

# Флюоресценция. Зелёные белки



# План выступления

1. Понятие флюоресценции
2. Механизм флюоресценции
3. Флюорохромы и флюорофоры
4. Характеристики флюоресценции
5. Факторы, влияющие на флюоресценцию
6. Флюоресцентные методы исследования клеток
7. Флюорохромы, связывающиеся с НК
8. FISH-метод
9. Иммуноцитохимическое окрашивание
10. Митотрекеры
11. Зелёный флюоресцирующий белок

# Понятие флюоресценции

**Флюоресценция** – это физическое явление, суть которого заключается в кратковременном поглощении кванта света флюорофором (веществом, способным флуоресцировать) с последующим быстрым высвобождением другого кванта с меньшей энергией.

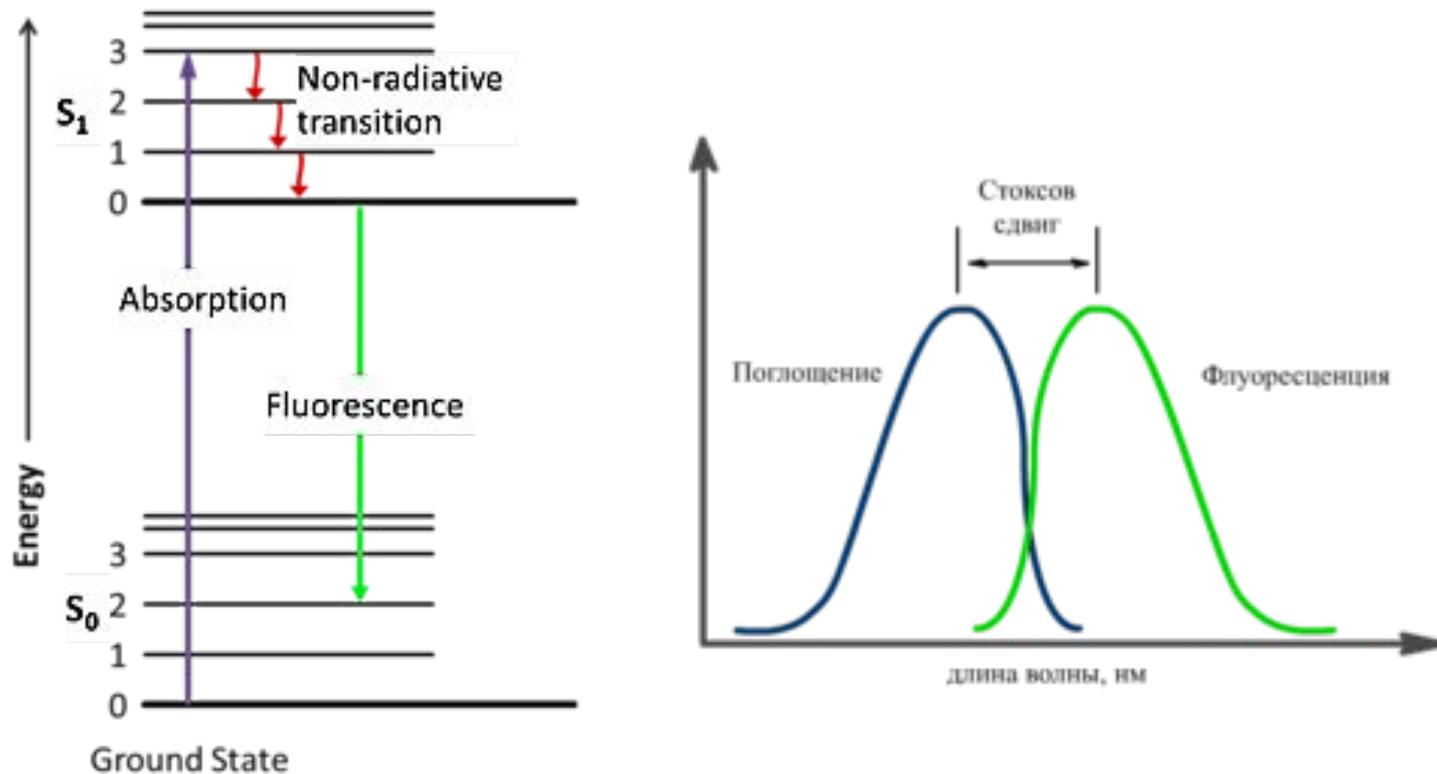


**Фиолетовая разновидность  
флюорита**

<http://www.ladykiss.ru/kamni/tekuchij-kamen-flyuorit-eg-o-svojstva-i-sfery-primeneniya.html>

## **Свойства флюоресценции (открыта Стоксом в 1852 году):**

- 1) явление возникает в способных к этому телах почти всегда под влиянием света, содержащего лучи короткой длины волны — фиолетовые и ультрафиолетовые;
- 2) лучи, вызывающие флюоресценцию тела, всегда поглощаются этим телом.



