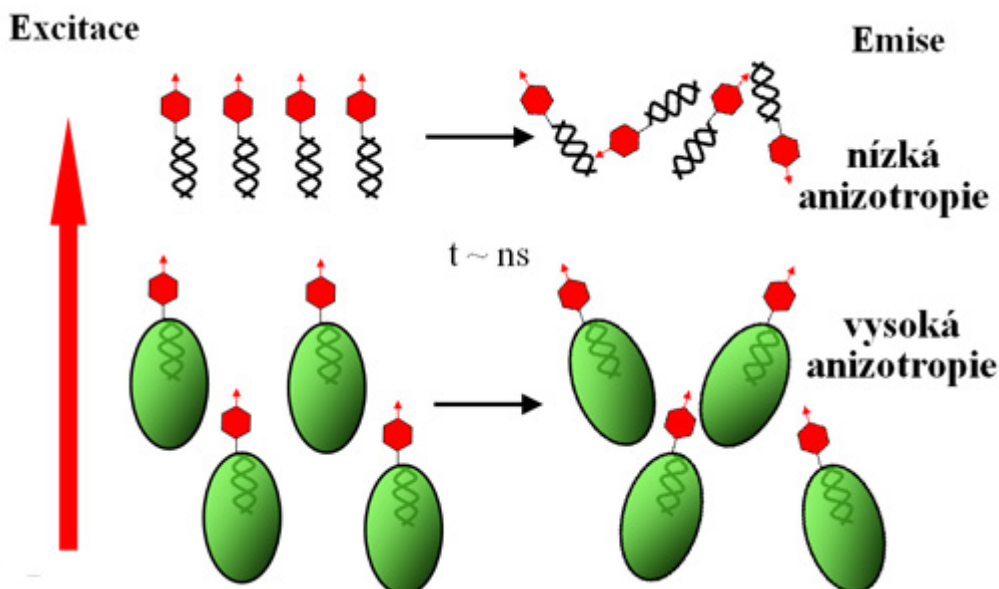


## Studium vazby molekul za použití anizotropie fluorescence

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.

Při titrování roztoku fluorescenčně značené DNA roztokem DNA-vazebného proteinu dochází k postupné vazbě molekul proteinu na vazebná místa jednotlivých molekul DNA a tedy k postupnému zvyšování anizotropie fluorescence. Protein se na vazebná místa na DNA váže až do okamžiku, kdy je koncentrace proteinu tak vysoká, že jsou všechny molekuly DNA obsazeny. V tomto momentě anizotropie fluorescence dosáhne maximální hodnoty a přestane se dále zvyšovat. Koncentrace proteinu, při které hodnota anizotropie fluorescence tvoří 50 % maximální hodnoty, se nazývá **disociační konstanta (Kd)**. Ta reprezentuje afinitu (sílu vazby) konkrétního proteinu k DNA. Studium změn Kd v závislosti např. na iontové síle či teplotě umožňuje získat cenné poznatky o povaze komplexu protein-DNA a o mechanismu, jakým spolu obě makromolekuly interagují.

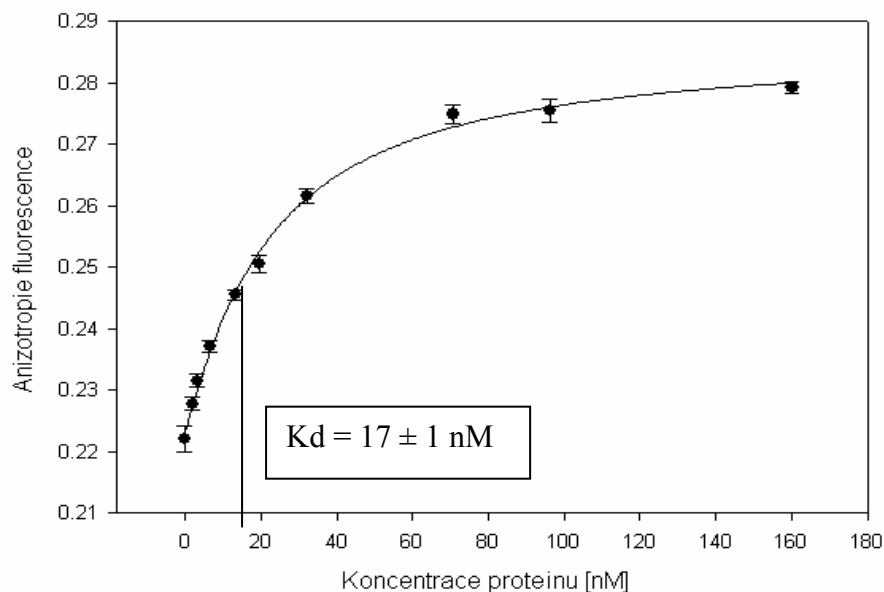


### Materiál

- 30 pmol vysušeného fragmentu DNA (GTTAGG)<sub>4</sub> značeného Rhodaminem Red X ( $\lambda_{\text{ex}} = 572$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 591$  nm)
- Roztoky proteinu (lidský telomer-vazebný protein TRF1, MW = 110 kDa) o koncentracích 1  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$
- Pufř P (20mM HEPES, 180mM KCl, 0,1mM EDTA, 3mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0)
- 1M DTT
- Spektrofluorometr vybavený polarizátory pro měření anizotropie fluorescence
- Mikrokvyeta s magnetickým míchadlem

## Postup

- 1) Resuspendovat vysušenou DNA v 1,5 ml pufru P a důkladně vortexovat. Výsledná koncentrace DNA bude 20nM.
- 2) Pufrem P naředit resuspendovanou DNA na 2nM, resp. 10nM roztok o objemu 1,5 ml. Přidat 1.5  $\mu$ l 1M DTT. Roztok přenést do kyvety. Kyvetu při manipulaci odzátkovávat jen na nezbytně dlouhou dobu, aby bylo zamezeno vnášení částic prachu do vzorku.
- 3) Na fluorimetru 5x změřit anizotropii fluorescence pomocí funkce „batch experiment“ a nastavení uloženém v souboru ./RedX\_titrator/p0.xml ( $\lambda_{ex} = 572$  nm,  $\lambda_{em} = 591$  nm, šířka štěrbin 8/8 nm). Hodnoty anizotropie zaznamenat do tabulky v software SigmaPlot.
- 4) Postupně přidávat 1  $\mu$ M roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 3, 5, 10, 20 a 50  $\mu$ l. Po každém přidavku 5x změřit hodnotu anizotropie fluorescence a zaznamenat do tabulky v software SigmaPlot.
- 5) Postupně přidávat 20  $\mu$ M roztok proteinu tak, aby celkový objem přidaného roztoku byl 3, 5, 10 a 20  $\mu$ l. Po každém přidavku 5x změřit hodnotu anizotropie fluorescence a zaznamenat v software SigmaPlot.
- 6) V software SigmaPlot provést úpravu hodnot anizotropie na změnu objemu po přidavku roztoků proteinu.
- 7) Pomocí software SigmaPlot vynést do grafu závislost korigovaných hodnot anizotropie fluorescence na koncentraci přidaného proteinu.
- 8) Pomocí software SigmaPlot analyzovat křivku vazby proteinu a stanovit disociační konstantu  $K_d$ .



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