

# Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Oddělení funkční genomiky a proteomiky

Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta  
Brno, Česká republika

FGIP

# Proč biofyzikální metody?

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

# Proč fluorescence?

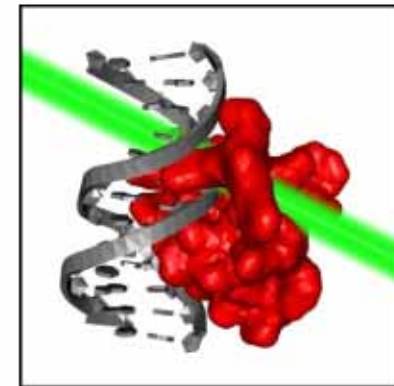
- Umožňuje nám vidět pouhým okem, co bychom jinak neviděli

# Obsah přednášek

- Absorbční a fluorescenční 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

## Přednášky

1. [Základní přehled biofyzikálních metod používaných v biologii](#)
2. [Definice a charakteristiky absorpce, fluorescence a fosforescence](#)
3. [Přístrojové vybavení pro měření - spektrofotometr, spektrofluorometr](#)
4. [Časově ustálená fluorescence \(Steady state\)](#)
5. [Časově rozlišená fluorescence \(Time-resolved\)](#)
6. [Anizotropie fluorescence a její změna při interakci makromolekul](#)
7. [Absorpční spektroskopie v biologické analýze molekul](#)
8. [Zhášení fluorescence, fluorescenční rezonanční přenos energie - použití při sledování strukturních změn molekul](#)
9. [Vlastní fluorescence biologicky významných molekul](#)
10. [Nevlastní fluorescence - fluorescenční značky, sondy a indikátory](#)
11. [Fluorescenční značení DNA a proteinů](#)
12. [Fluorescenční mikroskopie](#)
13. [Analytické použití fluorescence pro stanovení koncentrace](#)
14. [Příklady využití fluorescence v biologické praxi](#)

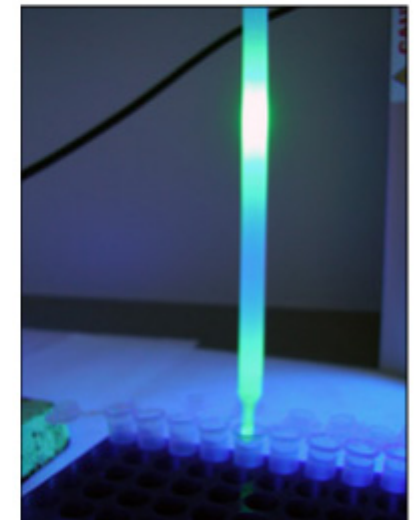


# Praktické úlohy

- Měření spektrálních charakteristik proteinů a nukleových kyselin
- Stanovení koncentrace nukleových kyselin a proteinů za použití fluorescence a absorpční spektroskopie (kolorimetrie)
- Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluorescenčních sond
- Měření vlastní fluorescence proteinů
- Příprava fluorescenčně značeného proteinu nebo 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 pomoci anizotropie fluorescence – vazba proteinu a fluorescenčně značené DNA

### Cvičení - praktické úlohy

1. [Měření spektrálních charakteristik proteinů a nukleových kyselin](#)
2. [Přesné stanovení koncentrace nukleových kyselin a proteinů za použití fluorescence a absorpční spektroskopie](#)
3. [Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluorescenčních sond](#)
4. [Měření vlastní fluorescence albuminu, tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu](#)
5. [Příprava fluorescenčně značeného proteinu](#)
6. [Spektroskopická charakteristika fluorescenčně značené DNA a proteinu](#)
7. [Vizualizace makromolekul při elektroforetické separaci](#)
8. [Real-time PCR - detekce amplifikace DNA](#)
9. [Mikroskopie živých rostlin značených GFP](#)
10. [Fluorescenční mikroskopie \(fluorescenční in situ hybridizace\)](#)
11. [Studium vazby molekul za pomoci anizotropie fluorescence – vazba proteinu a fluorescenčně značené DNA](#)





# Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

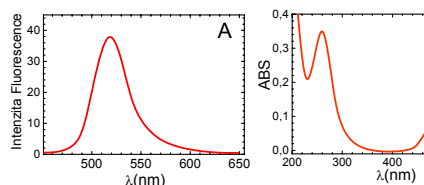
Schematické znázornění metodických přístupů použitých při praktické výuce předmětu

## Příprava fluorescenčně značené DNA



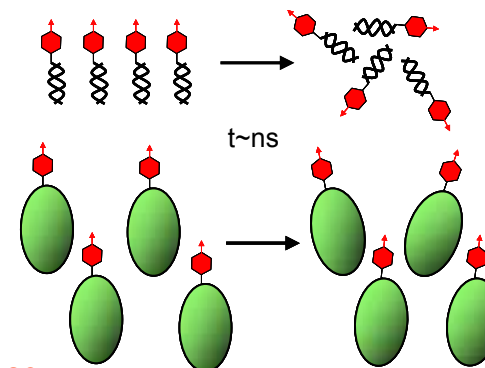
Při přípravě fluorescenčně značené DNA se používá **gelová filtrace** pro separaci nenávaného fluoroforu po značení fragmentu DNA

## Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA



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

## Studium vazby DNA a proteinu Anizotropie fluorescence



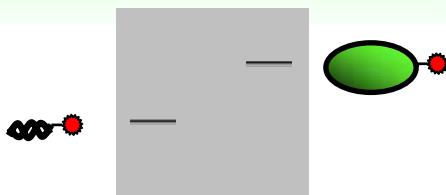
nízká anizotropie

vysoká anizotropie

Excitace

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

## Vizualizace molekul při elektroforetické separaci

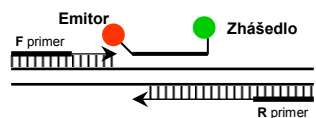


## Fluorescenční mikroskopie sledování hybridizace *in situ*

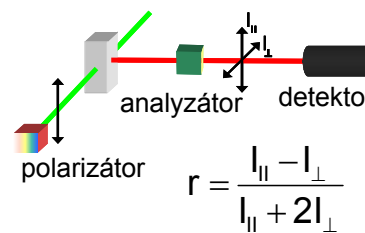


Metafázové chromozómy po fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)

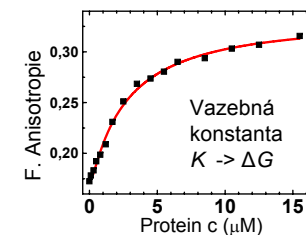
## Real-time PCR detekce amplifikace DNA



Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA.



Experimentální uspořádání při měření anizotropie fluorescence  $r$



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

# Příprava fluorescenčně značené DNA



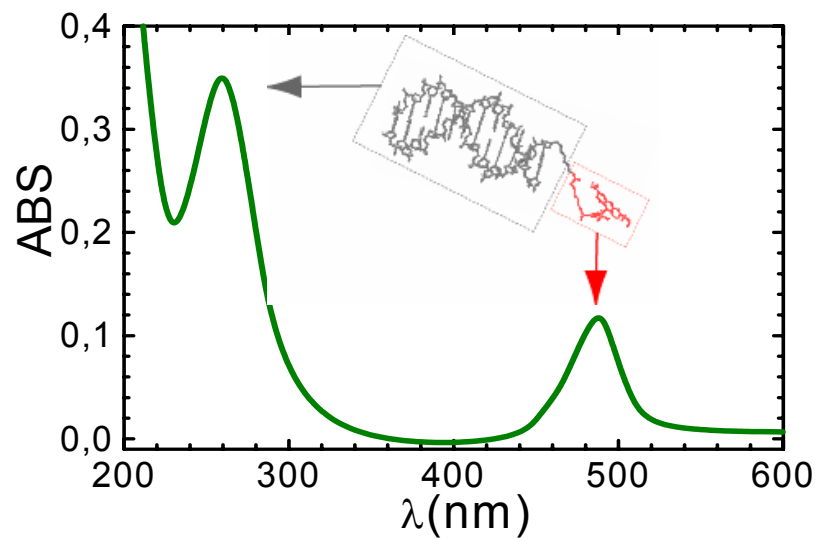
Při přípravě fluorescenčně značené DNA se používá **gelová filtrace** pro separaci nenavázaného fluoroforu po značení fragmentu DNA

## Výhody fluorescenčního značení molekul

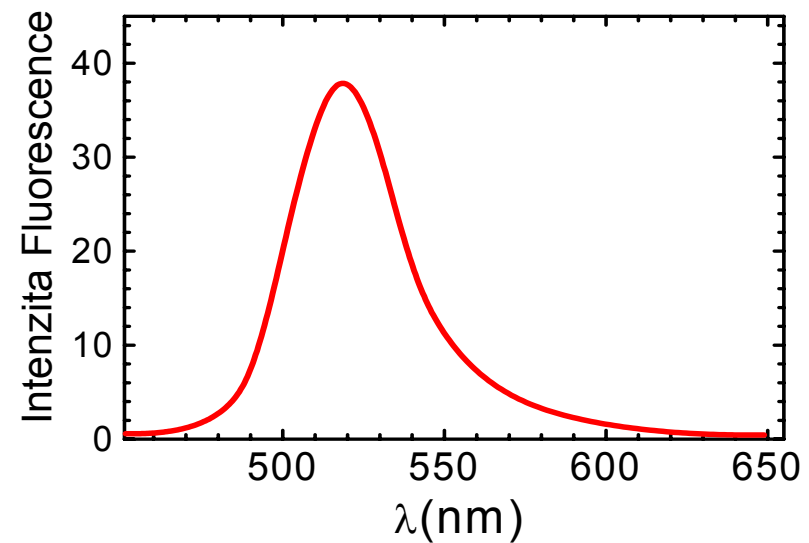
- není nutno pracovat s radioaktivitou
- dlouhá životnost značení
- možnost kvantitativního vyhodnocení množství DNA
- vysoká citlivost



# Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA

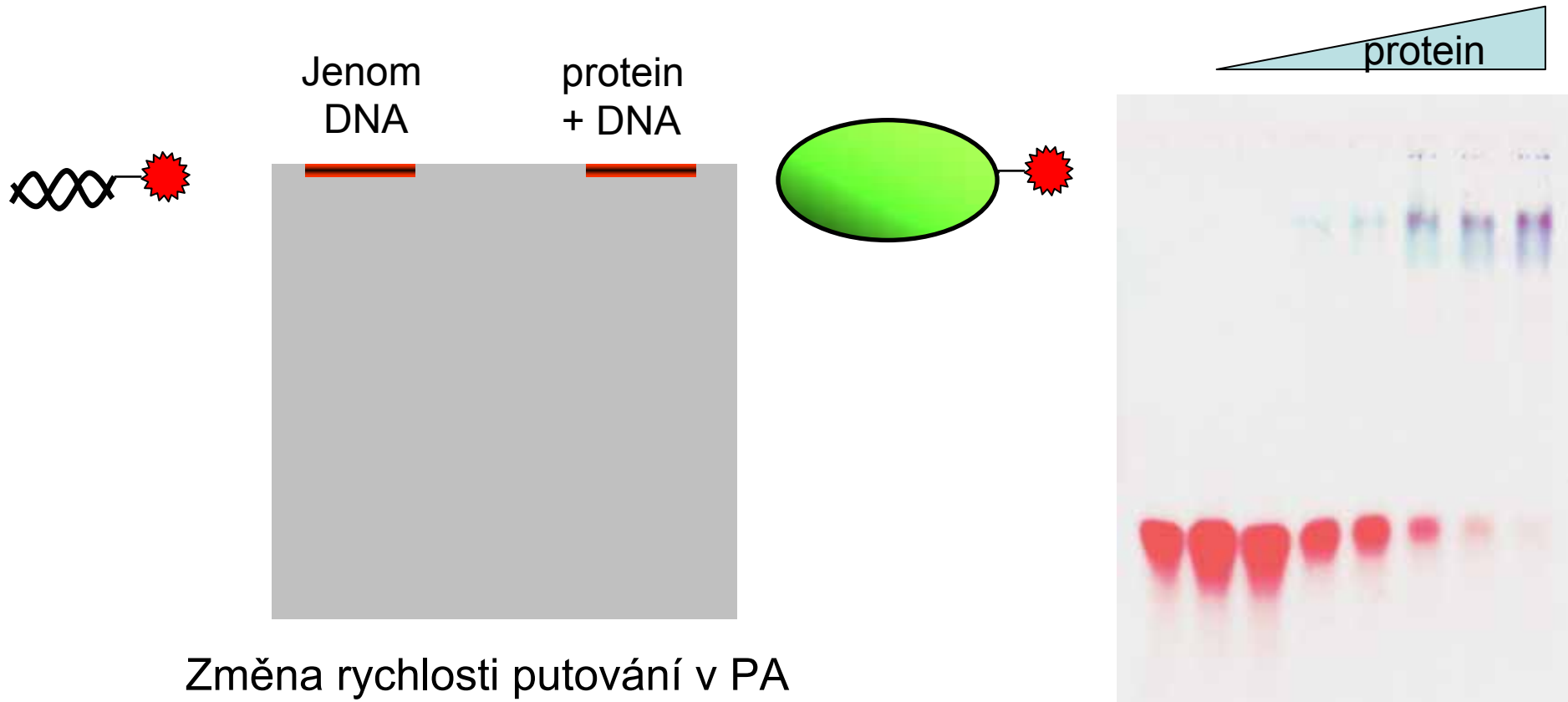


UV/Vis absorbní spektrum (-)



fluorescenční emisní spektrum (-)

# Vizualizace molekul při elektroforetické separaci

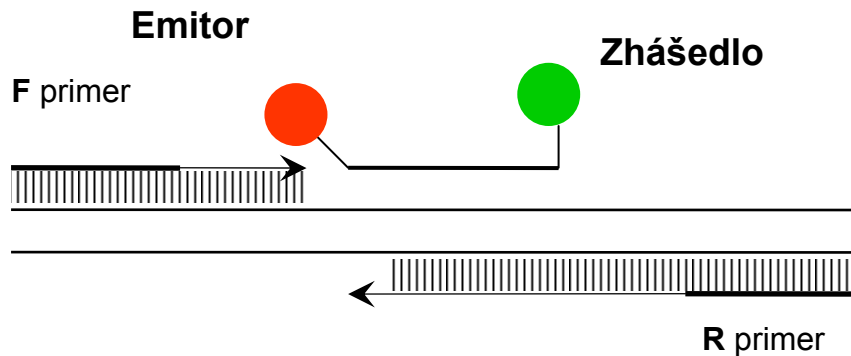


Změna rychlosti putování v PA gelu po vazbě proteinu na DNA

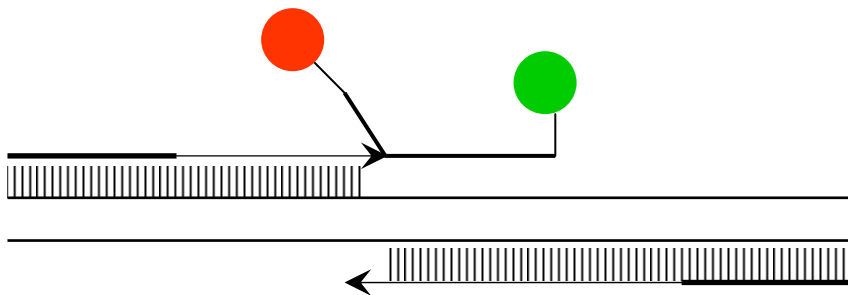
fluorescence  
Coomasie

# Real-time PCR

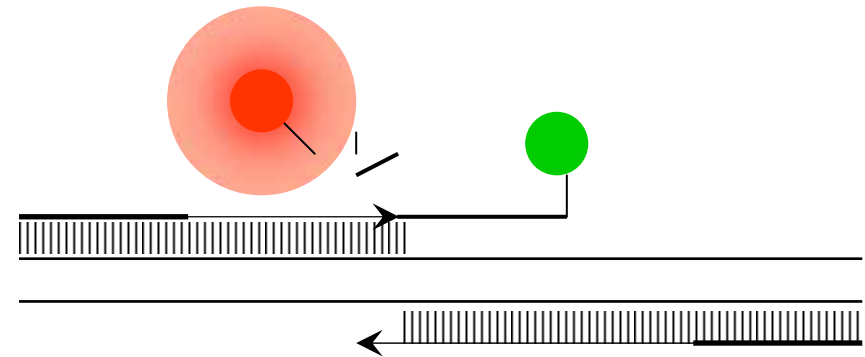
## detekce amplifikace DNA



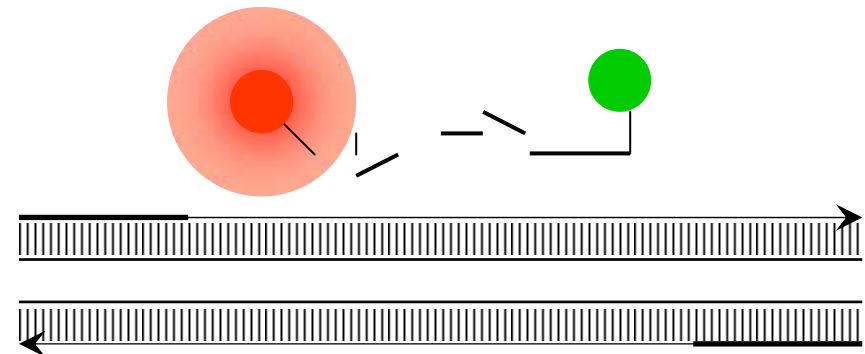
1. Značená sonda se hybridizuje s komplementární sekvencí. Záření Emitoru je zhaseno a není pozorováno.



2. Při polymerizaci dochází k nahrazení sondy novým řetězcem.

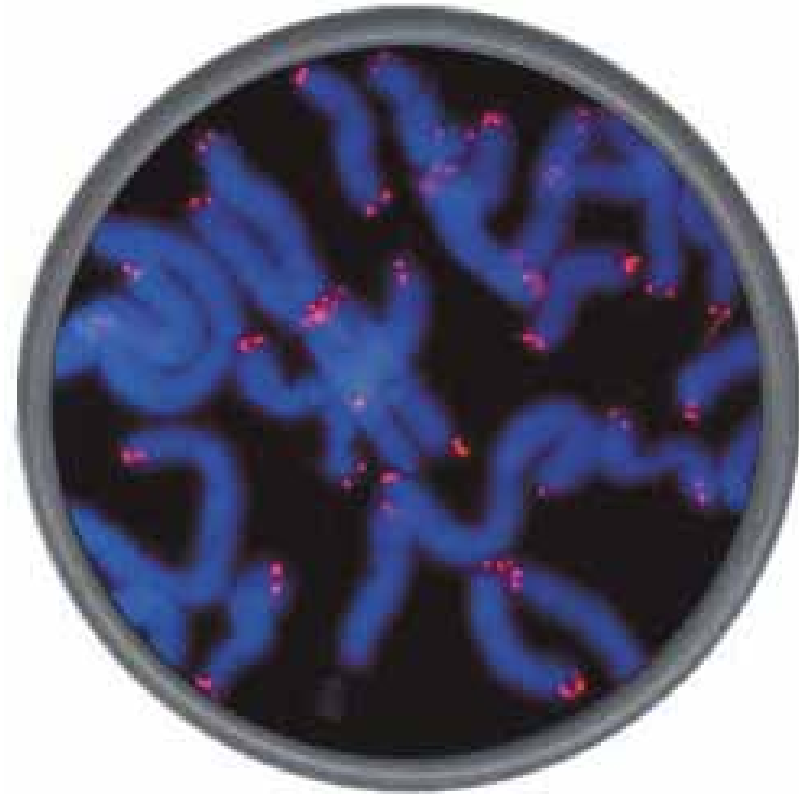


3. Při každém amplifikačním cyklu odštěpuje polymeráza Emitor, jehož záření je detekováno



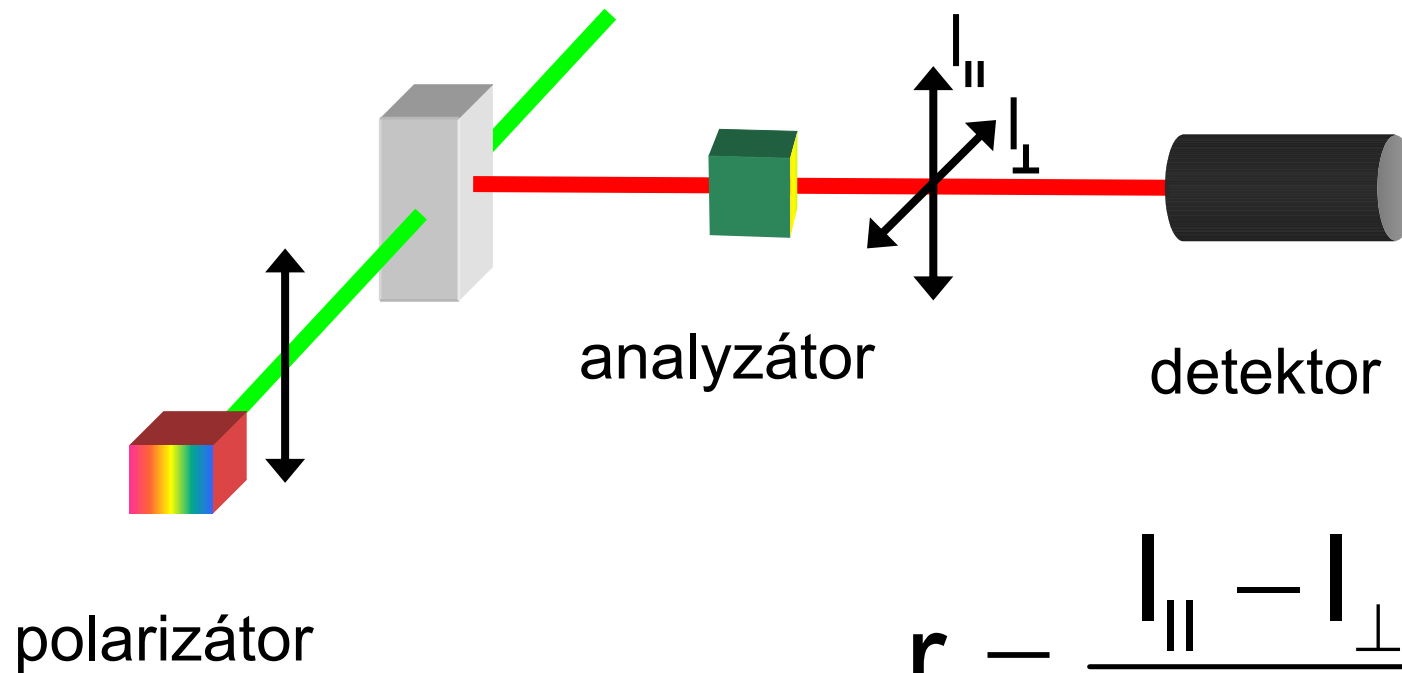
4. Polymerizace je dokončena. Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA

# Fluorescenční mikroskopie sledování hybridizace *in situ*



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

# Fluorescenční anizotropie

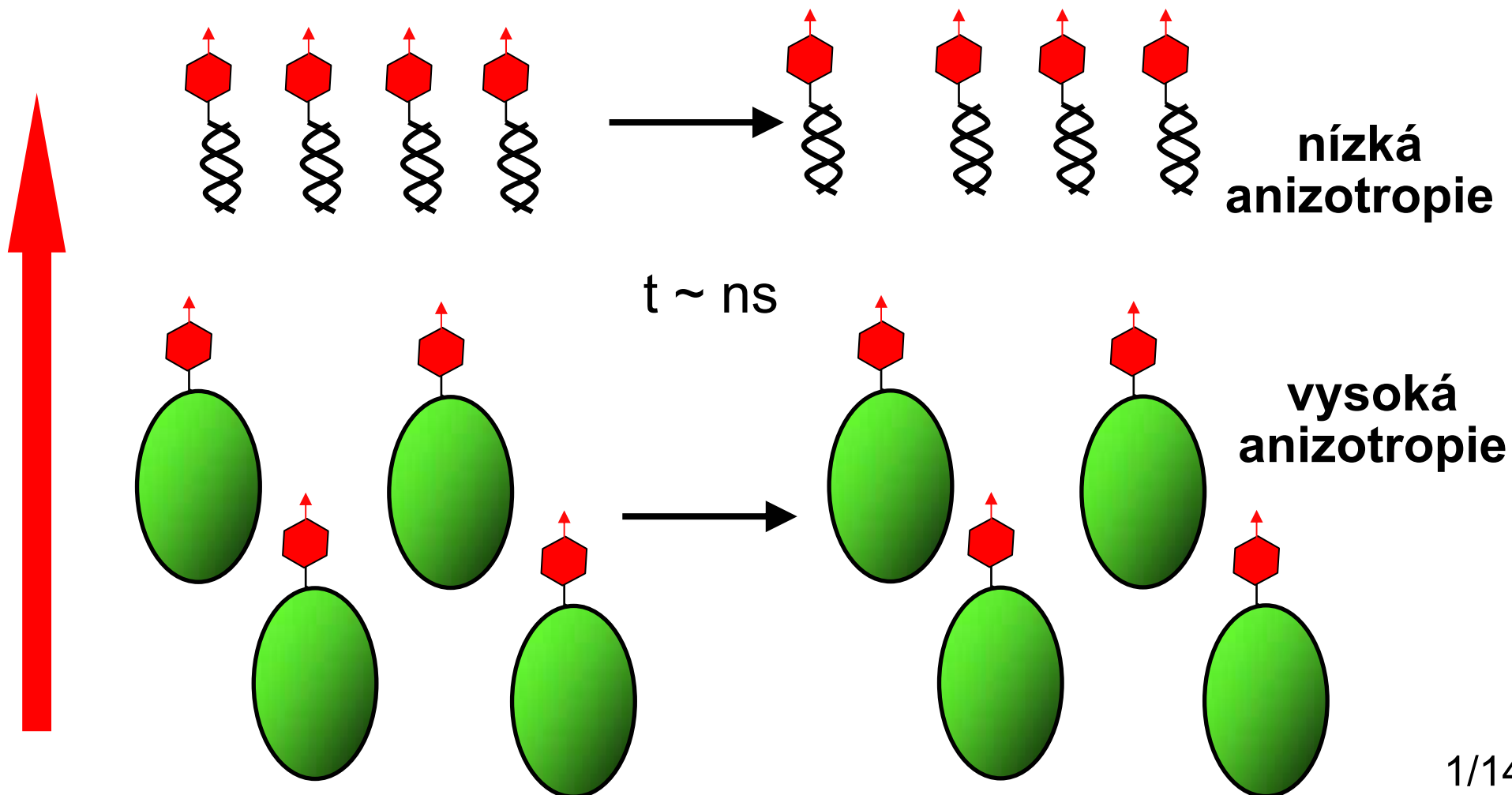


$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

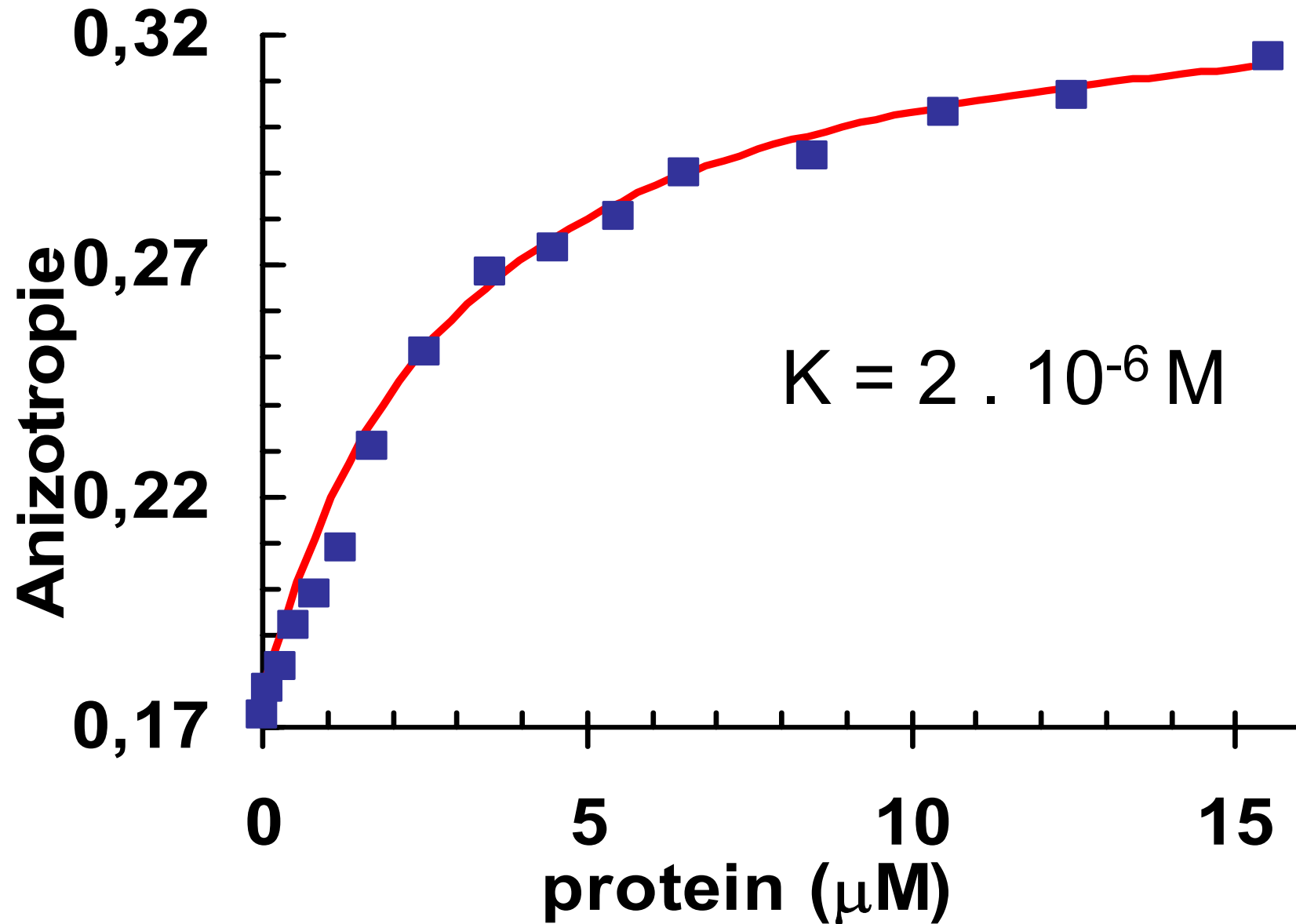
# Princip sledování vazby makromolekul

Excitace

Emise



# Vazba proteinu na DNA

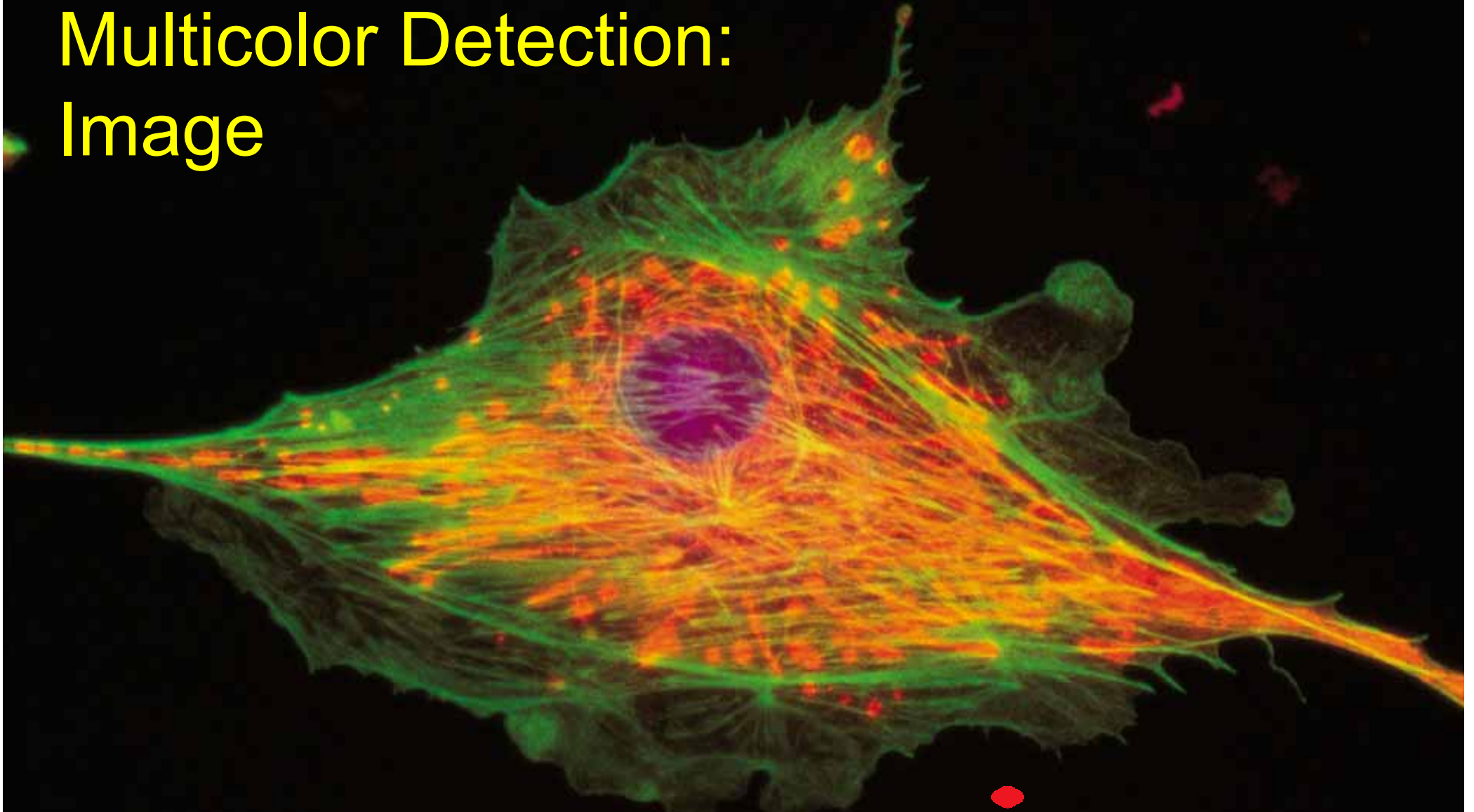




# Kde se dají využít získané znalosti?

- Tam, kde se setkáte v praxi s fluorescencí a fluorescenční spektroskopií
- Když máte vzorku **málo** pro klasické metody detekce, zviditelníte si ho pomocí fluorescence
- V každodenní laboratorní praxi
- **V navazujících cvičeních Bi7230c !**

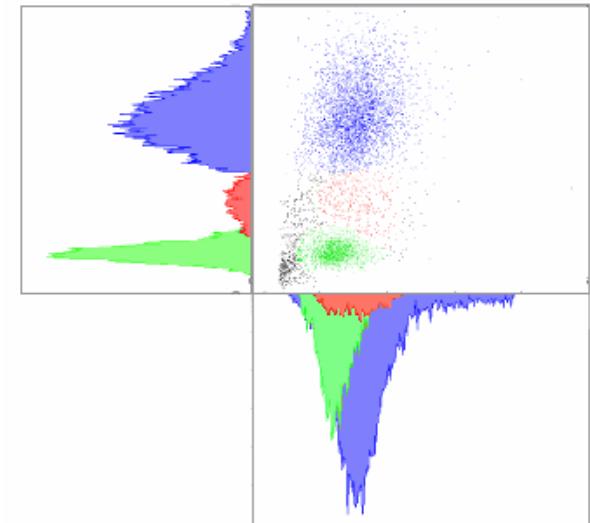
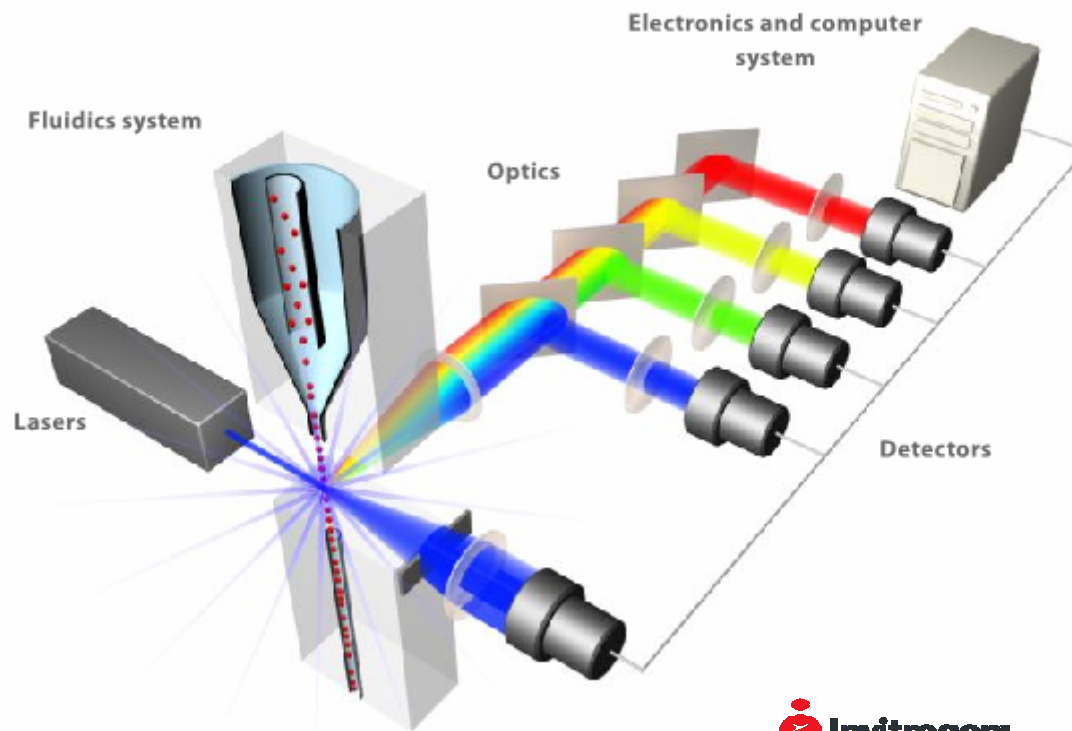
# Multicolor Detection: Image



