

MOLEKULARNE SONDY FLUORESCENCYJNE W BIOLOGII, BIOCHEMII I BIOTECHNOLOGII

MOLECULAR FLUORESCENT PROBES IN BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

Katarzyna Kukula

Iwona Kamińska

Jolanta Ortyl

Politechnika Krakowska im. T. Kościuszki
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej
Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej
ul. Warszawska 24

31-155 Kraków

e-mail: jortyl@chemia.pk.edu.pl

Anna Chachaj-Brekiesz

Uniwersytet Jagielloński

Wydział Chemii

ul. Ingardena 3

30-060 Kraków

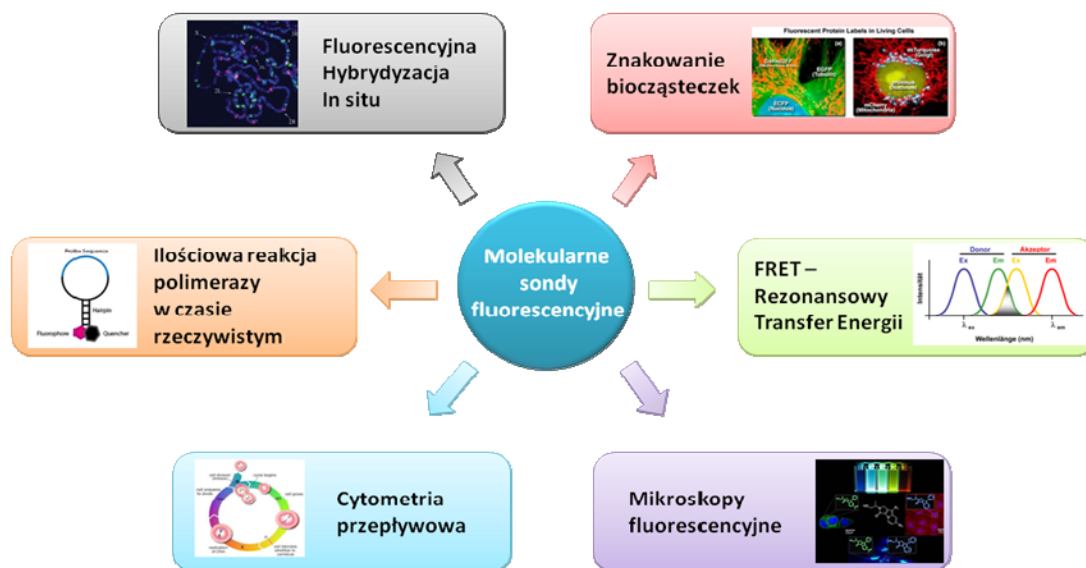
Abstract: Nowadays molecular fluorescent probes are widely used in many fields of science, primarily in biology, medicine and biotechnology. Particular emphasis on the development of technologies to cancer cells diagnosis and detection of genetic mutations led to numerous modification of luminescent fluorophores, which has resulted in a wide range of such compounds. Scientists from around the world are continuously trying to experience the mechanism of cells function and metabolic pathways. Certainly, it is affected by the fact that any analytical techniques using fluorescence operate easily and nondestructively. A phenomenon of fluorescence is observable by chromophore which absorbs energy at a certain wavelength and is able to emit electromagnetic radiation at another wavelength.

Keywords: fluorescent probe, molecular biology, detection of proteins.

Wprowadzenie

Sondy molekularne powszechnie znajdują zastosowanie w diagnostyce medycznej, monitorowaniu zmian środowiska, identyfikacji żywności genetycznie zmodyfikowanej oraz śledzeniu aktywności komórek. Ze względu na wykorzystanie zjawiska fluorescencji są powszechnie wykorzystywanym narzędziem do detekcji biomolekuł (rys. 1). Zmiana właściwości fotofizycznych czujnika molekularnego na skutek zmieniających się właściwości

fizykochemicznych otoczenia, w którym się znajduje sprawiła, że sondy są także z powodzeniem wykorzystywane w fotochemii polimerów. Wykazywanie własnej luminescencji przez opisywane powyżej związki, jest możliwe dzięki chromoforowi stanowiącemu układ sygnałowy. Oznacza to, że jest to grupa posiadająca zdolność do absorbowania energii o określonej długości fali, a później do emisji promieniowania elektromagnetycznego w innej długości fali.



