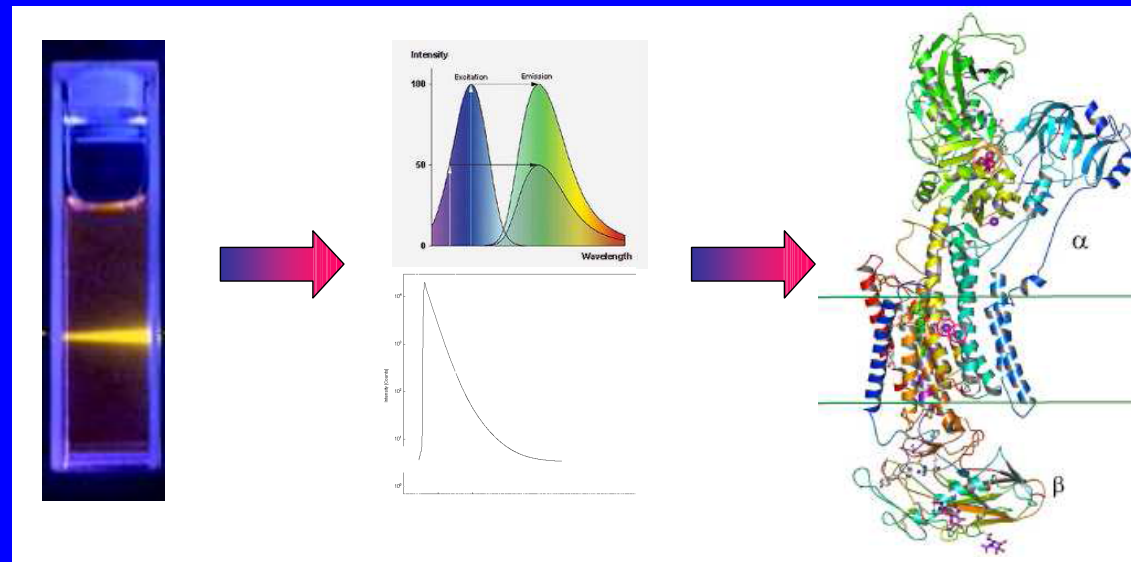


Barevné hry se světlem - co nám mohou říci o biomolekulách ?

Martin Kubala

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta, katedra biofyziky



Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Velikosti objektů v přírodě

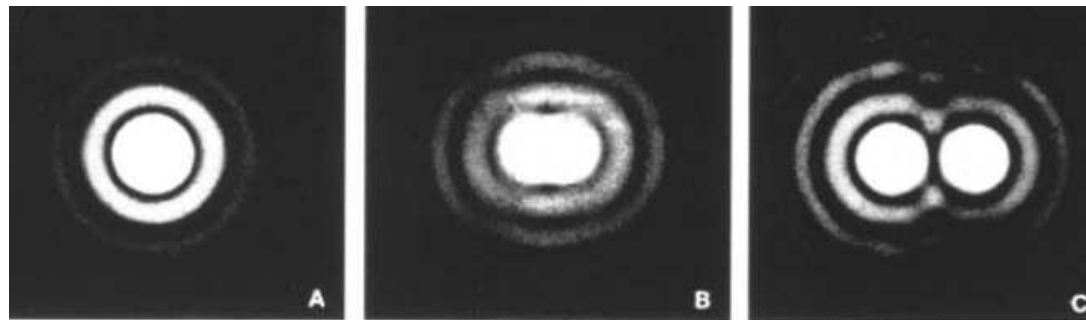
- Dítě ~ 1 m (10^0 m)
- Prst ~ 2 cm (10^{-2} m)
- Vlas ~ 0.1 mm (10^{-4} m) ← Rozlišení oka
($d \sim 0,1$ mm)
- Buňka ~ 20 μ m (10^{-5} m)
- Mitochondrie ~ 1 μ m (10^{-6} m) ← Rozlišení optického
mikroskopu
($d = 0,61\lambda/NA$)
- Membrána ~ 7 nm (10^{-9} m)
- C – C vazba ~ 0.15 nm (10^{-10} m)

Pro sledování objektů < 250 nm (např. molekul) nám již zrak nestačí a musíme tedy použít jiné metody.

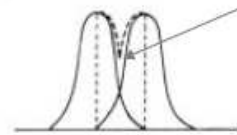
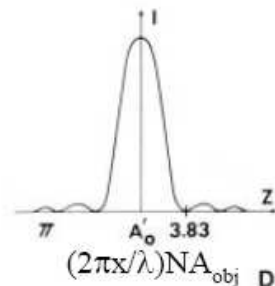
Limity optické mikroskopie

Rozlišení dvou
sousedních bodů
(Rayleighovo kritérium)

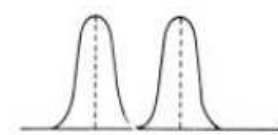
$$d = 0.61\lambda / NA$$



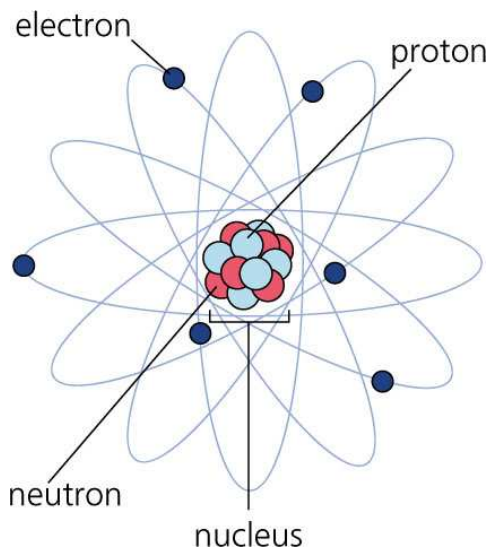
Rayleigh Criteria: Overlap by r' ,
then dip in middle is 26% below
Peak intensity



E

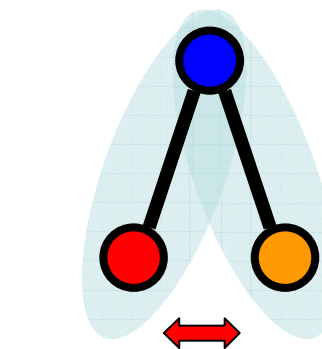
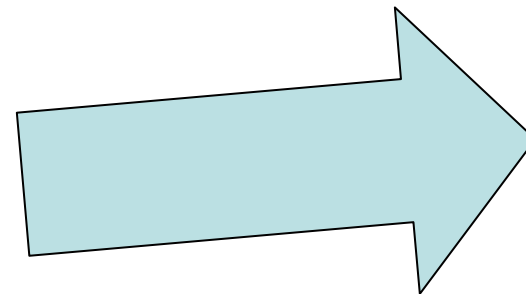
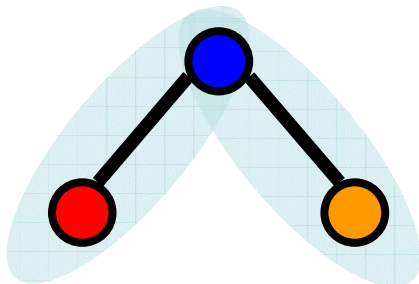
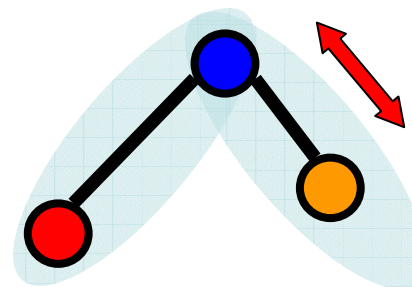


F

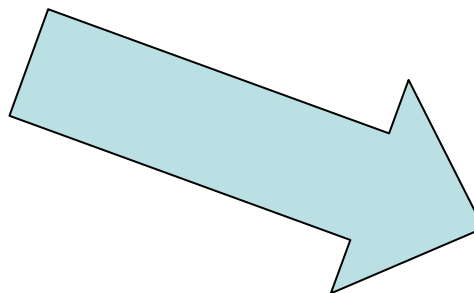


Molekuly

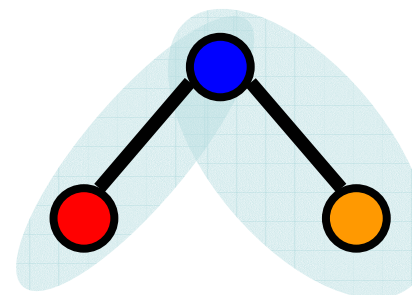
Pohyb jader (vibrace a rotace)



$4 \cdot 10^{-20}$ J

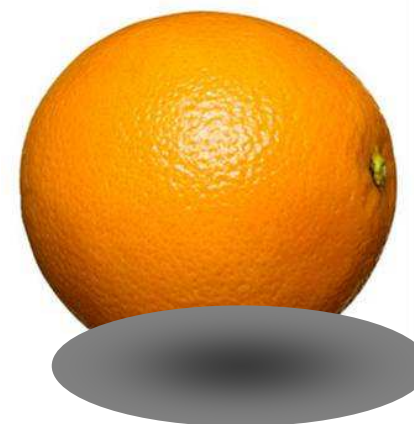
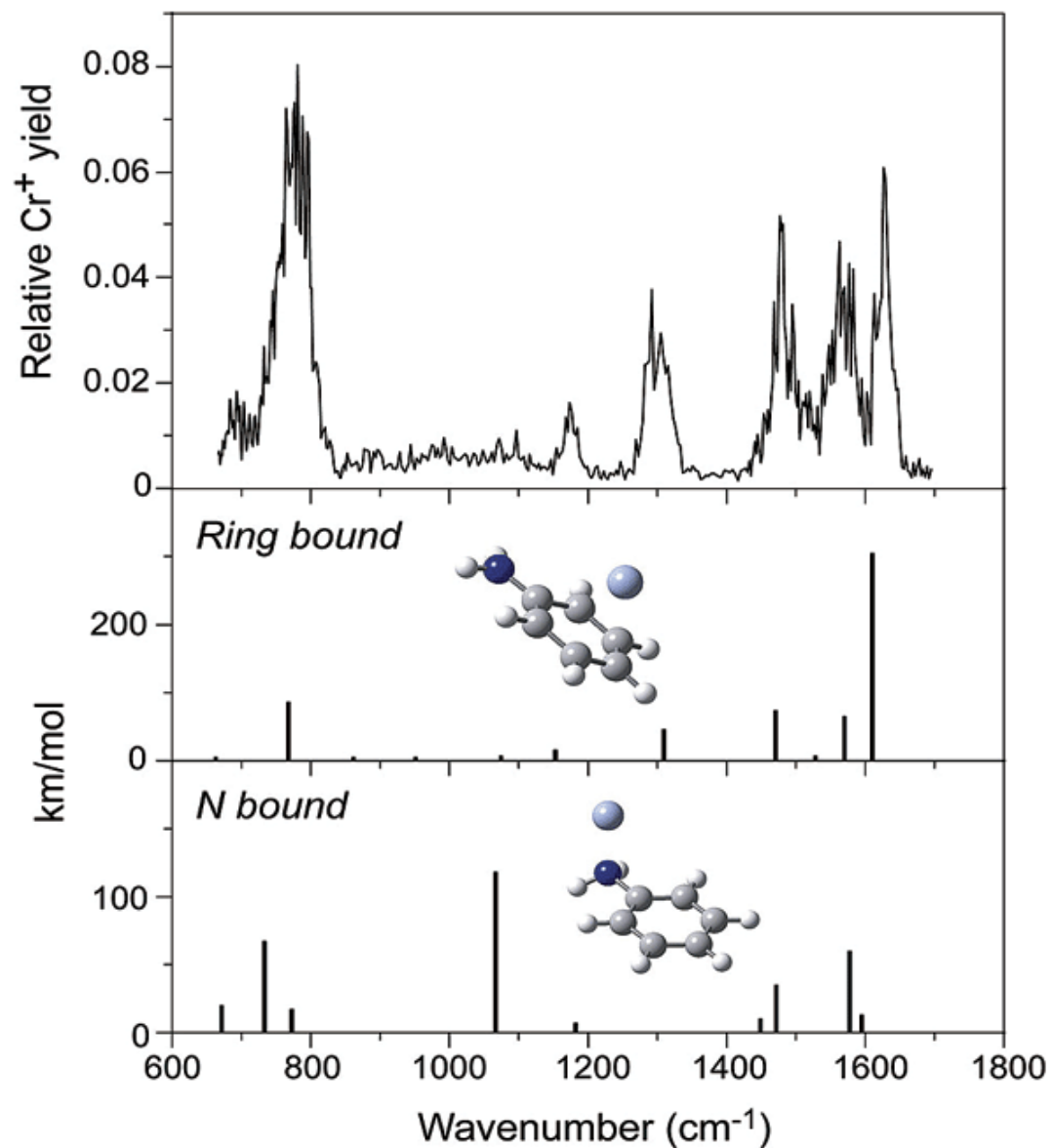


Změny v elektronovém obalu



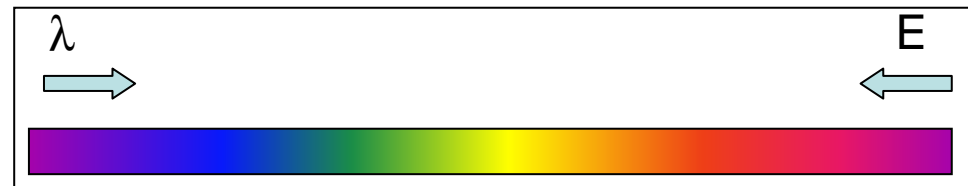
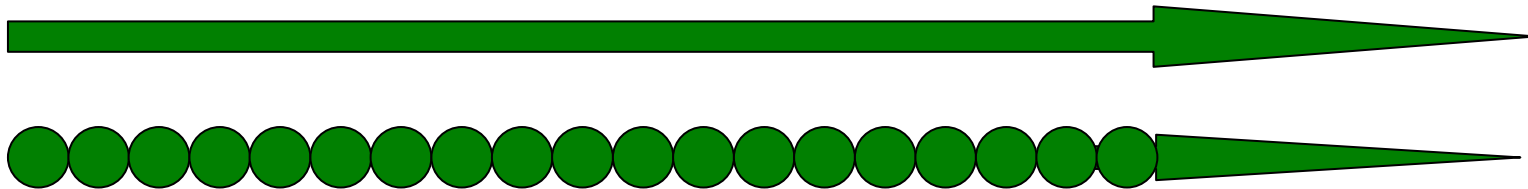
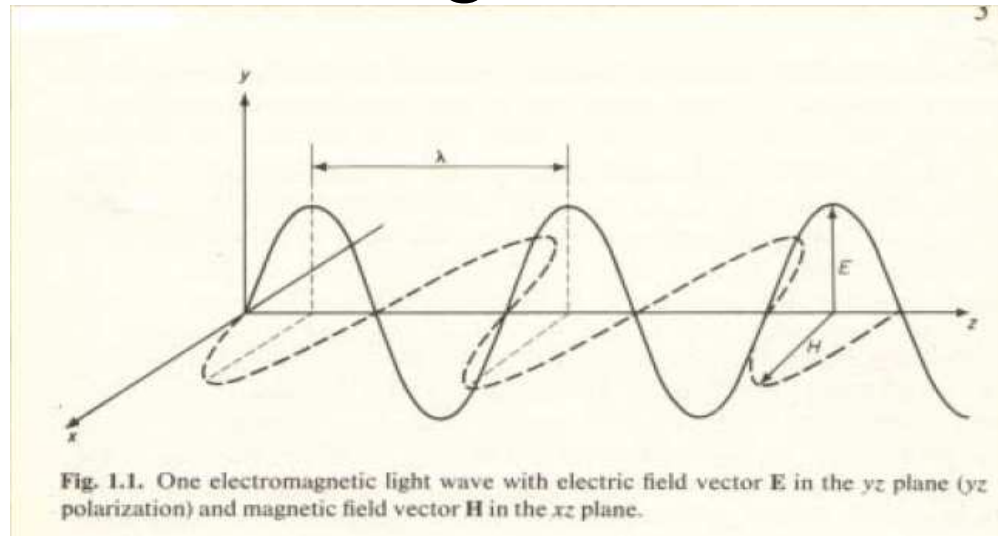
$4 \cdot 10^{-19}$ J

