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

PH CITLIVÉ FLUORESCENČNÍ SONDY

PH SENSITIVE FLUORESCENCE PROBES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE Kateřina Bílková
AUTHOR

VEDOUCÍ PRÁCE Ing. Filip Mravec, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2016

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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	**FCH-BAK0972/2015**	Akademický rok:	**2015/2016**
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie		
Student(ka):	**Kateřina Bílková**		
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)		
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)		
Vedoucí práce	**Ing. Filip Mravec, Ph.D.**		
Konzultanti:			

Název bakalářské práce:

pH citlivé fluorescenční sondy

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na problematiku měření pH pomocí 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. Pomocí laserové skenovací mikroskopie a časově rozlišené analýzy stanovit pH v rámci jednotlivých buněk.
4. Diskutovat výsledky v rámci lokálního rozlišení a nastavení metody.

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 Bílková 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 navrhnout vhodnou metodu pro měření pH bakteriálního cytosolu v bakteriích kmene *Cupriavidus necator*. Pro získání skenu bakterií byla zvolena fluorescenční mikroskopie a časově rozlišená fluorescence pro získání kalibrační křivky. Nejideálnější sondou citlivou na pH, kterou bylo možno využít, byl BCECF-AM. Bylo navrženo, že pro prokaryotický typ buněk by bylo vhodnější použít externí kalibraci než interní. Bakterie s označením H16 vykazují dlouhou dobu života pouze na granulích s obsahem PHB, zatímco u bakterií s označením PHB$^-$4 se nejdelší doba života vyskytuje náhodně v celé buňce.

ABSTRACT

The goal of this thesis was to suggest the suitable method for measuring bacterial cytosolic pH in bacteria strain *Cupriavidus necator*. Fluorescent microscopy was chosen to obtain scan of bacteria and time-resolved fluorescence was chosen to obtain a calibration curve. BCECF-AM was used as a pH-sensitive fluorescent probe. It was suggested that the external calibration is more suitable than internal one for the prokaryotic type of cells. Bacteria H16 shows a long fluorescence lifetime only on the granules containing PHB, while in PHB$^-$4 the longest fluorescence lifetime occurs randomly throughout the cell.

KLÍČOVÁ SLOVA

Intracelulární pH, časově rozlišená fluorescence, laserová skenovací mikroskopie, doba života fluorescence, FLIM, prokaryotická buňka, BCECF

KEY WORDS

Intracellular pH, time-resolved fluorescence, laser scanning microscopy, fluorescence lifetime, FLIM, prokaryotic cell, BCECF

BÍLKOVÁ, K. *pH citlivé fluorescenční sondy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 40 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:

Tato práce byla podpořena Centrem materiálového výzkumu na FCH VUT v Brně projektem Zapojení polyhydroxyalkanolátů do stresové odpovědi bakterií, r. č. GA15-20645S.

Ráda bych poděkovala vedoucímu mojí bakalářské práce Ing. Filipu Mravcovi, PhD za pevné nervy, protože to se mnou nebylo vždycky lehké. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Benešové, PhD a Ing. Danu Kučerovi za přípravu bakterií. Nakonec bych ráda poděkovala svým blízkým, kteří vždy věděli, kdy na mě raději nemají mluvit.

OBSAH

1. Úvod ... 7
2. Teoretická část ... 8
2.1. Fluorescence ... 8
2.1.1. Obecná teorie ... 8
2.1.2. Vlastnosti fluorescence ... 8
2.1.3. Využití v biochemii ... 9
2.2. Měření pH ve vodných roztocích ... 9
2.2.1. Definice pH ... 9
2.2.2. Instrumentální metody měření pH ... 9
2.2.3. Acidobazické indikátory ... 10
2.3. Měření pH v živých systémech ... 10
2.3.1. Buněčný stres ... 10
2.3.2. Mapování pH na úrovni buněčných organel ... 10
2.4. Laserová skenovací mikroskopie ... 11
2.5. TCSPC ... 12
2.6. FLIM ... 13
2.7. Indikátory pH ... 14
2.7.1. Nevlastní fluorofory ... 14
2.7.2. Fluorescenční pH sondy ... 14
2.7.2.1. Fluorescein ... 15
2.7.2.2. BCECF-AM ... 15
3. Současný stav řešené problematiky ... 17
3.1. Měření intracelulárního pH v gram-pozitivní bakterii ... 17
3.2. Měření intracelulárního pH v nádorové buňce ... 17
3.3. Aplikace fluorescenčních pH sond na bakterie mléčného kvašení ... 17
3.4. Měření pH gradientu pomocí dvoufotonové FLIM ... 18
3.5. Časově rozlišená fluorescence pro snímání intracelulárního pH v živých buňkách . 18
4. Experimentální část ... 20
4.1. Použité chemikálie ... 20
4.2. Přístroje a zařízení ... 20
4.2.1. Systém MicroTime 200 ... 20
4.3. Použité programy ... 21
4.4. Příprava roztoků pro externí kalibraci ... 21
4.5. Příprava roztoků pro interní kalibraci ... 22

4.6. Příprava buněčné suspenze 22
4.7. Příprava vzorků na měření 23
4.8. Vyhodnocení 23
4.8.1. TCSPC analýza 23
4.8.2. FLIM analýza 26
5. Výsledky a diskuze 28
5.1. Externí kalibrace 28
5.2. Interní kalibrace 29
5.3. FLIM analýza bakterií *Cupriavidus necator* H16 30
5.4. FLIM analýza bakterií *Cupriavidus necator* PHB^{-}4 33
6. Závěr 35
7. Literatura 36
8. Seznam použitých zkratek a symbolů 38
9. Přílohy 38

1. ÚVOD

Tato práce je navázaná na grantový projekt zaměřený na stres bakterií. Základní myšlenkou je určení intracelulárního pH pomocí laserové skenovací mikroskopie. Měření pro získání dob života bude založeno na TCSPC analýze používaného fluoroforu.

Každá buňka si v přirozeném prostředí snaží udržet své optimální vnitřní pH. Její chování i vlastnosti se ale mohou změnit, pokud je buňka vystavena vnějším fyzikálně-chemickým nebo biologickým procesům, které se obecně nazývají buněčný stres. Tyto faktory mohou nějakým způsobem narušit životní procesy v buňce a dělí se na nespecifické a specifické, které ovlivňuje jen některé procesy nebo struktury buňky. Na základě reakce buňky na určitý druh stresu lze zjistit vitalitu buňky, nebo jak moc je pro ni prostředí nepříznivé.

Pro zjišťování pH ve větších buňkách se používaly pH citlivé vpichové mikroelektrody, ovšem tato práce je zaměřena na neinvazivní metodu fluorescenční mikroskopie. V této práci se klade důraz na správný výběr sondy, která je do systému přivedena v leukoformě a pak je schopná měnit svou dobu života v závislosti na pH, ve kterém se nachází. Na základě kalibrační křivky získané z proměření sondy v různém pH se bude mapovat rozložení pH v cytosolu bakterie kmene *Cupriavidus necator*, a to jak typu, který obsahuje granule PHB, tak i neprodukujícího typu.

Cílem této práce je získat poznatky o rozložení pH v bakteriálním cytosolu, tedy hydrolytické aktivitě v jednotlivých jejích částech. Tyto informace je pak možné uplatnit pro další výzkum stresu buněk.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Fluorescence

2.1.1. Obecná teorie

Molekuly látek se systémem konjugovaných dvojných vazeb, dvojnou vazba mezi dusíky nebo organokovovou sloučeninou lze excitovat elektromagnetickým zářením o vhodné vlnové délce. Při návratu do základního stavu se vyzařuje energie ve formě fotonů. Tyto molekuly se nazývají fluorofory a jevu se říká fluorescence.

Emisní záření trvá krátkou dobu vzhledem k absorpci a po ukončení excitačního záření téměř okamžitě zhasíná. Toto záření je charakterizováno vyzařováním energie po velmi krátkou dobu, řádově 10^{-9} s až 10^{-6} s. Elektrony v obalech fluoroforů jsou schopny absorbovat foton a tím zvýšit svou energii, tedy přejít do vyššího elektronového stavu. Část této získané energie vyzáří opět ve formě fotonu, ale s nižší energií kvůli nezářivým pochodům. Jsou to děje, kdy se část energie dostává do nižších excitovaných stavů postupně až na stav S_1. Při přechodu ze stavu S_1 do základního S_0 jsou zářivé přechody energeticky výhodnější než nezářivé, proto zde již může docházet k fluorescenci. Díky nezářivým procesům u přechodů z vyšších excitovaných stavů do nižších dochází tedy ke ztrátě energie, proto je vlnová délka následně emitovaného záření delší než vlnová délka excitačního záření.

2.1.2. Vlastnosti fluorescence

Mezi nejdůležitější charakteristiky fluorescence patří doba života a kvantový výtěžek. Kvantový výtěžek lze definovat jako počet emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Při zkoumání vlastností fluoroforů se klade důraz na to, jestli se při přechodu z excitovaného stavu do základního dostává zářivý nebo nezářivým přechodem, popřípadě kombinací obou. Kvantový výtěžek se dá spočítat podle rovnice:

$$\varphi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}, \tag{1}$$

kde konstanta k_r představuje rychlost zářivého přechodu a k_{nr} rychlost nezářivého přechodu. Výsledkem rovnice je tedy ta část fluoroforu, která se vrací do základního stavu zářivým přechodem. Z této rovnice plyne, že pokud bude konstanta zářivého přechodu mnohem vyšší než u nezářivého, kvantový výtěžek se bude blížit jedné, tedy většina absorbovaného záření bude i zářivě emitována.

Veškeré interakce v excitovaném stavu mají vliv na emisi daného fluoroforu. Doba života fluoroforu se tedy dá se definovat jako převrácená rychlostní konstanta rozpadové rovnice prvního řádu, tedy čas, kdy původní intenzita klesne na $\frac{1}{e}$. Pokud se vzorek excituje krátkým pulzem, tak určitě množství molekul přejde do excitovaného stavu. Časem se tyto molekuly opět vrací zpět do základního stavu, kde rychlost vyhasínání lze zjistit z rovnice:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \tag{2}$$

2.1.3. Využití v biochemii

Existuje mnoho způsobů využití fluorescence v biochemii. Velmi významným využitím fluorescenčních sond je stanovování živých a mrtvých buněk v daném roztoku. Při stanovení živých buněk je nutné brát ohled na velikost a vlastnosti buněk, aby nedocházelo k jejich poškození. Déle je nutné brát v potaz, zda daný indikátor se dokáže dostat skrz membránu do buňky.

Fluorescenční spektroskopii je možné využít při zkoumání životnosti buněk, kdy fluorogenní substráty pronikající do buňky, kde přemění buněčné esterázy na fluoreskující produkt. Na základě intenzity nitrobuněčného dohasínání fluoreskujících produktů je možné měřit, jak moc je membrána pevná a propustná pro ostatní látky. K tomuto účelu se používají především sondy jako karboxyeosin diacetát a fluorescein diacetát.

Živé buňky nejsou schopny propouštět všechna barviva. Toho se využívá při detekci mrtvých buněk, kdy je k buňce dopraveno barvivo pro nukleové kyseliny. Toto barvivo se dostane do cytosolu mrtvé buňky, ovšem s živou buňkou nedochází k žádné interakci, tedy barvivo zůstane pouze v okolí. Jako příklad těchto barviv lze uvést propidium-jodid nebo cyaninová barviva. Dále je také možné využívat oxidačně-redukčního potenciálu živých buněk. Aplikované sondy, jako je například resazurin, jsou těmito buňkami buď oxidovány, nebo redukovány, přičemž je zaznamenávána změna fluorescence.

V neposlední řadě se fluorescence využívá i pro zjišťování pH jak v roztoku, tak v buňkách. Fluorescenční signál indikátoru BCECF nebo SNARF-1 je velmi citlivý na pH, čímž je umožněno jejich využití při měření pH uvnitř buněk [2].

2.2. Měření pH ve vodných roztocích

2.2.1. Definice pH

Hodnota pH je definována jako záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationů. Obecně platí rovnice:

$$\mathrm{pH} = -\log\left(a_{H_3O^+}\right), \tag{3}$$

kde a je aktivita kationu H_3O^+. Ve zředěných vodných roztocích lze hodnotu aktivity nahradit hodnotou koncentrace, pak platí tato rovnice:

$$\mathrm{pH} = -\log\left(c_{H_3O^+}\right). \tag{4}$$

Hodnoty pH se pohybují od 0 do 14. Tyto hodnoty platí pro většinu vodných roztoků při pokojové teplotě, tedy 25 °C. Ve vodném roztoku je vždy kromě molekul H_2O obsaženo určité množství oxoniových kationů H_3O^+, respektive $[H(H_2O)_4]^+$ a hydroxylových anionů OH^-, což je dáno autoprotolýzou vody.

Kyselost nevodných roztoků, což jsou například roztoky kyselin nebo hydroxidů v alkoholech, ketonech nebo třeba nepolárních rozpouštědlech, popisuje hodnota Hammetovy funkce. Velikost Hammetovy funkce pro určité prostředí se zjišťuje na základě poměru kyselé a zásadité formy určitého acidobazického indikátoru v měřeném roztoku [1].

2.2.2. Instrumentální metody měření pH

Pro přesné měření hodnot pH ve vodných roztocích se v současné době používá nejvíce potenciometrie s využitím měrné skleněné elektrody. Tato metoda je založena na určení rozdílu

elektrického potenciálu mezi měrnou a referenční elektrodou. Jako referenční elektrody se využívají jakékoli elektrody II. druhu, nejčastěji kalomelové nebo argentochloridové.

Elektrický potenciál měrné skleněné elektrody závisí na kyselosti roztoku, ve kterém jsou ponořeny elektrody. Základní část skleněné elektrody tvoří malá tenkostěnná skleněná baňka. Vnitřek baňky je naplněn pufrem a vnější povrch baňky je ve styku s měřeným roztokem. Rovnováha mezi hydroxylovými ionty ve zkoumaném roztoku a ionty v povrchu skla způsobuje změnu elektrického potenciálu elektrody.

2.2.3. Acidobazické indikátory

V závislosti na pH prostředí dokážou některé organické látky měnit uspořádání dvojných vazeb v molekule, což se projeví změnou fotofyzikálních vlastností, jako je barva, intenzita barvy roztoku atd. Kyselost se v tomto případě měří porovnáním s kalibrovanou barevnou škálou pro daný acidobazický indikátor. Existují jak přírodní indikátory (např. barvivo v červeném zelí, které mění barvu ze žluté přes modrou na červenou po okyselení roztoku), tak i umělé (například fenolftalein, kdy k přechodu dochází při pH 8 – 9,8).

2.3. Měření pH v živých systémech

Jednou z pozorovatelných změn v buňce následkem buněčného stresu může být i změna cytosolického pH. Díky tomu lze měřit, jak moc daný faktor může buňku ovlivnit.

