

Analytické aplikace fluorescence

Pokročilé biofyzikální metody v experimentální biologii

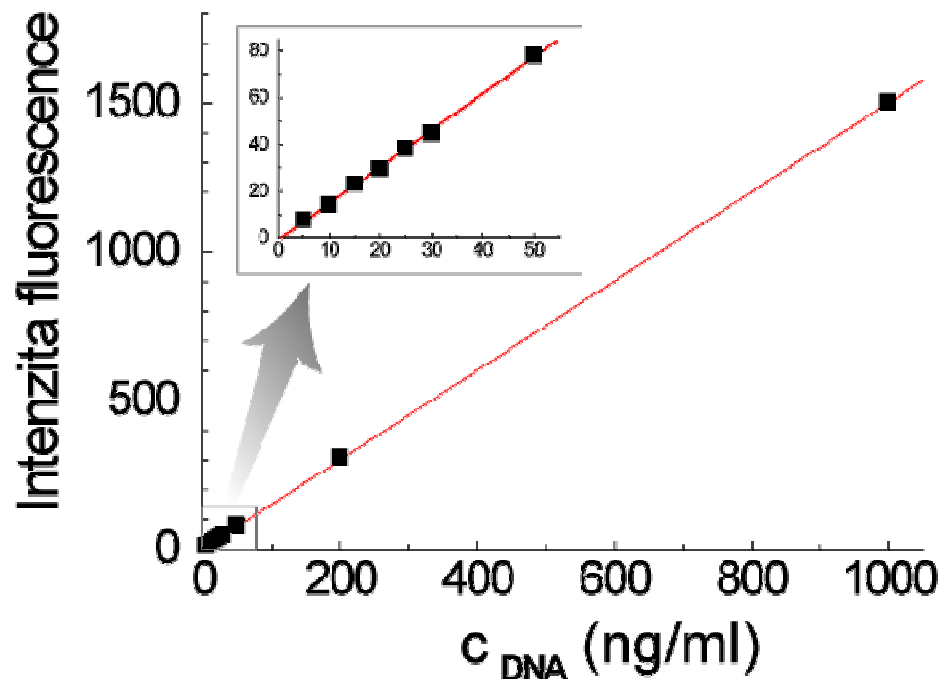
Ctirad Hofr



Určení koncentrace DNA

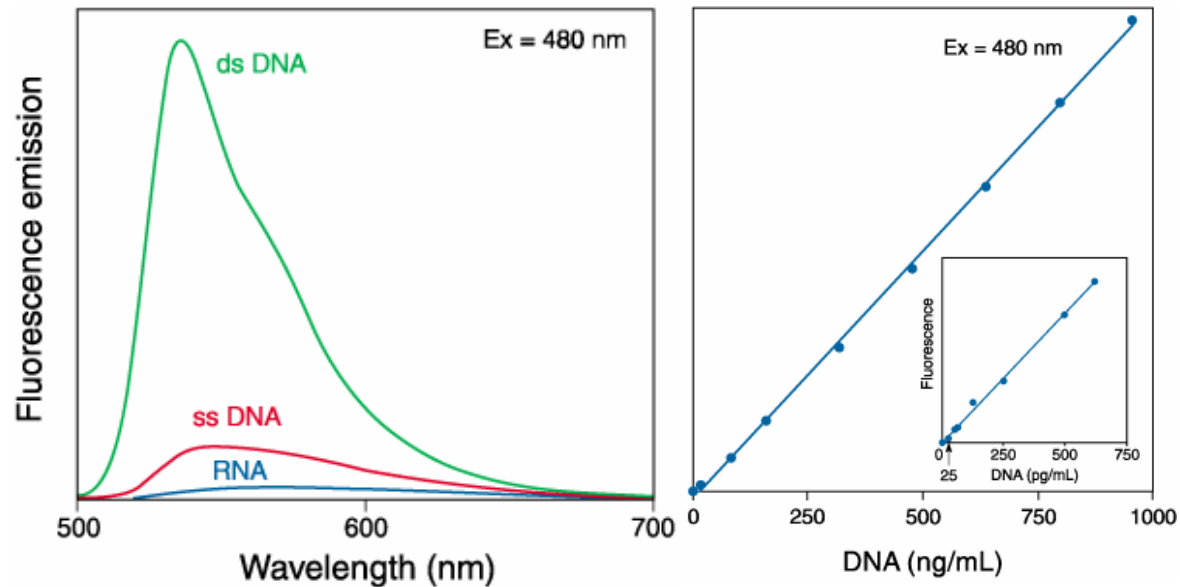
- Pomocí absorpční spektroskopie je možno přesně určit koncentraci až do limitu 1 $\mu\text{g/ml}$
- Použití fluorescenční sondy umožňuje snížit limit detekce 1000krát - na **1 ng/ml!**
- Při použití fluorescenčních sond na měření koncentrace komplexních vzorků (buněčný lyzát, krevní plazma) je menší vliv přítomnosti proteinů (absorbují při 260nm), nukleotidů a krátkých oligonukleotidů
- Přesnost měření je kolem 5%

Stanovení koncentrace DNA pomocí Hoechst 33258



- Standard - roztok DNA od 5 – 1000 nM
- Smíchání s roztokem Hoechst (200 ng/ml) v poměru 1:1
- Ex/Em 350/455 nm
- Měřeno v TE pufru
- Spotřeba vzorku ~ 50 ng DNA

Stanovení koncentrace DNA pomocí PicoGreen



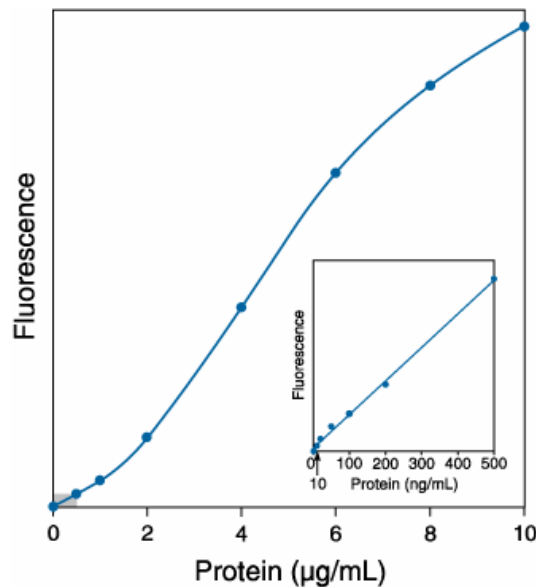
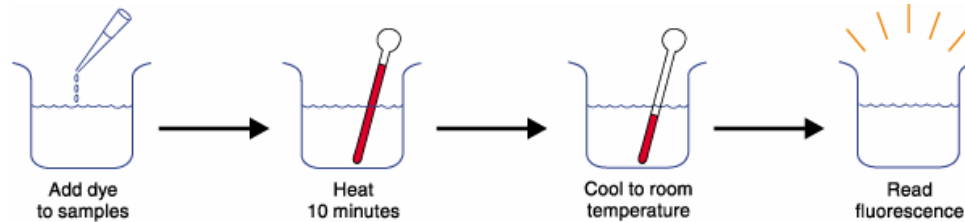
- Detekce **25 pg/ml**
- Ex/Em 480/520 nm
- Velký dynamický rozsah – lze stanovit koncentraci od 0.025 -1000 ng/ml



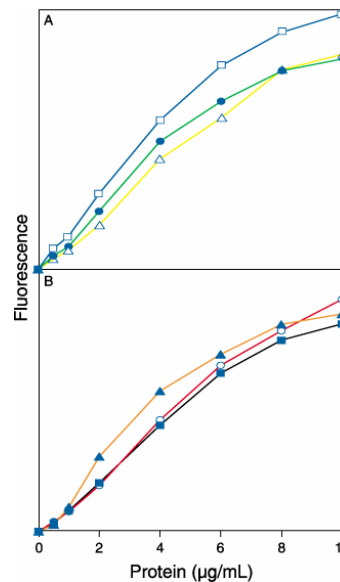
Určování koncentrace proteinů

- **UV absorpce** - stanovení na základě absorpce aromatických AK – je závislá na jejich výskytu v sekvenci (1 mg/ml)
- **Bradfordová metoda** – založená na změně zbarvení po vazbě na protein (0.25 mg/ml)
- **Fluorescenční metody** (10 ng/ml)

Fluorescenční stanovení koncentrace proteinů



BSA



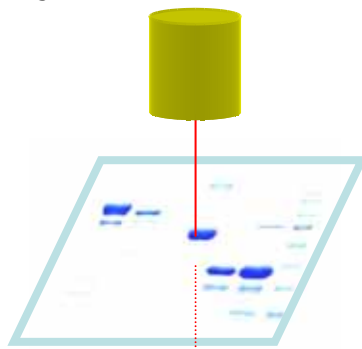
A) BSA, tryptase,
carbonic anhydrase
B) IgG, streptavidin,
RNase A

- Při použití fluorescenční sondy NanoOrange, je potřeba vyrovnat rozdíly ve struktuře proteinů, které by ovlivňovali interakce – je nutno je zdenaturovat
- Citlivost 10ng/ml
- Dynamický rozsah 1000
- Stabilní po dobu 6 hod
- Malá závislost na typu proteinu
- Metoda není citlivá na kontaminaci jinými molekulami než lipidy
- Pro kvantifikaci v přítomnosti lipidů nebo lipoproteinů lze použít CBQCA kit

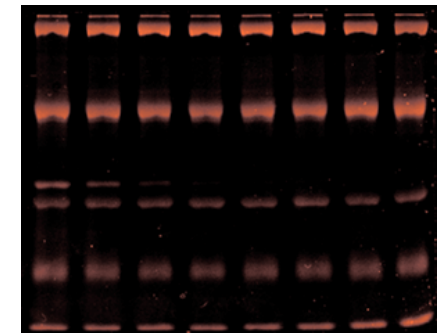
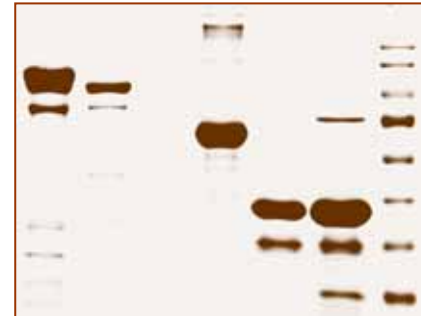
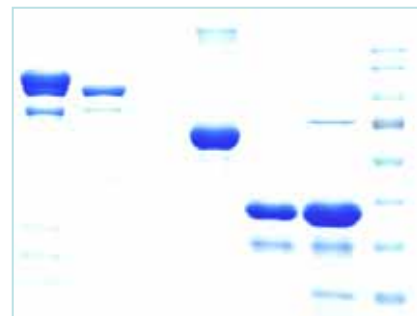
Stanovení množství za použití densitometrie gelů

- Při analýze molekul v gelu je možno získat současně informace o kvalitě i kvantitě
- Měří se množství absorbovaného/emitovaného světla v závislosti na 2D poloze
- Stanovení koncentrace DNA a proteinu po barvení gelu Coomasie, stříbrem nebo fluorescenčně

Zdroj světla



Detektor



Literatura

- Lakowicz J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy. Third Edition, Springer + Business Media, New York, 2006.
- Fišar Z.: FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH
<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>

Poděkování

Grafika z knihy Principles o Fluorescence byla pro účely této přednášky laskavě poskytnuta profesorem J.R. Lakowitzem.