

MODERNÍ TECHNIKY STUDIA BUŇKY

2. MOLEKULÁRNÍ PRÓBY A ZNAČKY

Mgr. Aneta Vrzalová, Ph.D.

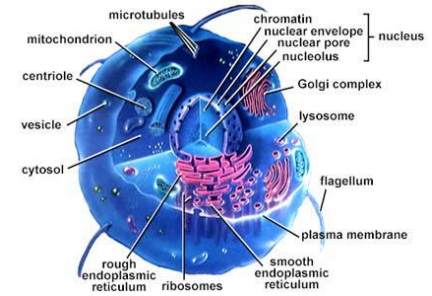
Katedra buněčné biologie a genetiky

Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

- ÚVOD DO FLURESCENČNÍCH TECHNIK
- CDNA SONDY – NORTHERN/SOUTHERN BLOTING
- FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET)
- GENE REPORTER ASSAYS
- ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

Důvody pro použití značek a sond:

- zvýšení citlivosti
- získání informace o koncentraci analytu, o struktuře látky, o funkci molekuly v systému... (*In vivo, in vitro*)



SONDY

- Fluorescenční sondy - jsou vnější fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou **NEKOVALENTNĚ** a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti
- Lokalizace cíle – životnost buněk, proliferace a funkce, studium neurotransmiterových receptorů a iont. kanálů, transdukce signálu, reaktivní kyslík, indikátory iontů, pH, membránový potenciál
- Specifický fragment označené nukleové kyseliny (DNA microarrays)
- Radioaktivně nebo chemicky značené

ZNAČKY (TAGY)

- jsou vnější (extrinsic fluorescence) fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám vážou **KOVALENTNÍ** vazbou
- Usnadnění orientace a identifikace polohy, pohybu apod.
- Značení peptidů, proteinů, protilátek, antigenů, enzymů, NK, membrán, buněk, tkání..



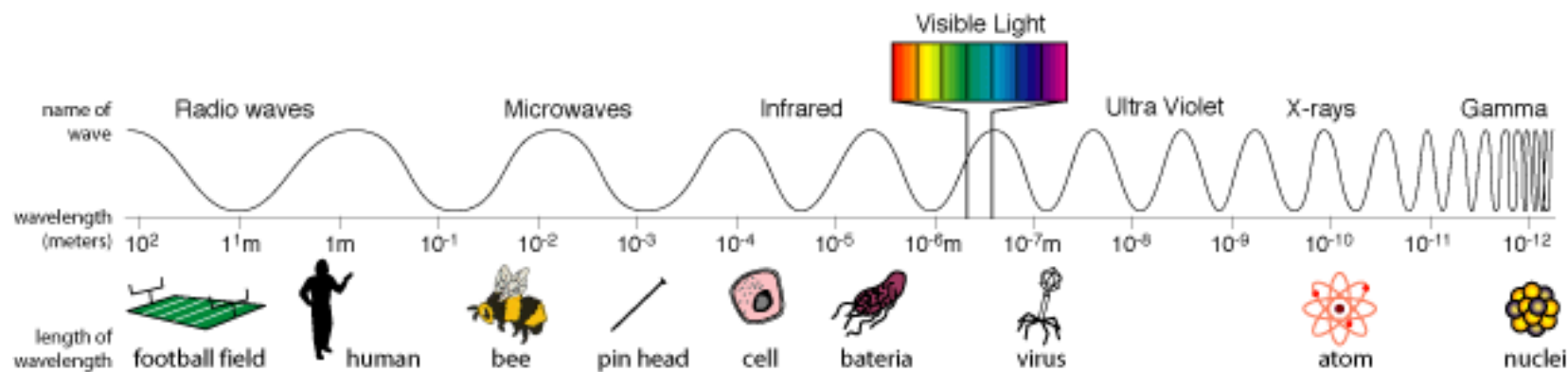
LUMINESCENCE

1889 E.WIEDEMANN

„ Spontánní záření tělesa, představující přebytek nad teplotním zářením, které je charakterizováno dozníváním, jehož trvání značně převyšuje periodu světelných kmitů“

- dlouhá, ale konečná doba trvání
- excitace a emise jsou odděleny přechodovými ději a stavy

Elektromagnetické spektrum



V roce 1865 odvodil J.C.Maxwell teorii, že světlo je jednou z forem elektromagnetické energie, která se šíří ve formě vln

Fotochemie - stavy s vyšší energetickou hladinou (excitované stavy) a jejich přechod zpátky na základní hladinu.
Základním principem fotochemie je absorpce světla (fotonu) látkou a následná reakce nebo změna elektronového stavu molekuly.

VNĚJŠÍ A VNITŘNÍ LUMINISCENCE

VNITŘNÍ/intrinsic (nativní luminiscence) – molekuly lze stanovit bez výrazného zásahu do sledovaného systému, zpravidla aromatické látky

VNĚJŠÍ/extrinsic luminiscence – do sledovaného systému přidáme fluoreskující činidlo(barvivo), jehož fluorescence bude závislá na koncentraci analytu, případně se na něj naváže

Class	Compounds ^a
aromatic amino acids	phenylalanine (F) tyrosine (F) tryptophan (F, P)
vitamins	vitamin A (F) vitamin B ₂ (F) vitamin B ₆ (F) vitamin B ₁₂ (F) vitamin E (F) folic acid (F)
catecholamines	dopamine (F) norepinephrine (F)
pharmaceuticals and drugs	quinine (F) salicylic acid (F, P) morphine (F) barbiturates (F) LSD (F) codeine (P) caffeine (P) sulfanilamide (P)
environmental pollutants	polycyclic aromatic hydrocarbons: pyrene (F) benzo[a]pyrene (F) organothiophosphorous pesticides (F) carbamate insecticides (F) DDT (P)

TYPY LUMINISCENCE

Ke vzniku luminiscence je třeba dodat látce energii v libovolné podobě, kromě energie tepelné

Druh budící energie	Luminiscence
Chemická	Chemiluminiscence, bioluminiscence
α -, β -, γ -, záření	Radioluminiscence, scintilace
RTG záření	Roentgenoluminiscence
UV-VIS záření	Fotoluminiscence (fluorescence, fosforescence)
Elektrická	Elektroluminiscence (galvanoluminiscence)
Mechanická	Triboluminiscence, krystaloluminiscence
Ultrazvuk	Sonoluminiscence
Katodové záření	Katodoluminiscence (TV obrazovka, oscilograf)

Fotoluminiscence – luminiscence je vyvolána elektromagnetickým zářením (např. v případě zářivky)

Elektroluminiscence – LED dioda, reklamní panely, nouzové osvětlení

Chemiluminiscence – luminiscence je vyvolána chemickou reakcí (patří sem i bioluminiscence, kdy je emise světelného záření vytvořena živými organismy)

Radioluminiscence – luminiscence je vyvolána působením jaderného záření (osvětlení hodinek – radiová pasta, tritium, luminova)



FOTOLUMINISCENCE

- vyzařování světla po ozáření jiným elektromagnetickým zářením
- Stokesův zákon: vlnová délka luminiscenční emise při fotoluminiscenci je větší nebo rovna vlnové délce excitačního světla

$$\lambda_{\text{ex}} \leq \lambda_{\text{em}}$$

- Podle průběhu mluvíme o:

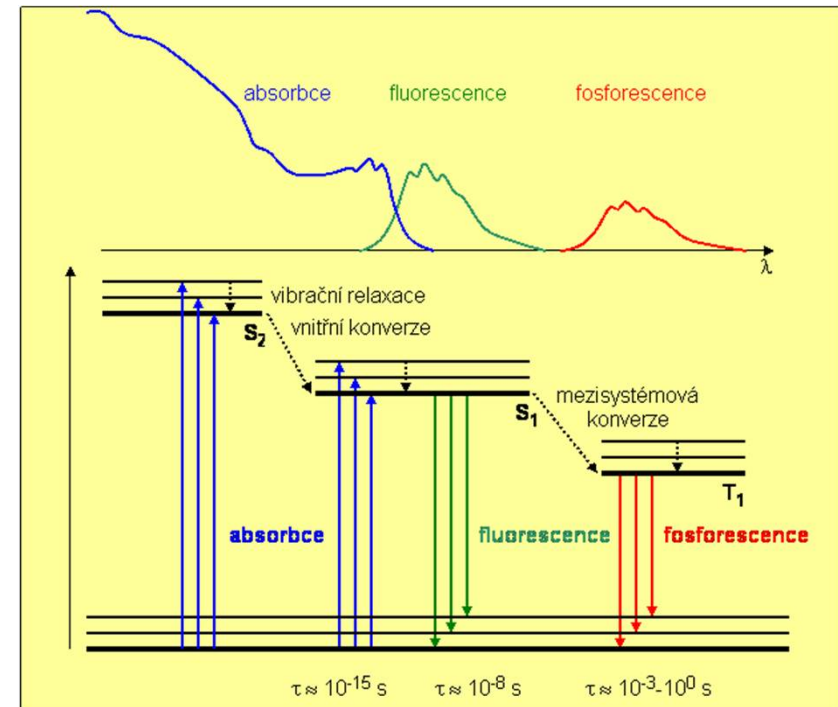
FLUORESCENCI

(nastává bezprostředně po nabuzení 10^{-6} s)

FOSFORESCENCI

(probíhá postupně – $10^{-3} - 10^3$ s)

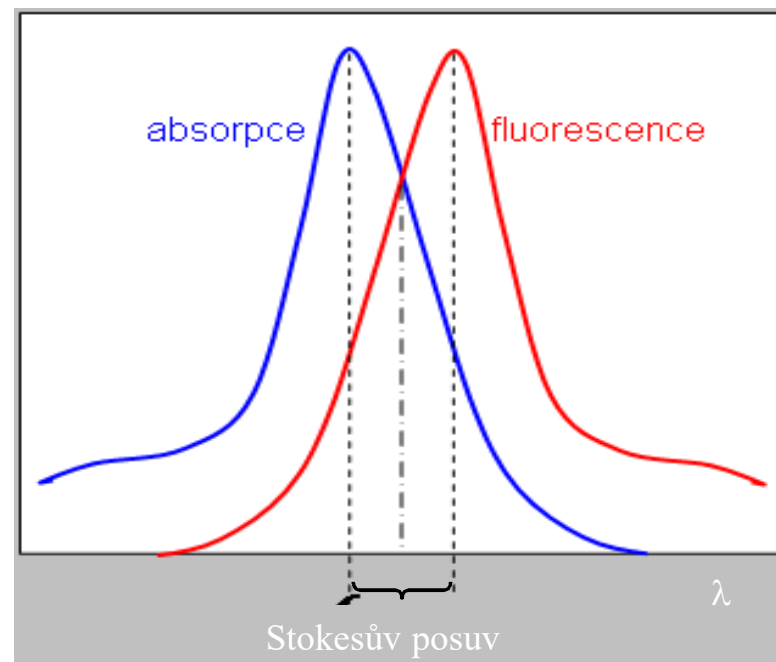
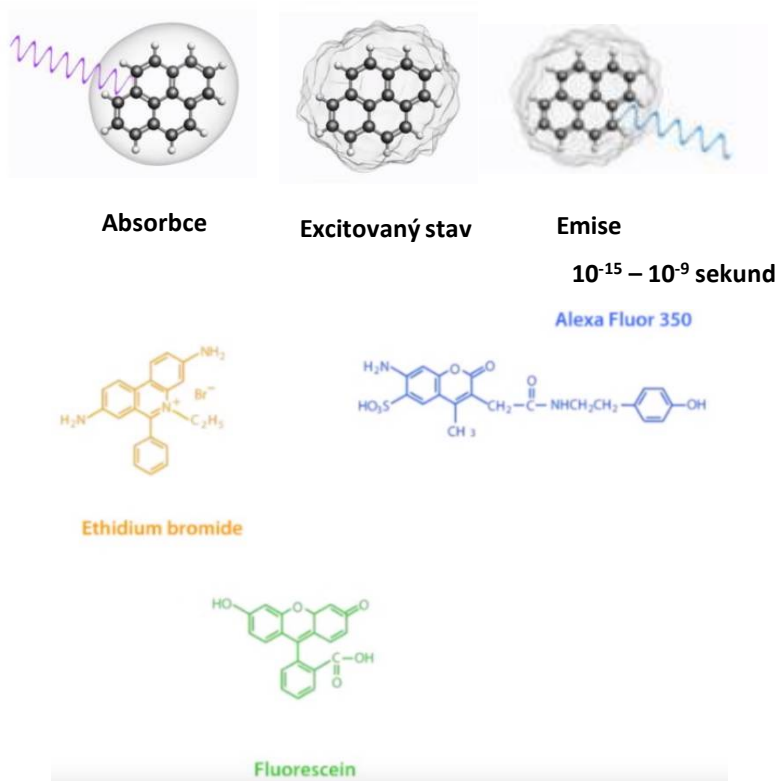
Vzniká excitací atomu působením jiného záření, elektronů apod. a následným návratem atomu do základního stavu, čímž dojde k vyzáření fotonu.



Emitované záření má větší vlnovou délku a tudíž nižší energii

FLUORESCENCE

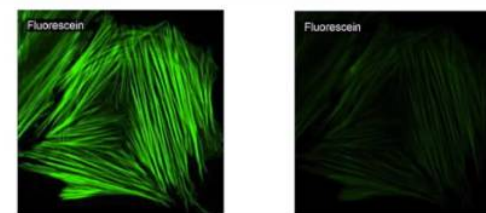
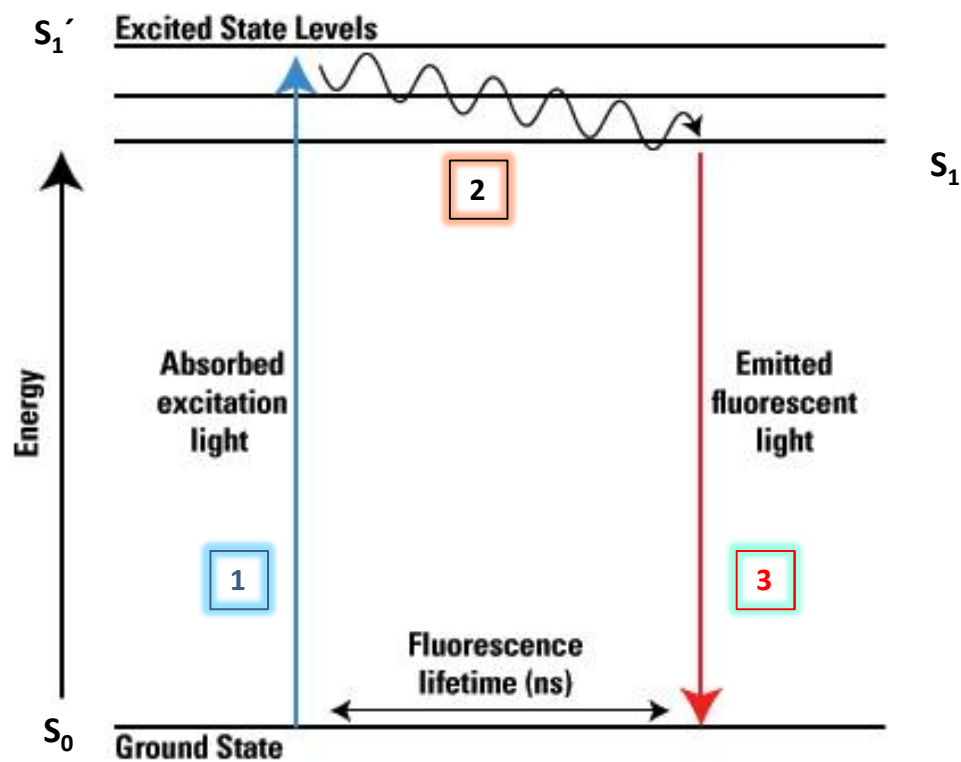
- Citlivost, rychlá odpověď, selektivita
- Výsledek 3 fázového procesu probíhající ve fluoroforech (polyaromatické uhlovodíky nebo heterocykly)



$$E = h \cdot c / \lambda$$

Fluorescence

- 1. EXCITACE
- 2. NEZÁŘIVÝ PŘECHOD (METASTABILNÍ HLADINA)
- 3. EMISE



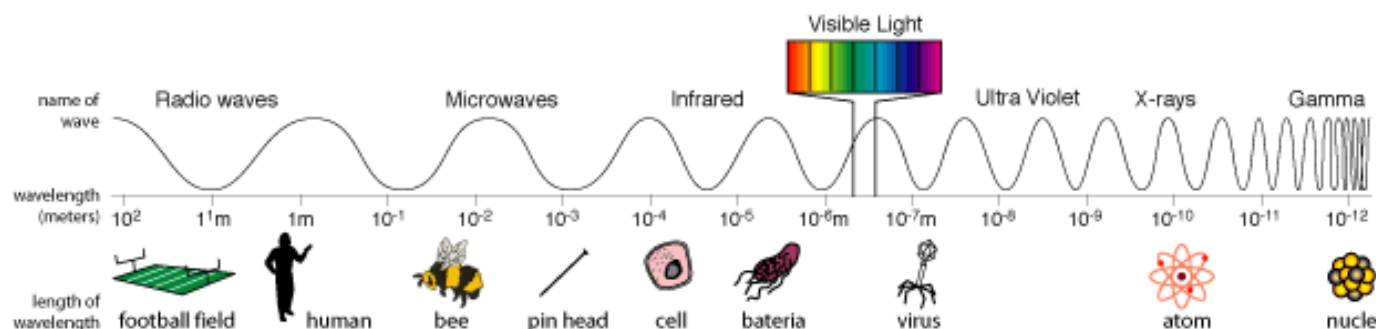
Před

Po 15 s

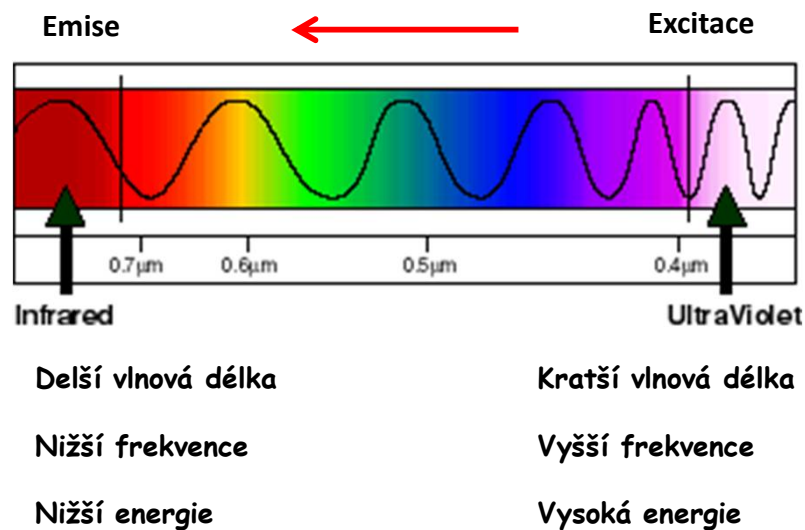
Photobleaching – poškození struktury

Fluorescence

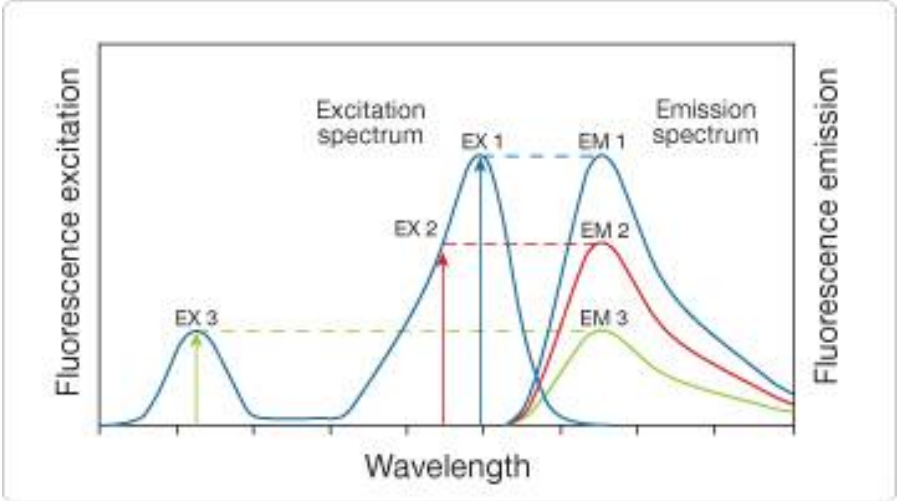
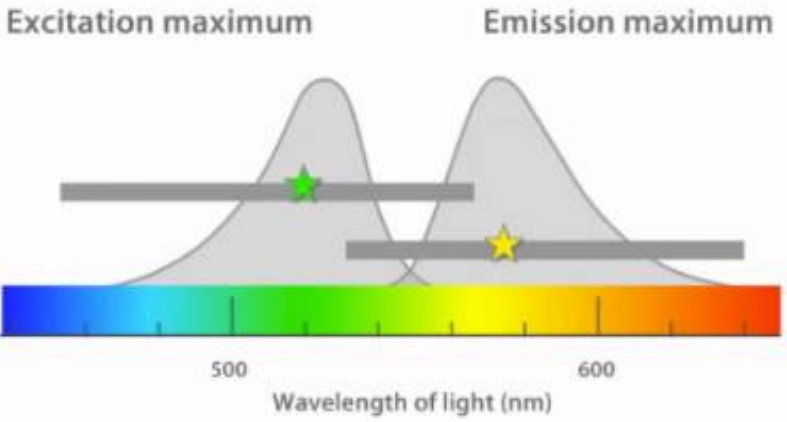
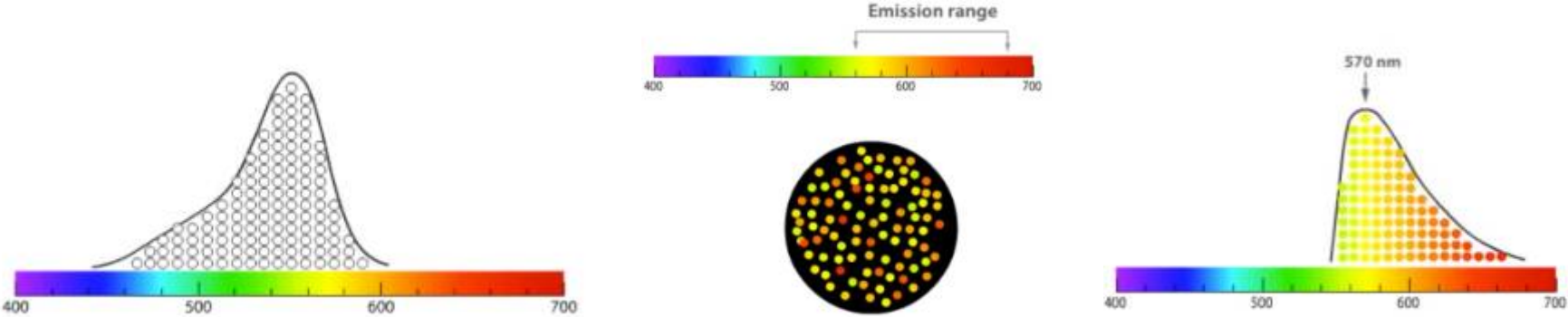
Elektromagnetické spektrum



Barva	Vlnová délka	Frekvence
červená	~ 625 až 740 nm	~ 480 až 405 THz
oranžová	~ 590 až 625 nm	~ 510 až 480 THz
žlutá	~ 565 až 590 nm	~ 530 až 510 THz
zelená	~ 520 až 565 nm	~ 580 až 530 THz
azurová	~ 500 až 520 nm	~ 600 až 580 THz
modrá	~ 430 až 500 nm	~ 700 až 600 THz
fialová	~ 380 až 430 nm	~ 790 až 700 THz



Fluorescence



FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ

- fluorescenčních barvivo je kovalentně navázáno na funkční skupiny biomolekul (nukleové kyseliny, proteiny)

Fluorescenční značení proteinů

- Proteiny - dynamika konformačních změn, molekulární interakce, sledování pohybů,
- Peptidy - studium vazby ligandu na receptor, struktura proteinů, aktivita enzymů
- Protilátky – detekce antigenů v imunofluorescenčních testech, imunodiagnostika

Fluorescenční značení nukleových kyselin

- Biofyzikální studie struktury, funkce a dynamiky NK
- Přímé *in vivo* sledování DNA a RNA a jejich interakcí s ostatními komponentami buňky, organizace chromatinu a studium regulace genové exprese

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ

Fluorescenční značení polysacharidů

- usnadňují identifikaci nových bioaktivních polysacharidů a charakterizaci jejich biologických funkcí
- Glykosaminoglykany (heparin) – komponenty extracelulární matrix; esenciální pro buněčnou adhezi, migraci, růst; antikoagulační, antitrombotické, protizánětlivé, antivirové vlastnosti

Fluorescenční značení lipidů

- Skladování energie, tvorba buněčných membrán, signalizace
- Nilská červeň – intracelulární lipidové kapičky
- Fluorescenčně značené domény vázající lipidy

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ - TECHNIKY

- **Chemická modifikace** – kovalentní/nekovalentní

robustní, snadno proveditelné a velmi účinné s širokou škálou fluoroforů. Jsou vhodnější pro *in vitro* studie než pro *in vivo*.

- **Enzymatické** - umožňují rychlé, vysoce účinné a selektivní značení *in vivo* a *in vitro*, cílení na proteiny nebo celé buňky, velká velikost
- **Peptidové/proteinové tagy** - specifické a selektivní značení proteinů, začlenění krátkých fluorescenčních značek, které nenarušují skládání nebo funkci molekuly
- **Genetické** – značení proteinových domén, malých peptidů, AMK; místa podél chromozomu *in vivo*; detekce chromoz. abnormalit (delece, duplikace)
- **Vícebarevné** - schopnost sledovat nebo detekovat více fluorescenčně značených proteinů současně; zobrazování živých buněk, průtoková cytometrie

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ - TESTY

Fluorescenční mikroskopie

- identifikace buněk a jejich komponent, fyziologie
- emitované světlo je oddělováno od excitačního světla pomocí optických filtrů

Průtoková cytometrie

- analýza a třídění částic v „reálném čase“ při průchodu světelným paprskem detektorem
- fluorescenčně značené markery (ligandy, protilátky) se vážou na specifické molekuly na povrchu buňky nebo uvnitř buňky
- detekce, kvantifikace, izolace a charakterizace
- imunologie, hematologie, transplantační medicína, onkologie a genetika

FLUORESCENČNÍ ZNAČENÍ - TESTY

Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

- lokalizace specifických sekvencí DNA na chromozomech
- Diagnostické účely - detekce chromozomálních abnormalit, analýza rakovinných buněk

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

- analýza časových změn v intenzitě fluorescence fluorochromů, které jsou způsobeny chemickými, biologickými nebo fyzickými vlivy
- chemická kinetika, molekulární difúze, účinky koncentrace, dynamika konformace, molekulární interakce

Microarrays

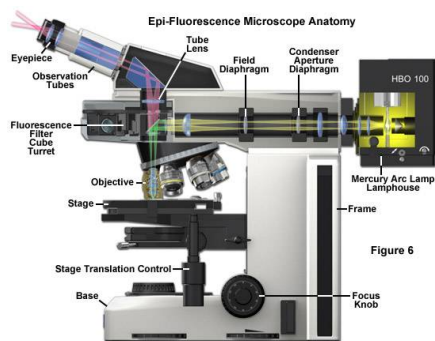
- studium genové exprese za různých podmínek
- na čípech DNA lze současně zkoumat tisíce genů

FLUORESCENCE - PŘÍSTROJE

Přístroje založené na měření fluorescence jsou čtverého typu:

- **spektrofluorimetry** – měří střední signál celého vzorku umístěného obvykle v kyteti nebo v jamce mikrodestičky
- **fluorescenční mikroskopy** – umožňují pozorovat fluorescenci dvoj- nebo trojrozměrných mikroskopických objektů
- **fluorescenční skenery** (včetně čteček mikrodestiček) – měří fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů (elektroforetické gely, bloty, chromatogramy)
- **průtokové cytometry** – měří fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk a umožňují identifikaci a separaci jejich subpopulací

Existují však i další přístroje, které jako detekci používají fluorescenci.



FLUORESCENCE – TYPY FLUOROFORŮ

1) ORGANICKÁ BARVIVA – fluorescein, fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine (tetramethyl rhodamine isothiocyanate, TRITC)

- Výhodou je malý rozměr – biokonjugace (crosslink) s makromolekulami (protilátky, biotin, avidin) bez narušení biologické funkce

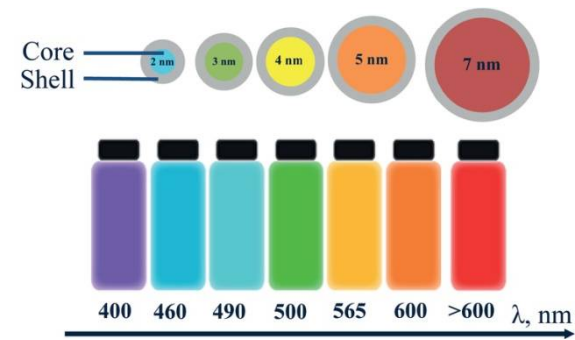
2) BIOLOGICKÉHO PŮVODU – expresní systémy

- GFP a jeho deriváty
- Benefity – expresní plasmid vnesen do bakterie, buňky, orgánu nebo organismu, fúze s proteinem, který studujeme
- Nevýhody – ovlivnění funkce proteinu, toxicita, reaktivní formy kyslíku (ROS)

3) Kvantové tečky (Quantum dots, QDs)

- Polovodičové nanočástice, mají jedinečnou velikost a tvar závislou na optoelektronických vlastnostech
- Umožňují konstruovat součástky, s nimiž lze manipulovat s jednotlivými elektrony, fotony
- Past pro elektrony, neboť mají nižší úroveň energie než je hodnota vodivostního pásu okolního polovodičového materiálu
- Vykazují fluorescenci

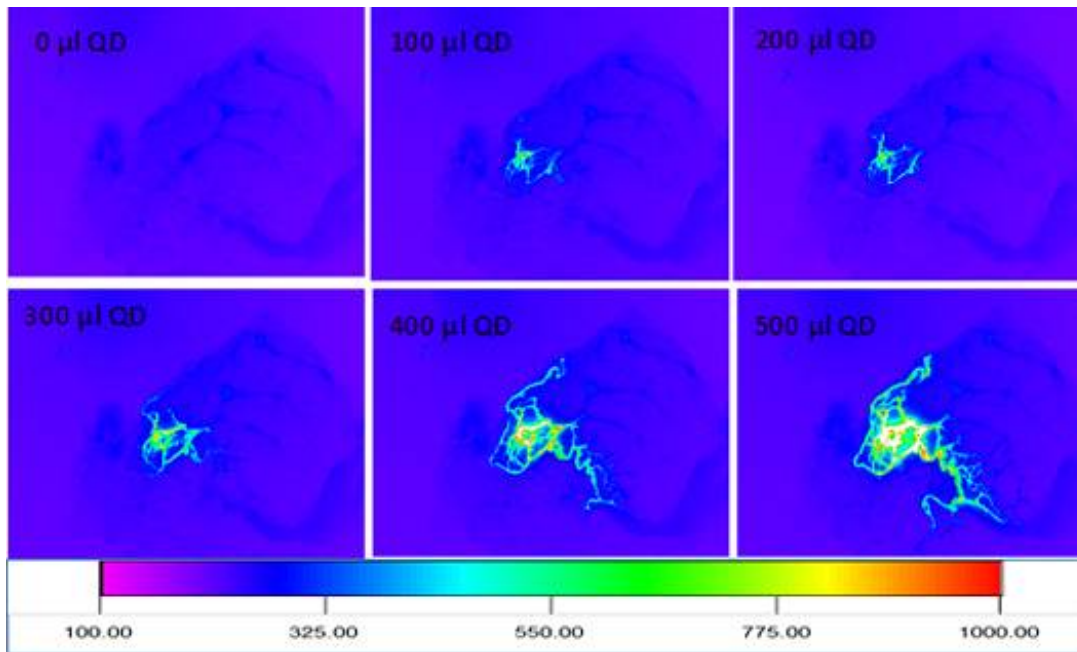
- 2 – 10 nm, široká absorpční spektra, úzká emisní spektra závislá na jejich velikosti, odolné vůči zhášení a chemické degradaci
- nejčastěji se jedná o sloučeniny prvků z II. a VI. skupiny prvků (CdTe, CdSe, CdS, ZnSe ...) a III. a V. skupiny (InP, InAs ...)



	13 IIIA	14 IVA	15 VA	16 VIA
properties	5 B Boron 10.81 24.31	6 C Carbon 12.01 12.01	7 N Nitrogen 14.01 14.01	8 O Oxygen 16.00 16.00
	13 IIIA	14 IVA	15 VA	16 VIA
	13 IIIA	14 IVA	15 VA	16 VIA
30	31	32	33	34
Zn Zinc 65.38 65.38	Ga Gallium 69.72 69.72	Ge Germanium 72.64 72.64	As Arsenic 74.92 74.92	Se Selenium 78.96 78.96
48	49	50	51	52
Cd Cadmium 112.41 112.41	In Indium 114.82 114.82	Sn Tin 118.71 118.71	Sb Antimony 121.76 121.76	Te Tellurium 127.60 127.60
80	81	82	83	84
Hg Mercury 200.59 200.59	Tl Thallium 204.38 204.38	Pb Lead 207.2 207.2	Bi Bismuth 208.98 208.98	Po Polonium 209 209
112	113	114	115	116
Cn Copernicium 285 285	Nh Nihonium 284 284	Fl Flerovium 287 287	Mc Moscovium 288 288	Lv Livermorium 293 293

- životnost, intenzita signálu, rozpětí excitace, šířka emisního spektra
- značky DNA, ve fluorescenčním značení mikroskopických preparátů, ke specifickému značení tkání, organismu, protilátek, oligonukleotidů, enzymů, ve FRET (Förstrův rezonanční přenos energie), BRET (bioluminescenční rezonanční přenos energie), ECL (elektrochemiluminiscenci)

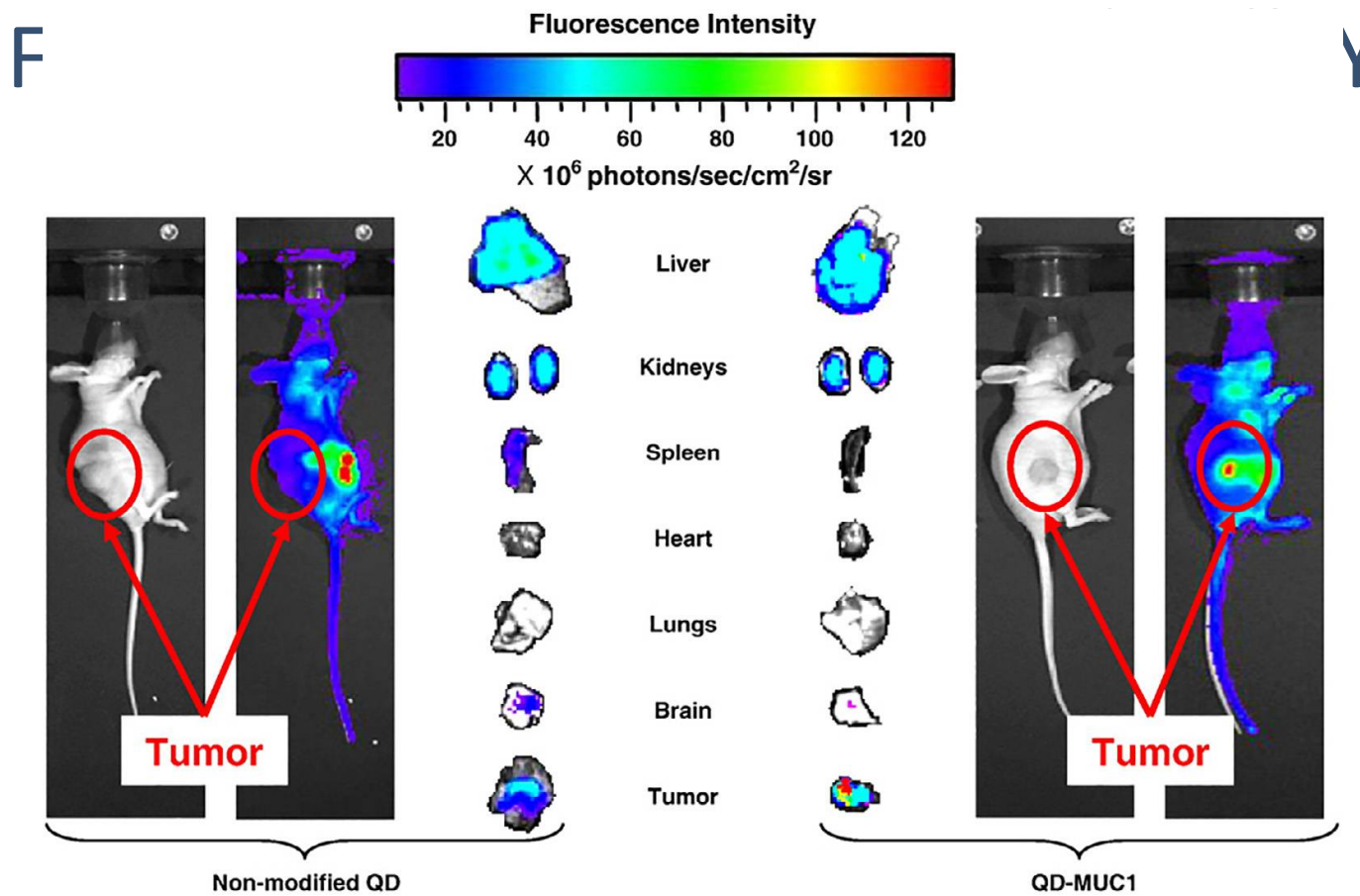
FLUORESCENCE – KVANTOVÉ TEČKY



Fluorescence kvantových teček ve svalové tkáni

S množstvím aplikovaných kvantových teček vzrůstá intenzita fluorescence a zvětšuje se plocha rozlití kvantových teček v tkáni

