

FRET

Fluorescence Resonance Energy Transfer

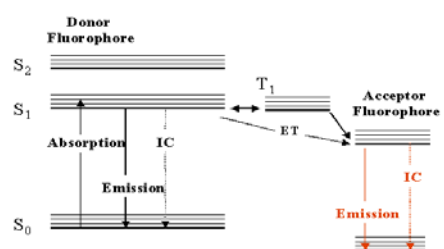
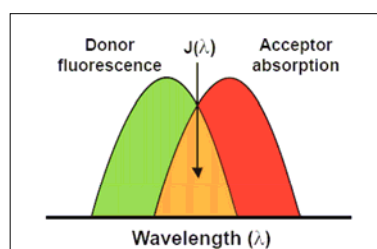
FRET

- **FRET je Fluorescence Resonance Energy Transfer** – Fluorescenční rezonanční energetický transfér
- podle objevitele Förster nazýván také **Förster Resonance Energy Transfer**
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

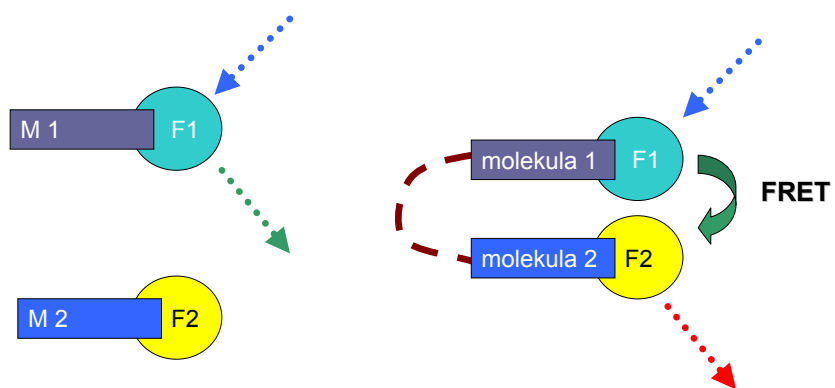
1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla

Podmínky:

- a) vzdálenost mezi molekulami je menší, než 100 Å
- b) emisní spektrum donoru se překrývá se absorpčním (excitačním) spektrem akceptoru
- c) molekuly mají stejně orientovány dipólové momenty



FRET: schéma



Základní vztahy

- účinnost FRET E je definována:

$$E = 1 - \tau'_D / \tau_D$$

- kde τ'_D a τ_D jsou fluorescenční časy vyhasínání v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

$$E = 1 - F'_D / F_D$$

- F'_D a F_D jsou intensity fluorescence v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

Základní vztahy

- účinnost (E) závisí na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem (r)

$$E = \frac{1}{(1 + (r/R_0)^6)}$$

- R_0 je Försterova vzdálenost při které je účinnost přenosu 50%

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

- R_0 závisí na integrálu překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru (J)
- κ^2 je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je většinou 2/3
- n je refrakční index, Q_0 je kvantový výtěžek samotného donoru

FRET

Donor	Acceptor	R_0 (Å)	Ref
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	49-56	13
IAEDANS ¹	FITC	49	13
IAEDANS ¹	5-(Iodoacetamido)fluorescein	49	13
Fluorescein	Fluorescein	44	13
EDANS	DABCYL	33	In House
Tryptophan	IAEDANS ¹	22	7
Tryptophan	Dansyl	21-24	7
Tryptophan	Pyrene	28	7
Dansyl	Fluorescein	33-41	14
Naphthalene	Dansyl	22	13
Pyrene	Coumarin	39	13
8-Phycocerythrin	Cy5	79	13

www.anaspec.com

FRET

Quencher (Acceptor)	λ_{exc} (in nm)	Amine-Reactive	Thiol-Reactive	Carboxy-Reactive (NH ₂ -Containing)	Recommended FRET Donor
DNP	348	DNP-X, acid; DNP-X, SE	DNP C2 maleimide	DNP C2 amine	Abz, Abz(N-Me), MCA, Trp
DABCYL	485	DABCYL; DABCYL, SE	DABCYL C2 maleimide	DABCYL C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
DABCYL Plus™	486	DABCYL Plus™ acid; DABCYL Plus™, SE	DABCYL Plus™ C2 maleimide	DABCYL Plus™ C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
QXL™ 490	488	QXL™ 490, acid; QXL™ 490, SE	QXL™ 490 C2 maleimide	QXL™ 490 C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
QXL™ 520	508, 530	QXL™ 520, acid; QXL™ 520, SE	QXL™ 520 C2 maleimide	QXL™ 520 C2 amine	FAM, FITC, Rh6G HiLyte Fluor™ 488
QXL™ 570	538, 577	QXL™ 570, acid; QXL™ 570, SE	QXL™ 570 C2 maleimide	QXL™ 570 C2 amine	Cy3, TAMRA, ROX, HiLyte Fluor™ TAMR
QXL™ 610	594, 628	QXL™ 610, acid; QXL™ 610, SE	QXL™ 610 C2 maleimide	QXL™ 610 C2 amine	ROX, Texas Red®, HiLyte Fluor™ TR
QXL™ 670	665	QXL™ 670, acid; QXL™ 670, SE	QXL™ 670 C2 maleimide	QXL™ 670 C2 amine	Cy5, HiLyte Fluor™ 647

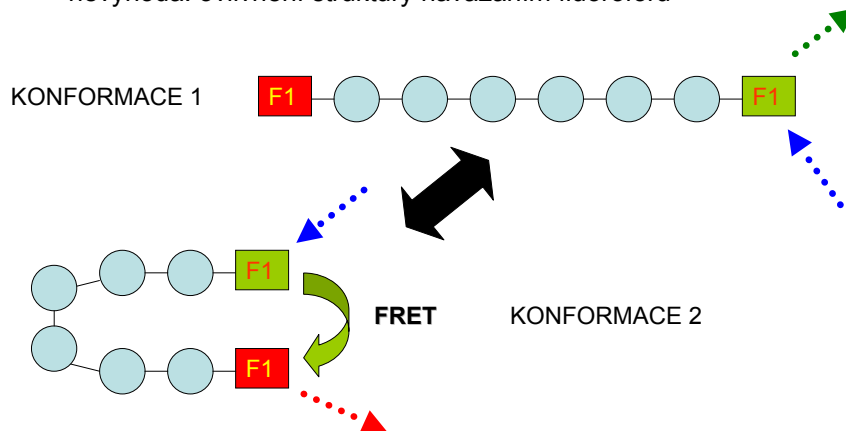
www.anaspec.com

Aplikace

- sledování strukturních a konformačních změn (dvě molekuly (případně dvě části molekuly) jsou označeny donorem a akceptorem a sledujeme zda dochází k výměně energie
- sledujeme: studium struktury proteinů, polynukleotidů, DNA, protein-protein interakce, DNA-protein interakce, atd.
- analytické aplikace

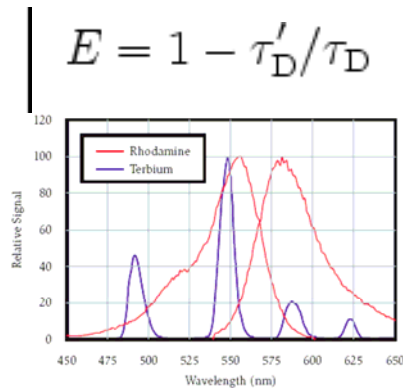
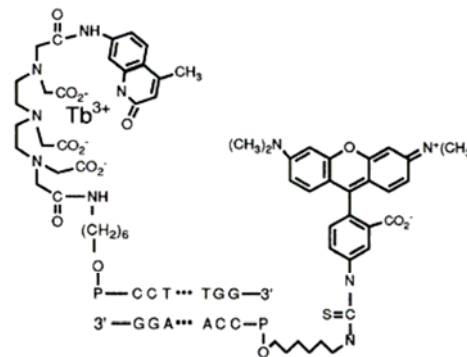
Sledování změn konformace molekuly

- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů

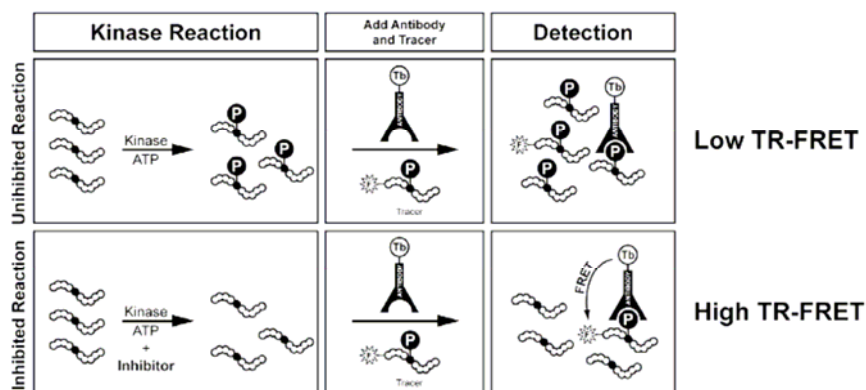


Sledování interakcí mezi vlákny DNA

- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln³⁺

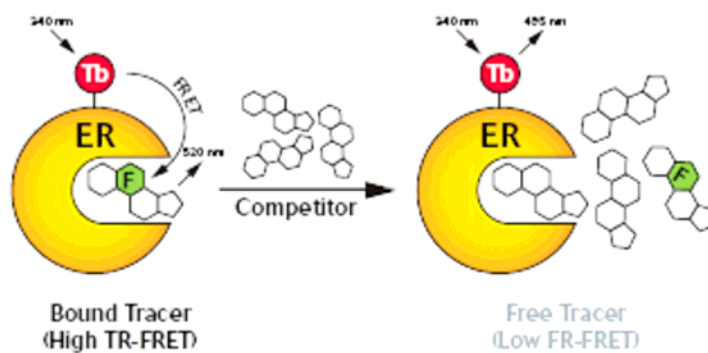


Analytické aplikace FRET



www.invitrogen.com

Analytické aplikace FRET



Chemiluminescence

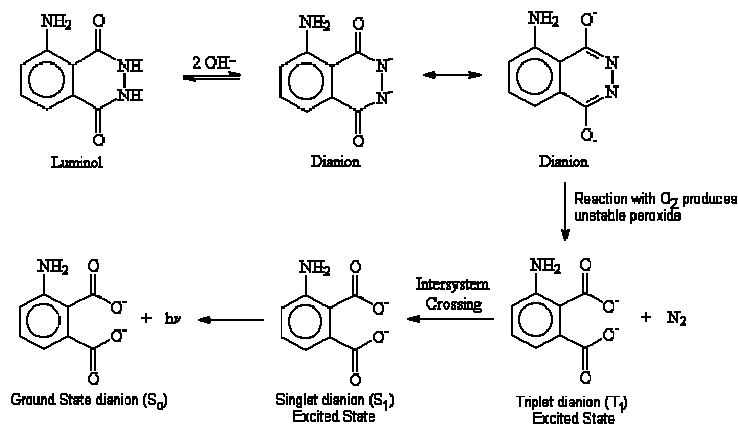
- zdrojem excitace je chemická reakce



- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton

http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Chemoluminescent_reaction.jpg

Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



Chemiluminiscenční reakce

- reakce luminolu v zásaditém prostředí s kyslíkem (peroxid, vzdušný kyslík) → modře fluoreskující roztok
- jestliže jsou v roztoku obsaženy také Fe^{2+} , nebo Cu^{2+} (katalýza reakce) dochází k zvýšení intenzity luminiscence

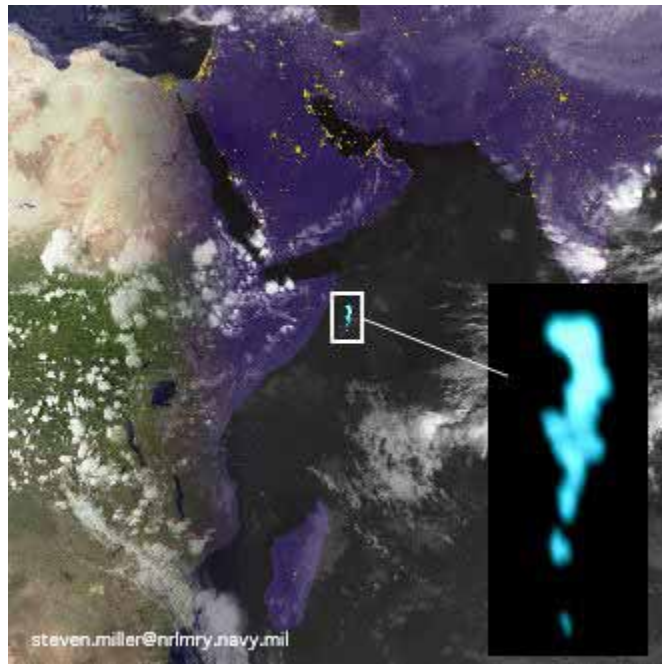


<http://people.howstuffworks.com/luminol.htm>

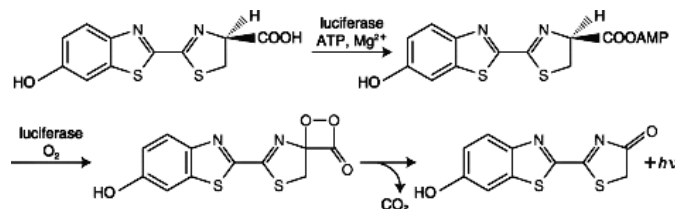
Bioluminiscence

- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo
- v roce 1887 profesor Duboise izoloval ze světlušek dvě látky: luciferin a luciferázu
- na zemi světélkují zejména brouci z čeledi Lampyriade (světlušky) a někteří kovaříci (např. *Pyrophorus noctilucus*)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakatice, ryby, paryby, atd.
- bioluminiscence živočichů je vysvětlována různými důvody: hledání partnera (světlušky), lákání kořisti (např. ryba zubatka, některé druhy světlušek, žraloček brazilský), zastrašení nepřátel (ryba stříbrnák, medusy z čeledi klanonožců).

Světlušky...



Luciferin



Luciferin

- luciferin se za přítomnosti katalyzátoru luciferázy a oxiduje kyslíkem na oxyluciferin
- přeměna 1 molekuly luciferinu na oxyluciferin je doprovázena emisí 1 fotonu (namodralé světlo)
- u tohoto děje se 1 molekula ATP přemění na ADP
- u některých organismů je tzv. fotoprotein – kyslík, luciferin a luciferáza se nacházejí blízko sebe, ale teprve změna konformace fotoproteinu spustí chemickou reakci („aktivátorem“ jsou většinou ionty Ca²⁺)

Bioluminescence medusy *A. Victoria*

Většina mořských živočichů jevících bioluminiscenci emituje namodralé světlo (základem je oxidace luciferinu). U medusy *Aequorea Victoria* však byla pozorována **zelená** luminiscence...



Bioluminescence medusy *A. Victoria*

- medusa obsahuje protein aequorin, který se skládá s apoproteinu (apoaequorin) a prostetického proteinu (coelenterazine), který je podobný luciferinu
- v přítomnosti O_2 a při vysoké hladině Ca^{2+} dojde k oxidaci coelenterazinu na excitovaný coelenteramid a CO_2
- relaxací coelenteramidu do základního stavu se uvolňuje modré světlo ($\lambda = 469 \text{ nm}$)
- uvolněné světlo může být absorbováno dalším proteinem obsaženým v těle medusy – GFP

„Green fluorescent protein“

- absorpční maxima GFP jsou 395 a 475 nm ~ může dojít k absorpci světla uvolněného z aequorinu
- absorbované světlo excituje GFP a dochází k vyzáření **zeleného** světla ($\lambda = 509$ nm)

