

POKROČILÁ
BIOFYZIKÁLNÍ CHEMIE -
EXPERIMENTÁLNÍ METODY
C 5 8 4 6

Fluorescence ve výzkumu biomolekul

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

Funkční genomika a proteomika

Národní centrum pro výzkum biomolekul

Přehled kvantitativních metod fluorescenční analýzy interakcí biomolekul

1

Teorie = základ praxe

Vazebná křivka, rovnovážná disociační konstanta, lineární rozsah detektoru.

2

Fluorescence při kvantifikaci afinity a vzdálenosti

Stanovení vazebné afinity fluorescenčně značných proteinů - fluorescenční anisotropie, microscale thermophoresis. FRET.

3

Která je nejlepší - srovnání metod

Shrnutí praktických výhod a nevýhod kvantitativních metod fluorescenční analýzy interakce biomolekul.

4

Fluorescenční rezonanční přenos energie - FRET

Původ rezonančního přenosu energie, charakteristické veličiny FRET, Aplikace FRET při studiu biomolekul

Vazebná křivka 1 isoterma

Pro vazbu dvou proteinů **A,B**
a vznik komplexu **A.B**
při konstantní teplotě



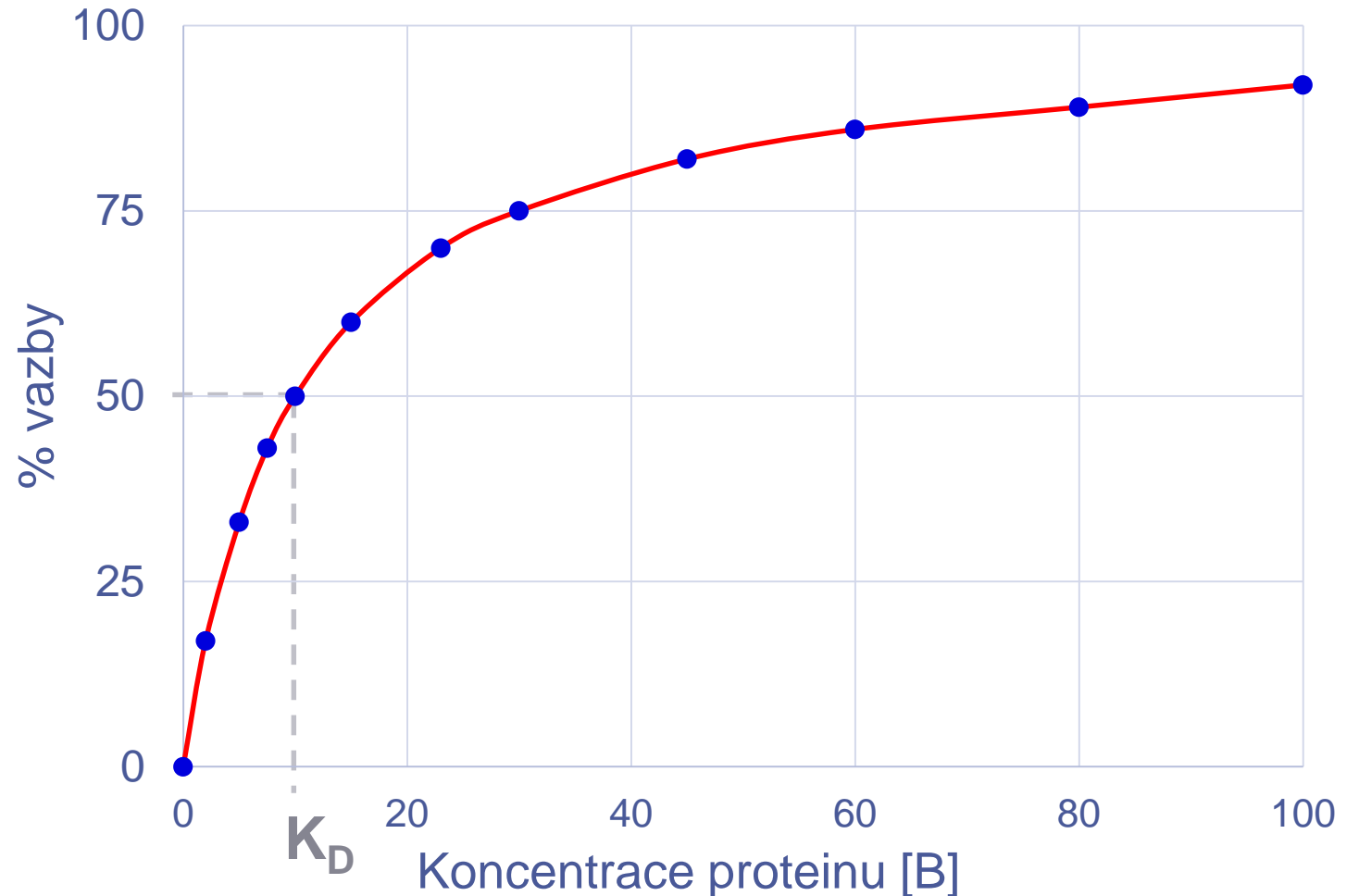
zapišeme **rovnovážnou disociační konstantu**

$$K_D = \frac{[A][B]}{[A \cdot B]}$$

Jestliže přidáváme postupně protein B k proteinu A, vazebnou křivku lze vyjádřit rovnicí

$$\% \text{ vazby} = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

Závislost míry vazby na celkové koncentraci přidaného proteinu B



K_D disociační konstanta – koncentrace proteinu, při které je právě polovina molekul v komplexu

Vazebná křivka 2

odvození rovnice funkce

Míru vazby vyjádříme poměrem koncentrace komplexu **A·B** a celkové koncentrace proteinu **A** násobený 100%.

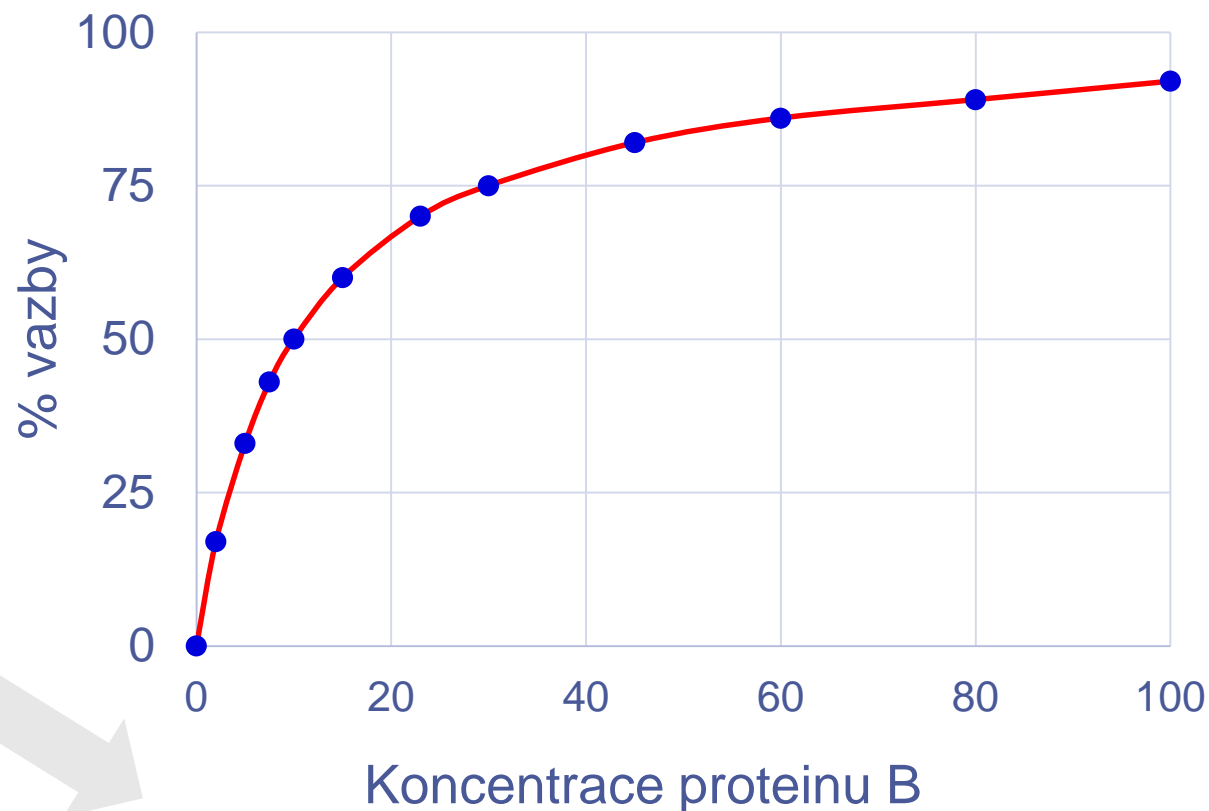
$$\% \text{vazby} = \frac{[A \cdot B]}{A_{TOT}} \cdot 100\%$$

Po dosazení za **A·B** a **A_{TOT}** získáme rovnici pro vazebnou křivku

$$[A \cdot B] = \frac{[A][B]}{K_D}$$

$$A_{TOT} = [A \cdot B] + [A]$$

Závislost míry vazby na celkové koncentraci přidaného proteinu B



$$\% \text{vazby} = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

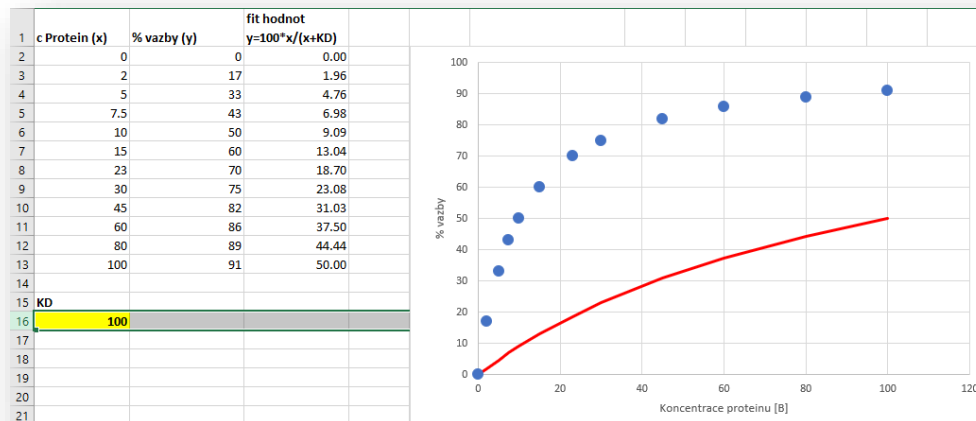
Vazebná křivka 3 fitování pro chytré hlavy



Vyzkoušet, jak se mění tvar vazebné křivky v závislosti na K_D si můžete v souboru

[KD_vliv_na_tvar_krivky.xlsx](#)

když **ručně** změníte hodnotu K_D na řádku 16.

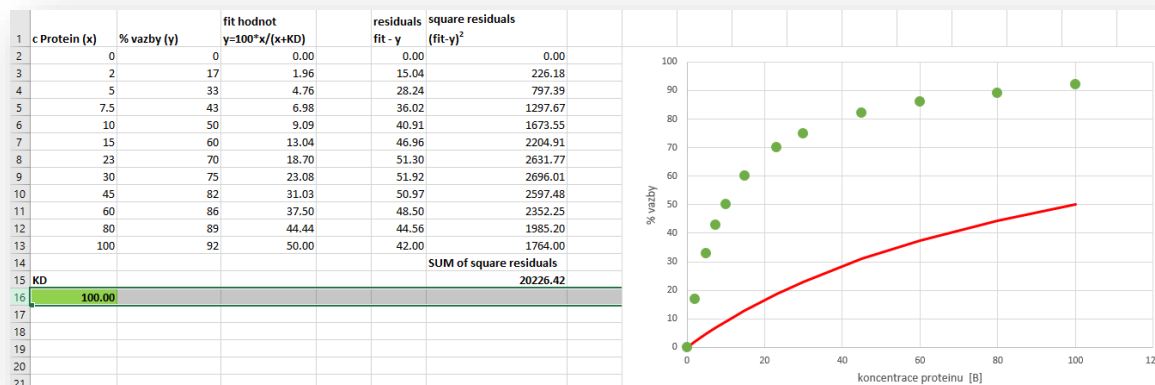


Automatické fitování dat v Excel minimalizací součtu druhých mocnin odchylek měřených dat a fitovaných hodnot za použití doplňku Řešitel (Solver) si můžete vyzkoušet v souboru

[Automat KD fit.xlsx](#)

Videonávod, jak aktivovat doplněk Řešitel (Solver) v programu Excel je v souboru

[Resitel Solver_ON.mp4](#)



