

Kloning och rening av GFP

Ida Harila

Projektarbete 100p

Luleå 2012

Handledare: Marcus Wallgren

Sammanfattning

Upptäckten och användningsområden för det grönt fluorescerande proteinet, GFP har visat ha en viktig roll för forskningen. Man har bland annat fått större förståelse för hur proteiner fungerar i levande organismer. De vi har att tacka är Osamu Shimomura, Martin Chalfie och Roger Y. Tsien som fick Nobelpriset 2008 i kemi för den stora upptäckten. GFP är ett fluorescerande protein vilket i det här fallet betyder att när det träffas av ultraviolett ljus så absorberas energi och proteinet exciteras. Sedan sänder det ut ljus med våglängden som ger grönt ljus. Idag har forskningen kommit ännu längre och man har tagit fram mutanter till proteinet som fluorescerar i andra färger. Ett experiment har gjorts med hjälp av möss som var genmodifierade för att deras nervceller skulle producera dessa proteiner. Resultatet blev en mushjärna som lös i olika färger. Detta ledde till att forskarna kunde urskilja nervcellerna. Jag har utfört en laboration vid Umeå Universitet där jag har fått klonat och rena fram detta protein. Jag har fått en inblick i olika metoder och arbetsätt som man använder sig av.

Innehåll

Inledning.....	3
Metod.....	4
Litteraturundersökning.....	4
Laboration	4
Litteraturstudier av GFP	5
Upptäckten	5
En närmare titt på proteinet	6
GFP och dess mutanter	7
Laborationen	9
Teori	9
Bakteriers uppbyggnad.....	9
PCR	10
Metoder för separation av molekyler	10
Enzymreaktioner	11
Kloning.....	11
Odling av bakterier	11
Sonikera.....	12
IMAC med Ni-kolonn	12
Utförande	13
steg 1: Förberedning för PCR.....	13
Steg 2: PCR.....	13
Steg 3: Gelelektrofores.....	14
Steg 4: Rening.....	15
Steg 5: Klippning av restriktionsiter	15
Steg 6: Rening.....	15
Steg 7: Ligerig	15
Steg 8: Transformerig	15
Steg 9: Odling av förkultur och odling över natt.....	16
Steg 10: Plasmidrening	16
Steg 11: Gelelektrofores.....	16
Steg 12: Transformerig	16

Steg 13: Odling för proteinproduktion	16
Steg 14: Skördning av övernattnskulturer	17
Steg 15: Sonikering	17
Steg 16: IMAC med Ni-kolonn	17
Steg 17: SDS-PAGE	18
Analys av resultatet	19
Referenslista	20
Tryckta källor	20
Muntliga källor	20
Elektroniska källor	20
Figurer och tabeller	21

Inledning

Syftet med denna rapport har varit att visa på hur kloning av gener går till. Kloning och genmodifiering är idag ett aktuellt och väldigt omdiskuterat område som intresserar många. Det har visat sig att kloning av många proteiner lett till att man kunnat studera deras egenskaper på ett djupare plan. Genmodifieringarna av mushjärnor är gett ökade kunskaper kring nervceller.

Mitt intresse för bioteknik och liknande växte fram under mina två tidigare år på gymnasiet, när jag läste kemi A och biologi A. Efter en biologilektion frågade jag min lärare om det var möjligt att göra mitt projektarbete inom detta område, då hjälpte han mig att kontakta Umeå universitet. Det föll sig naturligt att rikta in sig på områden som kloning och hur man renar fram GFP. I och med detta fick jag lära mig grunderna och hur man går tillväga. Det var inte allt för avancerat och det gick bra att förstå med vissa förkunskaper.

Mina frågeställningar:

- Vad är GFP?
Hur upptäcktes det?
Vilken betydelse har det haft?
Hur är proteinet uppbyggt?
Inom vilka arbetsområden används det?
- Vilka olika principer använder man sig av vid kloning och rening av ett protein?

Jag vill tacka Lars Backman och Marcus Wallgren vid Umeå universitet som gjorde mitt arbete möjligt. Det hela har varit mycket givande på många olika sätt och det är en erfarenhet jag inte skulle vilja vara utan.

Metod

I detta arbete ligger tyngden i utförandet av laborationen och den beskrivning som finns där till. Men för att det skulle vara möjligt var en viss litteraturstudie nödvändig. Rapporten är därför uppdelad i en litteratur och fakta del, och en beskrivning av laborationen.

Litteraturundersökning

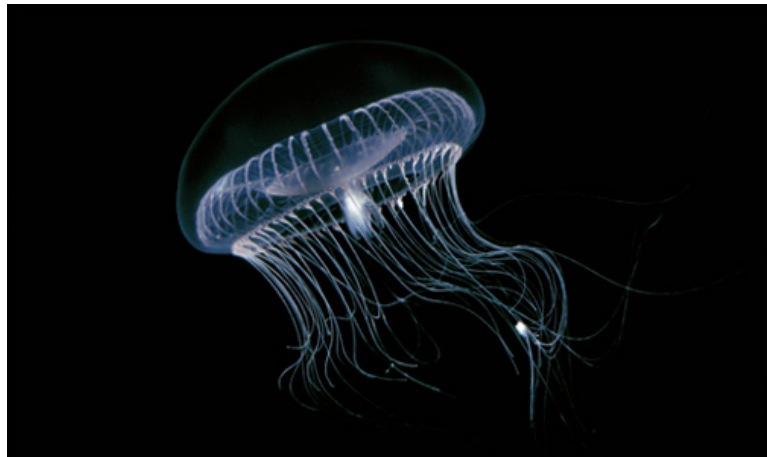
Det första jag gjorde var att börja söka fram fakta som är aktuell för området. Jag ville få svar på frågor kring GFP, hur det hade upptäckts, dess uppbyggnad och funktion. Jag använde mig av internetsidor och diverse litteratur, men internet har varit den mest effektiva kunskapskällan. Vad gäller mina funderingar kring de grundläggande metoderna har litteraturen men även internet fungerat som bra och säkra källor.

Laboration

För att det skulle vara möjligt att genomföra laborationen kontaktade jag Umeå Universitet. Under en veckas tid infann jag mig därför på kemiskt-biologiskt centrum (KBC) under handledning av Marcus Wallgren. I beskrivningen av utförandet har jag näst intill bara använt mig av mina intervjuer med Marcus Wallgren.

Litteraturstudier av GFP

Aequorea Victoria är en manet som man kan hitta vid norra Amerikas västkust. Det speciella med denna manet är att i dess organ, som avger ljus, finns det grönt fluorescerande proteinet, GFP. Detta protein lyser stark när det utsätts för ultraviolett ljus. Upptäckten av GFP har revolutionerat forskningen inom många områden. 2008 fick kemister Osamu Shimomura, Martin Chalfie och Roger Y. Tsien Nobelpriset i Kemi efter just denna upptäckt.

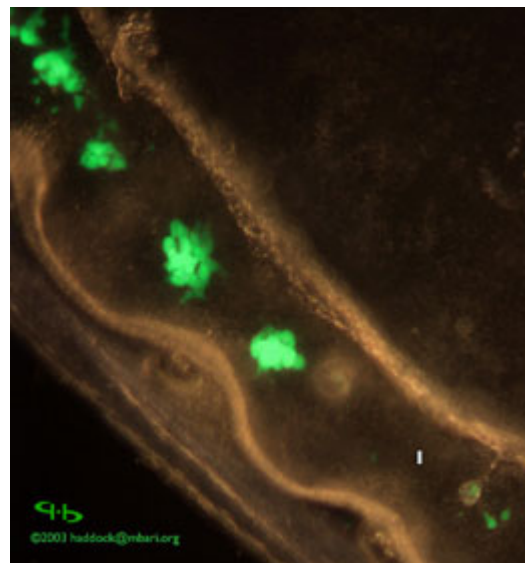


Figur 1. *Aequorea Victoria*.

Man använder GFP i dag i första hand för att förstå celler och proteiners funktioner i levande varelser. Man kan med hjälp av detta protein forska kring andra protein, som man annars inte hade kunnat se, det eftersom GFP fungerar som en liten lampa som aktiveras med hjälp av ultraviolett ljus. Man kan alltså spåra dessa proteiner i kroppen. Viktiga användningsområden för det fluorescerande proteinet har varit möjligheten att spåra hur cancertumörer bildar nya blodkärl, hur det går till när Alzheimers sjukdom döda hjärnceller och hur HIV smittade celler producerar nya virus (Nobelprize.org, 2008).

Upptäckten

1955 kom man fram till att maneten kan producera ljus med hjälp av kemiska reaktioner, som ger upphov till energi i form av grönt ljus. Under 60-talets senare del började den japanske forskaren Osamu Shimomura samarbeta med Frank Johnson vid Princeton. De ville klargöra vad det var för molekylär mekanism som fick *Aequorea victoria* kanter att avge grönt ljus när den skakas om. Shimomura hade redan tidigare tillsammans med professor Yoshimasa Hirata gjort omfattande projekt vid



Figur 2. *Aequorea Victoria*, närmare bild på dess kant och det fluorescerande proteinet.

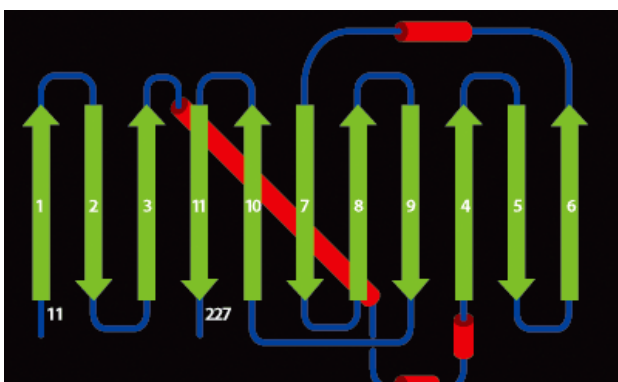
Nagoyauniversitet för att utreda vad det är som får de krossade resterna av blötdjuret Cypridina att lysa när de fuktas (Cypridina är en liten organism med ett skal, som finns vid Japans kust.). de lyckade identifierade denna komponent som ett protein, det fick namnet Aequorin.

Det kom som en överraskning när man såg ett blått ljus det synliga spektrumet som kom från det renade Aequorin, eftersom man ser ett grönt ljus från Aequora victoria. För att förklara detta isolerade man genen för det grönt fluorescerande proteinet. Och fann att det gröna ljuset var en ljusfiltrerande effekt av GFP, som man finner i mycket hög koncentration tillsammans med aequorin i Aequora victoria (Ehrenberg, 2008).

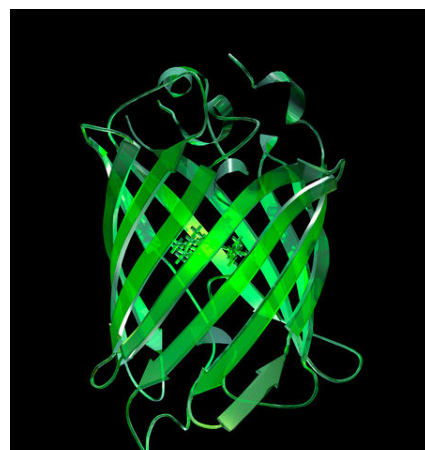
En närmare titt på proteinet

GFP består utav 238 aminosyror och denna långa kedja vecklar ihop sig och formas likt en colaburk. Inne i denna "burk" finns en kemisk grupp, en kromofor, som när den träffas av ultraviolett och blått ljus tar upp energi och därefter exciteras. När kromoforen sedan sänder ut ljus, gör den det med den våglängd som ger grönt ljus. Det är så här man förklarar att proteinet aequorin och maneten Aequorea victoria ger olika färger.

Om man tittar närmare på proteinets struktur ser man att det är elva betakedjor som bygger upp betasheet, "burken" eller cylindern, och från dess axlar går en alfahelix spiral. Kromoforen hittar man i mitten av beta-sheet (Zimmer, 2011).



Figur 3. Molekylstrukturen för GFP, molekylen utvecklad (proteinets sekundärstruktur).



Figur 4 .Molekylstrukturen för GFP (proteinets tertiärstruktur).

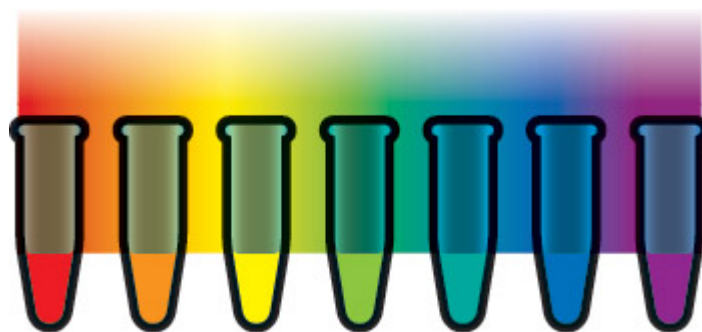
Det revolutionerande med proteinet är att det inte behöver något komplement. Det enda man behöver göra för att det ska avge det gröna ljuset är att belysa det med ultraviolett eller blått ljus. Hade man behövt en ständig tillförsel av någon kemikalie hade detta kunna störa cellerna. Detta är också är svårt att utföra på en sådan liten skala (Kungl. Vetenskapsakademien, 2008).

Proteinet i sig är inte giftigt och ger knappt några skador på cellens livsprocess. När genen för GFP smälter samman med genen för det protein som man vill studera har det visat sig att proteinet i fråga behåller dess vanliga aktivitet.

GFP och dess mutanter

Idag finns det nya varianter av proteinet med förbättrade och kompletterande egenskaper som också avger ljus med andra färger. Några av dessa mutanter har fått bättre fluorescerande egenskaper och en del är mer anpassningsbara i temperaturer som är högre än i norra Stilla havet (Ehrenberg, 2008).

För att få fram protein som absorberar och kan skicka ut ljus från andra delar av det synliga spektrumet, bytte man ut aminosyror. Tack vare dessa försök fick man ytterligare kunskap och förståelse. Nu kunde man alltså utveckla mutanter till GFP som lyste starkare och i andra färger. Med hjälp av det ökade spektrumet kan man märka proteiner med olika färger och sedan studera hur de samverkar. Det var dock en färg som verkade lite svårare än de andra att få fluorescera, och det var det röda ljuset. Det var detta ljus som var speciellt användbart för studier på människokroppen, eftersom det lättast syns igenom biologisk vävnad. Eftersom det var så svårt att få fram det röda ljuset började två forskare från Ryssland leta efter ytterligare mutanter till GFP och hittade några hos fluorescerande koraller, ett gult, ett rött och några gröna.

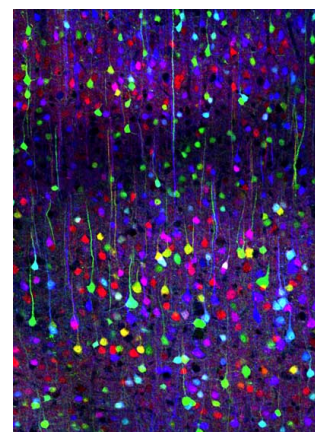


Figur 5. GFPs mutanter som fluorescerar i olika färger.

Det röda proteinet fick namnet DsRED, det visade sig sen att det vara mer otympligt och svårhanterligt. Det berodde på att det inte bestod utav en aminosyrakedja utan fyra, detta gjorde det svårt att använda det som markörer i olika biologiska förlopp. Nu är dock detta problem löst och proteinet kan nu lätt kopplas till andra proteiner.

Idag, snart 50 år efter det att man fått fram en lösning med ett fluorescerande protein med grön färg, har man nu liknande protein till GFP, som lyser med regnbågens alla färger. Denna utveckling har involverat många företag och forskare.

I ett specifikt experiment "The brainbow" använde man sig av tre fluorescerande proteinerna och möss till sin hjälp. Mössen genmodifierades så dess nervceller



Figur 6. "The Brainbow" bild på hjärnbark.

producerade cyanblått, gult och rött. Man fick då en mushjärna som lös i alla möjliga färger och forskarna kunde urskilja nervceller i hjärnan(Kungl. Vetenskapsakademien, 2008).

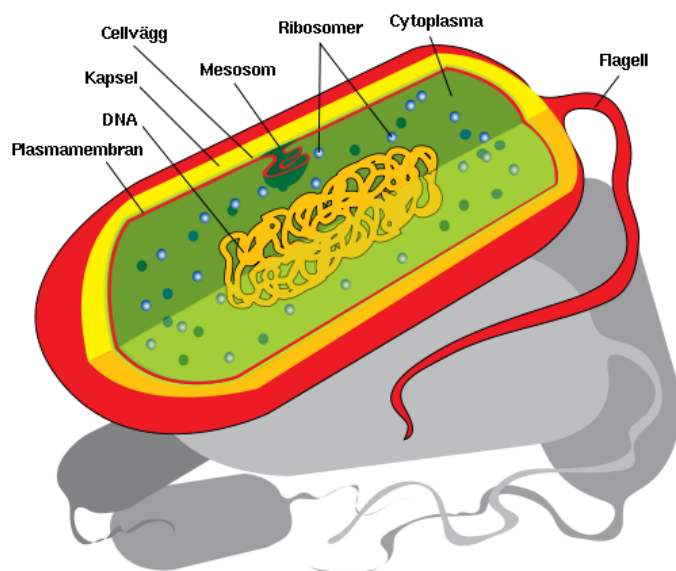
Laborationen

Teori

Bakteriers uppbyggnad

Bakterier är små prokaryota encelliga organismer utan cellkärna som saknar membran slutna organeller, arvsmassan finns i stället fritt i cytoplasman. Men förutom bakteriekromosomen, så kan de också innehålla så kallade plasmider. Dessa är mindre ringslutna DNA-molekyler som ofta bara innehåller ett fåtal gener som kan vara gynnsamma för bakterien. Plasmider kan bakteriecellerna också byta mellan varandra för att få nya egenskaper, samt föröka sig i cellen. Bakterier har generellt sett en stor betydelse för ekosystemet de har också bland annat viktiga uppgifter i olika organismers tarmsystem.

Det finns två olika typer av prokaryota celler, dessa är arkebakterier och bakterier. Arkebakterierna förekommer i extrema miljöer, medan bakterier är en mångformig grupp av blågröna bakterier, ”vanliga” bakterier och aktinomycceter (Karlsson, Molander, Wickman, 2008). De allra flesta bakterier har en omslutande cellvägg som ger den form och stöd. En del tillverkar också en kapsel utanför dess cellvägg. Den fungerar ofta som skydd och ibland som näringsreserv om det skulle behövas. Cellerna brukar också



Figur 7. En bakteriecells uppbyggnad.

vara utrustade med flagell eller cilier, dessa är utskott uppbyggda av proteintrådar som fungerar som deras rörelseorgan. Pili som är lite tunnare utskott från bakteriecellen används vid konjugation, när bakterierna byter arvs massa mellan varandra. Cellmembranet är det som reglerar vilka ämnen som tar sig in och ut ur cellen. I cellen och cytoplasman finns också ribosomer där proteiner bildas (Pedersen, ne).

Bakterier saknar könlig förökning, de förökar sig därför genom delning eller i vissa fall avknoppning. På grund av mutationer och överföring av plasmider, kan bakterier med nya egenskaper snabbt bildas. Bakterier arbetar på egen hand, de ingår alltså inte i flercelliga organismer. Men de kan dock utsöndra en klibbig substans som gör att celler hänger ihop med varandra och bildar kolonier (Karlsson, Molander, Wickman, 2008).

PCR

Med PCR (polymerase chain reaction) kan man lätt få ett stort antal utav en utvald DNA-sekvens. Detta har gjort det betydligt lättare att analysera gener. För att det ska vara möjligt behöver man dock veta början och slutet på den valda sekvensen. När man vet dessa så kan man låta en så kallad DNA-syntesmaskin framställa dessa korta DNA-sekvenser. Man kallar dem reverse och forward primers. Dessa blandar man sedan med bl.a. DNA-byggstenar, d.v.s. nukleotider (bestående av deoxiribos, fosfatgrupp och kvävebas). När man sedan höjer temperaturen så säras det dubbelsträngade DNA:t. Efter det sänker man temperaturen igen, när basparen då åter börjar binda fäster ens primrar vid den bit av DNA-molekylen som man vill kopiera. Efter det sänker man temperaturen igen, då sätter kopieringsproteinet (DNA-polymras) igång att arbeta. Denna process upprepas tills man uppnått det antal exemplar man vill ha (genteknik.nu, 2002).

Metoder för separation av molekyler

Med hjälp av olika elektrofores metoder separera man molekyler beroende på laddning, form och storlek, ofta DNA-, RNA- och proteinmolekyler. Vid gelelektrofores använder man sig av en gelplatta som kan tillverkas på lite olika sätt. Partiklarna eller molekylerna vandrar där under inverkan av ett elektriskt fält på de skikt som gelen bildar. Man färgar ofta gelen före för att kunna analysera svaren senare (muntlig källa: Markus Wallgren).

SDS-PAGE är också en typ av elektrofores som kan användas för att kontrollera rening och bestämma molekylvikten för proteiner i olika blandningar. Gelen man använder består av kemiskt stabila och genomskinliga polymerer (uppbyggda av akrylamid). Eftersom SDS binder till protein löser man proteinblandningarna med en buffert med SDS. Proteinmolekylens bindningar bryts, detta medför att polypeptidkedjorna mister sin form. En SDS-molekyl binder till ungefär två aminosyror. Proteinets naturliga laddning spelar längre ingen roll eftersom SDS har en starkt negativ laddning, detta överförs åt hela komplexet. Laddningen blir då proportionell mot proteinets massa, vilket medför att större molekyler får större laddning. När man till sist lägger spänning över det hela vandrar proteinerna mot anoden, hur snabbt detta går beror på molekylernas storlek. Då gelen ger upphov till ett visst motstånd kommer proteiner som är små vandra snabbare än de som har större storlek.

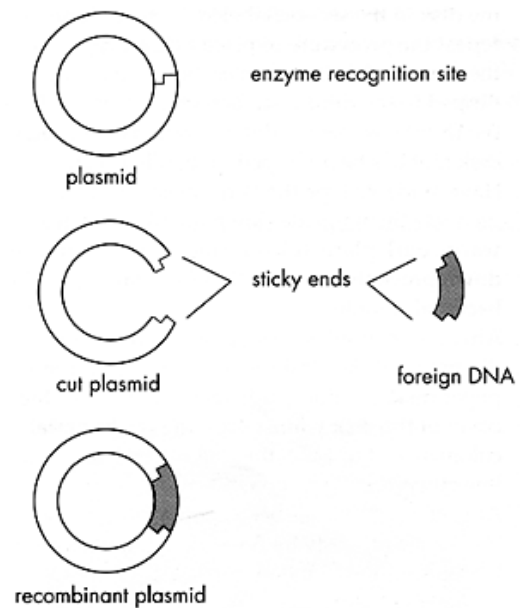
Det finns ytterligare metoder man kan använda för att separera molekyler beroende på laddning, form och storlek. Med isoelektrisk fokusering kommer proteiner som är amfolyter att vandra över en pH-gradient. Vid det pH-värde där nettoladdningen är lika med noll kallas för proteinets isoelektrisk punkt. Olika laddade proteiner kommer därför att vandra olika långt beroende på deras isoelektriska punkt, och ansamlas till en bestämd position. Den två dimensionella gelelektroforesen bygger på att man kombinerar två metoder för att separera. Detta sker både beroende på storlek med SDS-PAGE och beroende på laddning med isoelektrisk fokusering. Sedan finns det ytterligare metoder som kallas immunologiska metoder, i dessa använder man sig av antikroppar för att identifiera peptider och proteiner (solunetti.fi, 2006), (Elliott, 1997, 2001, s.58-60).

Enzymreaktioner

Enzymer är globulära proteiner som katalyserar kemiska reaktioner, och de är indelade i sex olika grupper beroende på vad för reaktioner de katalyserar. Reaktionen börjar med en molekyl som binds till bindningsfickan på enzymet. Sidokedjorna som bygger upp fickan kan påverka elektronstrukturen så att den försvagas och delas eller spjälkas. Reaktanterna kallas substrat som binds till den aktiva ytan och bildar ett enzym-substratkomplex, komplexet omvandlas sedan till produkter. Enzymer fungerar genom att de sänker aktiveringsenergin för reaktionerna de katalyserar. Detta medför att hastigheten för omvandlingen av substratet till produkten ökar avsevärt mycket (Jörnvall, Nordlund, ne).

Kloning

Med hjälp av kloning kan man infoga en vald gen från en ursprunglig vektor, en så kallad plasmid, in i en ny sådan. Man använder sig då av restriktionsenzymer som klipper av DNA:t i plasmiden på rätt ställen (restriktionssiter) så att genen med så kallade sticky ends, gör det lättare för genen att binda till den nya plasmiden som har klippts upp av samma restriktionsenzymer. Alternativt kan genen i den ursprungliga plasmiden kopieras upp med hjälp av PCR, det leder till att en större mängd frigjord gen skapas. Viktigt är då att restriktionssiter på vardera änden av genen tillförs, så att restriktionsenzymerna har någonstans att klippa. Man klistrar sedan ihop dem med hjälp av ett protein som heter ligas. Därefter förs den nya plasmiden, innehållandes genen av intresse, in i en bakterie (via transformering). Dessa bakterier massproducerar sedan plasmiden (och självklart genen) när de tillväxer i näringsmedium (solunetti.fi, 2006).



Creating recombinant plasmids

Figur 8. man använder man sig av restriktionsenzymer som ger sticky ends så man lättare kan infoga den valda genen i en ny plasmid.

Odling av bakterier

När man ska odla bakterier så behöver man en miljö som de trivs, man försöker därför efterlikna deras naturliga miljö så mycket som möjligt. Vanligt är därför att man använder flytande näringsmedium. Odlingen sker ofta i ett slutet system och man tillför inget till kolven där odlingen sker. Detta betyder att utrymmet är begränsat och näringsnivåer sjunker samtidigt som utsöndringsprodukterna också ökar. För att kontrollera tillväxten så kan man använda sig av olika faktorer som t.ex. pH, värme, vattentillgång och syretillgång. När man tillsatt organismer till ett medium så tar det ett tag innan själva celledelningen börjar. Det beror på att det är

många kemiska processer som måste sättas igång inne i cellen, det finns också en del andra faktorer som gör att en viss förberedelse behövs innan celldelningen kan komma igång (Ehinger, Ekenstierna, 2008, s.18-22).

En vanlig bakterie att använda sig av vid odling är *Escherichia coli* (*E.coli*). *E.coli* bakterien har betytt mycket för forskningen och den har fungerat som en modellorganism sedan 1940. Bakterien tillhör gramnegativa bakterier och typorganismen är kolibakterien (Grubb, ne).

Sonikera

Man kan med olika metoder utföra lysering av celler för att frigöra dess innehåll. Med sonikering slår man sönder cellväggen med pulserande högfrekventa ljudvågor. Ljudvågorna skickas med hjälp av en sond som man sänker ned i sin vätska med cellsuspension. För att förhindra överhettning tillämpar man behandlingen i korta impulser, samtidigt som man förvarar lösningen på is (piercenet.com, 2012).

IMAC med Ni-kolonn

Vid forskning behöver man ofta skilja och rena ett enda protein för fortsatt undersökning. Ett sätt att göra detta på är att använda sig av attraherande taggar. Dessa kan förenas med ett rekombinant protein. Den vanligaste taggen som man använder är polyhistidin-taggen som bygger på den elektrostatiske bindningen till immobiliserade metaller. Taggen behövs oftast inte tas bort förrän i de sista momenten som ingår i reningen.

Utförandet av en Ni-kolonn går ofta till så att man sköljer en proteinlösning genom en kolonn med agarosgel laddad med nickeljoner. Sköljningen av proteinlösningen sker med flera olika buffertlösningar (promega.com, 2012).

Utförande

steg 1: Förberedning för PCR

Det första jag gjorde var är att förbereda en lösning som ska genomgå PCR. Denna lösning ska innehålla en vektor, med den gen man är intresserad av. I mitt fall var det gene som kodar för GFP. Idén med PCR-experimentet var att kopiera upp genen, med tillförda restriktionssiter, för att sedan föra in den i en annan vektor som lämpar sig bättre för proteinuttryck (produktion).

Min lösning innehöll:

- GFP plasmid 1 μ l
- DMSO 2,5 μ l
- Buffer 5 μ l
- for. 1,3 μ l
- rev. 1,3 μ l
- dNTPs 1 μ l
- dH₂O 36.9 μ l
- polymeras 1 μ l

Eftersom baserna G-C binder ganska starkt, görs bindningen med hjälp av DMSO svagare. Den buffert som jag använde stabiliserar lösningens pH, den innehåller också magnesium joner som behövs för enzymets aktivitet. Man använder två olika primers som är komplementära till DNA polymeras, forward och reverse. Deras uppgift är att bestämma vilken sekvens av plasmiden som ska kopieras (i mitt fall genen som kodar för GFP). dNTPs eller nukleotider, genens byggstenar sammanlänkas av DNA-polymeras för att bygga upp genkopior.

Det är viktigt att man tillsätter dessa komponenter i rätt ordning, speciellt polymeras eftersom processen startar direkt detta görs. Efter att man tillsatt sitt polymeras så startas PCR-maskinen, som i praktiken fungerar som temperaturreglerare. Man låter genen vara kvar i dess plasmid medan man ”kalkerar upp” kopior.

Steg 2: PCR

Det PCR-program jag använde mig av:

95°C2min

95°C10s

54°C10s

72°C2min (7 gånger)

95°C10s

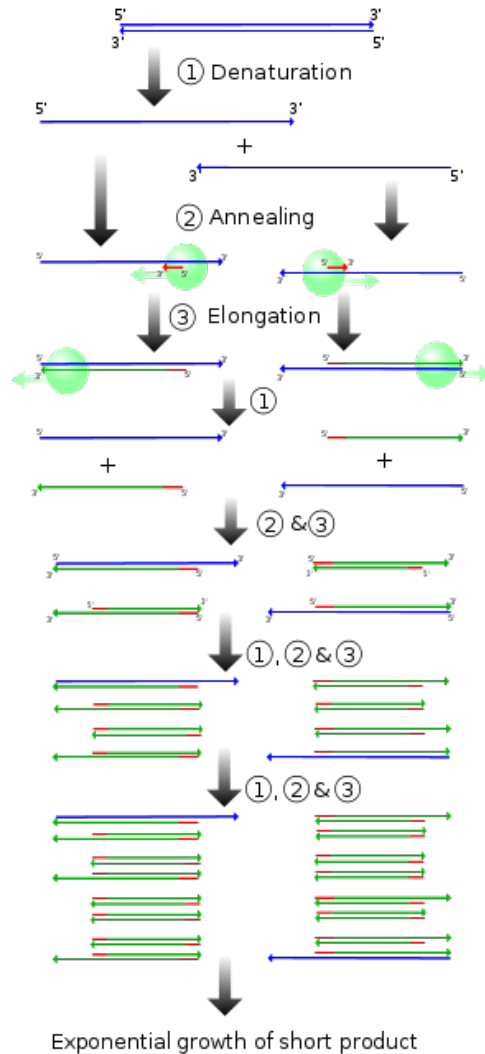
58°C10s

72°C2min (25 gånger)

72°C10min

Ev. 4°C24h

Vid 95°C sker det första steget som kallas denaturering. Det som händer är att DNA separeras. När temperaturen sedan sjunkit till 54 eller 58°C binds primer in till DNA:t, detta steg kallas annealing. I det sista steget, som man kallar elongation, höjs temperaturen till 72°C för det är vid denna temperatur som polymeraset är mest effektivt. Detta har kallas för en cykel. Efter att man först fått upp temperaturen, låtit första cykeln ske sju gånger och den andra typen av cykel ske 25 gånger, låt vi temperaturen stanna vid 72 grader utifall att det skulle funnits någonting kvar för polymeraset.



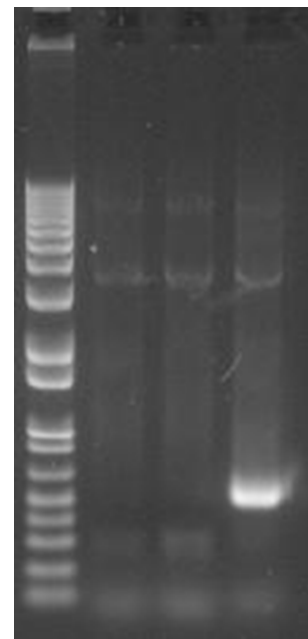
Figur 9. PCR-principen.

Steg 3: Gelelektrofores

Jag ville nu veta om jag hade lyckats med PCR-experimentet, och i så fall fått GFP gener. Detta gjordes genom att man kör elektrofores på provet. Om jag lyckats skulle, efter infärgning med gelRED, ett starkt band synas på gelen när den bestrålades av UV-ljus.

Den gel vi tillverkade bestod av 0,8 % agaros och TAE buffert, vi tillsatte även gelRED. Innan vi placerade mina prover till gelen tillsatte jag loadingbuffert som markör (så att proverna kunde följas visuellt i gelen). Proverna med loadingbuffert kördes sedan snabbt upp till 8000 rpm i en bordscentrifug för att blandas ordentligt.

I figur 1 av PCR produktgelen visar det att det tredje replikatet blev bra. Längst till vänster syns ett referensmedie. storleken på bandet som syns längst ner



Figur 10. Resultatet av den gelelektrofores jag utförde efter PCR.

av det tredje replikatet motsvarar ungefär det den förväntade storleken på GFP-genen (ca 750 bp).

Steg 4: Rening

Enligt gelen så gav tredje replikatet bästa resultat, därför renade jag den PCR-produkten med ett PCR purification kit från qiagen.

Steg 5: Klippning av restriktionssiter

För att kunna förena genen med den nya plasmiden tillsatte jag till både provet med isolerade genen (från PCR-experimentet) och det med nya plasmiden, restriktionsenzymen BamHI och XhoI, och en buffert som ger en miljö som enzymerna trivs i. Restriktionsenzymerna känner igen siter på genen och klipper upp den på samma sätt så den matcha den uppklippta plasmiden. För att denna förening ska ge bästa resultat förvaras de två lösningarna vid temperaturen 37°C. Det beror på att enzymerna trivs bäst vid den temperaturen, de förvarades där i cirka 30 minuter.

Steg 6: Rening

Nästa steg blev att rena de två proverna från enzymerna och buffertkomponenten, det gjordes på samma sätt som i steg 4 med ett reningskit.

Steg 7: Ligering

Det jag gjorde efter reningen var att ligera den klippta genen med den uppklippta nya plasmiden, detta gjordes med hjälp av ett ligas. Ligas är ett enzym som fungerar som en katalysator vid fosfodiesterbildning eftersom det är en reaktion som kräver mycket energi. Efter jag tillsatt detta enzym hade jag förhoppningsvis fått en sluten plasmid innehållandes GFP-genen.

Steg 8: Transformer

Nu hade jag mest troligt fått plasmider med GFP-genen. Det var därför dags att föra in dessa i bakterier för att massproducera plasmiden (och genen).

Jag förberedde en näringslösning (LB) för bakterierna i en odlingskolv, som jag sedan placerade i en tryck/värmekammare (autoklav) för att sterilisera mediet. Jag lät XL 1-blue celler (*E.coli*-stam som lämpar sig bra för plasmidproduktion) tina upp på is för att cellerna skulle må så bra som möjligt. Sedan tillsatte jag plasmiden till cellerna och förvarade de på is i 20 minuter. Efter det var det dags att heat-chocka cellerna i minst en minut vid 42°C, och förvara på is i 2 minuter. Jag tillsatte därefter LB, och provet förvarades i 30 minuter vid temperaturen 37°C. Efter det centrifugerades provet i 1 minut vid 6000 rpm. Därpå dekanterade jag bort en del av LB, sedan resuspenderade jag bakteriepelleten innan den ströks ut på en agarplatta. Efter det lämnades den över natten vid temperaturen 37°C så att bakteriekolonierna fick tid att växa.

Steg 9: Odling av förkultur och odling över natt

Det jag gjorde härnäst var att plocka ett fåtal singelkolonier och föra över dem till en näringslösning innehållandes antibiotika. Det gör man för att cellerna som tagit upp plasmiderna med genen, också är antibiotika resistent tack vare att plasmiden innehåller en gen som kodar för ett antibiotikaresistent protein. De andra bakterierna, som inte tagit upp plasmiden, slås på det här sättet ut. Näringslösningen finns där för att bakterierna ska må bra. Dessa placerades i 37°C på skak (165 rpm) och blev min förkultur.

Jag tog en mindre del av förkulturen och förde över den till en större volym näringsmedium för odlingen i 37°C över natten.

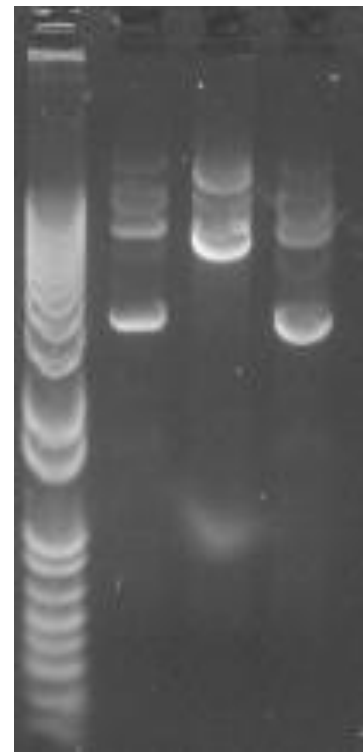
Steg 10: Plasmidrening

För att isolera min plasmid från bakteriecellerna använde vi oss av ett färdigt kit för plasmidrening från Sigma-aldrich.

Steg 11: Gelelektrofores

Efter att jag hade renat fram plasmiden innehållandes GFP-genen ville jag veta om jag hade lyckats klonat plasmiden och hur ren preppen var.

I figur 10 kan man avläsa att första och tredje blev bra och de motsvara ungefär storleken på plasmiden innehållandes vår GFP-gen. De övriga banden längre upp motsvara orenheter i större storlekar, som inte kommer påverka transformeringen av plasmiden in i *E. coli* bakterier. Jag har nu lyckats klonat in GFP-genen i den nya plasmiden (den som lämpade sig bättre för proteinproduktion än den tidigare) och dessutom med hjälp av bakterier, ökat mängden av denna. Nu var det dags för själva proteinproduktionen, åter igen med hjälp av bakterier.



Figur 11. Resultatet av reningen utav GFP i den nya plasmiden.

Steg 12: Transformering

Transformeringen skedde på samma sätt som vid steg 8, förutom att plasmiden fördes in i BL21-celler (*E. coli*-stam som lämpar sig bra för proteinproduktion).

Steg 13: Odling för proteinproduktion

Morgonen därpå hade vi fått flera bakteriekolonier på plattan. Dessa skrapades ner i ett falkonrör tillsammans med en mindre volym av vår förberedda näringslösning plus antibiotika för selektion. Falkonröret förvarades därefter i 37°C, i cirka en timma, vid 165 rpm. Denna förkultur görs för att bakterierna skulle få växa till sig

ordentligt innan de fördes över till odlingskolven där de fick växa ytterligare. Detta är en metod som man kan använda för att odlingen ska gå snabbare.

Förkulturen fördes över till en stor kolv och därefter odlade jag vid 37°C och 165 rpm tills OD₆₀₀ (optical density, man mäter bakteriekulturens absorbans vid 600nm för en uppskattning av tillväxt) var ca 0,38, då sänktes temperaturen till 20°C. När OD₆₀₀ var cirka 0,6 tillsatte jag 1 mM IPTG vilket gör så att produktionen av GFP börjades. Sedan lät jag odlingen tillväxa över natten.

Steg 14: Skördning av övernattskulturer

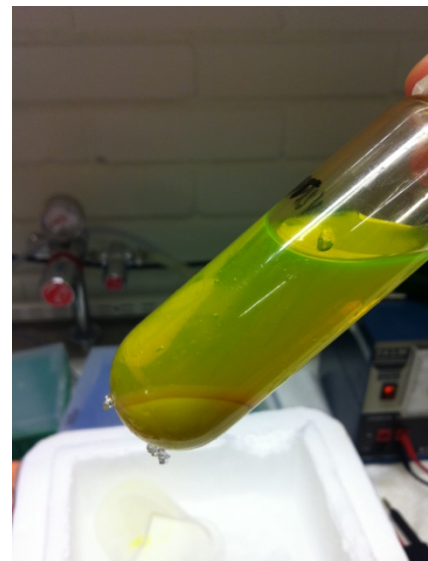
Nästa dag hade min odling ändrat färg från gulaktig till mer grön. Redan nu när jag belyste bakterieodlingen med UV-ljus visade det sig att den fluorescerade grönt ljus. För att få cellerna koncentrerade i en pellet, centrifugerades odlingen i 30 minuter med 5000 rpm i 4°C. Jag hällde därefter bort näringslösningen och resuspenderade pellen med en buffert. Det jag nu hade fått var en koncentrerad lösning med bakterieceller som innehöll GFP-proteinet.

Steg 15: Sonikering

Eftersom proteinet är intracellulärt så måste man sönderdela cellen för att komma åt det. Detta gjordes med hjälp av ultraljud (sonikering). Men denna celltyp är ganska besvärlig att slå sönder så jag förvarade cellerna i cirka -80°C i 30 minuter. Sedan lät jag dem tina eftersom det blir lättare att lysa cellerna när de är lite känsligare. Efter jag använt ultraljud på cellerna hamnade proteiner och andra cellrester i omgivande buffert.

Det jag gjorde då var att centrifugera de lyserade cellerna på i 30 minuter på 15000 rpm i 4°C. På så sätt fick jag en pellet med de tyngre cellresterna som slängdes, det jag behöll var supernatet med mitt protein.

Den lösliga fraktionen, alltså supernatet, filtrerades för att få bort eventuella pelletsrester. Under själva sonikeringen var jag tvungen att lösningen på is, det beror på att mycket energi absorberas av lösningen och omvandlas till värme.



Figur 12. Mitt GFP efter centrifugering, i botten kan man se pelleten med cellresterna.

Steg 16: IMAC med Ni-kolonn

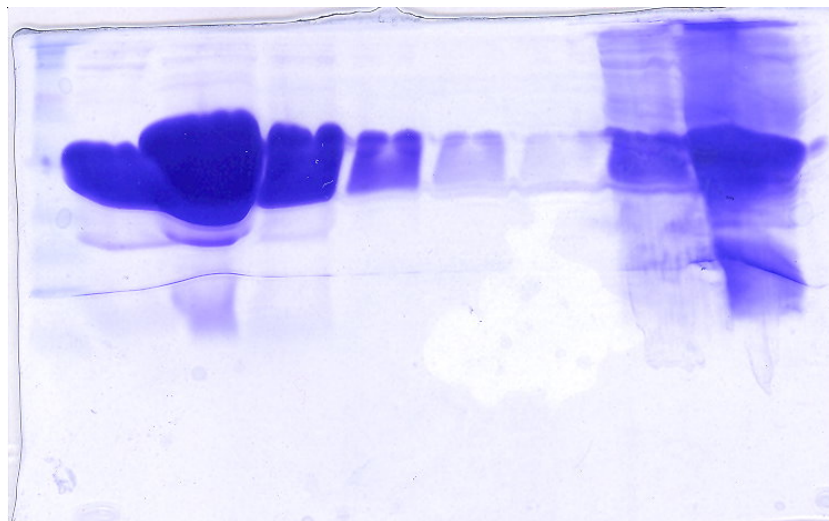
Efter det utförde jag IMAC med en Ni-kolonn. Det gjorde jag för att rena och tvätta rent proteinet från andra proteiner. När man utför en sådan här IMAC sköljer man proteinlösningen genom en kolonn med en agarosgel med nickeljoner. När man först sköljer med första buffertlösningen kommer GFP-proteinet att stanna kvar medan andra proteiner rinna genom kolonnen. Anledningen till detta är att på GFP-proteinet sitter det en His-tag, denna består av aminosyran histerin. Den sitter som en flagga

på GFP-proteinet och det är den som binder in till, allt annat kommer alltså att rinna rakt igenom. Sedan tillsatte vi en buffertlösning nummer två, det är en tvättlösning som sköljer bort en del andra proteiner som också kan ha bundit in till gelen. På grund av att den innehåller en mindre mängd imidazol som konkurrerar bort proteiner som bundit in. Buffertlösning nummer tre, en elueringsbuffert med väldigt hög halt av imidazol, sköljer ut GFP-proteinet.

Steg 17: SDS-PAGE

För att få veta vilken fraktion som jag hade renast GFP i så gjorde vi en SDS-PAGE. För att jag senare skulle kunna avläsa gelen färgades den med Coomassie-färg. När jag avläste de renade proteinet så jämförde jag dem och bestämde molekylmassan med känd serie referensproteiner som jag låtit gå i elektroforesen samtidigt.

I figur 13 som föreställer den SDS-PAGE som vi utförde på olika fraktioner med GFP-proteinet visade det sig att reningen gått väldigt bra. De stora banden i de första fraktionerna motsvarar GFP. Mängden smutsproteiner, kontaminanter som syns svagt ovanför och nedanför GFP är försumbart vilket betyder att vi lyckades med reningen.



Figur 13. Resultatet av min SDS-PAGE som utfördes efter rening på olika fraktioner med GFP-proteinet.

Analys av resultatet

Nu när jag har resultatet av mitt hårda arbete i handen måste jag säga att jag är väldigt nöjd. Huvudmålet med detta arbete som var att utföra laborationen, tycker jag att jag lyckats bra med och jag är nöjd med resultatet.



Figur 14. Resultatet av laborationen, GFP som fluorescerar under belysning av ultraviolett ljus.

Jag har haft höga ambitioner ända från början och är glad över att jag startade arbetet i tid och var strukturerad, ambitiös och disciplinerad.

Innehållet i rapporten har jag försökt få så omfattande som möjligt för att täcka den kunskap som är nödvändig. Tillägg och komplettering kan man dock säkert diskutera om det skulle behövas. Men eftersom detta arbete och denna rapport ska motsvara en gymnasiekurs på 100 poäng, har viss avgränsning varit nödvändig.

Jag hoppas kunna inspirera andra gymnasieelever med mitt arbete och skapa intresse för att fördjupa sig inom detta arbetsområde. Denna fördjupning har gett mig en önskad framtid och karriär inom bioteknik.

Referenslista

Tryckta källor

Janne Karlsson, Bengt-Olov Molander & Per-Olof Wickman (2008). *Biologi B*. Nacka, Liber AB.

Elliott, W.H. & Elliott, D.C. (1997,2001). *Biochemistry and Molecular Biology*. New York, Oxford University Press Inc.

Magnus Ehinger & Linda Ekenstierna (2008). *Bioteknik – från DNA till protein*. Lund, Författarna och Studentlitteratur AB.

Muntliga källor

Marcus Wallgren, Umeå Universitet (2011).

Elektroniska källor

Nobelprize.org (2008). *"The Nobel Prize in Chemistry 2008 - Illustrated Presentation"*.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html.

Hämtat den 21 oktober 2011.

Marc Zimmer (15 juni 2011). *GFP Gren Fluorescent Protein*.

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>. Hämtat den 21 oktober 2011.

2011.

Måns Ehrenberg (2008). *The green fluorescent protein: discovery, expression and development*.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/advanced-chemistryprize2008.pdf. Hämtat den 23 oktober 2011.

Kungliga Vetenskapsakademien (2008) *Nobelpriset i kemi 2008 Manetens gröna ljus revolutionerade biovetenskapen*.

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/popular-chemistryprize2008-sv.pdf. Hämtat den 9 januari 2012.

Karsten Pedersen. *Bakterier*. <http://www.ne.se/lang/bakterier>. Hämtat den 9 januari 2012.

Genteknik.nu (2002). *PCR*. <http://www.genteknik.nu/index.asp?id=570&typ=print>. Hämtat den 13 januari 2012.

Hans Jörnvall, Stefan Nordlund. *Enzymer*. <http://www.ne.se/lang/enzymer>. Hämtat den 27 januari 2012.

Solunetti.fi (2006). *Ligering*. <http://www.solunetti.fi/se/solubiologia/ligaatio/2/>. Hämtat den 2 februari 2012.

Solunetti.fi (2006). *SDS-PAGE av proteiner*.
http://www.solunetti.fi/se/solubiologia/proteiniinien_sds-page/2/. Hämtat den 27 januari 2012.

Rune Grubb. Escherichia. <http://www.ne.se/lang/escherichia>. Hämtat den 2 februari 2012.

Piercenet.com (2012). *Traditional Methods of Cell Lysis*.
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=72F377CD-2581-438C-9B27-5360226EA128>. Hämtat den 2 februari 2012.

Promega.com (2012). *Protein Purification and Analysis*.
<http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/protein-purification-and-analysis/>. Hämtat den 10 februari 2012.

Figurer och tabeller

Figur 1: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.htm

Figur 2: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.html>

Figure 3: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/cooluses0.htm>

Figure 4: <http://gfp.conncoll.edu/structure.html>

Figur5: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/illpres.html#

Figur 6: <http://gfp.conncoll.edu/cooluses0.html>

Figur 7: <http://www.ehinger.nu/undervisningindex.php/kurser/life-science/lektioner/2606-bakterier-1-sterilteknik-bakteriecellens-uppbyggnad.html>

Figur 8: <http://www.accessexcellence.org/RC/AB/WYW/wkbooks/SFTS/activity6.php>

Figur 9: http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction

Figur 10: resultatet av den gelelektrofores jag utförde efter PCR.

Figur 11: resultatet av reningen utav GFP i den nya plasmiden.

Figur 12: mitt GFP efter centrifugering, i botten kan man se pelleten med cellresterna.

Figur 13: resultatet av min SDS-PAGE som utfördes efter rening på olika fraktioner med GFP-proteinet.

Figur 14: resultatet av laborationen, GFP som fluorescerar under belysning av ultraviolettljus.