

Kehitysbiologiassa käytetään
lukuisia vialkaita
kuvantamismenetelmiä



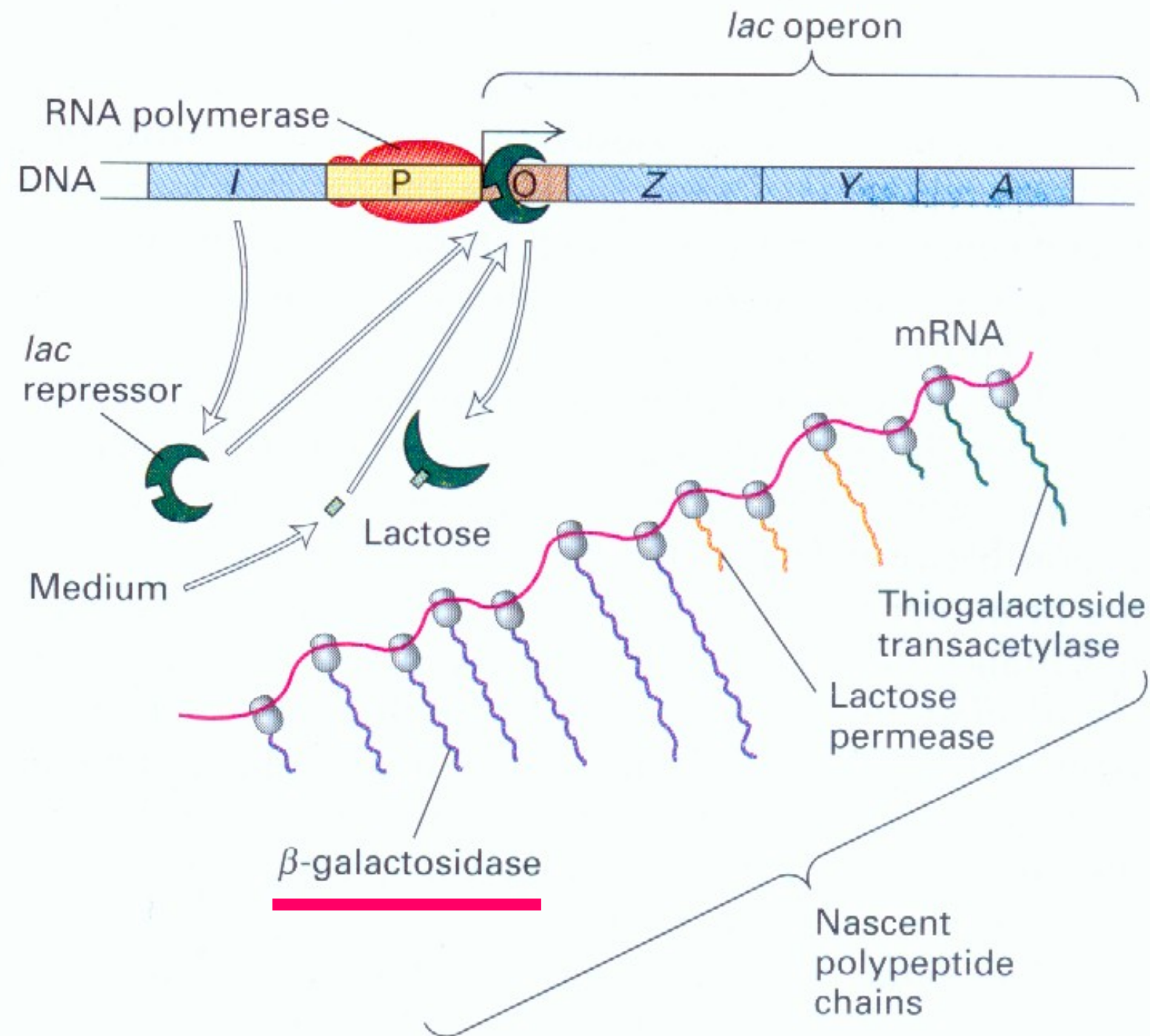
Reportterigeenit ja reportterikonstruktiot?

Monissa tilanteissa tarvitaan ilmaisinta (proobi, luotain, reportteri) kertomaan, mitä/missä/milloin solussa/alkiossa tapahtuu jotakin

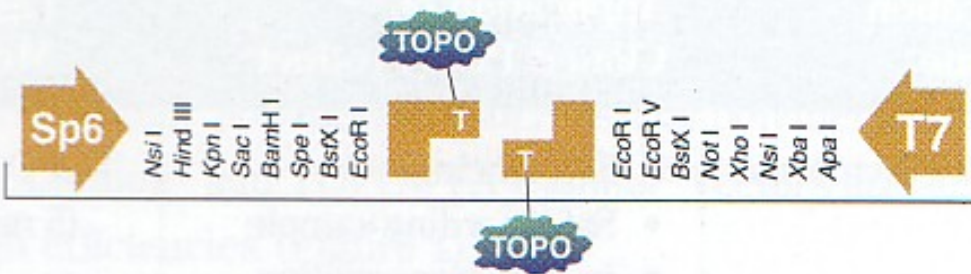
Vallankin kehitysbiologiassa käytetään usein ***lacZ*** -reportteria

lacZ on varsinaisesti *E. colin* laktoosioperonista "varastettu" *beta-galaktosidaasigeeni*, jollaista ei eläimillä eikä kai kasveillakaan ole lainkaan

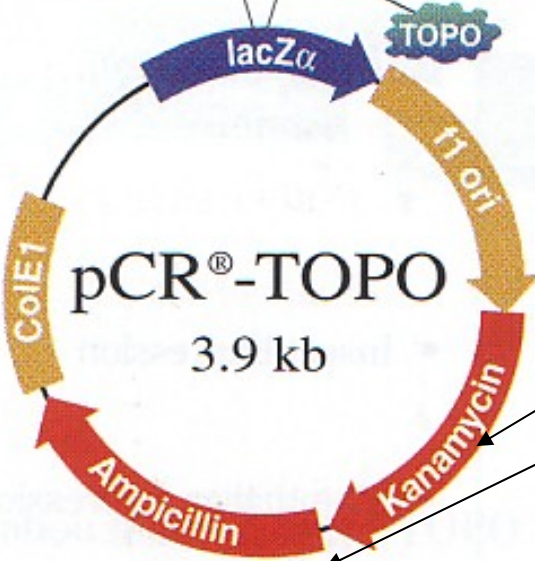
lacZ on monissa kloonausvektoreissa vakiovarusteena



pCR® II-TOPO



pCR® 2.1-TOPO



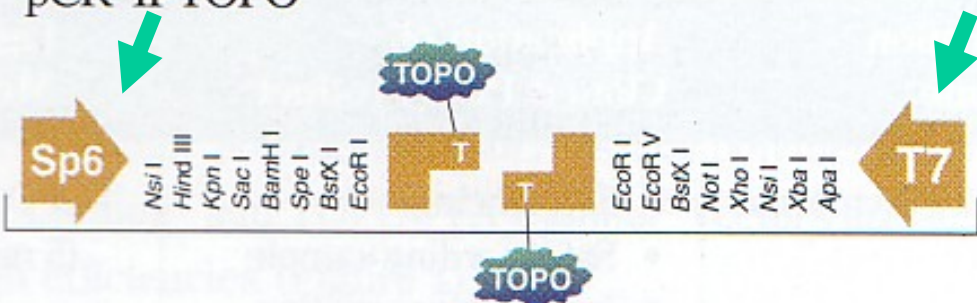
 Represents covalently-bound topoisomerase I

See polylinker sequence on page 192.

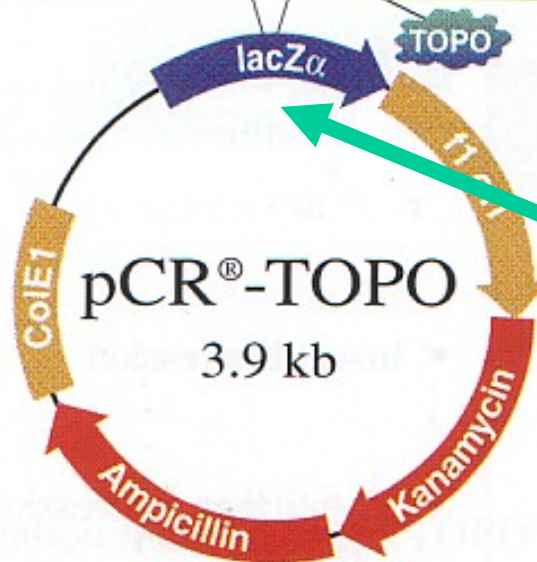
Hieno nykyaikainen
kloonausvektori, kaksi
mallia saatavana

Antibioottiresistenssigeenit:
jos solu pysyy elossa
antibioottiliemessä, on
transformaatio onnistunut

