

Fluorescenční značení molekul

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

M U N I Národní centrum
S C I pro výzkum
biomolekul



https://youtu.be/KvRYd8U7qGY?si=W_S4UZ84FFOP_gLR

Nevlastní fluorofory

fluorescenční **značky** – přidávají se ke studovanému vzorku a vážou se na něj kovalentně. Vážou na proteiny a nukleové kyseliny přes aminové nebo thiolové skupiny a boční řetězce.

fluorescenční **sondy** – vážou se na studovaný vzorek nekovalentně a po vazbě mění svoje fluorescenční vlastnosti (např. intenzitu, polohu em. maxima).

Možnosti zavedení fluoroforu

- **Kovalentní vazba**

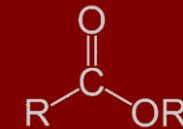
využívá se chemické reakce derivátu fluoroforu, během které se vytváří kovalentní vazba s biomolekulou

- **Nekovalentní vazba**

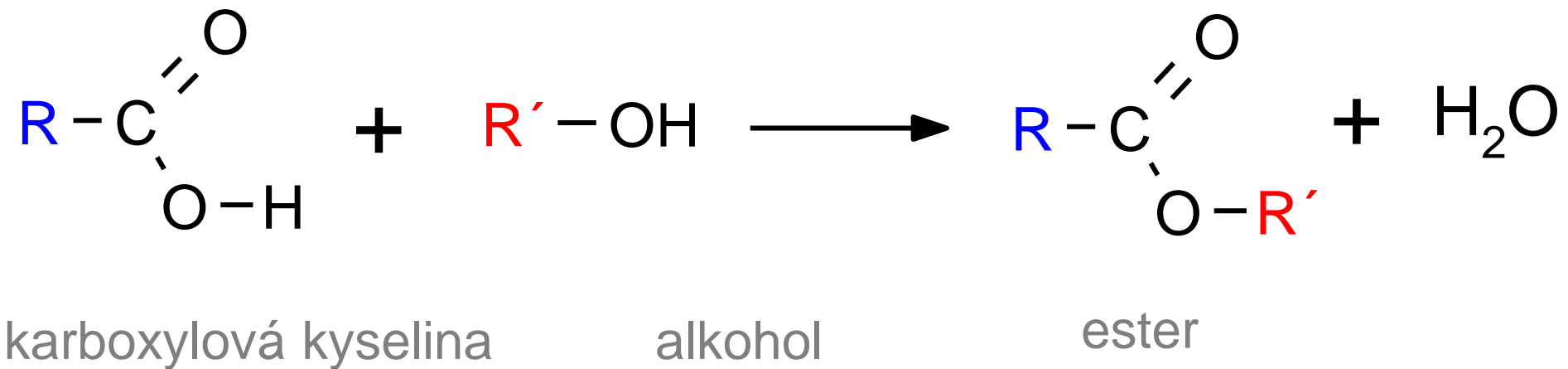
fluorofor se váže na biomolekulu prostřednictvím nekovalentních např. elektrostatických interakcí

- **Fluorogenní reakce**

využívá se chemické reakce, při které se nefluorescenční prekurzor mění na fluorofor.



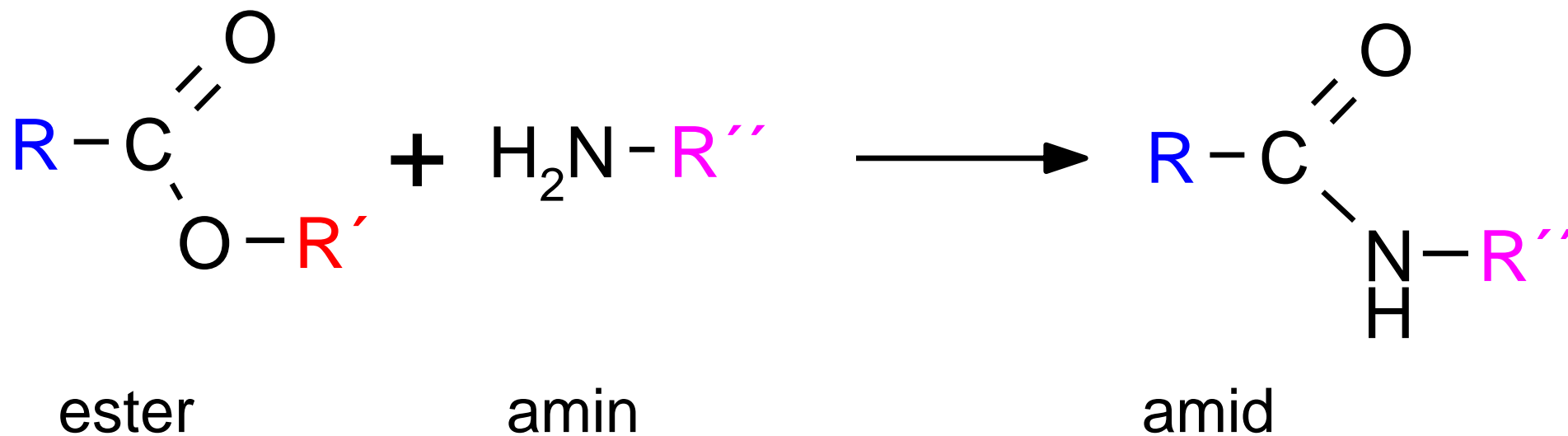
Vznikají reakcí karboxylové kyseliny a alkoholu



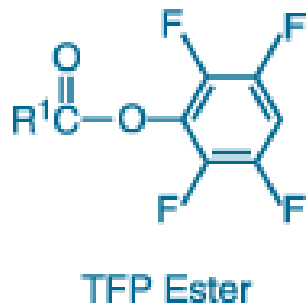
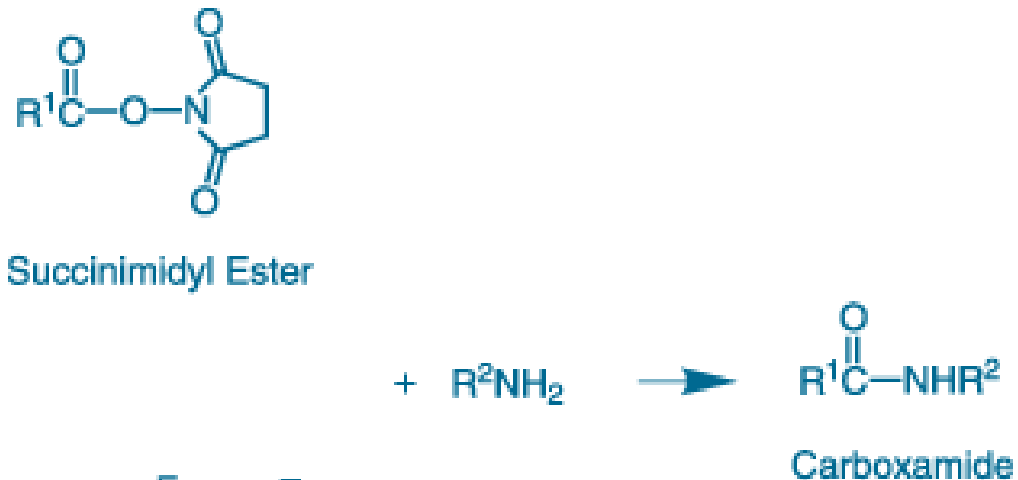
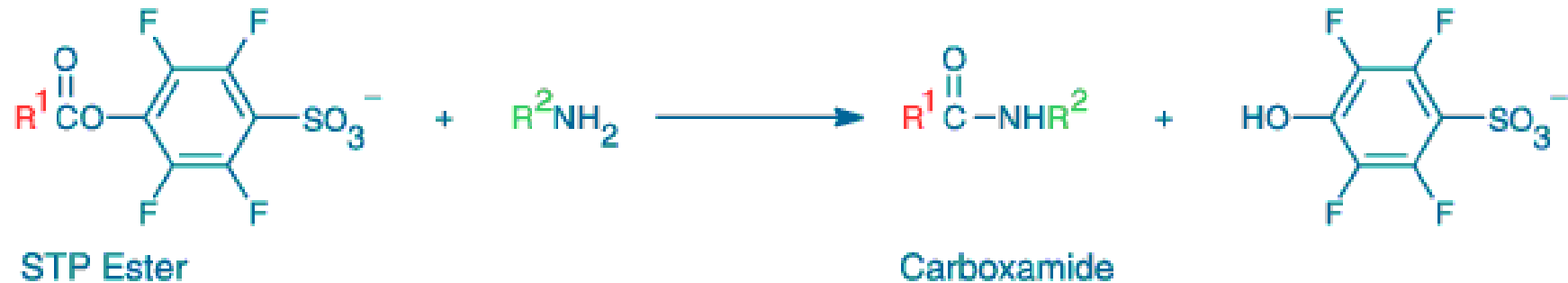
Fluorofory ve formě esterů jsou nejčastěji používány pro kovalentní značení biomolekul.

Vznik amidu

Amidy vznikají reakcí esteru s aminem

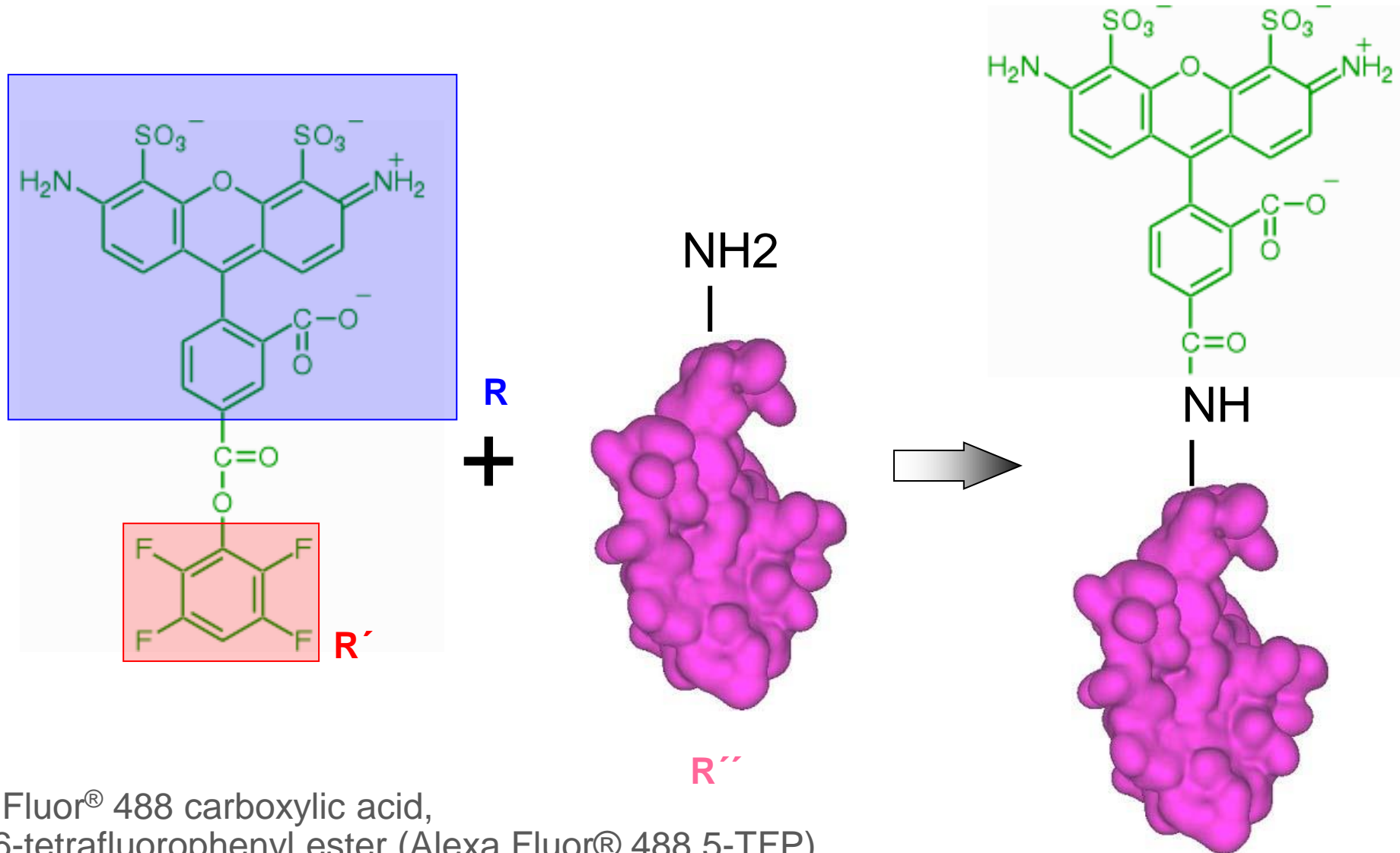


Reakce esterů při kovalentním značení molekul s NH₂ skupinou



Využívá se reakce esteru s aminem za vzniku amidu

Reakce esteru karboxylové kyseliny značky Alexa 488 s NH₂ skupinou proteinu



Alexa Fluor[®] 488 carboxylic acid,
2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester (Alexa Fluor[®] 488 5-TFP)

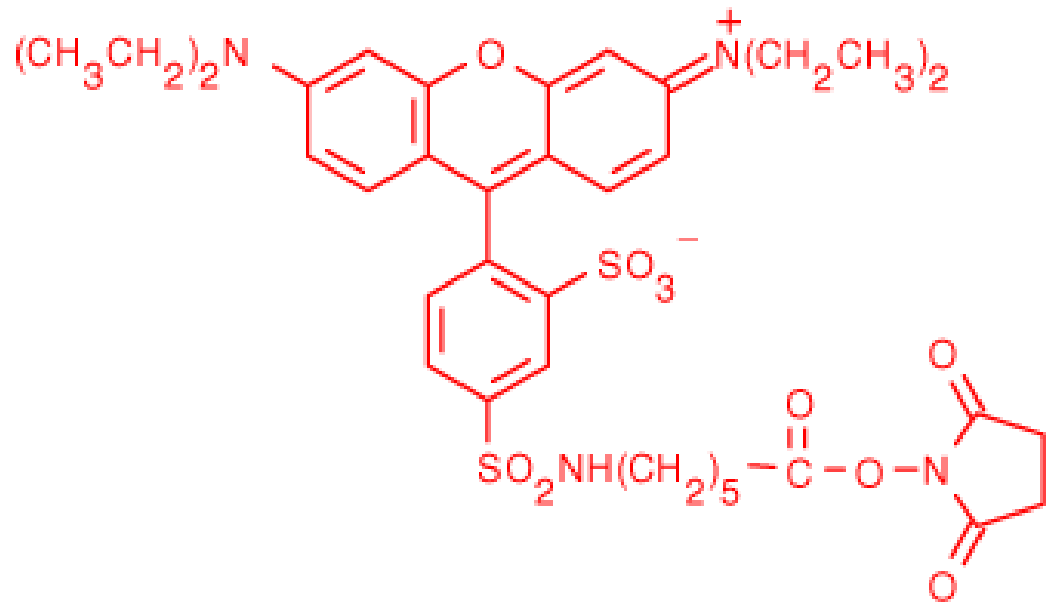
Jak přidat NH₂ skupinu k DNA?

Rovnou při syntéze oligonukleotidu se připojí alyfatický řetězec zakončený NH₂ skupinou (amino-linker)

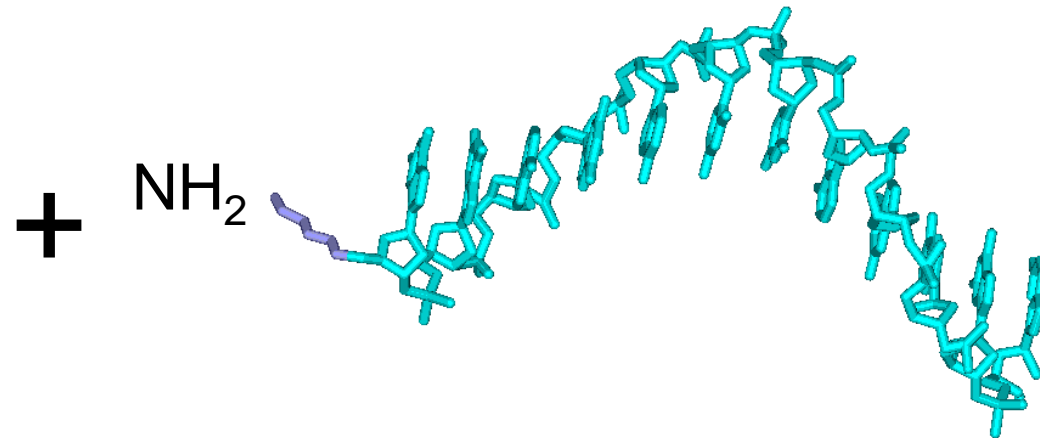


Modifikace 5' konce amino linkerem

Značení DNA přes NH₂ skupinu

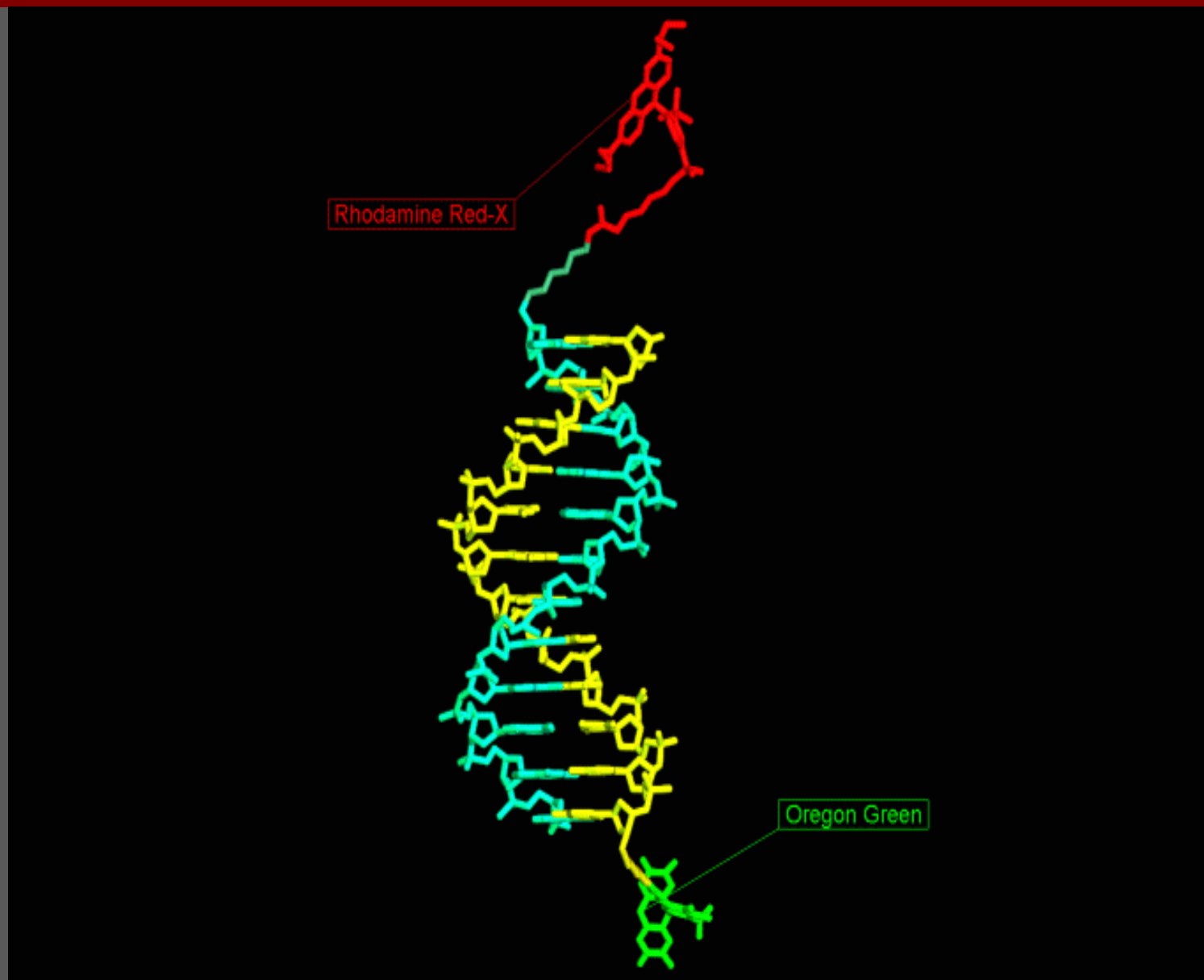


Rhodamine Red™-X, succinimidyl ester

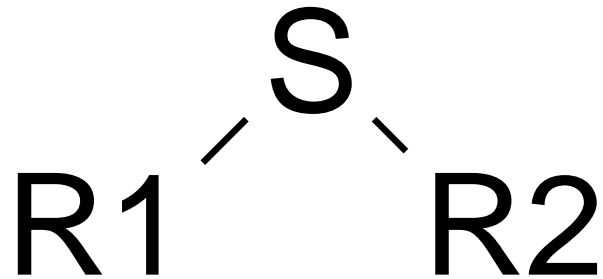


DNA s „amino-linkerem“

DNA značená Rhodaminem Red-X a OregonGreen



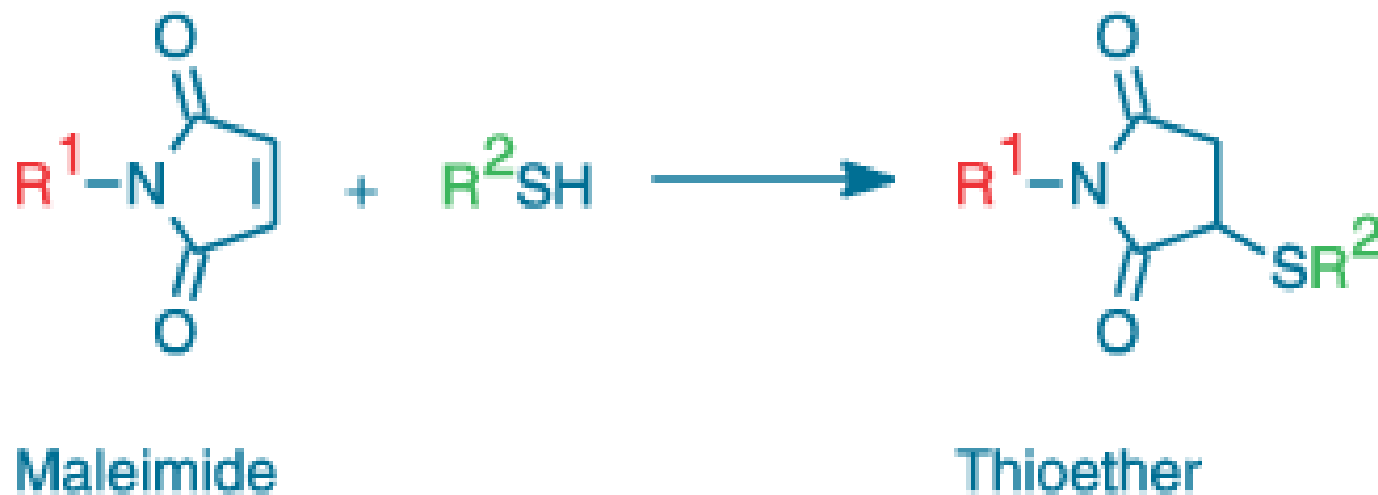
Připojení přes SH thiolovou skupinu za vzniku thioetheru



- Thioether je podobný esteru, jenom je O nahrazen S
- Thioether vzniká reakcí alkylačních činidel (např. halogenů, maleimidů) s thioly (obsahují SH skupinu)

Reakce při kovalentím značení s SH skupinou molekul

- Reakce thiolové skupiny s maleimidem za vzniku thioetheru
- Dvojná vazba maleimidu reaguje s thiolovou SH skupinou za vzniku thioetheru



Dalsi reakce pro znaceni molekul se skupinou SH

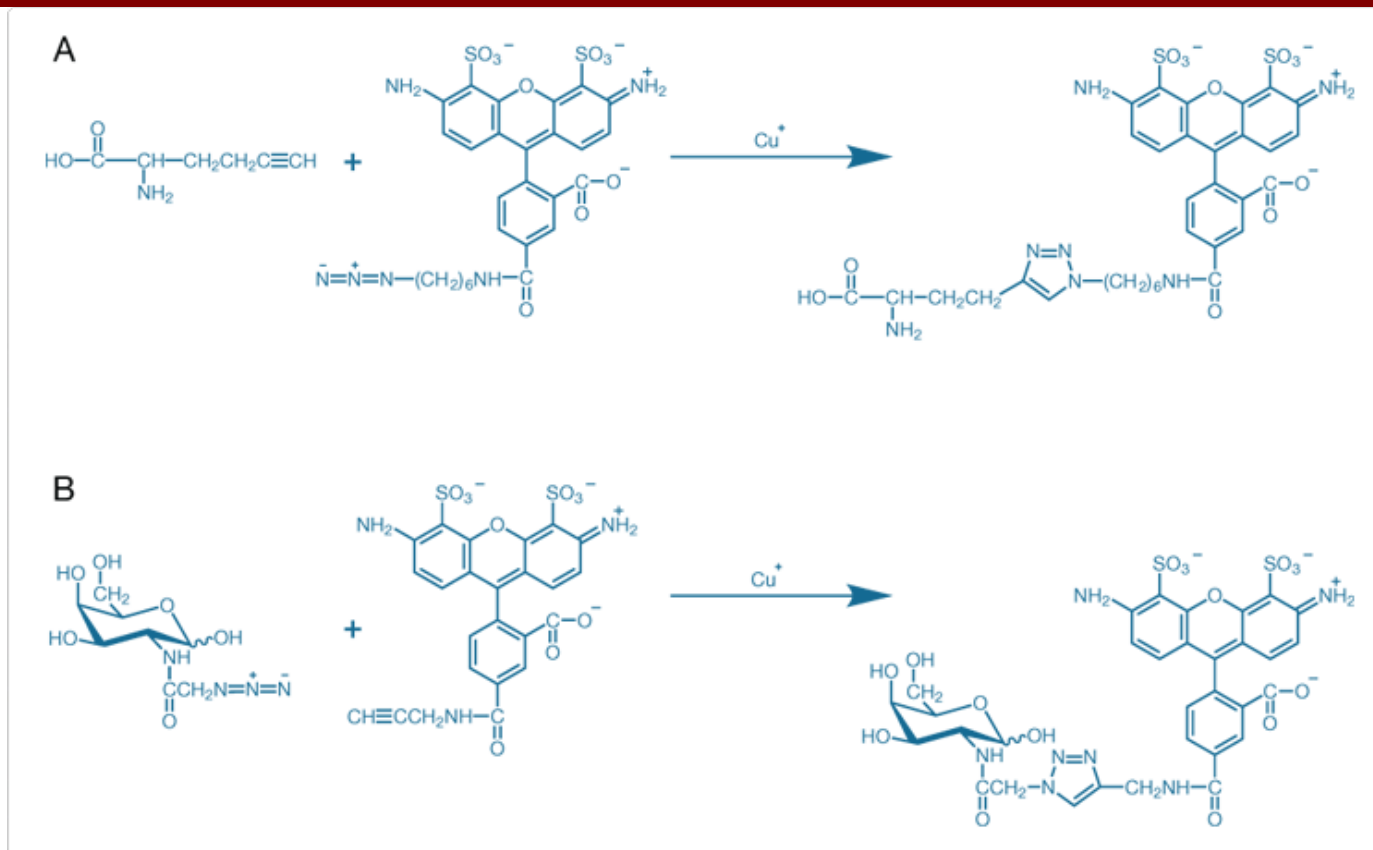
Disulfidy



Symmetric disulfide

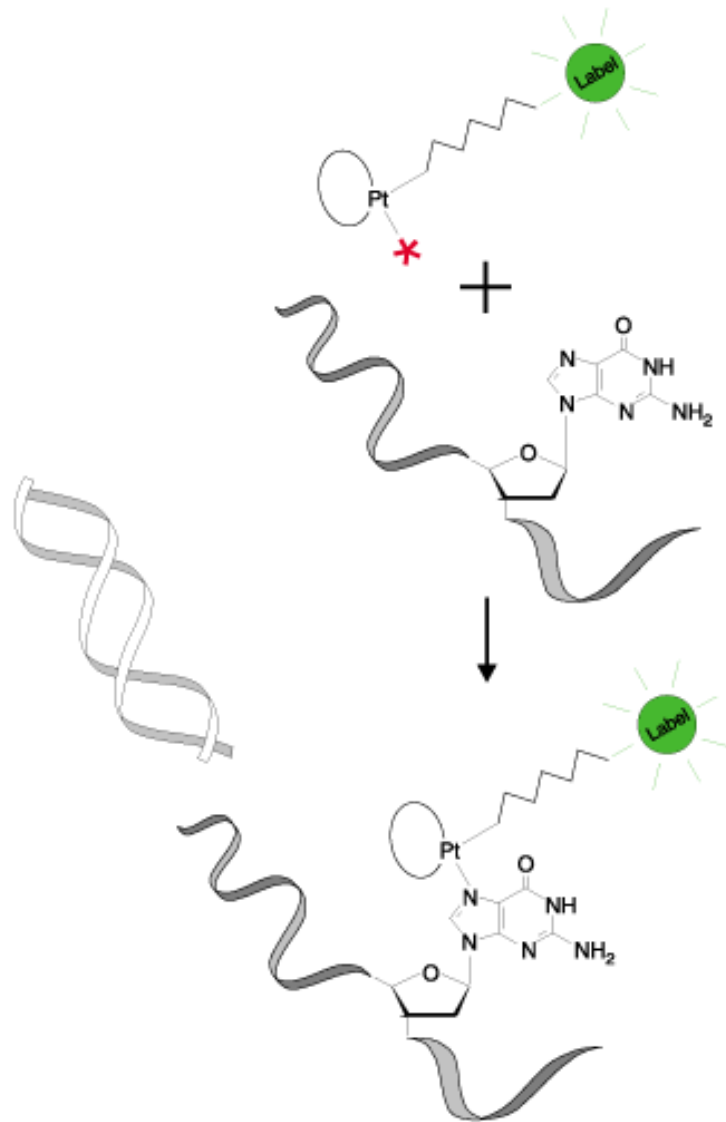
Mixed disulfide

“Click” chemistry



- Reakce katalizovaná Cu²⁺
- azide–alkyne cyklizační chemie pro detekci A) proteinů a B) cukrů.
- Reakční partneři A) L-homopropargylglycine (HPG) a Alexa Fluor 488 azide and B) *N*-azidoacetylgalactosamine a Alexa Fluor 488 alkyne.
- Partner vlevo je vpraven do proteinů během de novo syntézy nebo postranskripčními modifikacemi.

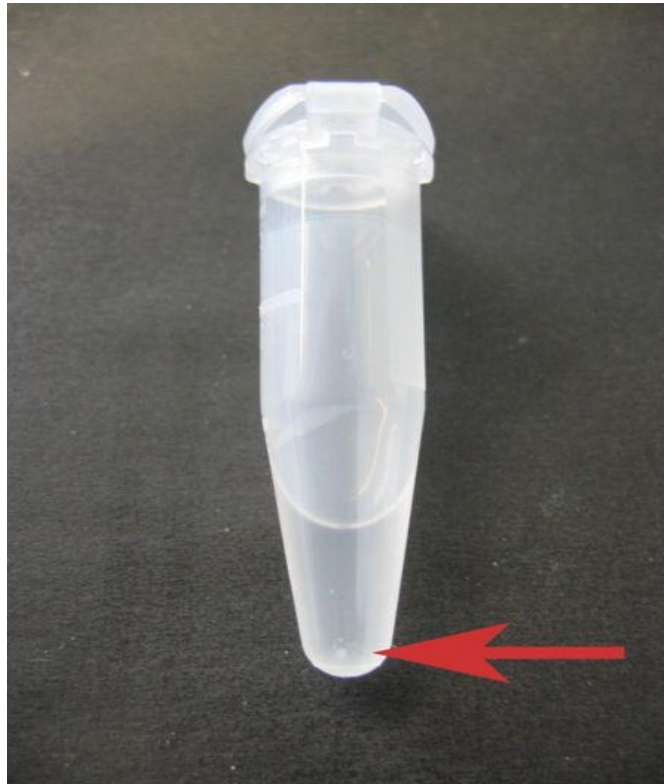
Další způsoby značení



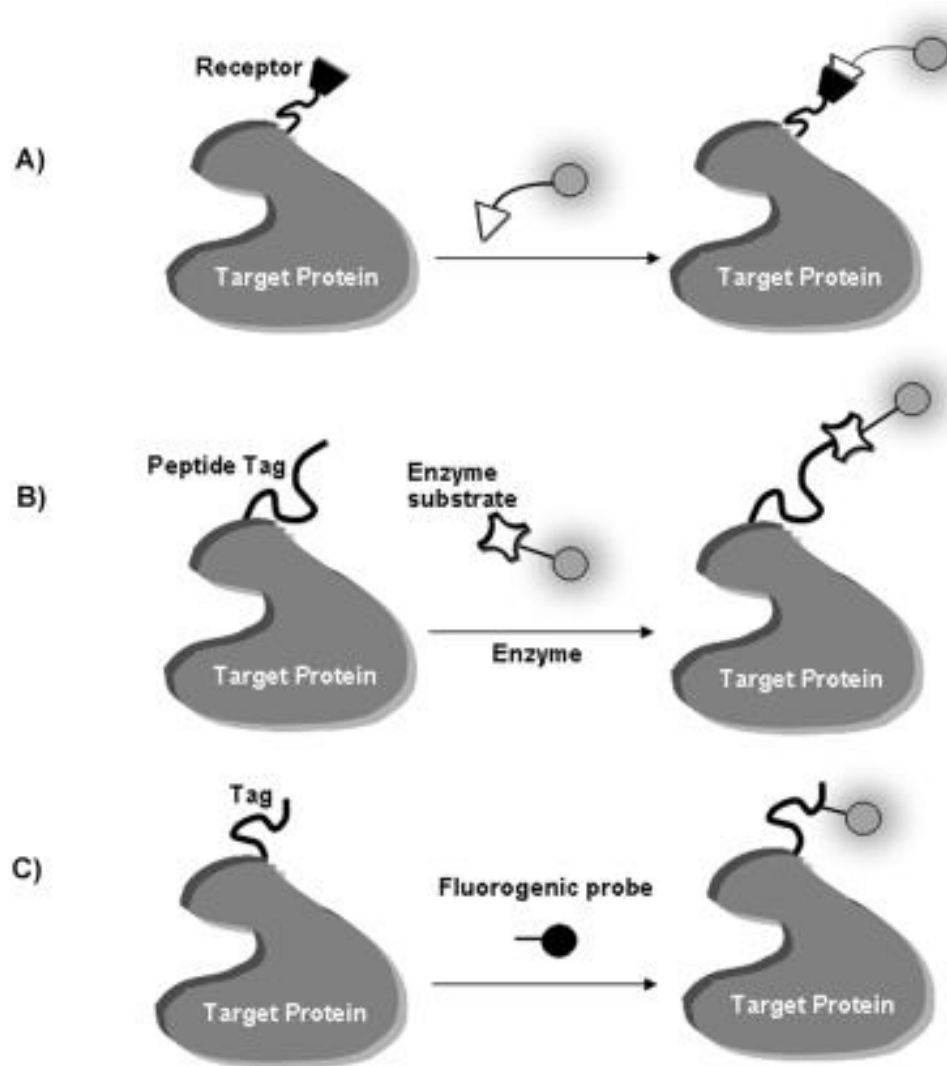
- DNA může být kovalentně značena bez připojení NH_2 skupiny při syntéze
- Využívá se reaktivity N7 guaninu s platinovými komplexy
- Platinový komplex obsahuje fluorescenční značku, která je po reakci kovalentně připojena ke guaninu

Separace nenavázané značky

- Chromatografie (protein)
gelová filtrace
- Ultrafiltrace
- Dialýza
- Srážení (DNA)

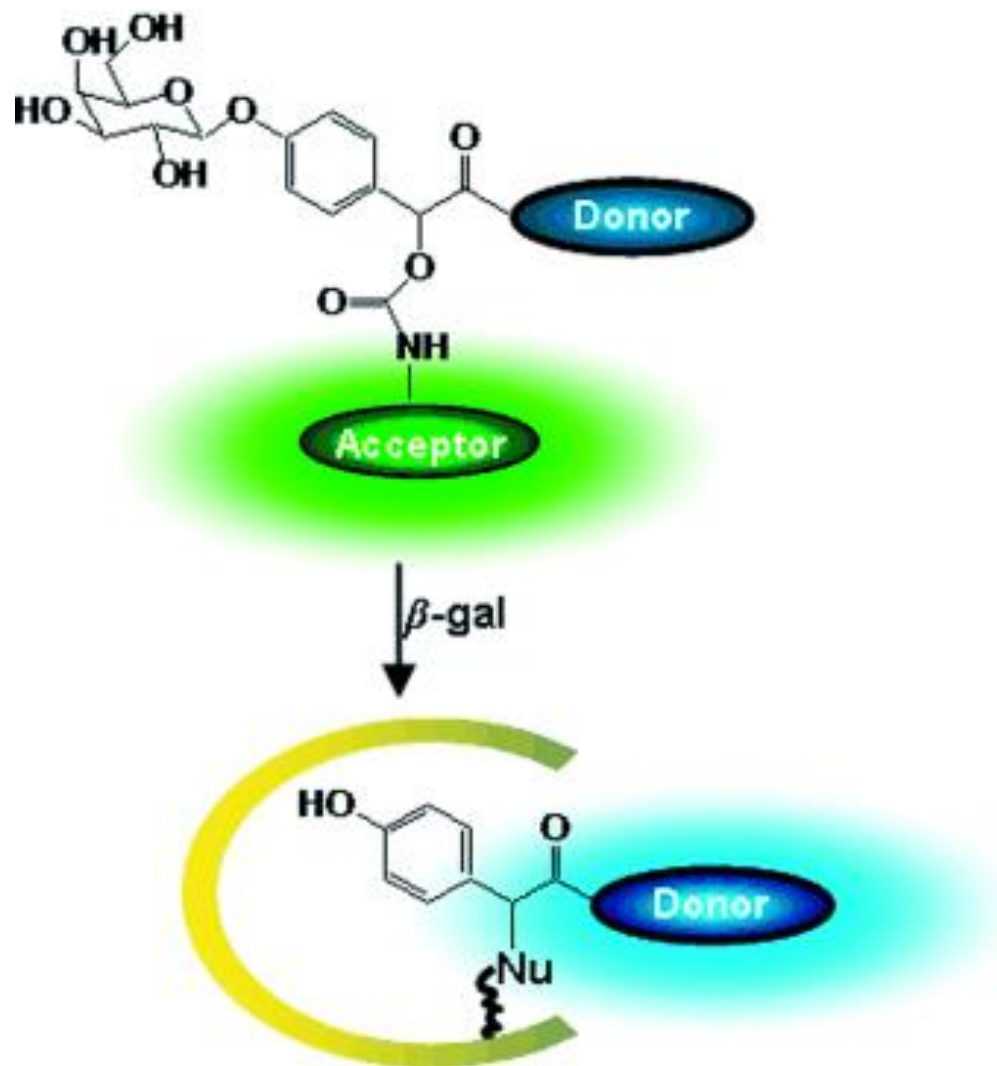


Chemické značení proteinů *in vivo*



- A) Receptor-protein – fluorescenční značka nebo sonda je připojena k molekule, která má vysokou afinitu k receptoru (avidin - biotin)
- B) Vazba zprostředkovaná enzymem – fluorofor je připojen k substrátu, který může být kovalentně navázán na peptidový „tag“ proteinu prostřednictvím dalšího proteinu/enzymu
- C) Značka původně nefluoreskuje. Po její vazbě k „tagu“ dochází k aktivaci fluorescence (fluorogenní reakce)

Fluorogenní detekce



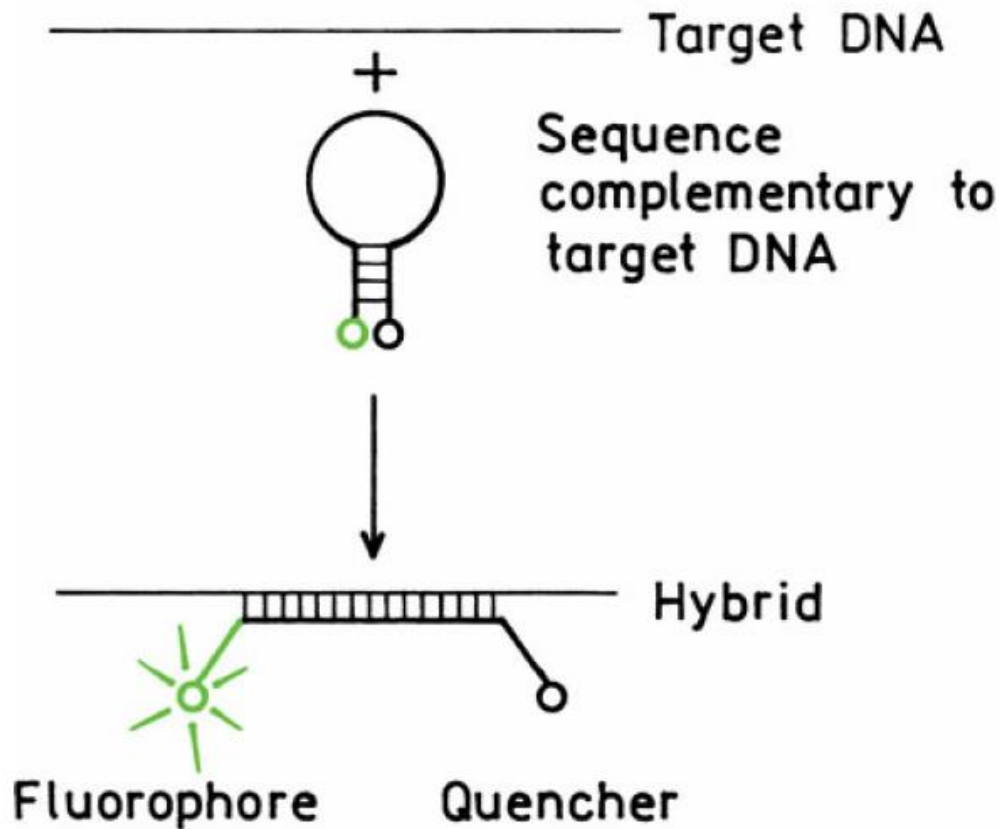
Značení β -gal *in vivo* fluorogenní sondou se změnou barvy emitovaného světla způsobenou přenosem energie. Nejdříve díky přenosu energie, fluoreskuje konjugát Donoru (D) a Akceptoru (A) zeleně. Kovalentní značení biomolekuly probíhá ve dvou krocích.

1. První krok zahrnuje štěpení O-galaktosidové vazby, při kterém se odštěpuje A vzniká reaktivní meziprodukt chinonmethid, který je náchylný k nukleofilnímu ataku blízkého zbytku aminokyseliny.

2. V druhém kroku dochází ke kovalentnímu připojení Donoru k molekule, který může zářit modře, protože již není navázaný Akceptor.

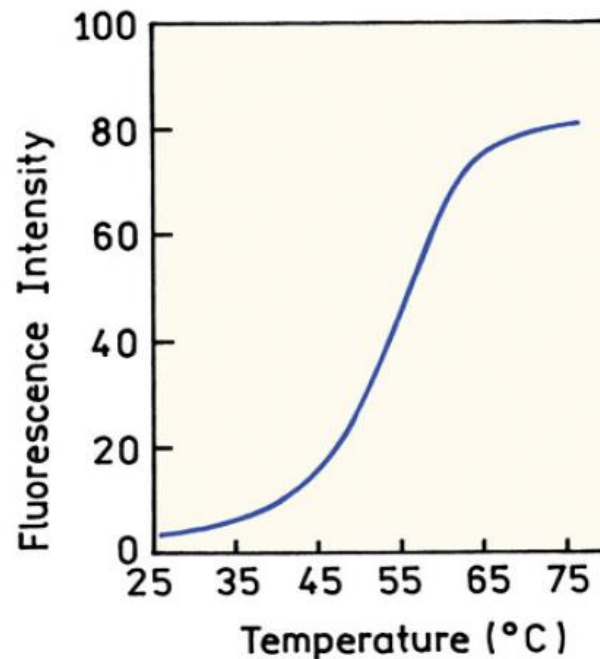
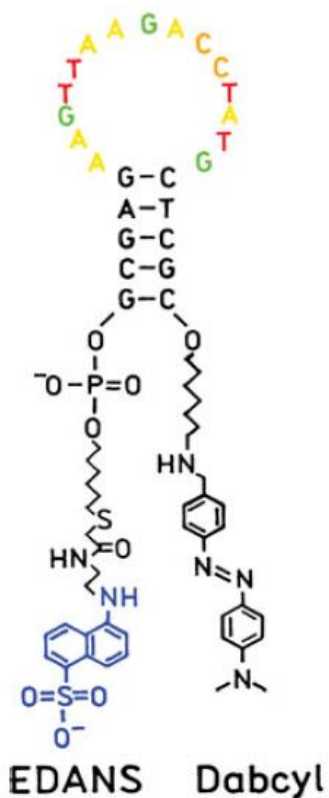


DNA beacons



- Beacon zn. angl. signální oheň (ne slanina)
- DNA beacon sestává z molekuly DNA, která je schopna tvořit vlásenkovou strukturu
- DNA má na jednom konci připojen fluorofor a na druhém jeho zhášedlo
- Při hybridizaci s komplementární DNA dochází k oddálení zhášedla a následné emisi fluorescence

Struktura a vlastnosti „DNA beacon“

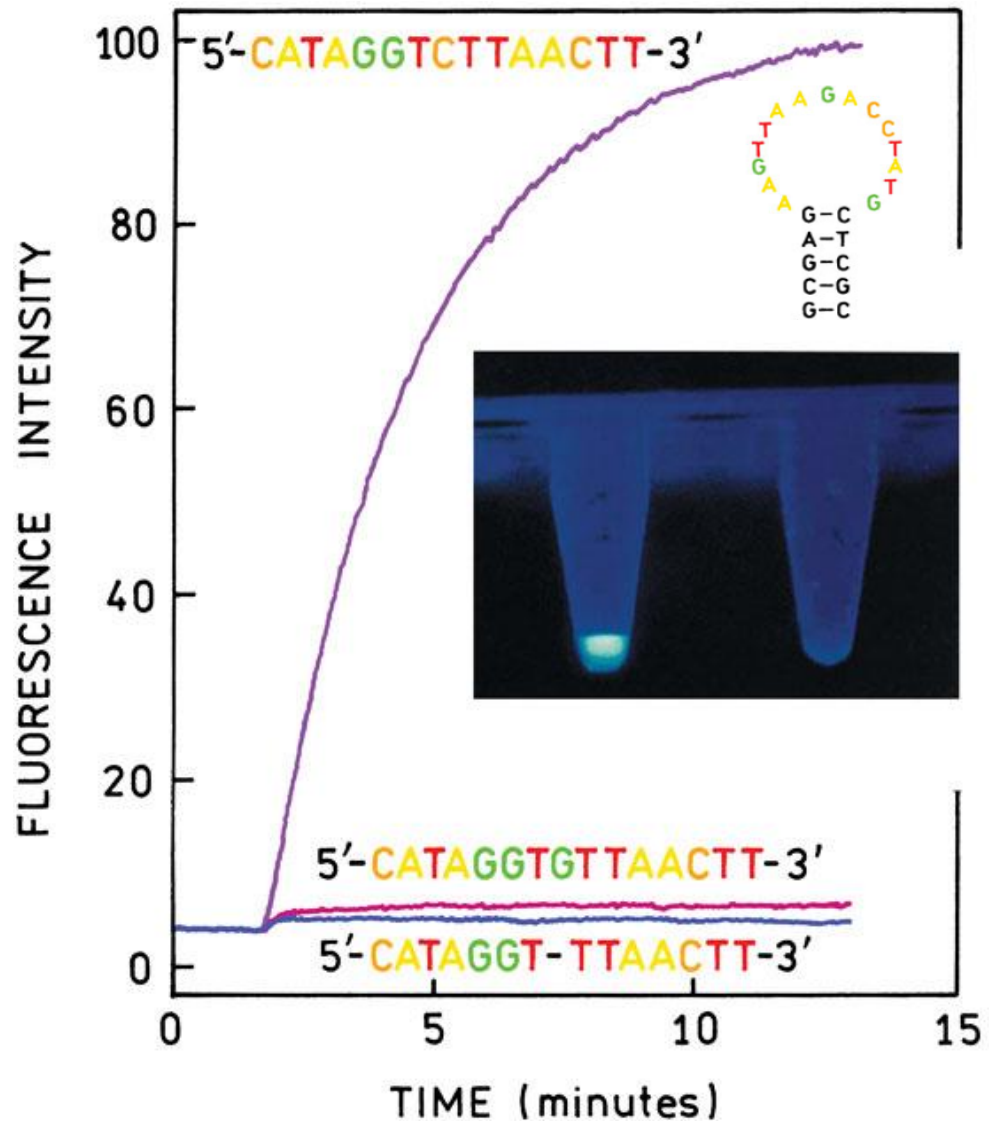


Při zvyšování teploty dochází k tání struktury vlásenky, což se projevuje vzrůstem intenzity fluorescence

Pozn. V případě Dabcylu byla zjištěna neočekávaná schopnost zhášet široké spektrum fluoroforů bez ohledu na míru překryvu spekter. Důvodem pro toto univerzální zhášení je pravděpodobně vytváření nefluorescenčního komplexu Dabcylu s fluoroforem.

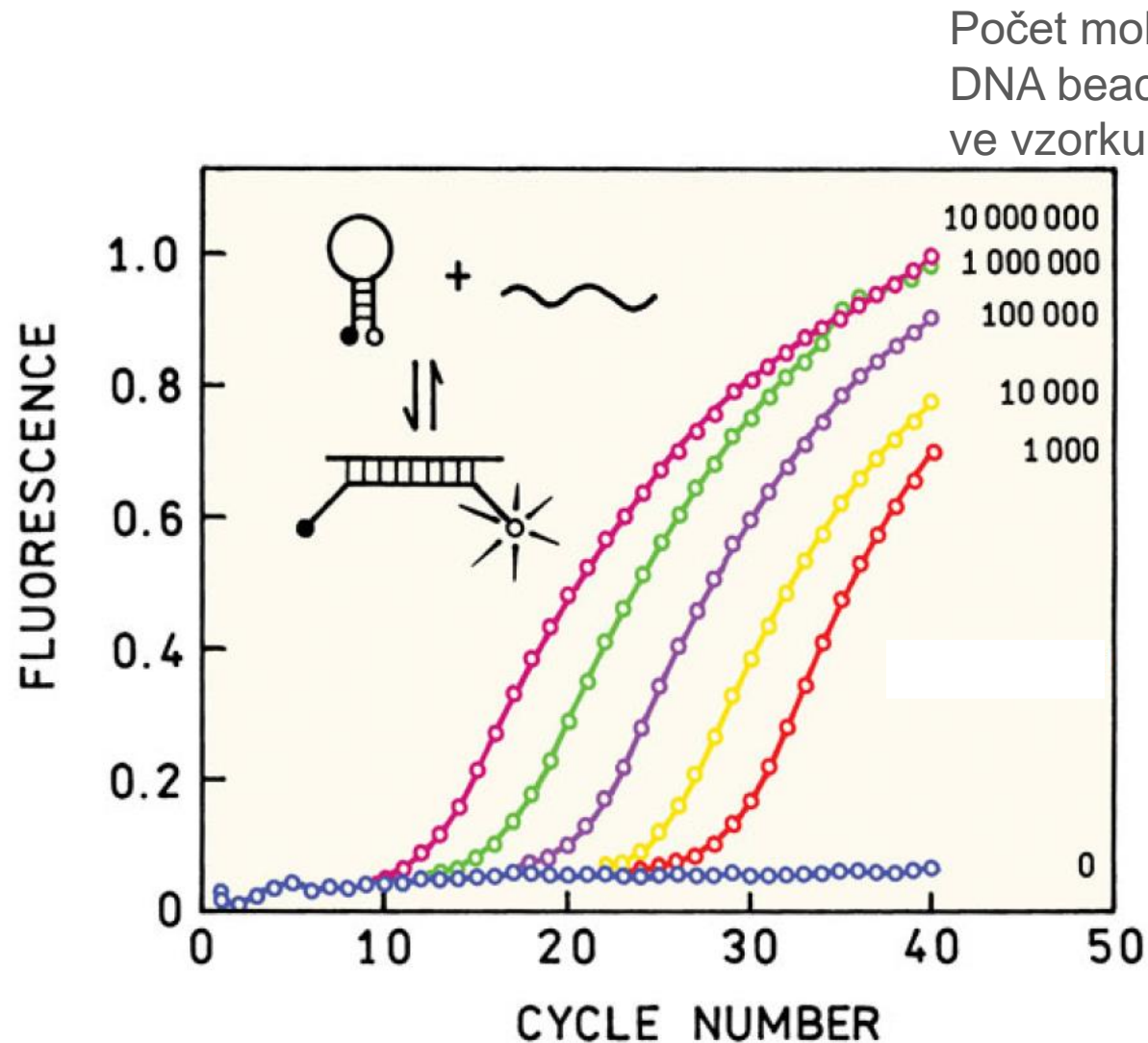
Každopádně je to výhodné, protože jedno zhášedlo může být použito pro celou řadu fluoroforů.

Vysoká citlivost „DNA beacon“



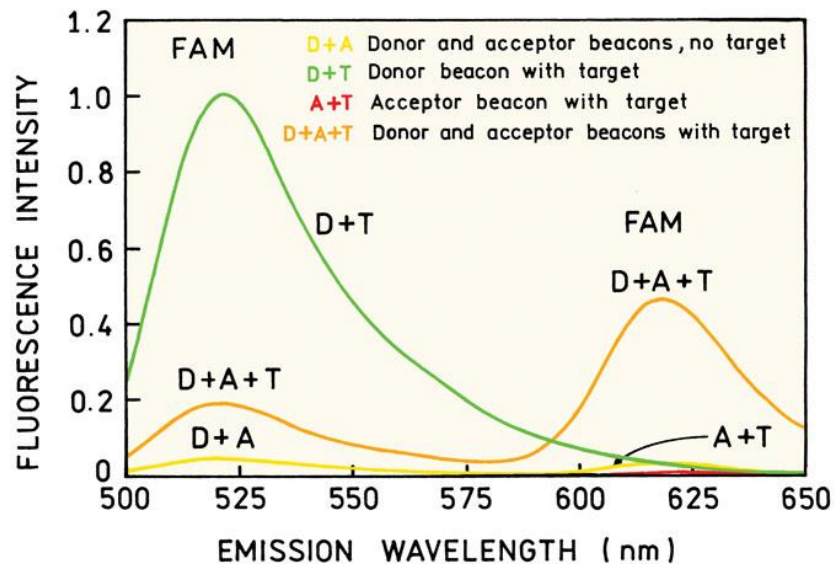
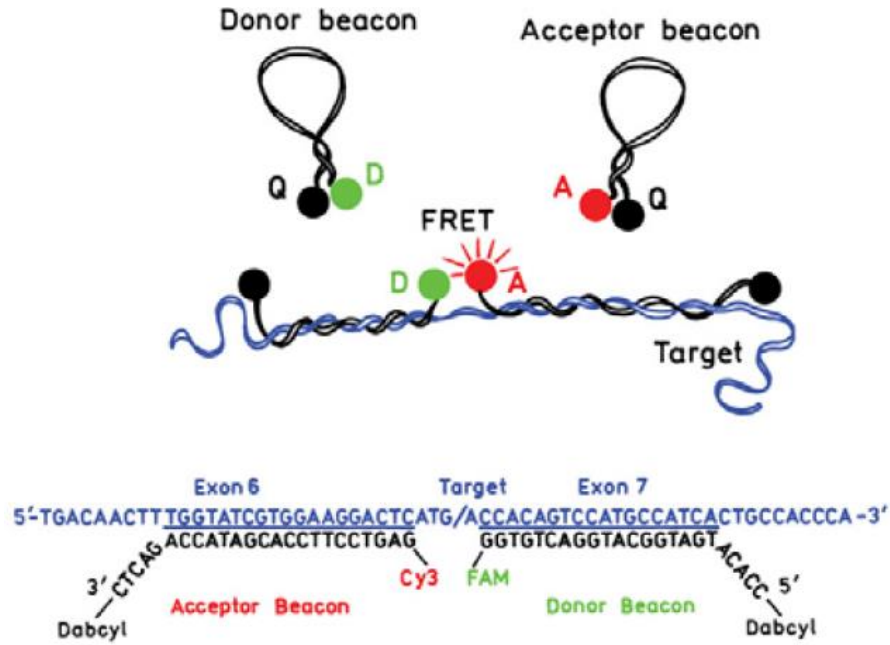
- V případě, že dojde k hybridizaci s DNA, která se liší i pouze v jednom nukleotidu, nedochází k nárůstu signálu fluorescence.
- Vysoká citlivost a poměr **on/off** signálu v **přítomnosti / nepřítomnosti** komplementární DNA.

Použití Dabcyl-Fluorescein páru na „DNA beacon“ ke sledování PCR



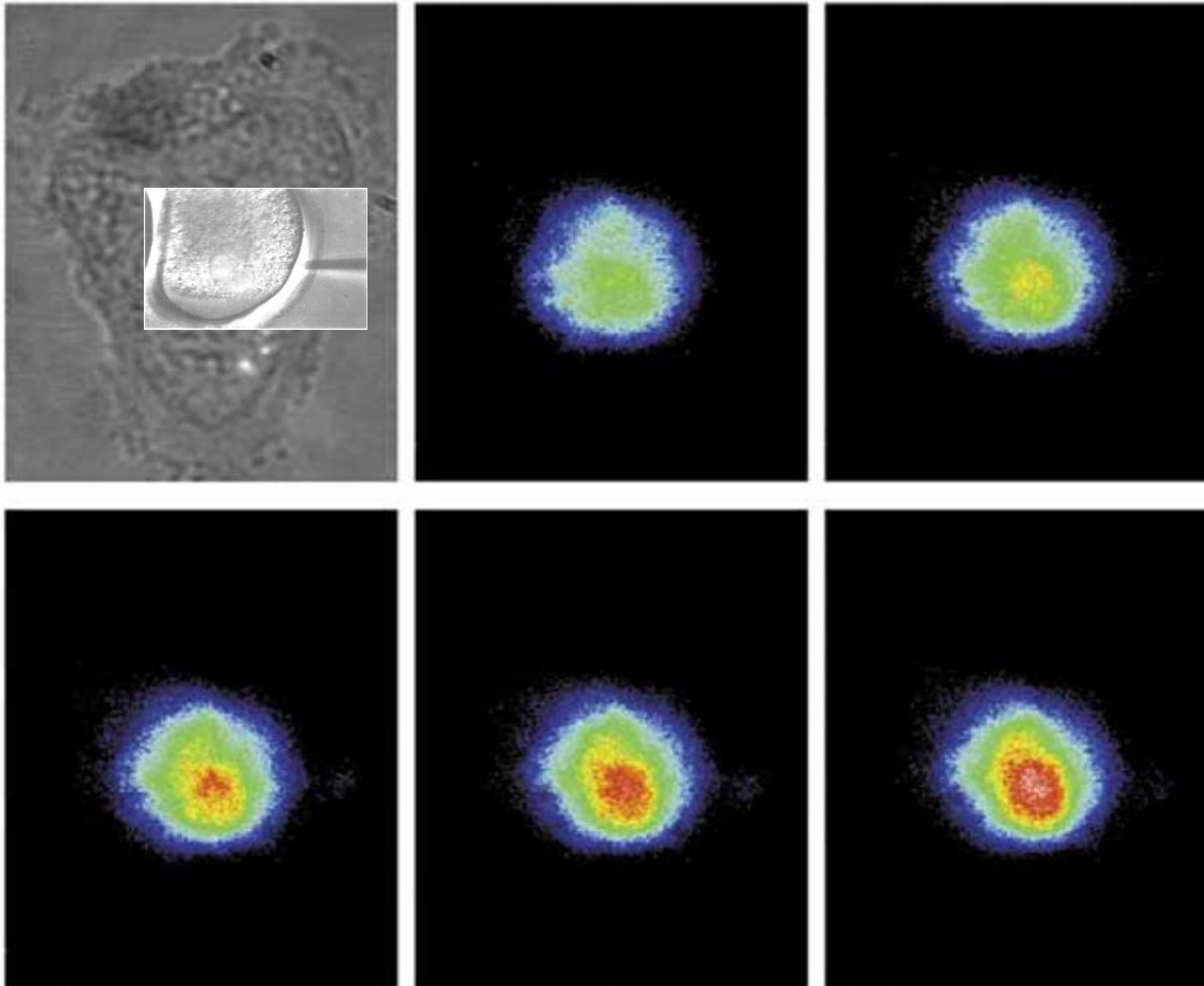
Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství amplifikované DNA

Hybridizace v sousedních oblastech



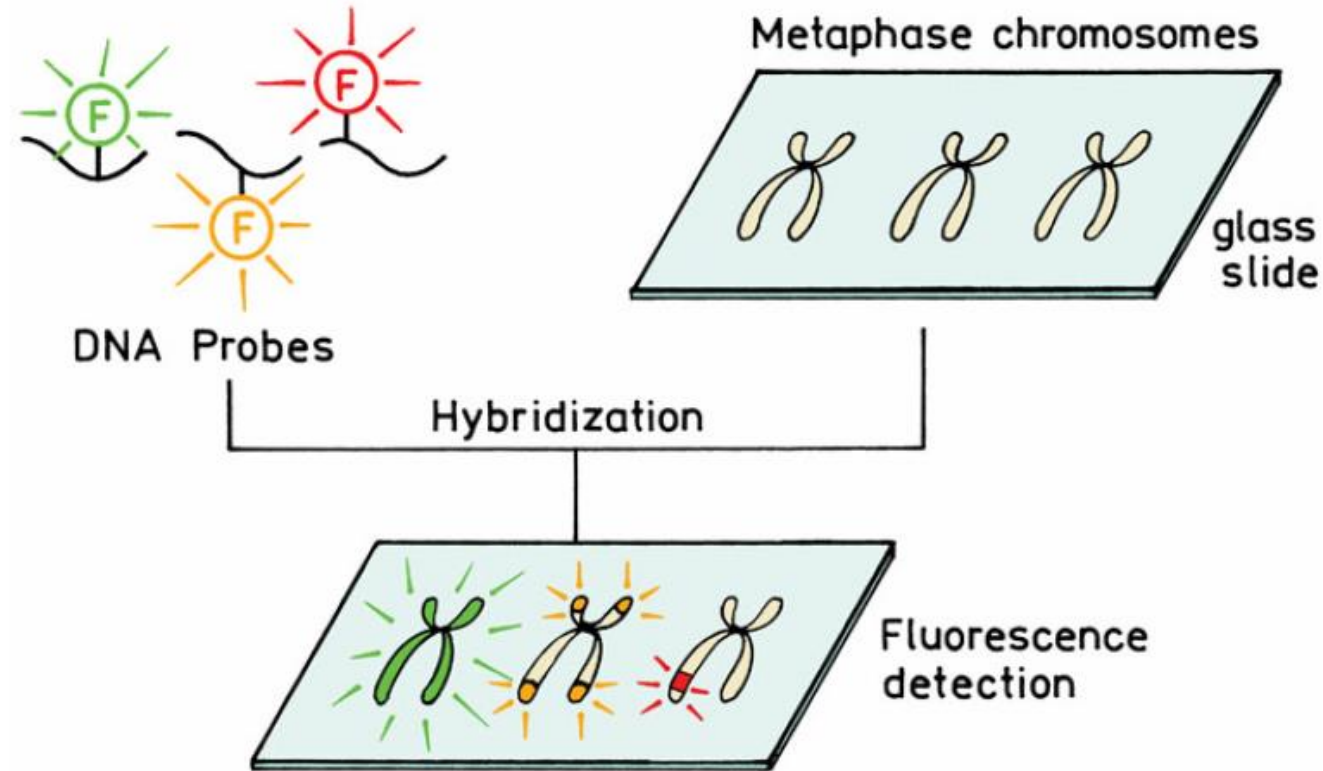
- Výhodné uspořádání ke snížení falešně pozitivních výsledků
- Používají se dvě vlásenky
- Jedna vlásenka obsahuje donor a druhá akceptor FRET
- Bez cílové DNA jsou oba fluorofory ve vlásence zhaseny
- V případě, že dochází ke správné hybridizaci s cílovou DNA, je pozorován FRET
- Když se hybridizuje pouze jedna vlásenka, dochází sice ke zvýšení intenzity, ale nezvyšuje se FRET
- Tímto způsobem je zaručena specifita analýzy

Detekce mRNA v živých buňkách



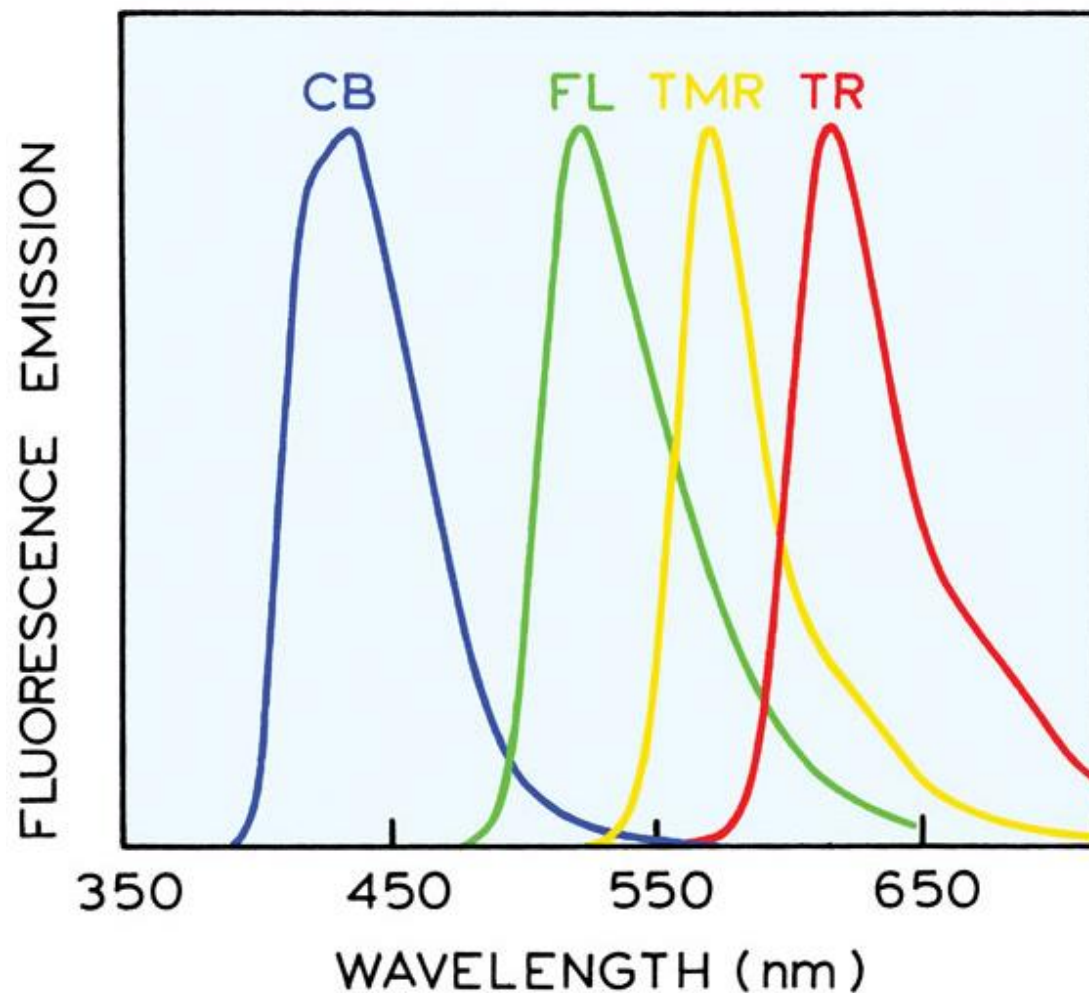
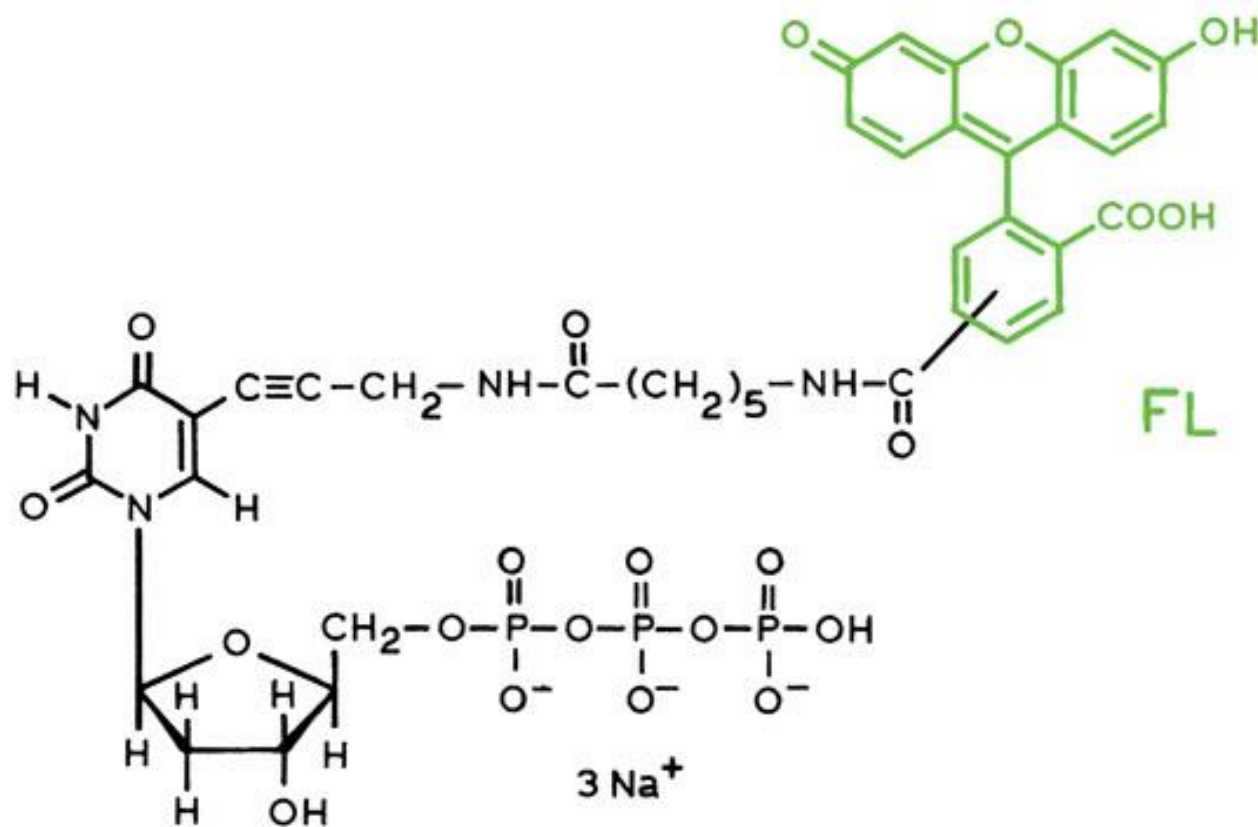
- Optické a fluorescenční zobrazení ledvinových buněk
- Zvyšování intenzity fluorescence „DNA beacon“ proti mRNA pro β -aktin prokázalo zvýšení koncentrace mRNA a tedy zvýšení produkce β -aktinu

FISH - fluorescence *in situ* hybridization

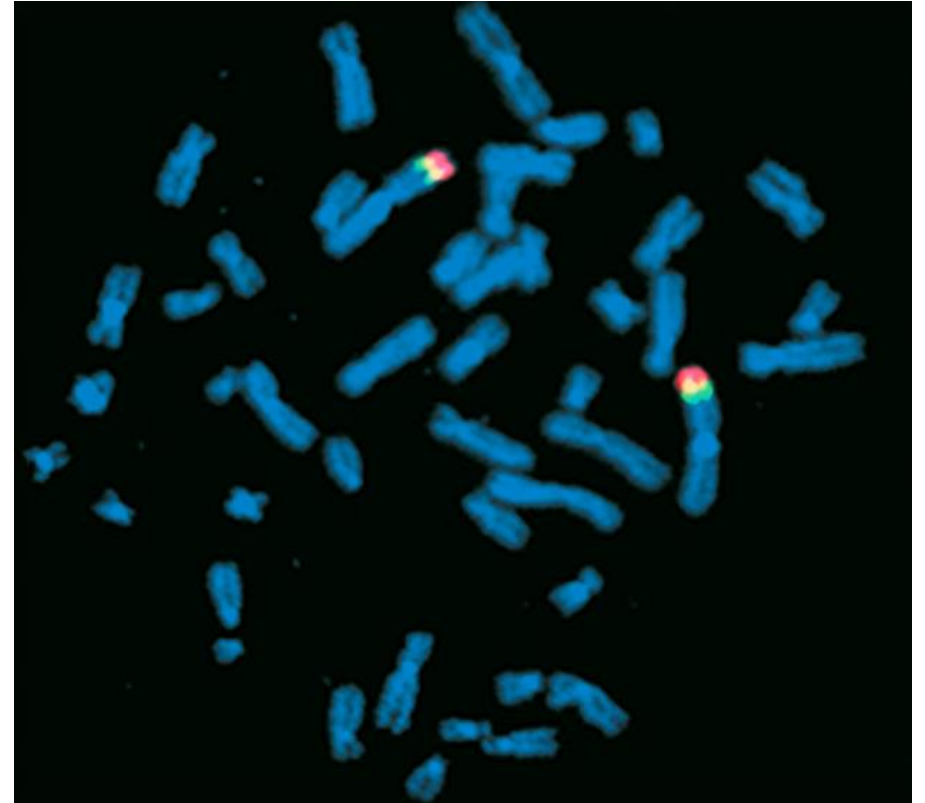


- DNA ve formě metafázových chromozomů je vystavena hybridizaci s fluorescenčně značenou DNA sondou
- DNA sonda má sekvenci komplementární k cílové DNA na chromozomu
- Po hybridizaci je část obsahující cílovou DNA lokalizována na základě fluorescence

Fluorescenční deoxyribonukleotidy pro syntézu FISH DNA sond

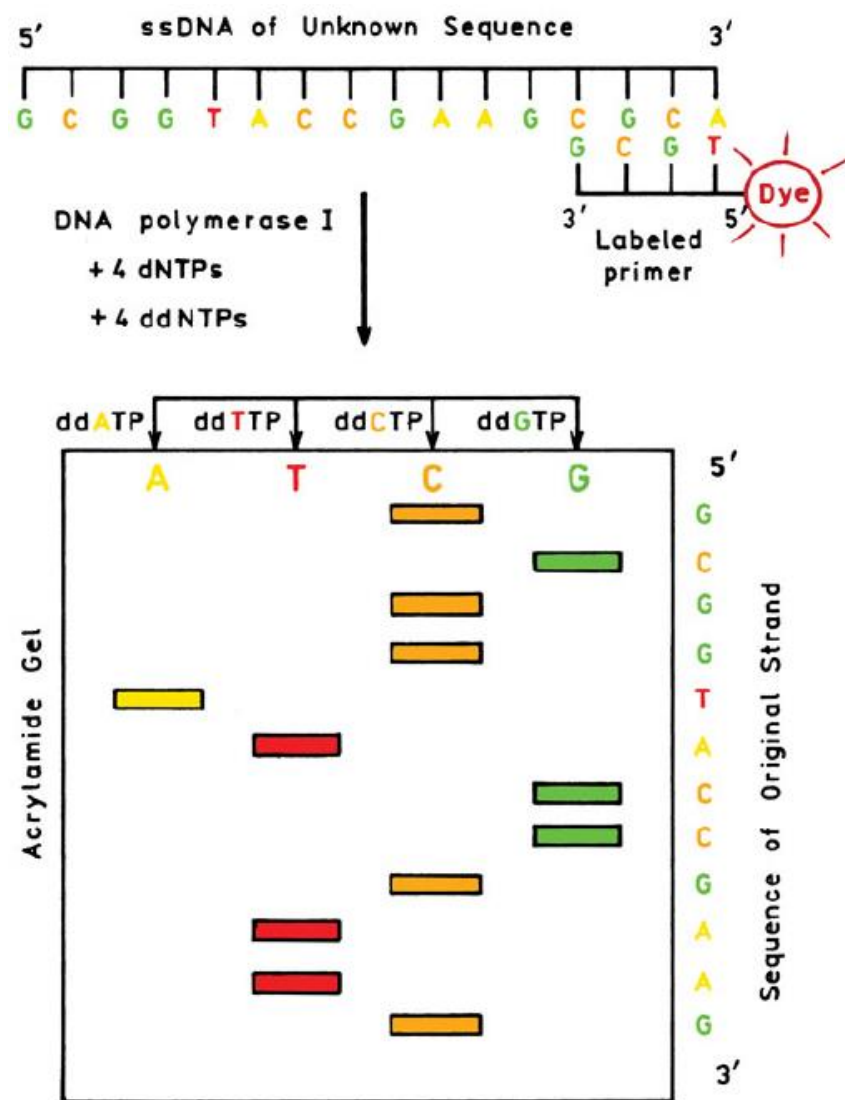


FISH příklady



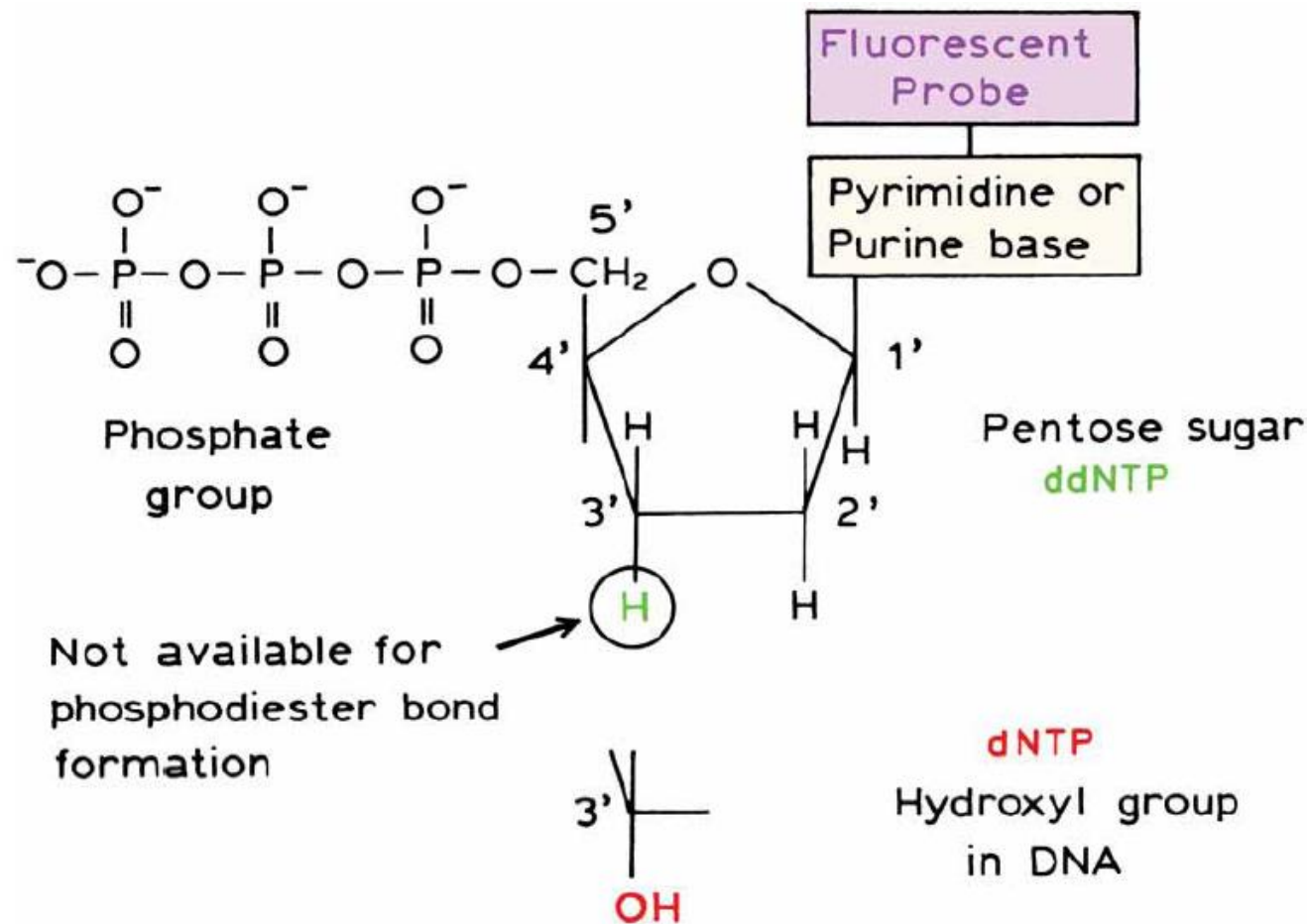
- Chromozomy, které byly hybridizovány s fluorescenčně značenými sondami
- Chromozomální DNA byla nespecificky obarvena DAPI

Radioaktivní sekvenování



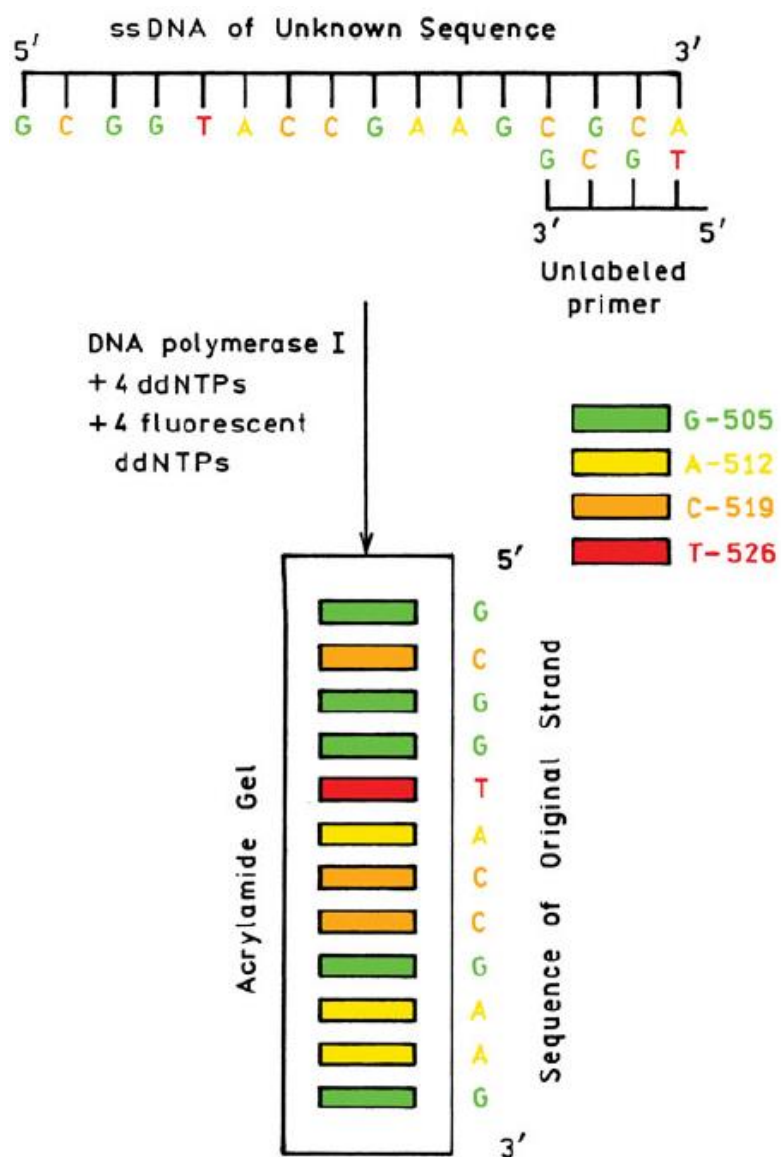
- Prvotní sekvenování používalo radioaktivně značený primer
- Primer byl prodlužován podle sekvenovaného řetězce DNA polymerázou
- Ve směsi normálních nukleotidů (dNTP) byl přidán vždy jeden typ (ddNTP), který zabraňuje dalšímu prodlužování syntetizovaného řetězce
- Takto vzniká směs řetězců DNA s proměnlivou délkou končící vždy daným ddNTP
- Každá reakční směs pro daný ddNTP byla analyzována v jedné elektroforetické jamce (celkově ve 4 jamkách)
- Sekvence byla stanovena z polohy pásu příslušného ddNTP na gelu

Schéma ddNTP DNA



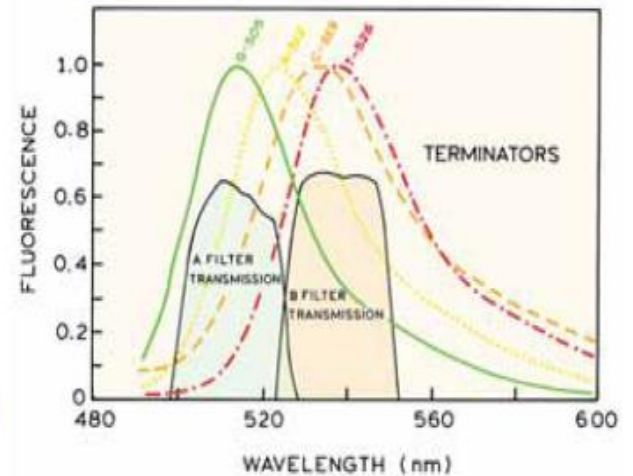
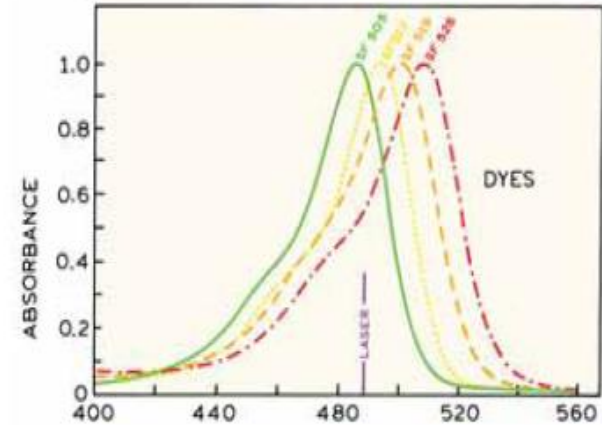
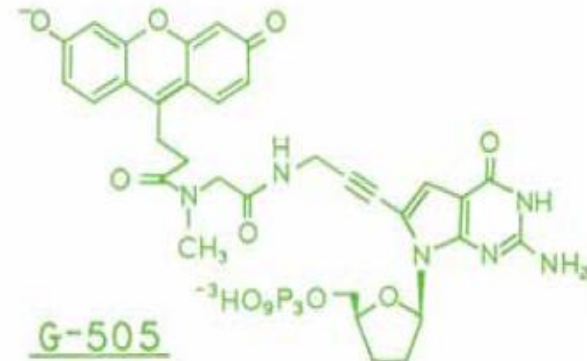
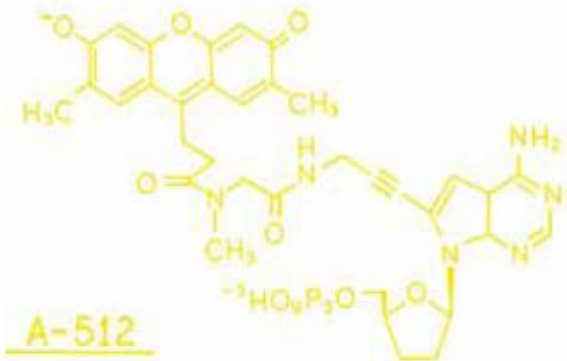
- Dideoxynukleotid-trifosfát ddNTP
- V poloze 3' u ribózy je zaměněna OH skupina za H, což zamezuje dalšímu prodlužování řetězce DNA

Fluorescenční značení zrychlilo sekvenování



- Použití 4 fluorescenčních značek umožnilo použít pouze jednu dráhu v gelu k identifikaci všech čtyř nukleotidů => 4-násobné zrychlení
- Fluorescenční skenování umožnilo dokončit projekty sekvenace genomu celých organismů ve výrazně kratší době

Fluorescenční značky pro sekvenaci



Připojení značky přes acetylénovou trojnou vazbu

Všechny značky se excitují jedním laserem (488 nm)

A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides

JM Prober, GL Trainor, RJ Dam, FW Hobbs, CW Robertson, RJ Zagursky, AJ Cocuzza, MA Jensen, and K Baumeister

Science 16 October 1987 238: 336-341

Human genome sequence



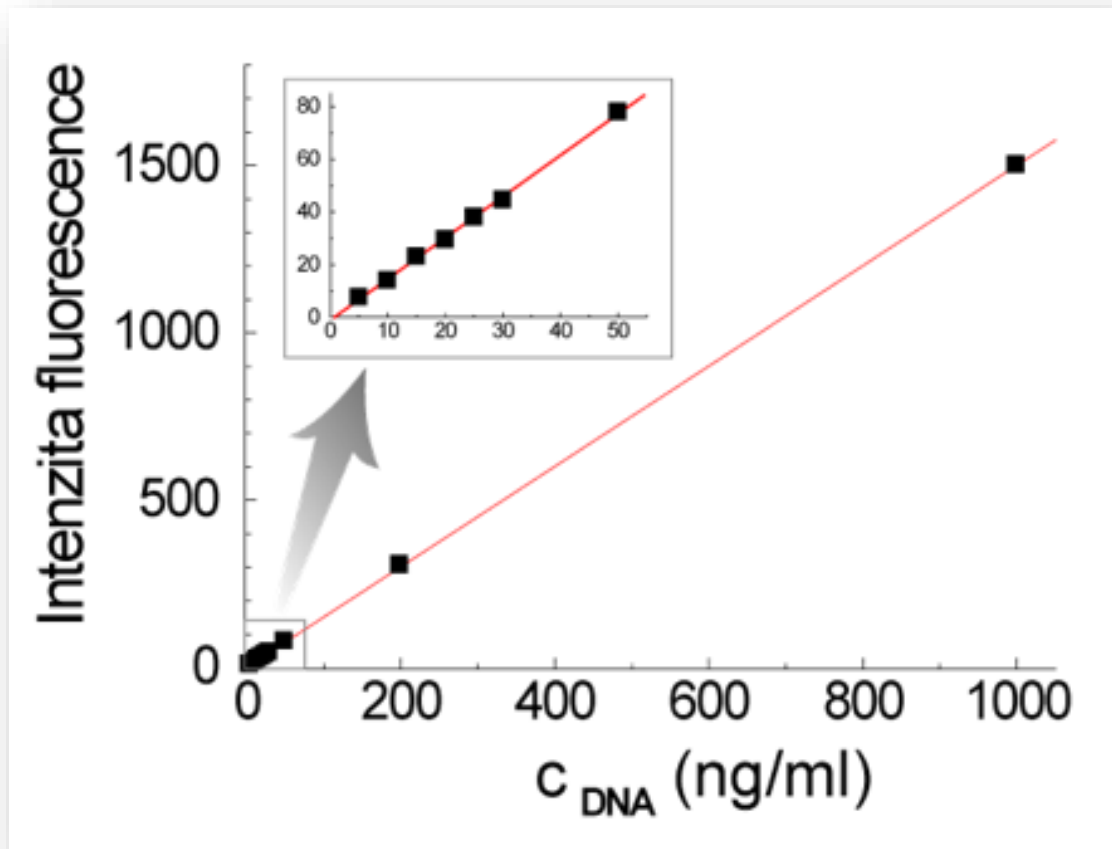
- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE
V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

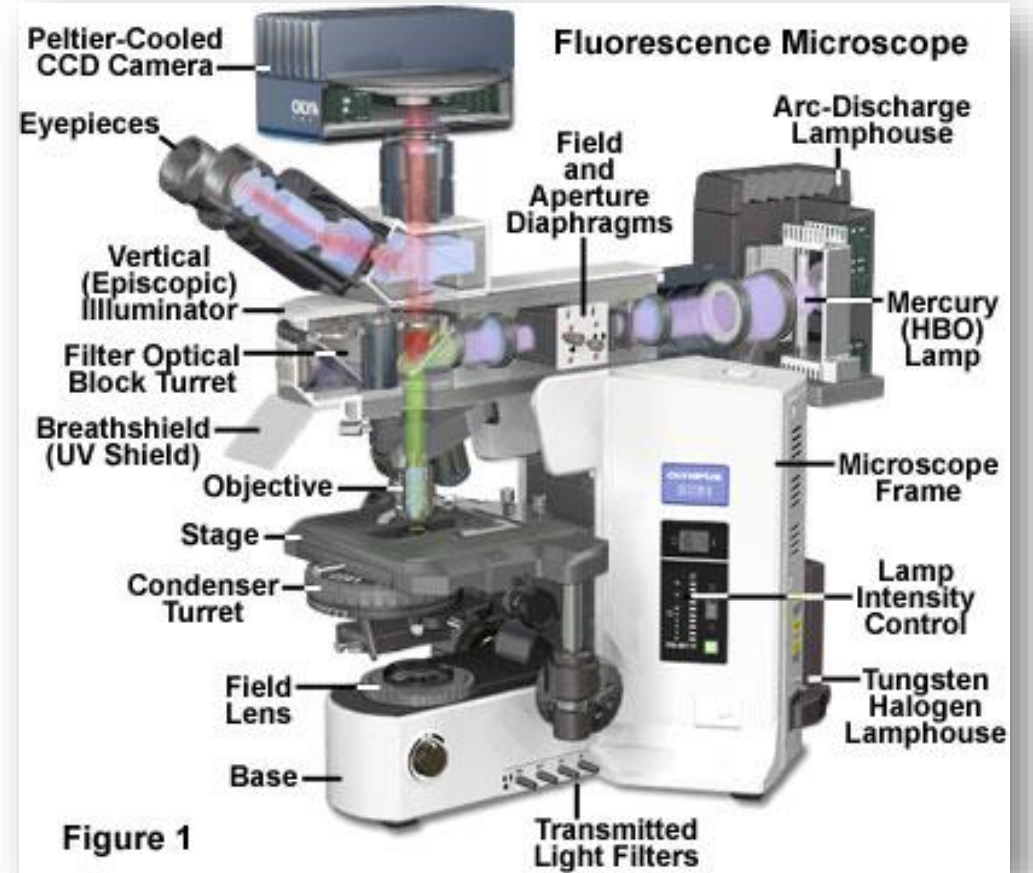
Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J. R. Lakowitzem.

Příště 2 in 1

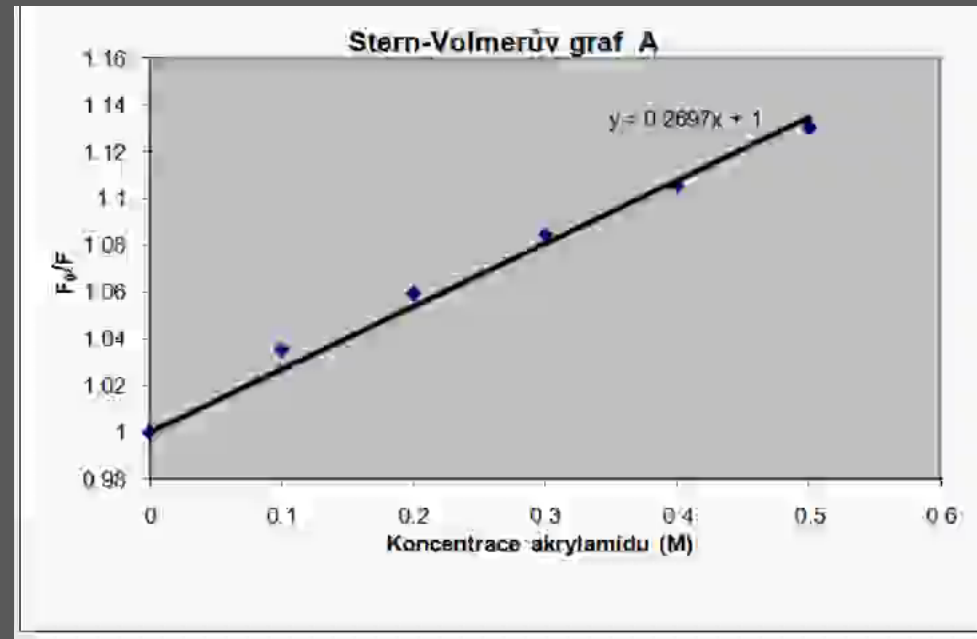
Analytické stanovení



Mikroskopie



Zhášecí konstanta K_{SV} z rovnice regrese



is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7230/um/9156087/RovniceRegrese_Excel_1.mp4