Excitovaný stav



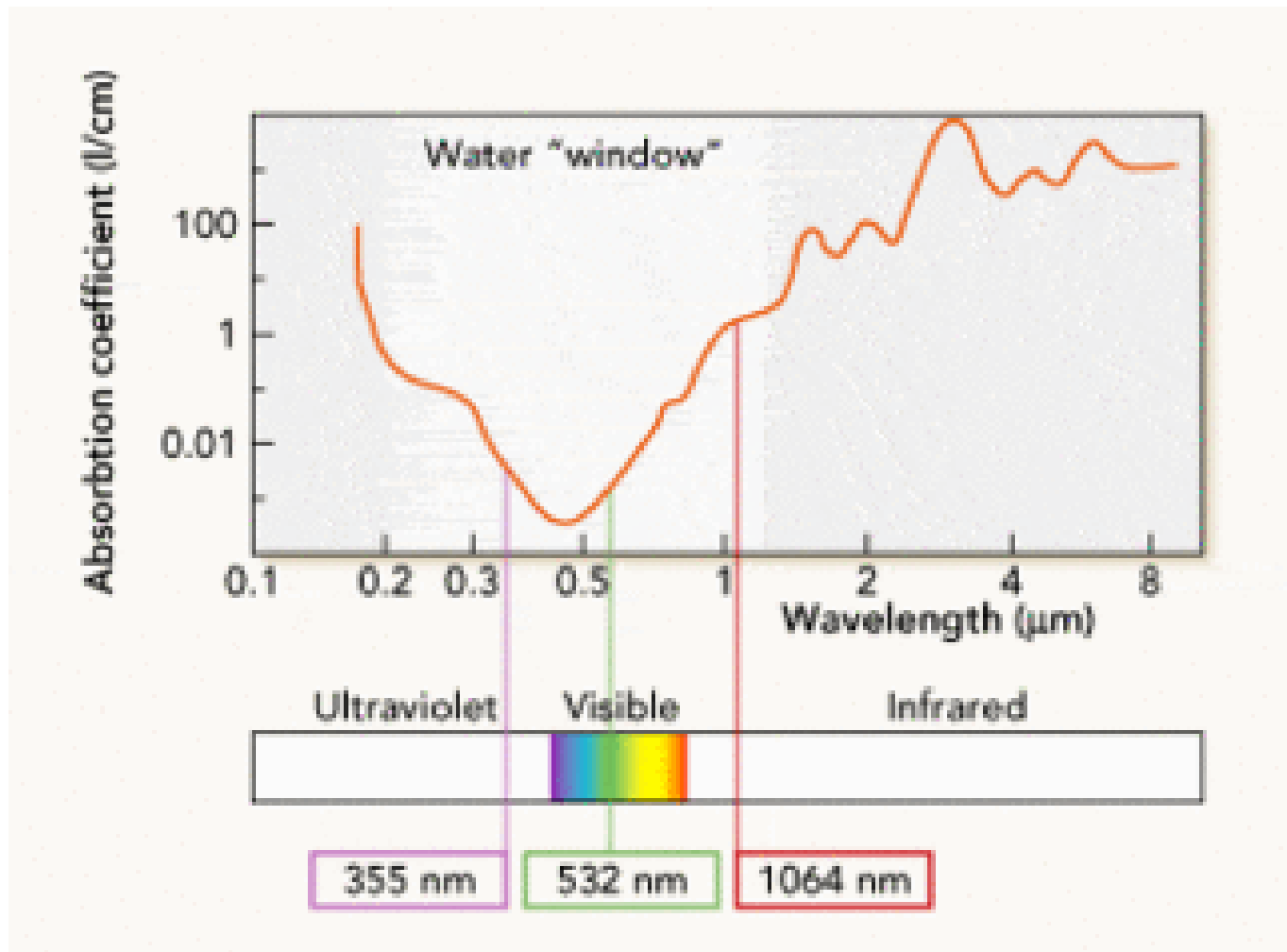
IRMPD spectrum of the $\text{Cr}^+(\text{aniline})$ complex, along with calculated IR absorption spectra of the two isomeric structures. The DFT frequencies are scaled down by a factor of 0.955. Oomens et al., J. Am. Chem. Soc., 126 (3), 724 -725, 2004

Energie světla



$$E = h\nu = hc/\lambda$$

Spektrální omezení

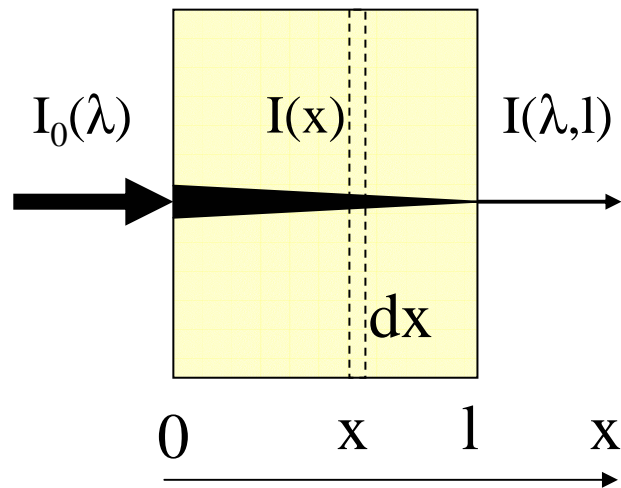


Interakce světla s hmotou

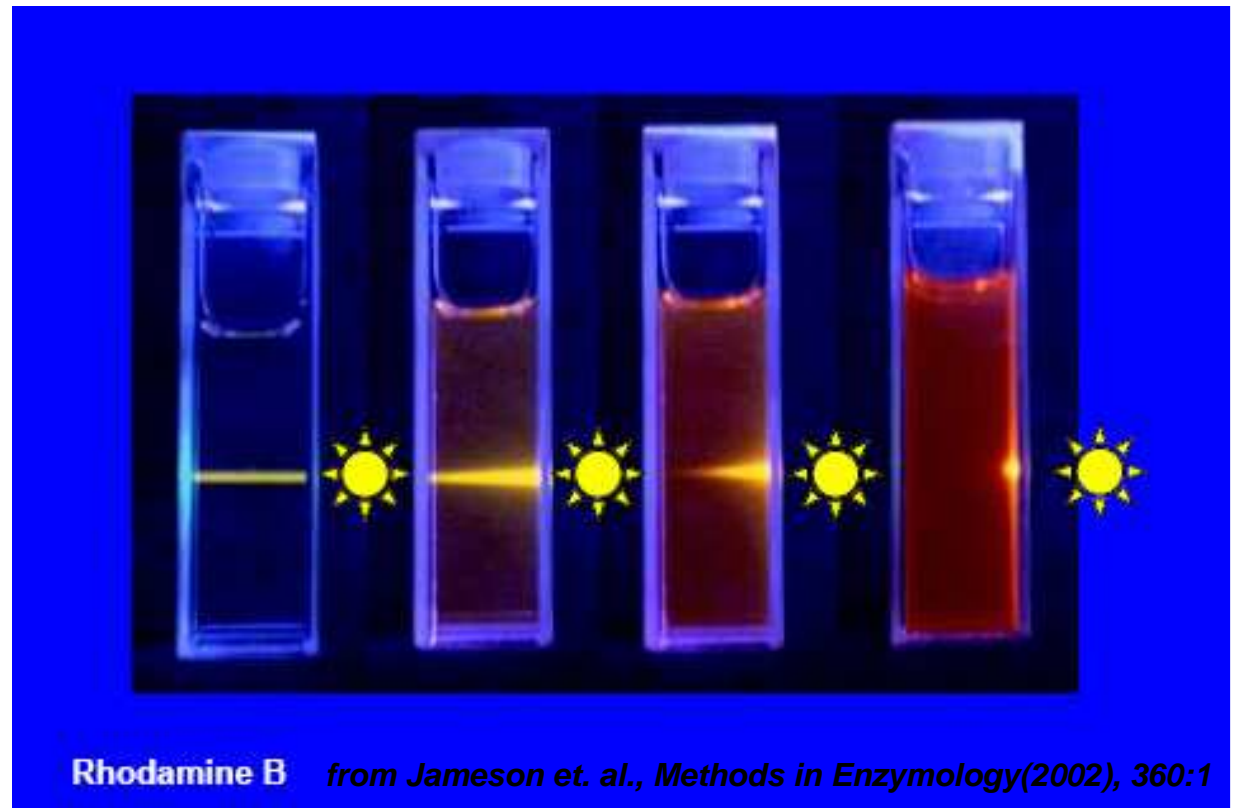
- Rozptyl a odraz
- Absorpce
- Emise



Absorpce



$$I(\lambda, l) = I_0(\lambda) \cdot 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l}$$

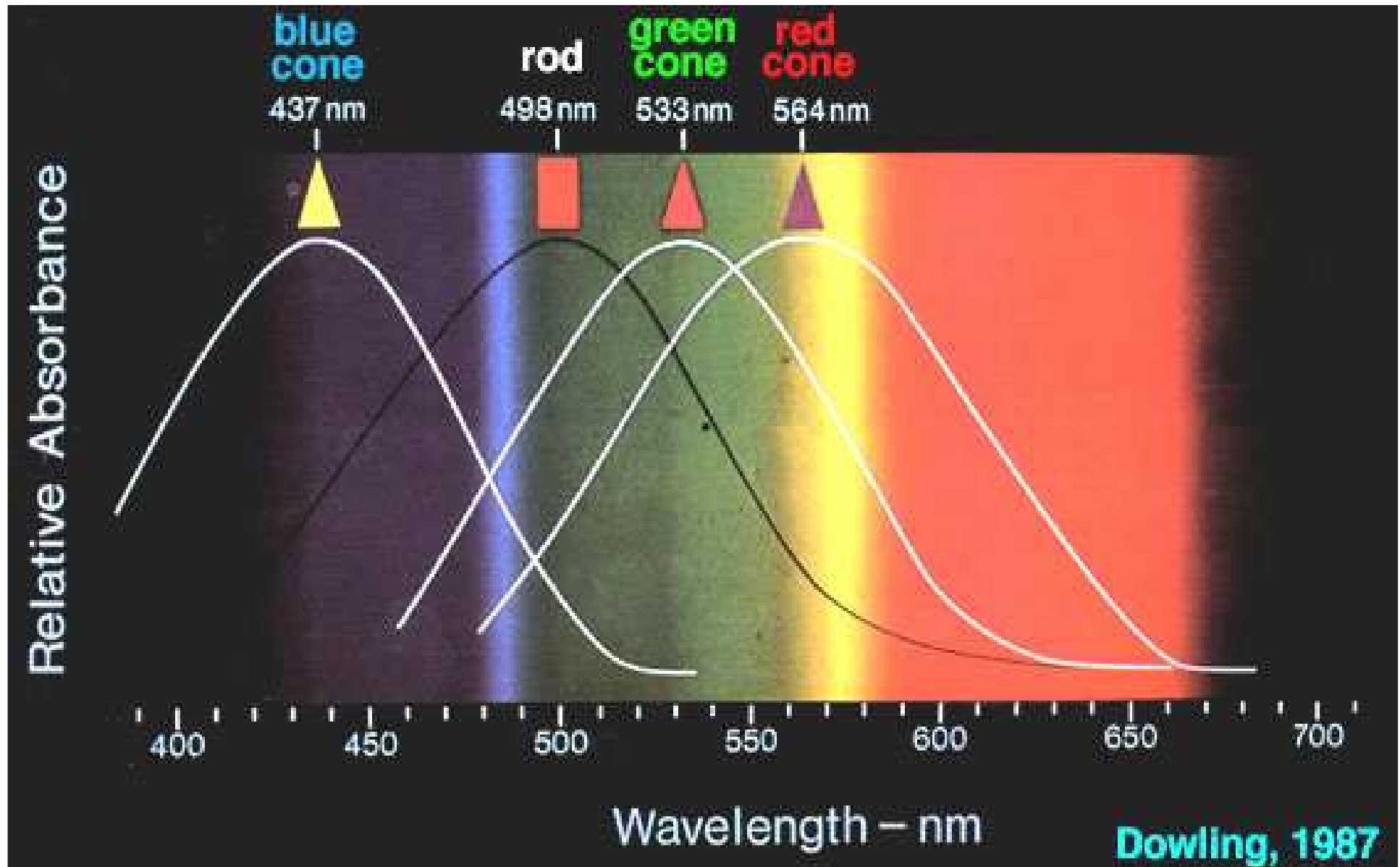


$$A(\lambda) = -\log \frac{I(\lambda, l)}{I_0(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l$$

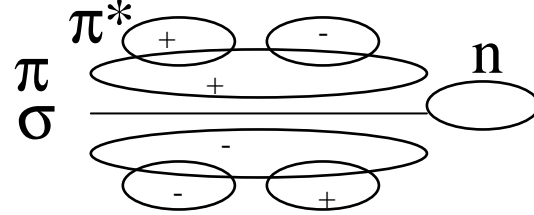
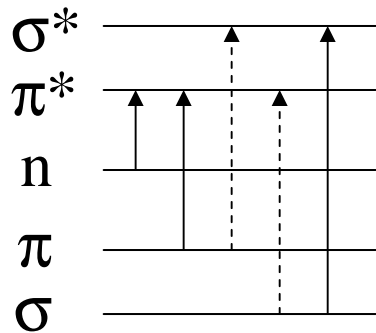
Měření absorbance je velmi jednoduché a proto je to nejčastěji užívaná metoda pro stanovení koncentrace látek

Vidění - spektrální vlastnosti pigmentů

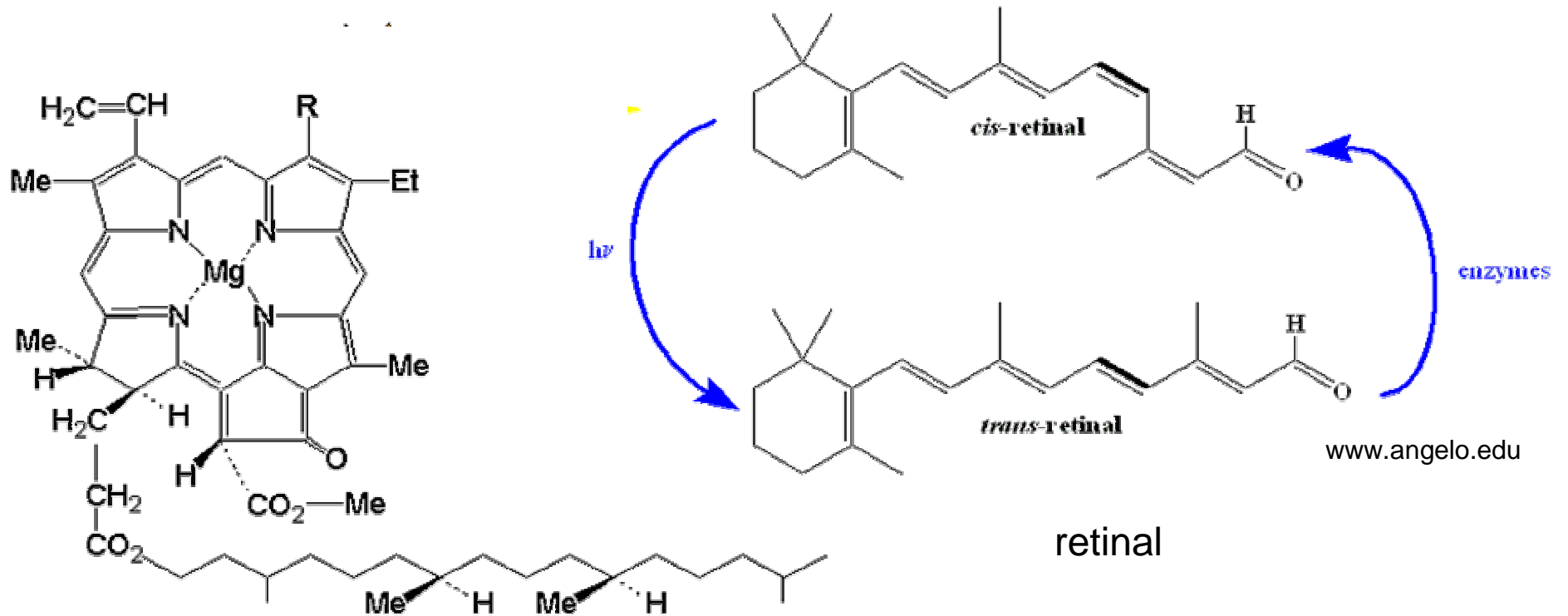
Vidíme odražené světlo !



Molekuly absorbující v UV/VIS části spektra



Molekula	přechod	λ [nm]
$\text{CH}_3\text{-CH}_3$	(σ, σ^*)	<160
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Cl}$	(n, σ^*)	~200
$\text{CH}_2=\text{CH-CH=CH}_2$	(π, π^*)	~220
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (acetone)	(n, π^*)	~285



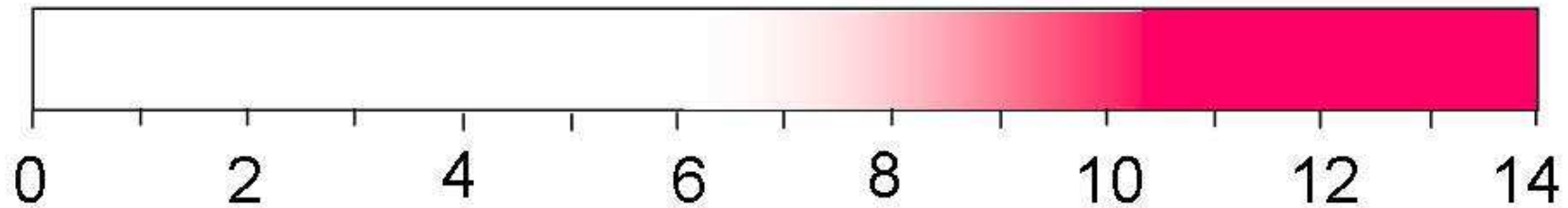
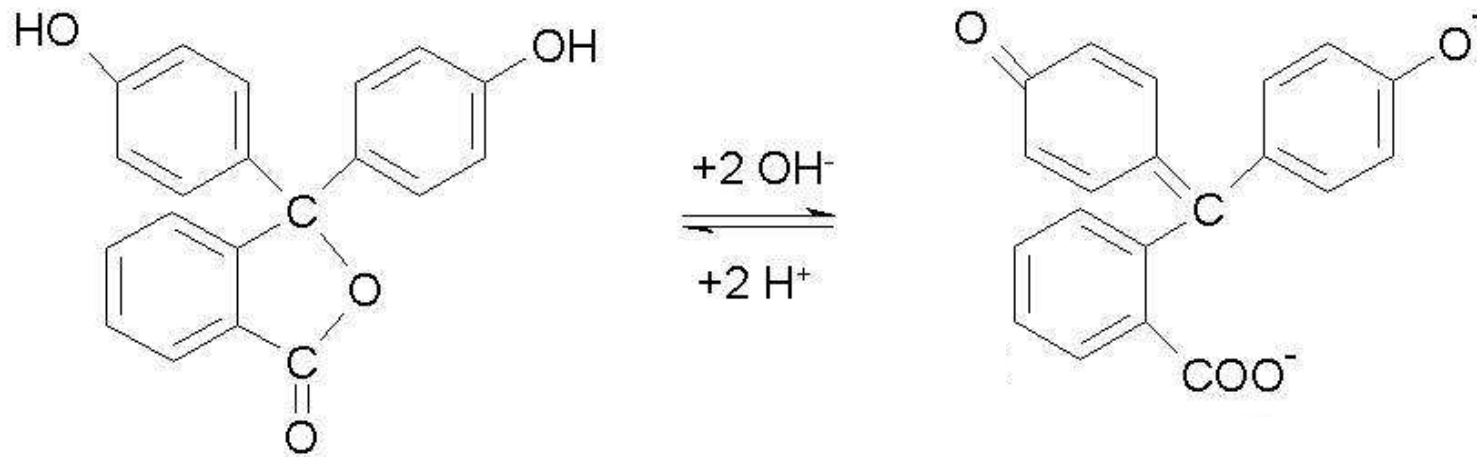
a, $\text{R}=\text{CH}_3$
 b, $\text{R}=\text{CHO}$

chlorofyl

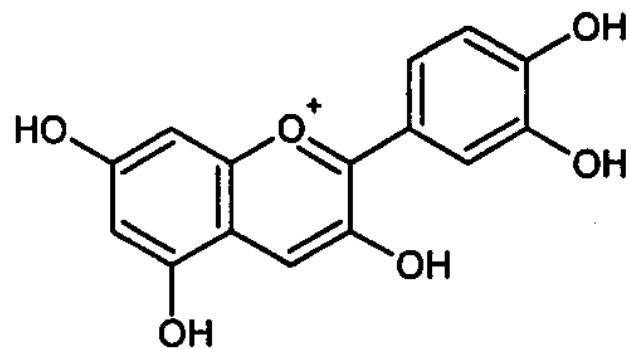
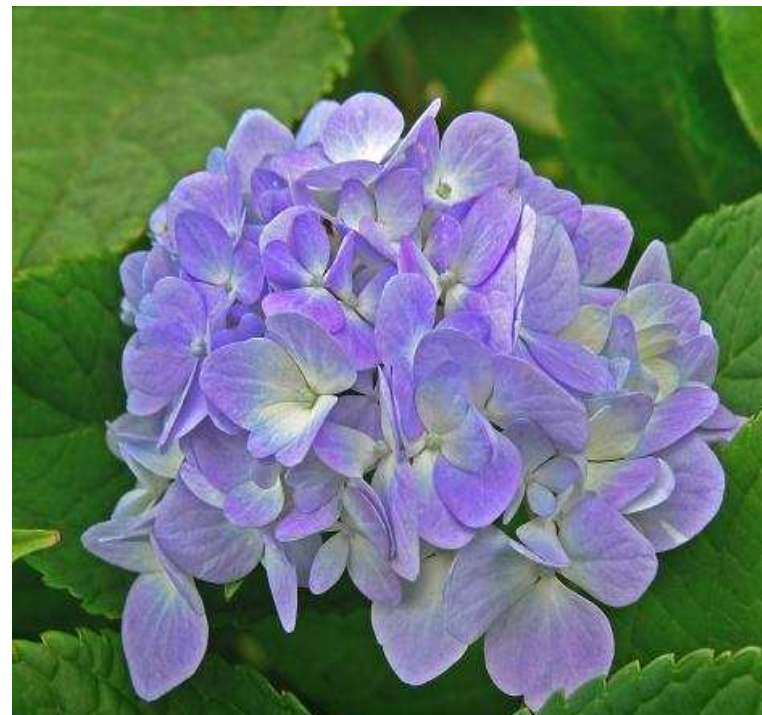
retinal

www.angelo.edu

Fenolftalein

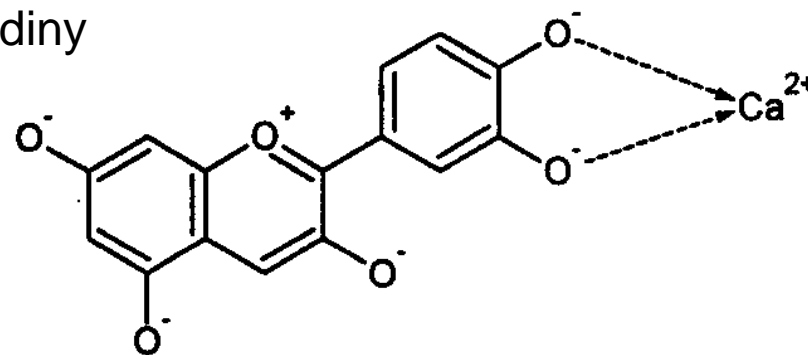
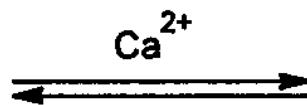


Barvy květů hortenzie



růžové v kyselé půdě

anthokyanidiny



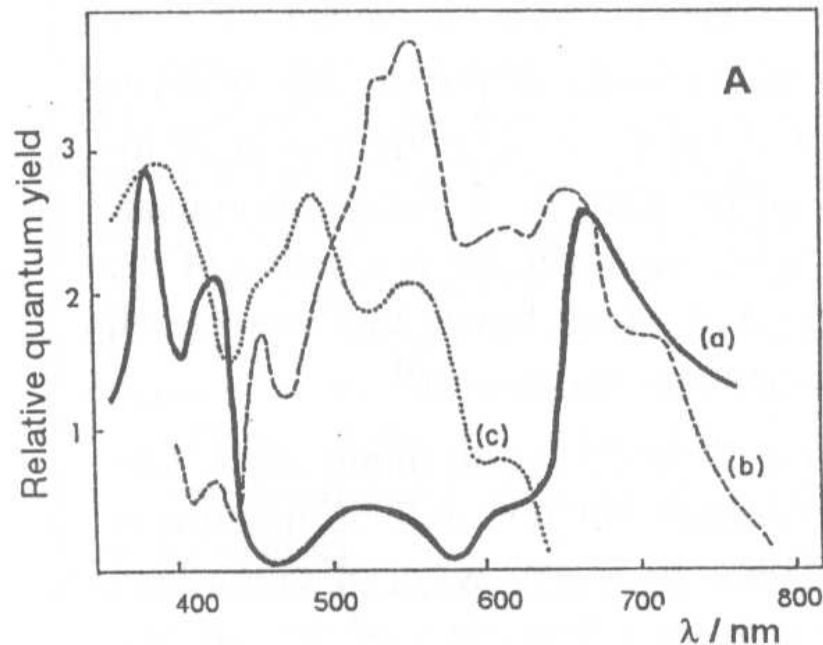
modré v zásadité půdě

Reakce jednobuněčných organismů na světlo

Fotokineze – pohyb závisí na intenzitě světla, nezávisle na tom, odkud přichází

Fotofobní reakce – náhlá (přechodná) změna pohybu

Fototaxe – orientovaný pohyb ve směru nebo proti směru, ze kterého přichází světlo (bakterie *Rhodospirillum centenum* se pohybuje od světla při osvětlení pod 650 nm, ale ke světlu při osvětlení nad 650 nm).



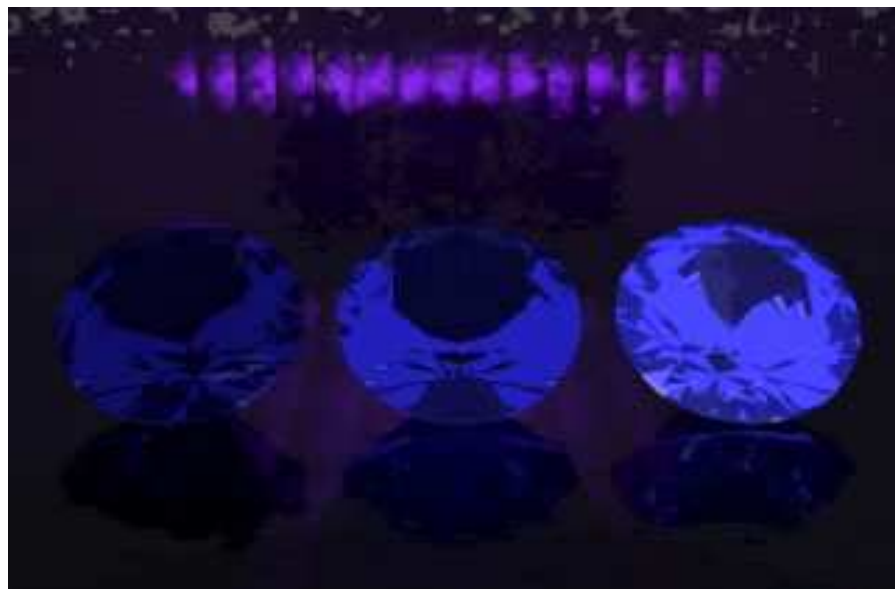
Akční spektra pohybu bakterie *Phormidium uncinatum*

A – fotokineze

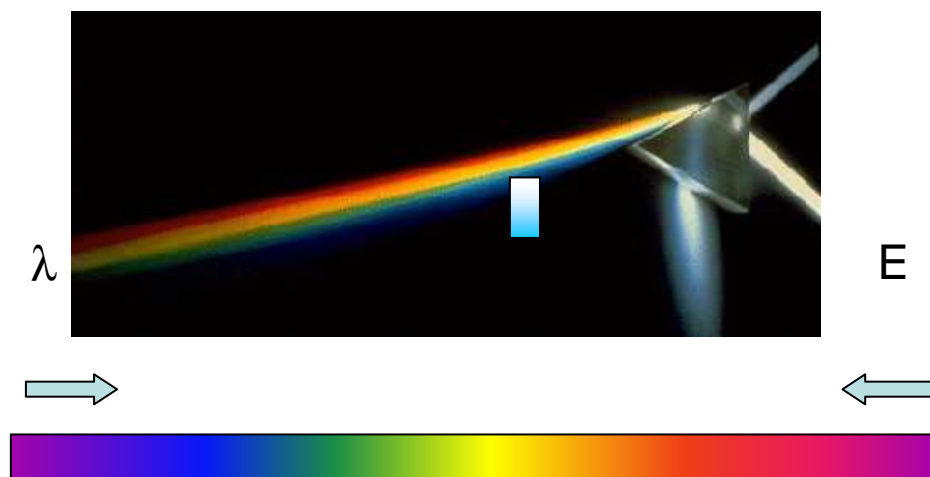
B – fotofobie

C - fototaxe

Změna barvy



<http://www.novori.com/jewelry-education/fluorescence.jpg>

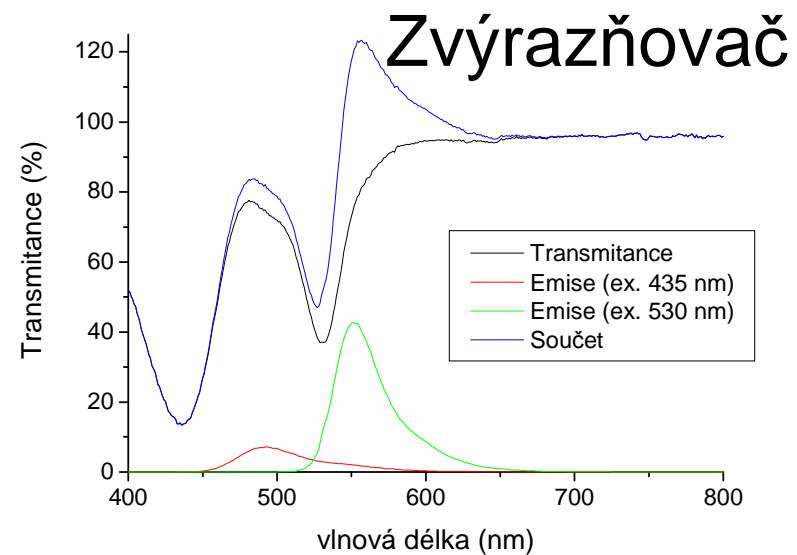
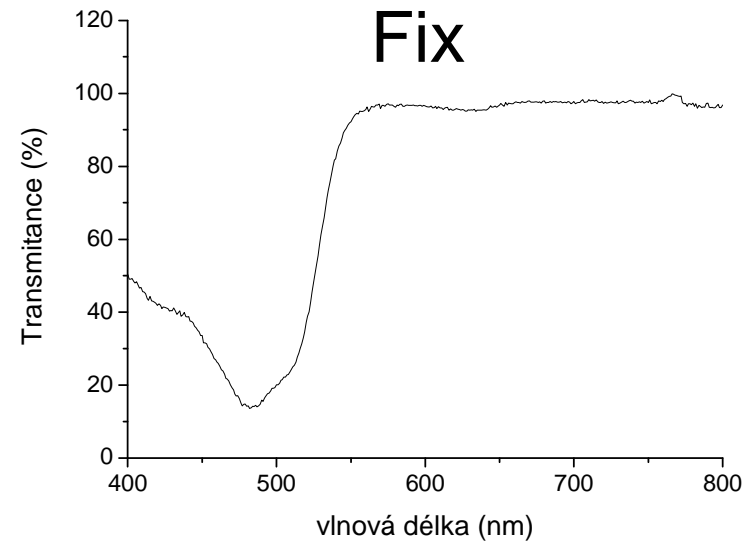


<http://woelen.scheikunde.net/science/chem/exps/fluorescence/fluorescence.jpg>

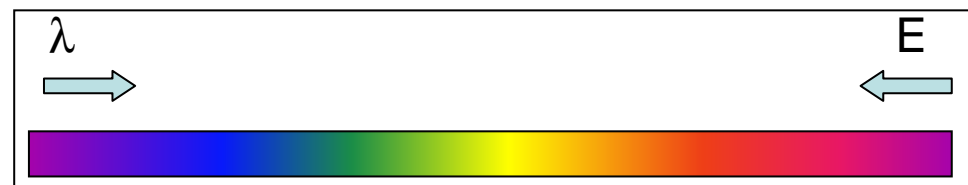
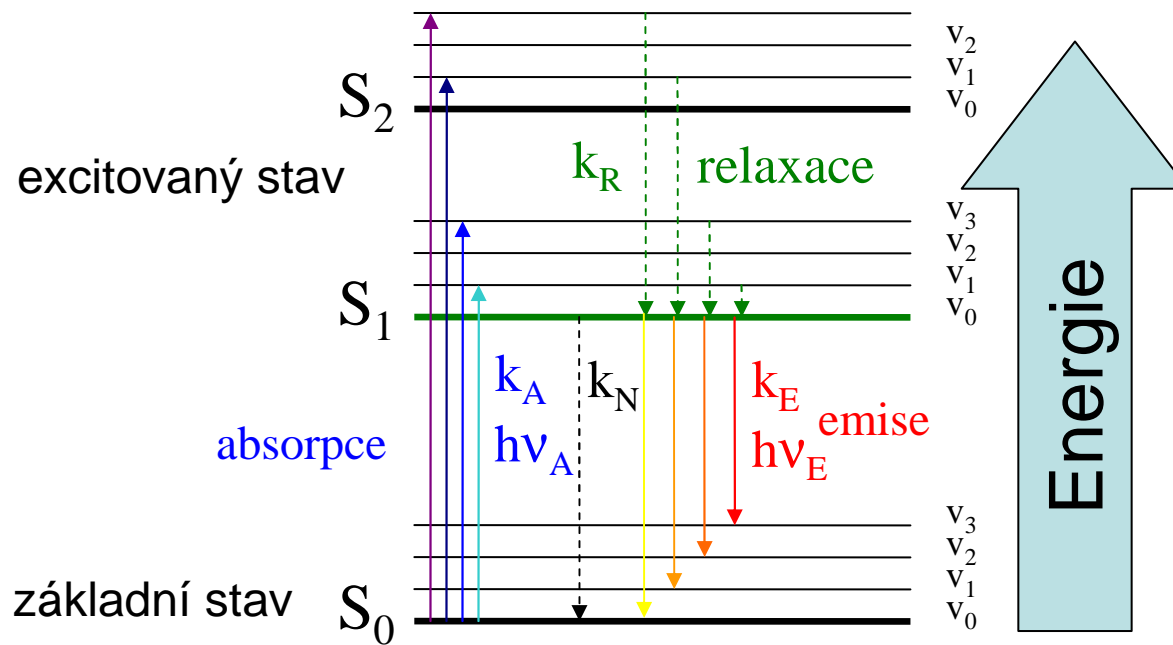
Aplikace v běžném životě



Proč zvýrazňuje zvýrazňovač ?



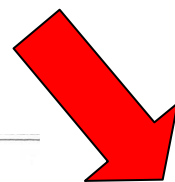
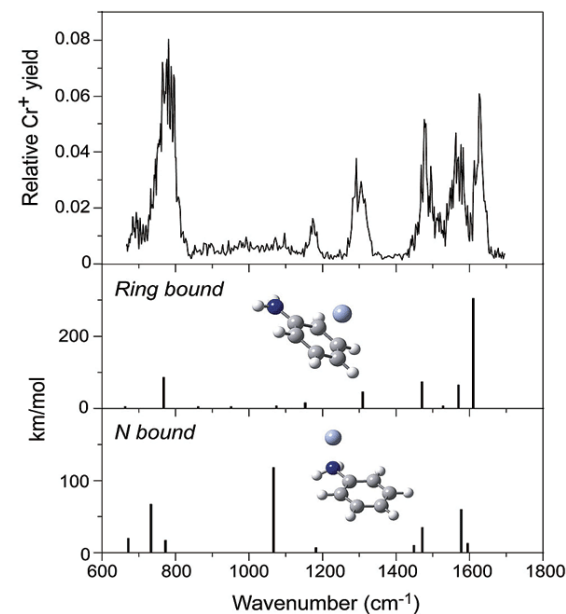
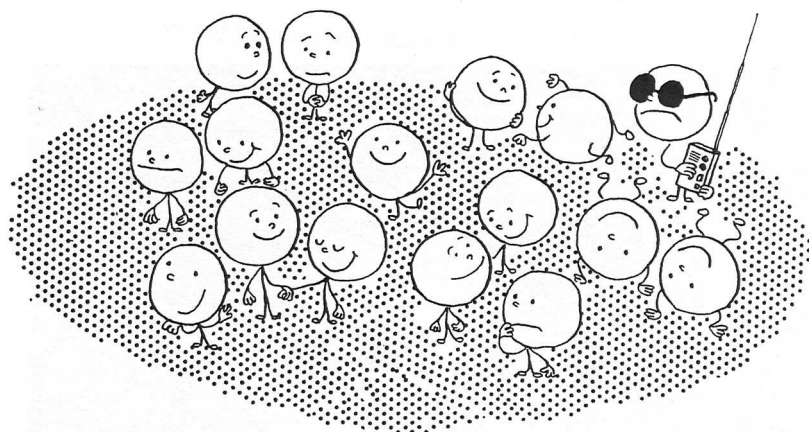
Fluorescence



Fluorescenční spektroskopie

extrémně citlivá
velmi pestrá

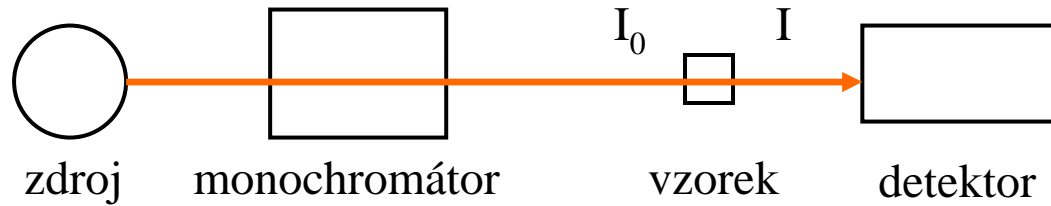
molekuly, které mohou
vyzařovat fluorescenci jsou
relativně vzácné



a proto je můžeme využít
i pro analýzu velmi
složitých systémů

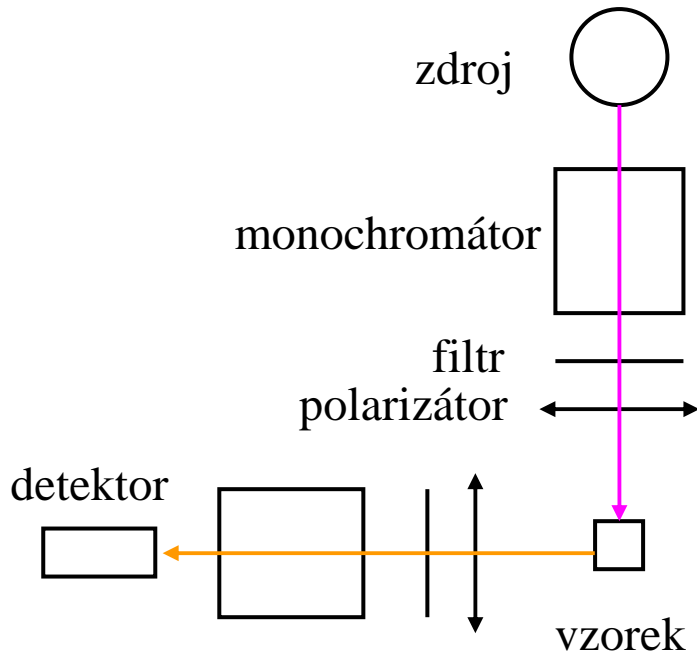
Figure 2. Fluorescent probe represents a molecular reporter in the biologic sample.

Citlivost



$$A(\lambda) = -\log \frac{I(\lambda, l)}{I_0(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l$$

Při malých koncentracích hledáme malý rozdíl dvou velkých čísel



V L-uspořádání měříme intenzitu emise proti „nulovému“ pozadí.

Pro malé koncentrace je intenzita úměrná

$$I \sim I_0 \varepsilon c l QY \eta$$

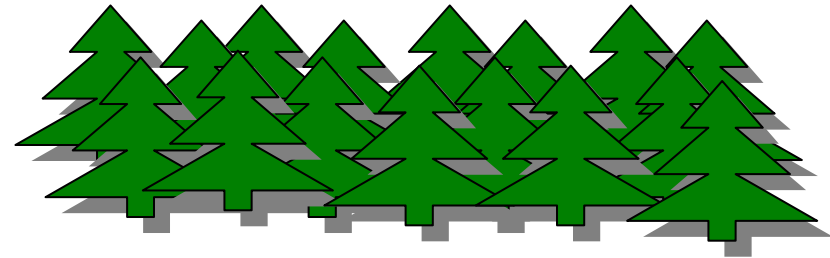
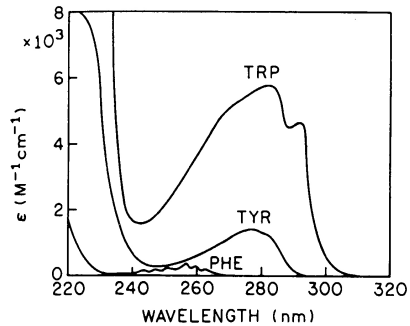
I závisí na koncentraci

QY nezávisí na koncentraci

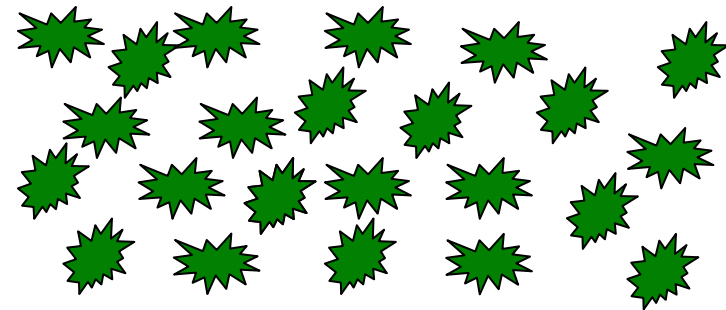
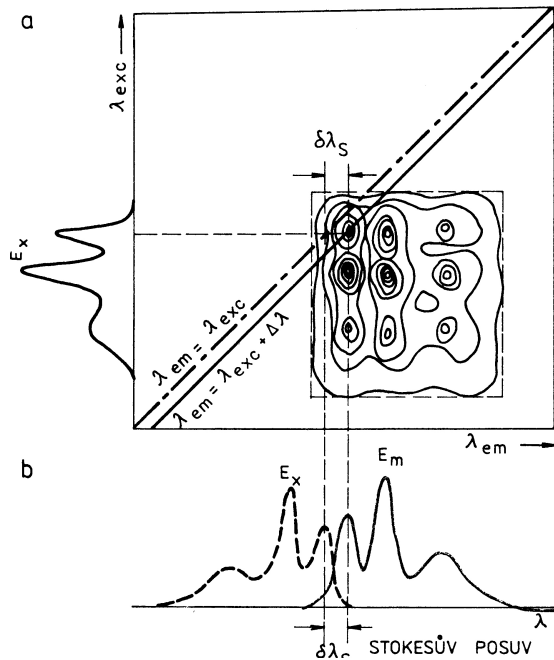
Pro přesné určení koncentrace potřebujeme srovnání se standardem

Variabilita

Intenzita nezávisí jen na vlnové délce absorpce...



... ale i na vlnové délce emise



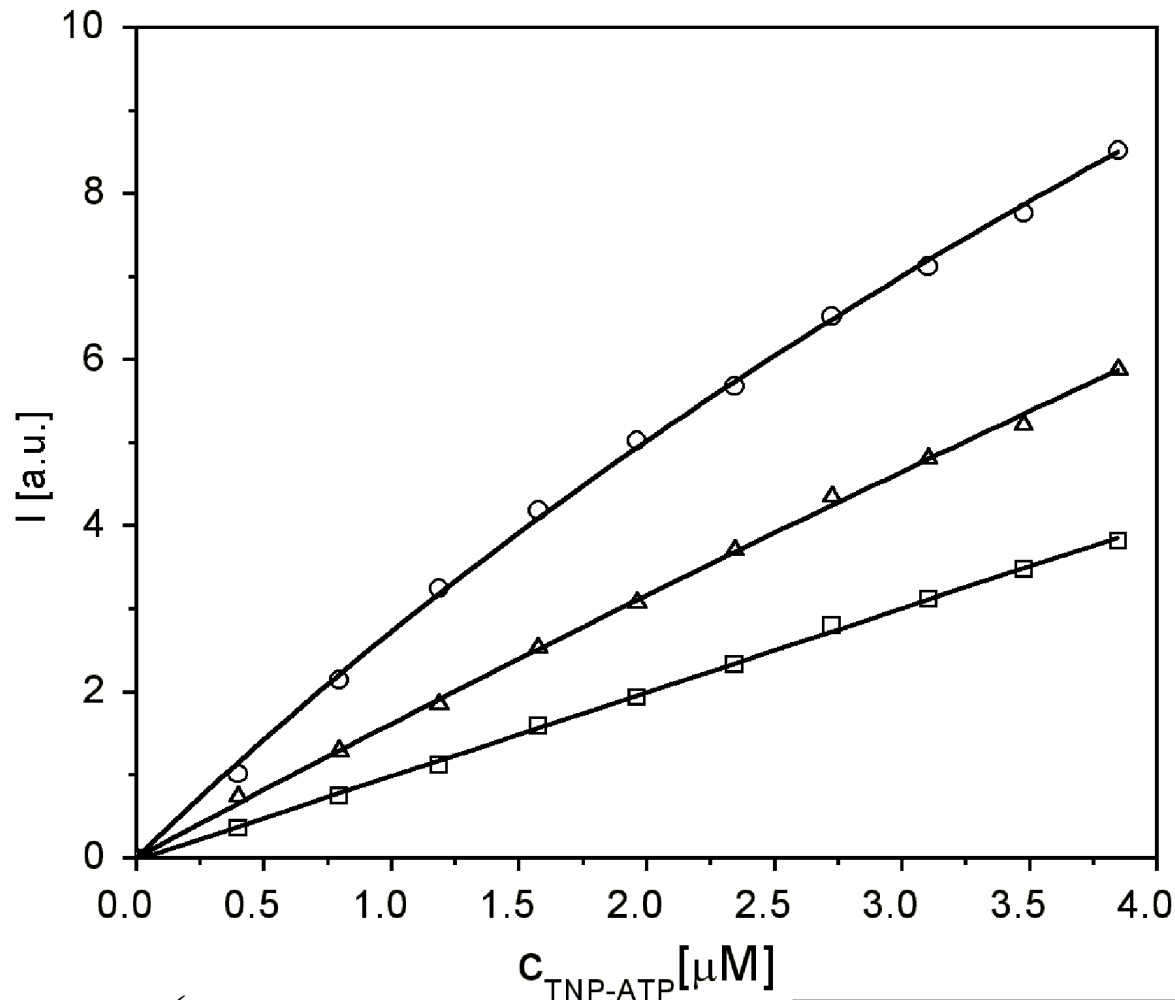
a můžeme použít ještě spoustu dalších triků ...

