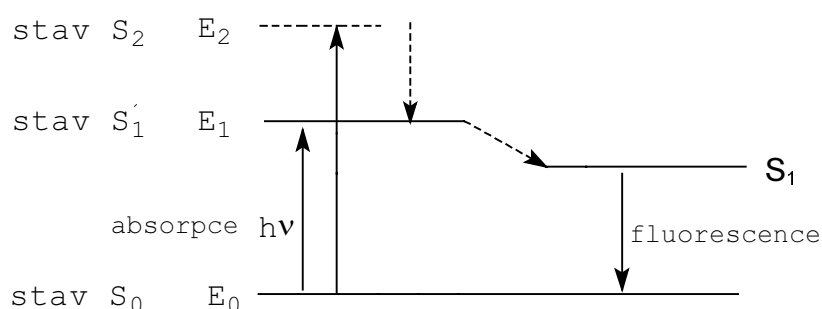


15 Fluorescenční reaktivní barviva

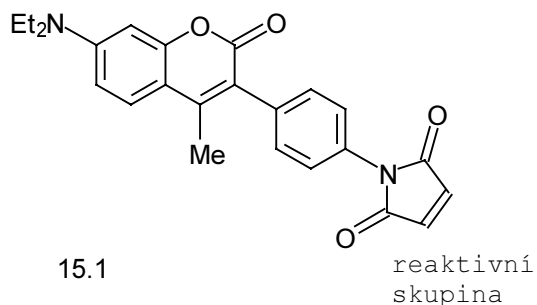
Jedná se o barviva, která vynikají intenzivní fluorescencí, a která mají ve své molekule reaktivní skupinu schopnou reagovat s nukleofilními skupinami (NH_2 , OH , SH) biologického substrátu. Pomocí těchto fluorescenčních barviv se zkoumá struktura substrátu. Velmi často se reaktivní fluorofory používají pro syntézu tzv. biokonjugátů „fluorofor-substrát“. Reaktivní luminofor (barvivo) se naváže na molekulu substrátu (na určitou nukleofilní skupinu) a při ozáření světlem se detekuje fluorescence luminoforu. Protože fluorescenční spektrofotometrie je řádově citlivější než UV/VIS spektrofotometrie, lze v podstatě detekovat jednotlivé nukleofilní skupiny, na které se navázal luminofor a zjišťovat tak strukturu substrátu na molekulární úrovni (obrázek 15-1). Optimální biokonjugáty obvykle mají vysoký kvantový výtěžek fluorescence, zachovávají si parametry (vlastnosti) původních neoznačkových biomolekul, takových jako například selektivní afinitu a schopnost se navázat na receptor nebo nukleovou kyselinu, aktivovat či inhibovat enzym, schopnost státi se součástí buněčné membrány. V případě přípravy konjugátu často hrozí nebezpečí, že v případě vyššího stupně substituce (reakce fluoroforu s nukleofilní skupinou) dojde k vysrážení konjugátu případně ztrátě jeho specifických vlastností.



Obrázek 15-1. Zjednodušený Jablonského diagram fluorescence

Reaktivní luminofory, lépe řečeno fluorofory, mají obecnou strukturu "fluorofor-reaktivní skupina", například (15.1).

kumarinový fluorofor

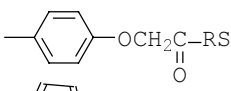



Jako fluorofory se používají fluoresceiny, rhodaminy, kumariny, pyreny, a podobně. Tyto sloučeniny (barviva) jsou popsány v dalším textu.

V současnosti byly vyvinuty nové fluorofory, které nesou označení BODIPY a které jsou na bázi 4,4-difluoro-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacenu (tabulka 15-1).

Substituční deriváty pokrývají svou fluorescencí celé viditelné spektrum, přičemž maximum fluorescence závisí na substituentech, které jsou navázané na základním skeletu. Např. BODIPY FL fluorofor (1,3,5,7-tetramethyl-8-propionyl derivát) se vyznačuje úzkým emisním pásem (vhodný pro "multicolor" aplikace), kvantový výtěžek fluorescence se blíží jedné, fotostálost je vyšší než u fluoresceinu.

Tabulka 15-1. Příklady BODIPY fluoroforů

Substituenty	λ_{\max} (nm)	ϵ (l.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	λ_{FL} (nm)
1,3,5,7 -CH ₃ 8 -CH ₂ CH ₂ COOH	503	80000	512
1,3,5,7 -CH ₃ 2 -NHCO-RS	508	69000	543
3 -CH ₂ CH ₂ COOH 5 -CH=CH-C ₆ H ₅	564	143000	570
3 -CH ₂ CH ₂ COOH 5 -(CH=CH) ₂ -C ₆ H ₅	582	154000	591
2-  5- 	588	68000	616

