

Anizotropie fluorescence

V této úloze bude demonstrováno měření interakce proteinu se značenou DNA metodou anizotropie fluorescence. Metoda je založena na změně rychlosti rotačního pohybu molekul značené DNA po excitaci lineárně polarizovaným světlem. Pokud je v roztoku pouze volná značená DNA, anizotropie fluorescence je relativně nízká díky rychlému rotování molekul. Po vazbě proteinu na DNA vzniká pomaleji se pohybující komplex a anizotropie fluorescence vzrůstá. Z jednotlivých bodů interakce je získána vazebná křivka a následně vyhodnocena vazebná afinita interakce.

Materiál

fluorescenčně značená dsDNA AlexaFluor 488 (vysušený alikvot, $n = 11,25$ pmol)

protein TRF2 ($c = 57$ μ M)

pufr 50 mM NaPi, 50 mM NaCl, pH 7,0


Kyveta

Spektrofluorometr FluoroMax-4

Postup

- Rozpusťte dsDNA AlexaFluor 488 ($n = 11,25$ pmol) v pufru do výsledné koncentrace 7,5 nM
- Do kyvety pipetujte 1400 μ l roztoku
- Změřte excitační spektrum dsDNA značené AlexaFluor 488 (pozn.: číslo v názvu fluoroforu odpovídá excitačnímu maximu volného fluoroforu) a odečtěte maximum
- Změřte emisní spektrum a odečtěte maximum
- Změřte anizotropii v jediném bodě udávaném maximy spekter (excitačního a emisního) a v magickém úhlu
- Přidávejte postupně 1, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 3 a 5 μ l roztoku proteinu (57 μ M) do kyvety a vždy změřte anizotropii při stejném nastavení
- Ze získaných bodů vytvořte vazebnou křivku a z ní vyhodnoťte disociační konstantu interakce protein-DNA

Spektrofluorometr: Program FluorEssence

Pro vybrání excitačního / emisního spektra: 

Nastavení pro měření excitačního spektra:

Záložka „Monos“:

- excitation: rozsah kolem předpokládané vlnové délky fluoroforu v kyvetě
- emission: předpokládaná emise fluoroforu v kyvetě
- slit (štěrbina): obojí 5 nm

Pozn. k nastavení štěrbin: pokud není křivka hladká nebo intenzita je příliš nízká (<100 000), tak rozšířit; pokud jsme získali příliš vysokou intenzitu (>2 000 000), tak zúžit

Záložka „Detectors“:

Signals:

S1

R1

Signal algebra: S1/R1 Add =>
 <=Remove S1, R1

RUN

[Nastavení pro měření emisního spektra:](#)

Záložka „Monos“:

- excitation: vlnová délka excitačního maxima stanovená v předchozím měření
- emission: rozsah vlnových délek začínající cca 15 nm od zjištěného excitačního maxima
- slit (štěrbina): obojí 5 nm

Záložka „Detectors“:

Signals:

S1

R1

Signal algebra:

S1/R1 Add=>
<=Remove S1, R1

RUN

[Uložení měření:](#)

Po prvním měření vyskočí okno na zadání názvu → Browse → rozkliknout složku Cvičení 2017 → jako název souboru napsat označení skupiny

Po dokončení měření kliknout na ikonu diskety a tím uložit celé měření.

Pro vybrání měření Anizotropie v „single point:



[Nastavení pro měření anizotropie fluorescence](#)

Záložka „Monos“:

- excitation: odečtená hodnota maxima excitačního spektra
- emission: odečtená hodnota maxima emisního spektra
- slit settings (štěrbiny): pro excitační i emisní 8-10 nm
- experiment settings: Maximum trials – 3, Target Std. Error – 10

Záložka „Detectors“:

Formulas

- Anisotropy
- S1_vm

RUN

Pro zopakování měření podle posledního aktuálního nastavení:

