných vzorků ?

Vysvětlete rozdíl v principu fungování rychlých a pomalých sond pro sledování membránového potenciálu.

Jak mohou být navázány fluorescenční sondy na nukleové kyseliny ?

Které funkční skupiny aminokyselin nejčastěji označujeme na proteinech ?

Co to jsou fluorogenní sondy ?

Jak jsou využitelné sondy s dlouhou dobou života fluorescence ? Uveďte příklady takových sond.

Co to jsou kvantové tečky ? Uveďte jejich přednosti a nevýhody.

Test 3

Co je to polarizátor ?

Při měření vzorku byla zjištěna hodnota polarizace $P = 0,2$. Jaká je hodnota anizotropie ?

Co to je fotoselekce ?

Co charakterizuje fundamentální anizotropie a jaké jsou její limitní hodnoty ?

Které vlastnosti zkoumané molekuly charakterizuje anizotropie fluorescence ?

Které vlastnosti prostředí ovlivňují naměřenou hodnotu anizotropie ?

Co je to G-faktor a k čemu slouží ?

Při rovnoběžně orientovaných polarizátorech byla naměřena relativní intenzita fluorescence 1000, při kolmo orientovaných polarizátorech pouze 500. Jaká je hodnota anizotropie (při $G = 1$) ?

Při měření fluorescence s polarizátory byly naměřeny tyto hodnoty relativní intenzity: $I_{VV} = 1000$, $I_{VH} = 500$, $I_{HV} = 800$, $I_{HH} = 400$. Určete hodnotu anizotropie.

Které artefakty mohou ovlivnit naměřenou hodnotu anizotropie ?

Jaké jsou výhody a nevýhody měření anizotropie s časovým rozlišením ?

Čím je charakteristická kinetika dohasínání anizotropie molekul s omezenou pohyblivostí ?

Srovnajte výhody a nevýhody měření kinetiky dohasínání anizotropie v časové a fázové doméně.

Jak se změní anizotropie fluorescence, pokud dojde k dimerizaci fluorescenčně označeného proteinu ?

Jak se při měření anizotropie fluorescence projeví, že se fluorescenční sonda navázala na protein nebo DNA ?

Vysvětlete, jak je možné využít anizotropie fluorescence k určení fázového přechodu lipidů.

Při měření roztoku fluoresceinu byla naměřena hodnota anizotropie fluorescence $r = 0,08$. Jakou očekáváte změnu hodnoty anizotropie, pokud do roztoku přidáme protein, na který se může fluorescein navázat ? Zdůvodněte.

Při měření proteinu označeného fluoresceinem byla naměřena hodnota anizotropie 0,2. Jakou očekáváte změnu anizotropie, pokud vzorek zahřejeme ? Zdůvodněte.

Kdy dochází k dynamickému zhášení fluorescence ?

Jak závisí intenzita fluorescence na koncentraci zhášedla při dynamickém zhášení ?

Jak závisí doba života excitovaného stavu na koncentraci zhášedla při dynamickém zhášení ?

S kterými molekulárními parametry souvisí difúzní bimolekulární rychlostní konstanta ?

Kdy dochází ke statickému zhášení fluorescence ?

Jak závisí intenzita fluorescence na koncentraci zhášedla při statickém zhášení ?

Jak závisí doba života excitovaného stavu na koncentraci zhášedla při statickém zhášení ?

Jak můžeme rozlišit, zda-li se jedná o zhášení statické či dynamické ?

Pro roztok fluoroforu byla naměřena relativní intenzita fluorescence 1200, po přidání 0,2 M KI klesla na 900. Určete Stern-Volmerovu zhášecí konstantu.

Fluorofor měl střední dobu života $\tau = 4$ ns. Po přidání zhášedla o koncentraci $c = 100$ mM došlo ke snížení intenzity fluorescence na polovinu a ke zkrácení doby života na 2 ns. (a) určete Stern-Volmerovu zhášecí konstantu, (b) určete bimolekulární zhášecí konstantu, (c) rozhodněte, zdali se jednalo o zhášení statické či dynamické.

Jak se ve Stern-Volmerově grafu projeví, že dochází současně ke statickému i dynamickému zhášení fluorescence ?

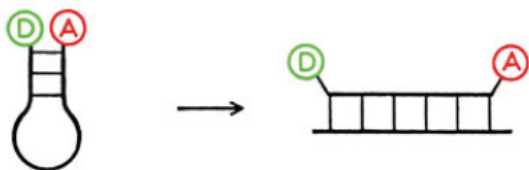
Jak se ve Stern-Volmerově grafu projeví, že populace fluoroforů je heterogenní (tzn. jsou tam frakce, které mají různou přístupnost zhášedla, popř. frakce, která je nepřístupná) ?

Uveďte nejčastější molekulární mechanismy, které jsou zodpovědné za zhášení fluorescence.

Napište podmínky, při kterých dochází k Försterově rezonančnímu přenosu energie (FRET).

Změnami kterých charakteristik se projevuje Försterův přenos energie (FRET) v experimentu ?

Oligonukleotid DNA je na svých koncích označen dvěma fluorofory, které tvoří donor-akceptorový pár při FRETu. Samotný oligonukleotid tvoří vlásenkovou strukturu, v případě, že se v roztoku nachází komplementární řetězec DNA, dojde k vytvoření duplexu (viz obrázek). Jak se to projeví ve fluorescenčním experimentu ?



Střední doba života excitovaného fluoroforu (donoru) poklesla v přítomnosti akceptoru díky FRETu ze 4 ns na 2 ns. Jaká je vzdálenost donoru od akceptoru, pokud je Försterova vzdálenost pro daný donor-akceptorový pár rovna $R_0 = 5 \text{ nm}$?

Při měření FRET byla pro vzorek označený jen donorem naměřena relativní intenzita fluorescence 1000, pro vzorek označený donorem i akceptorem relativní intenzita 700. Určete účinnost přenosu energie.

Střední doba života donoru poklesla v přítomnosti akceptoru z hodnoty 5 ns na 3 ns. Určete účinnost přenosu energie při FRET.

Jak daleko mohou být od sebe donor a akceptor, aby bylo možno s rozumnou přesností určit jejich vzdálenost ?

Co je to homotransfer ?

Jakým způsobem určujeme účinnost FRETu ve fluorescenční mikroskopii ?

V čem se liší fluorescenční mikroskop od klasického světelného mikroskopu ?

Jak je limitováno rozlišení klasických světelných mikroskopů ?

Spočítejte, jaké je teoreticky dosažitelné rozlišení klasického světelného mikroskopu, pokud vzorek osvětlujeme světlem o vlnové délce 400 nm a pozorujeme ho přes objektiv s numerickou aperturou 1,2.

Vysvětlete, z jakých komponent se skládá a jak funguje kostka s filtry, která se využívá v epifluorescenčních mikroskopech.

Jakým způsobem se vytváří obraz ve vícebarevné fluorescenční mikroskopii ?

Popište princip fungování fluorescenčního mikroskopu.

Jaké jsou výhody konfokálního mikroskopu ?

Jaké fluorescenční parametry obvykle sledujeme ve funkční fluorescenční mikroskopii (např. mapy pH, atd.) ?

Co to je FLIM ?

Vysvětlete princip nanoskopie (metoda STED).

Co je určující pro rozlišení při metodě STED ?

Za jakých podmínek fungují optimálně metody založené na sledování fluktuací intenzity fluorescence ?

Jakým způsobem vyhodnocujeme záznam dat v metodě FIDA (PCH) a jaké nám to dává informace o zkoumaném vzorku ?

Jaké jsou nejčastější důvody fluktuace intenzity fluorescence při malém detekčním objemu ?

Jakým způsobem vyhodnocujeme záznam dat v metodě FCS a jaké nám to dává informace o zkoumaném vzorku ?

Co nám umožňuje měření FCS na dvou vlnových délkách (two-color FCS) ?

Co nám umožňuje měření časově rozlišené FCS ?

Vysvětlete princip metody FRAP (fluorescence recovery after photobleaching).

Které informace můžeme získat při sledování jednotlivých molekul ?

Jaké jsou nepoužívanější způsoby sledování jednotlivých molekul ?

Jaký je princip buzení fluorescence metodou TIRF ?

Jaké jsou nejčastější praktické potíže při měření fluorescence jednotlivých molekul ?

Vysvětlete princip vícefotonové absorpce.

Jak závisí pravděpodobnost vícefotonové absorpce na výkonu laseru ?

Kdy může dojít k multifotonové excitaci ?

Podle čeho můžeme poznat, že dochází k vícefotonové excitaci fluoroforu ?

Jaké jsou výhody měření fluorescence s vícefotonovou excitací ?

Jaká je výhoda vícefotonové absorpce při měření anizotropie fluorescence ?

Jaké jsou výhody vícefotonového buzení při měření fluorescence v živých tkáních ?

Které vlastnosti okolních molekul (zejména solventu) ovlivňují měřené fluorescenční parametry ?

Vysvětlete mechanismus obecného efektu solventu a jak se projevuje v experimentu.

Zapište Lippert-Matagovu rovnici.

Vysvětlete princip analýzy vlivu solventu na měřenou veličinu pomocí Kamlet-Taftových parametrů.

Jak pomocí analýzy kinetiky spektrálních relaxací rozlišíme, zda-li se jedná o kontinuální relaxace (např. reorientace molekul solventu) nebo reakci v excitovaném stavu (např. přenos protonu) ?

Navrhněte fluorescenční experiment, pomocí něhož můžete určit, zda-li dvě molekuly spolu interagují. Uvažujte např. případ vazby malého fluoroforu na velký enzym.

Z kterého fluorescenčního experimentu můžete určit velikost molekuly ?