



Флуорофори для мікроскопії

Володимир ШВАДЧАК

ПНУ

22-07-2024

Онлайн-курс “Мікроскопія та інструментальні методи в біології”

Зміст лекції

1. Флуорофори

- *Що впливає на поглинання світла*
- *Синтетичні органічні барвники*
- *Природні флуорофори*
- *Флуоресцентні протеїни (GFP, RFP, etc...)*
- *Перекривання каналів (Channel crosstalk) і вибір флуорофорів*

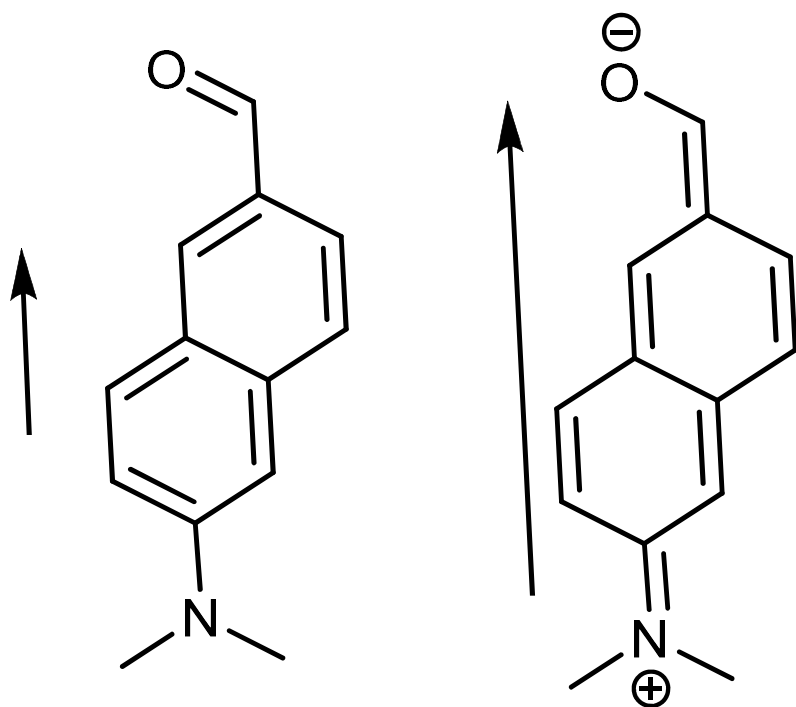
2. Мічення біологічних молекул.

- *Нековалентні мітки*
- *Реакції по амінокислотах*
- *Таги*
- *УАА*

Класифікація флуорофорів для мікроскопії

Погляд мікроскопіста:	- спектральні характеристики - стабільність - одно чи двофотонне збудження
Погляд хіміка:	- структура флуорофору - чи є фотореакції
Погляд біохіміка:	- натуральні - генетично кодовані - синтетичні
Погляд біолога:	- що мітить флуорофор - чи чутливий до якихось молекул

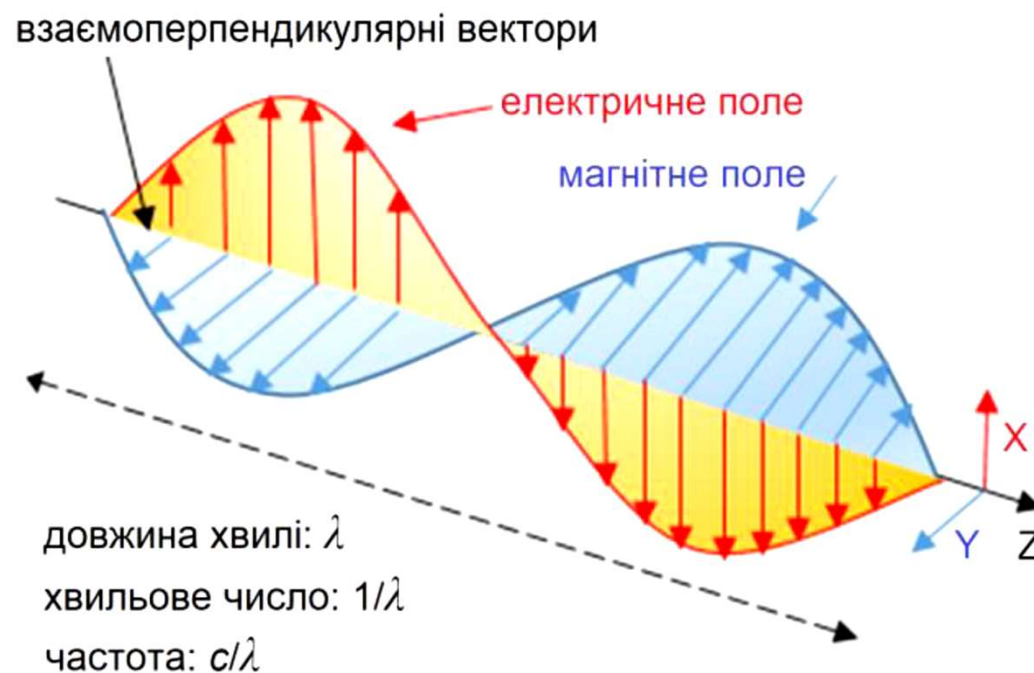
Поглинання світла



Основний стан

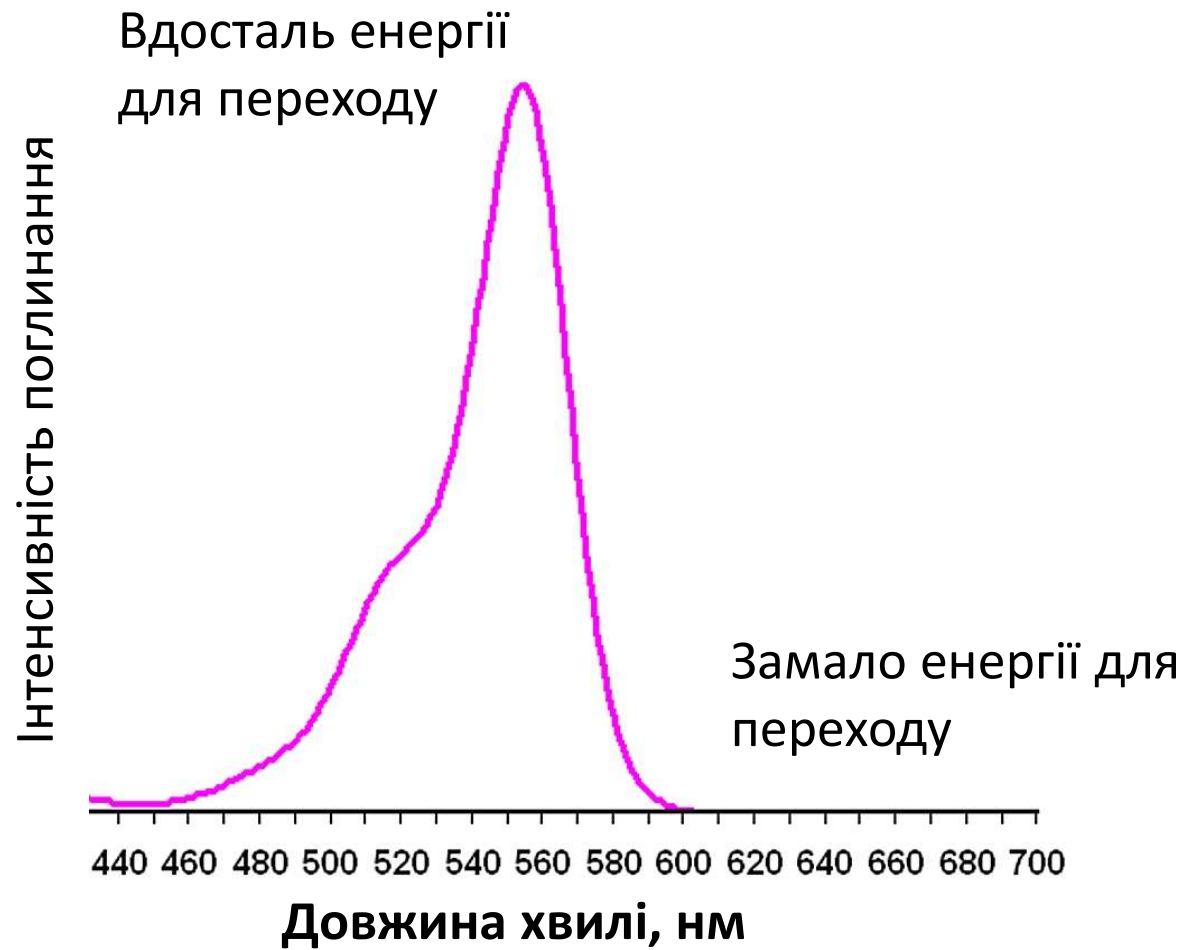
Збуджений стан

Для поглинання світла вектор E має співпадати з вектором зміни дипольного моменту молекули



Насправді на квантовомеханічному рівні все дещо складніше, фотони поляризовані по колу

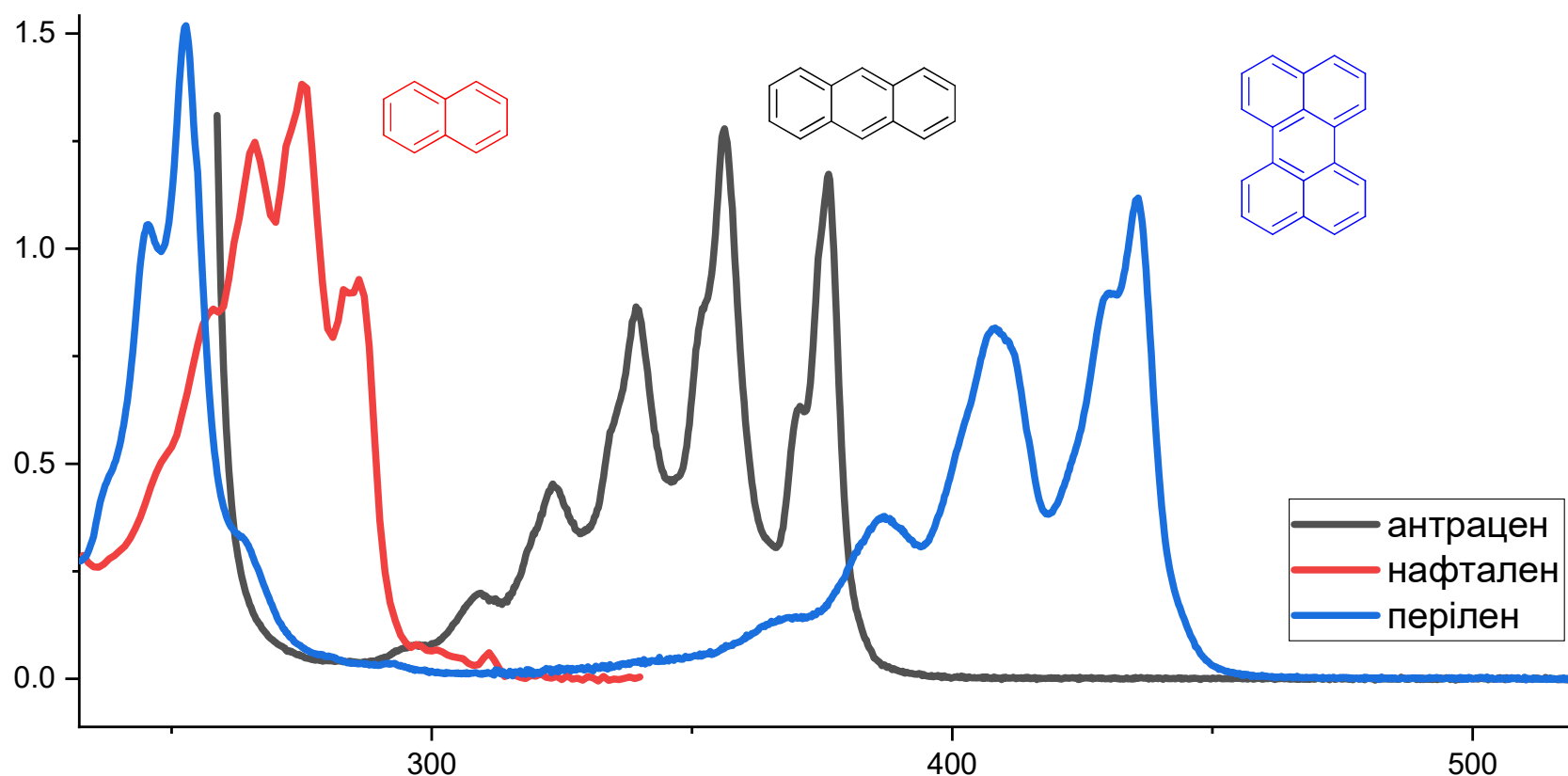
Поглинання світла: спектри



Спектр поглинання
Родаміну Б у воді

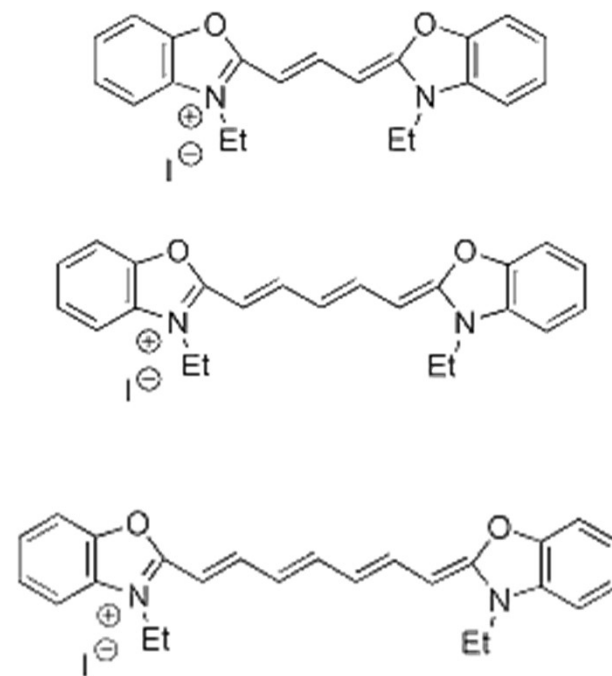
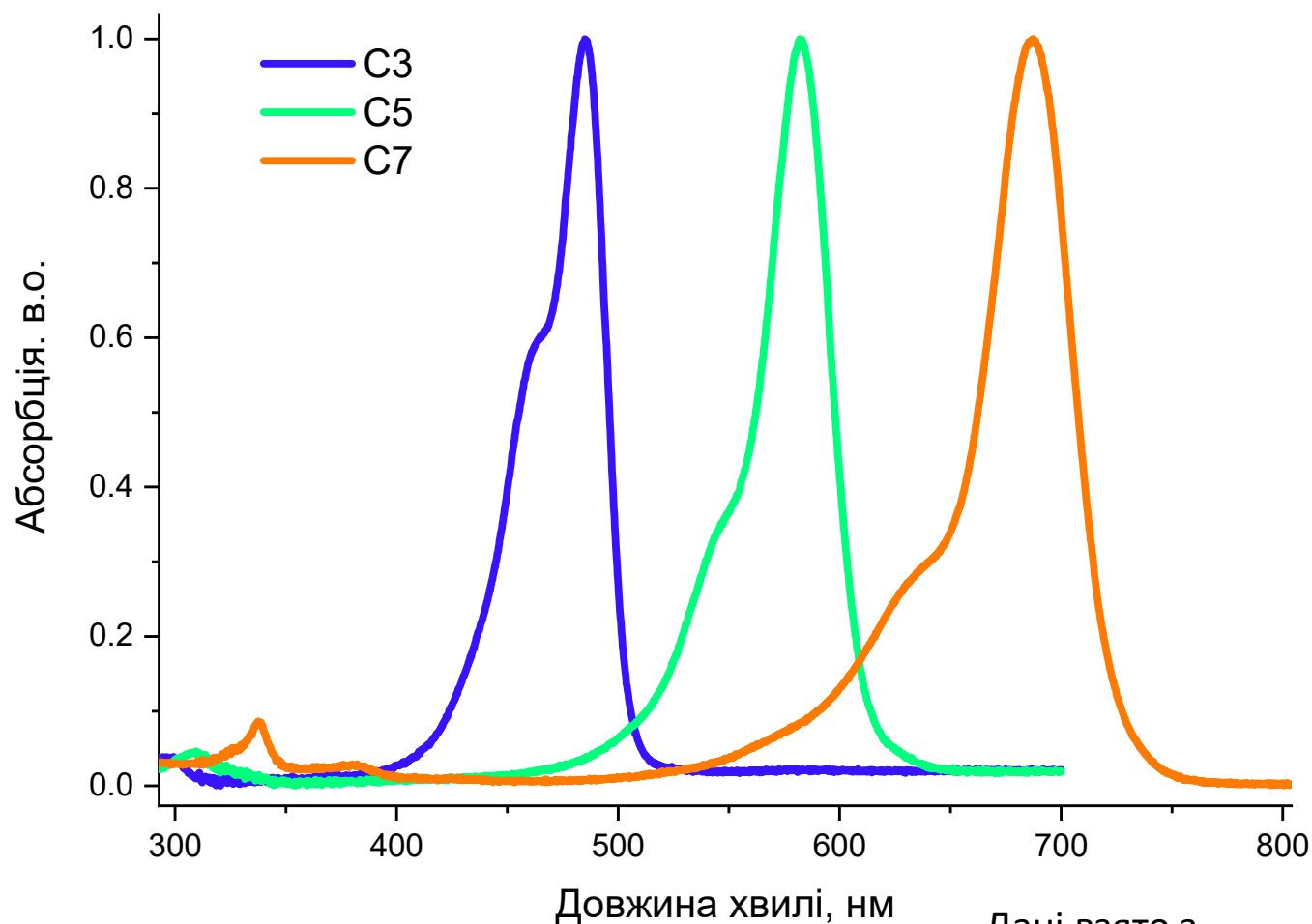
Чим довша π -система тим довша хвиля поглинання

Чим довша π -система, тим менше енергії потрібно для збудження й тим більша довжина хвилі поглинання



Чим довша π-система тим довша хвиля поглинання

Довжина пі-системи: ціанінові барвники

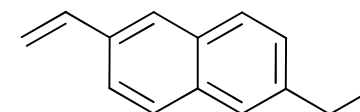
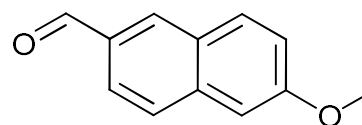
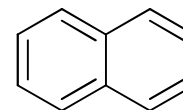
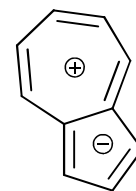
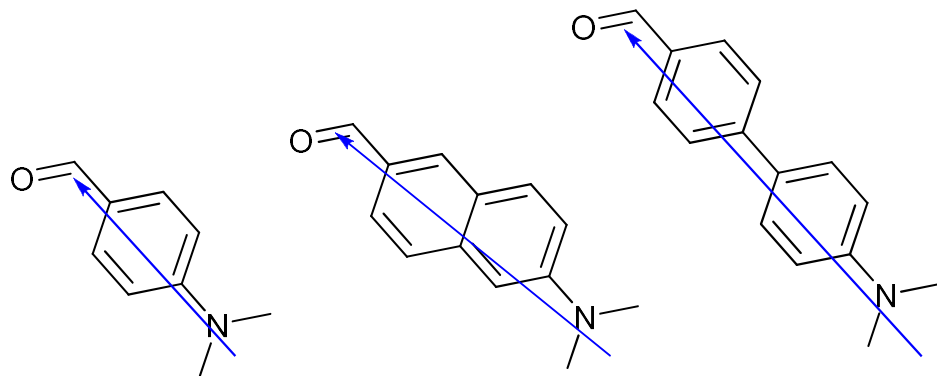


Дані взято з

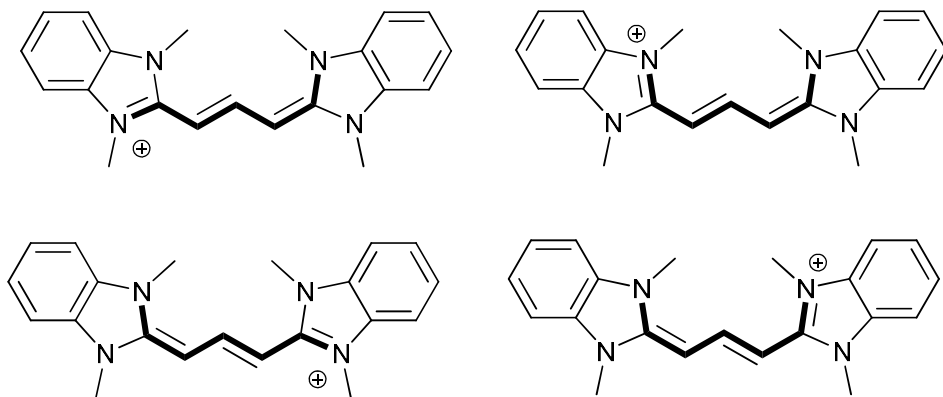
<https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/class.html>

