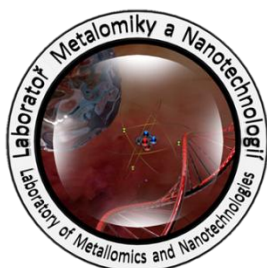




Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Příprava GFP pro molekulárně biologické aplikace

1.část: Biosyntéza GFP

Anotace

Zelený fluorescenční protein (GFP), který lze vnést do všech možných buněk a organismů. Je možné jej připojit k nejrůznějším proteinům, a tak je fluorescenčně označit bez nutnosti dalších spolupůsobících látek, neboť jeho absorpční a emisní centrum vzniká spontánní reakcí tří aminokyselin – serinu, tyrosinu a glycinu – které jsou součástí jeho struktury. Jde o poměrně malý protein složený z 238 aminokyselin, přičemž tři z nich spontánně za přístupu kyslíku vytvářejí fluorescenční chromofor p-hydroxybenzylideneimidazolonin. Ten má dominantní absorpční maximum při 400 nm a emisní maximum při 505 nm. Zelený fluorescenční protein má velice zajímavou strukturu – tzv. beta-barel složený z 11 vláken beta-skládaných listů s jednou alfa-šroubovicí zanořenou do nitra „soudku“. Chromofor je součástí této šroubovice a je umístěn přibližně uprostřed molekuly. Sekvence tří aminokyselin, které tvoří chromofor, není v denaturovaném (rozvolněném) proteinu ničím zajímavá – ale pokud se zelený fluorescenční protein



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



sbalí do „soudku“, prudké zakřivení vyvolá chemickou reakci.

Takto modifikovaný zelený fluorescenční protein nefluoreskuje. Proto je nutná přítomnost molekulárního kyslíku, v jehož přítomnosti nastává další chemická reakce, pomocí níž vzniká plně fluorescenční protein.

Použité chemikálie

SOC médium, LB agar, ampicilin, arabinosa, EDTA, TRIS-HCl, lysozym

Pracovní postup

Chemická transformace

1. 2 μ l vektoru pGLO-GFP přidáme do mikrozkušavky s chemicky kompetentní *E.coli* a směs jemně promícháme. Nemíchat pipetováním!
2. Mikrozkušavku vložíme na 30 min do ledové lázně a necháme směs inkubovat.
3. Buňky poté necháme projít „teplotním šokem“ při 42 °C po dobu 45 s bez třepání.
4. Okamžitě poté přeneseme mikrozkušavku do ledové lázně na 3 min.
5. Přidáme 250 μ l SOC média (při laboratorní teplotě).
6. Mikrozkušavku pevně zavřeme a protřepeme v horizontální poloze (200 rpm) při 37 °C po dobu 1,30 h.
7. Rozetřeme 25-200 μ l směsi na selektivní misku (LB agar+ampicilin+arabinosa) a necháme inkubovat přes noc při 37 °C.
8. Účinné klonování vyprodukuje stovky kolonií. Pro další analýzu vybereme 10 kolonií.

Enzymatická lýze

1. *E.coli* s pGLO-GFP plasmidem pěstujeme v 250 ml LB média s 100 μ g/ml ampicilinem a 0.2% arabinosou při 32 °C při třepání přes noc.
2. Buňky sklídíme odstředěním v 50 ml zkumavce Falcon při 4000 rpm po dobu 10 min.
3. Peletu několikrát důkladně promícháme rychlým pipetováním v TE pufru (1mM EDTA pH 8, 10mM TRIS-HCl pH 7.5).



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



4. K promíchanému peletu přidáme čerstvý lysozym (10 mg/ml v TE pufru) pro inicializaci enzymatického štěpení bakteriální buněčné stěny. Obsah zkumavky jemně promícháme otáčením zkumavky.
5. Zkumavku vložíme do mrazáku (-80 °C) na 30 min (zmražením dojde ke kompletnímu roztrhání bakterie).
6. Zkumavku vložíme do odstředivky a odstředíme 10 min při 14000 rpm.
7. Supernatant odpipetujeme do nové zkumavky (proteiny jsou přítomny v supernatantu).
8. Izolace GFP pomocí Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC; viz 2.část tohoto protokolu).

