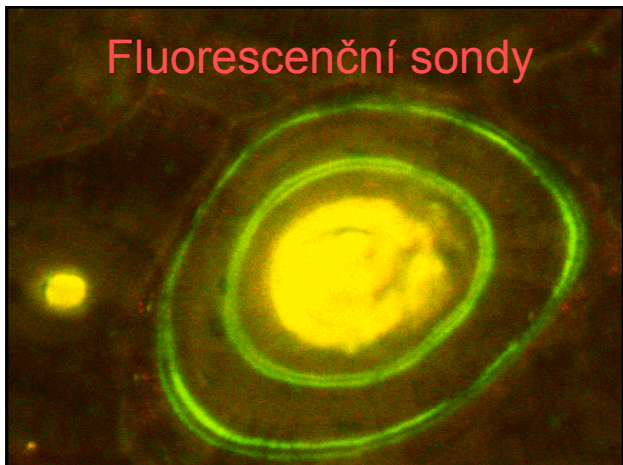


Fluorescenční sondy



Fluorescenční sondy

- vnější fluorofory, které se ke sledovaným molekulám, iontům, atd. váží nekovalentní vazbou
- změna fluorescenční vlastností (intenzita emise, posun emisního maxima, změna času vyhasínání)
- Princip: různý vliv na Franck-Condonův excitovaný stav

Fluorescenční sondy pro využití v analytické chemii, medicíně a biologii

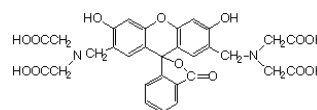
- kromě měření emisních spekter se využívá zejména fluorescenční mikroskopie, zhášení (emise i času vyhasínání)
- fluorescenční indikátory: sondy citlivé na určitou látku (většinou anion, či kation)
- sondy pro polaritu prostředí
- membránové sondy
- fluorescenční sondy pro nukleové kys.
- další
- www.molecularprobes.com

Indikátory pro anorganické ionty

- **disociační konstanta** – musí být srovnatelná s měřenou koncentrací kationu (koncentrace menší než desetina nebo větší než desetinásobek disociační konstanty způsobují příliš malé změny v pozorovaném signálu)

- pro sondy, u kterých dochází k nárůstu intenzity fluorescence platí vztah:

$$c_a = K_d (I - I_{\min}) / (I_{\max} - I)$$



Indikátory pro anorganické ionty

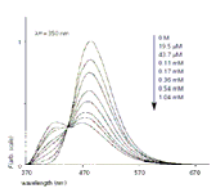
pro sondy, které vykazují spektrální posun se používá:

$$c_a = K_d (S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2)) (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

kde $R = I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$ je poměr intenzit pro dvě excitační vlnové délky λ_1 a λ_2 , R_{\min} a R_{\max} jsou poměry pro sondu volnou a plně obsazenou analytem,

$S_F(\lambda_2)/S_B(\lambda_2) = \epsilon_F \Phi_F / \epsilon_B \Phi_B$, ϵ - extinkční koeficienty, Φ - kvantové výtěžky sondy

excitované při λ_2 .

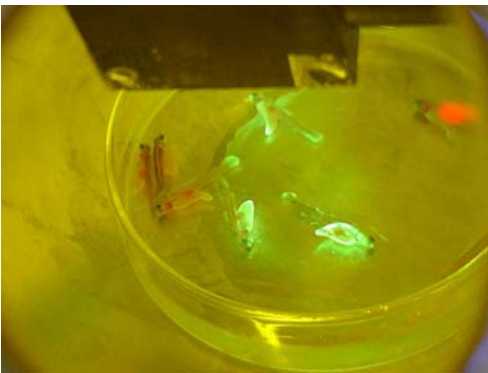
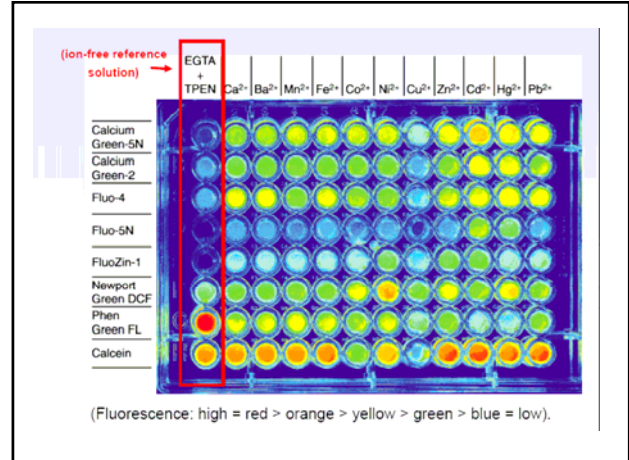
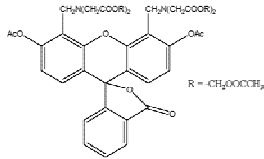


Indikátory pro anorganické ionty

- nejčastěji indikátory Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Na^+ nebo K^+
- indikátory jsou zpravidla chelatační činidla
- různé obchodní názvy (např. Fura-2, Calcium Green, Indo, atd.)

Stanovení Ca²⁺

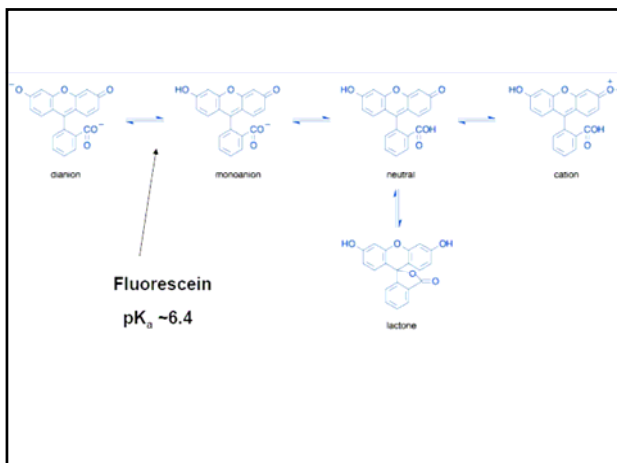
- stanovení Ca²⁺ pomocí fluorexonu (calceinu)
- analytické stanovení Ca²⁺ (i v přítomnosti Mg²⁺) – vymizení fluorekujícího komplexu Ca²⁺-fluorexon při titraci pomocí EDTA v zásaditém prostředí



Calceinem značený losos...

Indikátory pH

- použití pH indikátorů: kam nemůžeme dát pH elektrodu – např. buňky, živé tkáně, atd.
- buněčné pH se pohybuje mezi 6.8 – 7.4
- možnost měřit pH na dvě desetinná místa

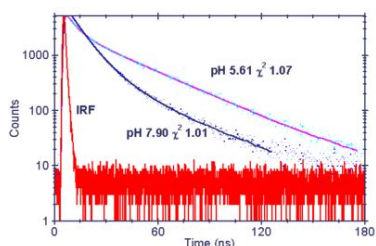


Indikátory pH

fluorofor	rozsah pH	způsob měření
SNARF indikátory	7,2-8,2	Ex 490/540 nebo Em 540/630
SNARF indikátory	6,0-8,0	Em 580/640
HPTS (pyranin)	7,0-8,0	Ex 450/405
BCECF	6,5-7,5	Ex 490/440
Fluoresceiny a karboxyfluoresceiny	6,0-7,2	Ex 490/450
LysoSensor Green DND-189	4,5-6,0	Em 520
Oregon Green indikátory	4,2-5,7	Ex 510/450 nebo Ex 490/440
LysoSensor Yellow/Blue DND-160	3,5-6,0	Em 450/510

„lifetime“ pH indikátory

- čas vyhasínání ovlivněn hodnotou pH
- výhoda: při měření tau nezáleží na koncentraci indikátoru

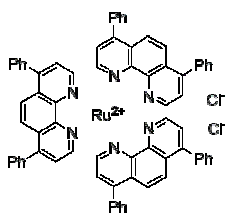


Sondy pro detekci plynů rozpuštěných v biologických kapalinách

- nejčastěji detekce O₂, nebo NO
- „lifetime“ sondy
- nejčastěji na principu oxidace centrálního iontu obsaženého v sondě, nebo dynamickým zhášení kyslíkem
- luficerin, luminol...

Rutheniové sondy

Ukázka: kyslíkové sondy používané k detekci kyslíku v kůži (www.molecularprobes.com)



Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride (abs. λ_{max} 455 nm, luminescence λ_{max} 613 nm)

Sondy pro měření polaroty prostředí

- Často se mění i kvantový výtěžek a doba vyhasínání fluorescence
- Polarita prostředí ovlivňuje většinu fluoroforů (např. tryptofánu)
- Polarita blízkého okolí fluoroforu může být dána konformací biomolekuly

Příklad sondy pro studium polaroty prostředí

Typickými sondami pro dynamickou polaritu jsou **1-anilino-naftalén-8-sulfonát (ANS)** a **2-p-toluidino-naftalén-6-sulfonát (TNS)**. S rostoucí polaritou prostředí se emisní spektrum posouvá k vyšším vlnovým délkám.

Fluorescenční vlastnosti ANS v různých prostředích

rozpuštědlo	$\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$ (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

Membránové fluorescenční sondy

- membránové struktury obvykle neobsahují fluorofory (většinou se jedná o nepolární uhlovodíkové řetězce – zbytky mastných kyselin), proto se jejich vlastnosti zkoumají pomocí sond
- transport a metabolismus lipidů v živých buňkách
- recyklace synaptosomů
- přenos signálu zprostředkovaný lipidy
- membránový potenciál
- interakce léčiv s membránou
- transport membránou
- mikroviskozita membrán a teplotní fázové přechody

Rozdělení membránových sond

1. fluorescenčně značené lipidy
2. malé lipofilní organické fluorofory

Fluorescenčně značené lipidy

- **mastná kyselina** je označena vhodným fluoroforem (nitrobenzoxadiazol (NBD), BODIPY, pyrén nebo dansyl)
- **fosfolipid** jsou značený buď v oblasti polárních hlaviček (dansyl, NBD, BODIPY, fluorescein, tetrametylrhodamin, Oregon blue, Oregon green, Texas red a dalšími), nebo v oblasti zbytků mastných kyselin (DPH, NBD, pyrén, BODIPY)
- značení **sfgolipidů, steroidů, triglyceridů, lipopolysacharidů**

Malé lipofilní, nebo amfifilní organické fluorofory

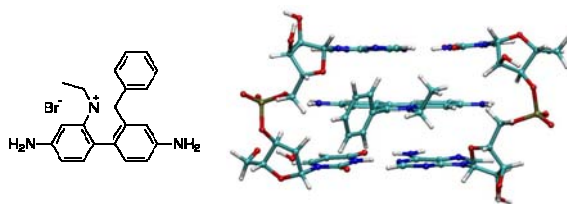
- malé molekuly, které podávají informaci o charakteristikách svého mikrookolí, jako je polarita, viskozita a uspořádání lipidů.
- typickým příkladem je nepolární sonda **DPH** (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien) – je ve vodě nerozpustná, fluoreskuje jen v nepolárním prostředí biologických membrán

Ukázky nepolárních malých sond



Fluorescenční sondy pro NK

- Vizualizace a identifikace RNA a DNA (nukleové báze mají jeví slabou luminiscenci)
- Různé principy interakce, např. „vmezezení“ (interkalace) barviva do šroubovice DNA (ethidium bromid)



Ethidium bromid interkalovaný mezi pár adenin-uracil

- ethidium bromid: ve vodě fluoreskuje jen slabě, při interakci s DNA se intenzita fluorescence zvýší 30x a čas vyhasínání se zvýší z 1.7 ns na 20 ns.

Příklady sond pro NK

fluorofor	λ_{ex}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)	použití
Akridinová oranž (DNA)	500	526	prostupuje; RNA/DNA; průtoková cytometrie
Akridinová oranž (RNA)	460	650	
Ethidium bromid	518	605	neprostupuje; vmezetování do dsDNA; barvení mrtvých buněk; elektroforéza; průtoková cytometrie; ...
Propidium jodid	535	617	neprostupuje; barvení mrtvých buněk
DAPI	358	461	částečně prostupuje; buněčný cyklus; AT-selektivní; ...
Hoechst 33342	350	461	prostupuje; AT-selektivní; selektivní vazba k dsDNA; buněčný cyklus; ...
PicoGreen	502	523	ultracitlivá kvantifikace roztoků dsDNA
OligoGreen	498	518	ultracitlivá kvantifikace roztoků ssDNA a oligonukleotidů
RiboGreen	500	520	ultracitlivá kvantifikace roztoků RNA
TOTO-1	514	533	neprostupuje membránu; vysoká afinita pro nukleové kyseliny
SYTO 85 orange	567	583	prostupuje membránu

Studium vazných míst biomolekul

- „calcium binding sites“ – místa v proteinech, kde se váže Ca^{2+}
- při studiu interakcí je možné nahradit vápenaté ionty Ln^{3+} (nejčastěji Eu^{3+} , nebo Tb^{3+})
- Ln^{3+} mají podobné vlastnosti jako Ca^{2+} , ale mají výborné luminiscenční vlastnosti
- podobný iontový poloměr
- koordinační číslo Ca^{2+} (až 8) je podobné koordinačnímu číslu Ln^{3+} (až 9)
- preference koordinace „tvrdými donory“
- Ln^{3+} váže 10^5 silněji než Ca^{2+}
- Ln^{3+} ligandová výměna je 100x pomalejší, než výměna Ca^{2+}
- jestliže Ln^{3+} nahradí Ca^{2+} v katalytickém místě, rychlost reakcí poklesne

Studium vazných míst Ca^{2+}

- protein thermolysin
- z luminiscenčních spekter a časů vyhasínání lze určit polohu Eu^{3+} (resp. Ca^{2+}) v biomolekule