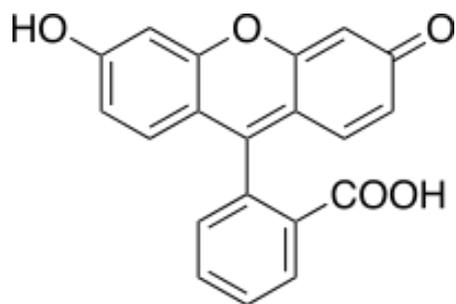
## Диаграмма Яблонского (слева) и сравнение спектров поглощения и флуоресценции вещества

<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F>

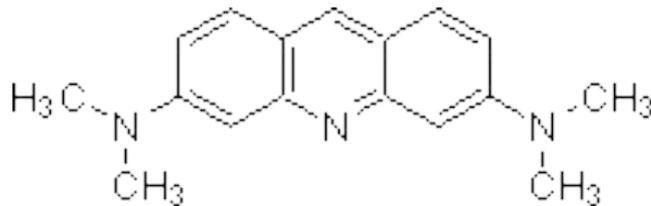
Фотон поглощается невозбуждённой молекулой или атомом ( $S_0$ ), при этом электрон последнего электронного уровня переходит в возбуждённое состояние ( $S_1$ ). Энергия фотона частично расходуется на какие-то процессы внутри вещества (потери на тепловые колебания молекул, затраты на фотохимические реакции и т.п.), не приводящие к излучению. Остальная часть высвобождается в виде излучения (Стоксово излучение). Длина волны света увеличивается.

# Флюорохромы и флюорофоры

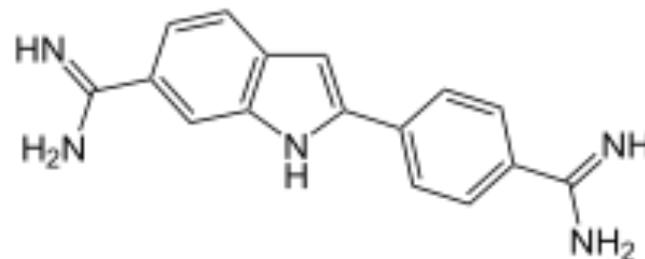
К флюоресценции способны многие вещества, обладающие системой сопряжённых  $\pi$ -связей. Способные флюоресцировать атомы, молекулы и молекулярные комплексы называют флюорофорами или флюорохромами. В ряде источников под флюорохромами понимают все виды флюоресцирующих молекул, а под флюорофорами — только флюоресцирующий компонент (группировку) крупной молекулы



**Флюоресцеин**

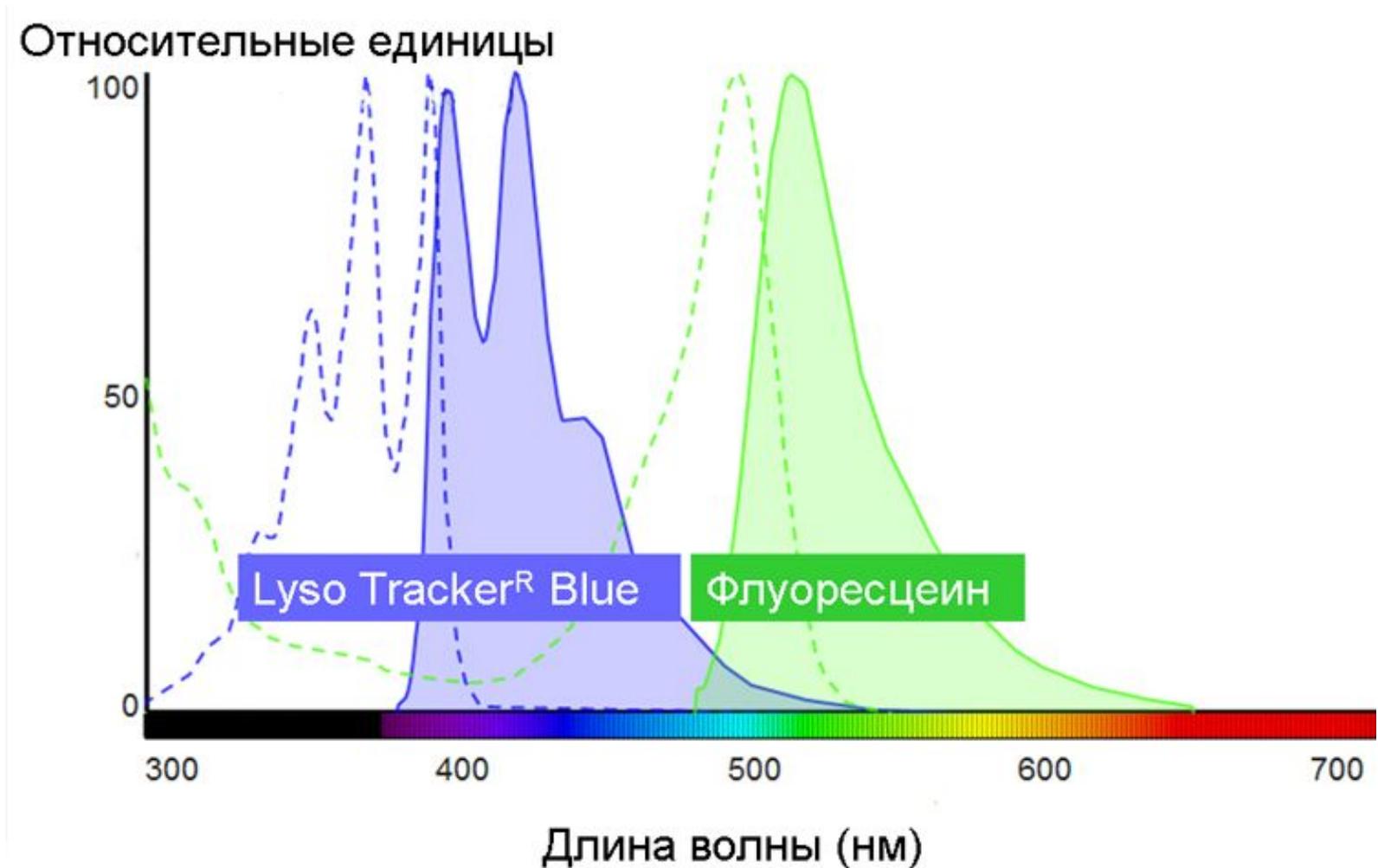


**Акридиновый  
оранжевый**



**DAPI  
(4',6-диамидино-2-  
фенилиндол)**

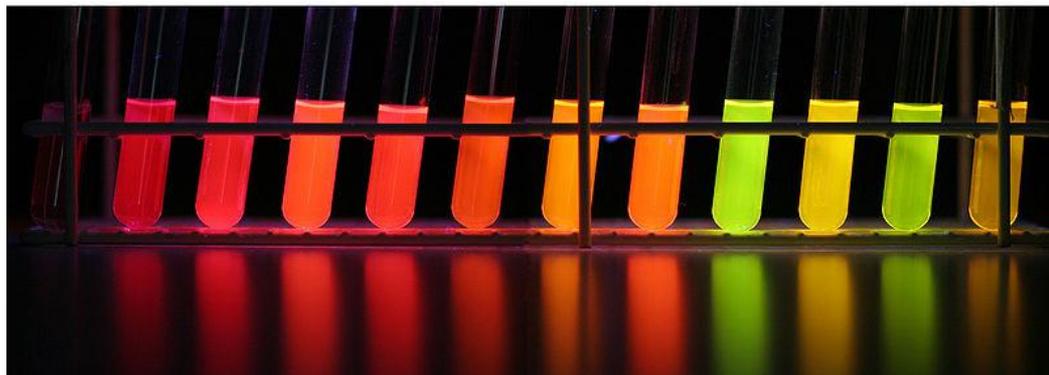
# Характеристики флюоресценции



**Спектры поглощения (пунктир) и флуоресценции (сплошные линии) флуоресцеина и Lyso Tracker<sup>TM</sup> Blue (Molecular Probes<sup>®</sup>)** *Источник: [Life Technologies](#).*

# Факторы, влияющие на флюоресценцию

- Структура вещества;
- рН среды;
- Температура;
- Концентрация люминесцентного вещества;
- Интенсивность возбуждающего излучения;
- Присутствие посторонних веществ



**Растворы красителя  
нильский голубой при  
освещении УФ (366 нм) в  
разных растворителях**

<https://tradio.wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F>

# Флюоресцентные методы окрашивания клеток



## **Окрашивание чистыми флюорохромами**

Акридиновый оранжевый,  
DAPI и др.



## **Использование меченых флюорофорами веществ**

Антитела в иммуноцитохимии,  
ДНК-зонды в FISH и др.

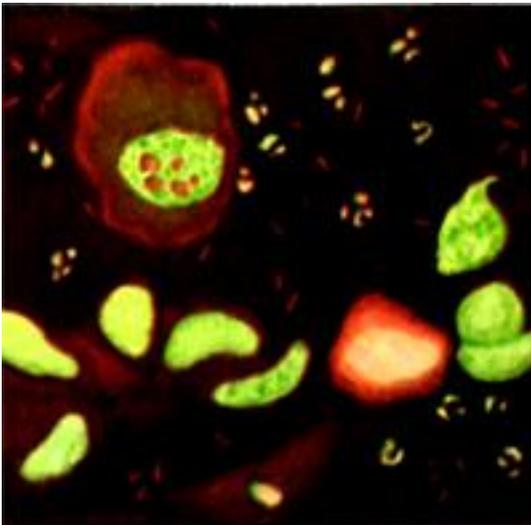
В клеточной биологии выделяют 2 основных направления использования флюоресцентных методов:

- окрашивание ядерных компонентов (ДНК, РНК, белки хроматина и т.д.);
- окрашивание компонентов цитоплазмы клеток

# Флюорохромы, связывающиеся с НК

Классификация по взаимодействию с нуклеиновыми кислотами:

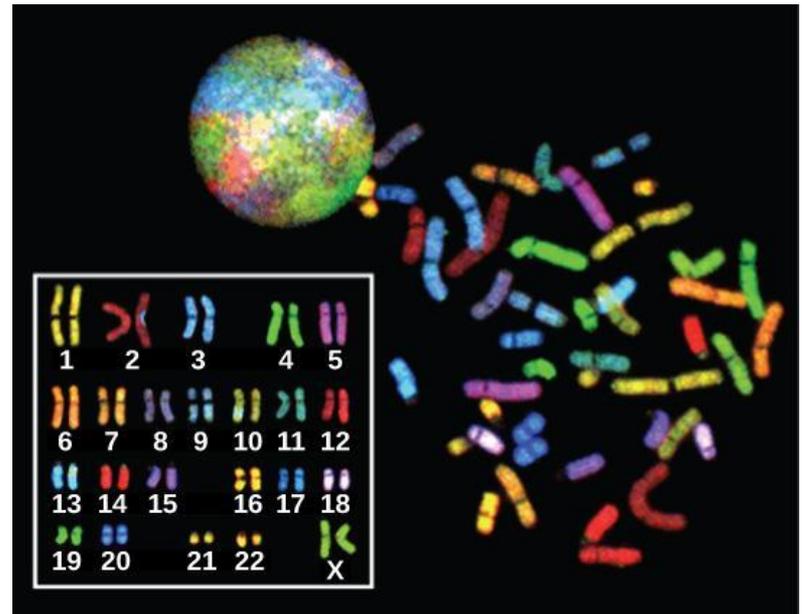
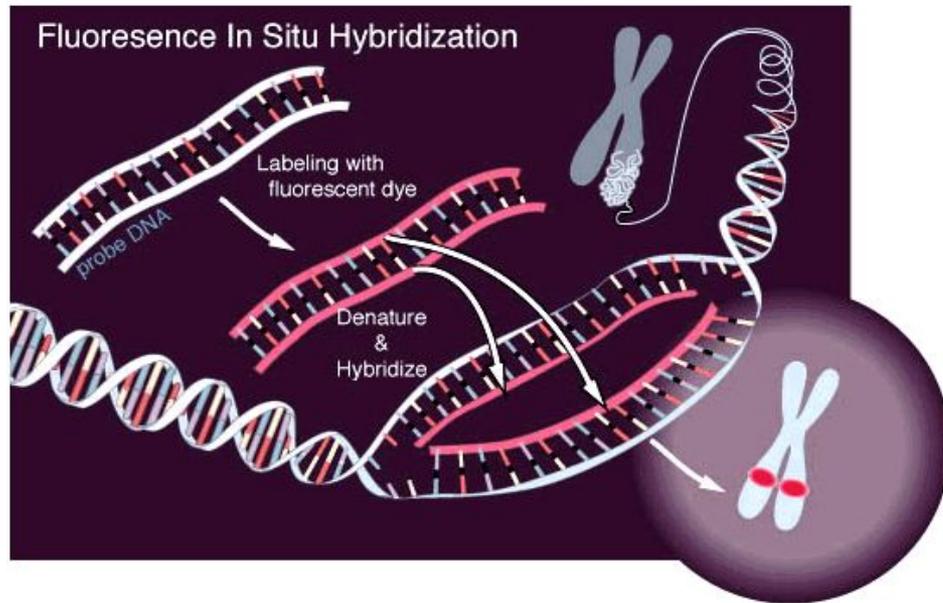
- Встраивание в малую бороздку двунитевой ДНК (DAPI, Hoechst)
- Встраивание между парами оснований в двунитевую ДНК (бромистый этидий, акридиновый оранжевый)
- Электростатические взаимодействия с РНК и одноцепочечной ДНК (акридиновый оранжевый)



Клетки раковой опухоли в соскобе с шейки матки (окрашивание акридиновым оранжевым, двунитевая ДНК окрашена в жёлто-зелёный цвет, РНК – в красный)

<http://www.anticancer.ru/articles/articles-321.htm>  
↓

# FISH-метод



Принцип FISH-окрашивания (слева) и 23 окрашенные пары хромосом соматической клетки женщины (справа)

<https://opentextbc.ca/conceptsofbiology1stcanadianedition/chapter/6-1-the-genome/>

Метод FISH (fluorescence *in situ* hybridization) служит для флюоресцентного выявления ДНК отдельных хромосом без разрушения клеток. Применяются меченные флюорохромами одноцепочечные ДНК-фрагменты

# Иммуноцитохимическое окрашивание

Для флюоресцентной окраски цитоплазмы используют методы иммуноцитохимии, в которых флюорохромный краситель, связанный с антителом или с другим высокоаффинным агентом, позволяет выявить внутриклеточную локализацию молекул определённого типа

## Схема Реакции иммунофлюоресценции (РИФ) (Кунса)

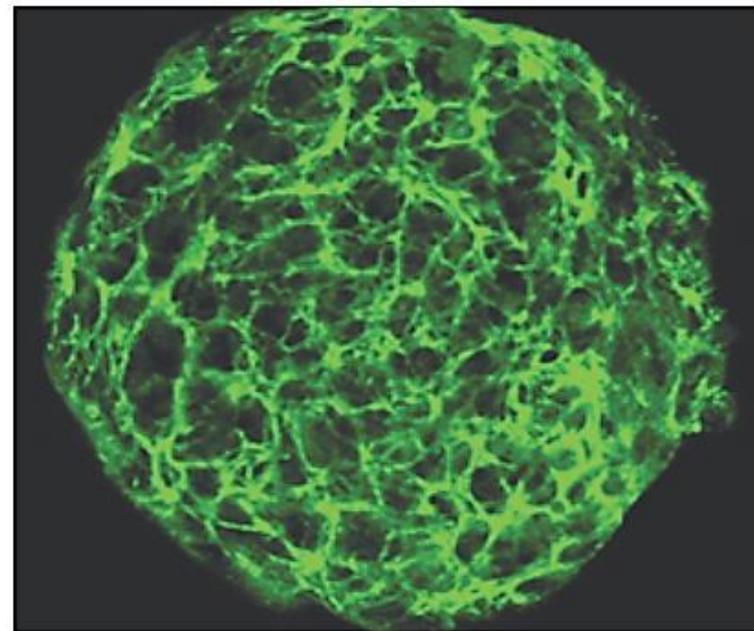
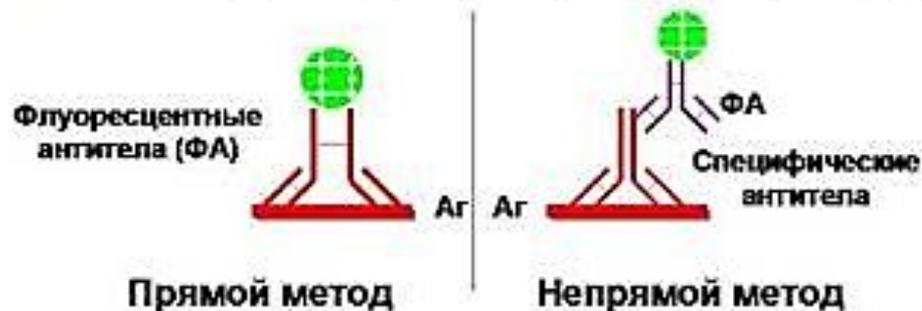
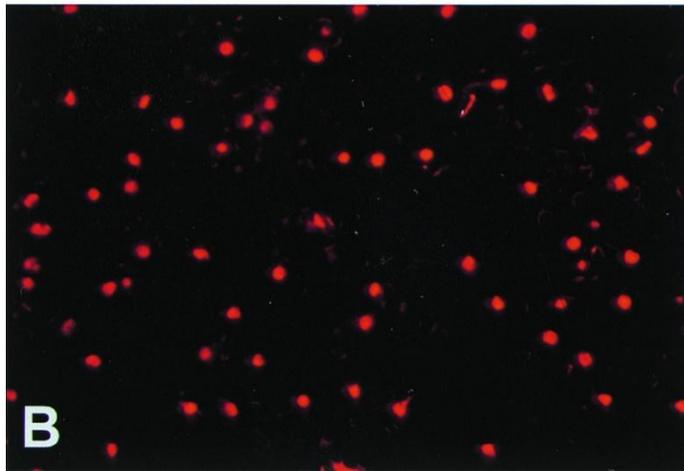
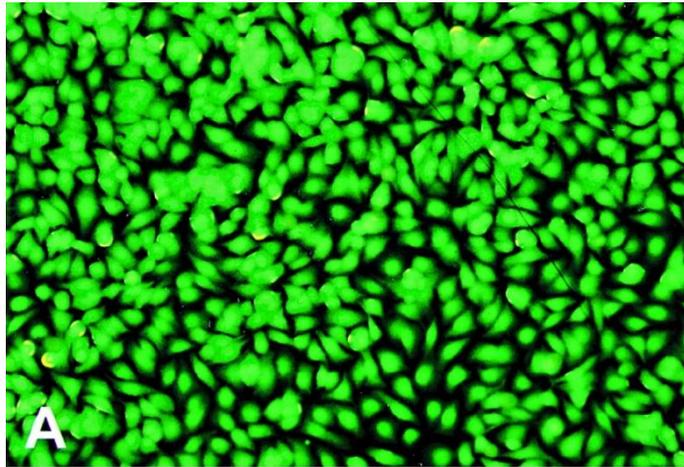


Рис. 6. 3D-сфероид из стромальных клеток лимба (7 сутки культивирования), экспрессия коллагена I типа. Иммуноцитохимическое окрашивание. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия

<http://www.eyepress.ru/image.aspx?8439>

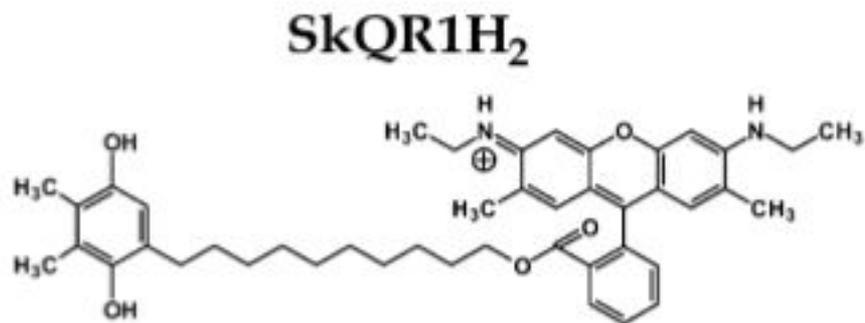
# Витальные флюорохромные красители



**Лёгочные эпителиальные клетки человека, окраска смесью флюоресцин диацетат/пропидиум йодид (FDA-PI). Живые клетки окрашиваются флюоресцеином в зелёный цвет, ядра мёртвых клеток – пропидиум бромидом в красный**  
<http://jap.physiology.org/content/89/4/1553>

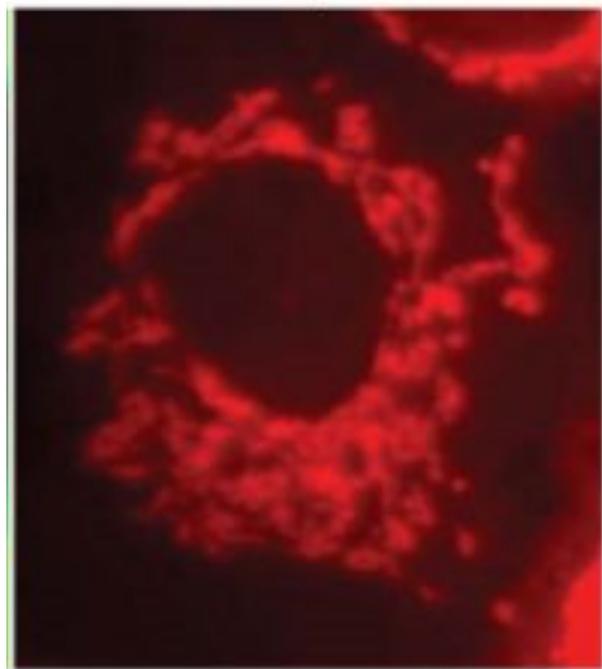
Витальные красители – красители, обладающие минимальной токсичностью, которые используются для выявления различных органелл и анализа их изменений в процессе жизнедеятельности клетки, а также для изучения различных физиологических явлений, происходящих в клетке.

# Митотрекеры



Для витальной окраски клеток чаще используют так называемые митотрекеры (MitoTrackers) – специфические зонды, связанные с флюорохромами. Благодаря своей структуре эти зонды могут взаимодействовать с внутренними компонентами клеточных органелл без нарушения их внутренней структуры.

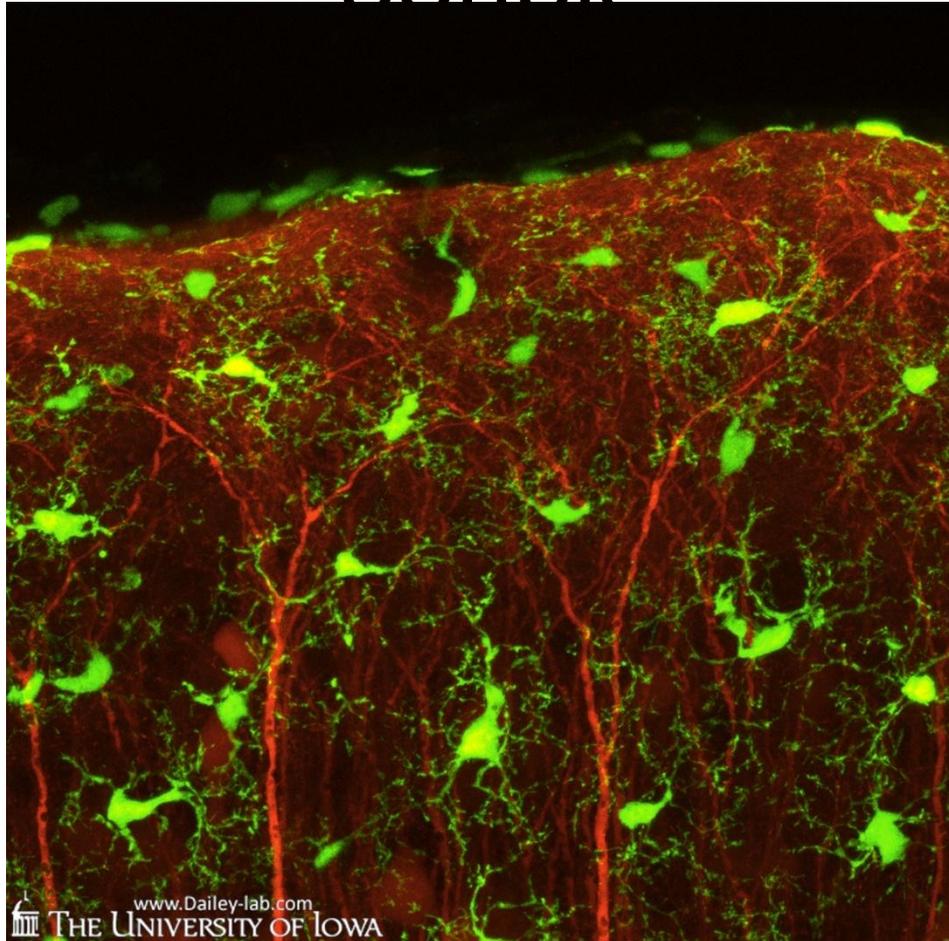
SkQR1



Производное пластохинона, соединённое с родамином-123 (слева), внедрённое в изолированные митохондрии (справа)

[http://istina.msu.ru/media/publications/article/c02/b3d/12198829/Antonenko\\_2008rus1\\_colour.pdf](http://istina.msu.ru/media/publications/article/c02/b3d/12198829/Antonenko_2008rus1_colour.pdf)

# Зелёный флюоресцирующий белок



**Окрашенные GFP микроглия в неокортексе**

[http://ionlieffmd.com/wp-content/uploads/2013/12/Neocortex\\_surface\\_GFP-YFP-13.jpg](http://ionlieffmd.com/wp-content/uploads/2013/12/Neocortex_surface_GFP-YFP-13.jpg)

# Немного истории

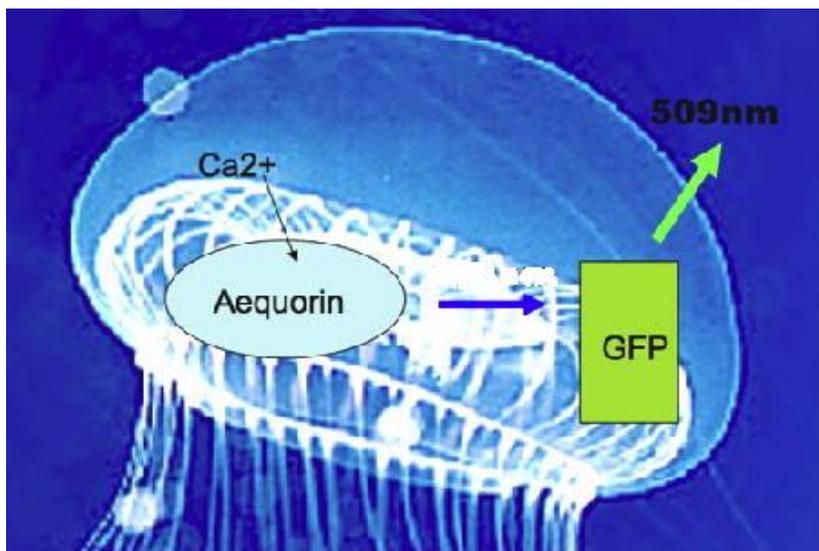


Схема безызлучательного переноса кванта света в медузе *Aequorea victoria* от экворина (нуждается в ионах  $\text{Ca}^{2+}$ ) на GFP с последующим испусканием зелёного света (слева) и нематода *Caenorhabditis elegans*, подобная той, в которую впервые был встроен генетически изменённый белок с GFP (справа). В 2008 году **Осаму Шимомура, Мартин Чалфи и Роджер Циен** получили Нобелевскую премию за открытие и изучение свойств GFP

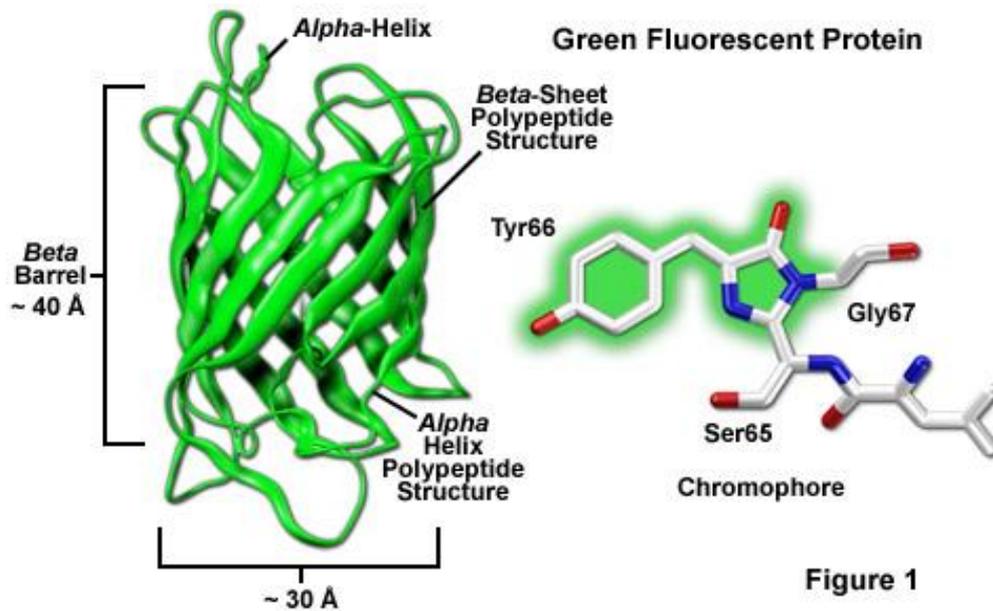
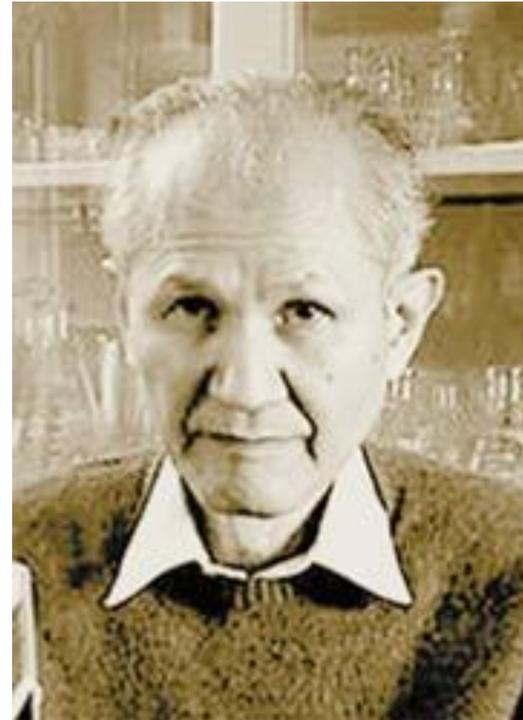


Figure 1



Структура GFP (green fluorescence protein) (слева) и его первооткрыватель  
Осаму Шимомура (справа)

<http://www.nkj.ru/archive/articles/15089/>

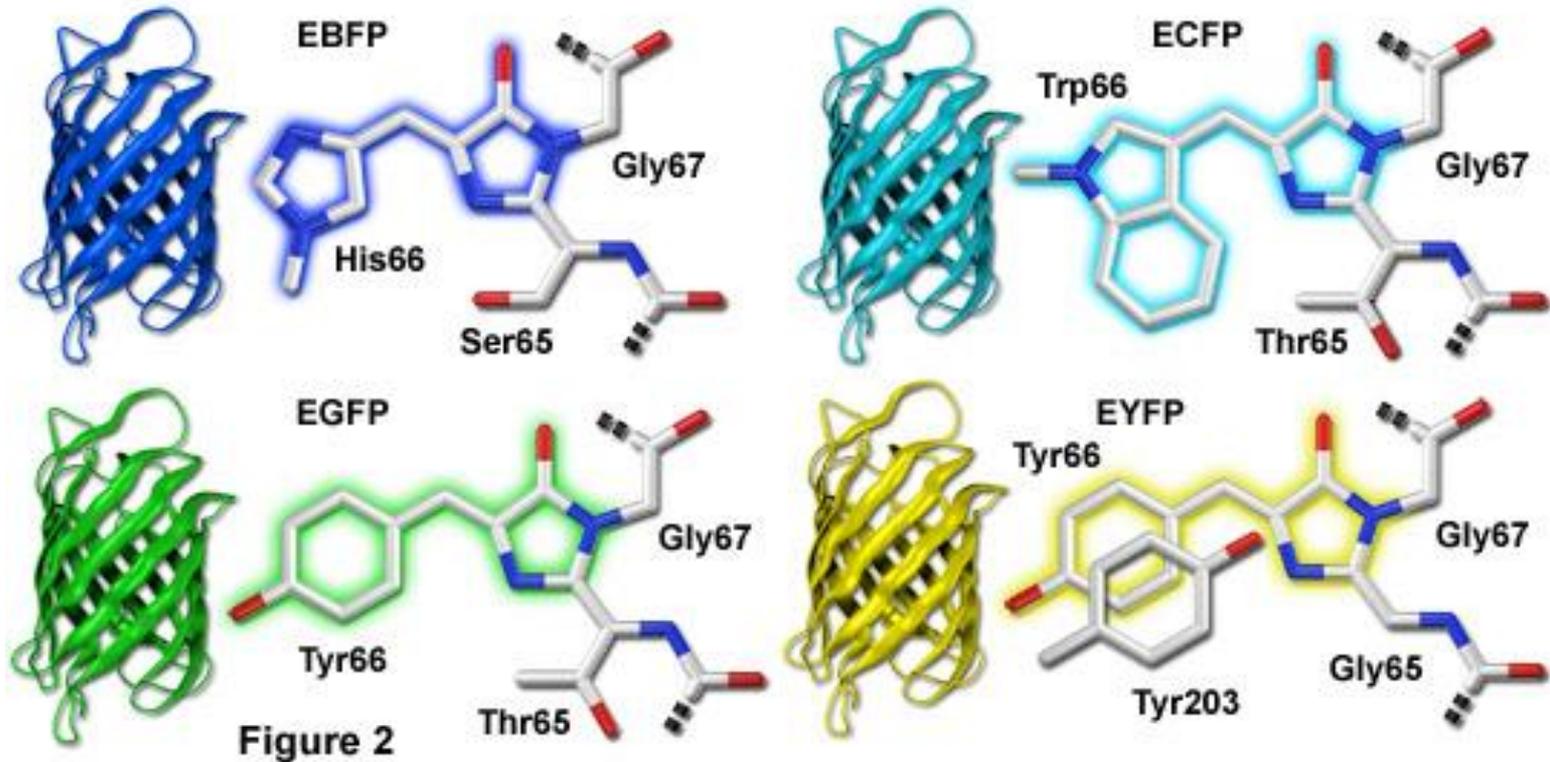
<http://amazingbiotech.blogspot.ru/2014/02/gfp-like-proteins-allow-monitoring-in.html?m=1>

# Преимущества использования GFP

- В отличие от других флуоресцентных меток, GFP-подобным белкам для свечения не нужны никакие вспомогательные вещества, кроме молекулярного кислорода, поэтому клетка остаётся живой и неповреждённой;
- GFP — это белковая молекула, которая синтезируется в клетке по своему генетическому коду. Современные методы генной инженерии позволяют «сшить» ген любого белка с геном флуоресцирующего белка, а затем внести эту генетическую «химеру» в клетку или модельный организм;
- молекула флуоресцирующего белка достаточно маленькая и поэтому практически не влияет на структуру, к которой пришта. Это означает, что вся сложная белковая конструкция выполняет те же функции, что и сам белок без флуоресцентной метки. Фермент остаётся тем же самым ферментом, но с одним очень важным отличием — он становится видимым под флуоресцентным микроскопом.

# Современные вариации GFP

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

