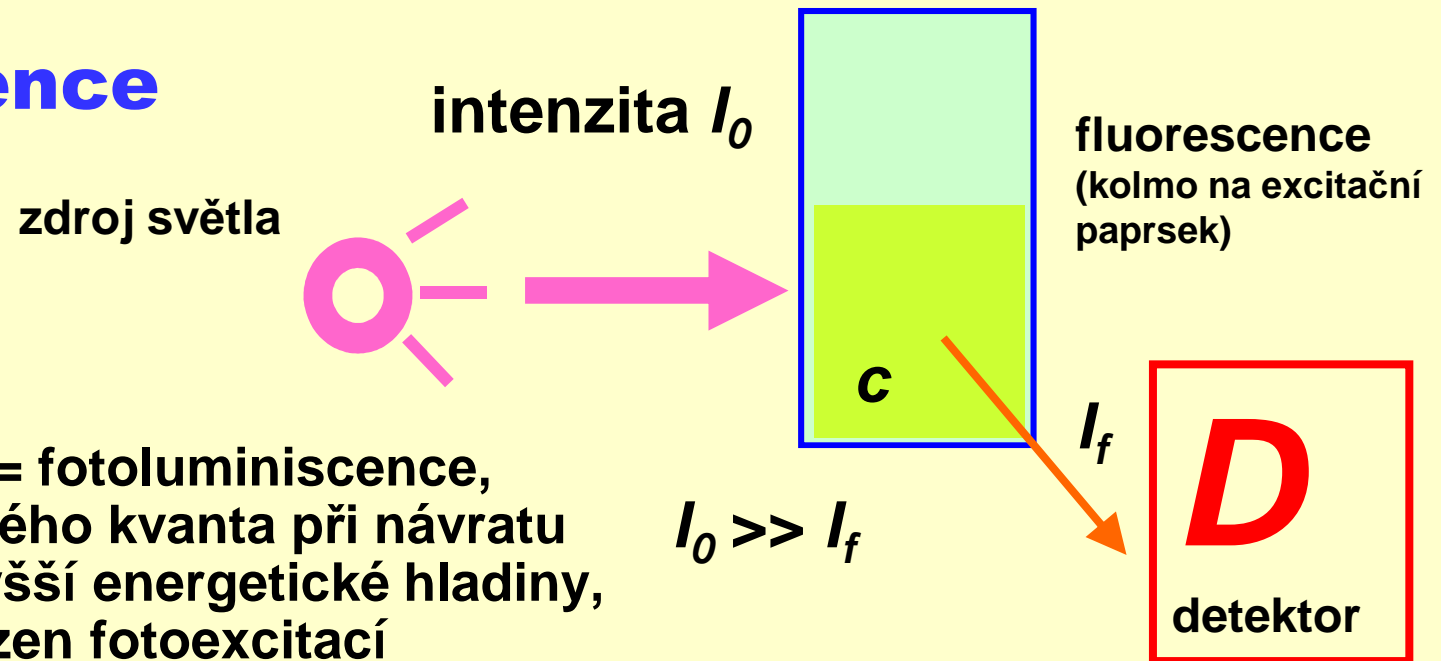


# Fluorescenční metody

- široké použití v oblasti výzkumu i praktické aplikace
- **bioanalytické metody**
  - klinická chemie (fluorogenní substráty při stanovení enzymů)
  - imunochemické metody (ELISA, FIA fluorescenční imunoanalýza)
  - genetické analýzy a DNA biočipy
  - monitorování prostředí (fluorescenční proby)
- **biomedicína**
  - identifikaci a separace buněk v průtokové cytometrii
  - zobrazení buněčných komponent ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu
  - konformace a dynamika buněčných systémů

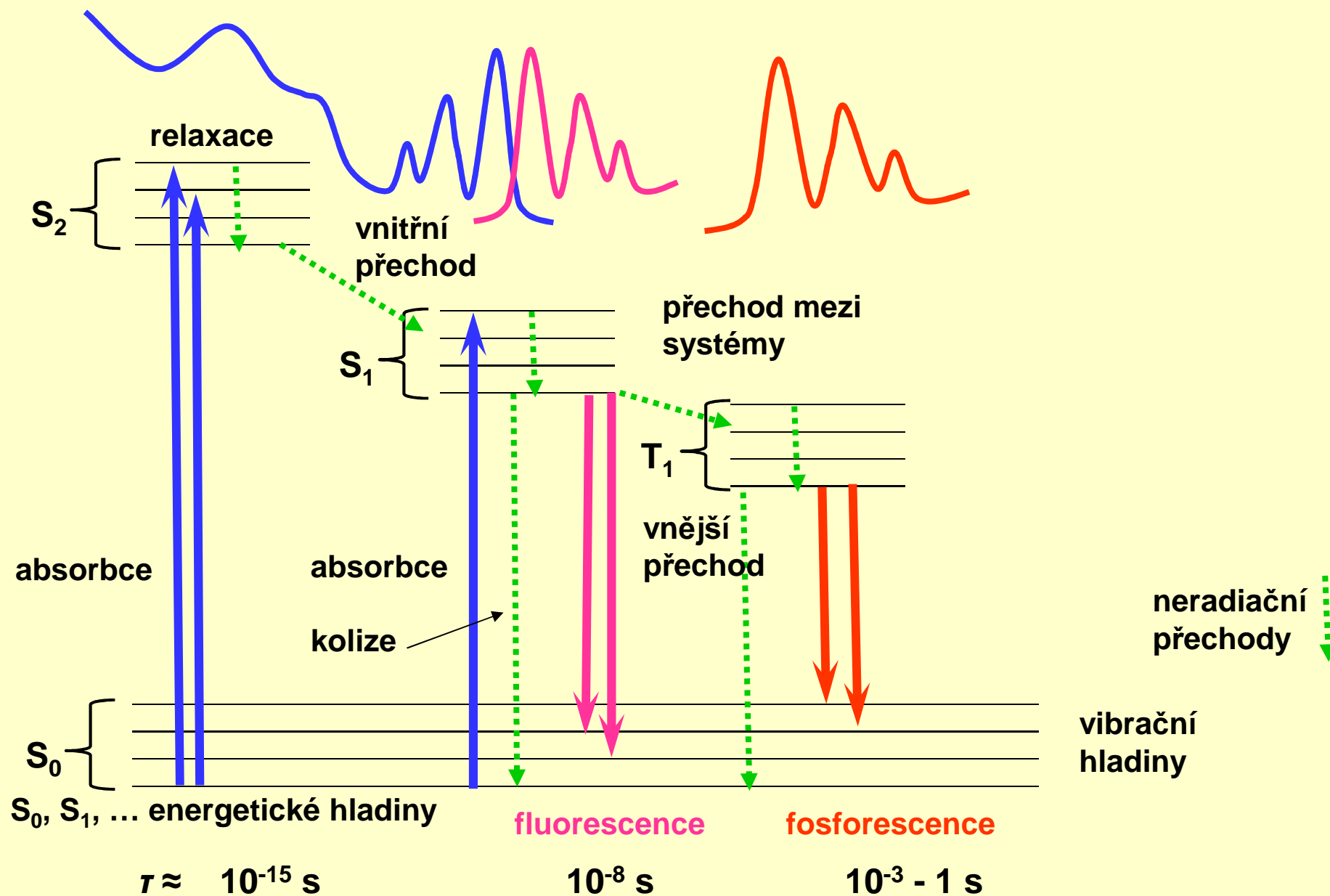
# Fluorescence



- fluorescence = fotoluminiscence, emise světelného kvanta při návratu elektronu z vyšší energetické hladiny, kam byl vybuzen fotoexcitací
- fluorescence  $F$  se udává při určité vlnové délce
  - emisní x excitační spektra
  - relativní vyjádření, alternativně jako intenzita světelného toku na jednotkovou plochu ("count")
- další charakteristiky: kvantový výtěžek  $\Phi$ , střední doba života  $\tau$ , polarizace  $P$  (směr kmitání el. vektoru emg. vlny)
- fluorescence prakticky ihned ( $10^{-8}$  s) po skončení excitace ustane
- fosforescence trvá delší dobu, při excitaci vzniká metastabilní stav
- energetické přechody - **Jablonského diagram**: (vznik a zánik excitovaných stavů)

$$I_f = k\Phi \varepsilon c l$$

# Fluorescence



## ▪ **Kashovo pravidlo:**

- před emisí dochází k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného stavu  $S_1$

## ▪ **Vavilovův zákon:**

- kvantový výtěžek a doba trvání excitovaného stavu složitých molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce budícího záření
- obecná vlastnost fluorescence: emisní spektra jsou nezávislá na vlnové délce excitace

## ▪ **Zcadlová symetrie mezi absorpčním a fluorescenčním pásem:**

- absorpce i emise z odpovídajících si vibračních hladin mají stejnou relativní pravděpodobnost. Většina absorbujících i emitujících molekul se nachází v rovnovážném vibračním stavu, přičemž vibrační struktura základního i excitovaného stavu mají stejnou strukturu
- po absorpci přechází elektron z rovnovážné vibrační hladiny stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_1$ , poté dochází k rychlé relaxaci na stavu  $S_1$  (v čase  $10^{-12}$ - $10^{-13}$  s) a teprve poté následuje zářivý přechod na vyšší vibrační hladinu stavu  $S_0$  a další vibrační relaxace na rovnovážnou vibrační hladinu stavu  $S_0$
- výjimky jsou důsledkem rozdílného geometrického uspořádání atomových jader v excitovaném a základním stavu

## ▪ **Stokesův posuv**

- rozdíl v energiích mezi maximy absorpčního a emisního pásu

# Sledování a měření fluorescence

- **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku v kyvetě nebo v jamce mikroadestičky
- **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
- **fluorescenční skenery** (i "čtečky" mikroadestiček) – měří fluorescenci 2D makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
- **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací
- **měření relaxačních časů** (pulzní, nebo fázový posun - frekvenčně modulované světlo)
- **fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)**
  - fluktuace intenzity  $F$  v mikroobjemu ( $10^{-15}$  l) určeném fokusovaným laserovým excitačním paprskem
  - rychle difundující fluorofory - fluktuace fluorescence (nedochází ke zprůměrování), její časová závislost se analyzuje pomocí autokorelační funkce (informace o kinetice, difúzi, koncentraci molekul ve vzorku)

# Rozdělení fluoroforů

- **vlastní (vnitřní, intrinsic) - přirozený výskyt**
  - proteiny (Trp, Tyr, Phe), NADH, FAD, FMN, chlorofyl
  - fykobiliproteiny, green fluorescent protein (GFP)
- **nevlastní (vnější, extrinsic) - přidávají se ke vzorkům, které samy nemají fluorescenční vlastnosti**
- **fluoresceční značky (váží se kovalentně)**
- **fluoresceční sondy (váží se nekovalentně)**
  - fluorofory, jejichž kvantový výtěžek, případně i spektrální vlastnosti se výrazně mění po navázání na bílkoviny, nukleové kyseliny, membrány aj.
  - studium změn konformace, membránového potenciálu, polarity a viskozity prostředí
- **fluorescenční indikátory (chemické sondy)**
  - spektrální vlastnosti nebo intenzita fluorescence jsou citlivé na přítomnost dalších látek - zjištění koncentrace

# Fluoresceční značky

- **klasické: organická barviva, fluorescentní bílkoviny, cheláty lanthanidů**
  - dobře rozpustné ve vodě, snadné použití, mnoho existujících protokolů a aktivovaných forem
  - ale široké spektrální pásy, náchylné na fotorozklad
- **moderní - polovodičové kvantové tečky, anorganické nanočástice dopované lanthanidy, nanočástice latexu a křemičitanů s navázanými fluorofory**
  - díky pokroku v oblasti materiálových věd

# Fluorescein

- nejčastěji používaný fluorofor
  - výhody: vysoká absorbce, velké  $\Phi$ , nízká cena
  - exc. lze při 488 nm Ar laserem (kofokál. mikrosk., cytometrie)

- fluorescein-5-isothiokyanát

- FITC, 494 / 520, s  $-NH_2$  skupinou dává thiomocovinové uskupení

- výhodnější je NHS-fluorescein

- reaguje rychleji, stabilnější produkt

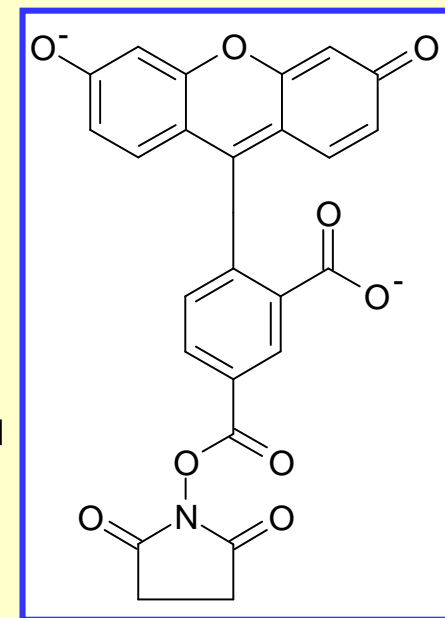
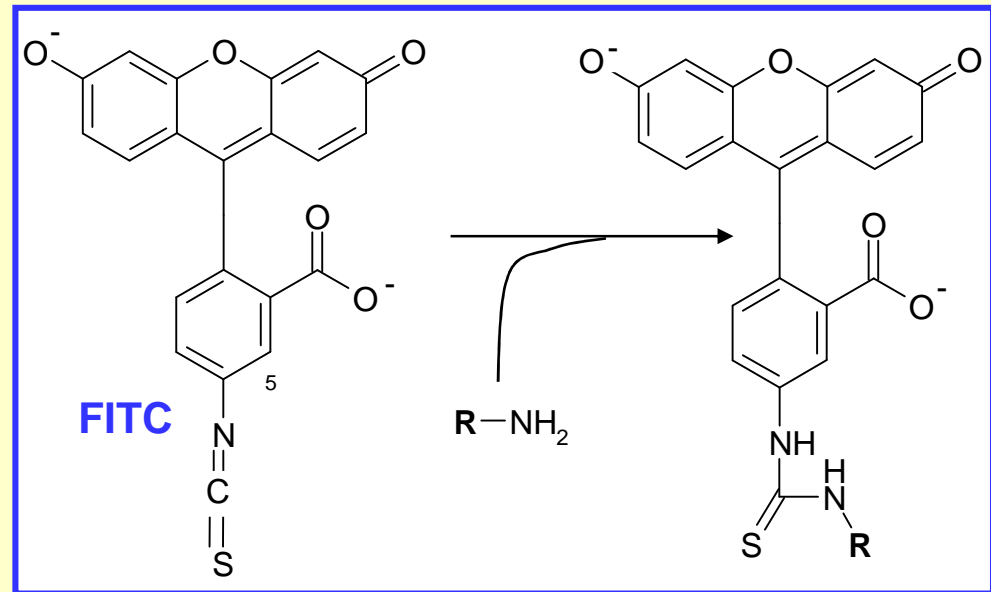
- na  $-SH$  skupiny: 5-jodoacetamidofluorescein (5-IAF) a fluorescein-5-maleimid

- na aldehydové či oxoskupiny:

- fluorescein-5-thiosemikarbazid, dá hydrazonovou vazbu
- použitelný např. pro značení cytosinův DNA či RNA po jejich aktivaci hydrogensířičitanem

- na sacharidové zbytky:

- fluorescein-dichlorotriazin (DTAF), i na jiné biomolekul s volnými alifatickými hydroxyly, také na tubulin



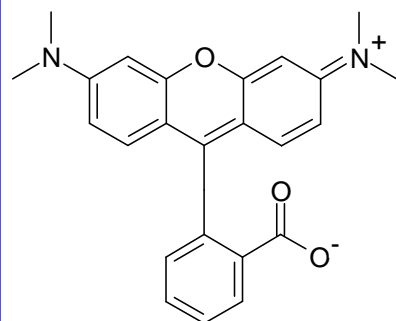
NHS-fluorescein



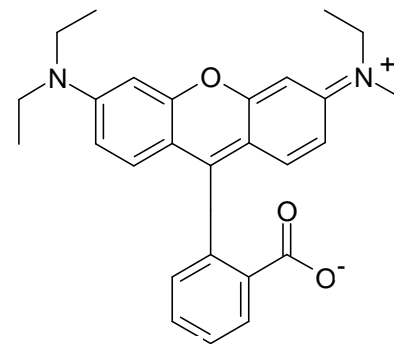
## **Problémy s fluoresceinem**

- **náchylný na fotorozklad - signál vydrží pouze pár minut**
- **pH závislost fluorescence - výrazně klesá signál pro pH pod 7**
- **existence isomerů - může komplikovat geometrii vazby k proteinům, následně eluční časy v chromatografii, migraci v gelech**
- **méně vhodný pro "ultracitlivé" aplikace**

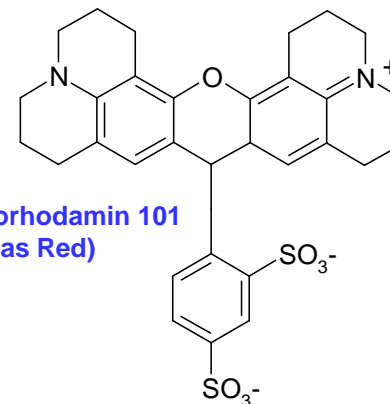
# Rhodaminy



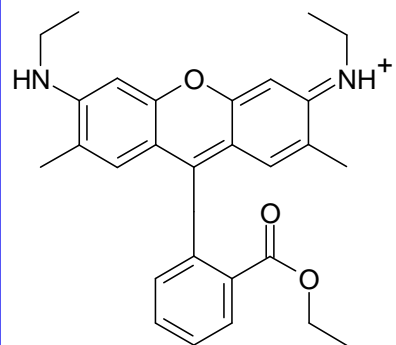
tetramethylrhodamin (TMR)



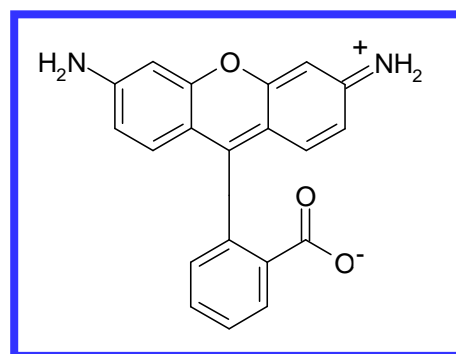
rhodamin B



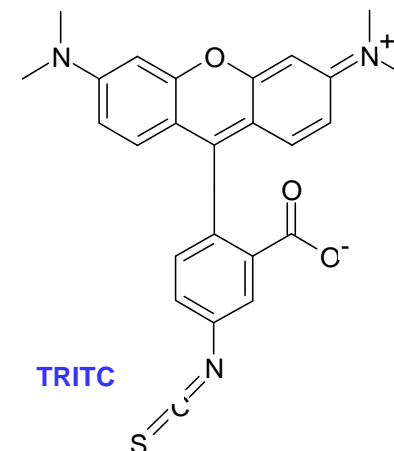
sulforhodamin 101  
(Texas Red)



rhodamin 6G



rhodamin 110



TRITC

- **strukturně podobné fluoresceinu, který doplňují**
  - místo atomů kyslíku jsou na postranní cykly vázány dusíkové atomy
  - mohou nést různé substituenty a tím je dostupná široká škála variant
- **emise probíhá při delších vlnových délkách ve srovnání s fluoresceinem**
  - použitelné pro techniky s dvojím značením
  - vyšší fotostabilita a dobrá excitovatelnost světlem rtuťových výbojek

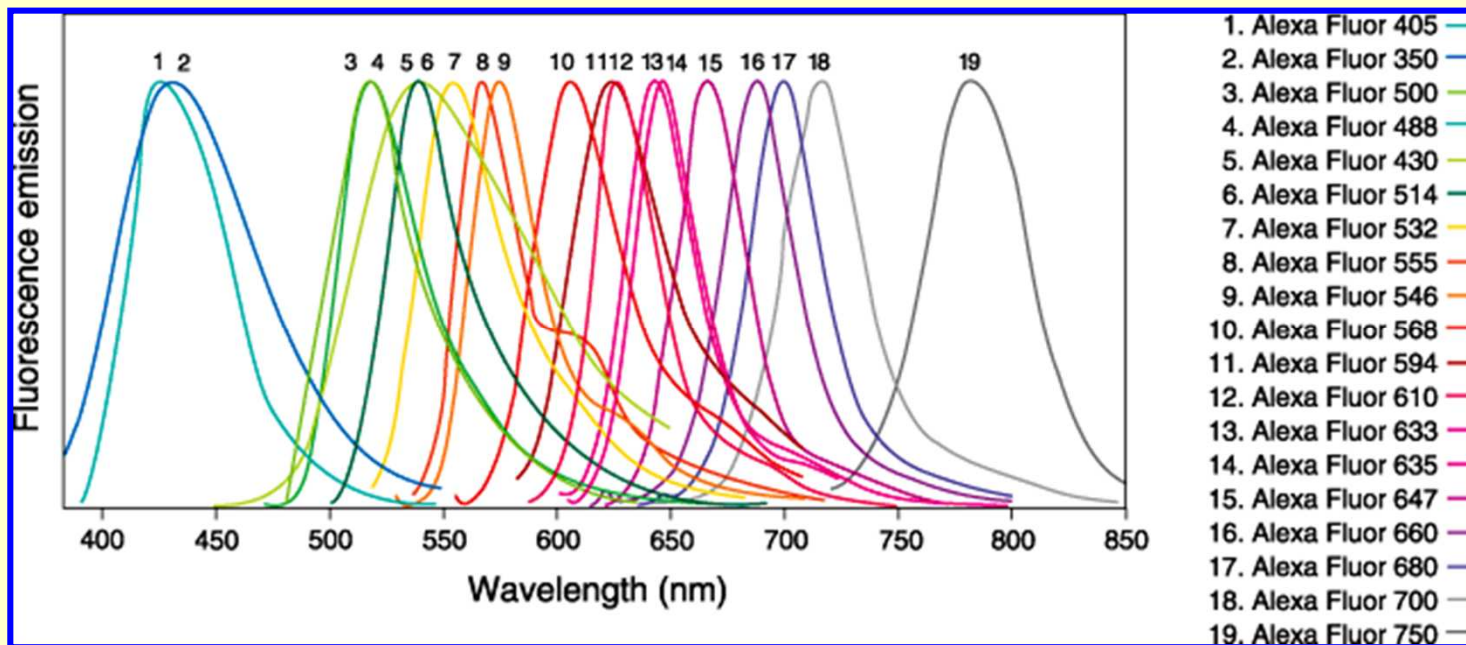
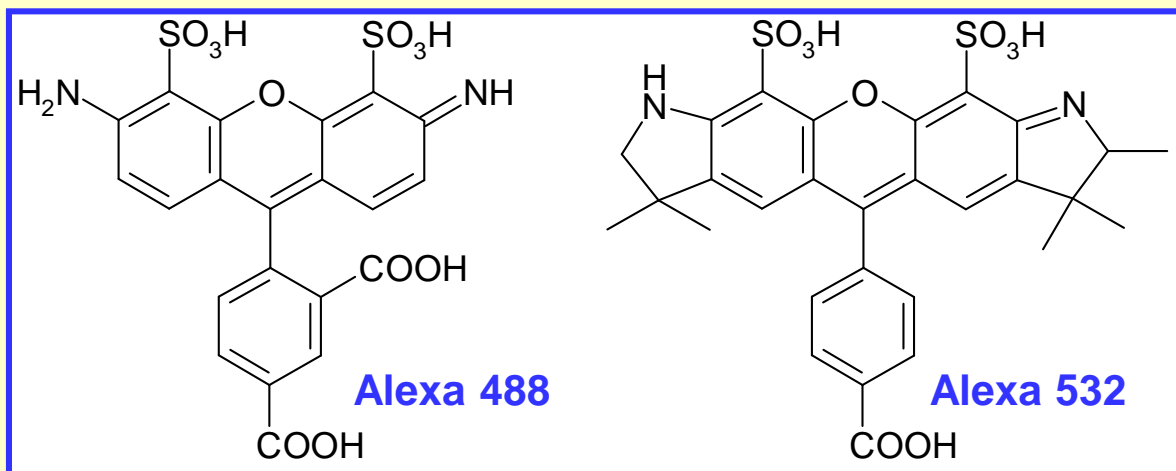
- **sulforhodamin B, jinak **Lissamin** rhodamin B**
  - obsahuje na dolním aromatickém jádře dvě sulfoskupiny v polohách 3 (vpravo nahoře) a 5 (dole) (Imperial Chemical Industries)
- **sulforhodamin 101, **Texas Red** (Molecular Probes)**
  - emitující nad 600 nm
- **tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (**TRITC**) resp. (**TMR**)**
  - od tetramethylrhodaminu, nejběžnější značkovací činidlo z této skupiny, (544 / 570),  $\epsilon_{544} = 10^5 \text{ M cm}^{-1}$
  - reakce s aminoskupinou probíhá analogicky jako u FITC
  - karboxytetramethylrhodamin (**TAMRA**) další alternativa
- **NHS-rhodamin (5-karboxymethylrhodamin sukcinimidylester) (544 / 576)**
- **karboxy-X-rhodamin (**ROX**) - značení oligonukleotidů, sekvenování**
- **Lissamin Rhodamin B sulfonylchlorid (556 / 576)**
  - má v 5-pozici reaktivní skupinu  $-\text{SO}_2\text{Cl}$  - s  $-\text{NH}_2$  vzniká sulfonamid
  - podobně existuje sulfonylchlorid i od Texas Red derivátu
- **na derivatizaci SH: tetramethylrhodamin-5-jodacetamid (540 / 567)**
- **pro reakci s aldehydy Lissamin rhodamin B sulfonylhydrazin**
  - má v 5 poloze skupinu  $-\text{SO}_2\text{-NH-NH}_2$ ) (560 / 585)
  - sulfonylhydrazin Texas Red emituje při delší vlnové délce (580 / 604)

