

ÚVODNÍ PŘEHLED

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI
SCI

Národní centrum
pro výzkum
biomolekul

Otázky a odpovědi



- Co je náplní přednášek?



- Jaké budou praktické úlohy v cvičení?



- Kde se dají získané poznatky využít?



- Jaká bude organizace výuky?

Proč spektroskopické metody?

Poskytují kvalitativní a kvantitativní údaje, což usnadňuje srovnávání molekul a celých biologických systémů.

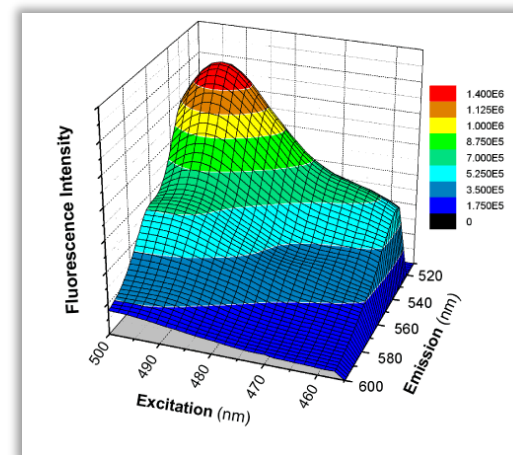
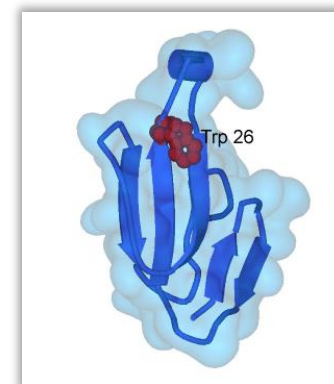
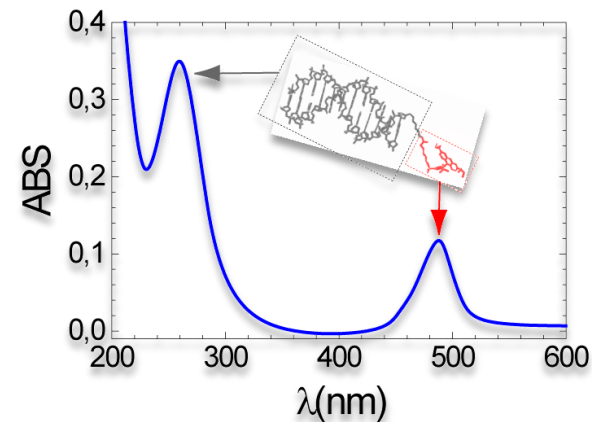
Proč fluorescence?

Umožňuje nám vidět pouhým okem, co bychom jinak neviděli.



Obsah přednášek I

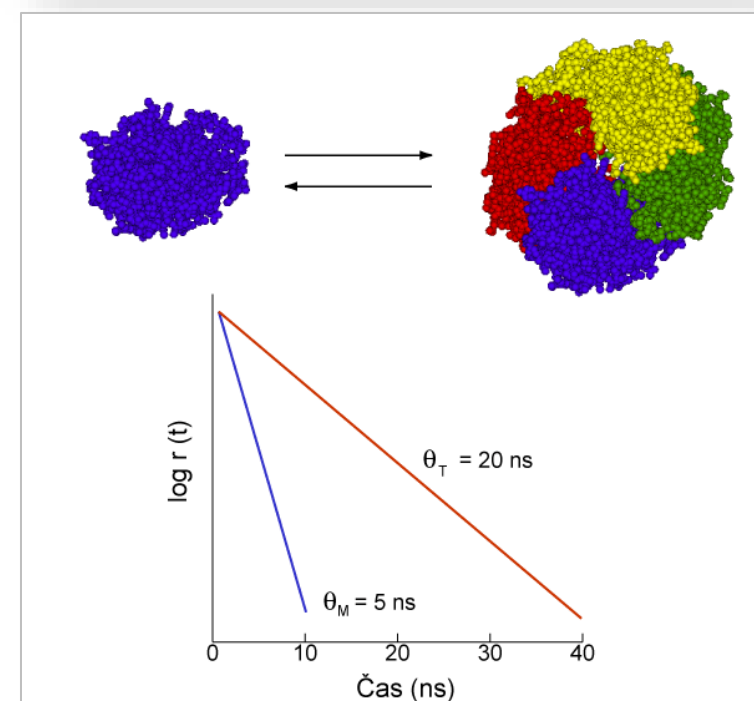
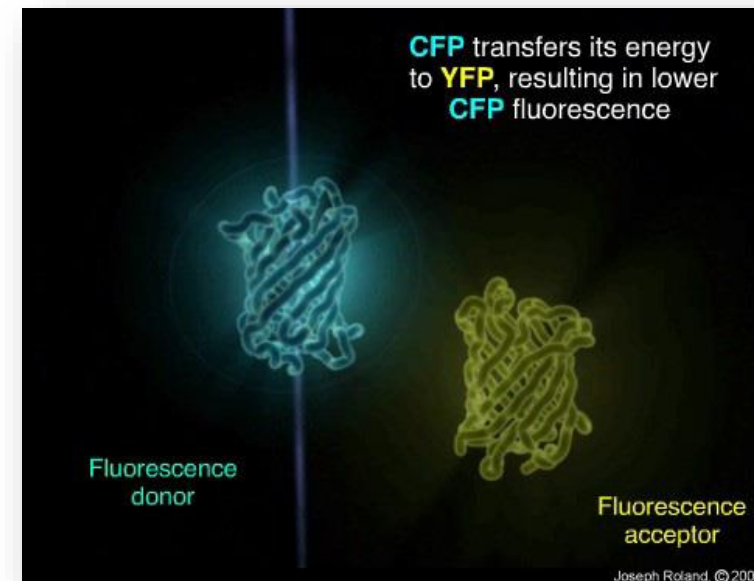
- Absorpční a fluorescenční spektroskopie v biologické analýze molekul
- Vlastní fluorescence proteinů
- Časově ustálená – *Steady state* a časově rozlišená - *Time-resolved* fluorescence





Obsah přednášek II

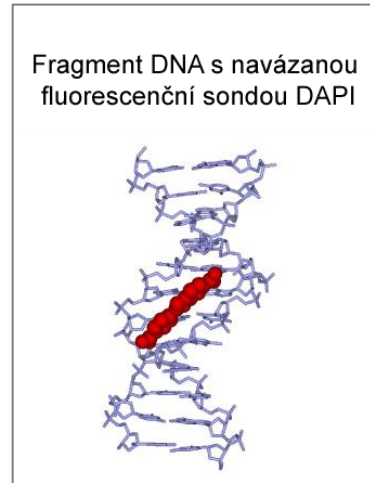
- Zhášení fluorescence, fluorescenční rezonanční přenos energie – použití při sledování interakce a strukturních změn biomolekul
- Anizotropie fluorescence a její změna při vzájemné vazbě biomolekul



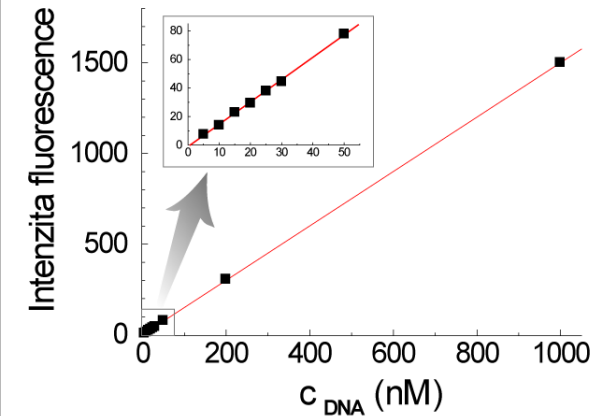


Obsah přednášek III

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



Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

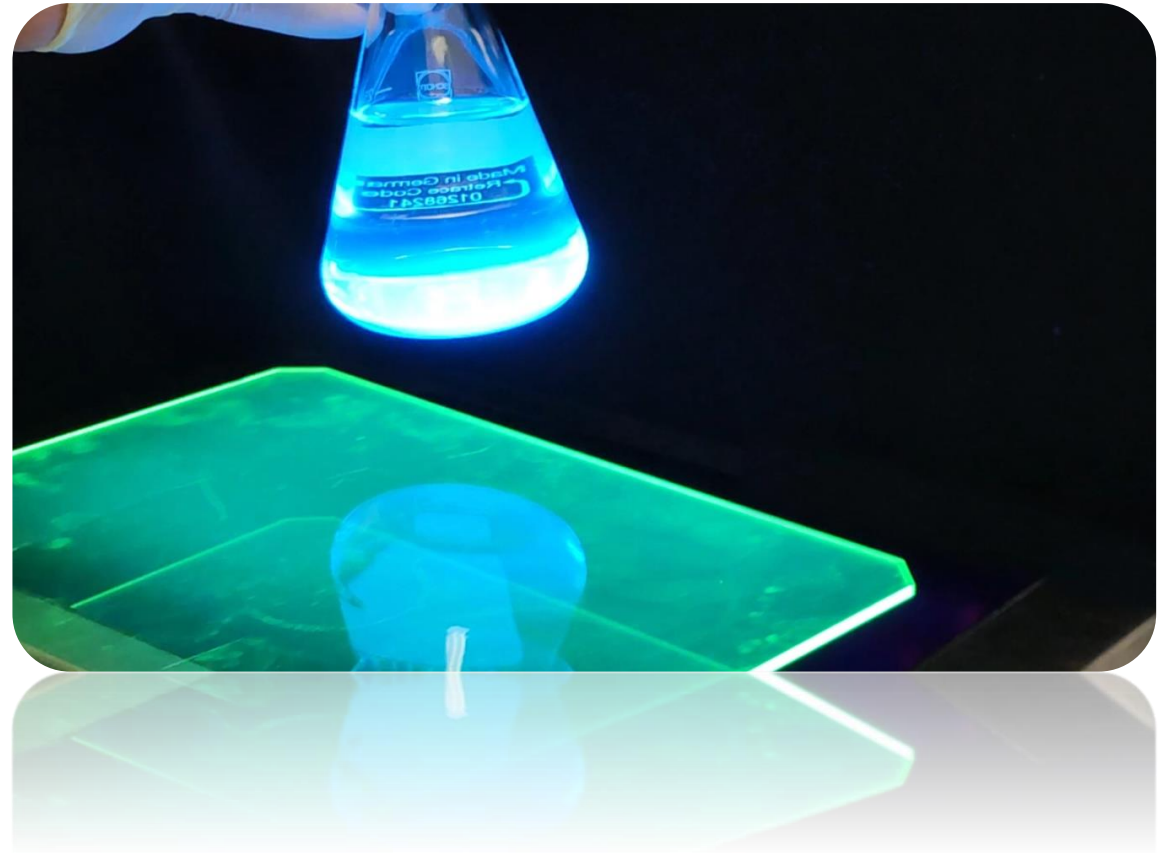




Demonstrační pokusy na přednáškách

Věříme tomu, co vidíme

- Praktické ukázky a demonstrace podstaty jevů jsou zařazeny do výkladu tak, aby objasnily principy
- Pozorování prováděných experimentů navíc podporuje upevnění znalostí všemi smysly.





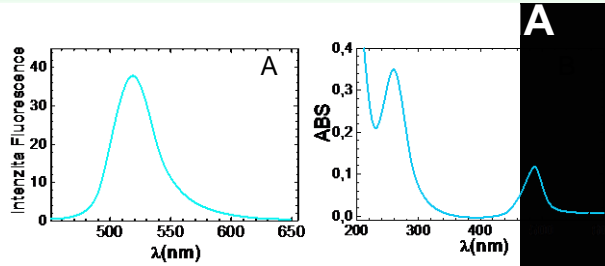
2. Praktické úlohy – cvičení C7235

- Měření spektrálních charakteristik proteinů a nukleových kyselin
- Stanovení koncentrace nukleových kyselin a proteinů za použití fluorescence a UV-VIS absorpční spektroskopie
- Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluorescenčních sond
- Měření vlastní fluorescence proteinů
- Příprava fluorescenčně značeného proteinu
- Stanovení účinnosti fluorescenčního značení biomolekul
- 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 vlastnoručně připravených fluorescenčních vzorků
- Studium interakce biomolekul za pomoci anizotropie fluorescence – vazba proteinu a fluorescenčně značené DNA

Schematické znázornění metodických přístupů použitých při praktické výuce cvičení C7235

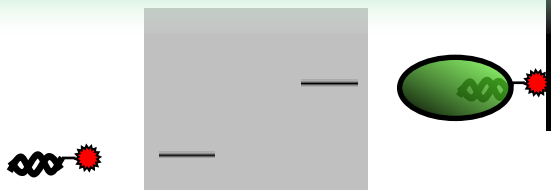
Fluorescenční značení biomolekul

Spektroskopická charakterizace

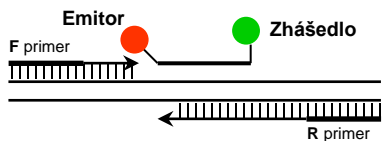


Fluorescenční emisní (A) a UV/Vis abs spektrum (B) fluorescenčně značené

Vizualizace biomolekul při elektroforetické separaci



Real-time PCR – detekce amplifikace DNA



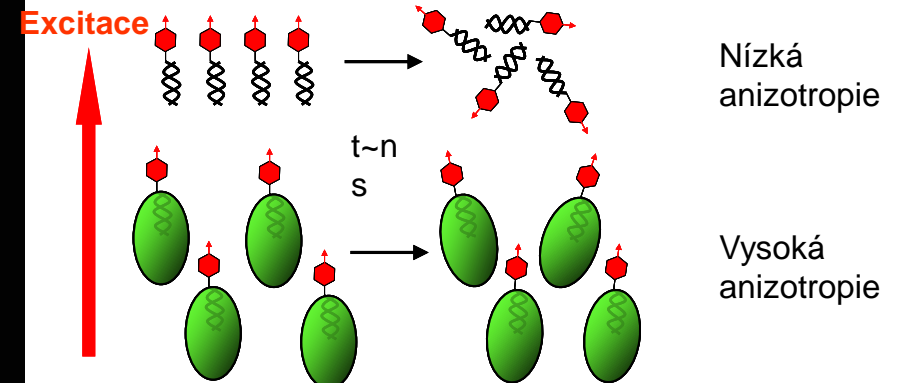
Intenzita emitovaného záření je přímo úměrná množství amplifikované DNA.

