



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## ZÁKLADNÍ KURZ

### ANALÝZY STRUKTURY A INTERAKCÍ BIOMAKROMOLEKUL

NÁVODY KE CVIČENÍM / EDITOVAL: VÁCLAV BRÁZDA

**BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.**

I. TURNUS: 18. 4. – 22. 4. 2011

II. TURNUS: 2. 5. – 6. 5. 2011

**MODERNÍ BIOFYZIKÁLNÍ METODY: POKROČILÉ PRAKTICKÉ VZDĚLÁVÁNÍ V EXPERIMENTÁLNÍ  
BIOLOGII**

**OPERAČNÍ PROGRAM VZDĚLÁVÁNÍ PRO KONKURENCESCHOPNOST**

**ČÍSLO PROJEKTU: CZ.1.07/2.3.00/09.0046**



**ZÁKLADNÍ KURZ**  
**ANALÝZY STRUKTURY A INTERAKCÍ BIOMAKROMOLEKUL**  
NÁVODY KE CVIČENÍM

**BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.**

Editoval: Václav Brázda

Autoři: Marie Brázdová (kapitola 1), Hana Pivoňková (kapitola 2), Václav Brázda (kapitola 3), Miroslav Fojta, Martin Bartošík (kapitola 4), Iva Kejnovská, Luděk Havran (kapitola 5)

ISBN: 978-80-87541-00-5

## Obsah

Obsah.....	4
Kapitola 1: Základní metody molekulární biologie - proteiny.....	5
I. Elektroforéza proteinů v přítomnosti SDS – SDS PAGE .....	5
II. Přenos proteinů na membránu (blotting).....	8
III. Imunodetekce proteinů na membráně.....	11
IV. EMSA - Gelová retardační analýza.....	13
Kapitola 2: Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA .....	16
Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA pomocí imunoprecipitace na magnetických kuličkách .....	16
Analýza nukleotidových sekvencí pomocí magnetických kuliček a hybridizace se sondou značenou enzymem .....	18
Kapitola 3: Základní metody molekulární biologie - DNA.....	21
I. Izolace superhelikální plazmidové DNA.....	21
II. Štěpení plazmidové DNA restriční endonukleázou (RE).....	22
III. ELISA stanovení apoptózy.....	23
IV. Denzitometrická analýza separované DNA pomocí programu ImageJ.....	24
Kapitola 4: Základní elektrochemické metody .....	25
I. Jednoduchý redox systém-anodická rozpouštěcí voltametrie .....	25
II. Klasická polarografie.....	26
III. Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie .....	26
IV. Elektrochemická analýza bílkovin.....	27
Kapitola 5: Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA / Značení DNA komplexy oxidu osmičelého.....	31
Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA.....	31
Příprava B-formy DNA .....	32
Indukce guaninového kvadruplexu draselnými ionty .....	33
Indukce guaninového kvadruplexu sodnými ionty .....	34
Rozlišení jedno a dvouřetězcové DNA - AC voltametrie .....	35
Značení DNA komplexy oxidu osmičelého.....	37

# Kapitola 1: Základní metody molekulární biologie - proteiny

Garant: Marie Brázdová

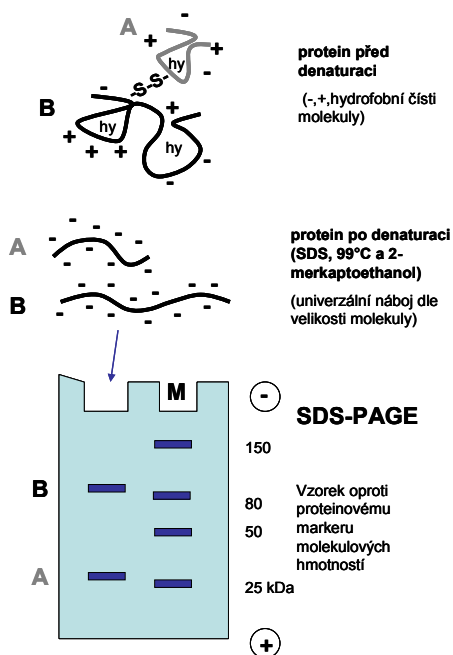
## I. Elektroforéza proteinů v přítomnosti SDS – SDS PAGE

**Cíl úlohy:** Stanovení molekulové hmotnosti proteinů rodiny p53 pomocí elektroforézy v přítomnosti SDS

### Princip úlohy:

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) patří mezi nejběžnější způsoby dělení proteinů. Proteiny migrují v elektrickém poli na základě jejich tvaru (globulární proteiny migrují rychleji než vláknité) a hustoty náboje (poměr velikosti náboje k jednotce hmoty). K určení relativní molekulové hmotnosti se využívá elektroforézy v přítomnosti SDS. SDS (laurylsíran sodný) se zde váže na bílkovinný řetězec v poměru 1.4 g SDS na 1 g bílkoviny, přičemž délka komplexu SDS – bílkovina je úměrná jeho molekulové hmotnosti. Často se disulfidické vazby eliminují redukčním činidlem ( $\beta$ -merkapt ethanol) a denaturace se dokončí varem. Tedy výsledně je

jediným faktorem rozhodujícím o pohyblivosti proteinů při denaturačním SDS-PAGE jejich molekulová hmotnost. Elektroforéza v přítomnosti SDS (SDS PAGE) je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda pro kvalifikovanou charakterizaci a srovnání bílkovin. Na základě srovnání relativních mobilit neznámé bílkoviny a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost. Dále se tato metoda používá k určení koncentrace proteinu, pak je nanášeno na gel různé množství standardu (např. BSA) o známé koncentraci a náš určovaný vzorek. Po denzitometrickém vyhodnocení intenzity proužků standardu a vzorku se z kalibrační křivky určí množství vzorku a následně jeho koncentrace.



Obr. 1 Princip metody SDS-PAGE

Pracovní postup SDS-PAGE:

**1. Příprava SDS-polyakrylamidového gelu**

a. Destilovanou vodou a etanolem důkladně očistíme a poté vysušíme skla, pro jeden gel vždy dvojice sklo 1.5 mm se spacerem a krycí sklo, podobně připravíme hřebínek (1.5 mm).

b. Příprava **separačního gelu** dle tabulky:

připravit separační gel podle tabulky v uvedeném pořadí za použití zásobních roztoků (12.5% SDS-PAGE, 10% APS) → nalít mezi skla do výšky asi 5 cm → zakápnout roztokem 2-butanolu

	1 gel	2 gely	4 gely
12,5 % SDS-PAGE	10 ml	20 ml	40 ml
10 % APS	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Temed	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l

c. připravíme si **koncentrační gel** podle tabulky → odsát butanol filtračním papírem → promíchat směs → vložit hřeben

	1 gel	2 gely	4 gely
5,0 % SDS-PAGE	2,5 ml	5 ml	10 ml
10 % APS	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Temed	12,5 $\mu$ l	25 $\mu$ l	50 $\mu$ l

d. Poté, co gel zpolymeruje (zkontrolujeme opět podle polymerizace nepoužitých zbytků směsi ve falkonce), opatrně vyjmeme hřeben a starty promyjeme elektroforetickým pufrům, abychom se zbavili zbytků nezpolymerovaného akrylamidu.

e. Gel se skly vložíme do aparatury a zalijeme elektrodoým pufrům 1xRB (10xRB: 0,25 M Tris; 1,92 M glycin; 1% SDS, pH 8,3) do doporučené úrovně hladiny.

**2. Příprava vzorků**

a. Nejdříve dopočítejte množství vzorku do jednotlivých startů, máte-li k dispozici roztok BSA (1mg/ml), protein p53 (1,2 mg/ml). Množství neznámých vzorků je dáno jejich objemem (viz tabulka).

b. Celkový objem směsi je 9 $\mu$ l, ke kterým přidejte 3  $\mu$ l 4 x CSB (100 mM Tris-HCl, pH 6,8; 200 mM  $\beta$ -merkaptóetanol; 4% SDS; 0,1% bromfenolová modř; 20% glycerol).

c. PIPETOVACÍ SCHÉMA

vzorek		μl	H <sub>2</sub> O	CSB
1	M (marker velikostí)	5		
2	BSA (1μg)			3
3	BSA (3μg)			3
4	BSA (5μg)			3
5	p53 (1μg)			3
6	Vzorek X	1		3
7	Vzorek X	2		3
8	Vzorek Y	1		3
9	Vzorek Y	2		3
10	Vzorek Z	1		3
	Celkem 9ul			ul

d. Vzorky centrifugujeme a směs povaříme na termobloku při 99 °C po dobu 5 min, znovu zcentrifugujeme.

e. Vzorky nanese na gel. Do první dráhy aplikujeme 5 μl směsi markeru molekulových hmotností (BioRad).

