

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 (ROX) (excitace 572 nm, emise 595 nm)
- protein s navázanou fluorescenční značkou Alexa Fluor 488 (excitace 496 nm, emise 519 nm)
- roztok akrylamidu 40% (akrylamid : bisakrylamid ~ 37,5:1)
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'-tetramethylethyldiamin)
- 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 Typhoon FLA-9500

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 4 % v 0.25X TBE a celkový objem směsi byl 100 ml.

Jednotlivé složky přidávejte v pořadí:

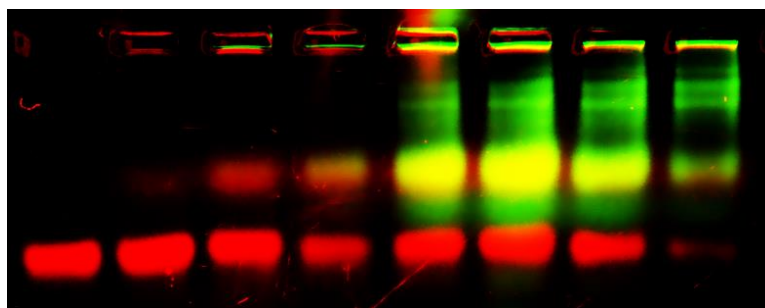
ddH₂O, 5x TBE, dále 400 µl 30% APS a 40 µl TEMED a až nakonec 40% akrylamid.

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 0,5 pmol/µl (zásobní DNA: 1 vysušený alikvot po 15 pmol)
3. Připravte roztok fluorescenčně značeného proteinu ve fosfátovém pufru tak, aby byla jeho koncentrace 2 pmol/µl. (zásobní protein: přibližně 40 pmol/µl – bude upřesněno)
4. Připravte vzorky do mikrozkušavek podle následující tabulky v pořadí: fosfátový pufr, protein, DNA, nanášecí pufr

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 (0,5 pmol/μl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
protein (2 pmol/μl)	-	1	2	3	4	6	8	10	12	1
fosfátový pufr	13	12	11	10	9	7	5	3	1	14
6x nanášecí pufr	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

5. Nechte 10 minut inkubovat za laboratorní teploty.
6. Sestavte aparaturu pro horizontální elektroforézu a naplňte ji 0.25X TBE pufrem (přípravte 2 litry pufre).
7. Odstraňte hřebínek a vložte gel do elektroforetické vany.
8. Naneste vzorky na gel v pořadí jako je v tabulce.
9. Spusťte elektroforézu při napětí 40 V. Po 30 minutách zvyšte napětí na 50 V a nechte pokračovat dalších 60 minut.
10. Detekujte fluorescenci značené DNA na fluorescenčním scanneru s nastavením budícího záření a detekčního filtru na Rhodamin Red X [ROX].
11. Detekujte fluorescenci značeného proteinu na fluorescenčním scanneru s nastavením budícího záření a detekčního filtru na Alexa fluor 488 [Alexa488].
12. 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