



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANIZOTROPNÍ TECHNIKY VE STUDIU
CYTOPLASMY**

ANISOTROPY TECHNIQUES IN STUDY OF CYTOPLASM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Sýkorová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1048/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kateřina Sýkorová	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806R002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Anizotropní techniky ve studiu cytoplazmy

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na problematiku měření anisotropie fluorescence uvnitř buněk s přihlédnutím k využití fluorogenních fluorescenčních sond.
2. Na základě rešerše vybrat vhodnou fluorescenční sondu pro studium bakteriálního kmene *C. neccator*.
3. Provést srovnávací experimenty časově rozlišené anisotropie a anizotropní fluorescenční mikroskopie.
4. Diskutovat výsledky a výhody použití jednotlivých metod.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kateřina Sýkorová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo provést srovnávací experimenty pomocí časově rozlišené anizotropie a ustálené anizotropie v bakteriích kmene *Cupriavidus necator*. Fluorescenční sondou pro skenování buněčného vzorku byl vybrán fluorescein, respektive jeho derivát BCECF_AM. Pomocí ověřovacího experimentu v systému glycerol/voda s přídavkem fluoresceinu, byla ověřena anizotropie a vypočítán molární hydrodynamický objem jedné molekuly fluoresceinu, který přibližně odpovídal jeho reálné hodnotě. Pomocí fluorescenční anizotropní mikroskopie byly získány obrázky bakterií s příslušnými středními hodnotami anizotropií. Skeny bakterií CN H16 a mutantů CN PHB⁻4, ukázaly patrné rozdíly mezi uniformitou vnitřního prostředí.

ABSTRACT

The main goal of this thesis was to compare experiments using time-resolved anisotropy and steady-state anisotropy for measuring in bacteria strain *Cupriavidus necator*. Fluorescent probe for anisotropy imaging was chosen BCECF_AM, which is derivate of fluorescein. Using experiment in system glycerol/water with fluorescein, anisotropy has been verified and calculated molecular hydrodynamic volume of a single fluorescein molecule, which approximately corresponded with real value. By using fluorescence imaging anisotropy microscopy, images and values of average anisotropy in cells were taken. Images of living cells (bacteria) of CN H16 and mutant CN PHB⁻4 showed differences, mainly in the uniformity of the inside environment.

KLÍČOVÁ SLOVA

Anizotropie fluorescence, fluorescenční sondy, fluorescenční mikroskopie, fluorescein, steady-state anizotropie.

KEY WORDS

Anisotropy fluorescence, fluorescence probe, fluorescence microscopy, fluorescein, steady-state anisotropy

SÝKOROVÁ, K. *Anizotropní techniky ve studiu cytoplazmy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 37 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD za odborné vedení, ochotu a pevné nervy při všech konzultacích. Dále bych ráda poděkovala své rodině za psychickou podporu.

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Fotoluminiscence	8
2.1.1 Fluorescence	8
2.1.2 Fluorofory	8
2.1.3 Fluorescenční sondy.....	9
2.1.3.1 Fluorescein	9
2.1.3.2 BCECF	10
2.2 Anizotropie fluorescence.....	11
2.2.1 Definice a základní vztahy.....	12
2.2.1.1 Stupeň polarizace	12
2.2.1.2 Anizotropie fluorescence.....	13
2.2.1.3 Fundamentální anizotropie	13
2.2.1.4 Použití Perrinovy rovnice.....	13
2.2.2 Časově-rozlišená (time-resolved) anizotropie	14
2.2.3 Ustálená (steady-state) anizotropie	14
2.3 Měření anizotropie fluorescence	14
2.3.1 Princip měření ustálené (steady-state) anizotropie	15
2.3.1.1 L-formát	15
2.3.1.2 T-formát	15
2.3.1.3 G-faktor a Magický úhel	15
2.3.1.4 Korekční faktory I_1 a I_2	16
2.4 Fluorescenční mikroskopie	16
2.4.1 Fluorescence life-time imaging (FLIM).....	16
2.4.2 Fluorescenční anizotropní mikroskopie	17
2.4.3 Přístroje.....	17
2.4.3.1 MicroTime 200.....	17
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	18
3.1.1 Fluorescenční anizotropní mikroskopie	18
3.1.2 Použití BCECF-AM v buněčném výzkumu	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
4.1 Materiály	20
4.1.1 Chemikálie.....	20
4.1.2 Přístroje.....	20
4.2 Metody	20
4.2.1 Příprava vzorků.....	20
4.2.1.1 Příprava zásobního roztoku	20
4.2.1.2 Příprava kalibrační a ověřovací řady	20
4.2.1.3 Příprava buněčné suspenze.....	20
4.2.1.4 Příprava vzorků na měření	21
4.2.2 Vlastní měření - nastavení přístroje	21
4.2.2.1 Doby života	21

4.2.2.2	Časově rozlišená anizotropie.....	22
4.2.2.3	Anizotropie ustálené fluorescence	22
4.3	Vyhodnocení	23
4.3.1	Časově rozlišená anizotropie fluorescence BCECF v bakteriální suspenzi	23
4.3.2	Ověřovací experiment a anizotropní mapování	23
4.3.2.1	Anizotropní mapování.....	24
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	25
5.1	Časově rozlišená anizotropie.....	25
5.1.1	Experimentální měření BCECF _{AM} v buněčné suspenzi	25
5.2	Ustálená (steady-state) anizotropie	26
5.2.1	Koncentrační řada pro ověřovací experiment	26
5.2.1.1	Stanovení molárního hydrodynamického objemu.....	27
5.2.2	Anizotropní mapování	28
5.2.2.1	Anizotropní snímky Cupriavidus necator H16.....	28
5.2.2.2	Anizotropní snímky Cupriavidus necator PHB ⁻ 4.....	31
6.	ZÁVĚR.....	33
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	34
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	37

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce je pilotní prací ke sledování změn v živých buňkách, zejména pak v bakteriích. Práce je navázána na grantový projekt ohledně stresu bakterií. Živou buňku může ovlivňovat celá škála různých faktorů. Vnější fyzikálně-chemické procesy, které na buňku působí, se obecně nazývají „buněčný stres“. Stresové faktory mohou být jak fyzikálně-chemické, tak i biologické a určitým způsobem narušují životní procesy v buňkách. Působení stresorů může být specifické a nespecifické. Specifické působení ovlivňuje jen některé struktury buňky nebo jejich funkce. Hlavní zaměření práce bude vyzkoušení experimentů na různé anizotropní techniky. Stanovení s alespoň částečnou informační hodnotou, bude založeno na měření pomocí mikroskopu steady-state anisotropie. Metoda vyžaduje použití fluorogenního substrátu v nízkých koncentracích. Na základě proměření sond v daném systému, budeme mapovat a pozorovat změny kterým budou sondy v rámci buňky podléhat. Vybraná sonda bude do systémů přiváděna v leukoformě a na základě anizotropních obrázků bude zpracována informace o konkrétním navázání sondy. Cílem této práce je získat poznatky o uvedených systémech a interpretace změn s ohledem na jejich možné uplatnění v dalších výzkumech.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotoluminiscence

Fotoluminiscence je děj, při kterém dochází vlivem absorpce elektromagnetického záření k excitaci molekuly a následné de-excitaci, která se projevuje emisí v ultrafialové a viditelné oblasti. Hlavní děj, ke kterému při tomto jevu dochází, je absorpce vhodného záření molekulou, kde přechází její valenční elektron ze základního singletového stavu do stavu s vyšší energií. Důležité jsou hlavně zářivé přechody, při kterých dochází k emisi světla. Podle typu zářivého přechodu se dá tento soubor dělit na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci.

Při fluorescenci excitovaná molekula emituje ze singletového stavu, přičemž elektron v excitovaném orbitalu má antiparalelní tedy opačný spin než elektron v párovém orbitalu v základním stavu. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu není spinově zakázaný. Doba dohasínání je obvykle řádově 10^{-8} s. Takovým to molekulám, které při absorpci světla následně vykazují fluorescenci, říkáme fluorofory. Zpravidla se mezi tyto molekuly řadí organické aromatické uhlovodíky a heterocykly. Fosforescence je emise fotonu z tripletového excitovaného stavu, kde elektron v excitovaném orbitalu má paralelní tedy stejný spin jako elektron v párovém orbitalu v základním stavu. Přechod excitovaného elektronu zpět na základní hladinu je tedy spinově zakázaný. Doba dohasínání u fosforescence je řádově $10^{-3} - 10^0$ s. Zpožděná fluorescence je zářivý přechod ze singletového stavu jako u fluorescence, ale vyznačuje se delší dobou dohasínání danou časem, po který je molekula v metastabilním tripletovém stavu. Emisní spektrum je totožné s emisním spektrem fluorescence. Z důvodu velkého rozdílu energií mezi stavy S_1 a T_1 se běžně nevyskytuje v aromatických uhlovodících.[3]

2.1.1 Fluorescence

Molekuly, které je možné excitovat elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce, nazýváme fluorofory. Fluorofory mají systém konjugovaných dvojných vazeb, například u azosloučenin mezi dusíky. Při fluorescenci dochází ke spinově povolenému, zářivému přechodu elektronu. Jedná se o velice rychlý přechod, řádově 10^{-9} s až 10^{-6} s obvykle z rovnovážné hladiny S_1 do základního stavu S_0 .

2.1.2 Fluorofory

Fluorofory můžeme dělit na nevlastní a vlastní. Vlastní neboli vnitřní fluorofory, jsou součástí chemické sloučeniny, které u konkrétní látky vyvolávají fluorescenci. Nevlastní fluorofory jsou mnohem využívanější skupinou. Jsou to sloučeniny, které se přidávají k určité látce, která sama o sobě fluorescenci nevykazuje. Rozlišujeme je podle typu vazby, kterou se vážou k dané molekule, kovalentně vázané sondy (fluorescenční značky) a fyzikálně vázané (fluorescenční sondy).

Fluorescenční značky se k pozorované látce váží prostřednictvím kovalentní vazby. Obvyklá místa navázání jsou povrchově aktivní látky, fosfolipidy, proteiny a polynukleotidy a další.[2]

Fluorescenční sondy se k pozorované látce váží prostřednictvím nekovalentní vazby. Spojením sondy a pozorované látky, se velmi často mění fluorescenční vlastnosti původní sloučeniny. Důležitý je výběr vhodné sondy pro daný experiment.

2.1.3 Fluorescenční sondy

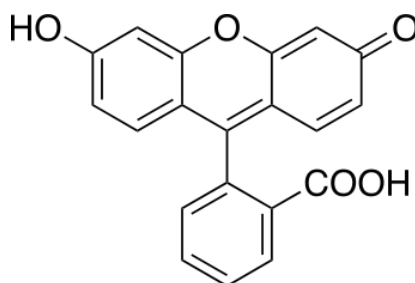
Fluorescenční sondy nebo jinak také známé jako fyzikálně vázané sondy, jsou silně závislé na vlastnostech prostředí (pH, polaritu, viskozitu, přítomnost zhašeče). Fluorescenčních sond je nespočetně mnoho, vzhledem k jejich rozdílným vlastnostem je důležité správné zvolení sondy pro dané potřeby.

Pro naše využití budou používané sondy, které jsou založené na intracelulární aktivitě esteráz. Jedná se o fluorogenní substráty esteráz, které jsou schopné pronikat do buněk volnou difúzí. Činností enzymů jsou převedeny na fluoreskující produkt mající náboj, díky kterému jsou v buňce zadržovány a koncentrovány. Měří například membránovou integritu, pokud je integrita buňky narušena, flurofory jsou vyplavovány ven z buňky. [2]

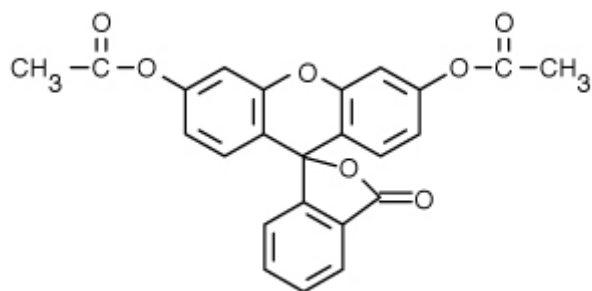
Jednou z prvních a nejstarších sond pro toto použití byl fluorescein a jeho derivát fluorescein diacetát (FDA). Další známou sondou je karboxyfluorescein diacetát (CFDA), který vykazuje po hydrolýze lepší retenci (větší negativní náboj za fyziologického pH). Pro další zlepšení retenčních vlastností derivátů fluoresceinu, se používá v mikrobiologických aplikacích například BCECF AM (2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-(a-6)-karboxyfluorescein, acetoxymethyl ester).[7]

2.1.3.1 Fluorescein

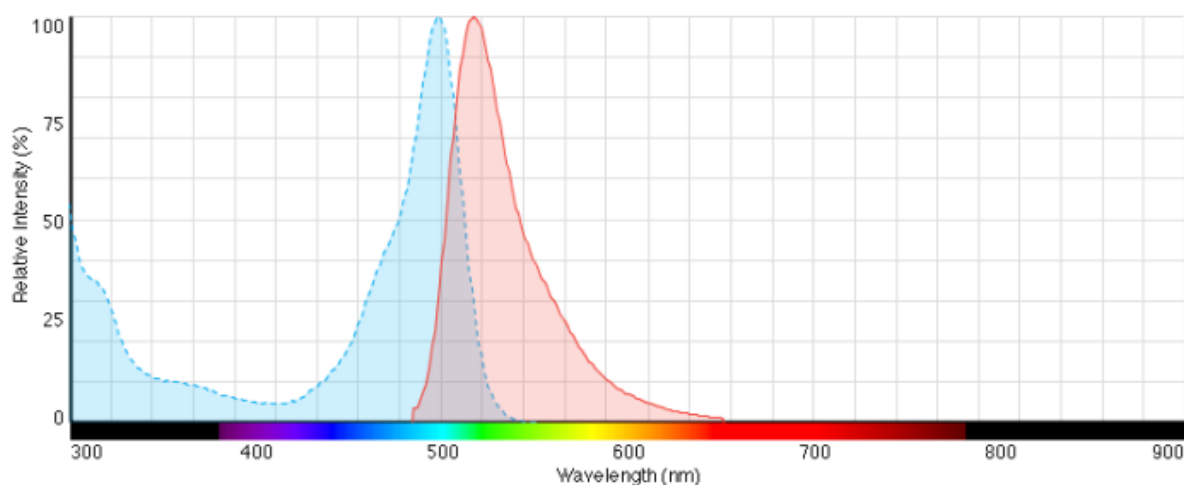
Fluorescein (3',6'-dihydroxyspiro[2-benzofuran-3,9'-xanthen]-1-on), je jeden z nejznámějších fluorescenčních sond, poprvé byl syntetizován vědcem A. von Baeyerem v roce 1871. Obvykle se nachází ve formě tmavě oranžového až červeného krystalického prášku. Je rozpustný ve vodě i v alkoholech, jeho bod tání je okolo 320°C. Absorpční maximum jeho čisté formy je 494 nm a emisní maximum 521 nm ve vodném prostředí a fyziologickém pH. Pro všechna pH má fluorescein při excitační vlnové délce 460 nm stejnou absorpci. Disodná sůl této látky se nazývá uranin a používá se jako pigmentová žlut'. Jeho častým derivátem je fluorescein-isothiokyanát (FITC), další deriváty patří například karboxyfluorescein s přidanou karboxylovou skupinou (492/517 nm) nebo karboxyfluorescein-sukcinimidylester (CFSE).[2][8]



Obr. 1 Strukturní vzorec fluoresceinu



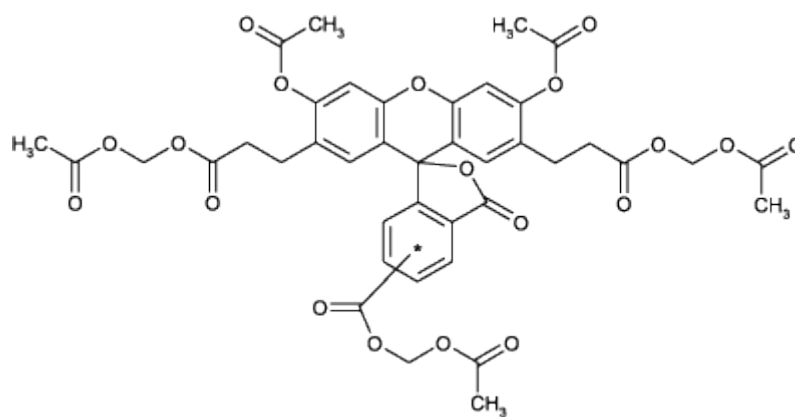
Obr. 2 Strukturní vzorec fluorescein diacetátu (FDA)



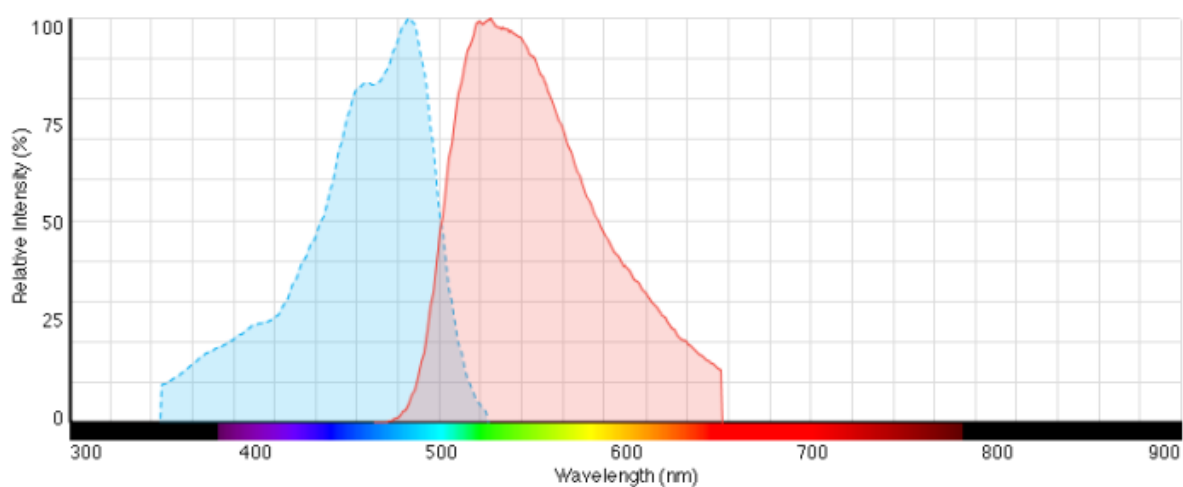
Obr. 3 Emisní a Excitační spektrum fluorescein diacetátu (FDA) v roztoku o hodnotě pH 8[8]

2.1.3.2 BCECF

BCECF (celý název (2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-karboxyfluorescein)) byl poprvé představen americkým chemikem Rogerem Tsienem a jeho spolupracovníkem v roce 1982. Je to široce užívaný fluorofor a nejčastěji se používá ve spojení s acetoxy methylesterem (AM). Látka je sama o sobě nefluorescenční, její fluorescenci způsobují až esterázy uvnitř buňky. Jeho isobestický bod je při přibližně 440 nm což je vcelku daleko od jeho excitačního maxima. BCECF má při fyziologickém pH 4-5 negativních nábojů. Sonda se bez esteru nevyužívá, protože její isobestický bod je vzdálený od absorpčního maxima a na mikroskopu vykazuje slabý signál. Ve spojení s acetoxymethylesterem vytváří neutrálně nabitou molekulu, a tedy do buňky proniká snáz než bez esteru.[8]



Obr. 4 Strukturní vzorec BCECF

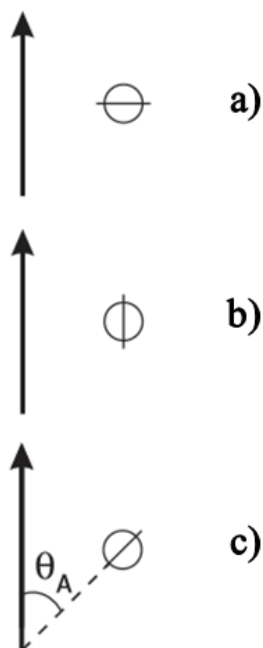


Obr. 5 Excitační a emisní spektrum BCECF v roztoku o hodnotě pH 5,2.[8]

2.2 Anizotropie fluorescence

Měření anizotropie fluorescence je velice zajímavý a významný způsob pro zkoumání jak v oblasti chemické, fyzikální tak i v biochemických a lékařských výzkumech. Umožňuje kvantitativní analýzu interakcí mezi fluorescenčně značenými a neznačenými molekulami, což je klíčové hledisko pro dané měření. Tenhle způsob měření je založen na principu fotoselektivní excitace fluoroforů polarizovaným světlem.

Světlo je elektromagnetická vlna, složená ze dvou složek: elektrické a magnetické. Tyto složky jsou na sebe kolmé a nemají výhodnou orientaci, ale při lineárně polarizovaném světle kmitá elektrická složka v jedné rovině a to je pro tento způsob velmi důležité. Pokud je daný systém fluoroforů excitován lineárně polarizovaným zářením, molekula a její fluorofory orientované v rovině elektrického vektoru budícího záření, jsou excitovány přednostně. Tento jev, který popisuje pravděpodobnost absorpci fotonů, se nazývá fotoselekce (viz. Obr.6).[2]



Obr. 6 Fotoselekce popisující případ kde: a)nedochází k absorpci, b)dochází k absorpci, c) absorpce je úměrná hodnota $\cos^2\theta$, kde základní šipka zobrazuje rovinu polarizovaného světla.[2]

Při ozáření vzorku polarizovaným světlem, kde jsou molekuly fluoroforů náhodně orientovány dojde k výběru takových molekul, které jsou orientované podle jejich přechodových momentů a které jsou orientovány podél elektrického vektoru polarizovaného záření. Jinak to můžeme nazývat selektivní excitací, s následnou částečně orientovanou skupinou fluoroforů. Vlivem zejména rotačních pohybů molekuly fluoroforu během doby života fluorescence, dochází k emitaci záření, které se neshoduje se zářením absorbovaným. Jev, při kterém molekula fluoroforu se pootáčí o určitý úhel, se nazývá depolarizace.

Depolarizace je pak závislá na dalších okolnostech, jako je rotační difúze, viskozita, rychlost rotující molekuly. Měření, které bude prováděno v prostředí s vysokou viskozitou, rotace fluoroforu bude zbržděna a naměříme velice malou míru depolarizace. Funguje to i naopak, v prostředí kde molekule nebrání nic v rotaci, naměříme velkou míru polarizace a anizotropie se bude blížit k nule.

2.2.1 Definice a základní vztahy

Rozsah neboli míra polarizace emise je popsána anizotropií fluorescence (r). Závisí přednostně na fotoselektivní excitaci fluoroforů polarizovaným světlem v opticky izotropním vzorku.[1]

2.2.1.1 Stupeň polarizace

Jeden z vyjádření anizotropie fluorescence je polarizační stupeň p , který je vyjádřen jako:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}, \quad (1)$$

kde při paralelní (kolmé) orientaci emisního a excitačního polarizátoru měříme intenzitu emise jako $I_{\parallel}$ (vertikální, neboli emisní), respektive $I_{\perp}$ (horizontální, neboli excitační).[2]

2.2.1.2 Anizotropie fluorescence

Nejčastějším vyjádřením je vztah pro anizotropii fluorescence r :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}}, \quad (2)$$

pro usnadnění pak existuje přepočtový vztah, kde platí:

$$r = \frac{2p}{3 - p}. \quad (3)$$

Vztah pro anizotropii je normalizován podle celkové intenzity fluorescence kde,

$$I_T = I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}, \quad (4)$$

takže jeho hodnota nezávisí na koncentraci fluoroforu a proto se také častěji využívá než vztah pro stupeň polarizace.[1][2]

2.2.1.3 Fundamentální anizotropie

Fundamentální anizotropie se uvádí jako limitní hodnota, nebo jinak také nazývaná limitní anizotropie. Je brána jako maximální měřitelná hodnota anizotropie r_0 , kterou popisuje úhel mezi excitací a emisí molekuly excitované polarizovaným zářením ve směru její osy. Popisuje ji teoretická hodnota anizotropie v případě, kdy fluorofor nekoná žádný pohyb. Při reálném měření pak pohybu brání rigidní prostředí. Hodnota fundamentální anizotropie systému se dá efektivně využít pomocí tzv. Perrinovy rovnice, například k zjištění viskozity vzorku:

$$\frac{r_0}{r(t)} = 1 + \frac{\tau}{\Phi}, \quad (5)$$

kde r_0 je fundamentální anizotropie, $r(t)$ je steady-state anizotropie, Φ je rotační korelační čas (čas, za který se molekula pootočí o 1 radián $\Phi = \frac{1}{6 \cdot D_r}$).

2.2.1.4 Použití Perrinovy rovnice

Perrinova rovnice počítá s kulovitými částicemi, které vykazují symetrické a izotropní rotace. Předpokládá, že při takovýchto podmínkách má časová závislost fluoroforu exponenciální průběh. Při měření ustálené anizotropie se počítá se střední hodnotou anizotropie (Rovnice č.5), pro další použití můžeme do rovnice zavádět rotační difúzní konstantu D_r :

$$D_r = \frac{kT}{6 \cdot V \eta}, \quad (6)$$

kde V je objem částice, η je viskozita prostředí, k je Boltzmannova konstanta a T je absolutní teplota, pro kterou v případě sférické částice platí Stokesův-Einsteinův vztah.

Pro rotační difúzní konstantu D_r , lze Rovnice č.5 upravit na vztah:

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + 6D_r \cdot \tau, \quad (7)$$

kdy za použití Rovnice č.6 vede k výsledné úpravě ve tvaru

$$\frac{r_0}{\langle r \rangle} = 1 + \frac{kT \cdot \tau}{V\eta}. \quad (8)$$

Z takovéto rovnice, za předpokladu známé viskozity prostředí η , může být vypočítán na základě jednoduché geometrické úvahy hydrodynamický objem V . [4]

2.2.2 Časově-rozlišená (time-resolved) anizotropie

Pomocí časově-rozlišené anizotropie měříme poklesy intenzit emise nebo samotný pokles anizotropie. Systému se dodává pulz, který je obvykle kratší než doba dohasínání fluorescence vzorku. Na základě této informace pak zjišťujeme doby života dané molekuly a jeho fluoroforu.

Excitaci krátkým pulzem charakterizuje rovnice $r(t)$:

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t)}, \quad (9)$$

kde hodnota $r(t)$ udává okamžitou, respektive časově rozlišenou anizotropii. Pro totální intenzitu fluorescence se pak uvádí vztah:

$$I_{\parallel}(t) + 2 \cdot I_{\perp}(t) = i(t). \quad (10)$$

2.2.3 Ustálená (steady-state) anizotropie

Způsob této metody je typický pro daný typ měření tím, že vzorek je ozářen kontinuálním paprskem a současně se zaznamenává emisní spektrum. Dostáváme při takovémto měření časovou střední hodnotu intenzity či polarizace fluorescence.

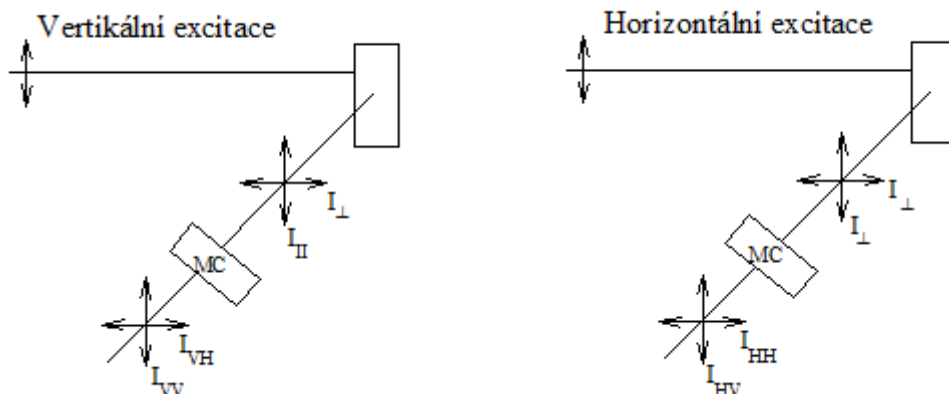
$$\bar{r} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 \cdot I_{\perp}} \quad (11)$$

2.3 Měření anizotropie fluorescence

Tuto metodu lze uplatňovat na širokém poli působení. Využívá se například při studování excitačního polarizačního spektra, konkrétně mezi jednotlivými odchylkami v excitovaných stavech molekul. Další uplatnění nachází tato technika při sledování micelárních systémů, kde se pomocí ní dá stanovit mikroviskozita uvnitř micel, její fluidita a další vlastnosti. V molekulární biologii se uplatňuje ke stanovování tvaru a velikostí proteinů, denaturaci, dynamických vlastností, interakcí s okolím, nebo k pozorování systému DNA, kde proteiny hrají velkou roli. Studium rigidity a výzkum biologických membrán je jednou z mála dalších využití anizotropie. [10]

2.3.1 Princip měření ustálené (steady-state) anizotropie

Pro měření jsou typické dva způsoby a to L-formát a T-formát. Rozdíl mezi těmito metodami je v použití počtu kanálů, v L-formátu se používá jeden emisní kanál v T-formátu jsou jednotlivé složky emise pozorovány samostatnými kanály. (viz Obr.7)



Obr. 7 Schéma uspořádání při měření anizotropie fluorescence. Na levé straně – L-formát, napravo – T-formát, MC-monochromátory.

2.3.1.1 L-formát

Tohle uspořádání je nejčastěji používané a to hlavně z důvodu, že fluorimetry při tomto uspořádání mají pouze jeden emisní kanál. Vzorek je postupně excitován různě polarizovaným zářením. Emise je pozorována pomocí monochromátoru, který bývá umístěn na kolmici budícího paprsku. [1]

2.3.1.2 T-formát

Při uspořádání na T-formátu se měření provádí ve dvou krocích, prvně se je polarizátor nastaven na vertikální orientaci pro měření paralelní a kolmých signálů a poté je nastaven na horizontální orientaci. Zatím co excitační polarizátory mění svoji orientaci, emisní polarizátory mají po celou dobu měření orientaci stejnou. Pro výpočet anizotropie je potřeba vzít v úvahu poměr horizontální a vertikální odezvy a započítat jí do výpočtu:

$$\frac{R_V}{R_H} = \frac{I_{II}}{I_{\perp}}, \quad (12)$$

kde R_V je polarizátor vertikální a R_H polarizátor horizontální. Vztah pro výslednou anizotropii bude vypadat následovně:

$$r = \frac{\frac{I_{II}}{I_{\perp}} - 1}{\frac{I_{II}}{I_{\perp}} + 2}. \quad (13)$$

2.3.1.3 G-faktor a Magický úhel

Důležité pro přesné měření je zmínka o G-faktoru a Magickém úhlu, při jejich nesprávném nastavení, nebo neuvážení ve výsledné analýze, může dojít k nesprávným hodnotám.

Pomocí G-faktoru, který vyjadřuje poměr citlivosti při detekci vertikální a horizontální polarizované emise, se dá korigovat detekční kanál pro každou emisní délku. Určí se pomocí proměření excitace vzorku horizontálně polarizovaným světlem, při všech původních nastavení přístroje jako jsou filtry, štěrby a podobně.

Vypočet G-faktoru pro dané měření se vypočítá dle rovnice:

$$G = \frac{I_{\parallel}}{I_{\perp}}. \quad (14)$$

Magický úhel nastavujeme, aby měření celkové intenzity fluorescence nebylo závislé na stupni polarizace vzorku. Protože účinnost přenosu emisního monochromátoru je závislá na polarizaci záření, pozorovaný signál není přesně úměrný. Proto nastavujeme při vertikálním excitačním polarizátoru emisní polarizátor na tzv. magický úhel $54,7^{\circ}$. [1]

2.3.1.4 Korekční faktory l_1 a l_2

Mezi další důležité korekční faktory, které mají za úkol korigovat vliv použitého objektivu. Tyto faktory ovlivňují pouze jmenovatel celé stanovené rovnice:

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{(1 - 3l_2) \cdot I_{\parallel} + (2 - 3l_1) \cdot G \cdot I_{\perp}}, \quad (15)$$

kde G je G-faktor, $I_{\parallel}$ a $I_{\perp}$ jsou intenzity horizontální a vertikální polarizace a l_1 a l_2 jsou korekční faktory.[14]

Korekční faktory se stanovují na základě dvou známých vzorků s odlišnou časově-ustálenou anizotropií. Stanoví se G-faktor pro daný systém, intenzity $I_{\parallel}$ a $I_{\perp}$ pro horizontální a vertikální polarizaci a dosadí se do uvedené Rovnice č.13. Pro dvě různé hodnoty známé ustálené anizotropie dostaneme soustavu dvou rovnic o dvou neznámých a z nich získáváme l_1 a l_2 .

2.4 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je široce využívána v mnoha vědních oborech, jako je fyzika, biologie a chemie. Velké využití nachází i v oblasti medicíny. Fluorescenční mikroskopie, konkrétně mikroskopie v buněčných systémech umožňuje pozorovat buňky a s velkou přesností sledovat jejich vnitřní část. Napomáhá k pozorování uspořádání buněk, jejich fungování, umožňuje označovat konkrétní místo fluorescenční látkou a pozorovat jejich obraz.

2.4.1 Fluorescence life-time imaging (FLIM)

Tato metoda se používá pro vytvoření obrazu na základě dob života ve vzorku. Jednotlivé intenzity obrazu odpovídají daným dobám života fluoroforu. Doba života nám říká jaký je průměrný čas, který stráví molekula v excitovaném stavu před emisí fotonu. Tuto metodu ovlivňuje pH, množství kyslíku a druhu vazby mezi molekulami ve vzorku. Doba života není závislá na koncentraci, absorpci vzorku, fotovybělování, nebo intenzitě excitačního záření. [13]

2.4.2 Fluorescenční anizotropní mikroskopie

Podobná metoda jako FLIM, někdy označovaná jako r-FLIM, nám poskytuje informaci o dobách života, kvantovém výtěžku, mobilitě a orientaci fluoroforů v pozorovaném vzorku. Vytváří obraz na základě hodnoty anizotropie, která odpovídá danému vzorku. Podle nastavení systému většinou dostáváme obrázek se škálou barev odpovídajících jednotlivým hodnotám anizotropie v systému. Navíc nám tato metoda umožňuje pozorování velmi malé části na povrchu nebo uvnitř buňky. Anizotropie ve vzorku pak bude záviset na strukturálních vlastnostech, viskozitě, volné otáčivosti a tvaru molekuly. Kupříkladu anizotropie pro volné fluorofory v roztoku bude velice nízká a to kvůli vysokému stupni volné otáčivosti molekuly. Jako další možné využití je pozorování mobility a lokalizace fluoroforů (fluorescenčních sond) v živém systému.[13]

2.4.3 Přístroje

Přístroje používané k takovýmto měřením používají konfokální mikroskopy, které jsou typické svou vysokou rozlišovací schopností danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny mikroskopu. Rozlišovací schopnost v měření buněčných suspenzí je důležitá kvůli předpokladu, že vzorek nebude mít zanedbatelnou výšku. Zaostrění zajišťuje bodová clonka taky nazývaná pinhole, která odfiltruje neostrý signál. Velikost pinhole rozhoduje o pronikání světla mimo focus, nebo ztratě užitečného světla. Intenzitu světla pak sledujeme pomocí Airyho kruhů na mikroskopu, které odpovídají šířce pinhole. [12]

2.4.3.1 *MicroTime 200*

MicroTime 200 je konfokální mikroskop pro měření fluorescenční korelační spektroskopie a mnoho dalších technik jako jsou například časově rozlišená fluorescenční korelační spektroskopie (FLCS), Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) a další. Skládá se z inverzního mikroskopu, excitační části a detekčního systému s jedno-fotonovou citlivostí a pikosekundovým rozlišením. Analýza naměřených dat probíhá v softwaru SymPhoTime 64. K celému přístroji patří také inverzní mikroskop Olympus IX73, který má transmisní osvětlovací systém se sadou silně zaostrujících objektivů. Excitační systém obsahuje sérii pulzních diodových laserů s pulzy v řádech pikosekund. Systém je také vybaven CCD kamerou, která umožňuje měření některých již zmiňovaných metod FCS, FLCS, FLIM, měření dob života a anizotropií. Laserové hlavy jsou integrovány do souhrnné jednotky (LCU), detekční systém se skládá z čtyř nezávislých detektorů se spektrálním rozmezím 400-1000 nm a šumem pod 250 cnts·s⁻¹. [13]

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1.1 Fluorescenční anizotropní mikroskopie

Lan Yao a kolektiv studovali mobilitu proteinu v živých buňkách, analyzovali lidský osteosarkom pomocí GFP(zelený fluorescenční protein). Součástí systému byl invertovaný mikroskop, kalcitové hranoly vložené mezi excitační a emisní optickou dráhu vzorku, snímáné pomocí Olympus IX71 a CCD kamerou. Fakt že GFP má vysokou rotační mobilitu v roztoku a jeho anizotropie je nízká, vedlo k zjištění, že když GFP polymeruje do dlouhých vláken, je znehybněn a jeho anizotropie má zvyšující se tendenci. Pomocí MATLABu byly vyhodnoceny a zobrazeny data ke studiu dynamiky živých buněk.[13]

Klaus Suhling s kolektivem využil měření časově-rozlišené anizotropie a za pomoci fluorescenční sondy fluoresceinu studoval mikroviskozitu prostředí v živých buňkách.[15]

Andrew Clayton a kolektiv rozšířily FLIM technologii, aby zahrnovala vytváření snímků založených na ustálené anizotropii fluorescence, anizotropie rFLIM. Pozorovali takto systému glycerol-fluorescein na bakteriích *Escherichia coli*. [16]

James A. Dix společně s A.S. Verkman pomocí anizotropního mapování, zkoumali buňky psích ledvin a Swiss 3T3 fibroblastů. Jako fluorescenčních sondy zvolili BCECF_AM a indo-1. Anizotropie byly měřeny za použití pulsního světelného zdroje a detektoru připojeného k epifluorescenčnímu mikroskopu. Zjistily, že anizotropie v cytoplazmě těchto buněk je vyšší než v intersticiální oblasti. Pomocí hodnot anizotropie a dob života a kalibrace systému na glycerol/voda zjišťovali viskozitu cytoplazmatu buňky.[17]

3.1.2 Použití BCECF_AM v buněčném výzkumu

Francisco Javier a kolektiv použili sondu BCECF na výzkum regulace a udržování objemu buněčné vody a intracelulární pH (pHi) v Neuroblastoma N1E-115. Studium interakce a kinetiky těchto dvou mechanismů, ověřovali pomocí kvantitativní fluorescenční zobrazovací mikroskopie. Metoda, kterou použili, měla časové rozlišení <1 s a citlivost na osmotické změny ~ 1 %. Tvrdili, že tato metoda je použitelná pro jakýkoli typ buňky, nezávisle na buněčném tvaru a geometrii.[18]

Takakazu Nakabayashi a kolektiv zjišťovali, jak závisí hodnota pH na době života BCECF v roztoku a gram-negativních bakteriích *Halobacterium salinarum*. Změny byly měřeny pomocí časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Zjistili, že korelace mezi pH a dobou života sondy *in vivo*, se liší od *in vitro*, rozdíly v tomto výzkumu byly připisovány proteinům membrány v biologickém systému.[19]

Earvin Liang a spol. popisuje použití fluorescenční sondy BCECF-AM na měření změn intracelulárního pH v lidské buňce Caco-2(buňka zasažená kolorektálním karcinomem). Zjišťovali změny pHi v závislosti na přidávání vhodných činidel do buněčné suspenze Caco-2. Jako činidla používali organické kyseliny, tetradecyl amin, hovězí albumin nebo chlorid amonný.[20]

Erkki Liimatta, Anu M. Kantola a Ilmo E. Hassinen popisují intracelulární způsob měření volného vápníku v izolovaném myoglobinu, z deficitních myších srdcí při velkém kolísání pH. K monitorování celého systému použily dvě fluorescenční sondy a to vápenatou sondu Fura-2 a pH sondu BCECF. Výsledky zaznamenávaly ve formě dvou excitovaných vlnových délek od obou sond. Zjistili že, když dochází k ischemii myšího srdce, tak fluorescence Fura-2 klesá díky okyselení celého systému, současný záznam ze sondy BCECF sloužil ke kalibraci systému v rámci pH.[21]

Carsten Hille a kolektiv popisali použití fluorescenční zobrazovací mikroskopie pomocí dob života (FLIM), v kombinaci se dvou fotonovou excitací (2P-FLIM). Pomocí této metody zjišťovali koncentraci mezibuněčné iontů v živých biologických tkání. Měření pH_i probíhalo na *Periplaneta americana* (Šváb Americký). Metoda byla založena na citlivých barvivech respektive sondách, které působí jako lokální senzory pro kvantifikaci prostředí (pH a iontů Cl⁻). Pro ověření systému, zda bude možné měřit 2P fluorescenční excitaci, byly provedeny měření ve vzorku fluoresceinu. Sonda MQAE byla vybrána na mapování koncentrace chloridů. Fluorescenční pH sonda BCECF, byla zvolená pro mapování v rámci fyziologického rozsahu pH. Zjistili, že tato technika se spolehlivou kvantifikací koncentrace pomocí fluorescenčních barviv, může být použita i pro jiné biologické systémy.[22]

C. M. Futsaether a kolektiv měřili pomocí fluorescenční spektroskopie intracelulárního pH v gram-pozitivní bakteriích *Propionibacterium acnes*. Sonda BCECF-AM byla do bakterie vnášena kvůli lepší penetraci membránou. Pozorovali různé vlivy působící na buňky, například přidání glukózy, které nemělo na vnitřní pH vliv. Další vlivy, které měli pozorovatelnou změnu na pH byly, acidifikace buňky za přidání NH₄Cl a alkalizaci pomocí NaHCO₃. Změny sledovali pomocí měření intenzity fluorescence fluorescenční sondy. Intenzity fluorescence při stanovení byli 505 nm a 450 nm a výsledky měření byly vyhodnoceny pomocí nukleární magnetické rezonance s použitím ³¹P.[23]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiály

4.1.1 Chemikálie

<i>Fluorescenční sondy</i>	Fluorescein sodný – CAS: 2321-07-5 Sigma Aldrich, číslo šarže: 101355957
<i>Rozpouštědla</i>	BCECF_AM – CAS: 117464-70-7 Glycerol – CAS: 56-81-5, čistota $\geq 99,5\%$ Sigma Aldrich, číslo šarže: BCBK9967V Mili-Q voda – Miliphore academic, Purelab: ELGA

4.1.2 Přístroje

<i>Fluorocube</i>	Horiba Scientific
<i>MicroTime 200</i>	PicoQuant
<i>Analytické váhy</i>	Denver Instrument, Mdl BC 100
<i>Mikropipety</i>	Finnpipette, Eppendorf Research
<i>Vibrační míchadlo</i>	IKA MS2 Minishaker

4.2 Metody

4.2.1 Příprava vzorků

4.2.1.1 Příprava zásobního roztoku

Zásobní roztok fluorescenční sondy pro kalibrační křivku byl připraven navážením potřebného množství pevné látky na analytických vahách s přesností na 4 desetinná místa. Pomocí rozpouštědla byl kvantitativně převeden na požadovaný objem. Jednalo se o fluorescein v čisté vodě o výsledné koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M. Takto připravený roztok byl skladován v lednici při teplotě 4 °C

4.2.1.2 Příprava kalibrační a ověřovací řady

Kalibrační řada byla připravena pro danou fluorescenční sondu tak, abychom zjistili závislost anizotropie fluorescence na viskozitě homogenního prostředí. Řadu tvořilo 6 vzorků obsahující směs glycerol/voda. Procentuální zastoupení glycerolu ve vzorku se pohybovalo od 50% do 96%. Výsledná koncentrace příslušné sondy ve vzorcích odpovídala $1 \cdot 10^{-6}$ M.

4.2.1.3 Příprava buněčné suspenze

Bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a jeho mutační kmen PHB- byly zaočkovány do inokulačního média Nutrien Broth při koncentraci $25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Po uplynutí 24 hodin při teplotě 30°C při centrifugaci o rychlosti 160 rpm bylo inokulum převedeno do minerálního (produkčního) média. Obsah inokula v produkčním médiu činila 10%, kultivace v takto připraveném produkčním médiu probíhala 72 h. Složení minerálního média je uvedeno v tabulce.

Tab.1 *Složení minerálního média v objemu 1000ml*

Látka	<i>m</i> [g]
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
KH ₂ PO ₄	1,02
Na ₂ HPO ₄	11,1
MgSO ₄	0,2
Fruktosa	20

Tab.2 *Složení stopových prvků v 1 ml*

Látka	<i>m</i> [g]
FeCl ₃	9,7
CaCl ₂	7,8
CuSO ₄	0,156
CoCl ₂	0,119
NiCl ₂	0,118
CrCl ₂	0,062
0,1 M HCl	1000ml

Po ukončení kultivace byl odebrán 1 ml buněčné suspenze a následně centrifugován po dobu 5 minut rychlostí 10 000 rpm. Po odstranění supernatantu se buňky rozsuspendovaly v 1 ml PBS pufru a následně se opět zcentrifugovaly. Poté, co byl supernatant oddělen od buněk, byl bakteriální sediment rozsuspendován v 1 ml PBS pufru. Do takto připraveného vzorku byl přidán 1 µl fluorescenční sondy BCECF. Konečná kultivace vzorku před měřením probíhala 30 minut při teplotě 30 °C.

4.2.1.4 *Příprava vzorků na měření*

Z připravené buněčné suspenze bylo odebráno pomocí pipety 10 µl vzorku a umístěno na sklíčko. Za pomoci 2% roztoku agarózy o teplotě cca 40 °C, byl vzorek zafixován přibližně 500 µl na krycím sklíčku. Při přelívání agarózovým gelem bylo třeba vzorek jemně promíchat, aby směs bakterií byla co nejvíc homogenní systém.

4.2.2 **Vlastní měření - nastavení přístroje**

Všechna měření byla prováděna při teplotě 25 °C. Měření buněčných suspenzí na přístroji Fluorocube probíhalo ve standardní křemenné kyvetě s optickou dráhou 1 cm.

4.2.2.1 *Doby života*

K měření dob života byl použit přístroj Fluorocube od firmy Horiba, pracující na základě metody TCSPC. Vzorky obsahující BCECF_AM byly excitovány pomocí nanoLED diody s vlnovou délkou 467 nm a se šířkou pulzu 1,2 ns. Nastavení přístroje bylo při měřeních následující: emisní monochromátor – 475 nm, excitační polarizátor – 0°, emisní polarizátor – 54,7° tzv. magický úhel. Měření probíhalo při nastavení přístroje: emisní monochromátor – 520 nm, Coaxial delay – 95 ns, TAC range – 200 ns, RT preset – 60 s, Peak preset – 10 000 counts, Repetition rate – 1 MHz.

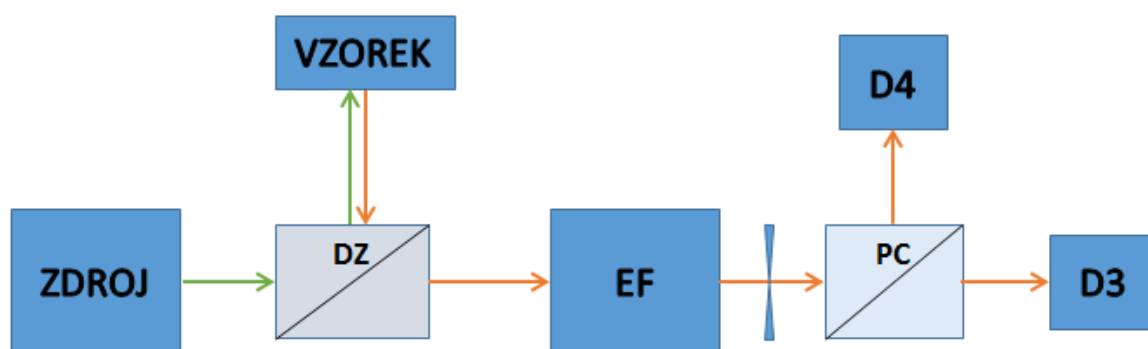
Měření odezvy sondy, bylo stanoveno při použití koloidního křemíku ludox s emisním monochromátorem nastaveným na vlnovou délku použité diody. Jako další způsob stanovení dob života byl použit přístroj MicroTime od firmy PicoQuant. Kde za pomoci TCSPC metody a FLIM analýzy byly vyhodnoceny doby života.

4.2.2.2 Časově rozlišená anizotropie

K měření časově rozlišené anizotropie byl použit přístroj Fluorocube od firmy Horiba. Nastavení přístroje bylo stejné jako u měření dob života. Vzorky byly excitovány nanoLED diodou s vlnovou délkou 467 nm. Měření probíhalo při nastavení přístroje: emisní monochromátor – 520 nm, Coaxial delay – 95 ns, TAC range – 200 ns, RT preset – 60 s, Peak preset – 10 000 counts, Repetition rate – 1 MHz. Měření bylo skončeno při rozdílu 100 000 counts (fotonů) mezi poklesy s VV a VH orientací polarizátorů.

4.2.2.3 Anizotropie ustálené fluorescence

K měření anizotropie ustálené fluorescence a anizotropního mapování, byl použit přístroj MicroTime od firmy PicoQuant s konfokálním mikroskopem Olympus IX71. U měření byl použit ultraplanární superapochromatický objektiv UplanSApo s vodní inverzí a 60-ti násobným zvětšením s numerickou aperturou 1,2. Objektiv byl namontován na skeneru s piezoelektrickým posuvem. Vzorky byly excitovány laserovou hlavicí vlnové délce 470 nm a paprsek dále procházel dvojitým dichroickým zrcadlem o vlnových délkách 405/467 nm. Dále byl paprsek poslán na objektiv a následně emise fluorescence byla sbírána pomocí emisního filtru s vlnovou délkou 520/35 nm. Měření probíhalo na dvou detektorech D3 a D4, při nastavení přístroje: TAC range – 25 ns, Repetition rate 40 MHz. Kalibrace přístroje G-faktoru byla stanovena pro dané měření na vodný roztok fluoresceinu disodného ve výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M.



Obr. 8 Nastavení přístroje pro dané měření, kde ZDOJ-laserová hlavice 470nm, DZ-dichroické zrcadlo 405/467nm, EF-emisní filtr 520/35nm, konfokální šterbina mezi EF-PC, PC-polarizační kostka Olympus, D3/4-detektory. Excitační paprsek označen zeleně, emise oranžově.

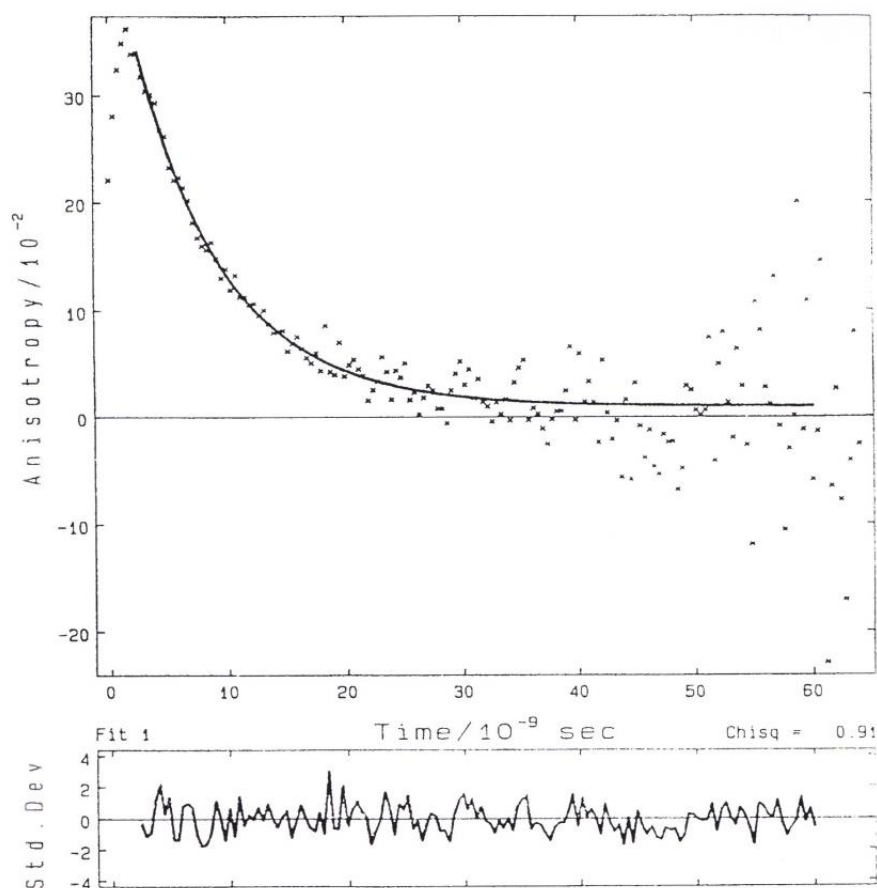
Laserová hlavice emituje vertikálně polarizované pulzy, které se při průchodu optickým vláknem stáčí na horizontální polarizaci. Dále paprsek prochází přes dichroické zrcadlo, objektiv, emisní filtr a dále se dělí přes polarizační kostku, kde horizontálně polarizované světlo prošlo a vertikálně polarizované světlo se odrazilo. V tomto případě byl detektor č.3

uložený dál to znamená, že na něj dopadalo horizontálně polarizované světlo a na detektor č.4 dopadalo vertikálně polarizované světlo.

4.3 Vyhodnocení

4.3.1 Časově rozlišená anizotropie fluorescence BCECF v bakteriální suspenzi

K analýze dat byl použit operační systém DAS6 Fluorescence Decay Analysis Software od firmy Horiba, který používá k vyhodnocení metodu rekonvoluční analýzy. Mezi poklesy s VV a VH orientací polarizátorů, byly získány dvě vyhasínací křivky a odezva přístroje. Tyto vyhasínací křivky byly přímo vyhodnoceny anizotropním modulem, který je součástí operačního systému DAS6. Ideální model anizotropie by měl vypadat tak, že na začátku v krátkých dobách života by anizotropie měla být vyšší a s vyhasínáním sondy postupně klesat k nule. Hodnota parametru χ^2 „chí“ kvadrát by se měla ideálně pohybovat okolo jedné. Obvyklý model anizotropie lze vidět na Obr.9.



Obr. 9 Modul časově rozlišené anizotropie s reziduální analýzou a parametrem $\chi^2=0,91$. [15]

4.3.2 Ověřovací experiment a anizotropní mapování

K analýze dat byl použit operační systém SymPhoTime 64 od firmy PicoQuant. Vyhodnocení dat probíhalo na dvou různých detektorech D3 a D4 (viz. Obr.8). Při daném experimentálním nastavení byl určen G-faktor, který se stanovil na vodný roztok fluoresceinu.

4.3.2.1 *Anizotropní mapování*

Před samotným měřením, byly vzorky pozorovány pomocí transmisního módu optického mikroskopu. Pomocí mikroskopu se pozoroval výskyt a rozložení bakterií ve vzorku. Přístření se provádělo v módu optického fluorescenčního mikroskopu, jehož součástí je externí metalhalidová lampa a sada fluorescenčních filtrů. První ověření měřitelnosti vzorku, se provádí již v konfokálním módu, pomocí detektorů. Provedla se sekvence krátkých skenů, které určily zaměření xyz rovin. Takovýmto rychlým skenem axiálních řezů, se identifikuje výskyt buněk. Na vybranou oblast s bakteriemi se použil jemný sken pro získání výsledných dat. V závislosti na velikosti signálu fluorescence bakterií se nastavuje délka skenování a doba setrvání na jednom pixelu „Dwell time“. Integrační čas pro jeden pixel úzce souvisí s definicí anizotropie, ze které vyplývá že, čím delší integrační byl použit, tím lepší výsledky získáváme. Při překročení délky integračního času, dochází k fotovybělení vzorku. Vyhodnocovací systém doporučuje minimálně 25 cnts·s⁻¹. Kritérium vhodnosti obrázku pro vyhodnocení je, aby z obou detektorů přišlo na každé místo alespoň 100 cnts·s⁻¹.

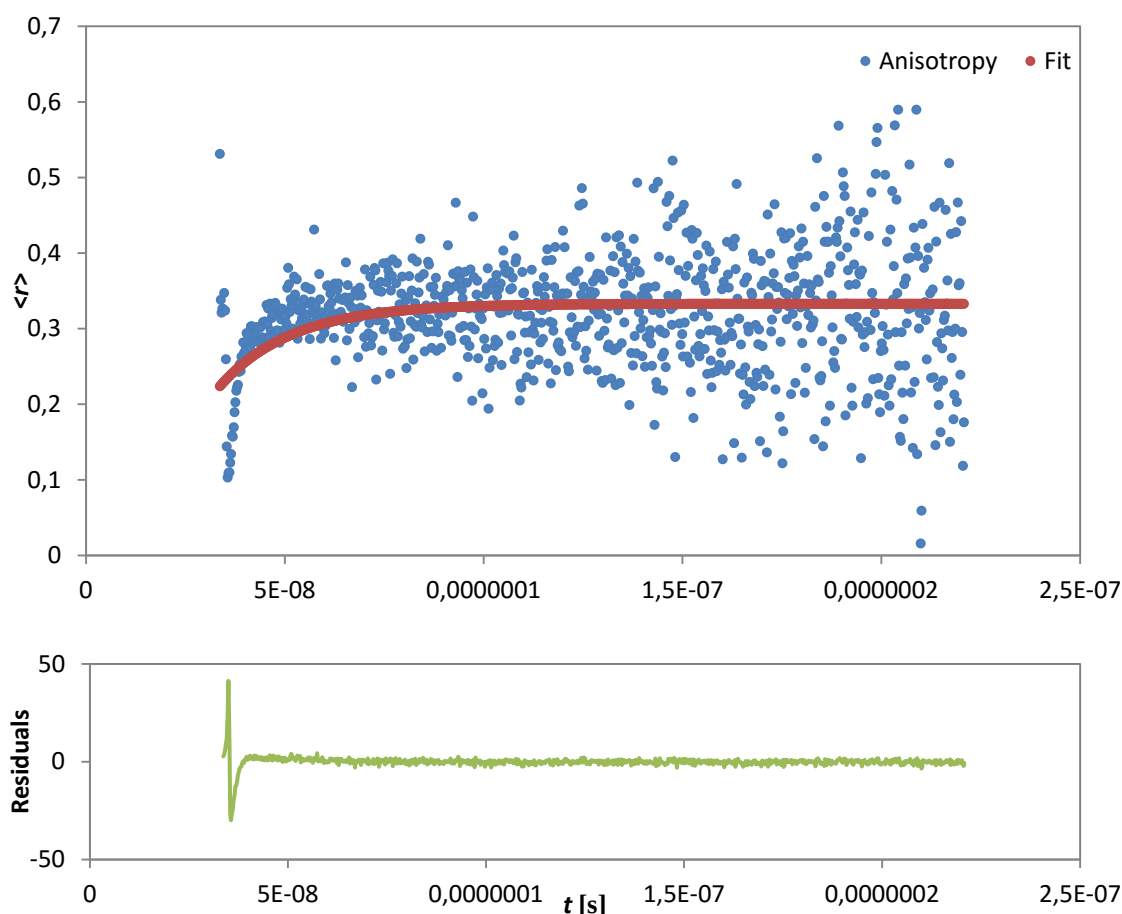
Takto získaná data byla vyhodnocena pomocí skriptu Anisotropy Imaging, který je součástí operačního systému PicoQuant. V případě kdy je intenzita velmi nízká to znamená, že průměrná hodnota je nižší než 100 cnts·s⁻¹, existuje algoritmus označovaný jako „Binning“. Pomocí tohoto algoritmu, který průměruje sousední pixely, se snižuje rozlišení obrázku, ale získávají se vyšší intenzity. Takto získaná data jsou zobrazeny jako barevně škálované snímky s histogramy, ze kterých se dá následně získat střední hodnota anizotropie.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Časově rozlišená anizotropie

5.1.1 Experimentální měření BCECF_AM v buněčné suspenzi

Mezi poklesy s VV a VH orientací polarizátorů, byla získána vyhasínací křivka, z které v rámci analýzy vyšly nehomogenní data. V našem měření měl průběh anizotropie časově rozlišené fluorescence opačný, nesprávný průběh. Hodnota parametru $\chi^2=9,81$ byla větší, než 1 což znamená, že se matematický model neshoduje s naměřenými daty a další vyhodnocení ani měření při takovémto nastavení neměla smysl. Na Obr. 10 je zobrazený jeden z lepších pokusů měření. Hned na první pohled je patrné, že fit naměřených dat má opačný průběh ve srovnání s Obr. 9 (viz Kapitola 4.2.2.2).



Obr. 10 Časově rozlišená anizotropie BCECF v bakteriální suspenzi s reziduální analýzou a parametrem $\chi^2=9,81$.

Měření časově rozlišené anizotropie nebylo pravděpodobně úspěšné v důsledku charakteru vzorku (buněčné suspenze). Problém v získání informací nastal při samotném měření, kdy rozptyl světla vzorku znemožňoval měření. Nařazení buněčného vzorku ještě zvyšovalo intenzitu rozptylu a současně přístroj ztrácel signál, který se nedal nahradit. Takovéto měření, by bylo nutné prodloužit řádově na hodiny, což není reálné řešení. Hlavním problémem je nejspíše samotná lokalizace uvnitř bakterie, která způsobovala rozptyl vzorku. Bakterie se uvnitř roztoku různě pohybovaly, vznášely, sedimentovaly a znemožňovaly tak měření.

Vhodné řešení toho problému, by bylo úplně změnit styl měření, neboť pro daný charakter vzorku, nemá přístroj Fluorocube dostatečně silný excitační zdroj.

5.2 Ustálená (steady-state) anizotropie

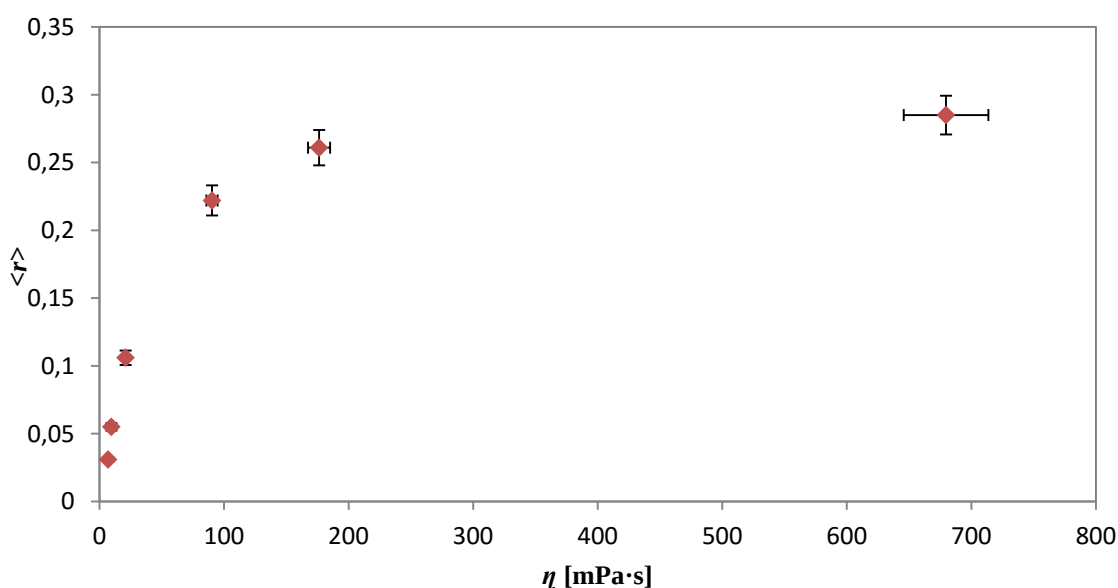
5.2.1 Koncentrační řada pro ověřovací experiment

Základem ověřovacího experimentu bylo vytvoření koncentrační řady glycerolu ve vodě s přídavkem fluoresceinu. Hodnota G-faktoru pro všechny vzorky koncentrační řady byla nastavena na 1,529. Fluorescenční sonda BCECF_AM je v leukoformě, tudíž by nebylo možné ji použít, protože by v takovémto systému nefluoreskovala. Cílem experimentu nebyla kalibrace jako taková, ale ověření zda bude mít anizotropie očekávanou odezvu v závislosti na viskozitě prostředí při použití mikroskopu. Kvůli možnému vybělení vzorku byly pořizovány skeny v roztoku, ze kterých byly získány střední hodnoty anizotropií. Ve spolupráci s doktorem Jiřím Smilkem, byla provedena reologie vzorků pro stanovení středních hodnot viskozit.

Tab.3 Hodnoty naměřené anizotropie fluoresceinu ve směsi glycerol/voda.

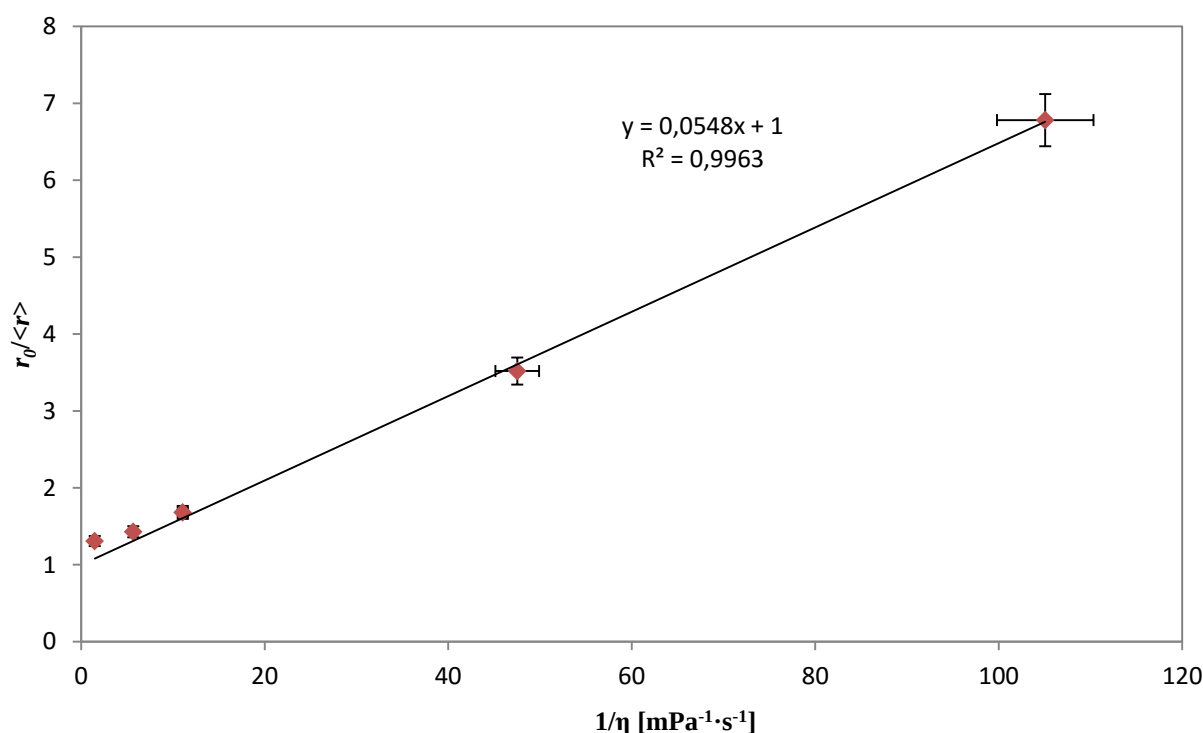
wgly [%]	$\langle r \rangle$	smodch [%]	η [mPa·s]	smodch [%]
98,5	0,285	0,27	679,7	0,9
90,5	0,261	0,29	176,3	1,5
84,5	0,222	0,26	90,3	2,3
70,6	0,106	0,15	21	2,8
59,7	0,055	0,09	9,5	7,6
54,8	0,031	0,06	6,9	11,2

Pomocí toho experimentu byla zjištěna závislost anizotropie na viskozitě. Jak lze na Obr. 1 vidět, závislost anizotropie ustálené fluorescence fluoresceinu na viskozitě prostředí stoupá. Při vhodné aproximaci dat a opakování experimentu minimálně v 10-ti opakování, by byly možné tyto výsledky použít jako kalibrační křivka.



Obr. 11 Závislost anizotropie fluoresceinu na viskozitě homogenního prostředí glycerol/voda.

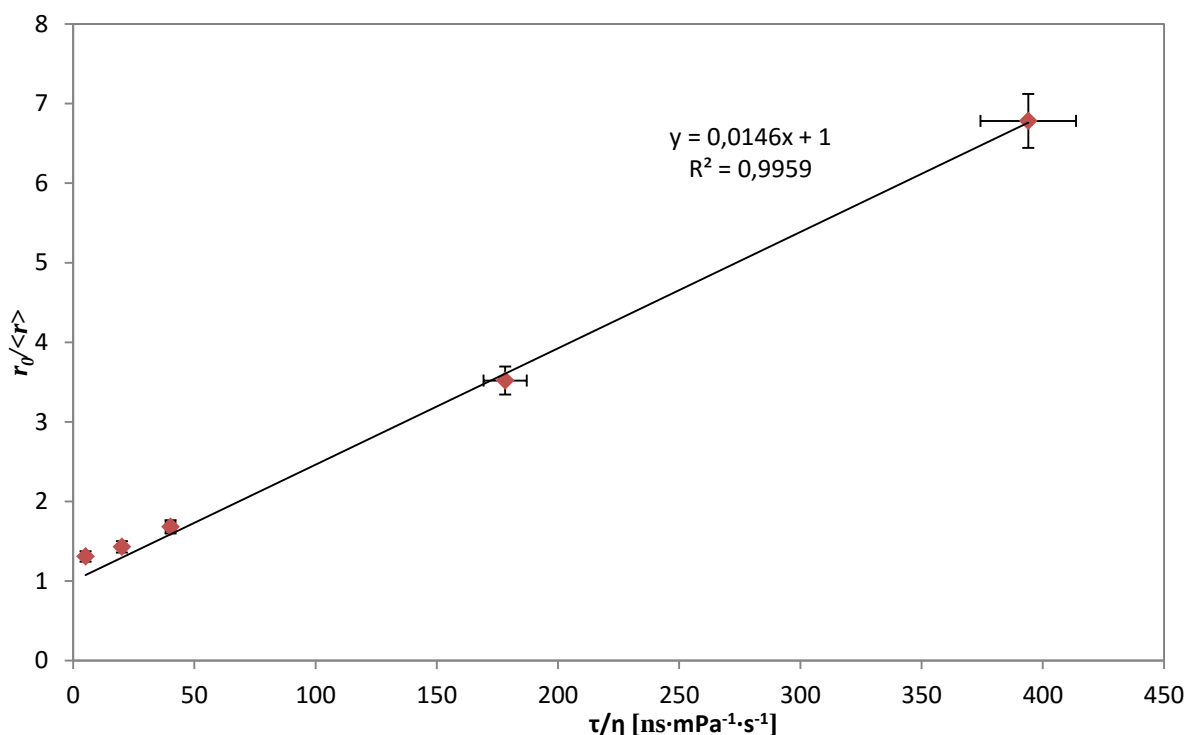
Pro samotné ověření správnosti stanovení anizotropie pomocí mikroskopu, byla použita Perrinova rovnice (viz. Rovnice č.5). Při vynesení funkce závislosti $\frac{r_0}{\langle r \rangle}$ na $\frac{1}{\eta}$ do grafu, byla získána téměř lineární závislost a ze směrnice této závislosti lze získat doby života. Hodnota fundamentální anizotropie fluoresceinu je $r_0 = (0,373 \pm 0,002)$ [2]. Odchyly lze pozorovat pouze v nejvíc zředěném prostředí a nelze očekávat, že korelační koeficient vyjde rovný jedné. Odchyly mohou být způsobené lokálním přehřátím laserovým paprskem (k potlačení tohoto efektu bylo využito skenování vzorku), nebo rozdílem mezi makro/mikro viskozitou v systému. Ověření anizotropie z Perrinovy rovnice, lze považovat za správné.



Obr. 12 Závislost poměru fundamentální a ustálené anizotropie na převrácené hodnotě viskozity.

5.2.1.1 Stanovení molárního hydrodynamického objemu

Perrinova rovnice v daném rozsahu viskozit odpovídá a po upravení závislosti v předchozím grafu viz. Obr.12 získáváme funkci $\frac{r_0}{\langle r \rangle}$ na $\frac{\tau_\eta}{\eta}$. Směrnici této funkce je $\frac{RT}{V_m}$, kde R je molární plynová konstanta, T je teplota a V_m je molární hydrodynamický objem. Z takto upravené závislosti a po upravení neznámých v Perrinově rovnici, kdy místo rotačního korelačního času dosadíme rotační difúzní koeficient, můžeme vypočítat molární hydrodynamický objem (Kapitola 2.2.1.4). Po dosazení do vztahu a vynásobení hodnoty získané ze směrnice závislosti Avogadrovým číslem, získáme hodnotu molární hydrodynamického objemu jedné molekuly.



Obr. 13 Závislost poměru fundamentální a ustálené anizotropie na poměru τ/η .

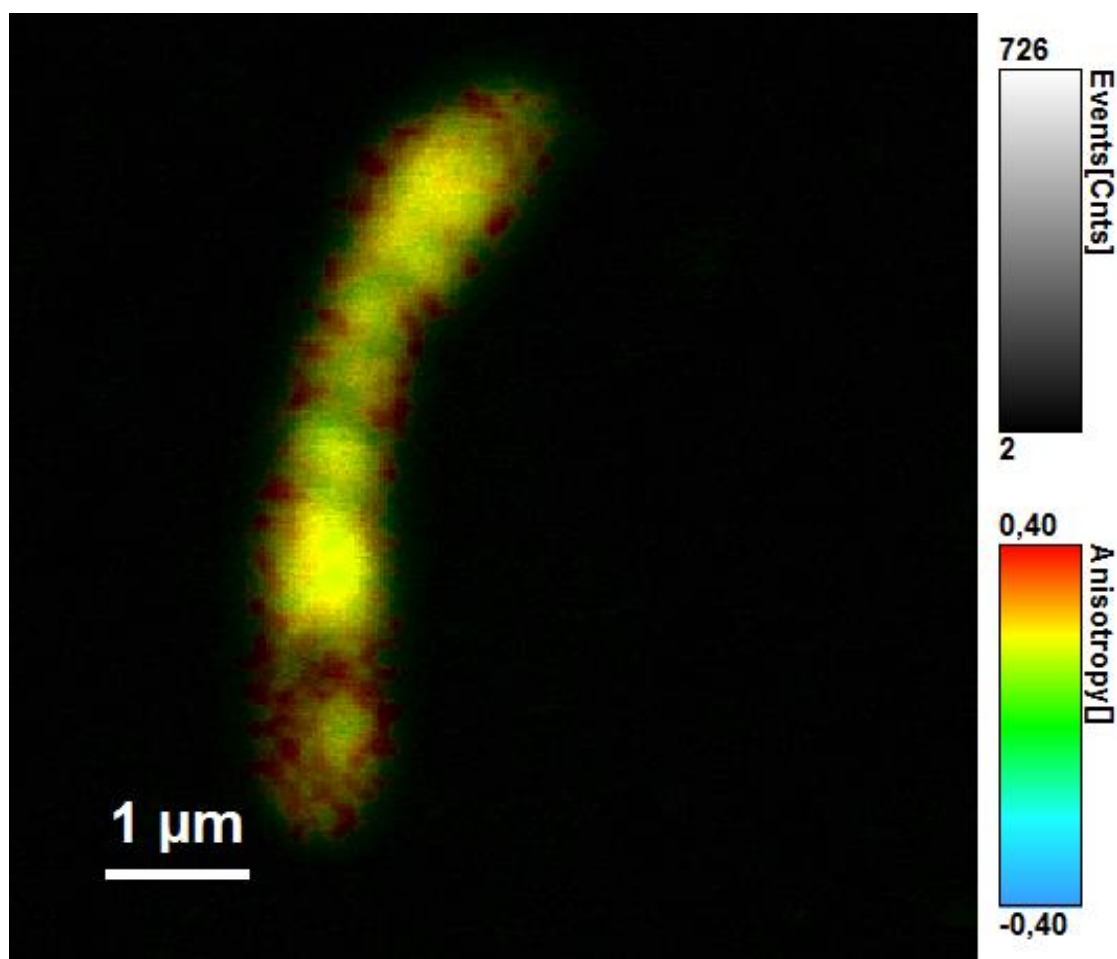
Molární hydrodynamický objem jedné molekuly z ověřovacího experimentu odpovídal $V_m = 0,225 \text{ nm}^3$. Takto zjištěný hydrodynamický objem může odpovídat reálné hodnotě jedné molekuly fluoresceinu. Korelační koeficient $R^2 = 0,9959$ se za daných podmínek dá považovat za velmi dobrou hodnotu a odpovídající trend je téměř lineární. Drobná odchylka je způsobena kvůli měření bez korekčních faktorů mikroskopu l_1 a l_2 , které je velmi obtížné stanovit.

5.2.2 Anizotropní mapování

Pomocí analýzy Anisotropy Imaging bylo možné sledovat zastoupení jednotlivých hodnot anizotropií v bakteriích. Hodnota G-faktoru byla ve všech měřeních nastavena na 2,760. Samotná interpretace obrázků velmi záleží na výsledné úpravě ve vyhodnocovacím skriptu. V případě nehomogenity vzorku, lze použít Dwell time jako finální úpravu.

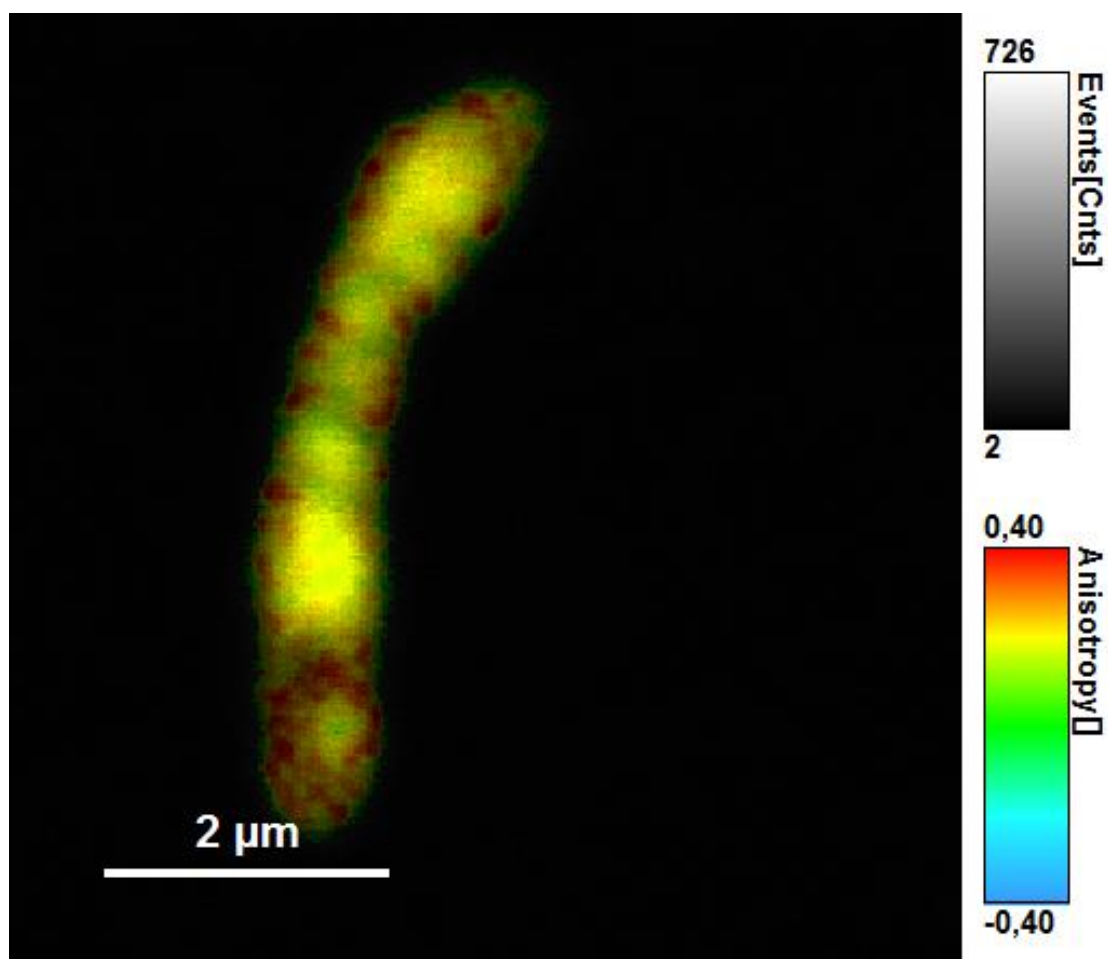
5.2.2.1 Anizotropní snímky *Cupriavidus necator* H16

Široká distribuce anizotropie u bakterií *CN H16* vykazuje neuniformitu systému, bakterie obsahují několik regionů s různou anizotropií. Na následujících třech obrázcích stejné bakterie budeme demonstrovat finální interpretaci prahování systému, pomocí úpravy jednotlivých fotonů. Úpravy Dwell time nemění obrázku, pouze čistí pozadí od šumu a výsledná statistika je ve správně zvoleném počtu fotonů mnohem lepší.



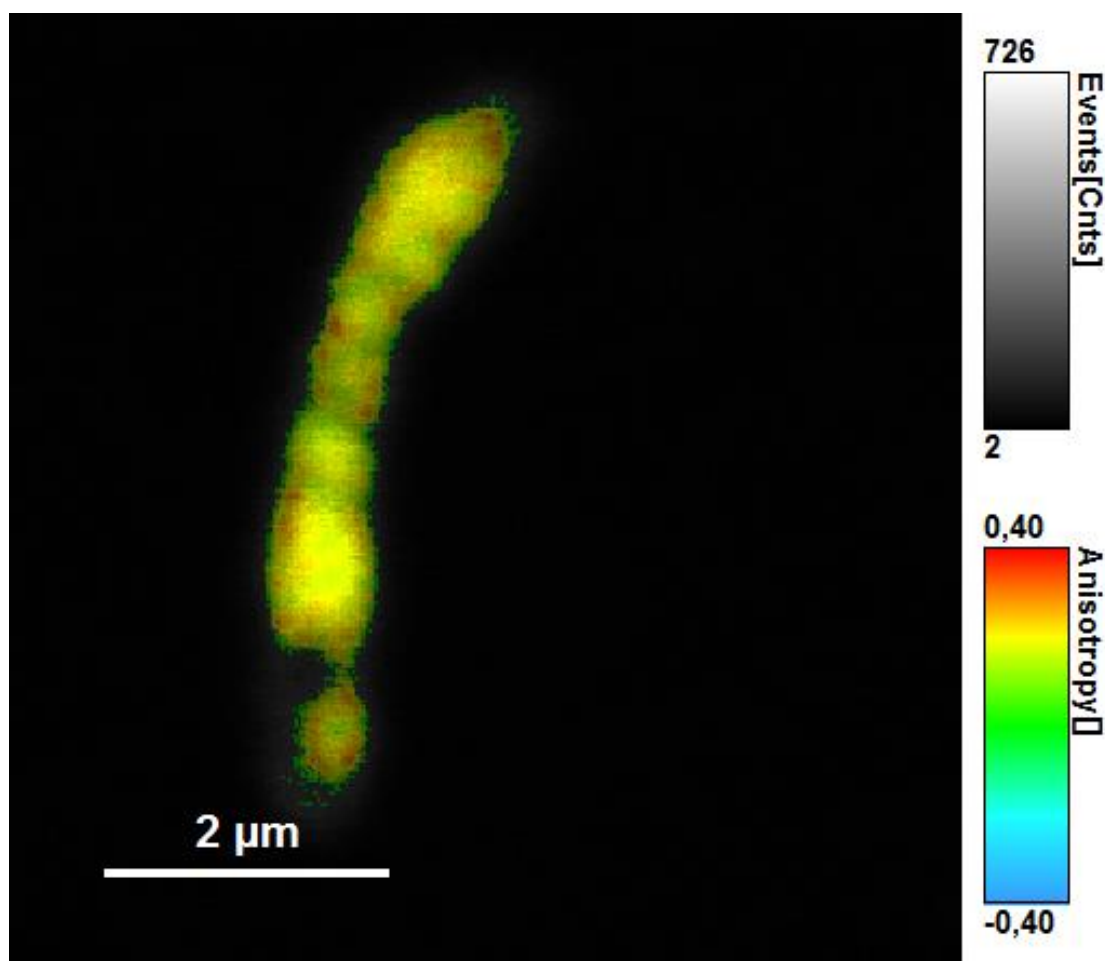
Obr. 14 Anizotropní snímek bakterie H16_1

Jak je vidět ze snímku, hodnoty blíží se limitní hodnotě anizotropie, se vyskytují na okrajích a kolem granulí bakterie. Hlavní rozložení barviva je nejspíše uvnitř granulí bakterie. Tento fakt může být způsoben buď vyšší afinitou sondy ke granulím, nebo zvýšenou hydrolytickou aktivitou sondy v těchto místech. Na Obr. 14 lze vidět první úprava snímku bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byl použit Dwell time 50 cnts·s⁻¹. Střední hodnota anizotropie takovéto interpretace je $r_3 = (0,1462 \pm 0,0073)$.



Obr. 15 Anizotropní snímek bakterie H16_2

Na Obr. 15 lze vidět druhá úprava snímku bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byl použit Dwell time 100 cnts·s⁻¹. Střední hodnota anizotropie takovéto interpretace je $r_2 = (0,2057 \pm 0,0105)$. Ve srovnání s předchozím snímkem (Obr 15.), lze pozorovat lépe viditelnou oblast se střední hodnotou anizotropie. Pro vyhodnocení je tedy lepší vyšší počet fotonů než je 50 cnts·s⁻¹.



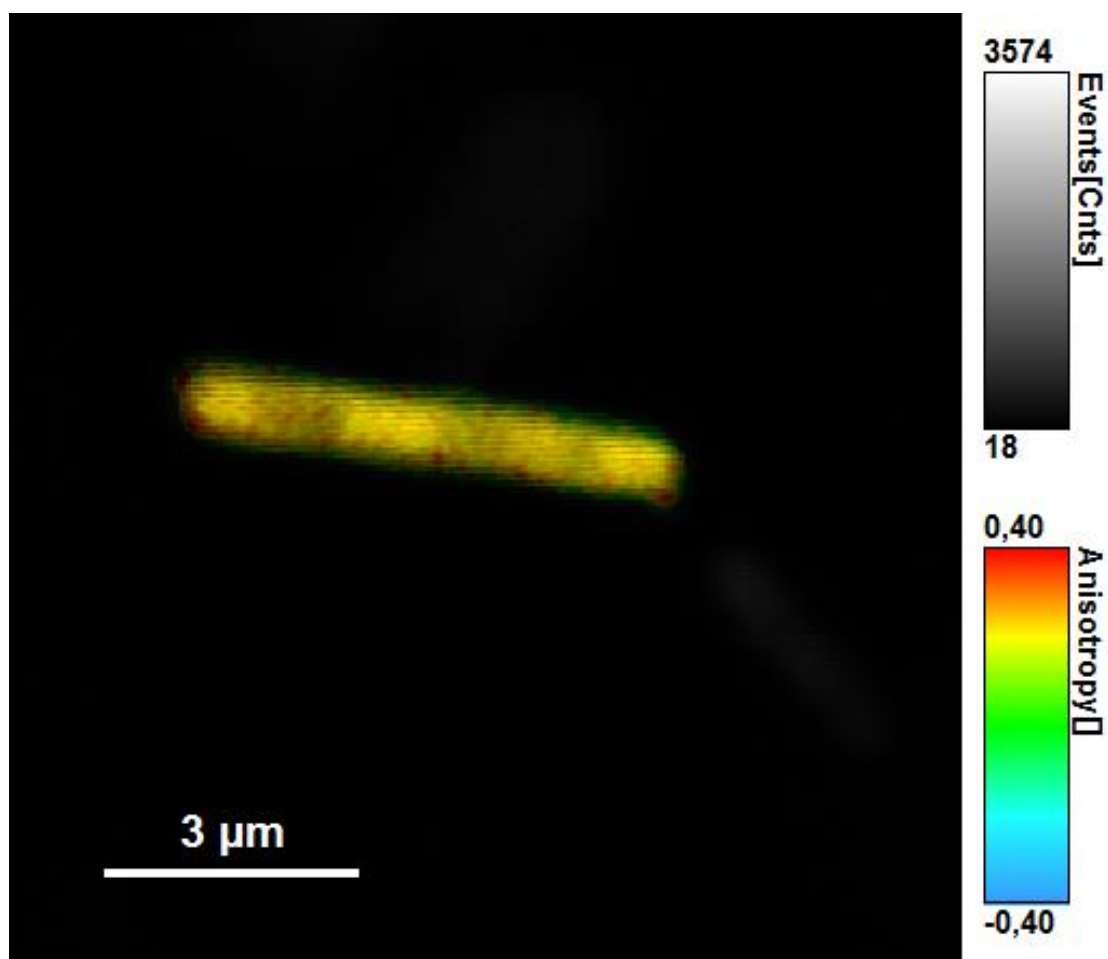
Obr. 16 Anizotropní snímek bakterie H16_3

Na Obr. 16 lze vidět druhá úprava snímku bakterie *Cupriavidus necator* H16, kde byl použit Dwell time 250 cnts·s⁻¹. Střední hodnota anizotropie takovéto interpretace je $r_3 = (0,1996 \pm 0,0098)$.

Při zvolení špatné úrovně prahování, nebudou zobrazeny celé bakterie, a proto se musí postupovat s obezřetností tak, aby byla zvolena správná hodnota počtu fotonů. Jako ukázka nevhodné interpretace, která zkresluje informace je Obr.16, který přichází o část spodní oblasti buňky. Pokud bychom zvolili vyšší hranici, přicházeli bychom tak částečně o nejvyšší hodnoty anizotropií. Při zvolení nižší hranice bychom nemuseli dostat zcela přesná data, kvůli vysokému zastoupení vysokých hodnot anizotropií značených červeně způsobující šum systému. Jako nejvhodnější úpravu byl zvolen Dwell time 100 cnts·s⁻¹, který je nejvhodnější možností hranice mezi 50 cnts·s⁻¹ a 250 cnts·s⁻¹.

5.2.2.2 Anizotropní snímky *Cupriavidus necator* PHB⁻4

Bakterie kmene *Cupriavidus necator* s označením PHB⁻4 je mutant bakterií H16, který nevytváří granule s obsahem PHB. Homogenní systém pak vykazuje regiony se stejnou anizotropií. Logický předpoklad, který vysvětluje úzkou distribuci anizotropie u PHB⁻4 je homogenní systém uvnitř buňky. Nejspíše vnitřní přítomnost granul vytváří jinak viskozitní prostředí. Z pohledu anizotropie je tato bakterie více jednolitá a uniformní než bakterie H16.



Obr. 17 Anizotropní snímek bakterie PHB

Na Obr. 17 lze vidět snímek bakterie *Cupriavidus necator* PHB⁻⁴, kde byl použit Dwell time 25 cnts·s⁻¹. Střední hodnota anizotropie takovéto interpretace je $r = (0,2137 \pm 0,0107)$.

Na základě Anisotropy imaging analýzy byly zjištěny podobné hodnoty střední anizotropie jako u bakterií H16, což byl očekávaný fakt. Stejně jako v případě bakterií H16 byl upraven počet fotonů pro vyhodnocení, kdy optimální hodnota byla 25 cnts·s⁻¹.

6. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala použitím různých anizotropních technik ve studiu bakteriální cytoplazmy. Na základě zadání bakalářské práce byla zpracována literární rešerše na téma měření anizotropie fluorescence uvnitř buněk s přihlédnutím k využití fluorogenních fluorescenčních sond. Navrženou fluorescenční sondou vhodnou pro studium anizotropie v buněčných systémech, byl Fluorescein disodný a jeho derivát BCECF_AM. S vybranými fluorescenčními sondami bylo provedeno měření a následné zhodnocení naměřených výsledků.

Použití časově-rozlišené anizotropie fluorescence v buněčné suspenzi nebylo úspěšné. Největší problém byl v získání informací, kdy rozptyl světla vzorku znemožňoval měření. Hlavním důvodem byl nejspíše charakter vzorku a příslušné nedostatečné excitační zdroje. Ředění buněčného vzorku ještě zvyšovalo intenzitu rozptylu a současně přístroj ztrácel signál, který se nedal nahradit. Tato metoda byla vyhodnocena jako nepoužitelná pro tyto účely.

Nejvhodnější stanovení anizotropie v buněčném vzorku, bylo stanovení pomocí ustálené anizotropie. Jako první byl proveden ověřovací experiment pomocí koncentrační řady glycerol/voda s přídavkem fluoresceinu. Experiment sloužil jako informace, jestli bude mít anizotropie očekávanou odezvu v závislosti na viskozitě prostředí při použití mikroskopu. Ověření anizotropie pomocí Perrinovy rovnice lze považovat za správné. Ze závislosti, sestavené pomocí Perrinovy rovnice (Kapitola 5.2.1.1), byl zjištěn molární hydrodynamický objem jedné molekuly $V_m = 0,225 \text{ nm}^3$, který by nejspíše mohl odpovídat reálné hodnotě jedné molekuly fluoresceinu.

Pro fluorescenční anizotropní mikroskopii byla vybrána metoda ustálené anizotropie fluorescence. Pomocí fluorescenční sondy BCECF_AM byly obarveny bakterie a bylo zjištěno, že v bakteriích kmene *Cupriavidus necator* H16 se anizotropie fluoroforu pohybovala v rozmezí $r = (0,1838 \pm 0,0092)$ a to výhradně v blízkosti granulí obsahujících PHB. Fluorogenní substrát, má nejspíše v těchto místech zvýšenou hydrolytickou aktivitu. V bakteriích mutanta kmene *Cupriavidus necator* PHB⁻4, je střední hodnota anizotropie $r = (0,2137 \pm 0,0107)$. Na první pohled jasně patrné rozdíly mezi CN H16 a CN PHB⁻4 je uniformita vnitřního prostředí, kdy bakterie CN PHB⁻4 vykazují více homogenní systém.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [2] VALEUR, Bernard. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. Weinheim: Wiley-VCH, 22 s. ISBN 35-272-9919-X.
- [3] KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 82 s. ISBN 80-863-6907-2
- [4] FIŠAR, Zdeněk. Principy fluorescenční spektroskopie. [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/principy.htm>
- [5] FIŠAR, Zdeněk. 2004. Fluorofory v biomedicíně [online]. [cit. 2015-12-30]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/soubory/fluorofory.htm>
- [6] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jörg ENDERLEIN. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles. Weinheim: WileyVCH, 2011, ix, 281 s. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [7] BRÁNSKÁ B., L. LINHOVÁ, P. PATÁKOVÁ, L. PAULOVÁ a K. MELZUCH. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. Chem. Listy 105, 586-593 (2011). ISSN 0009-2770, IF 0,620 [online]. [cit. 2016-01-02]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf
- [8] HAUGLAND, by Richard P. 2002. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 9. ed. Eugene, Or. [u.a.]: Molecular Probes, Inc, XXVI, Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook.html>
- [9] SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jörg ENDERLEIN. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles. Weinheim: WileyVCH, 2011, ix, 281 s. ISBN 978-3-527-31669-4.
- [10] UCEKAJOVÁ, Petra. Technika anisotropie a časově rozlišené anisotropie ve výzkumu koloidních systémů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 83 s. Vedoucí dizertační práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [11] TRAUTMANN Susanne, Volker BUSCHMANN, Sandra ORTHAUS, Felix KOBERLING, Uwe ORTMANN a Rainer ERDMANN. "Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview" PicoQuant GmbH, 2013 [online]. [cit. 2016-2-7]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/applications/category/life-science/fluorescence-lifetime-imaging-flim>
- [12] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. Praha: Chem. Listy, 2009, (103): 125-129. 2013 [online]. [cit. 2016-2-7]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [13] YAO L., J. SEGALA, A.J. BUCCI, G.O. ANDREEY, Y.K. RESHETNYAK, a O.A. ANDREEY, "Fluorescence anistropy imaging microscopy," Microscopy: Science,

Technology, Applications and Education, Formatex Research Center, 3, pp. 2072-8, 2010.

- [14] SCHAFFER J., A. VOLKMER, C. EGGELING, V. SUBRAMANIAM, G. STRIKER a C. A. M. SEIDEL. "Identification of Single Molecules in Aqueous Solution by Time-Resolved Fluorescence Anisotropy". American Chemical Society Vol. 103, č. 3, 1999 [online]. [cit. 2016-2-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp9833597>
- [15] SUHLING, Klaus, Jan SIEGEL, Peter M. P. LANIGAN, Sandrine LÉVÊQUE-FORT, Stephen E. D. WEBB, David PHILLIPS, Daniel M. DAVIS a Paul M. W. FRENCH. "Time-resolved fluorescence anisotropy imaging applied to live cells." Optics Letters. 2004, roč. 29, č. 6, 584 s. ISSN 0146-9592. DOI: 10.1364/OL.29.000584.
- [16] CLAYTON Andrew H.A., Quentin S. HANLEY, Donna J. ARNDT-JOVIN , Vinod SUBRAMANIAM a Thomas JOVIN. "Dynamic Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy in the Frequency Domain (rFLIM). " *Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, D-37077 Göttingen, Germany*, 2002.[online]. [cit. 2016-2-7]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349502739325>
- [17] DIX A. James a A. S. VERKMAN. " Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging. Application to cytoplasmic viscosity. " *Departments of Medicine and Physiology, Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco*. Biophysical Journal. 1990, Vol. 57, 240 s. [online].[cit. 2016-3-12]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1280665/pdf/biophysj00131-0058.pdf>
- [18] ALVAREZ-LEEFMANS Francisco J., José J. HERRERA-PERÉZ, M. S. MÁRQUEZ a V. M. BLANCO."Simultaneous Measurement of Water Volume and pH in Single Cells Using BCECF and Fluorescence Imaging Microscopy *Department of Pharmacology and Toxicology, Wright State University* 2005, [online]. [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1529/biophysj.105.069450. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349506722391>
- [19] NAKABAYASHI Takakazu, Hui-Pink WANG, K. TSUJIMOTO, S. MIYAUCHI, N. KAMO a N. OHTA. "A correlation between pH and Fluorescence Lifetime of 2',7'-Bis(2-Carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF) In Vivo and In Vitro." *Chemistry Letters* ,Vol. 36, č.2, 2007. DOI: 10.1246/cl.2007.206
- [20] LIANG Earvin, Puchun LIU a Steven DINH. " Use of a pH-sensitive fluorescent probe for measuring intracellular pH of Caco-2 cells." *International Journal of Pharmaceutics* . Vol. 338(1-2), 104-109 s., 2007, ISSN 03785173. [online]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.048 [cit. 2016-05-02]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517307000889>
- [21] LIIMATTA E., Anu M KANTOLS, I. E. HASSINEN. "Dual probe fluorescence monitoring of intracellular free calcium during ischemia in mouse heart by using continuous compensation for pH dependence of the dissociation constant of Fura-2, and the interference of myoglobin"*Journal of Biochemical and Biophysical*

Methods, Vol. 70, 547-554 s., 2007 DOI: 10.1016/j.jbbm.2007.01.006 [online]. [cit. 2016-05-02]. Dostupné z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165022X07000073>

- [22] HILLE C., Mattes LAHN a Carsten DOSCHE. "Two-photon Fluorescence Lifetime Imaging(2P-FLIM) for ion sensing in living cells." *Aplication note* , PicoQuant, GmbH, 2008 [online]. [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7269/appnote_twophotonexcitation.pdf

- [23] FUTSAETHER, C. M., B. KJELDSTAD a A. JOHNSON. " Measurement of the intracellular pH of *Propionibacterium acnes*: comparison between the fluorescent probe BCECF and ³¹ P-NMR spectroscopy." *Canadian Journal of Microbiology*, Vol.39, 180-186 s., 1993, ISSN 0008-4166. [online]. [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1139/m93-025. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m93-025>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BCECF_AM	2',7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
PBS	fosfátový pufr s obsahem 0,15 M NaCl (Phosphate Buffered Saline)
FLIM	fluorescence-lifetime imaging microscopy
2P-FLIM	two-photon fluorescence-lifetime imaging microscopy
pHi	intracelulární pH
Cnts	counts (počet fotonů prošlých jednotkovým objemem za jednotku času)
CN H16	bakterie <i>Cupriavidus necator H16</i>
CN PHB	bakterie <i>Cupriavidus necator PHB</i>

I	intenzita fluorescence
I_0	intenzita fluorescence v čase $t = 0$
τ	doba života fluoroforu
θ	rotační korelační čas
η	viskozita
r	anizotropie
r_0	fundamentální anizotropie
λ	vlnová délka
M	$\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$