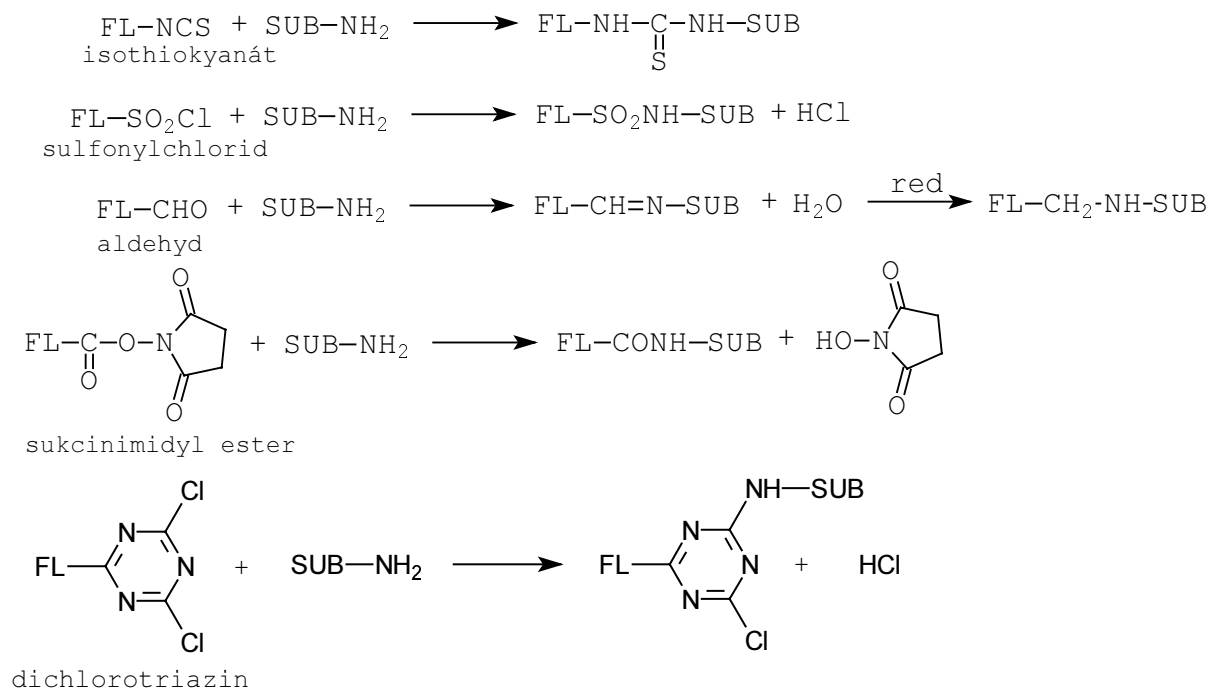
* RS značí reaktivní skupinu

Reaktivní skupiny jsou jednak selektivní, to je, že reagují pouze s aminoskupinou substrátu, nebo s thiolovou skupinou substrátu (např. maleinimidové deriváty). Nebo jsou neselektivní a reagují se všemi nukleofilními skupinami substrátu.

15.1 Modifikace aminů

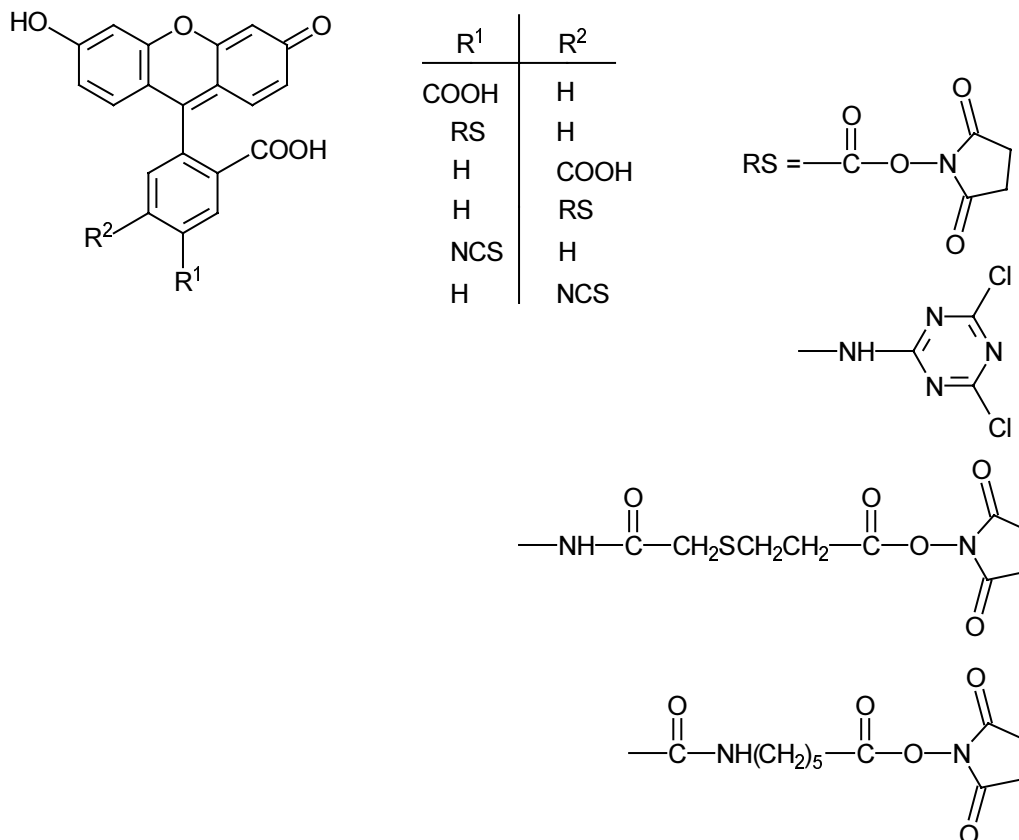
Amino-reaktivní fluorofory se používají k modifikaci proteinů, peptidů, ligandů, syntetických oligonukleotidů a ostatních biomekul. Na rozdíl od thio-reaktivních fluoroforů (obvykle užívají se pro zkoumání struktury proteinů a jejich funkce, viz následující kapitola) se používají obvykle k syntéze biokonjugátů pro potřeby immunochemie, fluorescence „in situ“ hybridizace, detekce buněk, značkování receptorů a fluorescenční analoga cytochemie. Stabilita chemické vazby mezi barvivem (fluoroforem) a biomolekulou je velmi důležitá, protože konjugáty se skladují a používají opakovaně po delší dobu.

Reakce primárních aminů (substrát, nebo-li biomolekula) s příklady reaktivních skupin ukazuje následující obrázek 15-2.



Obrázek 15-2. Jednotlivé reakce aminoskupiny s reaktivními skupinami fluoroforu

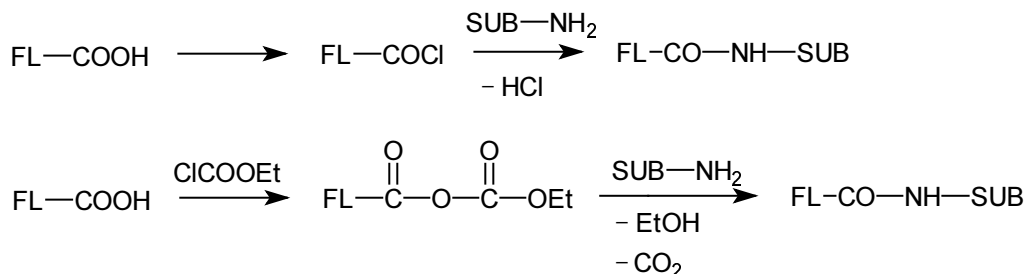
Jako tzv. **zelené fluorofory** se používají fluoresceiny (obrázek 15-3).



Obrázek 15-3. Příklad reaktivních fluoresceinů

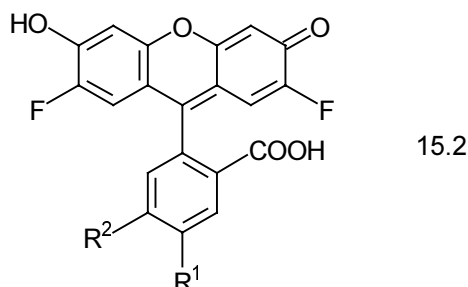
Tyto mají pK_a přibližně 6.4, absorpci cca. 490 - 495 nm ($\epsilon \approx 70 - 80 \cdot 10^3 \text{ lt.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), emisi 515 - 520 nm (při pH asi 9).

Pokud fluorofor obsahuje pouze COOH skupiny, tak se předpokládá, že tato skupina bude aktivována a aktivovaný fluorofor bude posléze reagovat s biomolekulou, například reakcemi ukázanými v obrázku 15-4.

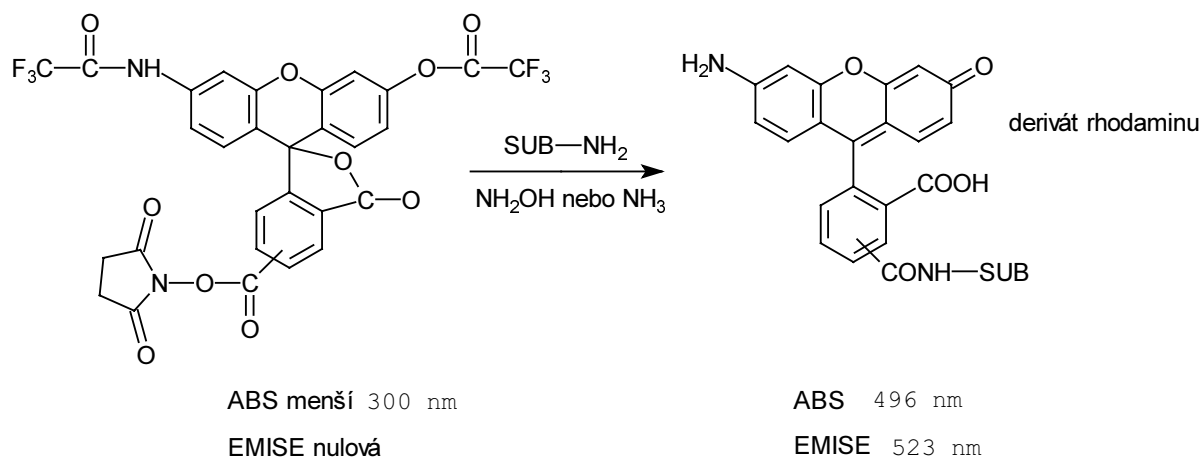


Obrázek 15-4. Způsob aktivace karboxylové skupiny a reakce s aminoskupinou substrátu

Výše uvedené fluoresceiny mají ale jednu podstatnou nevýhodu. Poměrně snadno podléhají fotodestrukci, která je činí problematickými při stanovování např. sekvence DNA. Proto byly připraveny difluoroderiváty (15.2), které mají podstatně lepší světlostálost a navíc mají nižší pK_a (cca. 4.7), takže jsou méně citlivé (jejich fluorescence) na fyziologické pH.

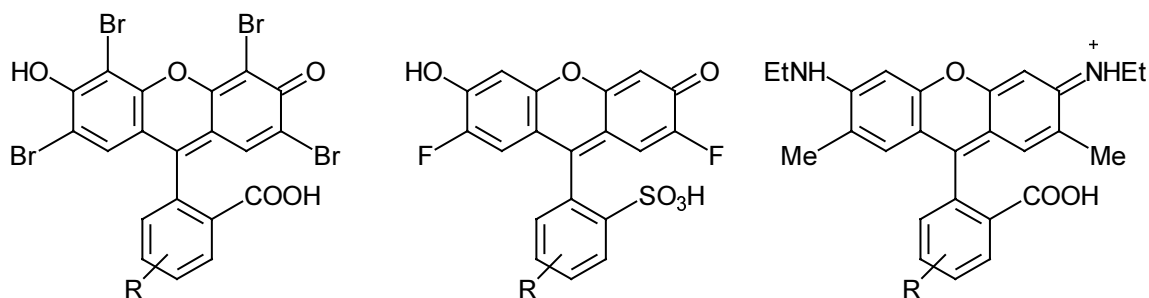


Hodně používaným barvivem je Rhodolová zeleň, která vykazuje fluorescenci až po navázání na biomolekulu (obrázek 15-5).



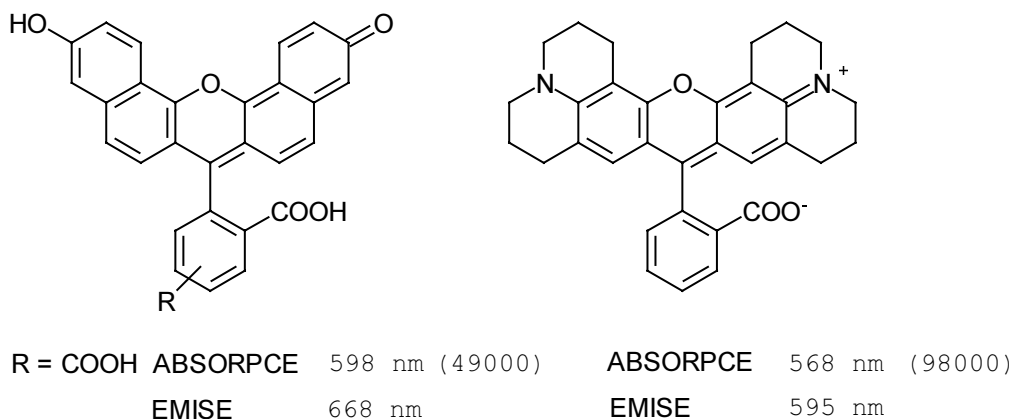
Obrázek 15-5. Princip funkce Rhodonolové zeleně

Jako **barviva s emisními maximi 500 až 540 nm** se používají následující deriváty fluoresceinu a rhodaminu (obrázek 15-6).



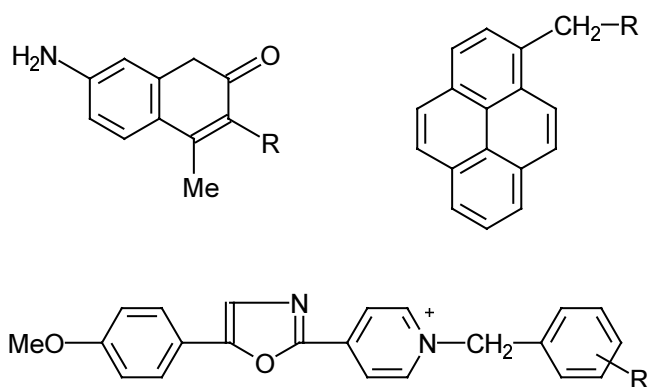
Obrázek 15-6. Fluoresceiny a rhodaminy s emisí 500-540 nm

Jako **barviva s emisí červeného světla** (tzv. dlouhovlnná barviva) se používají následující analogy fluoresceinů a rhodaminů (jedná se o větší planární systémy) (obrázek 15-7).



Obrázek 15-7. Barviva s emisí červeného světla

Jako **UV barviva**, to je že absorbují v UV oblasti spektra a fluoreskují modře se používají deriváty kumarinu, pyrenu, případně oxazolu (obrázek 15-8).

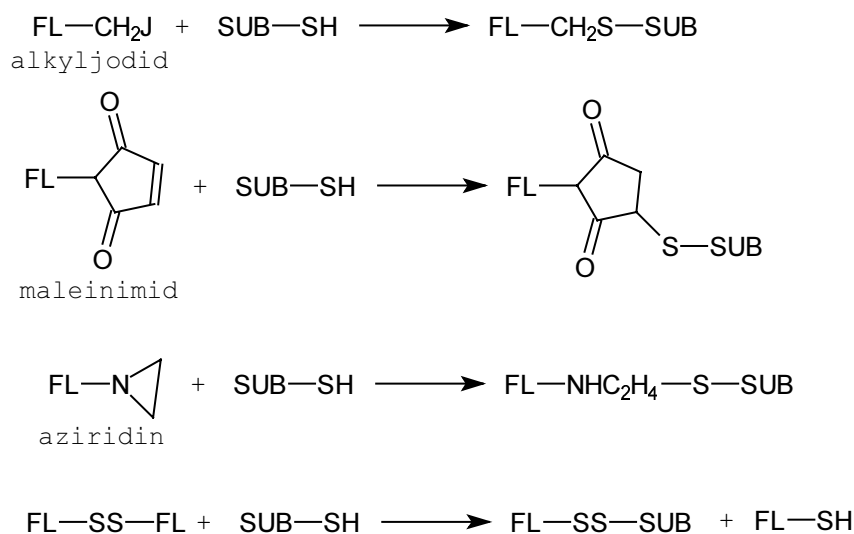


Obrázek 15-8. Barviva s emisí modrého světla

15.2 Modifikace thiolů

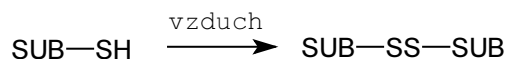
Na rozdíl od amino-reaktivních fluoroforů, thiole-reaktivní fluorofory se používají hlavně pro syntézu fluorescenčních peptidů, proteinů a oligonukleotidů pro zkoumání struktury biologických substrátů, jejich funkce a vzájemných interakcí. Jelikož vybrané funkční skupiny pro reakce s thiolovou skupinou jsou vysoce selektivní, používá se thiolová modifikace často ke zjišťování inter- a intramolekulárních vzdáleností za použití techniky „přenosu energie z excitovaného stavu“.

Reakce thiolů s příklady reaktivních skupin ukazuje následující obrázek 15-9.



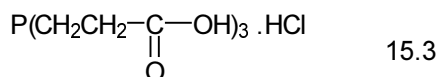
Obrázek 15-9. Reakce thiolové skupiny s reaktivními skupinami fluoroforu

Při modifikaci thiolů může dojít k jejich oxidaci na disulfidy (obrázek 15-10).



Obrázek 15-10. Oxidace thiolu na disulfid

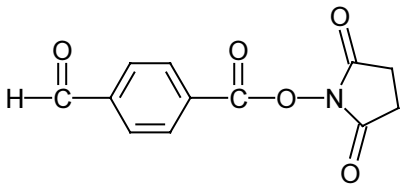
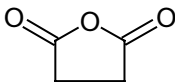
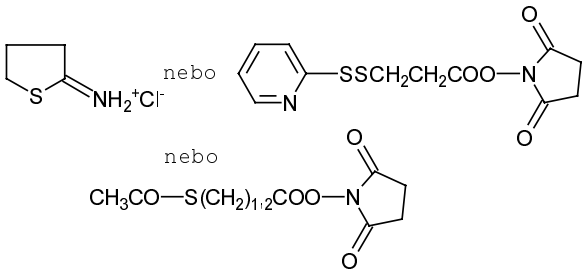
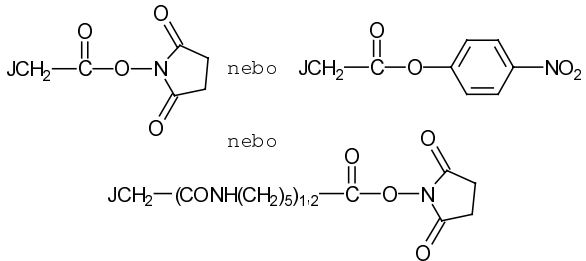
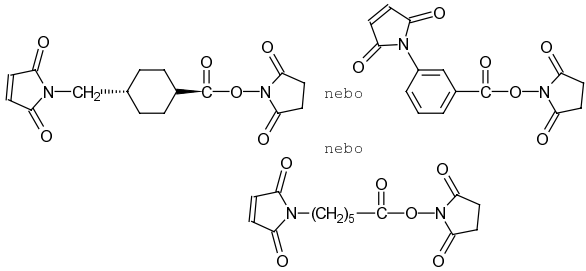
Proto se často přidává před modifikací redukční činidlo, např. tris-(2-karboxyethyl)fosfin (15.3).



Redukční činidlo samozřejmě zredukuje disulfidické můstky, které byly přítomné již před započítáním značkování.

Existují také činidla, která jsou schopná převést jednu nukleofilní skupinu na druhou. V následující tabulce 15-2 uvádíme v podstatě všechny možnosti.

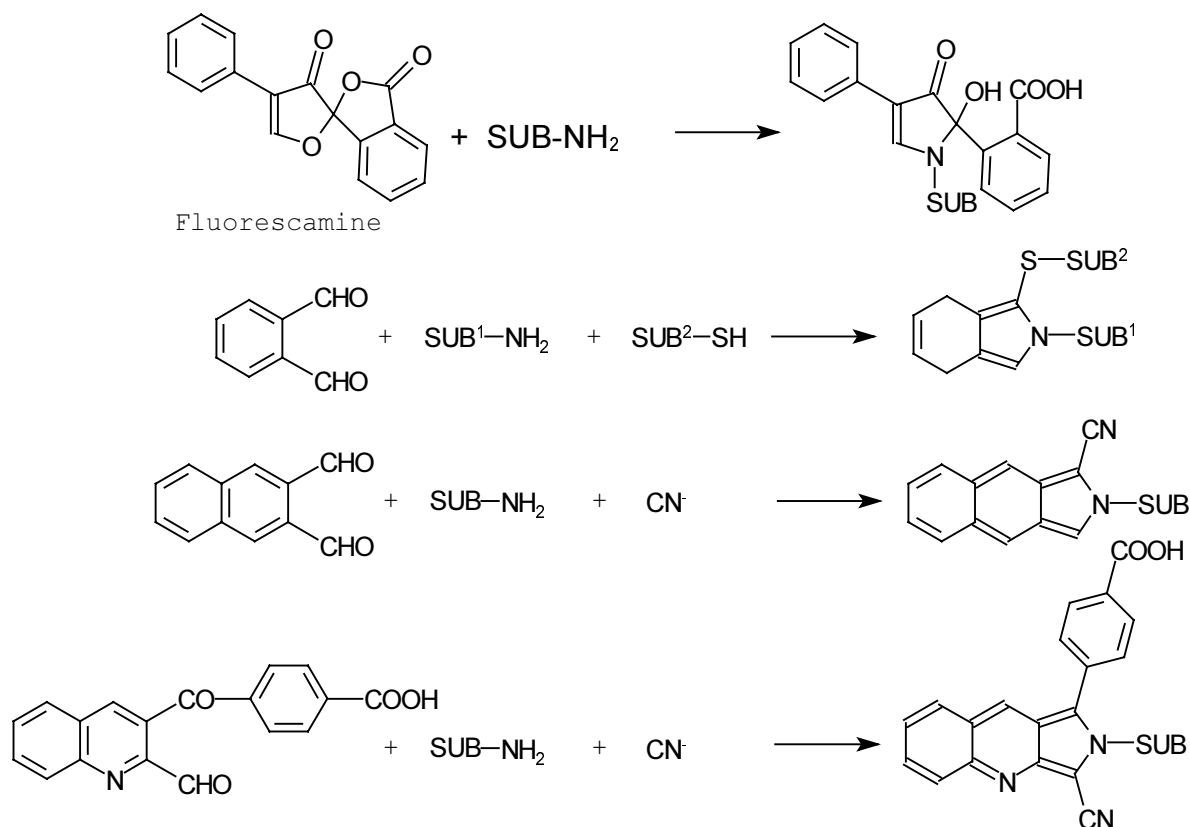
Tabulka 15-2. Konverze nukleofilních skupin na jiné nukleofilní skupiny

Výchozí skupina → výsledná skupina	Činidlo
aldehyd, keton → amin	$\text{NH}_3 + \text{NaCNBH}_3$
aldehyd, keton → thiol	$\begin{array}{c} \text{NH-COCH}_3 \\ \\ \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{-CH-CONHNH}_2 \end{array}$
amin → aldehyd	
amin → karboxylová kyselina	
amin → thiol	
thiol → aldehyd	$\text{Cl-CH}_2\text{CH=O}$
thiol → amin	$\text{CF}_3\text{-CONH-CH}_2\text{CH}_2\text{J}$
thiol → karboxylová kyselina	$\text{J-CH}_2\text{COOH}$ nebo $\text{Br-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
thiol → keton	$\text{Br-CH}_2\text{-CO-COOH}$
amin → jodoacetamid	
amin → maleinimid	

Co se týče vlastních barviv (fluoroforů), mají stejné konstituce, jako v případě modifikace aminů. Liší se pouze reaktivní skupinou.

15.3 Činidla pro derivatizaci nízkomolekulárních aminů

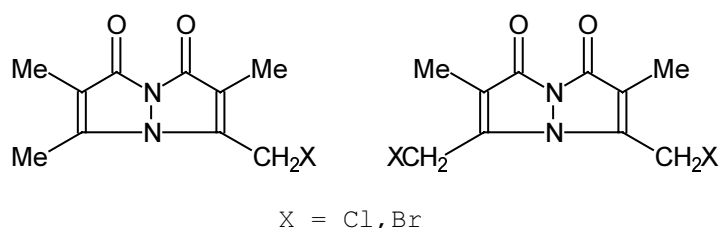
Jedná se o taková činidla, která, sama bezbarvá, reagují s aminoskupinou substrátu za vzniku molekuly „fluorofor-substrát“. Např. FLUORESCAMIN reaguje v milisekundách s primárním alifatickým aminem (peptidy, proteiny) za vzniku fluoreskujícího derivátu. Příklady takových činidel ukazuje následující obrázek 15-11.



Obrázek 15-11. Derivatizace aminů

15.4 Činidla pro derivatizaci thiolů

Jedná se o taková činidla, která, sama bezbarvá, reagují s thiolovou skupinou substrátu za vzniku fluoreskující molekuly. Nejpoužívanější jsou tzv. monobromo či více selektivní monochlorbimany. Jako oblíbené „crosslinkační“ činidlo se používá dibromoboman, který nefluoreskuje, dokud oba bromy nejsou substituovány thiolovou skupinou (obrázek 15-12).



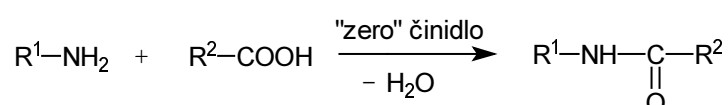
Obrázek 15-12. Činidla pro derivatizaci thiolů

15.5 Crosslinkační činidla

Tato reaktivní barviva se vyznačují tím, že mají dvě reaktivní skupiny schopné reagovat se dvěma nukleofilními skupinami substrátu. Některé jsou „čistě“ chemické, jiné jsou fotochemické a vyžadují aktivaci světlem. Rozlišujeme dva typy crosslinkačních činidel. Fluorofory **homobifunkční** (dvě stejné reaktivní skupiny). Tyto se obvykle používají pro spojení dvou aminů či thiolů při intramolekulárním spojování dvou biomolekul.

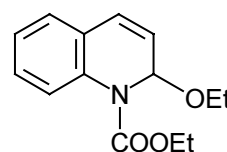
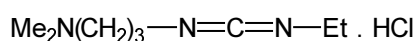
Heterobifunkční fluorofory (dvě rozdílné reaktivní skupiny) se používají obvykle pro intramolekulární propojování a nebo pro přípravu konjugátu ze dvou rozdílných biomolekul.

Existuje také „zero“ **crosslinkační** varianta, kdy dojde ke spojení dvou biomolekul aniž se „zero“ crosslinkační činidlo zapojí do výsledné molekuly (obrázek 15-13).



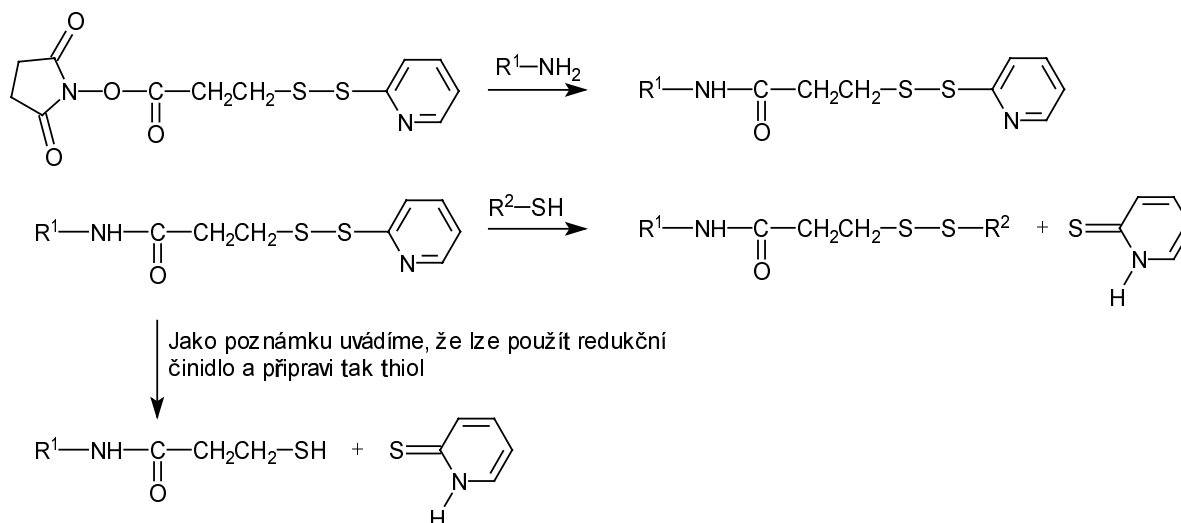
Obrázek 15-13. Spojení dvou biomolekul za vzniku amidu

Příklady takových „zero“ činidel ukazuje následující obrázek 15-14.



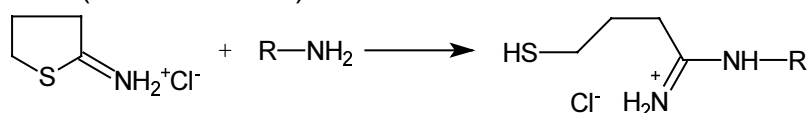
Obrázek 15-14. „Zero“ crosslinkační činidla

Co se týče **chemických crosslinkačních činidel**, nejobvyklejší je spojování dvou biomolekul propojením **amin-thiol** (obrázek 15-15).



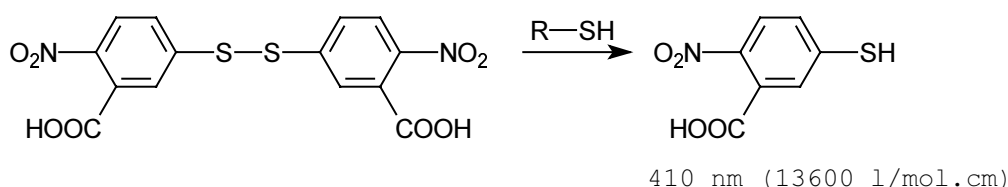
Obrázek 15-15. Chemická crosslinkační činidla pro vznik spojení amin-thiol

Velmi často je potřeba provést „thiolaci“ biomolekuly. Pro přímou thiolaci lze použít iminothiolan (obrázek 15-16).



Obrázek 15-16. Zavedení thiolové skupiny do molekuly substrátu majícího aminoskupinu

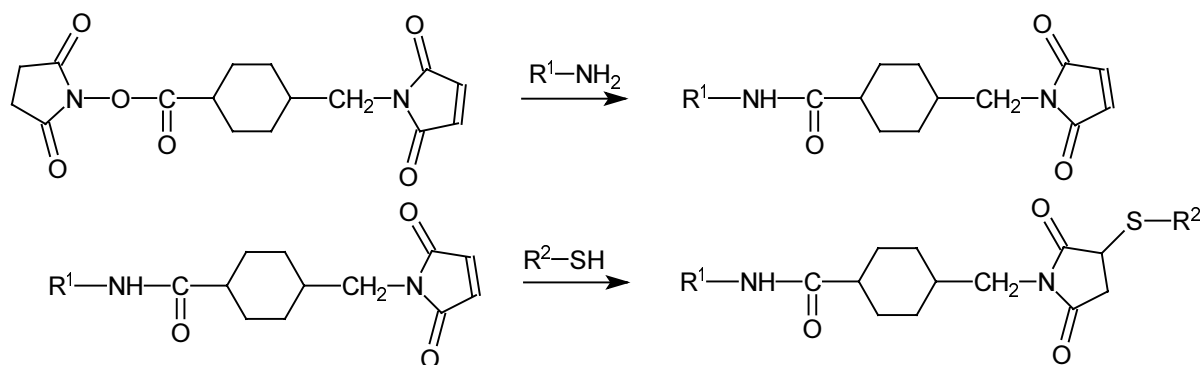
Obsah thiolových skupin ve vzorku lze např. stanovit následujícím činidlem (obrázek 15-17).



Obrázek 15-17. Stanovení obsahu thiolových skupin v substrátu

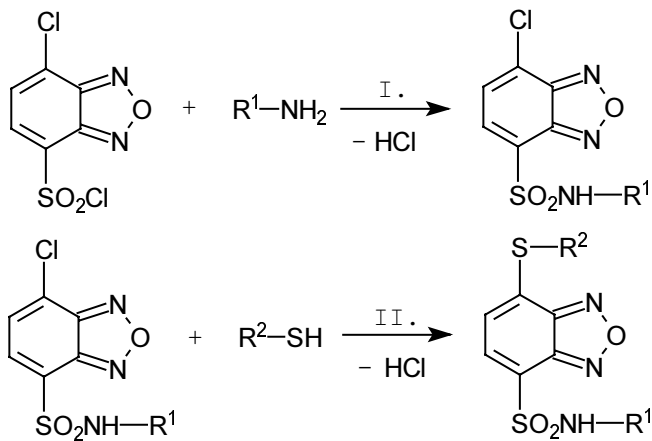
Při **thiol-thiol spojování** lze „použít“ oxidaci dvou thiolů na disulfid. Problém je ale v tom, že se tato reakce špatně kontroluje. Proto se více používá dibrombiman, který navíc fluoreskuje až tehdy, když jsou oba thioly navázány.

Pro **amin-amin spojování** existuje řada činidel schopných spojit dvě biomolekuly přes aminoskupinu v jednu molekulu (diisokyanáty, dichloridy dikarboxylových kyselin, glutaraldehyd, apod.). Problém ale je, že tato činidla obvykle tvoří vysokomolekulární agregáty, které jsou nevhodné pro přípravu konjugátu mezi dvěma rozdílnými amino-biomolekulami. Proto se postupuje tak, že se jeden amin převede na thiol a posléze provede mnohem lépe kontrolovatelné spojení amin-thiol (obrázek 15-18).



Obrázek 15-18. Spojení dvou biomolekul

Pokud bychom chtěli, aby amino-thiolové propojení dvou molekul bylo fluorescenční (označované), použijeme např. následující crosslinkační činidlo (obrázek 15-19).

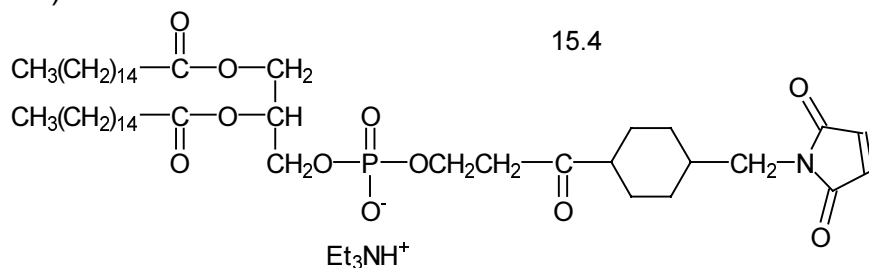


Pořadí reakcí I. a II. závisí na pH prostředí. Amin rychle reaguje v mírně kyselém až neutrálním prostředí. Thiol jako thiolát vyžaduje prostředí alkalické.

Obrázek 15-19. Spojení dvou biomolekul se zabudováním fluorescenční jednotky

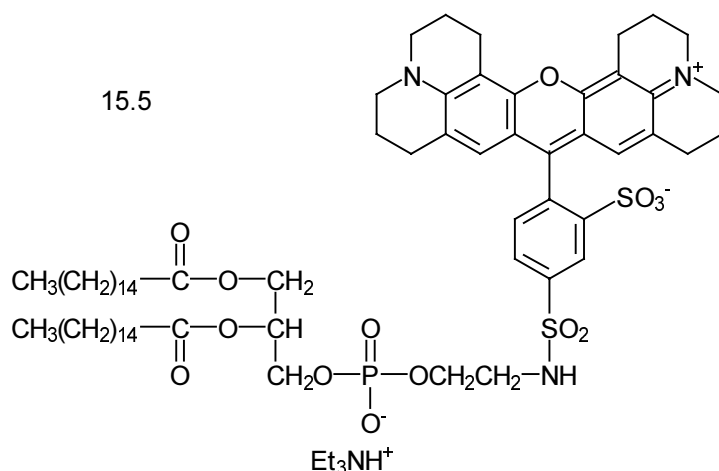
15.6 Propojení (crosslinkování) liposomů a buněčných membrán s biomolekulami

Buněčné membrány jsou tvořeny prostorově orientovanými molekulami liposomů a vytváří okolo jádra stěny, která je nepropustná pro polární látky (soli). Propojení mezi biomolekulou a membránou se provádí činidlem, které obsahuje ve své molekule fosfolipidickou část, která se zakotví (nejedná se o kovalentní vazbu) v lipidické vrstvě membrány. Toto činidlo má také reaktivní skupinu schopnou reagovat se zvolenou biomolekulou a utvořit tak propojení mezi biomolekulou a membránou, například (15.4).

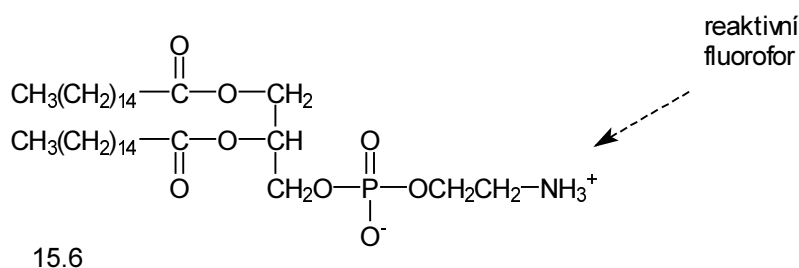


Pro zkoumání povrchových jevů a povrchových vlastností membrán slouží fluorofory, které mají ve své molekule fosfolipid. Tato část molekuly je opět schopná se zabudovat do membrány a označovat tak určité místo na jejím povrchu. Obecná struktura je „fluorofor-fosfolipid“, například (15.5).

15.5



Pro přípravu výše uvedených činidel slouží např. dihexadecanoylfosfoethanolamin (15.6), jehož aminoskupina může reagovat s amino-reaktivními fluorofory.

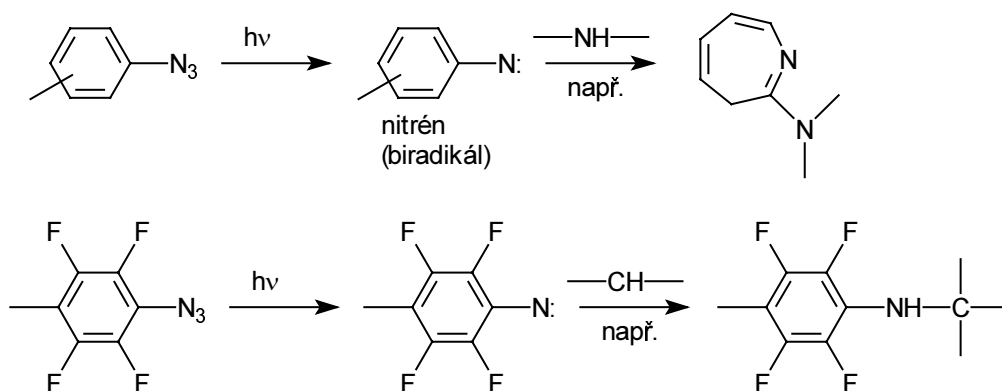


15.6

15.7 Fotoreaktivní crosslinkační činidla

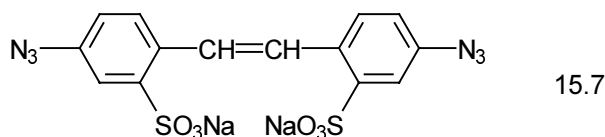
Tato činidla na rozdíl od chemických obvykle slouží jako nástroj pro stanovování blízkosti (sousedství) dvou skupin. Čili se jedná o určování prostorového uspořádání biomolekul. Tato činidla často mají jednu skupinu „chemickou“ a jednu „fotochemickou“

Fotoreaktivní skupiny jsou arylazidy, fluorované arylazidy, kde UV zářením (< 360 nm, dáno absorpcí arylazidové skupiny) dojde k excitaci azidoskupiny a ke vzniku dusíku a nitrénového biradikálu. Ten je velmi reaktivní a v případě jednoduchých arylazidů nejčastěji tvoří vazbu s nukleofilními skupinami. V případě fluorovaného derivátu nitren spíše reaguje insercí s C-H (obrázek 15-20).

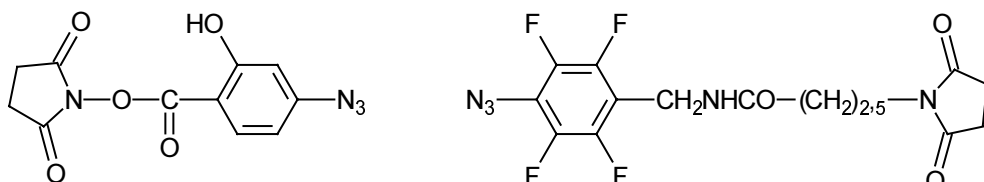


Obrázek 15-20. Fotochemická reakce azidů

Příkladem homobifunkčního činidla je následující diazid, který se připravuje z kyseliny 4,4'-diaminostilben-2,2'-disulfonové (15.7), který je navíc fluorescenčním fotoreaktivním činidlem.

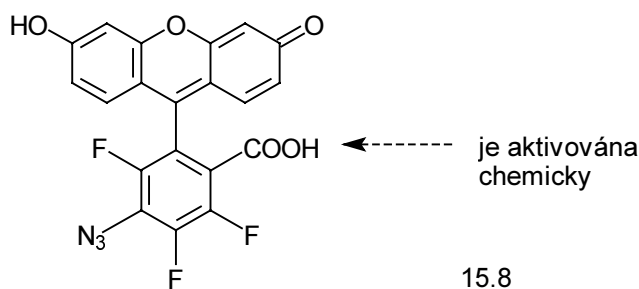


Příklady nefluorescenčních heterobifunkčních činidel jsou v obrázku 15-21.

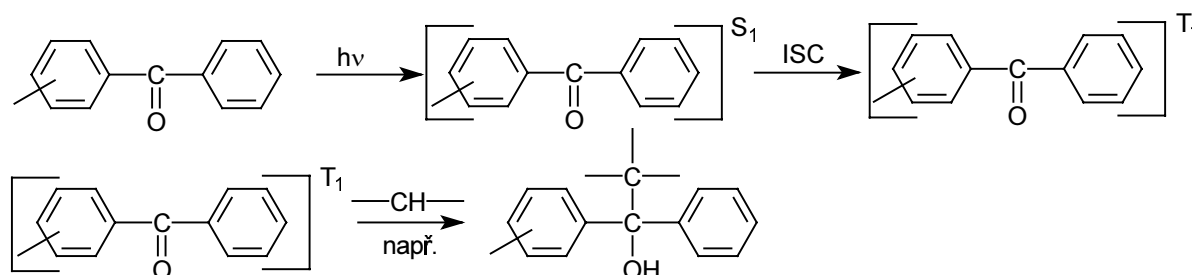


Obrázek 15-21. Nefluorescenční heterobifunkční činidla

Příkladem heterobifunkčního fluorescenčního činidla je derivát fluoresceinu (15.8).

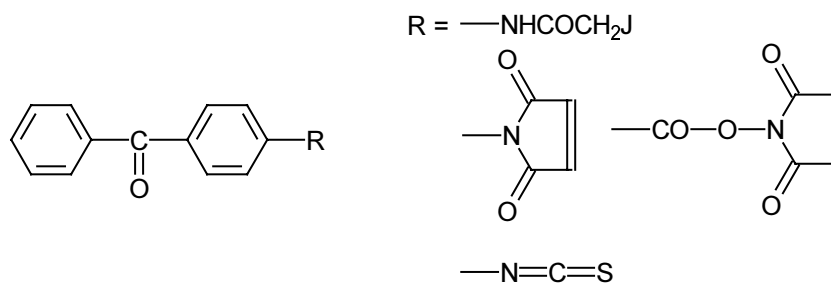


Další typ fotoreaktivních činidel je na bázi benzofenonu (obrázek 15-22), kde karbonylová skupina v podstatě s kvantovým výtěžkem 1 přejde po excitaci UV zářením ($< 360 \text{ nm}$) do svého tripletového stavu, který reaguje se substrátem.



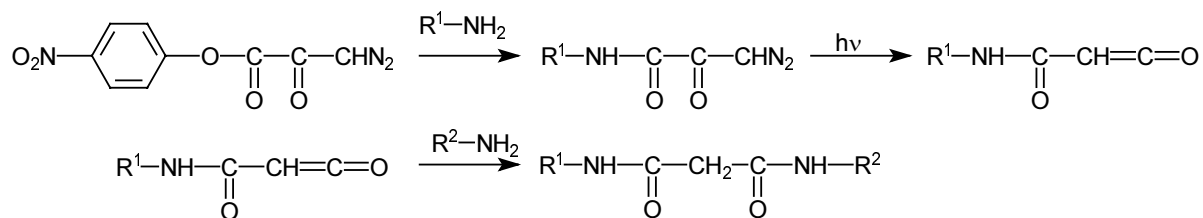
Obrázek 15-22. Fotochemická reakce derivátů benzofenonu

Příklady těchto činidel jsou v následujícím obrázku 15-23.



Obrázek 15-23. Benzofenonový typ činidel

Jiný typ fotoreaktivních činidel jsou diazopyrohroznany, které fotochemicky generují reaktivní acylační činidlo, schopné reagovat s aminoskupinami substrátu (obrázek 15-24).



Obrázek 15-24. Fotoreaktivní diazopyrohroznany