Základní charakteristiky luminiscence

- 1) **Intenzita emise** (závislost na vlnové délce absorpce i emise - spektrum, kvantový výtěžek)
- 2) **Střední doba života excitovaného stavu**
- 3) **Polarizace emitovaných fotonů**
- 4) **Změny intenzity v čase**

Důležité je, zda-li měřená
veličina závisí či nezávisí
na koncentraci fluoroforu

Vazba ATP na protein



1.6 μM K605

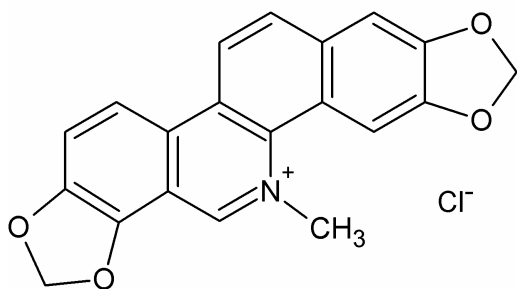
1.6 μM K605 +
19 mM ATP

Free probe

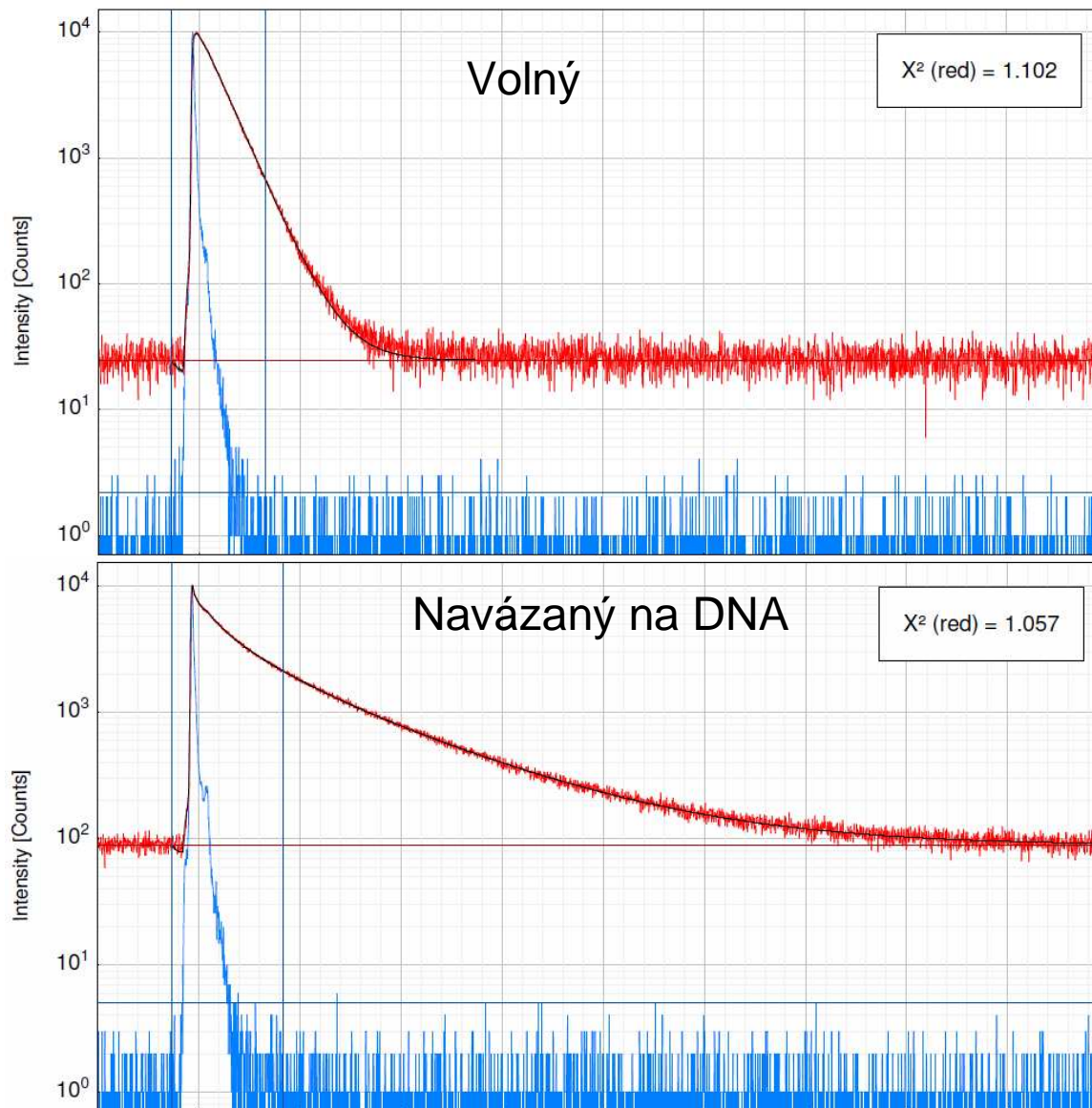
Kubala et al., *Physiol Res.* 2004;53(1):109-13

$$F^* = [P]_T + \frac{1}{2}(\gamma - 1) \left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} - \sqrt{\left([P]_T + [E]_T + K_P + [A]_T \frac{K_P}{K_A} \right)^2 - 4[P]_T[E]_T} \right)$$

Změny v kinetice dohasínání fluorescence



Sanguinarine chloride



Zhášení fluorescence

Pokud se fluorofor během doby, kdy je v excitovaném stavu, srazí s molekulou zhášedla, vrátí se do základního stavu bez vyzáření fotonu.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q[Q]$$

Stern-Volmerova zhášecí konstanta závisí na přístupnosti fluoroforu.

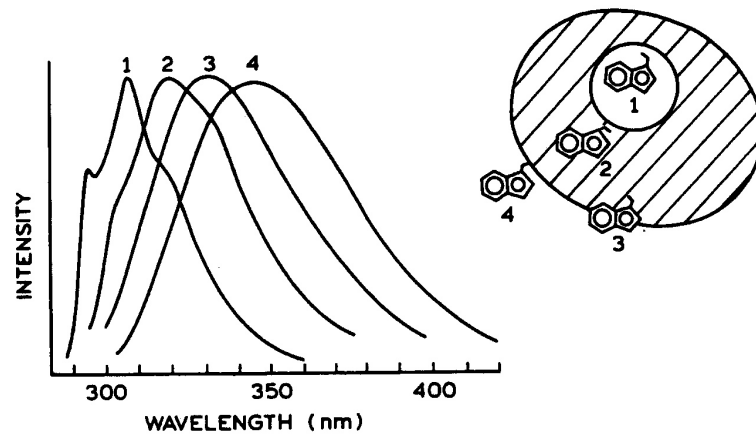
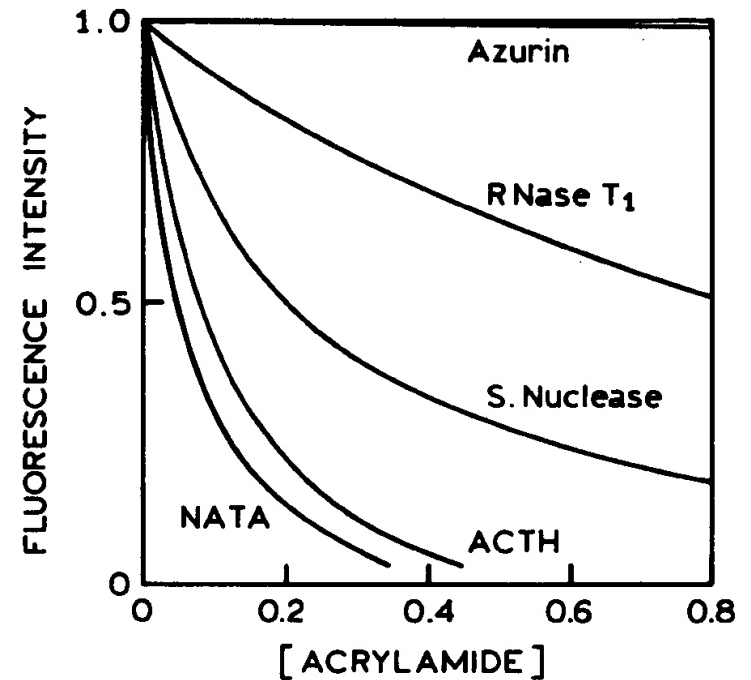
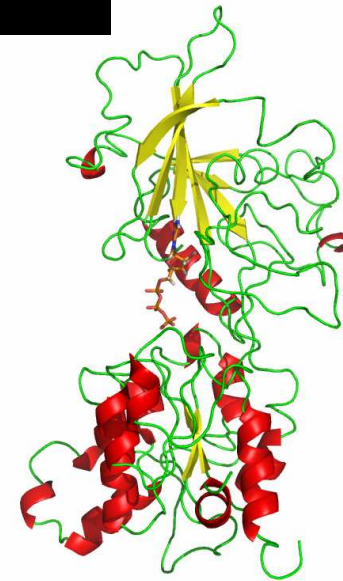
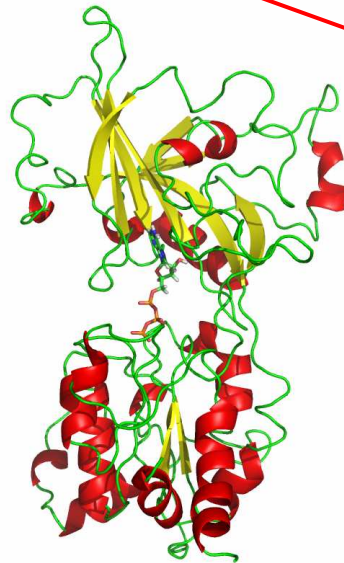
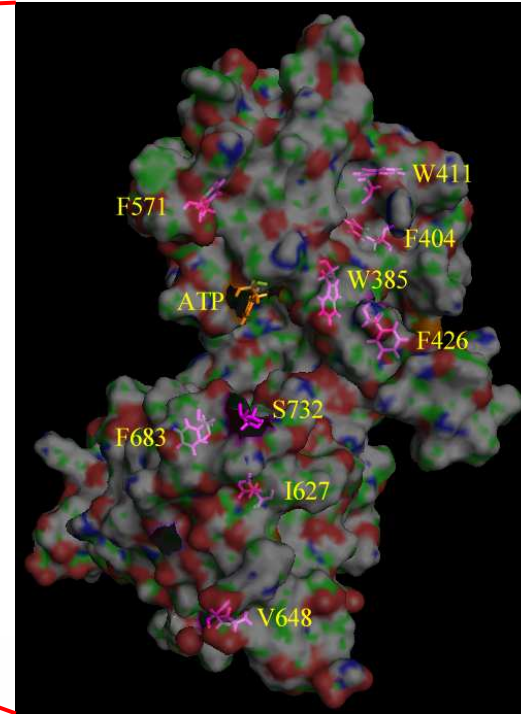
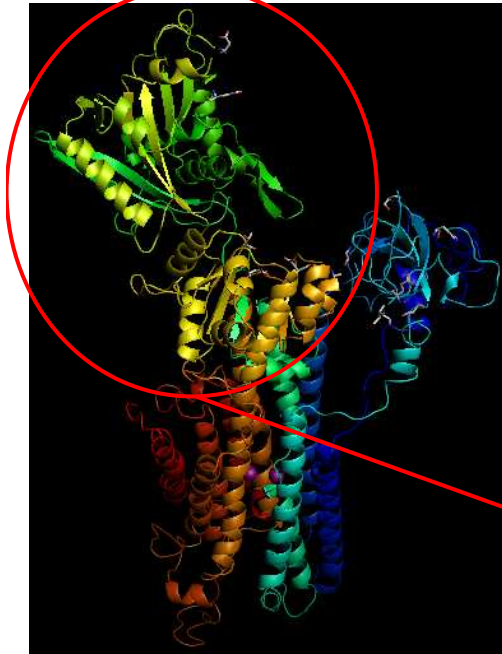


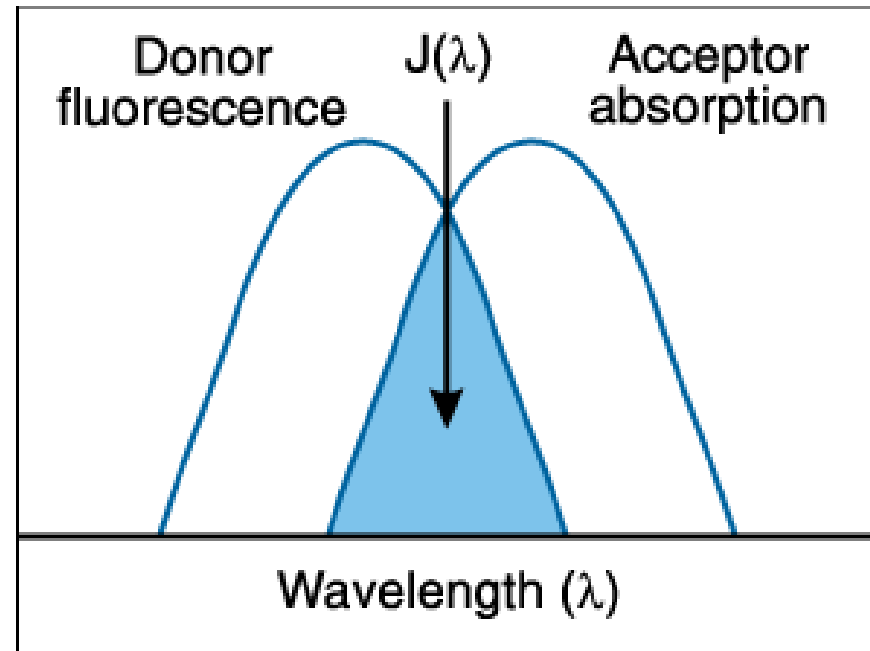
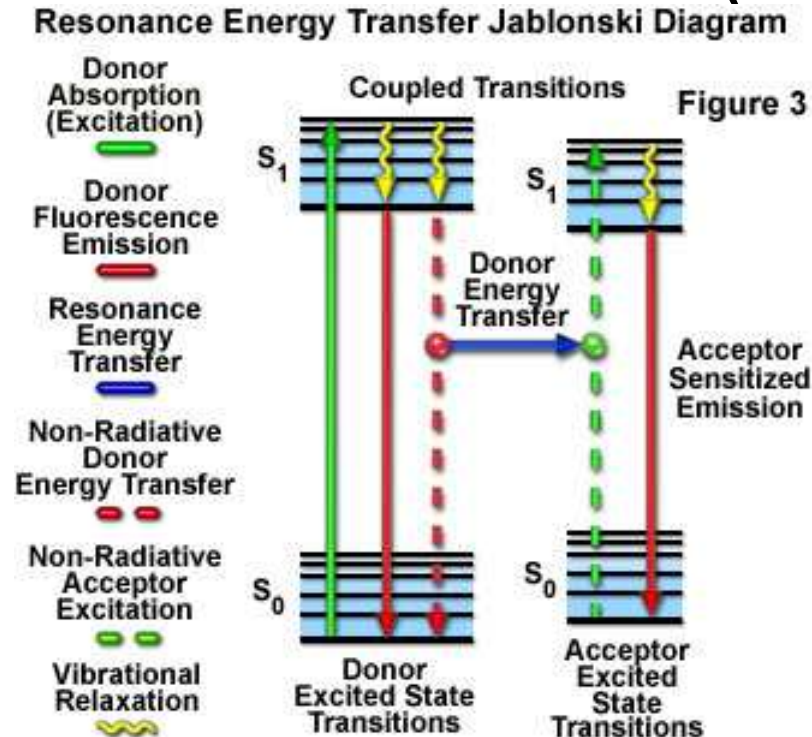
Figure 16.11. Effect of tryptophan environment on the emission spectra of proteins: (1) apoazurin Pfl, (2) ribonuclease T₁, (3) staphylococcal nuclease, (4) glucagon. Revised from Refs. 52 and 53.



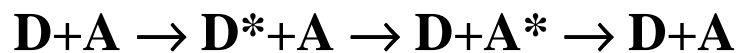
Zhášení fluorescence



Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

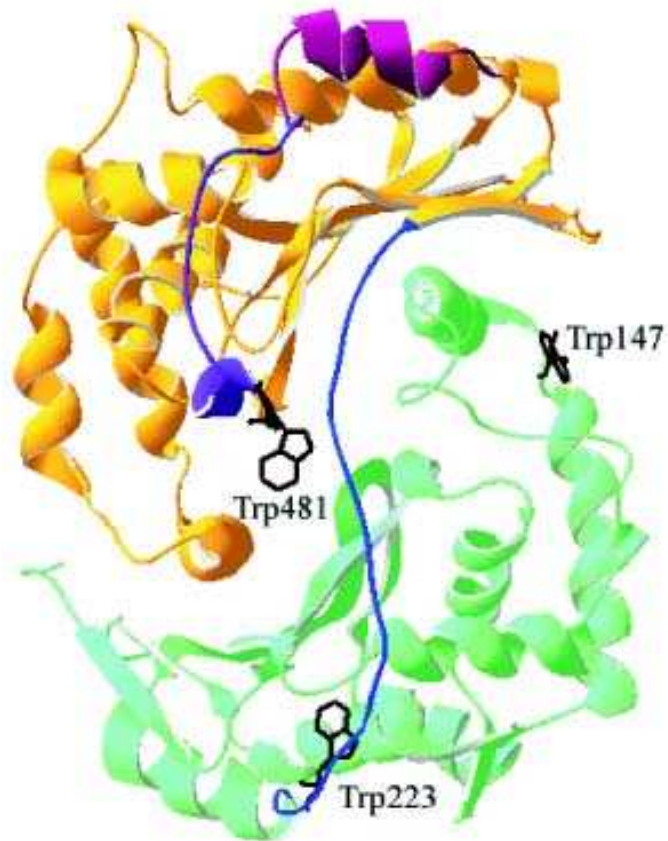


Pokud se v blízkosti fluoroforu (donoru) nachází molekula (akceptor), jejíž absorpční spektrum se překrývá s emisním spektrem donoru, může dojít k rezonančnímu (nezářivému !) přenosu excitační energie

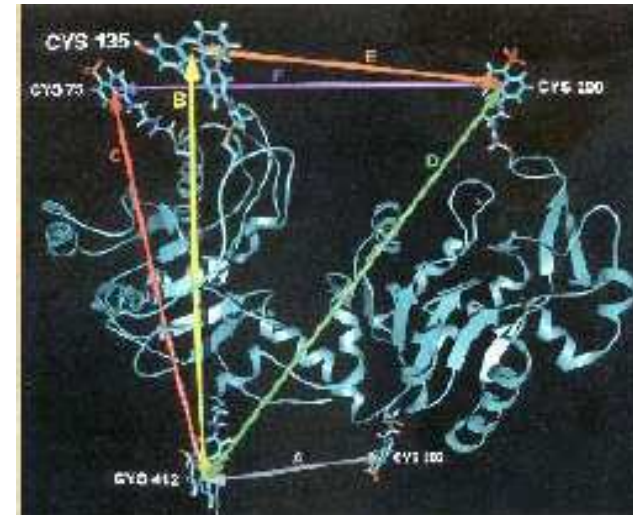


Protože se jedná o dipól-dipólovou interakci, závisí účinnost FRET na r^{-6} , což umožňuje měření inter- nebo intramolekulárních vzdáleností v nm škále.

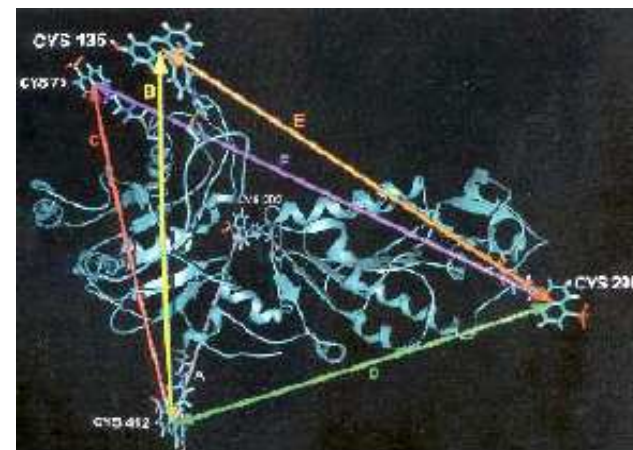
mitochondriální procesující
peptidáza
(Janata et al. 2004)



Fosfoglycerátkináza
(Lillo et al., 1997)

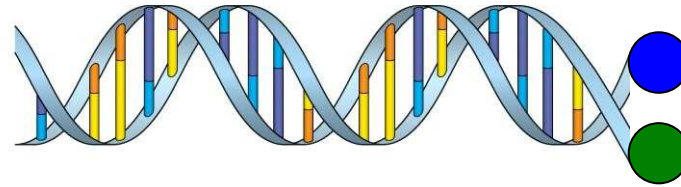


native state



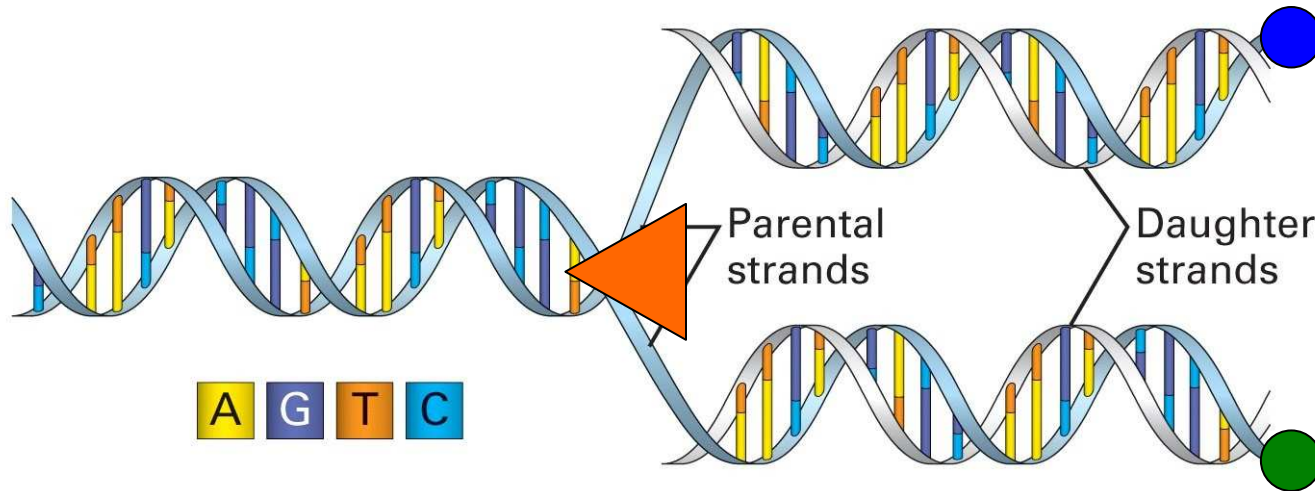
first unfolded state

Měření rychlosti DNA polymerázy



A G T C

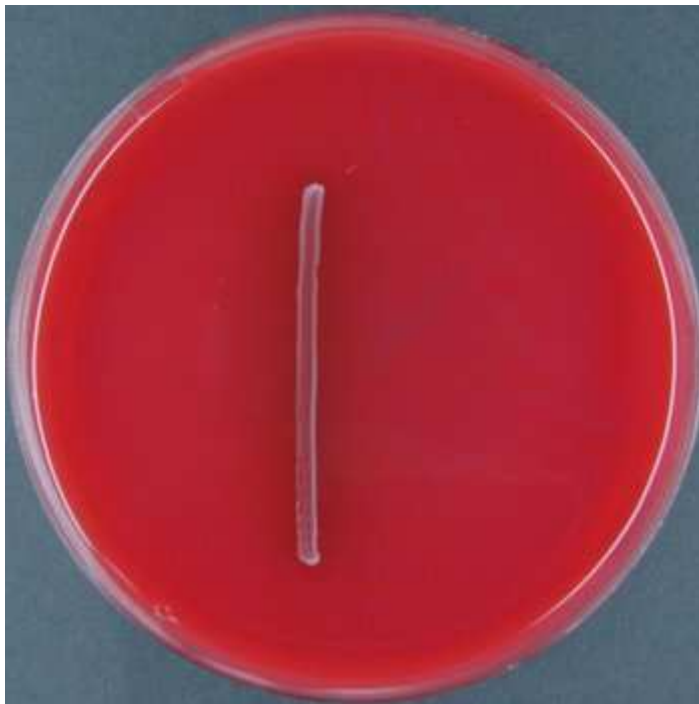
Silný FRET



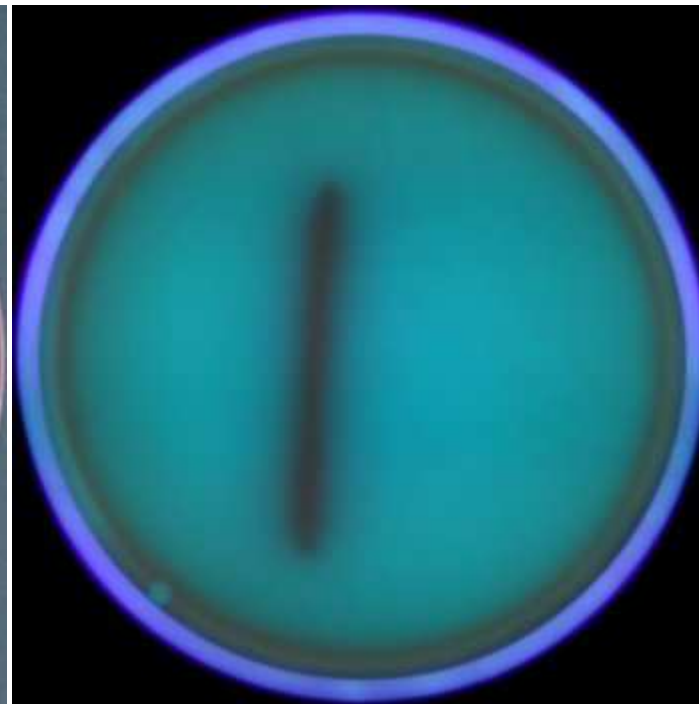
Slabý FRET

Mikrobiologie

Detekce *Streptococcus agalactiae* na aesculinovém krevním agaru



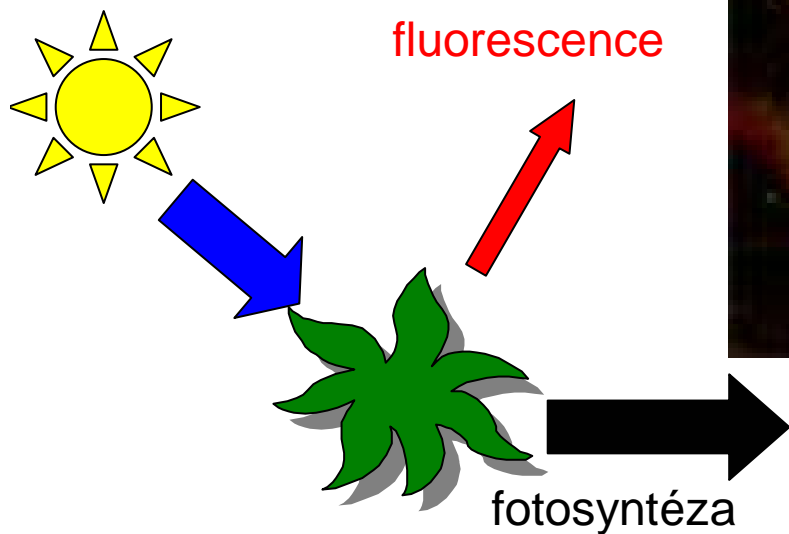
denní světlo



UV zářivka

Aplikace na úrovni organizmů

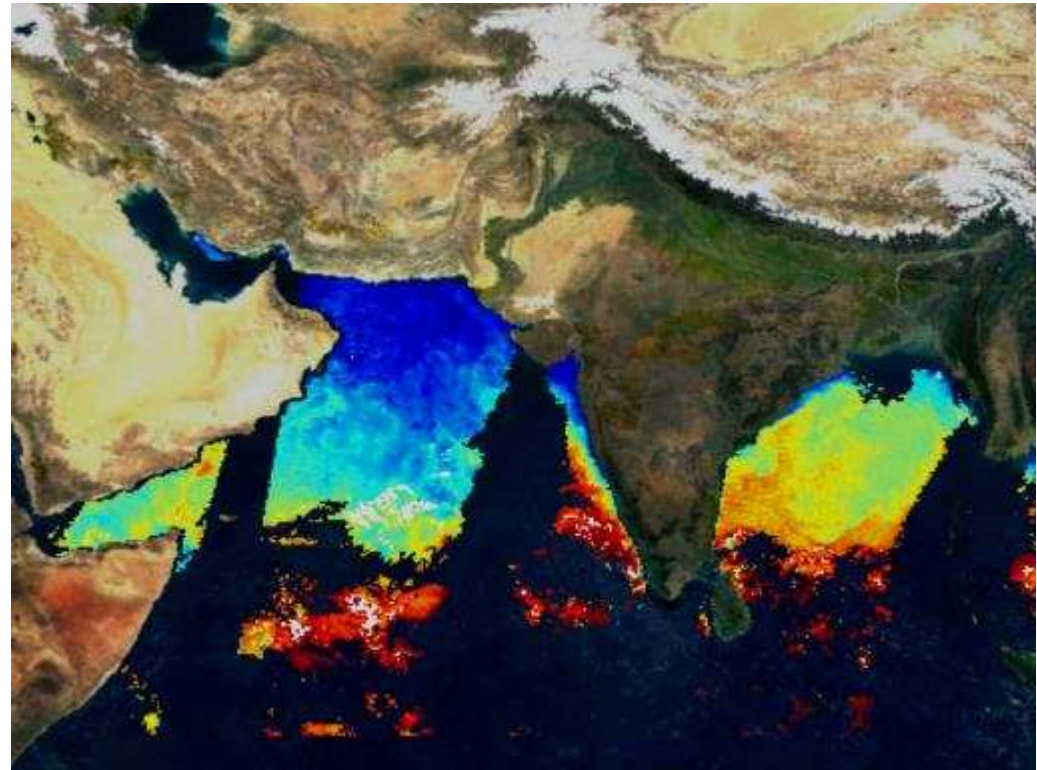
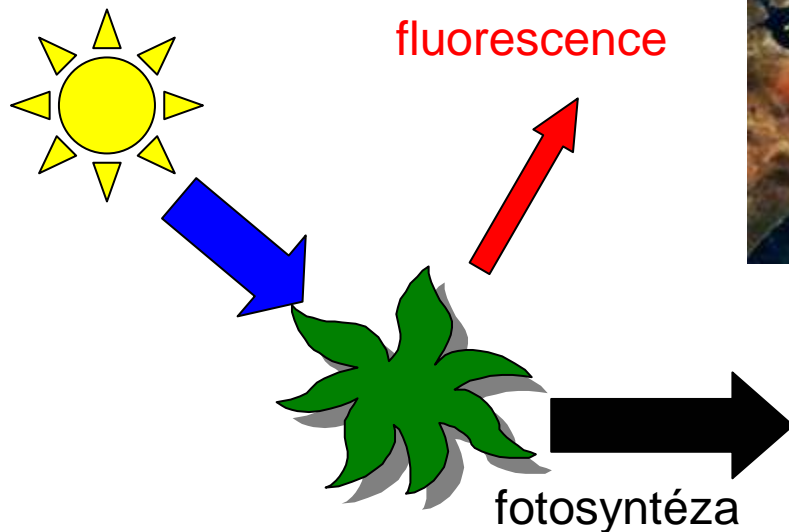
Šíření choroby rostlinou



<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Baulcombe/images/leaf.jpg>

Aplikace v planetárním měřítku

Monitorování chlorofylové fluorescence planktonu v Arabském moři
(modrá - vysoká intenzita fluorescence planktonu v nepříznivých životních podmínkách)

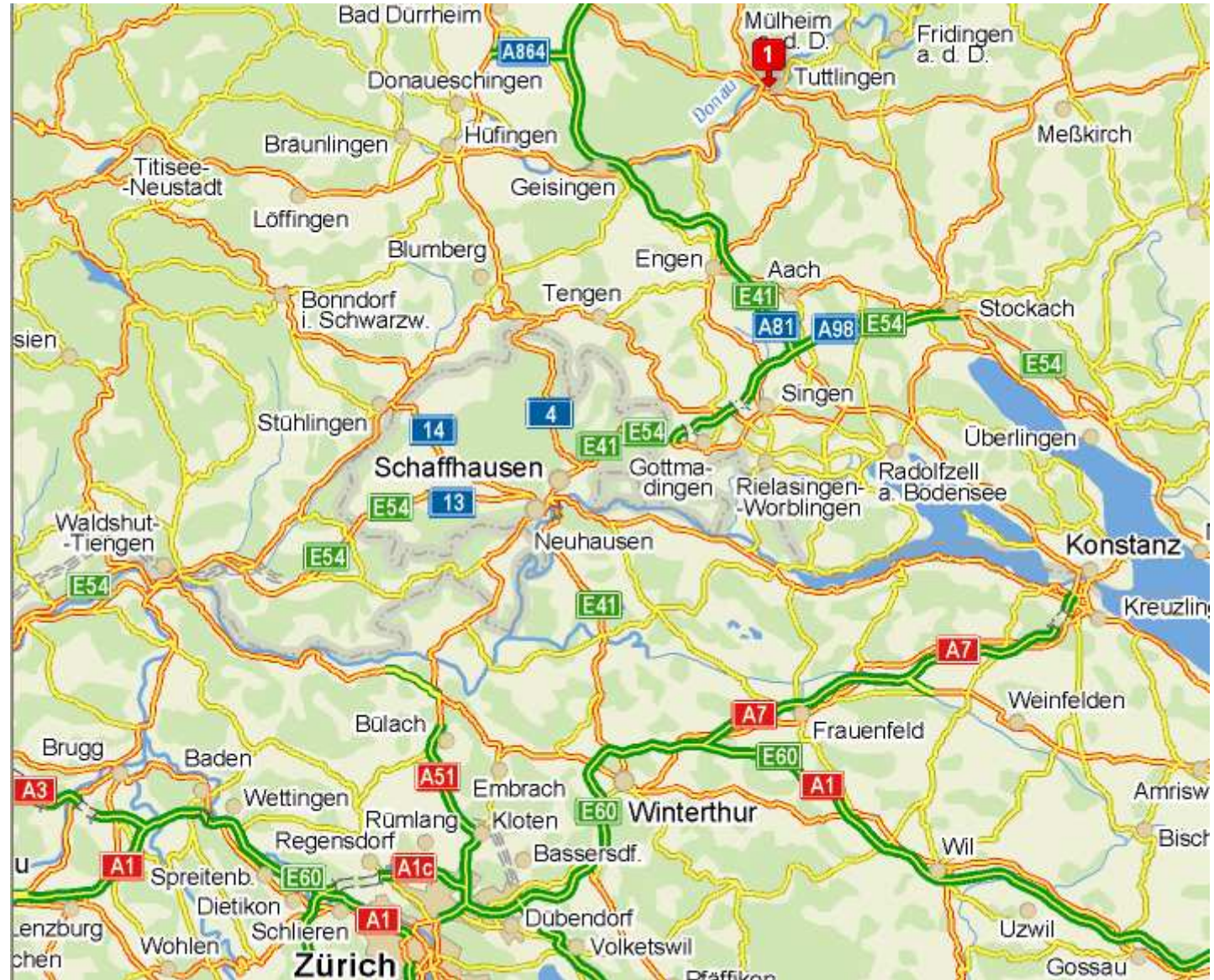
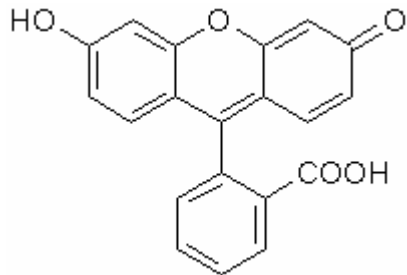


www.ioccg.org/gallery/terra/asia.html

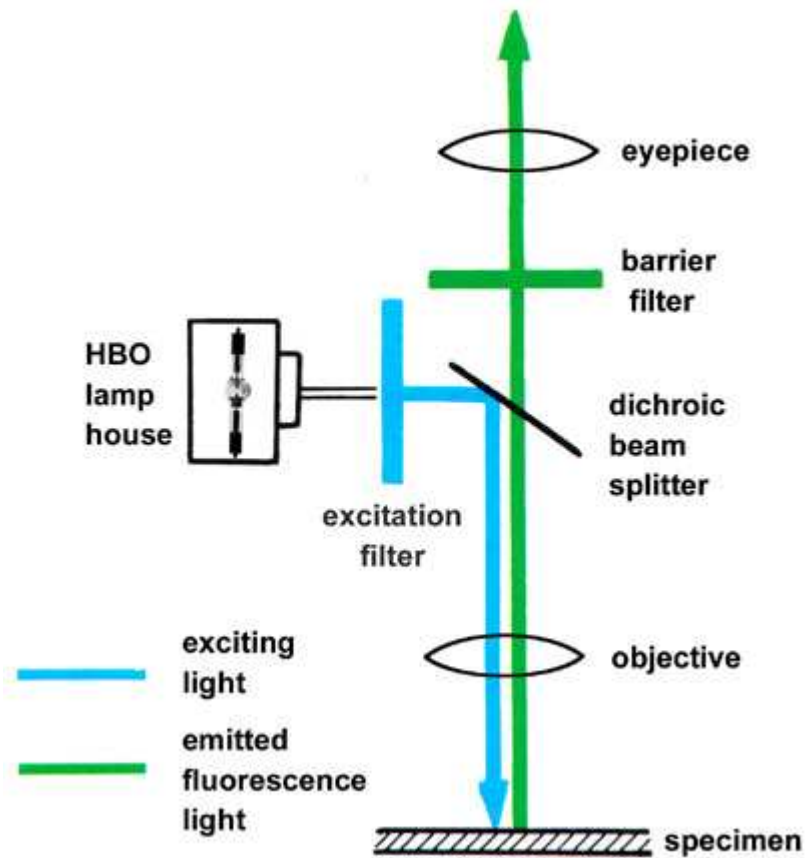
Aplikace v planetárním měřítku

1877
důkaz
podzemního
spojení mezi
Dunajem a Rýnem

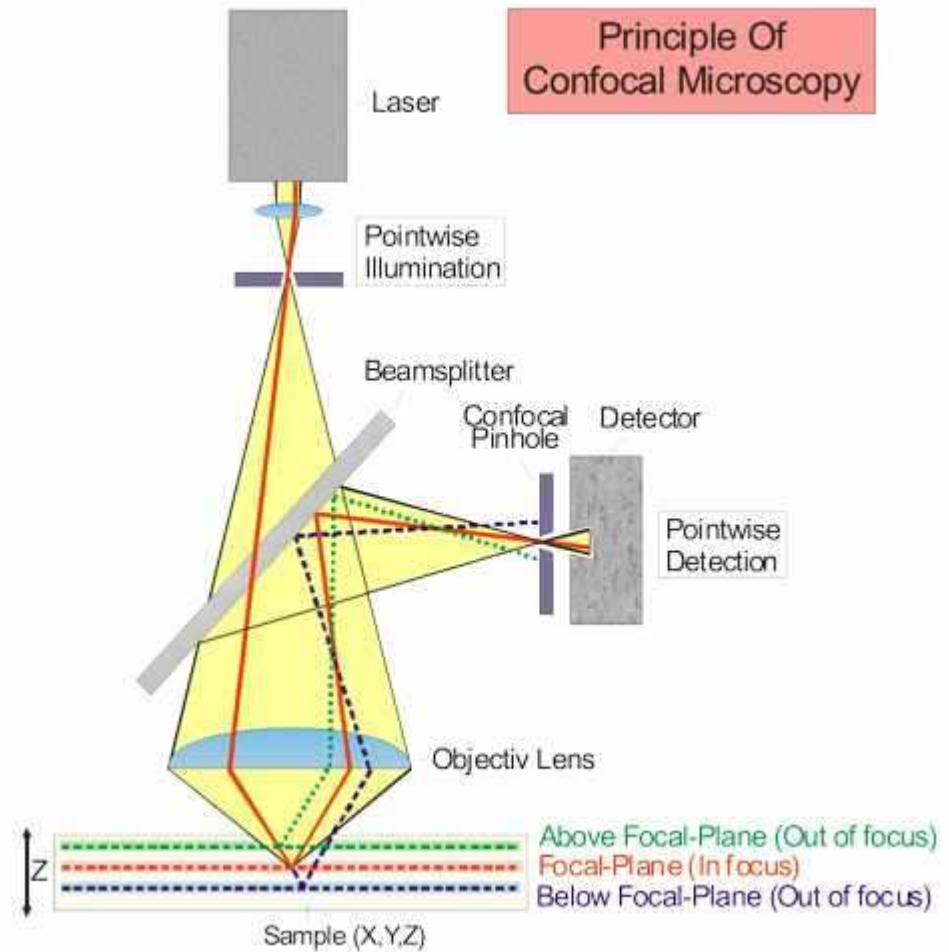
FLUORESCEIN



Fluorescenční mikroskopie

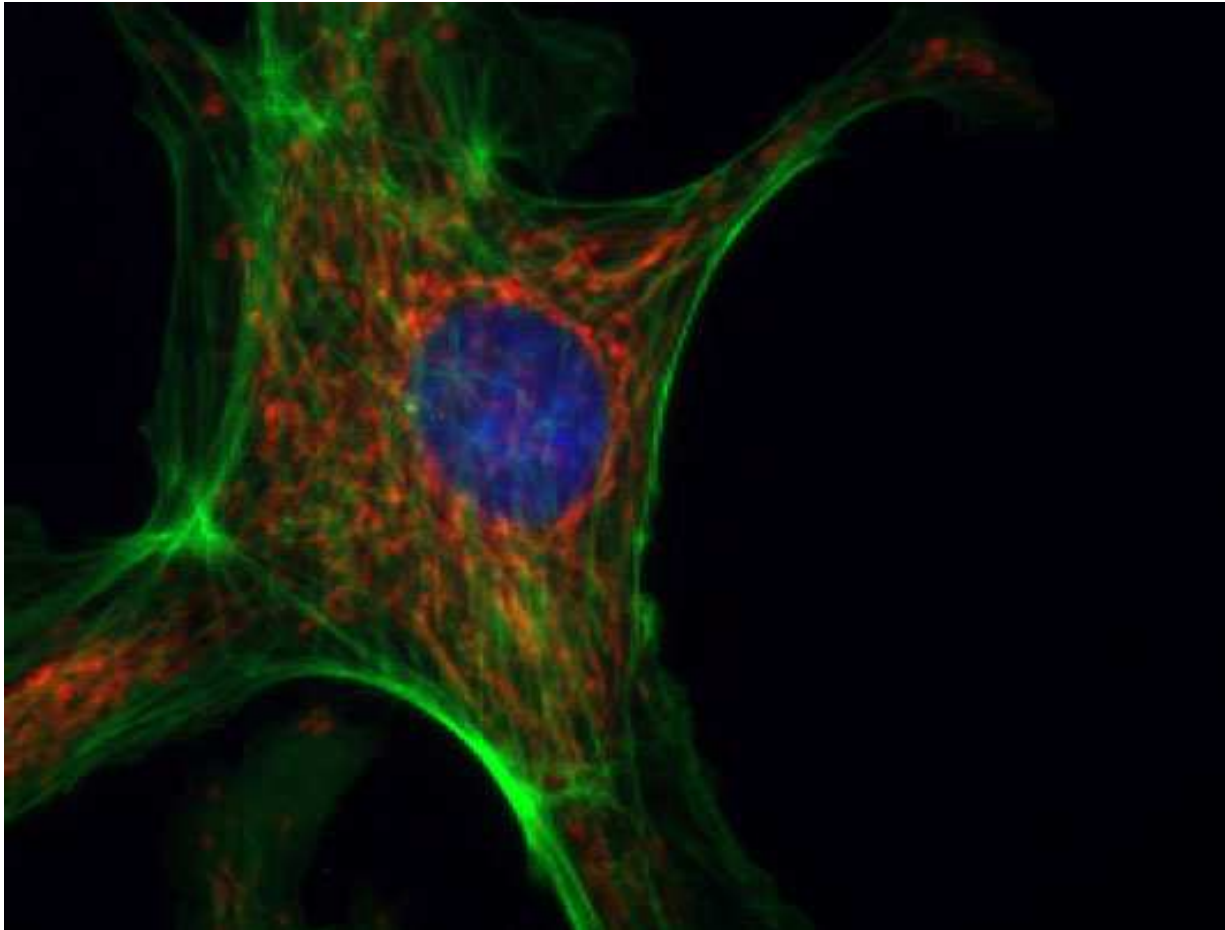


<http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluor.jpg>



<http://fb6www.uni-paderborn.de/ag/ag-sol/fgruppe/mainframe/images/microscope1.jpg>

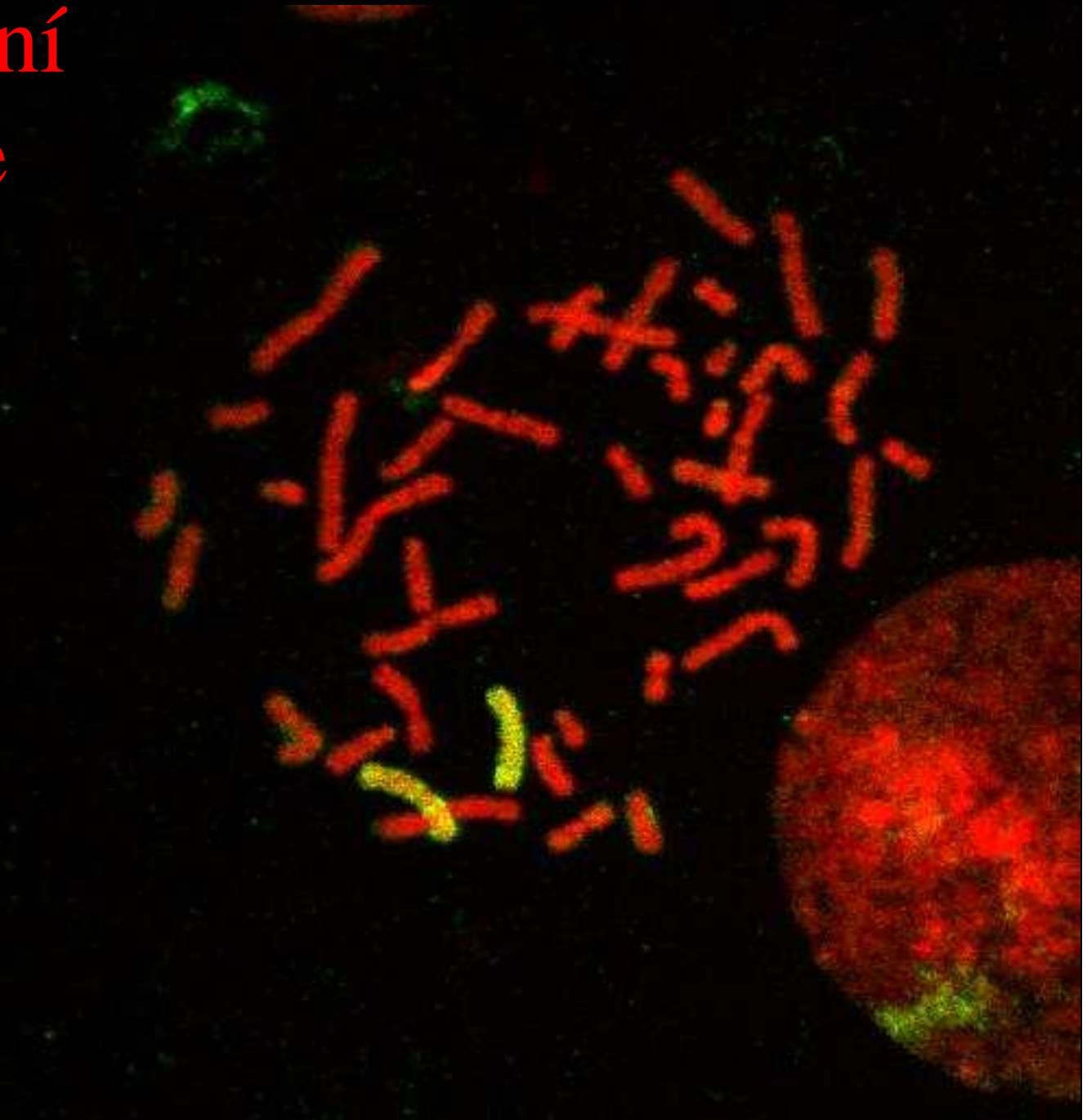
Fluorescenční mikroskopie



Fluorescenční mikroskopie endoteliálních buněk za použití tří fluorescenčních značek. Červeně jsou označeny mitochondrie, zeleně F-actin cytoskeletu a modře jádro.

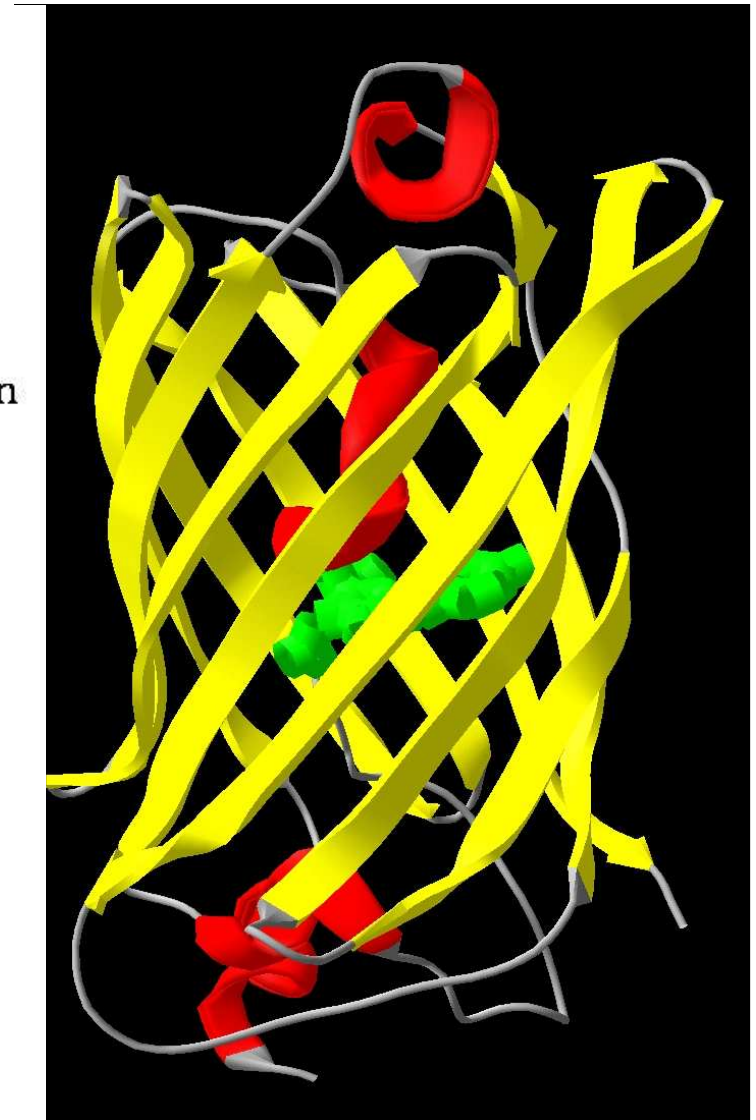
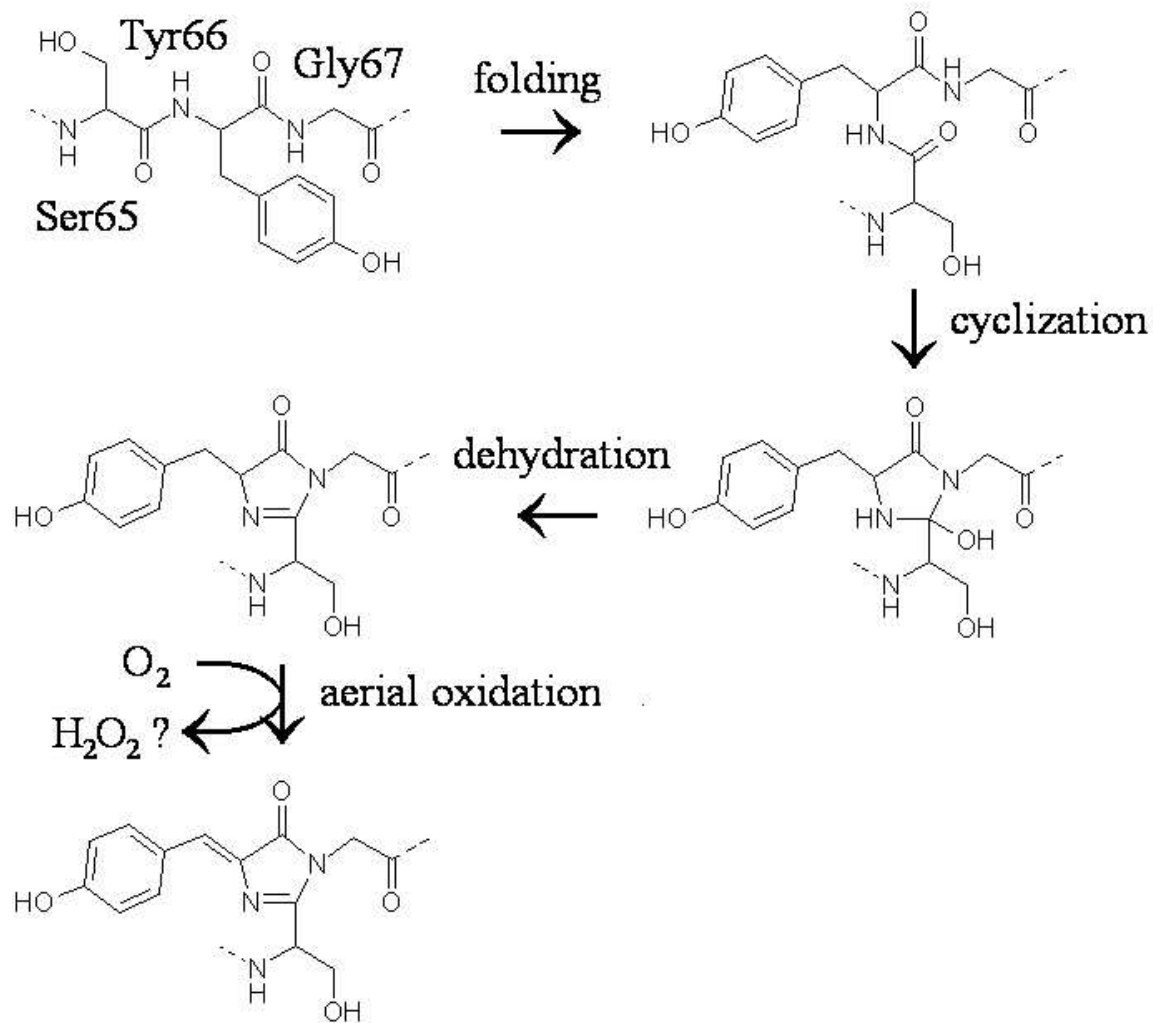
Fluorescenční mikroskopie

Lidský chromozóm 8
(FITC) je obarven
žlutozeleně, ostatní
chromozómy červeně
(propidium iodide)

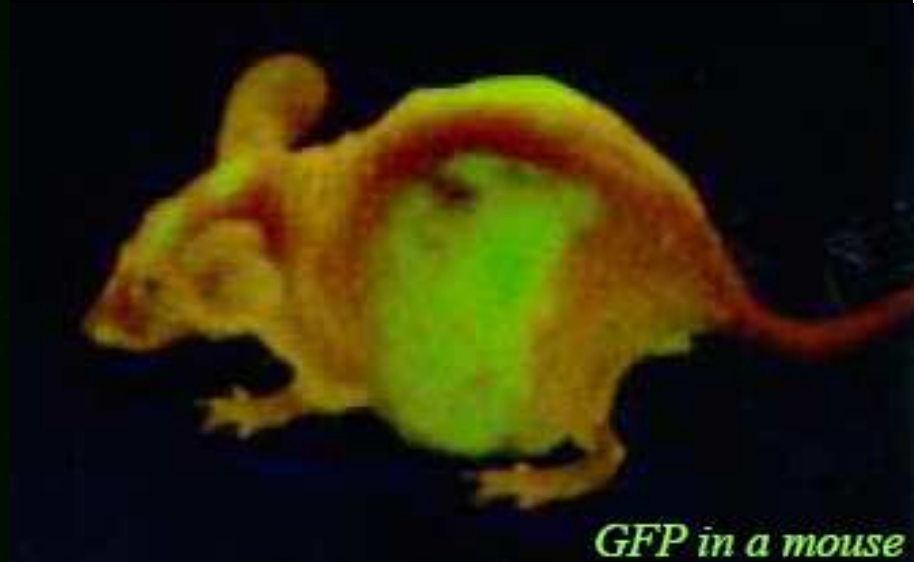
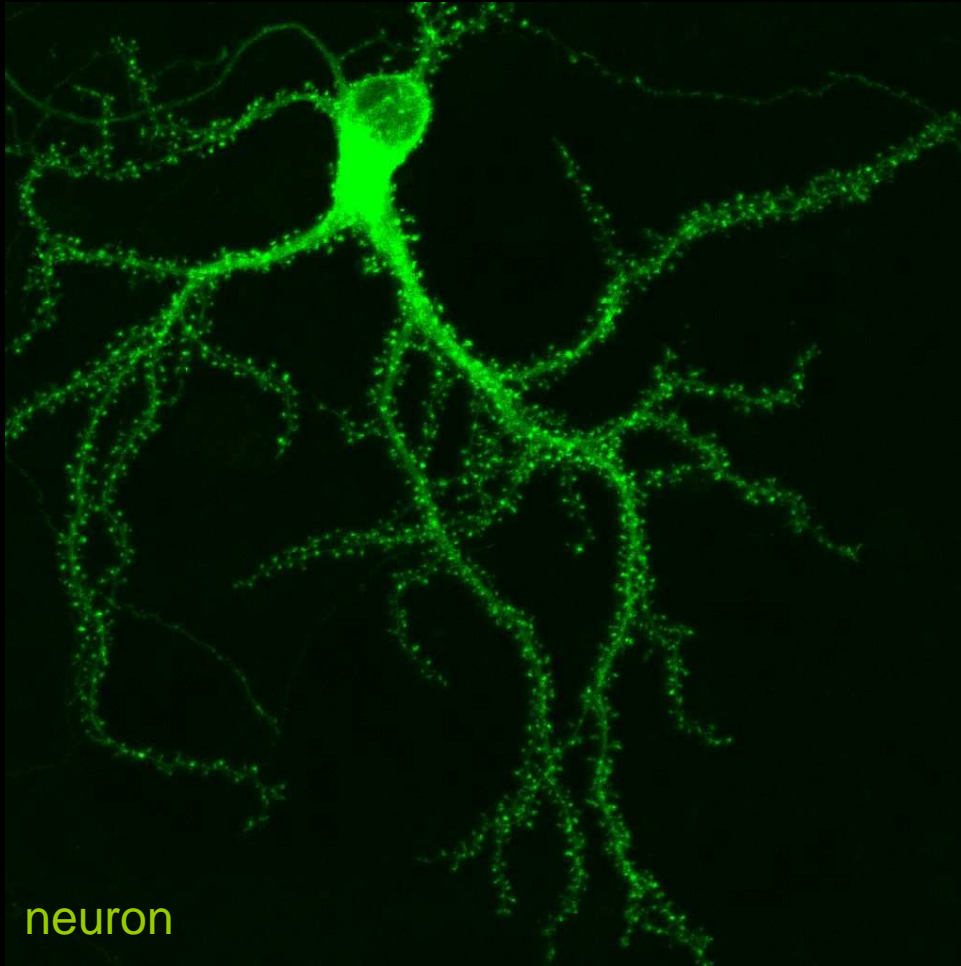


Fluorescenční proteiny

GFP z *Aequorea victoria*

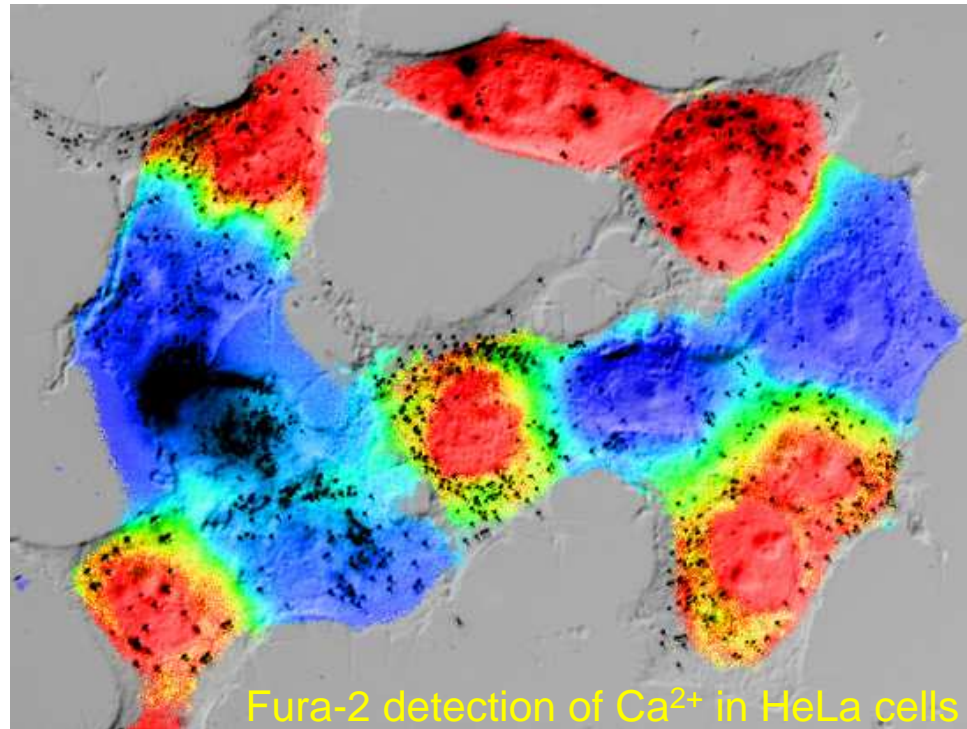


Fluorescence GFP in vivo

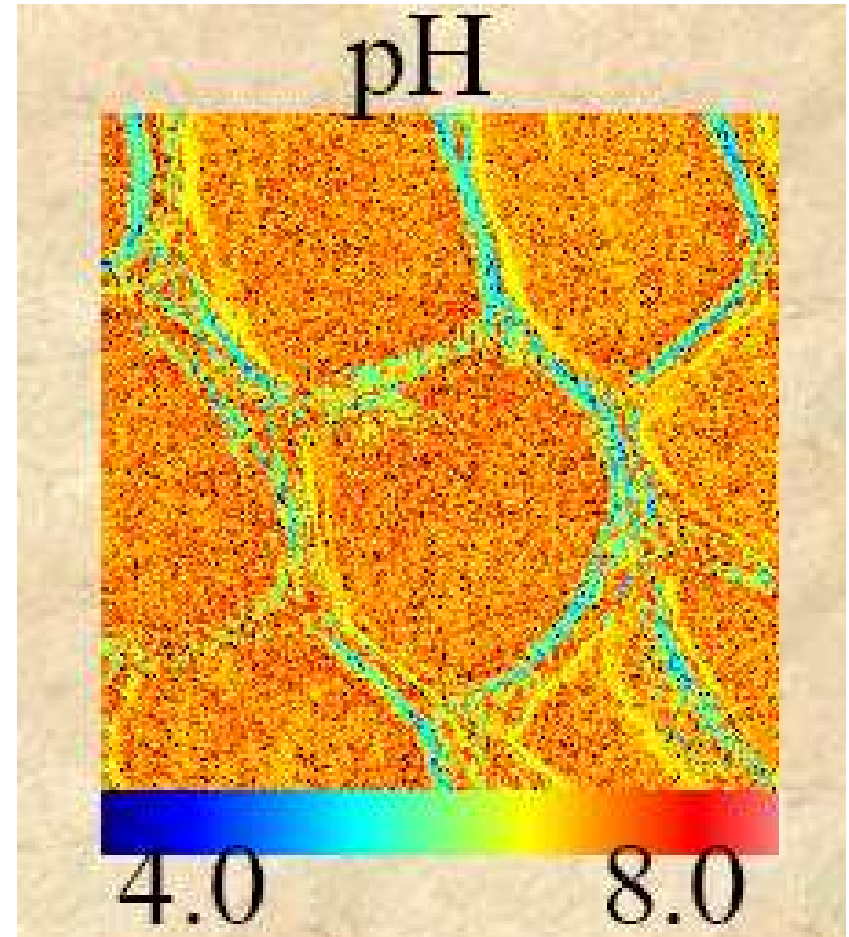


<http://www.thedesignmatrix.com/content/life-secrets-revealed-by-a-molecular-green-lantern/>

Funkční fluorescenční mikroskopie



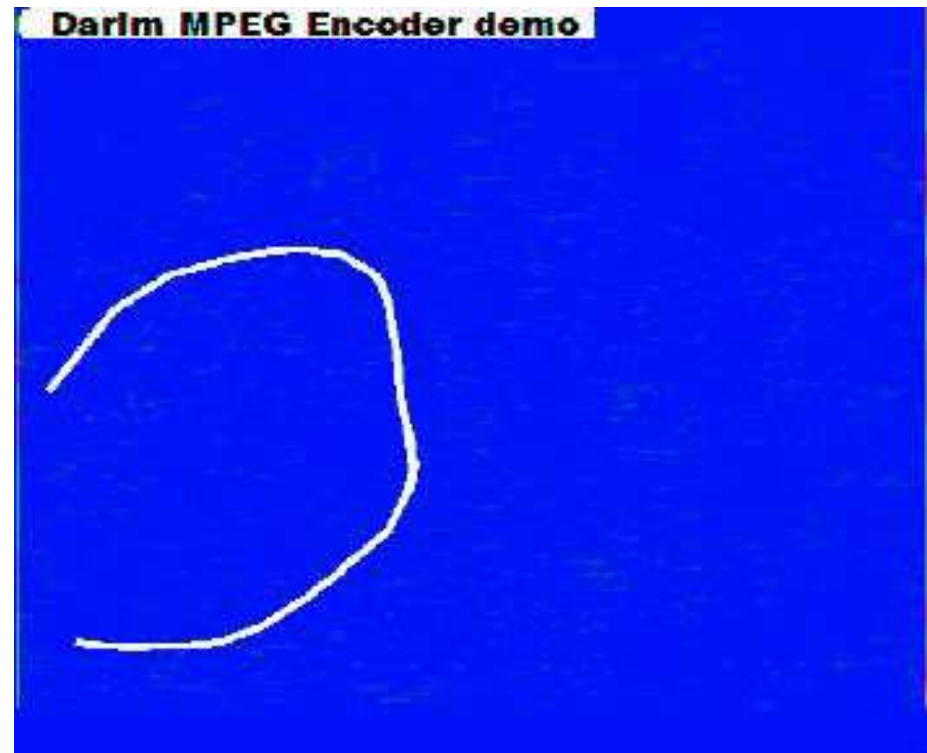
www.pco.de/data/CalciumOverlay_GalleryXL.jpg



Vápníkové vlny

Šíření intercelulárních Ca^{2+} vln z astrocytů do endoteliálních buněk

Spuštění intercelulární Ca^{2+} vlny je způsobeno mechanickou stimulací (šipka) gliové buňky, která se šíří mezi gliovými buňkami a do sousedních endoteliálních buněk. Bílá čára označuje hranici mezi endoteliálními a gliovými buňkami. Leybaert et al., (1998), *Glia*, 24, 398 - 407. Interval mezi obrázky = 0,3 s.



<http://users.umassmed.edu/michael.sanderson/mjslab/MOVIE.HTM>

Závěr

- Fluorescenční spektroskopie je použitelná na škále od molekul až po velké systémy
- Může být využita jak pro prostou vizualizaci tak pro funkční charakterizaci
- Největšími výhodami jsou extrémní citlivost, neinvazivnost a široká škála použitelných technik