2.3.1. Buněčný stres

Živou buňku může ovlivňovat celá škála různých faktorů. Vnější fyzikálně – chemické procesy se obecně nazývají „buněčný stres“. Stresové faktory mohou být jak fyzikální, 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, například blokace enzymové aktivity specifickými enzymovými jedy.

Nespecifické působení stresorů ovlivňuje celou skupinu podobných látek nebo části buňky. Jedná se například o denaturaci proteinu následkem vysoké teploty, pH nebo přítomností těžkých kovů. Mezi další důležité stresové faktory patří například mražení, tání, osmotický stres nebo fotostres.

Buňka se buďto se stresem vyrovná, nebo na ni má stres negativní účinek od změny genetické informace až po nekrózu buňky. Nejobvyklejší reakcí, jak se buňka dokáže stresu bránit, je tvorba stresových proteinů. Díky těmto proteinům se dokáže na daný stresor adaptovat do takové míry, aby eliminovala většinu negativních vlivů způsobených stresory.

2.3.2. Mapování pH na úrovni buněčných organel

Pro tuto práci je nutné, aby se daly rozlišit jednotlivé části buňky. Proto je potřeba vybrat metodu i látku tak, aby se daly zobrazit organely a nikoli pouze celá buňka. Nejoptimálnější je metoda fluorescenční mikroskopie, která je lokálně zaměřitelná.

Dále je potřeba vybrat vhodný acidobazický indikátor (sondu), který by byl velmi citlivý na změnu pH. Pro indikátory založené na fluorescenci je nutné, aby vnášená sonda byla fluorogenní, tedy aby byla do buňky dodána v leukoformě a fluoreskovat začala až v cytosolu jako reakce na určitý biologický proces, například na hydrolýzu. Proto by použití vhodné

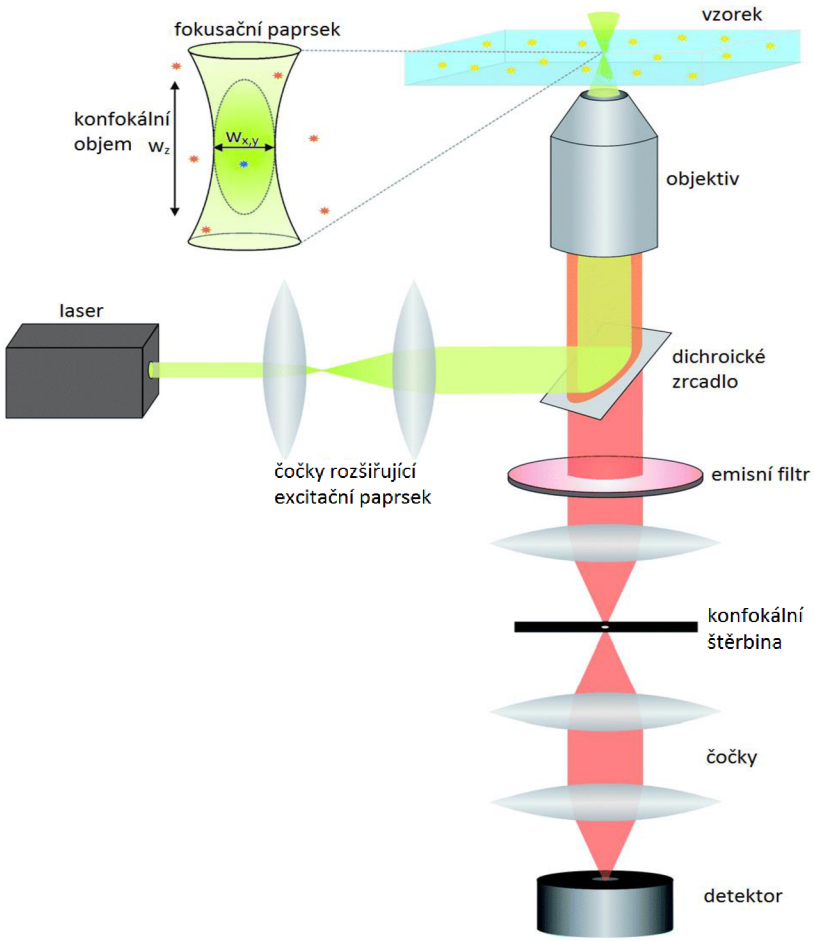
fluorescenční sondy použitelné pro fluorescenční mikroskopii mohlo přinést informace o hydrolytické aktivitě v jednotlivých částech buňky.

2.4. Laserová skenovací mikroskopie

Laserový paprsek excitačního spektra je fokusován do zkoumaného vzorku, kde excituje fluorofor obsažený v molekulách. Fluorescenční záření excitovaných molekul je vedeno zpět objektivem a odděleno od excitačního záření emisním filtrem a dichroickým zrcadlem. V detekční optické části je umístěna konfokální štěrbina (pinhole) o průměru 40 – 100 μm, která blokuje světlo, které pochází z oblasti mimo ohniskovou rovinu.

Při této metodě využívá velmi malý objem, který se nazývá konfokální. Tento objem se pohybuje mezi 0,3 a 1 femtolitrem. Pokud se molekula nenachází v konfokálním objemu, intenzita fluorescence zůstává nízká. Jakmile molekula do tohoto objemu vstoupí, dojde k nárůstu intenzity signálu. Ze změn intenzity fluorescenčního signálu lze statistickou analýzou určit, jak dlouho byla molekula v excitovaném stavu, tedy dobu života fluoroforu, popřípadě i kolik molekul bylo v daném čase obsaženo v konfokálním objemu, tedy koncentraci fluoroforu [2].

Pro měření je velmi důležité vybrat správnou sondu. Od sondy se chce, aby měla co největší kvantový výtěžek a co největší fotostabilitu, protože musí vydržet vysokou intenzitu excitačního záření z laseru, které dopadá na vzorek s fluoroforem.



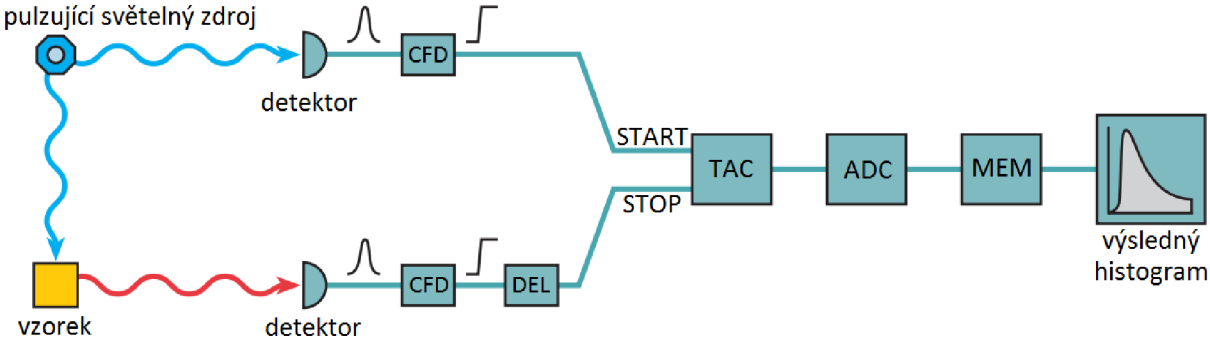
Obr. 1: Schéma konfokálního mikroskopu. Excitační laserové světlo (zeleně) je fokusováno přes objektiv do vzorku. Ve fokusovaném paprsku pochází fluorescenční signál pouze z molekul obsažených v konfokálním objemu (modře). Excitované fluorescenční světlo ze vzorku prochází dichroickým zrcadlem a emisní filtr do detektoru [16].

2.5. TCSPC

Metoda TCSPC je založena na detekci jednotlivých fotonů. Měří se doba, za kterou foton dopadne na detektor od počátku určitého signálu – světelného impulsu. Jedná se o statistickou metodu, proto je důležité, aby se světelný impuls opakoval ve vysoké frekvenci a také aby dokázal naráz vysvítit velké množství fotonů pro požadovanou přesnost statistických údajů.

Z laseru je vyslán excitační puls, který excituje vzorek a zároveň je vyslán signál do elektroniky, kde je intenzita upravena pomocí CFD (constant function discriminator), který zároveň zaznamená čas příchodu excitačního pulzu, čímž je generován v detekční elektronice signál START. Ten spustí lineární vkládání napětí na kondenzátor, který tvoří převodník mezi časem a signálem (TAC – time to amplitude converter). V druhém emisním kanálu je sledován emitovaný foton, který přijde na detektor. Tento detektor je citlivý na jeden jediný foton. Ten vyšle signál, který je opět upraven a vpuštěn do detekční elektroniky k TAC jako STOP signál. Tímto dojde k zastavení zvyšování napětí. V TAC se odečte napětí úměrné časovému rozdílu mezi excitačním pulzem a příchodem emitovaného fotonu.

Tento proces je opakován dokola v závislosti na tom, kolik měření a fotonů je potřeba a jednotlivé naměřené časy jsou zaznamenávány do histogramu, dokud není měření ukončeno. Obecně se za dostatečnou hodnotu počtu opakování bere dosažení hodnoty 10^4 fotonů v kanálu s nejvyšším počtem fotonů. Čas změřený pro jednu START-STOP sekvenci je reprezentován jako navýšení hodnoty v paměťovém histogramu, kde na ose *x* je zobrazen čas. Díky vysoké opakovací frekvenci světelného zdroje mohou být sekvence měřeny ve velmi krátké době. Výsledný histogram zobrazuje intenzitu fluorescence v závislosti na čase. Pokud je potřeba, může se ještě napětí zesílit pomocí PGA (programmable gain amplifier). Ten předá informace ADC (analog to digital converter), kde je toto napětí převedeno na numerickou hodnotu [6].



Obr. 2: Hlavní komponenty pro zpracovávání signálu – constant fraction discriminators (CFD), electrical delays (DEL), time to amplitude converter (TAC), amplitude to digital convertor (ADC), zesilovač umístěný mezi TAC a ADC a digital memory (MEM).

2.6. FLIM

Fluorescence life-time imaging (FLIM) je metoda, kterou lze mapovat rozložení dob života uvnitř fixovaných i živých buněk. Intenzitní škála obrazu odpovídá určitým dobám života fluoroforu, a ne jeho emisním spektrům. Je mnohem obsáhlejší než jiné metody založené na intenzitě.

Délka doby života není závislá na lokální koncentraci fluoroforů, intenzitě excitačního paprsku, absorpci nebo tloušťce vzorku a je mírně citlivá na úrovni fotovybělování. Ačkoli je doba života fluorescence do značné míry necitlivá vůči uvedeným faktorům, velmi reaguje na změnu okolního prostředí, jako například změnu pH, polarity, indexu lomu média nebo teploty. Dále také závisí na množství obsaženého kyslíku nebo způsobu vazby mezi molekulami.

Díky citlivosti na výše uvedené faktory lze tuto metodu využít i pro mapování prostorové variace životnosti v reakci na změny v prostředí buňky. Proto FLIM může velmi přesně poskytovat informace o činnosti biomolekuly *in vitro* i *in vivo* [3].

Z této metody lze získat dvě stěžejní informace pro experimentální část. Jednou z informací je zjištění intenzity v konkrétním bodě buňky. Ta je definována rozlišením sytému, např. difrakční limit, instrumentální korekce apod. Významnější informací je ovšem distribuce doby života v dané části buňky nebo průměrná hodnota doby života. Ta umožňuje poměrně citlivě rozlišit jednotlivé fluorofory a stanovit jejich distribuci.

Buď se může jednat o fluorofory s různou chemickou podstatou v jednom prostředí, nebo o jeden fluorofor v prostředí o různých vlastnostech.

2.7. Indikátory pH

2.7.1. Nevlastní fluorofory

Jsou to látky, které nefluoreskují, dokud se k nim nepřidá fluorofor. Podle typu vazby, kterou se váží ke sledované látce, se dají rozdělit na fluorescenční sondy a fluorescenční značky.

Fluorescenční značky jsou ke studované látce vázány kovalentní vazbou a patří mezi ně thiokyanosloučeniny jako je například fluoresceinizothiokyanát (FITC) nebo tetrametylrhodaminizothiokyanát (TMR). Nejčastěji se využívají pro fluorescenční značení proteinů, v imunologii nebo histochemii.

Fluorescenční sondy se ke struktuře zkoumané látky poutají nekovalentní vazbou, kdy pak po navázání mění velmi často svoje fotofyzikální vlastnosti.

Nevlastní fluorofory lze dále dělit do dvou skupin podle toho, jestli se jejich kvantový výtěžek mění v závislosti na biologickém systému.

Pokud se kvantový výtěžek fluorescence se nemění po interakci s biologickým okolím, jedná se o fluorescenční barviva používaná ve fluorescenční cytochemii. Do této skupiny látek lze zařadit například fluorescein a jeho deriváty nebo akridinovou oranž.

Do další skupiny látek, kde se kvantový výtěžek mění velmi výrazně při interakci s buněčným okolím, lze zařadit například 1-anilinonaftalen-8-sulfonát (ANS).

Fluorescenční indikátory mohou mít i vysokou specifitu pro určitou látku. Tuto vlastnost lze využít při stanovování jednotlivých látek [4][6].

2.7.2. Fluorescenční pH sondy

Fluorescenční sondy reagující na pH umožňují měření pH uvnitř buněk s velkou přesností. Intracelulární pH se v cytosolu pohybuje mezi 6,8 a 7,6 a v kyselých organelách mezi 4,5 a 6,0. Je tedy potřeba měřit změny pH v oblasti desetin jednotek pH, tedy je nutné vybírat sondy s velkou citlivostí a rozlišením už při minimální změně pH.

