

NEVLASTNÍ FLUORESCENCE

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

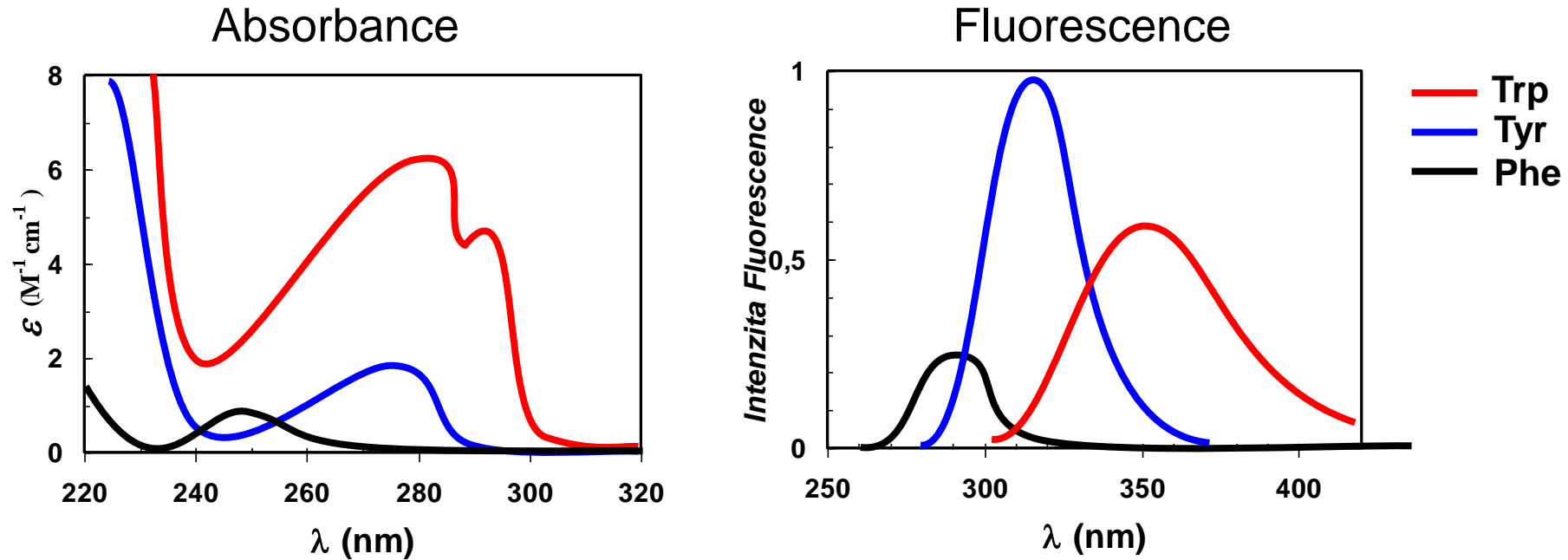
NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI **SCI** **Národní centrum
pro výzkum
biomolekul**



Dá se vnitřní fluorescence proteinů použít k určení koncentrace?

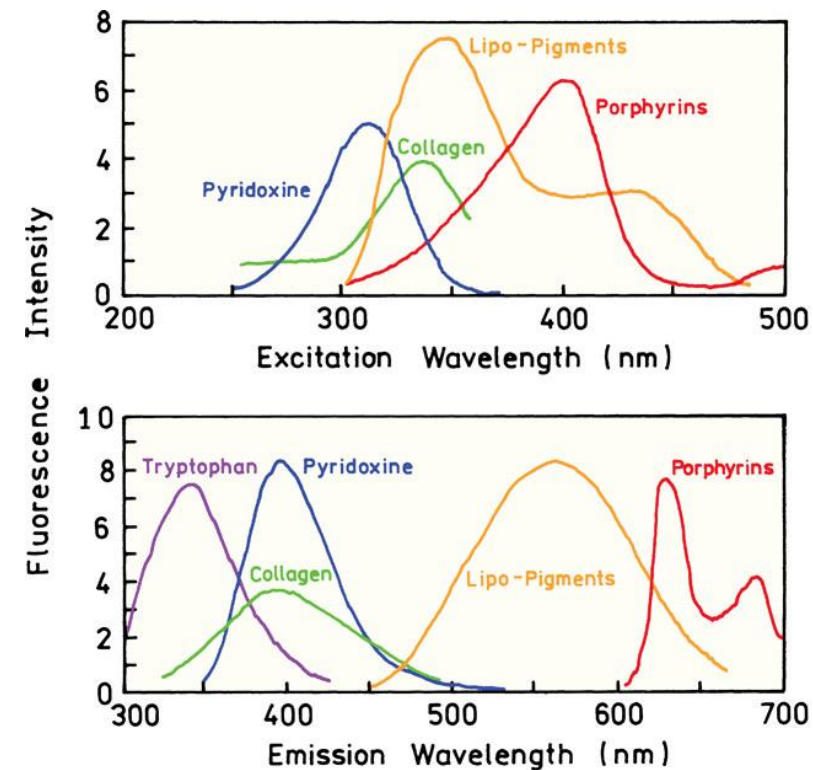
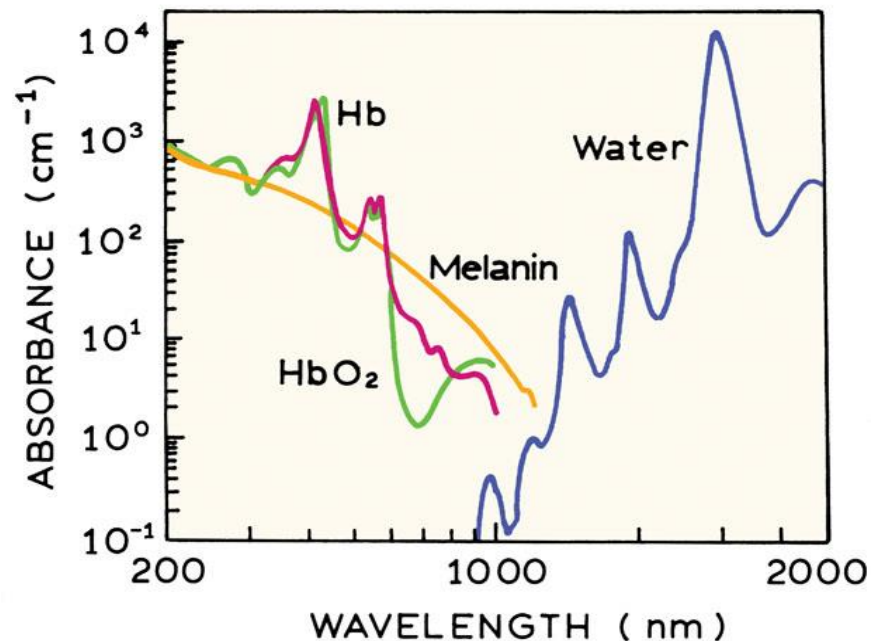


- Jenom ve velmi omezené míře a pouze u některých proteinů (závislost emise tryptofanu na poloze ve struktuře proteinu, vzájemné zhášení fluorescence AK přenosem energie).
- Při použití vnějšího značení je stanovení koncentrace mnohem přesnější.

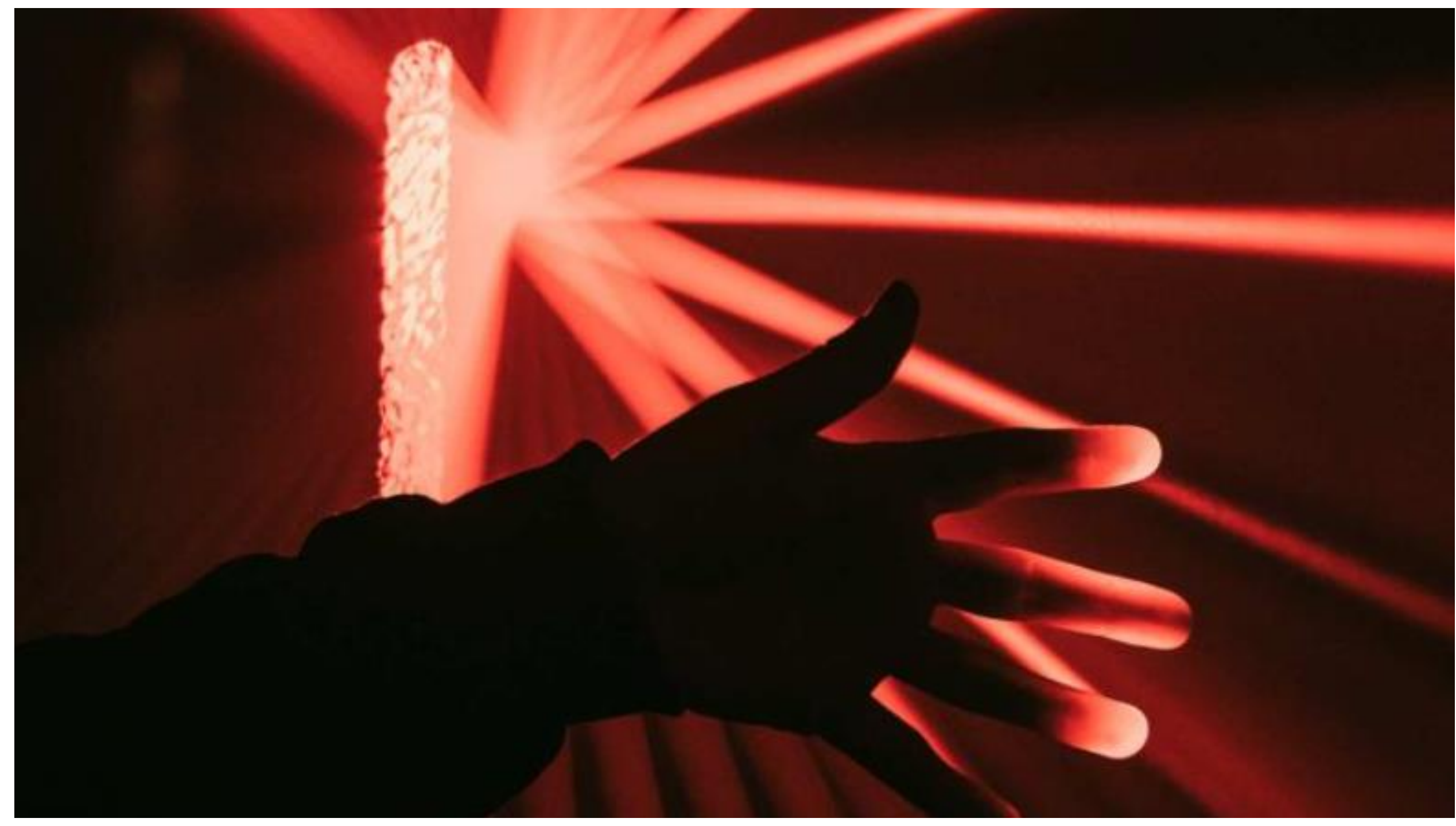
Nevlastní fluorofory

- Vnější, neboli nevlastní 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 tomto intervalu.
- 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 .

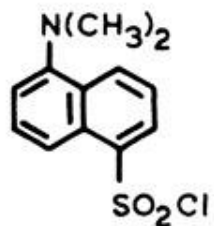
$$Bs = Q \epsilon$$

- 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 **Bs > 5000**

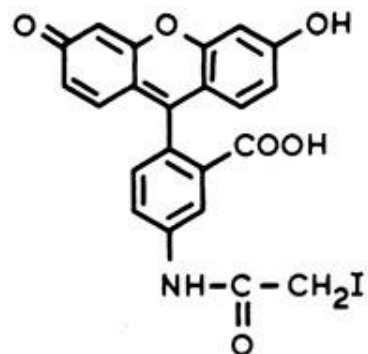
Příklady svítivosti nevlastních fluoroforů

Fluorofor	ε (cm ⁻¹ M ⁻¹)	Kvantový výtěžek (Q)	Svítivost (Bs)
Fluorescein (FAM)	79 000	0.9	71 100
BODIPY FL	91 000	0.9	81 900
Oregon Green [®] 488	87 000	0.9	78 300
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 Fluor 594	139 000	0.9	125 100

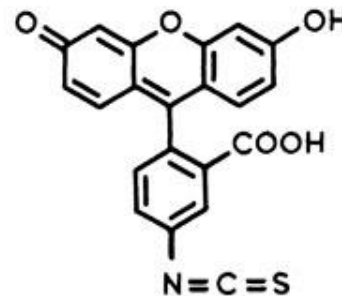
Příklady fluorescenčních značek



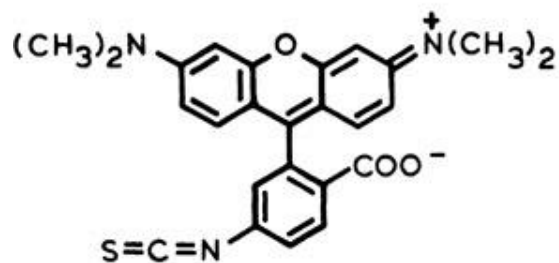
DNS-Cl



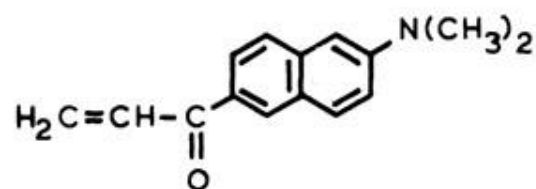
5-IAF



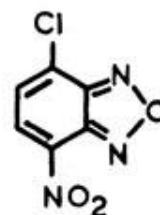
FITC



TRITC



Acrylodan



NBD-Cl

DNS-Cl dansyl chlorid
(5-dimetylamino-naftalén-1-sulfonyl chlorid)

5-IAF 5-jodoacetamidofluorescein

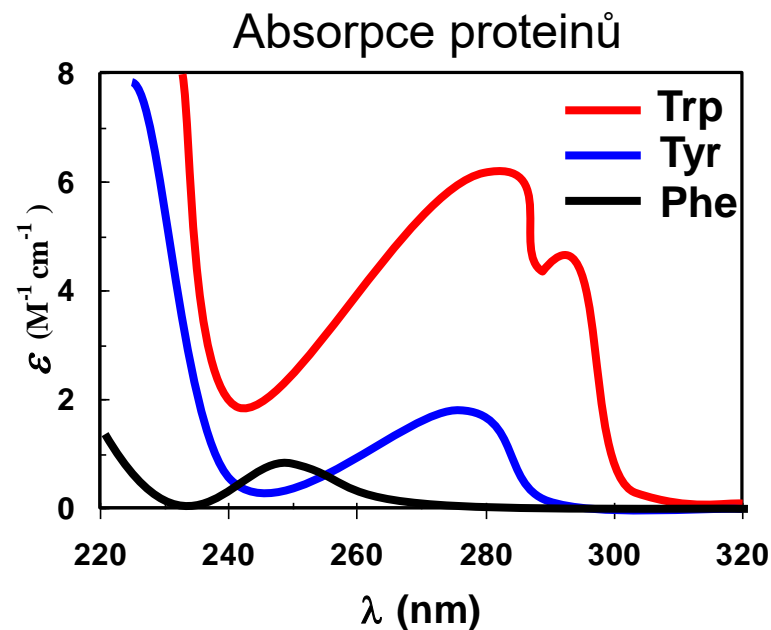
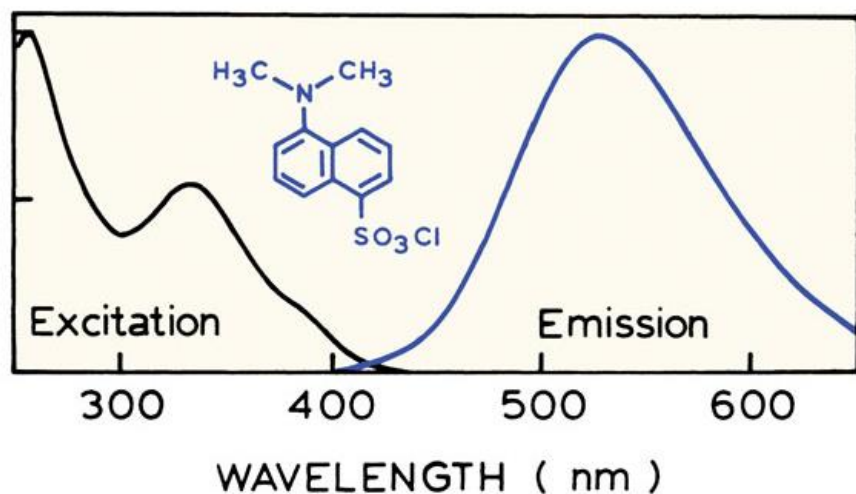
FITC fluorescein-5-izothiokyanát

TRITC tetrametylrhodamin-5(a 6)-izothiokyanát

Acrylodan 6-akryloyl-2-dimetylamino-naftalén

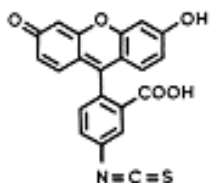
NBD-Cl 4-chloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol (4-chloro-7-nitrobenzofurazan)

Dansyl chlorid

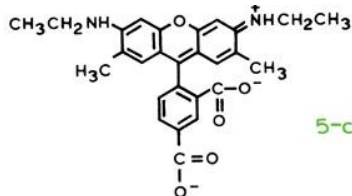


- Jedna z prvních a z toho důvodu také v literatuře nejvíce zastoupených fluorescenčních značek.
- Často se používá ke značení proteinů je výhodný zejména při měření anizotropie.
- Velmi vhodná doba dohasínání fluorescence $\tau \sim 10$ ns.
- Je excitován při 350 nm, kde proteiny téměř neabsorbují.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

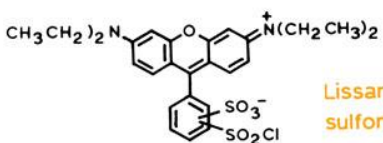
Fluorescein a rhodaminy



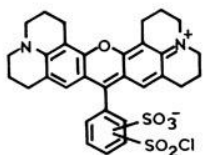
FITC



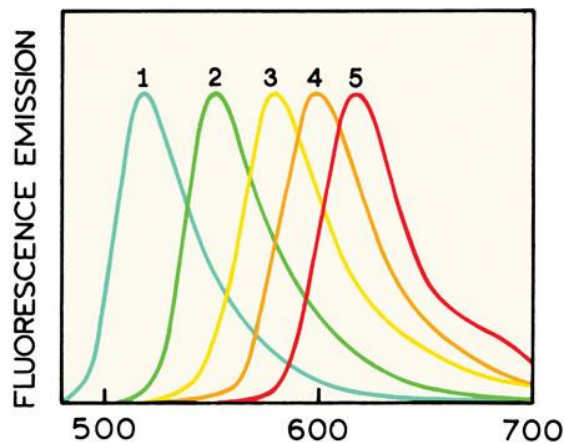
5-carboxyrhodamine 6G hydrochloride



Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride



Texas Red sulfonyl chloride



- Patří k nejrozšířenějším fluorescenčním značkám.

Abs.max.

Em. max.

fluorescein

490 nm

520 nm

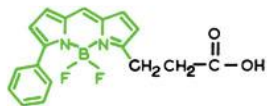
rhodaminy

500-600 nm

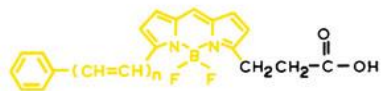
530-620 nm

- 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.

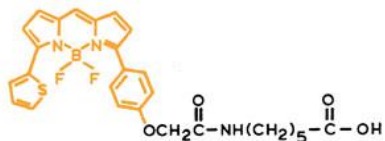
BODIPY



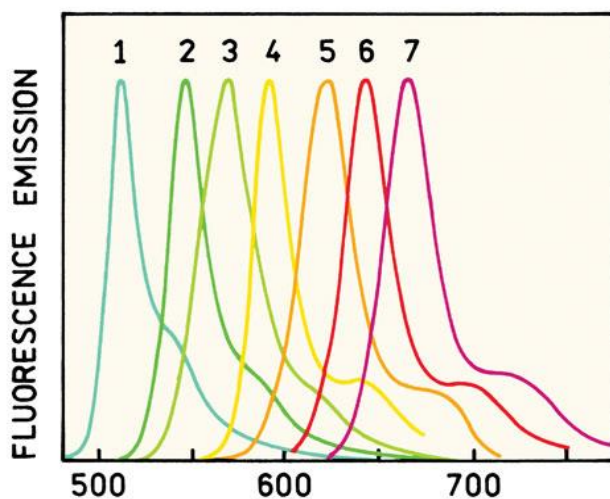
BODIPY-R6G



BODIPY- 581/591

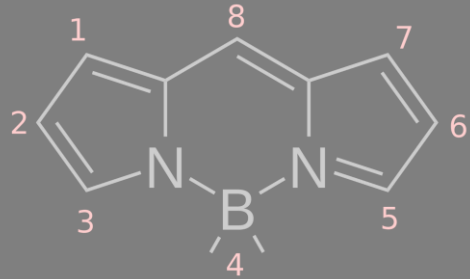


BODIPY- Texas Red

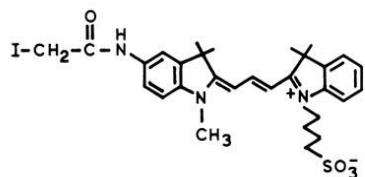


- Nástupce fluoresceinových a rhodaminových značek.
- Odvozeny od fluoroforu, který obsahuje Bór.
- Emisní maxima 510-675 nm.
- Extrémně vysoký kvantový výtěžek $Q \sim 1$!
- Nejsou citlivé na polaritu solventu a pH.
- Emisní spektrum je úzké a emise je tak soustředěna na úzký rozsah vlnových délek a může být rozlišeno více různých značek ve směsi.
- Nevýhodou je malý Stokesův posuv, jehož důsledkem je poměrně malá hodnota Försterovy vzdálenosti při rezonančním přenosu energie ($R_0=57 \text{ \AA}$).
- Díky významnému překryvu emisního a absorpčního spektra dochází k samozhášení při vysoké koncentraci značení – když jsou molekuly fluoroforů blíže než R_0 .
- Nejsou vhodné pro FRET aplikace.

Vliv přidání halogenidů na fluorescenci

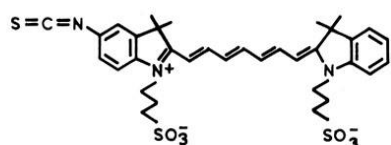
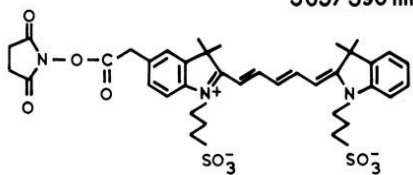


Cy značky



Cy-3 Iodo Acetamide

565/590 nm QY=0.07

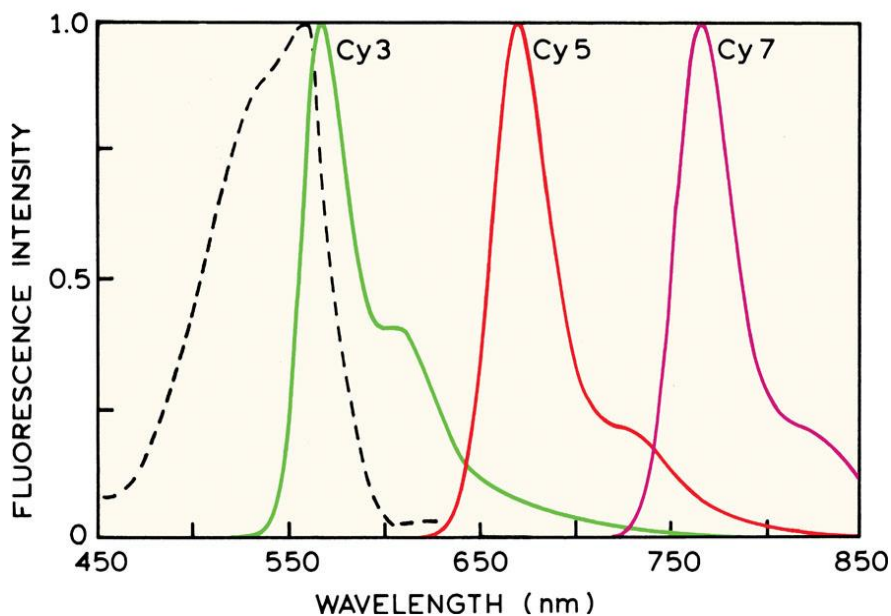


Cy-5-N-Hydroxysuccinimide

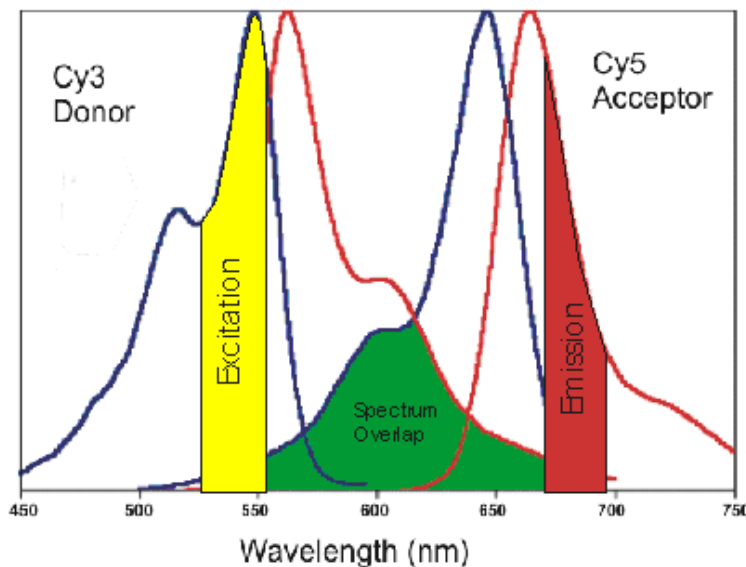
648/669 nm QY=0.10

Cy-7-Isothiocyanate

750/777 nm QY=0.10



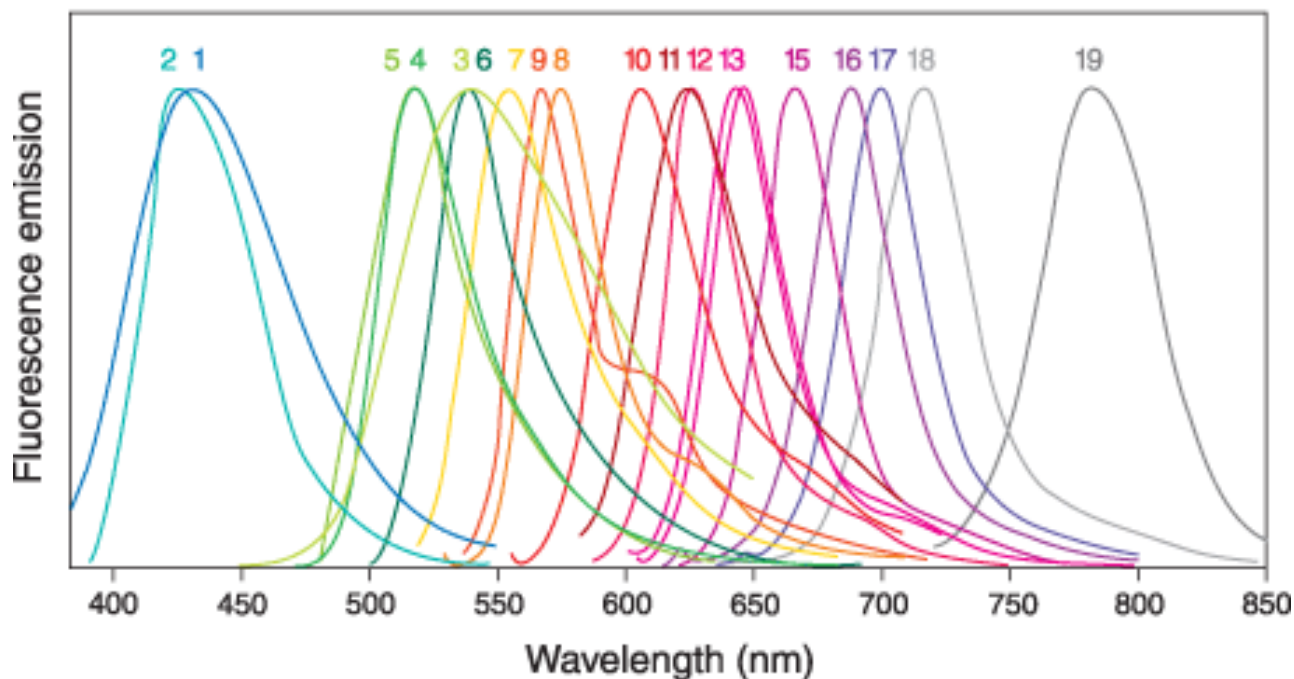
- Cyaniny jsou velmi populární.
- Číslo znamená délku řetězce konjugovaných vazeb mezi dvojicí aromatických jader.
- Vhodné pro oblast od 550 nm dále.
- Relativně malý Stokesův posuv.
- Používají se pro FRET studie.



<http://www.cytographica.com/animations/Cy3Cy5FRET.html>

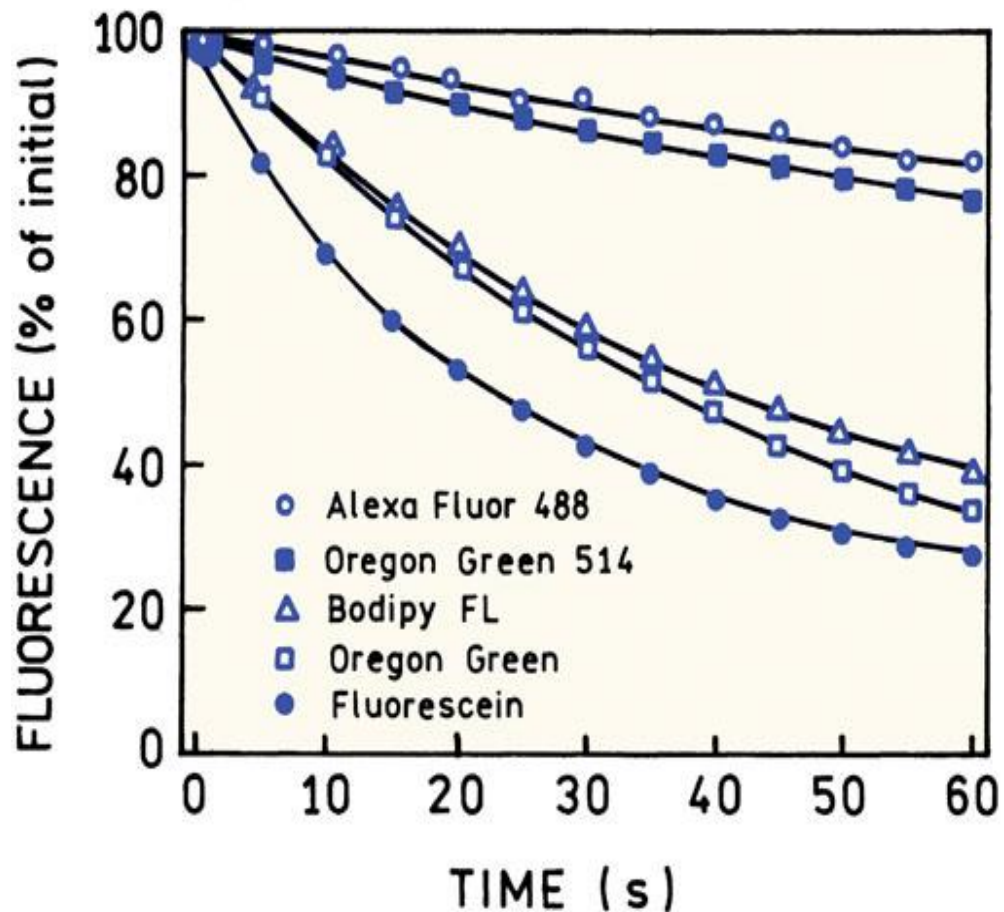
Alexa Fluor

- | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 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 | |



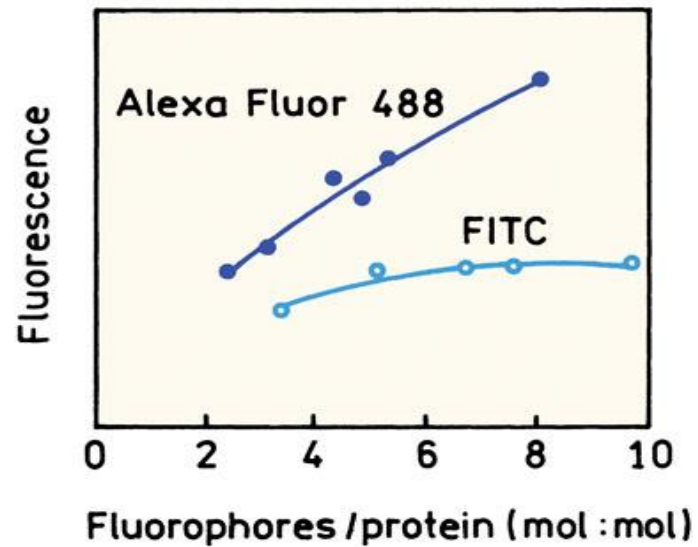
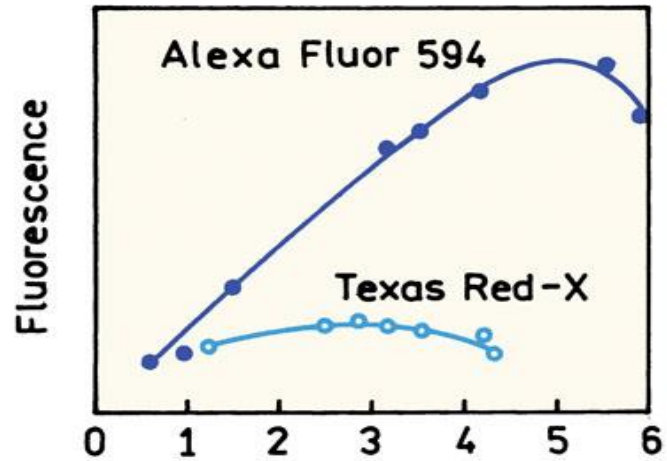
- Vysoký kvantový výtěžek → vysoká svítivost.
- Zlepšená rozpustnost ve vodě.
- Malá závislost fluorescence na pH.
- **Fotostabilní !**

Fotostabilita fluoroforů



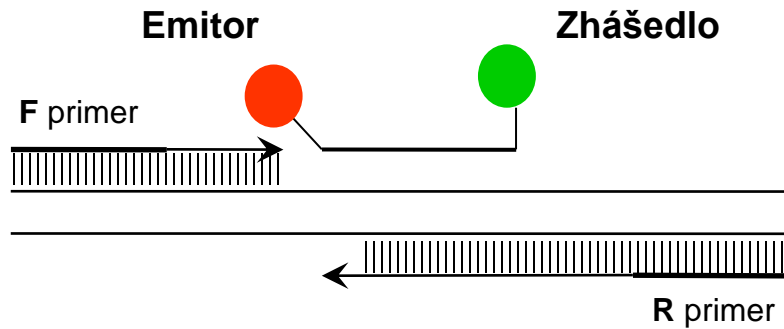
- Po určitém čase dojde u každého fluoroforu k fotovybělení.
- Nejdůležitější je fotostabilita při mikroskopii, kde se používají vysoké intenzity excitačního světla.
- Nejvyšší fotostabilitu ukazují sondy skupiny Alexa.
- Zatím nebyla zjištěna žádná spojitost mezi strukturou fluoroforů a jejich fotostabilitou.

Vliv míry značení na intenzitu fluorescence

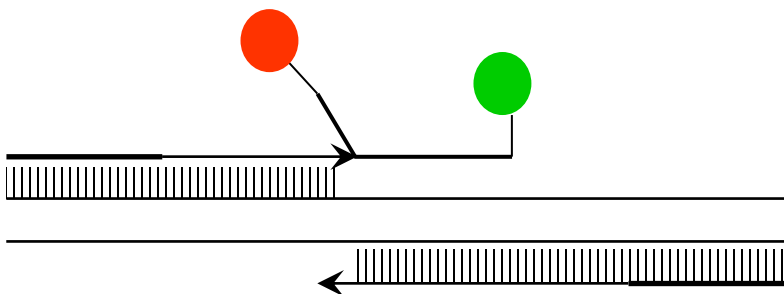


- U klasického fluoresceinu a rhodaminů při vysoké hustotě značení (molekuly fluoroforu jsou ve vzdálenosti kolem R_0) často dochází k samozhášení.
- V případě Alexa fluoroforů ke zhášení v takové míře nedochází a to je důvodem větší intenzity emise v případě vyšší hustoty značení.

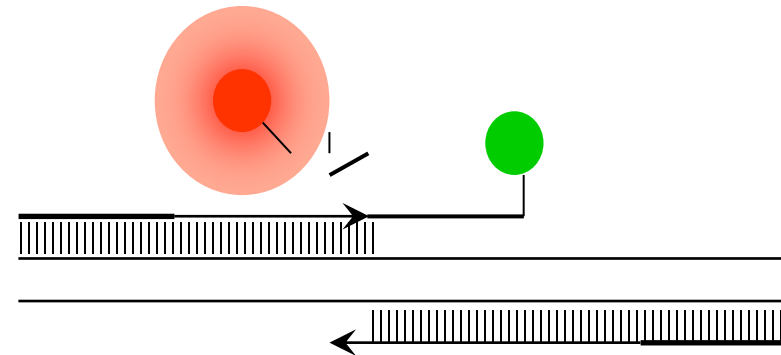
Real-time PCR - detekce amplifikace DNA Bi9310



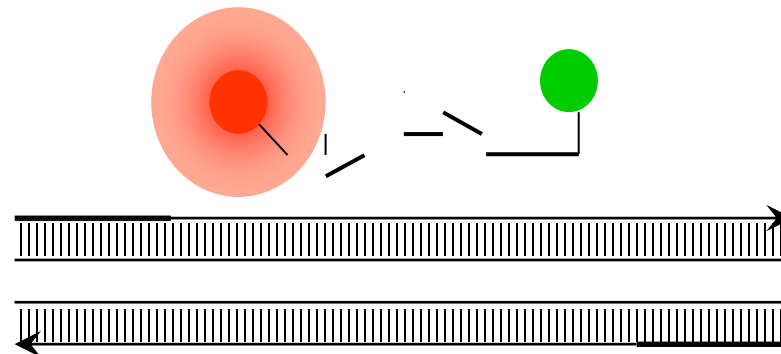
1. Značená sonda se hybridizuje s komplementární sekvencí. Záření Emitoru je zhášeno a není pozorováno.



2. Při syntéze DNA dochází k nahrazení sondy novým řetězcem.

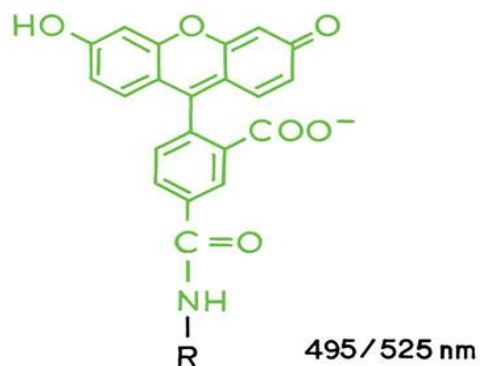


3. Při každém amplifikačním cyklu odštěpuje polymeráza Emitor, jehož záření je detekováno.



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

Fluorescenční značky pro RT-PCR

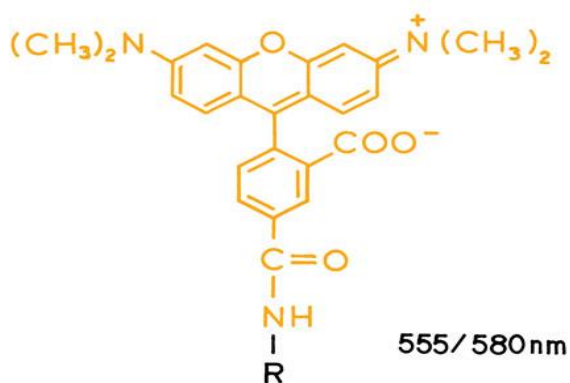


FAM or F
5-carboxyfluorescein



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

- Které z daných značek je nevhodnější použít?



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



ROX or R
5-carboxy-X-
rhodamine

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 fluorescence sond výrazně zvýší.

Sondy citlivé na polaritu prostředí

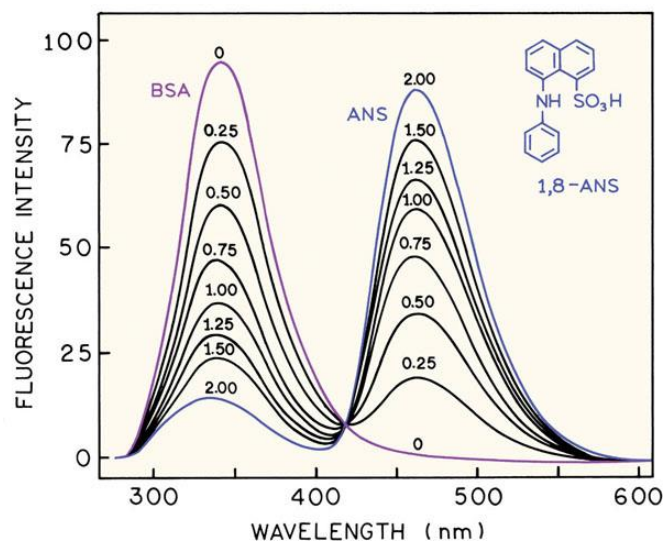
- Typické sondy pro dynamickou polaritu **1-anilinonaftalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-p-toluidinonaftalén-6-sulfonát (TNS)**.
- **Fluorescenční parametry** - V tabulce jsou uvedeny fluorescenční parametry ANS v různých rozpouštědlech, odkud vyplývá, že s rostoucí polaritou rozpouštědla se emisní maximum fluorescence ANS posouvá do červené oblasti a současně klesá kvantový výtěžek a doba dohasínání
- **Vazba ANS k apomyoglobinu** – ANS se váže do nepolárního vazebného místa pro hem, emisní maximum se posouvá na 454 nm a kvantový výtěžek fluorescence vzrůstá na 0,98.
- **Studium struktury a stupně polárnosti** různých vazebných míst na proteinech včetně případného vytěsňování fluorescenčních sond z této vazby nebo změny vyvolané např. aktivací enzymu apod.
- **Použití ANS a TNS** bylo použito např. pro studium polarity 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

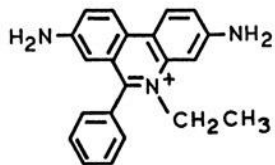
Parametry fluorescence sondy 1-anilinonaftalén-8-sulfonátu (ANS) při různé polaritě rozpouštědla

Změna fluorescence sérového albuminu v přítomnosti ANS

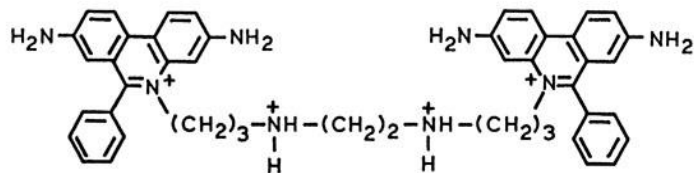


- Při zvyšování poměru molekul ANS:SA dochází k posunu emisního maxima z 350 nm na 480 nm.
- To se projeví zvýšením intenzity záření, které vidíme okem při excitaci 280 nm.

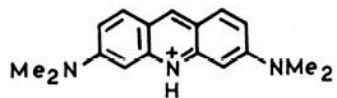
DNA sondy



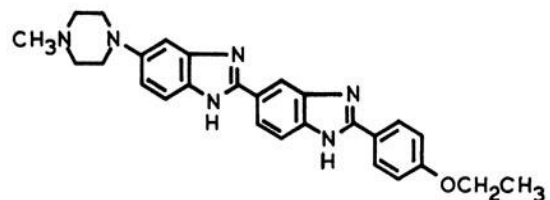
Ethidium Bromide
518/605 nm



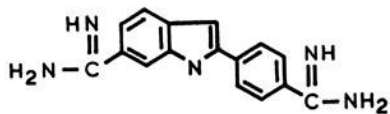
Ethidium Homodimer
528/617 nm



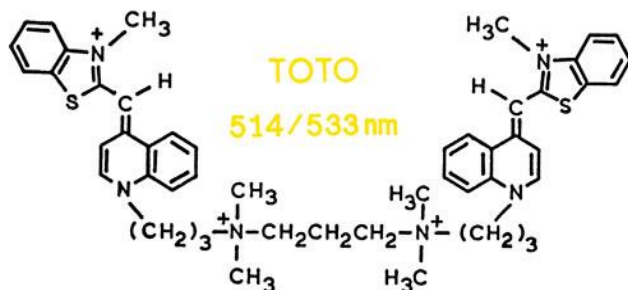
Acridine Orange
500/526 nm DNA
460/650 nm RNA



Hoechst 33342
350/460 nm



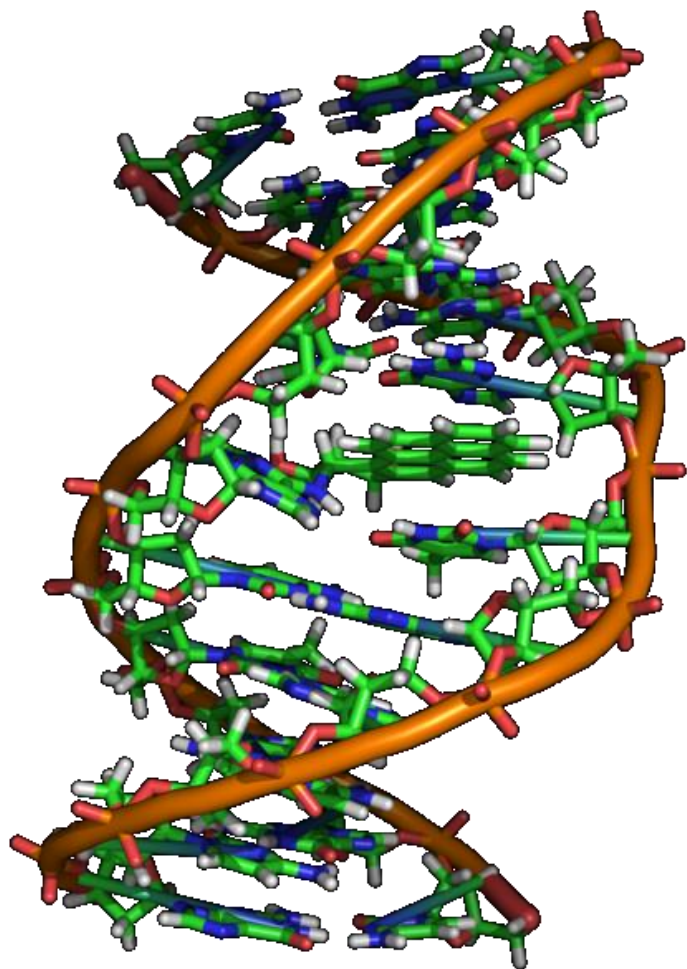
DAPI
355/461 nm



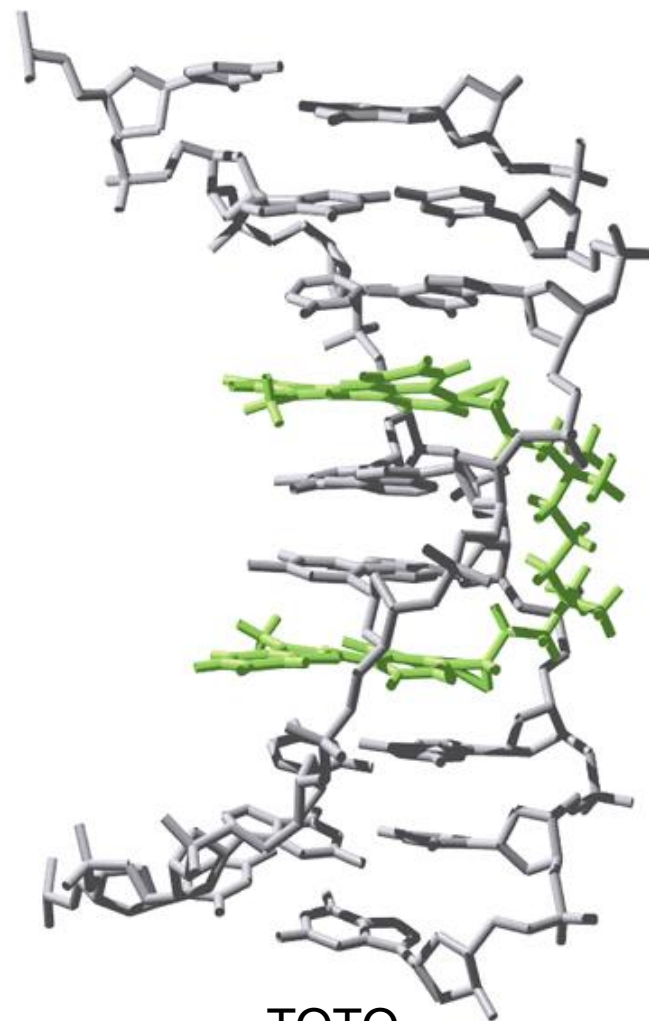
TOTO
514/533 nm

- 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 při elektroforéze DNA?

Interkalace

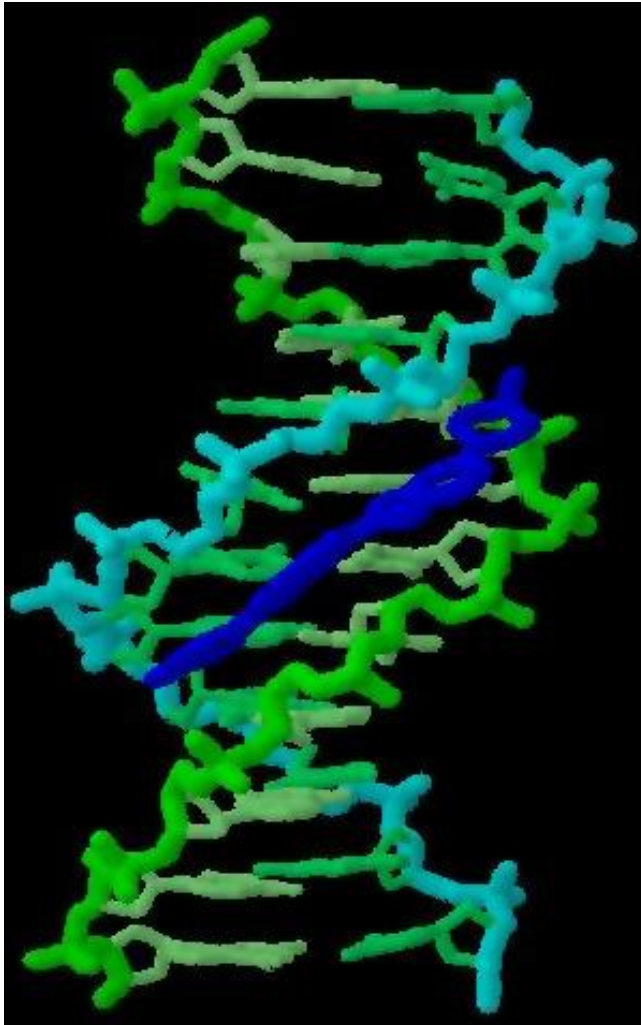


Benzopyrene

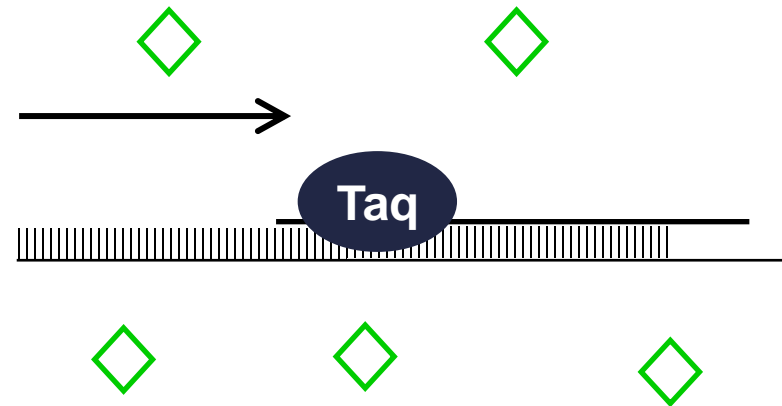


TOTO

Syber Green



- Selektivně se váže na ds DNA do malého žlábků.
- 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

