

Fluorescenční metody ve vědách o životě

Ctirad Hofr



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

NÁRODNÍ CENTRUM VÝZKUMU BIOMOLEKUL

Lifeb
lablifeB.org

První setkání v rámci předmětu

1. Co je náplní přednášek?
2. Jaké budou praktické úlohy v cvičení?
3. Kde se dají získané poznatky využít?
4. Jaká bude organizace výuky?



Proč spektroskopické metody?

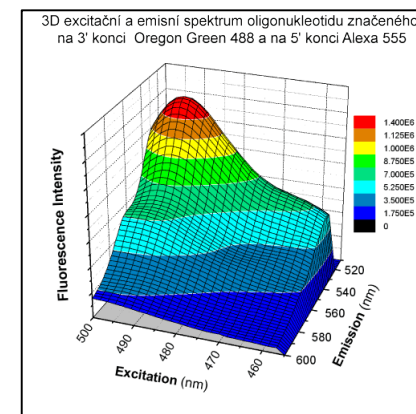
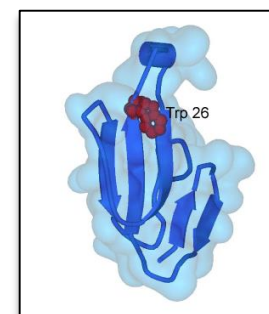
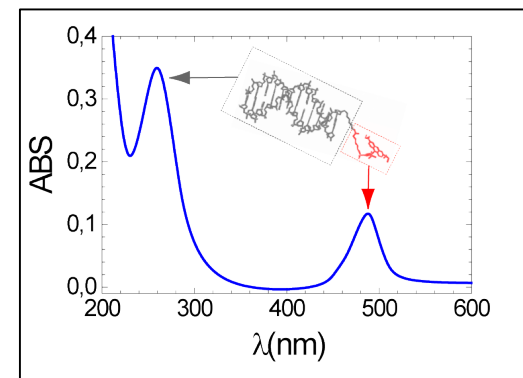
- Poskytují kvantitativní údaje, což usnadňuje srovnávání různých biologických systémů

Proč fluorescence?

- Umožňuje nám vidět pouhým okem, co bychom jinak neviděli

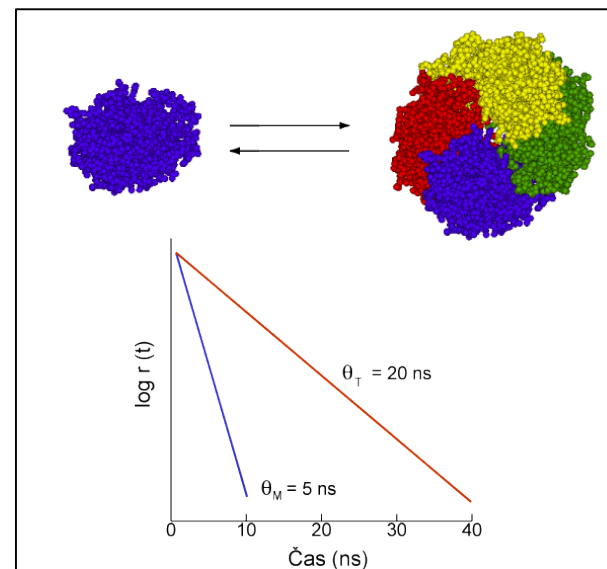
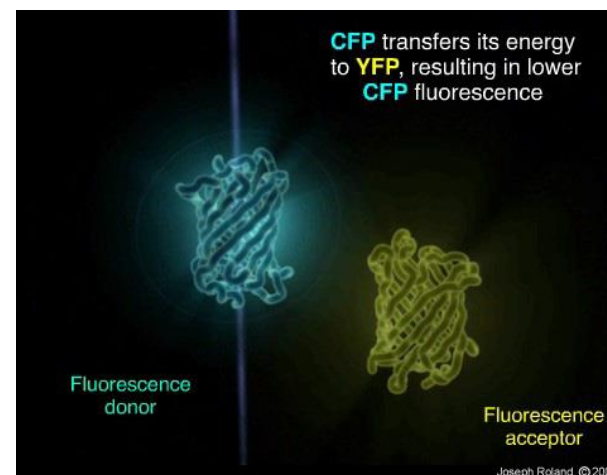
1. Obsah přednášek I

- Absorbční a fluorescenční spektroskopie v biologické analýze molekul
- Vlastní fluorescence proteinů
- Časově ustálená a časově rozlišená fluorescence (Steady state, Time-resolved)



Obsah přednášek II

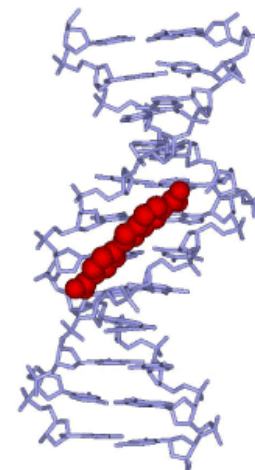
- Zhášení fluorescence, fluorescenční rezonanční přenos energie - použití při sledování interakce a strukturních změn molekul
- Anizotropie fluorescence a její změna při interakci makromolekul



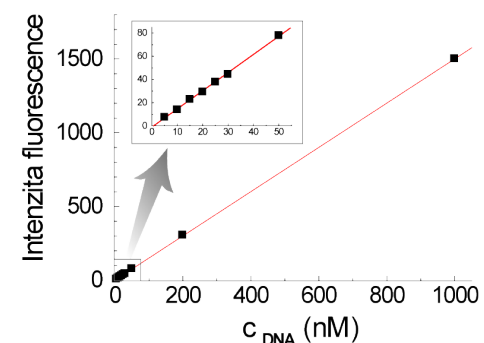
Obsah přednášek III

- Nevlastní fluorescence - fluorescenční značky, sondy a indikátory
- Fluorescenční značení DNA a proteinů
- Analytické použití fluorescence pro stanovení koncentrace molekul

Fragment DNA s navázanou fluorescenční sondou DAPI

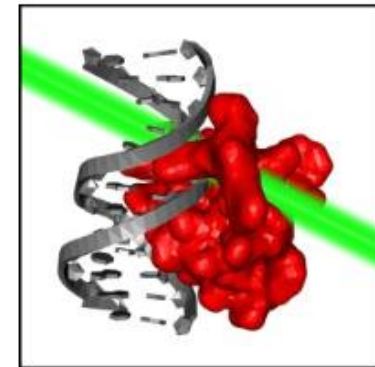


Fluorescenční stanovení koncentrace DNA



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](#)



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.

2. 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
- 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
- Fluorescenční mikroskopie (fluorescenční *in situ* hybridizace)
- Studium interakce molekul za pomoci anizotropie fluorescence – vazba proteinu a fluorescenčně značené DNA

Fluorescenční metody ve vědách o životě

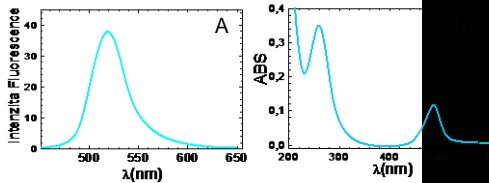
Schematické znázornění metodických přístupů použitých při praktické výuce předmětu

Příprava fluorescenčně značené DNA



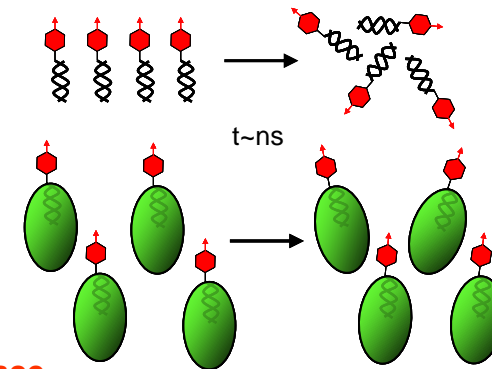
Při přípravě fluorescenčně značené DNA se používá **gelová filtrace** pro separaci nenavázaného fluoroforu po značení fragmentu DNA

Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA



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

Studium vazby DNA a proteinu Anizotropie fluorescence



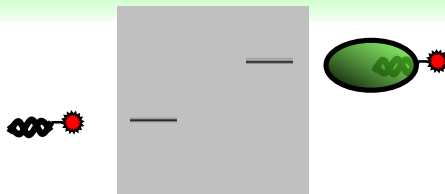
nízká anizotropie

vysoká anizotropie

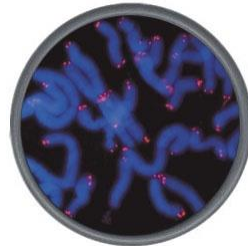
Excitace

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

Vizualizace molekul při elektroforetické separaci

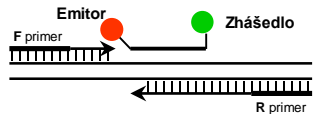


Fluorescenční mikroskopie sledování hybridizace *in situ*

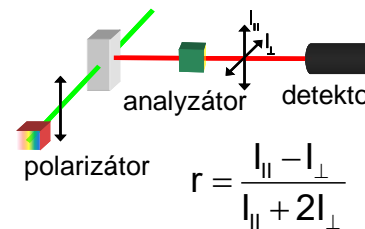


Metafázové chromozómy po fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)

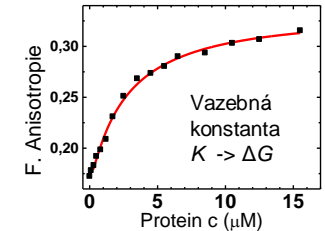
Real-time PCR detekce amplifikace DNA



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 značeného proteinu

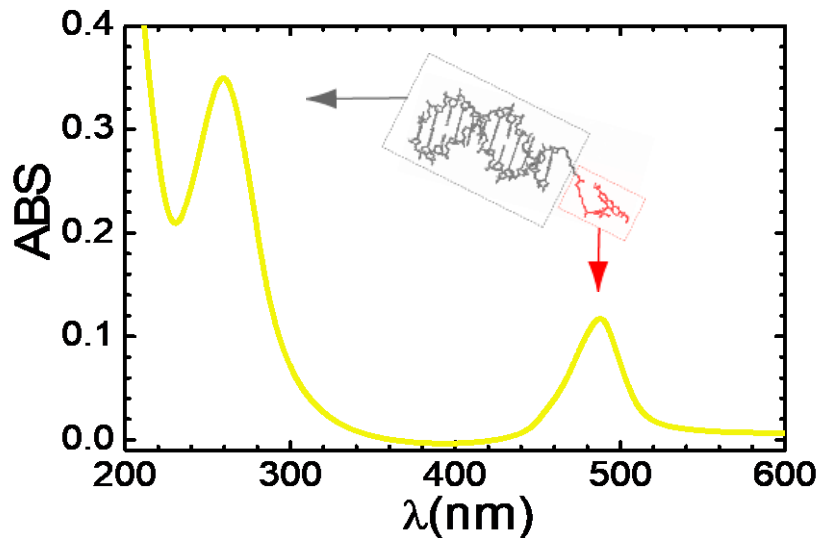
Výhody fluorescenčního značení molekul

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

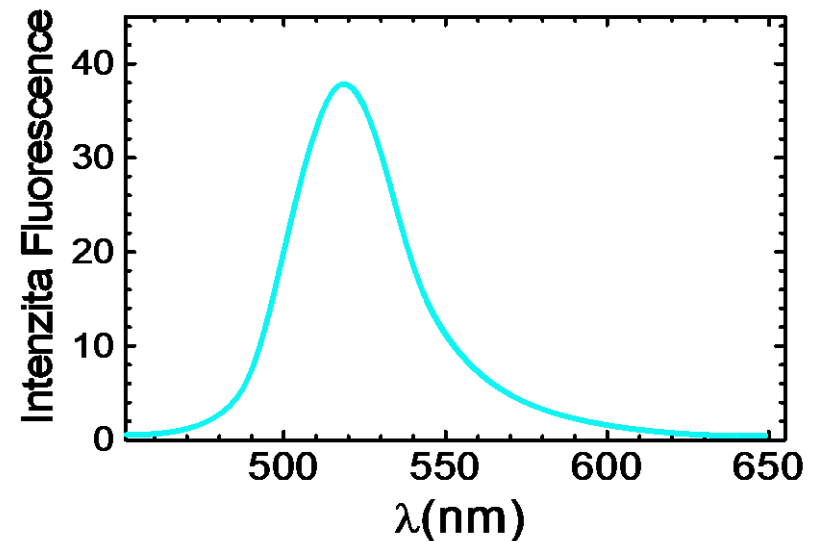


Při fluorescenčním značení se používá **gelová filtrace** pro separaci nenavázaného fluoroforu od značené biomolekuly.

Spektroskopická charakterizace fluorescenčně značené DNA

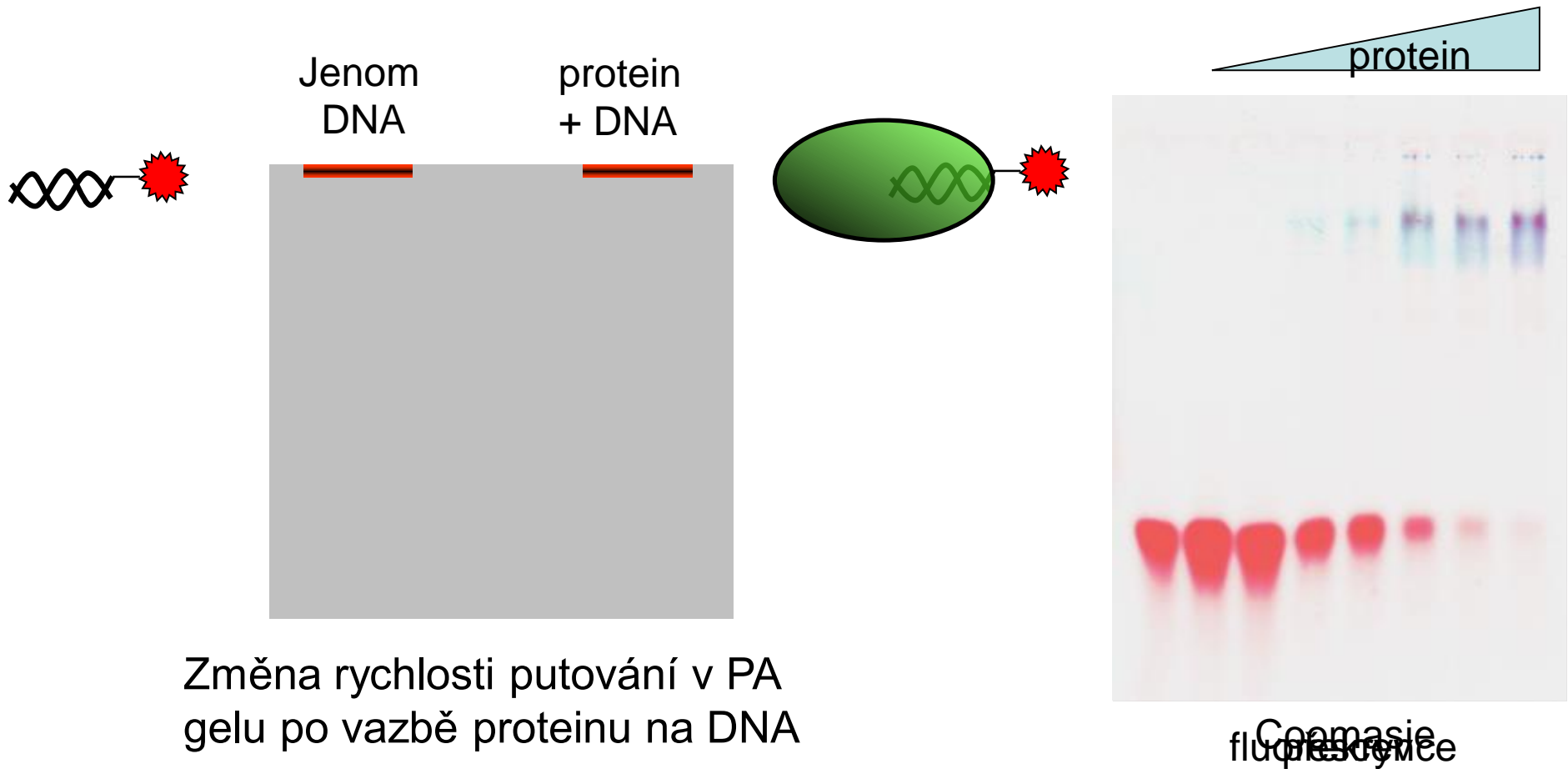


UV/Vis absorbní spektrum (-)



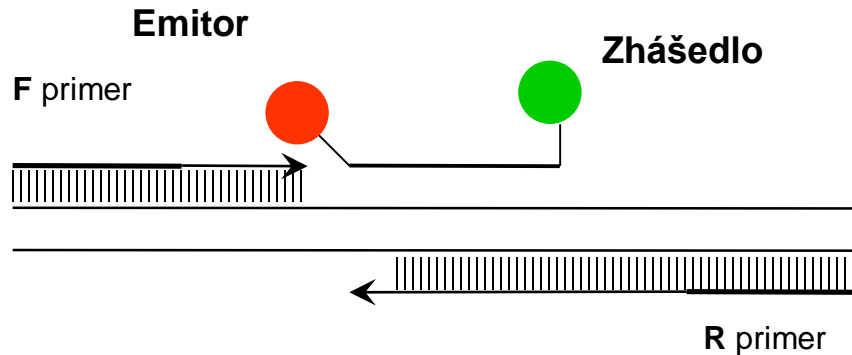
fluorescenční emisní spektrum (-)

Vizualizace molekul při elektroforetické separaci

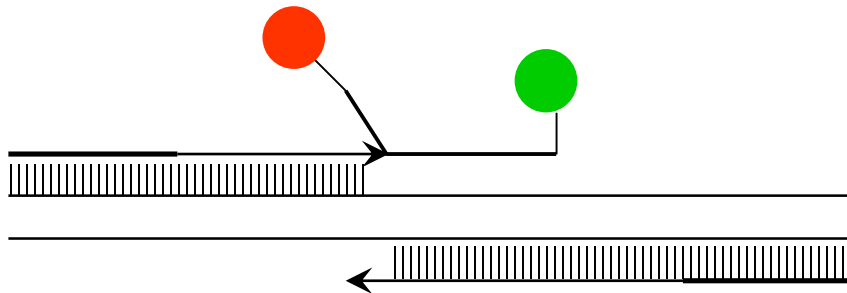


Real-time PCR

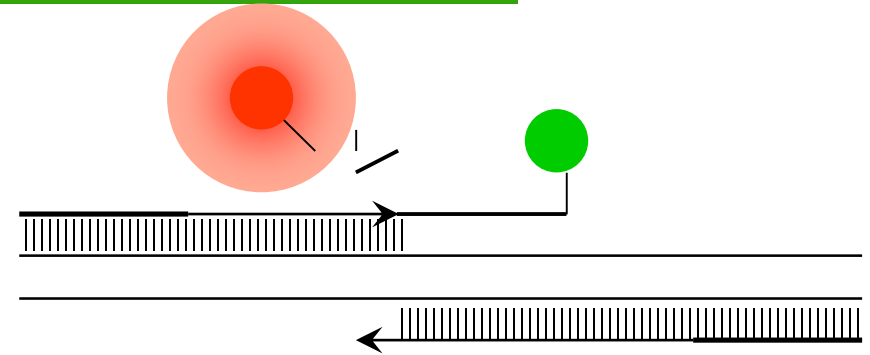
detekce amplifikace DNA



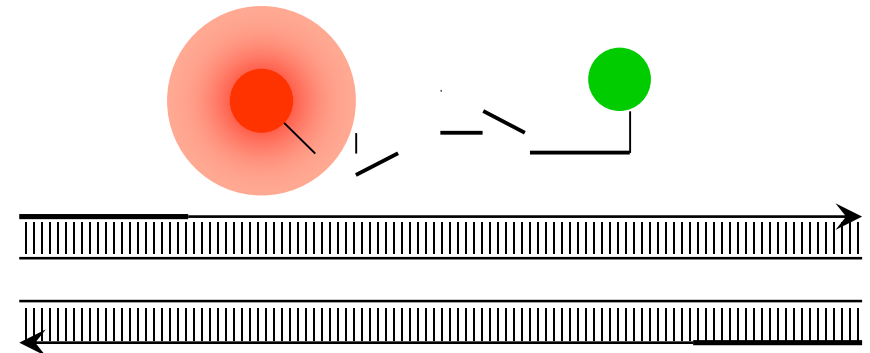
1. Značená sonda se hybridizuje s komplementární sekvencí. Záření Emitoru je zhášeno a není pozorováno.



2. Při polymerizaci dochází k nahrazení sondy novým řetězcem.



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



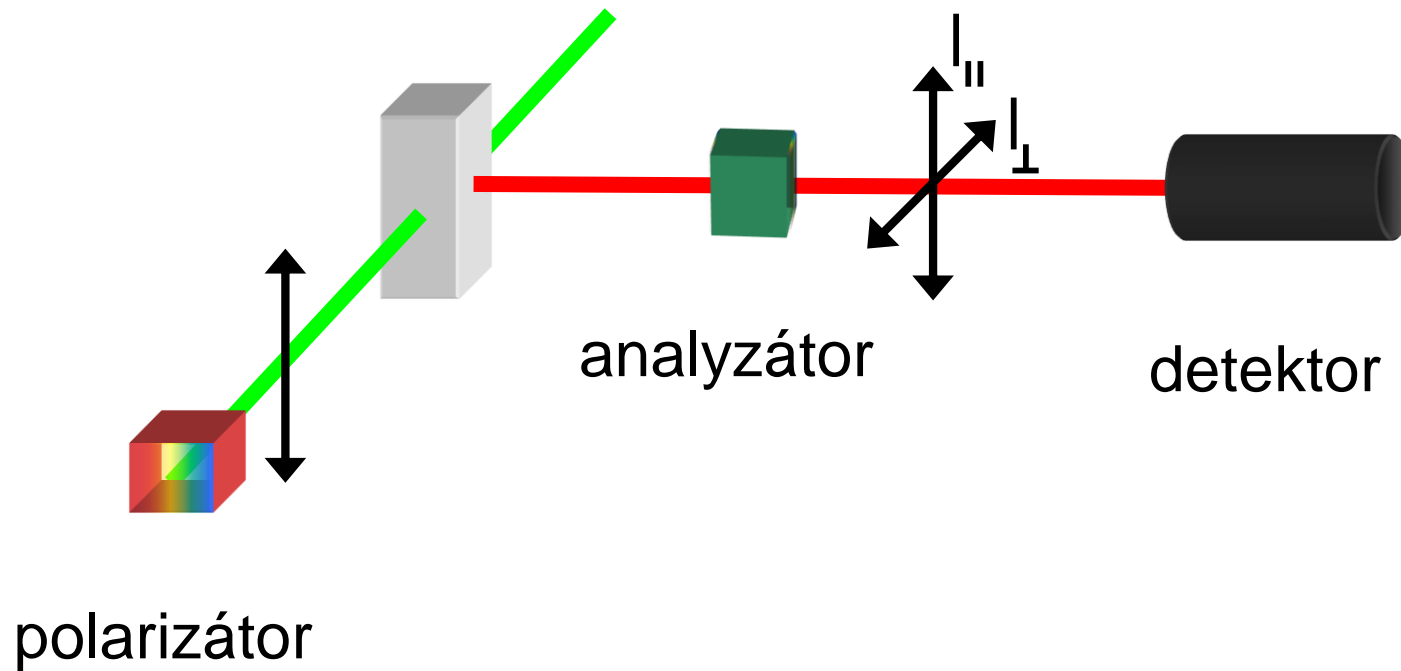
4. Polymerizace je dokončena. Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA.

Fluorescenční mikroskopie sledování hybridizace *in situ*



Metafázové chromozómy po fluorescenční
in situ hybridizaci (FISH)

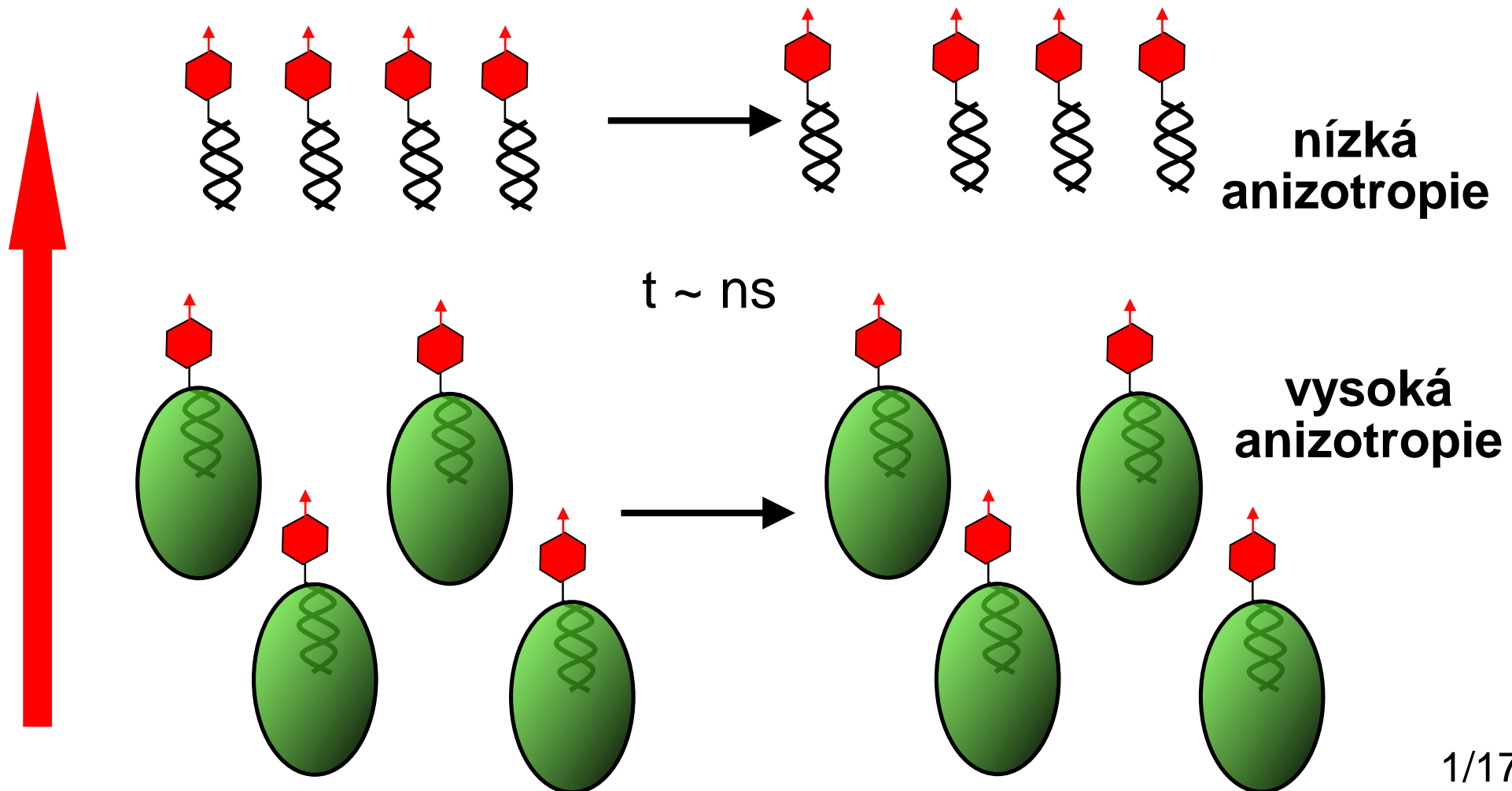
Fluorescenční anizotropie



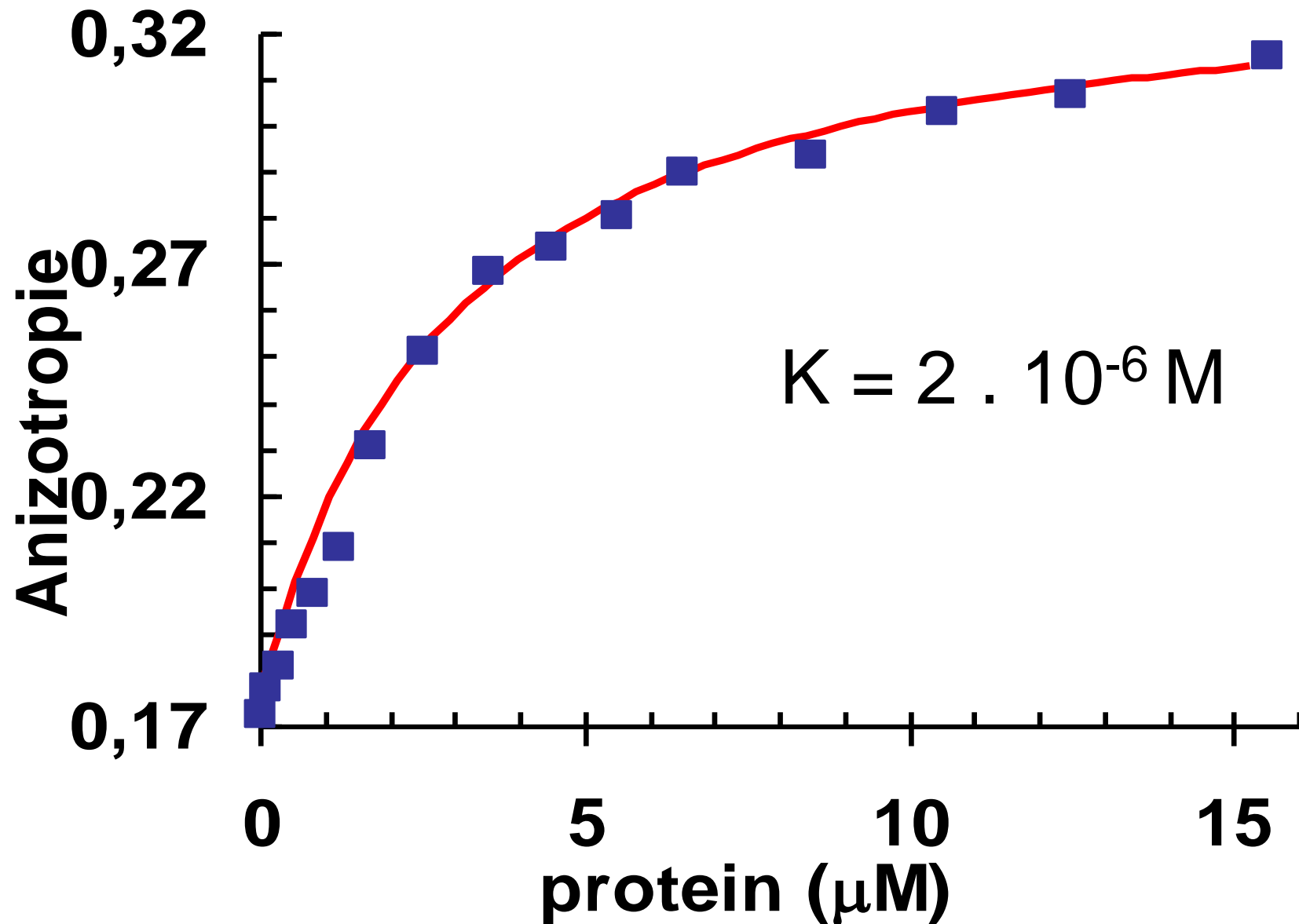
Princip sledování vazby makromolekul

Excitace

Emise



Vazba proteinu na DNA

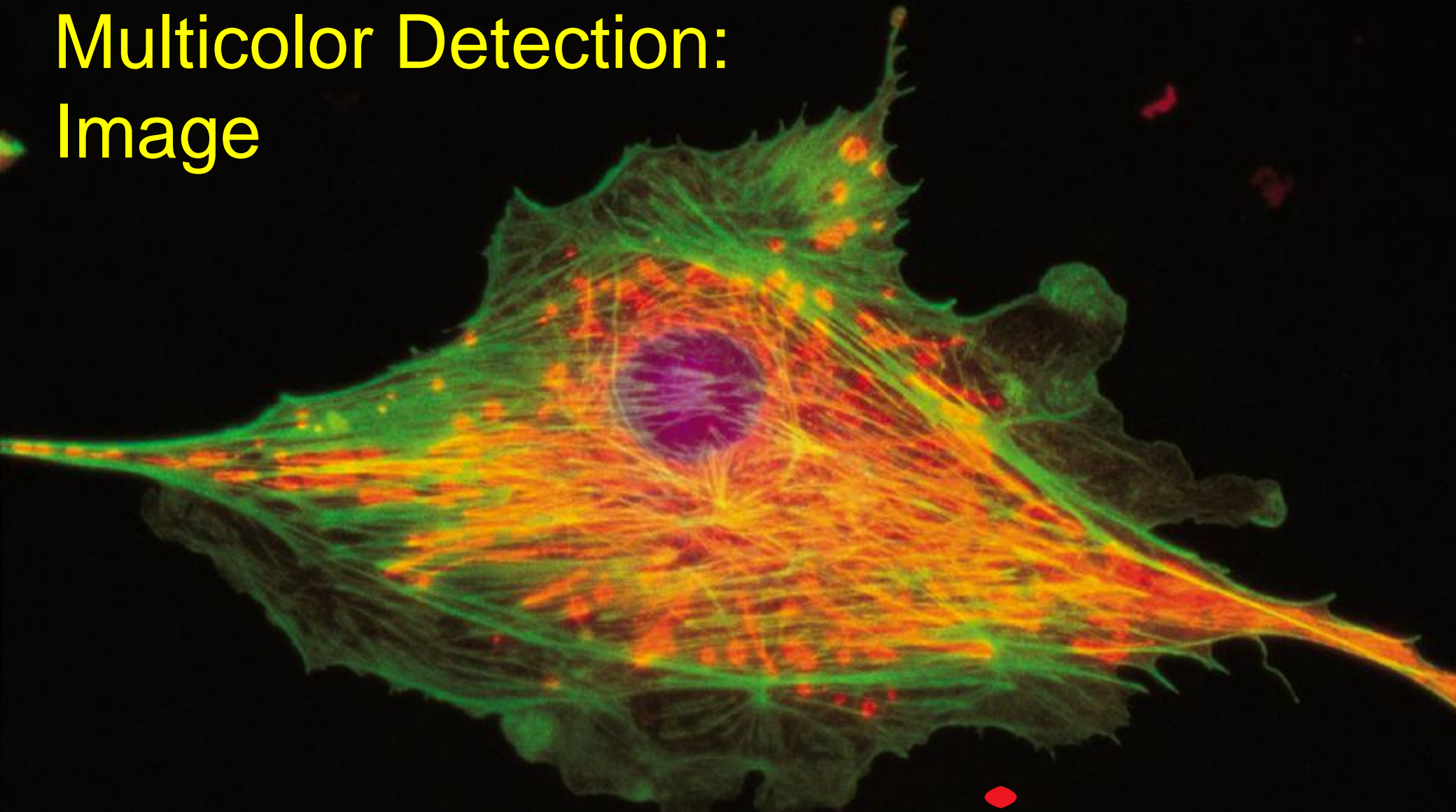


3. Kde se dají využít získané znalosti?

- Všude 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 např. vizualizace biomakromolekul v gelu a pod mikroskopem
- **V navazujících cvičeních C7235 !**



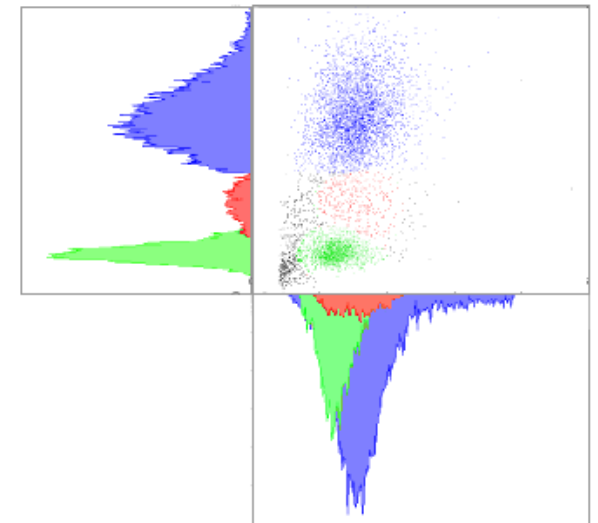
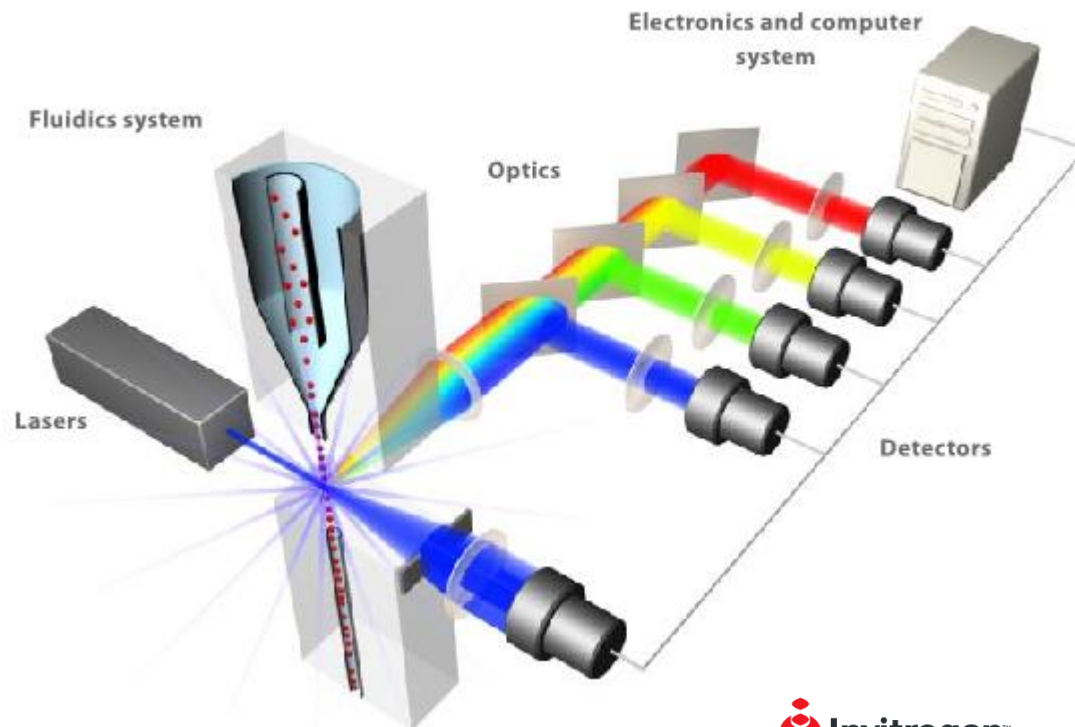
Multicolor Detection: Image



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

Spektroskopie kolem nás



Fluorescence, kde bychom ji nečekali



Je tato fluorescence přírodního nebo syntetického původu?

Úlohy = případové studie

- Celkově 4 úlohy
- Za úlohy lze získat body, které se připočítávají k testu u zkoušky
- V případě úspěšného splnění všech úloh dostatek bodů pro vykonání ústní zkoušky
- Omezená doba možnosti řešení úloh 48 h

Datum praktického cvičení

Návrh termínu pro cvičení

14.-16.1.2019



Příště: Co všechno svítí na diskotéce?



Domácí úkol

- Naučit se komentovat video od 0:42 do 3:00

Introduction to Fluorescence

[https://www.youtube.com/watch?v=SGFlr1jFNB
M&feature=youtu.be&t=42](https://www.youtube.com/watch?v=SGFlr1jFNBM&feature=youtu.be&t=42)