

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.

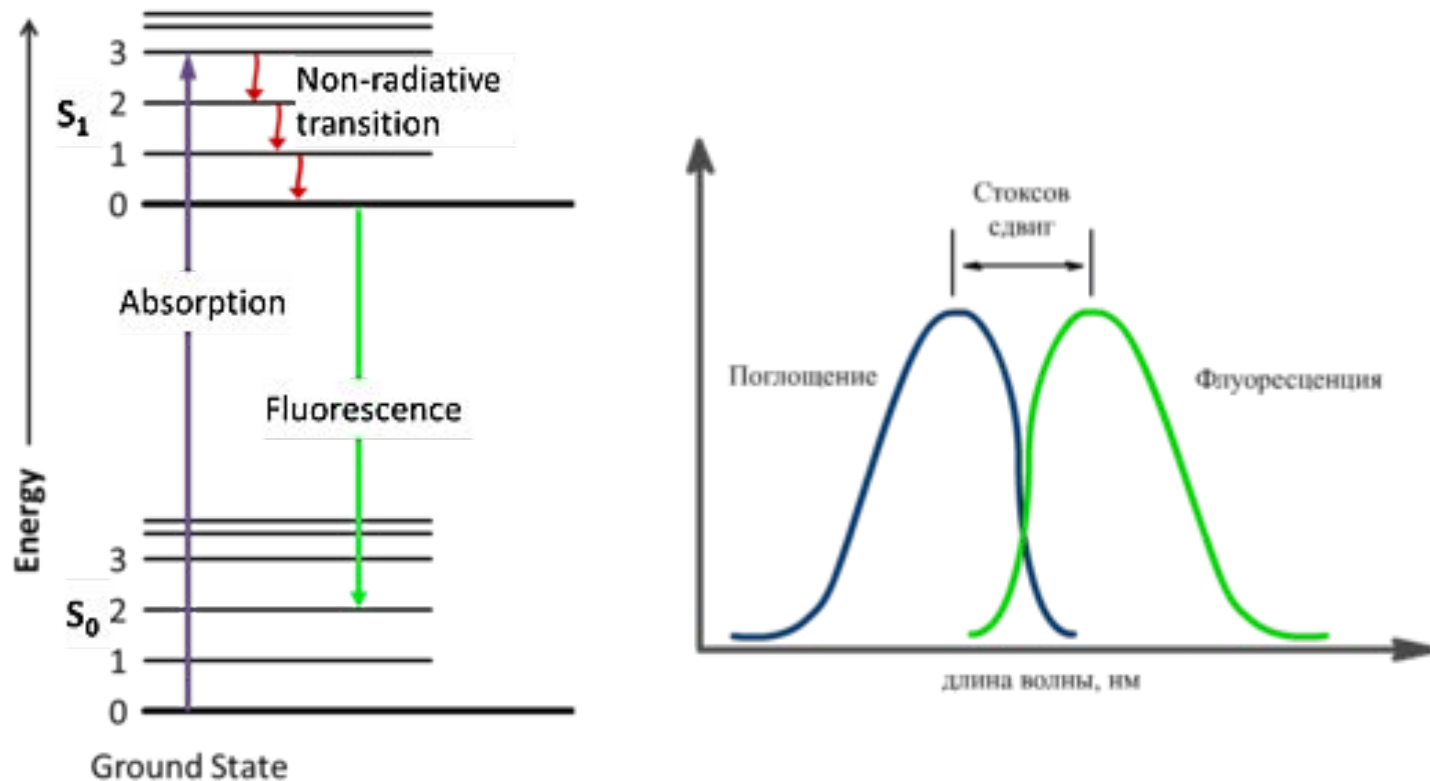


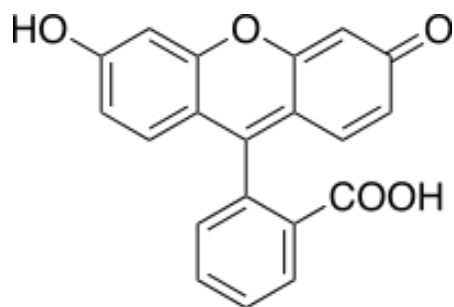
Диаграмма Яблонского (слева) и сравнение спектров поглощения и флуоресценции вещества

<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>

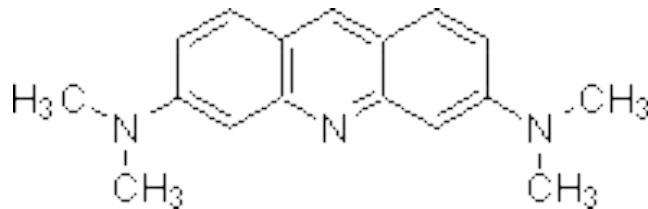
Фотон поглощается невозбуждённой молекулой или атомом (S_0), при этом электрон последнего электронного уровня переходит в возбуждённое состояние (S_1). Энергия фотона частично расходуется на какие-то процессы внутри вещества (потери на тепловые колебания молекул, затраты на фотохимические реакции и т.п.),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

Флюорохромы и флюорофоры

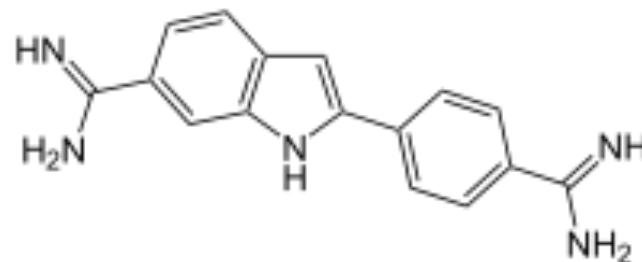
К флюоресценции способны многие вещества, обладающие системой сопряжённых π -связей. Способные флюоресцировать атомы, молекулы и молекулярные комплексы называют флюорофорами или флюорохромами. В ряде источников под флюорохромами понимают все виды флюоресцирующих молекул, а под флюорофорами — только флюоресцирующий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



Флюоресцеин

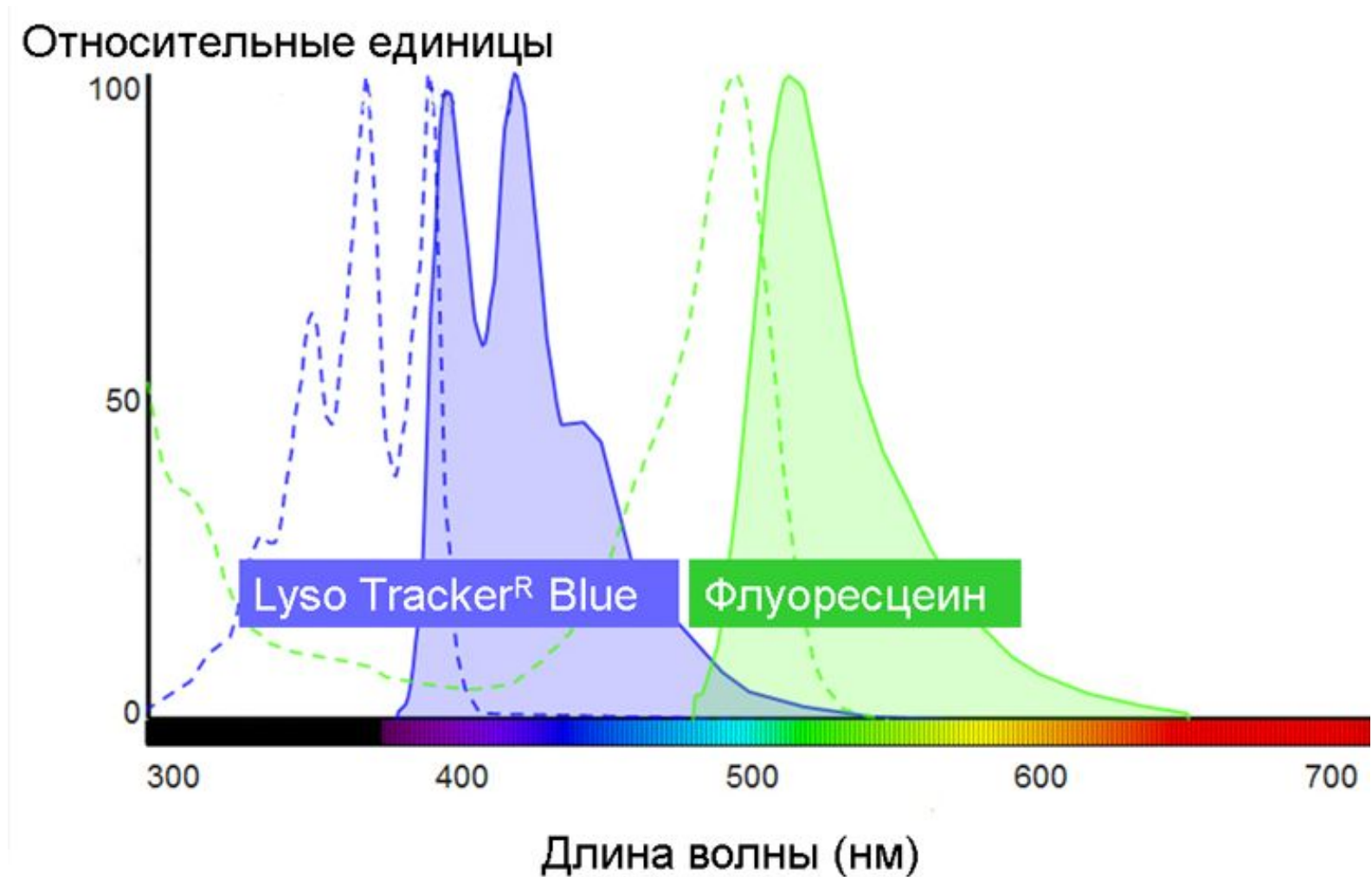


**Акридиновый
оранжевый**



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

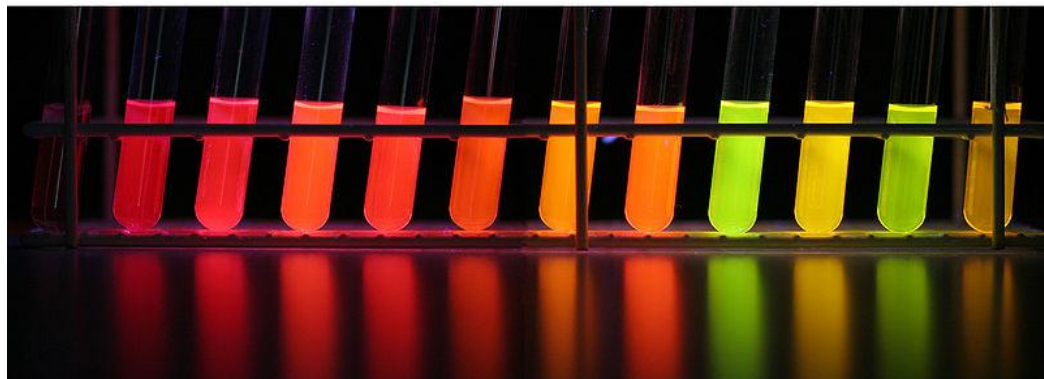
Характеристики флюоресценции



Спектры поглощения (пунктир) и **флуоресценции** (сплошные линии) флуоресцеина и Lyso TrackerTM Blue (Molecular Probes[®]) *Источник: [Life Technologies](#).*

Факторы, влияющие на флюоресценцию

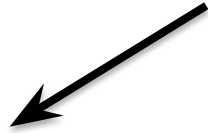
- Структура вещества;
- рН среды;
- Температура;
- Концентрация люминесцентного вещества;
- Интенсивность возбуждающего излучения;
- Присутствие посторонних веществ



**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.

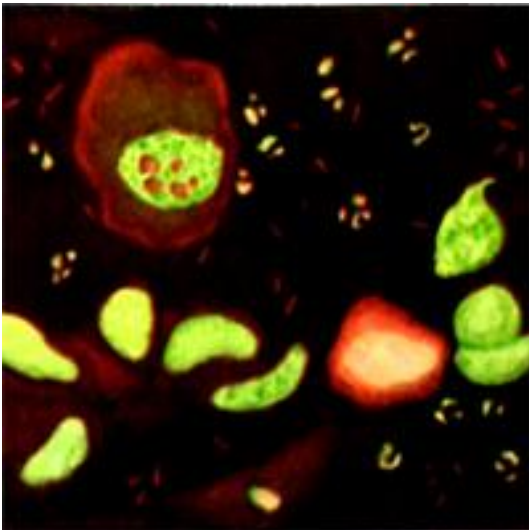
В клеточной биологии выделяют 2 основных направления использования флюоресцентных методов:

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

Флюорохромы, связывающиеся с НК

Классификация по взаимодействию с нуклеиновыми кислотами:

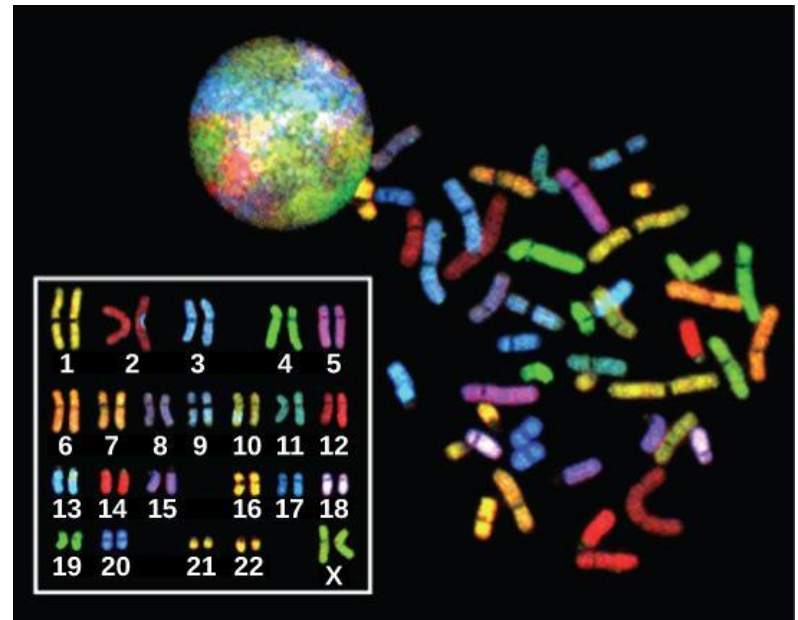
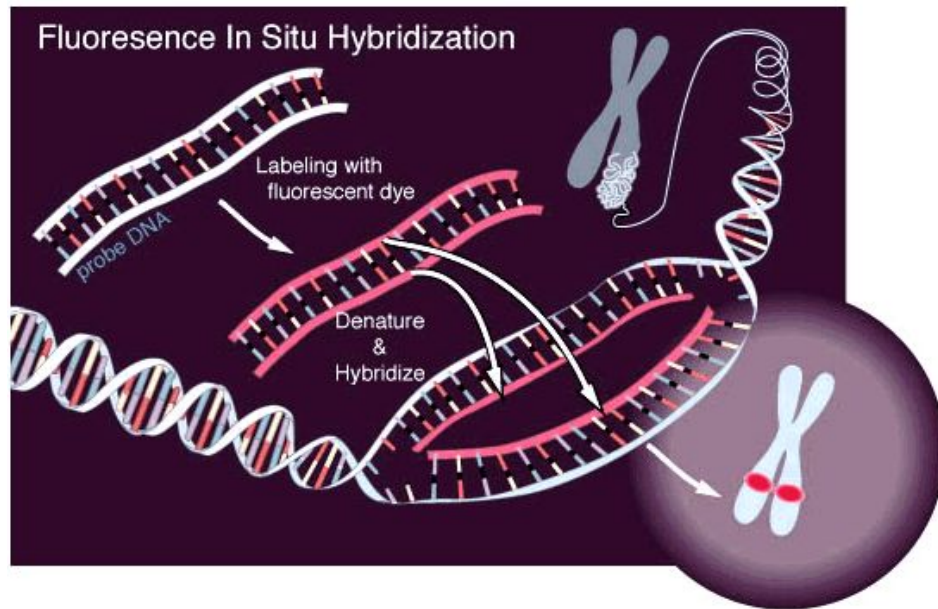
- Встраивание в малую бороздку двунитевой ДНК (DAPI, Hoechst)
- Встраивание между парами оснований в двунитевую ДНК (бромистый этидий, акридиновый оранжевый)
- Электростатические взаимодействия с РНК и одноцепочечной ДНК (акридиновый оранжевый)



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)

