

16. Spektroskopie jednotlivých molekul

Proč sledovat jednotlivé molekuly ?



Pozorování celého souboru

1) bez časového rozlišení

spektrální měření - máme 3 druhy objektů
(zelený, žlutý, oranžový) v molárním poměru
5:5:1

hmotnostní měření - poměr hmotností zhruba
1:1:0,01



měření polohy

- laterální - objekty se pohybují po celé ploše,
větší pravděpodobnost výskytu v okolí košů

-vertikální - větší objekty se nacházejí zhruba 20
cm nad zemí, menší zhruba 100 cm nad zemí

- pohyb všech objektů je navzájem korelován

2) s časovým rozlišením

ve hře jsou přestávky

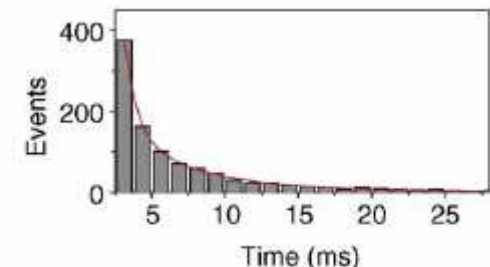
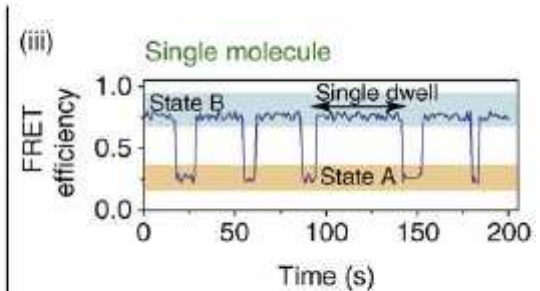
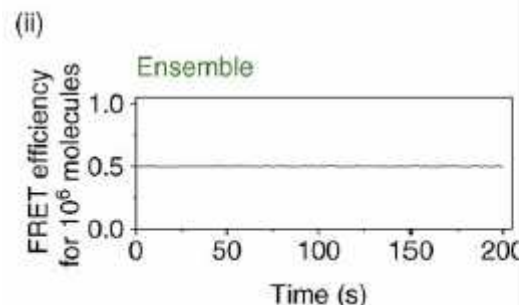
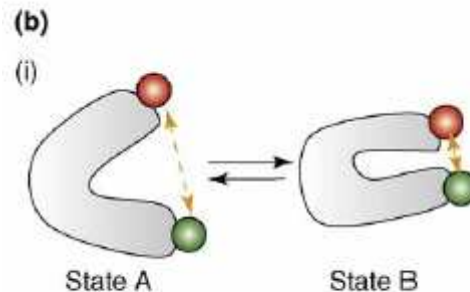
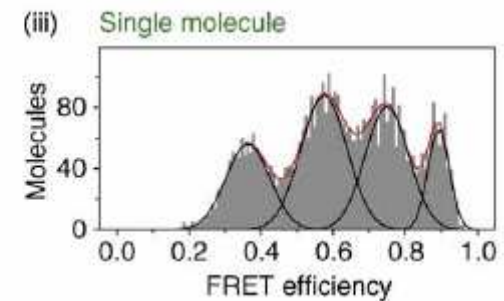
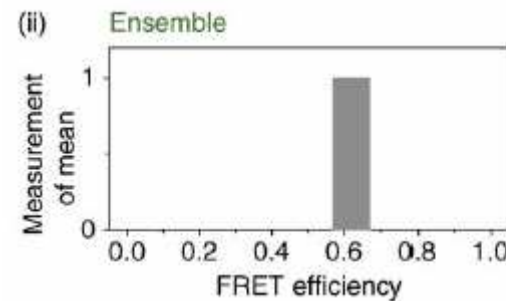
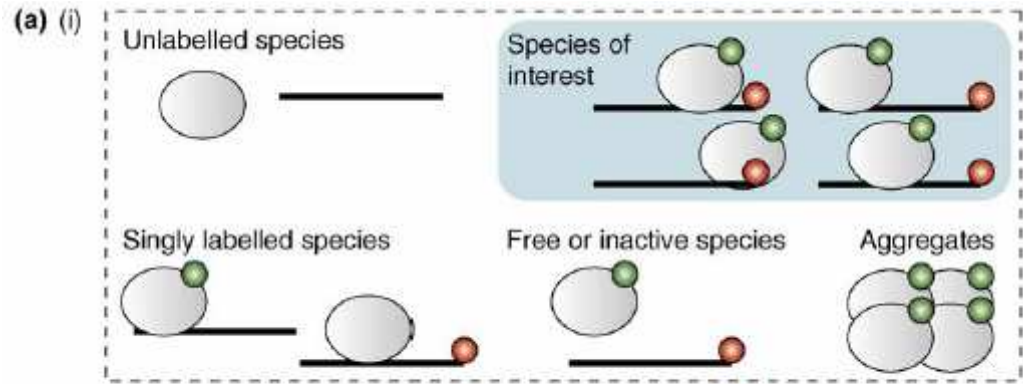
**Sledování jednotlivých objektů může výrazně napomoci
pochopení chování celého systému**

Molekuly

Pozorování jednotlivých molekul odhaluje heterogenity

a) statické
určení frakčního zastoupení jednotlivých stavů

b) dynamické
určení doby života jednotlivých konformací a rovnovážné konstanty

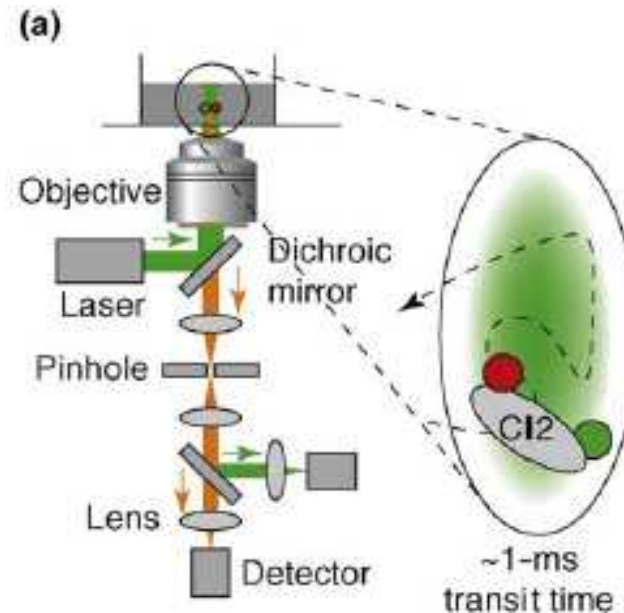


Konfokální mikroskopie

Sledování molekul imobilních i difundujících v roztoku v malém objemovém elementu (~ 1 fl).

A) Mikroskop je stále zaměřen na 1 bod, probíhá skenování v čase, ne v prostoru.

B) Ohnisko se posouvá za migrující částicí (particle tracking), s rozlišením až 1 nm.



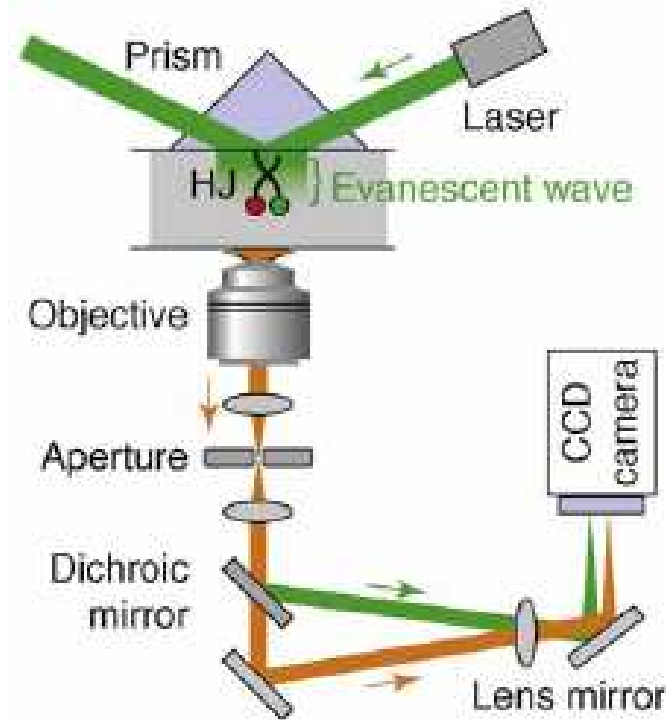
Kapanidis AN., Strick T. (2009) Trends Biochem Sci 34: 234-43

TIRF (total-internal-reflection fluorescence)

Fluorescence je buzená evanescentní vlnou, jejíž intenzita směrem od rozhraní exponenciálně klesá (~100 nm) - velmi citlivé rozlišení pohybů podél osy z.

Metoda používaná převážně pro imobilizované molekuly.

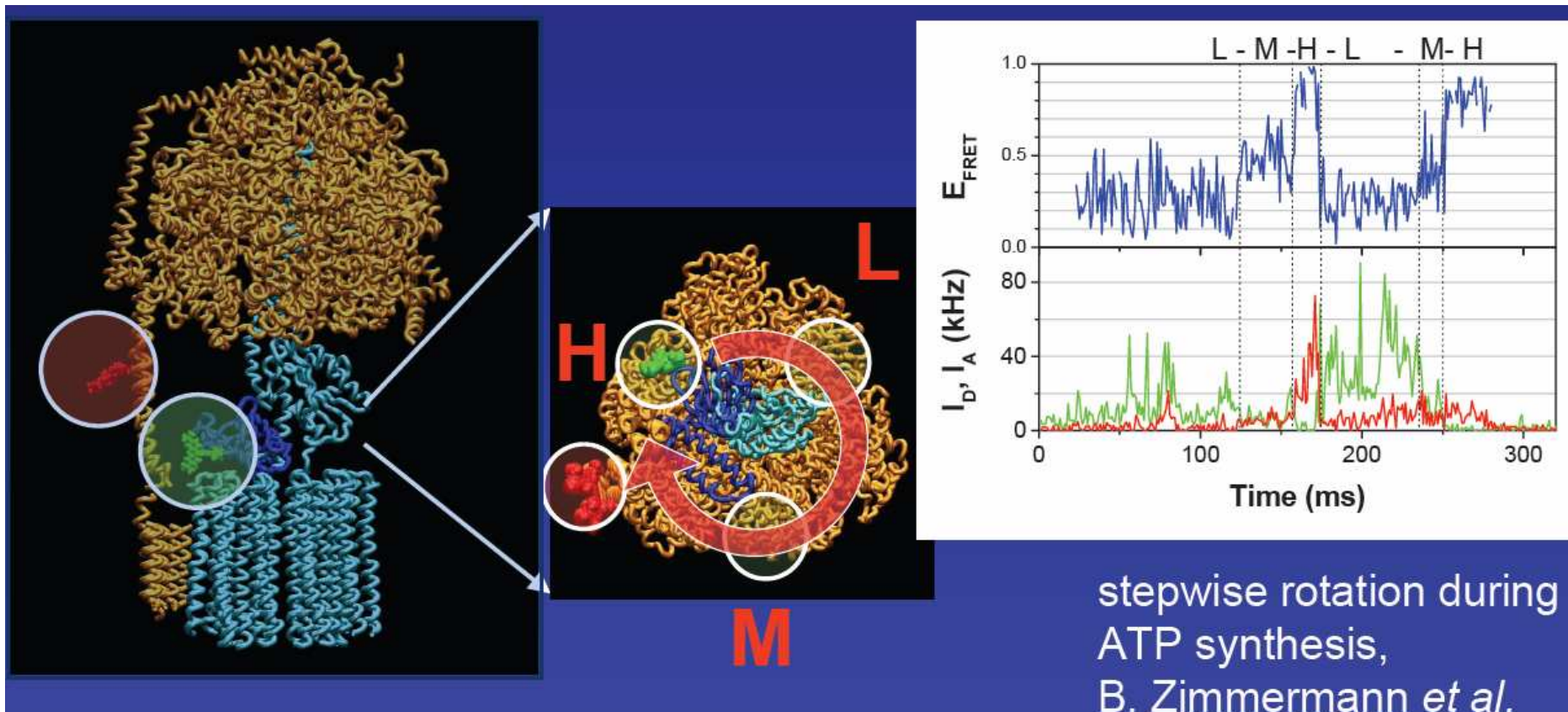
Sledování širší oblasti (wide-field)



Kapanidis AN., Strick T. (2009) Trends Biochem Sci 34: 234-43

Single-molecule FRET

Rotace podjednotky ϵ v F1Fo-ATP syntáze



Srovnání s dalšími metodami

Table 1. Capabilities and applications of the main single-molecule methods in biology

Attributes	Force			Fluorescence		
	AFM	Optical tweezers	Magnetic tweezers	FRET	Fluorescence intensity	Tracking and localization
Temporal resolution ^a	10 ms	10 ms	30 ms	50 ms (TIRF) 1 ms (confocal) ns (populations)	50 ms (TIRF) 1 ms (confocal) ns (populations)	10 ms (TIRF) 1 ms (special probes)
Spatial resolution ^b	5 Å (routine) 1 Å (high end)	1 nm (routine) 1 Å (high end)	10 nm	1–10 nm	1–10 Å	1–10 nm (localization) 50 nm (resolution)
Range of applied forces ^a	10–2000 pN	1–200 pN	0.01–200 pN	None	None	None
Main applications ^b	Force-extension analysis [2] Transition-state analysis [20] Protein and nucleic acid folding and unfolding [2] Membrane protein dynamics [30] Static and/or dynamic structure of large complexes [20,34]	Force-extension analysis [3,28,29] Transition-state analysis [7,28,29] Protein and nucleic acid folding and unfolding [3,28,29] Motion of molecular motors [7]	Force-extension analysis [66] Transition-state analysis [33] Protein and nucleic acid folding and unfolding [66] Molecular interactions involving DNA or RNA [10] DNA topology [35]	Static and/or dynamic structure of small proteins and protein complexes [66,67] Timescales of protein dynamics [68] Timescales of DNA or RNA dynamics [28,69] Molecular interactions involving DNA or RNA [70] Molecular interactions not involving DNA or RNA [71]	Membrane protein dynamics [72] Protein dynamics [73] Reaction kinetics [74] Measuring subunit [19] or binding stoichiometry [75]	Motion of molecular motors [76] Studies in living cells (e.g. diffusion, interactions) [77]

^aNumbers quoted are the 'routine' value for that parameter under typical experimental conditions (AFM on protein chain at ~100 pN [$1 \text{ p} = 10^{-12} \text{ N}$]; optical or magnetic trapping of DNA at ~20 pN). Temporal resolution, spatial resolution, force and tether stiffness are interrelated. As applied force increases, temporal and spatial resolutions improve. At any given force, temporal resolution must be sacrificed to improve spatial resolution, and vice versa. Typically, the 'high end' spatial values are obtained by decreasing temporal resolution to ~1 s.

^bThis table serves as a general guide for a large set of applications and chemistries and, as such, cannot list all of the applications in which the listed single-molecule techniques have been used.

Praktické poznámky

Úspěšné provedení experimentu vyžaduje nejmodernější technologie.

Detekujeme velmi slabé signály, což vyžaduje pečlivou analýzu zašuměných dat.

Potřebujeme nasbírat dostatečně velký soubor dat.

Pozorujeme pohyby na nm škále, což vyžaduje mimořádně stabilní aparaturu, musíme eliminovat vibrace a fluktuace teploty (např. změna teploty o $<1^\circ\text{C}$ již může vyvolat změnu signálu, která může být zaměněná s pohyby sledované molekuly).

Sledování jednotlivých molekul je omezeno počtem fotonů, které fluorofor vyzáří před fotodegradací ($\sim 10^4$ - 10^5 , ne všechny fotony detekujeme).

Některé přístroje jsou velmi složité a jejich správné nastavení může vyžadovat nějaký čas, což je nepříjemné zejména při analýze nestabilních biologických vzorků.

Shrnutí

Sledování chování jednotlivých molekul umožňuje získat detailní informace, které jsou ztraceny při měření velkých souborů částic

Možné zjišťování poměrného zastoupení jednotlivých frakcí, doba života konformačních stavů, rovnovážných konstant, atd.

Konfokální mikroskopie - buďto sledování jednoho bodu v čase, nebo sledování jedné částice (particle tracking)

TIRF - buzení fluorescence evanescentní vlnou umožňuje citlivé sledování pohybů podél osy z

Praktické měření vyžaduje náročnou aparaturu, často problémy s dostatečným počtem detekovaných fotonů