

Praktický kurz

Pokročilé biofyzikální přístupy v experimentální biologii

**Místo konání: Brno, Univerzitní kampus Bohunice
blok A2, seminární místnost 1.21**

**Datum: 18.1. – 22.1. 2010
25.1. – 29.1.2010**

Začátek vždy v 9:00

Vedoucí kurzu: Mgr. Ctirad Hofr Ph.D
hofr@sci.muni.cz

Kurz je organizován v rámci projektu OP VK

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

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Časový plán kurzu

Pokročilé biofyzikální přístupy v experimentální biologii

	Pondělí	Úterý	Středa	Čtvrtek	Pátek
	Úvodní přednáška Ctirad	Anisotropie Michal	GISH Terezie	Zákl. mikroskop Pop	Pokočil. mikroskopie Martina
10-13	<p>1. Skupina - Měření spektrálních charakteristik proteinů a DNA spektrofotometr</p> <p>2. skupina Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou</p>	<p>1. skupina Příprava fluorescenčně značeného proteinu</p> <p>2. Předvedení měření anizotropie fluorescence</p>	<p>1. Zahájení Mikroskopie - fluorescenční in situ hybridizace (Terezie) každý si připravil jeden preparát</p> <p>2. Časově rozlišená fluorescence Zapůjčení přístroje Temprom Specion</p>	<p>1. sledování již připravených preparátů rostlin obsahujících GFP a ukázka překryvu obrazů za použití Photoshopu (Jan Hejátko)</p> <p>2. Konfokální mikroskopie Olympus</p>	<p>Příprava a sledování živých rostlin obsahujících proteiny značené GFP</p> <p>In vivo kofokální mikroskopie (Martina)</p> <p>Upoutávka na OPVK a kurzy</p>
oběd	záměna skupin	záměna skupin	záměna skupin	záměna skupin	
14-17	<p>3. skupina Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluorescenčních sond</p> <p>4. skupina Stanovení koncentrace DNA za použití Hoechst</p>	<p>1. skupina Vizualizace makromolekul při elektroforetické separaci EMSA</p> <p>2. Charakterizace neznámého vzorku</p>	<p>1. Měření vlastní fluorescence AK a proteinů</p> <p>2. dokončení preparátu a ponecháno přes noc hybridizovat</p>	<p>Prohlížení připravených preparátů na fluorescenčních mikroskopech (Terezie) a ukázka překryvu obrazů za použití Photoshopu</p>	

Měření spektrálních charakteristik a stanovení koncentrace DNA a proteinů

Spektroskopie v UV oblasti umožňuje stanovit koncentraci a čistotu biologických molekul. Molekuly DNA mají absorpční maximum kolem 260 nm, molekuly proteinů kolem 280 nm. Pro přímé spektrální určení koncentrace se využívá Lambert-Beerova zákona pro monochromatické světlo, který lze zapsat ve tvaru $A = c \cdot \epsilon$ za předpokladu, že měříme v 1 cm kyvetě a známe extinkční koeficient ϵ , který má jednotku $[M^{-1}cm^{-1}]$ pro molární koncentraci nebo $[mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}]$ pro koncentraci v mg/mL.

V případě, že neznáme extinkční koeficient, můžeme pro určení koncentrace DNA o vysoké molekulární hmotnosti použít zjednodušeného předpokladu, že roztok dvouřetězcové DNA o absorbanci 1 má koncentraci 50 $\mu g/mL$ a pro převod na molární koncentraci nukleotidu DNA pak vztah $320 \mu g/mL = 1 mM$.

Pro určení koncentrace proteinů spektroskopicky lze využít absorbance proteinů při 280 nm. Jestliže známe primární sekvenci aminokyselin proteinu, lze extinkční koeficient vypočítat <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>. Ze změřené absorbance pak určíme koncentraci proteinu. Znalost extinkčního koeficientu není nutná v případě univerzální Bradfordové metody. **Bradfordová metoda** je v současnosti nejrozšířenější způsob určování koncentrace proteinu. Bradfordová metoda využívá posunu absorpčního maxima „Coomasie Blue“ po vazbě na protein. Za použití kalibrační křivky se známou koncentrací proteinu lze určit skutečnou koncentraci neznámého proteinu nebo směsi proteinů.