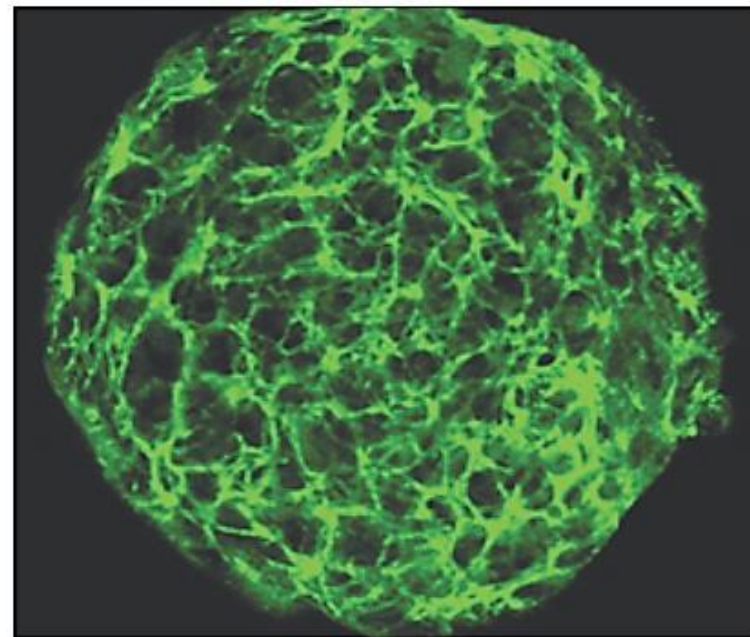
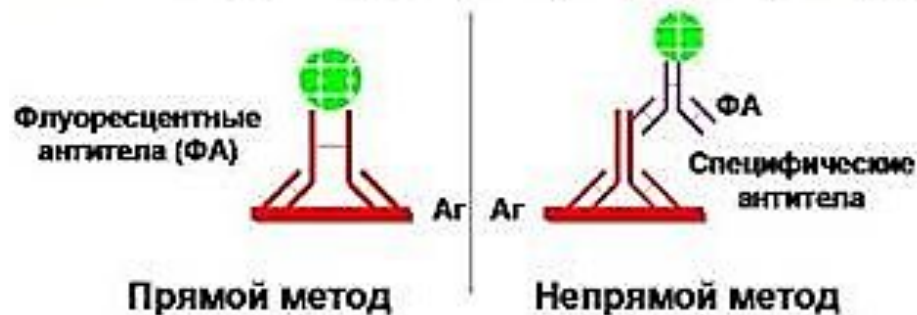
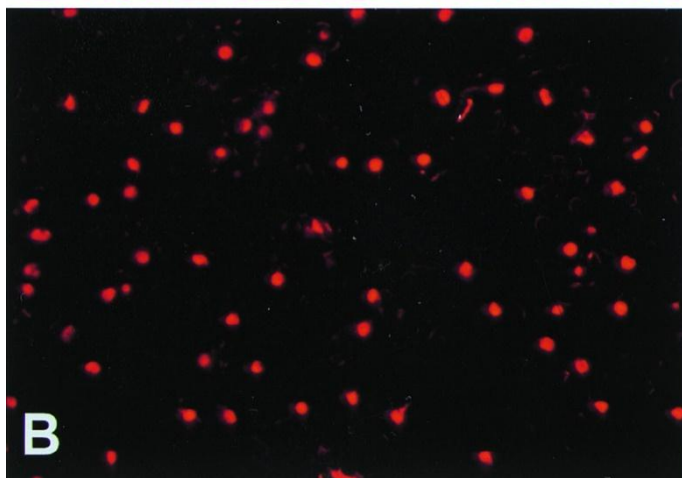
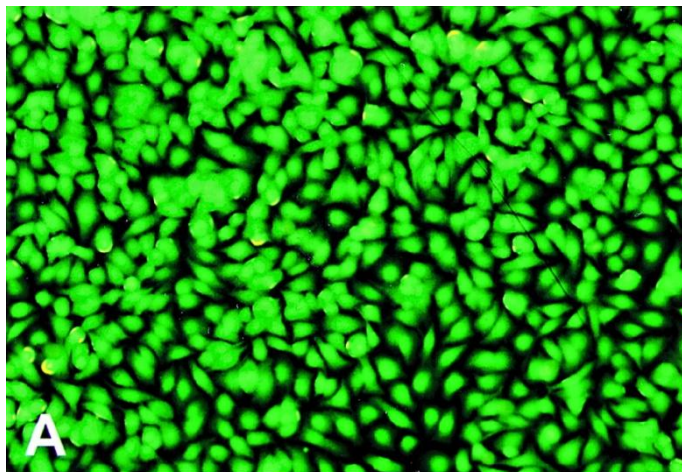


Рис. 6. 3D-сфероид из стромальных клеток лимба (7 сутки культивирования), экспрессия коллагена I типа. Иммуноцитохимическое окрашивание. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия

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

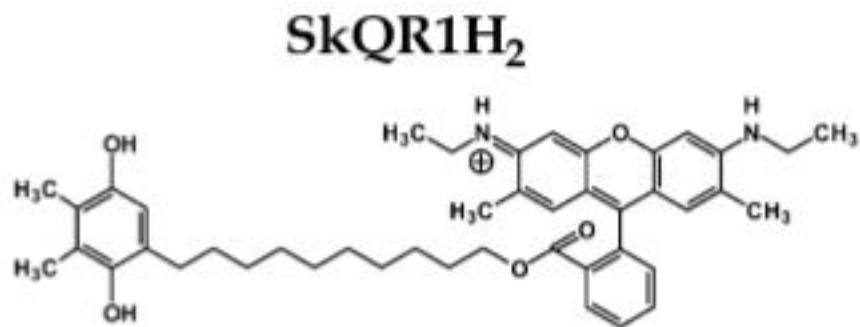
Витальные флюорохромные красители



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>

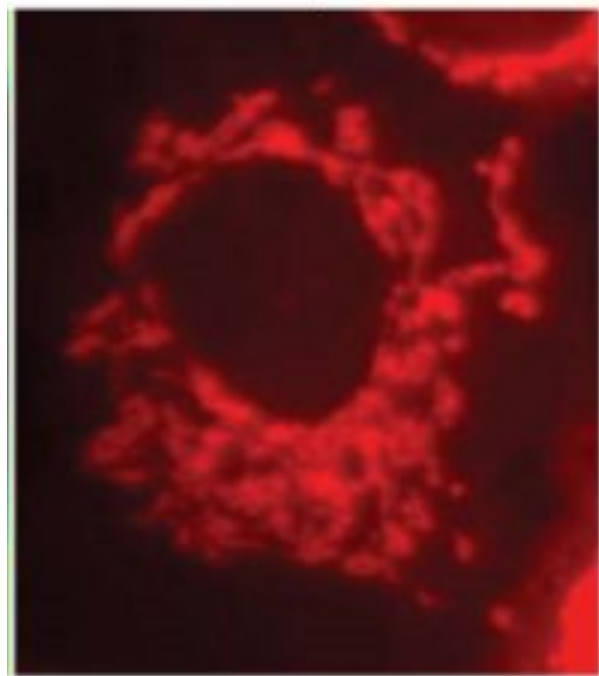
Витальные красители – красители, обладающие минимальной токсичностью, которые используются для выявления различных органелл и анализа их изменений в процессе жизнедеятельности клетки, а также для изучения различных физиологических явлений, происходящих в клетке.

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.

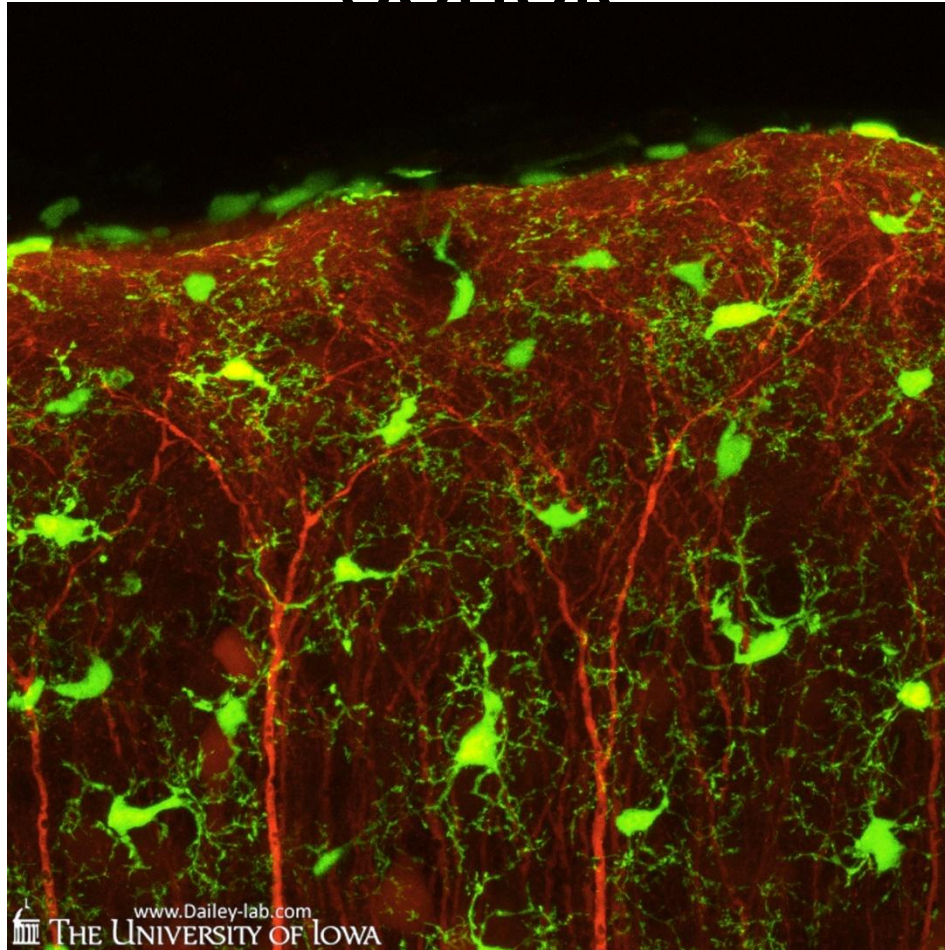
SkQR1



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

Зелёный флюоресцирующий белок



Окрашенные GFP микроглии в неокортексе

http://ionlieffmd.com/wp-content/uploads/2013/12/Neocortex_surface_GFP-YFP-13.jpg

