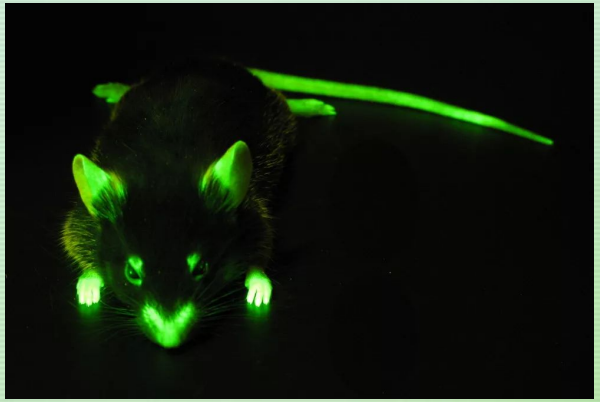
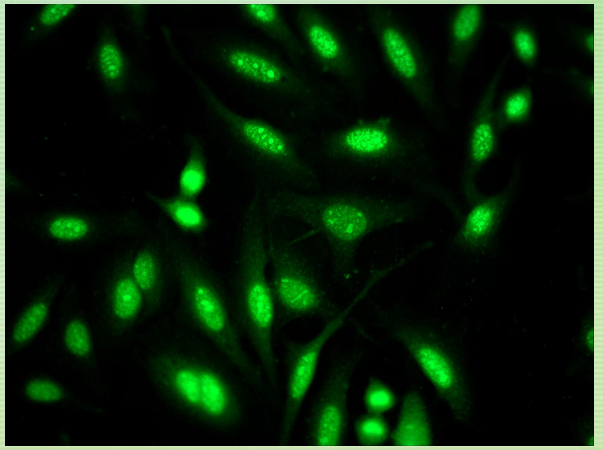
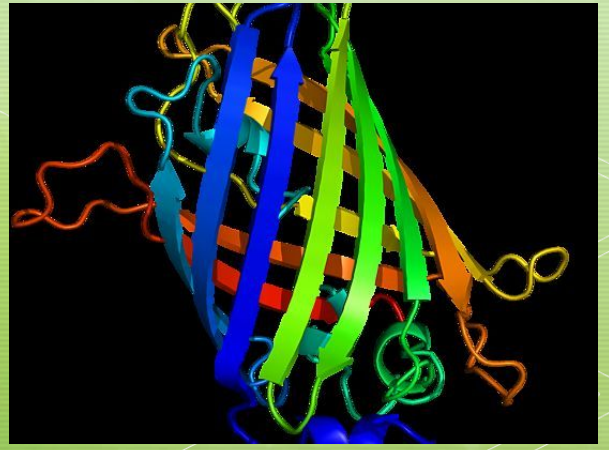
# Зеленый белок (GFP - green fluorescent protein) и GFP подобные белки

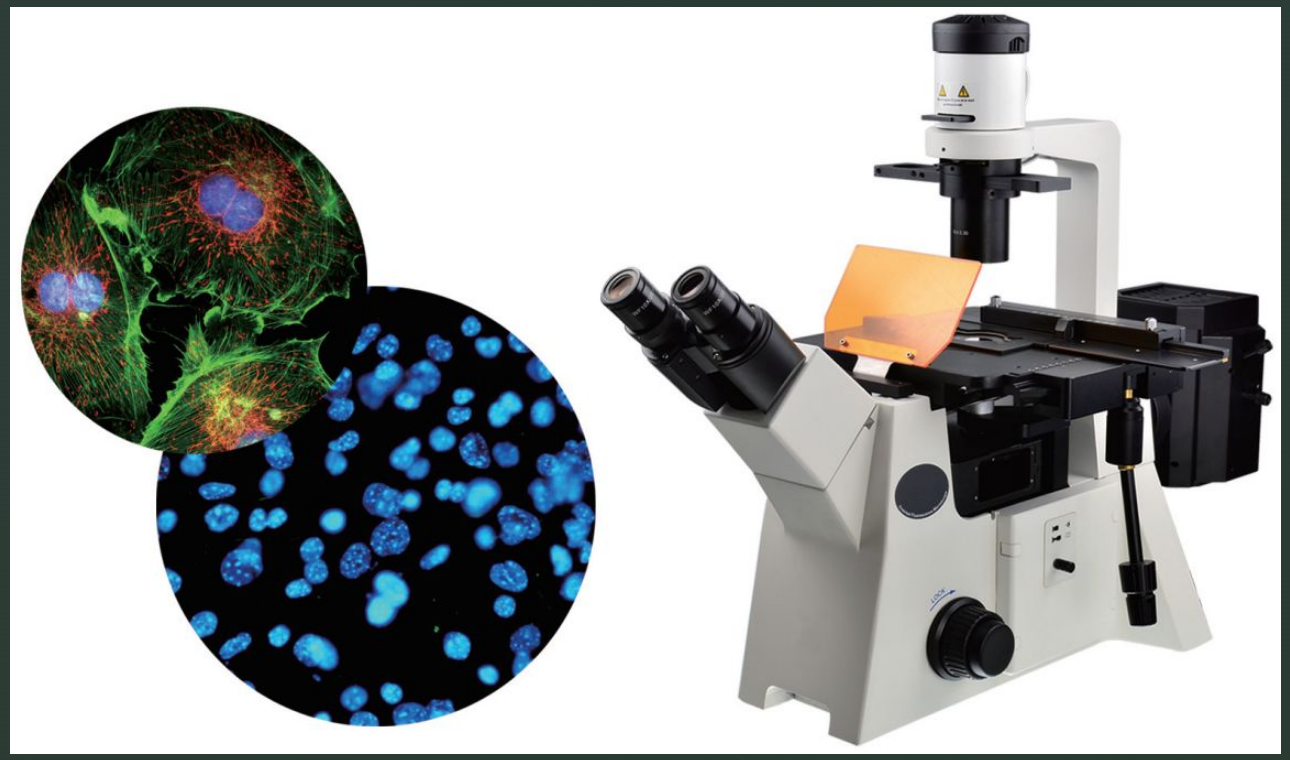
Автор: Жуйкова Наталья

Магистратура, 1 курс



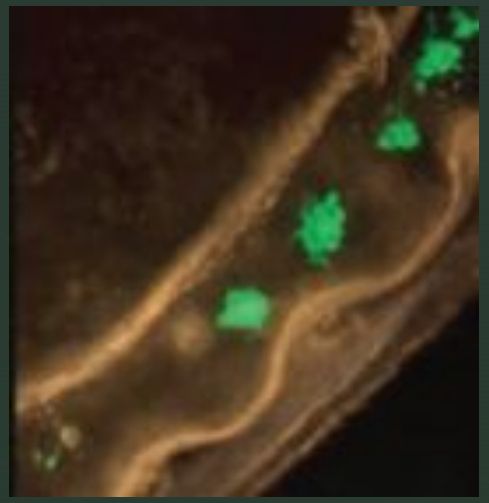


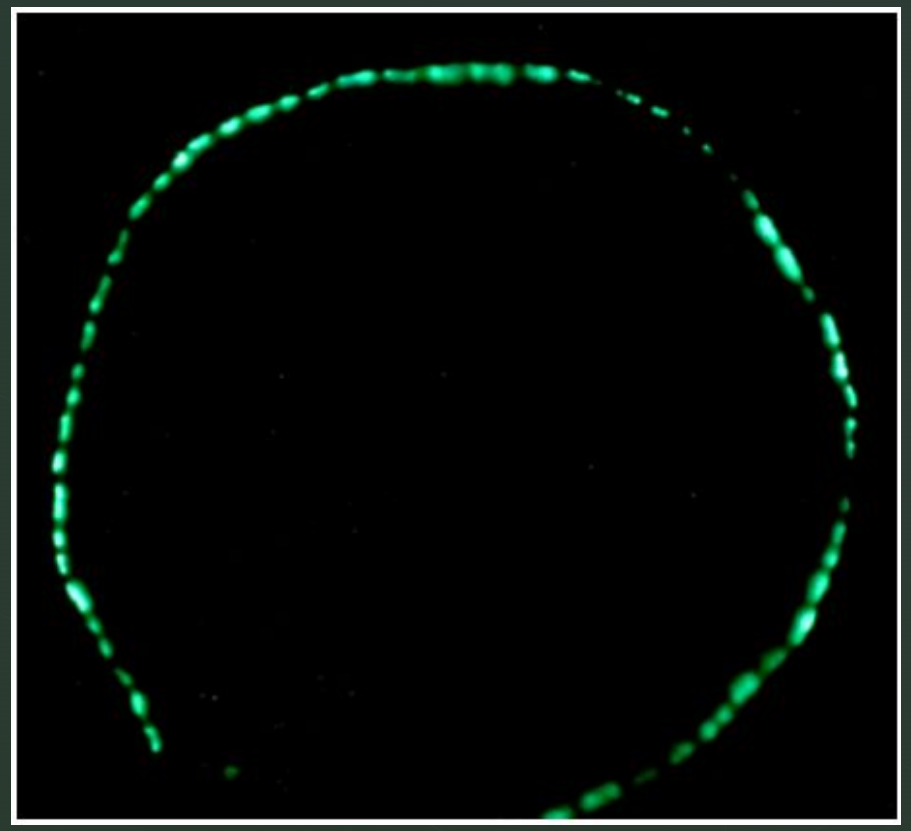




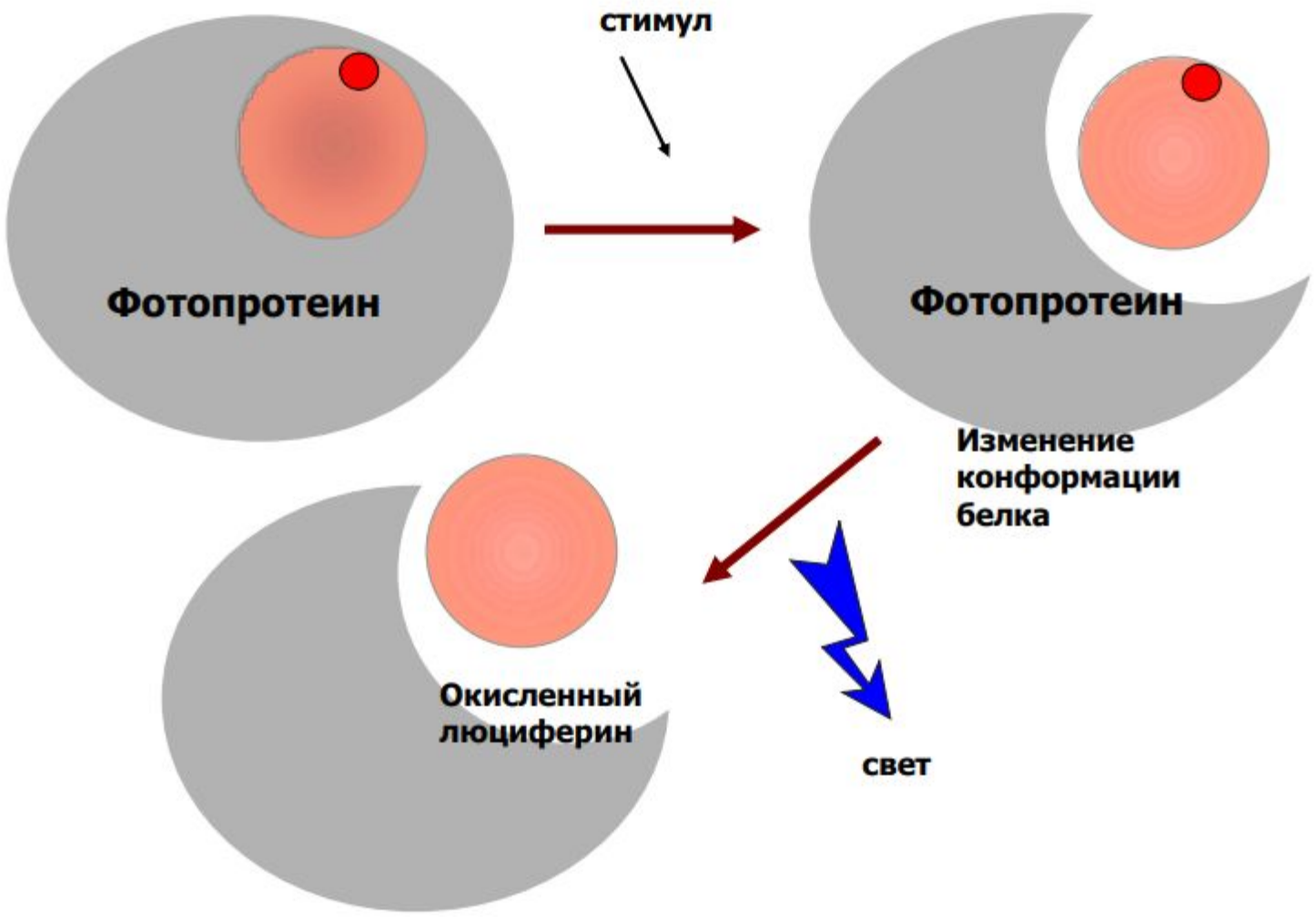
- Флуоресцентная микроскопия — это метод получения увеличенного изображения с использованием люминесценции возбуждённых атомов и молекул образца

# Гидромедуза Aequorea victoria

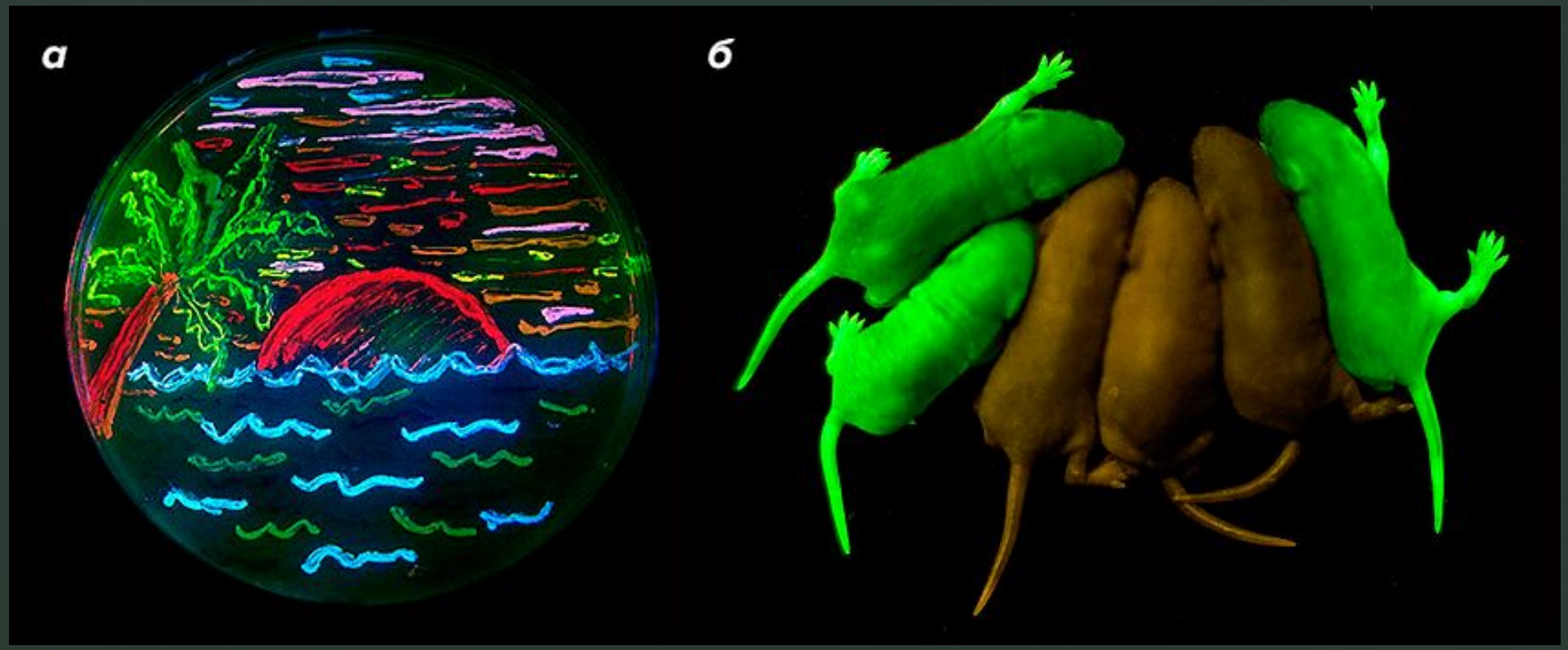




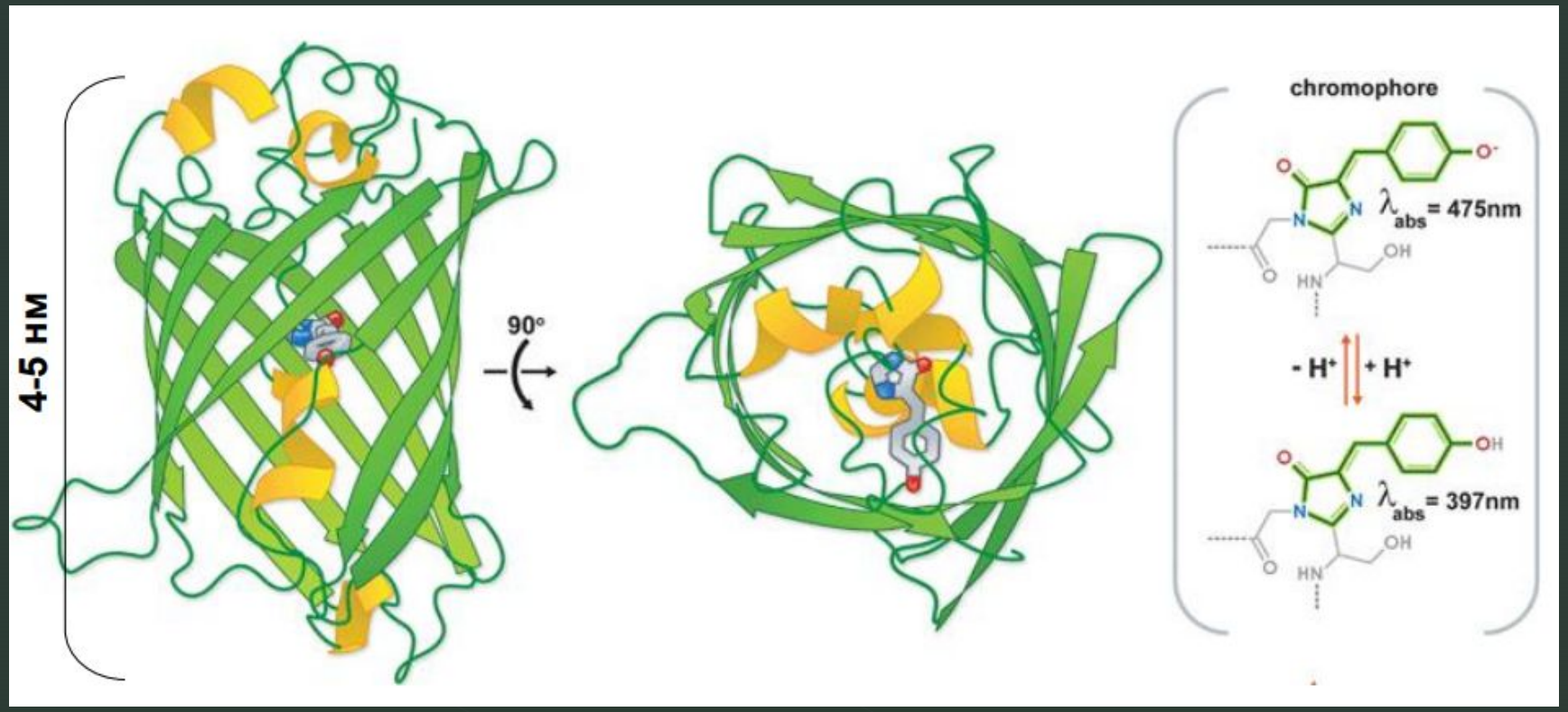
# Биолюминесценция



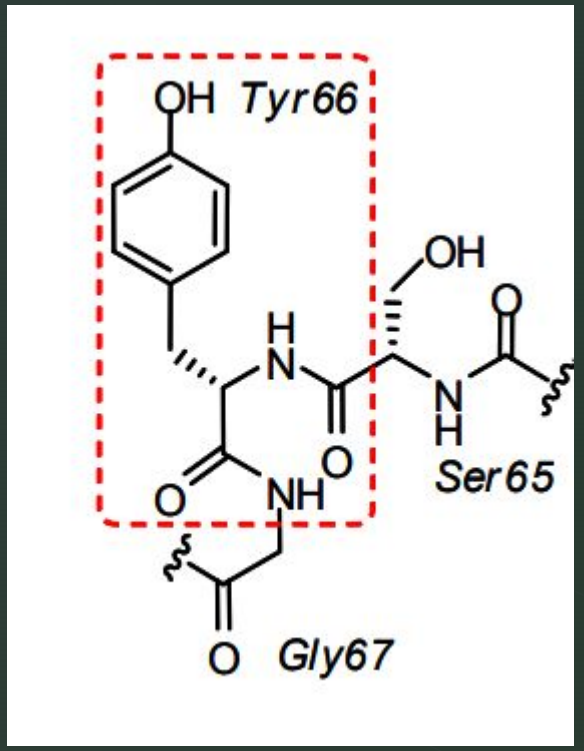
- Во-первых, в отличие от других флуоресцентных меток, GFP-подобным белкам для свечения не нужны никакие вспомогательные вещества, кроме молекулярного кислорода, поэтому клетка остаётся живой и неповреждённой.
- Во-вторых, в отличие от других красителей, GFP — это белковая молекула, которая синтезируется в клетке по своему генетическому коду. А современные методы генной инженерии позволяют «сшить» ген любого белка с геном флуоресцирующего белка, а затем внести эту генетическую «химеру» в клетку или модельный организм. Такая генетически модифицированная клетка начинает синтезировать сложный «химерный» белок, содержащий светящуюся белковую молекулу.
- В-третьих, молекула флуоресцирующего белка достаточно маленькая и поэтому практически не влияет на своего «партнёра». Это означает, что вся сложная белковая конструкция выполняет те же функции, что и сам белок без флуоресцентной метки

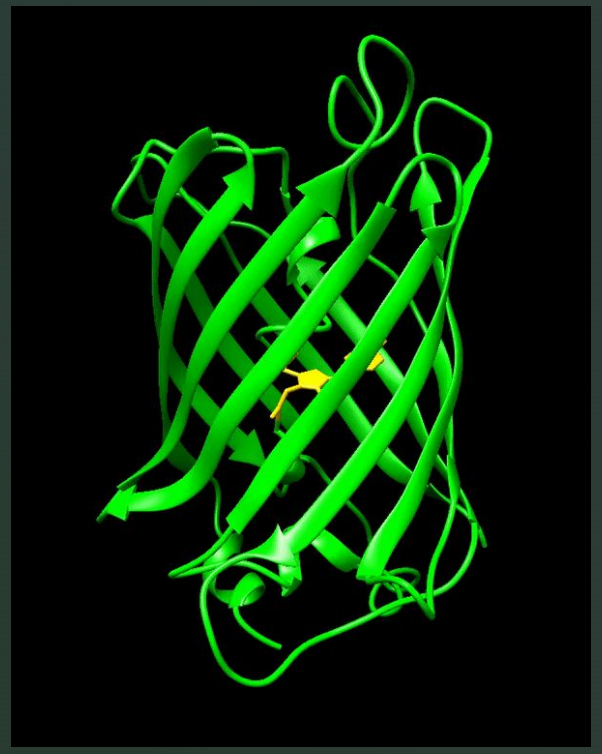



Флуоресцентное «творчество». а — «Рисунок» бактериями, экспрессирующими гены различных флуоресцентных белков, на чашке петри. б — Мыши, несущие ген зеленого флуоресцентного белка, и обычные мыши.

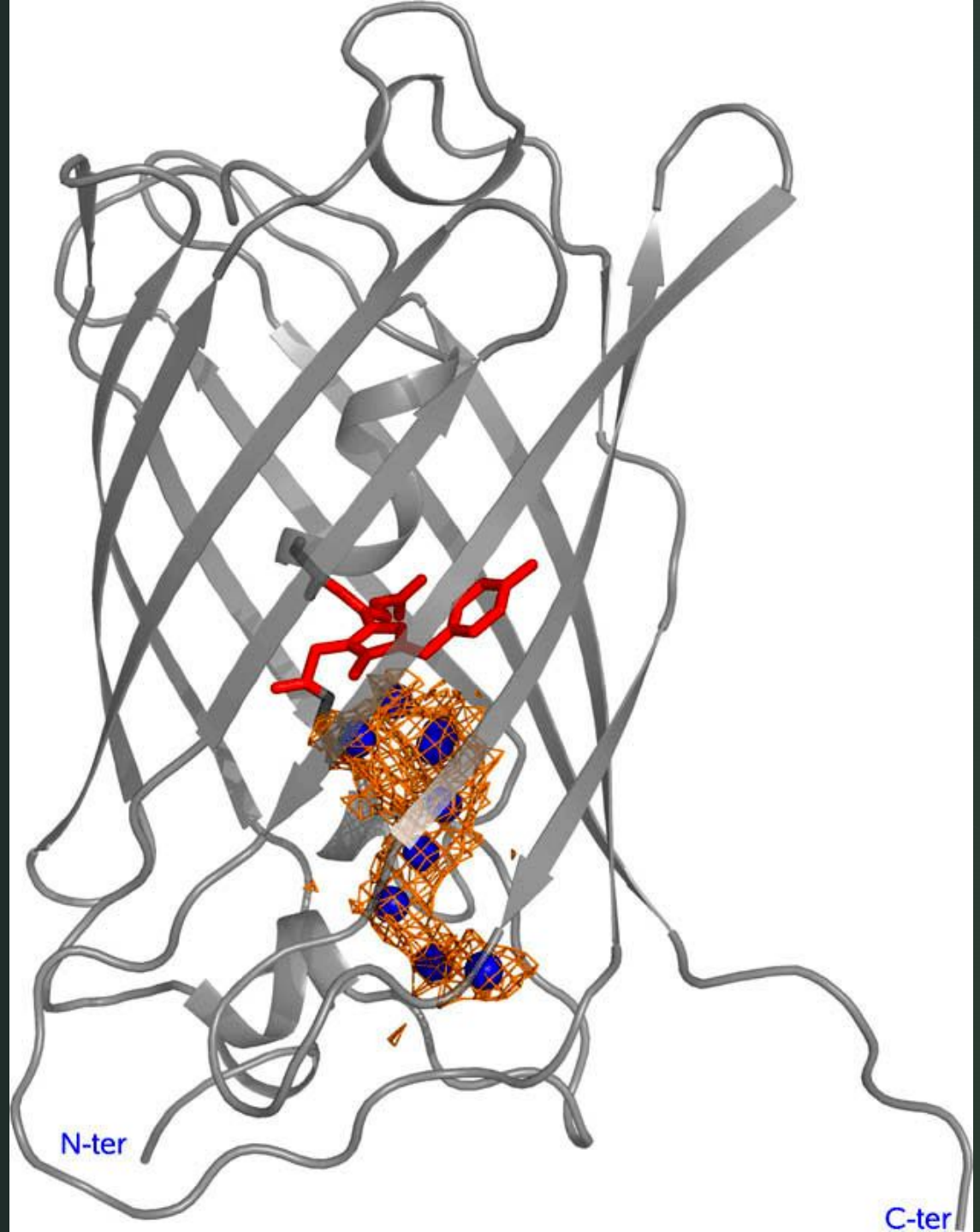



- Зелёный флуоресцентный белок характеризуется двумя пиками поглощения при длинах волн 395 нм (основной) и 475 нм (минорный) и пиком флуоресценции на 498 нм.
- Белок состоит из 238 аминокислот с молекулярной массой 26,9 кДа.
- Белок представляет собой бета-складчатую структуру формирующую «бочонок» или «цилиндр» из 11 поворотов первичной последовательности, внутри которого располагается альфа-спираль с хромофором



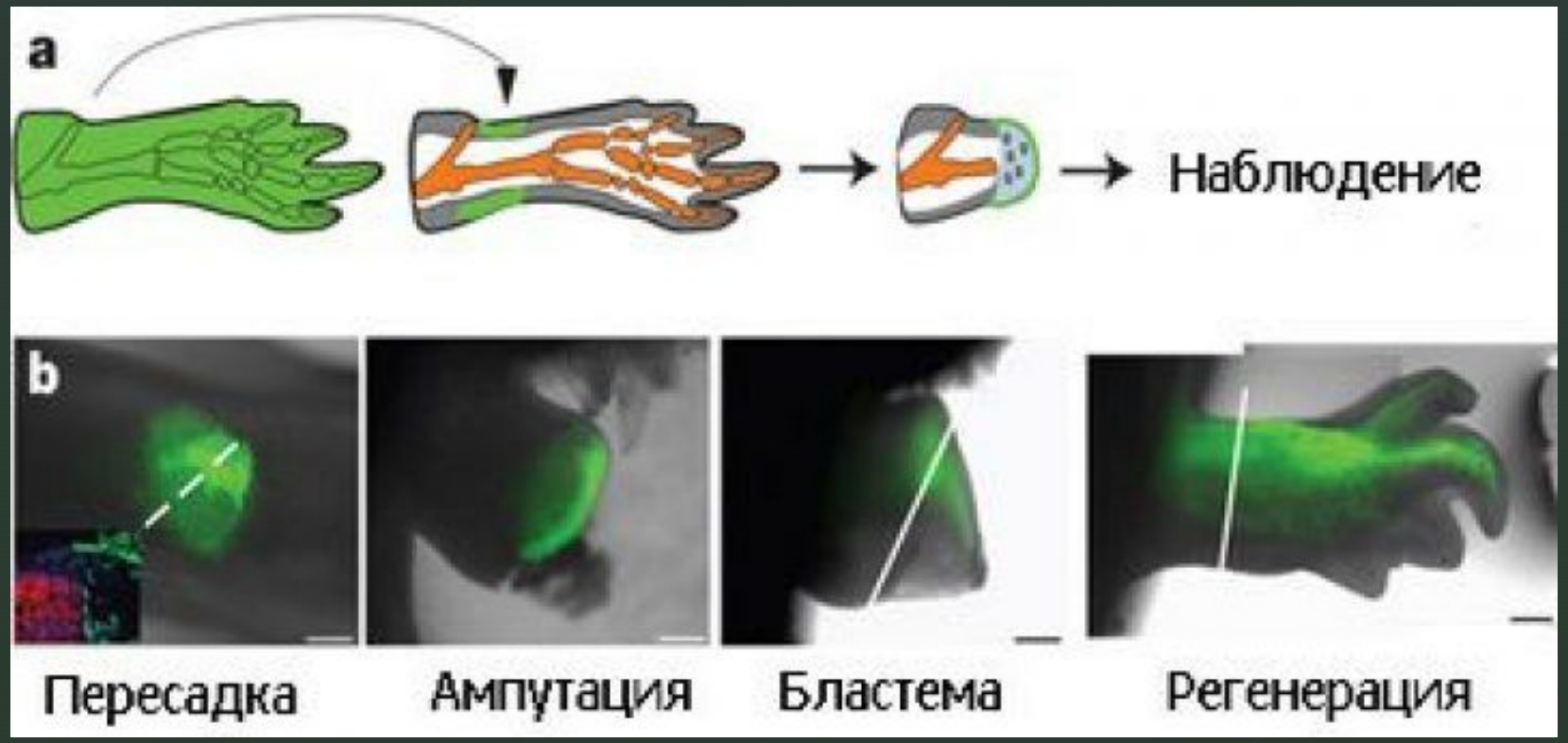



- Оболочка цилиндра защищает хромофор от тушения его флуоресценции компонентами микроокружения.
- Кроме этого, внутренняя структура молекулы вызывает специфические реакции циклизации трипептида Ser65-Tyr66-Gly67, что приводит к образованию хромофора. Этот процесс называется созреванием и включает несколько этапов, каждый из которых формирует промежуточный или конечный продукты с различными спектральными свойствами



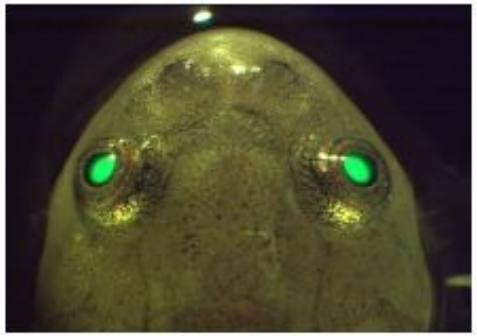

- Пептидный остов отмечен *серым цветом*, хромофор (Gln65—Tyr66—Gly67) — *крас ным*. Углубление, формирующее канал, показано в виде *оранжевой сетки*, охватывающей молекулы воды (*синие сферы*).

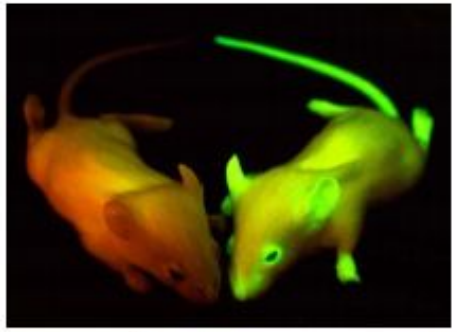
- Анализ экспрессии генов
- Прижизненное мечение организмов, тканей, клеток, клеточных структур и белков

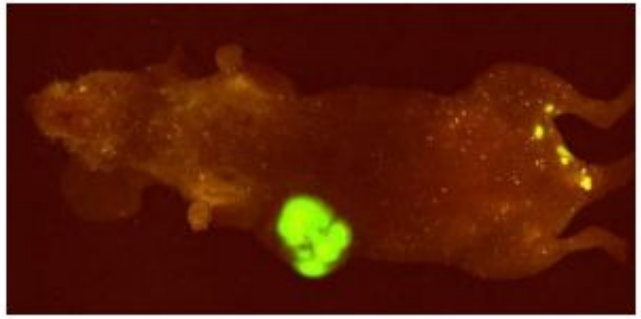


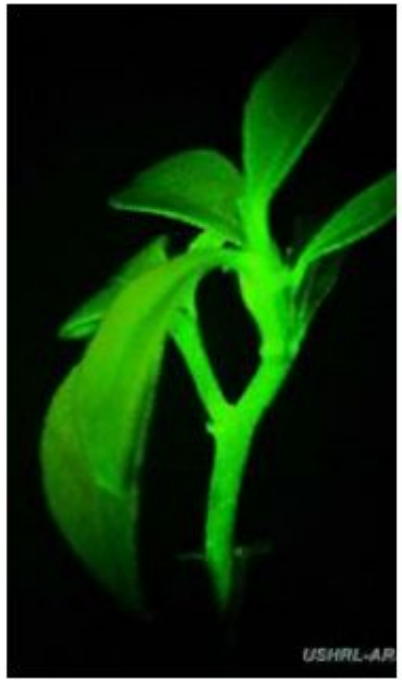
# Область применения

**Видно, где и когда включается промотор; можно метить организмы или группы клеток**



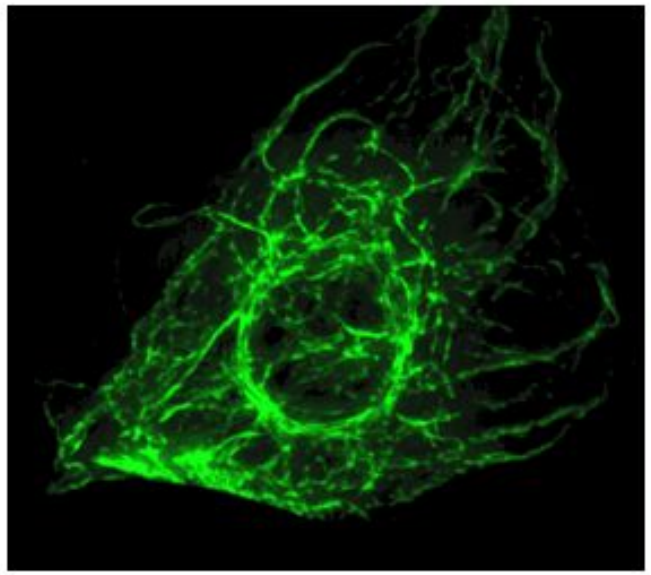


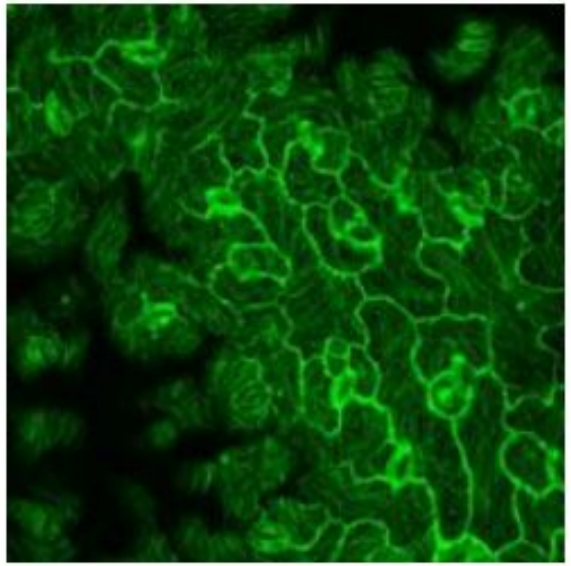


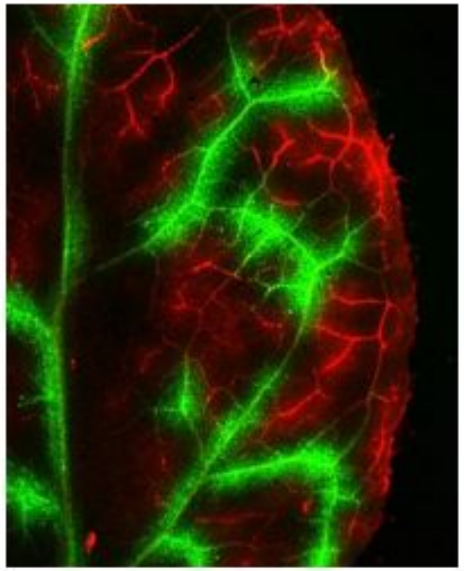


# Область применения

**Можно следить за локализацией белков в живых клетках**

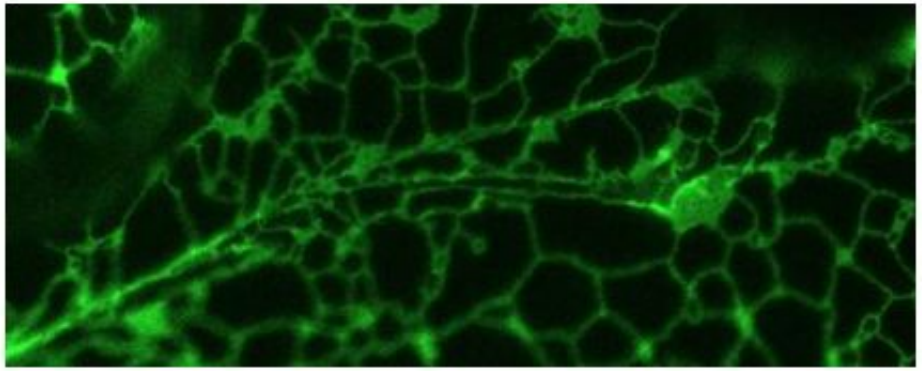




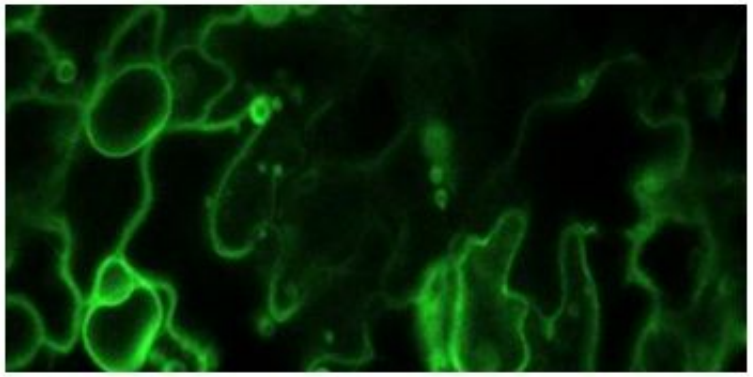


# Область применения

**Можно метить клеточные структуры**

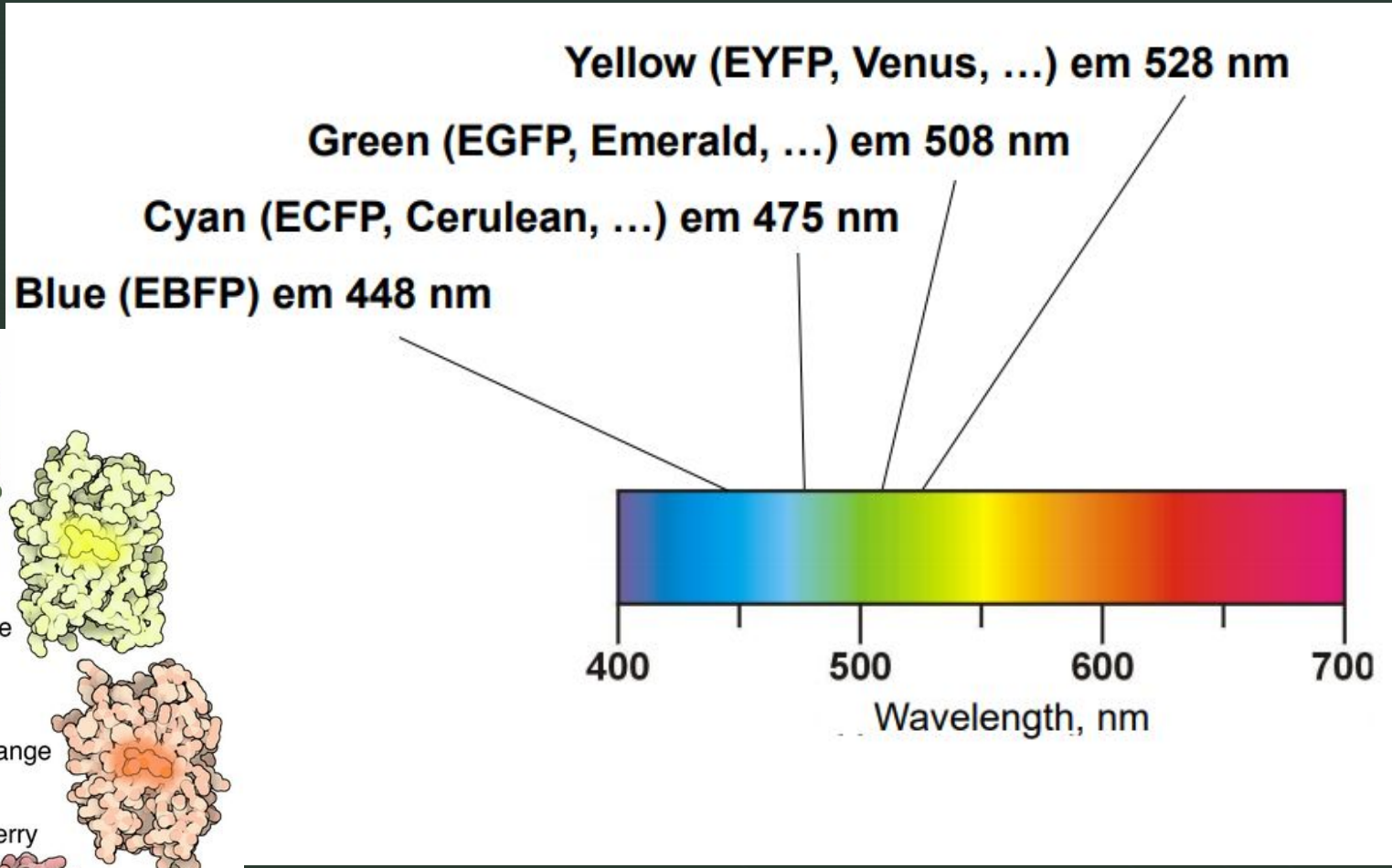


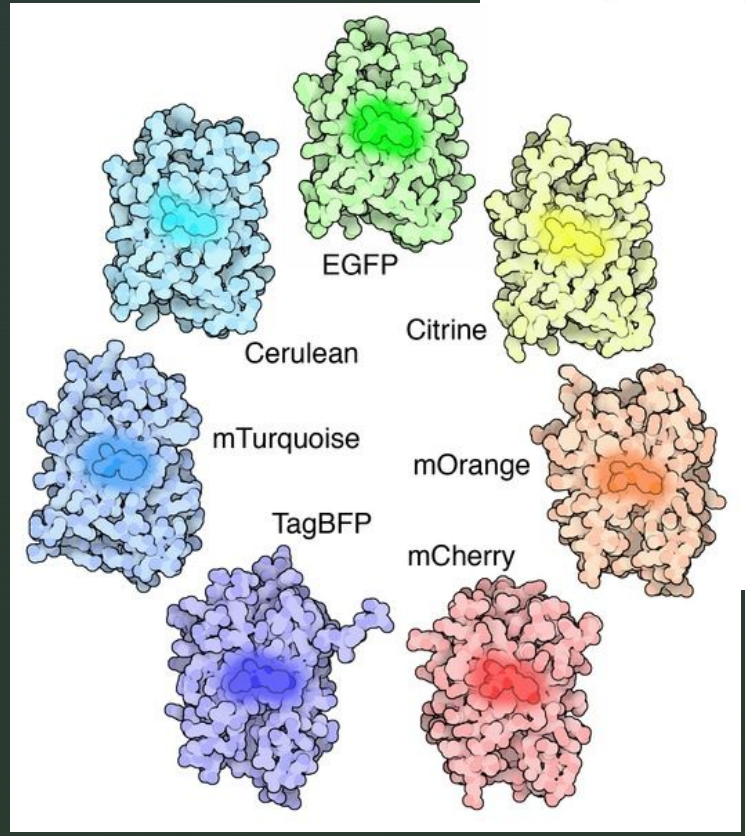
Эндоплазматический ретикулум

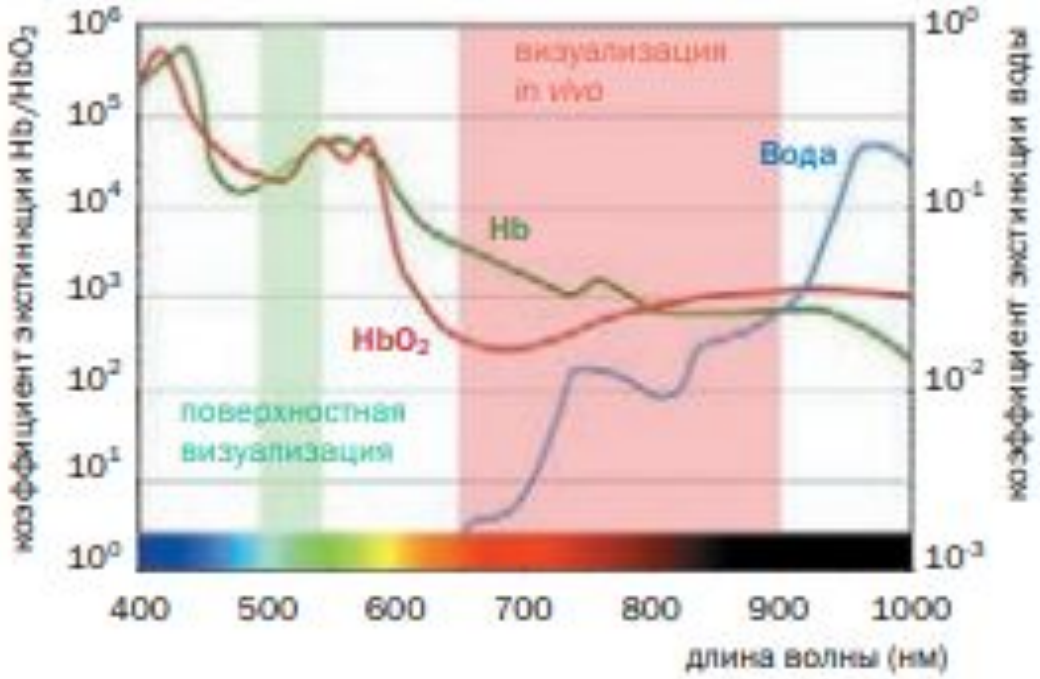


Комплекс Гольджи

# Мутанты зеленого белка






Красный свет лучше проходит через ткани животных.

Флуоресценция и окраска небиолюминесцентных коралловых полипов.

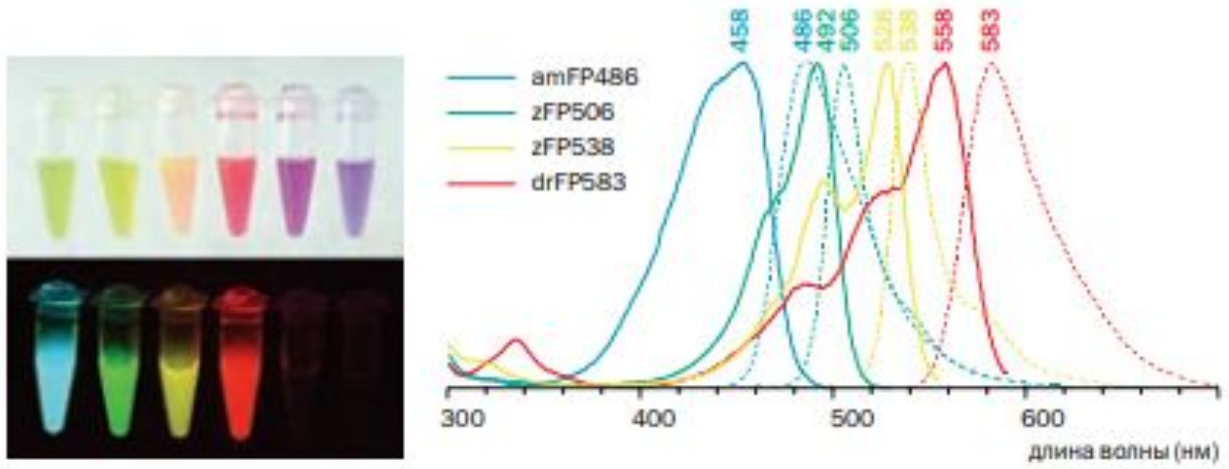
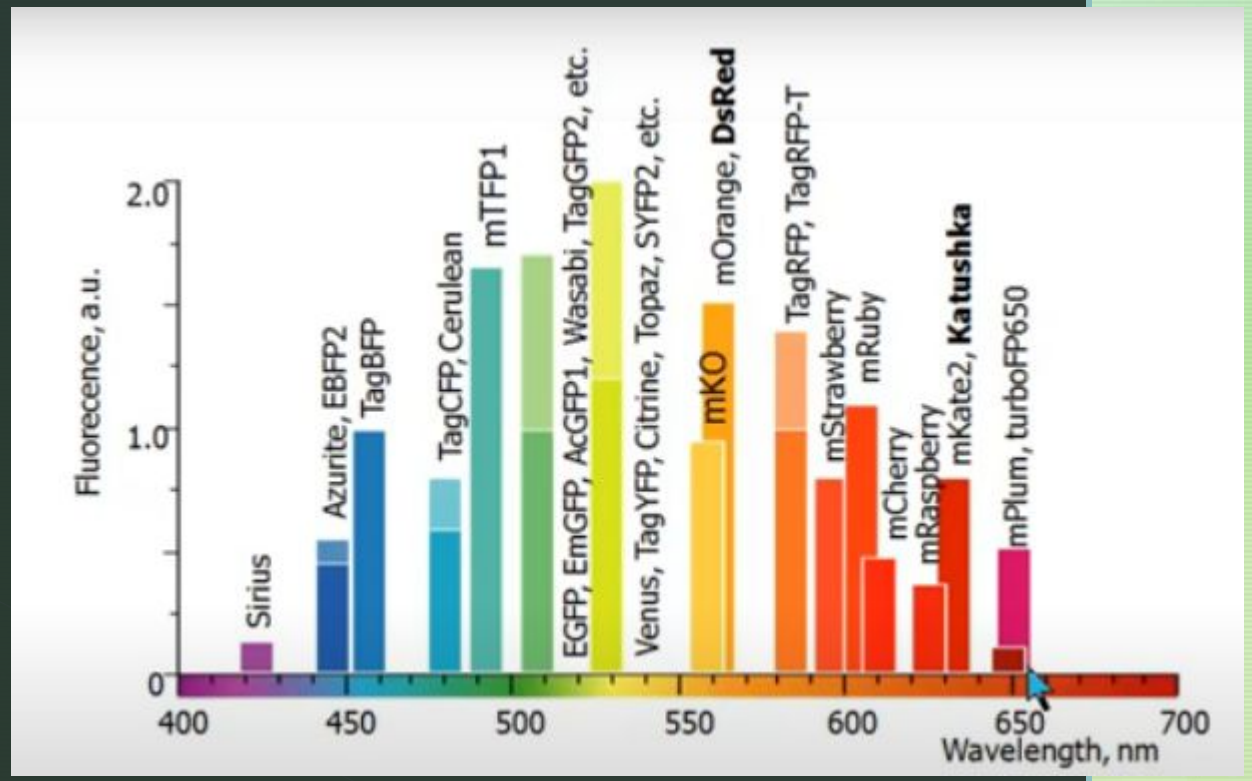
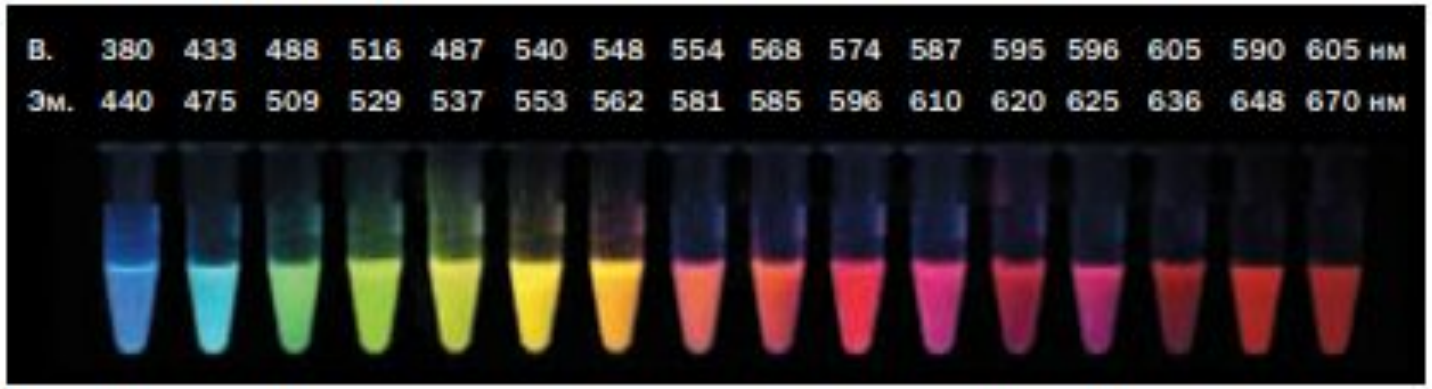


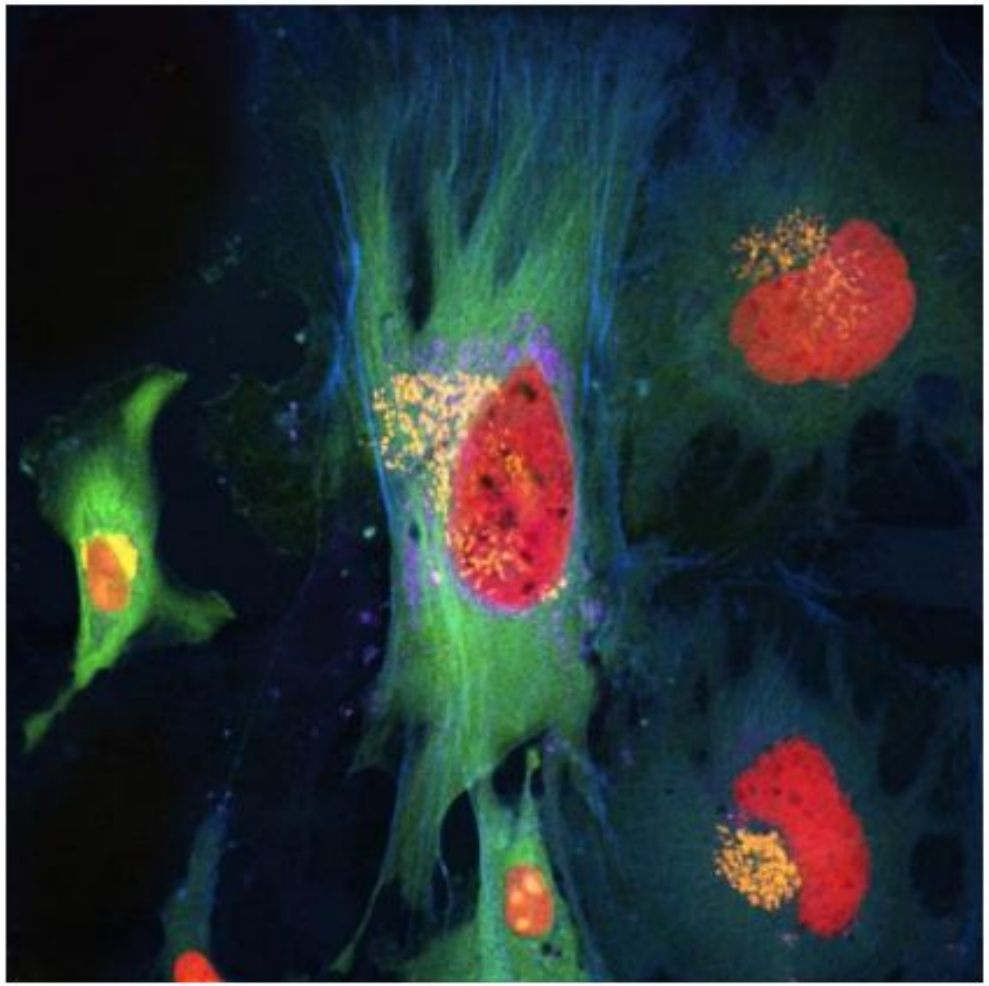

**Рис. 6.** GFP-подобные белки коралловых полипов.




Палитра GFP-подобных белков. В. – возбуждение; Эм. – эмиссия.

