

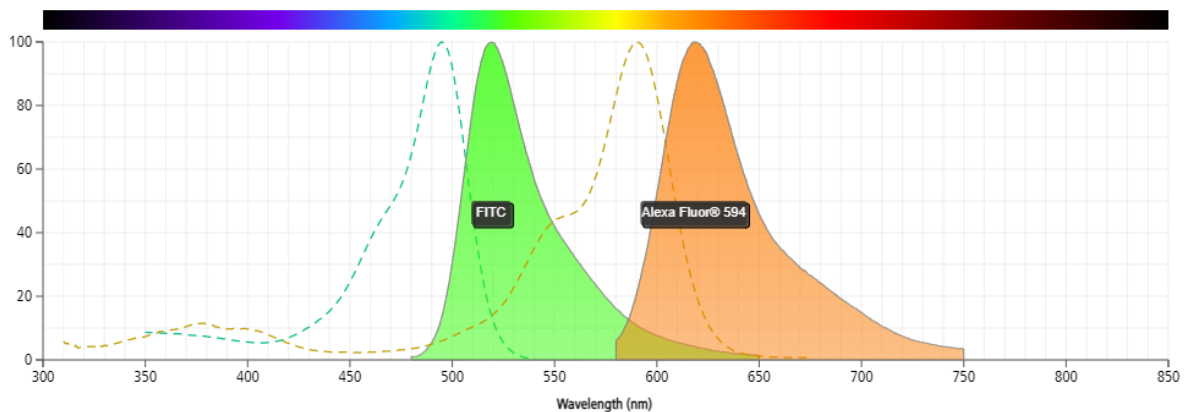
Fluorescence Lifetime - FRET praktická ukázka na hybridizaci DNA

Jednořetězcová DNA (single-strand) o velikosti 40bp je modifikována **fluorescenční značkou Alexa Fluor 594 (akceptor)** na svém 5' konci a fluorescenční značkou **Fluorescein (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** (Försterův rezonanční přenos energie). 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 **Fluorescence Lifetime**, kde budeme pozorovat zvýšení času dohasínání donoru.

Materiál

- Značená jednořetězcová DNA (AF594 a FITC) o zásobní koncentraci 10 μM
- Komplementární řetězec DNA o zásobní koncentraci 10 μM
- Fosfátový pufr – 50 mM NaPi, 50 mM NaCl, pH 7
- 100x ředěný roztok Ludox (koloidní sílice)



Obrázek 1: Excitační a emisní spektrum fluoroforů Fluorescein (FITC) a Alexa Fluor 594.

Vytvoření standardní křivky

1. Zapnout přístroj Fluoromax 4.
2. Zapnout měřicí přístroj **DeltaHUB** a **NanoLED** (nechat klíček v poloze StandBy).
3. Zapnout PC.
4. Spustit program **FluorEssence** a inicializovat přístroj (ikona M).
5. Spustit program **FluoroMax4-USBLamp** a **vypnout** lampu přístroje.
6. Napipetovat 1,4 ml 1x zředěného roztoku Ludox do optické kyvety a umístit do měřicí cely.
7. Naředit fluorescenčně značené DNA vlákno **na finální koncentraci 100 nM** o objemu 1,5 ml.
8. Spustit program **DataStation**, vybrat konfiguraci Fluoromax_PLUS_C, vybrat **Emission 1 jako emisní monochromátor** a **S jako detektor**. Zakliknout „Use NanoLED Sample Chamber...“
9. Vybrat měřicí metodu Lifetime.
10. Otočit klíčkem na NanoLED přístroji do pozice ON.
11. Nastavit **S detector na 950 V, Cout rate na 5000**, emisní vlnovou délku na **456 nm** a šířku štěrbinu **8 nm**.
12. Zkontrolovat, že je krycí destička před zdrojem fluorescence přístroje (škvíra více vzadu), a ne před zdrojem Lifetime (škvíra blíže).
13. Označit **Prompt signál** a spustit měření pro získání **IRC signálu**.
14. Napipetovat 1,4 ml zředěné fluorescenčně značené DNA do kyvety a vložit do přístroje.
15. Změnit **emisní vlnovou délku na 515 nm** (maximální emise donorového fluoroforu), ponechat šířku štěrbinu na **8 nm**.
16. Přejmenovat signál **Decay na ssDNA** a spustit měření. (Zde sběr dat bude trvat podstatně déle než v případě měření IRC signálu. Dáno koncentrací a svítivosti fluoroforu.)
17. Přejít do programu FluorEssence, opět **zapnout lampu přístroje** a vyndat krycí destičku před zdrojem fluorescence 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.
18. Přidat **20 µl komplementárního řetězce DNA** do kyvety a řádně promíchat. Inkubace 5 min při RT.
19. Vypnout lampu přístroje, vložit krycí destičku před zdroje fluorescence přístroje, zkontrolovat předchozí identické nastavení pro měření Lifetime. Přidat nový signál Decay a přejmenovat jej na **dsDNA** a spustit měření. Uložit data.
20. Opět přejít do programu FluorEssence a dle identického nastavení v předchozím kroku změřit emisní spektrum.
21. Pomocí softwaru **DAS6 analysis** vyhodnotit lifetime data a porovnat změnu.
22. Porovnat změnu emisních spekter před a po hybridizaci DNA.
23. Diskuze výsledků.