

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 Rhodamin Red X (excitace 572 nm, emise 595 nm)
- protein s navázanou fluorescenční značkou Alexa Fluor 488 (excitace 496 nm, emise 519 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'-tetramethylethylendiamin)
- Fosfátový pufr (50 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný)
- ddH₂O
- n-butanol nasycený vodou (45 ml n-butanolu smíchaný s 5 ml ddH₂O)
- mikrozkušavky
- 6x nanášecí pufr (0.15% orange G, 60% glycerol, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 60 mM EDTA)
- aparatura pro horizontální elektroforézu
- fluorescenční scanner FLA-7000

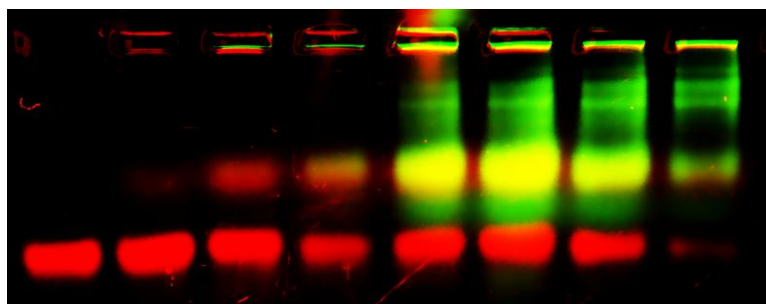
Postup

1. Připravte směs pro horizontální akrylamidový gel tak, že smícháte odpovídající množství zásobního roztoku akrylamidu (neurotoxin!), 5X TBE a ddH₂O, aby výsledná koncentrace akrylamidu byla 5 % v 0.25X TBE a celkový objem směsi byl 80 ml.
Jednotlivé složky přidávejte v pořadí:
ddH₂O, 5x TBE, dále 400 µl 30% APS a 26,4 µl TEMED a až nakonec 30% akrylamid. Dobře promíchejte, nalijte do formy a nasad'te hřebínek na 10 jamek. Směs se po nalití do formy přelije vrstvou n-butanolu, aby mohlo dojít k polymeraci bez přístupu vzduchu. Nechte 1 hodinu polymerizovat na stole.
2. Připravte roztok fluorescenčně značené DNA ve fosfátovém pufru tak, aby byla jeho výsledná koncentrace 1,5 pmol/µl (zásobní DNA: vysušených 30 pmol)
3. Ze zásobního roztoku protein o koncentraci 3,6 pmol/µl odeberte 10 µl (do mikrozkušavky číslo 9).
Připravte roztok fluorescenčně značeného proteinu ve fosfátovém pufru tak, aby byla jeho koncentrace 3 pmol/µl.
4. Připravte vzorky do mikrozkušavek podle následující tabulky bez přidavku nanášecího pufru:

zkumavka číslo:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	pouze DNA	DNA : protein								pouze protein
		1:2	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16	1:20	1:24	
DNA (1,5 pmol/μl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
protein (3 pmol/μl)	-	1	2	3	4	6	8	10	10*	1
fosfátový pufr	14	13	12	11	10	8	6	4	4	14
6x nanášecí pufr	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

* ze zásobního roztoku proteinu o koncentraci 3,6 pmol/μl

5. Nechte 10 minut inkubovat za laboratorní teploty.
6. Sestavte aparaturu pro horizontální elektroforézu a naplňte ji 0.25X TBE puforem (cca 1,5 l).
7. Ke každému vzorku přidejte 6x nanášecí pufr 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 [FITC].
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