Сильный дипольный момент улучшает поглощение

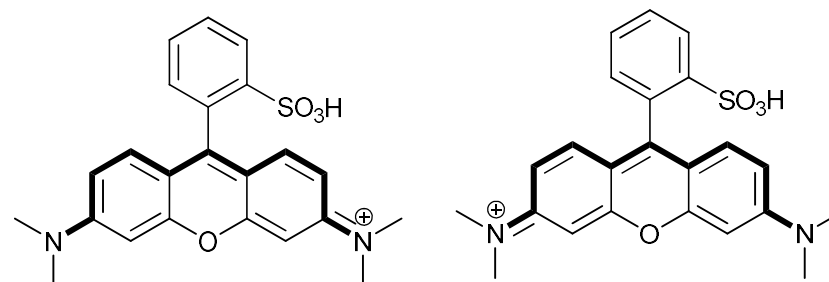
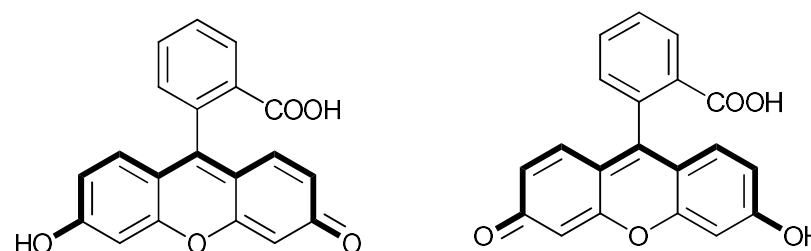
Розподіл зарядів (дипольний момент)



Заряд розмитий між однаковими атомами



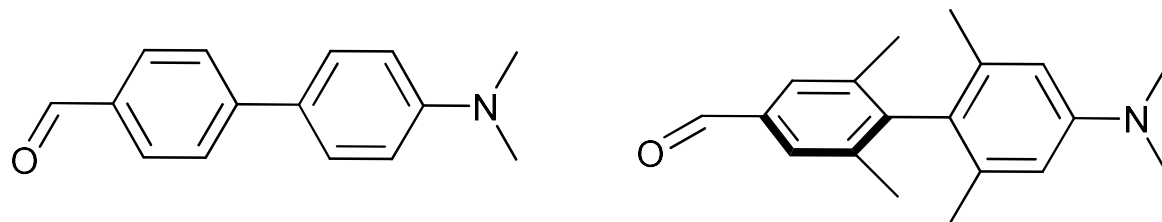
Ціанінові барвники
(4 мезомерні структури
одної молекули)



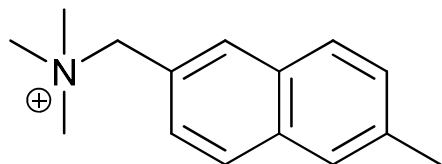
Мезомерні структури в
флуоресцеїнах та родамінах

Інші фактори що впливають на поглинання

Стерика: Виведення з площини зменшує спряження



Заряд: наявність неспряженого заряду призводить до червоного зсуву



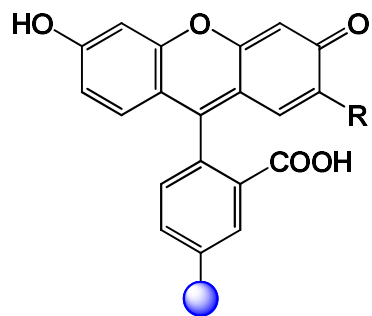
Що покращує поглинання

- Довга спряжена система
- Дипольний момент
- Заряд розмитий між симетричними атомами

Синтетичні флуорофори

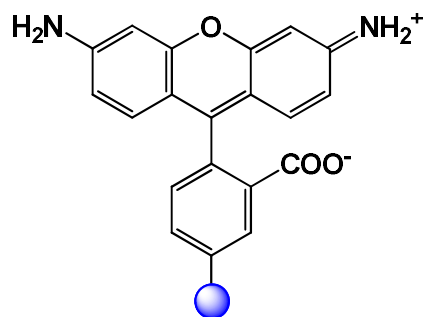


Основні сімейства яскравих комерційних флуорофорів



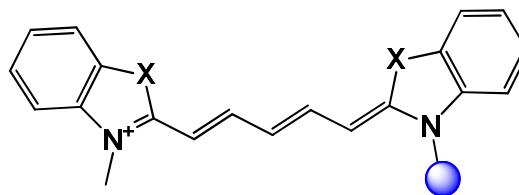
Fluorescein

Флуоресцеїн



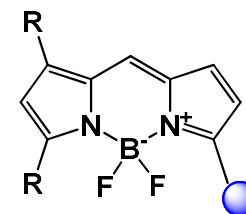
Rhodamine

Родамін



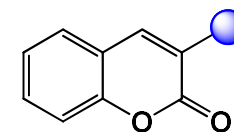
Cyanine

Ціанінові барвники



BODIPY

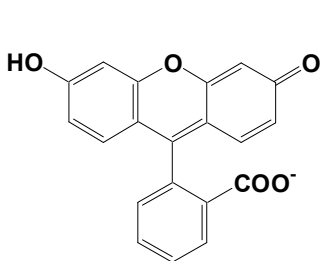
BODIPY



Coumarin

Кумарини

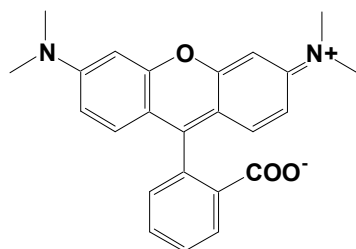
Флуорофори



Fluorescein

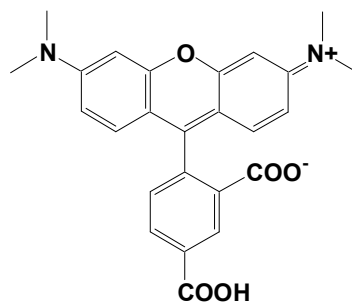
$\lambda_{\text{ABS}}/\lambda_{\text{EM}}$

490/515



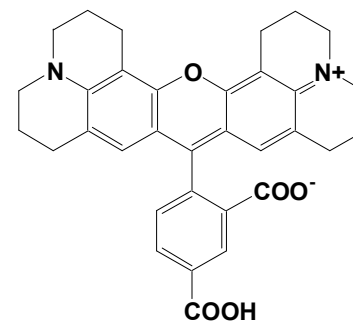
TMR

498/508



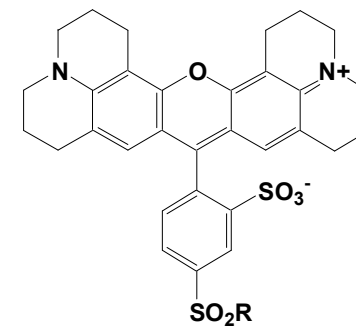
TAMRA

540/565



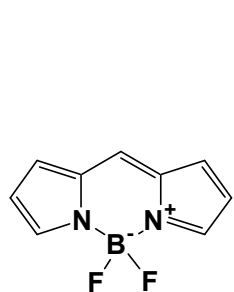
ROX

570/590



Texas Red

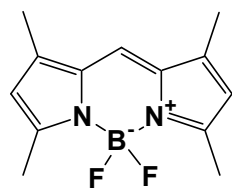
580/600



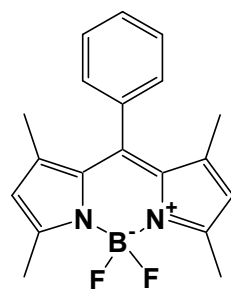
BODIPY core

Unknown

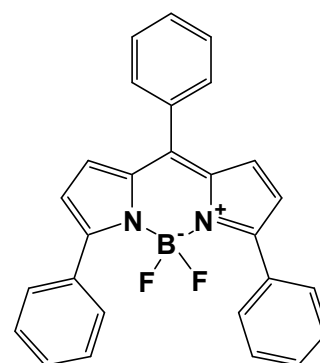
$\lambda_{\text{ABS}}/\lambda_{\text{EM}}$



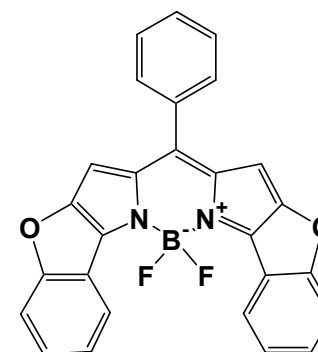
505/516



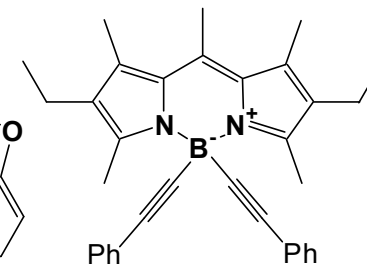
498/508



555/590

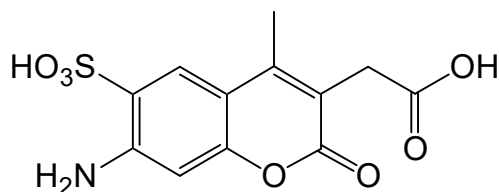


637/647



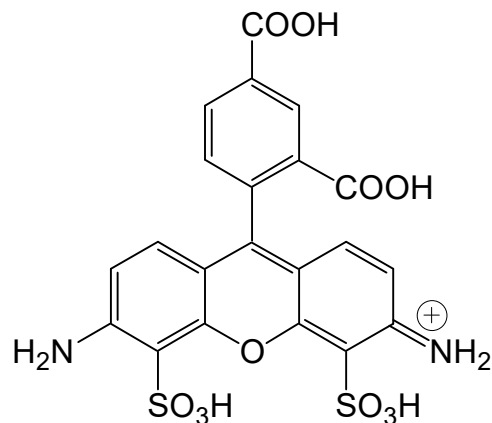
516/537

Комерційні флуорофори



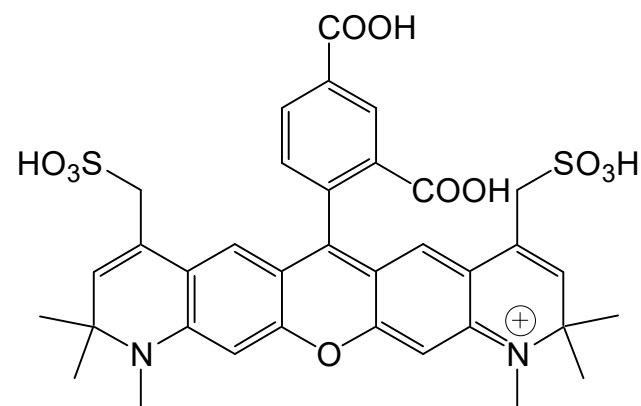
$\lambda_{\text{ABS}}/\lambda_{\text{EM}}$ 346/442

Alexa 350



495/519

Alexa 488

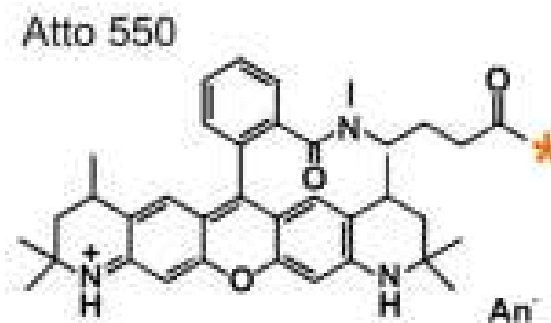
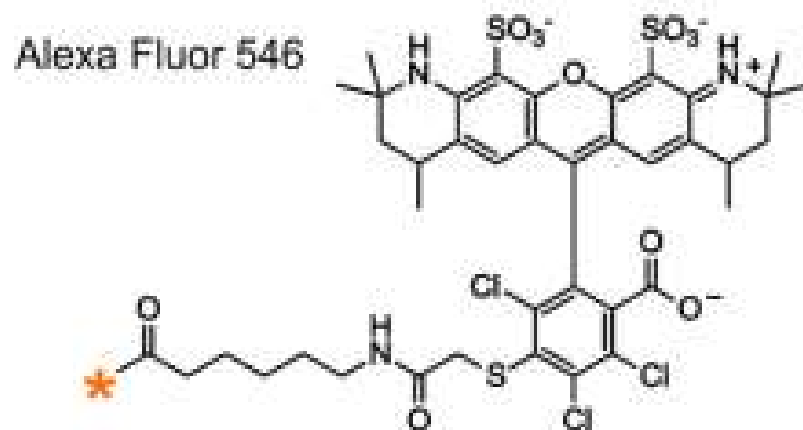
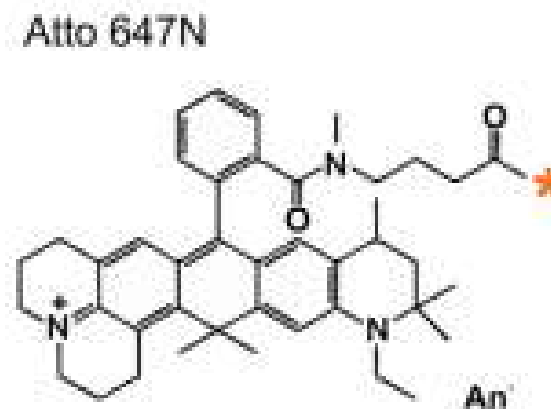
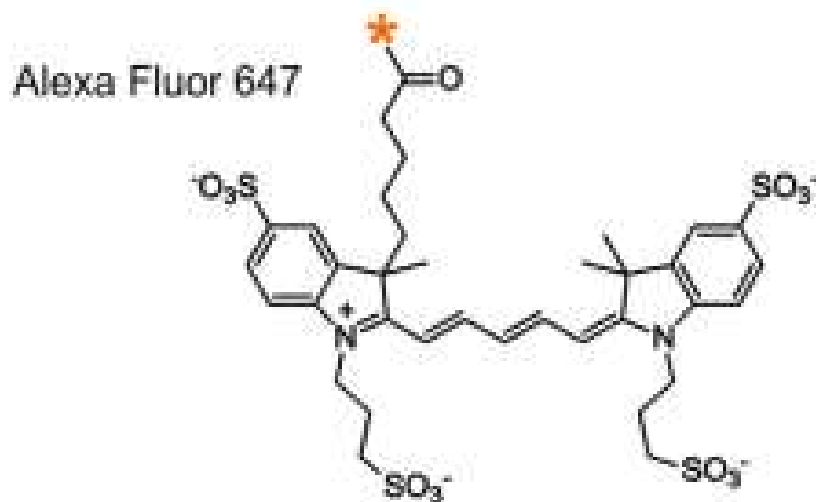


590/617

Alexa 594

Кілка компаній створили свої лінійки барвників під комерційними назвами (Alexa, Atto, DY) які покривають весь діапазон необхідний для мікроскопії. Це переважно представники різних сімейств.

Синтетичні органічні барвники: Комерційні сімейства

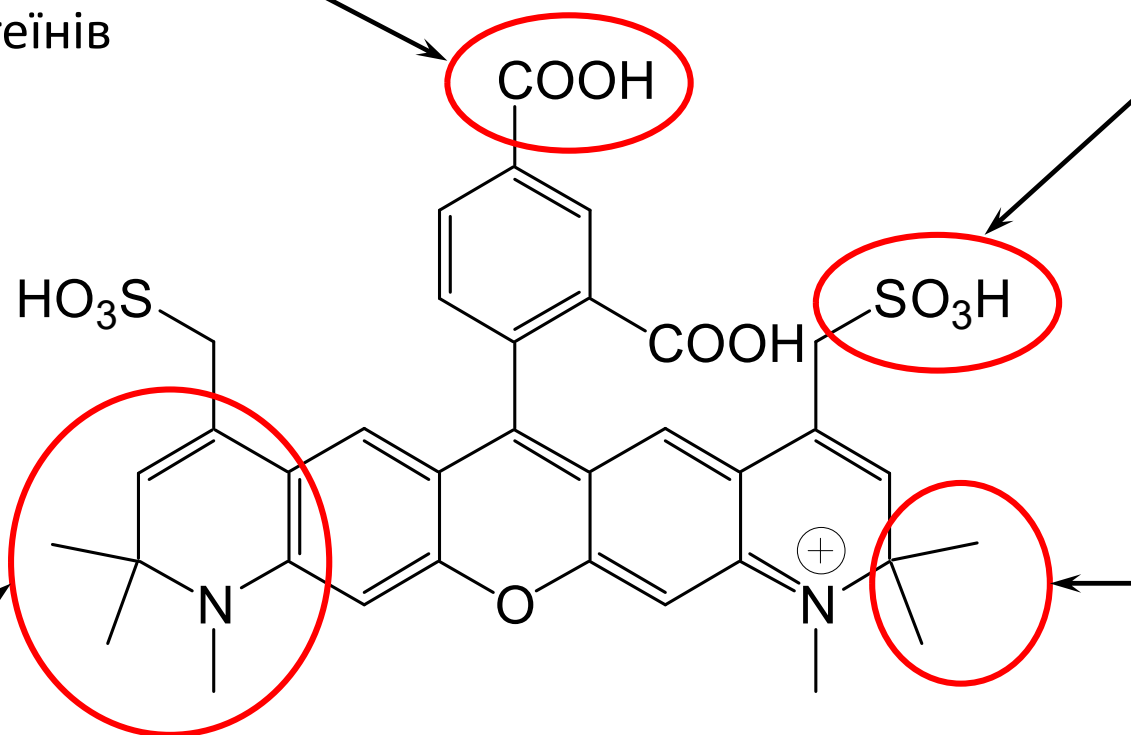


<https://www.atto-tec.com/>

Комерційні флуорофори: чому так складно?

Групи, до яких можна кріпити лінкер до протеїнів

Аніонні групи для збільшення розчинності та зменшення взаємодій з аполярними протеїнами



Замикання в цикл для зменшення обертання → зростання квантового виходу

Виведення з площини для зменшення самоагрегації (тобто для збільшення розчинності)

Що покращує флуорофор

- **Довга спряжена система**
- Дипольний момент
- Заряд розмитий між симетричними атомами

поглинання

- **Відсутність обертання**
- Водорозчинність, відсутність агрегації

квантовий вихід

Флуорофори

Флуорофор	$\lambda_{\max}$ nm	ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹	λ_{em} nm	φ
Флуоресцеїн Fluorescein	495	75 000	521	0.9
AlexaFluor488	490	73 000	524	0.92
Atto488	500	90 000	520	0.8
Cy3	555	150 000	570	0.31
Тетраметілродамін tetramethylrhodamine	546	90 000	580	0.7
AlexaFluor546	556	112 000	573	0.79
Cy5	646	250 000	662	0.2
Alexa647	650	270 000	665	0.33
Atto647	647	120 000	667	0.2
Cy7	750	199 000	773	0.3

Флуорофори для мікроскопії

Потрібно щоб флуорофор збуджувався в клітині

- Довжина хвилі поглинання $> 400\text{nm}$
- Переважно застосовують флуорофори між 405 і 650 нм
- Для конфокальної мікроскопії важливо щоб довжина хвилі збудження добре співпадала з доступними лазерами.

Потрібно щоб флуорофор світився

- Яскравість (=Квантовий вихід флуоресценції * коефіцієнт поглинання)
- Довжина хвилі емісії $> 400\text{ нм}$ (актуально для двофотонних), чим більше тим краще. З ІЧ-флуорофорами важко працювати

Бажано щоб можна було отримати багатоканальні зображення

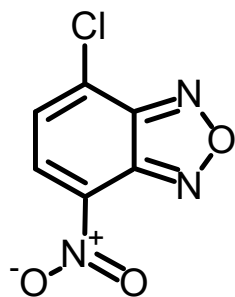
- Довжина хвилі емісії і ширина смуги емісії
- Накладання смуг з іншими барвниками які будуть застосовуватися

Фотостабільність

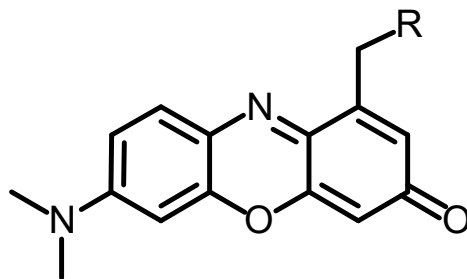
- бажано щоб витримували більше 1 000 000 циклів збудження (для спецтехнік типу STED потрібно набагато більше)

Сольватохромні барвники

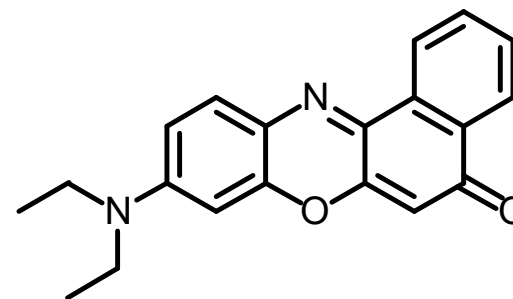
Інколи флуорофори спеціально роблять менш яскравими щоб вони змінювали флуоресценцію залежно від середовища



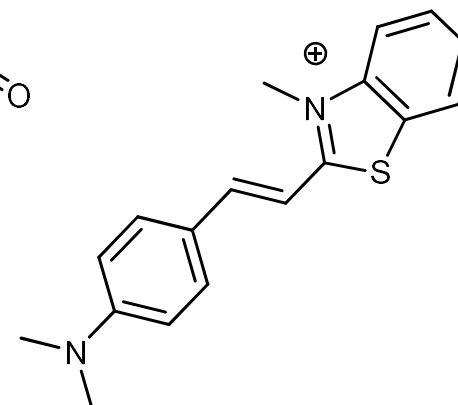
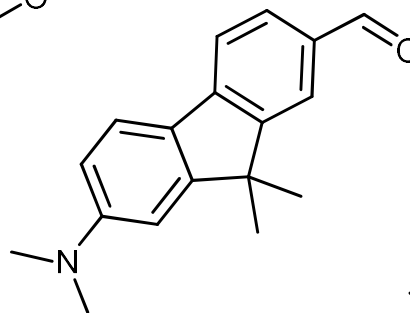
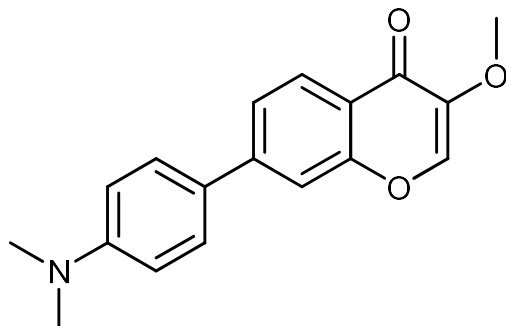
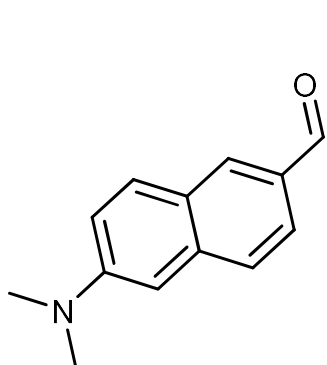
NBD-Cl



APM



Nile Red

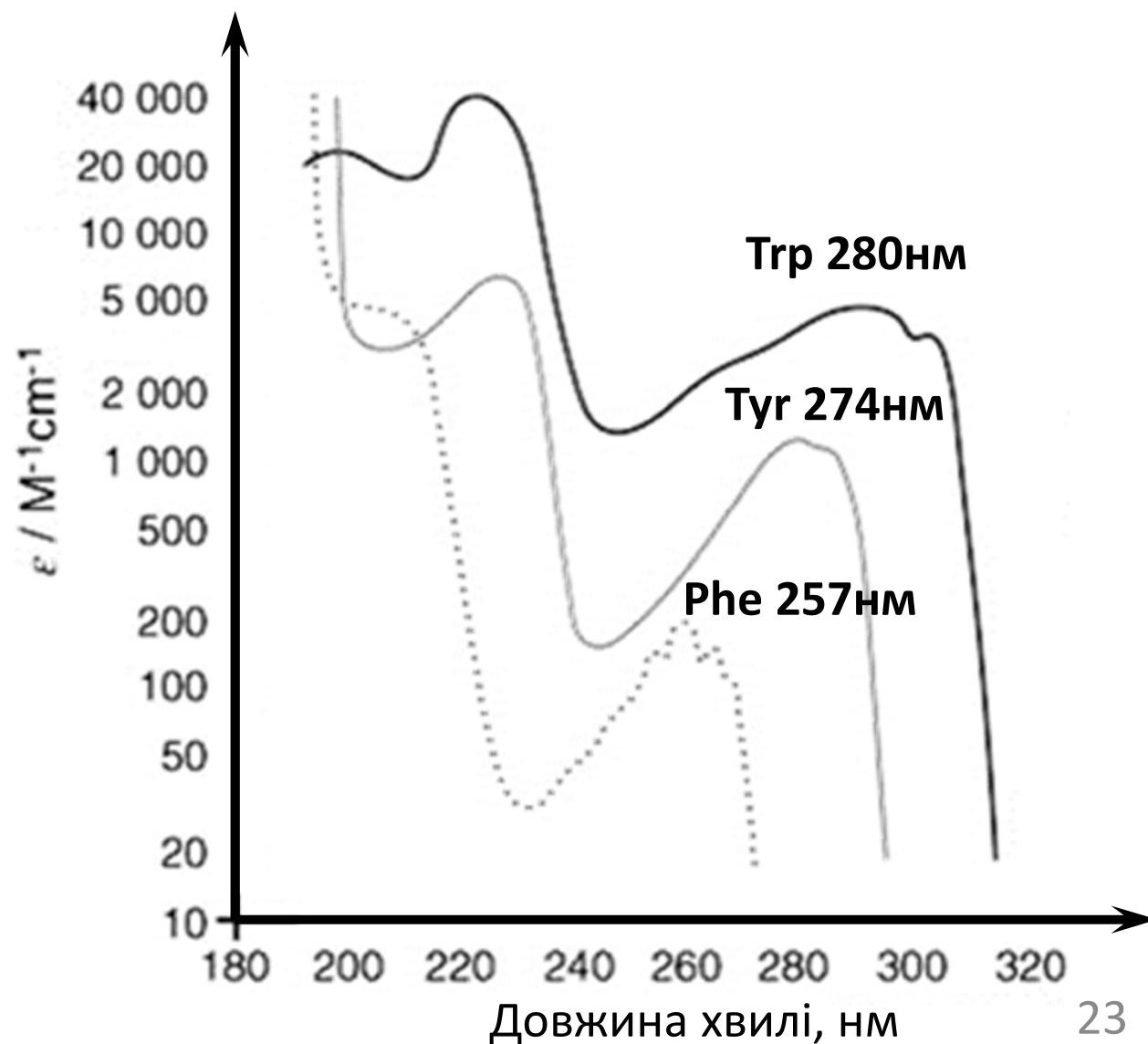
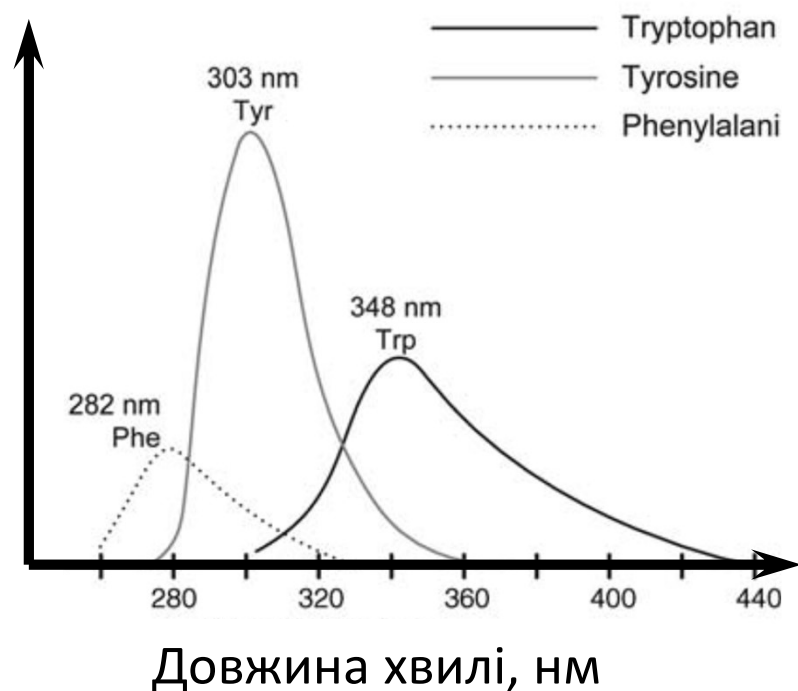


Природні флуорофори

Протеїни

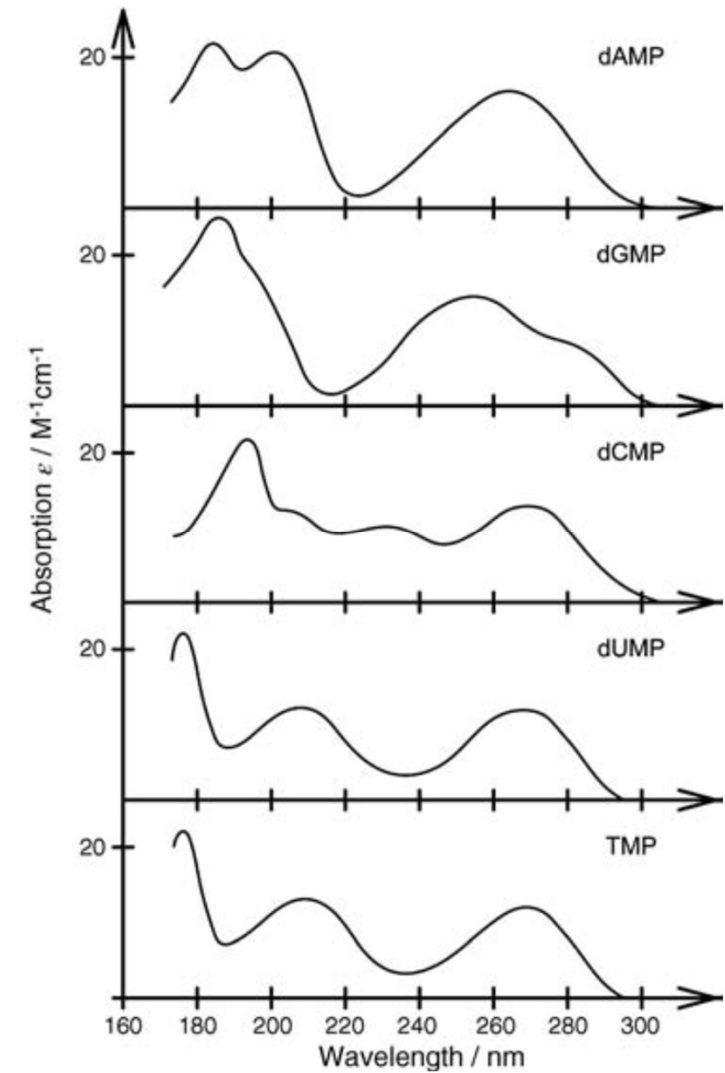
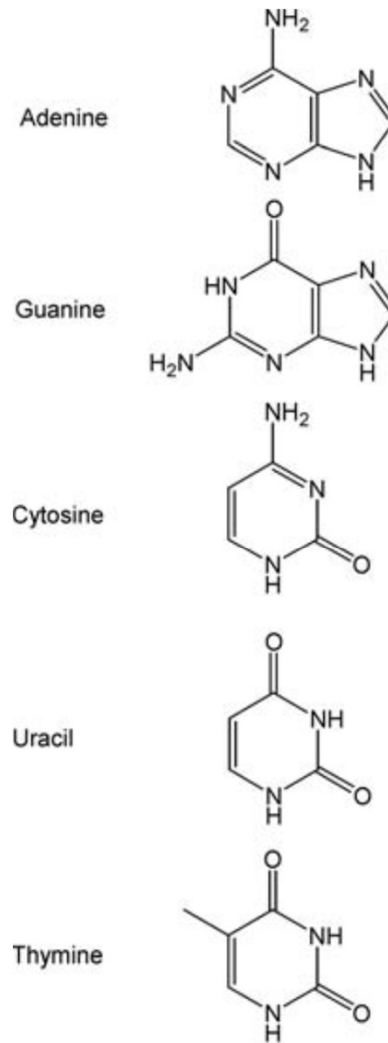
Всі протеїни сильно поглинають на 190-200 нм і поглинають до 225 нм

Крім того є сильне специфічне поглинання ароматичних амінокислот



Нуклеотиди

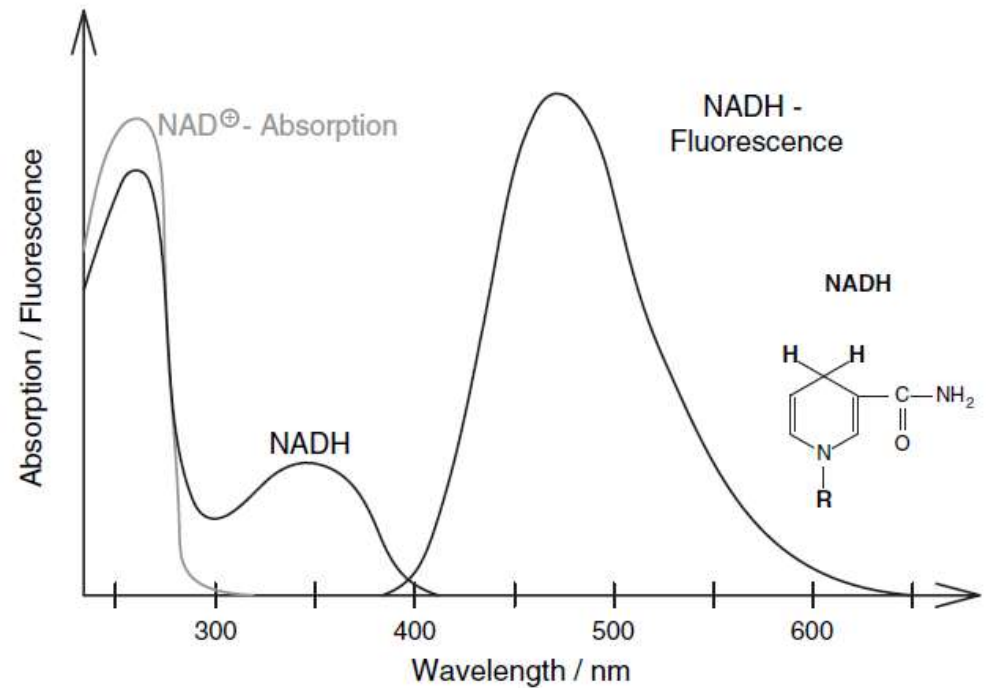
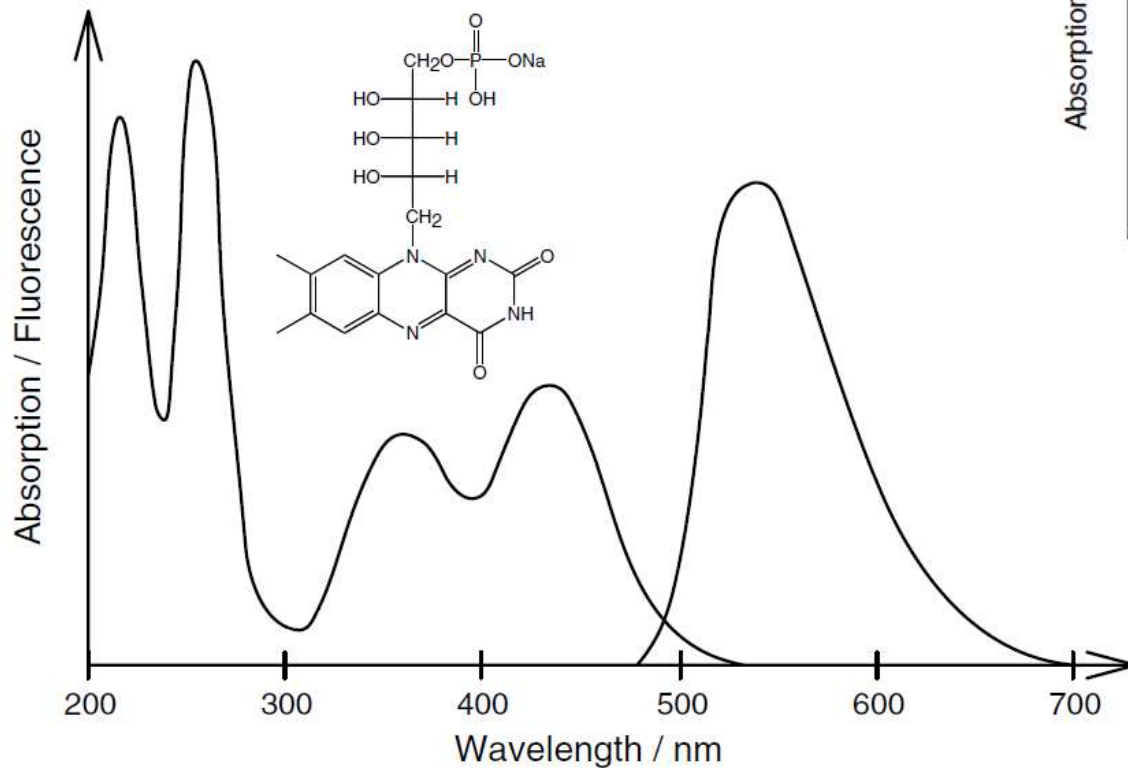
	ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$	максимум , нм
Аденін (AMP)	15400	259
Гуанін (GMP)	13700	253
Цитозин (CMP)	9000	271
Уридин (UMP)	10000	262



Калькулятор поглинання ДНК/РНК

<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

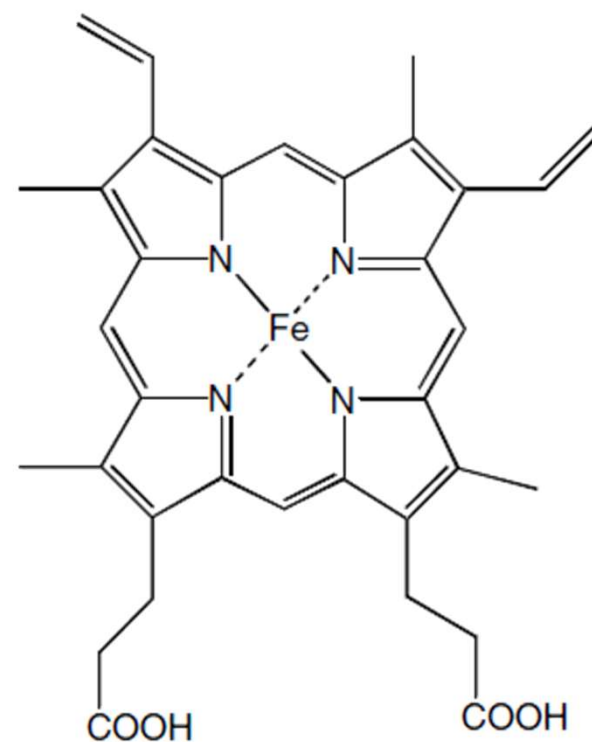
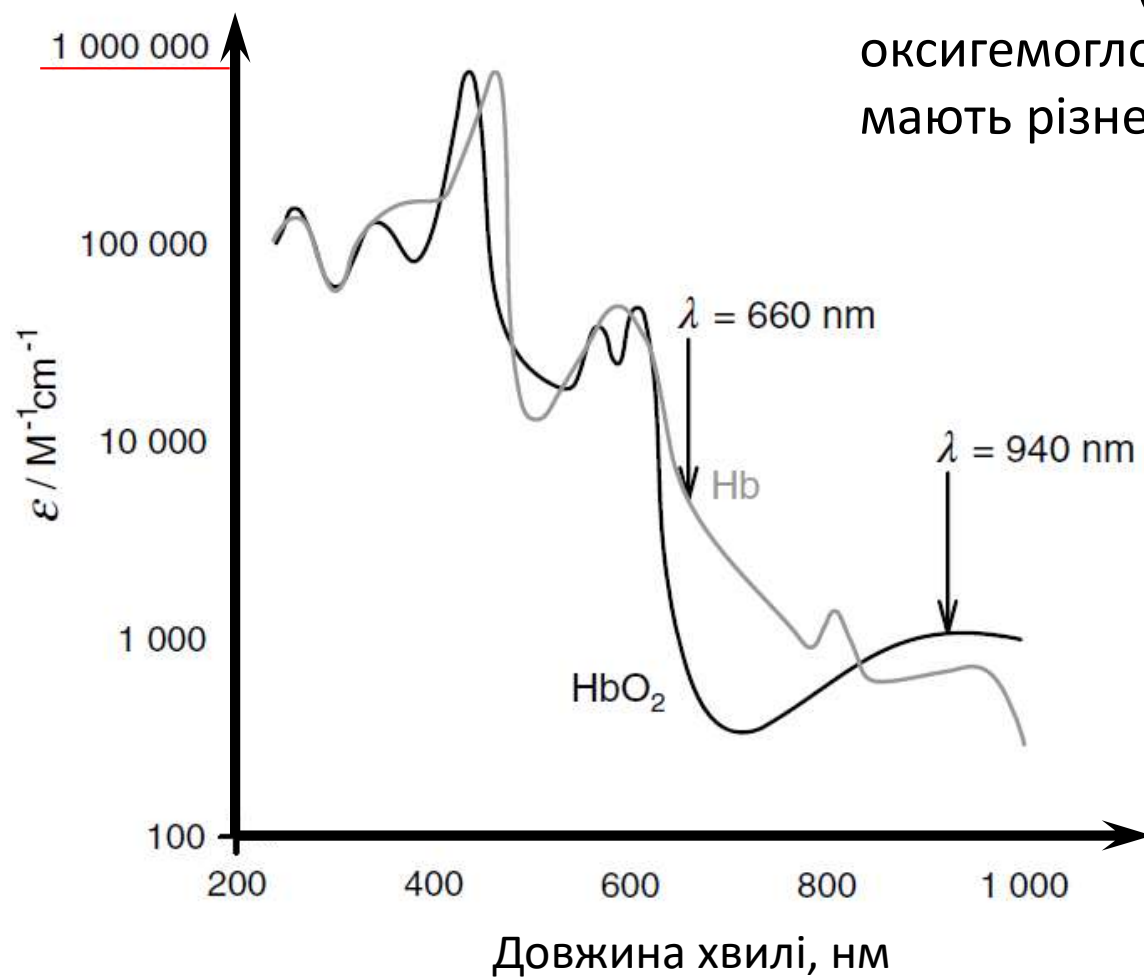
Рибофлавін та NADH