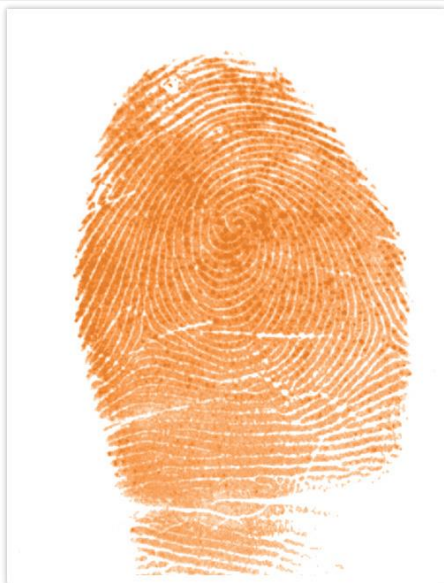
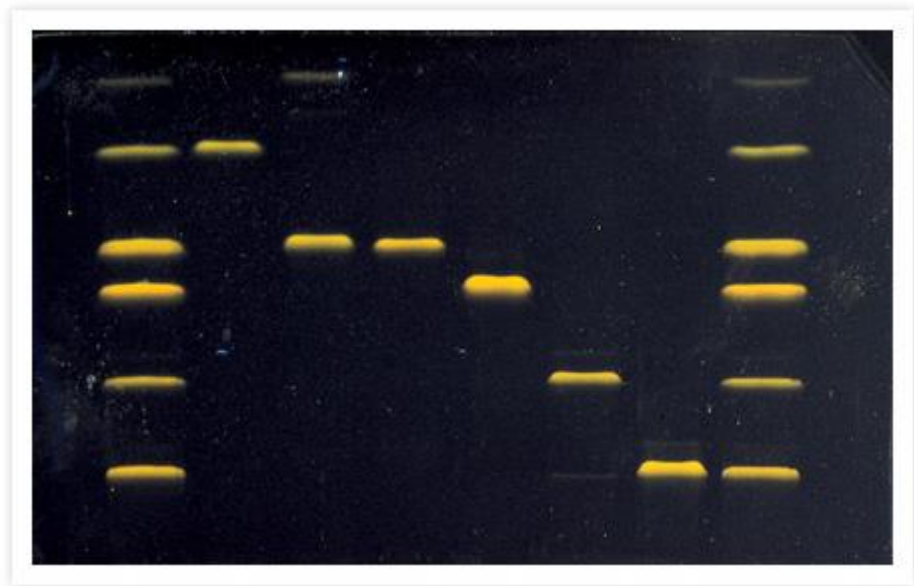
- Extinkční koeficienty byly zjištěny pro volné sondy ve vodném roztoku.

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

Proteinové sondy

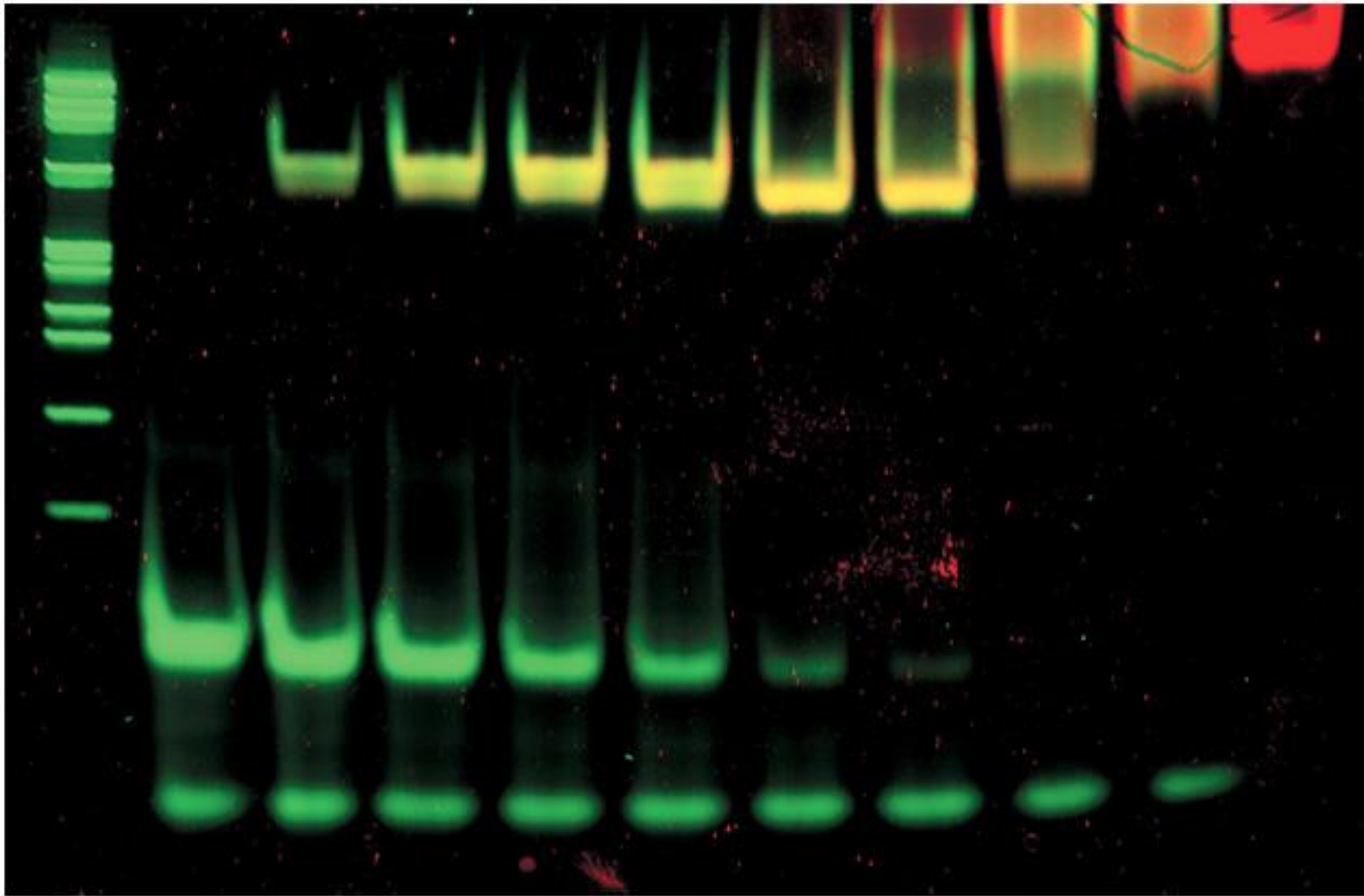
- Zvyšují intenzitu fluorescence po vazbě na protein.
- Nejcitlivější fluorescenční sondy pro barvení proteinů v gelu jsou ze skupiny organokovových sloučenin SYPRO.
- SYPRO Red, Orange, Tangerine, Rose.
- Vysoká citlivost ~ ng/mL.
- Před použitím je nutná kyselá fixace.

Sypro sondy



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

Současné barvení DNA a proteinů na gelu

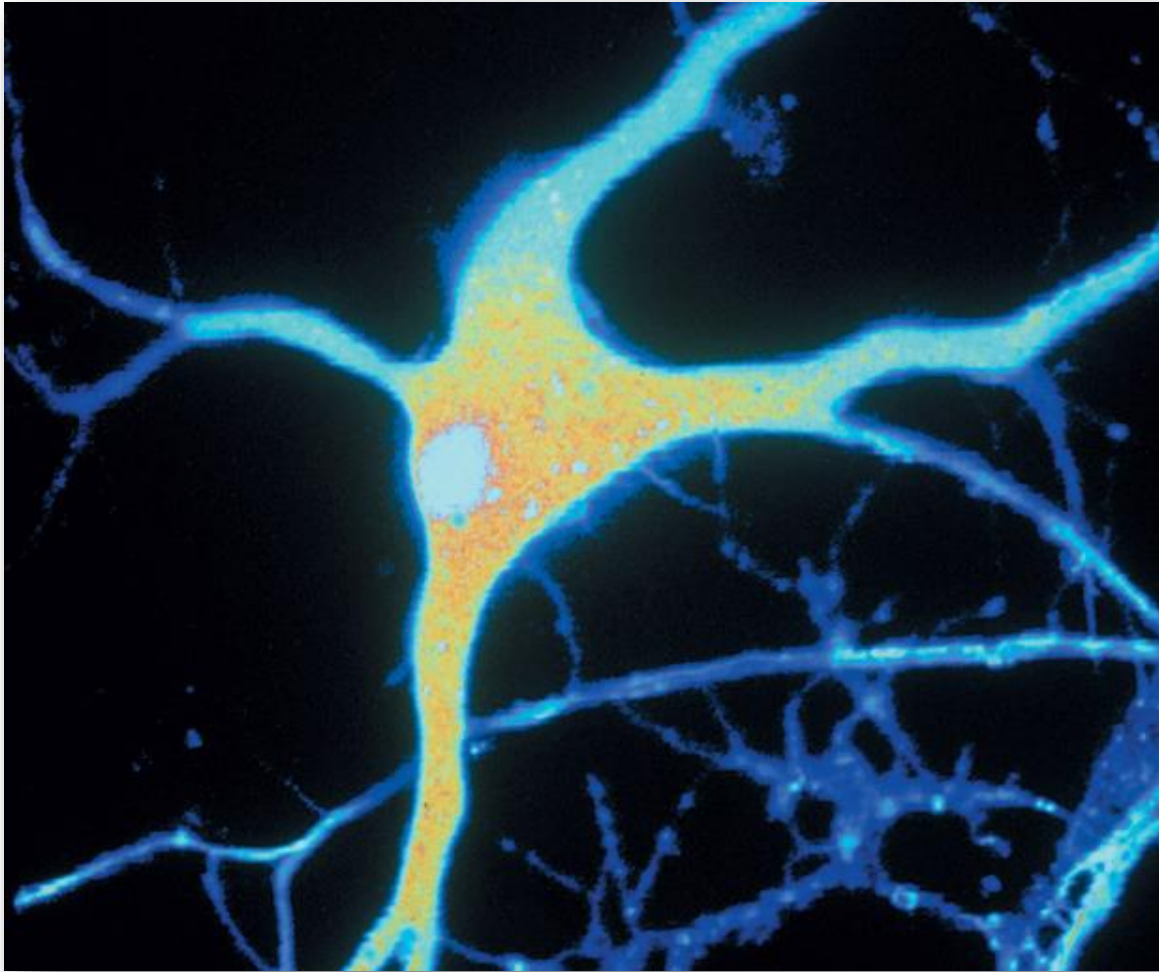


- DNA byla barvena Syber Green.
- Protein SYPRO Ruby.

Indikátory iontů

- Fluorescenční měření změn nitrobuněčných 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 nitrobuněčnou 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).

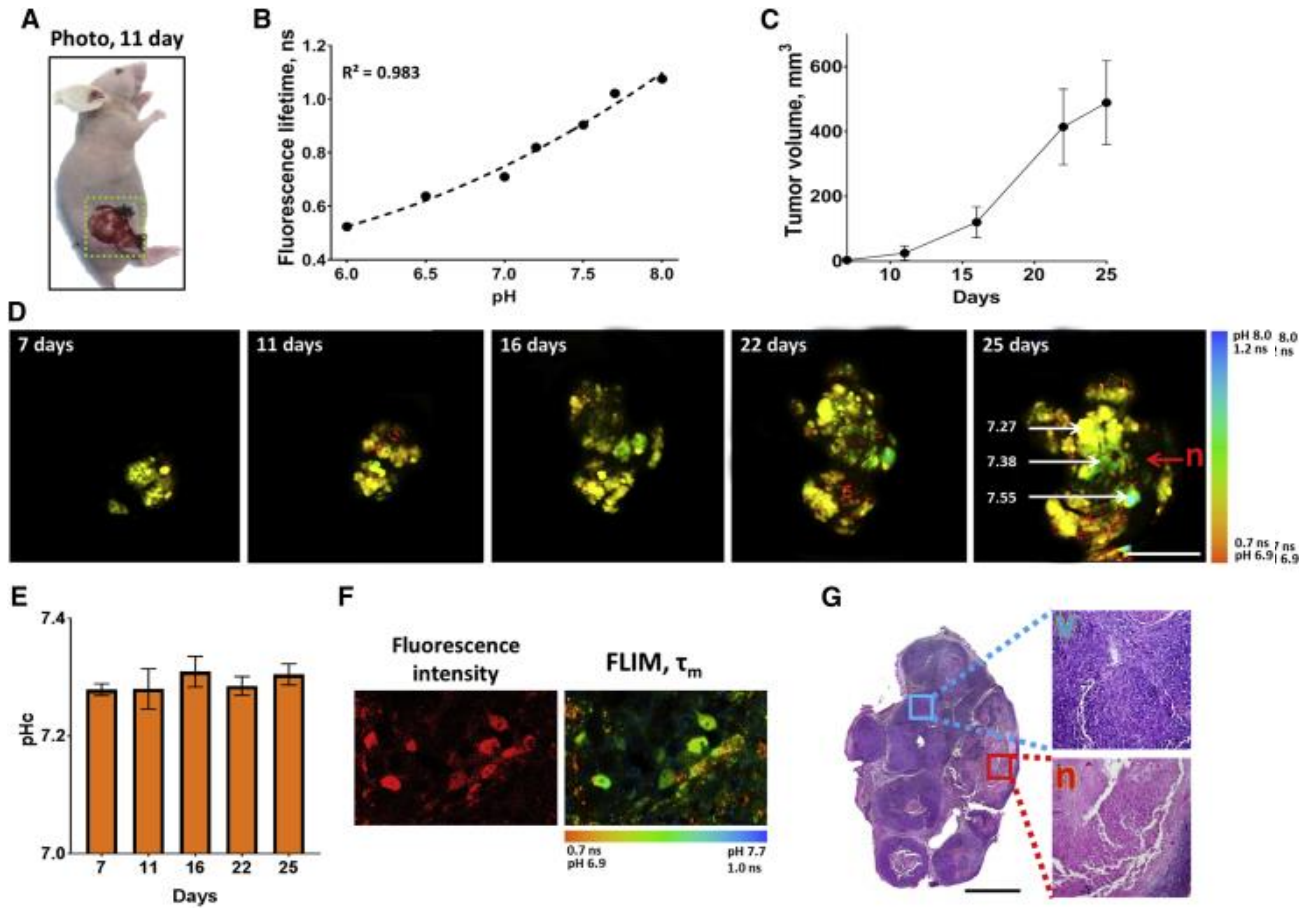
Indikace Ca^{2+} v nervových buňkách za použití Fluoro-3



- Pyramidový neuron z krysího hipokampu byl nejprve vystaven Alzheimerově amyloidnímu peptidu a poté excitační aminokyselině glutamátu. Zobrazování konfokální laserovou skenovací mikroskopií s použitím intracelulárního indikátoru Ca^{2+} fluo-3 ukazuje, že amyloidní peptid destabilizuje kalciovou homeostázu neuronu a zvyšuje jeho zranitelnost vůči excitotoxicitě.
- Excitotoxicita je patologický proces, při kterém jsou nervové buňky poškozovány a zabíjeny glutamátem a podobnými látkami. Snímek od Mark P. Mattson, Sanders-Brown Center on Aging, University of Kentucky.

<http://www.probes.com/servlets/photohigh?fileid=g001482&company=probes>

Aplikace určení pH v nádoru



Biophys J. 2022 Apr 5; 121(7): 1156–1165.

Published online 2022 Feb 23. doi: [10.1016/j.bpj.2022.02.036](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.02.036)

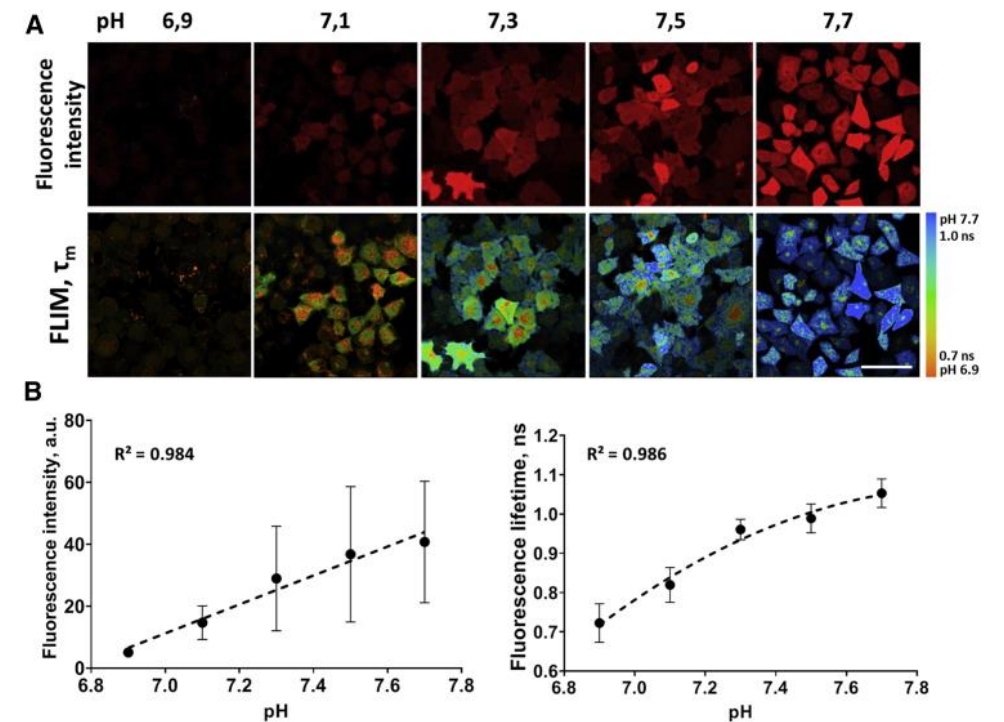
PMCID: PMC9034243

PMID: [35218737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35218737/)

Fluorescence lifetime-based pH mapping of tumors in vivo using genetically encoded sensor SypHerRed

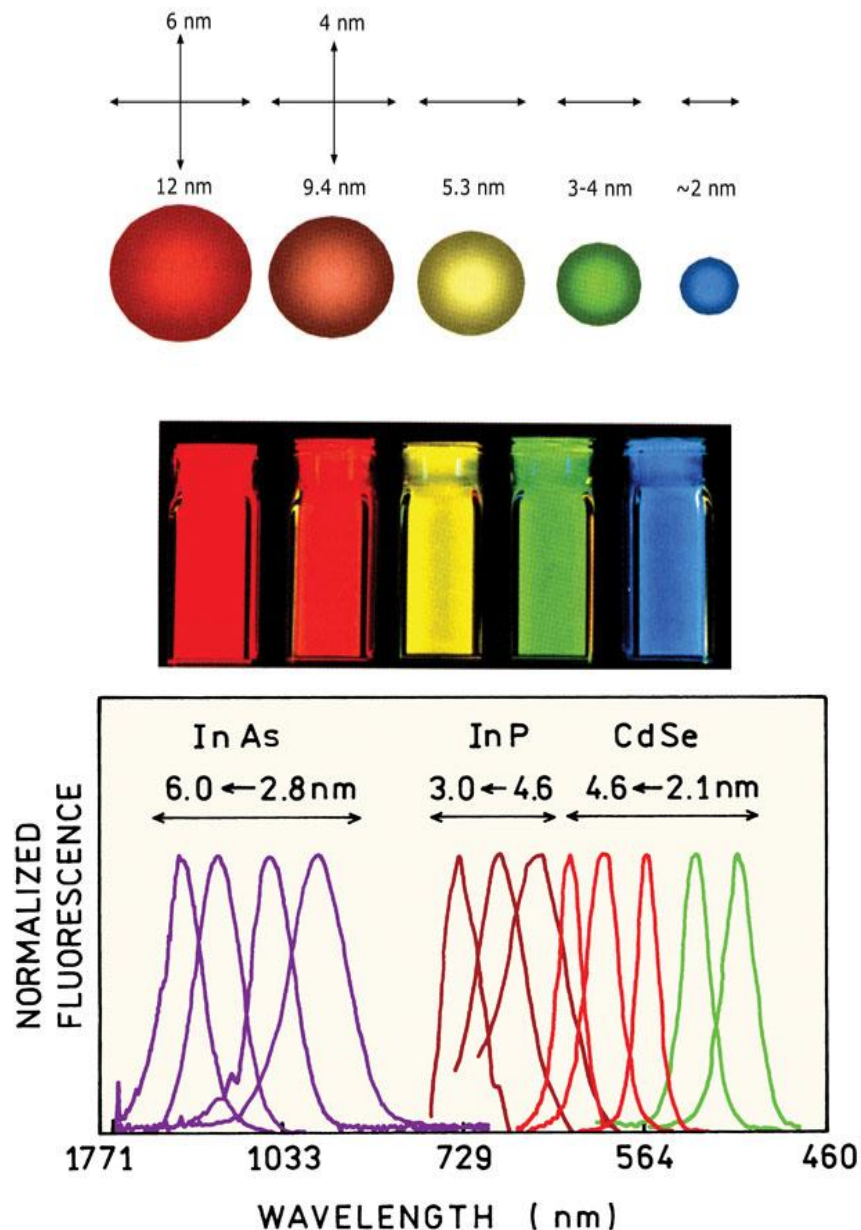
Liubov Shimolina,^{1,2} Ekaterina Potekhina,³ Irina Druzhkova,² Maria Lukina,² Varvara Dudenkova,² Vsevolod Belousov,^{3,4} Vladislav Shcheslavskiy,^{2,5,*} Elena Zagaynova,¹ and Marina Shirmanova^{2,*}

► Author information ► Article notes ► Copyright and License information ► [PMC Disclaimer](#)



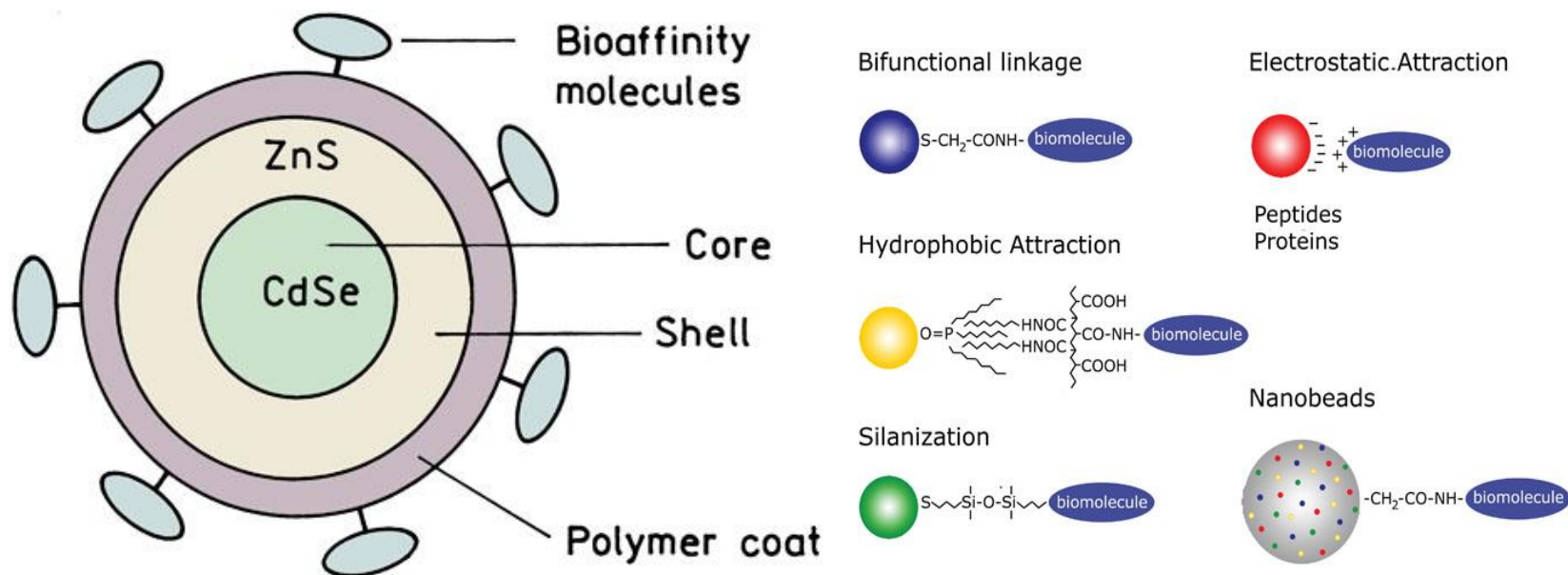
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9034243/>

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

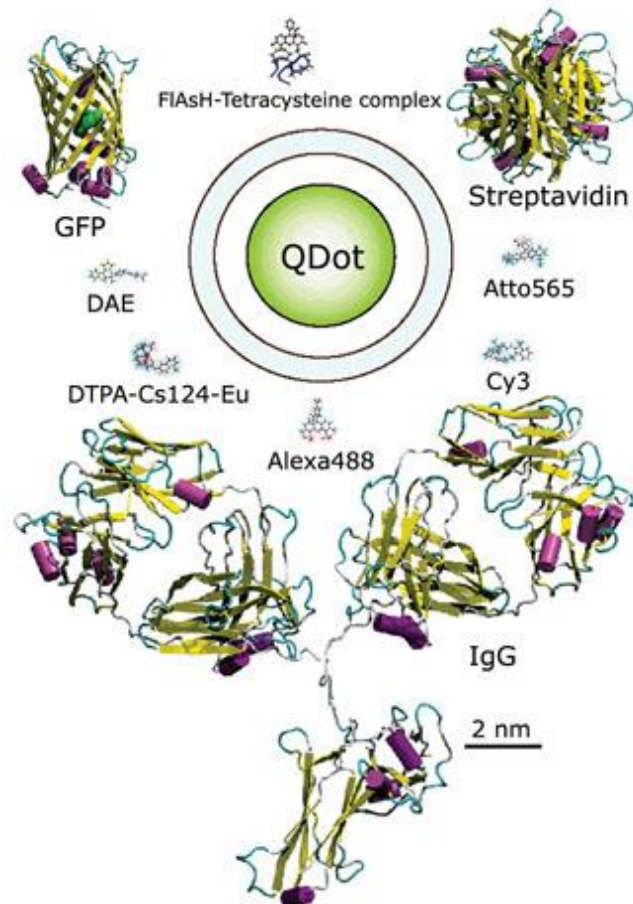


- Jádro je tvořeno polovodičem CdS pro UV, CdSe pro Vis a CdTe pro IR.
- Velikostí je srovnatelné s rozměrem GFP.
- Jádro je pokryto pláštěm (shell), který umožňuje spojení jádra s vnější hydrofilní vrstvou (Polymer coat).
- Vnější hydrofilní vrstva udává rozpustnost a umožňuje vazbu biologických molekul.

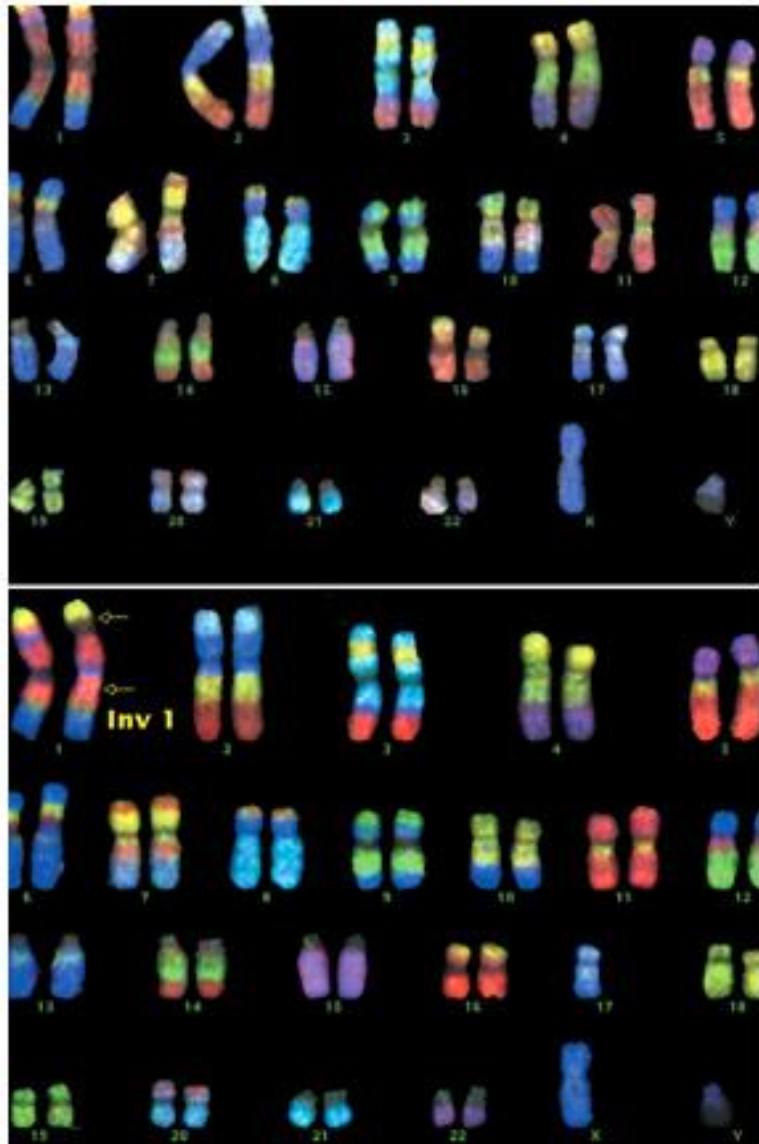
Vlastnosti QDots

- 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 $\epsilon \sim 10\,000\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Srovnání velikosti QDot



Aplikovatelnost fluorescenčního značení



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

Datum praktického cvičení a zkoušky

Potvrzení termínů cvičení

Út 16.- Čt 18.1. 2024

Út 23.- Čt 25.1. 2024

Termíny zkoušky

Pá 19.1.2024 v 9:00

Pá 26.1.2024 v 9:00

C02 místnost 1.21

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/~zfišar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

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