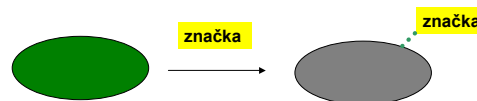


Vnější fluorofory: shrnutí

Vnější fluorofory

- **značky** (derivatizace, „labels“, „tags“) – kovalentní vazba
- **sondy** (indikátory, „probes“) – různé typy nekovalentních interakcí

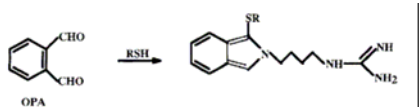


Důvody pro použití značek a sond

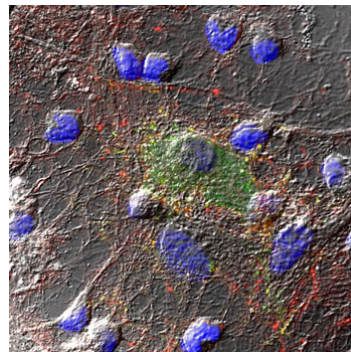
- **zvýšení citlivosti**
- **získání informace** o koncentraci analytu, o struktuře látky, o funkci molekuly v systému...
- **odvozené metody** (FRET, FIA, EIA, atd.)
- **kombinace značek a sond** (FISH, fluorescenční mikroskopie)

Značky

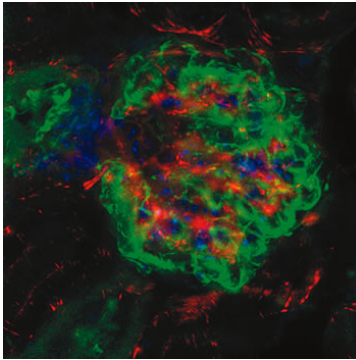
- značení molekul: „steady state“ luminiscenční spektroskopie, časově rozlišená luminiscence, luminiscenční detekce ve spojení se separačními technikami, fluorescenční mikroskopie, fluorescenční anizotropie...
- značení peptidů, proteinů, protilátek, antigenů, enzymů, NK, membrán, buněk, tkání, celých organismů...
- použití také „in vivo“
- využití: chemie, fyzika, biologie, medicína...



Ukázka derivatizačního činidla pro LIF – HPLC (CE)



převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

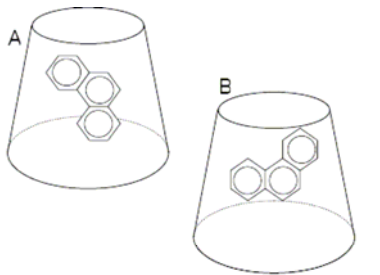


Myší játra značená různými fluorofory...

převzato z <http://www.fluorescence-microscopy.com>

Sondy

- využití: analytická chemie – detekce menších částic (ionty, malé molekuly), biologie a medicína (snadnější přístup např. do buněk)
- různé detekční systémy (mikroskopie, spektroskopie, „steady state“, časově rozlišena, atd.)
- použití „in vivo“
- membrány opticky aktivních senzorů



Axialní, nebo ekvatoriální inkluze

Fluorescenční optické senzory

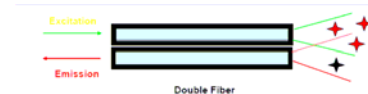
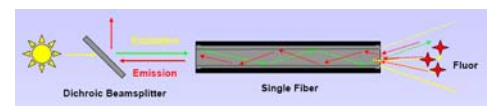
Fluorescence-based optical sensors

Fluorescenční optické senzory

- alternativa k optickým sensorům s chromofory
- pasivní a aktivní optické senzory
- senzory iontů, molekul
- různé typy interakcí...

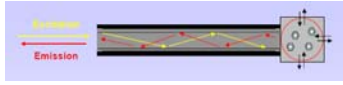
Pasivní senzory

- pasivní senzory excitují a sbírají světlo s roztoku, nebo povrchu, se kterým jsou v kontaktu

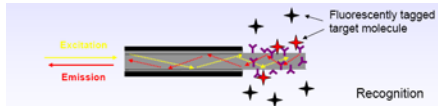


Aktivní senzory

- v koncové části senzoru je polopropustná, nebo propustná membrána, za kterou se nachází fluorofor, který může reagovat s analytem v roztoku



- např. v senzoru se mohou nacházet např. značené protilátky

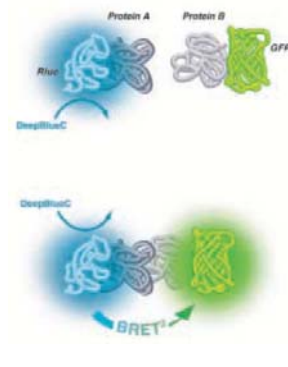


Odvozené techniky

- FRET
- BRET
- FISH
- FIA
- EIA
- a další

BRET

- podobně jako u FRET záleží na vzdálenosti mezi fluorofory – jestliže je dostatečně krátká, probíhá výměna energie (dojde k vyzáření světla druhým fluoroforem)
- u metody BRET je donorem energie luciferázou katalyzovaná oxidace coelenterazinu (z mořského koníka *Renilla*)
- jestliže je v blízkosti GFP, dojde k přenosu a následnému vyzáření zeleného světla
- možné i použití jiných molekul, např. derivátu coelenterazinu DeepBlueC (Packar Bioscience, USA)



Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



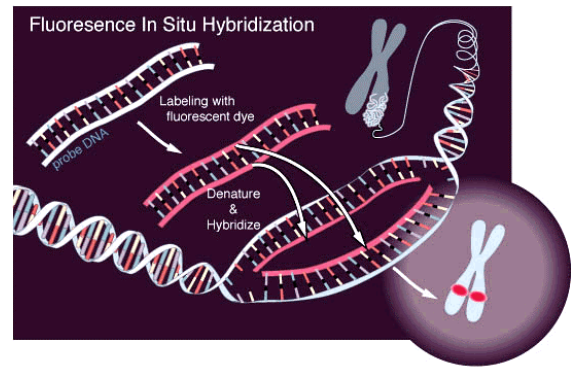
není Fish jako FISH...

FISH

- Fluorescence In Situ Hybridization je cytogenetická metoda, která umožňuje detekci a lokalizaci konkrétních sekvencí DNA v chromosomech
- tato metoda je určena k mapování genů a sledování chromosomálních abnormalit, atd.
- pro detekci se využívá fluorescenční mikroskopie

FISH

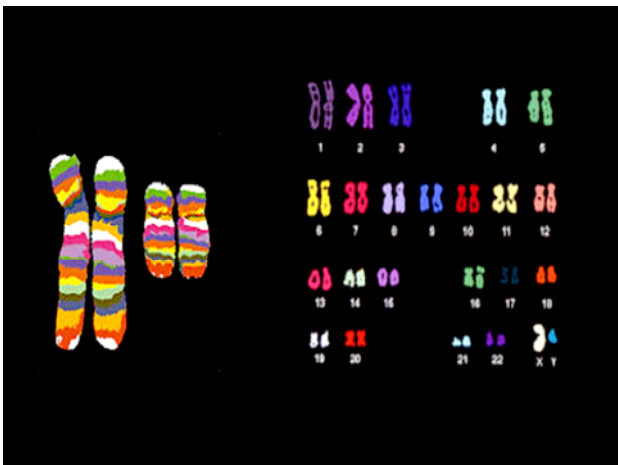
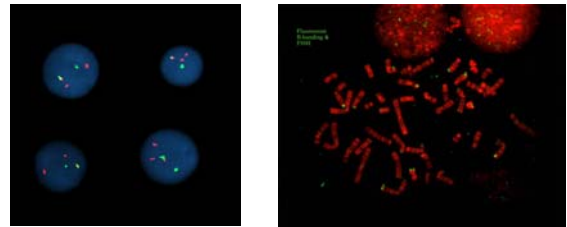
- krátký jednovláknový (single stranded) úsek DNA, který je komplementární k hledané sekvenci, je označen fluorescenční značkou
- v rozpletených úsecích DNA dochází k navázání na komplementární části
- dochází k nalezení a označení části sekvence, která kóduje zkoumaný úsek



Typy FISH

- **Locus specific probes:** jestliže izolujeme malý kousek genu a chceme vědět v kterém chromosomu se nachází
- **Centromeric repeat probes:** chromosomy obsahují opakující se sekvence. Jedním typem sondy lze obarvit velkou část chromosomu. Každý chromosom může mít jinou barvu...
- **Whole chromosome probes:** soubor více sond, které hybridizují chromosom po celé jeho délce. Tvorba tzv. spektrálního karyotu

Ukázky FISH



Bioanalytické metody

- FIA
- EIA