- *In vivo* i *in vitro* zobrazení
- Vizualizace transportu léčiv
- vývoj cílené léčby a kontrol zacílení léčiva na místo s nádorovou tkání
- je nutná jejich vysoká biokompatibilita

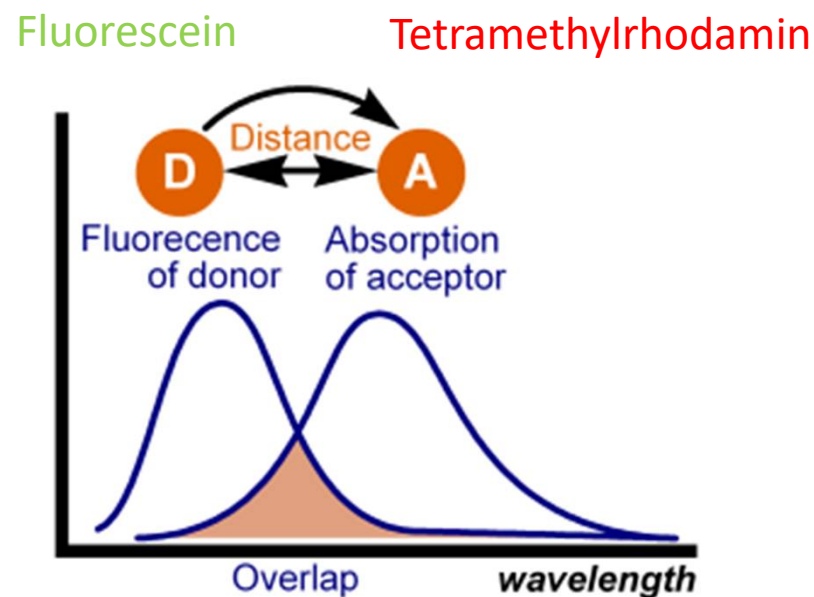


Real-time in vivo imaging of non-targeted versus targeted QD biodistribution in a nude mouse model 24 h after intravenous injection of QDs.

W.C.W. Chan, S. Nie, *Science* 281 (1998) 2016–2018

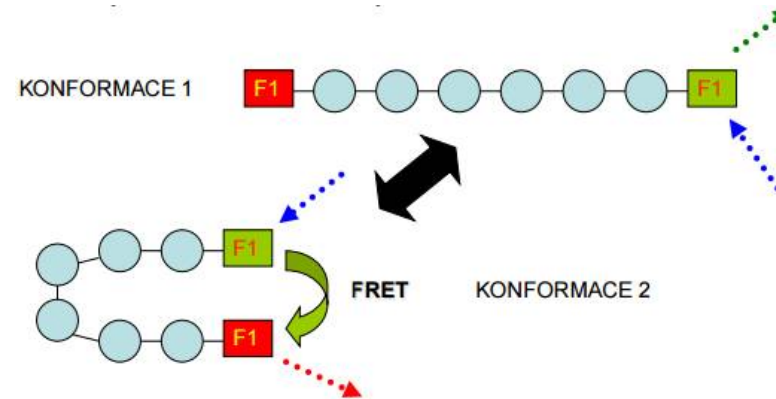
FÖRSTRŮV REZONANČNÍ PŘENOS ENERGIE (FRET)

- Přenos energie mezi dvěma fluorofory při jejich prostorovém přiblížení
- Pokud se emisní spektrum jednoho fluoroforu (tzv. donorového) překrývá s absorpčním spektrem druhého fluoroforu (tzv. akceptorového), dochází k poklesu intenzity fluorescence donorové molekuly a vyzáření energie zachycené akceptorovou molekulou v podobě fluorescenčního záření o delší vlnové délce

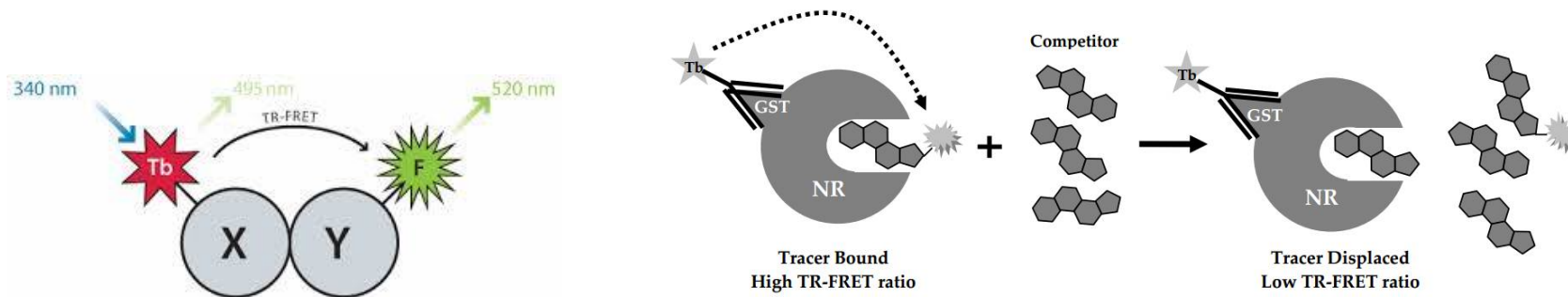


Aplikace

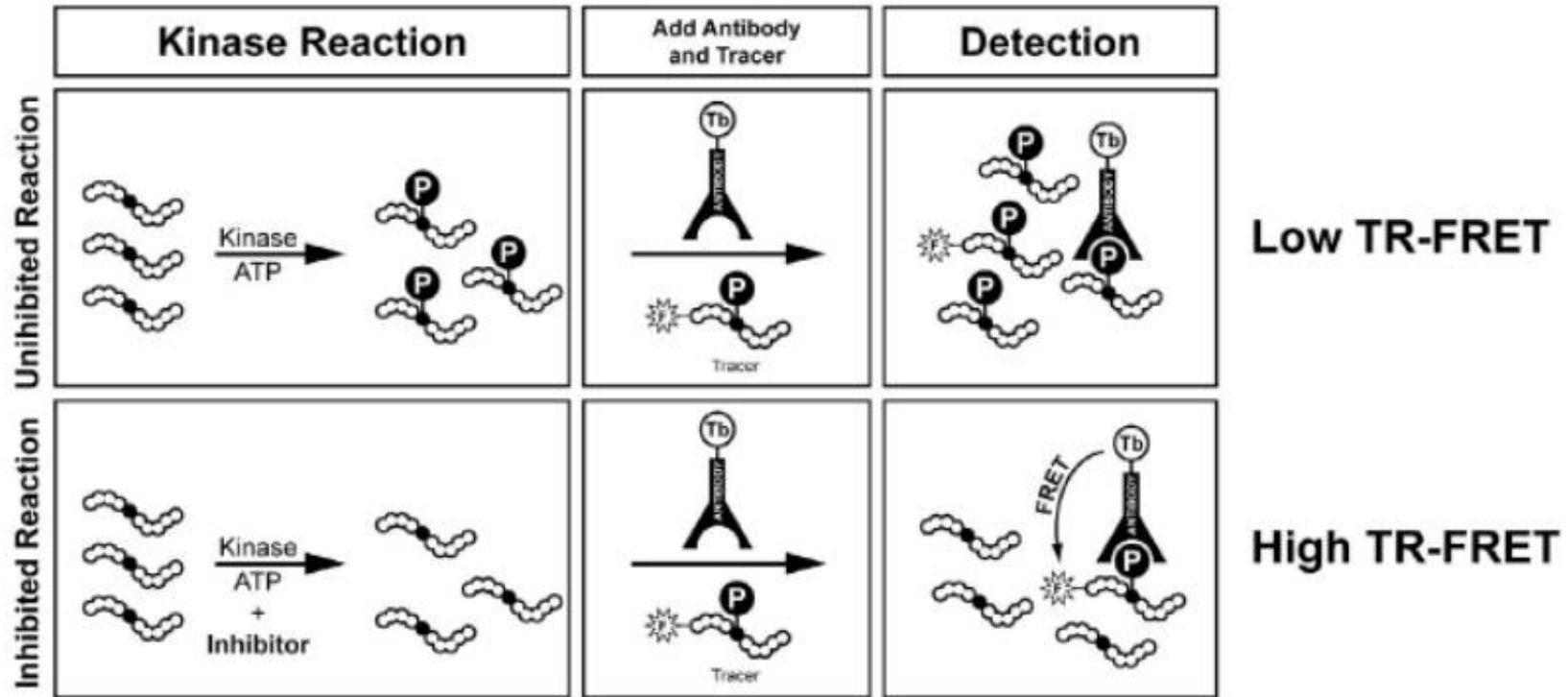
Sledování strukturních a konformačních změn - dvě molekuly, případně dvě části molekuly, jsou označeny donorem a akceptorem a sledujeme zda dochází k výměně energie



Sledování molekulární dynamiky jako jsou **protein-proteinové interakce, interakce protein-DNA a proteinové konformační změny**



Aplikace

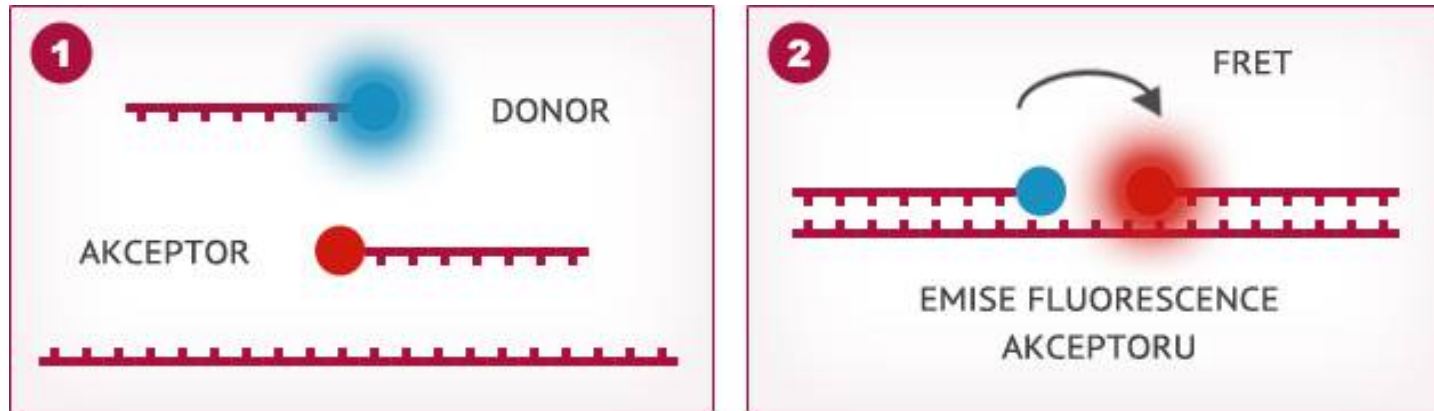




HYBRIDIZAČNÍ METODY

- Jako sondu označujeme v molekulární genetice **molekulu nukleové kyseliny**, kterou použijeme k **vyhledání určité sekvence** ve vzorku testované DNA nebo RNA
- Využívá se vlastnost jednovláknové nukleové kyseliny tvořit hybridní molekuly s jinou nukleovou kyselinou, pokud tato obsahuje komplementární sekvence (G-C, A-T)
- Denaturace a optimální podmínky pro hybridizaci (teplota, konc. solí)
- Hybridizaci lze provádět ve směsi, na nosiči se separovanou molekulou (NB), nebo přímo v buňce *in situ* (FISH)
- Vzniklou hybridní molekulu je třeba nějakým způsobem zviditelnit – důkaz, že hybridizace proběhla
- **Využijeme značky!** (radioaktivní, antigen, fluorescenční) – viz dále
- Vyšetřovat lze vzorky DNA i RNA - **izolované z buněk, přímo v buňkách**
- Kvalitativní i kvantitativní (změny exprese genů)

