



Praktický kurz

Pokročilé biofyzikální přístupy v genomice a proteomice

30. května 2013

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 (rychlé western blotování s permanentní fluorescenční vizualizací)
- moderní přístupy analýzy interakce biomolekul bez nutnosti jejich značení: izotermální titrační kalorimetrie (ITC)

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 inecasova@mail.muni.cz

Mgr. Ivona Nečasová

Seminář je organizován v rámci udržitelnosti projektu OP VK
Moderní biofyzikální metody: pokročilé vzdělávání v experimentální biologii CZ.1.07/2.3.00/09.0046

Mikrokalorimetrie

Izotermální titrační mikrokalorimetrie

Materiál:

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

DNA dhTR2 (15 nmol, $\epsilon = 272100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Protein TRF2 ($c = 7 \text{ mg ml}^{-1}$, $\text{MW} = 59135 \text{ g mol}^{-1}$)

spektrofotometr (Beckman)

Bradford reagent (BioRad)

VP-ITC

vakuum ThermoVac (MicroCal)

plastová stříkačka s hadičkou

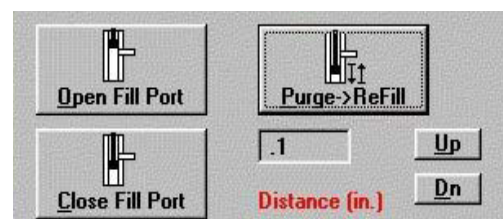
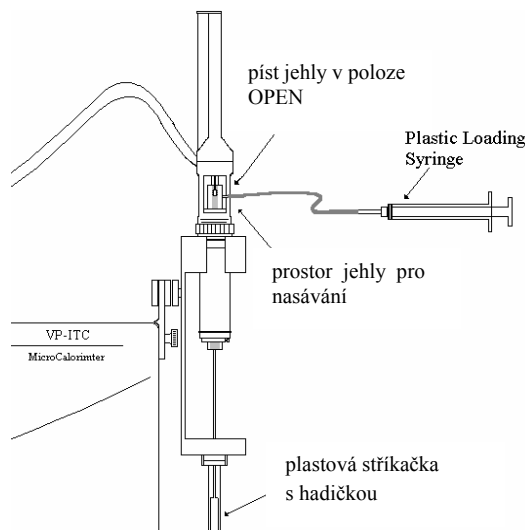
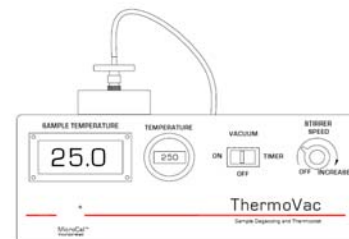
plastová vialka s míchadlem

Hamilton dávkovací stříkačka s pevnou jehlou („Hamiltonka“)



Postup:

- Připravte duplex rozpuštěním vysušeného alikvotu v pufru tak, aby měl koncentraci 24 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).
- Připravte protein naředěním jeho zásobní koncentrace na hodnotu 9 μM .
- Koncentraci proteinu zkontrolujte metodou Bradfordové tak, že ke 980 μl činidla přidáte 20 μl naředěného proteinu (pufru pro blankové měření)
- Promyjte celou i jehlu přístroje VP-ITC ddH₂O.
- Napipetujte DNA i protein 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 pufrům.
- Do cely napipetujte „Hamiltonkou“ protein TRF2 tak, abyste předešli vniknutí bublinky do cely. Nechte temperovat na 25°C.
- Pomocí plastové stříkačky s hadičkou nasajte do jehly duplex dhTR2:



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

The screenshot displays two panels: 'Experimental Parameters' and 'Injection Parameters'. The 'Experimental Parameters' panel includes fields for Total # Injections (25), Cell Temperature (°C) (25), Reference Power (µCal/sec.) (5), Initial Delay (sec.) (300), Syringe Concentration (mM), Cell Concentration (mM), and Stirring Speed (242). The 'Injection Parameters' panel includes fields for Volume (µl) (5), Duration (sec.) (10), Spacing (sec.) (300), and Filter Period (sec.) (2). Below these panels is an 'Edit Mode' section with radio buttons for 'All Same', 'Unique', and 'Apply To Rest'. At the bottom is a table with columns for Inj #, Volume, Duration, Spacing, and Filter, showing a sequence of 5 injections with varying parameters.

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

spektrofotometr (Beckman)

VP-DSC

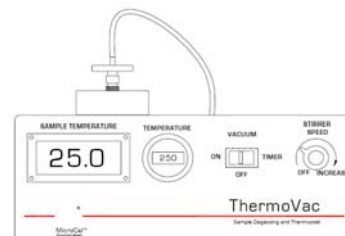
vakuum ThermoVac (MicroCal)

Hamilton dávkovací stříkačka s pevnou jehlou („Hamiltonka“)



Postup:

- Připravte duplex dhTR2 rozpuštěním vysušeného alikvotu v pufru tak, aby měl koncentraci 28 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 pufr.
- 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...			
DSC Controls			
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: mxfgdszfl.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.

DIGITÁLNÍ ZPRACOVÁNÍ OBRAZU

Úvod do komerčního programu *Adobe Photoshop* – předvedení základních funkcí pro zpracování a analýzu obrazu experimentálních dat. Skládání obrazu, zesílení signálu a odstranění šumu a pozadí na proteinových gelech, membránách a snímcích FISH.

Úvod do volně dostupného programu *Image J* – instalace softwaru a představení jeho základních vlastností, předvedení funkcí používaných pro pokročilou analýzu dat (měření intenzity signálu na gelech a membránách, snímcích z fluorescenčního mikroskopu, zpracování dat mikroskopie v čase a konfokální mikroskopie).

SURFACE PLASMON RESONANCE

Princip metody a seznámení s měřením interakce molekul za použití velmi nízkých koncentrací reagujících molekul

- seznámení s přístrojem ProteOn XPR36
- kroky experimentu, typy čípů
- příklad měření a analýzy výsledků

Ultra Fast SDS PAGE

Materiál:

Aparatura MiniProtean (BioRad)

Precastovaný polyakrylamidový gel (BioRad)

10x TANK pufr (60,56 g Tris, 288,56 g glycine, 20 g SDS, ddH₂O do 2 l)

Proteinový marker PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Roztok proteinu (zásobní koncentrace 0,82 mg/ml)

Pufr (50 mM Na-fosfát, 50 mM NaCl, pH 7,0)

Postup:

Roztok proteinu nechte rozpustit na ledu.

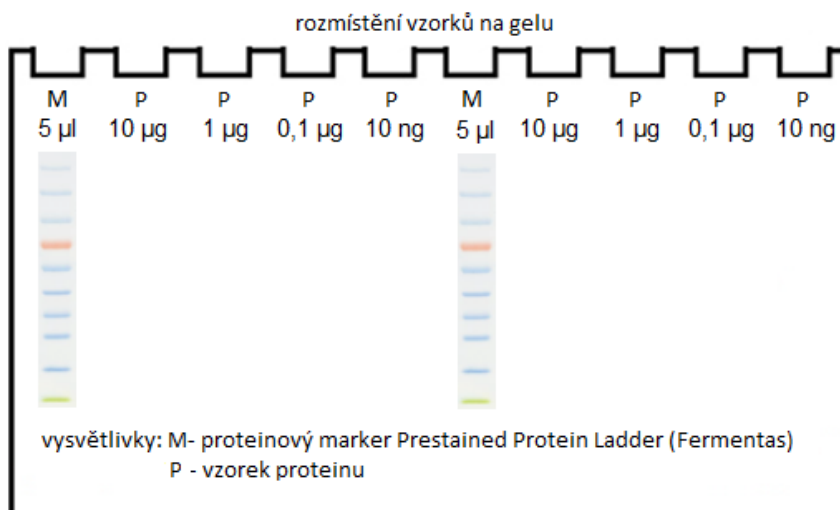
Připravte 100 μ l zředěného roztoku proteinu o výsledné koncentraci 8,2 μ g/ml.

Do jednotlivých jamek na gelu přijdou množství proteinu: 10 μ g, 1 μ g, 0,1 μ g a 10 ng. Budou třeba 4 opakování, tj. celkové množství každého namíchaného vzorku bude 4x větší. Pro vyšší dvě množství použijte zásobní roztok proteinu ($c = 0,82$ mg/ml), pro nižší dvě množství použijte naředěný roztok * (8,2 μ g/ml).

Nanášecí barvička je zásobní 4x koncentrovaná, výsledná koncentrace ve vzorku má být 1x. Doplňte tabulku a připravte vzorky.

Množství proteinu pro 4 opakování	Množství zásobního / zředěného roztoku proteinu [μ l] (*)	Přidaný pufr [μ l] do výsledného objemu vzorku 60 μ l	Nanášecí barvička [μ l]
40 μ g			
4 μ g			
0,4 μ g	*		
40 ng	*		

Gely vyjměte z obalu, odstraňte hřebínky a vložte do aparatury MiniProtean, zalijte 1x TANK pufr a naneste vzorky na oba gely v následujícím pořadí:



Aparaturu s gely umístěte do krabice s ledem, přiklopte víko.

Na zdroji nastavte metodu:

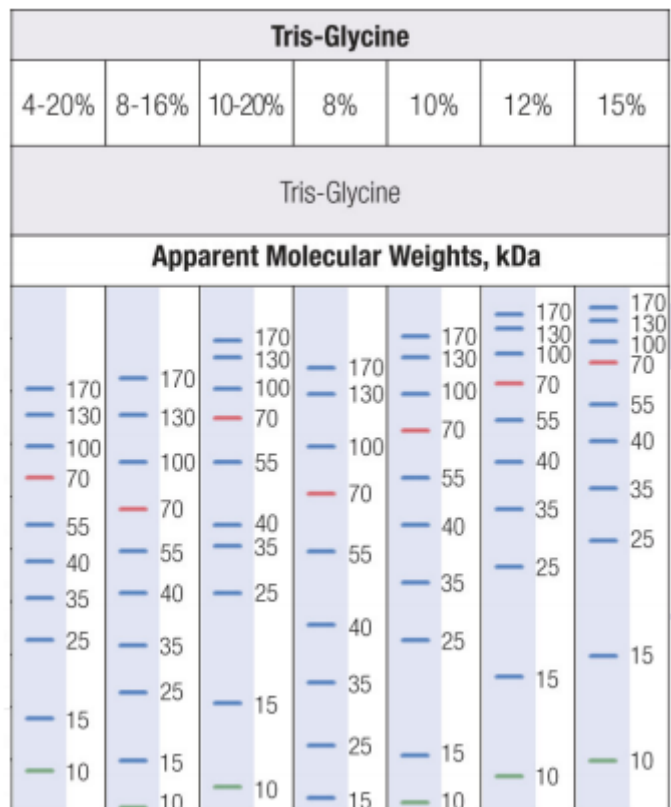
1. krok: 50 V 5 min

2. krok: 120 mA 30 min

Po skončení vyjměte gely ze skel (plastu), jeden rozřízněte na poloviny se stejnými vzorky, druhý ponechte vcelku.

Polovinu rozříznutého gelu vložte do folie a nechte barvit Coomassie BioSafe, max. po 30 minutách vylijte Coomassie a nechte gel odbarvit ve vodě.

Naskenujte obarvený gel na detekčním zařízení Gel Doc EZ Systém a vyzkoušejte automatickou detekci velikostního markeru.



Western blot + imunodetekce

Dry Western blot

Materiál:

TransBlot Turbo (BioRad)

předpřipravený komerčně dodávaný komplet filtračních papírů a membrány v pufru SDS Page se vzorky

Coomassie BioSafe (BioRad)

Ponceau S

Postup:

Vyjměte předpřipravené filtrační papíry s membránou z obalu (pravá strana balíčku), naskládejte do blotovacího zařízení

Vložte každý gel (jeden celý a jedna půlka) na membránu, překryjte zbylými filtračními papíry (levá strana balíčku)

Nastavte metodu Turbo - 1mini TGX gel – A run, B run

Po skončení otevřete víko, separujte jednotlivé vrstvy a vyjměte membrány.

Větší membránu opatrně rozstříhnete na dvě poloviny se stejnými vzorky.

Poloviny rozstřížené membrány položte na dvě různé plastové misky a zakápněte vodou.

Později: obarvěte jednu pomocí Ponceau Red a druhou pomocí Coomassie BioSafe.

Odbarvěte obě přiměřeně vodou.

Promývání membrán + inkubace v protilátkách

Materiál:

BenchPro™4100 Card Processing Station

Detekční systém LAS 3000

Promývací pufr (Wash): 1x TBST pufr (z 10x TBS + 0,1% Tween)

Blokační pufr: 5 g sušeného mléka + 100 ml TBST

Primární protilátka (1° antibody): anti-His (zředit 10 000x do 20 ml blokačního pufru)

Sekundární protilátka (2° antibody): anti-mouse (zředit 10 000x do 20 ml blokačního pufru)

Oplach (Rinse): ddH₂O

LumiGLO

Postup:

Připravte potřebné pufrы.

Protilátky naředte až 5 minut před skončením blotování!

Naplňte nádoby podle obrázku, zavřete zásuvku s roztoky (bez víček!), shora zasuněte kazetu až zacvakne (kazetu držte pouze na místě k tomu určeném)



Membránu umístěte do plastového držáku - nesmí vyčnívat a měla by být u spodního okraje držáku držák s membránou opatrně zasuněte 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:

LumiGLO: 1,9 ml ddH₂O + 50 µl LumiGLO reagent A + 50 µl Peroxide reagent B

„Complete“ vypustí poslední používaný roztok z kazety

Vytáhněte membrány v plastových držácích, vytáhněte kazety.

Na černý tácek položte folii a na ni položte membránu A, přelijte Lumiglo, po cca 1 minutě detekujte protein (LAS-3000):

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

Jak velký je používaný protein? Jakou má čistotu? Srovnajte výhody / nevýhody a detekční limity jednotlivých použitých metod vizualizace vzorku.