

Fluorescenční metody při studiu biomolekul

Ctirad Hofr

Molekulární komplexy chromatinu
CEITEC
Přírodovědecká fakulta
8. listopad 2013



Přehled I

1. Jak zviditelnit, co nevidíme?
2. Jak přispělo víno k objevení fluorescence?
3. Jak lze změřit fluorescenci?
4. Jak lze zlepšit viditelnost fluorescence?

1. Jak zviditelnit, co nevidíme?

Za použití **fluorescence!**

Umožňuje nám vidět pouhým okem,
co bychom jinak neviděli

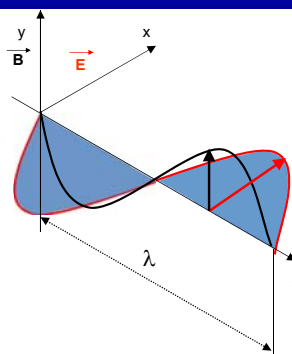
Příklady fluorescence živočichů



Co je to fluorescence?

- Emise z excitovaných singletových stavů elektronů
- Prakticky: fluorescenci pozorujeme během buzení a po jeho vypnutí rychle mizí
- Doba dohasínání τ (Lifetime) je průměrný čas, který uplyne od excitace po emisi – je řádově **1 – 10 nanosekund**

Světlo = elektromagnetická vlna



$$c = \lambda f$$

c je konstanta, pak
jestliže se zvýší vlnová délka,
musí se snížit frekvence, aby
byl součin konstantní.

Vlnová délka λ je nepřímo
úměrná frekvenci f

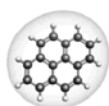
$$E = h f$$

Čím je větší frekvence, tím je
větší energie záření.

Čím je větší vlnová délka λ ,
tím je menší energie záření.

Koloběh života fluoroforu

Fluorophore in Ground State



Fluorophore



Energy levels

Vydáno se souhlasím s podmínkami licencování

Spektrum fluoroforu

• Excitační/Absorpční spektrum

Závislost intenzity absorpce/fluorescence na excitační vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření

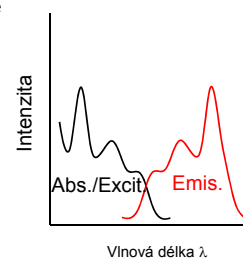
• Emisní spektrum

Závislost intenzity fluorescence na emisní vlnové délce při konstantní vlnové délce

• Nejdůležitější charakteristiky spektra:

maxima

Stokesův posuv



Vznik absorpčního=excitačního spektra

Excitation Range

Dye solution

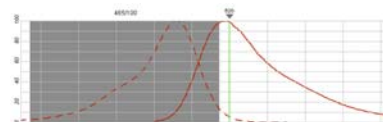


Vydáno se souhlasím s podmínkami licencování

Excitační spektrum

Závislost intenzity fluorescence na excitační vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření

$$\lambda_{EX} \text{ scan} \quad \lambda_{EM} = \text{konst.}$$

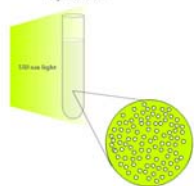


10

Vznik emisního spektra

Emission Range

Dye solution

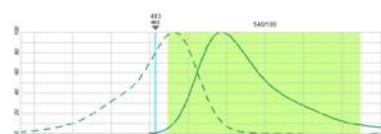


Vydáno se souhlasím s podmínkami licencování

Emisní spektrum

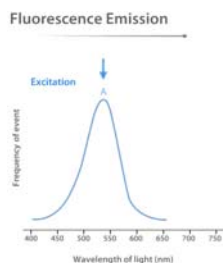
Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní excitační vlnové délce

$$\lambda_{EX} = \text{konst.} \quad \lambda_{EM} \text{ scan}$$



12

Závislost emisního spektra na excitačním světle

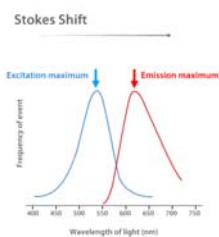


Stokesův posun

Emitované světlo má vždy menší energii (větší vlnovou délku) než je energie absorbovaného světla (menší λ).

