

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 6

**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI**

in modo **estremamente specifico e con grande affinità**:

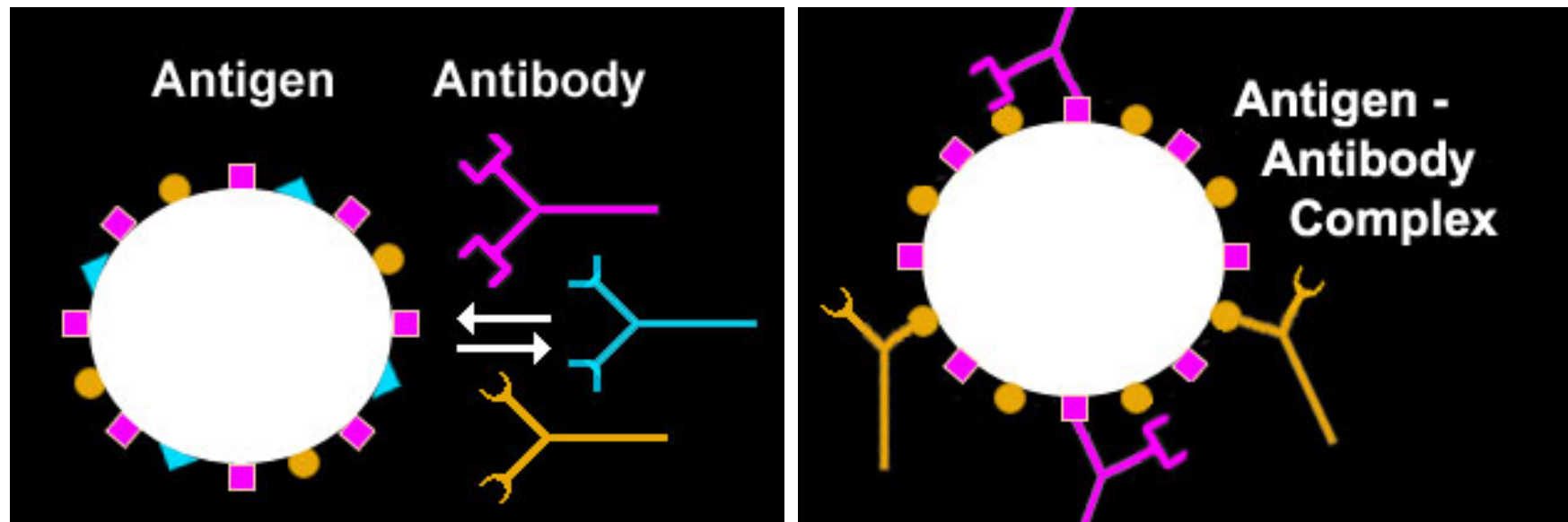
Possono essere usati come **SONDE** per:

riconoscimento, localizzazione, purificazione e dosaggio di antigeni

ANTIGENI: macromolecole riconosciute specificamente dall'anticorpo

Il **sito di riconoscimento** è detto **EPITOPO**:

un antigene normalmente comprende più di un epitopo (6-10 AA).



TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

- L'**elevata specificità di legame** degli anticorpi permette di sfruttarli per **riconoscere una singola proteina**
 - ✓ in un lisato cellulare
 - ✓ in situ nella cellula
- La **rilevazione/purificazione** del complesso Ag/Ab avviene **coniugando la regione costante** dell'anticorpo ad una molecola **visualizzabile** o utilizzabile per la **purificazione**:
 1. **enzima** con substrato cromogeno o chemiluminescente (WB, ELISA)
 2. **fluorocromo** (microscopio a fluorescenza o citofluorimetro)
 3. **beads** anche magnetiche (purificazione, immunoprecipitazione)

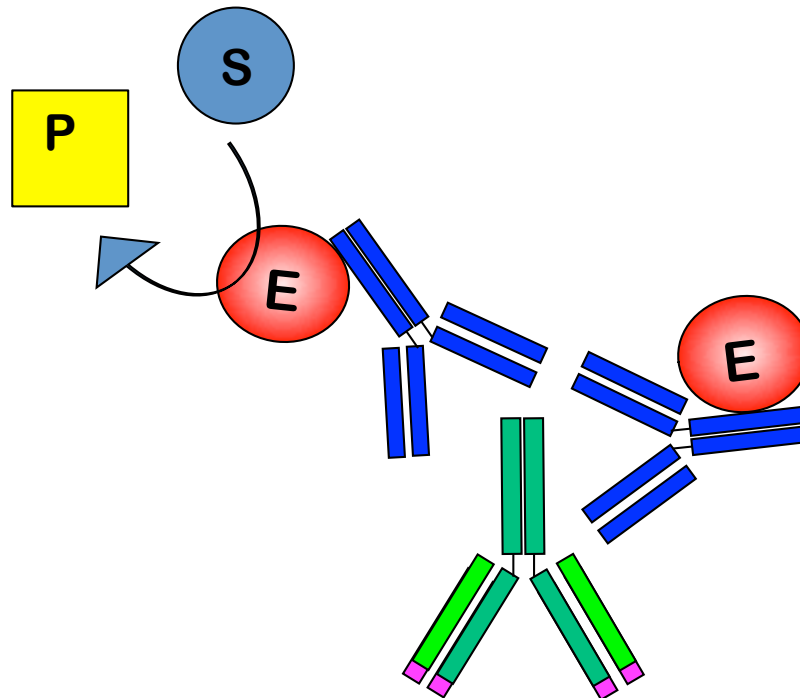
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE INDIRETTE

L'anticorpo **secondario** riconosce la porzione costante dell'anticorpo primario

può essere **coniugato** ad un enzima o ad un fluorocromo

VANTAGGI:

- si possono utilizzare pochi Ab secondari marcati per moltissimi Ab primari diversi
- il rapporto Ab primario /Ab secondario è $> 1:1$



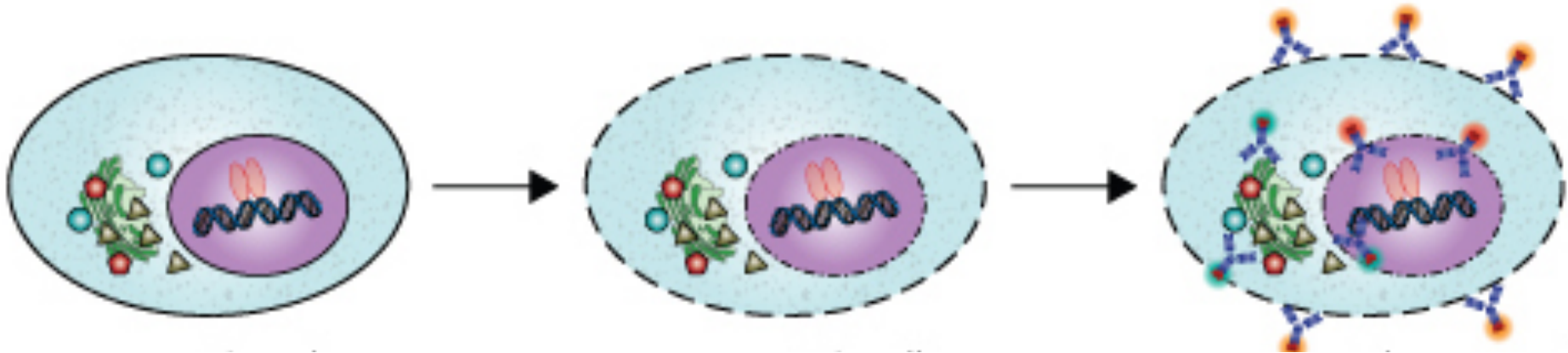
**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

**TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
per la RILEVAZIONE
e il DOSAGGIO di ANTIGENI**

**RICONOSCIMENTO DI ANTIGENI
IN SITU (CELLULE E TESSUTI)**

Immunofluorescenza

Permette di **visualizzare una proteina** sulla superficie o all'**interno della cellula**

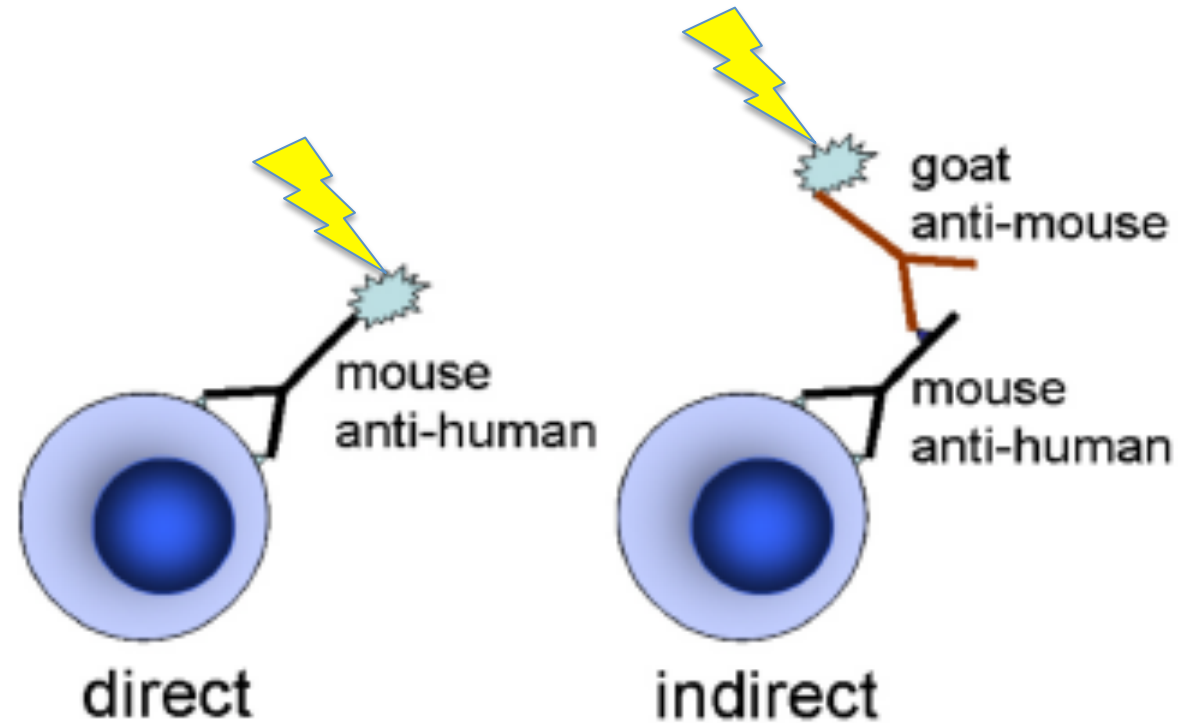


Fornisce informazioni su: livelli di espressione (non quantitativi) e localizzazione

protocollo :

- ✓ **FISSAZIONE** delle cellule in situ: si mantengono le strutture cellulari e le interazioni molecolari
si utilizzano **aldeidi** (paraformaldeide) oppure **alcoli** (metanolo/acetone)
- ✓ **PERMEABILIZZAZIONE** della membrana per consentire l'ingresso dell'anticorpo (blando trattamento con detergenti)
- ✓ **COLORAZIONE = incubazione** con l'anticorpo primario ed eventualmente successivamente con l'anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo (es. FITC, RITC)
- ✓ **ESAME** al microscopio a fluorescenza

L'anticorpo **secondario** è coniugato ad un **fluorocromo**
La visualizzazione avviene al **microscopio a fluorescenza**



Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati per IF

FITC and TRITC

Fluorescein isothiocyanate (FITC): organic fluorescent dye. excitation/emission peak at 495/517 nm and can be coupled to distinct antibodies with the help of its reactive isothiocyanate group. FITC served as an origin for further fluorescent dyes like Alexa Fluor®488.

TRITC (Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate). TRITC is a derivate of the Rhodamine family. TRITC is excited with light in the green spectrum with a maximum at 550 nm. Its emission maximum is lying at 573 nm.

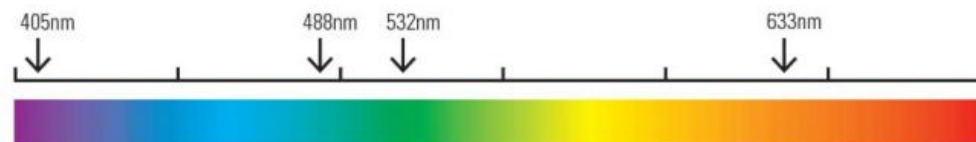
Even if FITC and TRITC are still in use, they are rather weak fluorescent dyes and not recommended for state of the art microscopy. Their profit is based on their economical price.

Cyanines

This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups.

Alexa Fluor® dyes big group of negatively charged and hydrophilic fluorescent dyes

Visible Spectrum



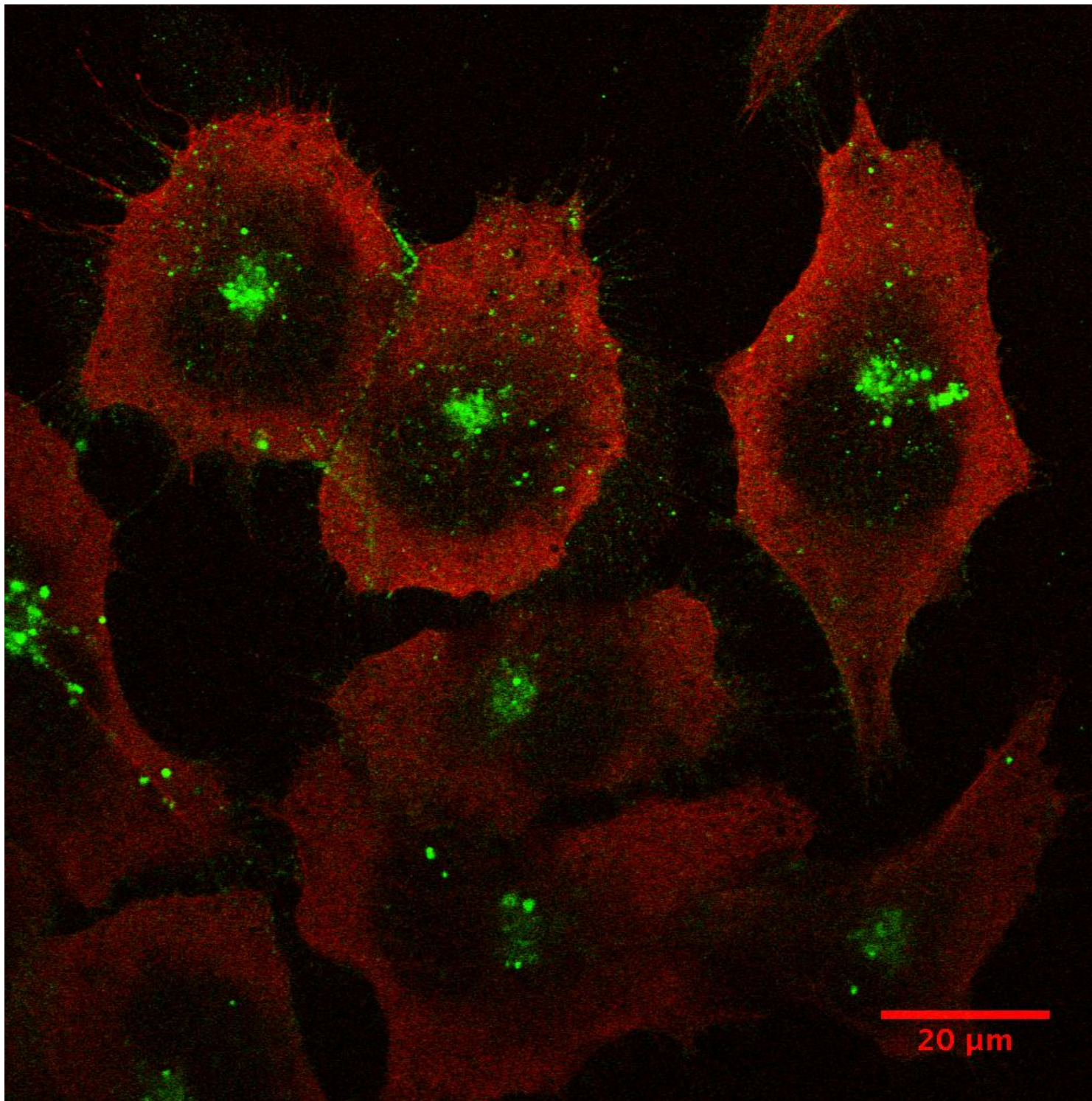
Catalog Code	Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
890	Certified Blank™				reference
897	Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
886	Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
887	Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
901	Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
914	APC-Cy™7	104k	650	767	conjugate
898	Chlorophyll (<i>a + b</i>)	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	plant pigment
895	Cy™5	792	649	666	conjugate
906	DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
913	Far-Out Red	-	475,590	663	reference
891	Fluorescein	389	495	519	conjugate
894	Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
916	Pacific Blue™	339	410	455	conjugate
899	PE (R-Phycoerythrin)	240k	480, 565	578	conjugate
908	PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugate
889	PE-Cy™7	240k	480	767	conjugate
909	PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugate
892	Propidium Iodide	668	536	617	DNA intercalator
905	T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugate
893	Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugate
915	Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	reference

Cellule umane
derivate
da tumore
al polmone
in coltura

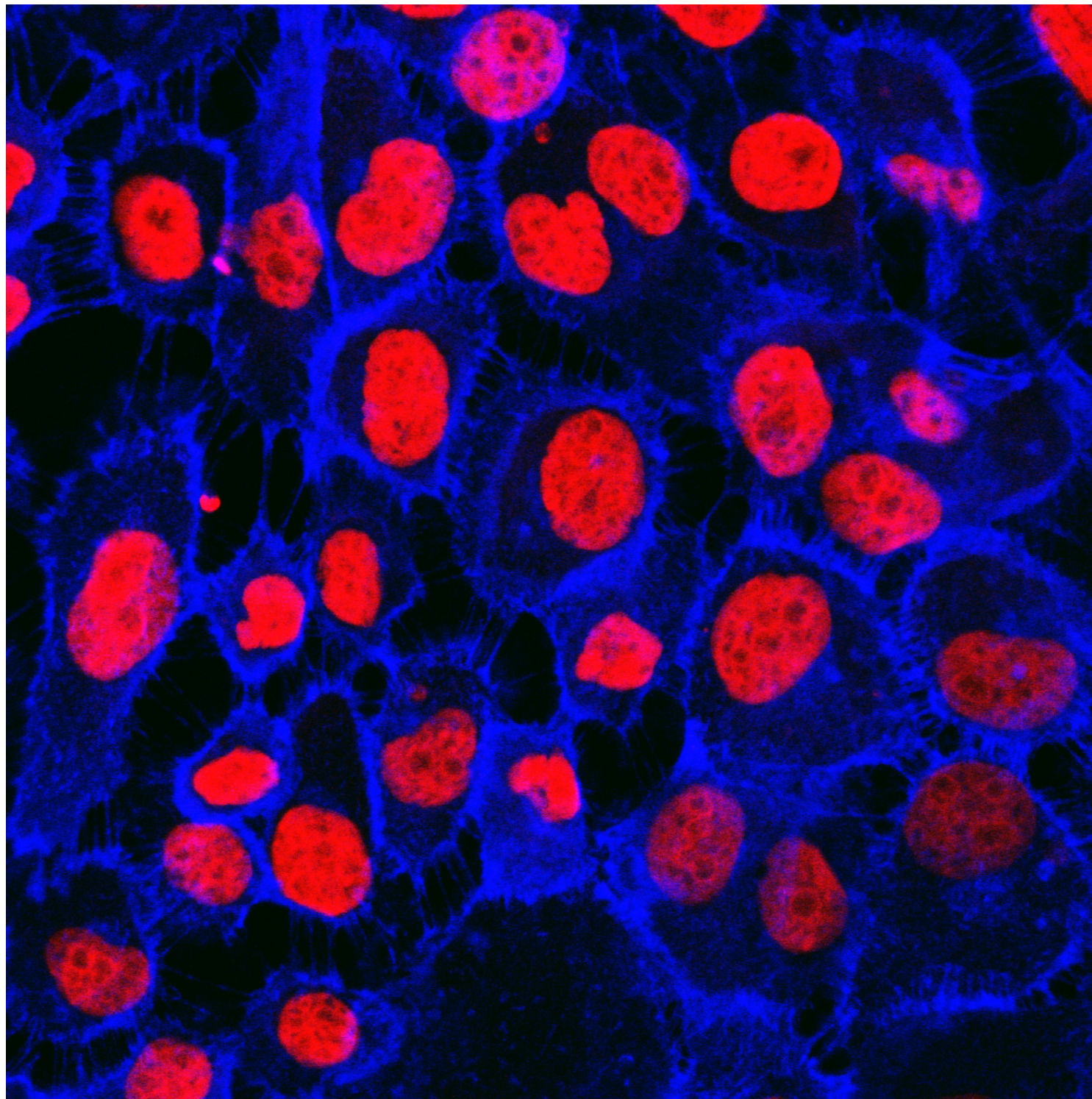
Alfa tubulina -
RITC

Gamma tubulina
- FITC

Immagine al
microscopio a
fluorescenza



20 μm



**Cellule umane
da epitelio
mammario
normale
in coltura**

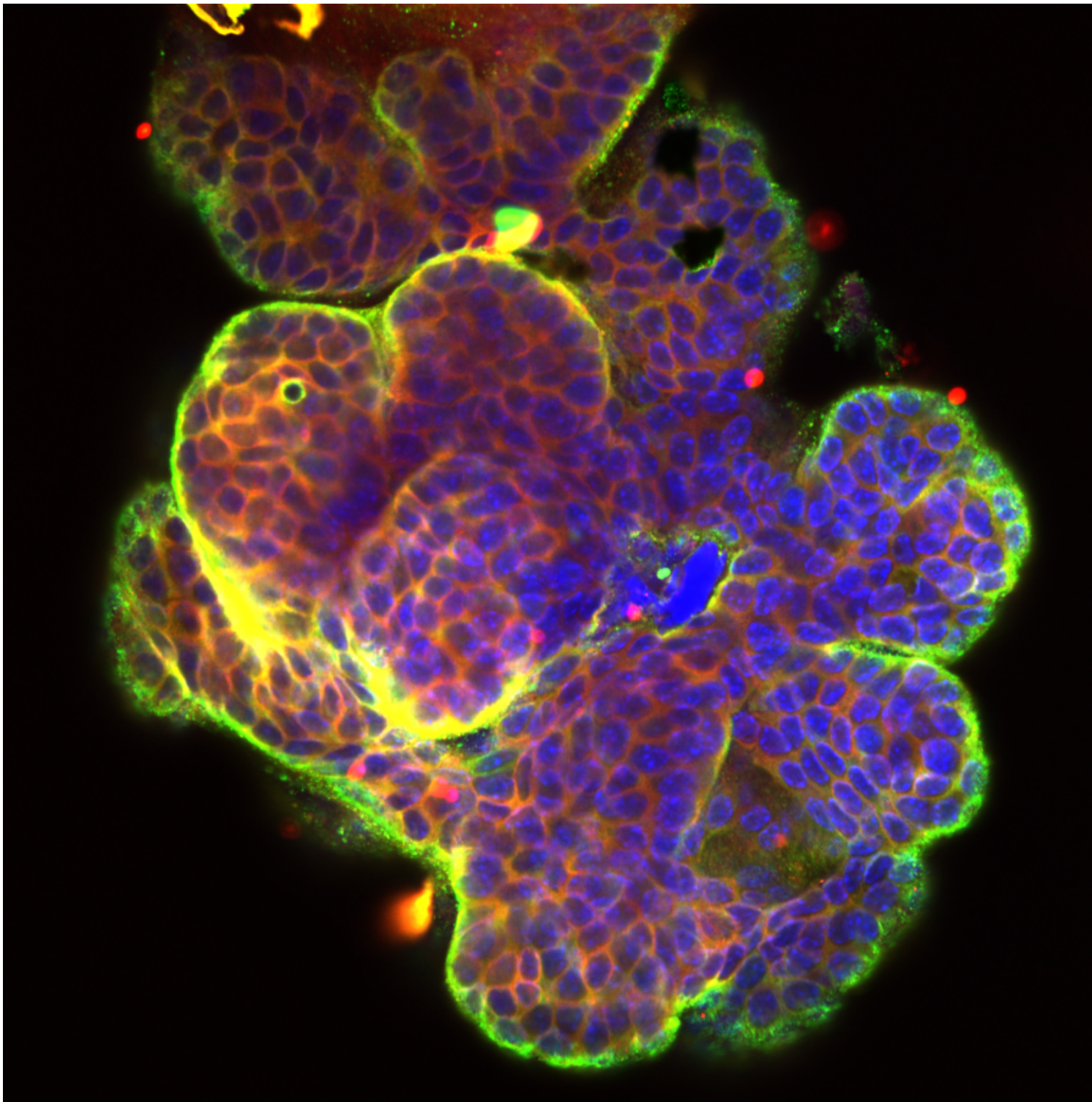
**Nuclei
(Propidio Ioduro)
Beta-catenin
(pacific blue)**

**Immagine al
microscopio a
fluorescenza**

**Organoide
derivato da
tessuto epiteliale
mammario di
topo**

Nuclei (DAPI)
CK 14 - FITC
CK 18 - RITC

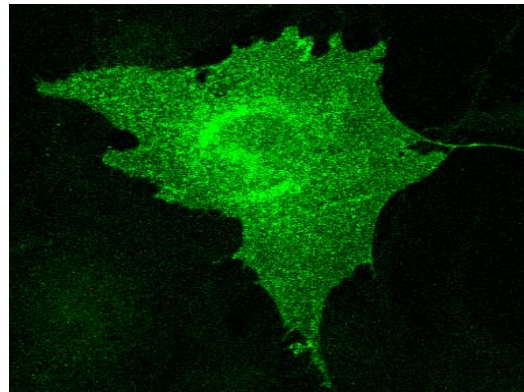
**Immagine al
microscopio a
fluorescenza
confocale**



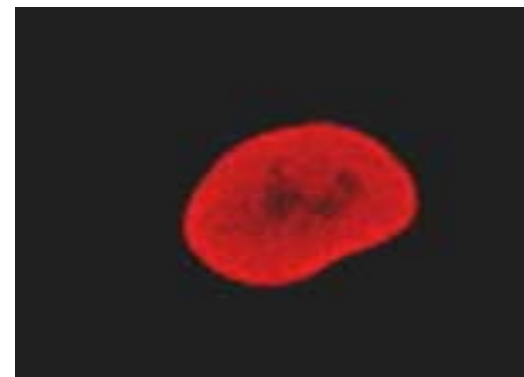
Differenze rispetto al sistema del gene reporter GFP:

- Mediante l'immunofluorescenza è possibile analizzare la **LOCALIZZAZIONE** di una proteina **ENDOGENA** della cellula
- Non si può operare in tempo reale (fissazione e permeabilizzazione)

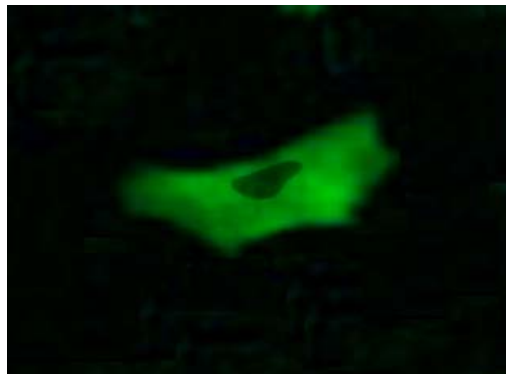
MEMBRANA: recettore Gas1



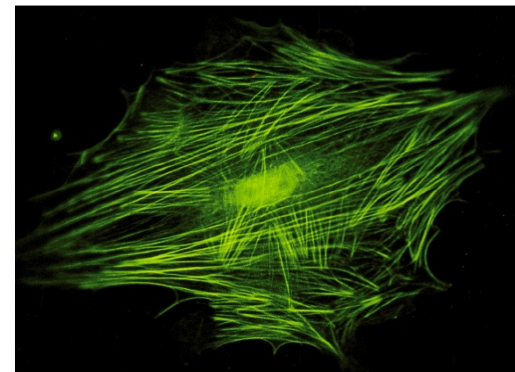
NUCLEO: TF p53



CITOPLASMA: Gas2

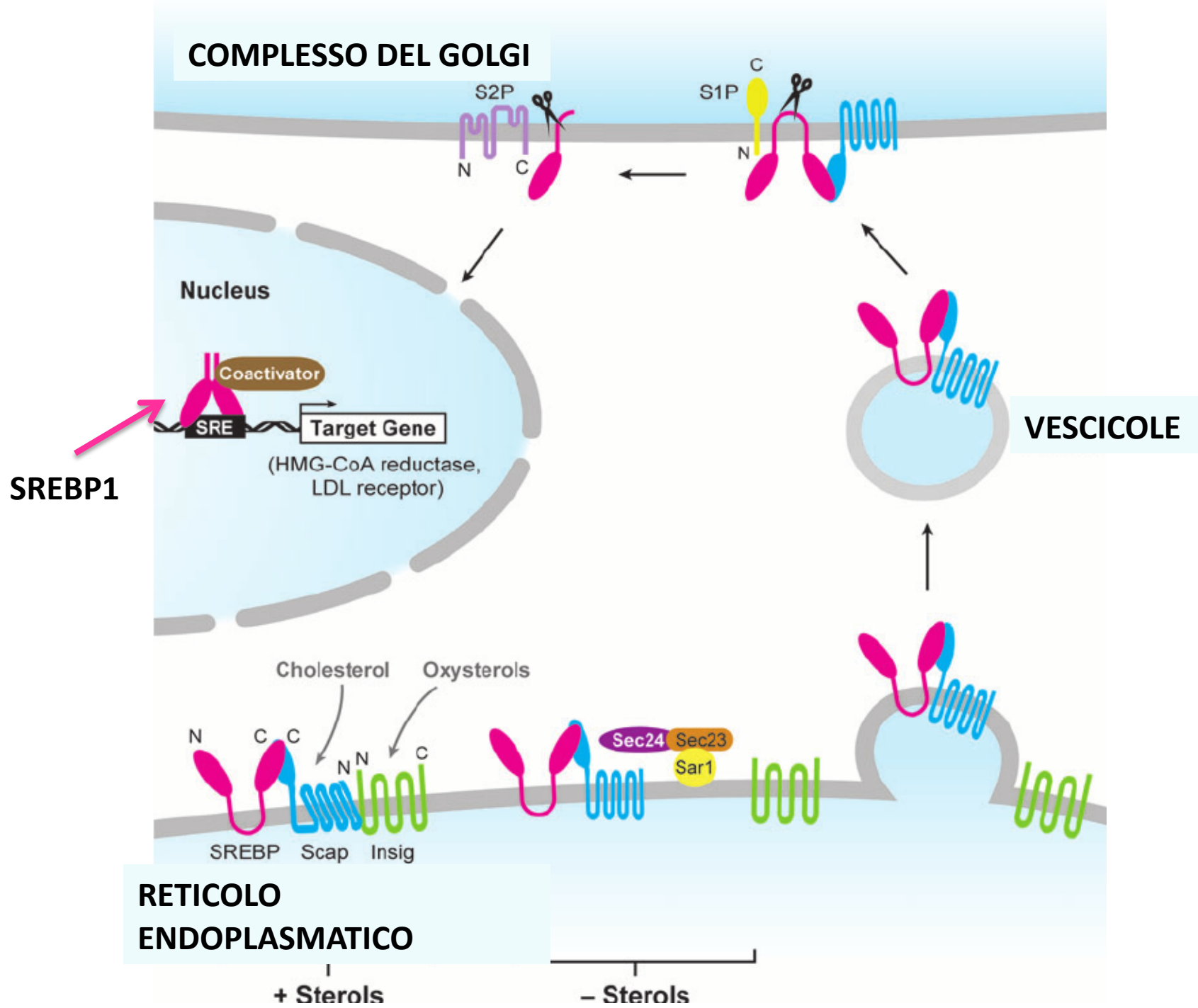


CITOSCHELETRO: actina



Applicazione:

**Visualizzare i cambiamenti nella localizzazione subcellulare
della proteina SREBP1a**



Step 1: clonaggio del cDNA di SREBP1a nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA

Name: pCDNA3

Insert: SREBP1a-HA

Original vector:

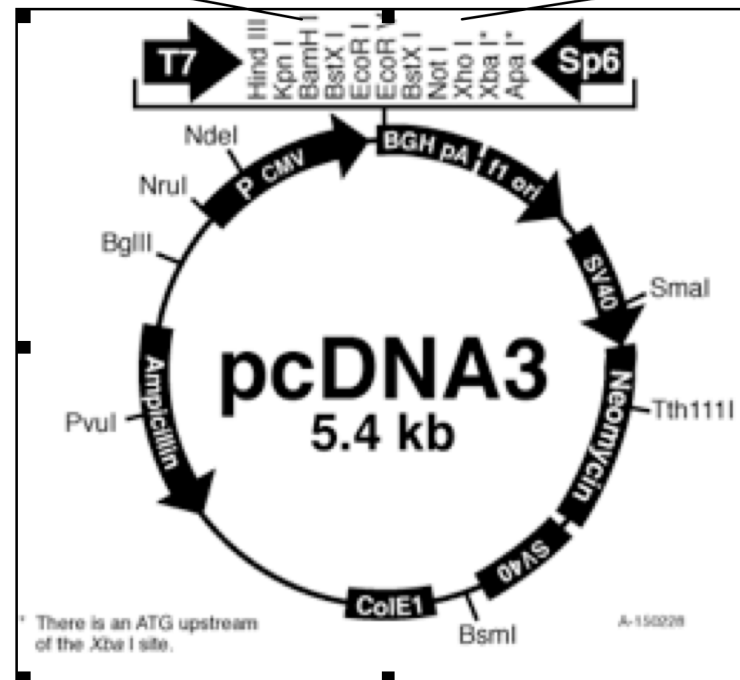
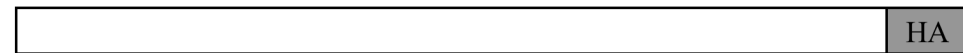
Selection: Amp^R (prokaryotic); Neo^R (eukaryotic)

Ref:

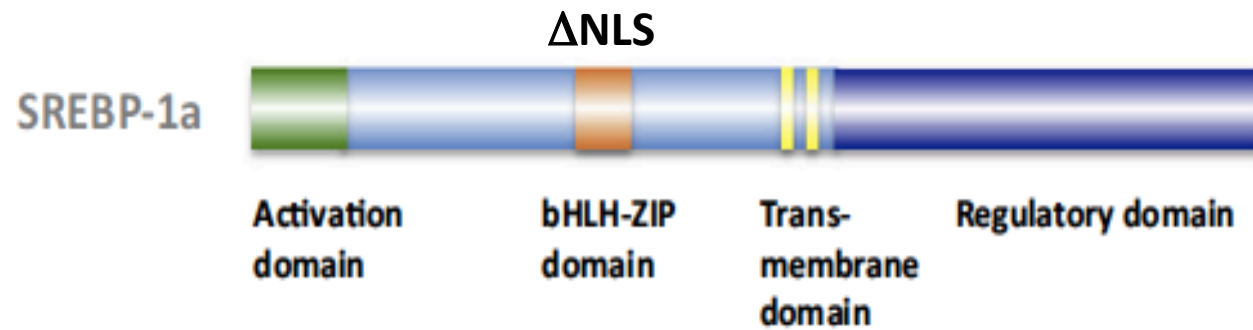
Notes:

BamHI

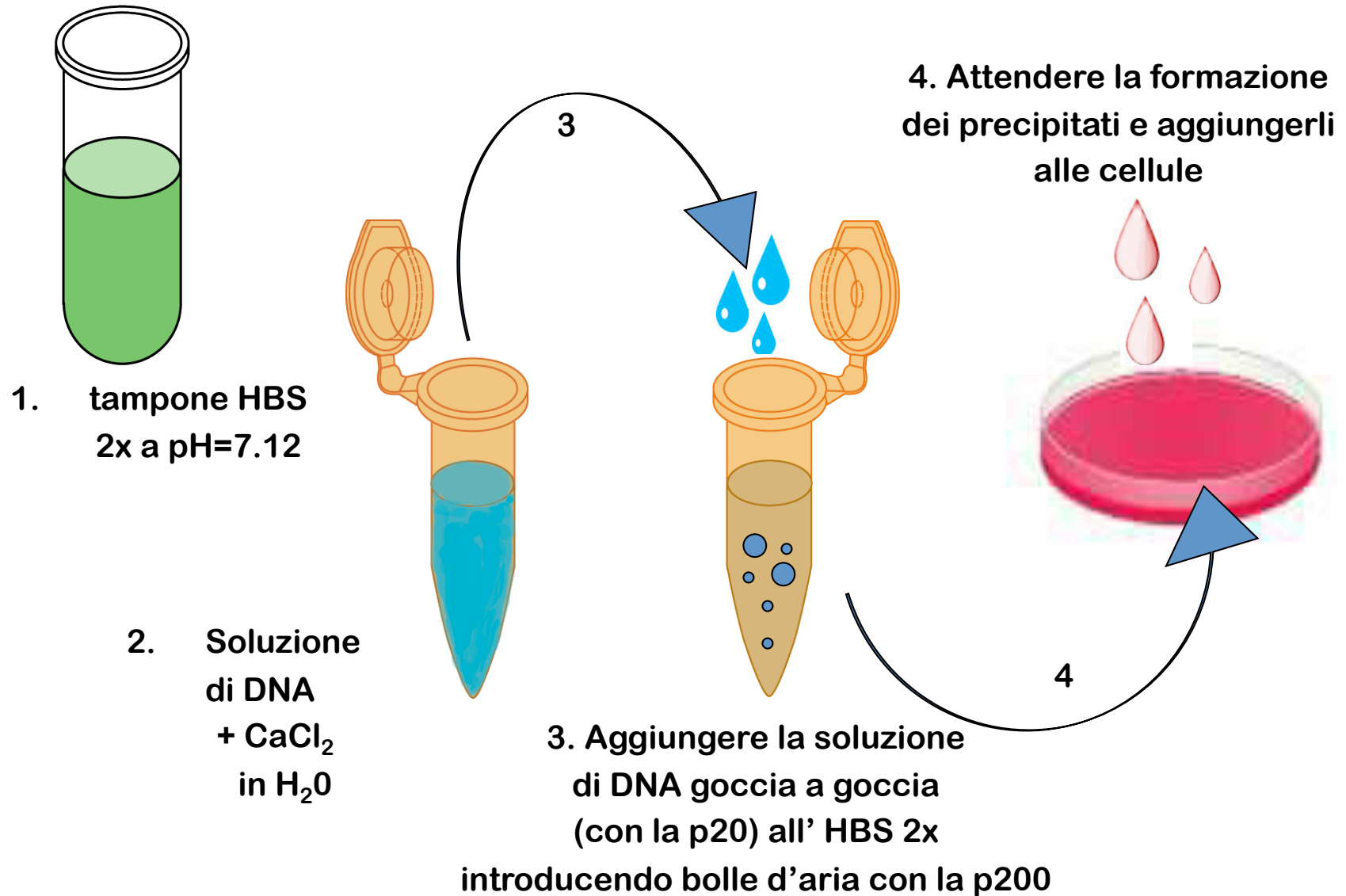
XhoI



Step 2: mutagenesi del NLS di SREBP1a



Step 3: trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura e trattamenti (terreni diversi)

