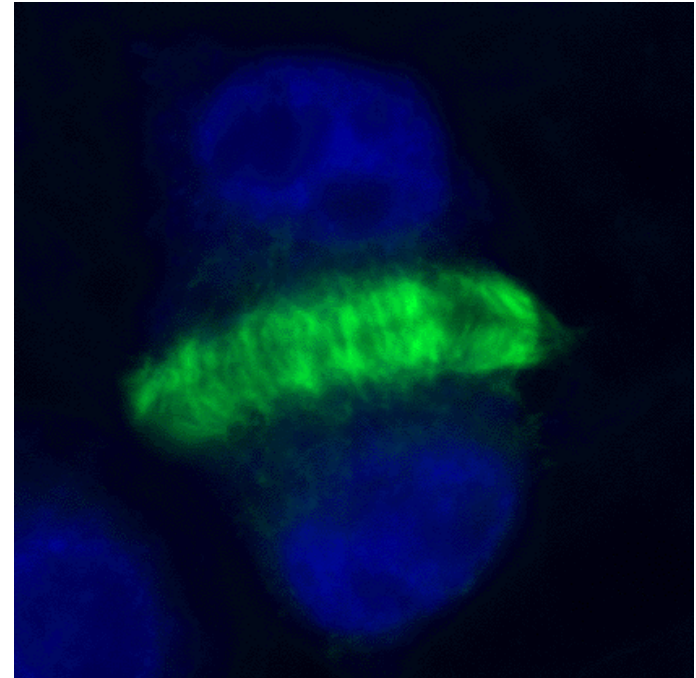


Fluorescenční mikroskopie

-fluorescenční mikroskopie

-konfokální mikroskopie



Fluorescence a fluorofory

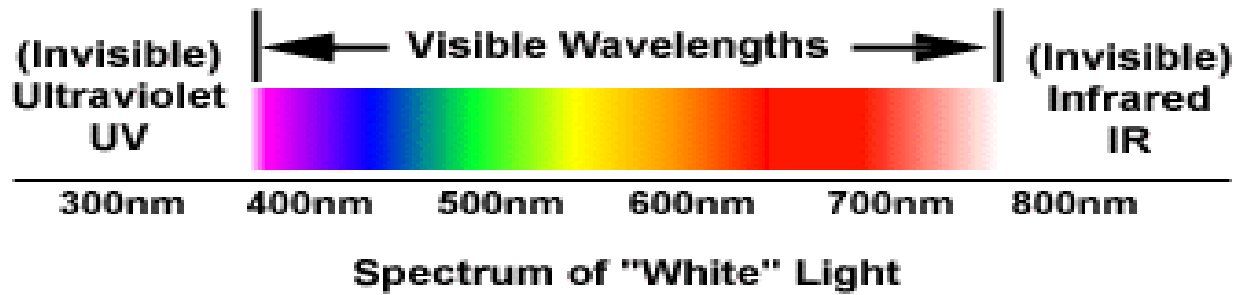


Figure 2

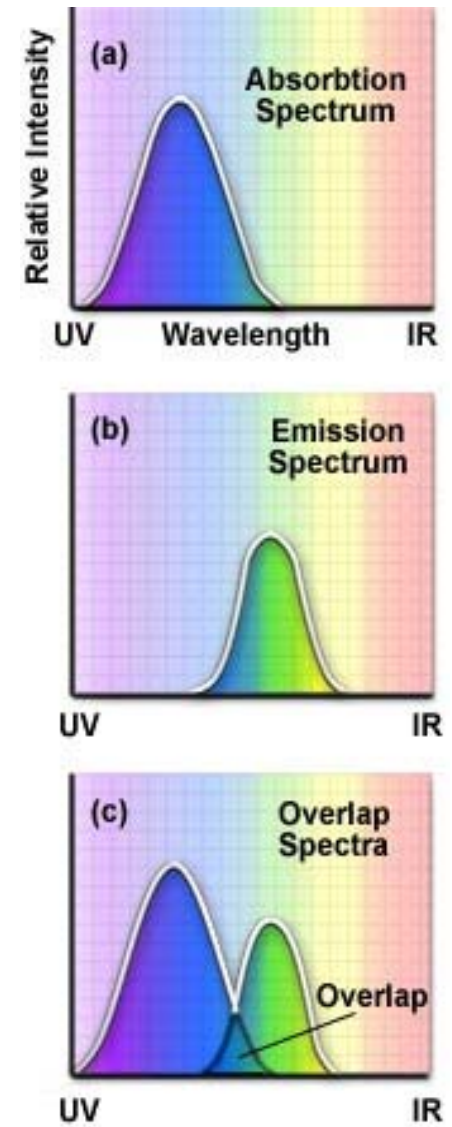
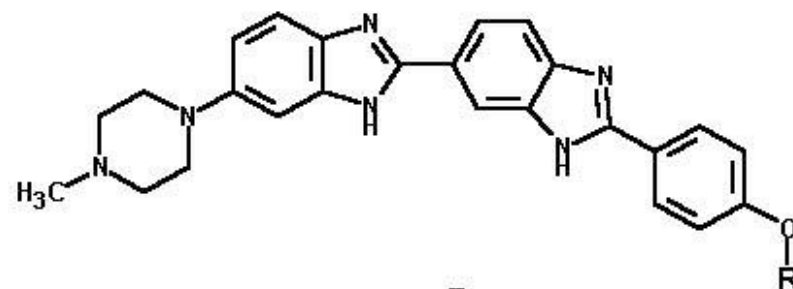
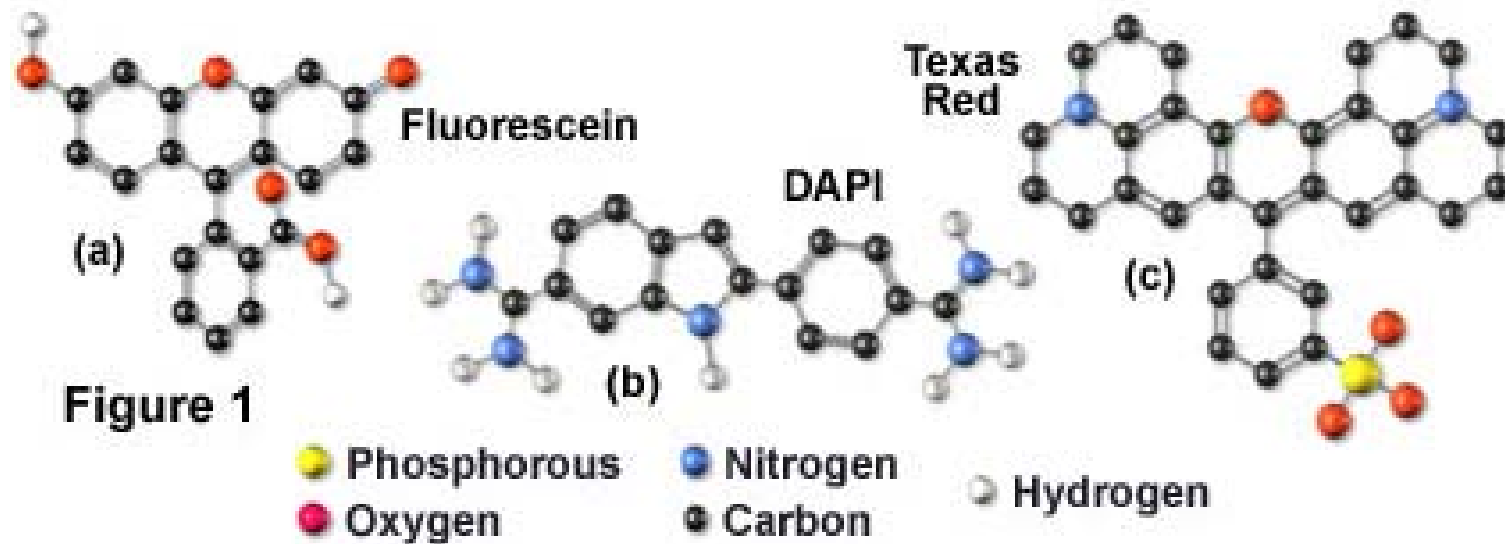
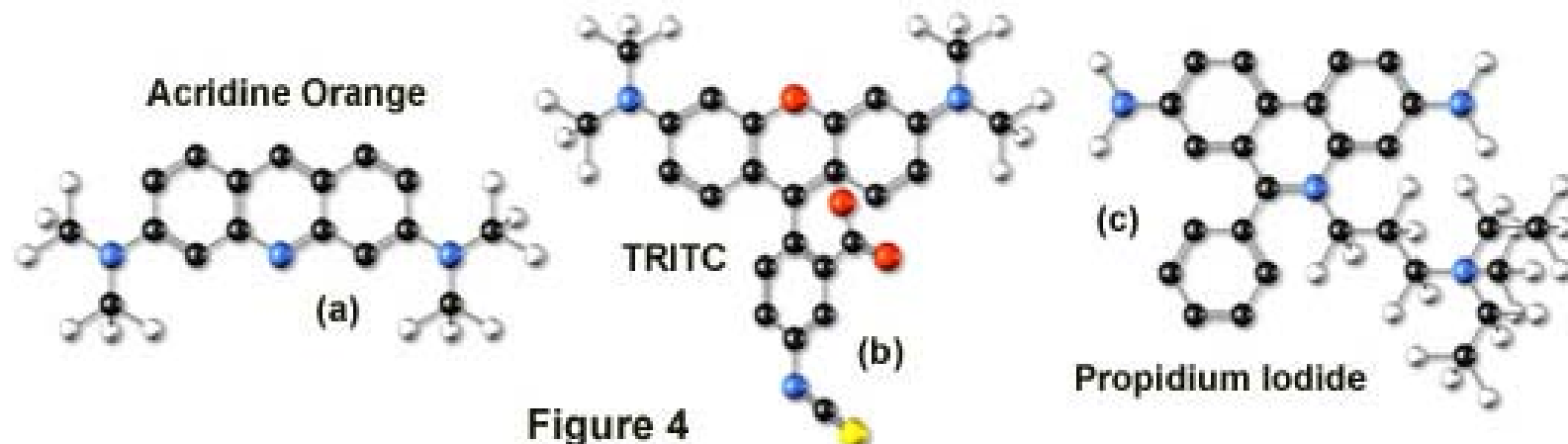


Figure 1



Hoechst 33258 R = H

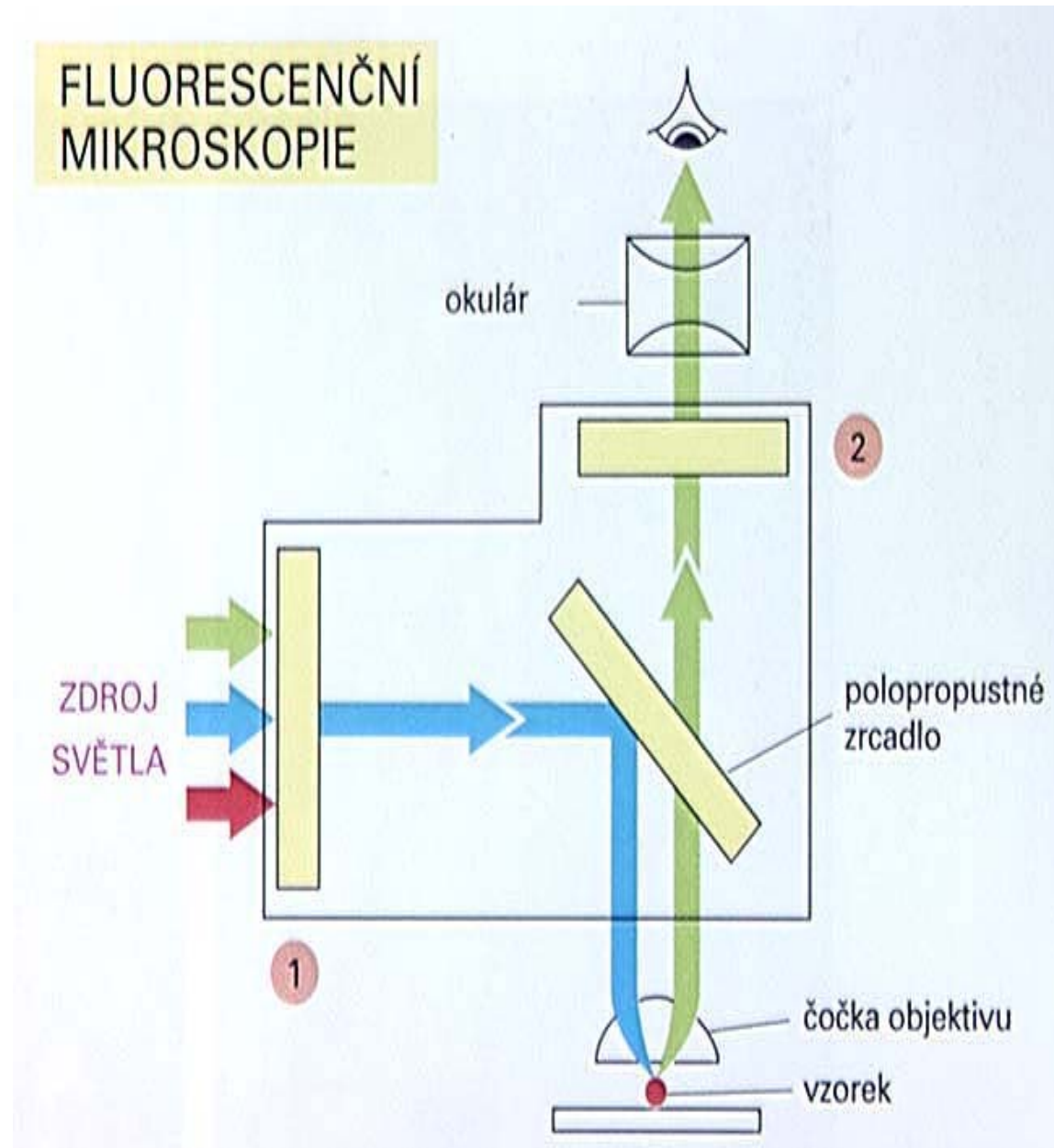
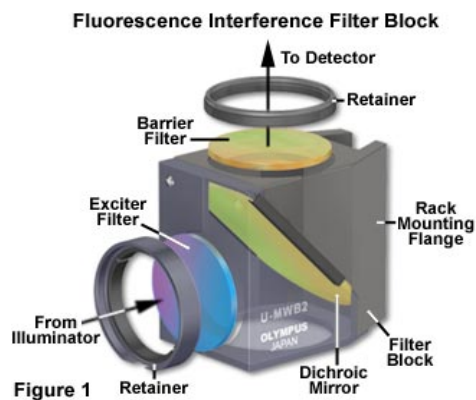
Hoechst 33342 R = CH₂CH₃

Schéma konvenčního fluorescenčního mikroskopu

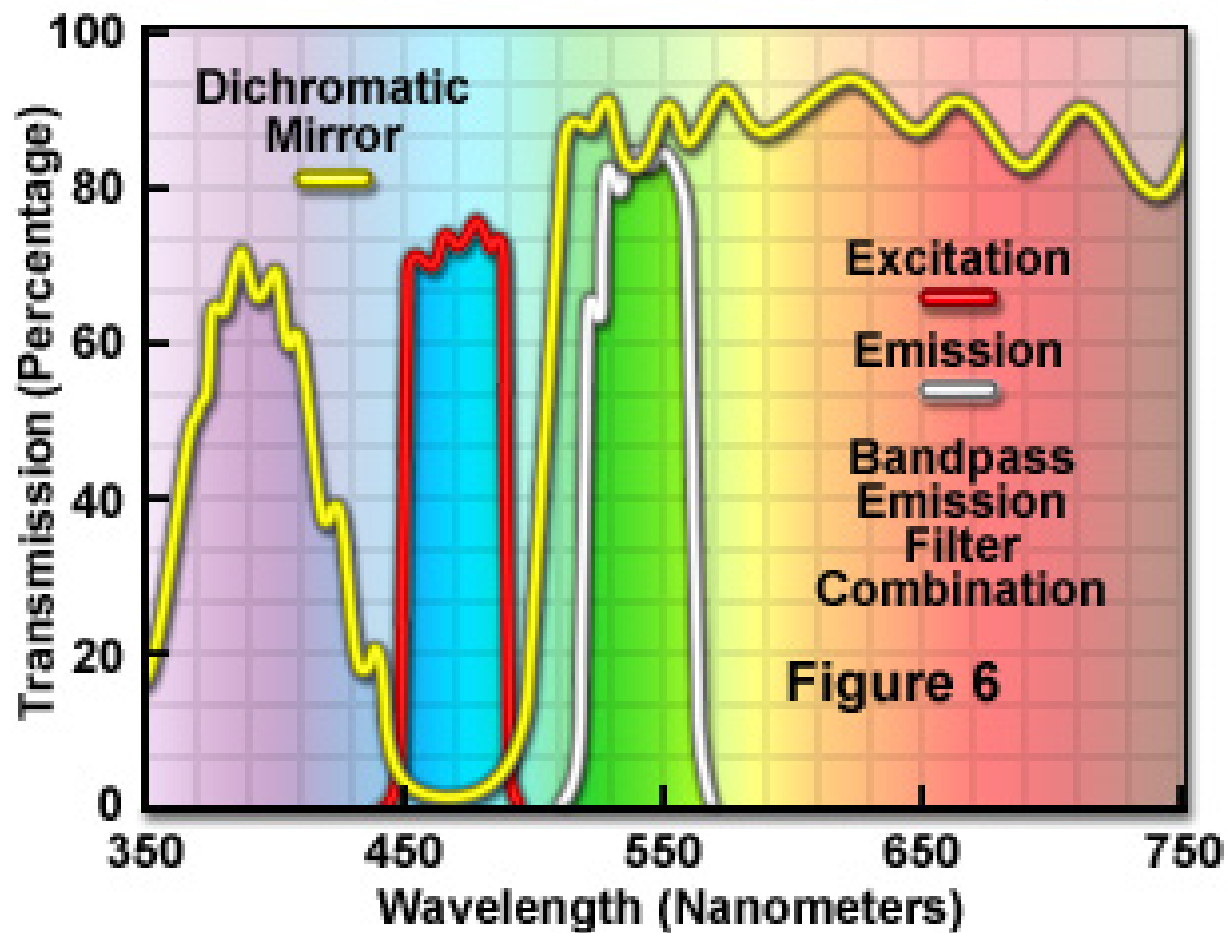
-Na fluorescenčně značený vzorek dopadá pouze světlo o vlnových délkách excitujících daný fluorofor.

