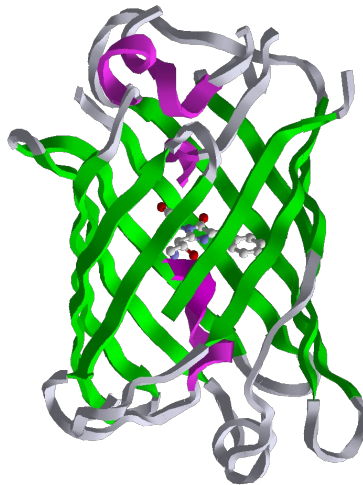


Fluorescentni proteini-struktura i primjena

UVOD

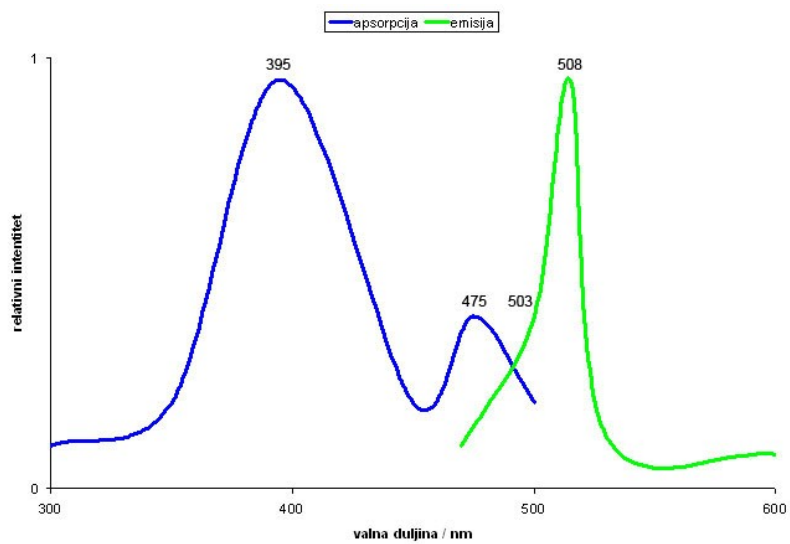
Rad grupe *Fluorescentni proteini-struktura i primjena* koncentriran je na upoznavanje s uobičajenim tehnikama molekularne biologije; od pripreme kompetentnih stanica do ekspresije proteina. Dodatni zadatak je pretraživanje literature i upoznavanje s bioinformatičkim oruđem u vizualizaciji proteina.



Slika 1: Struktura zelenog fluorescentnog proteina

Zeleni fluorescentni protein (GFP, slika 1) je dobar model za ovaj projekt budući da pri iluminaciji UV zračenjem emitira zeleno svjetlo, vrlo dobro je istražen te pogodan za upoznavanje s bioinformačkim alatima. GFP je otkriven pedesetih godina prošlog stoljeća u tihooceanskoj meduzi *Aequorea victoria*. Zbog svjetla koje emitira, postao je važno oruđe znanstvenicima iz područja biokemije, molekularne biologije, fiziologije i mnogih drugih znanosti. Može se koristiti za proučavanje ekspresije gena, kao indikator ili kao biljeg pomoću kojeg se prate neki drugi proteini ili molekule.

Proces koji je uzrok emisije zelenog svjetla je fluorescencija, a odvija se na fluoroforu, maloj molekuli koja je dio strukture samog proteina. **Fluorofor** spontano nastaje od triju aminokiselina (Ser66-Tyr67-Gly68) unutar samog središta proteina u slijedu od tri reakcijska koraka. U dozrelom proteinu fluorofor apsorbira svjetlost valne duljine od 395 nm te manjim dijelom na 475 nm. Emisija se odvija na 508 nm te manjim dijelom na 503 nm (Slika 2). Cilj projekta je transformirati *Escherichia coli* bakterije (soj Rosetta) plazmidom koji sadrži gen za zeleni fluorescentni protein. Potaknutu ekspresiju smo dokazali iluminacijom UV zračenjem i SDS-PAGE elektroforezom.



Slika 2: Graf apsorpcije i emisije fluorofora

MATERIJALI I METODE

KOMPETENTNE STANICE

Stanice *E. coli* (soj Rosetta) treba učiniti podložnima transformaciji plazmidima. Takve, kompetentne stanice pripremljene su uzastopnim resuspendiranjem, hlađenjem i centrifugiranjem stanica u puferu koji sadrži 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM CaCl₂.

TRANSFORMACIJA I UZGOJ

Kompetentne Rosetta stanice su potom transformirane CaCl₂/heat shock metodom (42° C 80 sec, 0° C 20 sec, slika 3) čime je u njih unesen plazmid koji sadrži gen za GFP te gen čiji produkt bakterijama daje otpornost na kanamicin. Stanice su razmazane na krutom LB agaru s kanamicinom te su na principu otpornosti na antibiotik selektirane transformirane stanice. Nakon 16-18 h na 37° C bakterije su s krute podloge presađene u 5 mL tekućeg medija gdje su na temperaturi 37° C uzgajane do optičke gustoće od približno 0.5.

INDUKCIJA EKSPRESIJE

Pri željenoj O.D. 0.5 rast baterija je u eksponencijalnoj fazi te se tad ekspresija GFPa inducirala IPTG-om (*i*-propil-tiogalaktosid) koji je dodan do konačne koncentracije 1 mmol/L. Uzgoj je nastavljen sljedećih 3-4 h a rezultati su provjereni SDS-PAGE metodom i iluminacijom UV-om.

IZOLACIJA PLAZMIDA

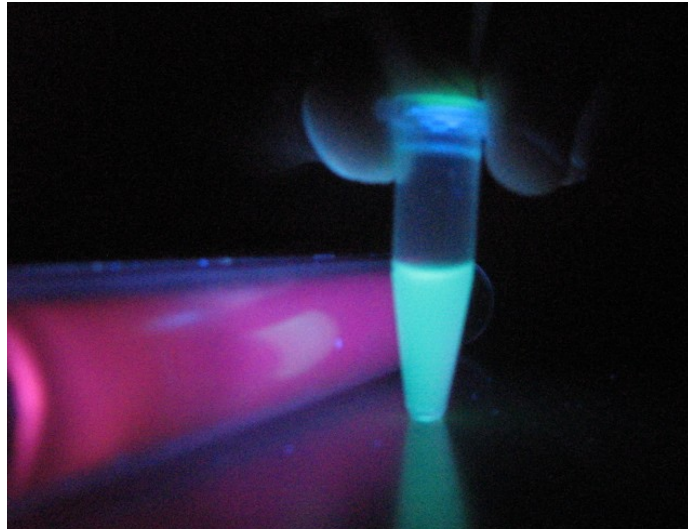
Iz dijela tekuće kulture izoliran je plazmid uz pomoć **QIAGEN**ovog miniprep kita.



Slika 3: Heat shock

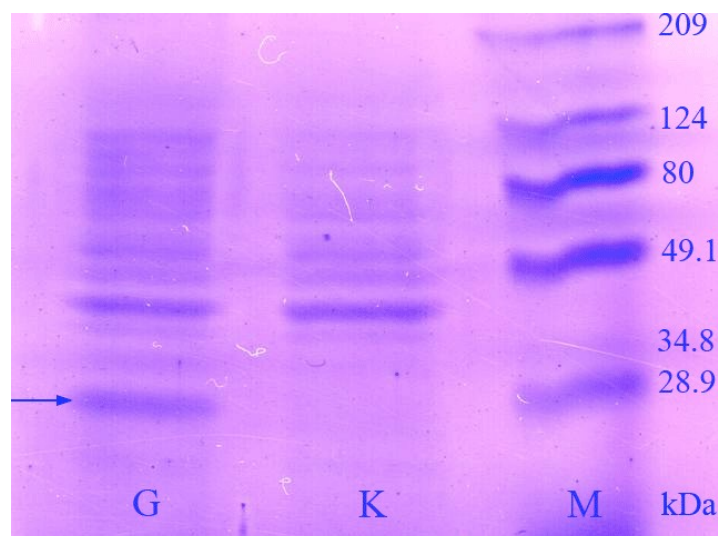
REZULTATI

Kolonije koje su rezultat uzgoja transformiranih stanica na krutoj podlozi, presađene su u tekući medij. Nakon uzgoja tekuće kulture i indukcije ekspresije, rezultat je provjeren optički. **Fluorescencija** koja se pojavljuje nakon osvjetljavanja UVom dokazuje da naše bakterije ekspimiraju GFP (slika 4).



Slika 4: GFP je ekspimiran u tekućoj kulturi

Transformirane stanice iz tekuće kulture analizirane su **SDS-PAGE** elektroforezom (slika 5). Netransformirana negativna kontrola, te transformirane stanice koje su ekspimirale GFP lizirane su kuhanjem i analizom na gelu su vidljivi ukupni stanični proteini. Usporedbom s markerom vidljivo je da su transformirane stanice ekspimirale protein koji po veličini odgovara zelenom fluorescentnom proteinu.



Slika 5: SDS-PAGE gel, G- transformirane stanice, K- kontrola, M- marker, GFP (26.9 kDa) je označen strelicom

ZAKLJUČAK

Tijekom projekta uspješno smo pripremili kompetentne stanice, transformirali ih, te smo potaknuli ekspresiju dodavanjem IPTGa. Escherichia coli stanice koje su preuzele gen, nakon indukcije su fluorescirale zeleno pri iluminacije UV zračenjem.

ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. Svjetlani Kalanj-Bognar (Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatski institut za istraživanje mozga) na ustupljenim kemikalijama, Martini Mijušković (New York University) na protokolima i dr. sc. Kseniji Zahradki (Institut Ruđer Bošković) na ustupljenom biološkom materijalu.

POPIS LITERATURE

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular Biology of the Cell, 4th edition, Garland science, 2002.
2. Nelson DL, Cox MM, Lehninger: Principles of Biochemistry, 4th edition, W H Freeman & Co., New York, 2004.
3. Atsushi M, Takeharu N, Hideaki M: Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering, Cur Op in Chem Biol. 2003;Vol.7;5;557-562, Review
4. Suresh S, Sapna KD: Anthozoa red fluorescent protein in biosensing. Anal and Bioanal Chem, 2006;vol 386;3; 1618-2642. Review
5. Tsien RY: The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem. 1998;67:509-44. Review.