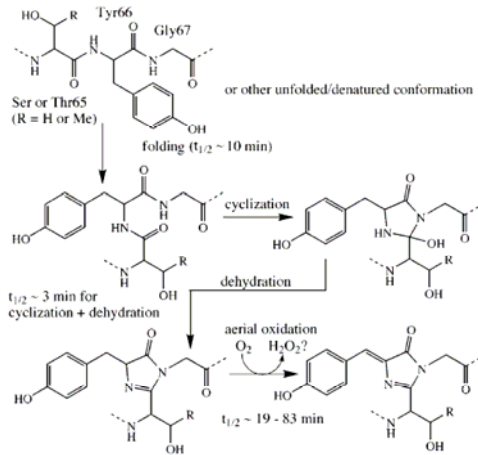


Struktura GFP

- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...

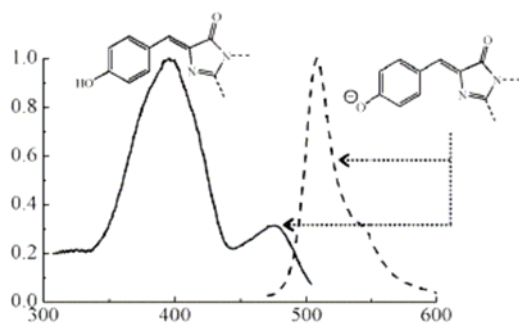
Struktura GFP

- GFP vzniká cyklizací, dehydratací a oxidací vzdušným kyslíkem sekvence proteinu obsahující Ser-Tyr-Gly



Tsien Y. R., *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509–44.

Fluorescenční vlastnosti GFP



„Divoký“ typ GFP – směs fenolového a fenolátového derivátu

Hlavní excitační pík - 395 nm (emisní maximum - 508 nm)

Minoritní excitační pík - 475 nm (emisní maximum – 503 nm)

Použití GFP v chemii a biologii

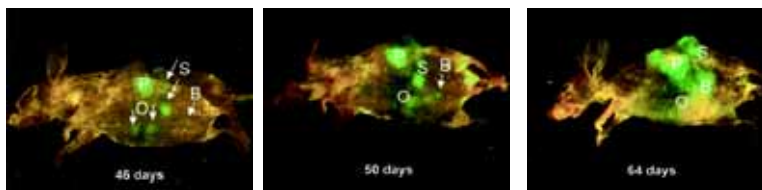
- lze připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly), který má vlastnosti stejné jako ostatní proteiny, ale je mnohem lépe detegovatelný
- genové inženýrství – sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...



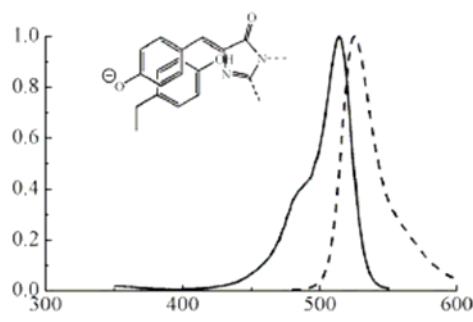
GFK – Green Fluorescent Králík

Použití GFP v chemii a biologii

- nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru



Jiné varianty GFP - YFP

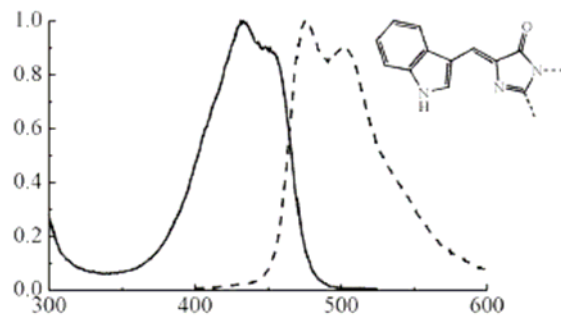


π -electronový „stocking“ s dalším Tyr (tzv. class 4)

516 nm \rightarrow 529 nm

zelenožlutlá luminiscence – YFP (yellow fluorescent protein)

Jiné varianty GFP

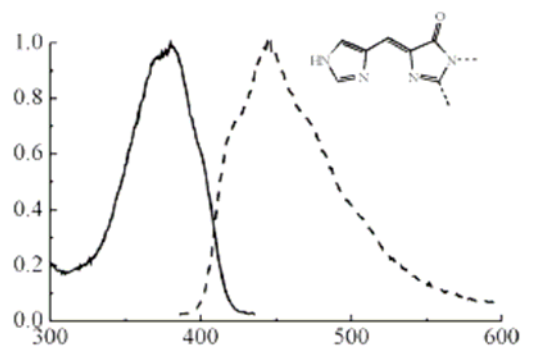


TYR je nahrazen indolem (tzv. class 5)

436 nm → 476 nm

modrozelená luminiscence, rozštěpení píků

Jiné varianty GFP - BFP

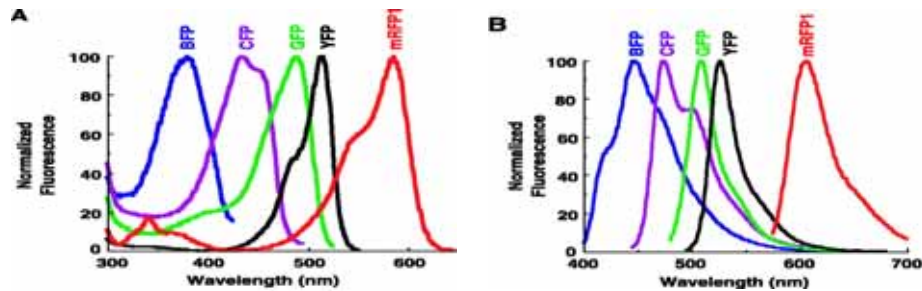


TYR je nahrazen imidazolem (tzv. class 6)

383 nm → 447 nm

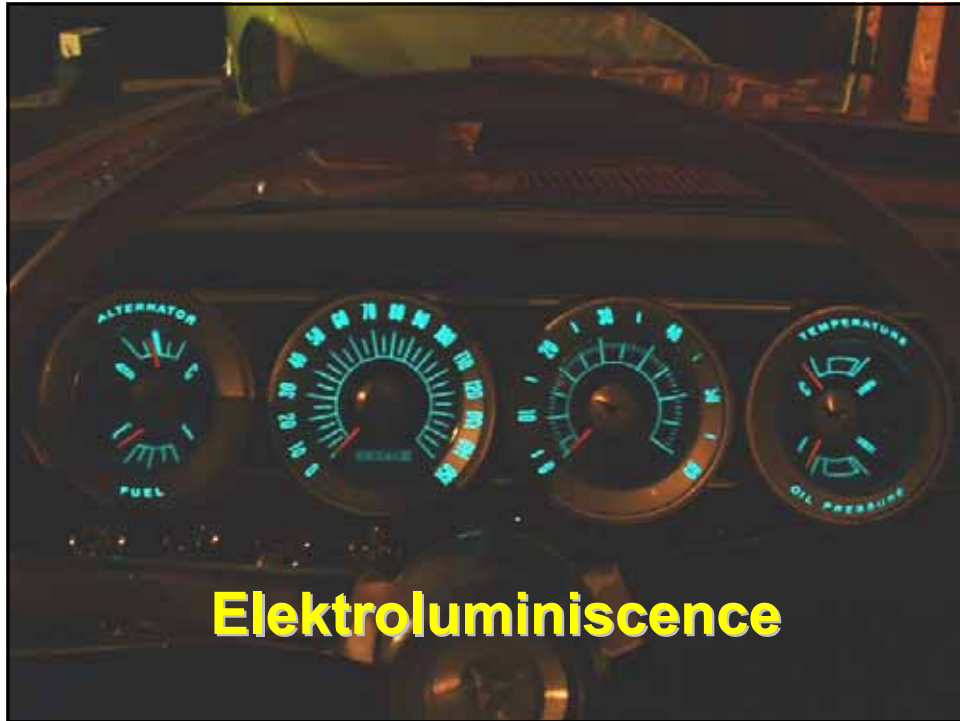
modrá luminiscence – BFP (Blue Fluorescent Protein)

Jiné varianty GFP



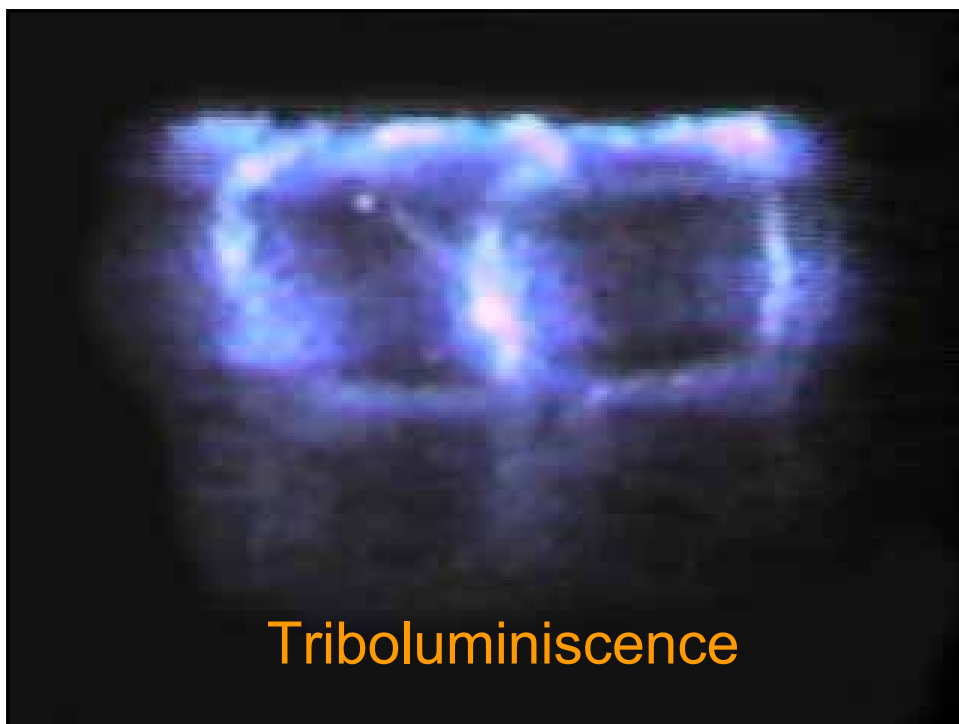
BRET

- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- sledování interakcí v živých organismech
- možnost sledování interakcí (podobně jako FRET), ale alespoň jeden z fluoroforů se ve sledovaném organismu vyskytuje přirozeně



Elektroluminiscence

- materiál emituje světlo působením procházejícího proudu, nebo působením elektrického pole
- většinou se jedná o tzv. radiační rekombinaci (zánik páru díra-volný elektron)
- příklady elektroluminiscenčních materiálů: ZnS dopovaný Ag, nebo Cu



Triboluminescence

- při škrábání, drcení, nebo tření může dojít k přerušení asymetrických vazeb krystalu (cukr, diamant)
- náboj je po přerušení asymetrických vazeb nerovnoměrně rozložen
- při vyrovnání nábojů v krystalu dochází k luminiscenci

Thermoluminiscence

- přírodní krystalické materiály obsahují poruchy v krystalické mřížce (např. obsahují volné ionty, které narušují elektrické pole krystalu)
- jestliže se vytvoří tzv. potenciálová díra v elektrickém poli, může se v ní usadit volný elektron (elektronová past)
- tento volný elektron může být excitován (vesmírné záření, radioaktivita) a v elektronové pasti může být jeho energie zachována i stovky, nebo tisíce let
- termoluminiscenční datování: zahříváním, nebo po ozáření silným světlem získá elektron v tzv. dlouhodobé elektronové pasti dostatek energie, aby se uvolnil
- uvolněná energie se měří
- vhodné pro datování látek, které byly v minulosti ozářeny
- nutná složitá kalibrace