Doporučená literatura

Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* 173(1): 33-38.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

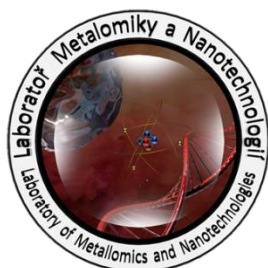


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií

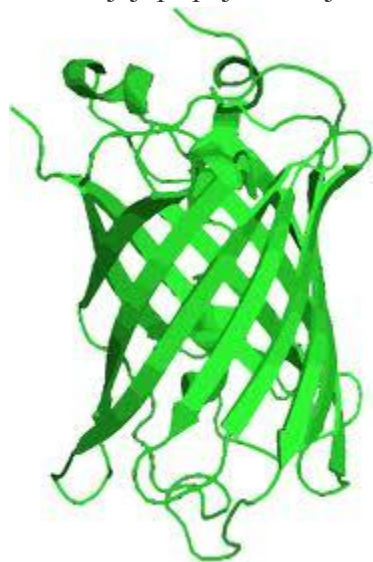


Příprava GFP pro molekulárně biologické aplikace

2.část: Izolace GFP

Anotace

Zelený fluorescenční protein (GFP), který lze vnést do všech možných buněk a organismů. Je možné jej připojit k nejrůznějším proteinům, a tak je fluorescenčně označit bez nutnosti dalších spolupůsobících látek, neboť jeho absorpční a emisní centrum vzniká spontánní reakcí tří aminokyselin – serinu, tyrosinu a glycinu – které jsou součástí jeho struktury. Jde o poměrně malý protein složený z 238 aminokyselin, přičemž tři z nich spontánně za přístupu kyslíku vytvářejí fluorescenční chromofor p-hydroxybenzylidenimidazolonin. Ten má dominantní absorpční maximum při 400 nm a emisní maximum při 505 nm. Zelený fluorescenční protein má velice zajímavou strukturu – tzv. beta-barel složený z 11 vláken beta-skládaných listů s jednou alfa-šroubovicí zanořenou do nitra „soudku“. Chromofor je součástí této šroubovice a je umístěn přibližně uprostřed molekuly. Sekvence tří aminokyselin, které tvoří chromofor, není v denaturovaném (rozvolněném) proteinu ničím zajímavá – ale pokud se zelený fluorescenční protein



sbalí do „soudku“, prudké zakřivení vyvolá chemickou reakci.

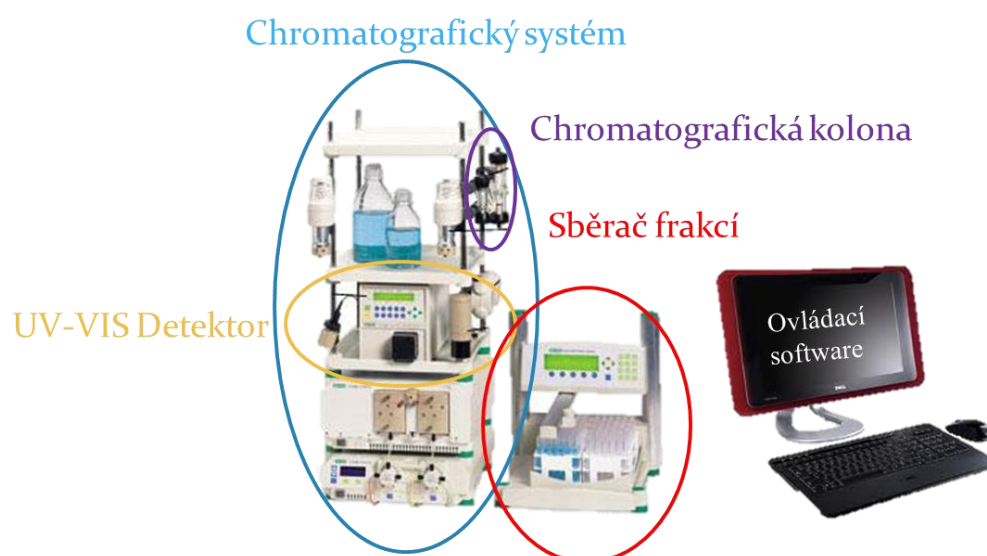
Takto modifikovaný zelený fluorescenční protein nefluoreskuje. Proto je nutná přítomnost molekulárního kyslíku, v jehož přítomnosti nastává další chemická reakce, pomocí níž vzniká plně fluorescenční protein.

