



Praktický kurz

# Pokročilé biofyzikální přístupy v genomice a proteomice

12.-13. května 2010

Cílem kurzu je praktické seznámení s moderními experimentálními přístupy, které jsou využitelné v laboratořích se zaměřením na experimentální biologii, biochemii a biofyziku

Budou představeny:

- Nové postupy pro zrychlení a zjednodušení analýzy proteinů (westernovo blotování s permanentní fluorescenční vizualizací)
- Moderní instrumentace pro rutinní kvantifikaci biomolekul (fluorescenční měření koncentrace proteinů, dsDNA a ssDNA)
- Fluorescenční mikroskopie vláken DNA
- Kalorimetrická analýza interakce biomolekul bez nutnosti jejich značení

## Místo konání

Brno, Univerzitní kampus Bohunice, blok A2, seminární místnost 1.21  
praktická výuka bude probíhat v laboratořích UKB

## Přihlášení

Zájemci se přihlásí prostřednictvím e-mailu na [hofr@sci.muni.cz](mailto:hofr@sci.muni.cz) Ctirad Hofr, Ph.D.

Seminář je odborně a technicky podporován společnostmi Invitrogen a Specion.



Seminář je organizován v rámci projektů OP VK

Moderní biofyzikální metody: pokročilé vzdělávání v experimentální biologii CZ.1.07/2.3.00/09.0046

Rozvoj týmu pro výuku, výzkum a aplikace v oblasti funkční genomiky a proteomiky CZ.1.07/2.3.00/09.0132



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Program kurzu

1.skupina	Středa 12.května	Čtvrtek 13.května
9:00 – 10:00	<b>Pokroky v blotování proteinů</b> Dr. Rázga (Invitrogen) <b>Úvod do DNA Fiber FISH</b> Mgr. Mandáková (FGP)	
10:00 – 11:00	<b>Blotování (dry blot iBlot)</b> <b>Automatické promývání</b> <b>membrány (BenchPro 4100)</b>	<b>Biokolorimetrické metody</b> <b>ITC a DSC při analýze</b> <b>interakcí a struktury molekul</b> Dr. Gimeson (GE Healthcare)
11:00 – 11:30	<b>Stanovení koncentrace</b> <b>DNA a proteinu (minifluorimetr</b> <b>Qubit)</b>	<b>Praktická ukázka</b> <b>kalorimetrů VP-ITC a VP-</b> <b>DSC (spuštění měření)</b>
11:30 – 12:30	<b>Přestávka na oběd</b>	<b>Přestávka na oběd</b>
12:30 – 13:00	<b>Vizualizace proteinů na</b> <b>membráně (WesternDot x</b> <b>chemiluminiscence)</b>	<b>Vyhodnocení termogramů</b> <b>(hybridizace DNA, tání DNA)</b>
13:00 – 15:00	<b>Fiber FISH DNA (příprava</b> <b>preparátů pro fluor. mikroskopii)</b>	<b>Fluorescenční mikroskopie</b> <b>Fiber FISH DNA preparátů</b>

2.skupina	Středa 12.května	Čtvrtek 13.května
9:00 – 10:00	<b>Pokroky v blotování proteinů</b> Dr. Rázga (Invitrogen) <b>Úvod do DNA Fiber FISH</b> Mgr. Mandáková (FGP)	<b>Vizualizace proteinů na</b> <b>membráně (WesternDot x</b> <b>chemiluminiscence)</b>
10:00 – 11:00	<b>Fiber FISH DNA (příprava</b> <b>preparátů pro fluor. mikroskopii)</b>	<b>Biokolorimetrické metody</b> <b>ITC a DSC při analýze</b> <b>interakcí a struktury molekul</b> Dr. Gimeson (GE Healthcare)
11:00 – 12:00	<b>Fiber FISH DNA (příprava</b> <b>preparátů pro fluor. mikroskopii)</b>	<b>Praktická ukázka</b> <b>kalorimetrů VP-ITC a VP-</b> <b>DSC (spuštění měření)</b>
12:00 – 13:00	<b>Přestávka na oběd</b>	<b>Přestávka na oběd</b>
13:00 – 13:30	<b>Stanovení koncentrace</b> <b>DNA a proteinu (minifluorimetr</b> <b>Qubit)</b>	<b>Vyhodnocení termogramů</b> <b>(hybridizace DNA, tání DNA)</b>
13:30 – 14:30	<b>Blotování (dry blot iBlot)</b> <b>Automatické promývání</b> <b>membrány (BenchPro 4100)</b>	<b>Fluorescenční mikroskopie</b> <b>Fiber FISH DNA preparátů</b>

# 1. Western blot + imunodetekce

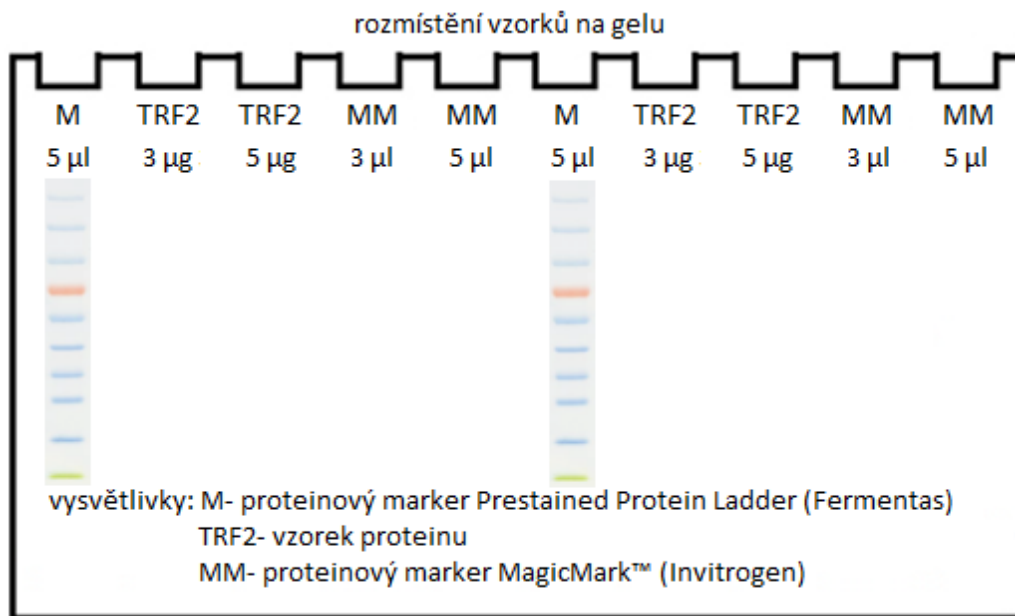
## Dry Western blot

### Materiál:

Transfer pufr  
iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen)

### Postup:

- Namíchejte Transfer pufr ( 50 ml):  
1x TANK buffer (= Tris Glycine SDS; zásobní 10X), 10% methanol , ddH<sub>2</sub>O
- Gel vyjměte ze skel a nechte vymýt v 50 ml Transfer pufru 10 minut na třepačce



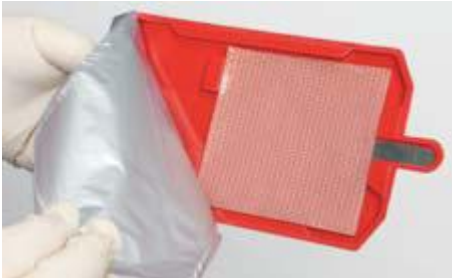
- Odklopte víko přístroje, oddělte ochrannou folii z anodové destičky s membránou (Anode Stack- Bottom) a i s plastovým obalem položte do přístroje (aby výstupek plastového obalu zapadl do vykrojení na pravé straně přístroje):



- Na membránu dále položte gel, filtrační papír (iBlot™ Filter Paper) nasáknutý ddH<sub>2</sub>O. Válečkem odstraňte bublinky vzduchu:



- Odstraňte ochrannou folii a červený plastový obal z katodové destičky (Cathode Stack- Top) a položte ji na filtrační papír a přejeďte válečkem:



- Do víka přístroje vložte houbičku (kovový kontakt v pravém horním rohu víka přístroje):



- Zavřete víko a zajistěte
- Nastavte metodu P3 a čas 7 minut, START
- Po skončení otevřete víko, separujte jednotlivé vrstvy a vyjměte membránu
- Membránu opatrně rozstříhnete na dvě poloviny se stejnými vzorky

### Promývání membrán + inkubace v protilátkách

#### Materiál:

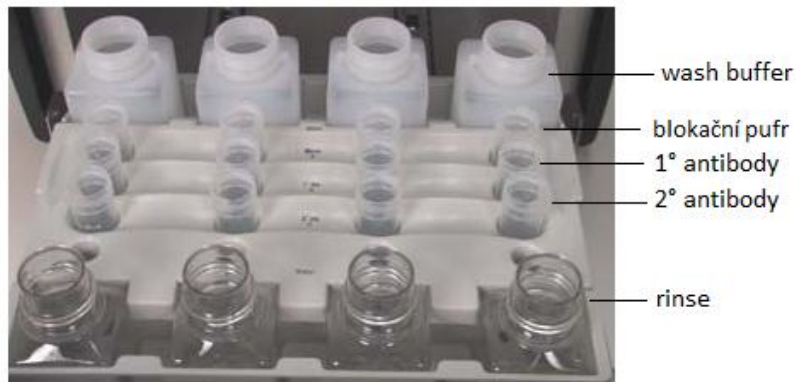
Blokační pufr A, B- WesternDot™ Blocking Buffer (Invitrogen)  
 Primární protilátka- anti-His  
 Sekundární protilátka- anti-mouse, Biotin-XX-Goat anti-mouse (Invitrogen)  
 LumiGLO  
 3° protilátka- Qdot® (Invitrogen)  
 BenchPro™4100 Card Processing Station  
 Detekční systém LAS 3000

#### Postup:

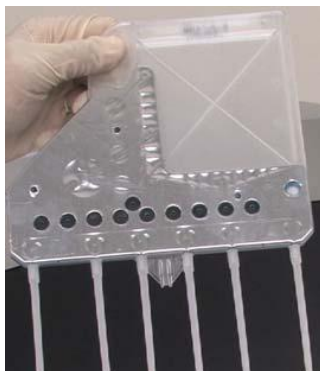
- Připravte:
  - blokační pufr A: 7,5 g sušeného mléka + 15 ml TBS + 135 ddH<sub>2</sub>O + 0,15 ml Tween
  - primární protilátka (1° antibody): anti-His 4 µl + 40 ml blokační pufr A
  - sekundární protilátka (2° antibody): anti-mouse 2 µl + 20 ml blokační pufr A

blokační pufr B: WesternDotBlocking buffer  
 primární protilátka (1° antibody): ½ připravené 1° protilátky v blokačním pufru A (20 ml)  
 sekundární protilátka (2° antibody): 5 µl Biotin-XX-Goat anti-mouse + 20 ml blokační pufr B

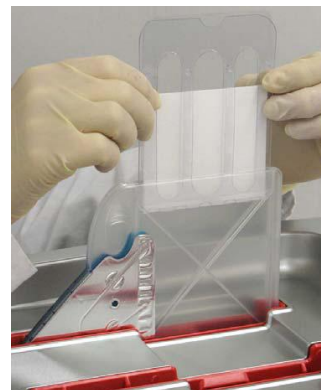
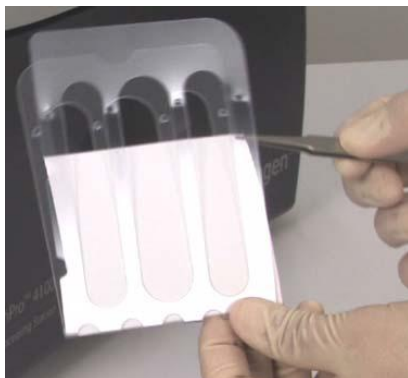
wash buffer: TBST  
 oplach (rinse): ddH<sub>2</sub>O



- Zavřít zásuvku s roztoky (bez víček!), shora zasunout kazetu (kazetu držet pouze na místě k tomu určeném):



- Membránu umístit do plastového držáku a držák s membránou zasunout do kazety:



- Zapnout přístroj, nastavit metodu: WesternBreeze (95 min)  
„INFO“ zobrazí seznam jednotlivých kroků metody  
„HALF“ spustí metodu na poloviční objem kazety (malá membrána)
- 5 minut před koncem promývání namíchat LumiGLO / 3° protilátku:  
LumiGLO: 1,9 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 μl LumiGLO reagent A + 50 μl Peroxide reagent B  
3° protilátka: Qdot® 1 μl + 2 ml blokační pufr B (WesternDot™ Blocking Buffer)
- „Complete“ vypustí poslední používaný roztok z kazety
- Vytáhnout membrány.
- Na černý tácek položit folii a na ni položit membránu A (= ta, co byla v blokačním pufru A)  
Přelít Lumiglo, detekovat protein.
- Na misku na folii položit membránu B (= blokační pufr B), přelít 3° protilátkou, nechat inkubovat 10-15 minut, detekovat protein

## 2. Stanovení koncentrace DNA a proteinů na základě fluorescence

### Materiál:

- Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit
- Quant-iT™ Protein Assay Kit
- Standardy dsDNA, protein
- Vzorek DNA a proteinu o neznámé koncentraci
- Qubit™ fluorometr
- 0,5 ml PCR-zkumavky

### Postup:

#### A) Protein

- Připravit 600 µl Quant-iT™ working solution smícháním Quant-iT™ protein reagent a Quant-iT™ protein buffer v poměru 1:200  
standardy: 190 µl Quant-iT™ working solution + 10 µl proteinového standardu #2, #3  
vzorek o neznámé koncentraci: 198 µl Quant-iT™ working solution + 2 µl vzorku
- Vzorky krátce promíchat na vortexu (2-3 sec)
- Inkubace 15 min při laboratorní teplotě

Pozn.: Ve vzorku nesmí být bublinky, pipetujte a promíchejte proto opatrně.

#### B) DNA

- Připravit 600 µl Quant-iT™ working solution:  
smícháním Quant-iT™ dsDNA BR reagent a Quant-iT™ dsDNA BR buffer v poměru 1:200  
standardy: 190 µl Quant-iT™ working solution + 10 µl dsDNA standardu #1, #2  
vzorek o neznámé koncentraci: 198 µl Quant-iT™ working solution + 2 µl vzorku
- Vzorky krátce promíchat na vortexu (2-3 sec)
- Inkubace 15 min při laboratorní teplotě

Pozn.: Ve vzorku nesmí být bublinky, pipetujte a promíchejte proto opatrně.

- Zapnout Qubit™ fluorometr
- Vybrat příslušnou metodu  
„Run new calibration“

Pozn.: Pro stanovení proteinů jsou pro kalibraci vyžadovány 3 standardy. Místo prvního nechte přístroj bez zkumavky a stiskněte „Go“. Poté vložte podle pokynů přístroje druhý a třetí standard.

- Po kalibraci změřit vzorek o neznámé koncentraci (3 měření)

Pozn.: Měření by mělo probíhat za laboratorní teploty (22-28°C). Teplota vzorků by měla být stejná. Zkumavku proto před měřením nadržte dlouho v rukách, její obsah by se ohříval. Teplota v přístroji může být až o 3°C vyšší než laboratorní, proto po každém měření vytáhněte zkumavku a ponechte ji inkubovat alespoň 30 sec před dalším měřením při laboratorní teplotě.

Obrázky převzaty ze stránek Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com))

# Kalorimetrická měření termodynamických charakteristik DNA

**Izotermální titrační kalorimetrie** umožňuje stanovit z jednoho měření kompletní soubor termodynamických parametrů příslušných interakci makromolekul ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ,  $K$ , stechieometrii  $N$ ). Při této praktické úloze bude izotermální titrační kalorimetrie použita k získání hodnoty entalpie příslušné hybridizaci komplementárních řetězců DNA.

**Diferenční skenovací kalorimetrie** dovoluje určit hlavní parametry termodynamické stability makromolekul: teplotu tání a entalpii strukturního přechodu. V této úloze bude diferenční skenovací kalorimetrie použita k charakterizaci tání krátkých fragmentů DNA.

## Materiál

- Oligonukleotid Top (5' gTTAagggTTAagggTTAg)
- Oligonukleotid Bottom (5' CAAACCCAATCCCAATC)
- Pufr: 50 mM NaCl, 50 mM Na fosfátový pufr pH 7.0

## Izotermální titrační kalorimetrie

1. Stanovte molární extinkční koeficient oligonukleotidů na základě sekvence za použití <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>
2. Stanovte přesnou koncentraci Top a Bottom oligonukleotidů v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěných roztoků při 260 nm.
3. Připravte roztok oligonukleotidu Top v pufru ze zásobního roztoku o koncentraci 18  $\mu\text{M}$  a celkovém objemu 1.8 mL.
4. Připravte roztok oligonukleotidu Bottom v pufru ze zásobního roztoku o koncentraci 120  $\mu\text{M}$  a celkovém objemu 0.5 mL.
5. Oba roztoky za neustálého míchání temperujte při teplotě 24°C pod vakuem pro odstranění bublinek vzduchu.
6. Roztokem oligonukleotidu Bottom naplňte celu izotermálního titračního kalorimetru.
7. Roztokem oligonukleotidu Top naplňte injektor izotermálního titračního kalorimetru.
8. Spusťte měření podle pokynů lektora.

## Diferenční skenovací kalorimetrie

1. Připravte roztok dvouřetězcové DNA hybridizací oligonukleotidů Top a Bottom v pufru, tak aby byla koncentrace DNA duplexu 50  $\mu\text{M}$ .
2. Roztok DNA za neustálého míchání temperujte při teplotě 24°C pod vakuem pro odstranění bublinek vzduchu.
3. Roztokem DNA naplňte celu izotermálního titračního kalorimetru.
4. Spusťte měření podle pokynů lektora.

## ITC záznam hybridizace komplementárních řetězců DNA

