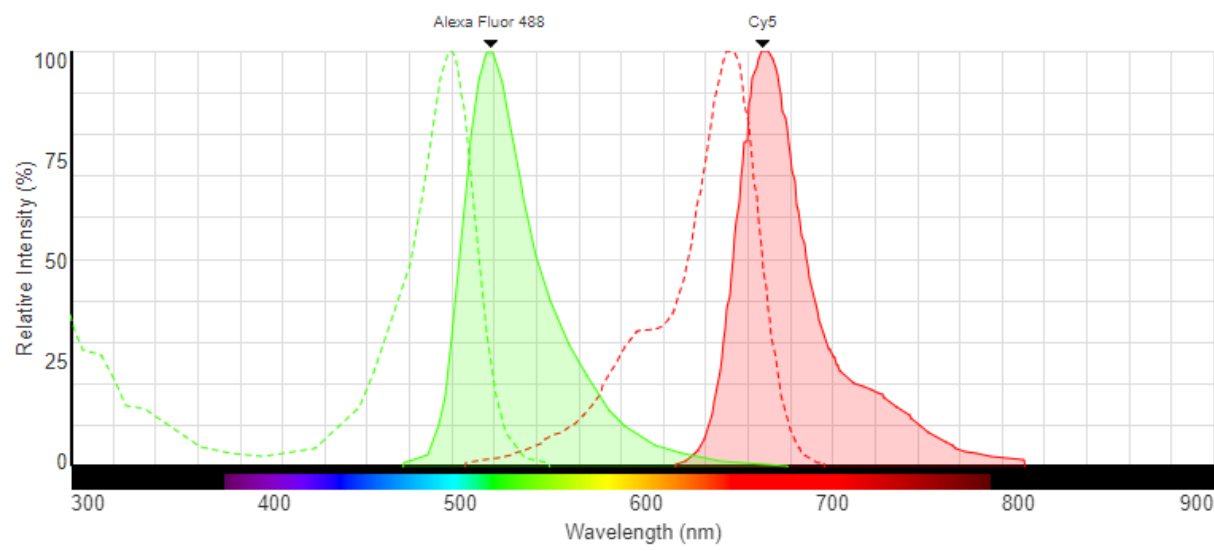


FRET–FLIM praktická ukázka na hybridizaci DNA

Cíl:

Demonstrace FRET (Försterův rezonanční přenos energie) fenoménu pomocí hybridizace DNA. Jednořetězcová DNA (single-strand) o velikosti 40bp je modifikována fluorescenční značkou Cy5 (akceptor) na svém 5' konci a fluorescenční značkou Alexa Fluor 488 (donor) na svém 3' konci. Samotné jednořetězcové vlákno je značně flexibilní, díky čemuž se jednotlivé fluorescenční značky přiblíží k sobě natolik, aby nastal jev FRET. Po přidání neznačeného komplementárního vlákna dochází k hybridizaci a vzniklá dvořetězcová DNA ztratí míru flexibility a nabyde prostorového uspořádání, kde se dva fluorofory od sebe vzdálí natolik, že pozorujeme vymizení FRET signálu.

Demonstraci budeme měřit pomocí fluorescenčních spekter daných fluoroforů a také komplementárně pomocí FLIM (Fluorescence Lifetime), kde budeme pozorovat zvýšení času dohasínání donoru.



Obrázek 1: Excitační a emisní spektrum fluoroforů Alexa Fluor 488 a Cy5.

Vzorky a materiál:

Značená jednořetězcová DNA o zásobní koncentraci 10 μM .

Komplementární řetězec DNA o zásobní koncentraci 10 μM .

Fosfátový pufr (50 mM NaPi, 50mM NaCl, pH=7).

100x ředěný roztok Ludox (koloidní silice).

Přístrojové vybavení:

Fluorimetr Fluoromax 4 s TCSPC měřící kartou, pulsním zdrojem a FLIM detektorem.

Měřící kyvety.

Postup měření:

- Zapnout přístroj Fluoromax 4.
- Zapnout měřicí přístroj DeltaHUB a NanoLED (nechat klíček v poloze StandBy).
- Zapnout PC.
- Spustit program FluorEssence a inicializovat přístroj (ikona M).
- Spustit program FluoroMax4USBLamp a vypnout lampu přístroje.
- Naředit fluorescenčně značené DNA vlákno na finální koncentraci 100 nM o objemu 1,5 ml.
- Napipetovat 1,4 ml zředěného roztoku Ludox do optické kyvety a umístit do měřicí cely přístroje.
- Spustit program DataStation, vybrat konfiguraci Fluoromax_PLUS_C, vybrat Emission 1 jako emisní monochromátor a S jako detektor. Zakliknout Use NanoLED Sample Chamber...
- Vybrat měřicí metodu Lifetime.
- Otočit klíčkem na NanoLED přístroji do pozice ON.
- Nastavit S detector na 950 V, Cout rate na 5000, emisní vlnovou délku na 456 nm a šířku štěrbinu 8 nm.
- Zkontrolovat, že je krycí destička před detektorem přístroje, a ne detektorem lifetime.
- Označit Prompt signál a spustit měření pro získání IRC signálu.
- Napipetovat 1,4 ml zředěné fluorescenčně značené DNA do kyvety a vložit do přístroje.
- Změnit emisní vlnovou délku na 515 nm (maximální emise donorového fluoroforu), ponechat šířku štěrbinu na 8 nm.
- Přejmenovat signál Decay na DNA-ss a spustit měření. Zde sběr dat bude trvat podstatně déle než v případě měření IRC signálu. Dáno koncentrací a svítivosti fluoroforu.
- Přejít do programu FluorEssence, opět zapnout lampu přístroje a vyndat krycí destičku před detektorem přístroje. Vybrat měření emisního spektra s nastavením: excitace při 490 nm (maximální excitace donorového fluoroforu), měření rozsah emise 495-750 nm. Štěrbinu ponecháme na hodnotě 5 nm. Detektor nastavíme na měření S1/R1 signálu. Změřit dané spektrum.
- Přidat 20 μ l komplementárního řetězce DNA do kyvety a řádně promíchat. Inkubace 5min při RT.
- Vypnout lampu přístroje, vložit krycí destičku před detektor přístroje, zkontrolovat předchozí identické nastavení pro měření lifetime. Přidat nový signál Decay a přejmenovat jej na DNA-ds a spustit měření. Uložit data.
- Opět přejít do programu FluorEssence a dle identického nastavení v předchozím kroku změřit emisní spektrum.
- Pomocí softwaru DAS6 analysis vyhodnotit lifetime data a porovnat změnu.
- Porovnat změnu emisních spekter před a po hybridizaci DNA.
- Diskuze výsledků.

Užitečné informace:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D},$$

kde E je efektivita FRET přenosu, τ_{DA} značí dobu života fluoroforu donoru v přítomnosti akceptoru a τ_D značí dobu života fluoroforu donoru bez přítomnosti akceptoru.

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6},$$

kde R_0 je Försterova vzdálenost při E rovno 50 %. R je reálná vzdálenost fluoroforů.

V našem případě sledovaný fluorescenční FRET pár má hodnotu $R_0 = 60 \text{ \AA}$.

Jedna nukleotidová báze v DNA řetězci odpovídá přibližně $3,4 \text{ \AA}$ vzdálenosti.