

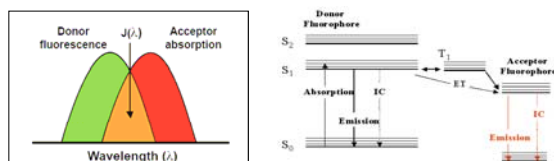
## FRET

### Fluorescence Resonance Energy Transfer

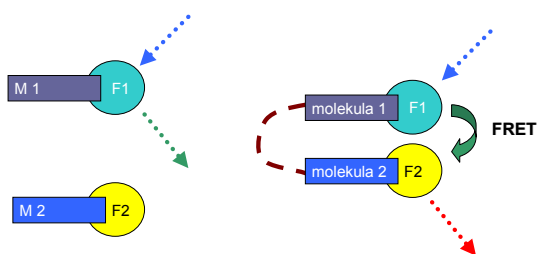
## FRET

- **FRET je Fluorescence Resonance Energy Transfer** – Fluorescenční rezonanční energetický transfér
- podle objevitele Förster nazýván také **Förster Resonance Energy Transfer**
- přenos energie mezi dvěma fluorofory vzdálenými 10-100 Å

1. první fluorofor (donor) je excitován specifickou vlnovou délkou
  2. místo fluorescence je energie přenesena na druhý fluorofor (akceptor)
  3. Akceptor vyzáří přijatou energii ve formě světla
- Podmínky:
- a) vzdálenost mezi molekulami je menší, než 100 Å
  - b) emisní spektrum donoru se překrývá se absorpčním (excitačním) spektrem akceptoru
  - c) molekuly mají stejně orientovány dipólové momenty



## FRET: schéma



## Základní vztahy

- účinnost FRET  $E$  je definována:

$$E = 1 - \tau'_D / \tau_D$$

- kde  $\tau'_D$  a  $\tau_D$  jsou fluorescenční časy vyhasínání v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

$$E = 1 - F'_D / F_D$$

- $F'_D$  a  $F$  jsou intenzity fluorescence v přítomnosti a bez přítomnosti akceptoru

## Základní vztahy

- účinnost ( $E$ ) závisí na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem ( $r$ )

$$E = \frac{1}{(1 + (r/R_0)^6)}$$

- $R_0$  je Försterova vzdálenost při které je účinnost přenosu 50%

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{23} \kappa^2 n^{-4} Q_0 J$$

- $R_0$  závisí na integrálu překryvu emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru ( $J$ )
- $\kappa^2$  je faktor zahrnující dipólové orientace, pro volně rotující molekuly je většinou 2/3
- $n$  je refrakční index,  $Q_0$  je kvantový výtěžek samotného donoru

## FRET

Donor	Acceptor	$R_0$ (Å)	Ref
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	49-56	13
IAEDANS'	FITC	49	13
IAEDANS'	5-(Iodoacetamido)fluorescein	49	13
Fluorescein	Fluorescein	44	13
EDANS	DABCYL	33	In House
Tryptophan	IAEDANS'	22	7
Tryptophan	Dansyl	21-24	7
Tryptophan	Pyrene	28	7
Dansyl	Fluorescein	53-61	14
Naphthalene	Dansyl	22	13
Pyrene	Coamarn	39	13
Bis(phenyl)ethyne	Cy5	79	13

www.anaspec.com

## FRET

Quencher (Acceptor)	$\lambda_{em}$ (in nm)	Amine Reactive	Thiol Reactive	Carboxy Reactive (NH <sub>2</sub> -Containing)	Recommended FRET Donor
DNP	348	DNP-X, acyl DNP-X, SE	DNP-C2 maleimide	DNP-C2 amine	Abz, Abz(N-Me), MCA, Trp
DABCYL	485	DABCYL, acyl DABCYL, SE	DABCYL-C2 maleimide	DABCYL-C2 amine	EDANS, AMCA, Hilyte Fluor™ 430
DABCYL Fluor™	486	DABCYL Fluor™ acyl DABCYL Fluor™, SE	DABCYL Fluor™ C2 maleimide	DABCYL Fluor™ C2 amine	EDANS, AMCA, Hilyte Fluor™ 430
QXL™ 490	488	QXL™ 490, acyl QXL™ 490, SE	QXL™ 490 C2 maleimide	QXL™ 490 C2 amine	EDANS, AMCA, Hilyte Fluor™ 430
QXL™ 520	508, 530	QXL™ 520, acyl QXL™ 520, SE	QXL™ 520 C2 maleimide	QXL™ 520 C2 amine	FAVA, FITC, Rh6G, Hilyte Fluor™ 488
QXL™ 570	538, 577	QXL™ 570, acyl QXL™ 570, SE	QXL™ 570 C2 maleimide	QXL™ 570 C2 amine	Cy3, TAMRA, ROX, Hilyte Fluor™ TR
QXL™ 610	594, 628	QXL™ 610, acyl QXL™ 610, SE	QXL™ 610 C2 maleimide	QXL™ 610 C2 amine	ROX, Texas Red®, Hilyte Fluor™ TR
QXL™ 670	665	QXL™ 670, acyl QXL™ 670, SE	QXL™ 670 C2 maleimide	QXL™ 670 C2 amine	Cy5, Hilyte Fluor™ 647

www.anaspec.com

## Aplikace

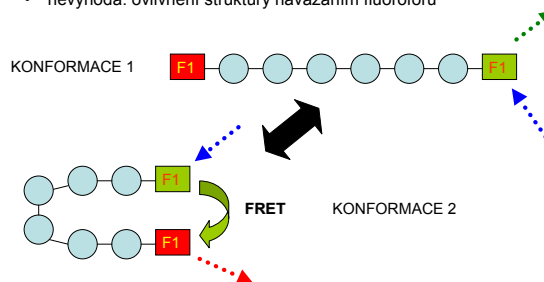
• sledování strukturálních a konformačních změn (dvě molekuly (případně dvě části molekuly) jsou označeny donorem a akceptorem a sledujeme zda dochází k výměně energie

• sledujeme: studium struktury proteinů, polynukleotidů, DNA, protein-protein interakce, DNA-protein interakce, atd.

• analytické aplikace

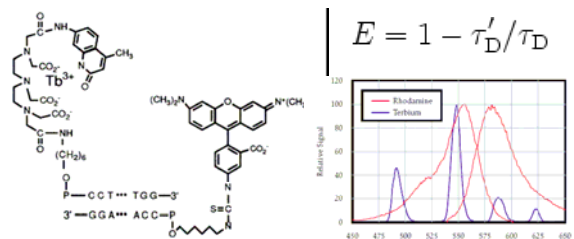
## Sledování změn konformace molekuly

- např. sledování změn struktury proteinu, případně jiných biopolymerů
- nevýhoda: ovlivnění struktury navázáním fluoroforů

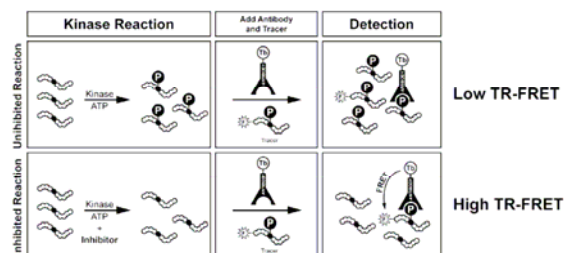


## Sledování interakcí mezi vlákny DNA

- vzdálenost mezi vlákny DNA spojenými vodíkovými můstky je 30-60 Å
- na větší vzdálenosti: donor obsahuje Ln<sup>3+</sup>

