Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr

Oddělení funkční genomiky a proteomiky
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Brno, Česká republika

Proč biofyzikální metody?

- Biofyzikální metody využívají fyzikální principy ke studiu biologických systémů
- Poskytují kvantitativní údaje, což usnadňuje srovnávání různých experimentálních systémů

Proč fluorescence?

- Umožňuje nám vidět pouhým okem, co bychom jinak neviděli

Obsah předmětu

- Absorbční a flouorescenční spektroskopie v biologické analýze molekul
- Vlastní fluorescence proteinů
- Časově ustálená a časově rozlišená fluorescence (Steady state, Time-resolved)
- Zhášení fluorescence, fluorescenční rezonanční přenos energie - použití při sledování strukturních změn molekul
- Anizotropie fluorescence a její změna při interakci makromolekul
- Nevlastní fluorescence - fluorescenční značky, sondy a indikátory
- Fluorescenční značení DNA a proteinů
- Fluorescenční mikroskopie
- Analytické použití fluorescence pro stanovení koncentrace molekul
- Příklady využití fluorescence v biologické praxi

Praktické úlohy

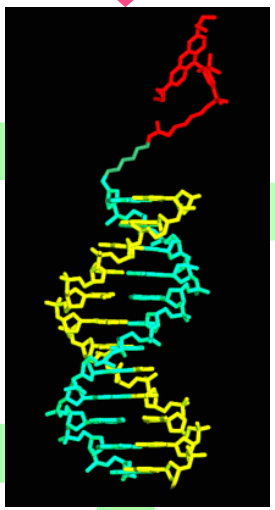
- Měření spektrálních charakteristik proteinů a nukleových kyselin
- Stanovení koncentrace nukleových kyselin a proteinů za použití fluorescence a absorbční spektroskopie (kolorimetrie)
- Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluorescenčních sond
- Měření vlastní fluorescence proteinů
- Příprava fluorescenčně značeného fragmentu DNA
- Vizualizace makromolekul při elektroforetické separaci
- Využití fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) při sledování hybridizace komplementárních řetězců nukleových kyselin
- Sledování změny intenzity fluorescence po relaxaci vlásenkové struktury fluorescenčně značené DNA
- Real-time PCR - detekce amplifikace DNA
- Fluorescenční mikroskopie (fluorescenční *in situ* hybridizace)
- Studium interakce molekul za pomocí anizotropie fluorescence – vazba proteinu a fluorescenčně značené DNA

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

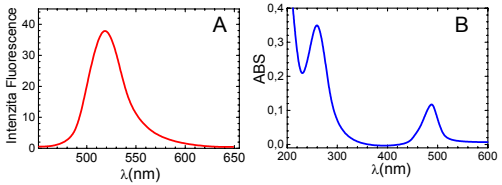
Schematické znázornění metodických přístupů použitých při praktické výuce předmětu

Příprava fluorescenčně značené DNA

Při přípravě fluorescenčně značené DNA se používá **gelová filtrace** pro separaci nenavázaného fluoroforu po značení fragmentu DNA



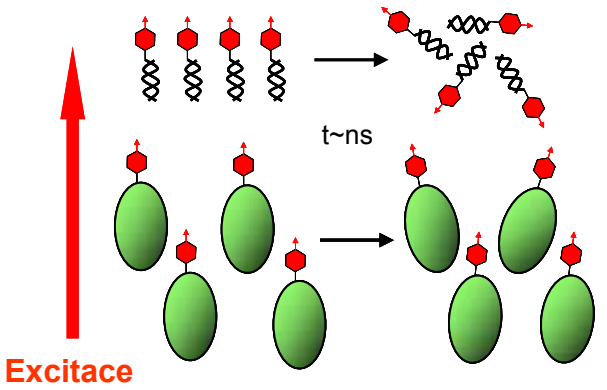
Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA



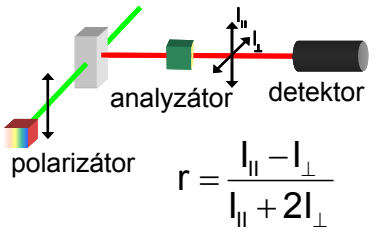
Fluorescenční emisní (A) a UV/Vis absorbční spektrum (B) fluorescenčně značené DNA

Studium vazby DNA a proteinu

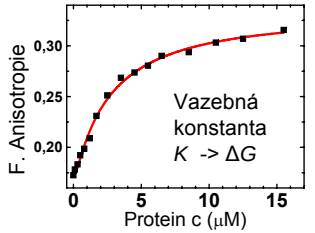
Anizotropie fluorescence



Snížení pohyblivosti po vazbě proteinu => pomalejší změna uspořádání molekul => zvýšení anizotropie fluorescence **r**

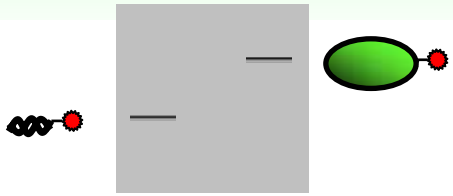


Experimentální uspořádání při měření anizotropie fluorescence **r**



Záznam změny anizotropie fluorescence **r** po vzájemné vazbě proteinu a DNA

Vizualizace molekul při elektroforetické separaci



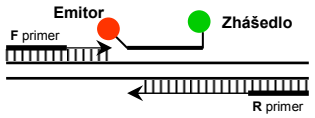
Fluorescenční mikroskopie

sledování hybridizace *in situ*

Metafazové chromozómy po fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)

Real-time PCR

detekce amplifikace DNA



Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA.

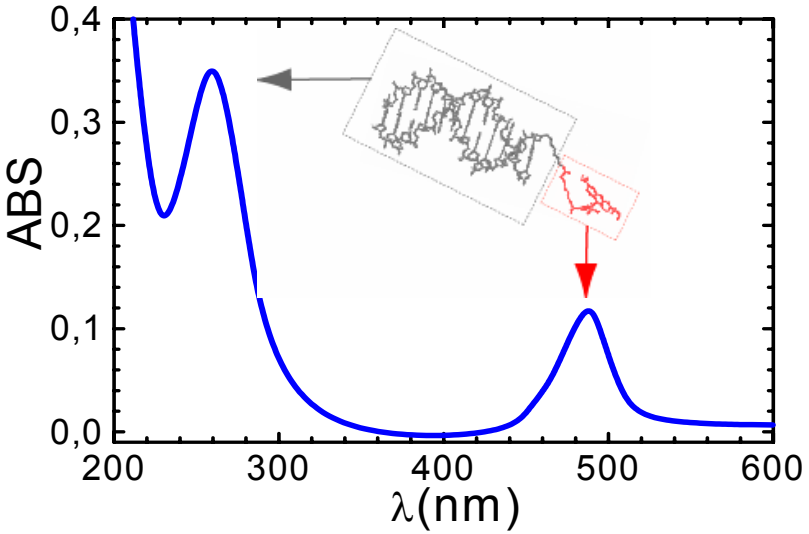
Příprava fluorescenčně značené DNA

Při přípravě fluorescenčně značené DNA se používá **gelová filtrace** pro separaci nenavázaného fluoroforu po značení fragmentu DNA

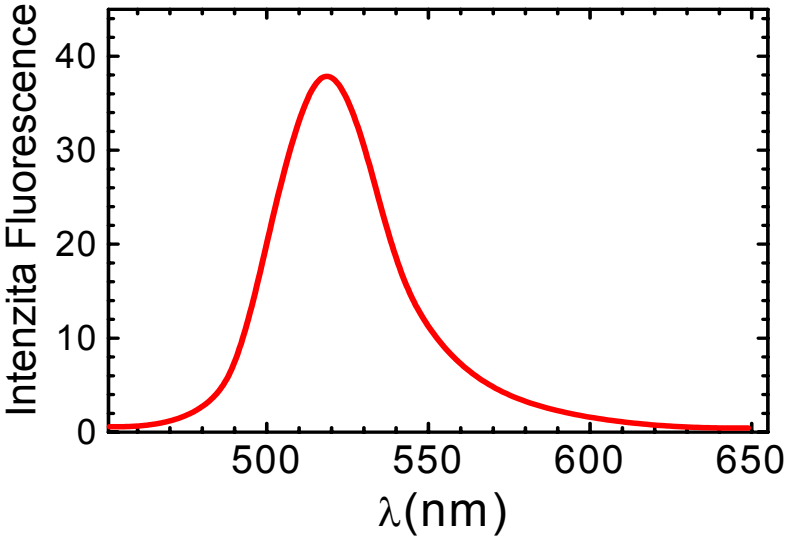
Výhody fluorescenčního značení molekul

- není nutno pracovat s radioaktivitou
- dlouhá životnost značení
- možnost kvantitativního vyhodnocení množství DNA
- vysoká citlivost

Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA

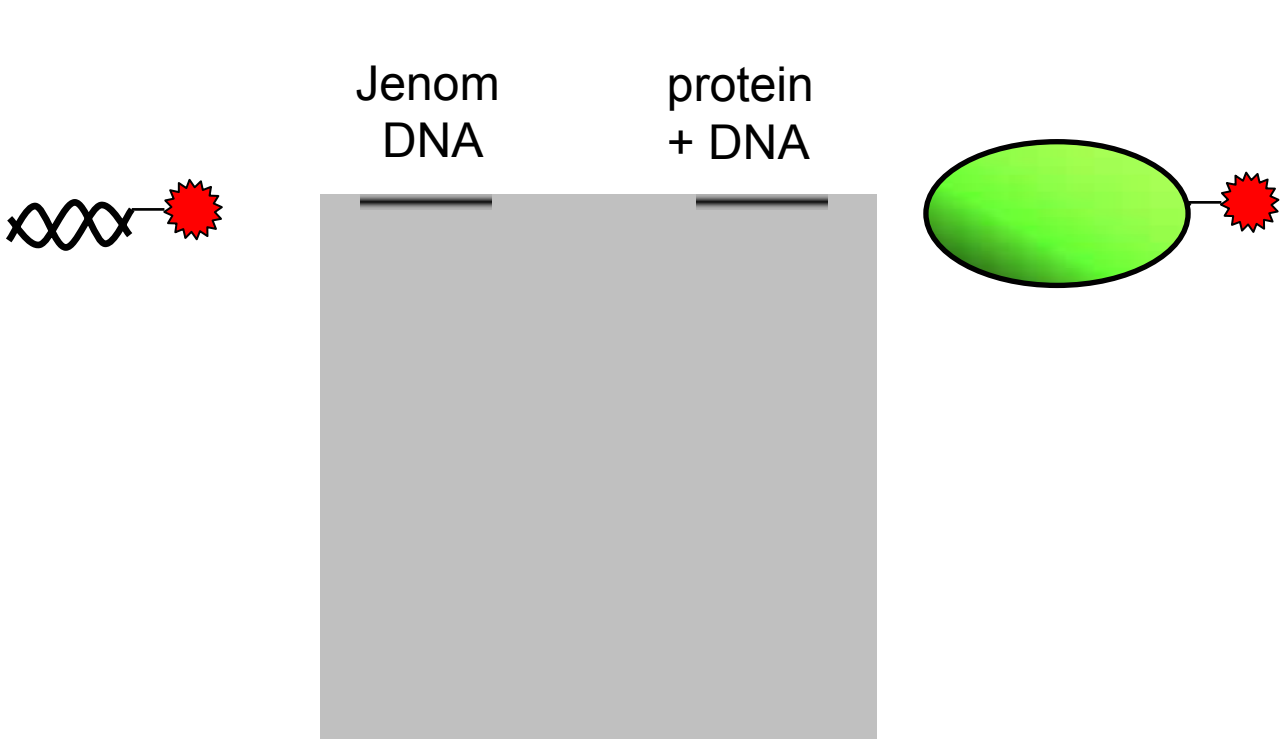


UV/Vis absorbční spektrum (-)

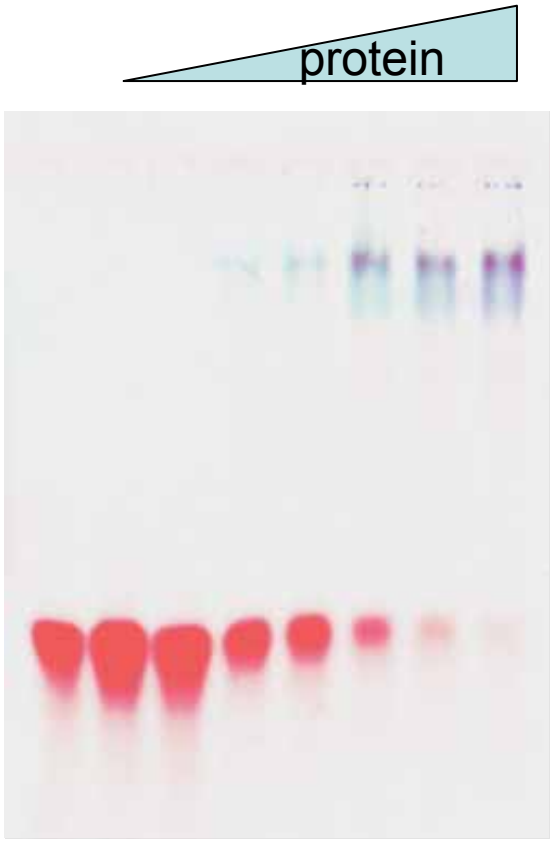


fluorescenční emisní spektrum (-)