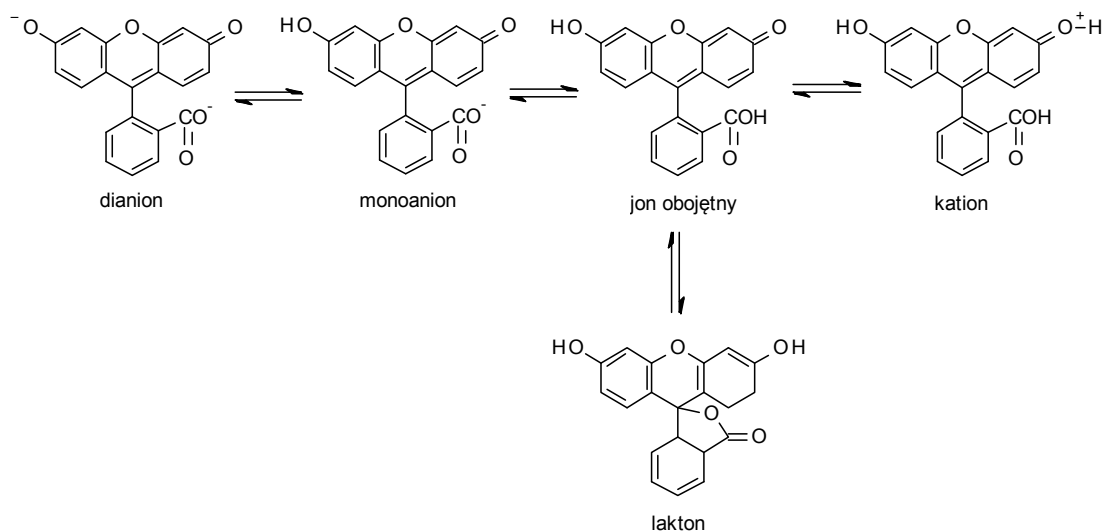
Rys. 1. Zastosowanie molekularnych sond fluorescencyjnych.

Opis zagadnienia

Molekularne sondy fluorescencyjne

Wzrost zainteresowania nowymi technikami wykorzystującymi sondy molekularne wykazujące zjawisko fluorescencji sprawił, że wielu współczesnych naukowców opracowało szereg nowych fluoroforów charakteryzujących się interesującymi właściwościami emisji. Do tej grupy związków należą między innymi fluoresceina i jej pochodne. Fluoresceina jest fluoroforem charakteryzującym się budową policykliczną, posiadającym widmo absorpcji o

maksimum przy długości fali równej $\lambda_{max}=490$ nm, natomiast maksimum widma emisji przypadającym na długość fali $\lambda_{max}=512$ nm [1]. Sondy molekularne na bazie fluoresceiny stosowane są głównie jako sensory pH (rys. 2). Rozpatrując równowagi jonowe tego fluoroforu i jego pochodnych można stwierdzić, że są one zależne od pH panującego w ich środowisku ze względu na to, iż zarówno znajdująca się w ich strukturze grupa fenylova jak i karboksylowa w roztworach o pH wyższym od 9 ulegają całkowitej jonizacji.



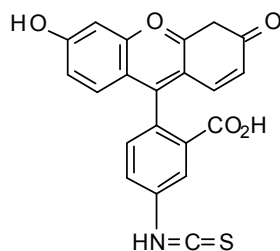
Rys. 2. Równowagi jonizacji fluoresceiny, które gwarantują czułość tego związku na zmiany pH w środowisku pomiarowym.

Analizując widmo absorpcji można zauważyć, że wraz ze wzrostem kwasowości otoczenia widmo przesuwa się w stronę fal krótszych i zmniejsza się zdolność pochłaniania kwantów promieniowania.

Protonowanie dianionu prowadzi do powstania monoanionu i kolejno jonu obojętnego oraz kationu. Z wymienionych form właściwości fluorescencyjne wykazują jedynie dianion oraz monoanion (rys. 2). Dodatkowo, w niektórych

roztworach, np. w acetonie fluoresceina może przybrać postać laktonu [2].

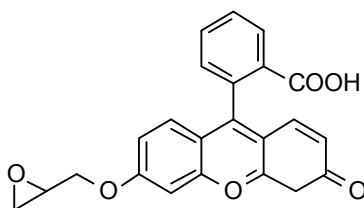
Kolejnym przykładem sondy fluorescencyjnej niezwykle istotnej w badaniach biologicznych jest pochodna izotiocyjanianowa fluoresceiny – FITC (rys. 3), wykorzystywana jest między innymi do monitoringu białka transferyny, odpowiedzialnego za transport jonów żelaza podczas endocytozy.