Použité chemikálie

SOC médium, LB agar, ampicilin, arabinosa, EDTA, TRIS-HCl

Pracovní postup

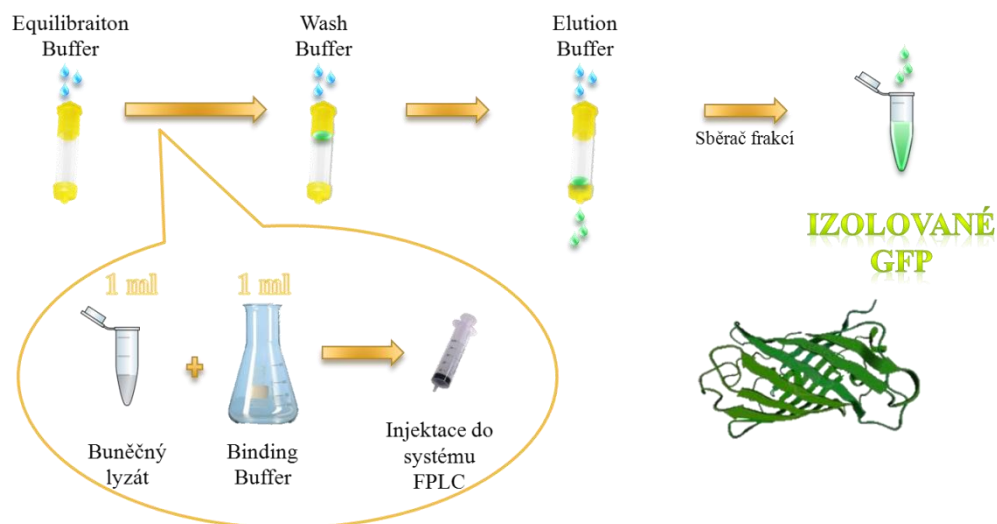
Izolace GFP pomocí FPLC



1. K systému FPLC připojíme chromatografickou kolonu (náplň Macro-Prep Methyl HIC Support, Bio-rad).
2. Systém promýváme Equilibration Buffer (průtok 6 ml/min) po dobu 5 min.
3. Supernatant (1 ml), získaný po enzymatické lýze buněk, smícháme s 1 ml Binding Buffer.
4. Po uplynutí 5 min (krok 2.) zastavíme promývání, na nástřikovém ventilu navolíme pozici I (inject) a vytáhneme injekční stříkačku a nabereme vzorek (krok 3.) do injekční stříkačky.
5. Na nástřikovém ventilu zvolíme pozici L (load).
6. Vyměníme Equilibration Buffer za Wash Buffer.
7. Spustíme program na izolaci GFP a necháme 5 min promývat.

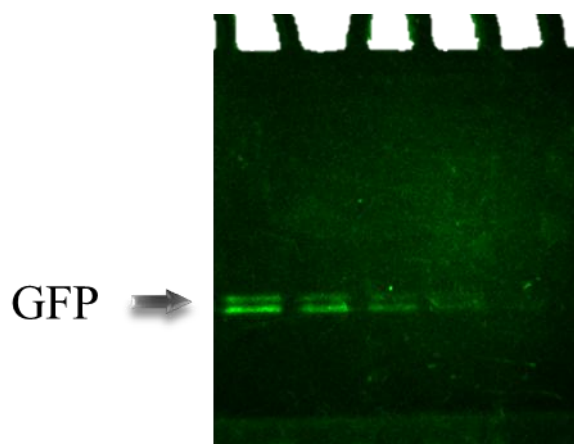
8. Dáme Pause a vyměníme Wash Buffer za TE Buffer a opět spustíme.

