



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: 23. 4. – 27. 4. 2012 / II. TURNUS: 14. 5. – 18. 5. 2012



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ZÁKLADNÍ KURZ

ANALÝZY STRUKTURY A INTERAKCÍ BIOMAKROMOLEKUL

NÁVODY KE CVIČENÍM

BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.

I. TURNUS: 23. 4. – 27. 4. 2012

II. TURNUS: 14. 5. – 18. 5. 2012

**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

editoval: Václav Brázda

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

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

Brno 2012

Česká Republika

Druhé upravené vydání

ISBN: 978-80-87541-02-9

ISBN 978-80-87541-02-9



9 788087 541029 >

Obsah

Obsah.....	5
Kapitola 1: Základní elektrochemické metody	7
I. Jednoduchý redox systém - anodická rozpouštěcí voltametrie	7
II. Klasická polarografie.....	8
III. Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie	8
IV. Elektrochemická analýza bílkovin.....	10
Kapitola 2: Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA / Značení DNA komplexy oxidu osmičelého.....	13
Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA.....	13
Příprava B-formy DNA	14
Indukce guaninového kvadruplexu draselnými ionty.....	15
Indukce guaninového kvadruplexu sodnými ionty.....	16
Rozlišení jedno a dvouřetězcové DNA - AC voltametrie	17
Značení DNA komplexy oxidu osmičelého.....	19
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 poškození DNA	23
IV. Denzitometrická analýza separované DNA pomocí programu ImageJ.....	24
Kapitola 4: Základní metody molekulární biologie - proteiny.....	26
I. Elektroforéza proteinů v přítomnosti SDS – SDS PAGE	26
II. Přenos proteinů na membránu (blotting).....	29
III. Imunodetekce proteinů na membráně.....	33
IV. EMSA - Gelová retardační analýza.....	35
Kapitola 5: Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA	38
Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA pomocí imunoprecipitace na magnetických kuličkách	38
Analýza nukleotidových sekvencí pomocí magnetických kuliček a hybridizace se sondou značenou enzymem	40

Kapitola 1: 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 elektroodový děj probíhá reverzibilně, tak i ve zpětném scanu obdržíme voltametrický pík. Některé kovy se rozpouští ve rtuti 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 Cd^{2+} ($C = 10 \mu\text{M}$) a opět provedeme scany bez a s akumulací.

Seznam potřebného vybavení a chemikálií

potenciostat (Autolab)

elektroodový 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 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 vybublání argonem (2 min.) provedeme polarografický záznam s počátečním potenciálem 0 V a konečným potenciálem -0,9 V. Poté přidáme Cd^{2+} ($C = 0.5 \text{ mM}$) a opět provedeme scan. Podobně přidáme Pb^{2+} .

Seznam potřebného vybavení a chemikálií

potenciostat (Autolab)

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

$\text{Ag}/\text{AgCl}/3\text{M KCl}$, pomocná elektroda: platinový drát

tlaková láhev s argonem

0,2 M acetátový pufr, pH 5,0

roztoky Cd^{2+} a 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 – voltametričtém 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 μl), 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 μl). 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 $\mu\text{g/ml}$. 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 Co^{2+} , založená na tzv. katalytickém píku H měřeném 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 NH_4Cl a NH_4OH) + 1 mM $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$; vypočítat potřebné objemy
2. Zapojit 3-elektrodotý 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 μA)
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 adsorbujícími látkami
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 μ l kapky, opláchnout ve vodě a přenést do čistého elektrolytu, změřit; využití - redukce použitého objemu

Seznam potřebného vybavení a chemikálií

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

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

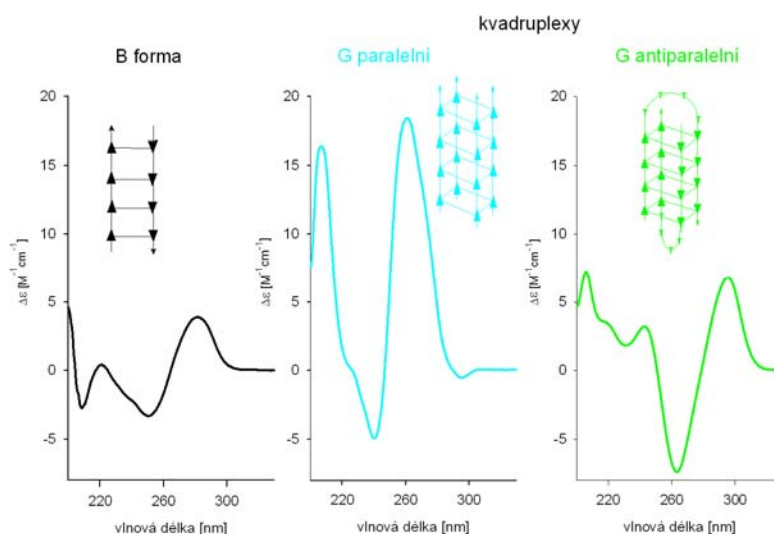
Kapitola 2: Cirkulární dichroismus jako nástroj studia struktury DNA / Značení DNA komplexu oxidu osmičelého

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 komplementárními 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

- 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.
- 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 ε 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.
- Pro vytvoření duplexu je třeba smíchat oba řetězce v poměru molárních koncentrací 1:1. Řetězec s vyšší koncentrací se přidá do kyvety k řetězci s nižší koncentrací. Pro výpočet potřebného objemu použijte vzoreček $V_1c_1 = V_2c_2$, kde V_2 je přidávaný objem. $V_2 = \dots\dots\dots \mu\text{l}$.
Řetězec s vyšší koncentrací přepipetujte do ependorfy a z ní odeberte vypočtený objem a přidejte do kyvety s nižší koncentrací DNA, promíchejte.
- Kyvety 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 ependorfky napipetujte 1,5 ml 1 mM Na-fosfátového pufru s 0,3 mM EDTA, pH 7,2 a přidejte 15 μ l zásobního roztoku oligonukleotidu G₃TTG₃TTG₃TTG₃ 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 37 μ l ze zásobního roztoku 0,4 M K-fosf. pufru a 32 μ l 3 M KCl.
4. Změřte CD spektrum ve vyšší iontové síle, pojmenujte např. GK. Změřte ještě po čase.
5. Návrh struktury kvadruplexu.

Materiál a chemikálie

křemenné kyvety

oligonukleotid

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

0,4 M K-fosfát, 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 μ l zásobního roztoku oligonukleotidu AG₃TTAG₃TTAG₃TTAG₃ 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 Na-fosfátový pufr a 150 mM NaCl přidáním 37 μ l ze zásobního roztoku 0,4 M Na-fosf. pufru a 80 μ l 3 M NaCl.
4. Změřte CD spektrum ve vyšší iontové síle, pojmenujte např. GN.
5. Návrh struktury kvadruplexu.

Materiál a chemikálie

křemenné kyvety

oligonukleotid

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

0,4 M Na-fosfát, 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 napětí 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 cukrfofosátové 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. Rozdílů v ACV záznamech lze využít pro rychlé rozlišení ss a ds DNA.

Pracovní postup

- Denaturace DNA. DNA rozpuštěná ve vodě (o koncentraci maximálně 150 µg/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 µg/ml (připravovaný objem 30 µl)
- Měření AC voltametrie – do měřicí nádobky nalijeme 3 – 5 ml základního elektrolytu (roztok 0,3 M NaCl a 50 mM Na₂HPO₄). 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 Na₂HPO₄
- 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 OsO₄, roztok 2,2'-bipyridinu

isopropylalkohol, ethanol

Kapitola 3: Základní metody molekulární biologie - DNA

Garant: Václav Brázda

Dopoledne 9-12

1. Izolace superhelikální plazmidové DNA

Princip a cíl

Plazmidy jsou mimochromozomové genofory tvořené kružnicovou dsDNA. V bakteriálních buňkách se vyskytují v jedné až několika tisících kopiích 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 Plasmid MidiPrep Kit – Sigma). Bakteriální stěny jsou lyzovány přidáním 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. Do zkumavky vložte HP MidiPrep Vazebnou Kolonu a přidejte 4 ml roztoku na přípravu kolony (05-Column Preparation Solution), stočte 3000g/2minuty.
8. Do kolony vystříknete 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 z původní superhelikální kruhové molekuly DNA získat lineární DNA a 2 fragmenty.

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) fragment po štěpení Scal, C) fragmenty 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 poškození DNA

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 8-hydroxy-2'-deoxyguanozinu ve vzorku slin, který se používá jako marker oxidativního poškození DNA a je často zvýšen v moči, séru nebo slinách při onemosněních spojených s poškozením DNA.

170 minut

1. Nachystejte si ELISA destičku, 20x promývací roztok, Sample Diluent, Antibody Diluent, HRP Conjugate Diluent, TMB Substrate a Stop Solution 2.
2. Připravte koncentrační řadu 8-OHdG a naředěte vzorky (sliny 1:8) v „Sample Diluent“.

Koncentrační řada:

Připravte 7 zkumavek, popisky 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875 a 0,94 ng/ml; dejte 250 μ l „Sample Diluent“ do zkumavky 1(60 ng/ml) a 125 μ l do zbývajících zkumavek. Do zkumavky „1“ přidejte 1,5 μ l zásobního roztoku 8-OHdG a pipetou pořádně promíchejte. Následně 125 μ l ze zkumavky „1“ přeneste do zkumavky „2“ a znovu promíchejte. Následně přeneste 125 μ l z dvojky do trojky atd... Nakonec připravte novou zkumavku a dejte do ní 125 μ l Sample Diluent“ (koncentrace 0 ng/ml).

3. Napipetujte 50 μ l vzorku a koncentrační řady na ELISA destičku (jeden strip koncentrační řada, druhý strip vzorky).
4. Přidejte 50 μ l naředěné (1:250) protilátky Anti-8-OHdG do každé jamky mimo blanku a zakryjte destičku.
5. Hodinu inkubujte při pokojové teplotě.

6. 6x propláchněte 300 μ l 1x promývacího pufru.
7. Přidejte 100 μ l naředěné (1:500) sekundární protilátky Anti-Mouse IgG: HRP Conjugate do každé jamky mimo blanku a zakryjte destičku.
8. Inkubujte jednu hodinu při pokojové teplotě.
9. 6x propláchněte 300ul 1x promývacího pufru.
10. Přidejte 100 μ l TMB substrátu do každé jamky.
11. Inkubujte 15 minut při pokojové teplotě a pokud možno v temnu.
12. Přidejte 100 μ l Stop Solution 2.
13. Změřte při 450nm.

Výsledek 4: Určení největšího množství 8-hydroxy-2'-deoxyguanozinu 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 μ g/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 metody molekulární biologie - proteiny

Garant: Marie Brázdová

I. Elektroforéza proteinů v přítomnosti SDS – SDS PAGE

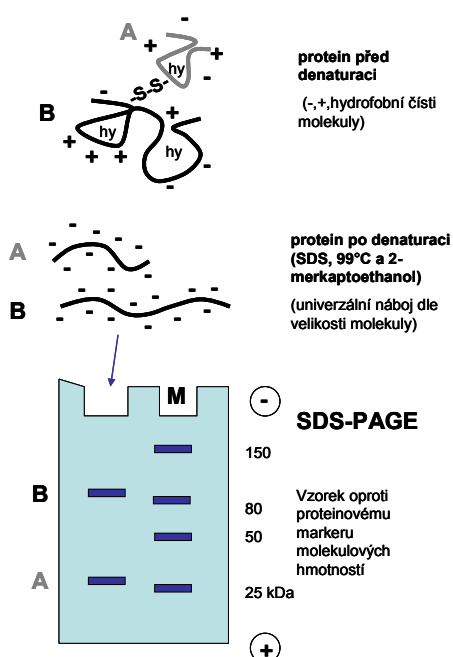
Cíl úlohy

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 (β -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.

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 µl	100 µl	200 µl
Temed	25 µl	50 µl	100 µl

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 µl	50 µl	100 µl
Temed	12,5 µl	25 µl	50 µl

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

e. Gel se skly vložíme do aparatury a zalijeme elektrodovým puřrem 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 (1 mg/ml), protein p53 (1,2 mg/ml). Množství neznámých vzorků je dáno jejich objemem (viz tabulka).

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

c. PIPETOVACÍ SCHÉMA

vzorek		μ l	H ₂ O	CSB
1	M (marker velikostí)	5		
2	BSA (1 μ g)			3
3	BSA (3 μ g)			3
4	BSA (5 μ g)			3
5	p53 (1 μ g)			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 9 μ l			μ l

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 μ l 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 představené bromfenolovou modří nedosáhne spodního okraje gelu.

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

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 ruce nebo oděvu lze odstranit velmi obtížně) a gel přelijeme odbarvovacím roztokem. Za mírného třepání při laboratorní teplotě necháme gel odbarvovat.

- c. Po zmodrání 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 β -merkaptoetanol; 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

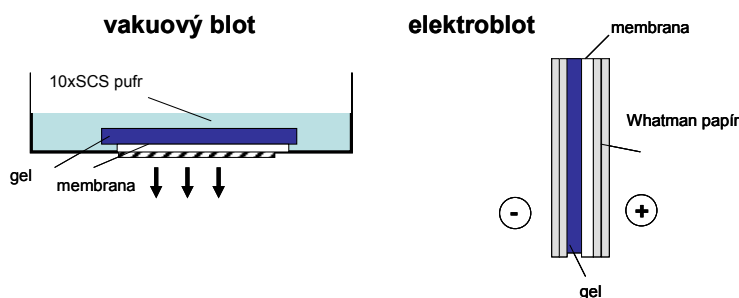
DNA-protein komplexů na nativním PAGE či agarózovém gelu. Protože sondy-protilátky pro daný protein většinou nelze použít přímo v gelu jsou proteiny či jejich komplexy s DNA přeneseny po elektroforéze na membránu (používají se nitroceluloza, PVDF a další).

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 zastřiženou 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 zastřižením pravého horního rohu. Na membránu položíme gel

tak, aby jeho kraje přečnivaly přes otvor v igelitové masce. Pečlivě zkontrolujeme a odstraníme případné netěsnosti.

2. Gel zalijeme blotovacím pufrům 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 nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu (standard 8 cm * 6 cm) → popsat, u PVDF aktivace 1 min v 100% MeOH, 5 min H₂O, 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, watman 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)

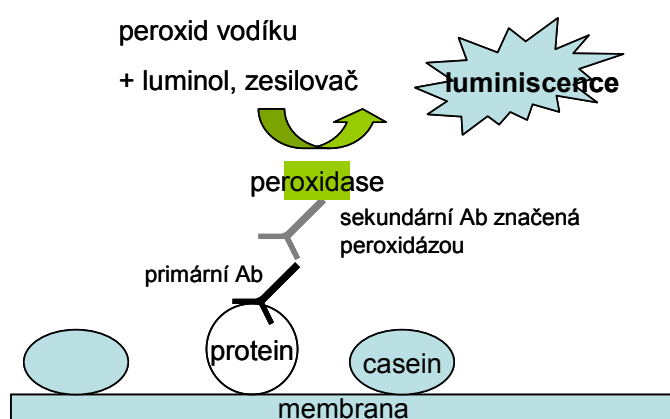
III. Imunodetekce proteinů na membráně

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 ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)

IV. EMSA - Gelová retardační analýza

Cíl úlohy

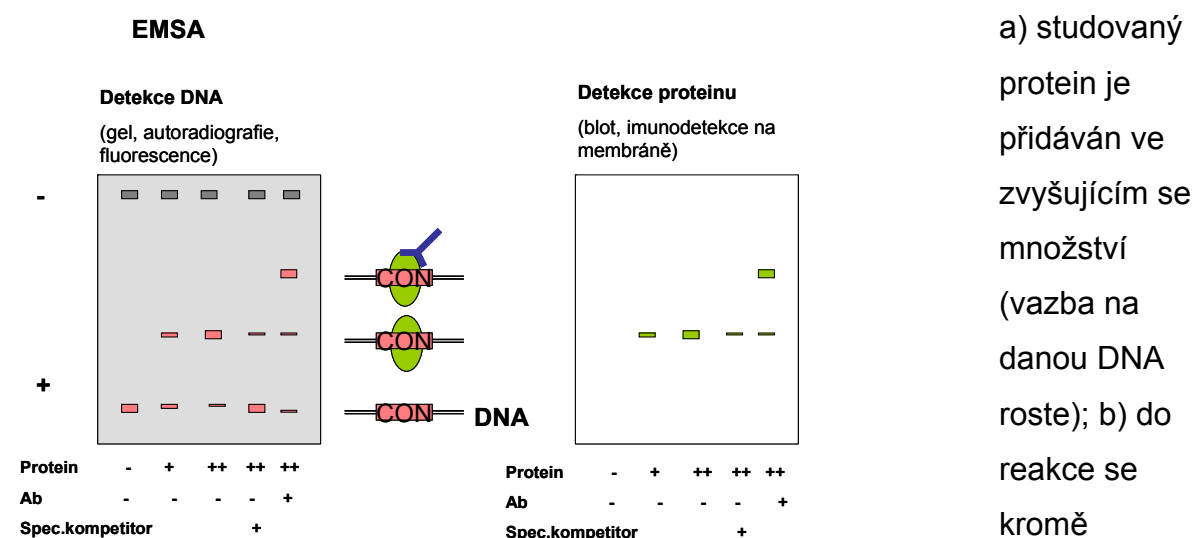
Detekce vazby proteinu p53 na cílové místo v promotoru genu p21 pomocí EMSA (gelová retardační analýza)

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 transkriptovaný protein) v DNA vazebném pufru, a reakční směs je potom analyzována na nedenačním gelu.

Při studiu specifity dané reakce se uplatňují nejčastěji 4 přístupy:



studovaného proteinu přidá také specifická protilátka, v tomto případě pozorujeme tak zvaný „supershift“; c) specifita interakce daného proteinu ke studované DNA bývá ověřována kompetičními experimenty, kdy je k reakční směsi přidán specifický či nespecifický kompetitor (obvykle neznačená DNA), d) blotting.

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-protein p53**

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 5: Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA

Garant: Hana Pivoňková

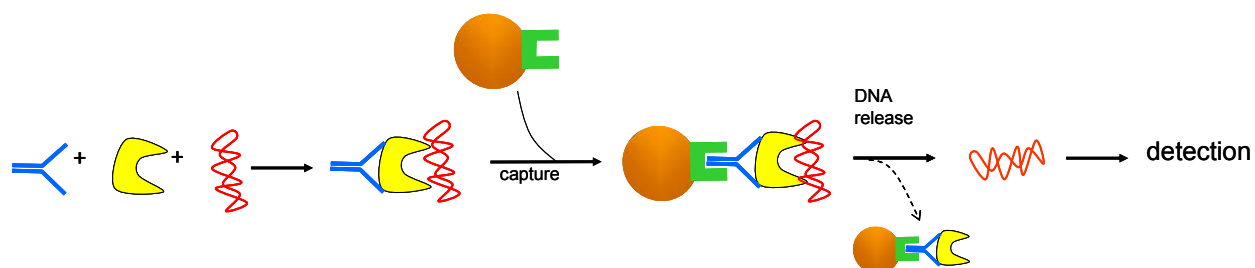
Studium vazby proteinu p53 na nadšroubovicovou a lineární DNA pomocí imunoprecipitace na magnetických kuličkách

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:



Pracovní 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 μ l magnetických kuliček
- 4) promyjeme (na vortexu) 3x400 μ 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 μ l pufru (protřepeme v ruce)
- 9) zároveň necháme zahřát termomixer na 65 °C, nastavíme 5 minut, 500 ot/min
- 10) ke kuličkám přidáme 20 μ 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 μ l barvy
- 13) nanese po 11 μ 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 μ l sc nebo linDNA (200 ng) + 1 μ l barvičky (obs. SDS) + 9 μ l vody

vzorek č.		1	2	3	4
sc/lin DNA		B/B	B/P	P/B	P/P
	vých. konc.				
sc DNA (ul)	400 μ g/ml	1	1	1	1
lin DNA (ul)	400 μ 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 μ 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

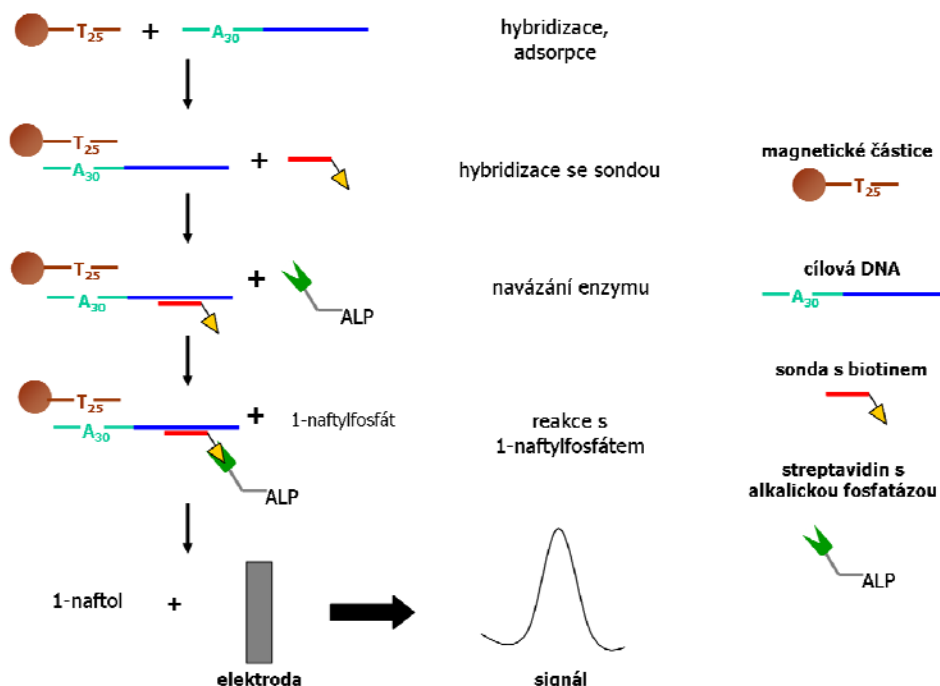
Smícháme vše v erlenmayerově nádobě, necháme rozvařit v mikrovlnné troubě, dovážíme na původní objem, erlenku mírně zchladíme pod tekoucí vodou, nalejeme do gelového nosiče s hřebínkem pro 15 startů, necháme ztuhnout.

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

Princip úlohy

Přítomnost určité sekvence nukleotidů v cílové DNA lze dokázat pomocí vhodné 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)₃₀-koncem nejprve navázána na magnetické kuličky modifikované (dT)₂₅ 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.



Pracovní postup

- 1) napipetujeme 40 μ l kuliček DB-(dT)₂₅ do eppendorfky, pomocí magnetu odebereme skladovací pufr a 3x promyjeme 100 μ 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 μ l
- 3) do jedné eppendorfky napipetujeme 20 μ l cílové DNA I (5 μ 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 μ l 0,3M NaCl/ 10mM TRIS
- 6) do obou eppendorfek napipetujeme 20 μ l biotinylované sondy (5 μ g/ml)

- 7) viz 4)
- 8) viz 5)
- 9) přidáme 50 μ l mléka (2,5 g sušeného mléka + 50 ml PBS) - necháme inkubovat 10 min, 20 °C, 900 rpm
- 10) po odebrání mléka přidáme 50 μ l konjugátu streptavidinu s alkalickou fosfatázou 100x ředěného v mléce
- 11) viz 4)
- 12) promyjeme - 3x 100 μ l PBST (fosfátový pufr + 0,2 % TWEEN) a 3x 100 μ l 0,3M NaCl/ 10mM TRIS
- 13) přidáme 50 μ 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

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 2012

Česká Republika

Druhé upravené vydání

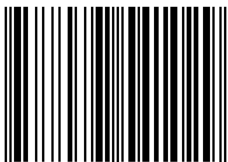
ISBN:978-80-87541-02-9

ISBN 978-80-87541-02-9



9 788087 541029 >

ISBN 978-80-87541-02-9



9 788087 541029 >