

Vlastní luminiscence biomolekul, fluorescenční sondy a značky

Vlastní luminiscence biomolekul

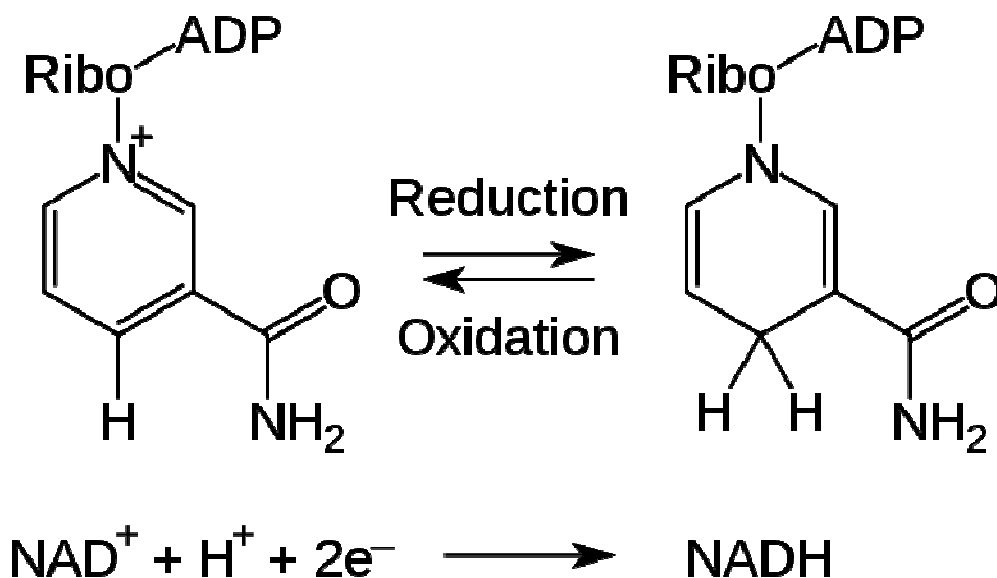
Vlastní luminiscence biomolekul pochází zejména z proteinů, NADH, flavoproteinů, vitamínu A a tetrapyrolových barviv.

Proteiny

Hlavními fluorofory v proteinech jsou aromatické aminokyseliny tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Absorbují i emitují v UV oblasti. Dominantním fluoroforem je tryptofan díky své indolové skupině. Jeho fluorescence je také velice citlivá na vlastnosti okolí, takže pomocí něj můžeme sledovat konformační změny proteinů, např. při vazbě ligandů nebo při meziproteinových interakcích.

NADH

NADH fluoreskuje silně ve viditelné oblasti (460 nm), zatímco jeho oxidovaná forma NAD⁺ nikoliv. Fluoreskující skupinou je zde nikotinamidový kruh. Po navázání na protein se jeho fluorescence obvykle zvyšuje, je to způsobeno tím, že interakce s proteinem omezí kontakt nikotinamidové skupiny a adeninu, který fluorescenci částečně zhasí.



Obrázek č. 1: NADH/NAD⁺, sice paní doktorka Zachová u státnic prý není, ale zmiňovala se, že to patří ke slušnému chemickému vychování. ☺

Tetrapyrolová barviva

Tetrapyroly jsou složené ze čtyř pyrolových jader svázaných kovalentní vazbou. Běžně jsou součástí proteinových struktur, a pokud jsou cyklické, často se v jejich středu nachází kovový kationt vázaný koordinační vazbou. Jejich okolí, stejně jako kovový iont uprostřed ovlivňují jejich spektrální charakteristiky, emisní a absorpční pásy se rozkládají přes velkou část viditelného záření a vzácně mohou absorbovat i v NIR (temnomilné bakterie žijící u horkých pramenů – ty využívají NIR). Silné absorpční pásy jsou způsobeny konjugovaným systémem jejich elektronů. Můžeme rozlišit:

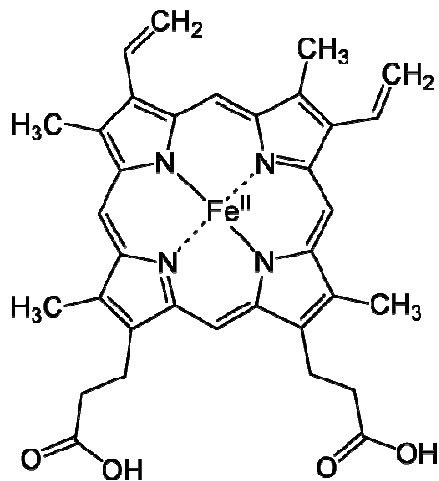
Lineární tetrapyroly

Fykobiliny – slouží jako světlosběrné molekuly cyanobakterií a nacházejí se též v červených řasách. Zvláště dobře absorbují fotony delších vlnových délek – od červené po zelenou. Jsou vázané na proteiny, kterým říkáme fykobiliproteiny. Ty pak předávají energii chlorofylu a.

Bilirubin – žlutý produkt rozpadu hemu. Vylučován se žlučí a močí, je původcem žluté barvy moči a podlitin.

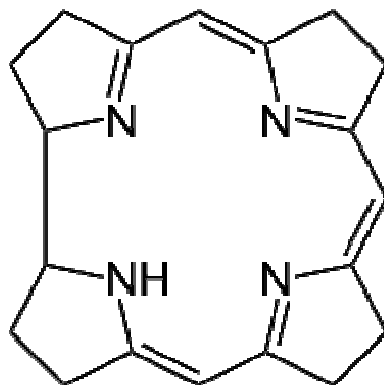
Cyklické tetrapyroly

Porfyriny – mnoho z nich se vyskytuje přirozeně v organismech (hemy). Skládají se ze čtyř pyrolových jader. Všechny porfyriny jsou barviva. Mají schopnost tvořit komplexy s kovovými ionty, vzniklé metaloporfyriny mají nezastupitelnou úlohu v mnoha metabolických procesech. Metaloporfyrin vázající železo, hem, umožňuje mimo jiné přenos kyslíku červenými krvinkami. Jiný metaloporfyrin, vázající hořčík, chlorofyl, umožňuje fotosyntézu. Nalezneme je také v cytochromech.



Obrázek č. 2: Hem b, neznámější porfyrin

Koriny – porfyriny bez jednoho atomu.



Obrázek č.3: Korin. Na rozdíl od porfyrinu mu chybí jeden atom spojující pyrolová jádra.

Fluorescenční sondy a značky

Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce, thiolové skupiny atd. Mají různé aplikace v biofyzice, imunologii, afinitní chromatografii a jiných, pomocí fluorescenčních značek lze například studovat změny konformace proteinů či pohyby lipidů v biomembránách.

Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti – např. sonda $\text{disC}_3(3)$ používaná na oddělení biofyziky po interakci s proteiny uvnitř buňky posune své emisní maximum k červené části spektra a její kvantový výtěžek se v důsledku interakce zvýší.

Jak sondy, tak i značky mohou být citlivé na celou řadu parametrů okolí, jako je pH, viskozita či polarita. Při použití sondy či značky je nutné uvážit, jak fluorofor do zkoumaného systému dostaneme. Pokud tedy chceme zkoumat vnitřek buněk, fluorofor by měl být lipofilní, aby se dostal přes plasmatickou membránu, která by polární molekuly nepropouštěla. Například pro značení membrán se nejčastěji používá nepolární sonda **DPH** (1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien), která je ve vodě prakticky nerozpustná, takže veškerá fluorescence pochází z nepolárního prostředí biologických membrán, kam se nekovalentně váže.