Vizualizace molekul při elektroforetické separaci

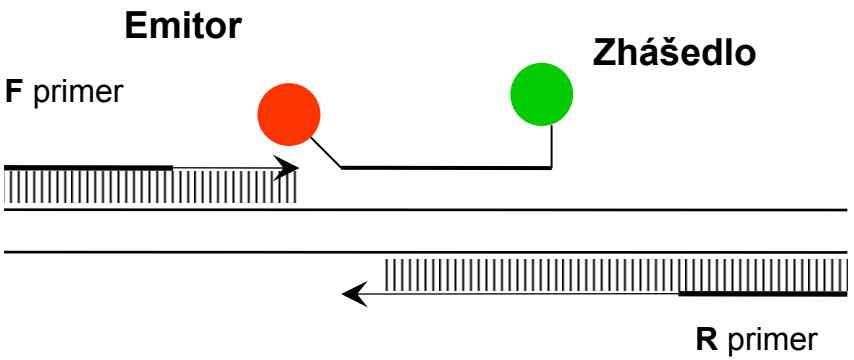


Změna rychlosti putování v PA gelu po vazbě proteinu na DNA

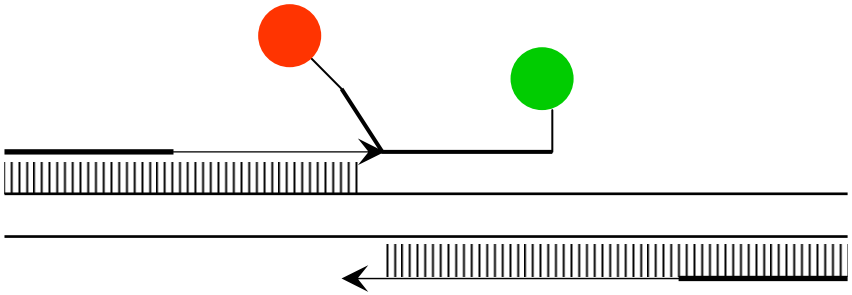


překryv

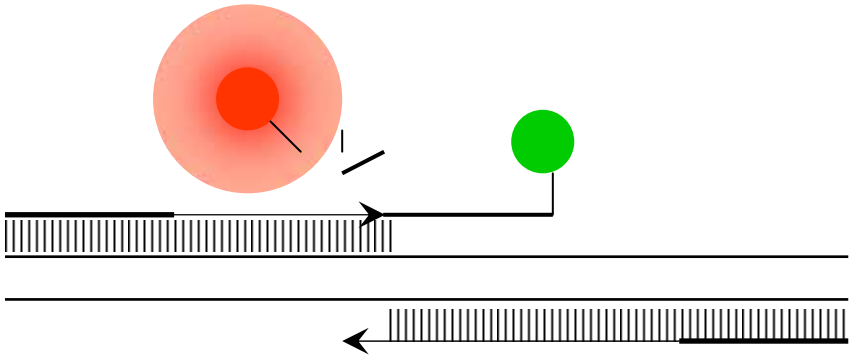
Real-time PCR
detekce amplifikace DNA



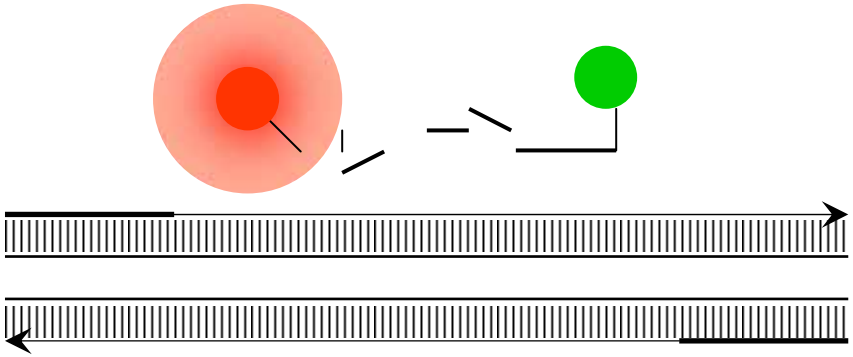
1.Značená sonda se hybridizuje s komplementární sekvencí. Záření Emitoru je zhášeno a není pozorováno.



2.Při polymerizaci dochází k nahrazení sondy novým řetězcem.

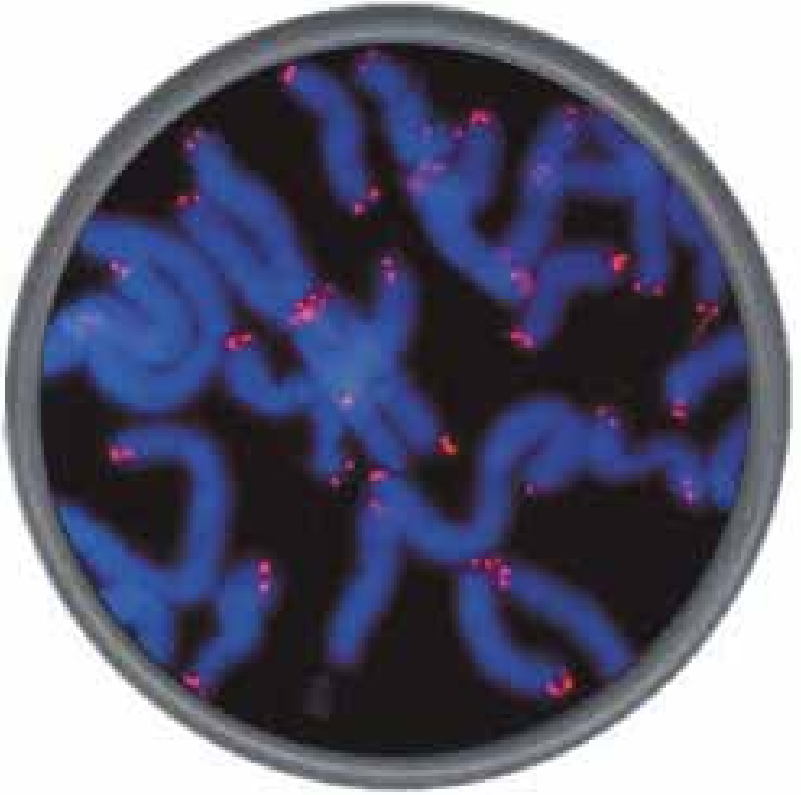


3.Při každém amplifikačním cyklu odštěpuje polymeráza Emitor, jehož záření je detekováno



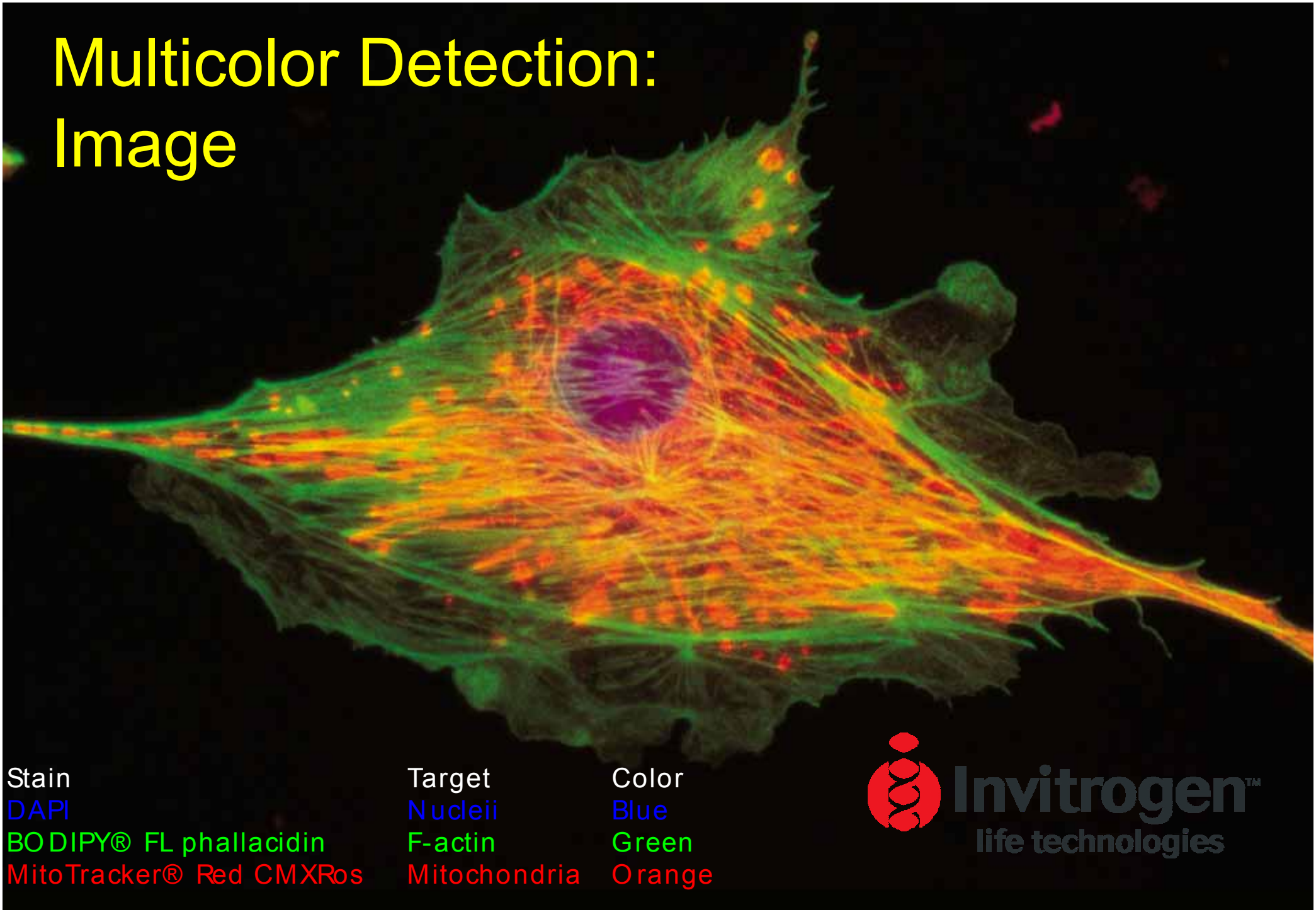
4.Polymerizace je dokončena. Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA.

Fluorescenční mikroskopie sledování hybridizace *in situ*



Metafázové chromozómy po fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)