Fluorescenční mikroskopie – sledování značených biomolekul přímo v buňkách

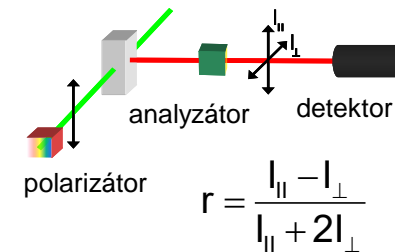


gelová filtrace separuje nenavázané fluorofory po značení fragmentu DNA

Studium vazby DNA a proteinu Anizotropie fluorescence

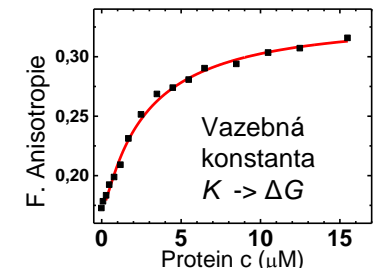


Snížení pohyblivosti po vazbě proteinu -> pomalejší změna uspořádání molekul -> zvýšení anizotropie fluorescence r



$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}}$$

Experimentální uspořádání při měření anizotropie fluorescence r

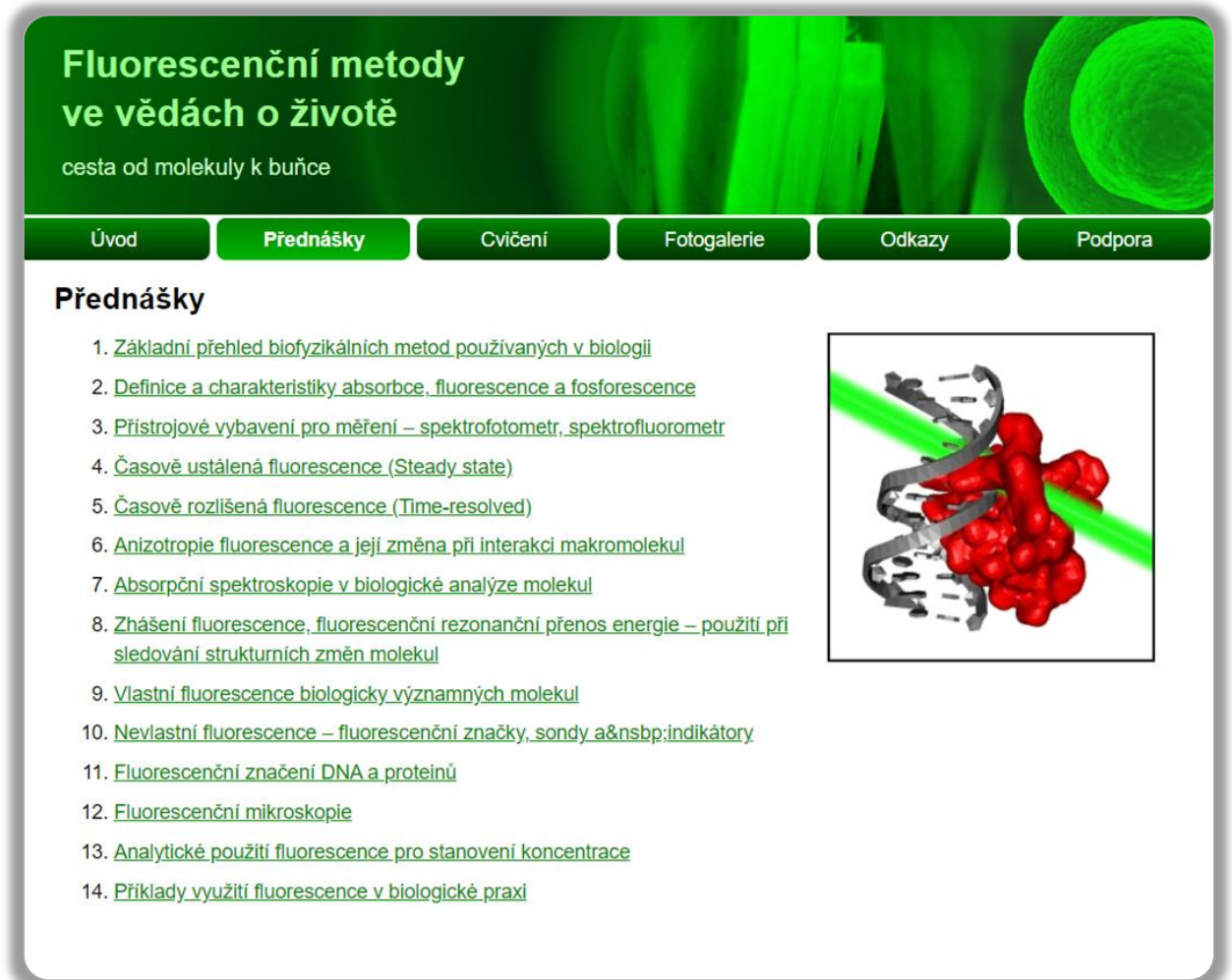


Záznam změny anizotropie fluorescence r po vazbě proteinu na DNA

Vazebná konstanta $K \rightarrow \Delta G$

Webová stránka předmětů C7230 a C7235

- Učební materiály jsou uspořádány do webové stránky
- Přednášky jsou průběžně aktualizovány
- Webové stránky obsahují také úlohy navazujícího cvičení

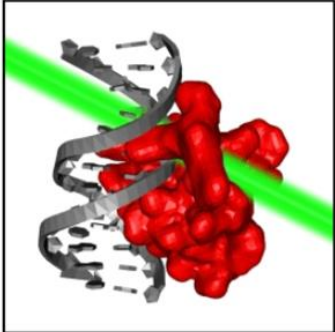


Fluorescenční metody ve vědách o životě
cesta od molekuly k buňce

Úvod **Přednášky** Cvičení Fotogalerie Odkazy Podpora

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 strukturálních 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](#)



<https://is.muni.cz/auth/el/sci/podzim2021/C7230/um/web/PBM/EBprednasky.html>

Literatura

1. Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
2. Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE
V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfišar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

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



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 vzorek pomocí fluorescence
- V každodenní laboratorní praxi – např. detekce biomolekul v gelu a vizualizace fluoroforů pod mikroskopem
- **V navazujících cvičeních C7235 !**

Kde se můžete dozvědět více?

[F9070](#) Experimentální metody biofyziky

Přednášky odborníků, kteří metody skutečně používají

Exkurze do výzkumných laboratoří mezinárodně uznávaných společností

C02 – 2.11 Úterý od 15:00 Podzim 2023

[CORE075](#) Do světa biomolekul

jaké biomolekuly a proč se vyskytují v buňkách, jak se to vše dozvídáme, jaký je pravděpodobný původ biomolekul

Připravujeme

Vědecká ilustrace

příprava vědeckých obrázků a prezentací. Cílem je zlepšit grafickou gramotnost a komunikaci v oblasti prezentace biomolekul. Praktický výukový kurz obsahuje přednášky, videonávody a případové studie.



Pozorování více molekul současně

Stain

DAPI

BODIPY® FL phalloidin

MitoTracker® Red CMXRos

Target

Nuclei

F-actin

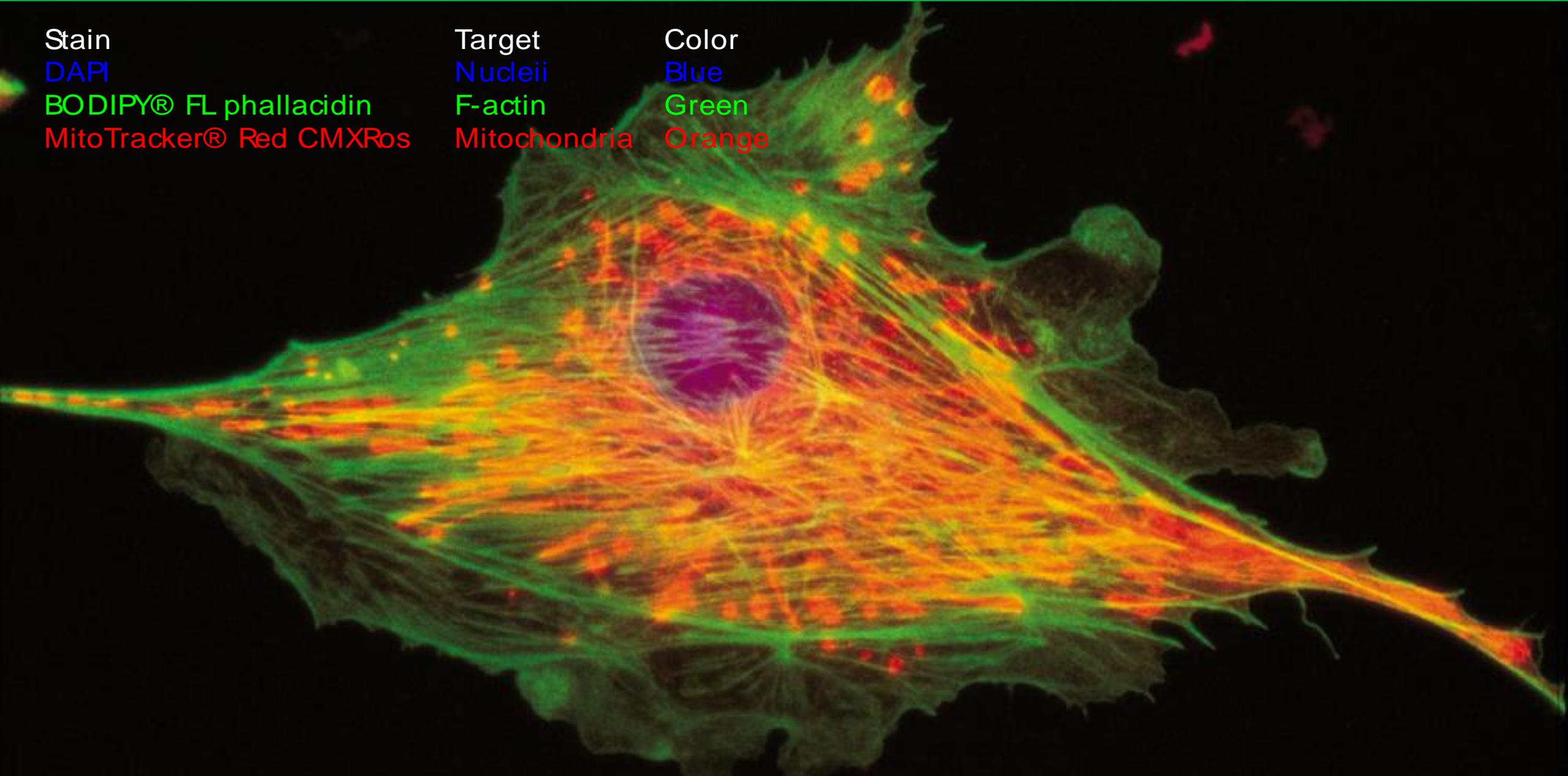
Mitochondria

Color

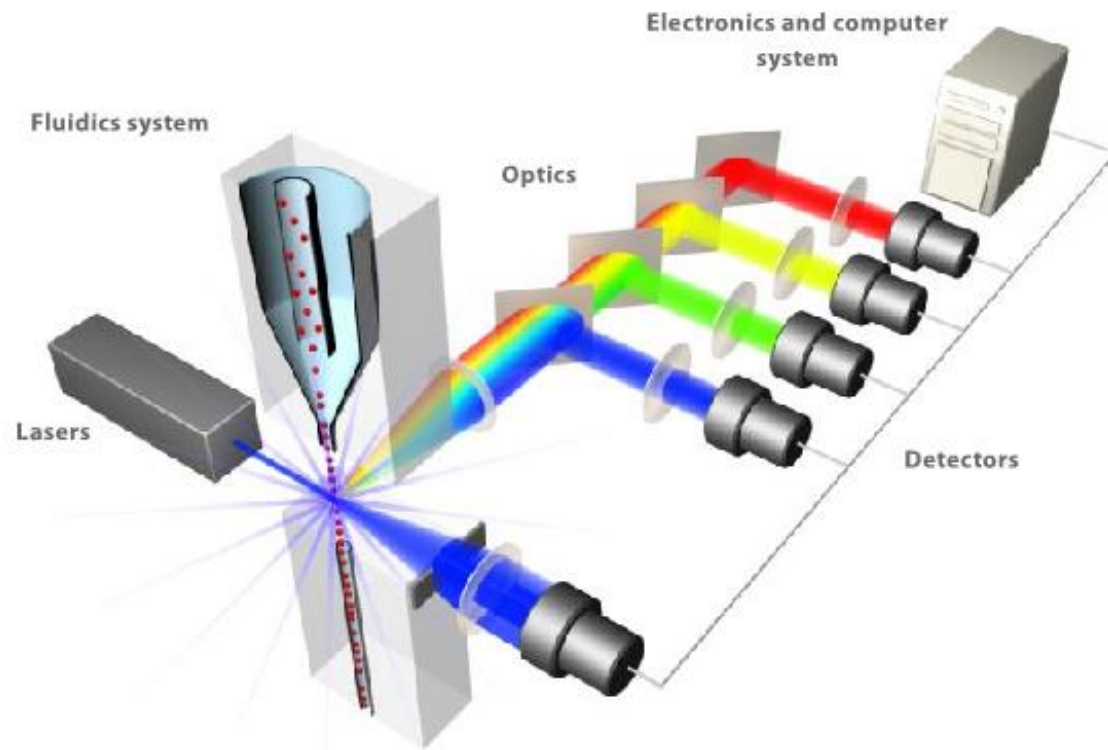
Blue

Green

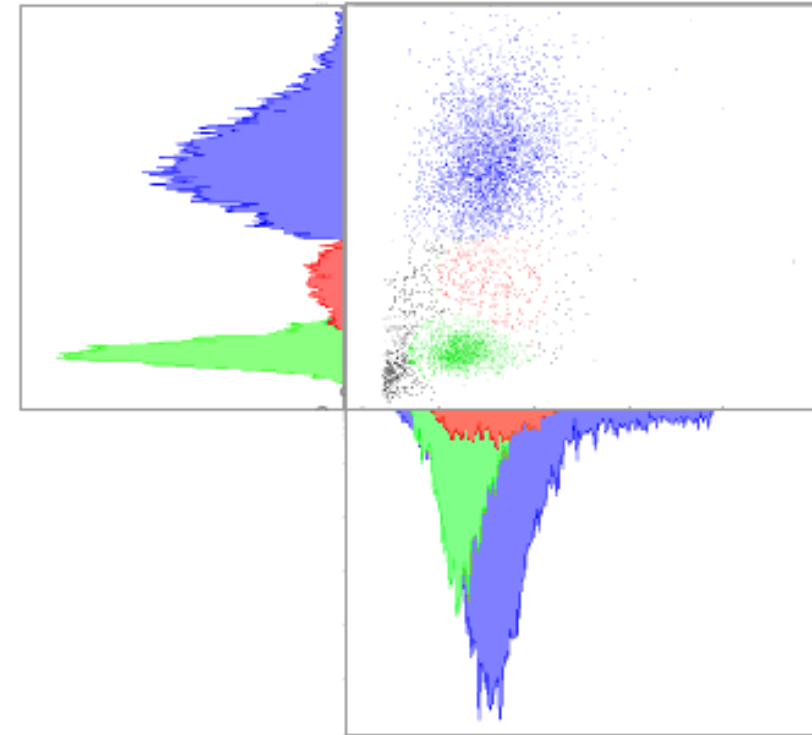
Orange



Průtoková cytometrie - Flow Cytometry

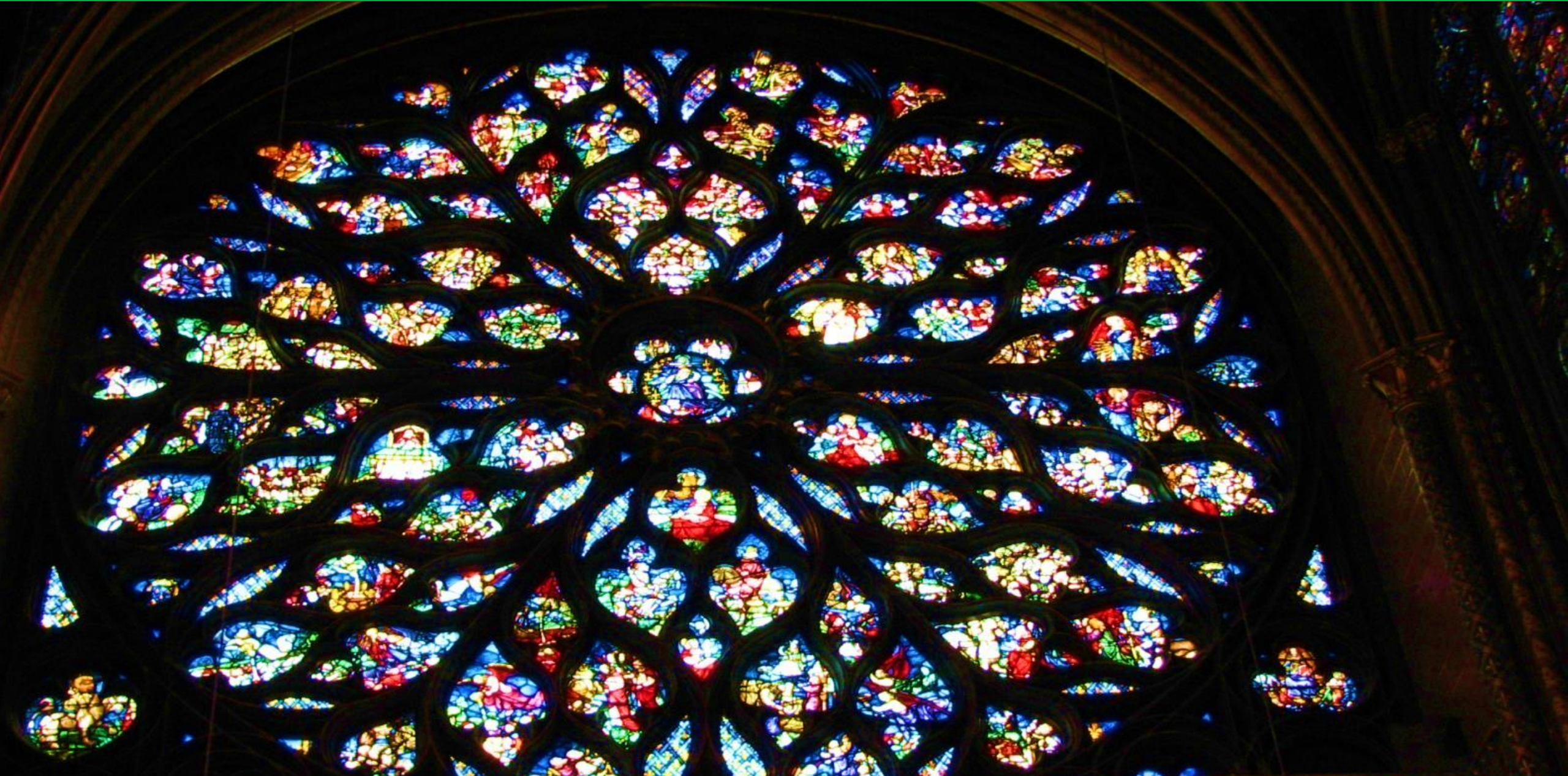


Detekce každé buňky zvlášť



Rozdělení populace buněk podle velikosti a přítomnosti fluorescenčních sond a značek.

Spektroskopie kolem nás



Fluorescence, kde bychom ji nečekali



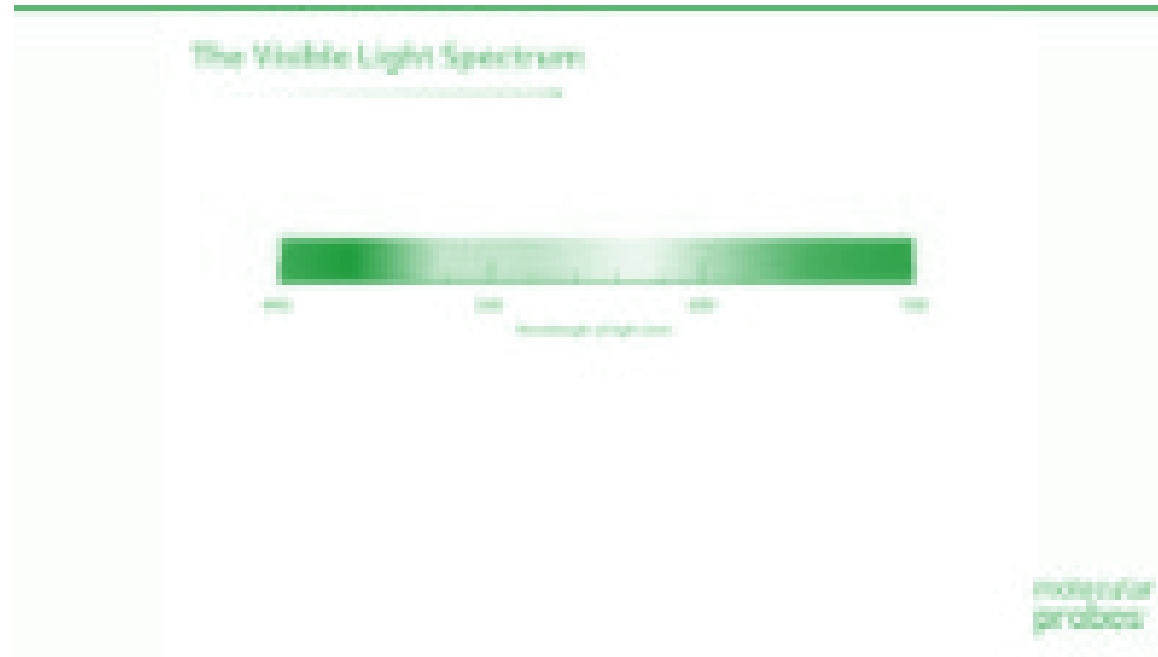
- Úlohy – případové studie
 - Celkově 4 úlohy
 - Za úlohy lze získat body, které se připočítávají k testu u zkoušky
 - V případě úspěšného splnění všech úloh dostatek bodů pro vykonání ústní zkoušky
 - Omezená doba možnosti řešení úloh – 48 h
- Praktická cvičení v rámci navazujícího předmětu C7235
 - Blokované – tři dny 9 – 15 hod
 - Předběžný termín cvičení
 - 1. běh Úterý 9. 1. – čtvrtek 11.1. 2024
 - 2. běh Úterý 16. 1. – čtvrtek 18.1. 2024

Příště: Co všechno svítí na diskotéce?



Příprava na příští přednášku

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



<https://youtu.be/SGFlr1jFNBM?t=42>