

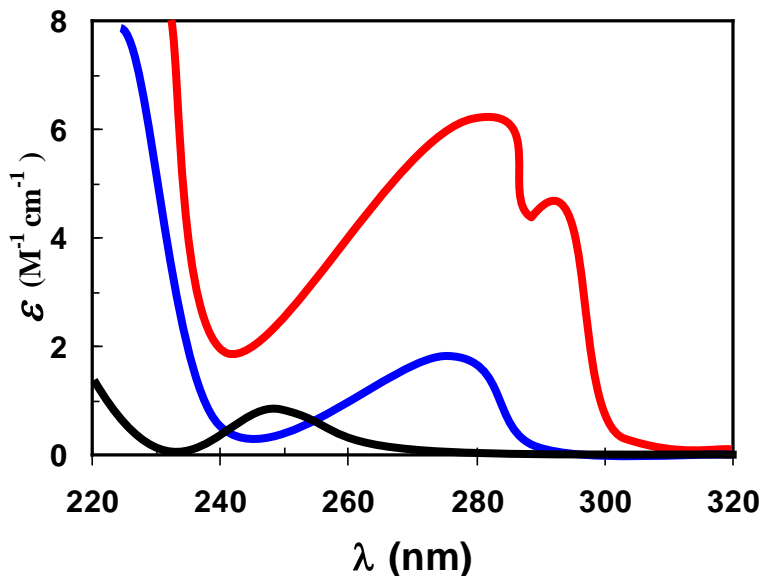
Nevlastní fluorescence

Fluorescenční metody ve vědách o živé přírodě

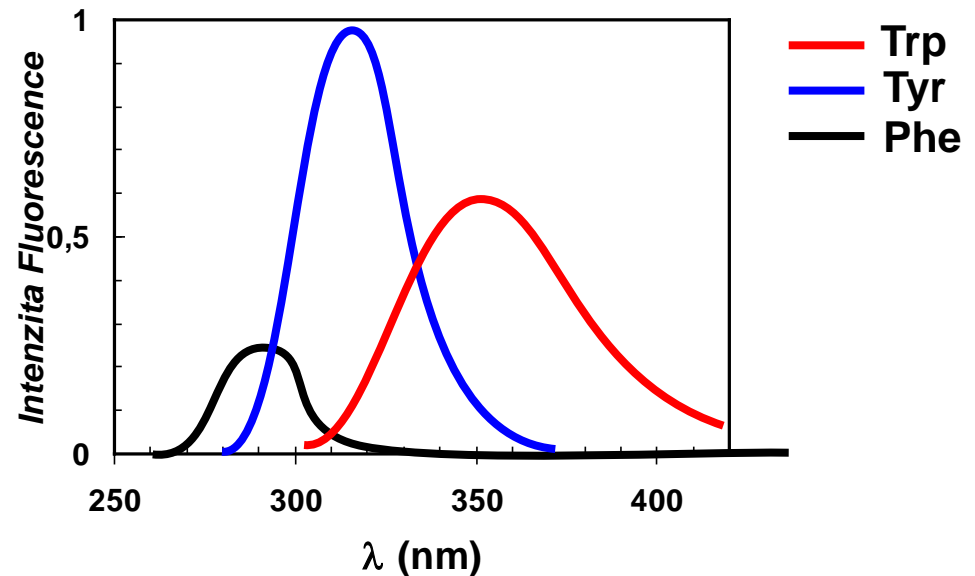
Ctirad Hofr

Dá se vnitřní fluorescence proteinů použít k určení koncentrace?

Absorbance



Fluorescence



- Jenom ve velmi omezené míře a pouze u některých proteinů (závislost emise tryptofanu na poloze ve struktuře proteinu, vzájemné zhášení fluorescence AK přenosem energie)
- Při použití vnějšího značení je stanovení koncentrace mnohem přesnější

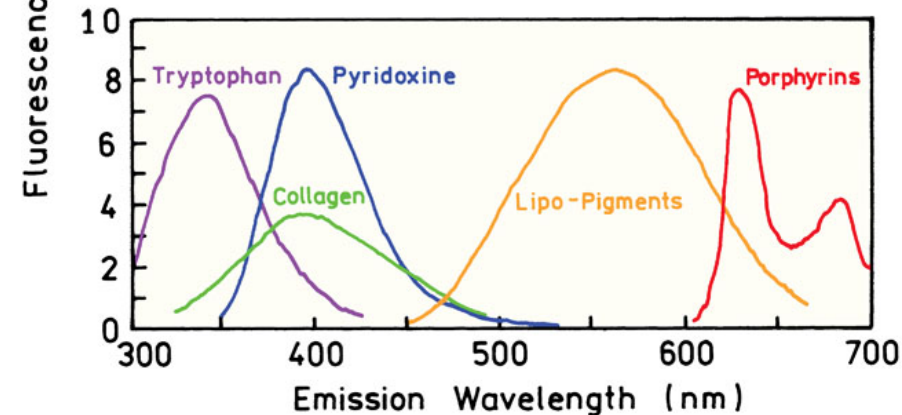
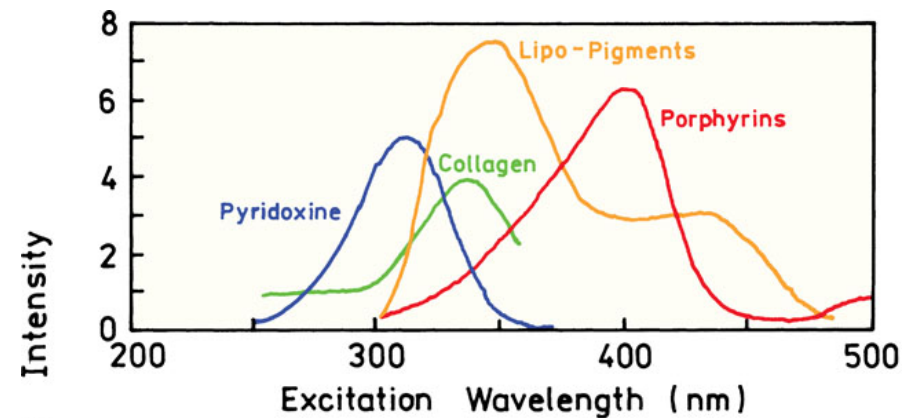
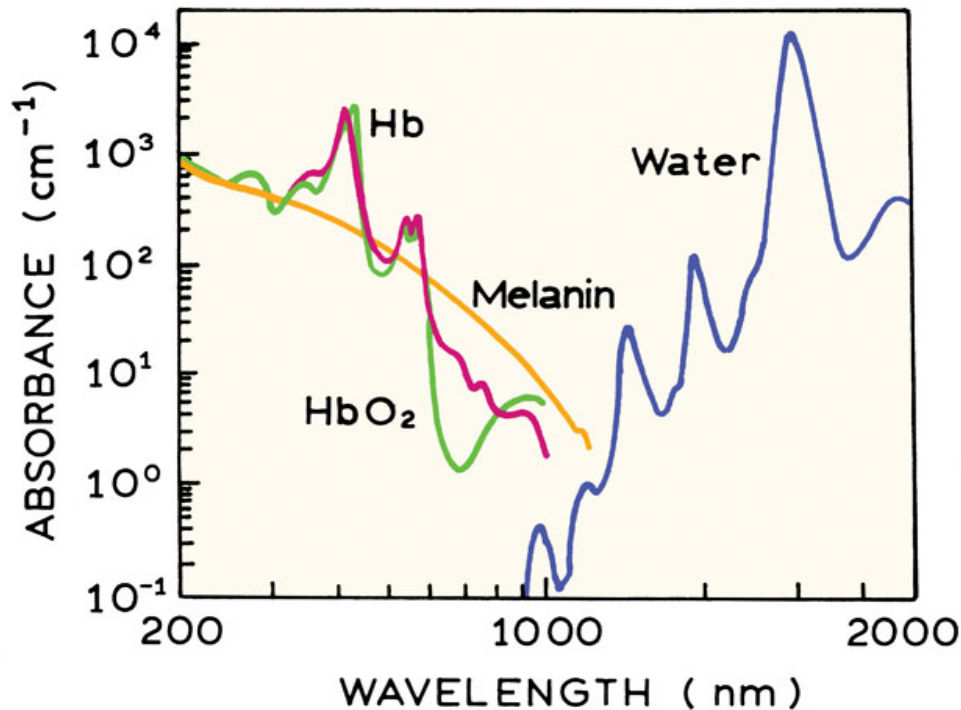
Nevlastní fluorofory

