Hamburg

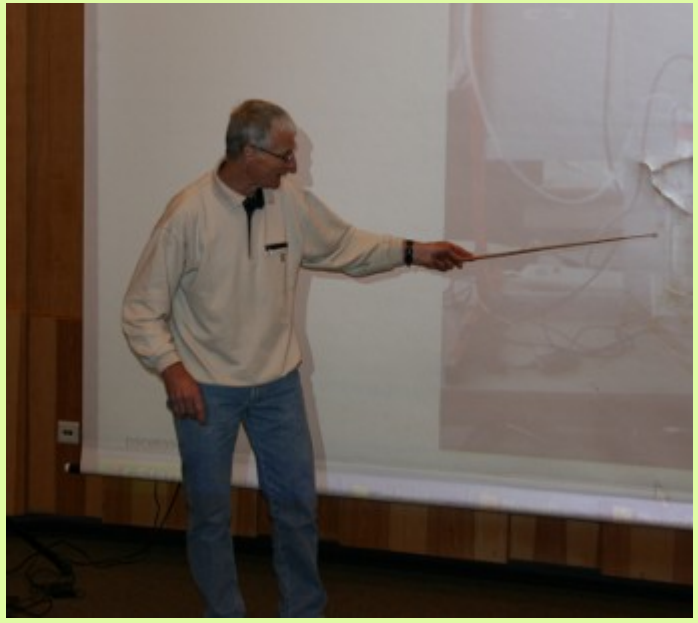
4. - 9.5. 2009

Mezinárodní setkání Comenius

- V rámci projektu Comenius se naše škola zúčastnila 4. mezinárodního setkání studentů a učitelů.
- Setkání se již konalo v Madridu, Pforzheimu, loni u nás v České Republice a letos byl tento projekt zakončen setkáním v Hamburku.
- Účastnické země – Španělsko, Německo, Česká Republika, Slovensko, Lotyšsko, Maďarsko

Commenius Hamburg

- Tématem všech setkání bylo studium biotechnologií a jejich možné využití.
- Program setkání zahrnoval jednak práci v laboratoři, přednášky profesora Barona, ale také prohlídku města a okolních zajímavostí.



Cíl práce

- Výchozím materiálem byly bakterie E. Coli do jejichž genetické informace byl již při minulém setkání vpraven gen pro tvorbu zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a gen pro rezistenci vůči antibiotikům.
- Cílem práce bylo vyprodukovat GFP, izolovat ho z bakterií a stanovit základní vlastnosti.

Rozdělení práce

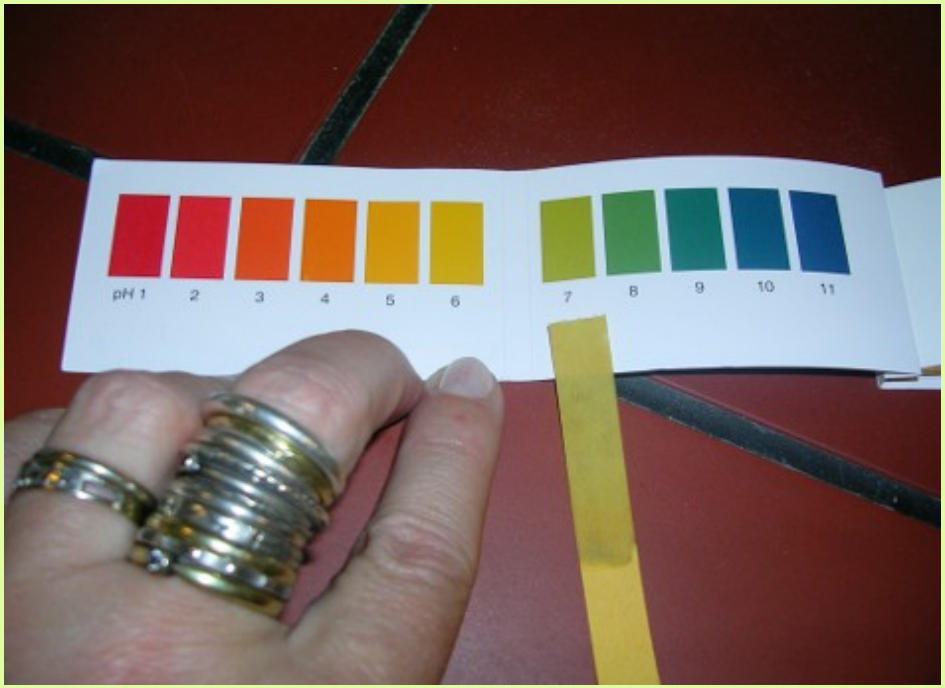
- Růst kultury – namnožení bakterií
- Produkce GFP
- Uvolnění GFP z bakterií
- Čištění
- Izolace GFP a stanovení jeho vlastností

Růst kultury

- Aby byl výsledek naší práce co nejlepší a získali co nejvíce GFP, musíme nejdříve naši bakteriální kulturu zvětšit.
- Vložení bakterií do kultivačního média. Poté přidání antibiotika ampicilinu, který ničí bakterie. Bakterie, které mají v genomu gen pro GFP, mají rovněž gen pro rezistenci vůči antibiotikům. Proto ampicilin zničí pouze bakterie bez genu pro GFP a bakteriím s genem pro GFP neuškodí.
- Pro pěstování bakterií musíme udžovat stálé optimální prostředí:
  - 37°C
  - pH = 7
  - Neustálé okysličování roztoku

Růst kultury

- Vždy po dvaceti minutách vezmeme vzorek roztoku a měříme pomocí fotometru optickou hustotu, která se díky množení bakterií neustále zvětšuje.
- Asi po ¾ hodině je již bakterií dostatek a začneme s produkcí GFP

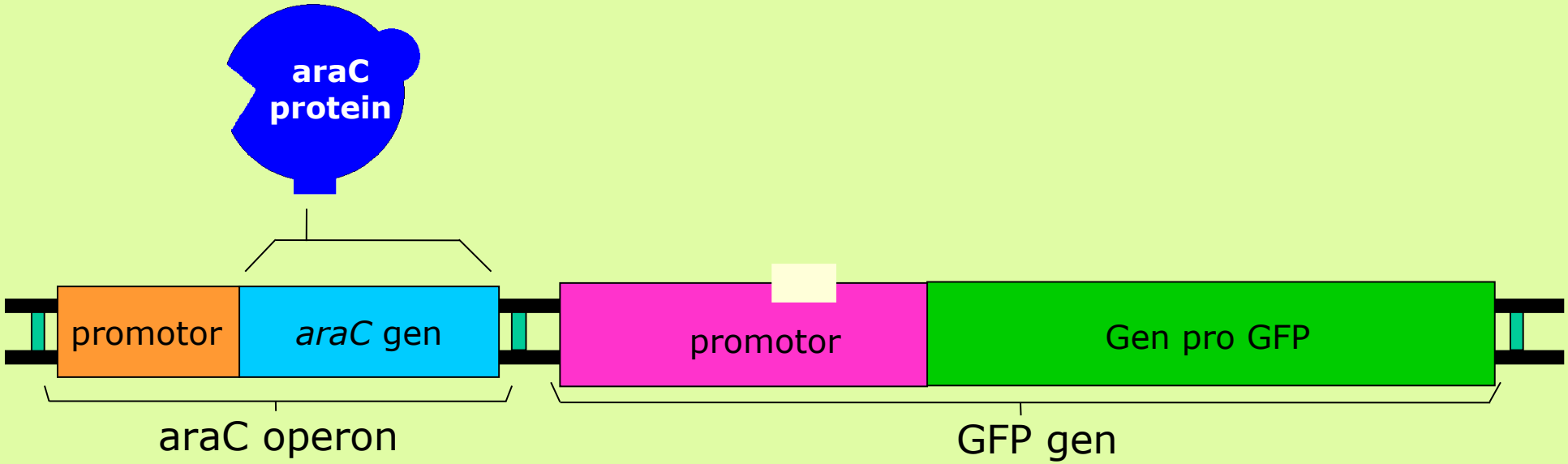


Měření pH – kontrola stálosti roztoku

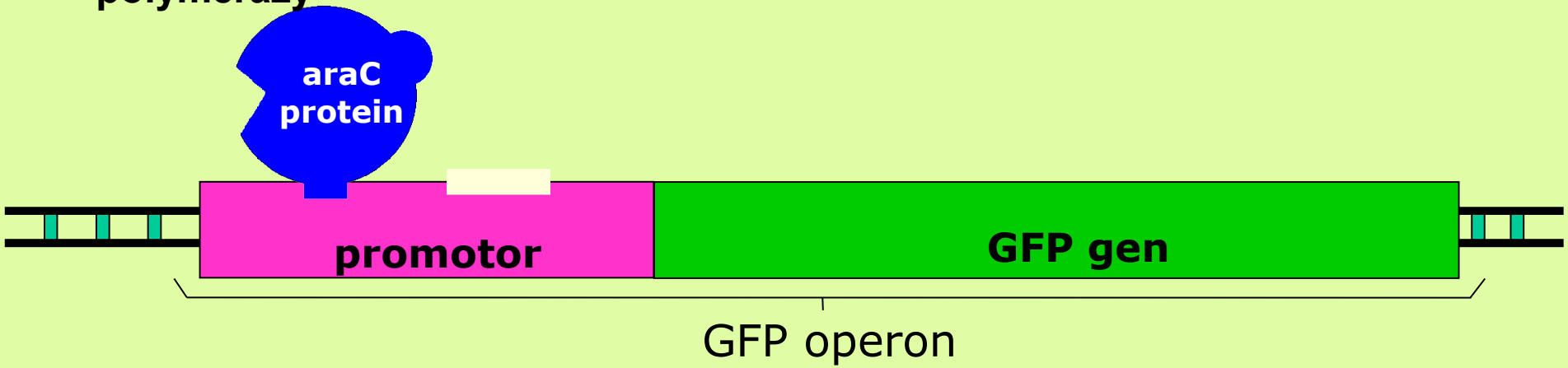
Produkce GFP

- Začneme přidáním monosacharidu L-(+)-arabinosy
- Arabinosa se váže na represor (bílkovinu araC), který brání přepisu genu pro GFP do mRNA a následné tvorbě GFP. Pokud dojde k navázání arabinosy, začne se přepisovat gen do mRNA a poté na ribozomech se začne vytvářet podle mRNA bílkovinný řetězec (GFP).

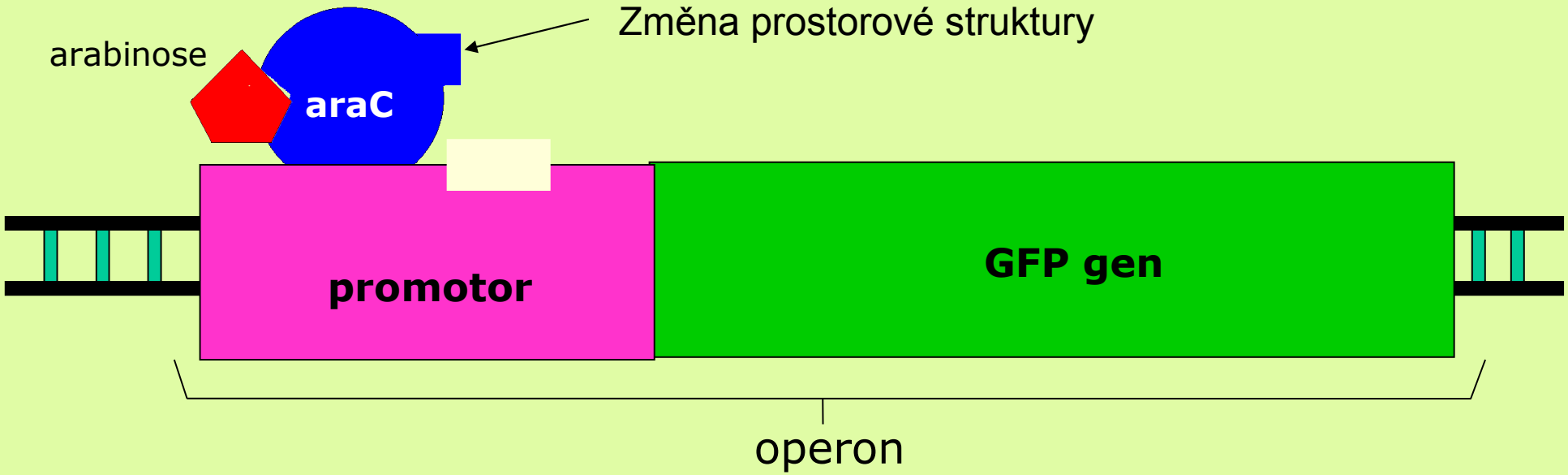
1. Gen araC produkuje protein araC (represor)



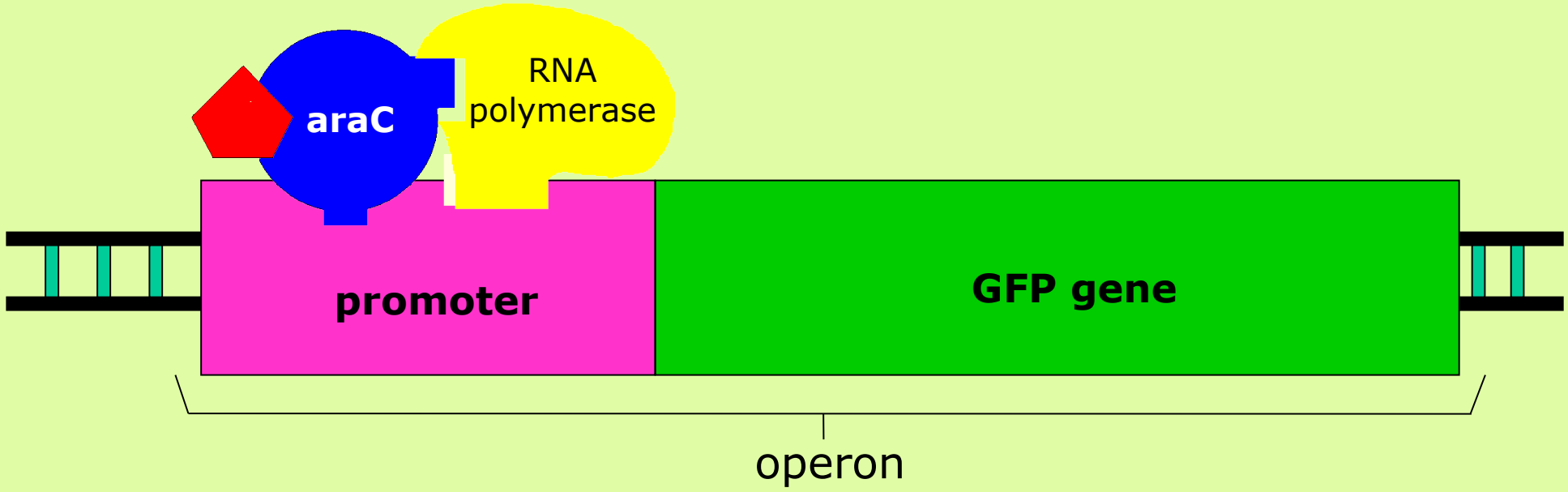
2. represor araC se naváže k promotoru GFP operonu a zabraňuje navázání RNA polymerázy



3. Dojde k navázání arabinosy (induktoru) na represor araC. AraC změní svoji prostorovou strukturu a tím pádem umožní navázání RNA polymerázy



4. RNA polymeráza začne syntetizovat komplementární řetězec mRNA podle kterého se na ribozomech poskládá molekula GFP z aminokyselin.

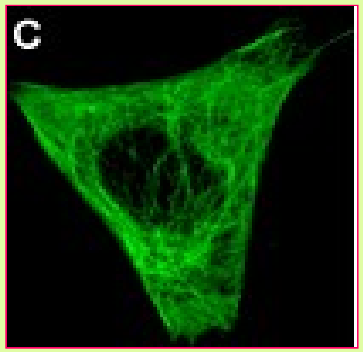


GFP – zelený fluorescenční protein

- Protein izolovaný z medúzy Ae*quorea victoria*
- Biologická funkce GFP – obraný mechanismus – podrážděná medúza produkuje GFP, jehož zelené fluorescenční světlo ji chrání proti nepřátelům

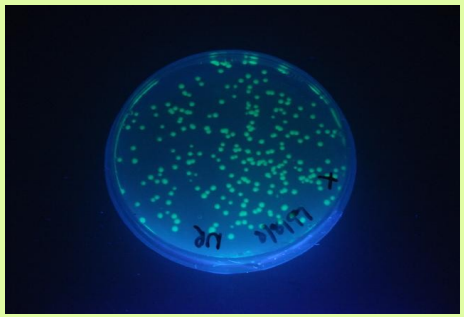
Možné využití GFP v biotechnologii :

- Lokalizace cytoskeletu nádorové buňky



- Lokalizace buněk (např. nervové buňky v červovi)

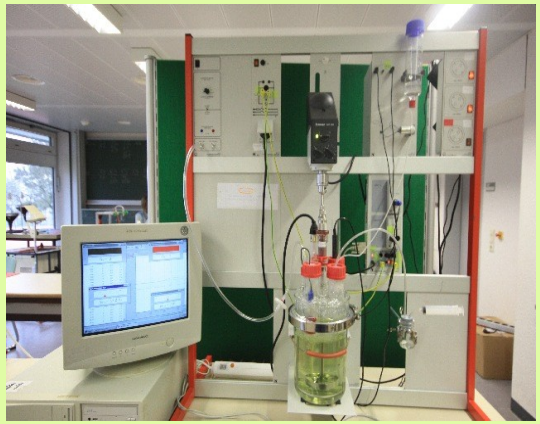
- Exprese proteinu (kolonie produkující GFP)



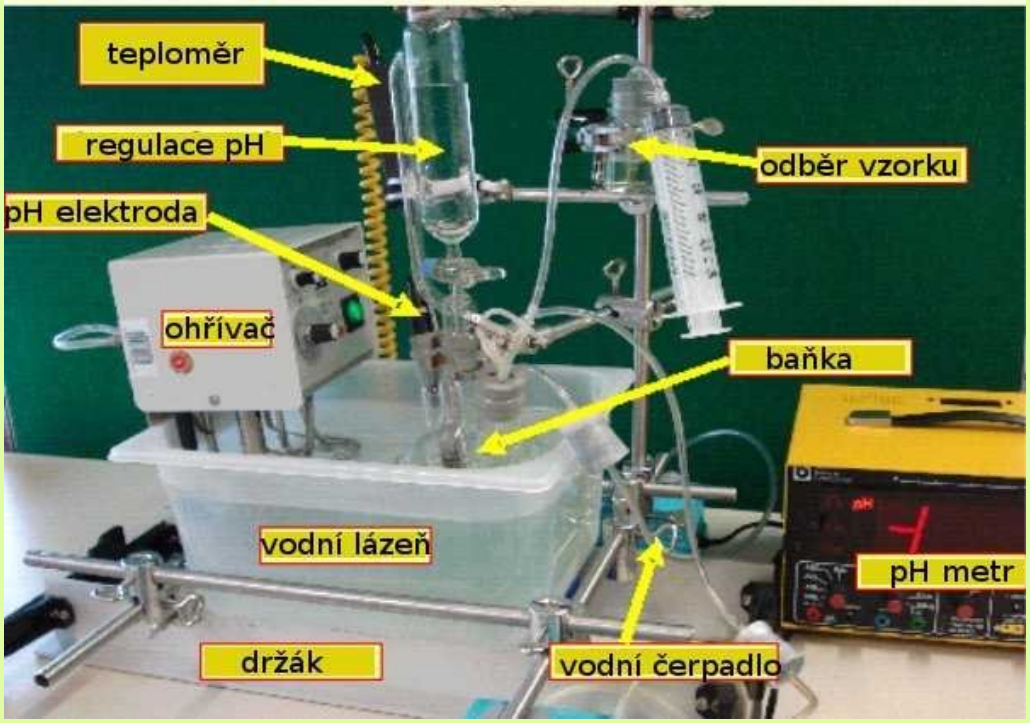
GFP – zelený fluorescenční protein

- GFP je složen z 238 aminokyselin
- Fluorescenční část zeleného fluorescenčního proteinu se vytváří autokatalytickou reakcí tří aminokyselin (ser-tyr-gly)
- GFP pohlcuje světlo vlnových délek 238 nm – 457 nm
- GFP vyzařuje zelené světlo o vlnové délce 508 nm

Fermentátor



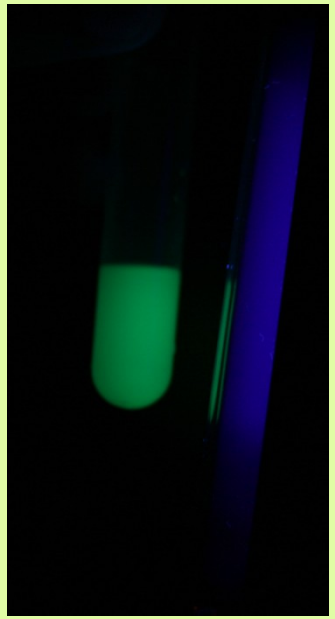
- Pro pěstování bakterií a pro produkci GFP jsme používali fermentátory
- Různé pracovní skupiny používali různé druhy fermentátorů. Od těch nejjednodušších až po velmi drahé přístroje.



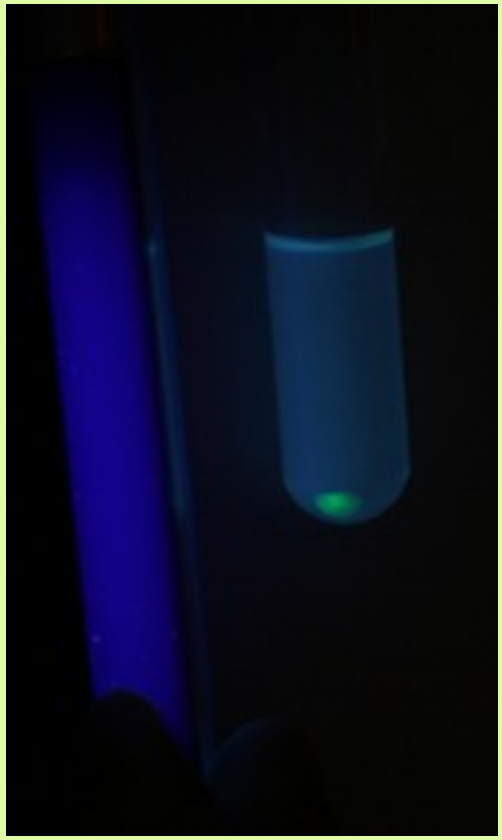
Separace GFP z namnožených E. coli

- Do zkumavek dáme malé množství kultivovaných bakterií a vložíme asi na 5 minut do centrifugy.
- Po vytažení vidíme na dně malou usazeninu která představuje buňky bakterie E. Coli, medium z okolí slejeme.
- Do zkumavky přidáme roztok lysozymu (enzym, který ničí vazby mezi peptidoglykanem mureinem, který tvoří buněčnou stěnu bakterií) a promícháme ho s bakteriemi

- Směs ochladíme na teplotu -18°C po dobu nejméně 20 minut
- Touto teplotou je podpořena lýza buňky kterou zajišťuje lysozom
- Rozpadem buněčných stěn bakterií dojde dojde k uvolnění GFP a ostatních proteinů z buňky



- Vložíme roztok do centrifugy. Po vytažení vidíme na dně tuby usazenou bílou skvrnu, která představuje usazené těžší složky buňky včetně bílkovin, slijeme zbytky ze zkumavky a necháme v ní pouze usazenou složku. Pokud vložíme zkumavku pod UV lampu, můžeme sledovat, že nám usazenina zeleně fosforeskuje.



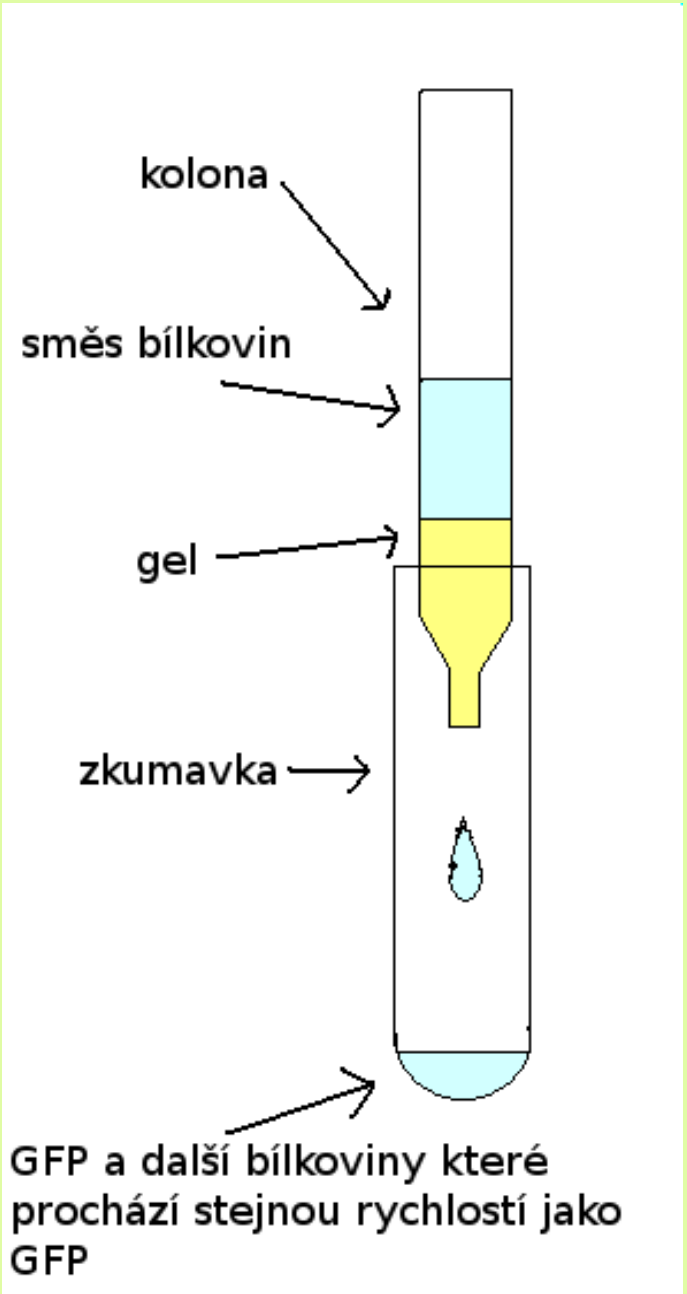
Sloupcová chromatografie

- *Sloupcová chromatografie využívá kolonu, v níž je pevná fáze (gel) přes kterou prochází roztok lysátu (bakteriální drť a GFP). Díky rozdílné rychlosti průchodu můžeme separovat jednotlivé bílkovinné složky.*

- Při průchodu lysátu kolonou používáme několik pufrů, které nám zaručují správný průchod GFP kolonou. Pufry jsou roztoky o různé koncentraci síranových aniontů a amonných kationtů.

GFP pod UV lampou před průchodem kolonou

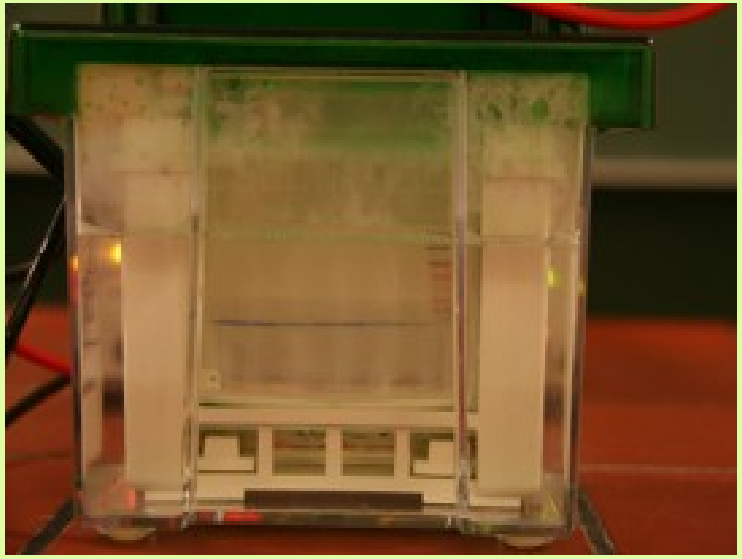
- Díky různé rychlosti průchodu jednotlivých látek gelem v koloně, můžeme separovat bílkoviny od ostatních částí bakterií.
- Po průchodu GFP kolonou ověříme jeho přítomnost ve výsledném roztoku opět pod UV lampou.



Elektroforéza

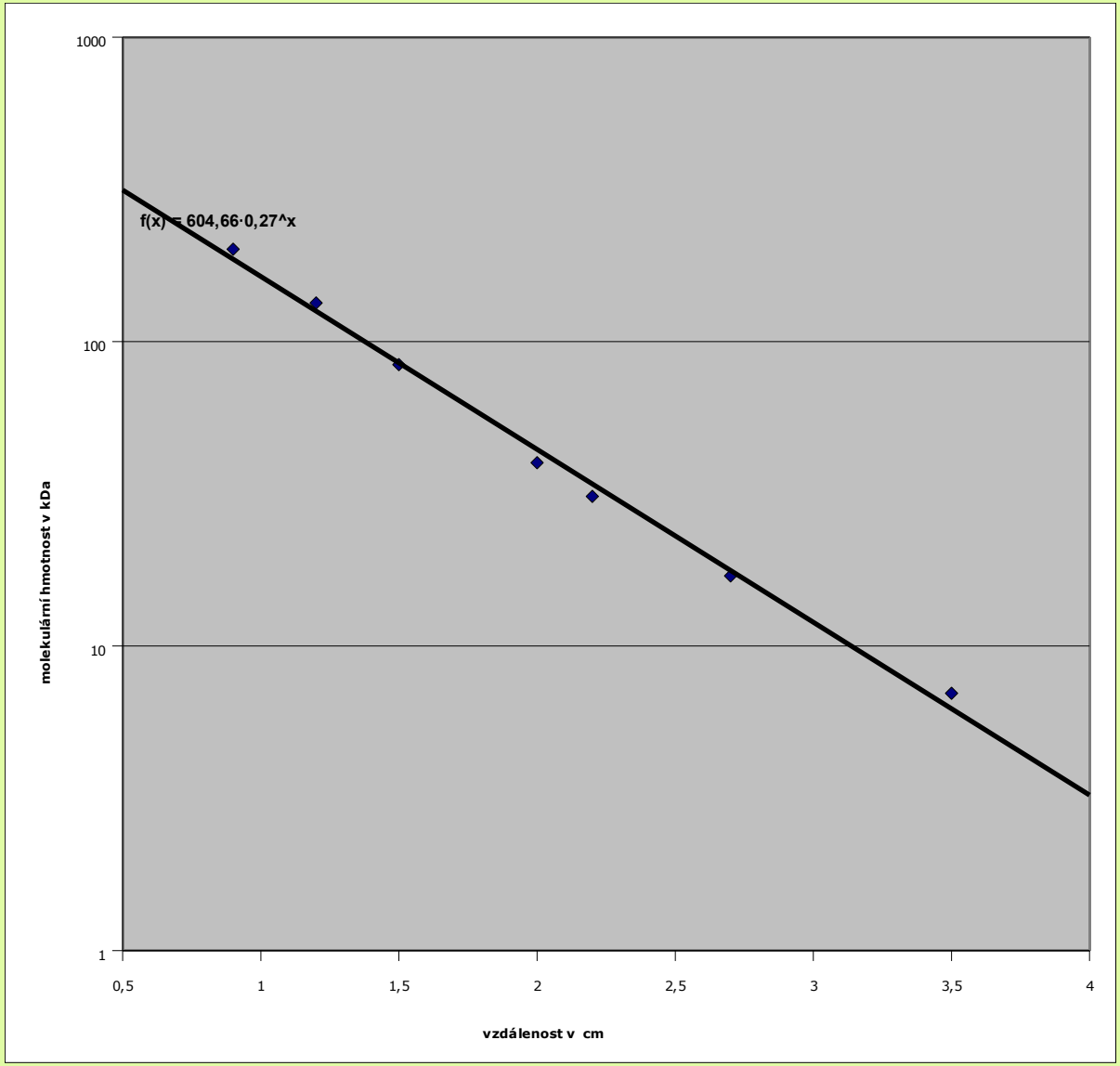
- Při elektroforéze jsme využili shopnost bílkovin trořit ionty v závislosti na počtu jejich karboxylových nebo aminových skupin a na pH prostředí.

- Na sloupec PAGE (polyakrylamidového) gelu umístěného mezi dvěma elektrodami naneseme směs bílkovin. Bílkoviny postupují různou rychlostí podle velikosti svého náboje a podle hmotnosti ke kladně nabité elektrodě.



- Účel této metody je, spíš než izolace GFP, podle vzdálenosti kterou GFP urazí určit o jaký protein se jedná a některé jeho vlastnosti (molární hmotnost)

Určení hmotnosti GFP



- Graf ukazuje souvislost mezi molekulární hmotností a vzdáleností, kterou urazí molekula.
- Díky elektroforéze můžeme změřit jakou vzdálenost GFP urazil a podle toho z grafu určíme molární hmotnost.

Tímto náš biotechnologický program skončil a začala část odpočinkovější

Hamburg je velké přístavní město, proto jsme se nemohli obejít bez prohlídky centra ale hlavně přístavu.

radnice

Přivítání na radnici

Přístav Hamburg

Výlet na moře a do Lübecku

„Náš český vědecký tým.“

Teda vlastně nejsme všichni. Na fotce nám chybí Magda s Johankou, které musely odjet dřív.

Účastníci projektového setkání v Hamburgu – květen 2009

Míša Bochníčková

Johanka Drlíková

Markéta Harničárová

Martin Kubeš

Maruška Ondračková

Markéta Vejmělková

Ondra Vymazal

Radim Zahradníček

Magda Zaoralová

Mgr. Kateřina Krumpholcová

Ing. Věra Helceletová