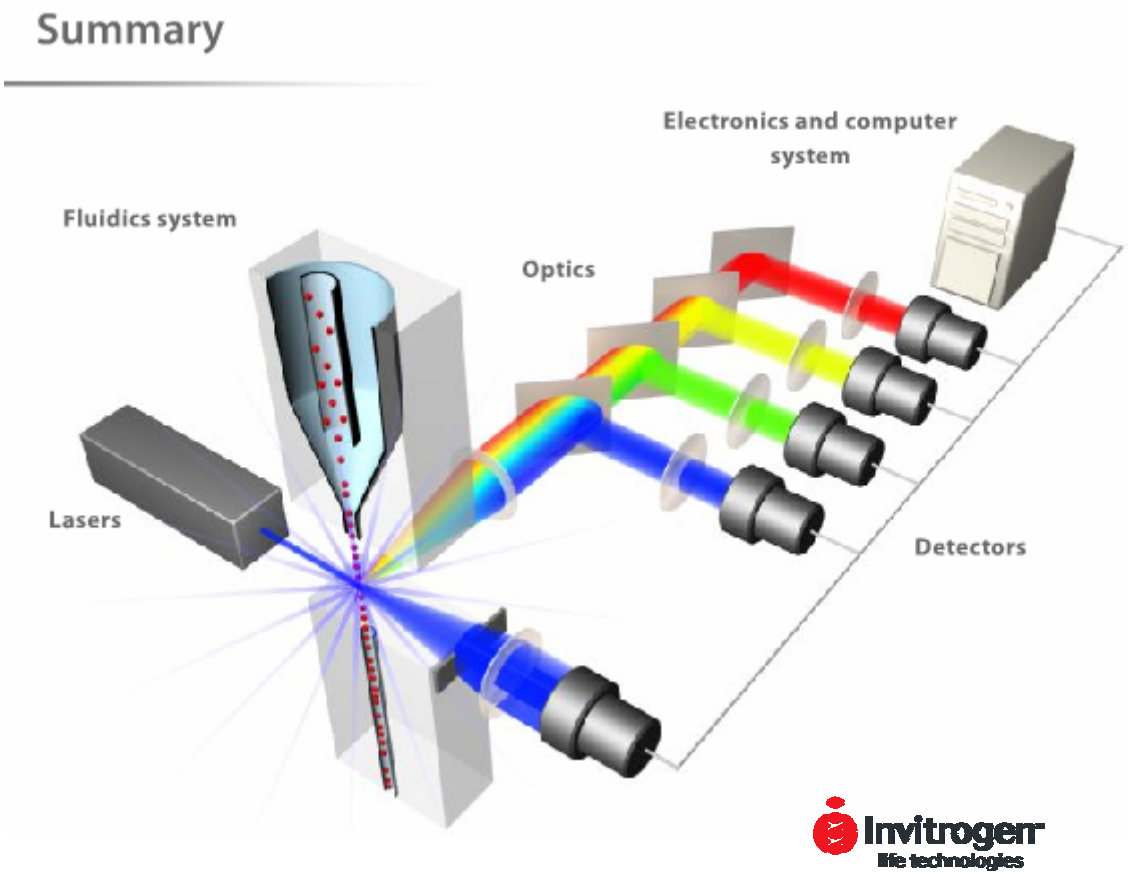
Multicolor Detection: Image



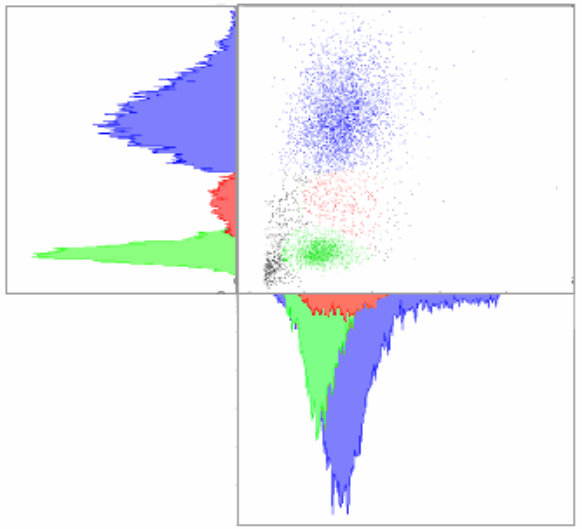
Stain	Target	Color
DAPI	Nucleii	Blue
BODIPY® FL phallacidin	F-actin	Green
MitoTracker® Red CMXRos	Mitochondria	Orange

Invitrogen™
life technologies

Průtoková cytometrie - Flow Cytometry

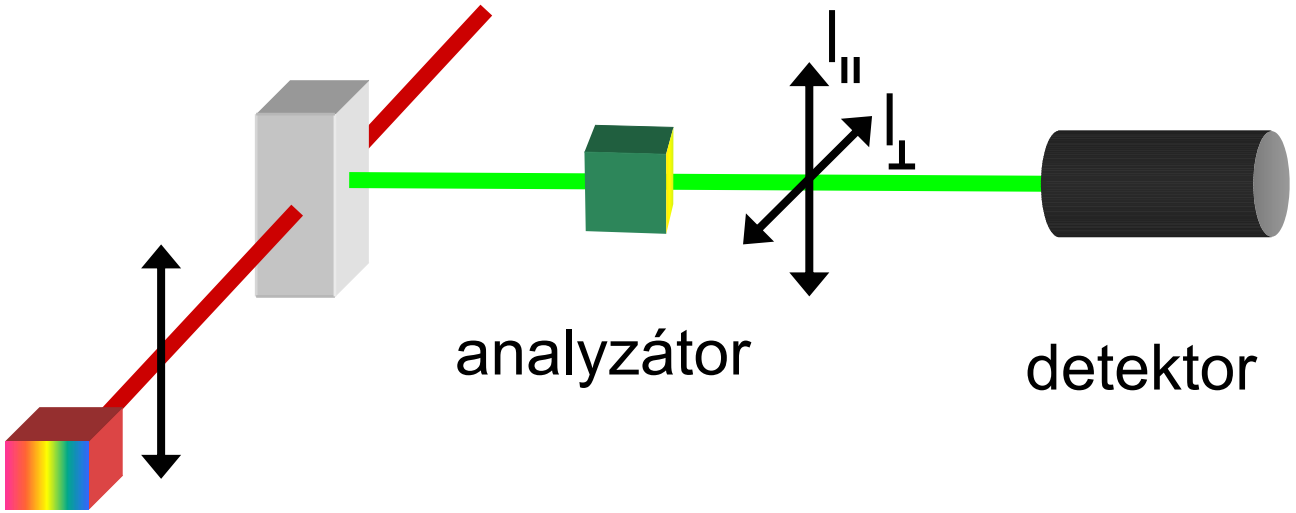


Detekce každé buňky zvlášť



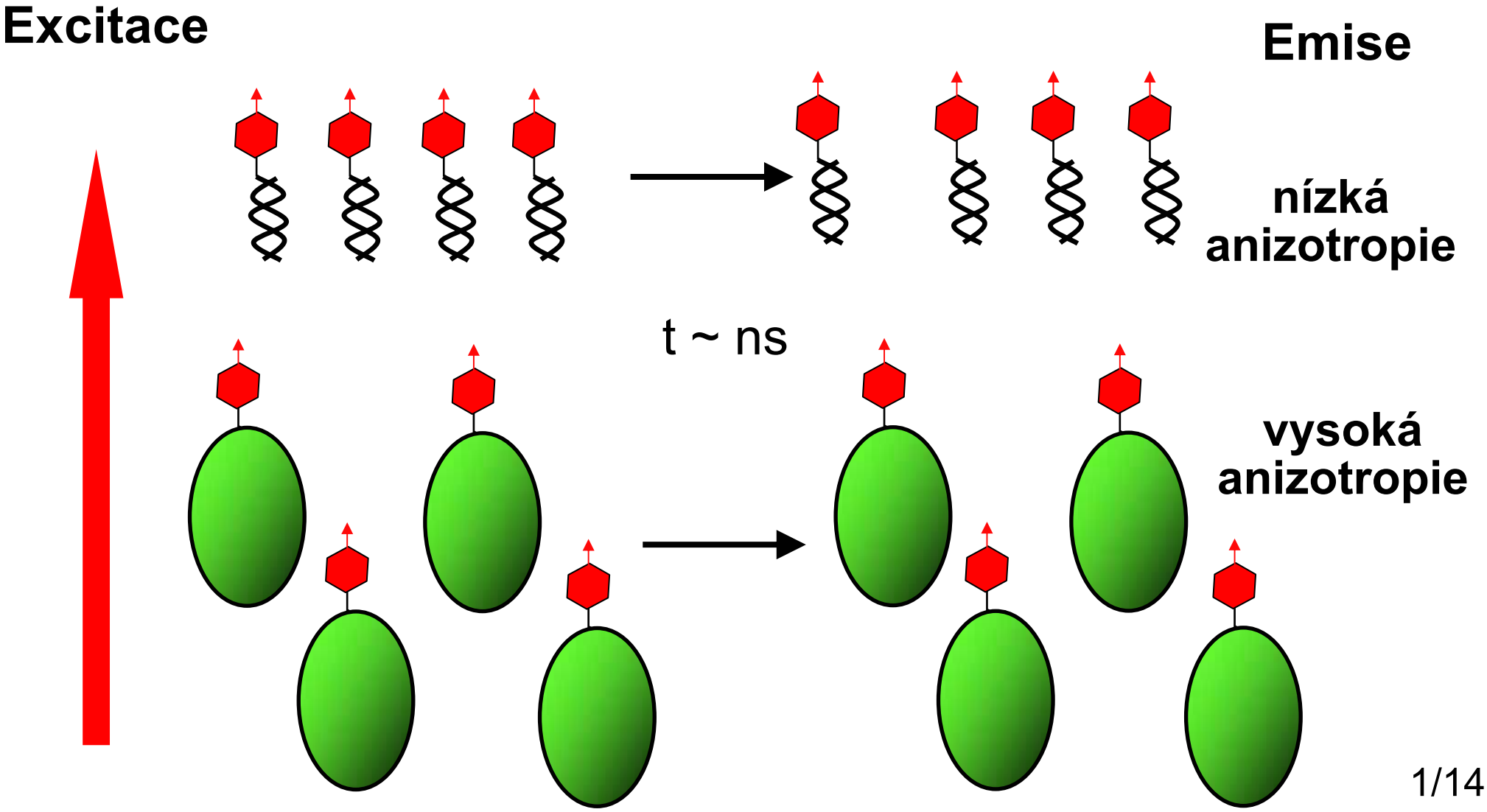
Rozdělení populace buněk podle jejich velikosti a přítomnosti fluorescenčních sond

Fluorescenční anisotropie

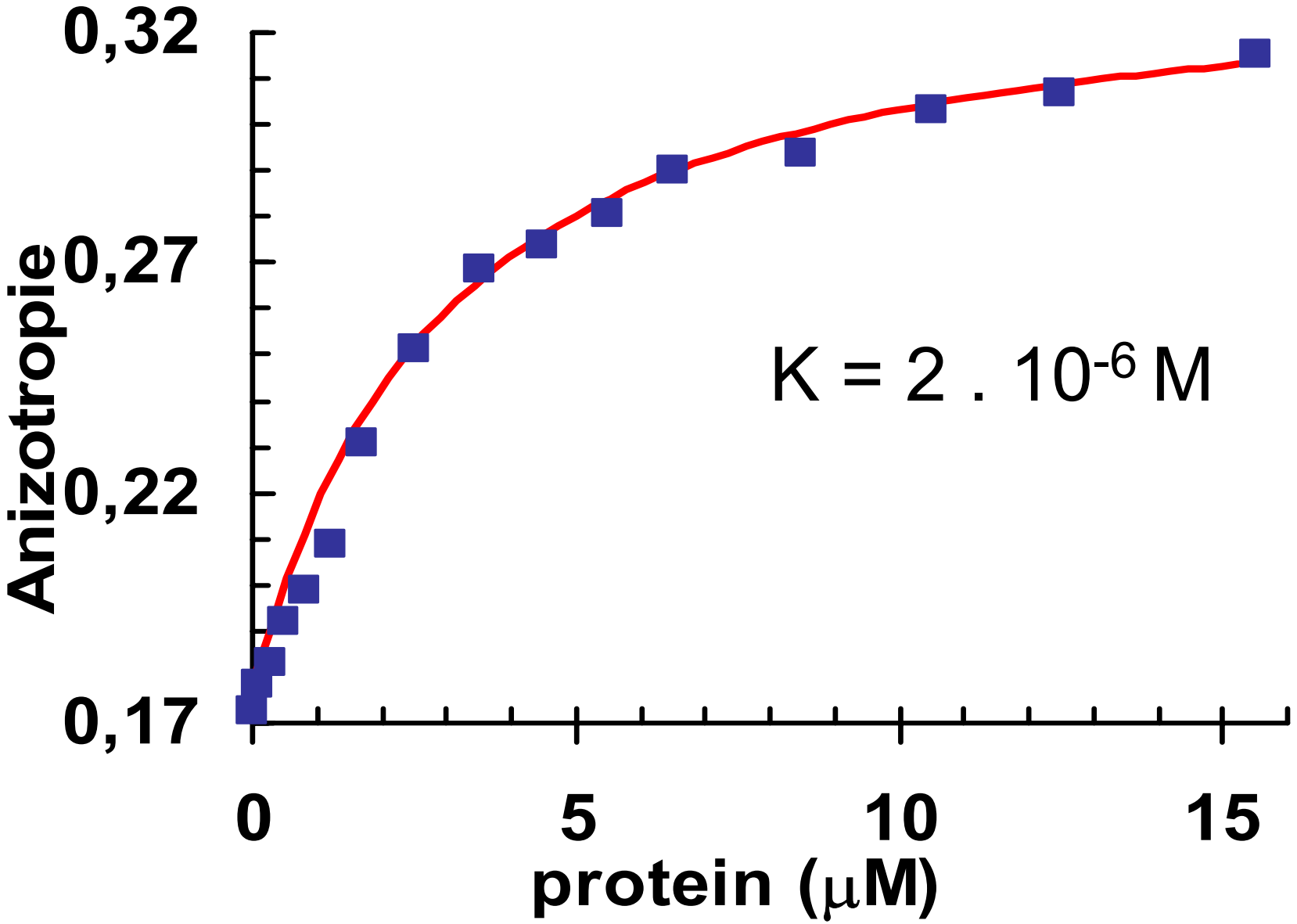
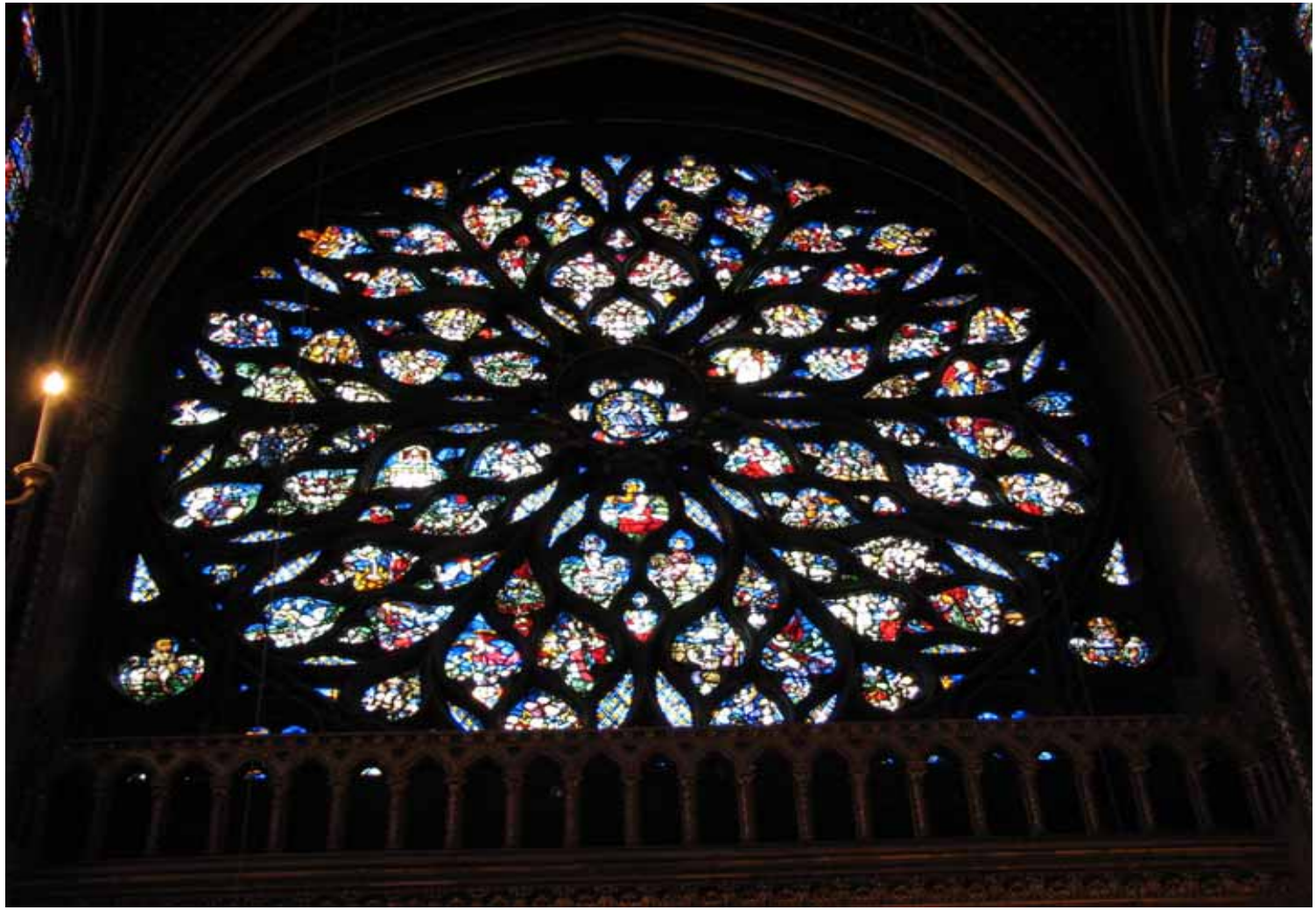


$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Princip sledování vazby makromolekul



Vazba proteinu na DNA



Biofyzikální přístupy kolem nás