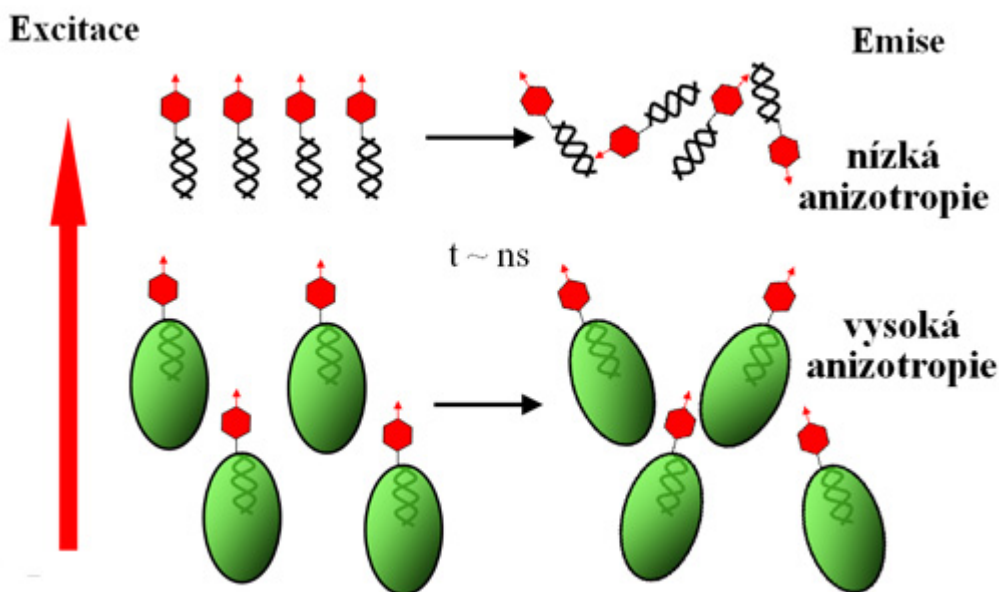


Studium vazby molekul za použití anizotropie fluorescence

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. Takto změna anizotropie popisuje míru interakce DNA a proteinu.



Materiál

- Fragment DNA (GTTTAGG)₄ značený Rhodaminem Red X ($\lambda_{\text{ex}} = 572$, $\lambda_{\text{em}} = 591$ nm)
- Roztok proteinu (Myb DNA vazebná doména, MW = 11 kDa)
- Pufř P (200 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný, pH 7.0)
- Spektrofluorometr vybavený polarizátory pro měření anizotropie fluorescence
- Mikrokvyeta s magnetickým míchadlem

Postup

Připravit 1.4 mL roztoku fluorescenčně značeného fragmentu o koncentraci 20 nM v pufřu P. Roztok důkladně promíchat a přenést do kyvety.

Změřit anizotropii fluorescence při $\lambda_{\text{ex}} = 572$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 591$ nm, šířka štěrbin 8/8 nm. Měření zopakujte 5X a zaznamenejte průměrnou hodnotu.

Připravit roztok 100 μ L proteinu o zásobní koncentraci 100 μ M v pufřu P a z něj naředit 200 μ L roztoku proteinu o koncentraci 10 μ M v P pufřu.

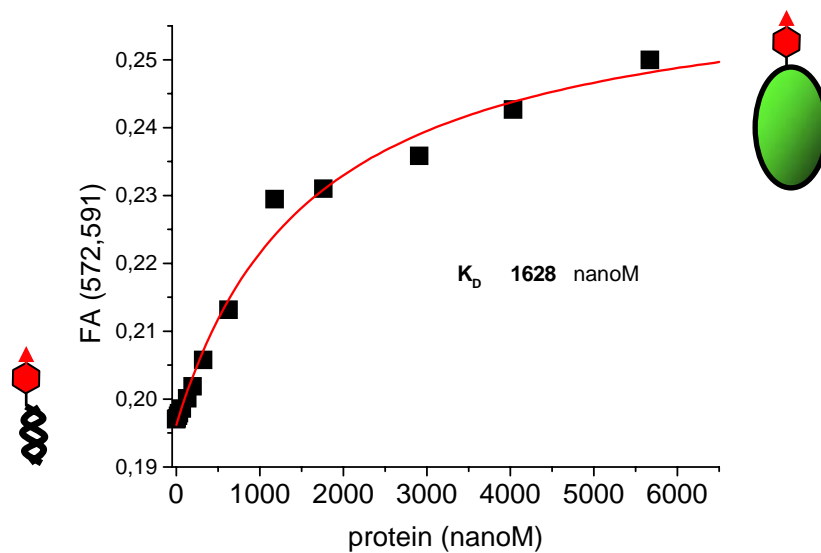
Postupně přidávat 10 μ M roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μ L a po každém přidávku měřit hodnotu anizotropie fluorescence.

Postupně přidávat po alikvotech **100** μM roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 20, 50, 80 μL a po každém přidavku měřit hodnotu anizotropie fluorescence.

Provést úpravu hodnot anizotropie na změnu objemu po přidavku roztoků proteinu.

Vynést závislost hodnot anizotropie fluorescence na koncentraci přidaného proteinu.

Analyzovat křivku vazby proteinu a stanovit disociační konstantu K_d .



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