Немного истории

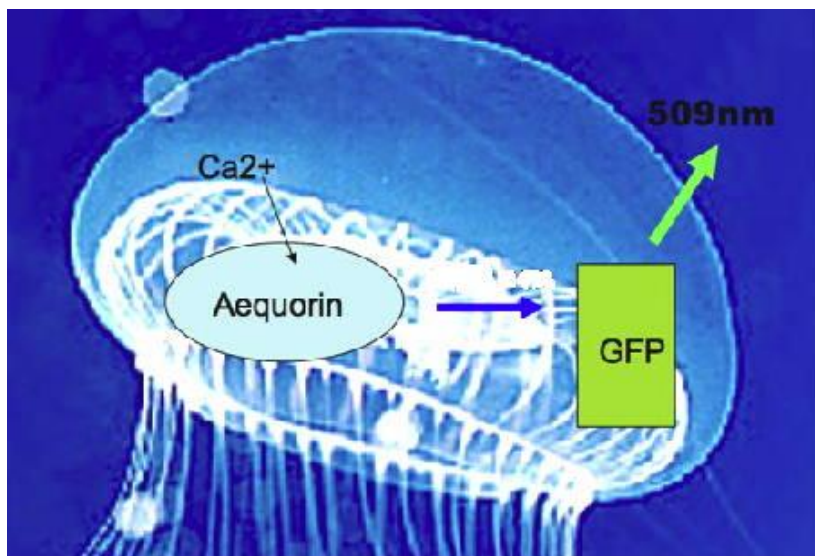


Схема безызлучательного переноса кванта света в медузе *Aequorea victoria* от экворина (нуждается в ионах Ca^{2+}) на GFP с последующим испусканием зелёного света (слева) и нематода *Caenorhabditis elegans*, подобная той, в которую впервые был встроен генетически изменённый белок с GFP (справа). В 2008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

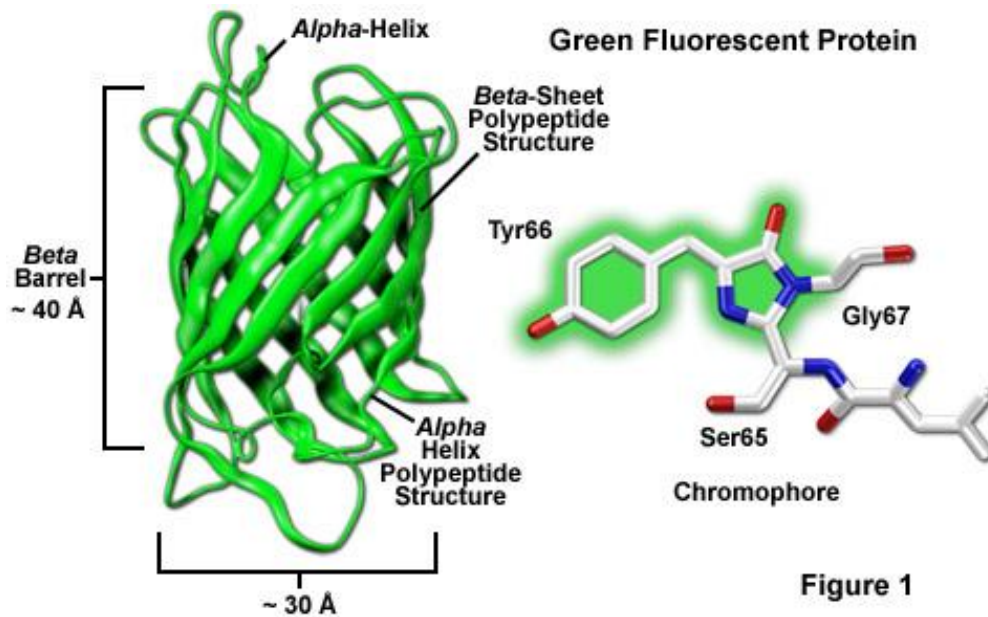
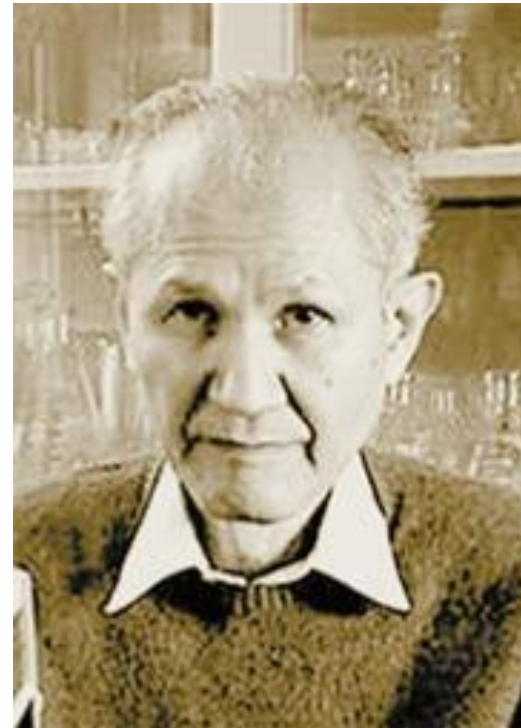