Vnější, neboli nevlátní fluorofory se používají mnohem více než vnitřní.

fluorescenční značky - přidávají se ke studovanému vzorku a vážou se na něj kovalentně. Vážou se 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)

Absorpce biologického materiálu



- Biologický materiál absorbuje relativně nejméně v intervalu (500,600) nm
- Nejnižší přirozené fluorescenční pozadí je v rozsahu 400-500 nm
- Také proto se používají sondy a značky, které mají excitaci a emisi v tomto intervalu
- Hlavně ale, aby mohly být značené biomolekuly studovány i za přítomnosti neznačených proteinů, musí mít značky a sondy větší excitační a emisní vlnovou délku než vnitřní fluorofory (aromatické AK) tj. 400-600 nm

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

Svítivost značky (Brightness)

- je dána součinem kvantového výtěžku a molárního extinkčního koeficientu ϵ

$$B_s = Q \epsilon$$

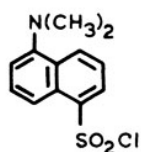
- Dobrý parametr pro účinnost s jakou značka přeměňuje excitační světlo na fluorescenci
- Po kovalentní vazbě k biomolekule často dochází k výrazné změně ve svítivosti
- Pro praxi je vhodné mít značku se svítivostí $B_c > 5000$

Příklady svítivosti nevlastních fluoroforů

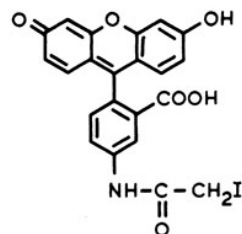
Fluorofor	ϵ (cm⁻¹ M⁻¹)	Kvantový výtěžek (Q)	Svítivost (Bs)
Oregon Green[®] 488	87 000	0.9	78 300
BODIPY FL	91 000	0.9	81 900
Fluorescein (FAM)	79 000	0.9	71 100
JOE	71 000	0.6	42 600
TAMRA	103 000	0.2	20 600
Rhodamine Red-X (ROX)	82 000	0.7	57 400
Texas Red Alexa 594	139 000	0.9	125 100

<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/21.html>

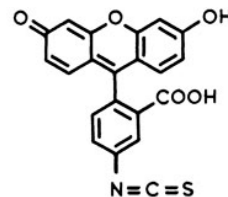
Příklady fluorescenčních značek



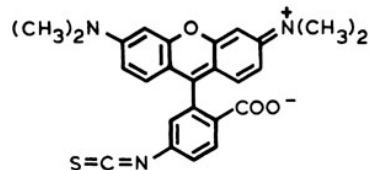
DNS-Cl



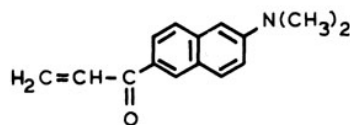
5-IAF



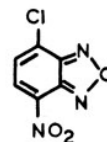
FITC



TRITC



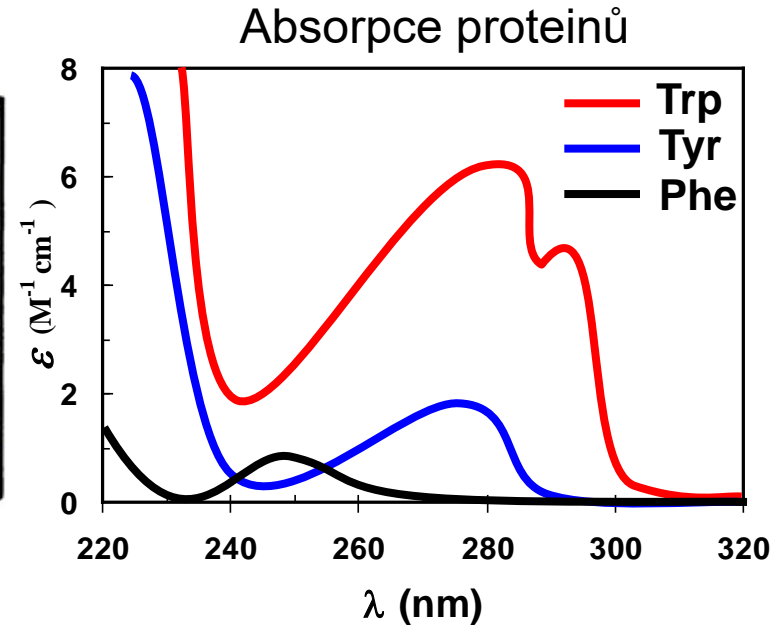
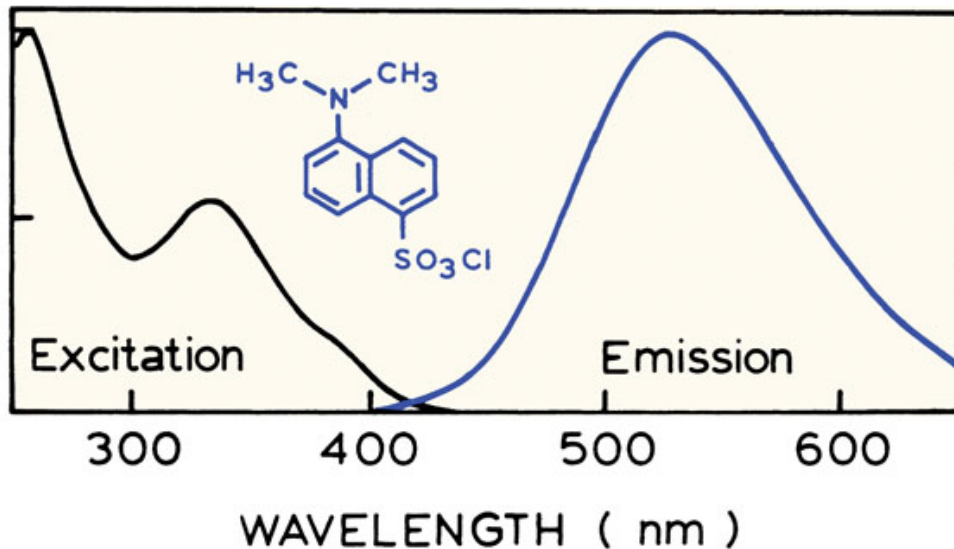
Acrylodan



NBD-Cl

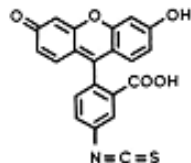
- dansyl chlorid (DNS-Cl; 5-dimethylaminonaftalén-1-sulfonyl chlorid)
- fluorescein-5-izothiokyanát (FITC)
- 5-jodoacetamidofluorescein (5-IAF)
- tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát (TRITC)
- 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl; 4-chloro-7-nitrobenzofurazan)
- 10• 6-akryloyl-2-dimethylaminonaftalén (Acrylodan)

Dansyl chlorid

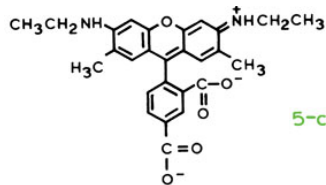


- Jedna z prvních a z toho důvodu také v literatuře nejvíce zastoupených fluorescenčních značek
- Často se používá ke značení proteinů je výhodný zejména při měření anizotropie
- Velmi vhodná doba dohasínání fluorescence $\tau \sim 10$ ns
- Je excitován při 350 nm, kde proteiny téměř neabsorbují
- Emisní spektrum je velmi citlivé na polaritu roztoku a má maximum většinou kolem 520 nm
- Reaguje s volnými aminoskupinami proteinů

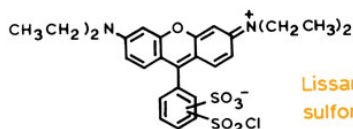
Fluorescein a rhodaminy



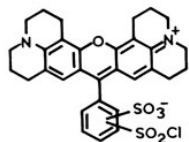
FITC



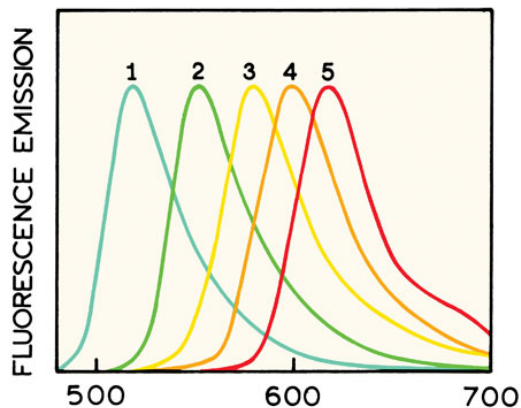
5-carboxyrhodamine 6G hydrochloride



Lissamine rhodamine B sulfonfyl chloride

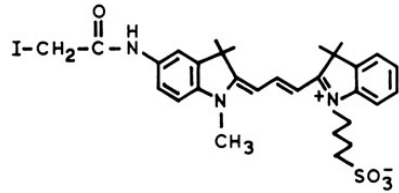


Texas Red sulfonfyl chloride



- 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 $Q \sim 0.3-0.9$
- 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

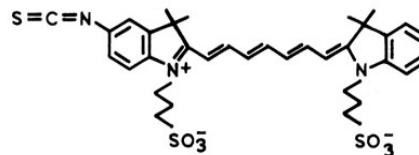
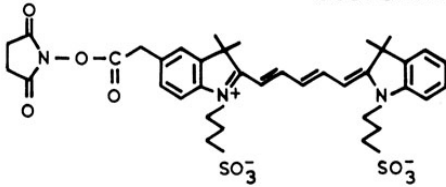
Cy značky



Cy-3 Iodo Acetamide

565/590 nm

QY=0.07



Cy-5-N-Hydroxysuccinimide

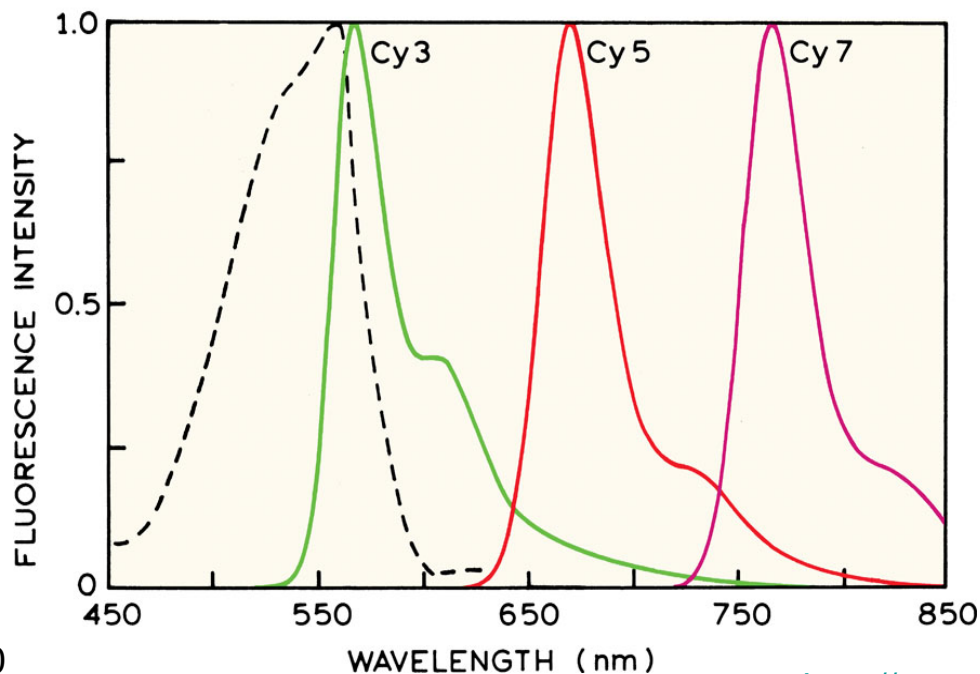
648/669 nm

QY=0.10

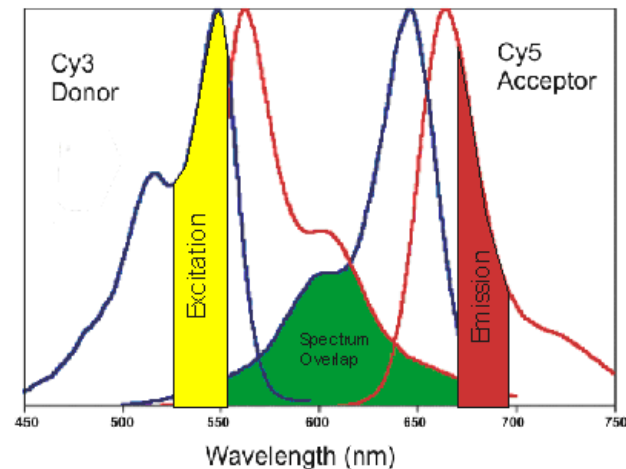
Cy-7-Isothiocyanate

750/777 nm

QY=0.10

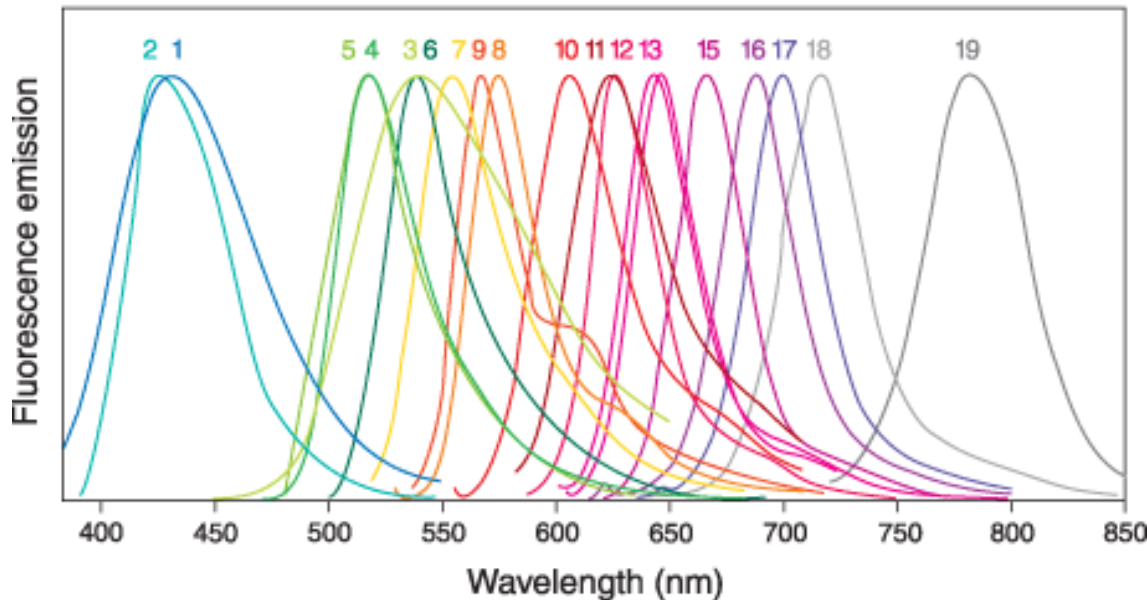


- Velmi populární
- Číslo znamená délku řetězce konjugovaných vazeb mezi dvojicí aromatických jader
- Vhodné pro oblast od 550 nm dále
- Relativně malý Stokesův posuv
- Používají se pro FRET studie



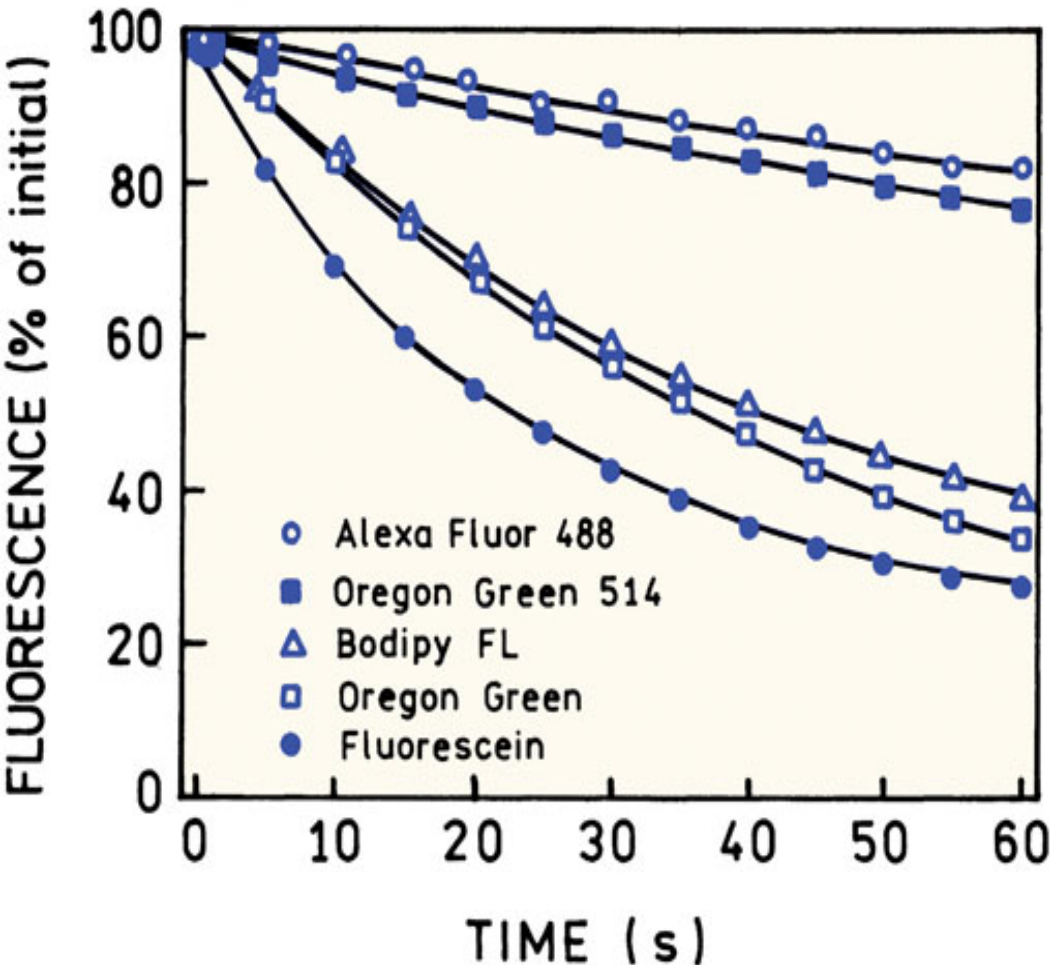
Alexa Fluor

- | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1. Alexa Fluor 350 | 6. Alexa Fluor 514 | 11. Alexa Fluor 594 | 16. Alexa Fluor 660 |
| 2. Alexa Fluor 405 | 7. Alexa Fluor 532 | 12. Alexa Fluor 610 | 17. Alexa Fluor 680 |
| 3. Alexa Fluor 430 | 8. Alexa Fluor 546 | 13. Alexa Fluor 633 | 18. Alexa Fluor 700 |
| 4. Alexa Fluor 488 | 9. Alexa Fluor 555 | 14. Alexa Fluor 635 | 19. Alexa Fluor 750 |
| 5. Alexa Fluor 500 | 10. Alexa Fluor 568 | 15. Alexa Fluor 647 | |



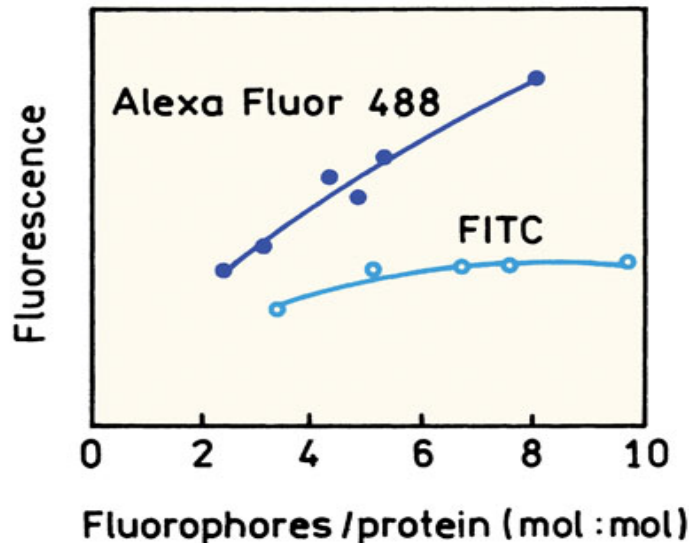
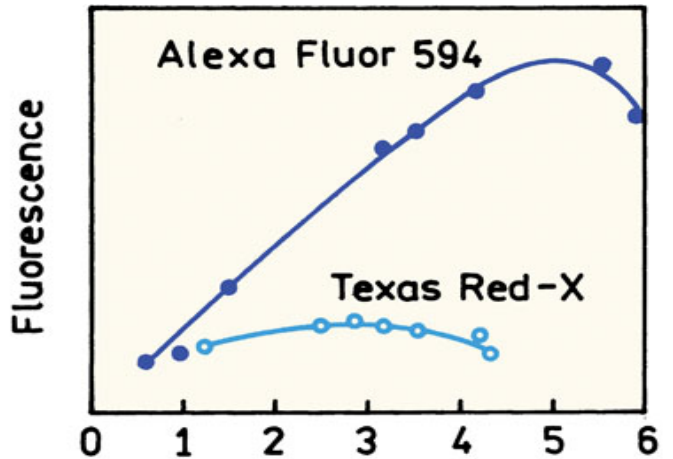
- Vysoký kvantový výtěžek -> vysoká svítivost
- Zlepšená rozpustnost ve vodě
- Malá závislost fluorescence na pH
- **Fotostabilní !**

Fotostabilita fluoroforů



- Po určitém čase 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

Vliv míry značení na intenzitu fluorescence

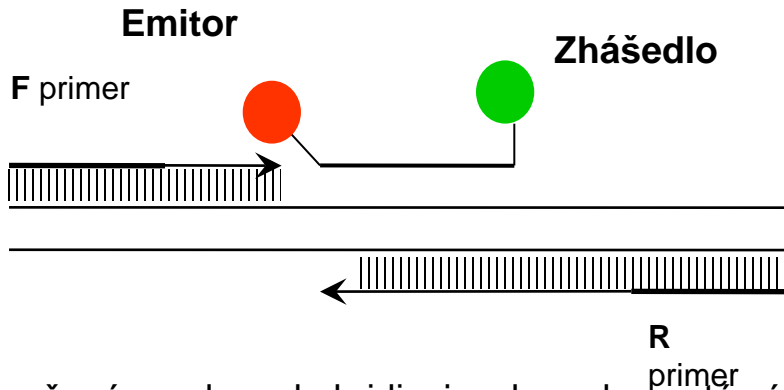


- U klasického fluoresceinu a rhodaminů při vysoké hustotě značení (molekuly fluoroforu jsou ve vzdálenosti kolem R_0) často dochází k samozhášení
- V případě Alexa fluoroforů ke zhášení v takové míře nedochází a to je důvodem větší intenzity emise v případě vyšší hustoty značení

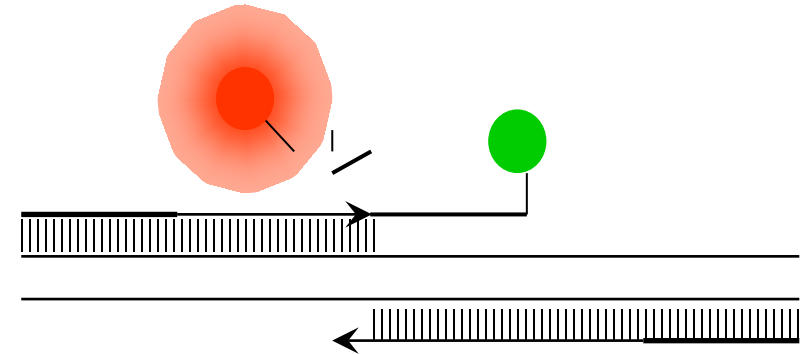
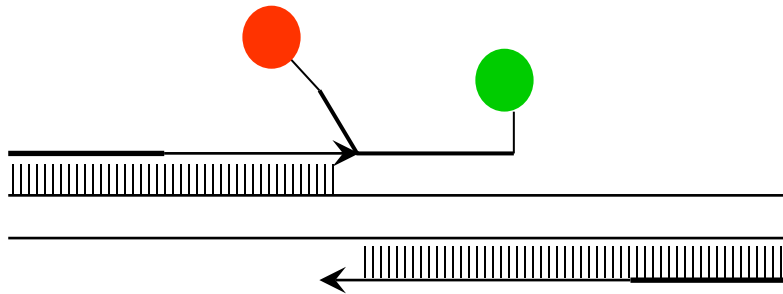
Real-time PCR

detekce amplifikace DNA

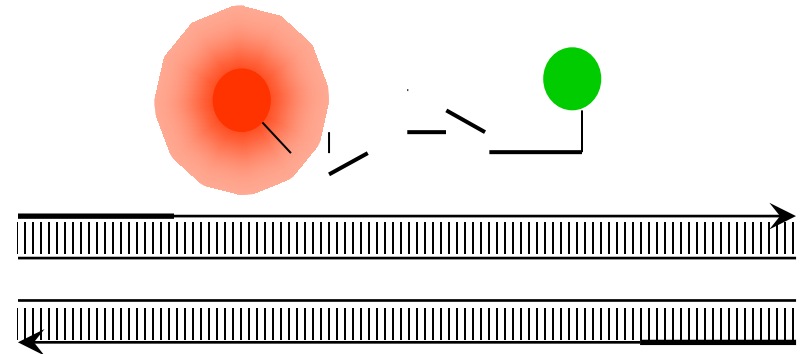
Bi9310



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



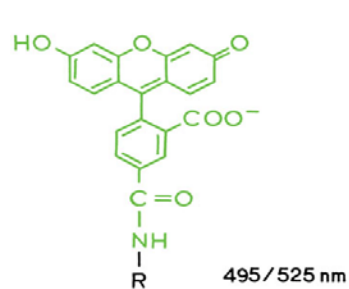
3. Při každém amplifikačním cyklu odštěpuje polymeráza Emitor, jehož záření je detekováno



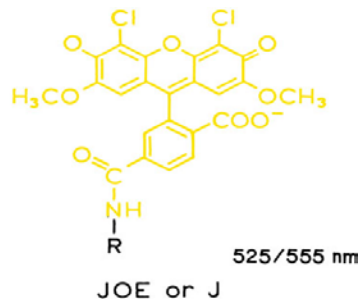
2. Při polymerizaci dochází k nahrazení sondy novým řetězcem.

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

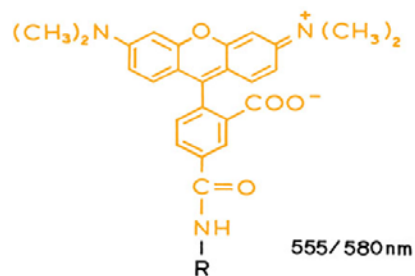
Fluorescenční značky pro RT-PCR



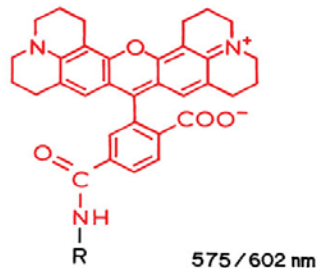
FAM or F
5-carboxyfluorescein



JOE or J
2',7'-dimethoxy-4',5'-
dichloro-6-carboxy-
fluorescein



TAMRA or T
N,N,N',N'-tetramethyl-6-
carboxyrhodamine



ROX or R
5-carboxy-X-
rhodamine

- Které z daných značek je nejvhodnější použít?

Fluorescenční sondy

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

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

Sondy citlivé na polaritu prostředí

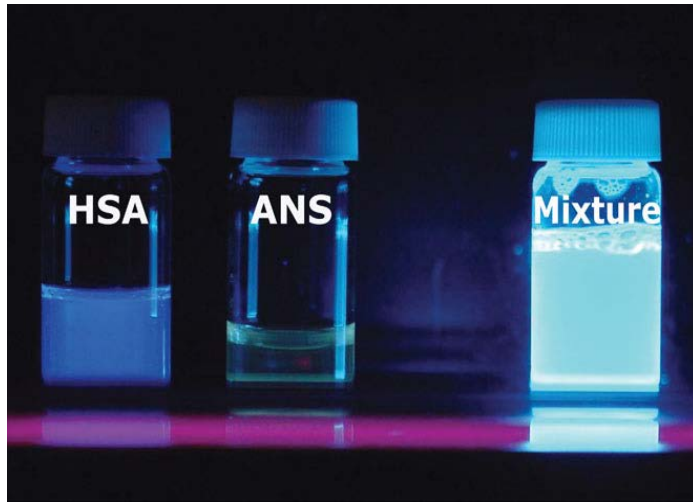
Typickými sondami pro dynamickou polaritu jsou **1-anilinonaftalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát (TNS)**. V tabulce jsou uvedeny fluorescenční parametry ANS v různých rozpouštědlech, odkud vyplývá, že s rostoucí polaritou rozpouštědla se emisní maximum fluorescence ANS posouvá do červené oblasti a současně klesá kvantový výtěžek a doba dohasínání. Při vazbě ANS k apomyoglobinu se ANS váže do nepolárního vazebného místa pro hem, emisní maximum se posouvá na 454 nm a kvantový výtěžek fluorescence vzrůstá na 0,98. Tímto způsobem lze studovat strukturu a stupeň polárnosti různých vazebných míst na proteinech včetně případného vytěsňování fluorescenčních sond z této vazby nebo změny vyvolané např. aktivací enzymu apod. ANS bylo použito např. pro studium polaritu vazebného místa pro hem v apomyoglobinu a apohemoglobinu, nebo konformačních změn ve svalech a v nervových zakončeních během akčního potenciálu. TNS bylo využito např. pro studium konformačních změn po aktivaci chymotrypsinogenu a změn konformace nervové membrány.



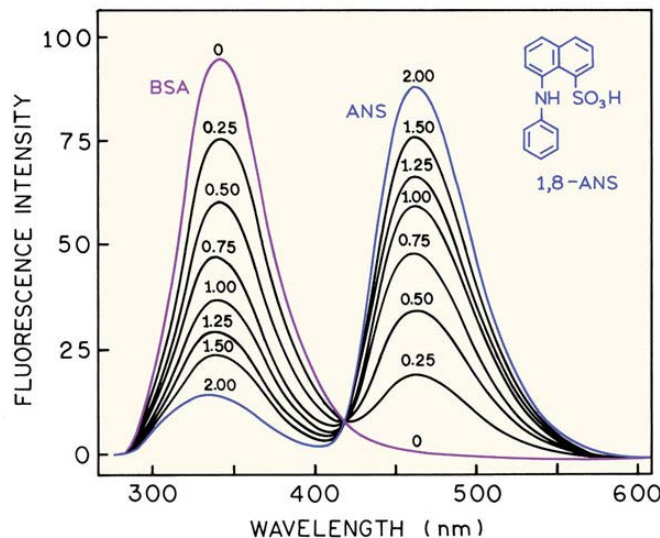
rozpouštědlo	λ_{em}^{max} (nm)	kvantový výtěžek	doba dohasínání (ns)
oktanol	464	0,646	12,3
propanol	466	0,476	10,2
metanol	476	0,216	6,05
voda	515	0,004	0,55

10 Parametry fluorescence sondy 1-anilinonaftalén-8-sulfonátu (ANS) při různé polaritě rozpouštědla

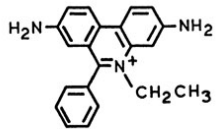
Změna fluorescence sérového albuminu v přítomnosti ANS



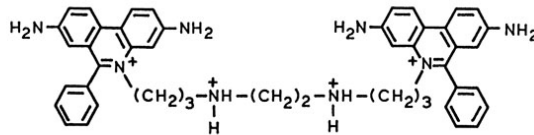
- Při zvyšování poměru molekul ANS:SA dochází k posunu emisního maxima z 350 nm na 480 nm
- To se projeví zvýšením intenzity záření, které vidíme okem při excitaci 280 nm



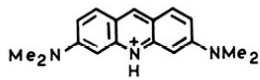
DNA sondy



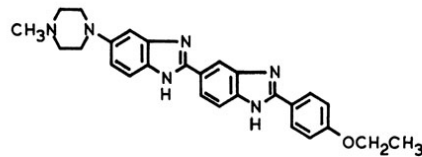
Ethidium Bromide
518/605 nm



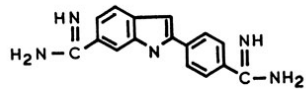
Ethidium Homodimer
528/617 nm



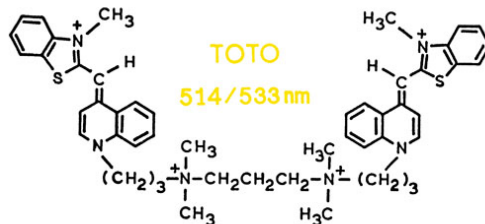
Acridine Orange
500/526 nm DNA
460/650 nm RNA



Hoechst 33342
350/460 nm



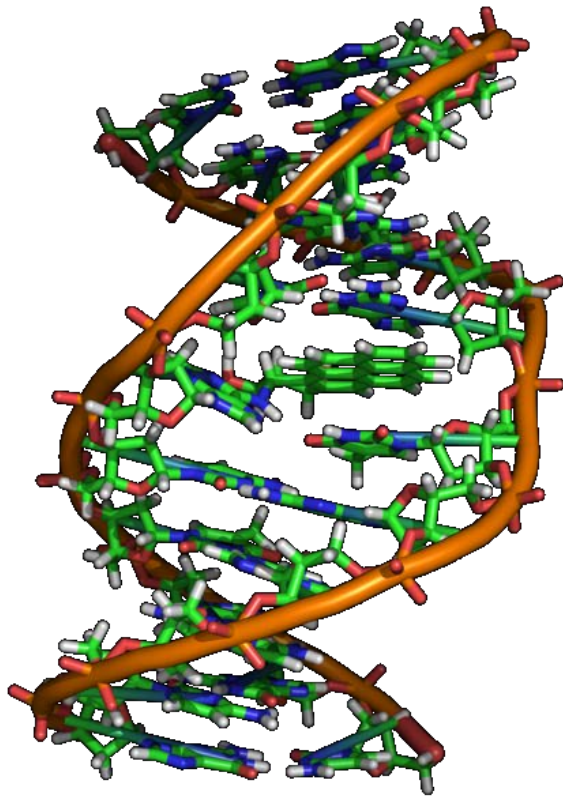
DAPI
355/461 nm



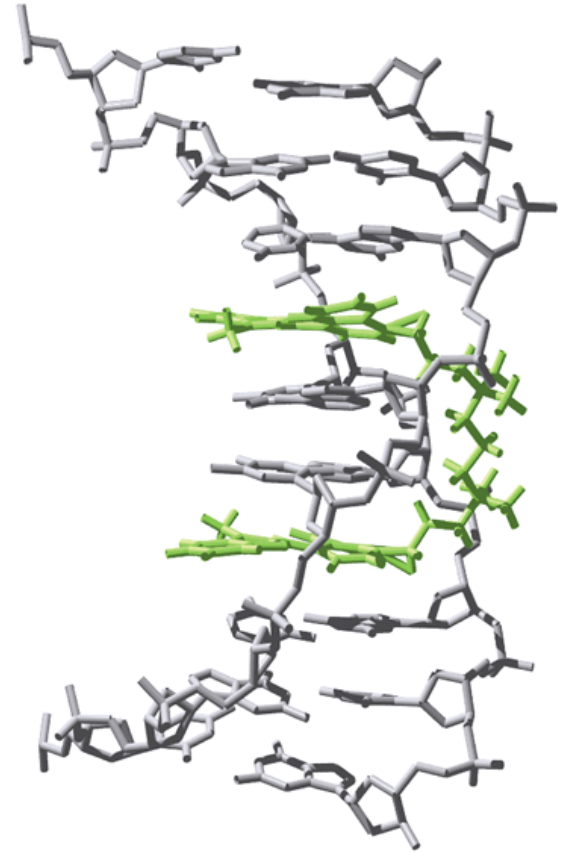
TOTO
514/533 nm

- Interkalátory EB, AO, TOTO se vážou vmezeřením mezi páry bazí
- 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 párů
- 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

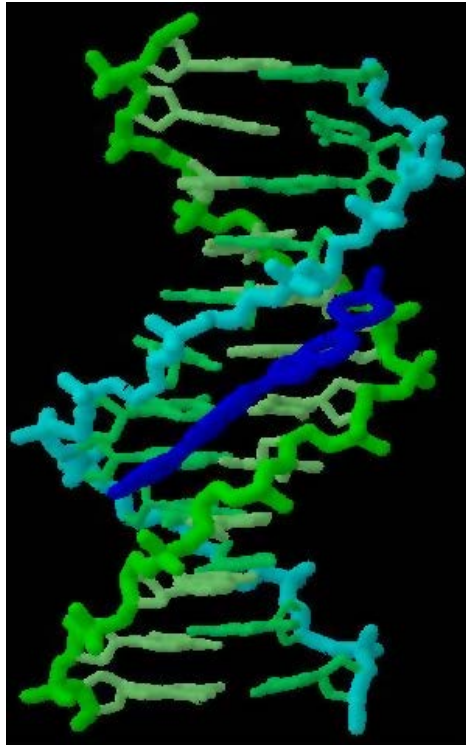


Benzpyrene

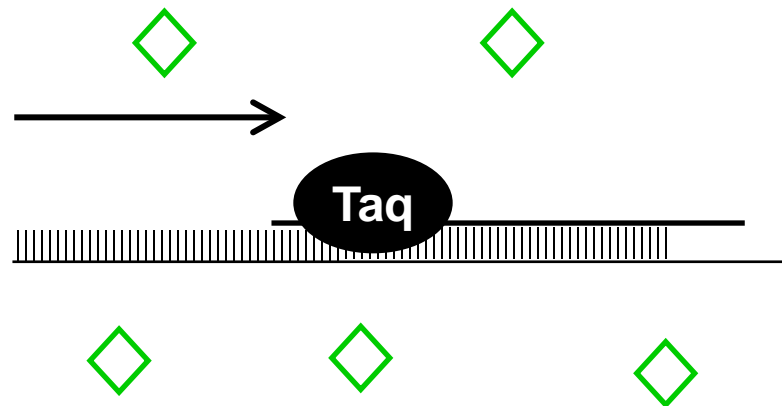


TOTO

Syber Green



- Selektivně se váže na ds DNA do malého žlábkku
- Detekce od 1 ng/mL
- Využití při RT 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.promega.com/geneticidproc/ussymp8proc/21.html>

Proteinové sondy

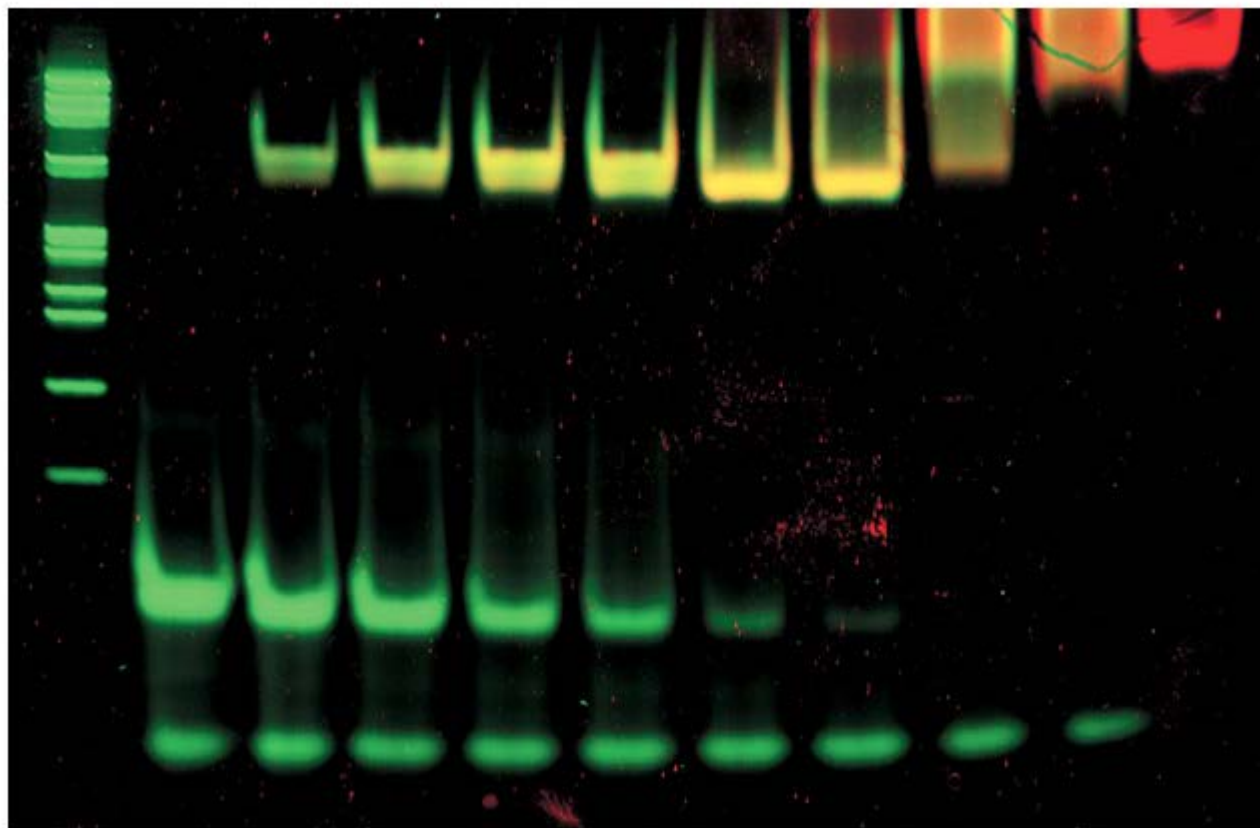
- Zvyšují intenzitu fluorescence po vazbě na protein
- Nejcitlivější fluorescenční sondy pro barvení proteinů v gelu jsou ze skupiny organokovových sloučenin SYPRO
- SYPRO Red, Orange, Tangerine, Rose
- Vysoká citlivost ~ ng/mL
- Před použitím je nutná kyselá fixace

Sypro sondy



- Primárně používané při barvení proteinů na gelu
- Využití v kriminalistice

Současné barvení DNA a proteinů na gelu

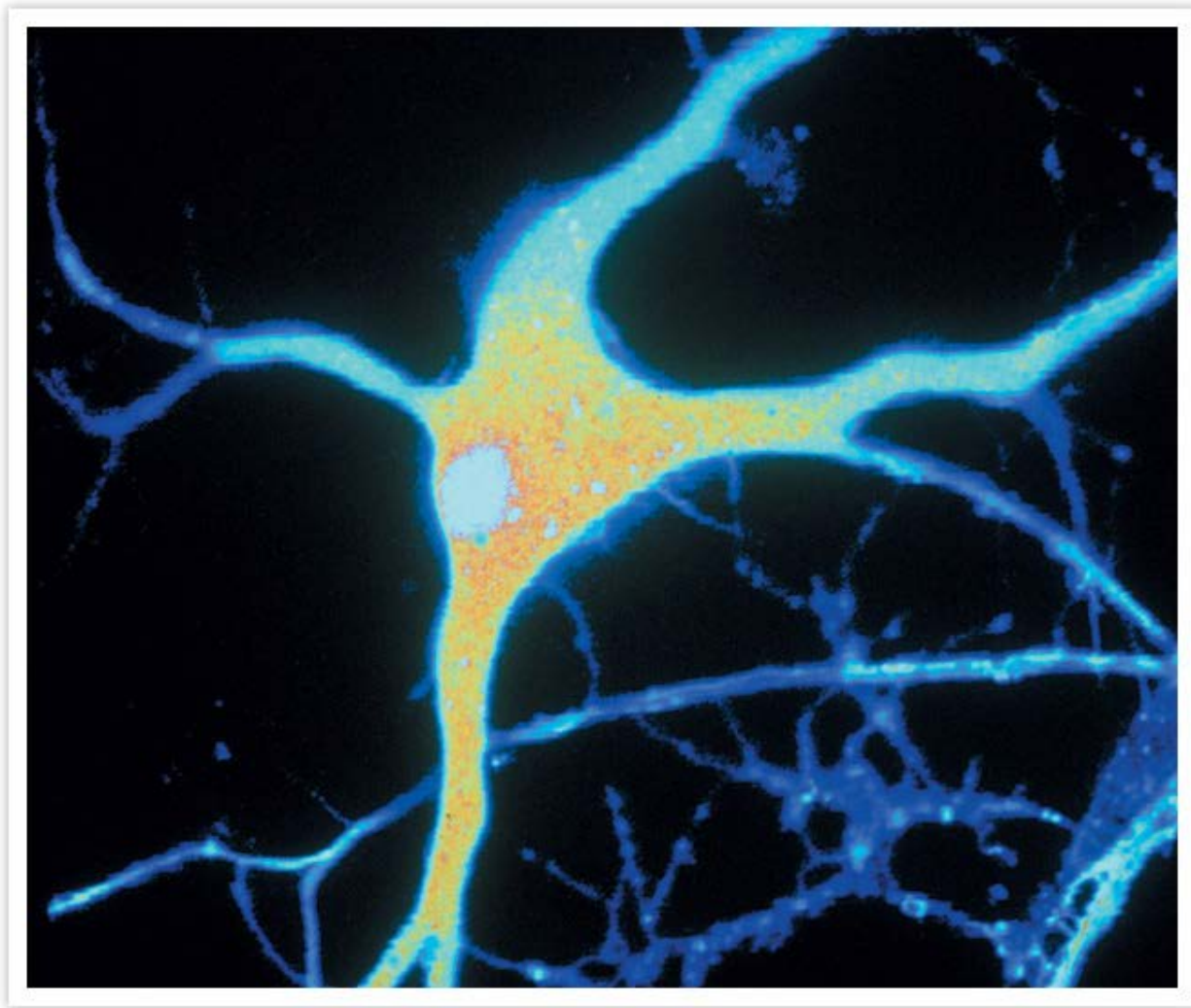


- DNA byla barvena Syber Green
- Protein SYPRO Ruby

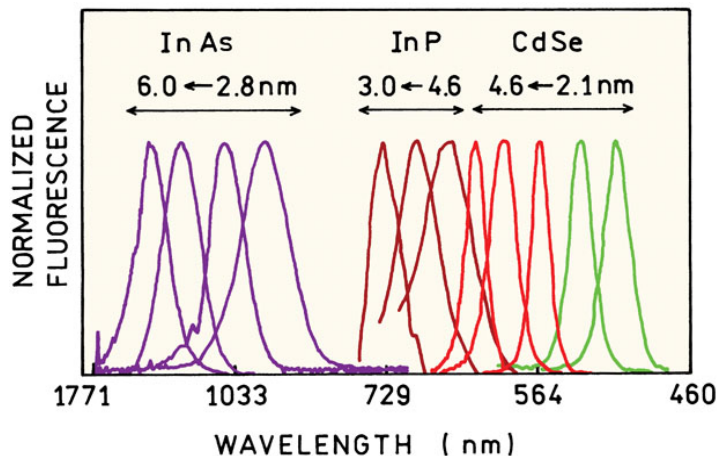
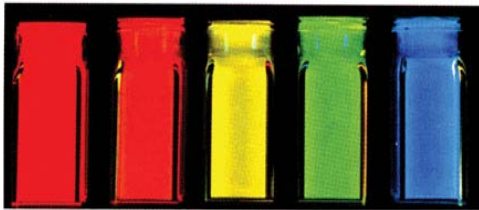
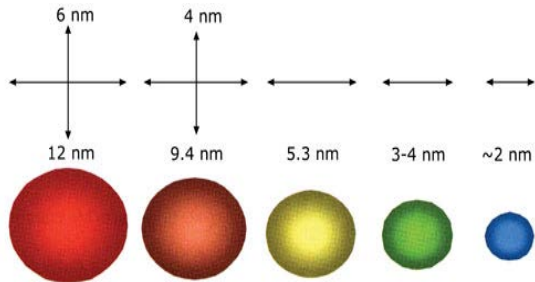
Indikátory iontů

- Fluorescenční měření změn nitrobuňčných iontů je možné díky sondám, které mění své spektrální vlastnosti po vazbě daného iontu. Nejčastěji se měří Ca^{2+} , kterému je věnována řada knih. Indikátory jsou obvykle deriváty chelátorů Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ nebo K^+ jako je EGTA, APTRA a BAPTA, které mají vhodnou afinitu pro studovaný iont. Při výběru vhodného indikátoru bereme v úvahu:
 - **formu indikátoru** (sůl, acetoxymetyl ester, dextranový konjugát), která ovlivňuje způsob, jakým se dostává do buňky (mikroinjekce, elektroporace, infúze z patch-pipety, pasivní difúze) a nitrobuňčnou distribuci
 - **způsob měření** – některé indikátory vykazují po vazbě iontu spektrální posuv absorpce nebo emise (měří poměr intenzit při různých vlnových délkách excitace nebo emise), jiné změnu intenzity fluorescence
 - **disociační konstantu** – musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu (koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu)

Indikace Ca^{2+} v nervových buňkách za použití Fluoro-3

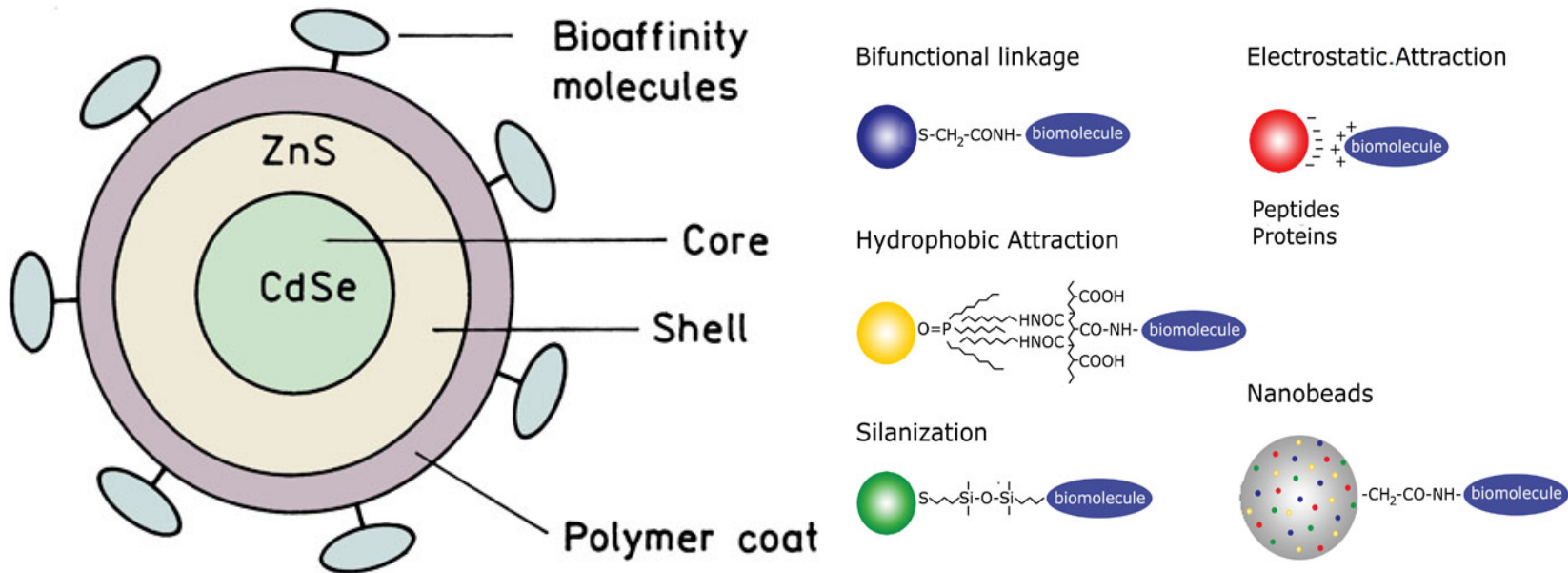


Quantum dots



- Základem je polovodičový materiál
- částice o velikostí řádově nm
- Mají úzké symetrické spektrum
- Nedochozí k fotovybělování!
- Emisní vlnová délka je dána průměrem a materiálem částice
- Široký rozsah emise od UV do IR

Vazba biomolekul na Qdots

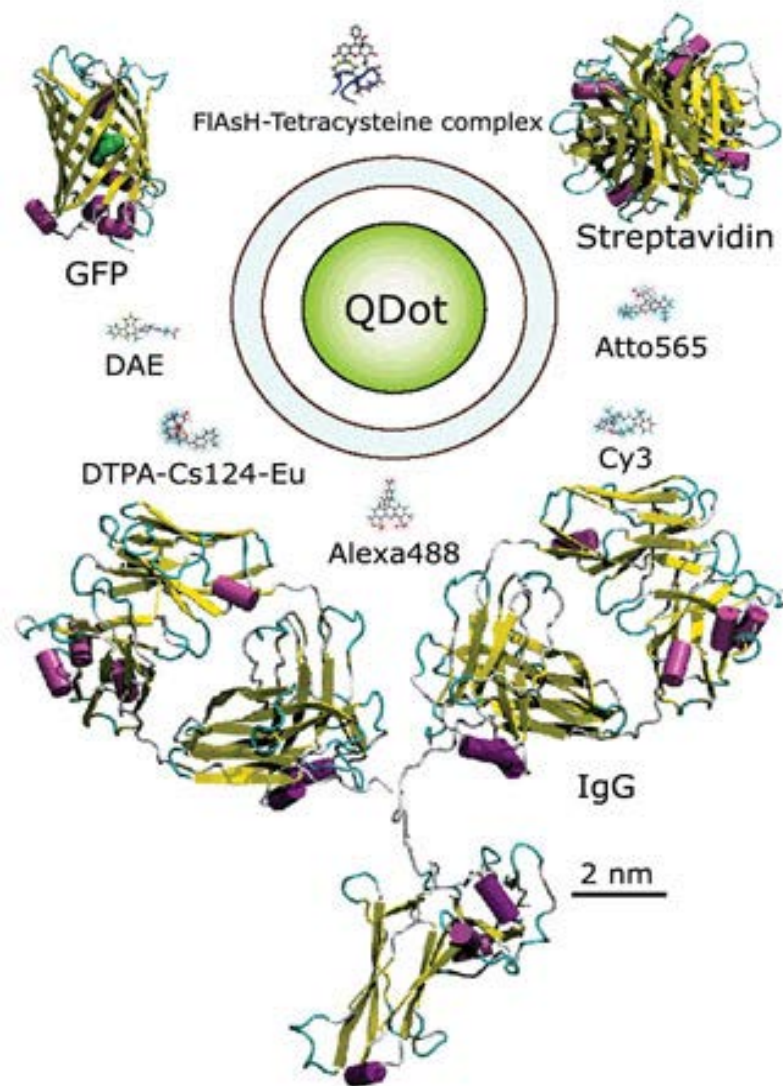


- Jádro je tvořeno polovodičem CdS pro UV, CdSe pro Vis a CdTe pro IR
- Velikostí je srovnatelné s rozměrem GFP
- Jádro je pokryto pláštěm (shell), který umožňuje spojení jádra s vnější hydrofilní vrstvou (Polymer coat)
- Vnější hydrofilní vrstva udává rozpustnost a umožňuje vazbu biologických molekul

Vlastnosti QDots

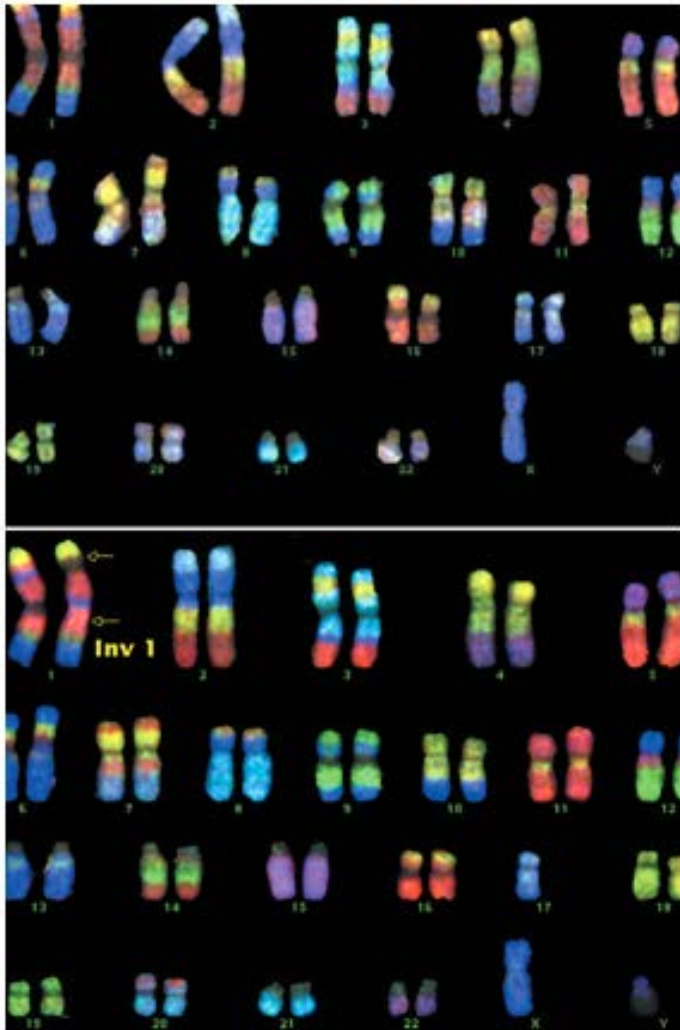
- Šířka emisního spektra je 20-30 nm, což je asi 1/3 hodnoty „klasických“ fluoroforů
- Kvantový výtěžek 0.35-0.5
- Absorbují při každé vlnové délce (polovodič)
- Mohou emitovat při různé vlnové délce za stejného budícího záření!
- **Ultrafotostabilní** 100-krát odolnější proti fotovybělování než „klasické“ organické fluorofory
- Doba dohasínání ~ 100 ns
- Vysoký $\varepsilon \sim 10\,000\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Srovnání velikosti QDot



Aplikovatelnost fluorescenčního značení

- Rozdíl mezi lidským a opičím karyotypem
- Fluorescenční značení pomáhá odpovědět na základní vědecké otázky



Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006
- Haugland R.P.: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Ninth Edition, Molecular Probes, 2002
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

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