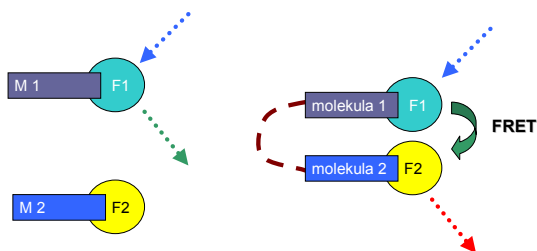


## FRET

Fluorescence Resonance Energy Transfer

## FRET: schéma



## 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

## 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

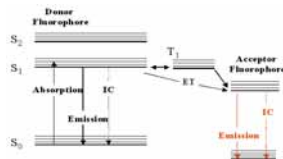
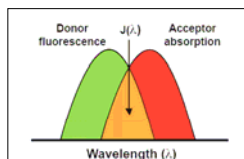
$$E = 1 - F'_D / F_D$$

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

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



## 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

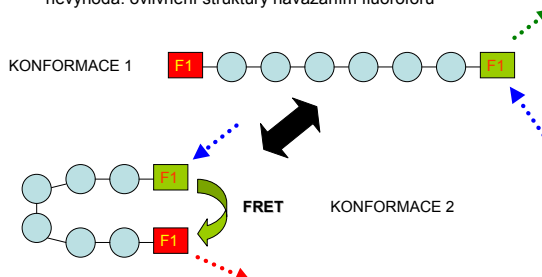
## FRET

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
Bulthecorythrin	Cys	79	13

www.anaspec.com

## Sledování změn konformace molekuly

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



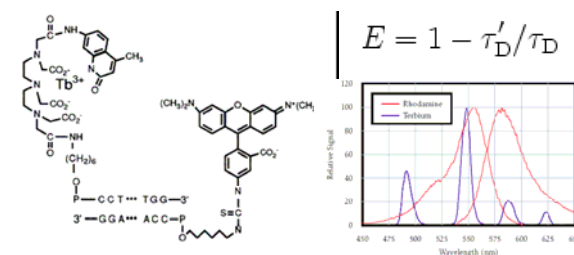
## FRET

Quencher (Acceptor)	$\lambda_{exc}$ (in nm)	Amine Reactive	Thiol Reactive	Carboxy Reactive (NH <sub>2</sub> -Containing)	Recommended FRET Donor
DNP	348	DNP-N <sub>2</sub> acid; DNP-N <sub>2</sub> SE	DNP-C2 maleimide	DNP-C2 amine	Abz, Abz(N-4M), MGA, Trp
DABCYL	485	DABCYL; DABCYL SE	DABCYL C2 maleimide	DABCYL C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
DABCYL Plus™	486	DABCYL Plus™ acid; DABCYL Plus™ SE	DABCYL Plus™ C2 maleimide	DABCYL Plus™ C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 430
QXL™ 490	498	QXL™ 490 acid; QXL™ 490 SE	QXL™ 490 C2 maleimide	QXL™ 490 C2 amine	EDANS, AMCA, HiLyte Fluor™ 488
QXL™ 520	508, 530	QXL™ 520 acid; QXL™ 520 SE	QXL™ 520 C2 maleimide	QXL™ 520 C2 amine	PAH, FITC, R18G, HiLyte Fluor™ 488
QXL™ 570	578, 577	QXL™ 570 acid; QXL™ 570 SE	QXL™ 570 C2 maleimide	QXL™ 570 C2 amine	Cy3, TAMRA, ROX, HiLyte Fluor™ 13AR
QXL™ 610	594, 628	QXL™ 610 acid; QXL™ 610 SE	QXL™ 610 C2 maleimide	QXL™ 610 C2 amine	ROX, Texas Red®; HiLyte Fluor™ TR
QXL™ 670	665	QXL™ 670 acid; QXL™ 670 SE	QXL™ 670 C2 maleimide	QXL™ 670 C2 amine	Cy5, HiLyte Fluor™ 647

www.anaspec.com

## 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>



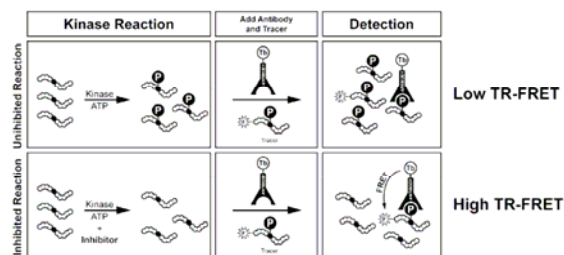
## Aplikace

• 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.

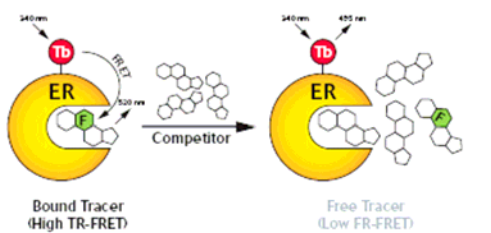
• analytické aplikace

## Analytické aplikace FRET

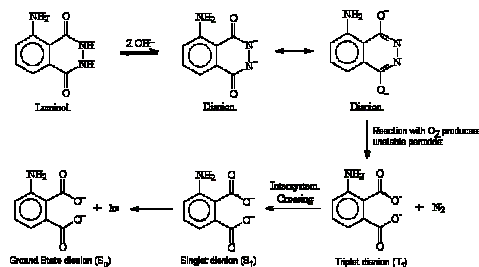


www.invitrogen.com

## Analytické aplikace FRET

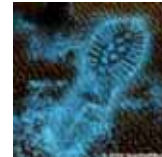


## Příklad chemiluminiscenční reakce – oxidace luminolu kyslíkem



## 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>

## Chemiluminiscence

- zdrojem excitace je chemická reakce



- z reakce jedné molekuly ~ jeden foton

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

## Bioluminiscence

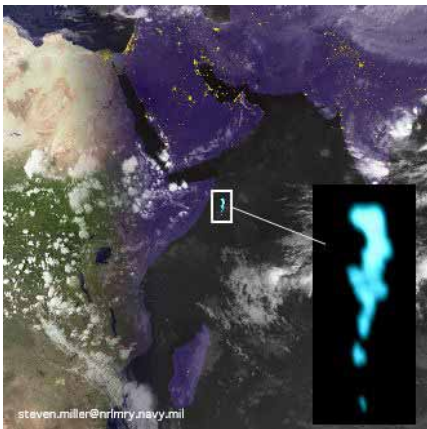
- celkem je známo asi 550 druhů organismů, které produkují luminiscenční světlo
- v roce 1887 profesor Duboise izoloval ze světlušek dvě látky: luciferin a luciferázu
- na zemi světélkují zejména brouci z čeledi Lampyriade (světlušky) a někteří kovařci (např. Pyrophorus noctilucus)
- v moři bylo zatím objeveno přibližně světélkujících 250 druhů: medusy, chobotnice, krakalice, 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...



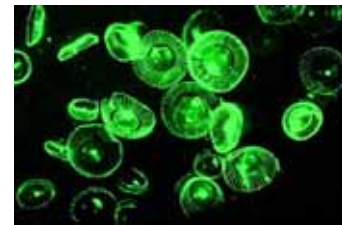
## Luciferin

- luciferin 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  $\text{Ca}^{2+}$ )

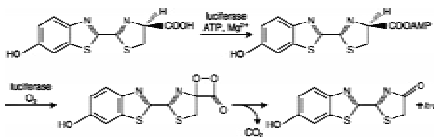


## Bioluminiscence medusy *A. Victoria*

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



## Luciferin

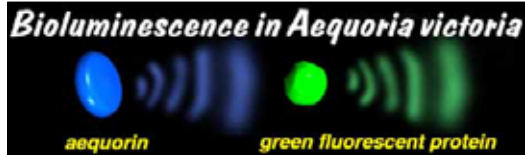


## Bioluminiscence medusy *A. Victoria*

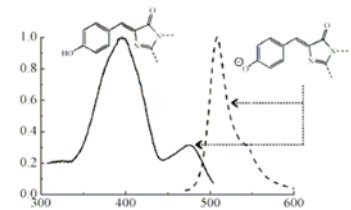
- medusa obsahuje protein aequorin, který se skládá s apoproteinu (apoequorin) a prostetického proteinu (coelenterazine), který je podobný luciferinu
- v přítomnosti  $\text{O}_2$  a při vysoké hladině  $\text{Ca}^{2+}$  dojde k oxidaci coelenterazinu na excitovaný coelenteramid a  $\text{CO}_2$
- relaxaci coelenteramidu do základního stavu se uvolňuje modré světlo ( $\lambda = 469 \text{ nm}$ )
- 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)



## 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)

## Struktura GFP

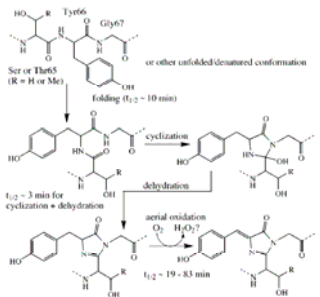
- GFP byl objeven Shimamurou v 60. letech
- GFP obsahuje běžné aminokyseliny, ale ve slunečním světle jeví lehce nazelenalou fluorescenci (kolem 500 nm), stejně jako živá *Aequorea Victoria* v moři...

## 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...

## 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.



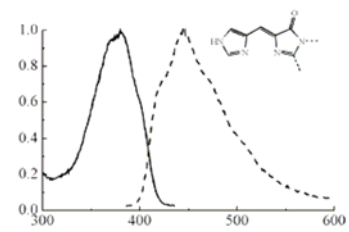
GFK – Green Fluorescent Králík

## 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 - BFP

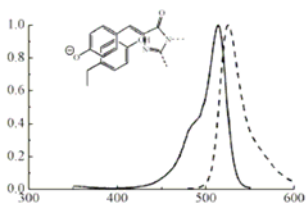


TYR je nahrazen imidazolem (tzv. class 6)

383 nm → 447 nm

modrá luminiscence – BFP (Blue Fluorescent Protein)

## Jiné varianty GFP - YFP

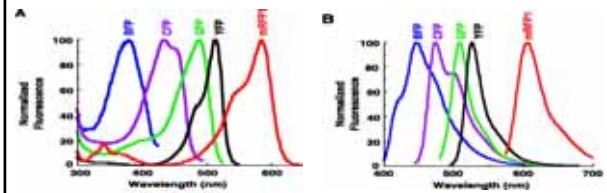


$\pi$ -electronový „stocking“ s dalším Tyr (tzv. class 4)

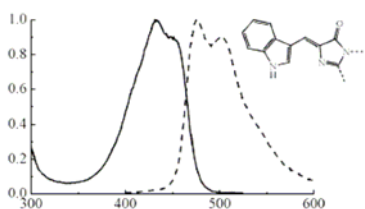
516 nm → 529 nm

zelenožlutá luminiscence – YFP (yellow fluorescent protein)

## Jiné varianty GFP



## Jiné varianty GFP



TYR je nahrazen indolem (tzv. class 5)

436 nm → 476 nm

modrozelená luminiscence, rozštěpení piků

## BRET

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



**Elektroluminiscence**

## Triboluminiscence

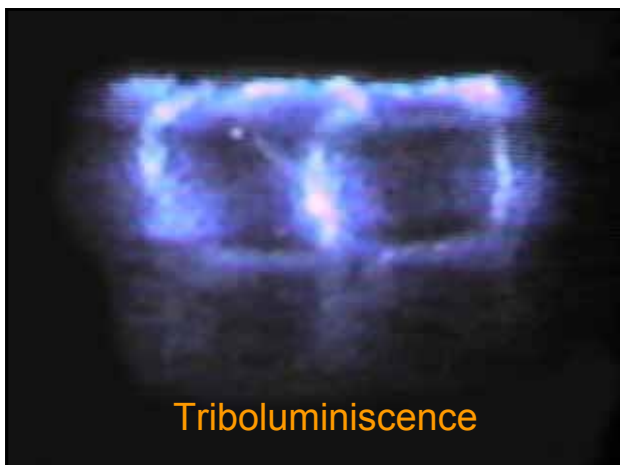
- při škrábání, drcení, nebo tření může dojít k přerušení asymetrických vazeb krystalu (cukr, diamant)
- náboj je po přerušení asymetrických vazeb nerovnoměrně rozložen
- při vyrovnání nábojů v krystalu dochází k luminiscenci

## 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

## 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



**Triboluminiscence**