



Praktický kurz

Pokročilé biofyzikální přístupy v genomice a proteomice

24.-25. května 2011

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)
- Kalorimetrická analýza interakcí biomolekul bez nutnosti jejich značení
- Využití fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) při sledování hybridizace komplementárních řetězců nukleových kyselin

Místo konání

Brno, Univerzitní kampus Bohunice, blok A2, seminární místnost 2.11
praktická výuka bude probíhat v laboratořích UKB

Přihlášení

Zájemci se přihlásí prostřednictvím e-mailu na hofr@sci.muni.cz Ctirad Hofr, Ph.D.

Seminář je organizován v rámci projektu OP VK

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Mikrokalorimetrie

Izotermální titrační mikrokalorimetrie

Materiál:

pufr: 50 mM Na-fosfát, 50 mM NaCl, pH = 7,00
ddH₂O

oligonukleotid hTR2-c (52 nmol, $\epsilon = 157100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

oligonukleotid hTR2-g (20 nmol, $\epsilon = 174600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

spektrofotometr (Beckman)

VP-ITC

vakuum ThermoVac (MicroCal)

plastová stříkačka s hadičkou

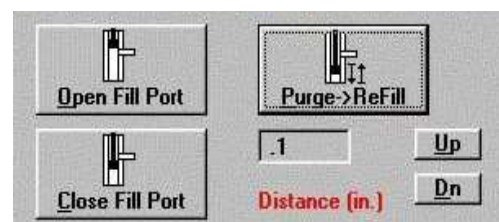
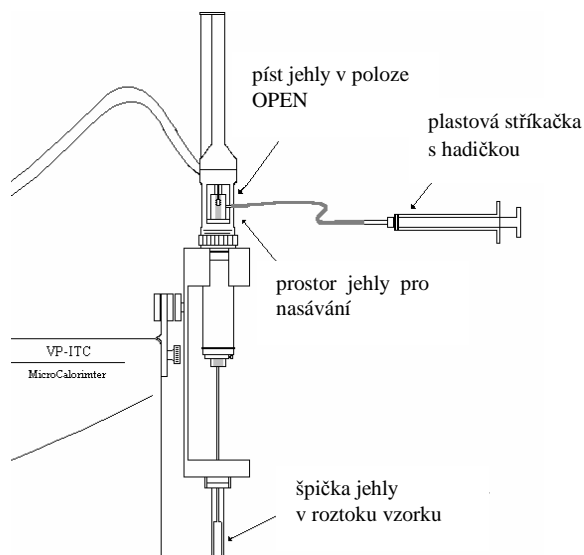
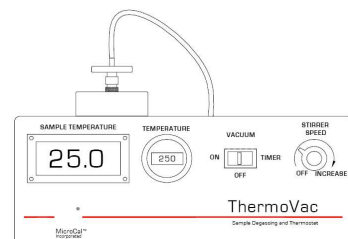
plastová vialka s míchadlem

Hamilton dávkovací stříkačka s pevnou jehlou („Hamiltonka“)



Postup:

- Připravte oligonukleotidy rozpuštěním vysušeného alikvotu v pufru tak, aby hTR2-c měl koncentraci 104 μM a hTR2-g 10 μM .
- Koncentraci oligonukleotidů zkontrolujte na spektrofotometru změřením absorbance při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu DNA (vzorek bude nutno naředit, aby bylo spektroskopicky možno přesně určit jeho koncentraci).
- Promyjte celou i jehlu přístroje VP-ITC ddH₂O.
- Napipetujte oligonukleotidy do plastových vialek s míchadlem a nechte cca 5 minut pod vakuem odplynit.
- Z cely odsajte „Hamiltonkou“ přebytečnou vodu po promývání, celou i jehlu 2x promyjte puftrem.
- Do cely napipetujte „Hamiltonkou“ oligonukleotid hTR2-g tak, abyste předešli vniknutí bublinky do cely. Nechte temperovat na 25°C.
- Pomocí plastové stříkačky s hadičkou nasajte do jehly oligonukleotid hTR2-c:



bílý píst v jehle musí být nahoře (**Open Fill Port**); pomalu nasávejte, dokud nevidíte u pístu bublinku. Až se bublinka dostane do hadičky, nasajte ještě malé množství vzorku a stiskněte **Close Fill Port** – píst se posune dolů a zabrání úniku vzorku z jehly během další manipulace.

Zbavte se případných bublinek v jehle příkazem **Purge/ReFill** – opakujte 2x

- Nastavte vhodné parametry:

Volume (µl): objem vzorku pro každou injekci

Duration (sec.): délka trvání injekce (bývá nastaven dvojnásobek hodnoty objemu)

Spacing (sec.): čas mezi jednotlivými injekcemi, aby se signál před začátkem nové injekce vrátil na základní hladinu

Filter period (sec.): časový interval potřebný pro převedení píků do jednobodového provedení

Total Number of Injections

Cell Temperature (°C)

Reference Power (µCal/sec): síla potřebná k udržení konstantní teploty v celách během experimentu (přibližná hodnota, na které se usadí baselina, když je systém ekvilibrován)

Initial Delay (sec.): čas od začátku experimentu do první injekce (potřebné pro ustanovení rovnováhy)

Syringe Concentration (mM): koncentrace vzorku v jehle

Cell Concentration (mM): koncentrace vzorku v cele

Stirring Speed (rpm): rychlost otáčení jehly během injekcí

Exp. Param	Value
Total # Injections	25
Cell Temperature [°C.]	25
Reference Power [µCal/sec.] (1 - 34.3)	5
Initial Delay [sec.]	300
Syringe Concentration [mM]	
Cell Concentration [mM]	
Stirring Speed	242
Data File Name	AnyName.itc
Feedback Mode/Gain	None <input type="radio"/> Low <input type="radio"/> High <input checked="" type="radio"/>

Injection Param	Value
Volume [µl]	5
Duration [sec.]	10
Spacing [sec.]	300
Filter Period [sec.]	2

Injection Mode	All Same	Unique	Apply To Rest
Selected	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>

Inj #	Volume	Duration	Spacing	Filter
1	5	10	300	2
2	10	20	300	2
3	10	20	300	2
4	10	20	300	2
5	10	20	300	2

- Vsuňte jehlu do cely, gumová hadička z jehly musí být odstraněna.
- Spusťte reakci tlačítkem Start – po ekvilibraci se jehla roztočí.

Diferenční skenovací mikrokolorimetrie

Materiál:

pufr: 50 mM Na-fosfát, 50 mM NaCl, pH = 7,00
ddH₂O

DNA dhTR2 (100 nmol, $\epsilon = 272100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

spektrofotometr (Beckman)

VP-DSC

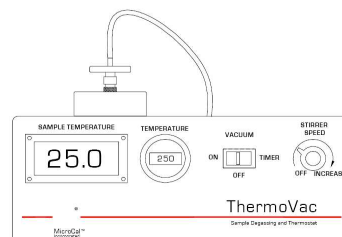
vakuum ThermoVac (MicroCal)

Hamilton dávkovací stříkačka s pevnou jehlou („Hamiltonka“)



Postup:

- Připravte duplex dhTR2 rozpuštěním vysušeného alikvotu v pufru tak, aby měl koncentraci 50 μM .
- Koncentraci duplexu zkontrolujte na spektrofotometru změřením absorbance při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu DNA (vzorek bude nutno naředit, aby bylo spektroskopicky možno přesně určit jeho koncentraci).
- Promyjte referenční (R) i vzorkovou (S) celu přístroje VP-DSC ddH₂O.
- Napipetujte duplex i pufr do plastových vialek s míchadlem a nechte cca 5 minut pod vakuem odplynit.
- Z cel odsajte „Hamiltonkou“ přebytečnou vodu po promývání a promyjte 2x puftrem.
- Do cely R napipetujte „Hamiltonkou“ pufr a do cely S duplex dhTR2 tak, abyste předešli vniknutí bublinky do cel. Nechte temperovat na 20°C.
- Zadejte vhodné parametry – viz tabulka:



DSC Controls			
Experimental Parameters			
Number of Scans:	10		
Post Cycle Thermostat (°C)	25		
Cell Concentration (mM)			
Cell Refill Parameters			
<input type="checkbox"/> Use Audible Fill Indicator			
Fill Between	N/A and N/A deg.		
DataFile Comments...			
<input type="checkbox"/> Apply Comments to all...			
Scan Parameters			
Starting Temperature (Deg. C)	20		
Final Temperature (Deg. C)	95		
Scanrate (Deg./hr.)	90		
PreScan Thermostat (min.)	15		
PostScan Thermostat (min.)	0		
Filtering Period (sec.)	8		
<input checked="" type="checkbox"/> Auto	File Name: mxjfgdszfl.dsc		
Feedback Mode/Gain			
<input type="checkbox"/> None	<input type="checkbox"/> Low	<input type="checkbox"/> Mid	<input checked="" type="checkbox"/> High
Scan Edit Mode			
<input checked="" type="checkbox"/> Identical Scans	<input type="checkbox"/> Unique Scans	<input type="button" value="Even"/>	<input type="button" value="Odd"/>

- Spusťte scan tlačítkem Start.

V laboratoři se nepozorným pracovníkům smazaly popisky ze tří zkumavek se vzorky oligonukleotidů. Pracovníci si vzpomněli, že dva ze vzorků byly navzájem komplementární a každý vzorek je značený jinou fluorescenční značkou. Použité značky byly TAMRA (Carboxytetramethylrhodamine), FAM (6-carboxyfluorescein) a ROX (Rhodamine Red X). Vaším úkolem je zjistit za pomoci spektrofluorometru, které dva vzorky jsou komplementární.

Určení komplementárního oligonukleotidového řetězce

Fluorescenční rezonanční přenos energie FRET

Materiál:

Vysušené fluorescenčně značené oligonukleotidy A (TAMRA), B (FAM) a C (ROX)
1x TE pufr (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)


Kyveta

Spektrofluorometr FluoroMax-4

Postup:

- Rozpusťte oligonukleotidy v 1x TE pufru: A a C ve 30 μ l, B v 1500 μ l
- Do kyvety pipetujte 1400 μ l roztoku B
- Změřte excitační spektrum oligonukleotidu B
- Změřte emisní spektrum od 500 nm do 600 nm
- Přidejte 10 μ l roztoku A do kyvety, po cca 1 minutě změřte emisní spektrum ve stejném rozsahu vlnových délek
- Přídavek 2x opakujte a pokaždé změřte emisní spektrum
- Celý postup opakujte pro druhou dvojici oligonukleotidů (B a C)
- Určete, kde dochází k FRET a z tohoto spektra dopočtete délku oligonukleotidů

Spektrofluorometr: Program FluorEssence

Pro vybrání excitačního / emisního spektra: 

Nastavení pro měření excitačního spektra:

Záložka „Monos“:

- excitation: rozsah kolem předpokládané vlnové délky fluoroforu v kyvetě
- emission: předpokládaná emise fluoroforu v kyvetě
- slit (štěrbina): obojí 1 nm

Pozn. k nastavení štěrbin: pokud není křivka hladká nebo intenzita je příliš nízká (<100 000), tak rozšířit
pokud jsme získali příliš vysokou intenzitu (>2 000 000), tak zúžit

Záložka „Detectors“:

Signals:

S1

R1

Signal algebra:

S1/R1 Add=>

<=Remove S1, R1

RUN

Nastavení pro měření emisního spektra:

Záložka „Monos“:

- excitation: vlnová délka excitačního maxima stanovená v předchozím měření
- emission: rozsah 500 nm až 600 nm
- slit (štěrbina): obojí 3 nm

Záložka „Detectors“:

Signals:

S1

R1

Signal algebra:

S1/R1 Add=>

<=Remove S1, R1

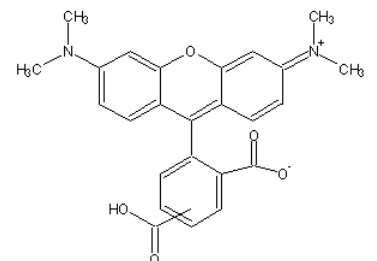
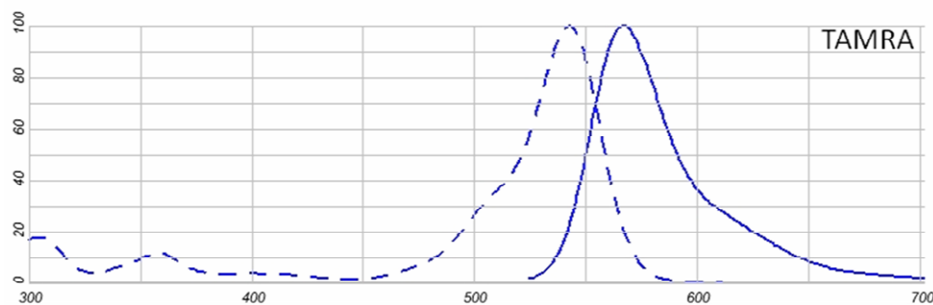
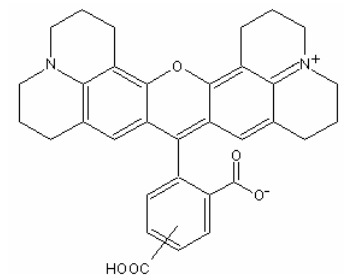
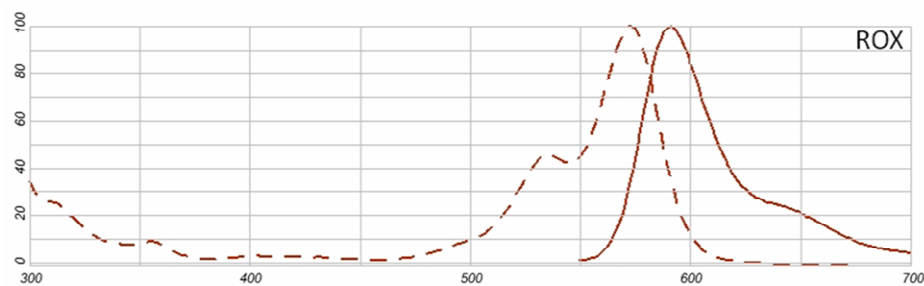
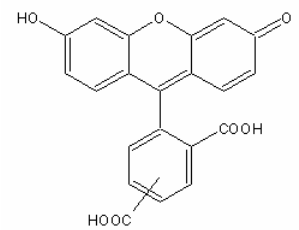
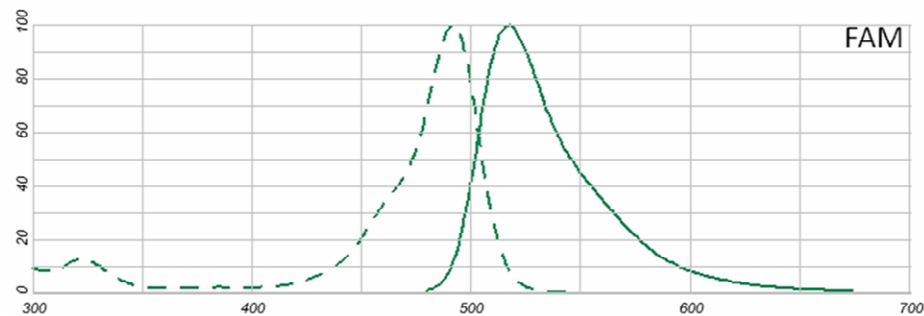
RUN

Pro zopakování měření podle posledního aktuálního nastavení: 

Uložení měření:

Po prvním měření vyskočí okno na zadání názvu → Browse → rozkliknout složku Cvičení 2011 → jako název souboru napsat označení skupiny

Po dokončení měření kliknout na ikonu diskety a tím uložit celé měření.



Nápověda: 1 Å = 0,1 nm

10 párů bází DNA má délku 3,4 nm

R₀ pro FAM-ROX i pro FAM-TAMRA je 50 Å

V laboratoři, kam jste zavítali, skladují alikvoty jednotlivých proteinů v různých krabičkách. Nešťastnou náhodou se ale popisek z jedné krabičky s proteinovými vzorky odlepil. Vaším úkolem je zjistit, jaký protein je v neoznačené krabičce. V laboratoři se pracuje s následujícími proteiny: TPP1, TIN2, TRF1, TRF2 a RAP1. Byly Vám poskytnuty následující údaje ke každému proteinu a gel (SDS PAGE) se vzorkem tohoto neznámého proteinu.

	TPP1	TIN2	TRF1	TRF2	RAP1	GST tag	His ₆ tag
velikost v kDa bez tagů	57,7	50,0	50,3	55,5	44,3	22	6
tagy daného proteinu	GST+His ₆	GST+His ₆	GST+His ₆	His ₆	His ₆		

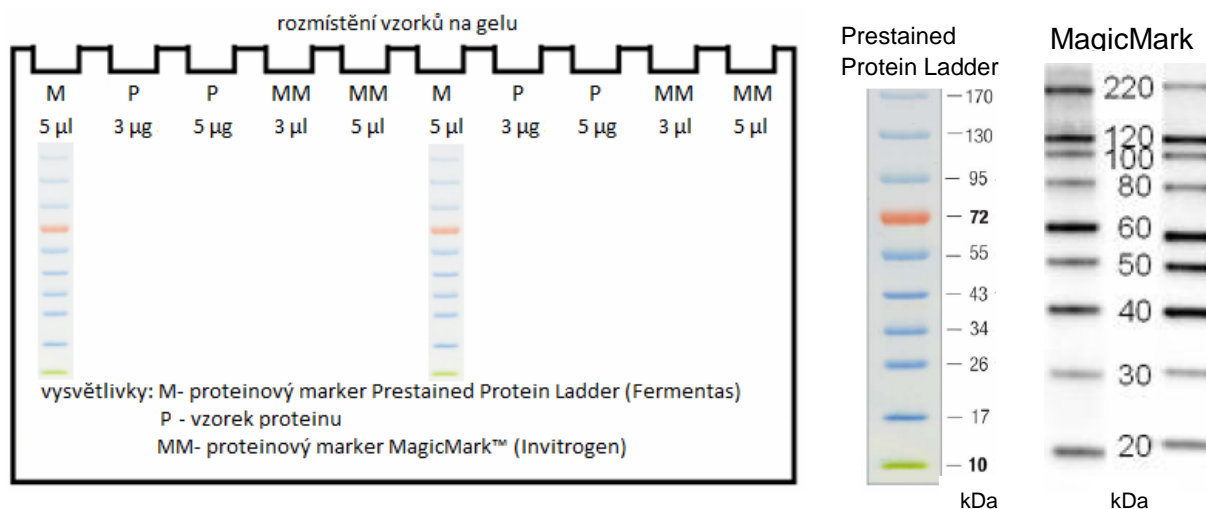
Western blot + imunodetekce

Dry Western blot

Materiál:

Semi-dry Blotting System (Hoefer)

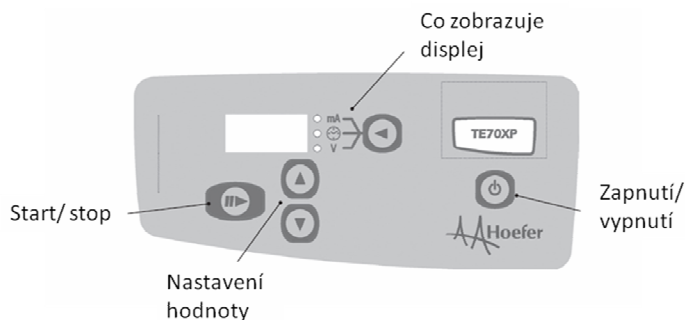
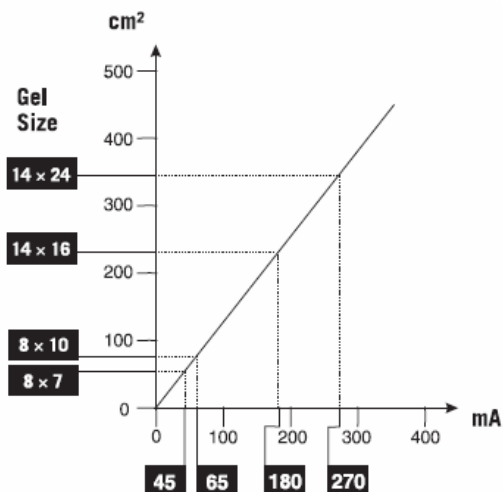
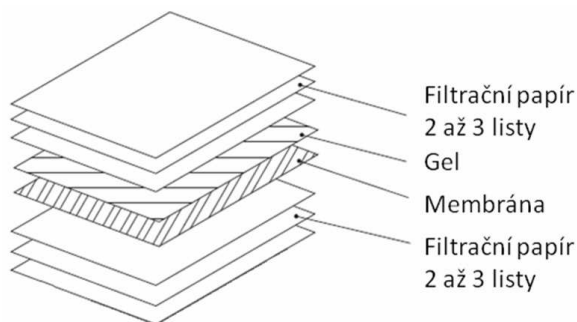
Transferový pufr (50 ml): 1x TANK buffer (= Tris Glycine SDS; zásobní 10X), 10% metanol
SDS Page se vzorky



Postup:

- Nastříhejte membránu a filtrační papíry (stejný rozměr jako gel)
- Připravte transferový pufr
- Nechte v něm nasáknout filtrační papíry (5 minut), membránu (2 minuty).
- Gel vyjměte ze skel a omyjte v transferovém pufru (2 minuty).

- Seskládejte blot v uvedeném pořadí:
- Podle přibližné velikosti gelu nastavte hodnotu proudu (mA).
Čas nastavte na 45 minut.



- 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:

BenchPro™4100 Card Processing Station
Detekční systém LAS 3000

Promývací pufr A/B (Wash) = 1x TBST pufr (200 ml): z 10x TBS + 0,1% Tween

Blokační pufr A = 5 g sušeného mléka + 100 ml TBST

Blokační pufr B = WesternDot™ Blocking Buffer (Invitrogen)

Primární protilátka (1° antibody): anti-His 2 µl + 20 ml blokační pufr A
anti-His 2 µl + 20 ml blokační pufr B

Sekundární protilátka (2° antibody): anti-mouse 2 µl + 20 ml blokační pufr A
Biotin-XX-Goat anti-mouse 5 µl + 20 ml blokační pufr B

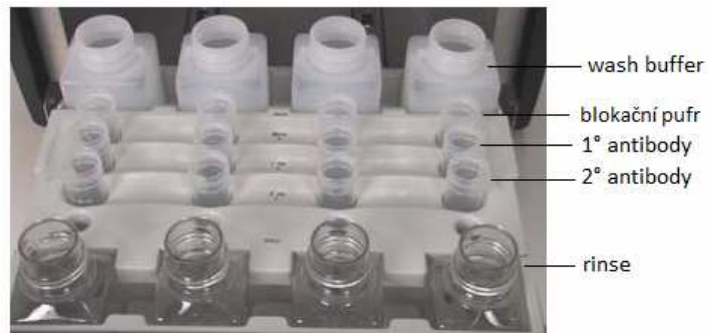
Oplach (Rinse) = ddH₂O

LumiGLO

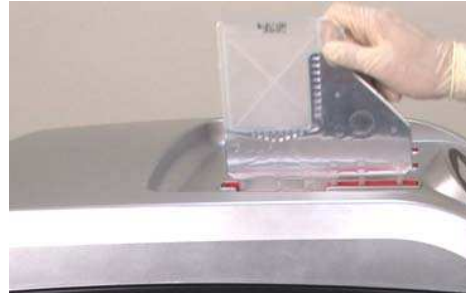
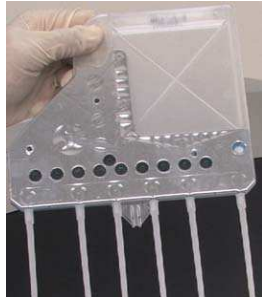
3° protilátka- Qdot® (Invitrogen)

Postup:

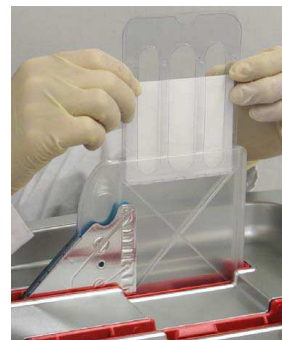
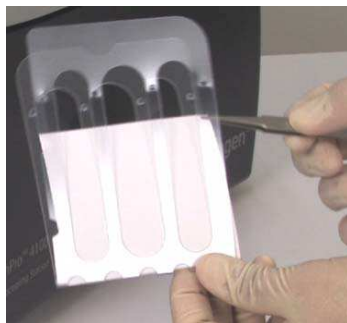
- připravte potřebné pufrы
- protilátky naředte až 5 minut před skončením blotování
- naplňte nádoby podle obrázku, každá skupinka dvě řady vedle sebe (v jedné A, ve druhé B)



- zavřete zásuvku s roztoky (bez víček!), shora zasuňte kazetu až zacvakne (kazetu držte pouze na místě k tomu určeném):



- membránu umístíte do plastového držáku - nesmí vyčnívat a měla by být u spodního okraje držáku
- držák s membránou opatrně zasuňte do kazety



- zapněte přístroj, nastavte 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°protilátk u:

LumiGLO: 1,9 ml ddH₂O + 50 µl LumiGLO reagent A + 50 µl Peroxide reagent B
3°protilátka: Qdot® 1 µl + 2 ml blokační pufru B (odpipetovat až po skončení promývání z nevyužitého zbytku)

- „Complete“ vypustí poslední používaný roztok z kazety
- Vytáhněte membrány v plastových držácích, vytáhněte kazety, odpipetujte 2 ml blokačního pufru B na 3°protilátku
- Do folie zatavte membránu B (= ta co byla v blokačním pufru B) spolu s 3°protilátkou a nechte inkubovat 10-15 minut na třepačce
- Na černý tácek položte folii a na ni položte membránu A (= ta, co byla v blokačním pufru A), přelijte Lumiglo, po cca 1 minutě detekujte protein:
Method/Tray position – Chemiluminescence, malá membrána pozice 1 – OK
Exposure type: increment, Exposure time: 10 sec, Sensitivity: standard
Focusing (zaostření) dvě šipky větší skok, jedna šipka jemnější posun
Return, Start
- Na průhledné sklo položte membránu na folii, detekujte protein:
Method/Tray position – Fluorescence: EtBr, malá membrána pozice 1 – OK
Exposure type: precision, Exposure time: 1 sec, Sensitivity: standard
Focusing (zaostření), Return, Start