Rozdíl mezi maximem absorpčního a maximem fluorescenčního emisního spektra je specifická charakteristika daného fluoroforu.

Vznik Stokesova posunu



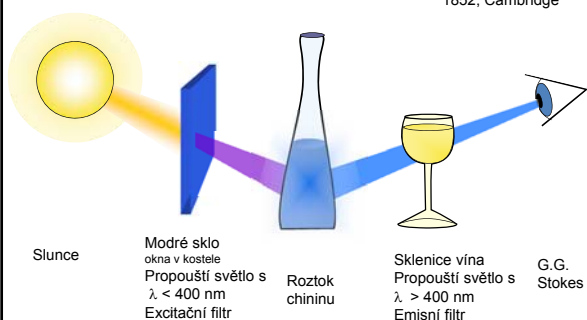
15

Jak přispělo víno k objevení fluorescence?



Experiment G. G. Stokes

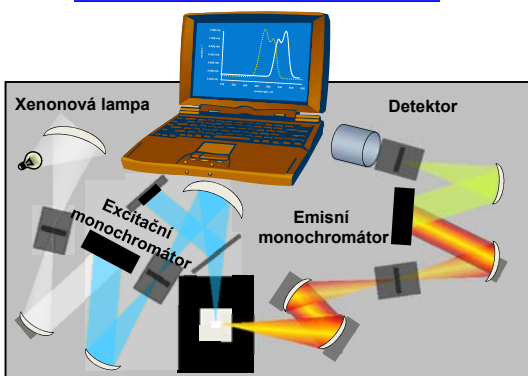
1852, Cambridge



Přístroje pro měření fluorescence

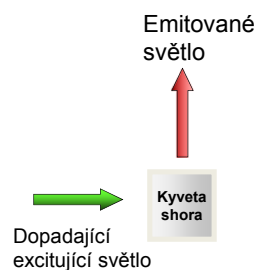
1. **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky
2. **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
3. **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
4. **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací

SpektoFLUORometr



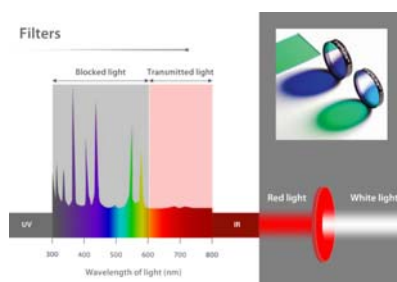
Poskytnuto HORIBA Jobin Yvon

Geometrie při měření fluorescence



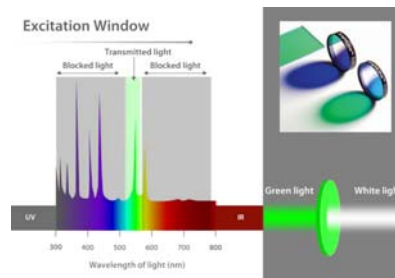
Filtr pro výběr excitačního světla I

- Long Pass filtr

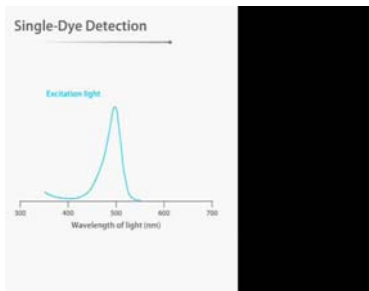


Filtr pro výběr excitačního světla II

- Band Pass filtr



Filtr emitovaného světla zlepší viditelnost fluorescence



Dokumentační systém

„intelligentní temná komora“

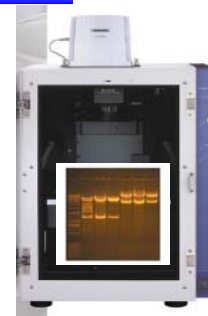
Umožňuje stanovit hodnotu lokální optické absorpce i fluorescence

Zdrojem univerzálního budícího záření je zpravidla transiluminátor, který emituje v UV oblasti.

Zdrojem selektivního budícího záření jsou LED diody na bočních stranách

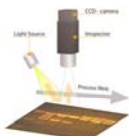
Emitované světlo je selektováno **filtry** v otočném karuselu.

Emise je sledována (digitálním) fotoaparátem nebo chlazeným CCD **detektorem**

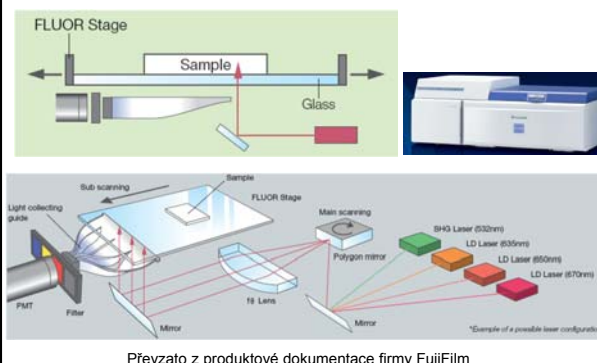


Fluorescenční scanner

- Snímá oblast a sleduje závislost intenzity emise fluorescence při daném excitačním záření
- Používá se k detekci fluorescenčně značených a barvených molekul po elektroforetické separaci

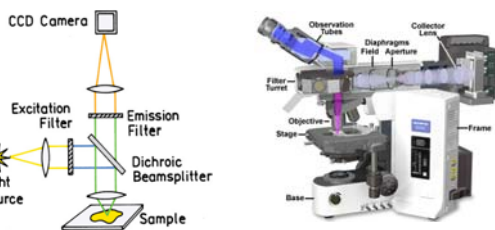


Fluorescenční scanner - schéma



Fluorescenční mikroskop

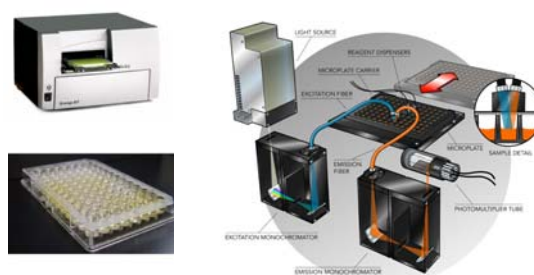
Hlavní rozdíl oproti spektrometrum :
nepoužívá monochromátory, ale **excitační a emisní filtr**



Převzato z J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy,
Third Edition, Springer, 2006

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/lightpaths/fluorescence/index.html>

Čtečka mikrodestiček



Převzato z přístrojové dokumentace
Biotek

Shrnutí I

- | | |
|---|-------------------|
| 1. Jak zviditelnit, co nevidíme? | Fluorescence |
| 2. Jak přispělo víno k objevení fluorescence? | Stokesův jev |
| 3. Jak lze změřit fluorescenci? | Spektrofluorometr |
| 4. Jak zlepšit viditelnost fluorescence? | Filtrem |

Proč svítí svítí na diskotéce i to co normálně
nesvítí?



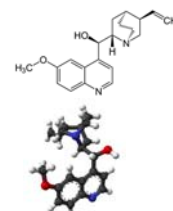
Přehled II

1. Jak fluorescenčně obarvit proteiny a DNA?
2. Jak Vikingové navigovali své lodě v mlze?
3. Co se dá určit z anizotropie při interakci proteinů a DNA?
4. Kde se s anizotropií setkáváme denně?

Jaký roztok chininu se hodí na diskotéku?



Tonik obsahuje chinin v koncentraci 30-80 mg/L



Fluorescenční značky

Vhodná značka pro kovalentní vazbu na biomolekulu by měla mít následující parametry:

- vysoká intenzita fluorescence
- stabilita i při souvislém ozařování
- minimální vliv na biologické chování studované molekuly

Svitivost značky (Brightness)

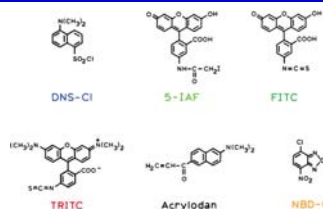
- je dána součinem kvantového výtěžku a molárního extinkčního koeficientu ϵ
 $B_s = Q \epsilon$
- Dobrý parametr pro účinnost s jakou značka přeměňuje excitační světlo na fluorescenci
- Po kovalentní vazbě k biomolekule často dochází k výrazné změně ve svitivosti
- Pro praxi je vhodné mít značku se svitivostí $B_c > 5000$

Příklady svitivosti nevlastních fluoroforů

Fluorofor	ϵ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Kvantový výtěžek (Q)	Svitivost (Bs)
Oregon Green® 488	87 000	0.9	78 300
BODIPY FL	91 000	0.9	81 900
Fluorescein (FAM)	79 000	0.9	71 100
JOE	71 000	0.6	42 600
TAMRA	103 000	0.2	20 600
Rhodamine Red-X (ROX)	82 000	0.7	57 400
Texas Red	139 000	0.9	125 100

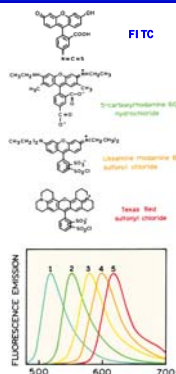
<http://www.promega.com/geneticidproc/ussvmp8proc/21.html>

Příklady fluorescenčních značek



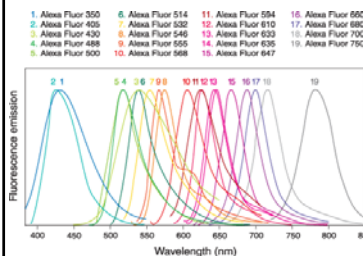
- dansyl chlorid (DNS-Cl; 5-dimethylaminonaftalén-1-sulfonyl chlorid)
- fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)
- 5-jodoacetamidofluorescein (5-IAF)
- tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát (TRITC)
- 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl; 4-chloro-7-nitrobenzofurazan)
- 6-akryloyl-2-dimethylaminonaftalén (Acrylodan)

Fluorescein a rhodaminy



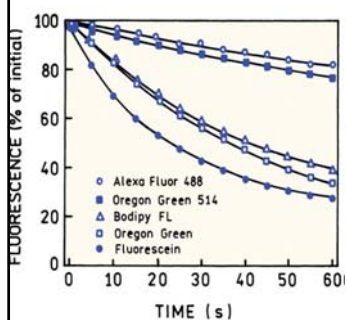
- Patří k nejrozšířenějším fluorescenčním značkám
- Abs.max. Em. max.
 fluorescein (490nm) (520)
 rhodaminy (500-600 nm) (530-620)
- Citlivé na polaritu solventu a na pH
- vysoká hodnota $\epsilon \sim 80\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- Vysoký kvantový výtěžek $Q \sim 0.3-0.8$
- Doba dohasínání fluorescence $\sim 4\text{ ns}$
- je syntetizováno velké množství derivátů, které se používají ke značení proteinů a DNA přes NH_2 skupinu nebo SH skupinu
- Intenzita fluorescence je závislá na pH
- Mají sklon k fotovybělování

Alexa Fluor



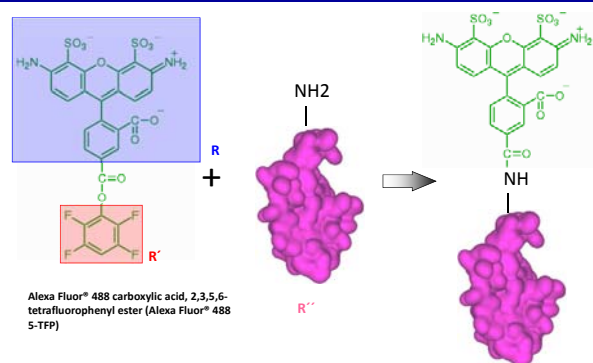
- Vysoký kvantový výtěžek \rightarrow vysoká svítivost
- Zlepšená rozpustnost ve vodě
- Malá závislost fluorescence na pH
- **Fotostabilní!**

Fotostabilita fluoroforů

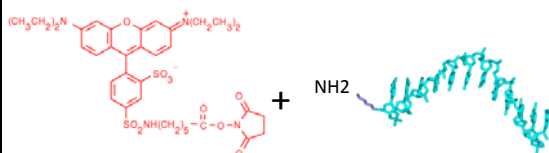


- Po určitém času dojde u každého fluoroforu k fotovybělení
- Nejdůležitější je fotostabilita při mikroskopii, kde se používají vysoké intenzity excitačního světla
- Nejvyšší fotostabilitu ukazují sondy skupiny Alexa
- Zatím nebyla zjištěna žádná spojitost mezi strukturou fluoroforů a jejich fotostabilitou

