

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 9

**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

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

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

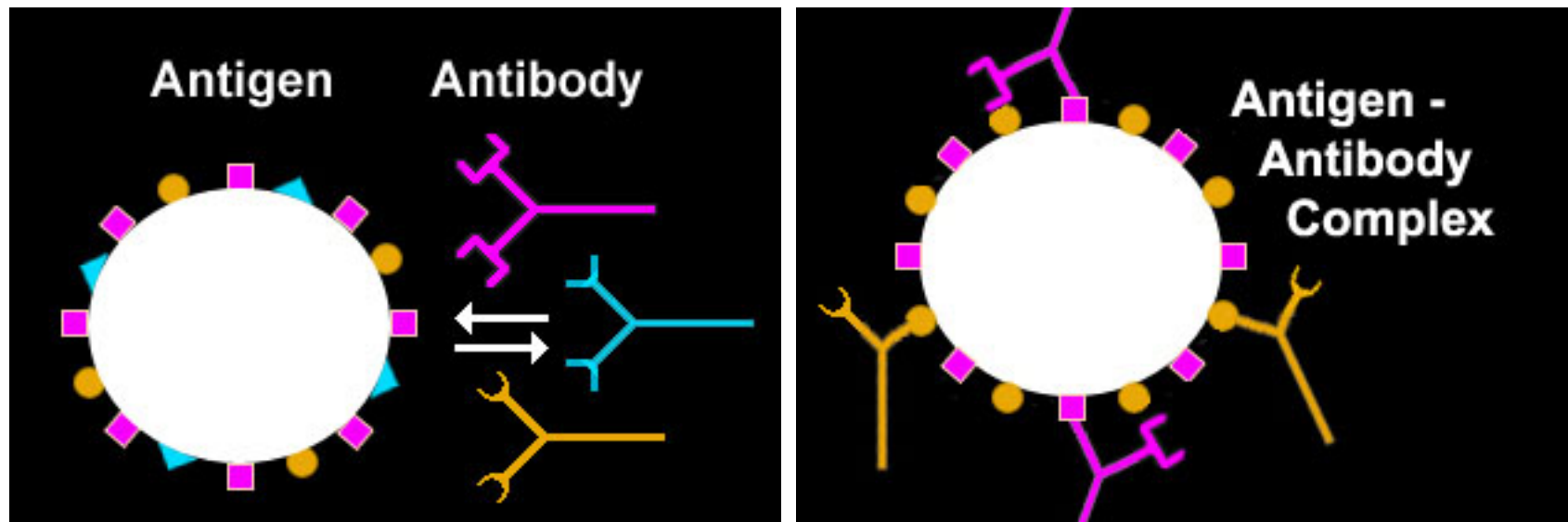
Possono essere usati come **SONDE** per:

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 un antigene**
 - ✓ **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)

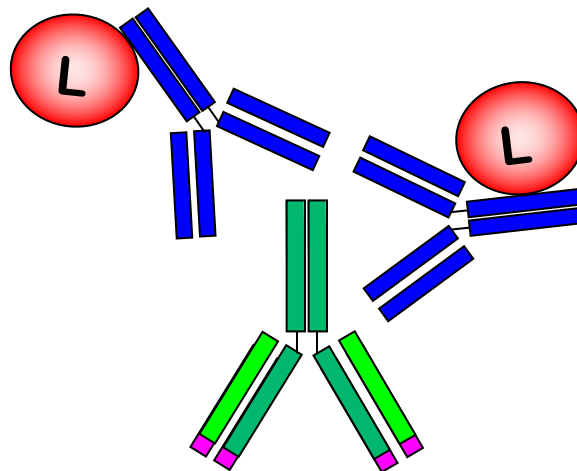
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE DIRETTE E INDIRETTE

Le tecniche **INDIRETTE** utilizzano un anticorpo secondario che riconosce la porzione costante dell'anticorpo primario

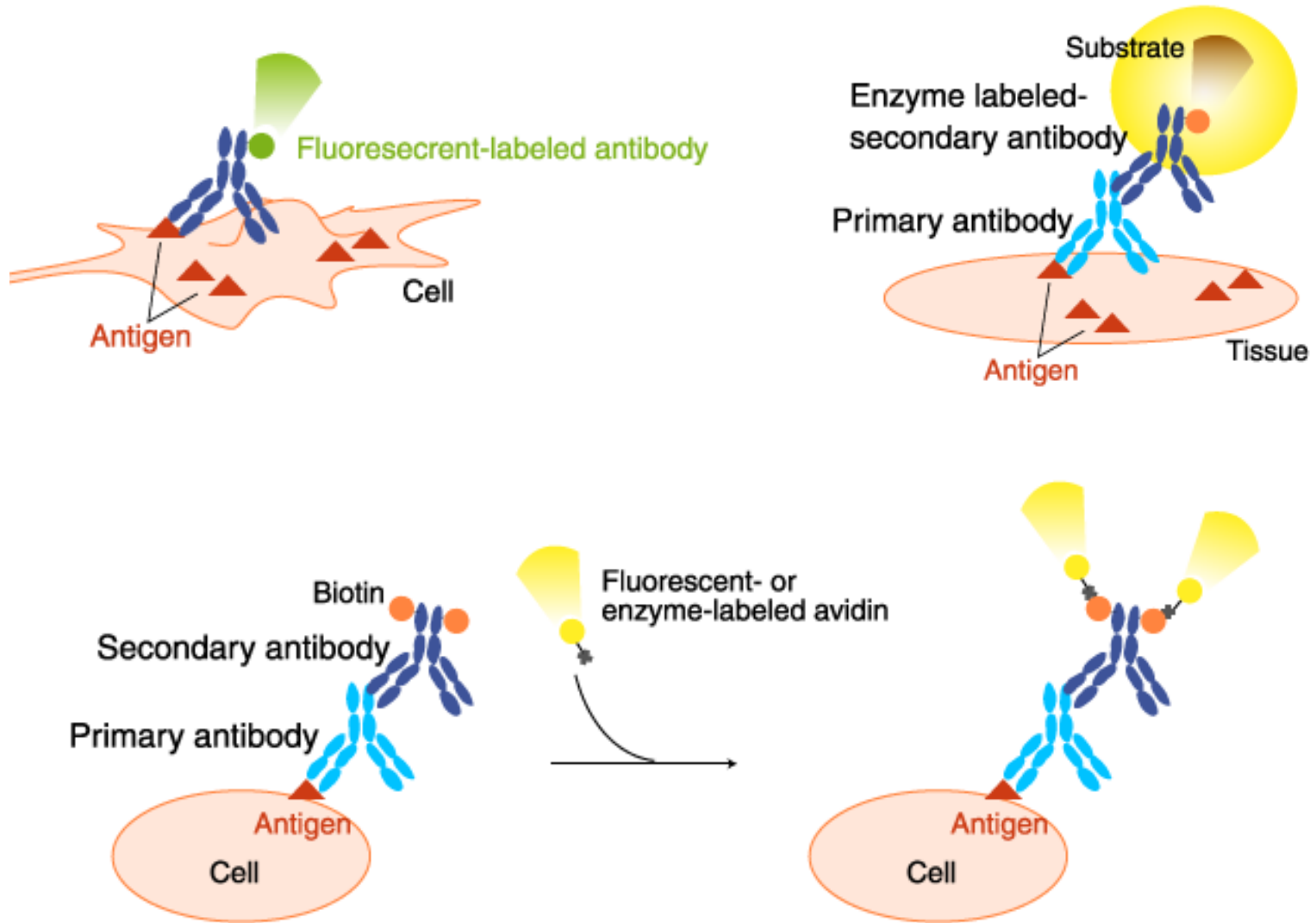
L'anticorpo primario (diretta) oppure quello secondario (indiretta) può essere **coniugato** ad un enzima o ad un fluorocromo

VANTAGGI delle tecniche **INDIRETTE**:

- si possono utilizzare pochi Ab secondari marcati per moltissimi Ab primari diversi
- il rapporto Ab primario /Ab secondario è $> 1:1$, si ha quindi un'amplificazione del segnale



CONIUGAZIONE degli anticorpi



APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI IN BIOLOGIA CELLULARE:

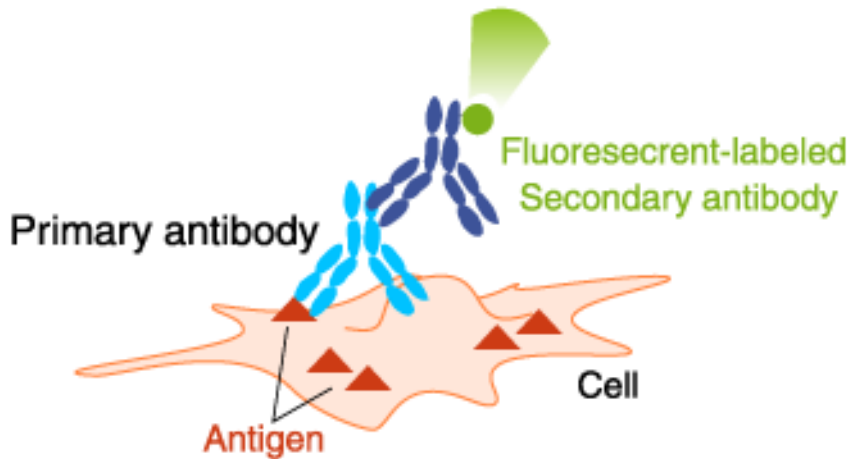
**TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
per la RILEVAZIONE
e il DOSAGGIO di ANTIGENI**

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

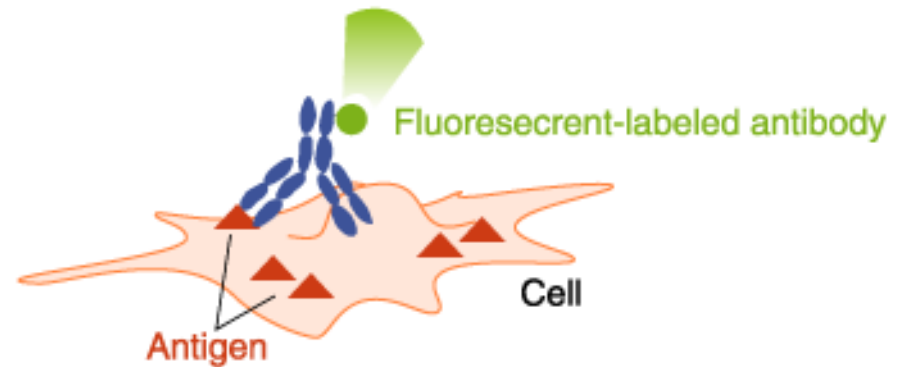
Immunofluorescenza

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

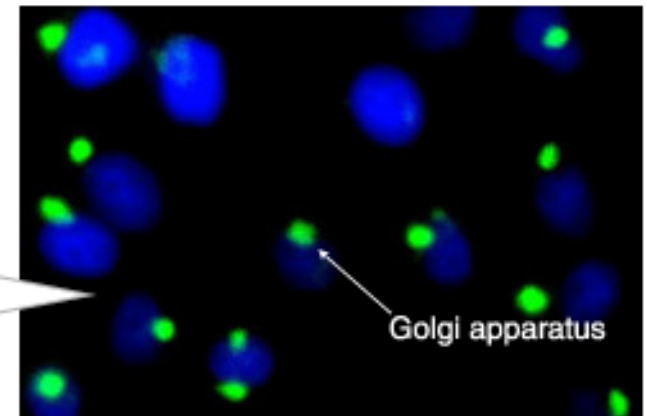
HeLa cells were stained with an antibody to the Golgi protein GM130.



Staining with a direct-labeled antibody

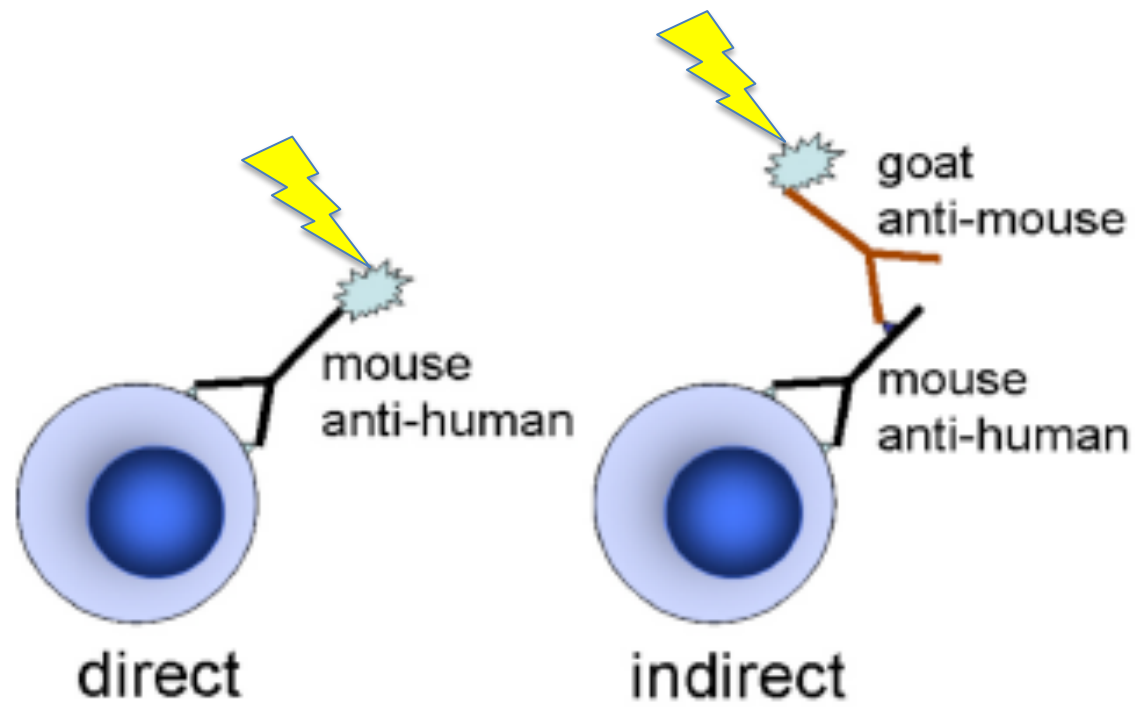


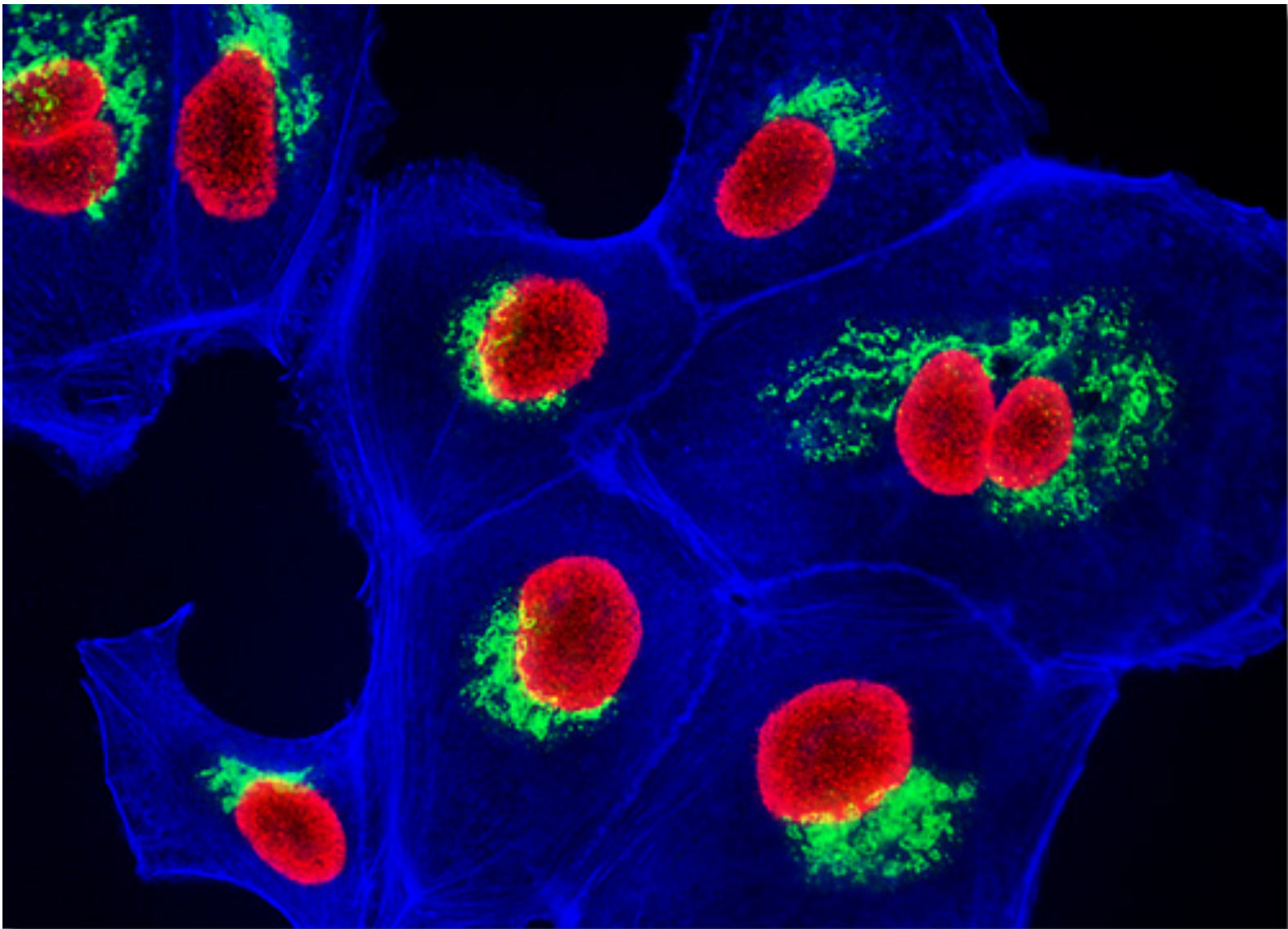
Green fluorescence of the fluorophore of the direct-labeled antibody (Alexa Fluor® 488) is observed by a fluorescence microscope.



Sample: HeLa cells

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





The close proximity between the Golgi complex and nuclei in the Madin-Darby canine kidney cell culture illustrated above was probed in a double immunofluorescence experiment with mouse anti-NPCP (nuclear pore complex protein) and rabbit anti-giantin (Golgi complex) primary antibodies. The antibody targets were visualized with goat secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 568 and Alexa Fluor 488, respectively, while the actin cytoskeletal framework was labeled with Alexa Fluor 350 conjugated to phalloidin.

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, es. Triton X-100)
- ✓ **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

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.

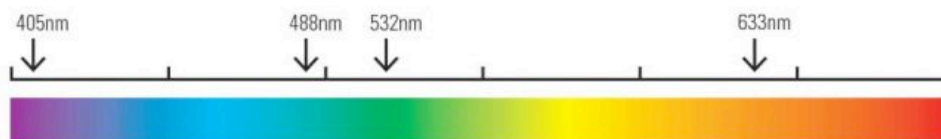
Even if FITC and TRITC are still in use, they are rather weak fluorescent dyes and not recommended for state of the art microscopy. Their profit is based on their economical price.

Cyanines

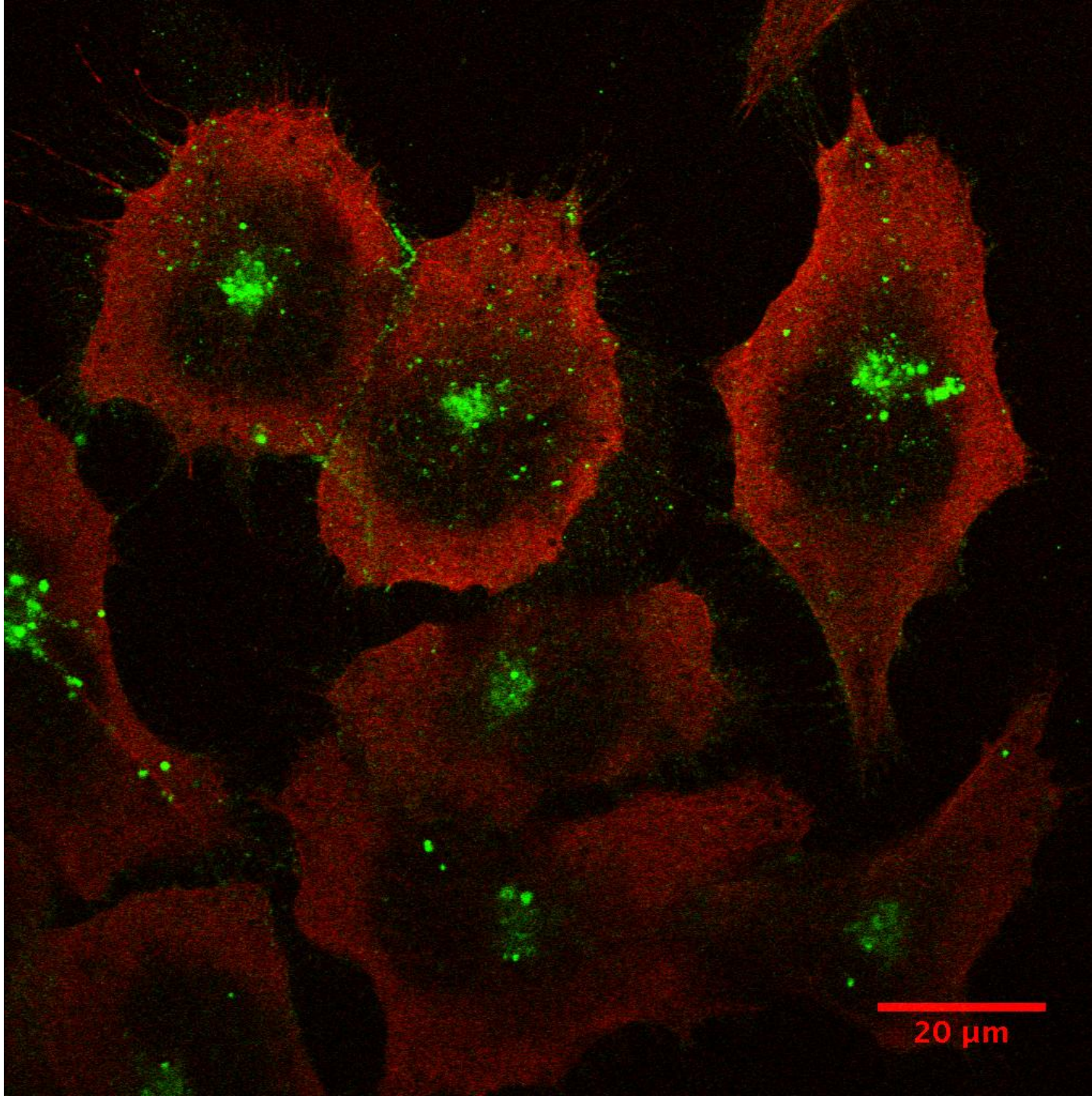
This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups.

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

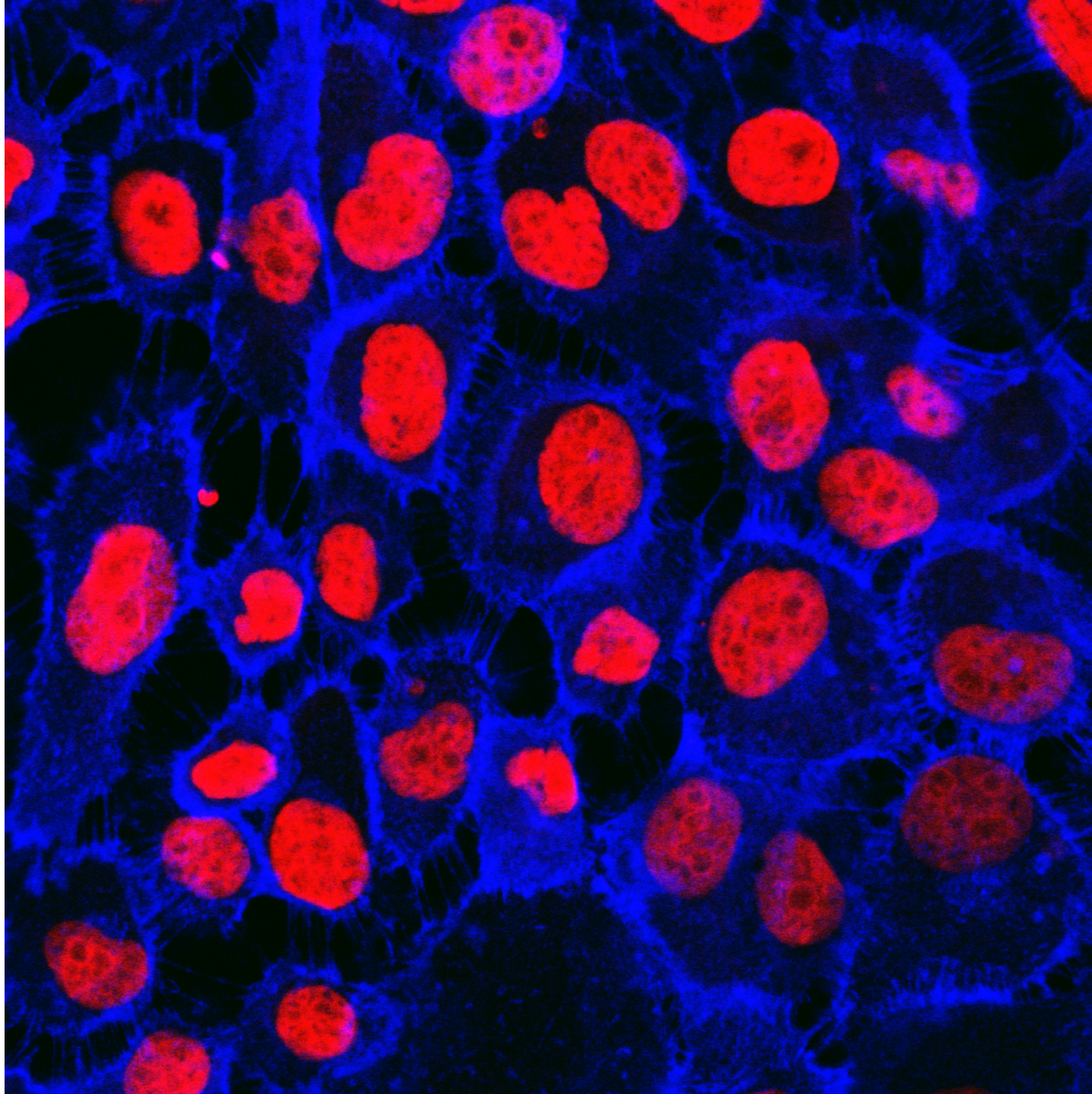


**Cellule umane
derivate
da tumore
al polmone
in coltura**

**Alfa tubulina -
RITC
Gamma tubulina
- FITC**

**Immagine al
microscopio a
fluorescenza**

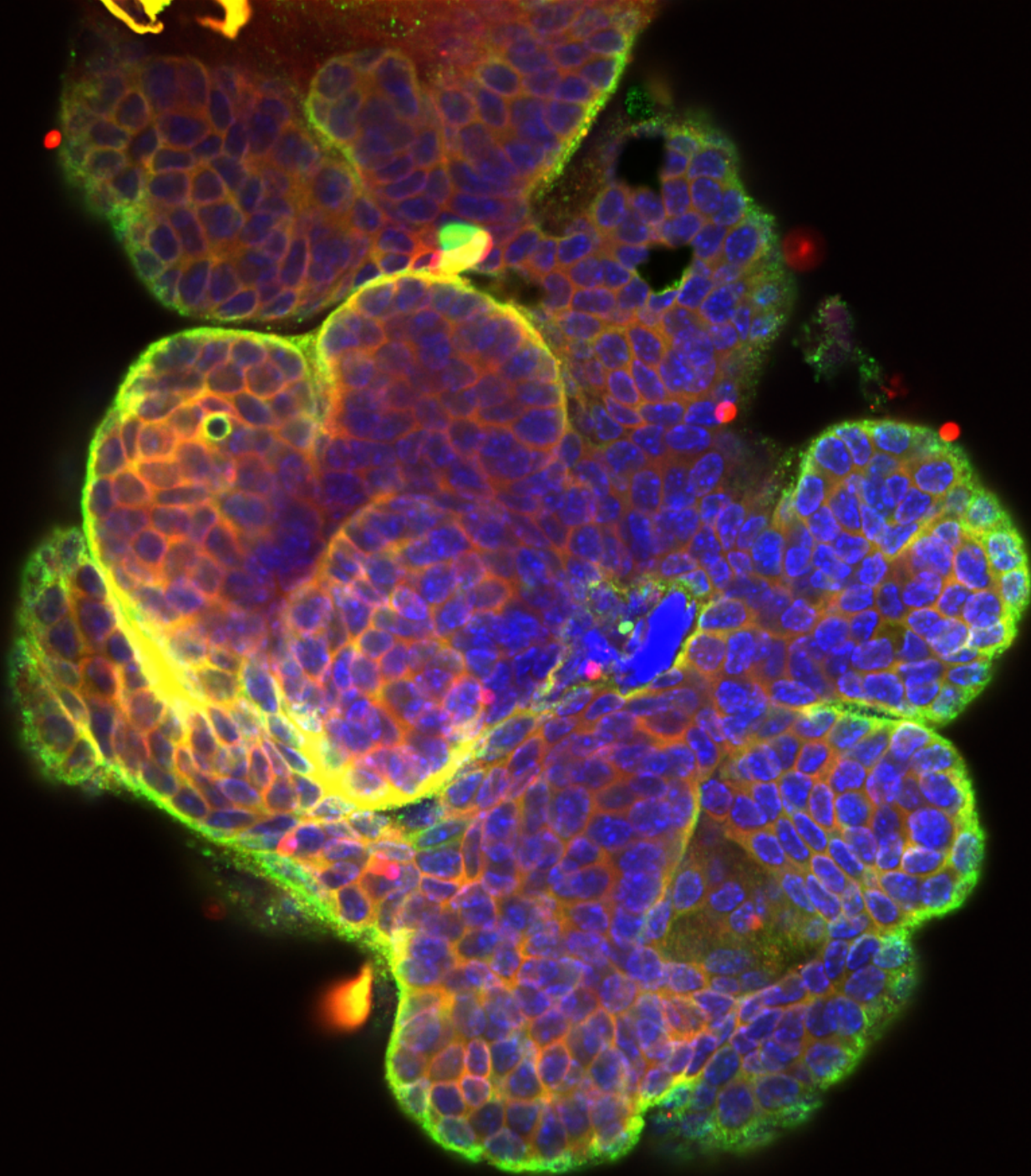
20 μ m



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

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

**Immagine al
microscopio a
fluorescenza**



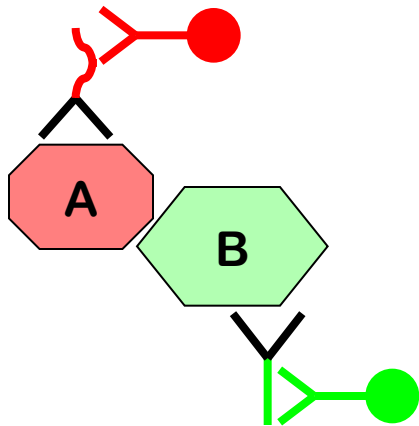
**Organoide
derivato da
tessuto epiteliale
mammario di
topo**


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


**Immagine al
microscopio a
fluorescenza
confocale**

Riconoscimento di antigeni multipli

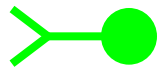
è possibile analizzare contemporaneamente **diversi antigeni**, utilizzando **anticorpi primari** diretti contro diverse proteine e prodotti in **animali diversi** (oppure monoclonali con **diverso isotipo**) e quindi **anticorpi secondari** **specie-specifici** (o **isotipo-specifici**) coniugati a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



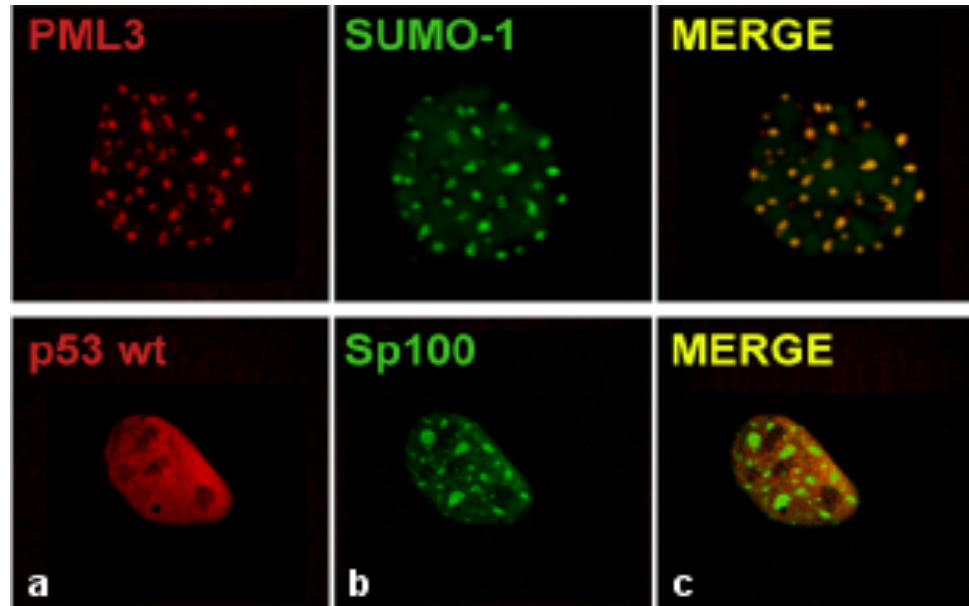
 Anticorpo primario anti-A prodotto in topo:
Fc specifico di topo

 Anticorpo secondario **anti-Fc di topo**
coniugato a rodamina

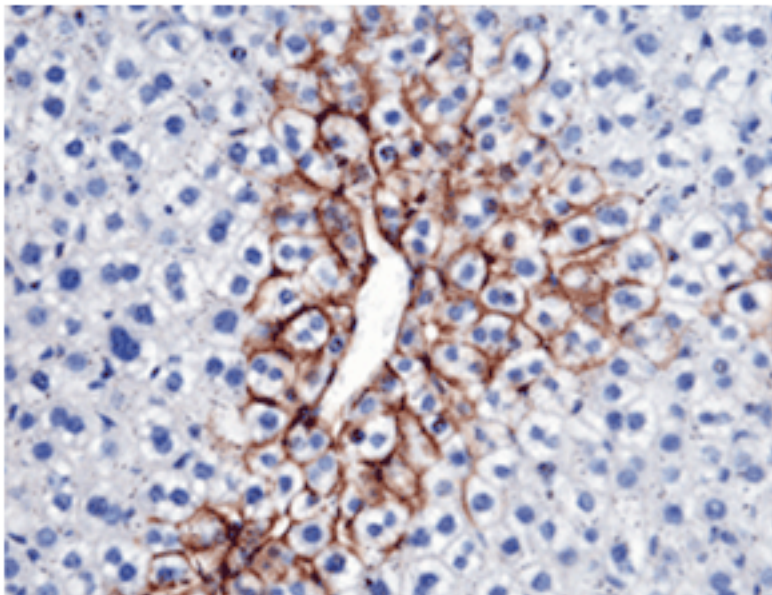
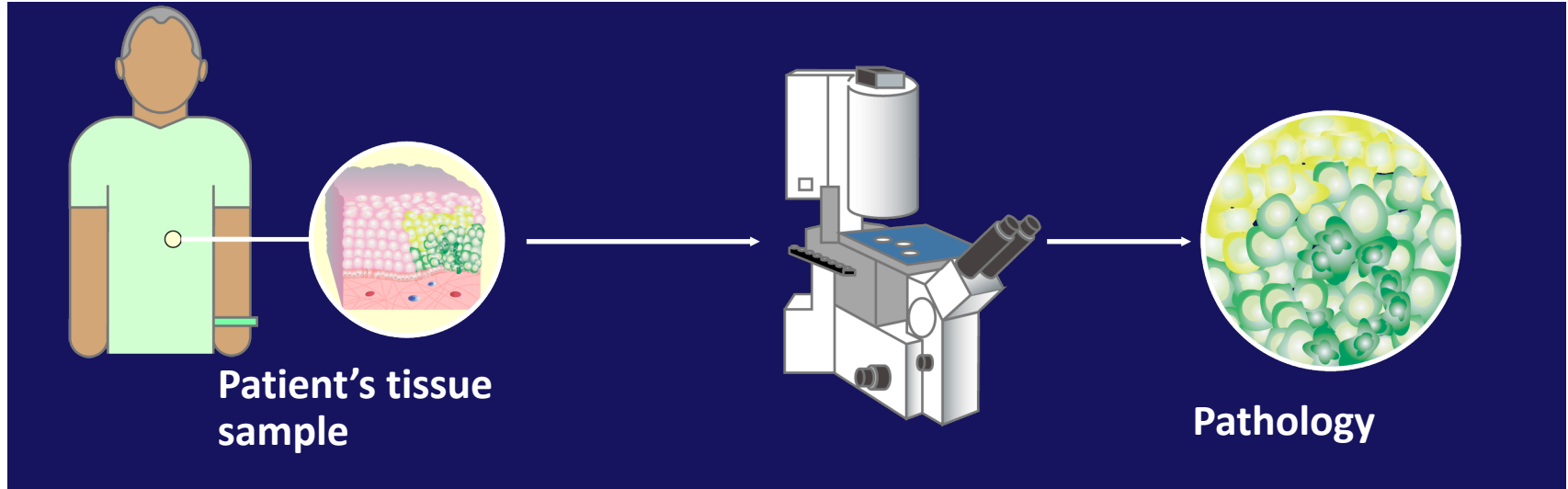
 Anticorpo primario anti-B
prodotto in coniglio:
Fc specifico di coniglio



Anticorpo secondario
anti-Fc di coniglio
coniugato a fluoresceina



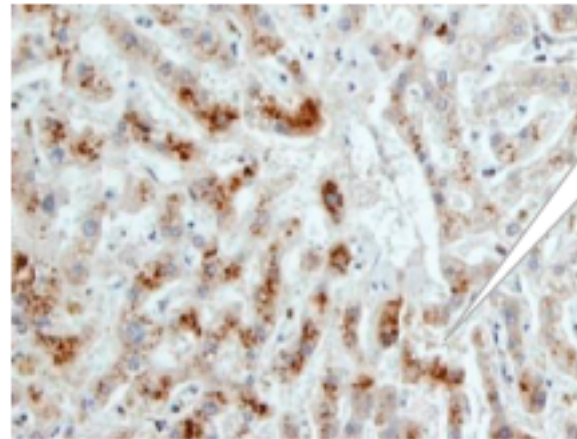
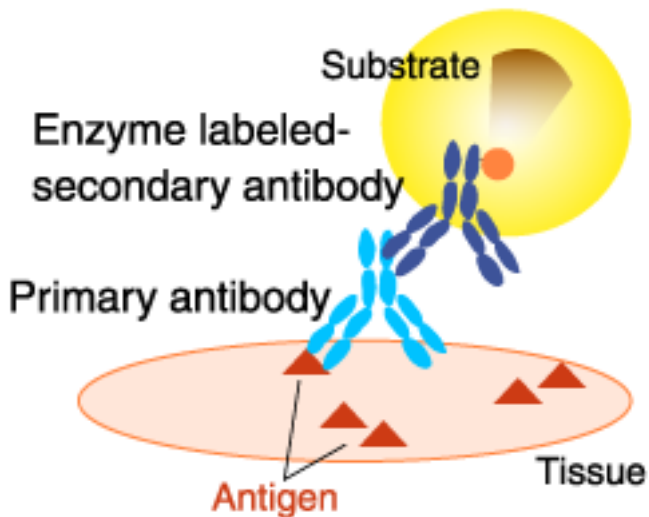
Utilizzo di anticorpi per il riconoscimento di antigeni nei tessuti



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)

Osservazione al microscopio ottico 18

ANALISI di antigeni in campioni di tessuto Mediante IMMUNO-ISTOCHEMICA



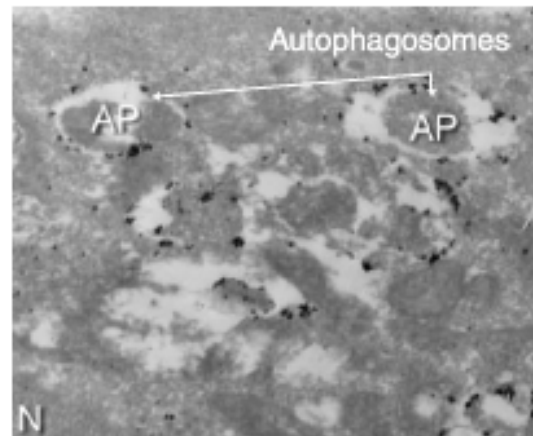
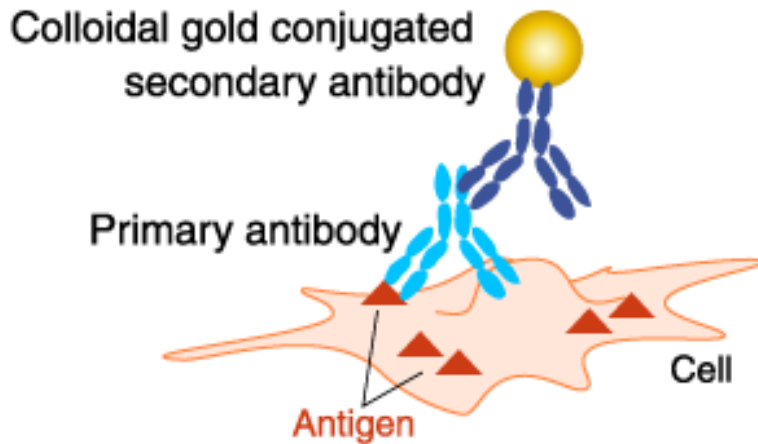
Sample: Human liver tissue section

The brown color, generated in the reaction between the substrate DAB and an HRP-labeled secondary antibody, is observed by light microscopy.

Enzyme name	Chromogenic substrate
HRP (Horseradish peroxidase)	DAB and TMB
AP (Alkaline phosphatase)	BCIP/NBT and pNPP

Coniugazione con ORO COLLOIDALE per analisi mediante MICROSCOPIA ELETTRONICA

Immunoelectron micrograph of autophagosomes detected using the marker LC3



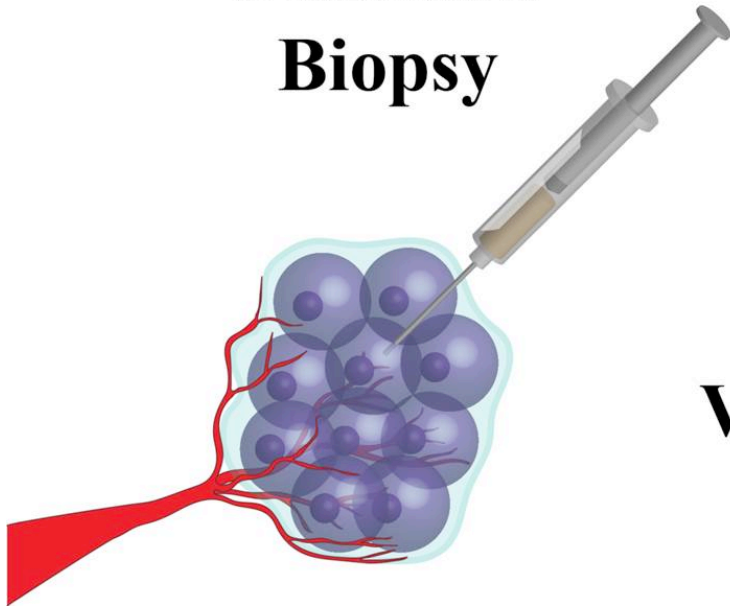
Sample: MEF cells (starved condition)

Colloidal gold (black dots), labeled on the secondary antibody, is observed by electron microscopy.

The data were kindly provided by Dr. Noboru Mizushima of the University of Tokyo.

Analisi di antigeni circolanti: BIOPSIA LIQUIDA

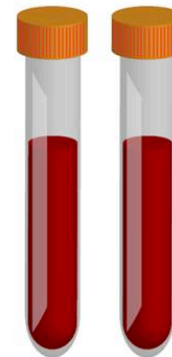
Standard Biopsy



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

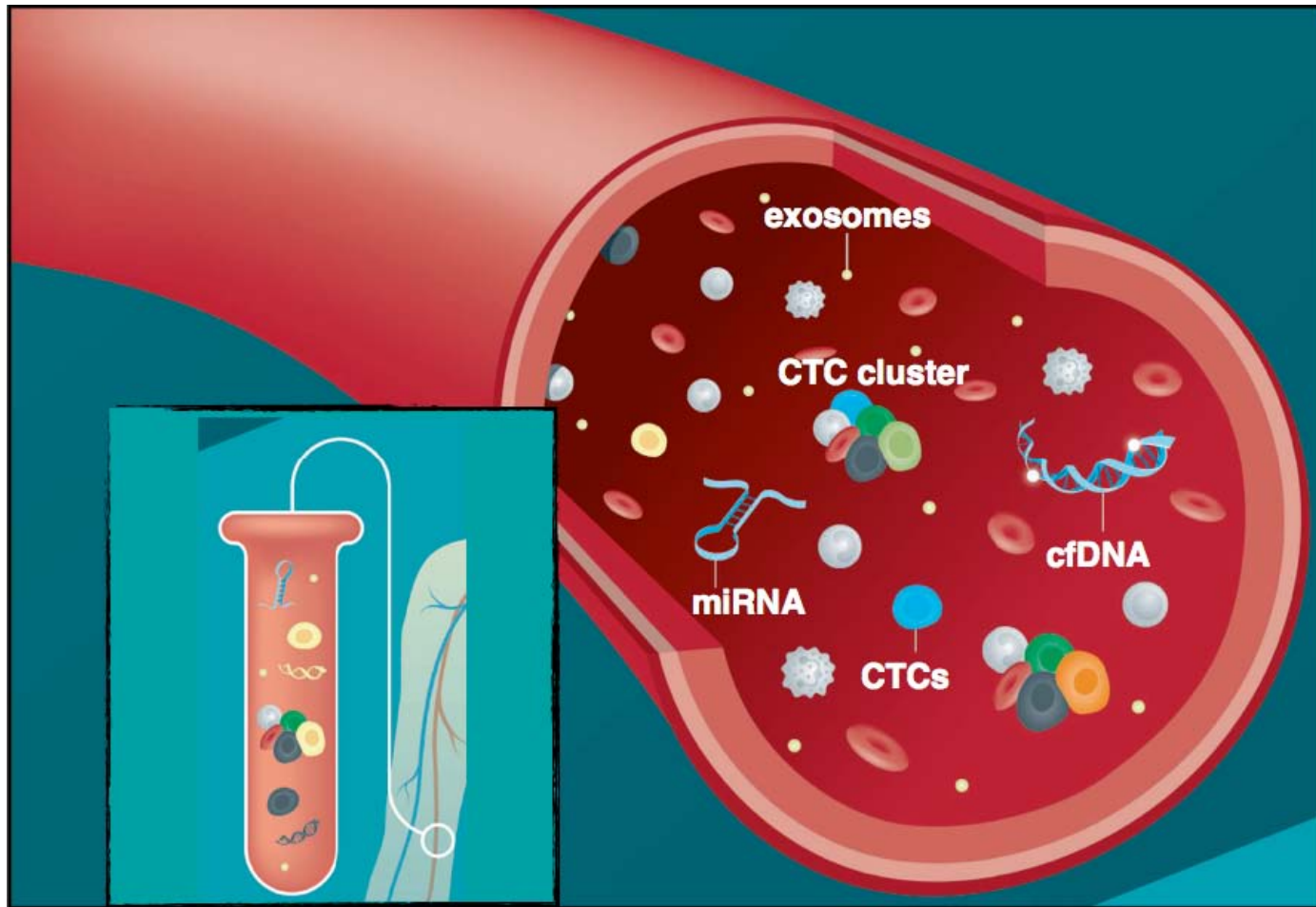
VS.

Liquid Biopsy



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

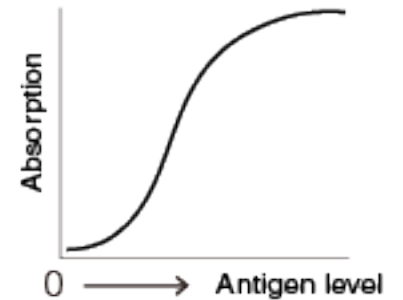
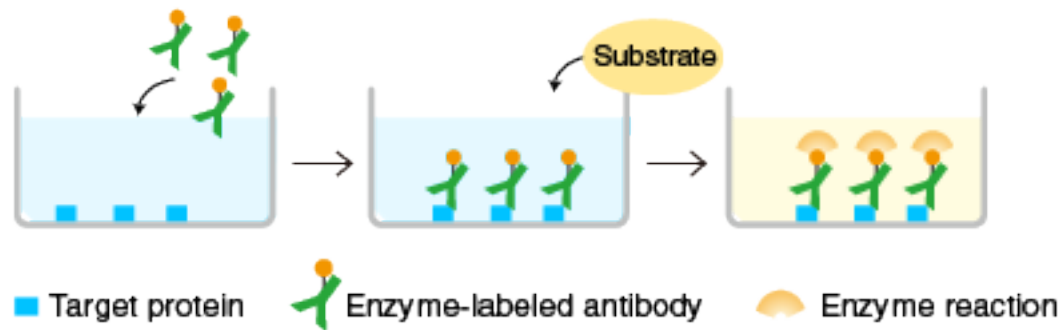
Analisi di antigeni circolanti: BIOPSIA LIQUIDA



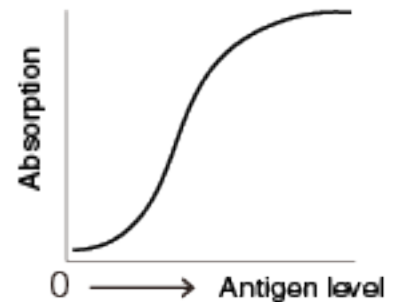
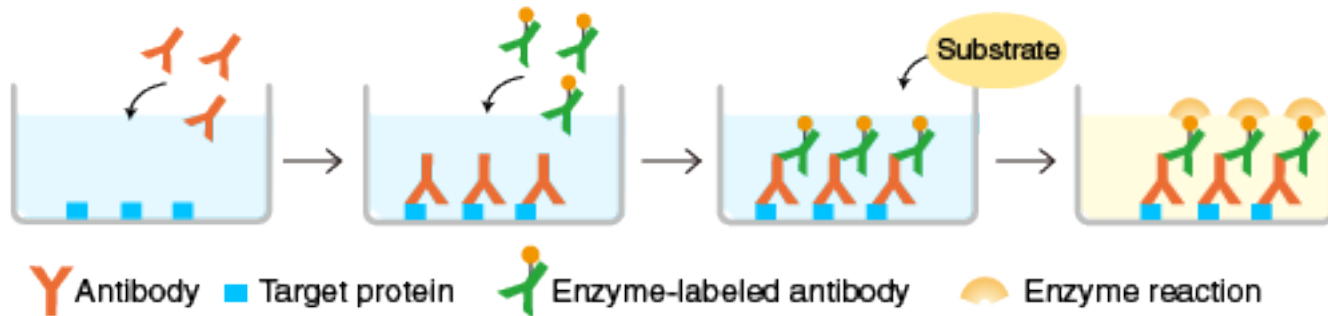
Rilevazione di proteine (antigeni o anticorpi) in soluzione mediante ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

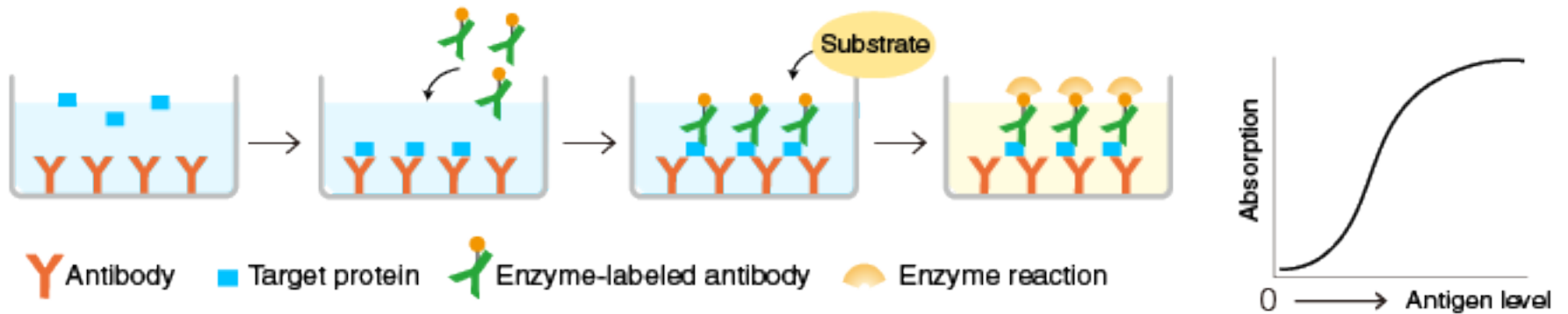
DIRECT ELISA



INDIRECT ELISA



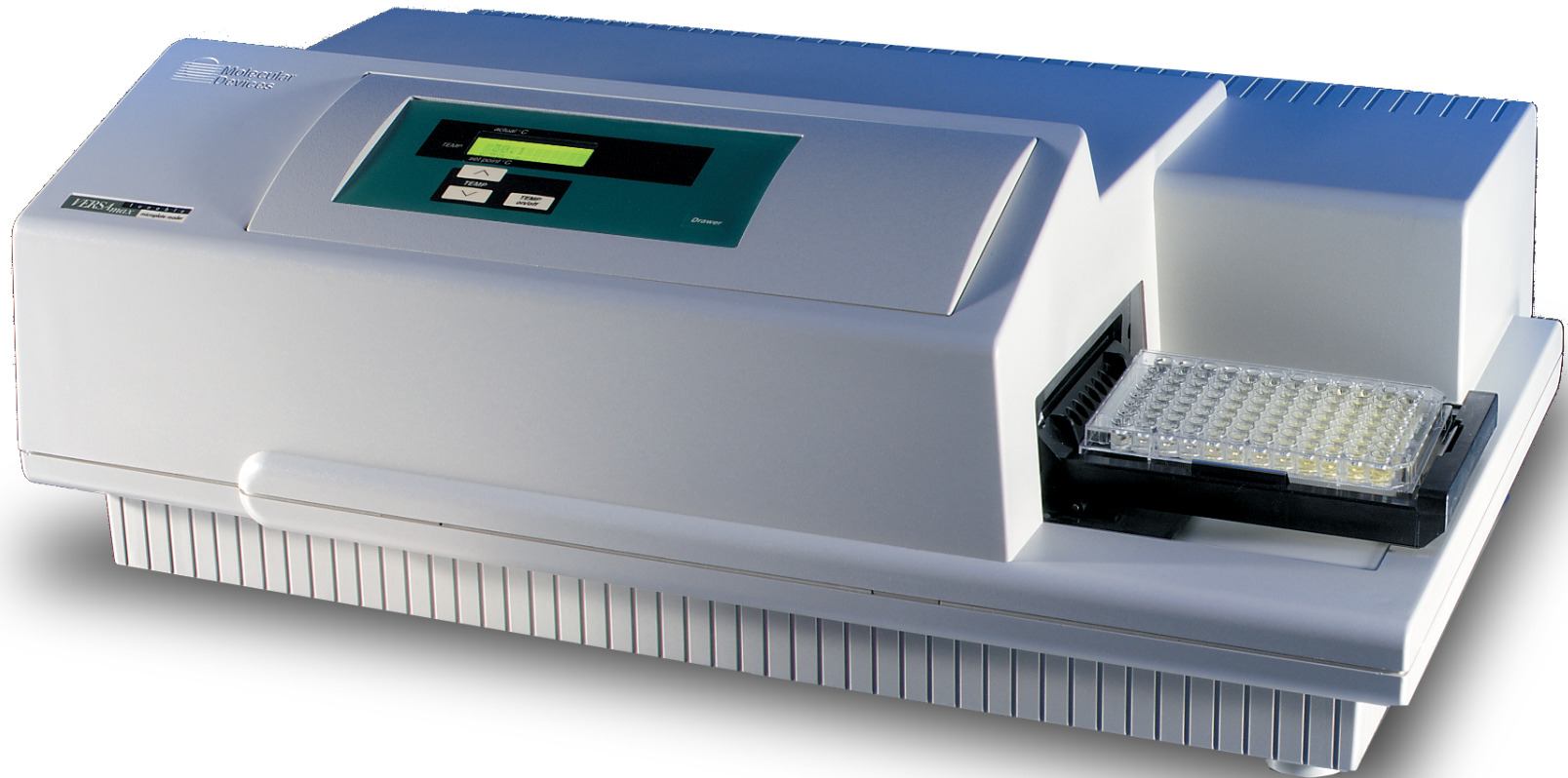
SANDWICH ELISA



Compared to direct ELISA, the sandwich ELISA (combining antibodies to two different epitopes on the target protein) has a higher specificity. Sandwich ELISA is useful for applications that require a high accuracy

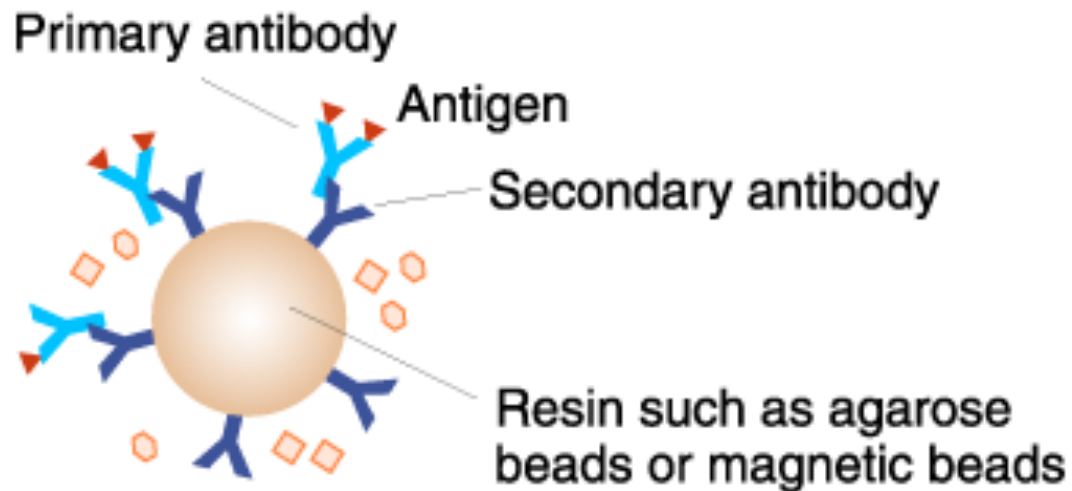
Letto di piastre multipozzetto

Legge Assorbanza, Luminescenza, Fluorescenza

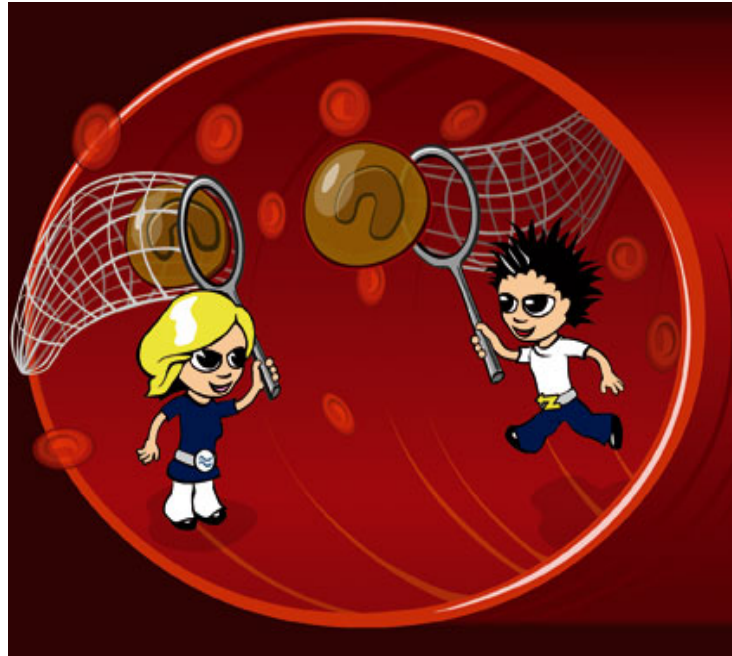


APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI IN BIOLOGIA CELLULARE:

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE per la PURIFICAZIONE DI CELLULE



Purificazione di specifici tipi cellulari



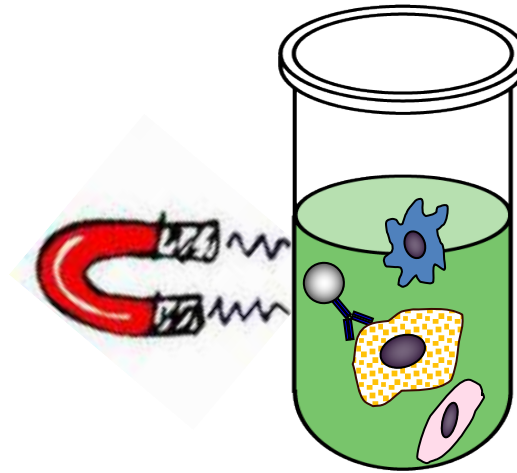
1) **Immunopurificazione magnetica:**

Un anticorpo coniugato ad una biglia metallica può essere usato per immunopurificare cellule mediante un magnete.

2) **FACS:**

purificazione di cellule riconosciute con anticorpi o molecole fluorescenti specifiche

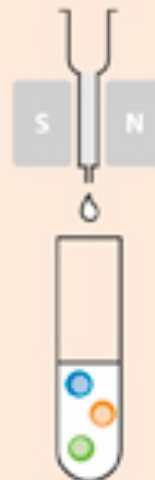
**Anticorpi specifici per antigeni di superficie
coniugati a microbeads magnetiche
si utilizzano per purificare specifiche popolazioni cellulari.**



Magnetic labeling



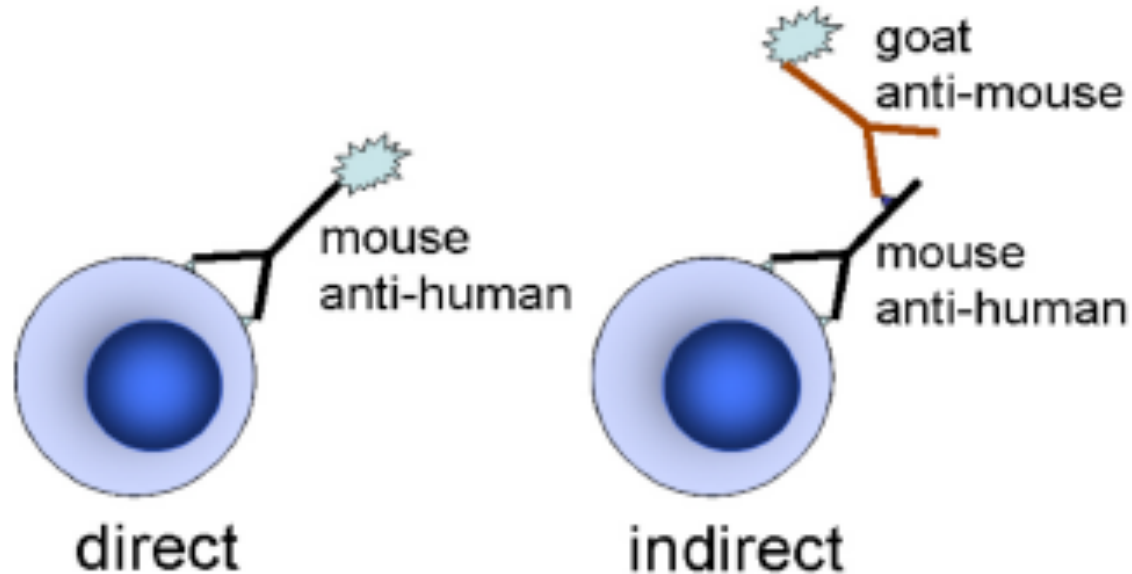
Magnetic separation



Elution of the labeled cells

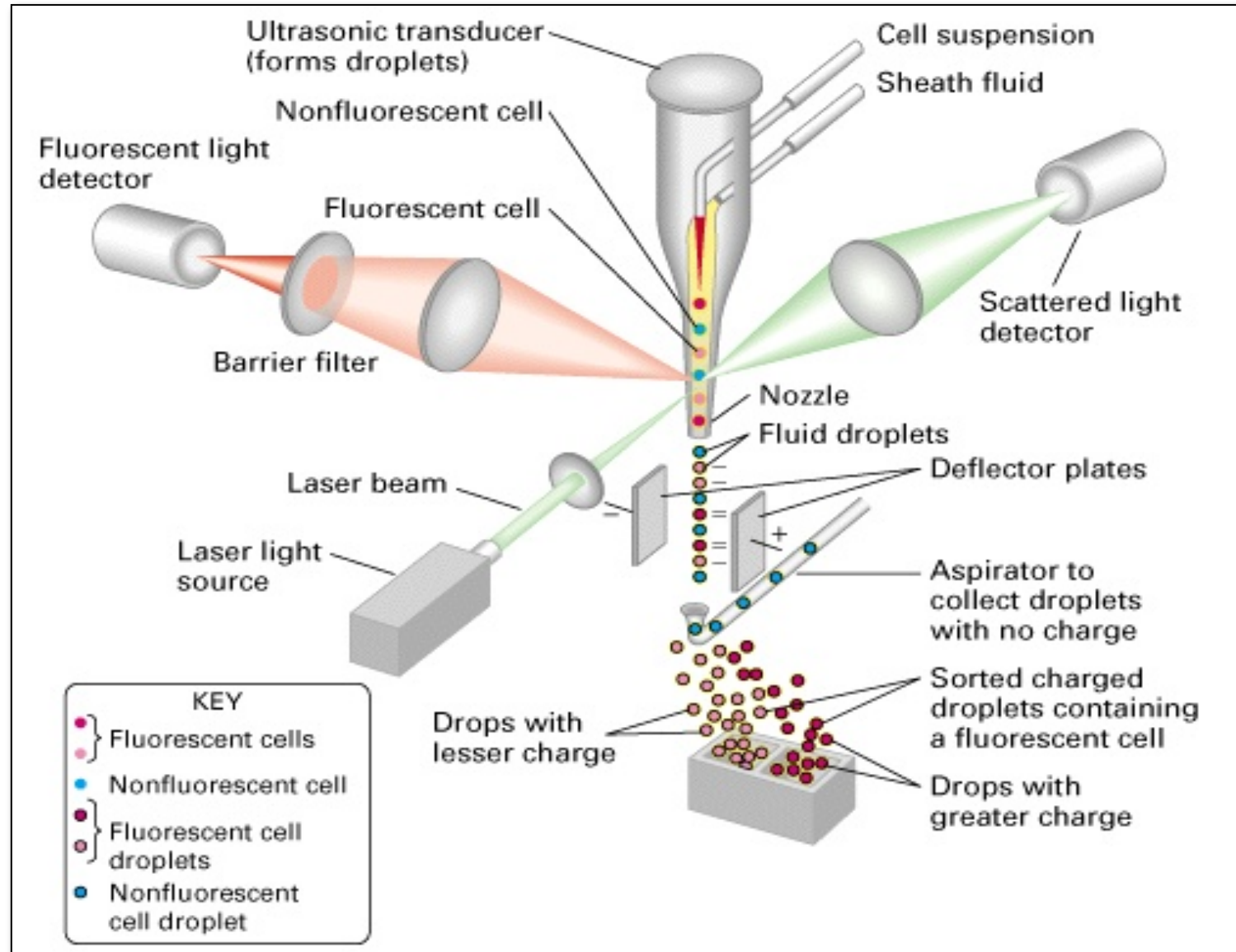


Citofluorimetro/FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)



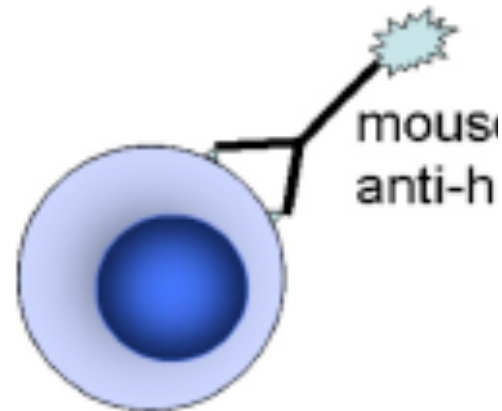
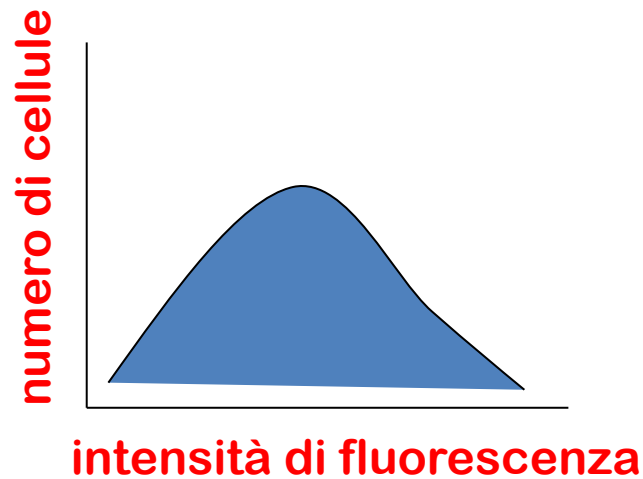
- E' possibile utilizzare **cellule vive** (antigeni di membrana), o cellule **fissate e permeabilizzate**
- Si può effettuare una **colorazione con** :
opportuni **anticorpi** primario e secondario (**coniugato con fluorocromo**)

Citofluorimetro/FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter)

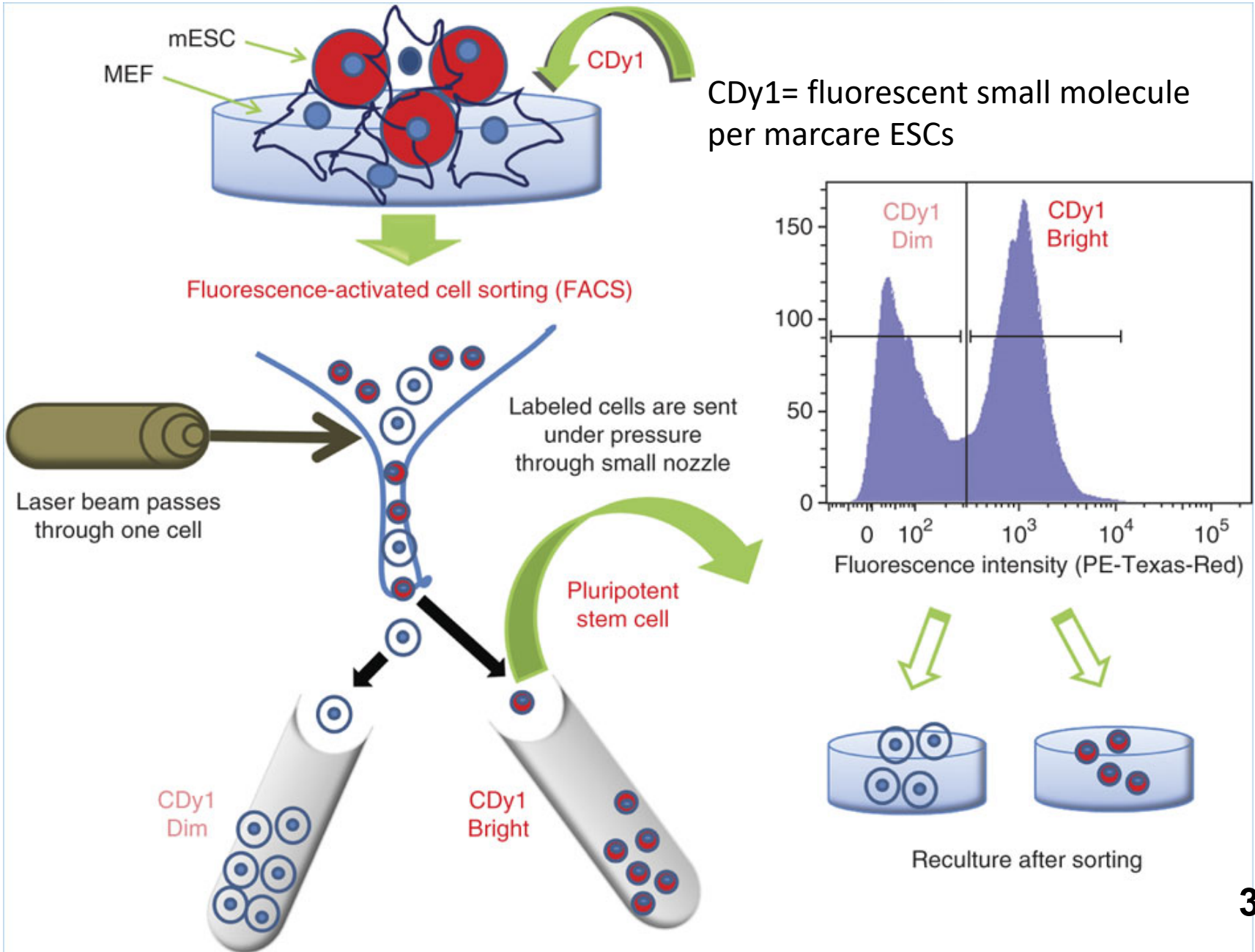


Lo strumento produce diversi tipi di OUTPUT

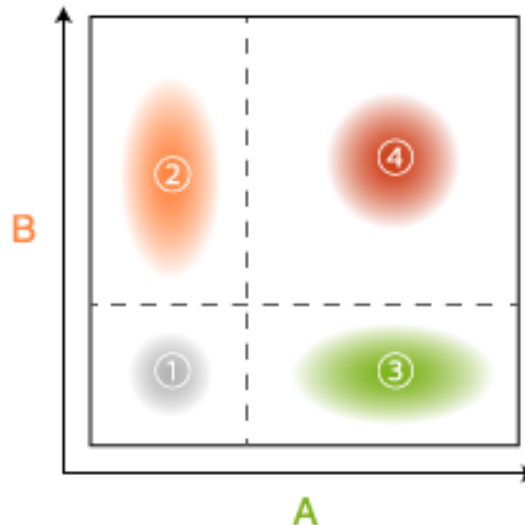
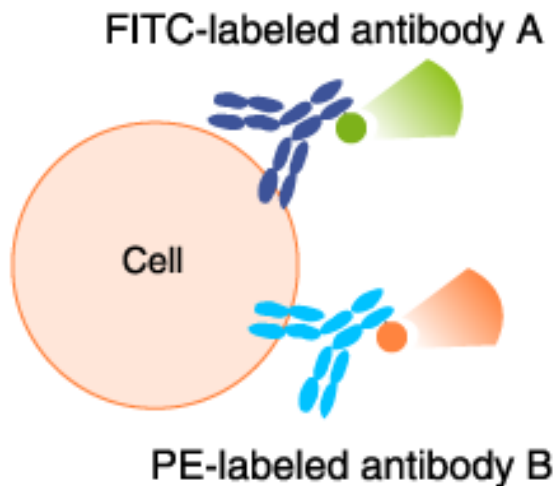
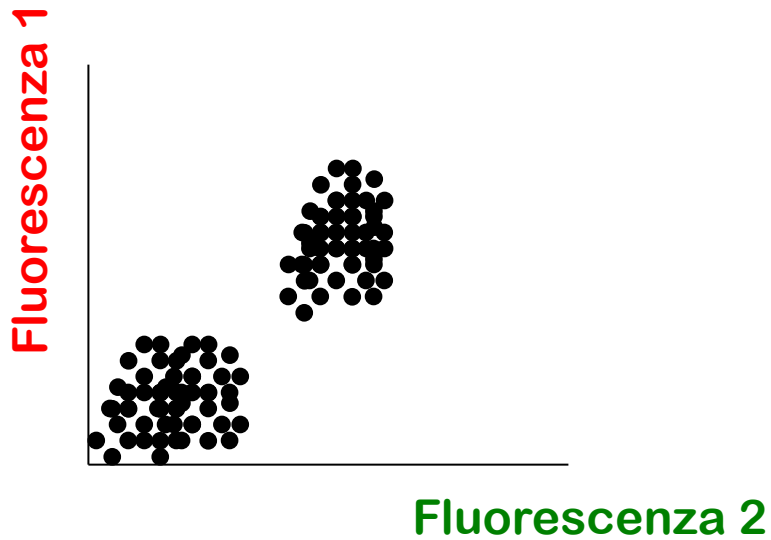
- 1) **istogramma monoparametrico**, in cui l'intensità di fluorescenza è riportata in funzione del numero di cellule



Isolamento di cellule staminali



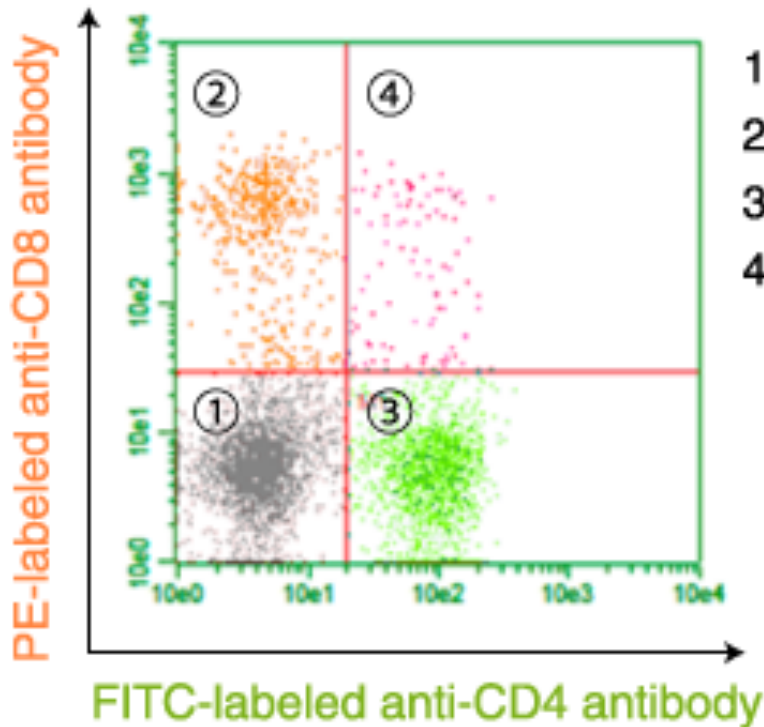
2) In alternativa lo strumento produce un **dot plot**, in cui un parametro è riportato in funzione di un altro (es. fluorescenza **rossa** vs fluorescenza **verde**)



- 1) Cells not expressing either A or B
- 2) Cells expressing only B
- 3) Cells expressing only A
- 4) Cells expressing both A and B

Isolamento di popolazioni linfocitarie

PE-labeled anti-CD8 antibody
FITC-labeled anti-CD4 antibody



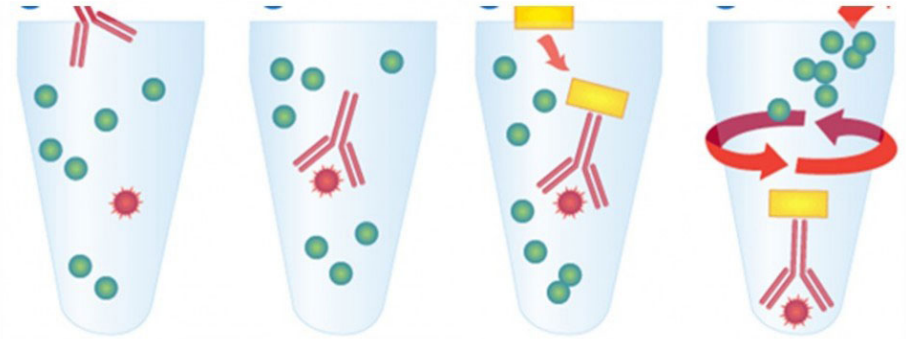
- 1) Cells not expressing either CD8 or CD4
- 2) Cells expressing only CD8 --- Cytotoxic T cells
- 3) Cell expressing only CD4 --- Helper T cells
- 4) Cells expressing both CD8 and CD4

Sample: mouse splenocytes

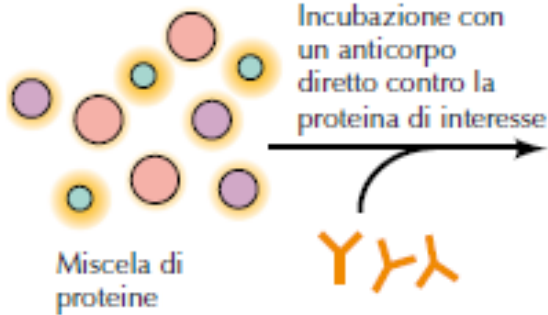
**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI IN BIOLOGIA
CELLULARE:**

**TECNICHE IMMUNOCHEMICHE
per la PURIFICAZIONE di ANTIGENI**

Immunoprecipitazione: tecnica per la purificazione di proteine

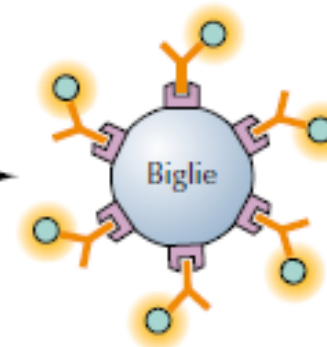


Lisato cellulare



Legame a un anticorpo specifico per la proteina di interesse

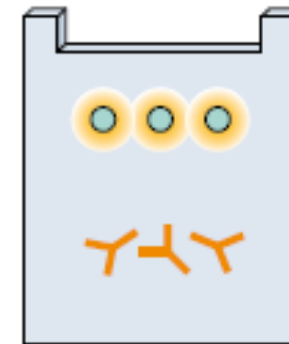
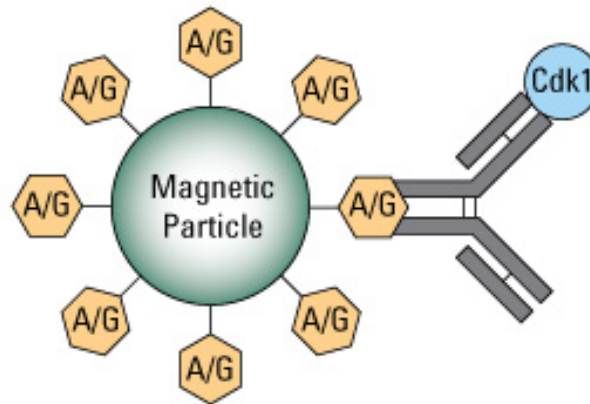
Raccolta dei complessi antigene-anticorpo



I complessi antigene-anticorpo si legano alle biglie

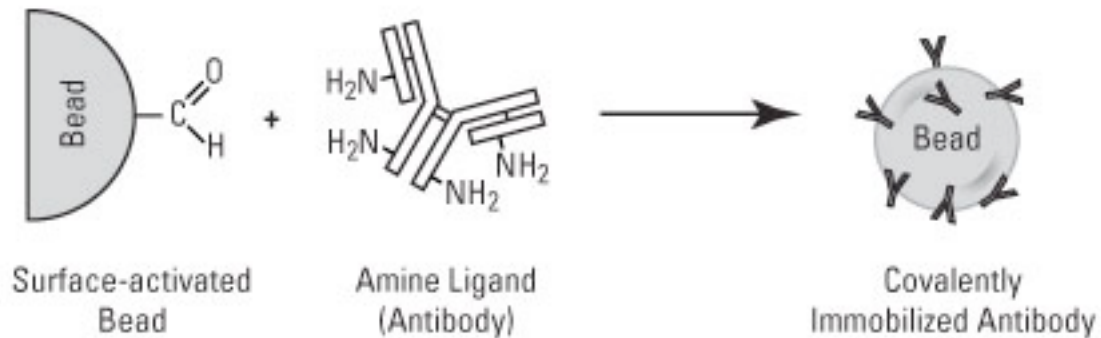
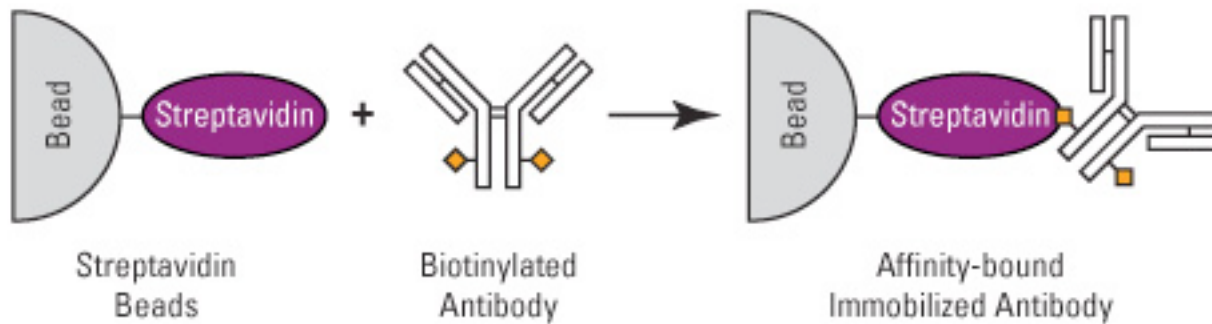
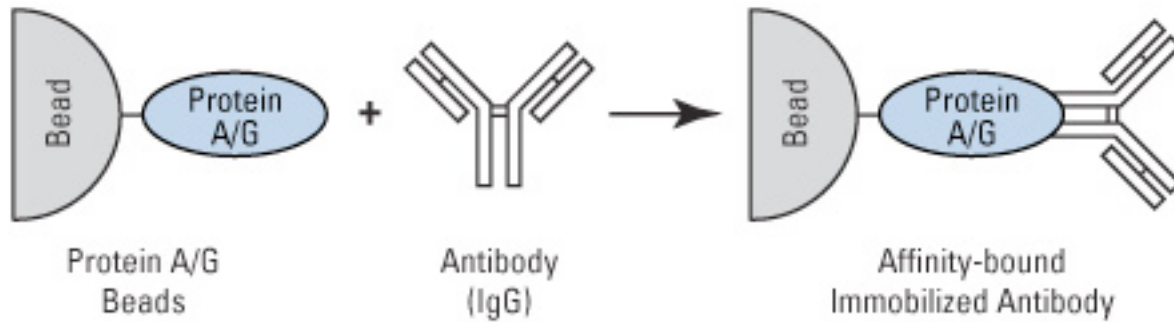
Dissociazione delle proteine in seguito ad ebollizione

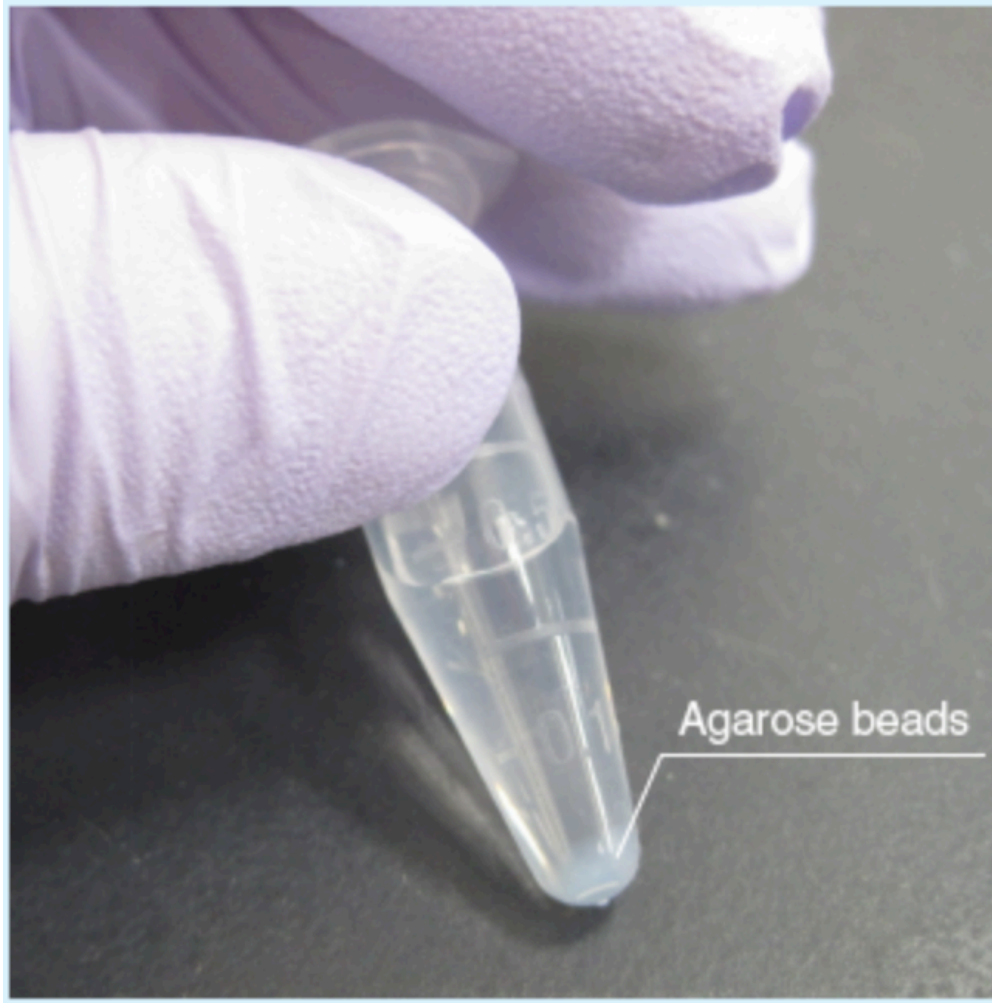
Elettroforesi su gel



Migrazione

Legame degli anticorpi alle beads





Agarose beads

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:

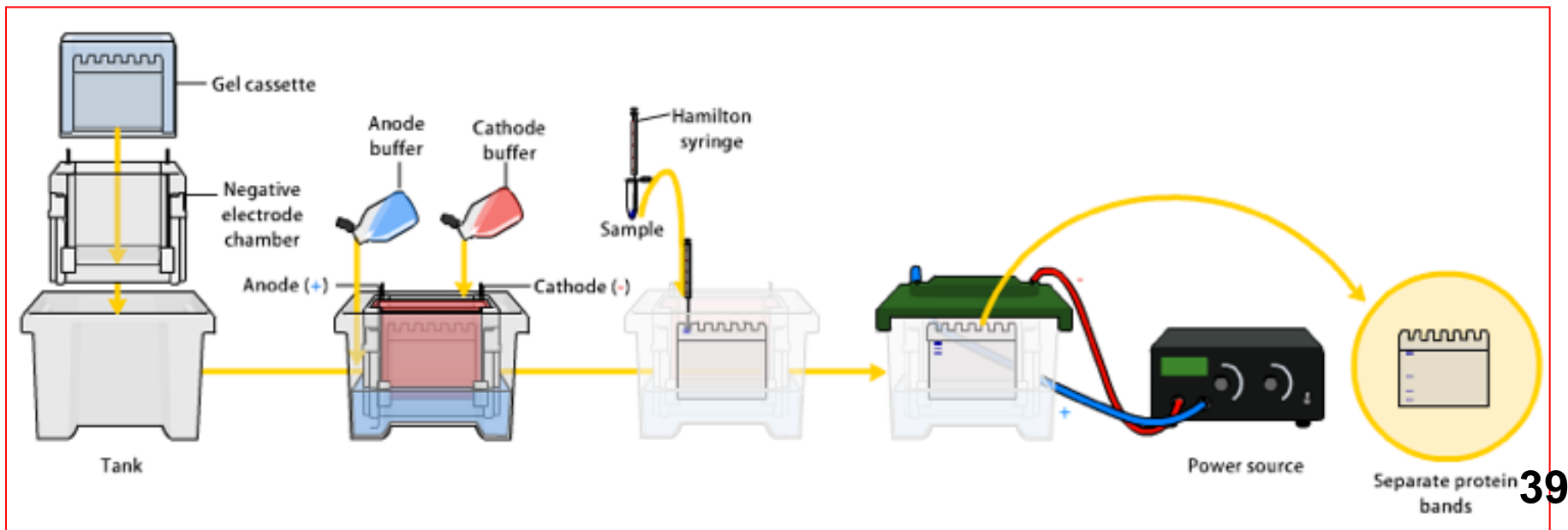
Massa molecolare (velocità di migrazione)

Livelli di espressione

Modificazioni post-traduzionali (Ab specifici)

Localizzazione subcellulare (dopo frazionamento)

Interazioni con altre proteine

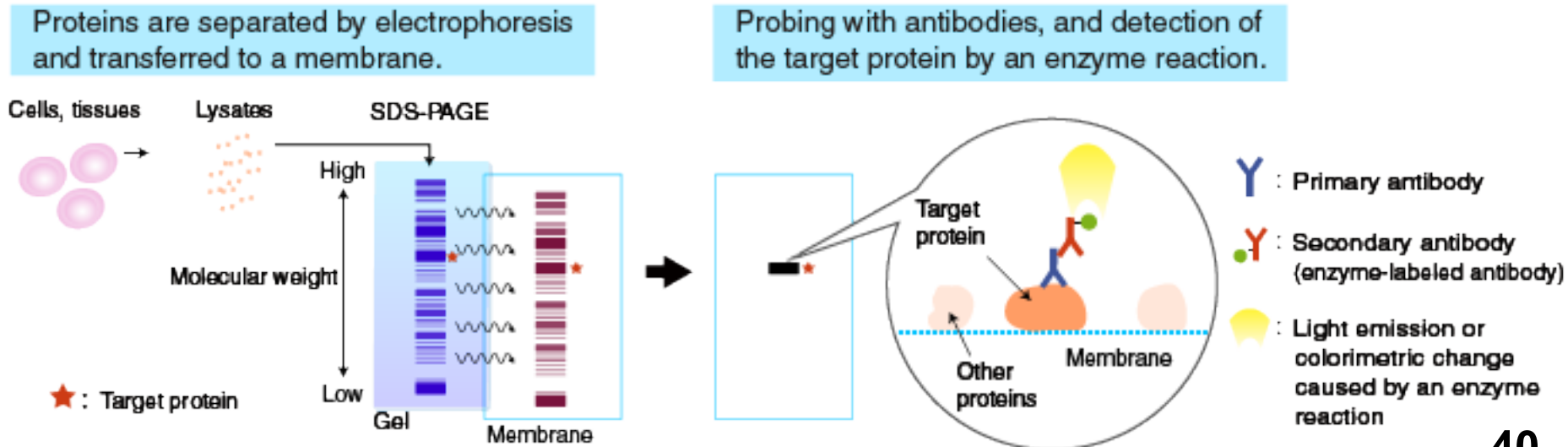


Poichè i gel di poliacrilamide sono supporti poco stabili e impenetrabili agli Ab , è necessario **trasferire le bande proteiche** su un supporto che le renda accessibili: di solito una **membrana** di nitrocellulosa, mediante un **campo elettrico trasversale**.

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**





Enzyme name	Chromogenic substrate	Chemiluminescence substrate
HRP (Horseradish peroxidase)	DAB and TMB	Luminol-based (ECL)
AP (Alkaline phosphatase)	BCIP/NBT and pPNPP	Dioxetane-based (CDP-star [®])

