

Úloha č. 4 – příprava rekombinantního proteinu značeného fluorescenční značkou GFP

Výsledky funkčního testu – potvrzení vazby klonované vazebné domény endolyzinu značené GFP na buněčnou stěnu bakterií

Předpoklad:

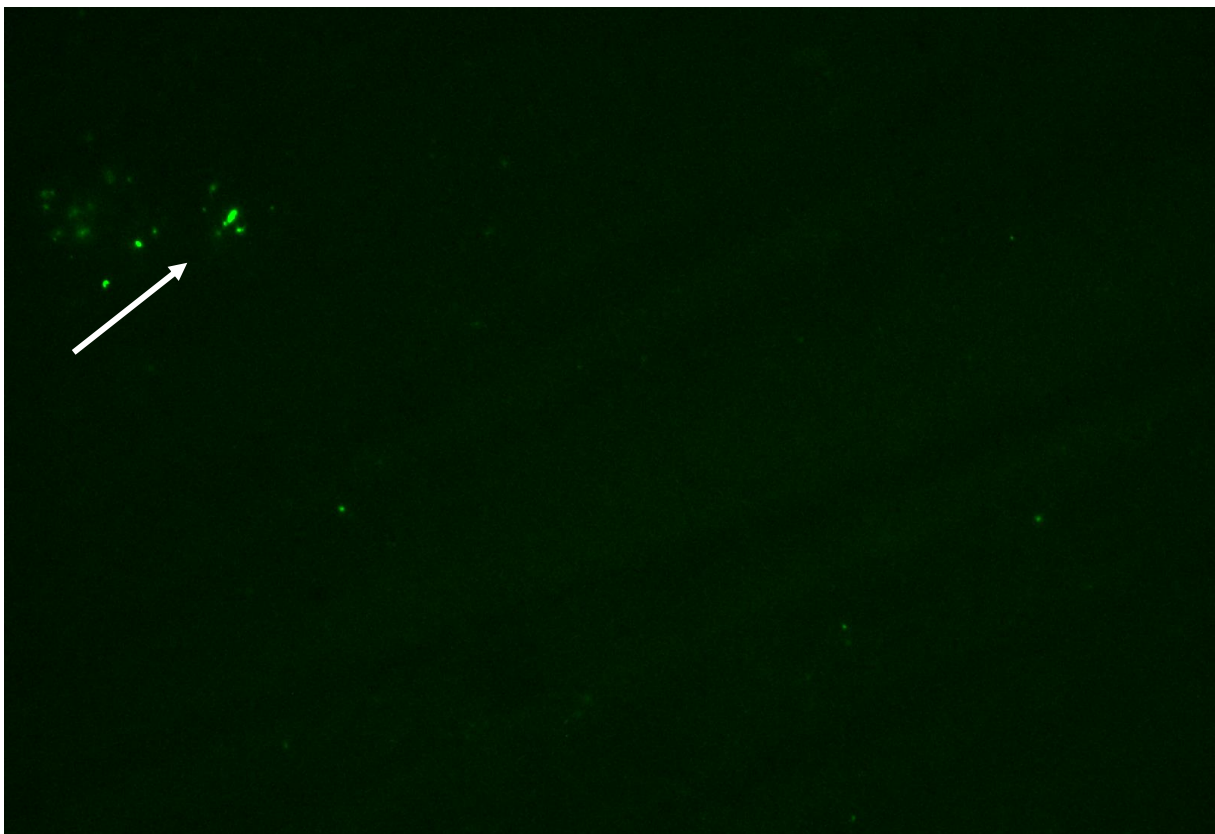
- po navázání domény na buněčnou stěnu pozorujeme zelenou fluorescenci
- specifita na *Staphylococcus aureus*, případně jiné druhy stafylokoků

Ošetření vzorku:

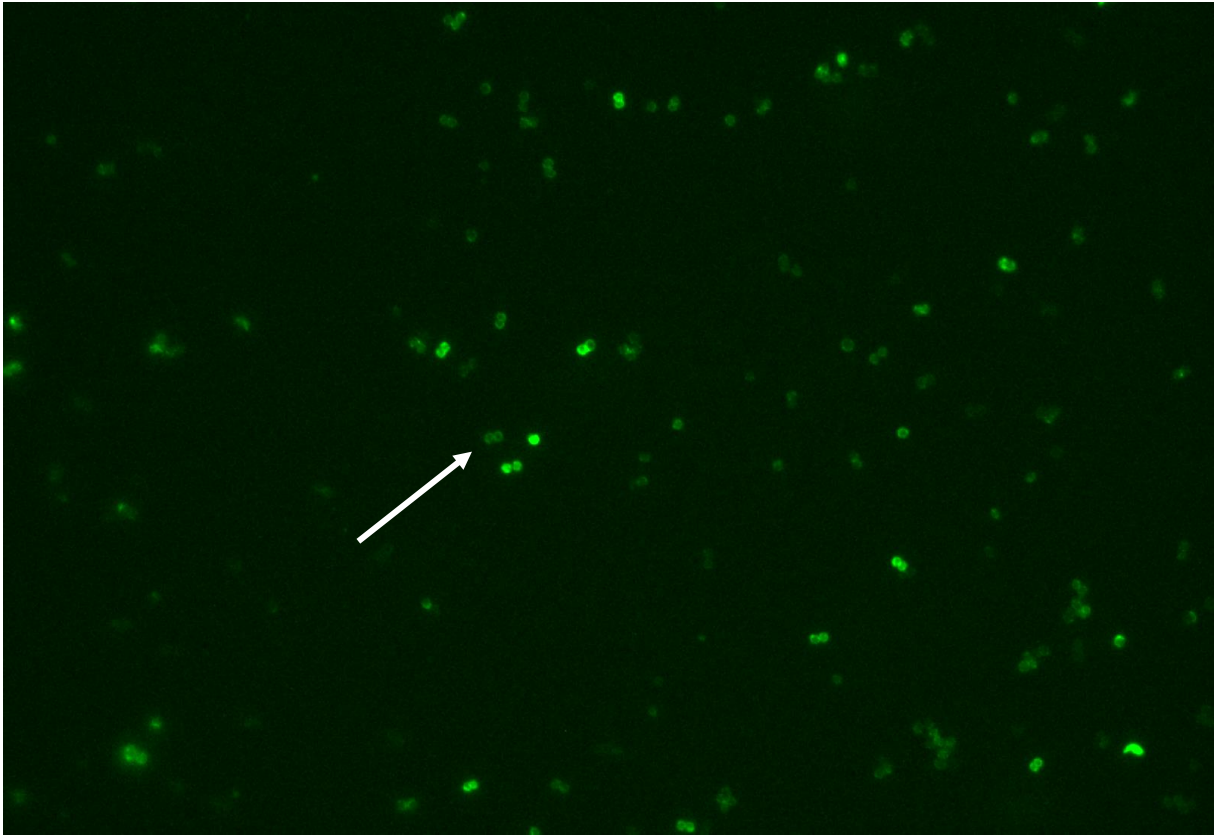
- 18-ti hodinová bakteriální kultura v MPB (resp. LB pro *E. coli*), odebrán 1 ml, centrifugace 11 000 g/2 min
- promyto 3x v PBS
- resuspendováno v 1 ml PBS
- k 250 ml buněčné suspenze v PBS přidat 50 µl purifikovaného proteinu po FPLC

Fluorescenční mikroskopie pod imerzí, filtr FITC (zelená fluorescence, emise 509 nm, excitace 395-475 nm)

Staphylococcus epidermidis – vidíme vazbu, ale s nízkou afinitou



Staphylococcus aureus – průkaz vazby GFP značené vazebné domény endolyzinu na buněčnou stěnu *S. aureus*, mikroskop zaostří vždy určitou vrstvu preparátu – můžeme tedy vidět jak povrch (celý zelený) některých buněk, tak řez buňkou (vidíme jako zelený prsteneček) – protein je navázán na buněčné stěně



Escherichia coli – negativní kontrola, bez vazby proteinu