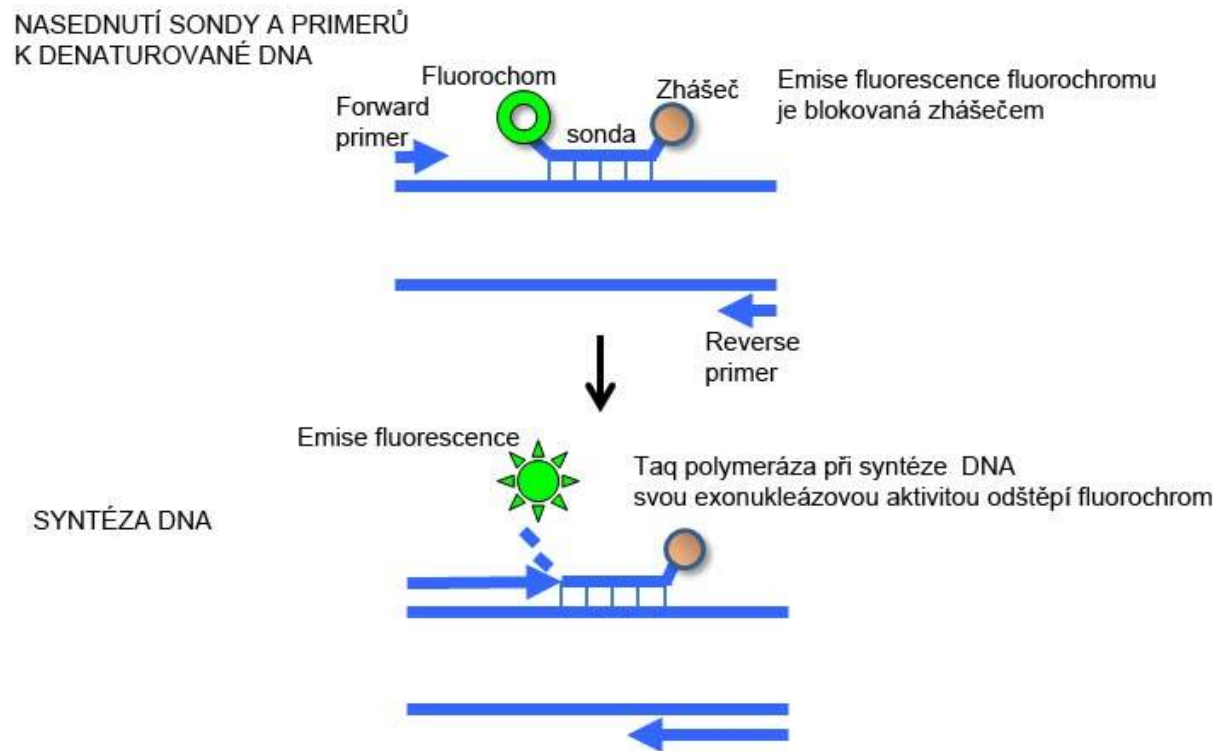
FRET - SONDY



Sondy jsou navrženy tak, aby hybridizovaly přilehle vedle sebe na templátovou DNA, kterou tvoří produkt PCR. Pokud sondy zhybridizují s cílovou sekvencí, dochází k přenosu energie mezi fluorofory donor-akceptorového páru a zvýšení fluorescenční aktivity akceptorového fluoroforu, která je měřena

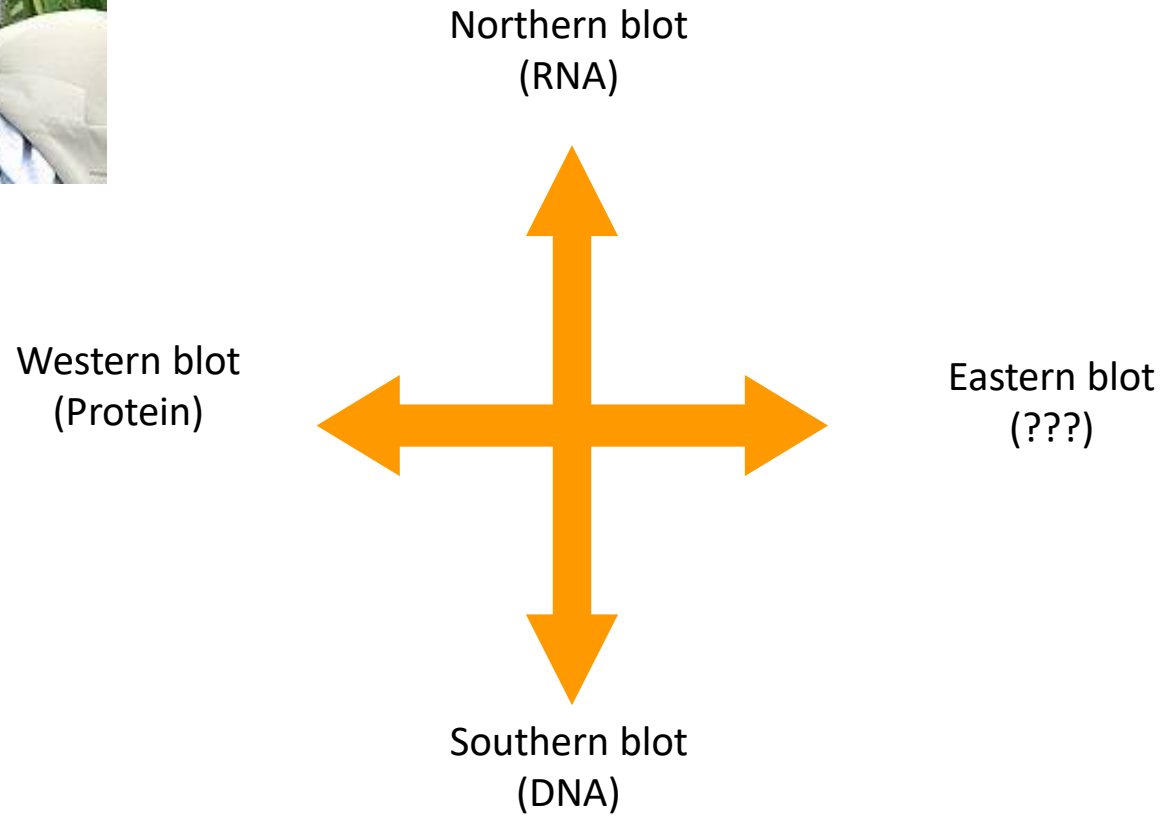
TaqMan sondy

- Dvojitě barvené hydrolyzační sondy, tvořeny 18-22 bp, která je komplementární k cílové sekvenci
- Využívají 5' exonukleázové aktivity Taq polymerázy při syntéze DNA
- Na 5' konci nesou reportérový fluorofor, na 3' nesou molekulu zhášeče, tj. molekulu barviva, která blokuje emisi fluorescence z fluoroforu na 5' konci





Sir Edwin Southern (1975)



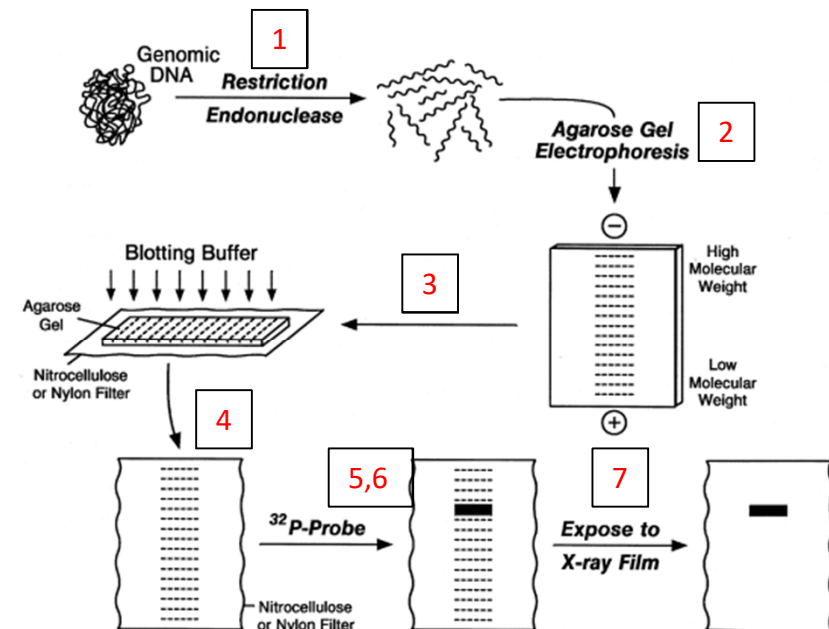
CDNA SONDY – NORTHERN/SOUTHERN BLOTTING

- cDNA sonda = relativně krátký úsek ssDNA určený k hybridizaci s komplementární cílovou DNA nebo RNA
- Krok 1 – restriční štěpení (k analýze 10 - 50 µg)
- Krok 2 - elektroforetická separaci na agarosovém gelu za denaturujících podmínek (formaldehyd)
- Krok 3 - transfer na nosič
(nylonovou membránu)
 - kapilární síly (RNA)
 - elektrické síly (DNA)

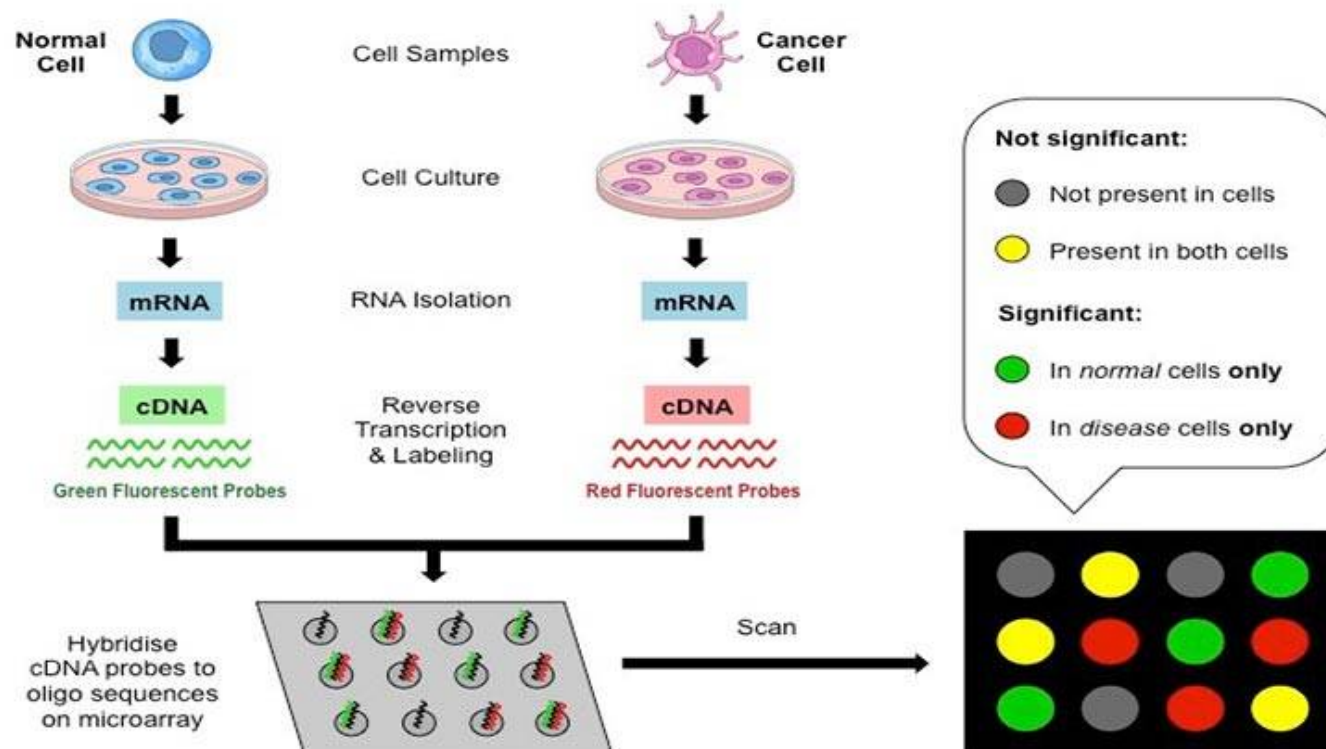
- Krok 4 - fixace nukleových kyselin pomocí tzv. UV-cross link
- Krok 5 - hybridizace separované RNA/DNA s cDNA sondou (teplota 55°C; přes noc)
vznik dvouvláknové DNA nebo DNA-RNA

Krok 6 – promývání

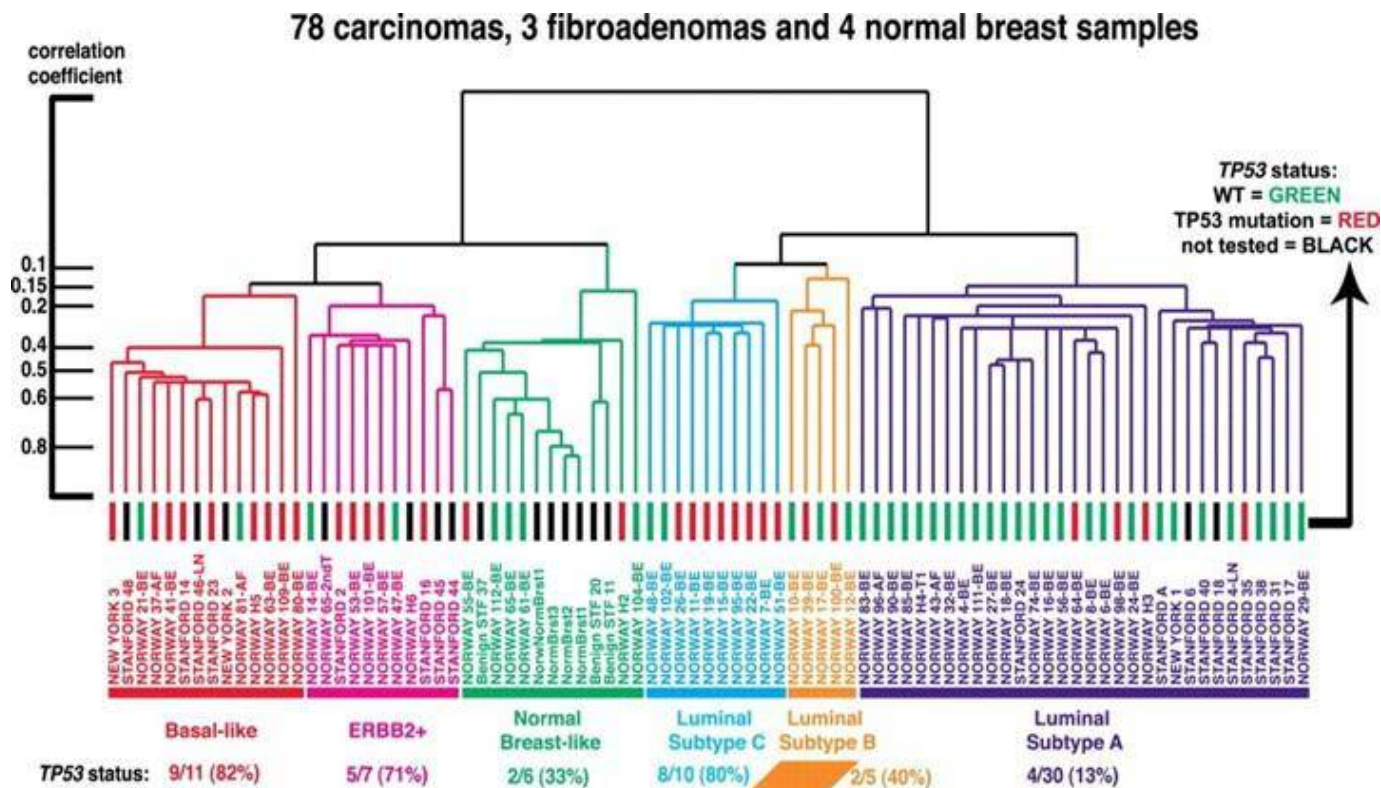
Krok 7 – detekce (³²P, DIG)



- DNA čipy (DNA Microarray) – moderní technologie, na nosiči není fixován vzorek, ale v mikro-uspořádání velké množství různých cDNA sond
- Možnost detekce velkého množství (stovky – tisíce) genů v jedné analýze!!
- Počítačový software pro vyhodnocení – odečtení intenzity vazby
- Lékařská diagnostika – vyšetření přítomnosti alel genů v jednom vzorku DNA



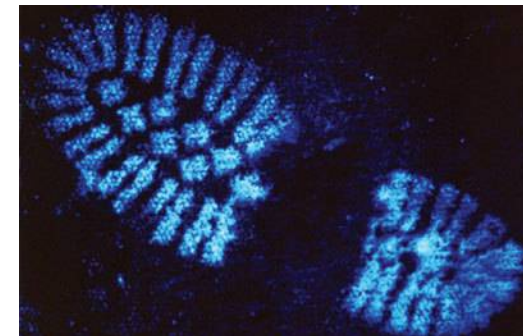
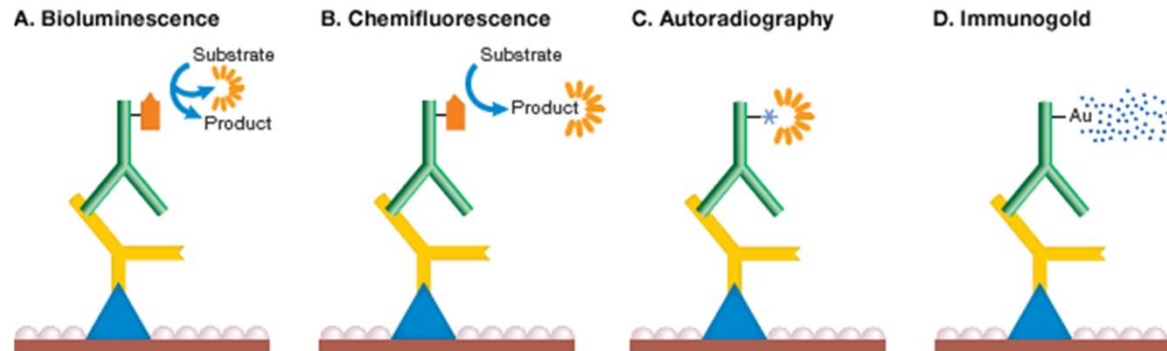
- paralelní detekce a kvantifikace exprese až desítky tisíc genů
- globální pohled na genovou expresi nádoru a identifikace genetických markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění
- karcinom prsu – heterogenní skupina nádorů, které mají odlišnou prognózu a odlišnou odpověď na léčbu (cílená léčba)
- **5 typů genetických profilů** – silný prognostický význam, unikátnost genového profilu
 1. onkologický pacient je nositelem tumoru jehož molekulární profil je unikátní a odlišitelný
 2. profil genové exprese metastatického ložiska je odvozený od profilu primárního nádoru



CHEMILUMINESCENCE

- chemický děj, při kterém se uvolňuje energie v podobě světla
- obvykle bez vyzařování tepla

Luminiscenční látka + oxidační činidlo → oxidovaná látka + světlo



BIOLUMINESCENCE

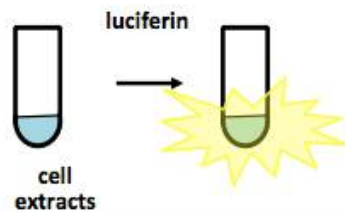
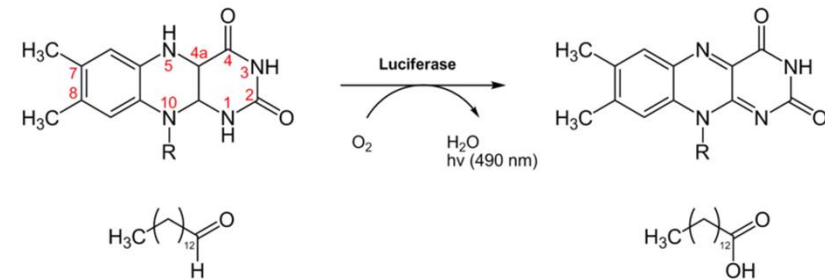
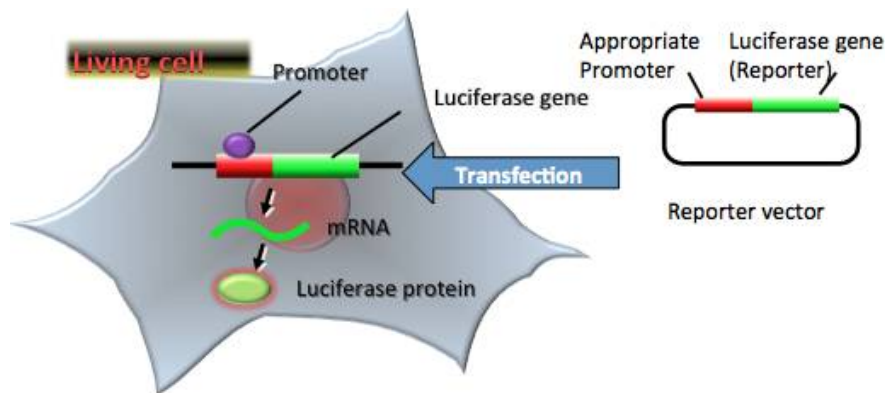
- enzymaticky katalyzovaná chemiluminiscence
- luminiscence živých organismů
- oxidace luciferinu na oxyluciferin za katalýzy enzymem luciferázou
- v reakci často figurují ještě ATP či NADPH
- velmi vysoké kvantové výtěžky enzymatických reakcí (i přes 90%)
- extracelulární i intracelulární





GENE REPORTER ASSAYS

- Metoda umožňující „zjednodušené“ monitorování transkripční aktivity (studium promotoru, interakce mezi promotorem a transkripčními faktory, signální transdukce aj.)
- konstrukt cirkulární (plasmidové) DNA je vpraven do buňky nebo organismu
- LUCIFERASA (firefly) – konverze luciferinu za uvolnění luminiscence

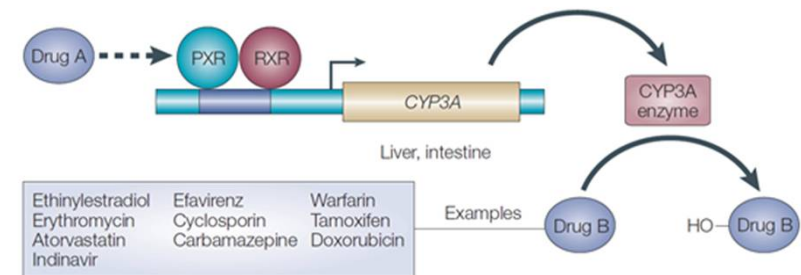


Promoter activity = Luciferase activity / Cell number or cellular enzyme activity

GENE REPORTER ASSAYS - konstrukty

VEKTOR

- expresní plasmid
- obvykle cDNA zaklonovaná do komerčního plasmidu (pGEMT, pSG5 apod.)
- exprimujeme v buněčném systému protein, který za normálních okolností se v buňce nenachází
- tzv. „over-exprese“ – pozor nefyziologický stav, narušení stechiometrie proteinů a transkripčních faktorů