## **Rhodaminy - zhodnocení**

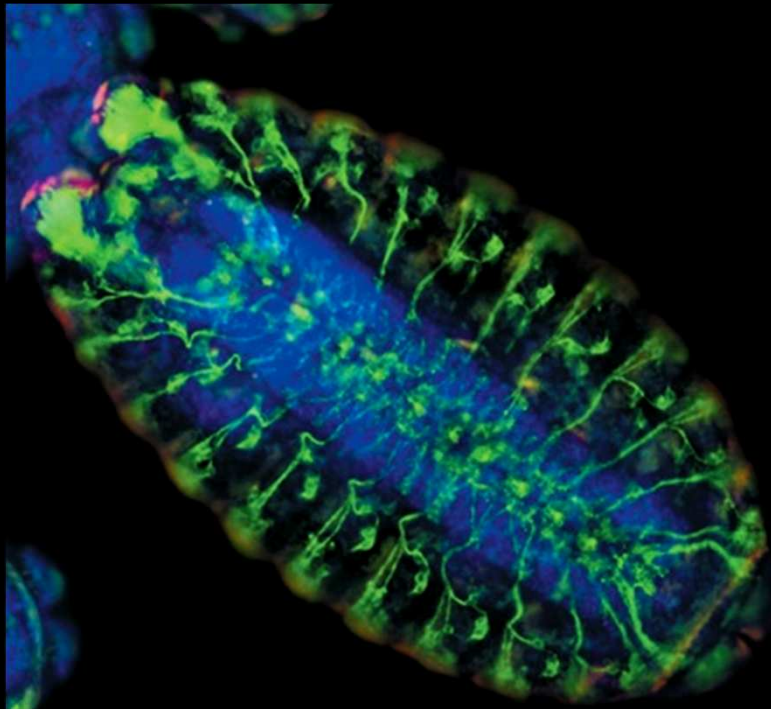
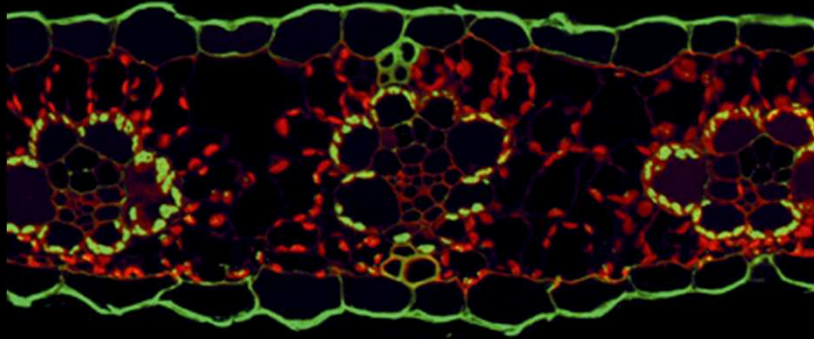
- **fluorescence v červené oblasti**
- **vyšší stabilita než fluorescein**
- **excitovat (při 520 nm) lze rtuťovou výbojkou**

# Alexa Fluor

- rhodaminový nebo kumarinový skelet doplněný o sulfoskupiny
- vyšší rozpustnost
- celá odstupňovaná řada sloučenin s posunujícími se exc. a emis. maximy
- napojení na značené biomolekuly probíhá v dolní části molekuly přes karboxyl v poloze 5 aktivovaný např. NHS skupinou
  - jsou přítomny i isomery se skupinou posunutou do polohy 6

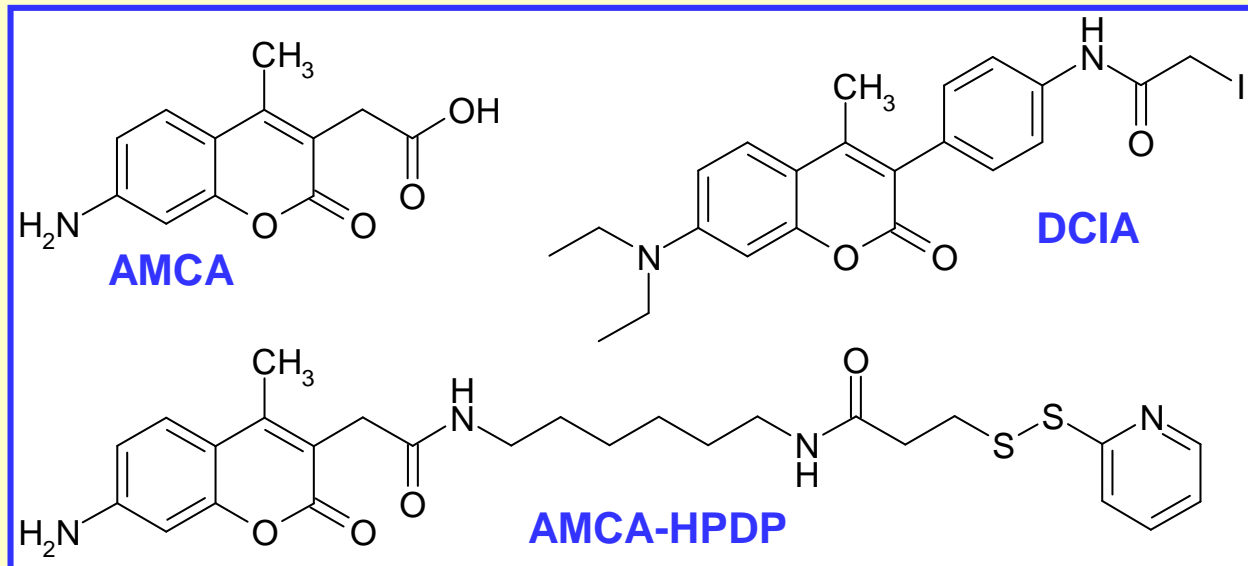


## Značení AlexaFluor

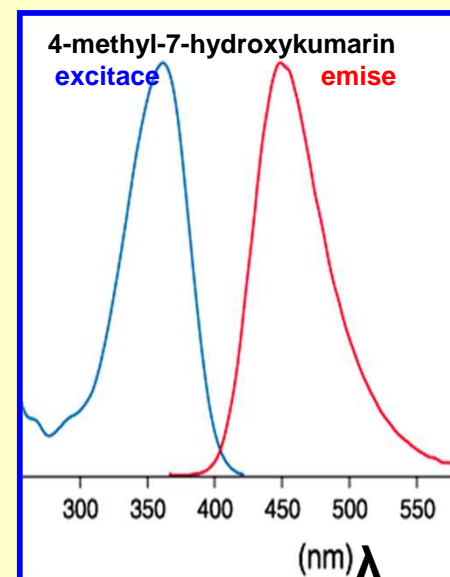


- imunolokalizace ribulosabisfosfát karboxylasy v 2.0  $\mu\text{m}$  řezu listu kukuřice (C4, separovány fotosynt. složky mezi mezofil a svazky cévní)
  - anti rubisco Ab, Alexa Fluor 488 kozí Ab anti králičí IgG
  - autofluorescence chlorofylu (červeně, v mezofylových plastidech)
  - lignin (matně zelený) v xylemu svazků
  - kutin (jasně zelený) v kutikule vně epidermis
- periferní neurosystém embrya *Drosophily*:
  - mAb 22c10 anti mikrotubuly, Alexa Fluor 488 králičí Ab anti-myší IgG
  - dělicí se buňky - Ab anti histon-H3, Alexa Fluor 594 kozí Ab anti králičí IgG
  - jádra DAPI (modrá fluorescence)

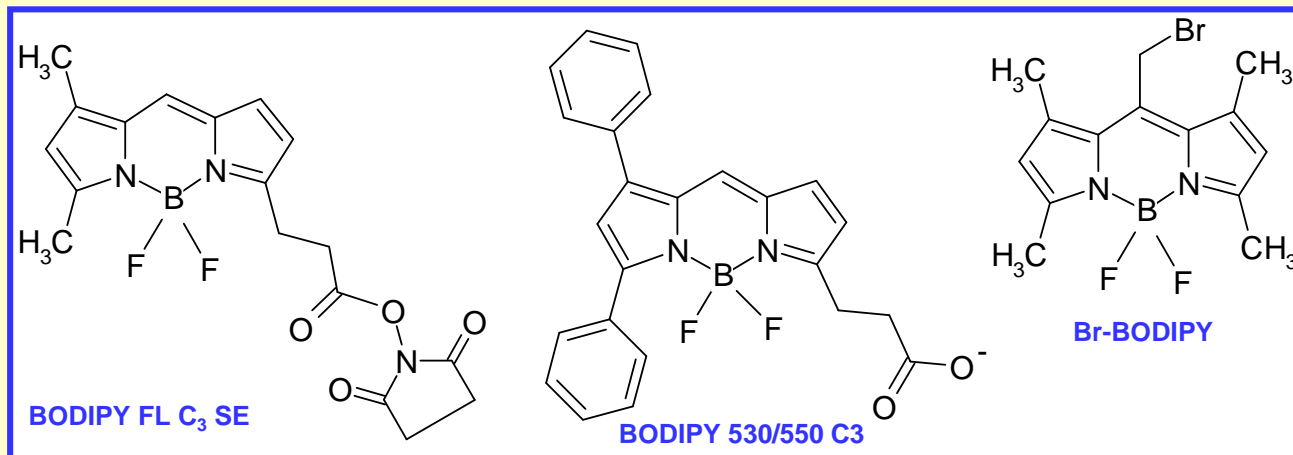
# Kumariny



- kumarin = 2H-1-benzopyran-2-on je přírodní látka
- 7-amino-4-methylkumarinové deriváty, zejména 7-amino-4-methylkumarin-3-octová kyselina (**AMCA**) (345 / 450)
  - pro -NH<sub>2</sub> AMCA-NHS
  - pro -SH AMCA-HPDP
  - pro aldehydy AMCA-hydrazid
- 7-diethylamino-3-[(4'-(jodacetyl)amino)-fenyl]-4-methylkumarin (**DCIA**)
  - velmi intenzívní fluorescence (382 / 472)
  - na světle nestabilní



# BODIPY



- **4,4-difluoro-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen**
  - nemá ionizovatelné skupiny - málo ovlivněn pH
  - vysoké absorpance a vysoké kvantové výtěžky fluorescence
  - menší komplikací jsou malé Stokesovy posuny pod 20 nm
- **modifikace v krajních polohách postranních cyklopentadienů**
  - deriváty s posunutými spektrálními charakteristikami
  - pro -NH<sub>2</sub> existuje BODIPY FL C<sub>3</sub> SE s postranní NHS skupinou (502 / 510)
  - komplikací je vzájemné zhašení, pokud je stupeň substituce vyšší
  - dostupné deriváty s jodacetamidovou a hydrazidovou skupinou
- **deriváty BODIPY 530/550 C<sub>3</sub>-X - maxima k vyšším vlnovým délkám**
  - přítomnosti objemných aromatických postranních substituentů
  - reaktivní skupinou X může být NHS nebo hydrazid
- **bromderivát Br BODIPY pro substituce sulfhydrylových skupin**



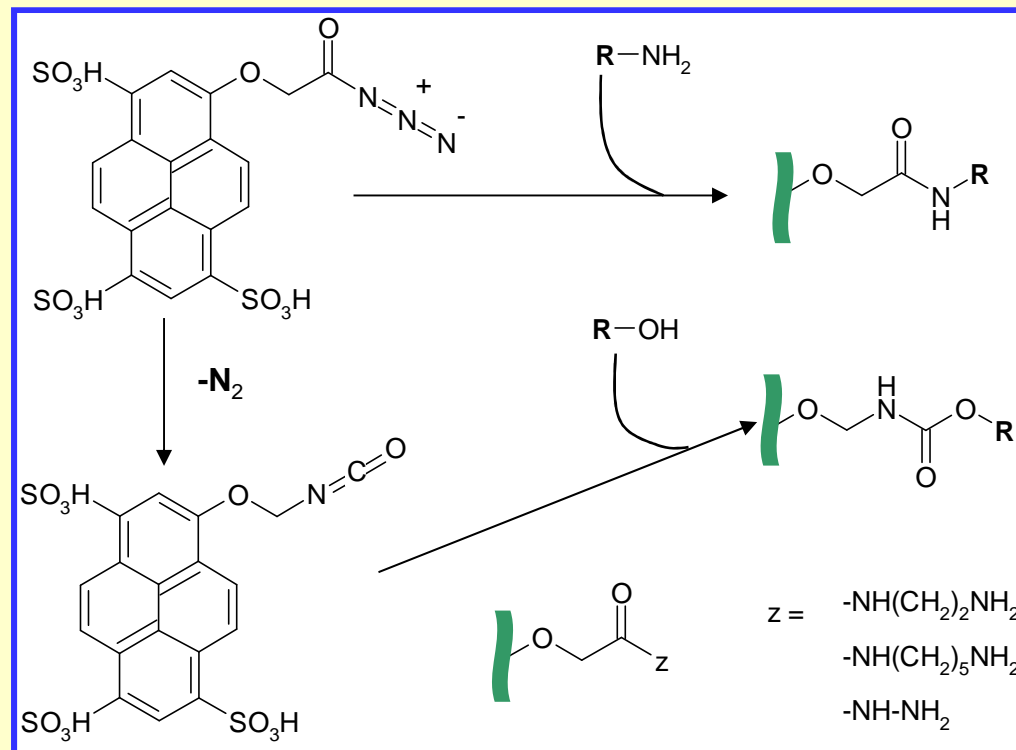
# Cascade blue

- od sulfonovaného pyranu

- vlastnostmi vhodně doplňuje fluorescein při multiznačení
- výborná rozpustnost ve vodě
- dobré kvantové výtěžky (kolem 50%)
- malá úroveň vzájemného zhášení při vyšších substitučních poměrech
- mateřská sloučenina má na horním jádře vpravo pouze methoxyskupinu.

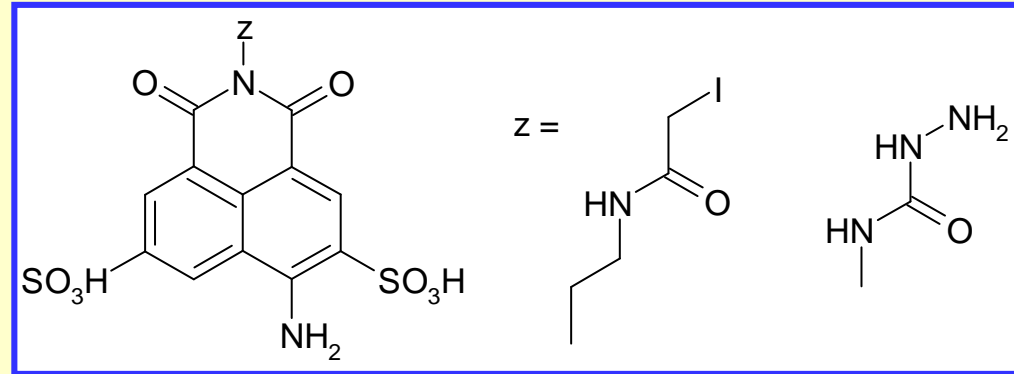
- pro značení aminoskupin - acetylazidový derivát (375+400 / 410)

- při vyšších teplotách – kolem 80 °C v DMF probíhá p řesmyk azidového uskupení na isokyanátovou formu a odštěpí se molekula dusíku
- isokyanát reaguje s volnými hydroxyly, vzniká urethanové uskupení
- další formy mají v postranní části hydrazinový, ethylendiaminový nebo kadaverinový (pentamethylendiaminový) zbytek



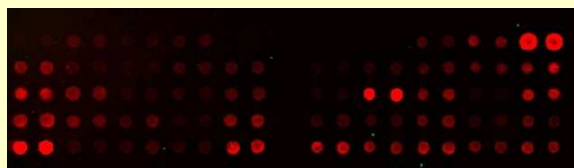
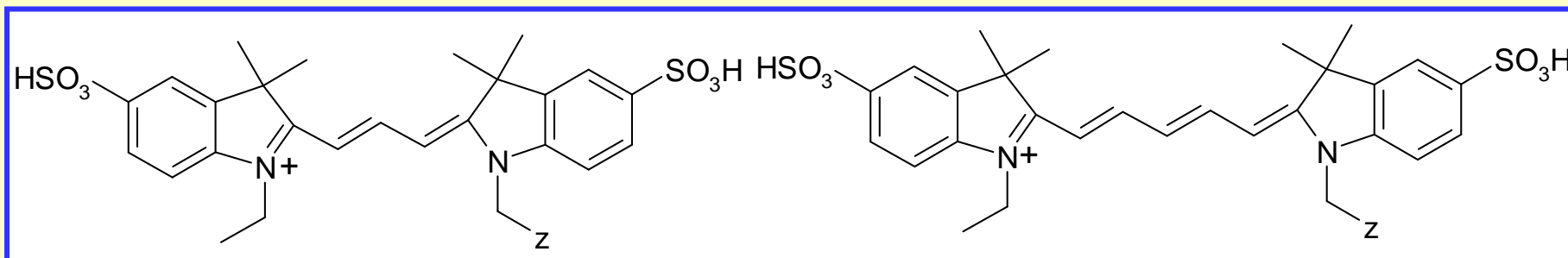
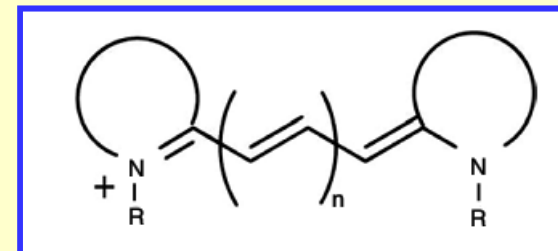
# Lucifer yellow

- základní sloučeninu  $z = H$
- deriváty 4-aminonaftalimid-3,6 disulfonátu
- napojení se realizuje přes horní imidový atom dusíku
  - jodacetamidový derivát (na –SH)
  - hydrazidová skupina (Lucifer Yellow CH, na aldehydy)
  - optické parametry (427 / 530)
- především v cytochemii

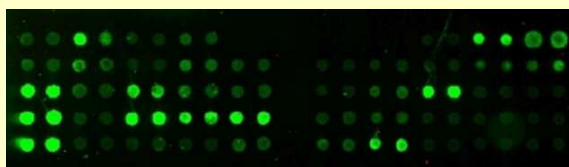


# Cyaninové fluorofory

- velmi populární zejména v oblasti DNA biočipů využívajících cDNA fragmenty jako imobilizované próby
- základem je **indokarbocyaninový skelet**
  - je sulfonován, obě aromatické části jsou spojeny uhlíkatým můstkem s konjugovaným systémem dvojných vazeb (methin)
- je k dispozici odstupňovaná řada fluoroforů (Amersham Biosci.)



vzorek - Cy5



kontrola Cy3

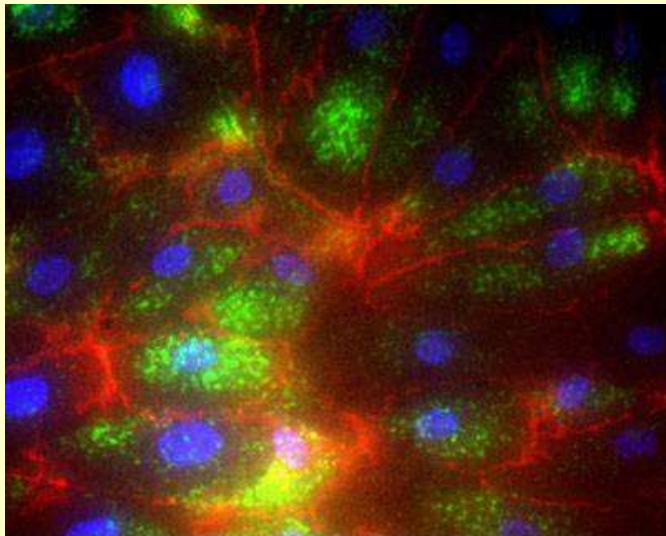
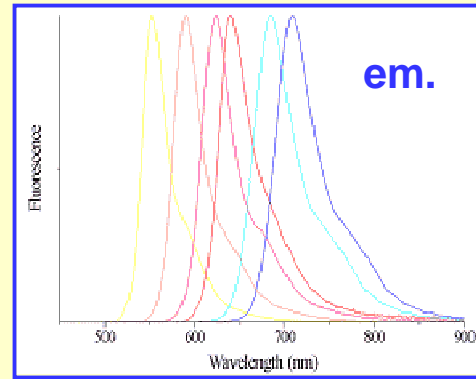
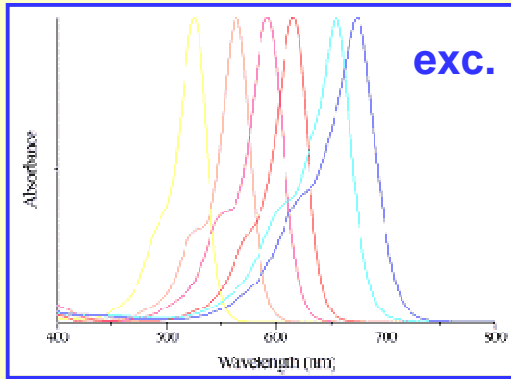
překryvový signál (oba kanály)

## Cyaniny - zhodnocení

- **délka polyenového spojovacího řetězce**
  - monomethinové sloučeniny - thiazol orange (TO), oxazole yellow (YO) nebo jejich dimery (TOTO, YOYO) - fluoreskují po vazbě na nukleové kyseliny (fluorescenční sondy)
  - polymethinové sloučeniny - Cy3, Cy5, ...
  - délka spoj. řetězce, resp. počet vinylenových -CH=CH- skupin působí bathochromní posun o cca 100 nm - fluorofory emitující až v NIR oblasti
- **výhody NIR fluorescence**
  - není zde už autofluorescence biologických složek - vyšší citlivosti
  - méně nákladná instrumentace, excitace při delších vlnových délkách
- **problémy**
  - úzké excitační pásy, fotorozklad, menší intenzita v NIR

# Atto

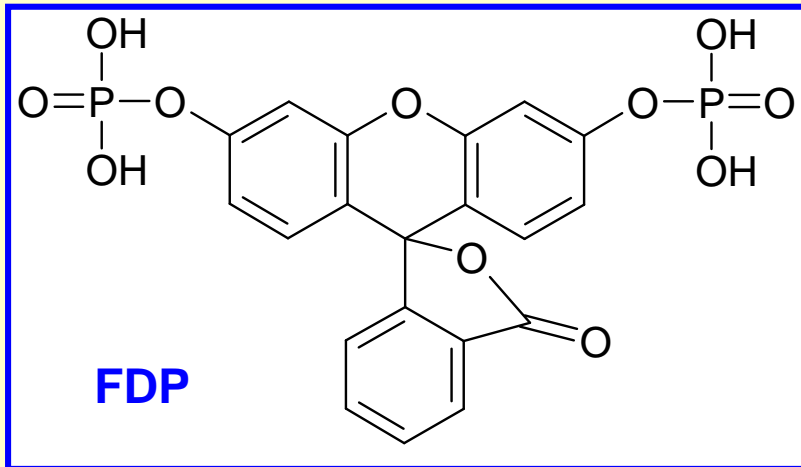
- vysoká absorpce a výtěžek, fotostabilita
- modifikace oligonukleotidů
- několik typů struktur na bázi kumarinu, rhodaminu, ... (Atto-Tec)



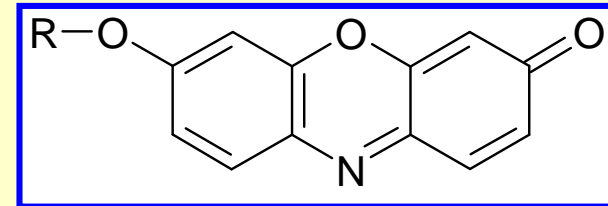
Fluorescent Dye	Absorption max. [nm]	Emission max. [nm]	Extinction coefficient [ $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ ]
Atto 390	390	479	24.000
Atto 425	436	484	45.000
Atto 465	453	508	75.000
Atto 495	495	527	80.000
Atto 488	501	523	90.000
Atto 520	516	538	110.000
Atto 532	532	554	115.000
Atto 550	554	579	120.000
Atto 565	563	592	120.000
Atto 590	594	624	120.000
Atto 594	601	627	120.000
Atto 620	619	643	120.000
Atto 633	629	657	130.000
Atto 647N	644	669	150.000
Atto 655	663	684	125.000

Trojnásobné značení endoteliálních buněk (HUVEC): von Willebrand faktor - Atto 550 znač. Ab (zelené), kadherin - Atto 655 znač. Ab (červeně) a jádra DAPI (modře)

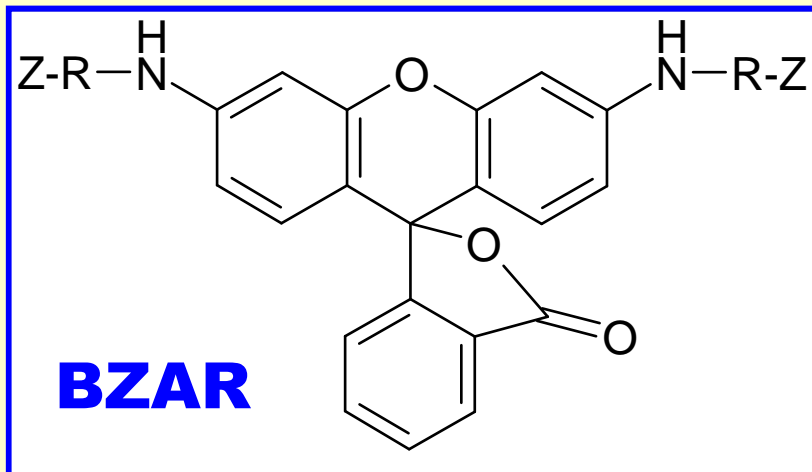
# Fluorogenní substráty hydrolas



deriváty fluoresceinu, např.  
fluoresceindifosfát pro ALP



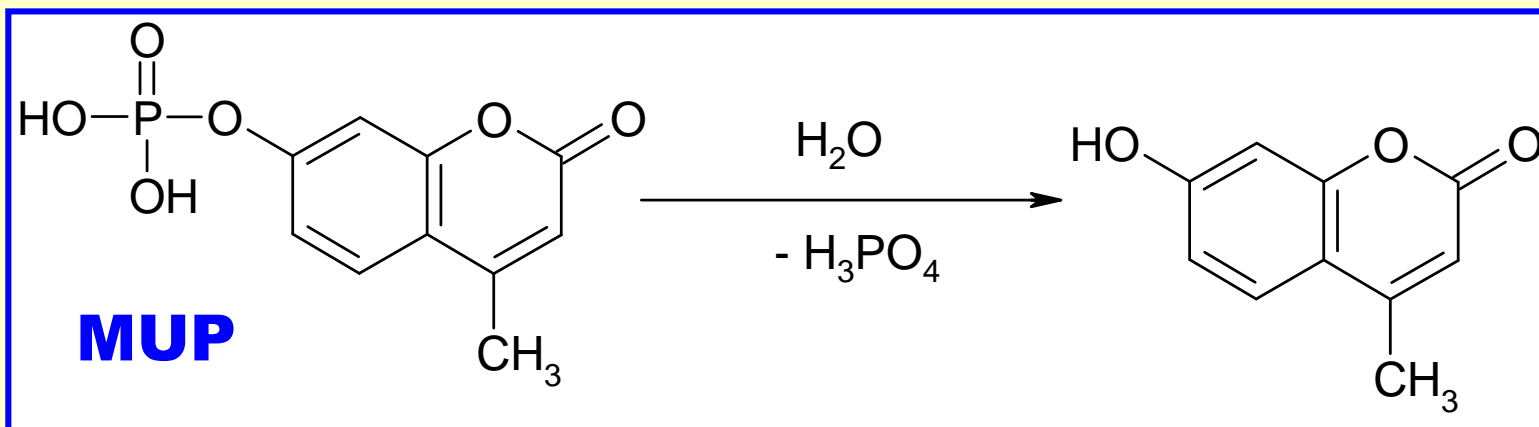
deriváty resorufinu



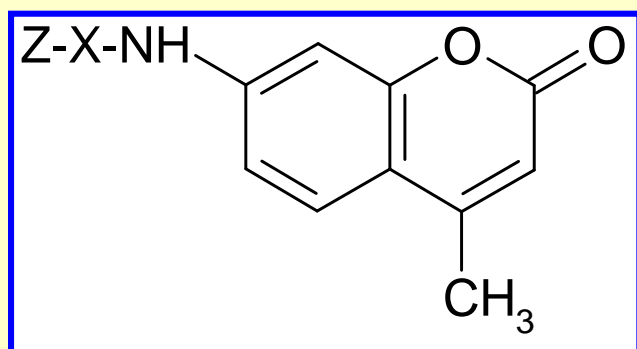
rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-argininamid)  
(**BZAR**), pro serinové proteiny, (496 /  
520) cca 100x citlivější než sloučeniny  
založené na AMC

jiný příklad - rhodamin 110, bis-(*N*-CBZ-L-  
fenylalanyl-L-arginin amid) (**Z-FR-R110**)  
pro cysteinové proteiny katepsin B a L

# Fluorogenní enzymové substráty



4-methylumbelliferylfosfát (**MUP**), po hydrolyse fosfatasou vzniká 4-methyl-7-hydroxykumarin (**methyumbelliferol**), modrá fluorescence, (360 / 450)

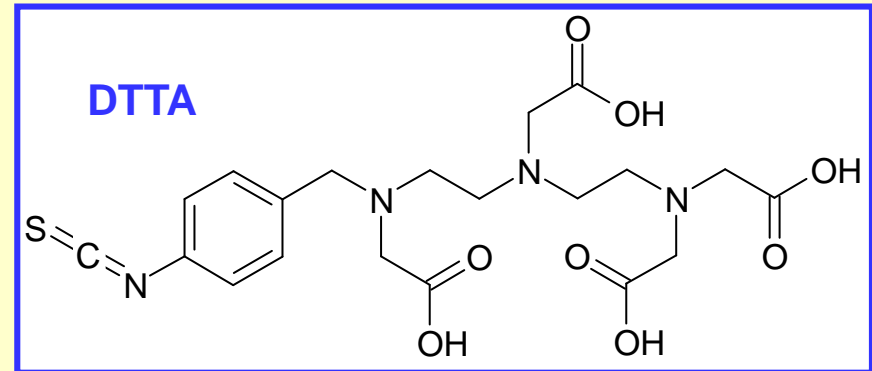


deriváty 7-amino-4-methylumbelliferolu (**Z-X-AMC** nebo **Z-X-MCA**), AMC produkt (342 / 441), např. 7-amino-4-methylkumarin *N*-CBZ-*L*-fenylalanyl-*L*-argininamid (**Z-FR-AMC**) pro stanovení serinových proteinas a plasminu, kalikreinu, katepsinu), nebo 7-amino-4-methylkumarin, *N*-CBZ-*L*-aspartyl-*L*-glutamyl-*L*-valyl-*L*-asparagylamid (**Z-DEVD-AMC**) pro kaspasu 3

alternativně deriváty 7-amino-4-trifluoromethylkumarinu, např. **Z-DEVD-AFC**

*N*-CBZ- je *N*-benzyloxykarbonyl-

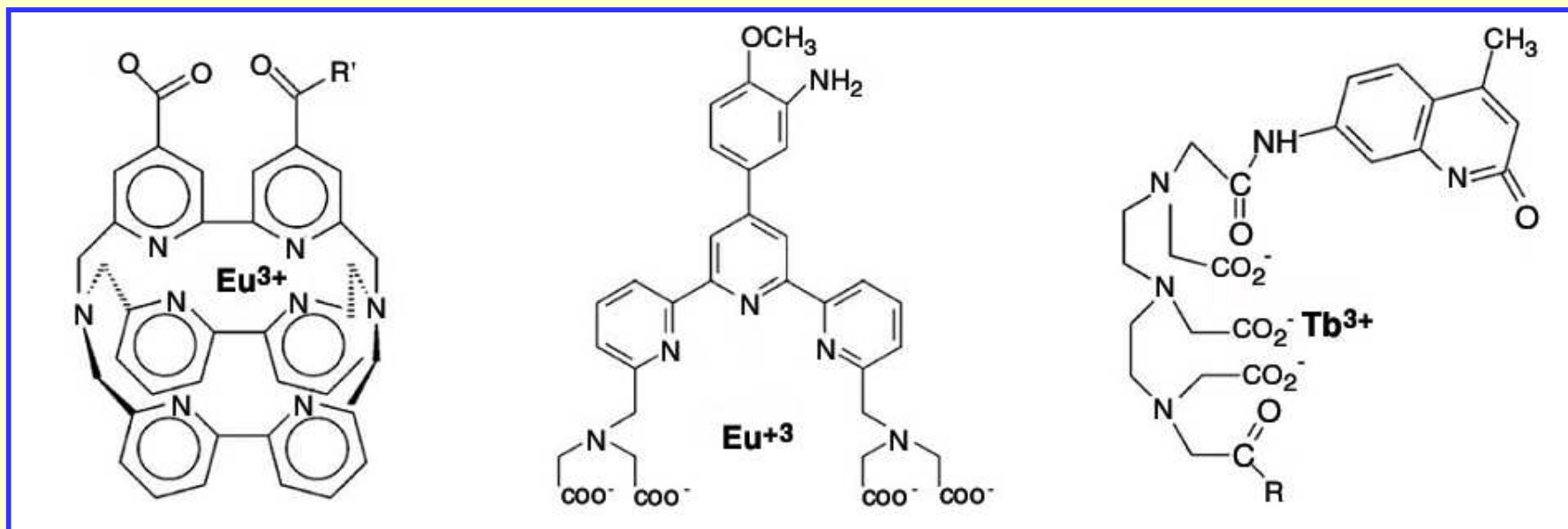
# Lanthanidové komplexy



- $\text{Eu}^{3+}$  a  $\text{Sm}^{3+}$  ve formě **chelátových** komplexů
  - atraktivní fluorescenční značky vhodné pro časově rozlišenou fluorescenci („**time-resolved fluorescence**“, TRF)
- pro "přichycení" k biomolekulám slouží  $\text{N}^1$ -(*p*-isothiokyanatobenzyl)-diethylen-triamin- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^3$ -tetraoctová kyselina (**DTTA**)
- která se může vázat na aminoskupiny za vzniku thiomocovinového uskupení.
- takto připravené komplexotvorné místo pak váže iont lanthanidu a získá se intenzivně fluoreskující značka s relativně dlouhou dobou záření po excitaci
  - při pulzní excitaci se vyčká, až vymizí či vyhasne nespecifická fluorescence pozadí, případně rozptýlené záření, a až pak se po krátké prodlevě změří fluorescence značky
  - lze použít i další lanthanidy, např. terbium a dysprosium
  - proces pod názvem DELFIA zavedla finská firma Wallac Oy



## Další chelátové struktury



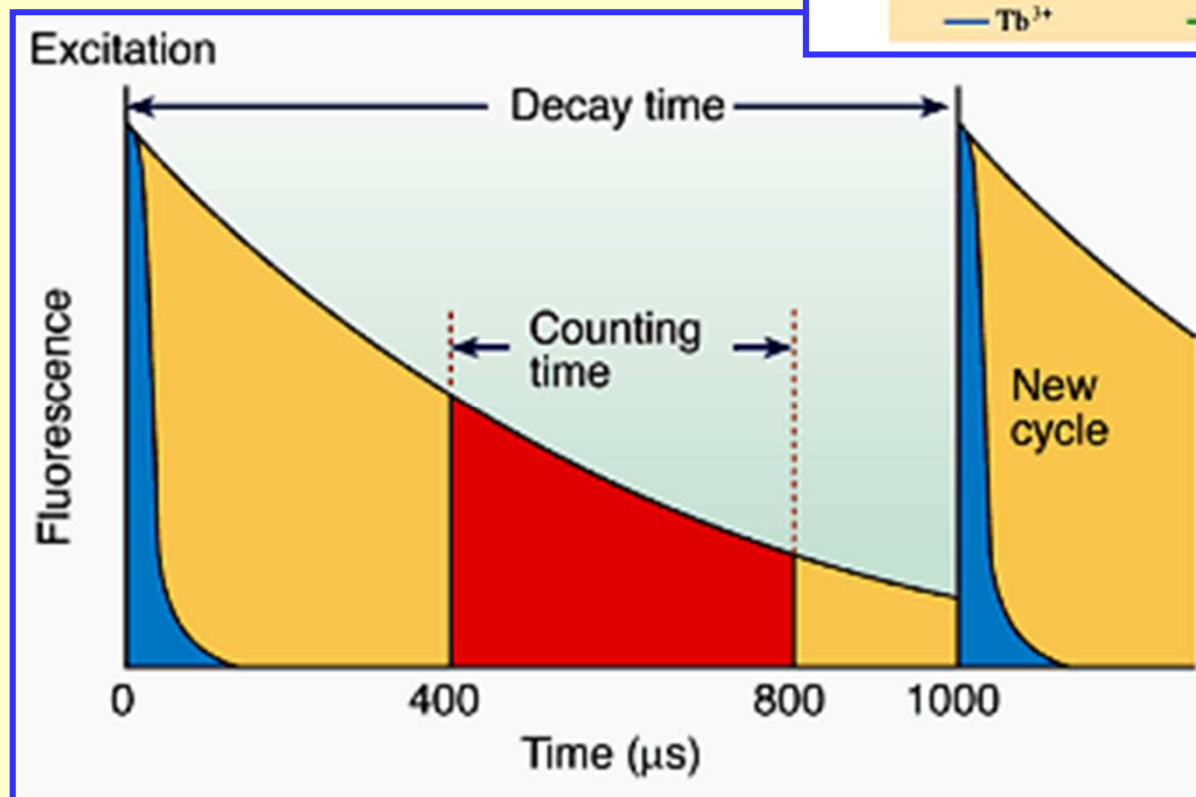
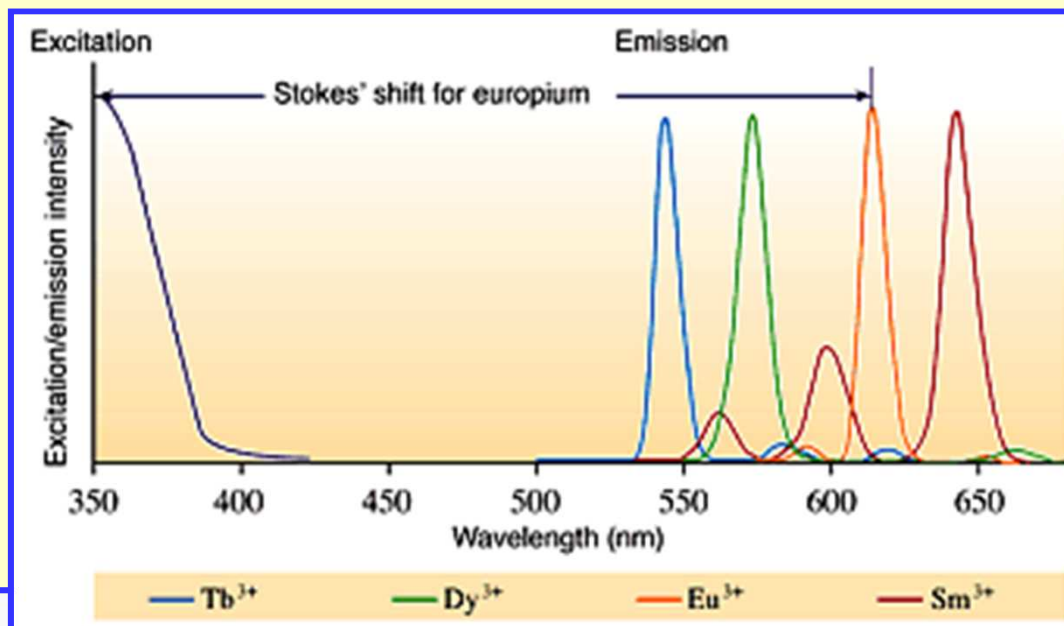
■ kryptát

terpyridin

chelát s anténou

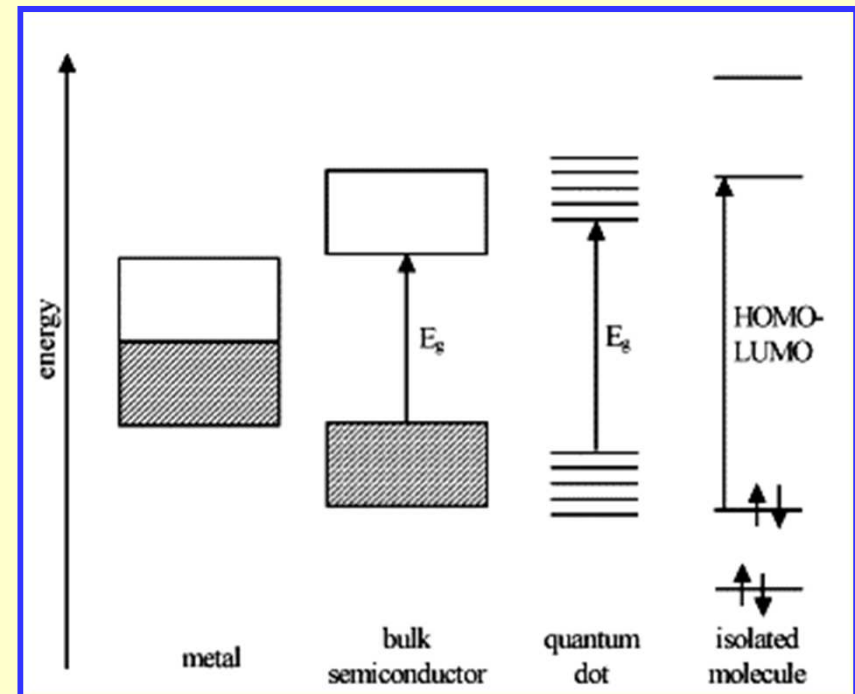
## TRF měření

- cheláty lanthanidů (Eu, Sm, Dy)
  - dlouhá životnost excitovaného stavu
  - velké Stokesovy posuny

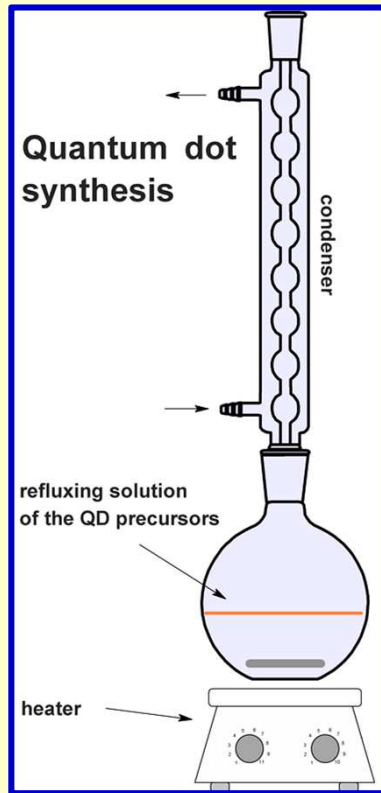


# Kvantové tečky

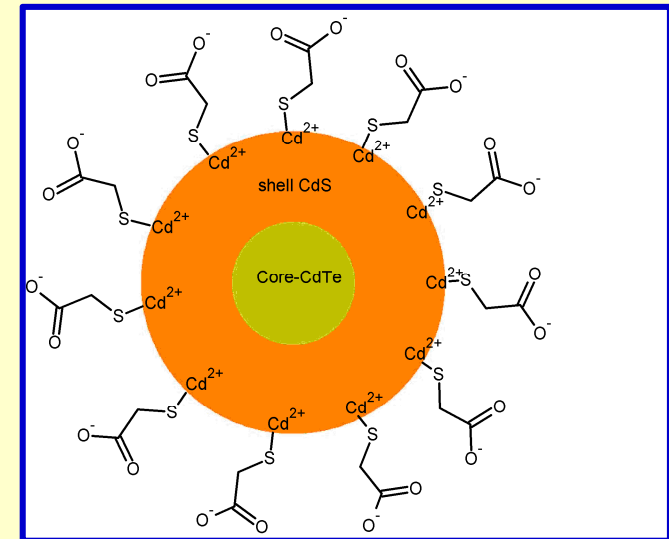
- moderní fluoreskující polovodičové nanokrystaly
- QD, "quantum dots" jsou menší než 10 nm a svým kvantovým chováním se nachází mezi polovodiči a izolovanými atomy
- polovodiče - valenční a vodivostní energ. hladiny odděleny o  $E_g$ 
  - excitace - elektron přejde do vodivostní hladiny a zanechá za sebou kladně nabitou díru ve valenční hladině
  - prostorová separace tohoto páru ("exciton") odpovídá Bohrovu průměru a je typicky 1 až 10 nm
- QD mají obdobnou velikost
  - excitony jsou v nich ohraničeny podobně jako chování částice v uzavřeném prostoru
  - energetické hladiny připomínají atomy či molekuly
  - optické vlastnosti závisí na velikosti



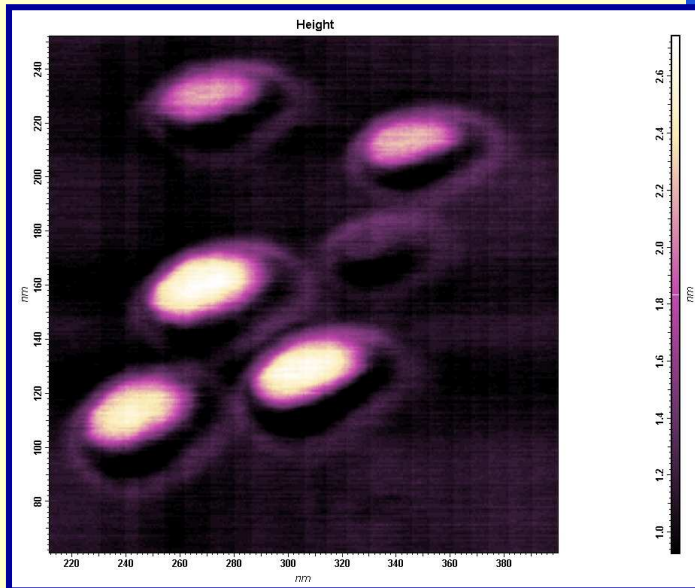
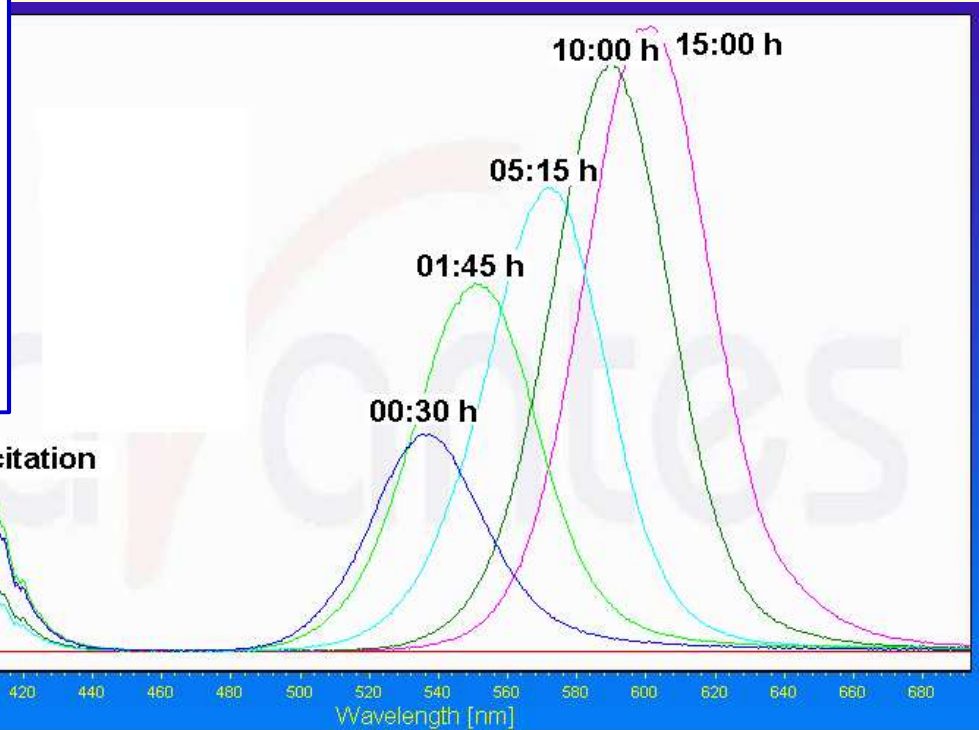
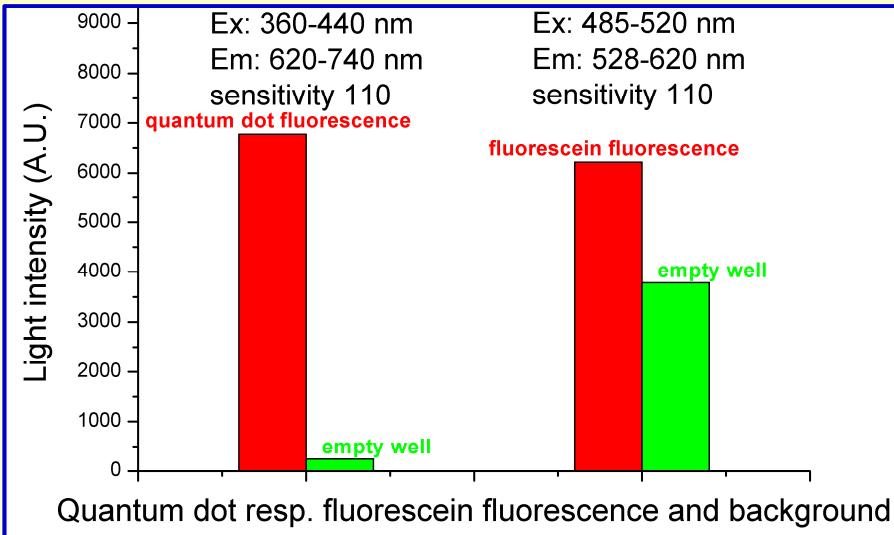
# Kvantové tečky (QD)



- unikátní fluorescenční vlastnosti - stabilita vůči fotorozkladu, velké Stokesovy posuny
- CdTe jádro obalené CdS, rozpustnost díky vazbě thioglykolové kys. (TGA)
- prekurzory - Te, CdCl<sub>2</sub>, TGA a NaBH<sub>4</sub>
  - NaHTe připraven redukcí Te pomocí NaBH<sub>4</sub>
  - nástřik roztoku NaHTe do směsi CdCl<sub>2</sub> a TGA v inertní atmosféře
  - refluxace na vzduchu (minuty až hodiny)
- při zahřívání roste průměr QD, emisní maximum se posouvá k delším vln. délkám
- větší QD mají lepší stabilitu



# Vlastnosti QD



# QD: absorbní / emisní spektra



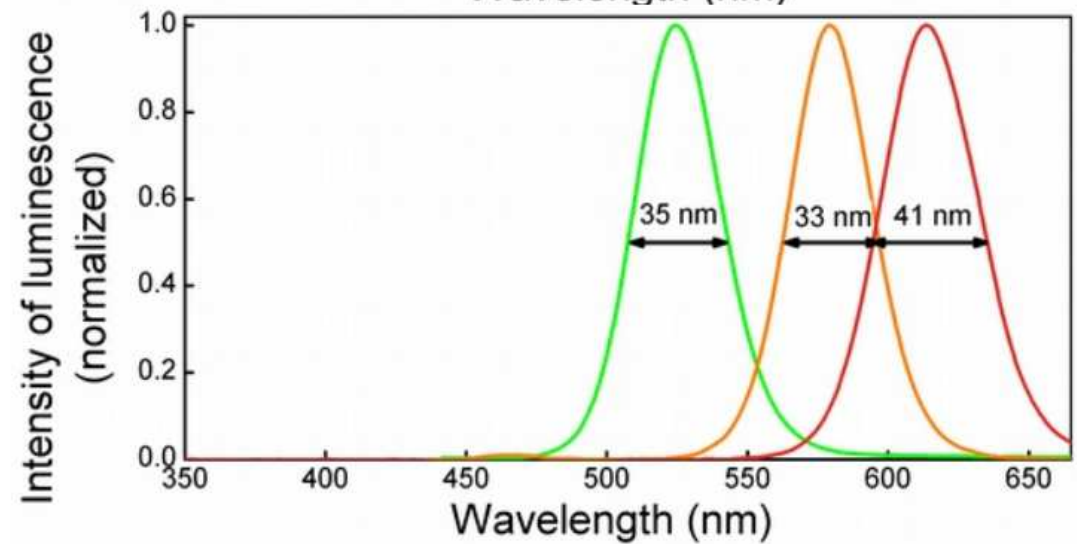
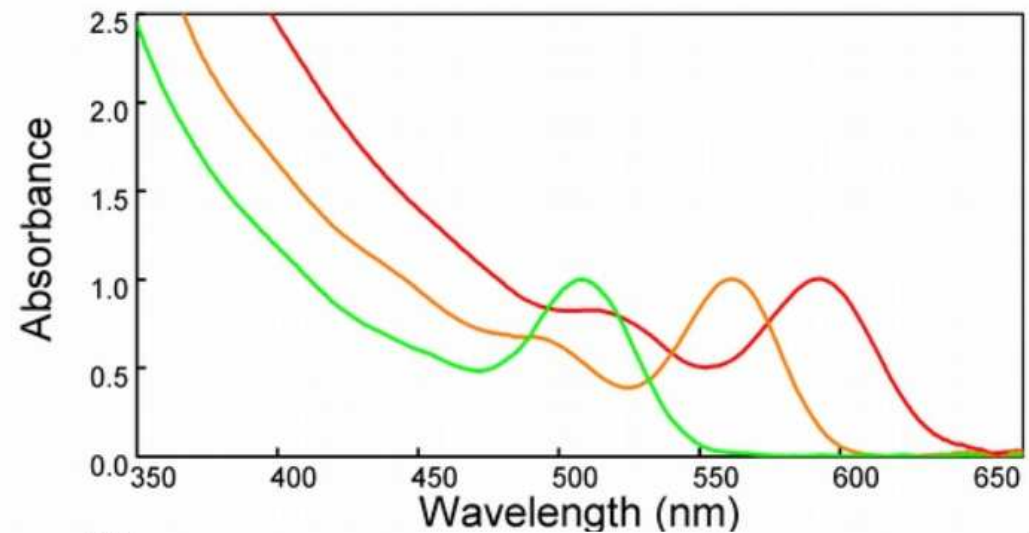
$\Phi$  2.5 nm  
CdTe



$\Phi$  3.0 nm  
CdTe



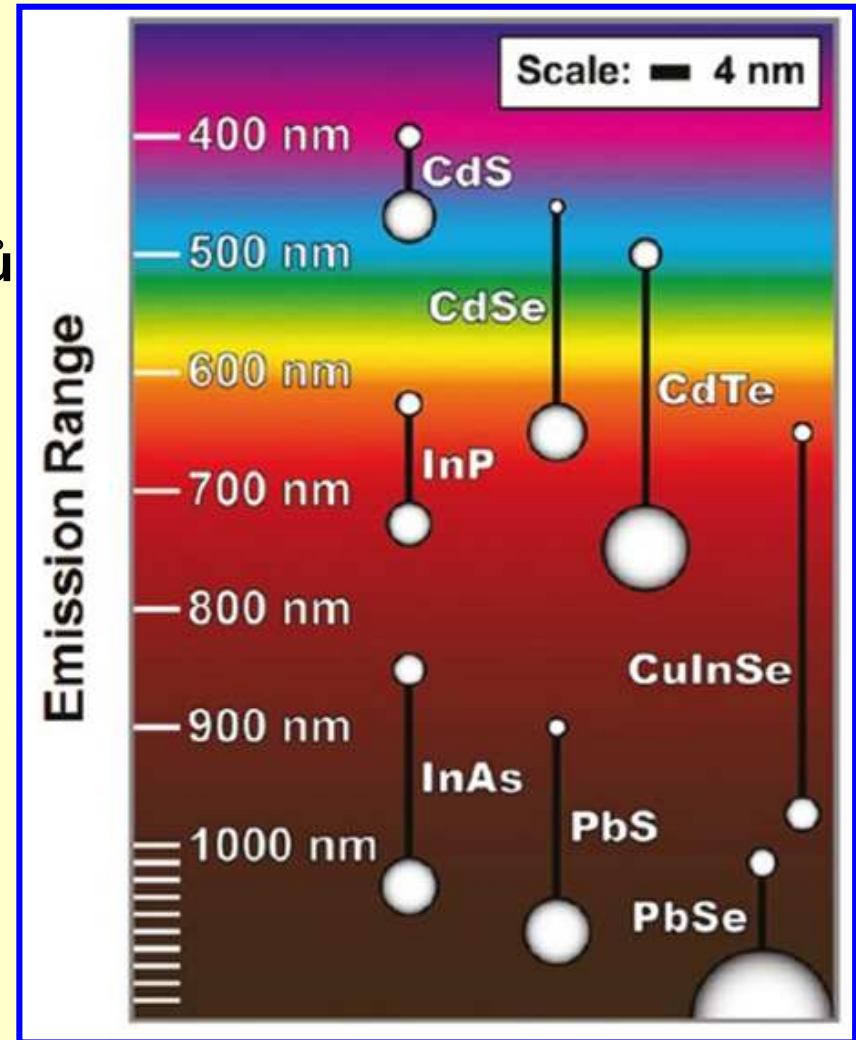
$\Phi$  3.4 nm  
CdTe



# Fotoluminiscence u QD

- vzniká radiční rekombinací excitonů  
spektrální vlastnosti jsou „laditelné“  
změnou velikosti částic

- např. u CdSe nanokrystalů lze emisi nastavit od 450 do 650 nm
- menší QD jsou „modřejší“  
(hypsochromní efekt)



- pro konjugaci s biomolekulami se nanášejí reaktivní vrstvy
  - tri-n-oktylfosfinoxid (TOPO) nebo hexadecylamin
  - silanizační činidla vytvářející silikátový obal
  - thioly, thiokyseliny, glutathion, ...

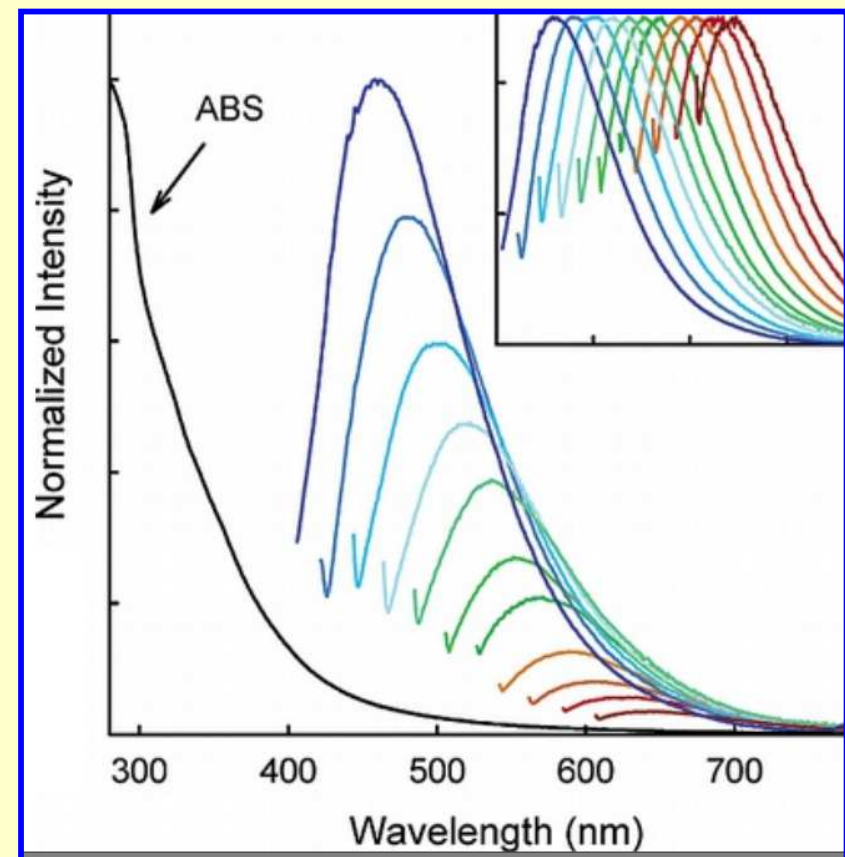
# Výhody QD

- oproti klasickým fluoroforům zahrnují:
- **vysoký jas** (20x vyšší proti jiným typům, daný velkými kvantovými výtěžkem a vysokým extinkčním koeficientem)
- **úzké emisní pásy pod 30 nm, velké Stokesovy posuny** - částice obsahující různé barevné QD v různých poměrech, čímž vzniká chemický „čárový kód“ umožňující identifikaci v komplexních směsích
- **velmi stabilní a nepodléhají fotodegradaci** - často se chrání proti fotooxidaci pláštěm z polymerů nebo jiných polovodičů (např. CdSe povlečený ZnS nebo silikátem)
- **široké absorpční pásy** - různé barevné QD lze excitovat stejným zdrojem světla a jednoduše tak vyhodnocovat současně různé značení odlišnými barvami při multiplexních stanoveních



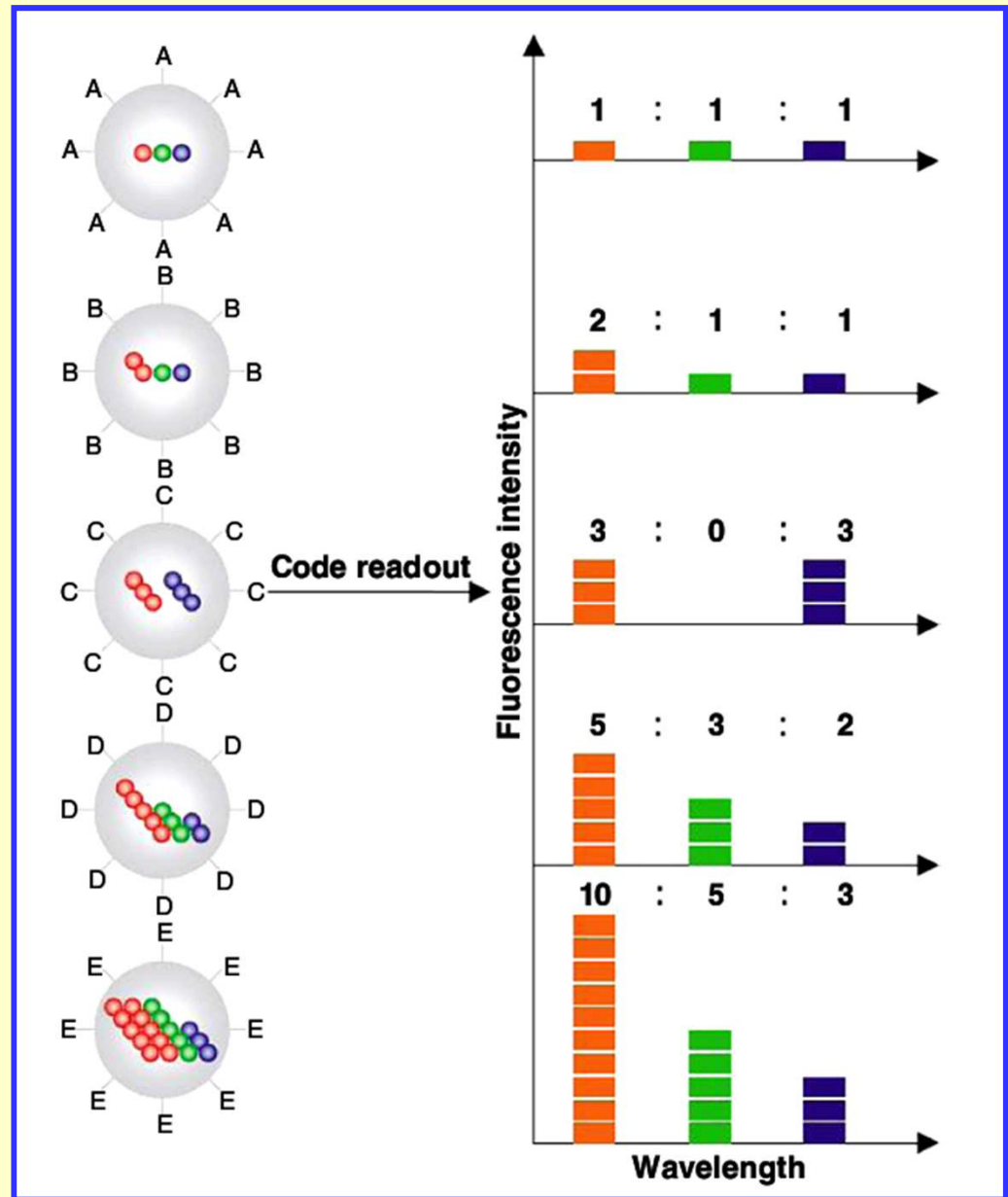
# QDs mohou být toxické

- CdSe a CdTe snadno připravitelné ve vodě, nejčastější pro bioaplikace
  - vysoký kvantový výtěžek (~50%), klesne po biokonjugaci (~20%)
- “klasické” materiály - CdTe, CdSe, HgTe, PbS ... jsou toxické
- nové možnosti – Si, ZnS dopovaný Mn, InP, InP / ZnS, Ag<sub>2</sub>S, Ag<sub>2</sub>Se, C dots
- **uhlíkové QDs** (C-dots, včetně dopovaných Si)
- vznikají při rozkladu organických sloučenin uhlíku
  - saze, parafinový vosk
  - emisní spektra závisí na velikosti a excitační vlnové délce

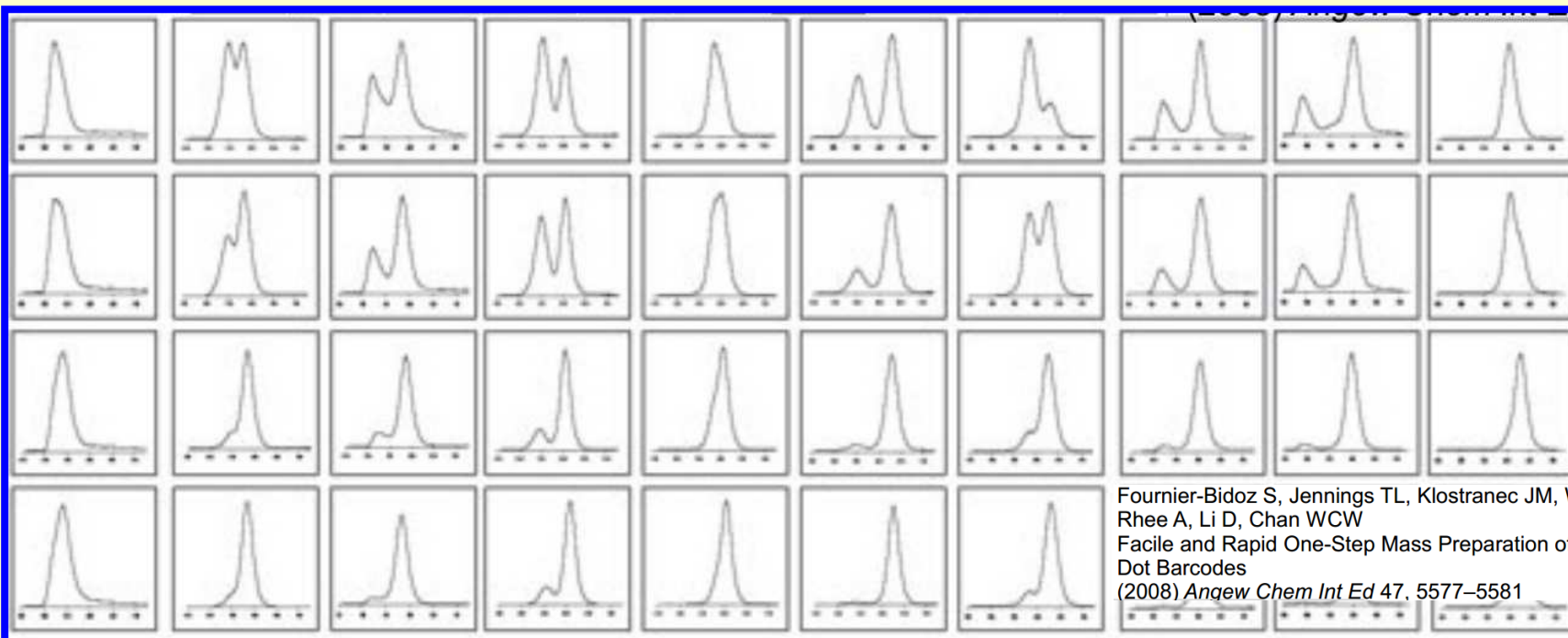
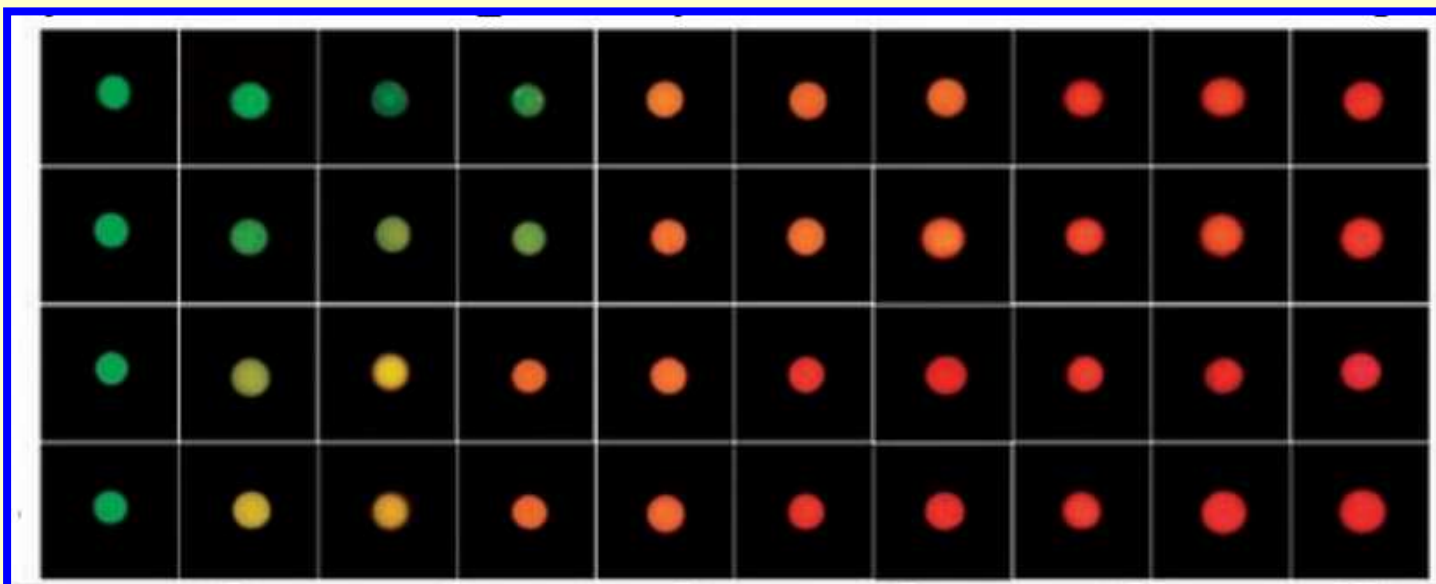


# Nanočástice s fluorofory

- **optické kódování** na základě multiplexování vln. délek
- polymer, uvnitř směsi různě fluoreskujících QD - charakt. spektrum
- možnost identifikace cílových biomolekul ve směsích při užití kombinatorických postupů



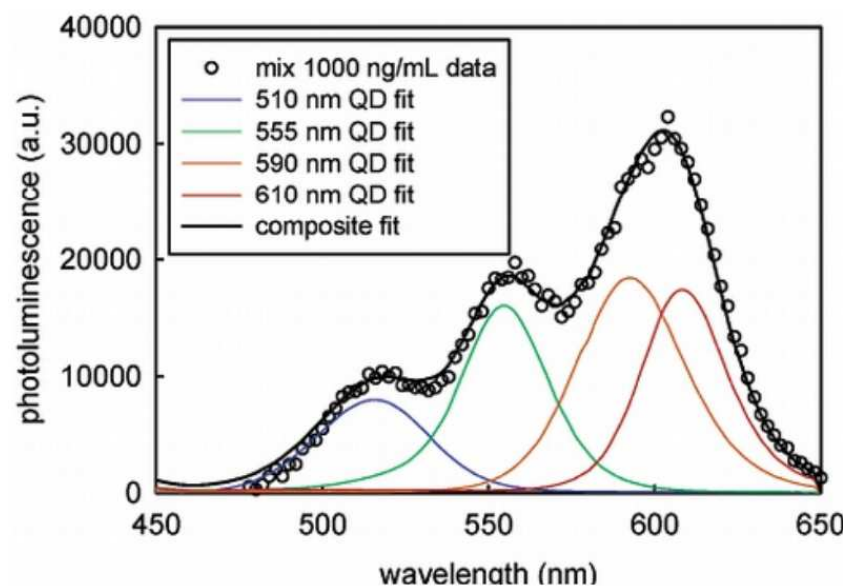
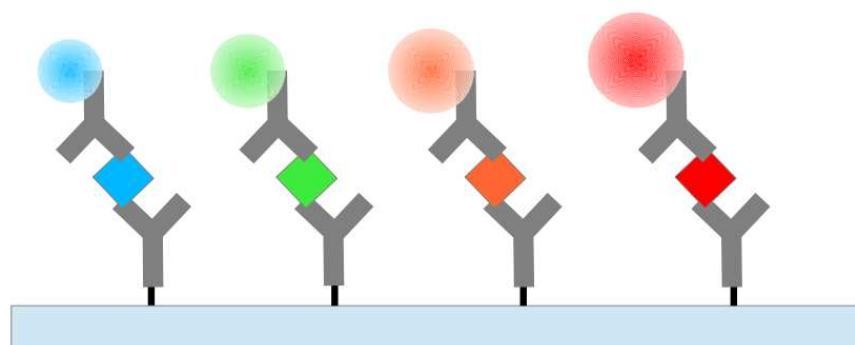
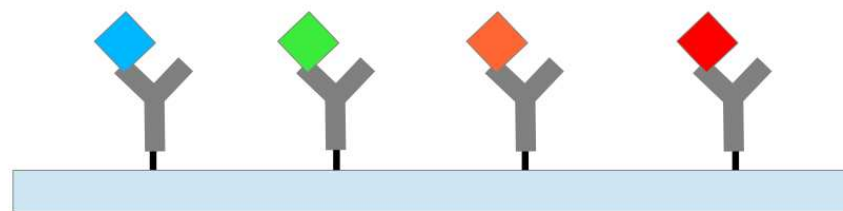
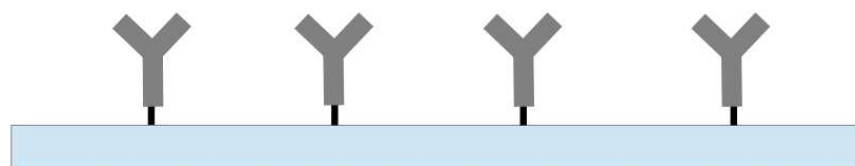
# Bar coding (optický „čárový“ kód)



Fournier-Bidoz S, Jennings TL, Klostranec JM, Winnie Fung, Rhee A, Li D, Chan WCW  
Facile and Rapid One-Step Mass Preparation of Quantum-Dot Barcodes  
(2008) *Angew Chem Int Ed* 47, 5577–5581

# Multiplexní imunostanovení

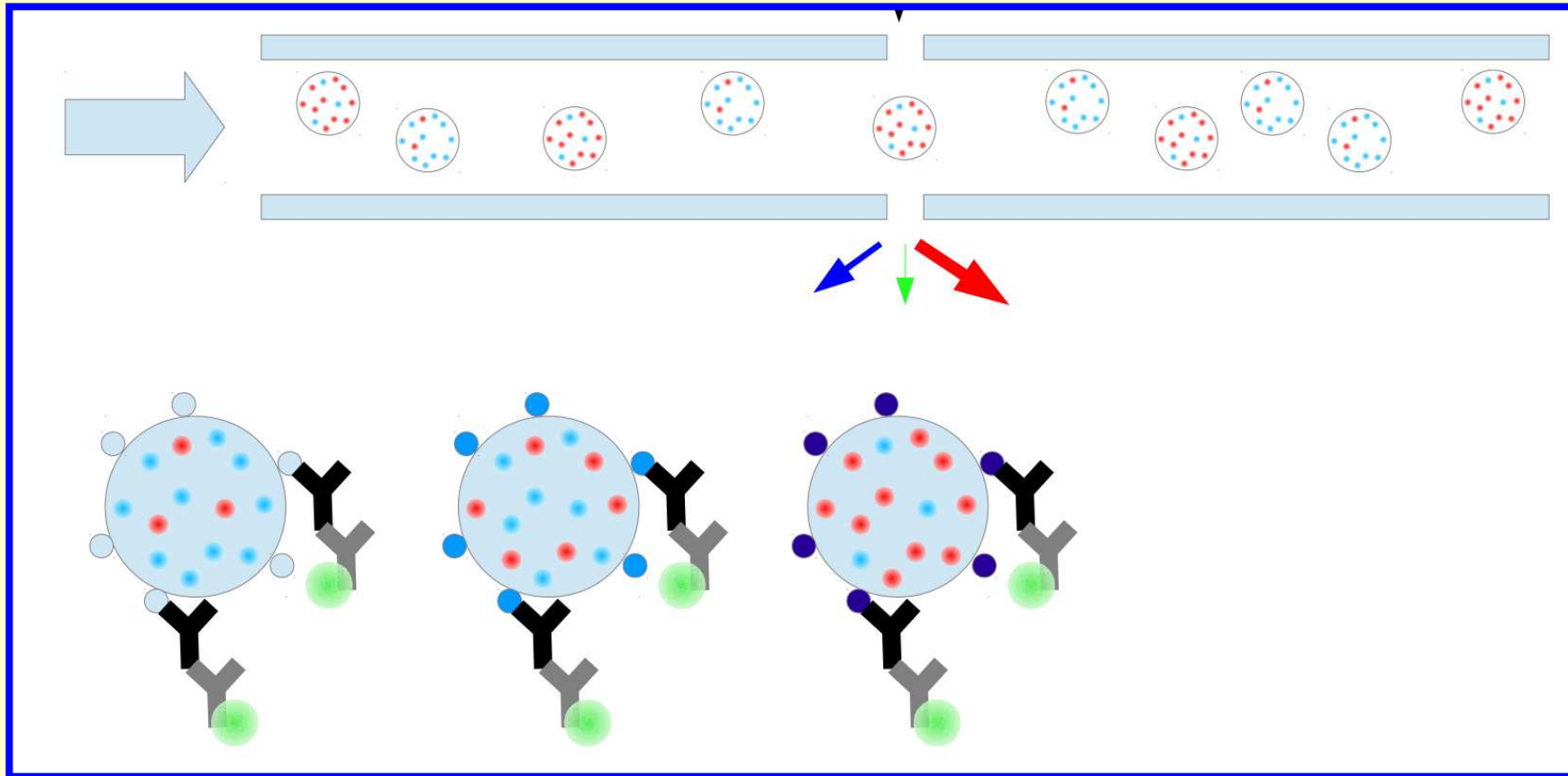
- různé QD jako značky, stanovení několika analytů (markerů) vedle sebe v jediné proceduře



Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, Medintz IL, Mattoussi H Multiplexed Toxin Analysis Using Four Colors of Quantum Dot Fluororeagents (2004) *Analytical Chemistry* 76, 684-688

# Kapilární fluorescenční imunostanovení

excitace



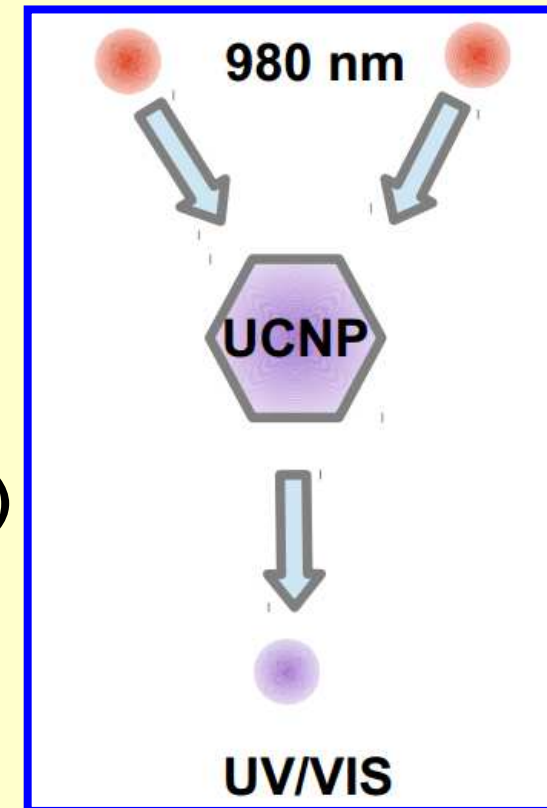
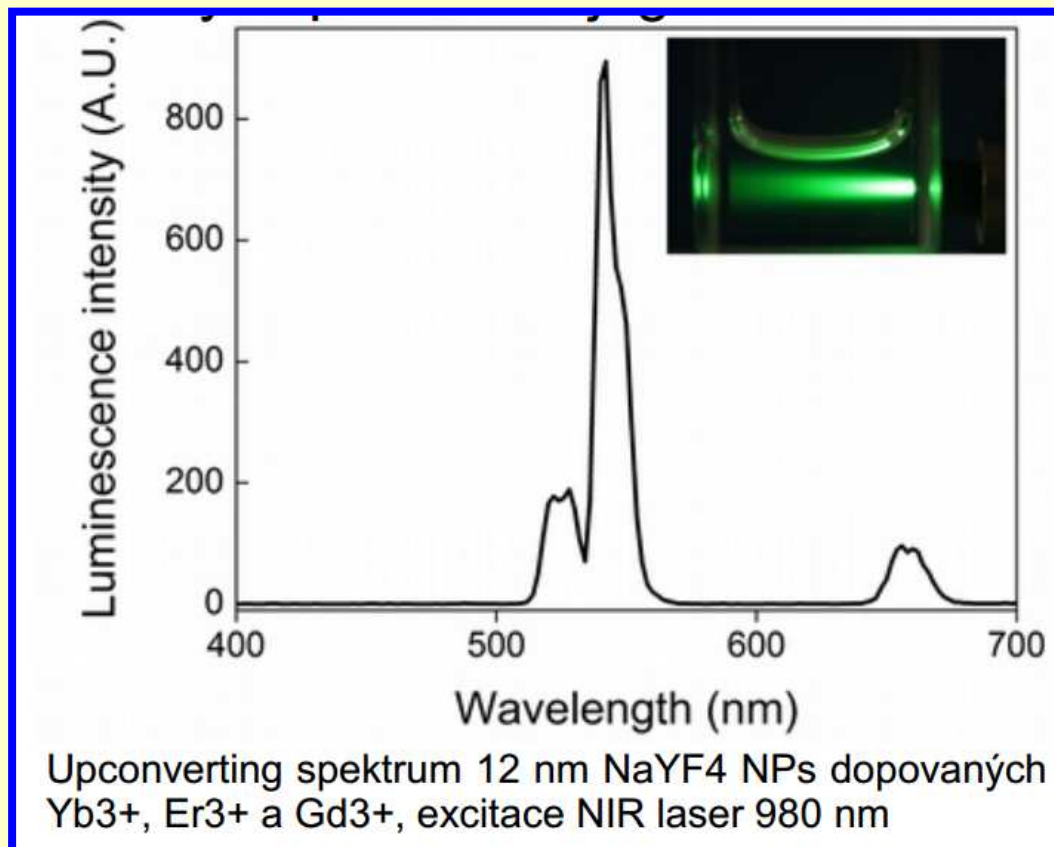
- kodování – typ biorekogničního elementu (co se měří)
- společná sekundární značka (kolik toho je přítomno ve vzorku)

# Anti-Stokes fluorescence

- organic fluorophores – excitation with shorter wavelength, emission at a longer wavelength, intensity of emission is directly proportional to the excitation
- however, a longer wavelength can be changed to a shorter one – energy of few photons is summarised and a higher energy photon becomes emitted; intensity depends on the square of excitation – non-linear processes
- two(multi)-photon luminescence
  - several photons interacting with a single molecule
  - e.g. 2-photon confocal microscopy – lower excited volume, better resolution
- second harmonic generation
  - increased energy of photons passing through suitable crystallic materials
  - double frequency at the output, narrow emission peaks, coherence
  - nanocrystals of KNbO<sub>3</sub>, LiNbO<sub>3</sub>, BaTiO<sub>3</sub>, ZnO
- „upconversion“

# Upconverting NPs (UCNP)

- gradual absorption of several photons
- lower excitation intensity compared to multiphoton techniques
  - observed for materials doped with Ti, Ni, Mo, actinoids
- quite high for NPs based on  $\text{NaYF}_4$  doped with lanthanoids (eg.  $\text{Yb}^{3+}$  and  $\text{Er}^{3+}$ , or  $\text{Yb}^{3+}$  and  $\text{Tm}^{3+}$ )

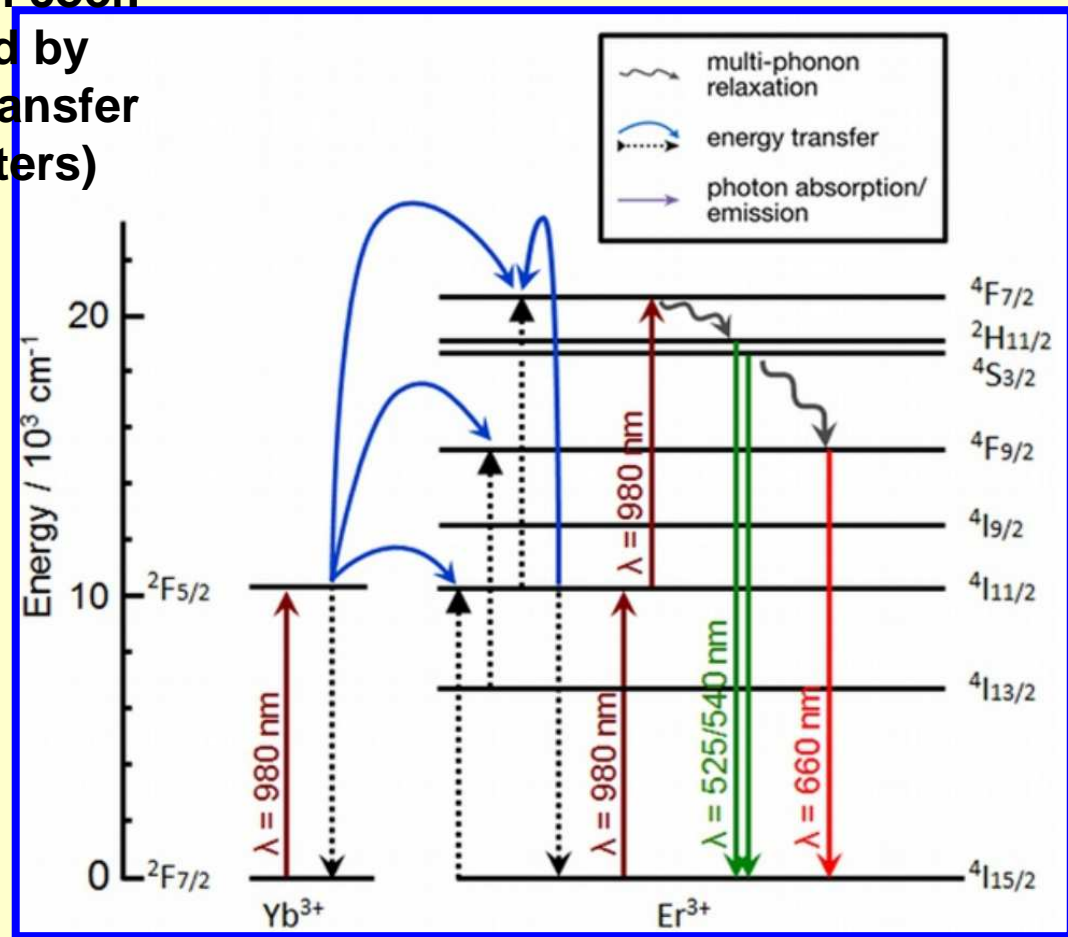
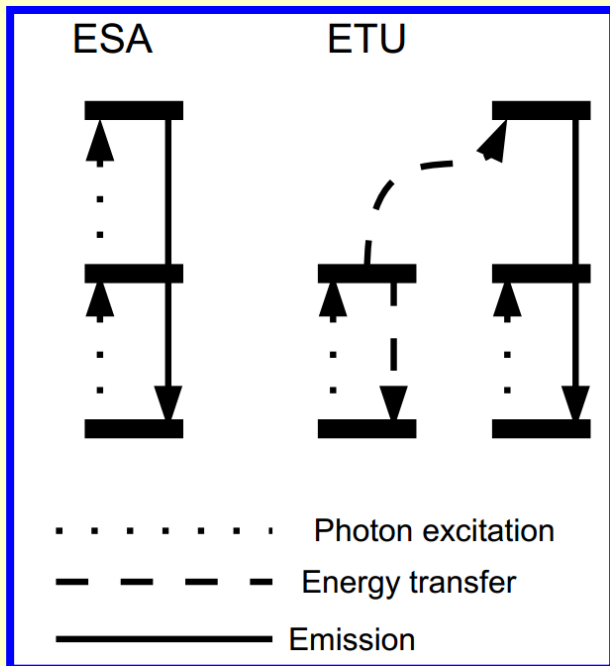


$$I_{emit} = K[I_{excit}]^2$$

# Mechanism of upconversion

- **ESA (excited-state absorption)**
  - ions gradually absorb several photons
  - transfer to the target band, emission starts
- **ETU (energy transfer upconversion)**
  - ions with a higher extinction coef. (sensitizers) become excited by absorption of photon and transfer energy to nearby ions (emitters)

