



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

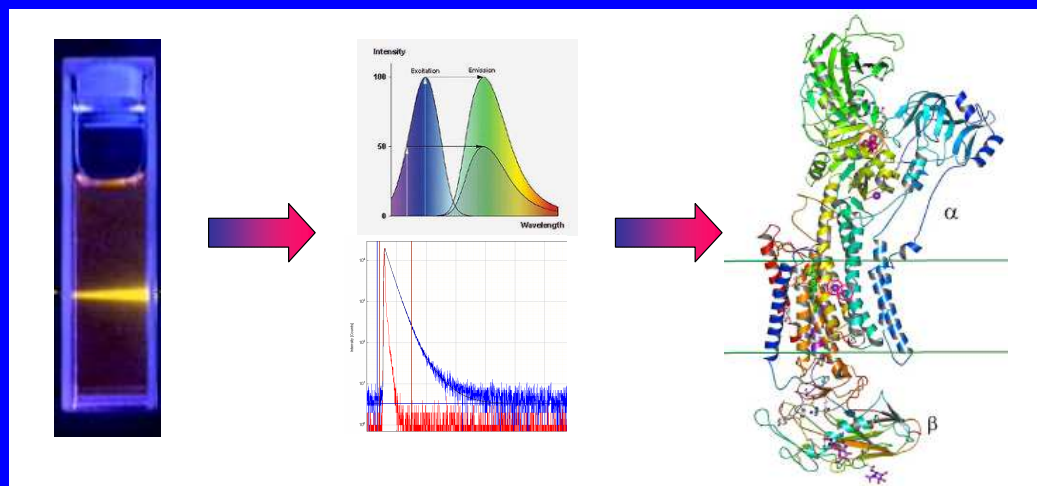
Barevné hry se světlem - co nám mohou říci o biomolekulách ?

Martin Kubala

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta, katedra biofyziky

mkubala@prfnw.upol.cz



Vzdělávání středoškolských pedagogů a studentů středních škol jako nástroj ke
zvyšování kvality výuky přírodovědných předmětů

CZ.1.07/1.1.00/14.0016

Velikosti objektů v přírodě

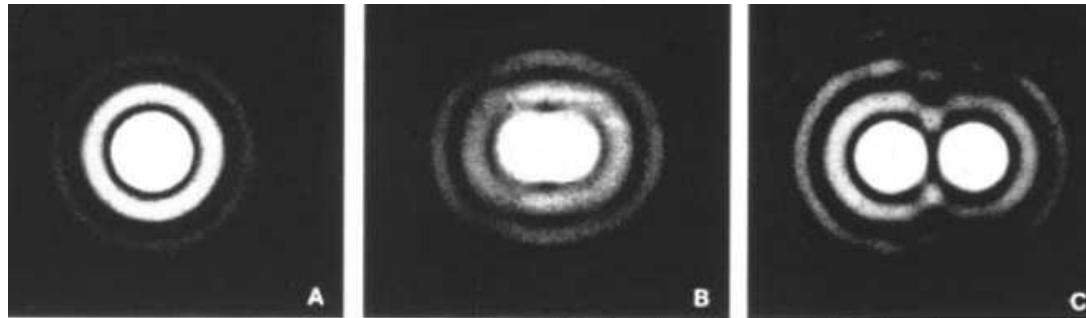
- Krajinné prvky ~ 100 m (10^2 m)
- Dítě ~ 1 m (10^0 m)
- Prst ~ 2 cm (10^{-2} m)
- Vlas ~ 0.1 mm (10^{-4} m)
- Buňka ~ 20 μm (10^{-5} m)
- Mitochondrie ~ 1 μm (10^{-6} m)
- Membrána ~ 7 nm (10^{-9} m)
- C – C vazba ~ 0.15 nm (10^{-10} m)

← Rozlišení oka
($d \sim 0,1$ mm)

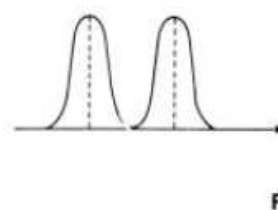
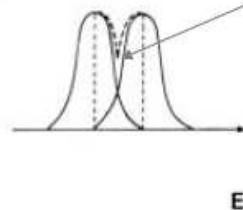
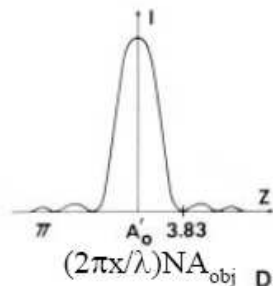
Limity optické mikroskopie

Rozlišení dvou
sousedních bodů
(Rayleighovo kritérium)

$$d = 0.61\lambda / NA$$

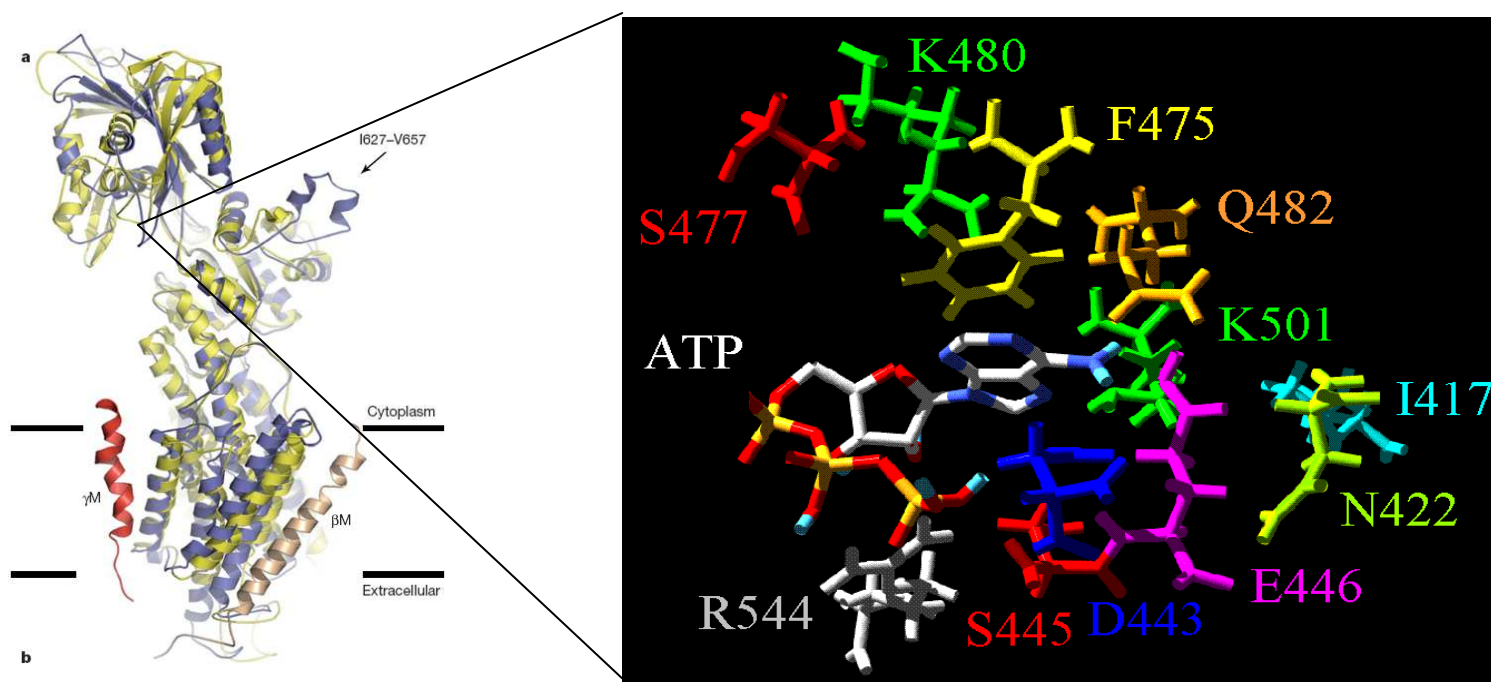


Rayleigh Criteria: Overlap by r' ,
then dip in middle is 26% below
Peak intensity



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

Struktura a interakce biomolekul



Vazba protilátek na rhinovirus (způsobuje nachlazení)



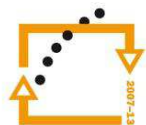
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

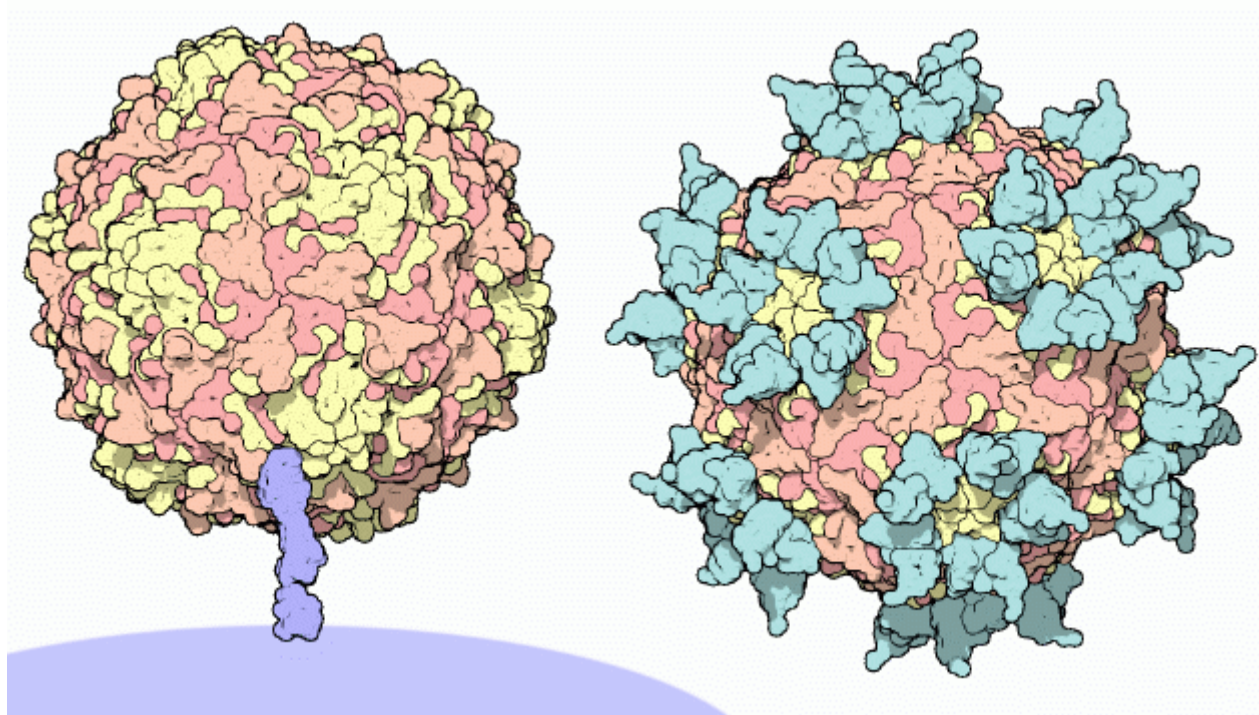


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



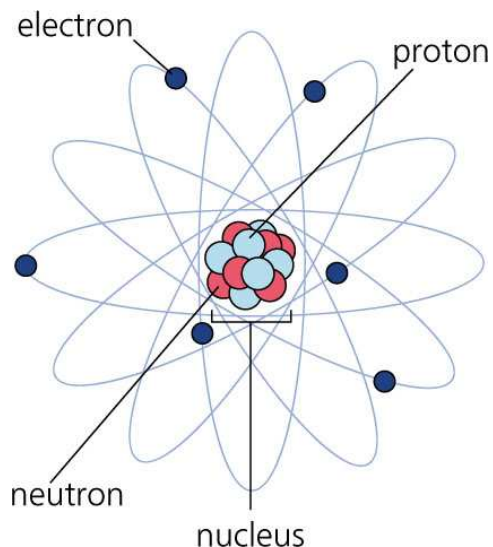
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



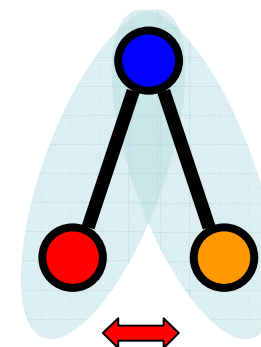
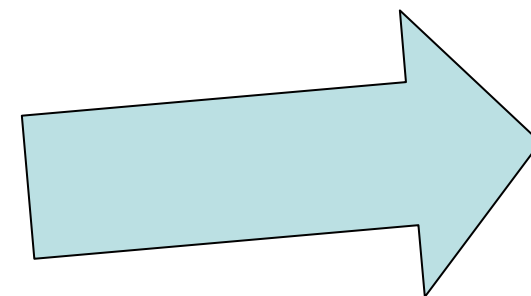
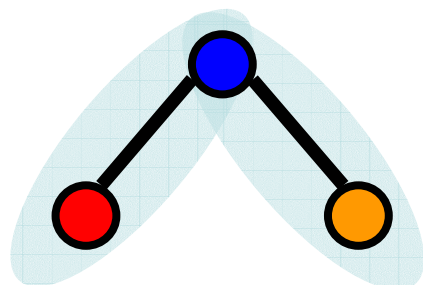
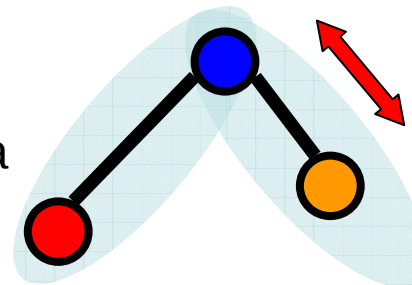
Očkovací strategie:

Modifikujeme strukturu viru tak, aby jej stále rozpoznávaly protilátky, ale aby již nemohl napadat buňky.

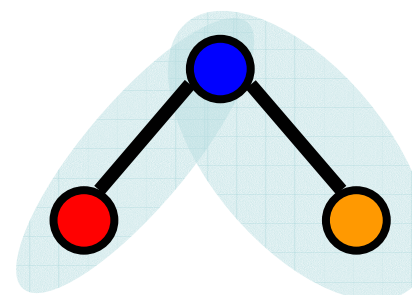
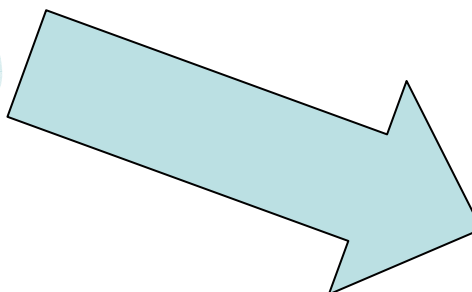


Molekuly

Pohyb jader (vibrace a
rotace)



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



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

Změny spinu
 10^{-25} J

Změny v elektronovém
obalu

Excitovaný stav

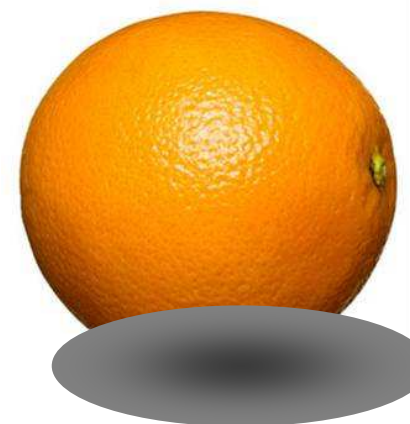
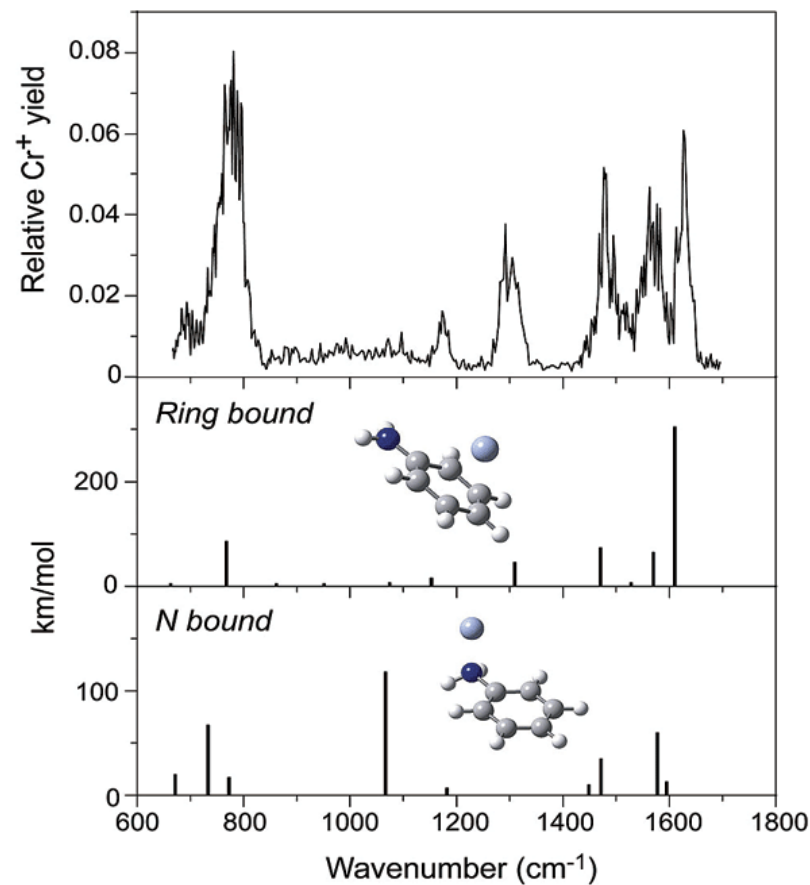


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



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



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



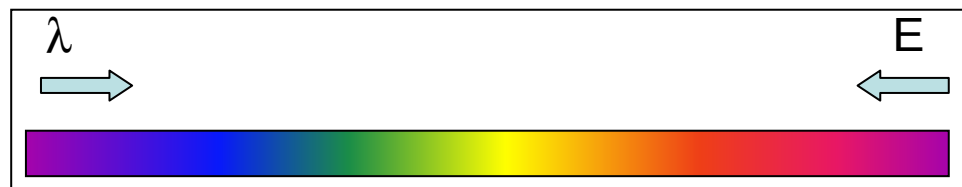
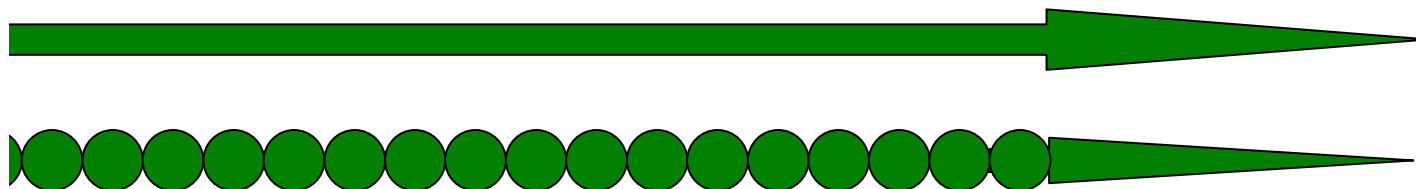
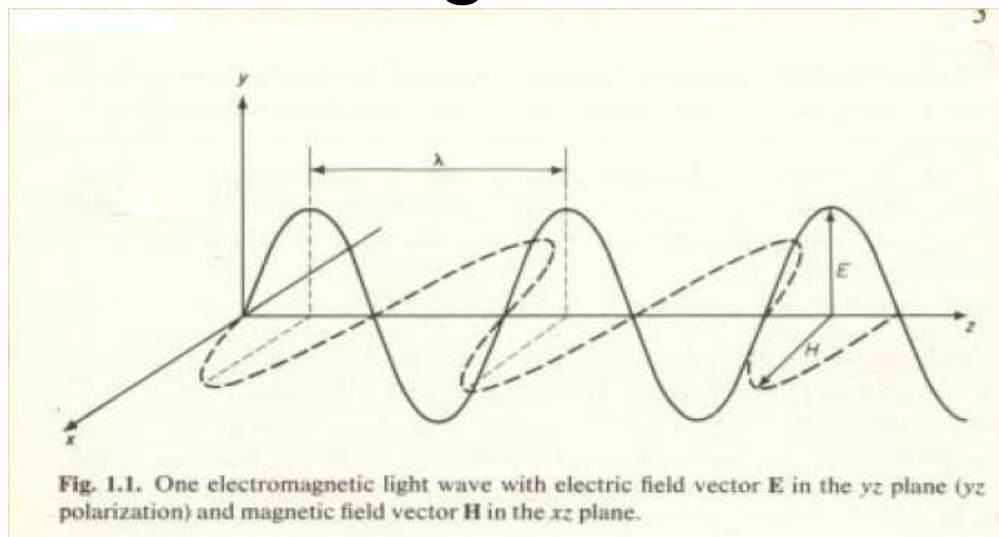
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

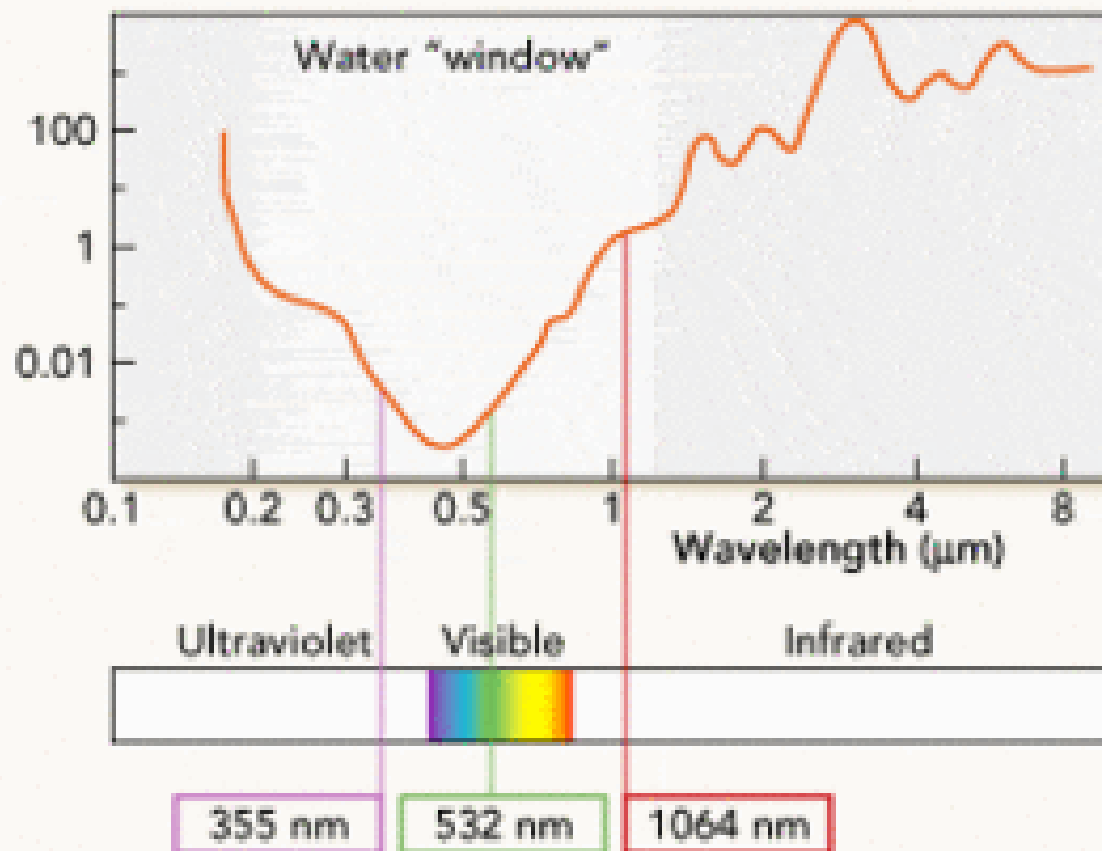
Energie světla



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

Spektrální omezení

Absorption coefficient (l/cm)





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Interakce světla s hmotou

- Rozptyl a odraz
- Absorpce
- Emise





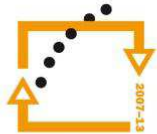
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



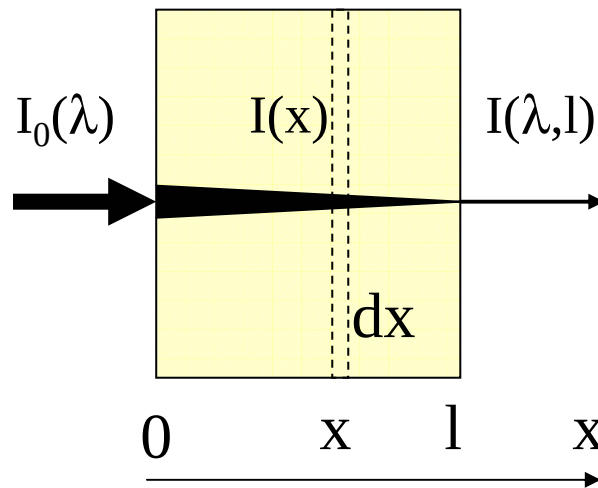
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



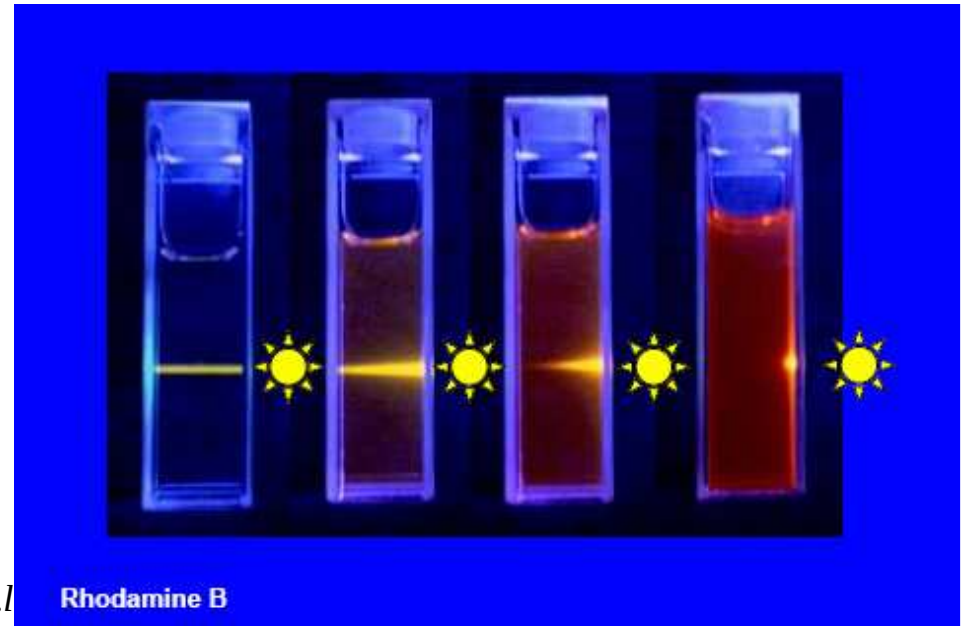
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Absorpce



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



from Jameson et. al., *Methods in Enzymology*(2002), 360:1

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

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



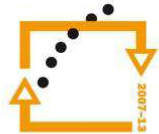
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

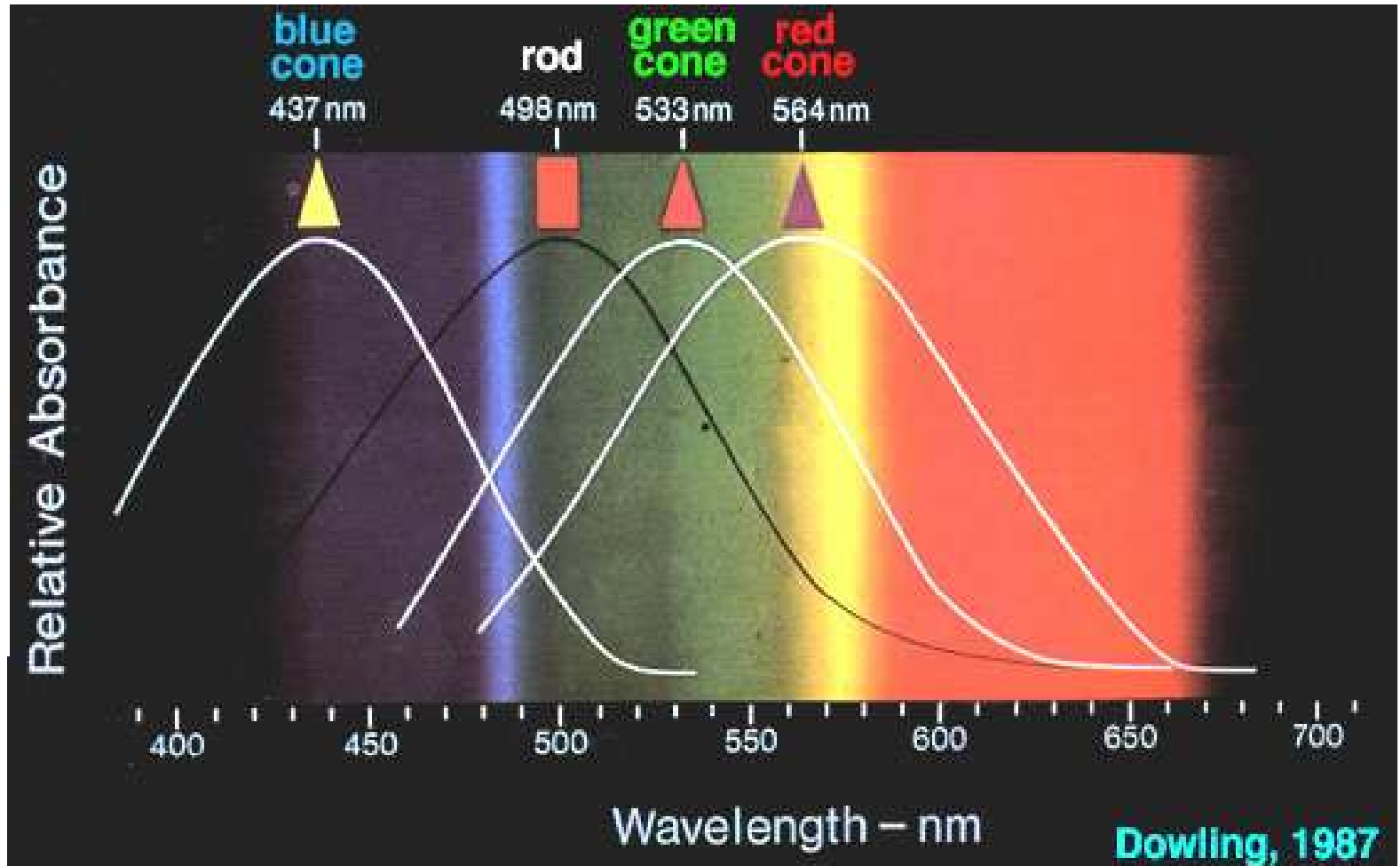


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Vidění - spektrální vlastnosti pigmentů

Vidíme odražené
světlo !





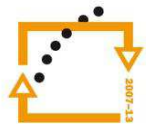
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



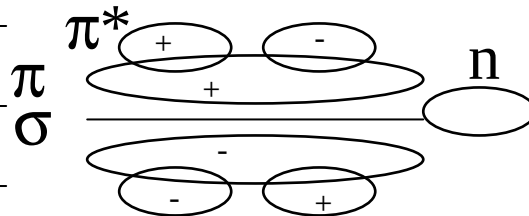
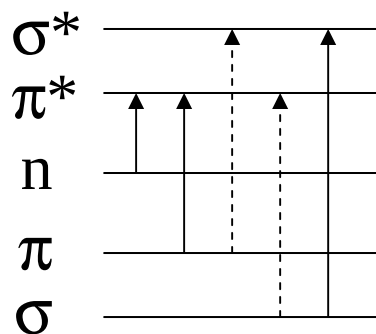
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



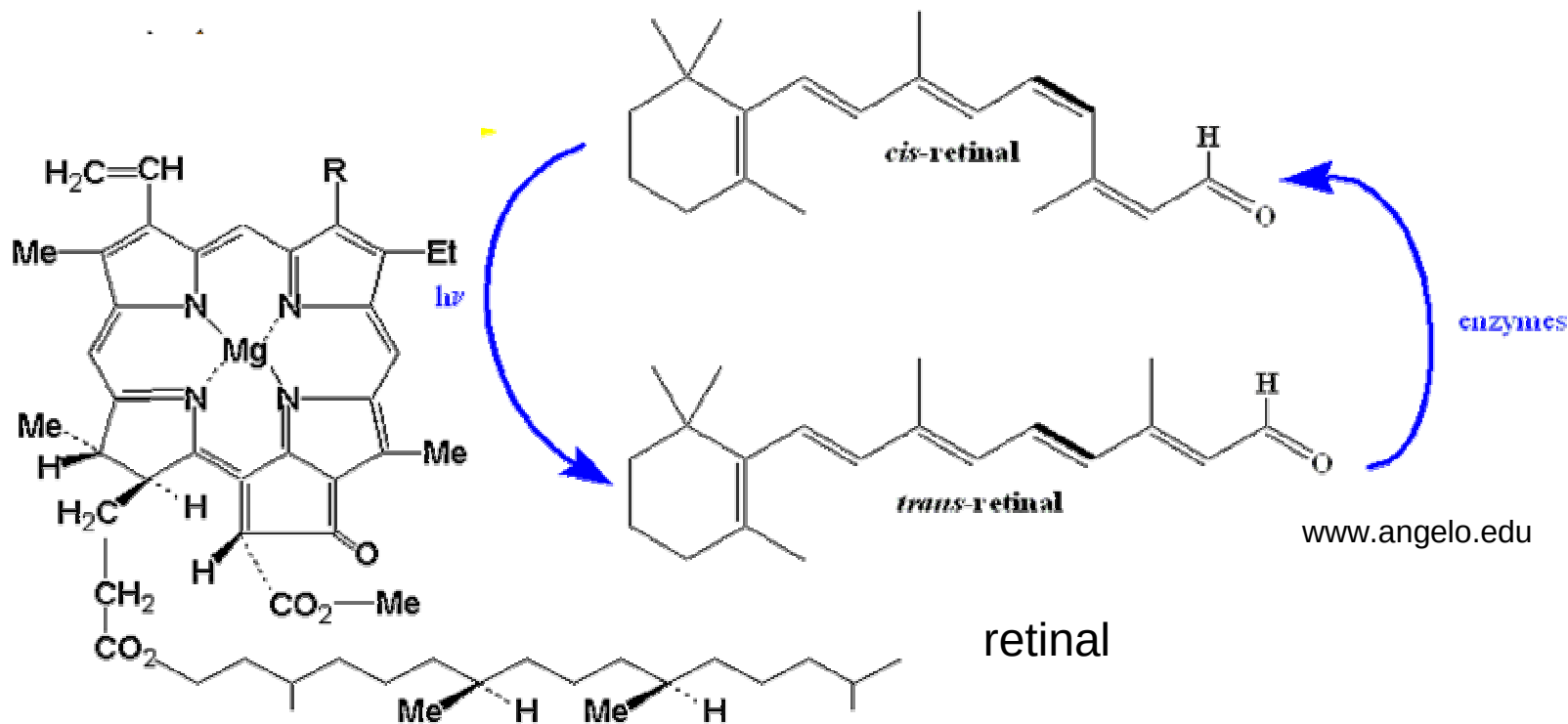
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Molekuly absorbující v UV/VIS části spektra

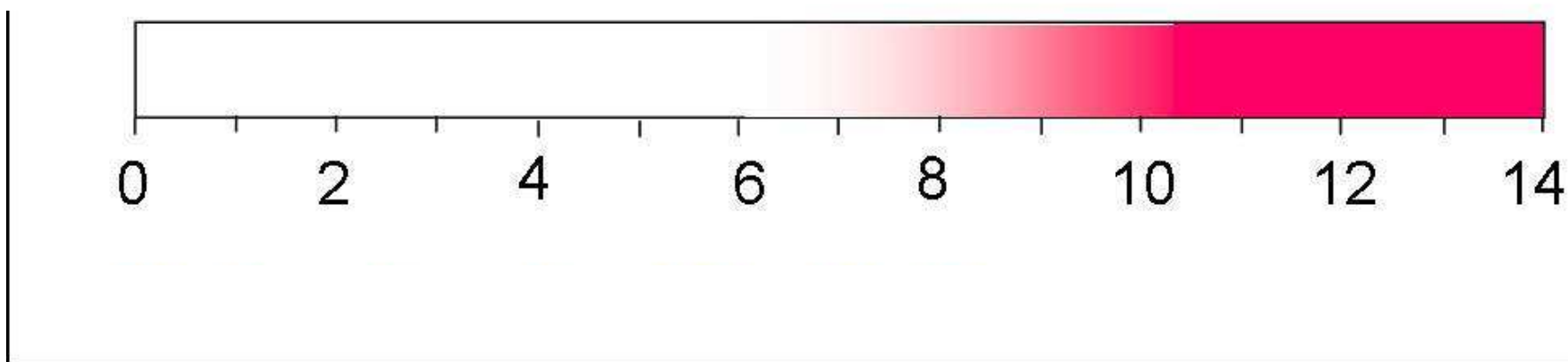
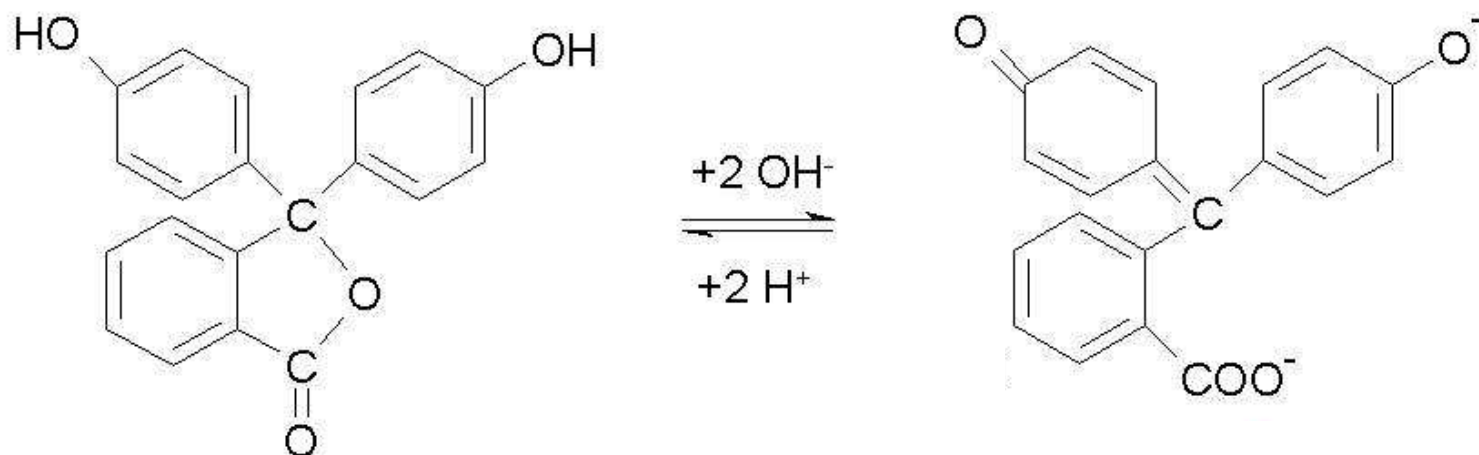


Molekula	přechod	λ [nm]
$\text{CH}_3\text{-CH}_3$	(σ, σ^*)	<160
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{Cl}$	(n, σ^*)	~200
$\text{CH}_2=\text{CH-CH=CH}_2$	(π, π^*)	~220
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (acetone)	(n, π^*)	~285



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

Fenolftalein





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



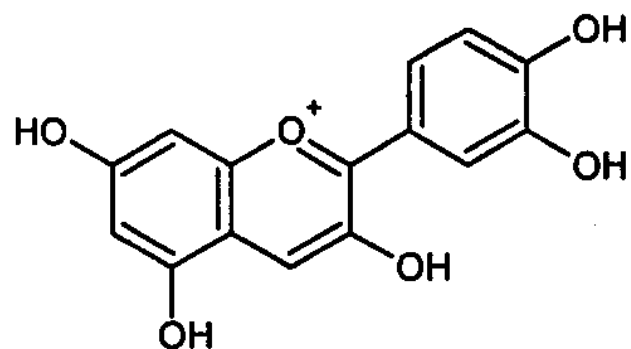
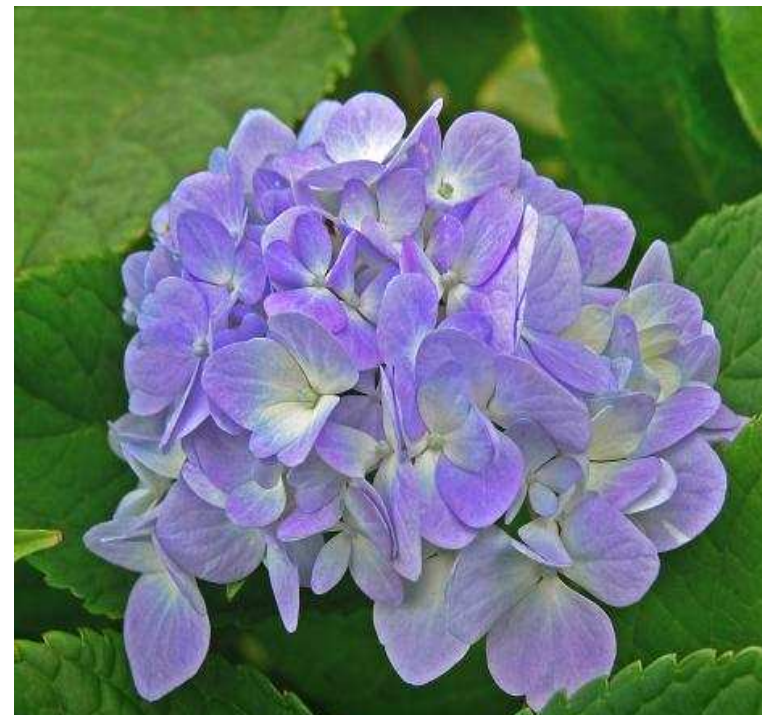
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

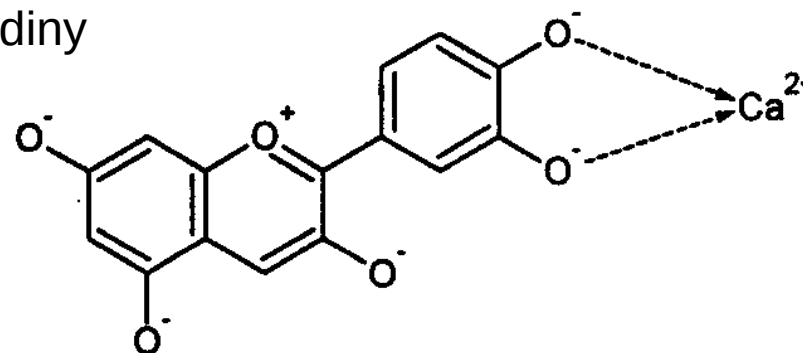
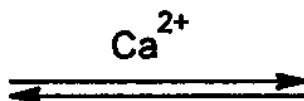
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Barvy květů hortenzie



růžové v kyselé půdě

anthokyanidiny



modré v zásadité půdě



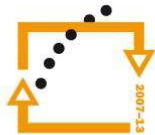
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Reakce jednobuněčných organismů na světlo

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

Fotofobní reakce – náhlá (přechodná) změna pohybu

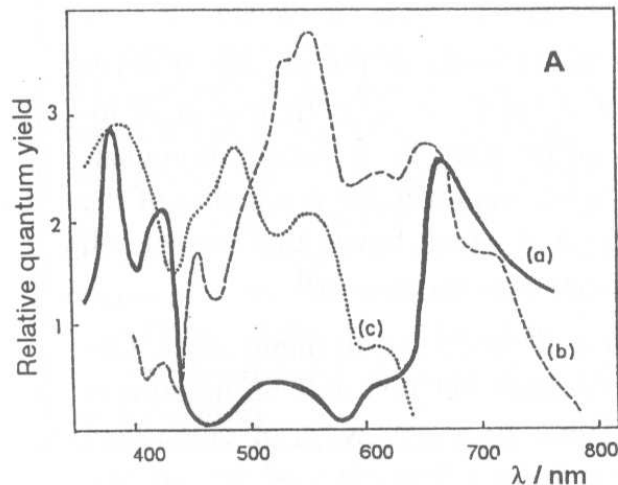
Fototaxe – orientovaný pohyb ve směru nebo proti směru, ze kterého přichází světlo (bakterie *Rhodospirillum centenum* se pohybuje od světla při osvětlení pod 650 nm, ale ke světlu při osvětlení nad 650 nm).

Akční spektra pohybu bakterie
Phormidium uncinatum

A – fotokineze

B – fotofobie

C - fototaxe





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



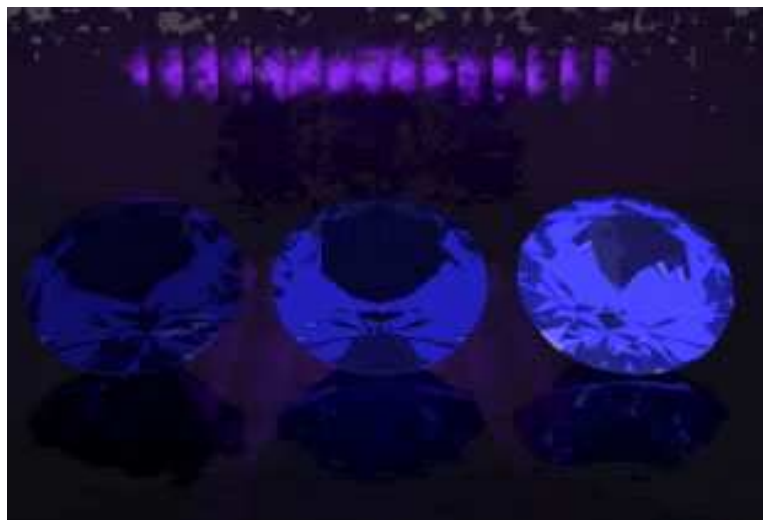
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

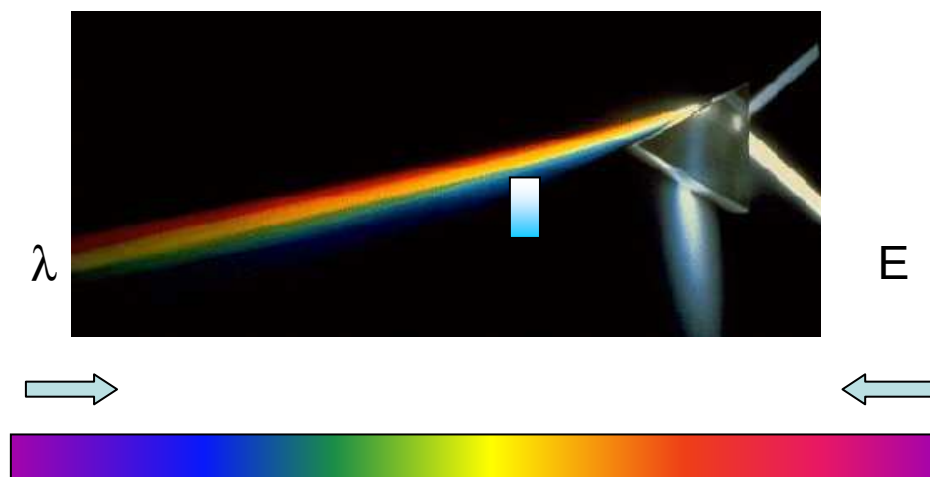
Změna barvy



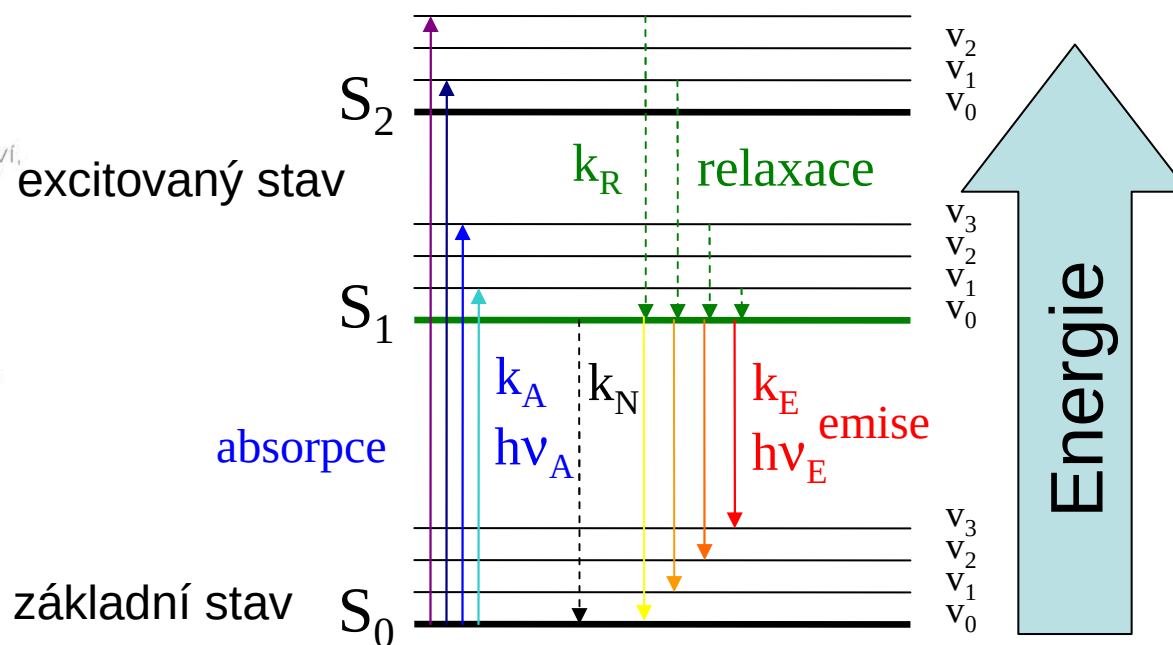
<http://www.novori.com/jewelry-education/fluorescence.jpg>



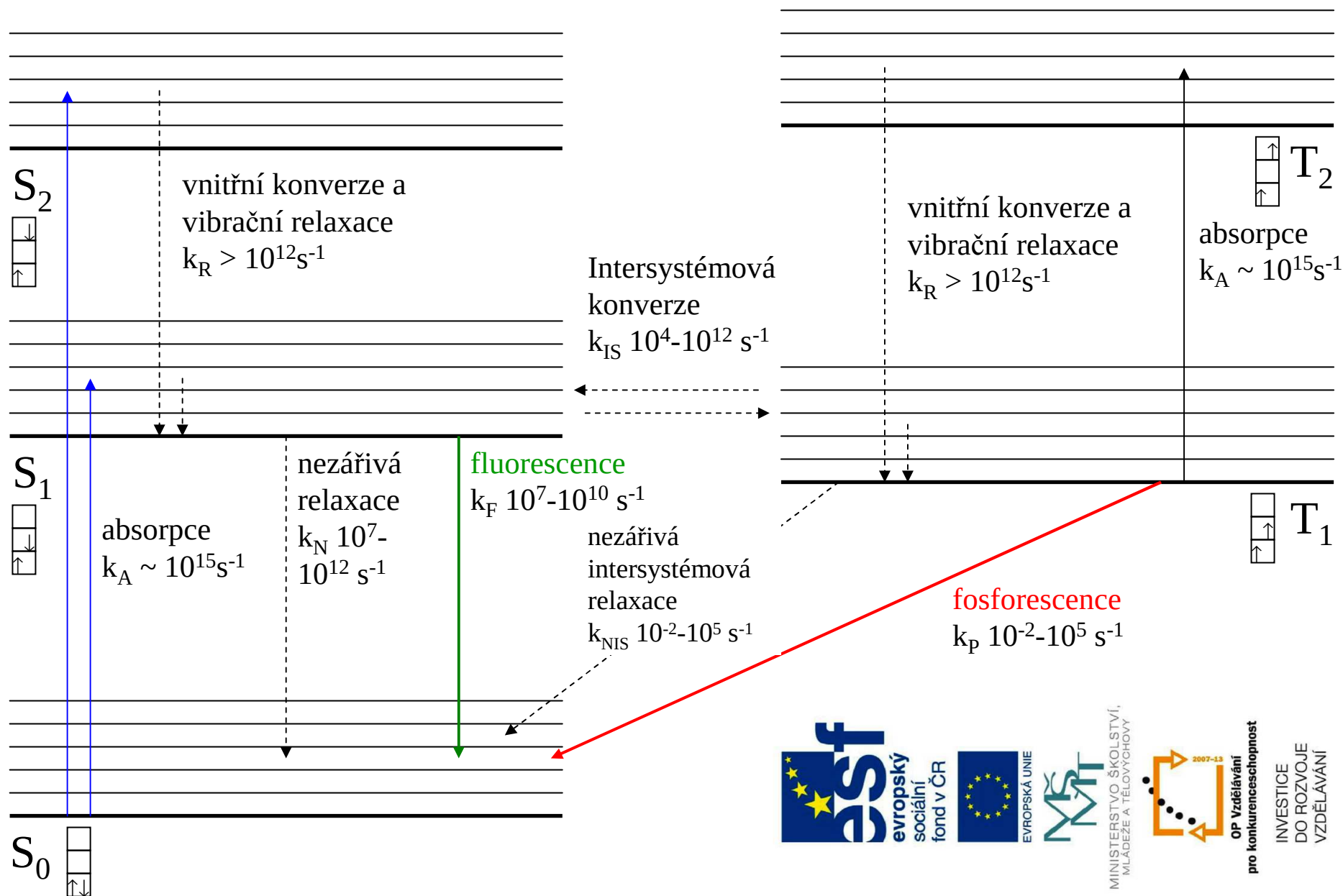
<http://woelen.scheikunde.net/science/chem/exps/fluorescence/fluorescence.jpg>



Fluorescence



Fluorescence a fosforescence





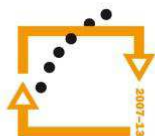
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

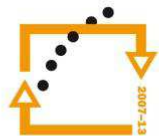
Rozdělení luminescencí

(podle způsobu buzení)

- 1) **Fotoluminiscence** – buzená UV, VIS nebo NIR světlem
- 2) Rentgenoluminiscence – buzená fotony RTG záření (luminiscenční stínítka, scintilátory, ...)
- 3) Katodoluminiscence – vyvolaná dopadajícími elektrony (obrazovky televizorů, stínítka el. mikroskopů)
- 4) Elektroluminiscence – vzniká účinkem el. pole nebo průchodem el. proudu
- 5) Galvanoluminiscence – elektrochemická reakce nebo el. proud
- 6) Radioluminiscence – emise vybuzená částicemi α, β nebo zářením γ (scintilátory)
- 7) Mechanoluminiscence – vybuzená vnějším mechanickým působením
- 8) Sonoluminiscence – buzená ultrazvukem
- 9) Termoluminiscence – vyvolaná dodáním tepelné energie (ohřevem), obvykle po předchozím vybuzení jiným způsobem
- 10) Krystaloluminiscence – při růstu krystalů
- 11) Lyoluminiscence – při rozpouštění krystalů
- 12) Kryoluminiscence – působení nízkých teplot
- 13) Chemiluminiscence – provází některé typy exotermních chemických reakcí, meziprodukty nebo konečné produkty vznikají v excitovaném stavu
- 14) Bioluminiscence – svícení organismů, doprovází životní procesy



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

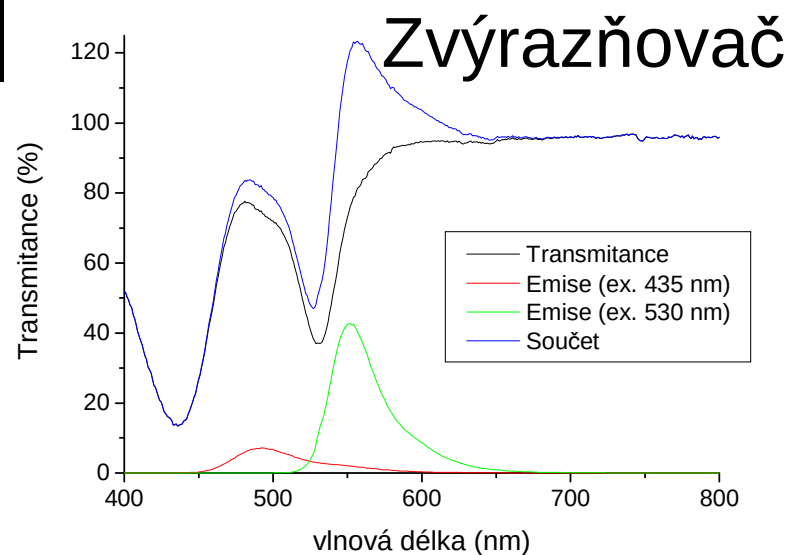
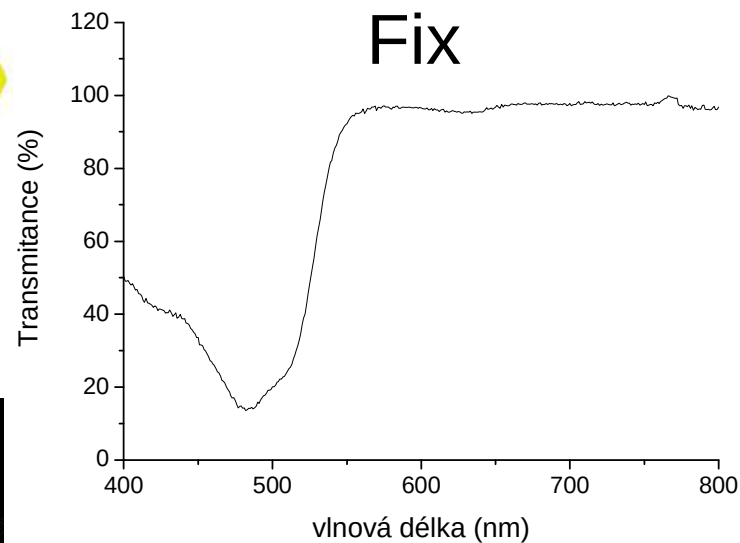


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Aplikace v běžném životě

Proč zvýrazňuje zvýrazňovač ?





evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



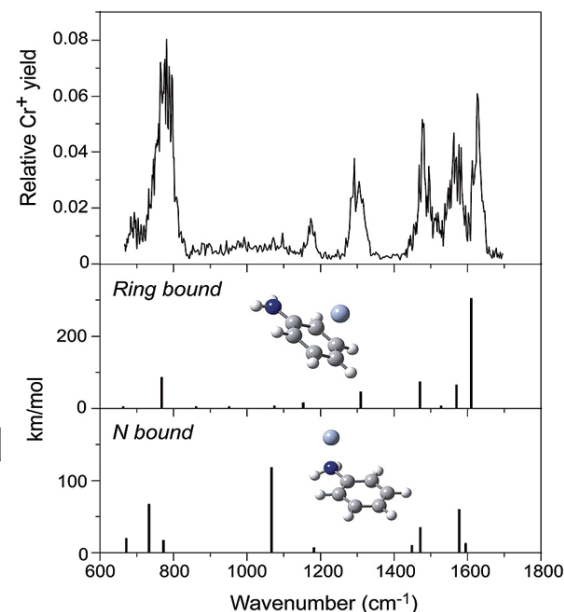
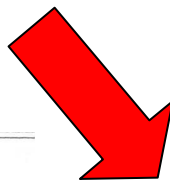
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

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

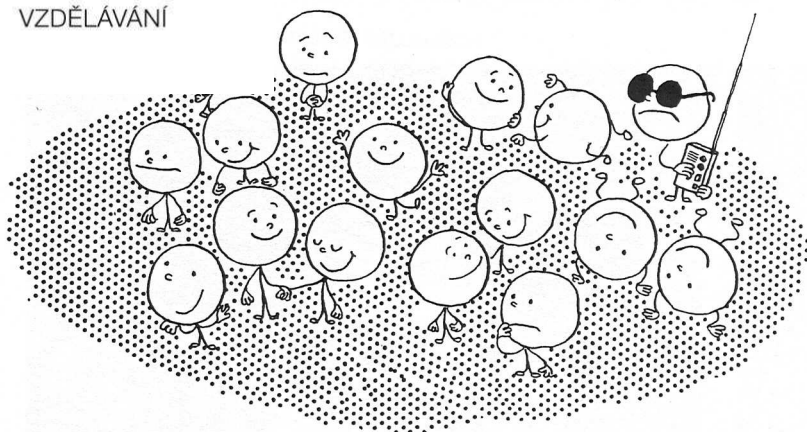


Figure 2. Fluorescent probe represents a molecular reporter in the biologic sample.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



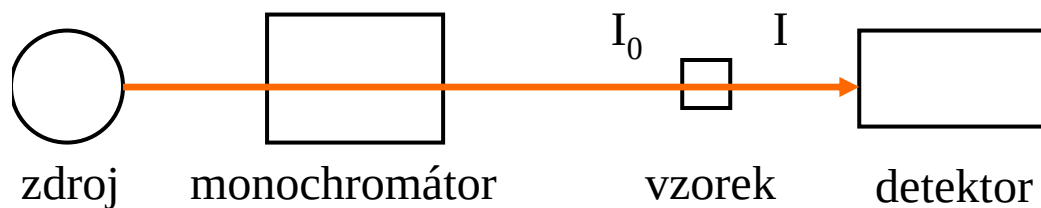
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

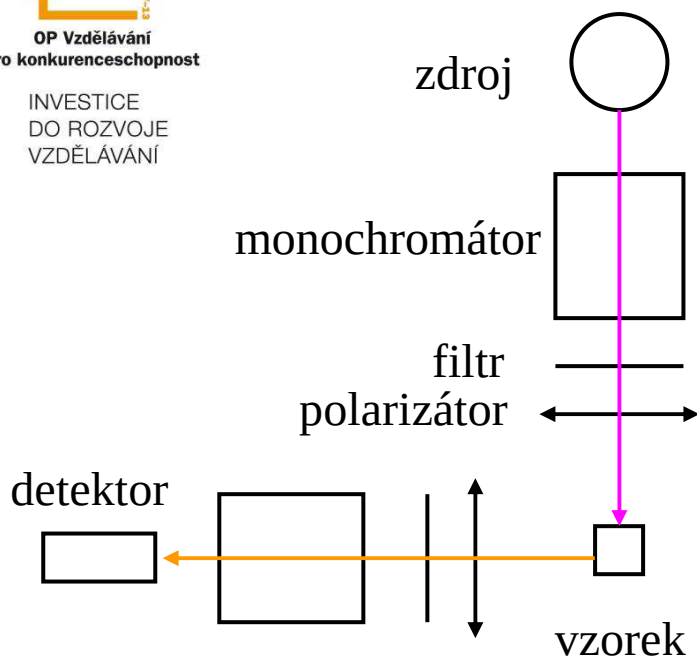
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Citlivost



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

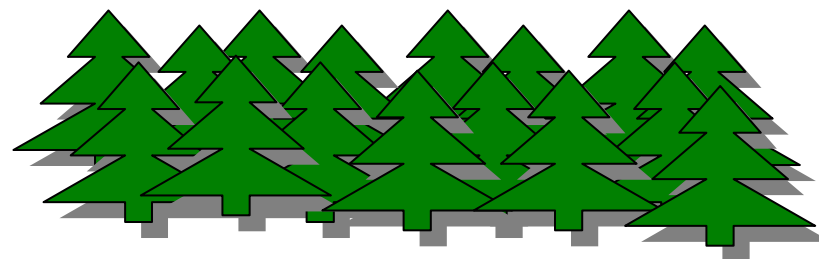
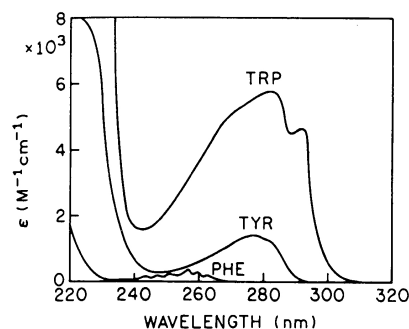
Při malých koncentracích hledáme
malý rozdíl dvou velkých čísel



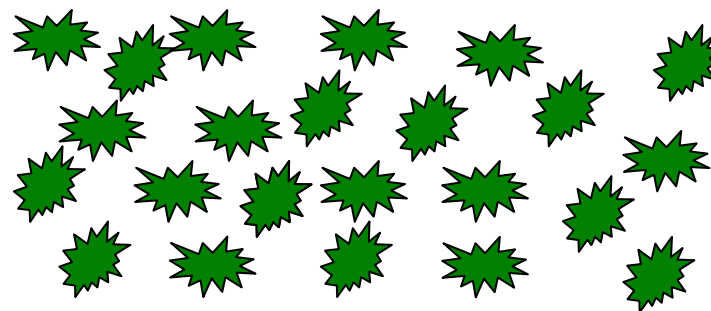
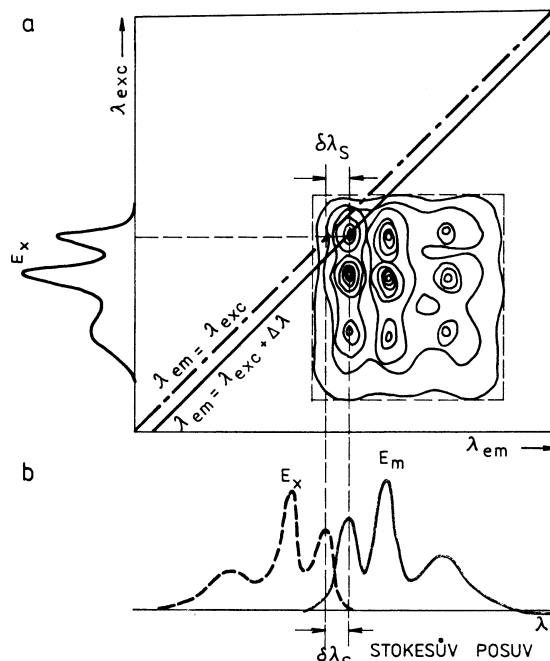
V L-uspořádání měříme intenzitu emise proti
„nulovému“ pozadí.

Variabilita

Intenzita nezávisí jen na vlnové délce absorpce...