Návod vznikl na základě videa - autor Karl Zuvela

<https://youtu.be/4jpoCGWmfeM>

Vazebná křivka 4

logaritmus koncentrace = sigmoida

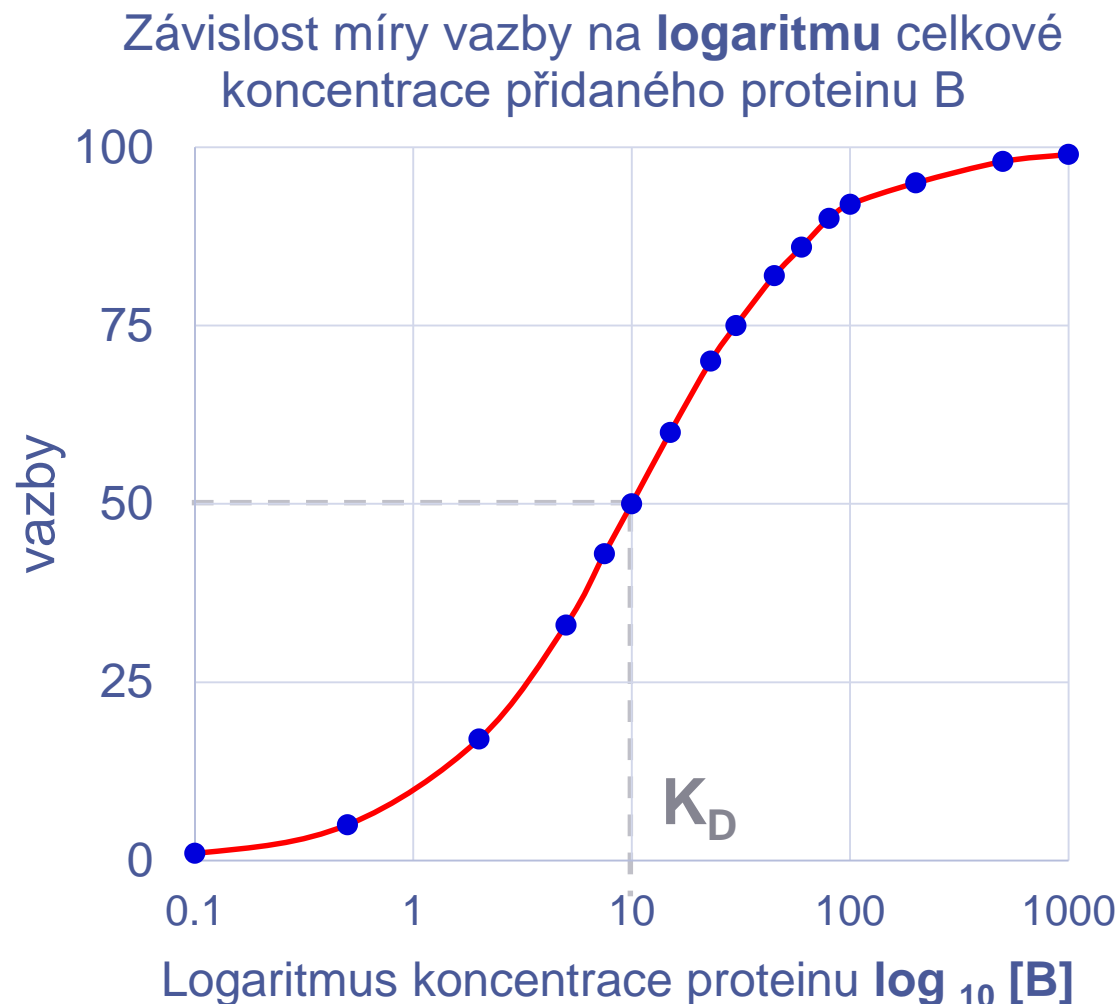
Jestliže přidáme k proteinu A protein B v dostatečně širokém rozsahu koncentrací, vazebnou křivkou závislosti míry vazby na logaritmu koncentrace B je sigmoida.

$$\% \text{ vazby} = \frac{[B]}{[B] + K_D} \cdot 100\%$$

K_D disociační konstanta – inflexní bod sigmoidy

Sklon sigmoidy – míra kooperativity vazby

v případě, že se váže více molekul B na jednu molekulu A.



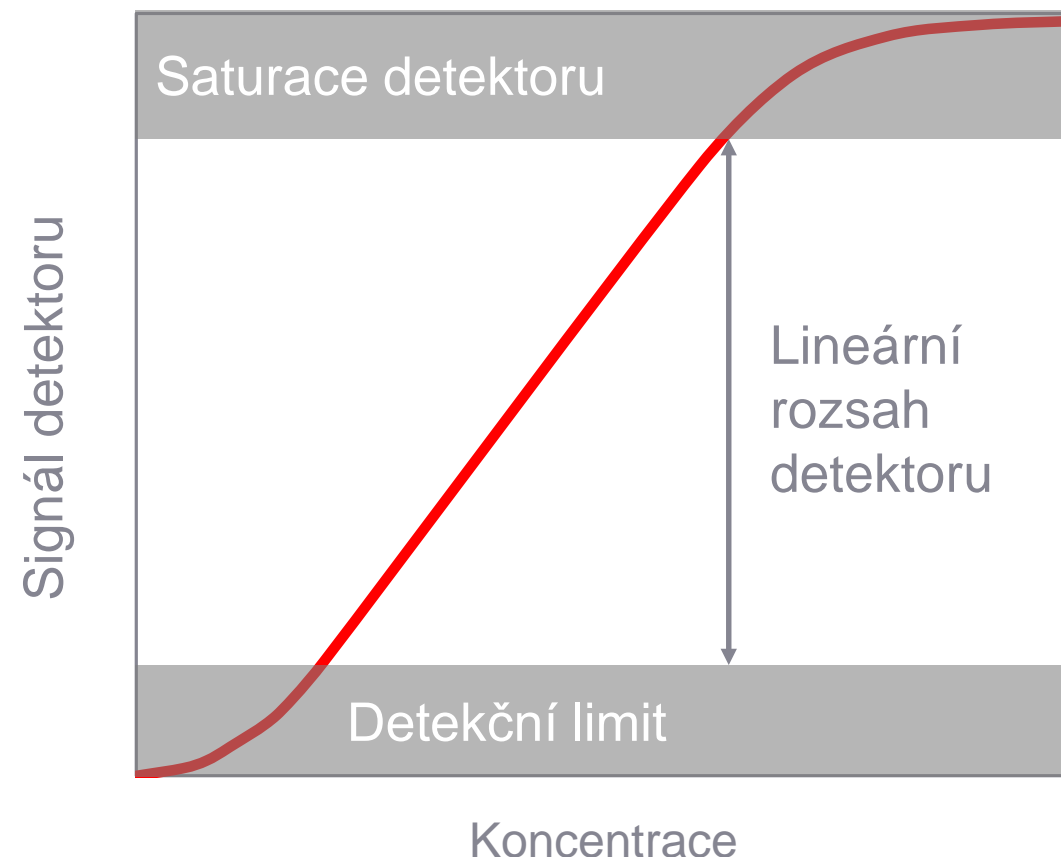
Poznejte svůj detektor - lineární rozsah detektoru = přesná kvantitativní měření

Pro přesné kvantitativní měření je nezbytné, aby byl přírůstek signálu přímo úměrný přírůstku koncentrace komplexů protein-protein.

To je splněno pro **lineární rozsah** detektoru – oblast detekce, kde po zvýšení koncentrace např. dvakrát zvýší hodnota signálu také dvakrát. Celkově má detekční křivka průběh sigmoidy.

Oblast pod lineárním rozsahem - jsme blízko minimálnímu detekčnímu limitu = nelineární odezva.

Oblast nad lineárním rozsahem – detektor je zahlcen signálem – satureován, velká změna koncentrace způsobí relativně malé a nelineární zvýšení signálu.



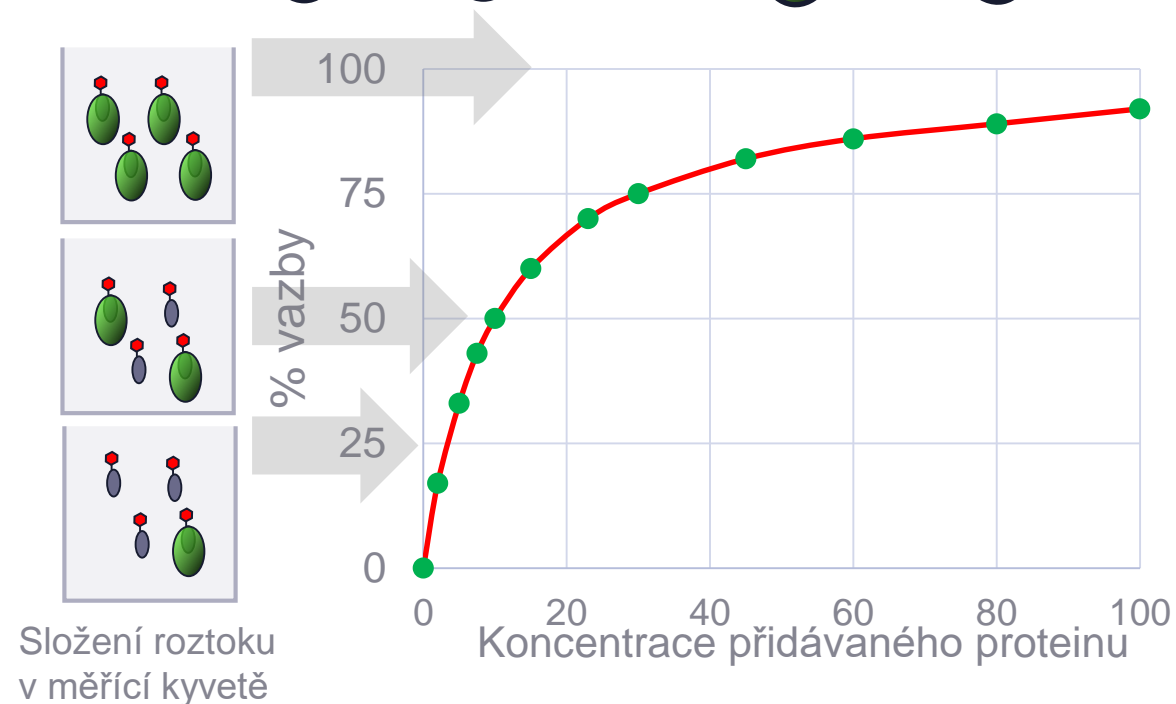
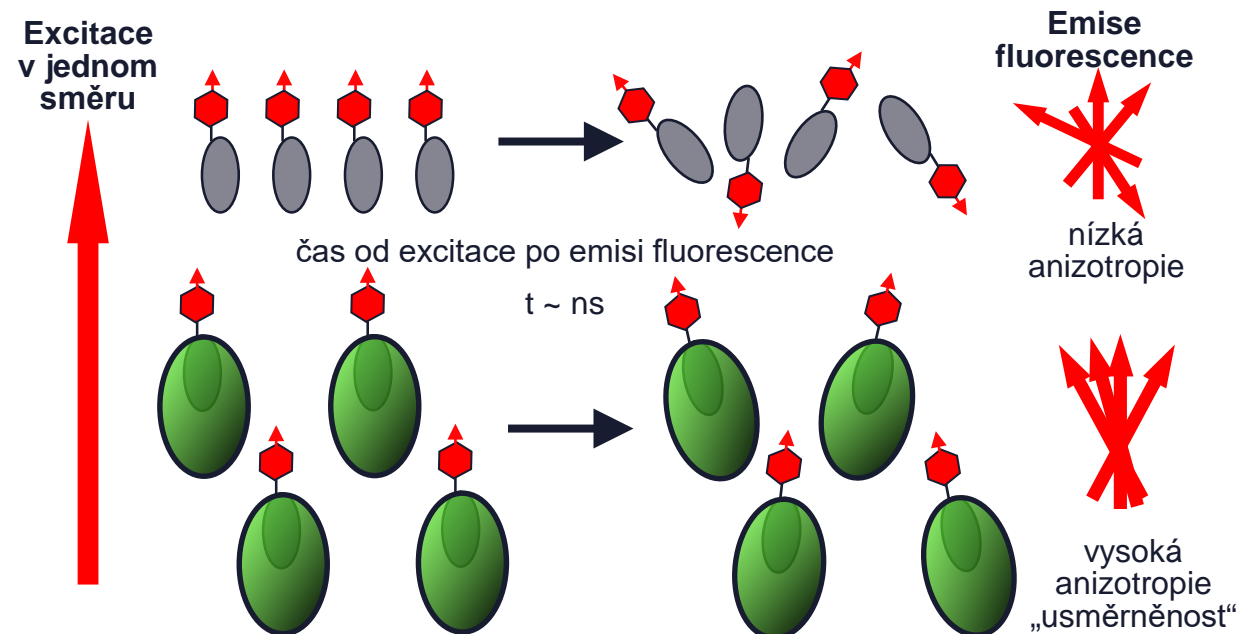
Fluorescenční stanovení vazebné affinity- anizotropie

Anisotropie fluorescence - princip

„Usměrňenost“ emitovaného světla se zvýší po vytvoření komplexu protein-protein; po excitaci lineárně polarizovaným zářením dochází k emisi fluorescence značené molekuly převážně v jednom směru.

