

Luminiscence a její praktické využití 2

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

Bioluminescence Resonance Energy Transfer

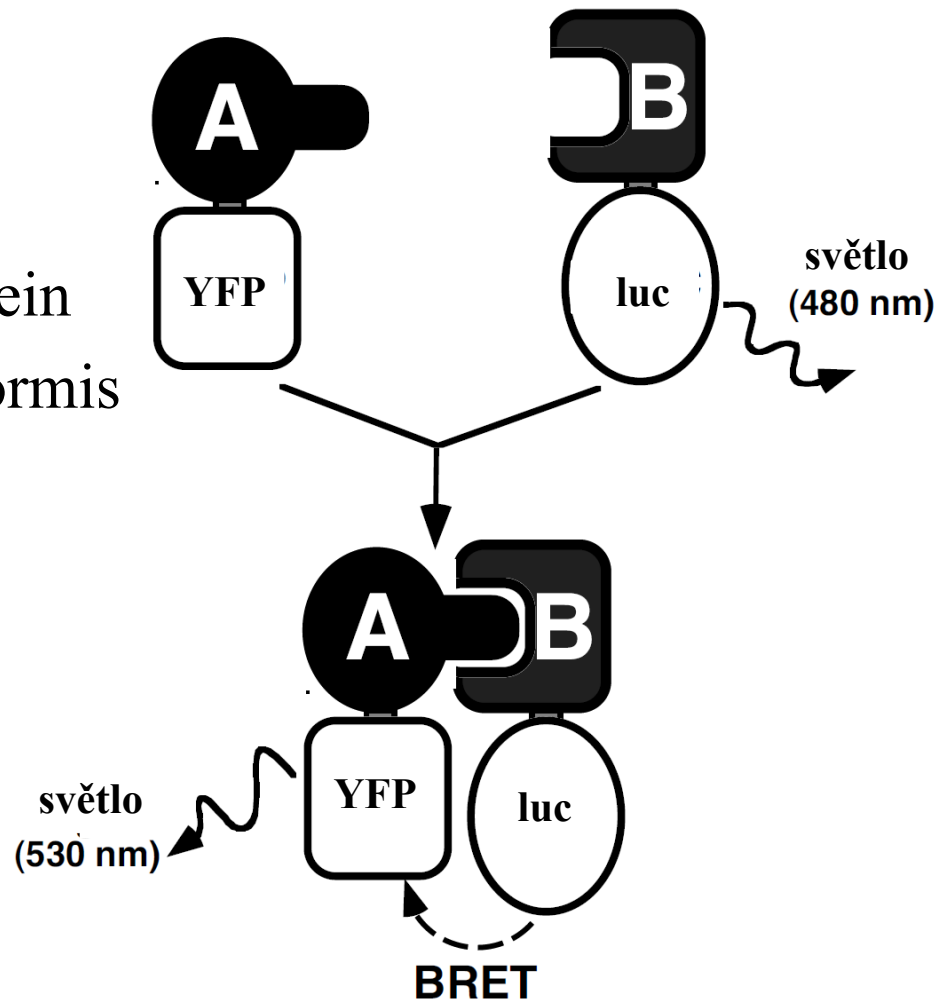
- energie je přenášena z luciferázy (donor) na fluorofor (akceptor), pokud se nachází v dostatečné blízkosti (< 10 nm)
- excitace fluoroforu $>$ emise (a detekce) světla

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

např.:

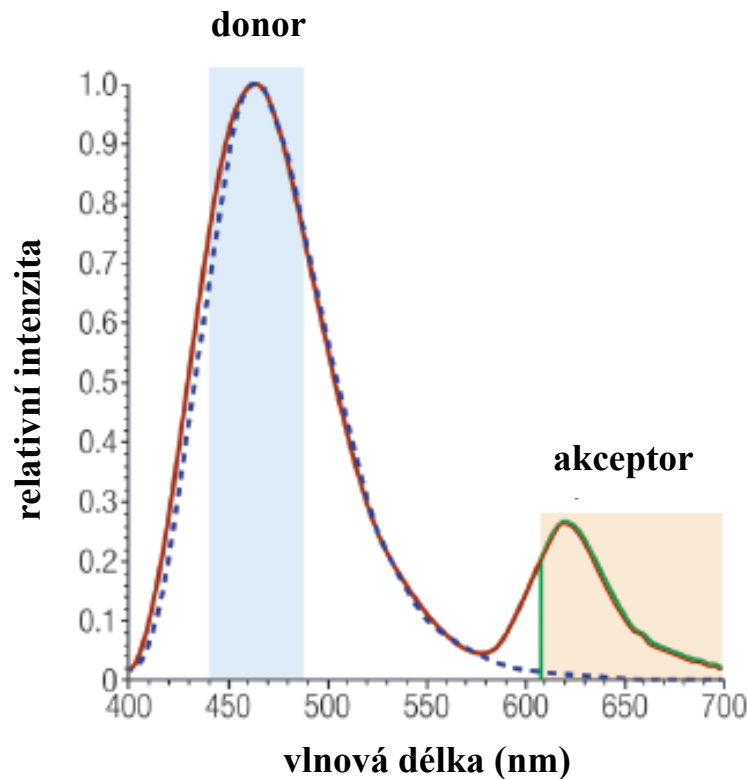
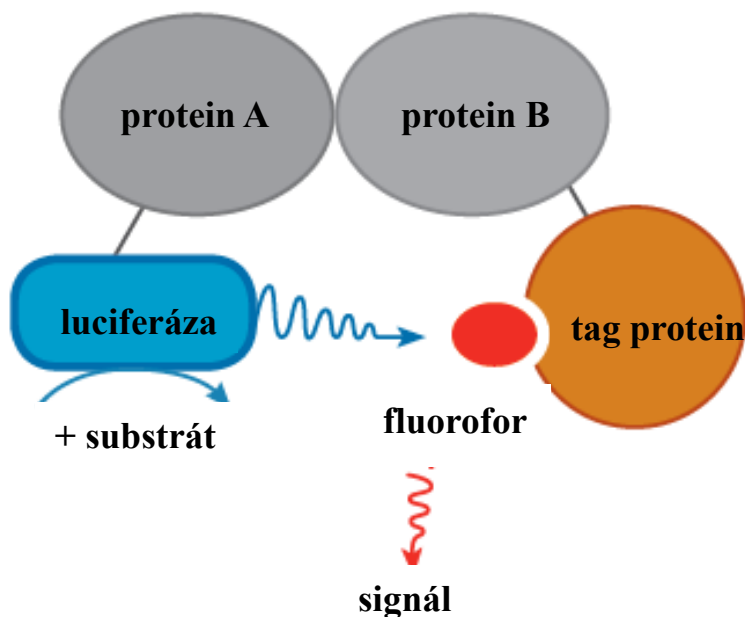
- žlutý fluorescenční protein
- luciferáza *Renilla reniformis*



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

$$\text{BRET index} = \text{emise}_{\text{AKCEPTOR}} / \text{emise}_{\text{DONOR}}$$



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

- měření proteinových interakcí za fyziologických podmínek (v živých buňkách)
- robustnost (nízká variabilita a vysoká reprodukovatelnost)
- vysoká senzitivita
- nevyžaduje žádnou další normalizaci (počet buněk, koncentrace proteinů)

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

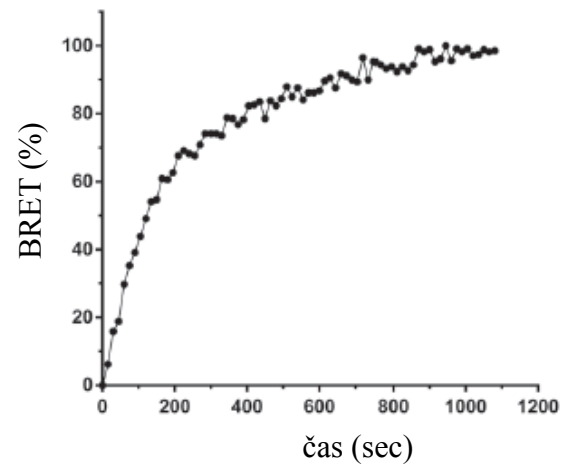
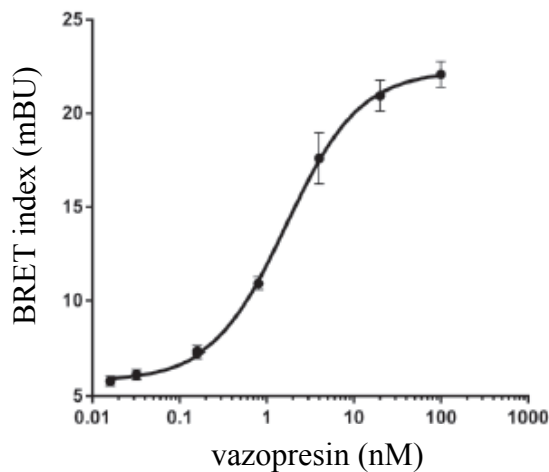
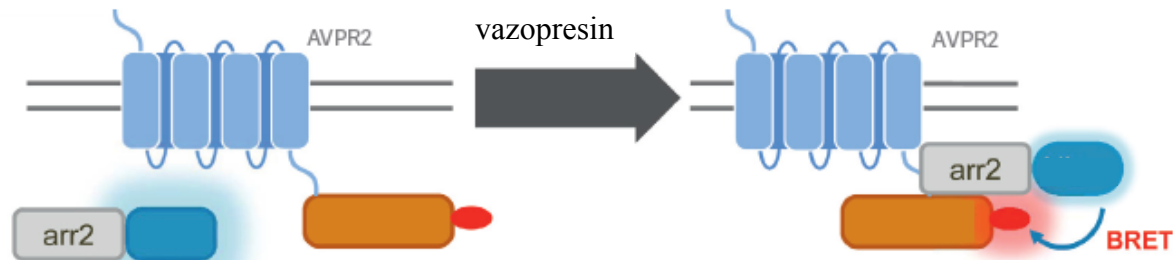
Využití:

- epigenetické proteinové interakce
- interakce signálních proteinů
- interakce kináz
- interakce transkripčních faktorů
- interakce membránových proteinů
- interakce proteinů s RNA

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

Příklad: interakce β -arestinu s receptorem pro vazopresin



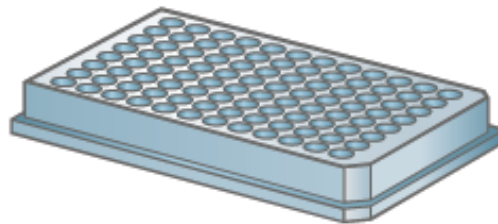
Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie BRET

Pracovní postup



Transfekce konjugovaných
konstruktů do živých
buněk



Přidání ligandu

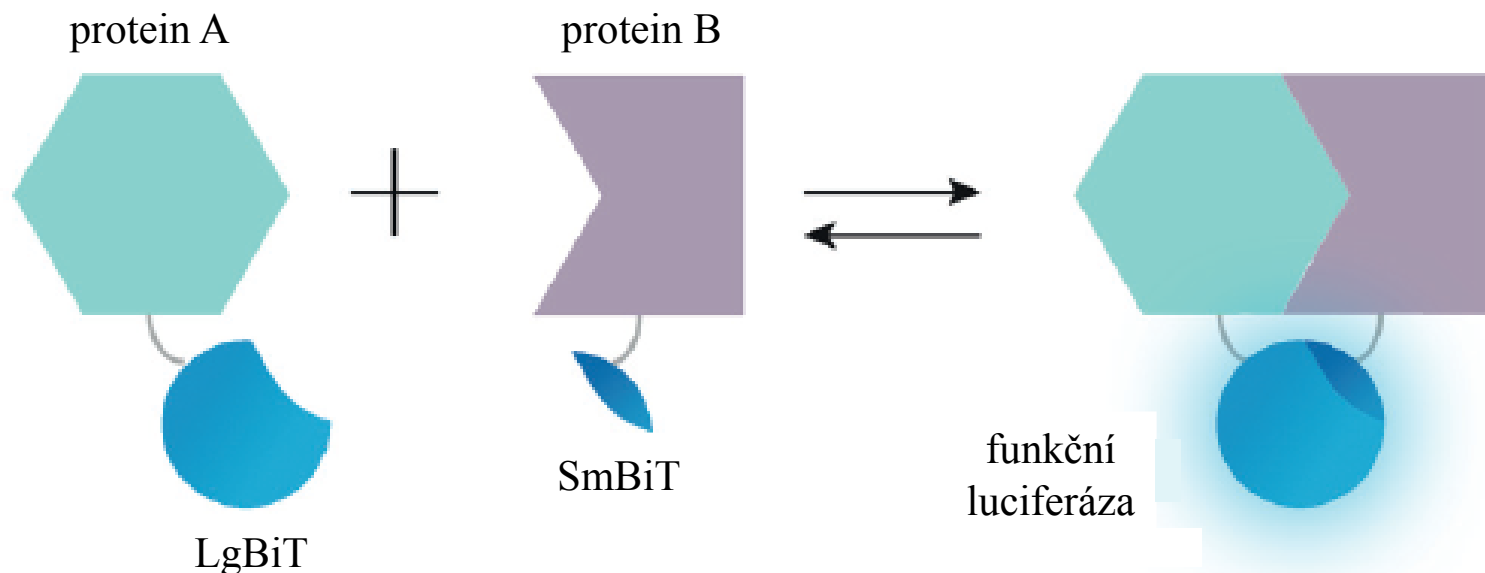


Přidání substrátu, měření
emise donoru a akceptoru,
výpočet BRET indexu

Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie NanoBiT (Binary Technology)

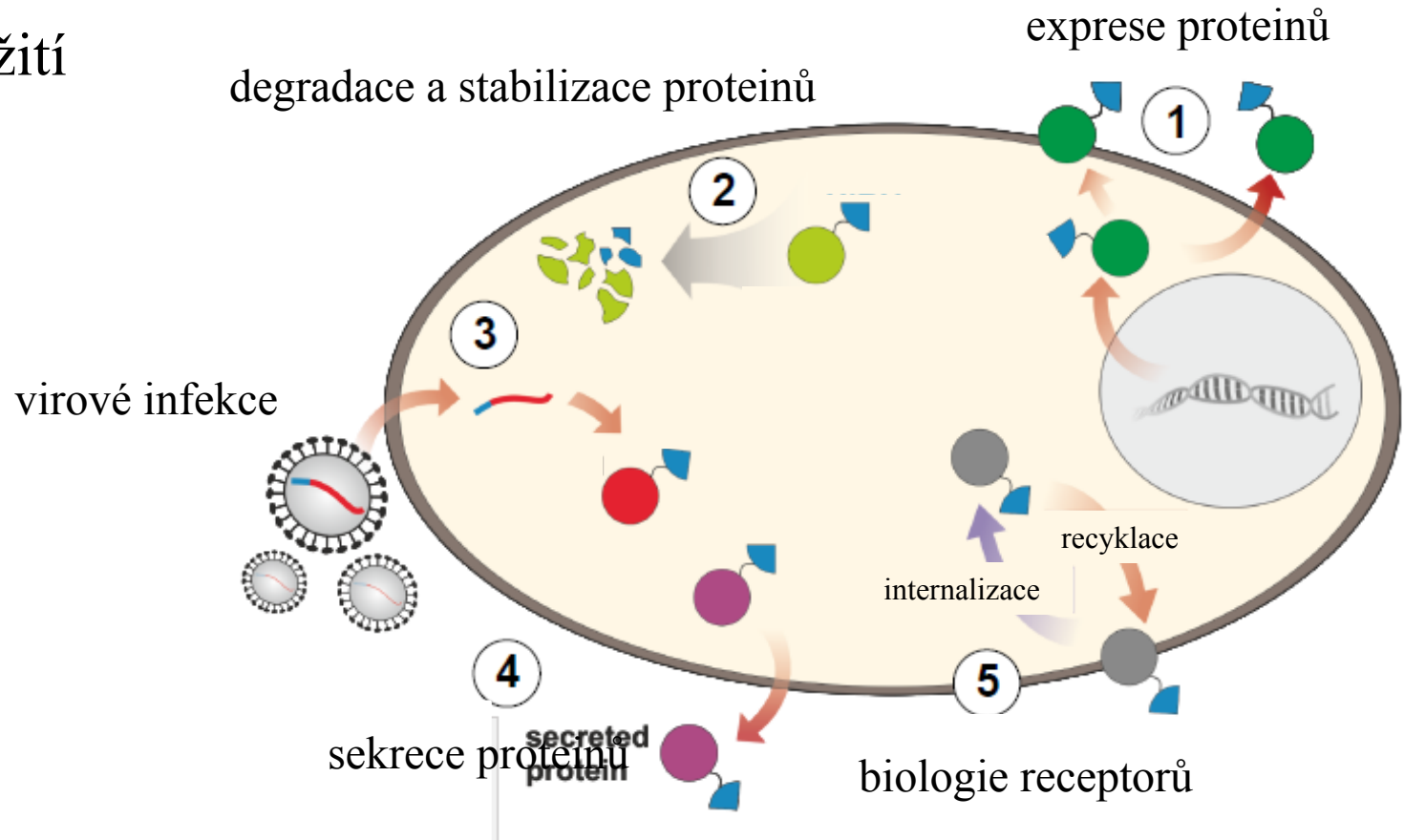
- podjednotky luciferázy jsou konjugovány se zájmovými proteiny
- interakce proteinů vede k sestavení funkční luciferázy



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie NanoBiT

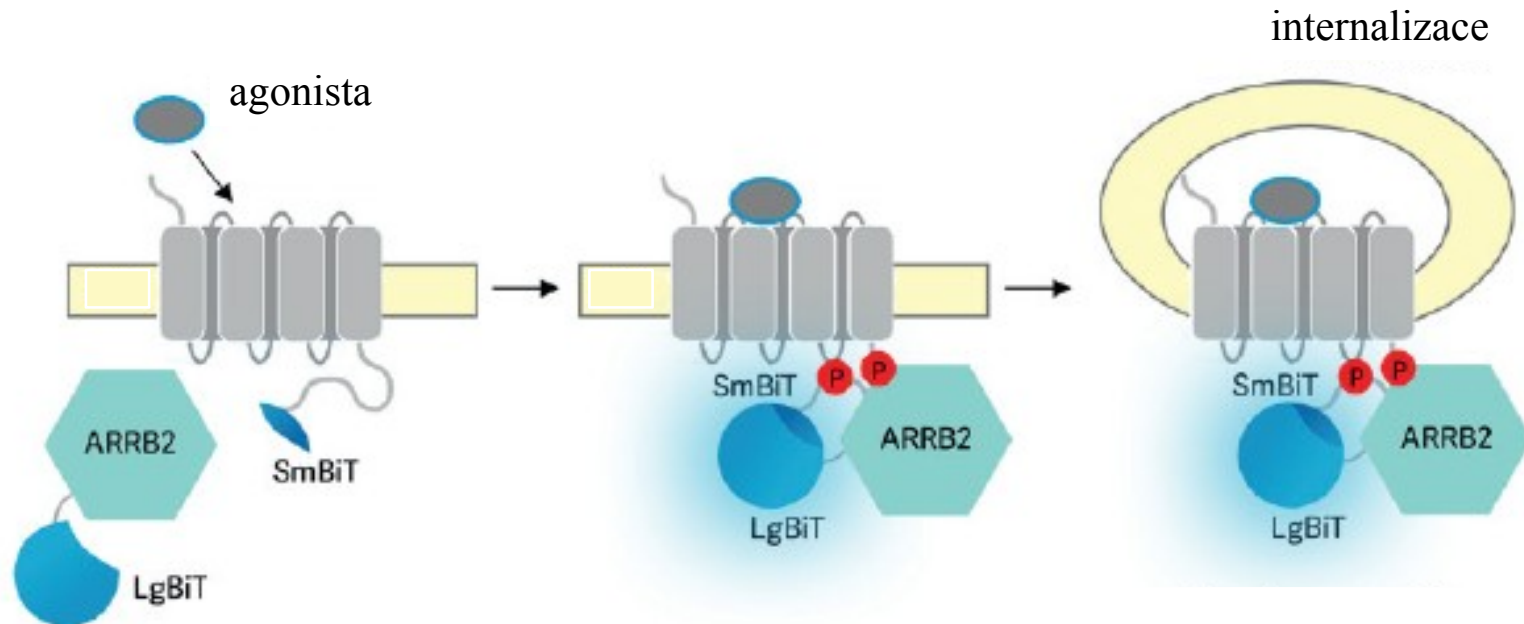
Využití



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie NanoBiT

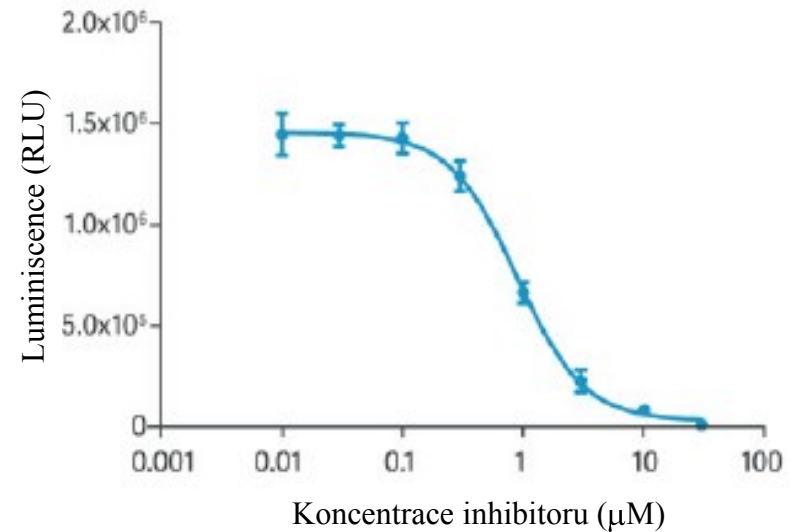
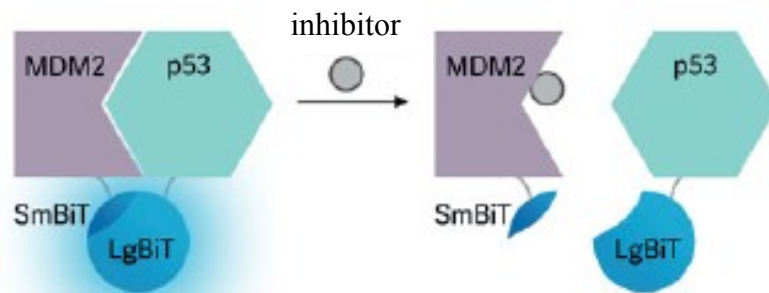
Příklad využití: vazba β -arestinu na GPCR



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie NanoBiT

Příklad využití: inhibice interakce p53/MDM2



Luminometrické aplikace v biologii a medicíně

Technologie NanoBiT

Příklad využití:
asociace a disociace PKA