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

# Průtoková cytometrie - Flow Cytometry

## Summary



Detekce každé buňky zvlášť



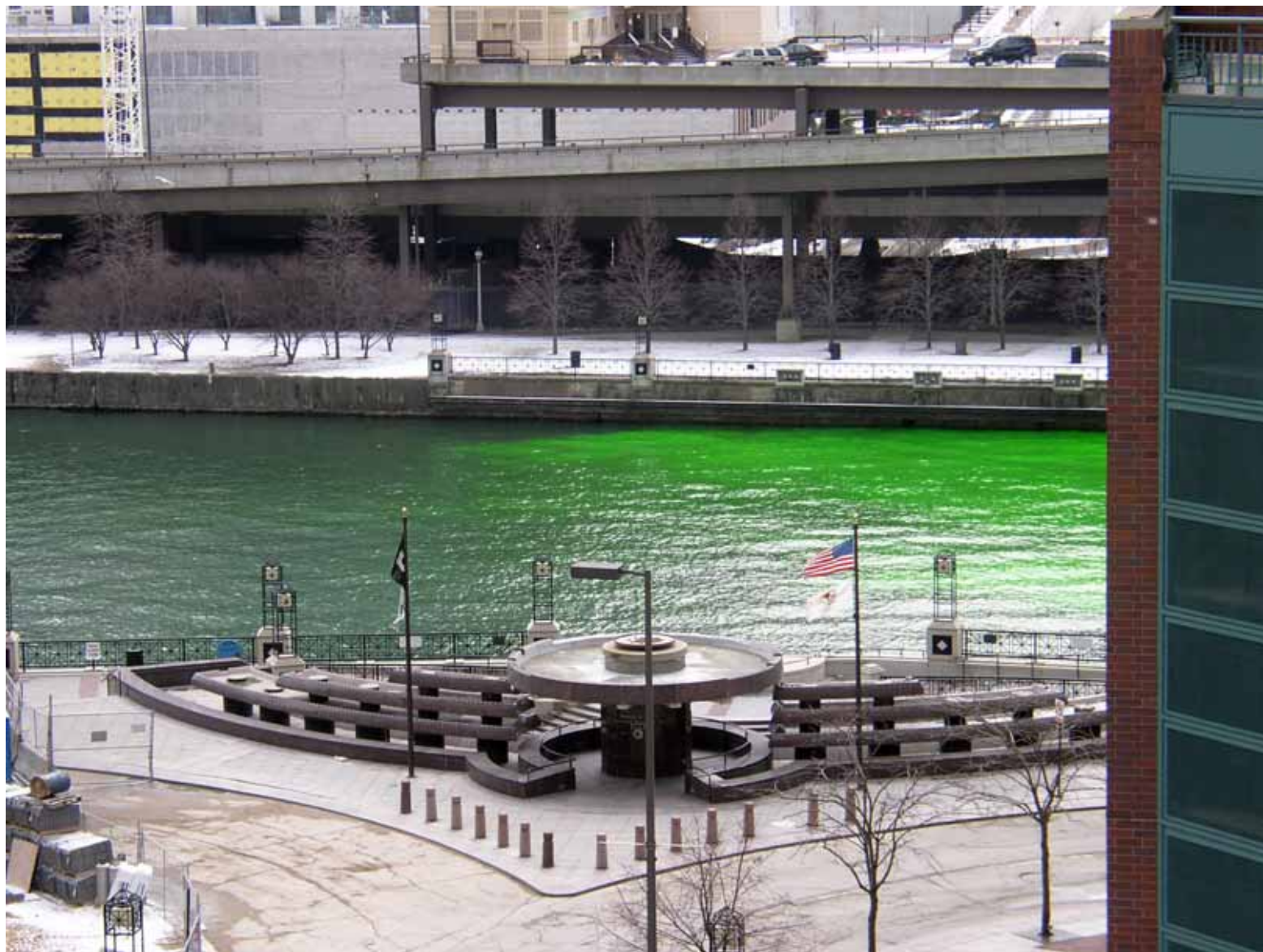
Rozdělení populace buněk podle jejich velikosti a přítomnosti fluorescenčních sond

# Biofyzikální přístupy kolem nás





# Fluorescence, kde bychom ji nečekali



# Příště: Co všechno svítí na diskotéce?