Prakticky

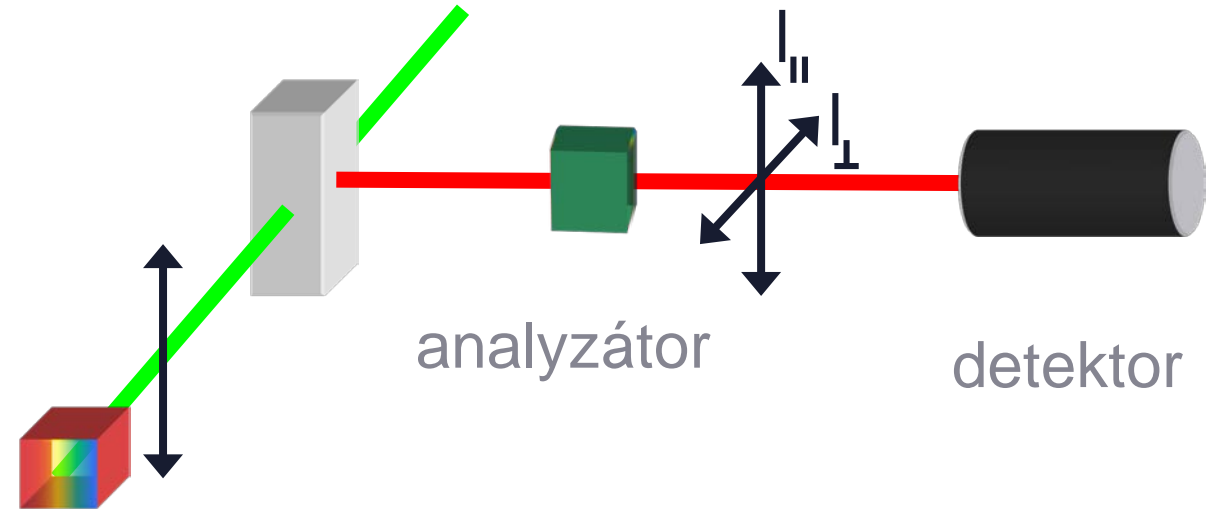
- značíme menší z proteinů.
- stačí naznačit 100 μg proteinu v kyvetě.
- přidávaný protein není značený.
- celková koncentrace přidávaného proteinu je minimálně 10x větší než koncentrace značeného proteinu



Anisotropie fluorescence měření

$$r = \frac{I_{II} - I_{\perp}}{I_{II} + 2I_{\perp}} = \frac{I_{VV} - I_{VH}}{I_{VV} + 2I_{VH}}$$

Hodnota anizotropie r je **podíl rozdílu** $I_{VV} - I_{VH}$ intenzity fluorescence při rovnoběžném (vertikálním) a kolmém (horizontálním) natočení analyzátoru vůči excitačnímu polarizátoru a **celkové intenzity fluorescence** $I_{VV} + 2I_{VH}$ ve 3D – všech třech směrech šíření fluorescence.



polarizátor

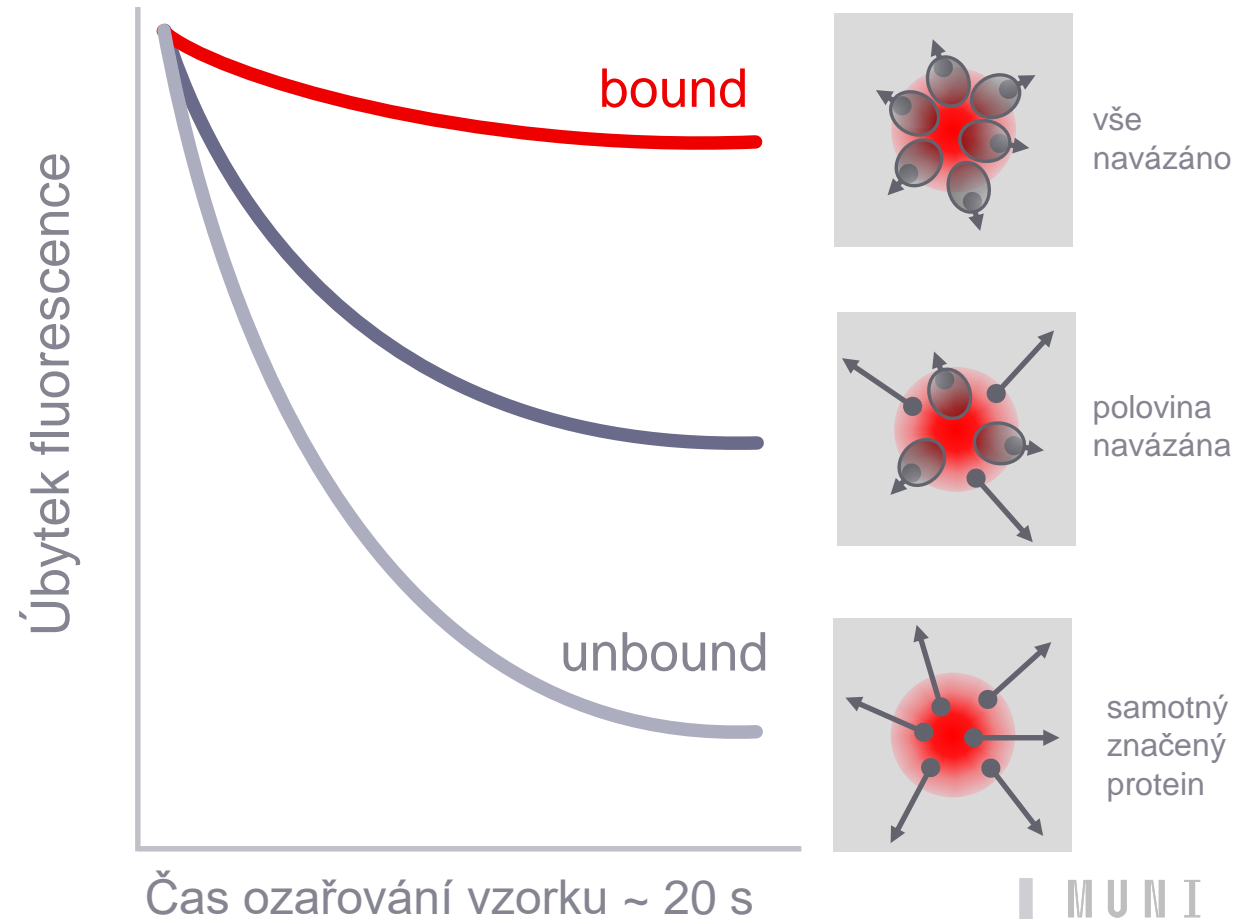
Prakticky

- Příklad - fluorometr s polarizátorem excitačního světla a otočným polarizátorem = analyzátozem vyzážené fluorescence pro zjištění intenzity v různých směrech.
- Potřebujeme ~ 10x vyšší koncentraci než na měření klasické fluorescence – polarizátory propouští 10x méně světla.
- Hodnota anizotropie r je bezrozměrná veličina (podíl čísel).