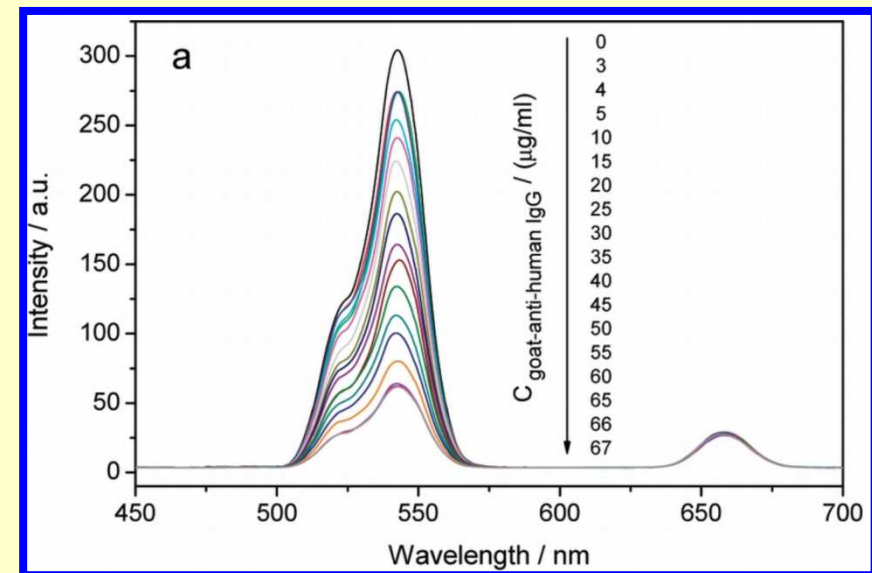
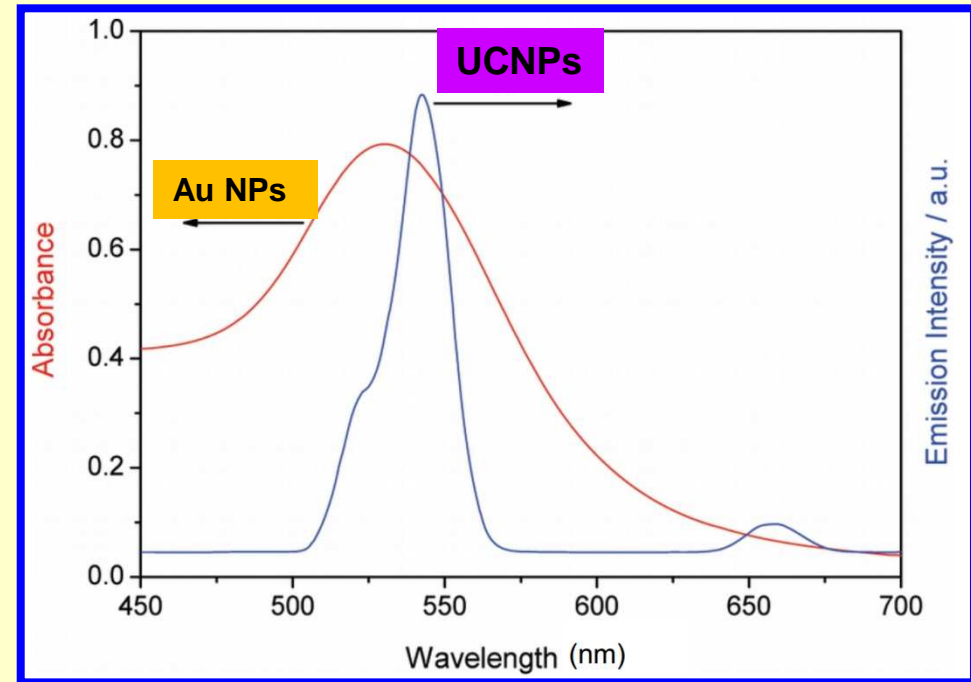
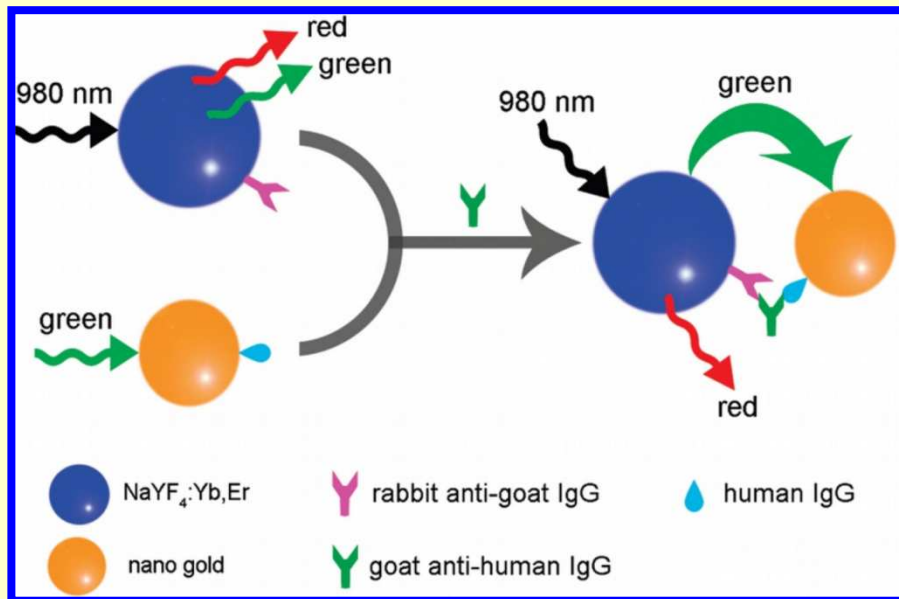
beta phase of NaYF<sub>4</sub> doped with Yb<sup>3+</sup> (20%, sensitiser) and Er<sup>3+</sup>, (2%, emitter)





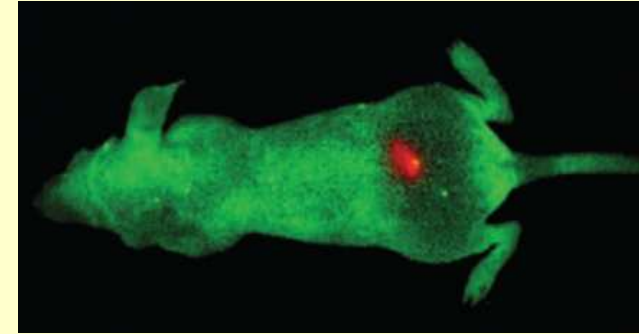
# Assays with UCNP - LRET

- detection of human IgG
- NaYF<sub>4</sub> : Yb : Er
- overlap of Au absorption with green emission (energy transfer)
- homogeneous competition

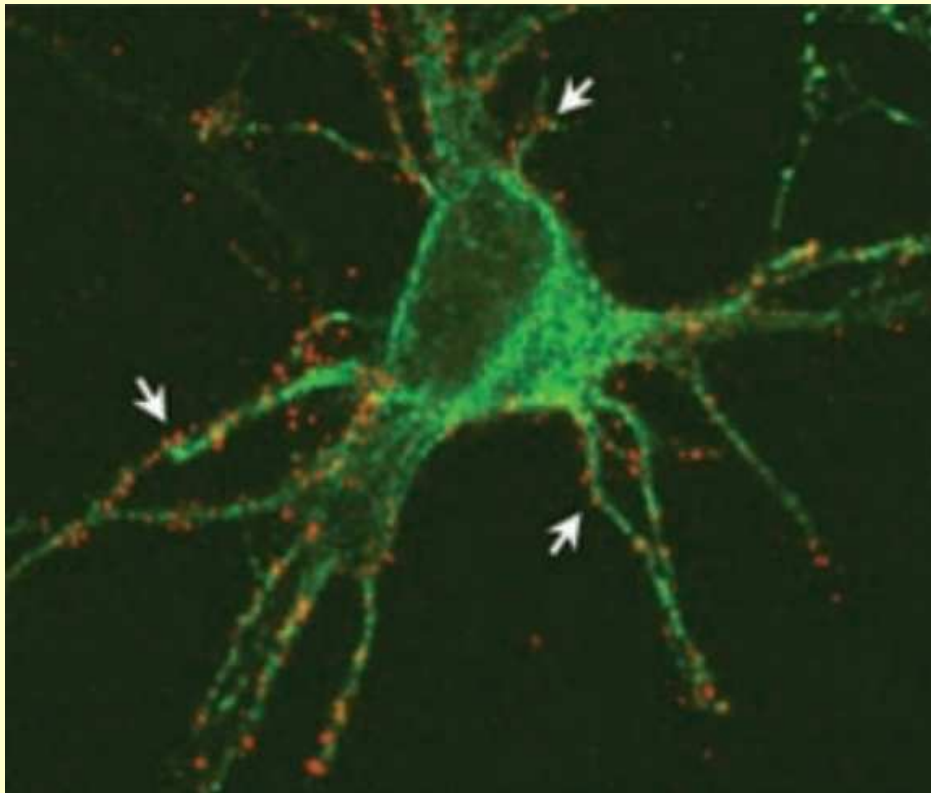


# Bioimaging with UCNP (... in NIR)

- tissues are rather transparent for NIR light (700 .. 900 nm)
  - out of water and hemoglobin
- single molecule (bioobject) visualisation



He Y, Zhong Y, Su Y, Lu Y, Jiang Z, Peng F, Xu T, Su S, Huang Q, Fan C, Lee S-T  
Water-dispersed near-infrared-emitting quantum dots of ultrasmall sizes for in vitro and in vivo imaging (2011) *Angewandte Chemie - International Edition* 50 (25), 5695-5698



Dahan, M., Lévi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., Triller, A.  
Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking (2003) *Science*, 302 (5644), pp. 442-445

# Fykobiliproteiny

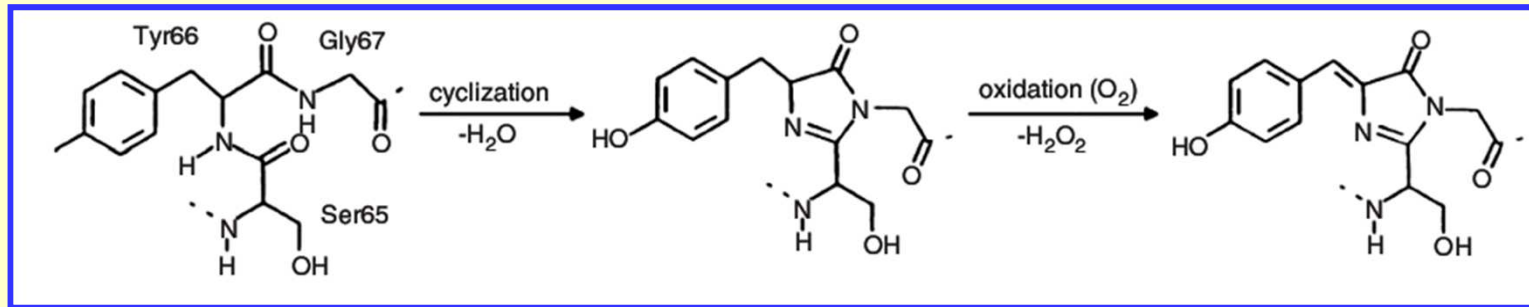
- intenzivně fluoreskující proteiny z fotosyntetického aparátu eukaryot, modrozelených a červených sinic, řas a cyanobakterií
- nativní nefluoreskují, ale excitační energii předávají na chlorofyly
- purifikované fluoreskují s výtěžky kolem 100%
  - obsahují několik bilinových chromoforů (např. B-fykoerythrin 34)
  - to v souhrnu poskytuje vysoké extinkční koeficienty pro celou molekulu

Název	Zdroj	Složení	$M_r$ (kDa)	Počet bilinů	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ (nm)	$\epsilon$ ( $10^6 M^{-1} cm^{-1}$ )
B-fykoerythrin	<i>Porphyridium cruentum</i>	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240	34	546 / 575	2,4
R-fykoerythrin	<i>Gastroclonium coulteri</i>	$(\alpha\beta)_6\gamma$	240	34	566 / 574	2,0
C-fykocyanin	<i>Anabaeba variabilis</i>	$(\alpha\beta)_2$	72	4	614 / 643	0,58
allofykocyanin	<i>Anabaeba variabilis</i>	$(\alpha\beta)_3$	110	6	650 / 660	0,70
CryptoFluor Crimson	<i>cryptomonad algae</i>		40,2		585 / 658	
CryptoFluor Gold	<i>cryptomonad algae</i>		30,8		566 / 600	

- fluorescenční výtěžky se blíží 30 fluoresceinům nebo 100 rhodaminům
- fluorescence není externě zhasená
- dostupnost mnoha konjugačních míst
- v prodeji jako konjugáty se streptavidinem nebo biotinem

# Zelený fluoresceční protein

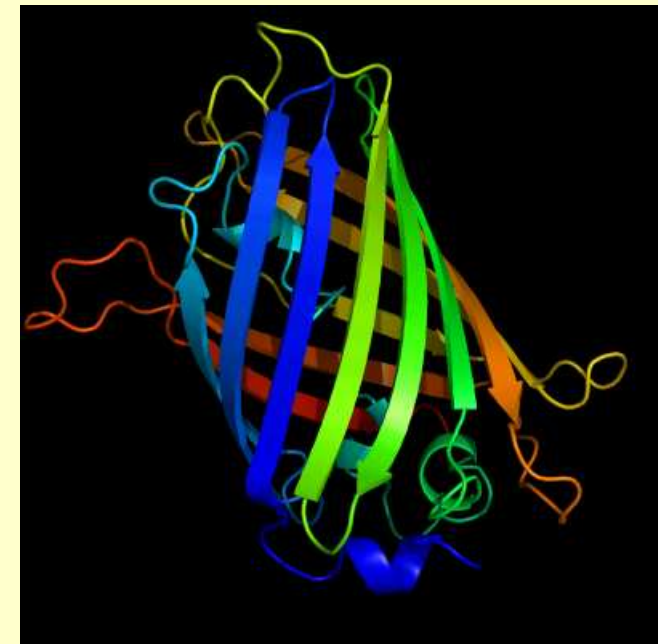
- "green fluorescent protein", **GFP** - z bioluminiscentní medúzky (*Aequorea victoria*, jellyfish), 26 kDa
- chromofor - *p*-hydroxybenzyliden-imidazolidinon, vzniká cyklizací a oxidací aa zbytků Ser-Tyr-Gly:



- mutagenézí získány vylepšené varianty - široké použití pro značení
  - divoký typ, směs fenolu a fenolátu
  - fenolátový anion
  - fenol
  - fenolátový anion s přidruženým  $\pi$ -elektronovým systémem
  - indol (Trp místo Tyr)
  - imidazol (His místo Tyr)
  - fenyl (Phe místo Tyr)

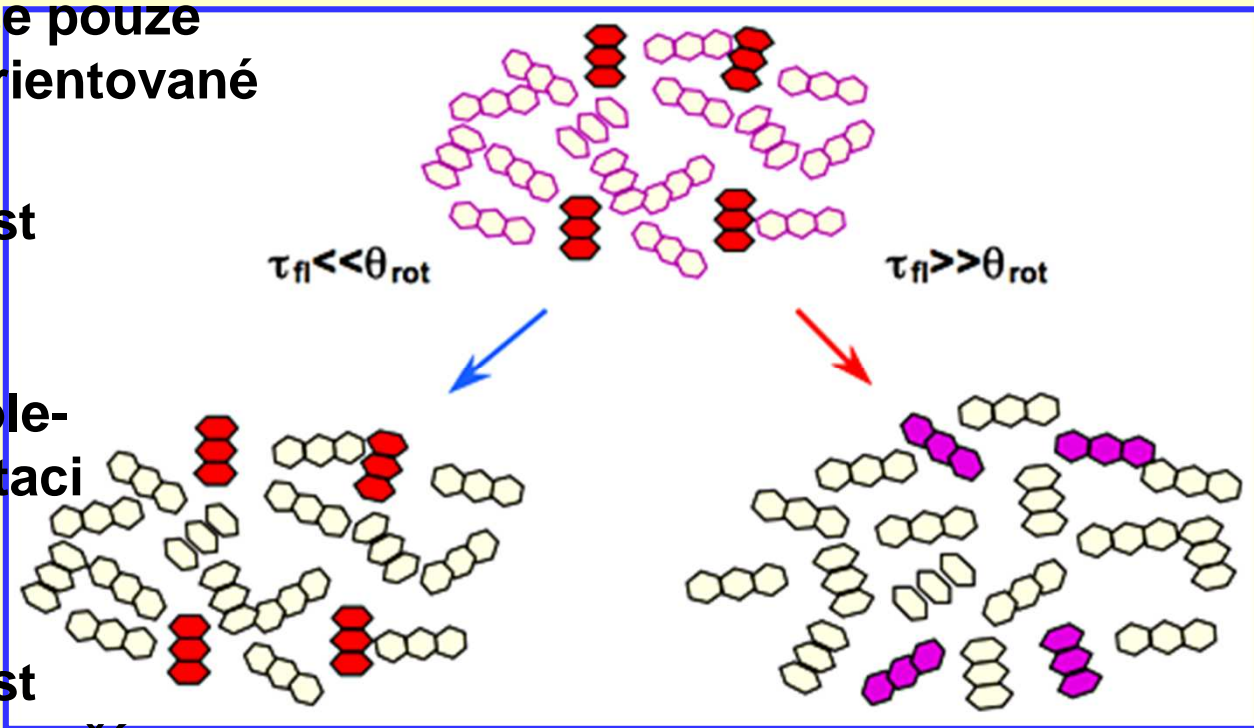
## Použití GFP

- biologická značka pro sledování a kvantifikaci exprimovaných bílkovin
- studium protein-protein interakcí
- interní buněčný "biosensor" pro sledování signálů
- rekombinantní techniky - spojení GFP se sekvencí jiné bílkoviny - chiméry - sledování lokalizace a pohybu bílkovin v buňkách
- zelené myši a podobné ...



# Fluorescenční polarizace (FP)

- založena na velikosti rotačního pohybu molekul
- v protikladu jsou doba života  $\tau_{fl}$  a rychlost pohybu  $\theta_{rot}$  fluoroforu
- excitace se provádí polarizovaným světlem, tj. excitují se pouze fluorofory vhodně orientované vůči rovině světla
- pokud bude životnost exc. stavu mnohem kratší, než rotace, tak si excitované molekuly zachovají orientaci a bude emitováno polarizované záření
- pokud bude životnost exc. stavu dlouhá, poruší se orientace molekul a nastane depolarizace



polarizované

depolarizované

emitované záření

## FP a mobilita molekul

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\theta}\right)$$

- $P_0$  ... FP v nepřítomnosti rotační difuze
- alternativní vyjádření rotace pomocí viskosity a molekulárního objemu  $V$ , lze dále zavést molekulovou hmotnost spec. objem bílkoviny  $v$  a hydrataci  $h$  (typ. 0.2 g vody na 1 g proteinu)
- v praxi jsou díky hydrataci a nesférickému tvaru korelační časy  $\theta$  asi 2x větší než odvozené pro kouli v suchém stavu (např. HSA,  $M=65$  kDa,  $h=1,9$  vychází  $\theta$  kolem 50 ns)

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} = \frac{\eta M_r}{RT} (\bar{v} + h)$$

# Polarizátor

- světlo po průchodu polarizátorem osciluje pouze v jedné rovině
- dichroické systémy - adsorbují jednu z obou rovin polarizace (film z orientovaného PVA dopovaného jódem), málo efektivní v UV oblasti
- krystaly kalcitu vykazující dvojitou refrakci - rozptylují různě obě roviny polarizace (Nicol a Glan polarizátory, Wollastonův hranol)



# Měření FP

- změří se horizontální a vertikální složky emitovaného záření

- polarizace se vypočte podle vztahu: bývá od -0.25 po 0.5

- alternativně se používá anisotropie  $r$ :

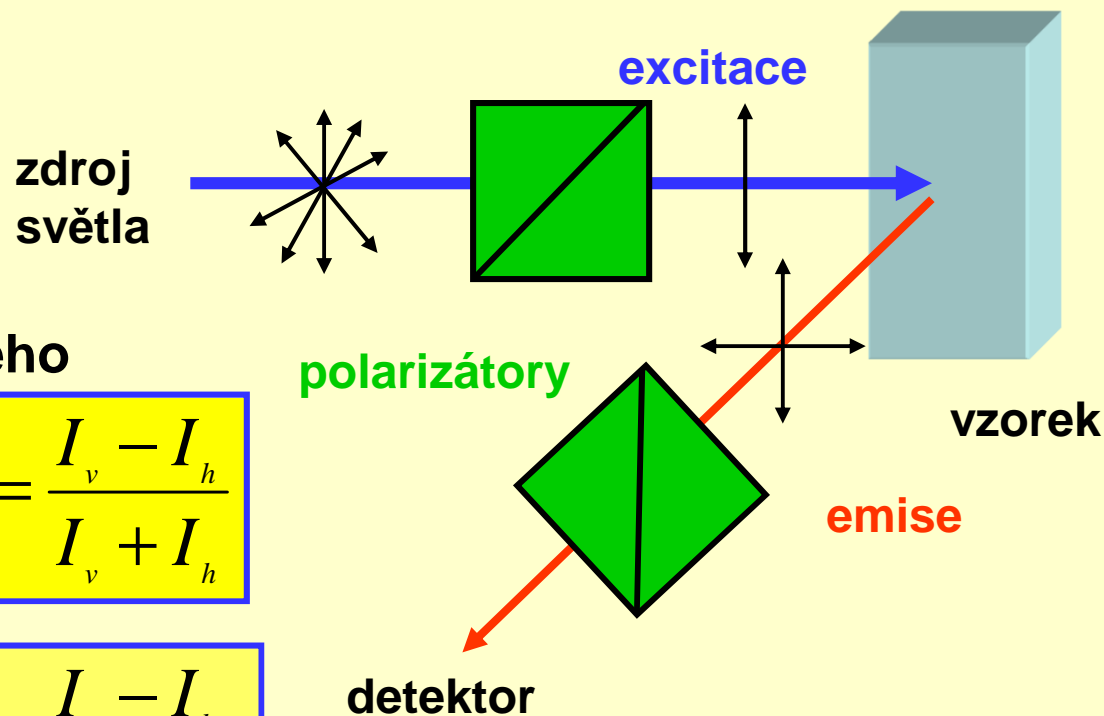
$$P = \frac{I_v - I_h}{I_v + I_h}$$

$$r = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$$

- obě veličiny jsou zaměnitelné (vnitřně souvisí):

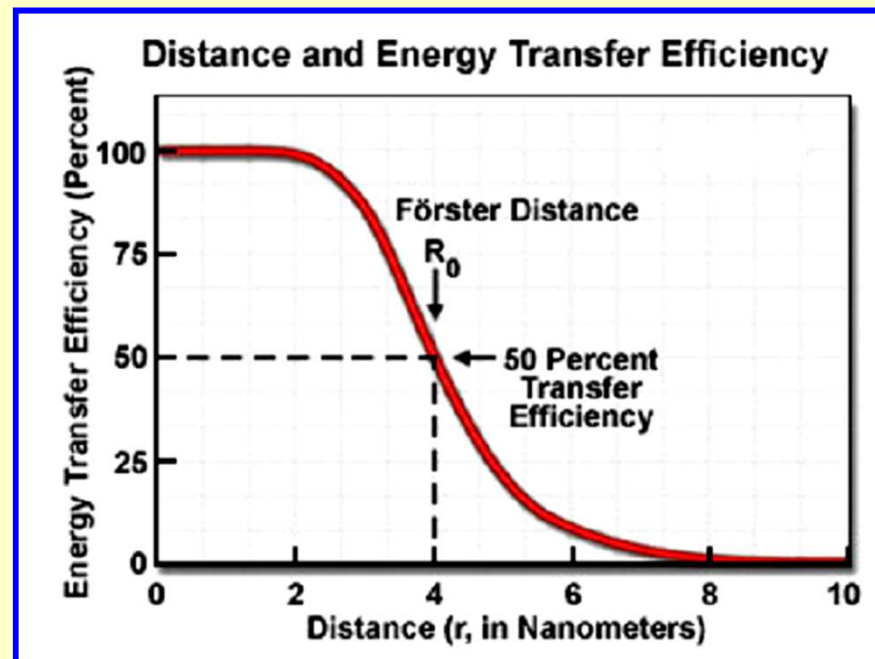
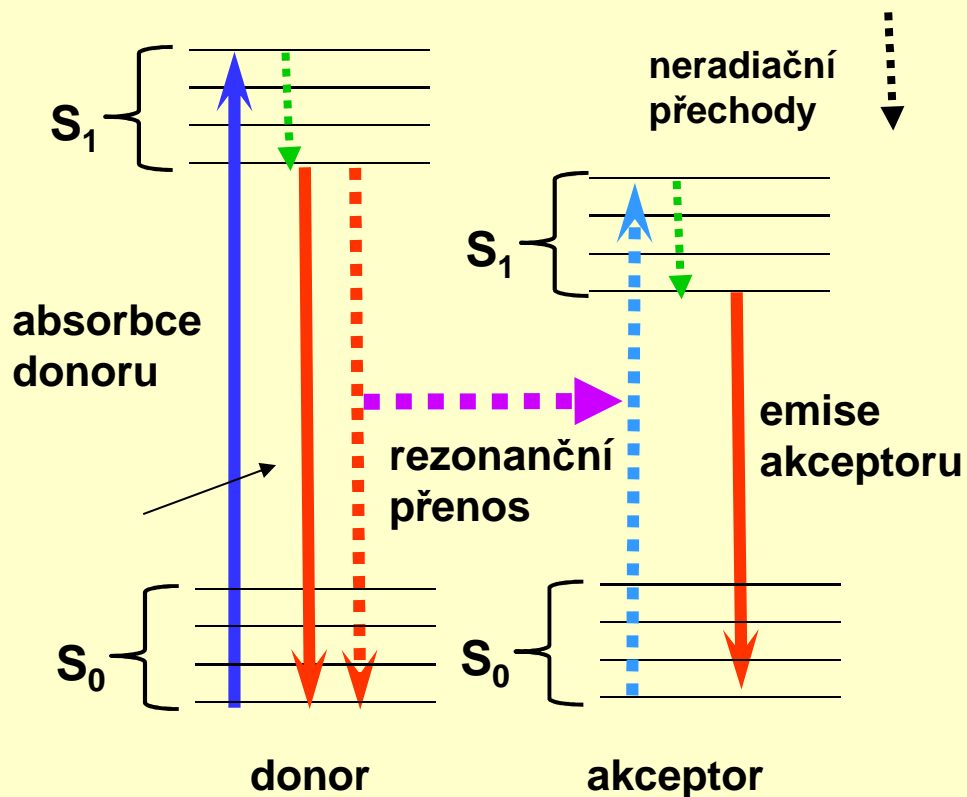
$$P = \frac{2r}{2 + r}$$

- jako tracer fungují konjugáty malých molekul (peptidy, léčiva, pesticidy, ...), které jsou pomocí vhodného můstku (linker) spojeny s fluoroforem (fluorescein, rhodamin)



# FRET Förster energy resonance transfer

- přenos energie zářivými nebo nezářivými mechanismy mezi dvěma chromofory
  - zářivý (triviální) přenos - excitovaná molekula donoru emituje záření, které je absorbováno molekulou akceptoru
  - nezářivý přenos energie (FRET) - ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem je excitovaná molekula akceptoru (chromofor, budící záření sám neabsorbuje)
  - nedochází k emisi světla donorem



# Efektivita FRET

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6} = 1 - \frac{\tau'_D}{\tau_D} = 1 - \frac{F'_D}{F_D}$$

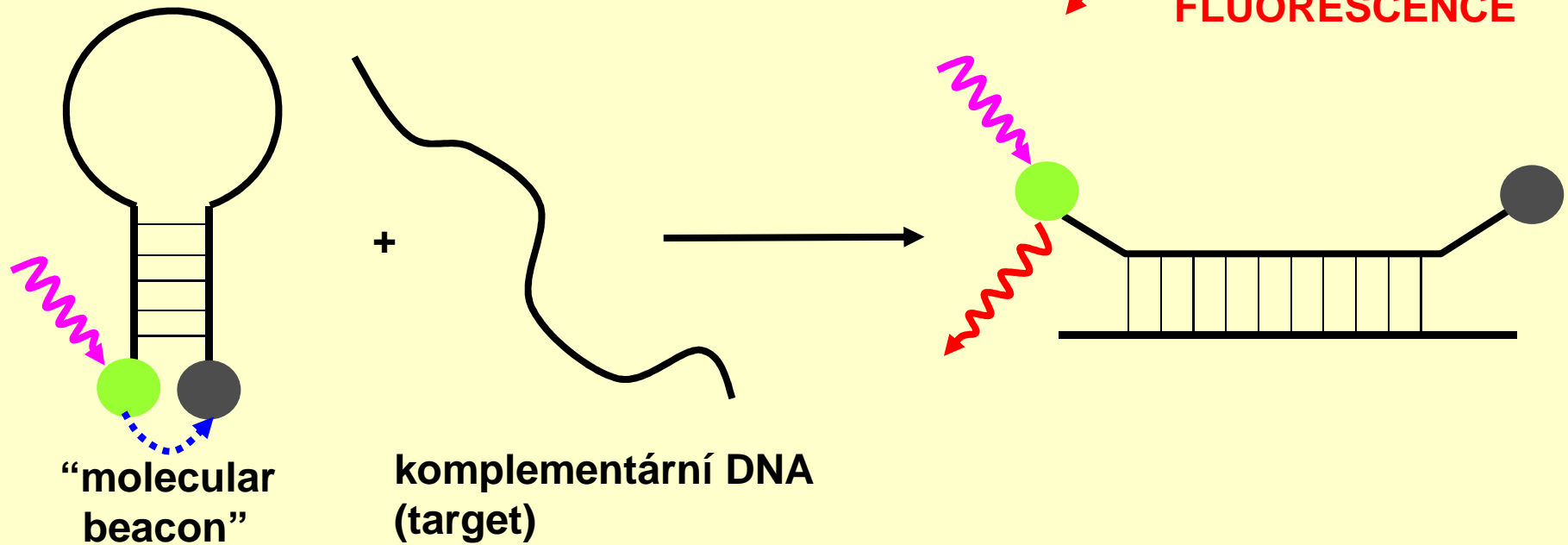
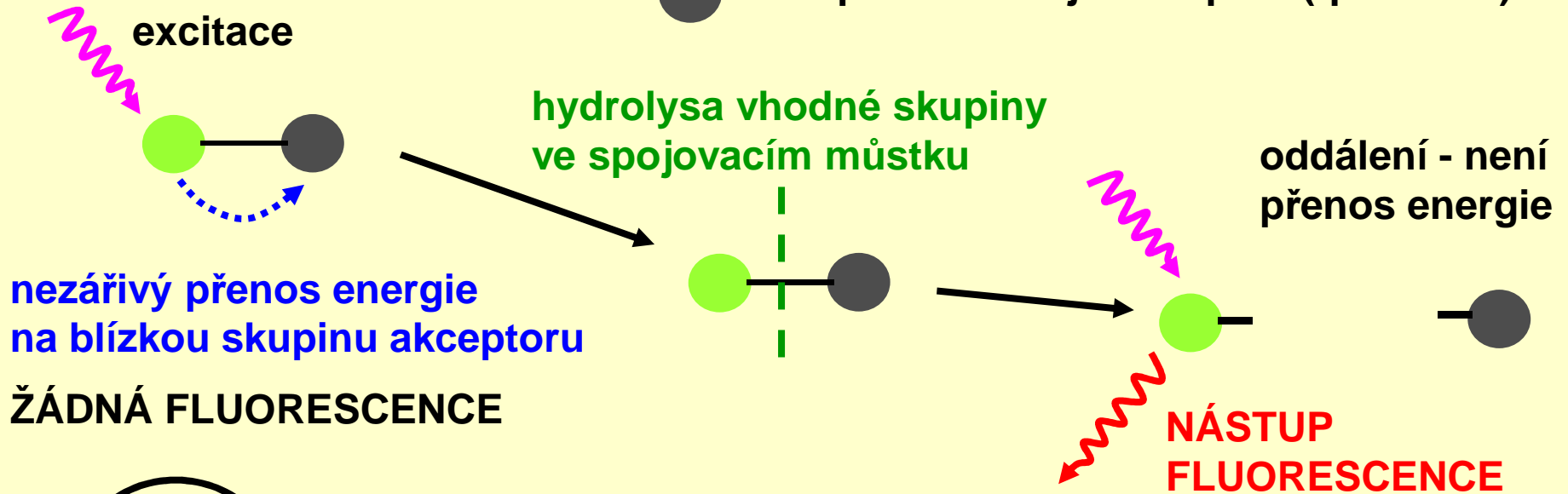
- dána poměrem vzdálenosti  $r$  mezi D a A a Forsterova poloměru  $r_0$ , nebo alternativně poměry doby  $\tau$  nebo intenzity  $F$  fluorescence donoru bez ( $\tau$ ,  $F$ ) a v přítomnosti ( $\tau'$ ,  $F'$ ) akceptoru, závisí dále na:
  - vzdálenosti mezi donorem a akceptorem
  - spektrální překryv emisního pásu donoru a absorpčního pásu akceptoru
  - vzájemné relativní orientaci dipólů donoru a akceptoru
- pravděpodobnost rezonančního přenosu energie určuje  $k_{DA}$ ,
  - určující složkou je dipól-dipólový přenos energie
  - Försterův vzorec (v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra)
  - $\tau_D$  – doba dohasínání fluorescence donoru,  $r_0$  – vzdálenost, ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly,  $r_{DA}$  – vzdálenost mezi donorem a akceptorem

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{r_0}{r_{DA}}\right)^6$$

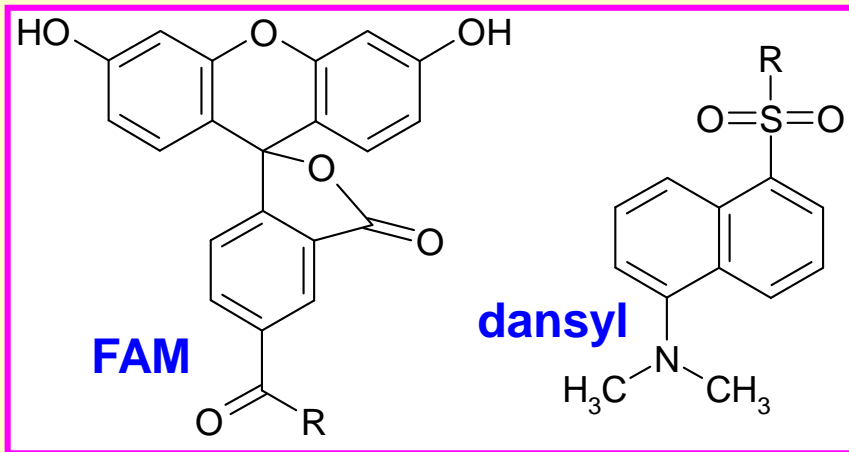
# FRET uspořádání

● donor - fluorescenční skupina (fluorofor)

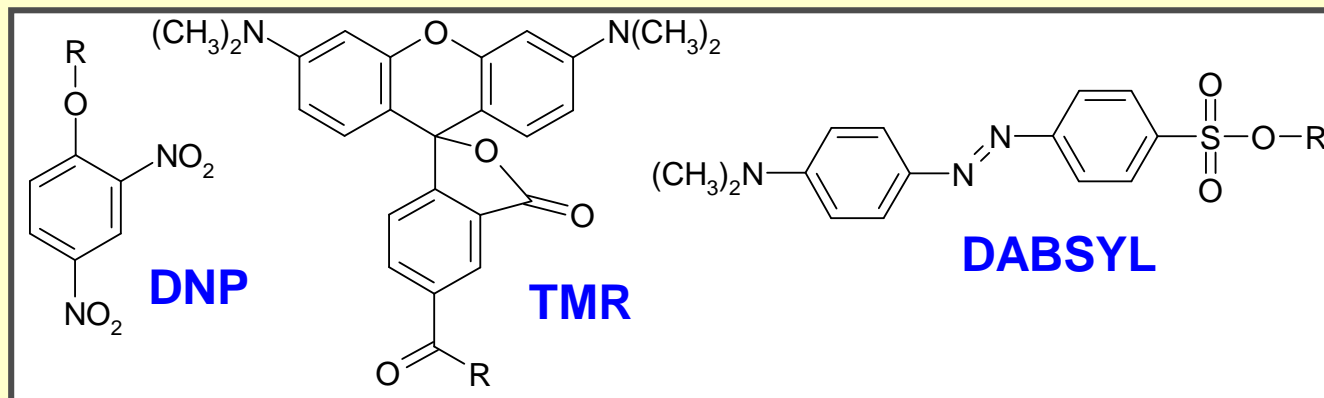
● akceptor - zhašející skupina (quencher)



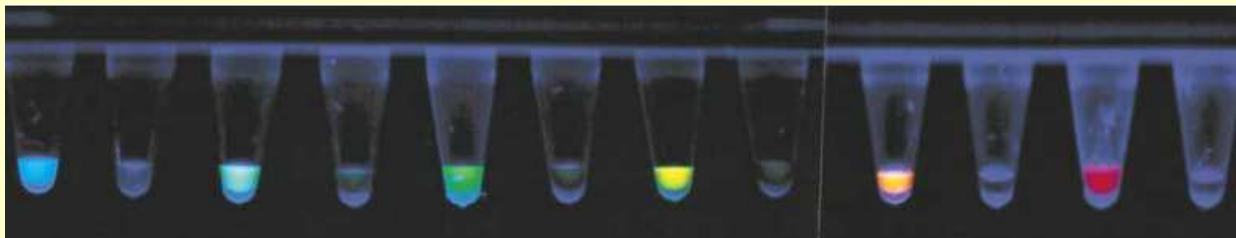
## FRET - vhodné skupiny



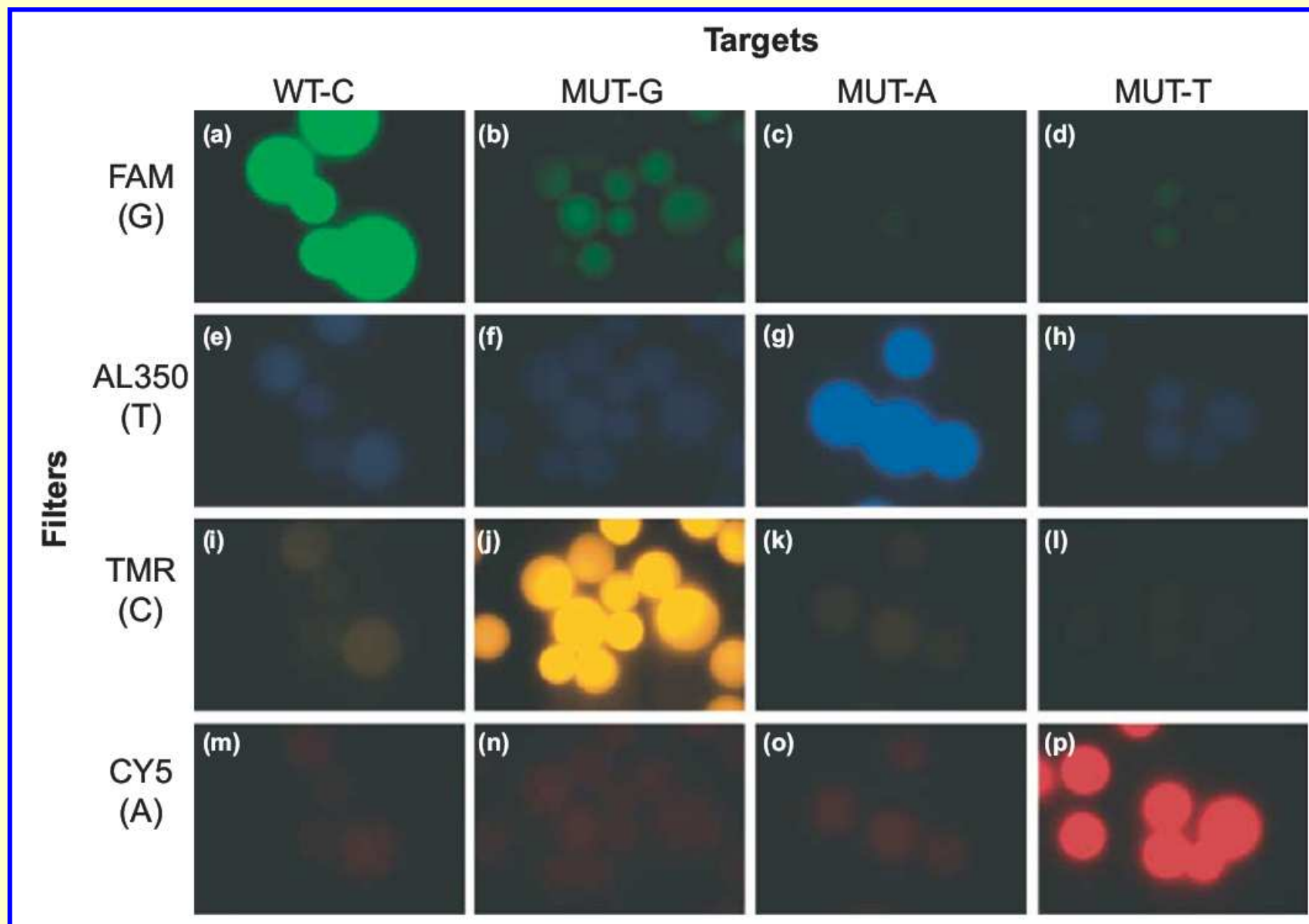
fluorofory (donory, R značí napojení na další část molekuly)



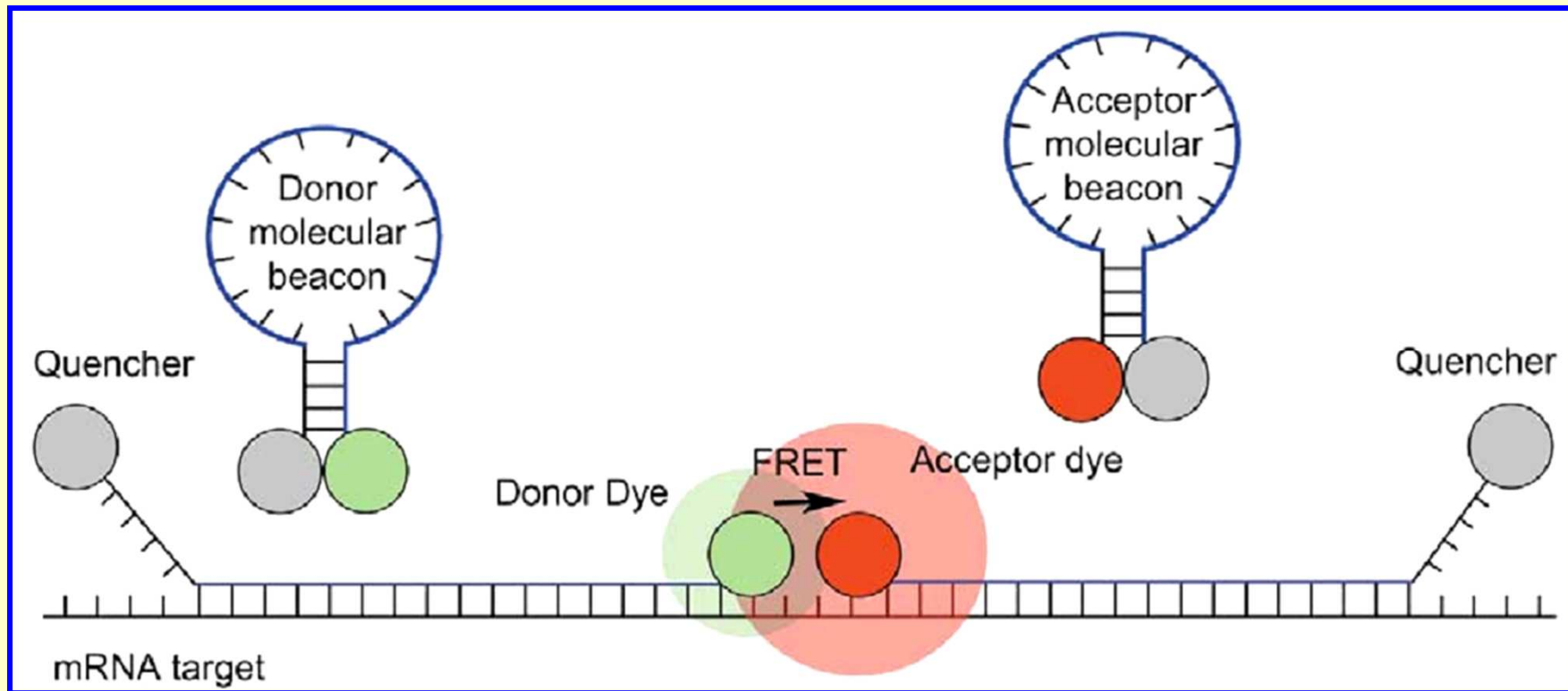
zhášeče (akceptory)



# Vícenásobné značení - detekce mutací



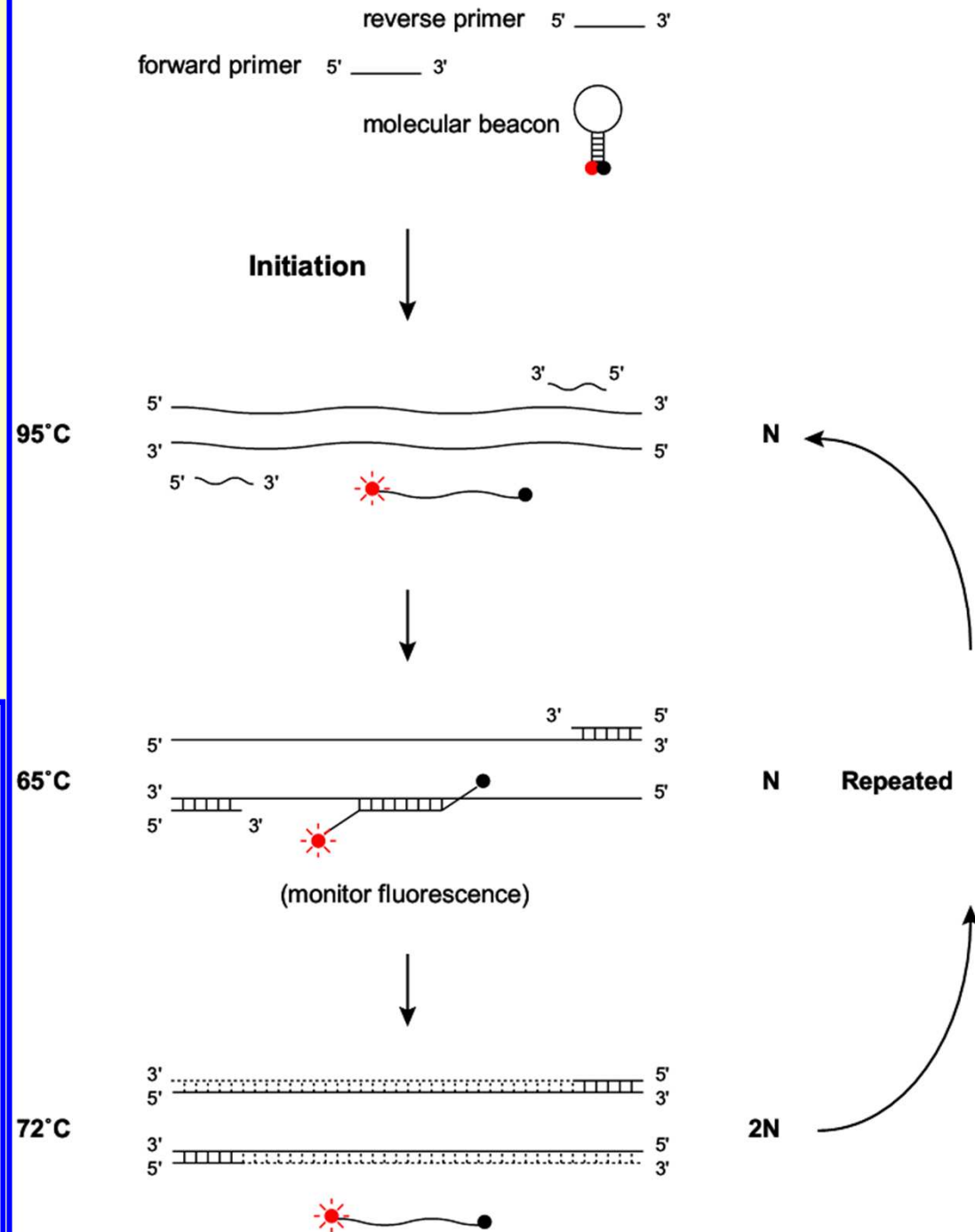
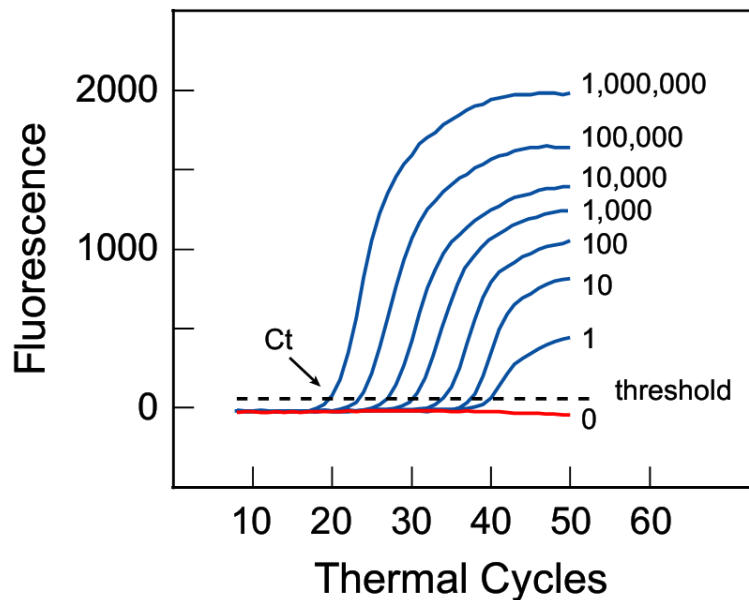
# FISH fluorescence in situ hybridization



- **dual molecular beacon - vyšší specifita - obě proby musí hybridizovat s cílovými místy, technika "adjacent probes"**

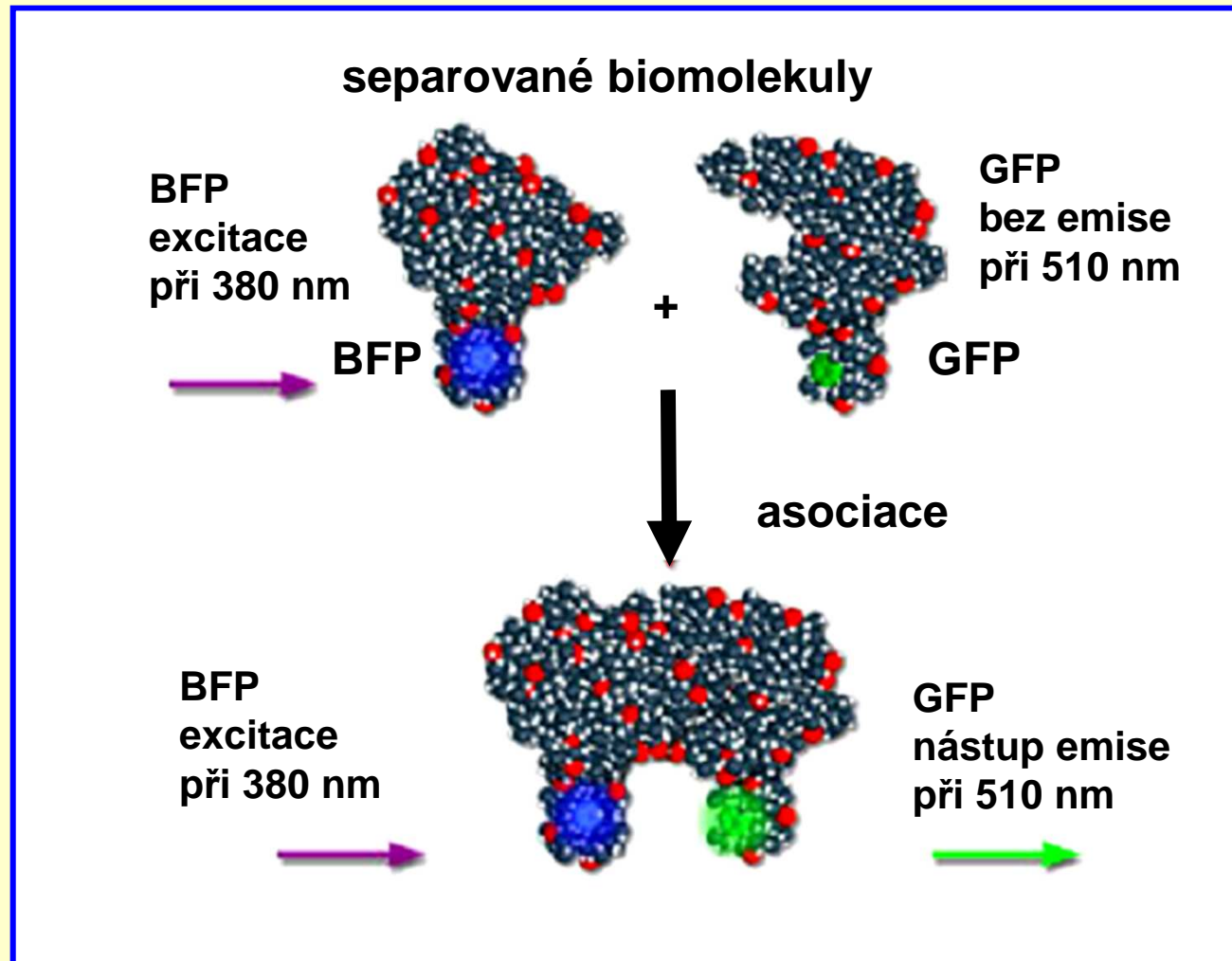
# Real time PCR

- zviditelnění průběhu pomocí MB
  - 95 °C denaturace
  - 65 °C annealing, přisednutí primerů a MB = fluorescence
  - 72 °C prodloužení vláken

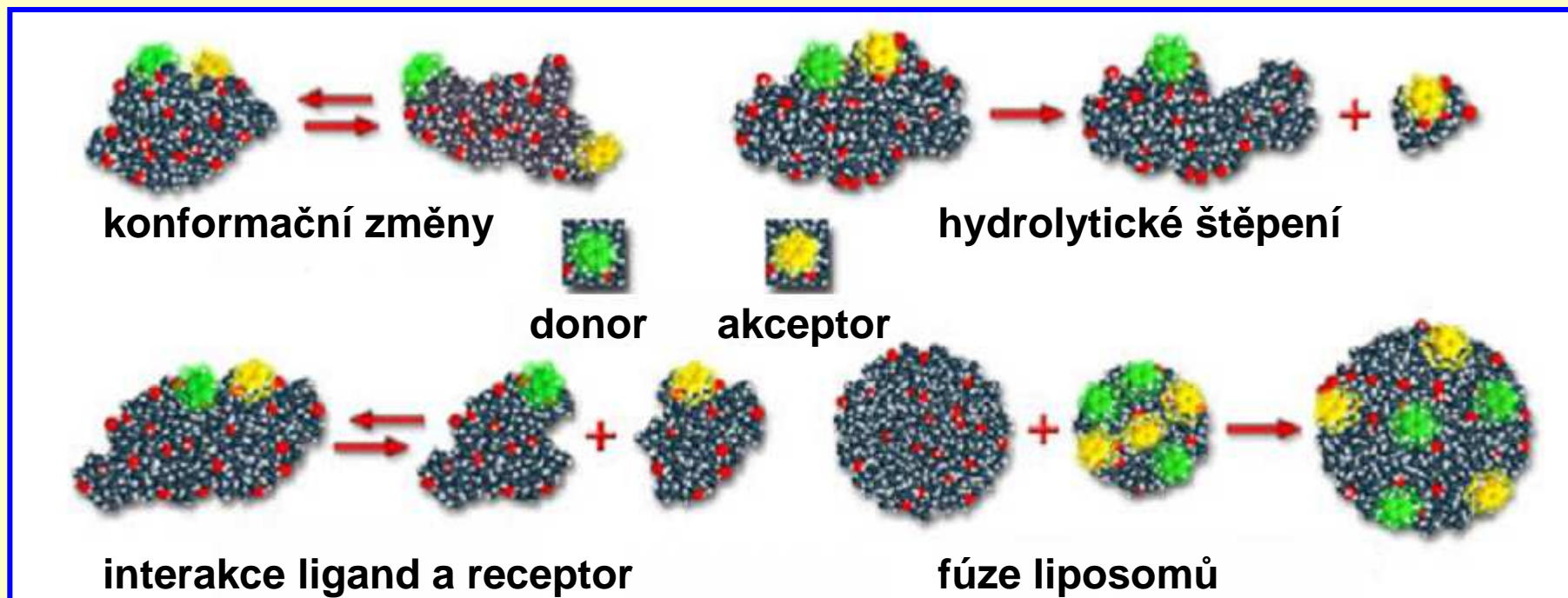




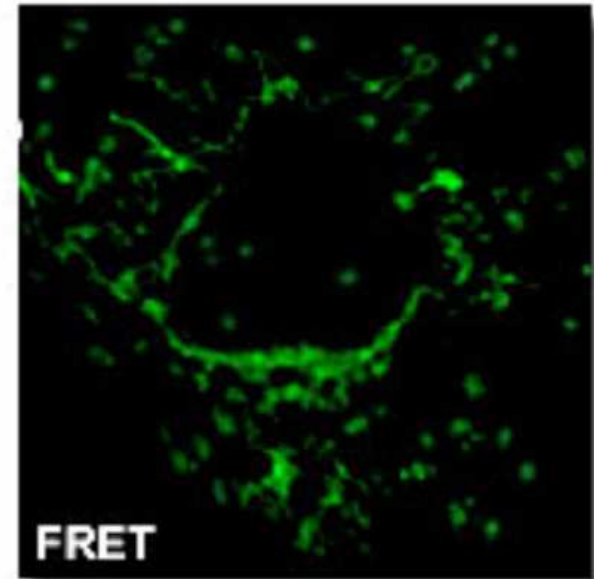
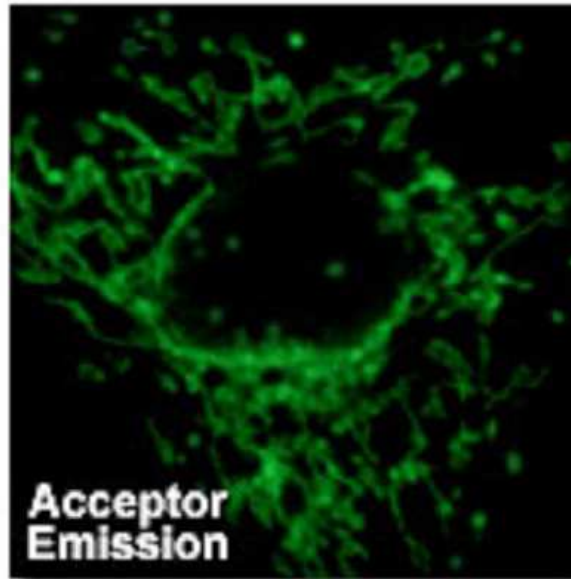
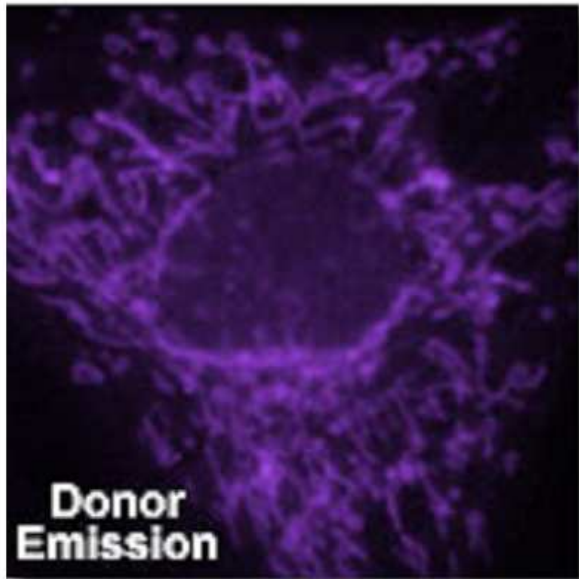
# FRET: in vivo interakce biomolekul



# FRET: in vivo interakce biomolekul



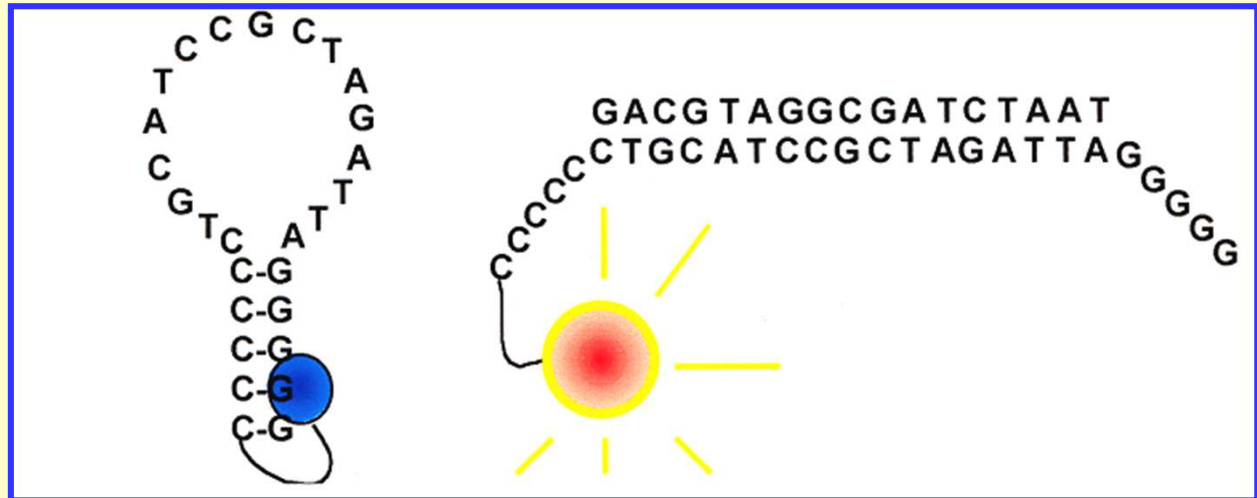
# FRET imaging v mikroskopii



- lokalizace a vzdálenosti biomolekul v buňce



# Gene-PIN

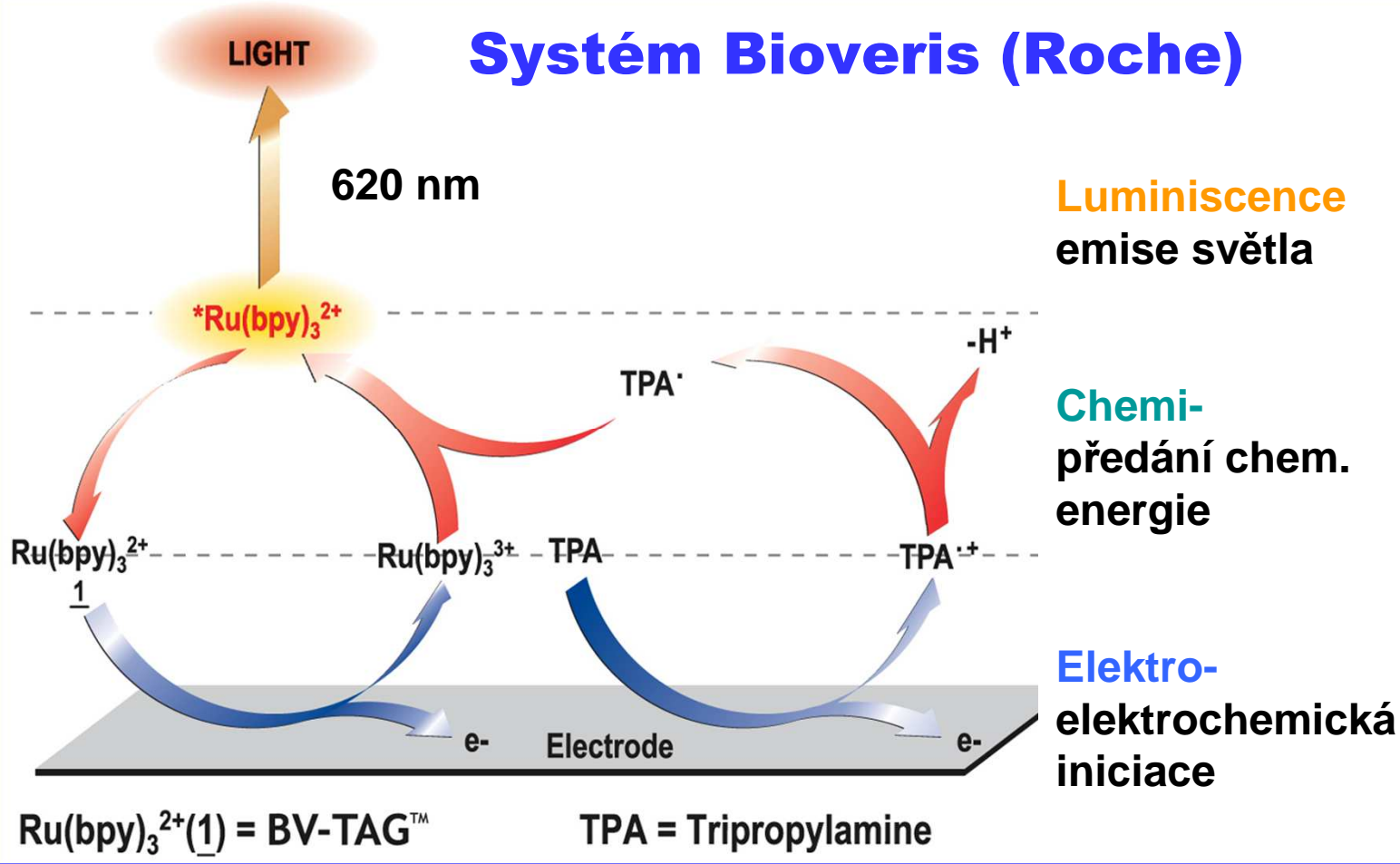


- oligonukleotid - "inteligentní" DNA proba obsahující sekvenci komplementární k cílové sekvenci v analyzovaném vzorku
- na jednom konci má řadu G, na druhém konci řadu C a navíc skupinu fluoroforu
- v roztoku tedy vytvoří vlásenkovou strukturu, v níž se fluorofor přiblíží ke guaninovým zbytkům, které fungují jako zhášec
- v přítomnosti cílové sekvence se vlásenka otevře a objeví se fluorescence
- výhody: jednoduchost, rychlost, citlivost ( $10^{-7}$  až  $10^{-12}$  M)

# **Elektrochemiluminescence (ECL)**

- chemiluminescence jako výsledek elektrochemické reakce, ze stabilního prekurzoru na povrchu elektrody vytvořen vysoce reaktivní prvek, který reaguje za tvorby světelného záblesku
- chemiluminiscentní reakce, která vede k emisi fotonu z rutheniového komplexu, je iniciována elektricky, spíše než chemicky
- realizace ECL na povrchu elektrody umožňuje přesnou prostorovou kontrolu procesu, včetně zapnutí a vypnutí (ON / OFF), PMT detektor je prostorově velmi blízko
- hlavní výsledek je intenzita světelného toku, podružnou informací je závislost proudové odezvy elektrody
- vhodné i pro velmi nestabilní látky (generování in situ)
- možnost recyklování - zesilovací účinek
- ECL lze provést i s luminolem
- komplexy ruthenia s bipyridinem,  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$
- technologie se využívá v imunoanalyzátoch firmy Roche

## System Bioveris (Roche)



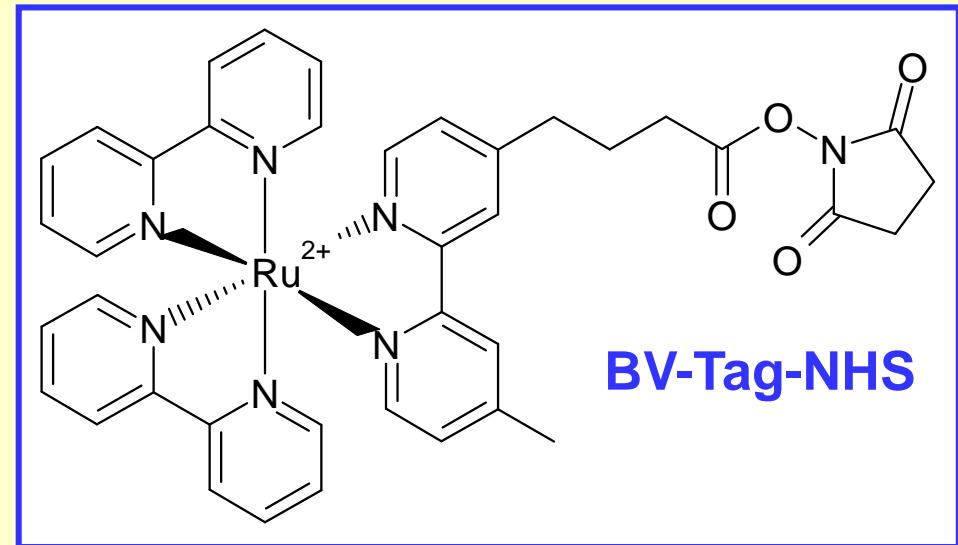
- ruthenium a TPA jsou oxidovány po aplikaci napětí na elektrodu
- radikál TPA<sup>·+</sup> ztrácí proton, redukuje Ru<sup>3+</sup> na Ru<sup>2+</sup>, které z excitovaného stavu přechází do základního za vyzáření fotonu
- Ru se nespotřebovává – recykluje se – zesilovací mechanismus
  - zvýšení citlivosti stanovení

# BioVeris tag

- stabilní neizotopická značka
- různé formy pro biomolekuly:

- BV-Tag-NHS-ester
- BV-Tag-fosforamid
- BV-Tag-maleimid
- BV-Tag-hydrazid
- BV-Tag-amin

aminy (bílkoviny)  
fosfokupiny (nukleové kyseliny)  
thioly  
sacharidy  
karboxyly



- podobný je systém ELECSYS
- obvykle kombinováno se záchytem pomocí magnetického nosiče

