

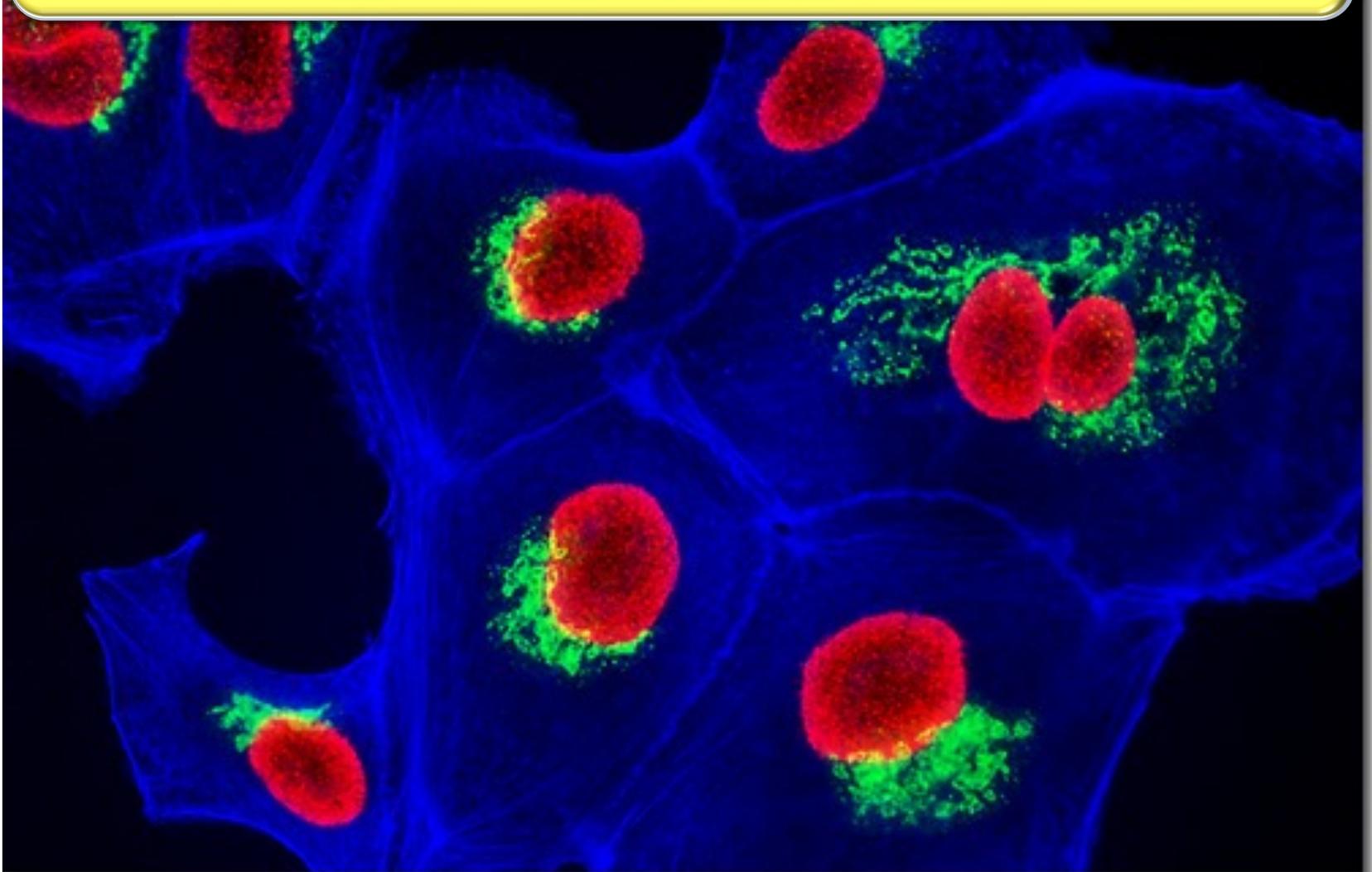
Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2024-2025

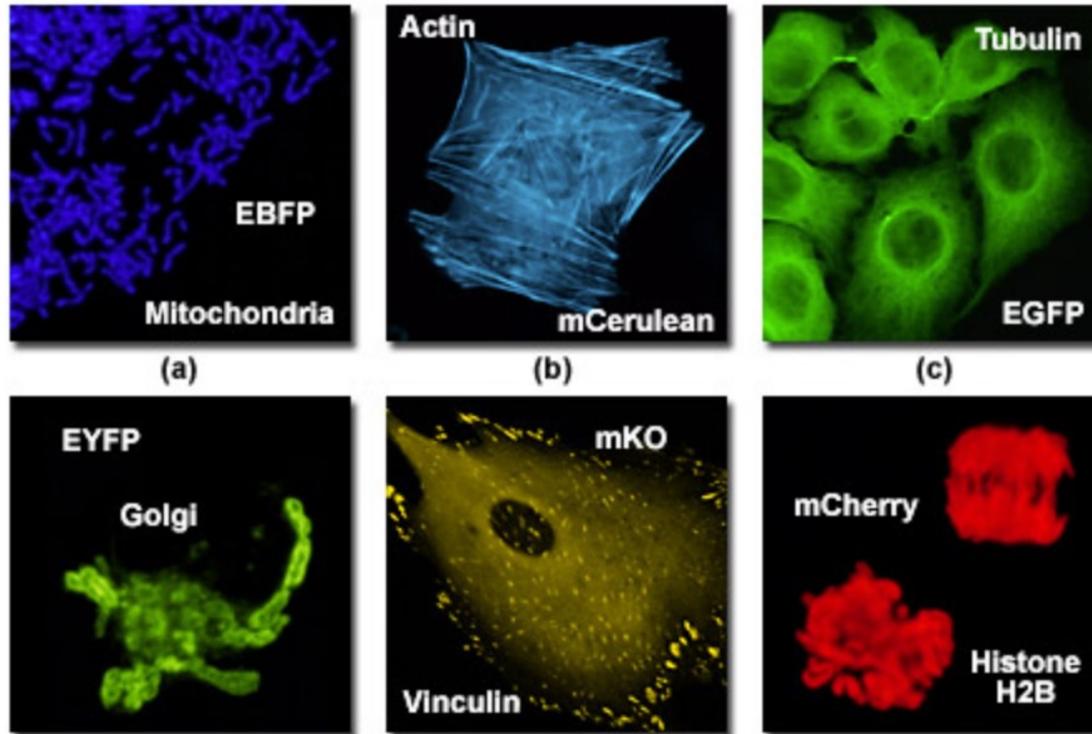
Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 4

Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine virali in situ



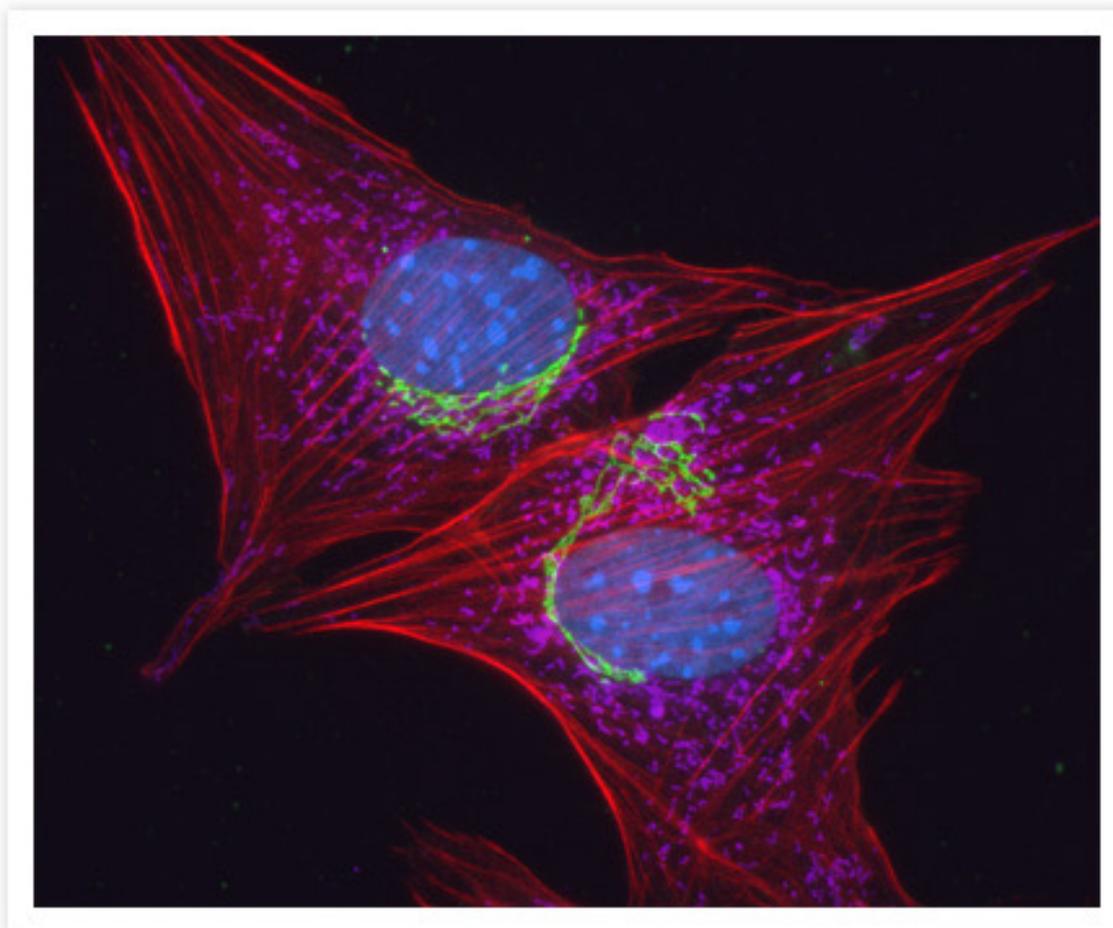
APPROCCIO #1: Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter



Vantaggi:

- 1) Approccio semplice: la proteina chimerica è direttamente visualizzabile
- 2) La proteina chimerica generalmente mantiene la localizzazione subcellulare (GFP non ha segnali propri)
- 3) Possono essere analizzate contemporaneamente molte diverse molecole in base alle caratteristiche dello strumento scelto

Utilizzo di coloranti fluorescenti selettivi per specifiche componenti subcellulari

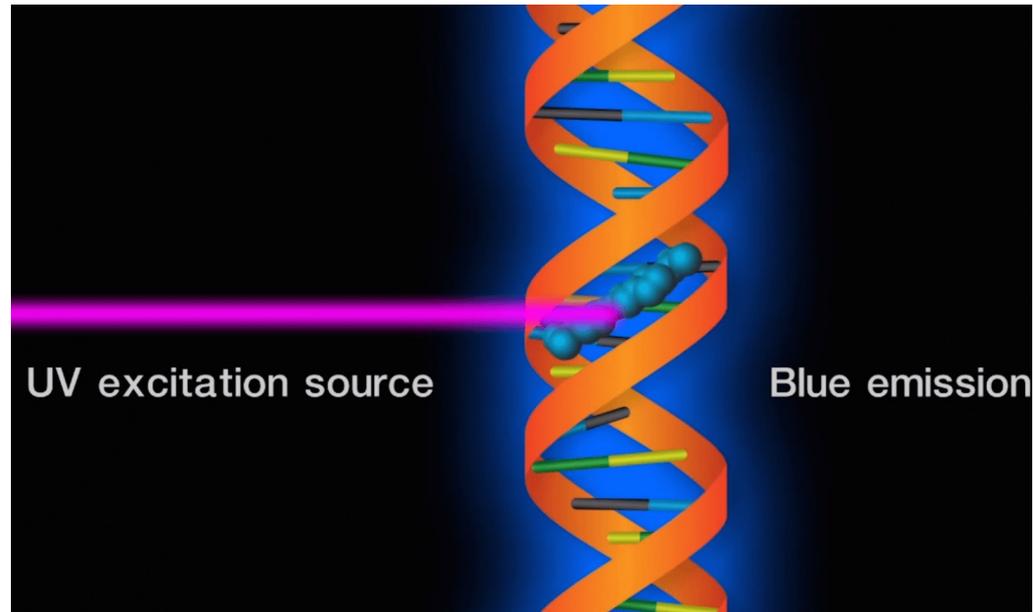


Fluorocromi comunemente utilizzati in microscopia cellulare

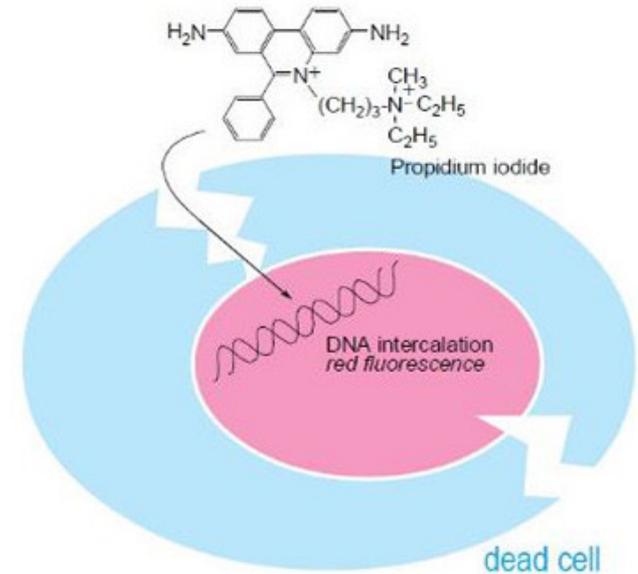
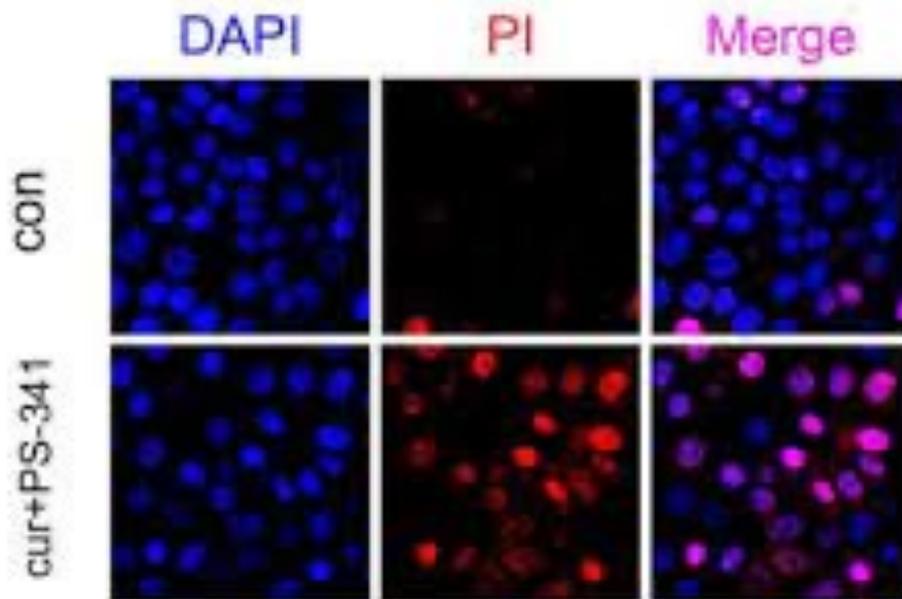


Catalog Code	Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
890	Certified Blank™				reference
897	Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
886	Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
887	Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
901	Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
914	APC-Cy™7	104k	650	767	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

**COLORANTI PER IL DNA utilizzati per microscopia:
DAPI, Hoechst, Acridine Orange, Propidio Ioduro....**



COLORANTI VITALI PER IL DNA



DAPI and PI double staining of H929 cells. Cell nucleus was visualized by DAPI. Cells undergoing necrosis were stained by PI. Cells were observed at $\times 200$ magnification, scale bar = 20 μm .

Microscopia confocale o deconvoluzione per analisi della localizzazione subcellulare

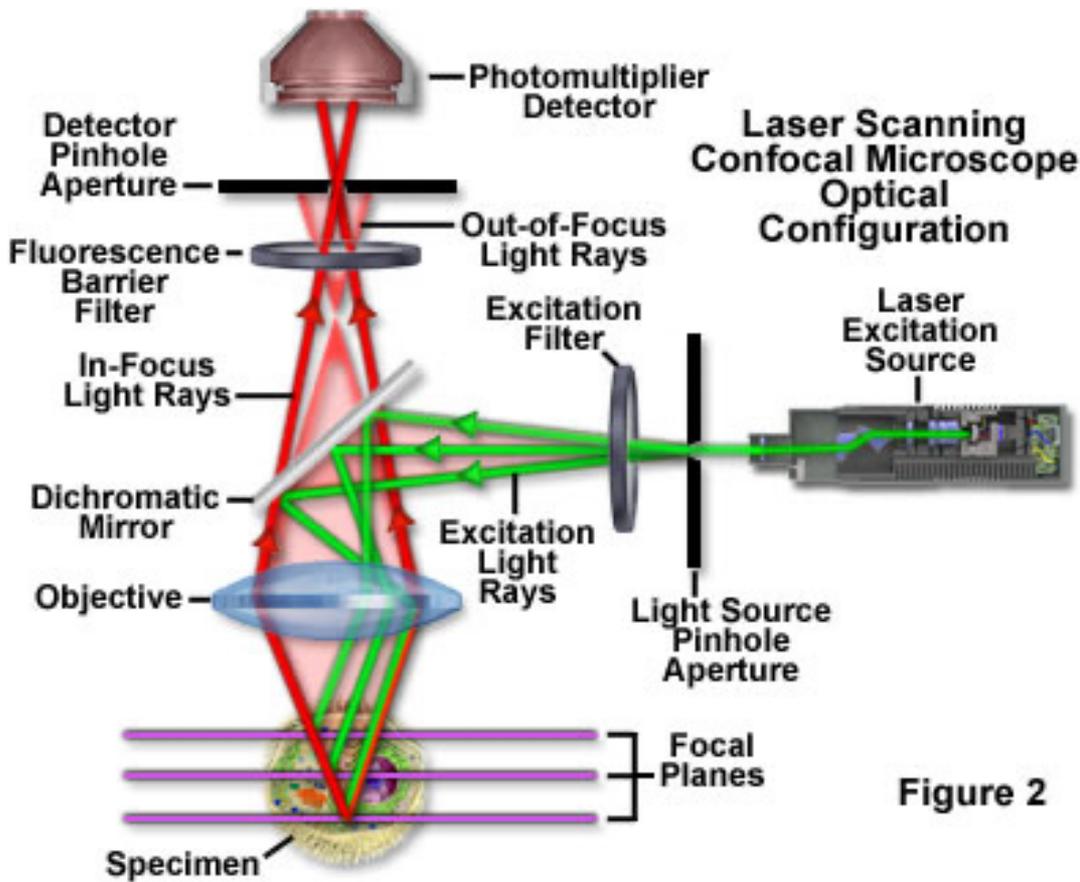
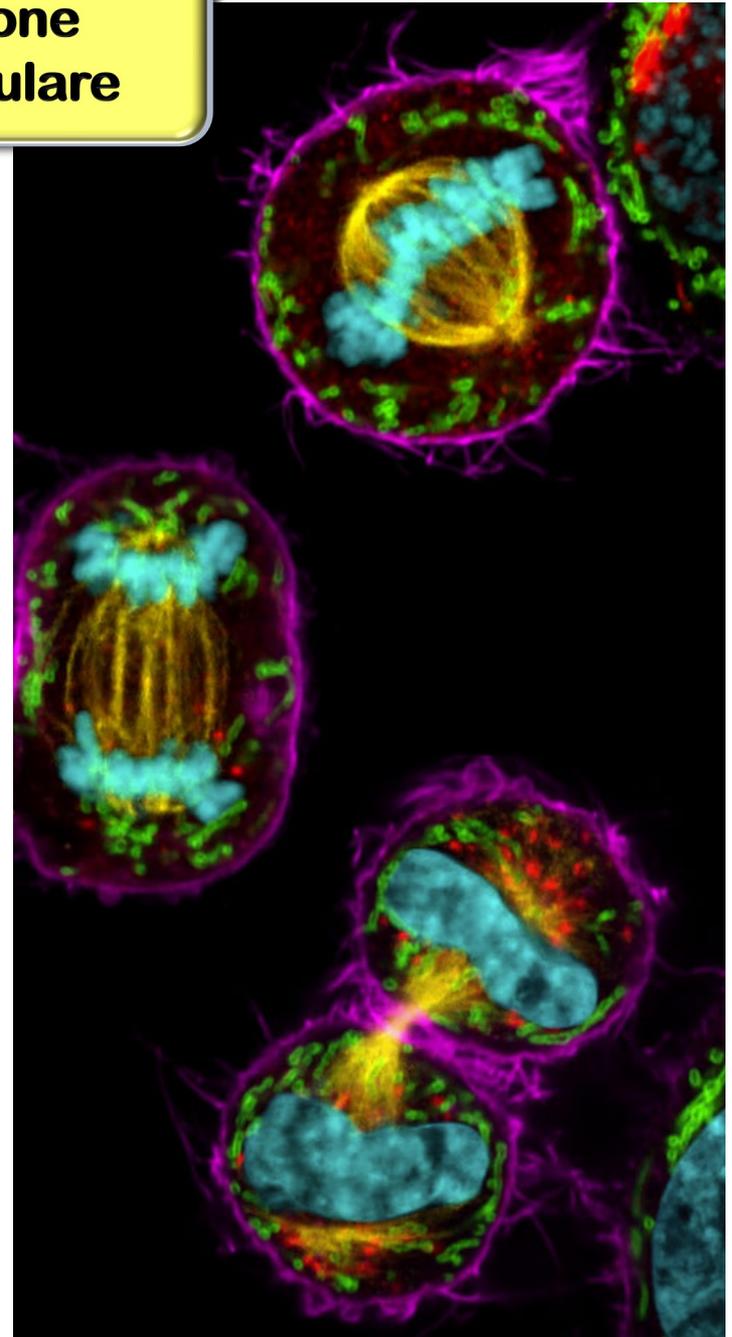
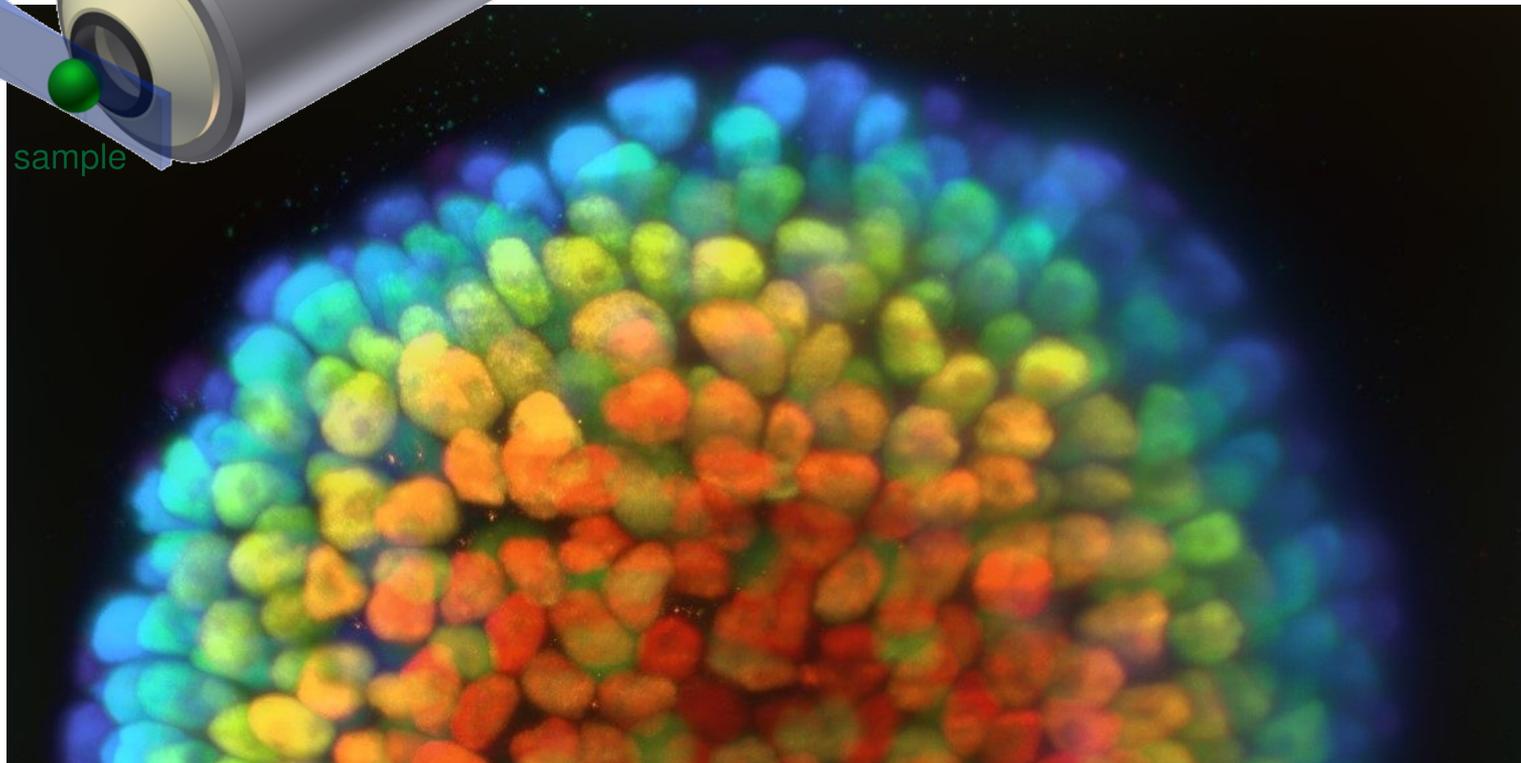
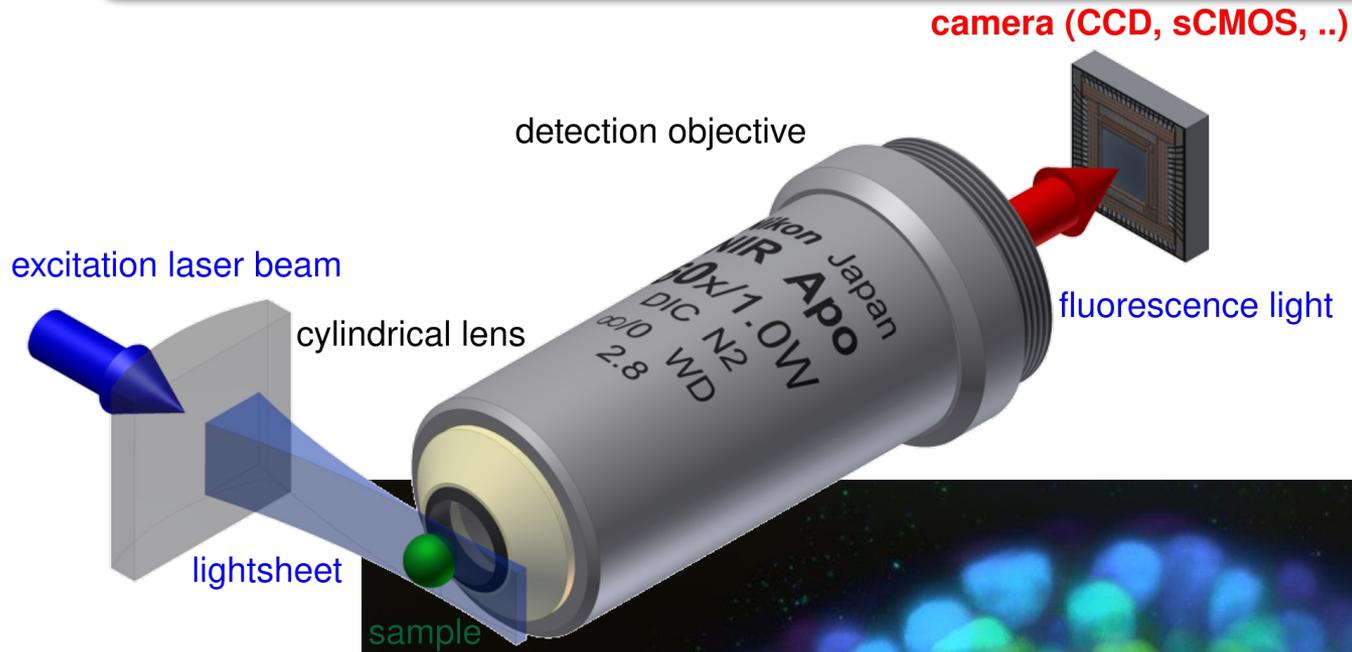


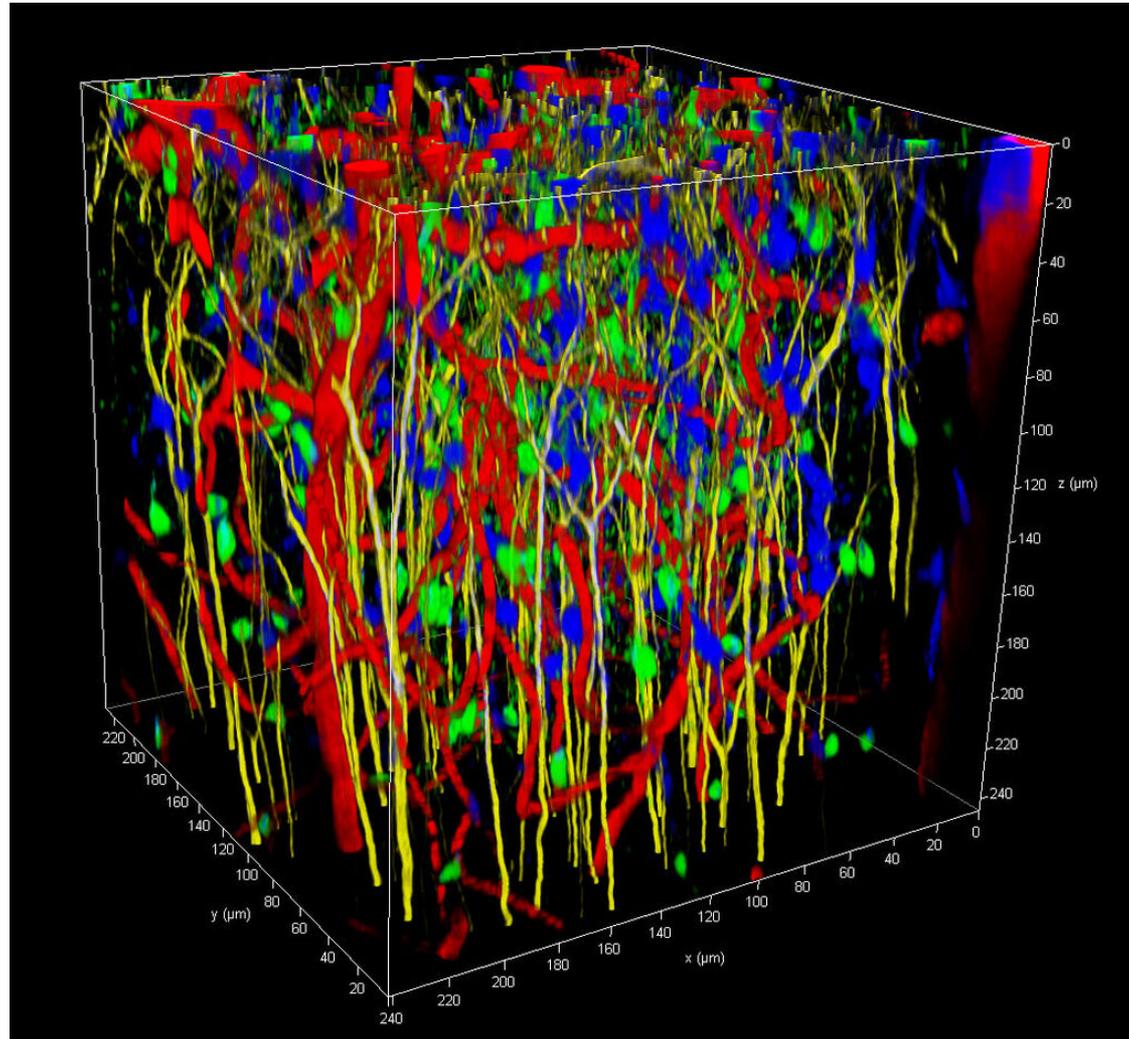
Figure 2



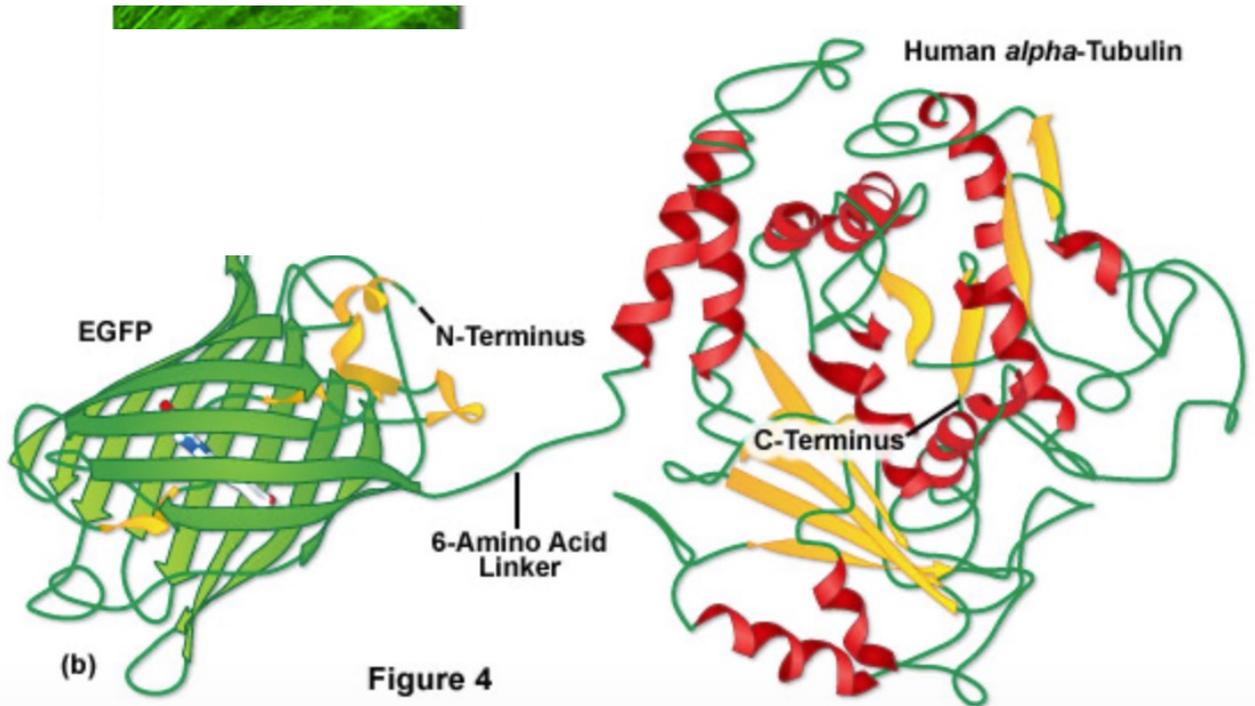
Microscopia lightsheet per imaging di campioni voluminosi



Microscopia multiphoton per elevata penetranza (analisi in vivo)



Svantaggi delle fusion proteins per gli studi funzionali:



1. l'ingombro sterico della GFP potrebbe interferire con le interazioni proteiche della proteina virale
2. Non sempre è possibile analizzare proteine di fusione

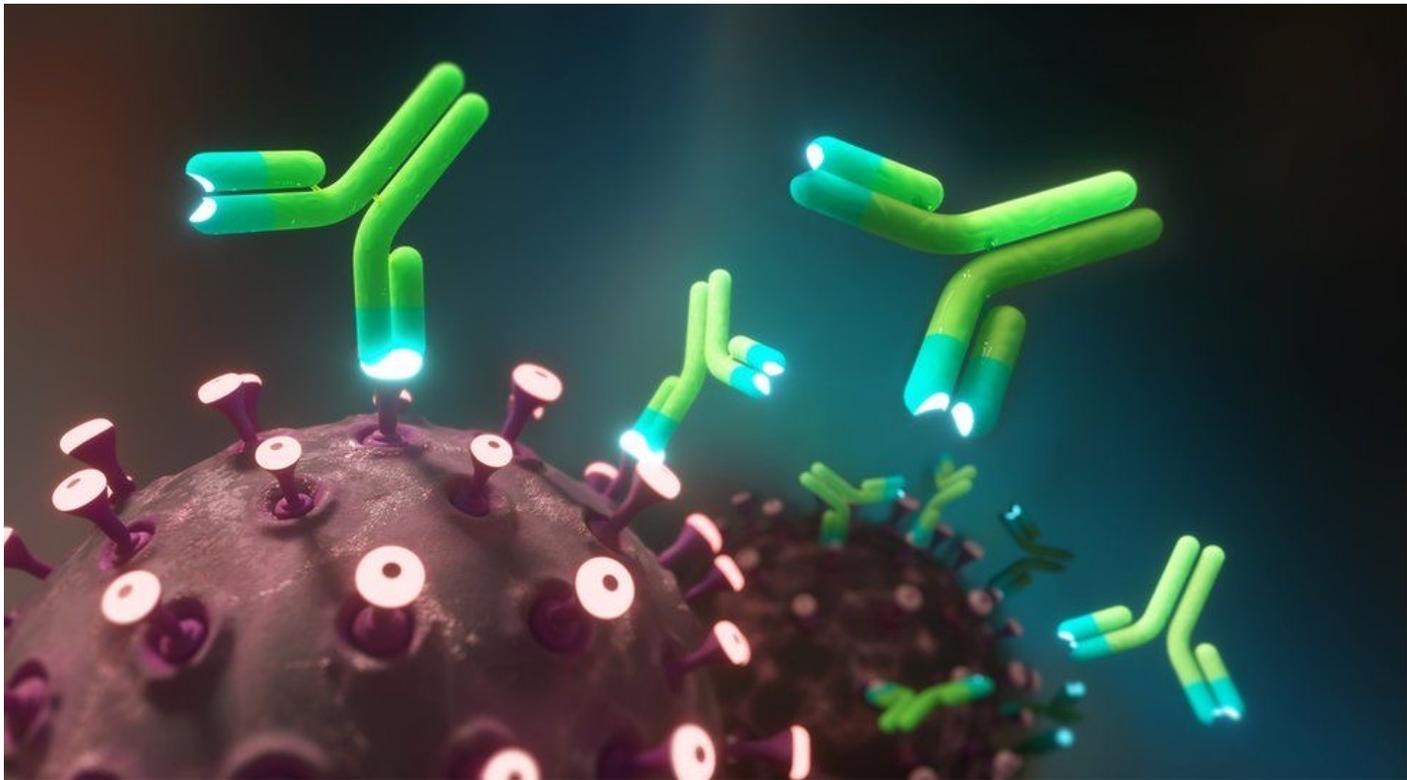
APPROCCIO #2:

riconoscimento di proteine specifiche

(anche endogene)

per affinità mediante “sonde” coniugate con fluorocromi

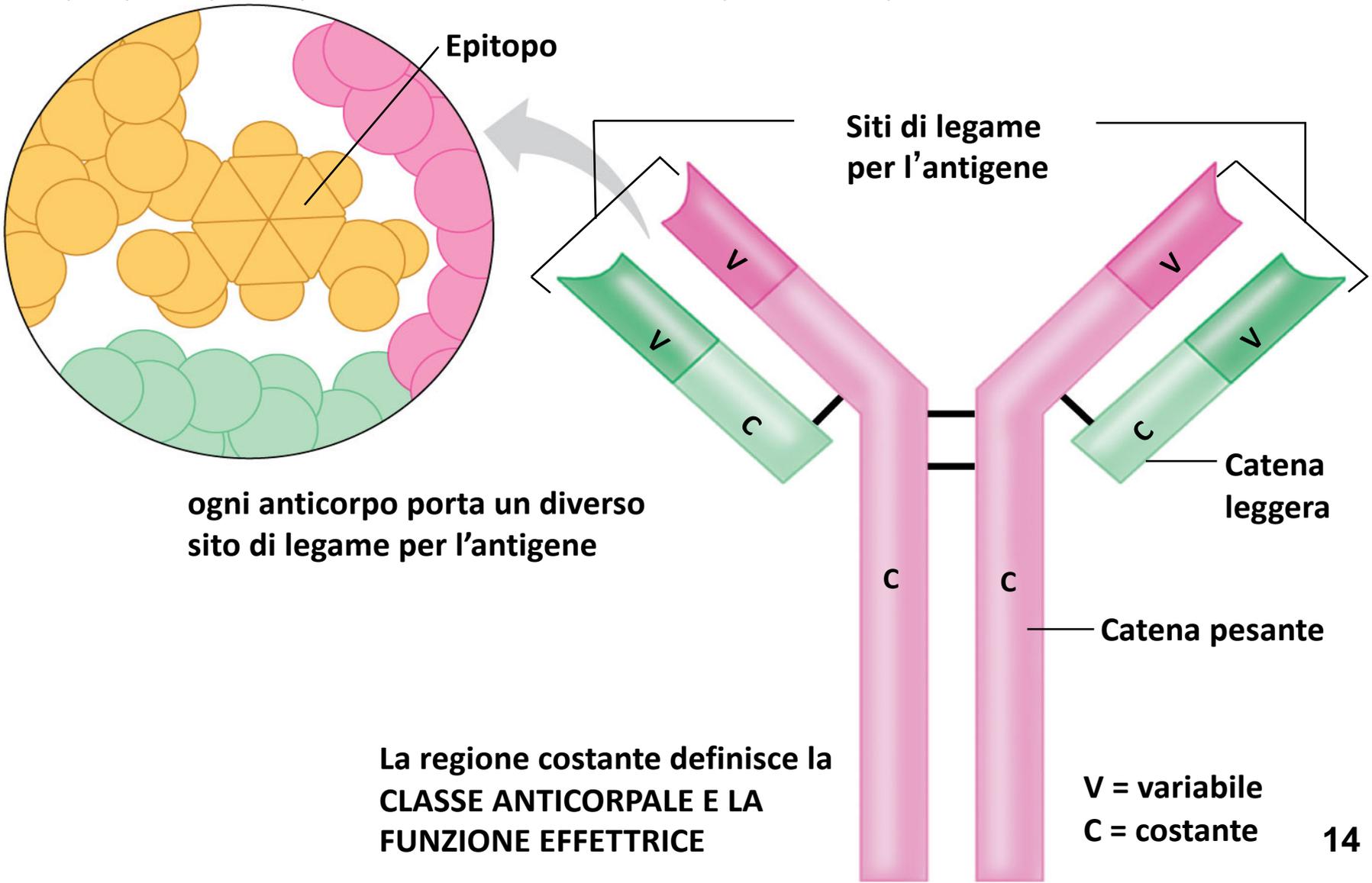
APPROCCIO #2: utilizzo di TECNICHE IMMUNOCHEMICHE



Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI** in modo **estremamente specifico** e con **elevata affinità**: possono essere quindi usati come **SONDE** per: **visualizzazione, purificazione e dosaggio** di antigeni, in fase liquida oppure **IN SITU**, in cellule e tessuti.

ANTIGENI: macromolecole riconosciute specificamente dall'anticorpo

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



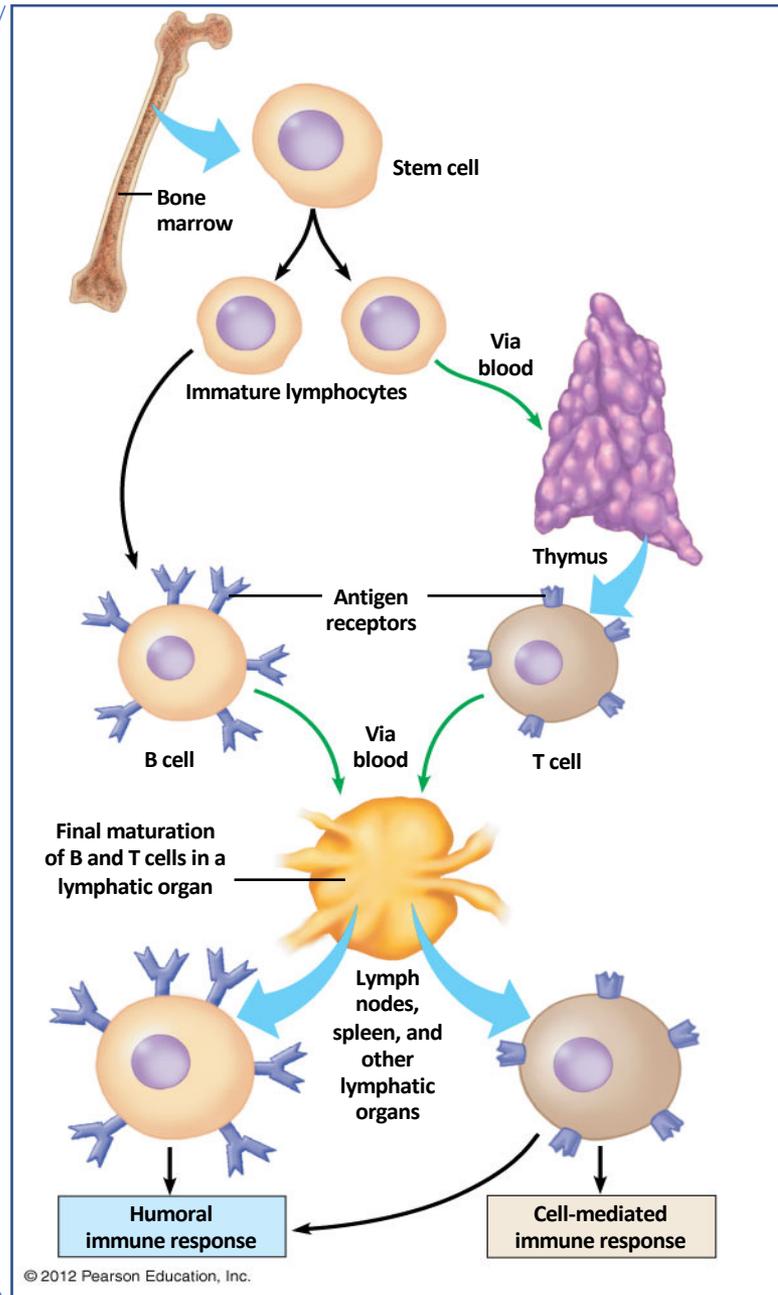
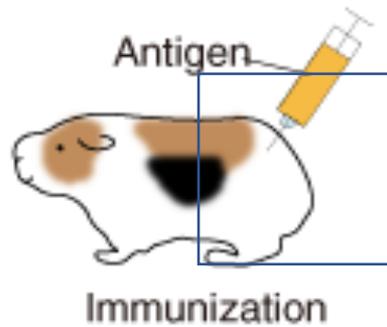
ogni anticorpo porta un diverso sito di legame per l'antigene

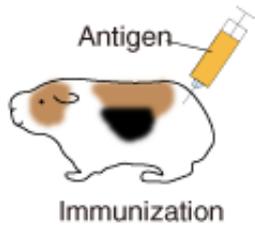
La regione costante definisce la CLASSE ANTICORPALE E LA FUNZIONE EFFETTRICE

**TECNICHE PER LA GENERAZIONE
DI ANTICORPI SPECIFICI**

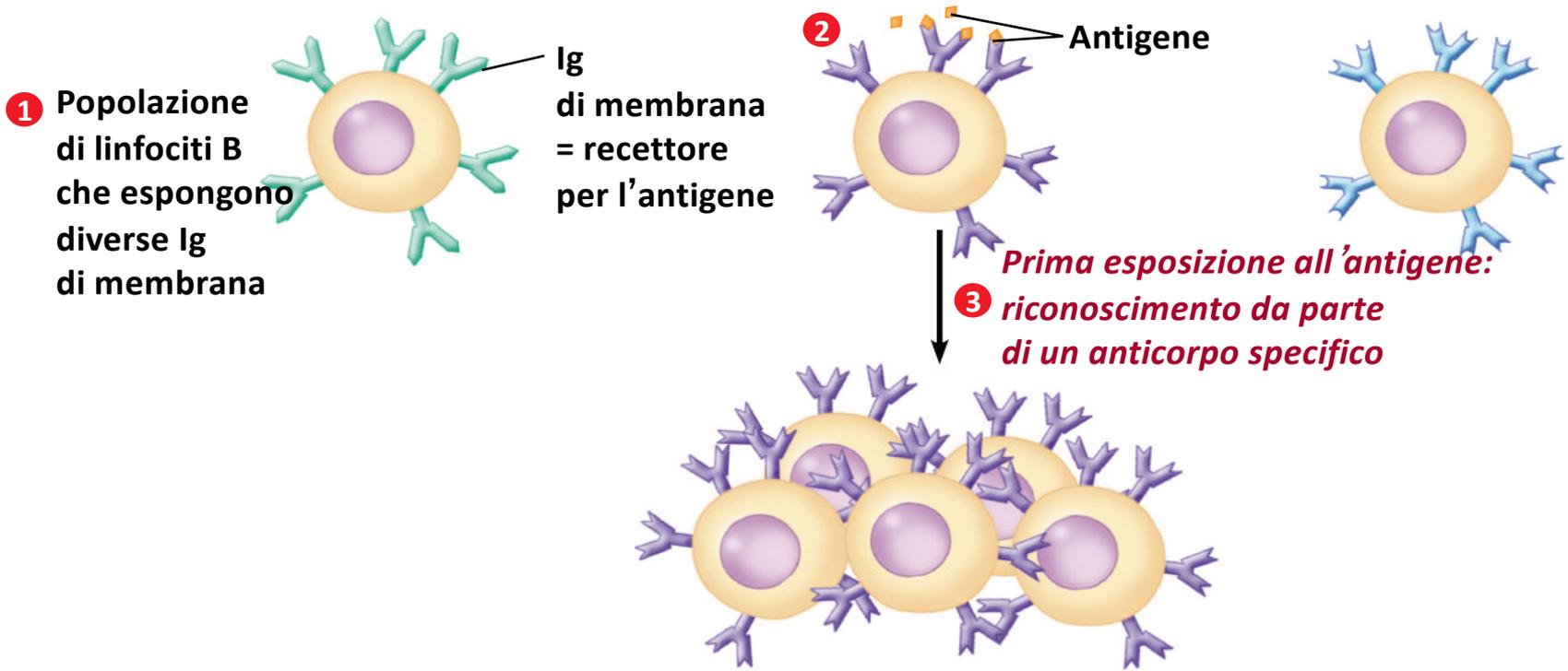
**Tecniche basate
sull'IMMUNIZZAZIONE di animali**

IMMUNIZZAZIONE di animali da laboratorio = iniezione dell' antigene



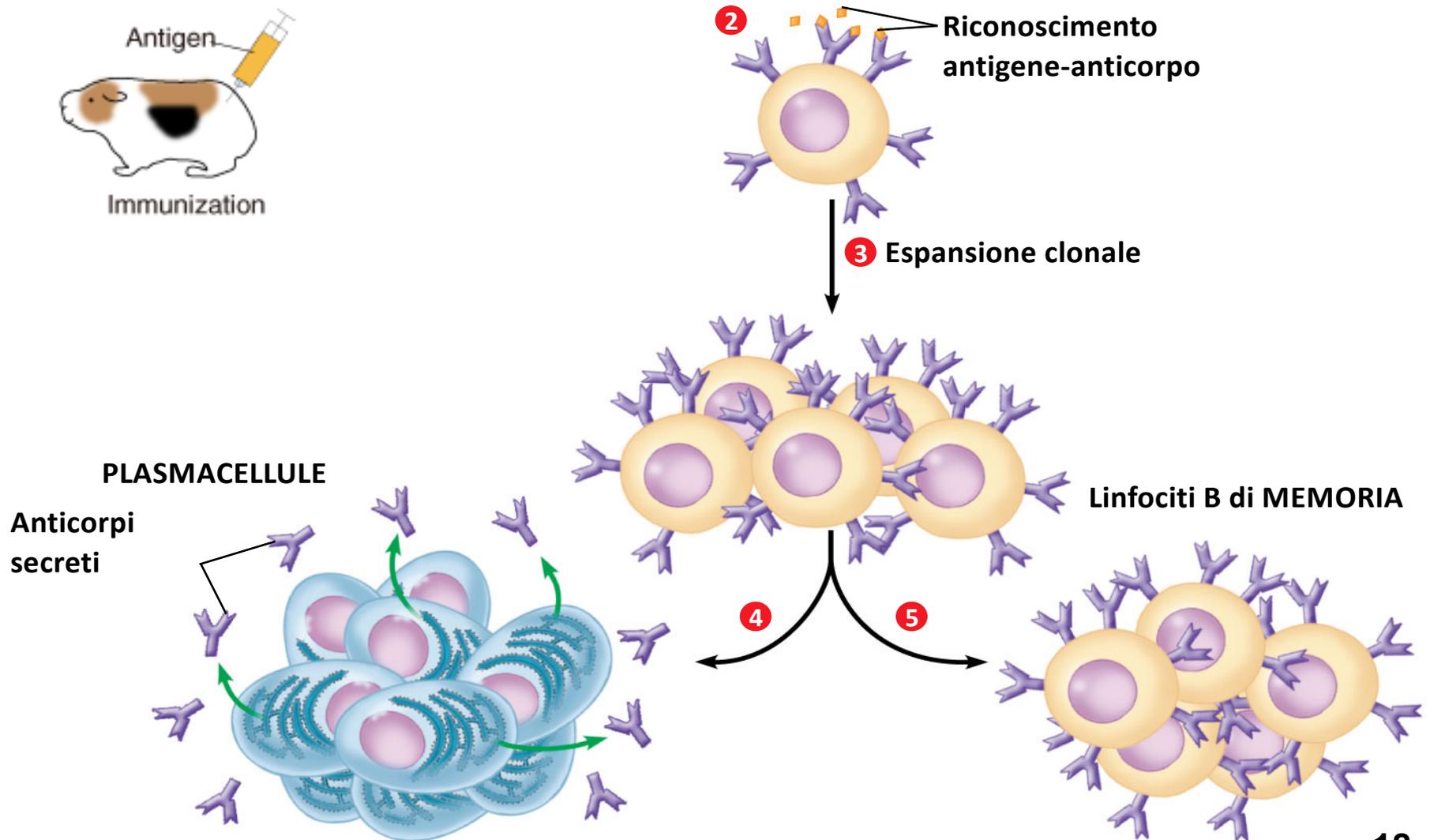


RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE

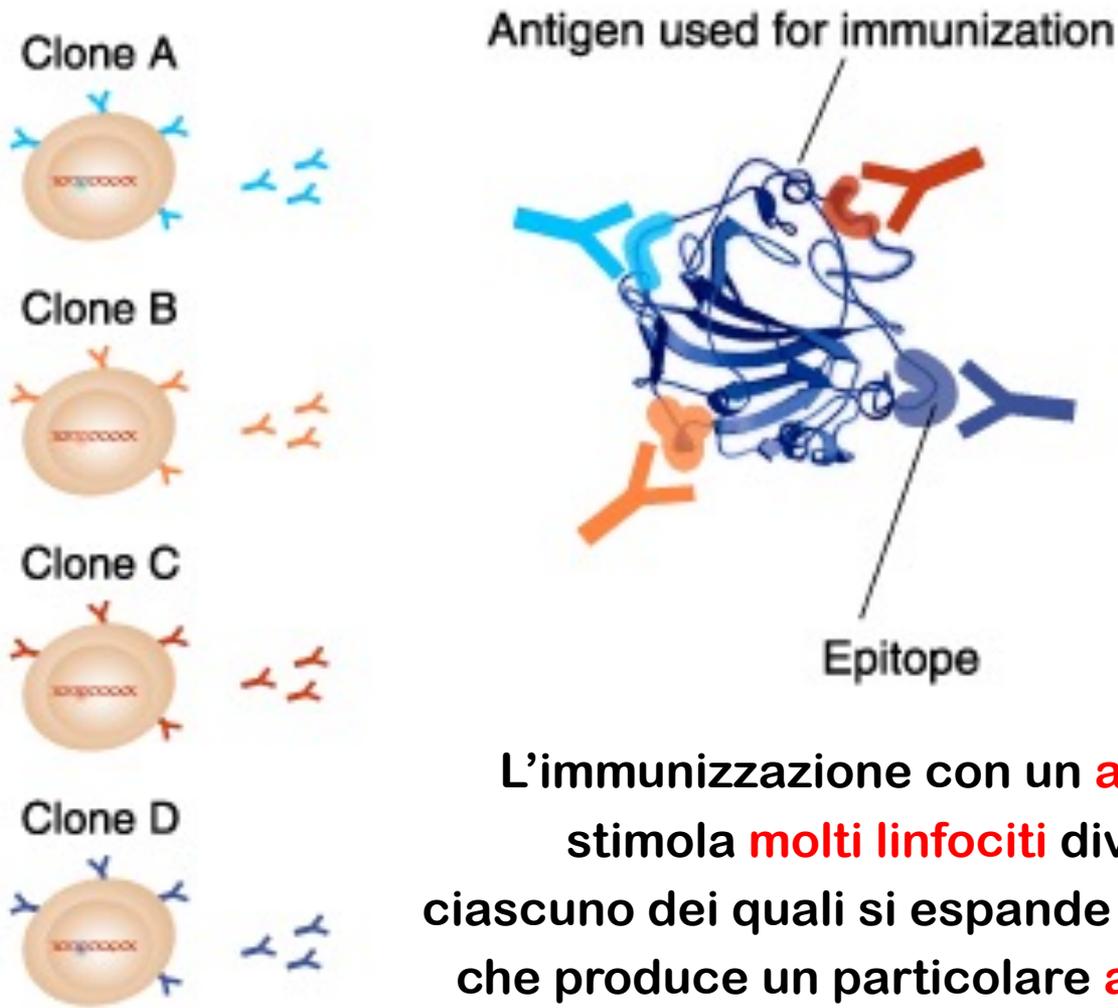


Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame all'antigene

La RISPOSTA IMMUNE genera PLASMACELLE e LINFOCITI DI MEMORIA

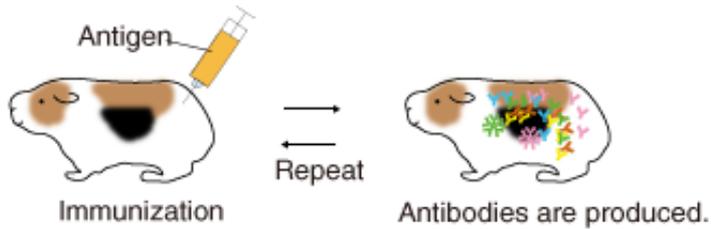


LA RISPOSTA IMMUNE è POLICLONALE



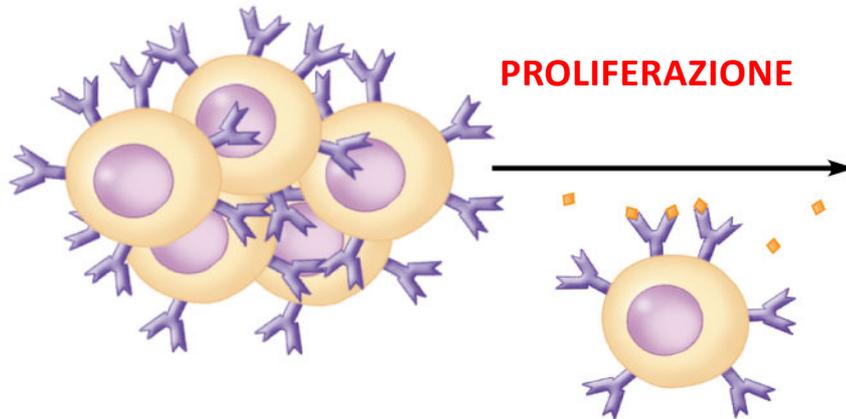
L'immunizzazione con un **antigene** stimola **molti linfociti** diversi, ciascuno dei quali si espande in un **clone** che produce un particolare **anticorpo**.

RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE



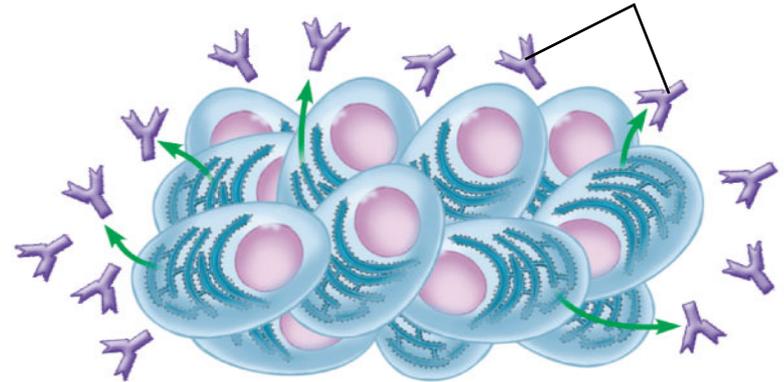
Immunized animals:
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

Linfociti B di MEMORIA

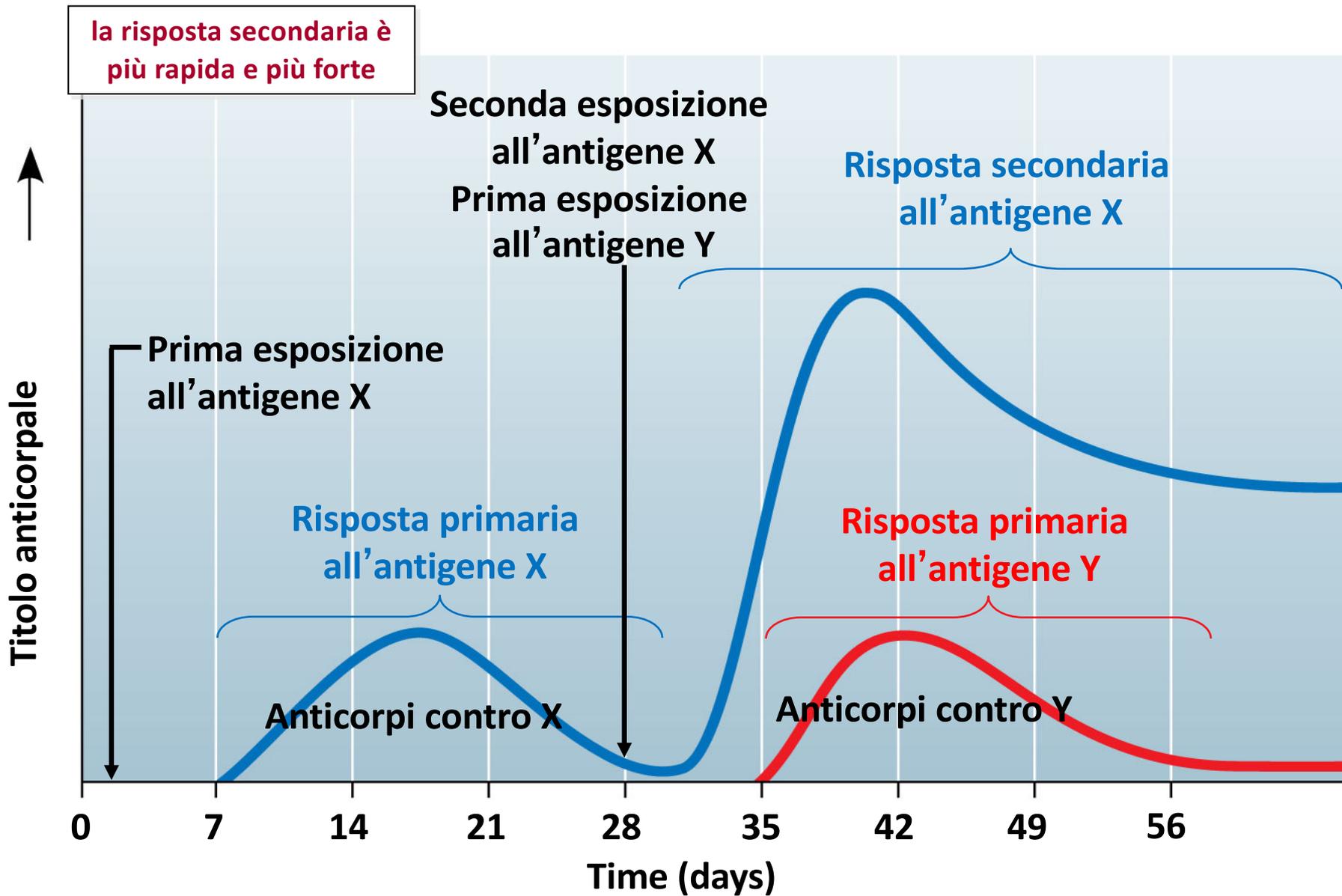


PLASMACELLE

ANTICORPI
SECRETI

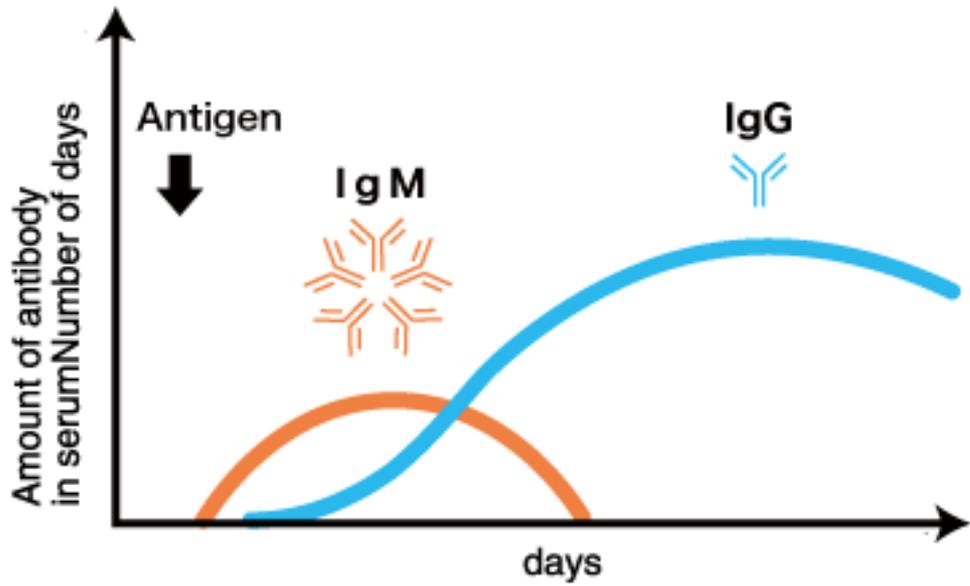


Linfociti B di MEMORIA

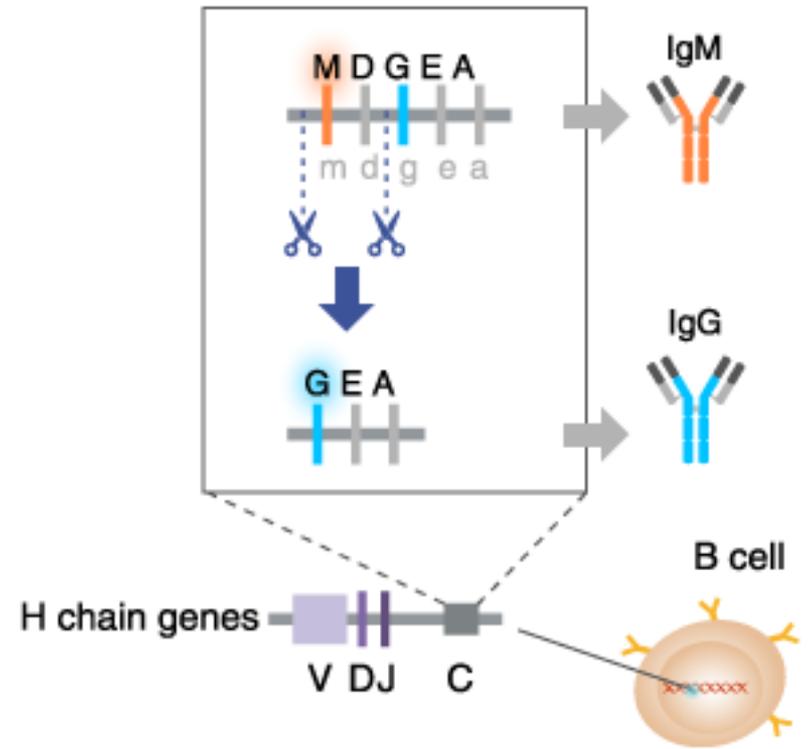


CLASSI ANTICORPALI

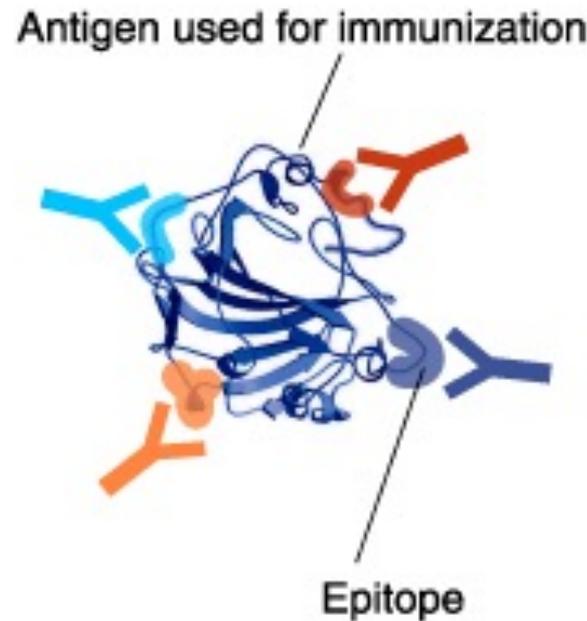
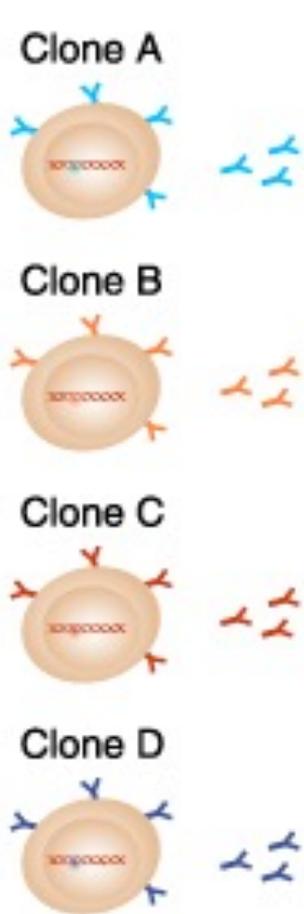
Levels of circulating antibodies to a specific antigen



Class switching



LA RISPOSTA IMMUNE GENERA ANTICORPI POLICLONALI

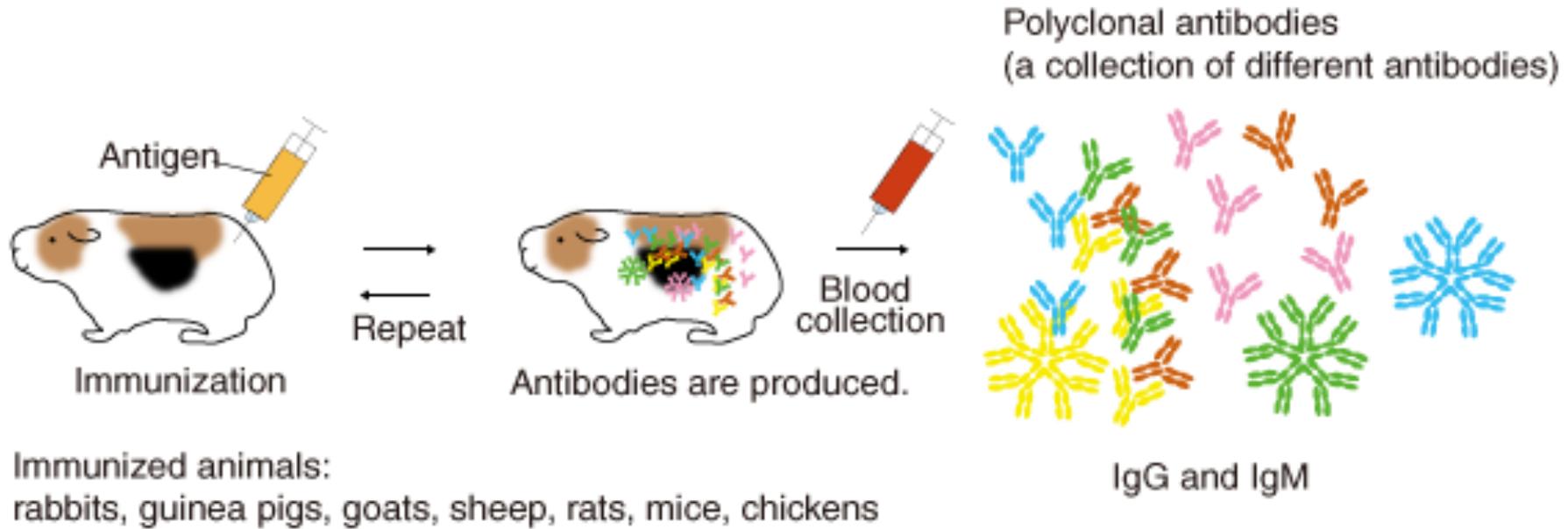


L'immunizzazione con un **antigene** stimola molti linfociti diversi, ciascuno dei quali si espande in un clone che produce un **diverso anticorpo**:

il **siero immune** (sangue dell'animale immunizzato) contiene una **miscela di anticorpi diversi** diretti contro lo **stesso antigene** ma capaci di riconoscere **epitopi diversi** di questo = **ANTICORPO POLICLONALE**

L'isolamento di **SINGOLI (cloni di) LINFOCITI** permette di produrre **ANTICORPI MOLOCLONALI**

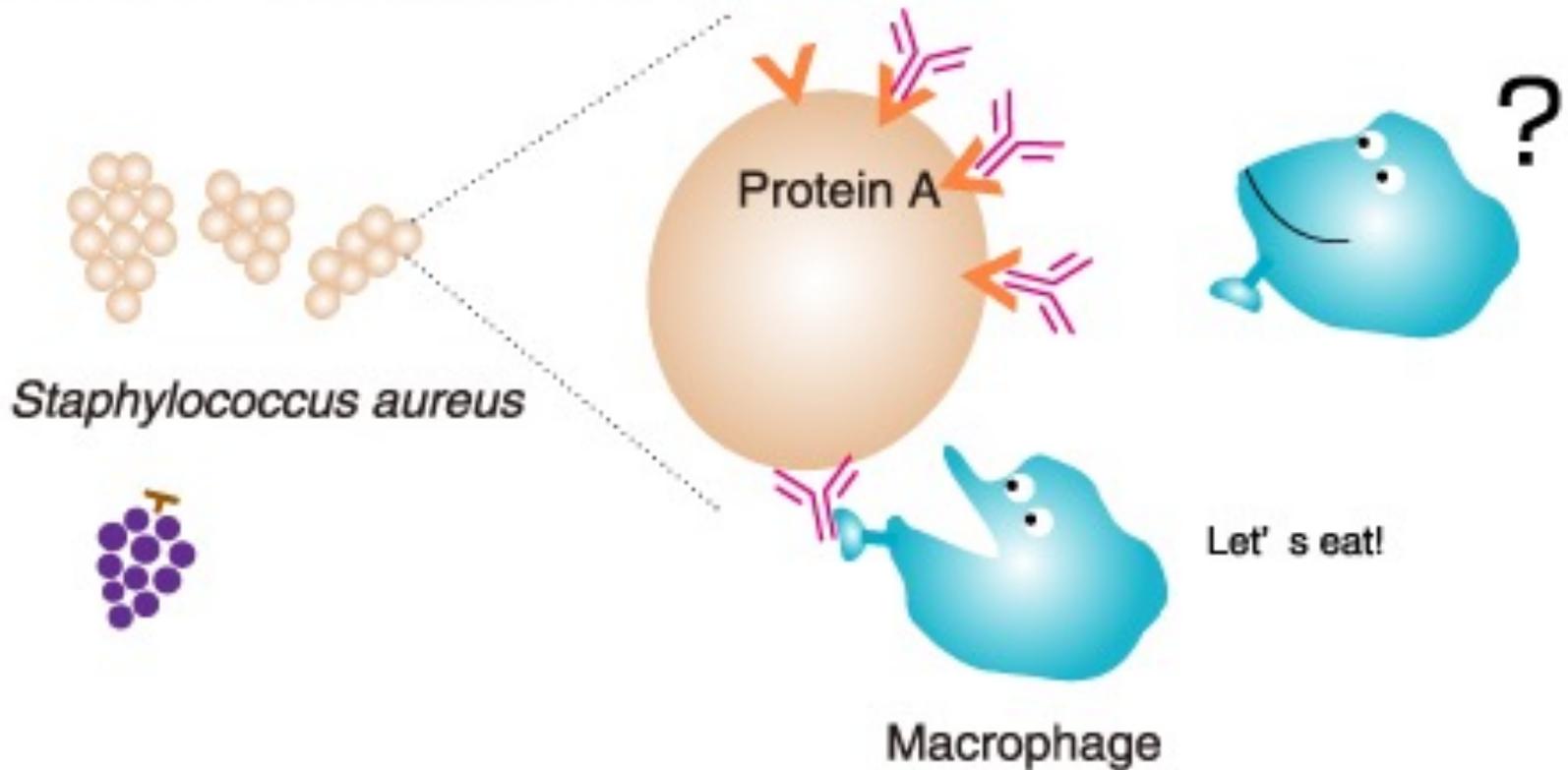
Al termine del ciclo di immunizzazione viene prelevato un po' del sangue dell'animale per recuperare gli anticorpi



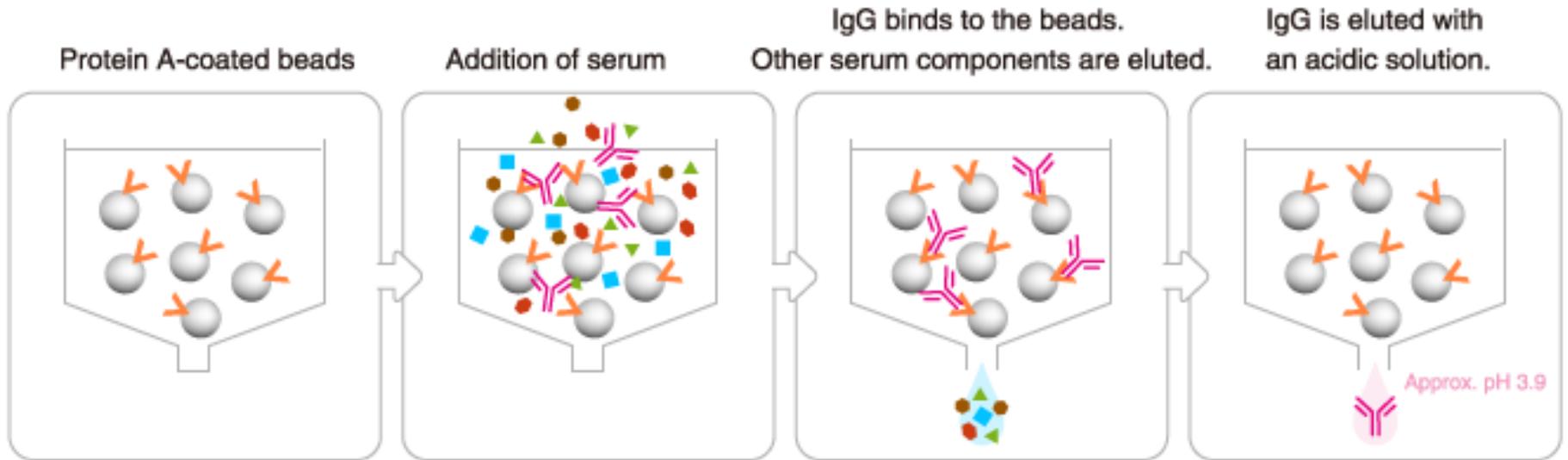
SIERO IMMUNE o ANTISIERO

PURIFICAZIONE DI ANTICORPI dal siero mediante PROTEINA A di Stafilococco

Immune evasion by *Staphylococcus aureus*



PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



ANTICORPI POLICLONALI:

Vantaggi:

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

Polyclonal antibodies

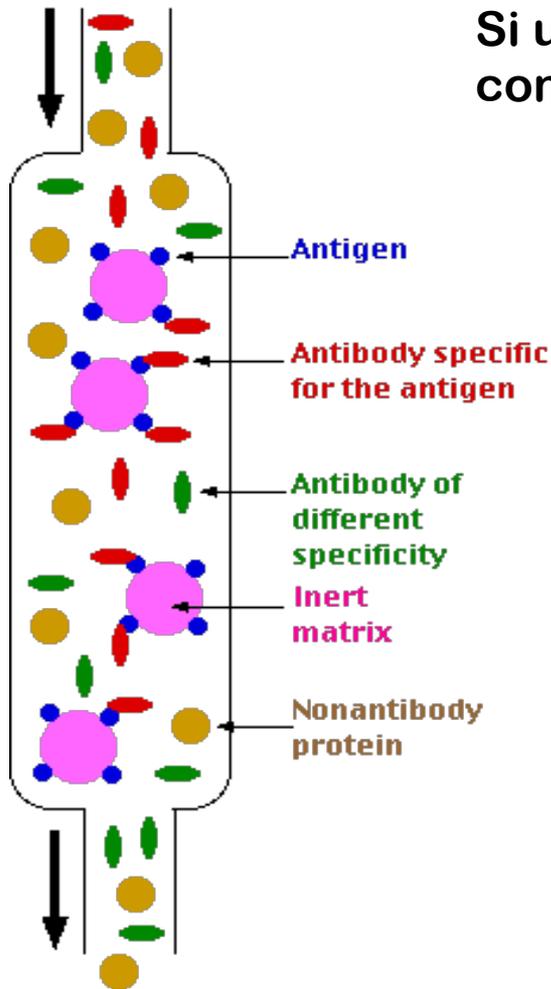


Svantaggi:

- ci può essere **crossreattività** con antigeni diversi che presentano un epitopo comune
- il siero dell'animale contiene **altri anticorpi**

PURIFICAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI per un antigene (o epitopo) mediante CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

Si utilizzano resine funzionalizzate
con antigeni ricombinanti

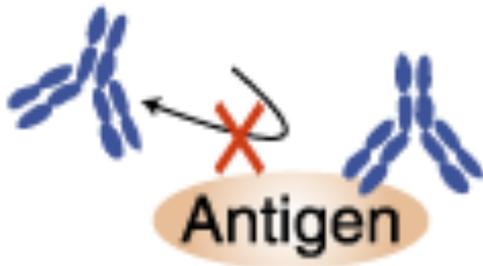


ANTICORPI MONOCLONALI:

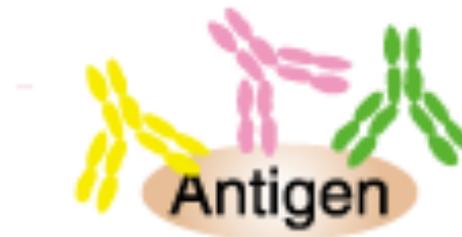
Anticorpi prodotti da un **singolo clone di linfociti B**

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

Monoclonal antibodies

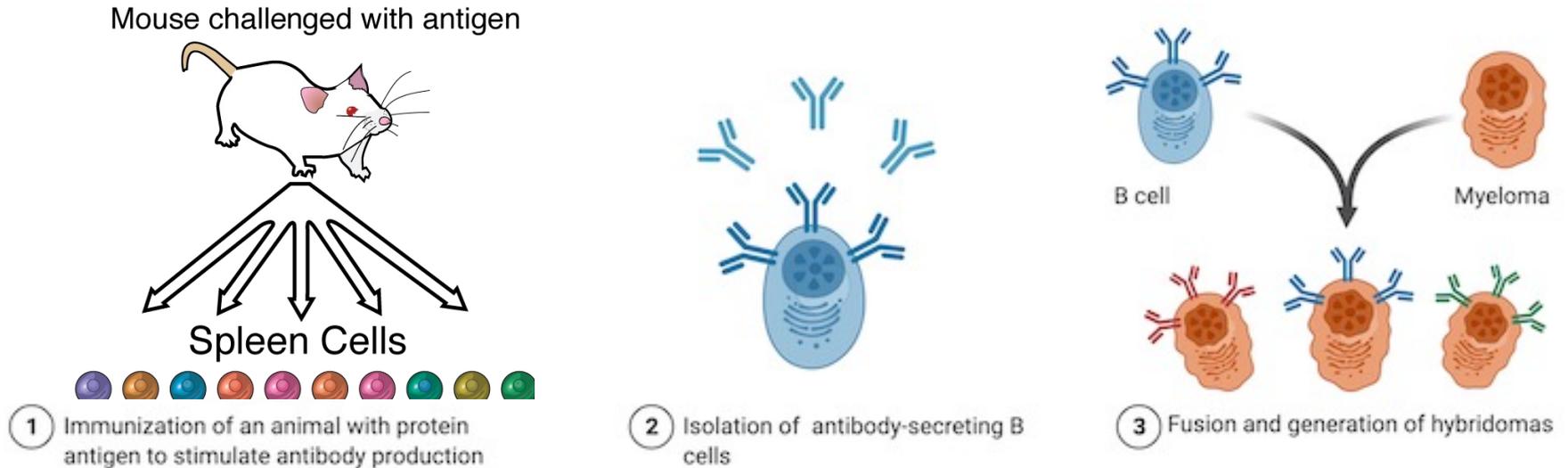


Polyclonal antibodies



ANTICORPI MONOCLONALI:

Prodotti mediante isolamento e **immortalizzazione di singoli linfociti** per ottenere **CLONI** di cellule che producono e **secernono anticorpi in vitro**



Produzione di anticorpi monoclonali

La milza viene prelevata e **si isolano i linfociti**

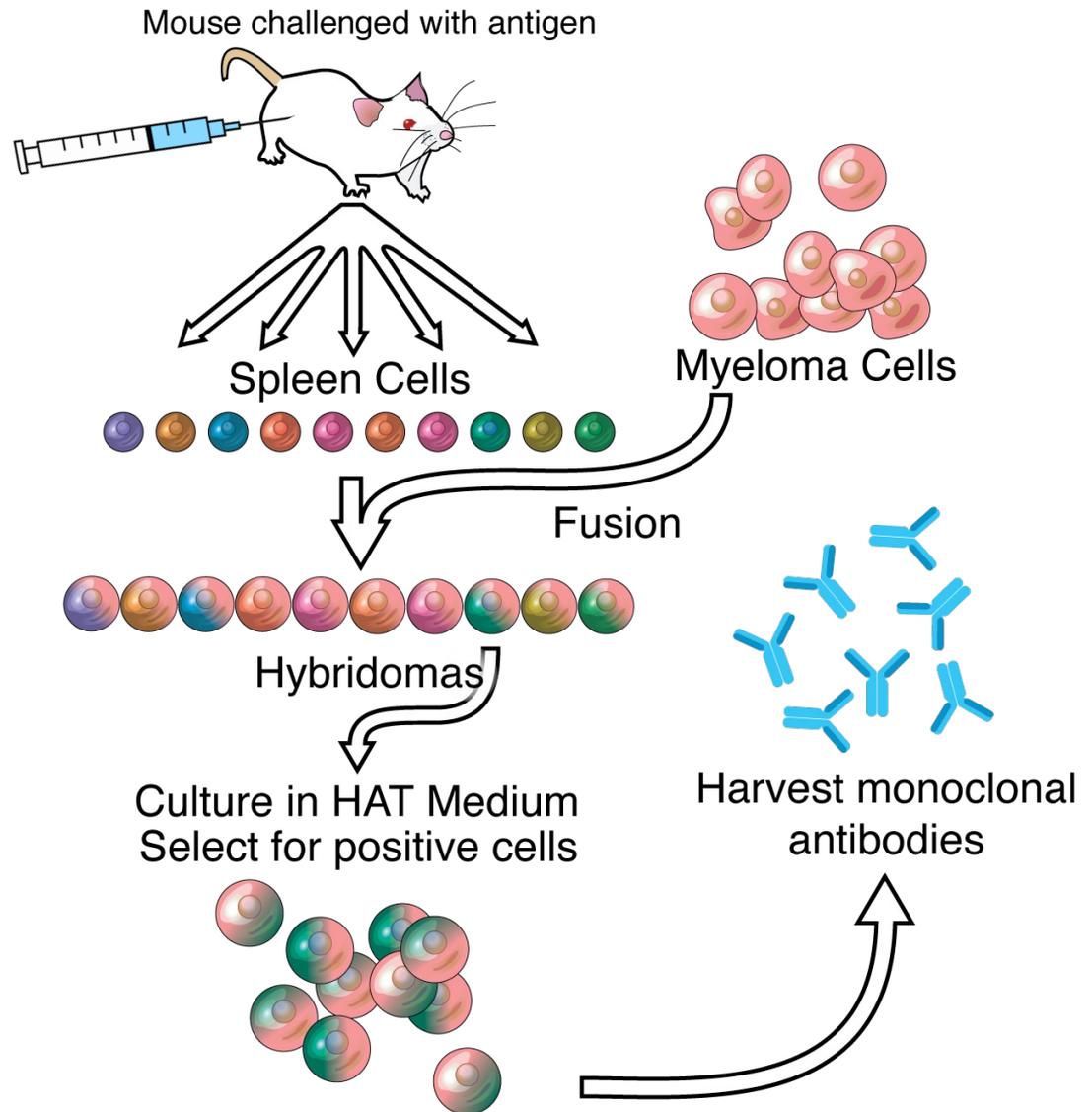
I linfociti vengono mescolati a **cellule immortali (cellule tumorali di MIELOMA)**

Si effettua una **FUSIONE CELLULARE**:

i linfociti B fusi alle cellule di mieloma sono **selezionati** in terreno HAT

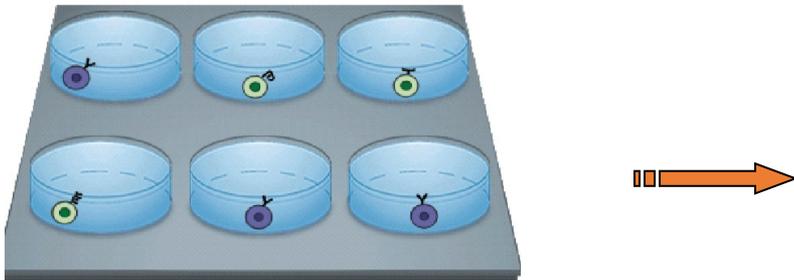
si dicono **IBRIDOMI**:

= linee cellulari immortali che producono anticorpi

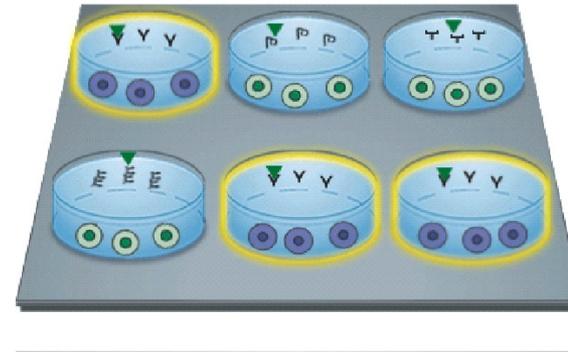


Produzione di anticorpi monoclonali

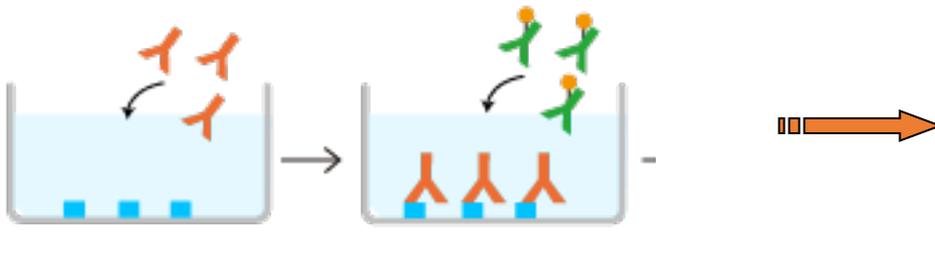
- 7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e seminati a singola cellula in piastre multiwell



- 8 Ogni clone produrrà un anticorpo diverso



- 9 Con un saggio immunochimico (ELISA) si può selezionare l'ibridoma desiderato



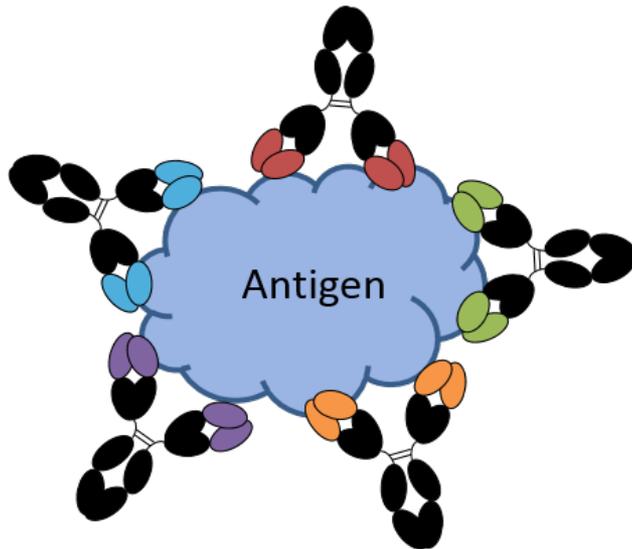
- 10 Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI**

(derivati da un singolo clone) che riconoscono lo specifico antigene X

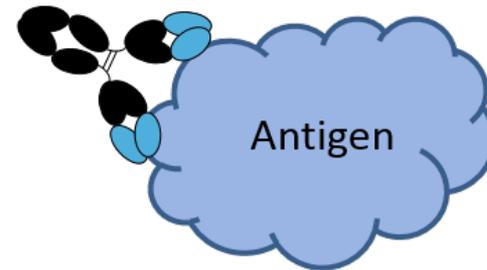


ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

Polyclonal antibody



Monoclonal antibody



Epitopi multipli	Singolo epitopo
Segnale più forte	Segnale più debole
Basso rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato	Rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato
Può riconoscere epitopi comuni ad altri antigeni (rischio che la specificità sia bassa)	molto specifico (se opportunamente selezionato)

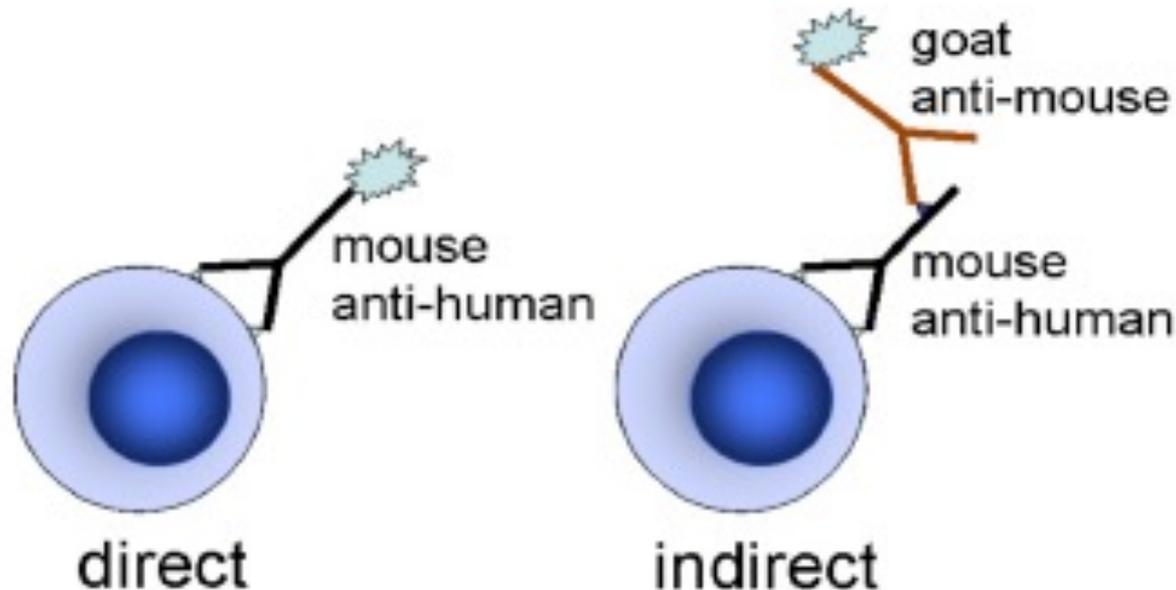
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

- 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**.

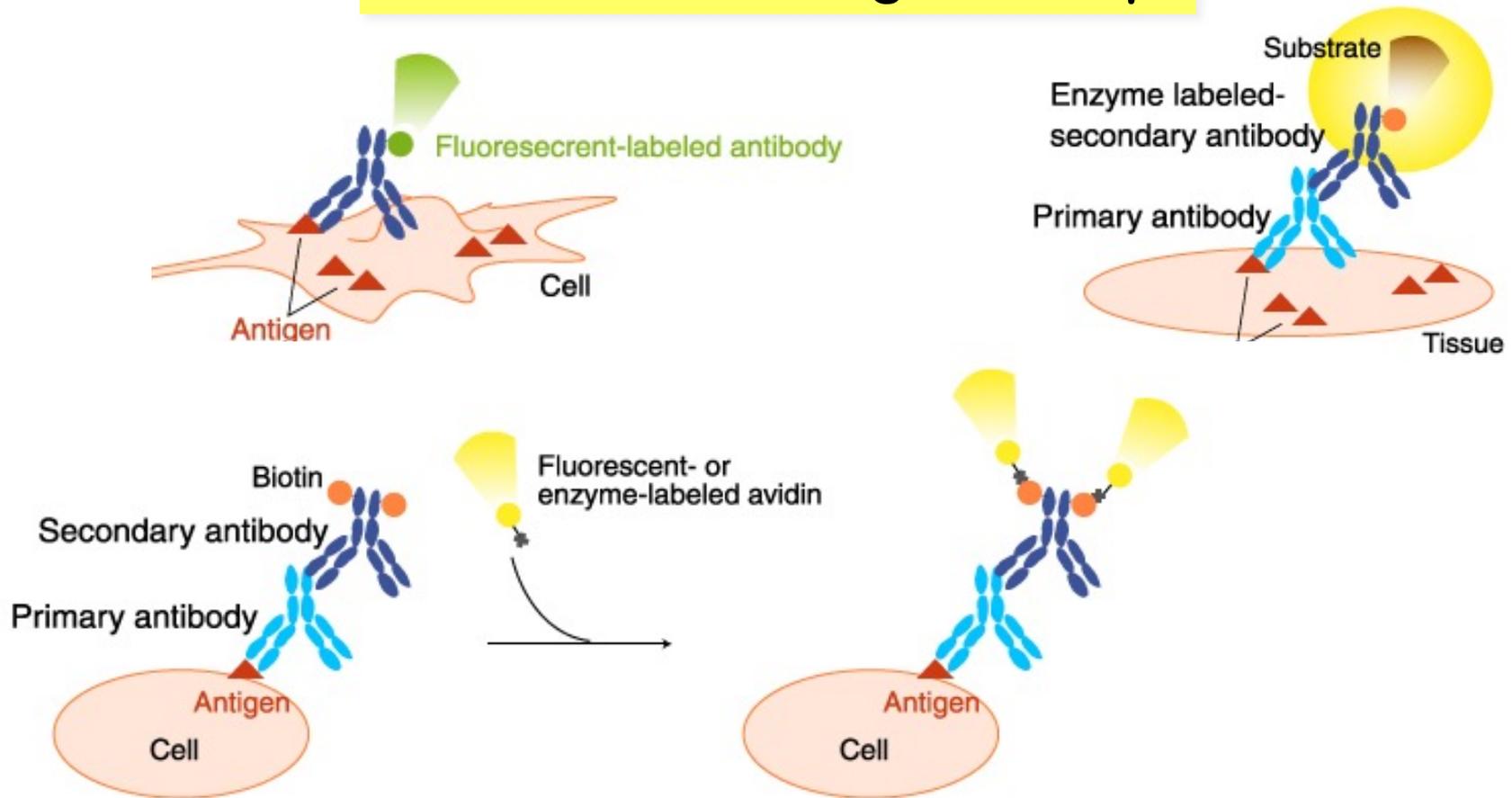
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE DIRETTE E INDIRETTE

Le tecniche DIRETTE sono basate sulla coniugazione dell'anticorpo specifico contro l'antigene con diverse molecole

Le tecniche INDIRETTE sono basate sulla coniugazione di un anticorpo secondario (che riconosce la porzione costante dell'anticorpo primario)



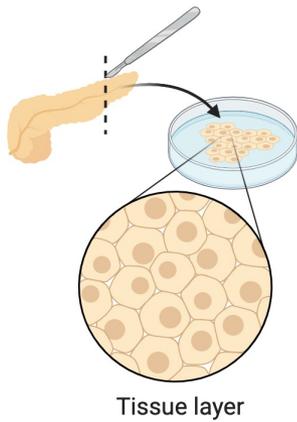
CONIUGAZIONE degli anticorpi



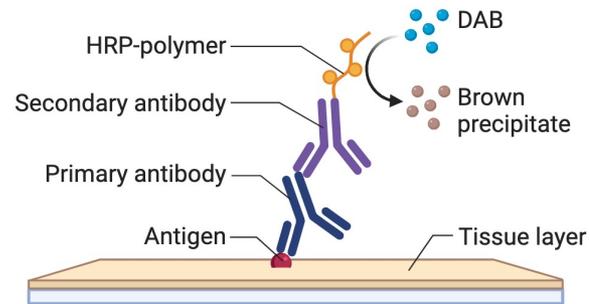
1. **enzima** con substrato cromogeno o chemiluminescente (WB, IHC, ELISA)
2. **fluorocromo** (microscopia a fluorescenza, citofluorimetria)
3. **biotina** (purificazione tramite streptavidina)
4. **beads** (resine o particelle magnetiche per purificazione)

ANALISI IN SITU IN TESSUTI: IMMUNOISTOCHEMICA

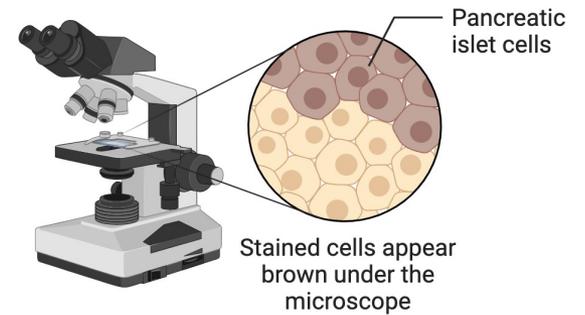
1 Sample collection



2 Immunohistochemistry assay

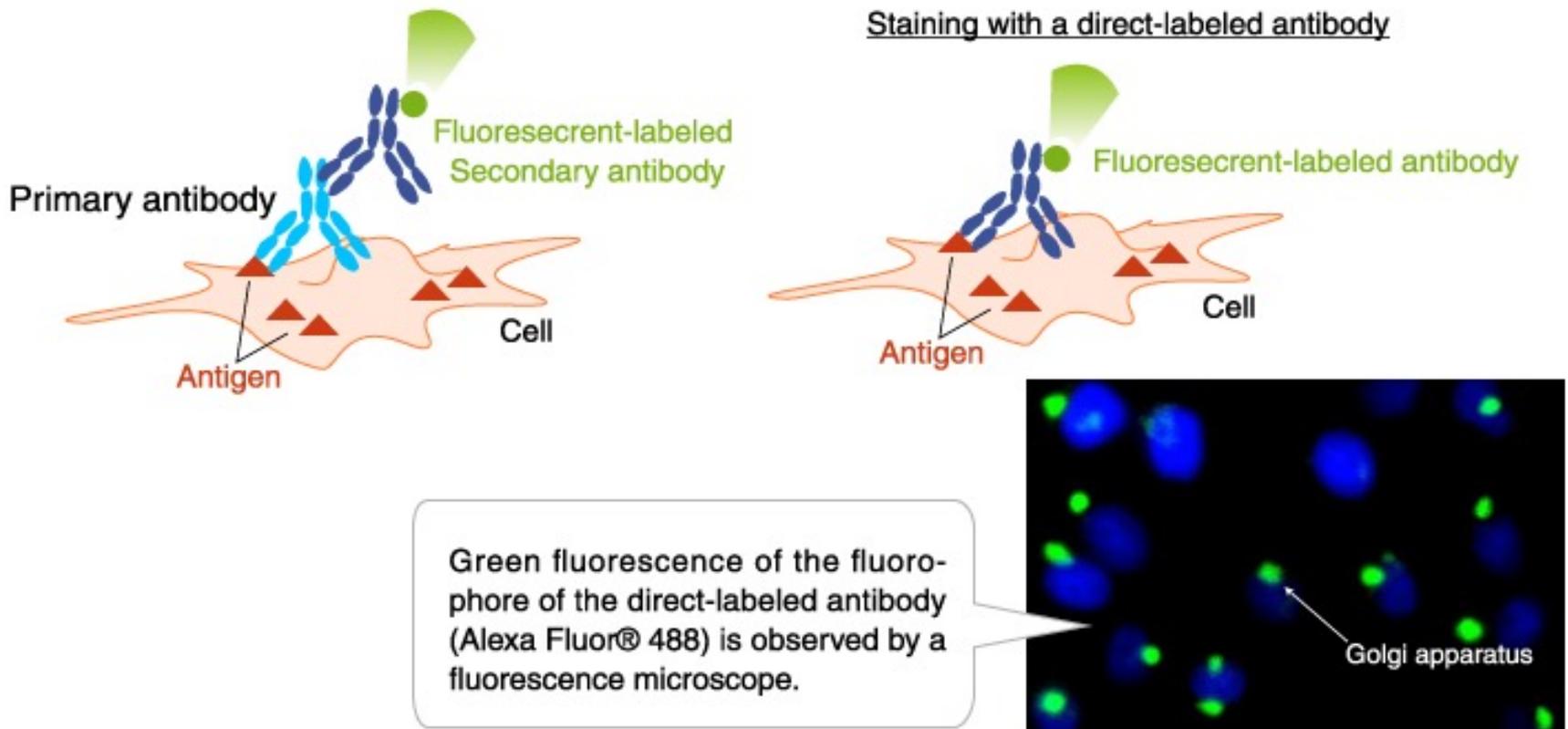


3 Microscopy and data analysis



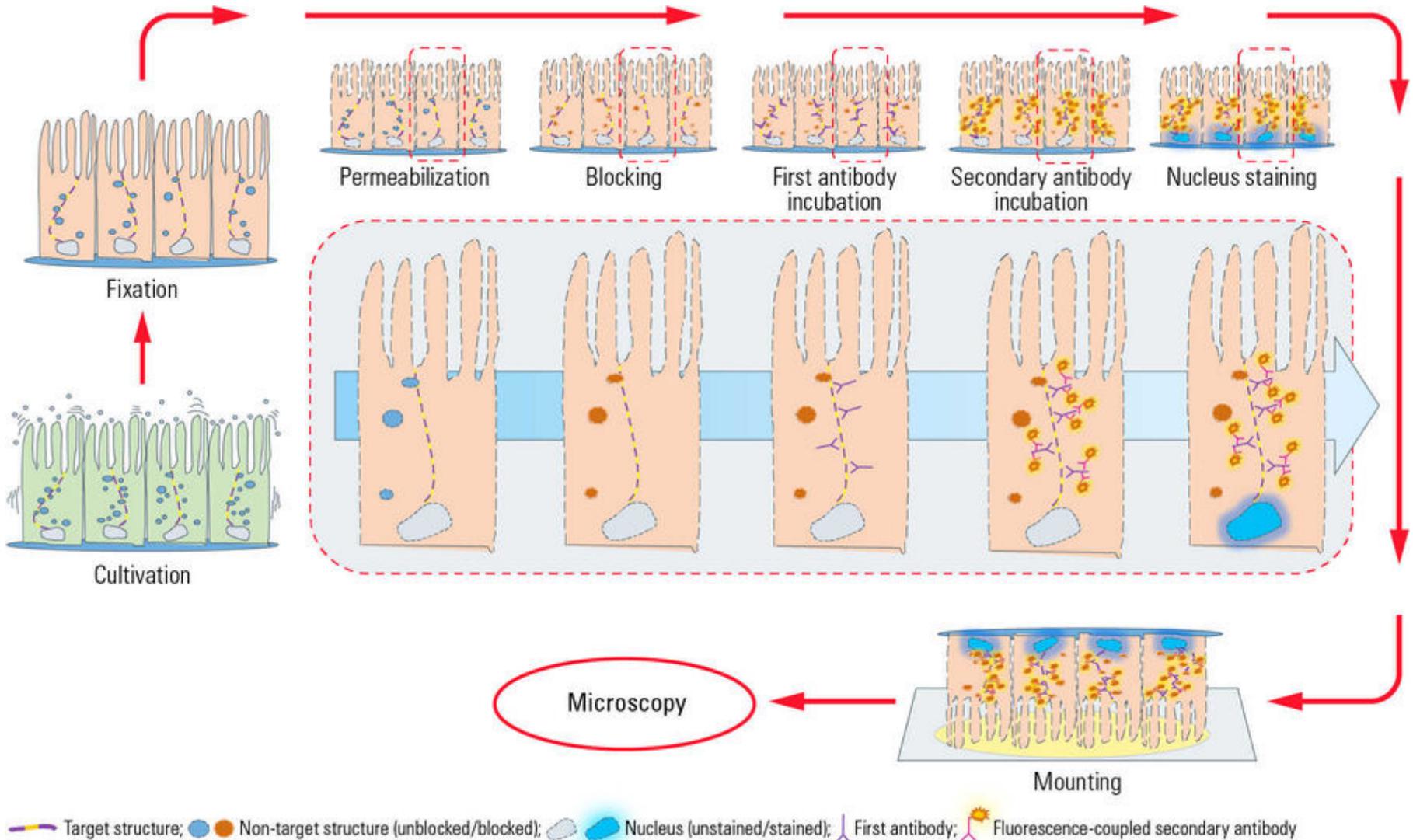
Analisi di antigeni IN SITU IN CELLULE: immunofluorescenza

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



Sample: HeLa cells

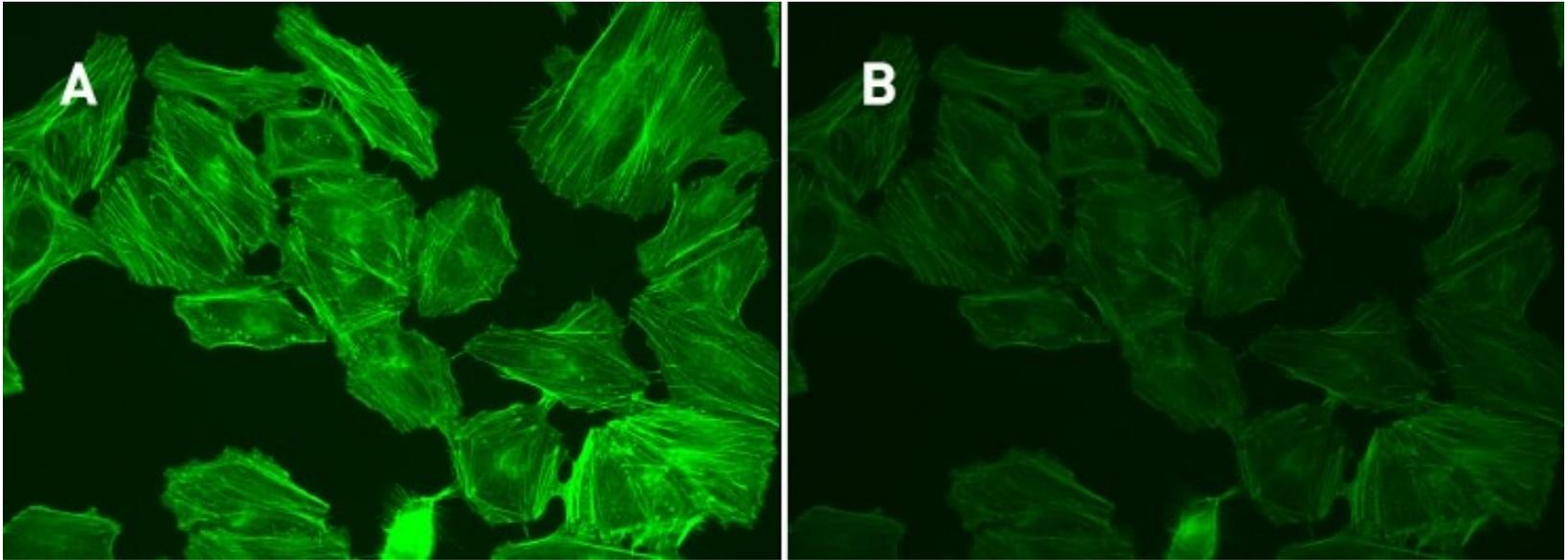
IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA



IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA

- ✓ **FISSAZIONE** delle cellule in situ: si mantengono le strutture cellulari e le interazioni molecolari. si utilizzano agenti crosslinkanti come **aldeidi** (paraformaldeide) oppure **solventi organici** (metanolo/acetone)
- ✓ **PERMEABILIZZAZIONE** della membrana per consentire l'ingresso dell'anticorpo (blando trattamento con detergenti, es. Triton X-100);
- ✓ **BLOCKING**: saturazione di siti aspecifici di legame dell'anticorpo (es. BSA)
- ✓ **incubazione** con un anticorpo primario ed eventualmente con un anticorpo secondario coniugato ad un fluorocromo
- ✓ **COLORAZIONE DEI NUCLEI e altre componenti, MONTAGGIO del vetrino** (**Mowiol, Prolong** agenti che mantengono idratazione, aumentano rifrazione e hanno effetto anti-fading)
- ✓ **ESAME** al microscopio a fluorescenza

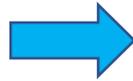
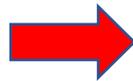
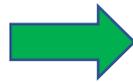
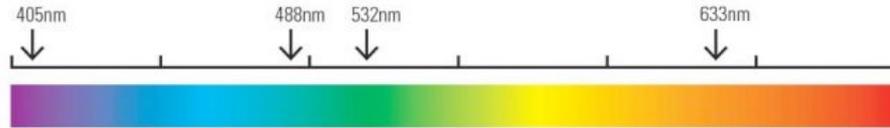
Fluorescence photo-bleaching



La luce di eccitazione può indurre la conversione chimica permanente del fluoroforo in una molecola non fluorescente.

Dopo un tempo (variabile) di esposizione si ha progressiva perdita della fluorescenza.

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

Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati per coniugazione

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

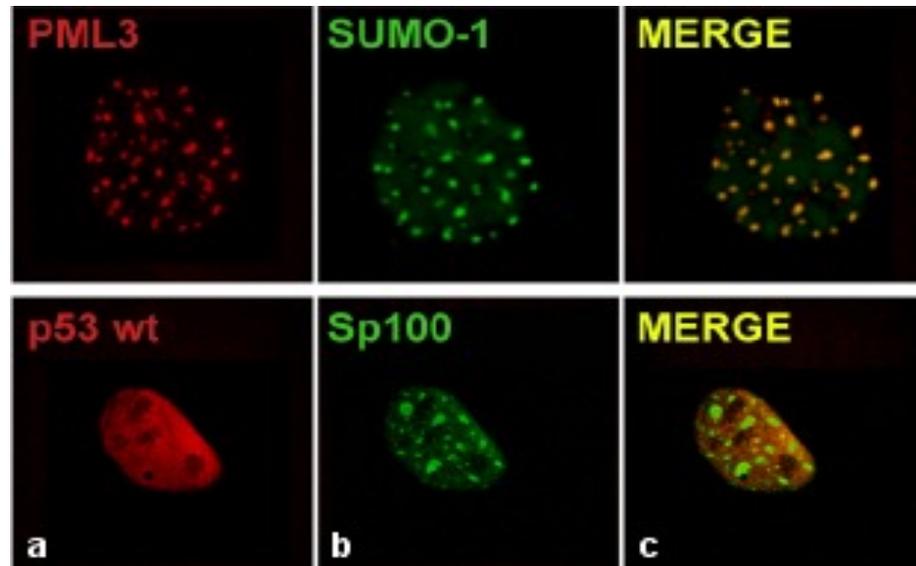
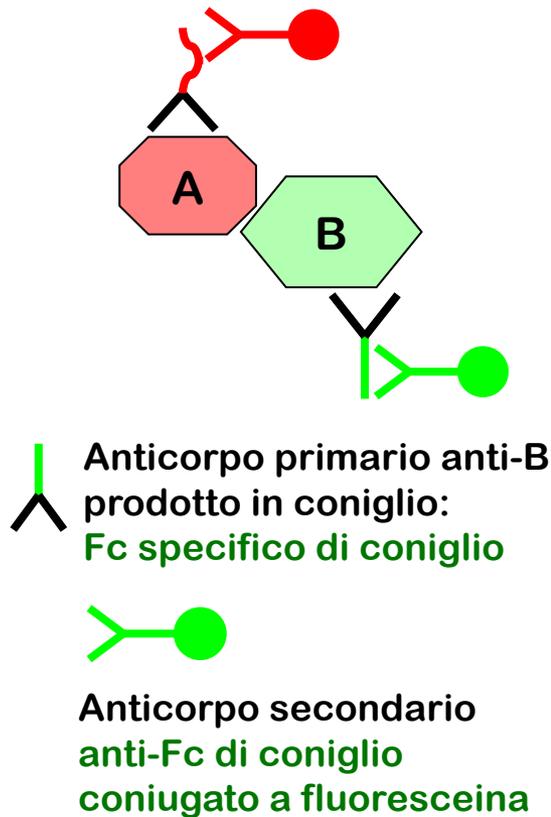
This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them **can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups**.

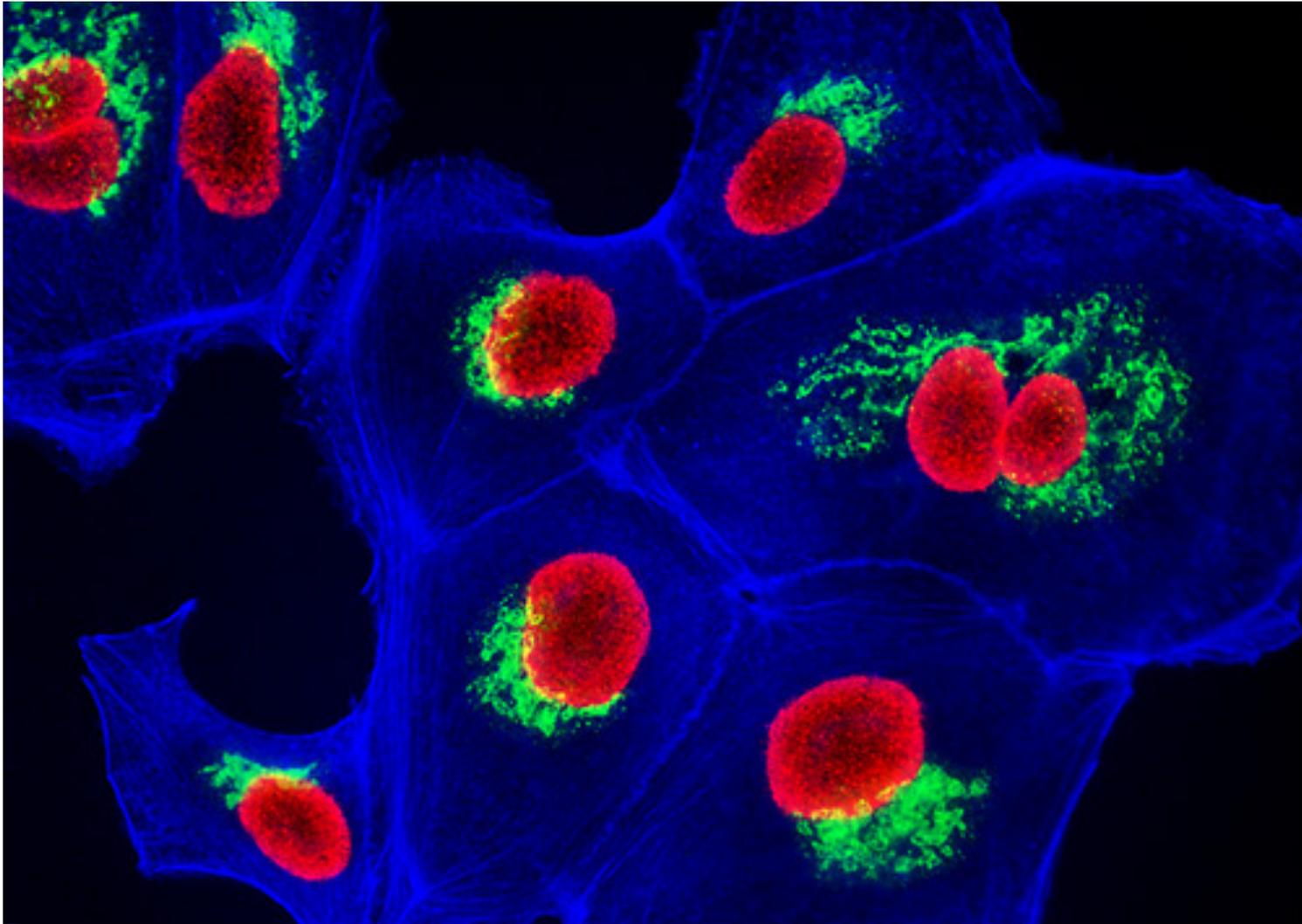
Alexa Fluor® dyes big group of negatively charged and hydrophilic fluorescent dyes

Riconoscimento di antigeni multipli

è possibile analizzare contemporaneamente **diversi antigeni**, utilizzando **anticorpi primari** diretti contro diverse proteine – direttamente coniugati

oppure prodotti in **animali diversi** (o monoclonali con **diverso isotipo**) e **anticorpi secondari specie-specifici** (o **isotipo-specifici**) coniugati a **diversi fluorocromi**





**Mouse anti-
Nuclear Pore
Complex Protein
+ goat anti-
mouse Alexa
Fluor 568**

**Rabbit anti-
Giantin (Golgi
complex) + goat
anti-rabbit Alexa
Fluor 488**

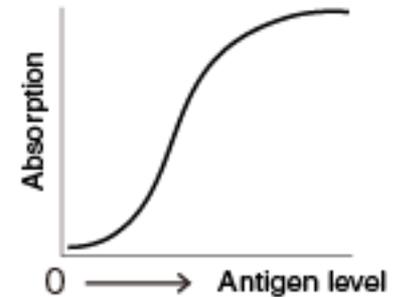
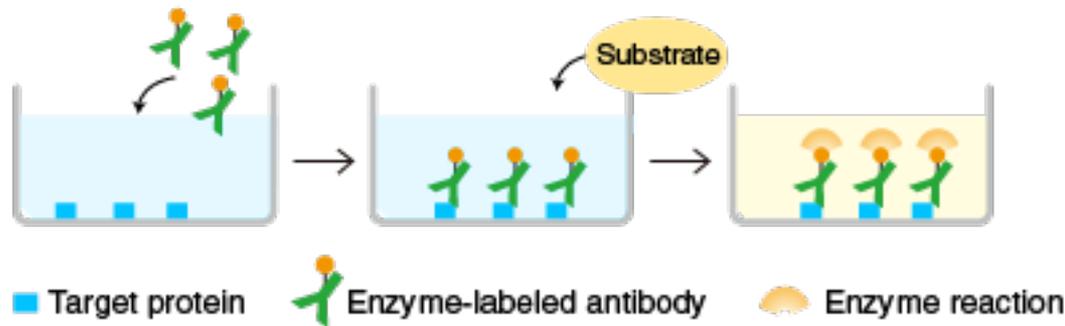
**Actin staining
Phalloidin
conjugated to
Alexa Fluor 350**

**ALTRE APPLICAZIONI
IMMUNOCHEMICHE**

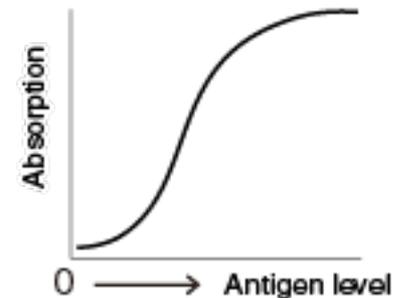
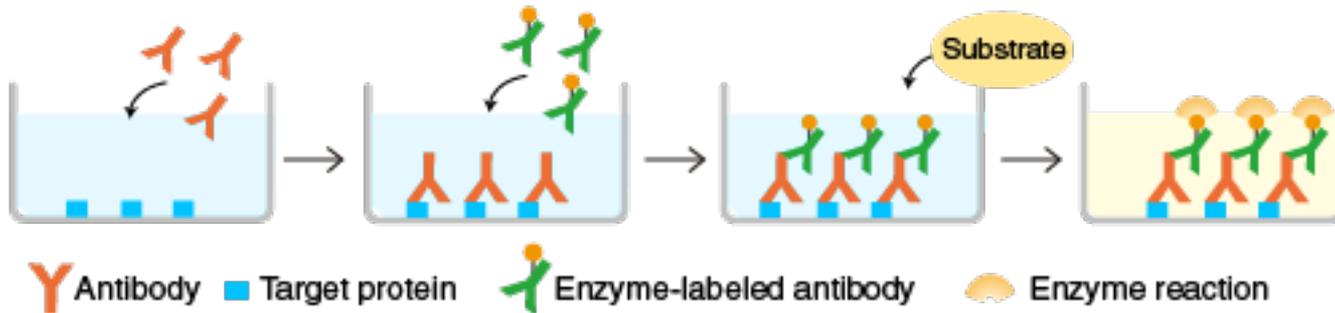
Rilevazione di proteine in soluzione mediante ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

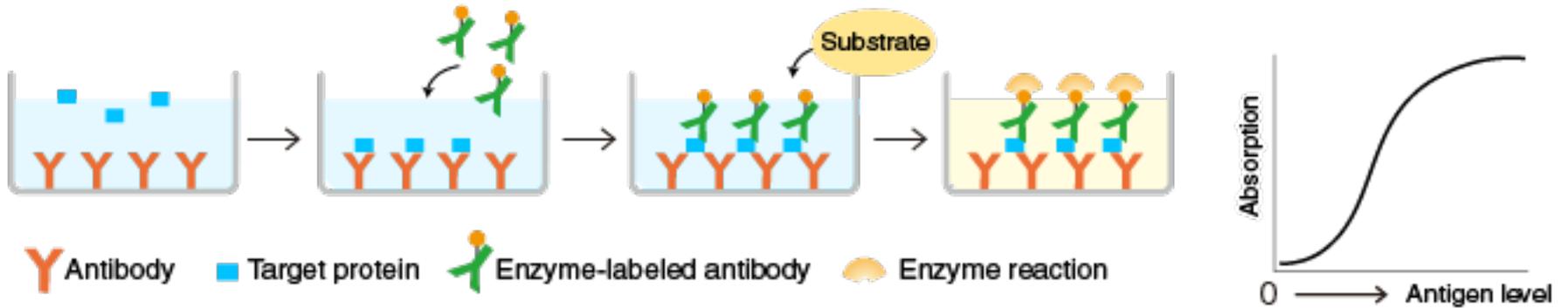
DIRECT ELISA



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

QUALI STRUMENTI UTILIZZARE PER LA RILEVAZIONE?

Lettores di piastre

Misura Assorbanza, Luminescenza, Fluorescenza



Western blot

Tecnica che prevede il **riconoscimento** di proteine previamente sottoposte ad **elettroforesi e trasferite su un supporto solido = MEMBRANA** mediante anticorpi specifici .

Permette di ottenere informazioni su:

Massa molecolare

Livelli di espressione

Modificazioni post-traduzionali

Western blot

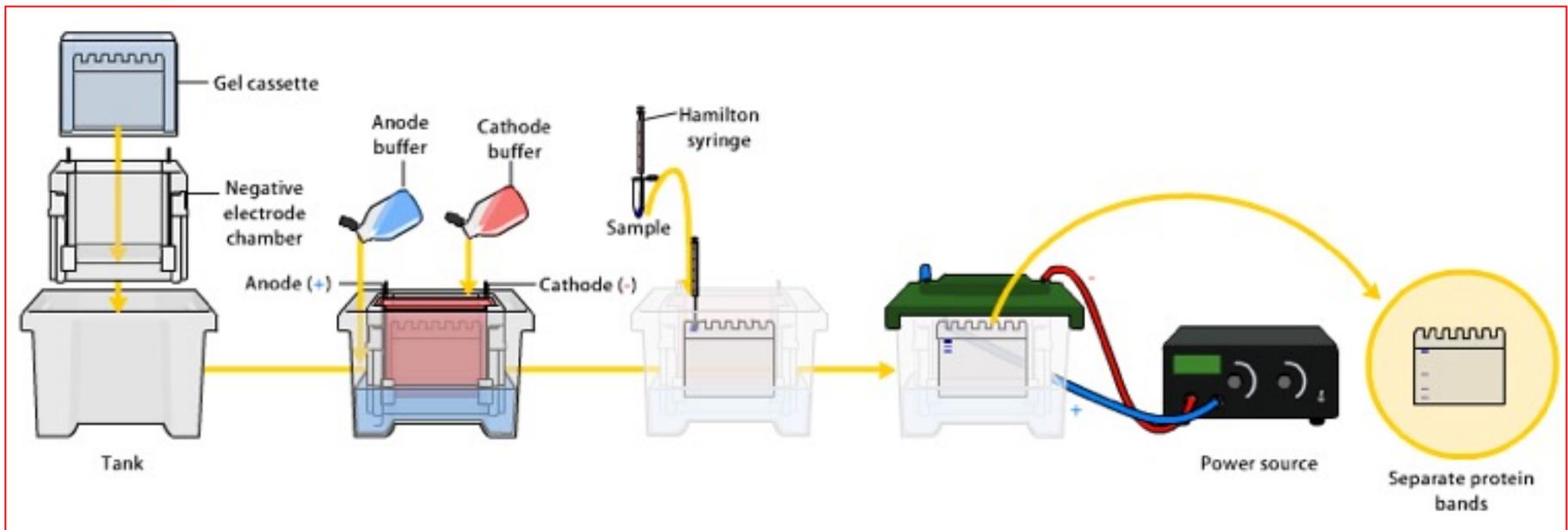
Tecnica che prevede il **riconoscimento mediante anticorpi specifici** di proteine previamente sottoposte ad **elettroforesi** e trasferite su un supporto.

Permette di ottenere informazioni su:

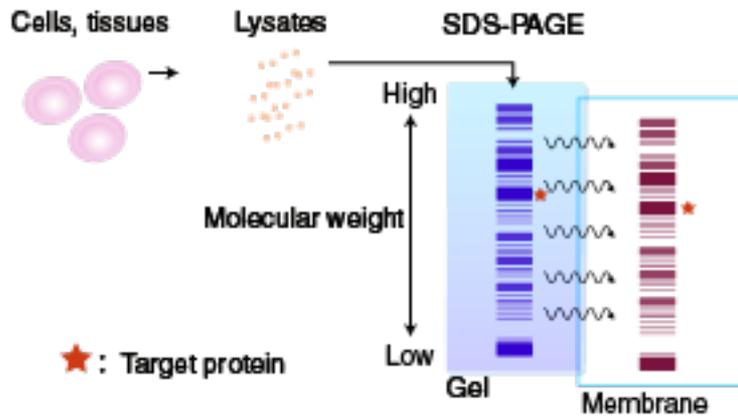
Massa molecolare

Livelli di espressione

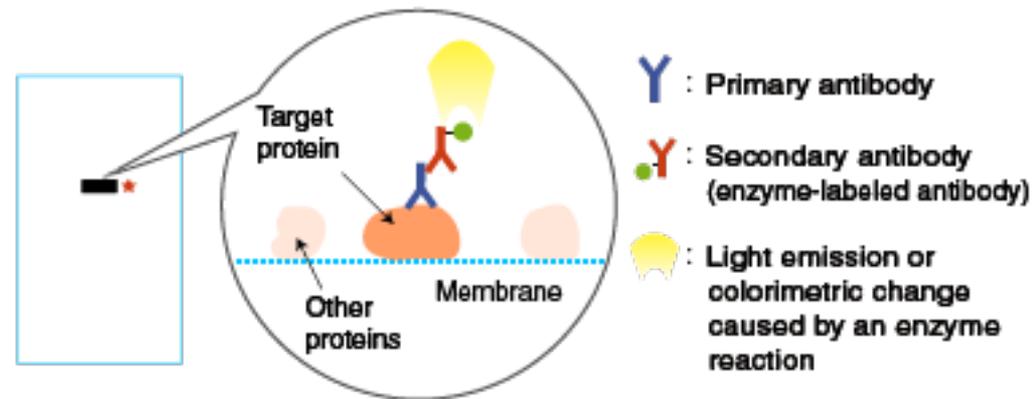
Modificazioni post-traduzionali



Proteins are separated by electrophoresis and transferred to a membrane.

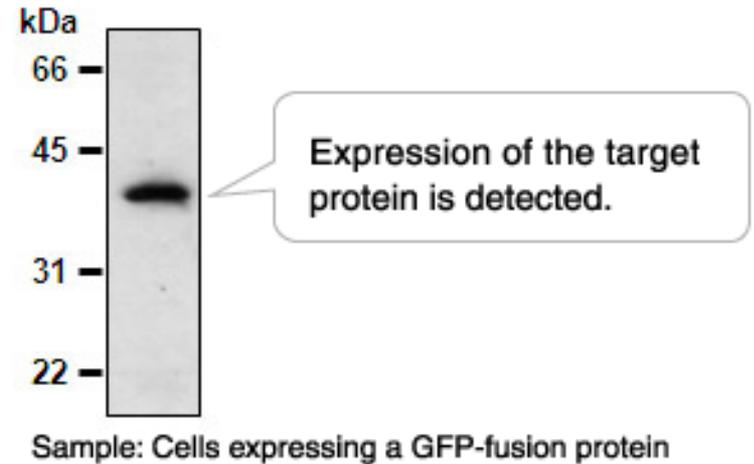
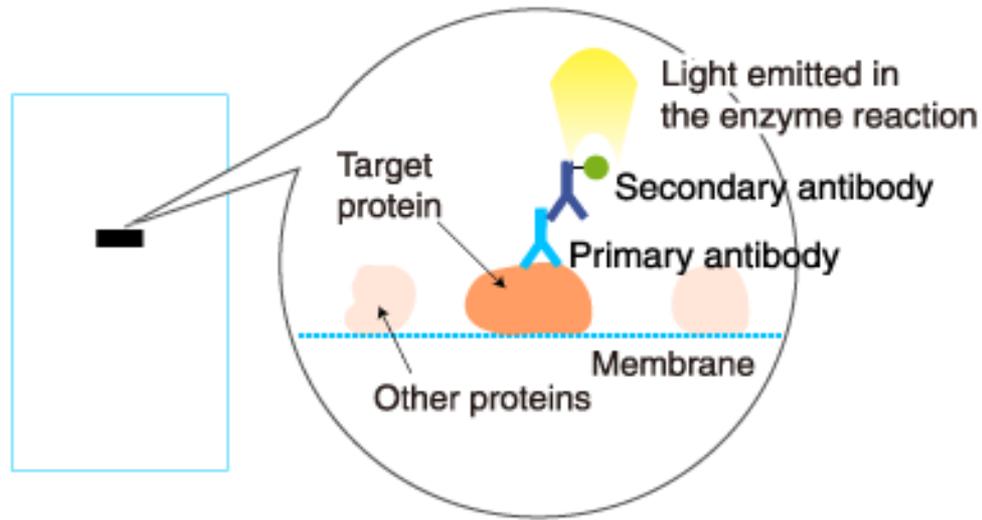


Probing with antibodies, and detection of the target protein by an enzyme reaction.





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 [®])



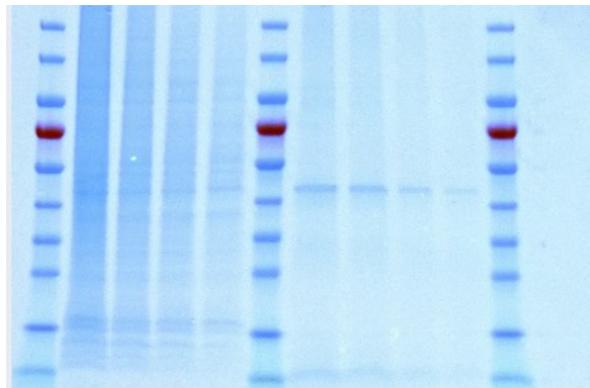
**QUALI STRUMENTI
UTILIZZARE PER LA RILEVAZIONE?**

QUALI STRUMENTI UTILIZZARE PER LA RILEVAZIONE?

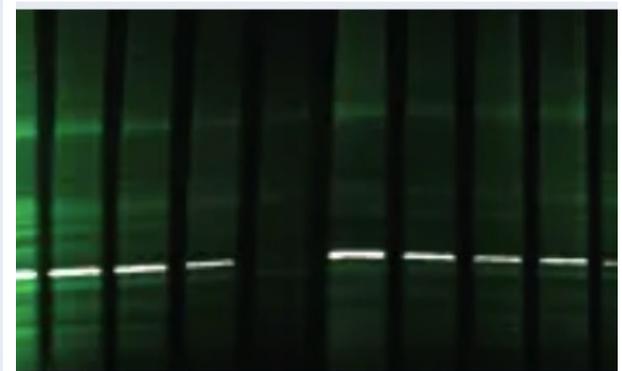
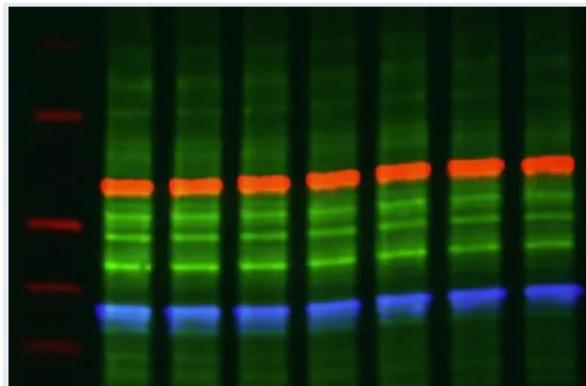
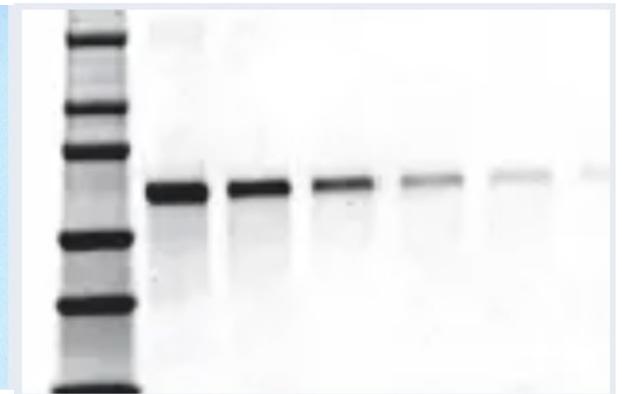
GEL IMAGER



visibile



chemiluminescenza



UV

fluorescenza