pCR® II-TOPO



pCR® 2.1-TOPO

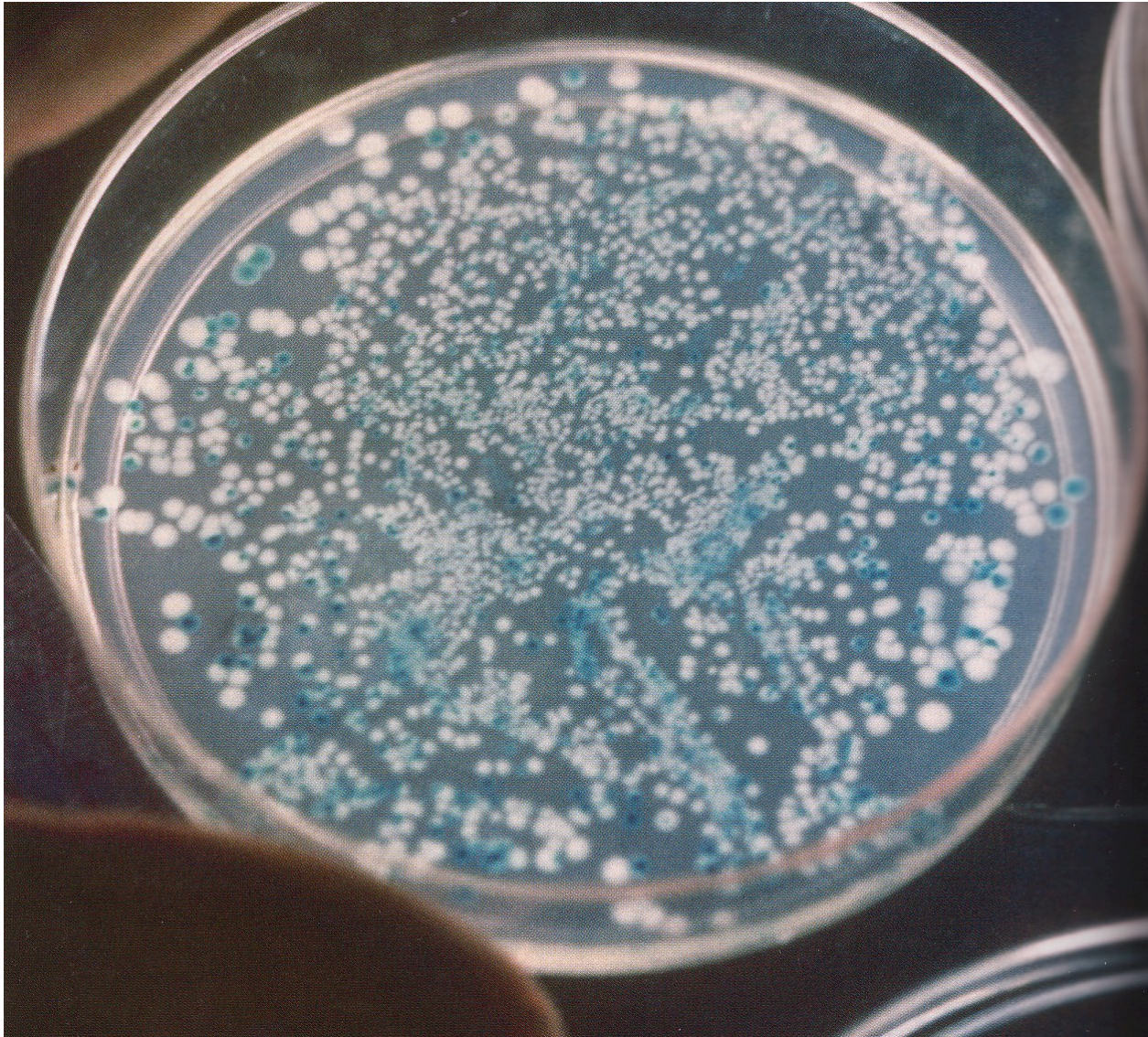


Promoottorit, jos halutaan käyttää ekspressiovektorina

lacZ -reportteri: jos se toimii, ei tässä välissä ole mitään (eli intergrointi ei onnistunut, klooni hylätään)

 Represents covalently-bound topoisomerase I

See polylinker sequence on page 192.

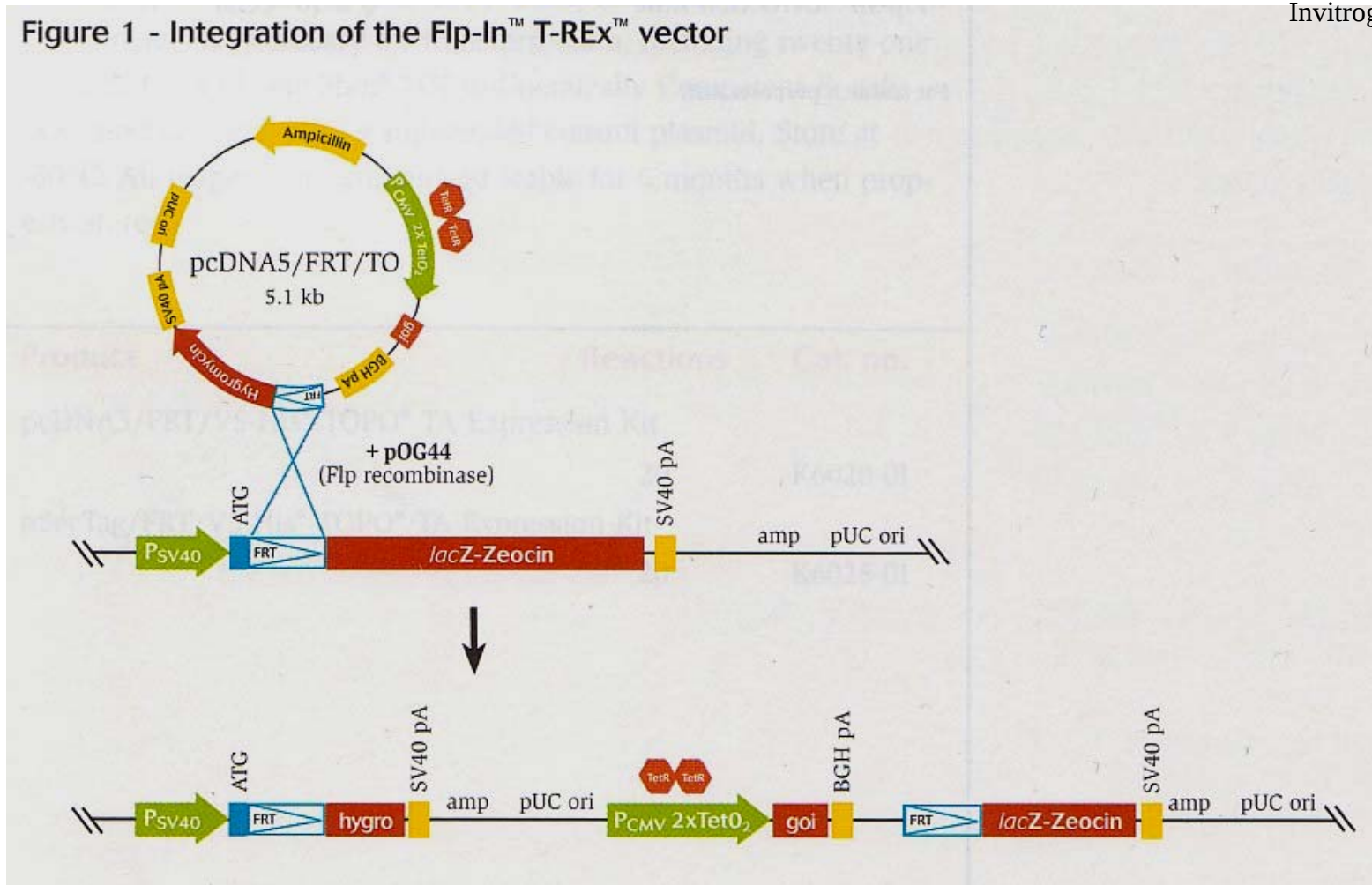


Siniset pesäkkeet ovat pysyneet elossa, mistä päätellen ne on transformoitu, mutta sininen ***lacZ*** -reportterin tuote paljastaa, ettei vektorissa ole insertiota

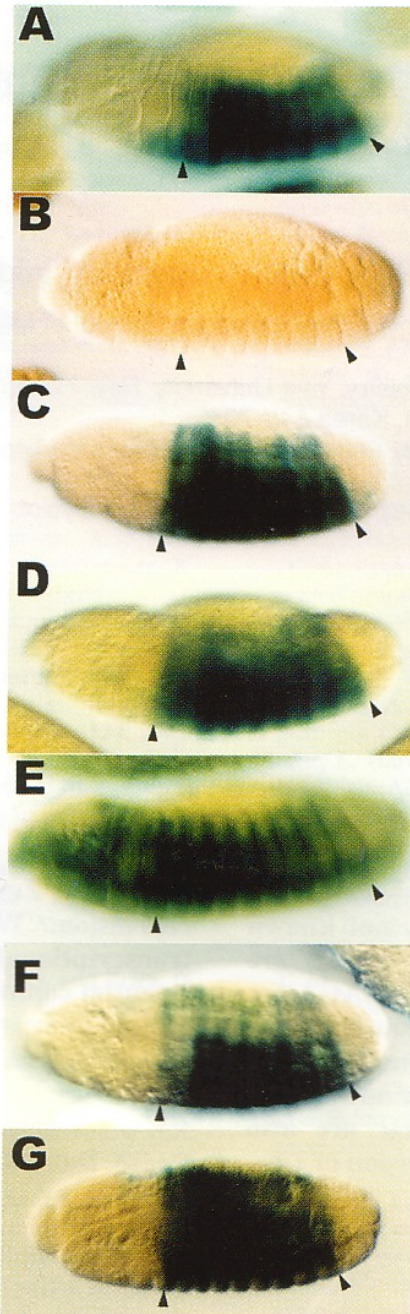
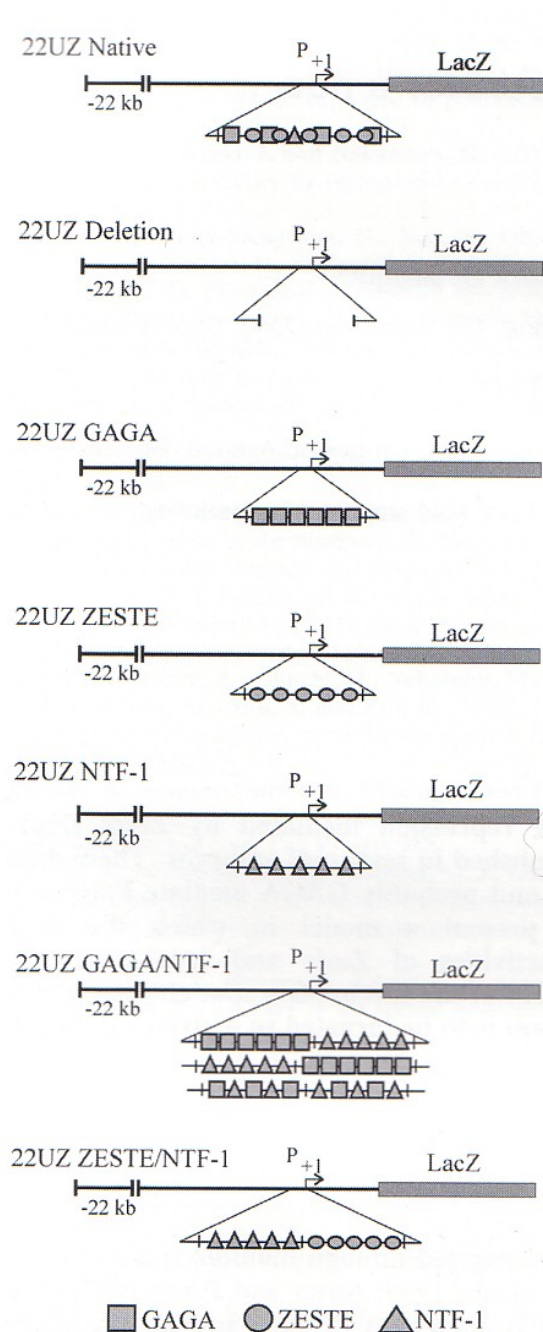
Siis:

Valkeat pesäkkeet ovat niitä toivottuja tässä tapauksessa, niihin on siirtynyt jotain

Figure 1 - Integration of the Flp-In™ T-REx™ vector



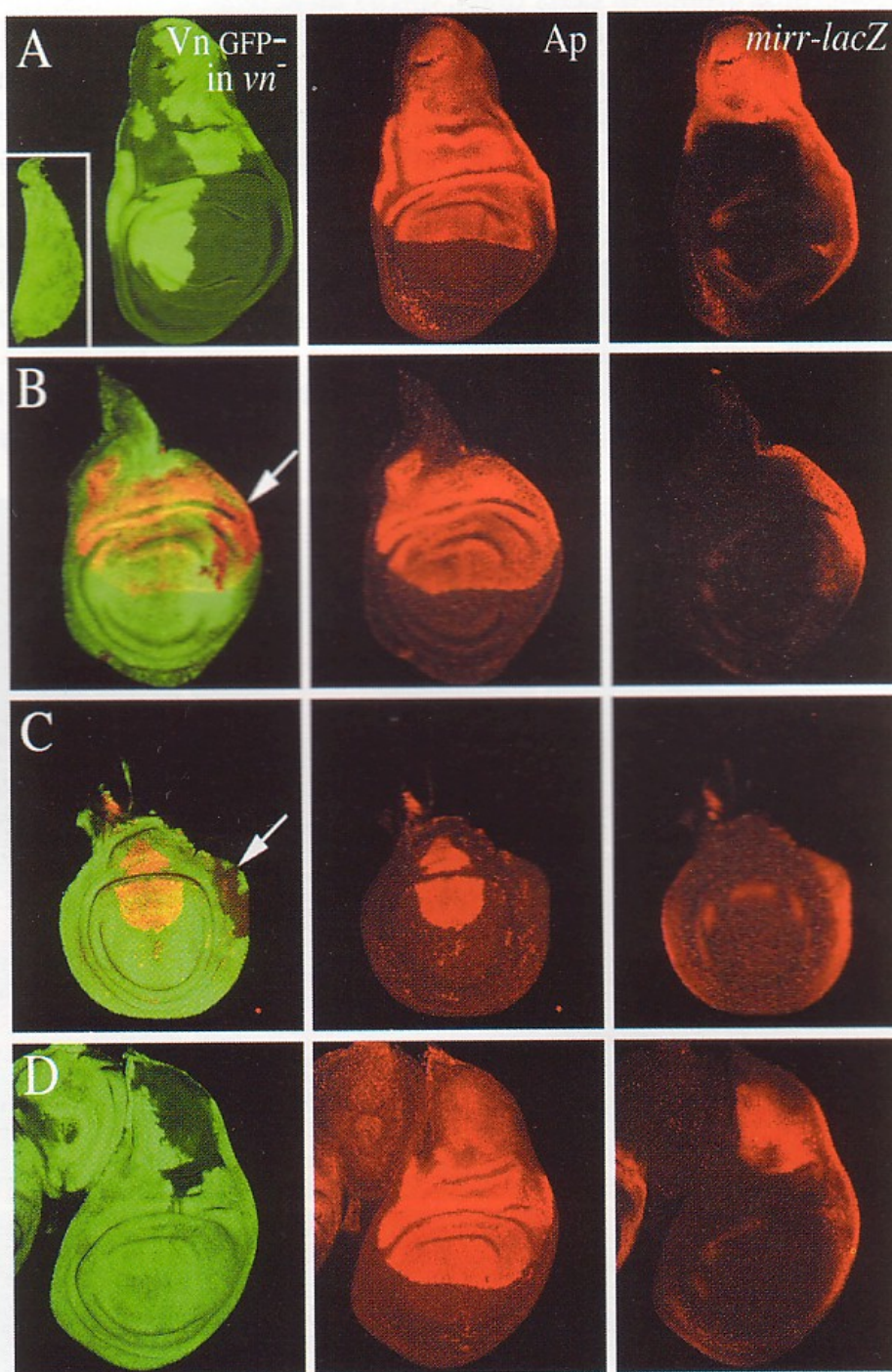
Ekspressiovektorissa *lacZ* pidetään toimimassa, jolloin sininen väri saadaan näkymään vaikka *Drosophila* alkiossa



Ubx proximal promoter

GAGA
ZESTE sitoutumismotiiveja
NTF-1

Polycomb repressorit
Trithorax aktivaattorit



GFP

Green Fluorescent Protein
on toinen usein käytetty
reportteri

Drosophila siiven aihe
eli imaginaalilevy

CELL 592-596

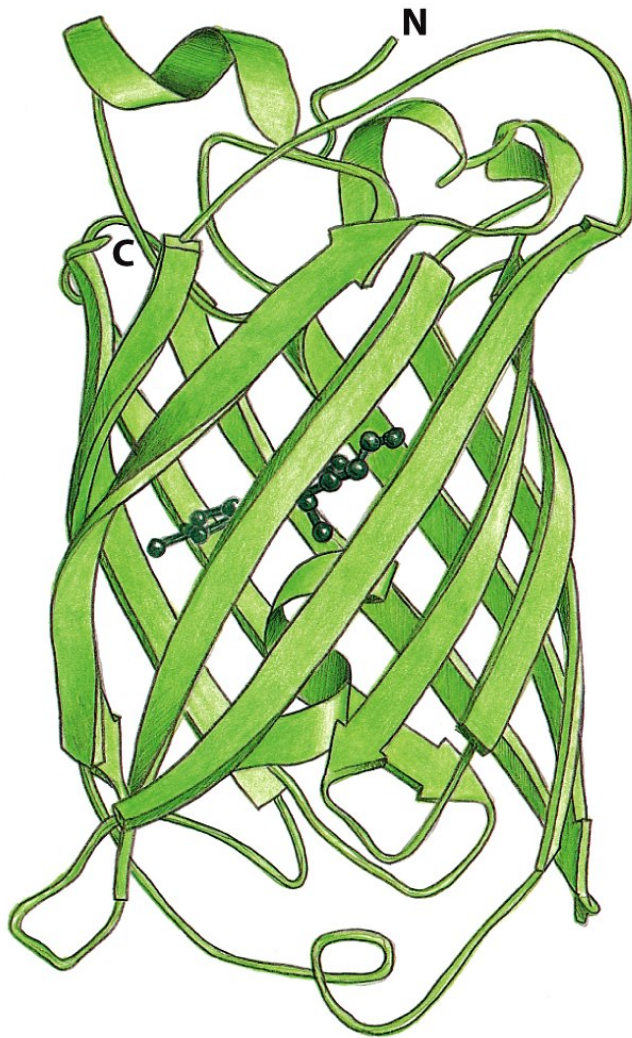
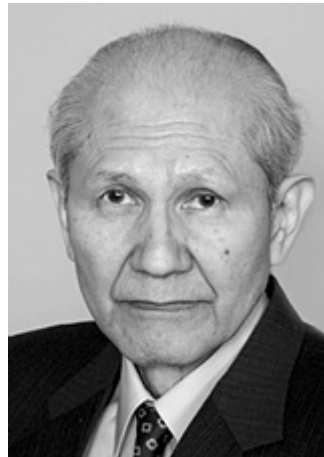


Figure 9-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

GFP "varastettiin" *Aequorea victoria* meduusalta

Kemian Nobel [2008](#):
Osamu Shimomura
Martin Chalfie
Roger Y. Tsien

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP".



CELL 593

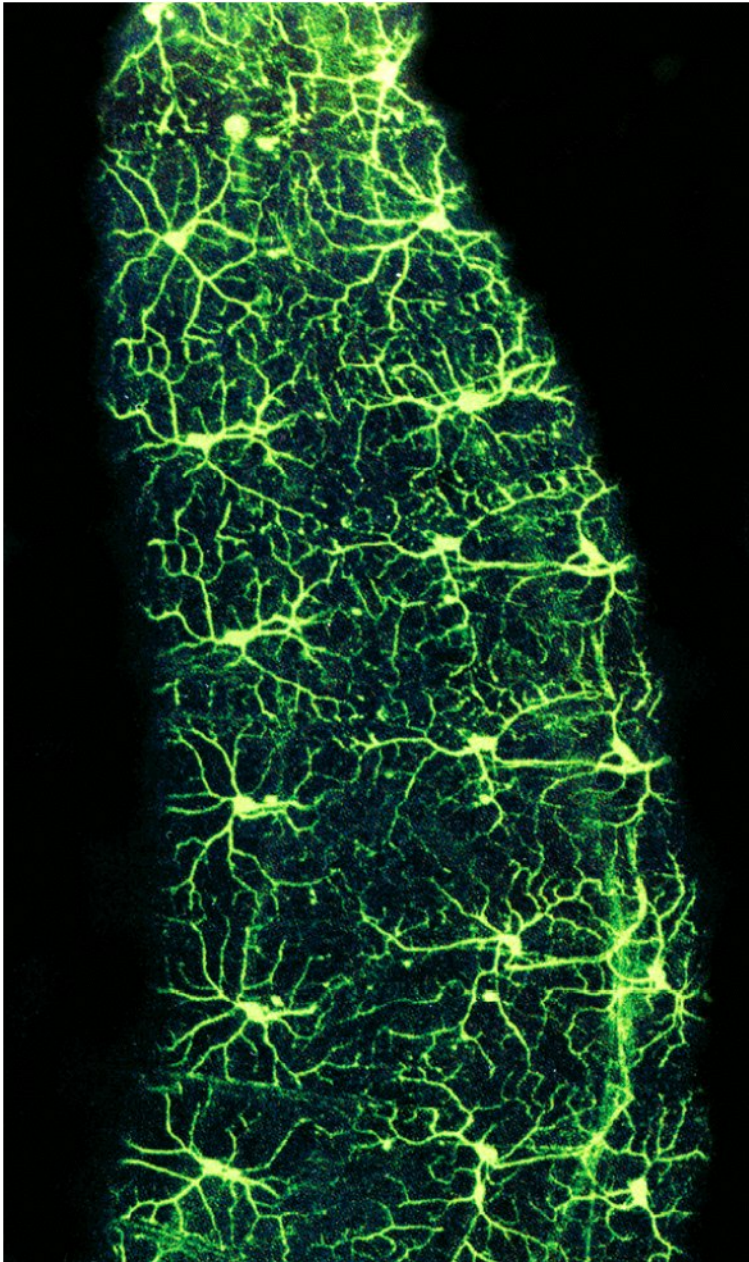
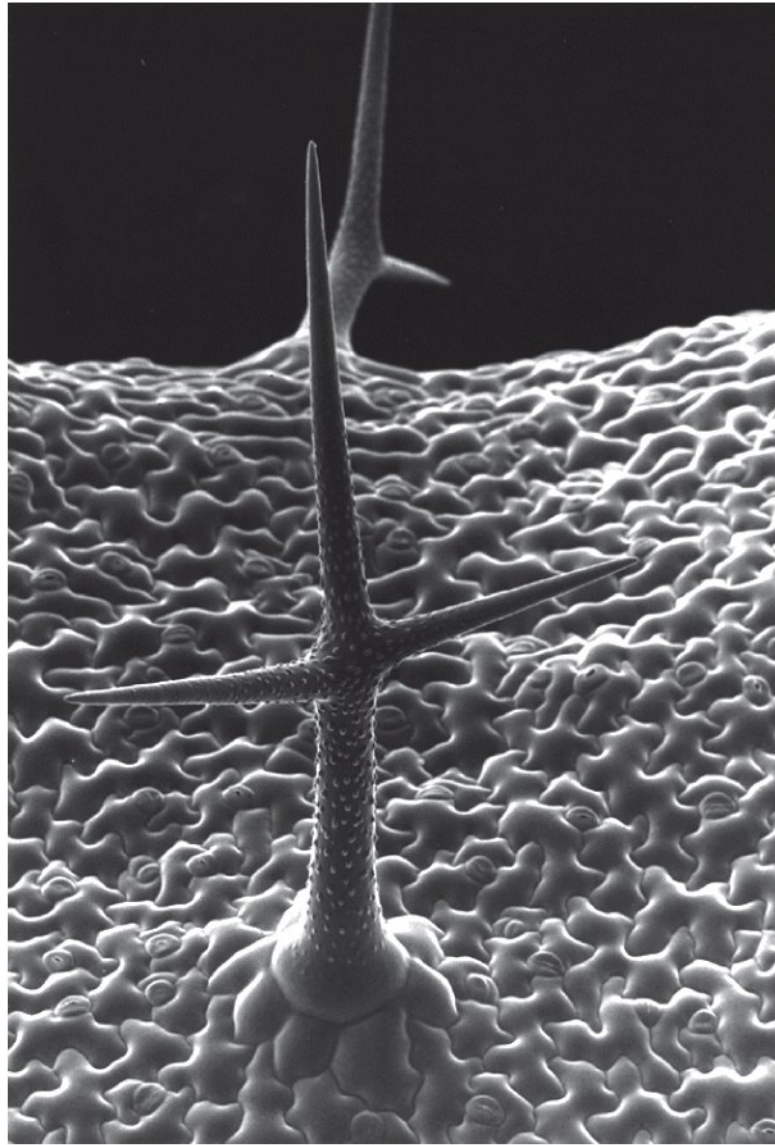


Figure 9-25 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Elävän kärpäsembryon neuronit
hohtavat vihreänä

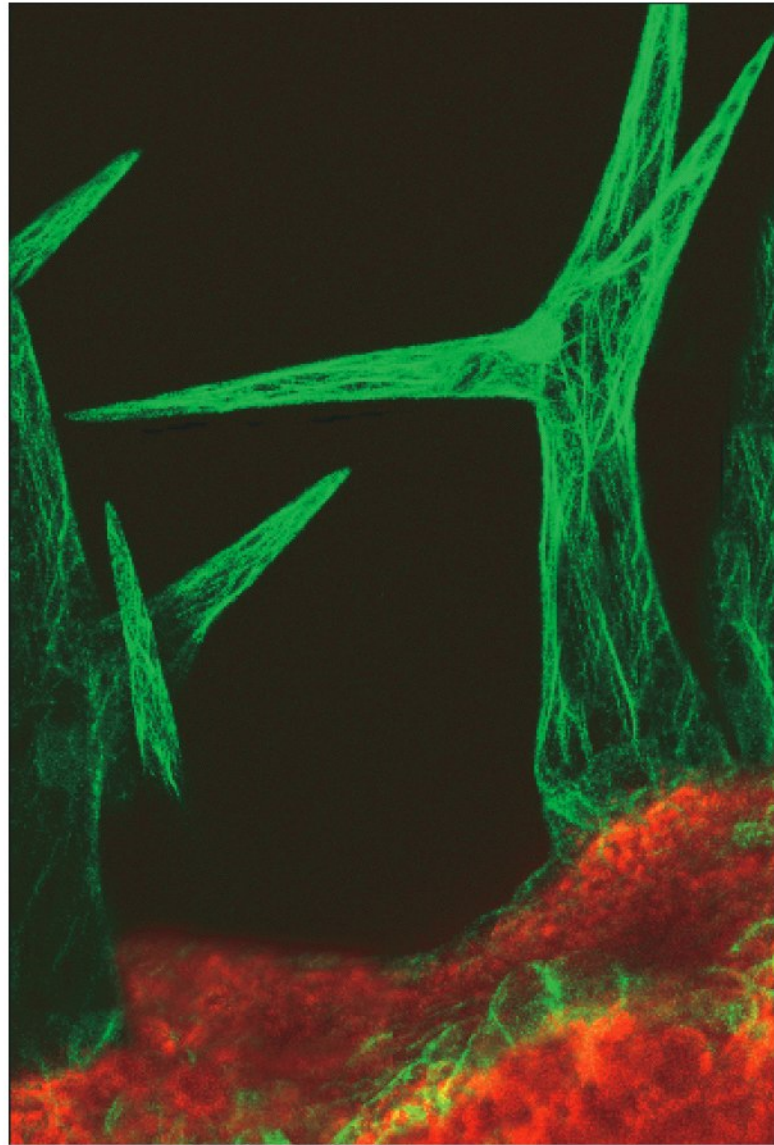
GFP istutettiin
neuronispesifiseen
promoottoriin ja pantiin sitten
geeninsiirrolla kärpäseen

Nämä neuronit on kutikulan
alla ja tunnustelee ympäristöä



(A)

100 μm



(B)

Lituruohon trikomit (karvat)

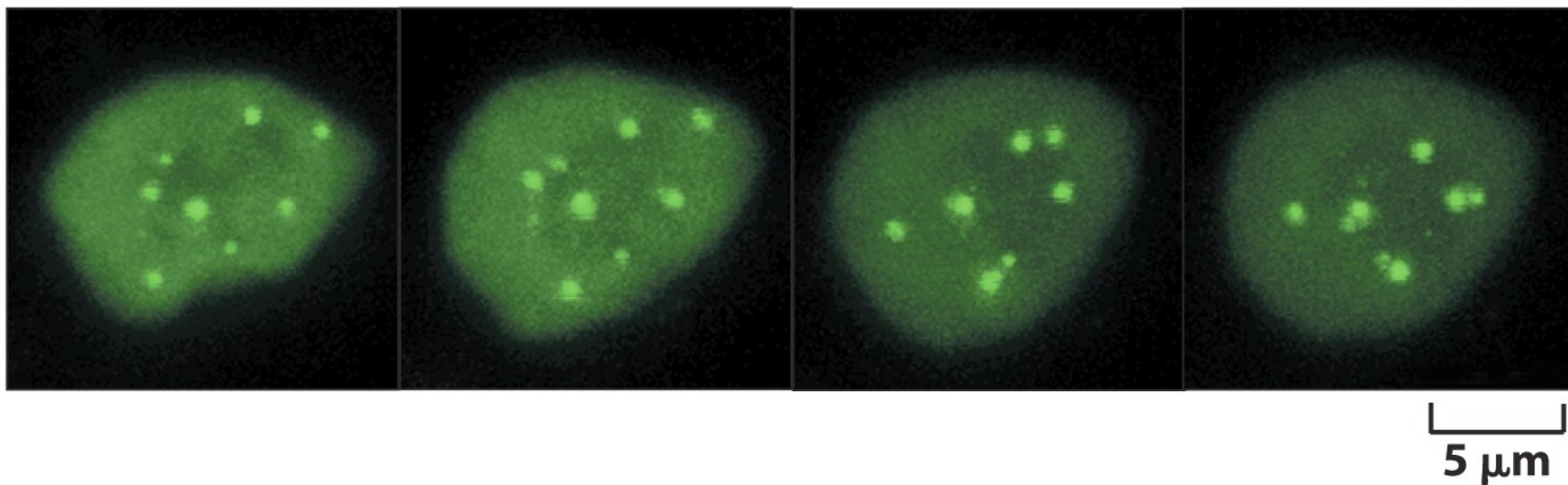


Figure 9-27 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Elävän tupakkasolun spliseosomit hohtaa tumassa (Cajalin kappaleissa)

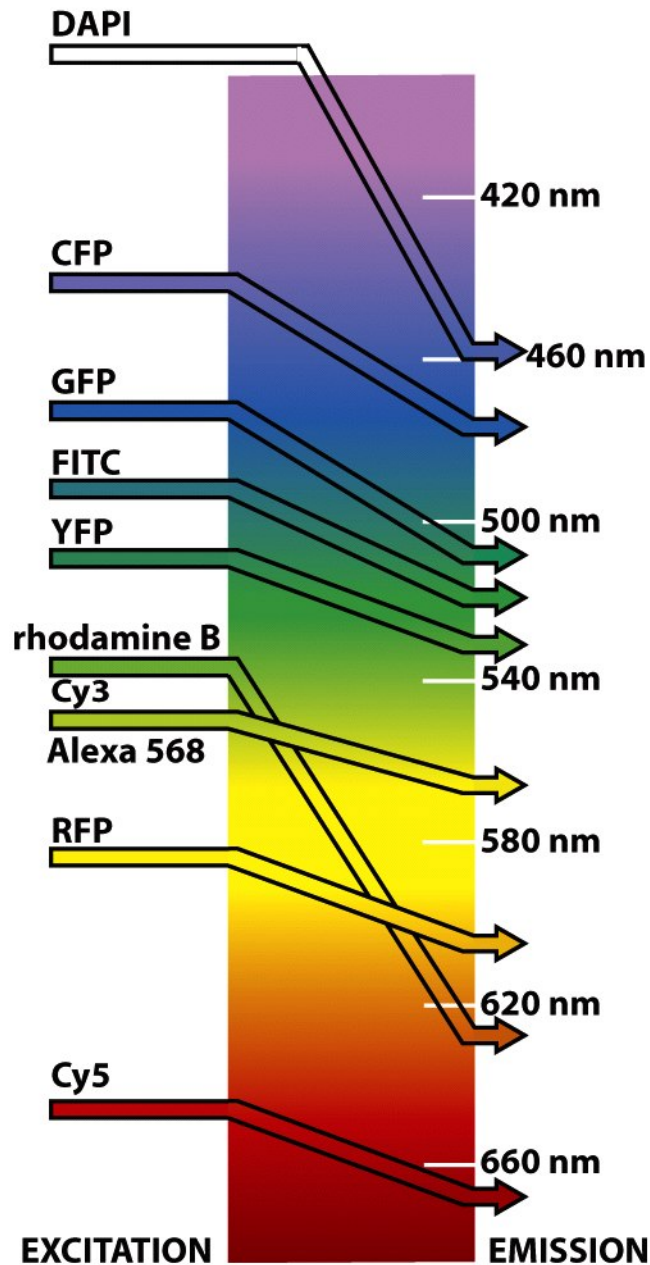


Figure 9-14 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

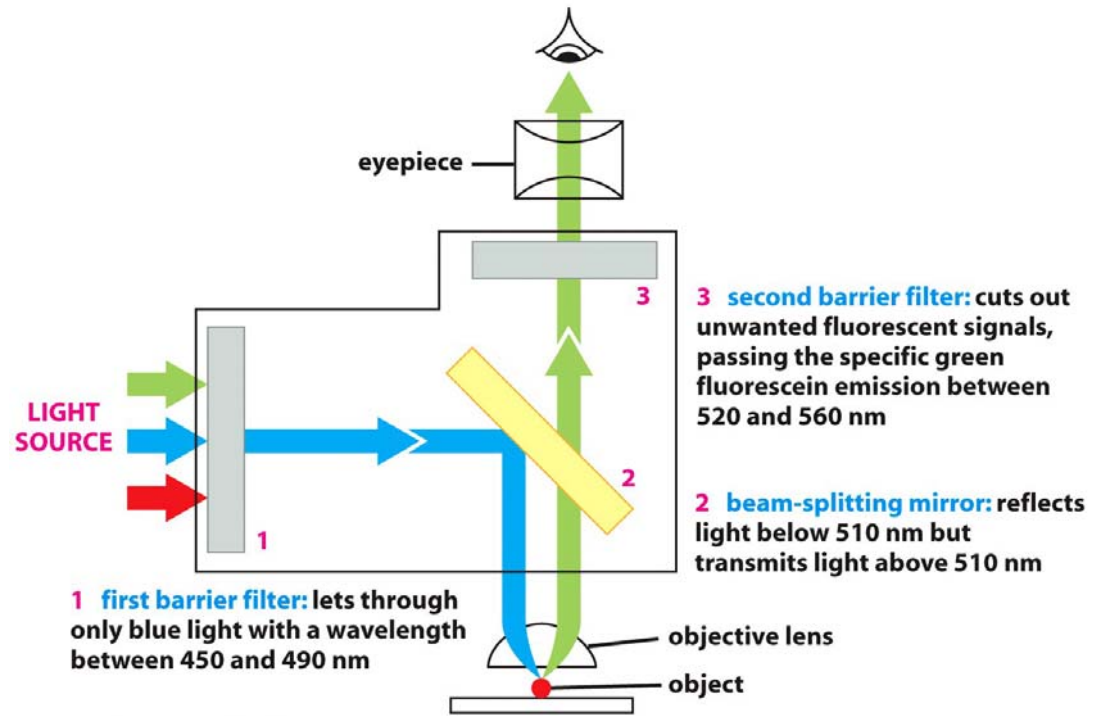
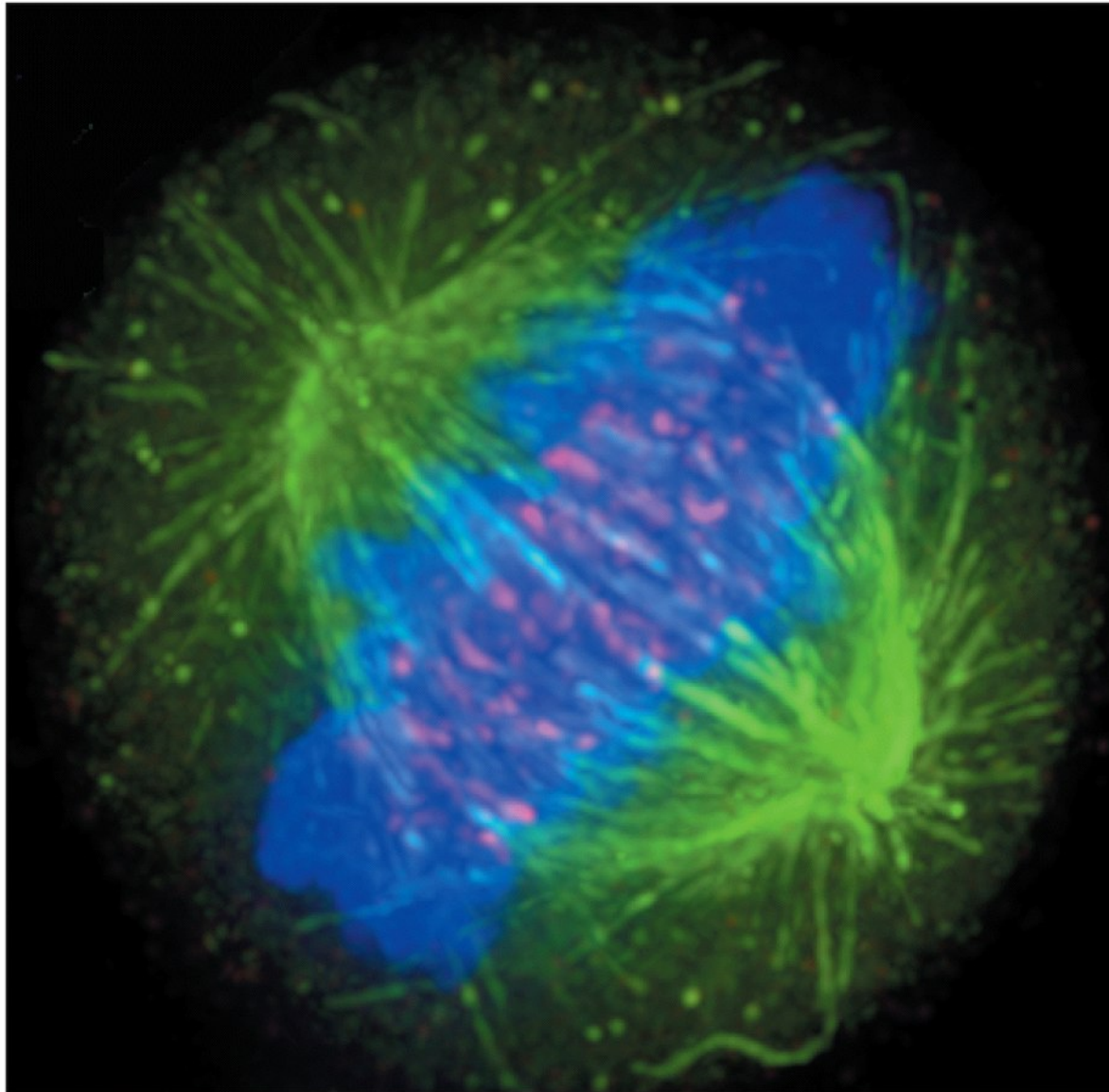


Figure 9-13 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Fluoresenssimikroskopian idea ja muutamia käytettävissä olevia värejä. Kuviin voidaan valottaa yksi väri kerrallaan

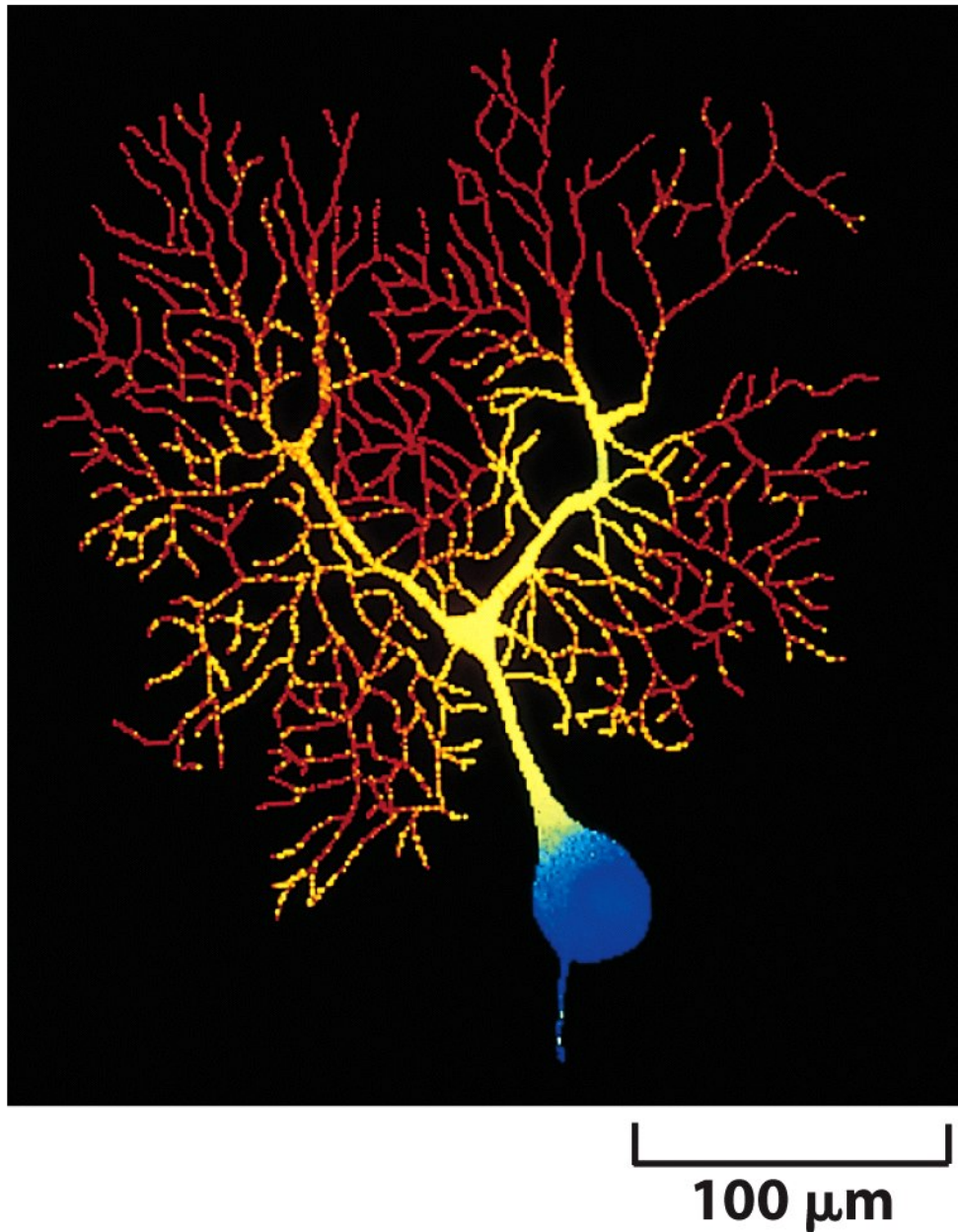


10 μm

mikrotubulukset
vihreä

sentomeerit
punainen

kromosomiaine (DNA)
sininen



Purkinjen solu pikkuaivoissa

Ca²⁺ konsentraatio ilmaistu
fluoresenssilla

Amph

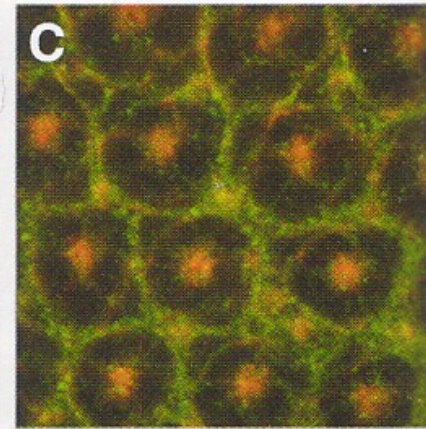
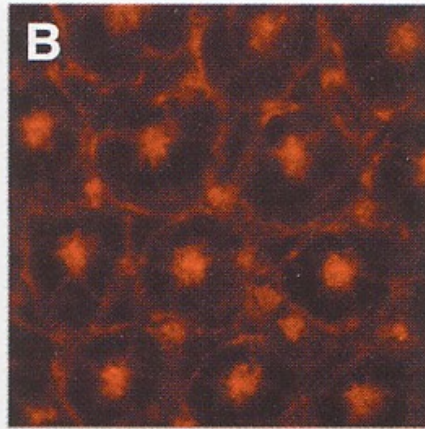
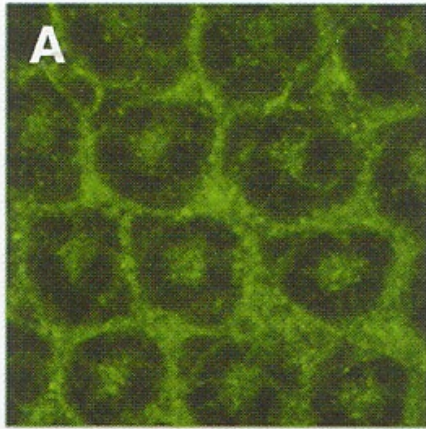
Actin

Merge

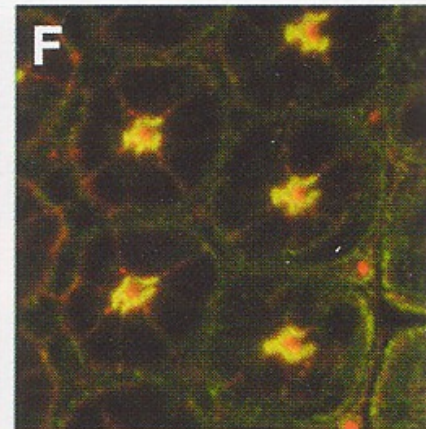
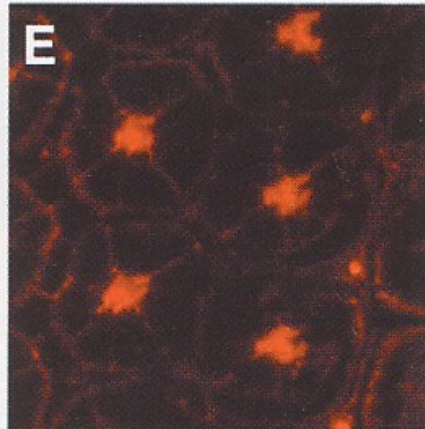
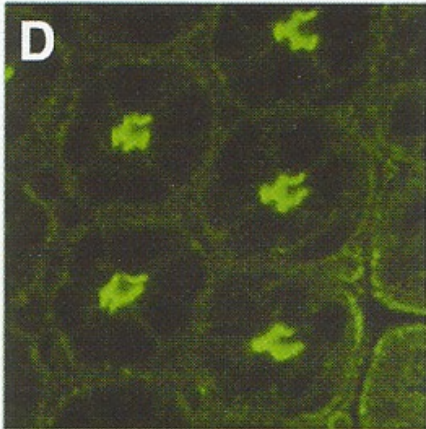
Ampiphysin
Actin
molemmat

Drosophila
silmä

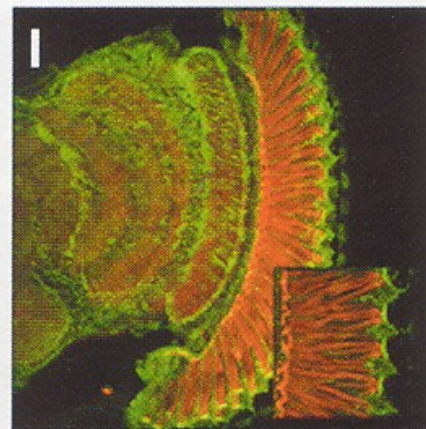
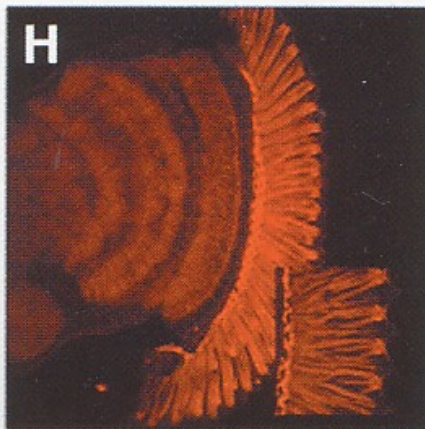
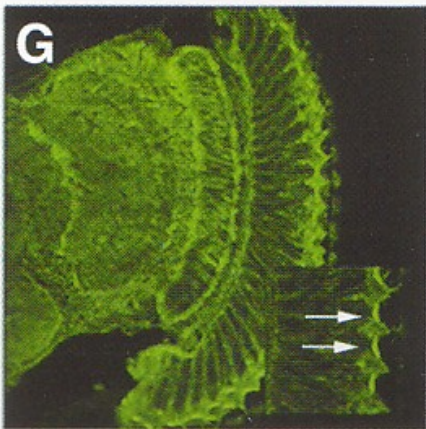
24hr APF



48hr APF



Adult

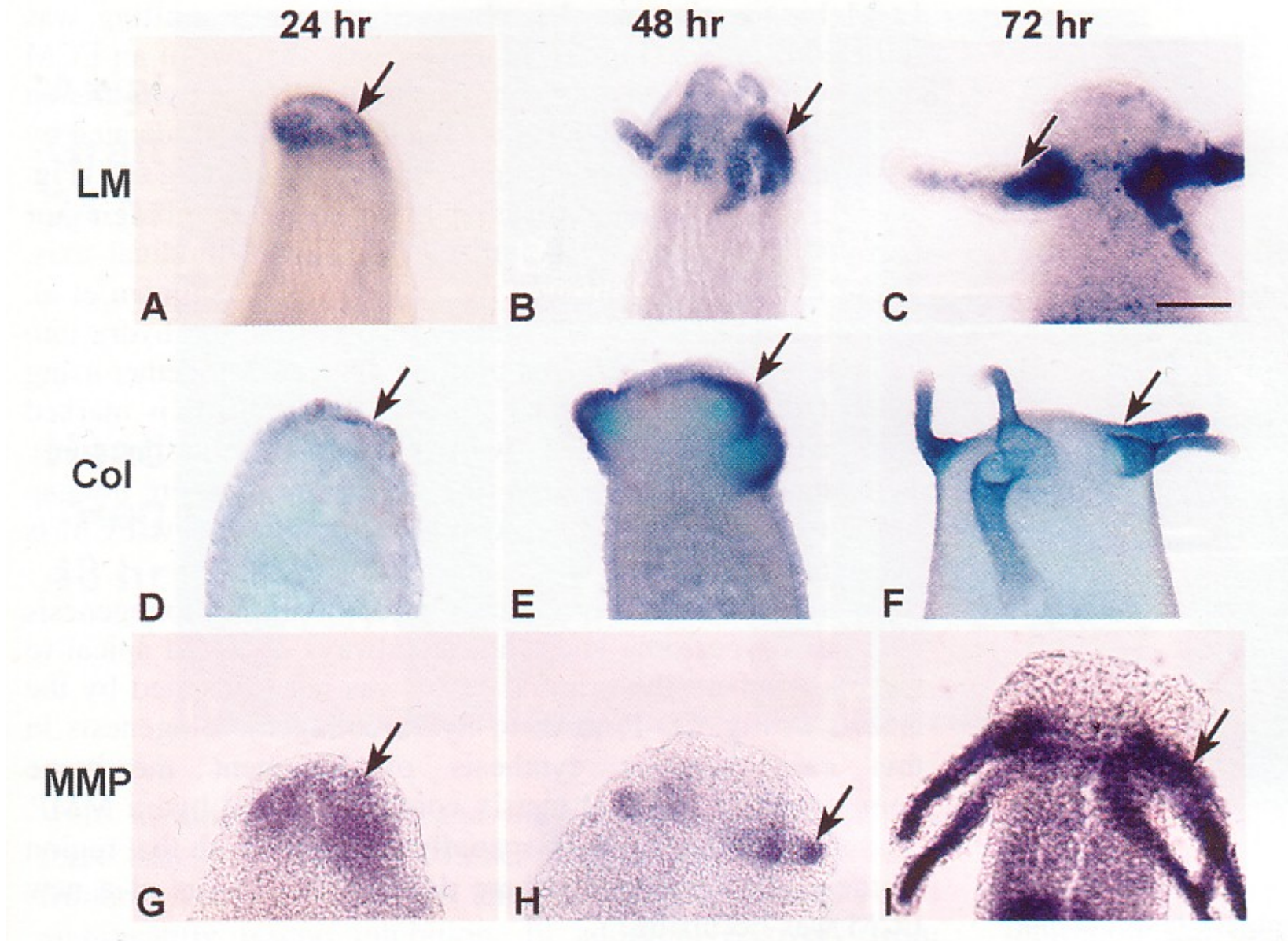


In situ hybridisaatio:

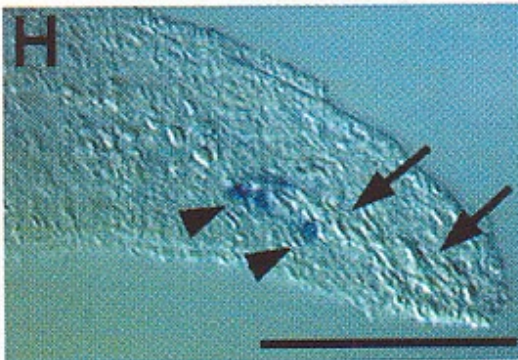
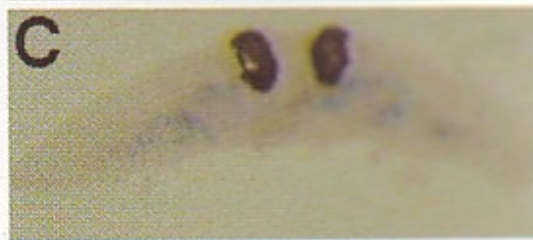
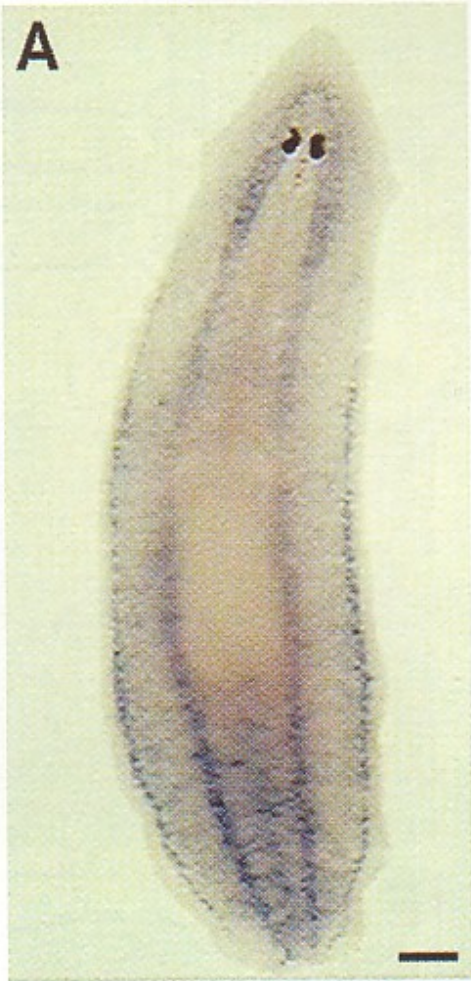
RNA/RNA, RNA/DNA

Digoksygeeniinillä (tms) merkitään tietyn geenin mRNA:ta vastaava proobi, tehdään kudος läpäiseväksi ja hybridisoidaan. Liika pestään pois ja *voilà* ... nähdään, missä mRNA on sijainnut = ko. geeni toiminut

Sopivissa oloissa proobi saadaan sitoutumaan myös vastaavaan DNA:han, esimerkiksi sylkirauhaskromosomissa



LM, Col ja MMP geenien mRNA:n kuvantaminen, *in situ* hybridisaatio



Pax6A mRNA

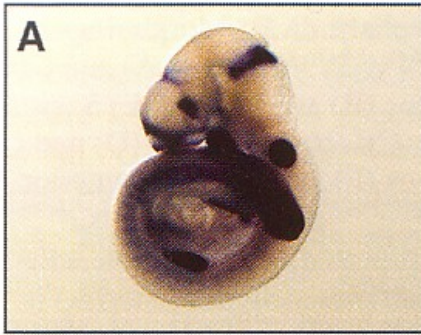
laakamato *Girardia tigrina*

Työn tarkoitus: *Pax6* geeniperhe on kaikkien silmien kehityksen takana, olivatpa ne millaisia tahansa. Planarialla on simppele kuppisilmä, joka aistii valon suunnan. Se regeneroituu niinkuin pääkin.

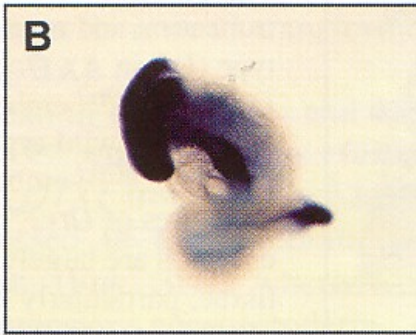
WT

 $Gbx2^{-/-}; Otx2^{hOtx1/hOtx1}$ *Fgf8*

A



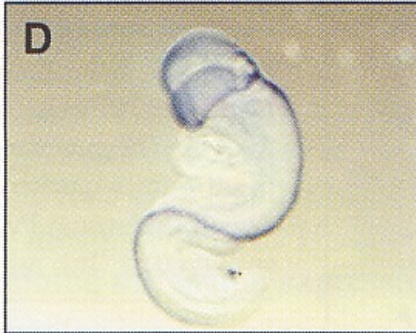
B

*Wnt1*

C



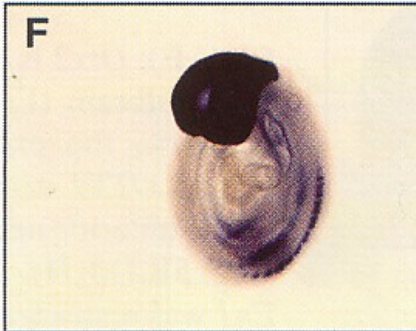
D

*En1*

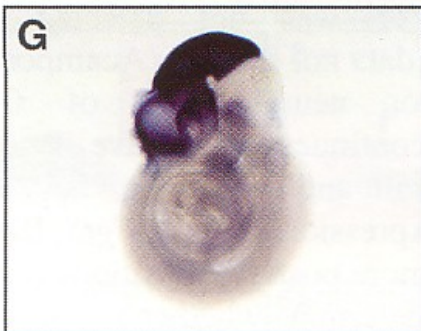
E



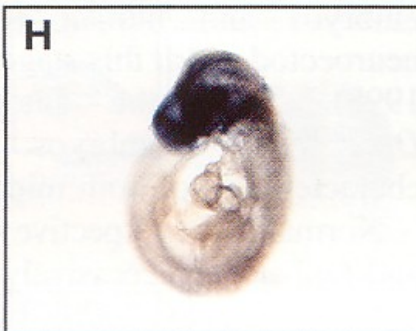
F

*hOtx1*

G



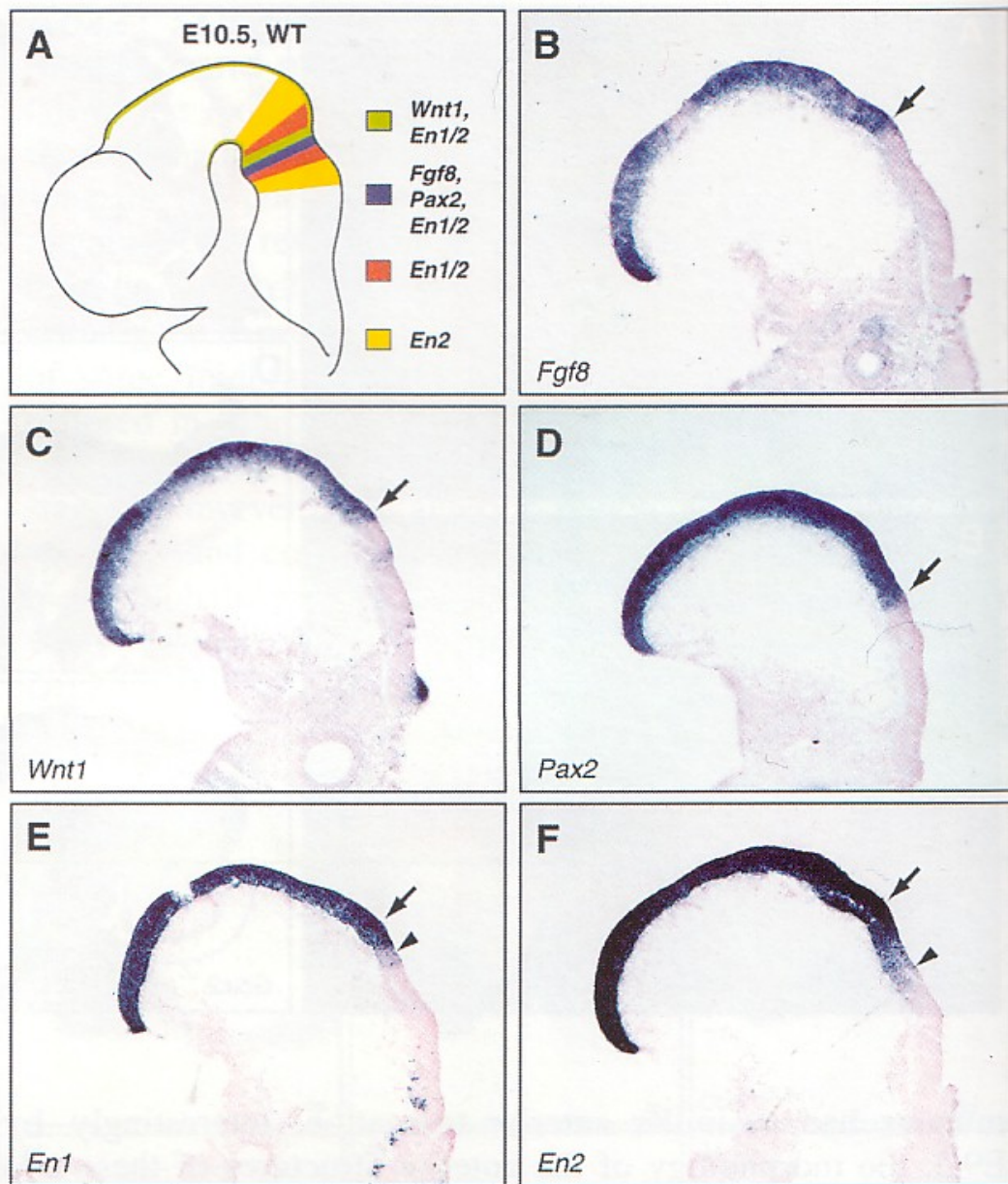
H



Hiiren alkiokin voidaan
läpivärjätä

vasen sarake: villi
oikea: mutantti

rivit: eri geenien
ilmenemiskuvio



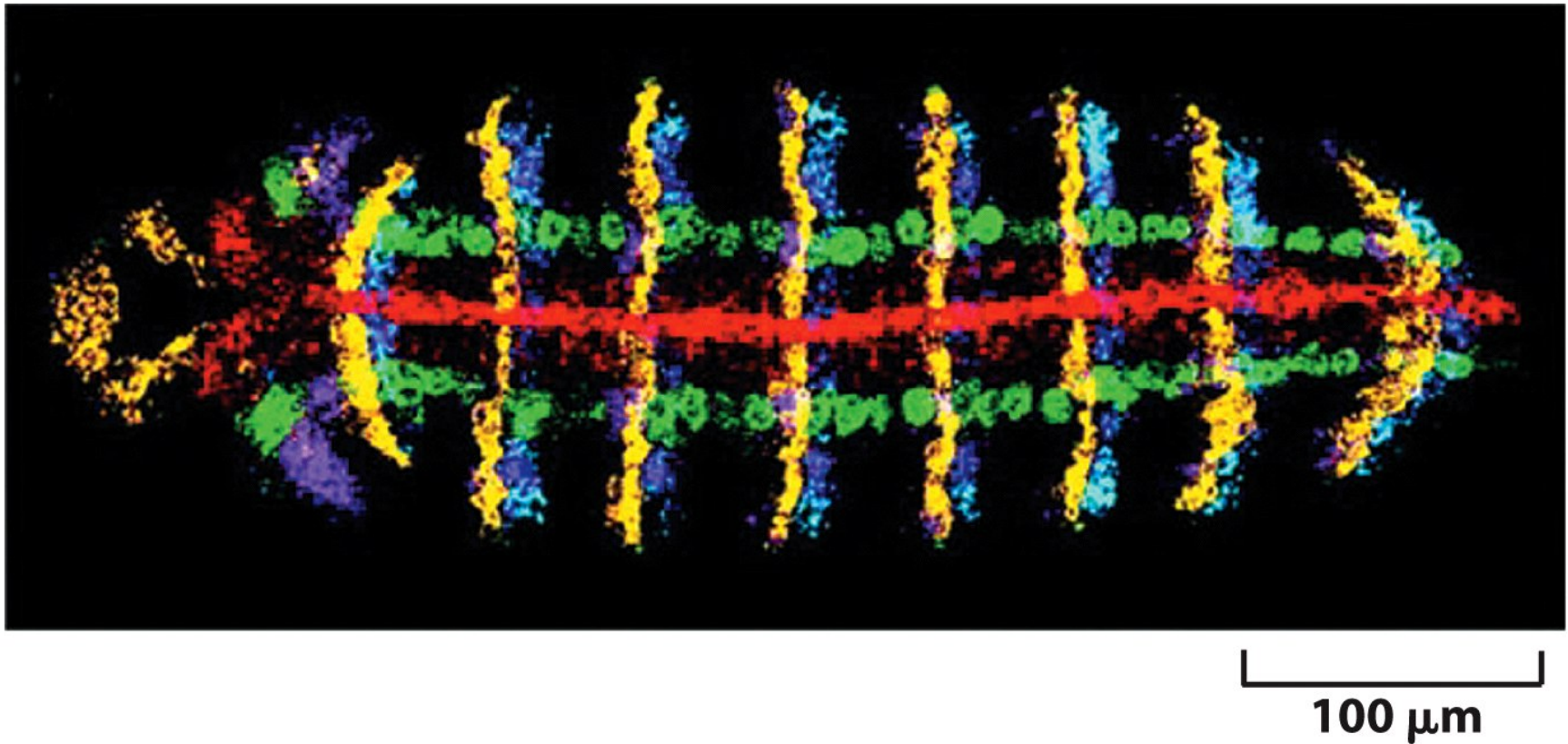


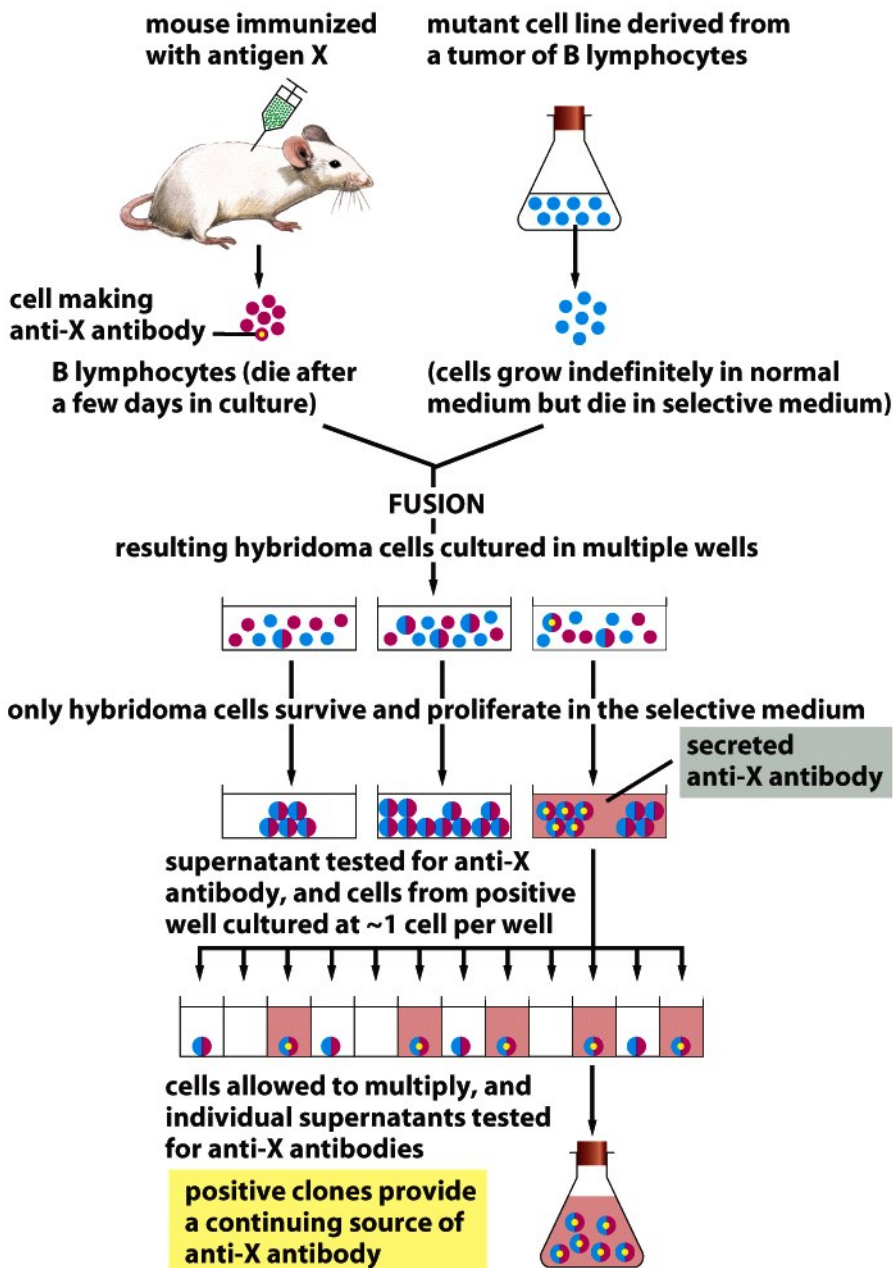
Figure 9-12 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Olipa nuo edelliset köyhiä aikoja! Pelkkää sinistä. Nyt RNA-hybridisaatiokin voidaan tehdä värillisenä

Immunologiset osoitusmenetelmät

Tehdään *proteiinille* monoklonaalinen vasta-aine

Merkitään se sopivasti, vaikkapa fluoresoivaksi tms



Hybridomasoluilla voidaan tuottaa monoklonaalisia antibodeja, jotka on sitten hyvin spesifisiä

(Esimerkki: nykyiset veriryhmien määrittämissä reagenssit)

**mouse immunized
with antigen X**

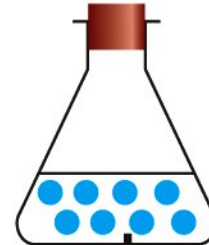


**cell making
anti-X antibody**



**B lymphocytes (die after
a few days in culture)**

**mutant cell line derived from
a tumor of B lymphocytes**

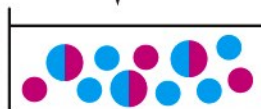


**(cells grow indefinitely in normal
medium but die in selective medium)**

FUSION

resulting hybridoma cells cultured in multiple wells

CELL 509



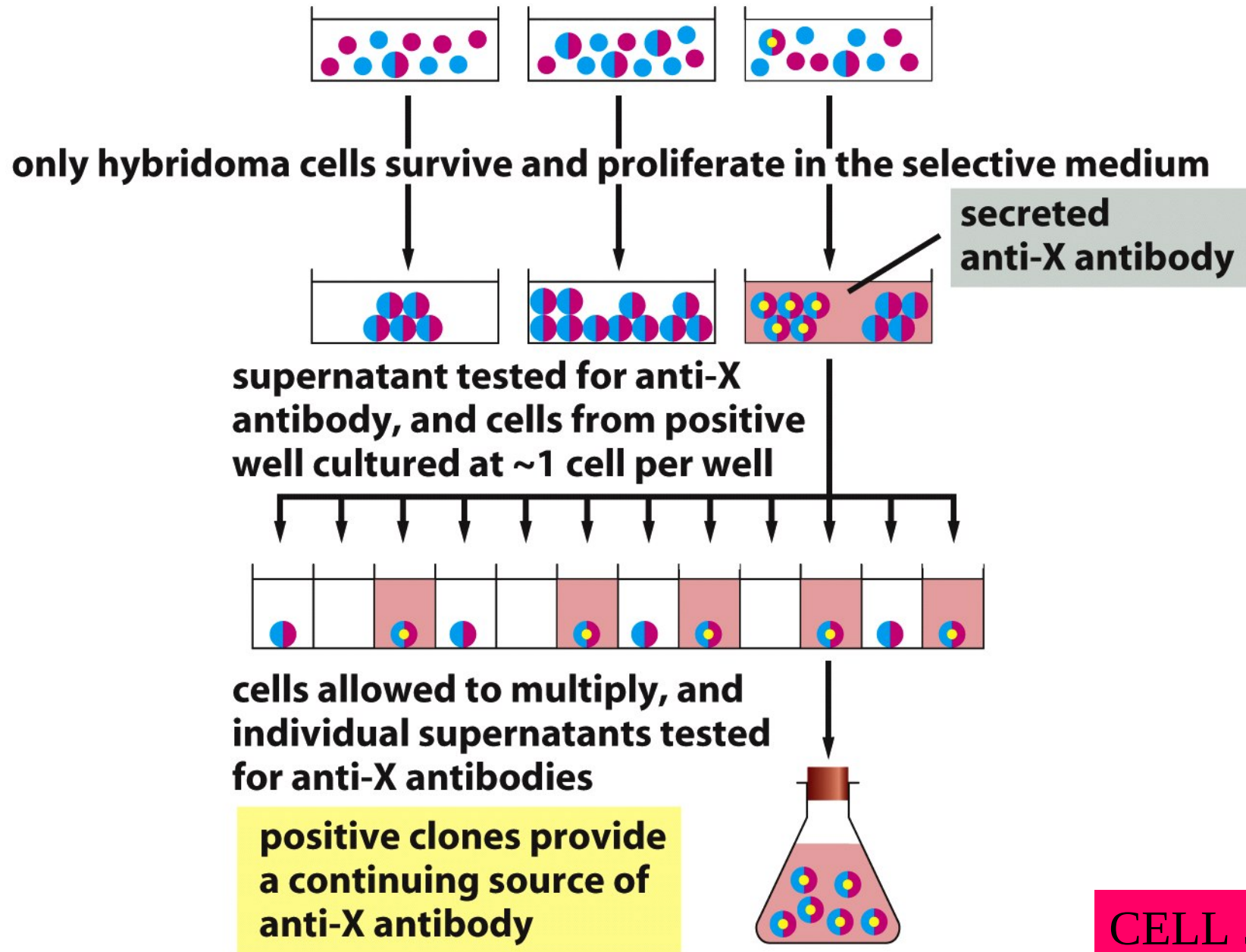




Figure 22-35 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Tällaista käsityötaitoa arvostettaisiin monella alalla, mutta taitajia on niukasti