Reakce esteru značky Alexa Fluor a NH_2 skupiny proteinu

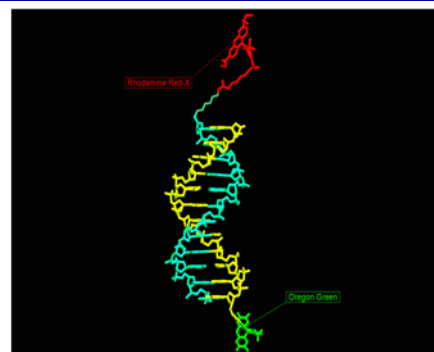


Značení DNA přes NH_2 skupinu



11

DNA značená Rhodaminem Red-X a OregonGreen



Fluorescenční sondy

- **Fluorescenční sondy** jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti.

Fluorescenční sondy jsou sami v roztoku zpravidla velmi málo fluorescenční. Po vazbě na proteiny nebo DNA se však jejich fluorescence velmi výrazně zvýší.

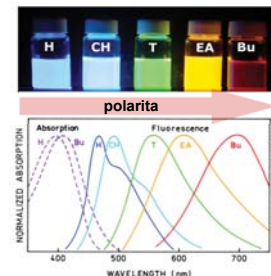
Závislost emisního spektra na polaritě rozpouštědla



DNS-Cl

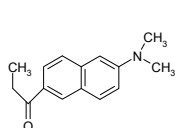
Podle zvyšující se polaritě:

H – hexan
CH- cyklohexan
T- toluen
EA – etylacetát
Bu – n-butanol



Praktická ukázka

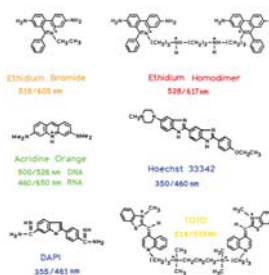
- Prodan (*N,N*-Dimethyl-6-propionyl-2-naphthylamine)



polarita ↓

C - Cyklohexan
G - Glycerol
D - dimethylformamid
E - Etanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$
V - Voda H_2O
Bu - n- Butanol $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

DNA sondy

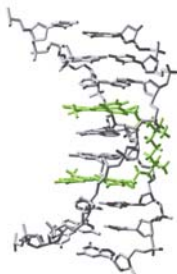


- Interkalátory EB, AO, TOTO se vážou vmezeřením mezi páry bází
- Hoechst, DAPI se vážou do malého žlábků DNA
- EB zvyšuje intenzitu fluorescence po vazbě 30x a τ se prodlužuje z 2 na 20 ns
- DAPI zvyšuje intenzitu fluorescence nejvíc v blízkosti AT páru
- TOTO (Thiazole Homodimer) zvyšuje intenzitu fluorescence po vazbě 1100x
- Sondy s velkou afinitou jak EB homodimer (váže se 10 000x pevněji než monomer EB) a kladně nabitý TOTO zůstávají navázané na DNA i během elektroforézy a používají se k vizualizaci DNA na gelu a umožňují zvýšit citlivost až 500x ve srovnání s klasickým barvením EB
- Jak je možno snížit spotřebu sondy?

Interkalace

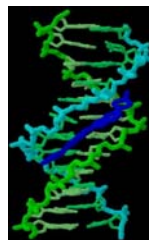


Benzpyrene



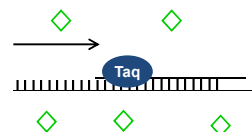
TOTO

Vazba do žlábků DNA



Syber Green

- Selektivně se váže na ds DNA do malého žlábků
- Detekce od 1 ng/mL
- Využití při Real-Time PCR ke kvantifikaci namnožené DNA



Srovnání sond pro kvantifikaci dsDNA

Sonda	Citlivost pro dsDNA	Extinction Coefficient (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Kvantový výtěžek po vazbě na dsDNA	Zvýšení intenzity fluorescence po vazbě na dsDNA
PicoGreen	25 pg/mL	70,000	0.53	~2000x
Hoechst 33258	1-10 ng/mL	40,000	0.59	~100x
Ethidium bromid	1-10 ng/mL	5,000	<0.3	~30x

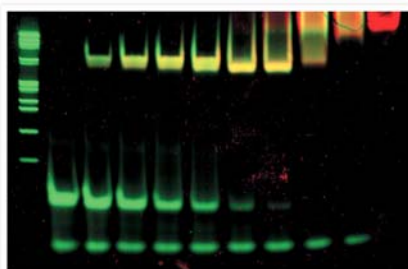
Extinkční koeficienty byly zjištěny pro volné sondy ve vodném roztoku
<http://www.omega.com/geneticidproc/ussymp8proc/21.html>

Proteinové sondy

- Zvyšují intenzitu fluorescence po vazbě na protein
- Nejcitlivější fluorescenční sondy pro barvení proteinů v gelu jsou ze skupiny organokovových sloučenin SYPRO
- SYPRO Red, Orange, Tangerine, Rose
- Vysoká citlivost ~ ng/mL
- Před použitím je nutná kyselá fixace
- Primárně používané při barvení proteinů na gely
- Využití v kriminalistice

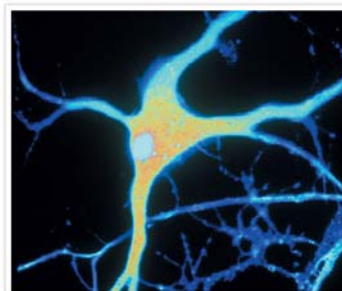


Současné barvení DNA a proteinů na gelu



- DNA byla barvena Syber Green
- Protein SYPRO Ruby

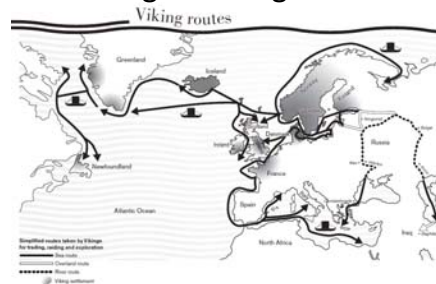
Indikace Ca²⁺ v nervových buňkách za použití Fluoro-3



Za použití sondy bylo sledováno odumírání nervové buňky



Jak Vikingové navigovali své lodě?



The National Maritime Museum
<http://www.nmm.ac.uk>

Vikingové používali sluneční kompas



• Poloha severu je určena stínem slunce.
 • Stín byl vyznačován pravidelně během dne.
 • Slunce je v nejvyšším bodě v poledne a proto je vržený stín výstupku nejkratší.
 • Je to přesně v polovině cesty stínu mezi východem a západem.
 • V bodě, kde je křivka nejbliže středu byla vyznačena čára, která ukazuje směr sever/jih.

The National Maritime Museum
<http://www.nmm.ac.uk>



Sluneční kámen



Poloha slunce mohla být díky slunečnímu kameni určena i při oblačnosti a za mlhavého počasí.

Fluorescenční metody studia biomolekul C. Hofr

Základní otázky současné vědy

- Nebylo náhodou možno navigovat na základě odhadu polohy slunce pouhým okem?
- Za jakých podmínek je možno použít sluneční kámen pro určení polohy slunce?

Anizotropie fluorescence v biologické analýze Hofr

Ověření určení polohy slunce za pomoci znalosti Vikingů

• **Dr. Gábor Horváth**, Eötvös University

okem



velká odchylna

polarizátorem



přesné určení



• Bylo **vyvráceno**, že by Vikingové mohli navigovat na širém moři odhadem polohy slunce pouhým okem bez dalších navigačních pomůcek.
 • Bylo **prokázáno**, že polarizátor mohl být používán k přesnému určení polohy slunce za podmínek mlhy a neúplné oblačnosti.

Horváth G et al. 2011, Hegedüs R et al. 2007

Dnešní měření anizotropie fluorescence

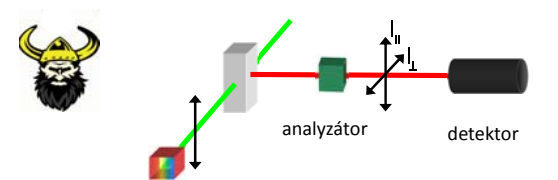


Diagram showing a light source (represented by a Viking head) passing through a polarizer, then an analyzer, and finally a detector. The angle between the polarizer and analyzer is denoted as θ . The parallel and perpendicular intensities are labeled $I_{||}$ and I_{\perp} .

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

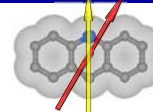
Měření anizotropie při ustálené fluorescenci

- Anizotropie - měří polarizovanou emisi
- Polarizátor je na dráze excitačního světla a dělá z něj rovinně polarizované
- Polarizátor (analyzátor) je na dráze emitovaného světla – fluorescence
- Měří se intenzita fluorescence při natočení polarizátoru vertikálně a analyzátoru vertikálně (VV), následně při natočení polarizátoru vertikálně a analyzátoru horizontálně (VH)
- Ze změřených intenzit se vypočítá hodnota anizotropie $\langle r \rangle$

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

61

Dipólové momenty přechodu



— Absorpce
— Emise

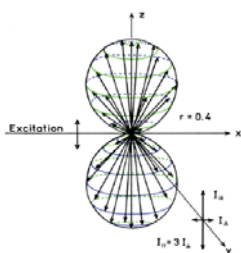
- **Dipólový moment přechodu** je kvantově mechanická záležitost. Není skutečným dipólovým momentem. Je dán okamžitým stavem elektronového obalu molekuly. Velikost dipólového momentu přechodu udává schopnost daného stavu molekuly absorbovat nebo emitovat světlo. Směr dipólového momentu přechodu udává směr, ve kterém je světlo molekulou nejlépe absorbováno nebo emitováno.
- Molekuly přednostně absorbují záření, jehož elektrická složka kmitá ve stejné rovině jako je **absorpční dipólový moment přechodu** elektronu do vyšší energetické hladiny.
- Molekuly přednostně emitují záření ve stejné rovině jako je **emisní dipólový moment přechodu** elektronu do nižší energetické hladiny.

6

62

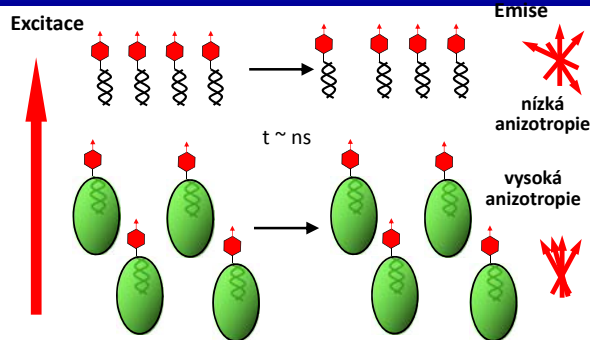
Fotoselektce

- Je-li roztok fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, potom budou excitovány pouze ty molekuly, které mají nenulový průmět svého absorpčního přechodového momentu do směru polarizace budícího záření

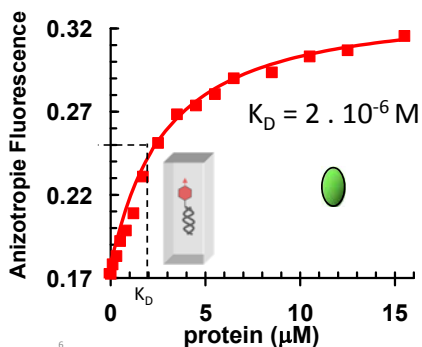


6

Detekce vazby proteinů na DNA ze změny anizotropie fluorescence



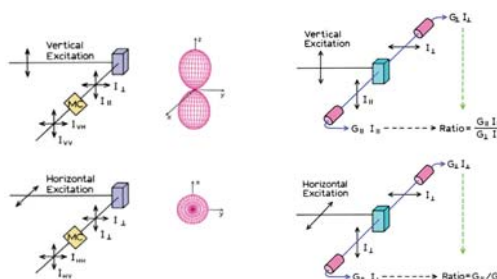
AF detekce interakce protein-DNA



6

65

L a T uspořádání měření

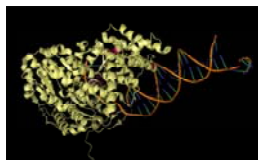


6

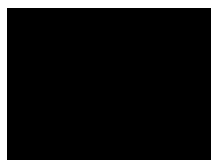
66

Aplikace I Helikázy

- Katalyzují rozvíjení DNA nebo RNA za přítomnosti ATP
- Hrají důležité role ve většině drah metabolismu nukleových kyselin



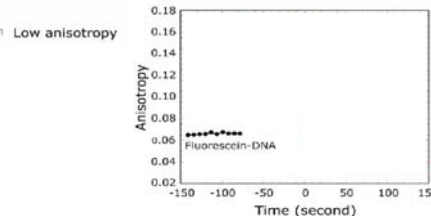
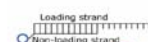
Helikáza UvrD navázána na DNA
Lee & Yang, *Cell*, 2006



Podílejí se na replikaci DNA

67

Sledování rozplétání DNA

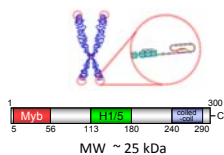
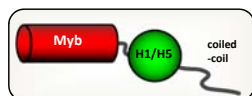


6

68

Aplikace II Interakce proteinů SMH s DNA

SMH rodina proteinů (Single Myb Histone)



MW ~ 25 kDa

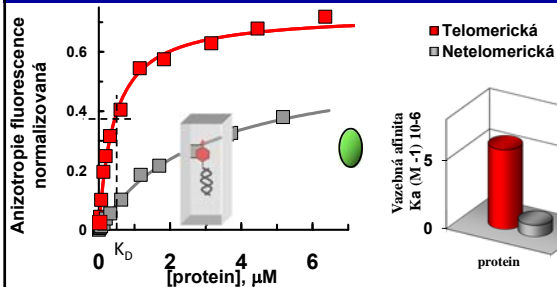
Telomerická DNA

5'-GGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAG
CCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATC-5'

Netelomerická DNA

5'-CATCATGGCTGGTTCATGGCTGGTACTAG
GTAGTACCGACCACTACCGACCATGATC-5'

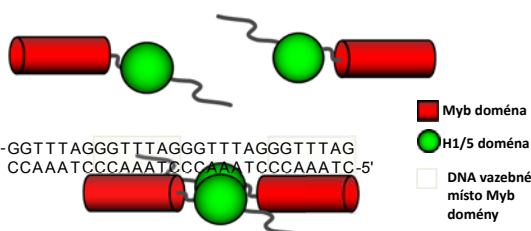
Vazebná afinita SMH proteinů k DNA



Vazebná afinita proteinů SMH k telomerické DNA je výrazně vyšší než k netelomerické DNA.

Hofr C. et al. 2009

Navržený model interakce SMH proteinů s telomerickou DNA



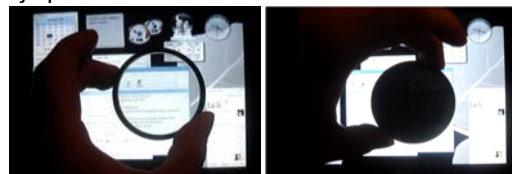
5'-GGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAG
CCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATC-5'

SMH proteiny ve formě dimeru se vážou telomerickou DNA s velkou afinitou a selektivitou ve srovnání s netelomerickou DNA.

Hofr et al, 2009, *Biochemical Journal*

Anizotropie kolem nás: monitor

- Anizotropie se projevuje u LCD monitoru
- Co je příčinou?



<http://www.youtube.com/watch?v=imQnWrLW2i0>

72

Shrnutí II

1. Jak fluorescenčně obarvit proteiny a DNA?
Reaktivními fluorofory – značkami a sondami
2. Jak Vikingové navigovali své lodě v mlze?
Sluneční kámen = polarizátor
3. Co se dá určit z anizotropie při interakci
proteinů a DNA? Disociační konstanta
4. Kde se s anizotropií setkáváme denně?
Monitor