

Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria – LEC

A equipe do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria proporciona colaborações, consultorias, prestações de serviços e treinamentos profissionais, além de acesso aos equipamentos da instalação para todos os pesquisadores que submetam propostas de pesquisas. As propostas podem ser submetidas em fluxo contínuo através do site SAU online. Em caso de dúvidas, o email do laboratório é: lec@lnbio.cnpem.br. Para os equipamentos que não estão disponíveis através do site, o usuário deverá enviar um e-mail para o laboratório, solicitando e justificando a necessidade da utilização. É importante preparar as amostras de acordo com as recomendações do laboratório e solicitar o número correto de turnos para cada experimento, evitando problemas no cronograma do laboratório.

Os experimentos programados deverão começar no início do turno solicitado e, em caso de problemas, a medida deverá ser cancelada previamente através do site SAU online. O não cumprimento das regras do laboratório pode resultar em restrições nos agendamentos futuros.

A UTILIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES DEVE SER MENCIONADA EM TODAS AS PUBLICAÇÕES, COMO “AGRADECIMENTOS” AO LNBio, CONFORME ESTABELECIDO NO TERMO DE COMPROMISSO DAS PROPOSTAS DE PESQUISA. AS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE QUALQUER PUBLICAÇÃO E TESES DEVEM SER ENVIADAS À COORDENAÇÃO DO LABORATÓRIO.

Recomendações para preparo de amostras e utilização do laboratório:

- preparo de amostras geral-

- Alta pureza e estabilidade de macromoléculas são características de amostras bem-sucedidas em experimentos biofísicos.
- Todas as moléculas devem ser purificadas em gel ou coluna antes do uso.
- Concentrações de proteínas, RNA ou pequenas moléculas devem ser acuradamente conhecidas, preferencialmente por parâmetros de absorbância medidos no próprio laboratório, para obtenção de melhores resultados quantitativos.
- As macromoléculas devem ser estáveis em condições experimentais. Precipitações geram dados inutilizáveis e podem danificar os aparelhos. É fortemente recomendável que isso seja testado antes da submissão de propostas.
- Todas as amostras devem ser centrifugadas antes das medidas, salvo exceções.

- utilização do laboratório -

O laboratório funciona de segunda à sexta-feira das 8:00 às 17:00 horas. Caso o usuário desconheça o equipamento que deseja utilizar, ele deverá passar por um treinamento com a equipe do LEC. Essa capacitação deverá ser pré-agendada com o pessoal do Laboratório.

Todos os usuários devem seguir as seguintes regras de utilização:

1. Os experimentos devem ser concluídos antes do horário de encerramento das atividades do laboratório.
2. Os usuários devem trazer todos os materiais necessários para a condução dos experimentos, como pipetas, ponteiras, tubos, água e tampões filtrados.
3. É necessário cumprir as regras de segurança do LNBio, portanto, o uso de calças compridas, sapatos fechados, luvas e jaleco se faz necessário durante a realização dos experimentos.
4. As amostras devem ser trazidas prontas (ou semiprontas), visto que existe pouco espaço no Laboratório destinado para preparo de amostras. E se necessário, os usuários deverão se ater a esse espaço.

5. Os usuários devem permanecer no Laboratório durante os experimentos. Nos intervalos, entre os experimentos, sugere-se utilizar o Science Café.
6. O usuário é responsável por seus descartes, e deve observar os recipientes destinados a cada resíduo. Caso haja dúvida, o usuário deve entrar em contato com o responsável técnico do laboratório.
7. As cubetas devem ser adquiridas com o técnico responsável. Elas são extremamente delicadas e, portanto, exigem cuidado no manuseio: sempre utilize luvas ao manuseá-las e tecidos KimWipes® para secá-los.
8. O usuário é responsável pela limpeza das cubetas e da área utilizada. Após terminar os seus experimentos, o usuário deve chamar o responsável pelo laboratório para verificar a limpeza realizada. O laboratório possui soluções adequadas para a limpeza das cubetas. Solicite por treinamento antes de utilizá-las.
9. Antes do início de qualquer experimento o responsável técnico da instalação irá realizar o treinamento do usuário, se necessário. Na primeira utilização do laboratório/equipamentos, o usuário deverá ler os POPs necessários para a realização da proposta de pesquisa e assinar ciência em sua ficha. Sempre recorra ao responsável em caso de dúvida ou problemas com os equipamentos.
10. Não é permitido alterar a voltagem ou qualquer outra especificação dos equipamentos. Também não é permitido retirar qualquer equipamento da tomada.
11. Ao final dos experimentos, desligue o equipamento, deixe a cubeta devidamente lavada, seca e entregue-a para o técnico.
12. Lembre-se que os computadores do LEC são utilizados exclusivamente para o gerenciamento dos aparelhos e para algumas análises de dados. Outras utilizações não são permitidas. O armazenamento de dados é de responsabilidade do usuário, dados mantidos nas máquinas do Laboratório poderão ser deletados sem aviso prévio.

- Staff -

Coordenador: Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira

- Contato -

lec@lnbio.cnpem.br

+ 55 (19) 3512-1100

+ 55 (19) 3512-1094

- Tecnologias disponíveis –

Dicroísmo Circular



Espectropolarímetros Jasco J-810 e J-1500.

O dicroísmo circular (CD) refere-se à absorção diferencial de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, sendo um fenômeno resultante da interação de moléculas assimétricas com a luz, possuindo ampla aplicação. A espectroscopia de CD é usada extensivamente para estudar moléculas quirais de todos os tipos e tamanhos, possuindo importantes aplicações no estudo de macromoléculas biológicas. O fenômeno do dicroísmo circular usando UV CD é muito sensível à estrutura secundária de polipeptídeos e proteínas, sendo assim usado na análise da estrutura secundária ou conformação de macromoléculas, particularmente proteínas, pois a estrutura secundária é sensível ao seu ambiente, temperatura ou pH. A técnica pode ainda ser utilizada para observar como a estrutura secundária da macromolécula em análise muda de acordo com as condições experimentais ou mediante a interação com outras moléculas. Informações estruturais, cinéticas e termodinâmicas sobre macromoléculas também podem ser derivadas da espectroscopia de dicroísmo circular.

No LEC temos dois Espectropolarímetros Jasco (sendo um modelo J-810 e outro modelo J-1500), acoplados a *Peltier* e banho térmico, e diferentes porta-amostras que podem acomodar de 85 µL a 2000 µL de amostra.

Aplicações – Análise da estrutura secundária de proteínas; análise da estrutura terciária de DNA e proteínas; medida da estabilidade de proteínas e DNA e transições de transferência de carga, análise de alterações nas estruturas secundária de macromoléculas mediante a interação com outras moléculas.

Dicas para preparo de amostras:

- Proteínas, DNA ou moléculas orgânicas, de 5-50 µM, e volumes de 50 µL a 2 mL.
- A solução de proteína deve estar em $A_{280nm} < 1,0$ unidade de absorção em tampão apropriado.
- Recomenda-se o uso de tampão fosfato a 20-50 mM, sendo que o tampão Hepes não é recomendado por absorver luz em comprimentos de onda próximos a 200 nm. Se possível, evite sal, detergentes e aditivos. Se tais aditivos forem imprescindíveis, recomenda-se o uso em baixas concentrações tais como: EDTA: <1 mM; Sais: <50 mM; Detergentes: menor concentração possível e desde que não absorvam nos comprimentos de onda utilizados para a análise.

- Reagentes críticos: DTT, β -Mercaptoetanol, Imidazol absorvem luz e não devem estar presentes na amostra submetida a experimentos de espectroscopia de dicroísmo circular.

Materiais de apoio:

cd.pdf

dichroweb2004.pdf

dichroweb2008.pdf

http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html

<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>

<http://www.jascoinc.com/Products/ApplicationNotes>

Sugestão de turnos por experimento:

Um turno por amostra para realização de experimentos de desnaturação térmica.

