

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - GFP

### Green Fluorescent Protein

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

1

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - GFP

### Plasmide con sequenza per GFP

```

SepI                               AseI   PvuII
EarI                               |       |
ACGCCCAATACGCAACCGCCCTCCCCCGCGCTTGGCCGATTCAATATGACGCTGCCACGACGGTT
TCCCGGTTATCGCTTGGCCGAGAGGGCGGCGCAACCGCTAAGTAATACGCTCAATCGATGATATCCCAA
10      20      30      40      50      60      70

                               AseI
TCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTGTAGCTCACTCATTAGCCACCCAG
AGGGCTGACCTTTCGCCCTCACTCGCGTGGCTTAATACACTCAATCGATGATATCCCGTGGGGTC
80      90      100     110     120     130     140

                               BsrBI
GCTTTACACTTTATCTCCGGCTCGTATGTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAAATTCACACAGGAA
CGAAATGTGAATACGAAGCCGAGCGATACACACACTTAACACTCGCCTTATGTGTAAAGTGTCTCTT
150     160     170     180     190     200     210

                               SalI   XbaI   BamHI   SmaI   KpnI
HindIII  SphI   Sse8387I  BspMI   XmaI   AgeI
ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTCGATGCTCGAGGTGCACTCTAGAGATCCCGGTACCGG
TCTCGATCTGCTACTAATCGCGTTCGAACGTACGGACCTCCAGCTGAGATCTCCTAGGGGCCATGGCC
220     230     240     250     260     270     280

                               GsuI
TAGAAAAATGAGTAAGGAGAAGAATTTTCACTGGAGTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTA
ATCTTTTACTCATTTCCTCTTTGAAAAGTGACCTCAACAGGGTTAAGAACACTTAATCTACCCT
290     300     310     320     330     340     350

TGTAAATGGGCAAAATTTCTCTGTCAGTGGAGGGGTGAAGGTGATGCAACAATACGGAAACTTACCCTT
ACAATTACCCTGTTTAAAGACAGTCACTCTCCCACTCCACTAAGTGTGTATGCCCTTTTGAATGGGAA
360     370     380     390     400     410     420

                               NcoI  MscI
AAATTTATTGCACTACTGGAAACTACCTGTTCCATGGCCCAACACTTGTCACTACTTCTCTTATGGTG
TTAAATAAACCTGATGACCTTTTATGAGCAAGGTACCGGTTGTGAACAGTGATGAAGAGAATACCAC
430     440     450     460     470     480     490

                               NdeI
TTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGG
AAGTTACGAAAAGTCTATGGGTCTATGATYACTTTGCCGACTGAAAAGTTCTCACGGGTACGGGCTTCC
500     510     520     530     540     550     560

                               BsrGI                               PmlI
TTATGACAGGAAGAACTATATTTTCAAGATGACGGGAACACAAAGACAGTCTGCTGAAGTCAAGTTT
AATACATGCTTCTTGTATATAAAGTTTACTGCTTGTGATGTTCTGTGACAGGCTTCAGTTCAAA
570     580     590     600     610     620     630

.....etc
    
```

2

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - GFP

**GFP e tecnologie ricombinanti:**

Sequenza nucleotidica che codifica per la GFP (GFP) → Trascrizione e traduzione → fotoni → Fluorescenza della proteina GFP

Plasmide con sequenza per GFP → Transfezione →

(A) Sovrapposizione tra immagine a contrasto di fase e immagine a fluorescenza: 2 cellule esprimono la proteina GFP. Le cellule sono vive. In campo scuro, la proteina fluorescente GFP si conferma come prevalentemente localizzata nel citoplasma. (B): GFP, (C) marcatore nucleare, (D) sovrapposizione (merge) di B e C.

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - GFP

Con costrutti di fusione, la GFP permette di seguire in modo dinamico la localizzazione intracellulare di proteine. Esempio: proteina di fusione tra GFP e istone H3

**1** La sequenza nucleotidica che codifica per H3 (rettangolo blu) viene inserita "in frame" nel plasmide che codifica per la GFP

**2** Trasfezione del plasmide di fusione. Le cellule trasfettate esprimono la proteina di fusione che è nella prima parte l'istone H3 e nella seconda parte la GFP. La proteina di fusione è la proteina H3 con la "lampadina" attaccata.

**3** La fluorescenza della proteina di fusione testimonia della sua localizzazione. La parte che corrisponde a H3 è riconosciuta dai sistemi di trasporto dal citoplasma verso il nucleo (l'istone H3 svolge la sua attività nel nucleo) e di conseguenza la fluorescenza è tutta nucleare. B-D: localizzazione della GFP sola. E-G localizzazione della proteina di fusione GFP-H3

Marcatore nucleare merge

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

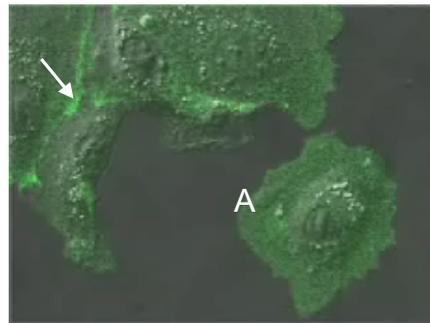
Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - GFP

Time-lapse: video microscopia di cellule in coltura al microscopio rovesciato a fluorescenza

Esempio:  
Time lapse della proteina di fusione GFP-caderina in cellule epiteliali in coltura.

Notare la localizzazione diffusa della fluorescenza nella cellula isolata: la proteina di fusione è localizzata sulla membrana plasmatica.

Osservare la redistribuzione della proteina di fusione e la sua concentrazione nei punti di interazione tra le cellule.



Vedi filmato

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita