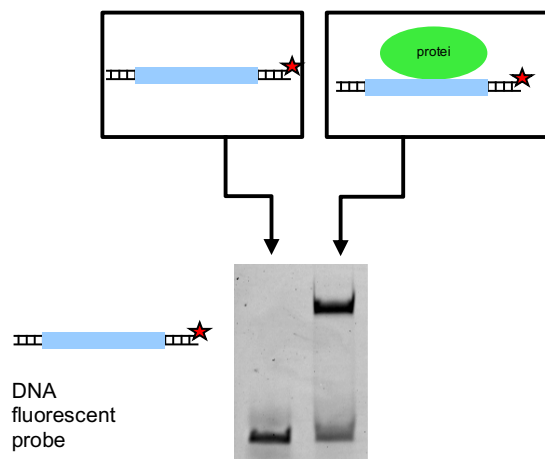


PROTEIN-DNA INTERAKTION

Ein EMSA („electrophoretic mobility shift assay“) ist eine relativ einfache Methode, um die Interaktionen von Proteinen mit DNA zu untersuchen. Angewendet wird diese Methode unter anderem zur Bestimmung von Bindungsparametern und relativen Affinitäten eines Proteins zu einer oder mehreren DNA-Bindungsstellen oder um die Affinitäten verschiedener Proteine zu einer bestimmten DNA-Bindungsstelle zu bestimmen. Das Prinzip dahinter ist, dass Protein-DNA-Komplexe größer sind als die DNA allein und sich somit langsamer in einer Gelelektrophorese bewegen. Man könnte also auch sagen, dass die DNA-Migration „geschifft“ oder retardiert ist, sobald ein Protein gebunden wurde. Deshalb wird die Methode auch als „gel shift“, „bandshift“ oder „gel retardation assay“ bezeichnet.



Untersucht wird in dieser Übung die Bindung eines Transaktivators (Xyr1), der im Pilz *Trichoderma reesei* der essentielle Aktivator der Expression von Hydrolasen ist. Als DNA-Sonde kommt eine Sequenz aus dem Promoter des xylanase 1 (*xyn1*) Gens (-430 to -396) zum Einsatz. Diese DNA-Sequenz enthält zwei Bindungsmotive (5'-GGC(T/A)₃-3') für Xyr1, angeordnet als ein sogenannter „inverted repeat“. Einer der beiden eingesetzten DNA-Stränge ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) markiert und kann somit später mit einem entsprechenden Detektionsgerät sichtbar gemacht werden.

pxyn1-Sonde

5' -**FAM**-TTGGCAGGCTAAATGCGACATCTTAGCCGGATGCA-3'

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um eine unspezifische Bindung der DNA-Sonde an Xyr1 handelt, werden mehrere Kontrollen benötigt. Zu diesem Zweck wird einerseits eine Bindungsreaktion der pxyn1-Sonde mit einem weiteren Protein (Rinderserumalbumin; BSA) durchgeführt. Andererseits soll durch den Einsatz von unterschiedlichen Konzentrationen einer alternativen, unmarkierten Sonde überprüft werden, ob diese mit der pxyn1-Sonde um die Bindungsstellen auf dem Transaktivator konkurriert („cold competitor“).

Eine weitere Möglichkeit, um Protein-DNA-Interaktion zu untersuchen, ist Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie. Dabei wird die Strukturänderung des Proteins in Gegenwart von (unmarkierter!) DNA bestimmt.

Hinweise:

* wird von dem/r Betreuer/in ausgegeben

(B) befindet sich am Betreuertisch

(E) befindet sich im allgemeinen Entnahmebereich auf RT

(G) befindet sich in der Gefrierlade

(K) befindet sich im Kühlschrank

alle weiteren Materialien/Lösungen sind selbst herzustellen oder am Hörer/innenplatz vorhanden

Abkürzungen:

RG, Reaktionsgefäß

RT, Raumtemperatur

sb, steriles, bi-distilliertes Wasser

sA, siehe Abbildung

Reservierung des Mini-PROTEAN Tetra Cell System möglich!

Es können zwei Personen pro Tag diese Übung durchführen – frühzeitige Reservierung empfohlen!

1. Herstellung der markierten und der unmarkierten DNA-Sonden

Lösungen: 0,25 µg/µl Oligonukleotidlösungen pxyn1.1f_FAM, pxyn1.1f, und pxyn1.1r (G)
2,5 µg/µl Oligonukleotidlösungen pxyn-comp-f und pxyn-comp-r (G)
5x Anlagerungspuffer (1 M Tris-HCl, pH 7,7) (K)
sb Wasser

Materialien: 1,5-mL-RG
Eisbad

Geräte: Thermoblock

Durchführung:

- Oligonukleotidlösungen auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen
- für die markierte pxyn1-Sonde (EMSA): je 2 µL von den komplementären Oligonukleotiden pxyn1-f_FAM und pxyn1-r in einem RG vorlegen
- für die unmarkierte pxyn1-Sonde (CD-Messung): je 2 µL von den komplementären Oligonukleotiden pxyn1-f und pxyn1-r in einem RG vorlegen
- für den unmarkierten cold competitor (EMSA): Verdünnung der komplementären Oligonukleotide pxyn-comp-f und pxyn-comp-r mit sb Wasser auf 1,25 µg/µl und 0,25 µg/µl
- je 2 µl von drei Konzentrationen (2,5 µg/µl, 1,25 µg/µl, 0,25 µg/µl) der Oligonukleotide pxyn-comp-f und pxyn-comp-r in einem RG vorlegen
- zu allen fünf Ansätzen 6 µL Anlagerungspuffer und 20 µL sb Wasser mischen (30 µL finales Volumen)
- bei 95 °C 5 min erhitzen
- langsam auf RT abkühlen lassen
- bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahren

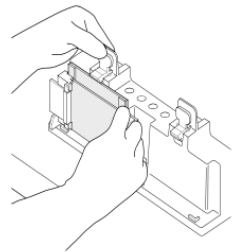
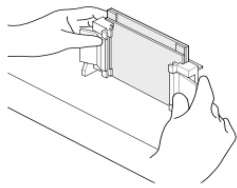
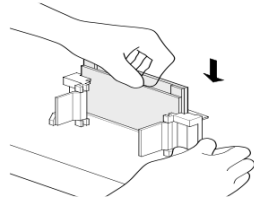
2. Herstellung des nativen Gels

Lösungen: Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid, 0.36 % (w/v) Bis-acrylamid) (K)
destilliertes Wasser (Kanister)
50 % (v/v) Glycerinlösung (K)
10x TBE Puffer (E)
25 % (w/v) APS-Lösung (K)
TEMED (K)

Materialien: Pasteurpipette und Saugkopf
kleiner Erlenmeyerkolben

Geräte: Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)*

Durchführung:

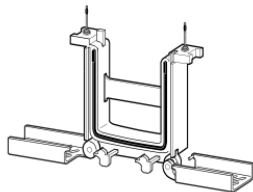


- den Gießrahmen auf eine ebene Fläche stellen (Klammern offen und nach vorne ausgerichtet)
- die beiden Glasplatten in den Gießrahmen stellen (kürzere Platte vorne; Abstandhalterplatte hinten); sA
Hinweis: Achten Sie darauf, dass beide Platten absolut eben aufliegen und die Beschriftung der Abstandhalterplatte richtig orientiert ist (Dichtheit!)
- Klammern schließen (dabei die Platten nicht verschieben!); sA
- in den Gießstand eine graue Dichtung legen
- den Gießrahmen in den Gießstand auf die Dichtung stellen (geschlossene Klammern nach vorne ausgerichtet) und festklemmen; sA
- optische Kontrolle (alles soll völlig plan und ebenmäßig ausgerichtet sein; Dichtheit!)
- Gellösung in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben herstellen (Nitrilhandschuhe, Abzug):
 - 1,5 mL Acrylamidlösung
 - 4,5 mL destilliertes Wasser
 - 1,5 mL Glycerinlösung
 - 250 μ L 10x TBE
→ zum Homogenisieren schwenken
 - 30 μ L APS
 - 7,5 μ L TEMED
→ kurz schwenken und sofort verwenden

- Gellösung mit Hilfe der Pasteurpipette zwischen die Glasplatten füllen (Nitrilhandschuhe, Abzug)
- Kamm einsetzen
- Gel auspolymerisieren lassen (ca. 20 min)
- restliche Gellösung im Kolben auspolymerisieren lassen, Pasteurpipette im Kolben stehen lassen (Abzug)
- später Gelreste mit Pasteurpipette aus dem Kolben kratzen
- Gelreste und Pasteurpipette entsorgen

3. Vorbereitung der Gelelektrophorese

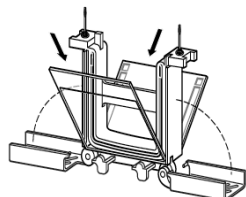
Lösungen: 10x TBE Puffer (E)
destilliertes Wasser (Kanister)



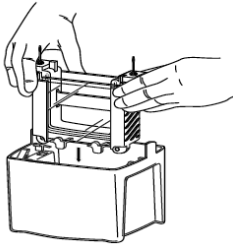
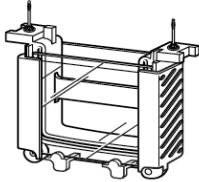
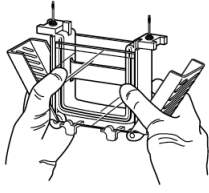
Materialien: großes Becherglas
Magnetrührstäbchen
Styroporbox (passend für die Elektrophoresekammer), Eis
Spritze*
Nadel*

Geräte: Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)*

Durchführung:



- 1 L Laufpuffer (0,25x TBE) durch Verdünnen der vorhandenen TBE-Lösung herstellen und sehr gut kühlen (Kühlschrank oder Eis; am besten



über Nacht)

- Gießrahmen samt Gelkassette aus dem Gießstand nehmen
- Gelkassette durch Öffnen der Klammern aus dem Gießrahmen nehmen
- Kammereinsatz mit geöffneten Armen auf eine ebene Fläche stellen; sA
- Gelkassette in den Einsatz legen (kurze Glasplatte nach innen ausgerichtet); sA
- gegenüber (anstatt einer zweiten Gelkassette) den Pufferdamm legen; sA
- Arme hochklappen (dabei mit dem Daumen die Gelkassette und den Pufferdamm in exakter Position fixieren); sA
- Kammereinsatz in die Laufkammer hängen; sA
- obere Kammer bis unter die Kante der äußeren Glasplatte mit kaltem Laufpuffer befüllen
- untere Kammer bis zur Markierung mit kaltem Laufpuffer befüllen (ca. 550 mL)
- Kamm vorsichtig entfernen
- Geltaschen mit Hilfe von Spritze und Nadel mit Laufpuffer spülen
- gesamte Elektrophoresekammer in Styroporbox stellen und mit Eis umgeben
- Deckel aufsetzen (Pole beachten)
- an Stromversorgung anschließen
- Gelvorlauf: 10 min bei 160V/35 mA pro Gel

4. Protein-DNA Bindungsreaktion

Lösungen: Xyr1-Protein (5 μ M bzw. 500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer bzw. CD-Puffer) (K)
 BSA-Protein (500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer) (K)
 DNA-Protein-Bindungspuffer (10 mM Tricin, 50 mM NaCl, pH 7,4) (E)
 CD-Puffer (50 mM Tris, 200 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 % Glycerin, pH 7,5) (E)

Materialien: 1,5-mL-RG

Durchführung:

Wichtig: Xyr1 reagiert empfindlich auf harsches Vortexen oder Einfrieren. Beim Ansetzen der Bindungsreaktionen sollte jedenfalls nur durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt werden. Die Inkubation und Lagerung auf Eis bzw. 4 °C stellt kein Problem dar, aber das Protein sollte nicht eingefroren werden (wichtig für die Abgabe der Proben für die Circular dichroismus-Messungen!).

Bindungsreaktionen und Leerproben für den EMSA:

1. Leerprobe (markierte pxyn1-Sonde)
2. Markierte pxyn1-Sonde + Xyr1-Protein (500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer)
3. Markierte pxyn1-Sonde + Xyr1-Protein (5 μ M, in DNA-Protein-Bindungspuffer)
4. Markierte pxyn1-Sonde + BSA
5. Markierte pxyn1-Sonde + cold competitor (0,25 μ g/ μ l) + Xyr1-Protein (500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer)
6. Markierte pxyn1-Sonde + cold competitor (1,25 μ g/ μ l) + Xyr1-Protein (500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer)
7. Markierte pxyn1-Sonde + cold competitor (2,5 μ g/ μ l) + Xyr1-Protein (500 nM, in DNA-Protein-Bindungspuffer)

Leerprobe

- 18 μ L Bindungspuffer
- 2 μ L markierte pxyn1-Sonde

Bindungsreaktionen ohne cold competitor

- 10 μ L Bindungspuffer
- 2 μ L markierte pxyn1-Sonde
- 8 μ L Xyr1- bzw. BSA-Protein

Bindungsreaktionen mit cold competitor

- 8 μ L Bindungspuffer
 - 2 μ L markierte pxyn1-Sonde
 - 2 μ L cold competitor Sonde
 - 8 μ L Xyr1- bzw. BSA-Protein
- 30 min auf Eis inkubieren
 - Verwendung für den EMSA

Bindungsreaktionen und Leerproben für die CD-Messung:

- eine 400 μ L-Reaktion und eine Leerprobe (CD-Puffer statt DNA) ansetzen:
 - 20 μ L unmarkierte pxyn1-Sonde
 - 380 μ L Xyr1-Protein (500 nM, in CD-Puffer!)
- 30 min auf Eis inkubieren
- Die Proben in die Box „Abgabe CD-Messung“ (K) geben.

5. Native Gelelektrophorese

Lösungen: 50 % (v/v) Glycerinlösung (K)

Geräte: Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)*
ChemiDoc Imager (Bio-Rad)

Durchführung:

- nach dem Gelvorlauf Stromzufuhr unterbrechen!
- Deckel abnehmen
- ev. Geltaschen erneut mit Laufpuffer spülen
- 5 μ L 50%ige Glycerinlösung zu den Proben geben und langsam (absinken lassen!) in je eine Geltaschen laden
- Gellauf: 1 h bei 160V/35 mA
- Stromzufuhr unterbrechen!
- Entnahme des Kammereinsatzes und der Gelkassette
- Gelanalyse am ChemiDoc Imager
Hinweis: Kontaktieren Sie dazu eine/n Betreuer/in.
- Abbau der Apparatur
- alle Teile mit Seifenwasser und Schwämmchen gründlich reinigen
- alle Teile mit VE-Wasser oder destilliertem Wasser nachspülen
- alle Teile trocknen lassen
- alle Teile beim/bei der Betreuer/in retournieren

6. Auswertung/Abgabe

- EMSA-Bild und CD-Spektrum auf ein A4-Papier kleben, Beschriftungen anbringen (Name, Datum, Spuren des Gels, CD-Kurven), kurze Interpretation der Ergebnisse (1-3 Sätze)
- A4-Blatt bei einem/r Betreuer/in abgeben