

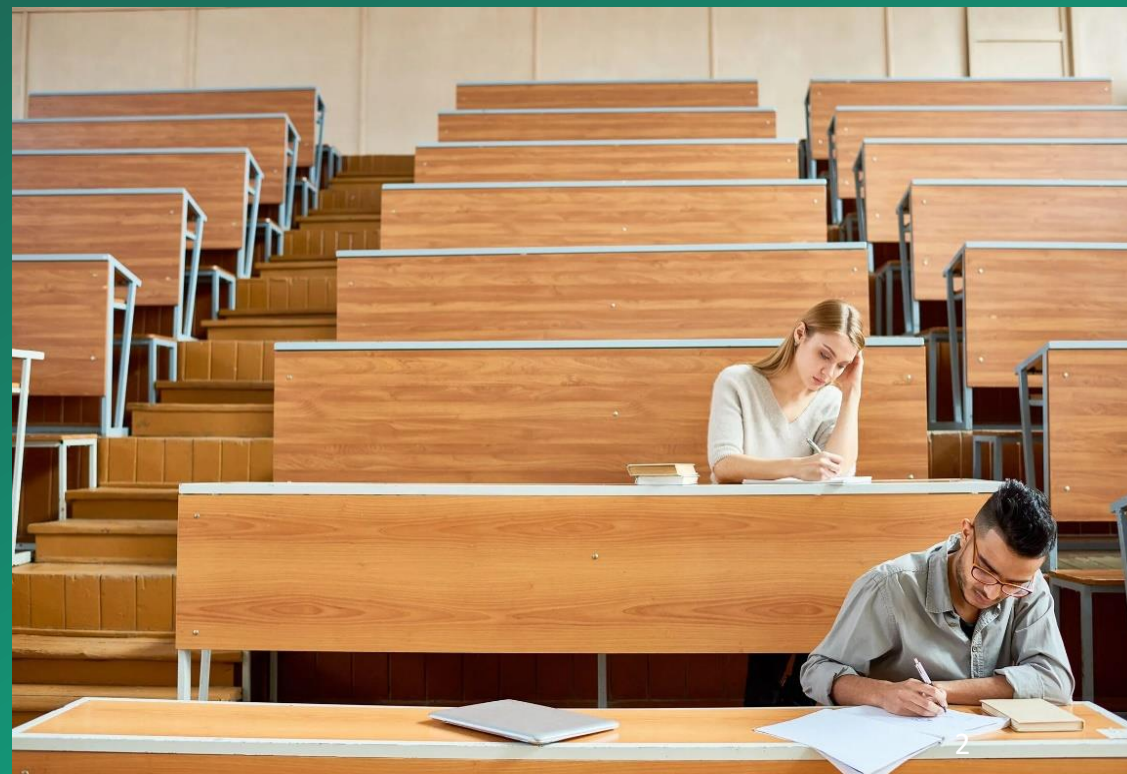
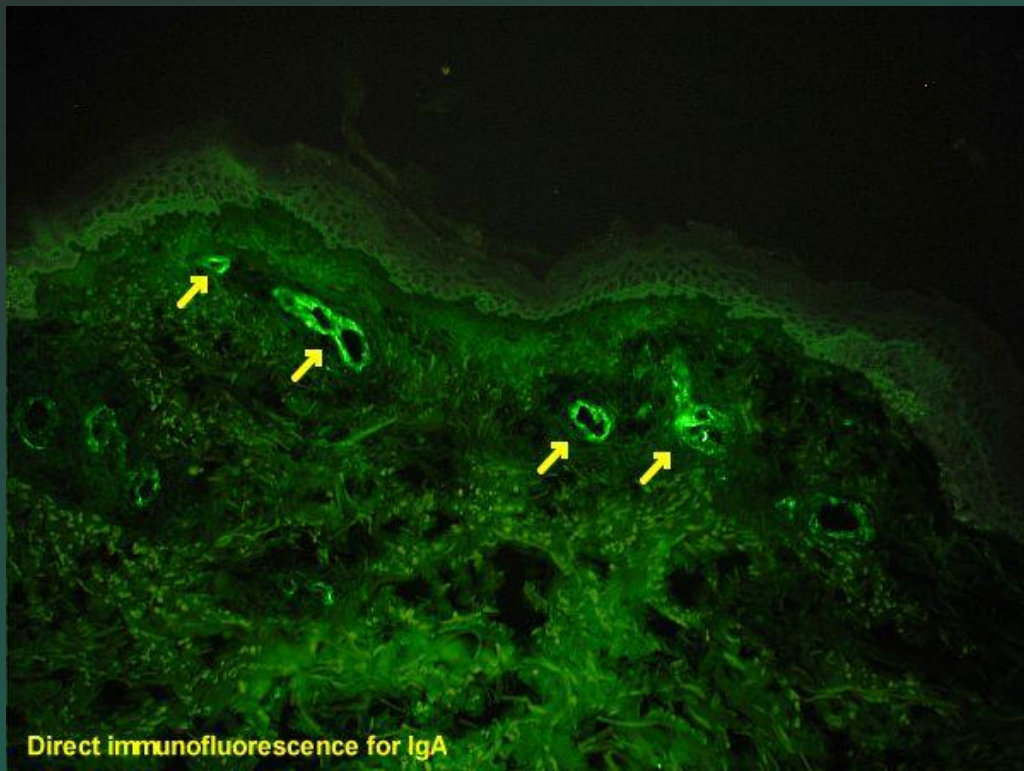


Микроскопия FRET

*Шеметева Мария,
ИСАН*

Москва,
2022

Почему FRET?



Механизм FRET

Впервые эффект был описан Теодором Фёрстером в 1948 году

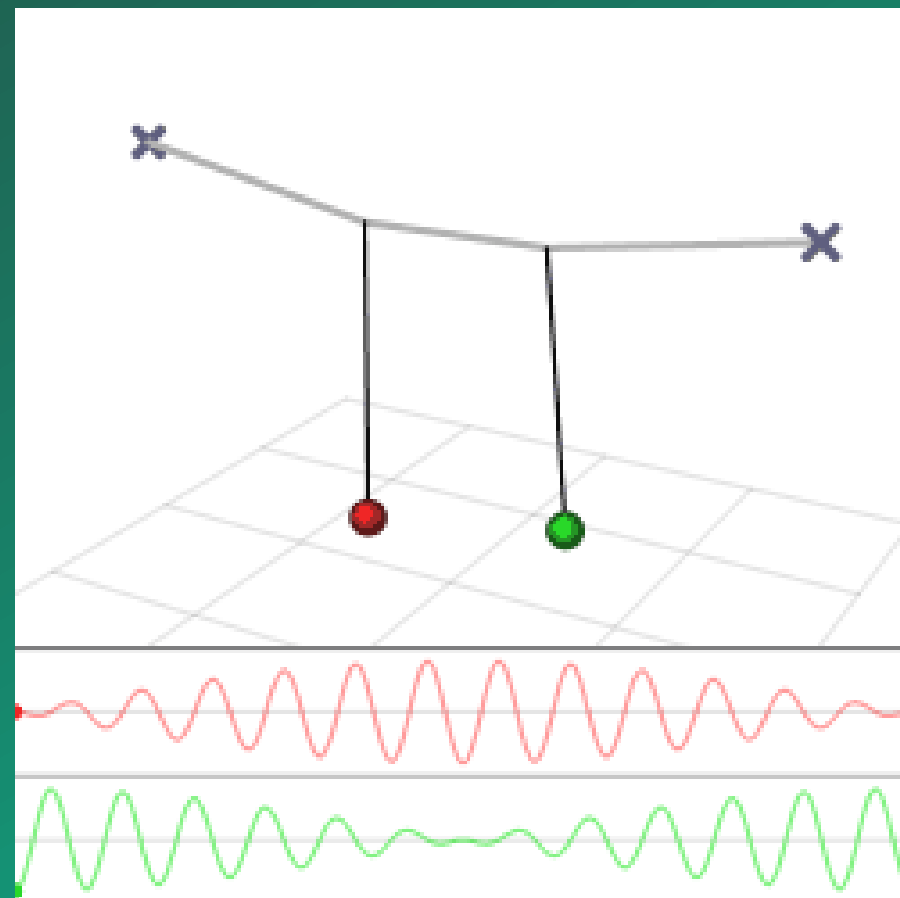
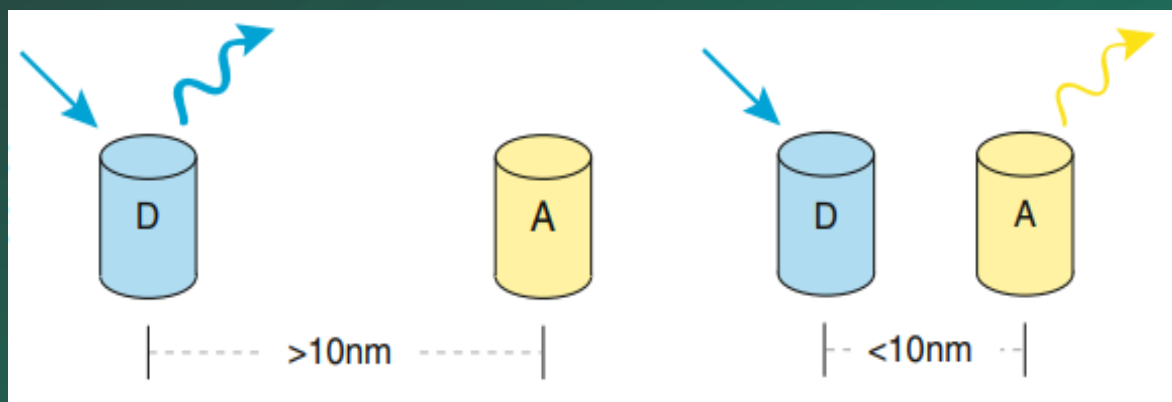
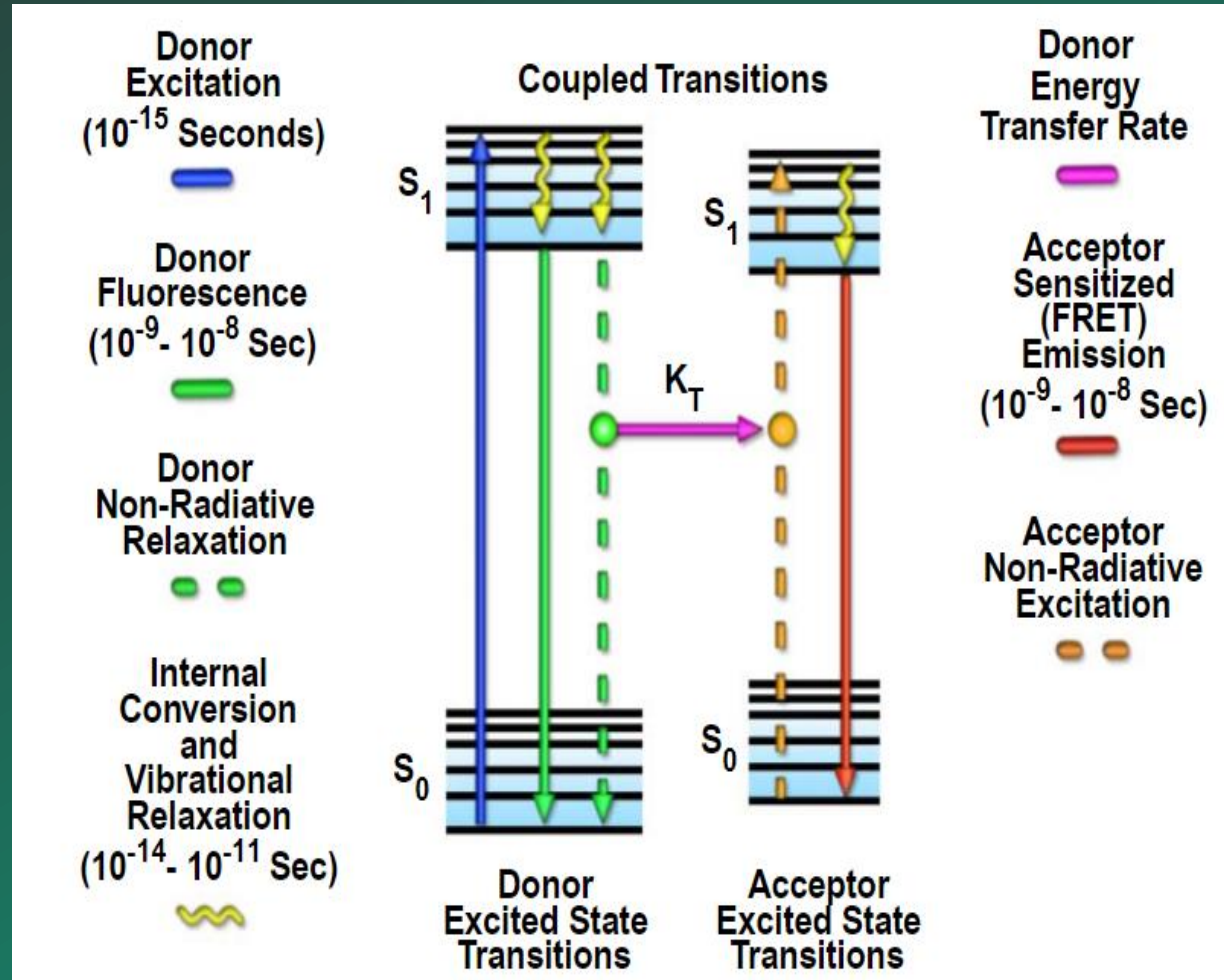


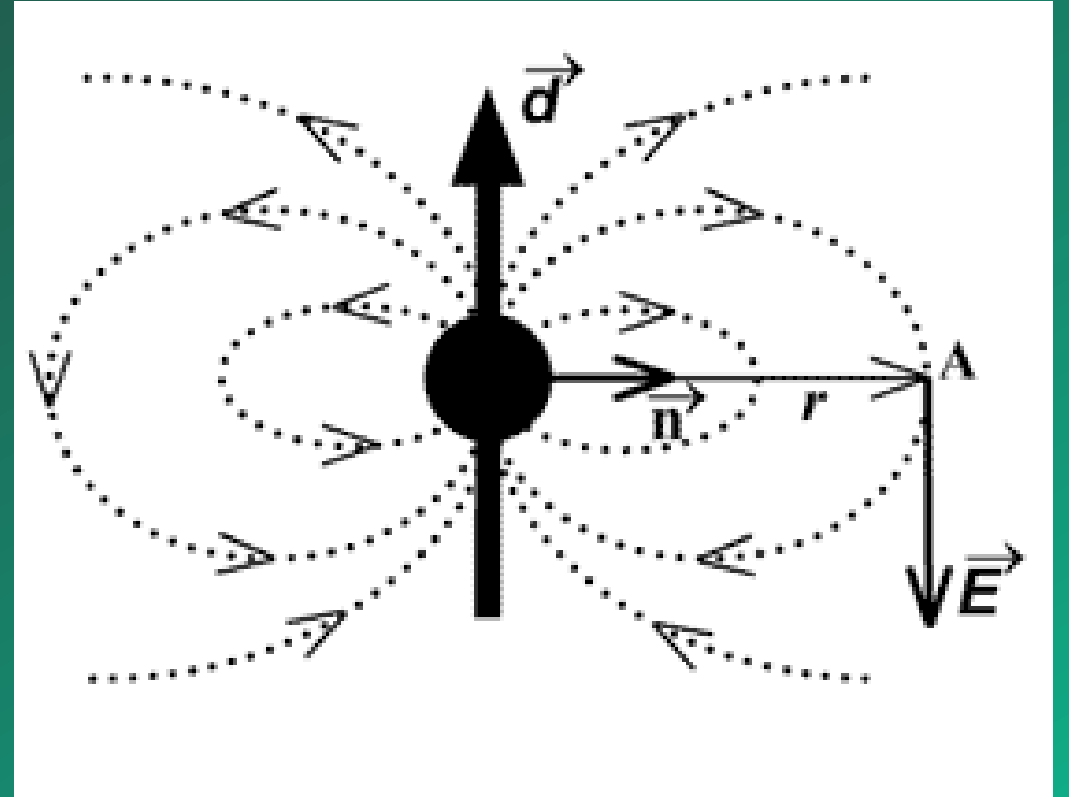
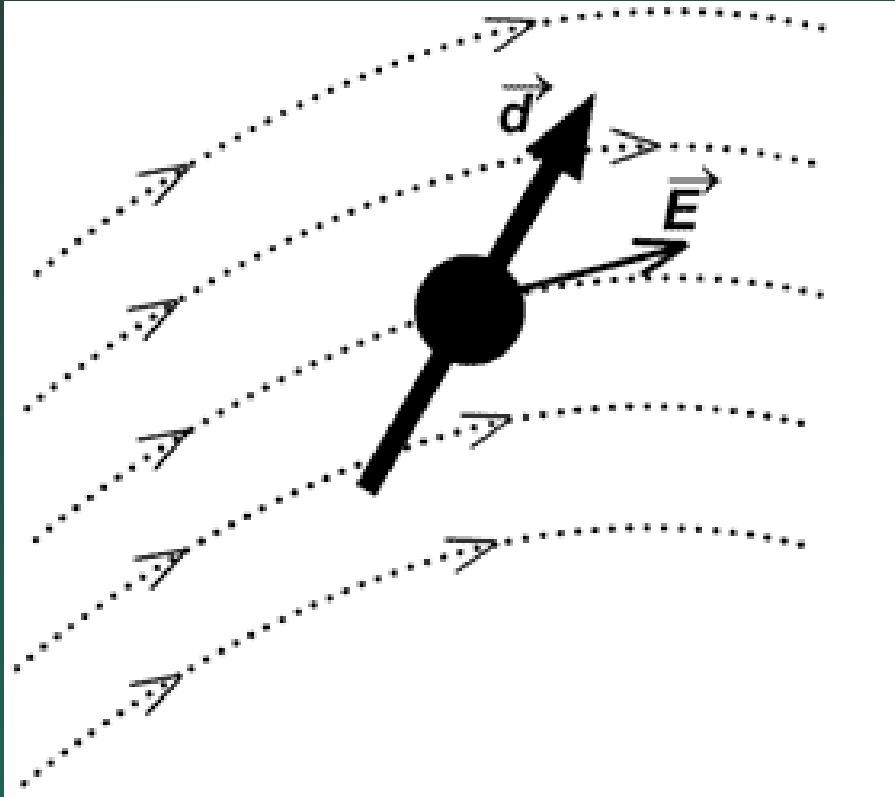
Диаграмма Яблонского



Диполь-дипольное взаимодействие

$$W = -\vec{E}\vec{d}$$

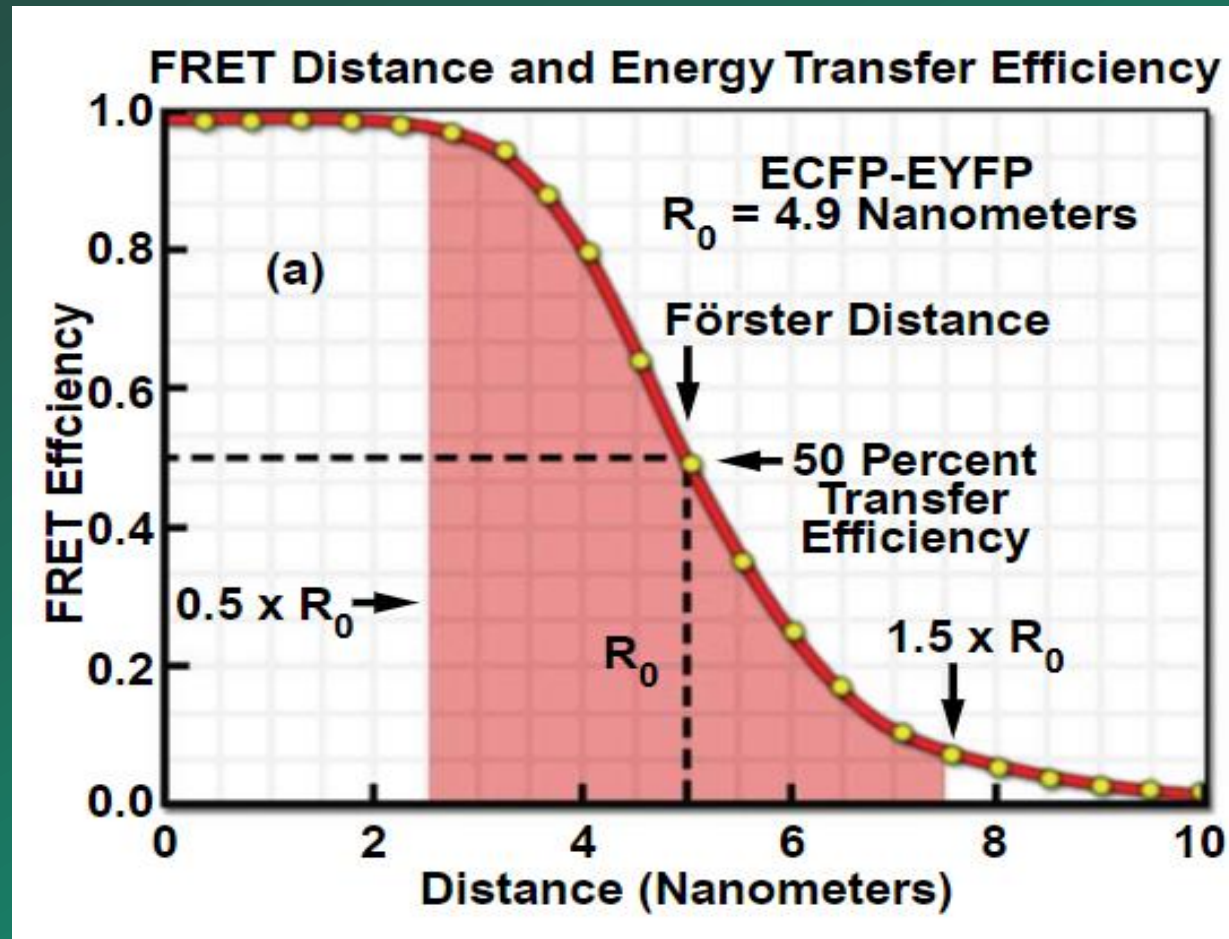
$$\vec{E} = \frac{3(\vec{n}\vec{d})\vec{n} - \vec{d}}{r^3}$$



$$W = -\frac{3(\vec{n}\vec{d}_1)(\vec{n}\vec{d}_2) - \vec{d}_1\vec{d}_2}{r^3}$$

Эффективность FRET

$$E_{FRET} = \frac{k_{ET}}{k_{ET} + k_f + \sum k_i} = \frac{1}{1 + R/R_0^6}$$



Ферстеровский Радиус

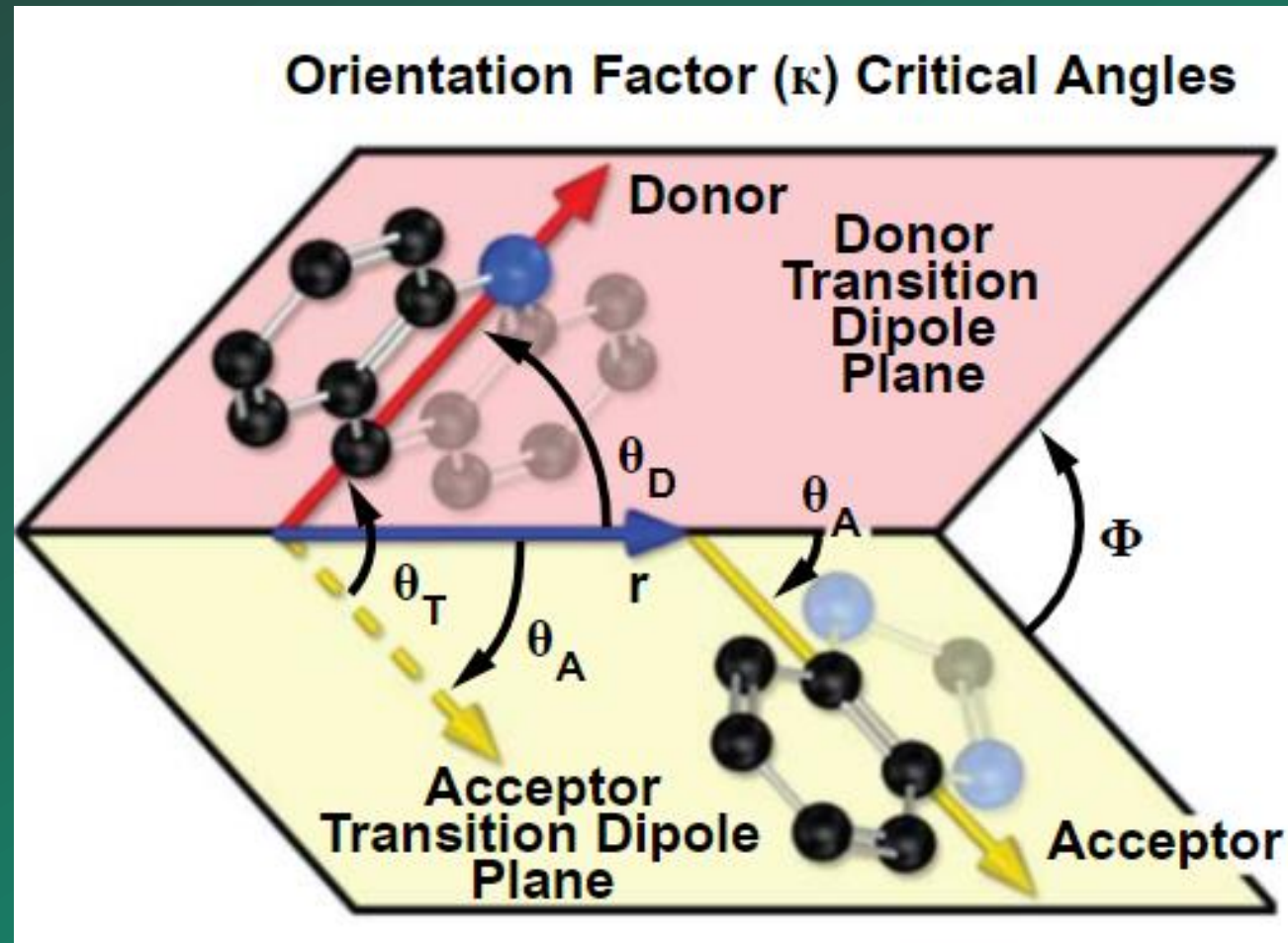
R_0 - это характерное расстояние, на котором эффективность FRET составляет 50 процентов

$$R_0 = \left[\frac{20.7}{128\pi^5 N_a n^4} \kappa^2 Q_d J(\lambda) \right]^{1/6},$$

где κ^2 - фактор ориентации между двумя флуорофорами,
 Q_d - квантовый выход донора,
 $J(\lambda)$ - перекрытие спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора,
 n - коэффициент преломления среды

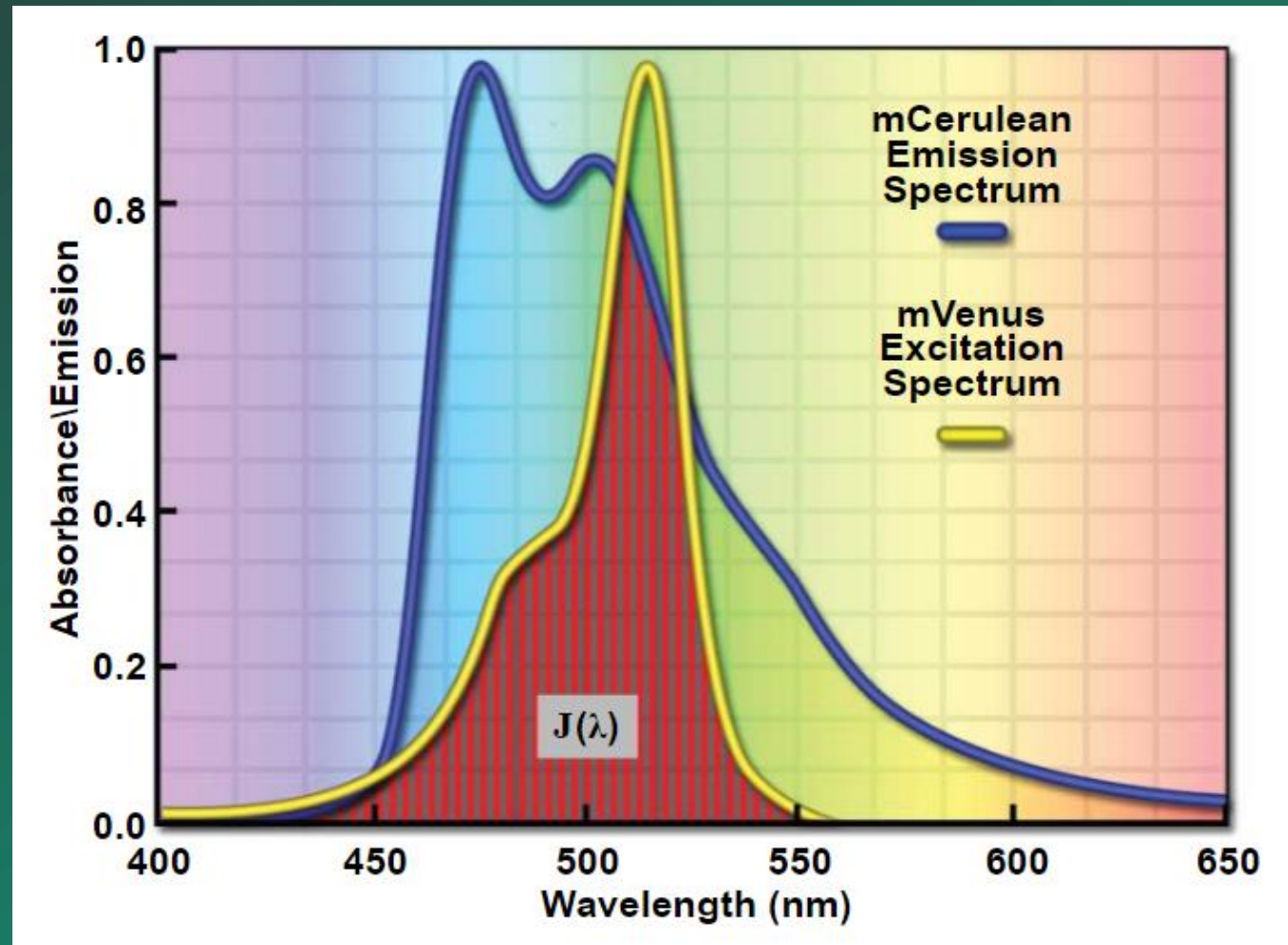
Ориентация диполей

$$\begin{aligned}\kappa &= \vec{d}_A \vec{d}_D - 3(\vec{d}_A \vec{r}) (\vec{d}_D \vec{r}) = \\ &= \cos \theta_T - 3 \cos \theta_A \cos \theta_D\end{aligned}$$



Интеграл перекрытия

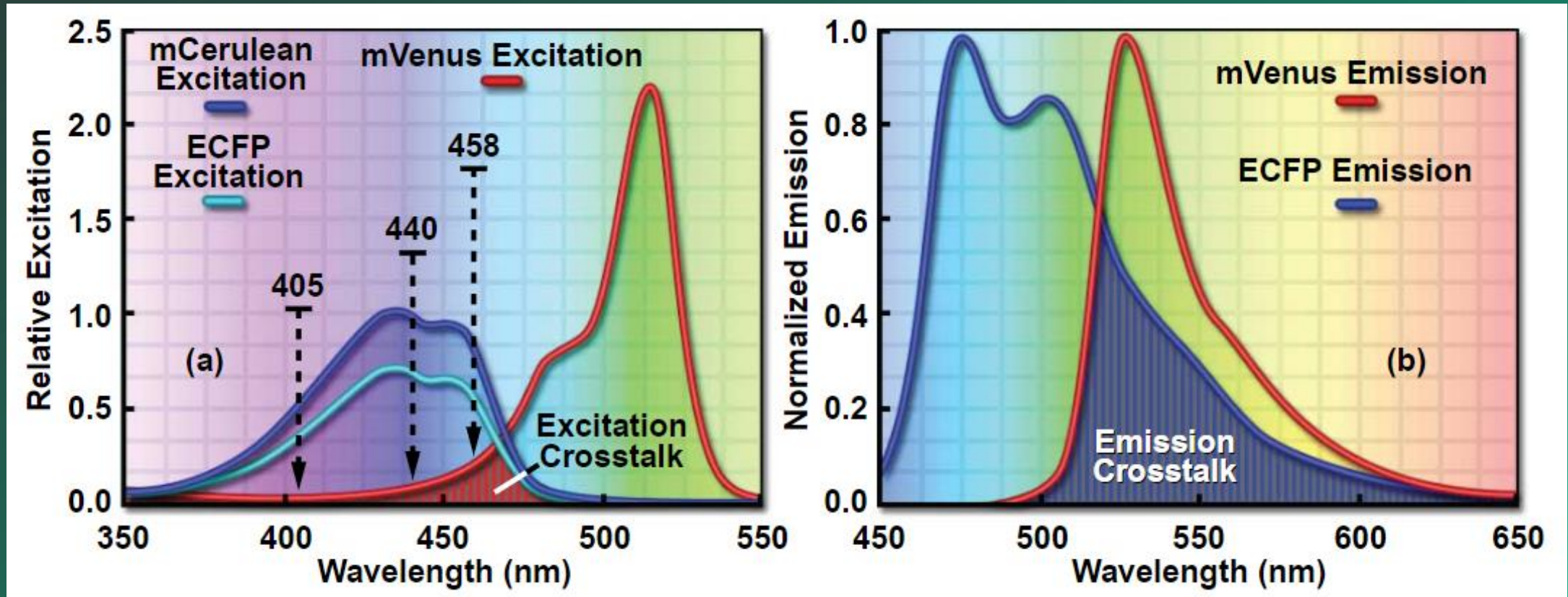
$$J(\lambda) = \frac{\int f_d \epsilon_a \lambda^4 d\lambda}{\int f_d d\lambda}$$



Проблемы FRET

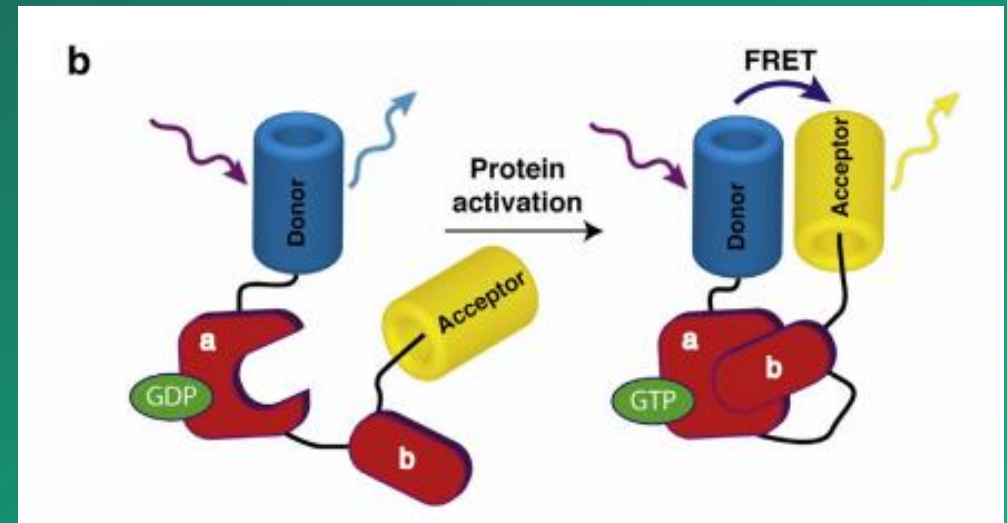
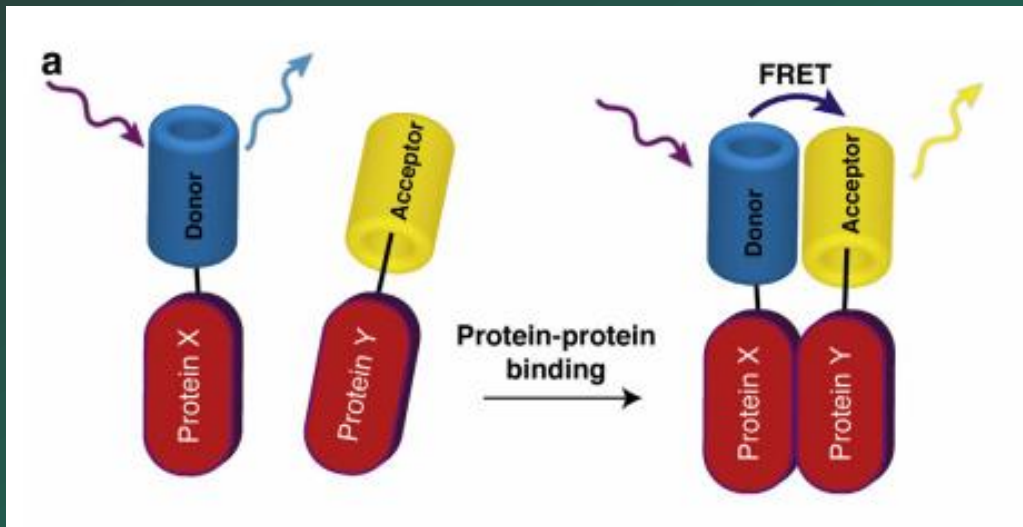


Перекрывание спектров



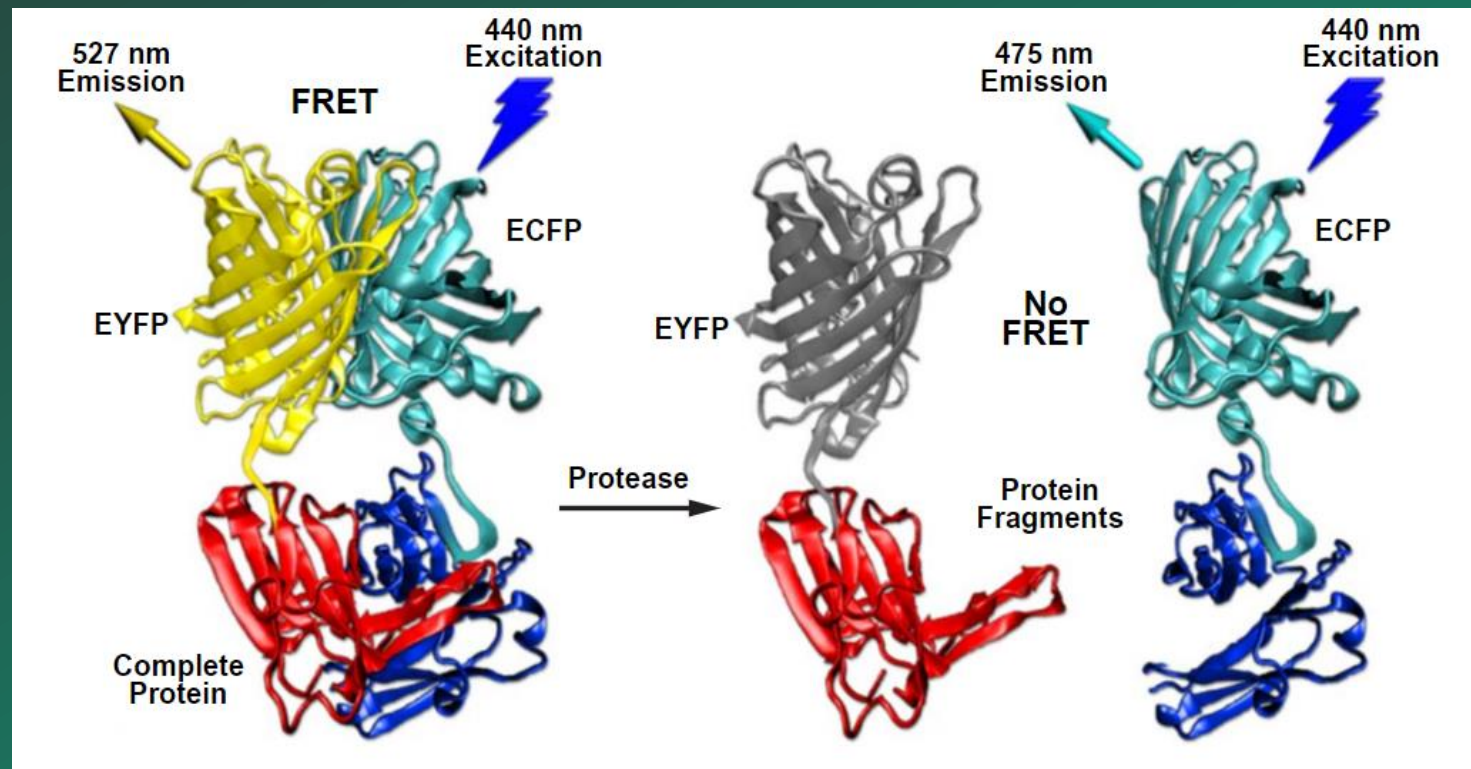
Области применения

- Взаимодействие между белками



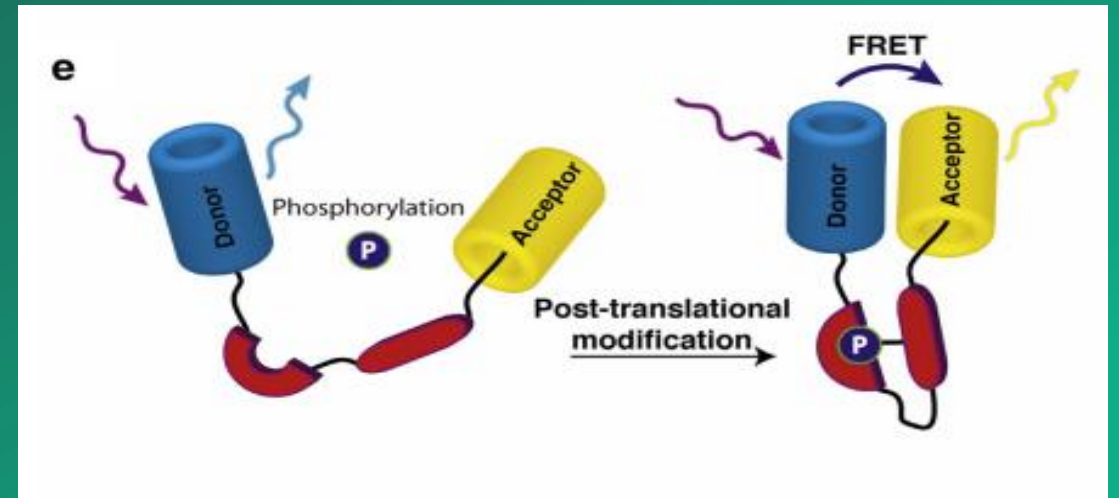
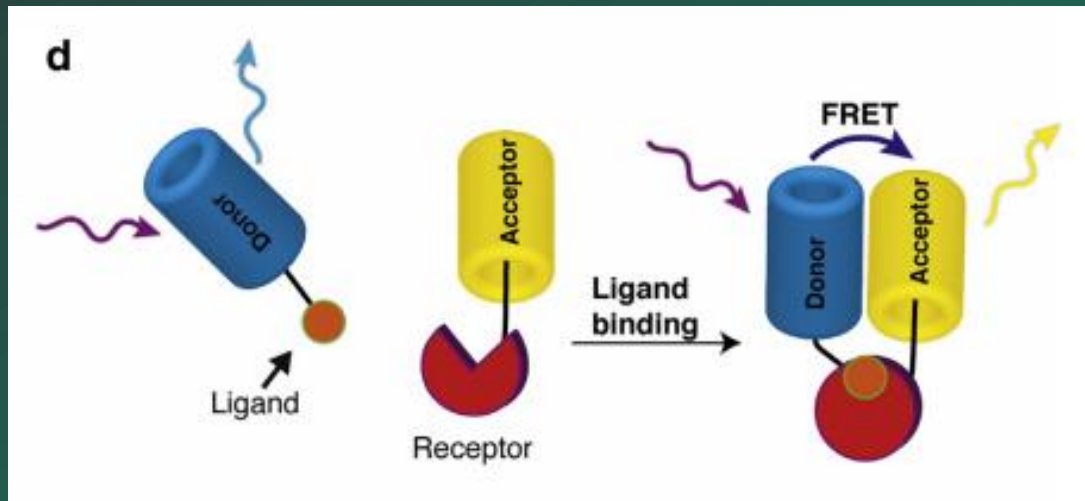
Области применения

- Ферментативное расщепление



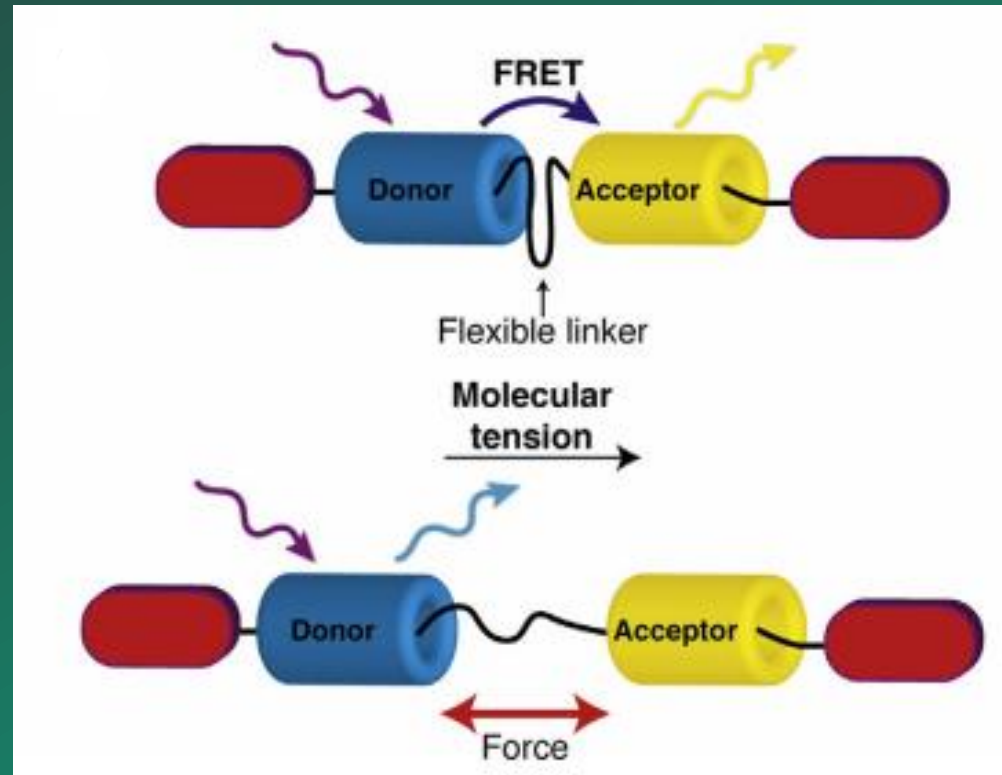
Области применения

- Конформационные изменения



Области применения

- Сенсорика молекулярного натяжения



Методы FRET

Список методов, которые могут быть применены достаточно большой, однако существует 4 основных:

1. *Sensitized Emission* – Чувствительная эмиссия
2. *Acceptor Photobleaching* – Фотодеградация акцептора
3. *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM)* – Микроскопия измерения времени жизни флуорисценции
4. *Fluorescence Polarization Imaging* – Визуализация флуоресцентной поляризации

Sensitized Emission

Сигнал собирается с двух каналов с помощью оптических фильтров, настроенных на флуоресценцию донора и акцептора, соответственно.

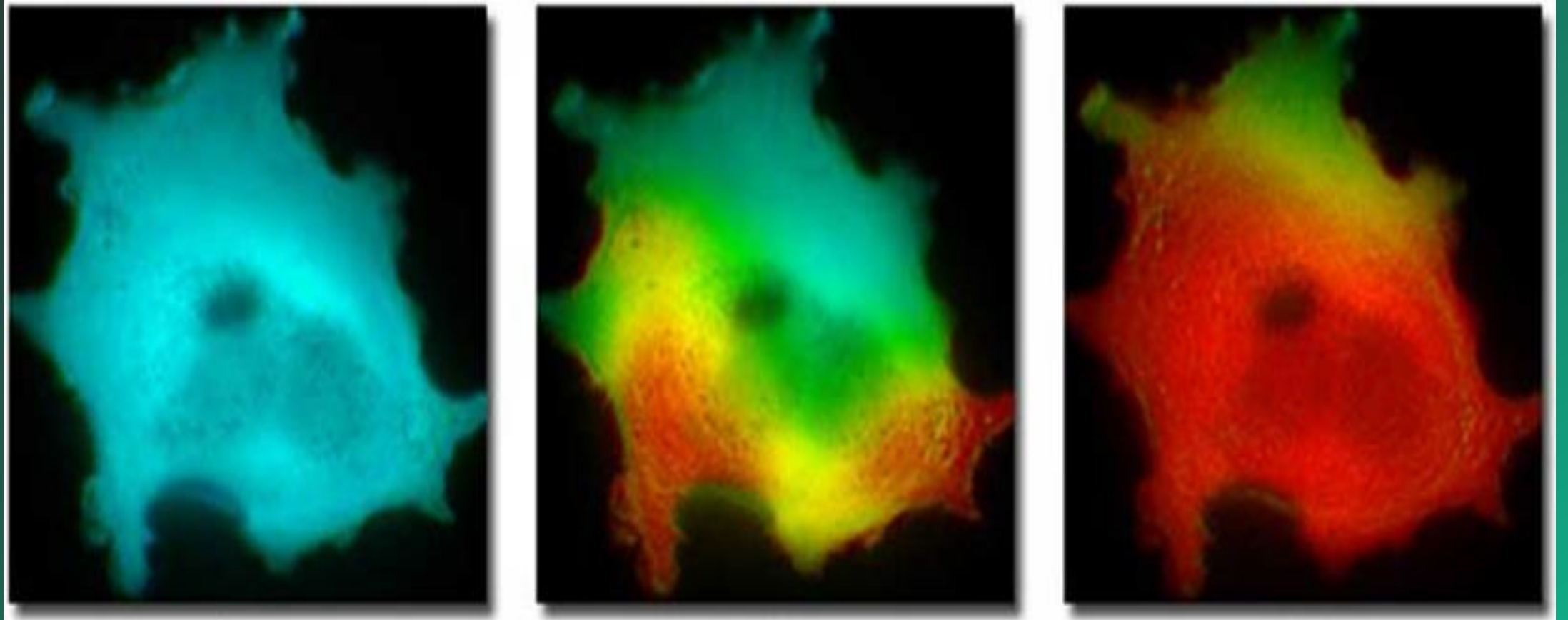


- Простота реализации
- Быстрота получения данных



- Перекрытие спектров
- При улучшении установки: повышенный уровень шума

Sensitized Emission



Acceptor Photobleaching

В основе концепции лежит тот факт, что донорная флуоресценция гаснет во время FRET, поскольку часть энергии донорной флуоресценции направляется на акцептор.



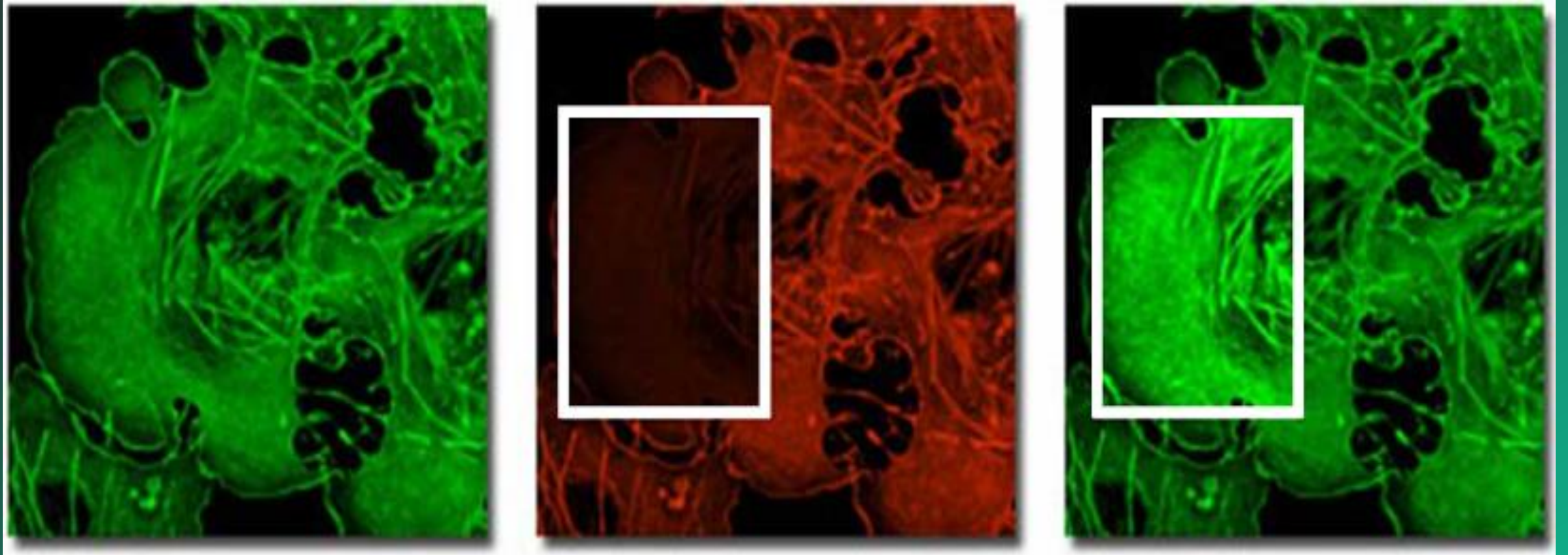
- Количественный метод

$$E_{FRET} = \frac{I - I_0}{I_0}$$

- Необходим только один образец

- Может быть использовано только один раз на ячейку
- Медленный процесс

Acceptor Photobleaching



FLIM

Взаимодействие FRET гасит флуоресценцию донора, и степень гашения может быть определена путем измерения уменьшения времени затухания флуоресценции донора в присутствии FRET.

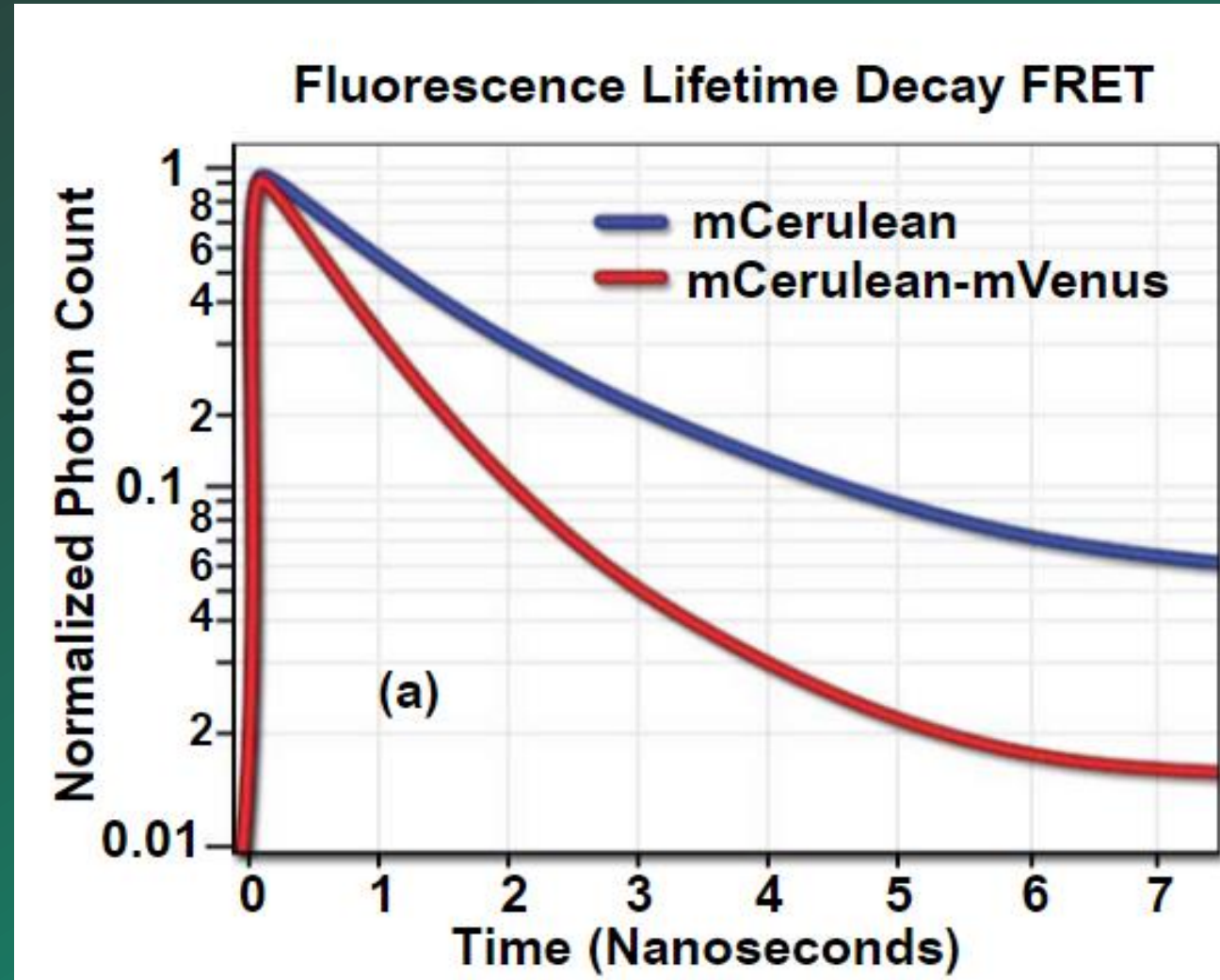


- Количественный метод
- Контролируется только донорская флуоресценция



- Влияние других факторов окружающей среды
- Медленный процесс
- Сложный процесс

FLIM



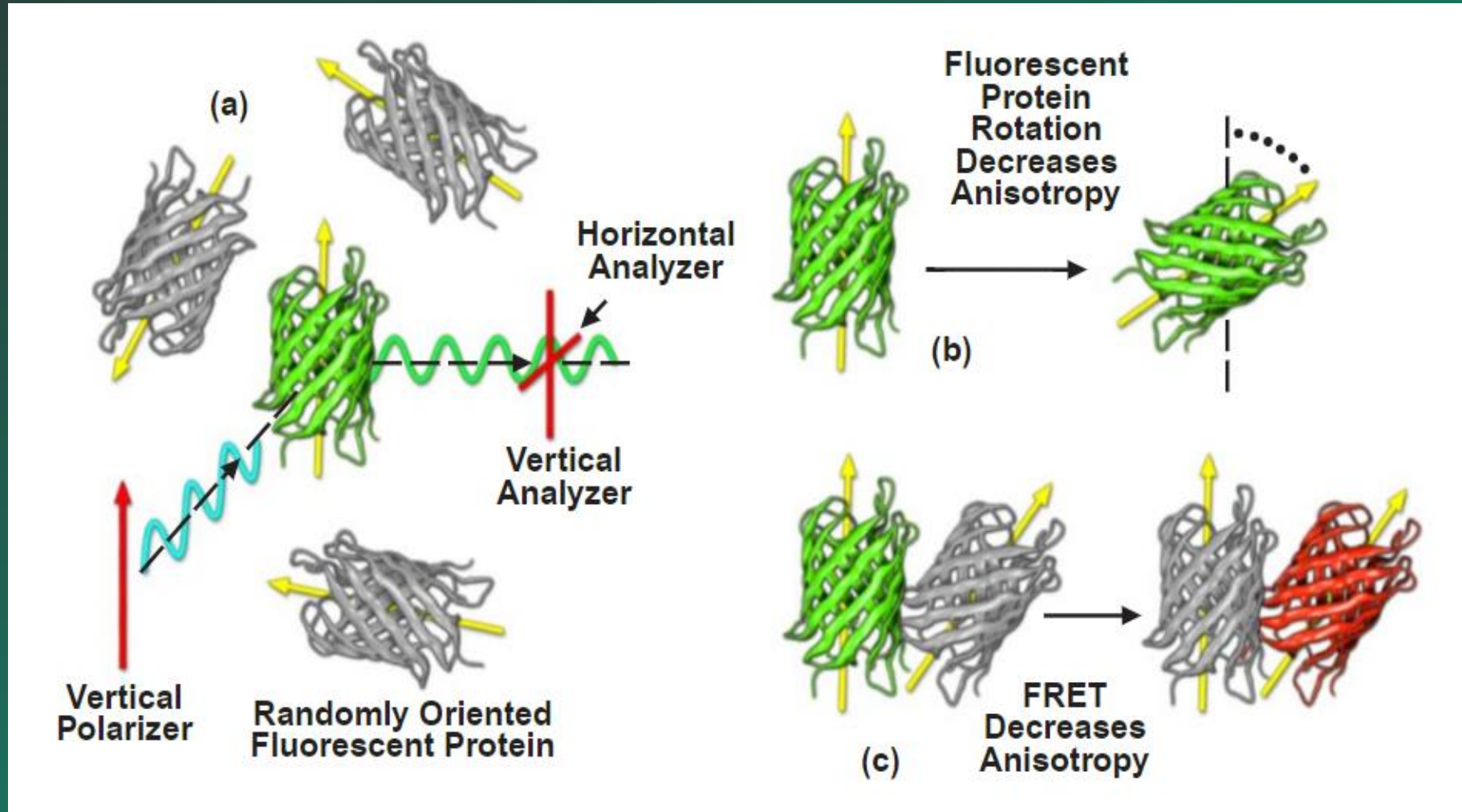
Fluorescence Polarization Imaging

Концепция данного метода основана на том факте, что возбуждение поляризованным светом выбирает популяцию флуоресцентных молекул, векторы поглощения которых выровнены параллельно вектору поляризации возбуждающего света.



- Простота измерения поляризации флуоресценции
- Быстрота получения данных
- Необходимо избегать прямого возбуждения акцептора
- Применим только для определения наличия/отсутствия FRET

Fluorescence Polarization Imaging



Спасибо за
внимание!