# Окрашивание частей клетки с помощью разноцветных флуоресцентных белков



**Фиолетовый - митохондрии** (TagBFP)

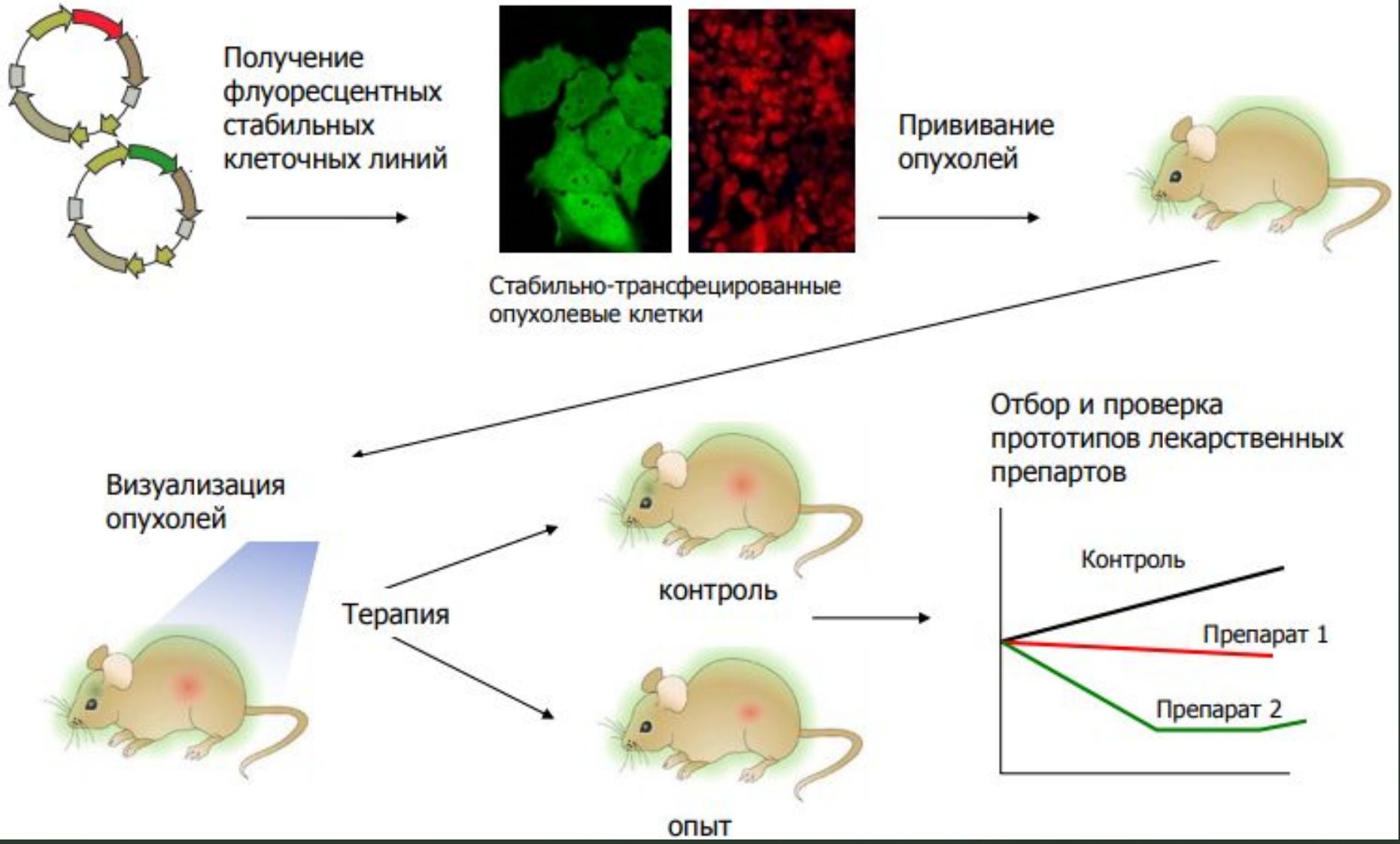
**Синий - цитоскелет** (TagCFP)

**Зеленый - микротрубочки** (TagYFP)

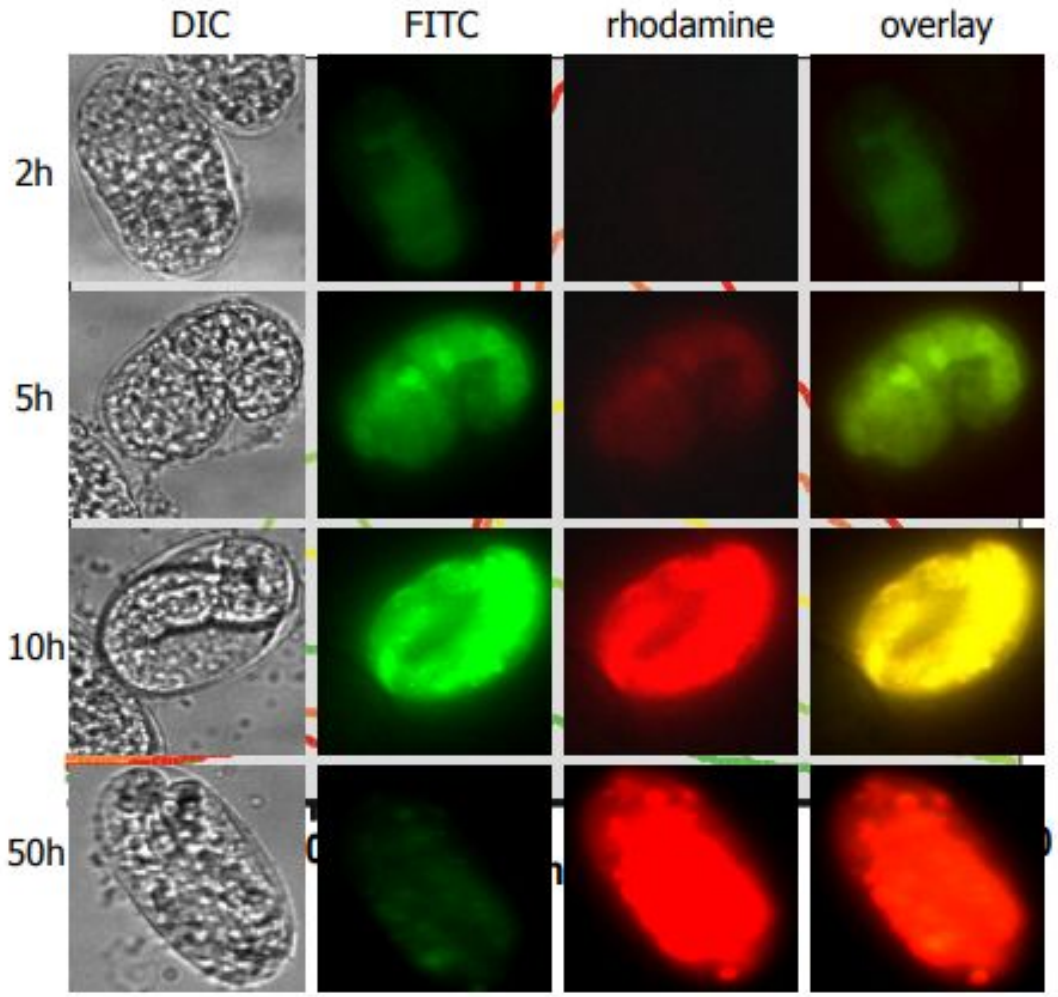
**Желтый – аппарат Гольджи** (TagRFP)

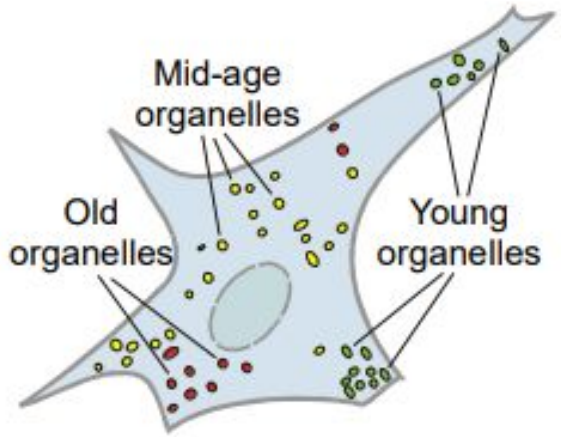
**Красный - ядро** (TagFP635)

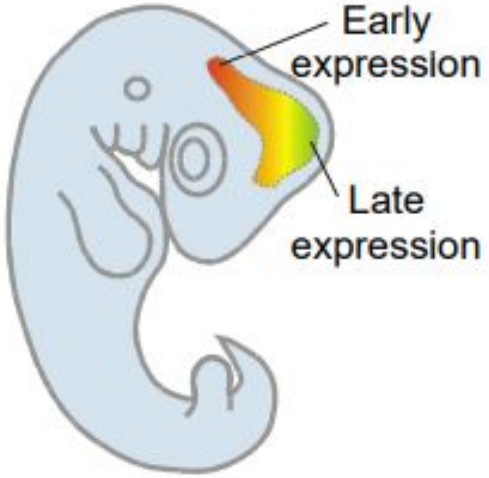
# Использование флуоресцентных белков для скрининга лекарственных препаратов



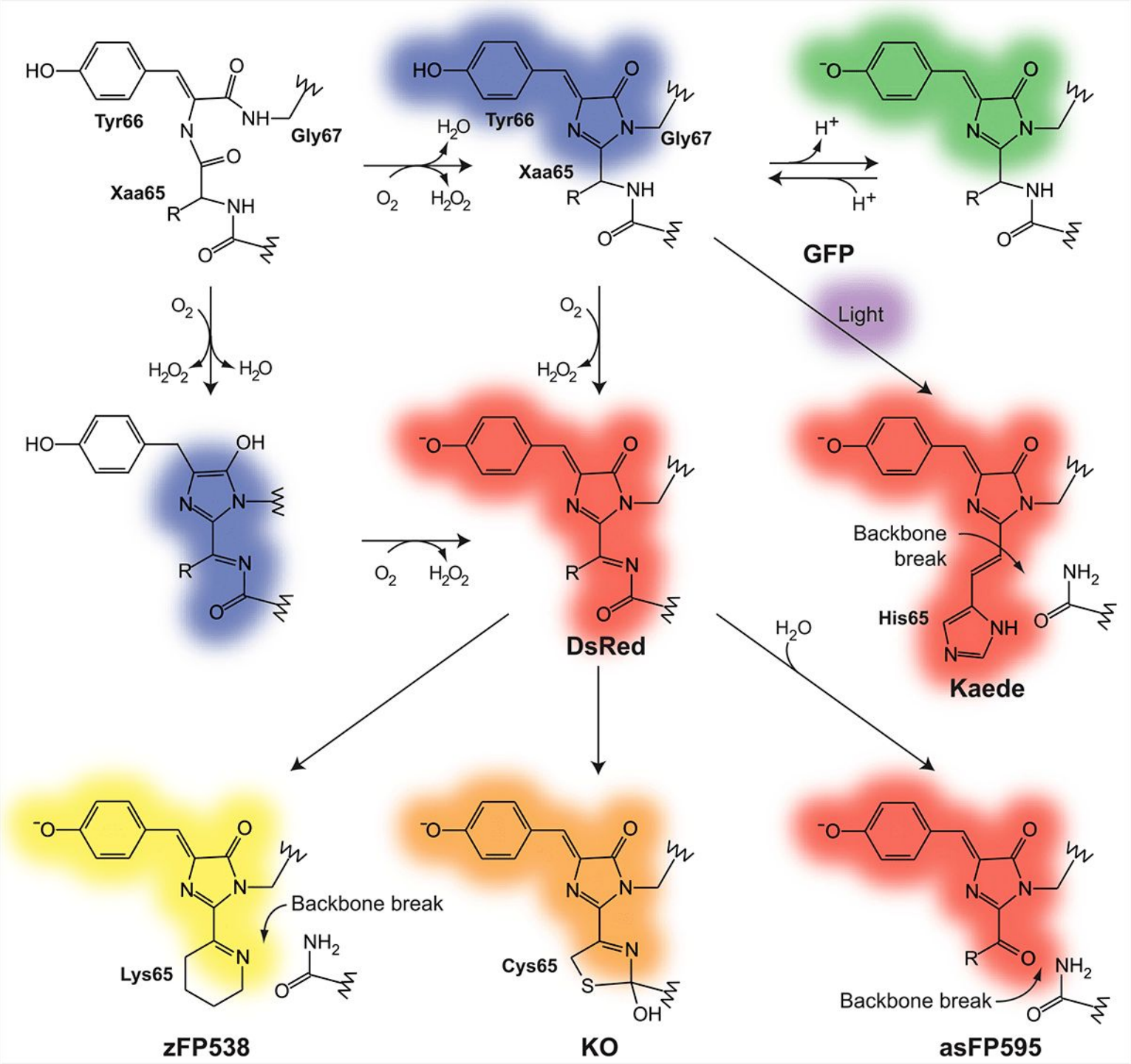
# Флуоресцентный таймер



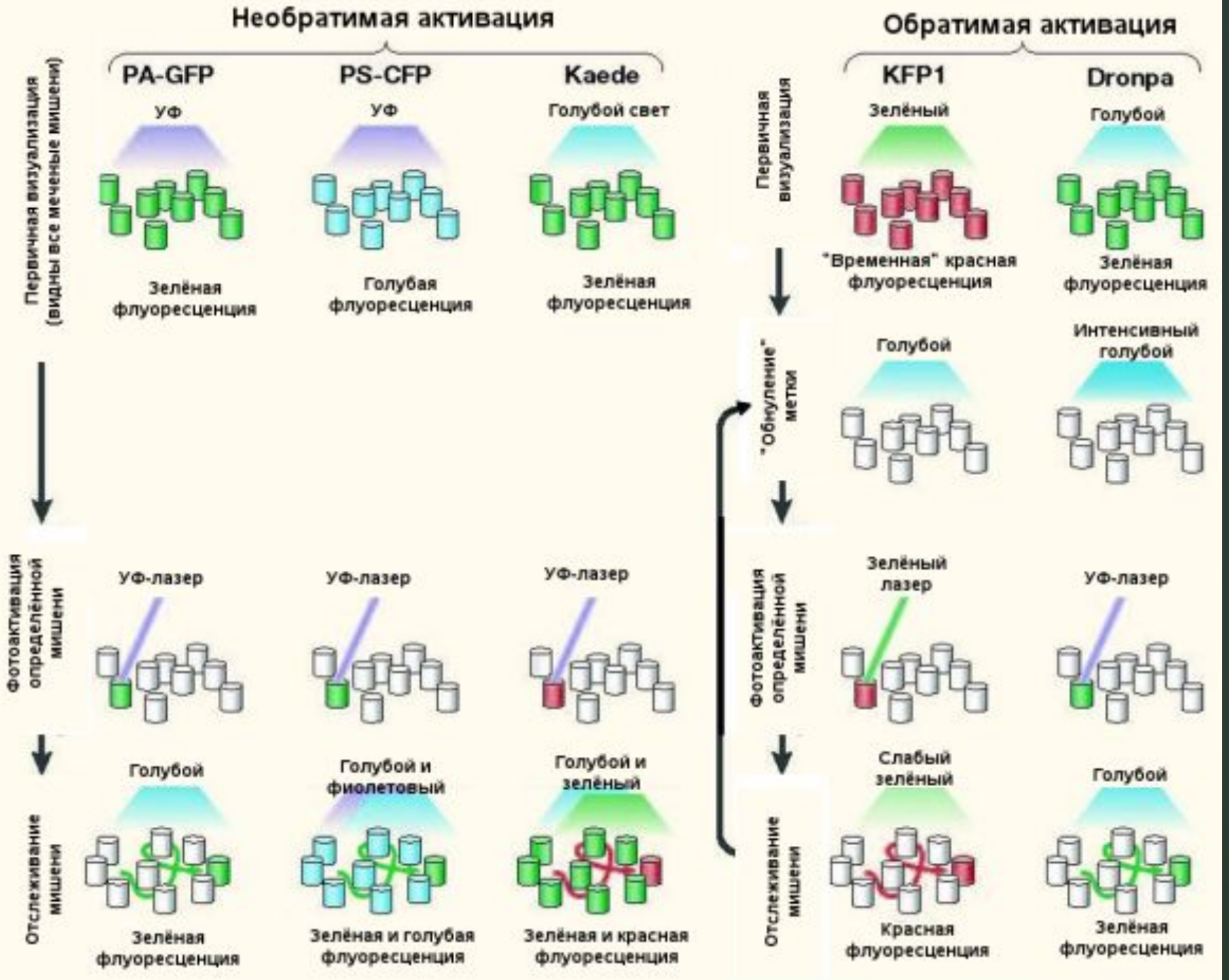



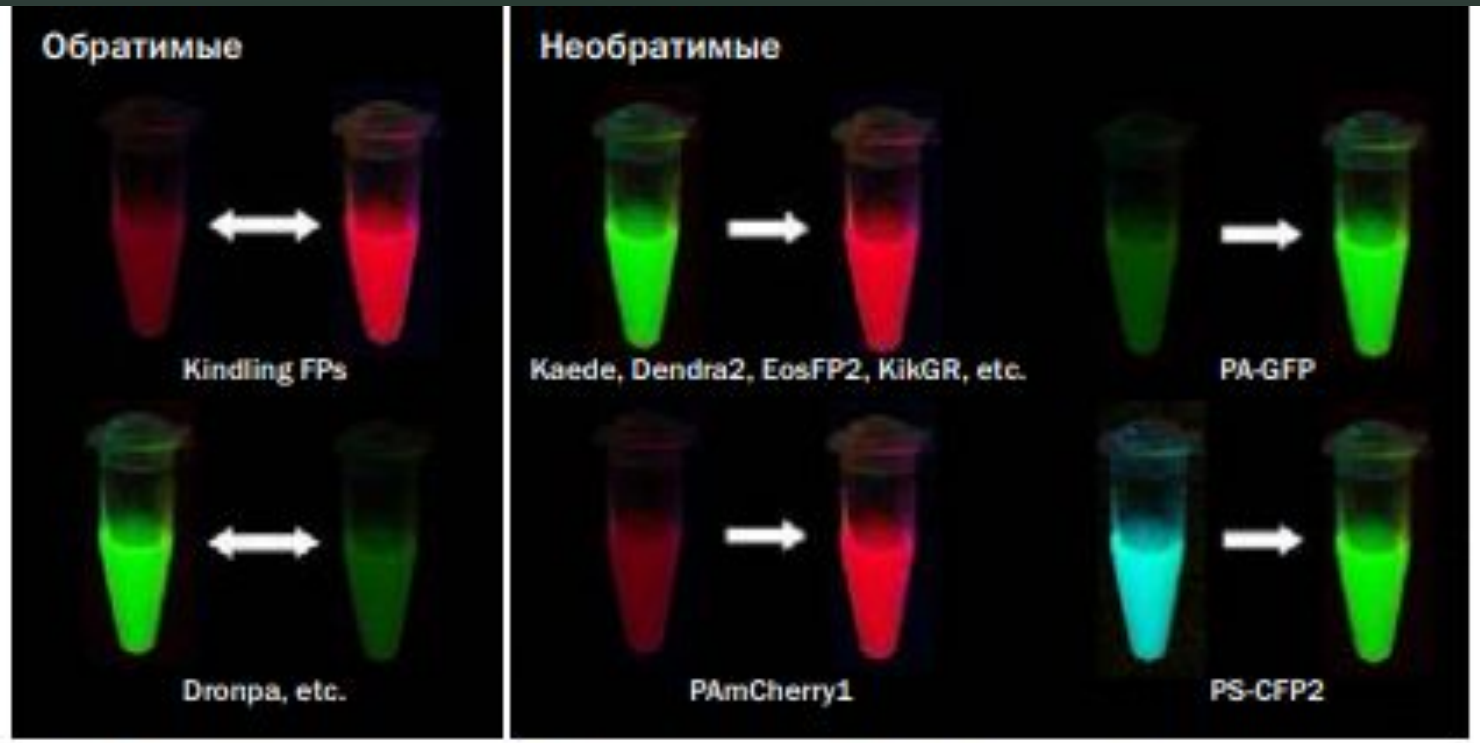




Terkikh et al., 2000; Verkhusha et al., 2004




**Химические структуры и пути созревания хромофоров GFP-подобных белков, встречающихся в природе**


Необратимая активация
Обратимая активация
PA-GFP
PS-CFP
Kaede
KFP1
Dronpa
Первичная визуализация (видны все меченые мишени)
УФ
УФ
Голубой свет
Зелёная флуоресценция
Голубая флуоресценция
Зелёная флуоресценция
Первичная визуализация
Зелёный
Голубой
"Временная" красная флуоресценция
Зелёная флуоресценция
"Обнуление" метки
Голубой
Интенсивный голубой
Фотоактивация определённой мишени
УФ-лазер
УФ-лазер
УФ-лазер
Фотоактивация определённой мишени
Зелёный лазер
УФ-лазер
Отслеживание мишени
Голубой
Голубой и фиолетовый
Голубой и зелёный
Зелёная флуоресценция
Зелёная и голубая флуоресценция
Зелёная и красная флуоресценция
Отслеживание мишени
Слабый зелёный
Голубой
Красная флуоресценция
Зелёная флуоресценция




Фотоактивируемые и фотопереключаемые флуоресцентные белки.

Спасибо за внимание!