-Do okuláru prochází pouze světlo emitované fluoroforem.

-Lze aplikovat více různých fluoroforů na jeden vzorek. Potom je možno studovat i vzájemné postavení těchto struktur v rámci jedné buňky.



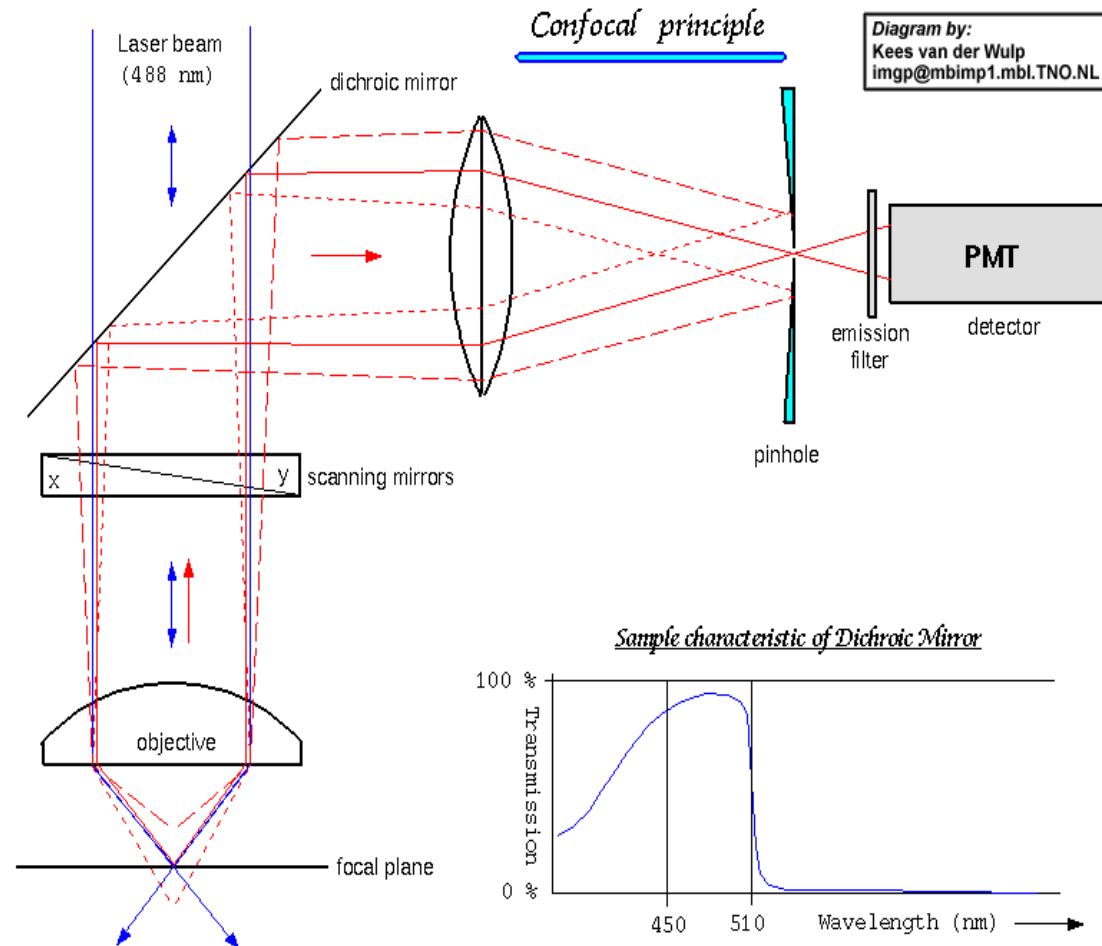
Nikon B-2E (Medium Band Blue Excitation)



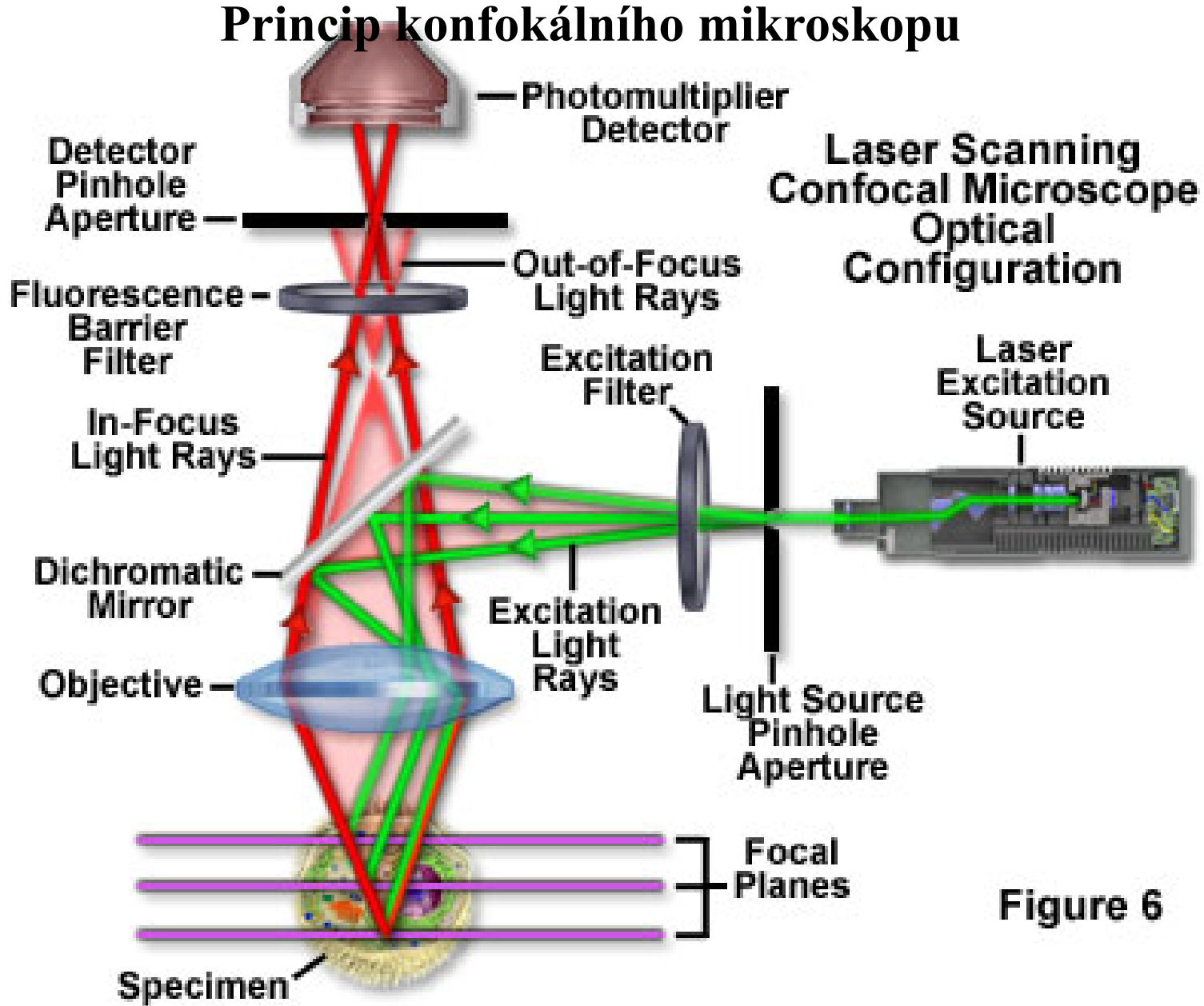
Konfokální mikroskopie

Hlavním přínosem konfokálního typu mikroskopu je omezení světla které je mimo fokus. To umožňuje „rozřezat“ objekt pomocí světelného paprsku, snímat série obrázků a posléze rekonstruovat 3D obraz objektu. Následující schéma popisuje fluorescenční konfokální mikroskop.

- Světelný (laserový) paprsek dopadající na objekt je fokusován do malého bodu na objektu.
- Směs reflektovaného a emitovaného světla je zachycena čočkou a je skrze dichroické zrcadlo (štípač paprsku) fokusována na fotodetektor. Dichroické zrcadlo však nepropustí reflektované světlo (excitující) nýbrž pouze emitované světlo.
- Před fotodetektoem se nachází konfokální apertura (štěrbina) skrze kterou prochází pouze emitované světlo a pouze z místa fokusu. Ostatní paprsky emitovaného světla se odrážejí pryč.



Princip konfokálního mikroskopu



Princip spinning-disk konfokálního mikroskopu

Spinning Disk Microscope Configuration

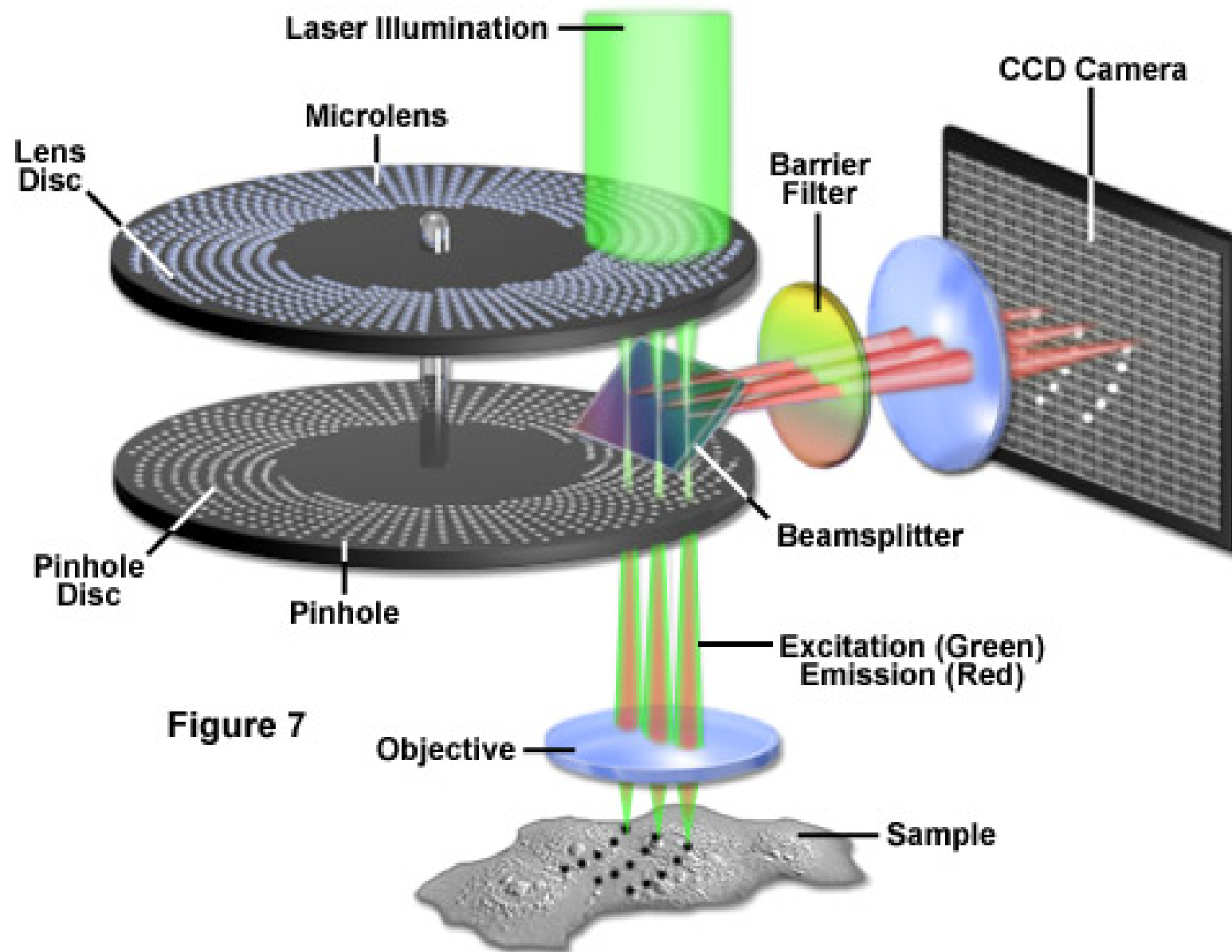
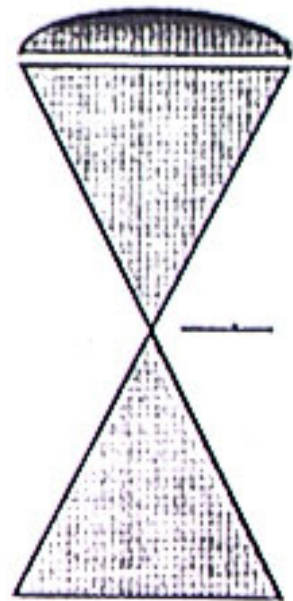


Figure 7

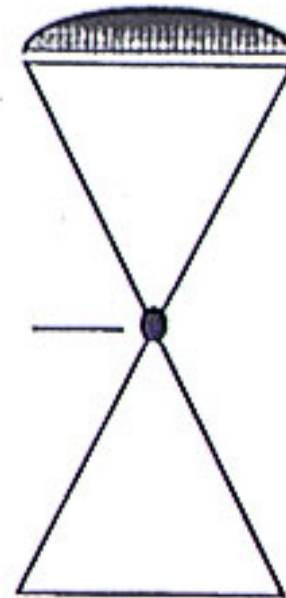
Multifotonová konfokální mikroskopie

Během snímání pomocí konfokálního mikroskopu dochází k excitaci fluoroforu velmi silným zdrojem světla - laserem. To vede k rychlému vysvícení fluoroforu nejen v místě snímání, ale též v místech kudy paprsek prochází k místu fokusu. Multifotonová mikroskopie je založena na principu snímání pomocí světla jehož energie je příliš nízká pro excitaci fluoroforu. V místě fokusu však dochází k setkání dvou nebo tří nízkoenergetických paprsků (fotonů) a sčítající se energie se stává dostatečnou pro excitaci daného fluoroforu. K excitaci dochází tedy pouze v místě fokusu.

1 photon excitation



2 photon excitation



focal plane

GFP – green fluorescent protein

Aequoria victoria



Courtesy of S. Kaech

Vlastnosti GFP

Protein o délce 230 aminokyselin

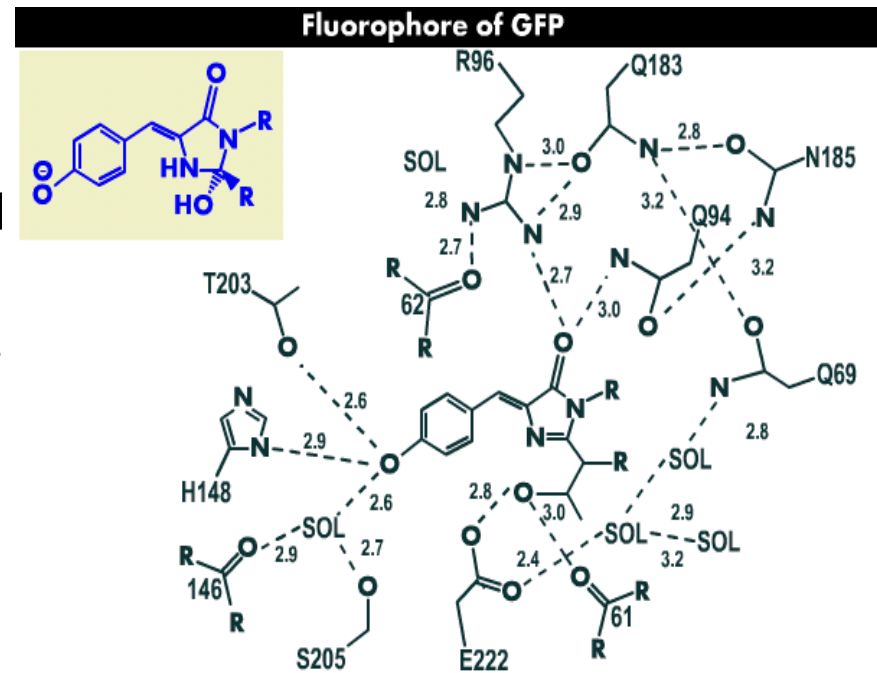
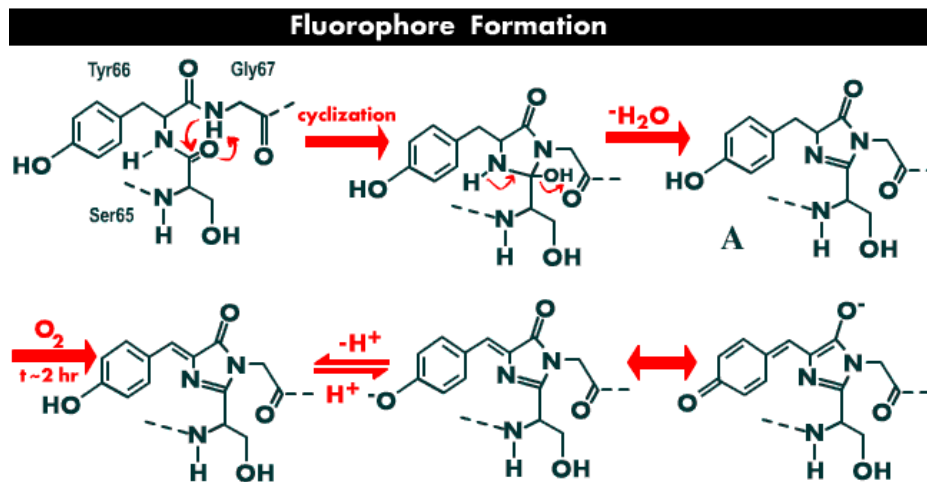
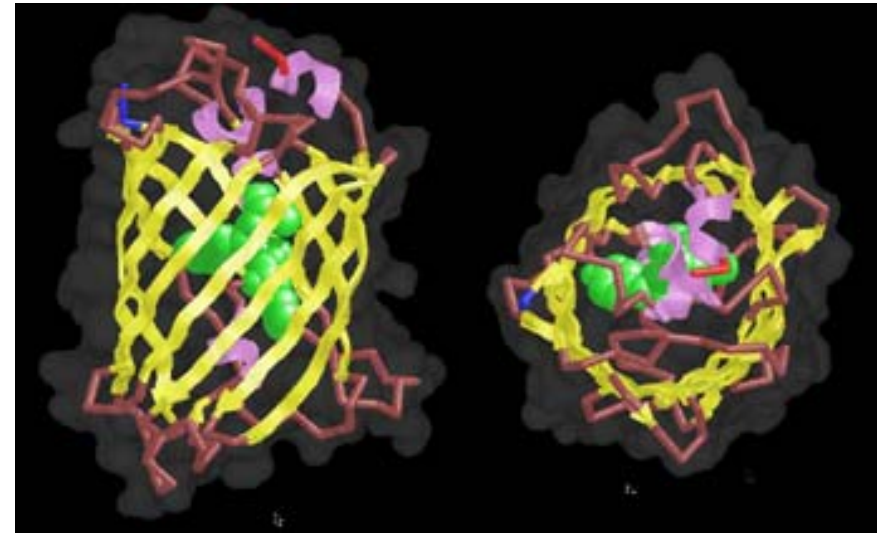
Molekulová hmotnost 27-30 kDa

Excitace 390-470 nm, emise cca 509 nm

Fluorofor:

Beta-barelová struktura: 11 antiparalelních beta řetězců, uprostřed se nachází alfa-helix s chromoforem.

Fluorofor je tvořen Ak zbytky 65, 66 a 67. K formaci chromoforu je třeba molekulárního kyslíku.



GFP v rostlinném organizmu

Rostliny v DNA sekvenci GFP mylně rozeznávaly intron a ten vyštěpovaly. Výsledné GFP bylo nefunkční.

Nutná optimalizace užití kodónů.

Nde I

cat atg	aaa	oyg	cat	gac	ttt	ttc	aag	agt	goc	atg	ccc	gaa	ggt	tat	gta	cag	gaa	aga	<i>gfp</i>
cat atg	aa	oyg	ca	gac	tt	ttc	aag	ag	goc	atg	cc	ga	gg	ta	gt	cag	ga	ag	<i>mgfp^Δ</i>
H	M	K	R	H	D	F	F	K	S	A	N	P	E	G	Y	V	Q	E	R

229/77

act ata	ttt	ttc	aaa	gat	gac	ggg	aac	tac	aag	aca	oyt	gct	gaa	gtc	aag	ttt	gaa	ggt	<i>gfp</i>
ac	at	tt	ttc	aa	ga	ggg	aac	tac	aag	aca	oyt	gct	gaa	gtc	aag	ttt	ga	gg	<i>mgfp^Δ</i>
T	I	F	F	K	D	D	G	N	Y	K	T	R	A	E	V	K	F	E	G

289/97



Dra I

gat acc	ctt	ggt	aat	aga	atc	gag	tta	aaa	ggt	att	gat	ttt	aaa	gaa	gat	gga	aac	att	<i>gfp</i>	
ga	acc	ct	gt	aa	ag	atc	gag	ct	aa	gg	at	gat	tt	aa	ga	ga	gga	aac	at	<i>mgfp^Δ</i>
D	T	L	V	N	R	I	E	L	K	G	I	D	F	K	E	D	G	N	I	

349/117



Acc I

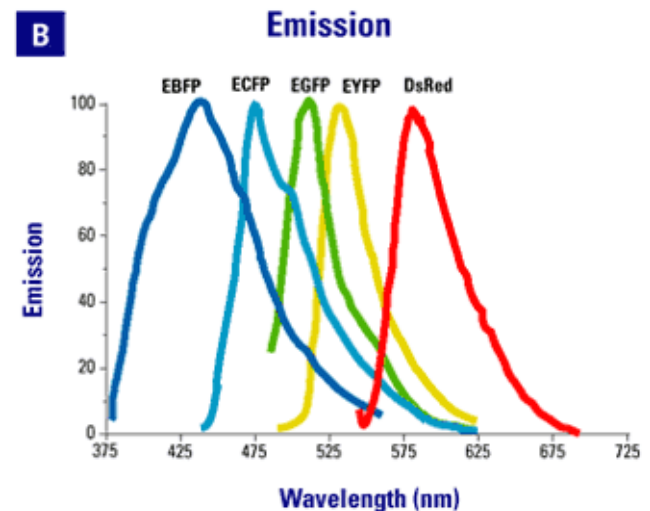
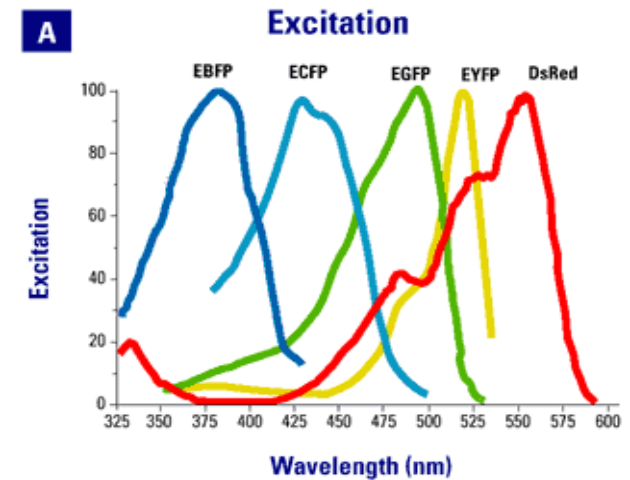
ctt gga	cac	aaa	ttg	gaa	tac	aac	tat	aac	tca	cac	aat	gta	tac	atc	atg	gca	gac	aaa	<i>gfp</i>	
ct	gg	ca	aa	ttg	gaa	tac	aac	ta	aa	tc	ca	aa	gta	tac	atc	atg	gca	gac	aaa	<i>mgfp^Δ</i>
L	G	H	K	L	E	Y	N	Y	N	S	H	N	V	Y	I	N	A	D	K	

409/127

Mutace GFP

Cílem mutačních úprav bylo a je:

1. optimalizace užití kodónů,
2. optimalizace teplot pro maturaci (Phe64Leu)
3. urychlení maturace
4. posun excitačních a emisních spekter do červené části spektra (S65T – tzv. EGFP)
5. navýšení intenzity fluorescence
6. zabránění opoligomerizaci atd.

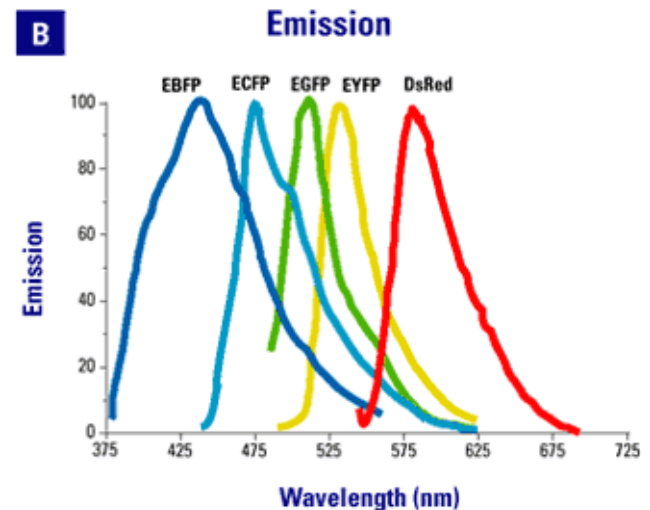
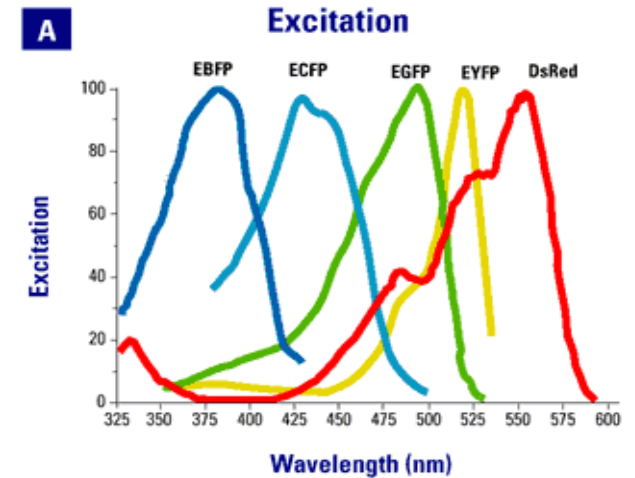


Mutace GFP

YFP vzniká z GFP mutací Thr203Tyr a dalšími nutnými mutacemi. Je charakteristický ještě delším posunem do červené oblasti.

BFP vzniká z GFP mutací Tyr66His(Trp). Spíše slabě fluorescenční, nutné další úpravy molekuly. Velmi krátká excitační vlnová délka cytotoxická. Používané hlavně pro dvojité značení nebo pro studie FRET.

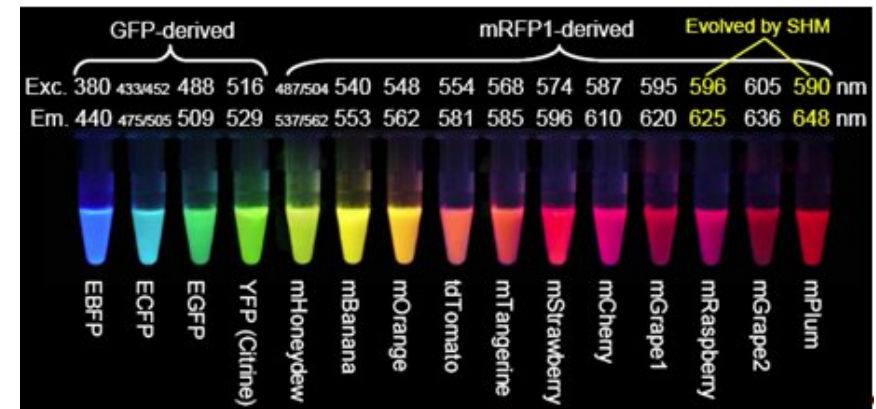
CFP je „cyan“ (modrozelený) chromofor, je oproti **BFP** posunut ve směru červené části spektra a je excitován vlnovými délkami které jsou pro buňku méně toxické. Používán ve FRET studiích s **YFP** chromoforem.



Nová generace fluorescenčních proteinů - mFruits

dsRedFP izolován z mořské sasanky *Discosoma striata*. Menší jasnost, často oligomery, agreguje. Izolovány další RFP z jiných mořských živočichů.

Protein	Color	Excitation Maximum (nm)	Emission Maximum (nm)
mPlum	far red	590	649
E2-Crimson	far red	611	646
mRaspberry	far red	598	625
HcRed1	far red	588	618
mCherry	red	587	610
mStrawberry	red	574	596
AsRed2	red	576	592
DsRed-Monomer	red	557	592
DsRed2	red	563	582
tdTomato	red	554	581
DsRed-Express2	red	554	591
DsRed-Express	red	554	586
mOrange2	orange	549	565
mBanana	yellow	540	553



[Speed Read](#)
[Award Ceremony Video](#)
[Award Ceremony Speech](#)
[Banquet Video](#)

- ▶ [Osamu Shimomura](#)
- ▶ [Martin Chalfie](#)
- ▶ [Roger Y. Tsien](#)

[All Nobel Prizes in Chemistry](#)
[All Nobel Prizes in 2008](#)

Press Release

8 October 2008

The [Royal Swedish Academy of Sciences](#) has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2008 jointly to

Osamu Shimomura, Marine Biological Laboratory (MBL), Woods Hole, MA, USA and Boston University Medical School, MA, USA,

Martin Chalfie, Columbia University, New York, NY, USA

and

Roger Y. Tsien, Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".

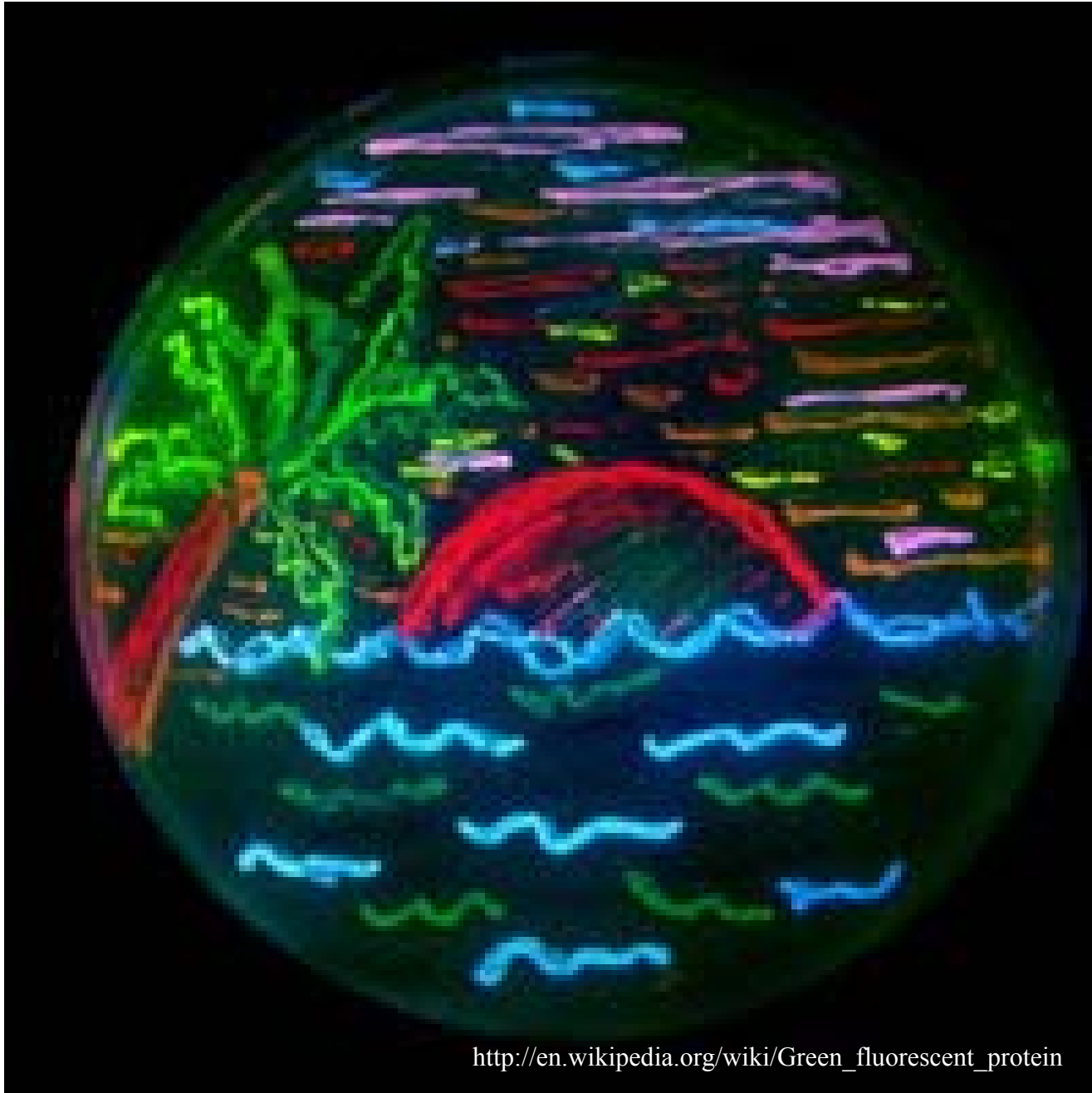
Roger Tsien

Bacterial colony using various GFP and GFP-like proteins (from Tsien lab Web site).



While Shimomura, Prasher and Chalfie were all instrumental in taking GFP from the jellyfish and showing that it can be used as a tracer molecule, it is Roger Tsien who is responsible for much of our understanding of how GFP works and for developing new techniques and mutants of GFP. His group has developed mutants that start fluorescing faster than wild type GFP, that are brighter and have different colors (see below, the E stands for enhanced versions of GFP, m are monomeric proteins and tdTomato is a head-to-tail dimer).





http://en.wikipedia.org/wiki/Green_fluorescent_protein

Využití fluorescenčních proteinů jako molekulární fluorescenční značky



Fúzní proteiny

Výhody

Pozorování dynamiky proteinových struktur v živé buňce bez nutnosti fixace

Možnost užití inducibilních promotorů a tedy indukovat tvorbu fúzních jen v určitém čase

Nevýhody

Fúze se může projevit v nefunkčnosti fúzního proteinu

Fototoxicita modrého krátkovlnného světla používaného pro excitaci BFP

FRET:

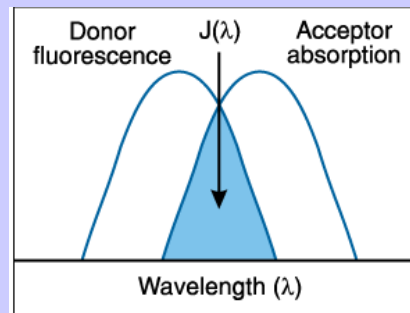
Fluorescence resonance energy transfer

(někdy též Förster resonance energy transfer)

Metoda pro měření nanometrových vzdáleností a jejich změn mezi molekulami *in vivo* i *in vitro*.

Základní podmínky pro FRET:

1. Donorový a akceptorový fluorofor. Absorpční spektrum akceptoru se musí překrývat s emisním spektrem donoru.



2. Donorový a akceptorový fluorofor musí být velmi blízko u sebe, aby došlo k FRET (většinou 10-100 Å).

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

Účinnost přenosu energie (E) se řídí podle vzorce

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

kde R_0 je vzdálenost mezi fluorofory, při které je 50% energie předáno (tedy 50% excitovaných donorových molekul je deaktivováno díky FRET). Závisí na spektrálních charakteristikách fluoroforů a jejich vzájemné orientaci.

Známe-li R_0 a měříme-li E, je možné stanovit vzdálenost mezi molekulami. Obecně lze takto stanovit spíše **změnu vzdálenosti mezi molekulami**, neboť E závisí také na orientaci molekul a dalších faktorech.

Příklady fluoroforů tvořících páry pro FRET:

GFP a jeho deriváty (zvláště ECFP a YFP)

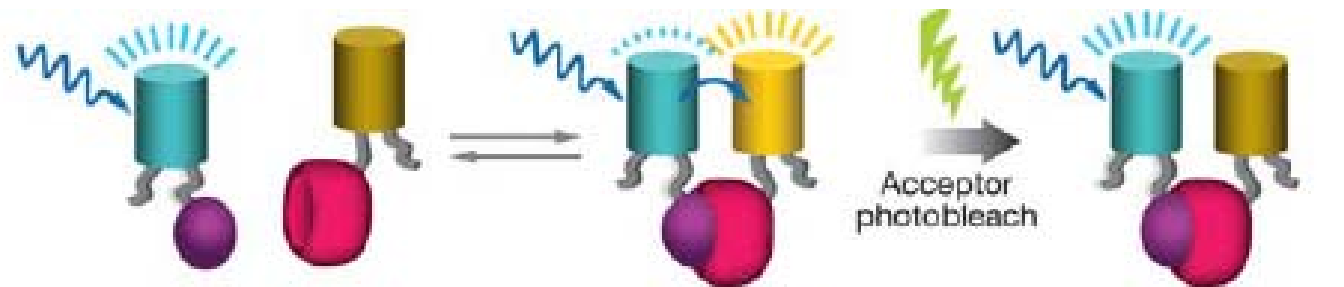
Coumarin – derivát fluoresceinu

Cyaninové barvy (Cy5, Cy5.5, Cy7) – vhodné pro měření vzdáleností $>100 \text{ \AA}$ (R_0 je velké)

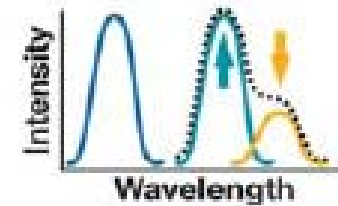
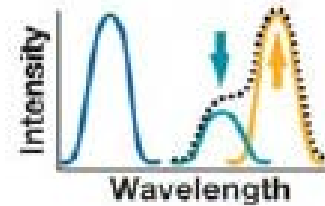
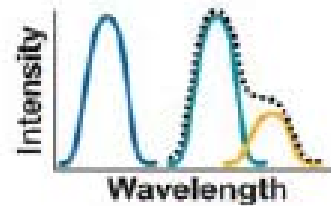
Cheláty lanthanoidů – organické fluorofory

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

Fluorescence
resonance
energy transfer
(FRET)



Spectral FRET



FRET: Fluorescence resonance energy transfer

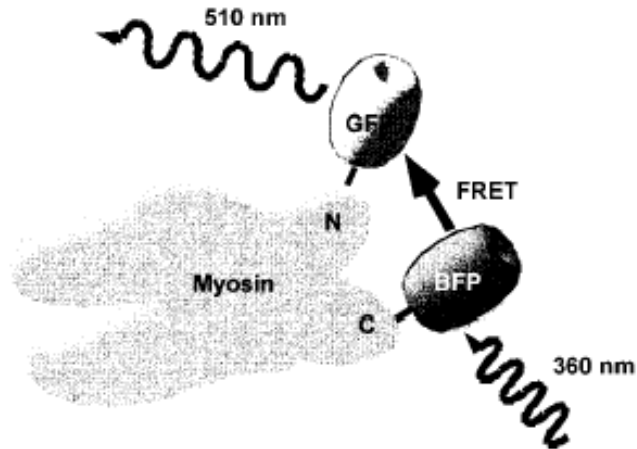


Fig. 1 GFP based FRET was used to measure conformational changes in myosin upon ATP binding and hydrolysis. Figure modified from ref. 4 with permission.

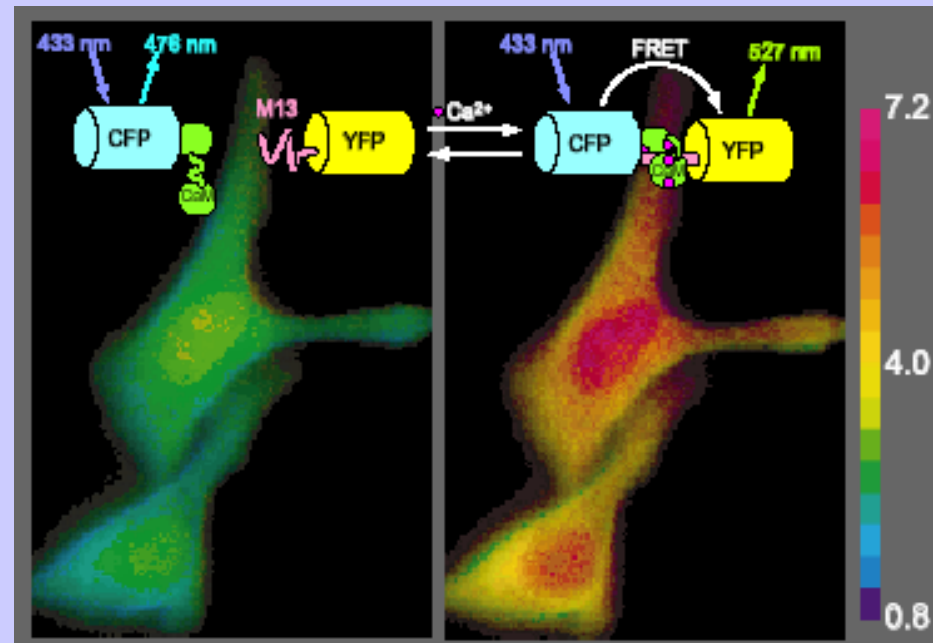


Fig. 2 FRET constructs for measuring intracellular calcium. Cyan fluorescence protein labeled calmodulin and yellow fluorescence protein labeled calmodulin binding peptide (M13-YFP) were coexpressed. High Ca²⁺ levels (right) lead to binding and FRET emission of YFP (pseudocolor red); low Ca²⁺ levels (left) lead to little FRET and mostly blue emission (pseudocolor green). Figure from ref. 5 with permission.

FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching

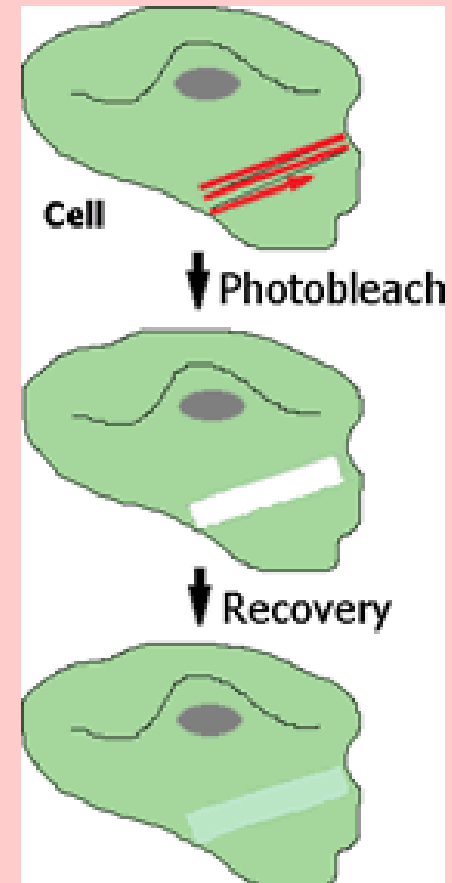
Metoda vyvinuta původně pro laterální difúzi molekul v membránách.

Princip FRAP:

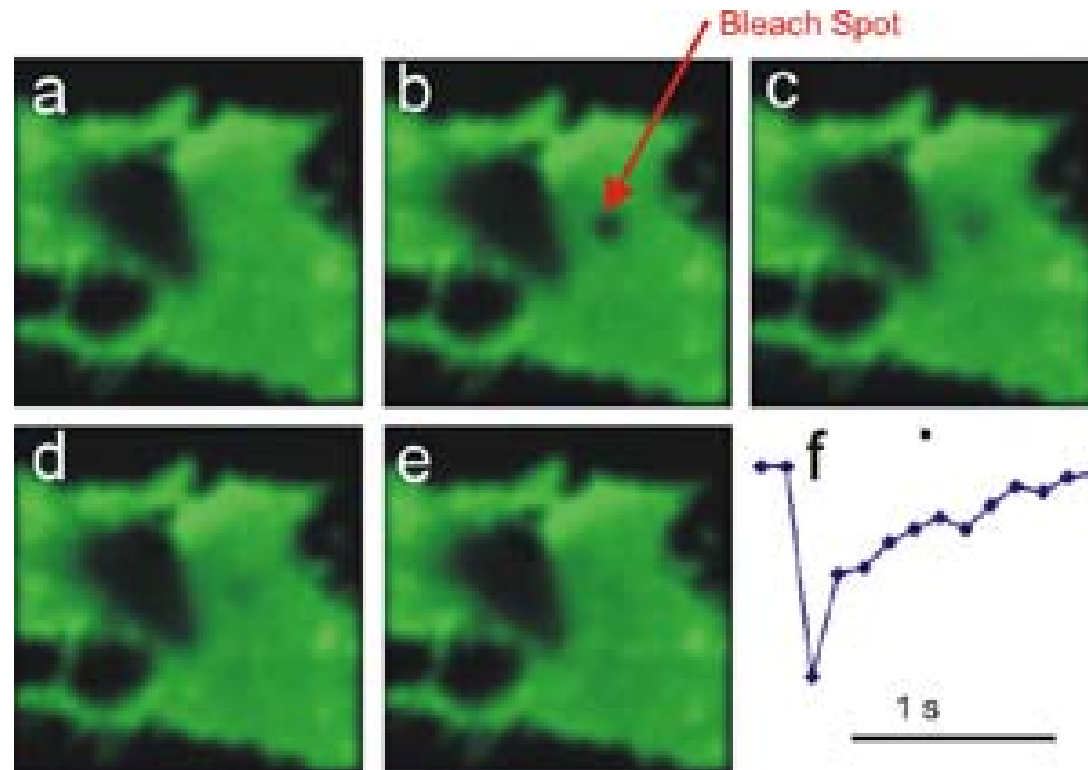
Fluorescenční molekula je fúzována se zkoumaným proteinem nebo membránovými lipidy.

Po ozáření vybraného místa excitačním světlem je fluorescence molekul **vysvícena**.

Pozorujeme **znovuobnovení fluorescence** ve vysvíceném místě, které svědčí o laterálním pohybu molekul v membránách, kontinuitě membránových organel (ER nebo GA), turnoveru zkoumaných molekul nebo transportu molekul (cytoskelet).

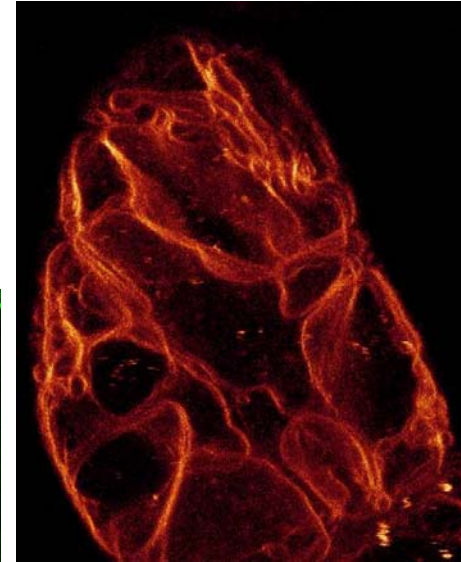


FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching

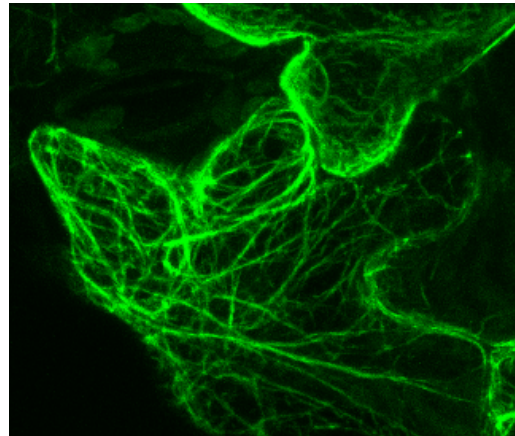


Praktické úlohy

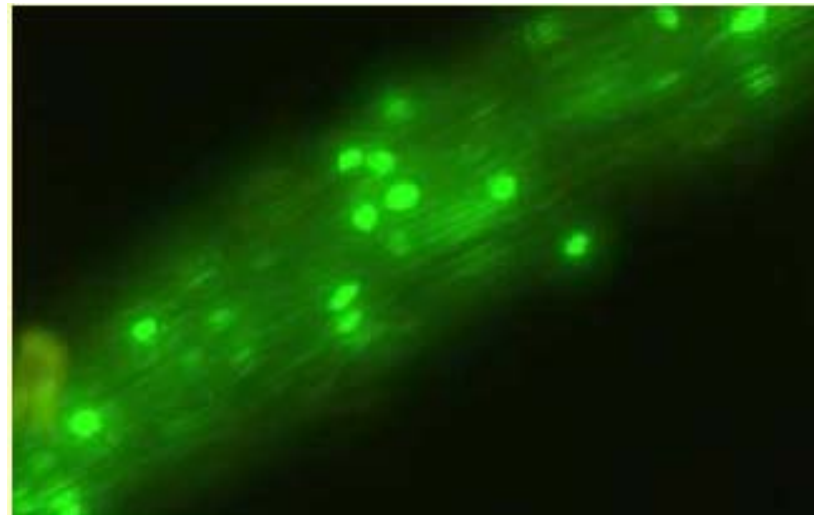
1. Endomembránový systém



2. Cytoskelet



3. Jádro



1. Endomembránový systém

- A. Vizualizace ER, GA, vakuol, peroxisómů. Popis struktury a dynamiky
- B. Demontrace role cytoskeletu v dynamice endomembránových organel
- C. Studium transportu v rámci sekretorické dráhy
- D. Role peroxisómů v oxidativním stresu

Teoretická příprava na praktikum:

- Sekretorická dráha, organely sekretorické dráhy, definice, funkce jednotlivých organel, struktura organel.
- Role cytoskeletu v pohybu organel, mechanismus pohybu cytoplazmy
- Regulační mechanismy kontrolující transport v rámci sekretorické dráhy
- Mechanismus účinku: **brefeldin A**

2. Cytoskelet

- A. Vizualizace aktinu a mikrotubulů. Popis struktury a dynamiky
- B. Popis mikrotubulárního cytoskeletu v difúzně rostoucích buňkách, organizace mikrotubulů v buňkách s různými tvary
- C. Role mikrotubulů v dělení jádra a buňky – změny MT v průběhu buněčného cyklu
- D. Demontrace role mikrotubulů v syntéze buněčné stěny a udržení tvaru buněk
- E. Demontrace role aktinového cytoskeletu v pohybu organel

Teoretická příprava na praktikum:

- Struktura a základní funkce mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu v rostlinné buňce
- Vysvětlení, co znamená dynamika rostlinného cytoskeletu
- Složení buněčné stěny a její mechanické vlastnosti
- Mechanismus účinku: **latrunkulin B, oryzalin, isoxaben.**
- Co je mutace *procuste1*? Jaký je fenotypový projev této mutace?

3. Jádro

A. Vizualizace jader pomocí různých technik

B. Vizualizace fází mitózy

C. Demonstrace struktury jader v diferencovaných buňkách, pohyb jader

D. Dělení jádra

Teoretická příprava na praktikum:

- Struktura a základní funkce jádra
- Fáze buněčného cyklu a mitózy
- Jaderný obal a transport mezi jádrem a cytoplazmou
- Mechanismus účinku: leptomycin B
- Princip vizualizace pomocí barviva Hoechst 33258, SYTO barviva (web praktika)