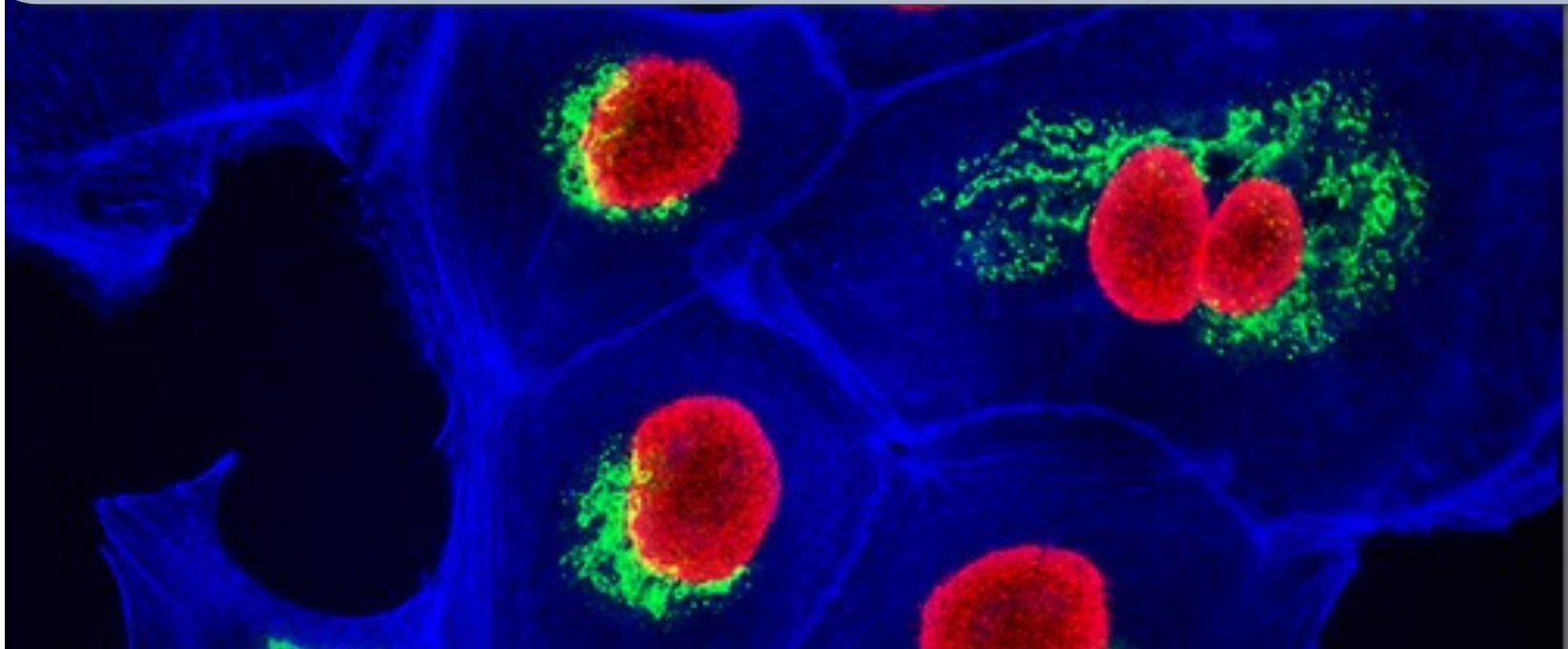


CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

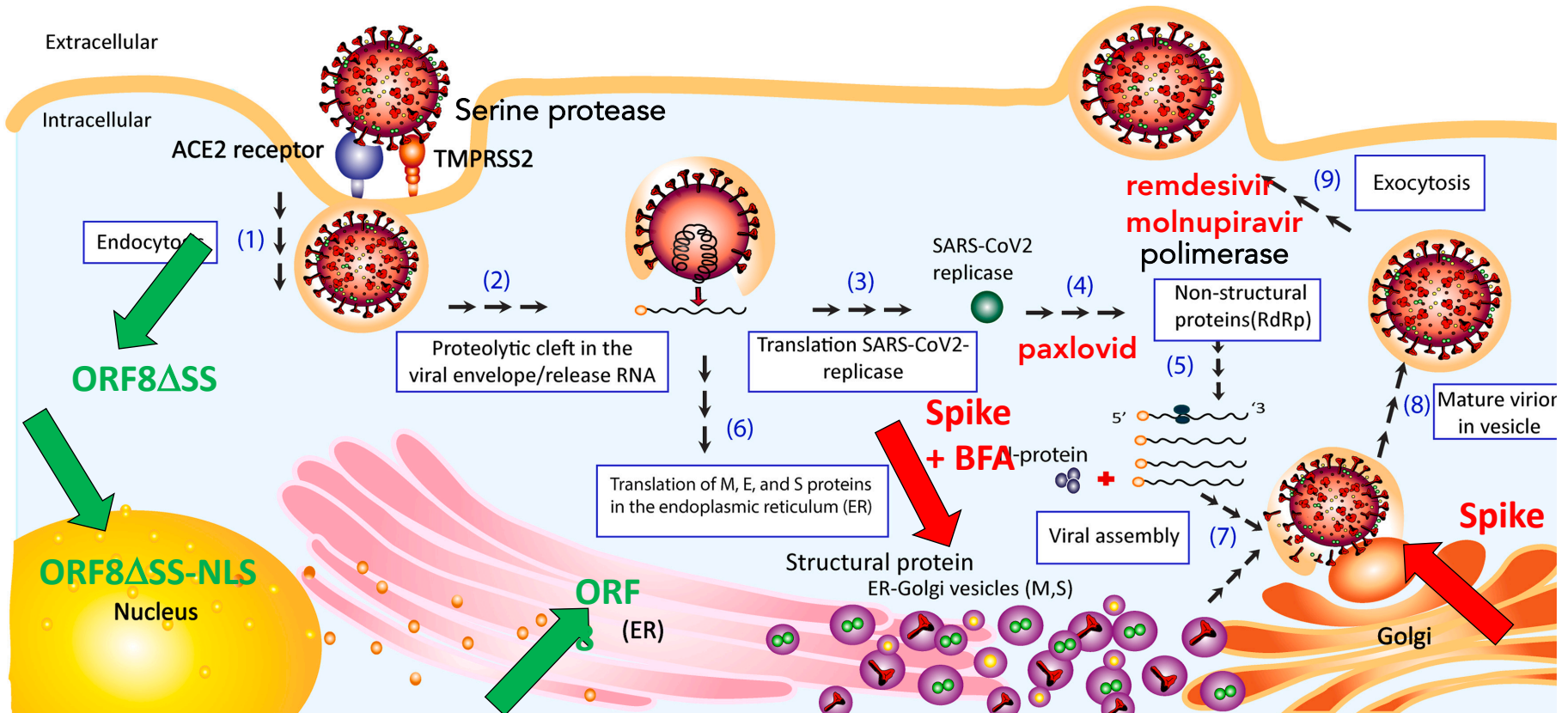
Corso di Biotecnologie Cellulari 2025-26

Lezione 6



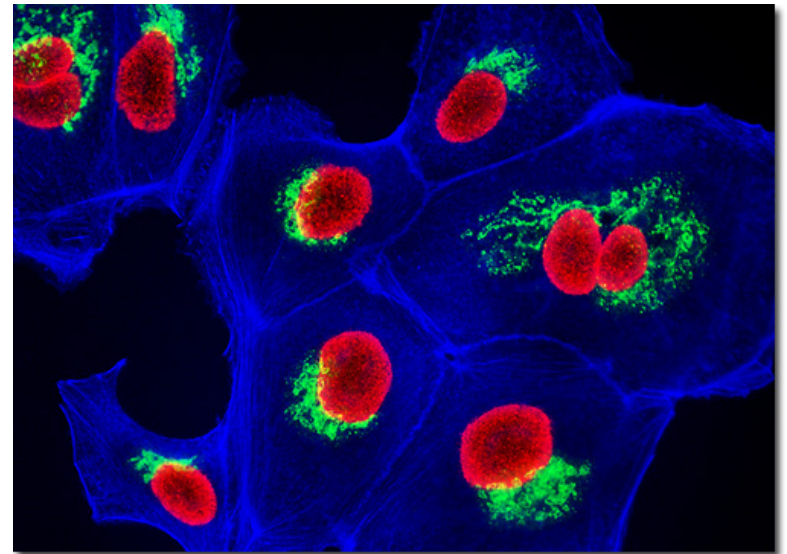
**Analisi della localizzazione subcellulare
delle proteine virali in situ**

Analisi della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.

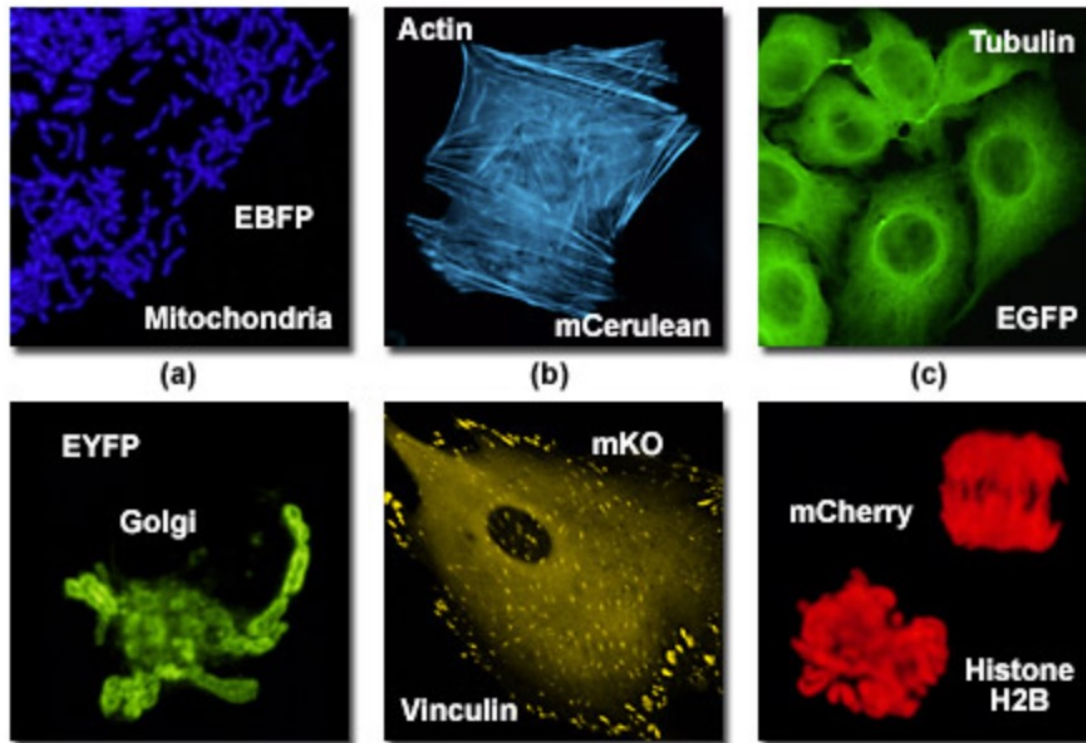


APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

1. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
2. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE
3. SCELTA DEI SAGGI e STRUMENTI



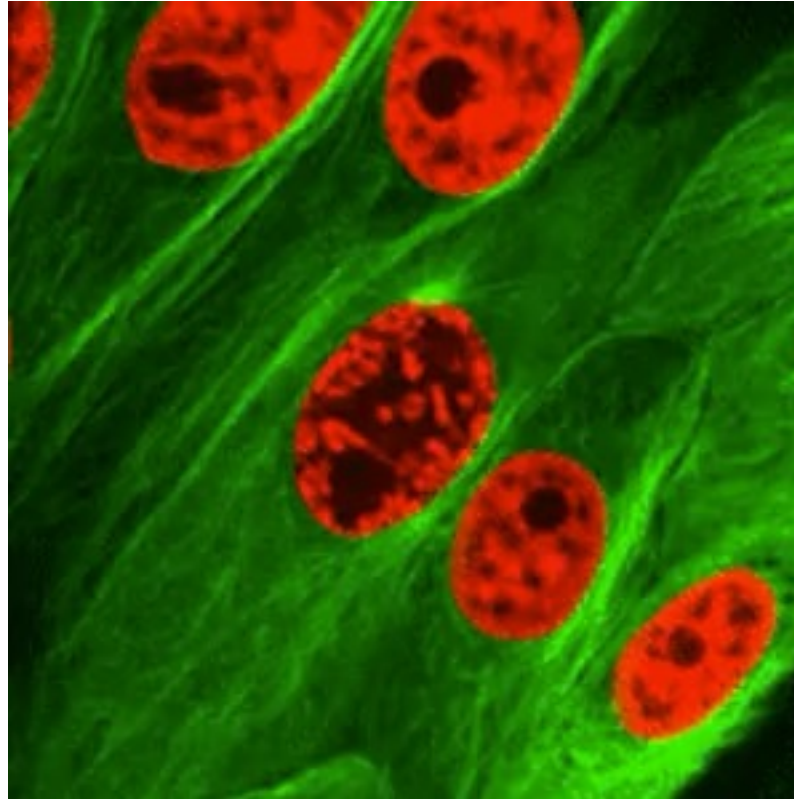
APPROCCIO #1: Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter



Vantaggi:

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

Possibilità di live imaging mediante time-lapse microscopy

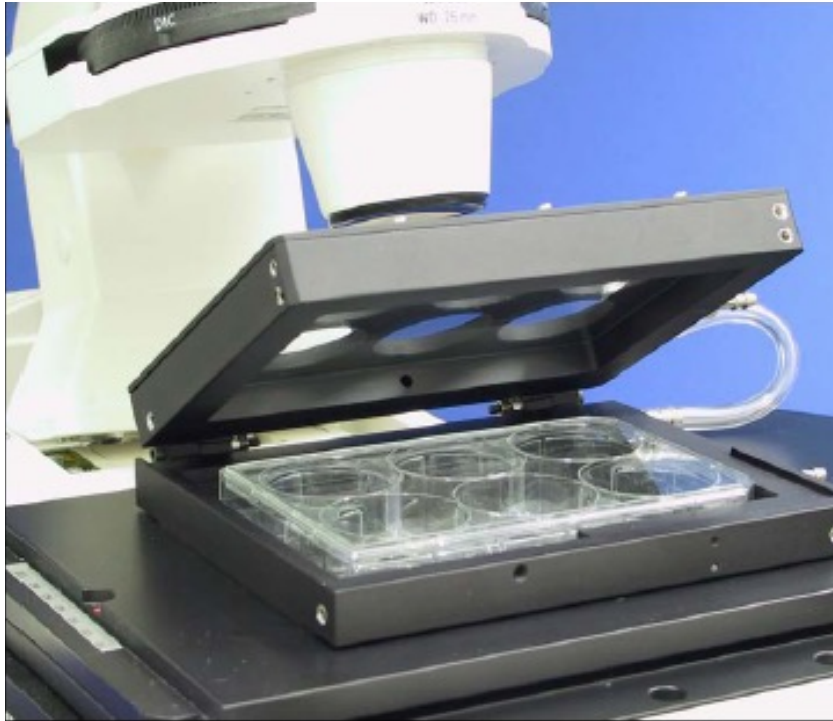


H2B-RFP

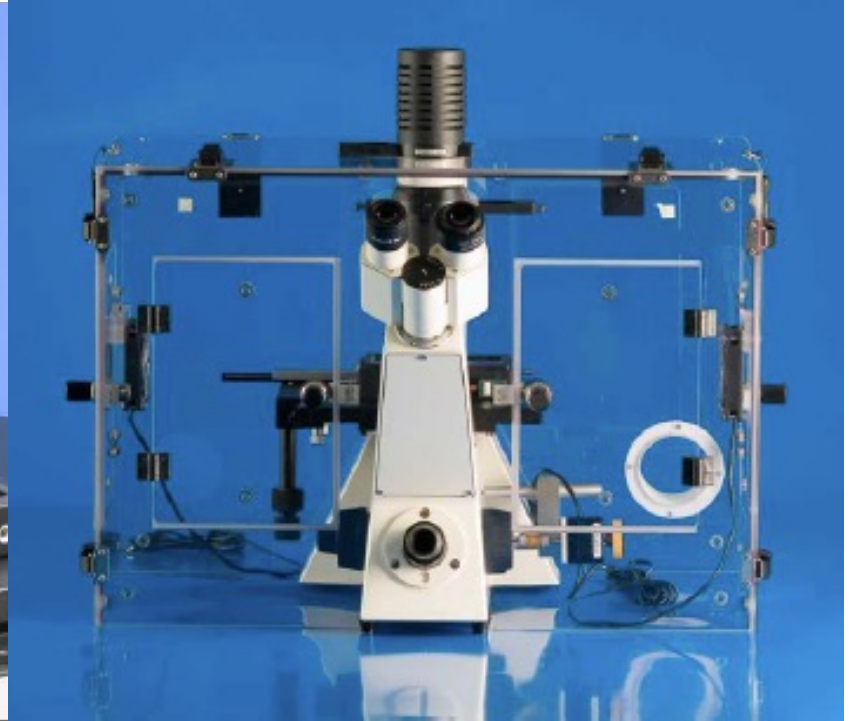
α-tubulin-GFP

LIVE IMAGING: MICROSCOPIA TIME-LAPSE

STAGE



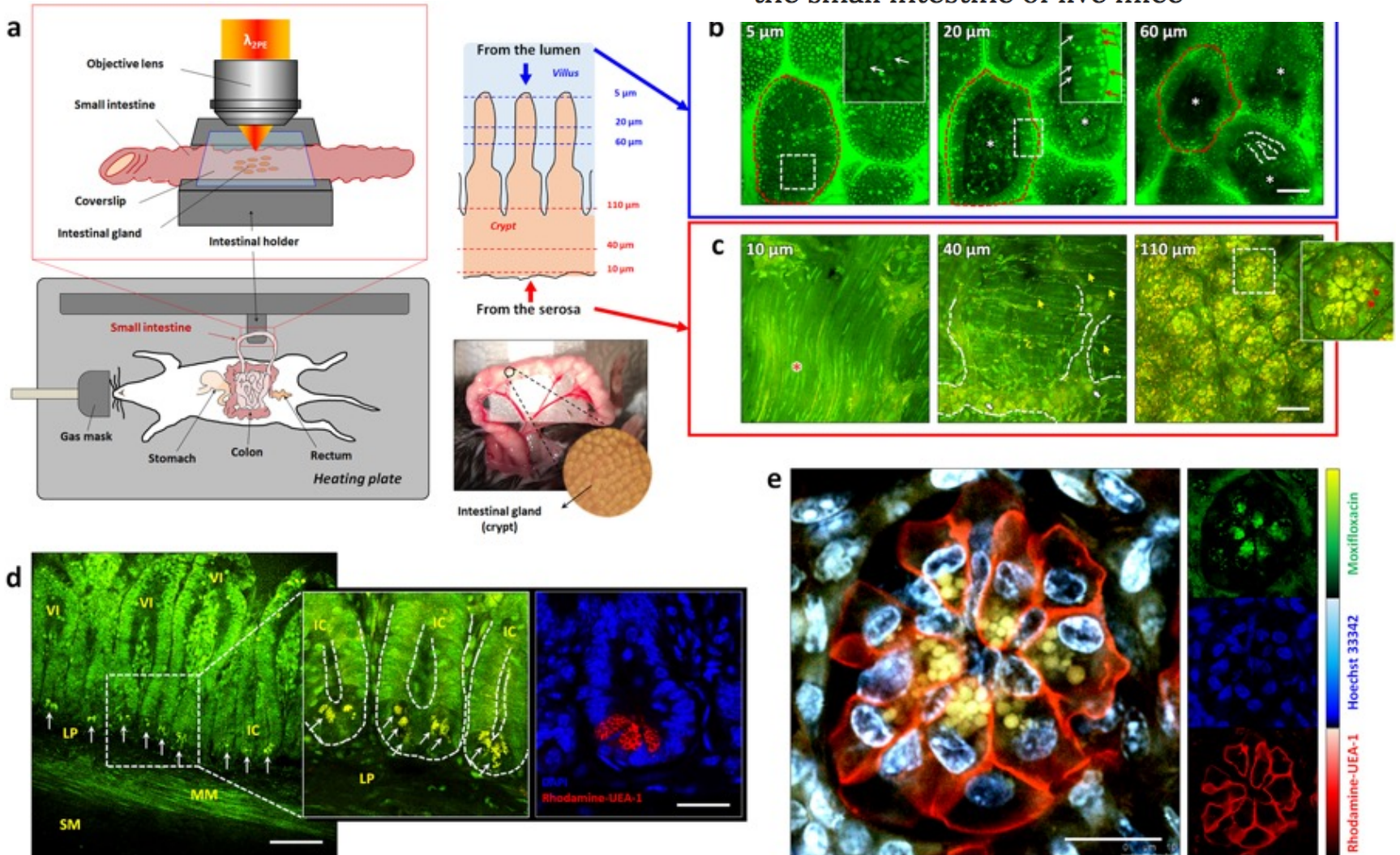
CAGE



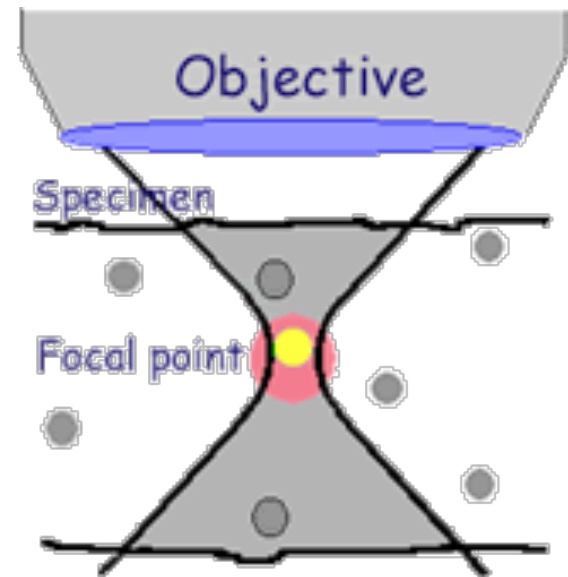
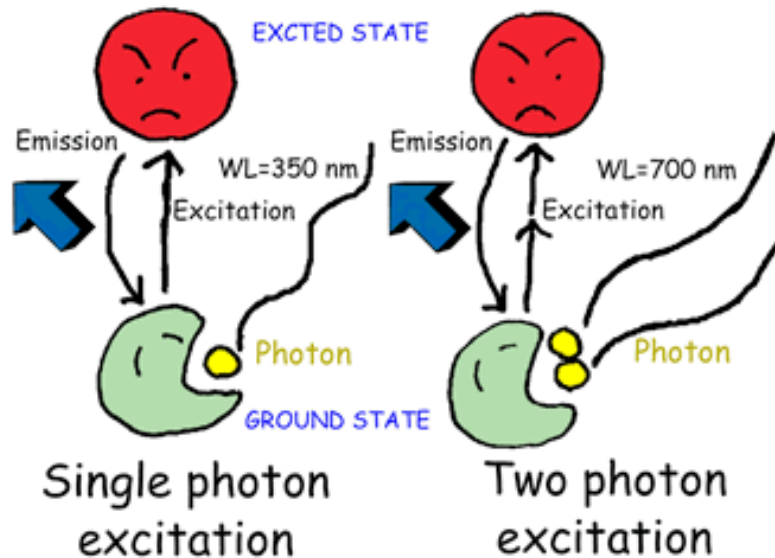
Analisi mediante microscopia intravitale

Article OPEN Published: 21 September 2018

Two-photon microscopy of Paneth cells in the small intestine of live mice



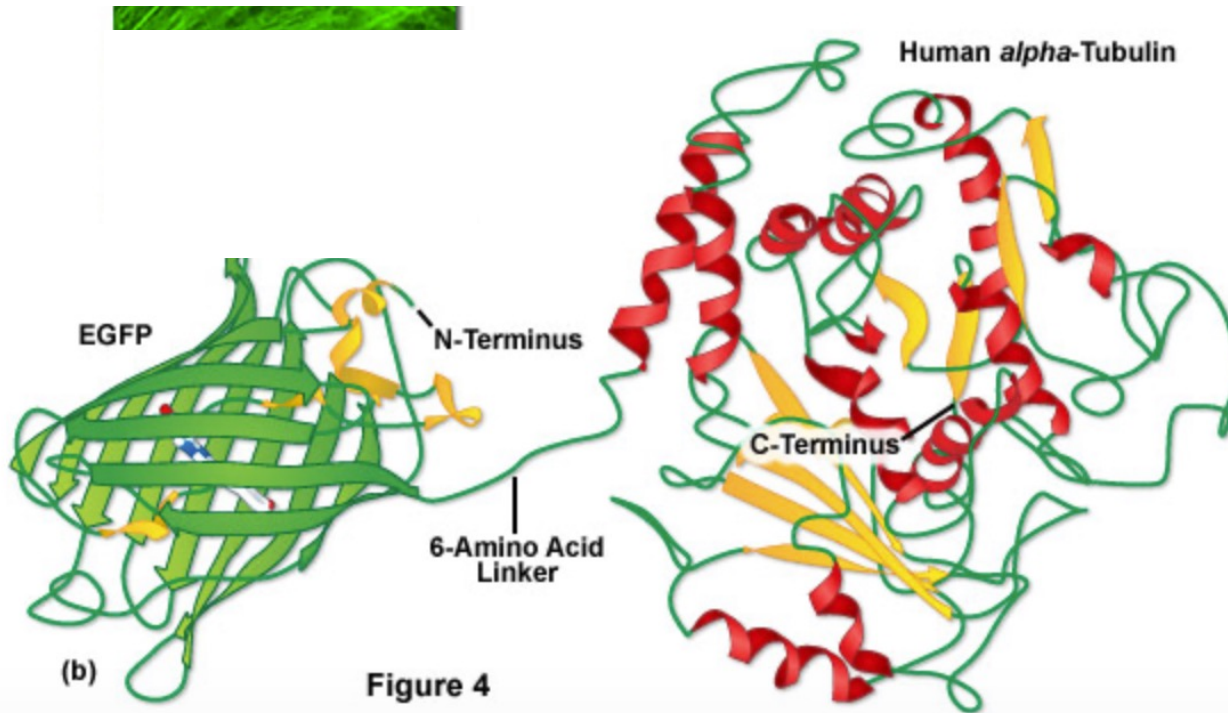
2-photon/multiphoton excitation microscopy per imaging IN VIVO



Eccitazione mediante **assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso (800-900 nm)**: la lunghezza d'onda della luce di eccitazione è maggiore di quella della luce emessa, ma l'energia fornita è comunque maggiore (eccitazione = 2 fotoni, emissione = 1 fotone)

La luce IR assicura **un'elevata penetrabilità** nei tessuti di organismi viventi e un limitato scattering

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 è possibile analizzare la proteina endogena (es. durante l'infezione)

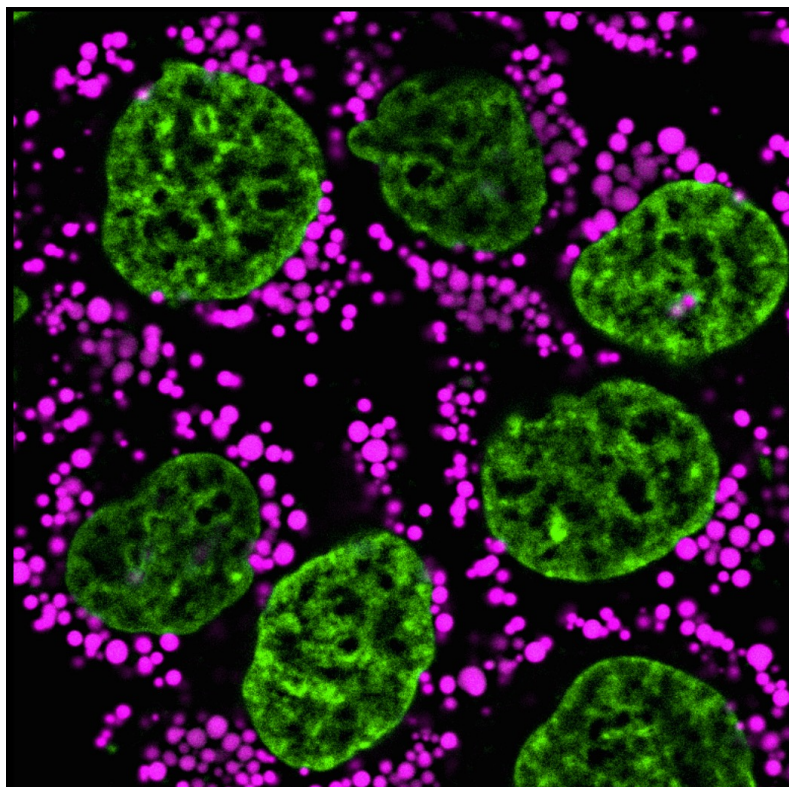
APPROCCIO #2:

riconoscimento di proteine specifiche

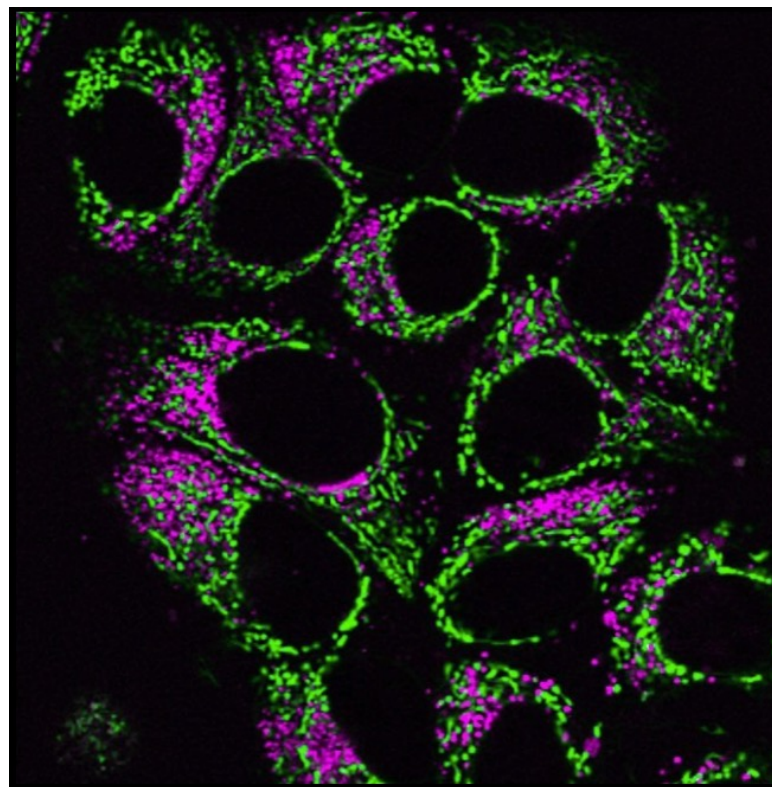
(anche endogene)

mediante “sonde” coniugate con fluorocromi

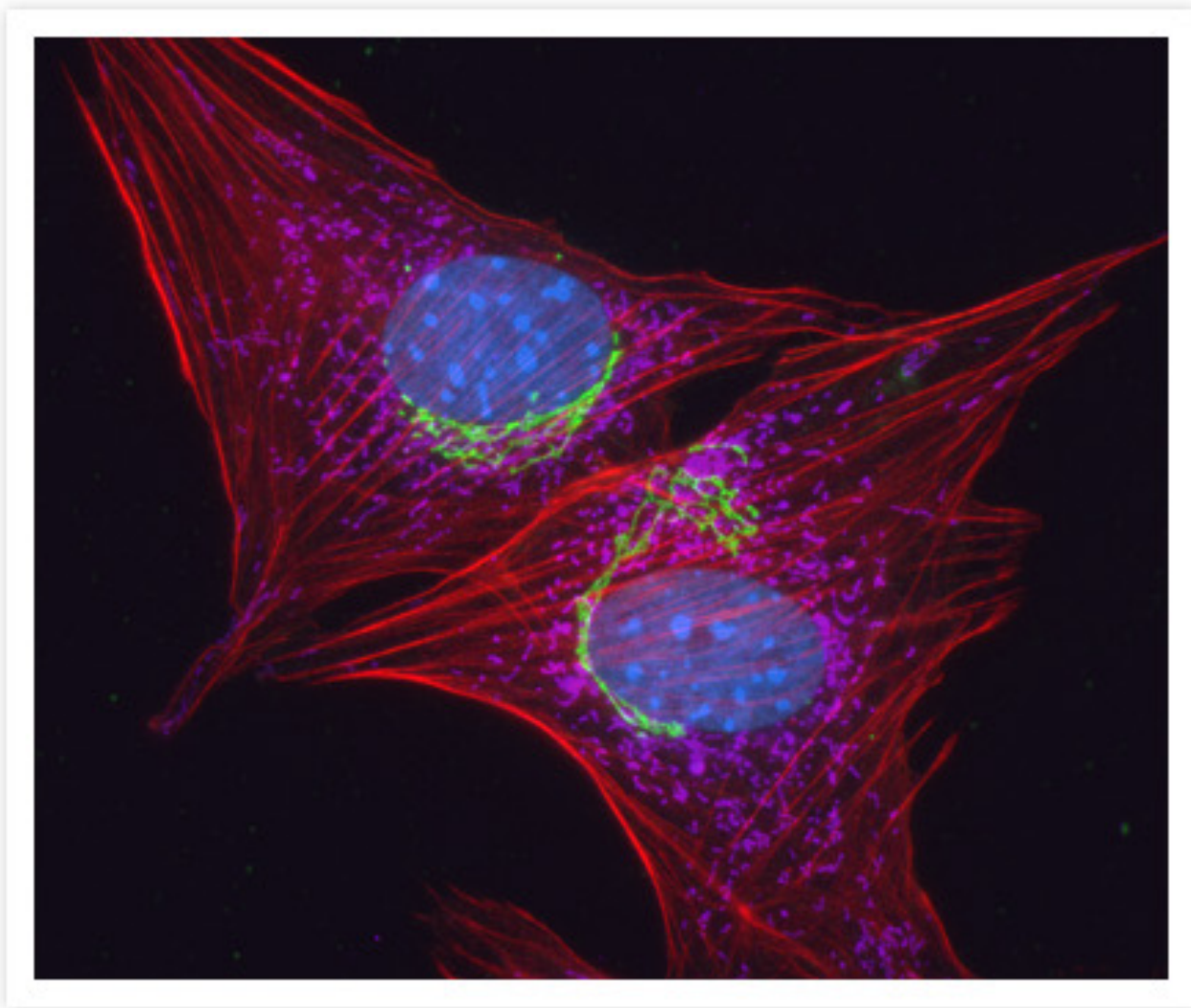
Sonde fluorescenti per specifiche componenti cellulari:



DNA
Lipid droplets

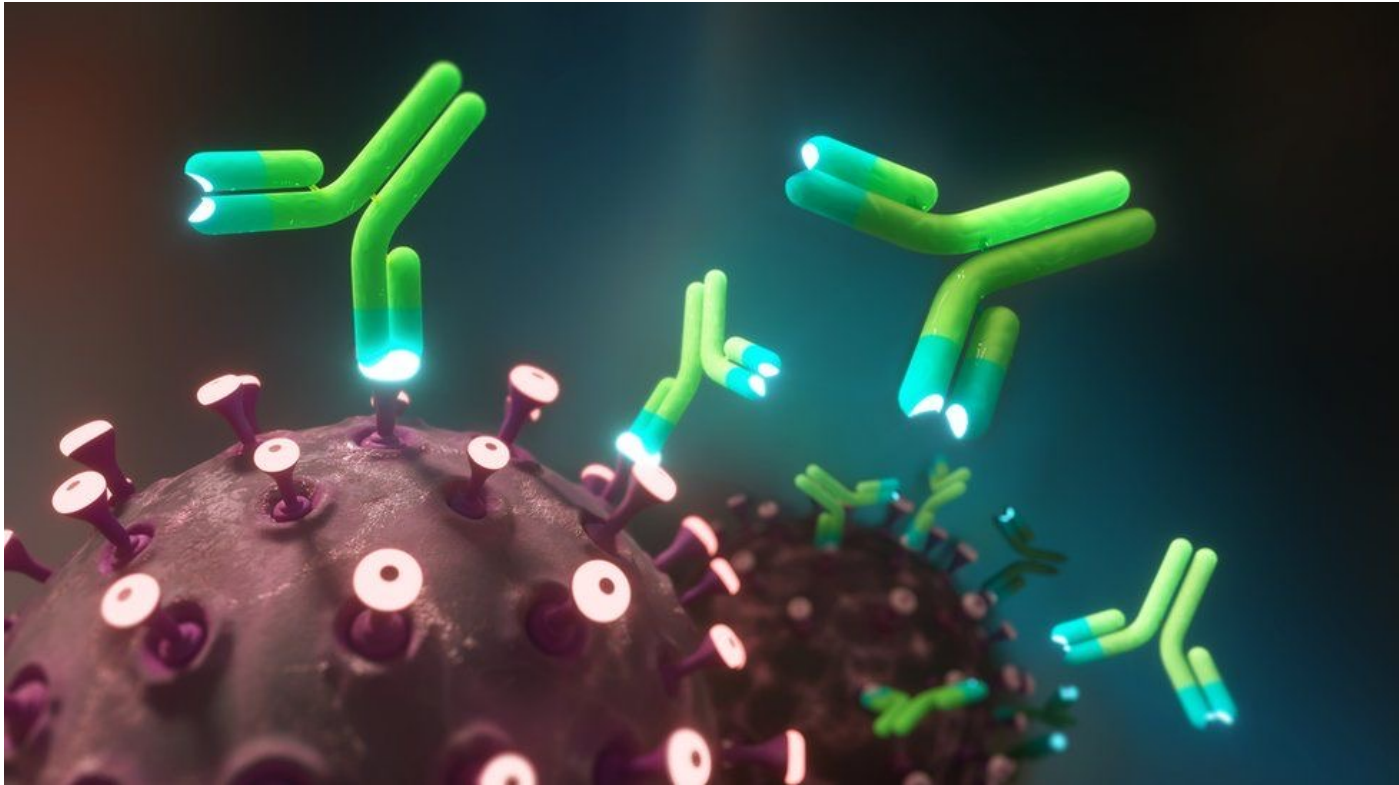


mitochondri
lisosomi



Falloidina-red
Lectina-green
Intercalante DNA-blue

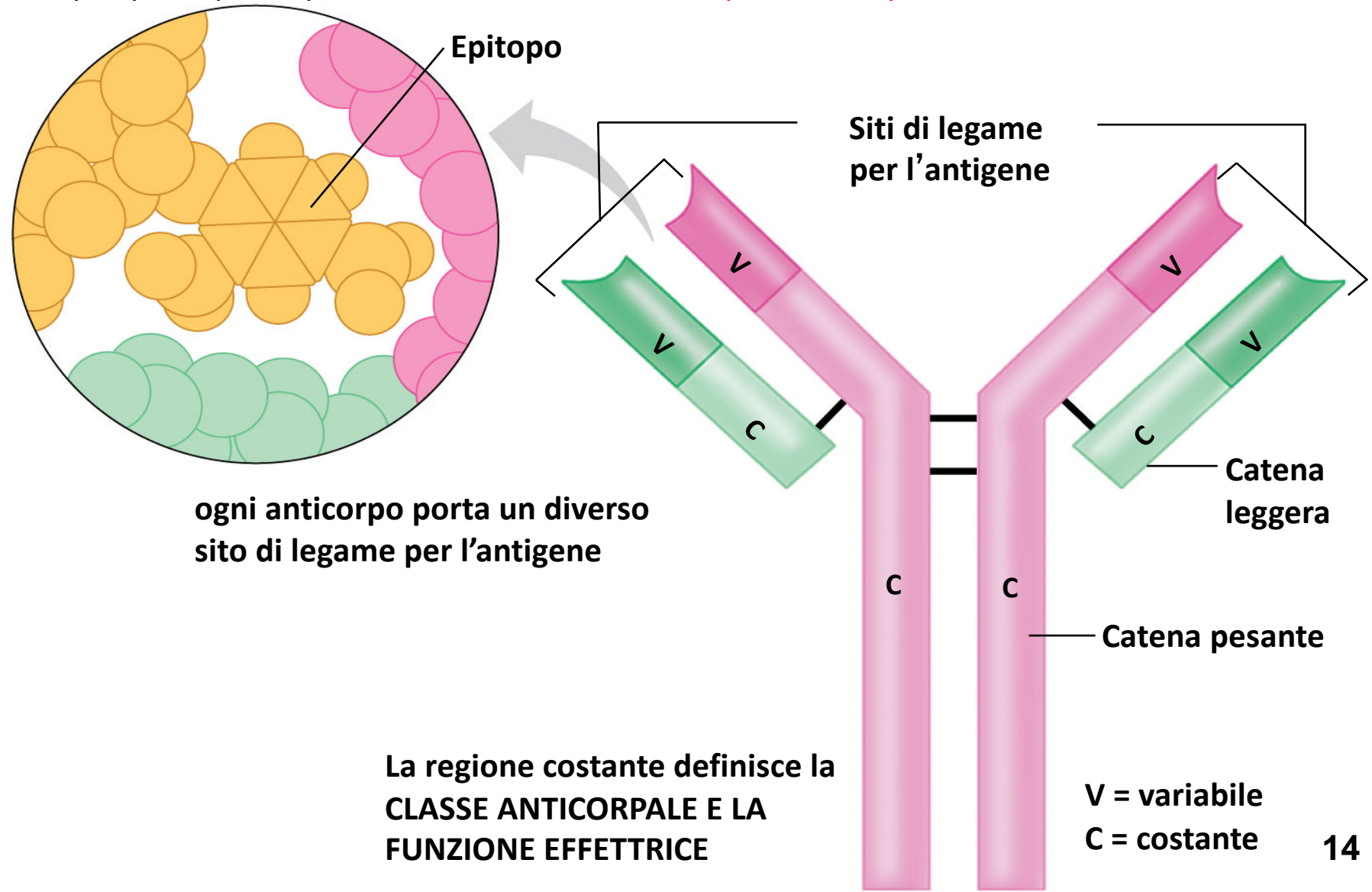
utilizzo di anticorpi per il riconoscimento specifico di antigeni proteici



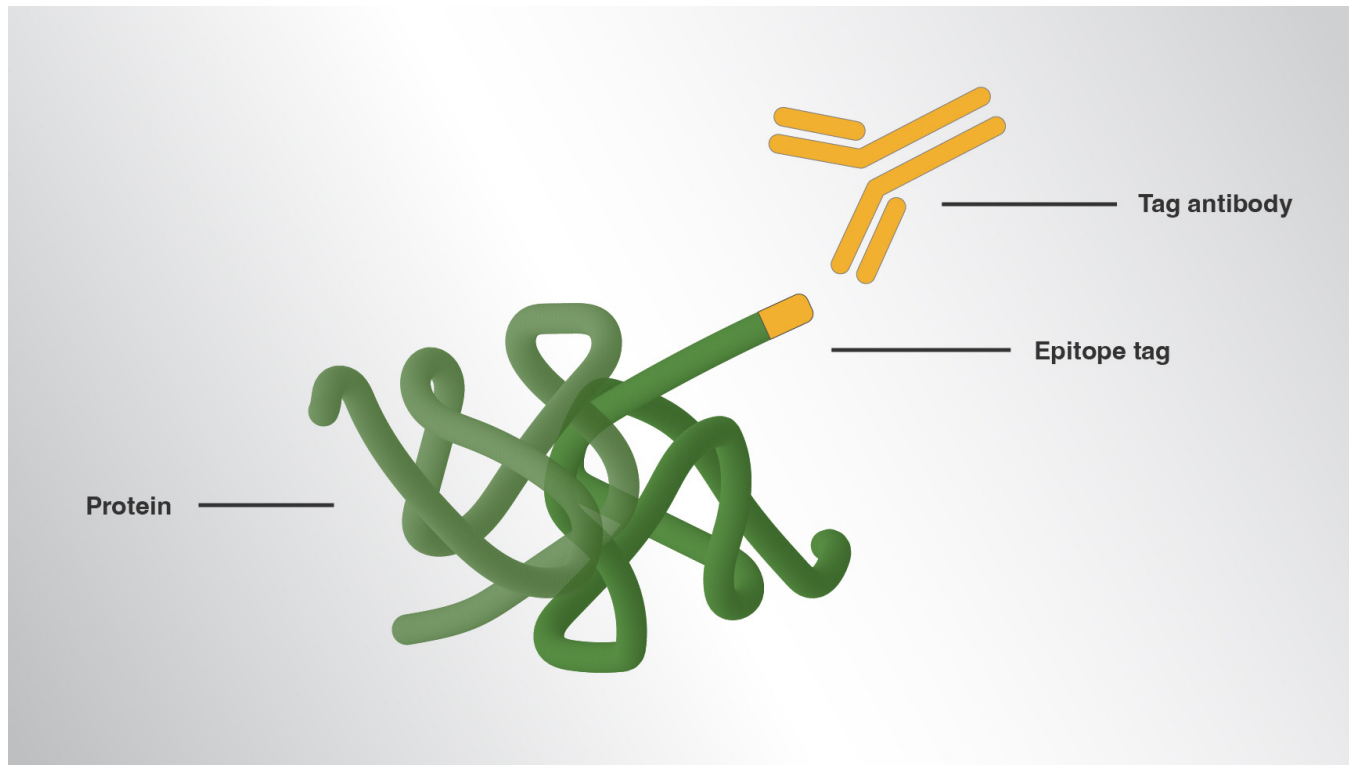
Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI** con elevata **specificità e affinità**:
possono essere quindi usati come **SONDE** per:
visualizzazione, purificazione e dosaggio di antigeni, in fase liquida, solida
oppure **IN SITU**, in cellule e tessuti.

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**.



Un TAG è un EPITOPO (6-10 AA)

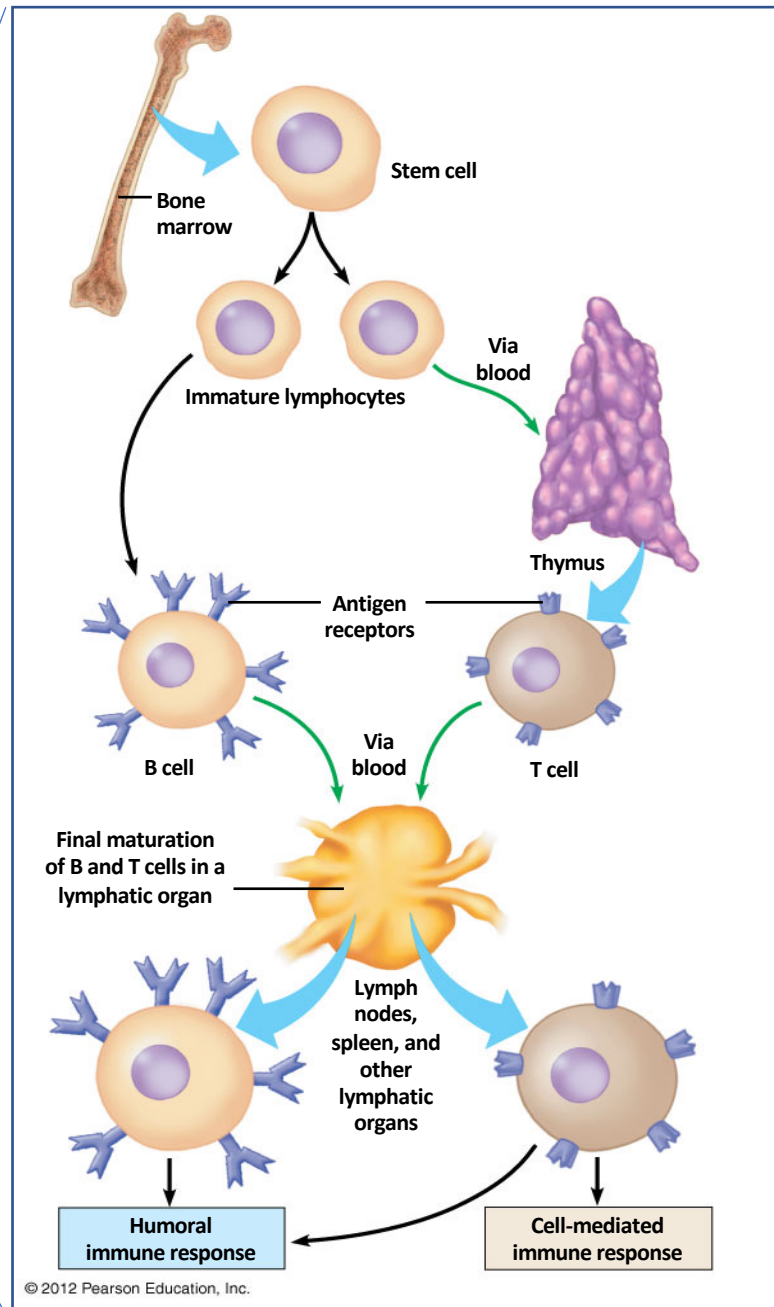
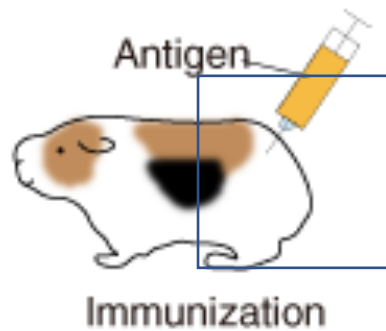


TECNICHE PER LA GENERAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI

**Tecniche basate sull'IMMUNIZZAZIONE di
animali**

IMMUNIZZAZIONE

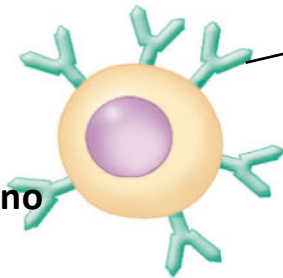
di animali da laboratorio
= iniezione dell' antigene



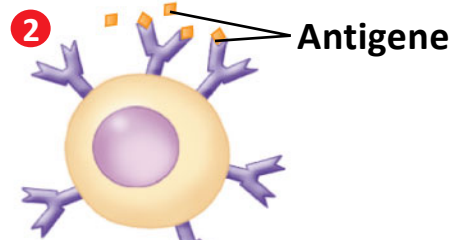


RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE

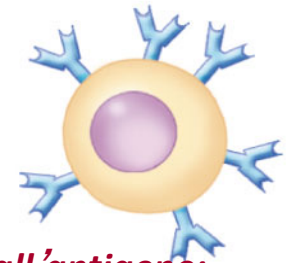
- 1** Popolazione di linfociti B che espongono diverse Ig di membrana



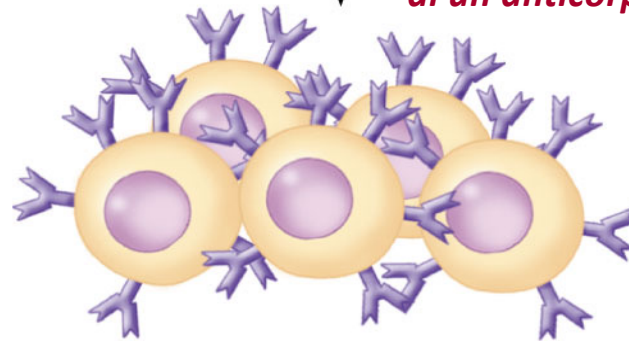
Ig di membrana = recettore per l'antigene



Antigene

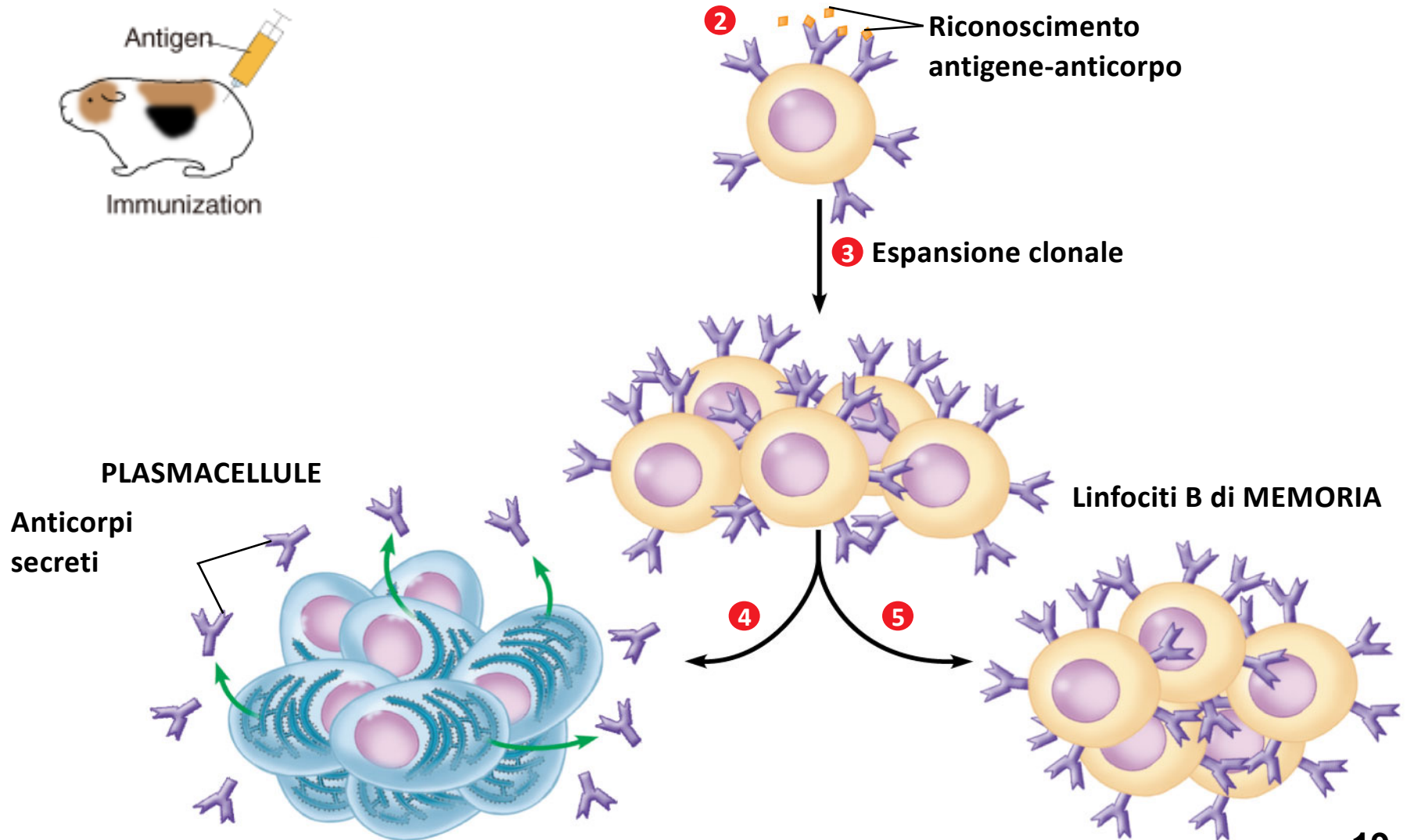


- Prima esposizione all'antigene:*
- 3** *riconoscimento da parte di un anticorpo specifico*

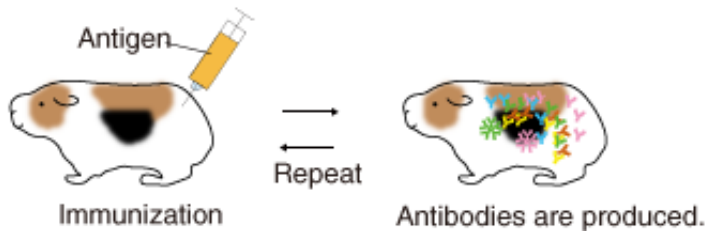


Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame all'antigene

La RISPOSTA IMMUNE genera PLASMACELLE e LINFOCITI DI MEMORIA

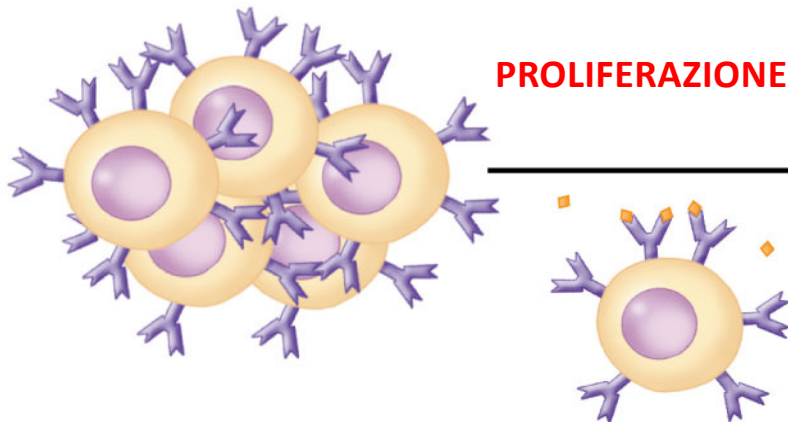


RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE



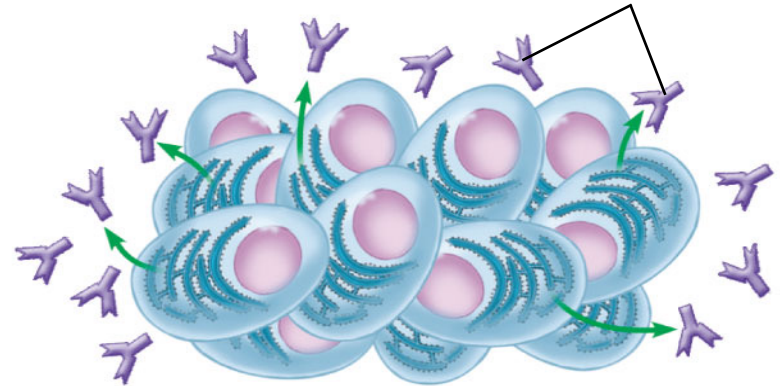
Immunized animals:
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

Linfociti B di MEMORIA

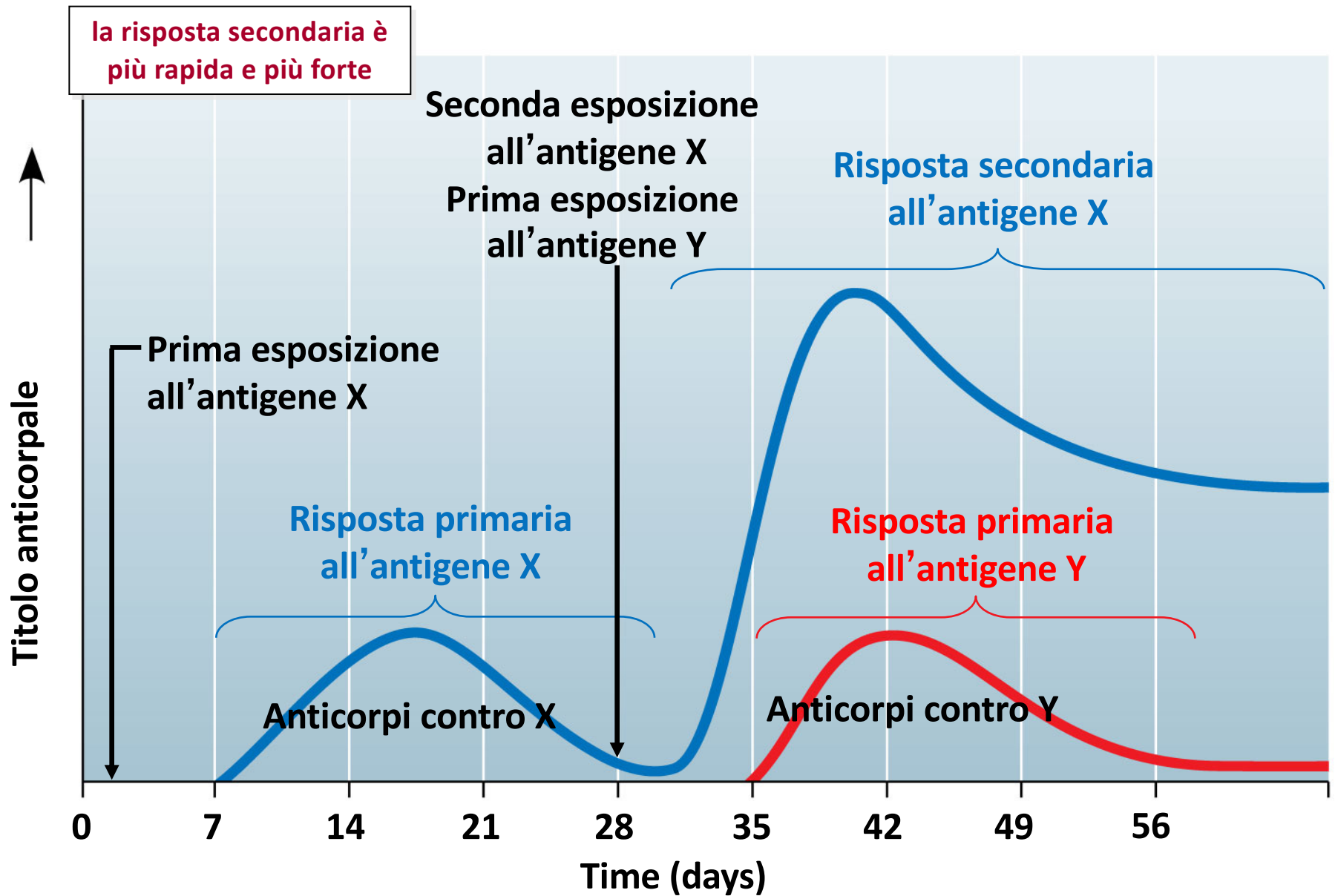


PLASMACELLE

**ANTICORPI
SECRETI**

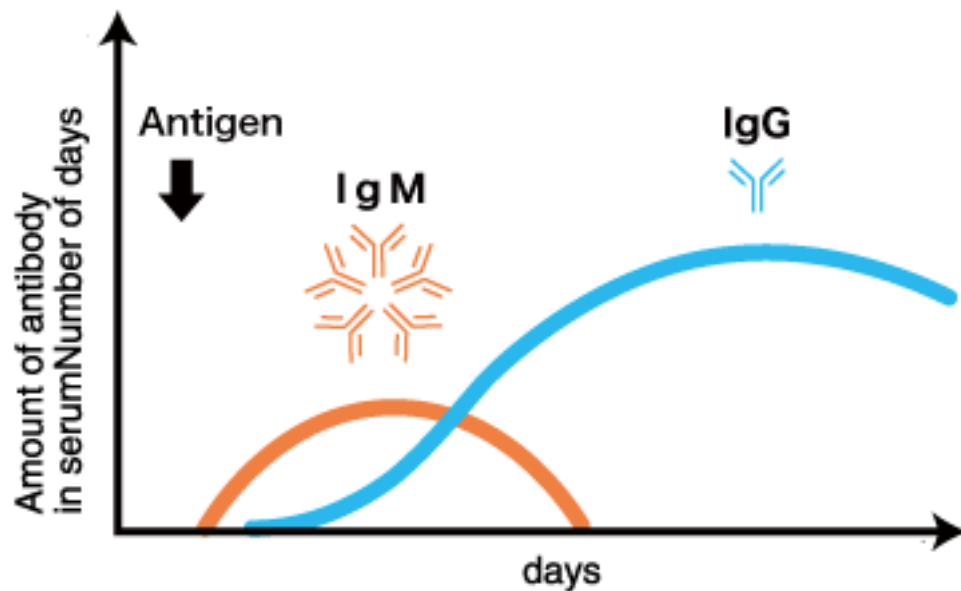


Linfociti B di MEMORIA

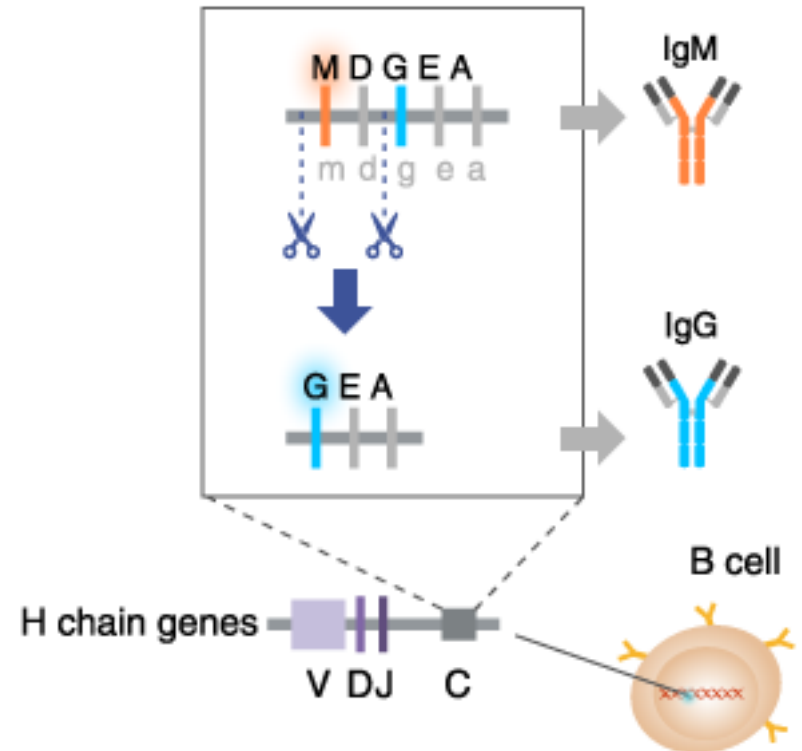


CLASSI ANTICORPALI

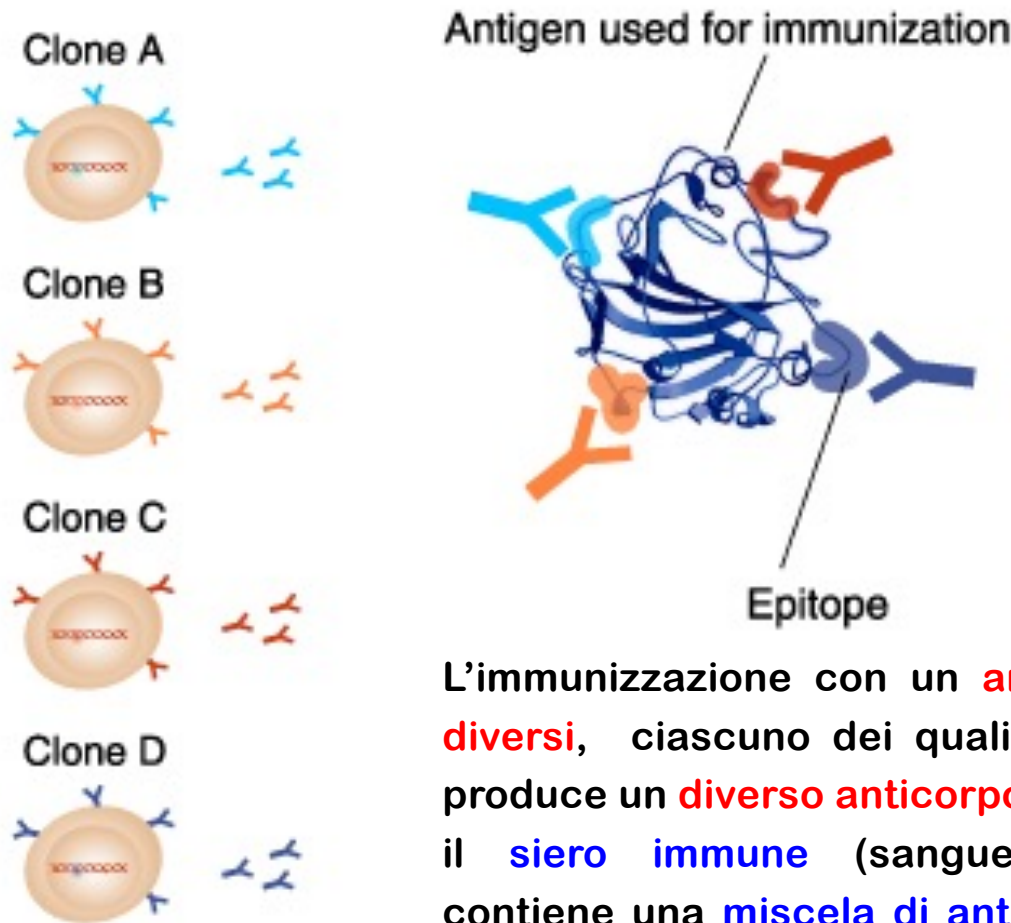
Levels of circulating antibodies to a specific antigen



Class switching



LA RISPOSTA IMMUNE GENERA ANTICORPI POLICLONALI

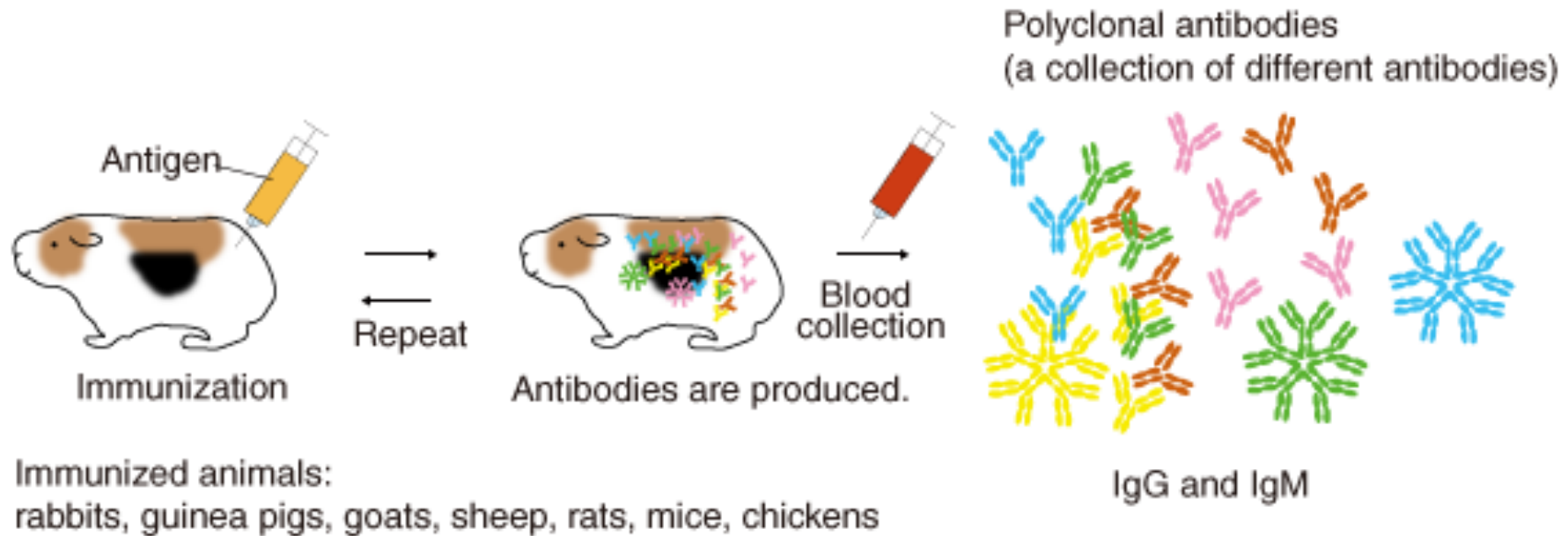


L'immunizzazione con un **antigene** stimola molti **linfociti diversi**, ciascuno dei quali si espande in un clone che produce un **diverso anticorpo**:

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**

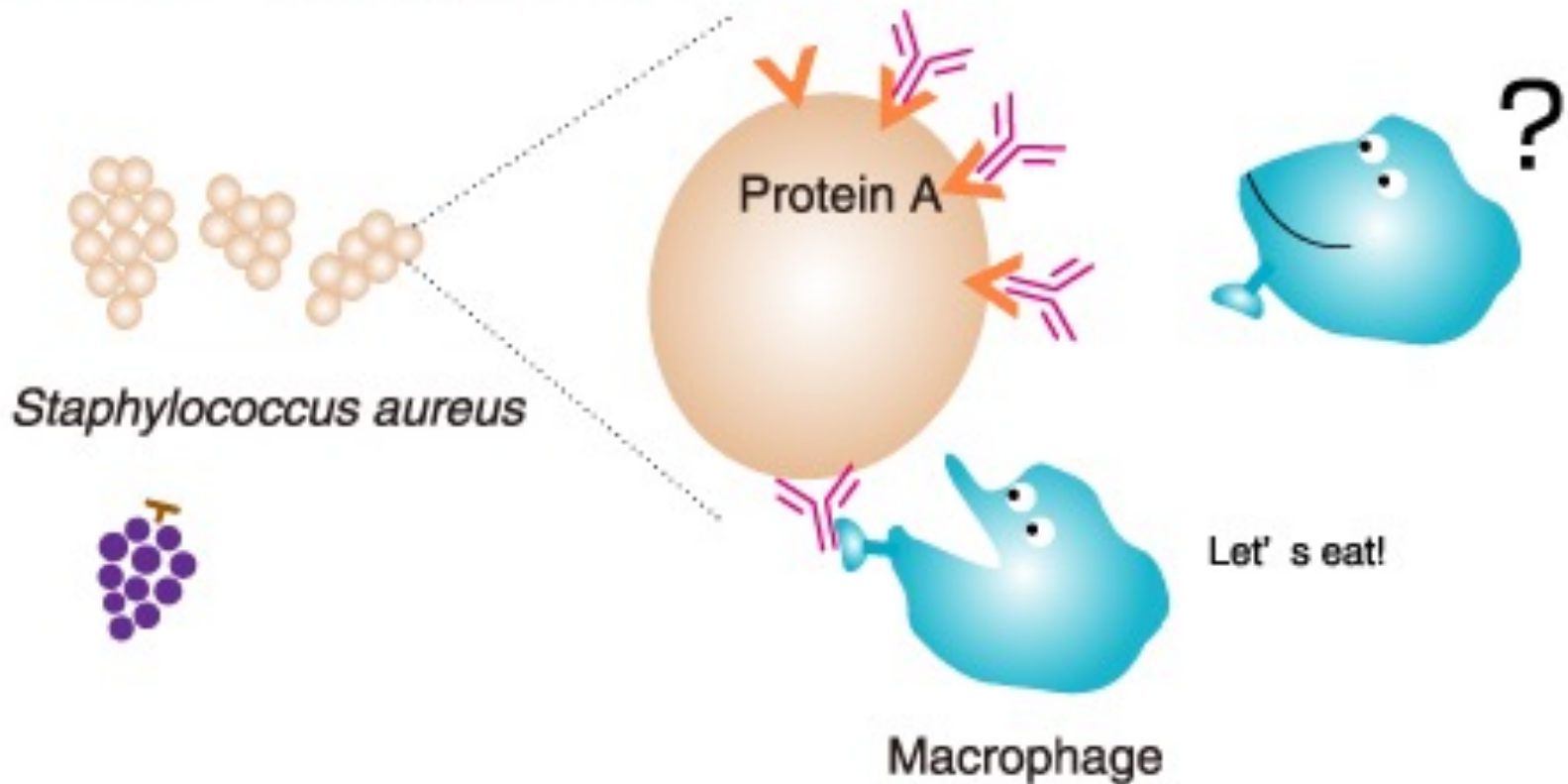
Al termine del ciclo di immunizzazione viene prelevato un po' del sangue dell'animale per recuperare gli anticorpi



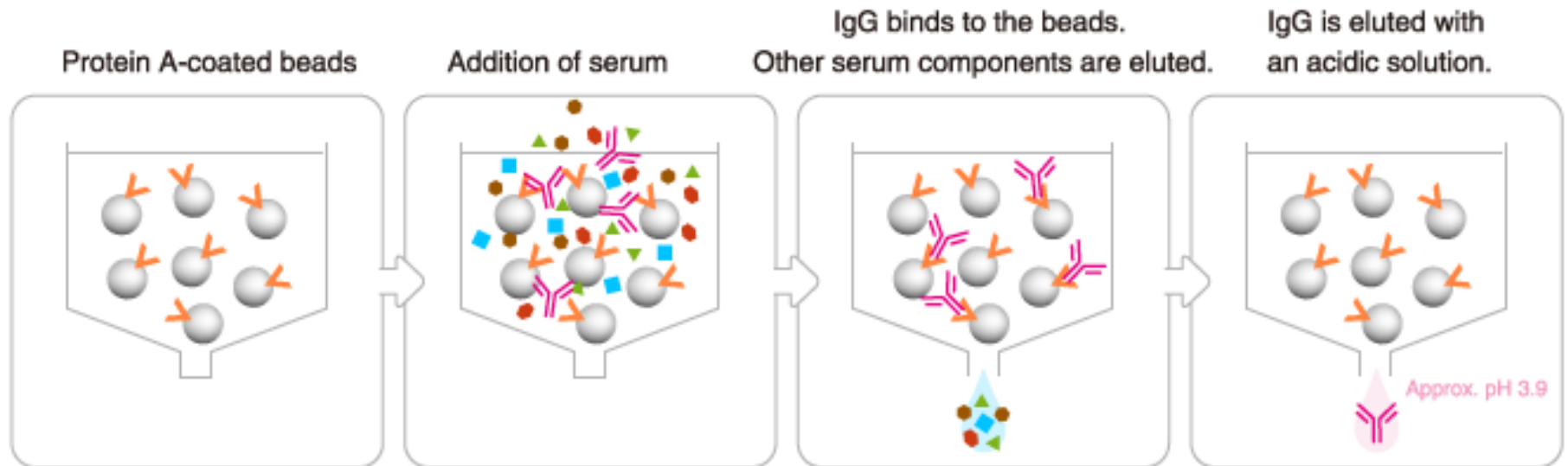
SIERO IMMUNE o ANTISIERO

PURIFICAZIONE DI ANTICORPI dal siero mediante PROTEINA A di *Stafilococco*

Immune evasion by *Staphylococcus aureus*

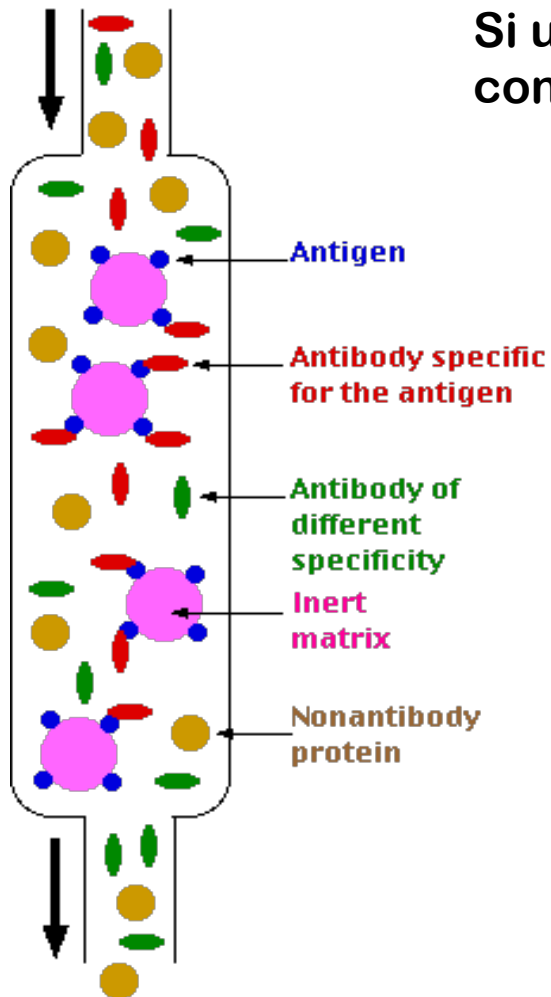


PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



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

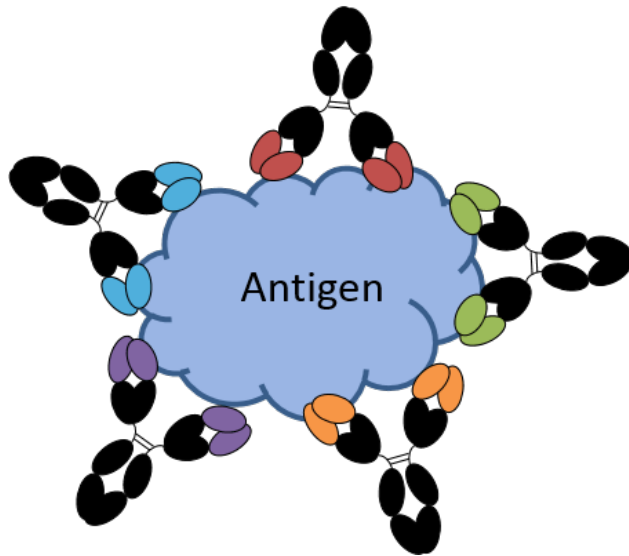


Polyclonal antibodies

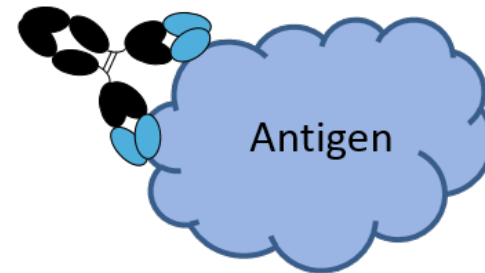


ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

Polyclonal antibody



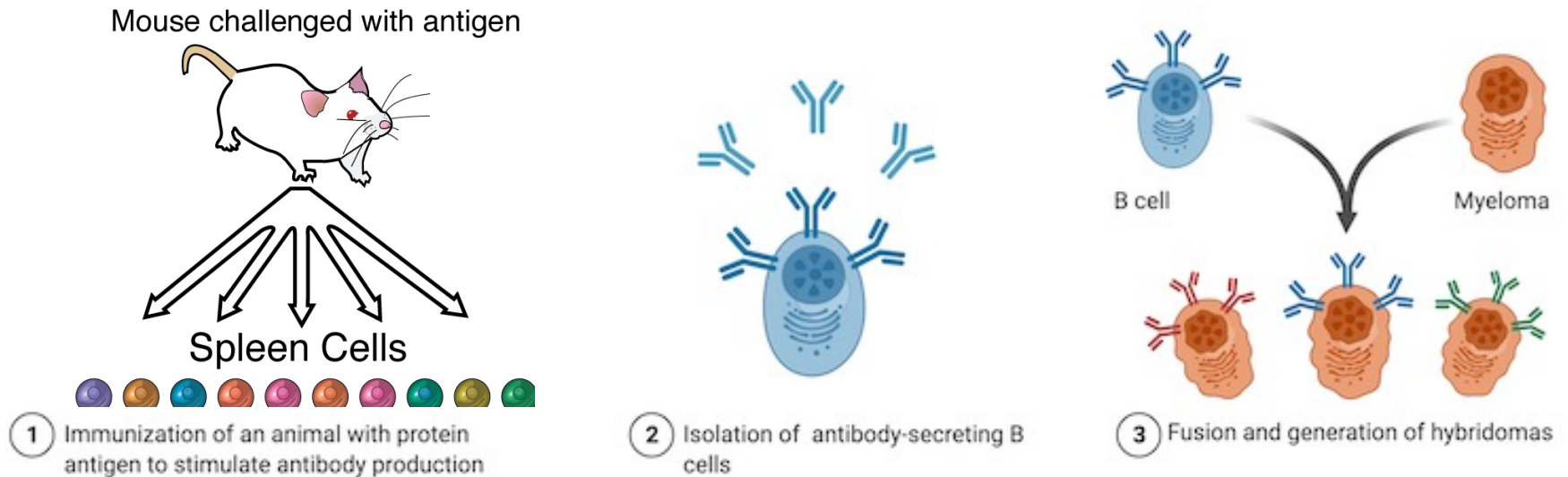
Monoclonal antibody



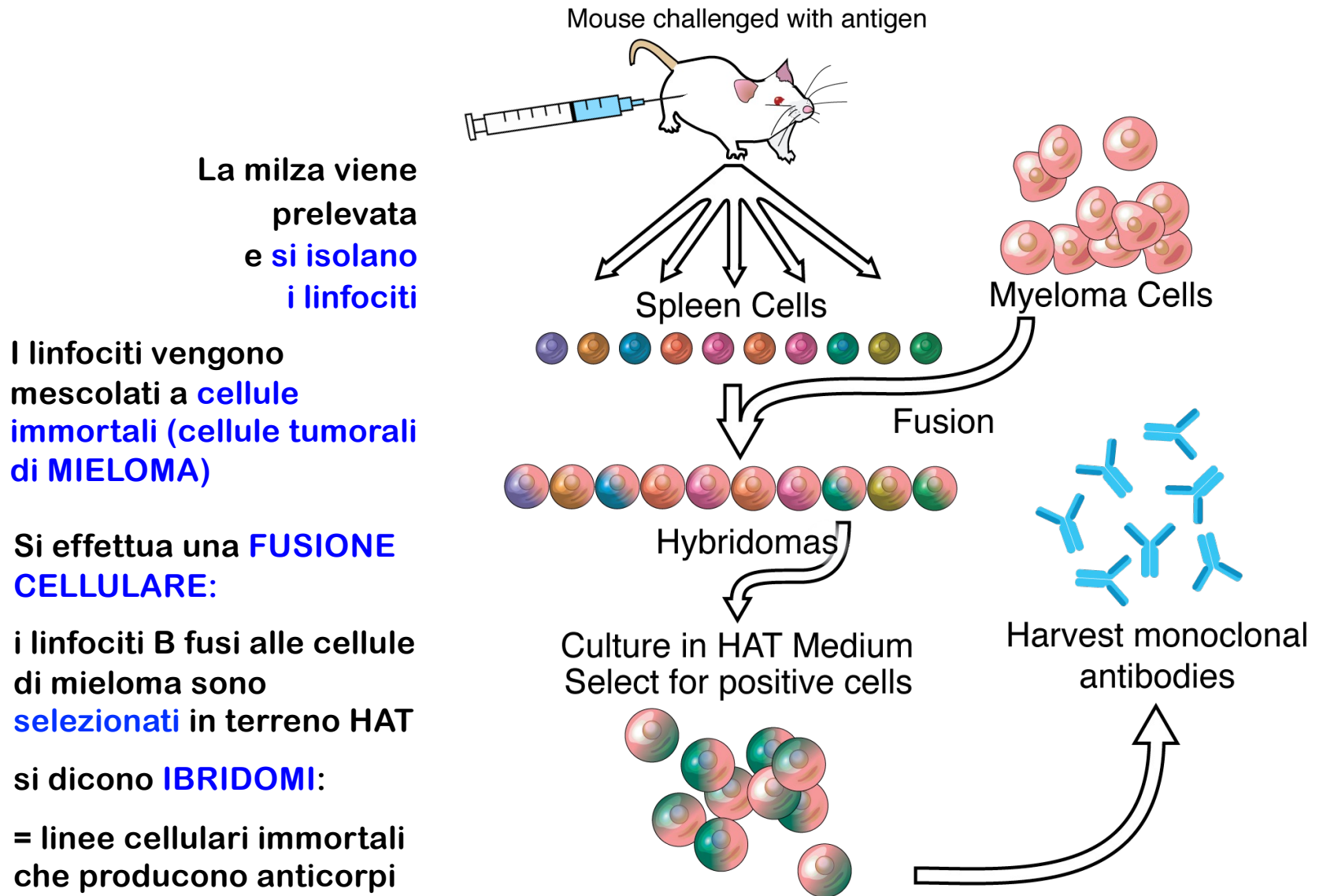
Epitopi multipli	Singolo epitopo
Segnale più forte	Segnale più debole
Basso rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato	Rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato
Può riconoscere epitopi comuni ad altri antigeni (crossreattività)	molto specifico (se opportunamente selezionato)

ANTICORPI MONOCLONALI:

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

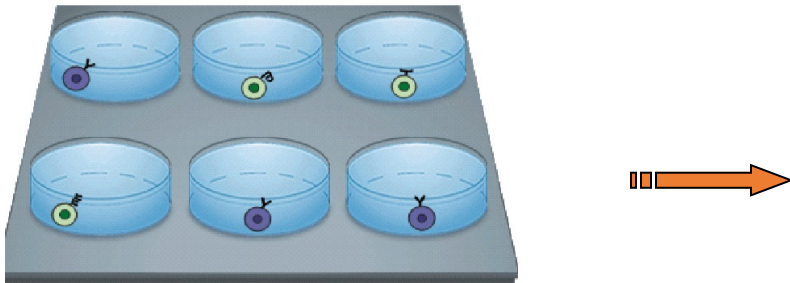


Produzione di anticorpi monoclonali

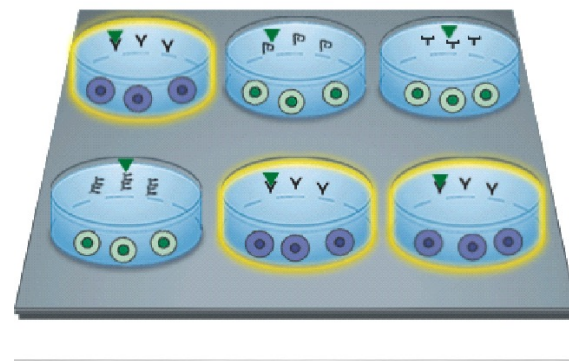


Produzione di anticorpi monoclonali

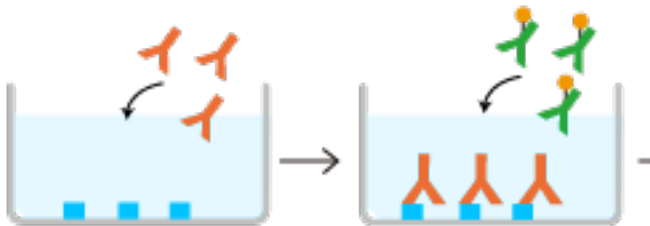
- 7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e seminati a singola cellula in piastre multiwell



- 8 Ogni clone produrrà un anticorpo diverso



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

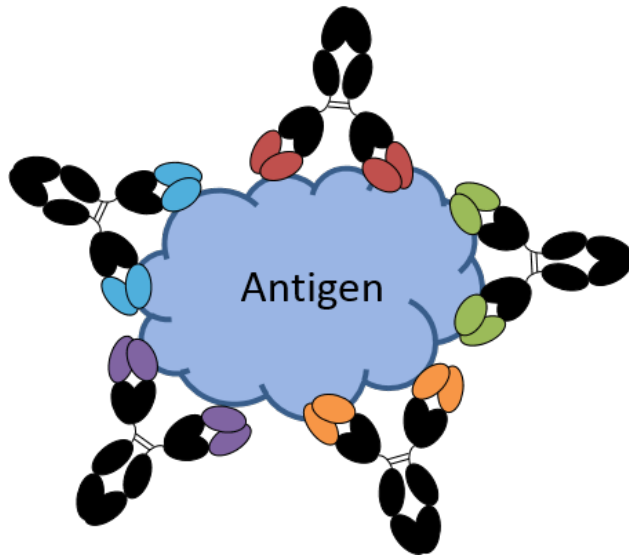


- 10 Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI**
(derivati da un singolo clone) che riconoscono lo specifico antigene X

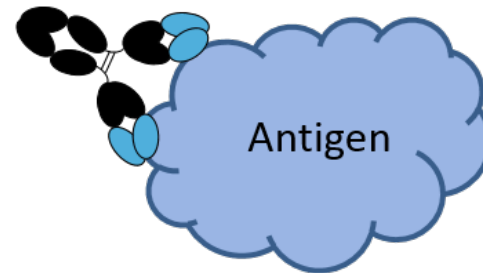


ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

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)

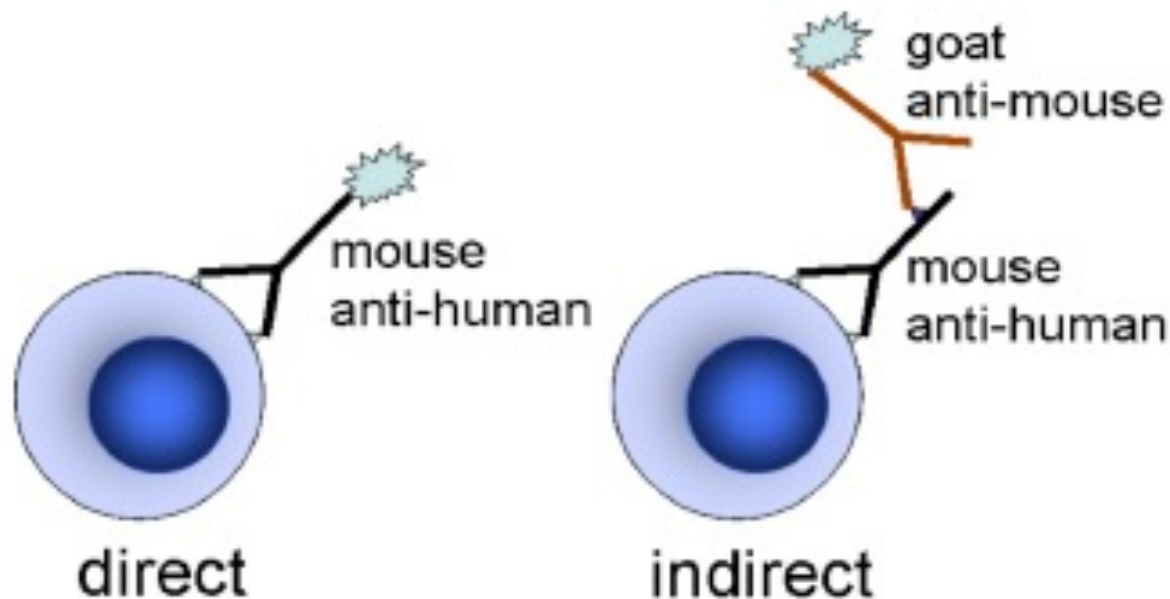
Tecniche che impiegano anticorpi = TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

- 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**.

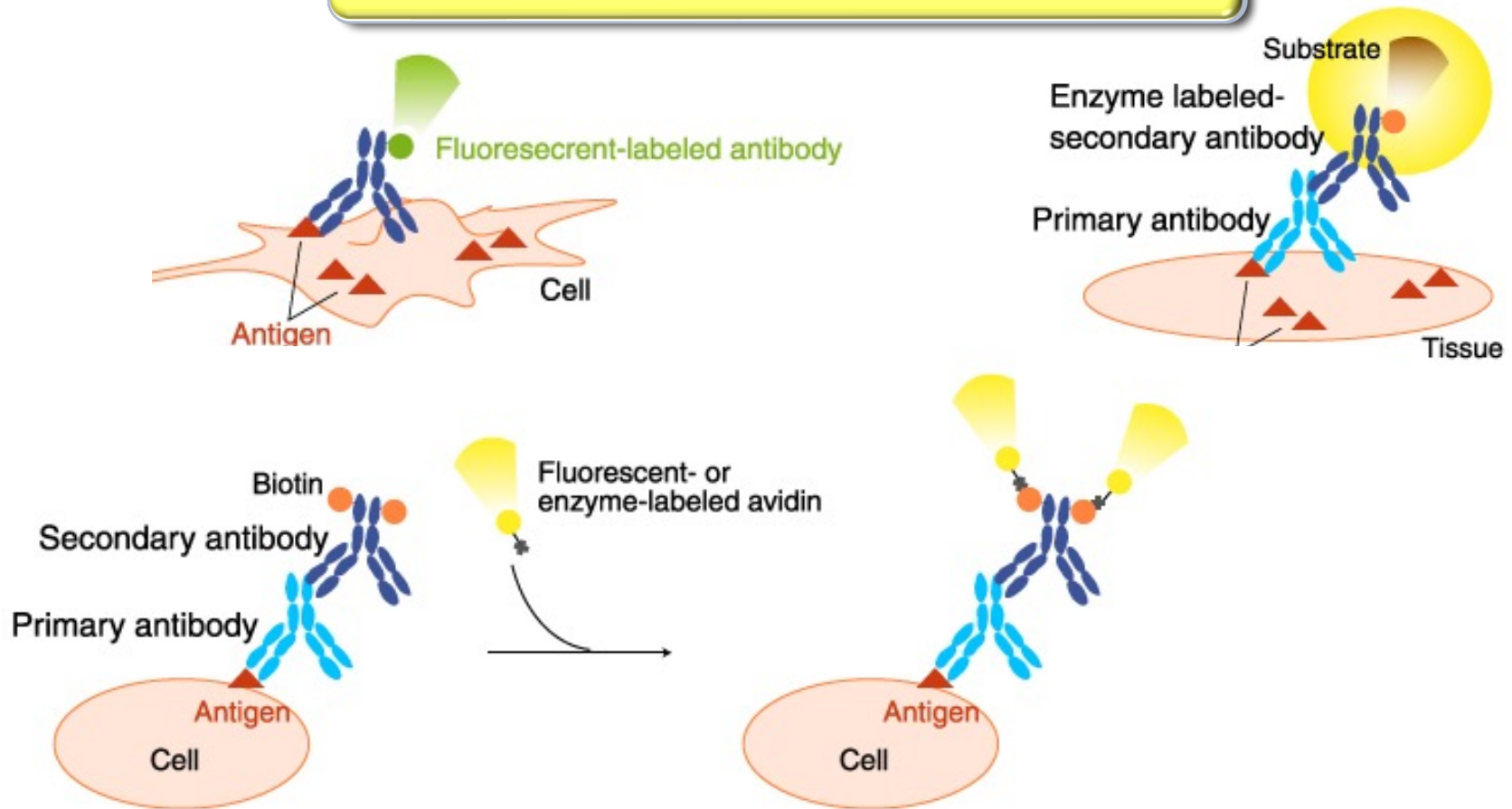
TECNICHE IMMUNOCHEMICHE DIRETTE E INDIRETTE

Le tecniche DIRETTE sono basate sulla coniugazione di un anticorpo primario 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)



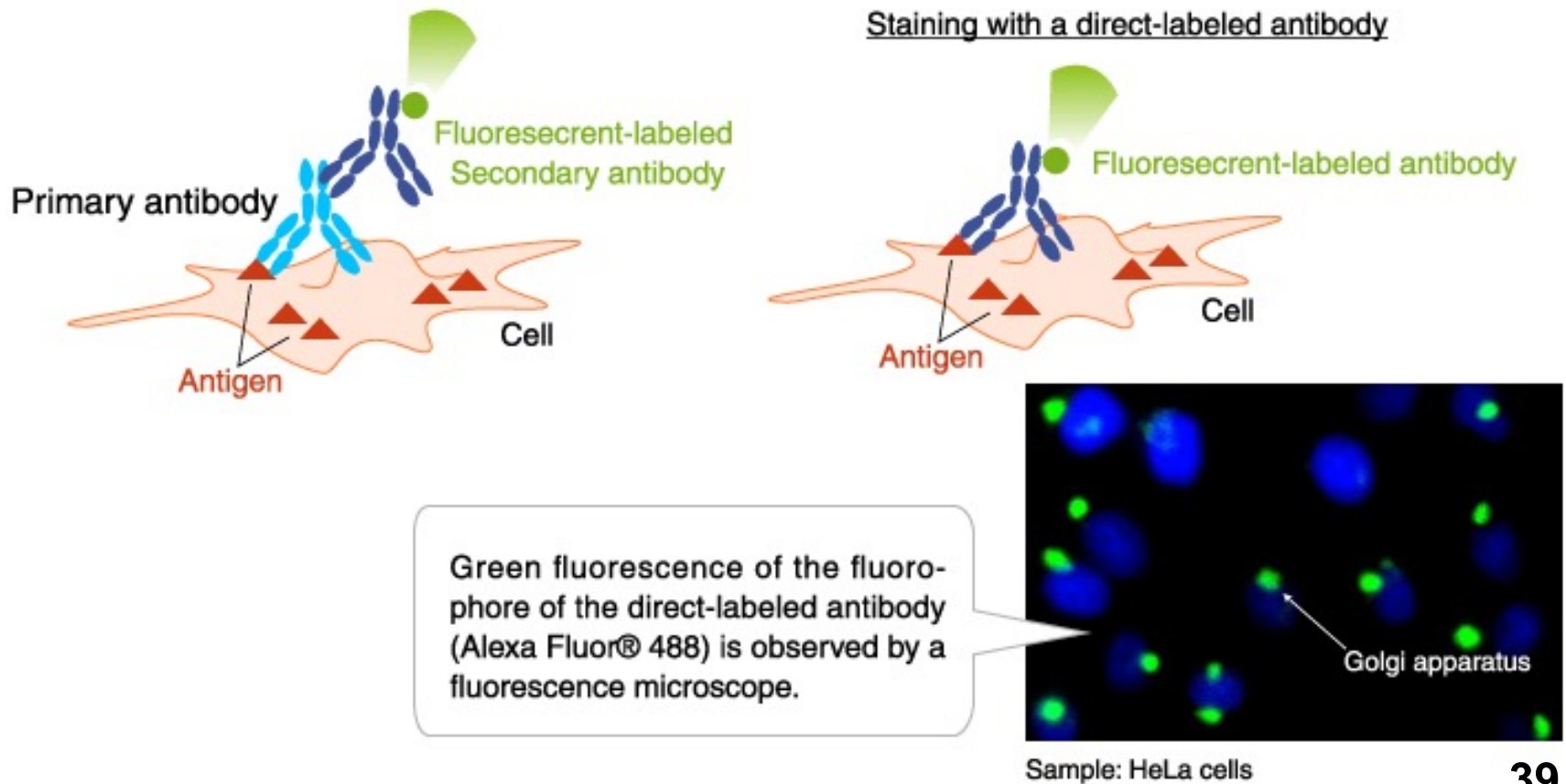
CONIUGAZIONE di ANTICORPI



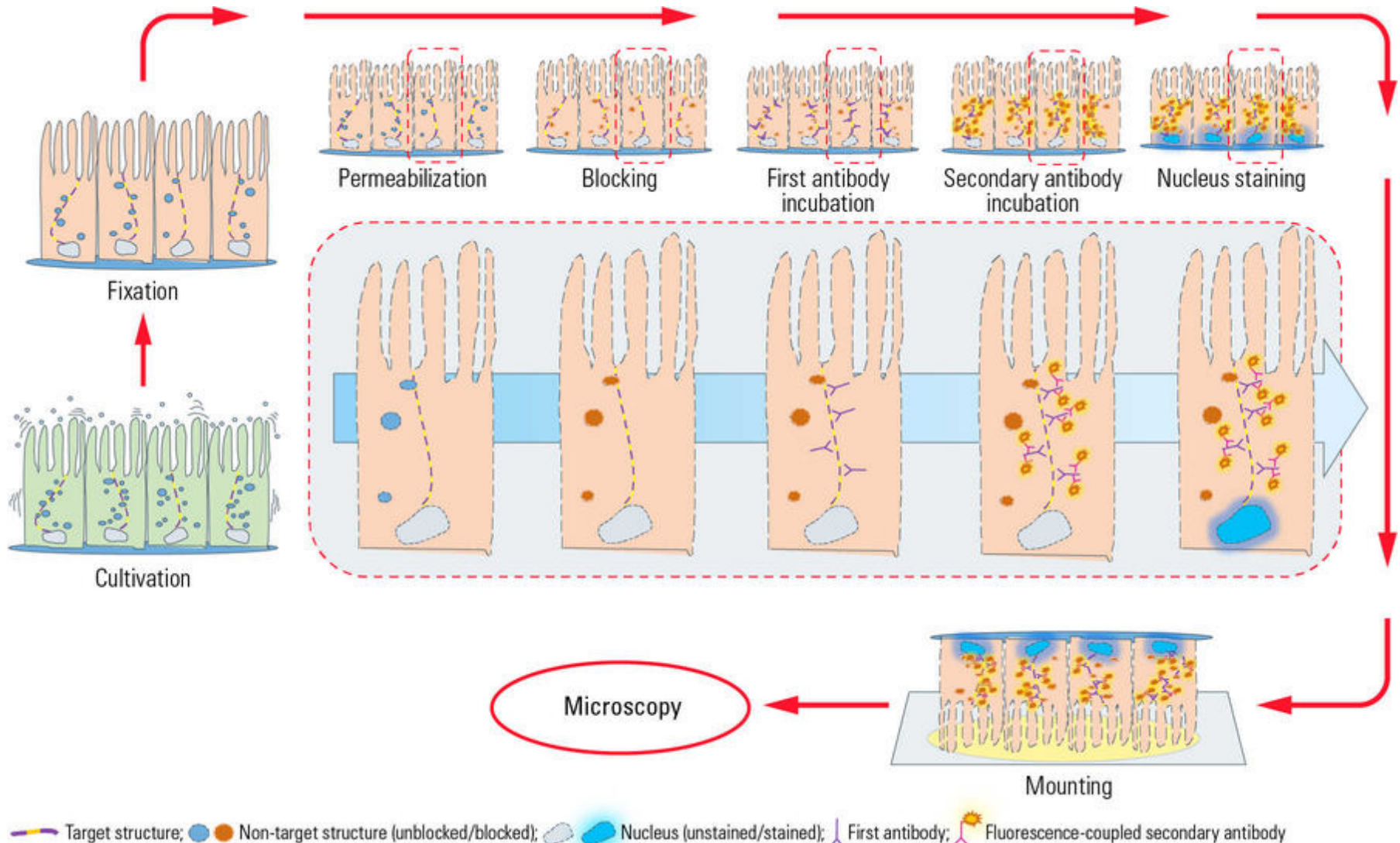
1. **fluorocromo** (microscopia a fluorescenza, citofluorimetria)
2. **enzima** con substrato **cromogeno o chemiluminescente** (WB, IHC, ELISA)
3. **biotina** (**purificazione** tramite streptavidina)
4. **beads** (resine o particelle magnetiche per **purificazione**)

Analisi di antigeni IN SITU IN CELLULE: immunofluorescenza

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



IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA

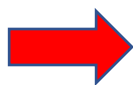
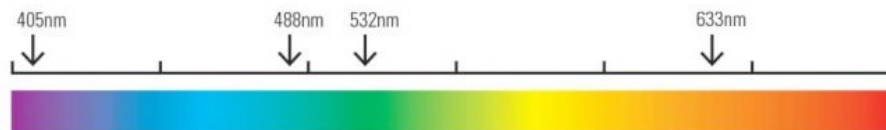


IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA

- ✓ **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**

Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati per la coniugazione

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 la 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.

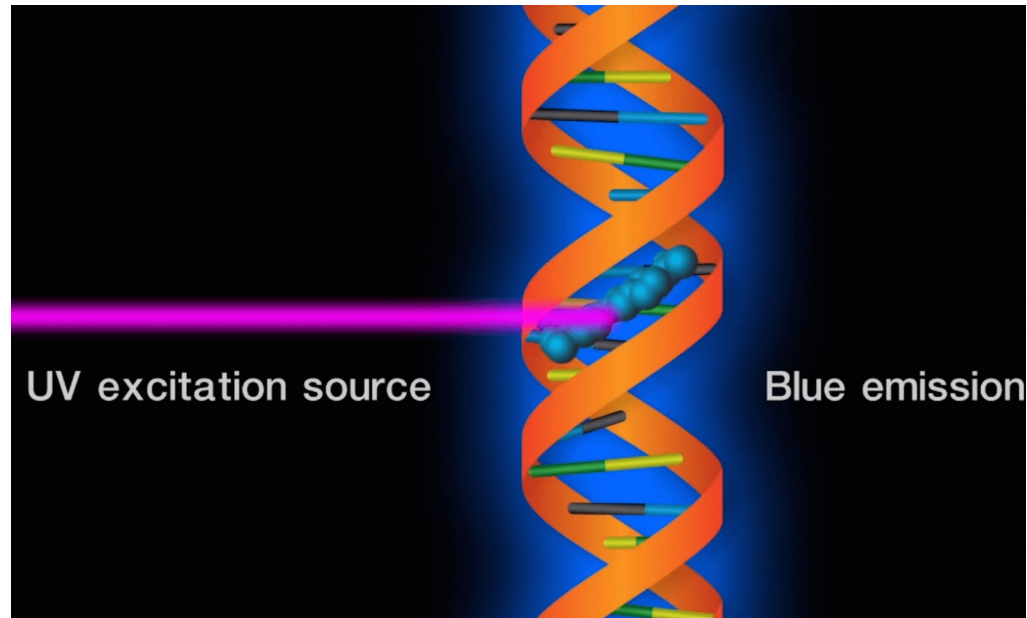
Even if FITC and TRITC are still in use, they are **rather weak** fluorescent dyes and not recommended for state of the art microscopy. Their profit is based on their **economical** price.

Cyanines

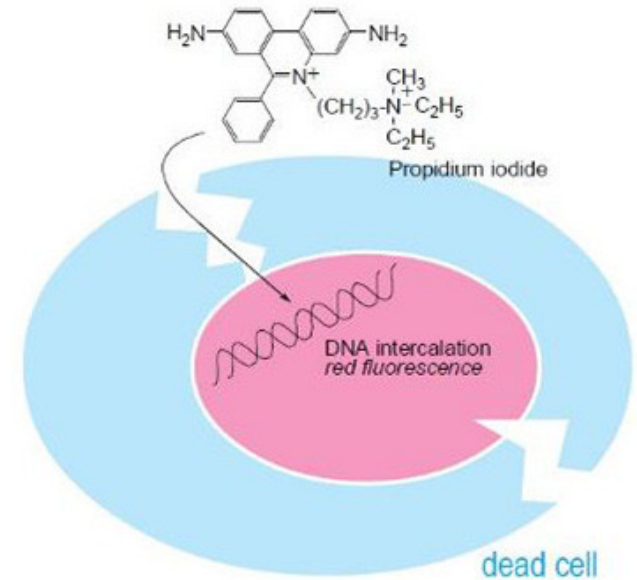
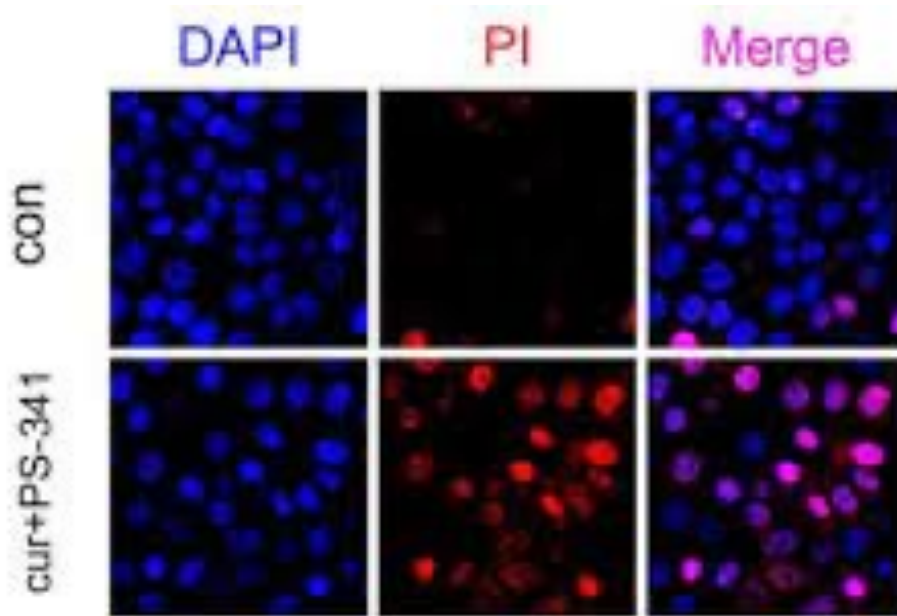
This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them **can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups**.

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

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

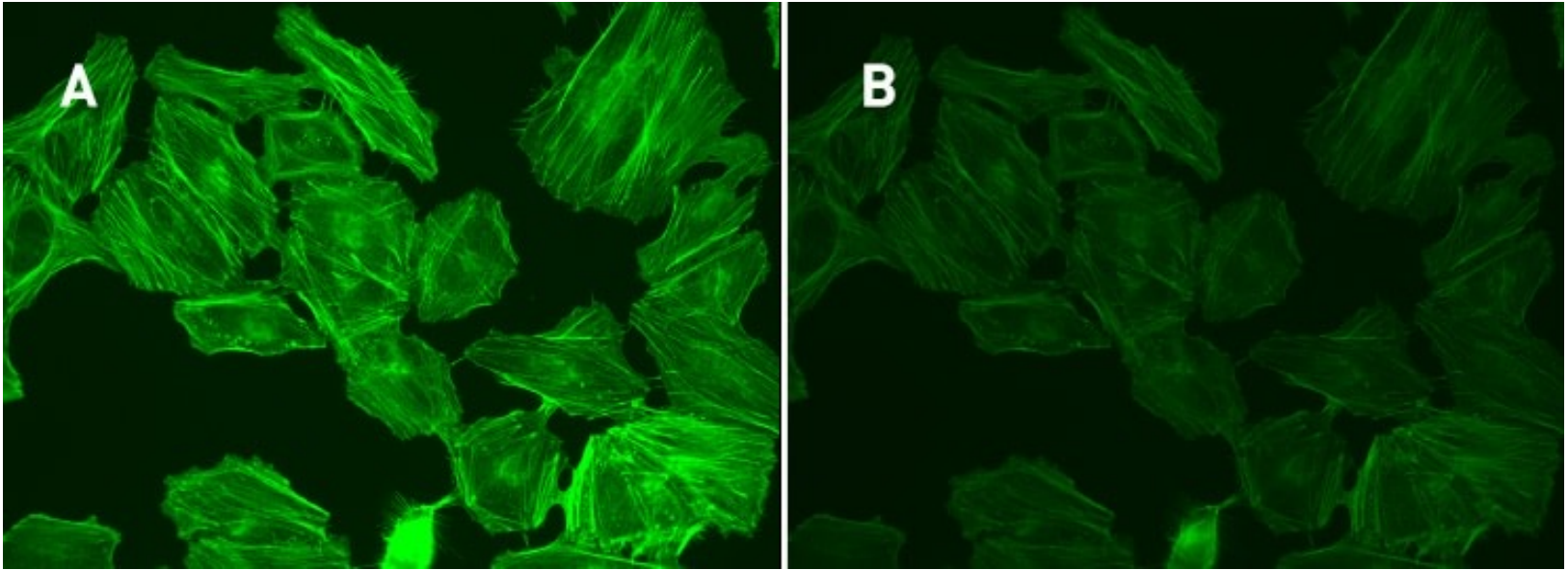


COLORANTI VITALI PER IL DNA



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 = $20\ \mu\text{m}$.

Fluorescence photo-bleaching



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

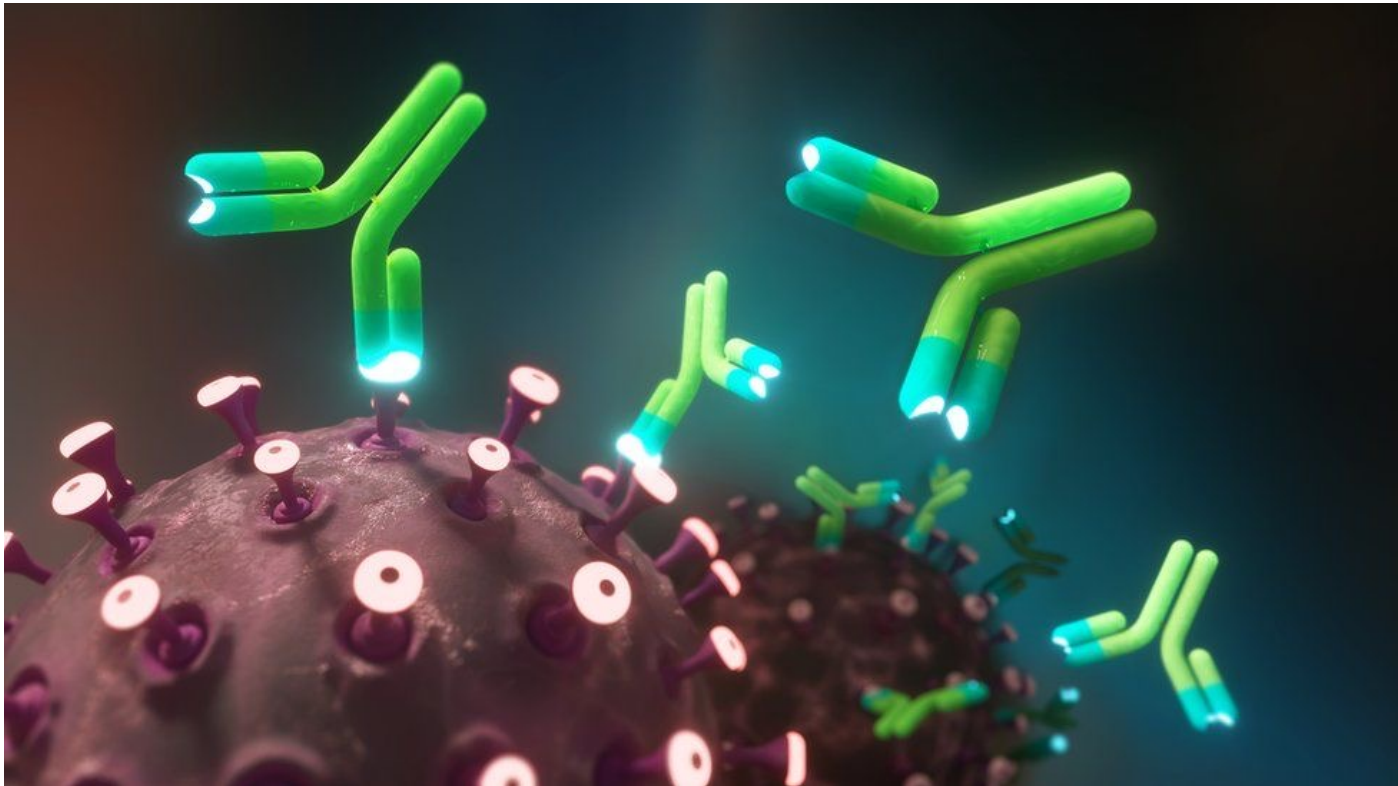
Dopo un tempo (variabile) di esposizione si ha progressiva perdita della fluorescenza.

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

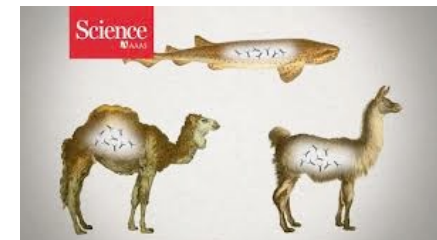
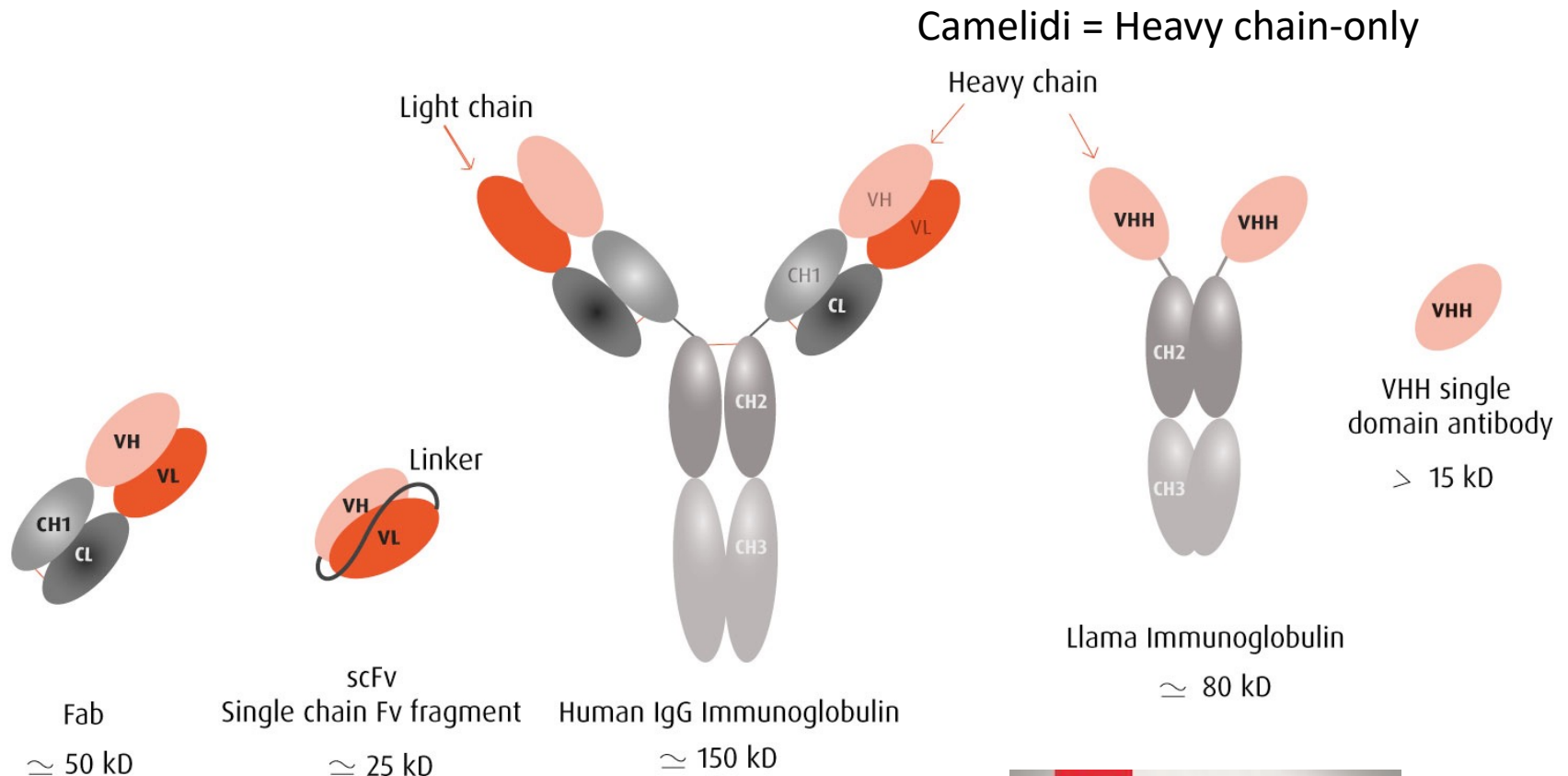
Corso di Biotecnologie Cellulari 2025-26

Lezione 7

TECNICHE IMMUNOCHEMICHE



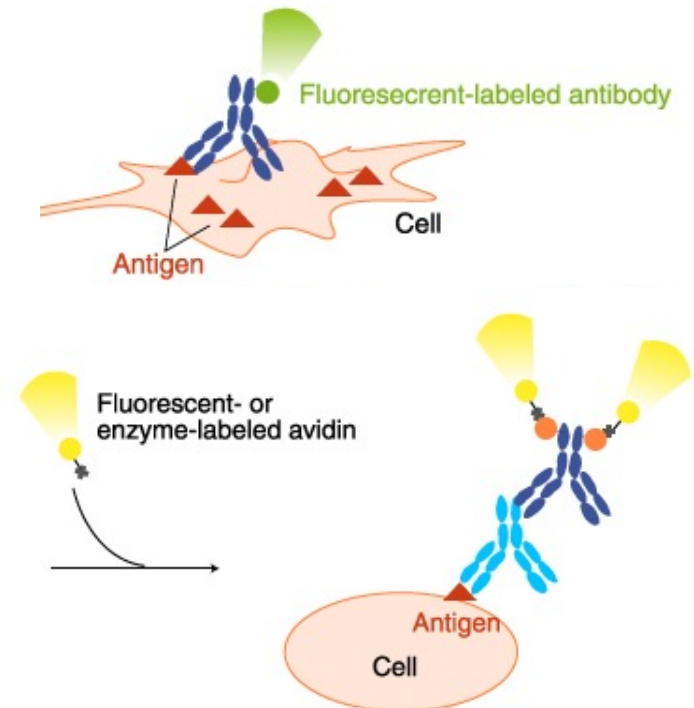
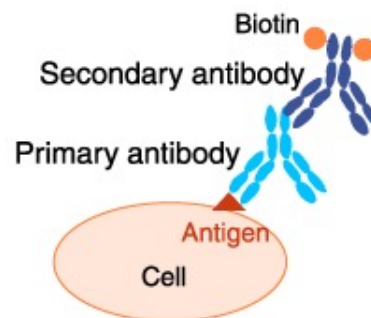
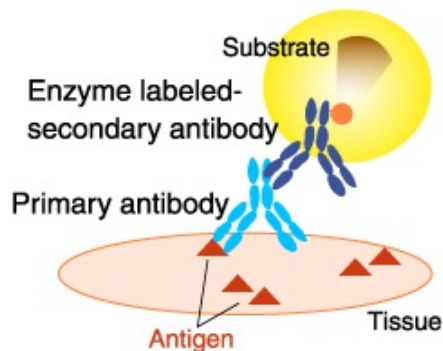
Anticorpi camelidi, nanobodies, single chain Fv, sono prodotti in vitro con tecniche di biologia molecolare



Tecniche che impiegano anticorpi = TECNICHE IMMUNOCHEMICHE

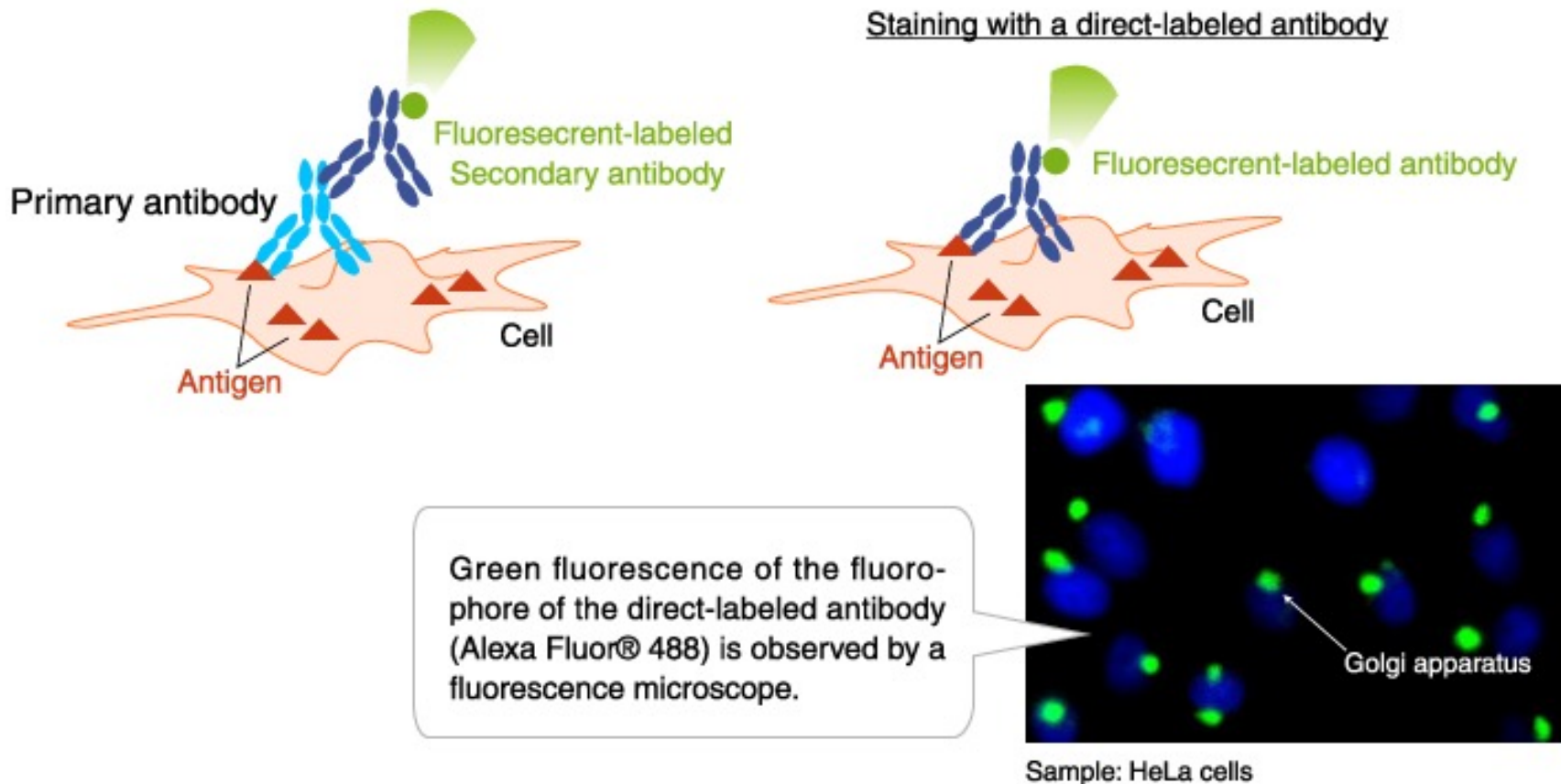
Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI** con elevata **specificità e affinità**:
possono essere quindi usati come **SONDE** per:
visualizzazione, dosaggio o purificazione di antigeni
in fase liquida, solida oppure **IN SITU**, in cellule e tessuti.

La **rilevazione/purificazione** del complesso Ag/Ab
avviene **coniugando la regione costante**
dell'anticorpo ad una molecola **visualizzabile** o
utilizzabile per la **purificazione**.



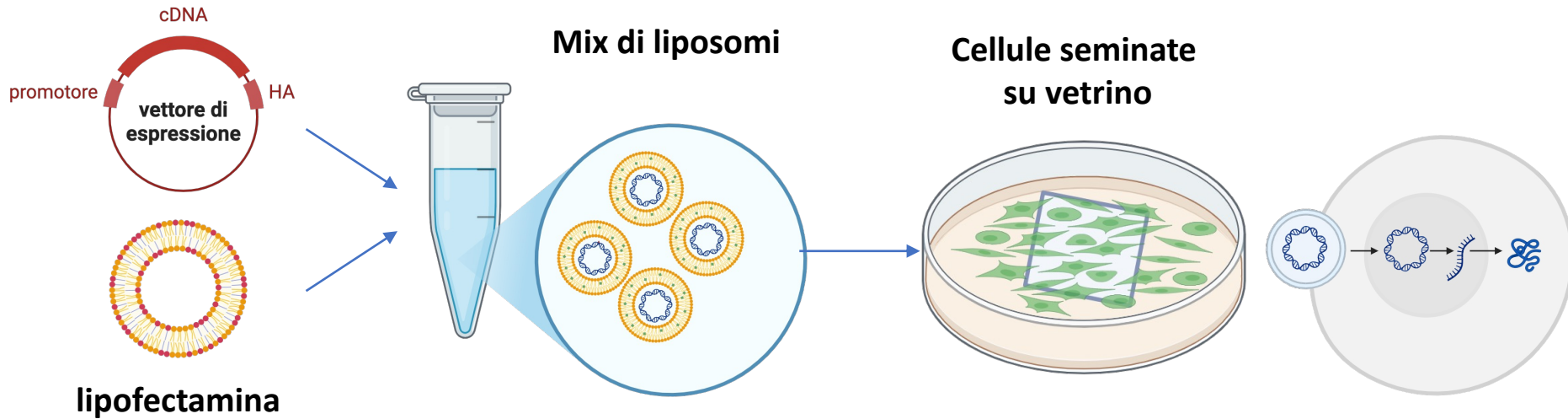
Analisi di antigeni IN SITU IN CELLULE e TESSUTI: immunofluorescenza

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

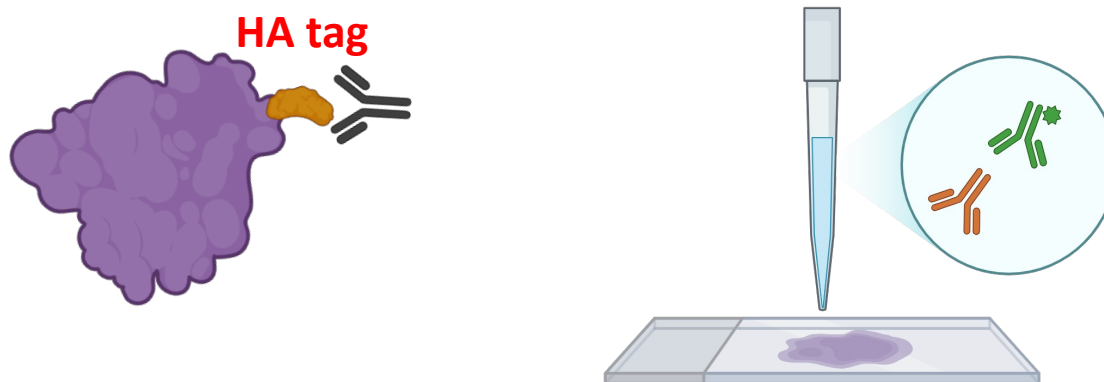


ESPERIENZA #4

Trasfezione di cellule in coltura

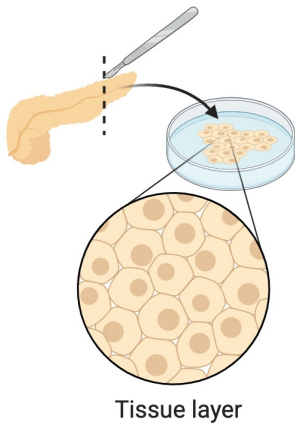


Riconoscimento di proteine espresse in maniera ectopica mediante immunofluorescenza con anticorpi specifici per il TAG

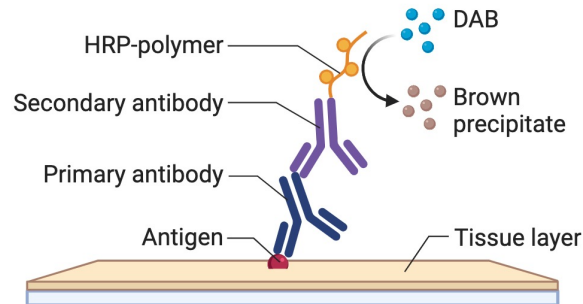


ANALISI IN SITU IN TESSUTI: IMMUNOISTOCHIMICA

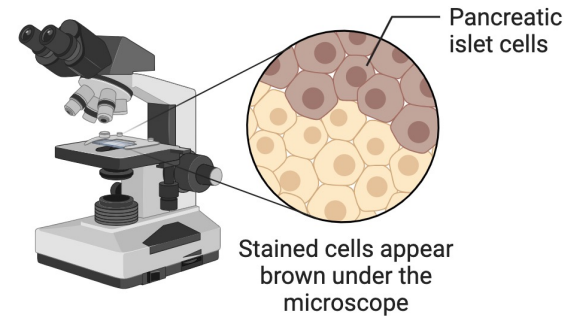
1 Sample collection



2 Immunohistochemistry assay



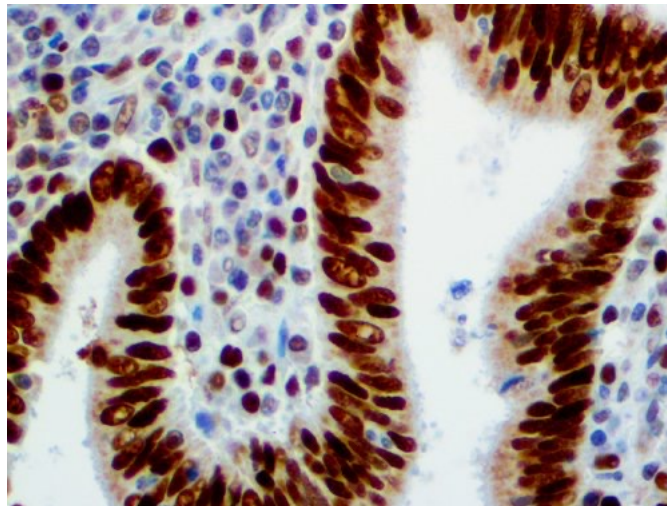
3 Microscopy and data analysis



DAB (3'3'diaminobenzidine)

HRP ↓ ossidazione

Precipitato colorato



Sez di tessuti fissati
e paraffinati,

Sez criostatiche

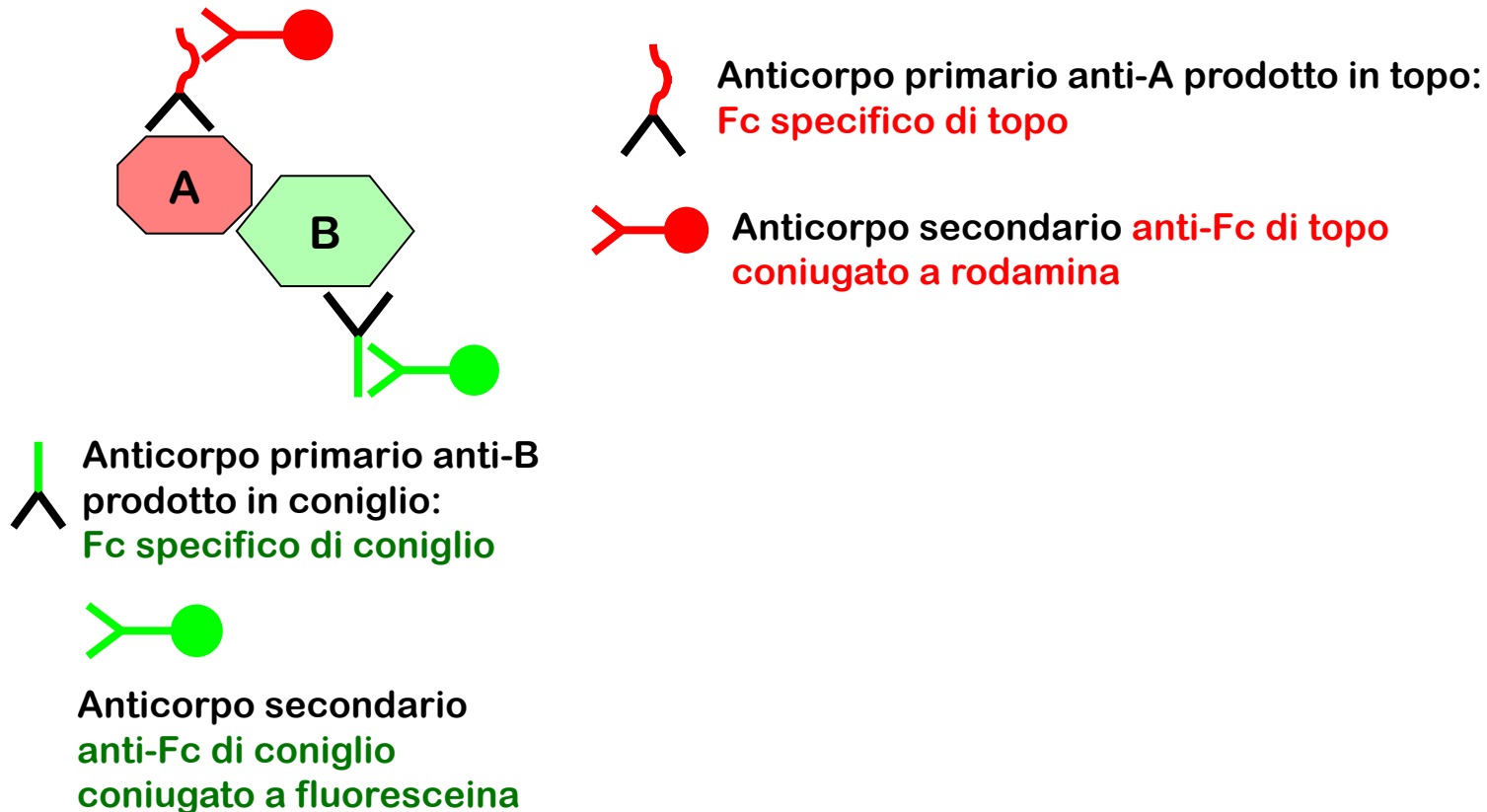
Cytosmear

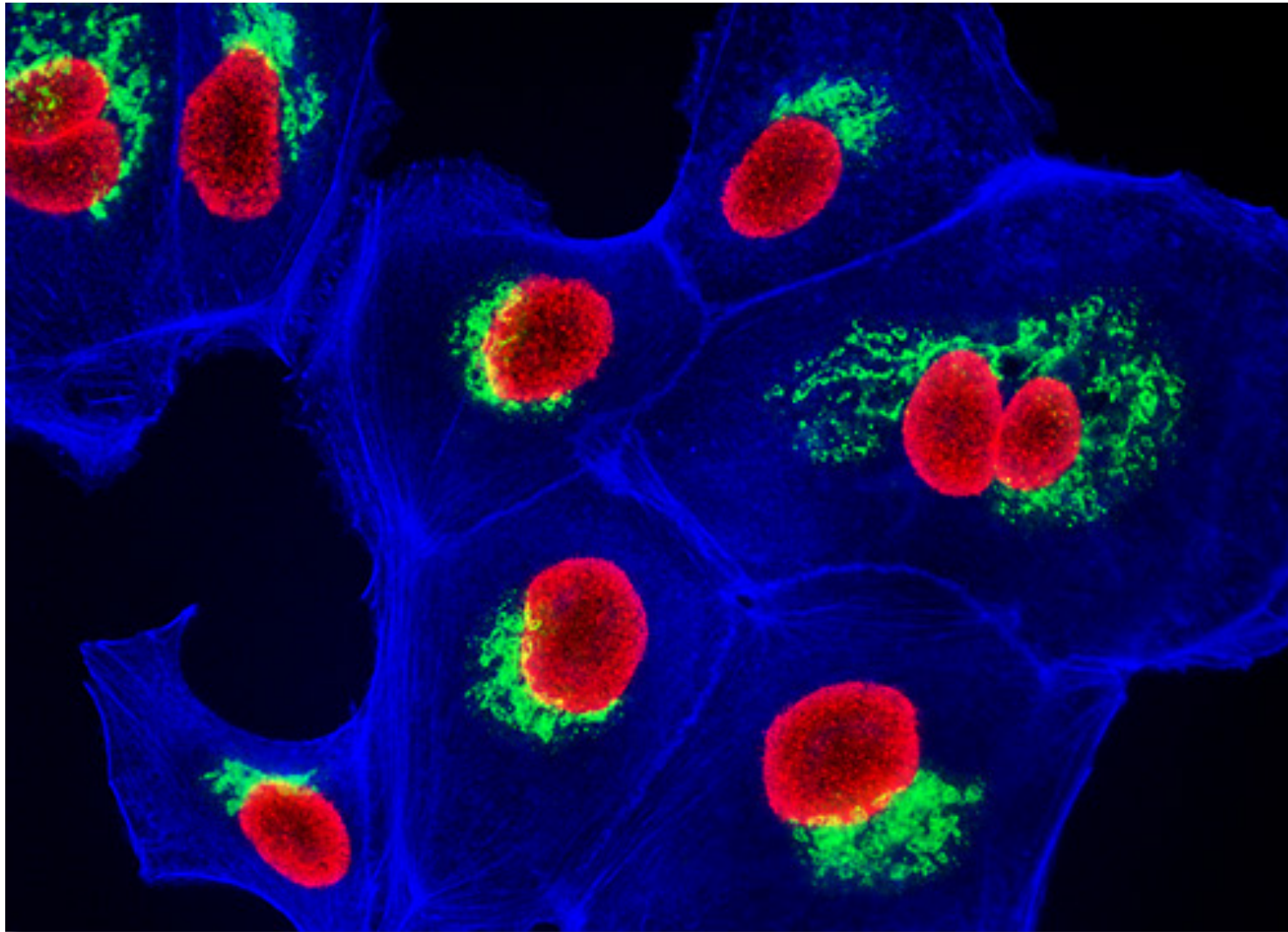
Cellule

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**

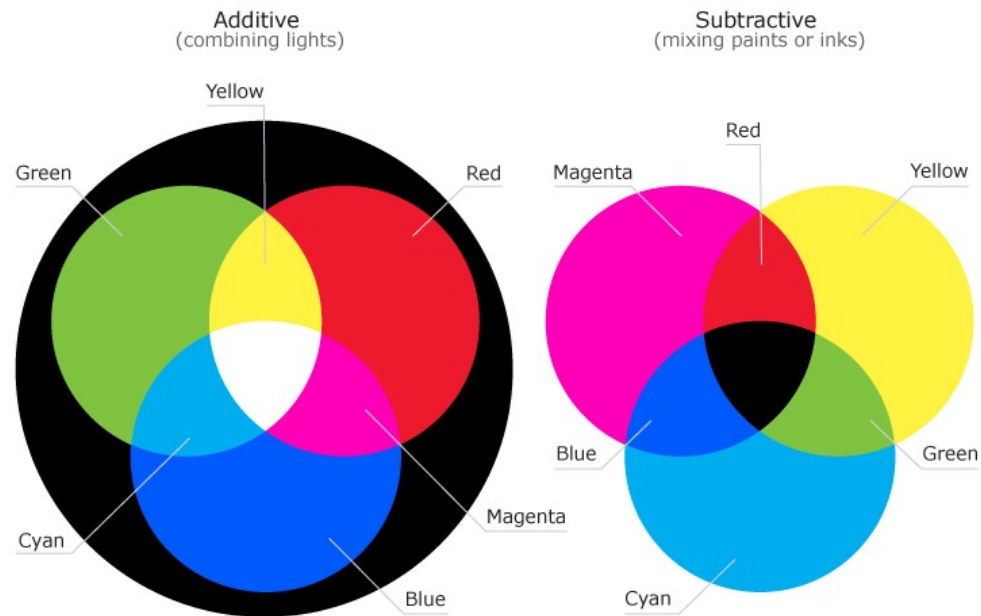




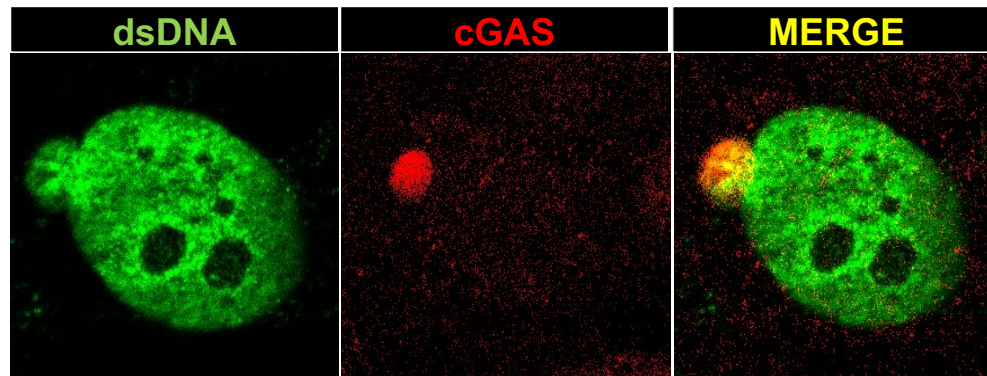
**Mouse anti-
Nuclear Pore
Complex Protein
+ goat anti-
mouse Alexa
Fluor 568**

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

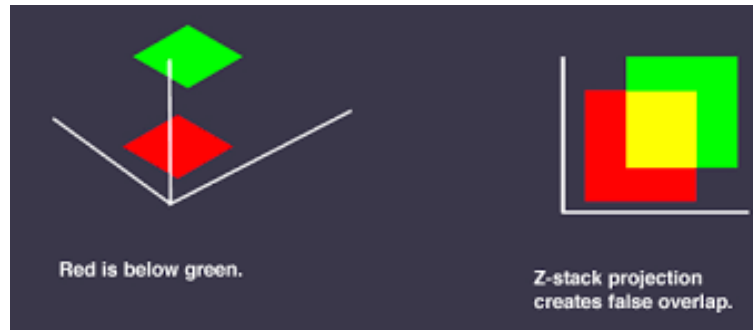
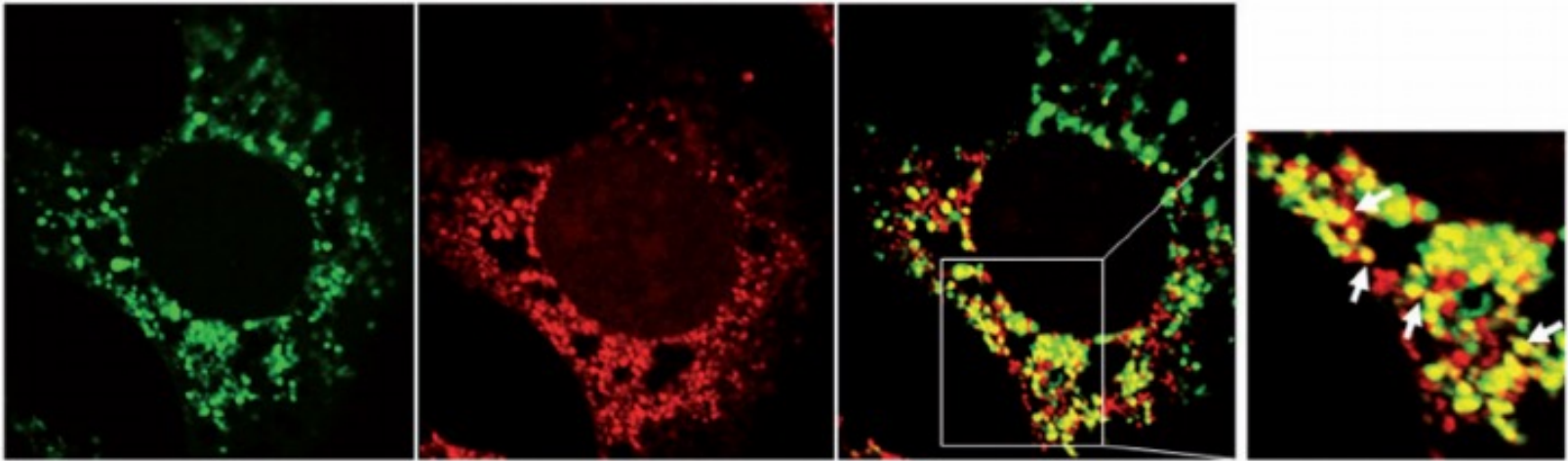
**Actin staining
Phalloidin
conjugated to
Alexa Fluor 350**



© The University of Waikato Te Whare Wānanga o Waikato | www.sciencelearn.org.nz



Utilizzo della microscopia confocale per analizzare la colocalizzazione di segnali nella cellula

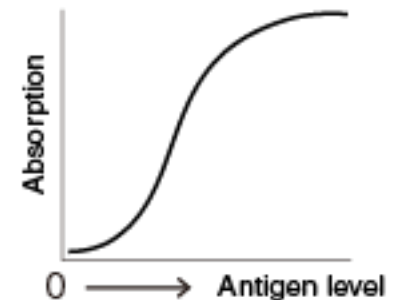
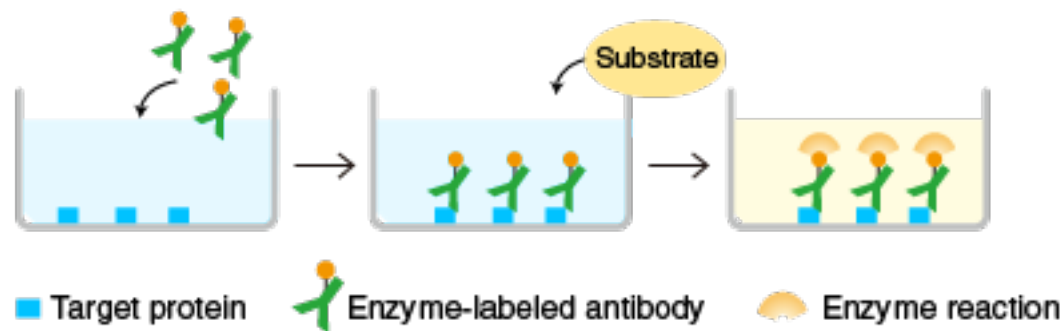


Se 2 o più segnali colocalizzati sono confocali, le molecole possono essere considerate co-localizzate nella cellula

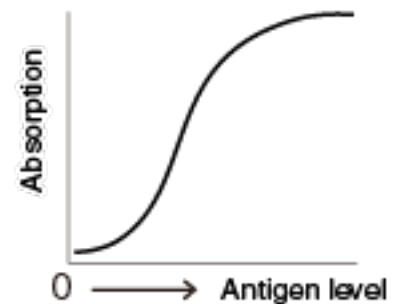
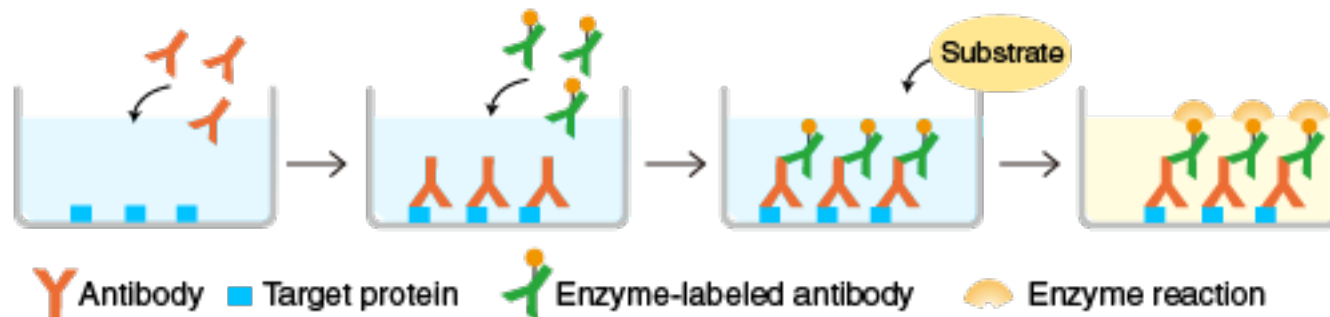
Rilevazione/DOSAGGIO di antigeni in fase liquida mediante ELISA

Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

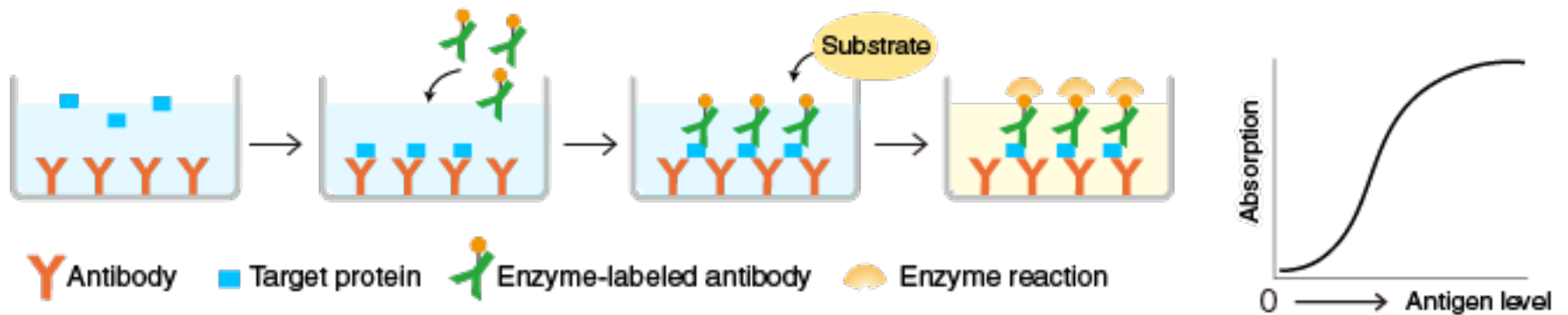
DIRECT ELISA



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

PLATE READER = LETTORE 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

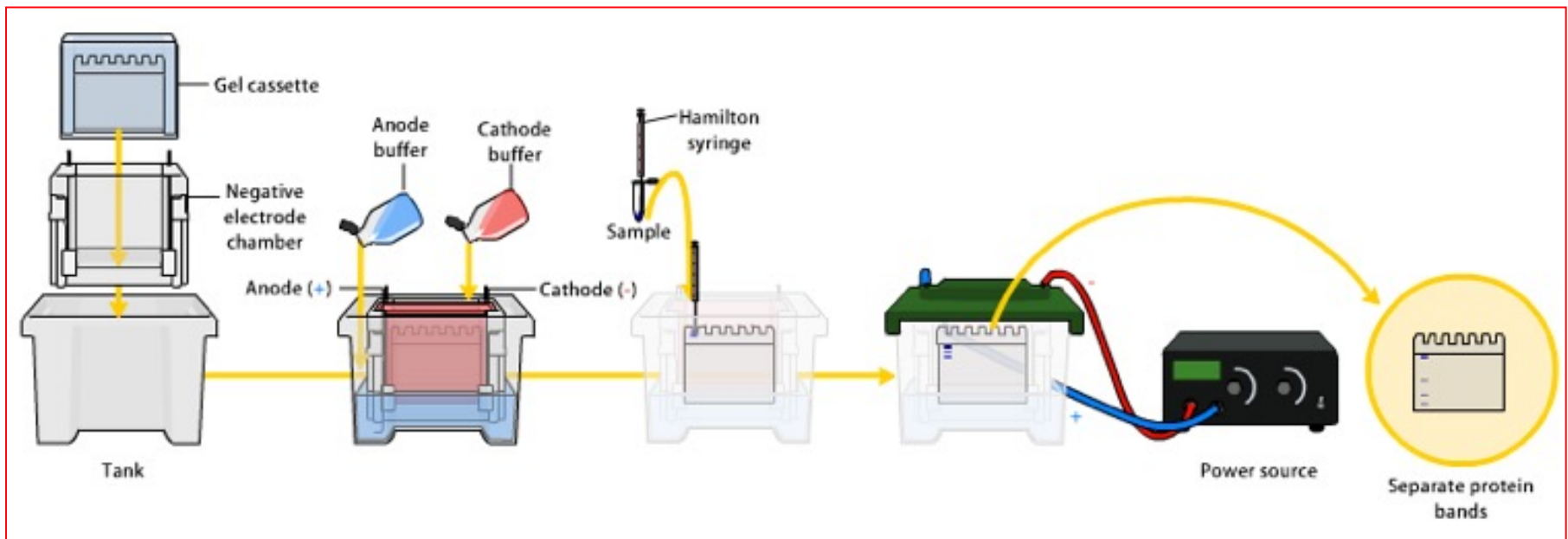
Tecnica che prevede il **riconoscimento mediante anticorpi specifici** di proteine previamente sottoposte ad **elettroforesi** e trasferite su un supporto.

Permette di ottenere informazioni su:

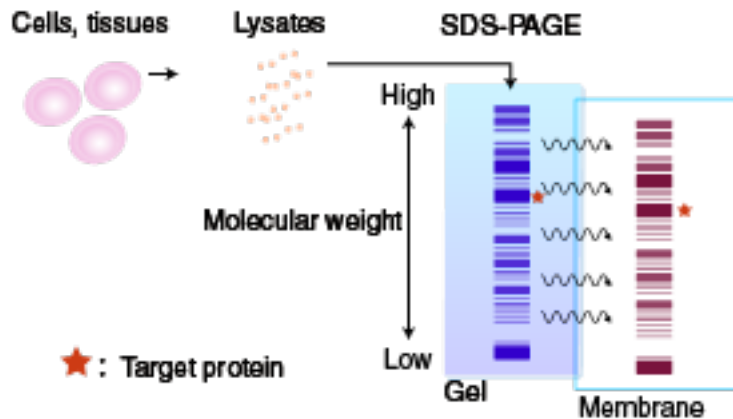
Massa molecolare

Livelli di espressione

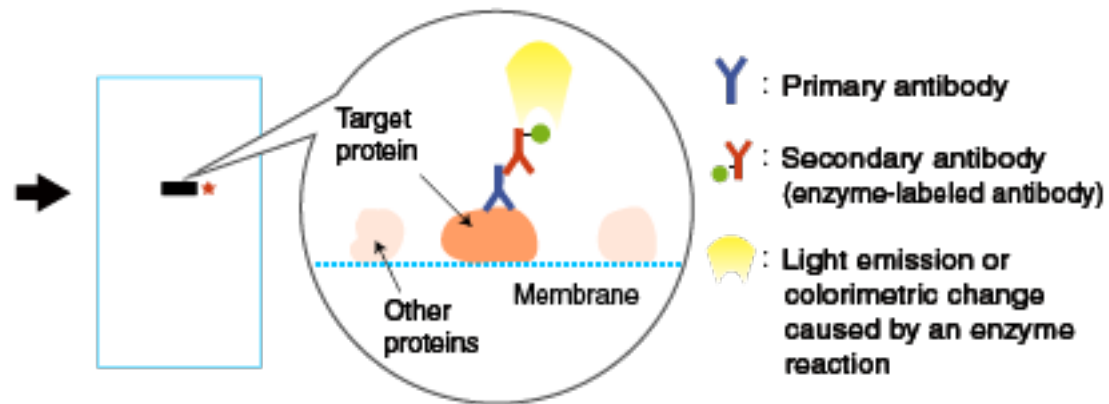
Modificazioni post-traduzionali



Proteins are separated by electrophoresis and transferred to a membrane.

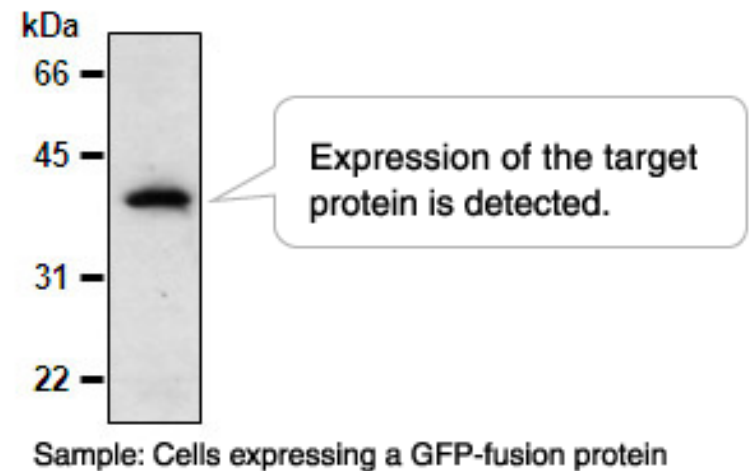
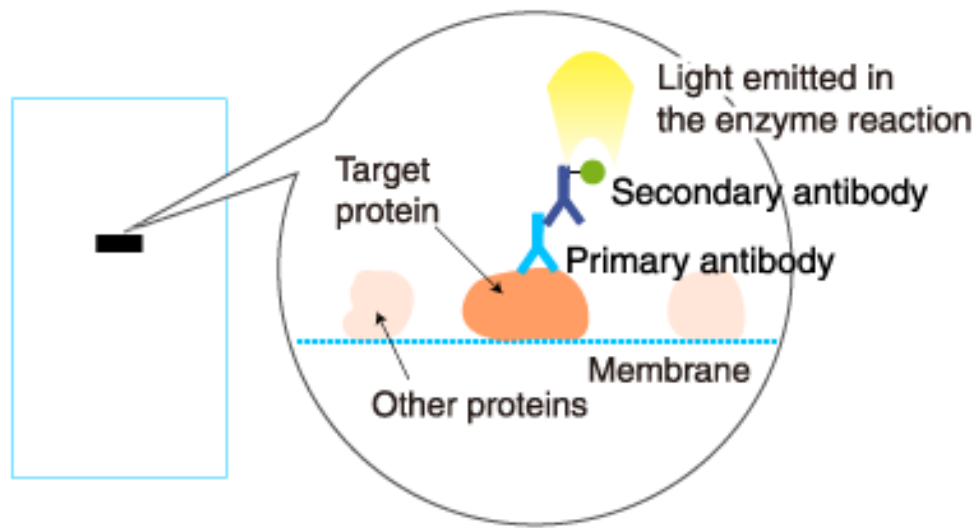


Probing with antibodies, and detection of the target protein by an enzyme reaction.





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

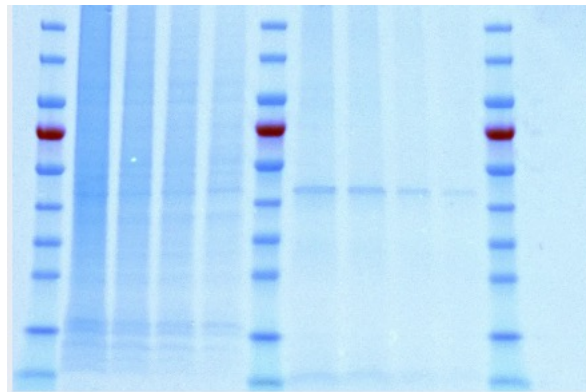


QUALI STRUMENTI UTILIZZARE PER LA RILEVAZIONE?

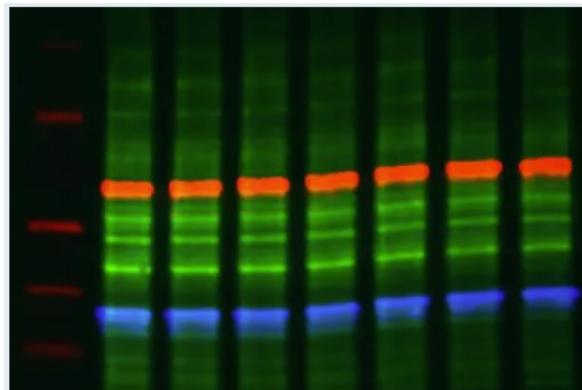
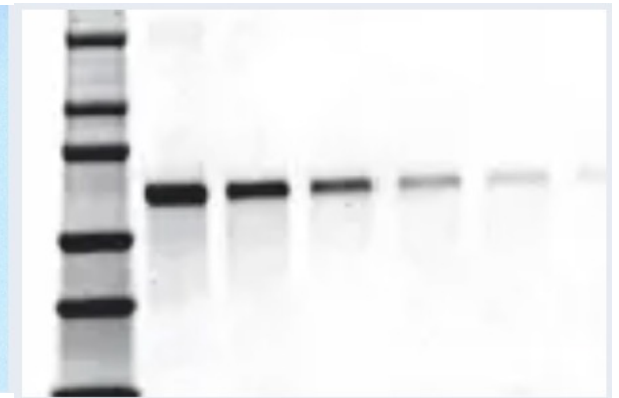
GEL IMAGER



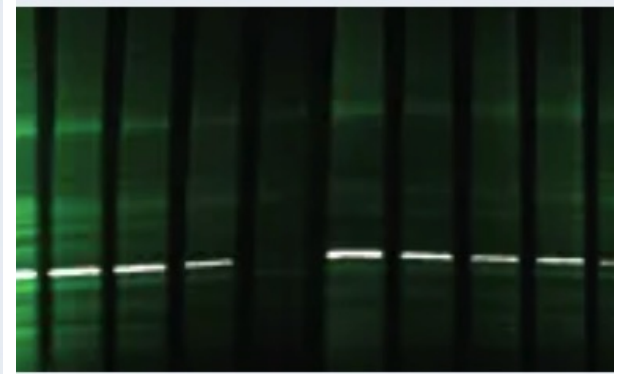
visibile



chemiluminescenza



UV



fluorescenza

ESPERIMENTO VIRTUALE:

**Analizzare l'interattoma (proteine cellulari associate)
delle proteine virali**

STRATEGIA SPERIMENTALE: DETTAGLIO

- 1. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO - SCELTA DELL'APPROCCIO SPERIMENTALE**
- 2. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE**
- 3. SCELTA DEGLI STRUMENTI**
- 4. ANALISI DEI RISULTATI**

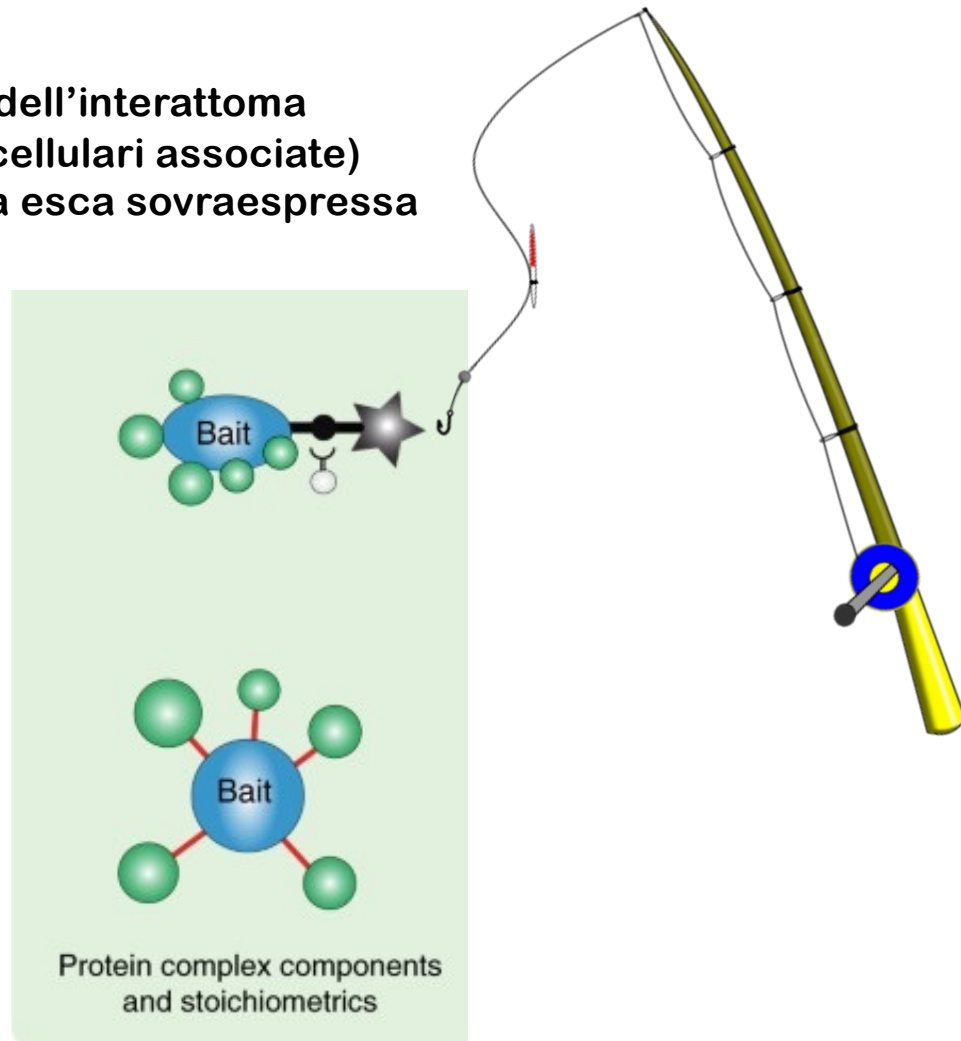
DISEGNO DELL'ESPERIMENTO:

- a) Sovraesprimere separatamente le ORFs VIRALI nel modello cellulare**
- b) Analizzare l'INTERATTOMA (proteine cellulari associate) delle proteine virali**

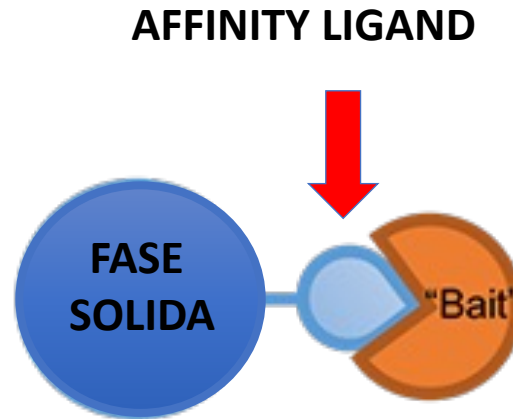
APPROCCIO SPERIMENTALE:

Utilizzo di tecniche che permettono di isolare proteine endogene associate a una proteina «ESCA» sovraespressa

Analisi dell'interattoma
(proteine cellulari associate)
della proteina esca sovraespressa

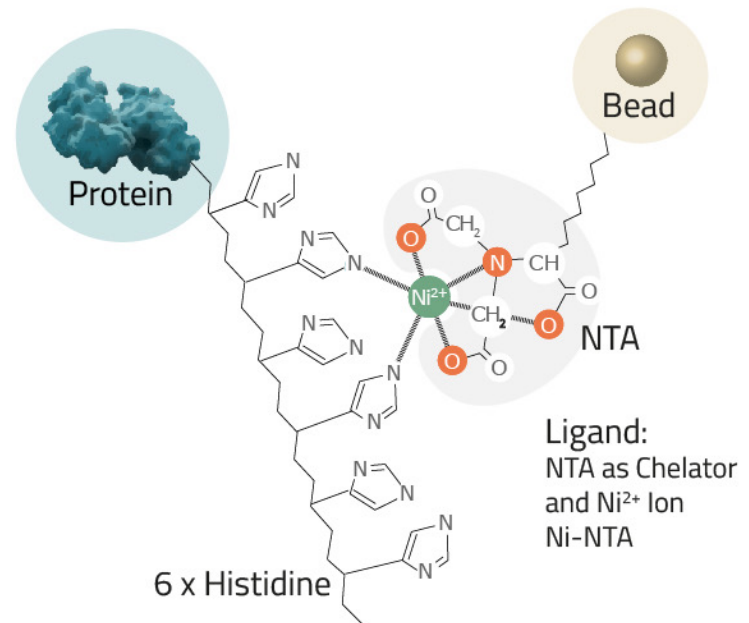
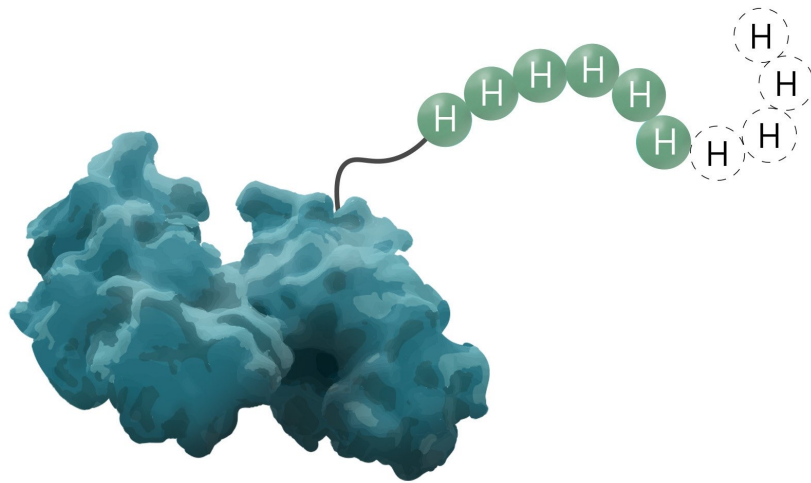


APPROCCIO #1: PURIFICAZIONE DI PROTEINE DI FUSIONE PER AFFINITA'



**Le BAIT sono PROTEINE DI FUSIONE
(prodotte in batteri o in cellule eucariotiche)
che vengono purificate mediante un LIGANDO ad
alta affinità coniugato ad una fase solida**

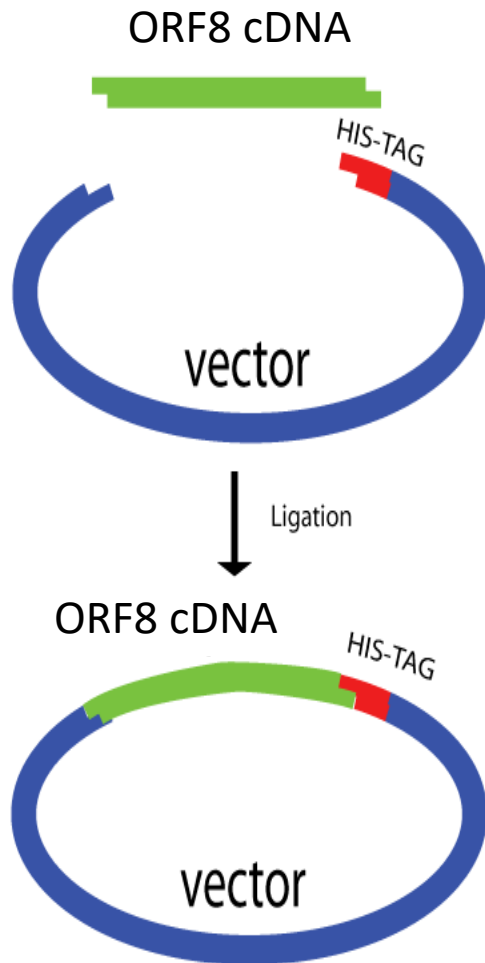
Produzione e purificazione della proteina ORF8-His



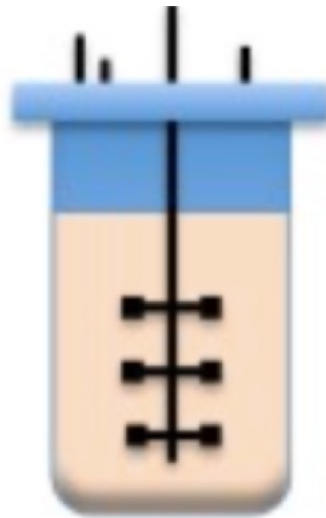
<https://cube-biotech.com/knowledge/protein-purification/his-tag/>

Produzione e purificazione della proteina ORF8-His

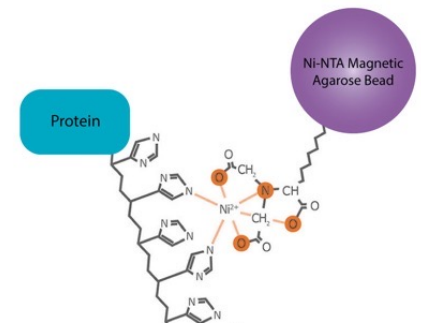
- **Clonaggio**



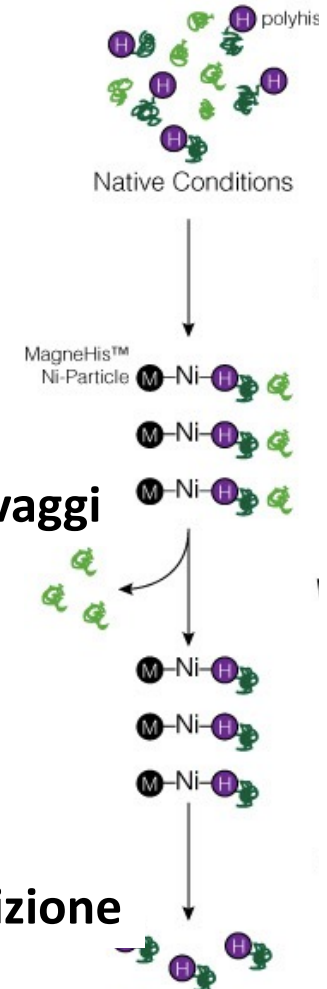
- **Trasformazione batterica**
- **Selezione**
- **Coltura**



- **Lisi dei batteri**



- **Legame alla resina**

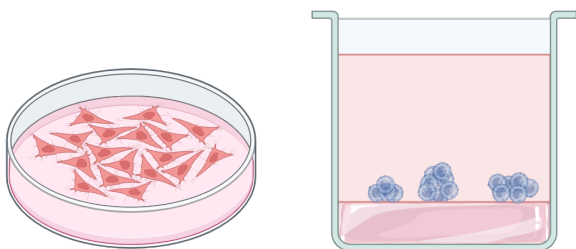


- **Lavaggi**

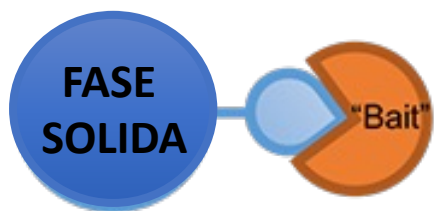
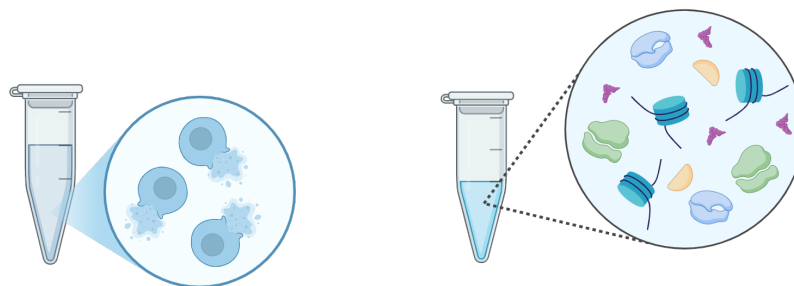
- **Eluizione**

ANALISI DELL'INTERAZIONE PROTEINA-PROTEINA mediante PURIFICAZIONE

Modello cellulare

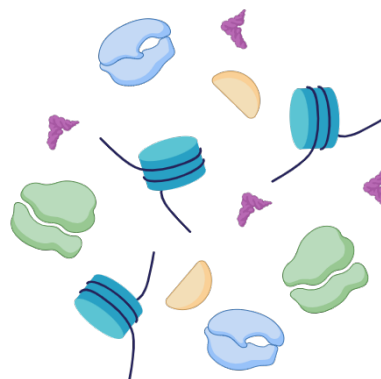


Ottenimento di un lisato cellulare



bait immobilizzata su fase solida
(His-ORF8)

+



Incubazione con lisato cellulare

ANALISI DELL'INTERAZIONE PROTEINA-PROTEINA mediante PURIFICAZIONE

Immobilizzare la bait su una fase solida

FASE
SOLIDA

"Bait"

+

Incubate

Lisato cellulare

"Prey"

FASE
SOLIDA

"Bait"

"Prey"

Wash

FASE
SOLIDA

"Bait"

"Prey"

Elute

FASE
SOLIDA

"Bait"

"Prey"

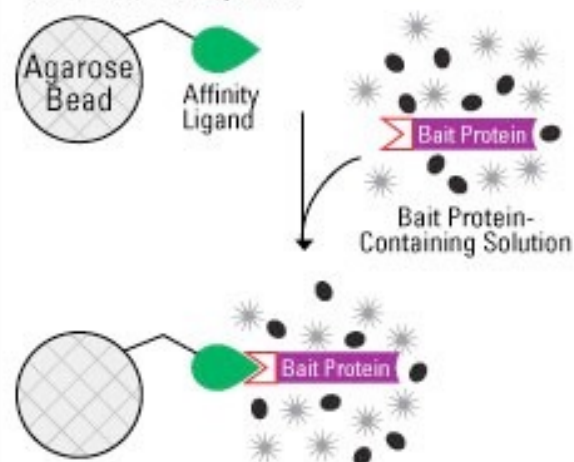
"Bait" only

Sample



Detect

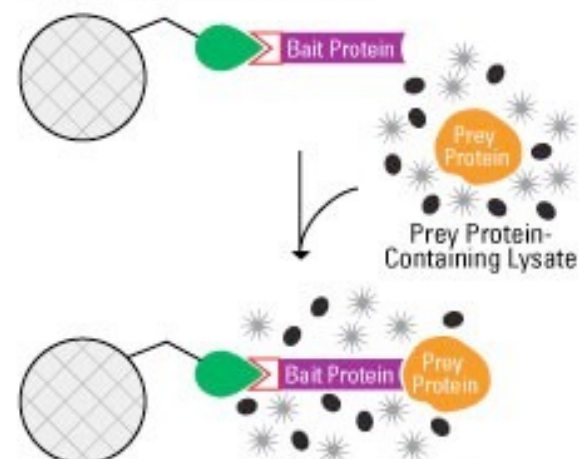
Step 1. Immobilize the fusion-tagged "bait" from the lysate.



Step 2. Wash away unbound protein.



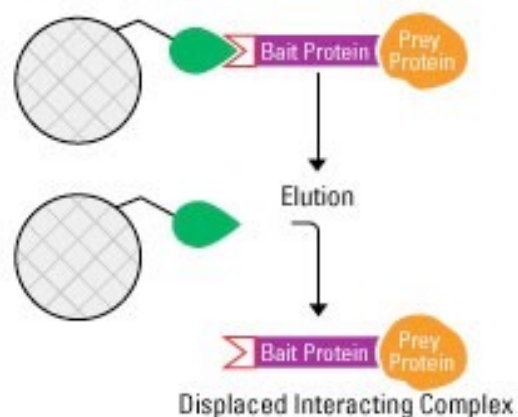
Step 3. Bind "prey" protein to immobilized "bait" protein.



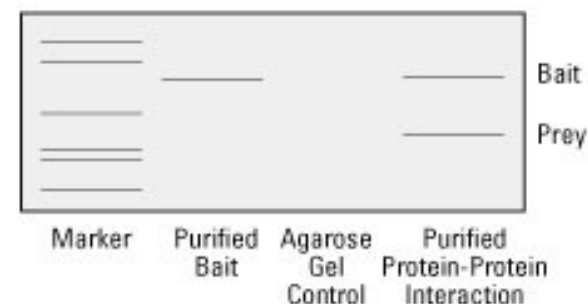
Step 4. Wash away unbound protein.





Step 5. Elute protein-protein interaction complex.



Step 6. Analyze protein-protein interaction complex by SDS-PAGE.



 = Affinity Ligand (Glutathione, Co^{2+} Chelate or Streptavidin)

 = Fusion Tag (GST, polyHis or Biotin)

GST-pulldown

Utilizza proteine di fusione con GST (esprese in batteri)

