

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 4

Vettori derivati da transposoni: SLEEPING BEAUTY

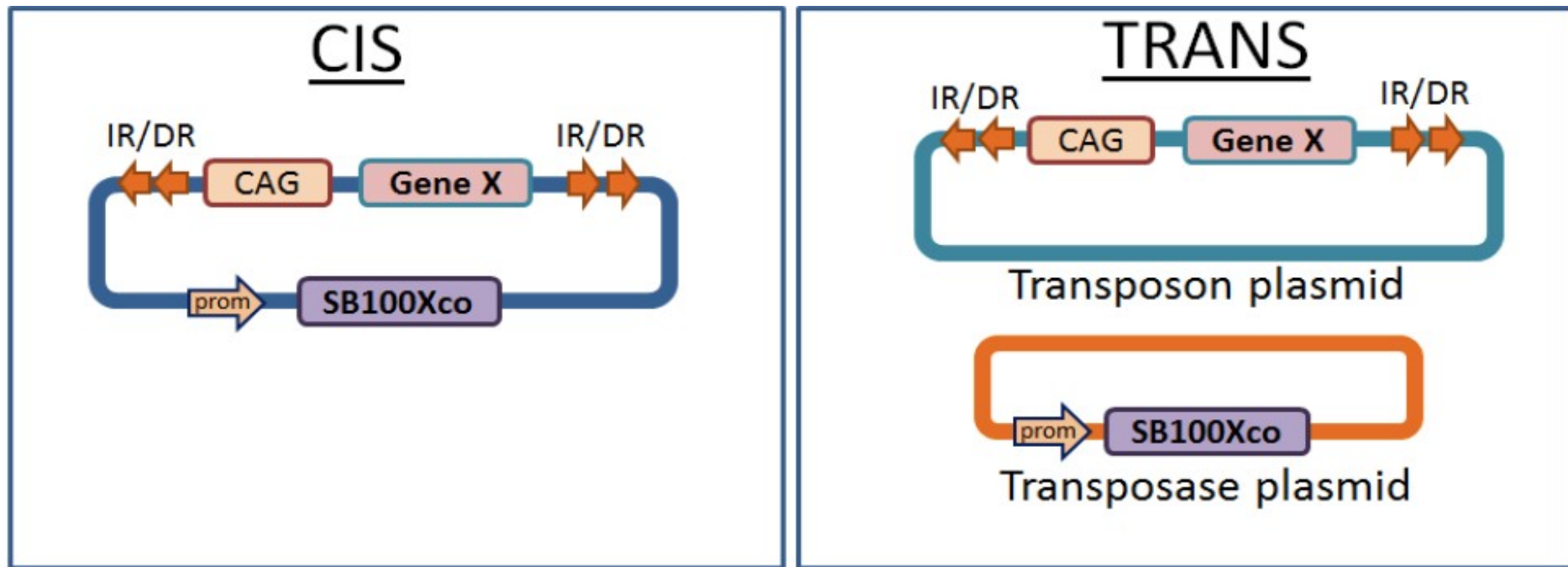
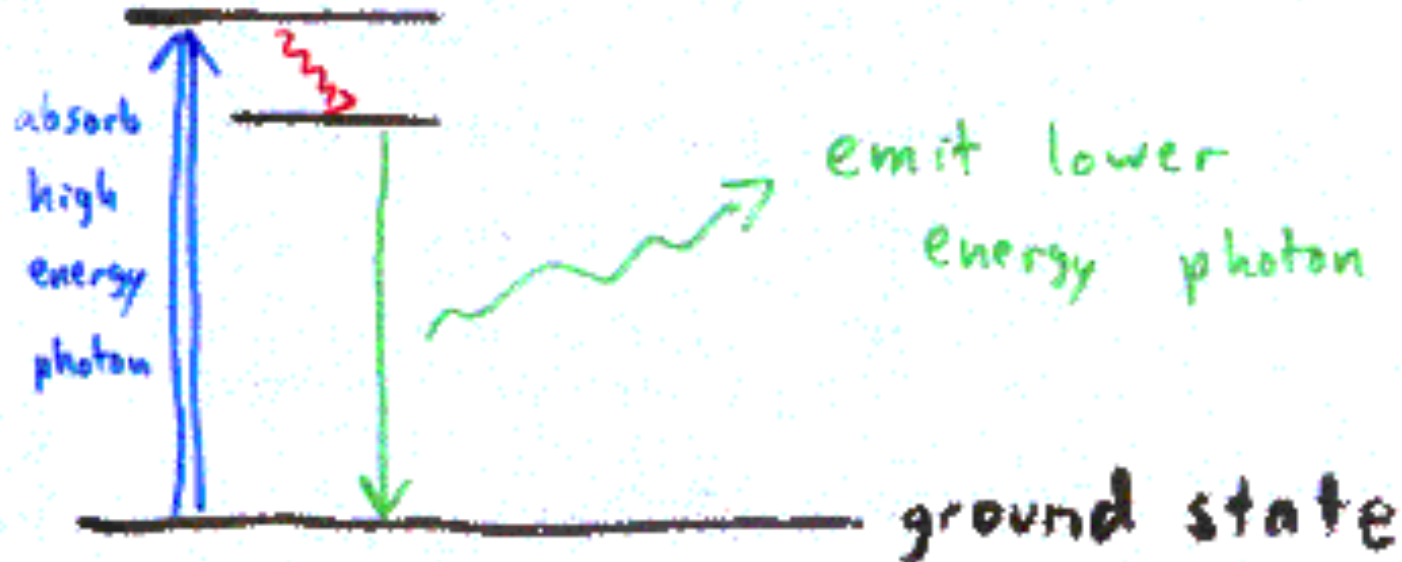


Figure 2: Schematics of Cis and Trans Sleeping Beauty plasmids.

**Analisi dell'espressione e localizzazione
subcellulare di proteine mediante
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA**

FLUORESCENZA

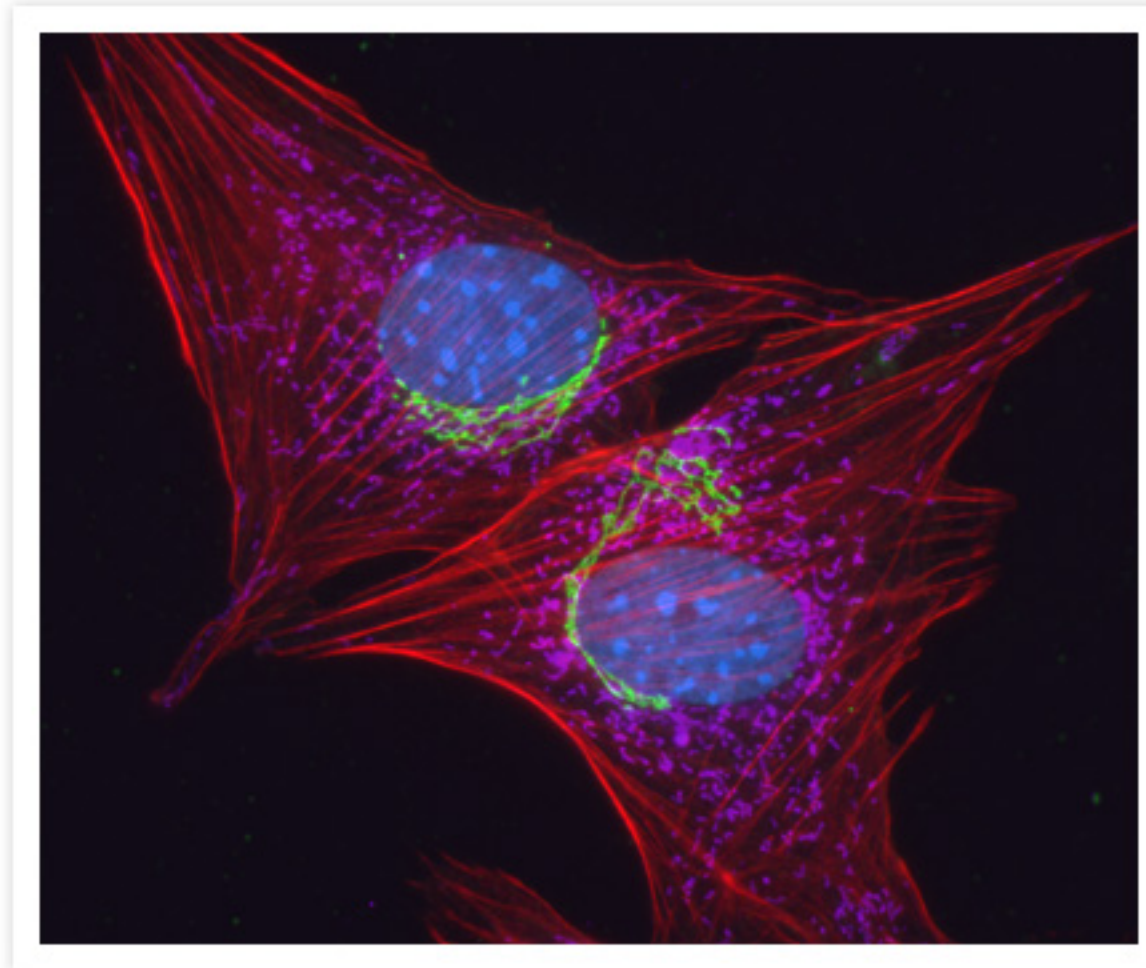


Alcune molecole, dopo **assorbimento** di luce ad una data lunghezza d'onda
(λ eccitazione)

hanno la proprietà di **emettere** luce a lunghezza d'onda superiore
(λ emissione)

Tale proprietà è nota come **fluorescenza**.

È **necessario** colorare il campione con **sostanze fluorescenti** che hanno affinità per **specifiche componenti cellulari**



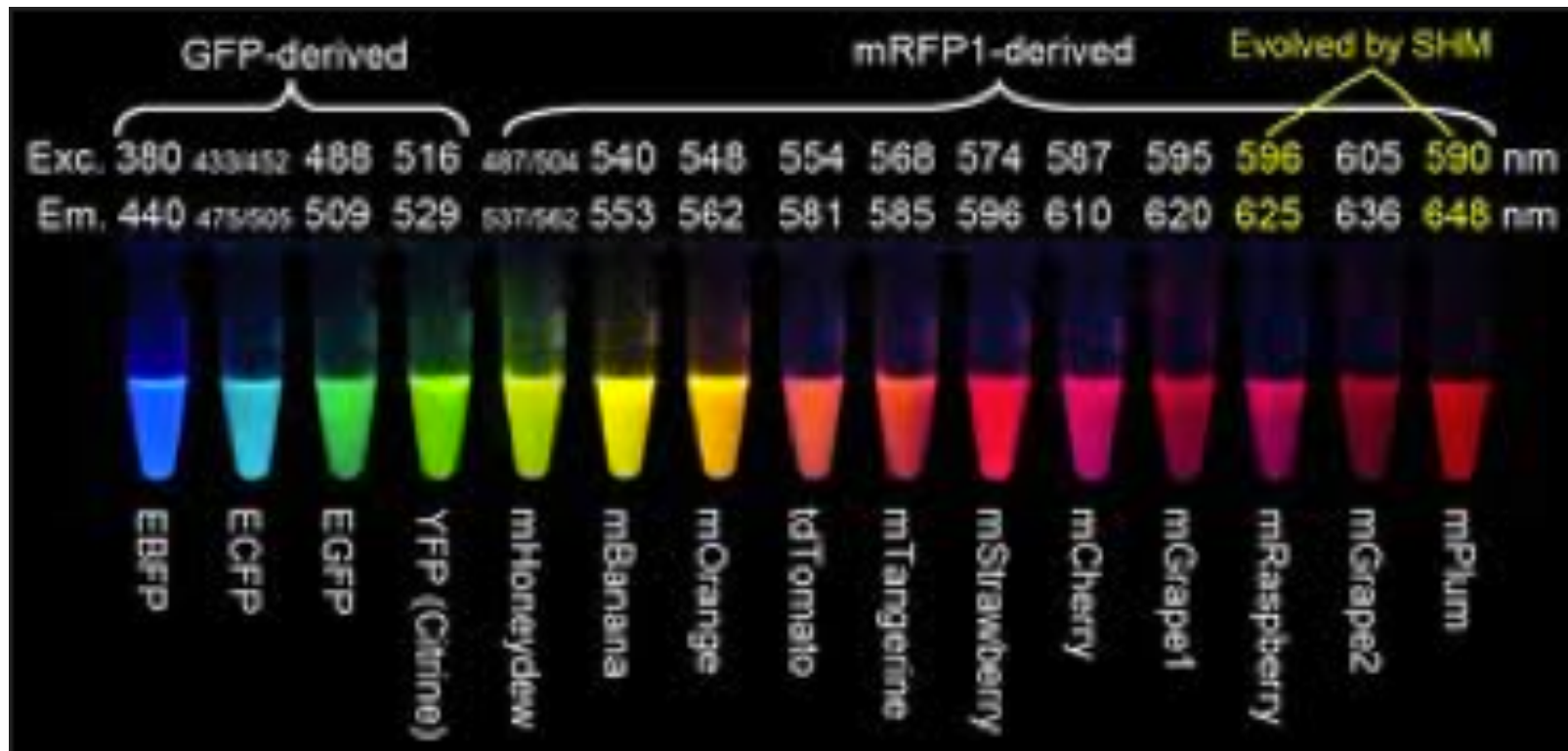
NIH 3T3
linea di
fibroblasti murini

- I Nuclei sono colorati con DAPI o HOECHST (intercalanti del DNA -fluorescenza blu).
- II CITOSCHELETRO con falloidina-(lega l'F actina)- fluorescente nel rosso
- I MITOCONDRI con un colorante che emette fluorescenza rosa quando è ossidato
- II GOLGI con una lectina (lega oligosaccaridi) coniugata ad un fluorocromo verde

Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati in microscopia

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

**Per la visualizzazione diretta in situ
(tecniche di imaging)
oppure per applicazioni mediante tecniche di FACS
si utilizzano
reporters fluorescenti (fotoproteine)**



GFP = Green Fluorescent Protein

◆ Proteina di circa 27 Kda isolata dalla medusa *Aequora victoria*

◆ Ha **FLUORESCENZA INTRINSECA**:

Il cromoforo è un

TRIPETIDE CICLICO

codificato nella

sequenza primaria,

che si forma mediante

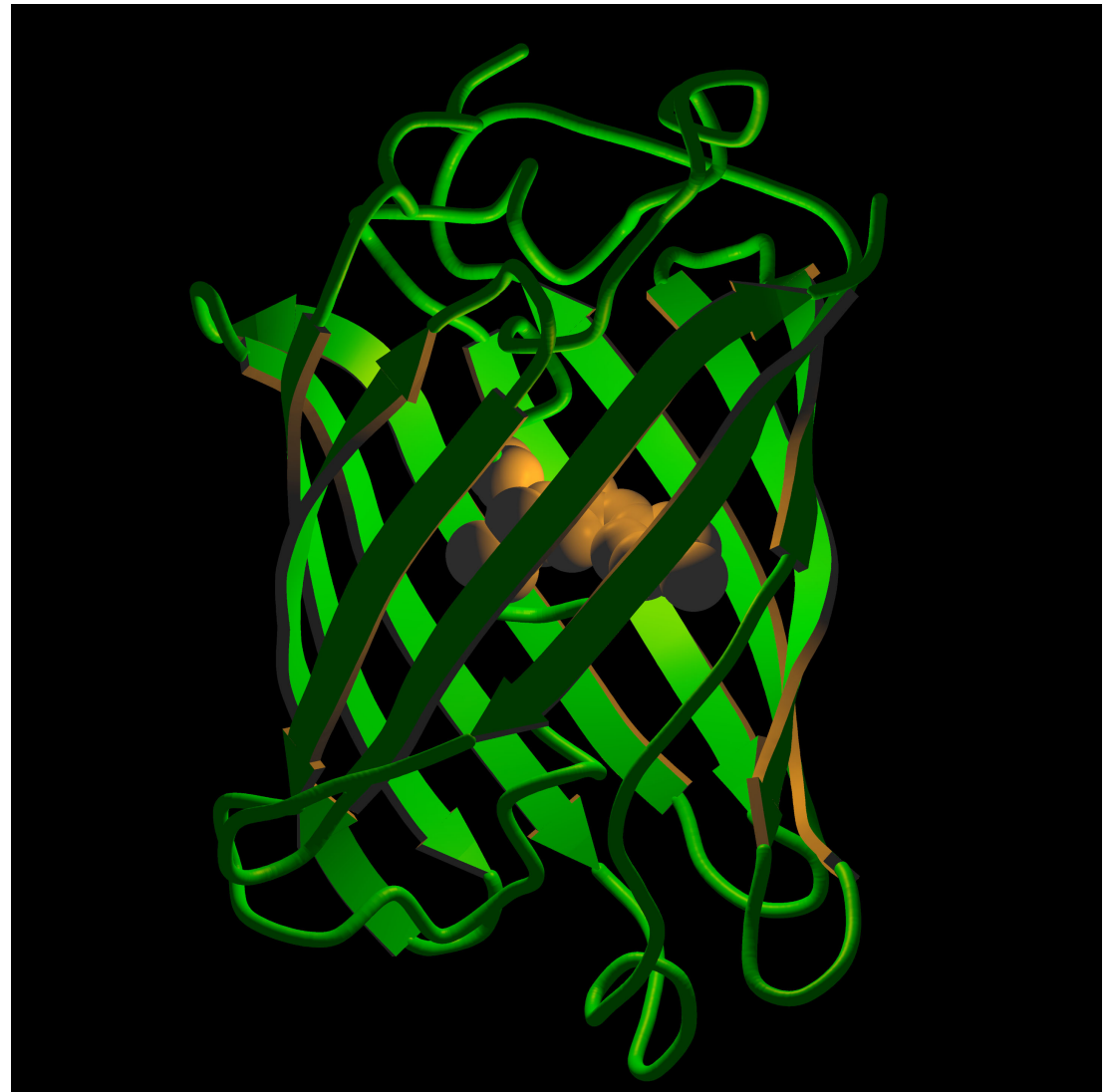
reazione autocatalitica

◆ Assorbe ed emette nel **visibile**

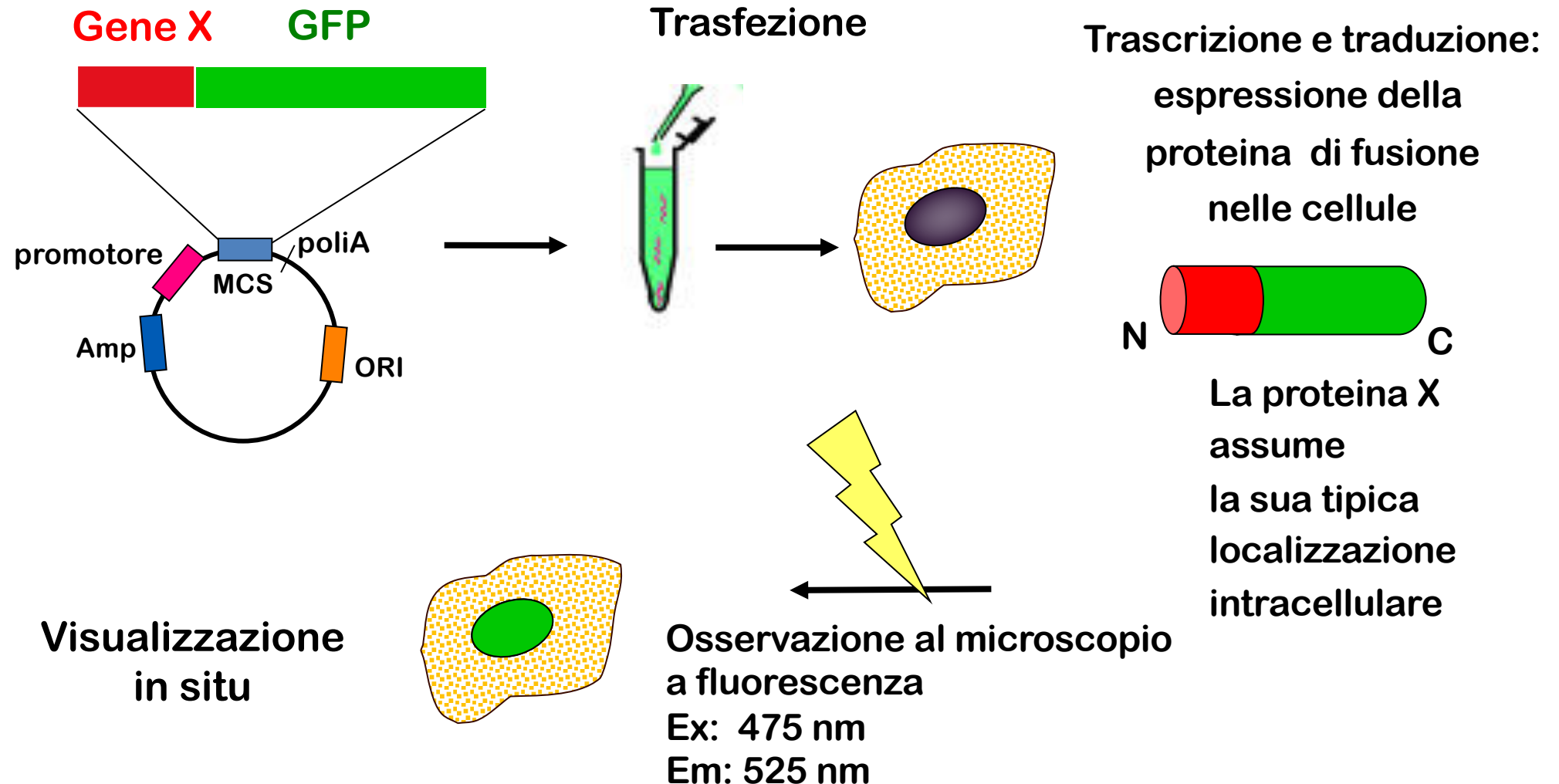
Osservazione al microscopio
a fluorescenza

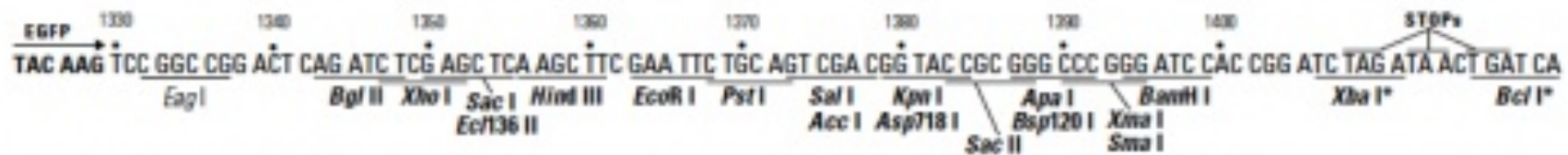
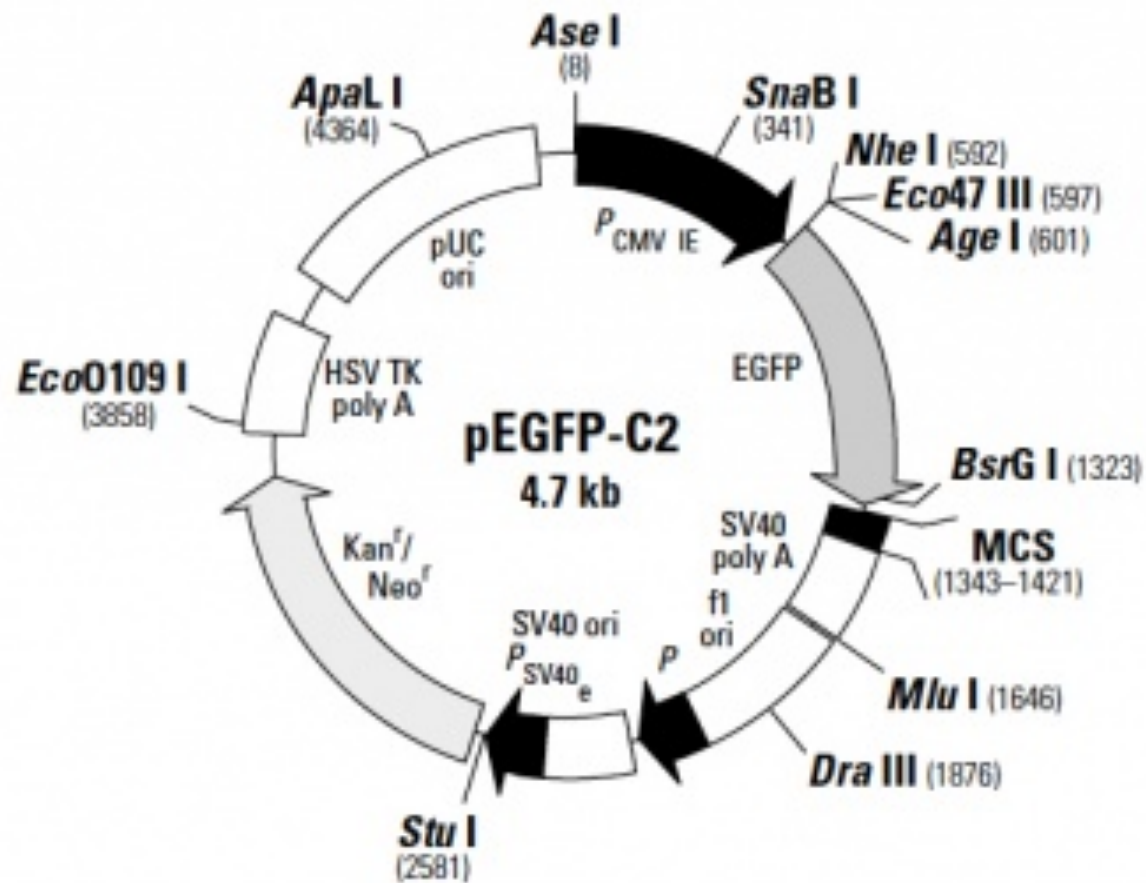
Ex: 475 nm

Em: 525 nm

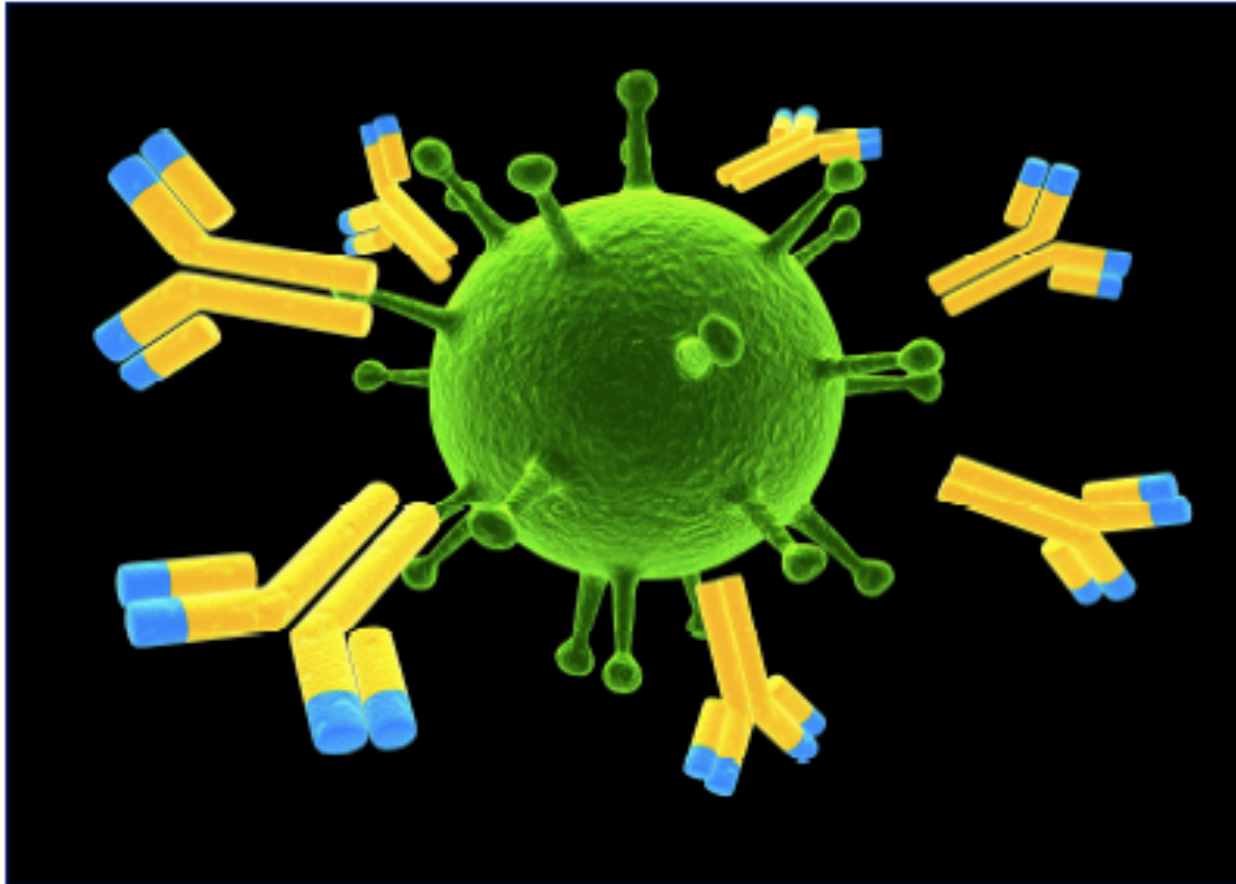


Utilizzo di fotoproteine per determinare la LOCALIZZAZIONE di una proteina di interesse (espressa in fusione)





TECNICHE IMMUNOCHEMICHE



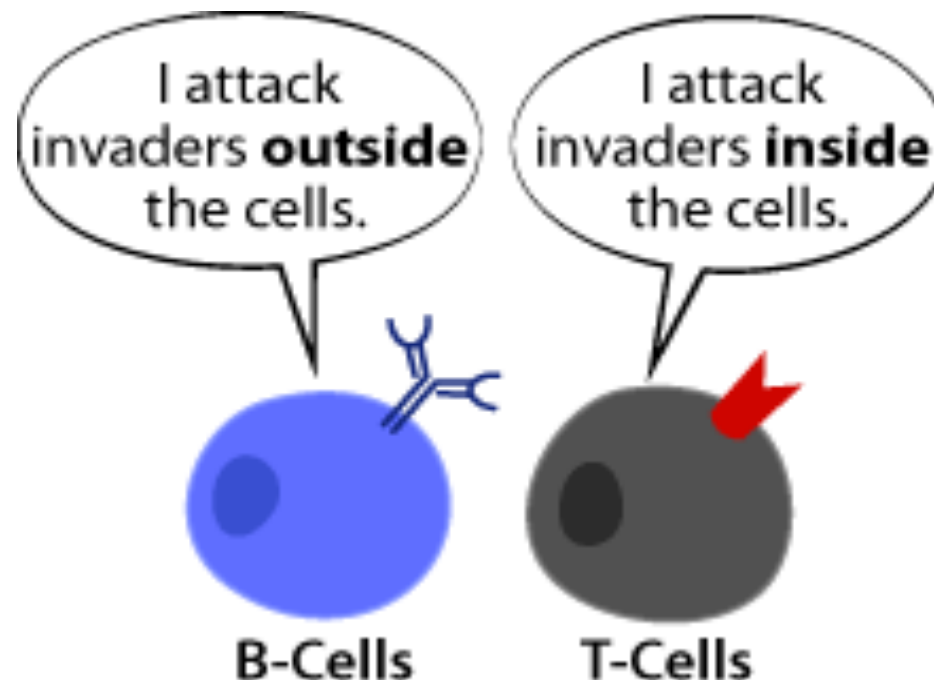
**TECNICHE BASATE SULL'INTERAZIONE
ANTIGENE-ANTICORPO**

Produzione di anticorpi: il sistema immunitario

Il sistema immunitario distingue ciò che è proprio (self) da ciò che è estraneo all'organismo (non-self).

