

## 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)
- 5X TBE (450 mM Tris, 450 mM kys. boritá, 10 mM EDTA)
- pufr B (200 mM NaCl, 50 mM fosfát sodný pH 7.0)
- 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

Připravte směs pro horizontální akrylamidový gel tak, že smícháte odpovídající množství zásobního roztoku akrylamidu a 5X TBE, tak aby výsledná koncentrace akrylamidu byla 7.5 % v 0.25X TBE. Směs se po nalití do formy překryje vrstvou n-butanolu, aby mohlo dojít k polymeraci bez přístupu vzduchu. Nechte 1 hod. polymerizovat na stole.

Připravte zásobní roztok fluorescenčně značené DNA v pufru B tak, aby byla jeho koncentrace 2 pikomol/ $\mu$ L.

Připravte zásobí roztok fluorescenčně značeného proteinu v pufru B tak, aby byla jeho koncentrace 5 pikomol/ $\mu$ L.

Připravte vzorky do mikroskopavek podle následující tabulky bez přídavku nanášecího pufru:

vše v $\mu$ l	pouze DNA	DNA:protein										pouze protein
		1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:9	1:10	
DNA (2 pikomol/ $\mu$ l)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	-
protein (5 pikomol/ $\mu$ l)	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	5
pufr B (Na-fosfát pH 7, 200 mM NaCl)	7,5	6,5	5,5	4,5	3,5	2,5	1,5	0,5	2	1	/	5
6x nanášecí pufr	2	2	2	2	2	2	2	2	2,5	2,5	2,5	2

Nechte 10 minut inkubovat za laboratorní teploty.

Sestavte aparaturu pro horizontální elektroforézu a naplňte ji 0.25X TBE puftrem.

Ke každému vzorku přidejte 1/5 celkového objemu 6x nanášecího pufru podle tabulky.

Vložte gel do elektroforetické vany.

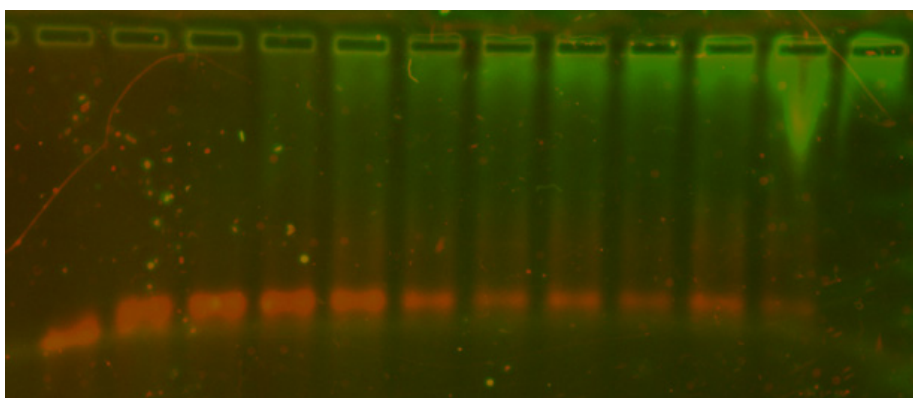
Naneste vzorky na gel v pořadí jako je v tabulce.

Spust'te elektroforézu při napětí 40V. Po 30 min. zvyšte napětí na 80V a nechte pokračovat další asi 2 hod.

Detekujte fluorescenci značené DNA na dokumentačním systému s nastavením budícího záření na UV 312 nm DIA a detekčního filtru na 605nm DF40.

Detekujte fluorescenci značeného proteinu na dokumentačním systému s nastavením budícího záření na BLUE 460 nm EPI a detekčního filtru na Y 515 nm -Di.

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.