### 3. Elektroforéza

a. Elektroforetickou aparaturu s nanesenými vzorky uzavřeme víkem s konektory a připojíme na zdroj napětí.

b. Na zdroji nastavíme program 3 (15 min 70 V a 45 min 150 V) a necháme probíhat elektroforézu, dokud čelo představované bromfenolovou modří nedosáhne spodního okraje gelu.

c. Vypneme zdroj, vyjmeme gel a opatrně oddělíme skla (zelený otvírák).

### 4. Barvení gelu a dokumentace

a. Gel vložíme do roztoku Coomassie Brilliant Blue G a za mírného třepání necháme barvit asi 20 min.

b. Barvicí roztok slijeme zpět do láhve (opatrně, abychom se nepotřísnil – barvicí schopnosti jsou značné a skvrny na ruku nebo oděvu lze odstranit velmi obtížně) a gel přelijeme odbarvovacím roztokem. Za mírného třepání při laboratorní teplotě necháme gel odbarvovat.

c. Po zmodráním odbarvovacího roztoku jej vyměníme a necháme třepat do úplného vymizení modrého pozadí – podle potřeby několikrát vyměníme odbarvovací roztok.

d. Odbarvený gel zdokumentujeme na přístroji LAS3000.

*Výsledek: Zhodnocení čistoty, koncentrace a velikosti neznámých vzorků X,Y,Z*

### **Seznam potřebného vybavení a chemikálií**

- Zásobní roztok pro přípravu separačního gelu: 12.5% akrylamid:bisakrylamid 19:1; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS
- Zásobní roztok pro koncentrační gel: 5% akrylamid:bisakrylamid 19:1; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS
- 10% persíran amonný (APS)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)
- RB (Elektrodový pufr): 25 mM Tris; 0,192 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3
- Izolovaný rekombinantní protein p53, p63, p73
- Proteinový standard (BioRad)
- 4 x CSB: 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 100 mM  $\beta$ -merkaptóetanol; 2% SDS; 0,1% bromfenolová modř; 10% glycerol
- Roztok Coomassie Brilliant Blue G: 0,25% Coomassie Brilliant G (Serva); 45% (v/v) metanol; 10% (v/v) kyselina octová
- Odbarvovací roztok: 25% (v/v) metanol; 10% kyselina octová
- Pipety, špičky, mikrozkuhavky, termoblok, zdroj napětí, třepačka
- Dokumentační systém LAS 3000

## ***II. Přenos proteinů na membránu (blotting)***

**Cíl úlohy:** Přenos proteinů z SDS-PAGE, PAGE či agarózového gelu na membránu

### **Princip úlohy:**

Přenos proteinu na membránu se používá pro identifikaci proteinů prostřednictvím protilátek a následuje obvykle po rozdělení proteinů na SDS-PAGE či po separaci DNA-protein komplexů na nativním PAGE či agarózovém gelu. Protože sondy-protilátky pro daný protein většinou nelze použít přímo v gelu jsou proteiny či jejich komplexy s DNA přeneseny po elektroforéze na membránu (používají se nitroceluloza, PVDF a další).

Podle typu přenášené makromolekuly rozeznáváme:

- Southernův přenos: přenos DNA;
- northernový přenos: přenos RNA;



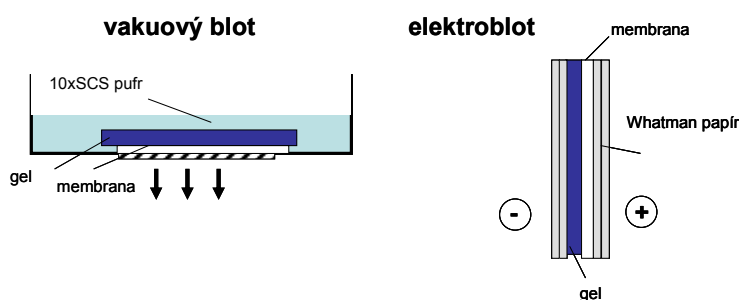
-westernový přenos: přenos proteinů.

Podle způsobu přenosu makromolekuly na membránu rozdělujeme blotting na:

-elektroblot- přenos, u kterého je využito elektrického pole;

-vakuový, u kterého jsou makromolekuly přenášeny prostřednictvím pufru (10x SSC) nasávaného vakuovou pumpou;

-kapilární přenos, u kterého je využito kapilárních sil, které prostupují gelem a membránou a strhávají s sebou nukleové kyseliny nebo proteiny. Vztlínání pufru je zajištěno navrstvením savého materiálu na membránu.



**Obr.2 Princip vakuového blotu a elektroblotu**

### 1.2.1 Vakuový blot - pracovní postup:

#### Vakuový blot - přenos proteinu z agarózového gelu na membránu

1. Sestavení blotovací aparatury (viz obrázek 2): na porézní podložku do prostoru vymezeného otvorem v igelitové masce umístíme 2 vrstvy filtračního papíru navlhčeného přenášečím pufrém (10 x SSC), na filtrační papíry položíme nitrocelulóзовou membránu zastříženou na rozměry odpovídající rozměrům gelu. Vždy po položení jednotlivých vrstev pečlivě skleněnou pipetou nebo tyčinkou odstraníme případné bubliny, které by mohly negativně narušit přenos. Orientaci membrány označíme zastřížením pravého horního rohu. Na membránu položíme gel tak, aby jeho kraje přečnívaly přes otvor v igelitové masce. Pečlivě zkontrolujeme a odstraníme případné netěsnosti.

2. Gel zalijeme blotovacím pufrém a zapneme pumpu. Na manometru nastavíme požadovaný podtlak. Přenos probíhá asi 1,5 hodiny. Během této doby zkontrolujeme občas průběh přenosu, zda nedošlo k narušení vakua, v případě, že byl vyčerpán veškerý blotovací pufr, nalijeme na gel ze zásobního roztoku.

3. Po skončení přenosu zrušíme vakuum, z blotovací aparatury vyjmeme membránu a imunochemicky detekujeme proteiny.

### 1.2.2 Elektroblot - pracovní postup:

#### Přenos proteinu z PAGE/SDS-PAGE na membránu

1. odříznout nitrocelulózovou nebo PVDF membránu (standard 8 cm \* 6 cm) → popsat, u PVDF aktivace 1 min v 100% MeOH, 5 min H<sub>2</sub>O, nastříhnout whatman papír na velikost přenášené oblasti
2. z gelu odříznout koncentrační gel a namočit do TB
3. hubka, 2x whatman, gel, membrána, 2x whatman, hubka (černá dole)
4. 1 x transfer b. + 100 ml MeOH (do 1 litru) → led
5. elektroblot, zapojení do zdroje na 1,5 hodiny při 150V (program 9)

### 1.2.3 detekce proteinů na membráně pomocí barvení Ponceau S

1. membránku ponoříme do roztoku Ponceau S na 5-10 min
2. odbarvíme destilovanou vodou ze stříčky
3. zdokumentujeme na dokumentačním systému

*Výsledek: Po vakuovém blotu či elektroblotu získáme přenesené proteiny na membráně, kde je můžeme před imunodetekcí zobrazit barvením Ponceau S barvivem, které neinterferuje i imunodetekcí*

#### Materiál a chemikálie:

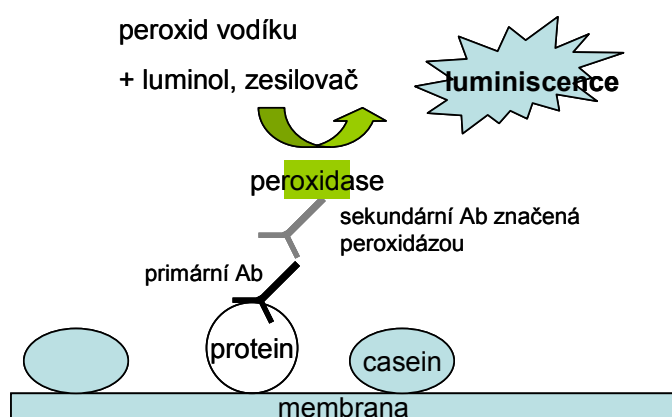
- gel s přenášeným proteinem nebo nukleovou kyselinou
- blotovací aparatura (firma Biorad)
- filtrační papír, whatman papír
- nitrocelulózová nebo PVDF membrána
- **20x SSC** (3.0 M Sodium chloride - 0.3 M sodium citrate) (na 1 l 175.3 g NaCl, 88.2 g sodium citrate upravit pH na 7.0 s 10 N NaOH)
- **10x transfer buffer** (1 l 30.3 g Trizma base (= 0.25 M), 144 g Glycine (= 1.92 M) pH by mělo být 8.3; neupravovat), 1x TB (100 ml MeOH + 100ml 10xTB + voda)

### III. Imunodetekce proteinů na membráně

**Cíl úlohy:** Imunodetekce proteinu p53 po přenosu z SDS-PAGE či agarózového gelu

#### Princip úlohy:

Detekci proteinů provádíme často imunochemickými metodami. Po přenosu na membránu následuje vysycení volných vazebných míst albuminem nebo mléčnými bílkoviny. Potom membránu inkubujeme v roztoku, který obsahuje protilátku proti hledanému proteinu. Tato tzv. primární protilátka je připravena tak, aby vykazovala silnou specifitu vůči studovanému proteinu. V dalším kroku se použije sekundární protilátka konjugovaná s enzymem (alkalická fosfatáza, peroxidáza, luciferáza apod.). Sekundární protilátka je druhově specifická, to znamená, že rozeznává primární protilátku podle druhu organismu ve kterém byla produkována. Pro úspěšnou detekci je nezbytné použít sekundární protilátku se specifitou odpovídající protilátce primární. Samotná detekce je provedena reakcí prostřednictvím konjugovaného enzymu. Do inkubační směsi je přidán specifický substrát zvolený tak, aby jeho přeměnou na produkt došlo k barevné reakci nebo emisi světelných kvant. Protože komplex protein-Ab1-Ab2-enzym je ukotven na membránu, k reakci dojde pouze v místech, kde je komplex navázán. Jeho pozice na membráně je



indikována zbarvením membrány. Z intenzity zbarvení můžeme určit množství proteinu v daném místě.

**Obr.3** **Princip**  
**imunodetekce**  
**s luminiscenční detekcí**

### Pracovní postup:

1. membránu po přenosu proteinů označit a nechat třepat v 5 % odtučněném mléku (5 g sušeného mléka + 100 ml 1x PBS) po 1 hod (30 min)
2. primární protilátku zředit v mléku (1:10 000) → nechat třepat přes noc při 4 °C (30 min)
3. promýt v 1x PBS + tween → 3x 5 min na třepačce
4. sekundární protilátku (konjugát) zředit v mléku (1:5000) → nechat třepat 1 hod v RT (30 min)
5. promýt v 1x PBS + tween → 3x 5 min na třepačce
6. vložit membránu do eurofólie
7. připravit si roztok pro chemiluminiscenci (ECL, 1:1): 0,5 ml reagentu 1 + 0,5 ml reagentu 2 (na membránu o velikosti 8 cm \* 6 cm) → nechat působit 1 min
8. roztok odsát → fotit v černé komoře na Las3000

*Výsledek: Detekce pozice proteinů po SDS-PAGE či agarozové elektroforéze*

### Materiál a chemikálie:

- 1 x PBS
- 5% odtučněné mléko v 1 x PBS
- primární protilátka
- sekundární protilátka s konjugovaným detekčním enzymem (HRP)
- 1 x PBST (100 ml 10xPBS, 0.5 ml Tween 20 na 1l)
- třepačka

Roztok na chemiluminiscenci:

RPN2106 Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)

## IV. EMSA - Gelová retardační analýza

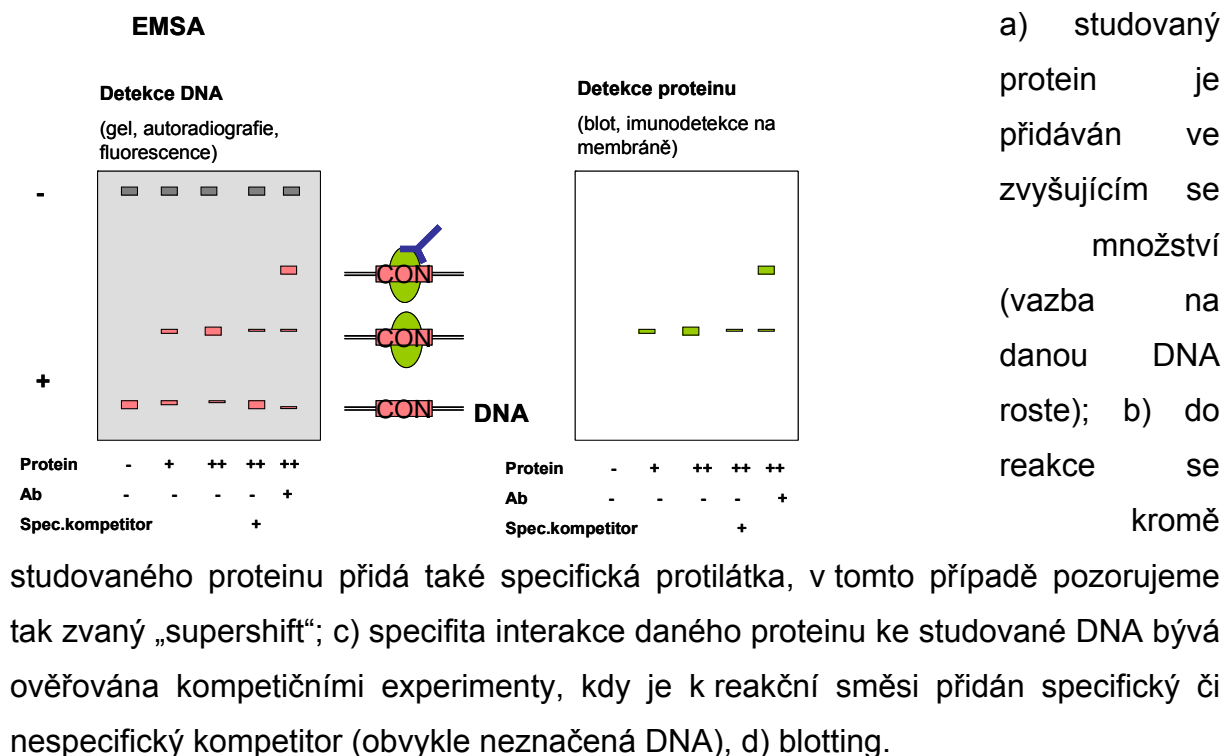
Cíl úlohy: *Detekce vazby proteinu p53 na cílové místo v promotoru genu p21 pomocí EMSA (gelová retardační analýza)*

### Princip úlohy:

Gelová retardační analýza je jednou z technik pro studium genové regulace a určení interakce DNA-protein. Tato metoda je založena na pozorování, že komplex DNA-protein putuje v nedenačním polyakrylamidovém či agarózovém gelu výrazně pomaleji, než samotná DNA. Často se využívá krátké DNA, představující studovanou cílovou sekvenci pro testovaný protein. Nejběžnější variantou byla metoda využívající radioaktivně značeného oligonukleotidu s předpokládanou cílovou sekvencí, kterou v současnosti vytlačuje použití fluorescenčně značených DNA.

Nejdříve je DNA inkubována s proteinem (jaderný nebo buněčný lyzát, purifikovaný protein, in vitro transitoovaný protein) v DNA vazebném pufru, a reakční směs je potom analyzována na nedenačním gelu.

Při studiu specifity dané reakce se uplatňují nejčastěji 4 přístupy:



Obr. 4 Princip metody EMSA s imunodetekcí

**Pracovní postup:**

1. Příprava agarózového gelu (do elm. baňky navážíme přesně 1 g agarózy, přidáme 3,3 ml 10x TBE pufru, a 100 ml vody - ryska, rozvaříme, doplníme vodu po rysku, vychladlý gel naléváme do misky s hřebínky, příprava vany s pufrem), příprava 1 l 0.33xTBE (33 ml 10xTBE do 1 l vody)

2. Příprava **komplexů DNA-proteinp53**

a) příprava DNA – změření koncentrace DNA na nanodropu, 200 ng na reakci rozmrazit → stočit → na led, změřit na nanodropu při 260 nm

- pBlue/PvuII (B/P) – nespecifická DNA

- pP21/PvuII (P/PvuII) – specifická DNA

Ředění ve vodě:

b) příprava proteinu

- wt p53 – 1000 ng/ul (pro poměr p53tet/DNA 1/1 je nutné dát 20 ng proteinu), rozmrazit → stočit → na led

- naředit protein na 20 ng/ul v TETKD (vazebný pufr s 0.5mM DTT)

c) pipetování podle tabulky

Vzorek		B/P (200 ng/μl)	P/P (200 ng/μl)	p53 (μl)	TETKD (μl)
1	pB/P	1	-	-	9
2	pB/P+p53 1/1	1	-	1	8
3	pB/P+p53 2/1	1	-	2	7
4	pP/P	-	1	-	9
5	pP/P+p53 1/1	-	1	1	8
6	pP/P+p53 2/1	-	1	2	7

- vortex → centrifugace → 10 minut při pokojové teplotě

- přidat 3 μl nanášecího pufru (LB)

**3. elektroforéza v 0.33xTBE**

naneseme na gel (v pořadí podle tabulky) → 1 hod / 120 V (v komorovce)

**4. detekce DNA-protein komplexů**

- gel obarvíme v EtBr (1 μg/ml), 20 min → promýt vodou → vyfotit pod UV světlem

- po vyfocení gel použijeme pro vakuový proteinový přenos na nitrocelulózovou membránu.