Qualsiasi molecola capace di indurre una **risposta immunitaria** è detta **antigene**.

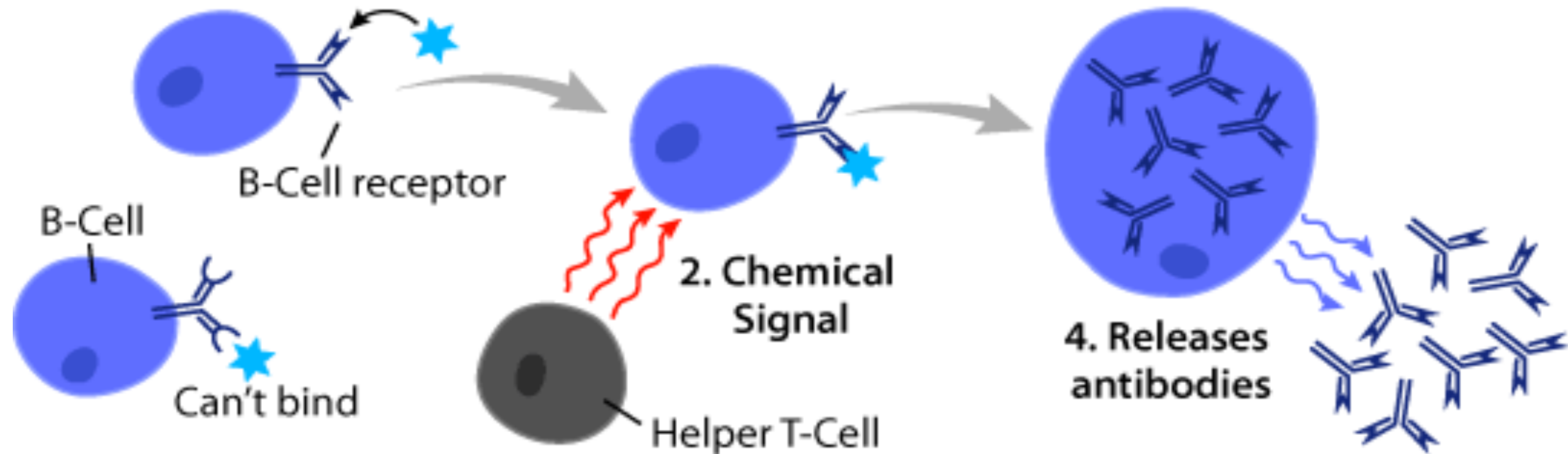
La risposta immunitaria **umorale** è mediata dagli **anticorpi (immunoglobuline, IG)**, glicoproteine prodotte dai linfociti B in grado di riconoscere antigeni specifici.



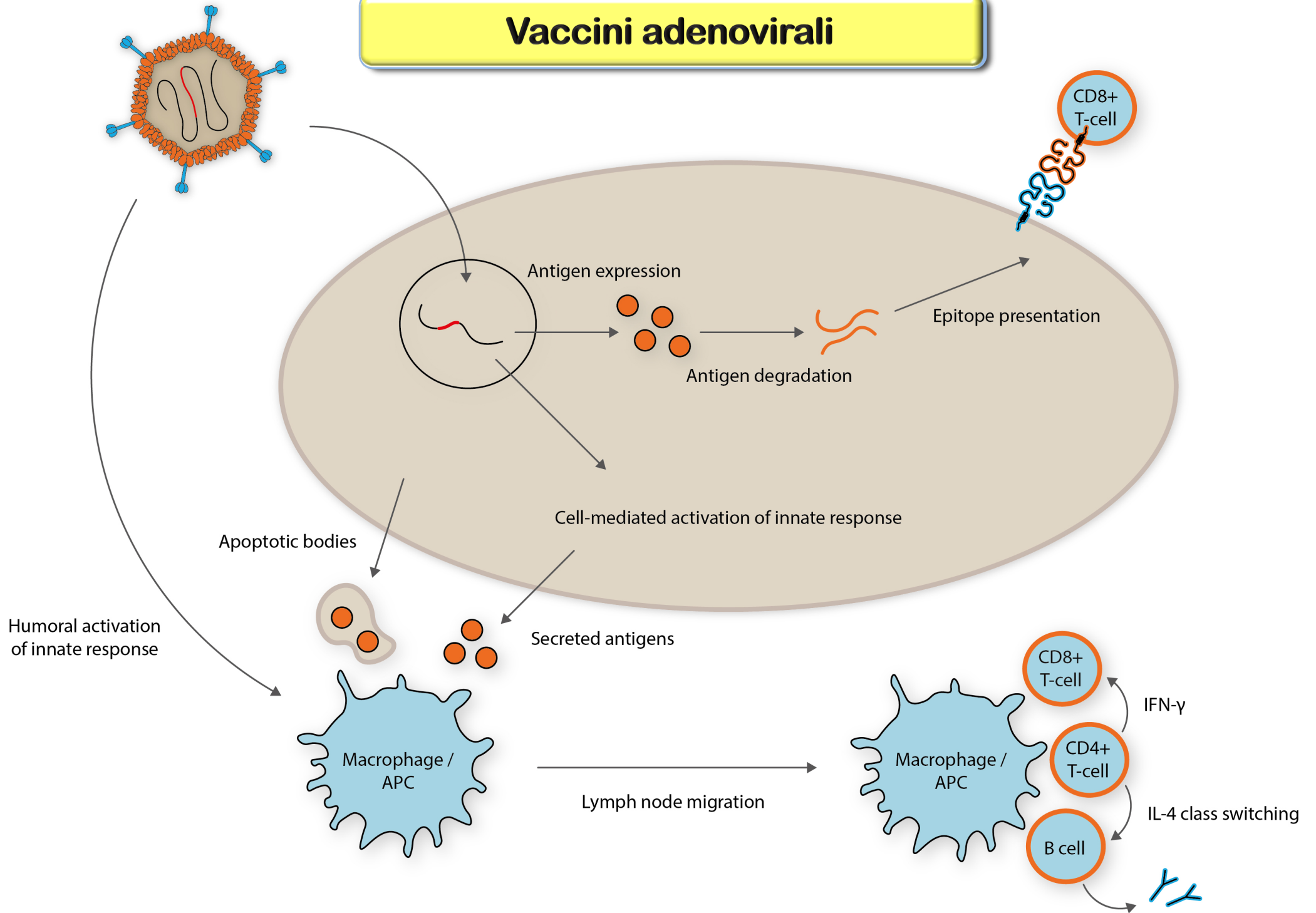
Produzione di anticorpi: il sistema immunitario

1. Binding to antigen

3. Becomes plasma cell

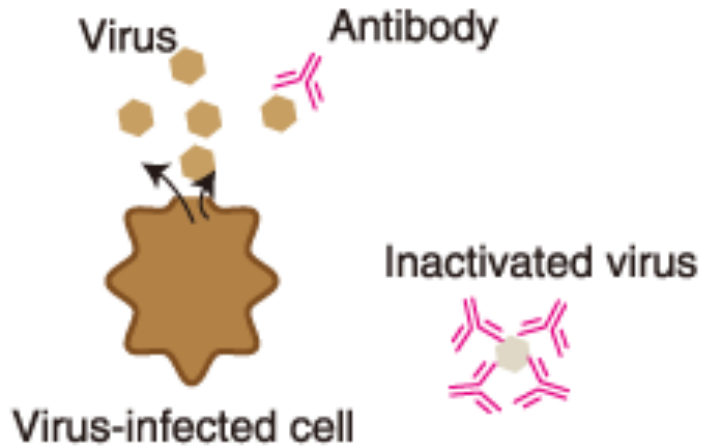


Vaccini adenovirali



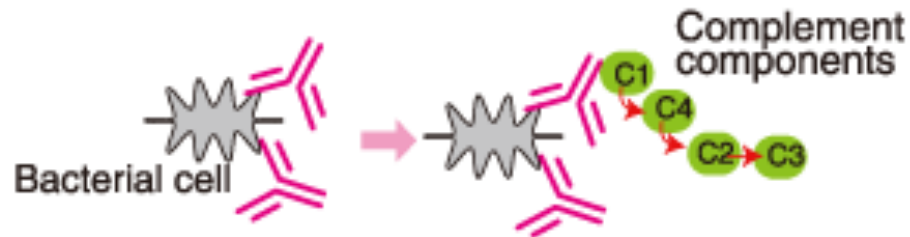
FUNZIONI DEGLI ANTICORPI

Neutralization



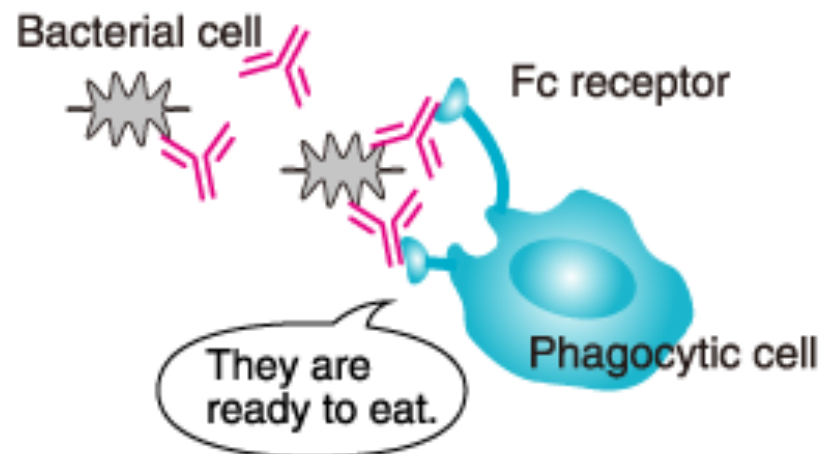
Antibodies bind to and inactivate viruses and toxins. These antibodies are called "neutralizing antibodies."

Complement recruitment by antibodies



Antigen-antibody complexes activate the complement system (the classical pathway), triggering its antibacterial activity.

Opsonization



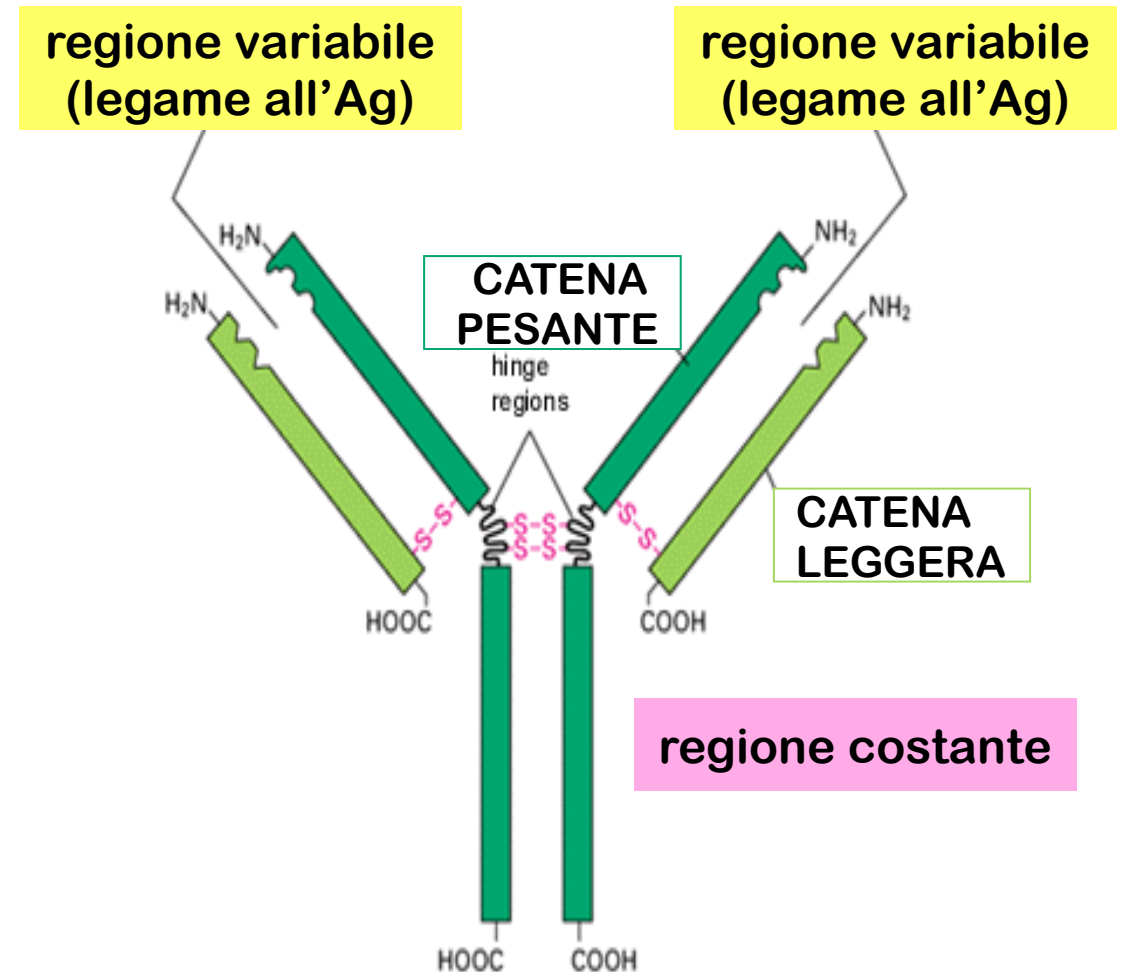
Phagocytic cells grab the antibodies bound to the surface of foreign substances, for efficient phagocytosis.

STRUTTURA degli ANTICORPI

Gli anticorpi sono **GLICOPROTEINE TETRAMERICHE**

composte da 2 catene leggere e 2 catene pesanti uguali

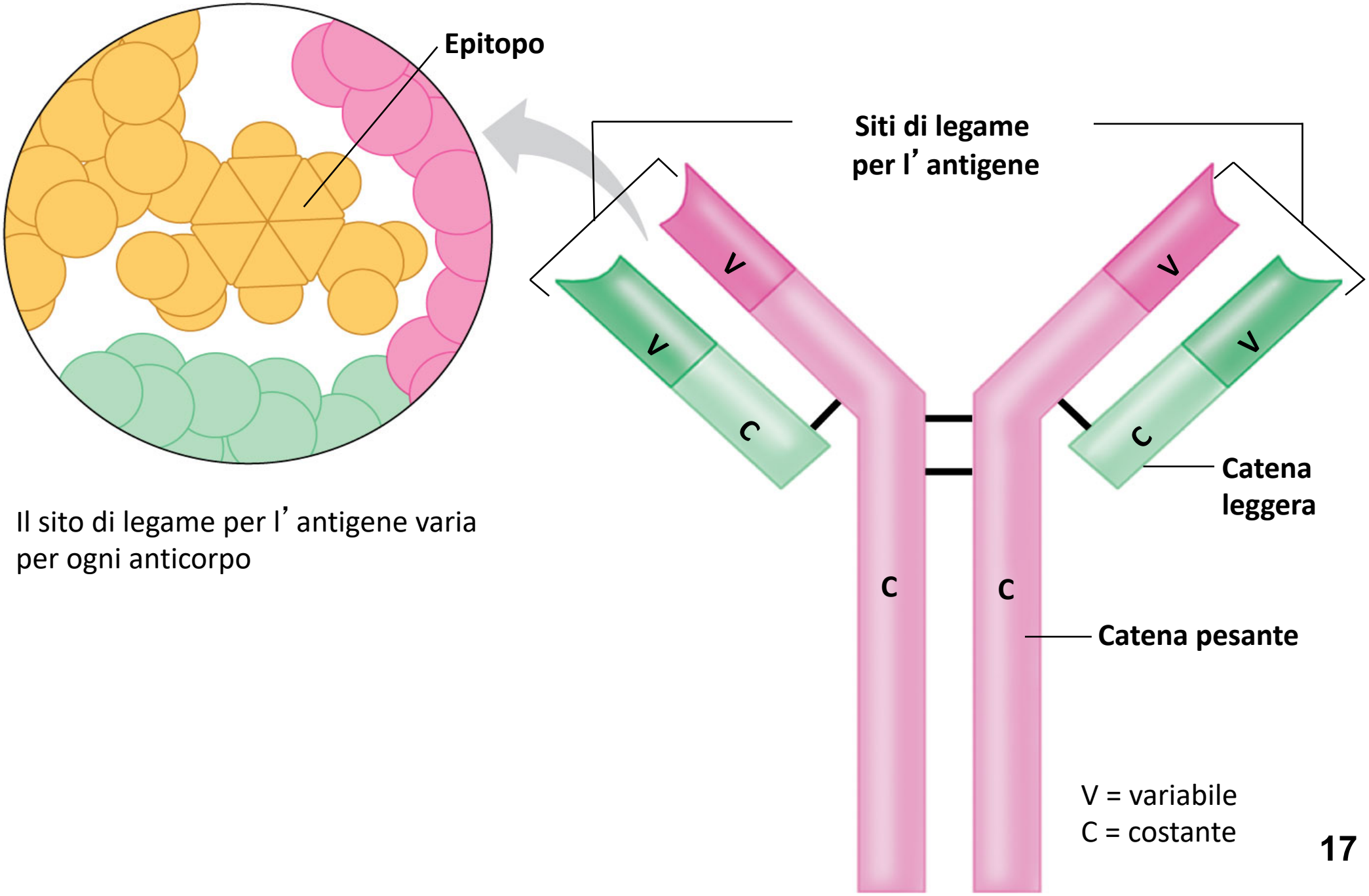
- Sono in grado di riconoscere in modo estremamente specifico una determinata molecola (**antigene**)
- La specificità del **legame** antigene/anticorpo è determinata dalla **regione VARIABILE** dell'anticorpo
- La **regione COSTANTE** svolge funzioni **strutturali**



La regione costante definisce la CLASSE ANTICORPALE E LA FUNZIONE EFFETTRICE

ANTIGENI: macromolecole riconosciute specificamente dall'anticorpo

Il **sito di riconoscimento** è detto **EPITOPO**: un antigene normalmente comprende più di un epitopo (6-10 AA) e quindi può essere riconosciuto da più anticorpi diversi.

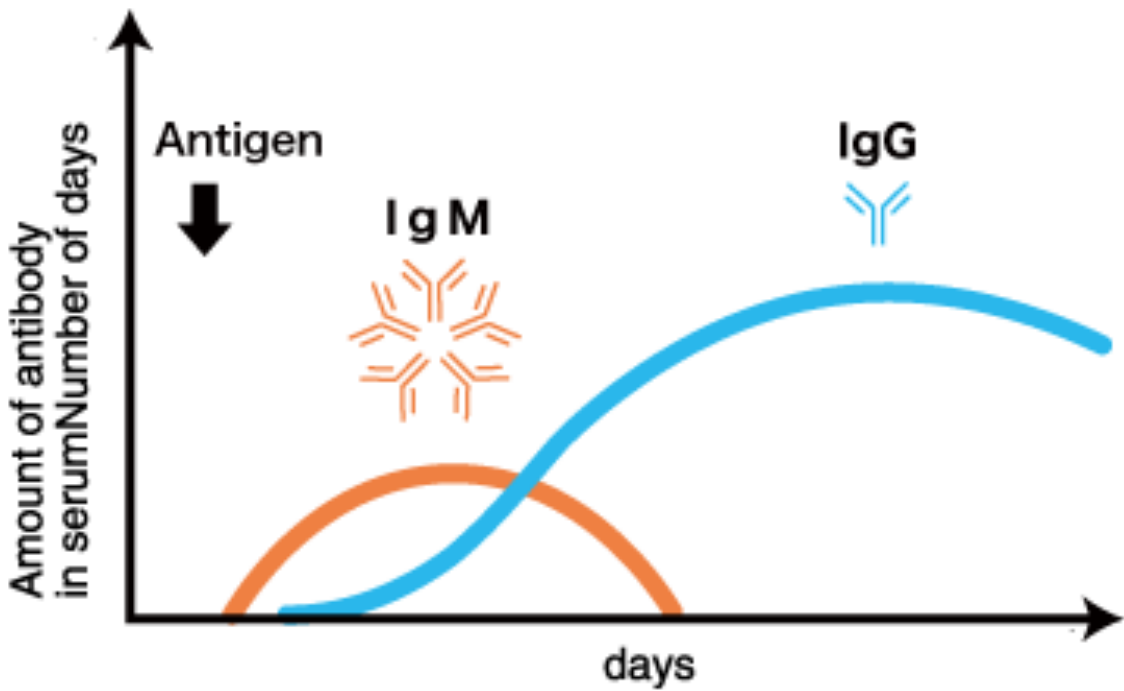


Il sito di legame per l' antigene varia per ogni anticorpo

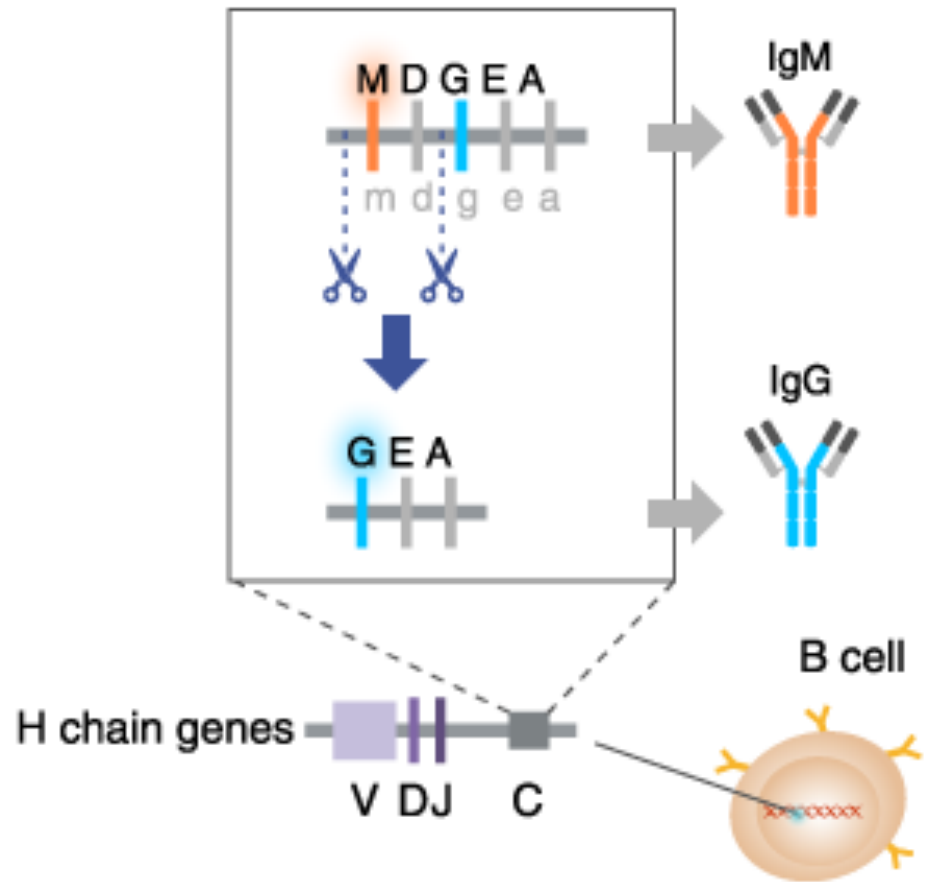
V = variabile
C = costante

CLASSI ANTICORPALI

Levels of circulating antibodies to a specific antigen



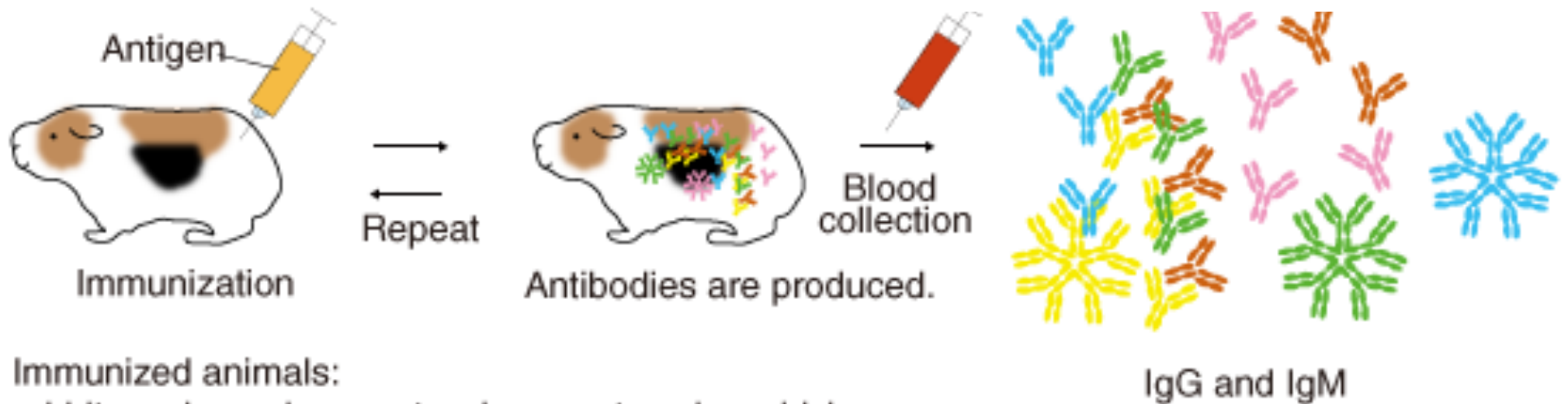
Class switching



OTTENIMENTO di ANTICORPI mediante IMMUNIZZAZIONE :

Mediante **IMMUNIZZAZIONE**
di animali da laboratorio
= iniezione dell' antigene

al termine del ciclo di immunizzazione
gli **anticorpi policlonali specifici**
contro l'antigene sono presenti nel
SIERO del sangue dell' animale
(prelevato senza sacrificare
l'animale)



Immunized animals:
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

SIERO IMMUNE o ANTISIERO

ANIMALI UTILIZZATI PER L'OTTENIMENTO di ANTICORPI:

Immunoglobulin classes

IgG, IgM, IgD, IgA

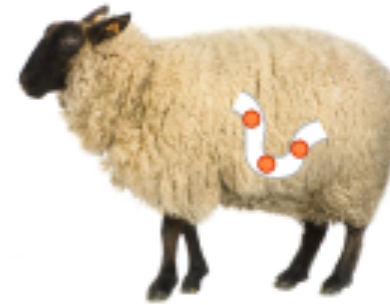
IgM, IgA, IgY

Mice

Rabbits

Sheep

Chickens



Organ in which immunoglobulin diversity is generated

Bone marrow

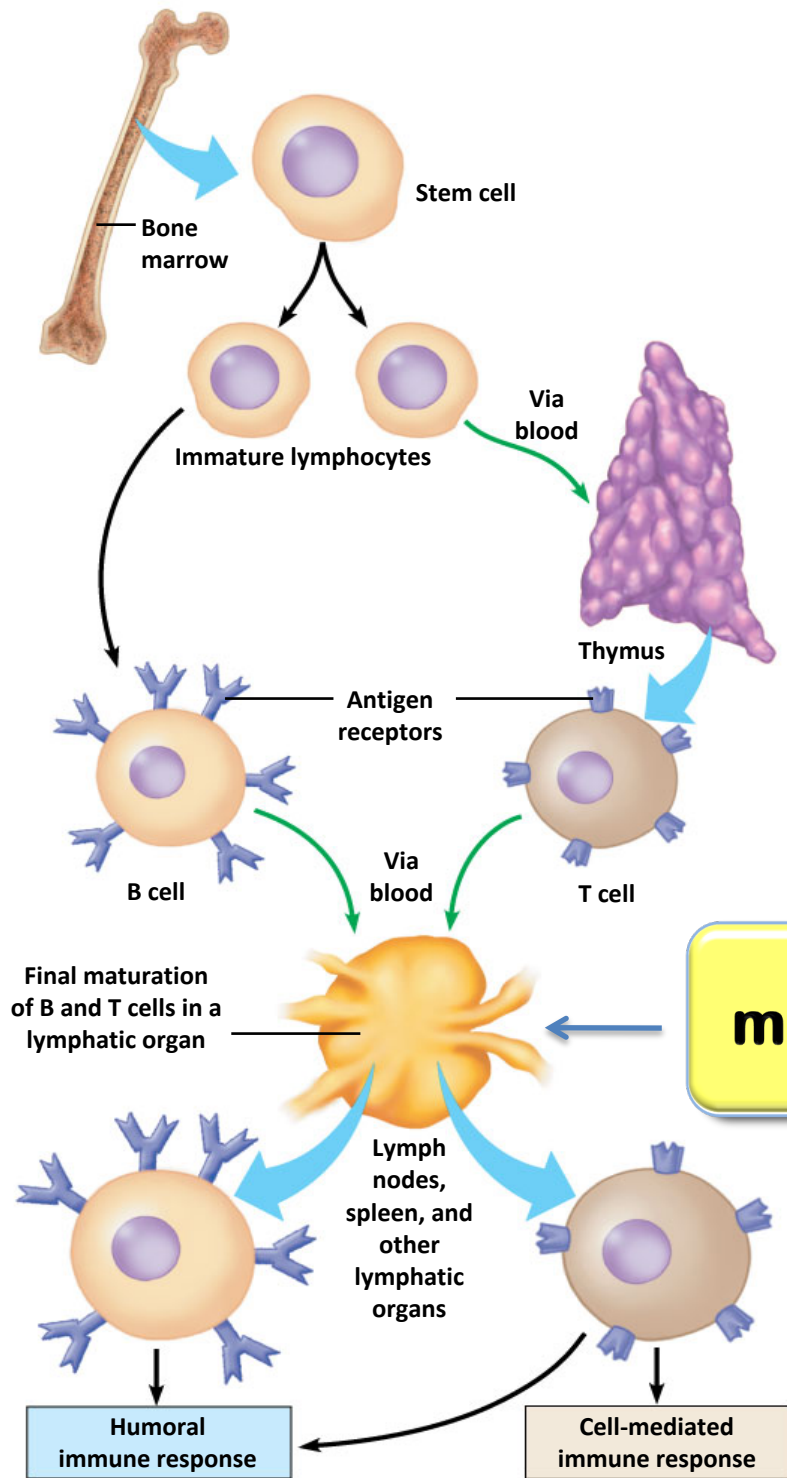
Appendix

Peyer's patches

Bursa of Fabricius

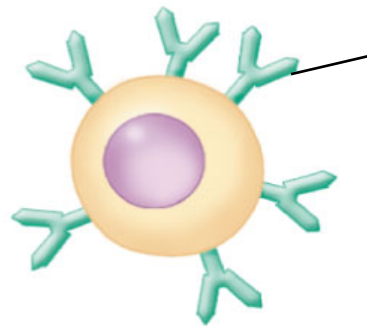
NB:

Ciascun linfocita B espone e produce UNO specifico anticorpo

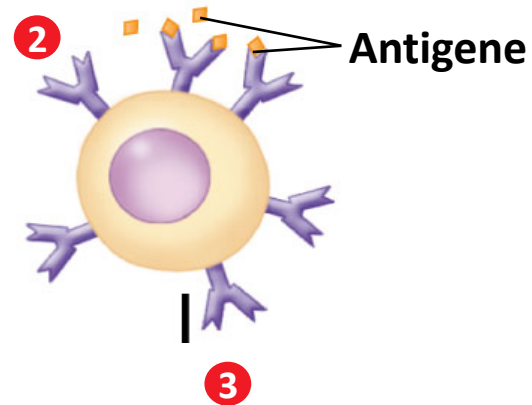


RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: RICONOSCIMENTO DELL'ANTIGENE

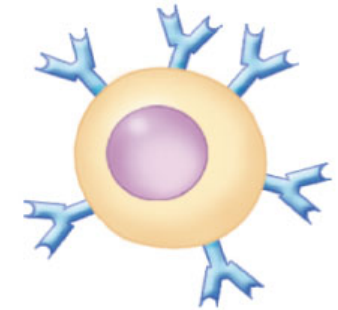
Popolazione
di linfociti B
che espongono
Ciascuno una
diversa Ig
di membrana



Ig
di membrana
= recettore
per l'antigene

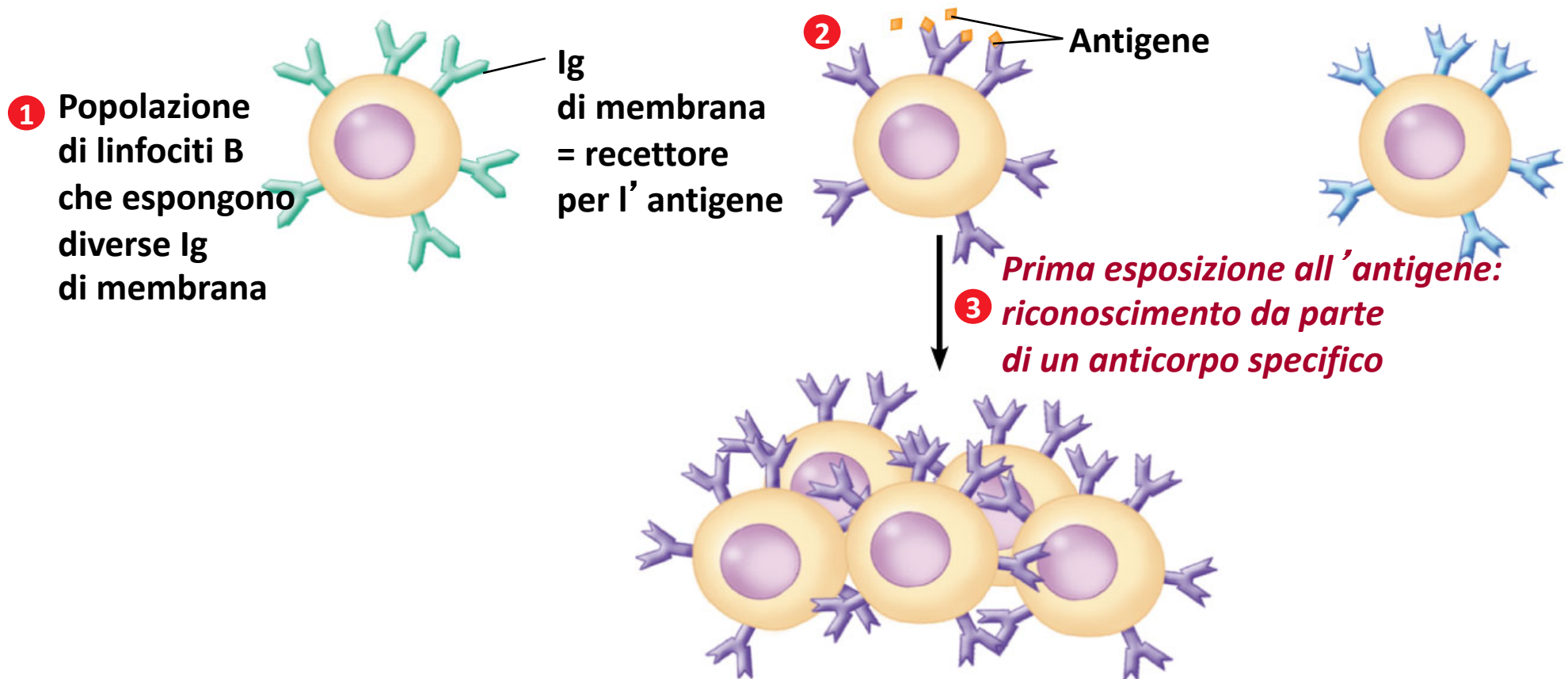


Antigene

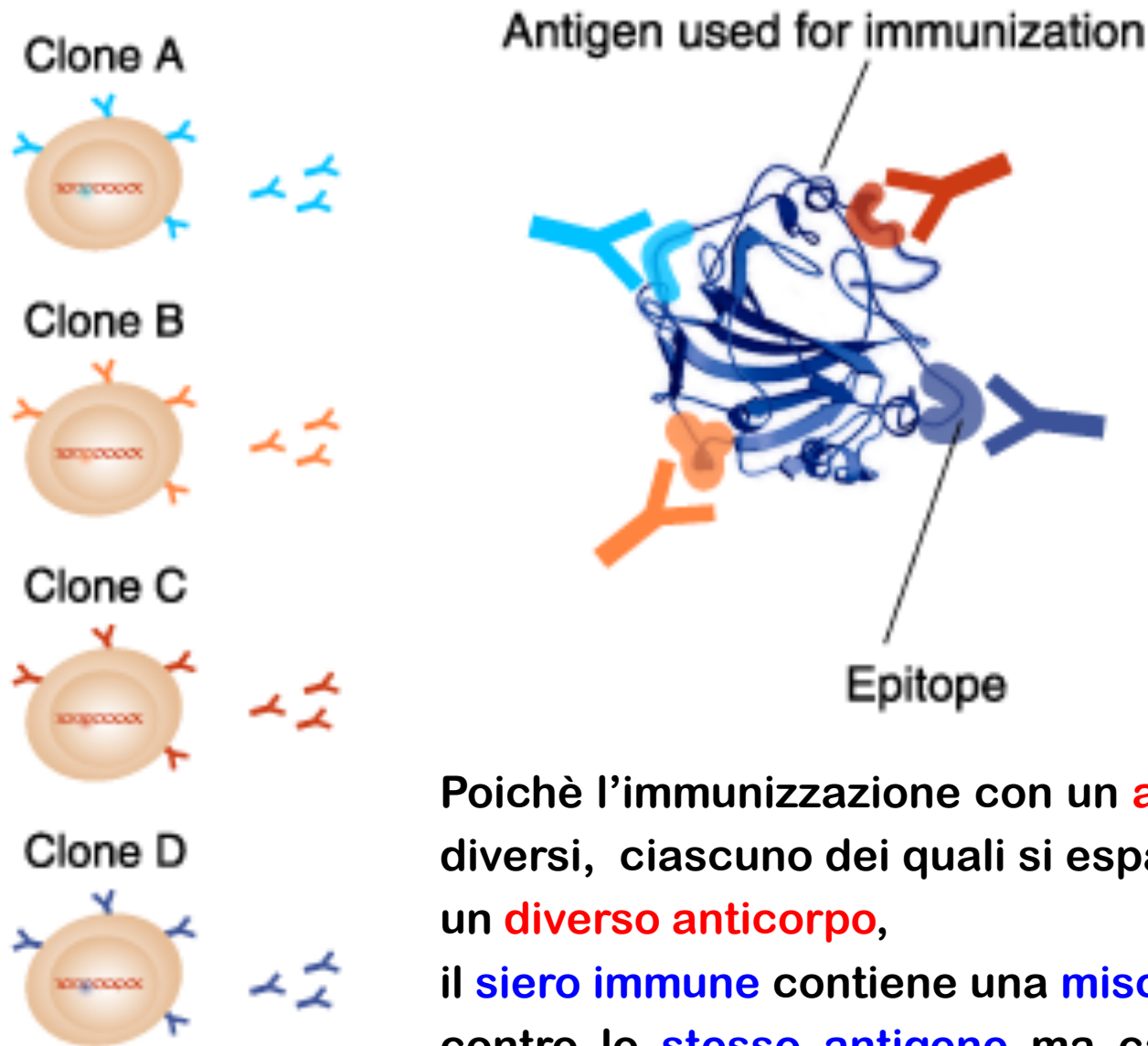


*Prima esposizione all'antigene:
riconoscimento da parte
di un anticorpo specifico*

RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE



ANTICORPI POLICLONALI:



Poichè l'immunizzazione con un **antigene** stimola molti linfociti diversi, ciascuno dei quali si espande in un clone che produce un **diverso anticorpo**, il **siero immune** contiene una **miscela di anticorpi diversi** diretti contro lo **stesso antigene** ma capaci di riconoscere **epitopi diversi** di questo

ANTICORPI POLICLONALI:

Vantaggi:

- ✓ Segnale forte (più anticorpi riconoscono uno stesso antigene)
- ✓ Basso rischio che l'epitopo sia nascosto / mascherato

Polyclonal antibodies



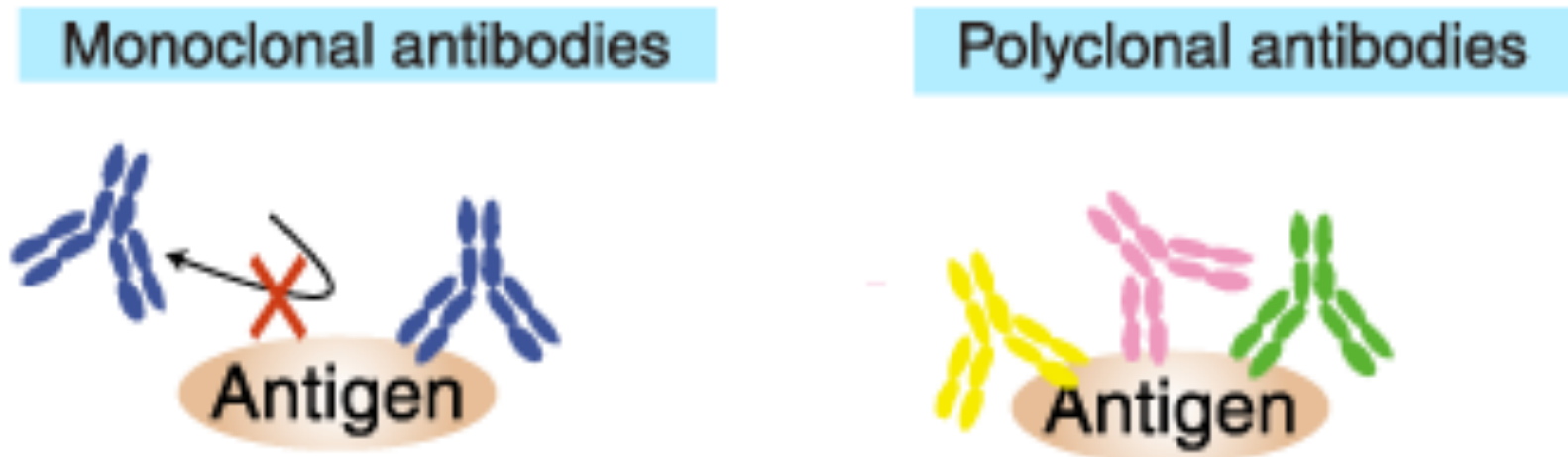
Svantaggi:

- ci può essere **crossreattività** con **antigeni diversi**
- **presenza di altri anticorpi** (risposte immuni) nel siero dell'animale

ANTICORPI MONOCLONALI:

Anticorpi prodotti da un **singolo clone di linfociti B**

Riconoscono **un solo epitopo** dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione



Vantaggi:

massima specificità di riconoscimento

(posso eliminare Ab che mostrano crossreattività)

Svantaggi:

Segnale più **debole** (riconosce un solo epitopo dell'antigene)

Rischio che l'epitopo sia **nascosto**/mascherato

**APPLICAZIONI DEGLI ANTICORPI
IN BIOLOGIA CELLULARE:**

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

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

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

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

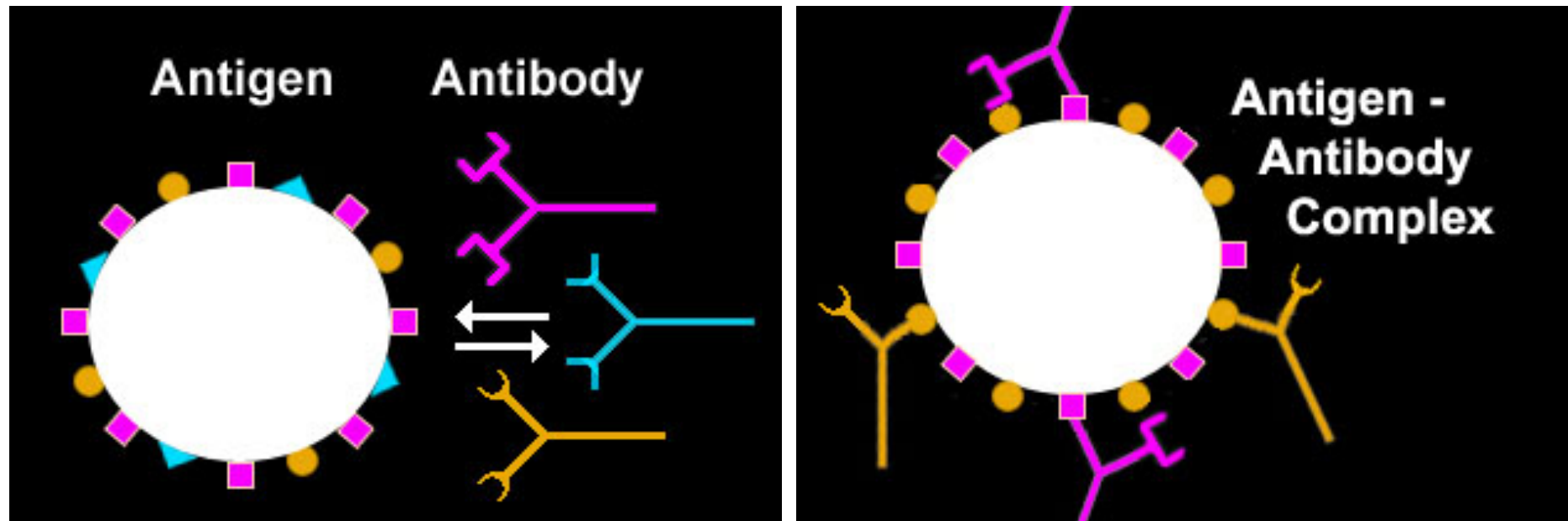
Possono essere usati come **SONDE** per:

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)

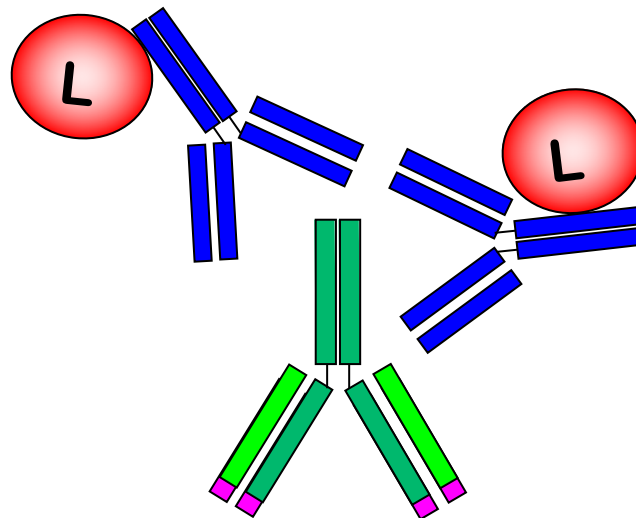
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE DIRETTE E INDIRETTE

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

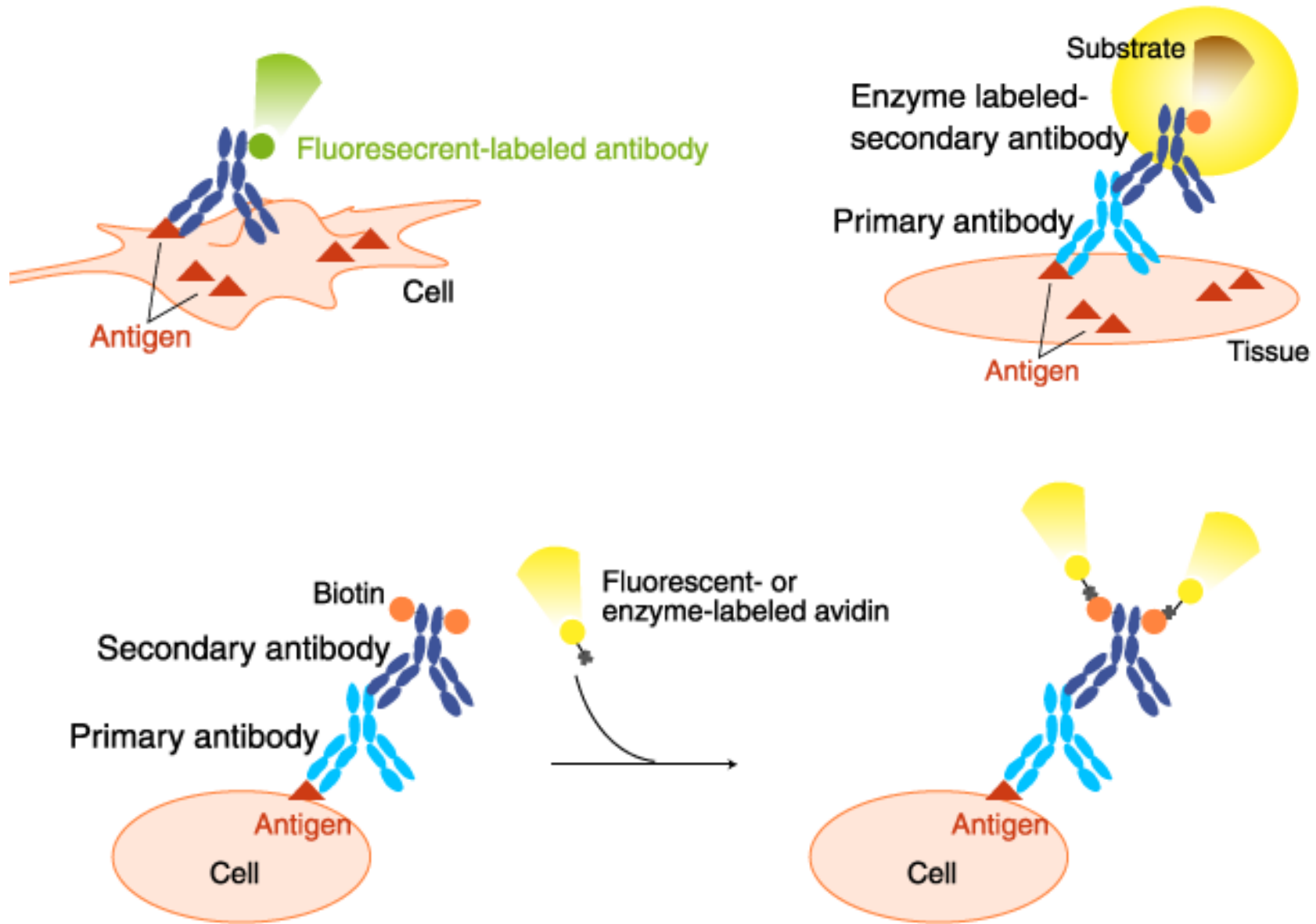
L'anticorpo primario (diretta) oppure quello secondario (indiretta) può essere **coniugato** ad un enzima o ad un fluorocromo

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



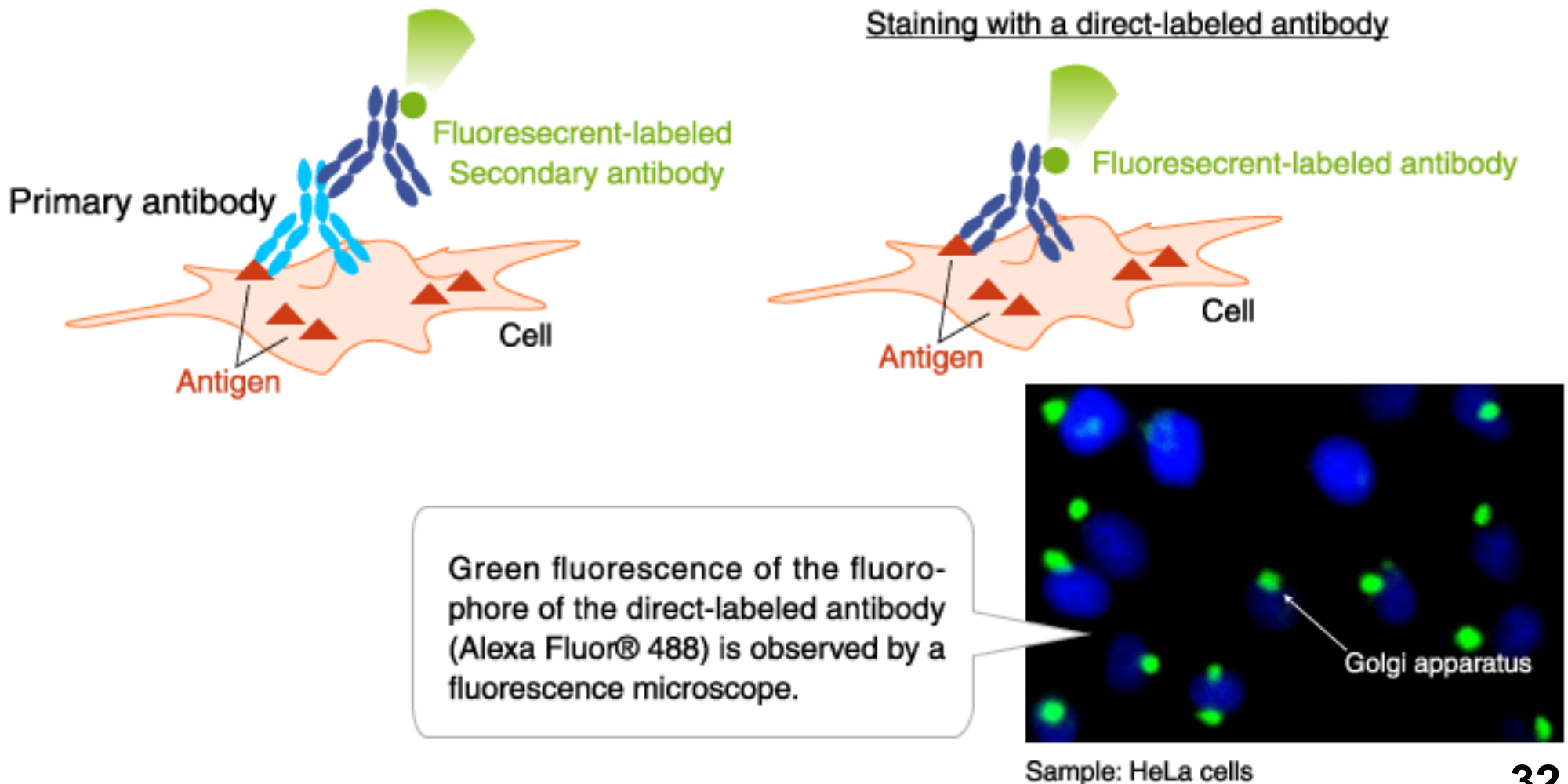
CONIUGAZIONE degli anticorpi



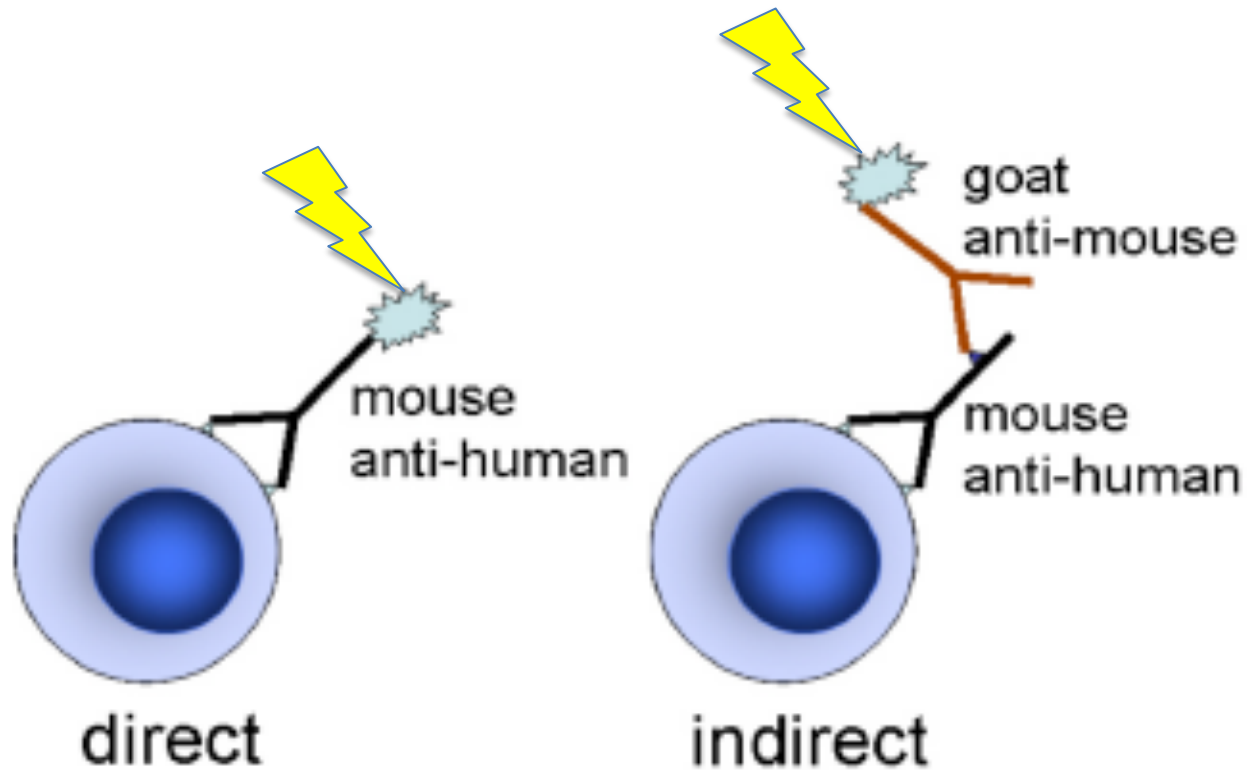
Immunofluorescenza

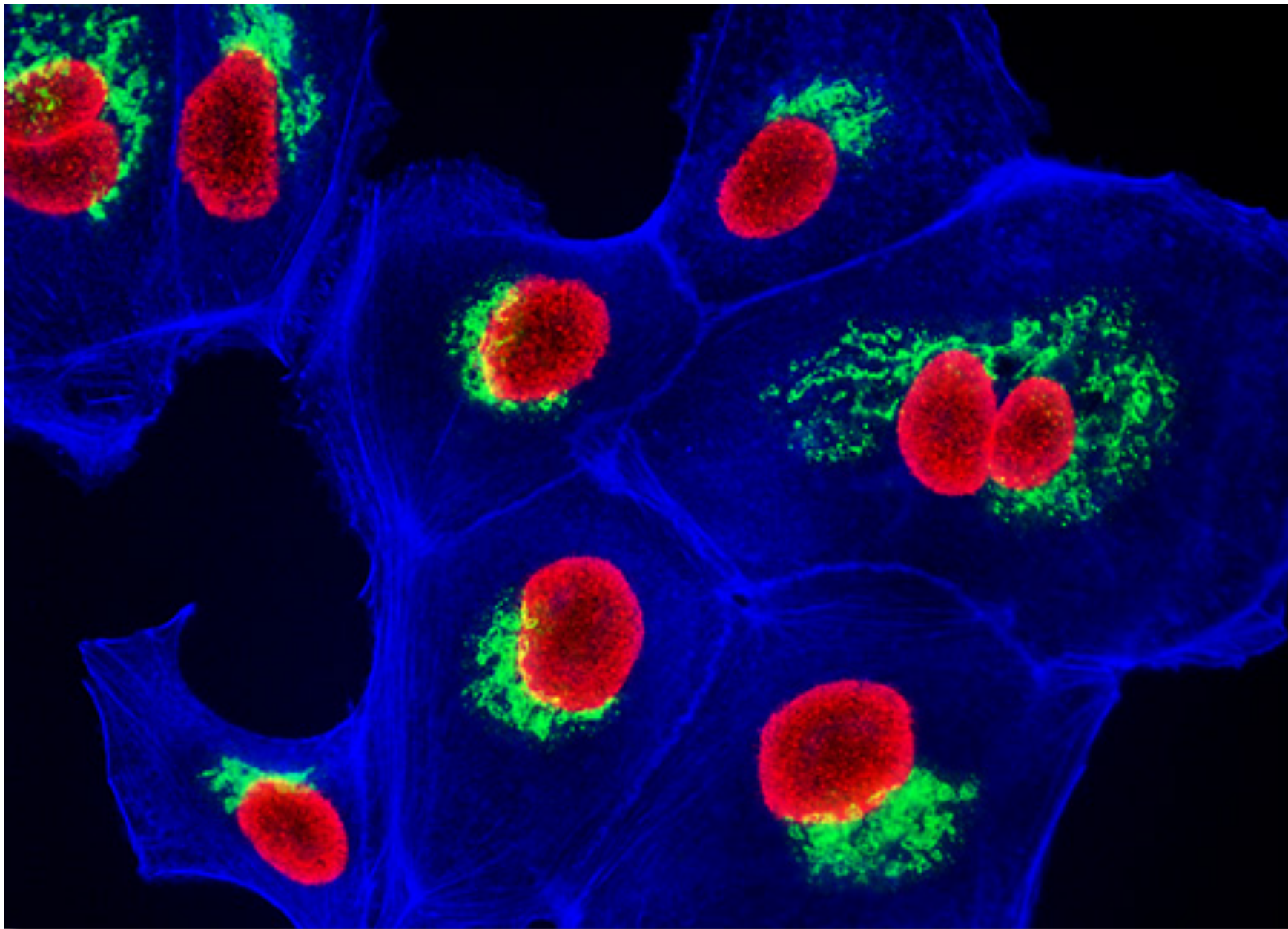
Permette di **visualizzare la localizzazione di una proteina** sulla superficie o all'interno della cellula

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



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.

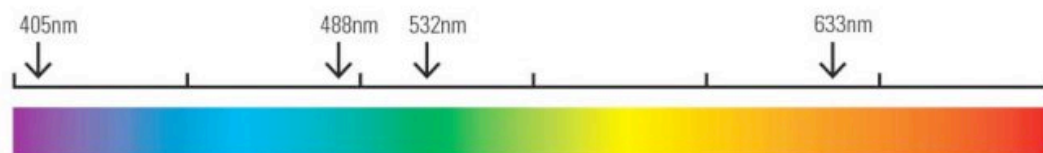
Even if FITC and TRITC are still in use, they are rather weak fluorescent dyes and not recommended for state of the art microscopy. Their profit is based on their economical price.

Cyanines

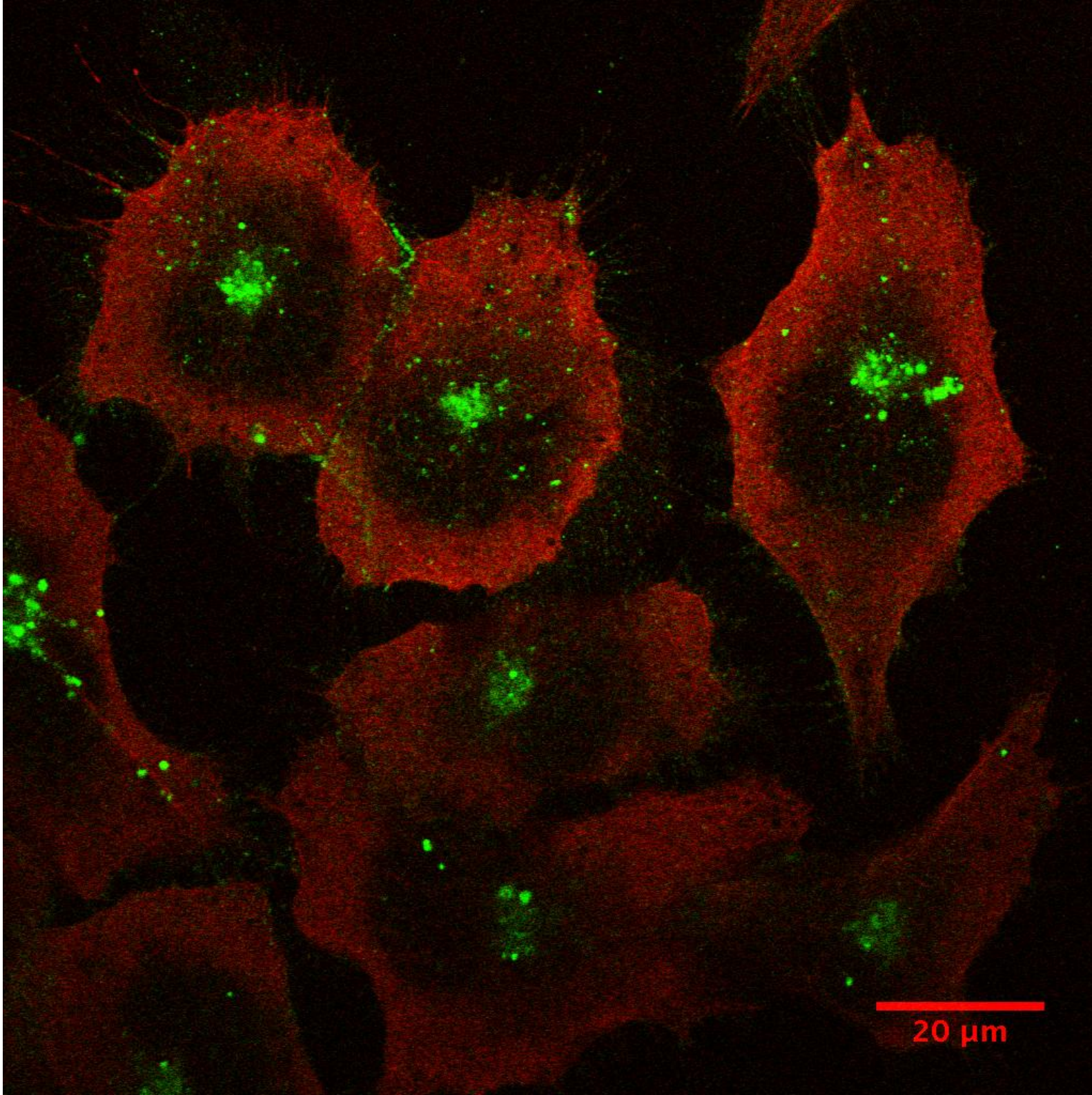
This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups.

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

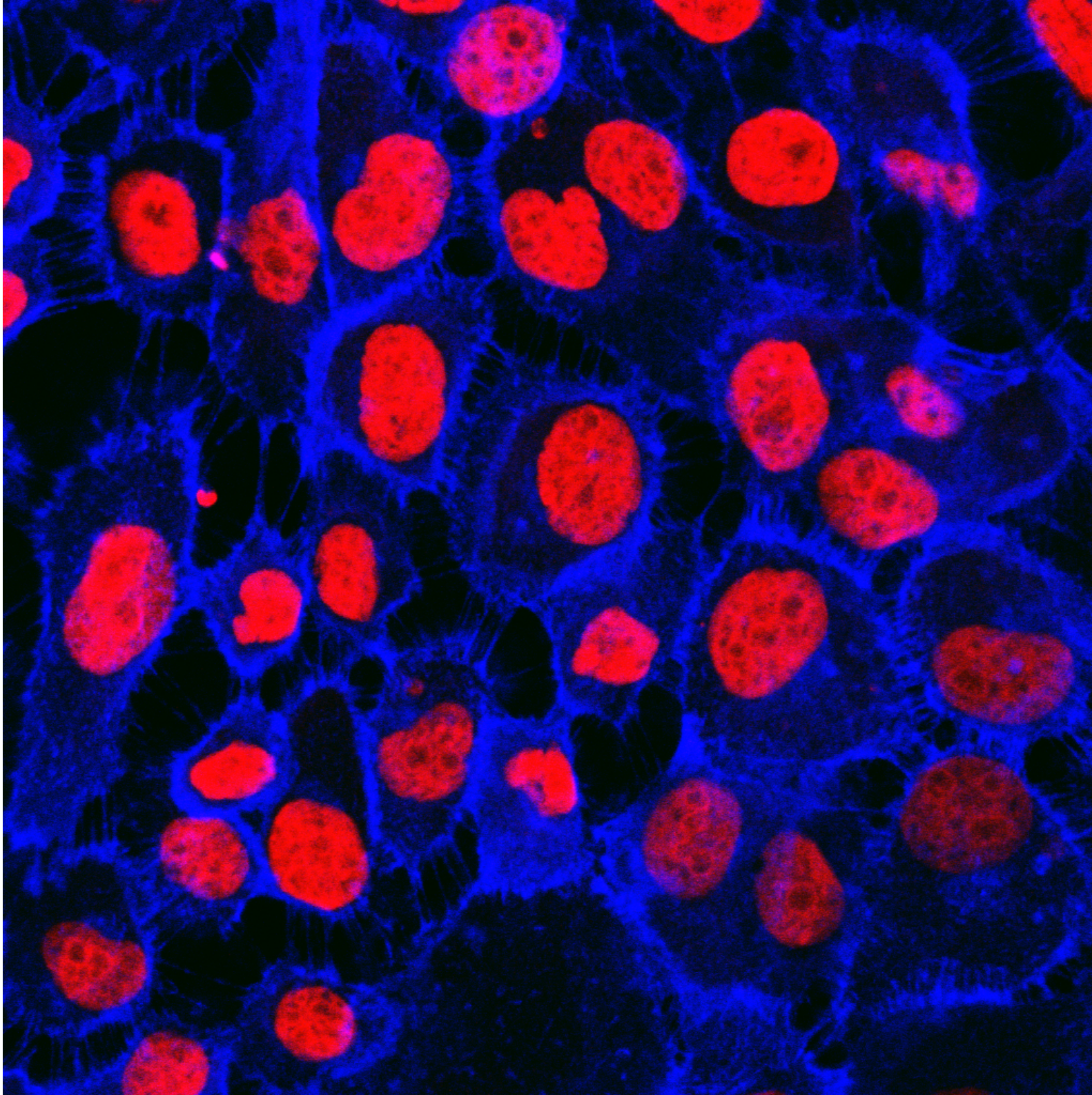


Cellule umane
derivate
da tumore
al polmone
in coltura

Alfa tubulina -
RITC
Gamma tubulina
- FITC

Immagine al
microscopio a
fluorescenza

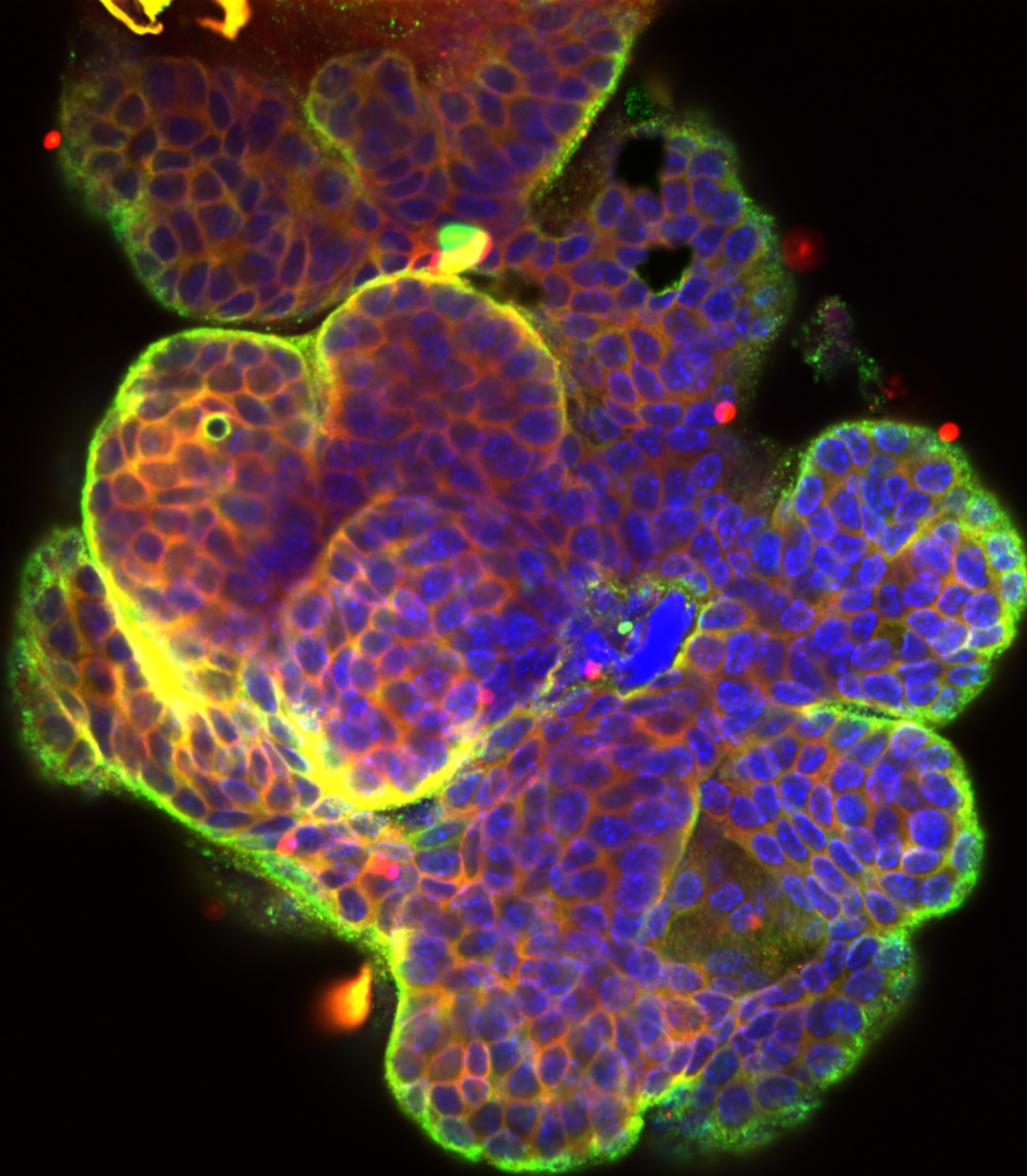
20 μm



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

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

**Immagine al
microscopio a
fluorescenza**



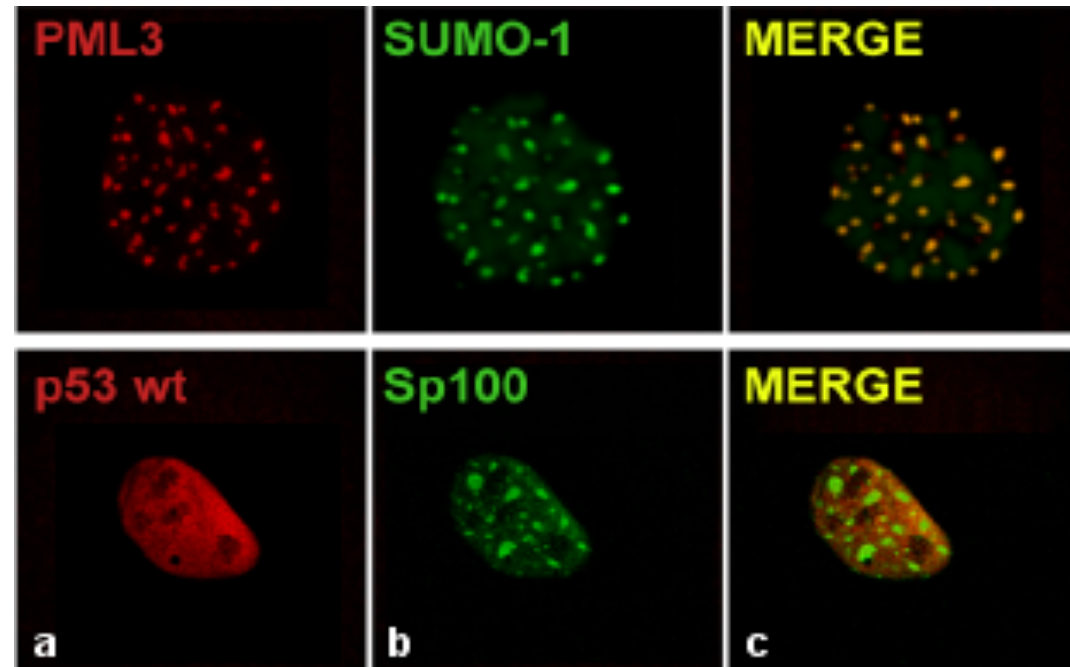
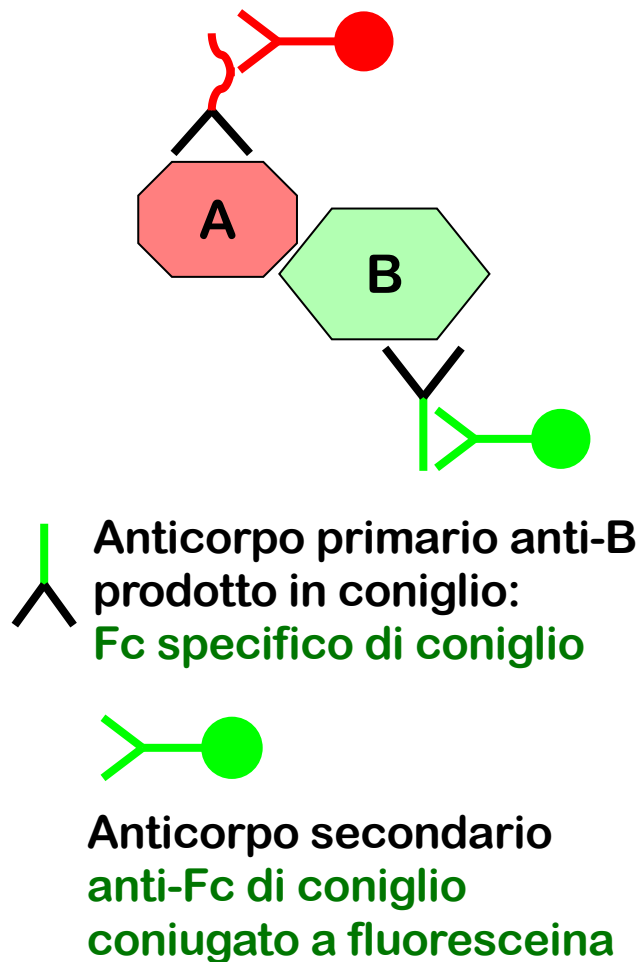
**Organoide
derivato da
tessuto epiteliale
mammario di
topo**

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

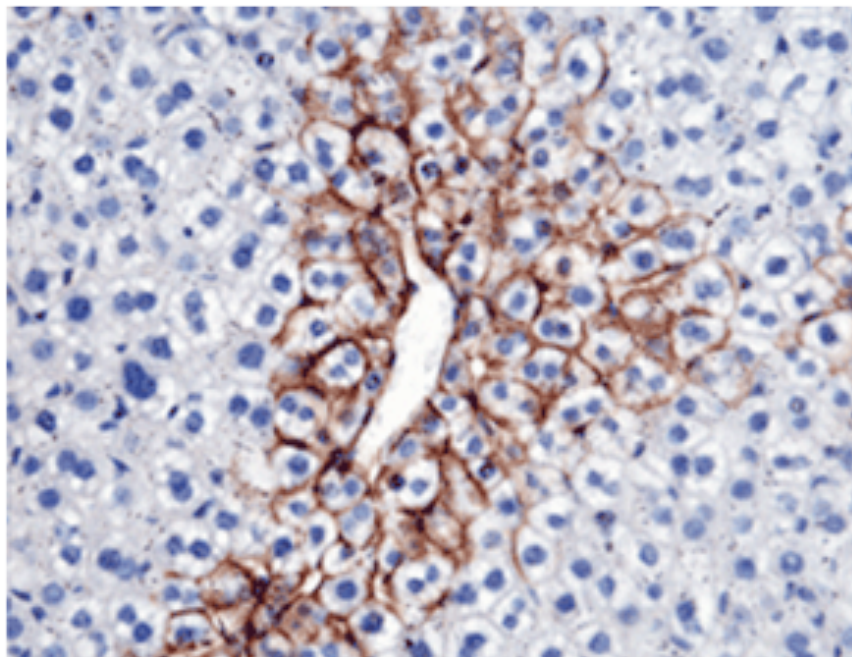
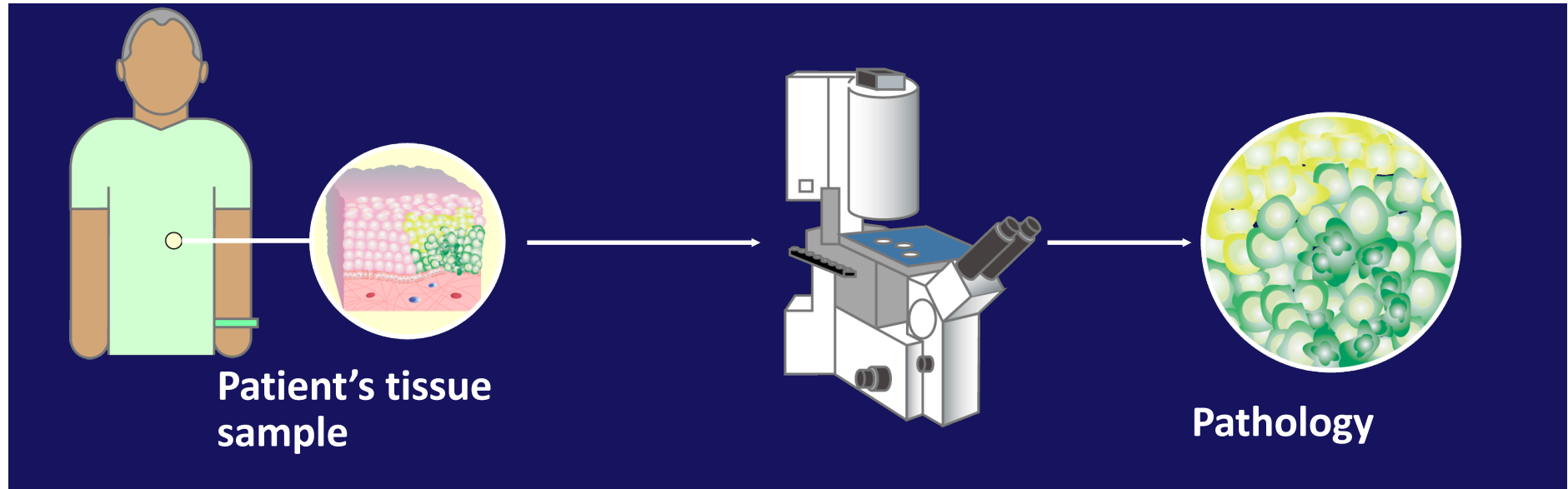
**Immagine al
microscopio a
fluorescenza
confocale**

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**



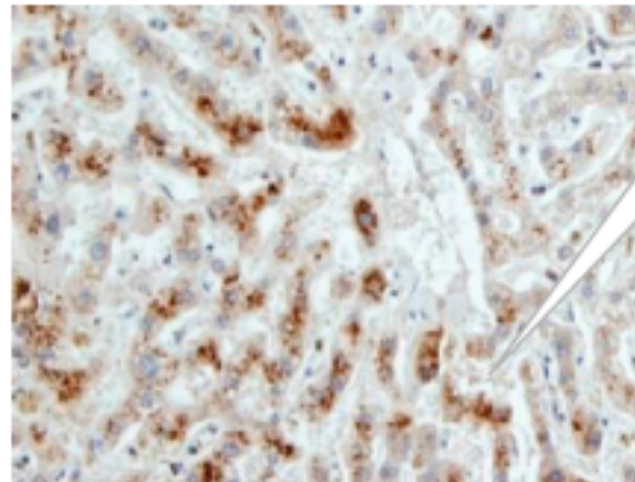
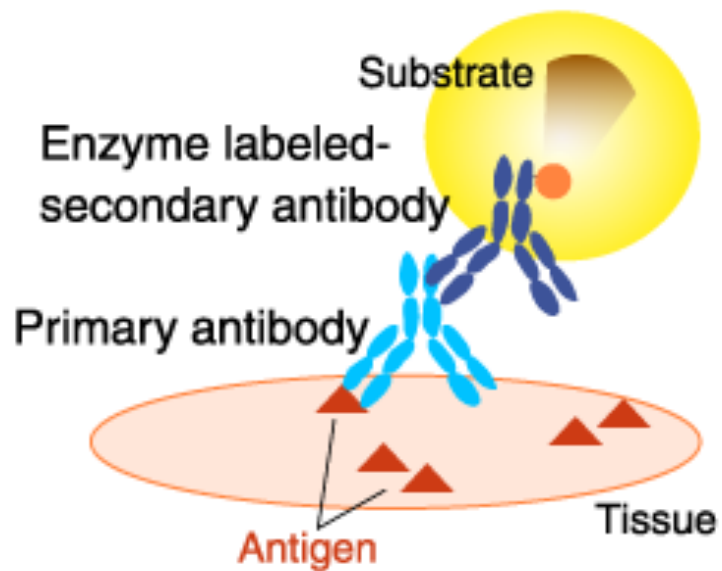
Utilizzo di anticorpi per il riconoscimento di antigeni nei tessuti



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 42

ANALISI di antigeni in campioni di tessuto Mediante IMMUNO-ISTOCHEMICA



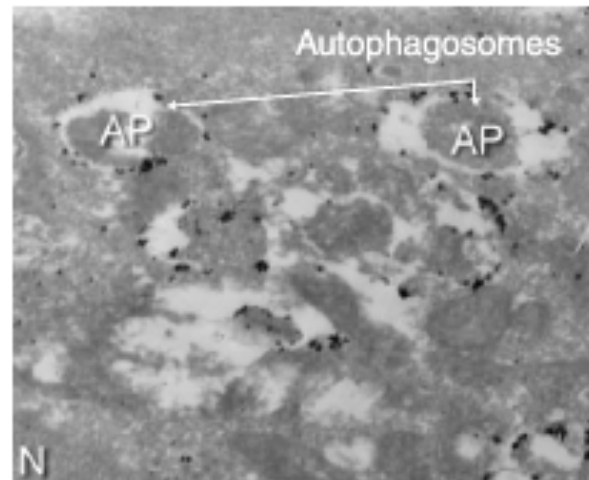
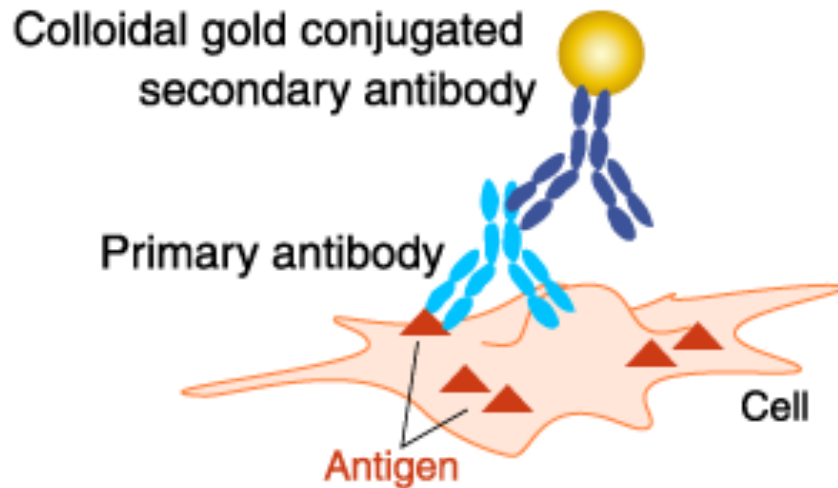
Sample: Human liver tissue section

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.