

Fluorescenční značení molekul

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

Ctirad Hofr



Nevlastní fluorofory

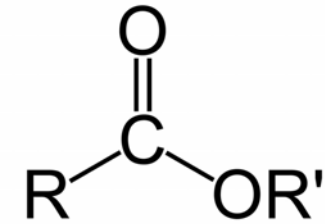
fluorescenční značky - přidávají se ke studovanému vzorku a vážou se na něj kovalentně. Vážou na proteiny a nukleové kyseliny přes aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce a thiolové skupiny.

fluorescenční sondy - vážou se na studovaný vzorek nekovalentně a po vazbě mění svoje fluorescenční vlastnosti (např. intenzitu, polohu em. maxima)

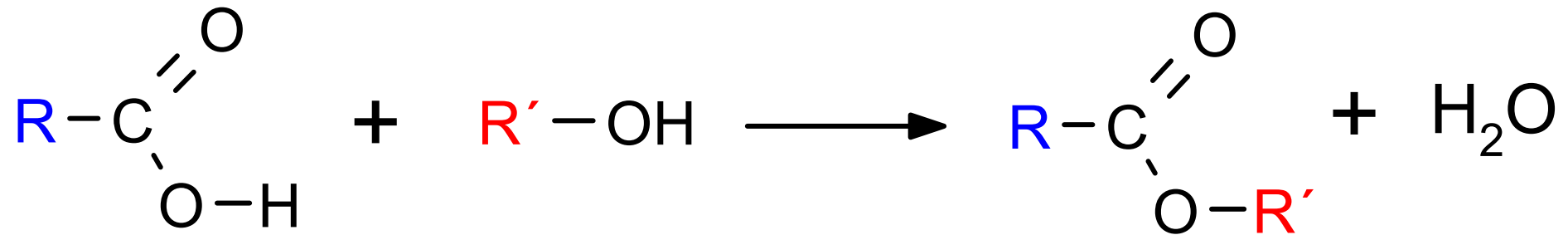
Možnosti zavedení fluoroforu

- **Kovalentní vazba**
využívá se chemické reakce derivátu fluoroforu, během které se vytváří kovalentní vazba s biomolekulou
- **Nekovalentní vazba**
fluorofor s váže na biomolekulu prostřednictvím nekovalentních (např. elektrostatických) interakcí
- **Fluorogenní reakce**
využívá se chemické reakce, při které se nefluorescenční prekurzor mění na fluorofor

Estery



Vznikají reakcí karboxylové kyseliny a alkoholu



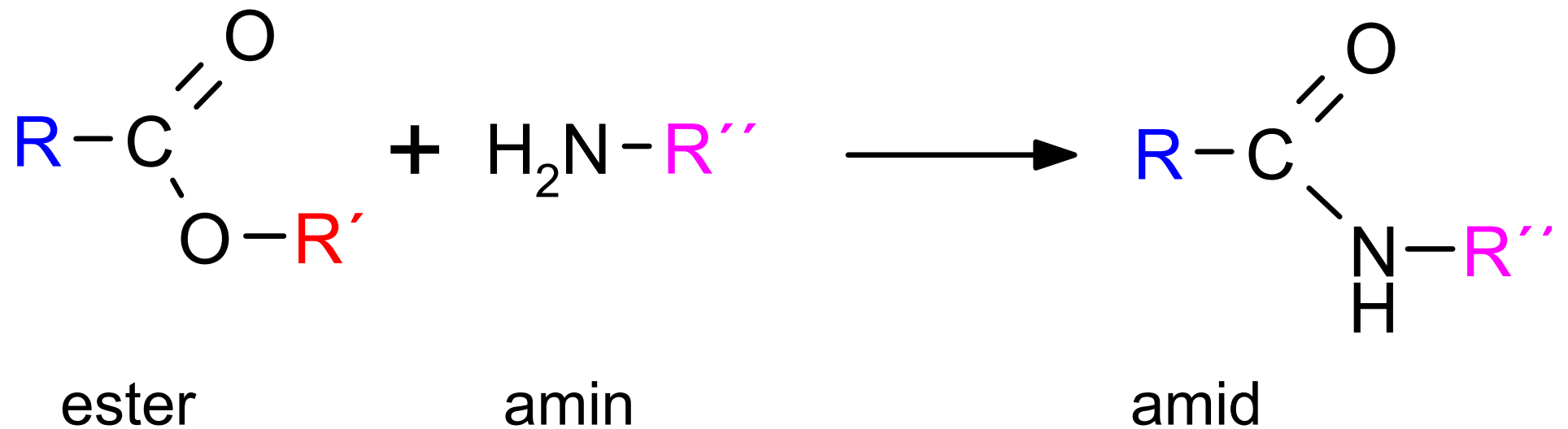
karboxylová kyselina

alkohol

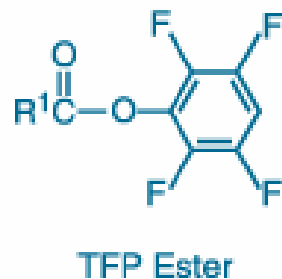
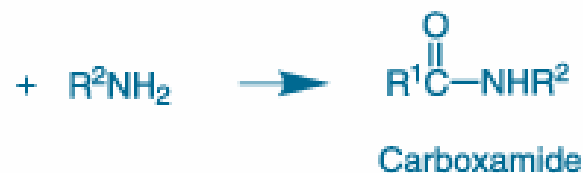
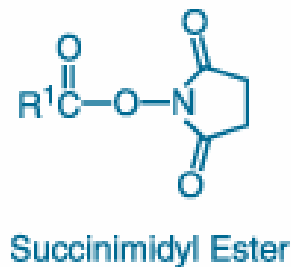
ester

Vznik amidu

Amidy vznikají reakcí esteru s aminem

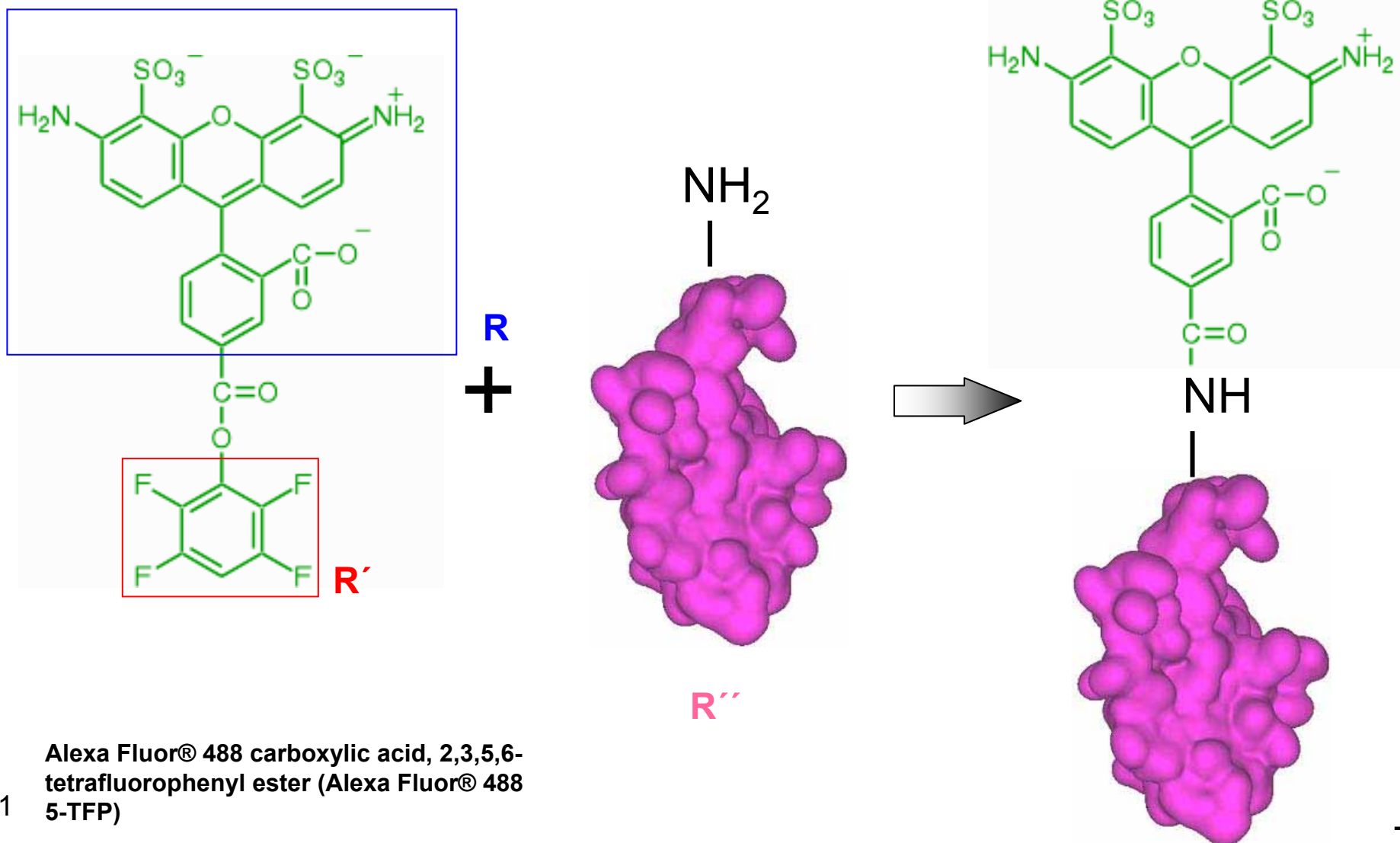


Reakce esterů při kovalentím značení molekul s NH₂ skupinou



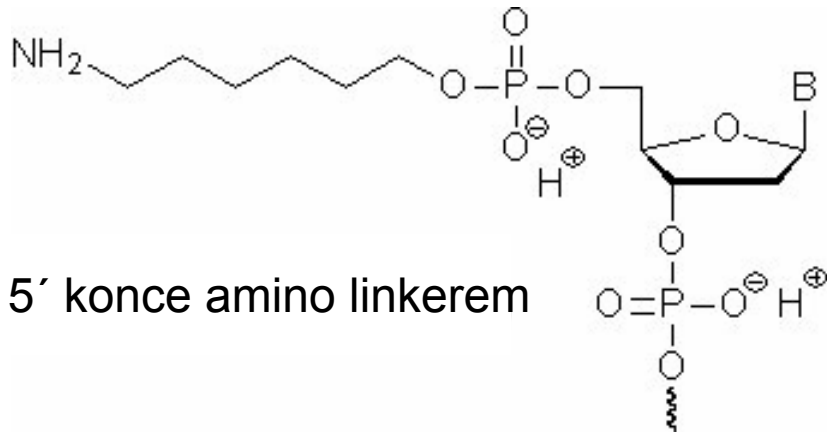
Využívá se reakce esterů s aminem za vzniku amidu

Reakce karboxylové kyseliny značky Alexa 488 s NH₂ skupinou proteinu



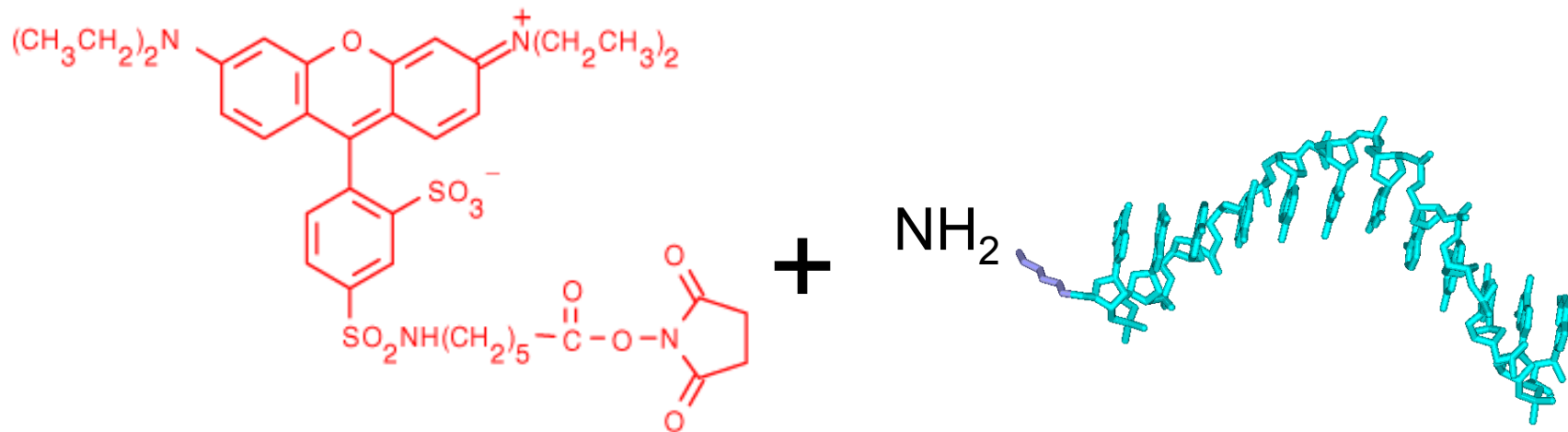
Jak přidat NH₂ skupinu k DNA?

Rovnou při syntéze oligonukleotidu se připojí alyfatický řetězec zakončený NH₂ skupinou (amino-linker)



Modifikace 5' konce amino linkerem

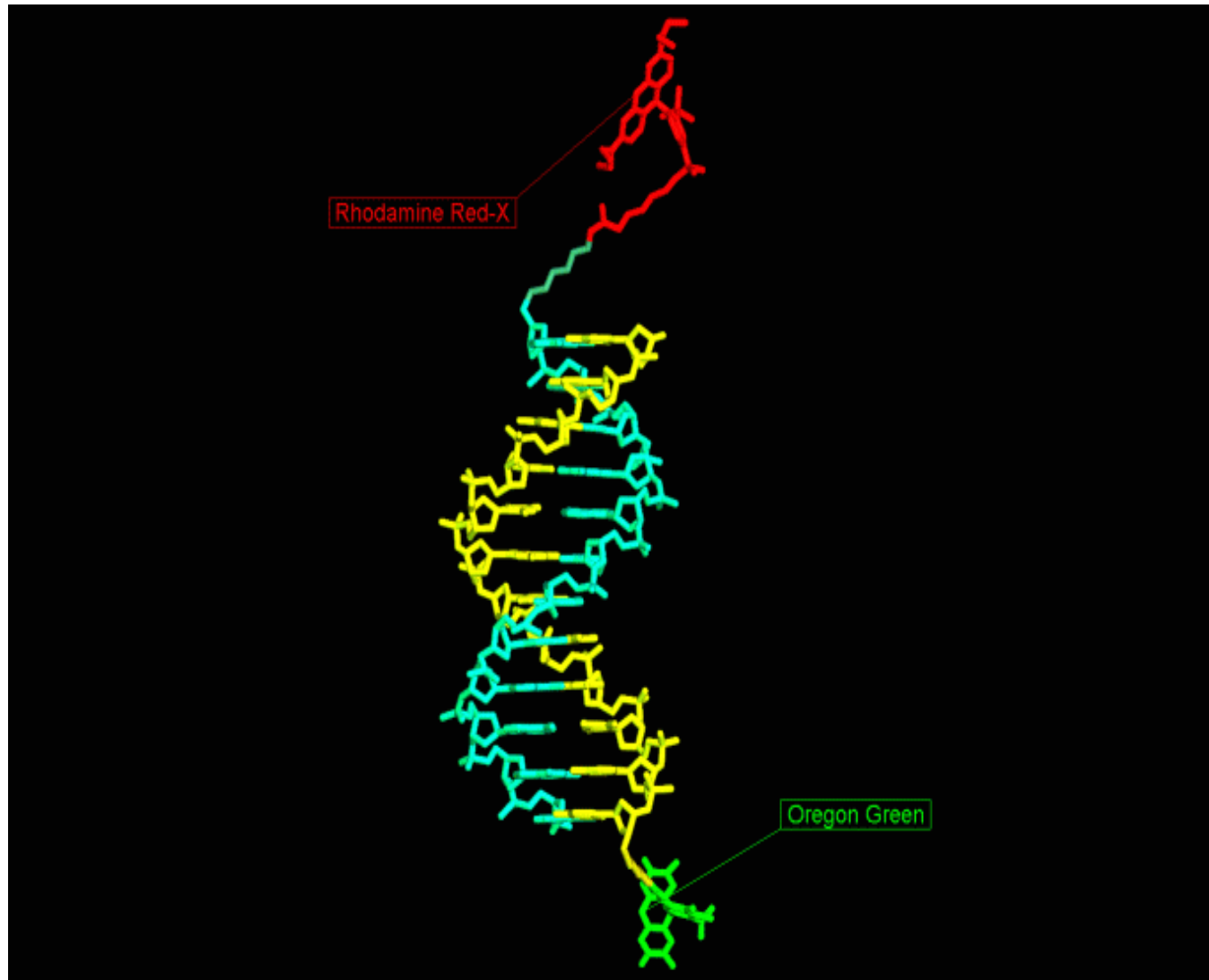
Značení DNA přes NH₂ skupinu



**Rhodamine RedTM-X,
succinimidyl ester**

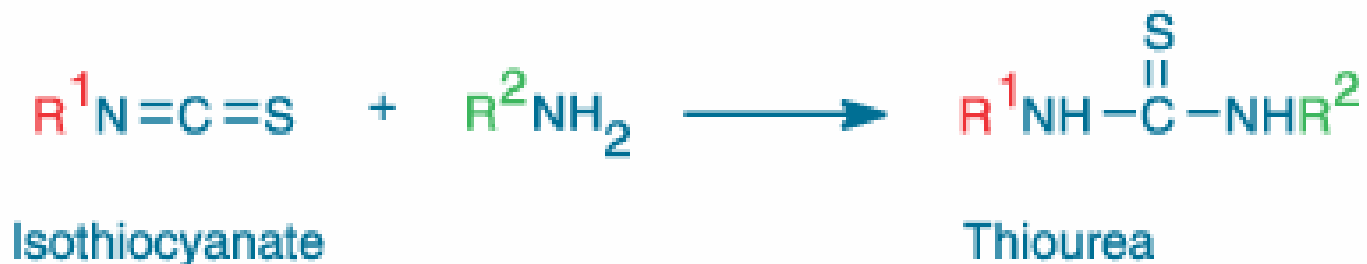
DNA s „amino-linkerem“

DNA značená Rhodaminem Red-X a OregonGreen

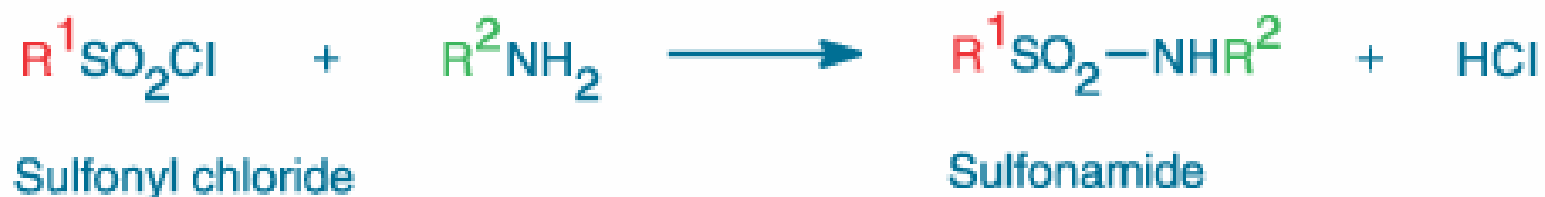


Další reakce pro značení přes amino skupinu

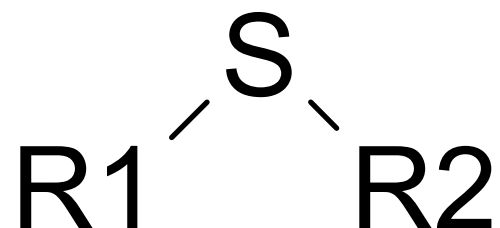
Reakce isothiokyanátu s primárním aminem



Reakce chloridu sulfonové kyseliny s aminem



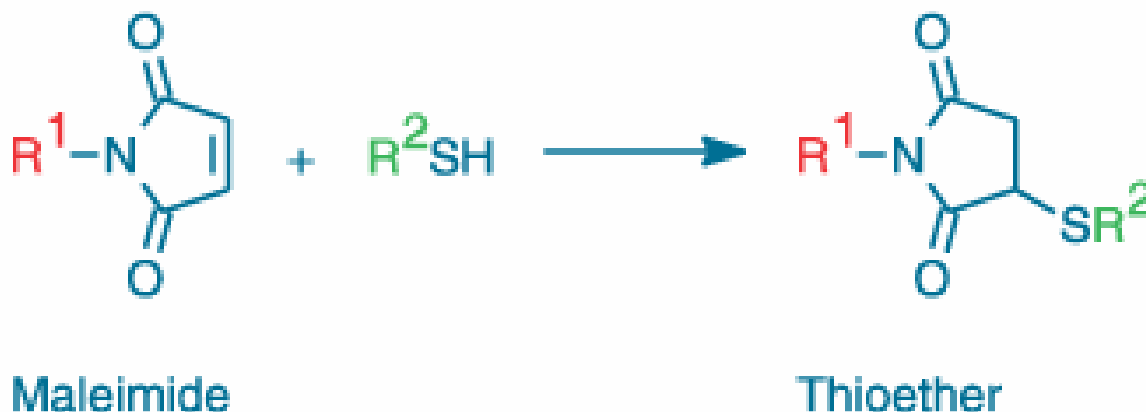
Připojení přes SH thiolovou skupinu za vzniku thioetheru



- Thioether je podobný esteru, jenom je O nahrazen S
- Thioether vzniká reakcí alkylačních činidel (např. halogenů, maleimidů) s thioly (obsahují SH skupinu)

Reakce při kovalentím značení s SH skupinou molekul

- Reakce thiolové skupiny s maleimidem za vzniku thioetheru
- Dvojná vazba maleimidu reaguje s thiolovou SH skupinou za vzniku thioetheru



Další reakce pro značení molekul se skupinou SH

Disulfidy

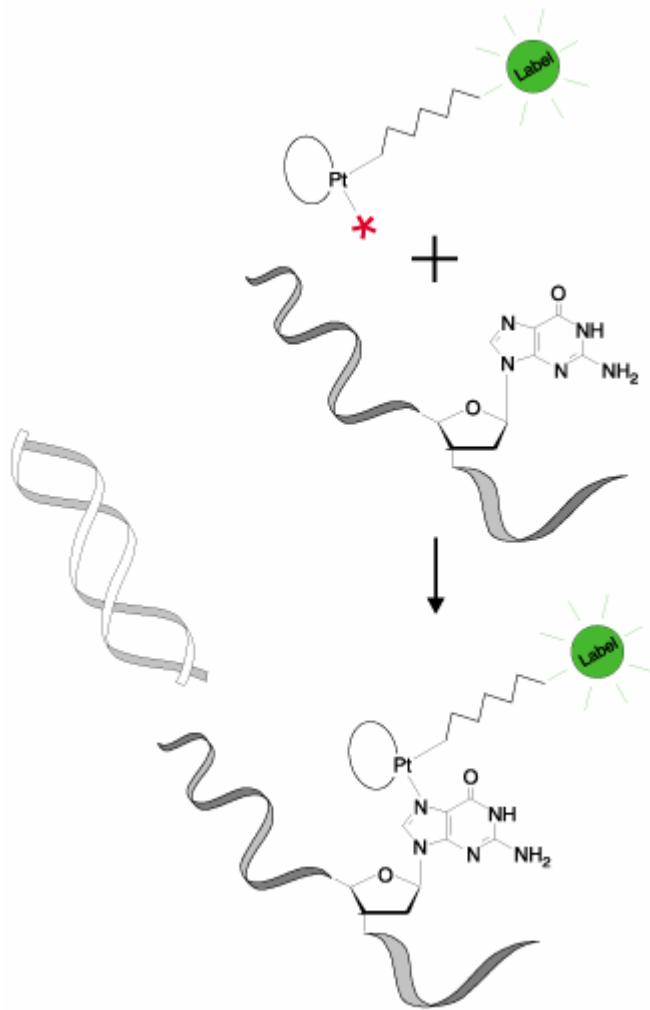


Symmetric disulfide

Mixed disulfide

Iodoacetamidy ?

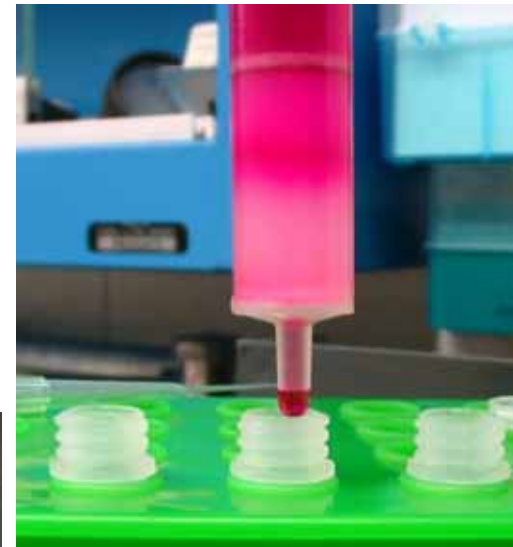
Další způsoby značení



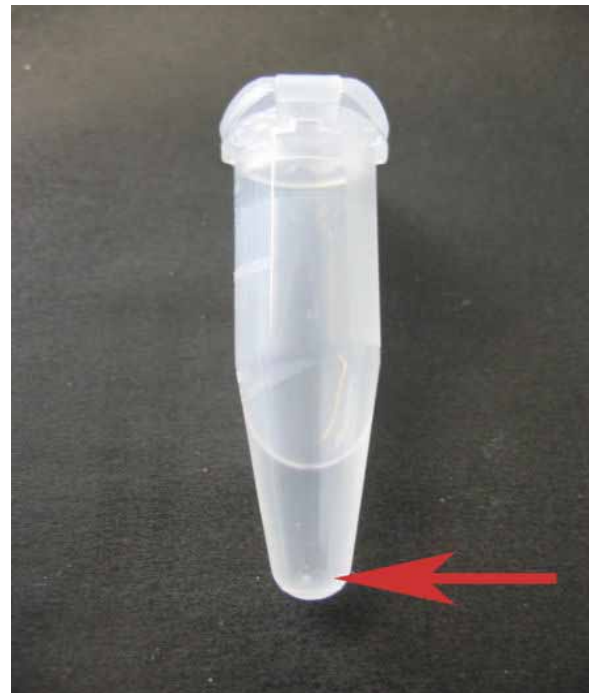
- DNA může být kovalentně značena bez připojení NH_2 skupiny při syntéze
- Využívá se reaktivity N7 guaninu s platinovými komplexy
- Platinový komplex obsahuje fluorescenční značku, která je po reakci kovalentně připojena ke guaninu

Separace nenavázané značky

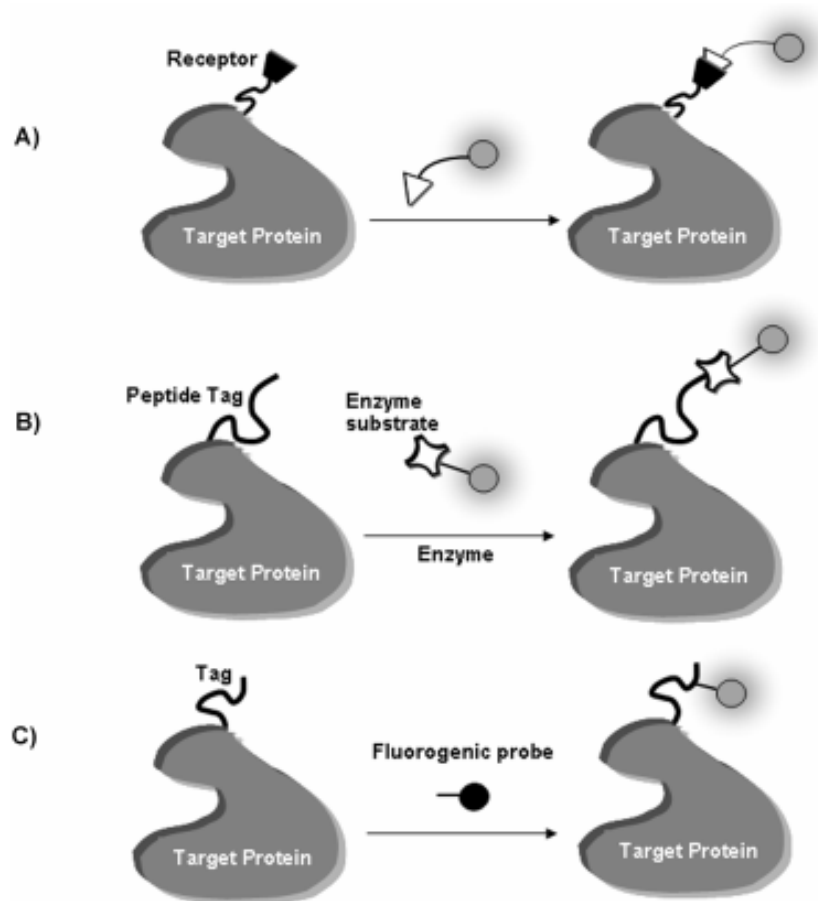
- Chromatografie (protein)
gelová filtrace



- Srážení (DNA)

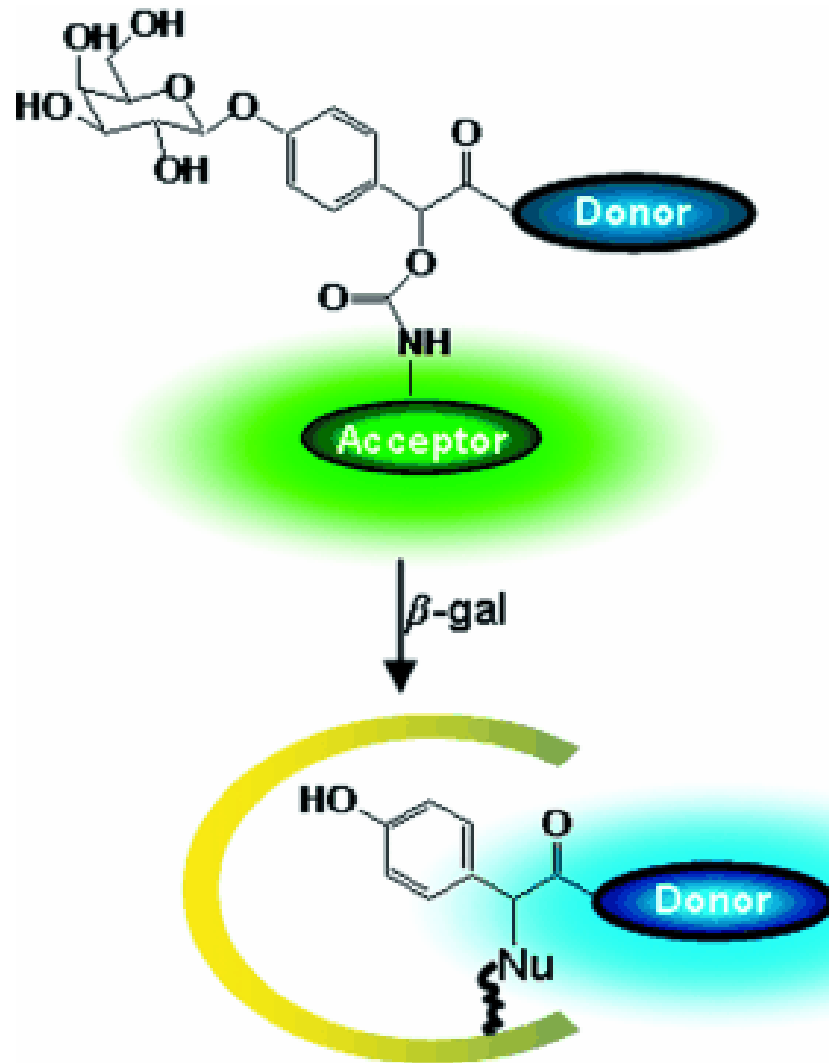


Chemické značení proteinů *in vivo*



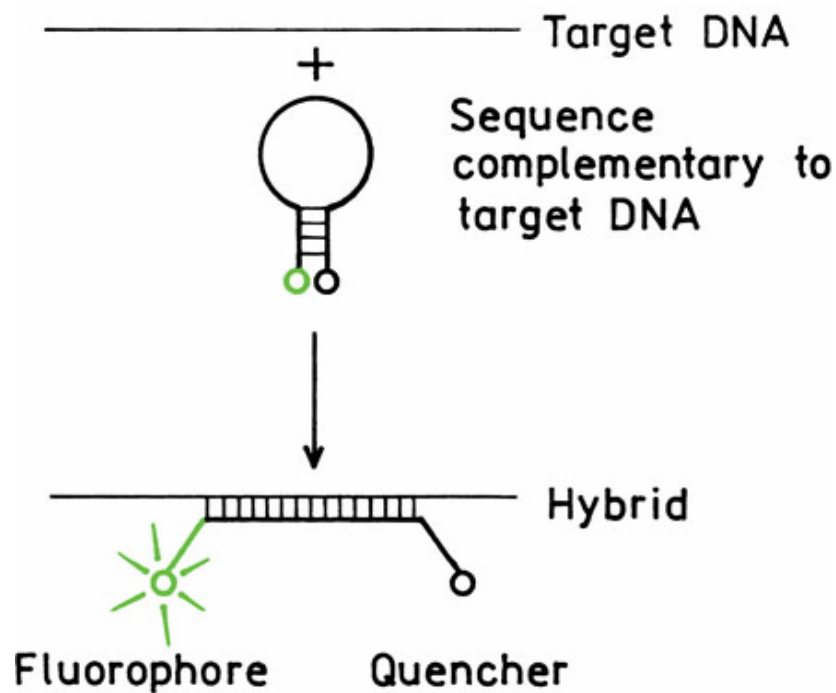
- A) Receptor-protein – fluorescenční značka nebo sonda je připojena k molekule, která má vysokou afinitu k receptoru (avidin - biotin)
- B) Vazba zprostředkovaná enzymem – fluorofor je připojen k substrátu, který může být kovalentně navázán na peptidový „tag“ proteinu prostřednictvím dalšího proteinu -enzymu
- C) Značka původně nefluoreskuje. Po její vazbě k „tagu“ dochází k aktivaci fluorescence (fluorogenní reakce)

Fluorogenní detekce



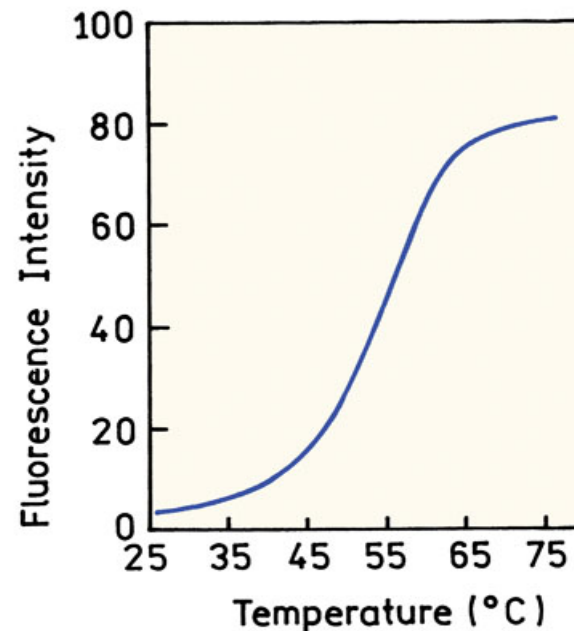
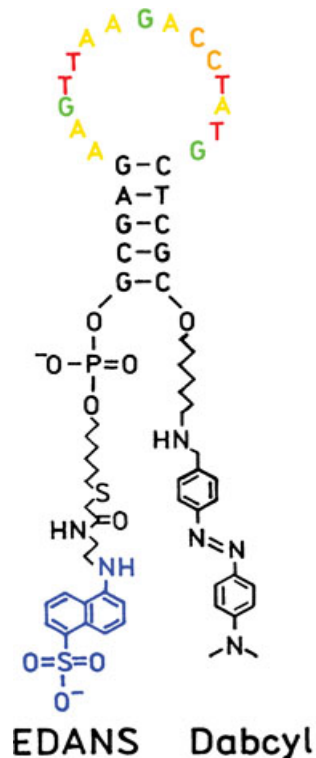
In vivo labeling of β -gal by a fluorogenic probe with spectral change. The labeling is proposed to take place in two steps. The first step involves O-galactoside bond cleavage, which generates an active intermediate quinone methide. This intermediate is susceptible to nucleophilic attack by a nearby amino acid residue, which leads to covalent attachment of the FRET donor (D) to the enzyme and displacement of the acceptor (A).

DNA beacons



- Beacon zn. angl.signální oheň, lampa (ne slanina)
- DNA beacon sestává z molekuly DNA, která je schopna tvořit vlásenkovou strukturu
- DNA má na jednom konci připojen fluorofor a na druhém jeho zhášedlo
- Při hybridizaci s komplementární DNA dochází k oddálení zhášedla a následné emisi fluorescence

Struktura a vlastnosti „DNA beacon“

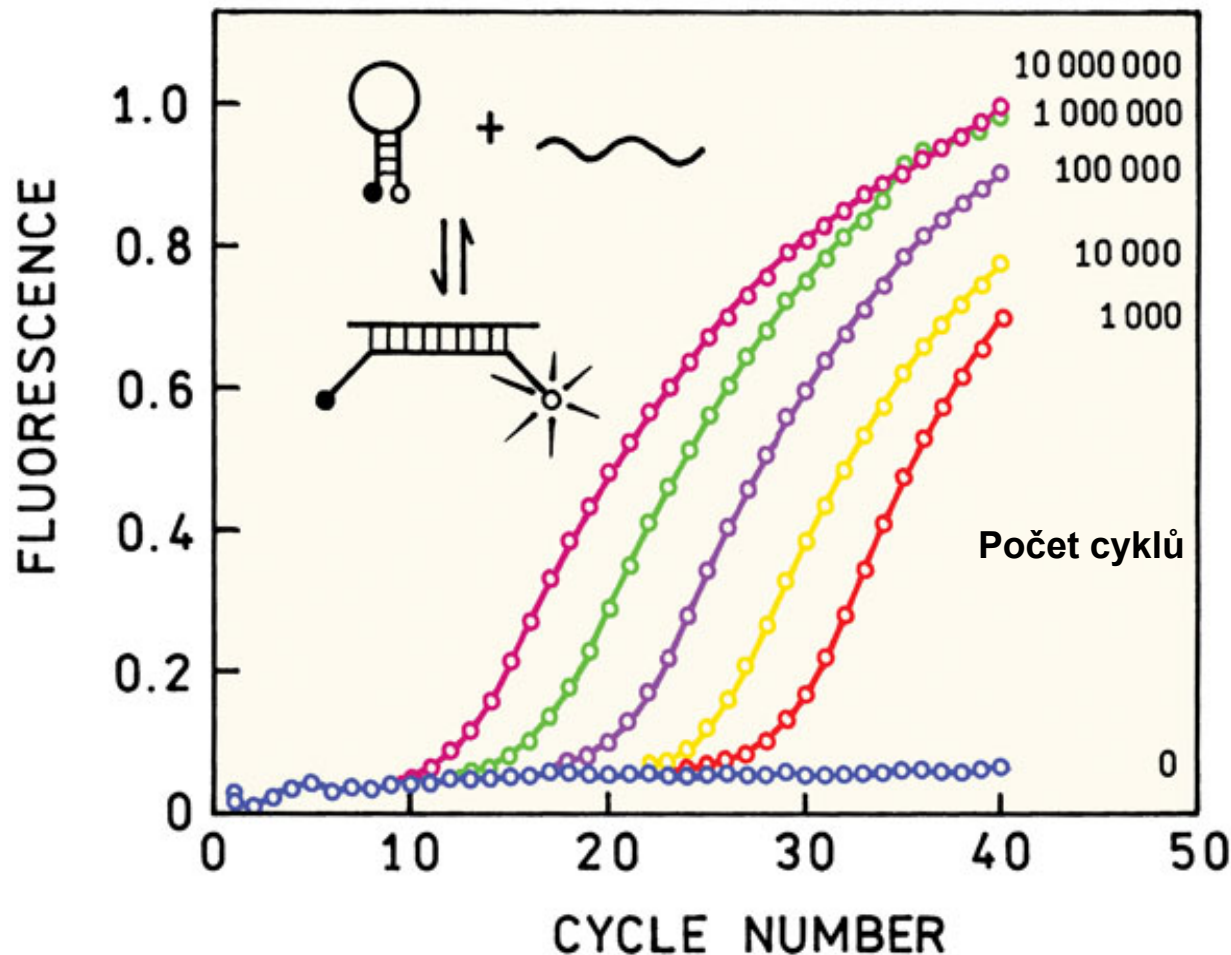


Při zvyšování teploty dochází k tání struktury vlásenky, což se projevuje vzrůstem intenzity fluorescence

Pozn. V případě Dabcylu byla zjištěna neočekávaná schopnost zhášet široké spektrum fluoroforů bez ohledu na míru překryvu spekter. Důvodem pro toto univerzální zhášení je pravděpodobně vytváření nefluorescenčního komplexu Dabcylu s fluoroforem.

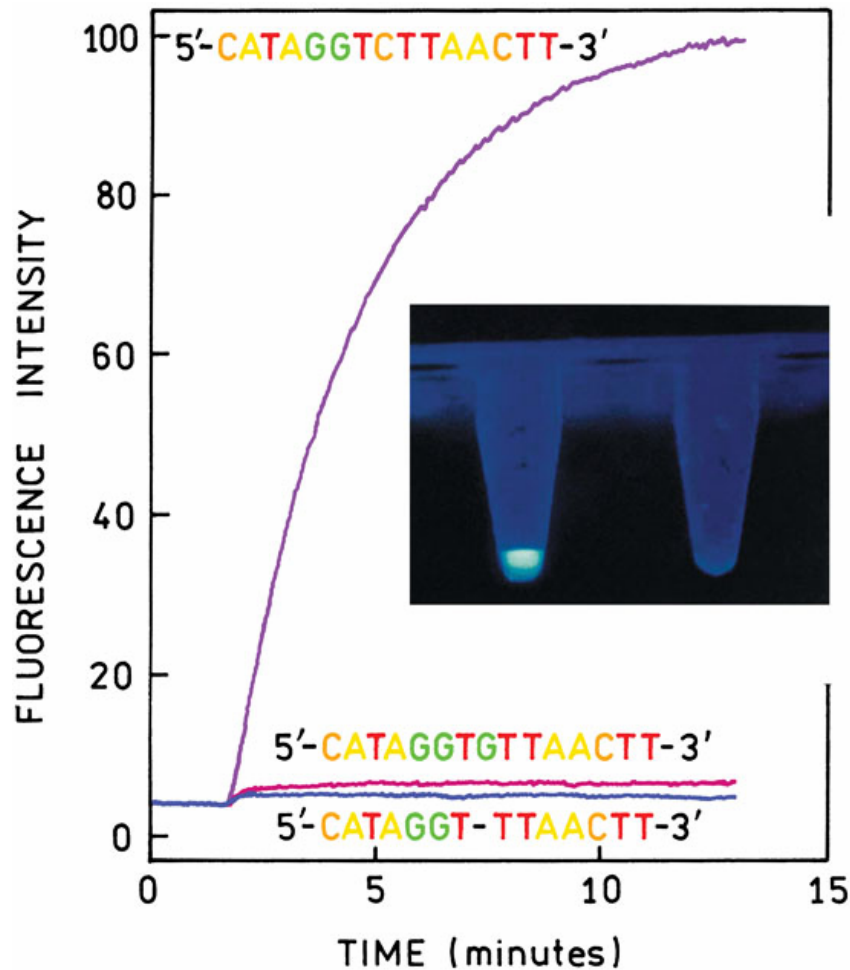
Každopádně je to výhodné, protože jedno zhášedlo může být použito pro celou řadu fluoroforů.

Použití Dabcyl-Fluorescein páru na „DNA beacon“ ke sledování PCR



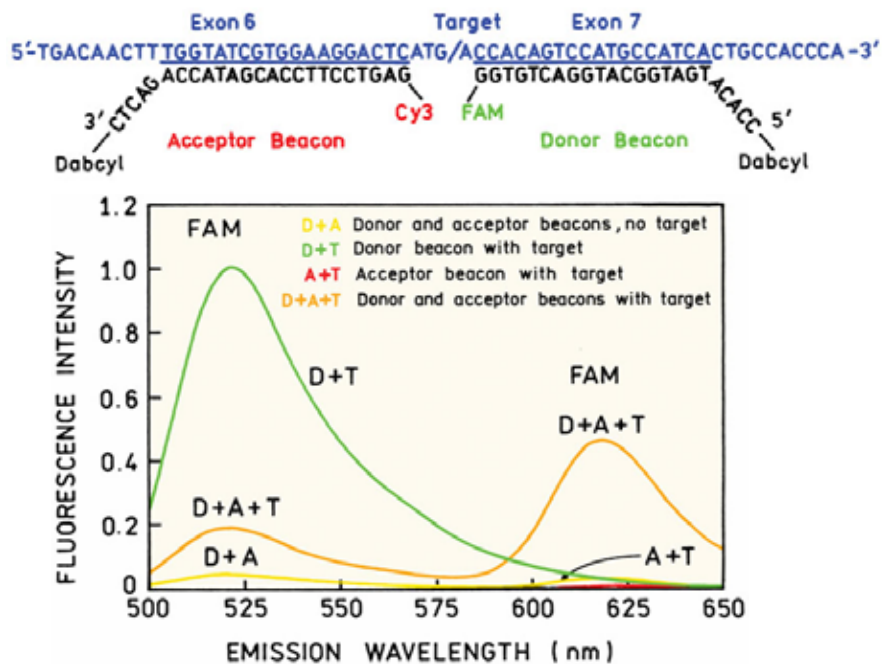
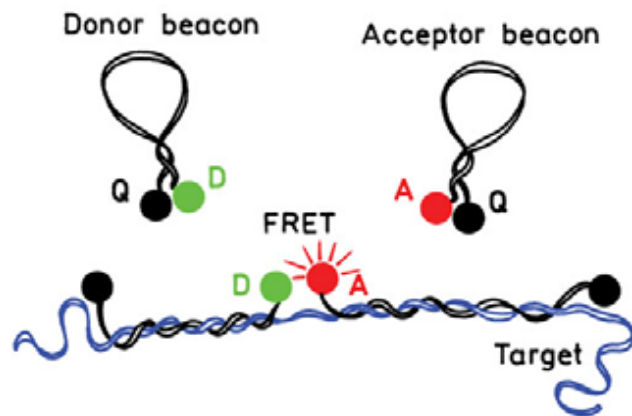
Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikované DNA

Vysoká citlivost DNA beacon



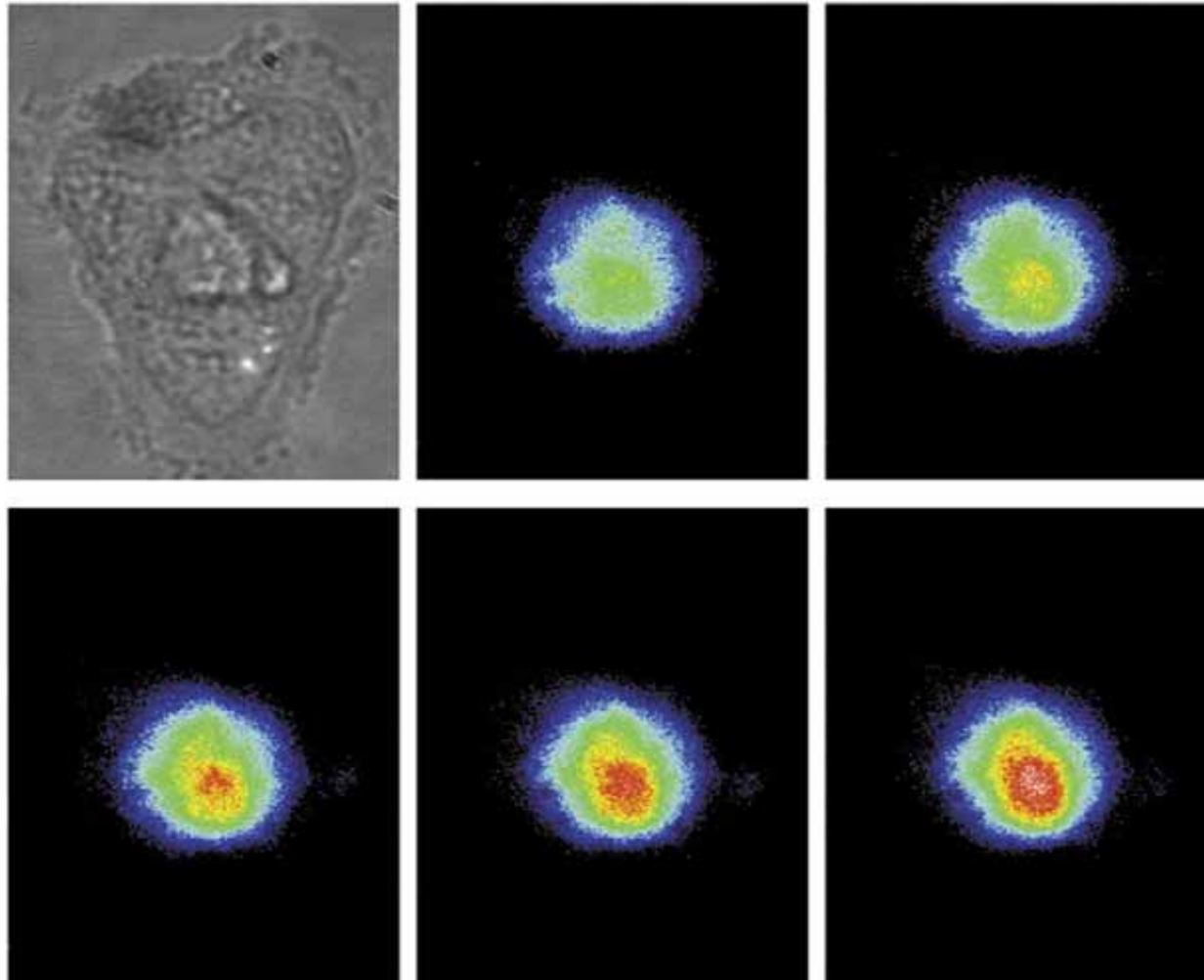
- V případě, že dojde k hybridizaci s DNA, která se liší i pouze v jednom nukleotidu, nedochází k nárůstu signálu fluorescence
- Vysoká citlivost a poměr on/off signálu v přítomnosti / nepřítomnosti komplementární DNA

Hybridizace v sousedních oblastech



- Výhodné uspořádání ke snížení falešně pozitivních výsledků
- Používají se dvě vlásenky
- Jedna vlásenka obsahuje donor a druhá akceptor FRET
- Bez cílové DNA jsou oba fluorofory ve vlásence zhaseny
- V případě, že dochází ke správné hybridizaci s cílovou DNA, je pozorován FRET
- Když se hybridizuje pouze jedna vlásenka, dochází sice ke zvýšení intenzity, ale nezvyšuje se FRET
- Tak se zvyšuje specifita analýzy

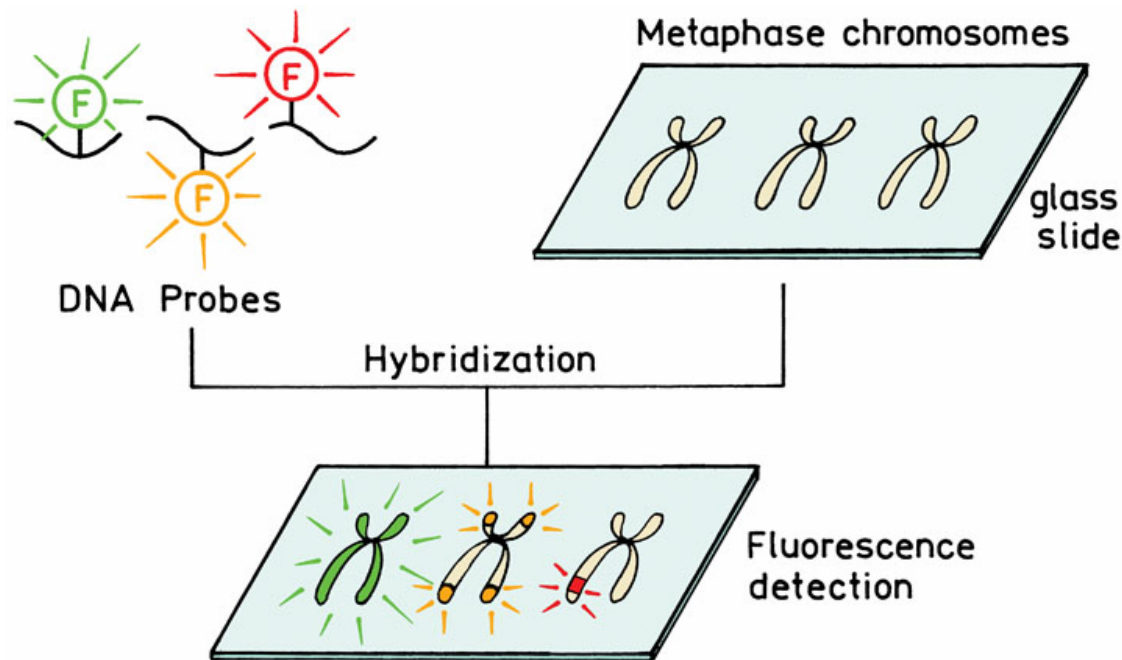
Detekce mRNA v živých buňkách



Optické a fluorescenční
zobrazení ledvinových
buňek

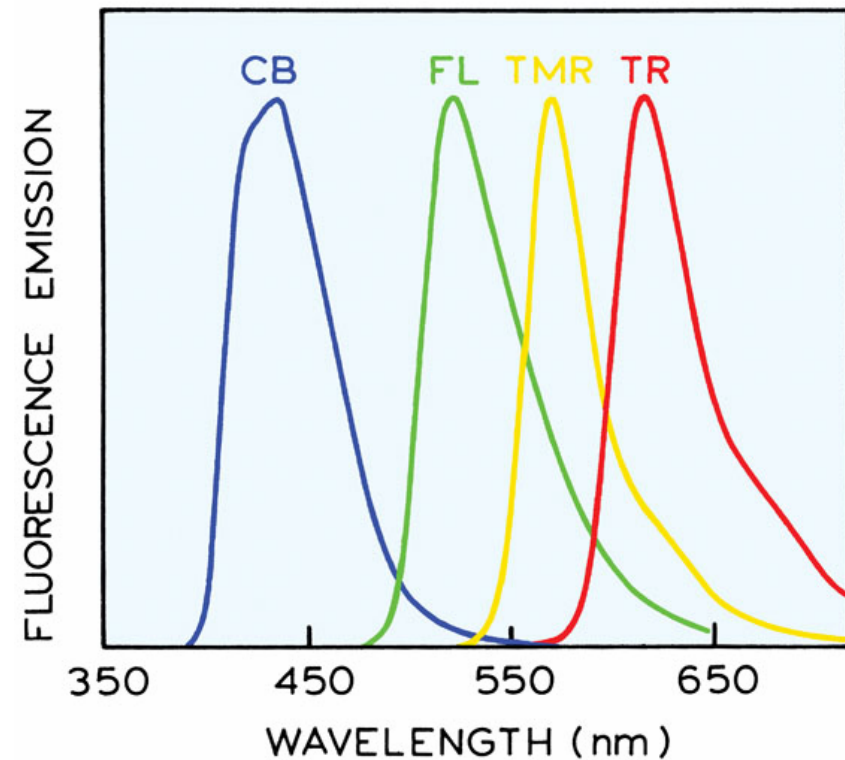
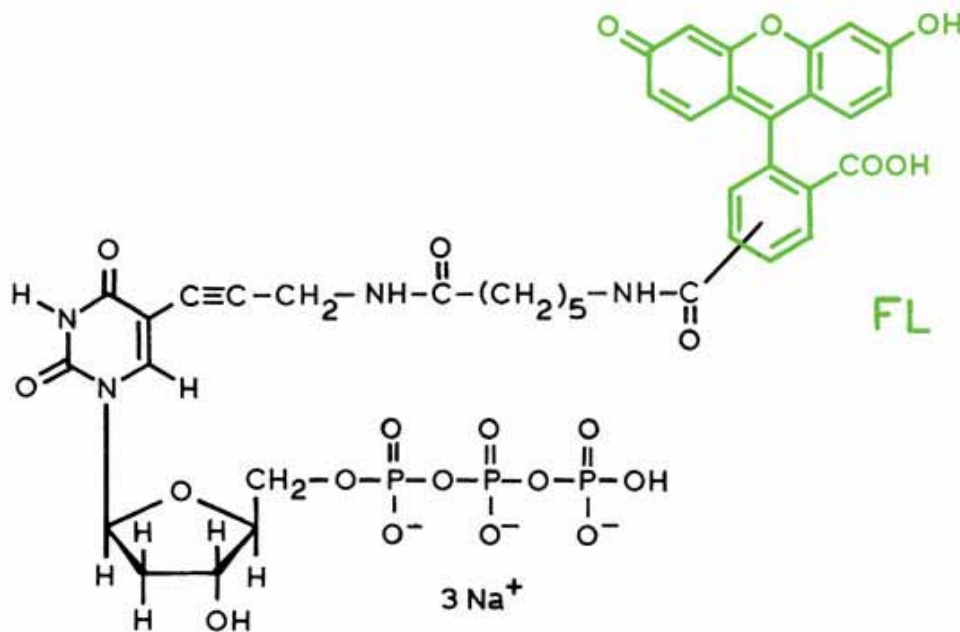
Zvyšování intenzity
fluorescence „DNA
beacon“ proti mRNA pro
 β -actin prokázalo zvýšení
koncentrace mRNA a
tedy zvýšení produkce
 β -actinu

FISH (fluorescence *in situ* hybridization)

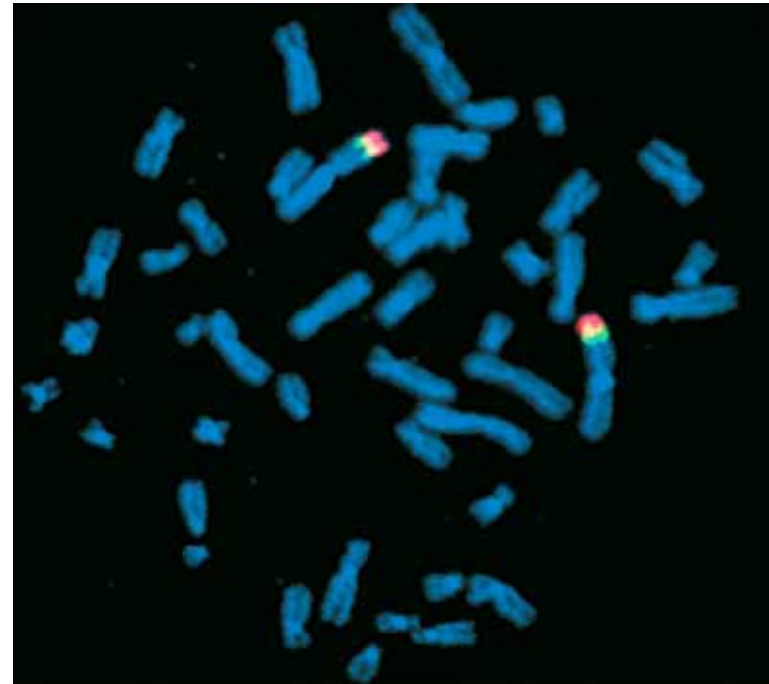
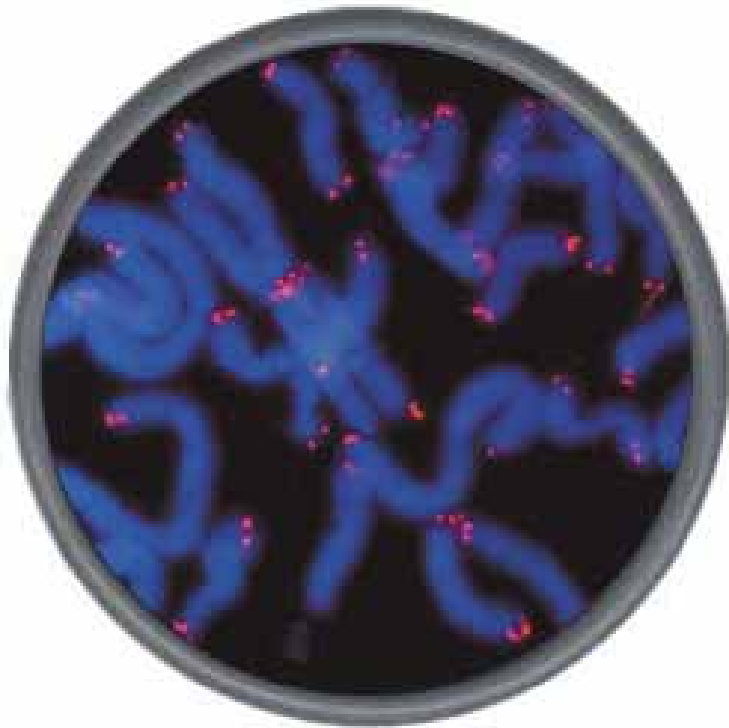


- DNA ve formě metafázových chromozomů je vystavena hybridizaci s fluorescenčně značenou DNA sondou
- DNA sonda má sekvenci komplementární k cílové DNA na chromozomu
- Po hybridizaci je část obsahující cílovou DNA lokalizována na základě fluorescence

Fluorescenční deoxyribonukleotidy pro syntézu FISH DNA sond

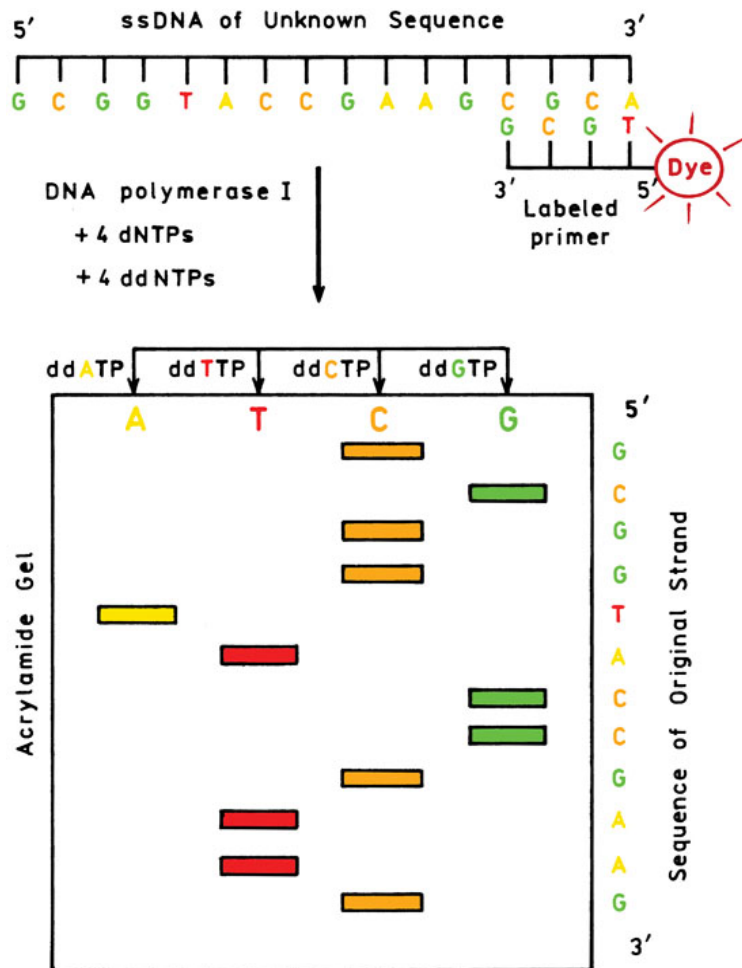


FISH příklady



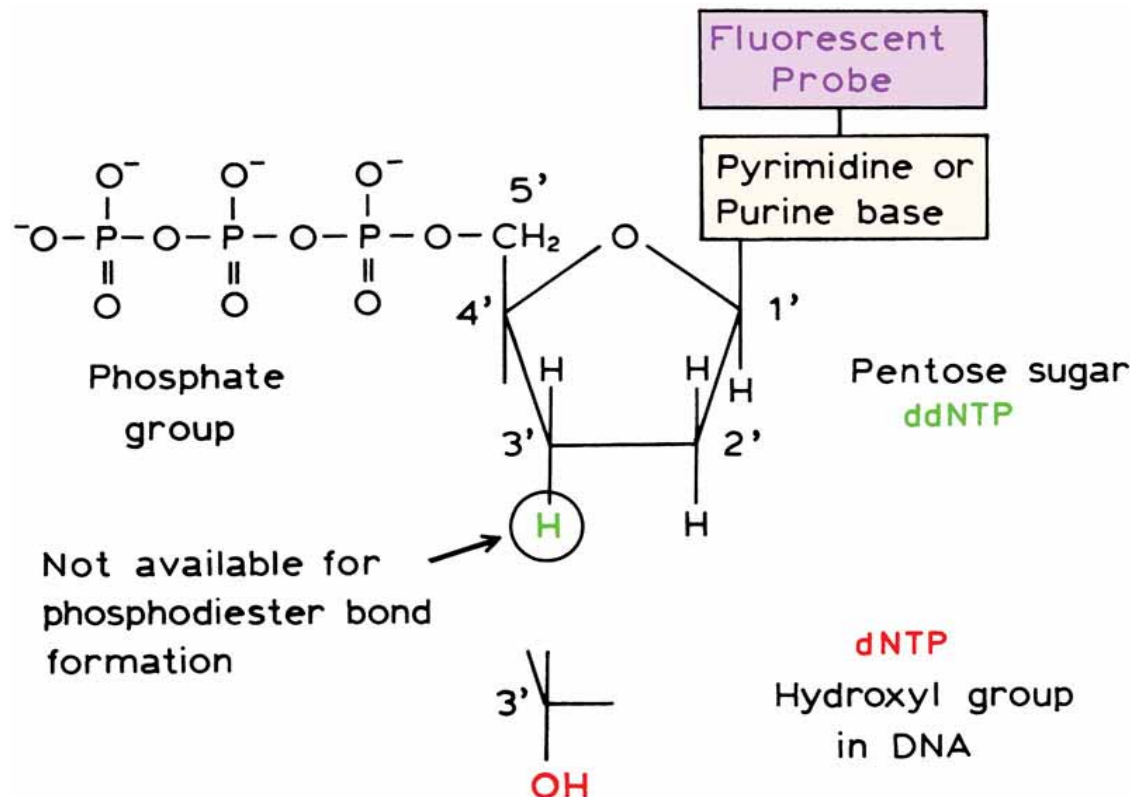
- Chromozomy, které byly hybridizovány s fluorescenčně značenými sondami
- Chromozomální DNA byla nespecificky obarvena DAPI

Radioaktivní sekvenování



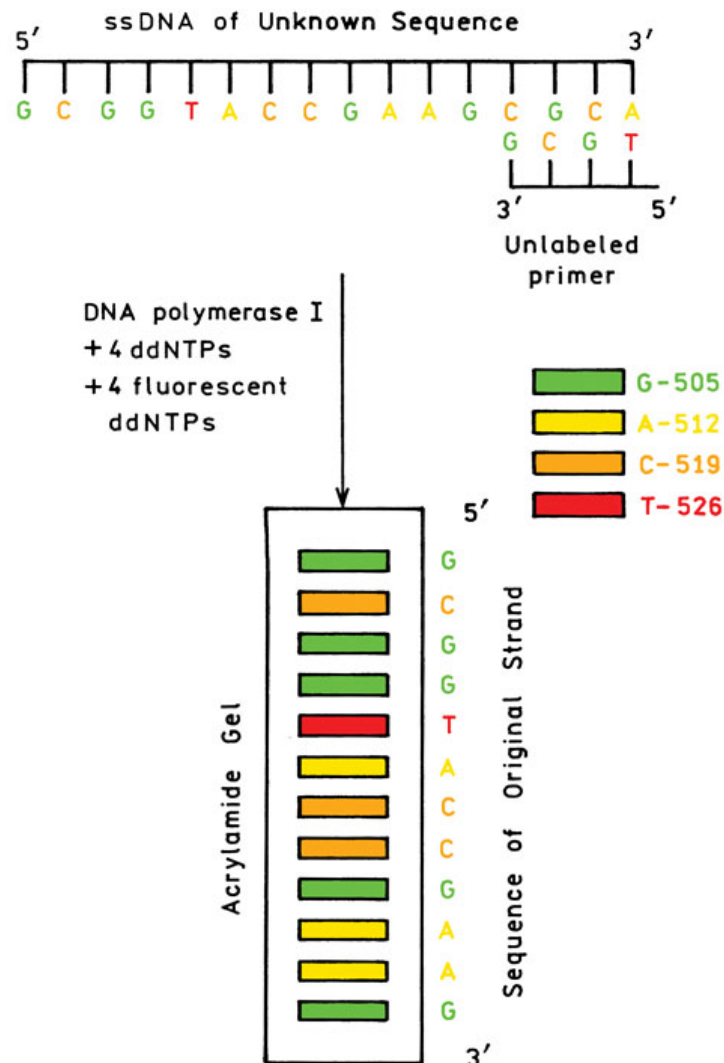
- Prvotní sekvenování používalo radioaktivně značený primer
- Primer byl prodlužován podle sekvenovaného řetězce DNA polymerázou
- Ve směsi normálních nukleotidů (dNTP) byl přidán vždy jeden typ (ddNTP), který zabraňuje dalšímu prodlužování syntetizovaného řetězce
- Takto vzniká směs řetězců DNA s proměnlivou délkou končící vždy daným ddNTP
- Každá reakční směs pro daný ddNTP byla analyzována v jedné elektroforetické jamce (celkově ve 4 jamkách)
- Sekvence byla stanovena z polohy pásu příslušného ddNTP na gelu

Schéma ddNTP DNA



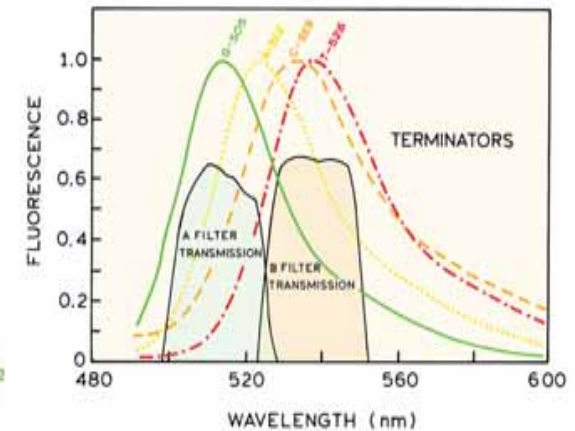
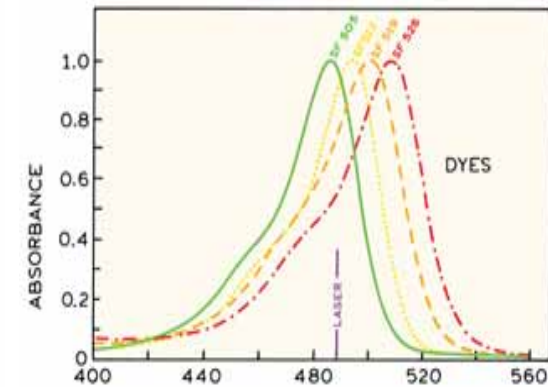
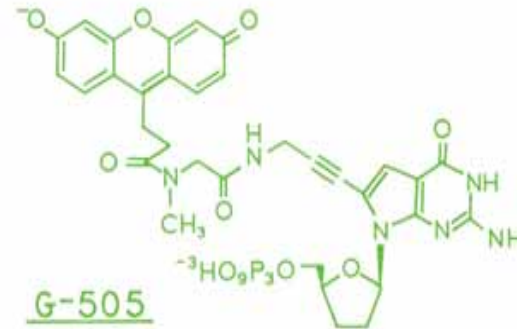
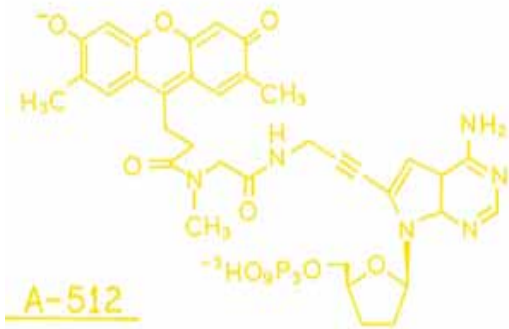
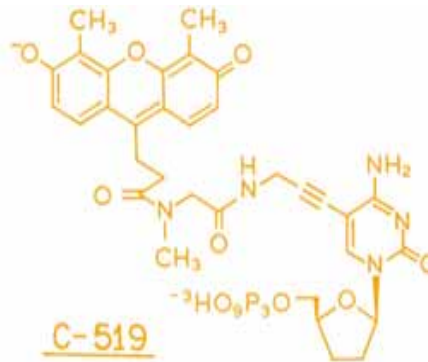
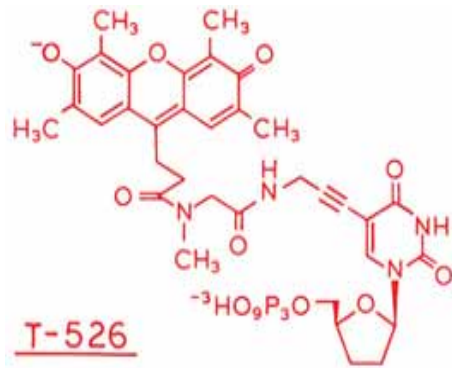
- Dideoxynukleotid-trifosfát ddNTP
- v poloze 3' u ribózy je zaměněna OH skupina za H, což zamezuje dalšímu prodlužování řetězce DNA

Fluorescenční značení zrychlilo sekvenování



- Použití 4 fluorescenčních značek umožnilo použít pouze jednu dráhu v gelu k identifikaci všech nukleotidů
- Fluorescenční skenování umožnilo dokončit projekty sekvenace genomu celých organismů ve výrazně kratší době

Fluorescenční značky pro sekvenaci



Připojení značky přes acetylénovou trojnou vazbu
Všechny značky se excitují jedním laserem (488nm)

Sekvenování DNA

- Nejčastější sekvenační primer M13:

5'- gTA AAA CgA Cgg CCA gTg -3,

http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/animations/dna_sequencing/index.html

Ukázka sekvenátoru



Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.