Materiál

- DNA (Salmon sperm)
- Oligonukleotid CNF2_Top (5' CAATAGGAAACTCCCAAATC)
- BSA (hovězí sérový albumin; $\epsilon = 0.677 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, MW = 66430)
- TE pufr
- Bradford reagent (BioRad)
- Kyvety a spektrofotometr

DNA

1. Připravte roztok DNA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 20 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci DNA.
2. Změřte absorpční spektrum DNA v rozsahu vlnových délek 220 až 350 nm.
3. Určete polohu absorpčního maxima.
4. Stanovte přesnou koncentraci DNA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 260 nm. Koncentraci vyjádřete v mg/mL a v OD/mL.
5. Nařed'te roztok oligonukleotidu v TE pufru tak, aby bylo spektroskopicky možno přesně stanovit jeho koncentraci.
6. Na základě zadané sekvence oligonukleotidu stanovte extinkční koeficient ϵ_{260} a spektroskopicky určete jeho koncentraci.
<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx?c=EU>
7. Porovnejte spektrum oligonukleotidu se spektrem fluorescenčně značeného oligonukleotidu v rozsahu vlnových délek 220 až 600 nm.

Protein

UV spektroskopie

1. Připravte roztok BSA v TE pufru ze zásobního roztoku o přibližné koncentraci 10 mg/mL tak, aby bylo možno přesně určit koncentraci BSA.
2. Změřte absorpční spektrum BSA v rozsahu vlnových délek 240 až 350 nm.
3. Určete polohu absorpčního maxima.
4. Stanovte přesnou molární koncentraci BSA v zásobním roztoku z hodnoty absorbance naředěného roztoku při 280 nm.

Bradfordové metoda

1. Připravte standardní kalibrační křivku pro měření koncentrace proteinu Bradfordové metodou.
2. Změřte koncentraci BSA pomocí této metody.
3. Vezměte roztok reakčního Bradfordové činidla z lednice a nechte jej zahřát na pokojovou teplotou a promíchejte.
4. Připravte roztoky blanku a standardů BSA o celkovém objemu 1 mL do mikrokumavek tak, že do 980 μ L reakčního Bradfordové činidla přidejte vždy 20 μ L TE pufru, a 20 μ L 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 1 mg/mL a 1.25 mg/mL. Současně připravte stejným způsobem roztok neznámého vzorku.
5. Všechny roztoky dobře promíchejte a nechte inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Inkubace by neměla přesáhnout 1h.
6. Nastavte spektrofotometr na 595 nm. Vynulujte roztokem blanku.
7. Změřte absorbanci roztoku standardů. Při měření postupujte od nejnižší koncentrace standardu k nejvyšší.
8. Vytvořte kalibrační křivku.
9. Změřte absorbanci neznámého vzorku a pomocí kalibrační křivky určete jeho koncentraci.
10. Porovnejte hodnoty koncentrace zásobního roztoku BSA určené spektroskopicky při 280 nm a pomocí Bradfordové metody.

Vliv pH a teploty na spektrální vlastnosti fluoroforů

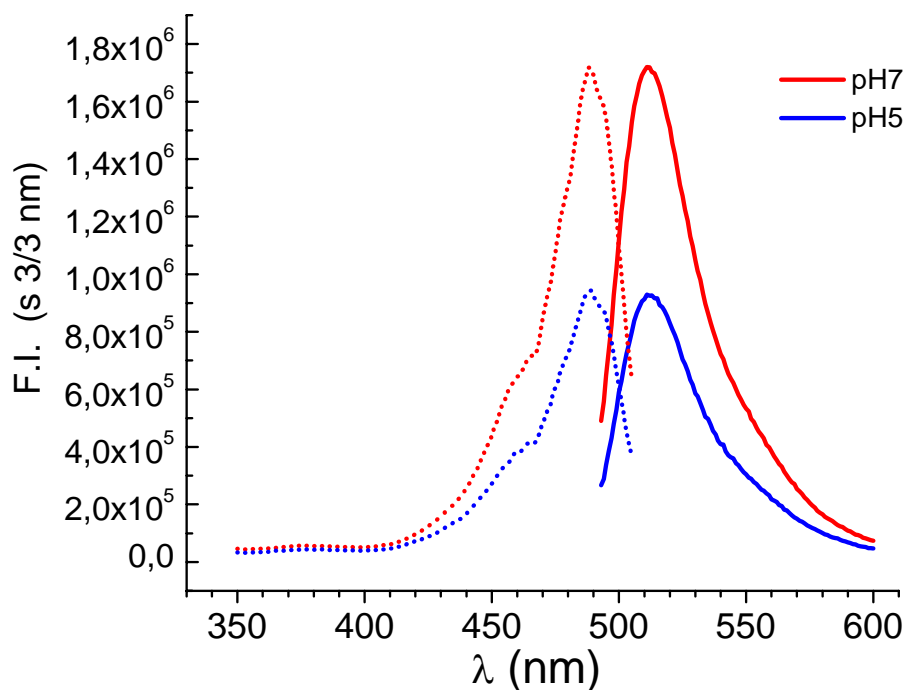
V tomto experimentu je ukázán vliv pH na fluorescenci a absorpci fluorescenční značky fluoresceinu rozpuštěné ve stejné koncentraci v roztocích o různém pH. Je rovněž demonstrován vliv teploty na intenzitu fluorescence.

Materiál

- fluorescein - NIST-traceable standard - 50 μM (Molecular Probes, Invitrogen)
- mikrokryveta
- pufr 5 (20 mM MES, pH 5.0)
- pufr 7 (50 mM fosfát sodný, pH 7.0)
- pufr 9 (12.5 mM boritan sodný/kys. boritá, pH 9.0)
- spektrofluorometr vybavený kryostatem (chlazenou vodní lázní)

Postup

1. Připravte vzorky fluoresceinu 1000x naředěním roztoku NIST standardu jeho přidáním 1,5 μL do 1499 μL roztoku pufru 5, pufru 7 a pufru 9.
2. Změřte excitační spektra vzorků při $\lambda(\text{em}) = 515 \text{ nm}$
3. Změřte emisní spektra vzorků při $\lambda(\text{ex}) = 488 \text{ nm}$
4. Změřte spektra při 20, 25 a při 37°C.



Obr. 1. Vliv pH na excitační a emisní spektrum fluoresceinu.

Výsledky

Při změně pufru z pH 7 na pH 5 a při zvýšení teploty dochází ke snížení intenzity fluorescence fluoresceinu.

Vlastní fluorescence proteinů

Vlastní fluorescenci proteinů je způsobena aromatickými aminokyselinami v nich obsaženými: tryptofanem (Trp), tyrozinem (Tyr) a fenylalaninem (Phe). Dominující je fluorescence tryptofanu, naopak prakticky vůbec se neuplatňuje fenylalanin. V této úloze jsou změřena fluorescenční excitační a emisní spektra albuminu a čistého tryptofanu, tyrozinu a fenylalaninu.

Vlastnosti L-tryptofanu

- MW = 204,23
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 295 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 353 \text{ nm}$
- emise Trp je vysoce závislá na polaritě a okolním prostředí

Vlastnosti L-tyrozinu

- MW = 181,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 275 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 304 \text{ nm}$
- emise Tyr je relativně málo citlivá na polaritu rozpouštědla

Vlastnosti L-fenylalaninu

- MW = 165,19
- absorpční maximum: $\lambda_{\text{exmax}} = 260 \text{ nm}$
- fluorescenční emisní maximum: $\lambda_{\text{emmax}} = 282 \text{ nm}$
- emise Phe je strukturovaná

Fluorescence proteinů je obvykle excitována při 280 nm nebo při delších vlnových délkách, takže fenylalanin není ve většině experimentů excitován. Navíc je kvantový výtěžek fluorescence Phe velmi malý (kolem 0,02). Tryptofanovou fluorescenci v proteinech lze selektivně excitovat při 295-305 nm.

Materiál

- L-tryptofan (Applichem), L-tyrozin (Applichem), L-fenylalanin (Applichem)
- Hovězí sérový albumin (MW = 69000)
- pufr A (120 mmol/l NaCl, 10 mmol/l KCl, 30 mmol/l Tris HCl, pH 7,4)
- skleněné zkumavky, mikropipety, ...

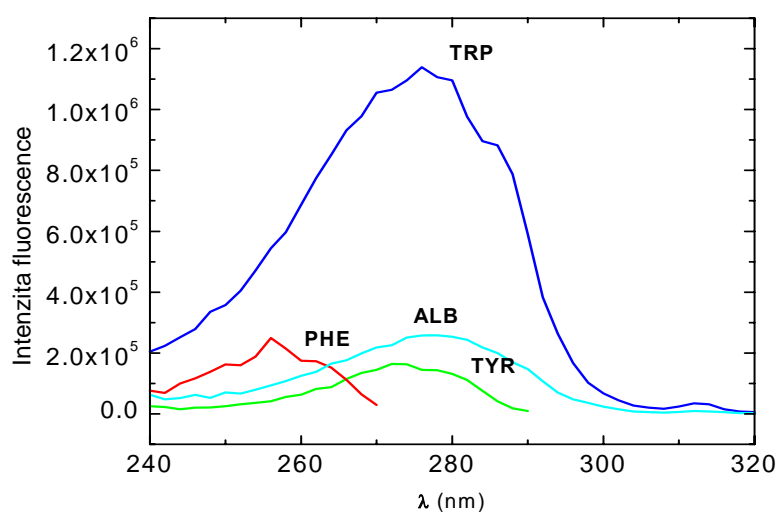
Postup

1. Připravte zásobní roztoky 10 mM Trp, 2 mM Tyr, 10 mM Phe a 0,25 mmol/l albuminu v pufru A.
2. Pro vlastní měření je nařed'te pufr A na koncentrace 5 μM Trp, 20 μM Tyr, 200 μM Phe a 0.6 μM albuminu.
3. Změřte excitační a emisní spektra vzorků za podmínek uvedených v tabulce.

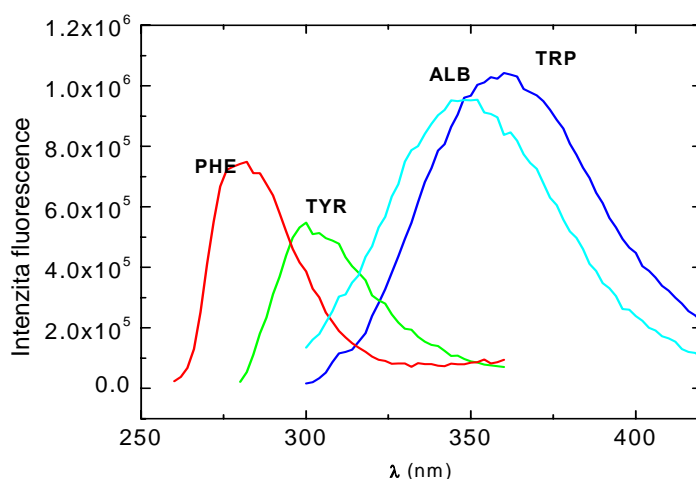
	excitační spektrum		emisní spektrum	
	λ_{em} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
L-tryptofan	350	240-320	280	300-420
L-tyrozin	300	240-290	270	280-360
L-fenylalanin	280	240-270	250	260-360
albumin	350	240-320	280	300-420

Výsledky

Změřená excitační a emisní spektra vlastní fluorescence tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr), fenylalaninu (Phe) a albuminu v pufru A jsou na Obr.1 a Obr 2. Z výsledných spekter je zřejmé, že prakticky veškerá vlastní fluorescence albuminu pochází od tryptofanu. Měření byla provedena na spektrofluorometru FluoroMax-4.



Obr. 1 Excitační spektra 5 μM Trp ($\lambda_{em} = 350$ nm), 20 μM Tyr ($\lambda_{em} = 300$ nm), 200 μM Phe ($\lambda_{em} = 280$ nm) a 0.6 μM albuminu ($\lambda_{em} = 350$ nm).



Obr. 2 Emisní spektra 5 μM Trp ($\lambda_{ex} = 280$ nm), 20 μM Tyr ($\lambda_{ex} = 270$ nm), 200 μM Phe ($\lambda_{ex} = 250$ nm) a 0.6 μM albuminu ($\lambda_{ex} = 280$ nm).

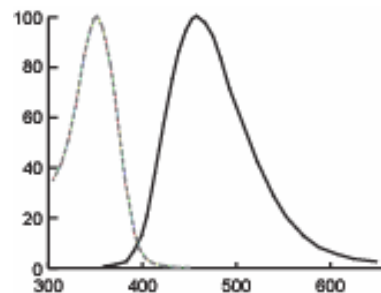
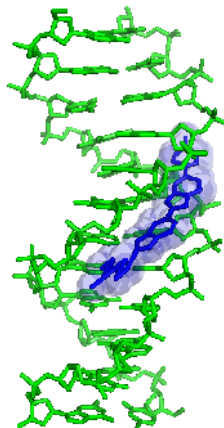
Fluorescenční stanovení koncentrace DNA

Určení koncentrace DNA je často základním krokem při analýze biologického materiálu a je součástí mnoha laboratorních protokolů. Znalost přesné koncentrace DNA je důležitá pro celou řadu technik (např. sekvenování, klonování cDNA, transkripce RNA). Koncentrace DNA je nejčastěji měřena UV spektroskopií, určením hodnoty absorbance při 260 nm ($Abs_{260} = 1$ pro dvouřetězcovou DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/mL}$; v 1 cm kyvetě).

Ke kvantifikaci nižších koncentrací DNA, než jsou detekovatelné za použití UV spektroskopie lze použít bisbenzen imidový interkalátor **Hoechst 33258**, který se váže na AT bohaté oblasti dvouřetězcové DNA a vykazuje zvýšenou fluorescenci za podmínek vysoké iontové síly. Hoechst má excitační maximum kolem 350 nm a emituje v oblasti 450 nm. Citlivost Hoechst interkalátoru je přibližně 10ng/mL. Dynamický rozsah použitelnosti Hoechst pro stanovení koncentrace DNA přesahuje 3 řády od 10ng/mL do 1 $\mu\text{g/mL}$ DNA.

Materiál

- Spektrofluorometr
- Mikrokyveta (1.5 mL)
- Roztok DNA (Salmon sperm)
- Hoechst 33258 10 mg/mL ve vodě
- 10X TNE pufr
- Destilovaná voda



Příprava roztoků

Varování: Hoechst 33258 je možný karcinogen a mutagen. Při přípravě roztoku pracujte v rukavicích, s respirátorem a v digestoři.

Hoechst 33258 roztok

Naředit 1ml zásobního roztoku Hoechst 33258(10 mg/mL) 9 mL destilované vody.

Uchovat v tmavé láhvi při 4°C až 6 měsíců

10 X TNE pufr

Rozpustit v 800 mL dest. vody:

12.11 g Tris Base, MW = 121.14

3.72 g EDTA, disodná sůl dihydrát, MW = 372.20

116.89 g NaCl, MW = 58.44

Nastavit pH na 7.4 koncentrovanou HCl

Doplnit dest. vodou do 1000 mL

Filtrovat (0.45 μm)

Lze uchovat při 4°C až po dobu 3 měsíců

Pozn. Koncentrace NaCl a pH jsou důležité pro správnou vazbu Hoechst na DNA.

1 X TNE: Naředit 5 mL 10X TNE do 45 mL destilované vody.

2X Hoechst roztok na stanovení

Naředit 5 μL Hoechst 33258 roztoku (1mg/mL) do 25 mL 1X TNE.
Uchovat za pokojové teploty.
Chránit před světlem.
Připravovat čerstvý každý den.
Nefiltrovat.

Standardní roztok DNA

Připravit 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ roztok DNA (objem 2mL) v 1X TNE.
Jemným poklepáním promíchat roztok v mikrozkumavce.
Uchovat při 4°C až 3 měsíce.

Vytvoření standardní křivky

1. Připravit tři následná ředění roztoku DNA v 1X TNE s koncentrací od 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNA do 200 ng/mL (např. 2000, 1200, 600, 200 ng/mL po 2mL)
2. Přidat vždy 1 mL 2X Hoechst roztoku ke každé koncentraci 1mL standardního roztoku DNA. Promíchat a pipetovat do mikrokvetvy. Celková koncentrace DNA standardu v kyvetě je nyní poloviční (1000, 600, 300, 100 ng/mL)
3. Připravit blank promícháním 1 mL 1X TNE pufru a 1mL 2X Hoechst roztoku. Všechny standardy a vzorky s Hoechst uchovejte v temnu až do měření.
4. Zapněte spektrofluorometr podle návodu.
5. Změřte intenzitu fluorescence
 - v módu **Single point** při $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, šířka štěrbin (slits) 2nm/2nm, integrační čas 1s (Fluoromax)
 - v módu **Read** při $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 442 \text{ nm}$, šířka štěrbin (slits) 10nm/10nm, integrační čas 1s (LS50)
6. Změřte nejdříve intenzitu fluorescence blanku, následně standardy.
7. Hodnoty intenzity zapište do tabulky a vynesete do grafu hodnoty intenzity fluorescence standardů po odečtení hodnoty blanku.

Měření neznámého vzorku

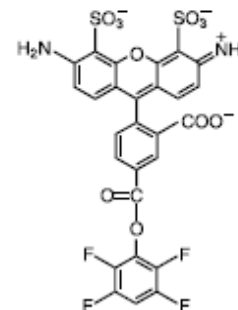
1. Nařed'te neznámý vzorek v 1X TNE na celkový objem 1mL.
2. Přidejte 1mL 2X Hoechst roztoku.
3. Připravte 2 různá ředění neznámého vzorku.
4. Změřte intenzitu fluorescence neznámých vzorků.
5. Po odečtení intenzity blanku určete podle standardní křivky koncentraci DNA v neznámém vzorku.

Výsledky

Stanovení koncentrace DNA v neznámém vzorku.

Fluorescenční značení proteinu

Fluorescenční značení proteinu bude provedeno za použití soupravy Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit. Fluorescenční značka Alexa Fluor 488 je spektrálně podobná fluoresceinu, ale na rozdíl od něj není její fluorescence citlivá na pH mezi 4 a 10. Proteiny značené tímto fluoroforem vykazují excitační maximum 494 nm a emisní maximum 519 nm. Alexa Fluor 488 je ve formě TFP (tetrafluorfenyl) esteru viz. Obr.1, který je v roztoku stabilnější než nejčastěji používaný NHS (sukcinimidyl) ester. Za použití následujícího postupu lze fluorescenčně naznačit 0.1 až 1 mg proteinu.



Obr. 1 AlexaFluor 488

Příprava proteinu

Pro optimální efektivitu značení by měl být protein ve fosfátovém pufru bez amonných iontů a primárních aminů. V případě, že protein je v jiném pufru (Trisový, glycinový), je možno dialýzou pufr změnit.

Výsledná koncentrace roztoku proteinu na značení by měla být 2 mg/mL.

Materiál

- Alexa Fluor 488
- Mikrozkušavka s magnetickým míchadlem
- Roztok proteinu (8 mg/ml) ve fosfátovém pufru
- 1M roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO₃, MW = 84), 1ml
- Kolona PD-10 Desalting Column (GE Healthcare)

Značení proteinu

Připravte 1M roztok rozpuštěním 84 mg NaHCO₃ v 1 ml dest. H₂O. Tento roztok, který má pH ~ 9 může být skladován až dva týdny při 4°C nebo může být rozdělen do alikvotů a zamražen (<-20°C).

Do skleněné vialky (4 mL) napipetujte 25 µl roztoku proteinu (c = 8 mg/ml).

Jestliže je koncentrace proteinu vyšší než 2 mg/ml, roztok se naředí přidáním fosfátového pufru na výslednou koncentraci 2 mg/ml.

Zkušavku s fluorescenční značkou nechte zahřát na laboratorní teplotu. Přidejte 10 µl 1M NaHCO₃ a promíchejte pipetováním nahoru a dolů. Odpipetujte roztok fluorescenční barvičky do mikrozkušavky s proteinem a promíchejte pipetováním nahoru a dolů.

Vše nechte míchat ve skleněné vialce s magnetickým míchadlem po dobu 1 h při laboratorní teplotě.

Pozn. NaHCO₃ se přidává, aby se zvýšilo pH reakční směsi, protože TFP estery reagují nejlépe při alkalickém pH.

Asi 20 minut před koncem inkubace připravte kolonu pro separaci proteinu a nenavázané fluorescenční značky.

Purifikace proteinu

Ustříhnete špičku kolony PD-10, kolonu umístíte do stojánku, odstraňte víčko a nechte obsah kolony vykat.



Promytí kolony 25 ml elučního pufru rozdělených do 4 dávek.

Pozn. Eluční pufr: 50 mM Na-fosfát a 50mM NaCl

Náplň kolony Sephadex™ G-25 Medium umožňuje gelovou filtrací oddělit nenavázanou fluorescenční značku od proteinu podle rozdílné velikosti a molekulové hmotnosti.



Opatrně naneste reakční směs Alexa488 s proteinem po 1 hodině inkubace pipetou do středu kolony. Použijte 100 µl elučního pufru k vypláchnutí mikrozkumavky s reakční směsí a opět naneste na kolonu. Roztok nechte zaputovat do kolony.



Eluční pufr přidávejte do kolony po 1 ml.

Postupně jímejte frakce vytékající z kolony do mikrozkumavek po 1 ml. Po cca 2-3 ml začíná vytékat značený protein. Značený protein je obsažen v 1-2 ml vytékajícího elučního pufru.

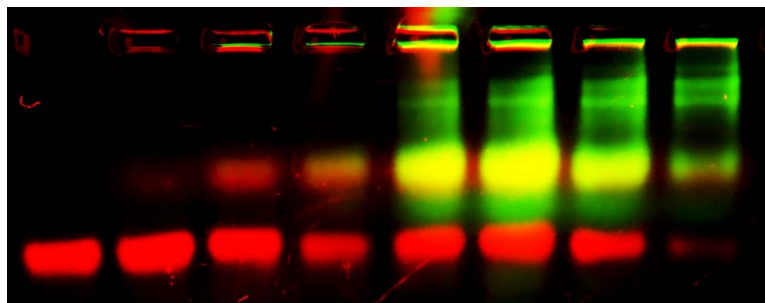


Značený protein odpipetujte do ultrafiltrační zkumavky (Amicon Ultra, 10K, Millipore) a zakonzentrujte na ~ 100 µL centrifugací na centrifuze s vykývným rotorem (4000 g, 20 min, 4°C)

Stanovte koncentraci značeného proteinu za použití Bradfordové reakce. Určete jaké poměrné množství proteinu bylo naznačeno ve srovnání s množstvím proteinu vstupujícího do reakce s fluoroforem.

5. Nechte 10 minut inkubovat za laboratorní teploty.
6. Sestavte aparaturu pro horizontální elektroforézu a naplňte ji 0.25X TBE puforem.
7. Ke každému vzorku přidejte 1/5 celkového objemu 6x nanášecího pufru podle tabulky.
8. Vložte gel do elektroforetické vany.
9. Naneste vzorky na gel v pořadí jako je v tabulce.
10. Spusťte elektroforézu při napětí 40 V. Po 30 minutách zvyšte napětí na 80 V a nechte pokračovat dalších 60 minut.
11. Detekujte fluorescenci značené DNA na fluorescenčním scanneru s nastavením budícího záření a detekčního filtru na rhodamin red-x [ROX].
12. Detekujte fluorescenci značeného proteinu na fluorescenčním scanneru s nastavením budícího záření a detekčního filtru na alexa fluor [Alexa 488].
13. Porovnejte obě výsledná zobrazení a určete oblasti, ve kterých se vyskytují komplexy vzniklé vazbou proteinu na DNA.

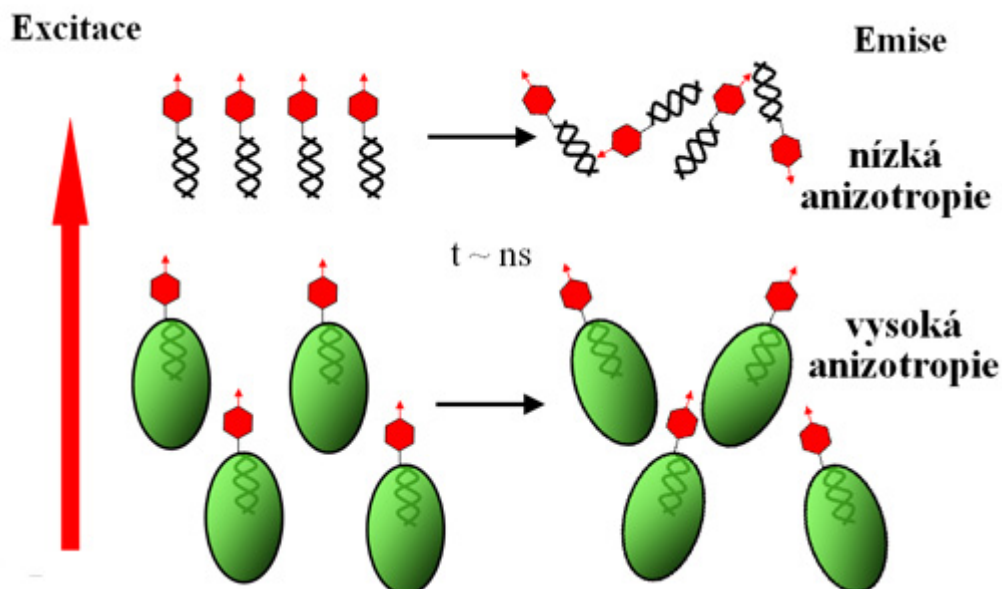
Obr. 1. Příklad překryvu zobrazení při různém fluorescenčním značení DNA a proteinu



Studium vazby molekul za použití anizotropie fluorescence

Změna anizotropie fluorescence je používána při popisu vzájemné interakce molekul. V případě, že se fragment DNA s fluorescenční značkou volně pohybuje (rotuje) v roztoku, je pozorovaná anizotropie relativně nízká. V případě, že dojde ke vzniku komplexu DNA a proteinu, dochází k výraznému snížení pohyblivosti DNA s fluorescenční značkou, což má za následek zvýšení anizotropie fluorescence.

Při titrování roztoku fluorescenčně značené DNA roztokem DNA-vazebného proteinu dochází k postupné vazbě molekul proteinu na vazebná místa jednotlivých molekul DNA a tedy k postupnému zvyšování anizotropie fluorescence. Protein se na vazebná místa na DNA váže až do okamžiku, kdy je koncentrace proteinu tak vysoká, že jsou všechny molekuly DNA obsazeny. V tomto momentě anizotropie fluorescence dosáhne maximální hodnoty a přestane se dále zvyšovat. Koncentrace proteinu, při které hodnota anizotropie fluorescence tvoří 50 % maximální hodnoty, se nazývá **disociační konstanta (Kd)**. Ta reprezentuje afinitu (sílu vazby) konkrétního proteinu k DNA. Studium změn Kd v závislosti např. na iontové síle či teplotě umožňuje získat cenné poznatky o povaze komplexu protein-DNA a o mechanismu, jakým spolu obě makromolekuly interagují.

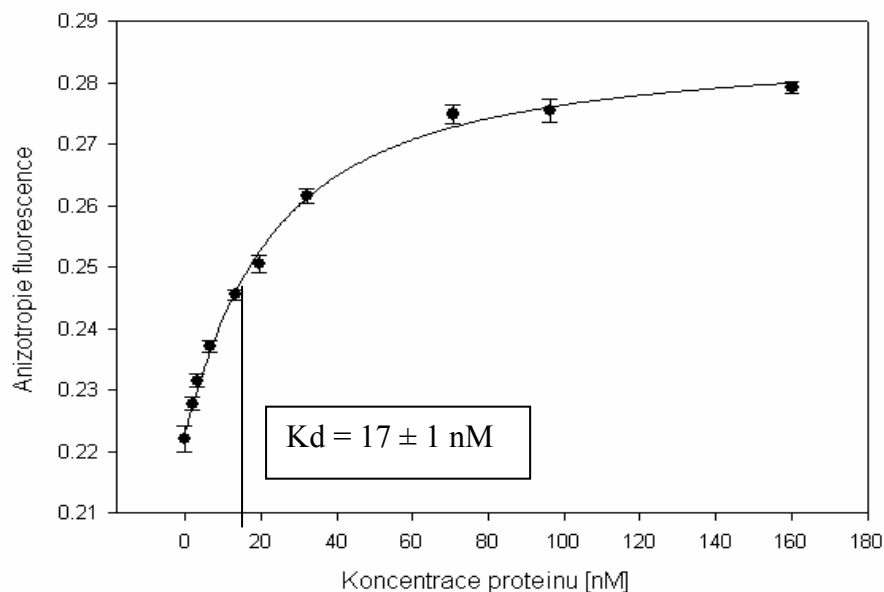


Materiál

- 30 pmol vysušeného fragmentu DNA (GTTAGG)₄ značeného Rhodaminem Red X ($\lambda_{\text{ex}} = 572$, $\lambda_{\text{em}} = 591$ nm)
- Roztoky proteinu (lidský telomer-vazebný protein TRF1, MW = 110 kDa) o koncentracích 1 μM a 20 μM
- Pufř P (20mM HEPES, 180mM KCl, 0,1mM EDTA, 3mM MgCl₂, pH 8.0)
- 1M DTT
- Spektrofluorometr vybavený polarizátory pro měření anizotropie fluorescence
- Mikrokvyeta s magnetickým míchadlem

Postup

- 1) Resuspendovat vysušenou DNA v 1,5 ml pufru P a důkladně vortexovat. Výsledná koncentrace DNA bude 20nM.
- 2) Pufrem P naředit resuspendovanou DNA na 2nM, resp. 10nM roztok o objemu 1,5 ml. Přidat 1.5 μ l 1M DTT. Roztok přenést do kyvety. Kyvetu při manipulaci odzátkovávat jen na nezbytně dlouhou dobu, aby bylo zamezeno vnášení částic prachu do vzorku.
- 3) Na fluorimetru 5x změřit anizotropii fluorescence pomocí funkce „batch experiment“ a nastavení uloženém v souboru ./RedX_titrator/p0.xml ($\lambda_{ex} = 572$ nm, $\lambda_{em} = 591$ nm, šířka štěrbin 8/8 nm). Hodnoty anizotropie zaznamenat do tabulky v software SigmaPlot.
- 4) Postupně přidávat 1 μ M roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 3, 5, 10, 20 a 50 μ l. Po každém přidavku 5x změřit hodnotu anizotropie fluorescence a zaznamenat do tabulky v software SigmaPlot.
- 5) Postupně přidávat 20 μ M roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 3, 5, 10 a 20 μ l. Po každém přidavku 5x změřit hodnotu anizotropie fluorescence a zaznamenat v software SigmaPlot.
- 6) V software SigmaPlot provést úpravu hodnot anizotropie na změnu objemu po přidavku roztoků proteinu.
- 7) Pomocí software SigmaPlot vynést do grafu závislost korigovaných hodnot anizotropie fluorescence na koncentraci přidaného proteinu.
- 8) Pomocí software SigmaPlot analyzovat křivku vazby proteinu a stanovit disociační konstantu K_d .



Obr. 1. Závislost anizotropie fluorescence značeného fragmentu DNA na koncentraci proteinu.