

Vzhledem k promíchávání suspenze a její tendenci k usazování je třeba nalézt vhodný poměr sklonu zkumavek a rychlosti otáček v závislosti na použité třepačce. Také použití zkumavek s kulatým dnem se ukázalo výhodnější než použití zkumavek se dnem špičatým. Ty jsou ale naopak lepší při pozdějším odebrání spodní organické fáze, obsahující produkty.

Při odebrání spodní organické fáze se s výhodou uplatňuje následující postup: Nejprve se odebere veškeré množství spodní fáze do mikrozkušavky a následně se odebere přesně 950 µl do dalších mikrozkušavky. Přímé odebrání přesného množství spodní fáze je obtížné z důvodu protékání organické fáze.

Pokud není možné provést celý pokus v jednom dni, dá se přerušit po přidání KCl nebo po vysušení vakuovým koncentrátorem (zkumavky se umístí do -20 °C).

#### Finanční a časová náročnost

Cena jedné desky pro HP-TLC je 160 Kč, přičemž na ni lze nanést až 10 vzorků. Cena fluorescenčního substrátu se pohybuje v rozmezí 3,50 - 35 Kč na vzorek, v závislosti na typu fluorescenčního substrátu. Ostatní investice jsou v rámci běžného laboratorního vybavení.

Celý pokus lze provést během 8 - 9 hodin.

#### Literatura

- |                                                                                          |                                                                                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Heller, R. 1953. - Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg. <b>14</b> : 1.                         | Opatrný, Z., Opatrná, J. 1976. - Biol. Plant. <b>18</b> : 381.                     |
| Chapman, K.D. 1998. - Trends Plant Sci. <b>3</b> : 419.                                  | Paul, R.U., Holk, A., Scherer, G.F.E. 1998. - Plant J. <b>16</b> : 601.            |
| Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. 1999. - Biochim. Biophys. Acta <b>1439</b> : 175. | Pejchar, P. 2002. - Diplomová práce. VŠCHT, Praha                                  |
| Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S. 1992. - Int. Rev. Cytol. <b>132</b> : 1.            | Scherer, G.F.E., Paul, R.U., Holk, A. 2000. - Plant Growth Regul. <b>32</b> : 123. |

### Sledování interakcí DNA s proteiny pomocí elektroforézy v agarosových gelech s následným *western* přenosem a imunodetekcí

HANA PIVOŇKOVÁ, KATEŘINA NĚMCOVÁ, MIROSLAV FOJTA

Laboratoř biofyzikální chemie a molekulární onkologie, Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, 612 65 Brno; (tel.: 541 517 197, e-mail: hapi@ibp.cz)

#### Úvod

Interakce bílkovin s DNA hrají klíčové role v regulaci důležitých procesů v buňkách, včetně replikace DNA, transkripce, oprav DNA apod. Mezi významné regulační proteiny interagující specifickým způsobem s DNA patří nádorový supresor protein p53 (El-Deiry 1998, Apella a Anderson 2001). Tento protein, skládající se z 393 aminokyselinových zbytků, se váže na DNA jako tetramer jednak sekvenčně specificky (prostřednictvím své centrální domény), jednak je schopen rozpoznávat určité struktury DNA (C-koncovou

i centrální doménou). Tyto aktivity proteinu p53 jsou regulovány prostřednictvím jeho posttranslačních modifikací (Apella a Anderson 2001, Gohler *et al.* 2002).

Pro sledování interakcí bílkovin s DNA se často používají elektroforetické metody, založené na změně elektroforetické pohyblivosti molekul DNA po jejich vazbě na molekulu proteinu (EMSA - *electrophoretic mobility shift assay*). Obvykle se přitom využívá specificky navržených oligonukleotidů (představujících vazebná místa pro zkoumaný protein), často radioaktivně značených, a elektroforézy v polyakrylamidových gelech. V naší laboratoři byla před několika lety objevena schopnost proteinu p53 vázat se selektivně na nadšroubovicovou DNA (scDNA) (Paleček *et al.* 1997, Brázdová *et al.* 2002). Abychom mohli účinně sledovat interakce proteinu p53 s poměrně velkými molekulami plasmidové scDNA, využíváme horizontální elektroforézu v agarosovém gelu, který má vhodnou velikost pórů. Ukázali jsme, že tato technika je vhodná i pro sledování vazby proteinu p53 na specifické sekvence uvnitř dlouhých lineárních fragmentů DNA (stovky až tisíce párů bází); takovéto molekuly mnohem lépe napodobují situaci v buňkách než krátké oligonukleotidy (obvykle desítky párů bází). Následný *western* přenos a imunodetekce bílkoviny umožňuje spolehlivou identifikaci nukleoproteinových komplexů v gelu.

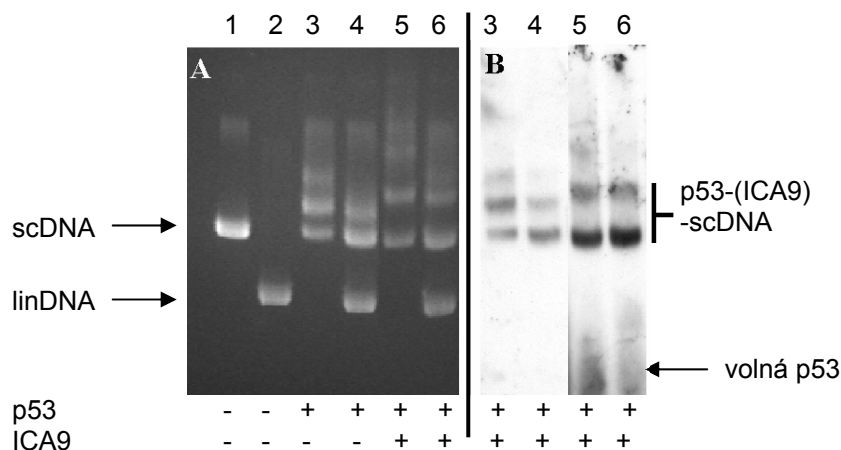
### Podstata metody

Podstatou prvního kroku metody je změna elektroforetické pohyblivosti molekul DNA v agarosovém gelu v důsledku tvorby komplexů s bílkovinou (v tomto případě s proteinem p53). Protože nukleoproteinový komplex má vyšší molekulovou hmotnost než samotná DNA, putuje v gelu pomaleji, což se po obarvení DNA ethidiumbromidem projeví vznikem retardovaných proužků (obr. 1, 2). Pokud se může na jednu molekulu DNA navázat více molekul proteinu, objeví se „žebříček“ proužků odpovídajících komplexům o různé stechiometrii p53:DNA (obr. 1). V případě, že se na komplex p53-DNA naváže protilátka rozpoznávající protein p53, ještě více se sníží pohyblivost komplexů (obr. 1, dráhy 5,6). Druhý krok metody je založen na vakuovém přenosu (*blotting*) komplexů z agarosového gelu na nitrocelulózovou membránu. Molekuly proteinu p53 zakotvené na membráně jsou poté detegovány pomocí protilátek (jako detekční metodu využíváme tzv. zesílenou chemiluminiscenci, kdy sekundární protilátka je značena peroxidasou katalyzující přeměnu substrátu vedoucí k emisi světla, které je zachyceno na fotografickém filmu). Srovnáním polohy proužků DNA (obarvené ethidiumbromidem v gelu) a proužků p53 (zviditelněné imunochemickou metodou) je možno přesně identifikovat komplexy p53-DNA (obr. 1, 2). Přidáním kompetitorové DNA (např. nespecifické lineární DNA) je možno odlišit nespecifickou interakci proteinu s DNA od jeho vazby na specifickou sekvenci (p53CON, obr. 2) či strukturu DNA (scDNA, obr. 1).

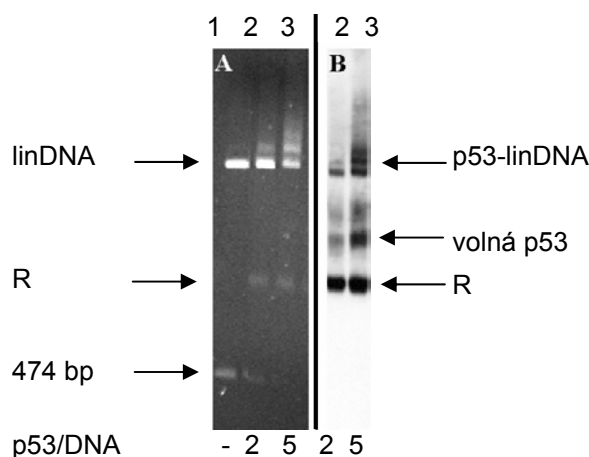
### Pracovní postup

#### Příprava DNA a proteinu p53

Ke studiu interakcí protein-DNA byla využita nadšroubovicová DNA (plasmid pBSK<sub>(-)</sub>) a fragment DNA z plasmidu pPGM1 o velikosti 474 bp (vyštěpený pomocí restriktasy *Pvu* II, Takara), který obsahuje tzv. specifické vazebné místo pro protein p53 (p53CON) (Paleček *et al.* 1997). Kompetitorová nespecifická lineární DNA byla získána štěpením plasmidu pBSK<sub>(-)</sub> restrikční endonukleasou *Sma*I (Takara).



Obr. 1. Vazba proteinu p53 na nadšroubovicovou DNA v přítomnosti kompetitorové lineární DNA a monoklonální protilátky ICA9. (A) Gel barvený ethidiumbromidem a (B) blot gelu: (dráha 1) kontrolní nadšroubovicová DNA (scDNA); (dráha 2) kontrolní lineární DNA; (dráhy 3 - 6) vazba proteinu p53 (*wild type*) na scDNA v přítomnosti kompetitorové lineární DNA (dráhy 4 a 6) a monoklonální protilátky proti p53 ICA9 (dráhy 5 a 6). Poměr p53/DNA byl 5/1. Vzorky byly inkubovány v prostředí 50 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 0,01 % Triton X-100, 2 mM DTT (pH 7,8) při 0 °C po dobu 30 minut. Vzorky s protilátkou ICA9 byly před přidáním DNA inkubovány při 0 °C po dobu 20 minut za stejných podmínek. Pozice proužků proteinu na blotu odpovídá pozici retardovaných proužků v gelu. Více podrobností viz text.



Obr. 2. Vazba proteinu p53 na fragmenty DNA pPGM1 o velikosti 474 bp v přítomnosti kompetitorové lineární DNA. (A) Gel barvený ethidiumbromidem a (B) blot gelu: (dráha 1) kontrolní DNA; (dráha 2) poměr p53/DNA byl 2 : 1; (dráha 3) poměr p53/DNA byl 5 : 1. Vzorky byly inkubovány v prostředí 50 mM KCl, 5 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, 0,01 % Triton X-100, 2 mM DTT (pH 7,8) při 0 °C po dobu 30 minut. Pozice proužků proteinu na blotu odpovídá pozici retardovaných proužků v gelu. Více podrobností viz text.

Protein p53 (*wild type*) byl exprimován v bakteriálních buňkách (*Escherichia coli* BL/DE3 obsahující pT7-7 Hup53), které byly pěstovány při 20 °C s využitím dvoustupňové indukce, aby se omezila agregace proteinů, a izolován podle protokolu (Hupp *et al.* 1992). Koncentrace proteinu byla zjištěna denzitometricky z SDS-PAGE obarveného pomocí Coomassie Blue R-250. Jako standard pro určení koncentrace proteinu p53 byl na gel nanesen protein BSA (hovězí sérový albumin).

#### Tvorba komplexů

200 ng scDNA (obr. 1) nebo 35 ng fragmentu pPGM1 (obsahující p53CON, obr. 2) a 200 ng kompetitorové lineární DNA bylo smícháno s proteinem p53 o různé koncentraci (poměr p53/DNA byl 2 - 5) a směs byla ponechána 30 min na ledové lázni. Protein p53 byl před tím inkubován 15 minut při 0 °C s 2 mM DTT ve vazebném pufru (5 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 0,01 % Triton X-100, pH 7,6). V některých případech byl protein ještě před přidáním DNA 20 minut inkubován s monoklonální protilátkou ICA-9 (10 µg.ml<sup>-1</sup>).

#### Elektroforéza

Do vzorků byl přidán nanášecí pufr (0,25 % bromfenolová modř, 0,25 % xylene cyanol, 40 % sacharosa) a vzorky byly naneseny na 1 - 1,3 % agarosový gel v 0,33 × TBE pufru (30 mM Tris, 30 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,7 mM EDTA, pH 8,0). Elektroforéza probíhala 3 - 10 hodin při 4 °C při napětí 120 V. Hustota gelu a doba trvání je závislá na typu použité DNA (např. celý plasmid vyžaduje delší elektroforézu než krátký fragment). Gel byl obarven ethidiumbromidem a snímán dokumentačním systémem s CCD kamerou.

#### Western přenos a imunodetekce

Gel byl zpracován ve vakuovém přenosovém systému (1,5 hodiny, podtlak 80 mPa) nitrocelulosovou membránou BioTrace NT PALL v prostředí 3 M NaCl s 0,3 M citrátem sodným (10×SSC). Membrána byla poté inkubována 45 minut s 5 % mlékem v 1× PBS (0,14 M NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). V dalším kroku byla do mléka přidána myší primární monoklonální protilátka proti p53 DO-1 (obr. 2) nebo králičí primární polyklonální protilátka CM1 (obr. 1) zředěné na určitou koncentraci, která byla empiricky zjištěna z kontrolních experimentů. Po 2 hodinách byla membrána 4 × po pěti minutách promyta v PBST (PBS, 0,05 % Tween 20). Komplex protein-primární protilátka byl rozpoznán sekundární protilátkou *anti-mouse* IgG nebo *anti-rabbit* IgG konjugovanou s peroxidasou. Tato protilátka byla ředěna 5% mlékem v PBS v poměru 1 : 1 000 až 1 : 10 000. Následovalo opět promytí v PBST.

Vlastní detekce proteinu byla provedena pomocí zesílené chemiluminiscence (ECL). Membrána byla vložena do filmové kazety, převrstvena ECL detekčními roztoky 1 a 2 (Amersham), smíchanými v poměru 1 : 1, překryta fólií a rentgenovým filmem (v temné komoře). Expozice trvala 1 hodinu. Poté byl RTG film vyvolán v pozitivní vývojce a ustálen v kyselém ustalovači.

Z výsledků je patrné, že protein p53 (*wild type*) se v přítomnosti kompetitorové lineární DNA přednostně váže na nadšroubovicovou DNA (obr. 1) a na fragmenty, které obsahují specifické vazebné místo (p53CON) (obr. 2).

### Zhodnocení metody

Tato metoda umožňuje velmi snadno a přesně sledovat interakci různých typů DNA s normálními i mutovanými proteiny, v závislosti na přidávku redukčních činidel (dithiothreitol), oxidačních činidel (diamid) (Fojta *et al.* 1999) nebo specifických monoklonálních protilátek (Brazda *et al.* 2000).

Další výhodou tohoto postupu je, že nemusíme používat radioaktivní značení DNA, čímž šetříme jak své zdraví, tak finanční prostředky.

Experimenty obvykle nevyžadují náročnou optimalizaci.

Časová náročnost závisí na velikosti molekul DNA použité v experimentu (délka elektroforézy) a na vlastnostech primární protilátky (imunodetekční krok; celkem 10 až 48 hodin).

Kromě základního laboratorního vybavení jsou zapotřebí elektroforetické aparatury pro agarosovou a polyakrylamidovou gelovou elektroforézu, chlazená centrifuga, FPLC pro izolaci proteinu, vakuový přenosový (blotovací) systém, kazety na fotografické snímání membrán, UV transiluminátor s detekčním systémem nebo fotoaparát, počítač (s programem Image-Quant umožňujícím kvantitativní vyhodnocení obrázků).

Z nezbytných chemikálií jsou finančně náročnější primární a sekundární protilátky a roztoky pro ECL. Z dalšího potřebného vybavení jsou poměrně drahé nitroceluloseové membrány a soupravy pro izolaci DNA.

### Literatura

- Apella, E., Anderson, C. W. 2001. - Eur. J. Biochem. **268**: 2764.
- Brazda, V., Palecek, J., Pospisilova, S., Vojtesek, B., Palecek, E. 2000. - Biochem. Biophys. Res. Commun. **267**: 934.
- Brazdova, M., Palecek, J., Cherny, D. I., Billova, S., Fojta, M., Pecinka, P., Vojtesek, B., Jovin, T.M., Palecek, E. 2002. - Nucleic Acids Res. **30**: 4966.
- El-Deiry, W. S. 1998. - Cancer J. **11**: 229.
- Fojta, M., Kubicarova, T., Vojtesek, B., Palecek, E. 1999. - J. Biol. Chem. **274**: 25749.
- Gohler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., Deppert, W. 2002. - J. Biol. Chem. **277**: 41192.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P. 1992. - Cell **71**: 875.
- Palecek, E., Vlk, D., Stankova, V., Brazda, V., Vojtesek, B., Hupp, T. R., Schaper, A., Jovin, T. M. 1997. - Oncogene **15**: 2201.

**Poděkování.** Práce byla financována granty GAČR 204/02/0734, IGA MZ NC/7574 – 3 a Z 5004920.