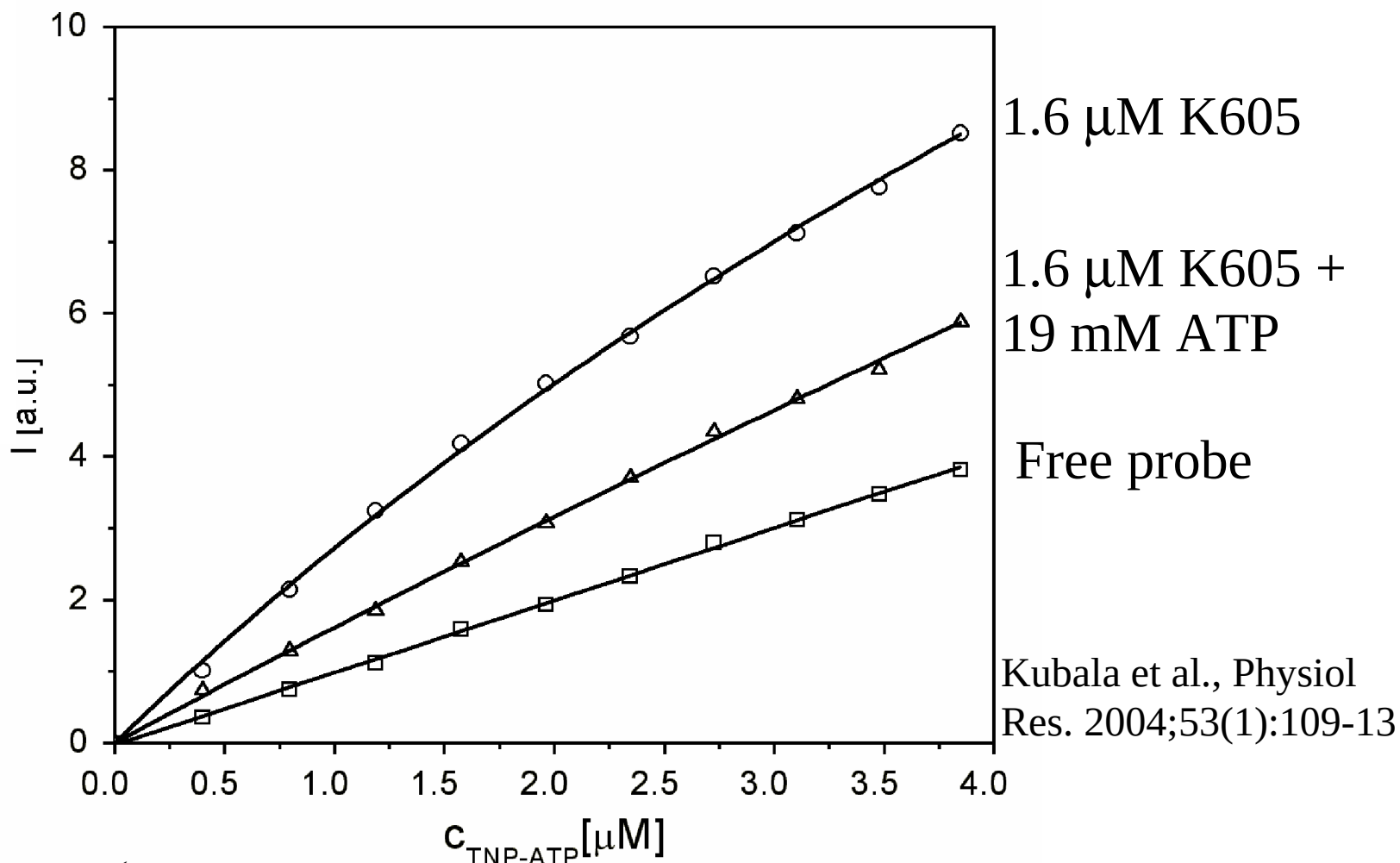


... ale i na vlnové délce emise



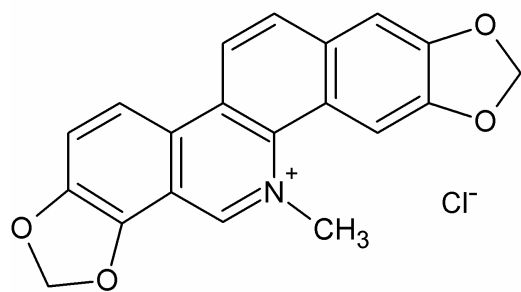
a můžeme použít ještě
spoustu dalších triků ...

Vazba ATP na protein



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

Změny v kinetice dohasínání fluorescence



Sanguinarine chloride



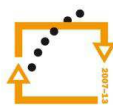
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

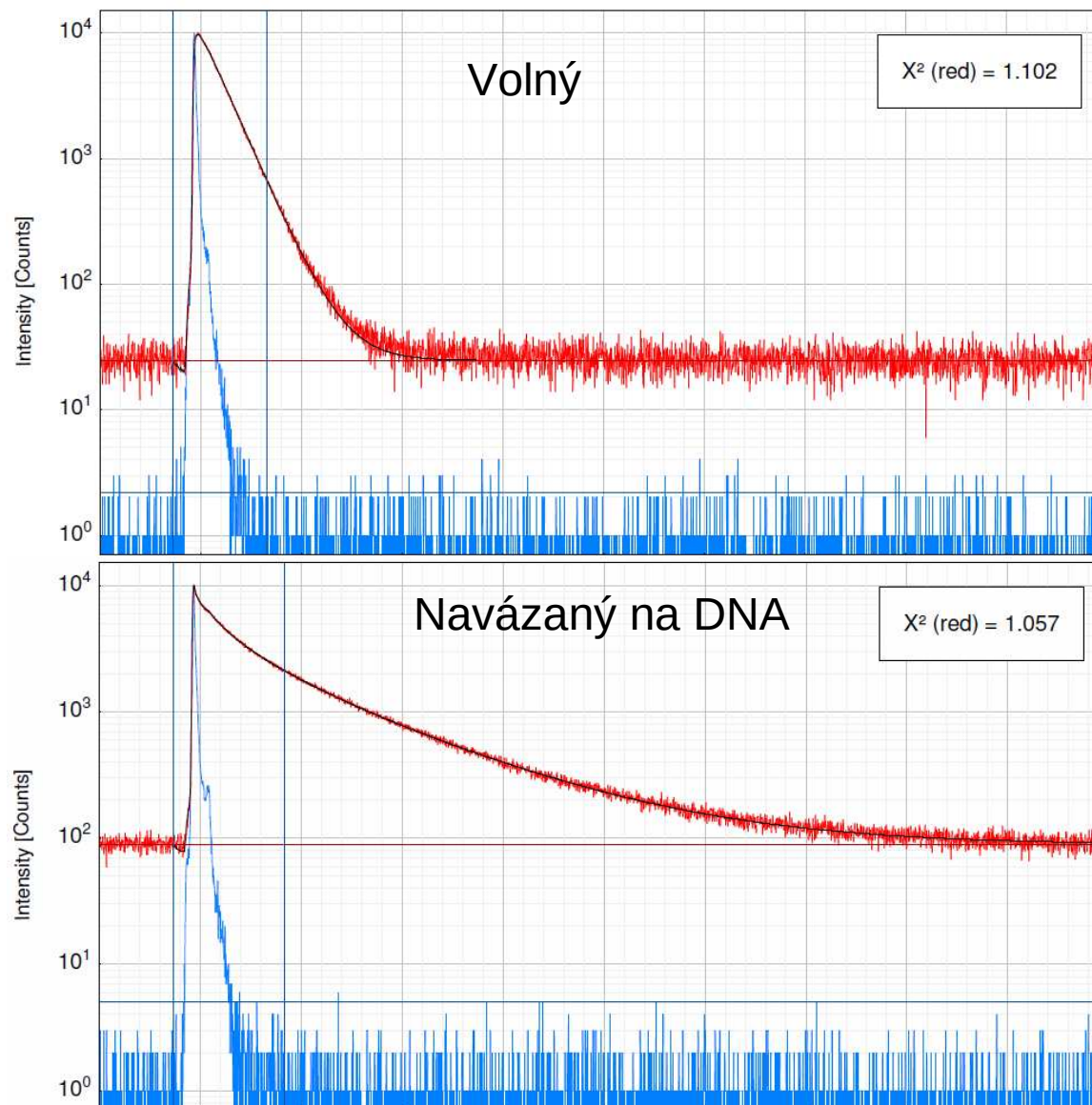


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ



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.

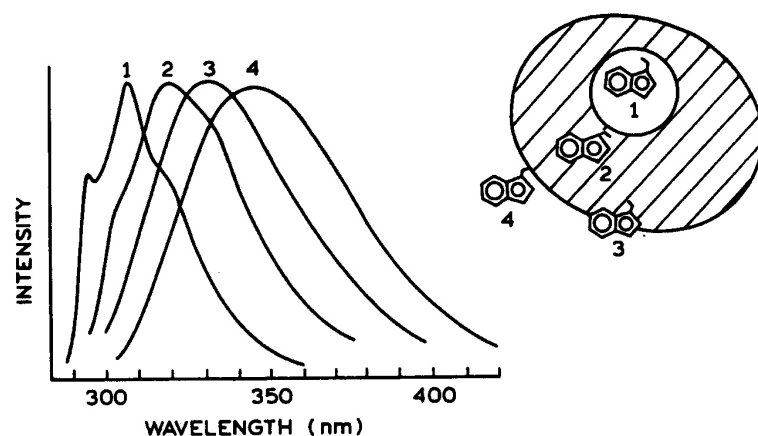
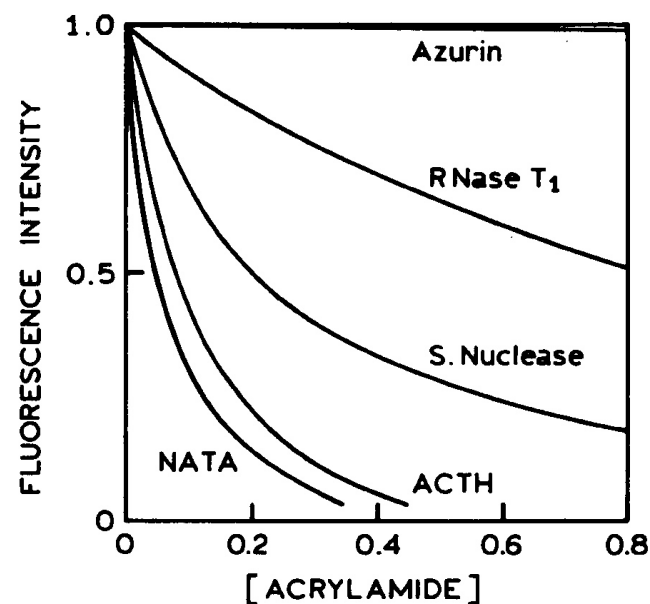
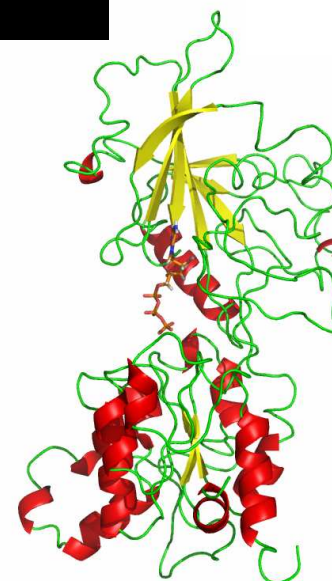
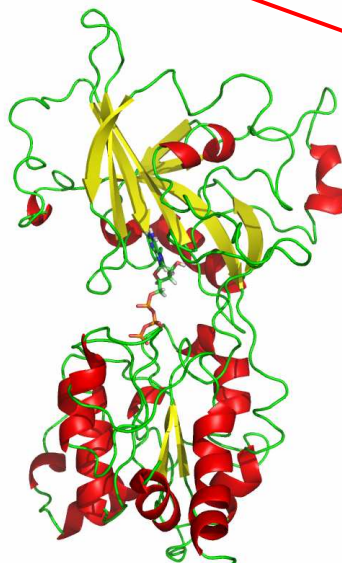
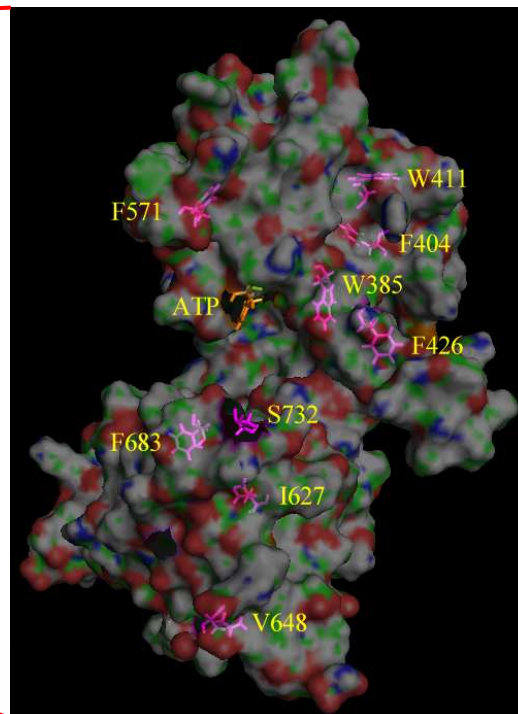
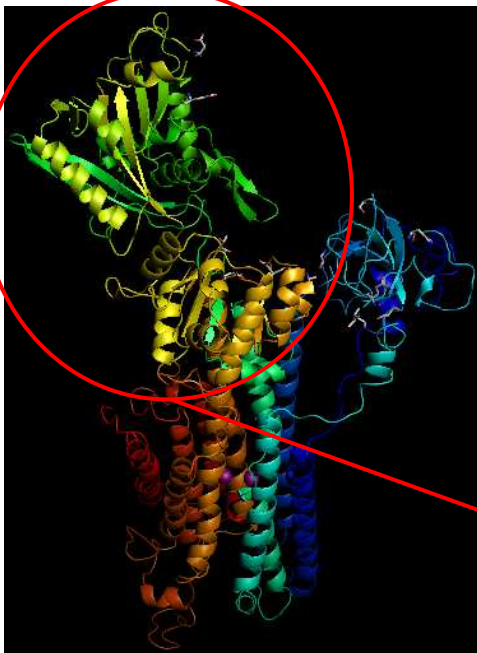


Figure 16.11. Effect of tryptophan environment on the emission spectra of proteins: (1) apoazurin Pfl, (2) ribonuclease T₁, (3) staphylococcal nuclease, (4) glucagon. Revised from Refs. 52 and 53.



Lakowicz, 1999

Zhášení fluorescence



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



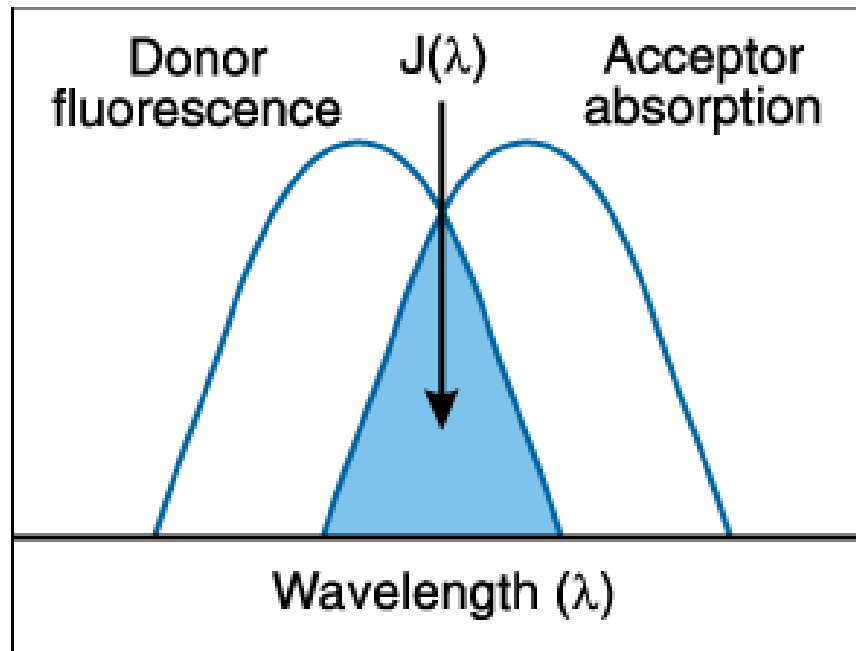
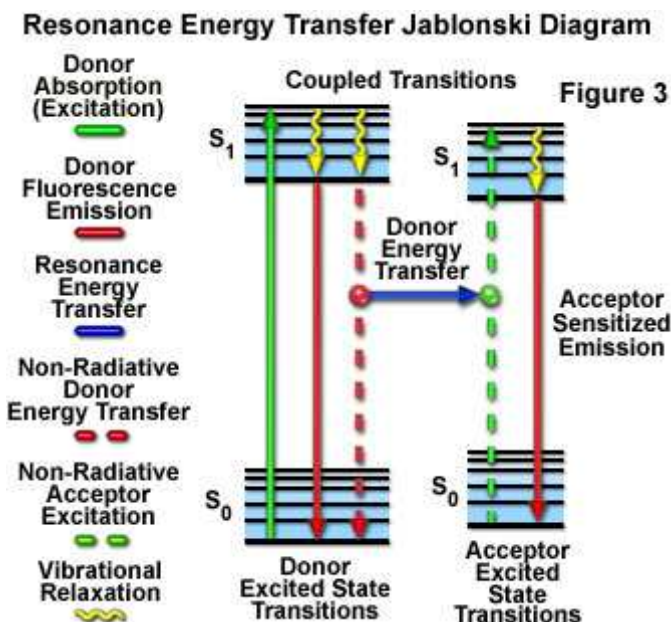
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



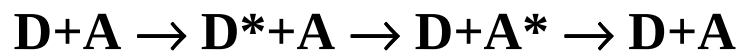
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Försterův rezonanční přenos energie (FRET)

