

Corso di Biochimica applicata

Analisi della localizzazione subcellulare di proteine in cellule di lievito mediante microscopia a fluorescenza

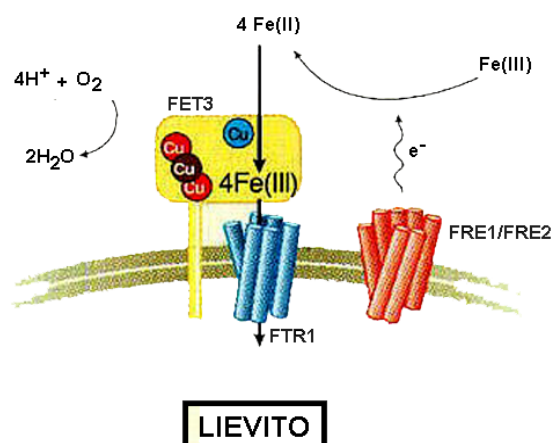
Ceppi di lievito *Pichia pastoris*

Ceppo	Proteina fluorescente	Localizzazione
GS115/GFP	esprime GFP sotto il controllo del promotore costitutivo GAP	citofasi
Δ I31/GFP-Fep1 (fep1 Δ)	esprime GFP-Fep1 sotto il controllo del promotore costitutivo GAP	nucleo
Δ A1/Fet3 (fet3 Δ , FTR1-GFP)	Ftr1-GFP integrata nel cromosoma, esprime Fet3 sotto il controllo del promotore costitutivo GAP Ftr1 è indotta in carenza di ferro	membrana plasmatica

Fet3 e Ftr1 costituiscono il sistema di trasporto ad alta affinità per il ferro in lievito. La presenza di entrambe le proteine durante la biosintesi è necessaria per l'esporto dal reticolo endoplasmatico e la corretta localizzazione sulla membrana plasmatica.

Il sistema Fet3-Ftr1 è indotto in condizioni di carenza di ferro, che si ottengono aggiungendo BPS (batofenantrolina disolfonato, un chelante del ferro) al terreno di coltura.

Il fattore di trascrizione Fep1 è un repressore trascrizionale che regola l'espressione di Fet3 e Ftr1, e di diversi altri geni che compongono il 'regulone del ferro'.



Materiali

Cellule di lievito cresciute fino a OD₆₀₀ 0.5-0.8 (fase esponenziale)

- 1) cellule risospese in PBS
- 2) cellule fissate

Soluzioni

PBS (20 mM KP_i pH 7.4, 150 mM NaCl)

Soluzione di fissaggio (50 mM KP_i, pH 6.5, 1 mM MgCl₂, 4% Formaldeide, 0.25% Glutaraldeide)

Soluzione Hoechst (Hoechst 33342 10 µg/ml in PBS)

Procedura per osservare cellule di lievito non fissate

Prelevare 500 µl di coltura;

Centrifugare a 4000 rpm per 2';

Risospendere il pellet in 50 µl di PBS;

Deporre 3 µl di cellule sul vetrino.

Protocollo di fissaggio per visualizzare cellule di lievito

Prelevare 500 µl di coltura e aggiungere 500 µl di soluzione di fissaggio, vortexando contemporaneamente;

Incubare per 1 h in ghiaccio;

Centrifugare a 4000 rpm per 2';

Risospendere il pellet in 500 µl di PBS;

Centrifugare a 4000 rpm per 2';

Ripetere il lavaggio per altre 2 volte;

Risospendere il pellet in 50 µl di PBS.

Deporre 3 µl di cellule sul vetrino.

Protocollo per la colorazione del nucleo con HOECHST 33342

1 µl di soluzione stock (Hoechst 33342 10 mg/ml in PBS conservata al buio) viene diluito 1:1000 in PBS. 1 µl di questa soluzione diluita viene aggiunto a 50 µl di cellule fissate e incubato 20 minuti a 30°C al buio. Le cellule sono pronte per essere osservate, il segnale Hoechst rimane stabile per molte ore.