9. Po dvou minutách promývání zapneme sběrač frakcí a nakapeme čisté GFP do mikrozkušavek Eppendorf o objemu 1,5 ml.



10. Přítomnost GFP ověříme vložení eppendorfky s proteinem do transiluminátoru a zkontrolujeme fluorescenci

11. Další ověření přítomnosti a čistoty GFP můžeme provést pomocí gelové elektroforézy (viz obrázek níže) a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (viz 3. část tohoto protokolu).



Doporučená literatura

CZ.1.07/2.3.00/20.0148 NANOLABSYS

Mezinárodní spolupráce v oblasti „*in vivo*“ zobrazovacích technik

http://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanolabsys/



Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." *Gene* 173(1): 33-38.



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

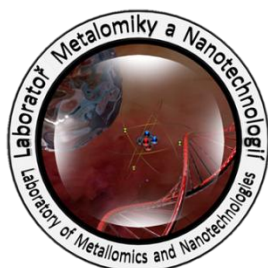


OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Laboratoř Metalomiky a Nanotechnologií



Příprava GFP pro molekulárně biologické aplikace

3.část: Ověření GFP pomocí MALDI-TOF MS

Anotace

Zelený fluorescenční protein (GFP), který lze vnést do všech možných buněk a organismů. Je možné jej připojit k nejrůznějším proteinům, a tak je fluorescenčně označit bez nutnosti dalších spolupůsobících látek, neboť jeho absorpční a emisní centrum vzniká spontánní reakcí tří aminokyselin – serinu, tyrosinu a glycinu – které jsou součástí jeho struktury. Jde o poměrně malý protein složený z 238 aminokyselin, přičemž tři z nich spontánně za přístupu kyslíku vytvářejí fluorescenční chromofor p-hydroxybenzylidenimidazolonin. Ten má dominantní absorpční maximum při 400 nm a emisní maximum při 505 nm. Zelený fluorescenční protein má velice zajímavou strukturu – tzv. beta-barel složený z 11 vláken beta-skládaných listů s jednou alfa-šroubovicí zanořenou do nitra „soudku“. Chromofor je součástí této šroubovice a je umístěn přibližně uprostřed molekuly. Sekvence tří aminokyselin, které tvoří chromofor, není v denaturovaném (rozvolněném) proteinu ničím zajímavá – ale pokud se zelený fluorescenční protein



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



sbalí do „soudku“, prudké zakřivení vyvolá chemickou reakci.

Takto modifikovaný zelený fluorescenční protein nefluoreskuje. Proto je nutná přítomnost molekulárního kyslíku, v jehož přítomnosti nastává další chemická reakce, pomocí níž vzniká plně fluorescenční protein.

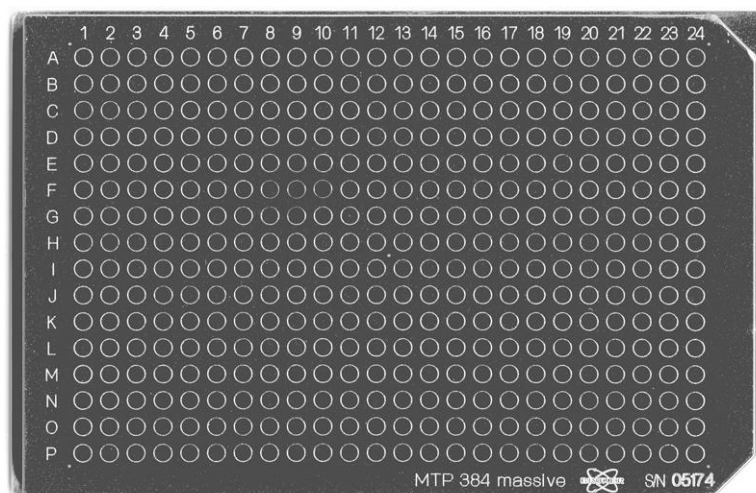
Použité chemikálie

Kyselina α -kyan-4-hydroxyskořicová (HCCA), kyselina trifluoroctová (TFA), acetonitril (ACN), voda (ACS čistota), kalibrační směs proteinů (Bruker), izolované GFP

Pracovní postup

Ověření přítomnosti GFP ve vzorku pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

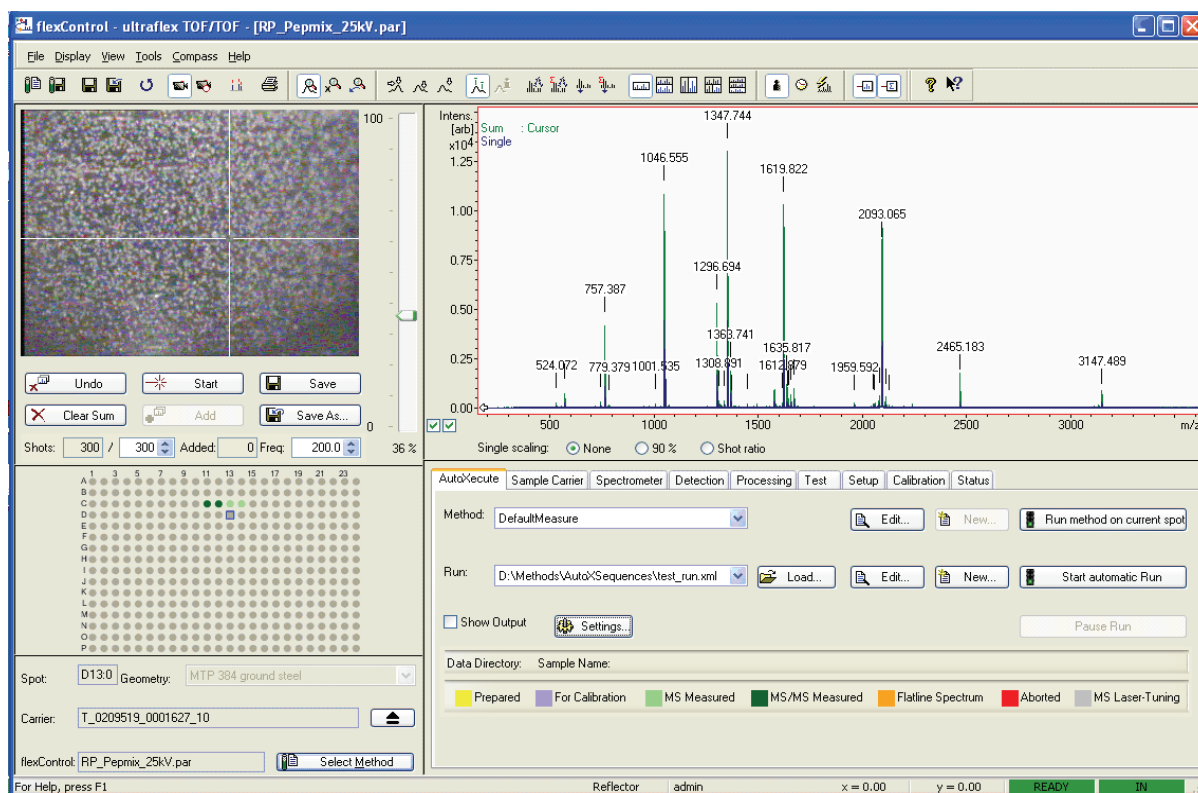
1. Připravíme si roztok matrice HCCA rozpuštěním cca 20 mg HCCA v 1 ml 50% ACN a 0,1% TFA. Pro rychlejší rozpuštění využijeme ultrazvukové lázně.
2. Vzorek izolovaného GFP odsolíme pomocí Amicon ultra 3k (viz návod k filtru Amicon).
3. Smícháme několik μ l odsoleného GFP s roztokem matrice HCCA v objemovém poměru 1:1. To stejné provedeme s kalibrační směsí proteinů.
4. Na MALDI destičku (viz obrázek níže) nanese pomocí mikropipety 2-3 kapky směsi kalibračních proteinů s HCCA maticí a 2-3 kapky směsi vzorku s HCCA maticí. Objem kapky je 1 μ l. Nanášení provádíme v boxu Biosan. Používáme rukavice a dáváme si pozor na kontaminaci vzorku/destičky (vlasy, chlupy,...). Zapišeme si do laboratorního deníku pozice jednotlivých skvrn.



