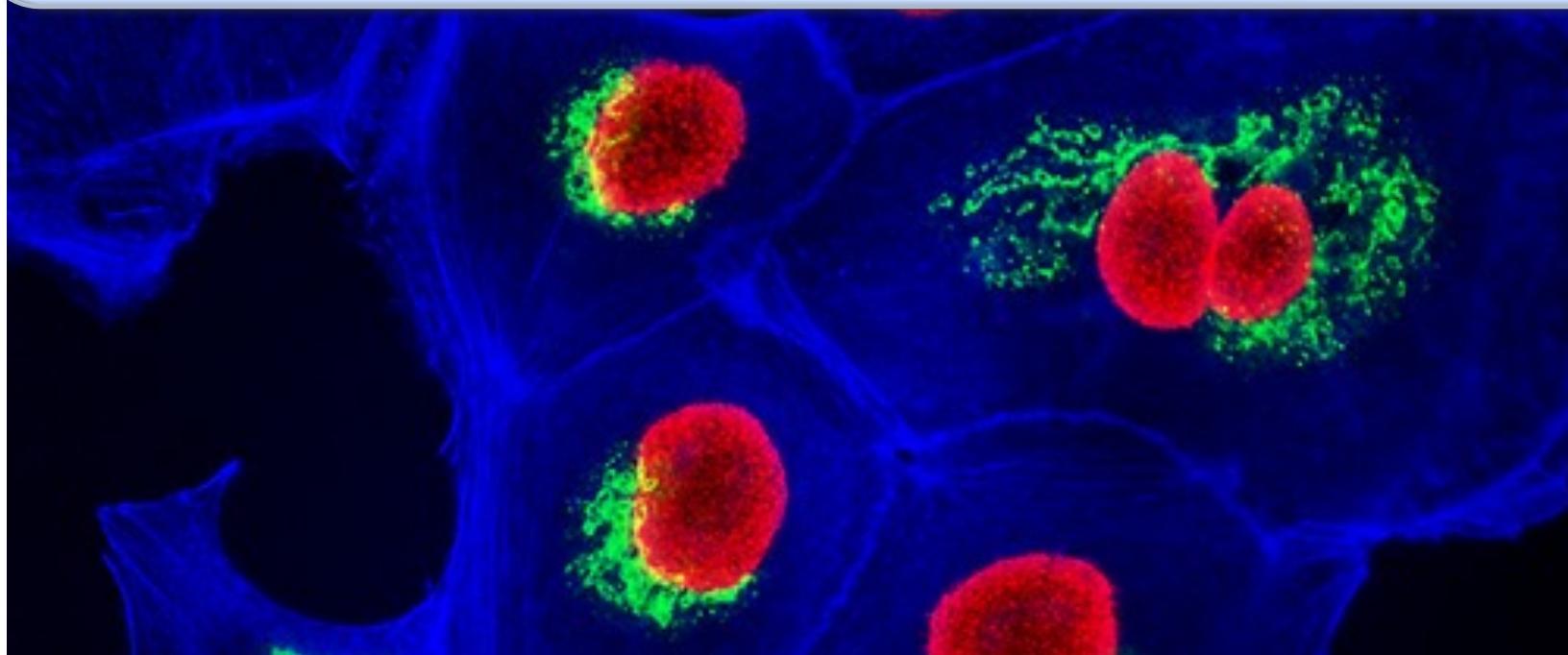


**CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche**

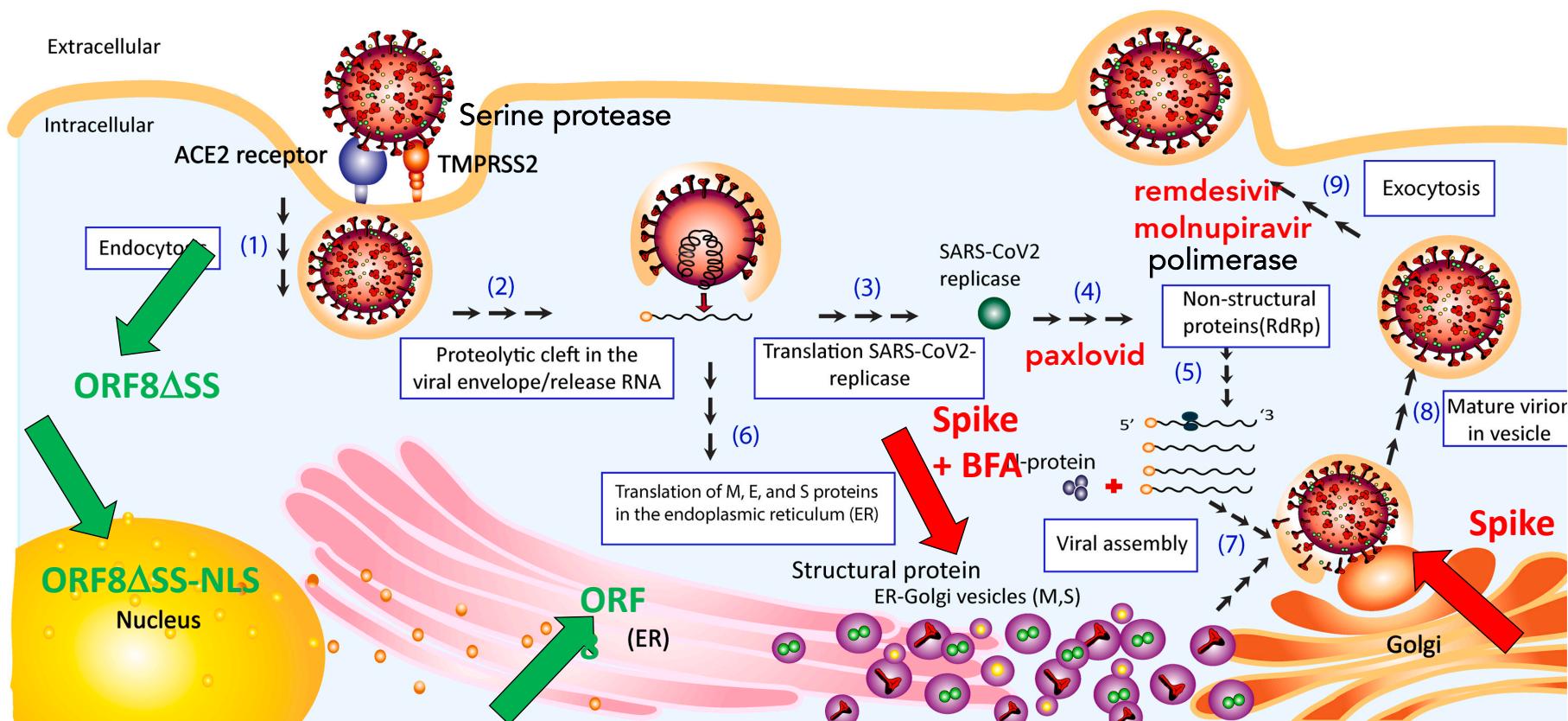
**Corso di Biotecnologie Cellulari 2025-26**

**Lezione 6**



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

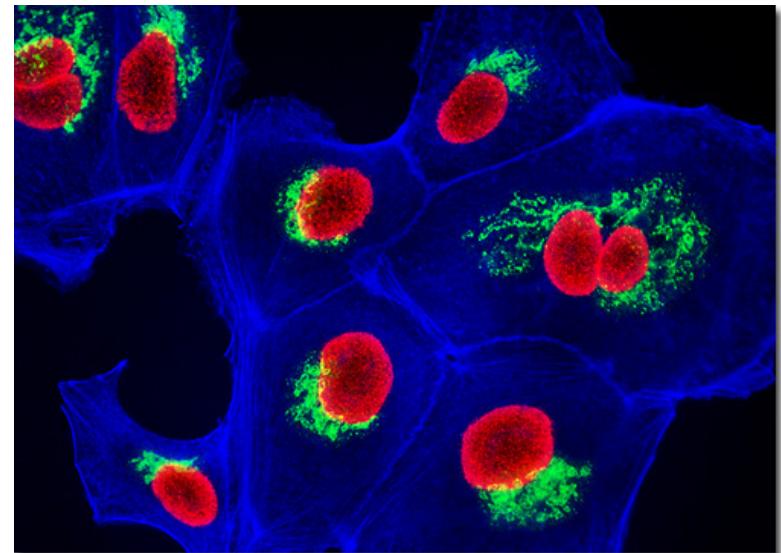
# Analisi della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.



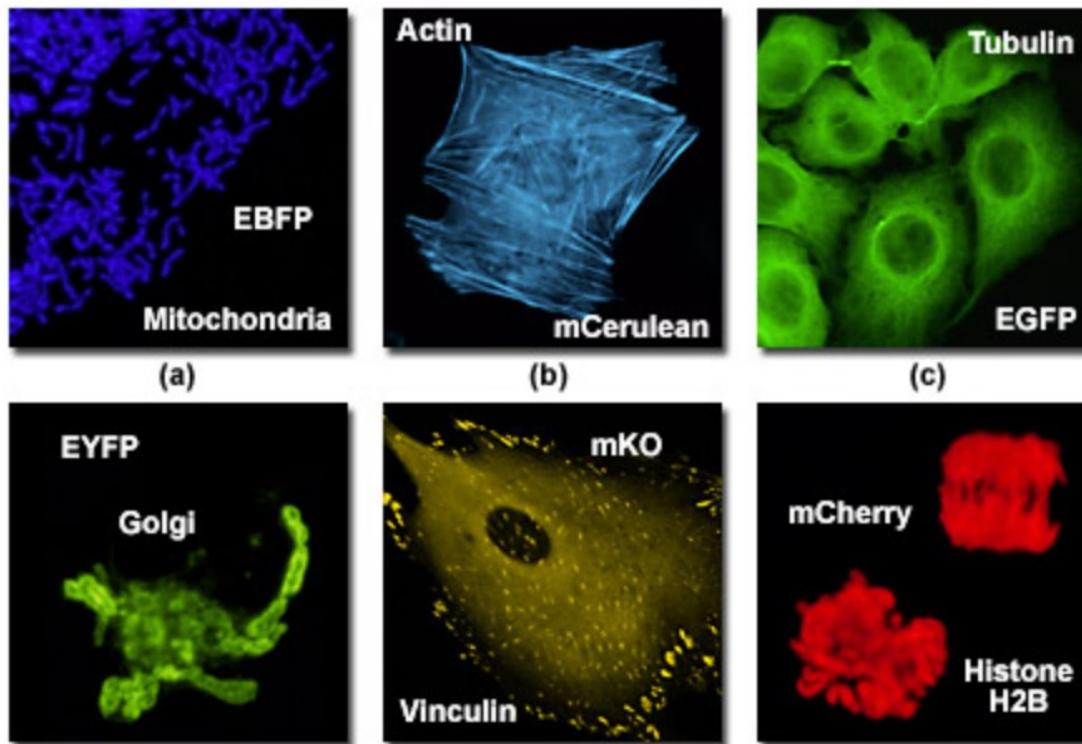
# APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

---

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



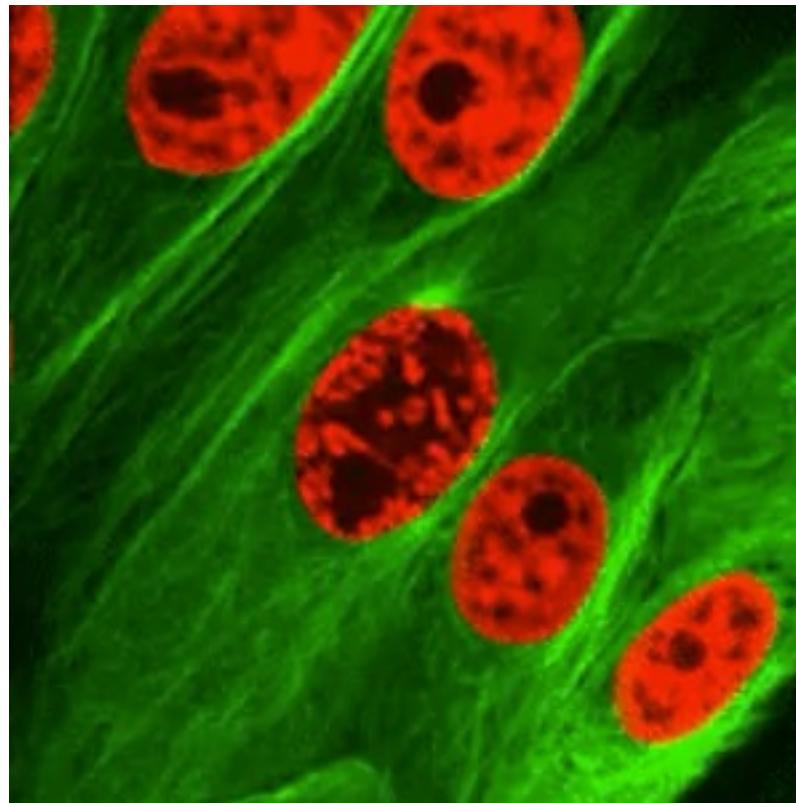
## APPROCCIO #1: Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter



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

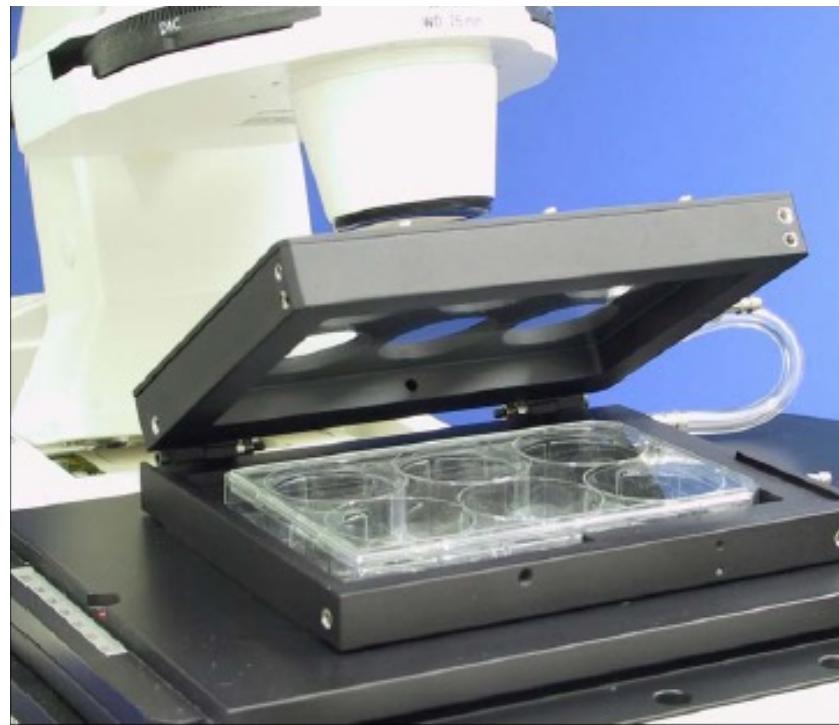


H2B-RFP

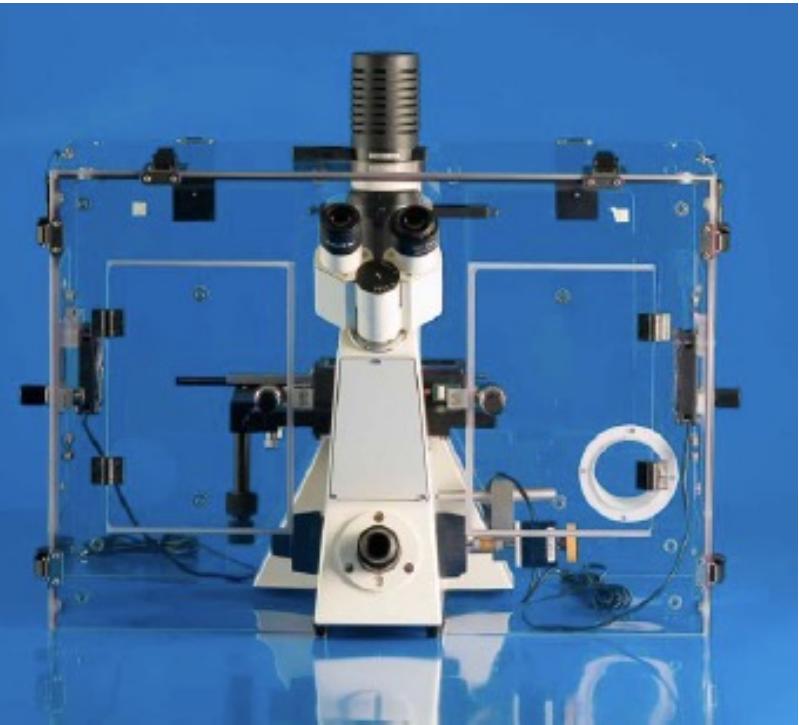
$\alpha$ -tubulin-GFP

## LIVE IMAGING: MICROSCOPIA TIME-LAPSE

STAGE



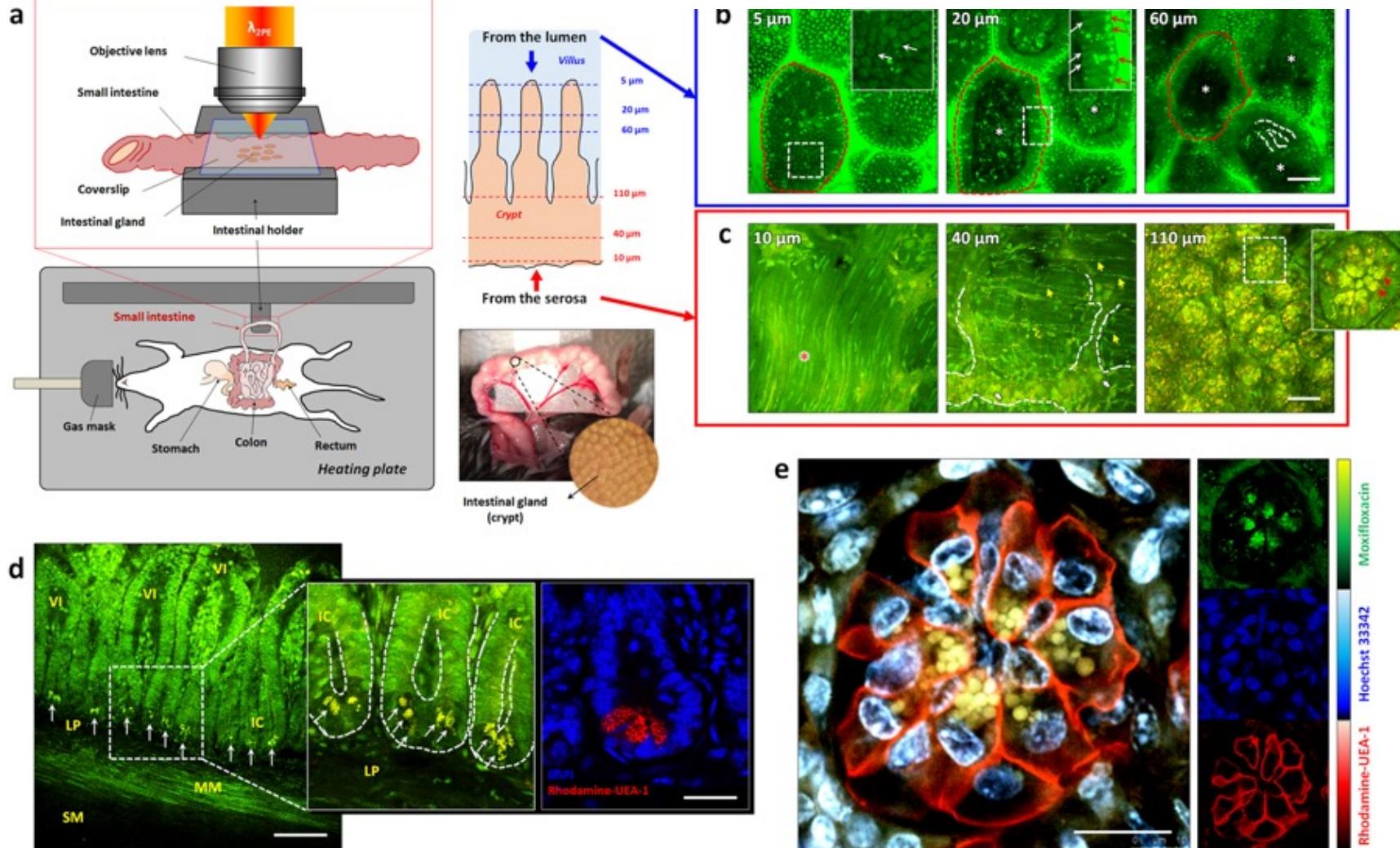
CAGE



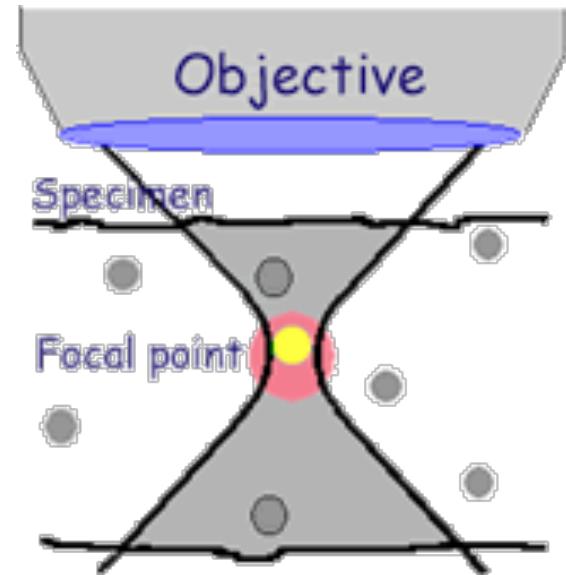
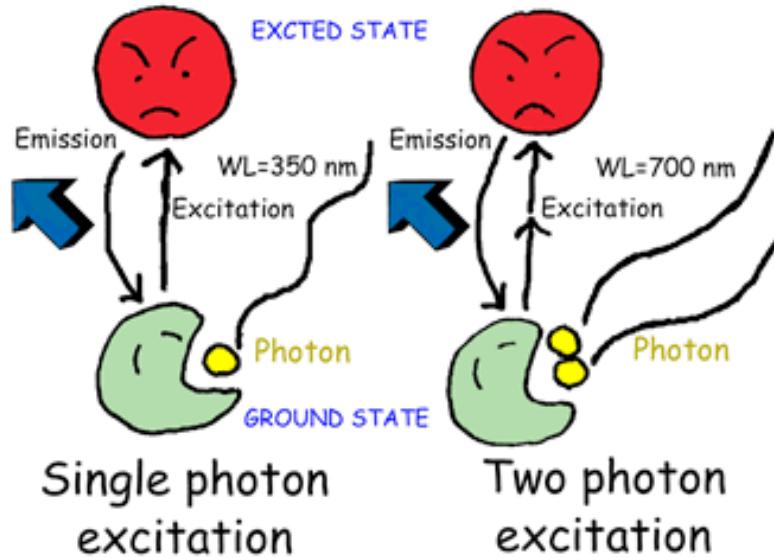
# Analisi mediante microscopia intravitale

Article | OPEN | Published: 21 September 2018

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



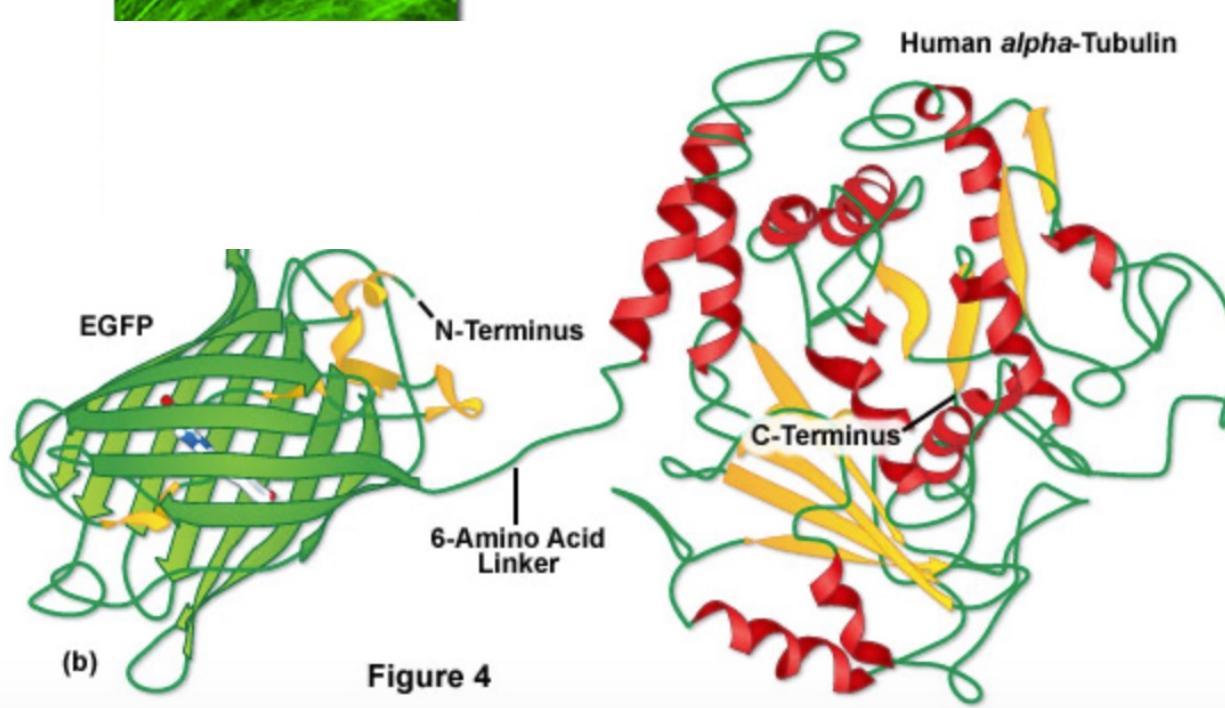
## 2-photon/multiphoton excitation microscopy per imaging IN VIVO



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

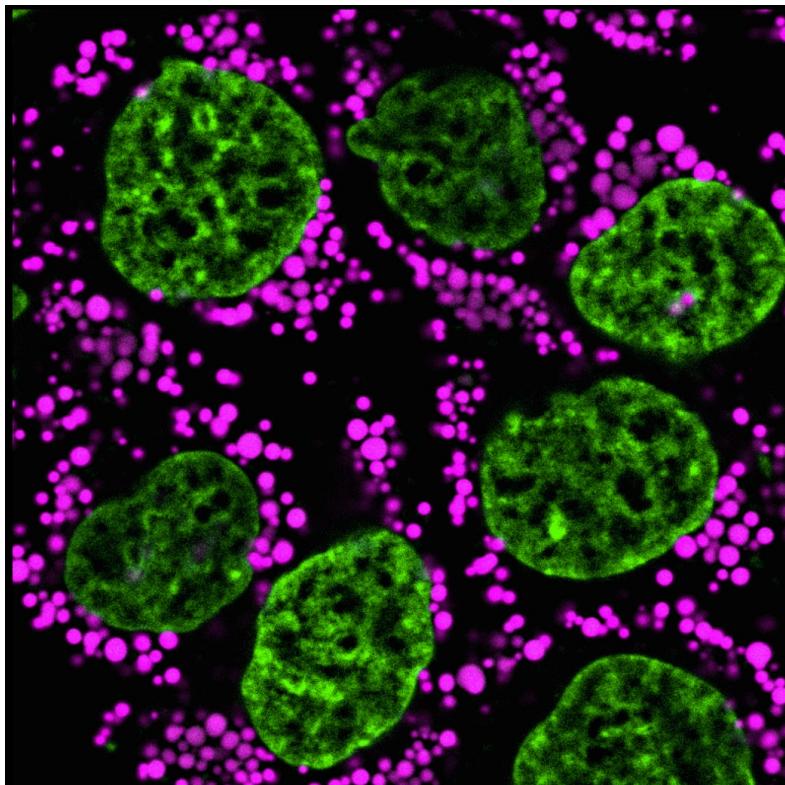
## Svantaggi delle fusion proteins per gli studi funzionali:



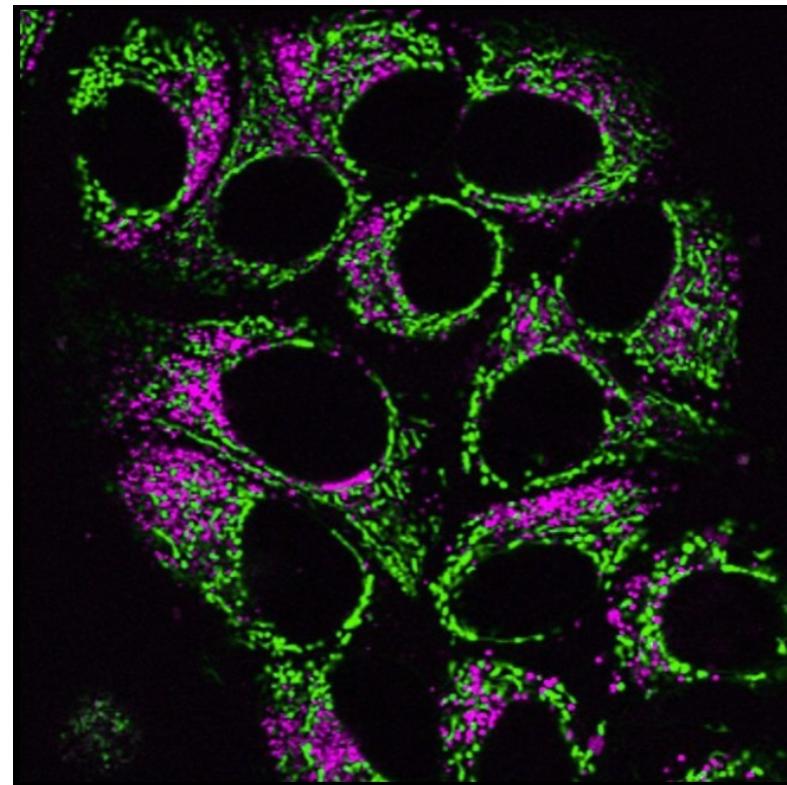
1. L'ingombro sterico della GFP potrebbe interferire con le interazioni proteiche della proteina virale
2. Non è possibile analizzare la proteina endogena (es. durante l'infezione)

**APPROCCIO #2:**  
**riconoscimento di proteine specifiche**  
**(anche endogene)**  
**mediante “sonde” coniugate con fluorocromi**

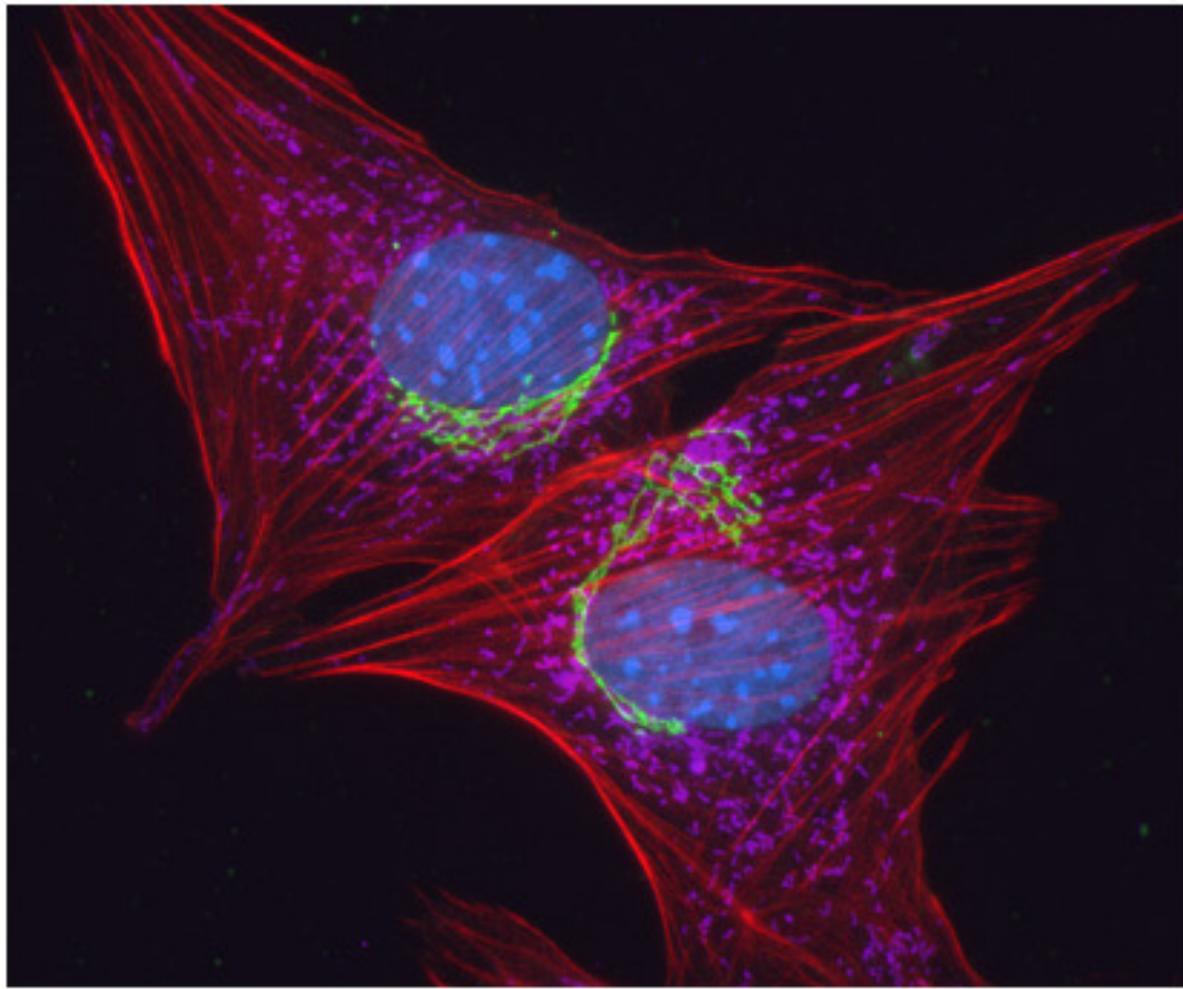
## Sonde fluorescenti per specifiche componenti cellulari:



DNA  
Lipid droplets

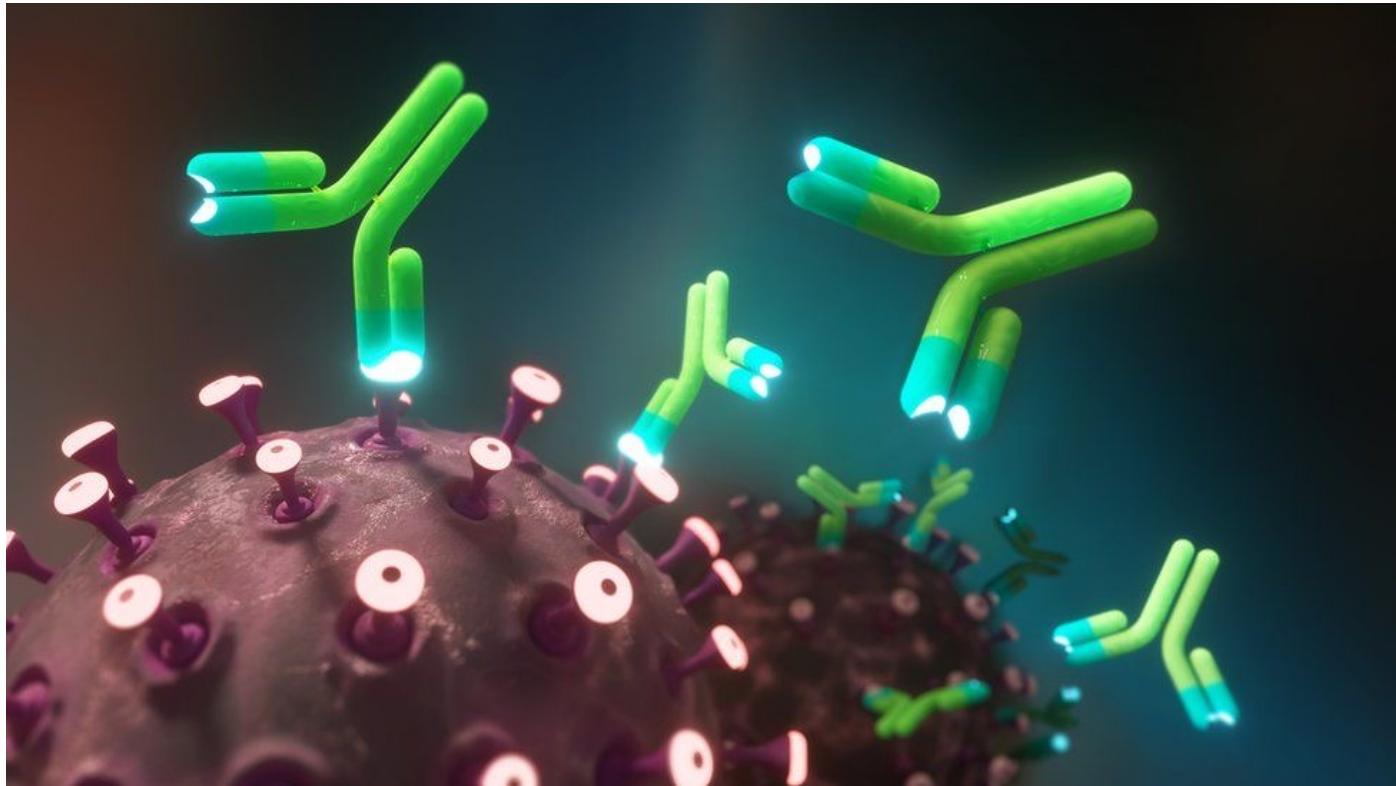


mitochondri  
lisosomi



Falloidina-red  
Lectina-green  
Intercalante DNA-blue

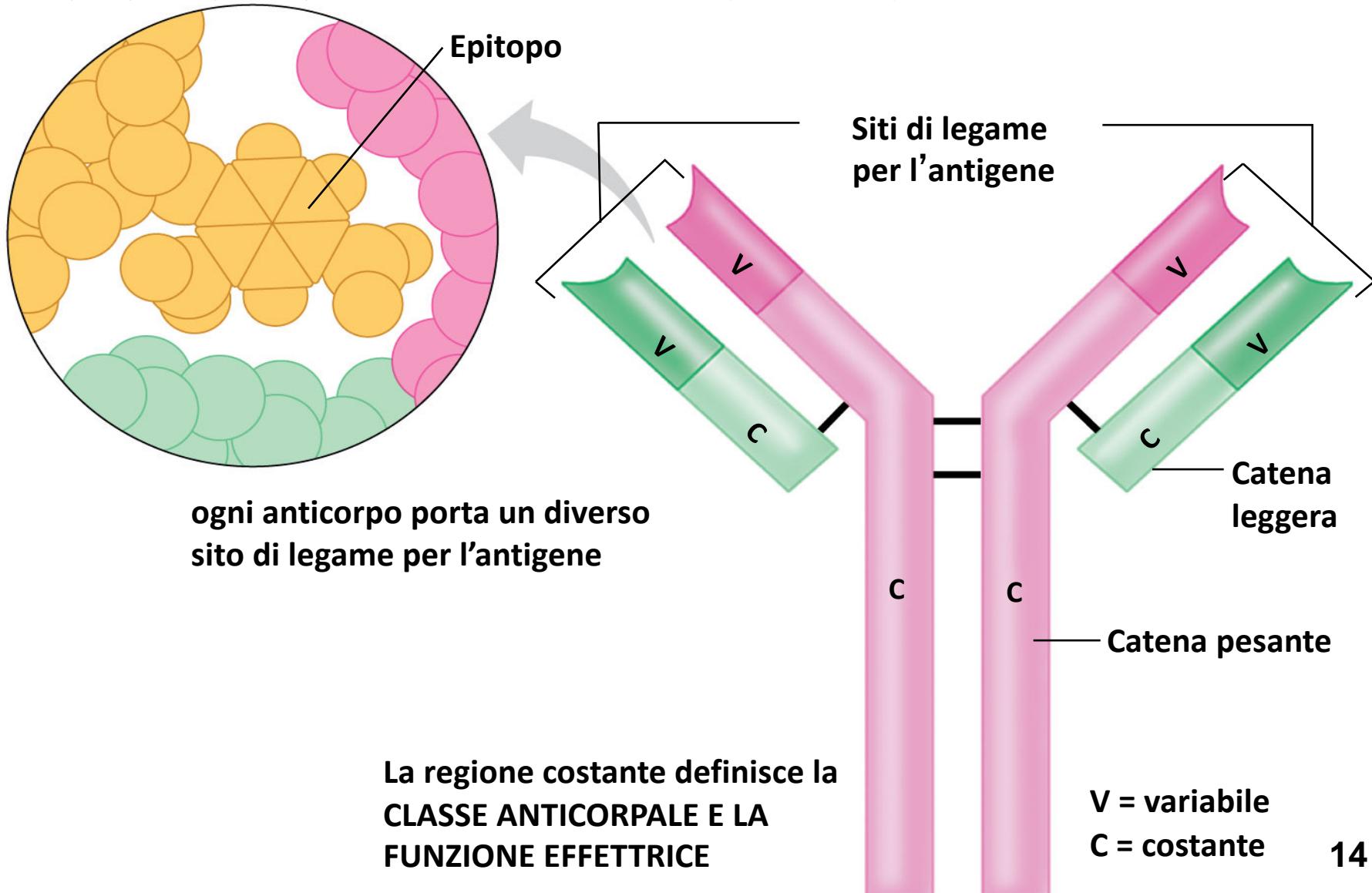
## **utilizzo di anticorpi per il riconoscimento specifico di antigeni proteici**



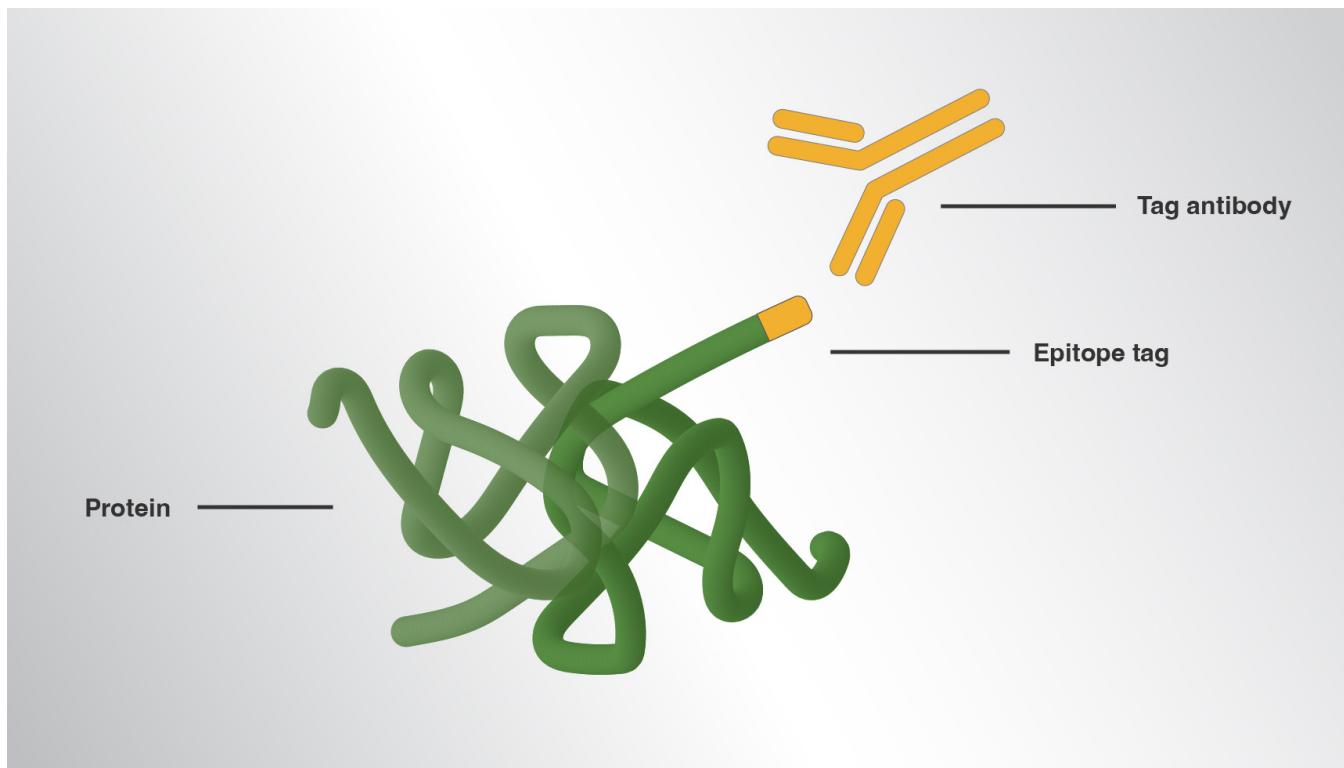
Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI** con elevata **specificità e affinità**:  
possono essere quindi usati come **SONDE** per:  
**visualizzazione, purificazione e dosaggio** di antigeni, in fase liquida, solida  
oppure **IN SITU**, in cellule e tessuti.

**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**.



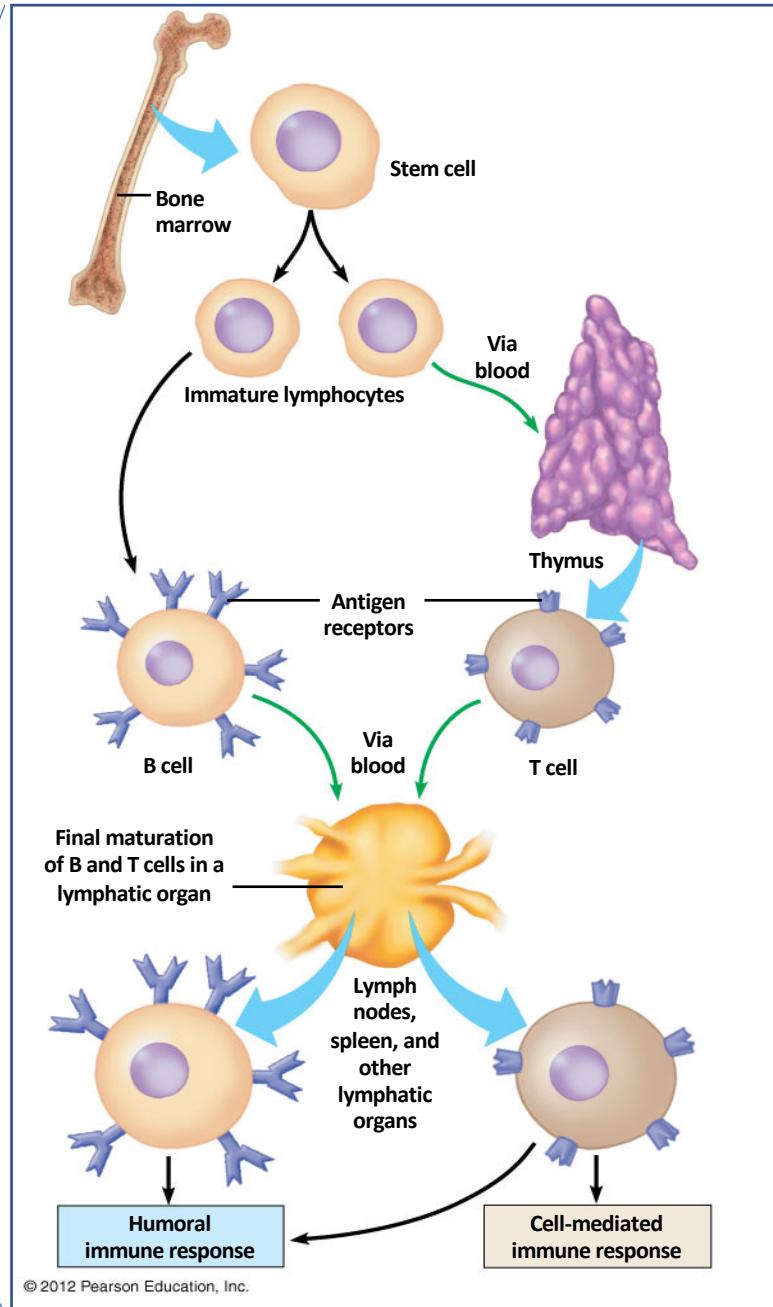
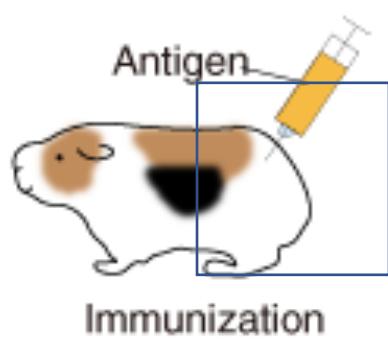
## Un TAG è un EPITOPO (6-10 AA)

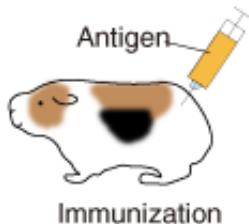


## **TECNICHE PER LA GENERAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI**

**Tecniche basate sull'IMMUNIZZAZIONE di  
animali**

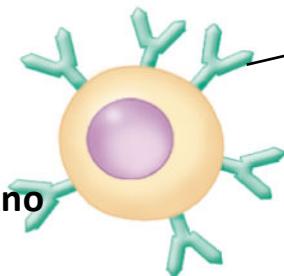
**IMMUNIZZAZIONE**  
di animali da laboratorio  
= iniezione dell' antigeno



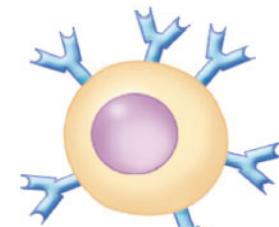
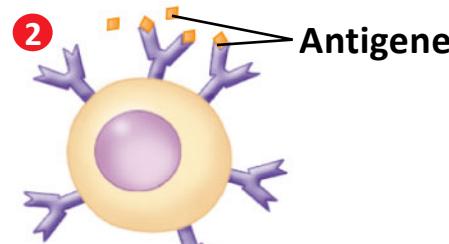


## RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE

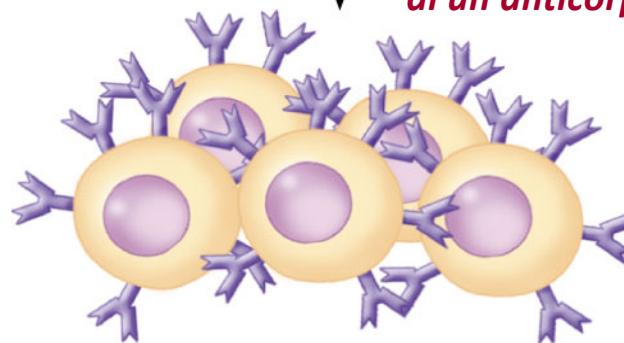
- 1 Popolazione di linfociti B che espongono diverse Ig di membrana



Ig  
di membrana  
= recettore  
per l'antigene

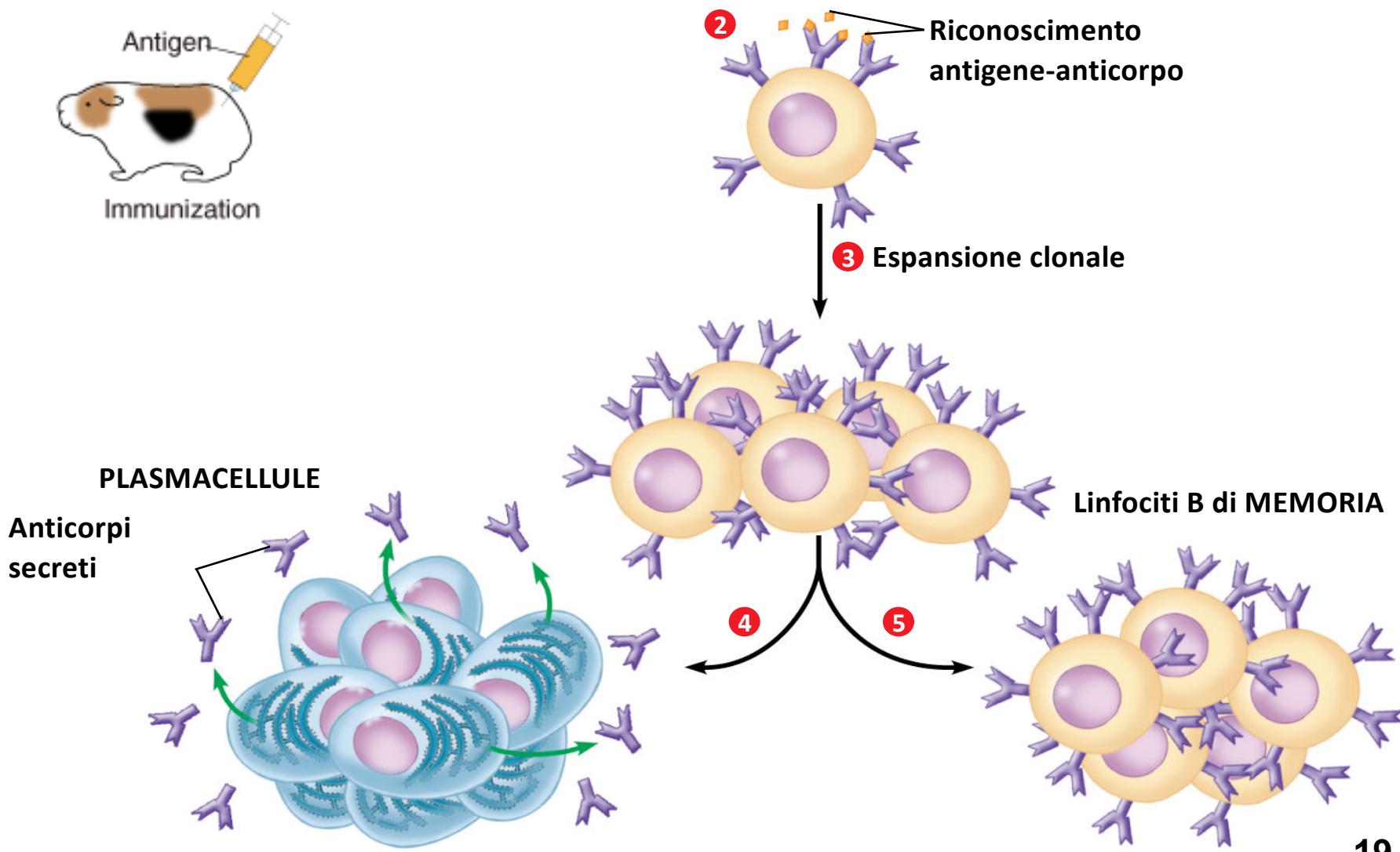


*Prima esposizione all'antigene:  
3 riconoscimento da parte  
di un anticorpo specifico*

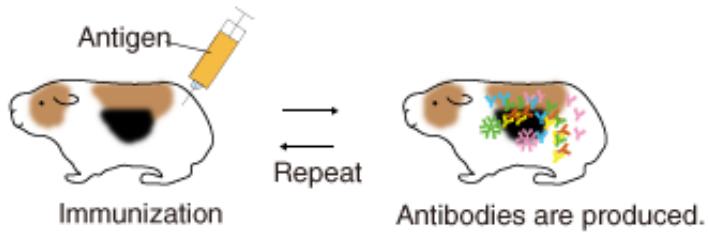


*Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame  
all'antigene*

# La RISPOSTA IMMUNE genera PLASMACELLULE e LINFOCITI DI MEMORIA

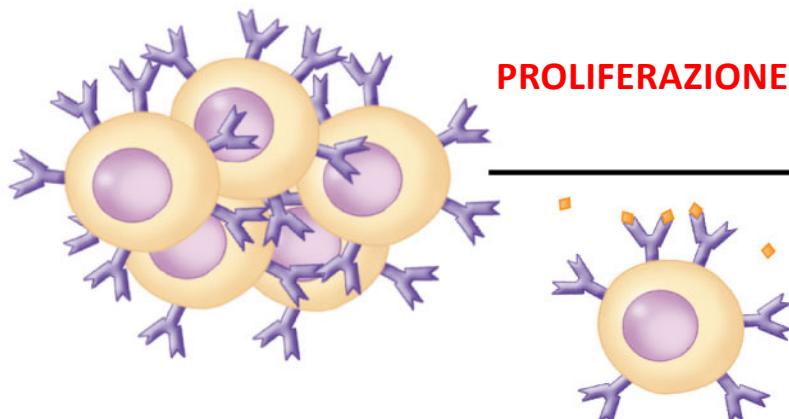


## RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE



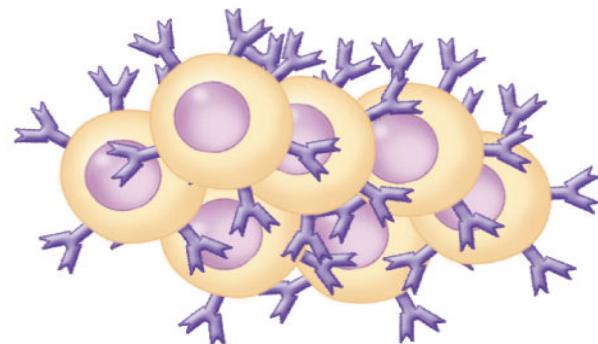
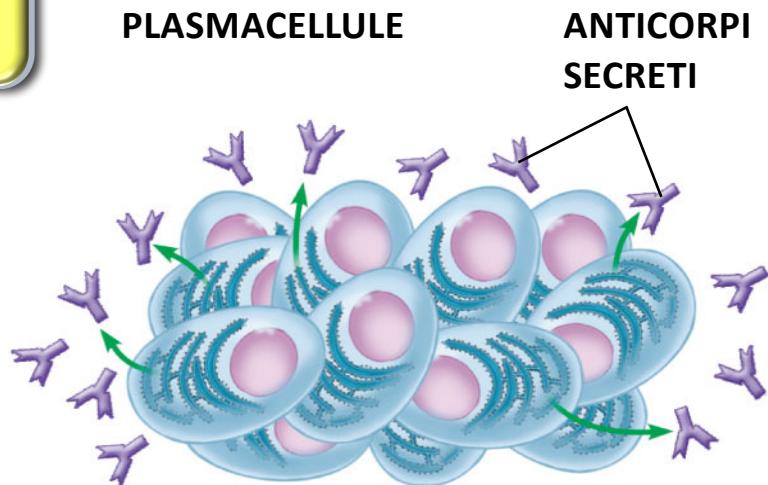
Immunized animals:  
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

### Linfociti B di MEMORIA



© 2012 Pearson Education, Inc.

### PLASMACELLULE

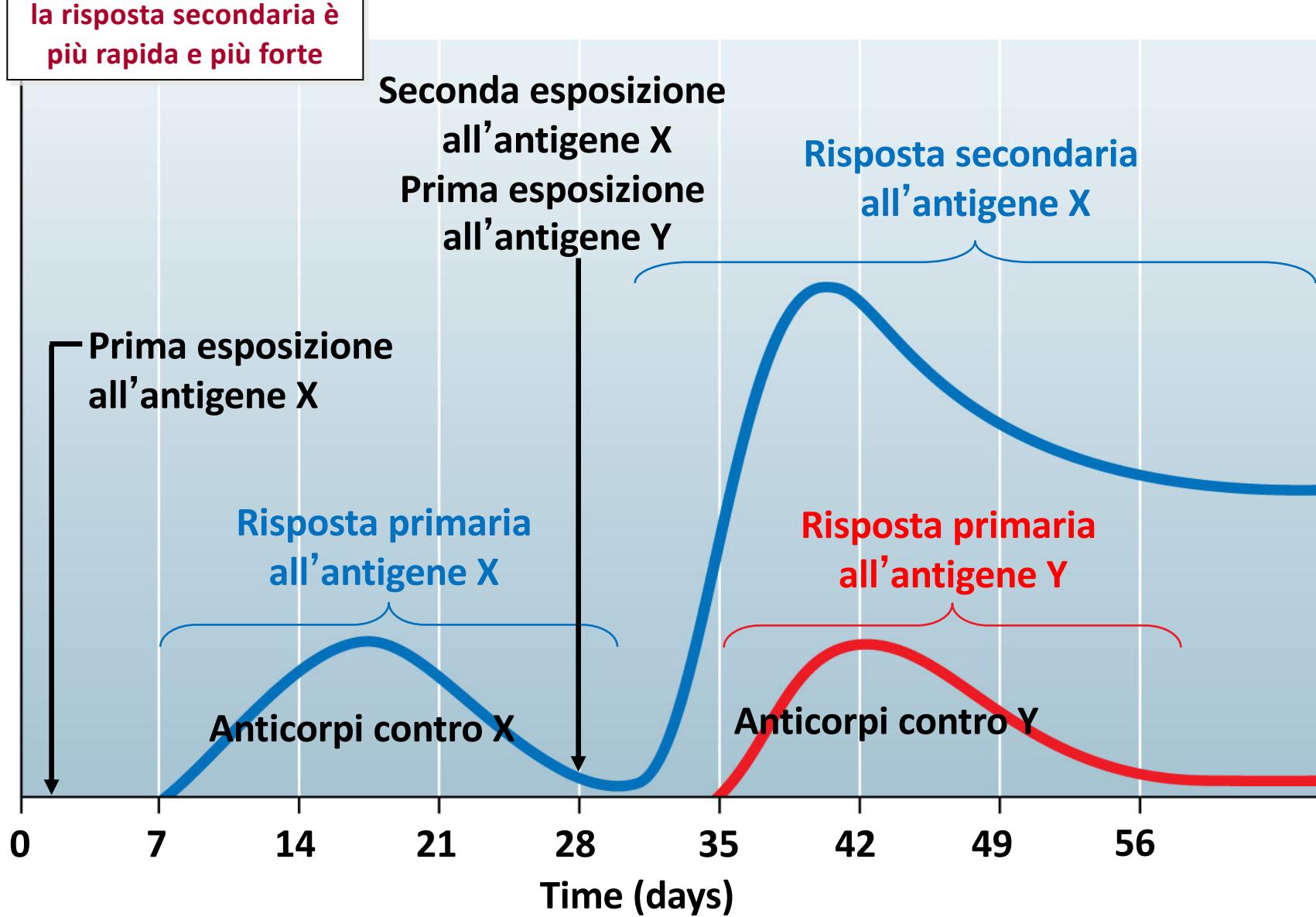


### Linfociti B di MEMORIA

la risposta secondaria è  
più rapida e più forte

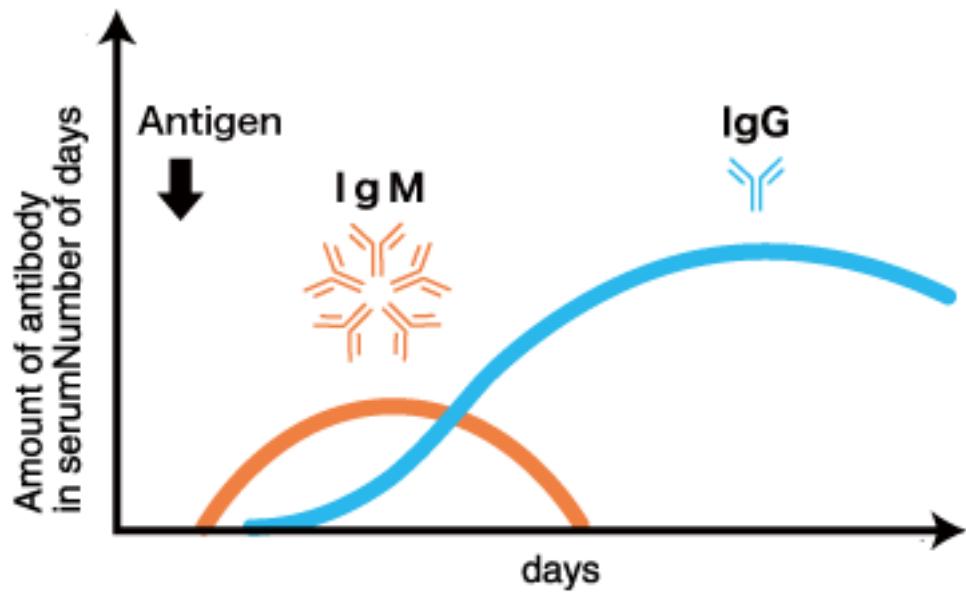


Titolo anticorpale

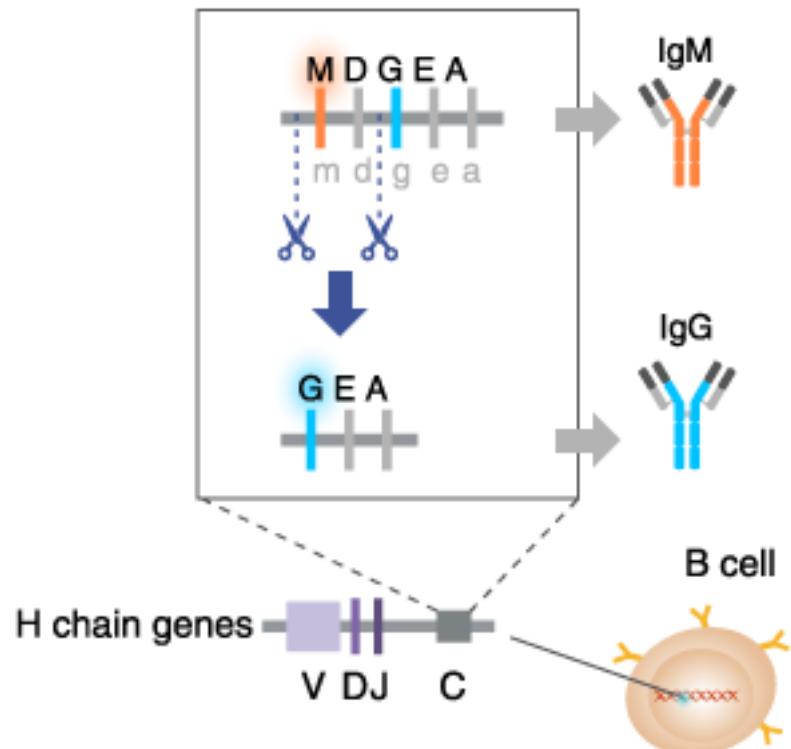


# CLASSI ANTICORPALI

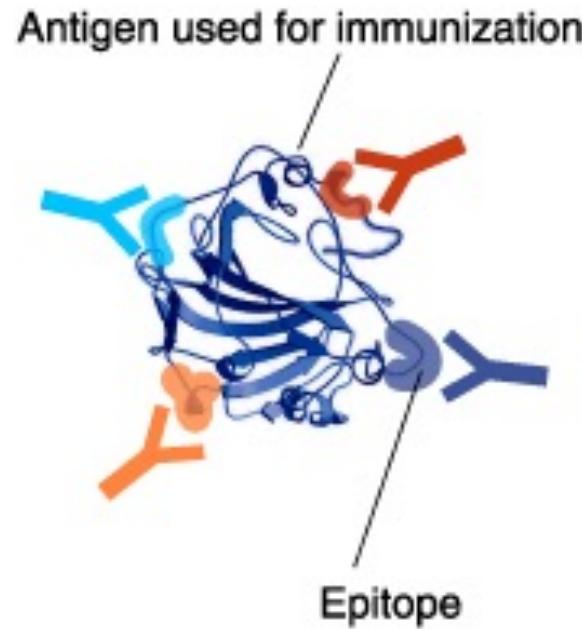
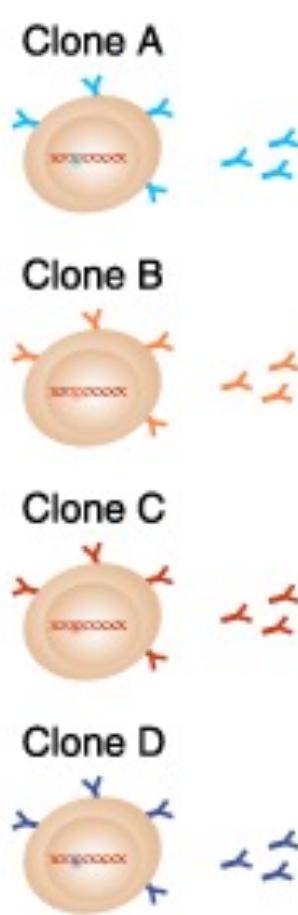
Levels of circulating antibodies to a specific antigen



Class switching



# LA RISPOSTA IMMUNE GENERA ANTICORPI POLICLONALI



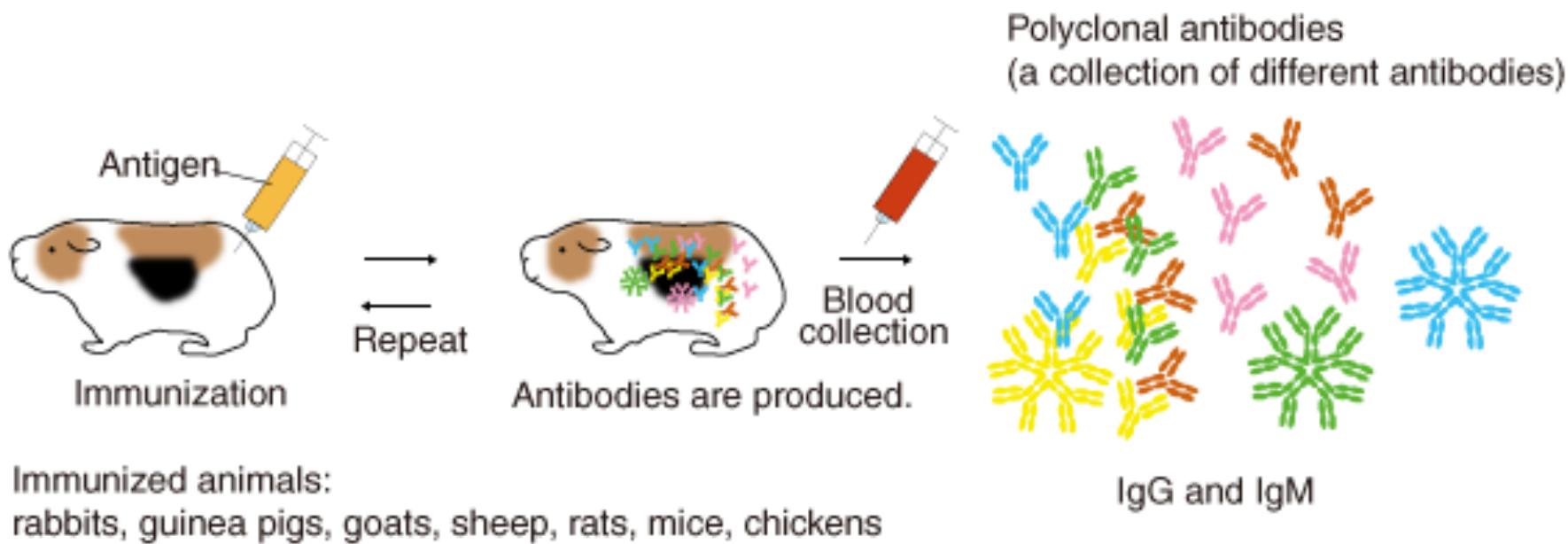
L'immunizzazione con un **antigene** stimola molti **linfociti diversi**,

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**

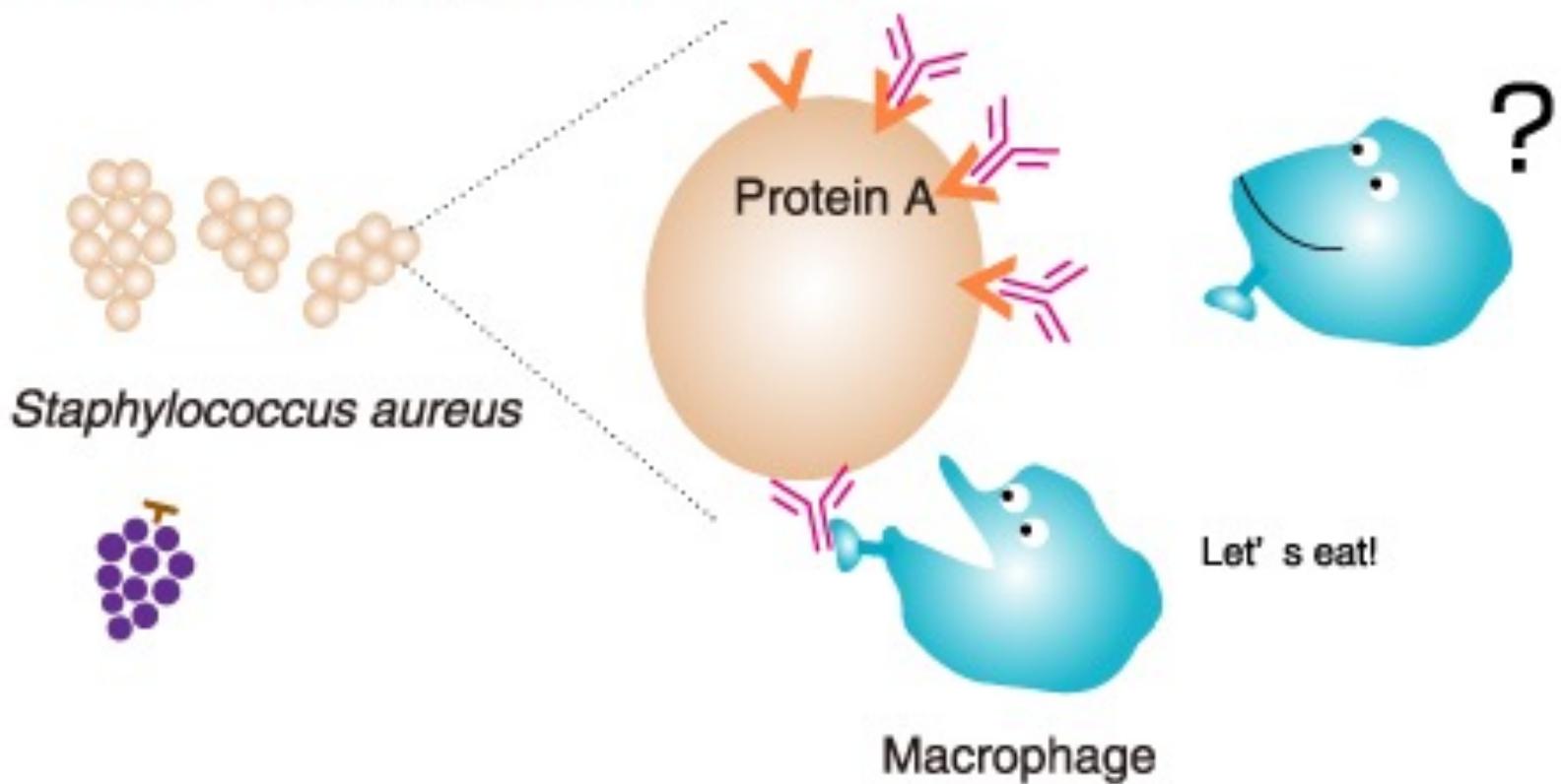
Al termine del ciclo di immunizzazione viene prelevato un po' del sangue dell'animale per recuperare gli anticorpi



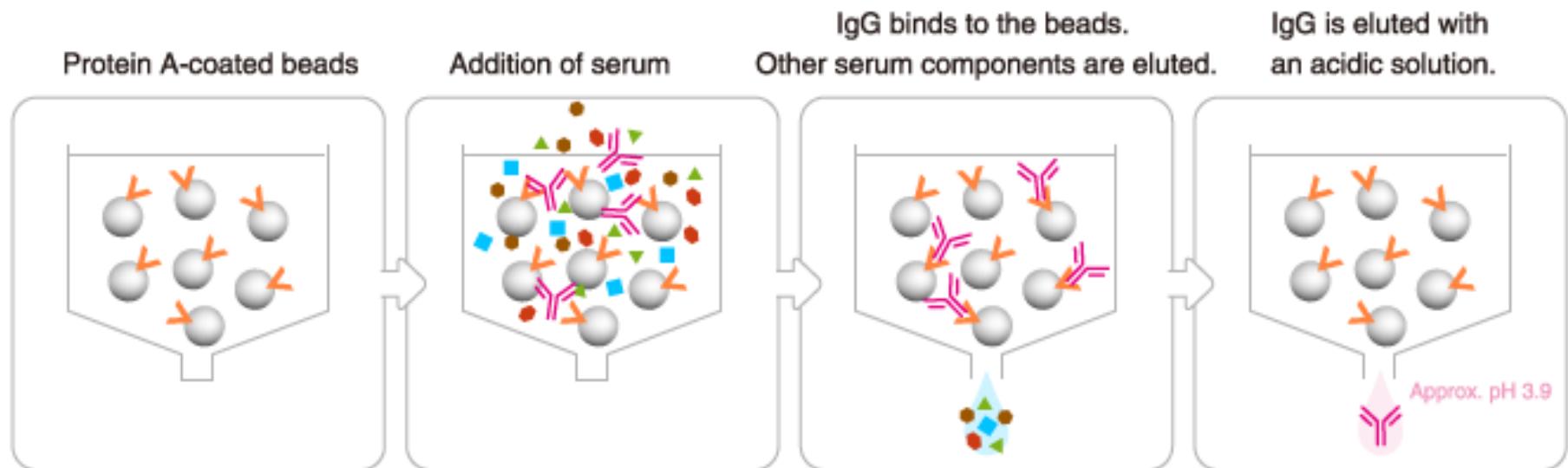
**SIERO IMMUNE o ANTISIERO**

# PURIFICAZIONE DI ANTICORPI dal siero mediante PROTEINA A di Stafilococco

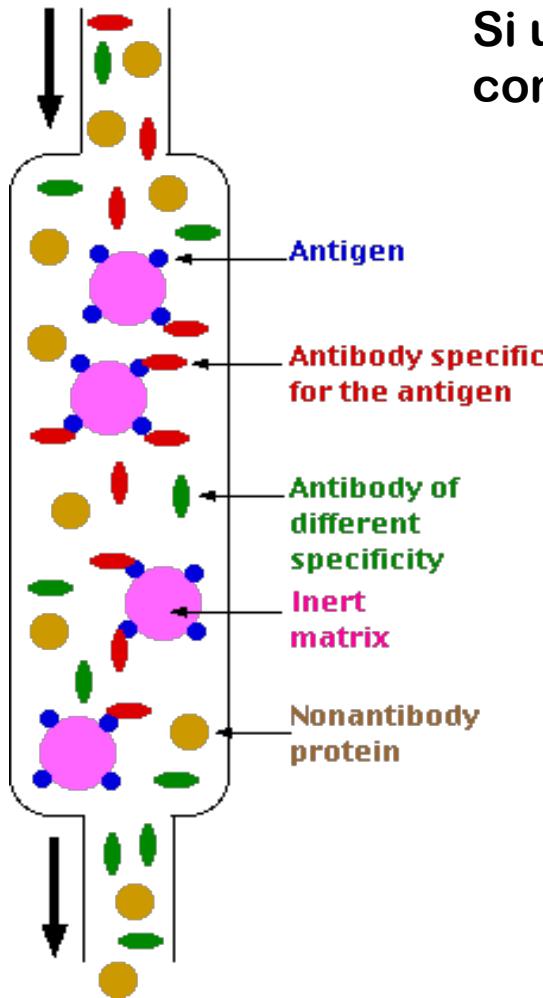
Immune evasion by *Staphylococcus aureus*



# PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



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



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

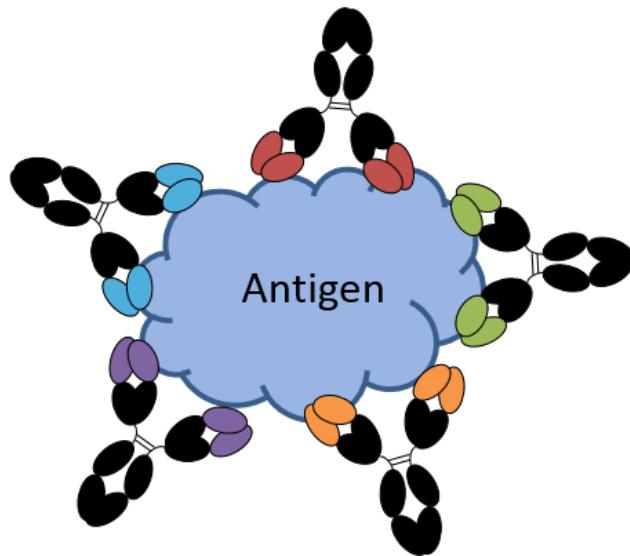


Polyclonal antibodies

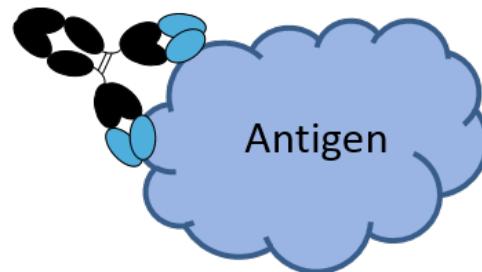


# ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

**Polyclonal antibody**



**Monoclonal antibody**

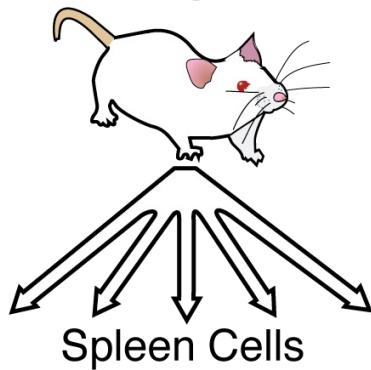


<b>Epitopi multipli</b>	<b>Singolo epitopo</b>
Segnale più forte	Segnale più debole
Basso rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato	Rischio che l'epitopo sia mascherato/denaturato
Può riconoscere epitopi comuni ad altri antigeni (crossreattività)	molto specifico (se opportunamente selezionato)

# ANTICORPI MONOCLONALI:

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

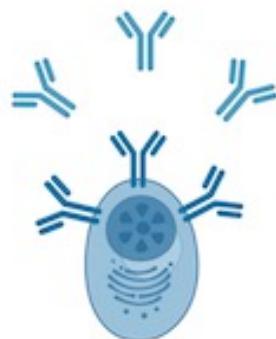
Mouse challenged with antigen



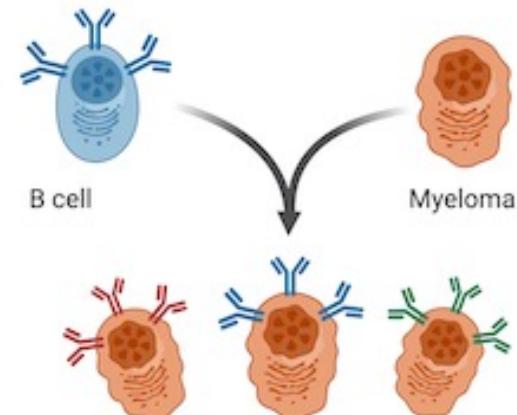
Spleen Cells



- ① Immunization of an animal with protein antigen to stimulate antibody production



- ② Isolation of antibody-secreting B cells



- ③ Fusion and generation of hybridomas

# Produzione di anticorpi monoclonali

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

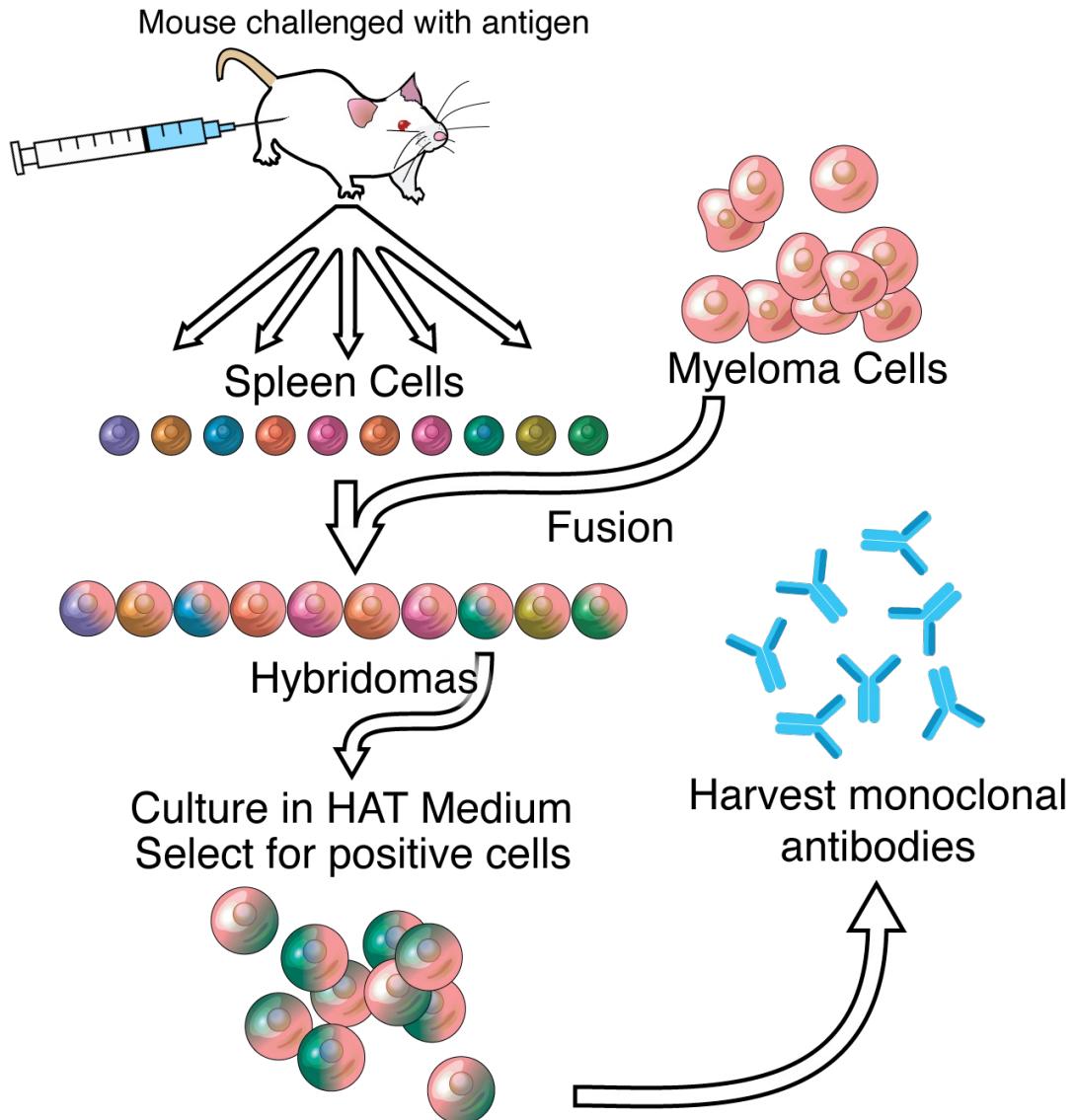
I linfociti vengono mescolati a **cellule immortali (cellule tumorali di MIELOMA)**

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

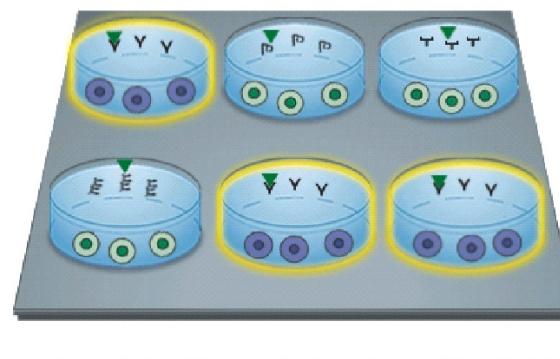


# Produzione di anticorpi monoclonali

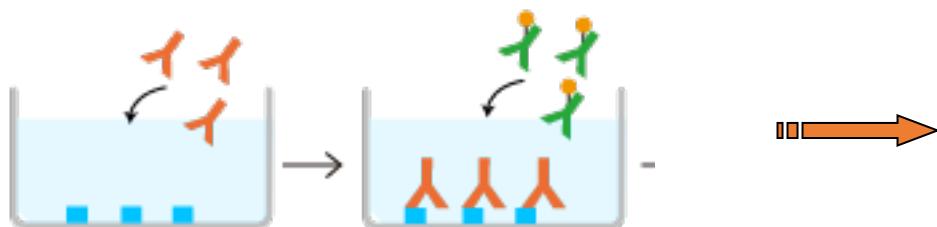
7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e seminati a singola cellula in piastre multiwell



8 Ogni clone produrrà un anticorpo diverso



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



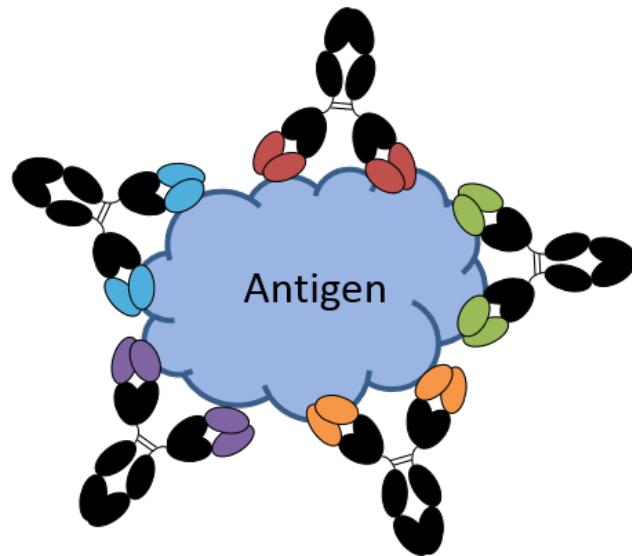
10 Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI**

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

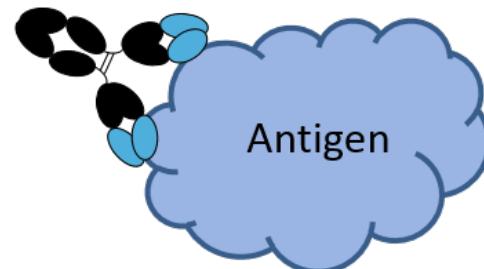


# ANTICORPI MONOCLONALI E POLICLONALI

**Polyclonal antibody**



**Monoclonal antibody**



<b>Epitopi multipli</b>	<b>Singolo epitopo</b>
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)

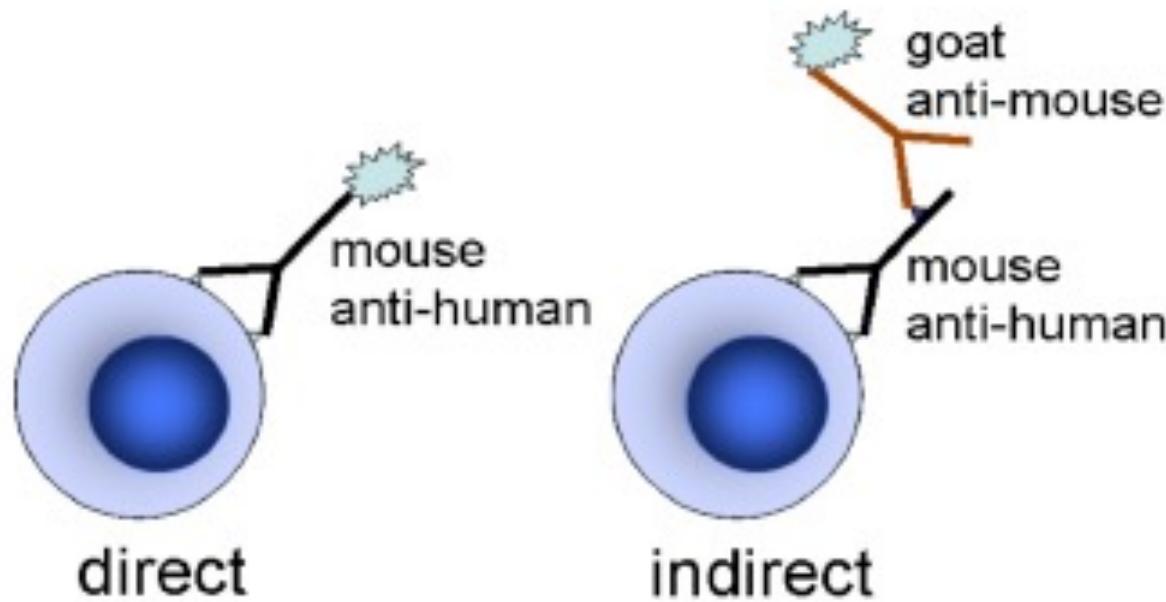
## Tecniche che impiegano anticorpi = TECNICHE IMMUNOCHIMICHE

- 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.

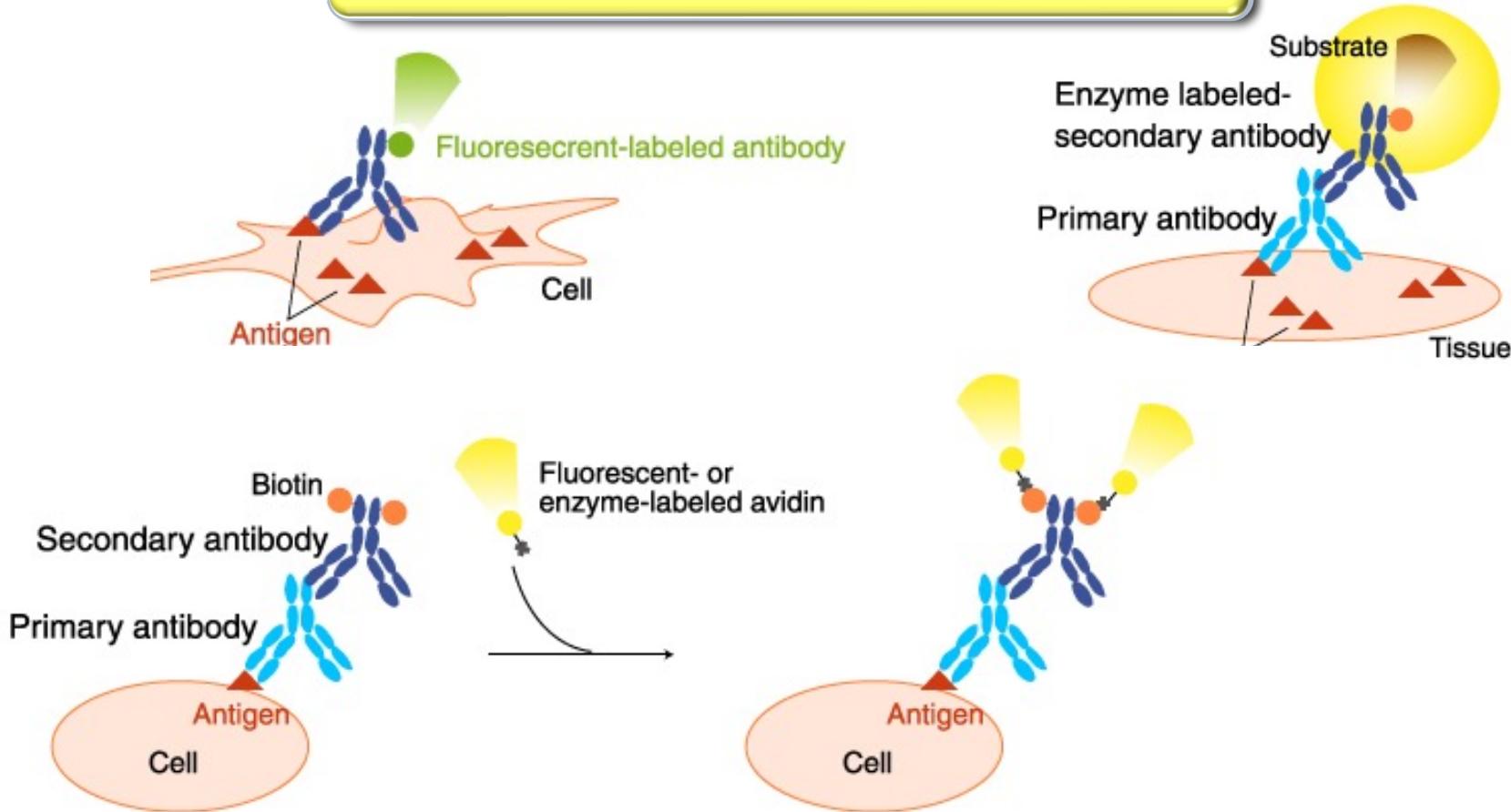
## TECNICHE IMMUNOCHIMICHE DIRETTE E INDIRETTE

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)



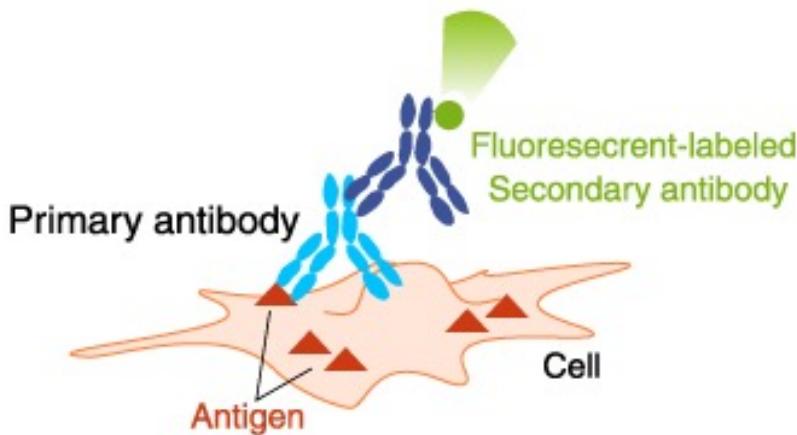
# CONIUGAZIONE di ANTICORPI



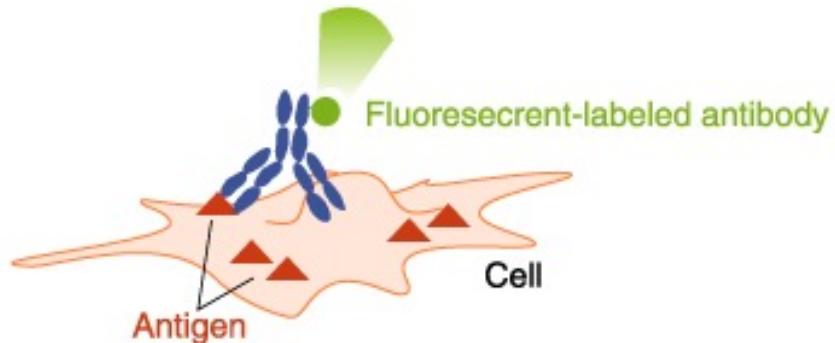
1. **fluorocromo** (microscopia a fluorescenza, citofluorimetria)
2. **enzima con substrato cromogeno o chemiluminescente** (WB, IHC, ELISA)
3. **biotina** (purificazione tramite streptavidina)
4. **beads** (resine o particelle magnetiche per purificazione)

# Analisi di antigeni IN SITU IN CELLULE: immunofluorescenza

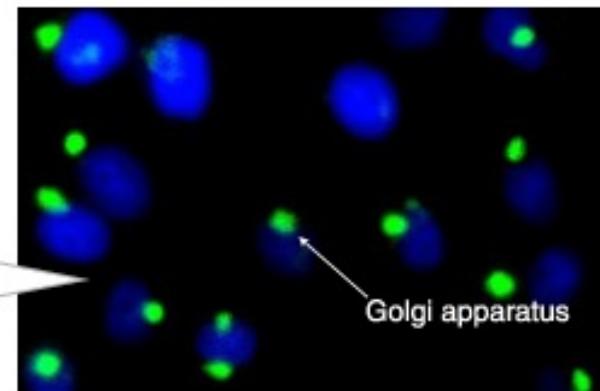
Permette di **visualizzare la localizzazione di una proteina sulla superficie o all'interno della cellula**



Staining with a direct-labeled antibody

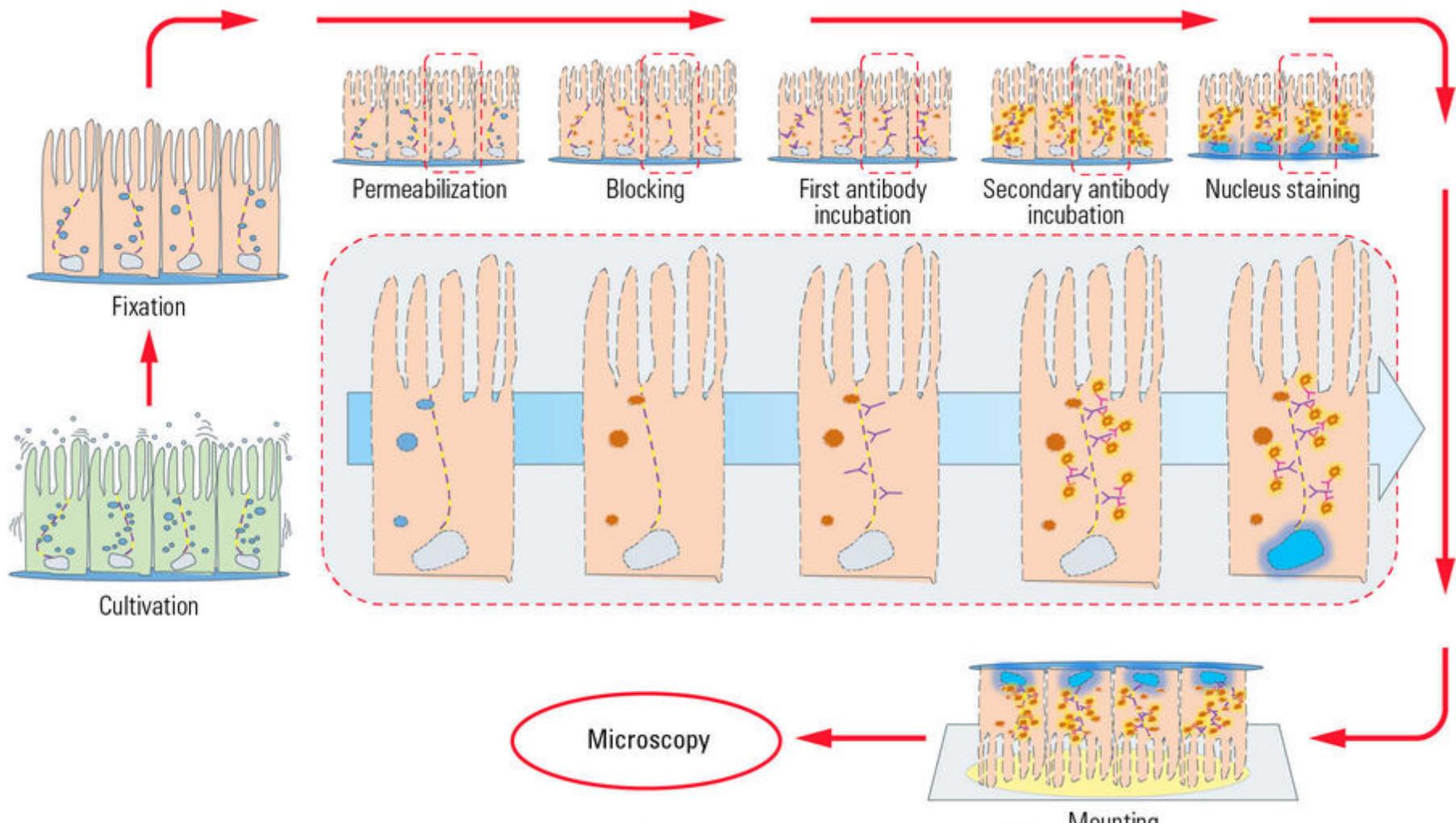


Green fluorescence of the fluorophore of the direct-labeled antibody (Alexa Fluor® 488) is observed by a fluorescence microscope.



Sample: HeLa cells

# IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA



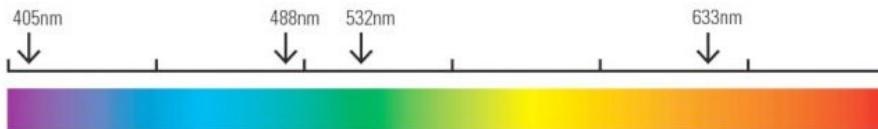
— Target structure; ● Non-target structure (unblocked/blocked); ○ Nucleus (unstained/stained); ↗ First antibody; ↘ Fluorescence-coupled secondary antibody

## IMMUNOFLUORESCENZA: PROCEDURA

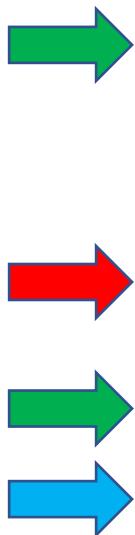
- ✓ **FISSAZIONE** delle cellule *in situ*: si mantengono le strutture cellulari e le interazioni molecolari. si utilizzano agenti crosslinkanti come **aldeidi** (paraformaldeide) oppure **solventi organici** (metanolo/acetone)
- ✓ **PERMEABILIZZAZIONE** della membrana per consentire l'ingresso dell'anticorpo (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 (a + b)	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.

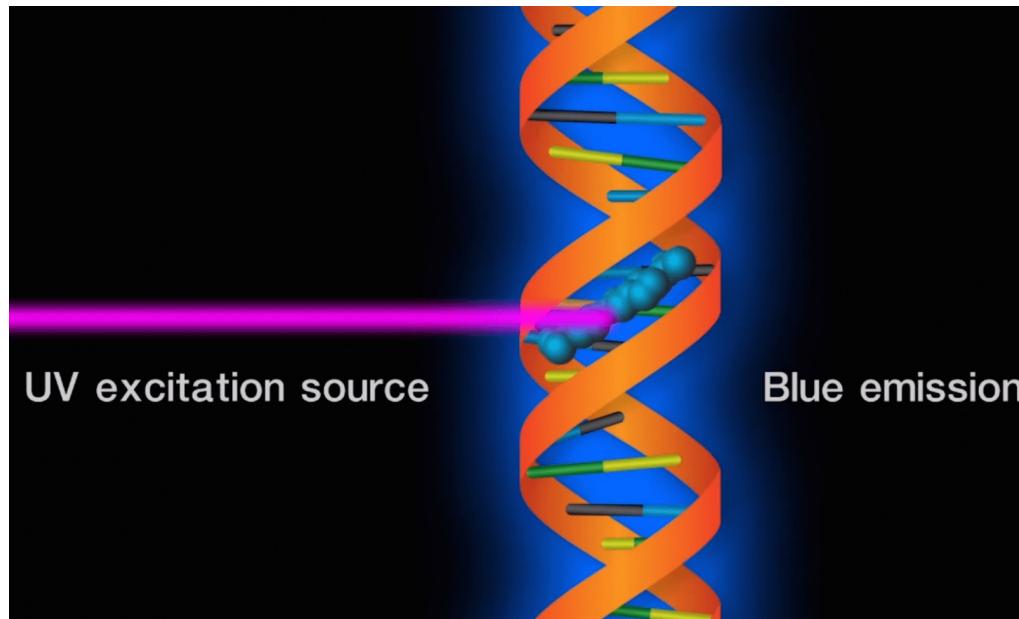
Even if FITC and TRITC are still in use, they are **rather weak** fluorescent dyes and not recommended for state of the art microscopy. Their profit is based on their **economical** price.

### Cyanines

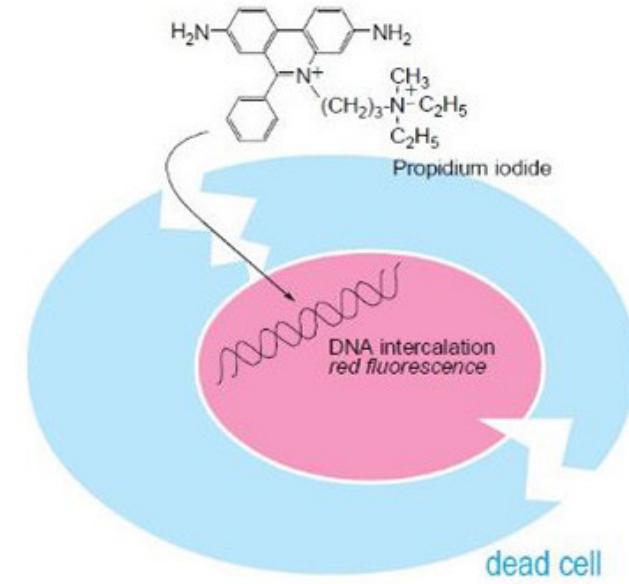
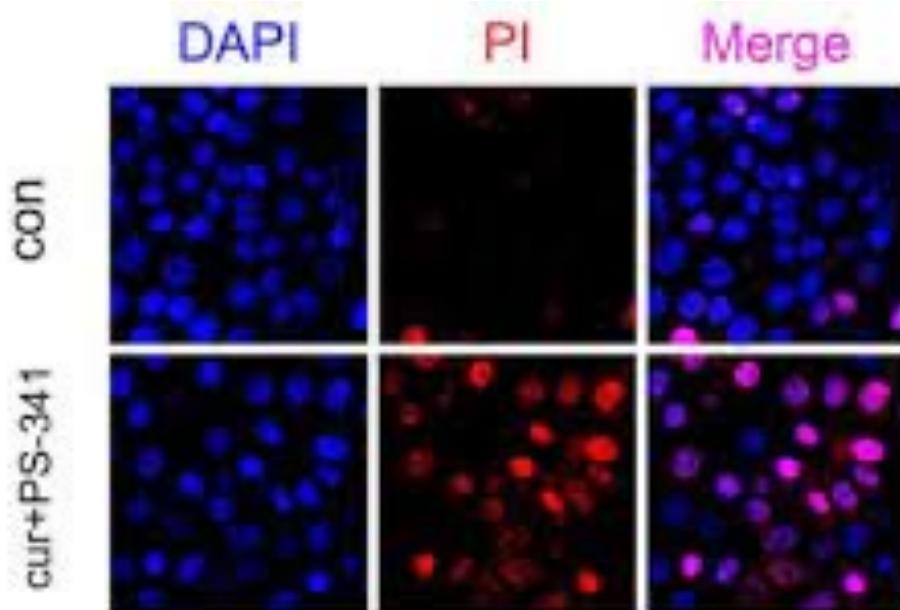
This relatively small collection of fluorescent dyes was derived from cyanine which was also the origin for their names: Cy2, Cy3, Cy5 and Cy7. All of them **can be linked to nucleic acids or proteins via their reactive groups**.

**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....

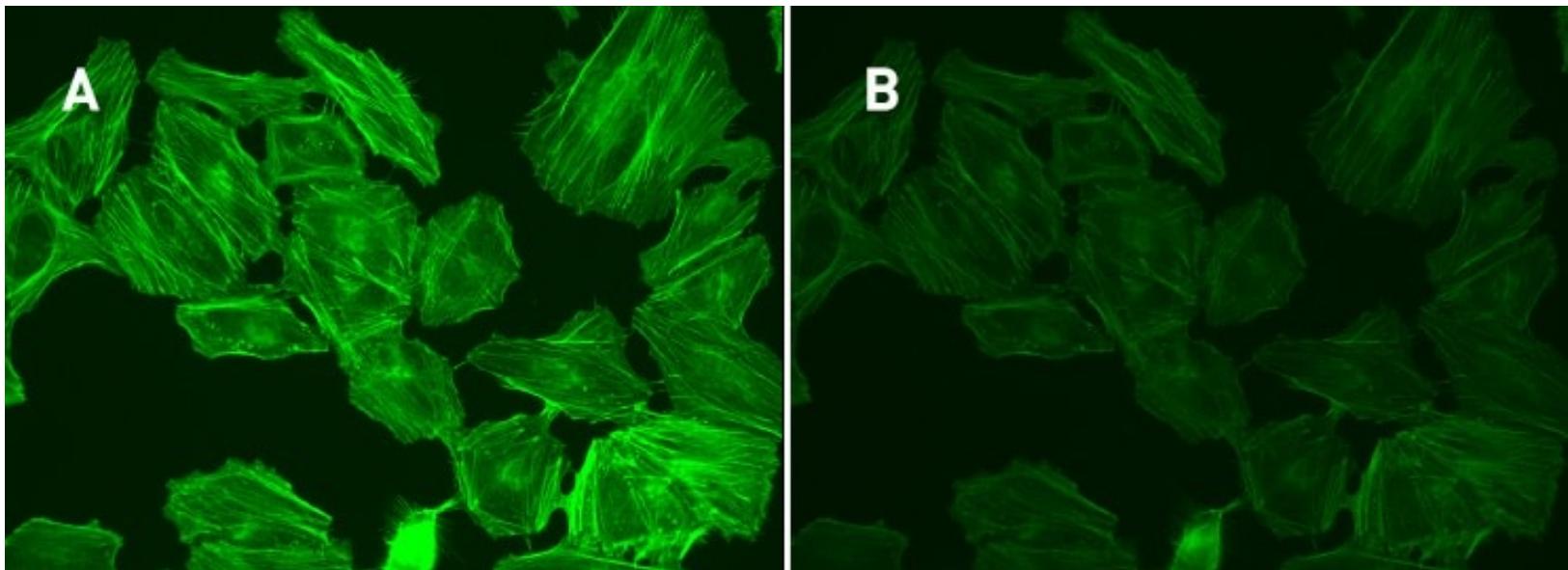


## COLORANTI VITALI PER IL DNA



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



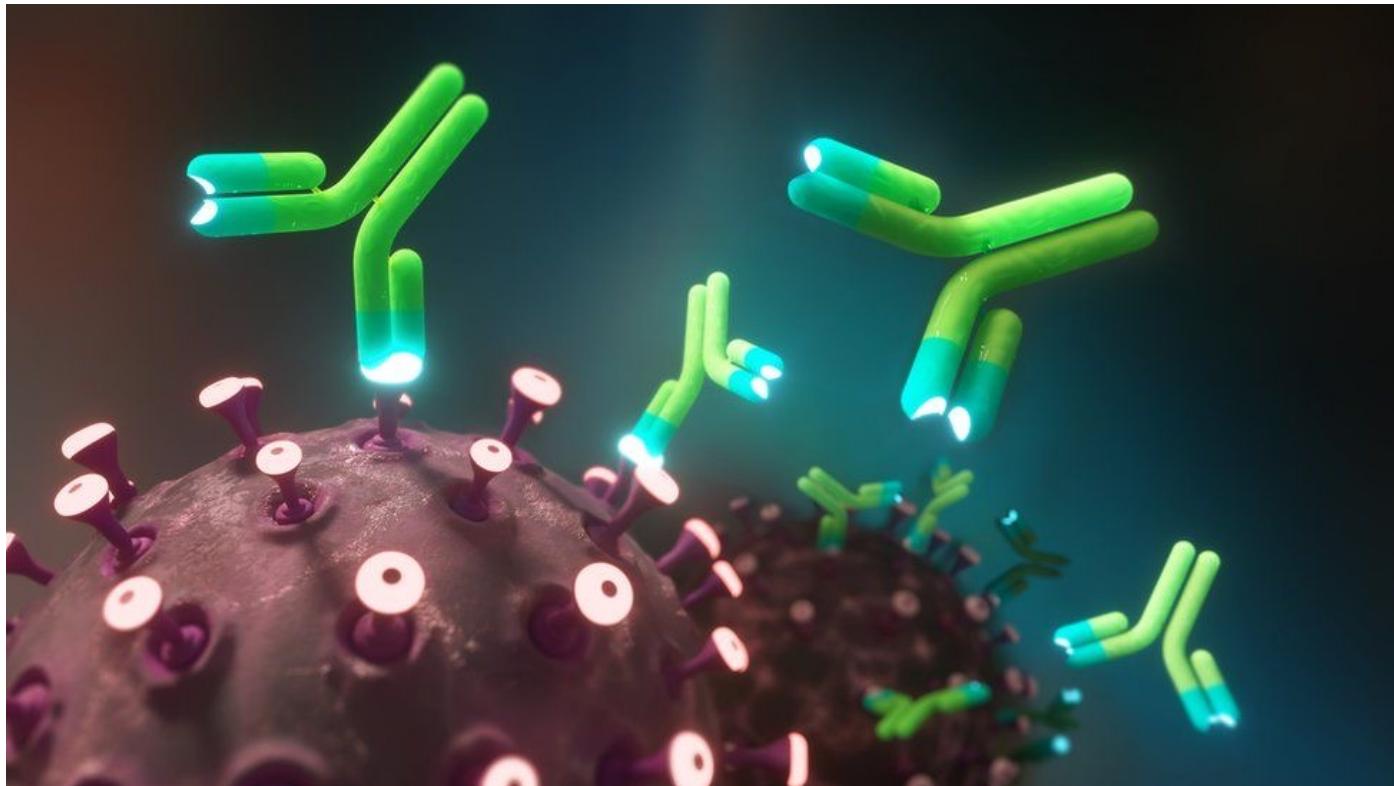
**La luce di eccitazione può indurre la conversione chimica permanente del fluoroforo in una molecola non fluorescente.**  
**Dopo un tempo (variabile) di esposizione si ha progressiva perdita della fluorescenza.**

**CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche**

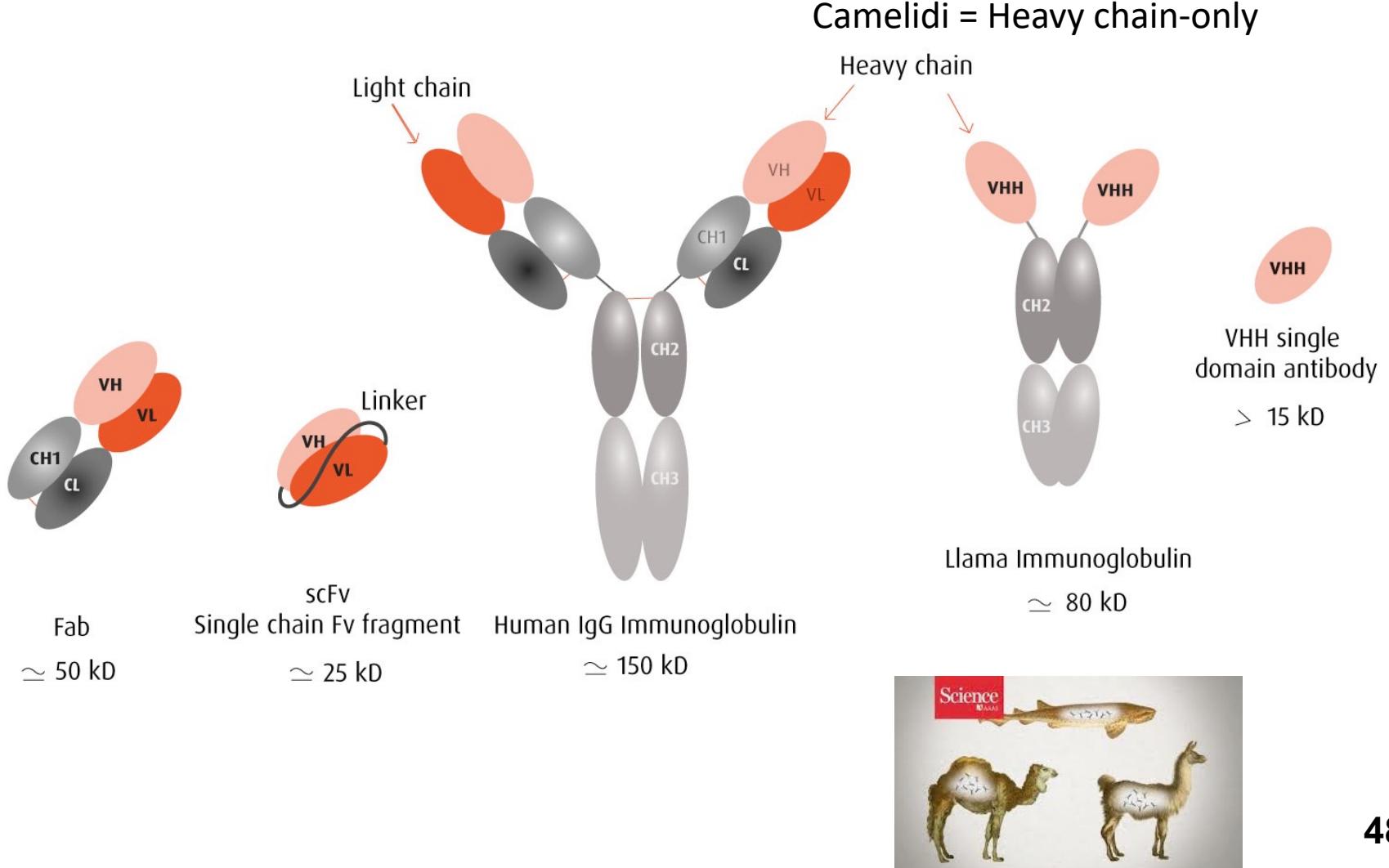
**Corso di Biotecnologie Cellulari 2025-26**

**Lezione 7**

**TECNICHE IMMUNOCHIMICHE**



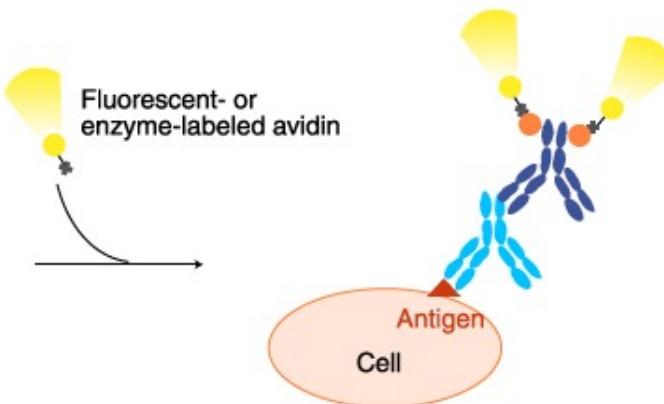
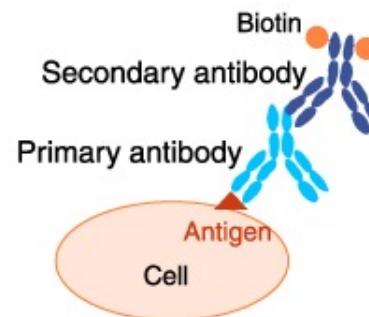
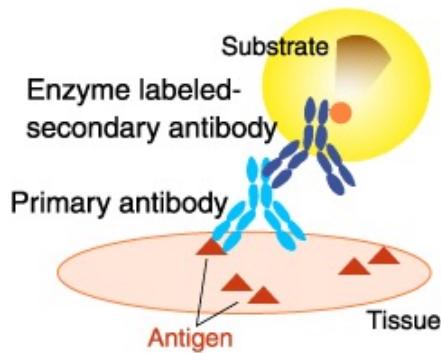
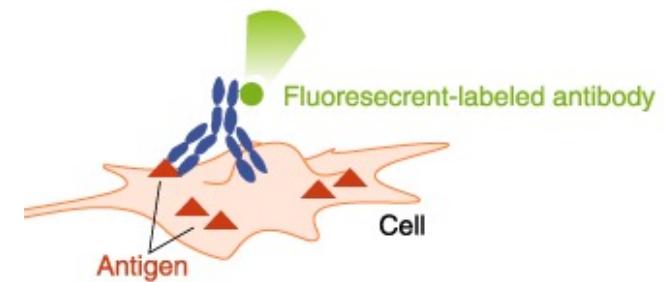
# Anticorpi camelidi, nanobodies, single chain Fv, sono prodotti in vitro con tecniche di biologia molecolare



## Tecniche che impiegano anticorpi = TECNICHE IMMUNOCHIMICHE

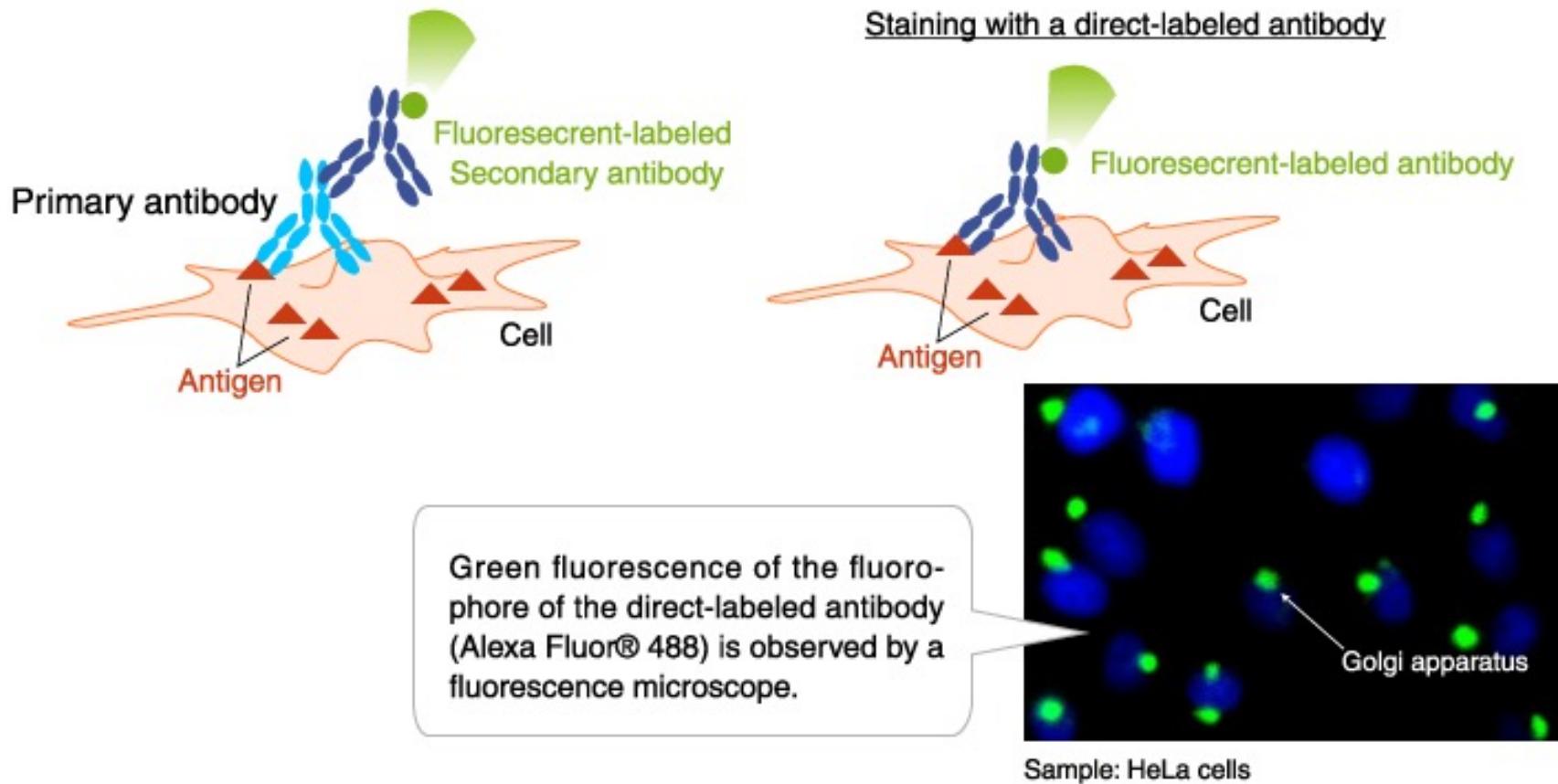
Gli **ANTICORPI** legano gli **ANTIGENI** con elevata **specificità e affinità**:  
possono essere quindi usati come **SONDE** per:  
**visualizzazione, dosaggio o purificazione di antigeni**  
in fase liquida, solida oppure **IN SITU**, in cellule e tessuti.

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



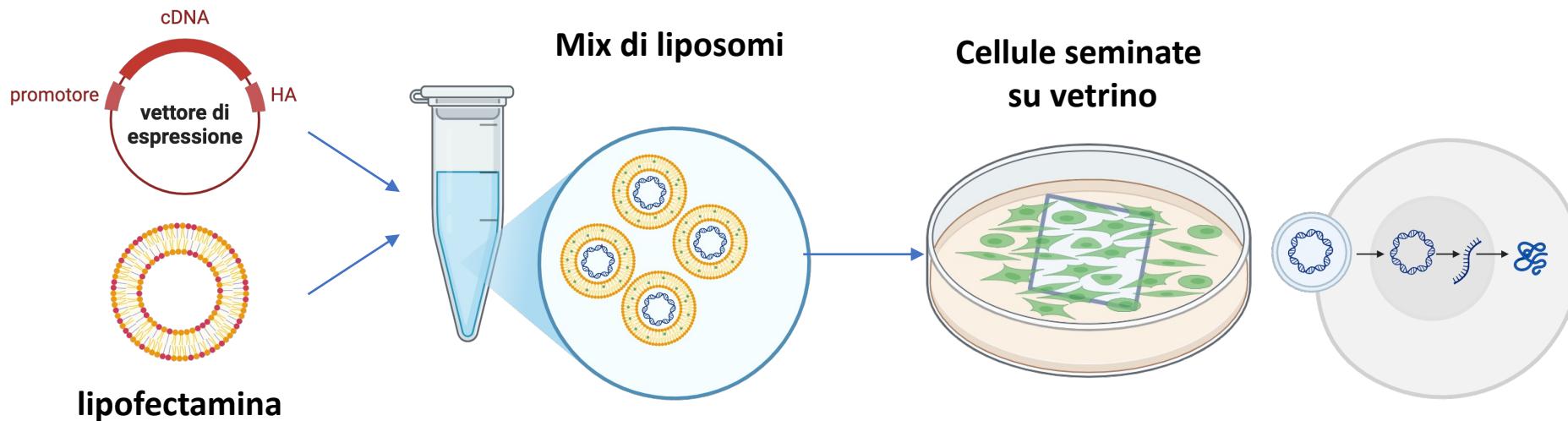
# Analisi di antigeni IN SITU IN CELLULE e TESSUTI: immunofluorescenza

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

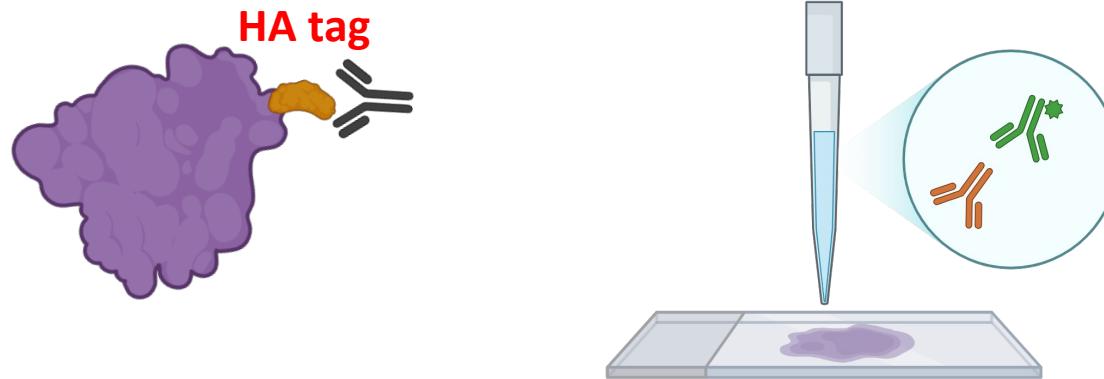


## ESPERIENZA #4

### Trasfezione di cellule in coltura

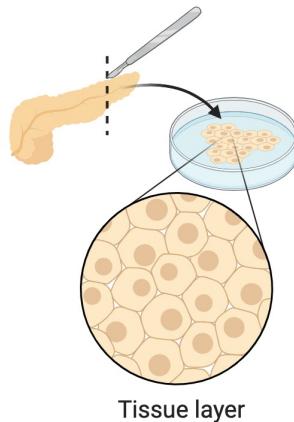


**Riconoscimento di proteine espresse in maniera ectopica  
mediante immunofluorescenza con anticorpi specifici per il TAG**

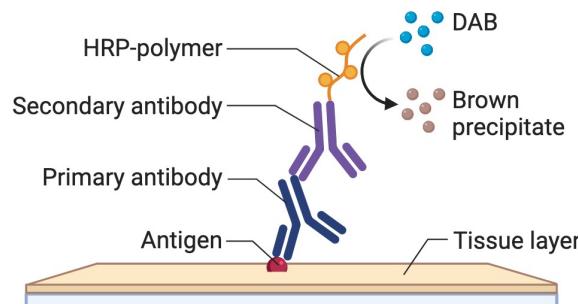


# ANALISI IN SITU IN TESSUTI: IMMUNOISTOCHIMICA

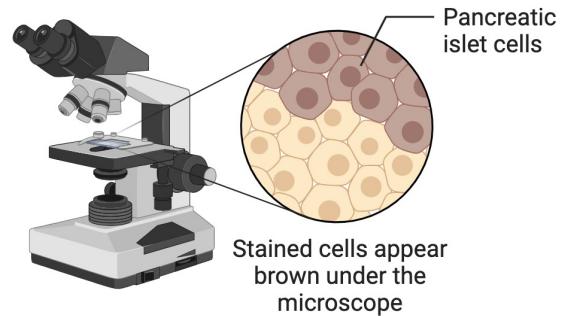
## 1 Sample collection



## 2 Immunohistochemistry assay



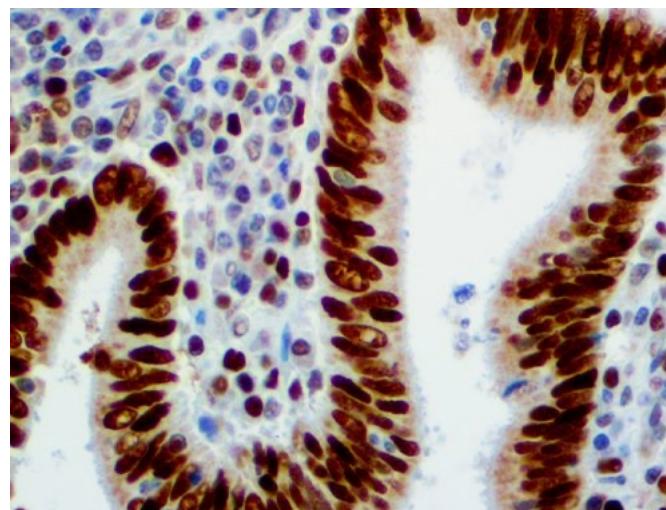
## 3 Microscopy and data analysis



DAB (3'3'diaminobenzidine)

HRP      ossidazione

Precipitato colorato



Sez di tessuti fissati  
e paraffinati,

Sez criostatiche

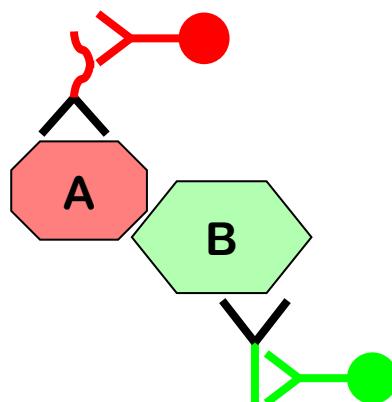
Cytosmear

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**

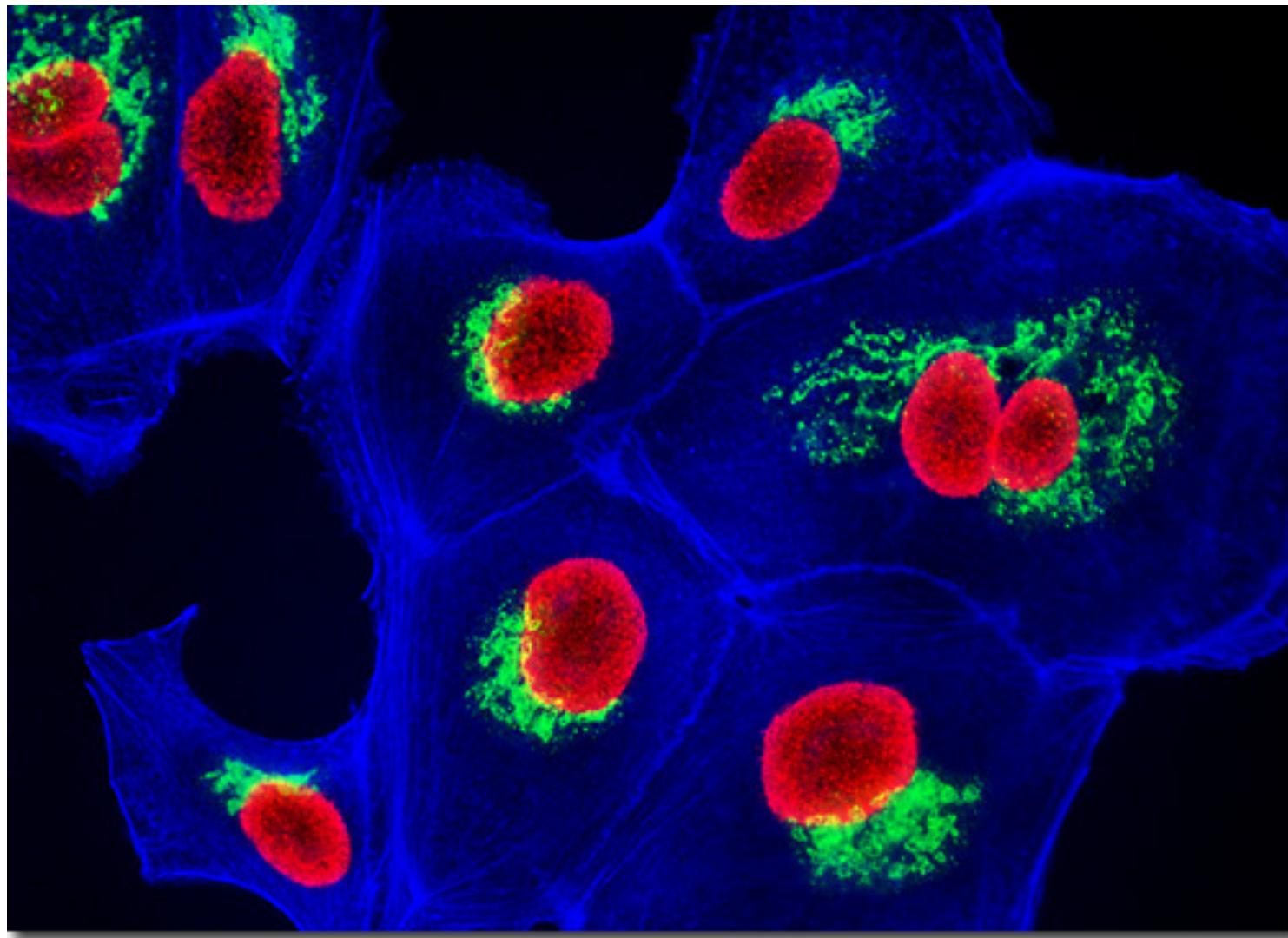


 Anticorpo primario anti-B  
prodotto in coniglio:  
**Fc specifico di coniglio**

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

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

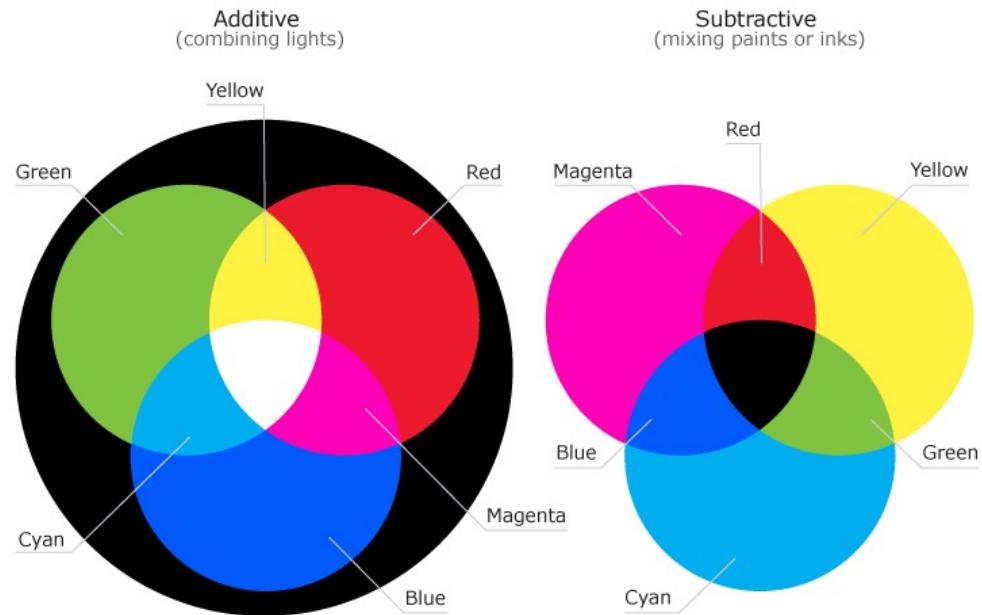
 Anticorpo secondario  
anti-Fc di coniglio  
**coniugato a fluoresceina**



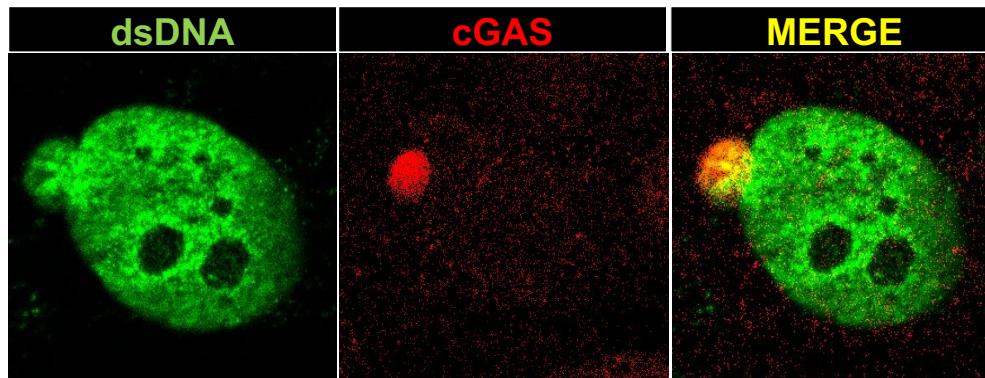
Mouse anti-  
Nuclear Pore  
Complex Protein  
+ goat anti-  
mouse Alexa  
Fluor 568

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

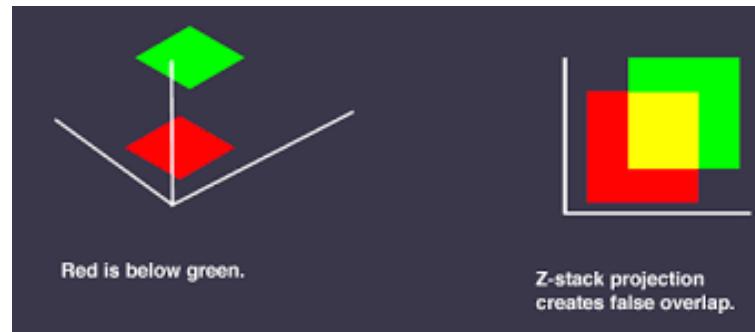
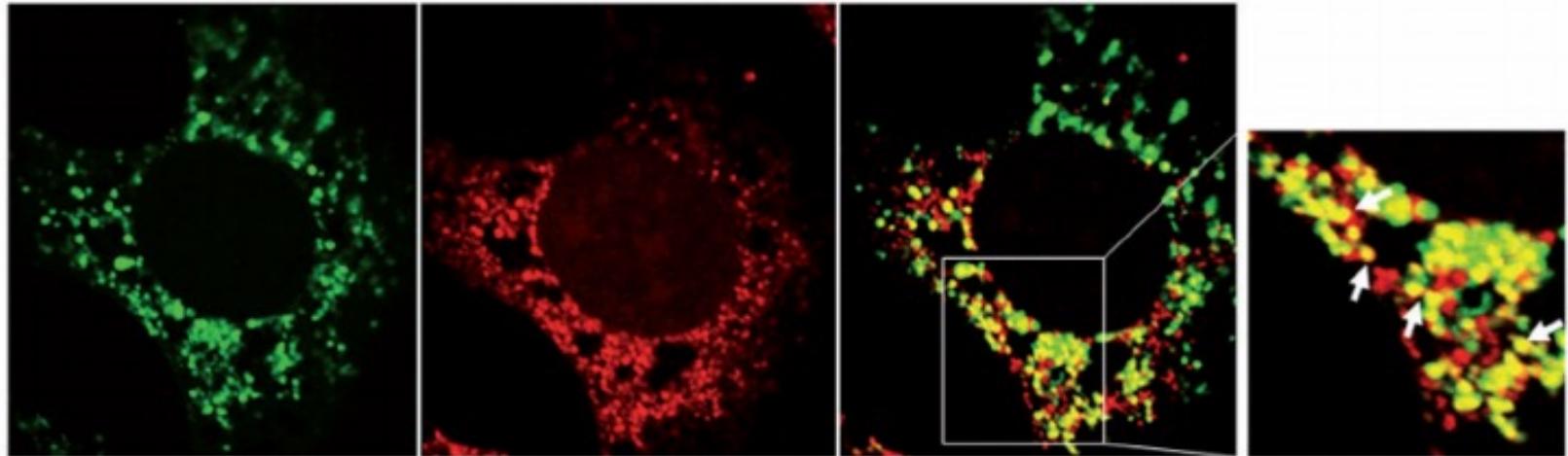
Actin staining  
Phalloidin  
conjugated to  
Alexa Fluor 350



© The University of Waikato Te Whare Wānanga o Waikato | [www.sciencelearn.org.nz](http://www.sciencelearn.org.nz)



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

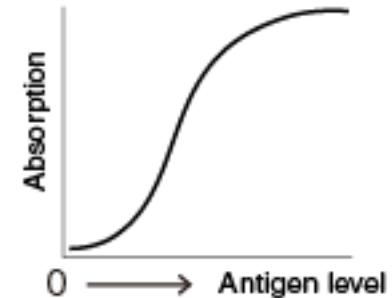
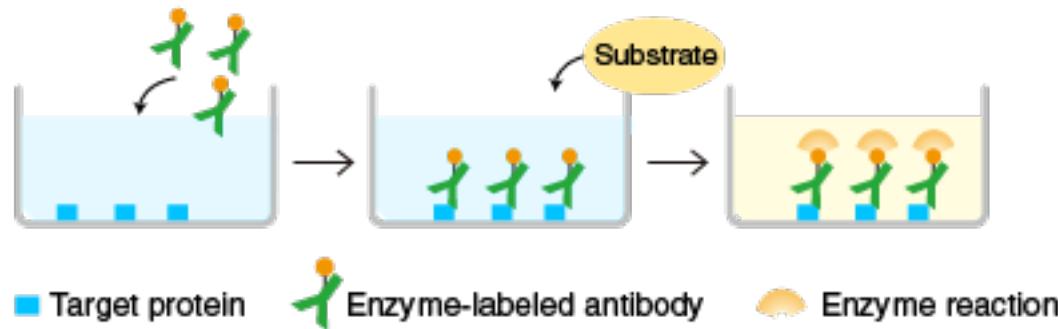


Se 2 o più segnali colocalizzati sono confocali, le molecole possono essere considerate co-localizzate nella cellula

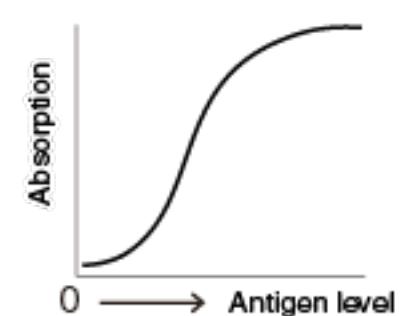
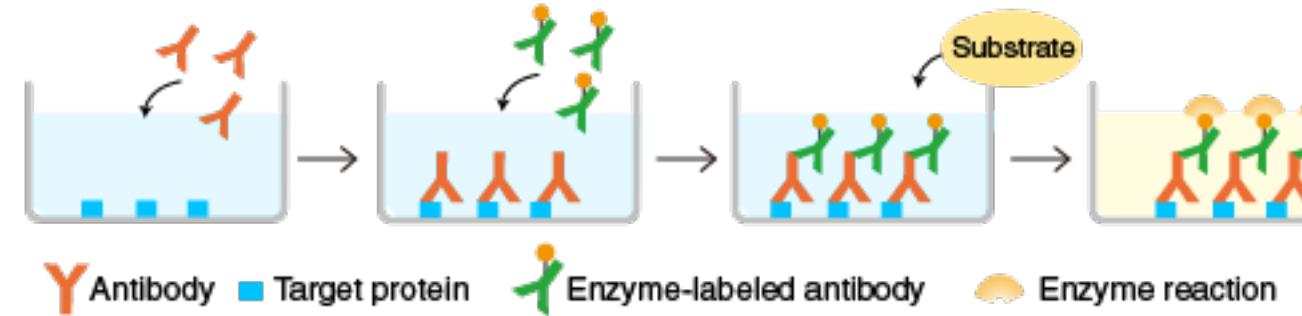
# Rilevazione/DOSAGGIO di antigeni in fase liquida mediante ELISA

## Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

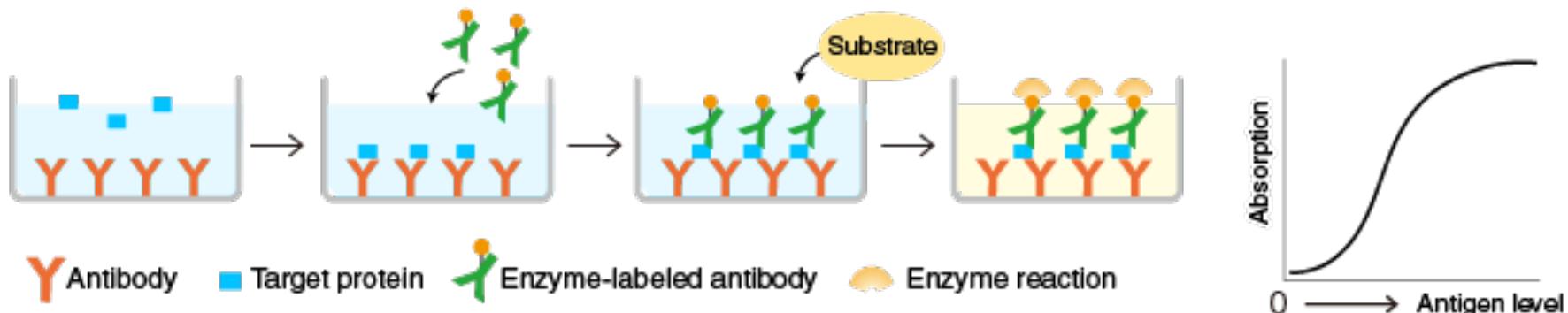
### DIRECT ELISA



### 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

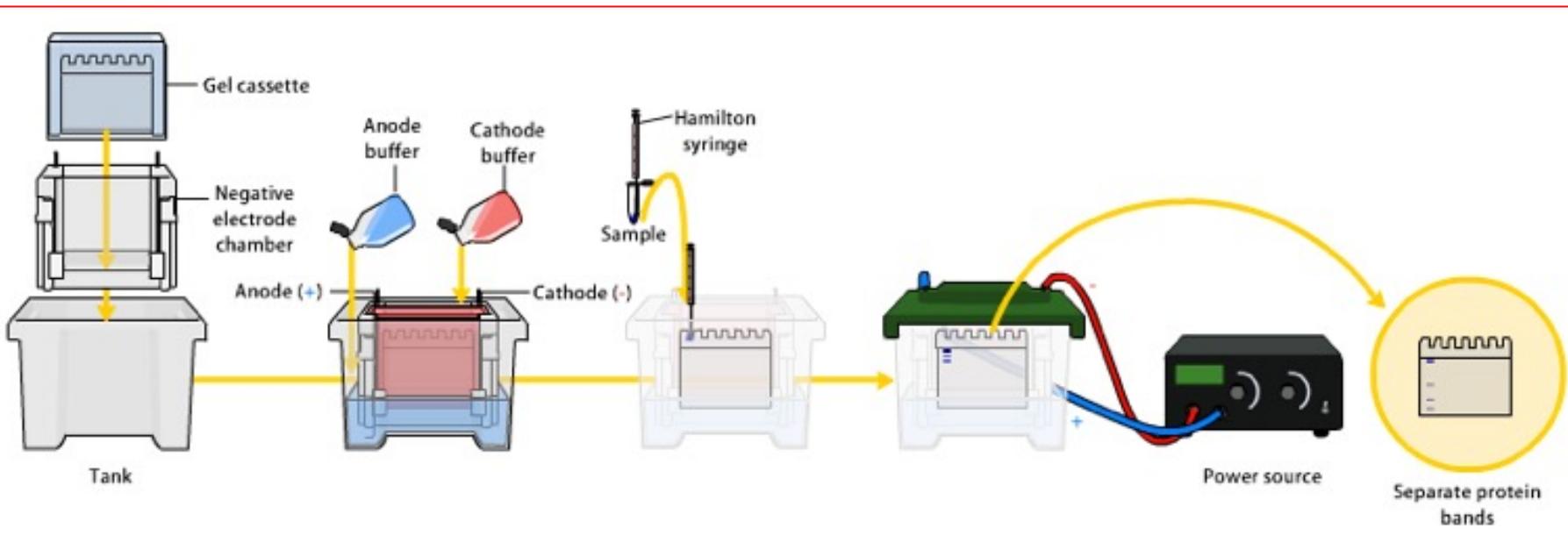
Tecnica che prevede il riconoscimento mediante anticorpi specifici di proteine previamente sottoposte ad elettroforesi e trasferite su un supporto.

Permette di ottenere informazioni su:

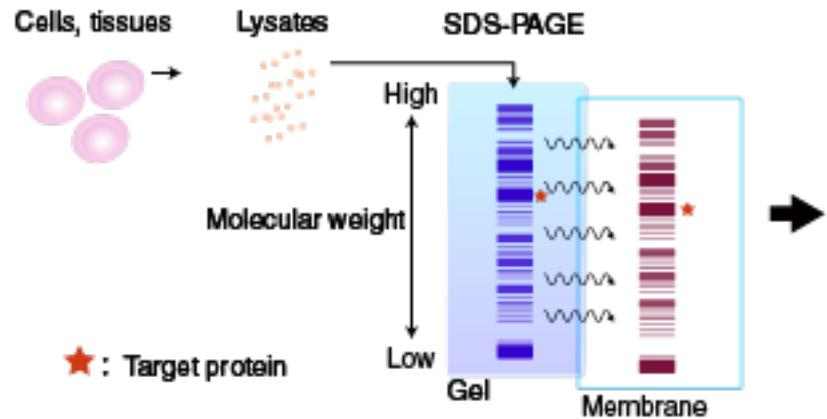
Massa molecolare

Livelli di espressione

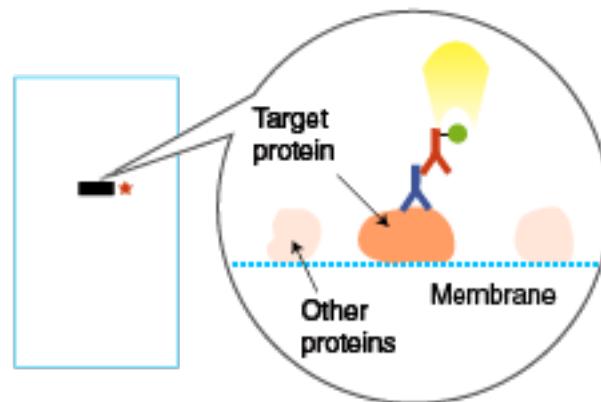
Modificazioni post-traduzionali



Proteins are separated by electrophoresis and transferred to a membrane.



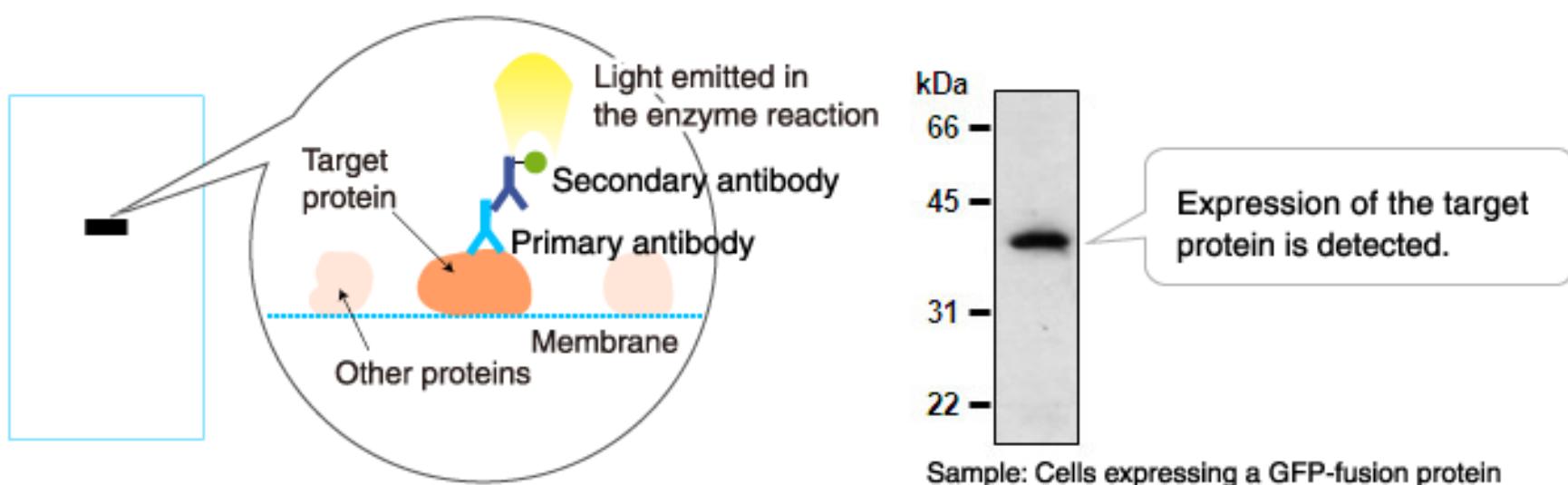
Probing with antibodies, and detection of the target protein by an enzyme reaction.



- Y : Primary antibody
- Y : Secondary antibody (enzyme-labeled antibody)
- Light emission or colorimetric change caused 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®)

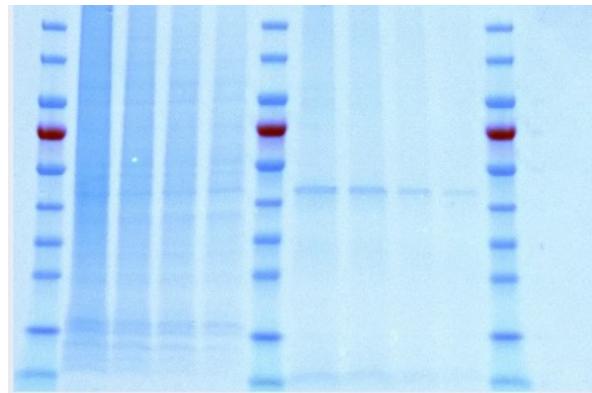


# QUALI STRUMENTI UTILIZZARE PER LA RILEVAZIONE?

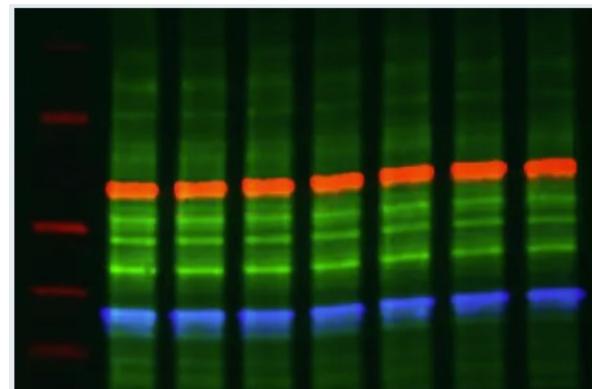
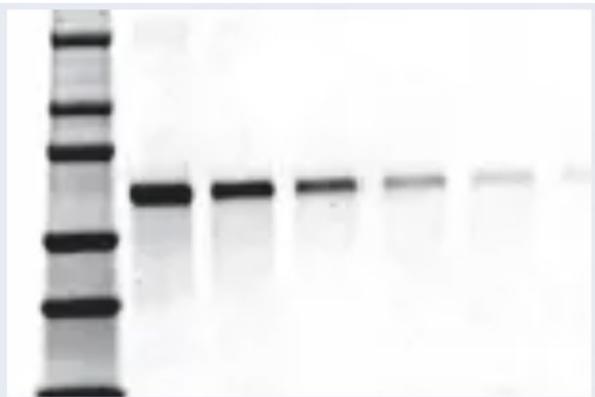
## GEL IMAGER



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**

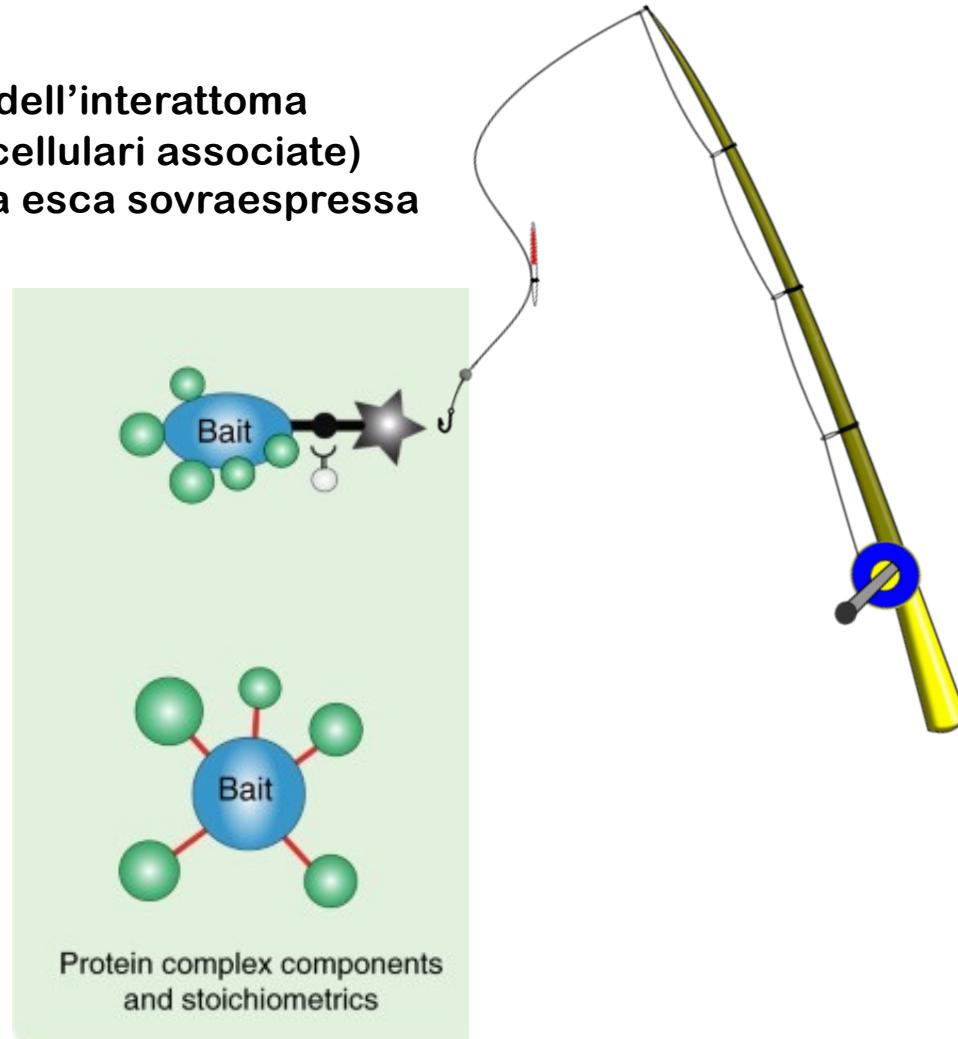
## **DISEGNO DELL'ESPERIMENTO:**

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

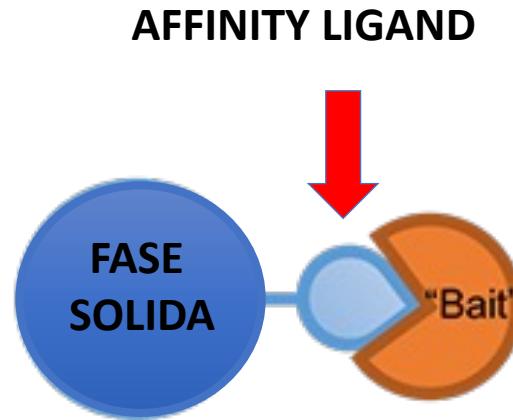
## APPROCCIO SPERIMENTALE:

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

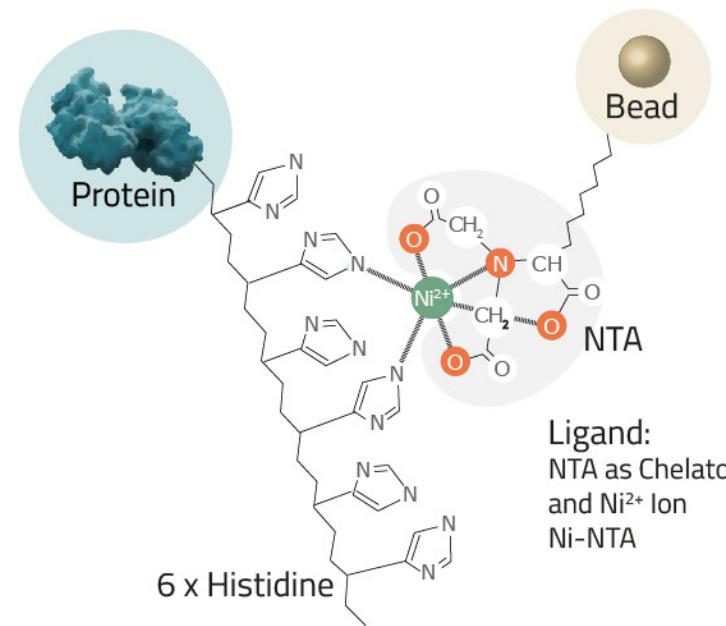
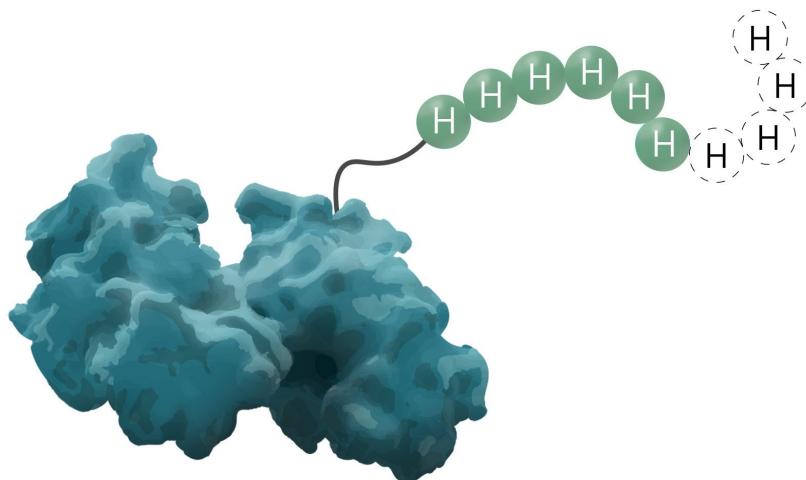


## APPROCCIO #1: PURIFICAZIONE DI PROTEINE DI FUSIONE PER AFFINITÀ'



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

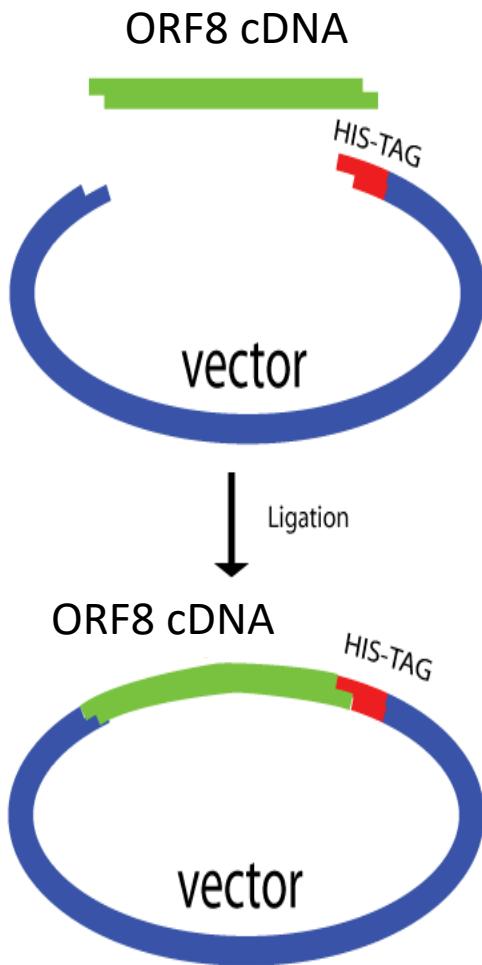
# Produzione e purificazione della proteina ORF8-His



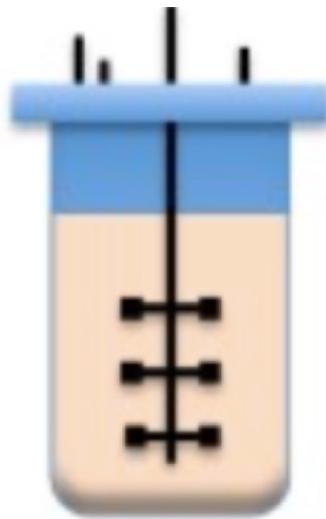
<https://cube-biotech.com/knowledge/protein-purification/his-tag/>

# Produzione e purificazione della proteina ORF8-His

- Clonaggio

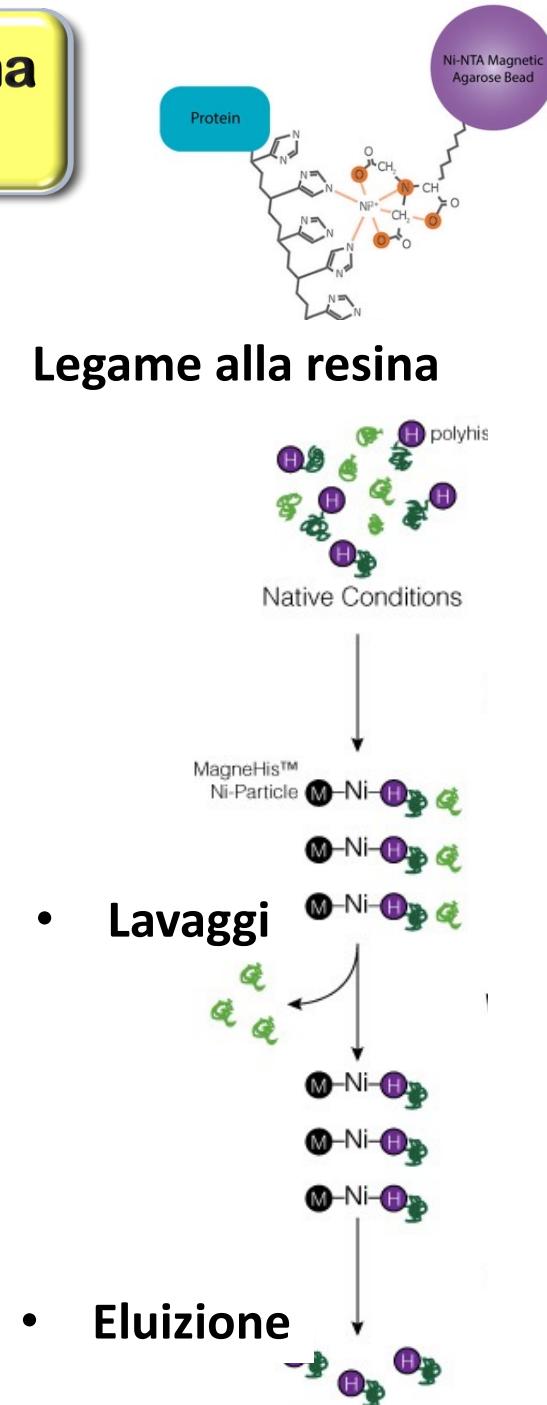


- Trasformazione batterica
- Selezione
- Coltura



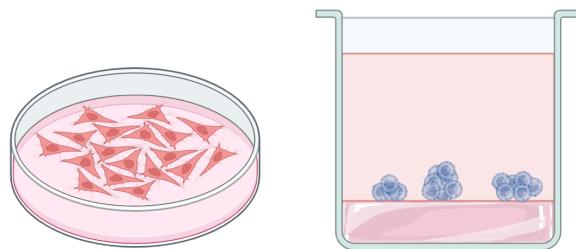
- Lisi dei batteri

- Legame alla resina

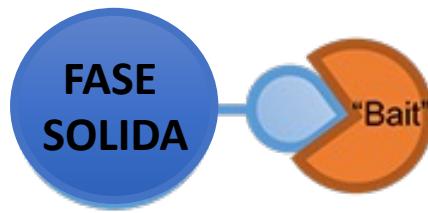
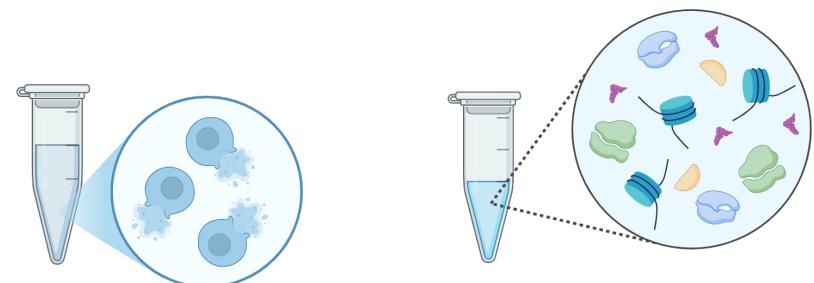


# ANALISI DELL'INTERAZIONE PROTEINA-PROTEINA mediante PURIFICAZIONE

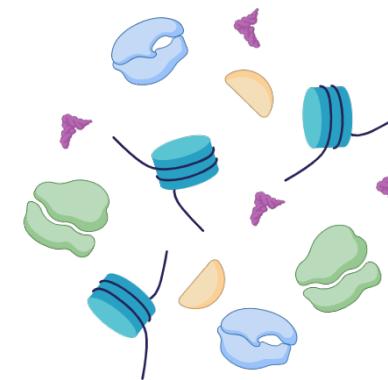
Modello cellulare



Ottenimento di un lisato cellulare



+

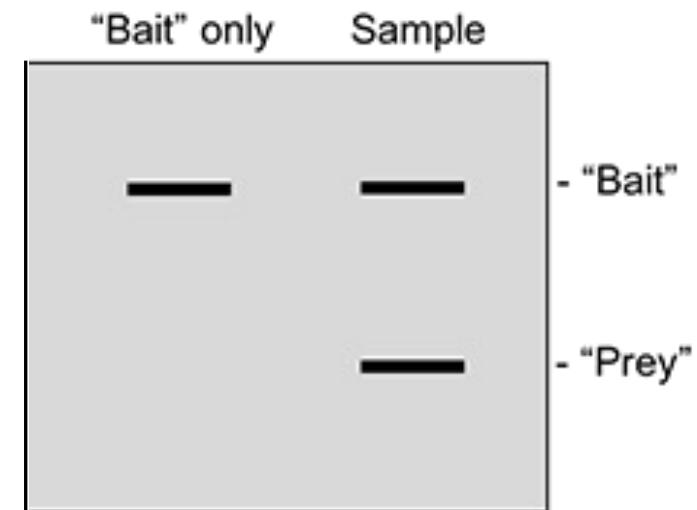
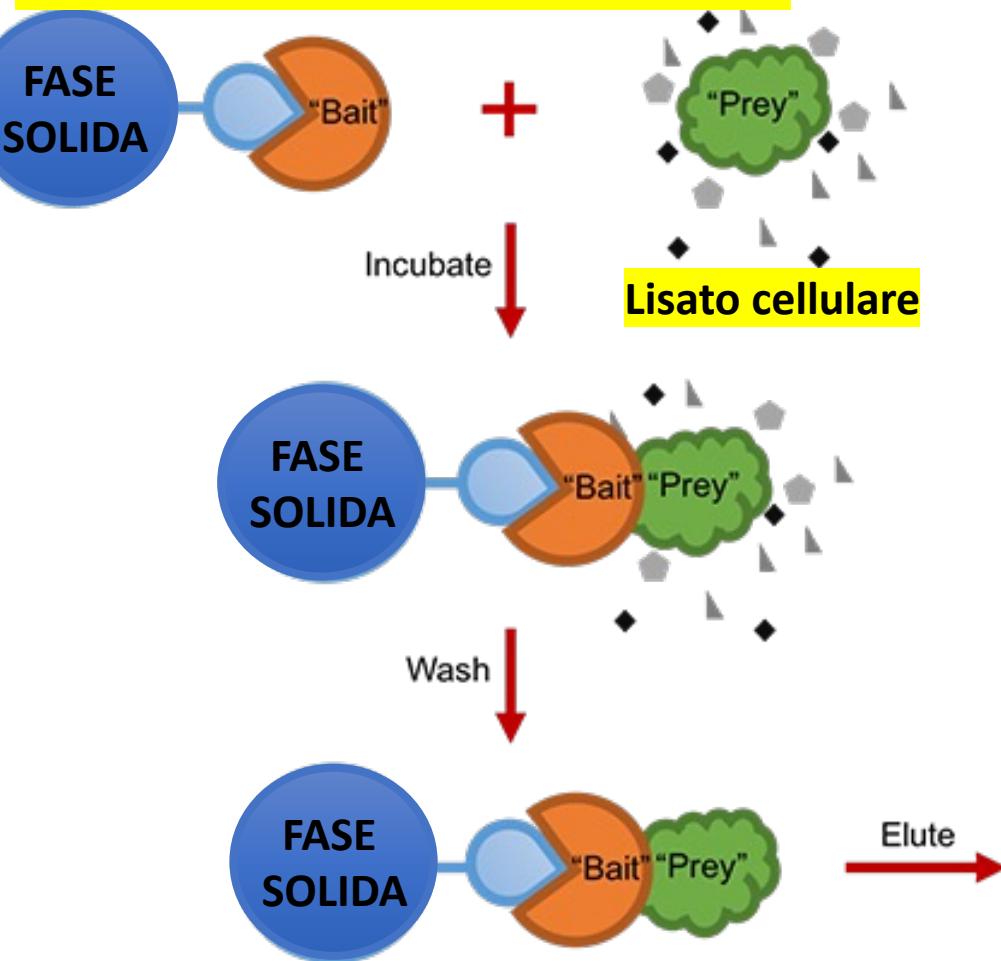


bait immobilizzata su fase solida  
(His-ORF8)

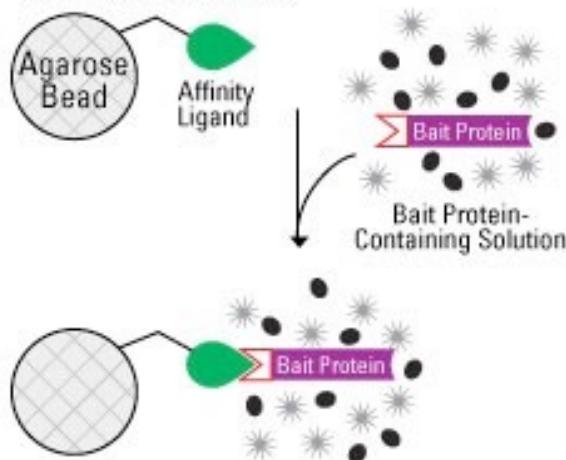
Incubazione con lisato cellulare

# ANALISI DELL'INTERAZIONE PROTEINA-PROTEINA mediante PURIFICAZIONE

Immobilizzare la bait su una fase solida



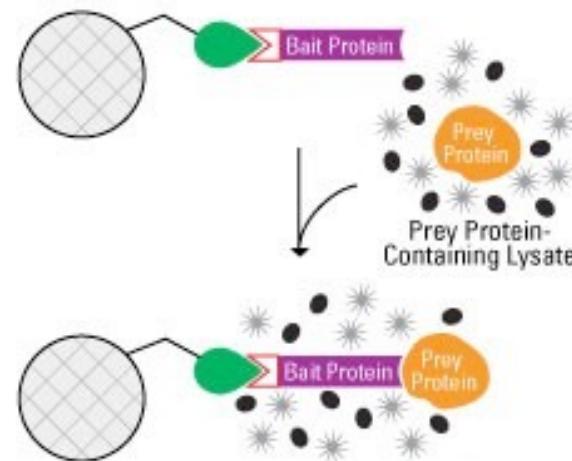
Step 1. Immobilize the fusion-tagged "bait" from the lysate.



Step 2. Wash away unbound protein.



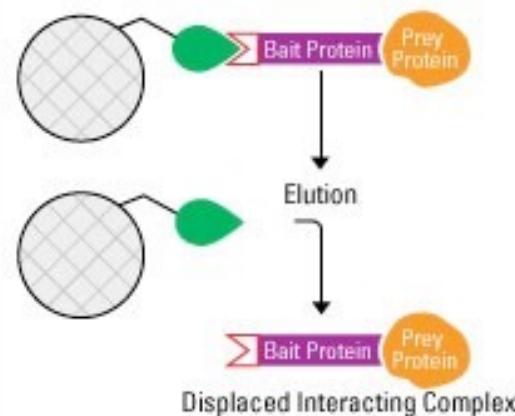
Step 3. Bind "prey" protein to immobilized "bait" protein.



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<sup>2+</sup> Chelate or Streptavidin)

= Fusion Tag (GST, polyHis or Biotin)

# GST-pulldown

Utilizza proteine di fusione con GST (espresso in batteri)

