

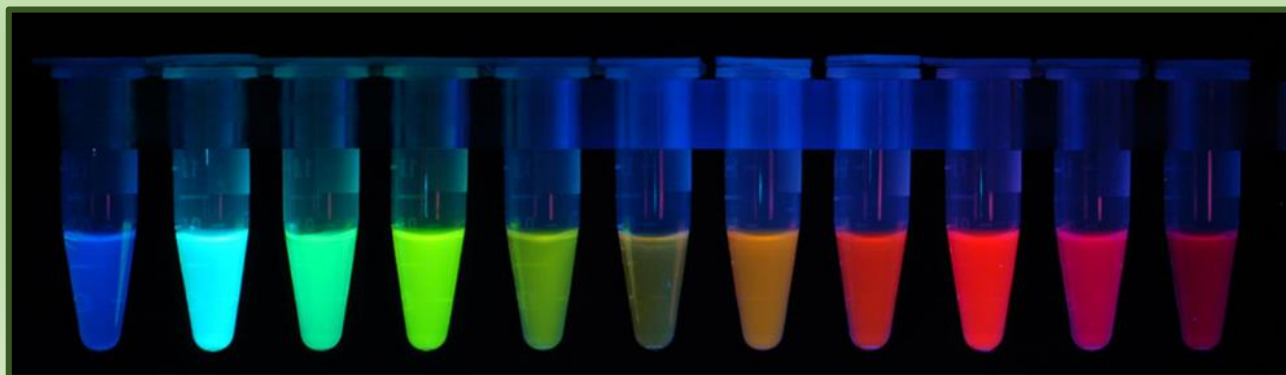
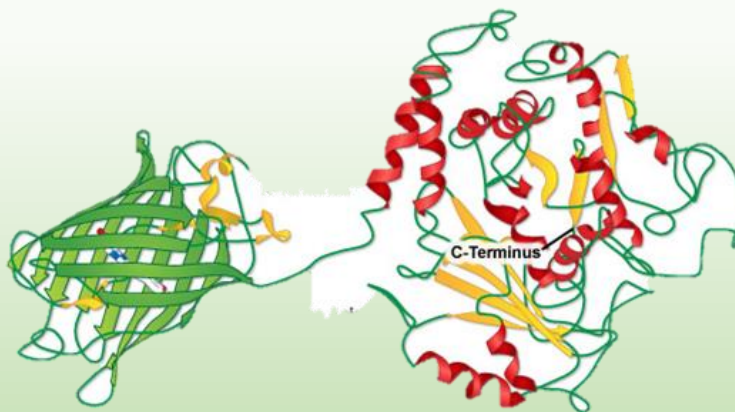
Fluoreszcensen jelölt fehérjék vizsgálata sejtekben

Készítette: Németh Virág Alexandra

Ótott Péter

Témavezetők: Besztercei Balázs

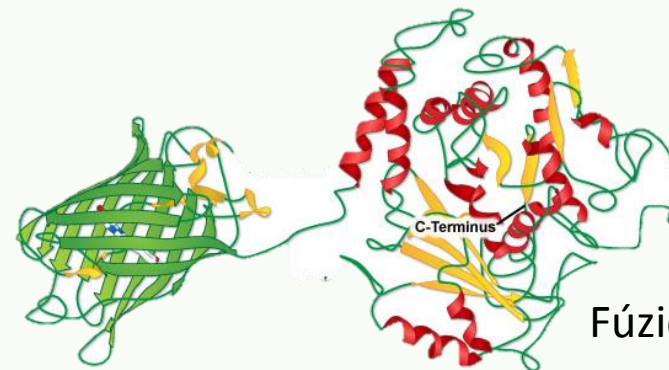
Baksa Attila



Céljaink:

1. Zöld fluoreszcens fúziós fehérje kifejezése emlős sejtvonalban
 - Rekombináns plazmid felszaporítása és izolálása baktérium sejtekből
 - Izolált rekombináns plazmid kimutatása sejtekben
2. Fehérjék kimutatása a sejtben immuncitokémiával

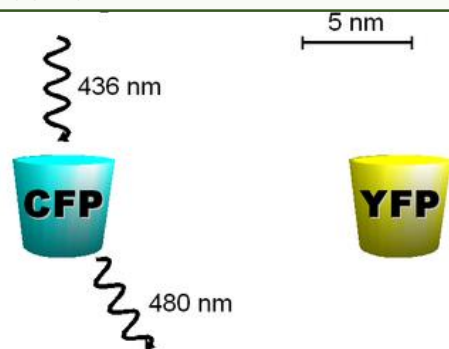
Fluoreszcens fehérjék



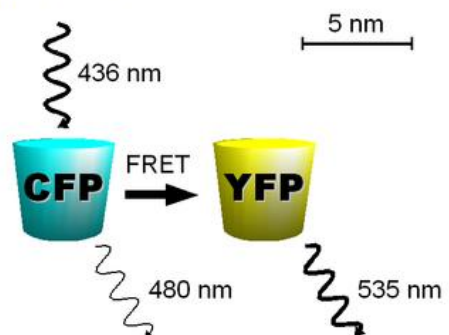
Fúziós fehérje

- Fluoreszcencia jelensége
- Néhány alkalmazási területei:
 - Lokalizáció, ko-lokalizáció vizsgálata
 - Fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (FRAP)
 - Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET)

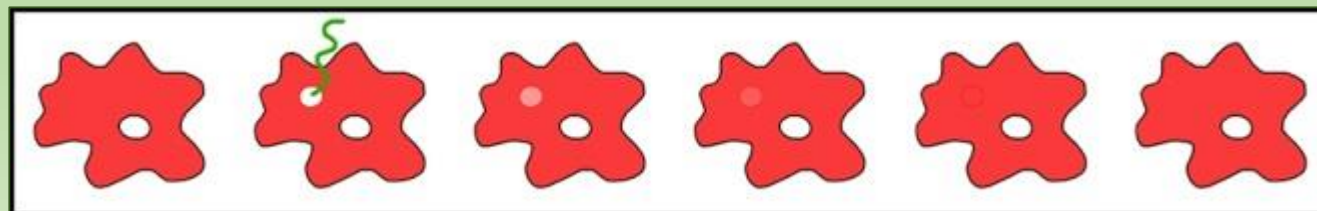
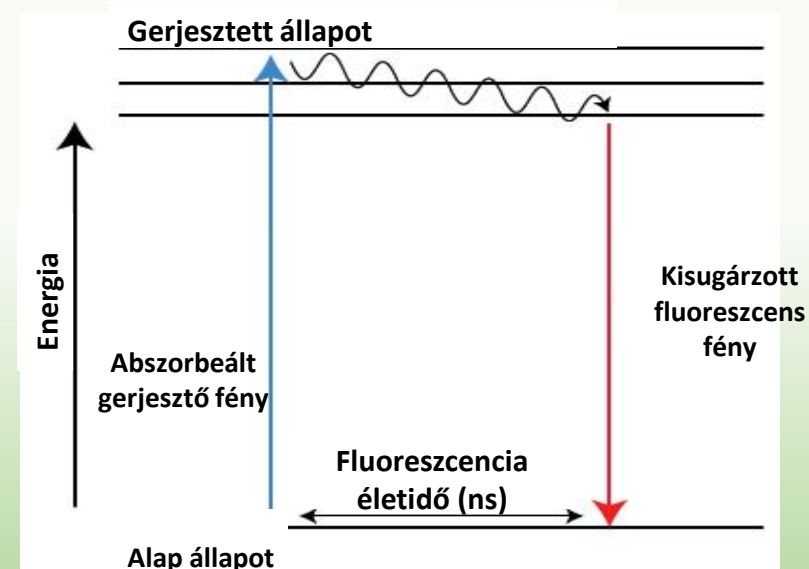
FRET



Segnale FRET



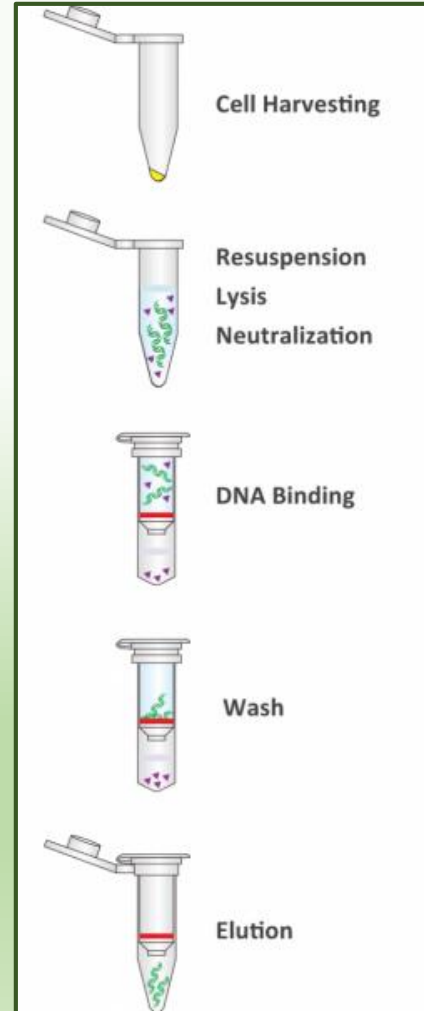
CFP: cián fluoreszcens fehérje
YFP: sárga fluoreszcens fehérje



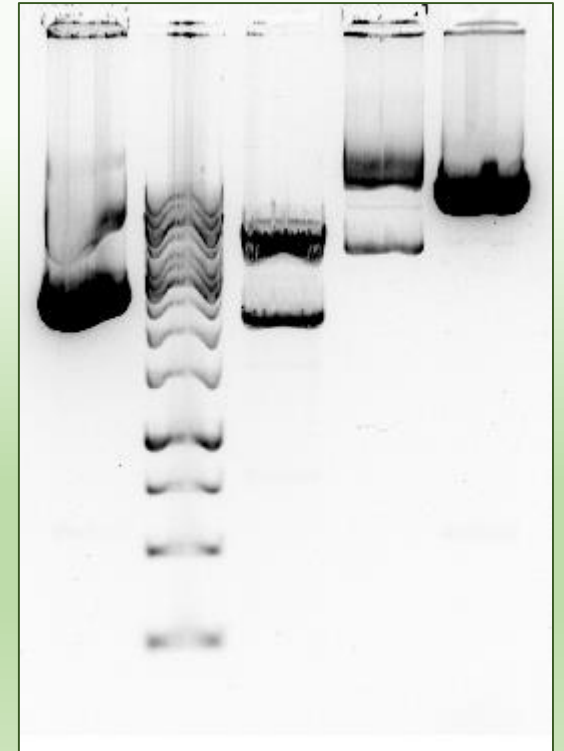
FRAP

Plazmid izolálás és futtatás agaróz gélelektroforézissel

- Plazmid: peGFP-Grp1-PH domén
- Baktérium sejtek
- CH3 BLUE
- Antibiotikum rezisztencia: Kanamycin

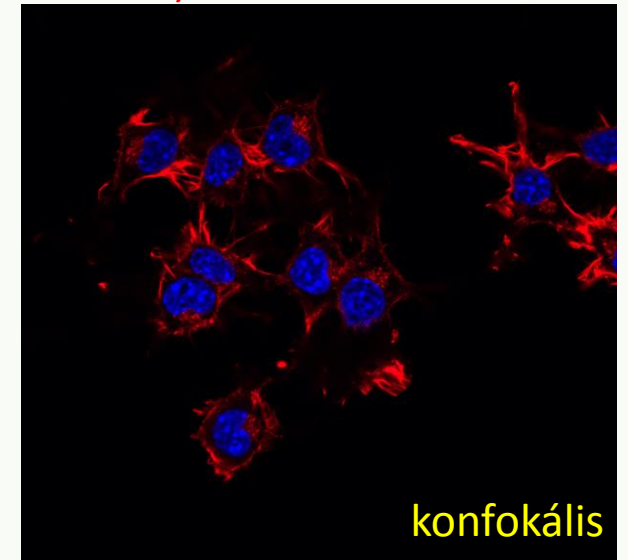


Tisztított plazmid
ellenőrzése agaróz
gélelektroforézissel

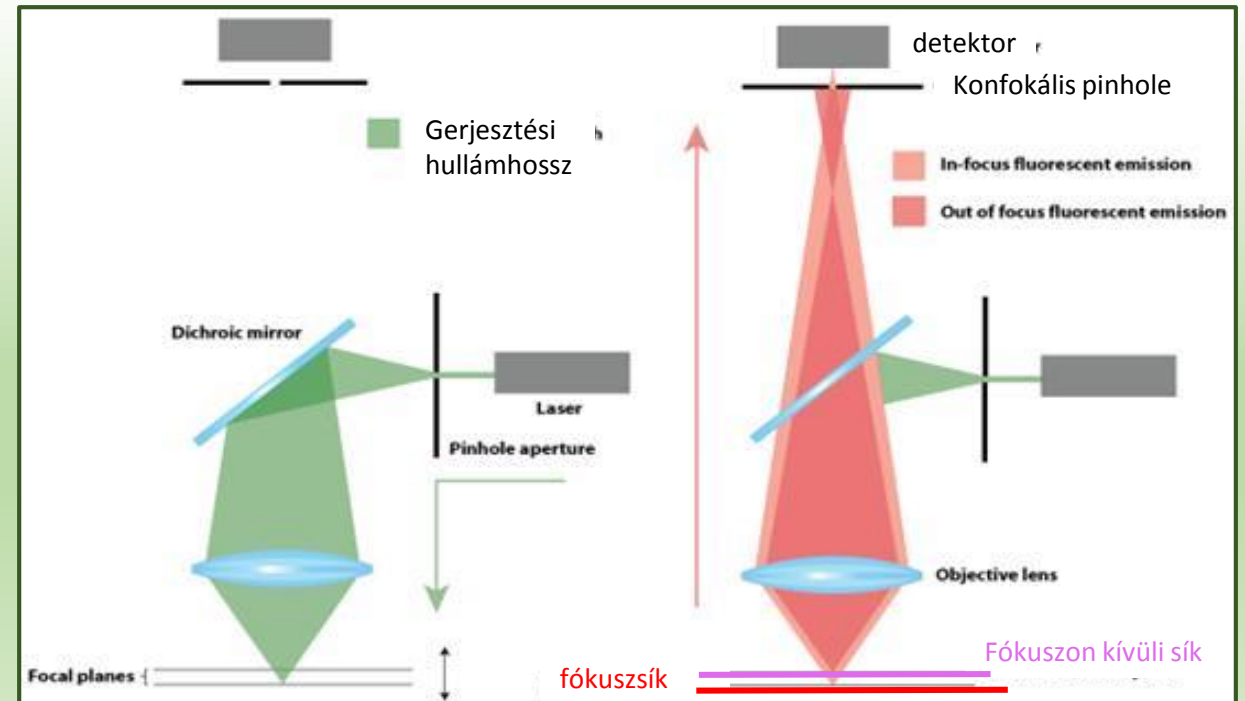


Konfokális mikroszkópia

Kék:DAPI piros:aktin (phalloidin CF543)



Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóp

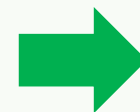
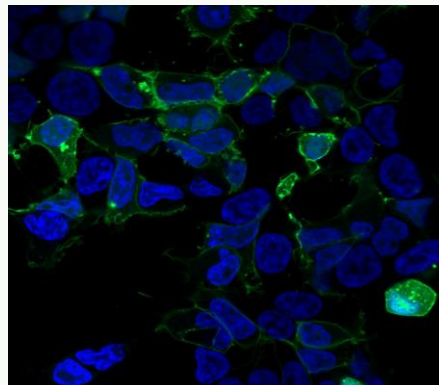
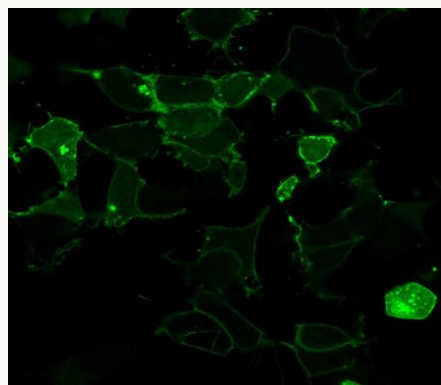
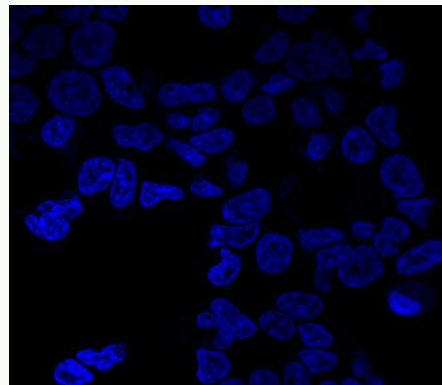


Eredményeink:

Kék: DAPI

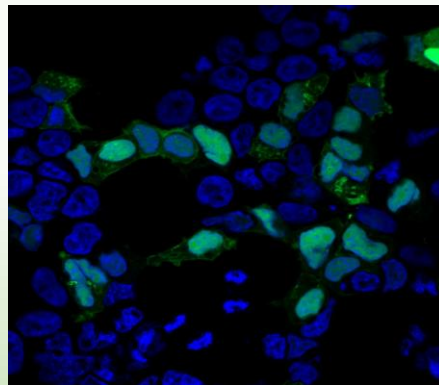
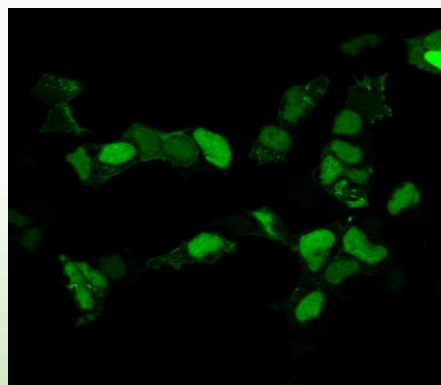
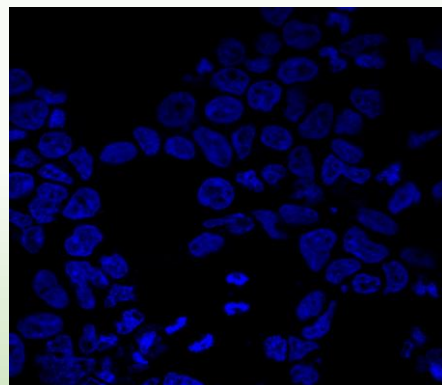
Zöld: GFP

EGFP-Akt-PH



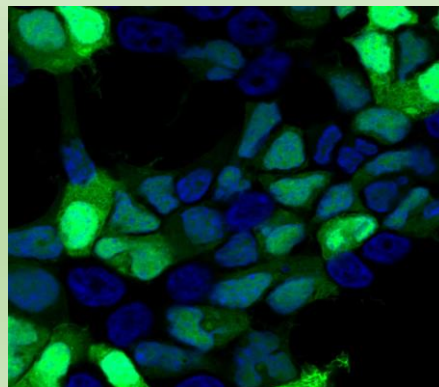
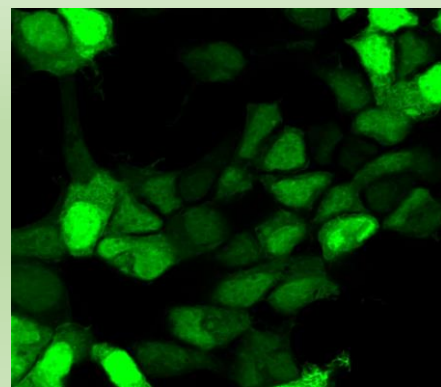
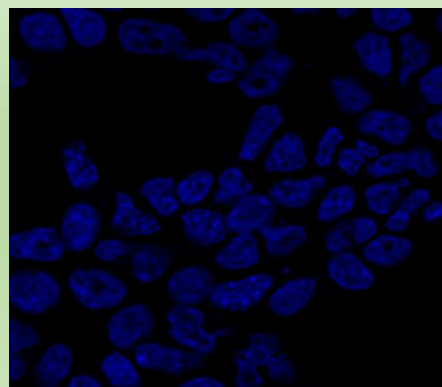
- membránhoz kötődik
- nagy méret-> sejtmagba nem

EGFP-Grp1-PH



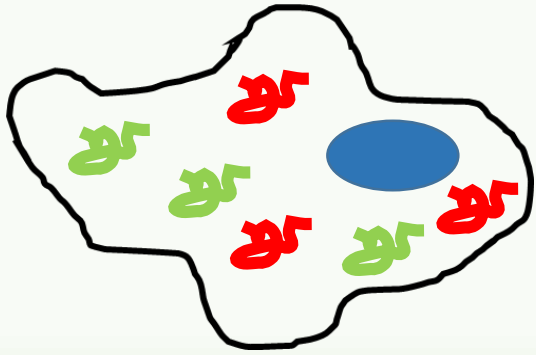
- sejtmag+ sejtmembrán
- kis méret-> sejtmag is

EGFP

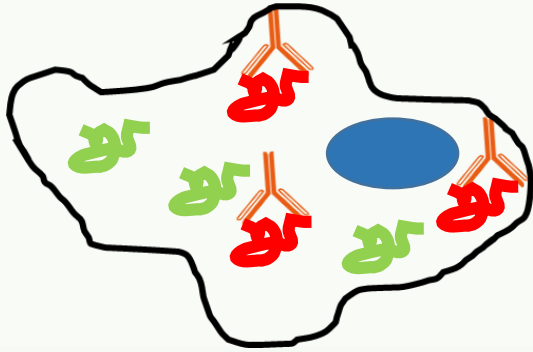


- mindenhol diffúzan
- nincs specifikus lokalizációja

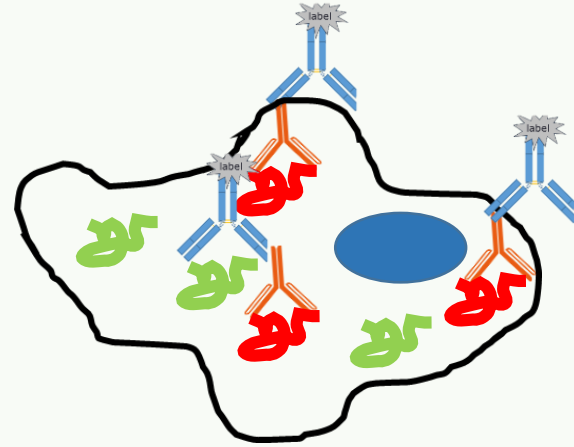
Immuncitokémia



Fixálás, permeabilizálás



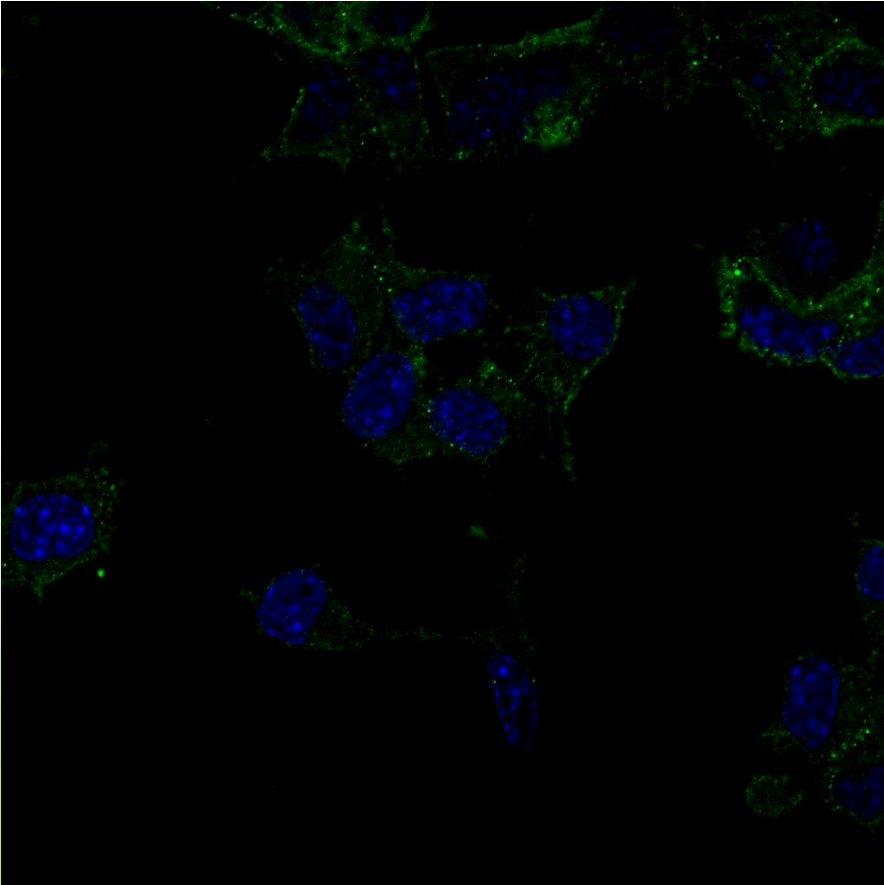
Elsődleges antitest



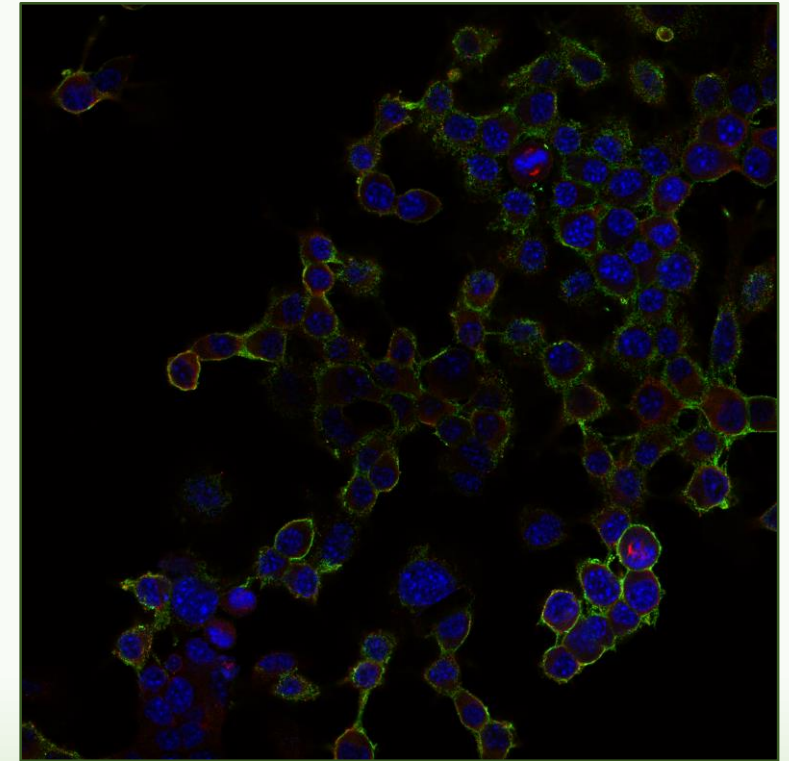
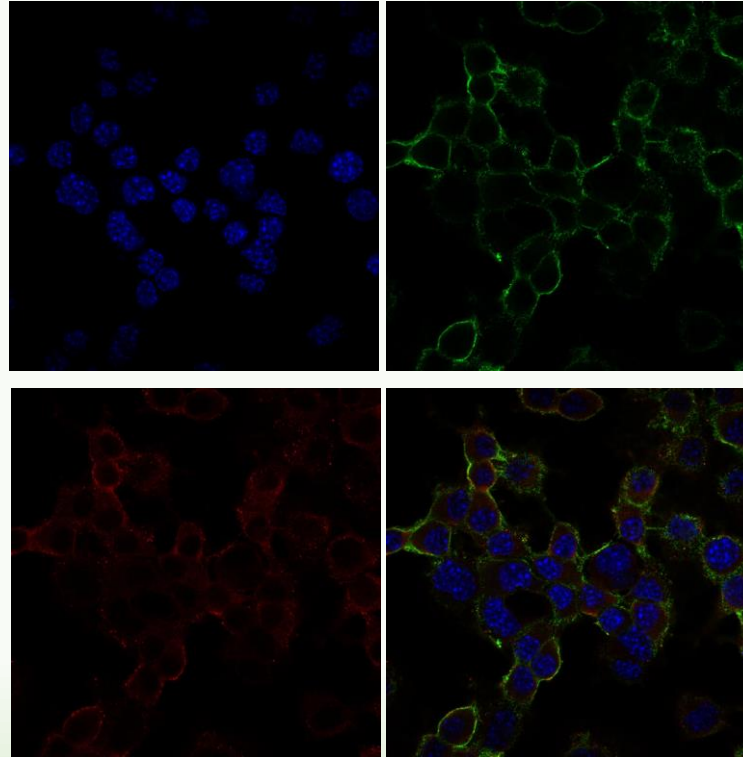
Másodlagos
antitest

- fehérjék specifikus kimutatása és lokalizálása fluorofórok segítségével
- Antigén-antitest kölcsönhatás
- Elsődleges és másodlagos antigének

Eredmények



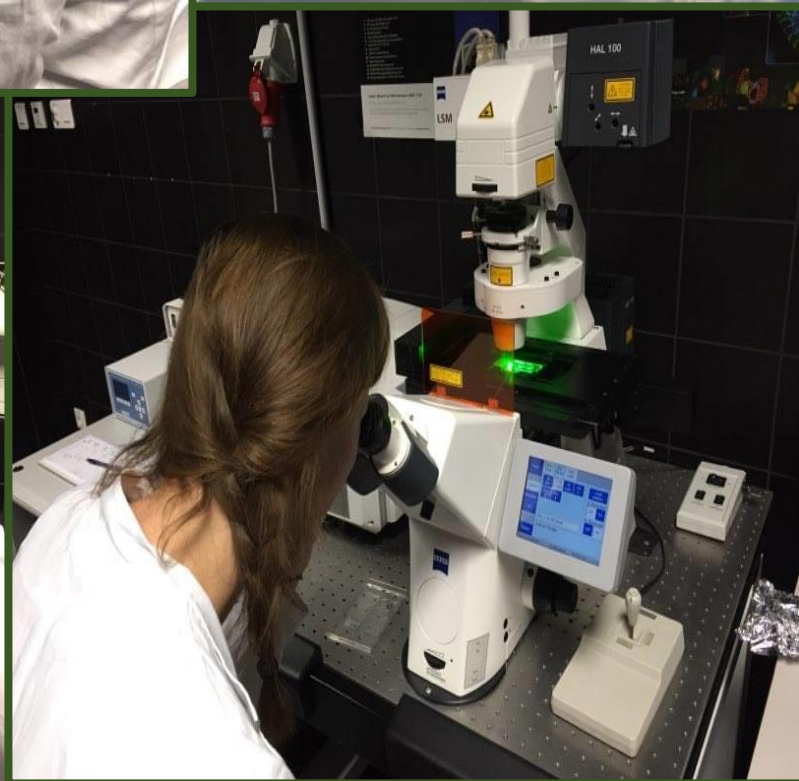
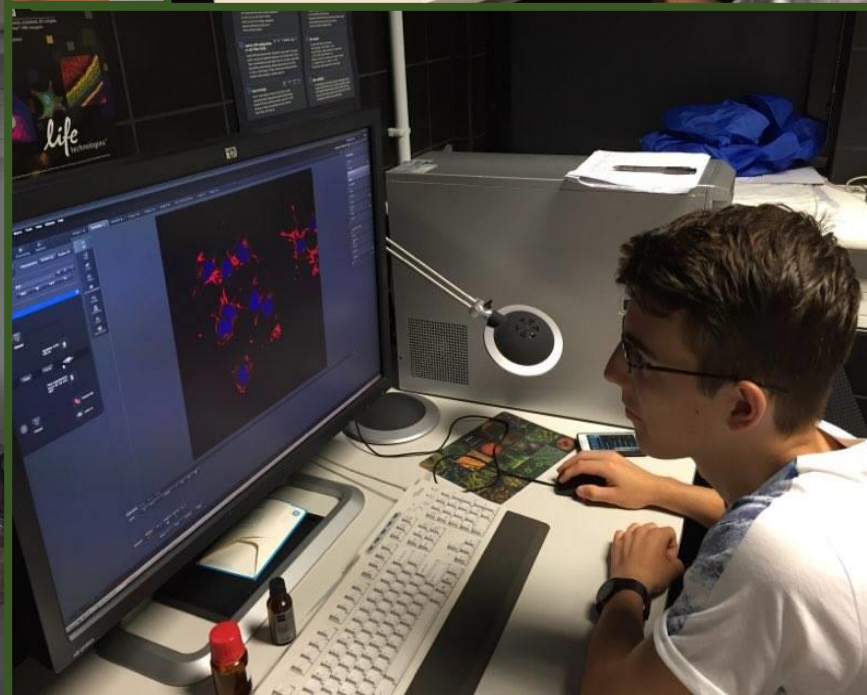
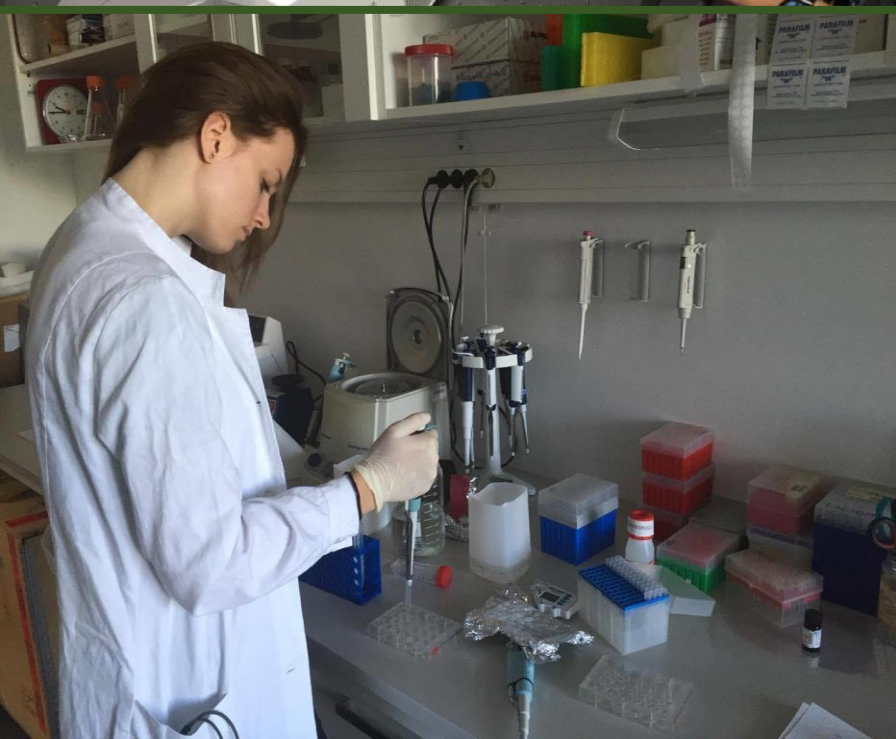
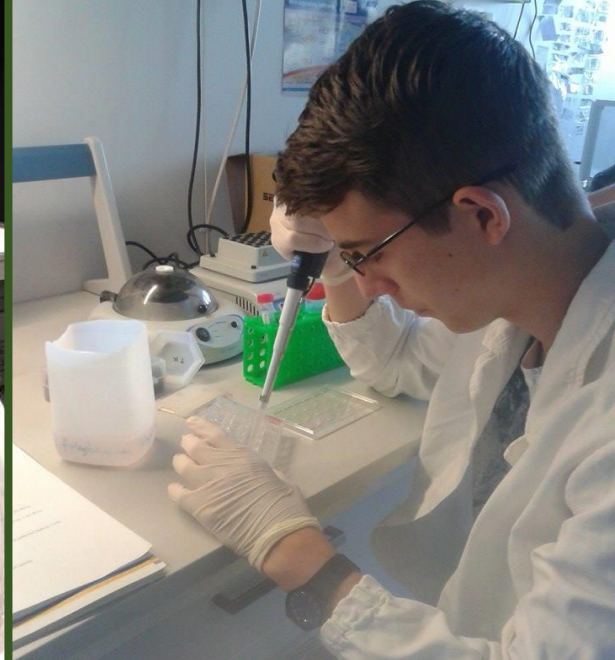
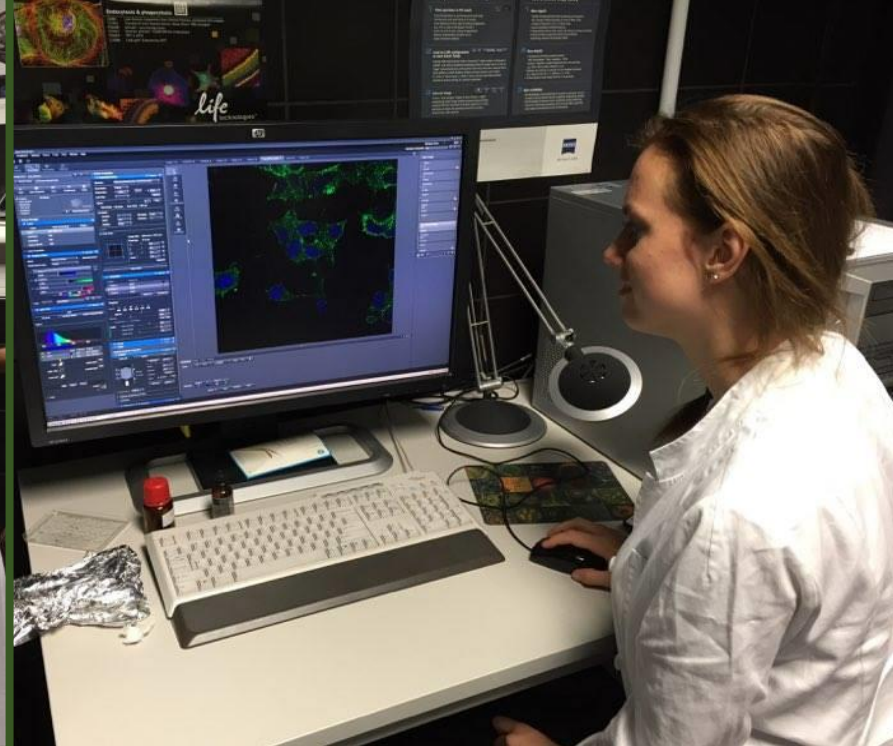
Z-stack

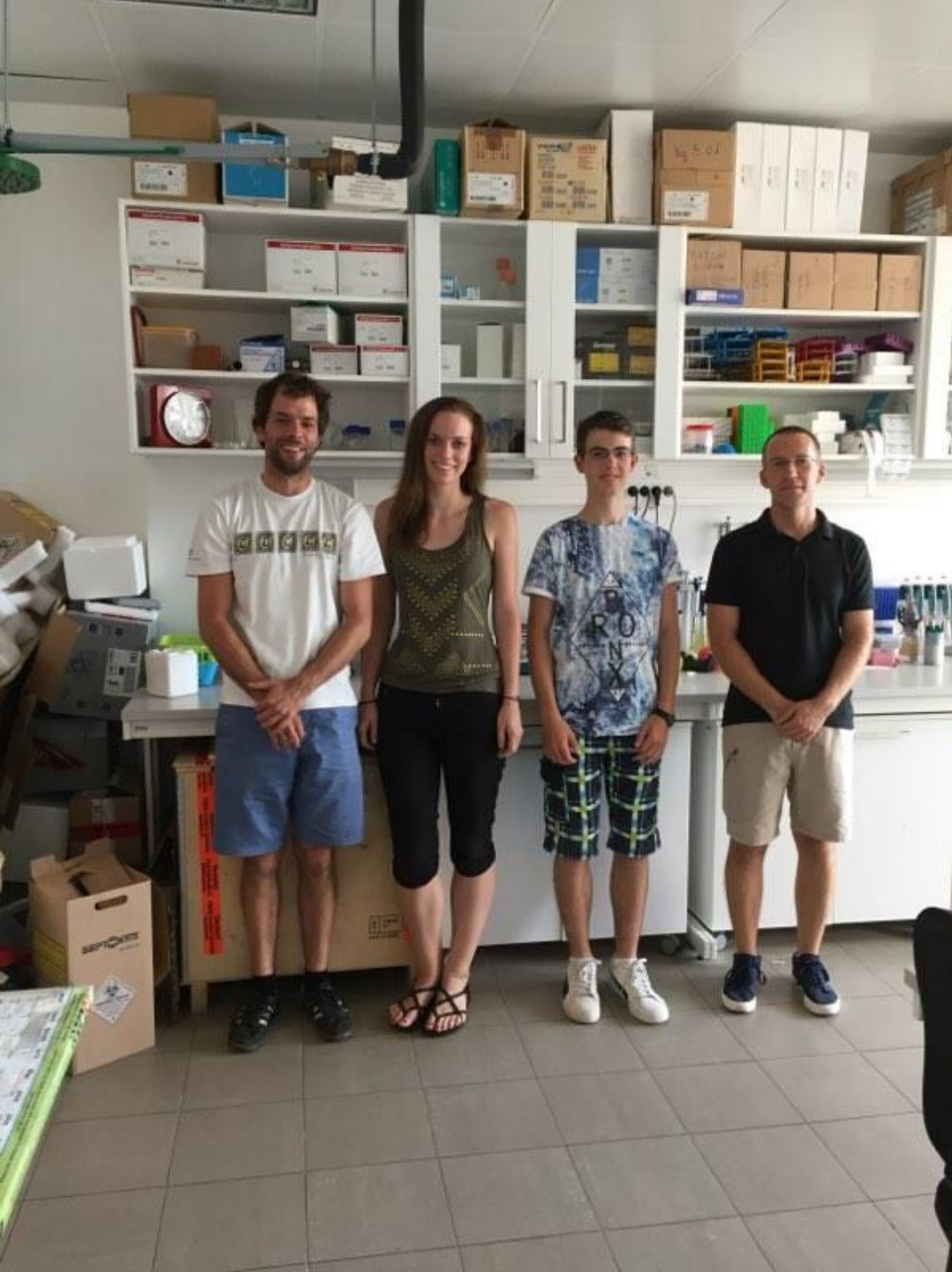


Tile scan

- Kék: DAPI (405nm) : sejtmaghoz
- Zöld: pGAP43 (Alexa fluor 488)
-> neuronális marker fehérje, membránhoz
- piros: calmodulin (Alexa fluor 647)
-> Ca kötő fehérje, a sejtben mindenhol

Munka közben... 😊





Köszönjük a segítséget
és támogatást!