

## Vizualizace makromolekul při elektroforetické separaci

Fluorescenční značení lze využít při sledování elektroforetické migrace makromolekul. V případě, že jsou protein a DNA naznačeny rozdílnou fluorescenční značkou, lze nezávisle detekovat polohu DNA a proteinů a sledovat jejich vzájemnou interakci.

### Materiál

- DNA fragment s navázanou fluorescenční značkou ( $\lambda_{EXmax}=572$  nm,  $\lambda_{EMmax}=595$  nm)
- protein s navázanou fluorescenční značkou ( $\lambda_{EXmax}=488$  nm,  $\lambda_{EMmax}=515$  nm)
- roztok akrylamidu 30% (akrylamid : bisakrylamid ~ 37:1)  
**Upozornění: Akrylamid je neurotoxin. Je nutno pracovat v rukavicích!**
- 5X TBE (450 mM Tris, 450 mM kys. boritá, 10 mM EDTA)
- 30% APS (ammonium persulfate)
- TEMED (N, N, N', N' – tetrametramethylethylendiamine)
- pufr B (20 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 1mM DTT, 5% glycerol)
- n-butanol nasycený vodou (45 mL n-butanolu smíchaný s 5 mL dest. vody)
- mikroskopavky
- 6x nanášecí pufr (0.15% orange G, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 60 mM EDTA)
- aparatura pro horizontální elektroforézu
- dokumentační systém LAS 3000

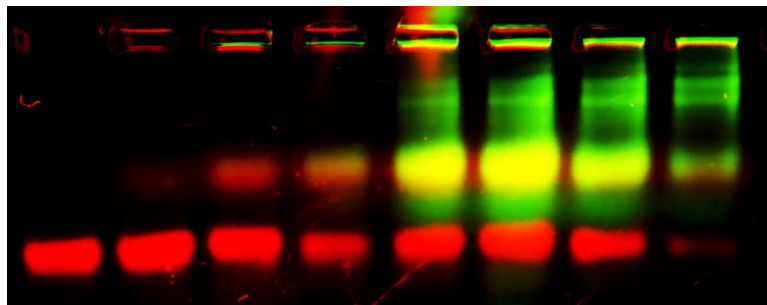
### Postup

1. Připravte směs pro horizontální akrylamidový gel tak, že smícháte odpovídající množství zásobního roztoku akrylamidu (neurotoxin!) a 5X TBE, tak aby výsledná koncentrace akrylamidu byla 7.5 % v 0.25X TBE. Dobře promíchejte. Přidejte 350 ul 30% APS a 23,45 ul TEMED. Opět dobře prodýchajte a nalijte do formy. Směs se po nalití do formy překryje vrstvou n-butanolu, aby mohlo dojít k polymeraci bez přístupu vzduchu. Nechte 1 hod. polymerizovat na stole.
2. Připravte zásobní roztok fluorescenčně značené DNA v pufru B tak, aby byla jeho koncentrace 0,5 pikomol/ $\mu$ L.
3. Připravte zásobí roztok fluorescenčně značeného proteinu v pufru B tak, aby byla jeho koncentrace 2 pikomol/ $\mu$ L.
4. Připravte vzorky do mikroskopavek podle následující tabulky bez přidavku nanášecího pufru:

vše v $\mu$ l	pouze DNA	DNA:protein										pouze protein
		1:2	1:4	1:6	1:8	1:10	1:12	1:14	1:16	1:18	1:20	
DNA (0,5 pikomol/ $\mu$ l)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
protein (2 pikomol/ $\mu$ l)	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	5
pufr B	8	7	6	5	4	3	2	1	-	-	-	5
6x nanášecí pufr	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2,2	2,4	2

5. Nechte 10 minut inkubovat za laboratorní teploty.

6. Sestavte aparaturu pro horizontální elektroforézu a naplňte ji 0.25X TBE pufrem.
  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. Spust'te elektroforézu při napětí 40V. Po 30 min. zvyšte napětí na 80V a nechte pokračovat další asi 2 hod.
  11. Detekujte fluorescenci značené DNA na dokumentačním systému s nastavením budícího záření na UV 312 nm DIA a detekčního filtru na 605nm DF40.
  12. Detekujte fluorescenci značeného proteinu na dokumentačním systému s nastavením budícího záření na BLUE 460 nm EPI a detekčního filtru na Y 515 nm -Di.
- Pozn. Detekci fluorescence lze provádět rovněž za použití fluorescenčního scanneru.
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.