Um turno para até 10 amostras (em média) para obtenção de espectros.

Fluorescência



Espectrofluorímetro ISS-K2.

A espectroscopia de fluorescência fornece informações sobre mudanças na conformação de macromoléculas devido a mudanças no ambiente (tais como pH, temperatura, adição de ligantes, etc) em que os fluoróforos presentes nela estão localizados. A técnica envolve o uso de um feixe de luz, geralmente luz ultravioleta, que excita os elétrons em átomos presentes na macromolécula. Para retornar ao estado fundamental, os elétrons dissipam parte desta energia absorvida na forma de luz, a qual é emitida em um comprimento de onda definido. Esta técnica é muito utilizada para estudar o comportamento estrutural de macromoléculas, como proteínas, além de monitorar a interação com ligantes, cinéticas de reação e outras interações em solução. Para usar a fluorescência é necessária uma solução com um fluoróforo, solubilizado em um tampão que não interfira no processo de absorção e emissão de luz.

No LEC dispomos de um fluorímetro ISS-K2 acoplado a um banho térmico, polarizadores, monocromadores, diferentes filtros e porta-amostras (para volumes entre 250 μ L a 2 mL), possibilitando ampla gama de desenhos experimentais.

Aplicações –Estudos sobre o comportamento estrutural de proteínas e DNA de acordo com as alterações das condições experimentais ou mediante a interação com outras moléculas, monitoramento de interação entre diferentes macromoléculas, análise cinética entre outras.

Dicas para preparo de amostras:

- Proteínas, DNA ou moléculas orgânicas, de 2-50 μ M, e volumes de 50 μ L a 2 mL
- As soluções deverão ser transparentes e a molécula em análise deverá estar o mais purificada possível.

- Antes de iniciar o experimento, deverá ser realizado um espectro da amostra e da solução “branco”, para verificar possíveis absorções da amostra e o comprimento de onda de excitação e emissão que será usado.
- Sais, detergente, aditivos como DTT, β -Mercaptoetanol, imidazol podem absorver luz em solução, nos comprimentos de onda de análise, atrapalhando as medidas.

Materiais de apoio

Anisotropy.pdf

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html>

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html>

<http://www.iss.com/fluorescence/instruments/pc1.html>

<http://ida.dk/netvaerk/idaforum/U0602c/Documents/20090317%20Vild%20med%20spektros>

Principles of Fluorescence Spectroscopy. Joseph Lakovickz. Ed. Spring.

Sugestão de turnos por experimento:

O número de turnos dependerá do tipo de experimento que será realizado.

Espectrofotometria UV/Vis



Espectrofotômetro Jasco V-730.

O espectrofotômetro UV-Vis mede a absorção de luz por moléculas em solução. Desta forma, para utilização deste equipamento, é necessária uma solução com um cromóforo, solubilizado em um tampão que não interfira no processo de absorção.

É um instrumento indicado para determinação da concentração de macromoléculas, utilizando-se propriedades intrínsecas de proteínas e DNA, ou valendo-se de testes colorimétricos. Além disto, é amplamente utilizado em medidas cinéticas de interação entre moléculas.

O equipamento disponível no LEC é um espectrofotômetro Jasco V-730, com feixe duplo, que cobre os comprimentos de onda de 190 a 800nm, acoplado a banho térmico e com porta amostras que variam de 80 μ L a 2 mL de capacidade. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, sendo utilizado como apoio para outras técnicas. Para utilizá-lo, entre em contato conosco.

Aplicações – determinação de concentração de macromoléculas em solução, estudos de cinética de interação, análise de pureza de soluções.

Dicas para preparo de amostras:

- As soluções deverão ser transparentes e a molécula em análise deverá estar o mais purificada possível.

- Proteínas, DNA ou moléculas orgânicas - 80 μ L a 2 mL.
- Evite utilizar altas concentrações de sais ou aditivos como detergentes e β -mercaptoetanol, pois os mesmos poderão alterar os perfis de absorção da molécula de interesse. Se esses aditivos forem necessários para manter a estabilidade de sua solução, utilize-os em baixas concentrações.
- A absorbância das soluções medidas deverá estar abaixo de 1,0 unidade de absorbância no comprimento de onda medido, a fim de respeitar-se as condições da Lei de Lambert-Beer. Se a solução estiver concentrada, resultando em absorbâncias superiores, ela deverá ser diluída antes da realização das medidas.

Materiais de apoio

<http://cnx.org/content/m34525/latest/>

http://www.kayelaby.npl.co.uk/chemistry/3_8/3_8_7.html

<http://media.rsc.org/Modern%20chemical%20techniques/MCT4%20UV%20and%20visible%20spec.pdf>

<http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>

Sugestão de turnos por experimento:

O número de turnos dependerá do tipo de experimento que será realizado.

Calorimetria de Titulação Isotérmica



VP-ITC Microcal

As reações entre moléculas envolvem a quebra e a formação de ligações covalentes e/ou interações não covalentes, resultando na absorção ou liberação de calor. A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) permite a medida direta desses calores, envolvidos em interações entre proteínas-proteínas e proteínas-ligantes. Essa é uma técnica termodinâmica usada para a determinação de constantes de ligações, determinação de estequiometria e do perfil de reações, incluindo a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS).

É um método livre de marcação química ou imobilização dos componentes. As injeções são controladas automaticamente e as mudanças de calor, associadas à uma reação química iniciada com a adição de um componente, são monitoradas a cada injeção.

O equipamento presente no LEC para essa finalidade é o VP-ITC Microcal.

Aplicações – Determinação das constantes de associação e dissociação entre macromoléculas e macromoléculas com ligantes, determinação do perfil de interação, determinação de parâmetros termodinâmicos envolvidos em interações, análise cinética de reações enzimáticas.

Preparo de amostras:

- Todas as moléculas devem ser purificadas em gel ou coluna antes do uso.
- Soluções proteicas e com ligantes devem estar no mesmo tampão para que nenhum calor de diluição seja gerado com a mistura delas. Se possível, as macromoléculas devem ser dialisadas contra o tampão, para assegurar a correspondência exata de sal da amostra. Este tampão, usado durante a diálise, deve ser utilizado como referência nos experimentos e quaisquer pequenas moléculas ligantes devem ser dissolvidas no tampão usado para realização da diálise.
- Concentrações de proteínas, RNA ou pequenas moléculas devem ser acuradamente conhecidas, preferencialmente por parâmetros de absorbância, para garantir a obtenção de melhores resultados quantitativos.
- As macromoléculas devem ser estáveis em condições experimentais. Precipitações tornam os dados inutilizáveis e podem danificar os instrumentos. Por isso, recomenda-se fortemente que seja feito um teste de precipitação antes da submissão de propostas. Esse teste pode ser feito por meio da incubação de uma pequena fração da amostra em temperatura experimental por uma hora para observação de formação de precipitados.
- DTT e TCEP devem ser evitados nas amostras, mas podem ser substituídos por β -mercaptoetanol.
- Concentração da amostra na cela: aproximadamente $10 * K_D$.
- Concentração na seringa: aproximadamente a concentração na cela * no de sítios de ligação * 10.
- Quando a K_D é desconhecida, pode-se partir de aproximadamente 50 μ M na cela e 500 μ M na seringa.
- Volume de amostra para a cela/experimento = 2000 μ L, volume de amostra da seringa/experimento = 400 μ L
- Tampões com baixa entalpia de ionização como fosfato, acetato, formato e citrato são preferidos em relação àqueles compostos por aminas primárias (Tris, por exemplo) que possuem alta entalpia de ionização.

Material de apoio

ITC.pdf

ITC_paper.pdf

ITC_review.pdf

ITC_Tutorail.pdf

ITC_user_manual.pdf

MicroCal1.26.10.pdf

<http://www.microcal.com/products/itc/vp-itc.asp>

Sugestão de turnos por experimento:

Um turno por amostra (em média).

Calorimetria de Varredura Diferencial



VP-DSC Microcal

A calorimetria de varredura diferencial (DSC) mede as mudanças de calor que ocorrem durante o aumento ou diminuição da temperatura na qual a amostra é mantida. Uma biomolécula em solução está em equilíbrio entre seu estado nativo e seu estado desnaturado. Para a maioria das macromoléculas, conforme a temperatura na qual elas são mantidas sofre variação para valores superiores, o estado desnaturado começa a ser favorecido. Com isto, torna-se possível a obtenção da T_m que é a temperatura na qual 50% das macromoléculas em solução encontram-se no estado nativo e 50% estão no estado desnaturado. Quanto maior o valor da T_m , mais estável é a macromolécula. Baseado nisto, o DSC é amplamente utilizado para determinação da estabilidade de macromoléculas em diferentes soluções experimentais e/ou após diferentes tratamentos. Ele ainda é utilizado para determinação da mudança na capacidade térmica (ΔC_p) de desnaturação. Essa técnica pode elucidar os fatores que contribuem para a compactação e estabilidade de biomoléculas nativas, incluindo interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, entropia conformacional, e o ambiente físico.

O LEC dispõe de um calorímetro VP-DSC Microcal, o qual só permite a análise de amostras em solução.

Aplicações - auxílio na elucidação dos fatores que contribuem para o envelhecimento e estabilidade de macromoléculas nativas, determinação da estabilidade de amostras em diferentes soluções ou submetidas à diferentes tratamentos, comparação entre diferentes lotes de amostras biológicas.

Preparo de amostras:

- Concentrações médias de amostra: 0,1 mg/mL a 10 mg/mL.
- Se possível, as macromoléculas devem ser dialisadas contra o tampão usado no experimento. Este tampão, usado durante a diálise, deve ser utilizado na cela de referência e para quaisquer futuras diluições.
- Se houver a possibilidade de material agregado, centrifugue ou filtre a amostra.
- Volume das celas de amostra e referência: aproximadamente 700 μ L.
- Recomenda-se a não utilização de Tampão Tris (ou outros contendo amins primárias) para experimentos de DSC. Como alternativa, recomenda-se um tampão com baixa dependência à temperatura para o pKa.

- DTT e TCEP devem ser evitados nas amostras, mas podem ser substituídos por β -mercaptoetanol.

Material de apoio

DSCnote1.pdf

DSCnote2.pdf

DSCnote3.pdf

<http://www.microcal.com/products/dsc/vp-dsc.asp>

Sugestão de turnos por experimento:

Um turno por amostra (em média).

Espalhamento Dinâmico de Luz



ZetaSizer Nano ZS90 Malvern

O espalhamento dinâmico de luz (DLS) é uma importante técnica experimental, também conhecida como Espectroscopia de Correlação de Fótons (PCS). Esse é um dos métodos mais utilizados para determinar o tamanho de partículas em solução, uma vez que o raio hidrodinâmico é um dos principais parâmetros obtido pelo DLS, e traduz informações a respeito do tamanho das moléculas e sobre seu estado oligomérico. A polidispersividade é outro parâmetro importante obtido por esta técnica, pelo qual se infere a qualidade da amostra, através da determinação das populações presentes em solução. Esta técnica também é utilizada para mensurar a estabilidade e a qualidade de amostras antes de experimentos específicos, tais como os de cristalização de proteínas.

No LEC está disponível o equipamento ZetaSizer Nano ZS90, para realização de medidas de DLS em cubetas (a partir de 20 μ L de amostra), para soluções com concentrações superiores a 0,1 mg/mL e faixa de tamanho de 0,3 nm à 5 μ m. Este equipamento permite ainda a medida de potencial zeta, em cubetas com volume médio de 1 mL.

Aplicações – Determinação do tamanho de moléculas em solução, determinação da polidispersividade de soluções, medidas de potencial zeta.

Preparo de amostras:

- Concentrações proteicas entre 0.5-0.75 mg/mL são bons índices para o início dos experimentos. Para proteínas menores, boas leituras são obtidas em concentrações mais altas.
- É necessário remover partículas extras da amostra, para que essas não dispersem luz. Recomenda-se a centrifugação da amostra antes do início das medidas ou a filtração da mesma, de acordo com as especificações da amostra.

Material de apoio

<https://www.malvernpanalytical.com/br/support/product-support/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs90>

<https://www.malvernpanalytical.com/br/search?q=Zetasizer+Nano+ZS90>

<http://www.wyatt.com/solutions/hardware/dynaproprotein-solutions-plate-reader.html>

Sugestão de turnos por experimento:

Uma amostra é medida em até 15 minutos.

Ultracentrifugação Analítica



Ultracentrífuga Optima XL-A Beckman Coulter

A ultracentrifugação analítica (AUC) é um dos métodos mais versáteis para determinação de peso molecular, propriedades hidrodinâmicas e propriedades termodinâmicas de proteínas e outras macromoléculas. A amostra em uma ultracentrífuga analítica, pode ser monitorada em tempo real através de um sistema óptico de detecção. Com isso, o operador pode observar a evolução da concentração de uma amostra *versus* o perfil do eixo de rotação, como resultado da força aplicada. Estudos de velocidade de sedimentação e de equilíbrio de sedimentação são os mais comumente realizados para determinação dos parâmetros desejados.

O LEC está equipado com uma ultracentrífuga Optima XL-A, equipada com rotor AN60Ti, capaz de comportar 3 amostras por experimento.

Aplicações – determinação do número de componentes de uma amostra, determinação da massa molar e a distribuição do coeficiente de sedimentação de cada componente, determinação de estequiometria de complexos macromoleculares.

Preparo de amostras:

- **Concentrações:** Para uma corrida de velocidade de sedimentação, é necessária proteína suficiente para ser vista com absorvância (0,2—1,2 unidades de absorção para respostas lineares).
- **Tampão:** Recomenda-se a utilização de tampão com força iônica >50 mM para evitar interferências não desejadas, decorrentes de efeitos de carga. Nenhum dos componentes do tampão pode absorver no comprimento de onda selecionado para realização do experimento.
- Recomenda-se que a amostra seja dialisada contra o tampão que a compõe e que parte do tampão durante a diálise seja trazido para ser colocado nos setores de referência.
- **Volume necessário:** Para celas utilizadas em experimentos de velocidade são necessários 420 µL do tampão e 400 µL para amostra. Para células de equilíbrio, são necessários de 120 µL de amostra e tampão para cada par de setores.
- Há uma tabela no manual Beckman (Disponível em Materiais de apoio) (p.4-26) que ajudar na escolha da velocidade do rotor baseado na massa molecular do monômero. Sugerimos fortemente que isto seja verificado durante o planejamento experimental.

Material de apoio

AUC_2007.pdf

AUC_manual_beckman.pdf

AUC_tutorial.pdf

<http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>

Sugestão de turnos por experimento:

Podemos medir até 7 amostras em uma corrida de velocidade de sedimentação, ou até 15 amostras em uma corrida de equilíbrio de sedimentação. Para um experimento de velocidade de sedimentação, pelo menos 3 turnos para garantir que o tempo para montar os experimentos seja considerado. Para experimentos de equilíbrio de sedimentação, são necessários 5 turnos.

Luminescência (Leitor de placa)



Leitor de Placa GloMax Multi Promega

O equipamento disponível no LEC é capaz de executar medidas de luminescência em diferentes configurações de placas. Além de preparo manual da placa, ele permite semi-automatização através de dois injetores, capazes de dispensar volumes entre 25 μ L - 200 μ L, com incrementos de 5 μ L. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, para utilizá-lo, favor entrar em contato conosco.

Aplicações - qualquer tipo de determinação que seja realizada através de leituras de luminescência.

Preparo de amostras:

- Por se tratar de uma técnica que geralmente é realizada com auxílio de kits específicos, sugerimos que sejam seguidas as instruções determinadas pelo fabricante do kit utilizado.
- No caso da utilização de placas com configurações diferentes à de 96 poços, sugerimos que nos contactem previamente para confirmação da compatibilidade com o instrumento.
- Por se tratar de luminescência, recomendamos a utilização apenas de placas brancas (sem fundo transparente).

Material de apoio

glomax multi plus brochure br214.pdf

<http://www.promega.com/products/pm/fluorometers-luminometers-multimode-readers/application-notes/>

Sugestão de turnos por experimento:

A leitura de uma placa completa dura apenas alguns minutos, porém, como os protocolos experimentais antes da leitura podem variar, o número de turnos solicitados deverá se adequar ao protocolo desejado.

Termoforese em Microescala



Monolith NT.115 Nanotemper

A termoforese em microescala é um método poderoso para quantificar interações biomoleculares. Ele mede o movimento das moléculas ao longo de gradientes de temperatura microscópicos e detecta mudanças em sua camada de hidratação, carga ou tamanho. Ao combinar a precisão da detecção de fluorescência com a flexibilidade e sensibilidade da termoforese, o MST fornece uma maneira flexível, robusta e rápida de medir interações moleculares. As aplicações variam de eventos de ligação de pequenas moléculas a interações proteína-proteína e interações de complexos multiprotéicos.

O instrumento Monolith usa formato capilar e, para cada experimento, é necessário ter uma concentração constante de uma molécula fluorescente (por exemplo, proteína marcada) e concentração variável de qualquer titulante (por exemplo, outra proteína, ligantes, etc). Para realizar uma curva neste dispositivo são necessários apenas 10 μ L de amostra por capilar.

O equipamento disponível no LEC realiza a leitura de até 16 capilares por medida, e está equipado com o software de análise dos dados. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, para utilizá-lo, favor entrar em contato conosco.

Aplicações – determinação da constante de afinidade entre biomoléculas e entre biomoléculas e ligantes.

Preparo de amostras:

- Este equipamento realiza medidas com amostras marcadas com sondas fluorescentes ou em fusão com moléculas fluorescentes. Assim, recomendamos o uso dos kits de marcação comercializados pela Nanotemper.
- Evite o uso de DTT nos tampões utilizados para preparo de amostras.

Material de apoio

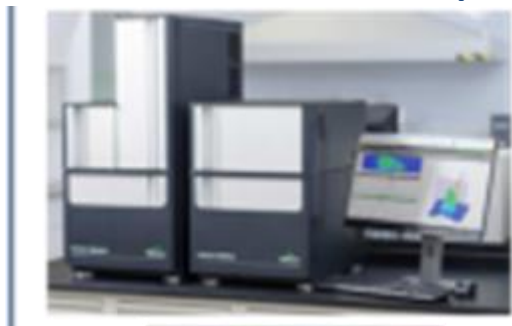
<https://nanotempertech.com/monolith/monolith-nt115/>

<https://nanotemper.my.site.com/explore/ExplorerLogin>

Sugestão de turnos por experimento:

1 dia por amostra

OMINISEC – Sistema GPC/SEC



OMINISEC Malvern

A cromatografia de permeação em gel (GPC) aliada a diferentes detectores é uma técnica analítica essencial para a caracterização de macromoléculas em solução, capaz de fornecer informações sobre o peso molecular absoluto, composição, tamanho e estrutura da amostra. Isto é possível porque após o processo de separação dos componentes da amostra, o qual acontece baseado no tamanho das moléculas, uma combinação de diferentes detectores (espalhamento de luz, viscosidade e índice de refração) permite a caracterização completa da amostra em um único experimento. Através dos detectores de espalhamento de luz é possível a determinação do peso molecular absoluto das macromoléculas, independentemente do volume de retenção da coluna ou de padrões. O detector de viscosidade permite a determinação do tamanho e da estrutura de macromoléculas enquanto o detector de índice de refração é responsável pela determinação da “concentração/composição” da amostra.

O equipamento disponível no LEC não apresenta detector UV mas permite a detecção das amostras através do detector de índice de refração. Ele possui um porta amostras climatizado e é compatível com colunas de até 30 cm de comprimento, as quais podem ser mantidas a temperatura ambiente ou aquecidas. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, para utilizá-lo, favor entrar em contato conosco.

Aplicações– determinação do peso molecular absoluto de macromoléculas, determinação da distribuição de peso molecular, determinação do tamanho e da ramificação de polímeros, determinação do raio de macromoléculas, determinação da viscosidade intrínseca.

Preparo de amostras:

- Para que as determinações dos parâmetros das macromoléculas sejam precisas, a amostra deverá ser a mais pura e homogênea possível. Embora seja um sistema que utiliza cromatografia de permeação em gel, ele não é destinado à purificação ou polimento de amostras.
- Os tampões não devem conter detergentes e devem ser filtrados antes de utilizados nos experimentos.

- Como não fornecemos as colunas para utilização durante os experimentos, a coluna trazida deverá estar em condições adequadas de uso pois sua qualidade impactará diretamente na qualidade dos resultados obtidos.
- Amostras que possuam mais de uma espécie poderão resultar em determinações imprecisas, caso tais espécies não sejam bem resolvidas na coluna utilizada. Recomendamos fortemente que todas as amostras que serão analisadas neste equipamento tenham um perfil cromatográfico já conhecido.

Material de apoio

<https://www.malvernpanalytical.com/br/search?q=omniseq>

Sugestão de turnos por experimento:

1 semana por amostra

Escaneamento Diferencial de Fluorescência



Tycho NT.6 Nanotemper

Os parâmetros determinados neste equipamento são adquiridos através da técnica de fluorescência aliada à desnaturação térmica. Para isto, a amostra proteica é inserida em um capilar e submetida ao aquecimento entre 35-95 °C, e a fluorescência emitida pelos resíduos de triptofano e tirosina presentes na amostra é detectada em 350 nm e 330 nm, durante todo o processo de aquecimento. A relação entre a fluorescência obtida nestes dois comprimentos de onda permite a obtenção de um parâmetro denominado temperatura de inflexão (Ti), o qual representa a transição observada durante o processo de desnaturação proteica. Comparando-se as Tis obtidas em diferentes condições experimentais (presença de potenciais moléculas ligantes, tampões, presença de aditivos), é possível inferir quais potenciais ligantes são capazes de interagir com a molécula proteica, alterando o Ti encontrado, qual sistema tamponante e aditivos são capazes de aumentar a estabilidade proteica e até mesmo, determinar a similaridade entre diferentes lotes de amostras.

O equipamento disponível no LEC permite a análise de até 6 capilares concomitantemente, levando cerca de 3-5 minutos por experimento. Este equipamento não se encontra no site da SAU online, para utilizá-lo, favor entrar em contato conosco.

Aplicações - determinação da estabilidade de amostras, verificação da interação entre proteína e moléculas ligantes, realização do controle de qualidade de amostras, comparação entre diferentes lotes de soluções proteicas.

Preparo de amostras:

- Por se tratar de um sistema que realiza as medidas de fluorescência baseadas nos resíduos de triptofano e tirosina, é mandatória a existência de tais resíduos nas amostras.
- O tampão e moléculas, que poderão ser adicionadas à solução proteica, não podem ter componentes que interfiram com o processo de fluorescência.
- Quanto mais resíduos de triptofano e tirosina presentes na amostra, menor será a concentração necessária para realização do experimento. Para moléculas padrão (IgG, por exemplo), a faixa de concentração adequada fica entre 0,010 à 1,0 mg/mL.
- As soluções deverão ser transparentes e a molécula em análise deverá estar o mais purificada possível.

Material de apoio

<https://resources.nanotempertech.com/brochures/nanotemper-tycho-brochure>

<https://nanotempertech.com/tycho/>

<https://nanotemper.my.site.com/explore/ExplorerLogin>

Sugestão de turnos por experimento:

30 minutos para até 6 amostras.