

A réz ionok hatása a módosított Zöld Fluoreszcens Fehérjére

Effect of cooper ions on modified Green Fluorescent Protein

Efectul ionilor de cupru asupra Proteinei Fluorescente Verzi modificate

BÁLINT Emese-Éva^{1,2}, KERESZTES Előd², FUNKENHAUZER Bernadett²,
DEMETER Erika¹, LÁNYI Szabolcs²

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Kémia és Anyagtudományok Kar,
RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313,
tel.: 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34, email: balintemese@sapientia.siculorum.ro, www.upb.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biomérnöki Tanszék,
Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-31 71 21, Fax 40-266-37 20 99

ABSTRACT

*The Green Fluorescent Protein (GFP) was isolated from the jellyfish *Aequorea victoria*, and it is used in biology and biotechnology for monitoring the proliferation of cancer cells and stem cells, and also it is often used as a biosensor for qualitative and quantitative determination of metals. Different metals have different impact on the protein's fluorescence, some metals reduce the intensity (Cu, Fe, Mg), while others increase (Zn) the fluorescence intensity emitted by the protein.*

The gene encoding the wild-type protein and the two histidine mutant (Q204H-S202H) was introduced in Escherichia coli BL21 (DE3) Star cells. After cell disruption proteins were isolated by immobilized metal ion affinity chromatography.

Sensitivity of these proteins toward metal ions was investigated at different concentrations of Cu²⁺ ions varying the pH (6.5-8) and the incubation temperature (20-45°C).

ÖSSZEFOGLALÓ

*A zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) az *Aequorea victoria* medúzából izolálták, és elsősorattal alkalmazzák a biológia és biotechnológia területén egyaránt rákos sejtek terjedésének és őssejtek osztódásának nyomonkövetésére, valamint bioszenzorként is használják a fémek minőségi és mennyiségi meghatározására. Különböző fémek különbözőképpen hatnak a fehérje fluoreszcenciájára, egyesek csökkentik (Cu, Fe, Mg), míg mások növelik (Zn) a fluoreszcencia intenzitását.*

A vad típusú és a két mutációt (S202H-Q204H) tartalmazó módosított zöld fluoreszcens fehérje génjét tartalmazó plazmidot Escherichia coli BL21(DE3) Star sejtekbe transzformáltuk, sejteltárás után a termelt összfehérje extraktumból affinitás kromatográfiával izoláltuk a fehérjéket.

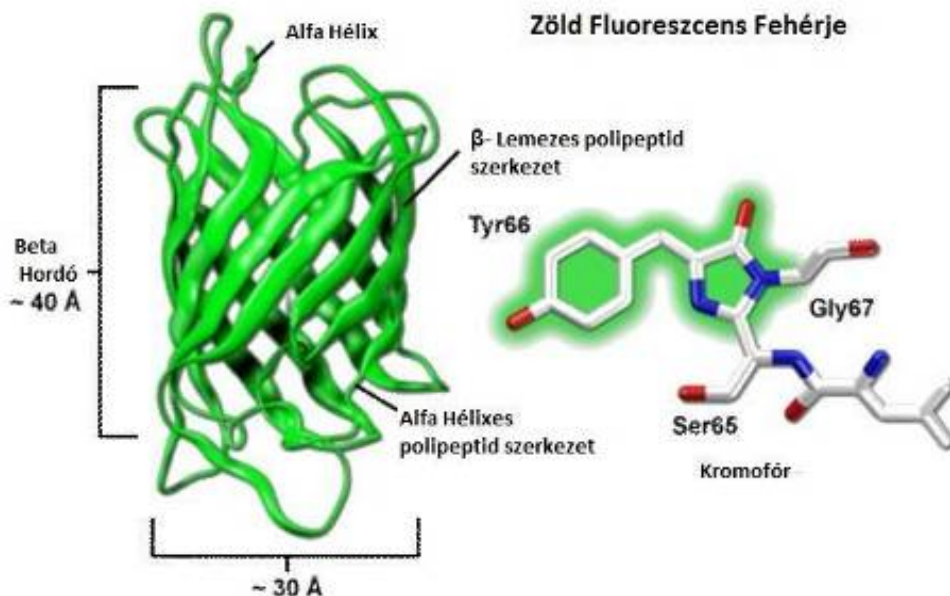
Az így előállított vad típusú és mutáns zöld fluoreszcens fehérjék érzékenységét vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu²⁺ ionokkal szemben változó pH (6.5-8) és hőmérséklet (20-45°C) hatására.

Kulcsszavak: EGFP, bioszenzor, fluoreszcencia intenzitás, mutáns EGFP, transzformálás.

1. BEVEZETŐ

Egyes szerves vegyületek magasabb energiájú (gerjesztett) állapotba kerülnek, ha nagy energiájú fényel sugározzák be őket. A többletenergiát később úgy adják le, hogy közben fényt sugároznak ki (emittálnak). Fluoreszcenciát bocsájthatnak ki különböző baktériumok, egysejtűek, rovarok, hidrák és medúzák egyaránt [1].

A fehérjét O. Shimomura 1962-ben izolálta az *Aequorea victoria* nevű medúzából. A medúza kék fényt bocsájít ki védekező mechanizmusként, amely fény egy részét a GFP elnyeli és zöld fényt emittál.



1.1 ábra

A zöld fluoreszcens fehérje (GFP), valamint a fehérje fluoreszcenciájáért felelős kromofór csoport szerkezete

A fehérje molekulatömege 27 kDa, 238 aminosavból áll, és hordós szerkezetét 11 β -lemez alkotja, melynek közepén található a fluoreszcenciáért felelős fluorofór (kromofór) csoport, amint az az 1.1.-es ábrán is látható. Ez a hordós szerkezet védelmet biztosít a kromofór csoport számára a környezeti hatásokkal szemben [2]. A GFP-nek gerjesztési maximuma van 395 és 475 nm-en valamint emissziós maximuma 508 nm-en. Egy spontán posztranszlációs modifikáció során képződik a kromofór csoport, amelyet három aminosav alkot: a 65-ös pozícióban egy szerin, a 66-os pozícióban treonin, míg a 67-es pozícióban egy glicin aminosav található (Ser65, Thyr66, Gly67). A fehérje csak a natív, három dimenziós szerkezet kialakulása után fluoreszkál.

Ha a kromofór csoport szerkezetét megváltoztatjuk, tehát az azt alkotó három aminosav valamelyikét kicseréljük más aminosavra, megváltozik a fehérje tulajdonsága, például a színe. Így lehet kéken (BFP), sárgán (EYFP) vagy pirosan (RFP) fluoreszkáló fehérjét kapni, mely variációk jelentősen megnövelik a fehérje felhasználási tartományát [3].

A GFP kromofór csoportjában kicserélve a 65. pozícióban található szerint treoninra egy stabilabb és ellenállóbb fehérje kapható, az EGFP. Ahhoz, hogy az EGFP fényt bocsásson ki, a hordó belsejében található három egymást követő aminosavnak ciklizálódnia kell, mely során kialakul egy konjugált imidazolinon gyűrű [4].

A zöld és egyéb színű fluoreszcens fehérjék alkalmazási területe igen elterjedt, mivel a fluoreszcens fehérjék egy sejt jelölése során nem módosítják a molekulák eredeti funkcióját. A zöld fluoreszcens fehérje széles körben alkalmazott mind a biológia, mind a biotechnológia területén egyaránt: a sejtbiológiában alkalmaznak biomolekulák jelölésére, mivel a GFP könnyen bejuttatható a célsejtbe úgy, hogy a molekulát kódoló DNS szakaszhoz hozzáépítik a fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt, így a célsejtek vagy enzimek funkciója és helye is meghatározható, viszont lipidek és cukrok nem jelölhetők vele [5]. Az igen figyelemreméltó FUCCI eljárás is a többszínű fluoreszcens fehérjéken alapszik (Fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator) [6]. Továbbá a rákos sejtek terjedésének nyomon követésére, őssejt kutatásban (követni tudják, hogy az őssejt mely részéből alakulnak ki bizonyos szövetek) és bioszenzorként is alkalmazható fémek kimutatására vízből és vérből egyaránt [7]. A nehézfémek a kromofór csoport melletti fémkötő helyekre bekapcsolódva növelhetik (Zn^{2+}) vagy csökkenthetik (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+}) a fehérje fluoreszcenciáját a koncentráció függvényében.

Mivel ezen fehérjék térszerkezete már ismert, molekulamodellezéssel kideríthető, hogy melyek a fehérje struktúrájában azok a helyek, ahol mutációt kialakítva új fémkötő helyeket lehet létrehozni, növelve ezáltal a fehérje érzékenységét a fém ionokkal szemben. A kutatásunk során használt EGFP fehérjén mutációt hajtottunk végre, a 202-es pozícióban levő szerint és a 204-es pozícióban levő glutamint hisztidinre cseréltük ki [8]. Az így létrejött mutáns fehérje (Mut2, mivel az eredeti fehérjéhez képest két hisztidinnel több található benne) fluoreszcenciájának csökkenését vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu^{2+} ionokra, párhuzamot vonva a vad típusú (WT, eredeti EGFP) fehérje fluoreszcenciájának csökkenése között.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A zöld fluoreszcens fehérjével végzett kísérletekhez első lépésben szükségünk volt a fehérjére oldott, tiszta formában, lehetőleg minél nagyobb mennyiségben, figyelmebe véve, hogy a méréseket négy különböző pH-n és öt különböző hőmérsékleten végeztük. Ezen okból kifolyólag a bakteriális expressziós rendszert (*Escherichia coli*) választottuk fehérjetermelésre, mely rendszer által nagy mennyiségben és viszonylag tisztán, extrém körülmények nélkül, olcsó táptalajon megfelelő minőségű és mennyiségű fehérjét lehet termeltetni.

A fehérje termelést megelőzően szükségünk van egy rekombináns vektorra, mely tartalmazza a termeltetni kívánt fehérje genetikai kódját, esetünkben az EGFP-t kódoló szekvenciát tartalmazó plazmid vektor a Budapesti ELTE Biokémia tanszék kegyes ajándéka volt, a fehérjén végzett mutáció már a Sapiencia BIBIRC laboratóriumaiban valósult meg.

2.1. Kompetens sejt kultúra készítése, transzformálása

A használt sejt vonalak kiválasztásánál figyelembe kell venni a különböző sejt vonalak rendeltetését. A klónozó sejt vonal fő célja, hogy a baktériumba bejuttatott plazmidot minél több példányban másolja le. A hangsúly a replikációs folyamatokon van, ezért kevesebb a fehérjetermelésért felelős enzim a klónozó sejt vonalakban, akkor alkalmazzuk leginkább, mikor a plazmid szaporítása a fő cél.

Ezzel szemben az expressziós sejt vonal elsődleges célja a fehérjetermelés. Ennek érdekében a baktérium genomjából kivették az RNáz enzimek egy részét, melyek a mRNS lebontásáért felelnek, így a mRNS sokkal stabilabb, és több fehérje tud róluk szintetizálódni. Az expressziós sejt vonal esetében a replikációért felelős gének vannak háttérbe szorítva, sok más fehérjebontó enzim génjével együtt azért, hogy a baktérium által megtermelt fehérjét a saját enzime ne bontsa le.

Kutatásunk során klónozó sejt vonalként DH5 α -t használtunk, expressziós sejt vonalként pedig a B121(DE3) STAR sejt vonalat, mivel kompatibilis a pET-rendszerrel, amelyikben az általunk használt gén található (pET15b-EGFP).

Az *E. coli* B121(DE3)STAR sejt vonalat szélesztjük LB táp agarra (Luria Bertani:1000 ml-re: 10g tripton, 5g élesztő kivonat, 5g NaCl, pH 7.5), mivel a megfelelő kompetencia kialakításához friss folyadék kultúrákra van szükség. Egy különálló teleppel beoltunk 3 ml LB levest, majd 16 órán keresztül rázó inkubátorban, 150 rpm sebességgel rázatjuk. A tenyészetet 100-szorosára hígítjuk 50 ml végtérfogatban LB tápoldattal, és 37°C-on inkubáljuk a log szakasz eléréséig, figyelemmel követve a sejtsűrűség növekedését a 600 nm-en mért elnyelés által. A sejteknek logaritmikus szaporodási fázisban kell lenniük, ez a feltétel a használt *E. coli* törzseknel $OD_{600}=0.5$ értéknél valósul meg. A sejtsűrűség nyomonkövetését CamSpec spektrofotométerrel végeztük.

A növekedési szakasz logaritmikus fázisának közepét elérve az összes művelet jégen kell végezni a megfelelő hatékonyság biztosítása érdekében.

A tenyészetet (50 ml sejtsuszpenzió) centrifugáljuk, az ülepedett sejteket 10 ml 0°C-os, steril 100 mM-os MgCl₂-oldatban óvatos pipettázással szuszpendáljuk, majd 20 percig jégen inkubáljuk. A MgCl₂ elősegíti a plazmid sejt falhoz való kötődését, mivel hozzátapad a sejt fal pozitív töltésű glikokálix rétegéhez.

Az inkubálás letelte után a szuszpenziót ismét lecentrifugáljuk. A sejteket 1 ml jég hideg, 100 mM-os CaCl₂-oldatban óvatos rázással szuszpendáljuk, majd egy órát inkubáljuk jégen. Ez a szuszpenzió már kémiailag kompetens sejteket tartalmaz. Hosszabb távú tárolás esetén 200 μ L 80%-os steril glicerint adunk a kompetens sejtekhez, 100 μ L-ként szétosztjuk, majd -80°C-on tároljuk őket felhasználásig. Hősokkal való transzformálás során kihasználjuk a plazmamembrán azon tulajdonságát, hogy fluiditását növelve lehetővé válik idegen plazmid bejutása a sejtbe. 1-2 μ l pET15bEGFP-WT, valamint pET15bEGFP-Mut2 plazmid preparátumot adunk 100 μ l kompetens sejtsuszpenzióhoz, majd 20 percig jégen inkubáljuk, mely idő alatt a negatív töltésű plazmidok a Ca²⁺ ionokkal körülvett sejtek falához tapadnak. A hősokk során a kompetens sejteket és a plazmidot tartalmazó tubust 42°C-on tartjuk 1 percet, mely idő alatt a plazmamembránt alkotó foszfolipid réteg elfolyósodik, és a sejt falhoz tapadt plazmidok be tudnak jutni a sejtekbe, majd visszatesszük jégre 2 percre. A sejtekre 0.9 ml szobahőmérsékletű LB tápoldatot töltünk, majd inkubáljuk rázatva. Ez az inkubálási idő az antibiotikum-rezisztencia kifejezését teszi lehetővé. A transzformálási mixből 100 μ l-ert szélesztünk ampicillint tartalmazó LB táp agarra, és inkubáljuk.

2.2. Heterológ expresszió (fehérje termelés)

2.2.1. Starter kultúrák előállítása

A megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje előállításához szükséges, hogy genetikailag homogén sejt kultúrát állítsunk elő. Ezért 3 ml folyékony LB, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó táptalajt egyetlen transzformált teleppel beoltva indítjuk el a starter kultúrát. Inkubáljuk rázó inkubátorban 12-16 órát.

2.2.2. Termelő kultúra, fehérje expresszió

A starter kultúra elkészítése után egy 1000 ml-es Erlenmeyer lombikba lévő, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatba öntjük a kémcsőben található baktérium-szuszpenziót, majd a sejt kultúrát tovább inkubáljuk 37°C-on, rázó inkubátorban 16 órán át, mely folyamat során az ampicillin jelenlétének köszönhetően folytonos marad a szelekció, Csakis azon sejtek maradnak életben, amelyek képesek az ampicillint bontani, mellette viszont a plazmida bevitt gén (EGFP vad típusú, illetve a mutáns verzió) is termelődni fog (nagy mennyiségben).

2.3. Nyers sejt kivonat előállítása

A heterológ expresszióval termelt fehérje izolálásának első lépése a sejt falak roncsolása. Az erre alkalmazható módszerek igen sokfélék, az ultrahanggal történő sejt fal- és sejt membrán roncsolás az egyik legegyszerűbb és leghatékonyabb sejt feltárási módszer. Az ultrahangos kezelés során vigyáznunk kell a termelődtől hőmérséklet megfelelő elvezetésére, annak érdekében, hogy a lokálisan kialakult magas hőmérsékletű részekben ne denaturálódjon a fehérjénk. A sejt kivonat és a sejt törmelék elválasztása centrifugálással történik, amelyből származó felülúszó tartalmazza az oldott formában jelen lévő célfehérjét a sejt összes fehérjéivel együtt.

A fehérjetermelés után a baktérium szuszpenziót lecentrifugáljuk, majd a sejt pelletet reszuszpendáljuk 10 ml 10 mM MOPS pufferrel, hogy biztosítsuk a megfelelő pH-t (7.5), majd 1 órán keresztül inkubáljuk, végül -80°C-ra tesszük.

A sejt szuszpenziót kiolvasztva szonikáljuk 3X1 percig, majd centrifugáljuk. A felülúszót, mely oldott formában tartalmazza a fehérjét, egy tiszta Falcon-tubusba öntjük, majd tisztítjuk.

2.4. Affinitáskromatográfias tisztítás

Az affinitáskromatográfia működési elve a Ni-NTA-t tartalmazó gyantán alapul. A vektor konstrukció összeállításánál a zöld fluoreszcens fehérje génjét oly módon klónozták bele a pET15b vektorba, hogy az tartalmazzon egy hat hisztidinből álló rövid láncot, mely megkönnyíti a fehérje izolálását az *Escherichia coli* által termelt össz-fehérjék közül. A gyantára pipettázott fehérje His-tag része kapcsolódik a Ni-NTA-hoz, megtapad rajta, a gyengén- vagy nem kötődött fehérjéket mosás következtében eltávolítjuk egy imidazol tartalmú oldattal. Magasabb koncentrációjú imidazol oldatot használva (300 mM), eluálhatjuk a specifikusan kötött fehérjéket a nikkeltartalomról. A lecsepegetett minta tartalmazza a fehérjénket, melyet egy Falcon tubusba összegyűjtünk.