REPORTÉR

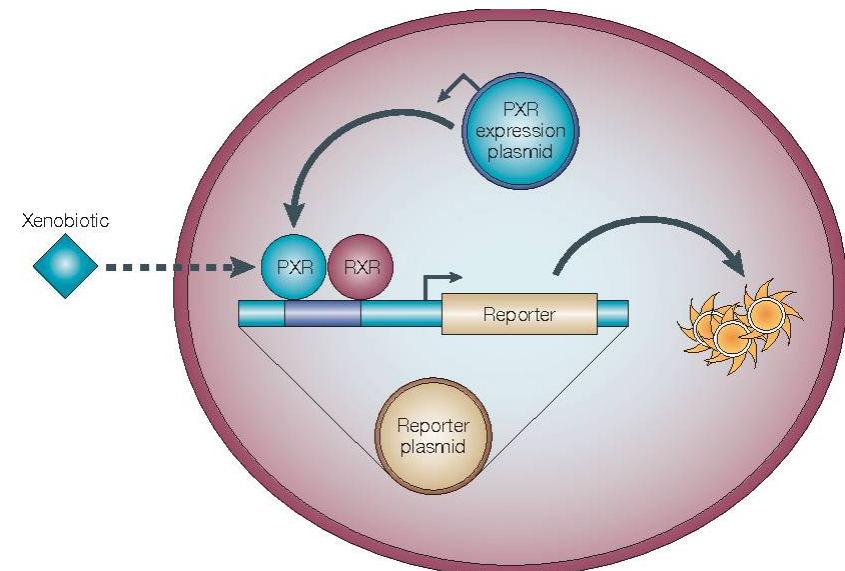
- tzv. reportérový gen – ukazuje míru transkripční aktivity
- vlastnost reportérového genu:
 - je buňce cizí (nepřirozený)
 - jeho aktivitu/obsah lze snadno a rychle měřit

CAT (chloramfenykoltransferasa) – acetylace radioaktivního chloramfenikolu

GFP, RFP – přímé měření fluorescence

b-galaktosidasa – konverze substrátu na barevný produkt – fotometrie

GUS – beta-glukuronidasa – různé koncovky stanovené produktu



GENE REPORTER ASSAYS

BUNĚČNÉ SYSTÉMY

- buněčné linie – většinou komerční nádorové (HepG2, HeLa)

TRANSIENTNÍ TRANSFEKCE

- plasmidová DNA (vektor, reportér) je vnesena do buněk jen dočasně
- většina buněčných linií má poločas zmnožení 12 – 72 hod
- při proliferaci se plasmid „ztratí“
- různé techniky vnesení plasmidové DNA do buňky
- lipofekce (Lipofectamine2000, FuGene6), elektroporace, tepelný šok

STABILNÍ TRANSFEKCE

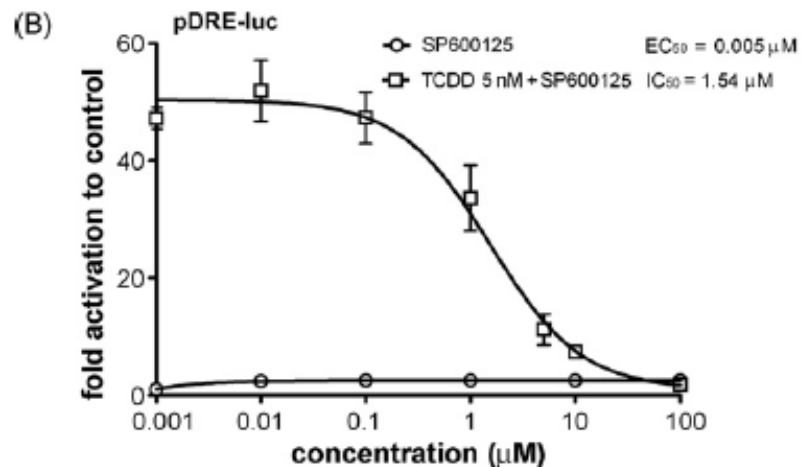
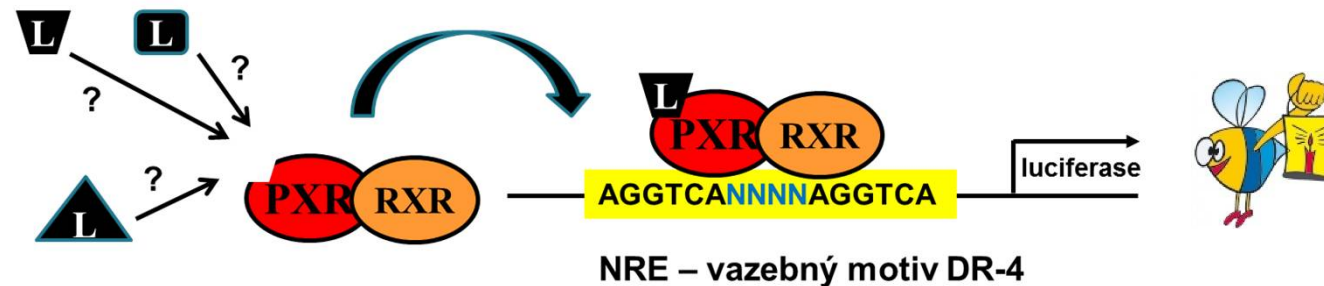
- selekční tlak – plasmidy nesou gen resistance
- kultivace v přítomnosti antibiotik (Neomycin, Bleomycin, Hygromycin)
- u linií kde je vnesen vektor i reportér je dvojí resistance!
- high throughput screening



GENE REPORTER ASSAYS - APLIKACE

Je testovaná látka ligandem (agonistou, antagonistou) receptoru X?

- Systém vektor wt-X + reportér
- Dose-response analýza – výpočet hodnot EC50, IC50

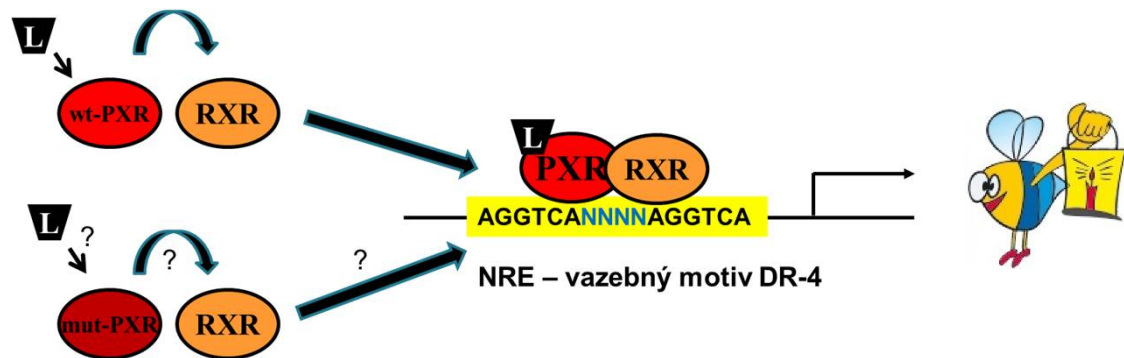


EC_{50} = half maximal effective concentration
 IC_{50} = half maximal inhibitory concentration

GENE REPORTER ASSAYS - APLIKACE

Aktivuje protein/receptor X expresi genu přes známou DNA sekvenci v promotoru?

- Jaká část proteinu je pro aktivaci nezbytná?
- Systém wt-X vs. mut-X + reportér
- Analyzujeme vliv jednotlivých mutací na proteinu X na jeho transkripční aktivitu



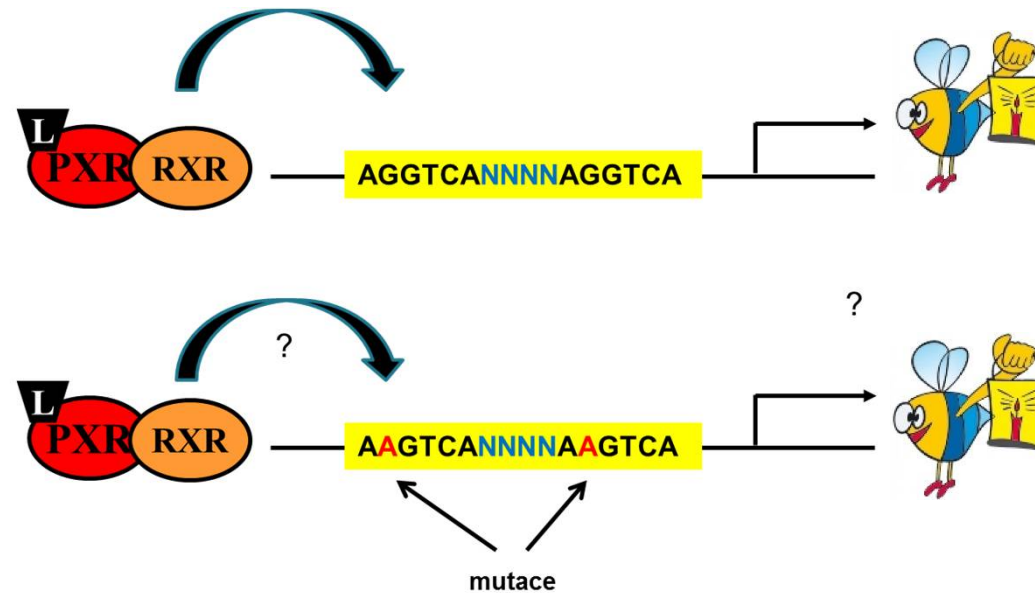
MUTACE

- ligand vazebná doména (LBD)
- DNA vazebná doména (DBD)
- heterodimerizační doména
- residua pro kovalentní modifikace – fosforylace, Ubikvitinace

GENE REPORTER ASSAYS - APLIKACE

Aktivuje protein/receptor X expresi genu přes analyzovanou sekvenci promotoru?

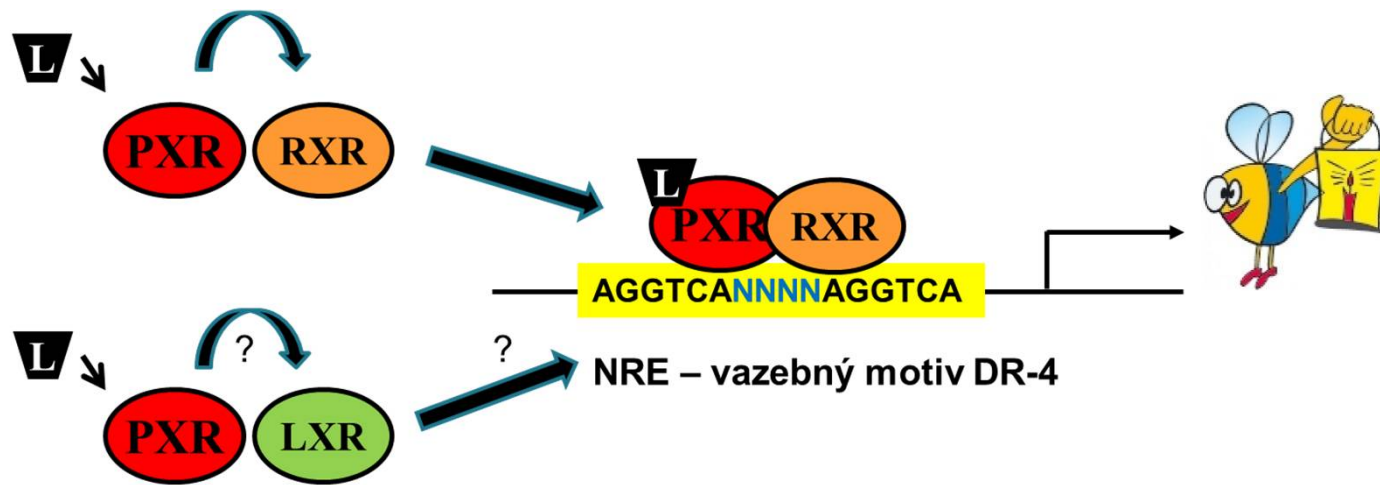
- Jaká sekvence DNA je pro aktivaci důležitá?
- Systém wt-X + reportér vs. mutovaný reportér
- Analyzujeme vliv jednotlivých mutací/sekvencí DNA na expresi reportéru



GENE REPORTER ASSAYS - APLIKACE

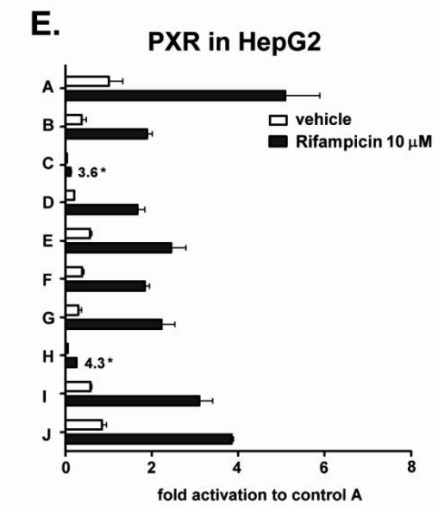
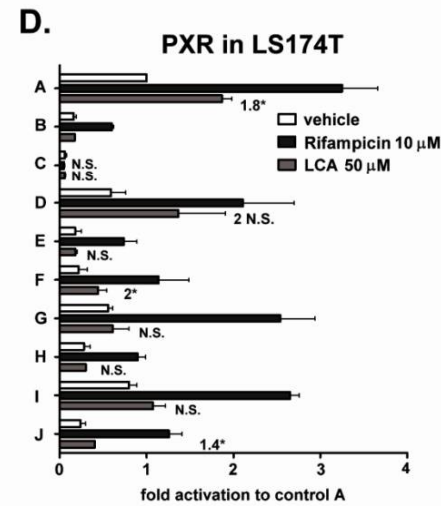
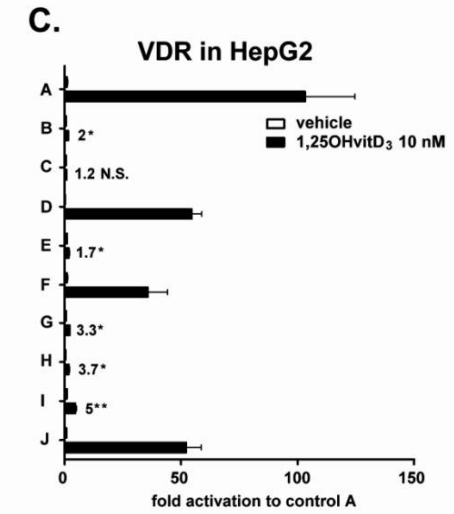
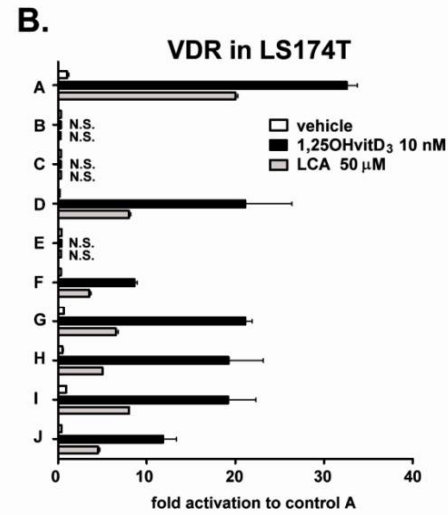
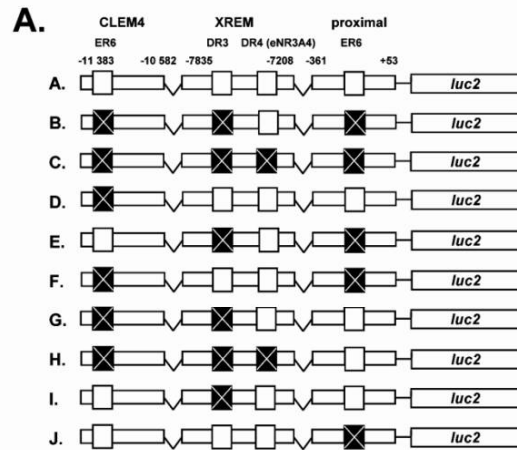
Analýza důležitosti tvorby proteinových komplexů pro expresi genu

- Systém wt-X + wt-Y + reportér



GENE REPORTER ASSAYS - APLIKACE

Figure 1.



Existuje kooperativita – antagonismus dvou a více promotorových sekvencí?

- Systém wt-X + hybridní reportér

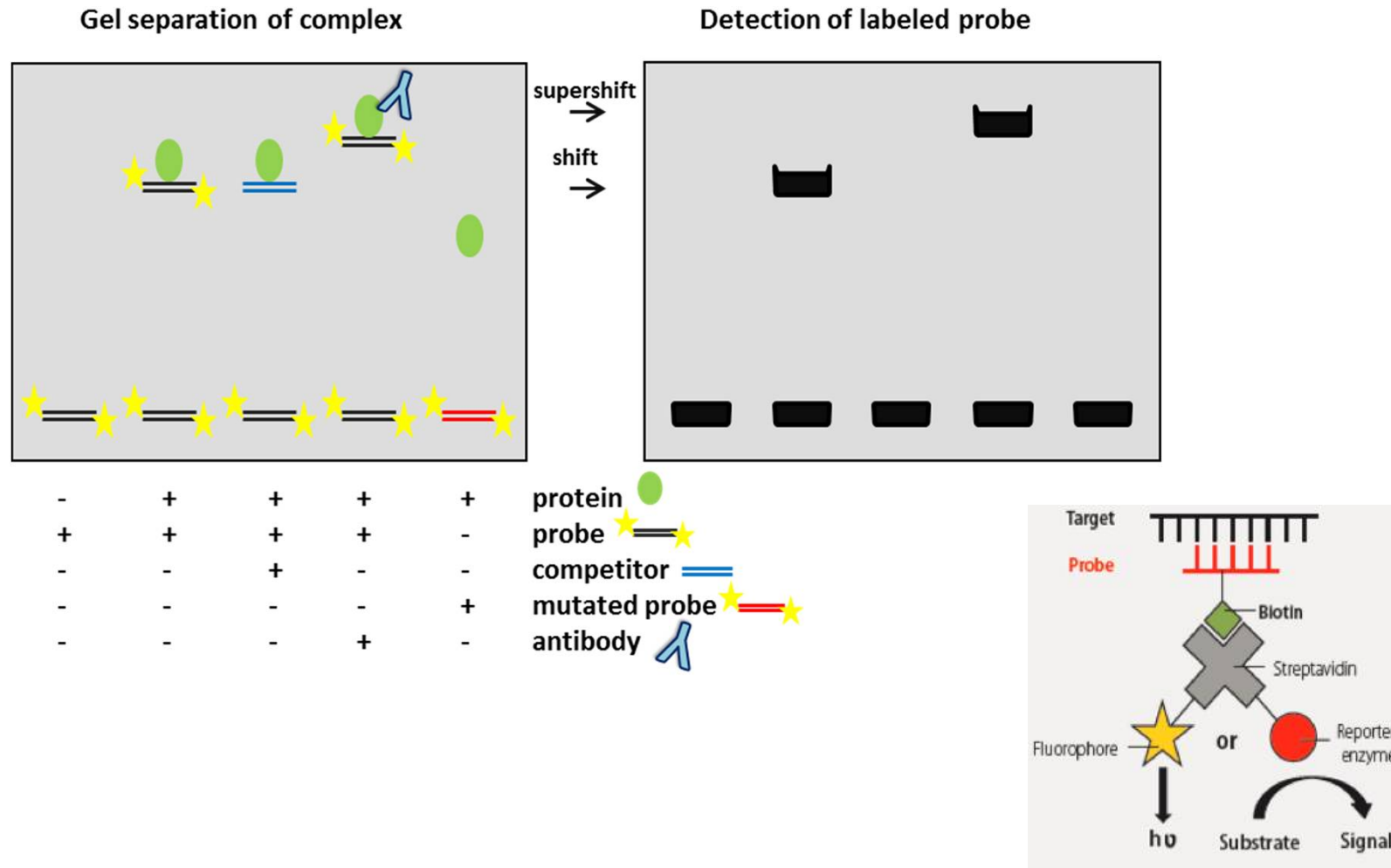
Pavek et al.

ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

- studium interakcí protein-DNA resp. protein-RNA
- separace komplexů na polyakrylamidovém nebo agarosovém gelu za NATIVNÍCH podmínek
- rychlost migrace je dána NÁBOJEM a VELIKOSTÍ molekul (částečně i tvarem)
- vznikne-li mezi proteinem a DNA (RNA) vazba, potom rychlost migrace vzniklého komplexu je nižší než rychlost migrace samotné DNA (RNA) – sondy!
- dochází tedy k posunu polohy bandu protein-DNA vs. DNA – tj. tzv „gel shift“

Garner MM, Revzin A (July 1981). "[A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system](#)". *Nucleic Acids Res.* 9 (13): 3047–60

ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)



Garner MM, Revzin A (July 1981). "[A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system](#)". *Nucleic Acids Res.* 9 (13): 3047–60

ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

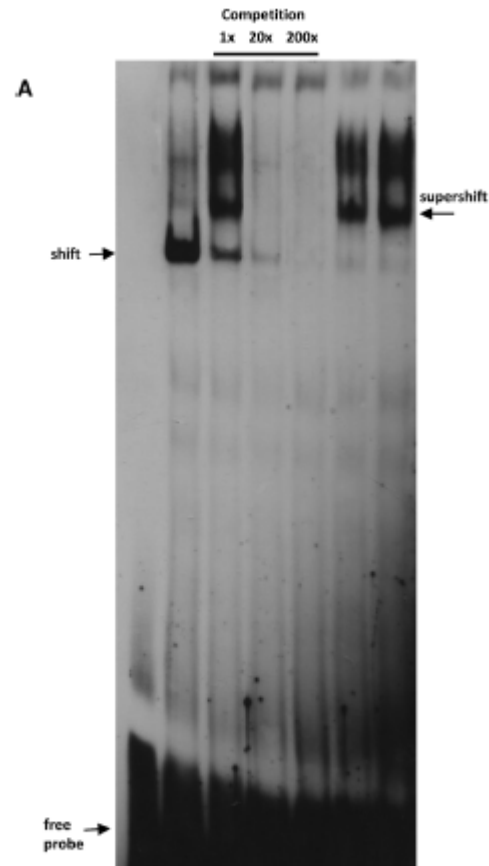
PROBA

- oligonukleotid – komerční syntéza na zakázku
- cca 20 – 25 basí
- značení ^{32}P -radio (poloha gamma), alternativně fluorescenční, biotinem
- syntetizuje se próba značená a neznačená
- syntetizuje se neznačená mutovaná próba
- analyzuje se paralelně vzorek s wt- a mutovanou próbou – tj. s wt- dojde ke kompetici a vymizení bandu, zatímco s mutovanou se band nemění
- lze analyzovat kombinace s jinými próbami – kompetice

VZOREK

- jaderné (někdy celobuněčné) extrakty buněčných proteinů
- *in vitro* translated proteins – rekombinantní

ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)



PXR	-	+	+	+	+	+	+
RXRα	-	+	+	+	+	+	+
DR3 3A4	-	-	+	+	+	-	-
DR3 3A4-biot	+	+	+	+	+	+	+
anti-PXR	-	-	-	-	-	+	-
anti-RXRα	-	-	-	-	-	-	+

Electrophoresis 2013, 00, 1–6

1

Aneta Vavrova
Radim Vrzal
Zdenek Dvorak

Department of Cell Biology and
Genetic, Faculty of Science,
Palacky University Olomouc,
Slechtitelu, Olomouc, Czech
Republic

Received February 7, 2013
Revised March 13, 2013
Accepted March 20, 2013

Research Article

A nonradioactive electrophoretic mobility shift assay for measurement of Pregnane X receptor binding activity to CYP3A4 response element

The electrophoretic mobility shift assay (EMSA) is a method for the study of specific DNA–protein interactions *in vitro*. The pregnane X receptor is a key xenobiotic sensor that regulates the expression of drug-metabolizing enzymes and many other genes. Radiolabeled ³²P-DNA-probes had been used in studies of PXR-DNA interactions. There is an increasing need for nonradioactive assays, due to the health, safety and environmental issues. In the current study, we present a protocol for the nonradioactive electrophoretic mobility shift assay, allowing studying interactions between human PXR with promoter DNA sequences.

Keywords:

Cytochrome P450 / Drug metabolism / Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) / Pregnane X receptor / Response elements

DOI 10.1002/elps.201300079

EMSA – APLIKACE

1. Kam se v DNA váže daný protein? Do jaké sekvence? Responzivního elementu?

- Analyzujeme vazbu proteinu P do responzivního elementu v sondě S
- Kompetice s 50 – 100 násobkem neznačené sondy – kontrola
- Kompetice s mutovanou sondou – umožní posoudit vliv mutace v DNA na vazbu proteinu

2. Jaký protein se váže do dané sekvence resp. responzivního elementu?

- Analyzujeme vazbu různých proteinů – většinou rekombinantních na sondu S
- Určíme zda a který protein se do dané sekvence váže

3. Jaká oblast (reziduum) v proteinu je důležitá pro vazbu do DNA?

- Analyzujeme vazbu proteinu P do responzivního elementu v sondě S
- Využíváme většinou rekombinantní proteiny
- Srovnání vazby wt-P a mutantů P-proteinů (site directed mutagenesis – plasmid, exprese)

4. Jaké koaktivátory, partneři, kofaktory jsou nutné pro vazbu proteinu do DNA?

- Exprimujeme v systému protein P + jednotlivé koaktivátory resp. Partnery
- Analyzujeme, zda přítomnost partnera ovlivní vazbu P do S (zesílení/zeslabení)

DĚKUJI!