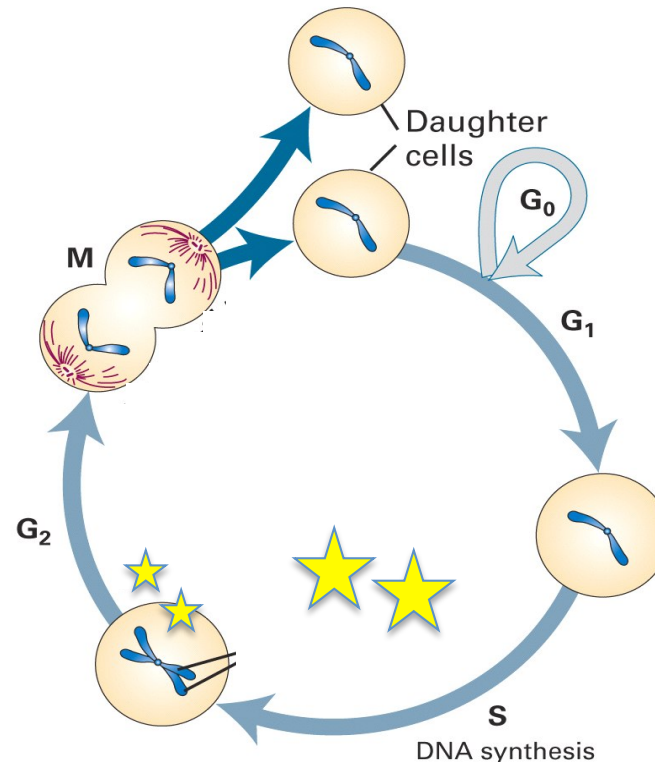


Step 4: analisi mediante immunofluorescenza (Ab primario specifico per TAG HA) della localizzazione di:

- | | |
|--|------------------|
| 1) SREBP1a in terreno completo | ER |
| 2) SREBP1a in terreno deprivato da lipidi | NUCLEO |
| 3) SREBP1a Δ NLS in terreno deprivato da lipidi | CITOPLASMA |
| 4) SP1 | GOLGI |
| 5) RAB5 | ENDOSOMI PRECOCI |
| 6) Succinato deidrogenasi | MITOCONDRIO |

Applicazione: saggi di proliferazione

Visualizzazione di cellule in fase S mediante IF anti-BrdU



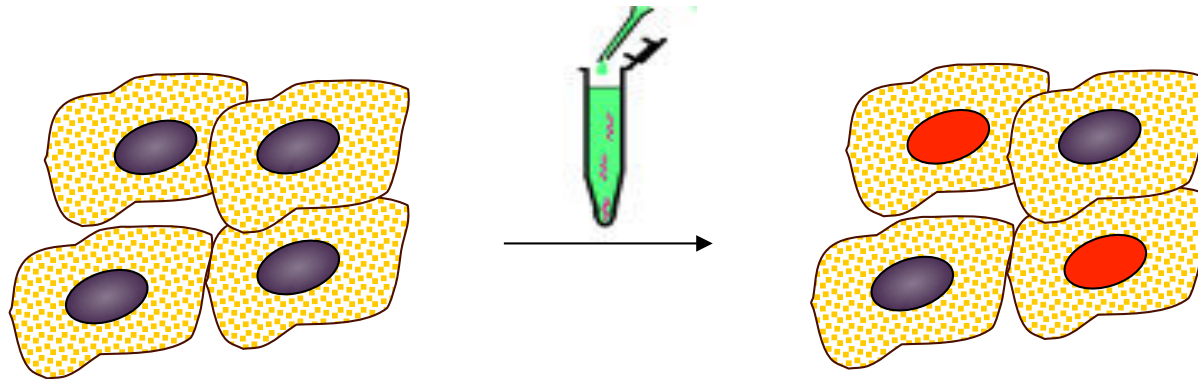
Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina: BrdU = 5-bromo desossiuridina**

Le cellule che hanno incorporato la BrdU (in fase S) possono essere poi IDENTIFICATE mediante immunofluorescenza con un **anticorpo anti-BrdU**

immunofluorescenza
con un anticorpo specifico anti- BrdU

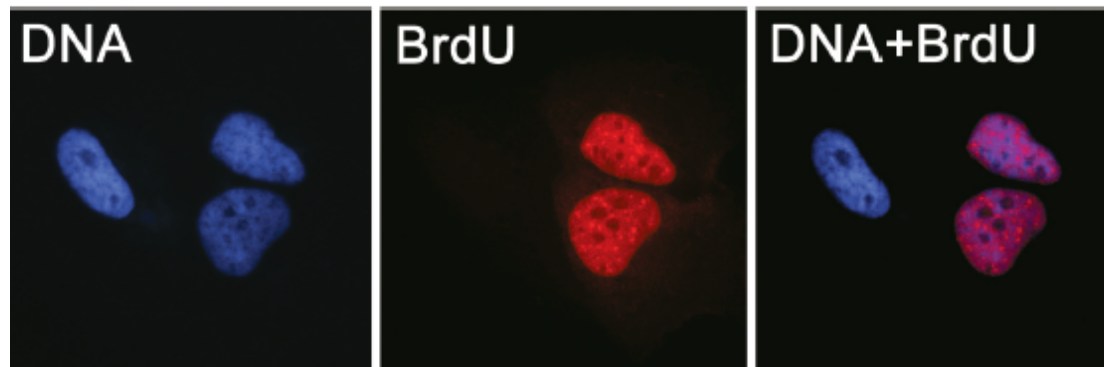
ed un anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo (es. FITC)

+ incubazione con colorante che colora il DNA =TUTTI i nuclei (emette nel blu)



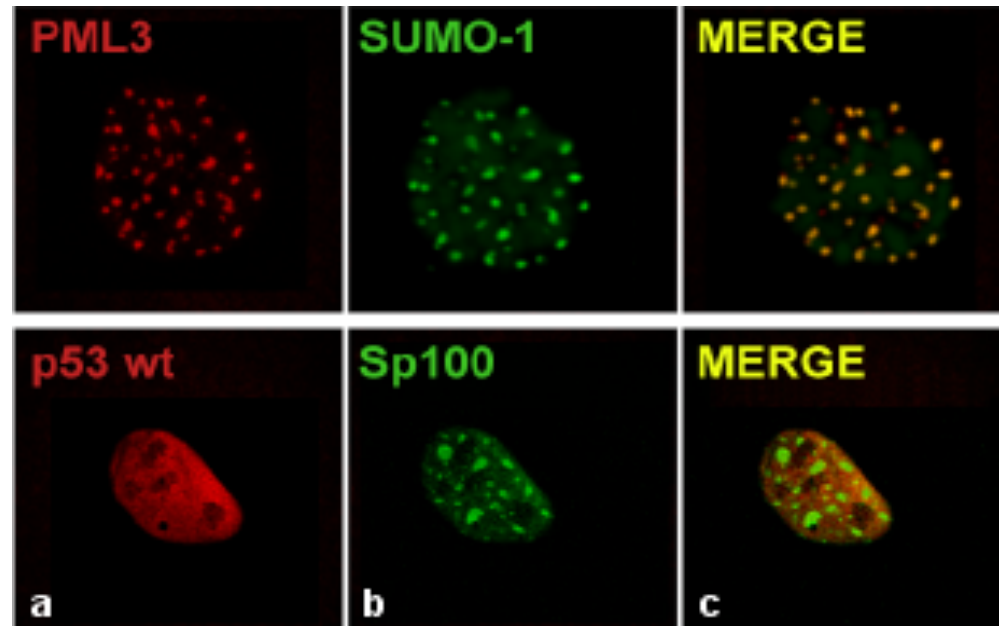
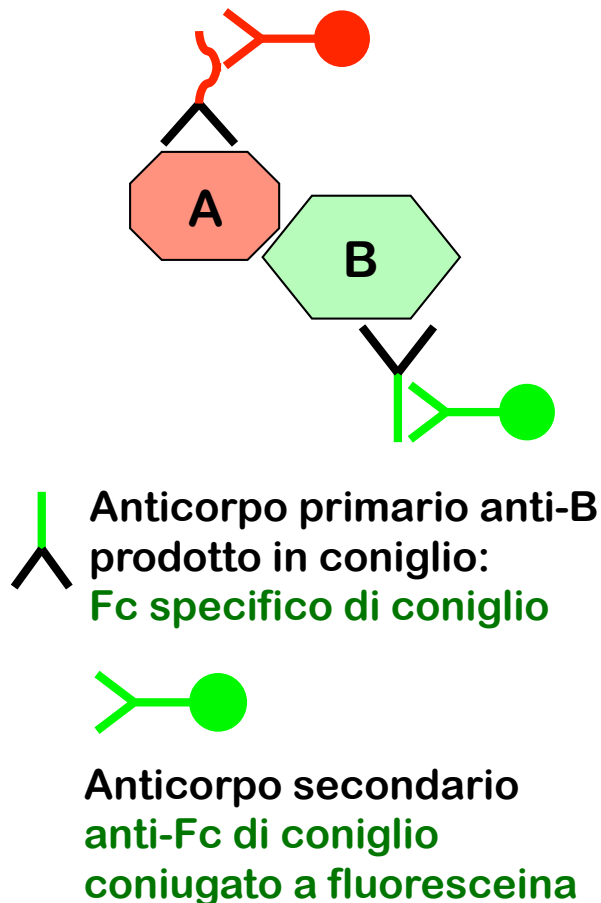
Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Immunofluorescenza anti-BrdU



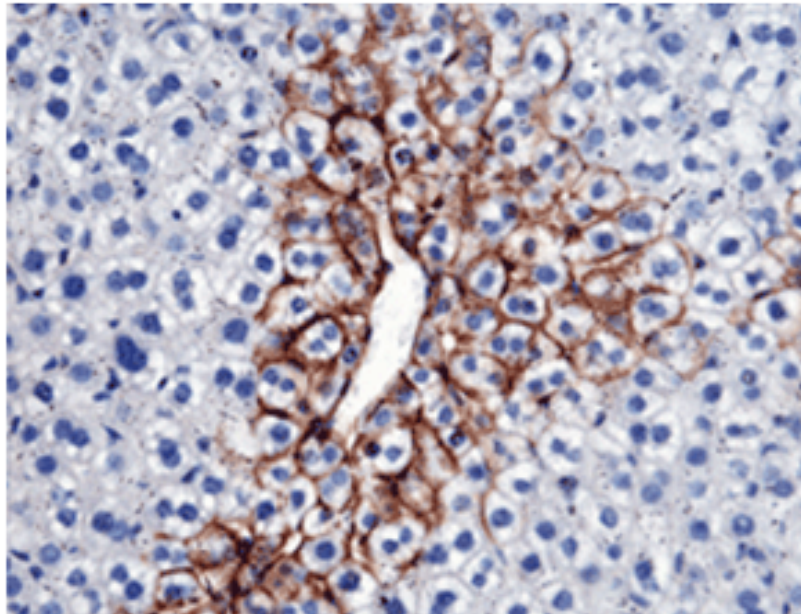
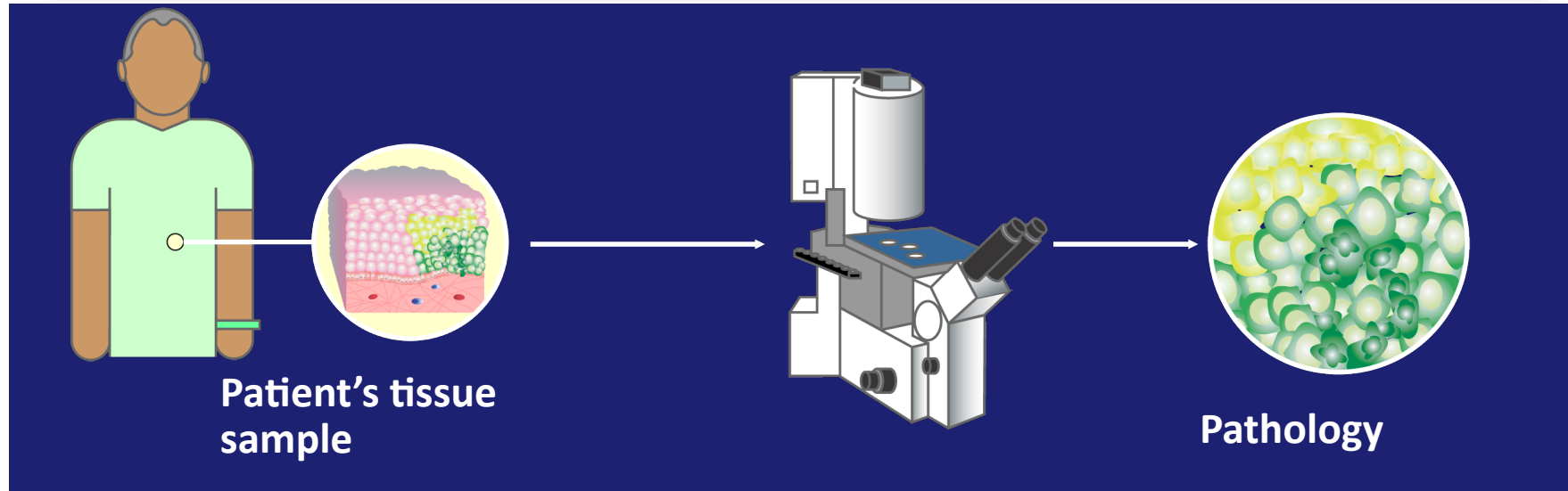
Riconoscimento di antigeni multipli

Utilizzando **anticorpi primari** diretti contro diverse proteine e prodotti in **animali diversi** (o con **diverso isotipo**) e quindi **anticorpi secondari specie-specifici** (o **isotipo-specifici**) coniugati a **diversi fluorocromi** è possibile analizzare contemporaneamente **diversi antigeni**



**Utilizzo di anticorpi per il
riconoscimento di antigeni nei
tessuti**

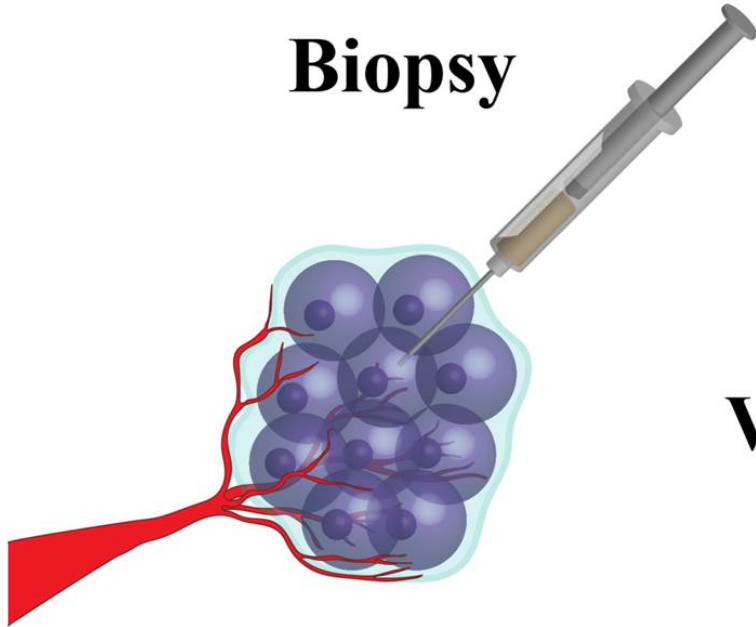
ANALISI di antigeni in campioni di tessuto Mediante IMMUNO-ISTOCHIMICA



Sezioni di tessuto congelato o fissato/
incluso in paraffina
sono colorate con **anticorpi**,
comunemente **coniugati con un enzima**,
es. fosfatasi alcalina o perossidasi che
catalizza una **reazione cromogenica**
(substrato cromogenico es. DAB o BCIP/
NBT)

Analisi di antigeni circolanti: BIOPSIA LIQUIDA

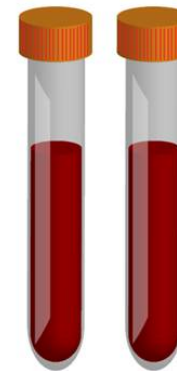
Standard Biopsy



Time-Intensive Procedure
Localized Sampling of Tissue
Not Easily Obtained
Some Pain/Risk
Invasive

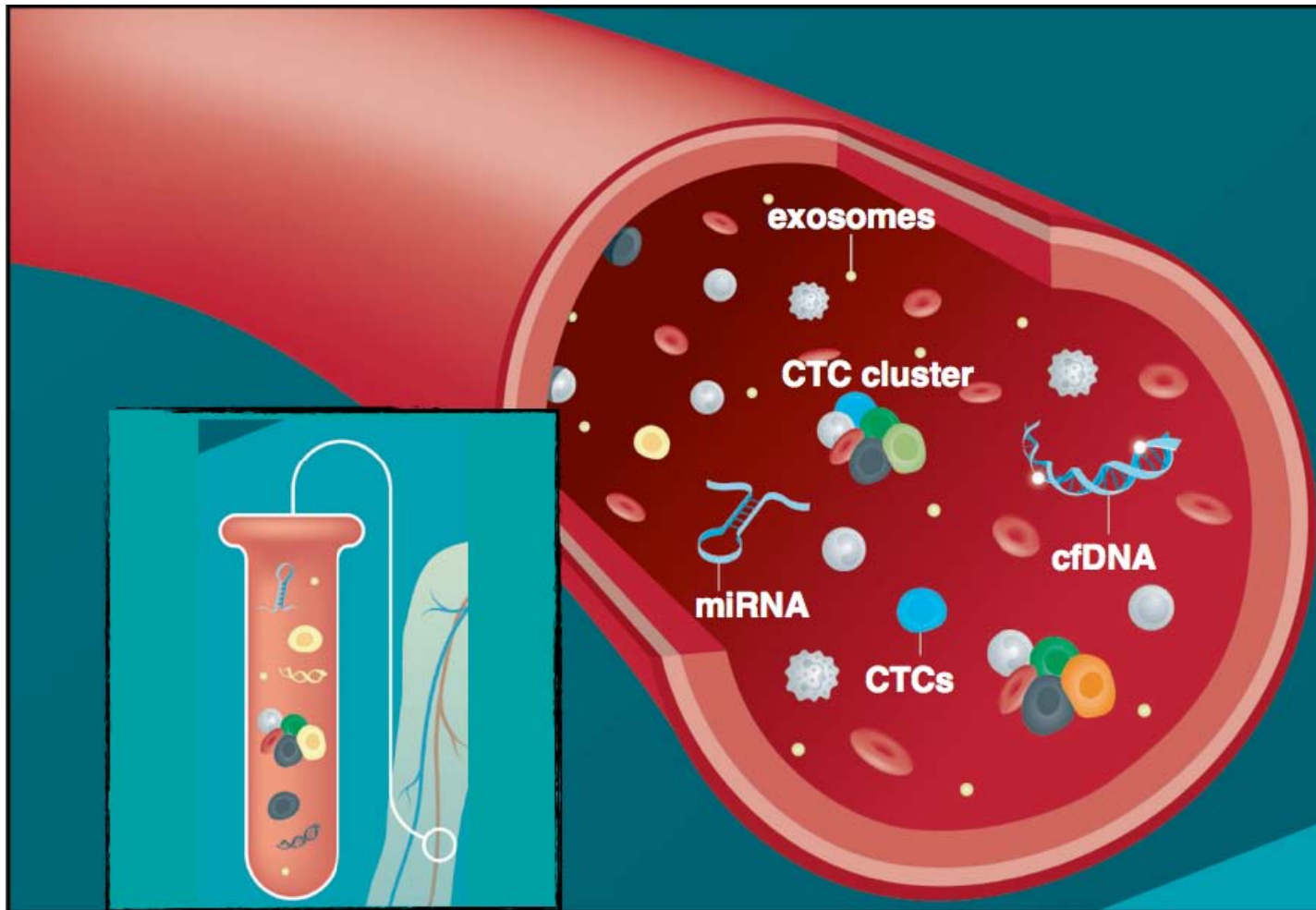
VS.

Liquid Biopsy



Quick
Comprehensive Tissue Profile
Easily Obtained
Minimal Pain/Risk
Minimally Invasive

Analisi di antigeni circolanti: BIOPSIA LIQUIDA

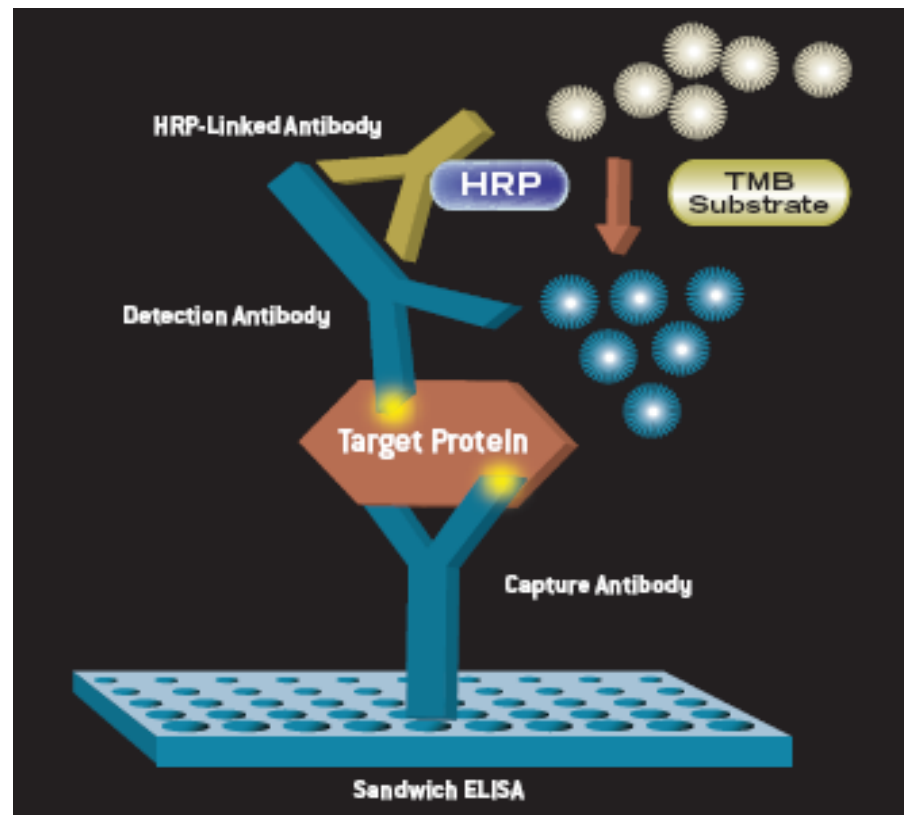


Rilevazione di proteine circolanti mediante ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

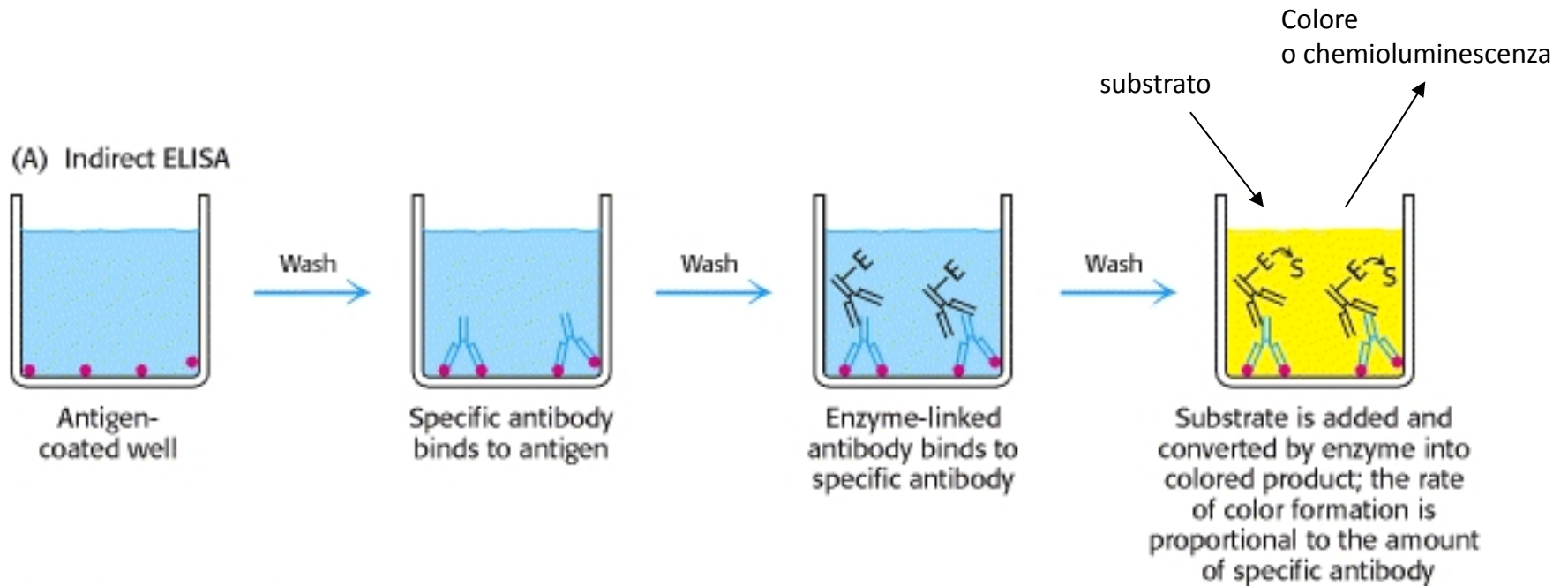
SANDWICH (DIRECT) ELISA

Serve a misurare la presenza di un antigene



INDIRECT ELISA

Serve a misurare la presenza di anticorpi diretti
contro uno specifico antigene



Letto di piastre multipozzetto

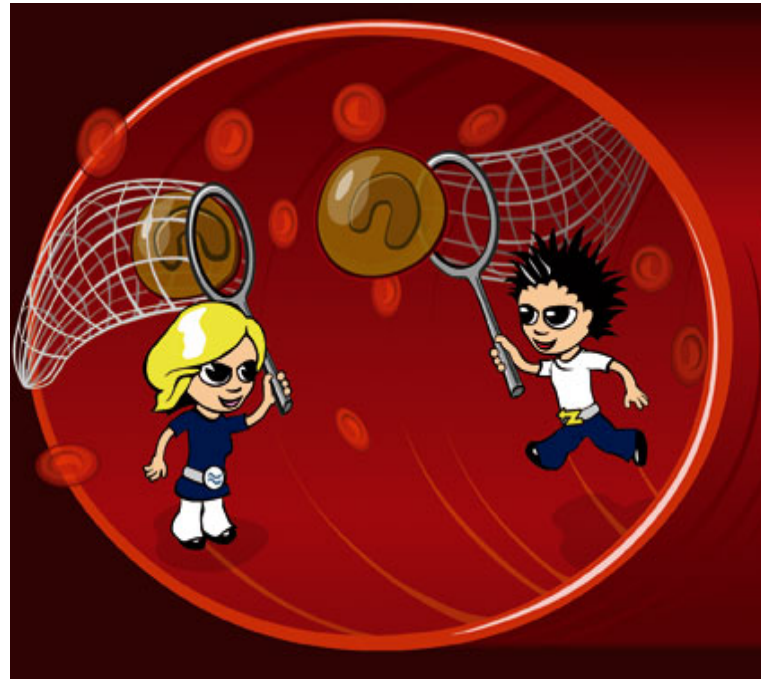
Legge Assorbanza, Luminescenza, Fluorescenza



**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

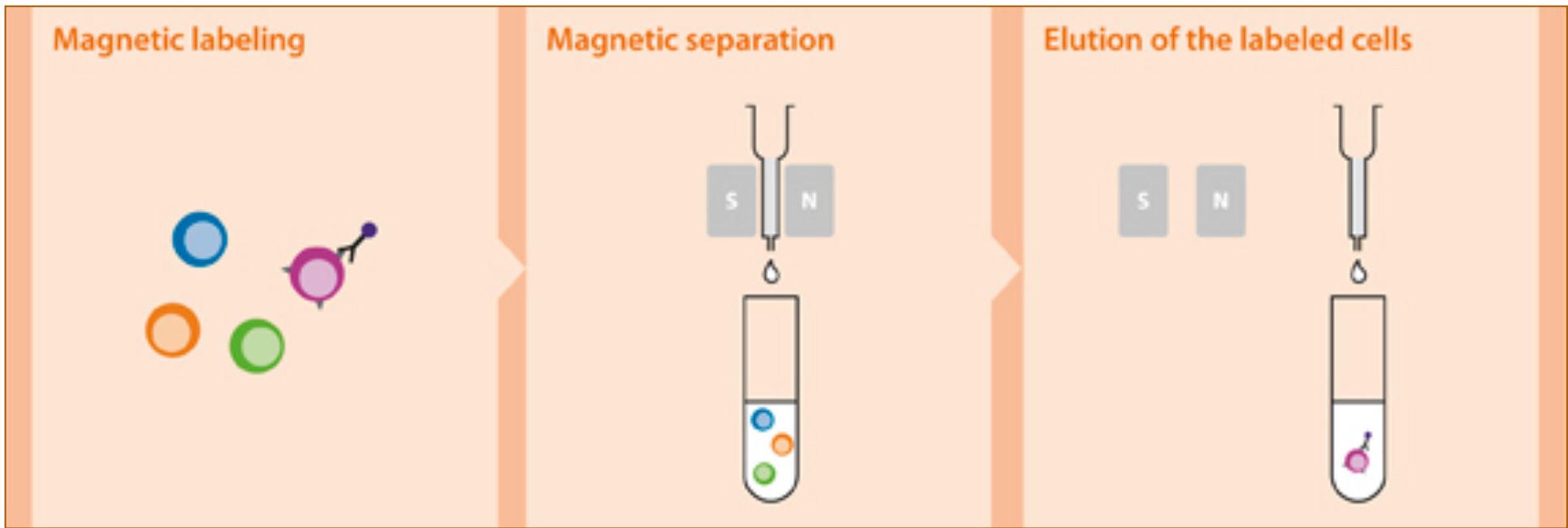
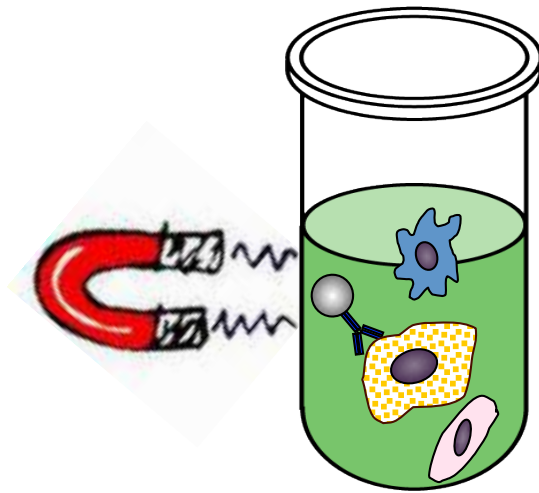
**TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
per la PURIFICAZIONE
DI CELLULE**

Purificazione di specifici tipi cellulari

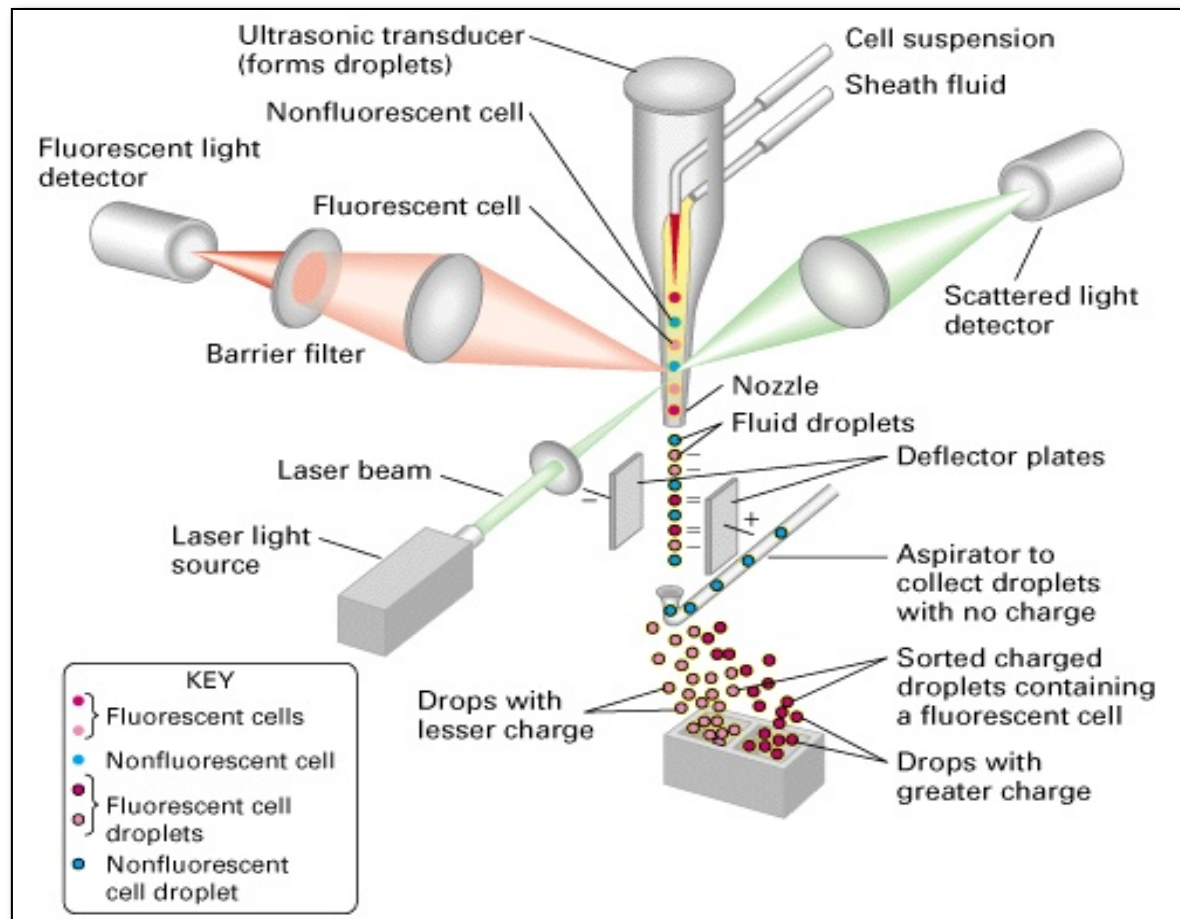


- 1) **FACS:**
purificazione di cellule riconosciute con anticorpi o molecole fluorescenti specifiche
- 2) **Immunopurificazione magnetica:**
Un anticorpo coniugato ad una biglia magnetica può essere usato per immunopurificare cellule mediante un magnete.

Anticorpi specifici per antigeni di superficie coniugati a microbeads magnetiche si utilizzano per purificare specifiche popolazioni cellulari.



Citofluorimetro/FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)



Il citofluorimetro valuta:
- numero di cellule
- intensità di fluorescenza

- E' possibile utilizzare **cellule vive** (antigeni di membrana), o **cellule fissate e permeabilizzate**

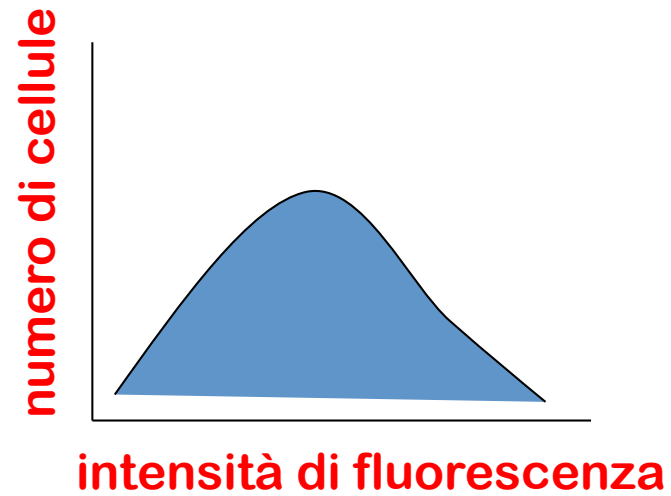
- Si può effettuare una **colorazione con :**

- 1) opportuni **anticorpi** primario e secondario (**coniugato con fluorocromo**)

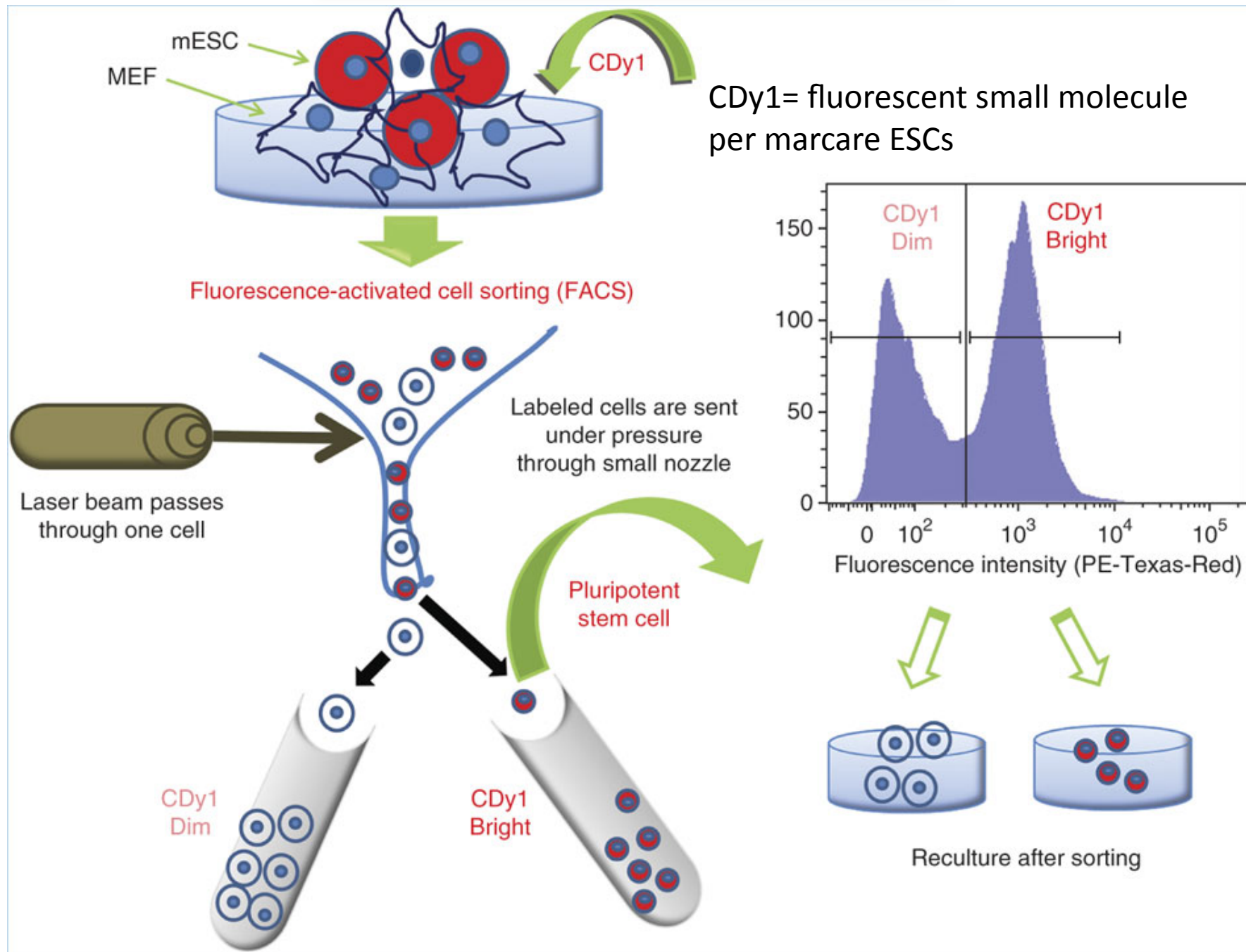
- 2) **sostanze fluorescenti** che legano specifiche molecole cellulari

Lo strumento produce diversi tipi di OUTPUT

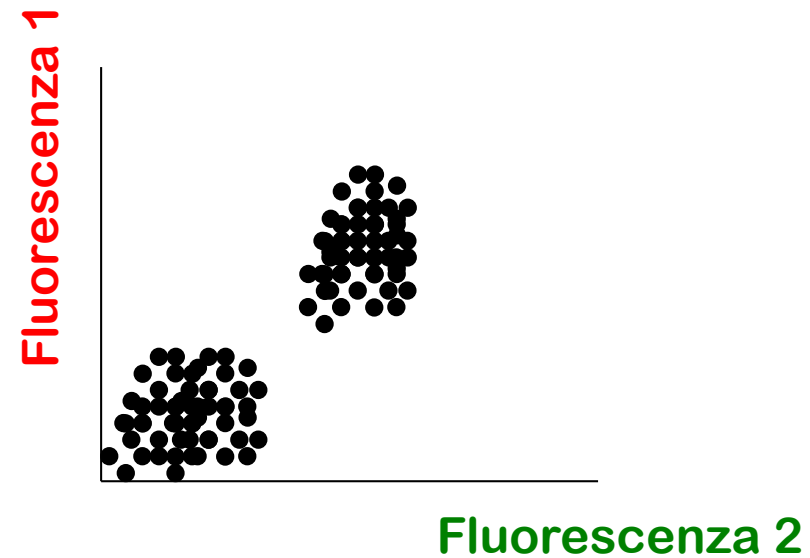
- 1) **istogramma monoparametrico**, in cui l'intensità di fluorescenza è riportata in funzione del numero di cellule



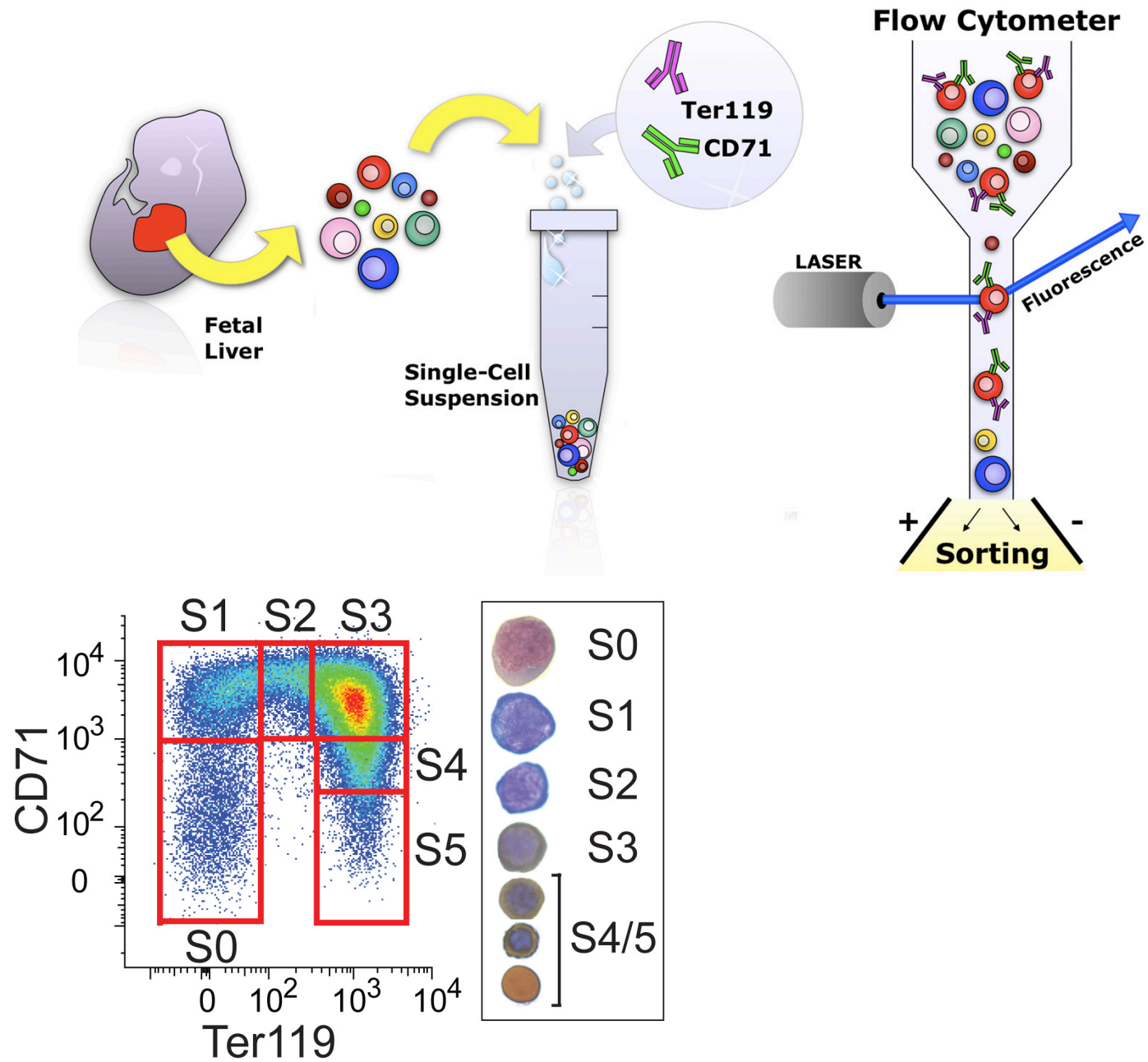
Isolamento di cellule staminali



2) In alternativa lo strumento produce un **dot plot**, in cui un parametro è riportato in funzione di un altro (es. fluorescenza **rossa** vs fluorescenza **verde**)



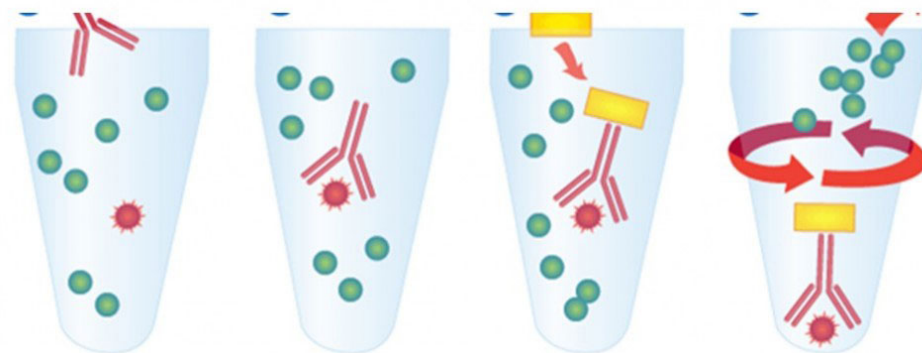
Studio di popolazioni cellulari durante l'emopoiesi



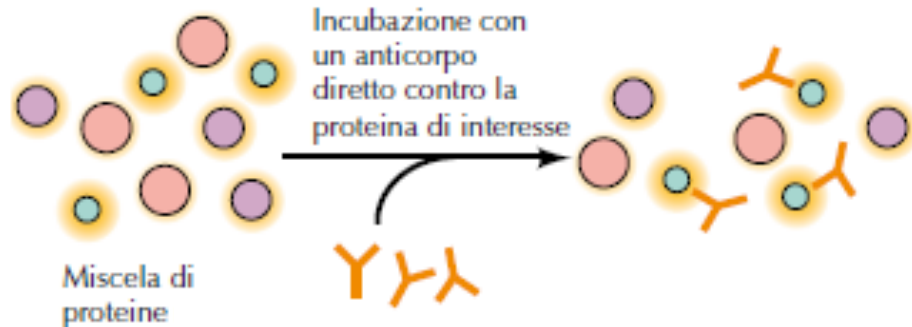
**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

**TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
per la PURIFICAZIONE
di ANTIGENI**

Immunoprecipitazione: tecnica per la purificazione di proteine

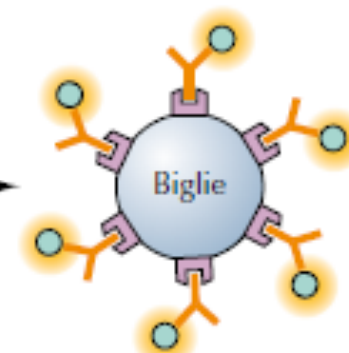
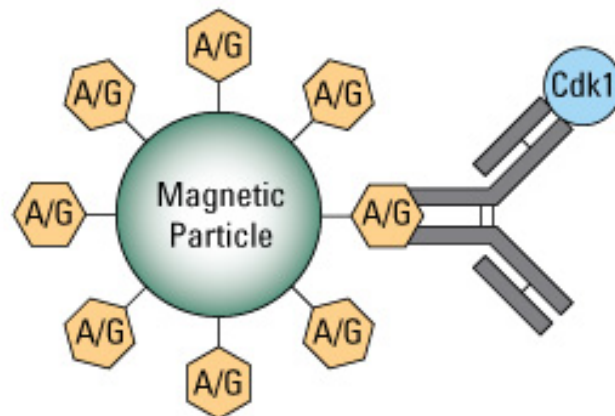


Lisato cellulare



Legame a un anticorpo specifico per la proteina di interesse

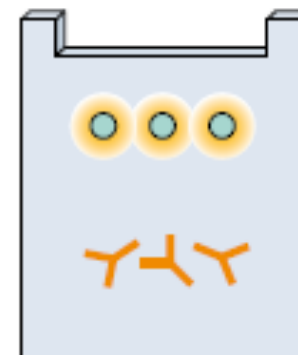
Raccolta dei complessi antigene-anticorpo



I complessi antigene-anticorpo si legano alle biglie

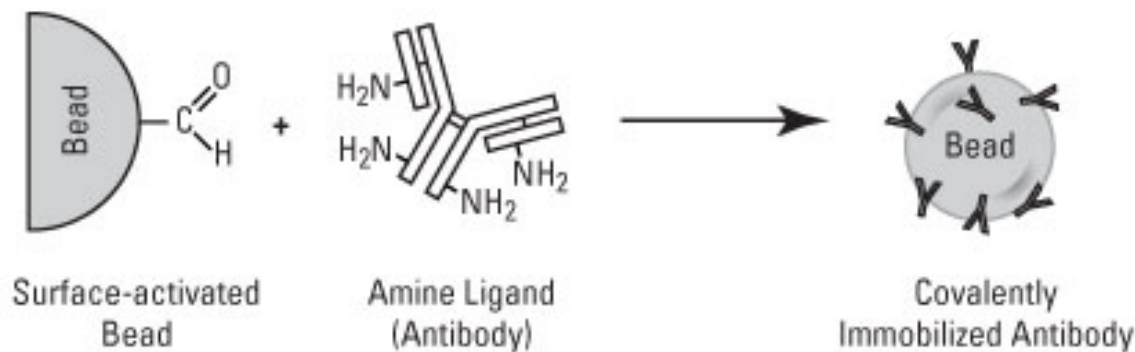
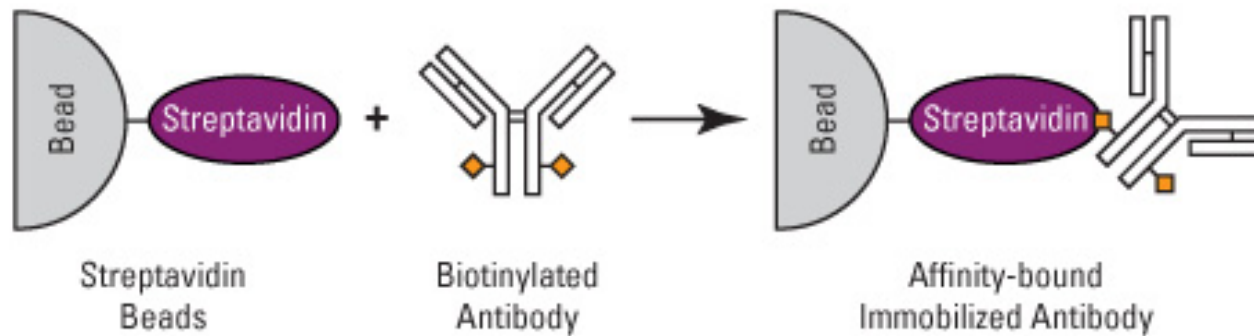
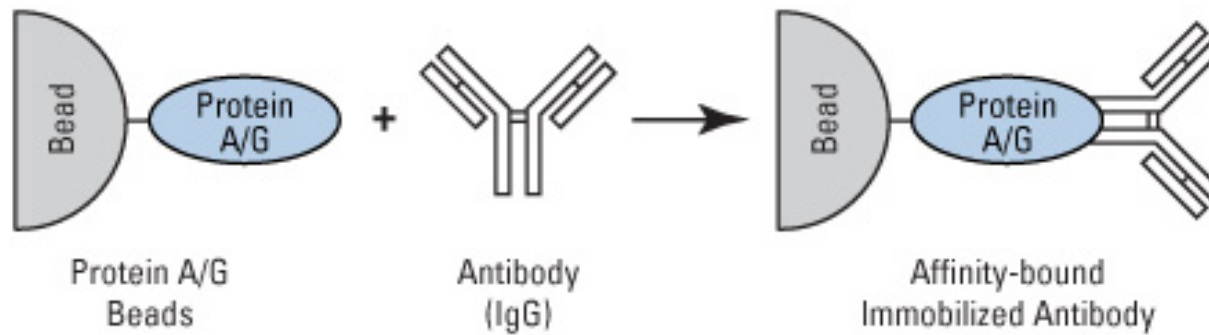
Dissociazione delle proteine in seguito ad ebollizione

Elettroforesi su gel



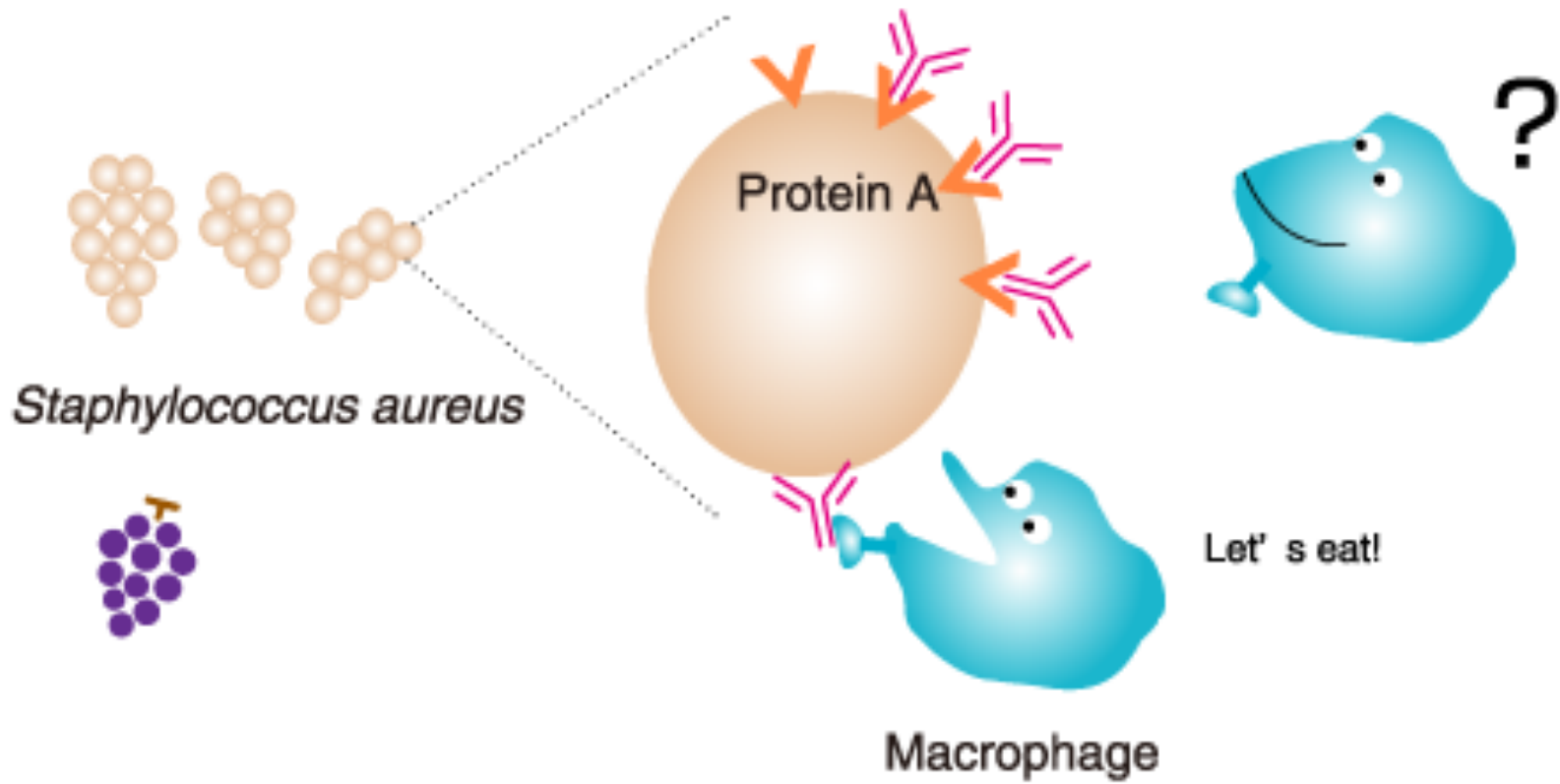
Migrazione

Legame degli anticorpi alle beads



**Legame degli anticorpi alle beads:
proteina A, proteina G, proteina A/G**

Immune evasion by *Staphylococcus aureus*



Visualizzazione delle proteine immunoprecipitate: western blotting

Tecnica che prevede il **riconoscimento mediante anticorpi specifici** di proteine previamente sottoposte ad **elettroforesi**.

Permette di ottenere informazioni su:

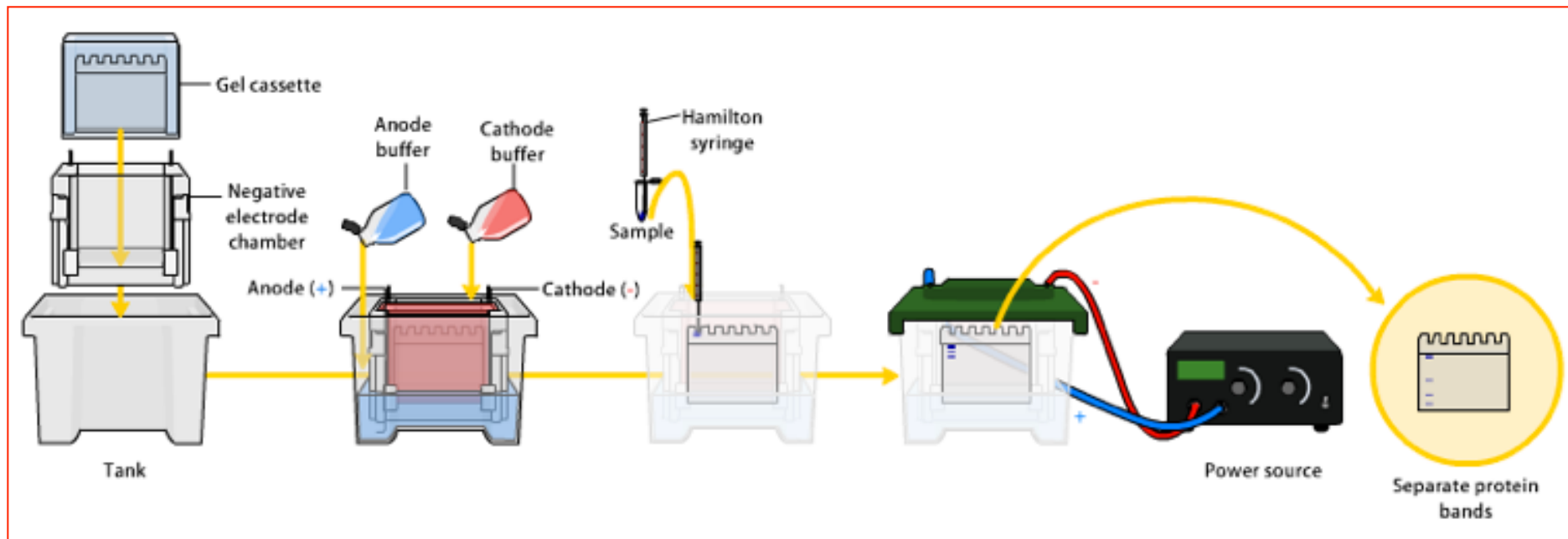
Massa molecolare (velocità di migrazione)

Livelli di espressione

Modificazioni post-traduzionali (Ab specifici)

Localizzazione subcellulare (dopo frazionamento)

Interazioni con altre proteine

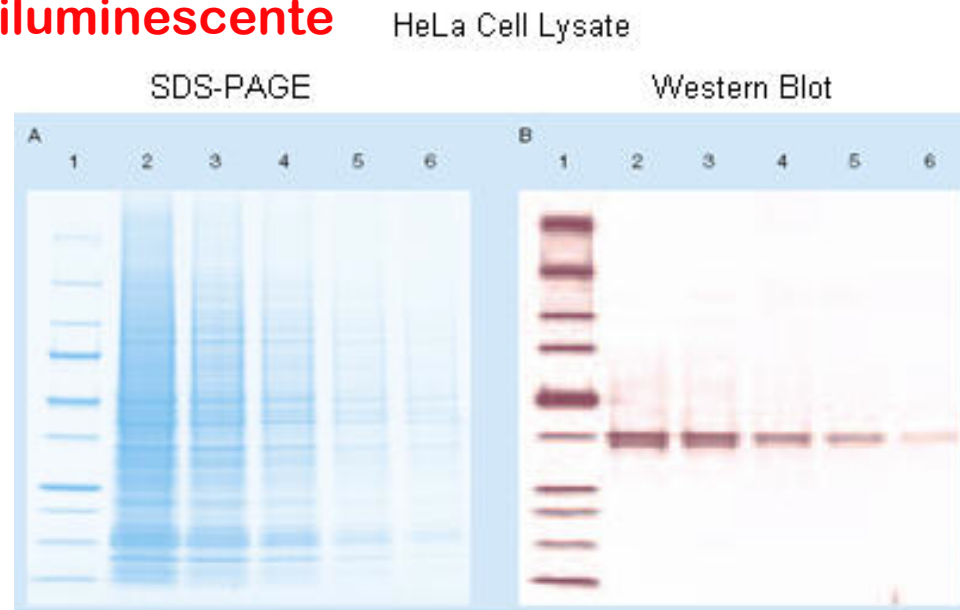


Poichè i gel di poliacrilamide sono supporti poco stabili e impenetrabili agli Ab , è necessario **trasferire le bande proteiche** su un supporto che le renda accessibili: di solito una **membrana** di nitrocellulosa, mediante un **campo elettrico trasversale**.

Il legame alla membrana è stabile e consente di effettuare **un'incubazione in fase liquida con un anticorpo primario specifico**, che riconoscerà specificamente la banda dell'antigene

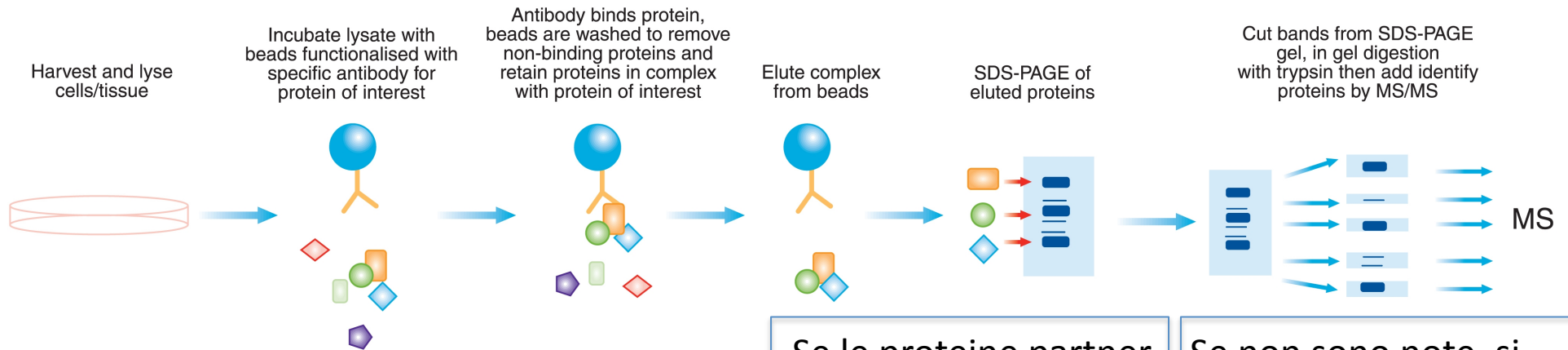
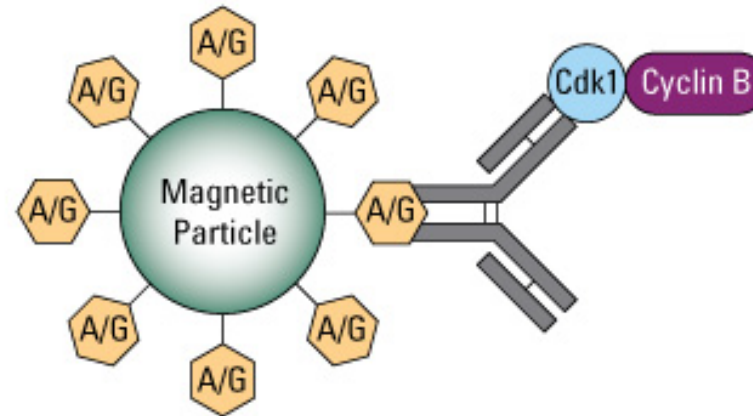
Si effettua successivamente un'incubazione con un **anticorpo secondario coniugato con un ENZIMA**

Reazione di **SVILUPPO**: incubazione con il **substrato** che sviluppa un **prodotto colorato o chemiluminescente**



Chemiluminescent Detection of CDK7
BioRad Bulletin 2032

Analisi dell'interazione proteina-proteina da lisato cellulare: co-immunoprecipitazione



Se le proteine partner sono note, si analizza mediante WB

Se non sono note, si sottopongono le bande dell'interattoma all'analisi mediante spettrometria di massa.