Figure 1



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

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

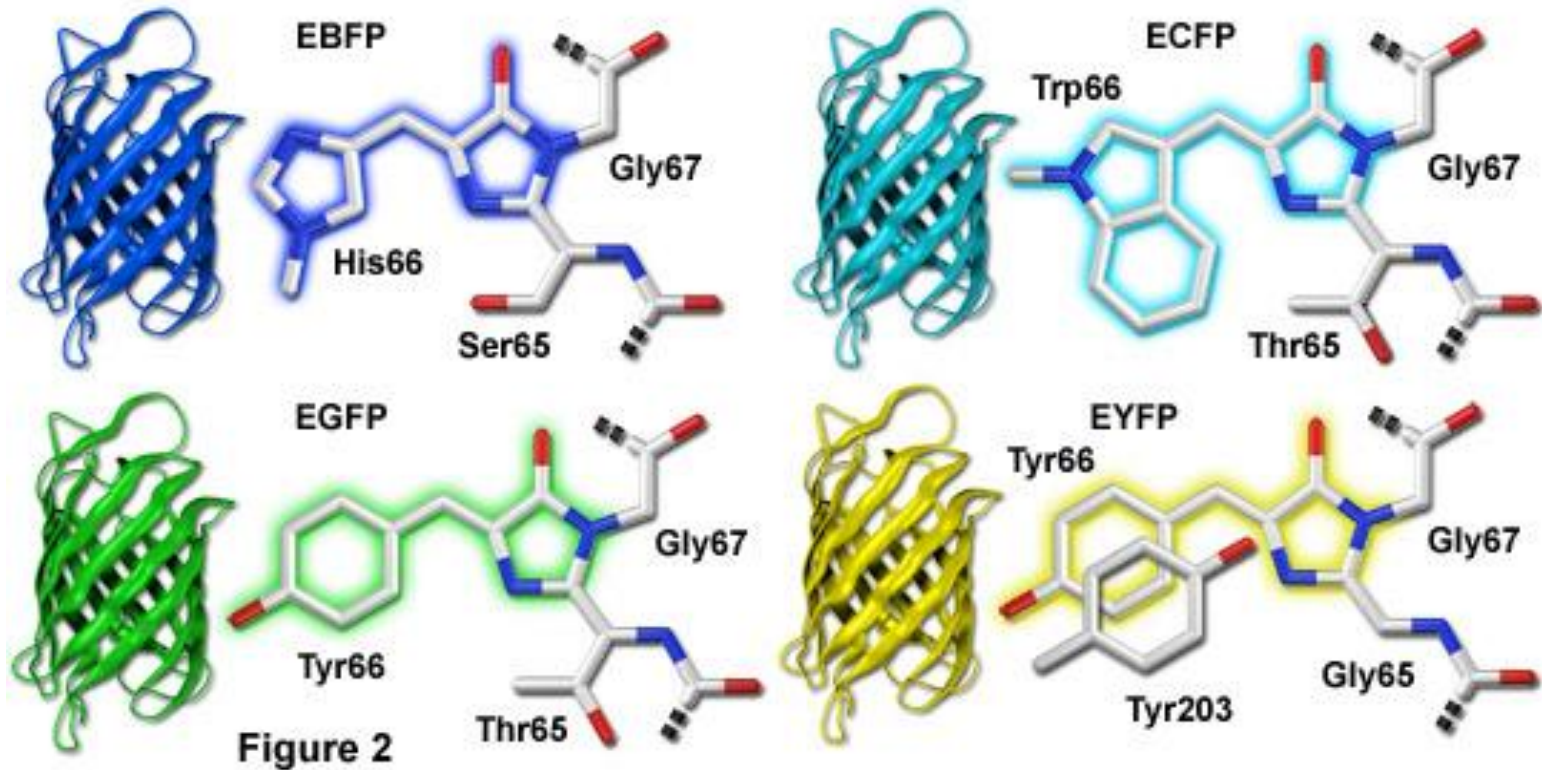
<http://amazingbiotech.blogspot.ru/2014/02/gfp-like-proteins-allow-monitoring-in.html?m=1>

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

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ