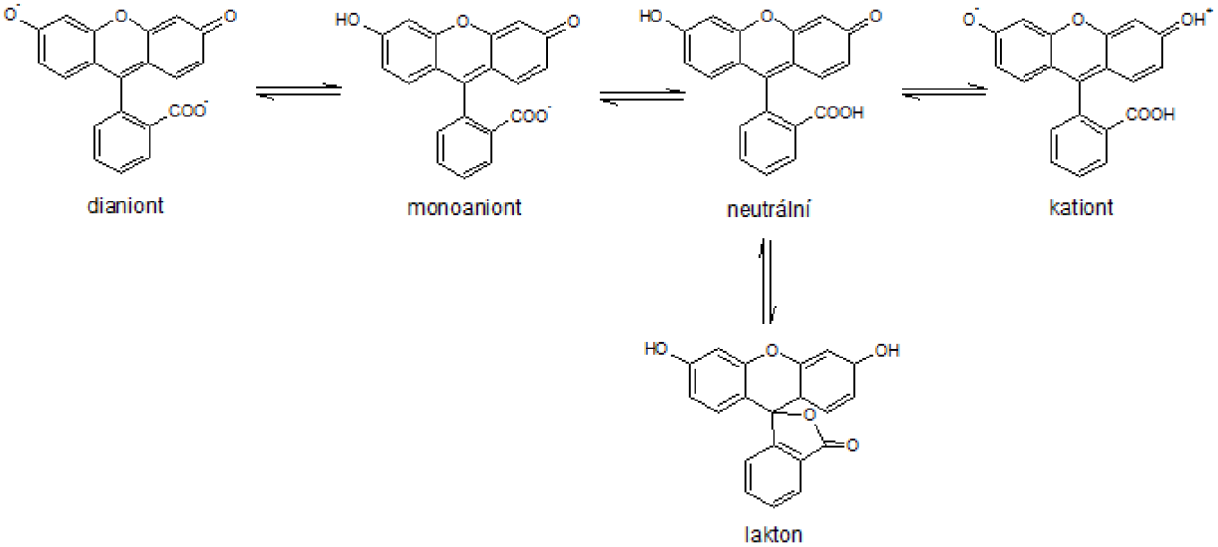
Tabulka 1: Často používané fluorescenční sondy rozpustné ve vodě pro měření intracelulárního pH

Název	**Fluorofor/výchozí fluorofor**	**CAS číslo**	**pK_a**	**Absorpční maximum [nm]**	**Emisní maximum [nm]**
Fluorescein	Fluorescein	2321–07–5	6,4	494	521
BCECF – AM	Karboxyfluorescein	85138–49–4	6,98	503	520
SNARF–1	Fluorescein	126208–12–6	7,5	514	580 (pH 6) 640 (pH 9)
pHrodo Green	Rhodamin	–	6,5	509	533
pHrodo Red	Rhodamin	–	6,5	560	585

2.7.2.1. *Fluorescein*

Fluorescein je červený krystalický prášek s bodem tání při 320 °C. Je rozpustný ve vodě i v alkoholech. 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.

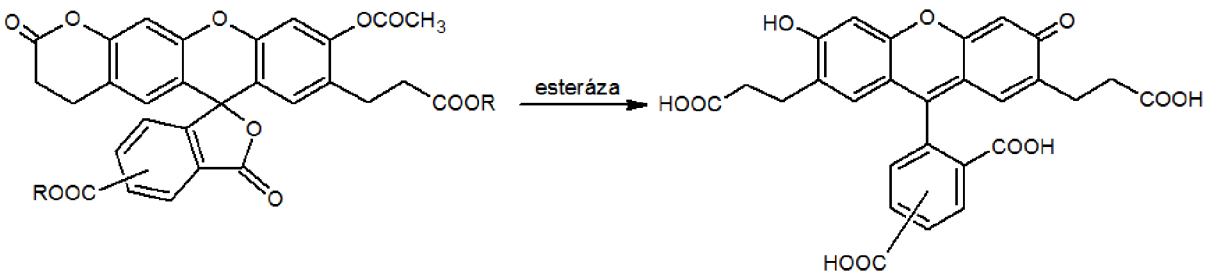
Doba života fluorescence protonované a deprotonované formy se pohybuje mezi 3 – 4 ns. Sodná sůl fluoresceinu není vhodná pro použití ve fyziologickém pH kvůli svému nízkému pK_a. Další deriváty, jako jsou například BCECF nebo SNARF se používají jako samostatné sondy [7].



Obr. 3: Přechody jednotlivých ionových forem fluoresceinu. V pH menším než 2 je fluorescein v podobě kationu, okolo pH 5 přechází na monoanion a v přibližně fyziologickém pH je ve formě dianionu. Největší kvantový výtěžek má právě jako dianion, a to φ = 0,93.

2.7.2.2. *BCECF-AM*

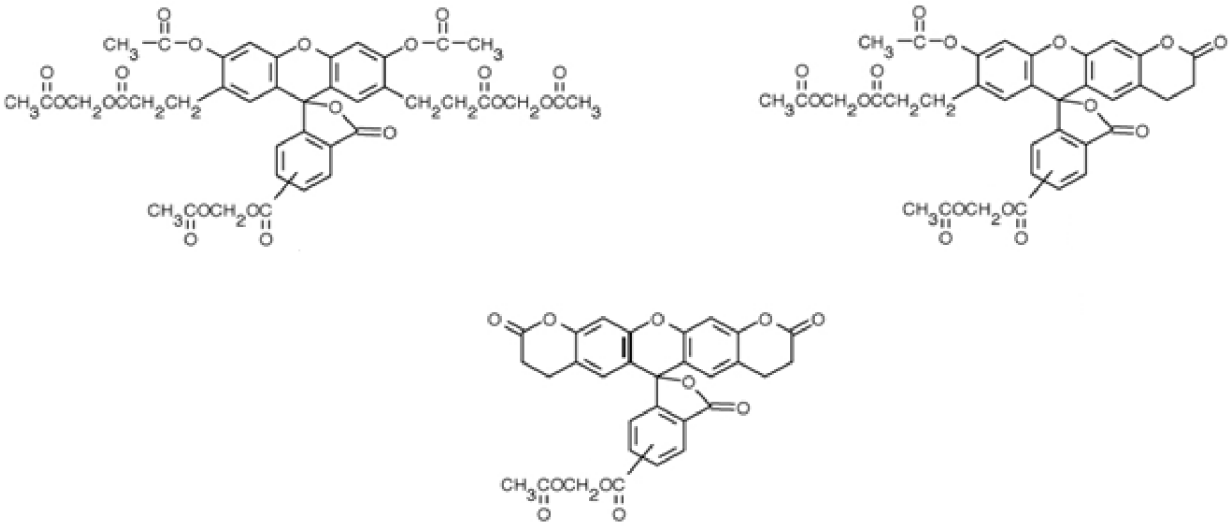
Sonda BCECF (celým názvem (2',7'-bis-(2-karboxyethyl)-5-karboxyfluorescein) se používá s acetoxymethylesterem (AM). BCECF-AM má při fyziologickém pH čtyři až pět negativních nábojů, které zvyšují jeho retenci v buňkách. Jeho isosbestický bod je při přibližně 440 nm. Látka je sama o sobě nefluorescenční, její fluorescenci způsobují až esterázy uvnitř buňky.



Obr. 4: Hydrolýza vazeb esterázou v živé buňce. Funkční skupina acetoxymethylester je zde zobrazená jako -R. Po hydrolýze vazeb vykazuje BCECF zelenou fluorescenci.

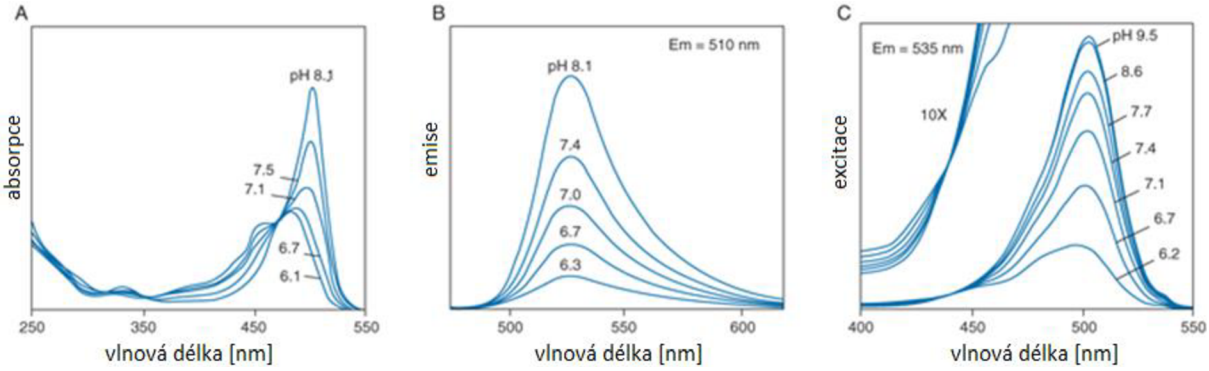
Sonda se bez esteru nevyužívá, protože její isosbestický bod je poměrně vzdálený od absorpčního maxima a na mikroskopu vykazuje pouze slabý signál. Ve spojení

s acetoxymethylesterem vytváří neutrálně nabitou molekulu, a proto do buňky proniká snáz než bez esteru [8].



Obr. 5: Směs izomerů BCECF využívaná jako sonda pro měření intracelulárního pH

Stejně jako u fluoresceinu a karboxyfluoresceinu je absorpce anionové (bazické) formy BCECF-AM daleko vyšší než u protonované formy. Posuv emisního spektra při excitaci při 505 nm je mírně závislý na pH. Měření intracelulárního pH je založeno na poměru intenzity emise detekované při 535 nm při excitační vlnové délce přibližně 490 nm v závislosti na intenzitě emisního záření při excitaci v isosbestickém bodě [9].



Obr. 6: Závislost BCECF-AM spekter na pH. A – absorpční spektrum, B – emisní spektrum, C – excitační spektrum. Excitační spektrum je zvětšeno 10x, aby byl dobře vidět isosbestický bod BCECF při 440 nm. Je patrné, že isosbestický bod excitačního spektra je různý od absorpčního [9].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Tato práce se zabývá měřením pH v různých částech gram-negativní prokaryotické buňky. Ve světové literatuře se výzkumy zabývaly většinou měřením pH v eukaryotických buňkách, popřípadě v gram-pozitivních prokaryotických buňkách.

3.1. Měření intracelulárního pH v gram-pozitivní bakterii

Měření intracelulárního pH probíhalo v gram-pozitivní bakterii řádu *Propionibacterium acnes* pomocí fluorescenční spektroskopie za použití sondy BCECF. Sonda byla do bakterie vnášena v podobě BCECF-AM kvůli lepší penetraci membránou.

Intracelulární pH bakterie bylo stanoveno vztahem mezi intenzitami fluorescence při 505 nm a 450 nm a pH využívající nigericin. Pro ověření intracelulárního pH stanoveného pomocí sondy BCECF-AM byly výsledky porovnávány s daty získanými použitím ^{31}P-NMR spektroskopie.

Bylo zkoumáno opět pomocí BCECF-AM a ^{31}P-NMR, jestli změna pH prostředí a přidání různých chemických látek do roztoku bude ovlivňovat i intracelulární pH. Zjistilo se, že bakterie si udržuje svoje pH, pokud je pH okolí v rozmezí 5,0 – 7,4. Intracelulární pH se začalo měnit při pH okolí 7,5. Jakmile prostředí dosáhlo hodnoty pH 8,5 a více, tak se intracelulární pH téměř rovnalo okolnímu. Zatímco přidání glukózy na vnitřní pH nemělo vliv, znatelnou acidifikaci buňky přineslo přidání NH_4Cl a alkalizaci $NaHCO_3$. Tyto změny byly pozorovatelné na změně intenzity fluorescenční sondy [10].

3.2. Měření intracelulárního pH v nádorové buňce

Měření intracelulárního pH probíhalo v lidské buňce zasažené kolorektálním karcinomem (označení buňky Caco-2) pomocí fluorescenční sondy BCECF v podobě BCECF-AM. Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 440 a 503 nm a emisní vlnové délce 535 nm. V průběhu času se do roztoku přidaly dvě slabé kyseliny, jedna slabá báze, kyselina olejová nebo tetradecylamin. Pokud to bylo třeba, byl do buněčné suspenze ještě přidán hovězí albumin nebo chlorid amonný, aby se co nejvíce potlačil vliv pH gradientu.

Když se do buněčné suspenze přidala slabá kyselina, hodnota intracelulárního pH začala postupně klesat ze 7,4 až na 6,7 (po přidání 50mM kyseliny). Po dobu 10 minut se hodnota pH opět postupně zvyšovala, ale už se nevrátila do své původní hodnoty. Stejný postup se opakoval i pro slabou bázi. Hodnota intracelulárního pH se okamžitě zvýšila, ale opět se už nevrátila úplně na svoji původní hodnotu.

Když se buňky Caco-2 umístily do roztoků s rozdílnou hodnotou pH, byl mnohem větší rozdíl v hodnotách intracelulárního pH po přidání slabé kyseliny tam, kde byly buňky umístěny v roztoku s nižším pH [11].

3.3. Aplikace fluorescenčních pH sond na bakterie mléčného kvašení

Pro tento výzkum byla používána sonda BCECF, dále pak byla syntetizována nová sonda s nižší hodnotou pK_a než má BCECF. Tato sonda, N-(fluoresceinthioureanyl)-glutamát (FTUG), prokázala mnohem menší citlivost na změnu koncentrace KCl než BCECF. Podobně jako BCECF, penetrace FTUG do buňky byla nezávislá na koncentračním spádu protonů, ale pouze na ATP. Tyto vlastnosti byly pozorovány jak v bakterii *Lactobacillus plantarum*, tak i v *Lactococcus lactis*. Před použitím sond bylo pH určeno radioaktivně značenou kyselinou

benzoovou. Hodnoty naměřené sondami se příliš nelišily od výsledků získané kyselinou benzoovou.

Dále bylo zkoumáno vylučování sondy z buňky. BCECF bylo vyloučeno z buňky *L. lactis* v nezměněné podobě, což bylo prokázáno chromatografií a hmotnostní spektrometrií. V případě FTUG byl vyloučen její konjugovaný derivát. Nemodifikovaný FTUG nebyl vyloučen, ačkoli byl přítomen v buněčném extraktu *L. lactis*.

Výsledek studie prokázal, že penetrace obou sond do buňky *L. lactis* je zprostředkována různými systémy řízenými ATP pro organické aniony [12].

3.4. Měření pH gradientu pomocí dvoufotonové FLIM

Tato metoda byla použita pro identifikaci mikrodomén (od 1 do 25 μm) ze dvou různých hodnot pH pro buňky nejsvrchnější vrstvy epidermis. Jako modelové buňky lidské kůže se využívaly buňky z bezsrstých myší.

Jako fluorofor je zde využit BCECF, jehož doba života je závislá na rozsahu a změně intracelulárního pH. Experimentálně bylo ověřeno, že pK_a sondy BCECF je 6,87. Doba života se pohybuje v kyselém prostředí kolem 2,7 ns a v zásaditém prostředí okolo 3,9 ns. Nejdelší doba života byla tedy prokázána pro plně deprotovaný stav, nejkratší doba života byla zaznamenána pro protonovanou formu. Rozdíl dob života je tedy přibližně 1,4násobný oproti intenzitě fluorescence. Mezi pH 4,5 a 7,5 je rozdíl intenzity téměř šestinásobný.

Měření tedy dokazuje, že doba života není úměrná kvantovému výtěžku. Výsledky z tohoto výzkumu se liší přibližně o 10 %, než co je uváděno v literatuře (*Principles of fluorescence spectroscopy, Lakowicz 1993*).

Dále byla sonda BCECF srovnána s fluoresceinem. Doba života fluoresceinu byla o 0,18 ns vyšší než BCECF v roztoku o pH 7,1 a o 0,10 ns vyšší v epidermálních buňkách. Zatímco viskozita obou sond v roztoku byla stejná, po penetraci do buněk se mírně zvýšila u fluoresceinu.

