Analytické aplikace fluorescence

Fluorescenční metody ve vědách o životě – cesta od molekuly k buňce

C7230

Ctirad Hofr

LifeB – Laboratoř interakce a funkce esenciálních Biomolekul

FGP – Funkční genomika a proteomika

NCBR – Národní centrum výzkumu biomolekul

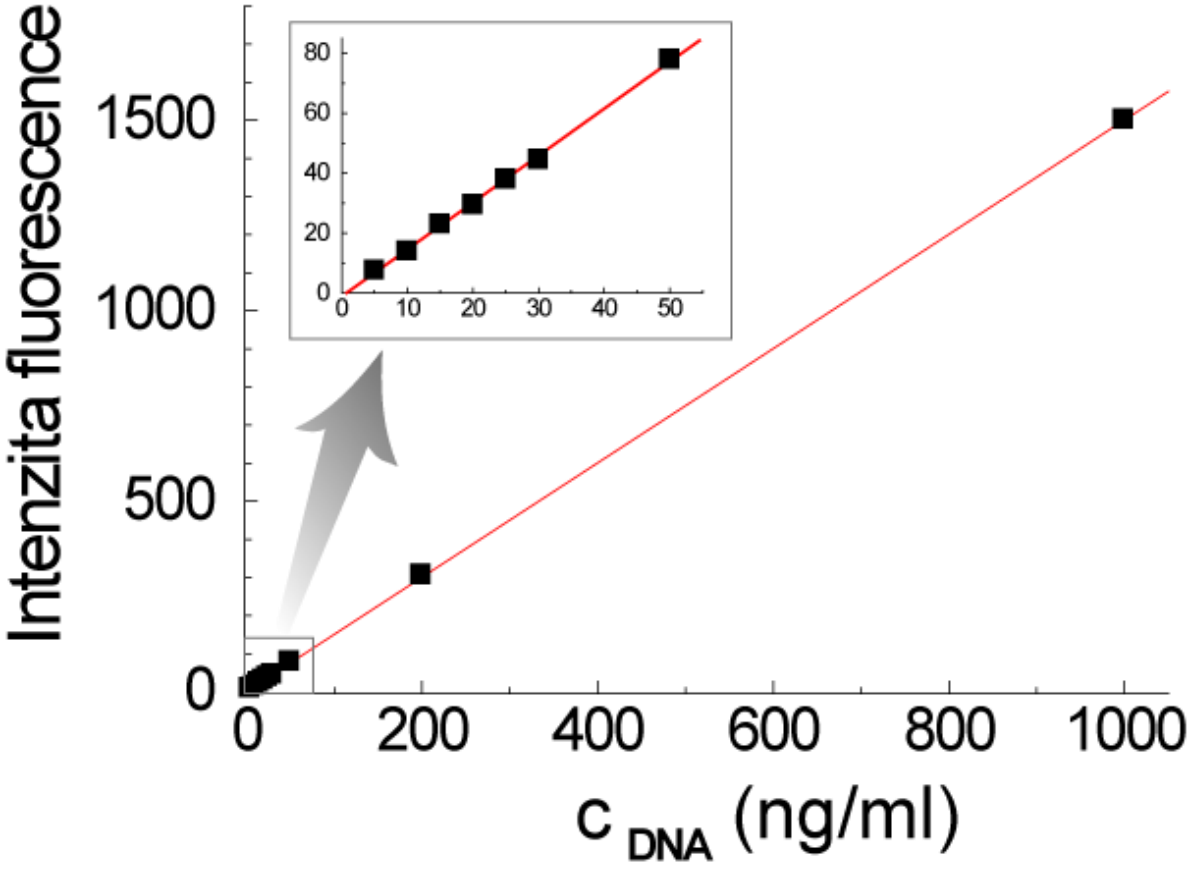
Přírodovědecká fakulta | Masarykova univerzita

MUNI SCI Národní centrum pro výzkum biomolekul

Určení koncentrace DNA

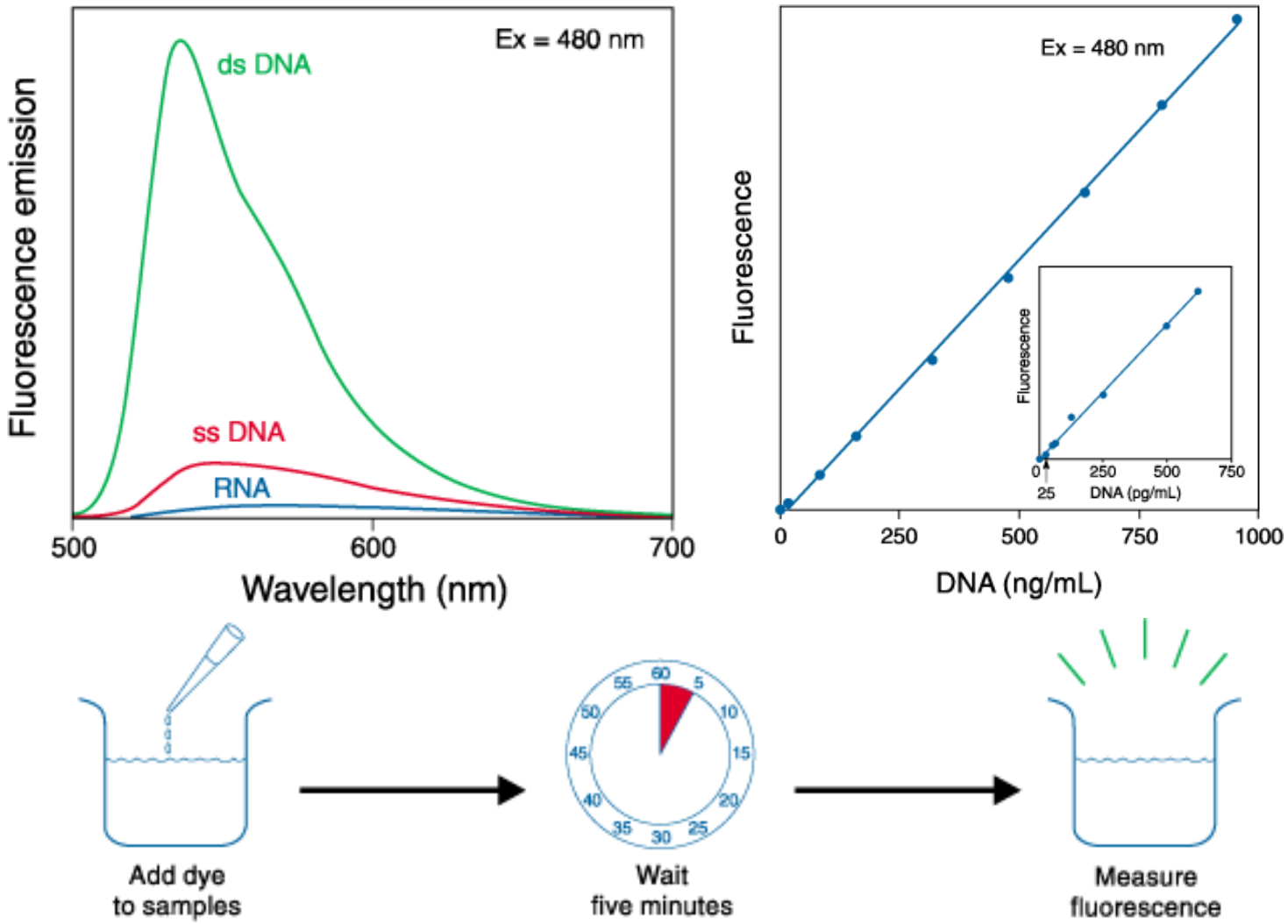
- Pomocí absorpční spektroskopie je možno přesně určit koncentraci až do limitu 1 μg/ml
- Použití fluorescenční sondy umožňuje snížit limit detekce 1000krát – na **1 ng/ml!**
- Při použití fluorescenčních sond na měření koncentrace komplexních vzorků (buněčný lyzát, krevní plazma) je menší vliv přítomnosti proteinů (absorbují při 260 nm), 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

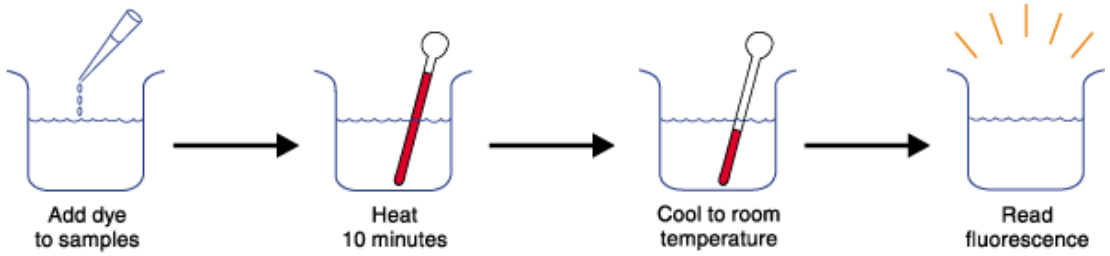


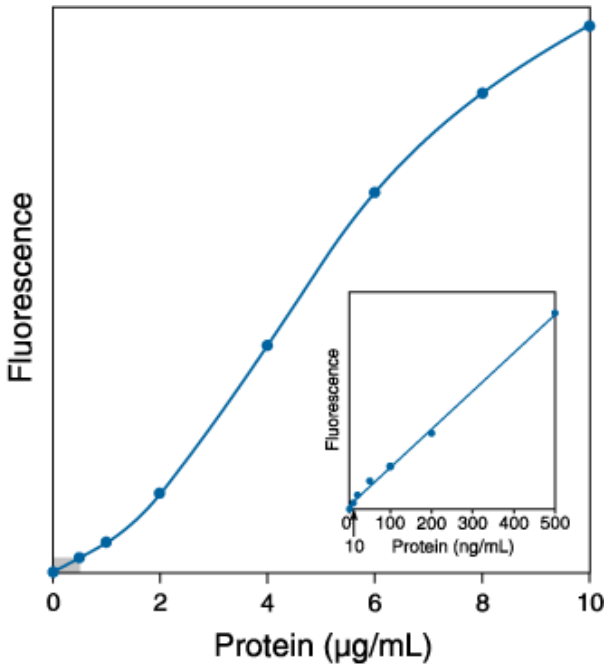
- Detekce **25 pg/ml**
- Ex/Em 480/520 nm
- Velký dynamický rozsah – lze stanovit koncentraci od 0,025 - 1000 ng/ml

Určování koncentrace proteinů

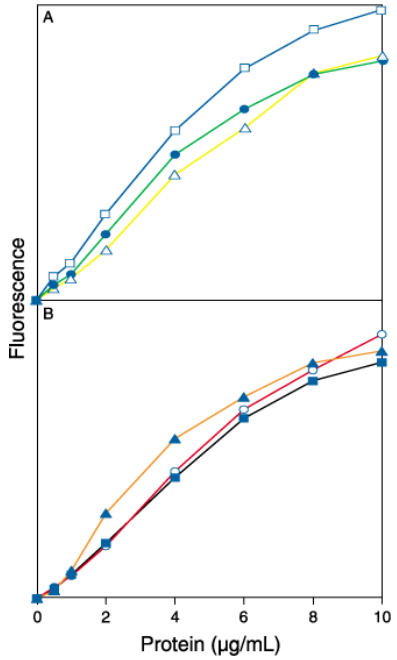
- **UV absorpce** – stanovení na základě absorpce aromatických AK – je závislá na jejich výskytu v sekvenci (1 mg/ml)
- **Bradfordova metoda** – založená na změně zbarvení po vazbě na protein (0,25 mg/ml)
- **Fluorescenční metody** (10 ng/ml)

Fluorescenční stanovení koncentrace proteinů





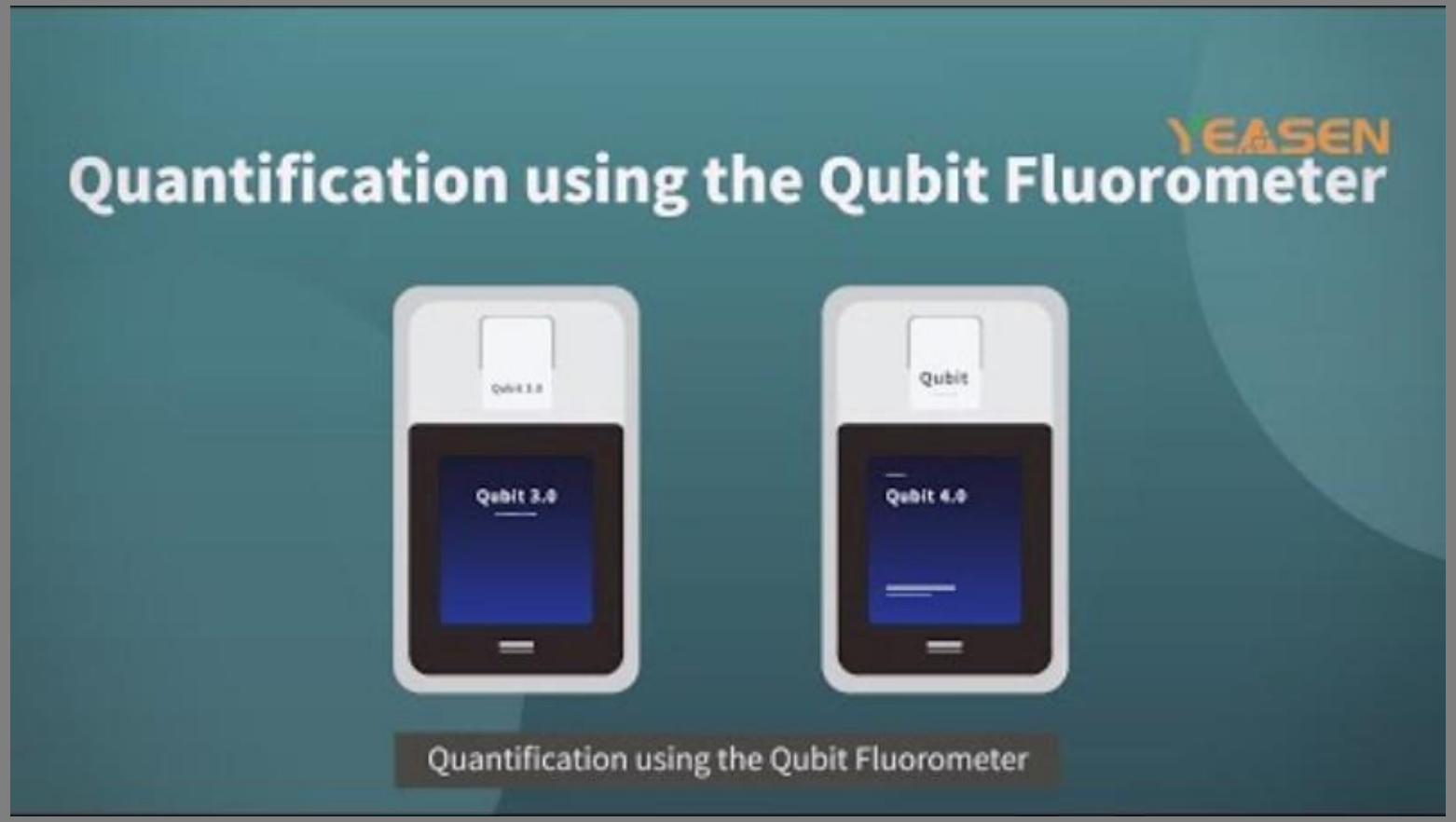
BSA



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

- Při použití fluorescenční sondy NanoOrange je potřeba vyrovnat rozdíly ve struktuře proteinů, které by ovlivňovaly interakce – je nutno je zdenaturovat
- Citlivost 10 ng/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

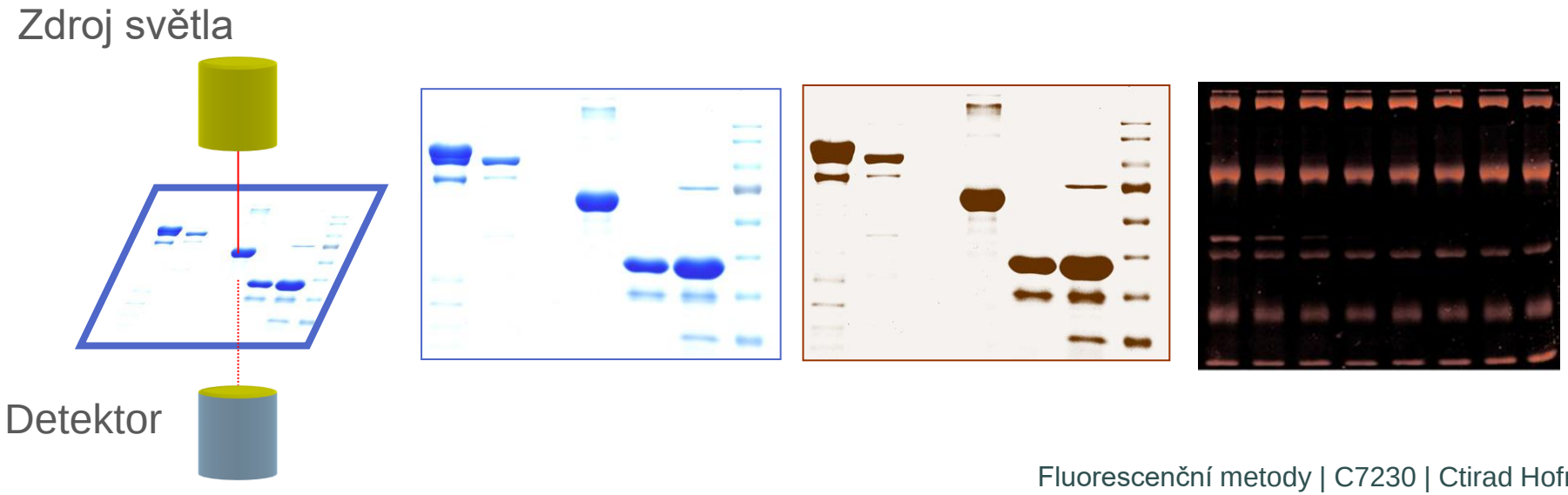
Quantification using the Qubit Fluorometer



https://www.youtube.com/watch?v=y3iKA5T5fnI

Stanovení množství za použití densitometrie gelů

- Při analýze molekul v gelu je možno získat současně informace
  - 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 (SYBR Green, SYPRO Ruby)



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/~zfisar/fluorescence/Default.htm**

Poděkování

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