

Johdanto

Työssä tehtiin fuusioproteiini, jossa *Pseudomonas Syringae* –bakteerin HrpZ-proteiini on fuusioproteiinin aminopäässä ja vihreä fluoresoiva proteiini (GFP) on karboksyylipäässä. GFP on yleisesti käytetty reportteriproteiini, jota koodaava sekvenssi liitetään osaksi tutkittavan proteiinin koodaavaa aluetta. Kun fuusioproteiinia muodostuu, se fluoresoi vihreää väriä, jonka avulla proteiinin tuotanto voidaan paikantaa visuaalisesti.

Halusimme tarkastella kahta E.Coli BL21 –kannassa tuotettua kloonina, joista toinen kantoi GFP-fuusioproteiinia ja toinen pelkkää GFP:tä. Emme halunneet denaturoida tutkittavia proteiineja, koska halusimme fluoresenssin olevan havaittavissa, joten käytimme eristykseen natiivigeeliprotokollaa.

Natiivigeelielektroforeesi tehdään ilman detergenttiä (esim. SDS) joten se ei denaturoi proteiineja. Proteiinirakenteet ja –laskostukset pysyvät siis pääosin muuttumattomina. Natiivigeelissä, proteiinin liikkuvuus perustuu proteiinin varaukseen ja hydrodynaamiseen kokoon. Proteiinin varaukseen vaikuttaa ajopuskurin pH. Koska proteiinin laskostuminen ei purkaudu, koko ei kerro pelkästään aminohapposekvenssin pituudesta vaan myös laskostumisen tiheydestä.

Aineisto ja menetelmät

Geeli

Teimme natiivigeelin yhdessä toisen ryhmän kanssa ja yhdistimme osin kaksi samankaltaista protokollaa. Teimme 12 % -erottelugeelin (Separating Gel) ja ylägeelin (Stacking Gel) The Hebrew University of Jerusalem sivuilla olevan BASIC-NATIVE GEL protokollan mukaisesti [1], ja ajopuskurin Institute of Molecular Development LLC:n protokollan mukaisesti [2]. Protokolla on tarkoitettu proteiineille, joiden pI on alle 7.0. GFP:n isoelektrinen piste on noin 5,3.

Geelin valamisessa ja liuosten valmistamisessa seurattiin protokollaa, siitä poikkeamatta.

Geeliajon parametrit

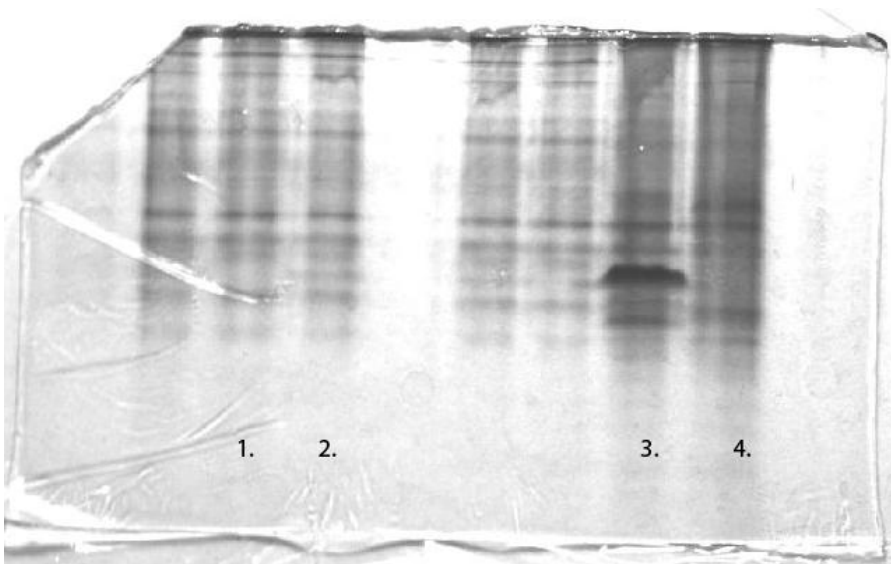
Elektroforeesi ajettiin kahdessa ajossa. Kahden tunnin jälkeen jännitettä ja virtaa nostettiin.

1. Ajo, noin kaksi tuntia : $I = 25\text{mA}$, $V = 250\text{V}$.
2. Ajo, noin 15 minuuttia : $I = 30\text{mA}$, $V = 300\text{V}$.

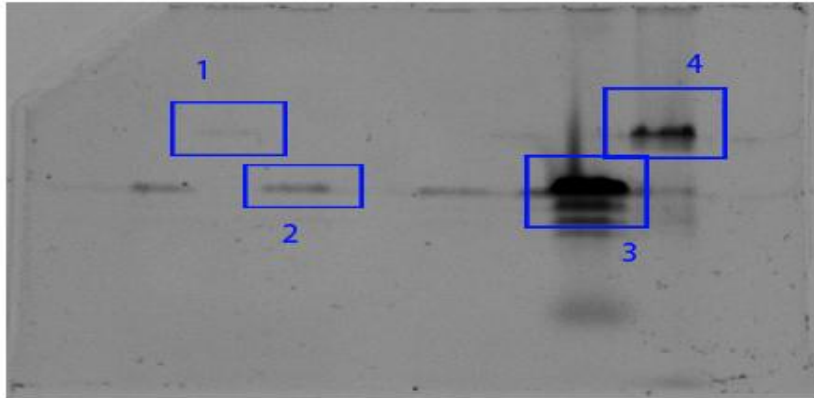
Geelin värjäys

Geeli värjättiin *Coomassie Brilliant Blue*:lla, standardiprotokolla.

Tulokset



Kuva 1. Coomassie-värjätty geeli. 1. oma fuusioproteiini, 2. oma GFP, 3. GFP-kontrolli, 4. fuusioproteiinikontrolli.



Kuva 2. GFP:n fluoresenssi elektroforeesigeelissä. 1. oma fuusioproteiini, 2. oma GFP, 3. GFP-kontrolli, 4. fuusioproteiinikontrolli.

Johtopäätökset

Kuvassa 2 nähdään, että fuusio on onnistunut ja proteiinit eivät ole denaturoituneet sillä molemmat näytteet fluoresoivat. Natiivigeelijaio on siis onnistunut. Fuusioproteiini on pelkkää GFP:tä sekvenssiltään pidempi ja on ajautunut lyhemmän matkan kuten olisi oletettavissa. Omat näytteet ja kontrollinäytteet vastaavat ajautumiseltaan toisiaan.

Molemmissa kuvissa omien näytteiden intensiteetti on pienempi, eli kontrollien konsentraatio on suurempi, mutta molemmat näytteet ovat onnistuneet. Jos niitä käytettäisiin edelleen, olisi pienempi konsentraatio otettava huomioon. Näytteet ovat selkeästi erottuneet ja ne voitaisiin leikata geelistä ja eristää jatkotutkimuksiin.

Viitteet

1. Dr. Mario Lebediker, The Hebrew University of Jerusalem : BASIC-NATIVE GEL Protocol http://wolfson.huji.ac.il/purification/Protocols/PAGE_Basic.html
2. Instiute of Molecular Development LLC : Basic Native Gel Protocol <http://www.molecularinfo.com/MTM/G/G1/G1-1.html>