A kolonnába 100 µl Ni-NTA gyöngyöt teszünk, az így megtöltött kolonnát átmoszuk kiegyenlítő pufferrel (7.5 pH 10 mM MOPS puffer, 300 mM NaCl). A fehérjénket rápipettázuk a kolonnára, az átfolyt mintát pedig összegyűjtjük. Ezen folyamat során a 6XHis-tartalmú fehérjék megkötődnek a gyanta felületén, a többi fehérje pedig változatlanul átfolyik az oszlopon. A töltetet ismét átmoszuk kiegyenlítő pufferrel, hogy a mechanikusan, nem kémiai kötéssel megtapadt nem specifikus fehérjéket távolítsuk el. Ezt a műveletet többször megismételjük, az átfolyt oldatot pedig összegyűjtjük külön Falcon tubusba. A többszöri mosást követően a töltetre pipettázuk az eluáló oldatot (300 mM imidazol, 7.5 pH 10 mM MOPS puffer, 300 mM NaCl), amely az imidazol-tartalmának köszönhetően leoldja a specifikusan megkötött fehérjéket a Ni-oszlopról. Az átfolyt mintát összegyűjtjük, ellenőrizzük a tisztítás sikerességét SDS-gélen, majd dialízisnek vetjük alá.

2.5. Gélelektroforézis 15%-os SDS-poliakrilamid-gélben

Az expresszált fehérjéket ellenőrizzük és szétválasztjuk molekulatömegük alapján. A gél tartalmaz SDS-t (Na dodecyl szulfátot), mely biztosítja a fehérjének a negatív töltést, így feszültség alá helyezve a fehérjék a pozitív pórus felé kezdenek vándorolni a térhálós szerkezetű gélmátrixban.

A gél két részből áll: az alsó (futtató) és a felső (koncentráló) gél. A felső gélen koncentrálnak a fehérjék, hogy megnövelve a feszültséget egyszerre induljon a molekulatömeg szerinti elválasztás, az alsó gélen pedig szétválhatnak a fehérje molekulák molekulatömegük alapján.

A minta előkészítése során azokat 5 percig főzzük 95°C-on β -merkaptóetanol-glicerinnel oldatban, így a fehérjék denaturálódnak. Ezután 10 μ l-t fölviszünk a géltre, 20 percig futtatjuk 50V-on, majd pedig 150V-on 100 percig.

Futtatás után az alsó gélt kivesszük a két üveglap közül és megfestjük Comassie Brilliant Blue festéket tartalmazó oldattal. A felesleges festéket kimossuk színtelenítő oldattal, majd desztillált vízben tároljuk. Ezek után elkülöníthetők lesznek a különböző méretű fehérjemolekulák a molekulatömeg-markerhez viszonyítva, melyet a GelDoc (BioRad) transziluminátor segítségével fényképezünk le.

2.6. Dialízis

A nikkel-oszlopos tisztítás után következik a dialízis, melynek szerepe a fémek és az imidazol eltávolítása a fehérje oldatból. Az imidazol az eluáló oldat által kerül kapcsolatba a fehérjével. A tisztított, imidazol tartalmú fehérje oldatot egy 12.4 kDa átmérőjű dialízis membránba helyezünk, mely a pórusain keresztül a 12.4 kDa-nál kisebb méretű molekulákat engedi átdiffundálni a koncentrációgradiensnek megfelelően. A 2X1 liter 10 mM MOPS-ot és Amberlite CG50 kationcserélő gyantát tartalmazó dialízis pufferbe helyezve a fehérjét 48 órán keresztül kevertettük 4°C-on. A kationcserélő gyanta megkötözi az oldatban nyomnyi mennyiségben található nehézfémeket, amelyek esetlegesen zavarják a fluoreszcencia méréseket, míg az imidazol a dialízis membrán pórusain keresztül átdiffundál a dialízis pufferbe. Az így megtisztított fehérje kerül további feldolgozásra.

2.7. Fluoreszcencia csökkenés vizsgálata

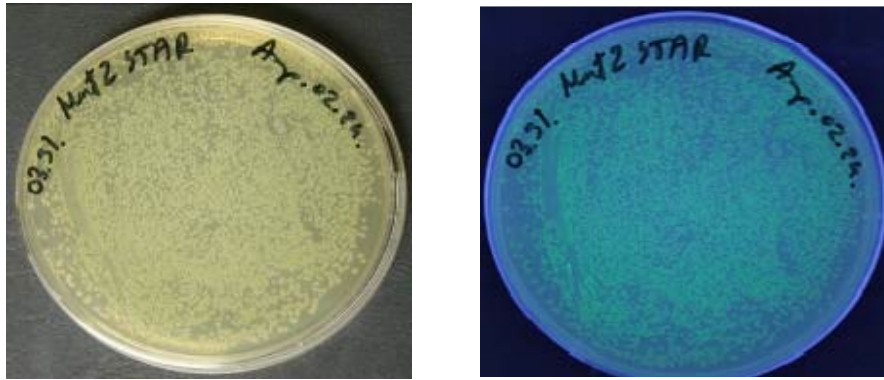
A két típusú (vad típusú és a mutáns) fehérjét 10 μ g/ml koncentrációra hígítottuk 10 mM MOPS pufferrel 6.5, 7-7.5, 8 pH-ra. Ezen fehérje oldatokhoz különböző koncentrációban adtunk réz-oldatot, és készítettünk belőlük 0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.4; 0.6; 0.8; 1; 2.5; 5; 10; 20; 30 μ M-os végkoncentrációjú fehérje-Cu²⁺- oldatot. Az így elkészített oldatokat 20 percen keresztül vízfürdőben inkubáltuk egyenként 20°C; 30°C; 35°C; 40°C; 45°C-on, míg a fehérje-fém komplex stabilizálódott. A hőkezelés után mindenik mintából két párhuzamos mérést készítettünk, és átlagot számoltunk belőle. A mikrotitráló lemezt behelyeztük a fluoriméterbe (Fluostar Optima fluoriméterrel), és mivel a fluoriméter termosztát funkcióval is rendelkezik, 10 percet hagytuk ugyanazon a hőfokon, amelyen a vízfürdőben volt, majd lemértük a különböző koncentrációjú vad típusú és mutáns fehérje oldatok fluoreszcenciáját, 485 nm gerjesztési valamint 520 nm elnyelési szűrőket használva. A gerjesztési és elnyelési spektrumot a módosított zöld fluoreszcencia fehérje esetén kísérleti úton határoztuk meg, felvéve a fehérje teljes spektrumát [7]

A különböző pH-n hígított fehérjét lemértük rézkoncentráción, és mind az öt különböző hőfokon. Az eredményeket átlagoltuk és kiszámítottuk azt is, százalékban, hogy mennyit veszít a fluoreszcenciájából. Ezeket az adatokat táblázatba rögzítettük, csoportosítottuk három paraméter szerint és ábráztuk.

3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

3.1. Transzformálás

A pET15b plazmidok rendelkeznek ampicillin rezisztens tulajdonsággal, azaz kódolják a β -laktamáz enzimet, mely az ampicillin laktám gyűrűjét bontja. Ezen enzim termelése esetén ellenőrizhetjük a transzformálás eredményességét, ha a sejtek felveszi a plazmidot, ő is rendelkezni fog ezzel a tulajdonsággal, s így kinő az antibiotikumot tartalmazó speciális táptalajon, mivel hatástalanítani tudja az antibiotikumot a plazmidon található gén által. Az anyag és módszerben leírtak alapján elvégeztük a transzformálást, majd 100 μ l transzformált baktérium szuszpenziót pipettáztunk ampicillines táptalajra. A transzformálás sikeresnek bizonyult, mivel a sejtek kinőttek az ampicillint tartalmazó táptalajon. UV fény alatt ezek a fehérjék világítanak (3.1 ábra).

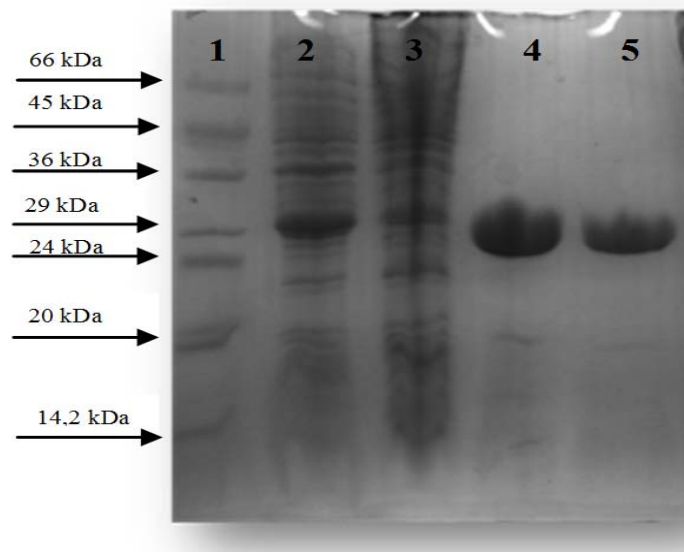


3.1. ábra

Transzformálás után ampicillines agaron kifejlődött EGFP-Mutáns2 telepek természetes fényben, illetve UV fény alatt

3.2. Fehérje expresszió és tisztítás

A 3.2.ábrán látható, hogy a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítása sikeres volt, mivel a zöld fluoreszcens fehérje a méretének megfelelő molekulásúly marker mellett fut, 29 kDa-nál. Ugyanakkor kijelenthetjük, hogy a fehérje oldat nem tartalmaz egyéb fehérjéket, ezáltal alkalmassá válik a további vizsgálatok lebonyolítására.



3.2. ábra

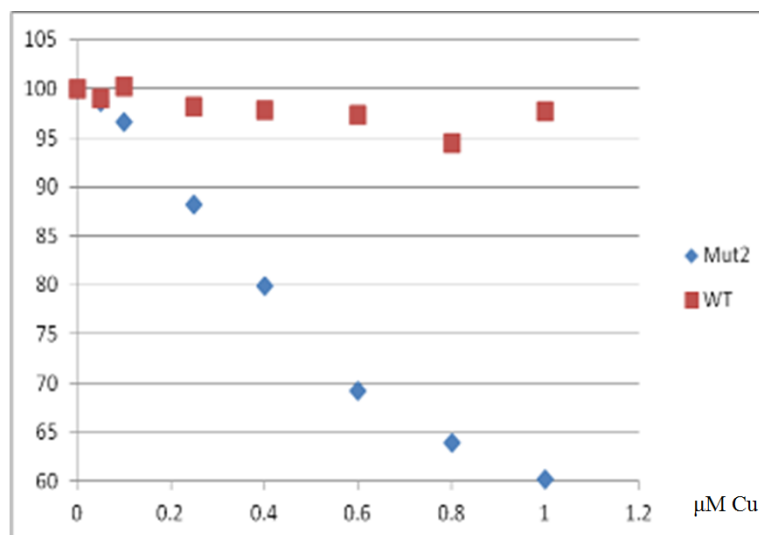
Fehérje tisztítás eredménye:

1. Oszlop: molekulásúly marker (Sigma), 2. Oszlop: össz sejtek,
3. Oszlop: Ni-oszlopon átfolyt fehérjék, 4. Oszlop: Ni-oszlopról eluált WT fehérje,
5. Oszlop: Ni-oszlopról eluált Mut2 fehérje

3.3. Fluoreszcencia csökkenés

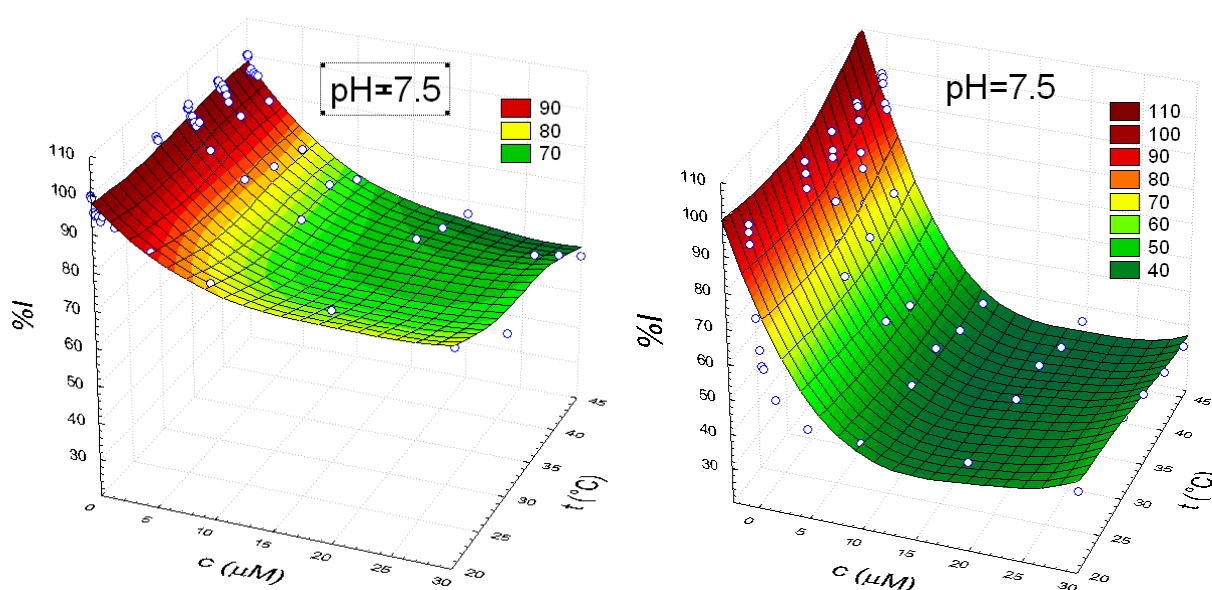
A fluoreszcencia változást mértük a Wt és Mut2 típusú fehérjéken egyaránt, különböző pH, Cu^{2+} koncentráció és hőmérséklet függvényében.

0-30 μM -os Cu^{2+} koncentráció intervallumban a fluoreszcencia 0.5 μM -nál hirtelen lecsökken, majd nagyon kis változást mutat. Ezen észrevétel után a méréseinket a 0-1 μM -os Cu^{2+} tartományban folytattuk. Azt tapasztaltuk, hogy ebben a tartományban jobban csökken a fehérjénk fluoreszcenciája, s ezen belül is a Mut2 zöld fehérje mutat nagyobb változást. Alacsonyabb Cu^{2+} koncentráció esetén a Mut2 nagyobb fluoreszcencia csökkenést mutat mint a Wt típusú fehérje, azaz a mutáció megnövelte a fehérje érzékenységi tartományát, kisebb koncentráció esetén erőteljesebb csökkenést mutat (3.3. ábra).



3.3. ábra
A Wt és Mut2 fehérje érzékenységi tartománya

A fluoreszcencia csökkenésének vizsgálata során a 7.5 pH tartomány bizonyult a legjobbnak, a 3.4.-es ábrán a vad és mutáns típusú zöld fluoreszcens fehérje fluoreszcenciájának csökkenése figyelhető meg a Cu^{2+} koncentráció (c), hőmérséklet (t) és százalékban megadott fluoreszcencia változás (I%) függvényében (a felületek a Statistica szoftver felhasználásával készültek). Az ábrán látható, hogy a Mut2 típusú fehérje nagyobb érzékenységet mutatott a Cu^{2+} ionokra nézve, mint a Wt típusú. A két fehérje közti különbség abban nyilvánul meg, hogy a Wt fehérje 202-es pozíciójában levő szerint és a 204-es pozícióban levő glutamint hisztidinnre cserélték a Mut2-ben. A hisztidin új fémkötő helyeket alakít ki a kromofór csoport mellett, ezzel segítve elő a fluoreszcencia kioltását. Ahogy az ábrán is jól látható, a Wt típusú fehérje fluoreszcenciája százalékban kifejezve 100-ról 70%-ra csökkent a Cu^{2+} koncentráció függvényében, míg a 2 hisztidinnel mutált fehérje fluoreszcenciája 100-ról 40%-ra.



3.4. ábra
A Wt és Mut2 fehérje fluoreszcenciájának (I%) csökkenése Cu^{2+} koncentráció(c) és hőmérséklet(t) függvényében

4. KÖVETKEZTETÉS

Munkánk során a vad típusú és a két mutációt (S202H-Q204H) tartalmazó módosított zöld fluoreszcens fehérje génjét tartalmazó plazmidot *Escherichia coli* BI21(DE3) Star sejtekbe transzformáltuk, sejteltárás után a termelt össz-fehérje extraktumból affinitás kromatográfiával izoláltuk a vad típusú és a mutáns fehérjéket.

Az így előállított vad típusú és mutáns zöld fluoreszcens fehérjék érzékenységét vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu^{2+} ionokkal szemben változó pH (6.5-8) és hőmérséklet (20-45°C) hatására.

A vizsgálatok során megbizonyosodtunk, hogy a mutáns fehérje magasabb érzékenységet mutat minden körülmények között a Cu^{2+} ionok koncentrációjának változására, amely lehetővé teszi bioszenzorként való alkalmazását a jövőben ivóvizek nehézfém tartalmának kimutatására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a Sectorial Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/88/1.5/S/60203 programnak, valamint a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Biomérnöki Tanszékének az anyagok és a kísérletek elvégzésének biztosításáért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1.] Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 2007: Thomson Brooks/Cole.
- [2.] Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 448-55.
- [3.] Olenych, S.G., et al., *The fluorescent protein color palette*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 21**: p. Unit 21 5.
- [4.] Wachter, R.M., et al., *Crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein*. Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9759-65.
- [5.] Komorowski, M., B. Finkenstädt, and D. Rand, *Using a Single Fluorescent Reporter Gene to Infer Half-Life of Extrinsic Noise and Other Parameters of Gene Expression*. Biophysical Journal, 2010. **98**(12): p. 2759-2769.
- [6.] Holmes, D.S., S.K. Dubey, and S. Gangolli, *Development of biosensors for the detection of mercury and copper ions*. Environmental Geochemistry and Health, 1994. **16**(3): p. 229-233.
- [7.] Sakaue-Sawano, A., et al., *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. Cell, 2008. **132**(3): p. 487-98.
- [8.] Palfi, M., Kovacs, E., Miklossy, I., Szilagyi, L., Abraham, B., Lanyi, Sz., *Comparative study of Green Fluorescent Protein mutants*. Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia, 2011(Special Issue): p. 35-45.