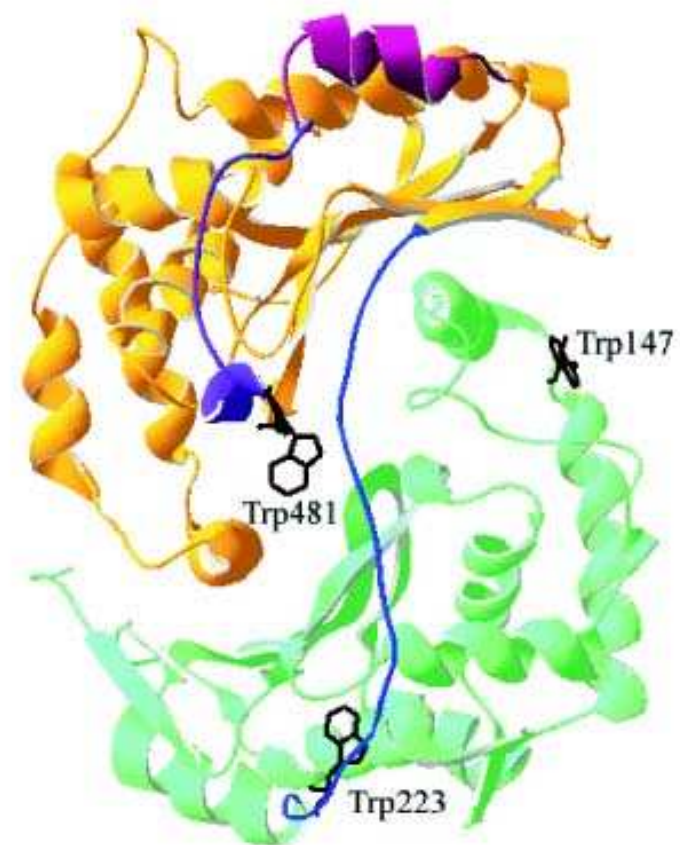


Pokud se v blízkosti fluoroforu (donoru) nachází molekula (akceptor), jejíž absorpční spektrum se překrývá s emisním spektrem donoru, může dojít k rezonančnímu (nezářivému !) přenosu excitační energie

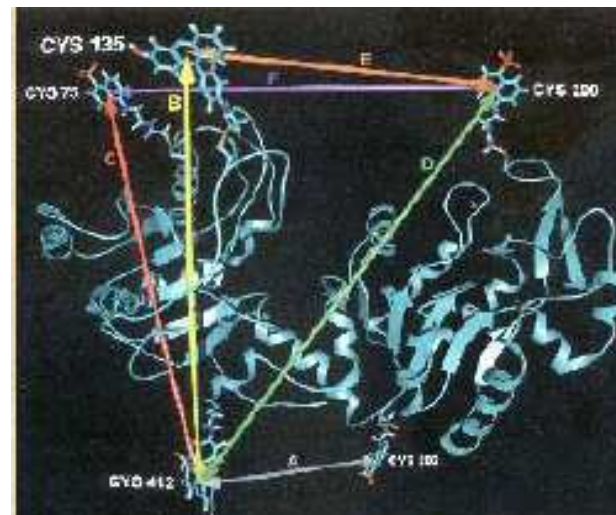


Protože se jedná o dipól-dipólovou interakci, závisí účinnost FRET na r^{-6} , což umožňuje měření inter- nebo intramolekulárních vzdáleností v nm škále.

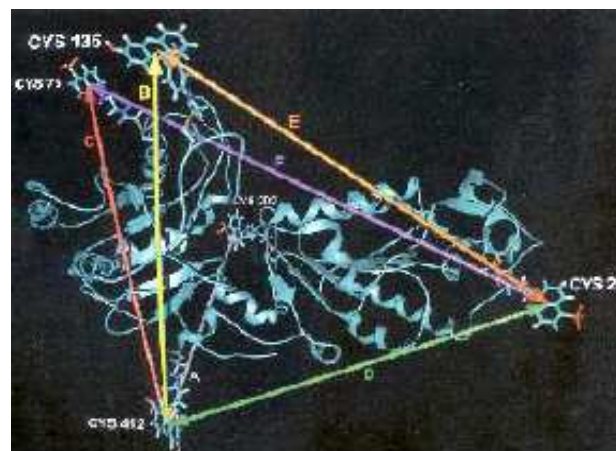
mitochondriální procesující peptidáza (Janata et al. 2004)



Fosfoglycerátkináza (Lillo et al., 1997)



native state



first unfolded state



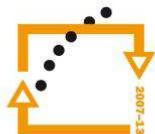
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



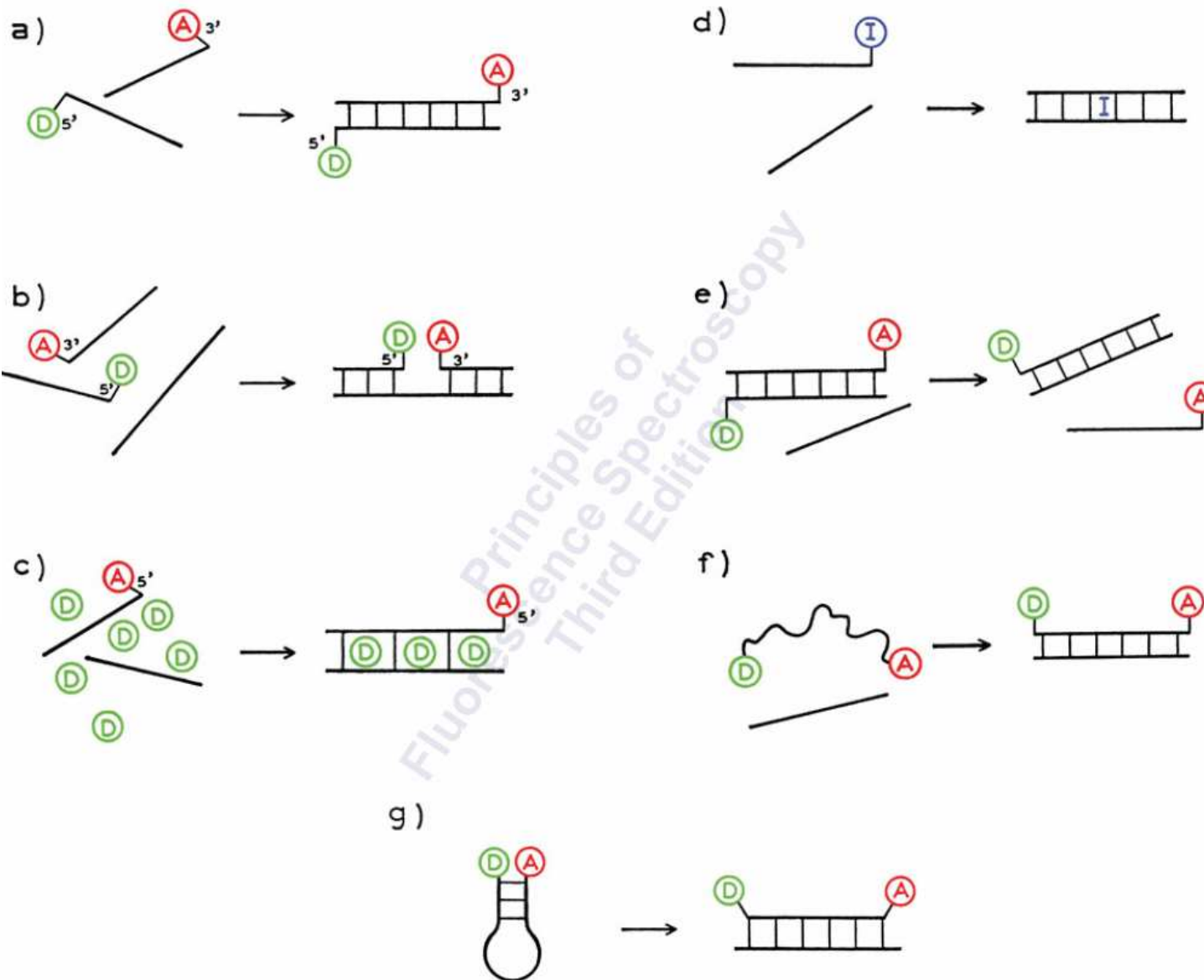
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Aplikace - hybridizace DNA





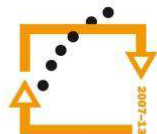
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



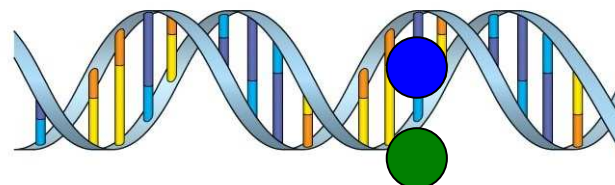
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

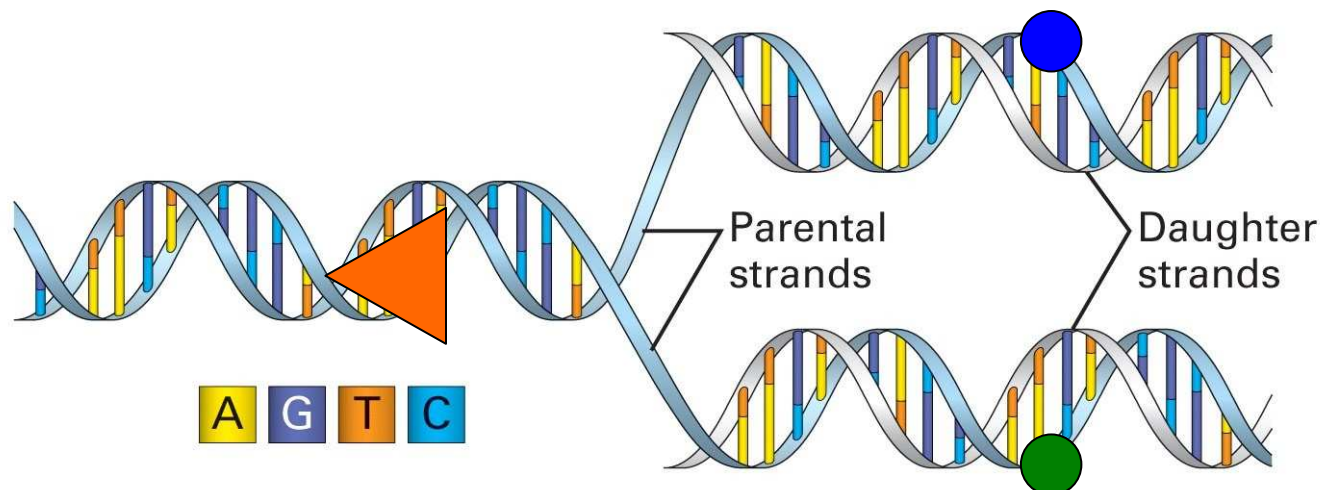
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Měření rychlosti DNA polymerázy



A G T C

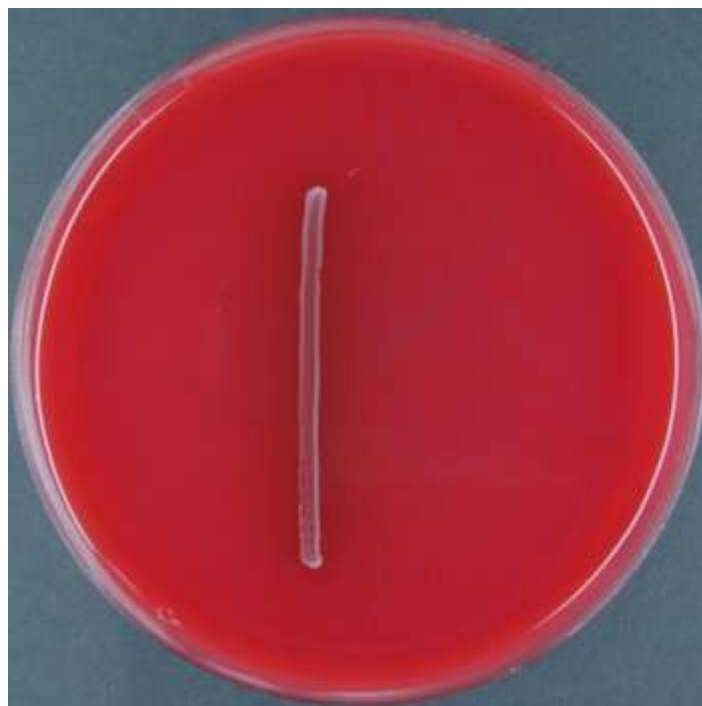
Silný FRET



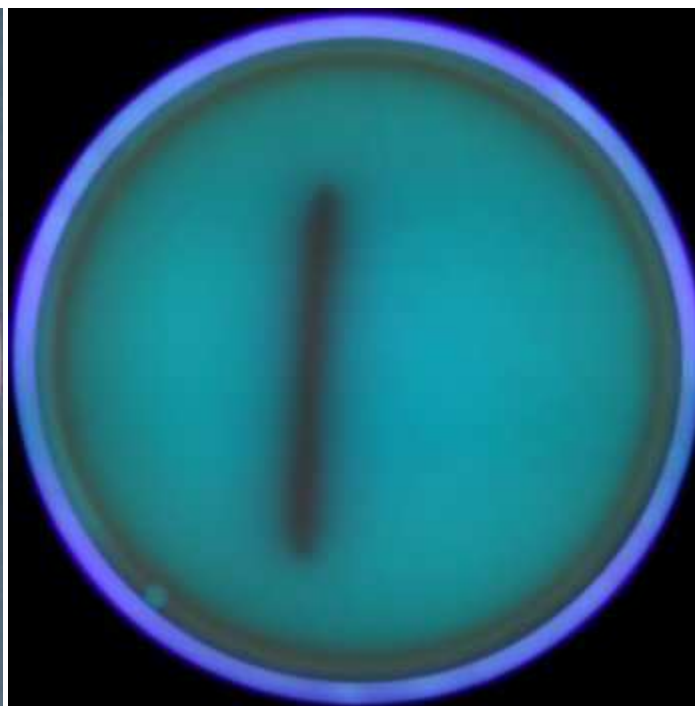
Slabý FRET

Mikrobiologie

Detekce *Streptococcus agalactiae* na aesculinovém krevním agaru



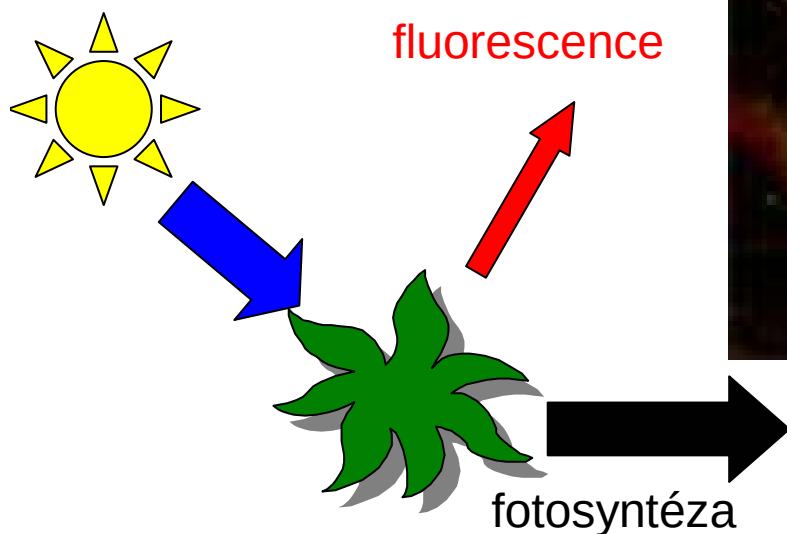
denní světlo



UV zářivka

Aplikace na úrovni organizmů

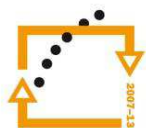
Šíření choroby
rostlinou



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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

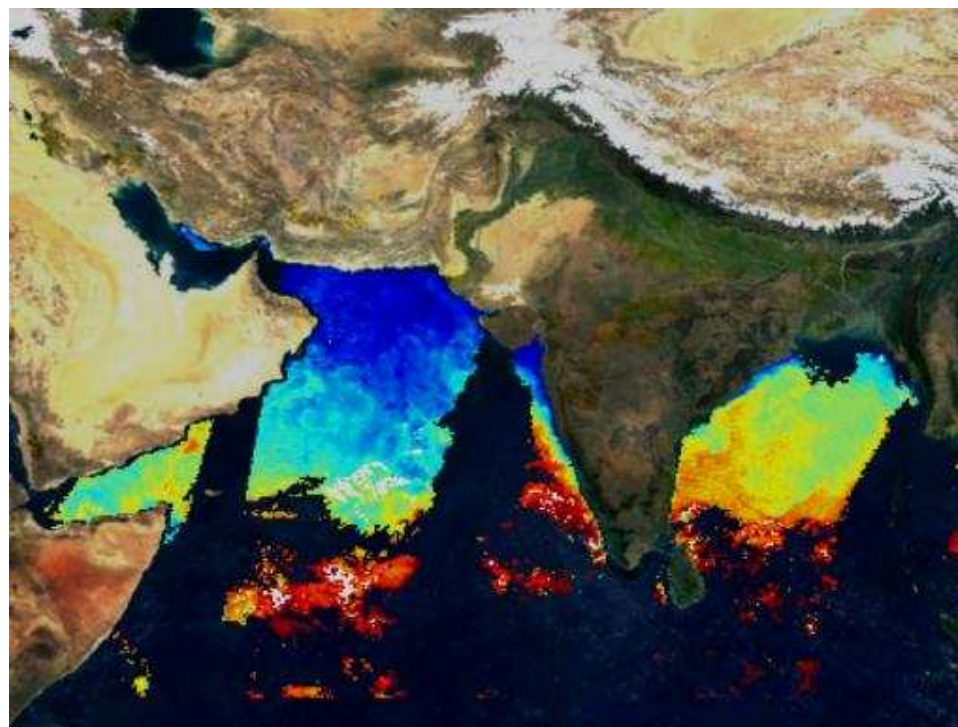


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

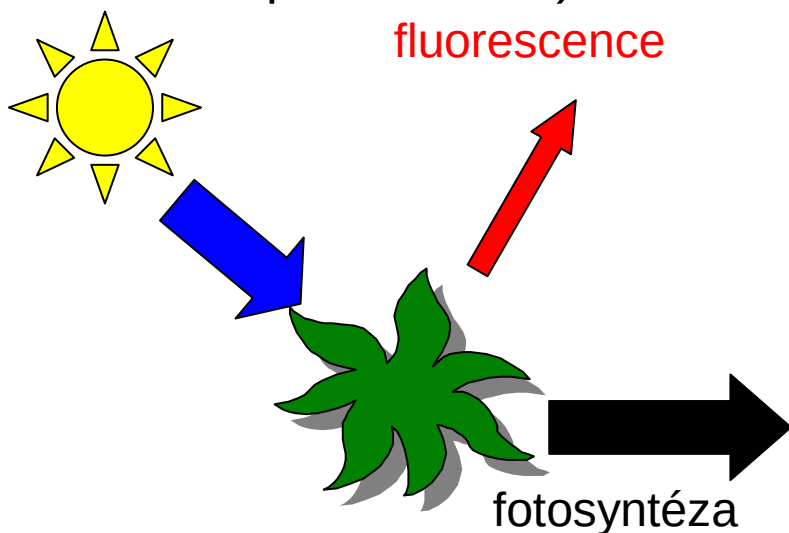
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Aplikace v planetárním měřítku

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



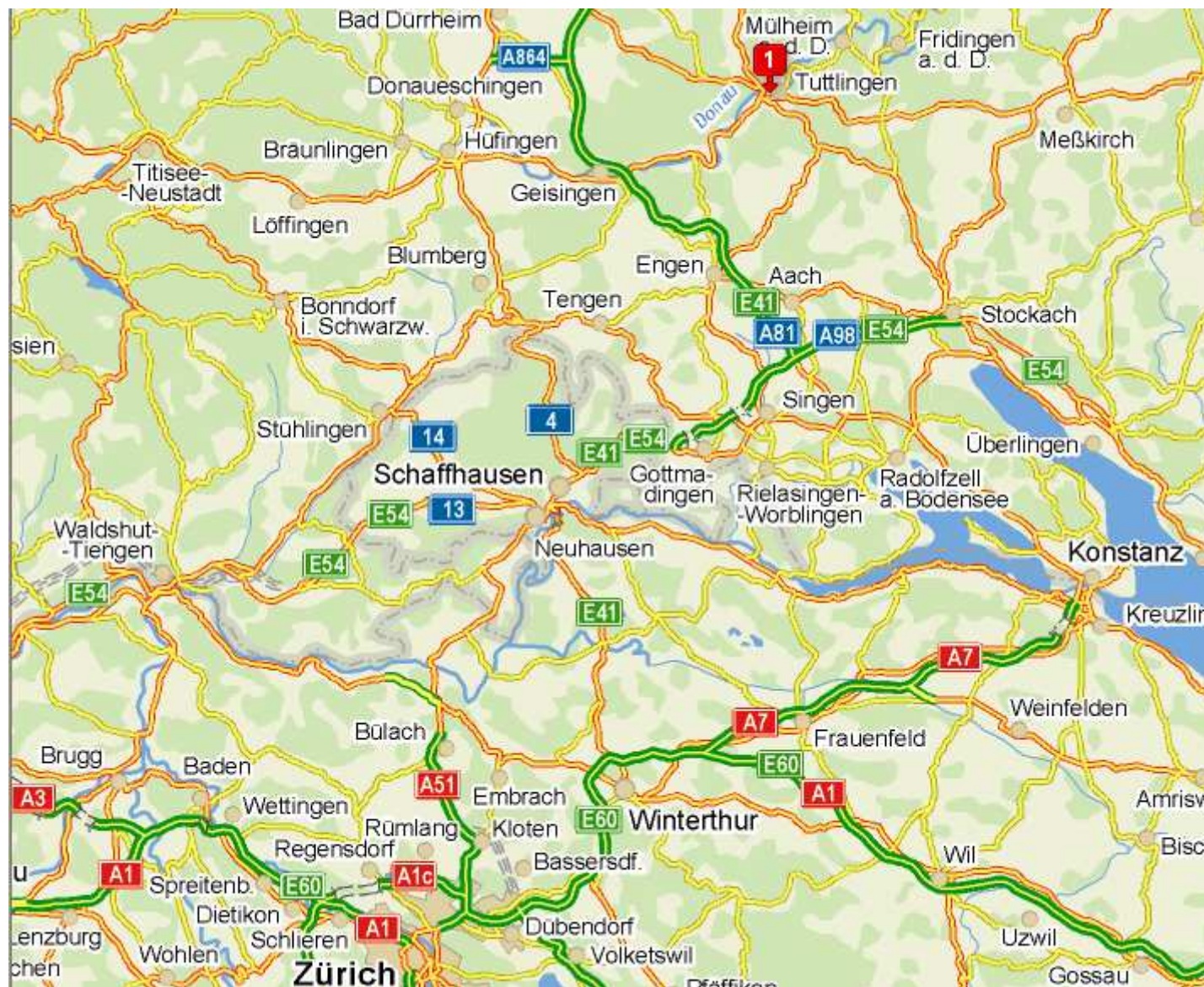
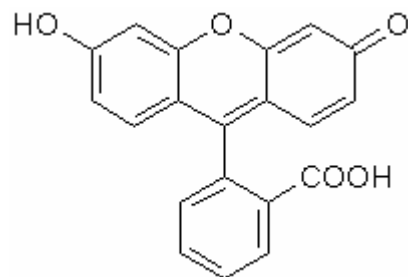
www.iocccg.org/gallery/terra/asia.html



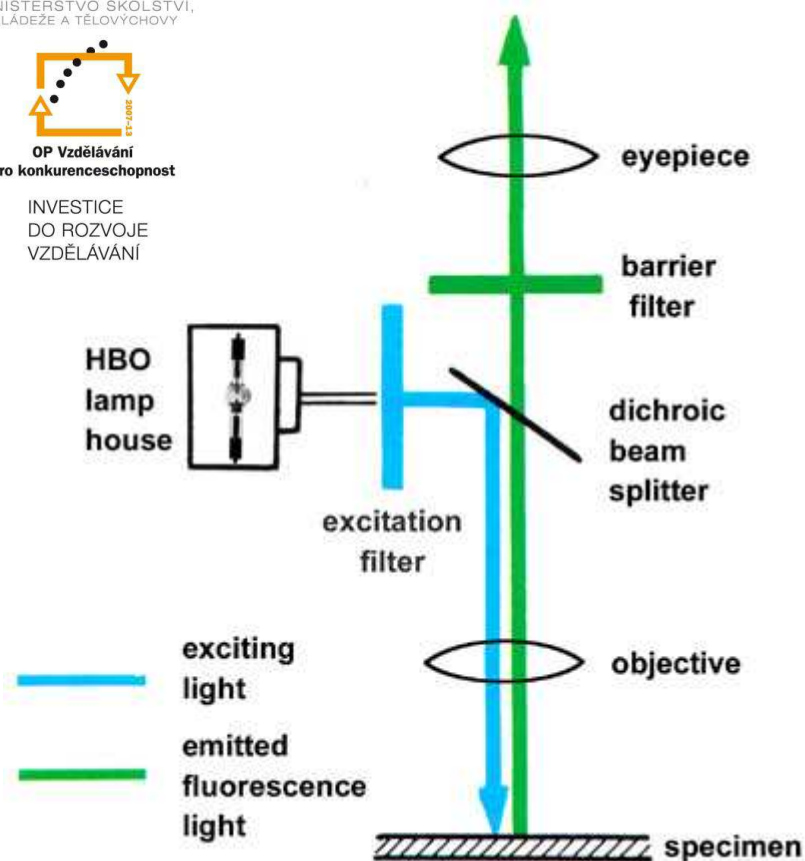
Aplikace v planetárním měřítku

1877
důkaz podzemního
spojení mezi
Dunajem a Rýnem

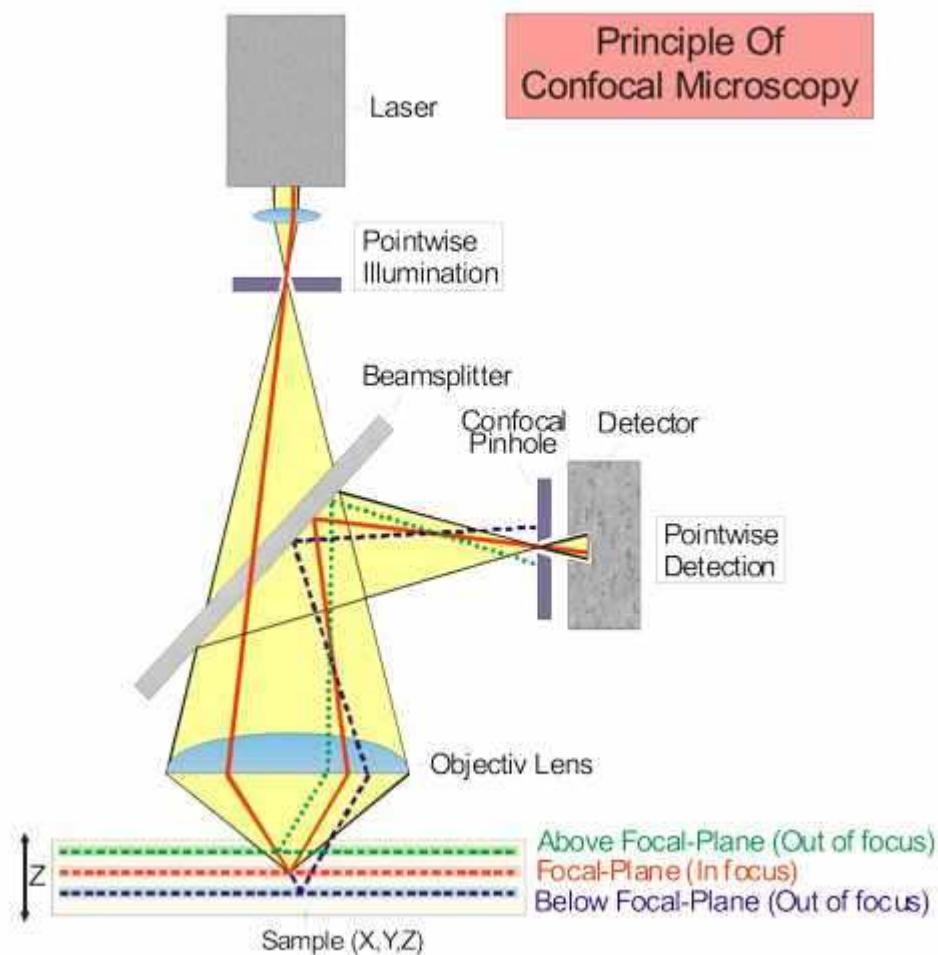
FLUORESCEIN



Fluorescenční mikroskopie



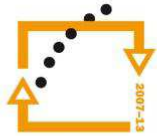
<http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluor.jpg>



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



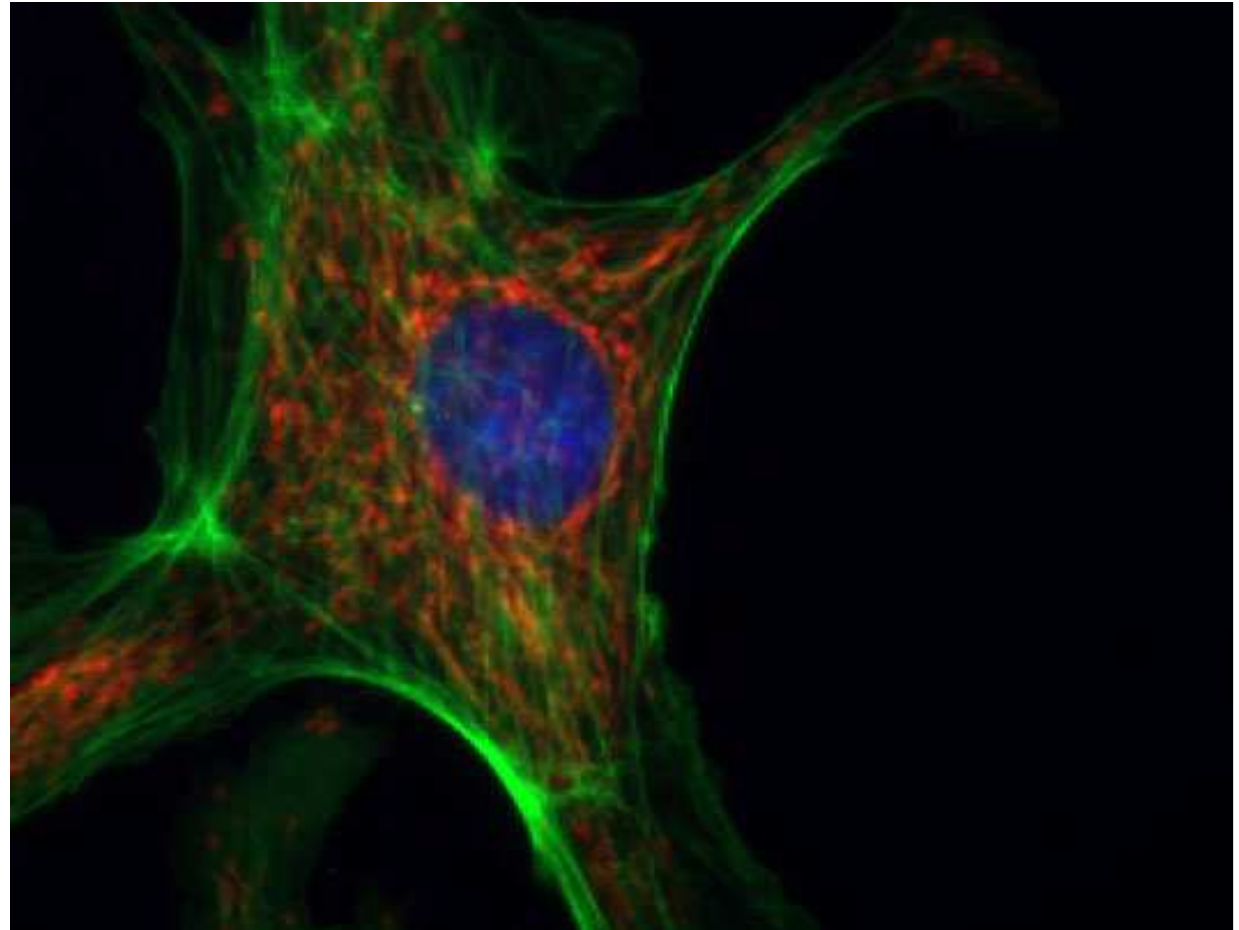
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Fluorescenční mikroskopie



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

http://www.meade.com/dsi/images/molecular_probes.jpg



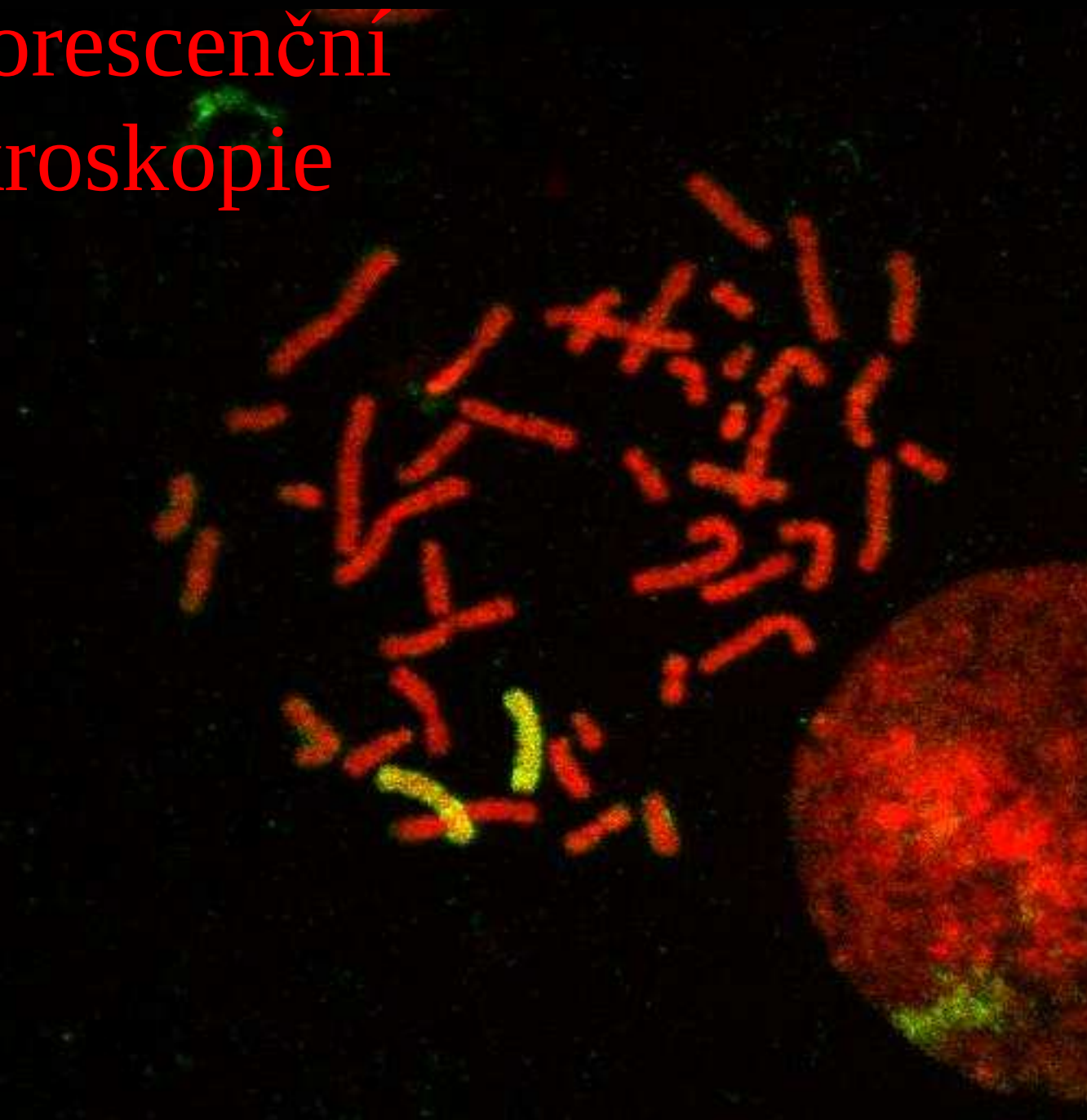
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Fluorescenční mikroskopie



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



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

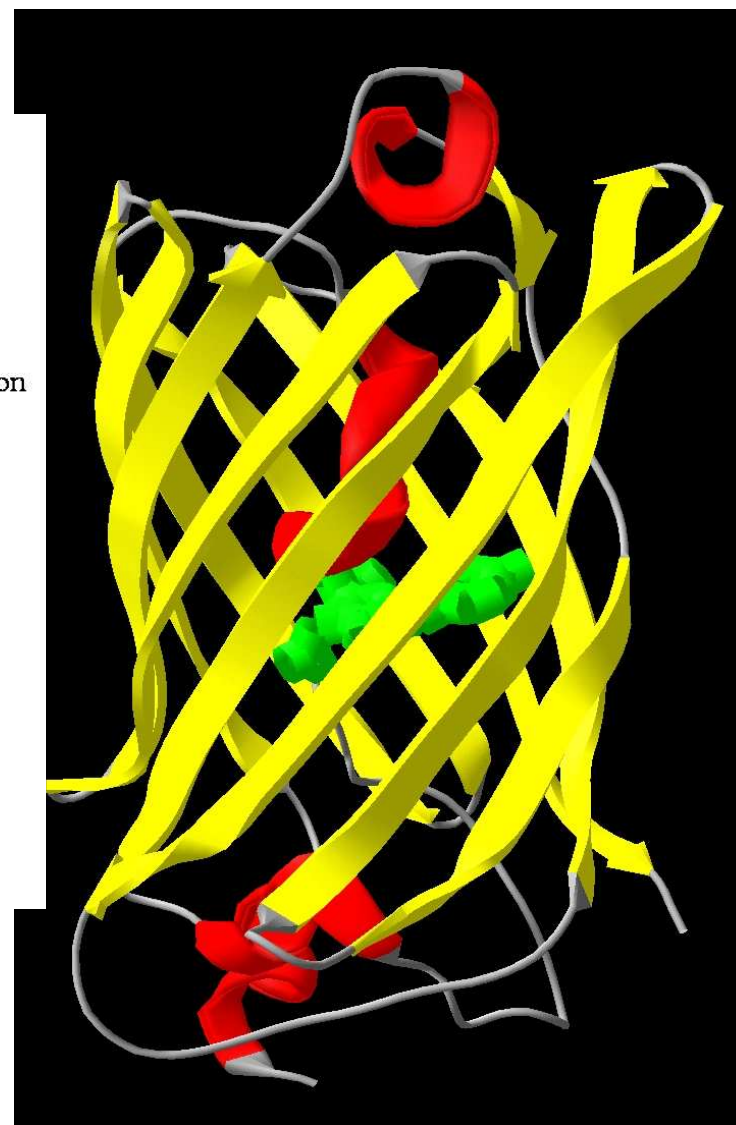
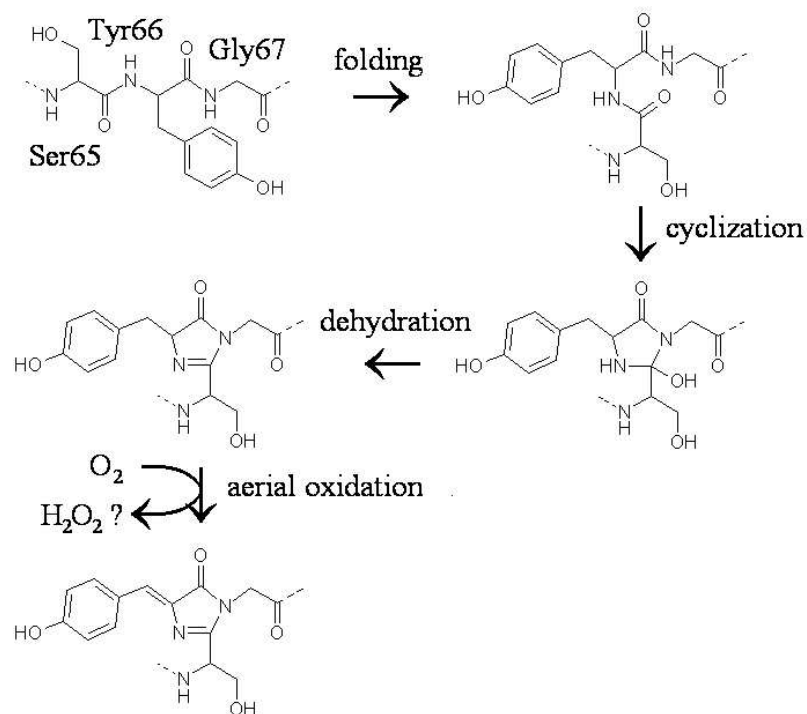


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

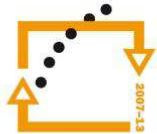
Fluorescenční proteiny

GFP z *Aequorea victoria*





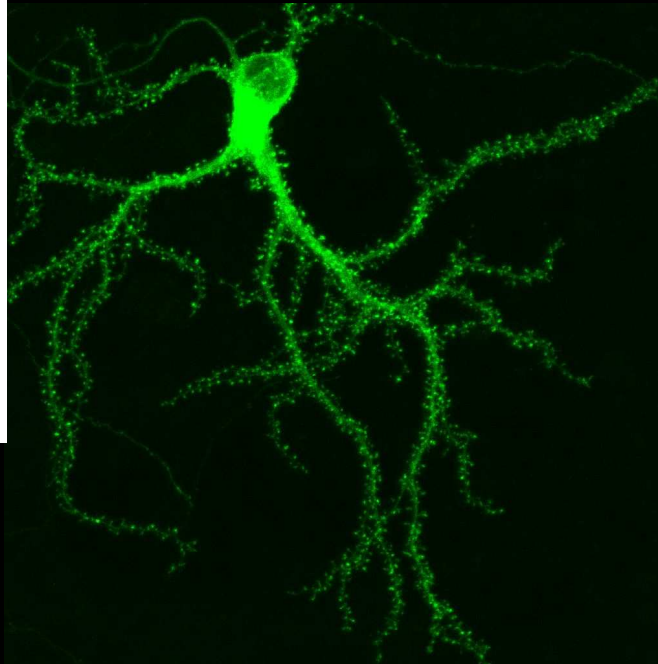
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



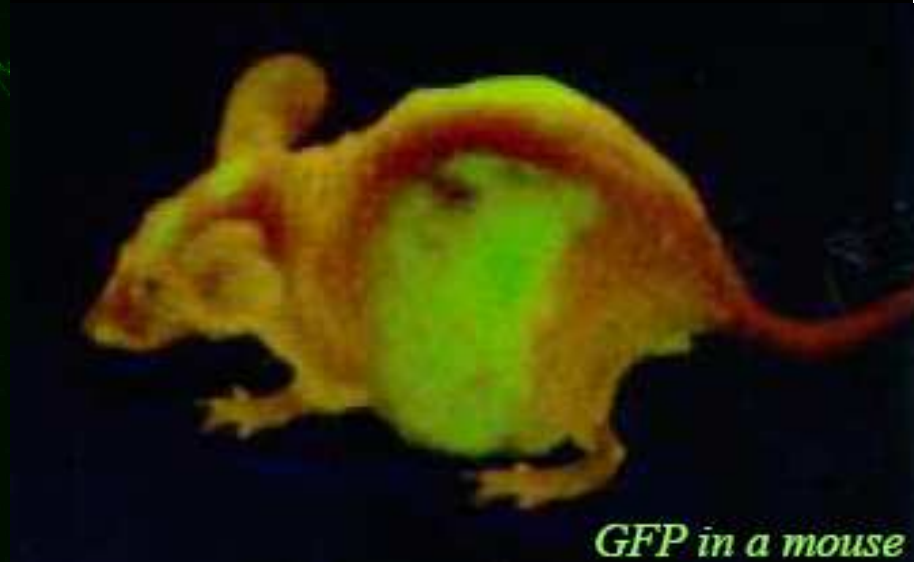
**OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Fluorescence GFP in vivo



neuron



GFP in a mouse

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



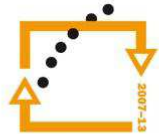
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



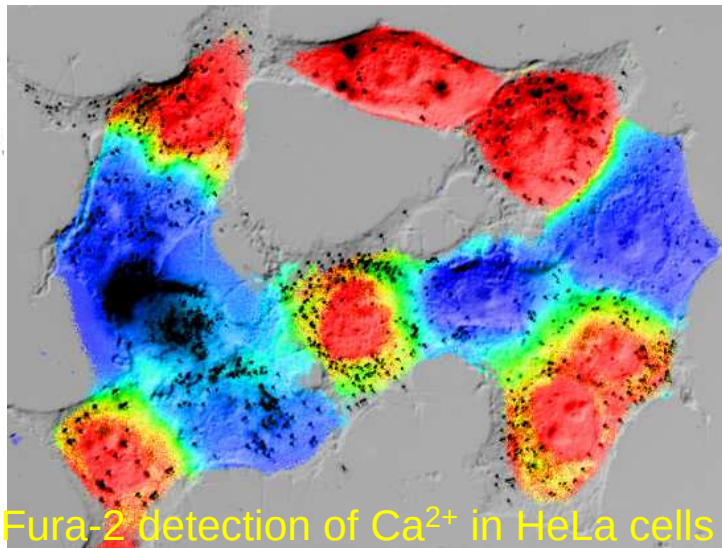
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

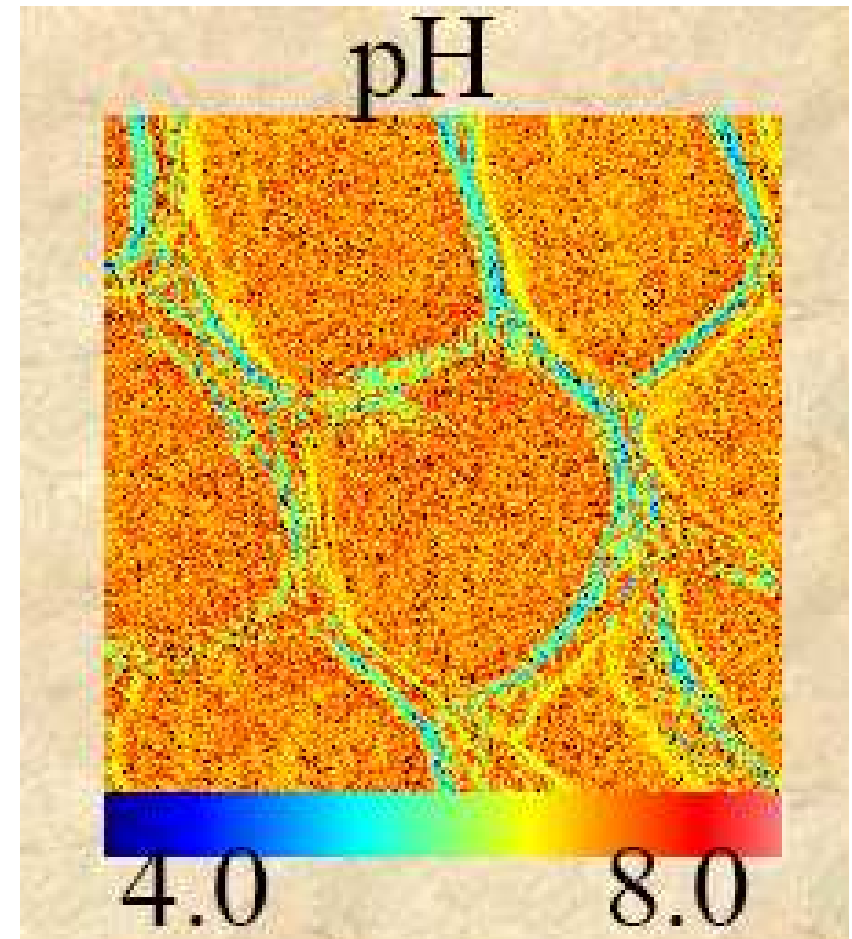
INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Funkční fluorescenční mikroskopie



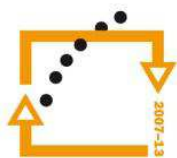
Fura-2 detection of Ca^{2+} in HeLa cells

www.pco.de/data/CalciumOverlay_GalleryXL.jpg





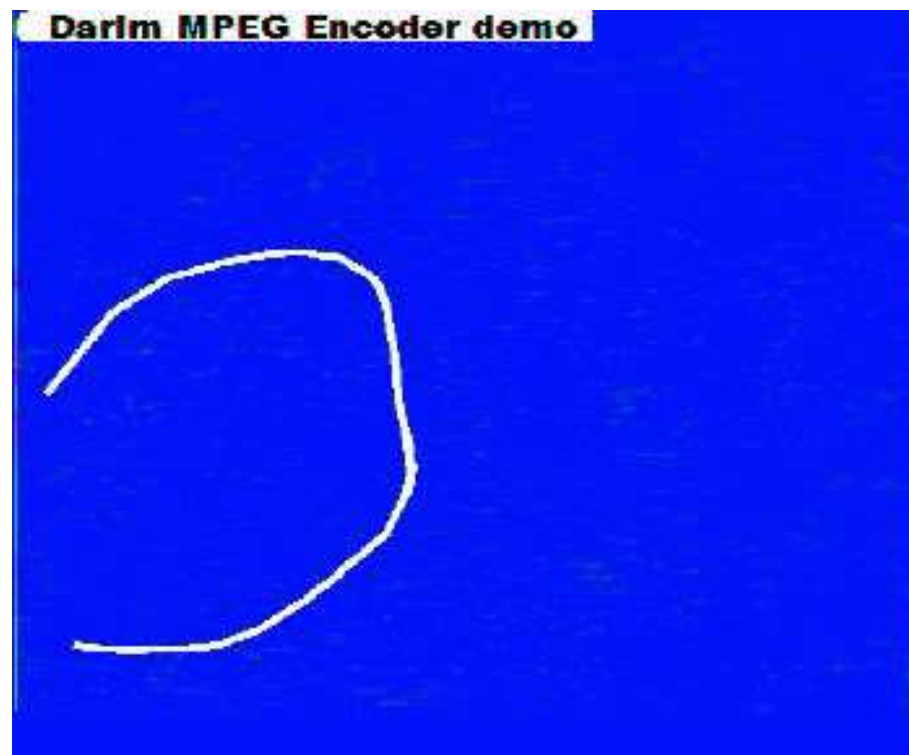
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE
DO ROZVOJE
VZDĚLÁVÁNÍ

Vápníkové vlny



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

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.

Závěr

- Fluorescenční spektroskopie je použitelná na škále od molekul až po velké systémy
- Můžeme ji využít k identifikaci molekul, k jejich kvantifikaci i sledování molekulárních interakcí
- Ve spojení s mikroskopem může být využita jak pro prostou vizualizaci tak pro funkční charakterizaci
- Největšími výhodami jsou extrémní citlivost, neinvazivnost a široká škála použitelných technik