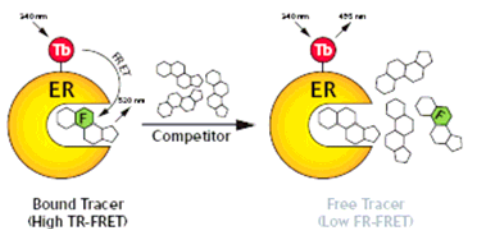


## Analytické aplikace FRET



www.invitrogen.com

## Analytické aplikace FRET

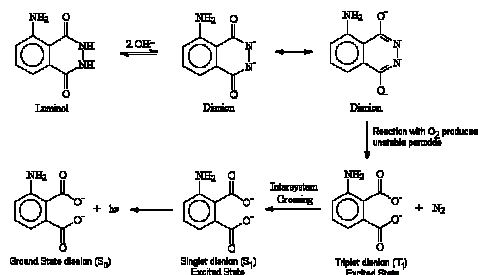


## Chemiluminescence

- zdrojem excitace je chemická reakce
- $$A + B \rightarrow X^* \rightarrow \text{Produkt} + \text{světlo}$$
- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton

[http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Chemoluminescent\\_reaction.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Chemoluminescent_reaction.jpg)

## Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



## Chemiluminiscenční reakce

- reakce luminolu v zásaditém prostředí s kyslíkem (peroxid, vzdušný kyslík) → modře fluoreskující roztok
- jestliže jsou v roztoku obsaženy také  $\text{Fe}^{2+}$ , nebo  $\text{Cu}^{2+}$  (katalýza reakce) dochází k zvýšení intenzity luminiscence

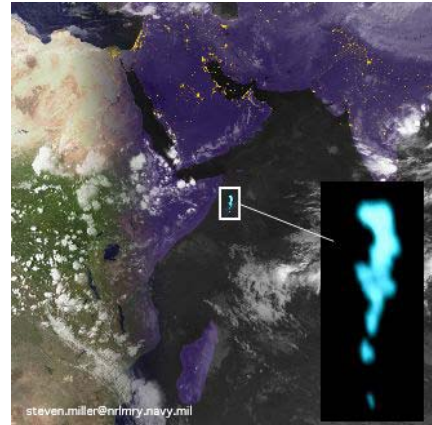


<http://people.howstuffworks.com/luminol.htm>

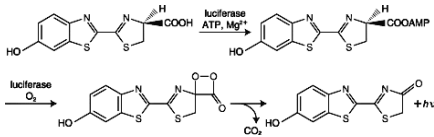
## Bioluminiscence

- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo
- v roce 1887 profesor Duboise izoloval ze světlušek dvě látky: luciferin a luciferázu
- na zemi světélkují zejména brouci z čeledi Lampyriade (světlušky) a někteří kovařci (např. Pyrophorus noctilucus)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakatice, ryby, paryby, atd.
- bioluminiscence živočichů je vysvětlována různými důvody: hledání partnera (světlušky), lákání kořisti (např. ryba zubatka, některé druhy světlušek, žraloček brazilský), zastrašení nepřátel (ryba stříbrnák, medusy z čeledi klanonožců).

## Světlušky...



## Luciferin



## Luciferin

- luciferin se za přítomnosti katalyzátoru luciferázy a oxiduje kyslíkem na oxyluciferin
- přeměna 1 molekuly luciferinu na oxyluciferin je doprovázena emisí 1 fotonu (namodralé světlo)
- u tohoto děje se 1 molekula ATP přemění na ADP
- u některých organismů je tzv. fotoprotein – kyslík, luciferin a luciferáza se nacházejí blízko sebe, ale teprve změna konformace fotoproteinu spustí chemickou reakci („aktivátorem“ jsou většinou ionty Ca<sup>2+</sup>)

## Bioluminiscence medusy *A. Victoria*

Většina mořských živočichů jevících bioluminiscenci emituje namodralé světlo (základem je oxidace luciferinu). U medusy *Aequorea Victoria* však byla pozorována **zelená** luminiscence...

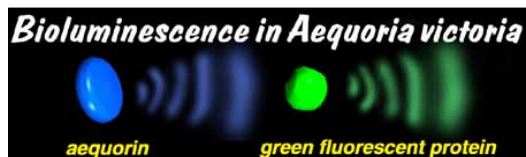


## Bioluminiscence medusy *A. Victoria*

- medusa obsahuje protein aequorin, který se skládá s apoproteinu (apoaequorin) a prostetického proteinu (coelenterazine), který je podobný luciferinu
- v přítomnosti O<sub>2</sub> a při vysoké hladině Ca<sup>2+</sup> dojde k oxidaci coelenterazinu na excitovaný coelenteramid a CO<sub>2</sub>
- relaxací coelenteramidu do základního stavu se uvolňuje modré světlo (λ = 469 nm)
- uvolněné světlo může být absorbováno dalším proteinem obsaženým v těle medusy – GFP

## „Green fluorescent protein“

- absorpční maxima GFP jsou 395 a 475 nm ~ může dojít k absorpci světla uvolněného z aequorinu
- absorbované světlo excituje GFP a dochází k vyzáření zeleného světla ( $\lambda = 509$  nm)

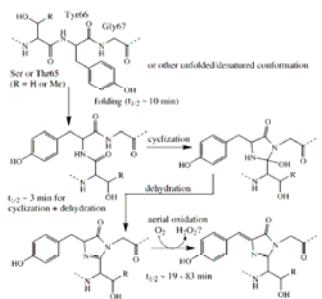


## Struktura GFP

- GFP byl objeven Shimamurov v 60. letech
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...

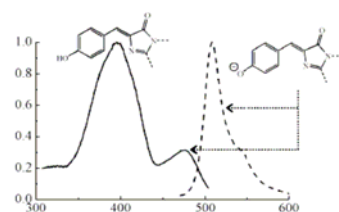
## Struktura GFP

- GFP vzniká cyklizací, dehydratací a oxidací vzdušným kyslíkem sekvence proteinu obsahující Ser-Tyr-Gly



Tsien Y. R., *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67:509–44.

## Fluorescenční vlastnosti GFP



„Divoký“ typ GFP – směs fenolového a fenolátového derivátu

Hlavní excitační pík - 395 nm (emisní maximum - 508 nm)  
 Minoritní excitační pík - 475 nm (emisní maximum - 503 nm)

## Použití GFP v chemii a biologii

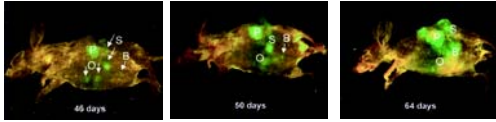
- lze připravit protein, který obsahuje sekvenci (např. Ser-Tyr-Gly), který má vlastnosti stejné jako ostatní proteiny, ale je mnohem lépe detegovatelný
- genové inženýrství – sekvenci z DNA medusy, která je zodpovědná za tvorbu GFP lze vpravit do DNA jiného organismu, např. i savce...



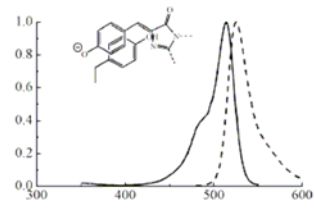
GFK – Green Fluorescent Králík

## Použití GFP v chemii a biologii

- nejde o bioluminiscenci (chemiluminiscenci), ale o fotoluminiscenci (excitace lampou, nebo laserem)
- obecně lepší rozlišení při sledování mikroskopem
- sledování genové exprese
- medicína a biologie: sledování metastáze tumoru

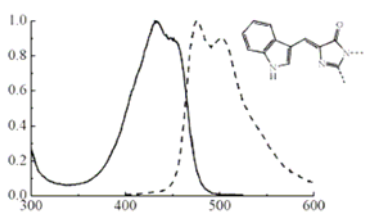


## Jiné varianty GFP - YFP



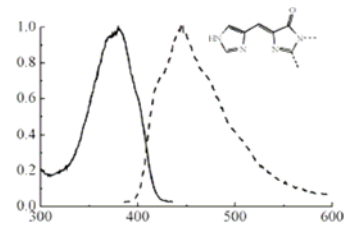
$\pi$ -electronový „stocking“ s dalším Tyr (tzv. class 4)  
516 nm  $\rightarrow$  529 nm  
zelenožlutá luminiscence – YFP (yellow fluorescent protein)

## Jiné varianty GFP



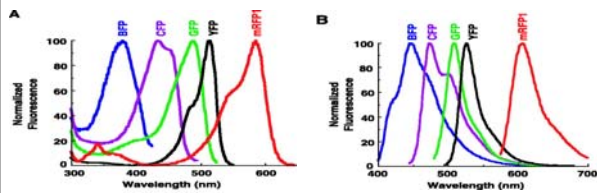
TYR je nahrazen indolem (tzv. class 5)  
436 nm  $\rightarrow$  476 nm  
modrozelená luminiscence, rozštěpení pík

## Jiné varianty GFP - BFP



TYR je nahrazen imidazolem (tzv. class 6)  
383 nm  $\rightarrow$  447 nm  
modrá luminiscence – BFP (Blue Fluorescent Protein)

## Jiné varianty GFP



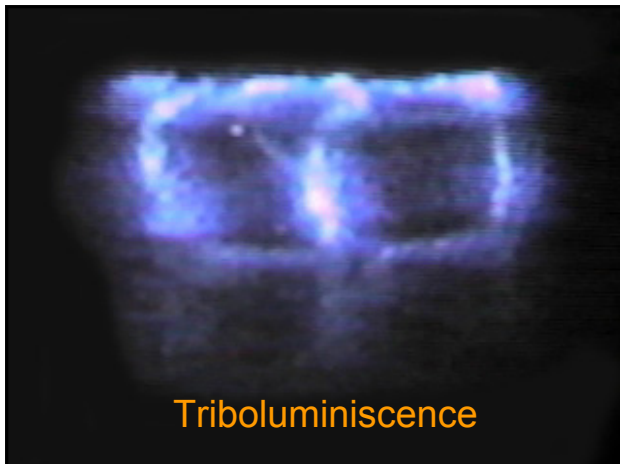
## BRET

- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- sledování interakcí v živých organismech
- možnost sledování interakcí (podobně jako FRET), ale alespoň jeden z fluoroforů se ve sledovaném organismu vyskytuje přirozeně



## Elektroluminiscence

- materiál emituje světlo působením procházejícího proudu, nebo působením elektrického pole
- většinou se jedná o tzv. radiační rekombinaci (zánik páru díra-volný elektron)
- příklady elektroluminiscenčních materiálů: ZnS dopovaný Ag, nebo Cu



## Triboluminiscence

- při škrábání, drcení, nebo tření může dojít k přerušení asymetrických vazeb krystalu (cukr, diamant)
- náboj je po přerušení asymetrických vazeb nerovnoměrně rozložen
- při vyrovnání nábojů v krystalu dochází k luminiscenci

## Thermoluminiscence

- přírodní krystalické materiály obsahují poruchy v krystalické mřížce (např. obsahují volné ionty, které narušují elektrické pole krystalu)
- jestliže se vytvoří tzv. potenciálová díra v elektrickém poli, může se v ní usadit volný elektron (elektronová past)
- tento volný elektron může být excitován (vesmírné záření, radioaktivita) a v elektronové pasti může být jeho energie zachována i stovky, nebo tisíce let
- termoluminiscenční datování: zahříváním, nebo po ozáření silným světlem získá elektron v tzv. dlouhodobé elektronové pasti dostatek energie, aby se uvolnil
- uvolněná energie se měří
- vhodné pro datování látek, které byly v minulosti ozářeny
- nutná složitá kalibrace