Microscale thermophoresis MST

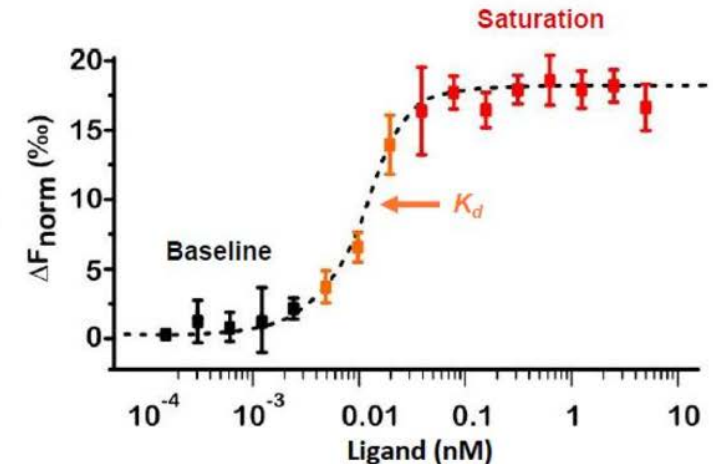
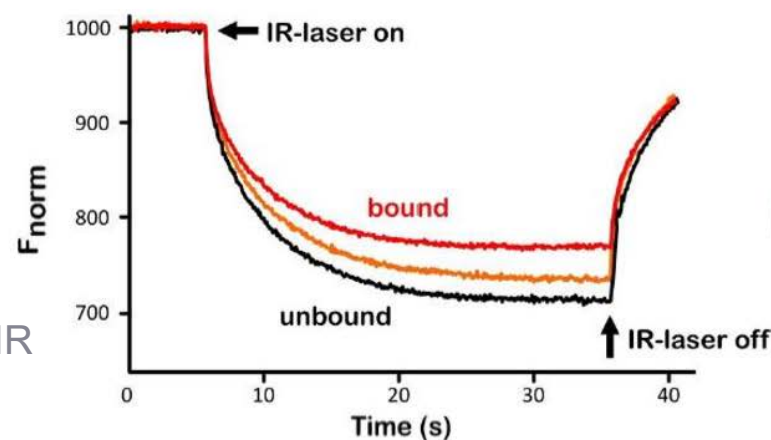
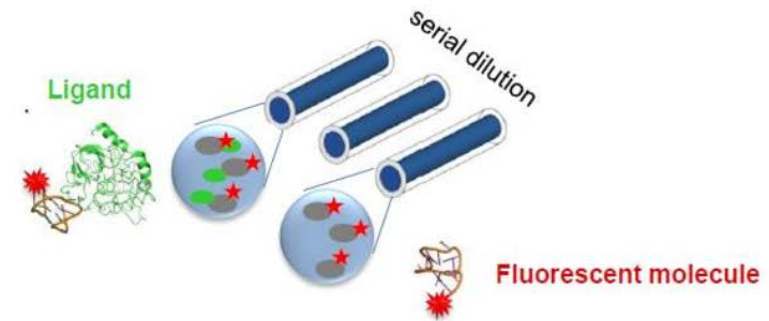
Princip MST

- Vytvoříme lokální teplotní gradient – ozáříme vzorek v kapiláře infračerveným laserem.
- Vzorek zároveň osvětlujeme excitačním světlem pro fluorofor, kterým je značený menší protein.
- Detekujeme pohyb fluorescenčně značených molekul jako změnu fluorescence v mikrooblasti osvětlené IR laserem.
- Při konstantní koncentraci fluorescenčně značeného proteinu zvyšujeme koncentraci přidávaného neznačeného proteinu = ligandu.
- Sledujeme snížení míry poklesu fluorescence v čase se vzrůstající koncentrací ligandu.



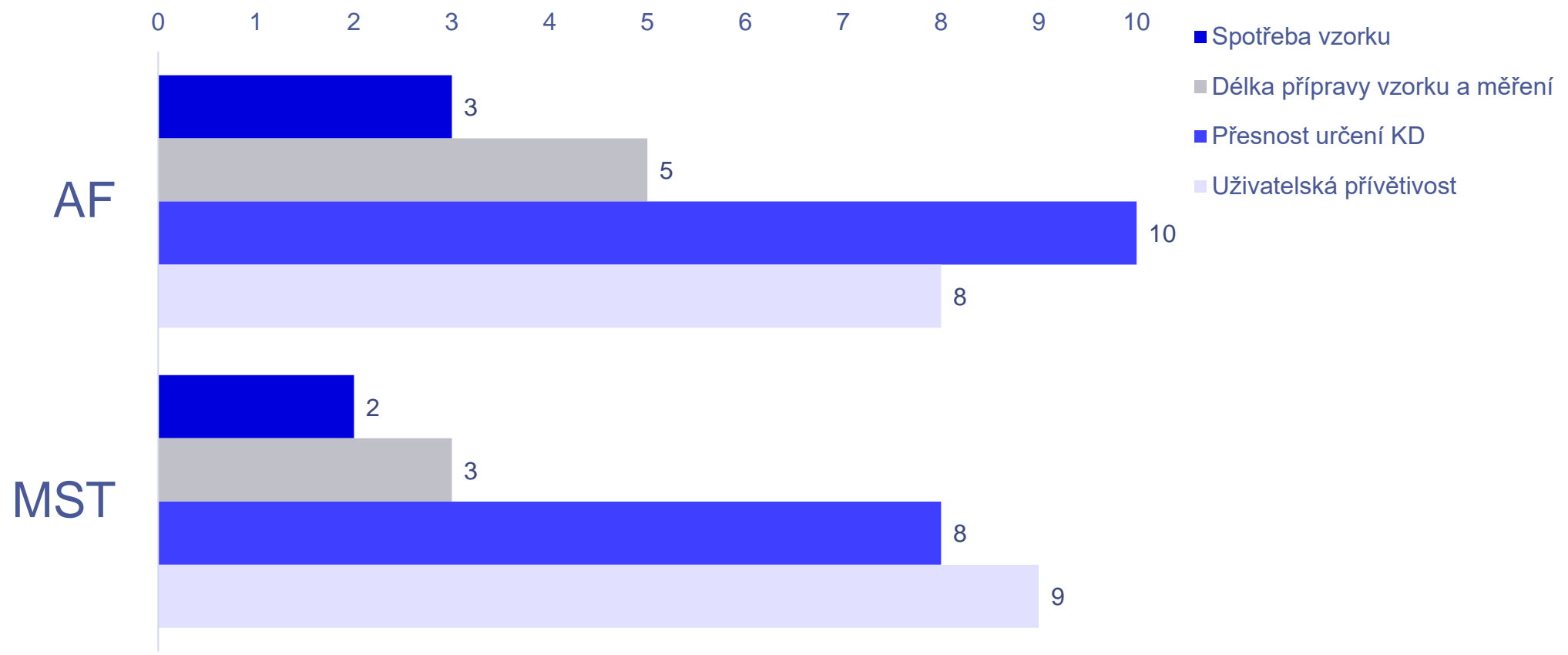
Prakticky MST měření protein-protein interakce

- Fluorescenčně naznačíme menší protein.
- Vytvoříme ředící řadu druhého proteinu = ligandu jeho postupným ředěním 2x.
- Smícháme roztoky tak, že koncentrace značeného proteinu je stejná, ale koncentrace ligandu se mění v rozsahu 5 řádů.
- Vzorky nasajeme do kapilár (5uL) .
- Měříme změnu fluorescence po zapnutí IR laseru.
- Vyneseme změnu fluorescence v závislosti na logaritmu koncentrace ligandu.
- Z inflexního bodu sigmoidy určíme disociační konstantu vzniku komplexu protein-ligand.



Obrázek laskavě poskytl Dr. Josef Houser,
CORE FACILITY Biomolecular Interactions and Crystallization
<http://bic.ceitec.cz/cs>

Srovnání fluorescenčních metod určení afinity biomolekul

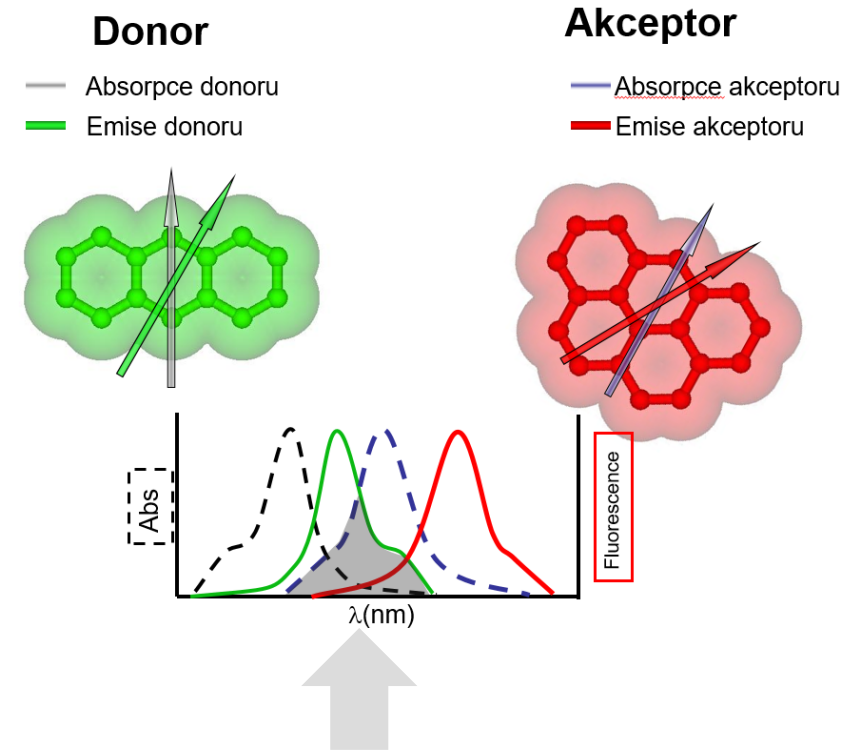


Fluorescenční rezonanční přenos energie

Fluorescence resonance energy transport - FRET

FRET je jev, při kterém dochází k absorpci fotonu pouze molekulou donoru – příjemcem fotonu. Následně dojde k **nezářivému** přenosu energie – **bez výměny fotonu** - z donoru – dárce energie na akceptor příjemce energie. Konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které budící záření pro donor neabsorbují, ale přesto emitují.

FRET vysvětlujeme za použití **dipólových momentů přechodů absorpce a emise**, které jsou dány okamžitým stavem elektronového obalu molekuly. Velikost dipólového momentu přechodu udává schopnost molekuly v daném stavu absorbovat nebo emitovat světlo. Směr dipólového momentu přechodu udává směr, ve kterém je světlo = jeho elektrická složka molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno, délka šipky = velikost dipólu udává pravděpodobnost přechodu elektronu mezi energetickými hladinami.



Podmínkou FRET je **překryv** emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru.

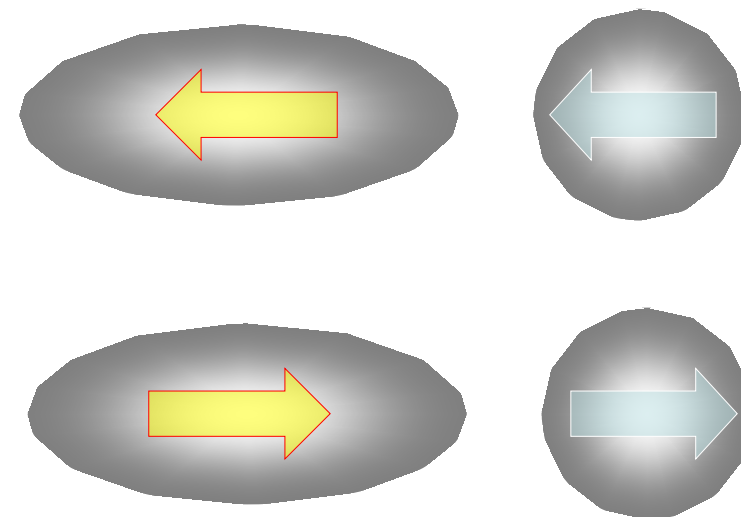
Pravděpodobnost přenosu energie k_{DA}

Rychlostní konstanta k_{DA} určuje pravděpodobnost rezonančního přenosu energie FRET.

Velikost k_{DA} pro dipól-dipólový přenos energie v případě slabé vazby, kdy vzájemné interakce donoru a akceptoru neovlivní optická spektra vypočítáme podle Försterova vzorce

$$k_{DA} = \frac{1}{\tau_D} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

τ_D – doba dohasínání fluorescence donoru, R_0 – Försterova vzdálenost, ve které je pravděpodobnost přenosu energie poloviční 50% tj. rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly, r – vzdálenost mezi donorem a akceptorem.



$$V = -\frac{\mu_1^2 \alpha_2}{\pi \epsilon_0 r^6}$$

Rezonanční přenos energie je nepřímo úměrný **šesté mocnině** vzdálenosti donoru a akceptoru podobně jako při interakci indukovaného dipólu a permanentního dipólu.

Účinnost fluorescenčního rezonančního přenosu E

Účinnost rezonančního přenosu energie E je závislá na poměrném množství energie fotonů, které jsou absorbovány donorem a následně je jejich energie vyzářena akceptorem.

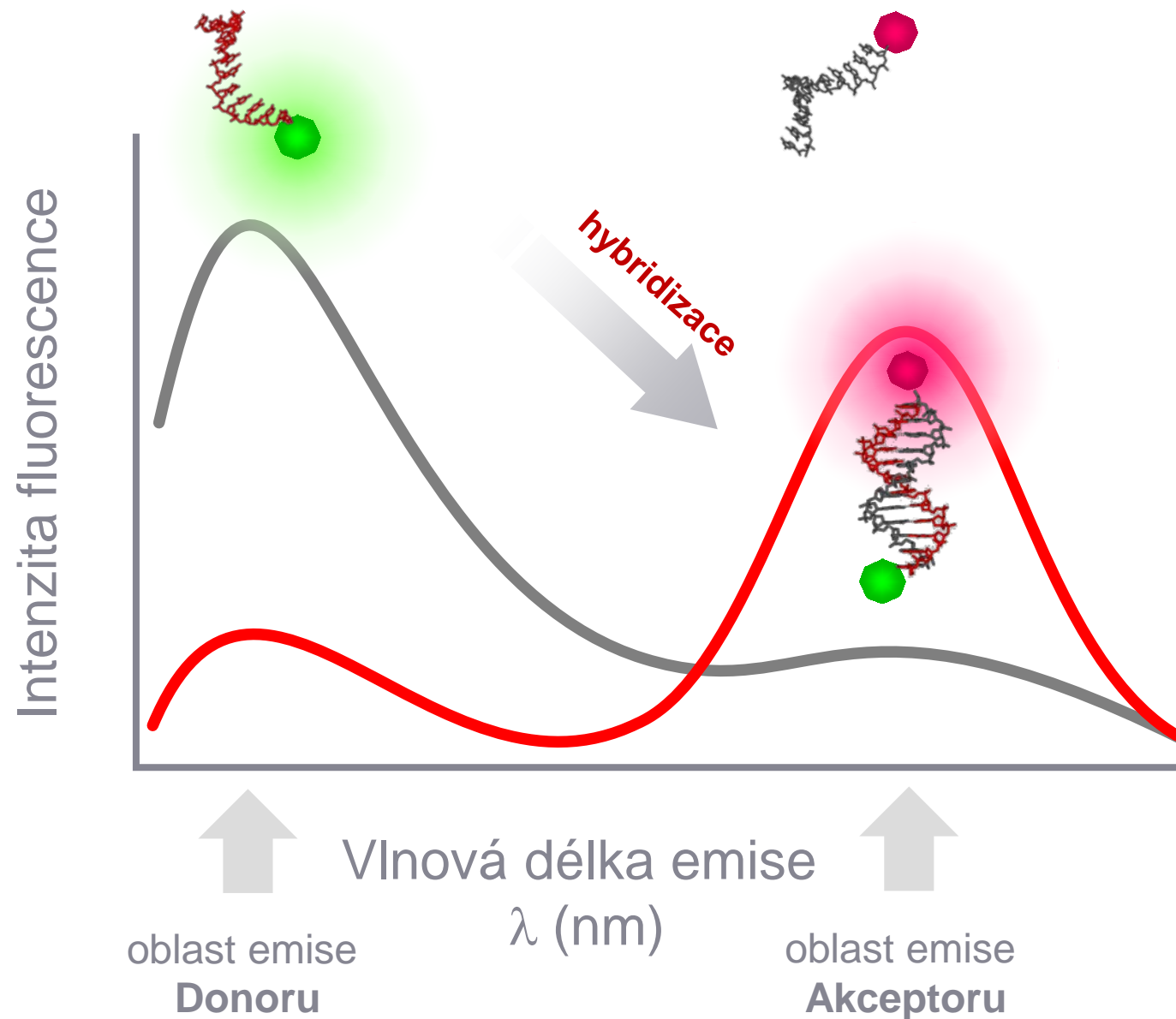
$$E = \frac{k_{DA}(r)}{\tau_D^{-1} + k_{DA}(r)} \quad E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

Prakticky se účinnost rezonančního přenosu energie E měří určením relativní intenzity fluorescence donoru za nepřítomnosti F_D a za přítomnosti akceptoru F_{DA} .

E rychle klesá se 6. mocninou vzdálenosti!

Popis hybridizace DNA za použití FRET

- Při hybridizaci DNA se dostávají do těsné blízkosti řetězce značené D zeleně a A červeně.
- Dochází ke snížení emise donoru a zároveň k navýšení emise akceptoru při excitaci v oblasti excitačního maxima donoru.
- Změna emisního spektra ukazuje na FRET mezi komplementárními řetězci a je důkazem hybridizace DNA.



Kde se můžete dozvědět více?

C7230 Fluorescenční metody ve vědách o životě - cesta od molekuly k buňce

C7235 cvičení

Teoretická vysvětlení principů fluorescence a praktická výuka aplikace fluorescenčních přístupů

Podzim 2020

FE010 Experimental Methods in Biophysics - life science laboratory approaches and excursions

Přednášky odborníků a exkurze do výzkumných laboratoří mezinárodně uznávaných společností

Podzim 2020

- Thermo Fisher 20 November 2018

