

Laborpraktikum

Namen: Sven Thierbach
Christian Gruchow
Peter Schön

Betreuerin: Hella Hartmann

Datum: 18.5.05

Biochemischer Nachweis von Protein-DNA Wechselwirkungen mit EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Ziel: Es soll die Bindung des Replikationsproteins A (RPA) an M13 ssDNA beobachtet werden. Des Weiteren soll ein prinzipielles Verständnis eines biochemischen Bindungsassays im Vergleich zu physikalischen Versuchsanordnungen erreicht werden.

Theoretischer Hintergrund:

DNA wird in einem nicht denaturierenden Gel unter dem Einfluss eines äußeren elektrischen Feldes zum Wandern gebracht. Dies geschieht, weil DNA negativ geladen ist. Bindet sich jedoch ein Protein (mit gegenüber der DNA vernachlässigbarer Ladung) an diese, so bewegt sich die gebundene DNA langsamer als die ungebundene, ihre elektrophoretische Mobilität ist geringer. Man nennt sie auch „geschiftet“. Begründet liegt dieser Befund darin, dass durch die erhöhte Masse der gebundenen DNA bei annähernd gleichbleibender Ladung sich die Driftgeschwindigkeit verringert. Man bezeichnet dies auch als Siebeffekt. Darüber hinaus besitzt der DNA-Protein-Komplex auch eine andere Form als ungebundene DNA, was zu größeren Behinderungen beim Durchwandern der Poren des Gels führt.

Das verwendete Protein A (RPA) ist ein heterotrimeres Protein, bestehend aus den Untereinheiten RPA70, RPA32 und RPA14. Es bindet direkt an einzelsträngige DNA (ssDNA). Diese ist im Experiment das zirkuläre Genom des Bakteriophagen M13.

Durchführung:

Herstellung eines 1% Agarosegels

Dieses Gel hat eine passende Porengröße, um die verwendete gebundene von ungebundener DNA zu trennen. (Für andere Porengröße müsste der Agaroseanteil variiert werden.) Für die Herstellung des Gels wird ein halbes Gramm Agarosepulver in 50ml TAE-Puffer gelöst. Dies geschieht, indem man die Mischung zuerst ein wenig quellen lässt und danach in der Mikrowelle solange immer wieder erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Das muss aber vorsichtig erfolgen, da die Mischung sehr plötzlich und heftig zu kochen beginnt. Unter Rühren wird die Mischung schließlich abgekühlt und in die Gelkammer mit eingebautem Kamm gegossen. Der Kamm formt die Slots, in die später die DNA eingefüllt wird. Das Gel muss danach bei Raumtemperatur erstarren (mindestens 1h).

Bindungsansätze

Damit sich am Ende DNA und Protein auch verbinden können, muss zunächst ein Bindungsmix hergestellt werden, den wir zweifach konzentriert haben. Die Mengenangaben sind auf ein Volumen von 300ml berechnet.

	Stammlösung	Vorverdünnung	C_{end}	2x Bindungsmix
--	--------------------	----------------------	------------------------	-----------------------

Hepes-KOH ph 7,8	0,5M		20mM	24µl
MgCl ₂	0,25M		5mM	12µl
DTT	1M	1:10	1mM	0,6 µl (6µ)
EDTA	0,25M	1:20	0,1mM	0,24µl (4,8µl)
H ₂ O (add 252µl)				205,2µl

Hepes-KOH dient dazu, einen stabilen pH-Wert der Lösung von ph=7,8 zu gewährleisten. Es ist notwendig, den ph-Wert zu kontrollieren, da das Protein bei unterschiedlichen ph-Werten unterschiedlich protoniert ist und damit unterschiedliche Ladungen besitzt, die das Wanderungsverhalten des DNA-Protein-Komplexes stark beeinflussen können. Das MgCl₂ wird benötigt, damit das Protein an die DNA binden kann, weil dazu Magnesium erforderlich ist. DTT schützt die SH-Gruppe der Aminosäure Cystein im Protein, da diese sonst mit einer anderen SH-Gruppe eine Bindung eingehen könnte, was zu Konformationsänderungen des Proteins führte, die wiederum das Bindungsverhalten gegenüber der DNA negativ beeinflussten. EDTA bindet Schwerionen, die ebenfalls unerwünscht sind.

Da sich Volumina kleiner als 2µl nur mit großen relativen Fehlern pipettieren lassen, wurden sowohl DTT als auch EDTA vorverdünnt. Die geklammerten Zahlen in der Tabelle stehen für die verwendeten Volumina der Vorverdünnung. Der Mix wird auf Eis gelegt, da sowohl DNA als auch Protein ständig gekühlt sein sollten und es sehr ungünstig wäre, sie in einen warmen Mix zu geben. Außerdem sind dadurch reproduzierbare Versuchsbedingungen gegeben.

Als nächstes wird die RPA-Proteinlösung mit Dialysepuffer im Verhältnis 1:4 verdünnt, d.h. auf 21µl Dialysepuffer kommen 7µl RPA-Lösung. Diese Mischung wird kurz zentrifugiert. Da sich dabei die Probe erhitzt, sollte das Zentrifugieren wirklich nur sehr kurz sein. 10 µl der RPA-Lösung werden abgetrennt und bei 95°C 5 Minuten lang inkubiert, um das Protein zu denaturieren und eine Vergleichsmessung durchzuführen.

Im nächsten Schritt werden 25,2µl des 2x Bindungsmixes 4,8µl der M13 ssDNA zugefügt. Jetzt können die kompletten Bindungsansätze hergestellt werden:

Ansatz	1	2	3	4	5
2xBindungsmix mit DNA	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
Dialysepuffer	5µl	4µl	2µl	-	-
RPA (1:4)	-	1µl	3µl	5µl	-
RPA (1:4) inaktiviert	-	-	-	-	5µl
Σ	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

Die einzelnen Bindungsansätze werden gevortext und zentrifugiert. Anschließend werden sie für 25 Minuten bei 37°C inkubiert, da es sich beim Protein um ein menschliches handelt, das bei Körpertemperatur seine höchste Aktivität besitzt. Während der Inkubation soll sich das Protein an die DNA anlagern. Jeder der Ansätze wird anschließend noch mit 2µl Ladepuffer versehen, der dazu dient, den Ansatz in den Slot fallen zu lassen, da seine Dichte höher als die von Wasser ist, und zu verhindern, dass er darüber difundiert. Darüber hinaus ist der Ladepuffer auch gefärbt (Bromphenolblau), was bei der Überprüfung hilft, ob das elektrische Feld auch richtig herum angelegt wird, denn der Farbstoff ist ebenfalls negativ geladen und wandert somit in dieselbe Richtung wie die DNA.

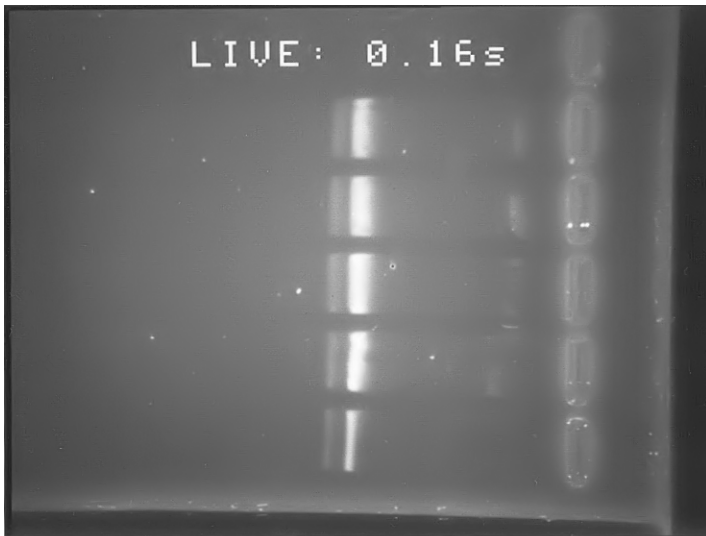
Elektrophorese

Zunächst muss die Gelkammer bis kurz über das Gel mit TAE-Puffer gefüllt werden. Anschließend wird der Kamm vorsichtig entfernt und die Bindungsansätze in die Slots des Agarosegels eingefüllt. Bei einer Spannung von 90V werden sie eine Stunde lang voneinander getrennt. Nach der Stunde ist der Farbstoff in allen Bahnen gleichweit gelaufen, da er von der DNA unabhängig ist und sich nicht mit dieser verbunden hat. Die DNA selbst ist nicht zu sehen und muss deshalb noch angefärbt werden.

Ethidiumbromidfärbung

Die Färbung wird mit Ethidiumbromid durchgeführt. Dies erfordert einige Vorsichtsmaßnahmen, da EtBr mutagen ist. Es werden 100ml EtBr-Lösung mit einer Konzentration von 0,5µg/ml benötigt. Diese wird dem Agrosegel, welches in eine Schale gelegt wurde, beigefügt. Das Ganze wird für 5min auf einem Rütteltisch gewegt, um dem EtBr die Möglichkeit zu geben, die DNA zu finden und an diese zu binden. Anschließend ist die DNA zwar immer noch nicht sichtbar, aber das EtBr fluoresziert im UV-Licht (350nm). Deshalb wird das Gel auf einem UV-Transilluminator fotografiert. Die DNA wird sichtbar.

Auswertung:



In jedem Streifen zeigen sich zwei Banden. Das kommt daher, dass einige DNA-Ringe aufgebrochen wurden und somit in linearer Form vorliegen. Die lineare DNA kann sich durch das Gel ein wenig schneller bewegen als dies der kreisförmigen möglich ist. Es bilden sich folglich zwei Banden heraus.

Es war zu erwarten, dass der Ansatz mit dem inaktiven Protein und derjenige ohne Protein gleichauf am Weitesten gewandert sind, da in beiden Fällen die DNA ohne Proteinhängsel relativ ungehindert wandern kann. Denn das denaturierte Protein ist entfaltet und kann deshalb nicht mehr an die DNA binden. Die anderen Ansätze sollten weniger weit gewandert sein, und zwar um so weniger, je höher die Proteinkonzentration ist, da durch das Anhängen von einem oder mehreren Proteinen die Beweglichkeit der DNA behindert wird. Dies war aber leider bei uns nicht zu beobachten, alle Ansätze sind gleich weit gewandert.

Offensichtlich hat sich das Protein also nicht an die DNA angelagert. Wieso das jedoch nicht geschah, konnte von uns im Nachhinein nicht mehr ermittelt werden, da sehr viele Schritte bei der Herstellung der Bindungsansätze notwendig waren und der Fehlermöglichkeiten somit viele sind.