www.ms-textbook.com



5. Nanesené skvrny necháme vyschnout (v boxu) při laboratorní teplotě.
6. MALDI destičku s nanesenými a vyschlými skvrnami snasadíme na adaptér a stiskneme tlačítko PUSH na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru. Počkáme, až se kryt dostane dolů a pak pomocí palce odděláme krytku. MALDI destičku s adaptérem vložíme dovnitř a krytku i kryt zavřeme.
7. Zmáčkne zelené tlačítko LOAD/EJECT. Jakmile dojde k „usazení“ MALDI destičky v iontovém zdroji, rozsvítí se kontrolka READY. Přístroj je připraven k měření.
8. V hlavním panelu programu flexControl (viz obrázek níže) se klikne na *File*→*Select method* a vybere se vhodná metoda. Pro měření proteinů metoda s LP (linear positive).



9. V položce *Detection* zkontrolujeme a případně upravíme rozsah $\frac{m}{z}$, ve kterém hodláme měřit.
10. Před začátkem kalibrace otevřeme položku *Calibration* a načteme vhodný seznam proteinů. Pokud není seznam úplný, doplníme název proteinu a jeho hmotnost. Zkontrolujeme stav přístroje – musí svítit zelená kontrolka READY a ACCES na přístroji. V programu flexControl lze vidět v pravém dolním rohu nápis READY a IN na zeleném podkladu (IN značí, že je destička vložena a připravena k měření).



11. Na schématu MALDI destičky v programu flexControl klikneme na pozici, kam jsme nanesli kalibrační směs. Na kameře můžeme sledovat, jak se destička posouvá na požadovanou pozici.
12. V kolonce *Shots* pod kamerou nastavíme počet krátkých pulzů laseru na 500. Vhodný výkon laseru nastavíme na posuvníku napravo od kamery – začínáme měřit s malou energií laseru a pomalu posouváme posuvníkem nahoru, dokud dochází ke zlepšování kvality spekter. Jakmile se začne zvedat „baseline“ spektra, přestaneme zvyšovat výkon laseru a nastavíme posuvník o zhruba 5 % níže.
13. Klikneme na tlačítko *Start* pod kamerou a začneme měřit. Při „střílení“ laserem ručně posouváme destičkou tak, že myší klikáme na různé body na kameře. Po „nastřílení“ celého předem nadefinovaného počtu spekter zprůměrované spektrum uložíme kliknutím na *Save As* a popíšeme soubor.
14. V položce *Calibration* klikneme na *Automatic Assign*. Tím se přiřadí hmotnosti naměřených píků standardů k jejich referenčním hmotnostem z načteného seznamu. Zkontrolujeme spektrum, zda píky odpovídají referenčním hmotnostem (v co nejmenším rozsahu $\frac{m}{z}$) a klikneme na *Apply*. Tím přístroj nakalibrujeme. V tabulce vidíme, jak moc se liší naměřená hodnota od hodnoty referenční a vypočtenou chybu. Klikneme na *Save* a spektrum znovu uložíme.
15. Po zkalibrování přístroje změříme a uložíme spektra GFP.

Doporučená literatura

GURÁŇ, Roman. Nanášení vzorků pro desorpční analytické metody (online). 2010 (cit. 21.6.2013). Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Jan Preisler. Dostupné z: <http://is.muni.cz/th/270205/prif_b/>.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost