

ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ

АТФ
детекція

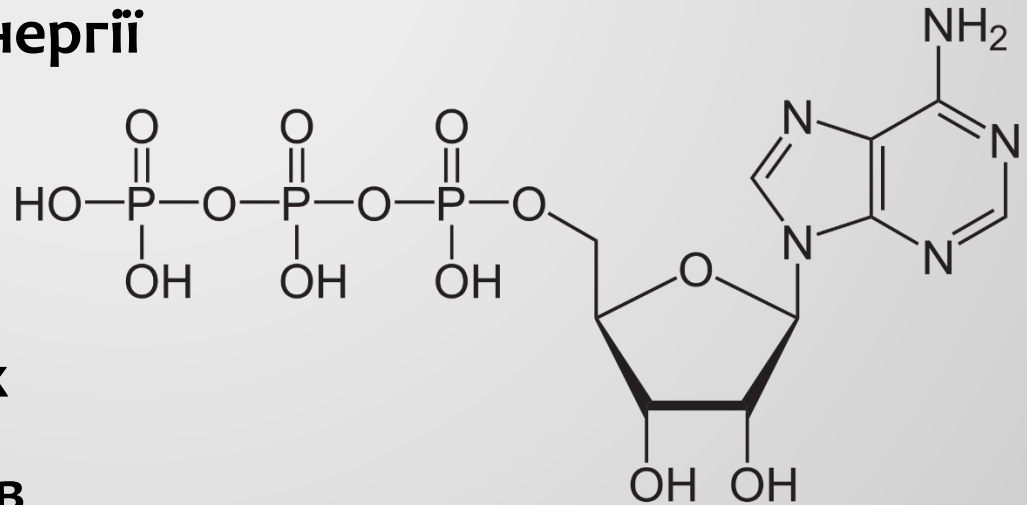
Бугера Олександра Ігорівна
Нетребчук Анастасія Павлівна
Пивоваренко Василь Георгійович

АДЕНОЗИН ТРИФОСФАТ

- основне джерело енергії

у клітині

- регулятор багатьох біохімічних процесів

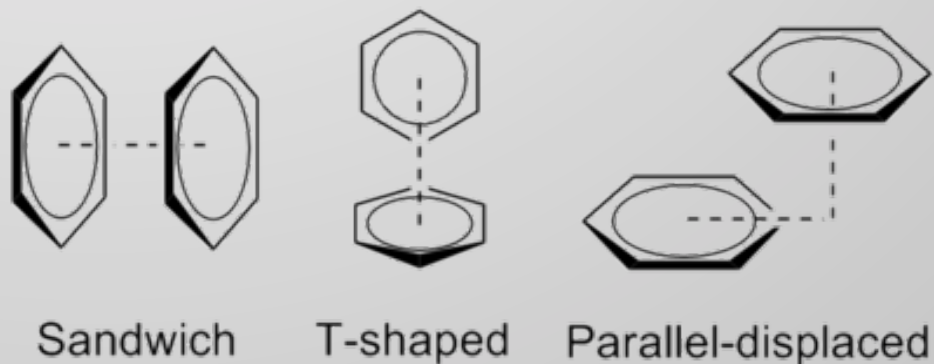
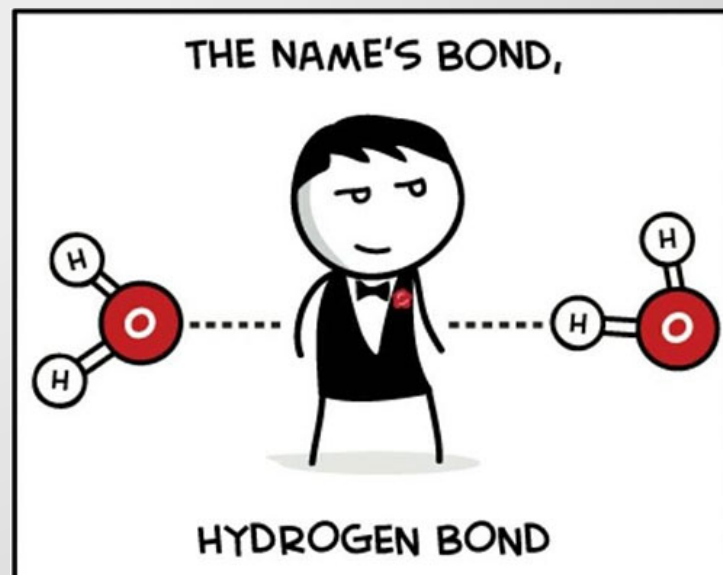


Аденозин -5'-трифосфат (АТФ)

- одна з вихідних сполук в синтезі РНК та ДНК

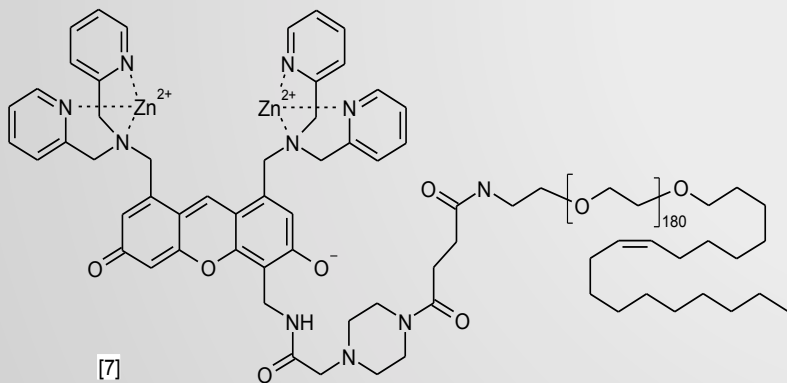
ЯК ЗОНД ЗВ'ЯЗУЄ АТФ?

- Стекінг – взаємодії
- Водневі зв'язки
- Йонні взаємодії



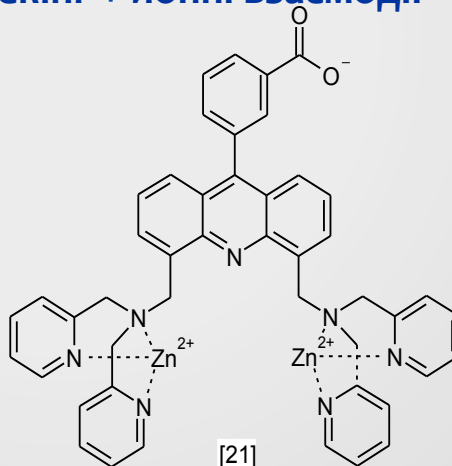
НАЙКРАЩІ З ВІДОМИХ ЗОНДІВ

Стекінг + йонні взаємодії



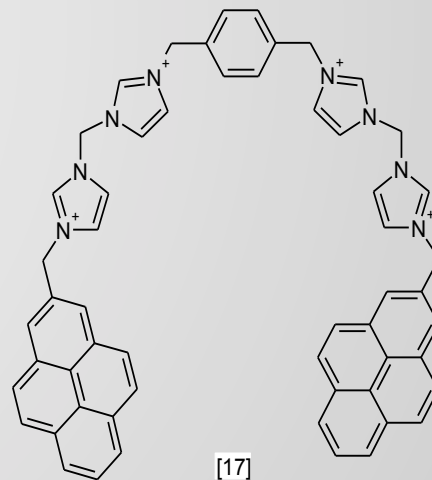
A. Ojida, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 18779–18789

Стекінг + йонні взаємодії



A. Ojida, et al. *Chem. Asian J.* 2006, 1, 555 – 563.

Стекінг + йонні взаємодії



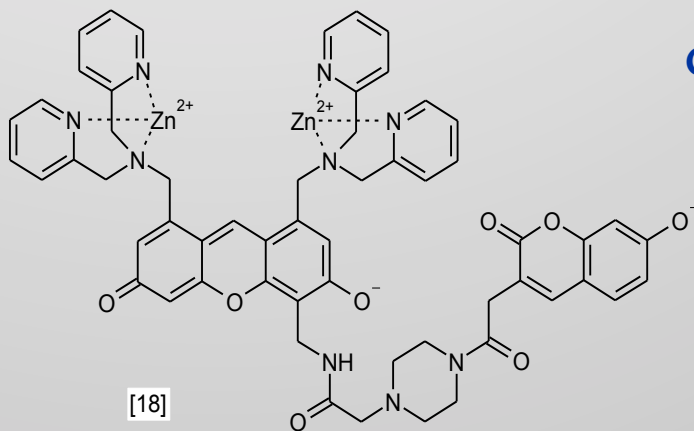
Z. Xu, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, 15528–15533.

Стекінг + водневі зв'язки



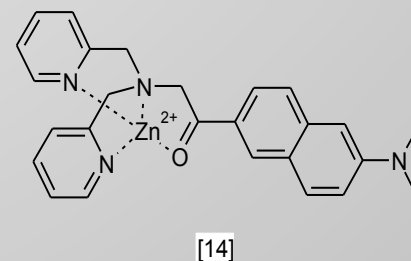
J.-L. Tang, et al. *Chem. Commun.*, 2014, 50, 15411–15414

Стекінг + йонні взаємодії + водневі зв'язки



A. Ojida, et. al *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 13290–13299.

Стекінг + йонні взаємодії



A.S. Rao, et al. *Chemical Communications* 2012, 48, 3206–3208

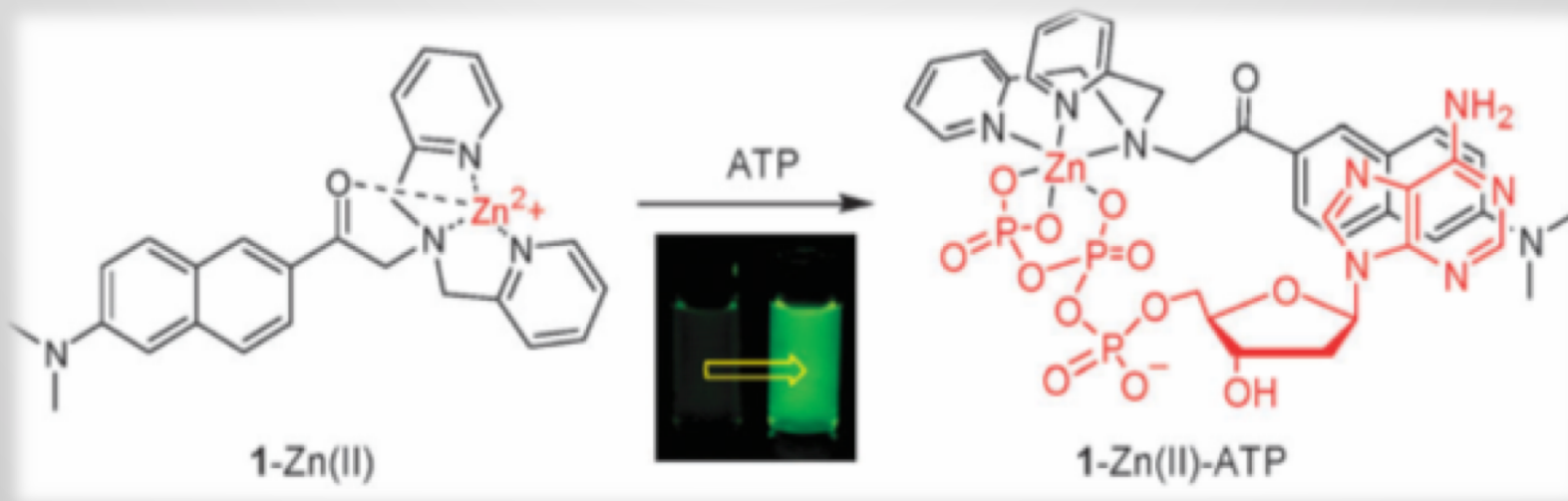
ВІДОМІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ АТФ

● Біоломінесцентний підхід



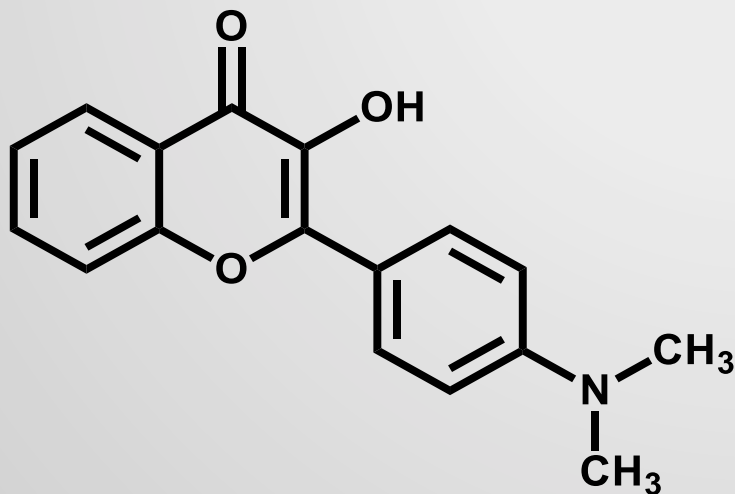
ВІДОМІ МЕТОДИ ДЕТЕКЦІЇ АТФ

● Колориметричні та флуоресцентні зонди

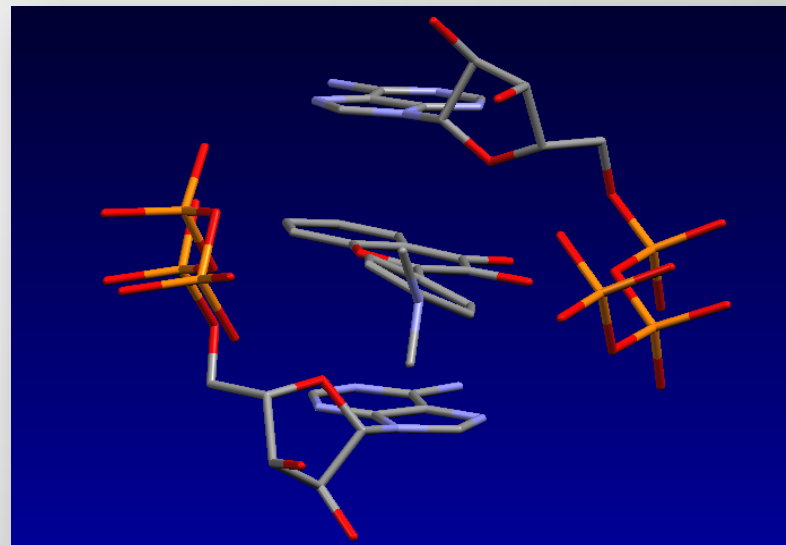


Rao. Chem. Commun., 2012

ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ 3-ГІДРОКСИФЛАВОНУ



3-гідрокси-4'-(диметиламіно)-флавіон
FME

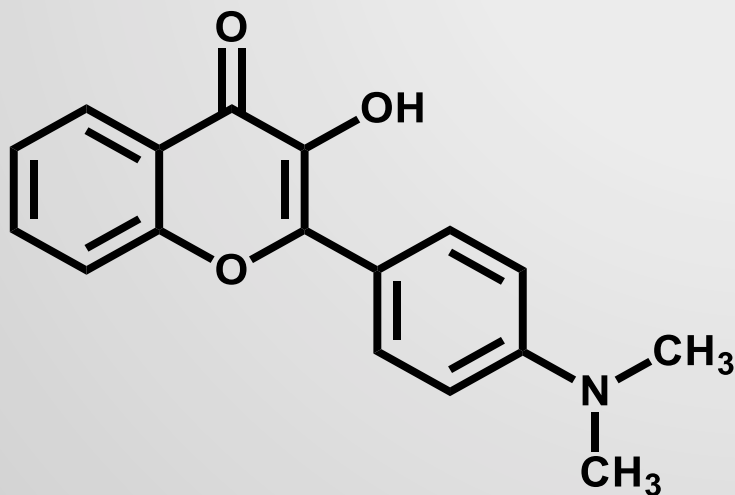


Можлива просторова
структура комплексу
АТФ₂ - FME

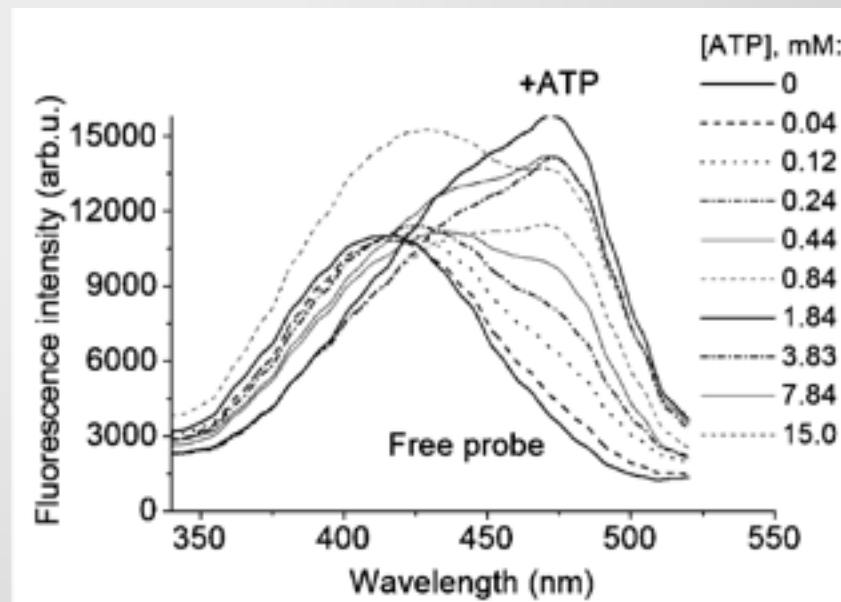
D.A. Yushchenko, O.B. Vadzyuk, S.O. Kosterin, G. Duportail, Y. Mely, V.G. Pivovarenko. Analytical Biochemistry 369 (2007) 218–225.

V. G. Pivovarenko, O. B. Vadzyuk, S. O. Kosterin, Fluorometric detection of adenosine triphosphate with 3-hydroxy-4'-(dimethylamino)flavone in aqueous solutions. J. Fluorescence. - 2006. - 16. - P. 9-15.

ФЛУОРЕСЦЕНТНІ ЗОНДИ НА ОСНОВІ 3-ГІДРОКСИФЛАВОНУ



3-гідрокси-4'-(диметиламіно)-флавон
FME



Спектр збудження
флуоресценції **FME** при
збільшенні концентрації **АТФ**

D.A. Yushchenko, O.B. Vadzyuk, S.O. Kosterin, G. Duportail, Y. Mely, V.G. Pivovarenko. Analytical Biochemistry 369 (2007) 218–225.

V. G. Pivovarenko, O. B. Vadzyuk, S. O. Kosterin, Fluorometric detection of adenosine triphosphate with 3-hydroxy-4'-(dimethylamino)flavone in aqueous solutions. J. Fluorescence. - 2006. - 16. - P. 9-15.

ЗАВДАННЯ

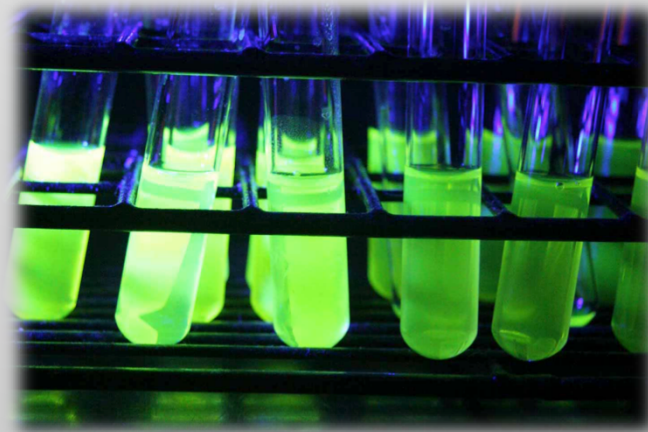
Збільшити:

- Межі чутливості зонда

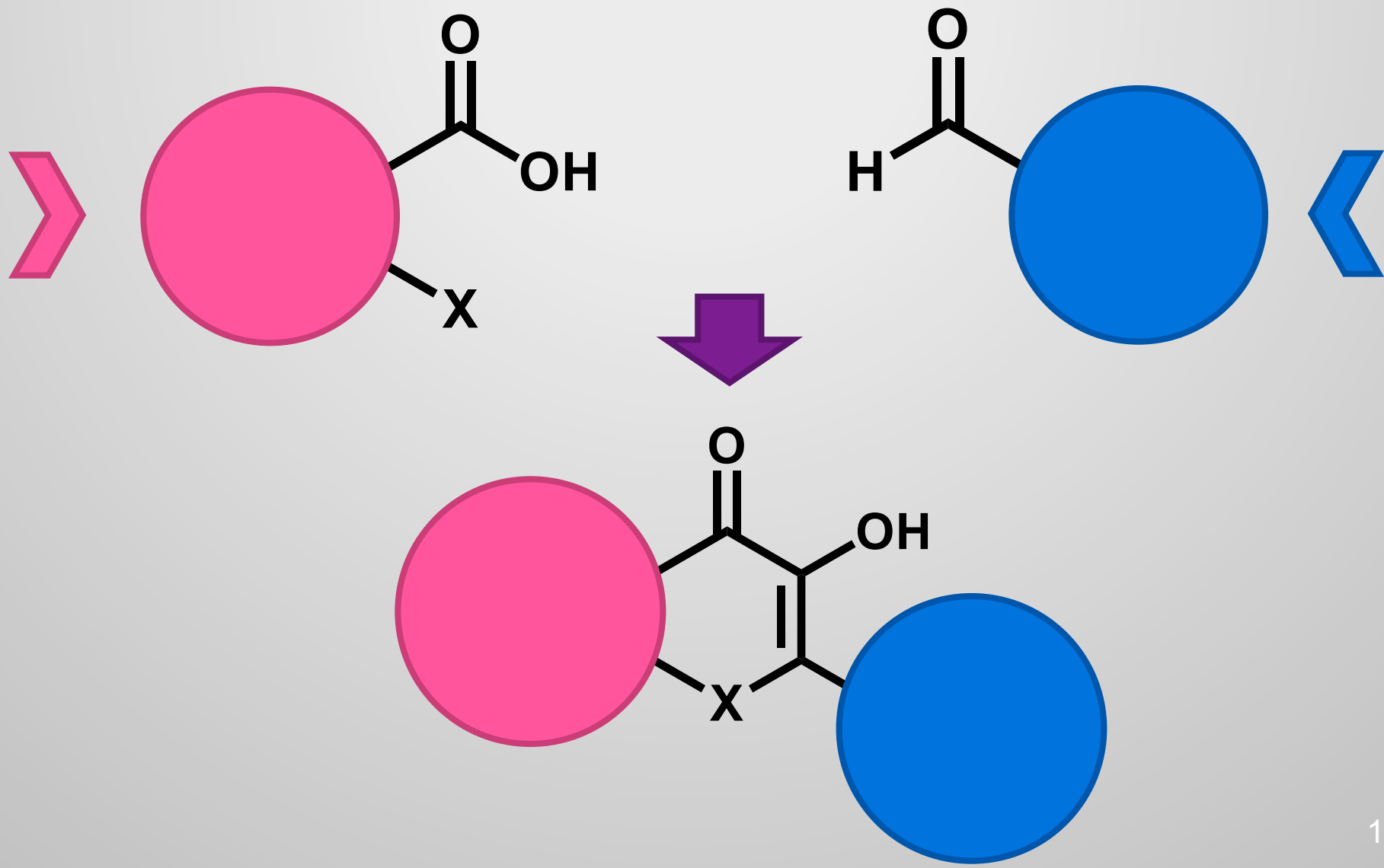
μM  mM

- Співвідношення сигнал\шум

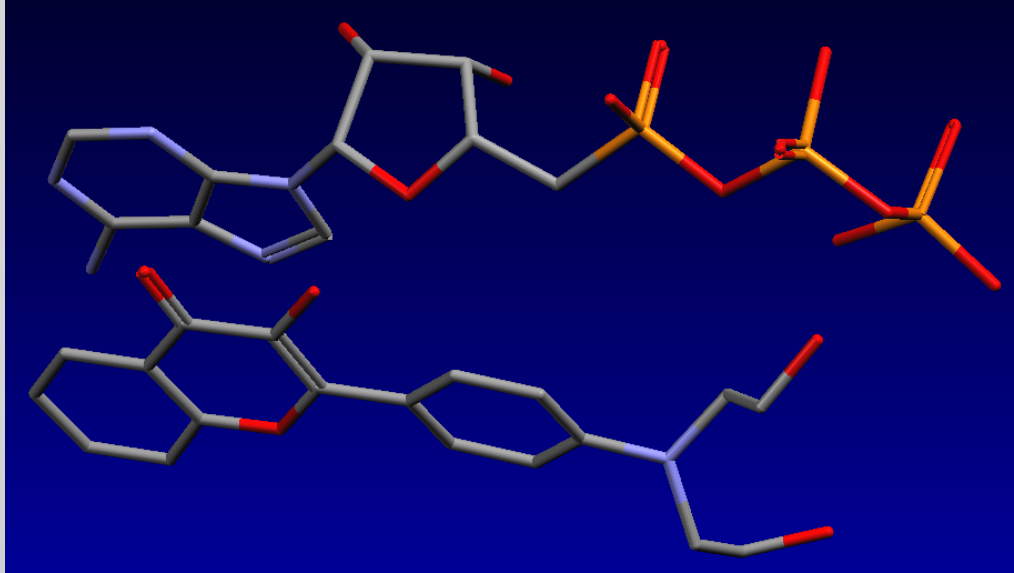
- Яскравість флуоресценції зонду та його комплексу з АТФ



ЯК СТВОРИТИ ЗОНД?



