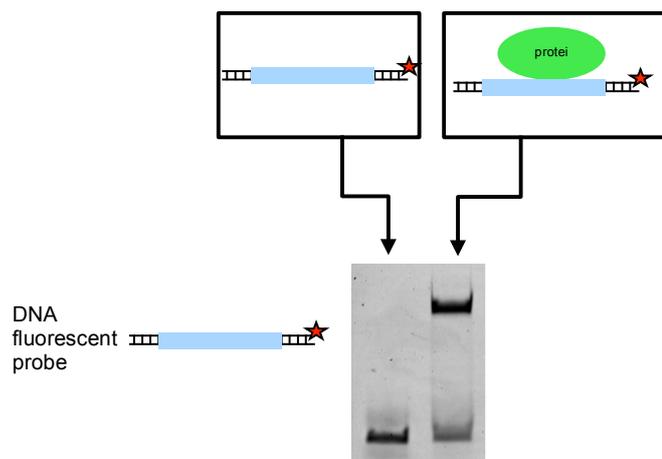


PROTEIN-DNA INTERAKTION

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 relativer 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 alleine und sich somit langsamer in einer Gelelektrophorese bewegen. Man könnte also auch sagen, daß die DNA Migration „geschiftet“ 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.

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

Eine andere 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 Systems möglich!

1. Herstellung der markierten und der unmarkierten DNA-Sonde

Lösungen: 0.25 µg/ml Oligonukleotidlösungen pxyn1.1f_FAM, pxyn1.1f und pxyn1.1r (G)
5x Anlagerungspuffer (1 M Tris-HCl, pH 7,7)
sb Wasser

Materialien: 1,5-mL-RG
Eisbad

Geräte: Thermoblock

Durchführung:

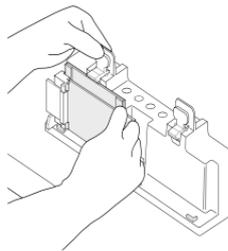
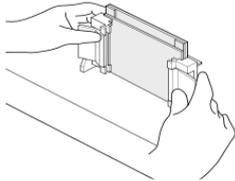
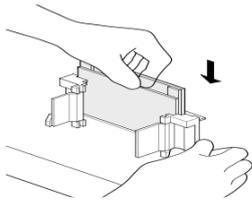
- Oligonukleotidlösungen auftauen, schütteln, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen
- je 2 µL von den komplementären Oligonukleotiden pxyn1.1.f_FAM und pxyn1.1r in einem RG vorlegen
- je 2 µL von den komplementären Oligonukleotiden pxyn1.1.f und pxyn1.1r in einem RG vorlegen
- zu beiden Ansätzen 6 µL Anlagerungspuffer und 20 µL sb Wasser mischen
- 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:

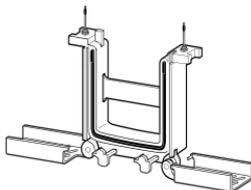
- den Gießrahmen auf eine ebene Fläche stellen (Klammern offen und nach vorne ausgerichtet)
- die beiden Glasplatten in den Gießrahmen stellen (kürzere Platte vorne; Abstandhalterplatte hinten); sA
Hinweis: Achten Sie darauf, daß beide Platten absolut eben aufliegen und die Beschriftung der Abstandhalterplatte 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 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

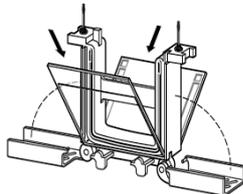
3. Vorbereitung der Gelelektrophorese

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



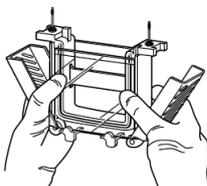
Materialien: großes Becherglas
 Magnetrührstäbchen
 Styroporbox (passend für die Elektrophoresekammer), Eis
 Spritze*
 Nadel*

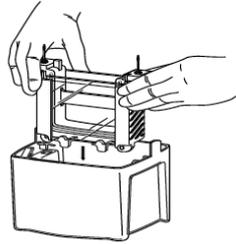
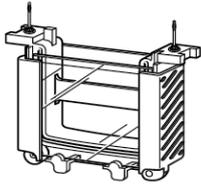
Geräte: Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad)*



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 Eis herumgeben
- Deckel aufsetzen (Pole beachten)
- an Stromversorgung anschließen
- Gelvorlauf: 10 min bei 160V/35 mA pro Gel

4. Protein-DNA Bindungsreaktion

Lösungen: Xyr1 Protein (500 nM, in DNA-Protein Bindungspuffer) (G)
DNA-Protein Bindungspuffer (10 mM Tricine, 50 mM NaCl, pH 7.4) (E)

Materialien: 1,5-mL-RG

Durchführung:

- eine 20 μ L-Reaktion und eine Leerprobe (Bindungspuffer statt Protein) ansetzen:
 - 10 μ L Bindungspuffer
 - 2 μ L markierte DNA Sonde
 - 8 μ L Xyr1 Protein
- bei RT 10 min inkubieren
- Verwendung für den EMSA
- eine 400 μ L-Reaktion und eine Leerprobe (Bindungspuffer statt DNA) ansetzen:
 - 20 μ L unmarkierte DNA Sonde
 - 380 μ L Xyr1 Protein
- bei RT 10 min inkubieren
- Die Proben in die Box „Abgabe CD-Messung“ (G) 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 beiden Proben geben und langsam (absinken lassen!) in je eine Geltaschen laden
Hinweis: Die mittleren Geltaschen verwenden, eine Geltasche als Abstand ist sinnvoll.
- 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, Gruppen Nr., Datum, Spuren des Gels, CD-Kurven), kurze Interpretation des Ergebnis (1-3 Sätze)
- A4-Blatt bei einem/r Betreuer/in abgeben