**Výsledek:** *Protein p53 se váže specificky na promotor genu p21*

**Materiál a chemikálie:**

- DNA, Protein p53
- vazebný pufr 20xTETK (100mM Tris HCl pH 7.6, 50 mM EDTA pH 8; 0,1% TritonX100, 1000 mM KCl); 10mM DTT (20x)
- ledová lázeň, agaróza, 10 x TBE
- elektroforetická aparatura, zdroj napětí, mikrozkuřavky, špičky, pipety

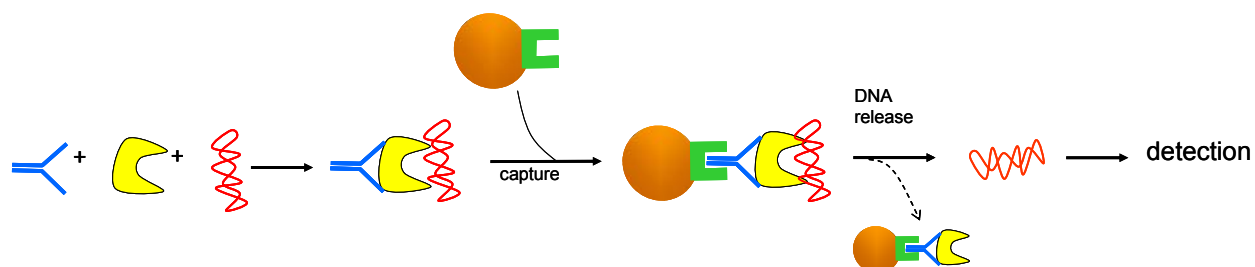
## Kapitola 2: Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA

Garant: Hana Pivoňková

### *Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA pomocí imunoprecipitace na magnetických kuličkách*

**Princip metody:** Magnetické kuličky nesoucí různé rozpoznávací částice (např. protein G, protilátky, streptavidin, oligonukleotidy,...) jsou vhodným nástrojem pro vysoce specifické zachycení, izolaci a analýzu různých molekul (DNA, RNA nebo proteinů) nebo celých buněk. Magnetické kuličky jsou využívány k různým účelům, např. ke studiu hybridizace DNA, DNA-protein interakcí, imunoprecipitace.

**Princip úlohy:** V této úloze budeme sledovat vazbu nádorového supresorového proteinu p53 s nadšroubovicovou DNA v přítomnosti lineární DNA obsahující (pPGM1) nebo neobsahující (pBSK) p53 vazebnou sekvenci, a vliv specifických monoklonálních protilátek (rozpoznávající epitopy buď v N- nebo C-koncové doméně proteinu). Pomocí magnetických kuliček pokrytých proteinem G zachytíme imunokomplex „protilátka-protein-DNA“ vytvořený za optimálních podmínek v roztoku. Působením SDS a zahřátím vzorku na 65 °C uvolníme navázanou DNA z komplexu, a tu pak analyzujeme pomocí gelové elektroforézy (barvení ethidium bromidem nebo SYBR Greenem).





## Vysvětlivky:



## POSTUP:

- 1) do 4 eppendorfek připravíme vzorky dle rozpisu, ve vazebném prostředí (5 mM Tris, 50 mM KCl, 2 mM DTT, 0,01% Triton) smícháme nejdříve danou protilátku a protein p53, necháme inkubovat 15 minut v ledové lázni
- 2) přidáme DNA podle rozpisu a necháme na ledové lázni 20 minut
- 3) mezitím připravíme do 1 eppendorfky 80  $\mu$ l magnetických kuliček
- 4) promyjeme (na vortexu) 3x400  $\mu$ l pufru (5 mM Tris, 50 mM KCl, 2 mM DTT, 0,01% Triton), tzn. resuspendování kuliček na vortexu, na magnetu odebrání špinavého pufru a přidání čistého
- 5) roztok kuliček před posledním odebráním pufru rozpipetujeme do 4 eppendorfek a odebereme pufr
- 6) ke kuličkám (bez pufru) přidáme preinkubovaný imuno-komplex
- 7) necháme inkubovat v termomixeru 2 cykly 10 minut při 10 °C (1 cyklus = 1 min třepat při 900 ot/min, 9 min třepat při 450 ot/min)
- 8) dáme do magnetu, odebereme roztok, promyjeme 3x100  $\mu$ l pufru (protřepeme v ruce)
- 9) zároveň necháme zahřát termomixer na 65 °C, nastavíme 5 minut, 500 ot/min
- 10) ke kuličkám přidáme 20  $\mu$ l 0.5% SDS, protřepeme
- 11) necháme zahřát na 65 °C, 5 min, 500 ot/min.
- 12) stočíme na minicentrifuze, epp. dáme do magnetu a roztok odebereme do čistých epp. s 2  $\mu$ l barvy
- 13) nanese po 11  $\mu$ l na každý gel (1,3% agarozový gel, pufr 1xTAE)
- 14) necháme jet 30 min při 120 V, lab. teplota)
- 15) obarvení gelu Et-Br nebo SYBR Greenem, snímání gelu na LAS-3000

KONTROLY: scDNA a linDNA, které nebyly vázané přes magnetické kuličky

Příprava: 1  $\mu$ l sc nebo linDNA (200 ng) + 1  $\mu$ l barvičky (obs. SDS) + 9  $\mu$ l vody

vzorek č.		1	2	3	4
sc/lin DNA		B/B	B/P	P/B	P/P
	<b>vých. konc.</b>				
sc DNA (ul)	400 $\mu$ g/ml	1	1	1	1
lin DNA (ul)	400 $\mu$ g/ml	1	1	1	1
KCl	500 mM	2	2	2	2
VP	10x	2	2	2	2
DTT	20 mM	2	2	2	2
protilátka	800 $\mu$ g/ml	1	1	1	1
protein p53		1	1	1	1
voda		10	10	10	10

GEL: 0,33 g agarózy

0,5 ml 50xTAE

25 ml vody

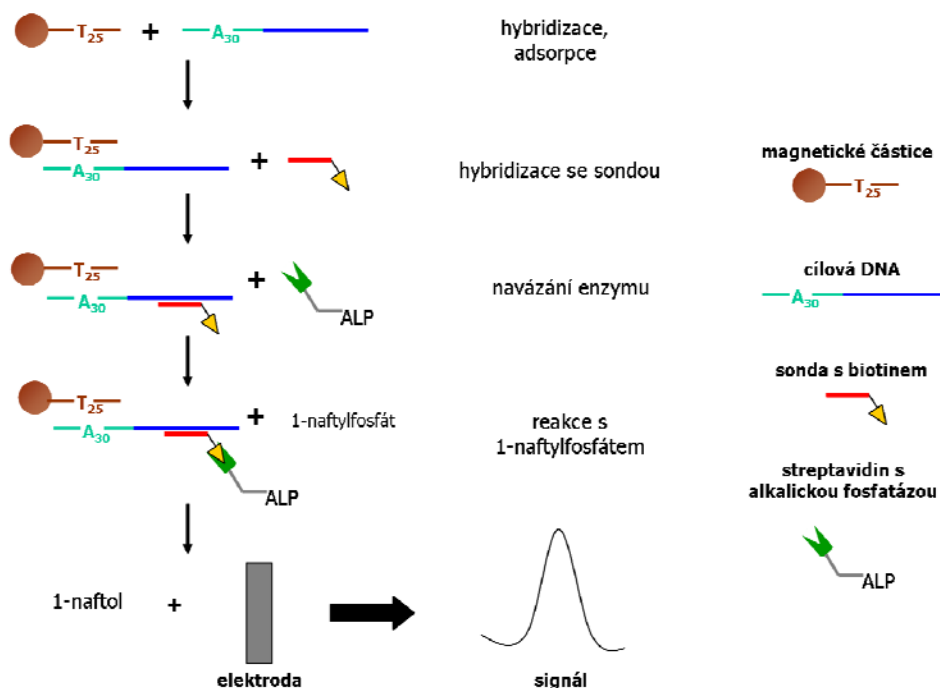
smícháme vše v erlenmayerově nádobě, necháme rozvařit v mikrovlnné troubě, dovážíme na původní objem, erlenku mírně zchladíme pod tekoucí vodou, nalejeme do gelového nosiče s hřebínkem pro 15 startů, necháme ztuhnout.

### ***Analýza nukleotidových sekvencí pomocí magnetických kuliček a hybridizace se sondou značenou enzymem***

**Princip úlohy:** Přítomnost určité sekvence nukleotidů v cílové DNA lze dokázat pomocí vhodně navržené sondy - krátkého úseku DNA, která s hledanou sekvencí hybridizuje, tj. vytvoří duplex DNA. Vznik duplexu detekujeme.

V této práci bude cílová DNA s (dA)<sub>30</sub>-koncem nejprve navázána na magnetické kuličky modifikované (dT)<sub>25</sub> řetězci. Bude-li v této DNA úsek komplementární k navržené sondě nesoucí biotin, dojde k hybridizaci. Na biotin bude poté navázán

konjugát streptavidinu s enzymem, alkalickou fosfatázou, která přemění elektroneaktivní substrát 1-naftylfosfát na 1-naftol, jehož oxidace bude detekována pomocí lineární voltametrie.



### Postup:

- 1) napipetujeme 40  $\mu$ l kuliček DB-(dT)<sub>25</sub> do eppendorfky, pomocí magnetu odebereme skladovací pufr a 3x promyjeme 100  $\mu$ l 0,3M NaCl/ 10mM TRIS (tj. resuspendujeme na vortexu a pomocí magnetu odebereme promývací roztok a přidáme čistý)
- 2) před posledním odebráním promývacího pufru kuličky rozdělíme do 2 eppendorfek po 50  $\mu$ l
- 3) do jedné eppendorfky napipetujeme 20  $\mu$ l cílové DNA I (5  $\mu$ g/ml) v roztoku 0,3M NaCl, do druhé totéž ale s cílovou DNA II
- 4) necháme inkubovat v termomixeru 20 min, 20 °C, 900 rpm
- 5) 3x promyjeme 100  $\mu$ l 0,3M NaCl/ 10mM TRIS
- 6) do obou eppendorfek napipetujeme 20  $\mu$ l biotinylované sondy (5  $\mu$ g/ml)
- 7) viz 4)
- 8) viz 5)

- 9) přidáme 50  $\mu$ l mléka (2,5 g sušeného mléka + 50 ml PBS) - necháme inkubovat 10 min, 20 °C, 900 rpm
- 10) po odebrání mléka přidáme 50  $\mu$ l konjugátu streptavidinu s alkalickou fosfatázou 100x ředěného v mléce
- 11) viz 4)
- 12) promyjeme - 3x 100  $\mu$ l PBST (fosfátový pufr + 0,2 % TWEEN) a 3x 100  $\mu$ l 0,3M NaCl/ 10mM TRIS
- 13) přidáme 50  $\mu$ l 100mM 1-naftylfosfátu v uhličitanovém pufru
- 14) viz 4)
- 15) odebereme roztok od kuliček a přeneseme ho do 1 ml uhličitanového pufru

Elektrochemická detekce:

metoda: LSV - lineární voltametrie

pracovní elektroda: PGE - elektroda z pyrolytického grafitu

roztok připravený v bodě 15) přeneseme do elektrochemické měřicí nádoby, vložíme do ní elektrody, spustíme měření, vyhodnotíme

## Kapitola 3: Základní metody molekulární biologie - DNA

Garant: Václav Brázda

Dopoledne 9-12

### ***1. Izolace superhelikální plazmidové DNA***

Princip a cíl: Plazmidy jsou mimochromozómové genofory tvořené kružnicovou dsDNA. V bakteriálních buňkách se vyskytují v jedné až několika tisících kopiích na buňku a jsou snadno dostupným zdrojem homogenní DNA. V přirozeném stavu v buňce mají plazmidy zpravidla negativní nadšroubovicové vinutí. Pro izolaci plazmidů pBluescript a pPGM2 použijeme metodu alkalické lyze s SDS (GenElute HP Placid MidiPrep Kit – Sigma). Bakteriální stěny jsou lyzovány přídatkem SDS a NaOH a odseparovány na koloně. Cílem je vyizolovat co největší množství co nejčistšího plazmidu.

1. 50 ml bakteriální kultury centrifugujte 5000 g/10 minut (připraveno)  
\_\_\_\_\_ 60 minut
2. K sedimentu přidejte 4 ml resuspenzačního pufru s RNazou (01-Resuspension / RNase A Solution, lednice) a resuspendujte (pipetováním a na vortexu)
3. Dále přidejte 4 ml lyzačního pufru (02-Lysis solution), promíchejte 7x jemným otočením, nechte stát 3 - 5 minut dokud nebude směs čirá a viskózní ( !!!  
**Nevortexovat**)
4. Připravte stříkačku (vyjmout píst) a dát do svislé polohy
5. Neutralizujte lyzované buňky přidáním 4ml **vychlazeného** (2-8°C) neutralizačního roztoku (03-Neutralization Solution) 5x otočením (objeví se bílá sraženina).
6. Přidejte 3 ml vazebného roztoku (04-Binding solution) a 2x otočte. Nalijte do připravené stříkačky. Nechte stát 5 minut.
7. Vložte HP MidiPrep Vazebnou Kolonu do zkumavky a přidejte 4 ml roztoku na přípravu kolony (05-Column Preparation Solution), stočte 3000g/2minuty
8. Do kolony vystříkněte mírným tlakem na stříkačku polovinu vyčištěného lyzátu. Nepřeplňte kolonu a stočte 3000 g/2minuty. Vyhodte eluát a přidejte na kolonu zbytek vyčištěného lyzátu a opět centrifugujte.

9. Přidejte 4 ml mycího roztoku 1 (06-Wash Solution 1) a stočte 3000 g/2minuty
10. Přidejte 4 ml mycího roztoku 2 (07-Wash Solution 2) a stočte 3000 g/2minuty
11. Dejte Kolonu do nové zkumavky, přidejte 1 ml elučního roztoku (08-Elution Solution) a centrifugujte 3000g/5minut. DNA je připravena k dalšímu použití.
12. Změřte koncentraci DNA na spektrofotometru.

Výsledek 1: koncentrace DNA.

## **II. Štěpení plazmidové DNA restrikční endonukleázou (RE)**

Princip a cíl: Pro další analýzy a kontrolu čistoty plazmidu použijeme restrikční endonukleázy. Restrikční endonukleázy jsou součástí tzv. restrikčně modifikačních mechanismů bakterií. Tento systém je zajišťován dvěma druhy enzymových aktivit – metylační a restrikční. Enzymy s metylační aktivitou specificky modifikují (metylují) vlastní buněčnou DNA, čímž ji chrání před degradací restrikčními enzymy. Restrikční endonukleázy jsou bakteriemi využívány ke štěpení cizorodé DNA, která není v příslušných sekvencích metylována. Restrikční endonukleázy rozpoznávají krátké sekvence dvouřetězcové DNA a štěpí ji ve specifických místech nebo poblíž nich. V našem případě použijeme RE Scal, která štěpí námi izolovanou DNA v 1 místě a PvuII, která ji štěpí ve 2 místech. Cílem je získat lineární DNA a 2 fragmenty z původní superhelikální kruhové molekuly DNA.

90 minut

1. Napipetujte do zkumavky 20 µg naizolované superhelikální DNA (2x)
2. Označte zkumavky jménem plazmidu a použitou RE (PvuII, Scal)
3. Přidejte 1/10 objemu pufru pro danou RE a 40 U RE
4. Promíchejte a dejte na 37 °C/1 hodinu
5. V mezičase připravte 1% agarózový gel s 1x TAE pufrem.
6. Odstraňte RE po štěpení centrifugací 14000 g/1 minutu přes Micropure-EZ kolonu.
7. Naneste na agarózový gel 400 ng A) superhelikální DNA, B) fragmentu po štěpení Scal, C) fragmentu po štěpení RE PvuII v nanášecím pufru.
8. Zapněte elektroforézu na 80 V (cca na 1 hodinu) a běžte na oběd. Pokračování odpoledne.

Odpoledne 13-16

### **III. ELISA stanovení apoptózy**

Princip a cíl: ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), patří mezi nejpoužívanější imunologické metody. Využívá základních vlastností proteinů a protilátek - schopnost vázat se na povrch umělých hmot a schopnost protilátky specificky rozpoznat antigen. Existuje celá řada variací této metody. V našem případě použijeme přímou ELISA metodu pro stanovení membránového receptoru Annexin V, který je v buňkách exprimován v časném stádiu apoptózy. Cílem je stanovit orientační množství Annexin V ve vzorku pomocí „Annexin V apoptotic kitu“ (Imtech).

---

170 minut

Příprava vzorku – naředěte vzorek 1:101 – 10 $\mu$ l vzorku + 1 ml Dilution Buffer (modrý uzávěr)

1. Napipetujte na mikrotitrační destičku 100 $\mu$ l vzorku, pozitivní a negativní kontrolu, kalibrační koncentrační řadu.
2. Inkubujte při RT / 60 minut.
3. Odstraňte (vyklepáním nebo odpipetováním), promyjte 3x 300 $\mu$ l Wash buffer (obvykle PBS).
4. Napipetujte 100  $\mu$ l protilátky proti Annexinu V (bílý uzávěr), zalepte a inkubujte při RT / 30 min.
5. Odstraňte (vyklepáním nebo odpipetováním), promyjte 3x 300  $\mu$ l Wash buffer (obvykle PBS).
6. Napipetujte 100  $\mu$ l TMB roztoku (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), inkubujte 5 min.
7. Přidejte 100  $\mu$ l Stop solution. Změřte při 450 nm po 10 minutách.

*Výsledek 4:* Určení největšího množství apoptotických buněk dle intenzity signálu.

## **IV. Denzitometrická analýza separované DNA pomocí programu ImageJ**

Princip a cíl: Denzitometrická analýza se používá pro kvantitativní analýzu obrazu. Pro vědecké účely existuje nekomerční program ImageJ vyvinutý National Institute of Health, USA. V našem případě vyhodnotíme denzitu jednotlivých proužků DNA po izolaci a po štěpení RE.

\_\_\_\_\_průběžně během ELISA stanovení

1. Dle instrukcí školitele obarvíte agarózový gel v ethidium bromidu (10 min v roztoku Etbr 0,5 µg/ml, 10 min ve vodě) a zdokumentujte pod UV lampou na DNA detekčním systému. Výsledek v tiff formátu přeneste na počítač s nainstalovaným programem ImageJ.

*Výsledek 2:* Foto izolované DNA a štěpené DNA, popsání jednotlivých proužků DNA separovaných na agarózovém gelu a vyhodnocení čistoty DNA a štěpení.

2. Analýza intenzity proužků DNA pomocí programu.

*Výsledek 3:* Zhodnocení čistoty a kvality DNA na základě denzitometrie.



## Kapitola 4: Základní elektrochemické metody

Garant: Miroslav Fojta

### I. Jednoduchý redox systém-anodická rozpouštěcí voltametrie

Pokud polarizujeme visící rtuťovou kapkovou elektrodu (HMDE) lineárně se měnícím stejnosměrným napětím, dochází v přítomnosti elektroaktivní látky v závislosti na směru polarizace HMDE k redukci (katodický směr) nebo oxidaci (anodický směr) dané elektroaktivní látky. Na voltamogramu – záznamu závislosti měřeného proudu na vkládaném napětí se objeví pík. Pokud za vzniklým píkem obrátíme směr polarizace pracovní elektrody (použijeme cyklickou voltametrii, CV) a daný elektrodový děj probíhá reverzibilně, tak i ve zpětném scanu obdržíme voltametrický pík. Některé kovy se rozpouští ve rtuťi za vzniku amalgámu. Tohoto jevu lze využít pro nahromadění analyzovaného kovu v materiálu HMDE. Provádíme elektrolýzu analyzovaného roztoku při vhodném potenciálu. Nahromaděný kov je pak rozpuštěn během voltametrického scanu. Touto metodou - anodickou rozpouštěcí voltametrií - lze stanovit velmi malé koncentrace běžných iontů kovů (sub nanomolární koncentrace).

#### Pracovní postup:

Do měřicí nádoby napipetujeme 3 ml základního elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 5,0) po vybublání argonem (3 min) provedeme CV záznam s počátečním potenciálem 0 V, konečným potenciálem -1 V a rychlostí scanu 500 mV/s. Poté provedeme scan elektrolytu s akumulací 30 s při -0.6 V Poté přidáme  $\text{Cd}^{2+}$  ( $C = 10 \mu\text{M}$ ) a opět provedeme scany bez a s akumulací.

#### Seznam potřebného vybavení a chemikálií:

potenciostat (Autolab)

elektrodový systém (663 VA-stand) pracovní elektroda: HMDE, referenční elektroda:

Ag/AgCl/3M KCl, pomocná elektroda: platinový drát

tlaková láhev s argonem

0,2 M acetátový pufr, pH 5,0

roztoky  $\text{Cd}^{2+}$

## **II. Klasická polarografie**

V polarografii je rtuťová kapková elektroda (DME) polarizována lineárně se měnícím stejnosměrným napětím. Pokud jsou v měřeném roztoku (elektrolytu) obsaženy látky, které na povrchu DME při určitém potenciálu podléhají elektrodové redukci nebo oxidaci (depolarizátory), pak při dosažení tohoto potenciálu začne obvodem protékat proud. Na záznamu (polarogramu) vzniká tzv. polarografická vlna. Její poloha (tzv. půlvlnový potenciál) je kvalitativním údajem, zatímco její velikost (hodnota limitního difúzního proudu) je údajem kvantitativním.

### **Pracovní postup:**

Do měřicí nádoby napipetujeme 2 ml základního elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 5,0) po vyublání argonem (2 min.) provedeme polarografický záznam s počátečním potenciálem 0 V a konečným potenciálem -0,9 V. Poté přidáme  $\text{Cd}^{2+}$  ( $C = 0.5 \text{ mM}$ ) a opět provedeme scan. Podobně přidáme  $\text{Pb}^{2+}$ .

### **Seznam potřebného vybavení a chemikálií:**

potenciostat (Autolab)

elektrodový systém (663 VA-stand) - pracovní elektroda: DME, referentní elektroda: Ag/AgCl/3M KCl, pomocná elektroda: platinový drát

tlaková láhev s argonem

0,2 M acetátový pufr, pH 5,0

roztoky  $\text{Cd}^{2+}$  a  $\text{Pb}^{2+}$

## **III. Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie**

### **Princip metody**

Adsorptivní rozpouštěcí voltametrie je založena na užití adsorptivního nahromadění analytu z roztoku na povrchu pracovní elektrody. Naadsorbovaný analyt je pak v dalším kroku – voltametrickém scanu rozpuštěn zpět do roztoku základního elektrolytu. Tím se o několik řádů zvýší detekční limit. Při adsorptivní přenosové rozpouštěcí voltametii je analyt adsorptivně nahromaděn na povrchu elektrody (analyt se musí adsorbovat ireverzibilně) z malé kapky vzorku (3-5  $\mu\text{l}$ ), poté je

elektroda s naadsorbovanou vrstvou omyta a přenesena do roztoku základního elektrolytu. Zde pak probíhá samotné elektrochemické měření. Díky aplikaci této metody se sníží potřebný objem vzorku o tři řády (jednotky ml – jednotky  $\mu$ l). Navíc lze tímto způsobem analyzovat vzorky DNA obsahující nízkomolekulární látky, které by mohly rušit elektrochemické měření.

### **Pracovní postup**

- Do nádobky si připravíme základní elektrolyt (0,3 M mravenčan amonný 0,05 M fosfát, pH 6,97 - dále mf) naředěním zásobního roztoku (0,5 ml mf, 2,5 ml vody).
- Změříme cyklickou voltametrií (CV) základní elektrolyt v potenciálovém rozsahu 0 až -1,85 V. Elektrolyt před měřením po dobu 3 minut probubláváme argonem, abychom z něho odstranili kyslík. Jako pracovní elektrodu používáme visící rtuťovou kapku.
- Do nádobky s elektrolytem přidáme tolik DNA, aby její výsledná koncentrace v nádobce byla 5  $\mu$ g/ml. Změříme CV bez akumulace analytu.
- Změříme CV s minutovou akumulací analytu na elektrodě při potenciálu 0 V.
- Pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí voltametrie provedeme měření vzorku DNA obsahujícího  $Zn^{2+}$  ionty s minutovou akumulací.

### **Materiál a pomůcky**

- potenciostat (Autolab)
- elektrodový systém (663 VA-stand)
- tlaková láhev s argonem
- pufr 6x mf
- roztok denaturované DNA
- roztok  $Zn^{2+}$

## ***IV. Elektrochemická analýza bílkovin***

### **Princip a cíl úlohy**

Pomocí elektrochemických metod je možné stanovit bílkoviny v roztoku, rozlišit danou bílkovinu s různými konformacemi, např. nativní a denaturovanou formu, a sledovat interakci s nízkomolekulárními látkami, s jinými bílkoviny nebo

nukleovými kyselinami. Princip analýzy spočívá v tom, že bílkoviny se obvykle velmi silně adsorbují na povrch elektrod, kde následně dochází (díky určitým aminokyselinám) k redoxním nebo katalytickým procesům. Pro přenos elektronů je důležité, aby elektroaktivní aminokyselina byla v blízkosti povrchu elektrody - proto změny v konformaci bílkovin vedou ke změně vzdálenosti nebo orientace daných aminokyselin, a tudíž i ke změně měřeného signálu. Pro přímou analýzu bílkovin (čili jedná-li se o signál z aminokyselin a ne třeba z kofaktorů nebo elektroaktivních značek) na rtuťové elektrodě se používá buďto alkalický roztok obsahující ionty kobaltu (jedná se o tzv. Brdičkovu katalytickou reakci, BCR), nebo více univerzální metoda bez nutnosti použití  $\text{Co}^{2+}$ , založená na tzv. katalytickém píku H měřeným pomocí chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA).

Aby Brdičková reakce proběhla, je kromě alkalického pH a přítomnosti dvou- nebo trojmocných kationtů kobaltu potřebné, aby bílkovina obsahovala aminokyselinu cystein, popřípadě cystin (2 cysteiny spojené disulfidickou vazbou). Cystein v komplexu s kobaltem katalyzuje redukci protonů z roztoku při méně negativních potenciálech, než při nekatalyzované reakci (při tzv. vybíjení elektrolytu, kdy signál z redukce protonů potlačí veškeré další redoxní signály).

CPSA je založená na stejném principu katalytické redukce protonů, ale bez nutnosti použití kobaltu nebo přítomnosti cysteinu. Navíc se může použít i neutrální a kyselé pH. Katalytický signál bílkovin (ve tvaru píku) u CPSA - pík H - je velmi citlivý na změnu konformace bílkoviny. Důvodem této citlivosti je vysoká rychlost změn potenciálu při měření (může řádově dosahovat i tisíce voltů za sekundu), která umožňuje již adsorbovaným bílkovinám zachovávat svou nativní strukturu na povrchu elektrody. Tato rychlost změn potenciálu se koriguje pomocí tzv. rozpouštěcího proudu, přičemž platí, že čím vyšší proud, tím vyšší rychlost. Kromě toho umožňuje CPSA stanovení velmi nízkých koncentrací bílkovin, řádově až femtomoly.

Cílem je tedy demonstrovat na modelových bílkovinách, jako je např. hovězí sérový albumin (BSA), základy Brdičkovy reakce (pomocí metody diferenční pulzní voltametrie), a dále pak vlastnosti píku H, včetně stanovení ultranízkých koncentrací.

## Pracovní postup

### A. Brdičková reakce:

1. příprava roztoku na Brdičkovu reakci ze zásobních roztoků; výsledný elektrolyt má být 0.1 M amonný pufr (směs  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) + 1 mM  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ ;

vypočítat potřebné objemy

2. Zapojit 3-elektrodivý systém, ponořit elektrody, nastavit parametry DPV (rozsah -0.1 až -1.85 V; krok 5 mV; amplituda 50 mV)
3. změřit elektrolyt
4. napipetovat do elektrolytu zásobní BSA tak, aby výsledná koncentrace byla 100 nM a změřit
5. popřípadě zopakovat experiment bez přidání kobaltu

B. Pík H a CPSA

1. připravit elektrolyt - 50 mM fosfátový pufr, pH 7, ze zásobního 0.8 M fosfátového pufru
2. změřit elektrolyt pomocí CPSA (-0.1 až -1.9 V, proud např. 20  $\mu$ A)
3. do elektrolytu napipetovat 100 nM BSA (vypočítat objem), zamíchat a změřit za stejných podmínek, jako elektrolyt
4. zkusit více rozpouštěcích proudů, sledovat jak se mění pík H
5. připravit nový elektrolyt, zkusit změřit 1 nM BSA (napočítat potřebný objem); použít nižší proud a delší dobu akumulace; jaký je detekční limit?
6. vyměnit 50 mM fosfát za 200 mM fosfát, ostatní podmínky jako v bodě 2 až 3; jaký je vliv koncentrace pufru (a tudíž iontové síly) na signál?
7. vyměnit neutrální prostředí fosfátu za zásaditý borátový pufr (50 mM borax, pH 8.7), ostatní podmínky jako v bodech 2 až 3; jaký je pík H?
8. vzít 2 nádobky, do jedné dát 50 mM fosfát, do druhé 50 mM fosfát + 100 nM BSA
9. akumulovat BSA (1 min/-0.1 V), opláchnout ve vodě a přenést do čistého elektrolytu, změřit CPSA jako v bodě 2; využití - zbavíme se možné interference slabě se adsorbujících látek
10. připravit do ependorfy 100 nM BSA; zásobní BSA má koncentraci 1 mg/ml (kolik je molární, když molekulová hmotnost je 69 kDa?) a je rozpuštěn v 0.1 M Tris, pH 7.4
11. adsorbovat 100 nM BSA ze 7  $\mu$ l kapky, opláchnout ve vodě a přenést do čistého elektrolytu, změřit; využití - redukce použitého objemu

Seznam potřebného vybavení a chemikálií

vybavení: potenciostat/galvanostat AUTOLAB + rtuťová elektroda s míchadlem a argonem na odstranění kyslíku; referenční elektroda Ag/AgCl/ 3 M KCl, pomocná elektroda z platiny; 2 elektrochemické nádoby; argonová bomba; software GPES

chemikálie: destilovaná voda, 0.1 M  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ , 1 M amonný pufr, 0.8 M fosfátový pufr, 0.2 M borátový pufr, 1 M Tris pufr, 1 mg/ml BSA

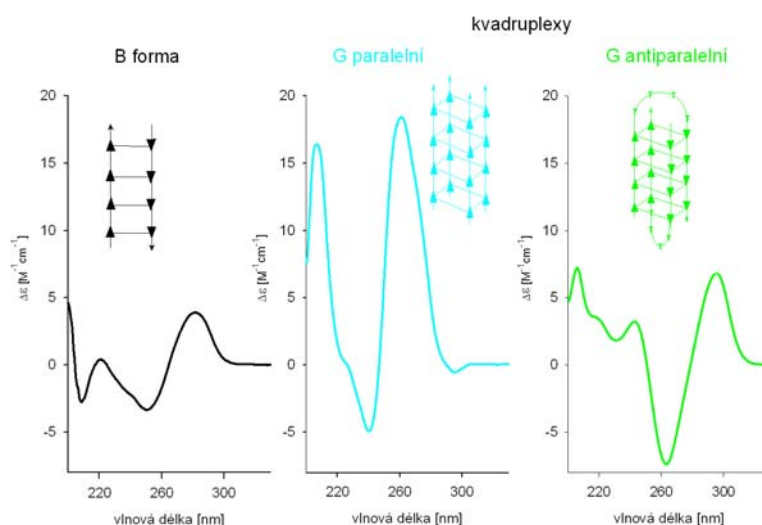
## Kapitola 5: Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA / Značení DNA komplexu oxidu osmičelého

Garant: Iva Kejnovská, Luděk Havran

### *Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA*

#### Princip a cíl úlohy

Ke stanovení struktury nukleových kyselin v roztoku se s výhodou používá spektroskopická metoda cirkulárního dichroismu (CD). Je velmi citlivá ke vzájemné orientaci bazí ležících nad sebou ve šroubovici nukleových kyselin. Jednotlivé struktury poskytují charakteristická spektra CD. Nejčastěji se vyskytující strukturou DNA je B forma, která je tvořena dvěma proti sobě orientovanými řetězci. Její CD spektrum je charakterizováno maximem na 275 nm a minimem na 245 nm, jejich amplitudy jsou podobné velikosti. V poslední době jsou studovány kvadruplexy, tedy čtyřřetězcová uspořádání DNA, která mohou vznikat v oblastech bohatých na guanin. Základní jednotku tvoří guaninová tetráda. Podle vzájemné orientace řetězců rozdělujeme kvadruplexy na paralelní a antiparalelní. CD spektrum paralelního kvadruplexu je charakterizováno vysokým pozitivním pásem při 260 nm, antiparalelního pak pozitivním pásem při 295 nm a negativním pásem při 260 nm. Na obrázku jsou ukázána CD spektra pro zmíněné struktury DNA. Cílem úlohy bude vytvořit tyto struktury a rozpoznat jejich CD spektra.



Obrázek: spektra cirkulárního dichroismu a schémata odpovídajících struktur DNA.

## Příprava B-formy DNA

### Pracovní postup

120 minut

1. Do dvou křemenných kyvet s optickou dráhou  $l = 0,1$  cm napipetujte 140  $\mu\text{l}$  1 mM Na-fosfátového pufru s 0,3 mM EDTA, pH 7,2 a přidejte do jedné kyvety 15  $\mu\text{l}$  guaninem bohatého řetězce GCGGCGACTGGTGAGTACGC (sense) a do druhé 15  $\mu\text{l}$  cytozinem bohatého řetězce GCGTACTCACCAGTCGCCGC (antisense). Opatrně promíchejte a změřte UV absorpční spektrum.
2. Kyvety omotejte parafilmem, aby se roztok neodpařil a zahřejte ve spektrofotometru na 90°C. Při vysoké teplotě je DNA denaturovaná a po odečtení absorbance při 260 nm lze vypočítat molární koncentraci:  $c = A/\varepsilon \cdot l$ , kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient – veličina charakteristická pro danou sekvenci bazí.  $\varepsilon = 9\,795\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pro G řetězec a  $9\,165\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pro C řetězec. Koncentrace řetězců jsou:  $c_G =$  M,  $c_C =$  M.
3. Do třetí kyvety smíchejte oba řetězce v poměru molárních koncentrací 1:1 na výsledný objem ( $V_2$ ) 200  $\mu\text{l}$ . Pro výpočet použijte vzoreček  $V_1c_1 = V_2c_2$ , kde koncentrace  $c_2$  je polovina průměru koncentrací jednotlivých řetězců.
4. Kyvetu opět omotejte parafilmem a zahřejte ve spektrofotometru na 90°C. Změřte absorbanci a vypněte vyhřívání spektrofotometru a nechejte duplexy pomalu chládnout. Po vychladnutí změřte absorbanci – dojde k výraznému poklesu oproti denaturovanému stavu, tj. vznikla uspořádanější struktura. Změřte také spektrum cirkulárního dichroismu.

### Materiál a chemikálie

křemenné kyvety

oligonukleotidy

pufr: 1 mM Na-fosfát s 0,3 mM EDTA, pH 7,2

pipety



## **Indukce guaninového kvadruplexu draselnými ionty**

### **Pracovní postup**

60 minut

1. Do ependorfy napipetujte 1,5 ml 1 mM Na-fosfátového pufru s 0,3 mM EDTA, pH 7,2 a přidejte 15  $\mu$ l zásobního roztoku oligonukleotidu G<sub>3</sub>TTG<sub>3</sub>TTG<sub>3</sub>TTG<sub>3</sub> a v termobločku zdenaturujte. Tím se odstraní vyšší struktury DNA vzniklé ve vysoké koncentraci zásobního roztoku.
2. Přepipetujte do 1 cm kyvety a změřte na dichrografu spektrum: v programu CD MAX Acquisition zadejte rozsah 210 – 330 nm, s rychlostí posuvu 1s, s krokem 0,5 nm. Zvolte SCAN a do žlutého řádku napište název ukládaného souboru např. GK1f.
3. Zvyšte iontovou sílu na 10 mM K-fosfátový pufr a 60 mM KCl přidáním ze zásobních roztoků 0,4 M K-fosf. a 3 M KCl. Pro výpočet přídatku použijte vztah  $V_1C_1 = V_2C_2$ .
4. Změřte CD spektrum ve vyšší iontové síle, pojmenujte např. GK. Změřte ještě opakovaně s časem.
5. Návrh struktury kvadruplexu.

### **Materiál a chemikálie**

křemenné kyvety

oligonukleotid

pufr: 1 mM Na-fosfát s 0,3 mM EDTA, pH 7,2

roztok 0,4 M K-fosfátového pufru, pH 7

roztok 3 M KCl

pipety

## **Indukce guaninového kvadruplexu sodnými ionty**

### **Pracovní postup**

60 minut

1. Do ependorfky napipetujte 1,5 ml 1 mM Na-fosfátového pufru s 0,3 mM EDTA, pH 7,2 a přidejte 15  $\mu$ l zásobního roztoku oligonukleotidu AG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub>TTAG<sub>3</sub> a v termobločku zdenaturujte. Tím se odstraní vyšší struktury DNA vzniklé ve vyšší koncentraci zásobního roztoku.
2. Přepipetujte do 1 cm kyvety a změřte na dichrografu spektrum: v programu CD MAX Acquisition zadejte rozsah 210 – 330 nm, s rychlostí posuvu 1s, s krokem 0,5 nm. Zvolte SCAN a do žlutého řádku napište název ukládaného souboru např. GN1f.
3. Zvyšte iontovou sílu na 10 mM K-fosfátový pufr a 60 mM KCl přidáním ze zásobních roztoků 0,4 M Na-fosf. a 3 M NaCl. Pro výpočet přídatku použijte vztah  $V_1c_1 = V_2c_2$ .
4. Změřte CD spektrum ve vyšší iontové síle, pojmenujte např. GN. Změřte ještě opakovaně s časem.
5. Návrh struktury kvadruplexu.

### **Materiál a chemikálie**

křemenné kyvety

oligonukleotid

pufr: 1 mM Na-fosfát s 0,3 mM EDTA, pH 7,2

roztok 0,4 M Na-fosfátového pufru, pH 7

roztok 3 M NaCl

pipety

## **Rozlišení jedno a dvouřetězcové DNA - AC voltametrie**

### **Princip metody**

AC voltametrie (ACV) patří mezi voltametrické metody se střídavou složkou potenciálu. U této metody se na elektrodu vkládá lineárně se měnící potenciál. Na tento potenciál je superponováno střídavé napětím sinusového průběhu o malé amplitudě (10 mV) a nízké frekvenci (desítky až stovky Hz). Měří se závislost střídavého proudu procházejícího elektrodou na jejím potenciálu. DNA poskytuje v ACV řadu signálů. Některé z nich jsou citlivé ke změnám struktury DNA. Dvouřetězcová (ds) a jednořetězcová (ss) DNA poskytují pík 1, který je způsoben adsorpcí/desorpcí cukr-fosfátové kostry. Ds DNA dále poskytuje pík 2 v důsledku adsorpce/desorpce zdeformovaných ds úseků. Ss DNA poskytuje pík 3, který je způsoben adsorpcí/desorpcí zbytků bází v jednořetězcových úsecích. Rozdíly v ACV záznamech lze využít pro rychlé rozlišení ss a ds DNA.

### **Pracovní postup**

- Denaturace DNA. DNA rozpuštěná ve vodě (o koncentraci maximálně 150  $\mu\text{g/ml}$ ) se zahřeje na 6 minut na 99 °C a poté se rychle ochladí v nádobě s ledem.
- Připravená denaturovaná DNA i původní nativní DNA se naředí 0,2 M NaCl na koncentraci 30  $\mu\text{g/ml}$  (připravovaný objem 30  $\mu\text{l}$ )
- Měření AC voltametrie – do měřicí nádoby nalijeme 3 – 5 ml základního elektrolytu (roztok 0,3 M NaCl a 50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Provedeme voltametrické měření v potenciálovém rozsahu -0,6 až -1,6 V. Jako pracovní elektrodu používáme visící rtuťovou kapku. Měříme nejdříve základní elektrolyt a potom postupně oba vzorky DNA. Měření DNA probíhá pomocí adsorptivní přenosové rozpouštěcí voltametrie (AdTSV).

### **Materiál a pomůcky**

- potenciostat (Autolab)
- elektrodový systém (663 VA-stand)
- tlaková láhev s argonem

- pufr 0,3 M NaCl, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- roztok 0,2 M NaCl
- DNA

## **Značení DNA komplexy oxidu osmičelého**

Komplexy oxidu osmičelého s bidentátními dusíkatými ligandy poskytují s pyrimidinovými zbytky bází v DNA kovalentní adukty. Thymin je asi 10x reaktivnější než cytosin. Pokud je jako ligand použit 2,2'-bipyridin (Os, bipy) je tato reakce specifická pouze pro jednořetězcovou DNA. Tato vlastnost byla použita pro detekci některých sekundárních struktur DNA. Tyto adukty jsou elektroaktivní a na rtuťových a uhlíkových elektrodách poskytují celou řadu elektrochemických signálů. Na rtuťových a uhlíkových elektrodách jsou to faradaycké signály způsobené postupnou redukcí nebo oxidací atomu osmia v molekule aduktu. Pouze na rtuťových elektrodách pak lze získat signál katalytického vylučování vodíku v důsledku přítomnosti aduktu na povrchu pracovní elektrody. Tento katalytický signál může sloužit pro velmi citlivé stanovení modifikované DNA. Naproti tomu elektrodu z pyrolytického grafitu lze použít pro přímou analýzu reakční směsi, kdy je nezreagovaný komplex separován z povrchu pracovní elektrody extrakcí organickým rozpouštědlem (chloroform, isopropylalkohol).

### **Pracovní postup:**

Provedeme denaturaci DNA: 6 min., 99 °C poté prudké zchlazení v ledu

Modifikace DNA: ke vzorkům jedno a dvou řetězcové DNA přidáme předem

připravený Os, bipy a necháme reagovat 20 min. při 37 °C

Elektrochemické měření: Do měřicí nádoby napipetujeme 2 ml základního elektrolytu (0,2 M acetátový pufr, pH 5,0) provedeme záznam SWV s počátečním potenciálem -1 V, konečným potenciálem 0,1 V, frekvence 200 Hz amplituda 50 mV. Poté obnovíme povrch pracovní elektrody lepící páskou nanese vzorek (7 μL) a 60 s akumulujeme. Pak elektrodu opláchneme v destilované vodě, ethanolu a isopropylalkoholu (60 s). Po omytí provedeme měření. Po naměření provedeme elektrochemickou úpravu povrchu elektrody (30 s 1,8 V) a opět obnovíme povrch lepící páskou.

### **Seznam potřebného vybavení a chemikálií:**

potenciostat (Autolab)

elektrodový systém (663 VA-stand), pracovní elektroda: PGE, referentní elektroda:

Ag/AgCl/3M KCl, pomocná elektroda: platinový drát

termomixér

0,2 M acetátový pufr, pH 5,0

roztok OsO<sub>4</sub>, roztok 2,2'-bipyridinu

isopropylalkohol, ethanol



## **Základní kurz analýzy struktury a interakcí biomakromolekul**

návody ke cvičením

editoval: Václav Brázda

autoři: Václav Brázda, Marie Brázdová, Miroslav Fojta, Luděk Havran, Iva Kejnovská,  
Hana Pivoňková, Martin Bartošík

Vydal: Biofyzikální ústav Akademie věd České republiky, v.v.i., Královopolská 135,  
612 65 Brno, Česká republika

Brno 2011

Česká Republika

Vydání první

ISBN:978-80-87541-00-5

ISBN 978-80-87541-00-5



9 788087 541005 >





ISBN 978-80-87541-00-5



9 788087 541005 >