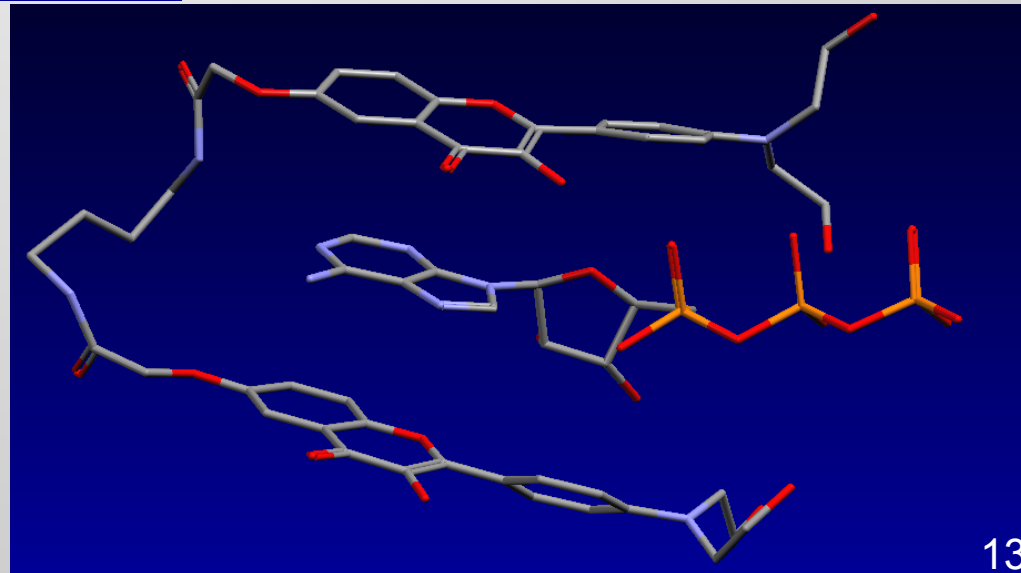
ВЗАЄМОДІЯ З АТФ



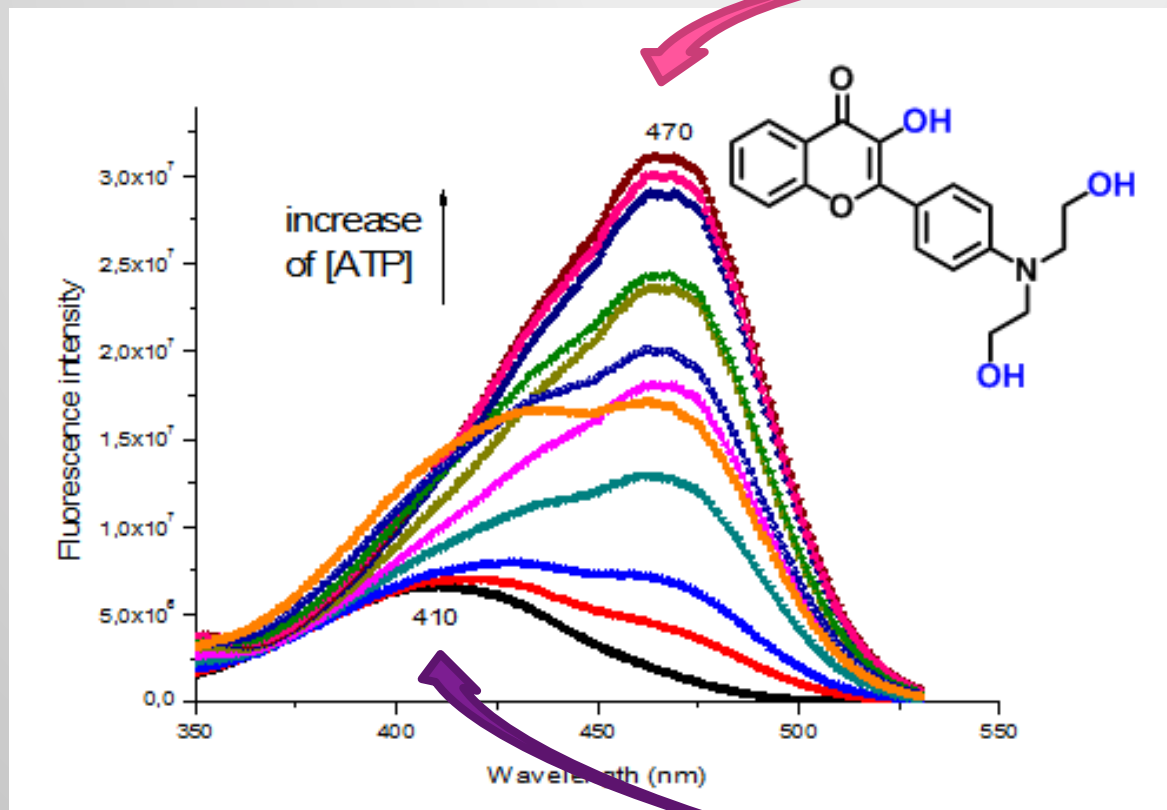
Можлива просторова
структура комплексу
зонд (Тип 2) - АТФ



Можлива просторова
структура комплексу
молекулярного пінцета з АТФ



СПЕКТР ЗБУДЖЕННЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

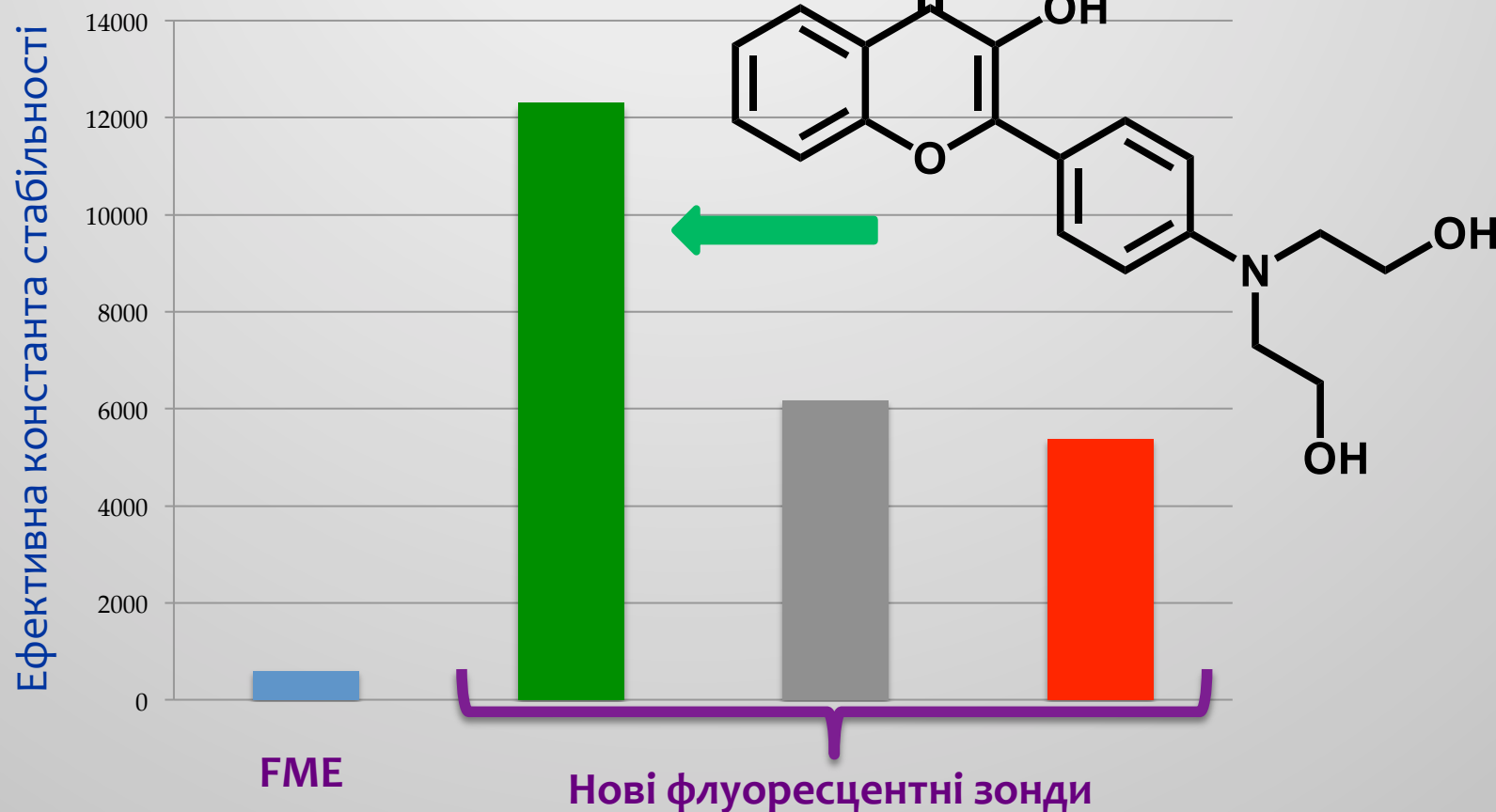


Максимальна
концентрація
АТФ

Без АТФ

КОНСТАНТА СТАБІЛЬНОСТІ

Комплекс
Зонд - АТФ



МЕЖІ ДЕТЕКЦІЇ

Нові
зонди

5 mM

0.2 μ M

Мінімальна
концентрація АТФ
в живих системах
– 0.7 μ M/г*

*Beis, I.; Newsholme, E. A. (October 1, 1975). "The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates". Biochem. J. 152 (1): 23–32. doi:10.1042/bj1520023.

ВИСНОВКИ

- Так як комплексоутворення відбувається при нейтральних значеннях рН, в межах фізіологічної концентрації АТФ, більшість досліджених барвників можуть бути використані в якості флуоресцентних зондів для вимірювання концентрації АТФ.
- Висока чутливість і широкий діапазон виявлення роблять ці барвники перспективними флуоресцентними зондами для виявлення АТФ в розчинах і в живих клітинах.