Nejnižší hodnota pH, a tedy největší množství kyselých oblastí, byla detekována na povrchu buněk. Nejvyšší pH, které bylo neutrální, bylo naměřeno v životaschopné epidermis kvůli nepřítomnosti matrix bohaté na ceramidy [13].

3.5. Časově rozlišená fluorescence pro snímání intracelulárního pH v živých buňkách

Tato studie využívala jak jednofotonovou, tak i dvoufotonovou FLIM společně s laserovou skenovací mikroskopií a TCSPC technikou pro zobrazení různých pH v buňce. Testy, která sonda je pro měření nejvhodnější, probíhaly především *in vitro*, ale také *in situ*. Jako fluorescenční sondy se používaly BCECF-AM, HPTS a SNARF-5F. Pro měření *in situ* se přidal K^+/H^+ ionofor nigericin. Jako nejvhodnější pro měření *in vitro* se zdála být sonda BCECF-AM.

Intracelulární pH se měřilo u švába amerického (*Periplaneta americana*), kde se pro experiment vybírali pouze samci ve věku od 3 do 6 týdnů. Z nich se vyjmuly slinné žlázy, které se přenesly do fyziologického roztoku. Do těchto žláz se pak postupně penetrovala společně s fyziologickým pufrem sonda BCECF-AM a vzorek se nechal určitou dobu ještě inkubovat.

Deprotonací použitých sond v alkalickém prostředí došlo k červenému posuvu jejich absorpčního maxima. Emisní spektrum HPTS a BCECF-AM bylo nezávislé na změně pH.

HPTS jako jediná měla monoexponenciální vyhasínací křivku s dobou života okolo 5,5 ns, ovšem uvnitř buňky s pH 6,5–8,5 neprojevovala žádnou změnu, proto je jako indikátor pH nepoužitelná. Vyhasínací křivky ostatních sond byly multiexponenciální, ovšem při změně pH měnily i svou dobu života.

Vyhasínací křivka SNARF-5F byla triexponenciální, ovšem změna doby života nebyla moc velká (od 1,7 ns pro pH 6,4 do 2,1 ns pro pH 8,4). Kvůli této malé změně byla vybrána sonda BCECF-AM, která svou dobu života měnila mnohem více (3,0 ns pro pH 6,4 až 3,9 ns pro pH 8,4). Biexponenciální vyhasínací křivka BCECF-AM odpovídala protonované a deprotonované formě sondy.

Pro kalibraci *in situ* se použil nigericin ve spojení se sondou BCECF-AM. I přes správné nastavení vnitřní koncentrace K^+ se zvýšil objem buňky, proto došlo k poklesu intenzity fluorescence. Vyhasínací křivka byla pořád biexponenciální, ovšem variace dob života fluoroforu se snížila přibližně o 0,3 ns okolo fyziologického pH. Průměrná doba života 3,37 ± 0,03 ns odpovídala pH přibližně 7,3, což korespondovalo s předchozím měřením, kdy se pH citlivou mikrosondou určilo ve slinných žlázách pH 7,5. Mírně nižší hodnota pH by mohla být způsobena jinou koncentrací H^+ způsobenou například únikem přes membránu [15].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

Fluorescenční sonda	BCECF-AM:	Sigma-Aldrich CAS: 117464-70-7
Interní kalibrace	intracelulární pH kalibrační kit: Life Technologies	
Externí kalibrace	kyselina citrónová:	Penta CAS: 5949-29-1 Číslo šarže: 1907070714
	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$:	Lach:ner CAS: 10039-32-4 Číslo šarže: 319061205
	KH_2PO_4:	Lach:ner CAS: 7778-77-0 Číslo šarže: PP/2009/00261
	NaOH:	Penta CAS: 1310-73-2 Číslo šarže: 1810241013
	$Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$:	Lachema CAS: 1303-96-4 Číslo šarže: 206270379
	HCl (aq.):	Penta CAS: 7647-01-0 Číslo šarže: 2006020615

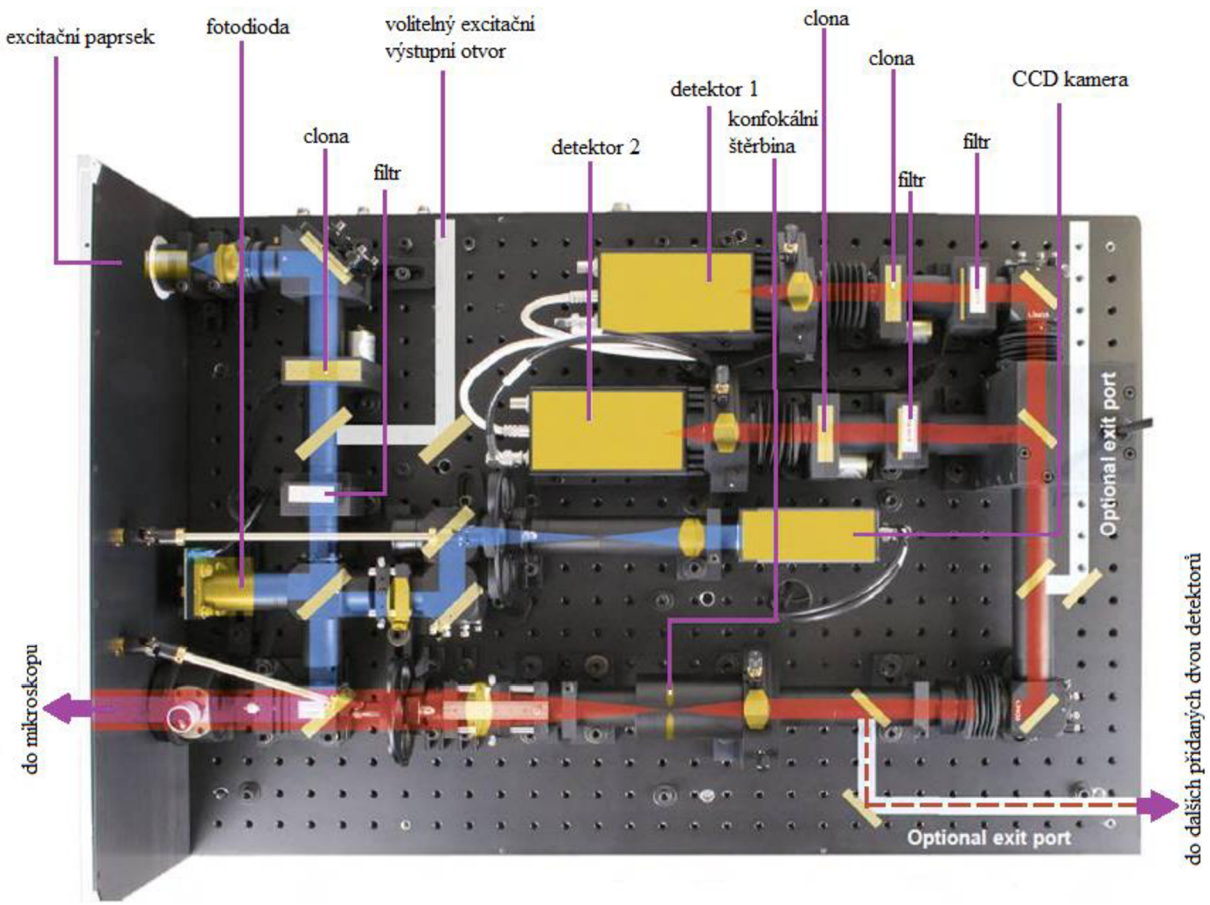
4.2. Přístroje a zařízení

4.2.1. Systém MicroTime 200

Systém přístrojů se skládá z inverzního mikroskopu Olympus IX 71 (Olympus), excitačních zdrojů a elektroniky od firmy PicoQuant (PicoQuant GmbH) a skeneru se subnanometrovým rozlišením firmy Physik Instrumente (Physik Instrumente GmbH).

Přístroj obsahuje excitační zdroje, pulsní pikosekundové diodové lasery o frekvencích do 80 MHz a vlnových délkách od 375 do 900 nm. Měřící soustava obsahuje čtyři nezávislé detektorové kanály. Dva z nich jsou detektory typu τ–SPAD se šumem nepřekračujícím 100 Cnts·s^{-1} a další dva jsou detektory MPD–SPAD se šumem pod 250 Cnts·s^{-1}. Přístroj je také vybaven externím spektrografem s CCD kamerou Newton [14].

Pro měření bylo použito následující nastavení přístroje: excitační zdroj 470 nm s horizontálně polarizovaným světlem při průchodu optickými zařízeními s frekvencí 40 MHz, superapochormatický ultraplanární objektiv UPLanSApo 60x/W s vodní imerzí, dichroické zrcadlo odrážející excitační vlnovou délku a propouštějící emisní vlnové délky 405/467 nebo 470/635, detektor τ–SPAD 2 a pinhole 50 μm.



Obr. 7: Schéma měřicího přístroje MicroTime 200 s naznačeným průchodem laserového paprsku (červeně) [14].

4.3. Použité programy

SymPhoTime 64 – software pro sběr a vyhodnocení dat pro TCSPC analýzu

4.4. Příprava roztoků pro externí kalibraci

Bylo zvoleno několik různých pufrů pro škálu pH od 5 do 8, aby iontová síla byla co nejmenší a neovlivňovala měření. Z každého pufru o daném pH byly odebrány 3 ml a k nim se přidalo 5 µl fluorescenční sondy BCECF-AM. Aby se zabránilo bakteriální kontaminaci, byly roztoky sterilně převedeny přes stříkačkový filtr (cut-off 220 nm) do vialek. Následně se nechaly tři týdny stát ve tmě při laboratorní teplotě, aby sonda zhydrolyzovala.

V následující tabulce jsou uvedeny jednotlivé pufry s jejich pH měřeným ihned po smíchání, dále pak po týdnu a po 21 dnech.

Tabulka 2: Přehled pufrů a jejich pH v závislosti na čase, iontová síla daného pufru

Pufr	**$pH_{teoretické}$**	**pH_{ihned}**	**$pH_{týden}$**	**$pH_{3\ týdny}$**	**I [mol·dm^{-3}]**
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ + kyselina citronová	5,06	4,97	5,06	5,11	0,26
	5,51	5,47	5,53	5,42	0,30
KH_2PO_4 + NaOH	6,01	6,02	6,06	5,97	0,11
	6,53	6,49	6,54	6,38	0,12
	7,08	6,93	7,04	6,84	0,14
	7,60	7,51	7,57	7,34	0,15
$Na_2B_4O_7 \cdot 20\ H_2O$ + HCl	8,02	8,09	8,18	7,91	0,07

4.5. Příprava roztoků pro interní kalibraci

Na základě literární rešerše [10] byl zvolen pro přípravu kalibrační křivky kit pro interní kalibraci od firmy Life Technologies, který obsahuje nigericin a valinomycin.

Ve 345 µl bezvodého roztoku DMSO bylo rozpuštěno 5 mg nigericinu tak, že vznikl 20 mM roztok. Ve 225 µl bezvodého roztoku DMSO bylo rozpuštěno 5 mg valinomycinu tak, že vznikl 20 mM roztok. 225 µl nigericinu bylo kvantitativně převedeno do valinomycinu a vytvořil se roztok s obsahem 10 mM každé látky.

Do 10 ml pufru o přesně daném pH, který byl dodán v kitu pro kalibraci, se napipetovalo 10 µl směsi valinomycinu s nigericinem v bezvodém DMSO.

Do buněčné suspenze se sondou se přidala výše připravená směs o daném pH a celý roztok se nechal inkubovat při teplotě 37 °C alespoň 5 minut.

4.6. Příprava buněčné suspenze

Bakteriální kmeny *Cupriavidus necator* H16 a PHB$^-$4 byly zaočkovány do inokulačního média Nutrien Broth o koncentraci 25 g·l^{-1}. Bakterie se nechaly centrifugovat rychlostí 160 rpm 24 hodin při teplotě 30 °C. Po uplynutí této doby bylo inokulum převedeno do minerálního (produkčního) média, které obsahovalo 10 % inokula. Kultivace v takto připraveném produkčním médiu probíhala 72 hodin. Složení minerálního média je uvedeno v příloze.

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 opět oddělen od buněk, byl bakteriální sediment rozsuspendován v 1 ml PBS pufru. Do takto připraveného vzorku byl přidán 1 µl fluorescenční sondy BCECF-AM. Nakonec se ještě vzorek nechal kultivovat 30 minut při teplotě 30 °C.

Takto připravené vzorky byly určeny pro měření na fluorescenčním mikroskopu. Pro interní kalibraci bylo ještě nutné obarvené vzorky centrifugovat 5 minut rychlostí 10 000 rpm a následně rozsuspendovat v pufru o příslušném pH s obsahem valinomycinu a nigericinu. Po centrifugaci a opětovném rozsuspendování buněk v příslušném pufru byly vzorky inkubovány 20 minut při teplotě 30 °C. Až po této době byly vzorky připraveny k měření interní kalibrace.

4.7. Příprava vzorků na měření

Z obarvené buněčné suspenze bylo odebráno cca 10 µl a umístěno na krycí sklíčko. Tato buněčná suspenze byla zafixována 2% roztokem agarózy o teplotě pod 40 °C. Množství agarózového roztoku bylo přibližně 500 µl. Při aplikaci bylo nutné směs jemně promíchávat, aby se agarózový gel dostal mezi bakterie.

4.8. Vyhodnocení

4.8.1. TCSPC analýza

TCSPC analýzou lze zjistit dobu života fluoroforu. Existuje několik způsobů vyhodnocování dat TCSPC, ale nepoužívanější je metoda nelineárních nejmenších čtverců, se kterou pracuje i program SymPhoTime 64. Modulem „Analyses“ v tomto programu byly vyhodnoceny vyhasínací křivky. TCSPC histogramy byly prokládány pomocí metody rekonvoluce multiexponenciálním modelem podle rovnice

$$F(t) = B + A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \tag{5}$$

kde t je čas, B fitovací parametr a A představuje předexponenciální funkci, která souvisí s relativním zastoupením fluoroforu ve vzorku a τ je odpovídající doba života.

Sledovanými parametry správnosti fitu byla suma nejmenších čtverců odchylek a reziduální analýza. Pro zjištění správnosti fitu se nejčastěji využívá parametr X^2, který porovnává naměřená data s matematickým modelem a lze ho získat z rovnice:

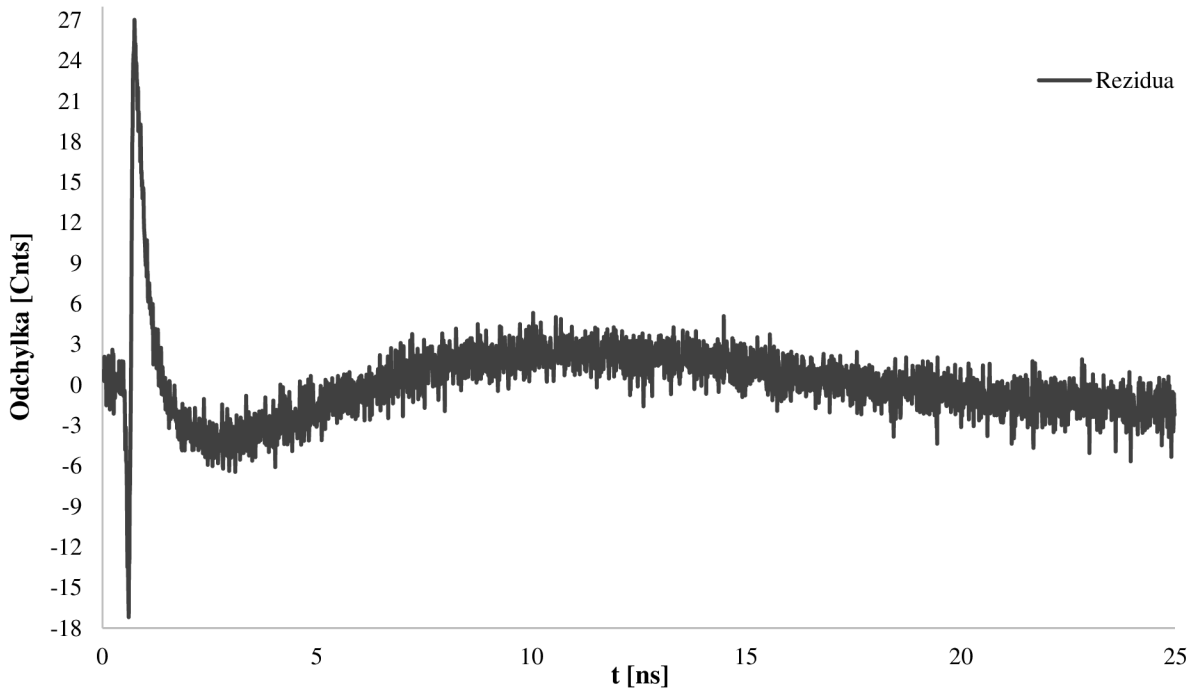
$$X^2 = \sum_{k=1}^{n} \frac{1}{\sigma_k^2} [N(t_k) - N_c(t_k)]^2 = \sum_{k=1}^{n} \frac{[N(t_k) - N_c(t_k)]^2}{N(t_k)}, \tag{6}$$

kde n je počet dat použitých pro analýzu, σ_k je standardní odchylka datového bodu, $N(t_k)$ zastupuje naměřená data a $N_c(t_k)$ je matematický model.

Nevýhodou tohoto parametru je, že závisí na množství dat tak, že se zvyšujícím se počtem dat se bude zvyšovat i parametr X^2. Proto se zavedla reprodukovaná správnost proložení X_R^2, která je nezávislá na množství dat. Pokud se při vyhodnocení vyskytnou jen náhodné chyby, rozložení kolem osy x bude rovnoměrné, tak parametr X_R^2 se bude blížit jedné. Pokud ovšem matematický model nebude korespondovat s naměřenými daty, pak parametr X_R^2 bude výrazně vyšší než jedna.

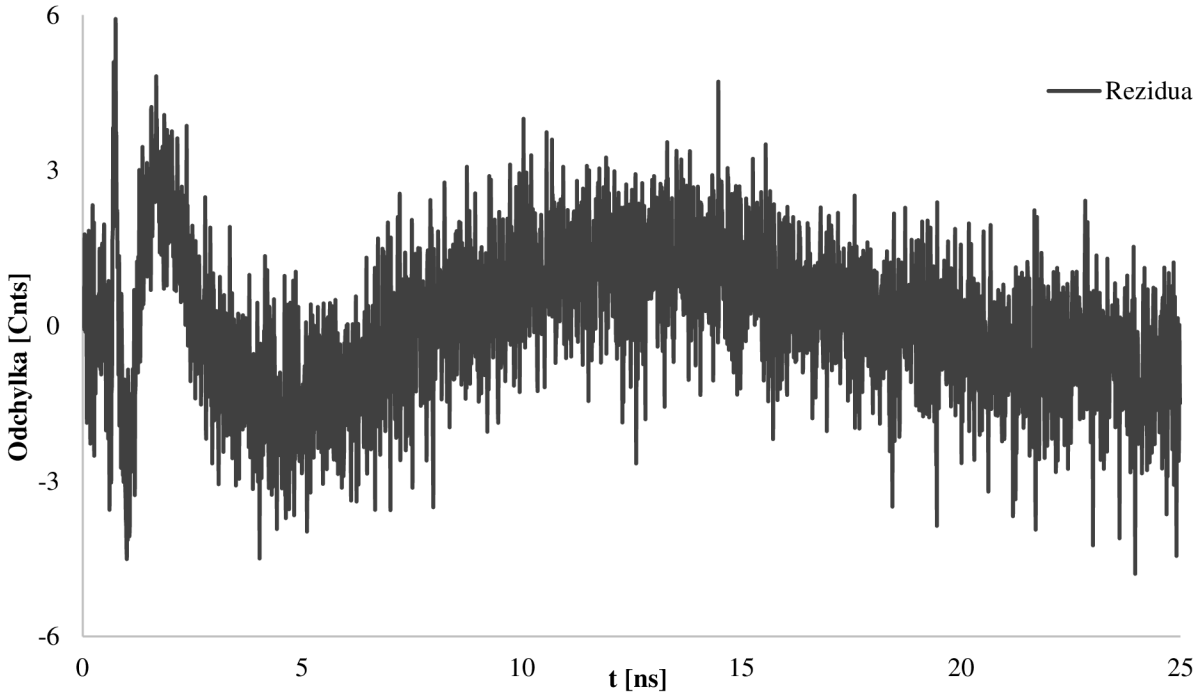
Jako dostatečné kritérium pro sumu čtverců je uváděna hodnota v intervalu 0,8 – 1,2. Pro správnou interpretaci dat by X_R^2, pokud neodpovídá hodnotám daného rozsahu, lze výsledné monoexponenciální křivce přidat parametr a změnit ji tak na biexponenciální. Tady je ale nutné sledovat hodnotu X_R^2, která by měla klesnout minimálně dvakrát pro správnou interpretaci dat. Pokud se hodnota X_R^2 změní pouze minimálně, je pro vyhodnocení nutná předchozí znalost vlastností analyzovaného vzorku, ale i přesto může být vyhodnocení nepřesné [5].

V případě reziduální analýzy bylo kritérium správnosti proložení dáno rovnoměrným rozložením odchylek v daném časovém rámci, což zobrazuje *Graf 1* a *2*. V případě prvního grafu jsou zobrazena rezidua pro monoexponenciální křivku, jejíž X_R^2 odpovídá hodnotě 10,84.



Graf 1: Příklad reziduální analýzy pro monoexponenciální křivku, parametr X_R^2 se rovná 10,84.

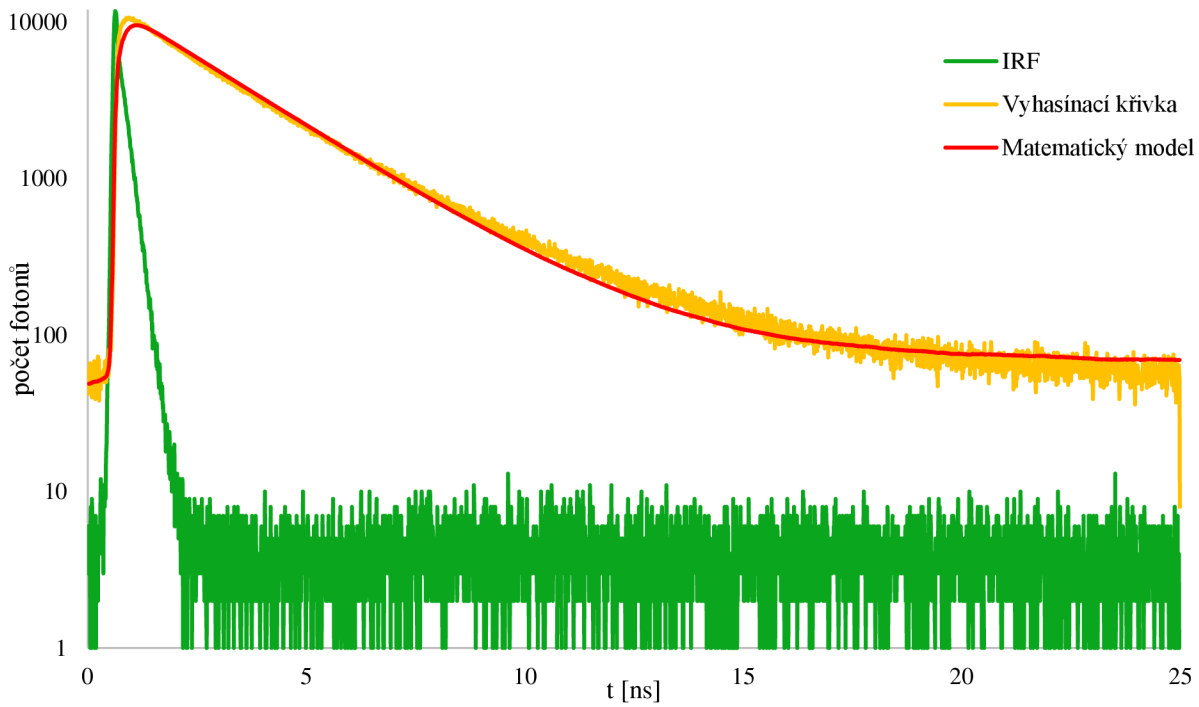
Při vyhodnocování dat je třeba pozorovat dva parametry zároveň. Prvním je výše zmíněný parametr X_R^2 a druhým je samotná reziduální analýza, které fialově zobrazuje *Graf 1* a *2*. V případě, že analyzovaný vzorek bude mít dvě a víc dob života, které se od sebe liší pouze minimálně, v reziduální analýze bude vidět systematická odchylka, tedy to, že rozložení bodů reziduální analýzy nebude zcela náhodné a nebude proto přesně kopírovat osu *x*. Z tohoto důvodu pak je nutné přidat parametr, v tomto případě další dobu života, a vyhodnocovat dál multiexponenciální model, který zobrazuje *Graf 2*.



Graf 2: Příklad reziduální analýzy pro biexponenciální křivku, parametr X_R^2 se rovná 2,04.

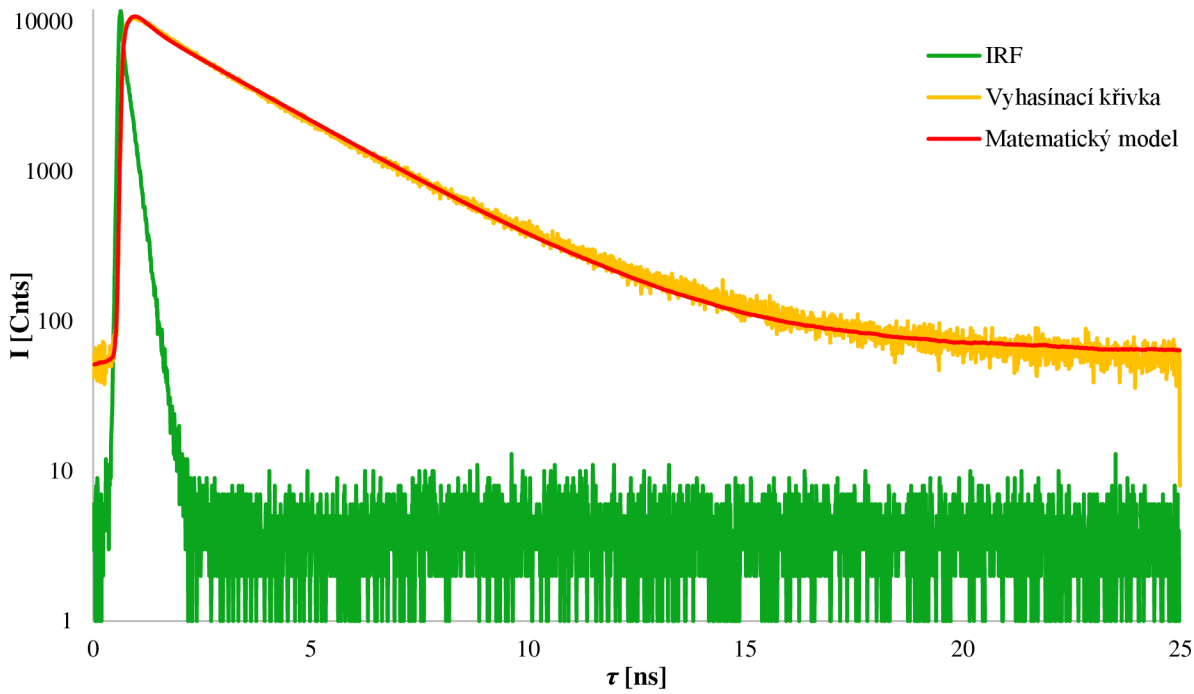
Jak je vidět z porovnání výše uvedených grafů, přidáním jednoho parametru se jak snížila hodnota X_R^2, tak se změnilo rozložení reziduí okolo osy *x*. Zatímco v případě monoexponenciální křivky se body pohybovaly v intervalu od -18 do 27, tak u biexponenciální křivky se tento interval snížil na hodnoty od -6 do 6. I tak ale je hodnota X_R^2 velmi vysoká a rozložení stále není náhodné, proto je nutné přidat další parametr.

Získaná data z TCSPC analýzy obsahují kromě reziduální analýzy i křivky naměřených dat, které se prokládají funkcí poklesu (matematický model) a z funkce přístrojové odezvy (IRF). Pro vyhodnocení dat je pak nutné IRF z analýzy odečíst. Vyhasínací křivka fluoroforu je v následujícím grafu vyznačena oranžově. Osa *y* zde reprezentuje četnost jednotlivých fotonů pro dané detekční kanály. Protože vyhasínací křivka má exponenciální charakter, je pro osu *y* standardně používané logaritmické měřítko. Monoexponenciální pokles má v tomto měřítku tvar přímky, tedy lze přímo dostat dobu života fluoroforu, viz *Graf 3*.



Graf 3: Rekonvoluce monoexponenciální vyhasínací křivky (oranžově), která je proložena matematickým modelem (červeně). Pro analýzu se odečítá IRF (zeleně), které má nejprve krátkou vysokou intenzitu a dál se jedná pouze o šum.

Po přidání dalších parametrů se u multiexponenciálních modelů vyskytuje paramter *A*, který určuje relativní zastoupení určitých dob života v analyzovaném vzorku. Biexponenciální vyhasínací křivku zobrazuje *Graf 4*.



Graf 4: Rekonvoluce biexponenciální vyhasínací křivky (oranžově) s IRF (zeleně) proložená matematickým modelem (červeně).

Po proložení vyhasínacích křivek byly získány parametry jednotlivých dob života, jejich relativní zastoupení (amplituda), příslušná intenzita fluorescence (integrál pod jednotlivými monoexponenciálními závislostmi) a průměrné hodnoty dob života. Tyto hodnoty byly využity pro interpretaci změn pH.

4.8.2. FLIM analýza

Tato metoda je založena na intepretaci TCSPC dat získaných v různých pozicích skeneru. Protože doba setrvání skeneru na jednom místě vzorku je nedostatečná k získání relevantního počtu dat (minimálně 10^4 fotonů v maximu), je TCSPSC analýza prováděna přes součet jednotlivých pixelů („Overall Decay“). V případě nehomogenity vzorků (vysoký šum) lze tuto analýzu provádět i na zvolené oblasti (Region Of Interest). Vždy je ale nutné dbát na dostatečný, statisticky významný počet fotonů pro analýzu[1].

Algoritmus FLIM analýzy pak pro každý pixel stanoví v rámci celkového modelu relativní zastoupení a korekci daných dob života. Tyto jsou pak zobrazeny jako histogram nebo jsou interpretovány jako střední hodnoty intenzity nebo barevnou škálou graficky.

---

[1] *Důvodem nemožnosti získání dat pro jednotlivé pixely je efekt fotovybělování, kdy dochází při osvitu k intenzivní degradaci fluoroforu. S tímto je spojená i délka potřebného měření. V případě střední hodnoty intenzity $5x10^4$ fotonů/s/pixel je pro dobu života 4 ns potřeba minimálně 40 s na získání dostatečného počtu fotonů pro statistiku (na základě empirického pozorování). Při rozlišení 300 x 300 pixelů pak celková doba na pořízení činí $3,6 \cdot 10^6$ s, což odpovídá 1000 h.*

Po nanesení vzorku na krycí sklíčko bylo nutné nejprve pomocí transmisního módu optického mikroskopu najít vrstvu s bakteriemi. Metalhalidovou lampou a sadou fluorescenčních filtrů se provedlo doostření v módu optického fluorescenčního mikroskopu. Pro orientaci, jestli je vzorek vůbec měřitelný, se udělaly skeny již v konfokálním módu pomocí elektroniky a detektorů. Takto se ověřila nalezená vrstva rychlým skenem a identifikovaly se výskyty buněk. Kvůli malému konfokálnímu objemu se musely udělat axiální řezy (*xz* nebo *yz* roviny) pro zaostření laterální roviny (*xy*). Poté se vybrala oblast s bakteriemi, od kterých se očekávaly nejlepší výsledky. Pro tuto oblast se použil jemný sken pro získání výsledků. Pokud by bylo potřeba, je možné v programu nastavit i čas, po který se bude skenovat jeden pixel, počet pixelů na jeden obrázek nebo sken v jednom, popřípadě obou směrech. Pro měření se používal jednosměrný sken, který je sice pomalejší (skenuje pouze zleva doprava, pak se vrátí na začátek a skenuje další část), ale zato přesnější oproti obousměrnému skenu.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pro vyhodnocení pH v bakteriích byla použita naměřená křivka pro externí kalibraci, ale i kalibrační křivka používaná v literatuře [15].

5.1. Externí kalibrace

Externí kalibrace byla měřena na detektoru τ-SPAD 2 a vyhodnotila se na 3 doby života. Jednotlivé délky života, jejich zastoupení a intenzita jsou uvedeny v tabulkách v příloze. Pro vyhodnocení kalibrace bylo nutné uvažovat všechny doby života, ale protože nebylo jak ověřit, který čas patří jaké formě sondy, zvolili jsme následující řešení.

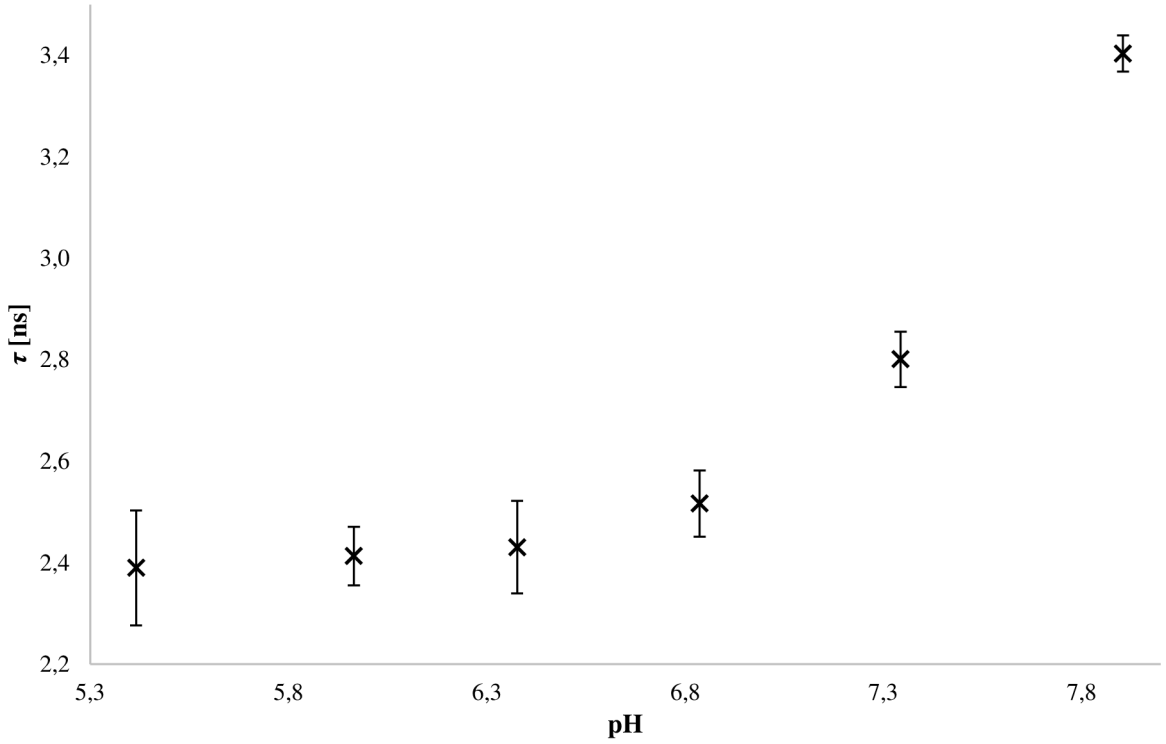
Nejkratší čas pravděpodobně reprezentuje pouze „dorotaci“ molekuly do směru paprsku kvůli polarizované excitaci. Má nízkou intenzitu, ale vysokou amplitudu, proto neovlivňoval průměrování přes intenzitu, ale doby života zprůměrované přes amplitudu se kvůli němu výrazně liší. Ovšem protože se nejedná o fluorescenční proces, ale pouze fotofyziku, lze ho z průměrování dob života pro kalibraci vyloučit.

Druhá nejdelší doba života pravděpodobně patří protonované formě sondy, což může být buď monoanionová, nebo neutrální forma.

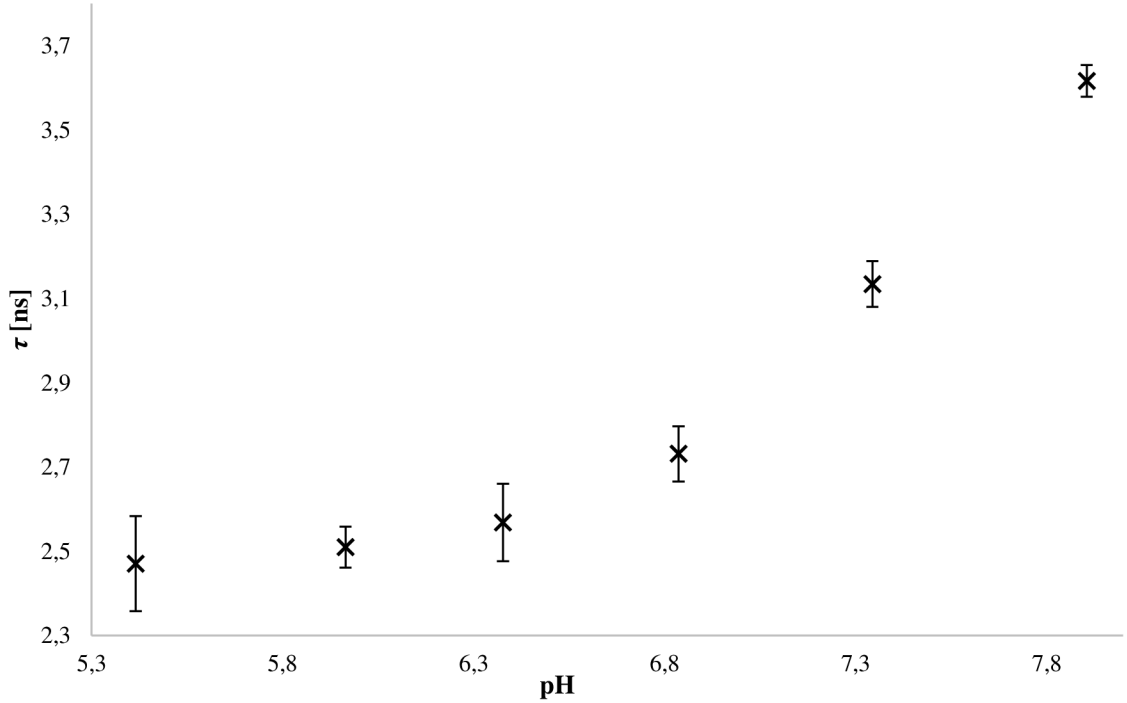
Třetí, nejdelší, doba života patří dianionové formě sondy, která se v roztoku zcela hydrolyzovala a má tedy jak nejdelší dobu života, tak i intenzitu a většinou i relativní zastoupení.

Pro výpočet kalibrační křivky se muselo počítat jak s nejdelším časem, tak i s druhým nejdelším, protože jinak by výsledky byly zkreslené. Doby života se průměrovaly jak přes intenzitu, což se velmi často používá i v literatuře, tak přes amplitudu. Ovšem hodnoty dob života pro stejné pH se v obou případech liší. Je to pravděpodobně dáno tím, že relativní zastoupení kratší doby života se často blíží relativnímu zastoupení nejdelší doby života. Z tohoto důvodu se doporučuje používat spíš hodnoty doby života vypočítané přes intenzity fluorescence.

Následující grafy zobrazují závislost doby života průměrované přes amplitudu i intenzitu fluorescence na pH.



Graf 5: Doby života fluoroforu zprůměrované přes amplitudu



Graf 6: Doby života fluoroforu zprůměrované přes intenzitu fluorescence

5.2. Interní kalibrace

Pro interní kalibraci prokaryotických buněk jsme zvolili postup uváděný výrobcem pro interní kalibraci eukaryotických buněk. Nejprve se vzorek s bakteriemi *Cupriavidus necator* H16 měřil pouze jako buněčná suspenze, kdy se měřila fluorescence sondy, která se dostala

do konfokálního objemu. Pro další měření se použila směs agarózy s pufrem o daném pH, do kterého se zamíchala buněčná suspenze. Naměřená data se vyhodnotila na dvě doby života. *Tabulka 3* a *Tabulka* 4 uvádí jejich zprůměrované hodnoty s odchylkami a parametr X_R^2.

Tabulka 3: Doba života sondy v buněčné suspenzi zprůměrovaná přes amplitudu ($\tau_{Avr\ A}$) a intenzitu ($\tau_{Avr\ I}$)

$\tau_{Avr\ A}$ [ns]	$\tau_{Avr\ I}$ [ns]	X_R^2
2,21 ± 0,03	2,44 ± 0,03	1,098

Tabulka 4: Doby života fluoroforu a jejich odchylky zprůměrované přes intenzitu ($\tau_{Avr\ I}$) a amplitudu ($\tau_{Avr\ A}$) v jednotlivých bakteriích měřené v agarózovém gelu s pufrem o daném pH.

pH	*Cupriavidus necator* H16			*Cupriavidus necator* PHB$^-$4		
	$\tau_{Avr\ A}$ [ns]	$\tau_{Avr\ I}$ [ns]	X_R^2	$\tau_{Avr\ A}$ [ns]	$\tau_{Avr\ I}$ [ns]	X_R^2
4,5	2,59 ± 0,02	3,02 ± 0,02	1,166	3,11 ± 0,28	3,41 ± 0,27	1,091
5,5	2,43 ± 0,02	2,89 ± 0,02	1,089	neměřeno		
6,5	2,45 ± 0,02	2,77 ± 0,02	1,171	neměřeno		
7,5	2,41 ± 0,01	3,00 ± 0,01	1,203	2,49 ± 0,01	2,97 ± 0,01	1,090

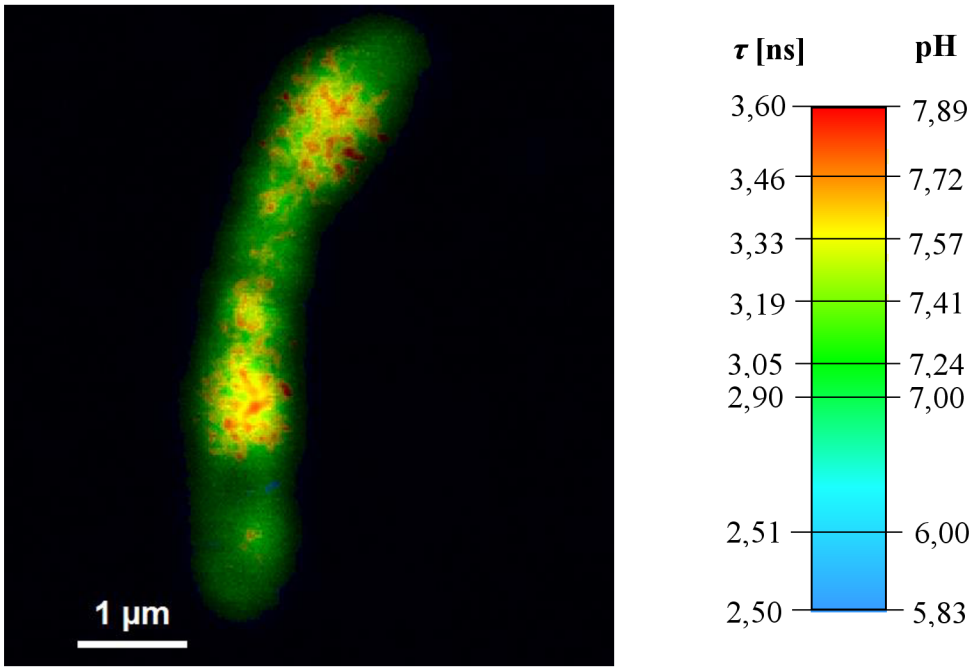
Jak je z naměřených hodnot patrné, doby života nemají žádnou závislost, proto z nich nelze sestrojit kalibrační křivku. Ačkoli doby života nevykazují žádnou vzestupnou nebo sestupnou tendenci, jejich hodnoty se pohybují v rozmezí 2,5 – 3,4 ns jako při externí kalibraci. Doby života u obou typů bakterií spíše klesaly, na rozdíl od hodnot z externí kalibrace.

Jak je tedy vidět z výsledných hodnot, tato kalibrace není vhodná pro následné použití pro vyhodnocení pH v bakteriích.

5.3. FLIM analýza bakterií *Cupriavidus necator* H16

Pomocí FLIM analýzy bylo možné detekovat zastoupení jednotlivých dob života v bakteriích. Na rozdíl od výsledků publikovaných v literatuře nejsou vyhasínací křivky biexponenciální, tedy v bakterii nelze najít pouze dvě doby života, které by odpovídaly protonované a deprotované formě sondy. Většinou se zde vyskytují dva intenzitně dominantní časy, které mají delší dobu života.

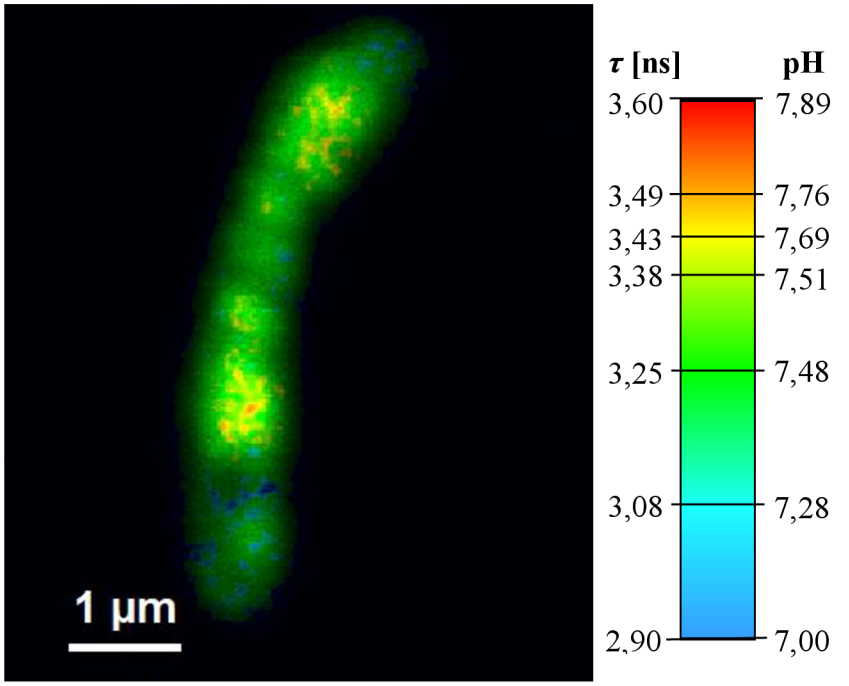
Na základě naměřených dob života z externí kalibrace bylo k dobám života fluoroforu v bakterii přiřazeno odpovídající pH. V prvním měření byla zvolena celý rozsah pH z naměřené kalibrace, tedy přibližně od 2,5 ns do 3,6 ns.



Obr. 8: Bakterie H16 s barevně rozlišenými dobami života v rozmezí 2,6 – 3,6 ns a barevná škála s pH odpovídajícím příslušným dobám života

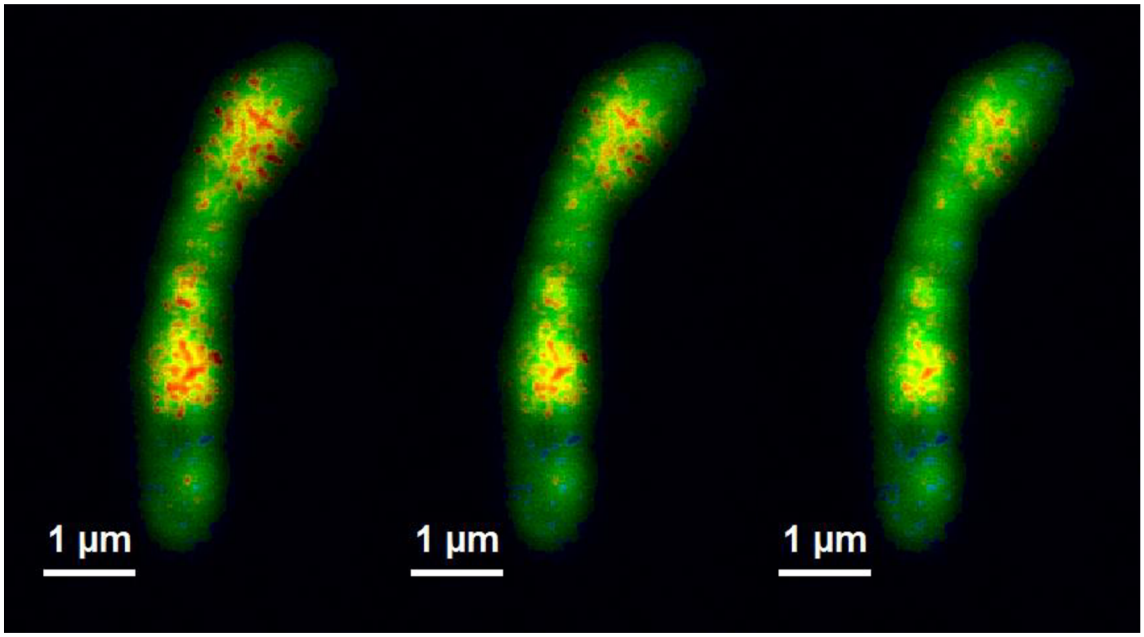
Protože v bakteriích se nízké doby života nevyskytují, což je patrné z *Obr. 8*, bylo možné upravit škálování barevné stupnice. Pro lepší rozlišení zeleně zbarvené plochy, tedy rozmezí pH přibližně 7,0 – 7,4, byla zvolena nová stupnice od doby života 2,9 ns do 3,6 ns místo původního rozsahu 2,6 – 3,6 ns.

Na *Obr. 9* je vidět, že změna škálování částečně pomohla rozlišit pH v oblasti okolo 7. Přibylo více oblastní s nižším pH, které v předchozím obrázku nebyly rozpoznatelné od ostatních.



Obr. 9: Bakterie CN H16 po změně prahování – ve spodní části přibyly oblasti s nižším pH, které předtím nebyly rozlišitelné.

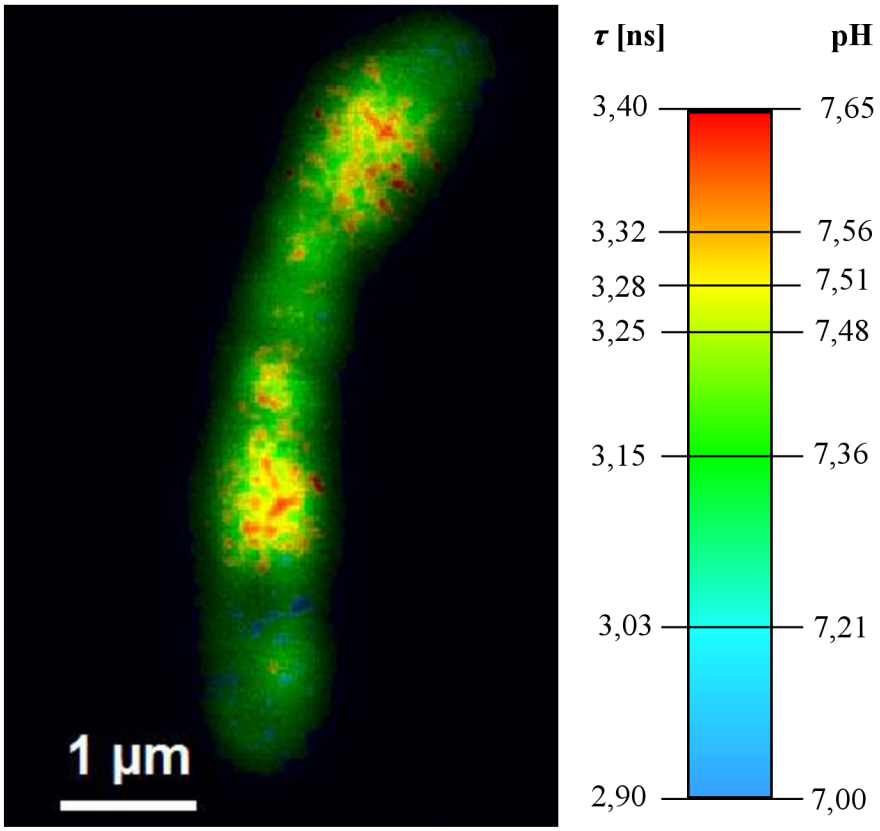
Jak je vidět, tak žádná doba života neodpovídá nejvyšší hodnotě 3,6 ns. Proto jsme se rozhodli upravit i horní hranici. Pro dobu života 3,5 ns se pomalu začala objevovat místa zbarvená dočervena. Pro jistotu jsme hranici ještě snížili, abychom zjistili, ve kterých oblastech je doba života nejvyšší. Na následujícím obrázku je vidět, jak se postupně mění pH v závislosti na hodnotě horní hranice doby života.



Obr. 10: Postupná změna horní hranice doby života při konstantní spodní hranici (2,9 ns, pH 7,05) – 3,3 ns (vlevo, pH 7,54), 3,4 ns (uprostřed, pH 7,65) a 3,5 ns (vpravo, pH 7,77)

Při změně škálování ale může docházet k problémům při vyhodnocování – je možné, že při zvolení špatného rozmezí dob života nebudou zobrazeny minoritní oblasti daného pH, proto se musí postupovat opatrně.

Pro tuto bakterii bylo nejvhodnější zvolit horní hranici 3,4 ns. Pokud bychom zvolili vyšší hranici, nebyly by delší doby života tak dobře rozlišitelné. Naopak při zvolení nižší hranice bychom nemuseli dostat už zcela přesná data kvůli velkému množství červeně zabarvených oblastí. Výsledná stupnice dob života by tedy nakonec byla od 2,9 ns do 3,4 ns, což odpovídá rozsahu pH od 7,0 do 7,6. Na *Obr. 11* jsou uvedeny jak odpovídající hodnoty pH, tak zvolený výsledný FLIM, na kterém je dobře vidět rozložení jednotlivých dob života.

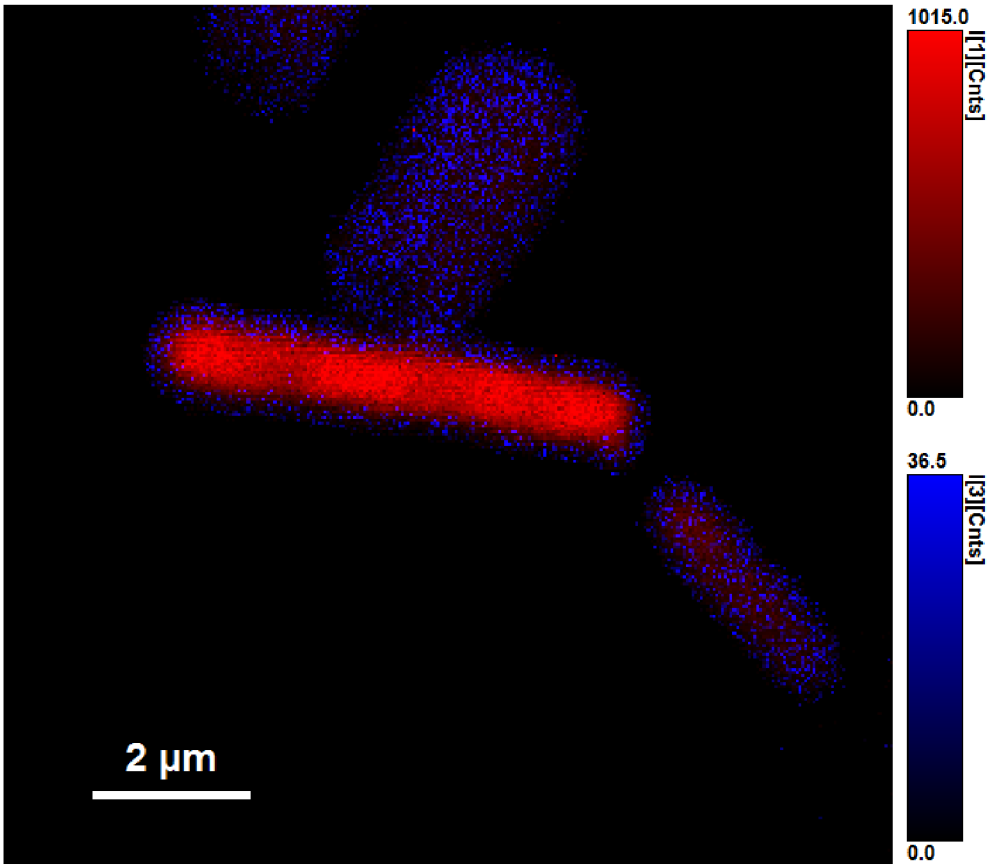


Obr. 11: Rozložení dob života a odpovídající pH pro CN H16

Z rozložení dob života vyplývá, že nejvyšší pH je situováno v oblasti okolo PHB granulí. Tento fakt může být způsoben buď vyšší afinitou sondy ke granulím, nebo zvýšenou hydrolytickou aktivitou v těchto místech.

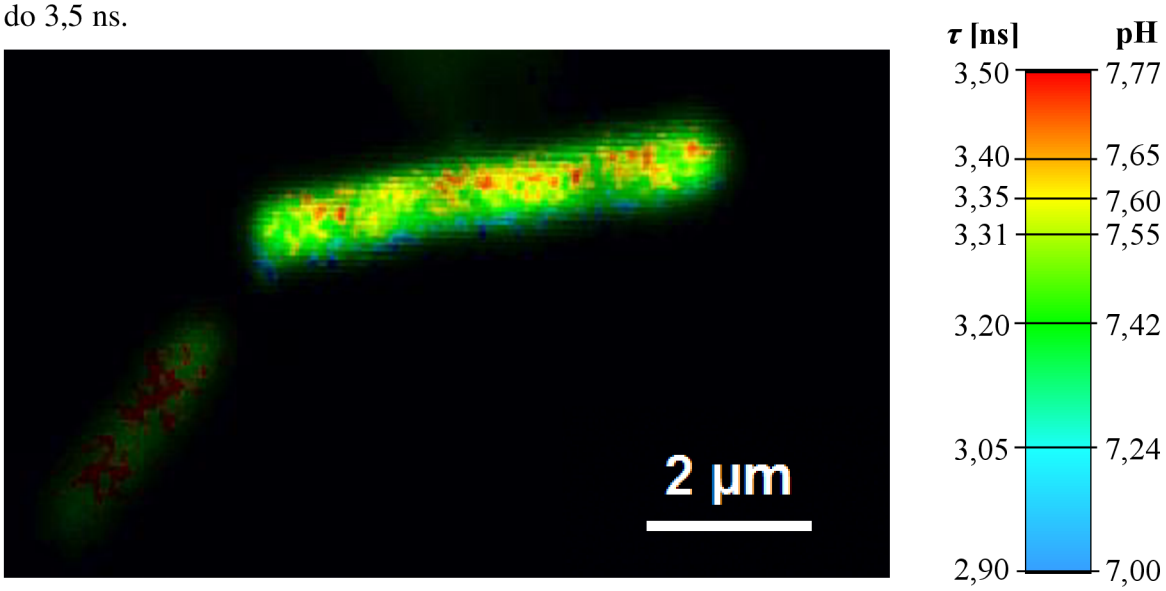
5.4. FLIM analýza bakterií *Cupriavidus necator* PHB$^-$4

Bakterie kmene *Cupriavidus necator* s označením PHB$^-$4 je mutant, který nevytváří granule s obsahem PHB. Na základě TCSPC analýzy byly nalezeny doby života, které svou délkou přibližně odpovídaly časům nalezeným v bakteriích H16, tedy žádná vyhasínací křivka neměla biexponenciální charakter. Navíc u všech zkoumaných vzorků se u nejkratší doby života objevila záporná amplituda. Pro zjištění, kde se doba života s touto amplitudou nachází, byl FLIM interpretován pomocí RGB škály, kde fluoroforu se zápornou amplitudou byl přiřazen modrý kanál a nejdelší době života červený kanál, viz *Obr. 12*. Z něj bylo určeno, že se pravděpodobně nejedná o intetrakci sondy ve vnitřním prostředí buňky, ale pouze v buněčné stěně, proto lze pak přejít k prahování dob života v buňce. To, že se nejedná pouze o chybu měření, dokazuje rozmístění nejkratší doby života, které je vidět na *Obr. 12*.



Obr. 12: Rozložení nejkratší doby života se zápornou amplitudou (modře) a nejdelší (červeně) doby života v bakterii PHB⁻4.

Stejně jako v předchozím případě byla upravena barevná škála tak, aby byla lépe rozlišitelná místa o mírně se lišícím pH. Jako optimální rozmezí dob života byl zvolen interval od 2,9 ns do 3,5 ns.



Obr. 13: Bakterie PHB⁻4 s barevně rozlišenými dobami života v rozmezí 2,6 – 3,6 ns a barevná škála s pH odpovídajícím příslušným dobám života

Z *Obr. 13* je vidět, že na rozdíl od bakterie *Cupriavidus necator* H16 se nejvyšší pH pohybuje až do hodnoty 7,7 a je rozmístěno po celé délce bakterie. Nejnižší pH je situováno pouze ve velmi malém množství na okraji.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo stanovit pH v cytosolu bakterie kmene *Cupriavidus necator*, a to jak v bakterii produkující PHB (H16), tak i v neprodukující (PHB^-4) pomocí metody fluorescenční mikroskopie.

Jako nejvhodnější, a také nejpoužívanější metodou pro kalibraci se zdála být externí kalibrace buněk fluorescenční sondou BCECF-AM, kdy se sonda hydrolyzovala v pufru o daném pH a po určité době byla proměřena fluorescence a stanovena doba života. Ovšem externí kalibrace má několik nevýhod, jako je například skladování, kdy pufry nemusí vydržet dostatečně dlouhou dobu nebo rozložení fluoroforu v roztoku. Oba tyto faktory by mohly výrazně ovlivnit měření.

Protože interní kalibrace prokaryotických buněk nebyla v literatuře zatím popsána, postupovali jsme podle návodu pro stanovení pH v eukaryotických buňkách. Interní kalibraci jsme ale nakonec museli z měření zcela vyloučit kvůli špatným výsledkům a spolehnout se pouze na externí kalibraci, kterou jsme porovnávali s kalibrační křivkou získanou z literatury.

V bakterii kmene *Cupriavidus necator* H16 se doba života fluoroforu pohybovala v rozmezí od 2,9 ns do 3,4 ns, což odpovídá pH od 7,0 do 7,65. Průměrná doba života sondy v buňce byla 3,2 ns, což odpovídá pH 7,4 a nejdelší doby života se vyskytovaly pouze v blízkosti granulí obsahujících PHB.

V bakteriích *Cupriavidus necator* s označením PHB^-4 se doby života pohybovaly v rozmezí od 2,9 ns do 3,5 ns, což odpovídá pH 7,0-7,8. Průměrná doba života sondy byla přibližně 3,1 ns, což je pH okolo 7,3. Nejdelší doby životy se vyskytovaly v celém těle buňky. Bylo zjištěno, že v buněčné stěně bakterie PHB^-4 se vyskytuje záporná amplituda jedné z dob života, což znamená, že fluorescenční sonda BCECF-AM interaguje se složkou buněčné stěny, která způsobuje opožděnou emisi fluorescence. V buněčné stěně bakterie s označením H16 tato látka přítomna není.

Záporná amplituda pro sondu BCECF-AM ještě v literatuře nebyla popsána, tedy nelze s přesností určit, co ji způsobuje. Je možné, že se jedná o vlastnost bakterie *Cupriavidus necator*, ale pH cytosolu tato vlastnost neovlivňuje. Má vysokou amplitudu, ale velmi nízkou intenzitu, proto pro $\tau_{Avr\,I}$ je tato hodnota zanedbatelná. Z toho důvodu by jsme pro správnou interpretaci dat použili pro bakterii s označení PHB^-4 pouze $\tau_{Avr\,I}$, protože zde se tato odchylka ztratí.

7. LITERATURA

[1] COVINGTON, A. K. a R. G. BATES. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1985-01-1, 57(3) [cit. 2015-12-29]. ISSN 1365-3075. Dostupné z: http://www.degruyter.com/view/j/pac.1985.57.issue-3/pac198557030531/pac198557030531.xml

[2] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, issue 1. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf

[3] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C., Richard ANKERHOLD a Gregor P. C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques – FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* [online]. 2012, 17(12): 4047-4132 [cit. 2015-12-30]. DOI: 10.3390/molecules17044047. ISSN 1420-3049. Dostupné z: http://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/4047/

[4] VALEUR, Bernard a Mário Berberane SANTOS. 2013. *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, xxi, 569 s. ISBN 978-3-527-32846-8.

[5] LAKOWICZ, Joseph R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, xxvi, 954 p. ISBN 03-873-1278-1.

[6] BECKER, W., A. BERGMANN, M. A. HINK, K. KÖNIG, K. BENNDORF a C. BISKUP. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2004, 63(1): 58-66 [cit. 2015-12-30]. DOI: 10.1002/jemt.10421. ISSN 1059-910x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.10421

[7] HAN, Junyan a Kevin BURGESS. 2010. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chemical Reviews* [online]. 110(5): 2709-2728 [cit. 2015-12-30]. DOI: 10.1021/cr900249z. ISSN 0009-2665. Dostupné z: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr900249z

[8] HAUGLAND, Richard P. 2002. *Handbook of fluorescent probes and research products*. 9. ed. Eugene, Or. [u.a.]: Molecular Probes, Inc, xxvi, 954 p. ISBN 978-097-1063-600.

[9] OKUDA, Mark M. a Frank H. STEPHENSON. Probes Useful at Near-Neutral pH. *Thermo Fisher Scientific* [online]. [cit. 2015-12-31]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/ph-indicators/probes-useful-at-near-neutral-ph.html

[10] FUTSAETHER, C. M., B. KJELDSTAD a A. JOHNSSON. Measurement of the intracellular pH of Propionibacterium acnes: comparison between the fluorescent probe BCECF and 31 P-NMR spectroscopy. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 1993, **39**(2): 180-186 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1139/m93-025. ISSN 0008-4166. Dostupné z: http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m93-025

[11] 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* [online]. 2007, **338**(1-2): 104-109 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.01.048. ISSN 03785173. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517307000889

[12] GLAASKER, Erwin, Wil N. KONINGS a Bert POOLMAN. The application of pH-sensitive fluorescent dyes in lactic acid bacteria reveals distinct extrusion systems for unmodified and conjugated dyes. *Molecular Membrane Biology* [online]. 1996, **13**(3):

173-181 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.3109/09687689609160594. ISSN 0968-7688. Dostupné z: http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09687689609160594

[13] HANSON, Kerry M., Martin J. BEHNE, Nicholas P. BARRY, Theodora M. MAURO, Enrico GRATTON a Robert M. CLEGG. Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging of the Skin Stratum Corneum pH Gradient. *Biophysical Journal* [online]. 2002, **83**(3): 1682-1690 [cit. 2016-01-02]. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73936-2. ISSN 00063495. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349502739362

[14] MicroTime 200. *PicoQuant* [online]. 1999 [cit. 2016-03-18]. Dostupné z: http://www.picoquant.com/products/category/fluorescence-microscopes/microtime-200-time-resolved-confocal-fluorescence-microscope-with-unique-single-molecule-sensitivity

[15] HILLE, Carsten, Maik BERG, Lena BRESSEL, Dorit MUNZKE, Philipp PRIMUS, Hans-Gerd LÖHMANNSRÖBEN a Carsten DOSCHE. Time-domain fluorescence lifetime imaging for intracellular pH sensing in living tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **391**(5), 1871-1879 [cit. 2016-04-29]. DOI: 10.1007/s00216-008-2147-0. ISSN 1618-2642. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00216-008-2147-0

[16] Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Northwestern University* [online]. Evanston: Northwestern University, 2011 [cit. 2016-05-05]. Dostupné z: http://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/fluorescence-correlation-spectroscopy/

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PBS	fosfátový pufr s obsahem 0,15 M NaCl
PHB	polyhydroxybutyrát
BCECF-AM	2',7'-*bis*(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein
SNARF	seminaphtorhodafluor
DMSO	dimetylsulfoxid
TCSPC	time-correlated single photon counting
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
^{31}P-NMR	nukleární magnetická rezonance s použitím ^{31}P
ATP	adenosintrifosfát
IRF	instrument response function
CN H16	produkující kmen bakterie *Cupriavidus necator*
CN PHB^{-}4	neprodukující kmen bakterie *Cupriavidus necator*
CDF	constant function discriminator
TAC	time-to-amplitude converter
PGA	programmable gain amplifier
ADC	analog-to-digital converter
τ	doba života fluoroforu
$\tau_{Avr\,A}$	doba života fluoroforu zprůměrovaná přes amplitudy
$\tau_{Avr\,I}$	doba života fluoroforu zprůměrovaná přes intenzity
φ	kvantový výtěžek fluorescence
A	amplituda (relativní zastoupení) doby života, předexponeniciální faktor
B	fitovací parametr
I	intenzita fluorescence
λ	vlnová délka
$N(t_k)$	parametr zastupující naměřená data
$N_c(t_k)$	matematický model pro proložení funkce
σ_k	odchylka datového bodu
X_R^2	redukovaný parametr X
M	mol·dm^{-3}
S_0	základní singletová hladina
S_1	první excitovaná singletová hladina

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Složení minerálního média pro tvorbu granulí na 1000 ml roztoku

Látka	**Množství**
$(NH_4)_2SO_4$	3 g
KH_2PO_4	1,02 g
Na_2HPO_4	11,1 g
$MgSO_4$	0,2 g
Fruktóza	20 g
Roztok stopových prvků	1 ml

Příloha č. 2: Roztok stopových prvků jako součást minerálního média

Látka	**Množství**
$FeCl_3$	9,7 g
$CaCl_2$	7,8 g
$CuSO_4$	0,156 g
$CoCl_2$	0,119 g
$NiCl_2$	0,118 g
$CrCl_2$	0,062 g
0,1 M HCl	1000 ml

Příloha č. 3: Průměrné doby života fluoroforu zprůměrované přes amplitudu ($\tau_{Avr\ A}$) a intenzitu fluorescence ($\tau_{Avr\ I}$)

pH	$\tau_{Avr\ A}$	$\tau_{Avr\ I}$
5,113	2,532 ± 0,0113	2,619 ± 0,113
5,416	2,390 ± 2,413	2,470 ± 0,049
5,965	2,413 ± 0,091	2,510 ± 0,092
6,377	2,431 ± 0,065	2,568 ± 0,066
6,837	2,516 ± 0,055	2,731 ± 0,054
7,344	2,801 ± 0,036	3,134 ± 0,038
7,905	3,404 ± 0,044	3,616 ± 0,048

Příloha č. 4: Naměřené doby života s odchylkami, jejich relativní zastoupení, intenzita fluorescence a parametr X_R^2

pH	τ_1 **[ns]**	τ_2 **[ns]**	τ_3 **[ns]**	A_1 **[kCnts]**	A_2 **[kCnts]**	A_3 **[kCnts]**	I_1 **[kCnts]**	I_2 **[kCnts]**	I_3 **[kCnts]**	X_R^2
5,113	2,868 ± 0,077	1,870 ± 0,015	0,0663 ± 0,0048	3,48 ± 0,52	1,77 ± 0,51	3,69 ± 0,23	1249 ± 148	415 ± 143	30,60 ± 0,60	0,965
5,416	2,696 ± 0,044	1,763 ± 0,094	0,0833 ± 0,0044	3,50 ± 0,78	1,71 ± 0,29	2,89 ± 0,19	1181 ± 778	377 ± 80	30,08 ± 0,79	0,989
5,965	2,809 ± 0,065	1,820 ± 0,120	0,0804 ± 0,0054	3,34 ± 0,47	2,23 ± 0,42	3,54 ± 0,24	1171 ± 134	508 ± 127	35,50 ± 1,10	0,996
6,377	2,955 ± 0,051	1,790 ± 0,080	0,0769 ± 0,0052	3,97 ± 0,35	3,25 ± 0,33	4,71 ± 0,24	1465 ± 103	729 ± 104	45,30 ± 1,10	1,005
6,837	3,175 ± 0,051	1,700 ± 0,058	0,0809 ± 0,0052	2,74 ± 0,16	2,21 ± 0,16	3,27 ± 0,17	1089 ± 48	469 ± 46	33,03 ± 0,75	1,012
7,344	3,485 ± 0,028	1,435 ± 0,046	0,0650 ± 0,0038	3,791 ± 0,086	1,899 ± 0,064	4,83 ± 0,25	1651 ± 24	341 ± 27	39,31 ± 0,57	0,998
7,905	3,774 ± 0,017	1,453 ± 0,081	0,0686 ± 0,0054	5,288 ± 0,069	1,004 ± 0,051	4,35 ± 0,33	2495 ± 21	182 ± 20	37,31 ± 0,77	0,985