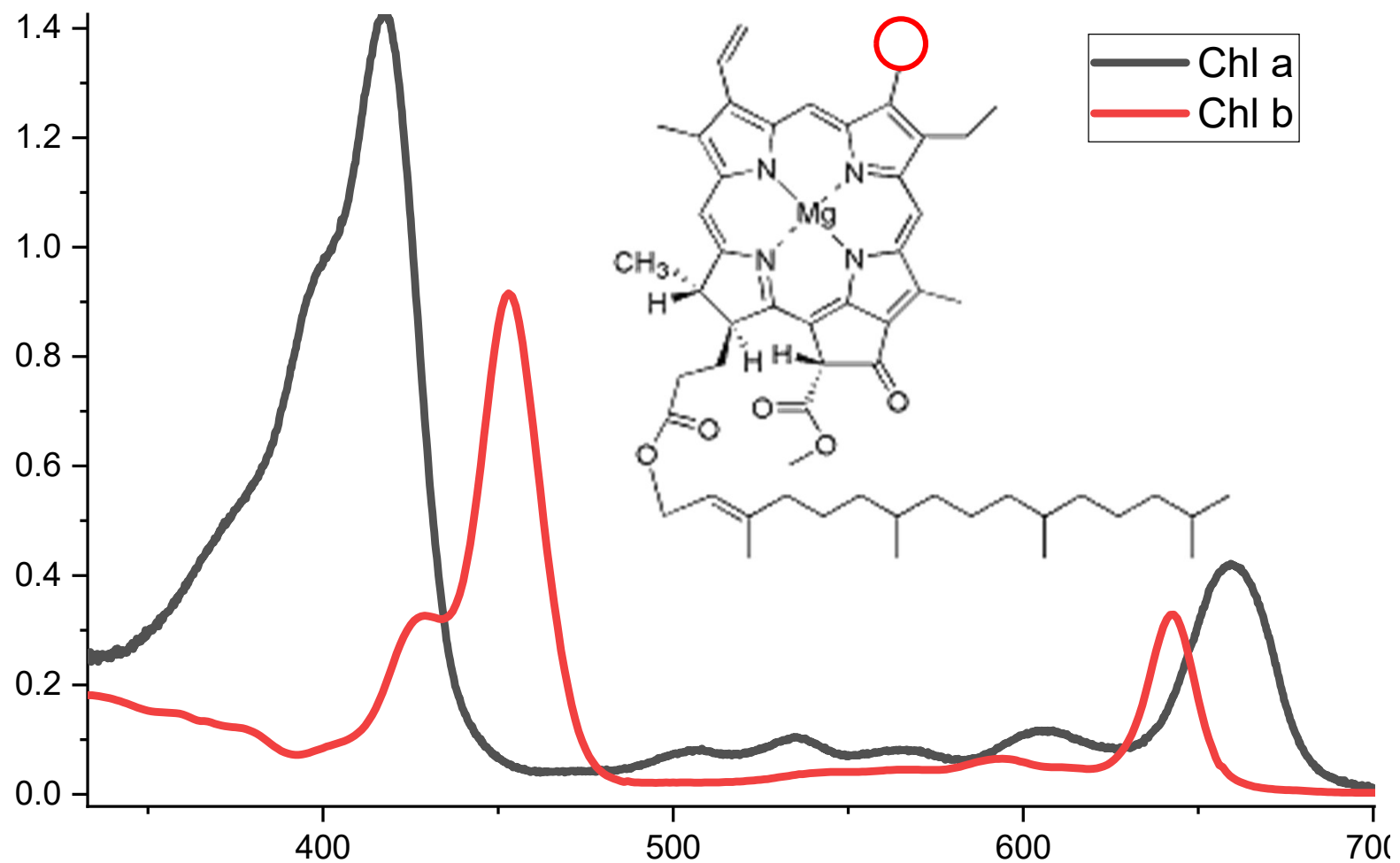
**Радше сприймається як перешкода
для мікроскопії (фоновий сигнал)**

Гемоглобін

Гемоглобін (Hb) та
оксигемоглобін (HbO₂)
мають різне поглинання



Хлорофіл



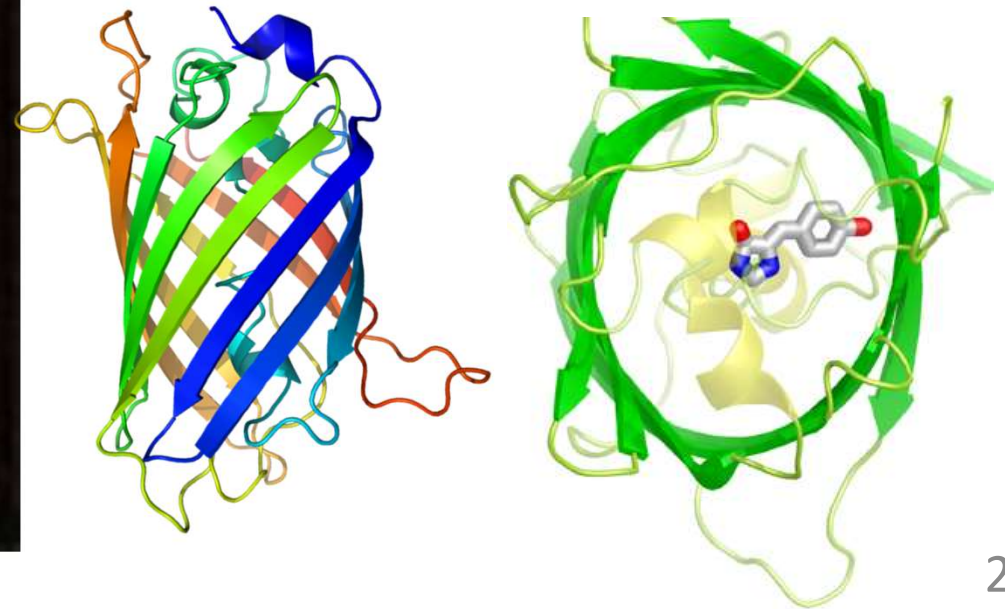
Флуоресцентні протеїни



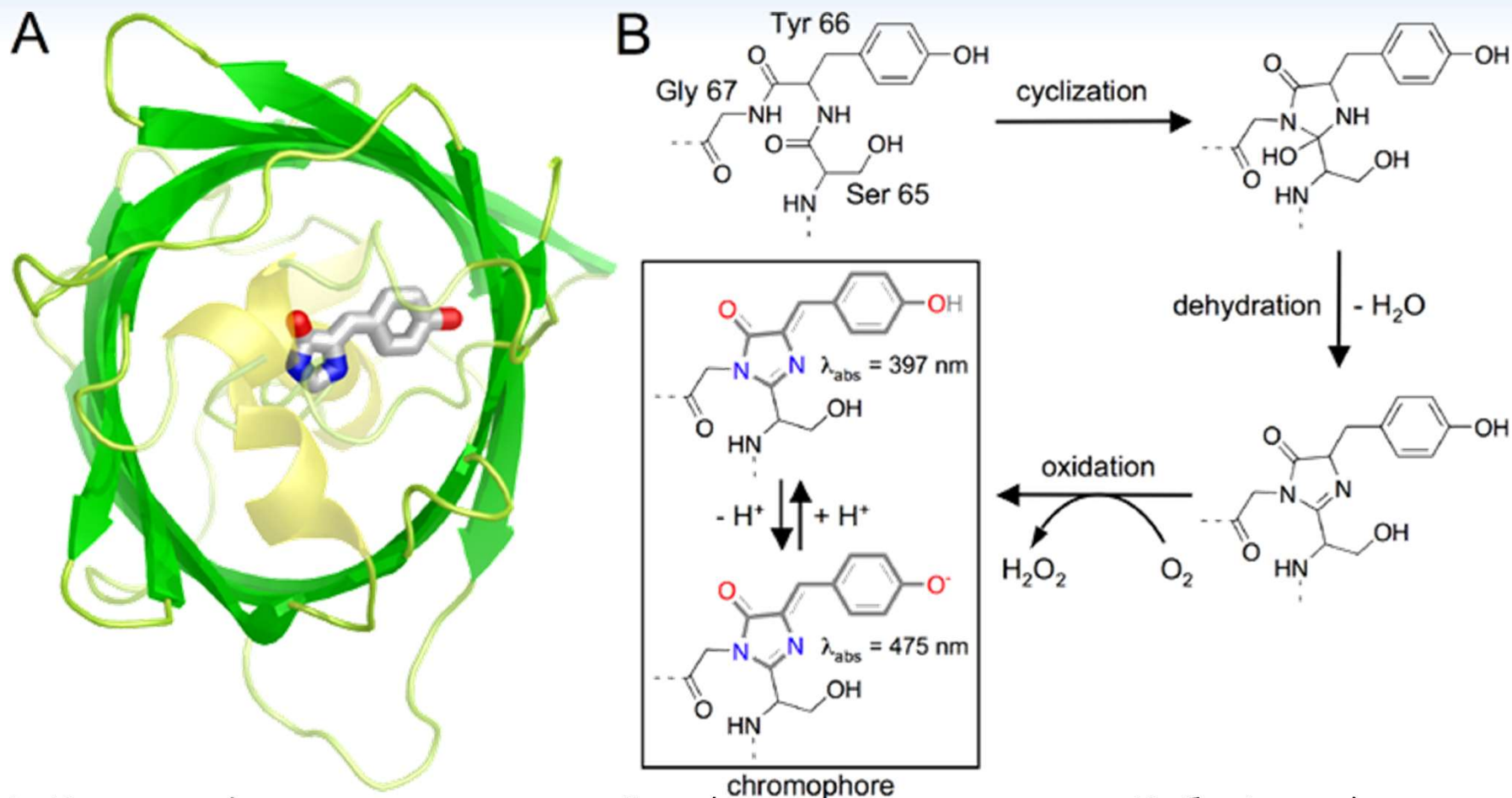
Флуоресцентні протеїни



Більшість природніх сполук є поганими флуорофорами через низьку фотостабільність. Так стається тому що флуорофор контактує з водою. Але є один дуже важливий виняток



GFP



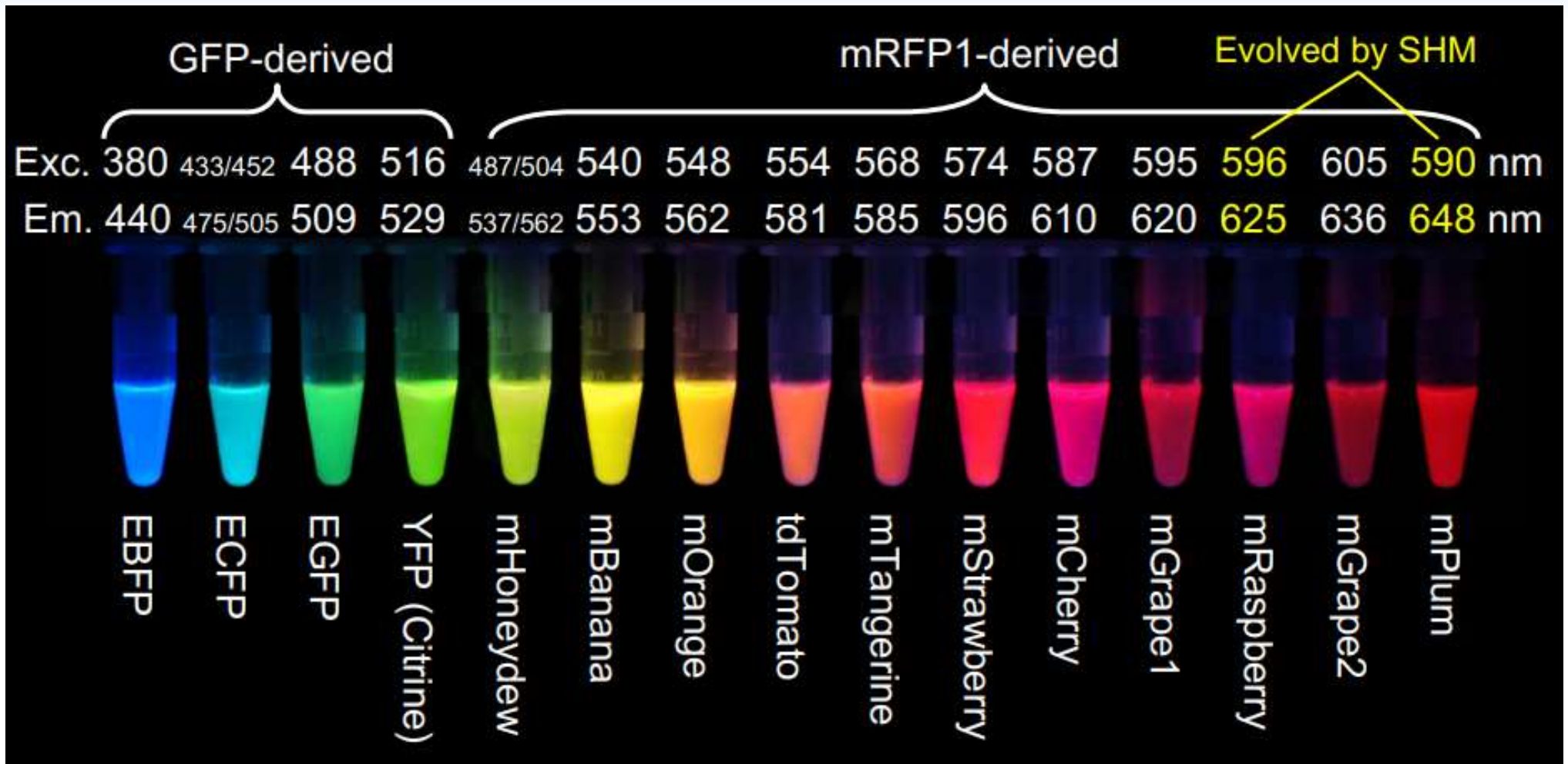
Лекція Цьєна по флуоресцентних протеїнах (того що оримав за них Нобелівську)

<https://www.youtube.com/watch?v=qK9aYnklr3w>

Рекомендується для прочитання розділ:

http://www.scholarpedia.org/article/Fluorescent_proteins

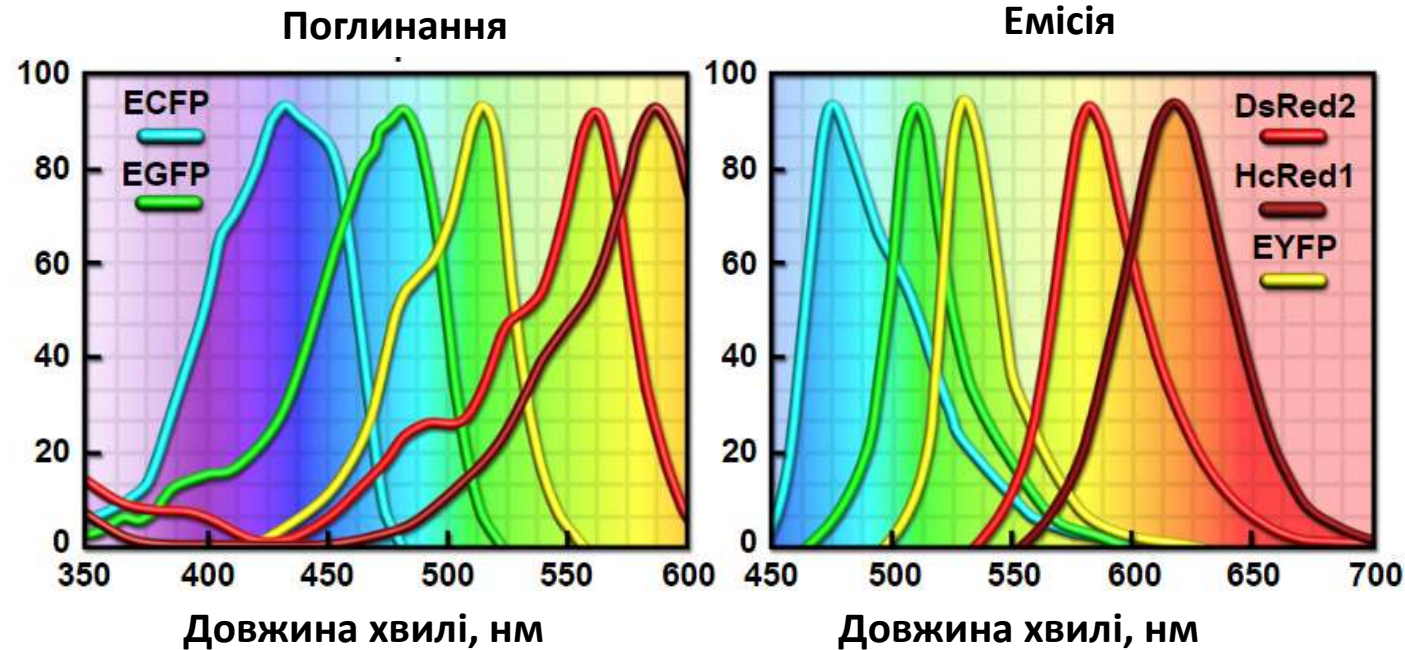
Флуоресцентні протеїни



<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/tsien-slides.pdf>

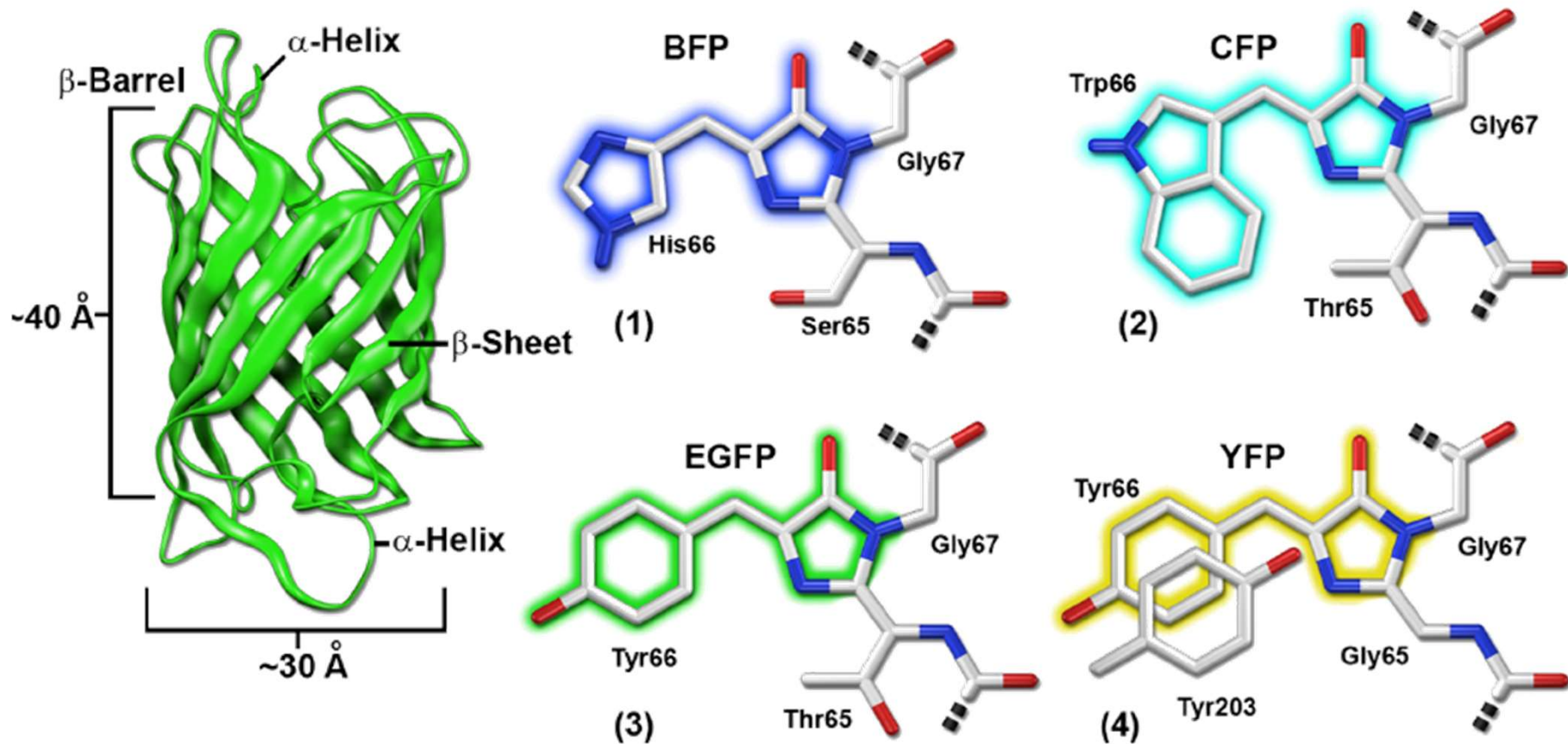
Nathan Shaner et al (2004) Nature Biotech. 22: 1567-1572

Флуоресцентні протеїни



Флуоресцентні протеїни сильно різняться за довжиною хвилі поглинання – від голубого до червоного кольору.

Флуоресцентні протеїни



Флуоресцентні протеїни сильно різняться за довжиною хвилі поглинання – від голубого до червоного кольору це пов'язано з різною будовою флуорофору.

Флуоресцентні протеїни

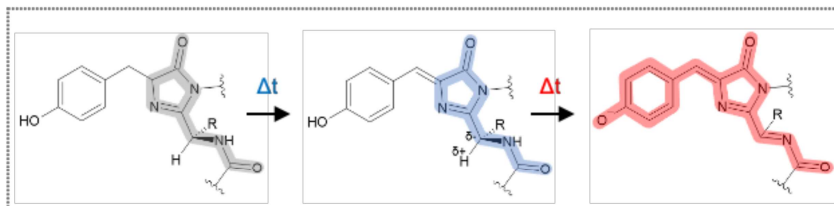
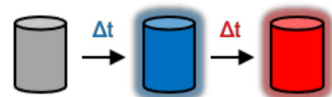
Протеїн (акронім)	Збудження Max (nm)	Емісія Max (nm)	Коефіцієнт поглинання (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Квантовий вихід	<i>in vivo</i> структура	Відносна яскравість (% від EGFP)
GFP (wt)	395/475	509	21,000	0.77	Monomer*	48
EGFP	484	507	56,000	0.6	Monomer*	100
ECFP	439	476	32,500	0.4	Monomer*	39
Venus	515	528	92,200	0.57	Monomer*	156
DsRed	558	583	75,000	0.79	Tetramer	176
mCherry	587	610	72,000	0.22	Monomer	47

Таблиця флуоресцентних протеїнів

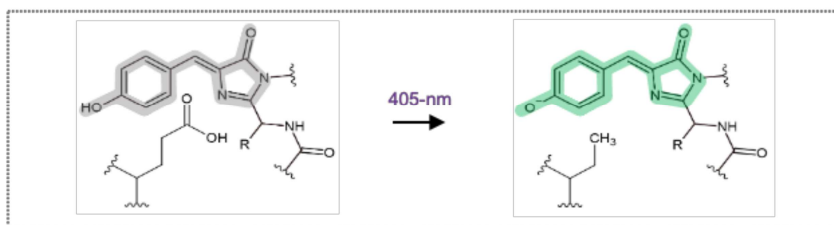
<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescent-proteins>

Флуоресцентні протеїни

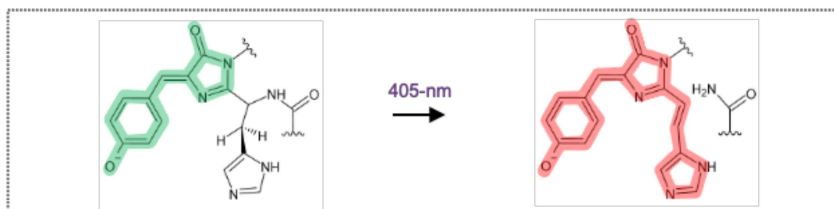
(a) Fluorescent Timer



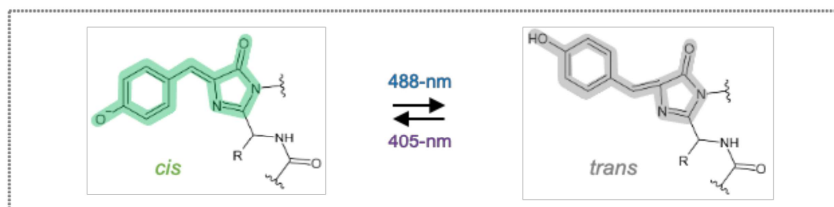
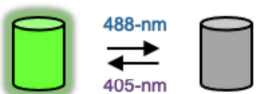
(b) Photoactivatable FP



(c) Photoconvertible FP

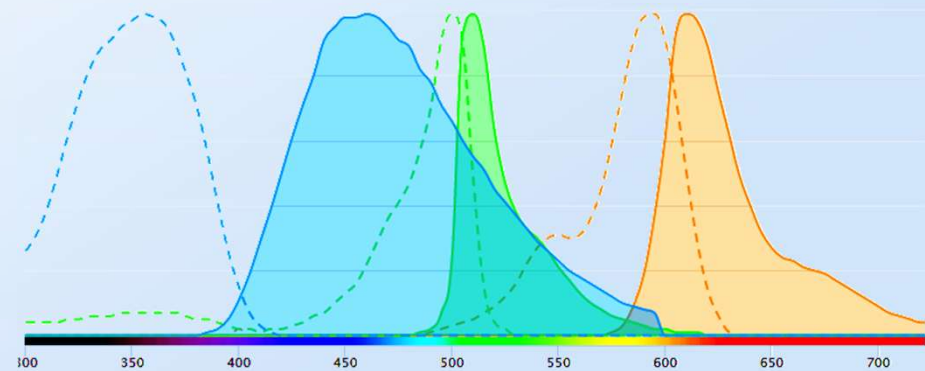


(d) Photoswitchable FP

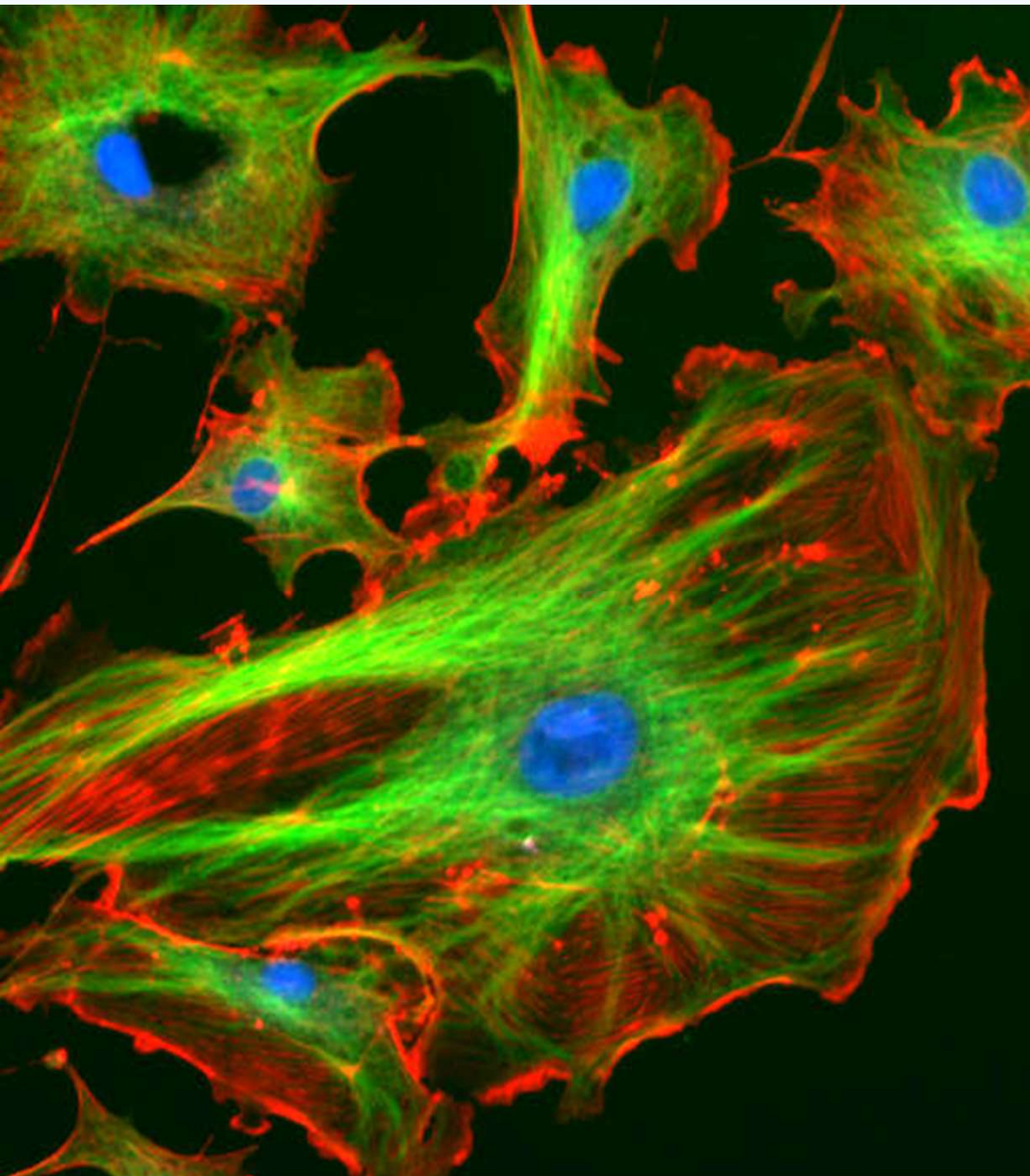


<https://doi.org/10.3390/s21030795>

Перекривання каналів



Перекривання каналів (*Channel crosstalk*)

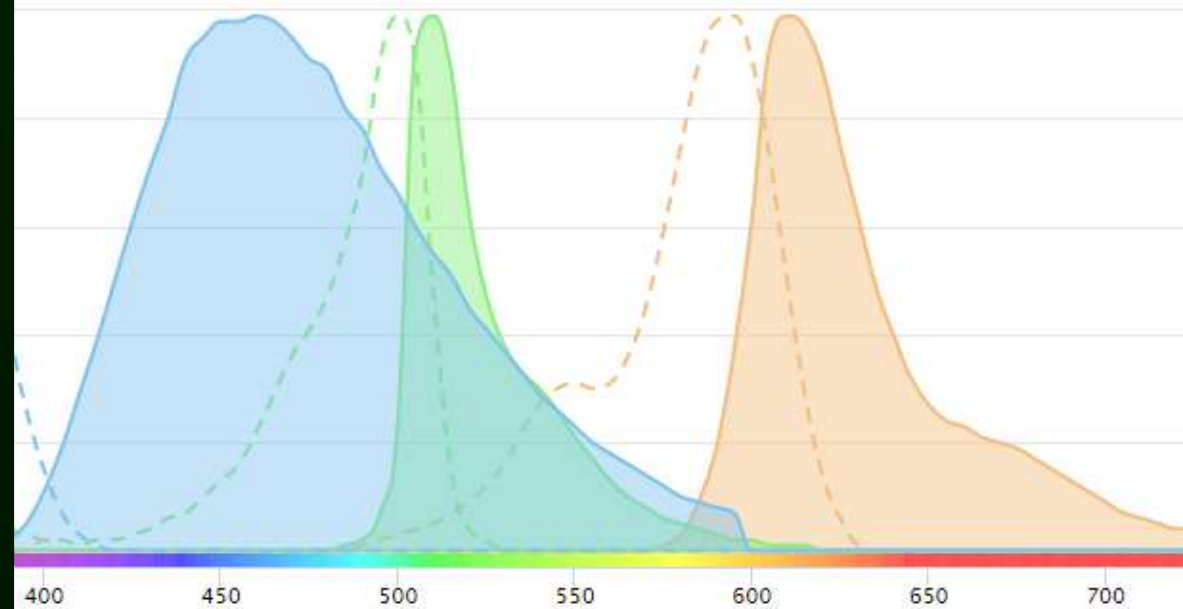


Актин (філаменти) - Texas Red X-Phalloidin

Тубулін (мікротрубки) –BODIPY-FL

ДНК (ядро) - DAPI

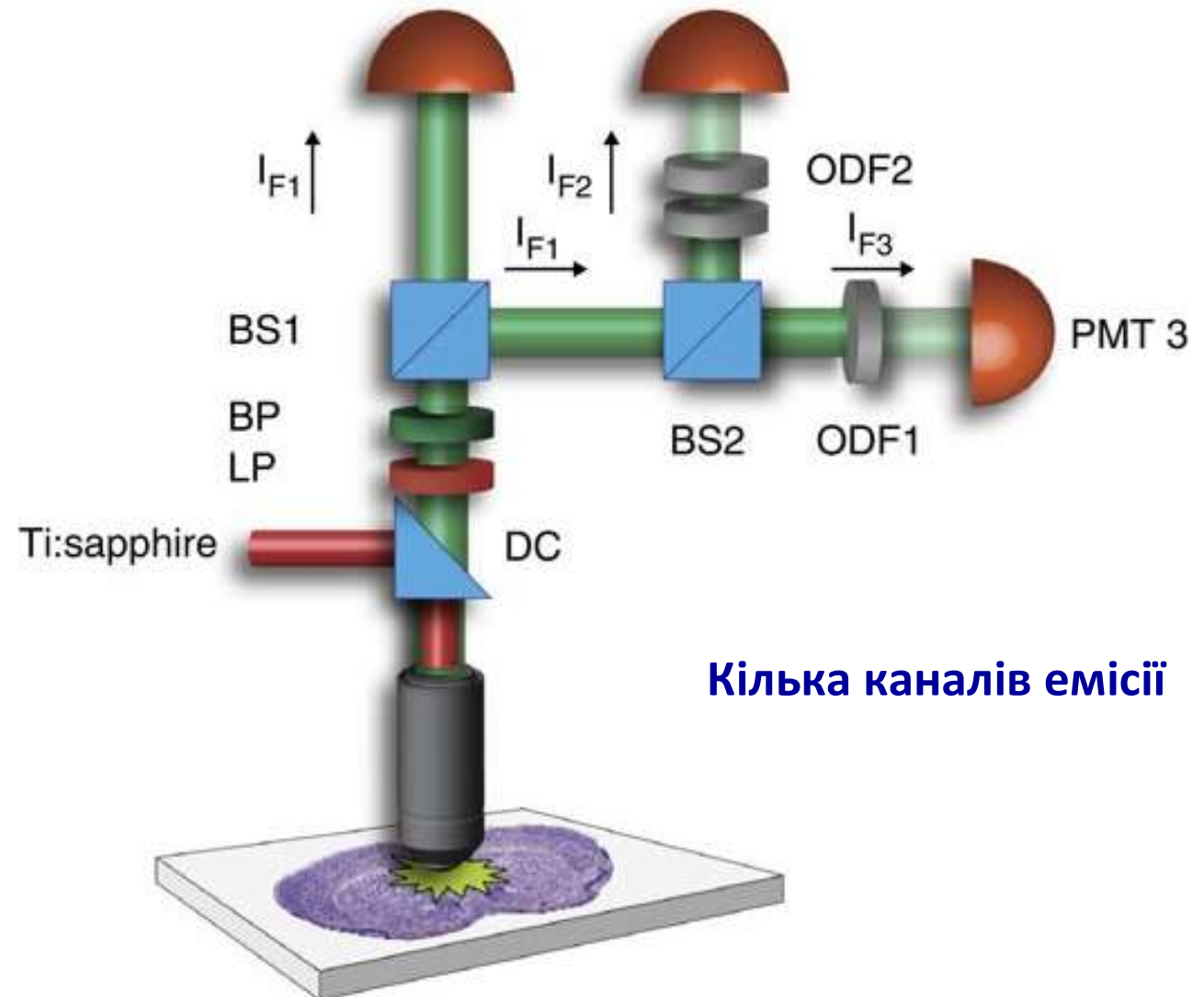
*спектральна деконволюція



Перекривання каналів (Channel crosstalk)



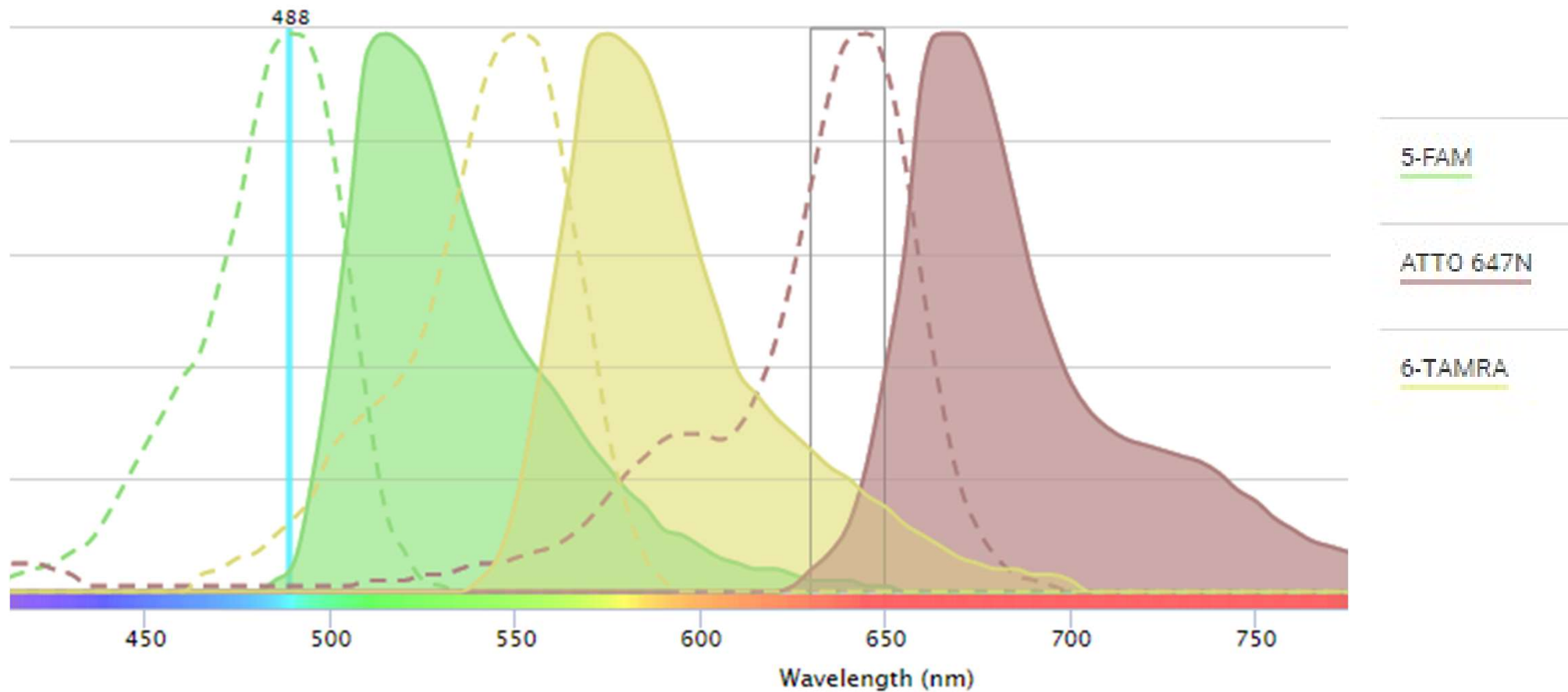
Кілька лазерів для збудження



Кілька каналів емісії

Перекривання каналів (Channel crosstalk)

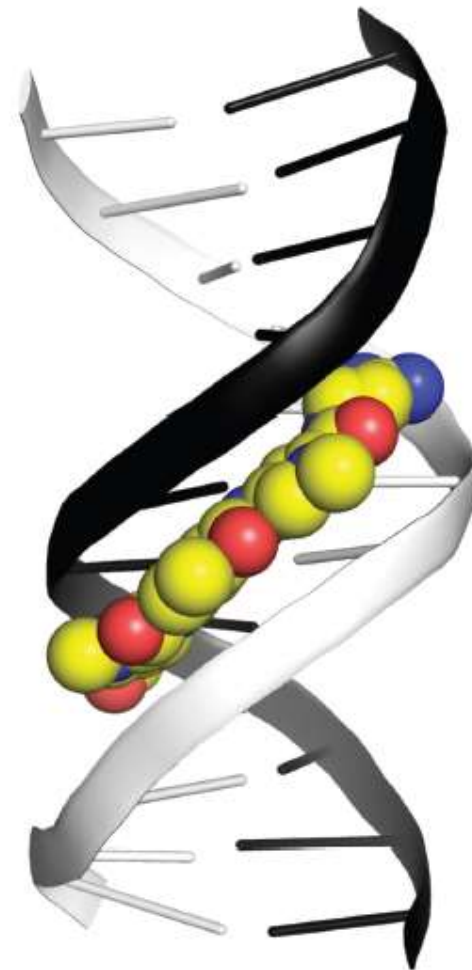
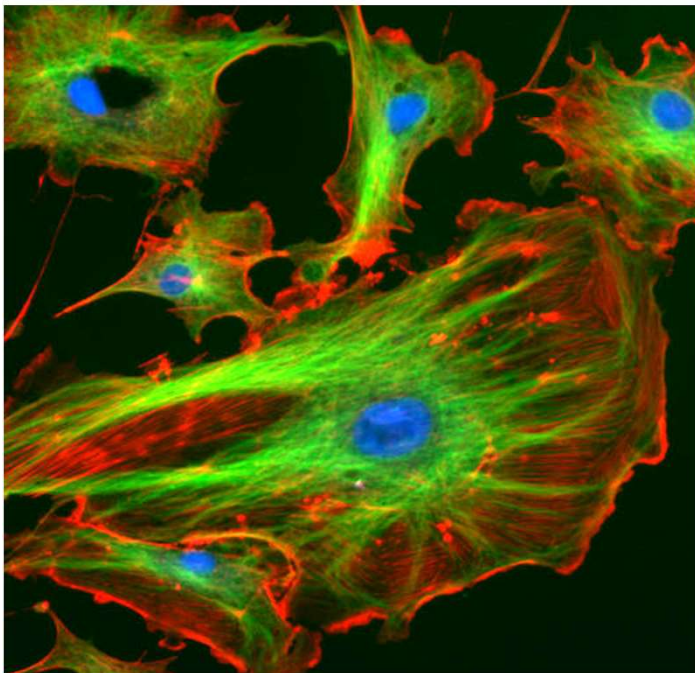
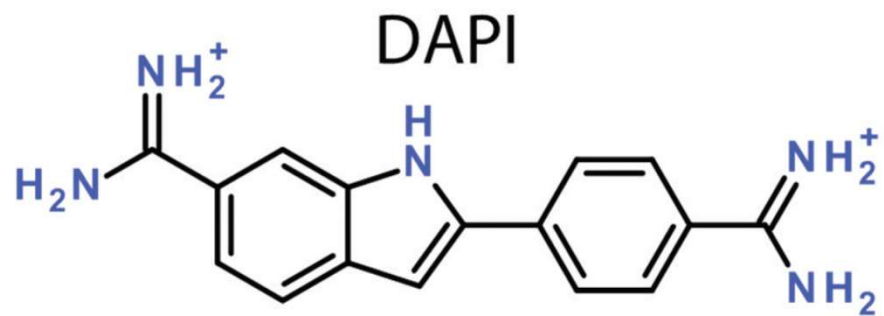
<https://app.fluorofinder.com/ffsv/svs/bdb977804ef0013bdef90211f09e3eab>



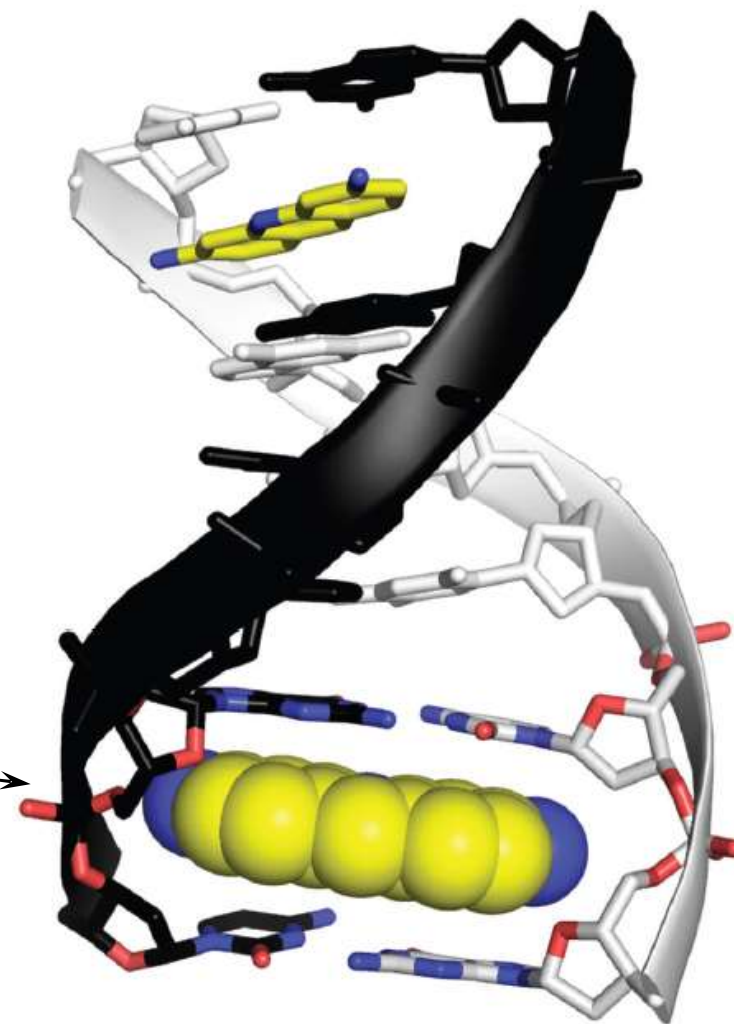
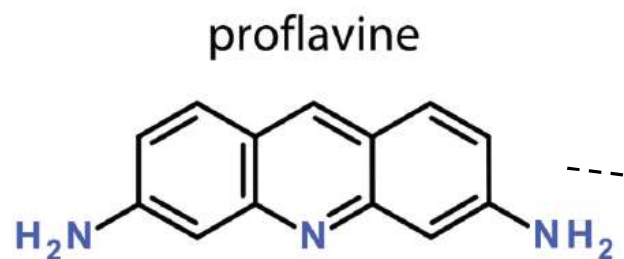
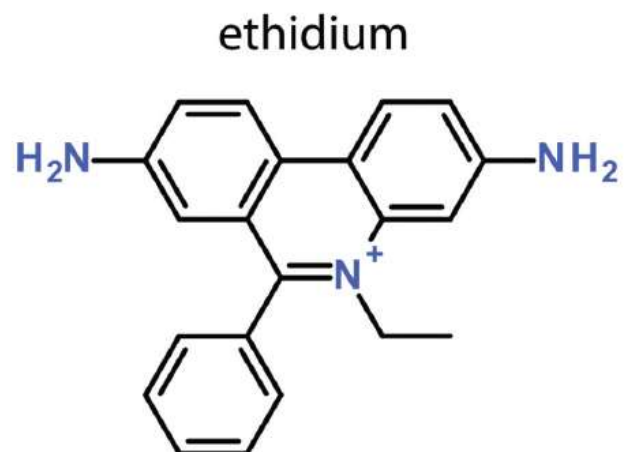
Нековалентні мітки



Нековалентні мітки

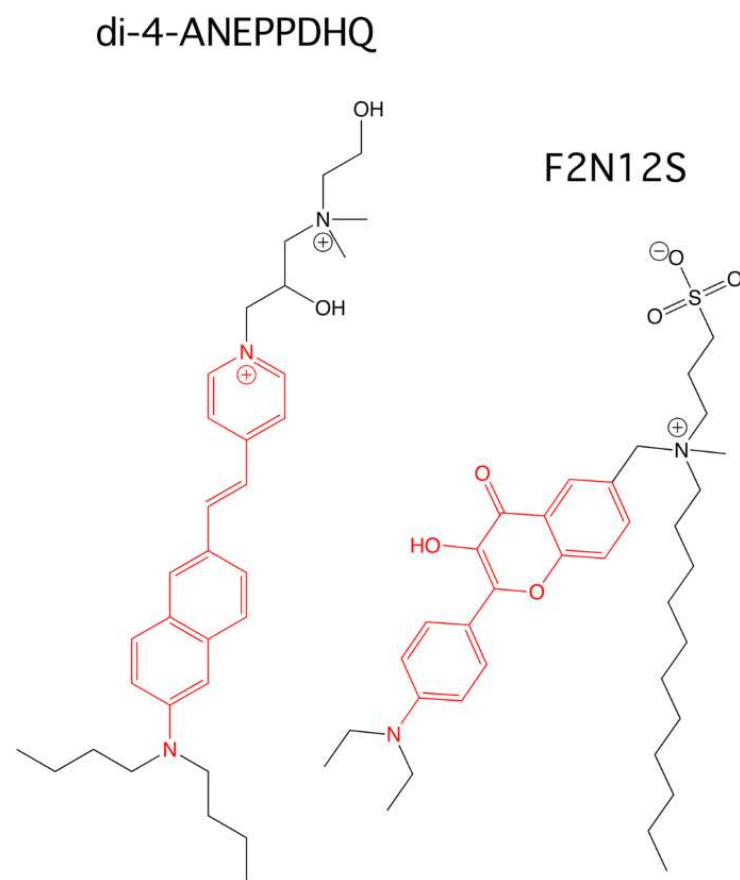
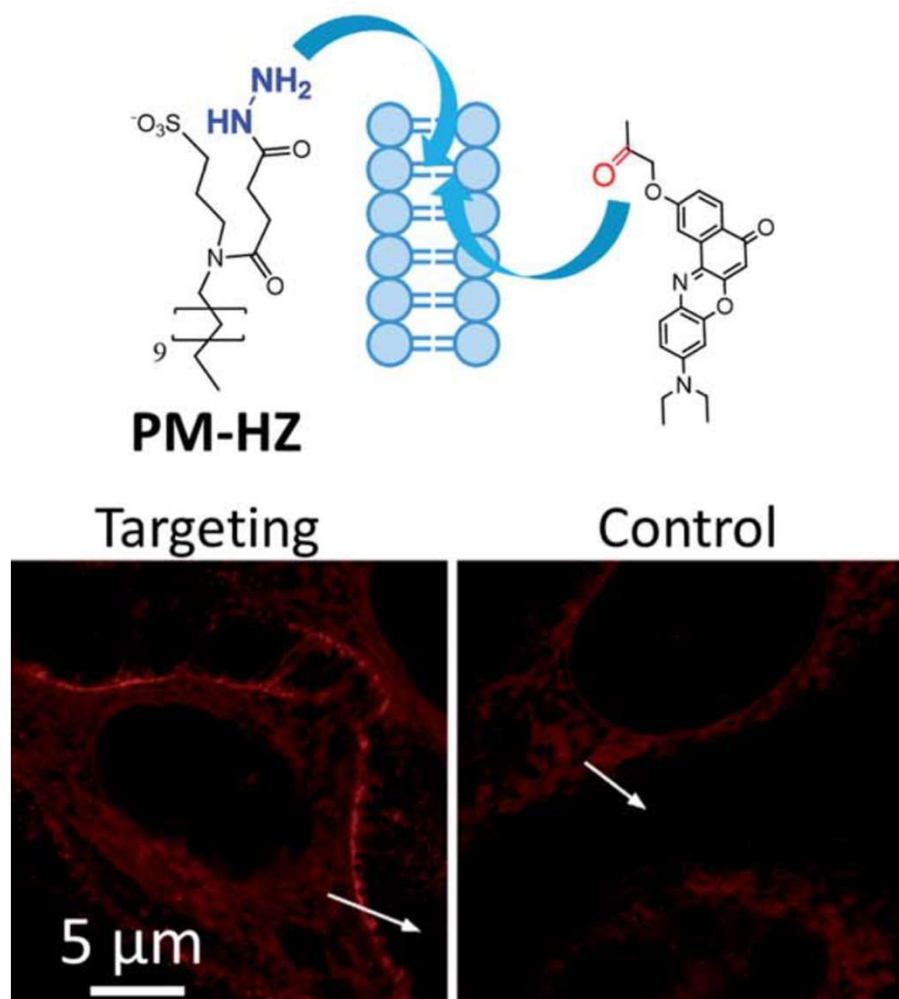


Інтеркаляція в ДНК

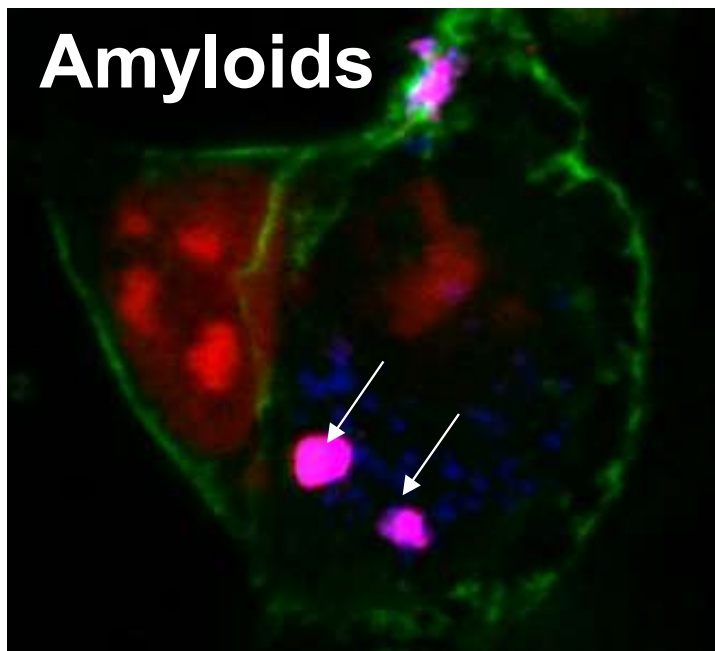
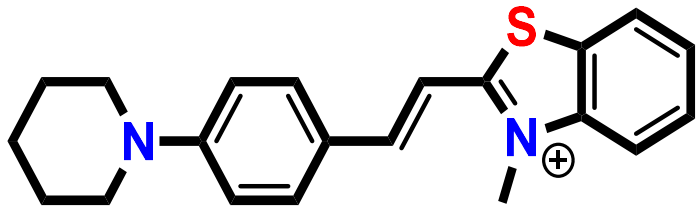


Аміногрупи етидію та профлавіну Н-зв'язуються з фосфодієфірною основою, тоді як ароматичні частини інтеркалюють в ДНК

Флуорофори, що зв'язуються з мембраною

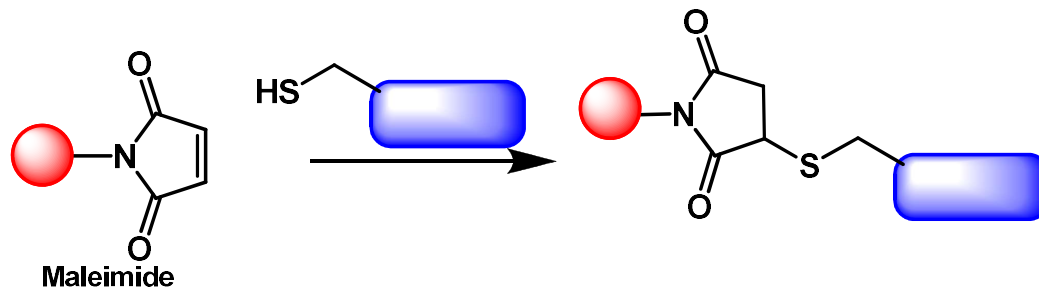


Інші нековалентні мітки



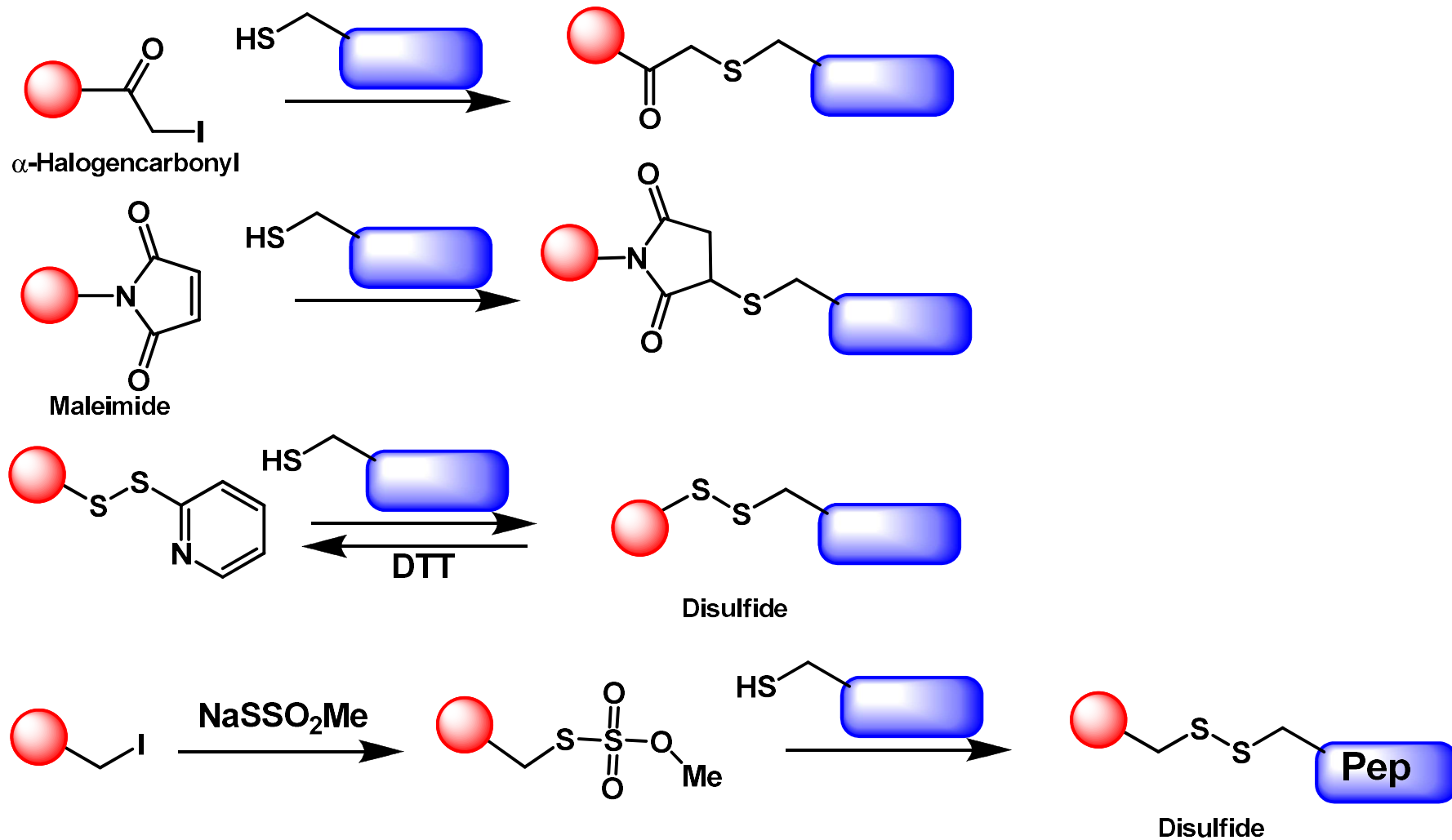
Ковалентне мічення

Мічення протеїнів: цистеїн

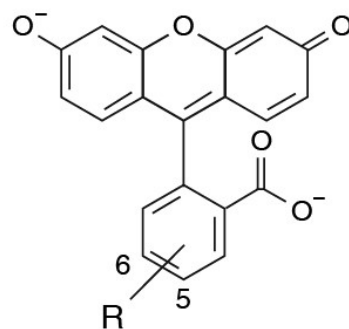
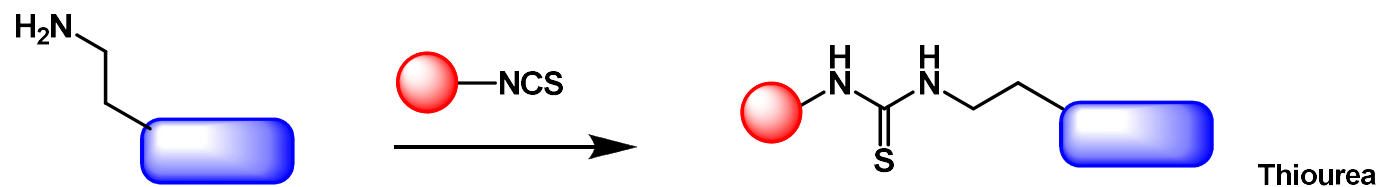


Малеїмід гладко реагує з сульфогрупою цистеїну при рН біля 8
Надлишок 1,2х, час реакції біля 4годин при 0,1мМ концентрації

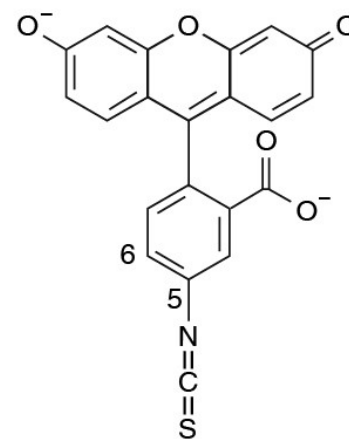
Мічення протеїнів: цистеїн



Мічення протеїнів: лізин

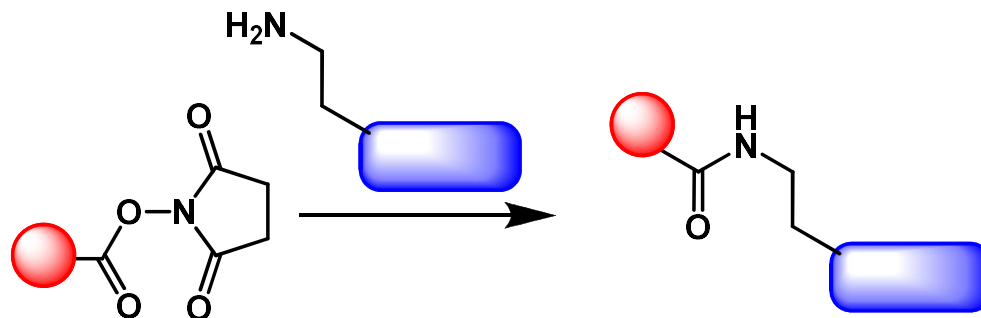


Fluorescein

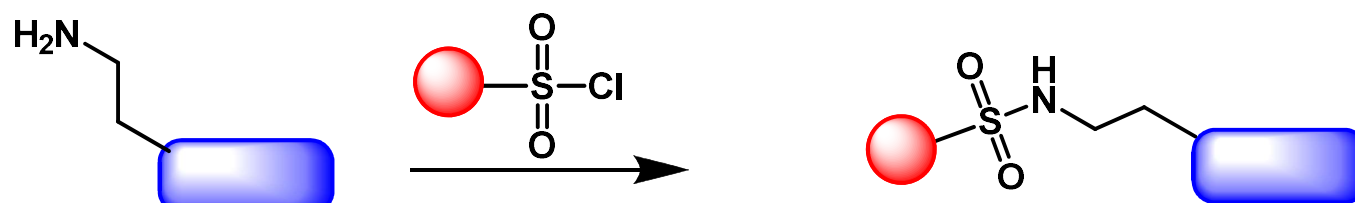


FITC

Мічення протеїнів: лізин

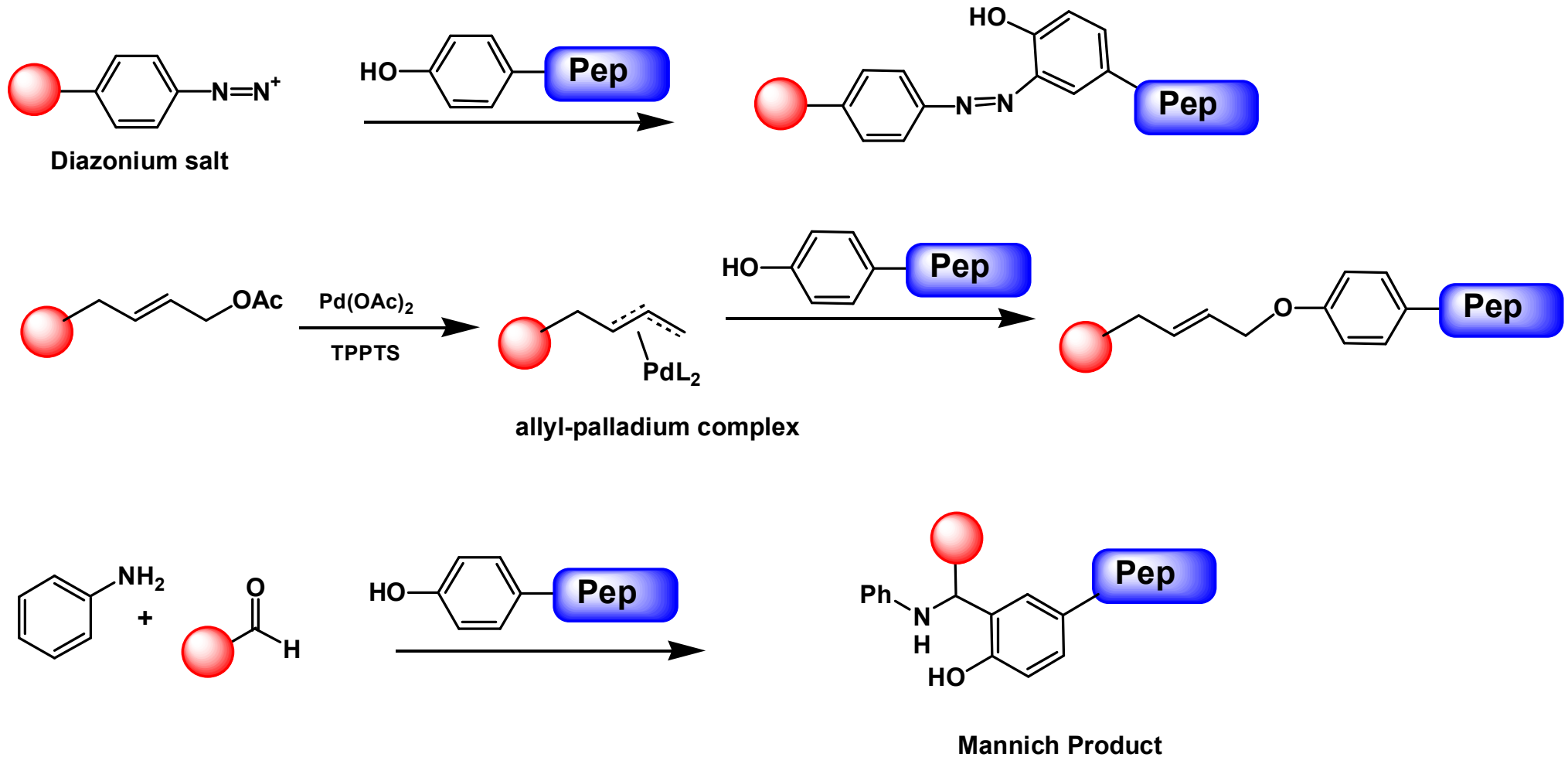


NHS естери



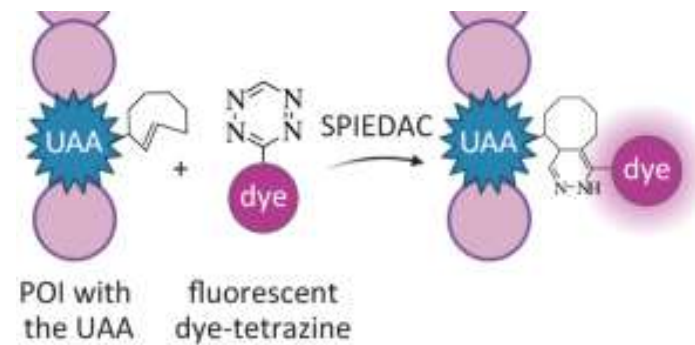
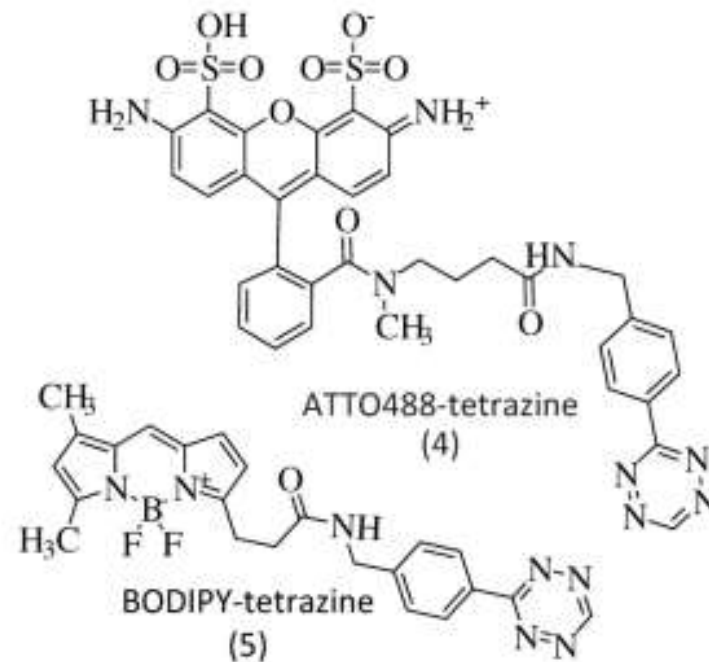
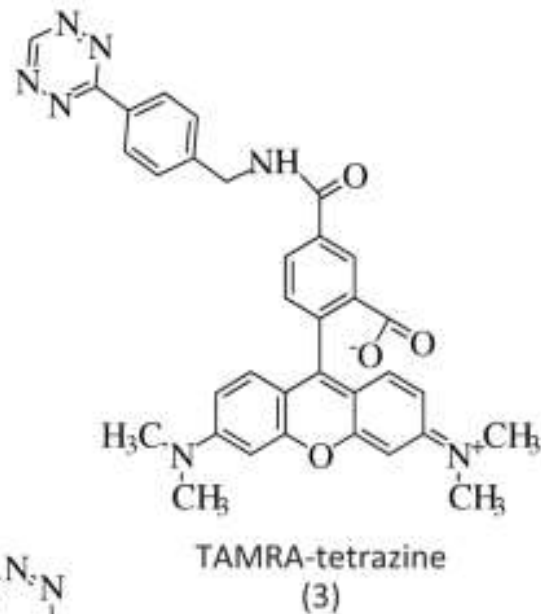
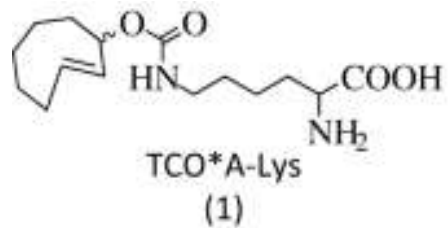
Сульфохлориди

Мічення протеїнів: Тирозин

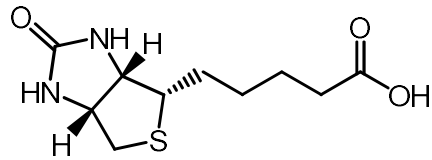


Тирозин для мічення протеїнів використовують дуже рідко, тільки в спеціальних випадках

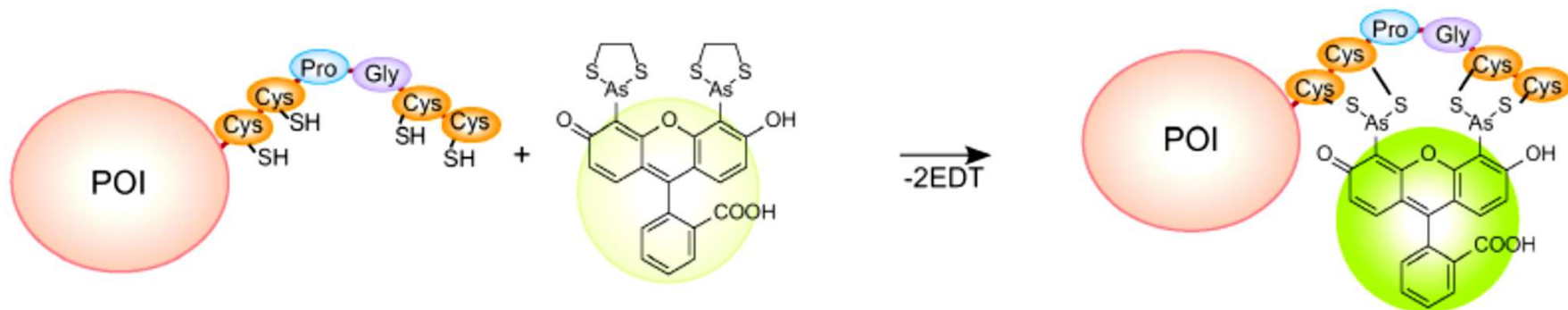
Мічення протеїнів: клік реакції



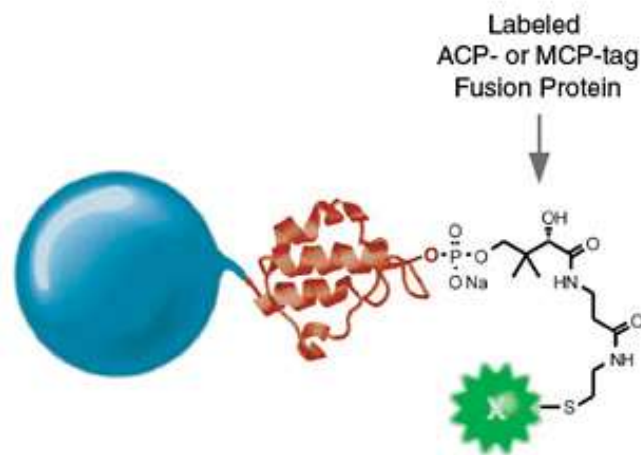
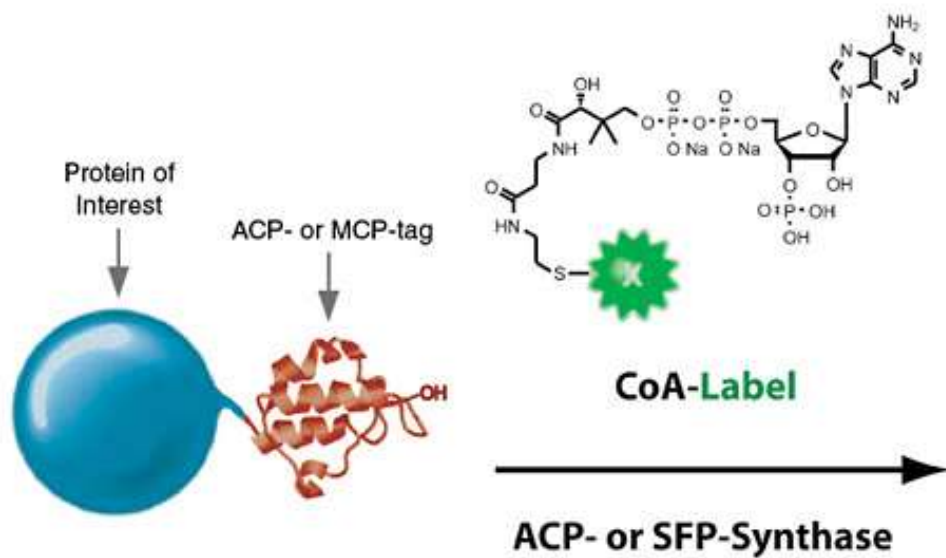
Мічення протеїнів: біотин



Мічення протеїнів: таги

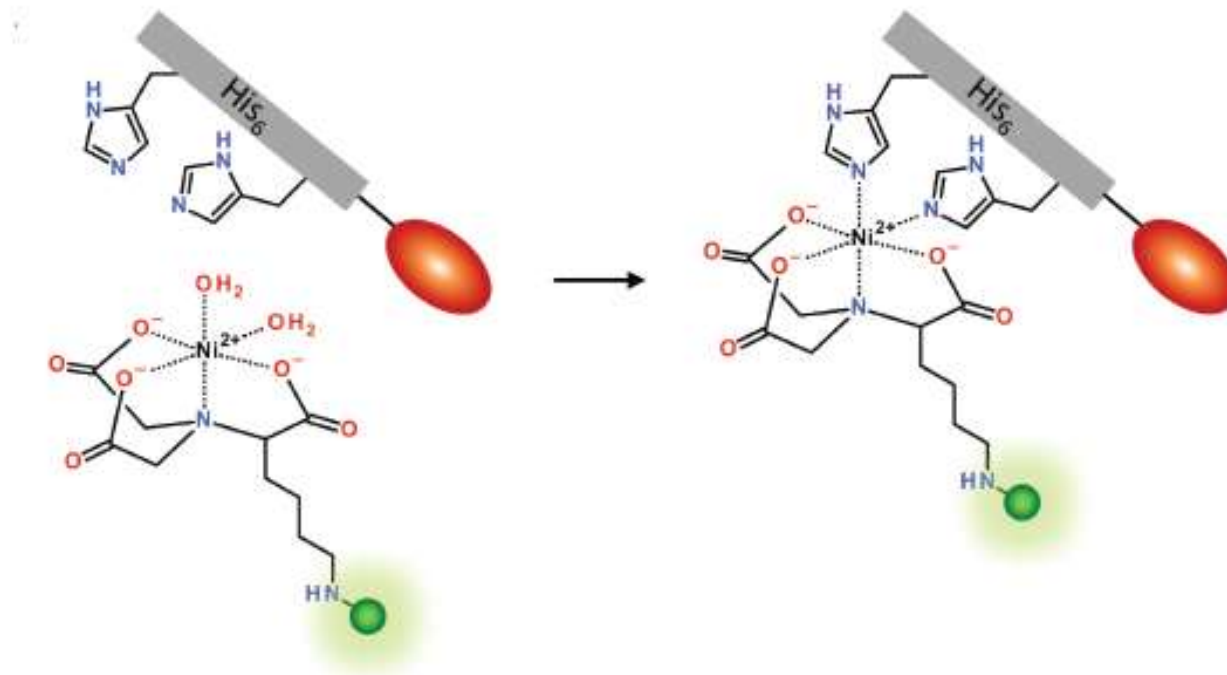


Пряма взаємодія з барвником

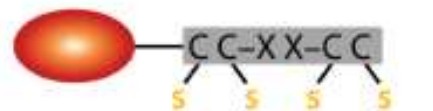
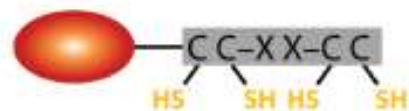


Фермент-залежна
взаємодія з барвником

Мічення протеїнів: таги



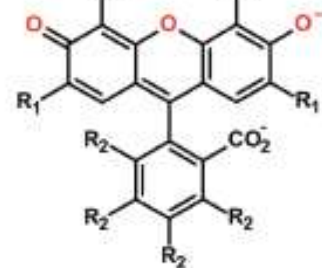
Мічення протеїнів: таги



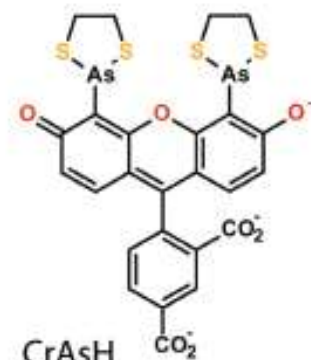
FIAsh: R₁=H, R₂=H

F₂FIAsh: R₁=F, R₂=H

F₄FIAsh: R₁=H, R₂=F



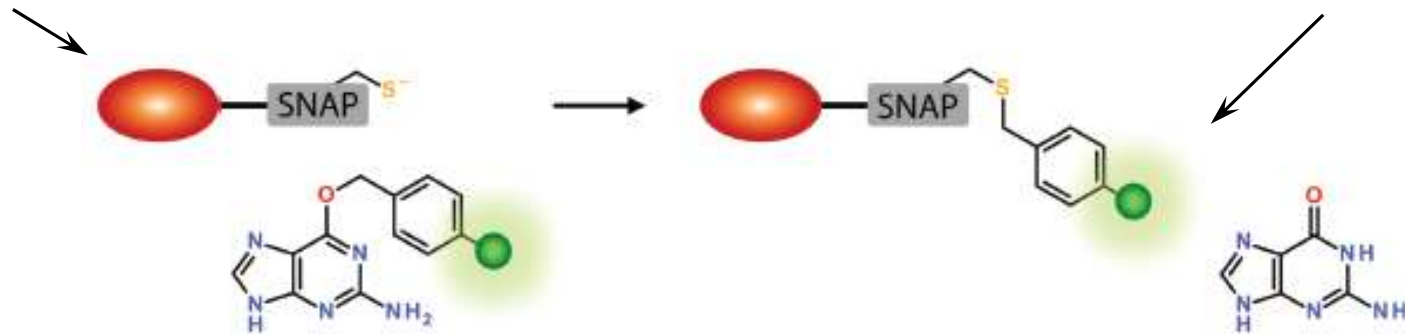
ReAsH



CrAsH

Мічення протеїнів: таги

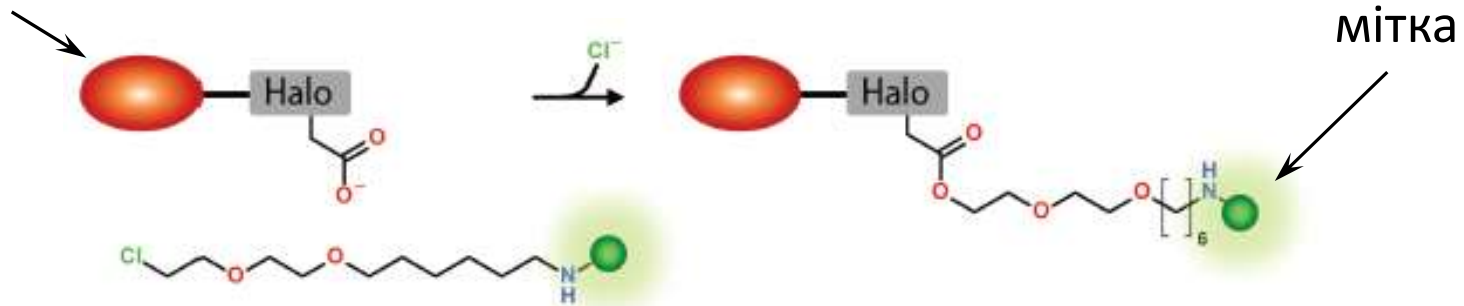
Цільовий білок



SNAP таг - 20 кДа фрагмент алкілтрансферази Об-алкіл-гуаніну. Реакція цистеїну в складі тагу з флуоресцентно міченим бензилгуаніном може бути використана для ковалентного флуоресцентного мічення

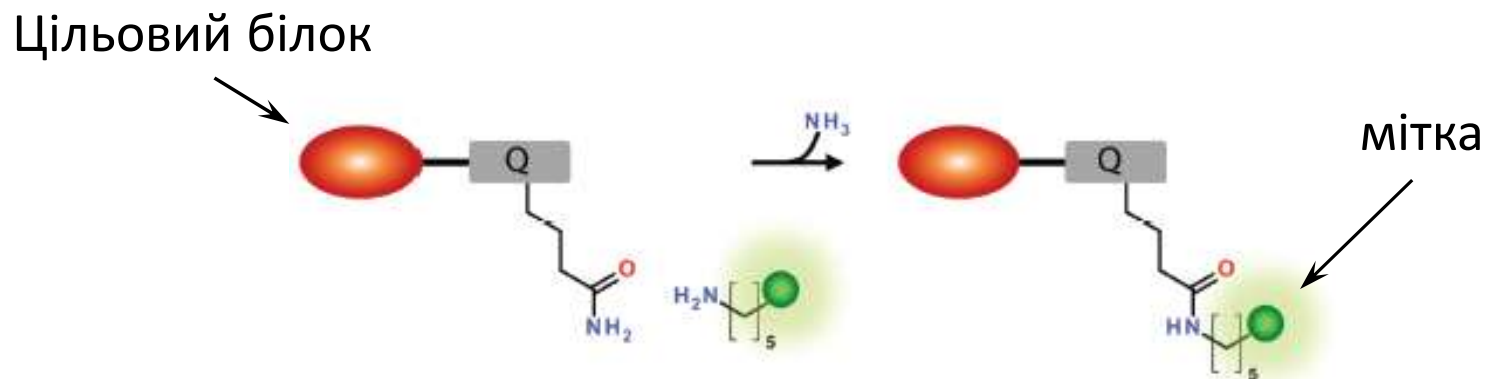
Мічення протеїнів: таги

Цільовий білок



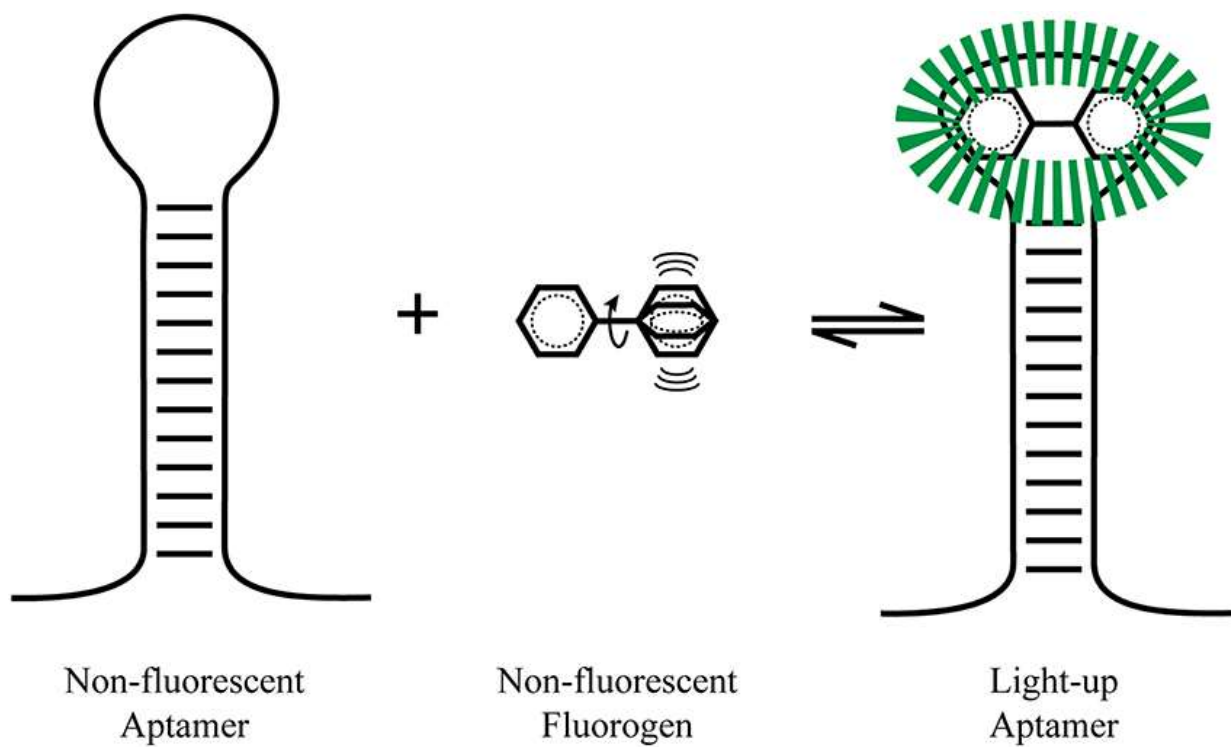
Halo tagR походить від галоалканодегалогенази. Аспартат у його складі Halo tag утворює ковалентний адукт з флуоресцентно модифікованими хлороалкановими лігандами

Мічення протеїнів: таги

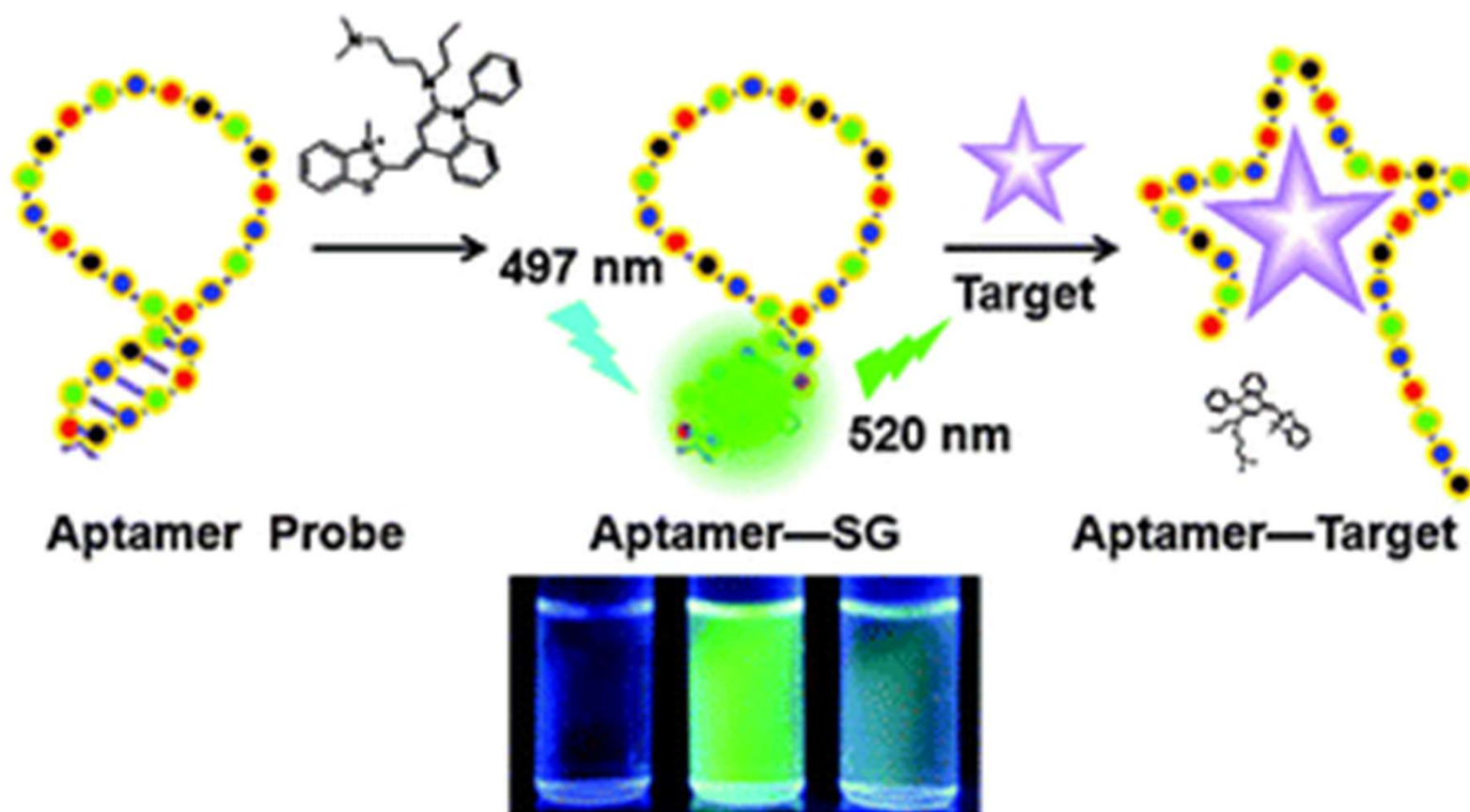


Q таг - це послідовність розпізнавання трансглутамінази. Трансглутаміназа переносить флуоресцентно мічені аміни на консервативний глутамін у складі тагу. Цільовий білок представлено помаранчевим кольором

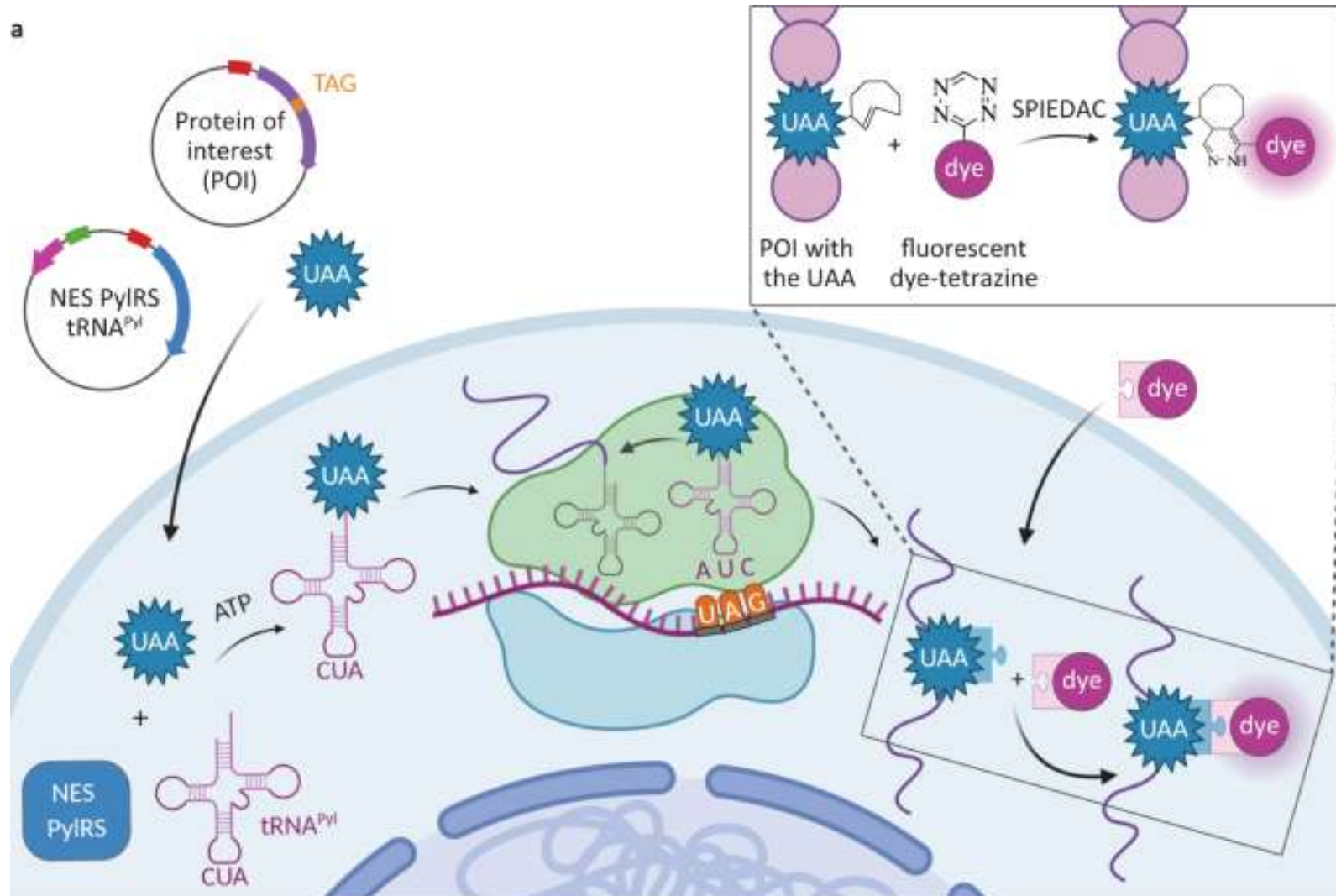
Аптамери



Аптамери

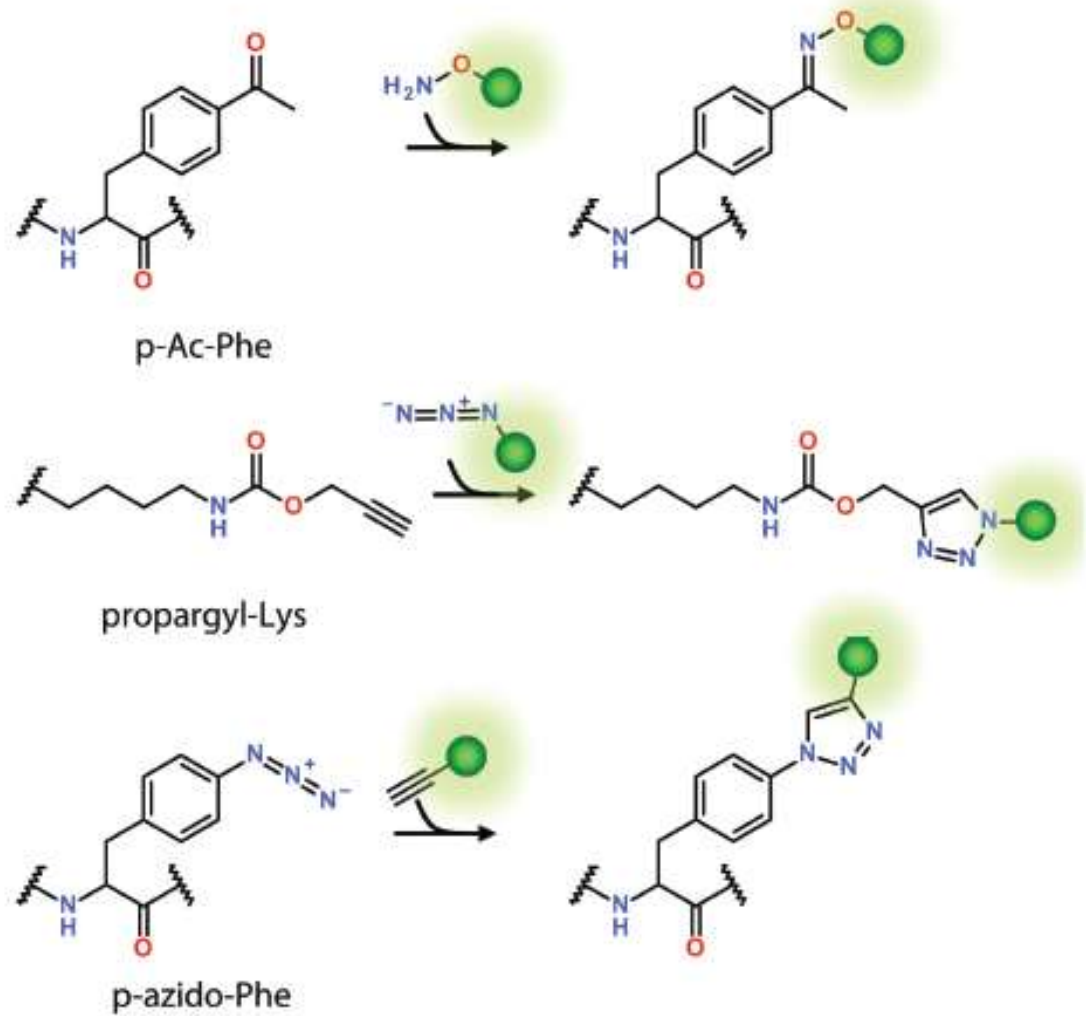
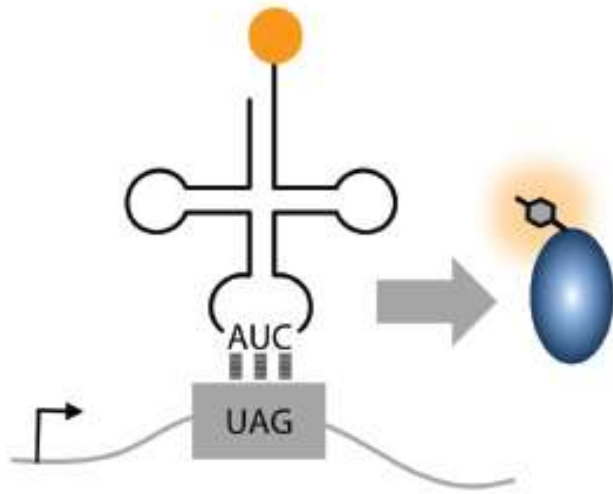


Генетично кодовані ненатуральні аміно кислоти



<https://www.nature.com/articles/s41467-022-27956-y>

Генетично кодовані ненатуральні аміно кислоти

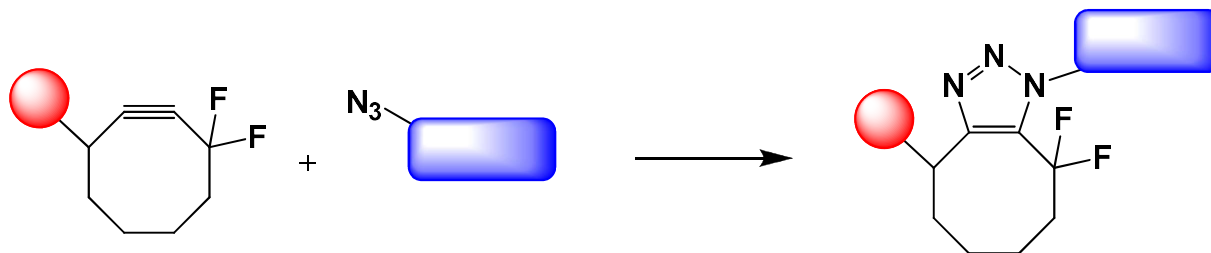
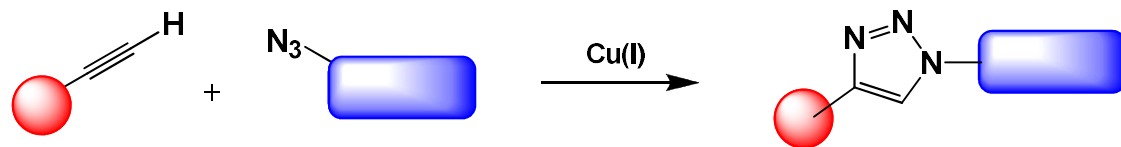


Мічення протеїнів: клік реакції

Клік реакція – швидкий та селективний процес.

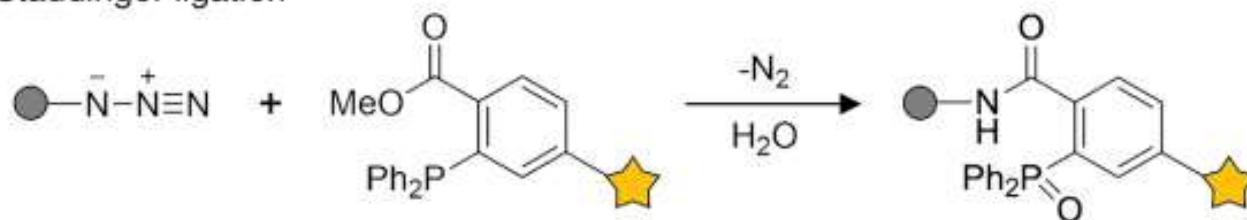
Переважно вимагає наявності **біоортогональних груп** – функціональних груп наявних в протеїні, та відсутніх в клітинах

Мічення протеїнів: клік реакції



Мічення протеїнів: клік реакції

Staudinger ligation



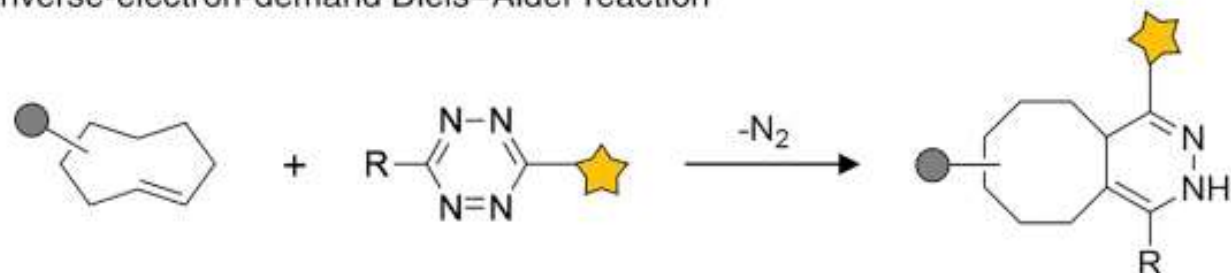
Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition



Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition



Inverse-electron-demand Diels–Alder reaction



Рекомендована література

D. Klostermeier, M. G. Rudolph Biophysical Chemistry 2017 Розділ 19.5.4