Rys. 3. Izotiocyjanianowa pochodna fluoresceiny – FITC [1].

Następna niezwykle interesująca molekula z tej grupy związków to 3-epoksypropoksy fluoresceina (EPF) (rys. 4), która znalazła zastosowanie w detekcji białka histydyny. Znakowanie przy wykorzystaniu tej pochodnej jest możliwe, dzięki obecności aktywnej grupy epoksydowej w strukturze fluoroforu. EPF wykazuje maksimum absorpcji i emisji zlokalizowane przy

długościach fali bardzo zbliżonych do tych charakteryzujących fluoresceinę - odpowiednio $\lambda_{max}=485$ nm oraz $\lambda_{max}=513$ nm. Natomiast jej wydajność kwantowa fluorescencji jest niemal trzykrotnie niższa, ze względu na to, iż w środowisku wodnym występuje jedynie w formie monoanionu.



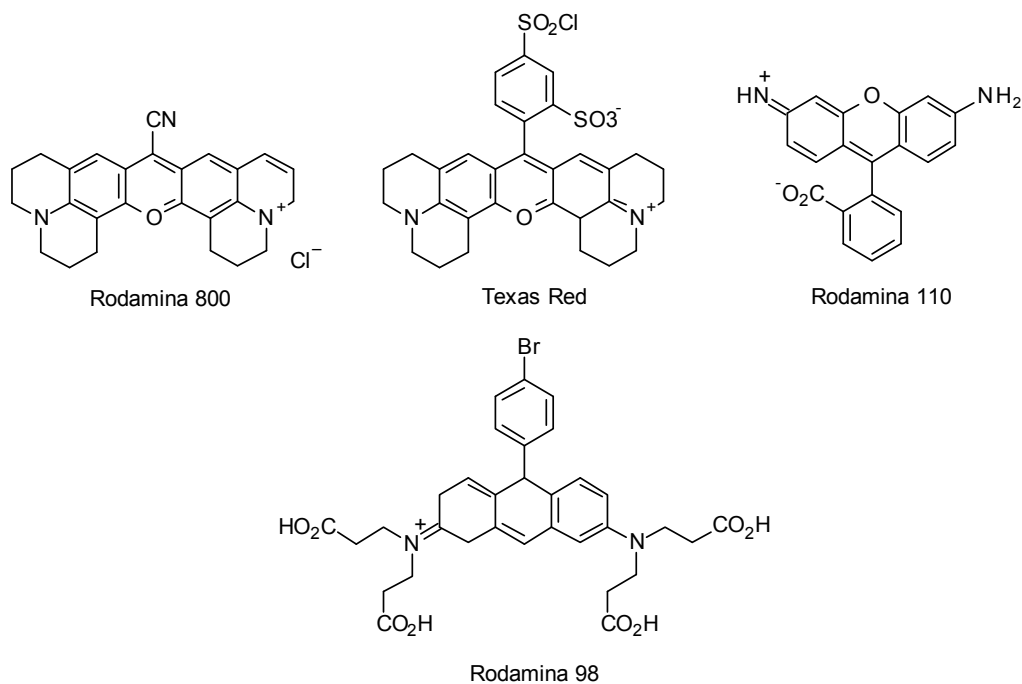
Rys. 4. 3-Epoksyfluoresceina (EPF) [1].

Rodaminy są kolejną rodziną związków chemicznych stosowanych do roli molekularnych sond fluorescencyjnych, ich cechą wspólną jest struktura na bazie ksantenu. Tym co je wyróżnia na tle innych fluoroforów, to wysokie wartości molowego współczynnika absorpcji oraz wysokie wartości wydajności kwantowej fluorescencji. Do przedstawicieli tej klasy sond molekularnych należą Rodamina 800 oraz Texas Red (rys. 5). Doniesienia literaturowe wskazują na szerokie zastosowanie tych związków do celów biologicznych.

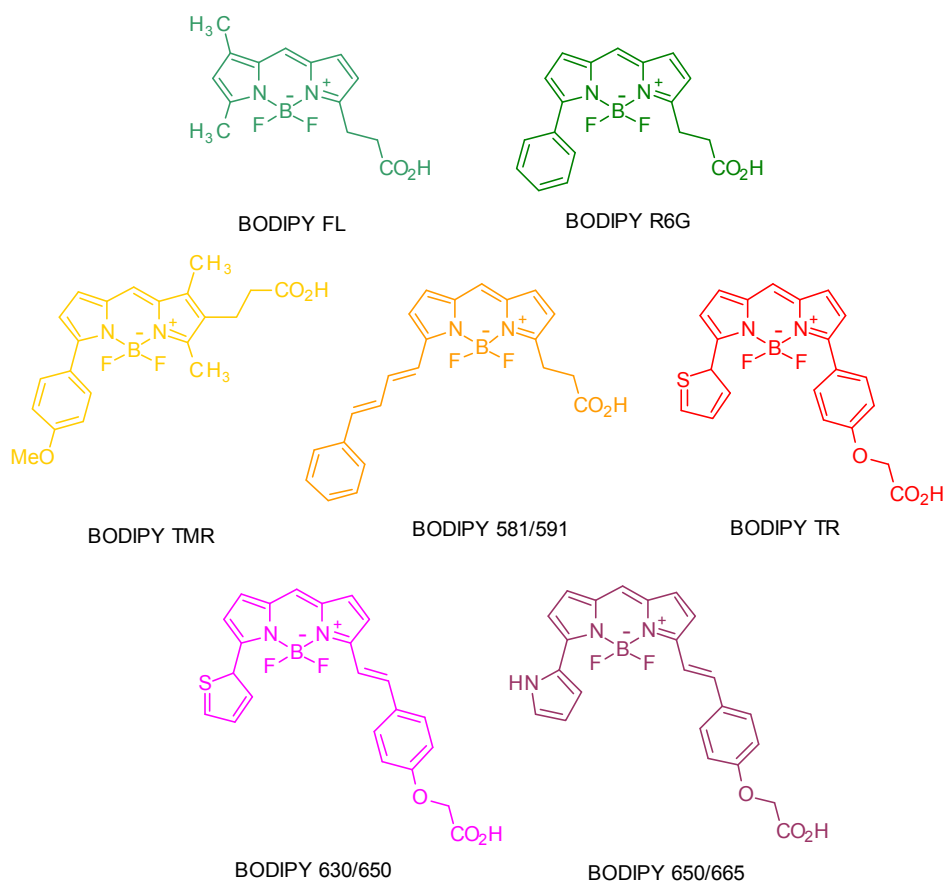
Idealnym tego przykładem jest Rodamina 110 (rys. 5) wykorzystywana do monitorowania aktywności enzymatycznej, a jej chemiczne modyfikacje znalazły zastosowanie do znakowania zarówno białek jak i biopolimerów. Na uwagę zasługuje również Rodamina 98 (rys. 5), zawierająca w swojej strukturze ugrupowania karboksylowe, których obecność skutkuje między innymi łatwiejszym dostępem do genomów białkowych [1].

Niezwykle interesującymi związkami do zastosowań jako molekularne sondy

fluorescencyjne są układy typu BODIPY (rys. 6). Głównym ugrupowaniem tych fluoroforów jest 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazo-s-indacen.



Rys. 5. Struktura Rodaminy 800, Rodaminy 110, Rodaminy 98 oraz Texas Red [1].



Rys. 6. Przykłady związków typu BODIPY.

Możliwość znakowania tym typem fluoroforów tak szerokiej gamy związków zawierających tłuszcze, peptydy, oligonukleotydy oraz białka sprawia, że mają one wielokrotnie większe zastosowanie w biologii molekularnej, niż wcześniej omawiane układy. Sondy typu

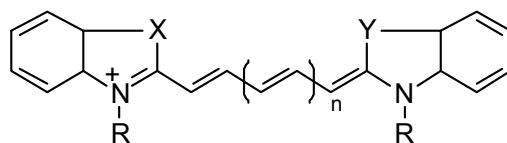
BODIPY charakteryzują się również lepszymi właściwościami optycznymi, do ich najbardziej interesujących właściwości należą wysoka wydajność kwantowa, wąskie pasma emisji oraz stabilność fotochemiczna [1].

Tabela 1. Właściwości optyczne fluoroforów typu BODIPY [2].

Nazwa	$\lambda_{abs-max}$ [nm]	λ_{em-max} [nm]	Kolor	E przy λ_{fl-max} [dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]
BODIPY® 493/503	500	506	Zielony	79 000
BODIPY® FL-X	504	510	Zielony	85 000
BODIPY® FL	505	513	Zielony	80 000
BODIPY® R6G	528	550	Zielony/Żółty	70 000
BODIPY® 530/550	534	554	Zielony/Żółty	77 000
BODIPY® TMR-X	542	574	Żółty	60 000
BODIPY® 558/568	558	569	Żółty	97 000
BODIPY® 564/570	565	571	Żółty	142 000
BODIPY® 576/589	576	590	Pomarańczowy	83 000
BODIPY® 581/591	584	592	Pomarańczowy	136 000
BODIPY® TR-X	589	617	Pomarańczowy/ Czerwony	68 000
BODIPY® 630/650-X	625	640	Czerwony	101 000
BODIPY® 650/665-X	646	660	Czerwony	102 000

Innymi związkami wykorzystywanymi do roli jako molekularne sondy fluorescencyjne są cyjaniny, których rdzeń stanowią połączone łańcuchem polimetynowym dwa pierścienie, aromatyczne lub heterocykliczne. Zadowalające

właściwości optyczne spowodowały iż, w zakresie genetyki głównie służą do detekcji materiału genetycznego (rys. 7). Widma emisji fluorescencji tych związków mieszczą się w zakresie od 600 do 900 nm.

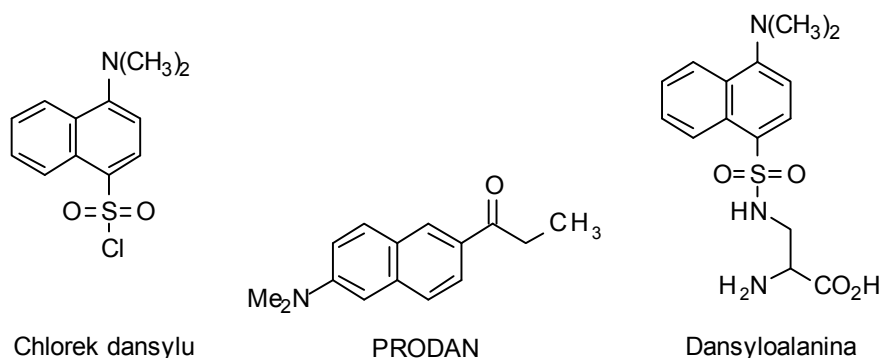


X, Y = O, S, C(CH₃)₂ lub C=CH₂; n = 0-4; R = (CH₂)_xSO₃⁻

Rys. 7. Podstawowa struktura cyjanin [1].

Kolejną, niemniej ważną rodziną luminezujących fluoroforów są pochodne naftalenowe. Obecnie są z powodzeniem stosowane do znakowania biocząsteczek takich jak m. in. aminokwasy, peptydy czy też białka. Do

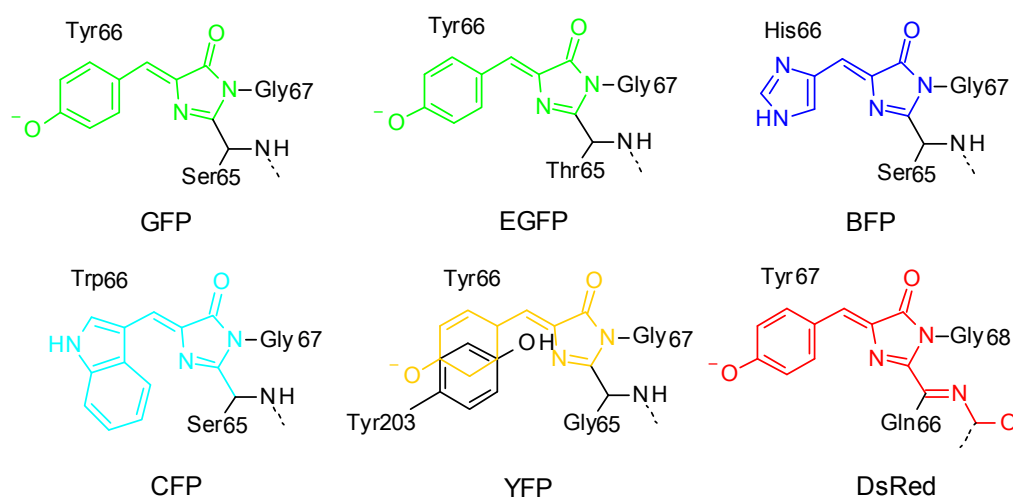
najczęściej stosowanych przedstawicieli tych związków można zaliczyć chlorek dansylu, dansyloalaninę oraz PRODAN (6-propionyl-2-(dimetyloamino)naftalen (rys. 8).



Rys. 8. Przykłady naftalenów wykorzystywanych do znakowania biomolekuł [1].

Pierwszy z powyżej wymienionych jest wykorzystywany do znakowania peptydów lub w derywatywacji przedkolumnowej w HPLC. Z kolei detekcja białek za pomocą dansyloalaniny dostarcza szereg informacji odnośnie ich wzajemnych oddziaływań, pełnionych funkcji oraz budowy. PRODAN charakteryzujący się zmianą właściwości fotofizycznych w zależności od zmieniającego się środowiska znajduje zastosowania jako sensor fluorescencyjny [1]. Kolejne z grupy fluoroforów naftalenowych - Acrylodan i Badan należą do reaktywnych sond fluorescencyjnych głównie wchodzących w reakcję z pochodnymi tiolowymi, najczęściej wykorzystywanych do znakowania białek. Ze względu na wysoką czułość, jaką wykazują, która przejawia się wrażliwością intensywności fluorescencji jak i położenia ich widm emisji na zmiany konformacyjne protein są idealnym narzędziem w biologii molekularnej [2].

O tym jak ważne w dzisiejszych czasach jest obrazowanie molekularne z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych, może wskazywać przyznanie Nagrody Nobla w dziedzinie chemii naukowcom Osamu Shimomura, Martinowi Chalfie oraz Rogerowi Y. Tsien w 2008 roku za całokształt pracy obejmującej zarówno odkrycie i prowadzenie badań nad zielonym białkiem fluorescencyjnym - Green Fluorescent Protein (GFP) [3]. Widma absorpcji dla GFP charakteryzują pasma o maksimum długości fali wynoszącej 395 nm oraz 470 nm, natomiast widmo emisji promieniowania jest zlokalizowane przy długości fali równej 509 nm [4]. Jego ciągłe próby udoskonalania w celu zwiększenia aplikacyjności zaowocowały powstaniem całej rodziny autofluorescencyjnych białek, których wykorzystanie wraz z omawianymi wcześniej sondami fluorescencyjnymi zrewolucjonizowało współczesną naukę (rys. 9).



Rys. 9. Zielone białko fluorescencyjne i przykłady autofluorescencyjnych białek powstałych dzięki jego modyfikacji.

Podsumowanie

Reasumując zjawisko fluorescencji, a co za tym idzie wszystkie techniki analityczne wykorzystujące je w swojej metodyce, przeżywają obecnie niezwykle szybki rozwój. Jest to możliwe, dzięki opracowaniu fluoroforów określanych jako molekularne sondy fluorescencyjne. Ich wyjątkowość objawia się emisją promieniowania w postaci fotonów w odpo-

wiedzi na mutagenne zmiany konformacyjne białek, co pozwala na szybkie diagnozowanie nowotworów i innych niebezpiecznych dla życia człowieka zmian genetycznych. Powyżej wymieniona cecha jak i nieinwazyjność oraz brak toksyczności sprawiają, że badania nad nowymi sondami fluorescencyjnymi stają się priorytetem w niejednym ośrodku naukowym na świecie.

Literatura

1. Gonçaves, M.S.T., Fluorescent Labelling of Biomolecules with Organic Probes, *Chemical Reviews*, 2009, 109, pp. 190-212.
2. The Molecular Probes® Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 2014, <http://www.atdbio.com> (dostęp 28.12.2014).
3. Tsien, R.Y., The Green Fluorescent Protein, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67, pp. 509-544.
4. Geddes, C.D., Lakowicz, J.R., *Reviews in Fluorescence*, Springer, 2006, <http://www.rcsb.org> (dostęp 03.12.2014).

Praca współfinansowana w ramach projektów „Bioinżynier chemiczny (BINC)” w ramach POKL 4.1.2 „Zwiększenie liczby absolwentów kierunków o kluczowym znaczeniu dla gospodarki opartej na wiedzy” umowa nr POKL.04.01.02-00-217/11-00 oraz w ramach projektu SONATA Narodowego Centrum Nauki (UMO-2012/07/D/ST5/02300)