

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

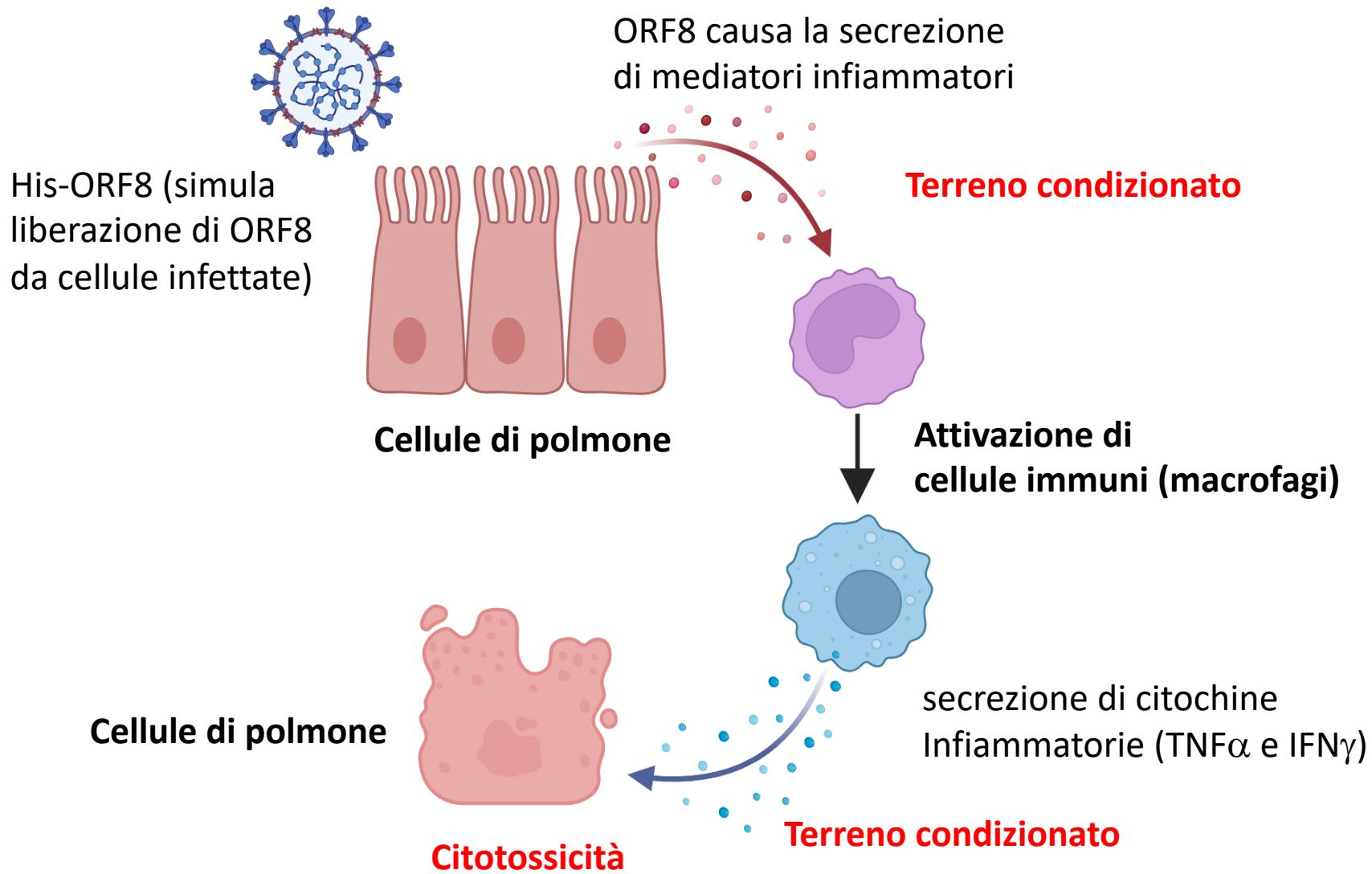
Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 11

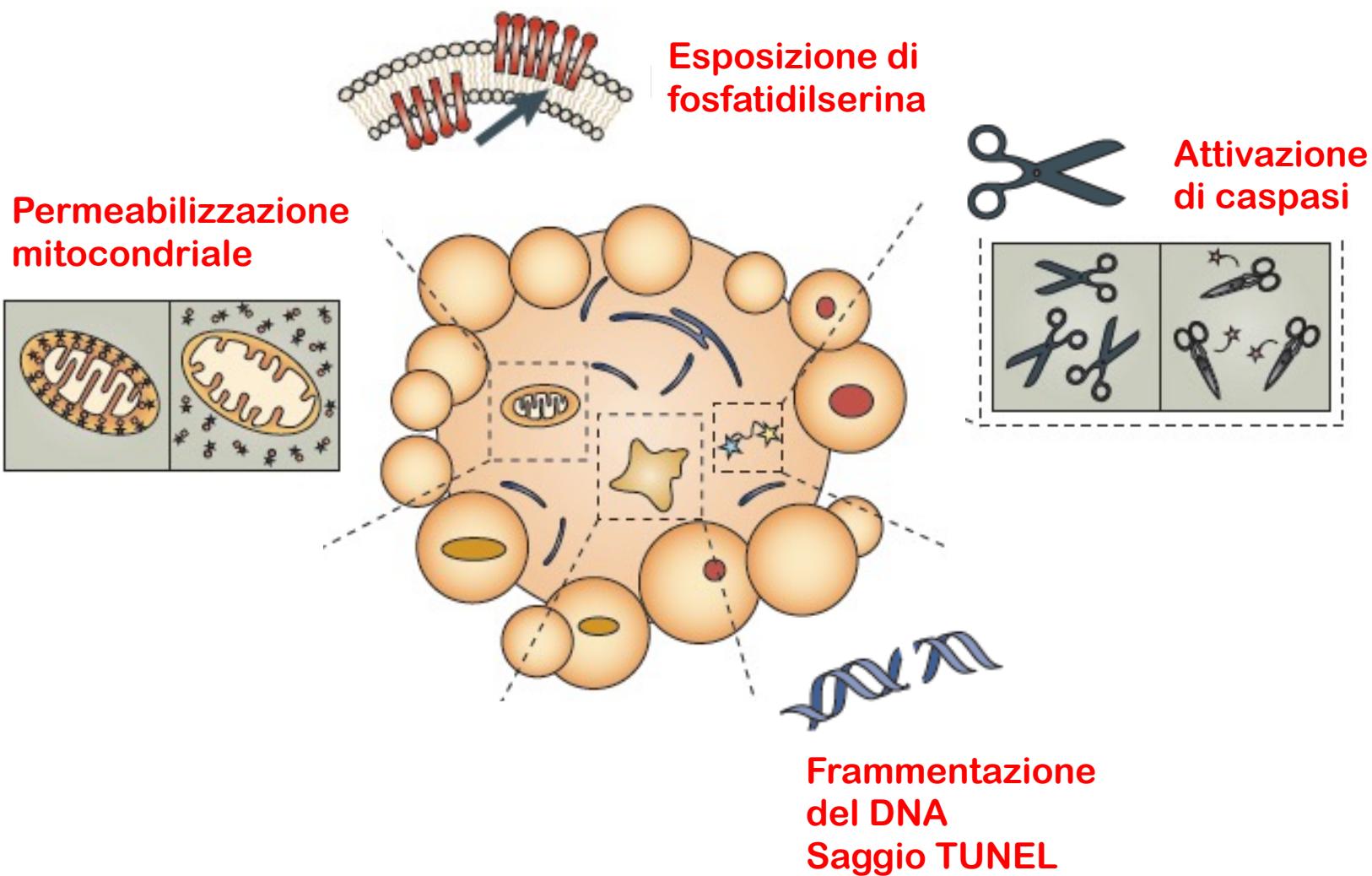
ESPERIMENTO 2:

Verificare la capacità di ORF8 di innescare una reazione infiammatoria con conseguente effetto citotossico a carico di cellule epiteliali di polmone

ESPERIMENTO 2)



APOPTOSI: SAGGI per valutare diversi EVENTI

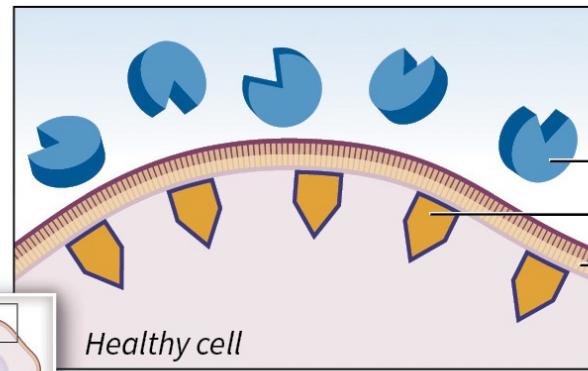


Saggi di esposizione di fosfatidilserina: ANNEXINA V (anche live)

Le cellule apoptotiche espongono **fosfatidilserina (PS)** al foglietto **esterno** della membrana plasmatica. L'**annexina V** lega la PS.

Visualizzazione della PS mediante colorazione delle cellule con **ANNEXINA V** coniugata a un fluorocromo (qui FITC)

1



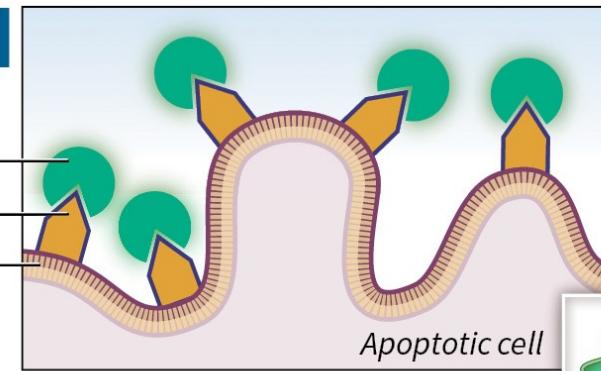
Annexin V Reagent

Phosphatidylserine (PS)

Plasma membrane

IncuCyte™ Annexin V Reagent Added to Media
No fluorescence in the presence of healthy cells that have PS located on the inner surface of the cell membrane.

2

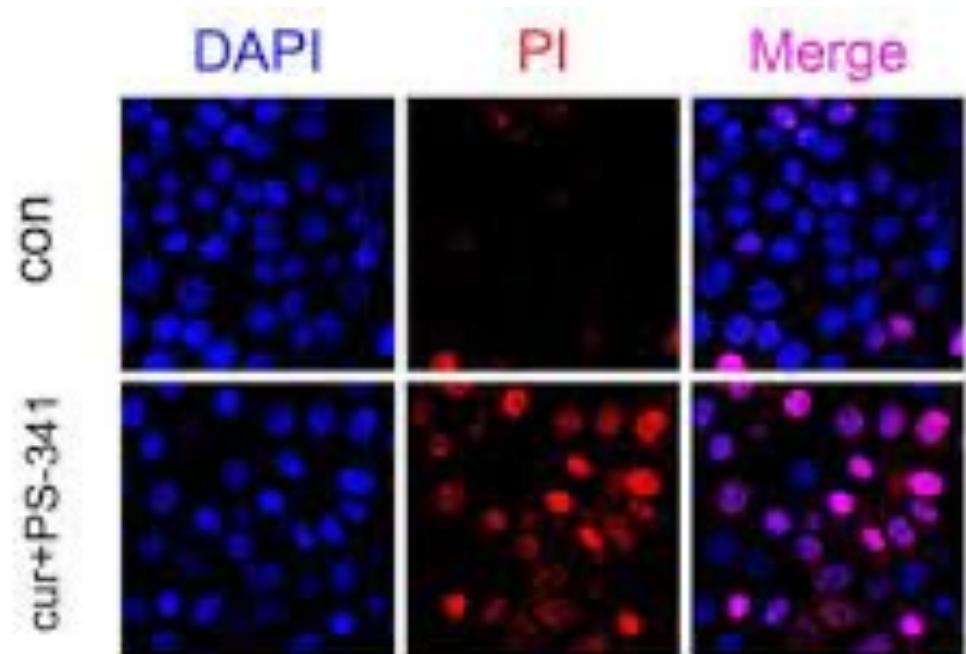
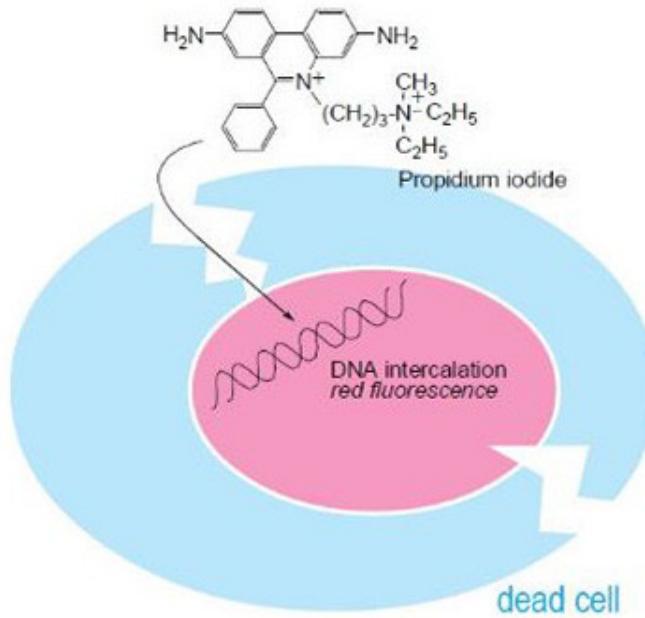


Apoptotic Cell Death and PS Externalization

Exposure of PS on the extracellular surface leads to binding of the Annexin V Reagent and a bright fluorescent signal.

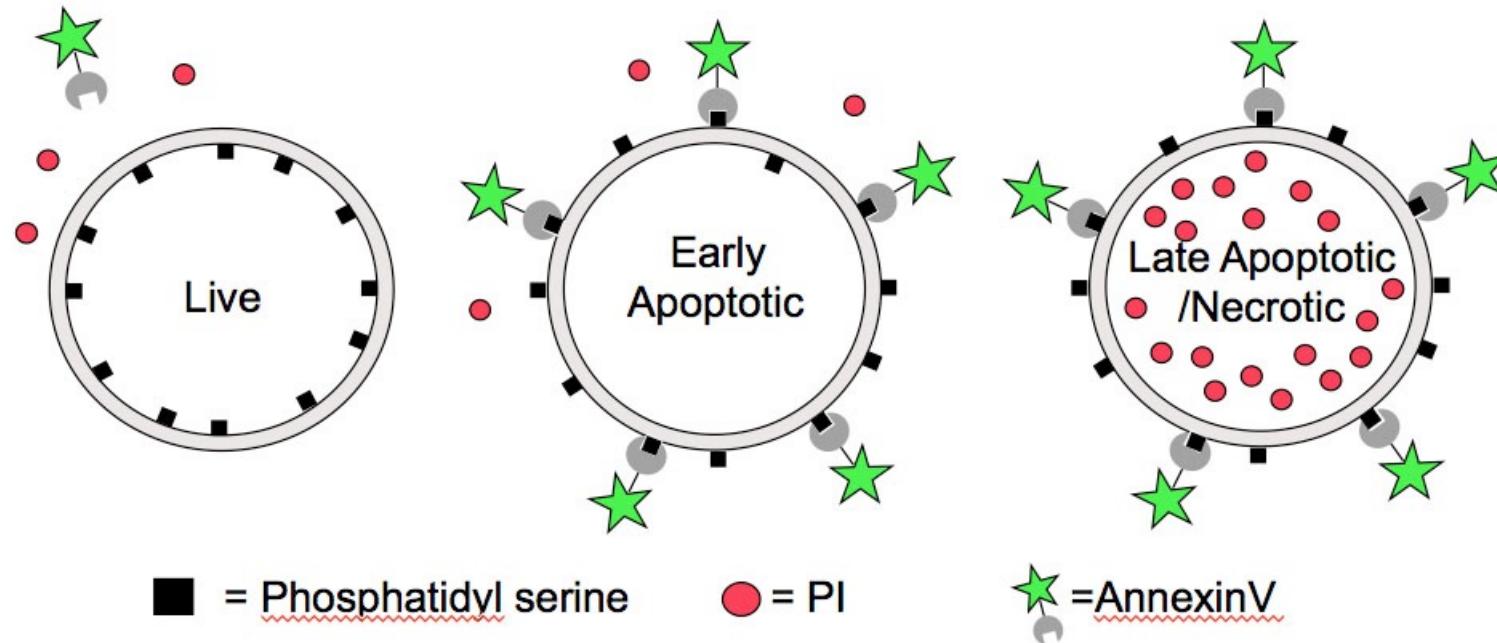
Morte cellulare infiammatoria: perdita dell'integrità di membrana

Propidio ioduro



Il PI può penetrare solo in cellule che hanno perso l'integrità della membrana

Analisi di morte cellulare mediante colorazione con Annexina + Propidio Ioduro



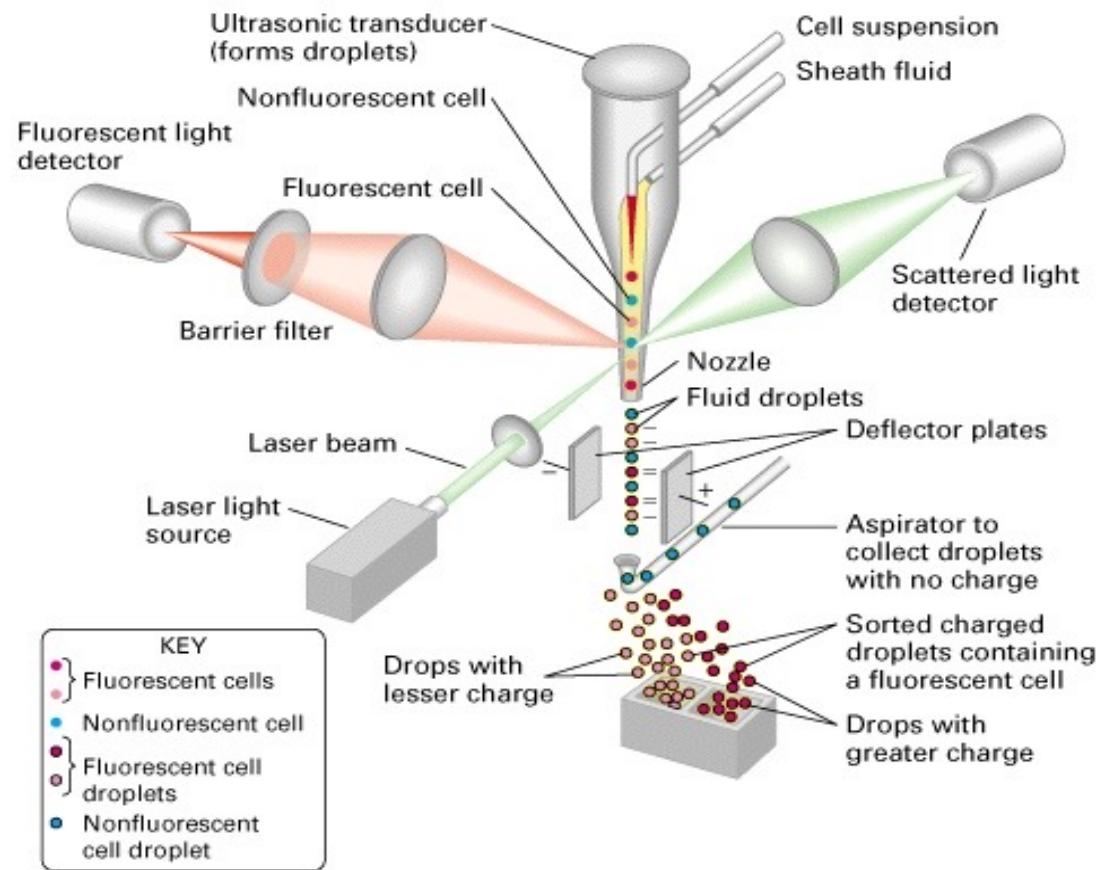
L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di morte infiammatoria:
il colorante può penetrare nella cellula

Saggi cell-based: SCELTA DELLO STRUMENTO

- Microscopia a fluorescenza (live o fixed)
- Citofluorimetria (live o fixed)



CITOFLUORIMETRO:



Il citofluorimetro valuta:

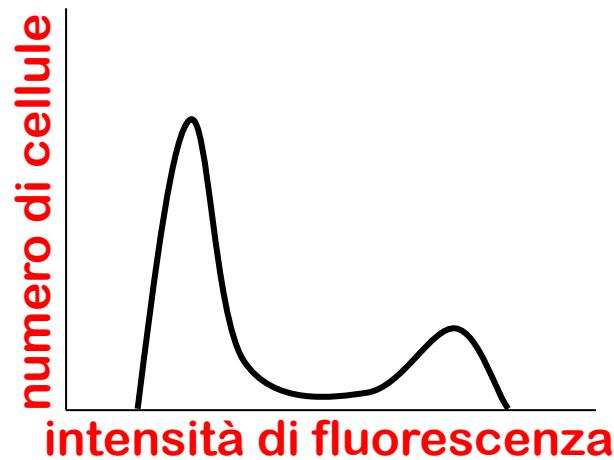
- numero di cellule
- forma cellulare
- intensità di fluorescenza

- Si può effettuare una colorazione con :

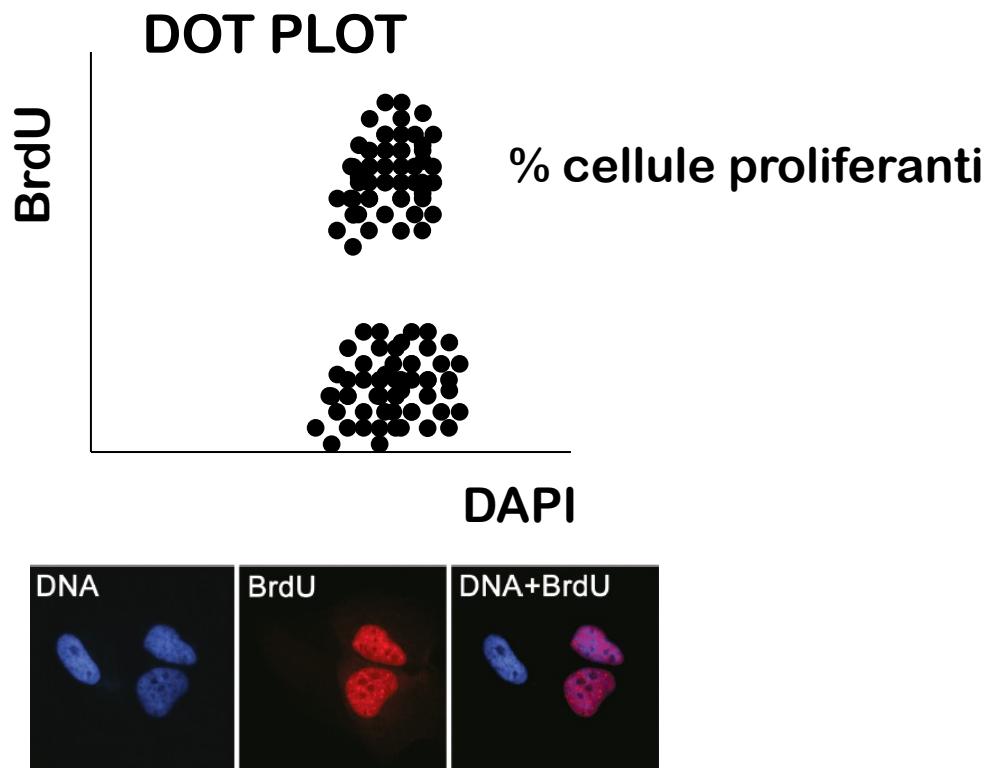
sostanze fluorescenti compresi
intercalanti degli acidi
nucleici e anticorpi

Lo strumento produce diversi tipi di **output**:

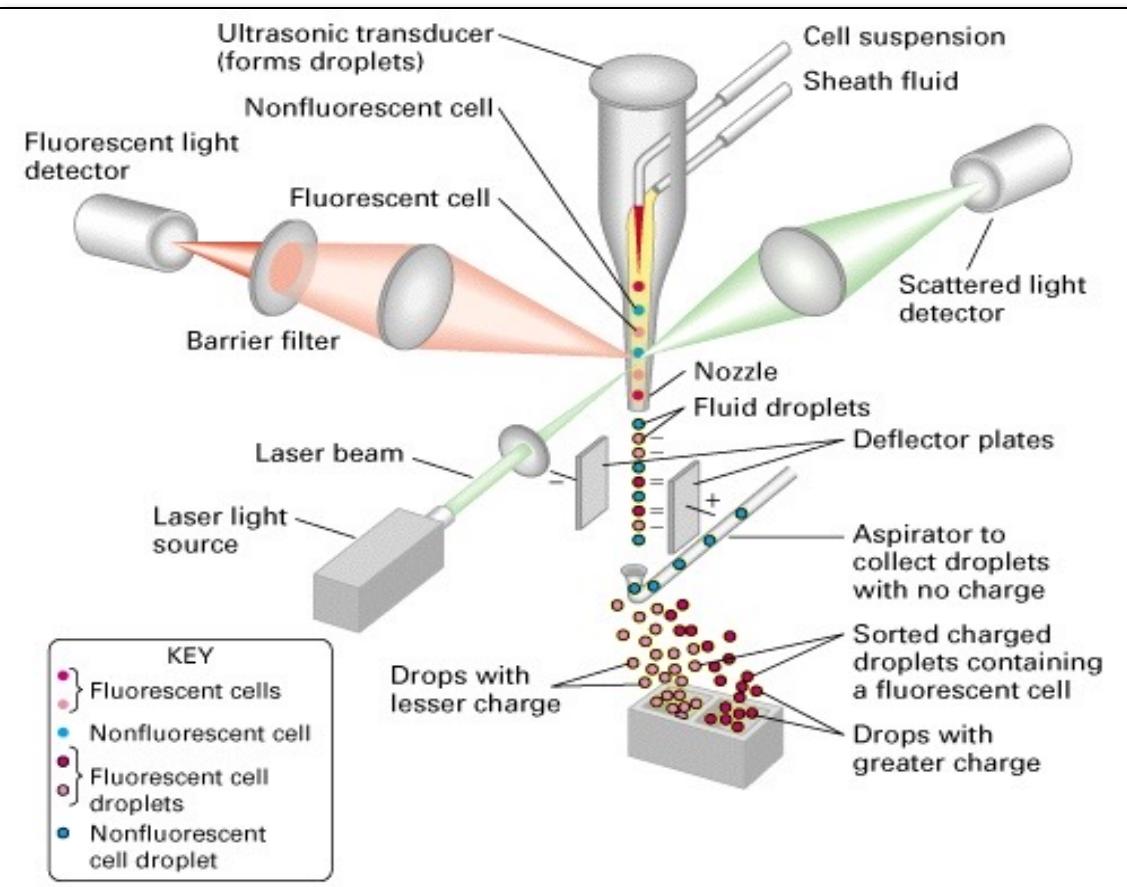
- 1) **istogrammi**, in cui un parametro (es. l'intensità di fluorescenza) è riportato in funzione del numero di cellule



2. **dot plot**, in cui un parametro è riportato in funzione di un altro (es. fluorescenza **rossa** vs fluorescenza **verde**) e ogni dot rappresenta una cellula



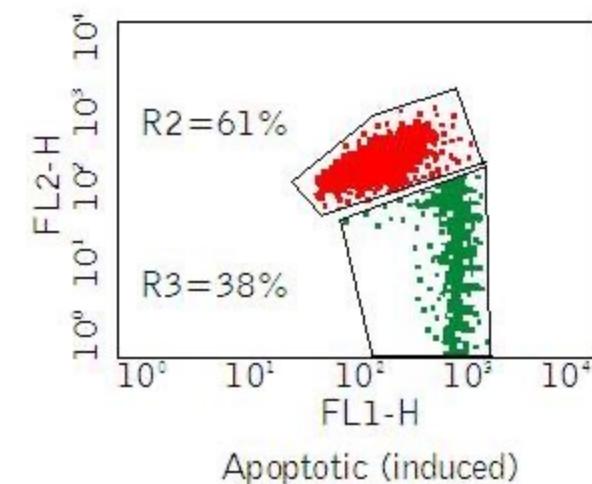
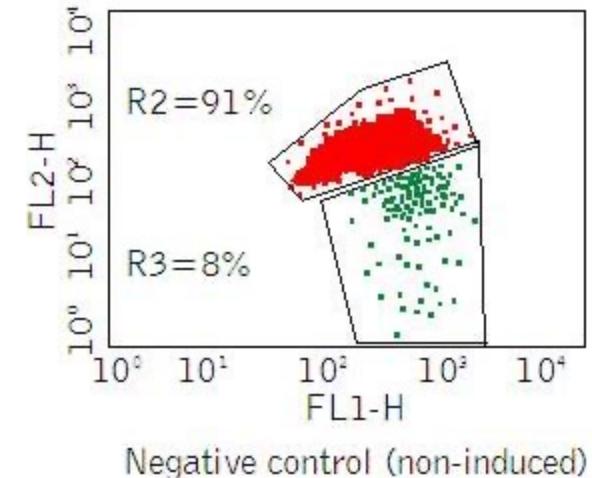
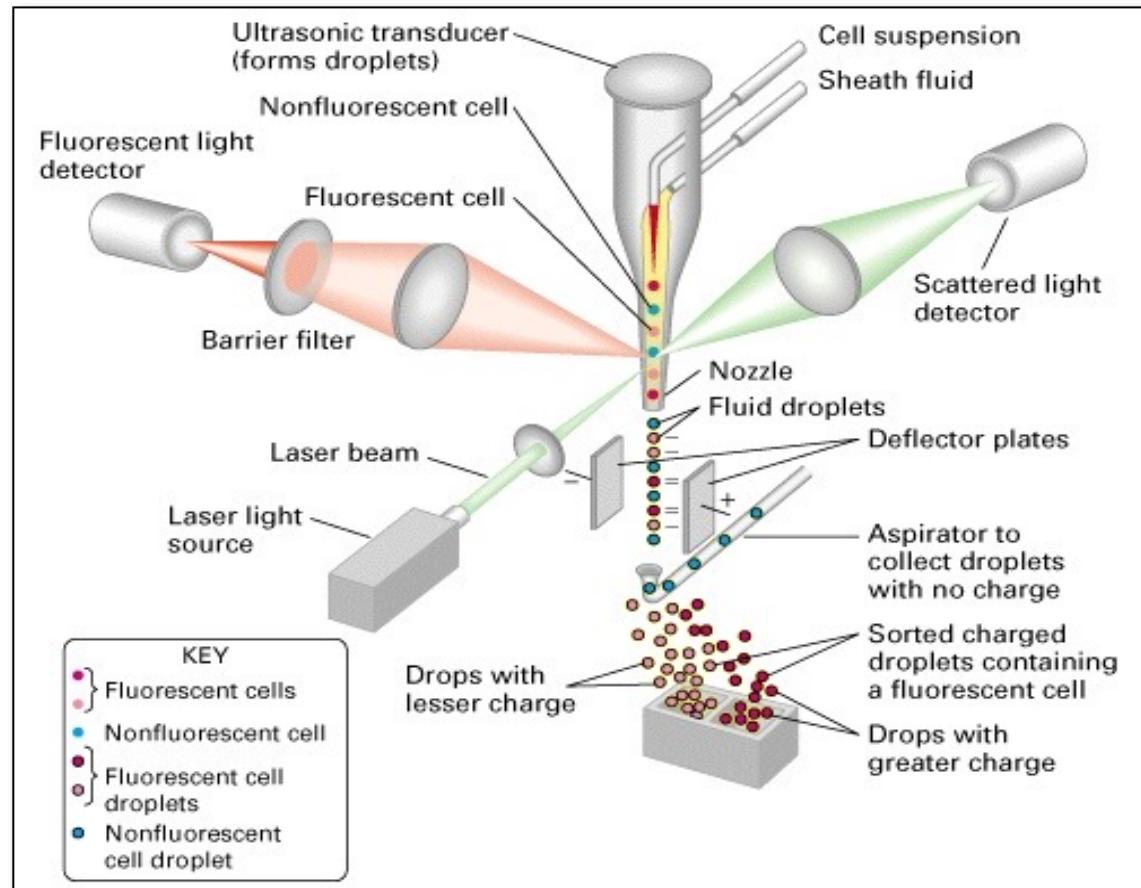
Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



- Si può effettuare una colorazione con :
 1. sostanze fluorescenti (es. Annexina V/PI, JC1)
 2. substrati fluorescenti per le caspasi
 3. Nucleotidi per saggio TUNEL

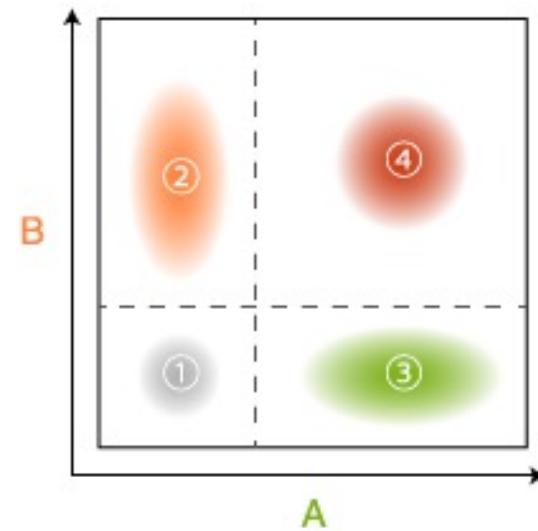
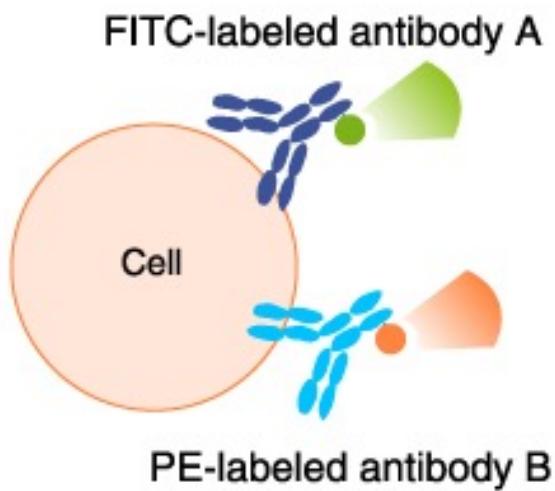
Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

Esempio di colorazione con colorante mitocondriale JC1 e conta delle cellule rosse/verdi



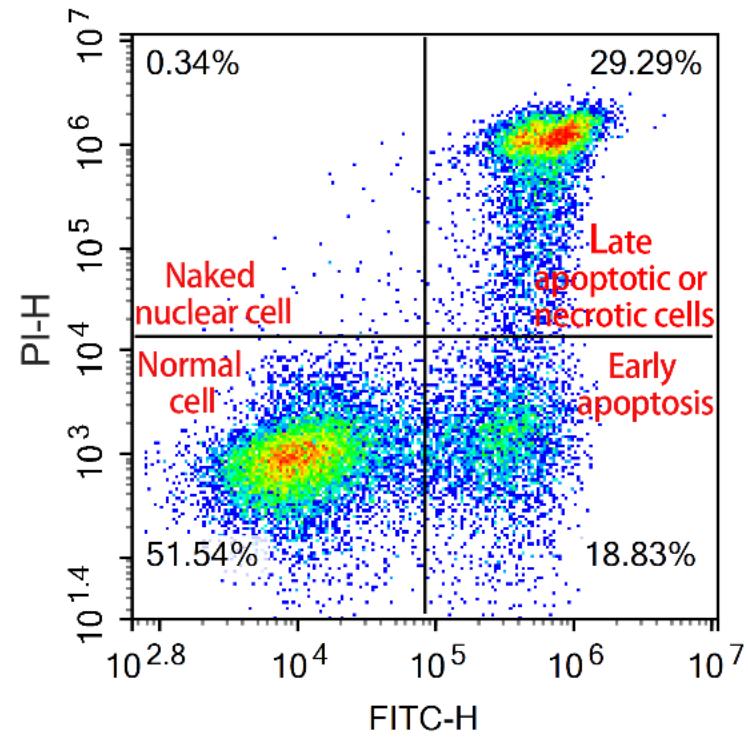
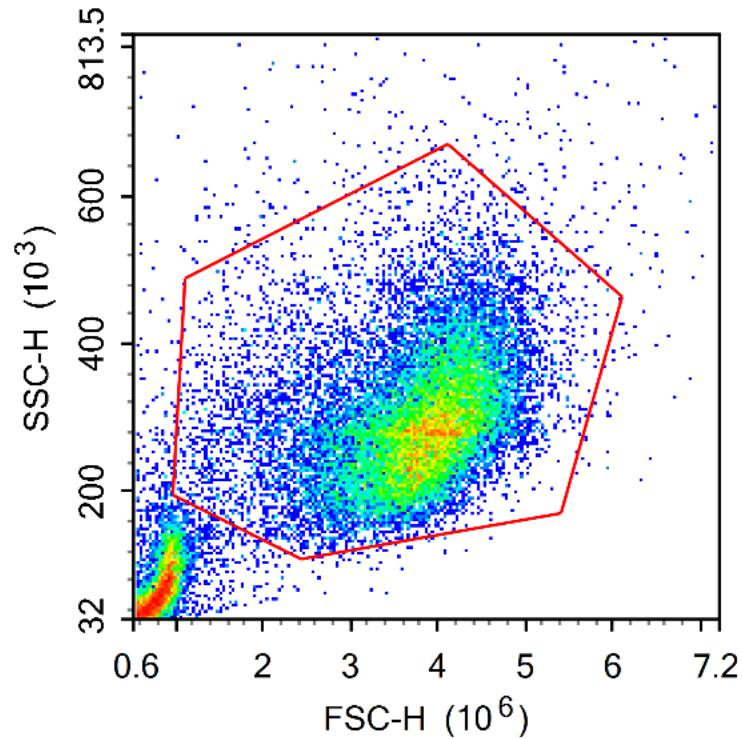
ANALISI MULTIPARAMETRICHE

di popolazioni cellulari eterogenee



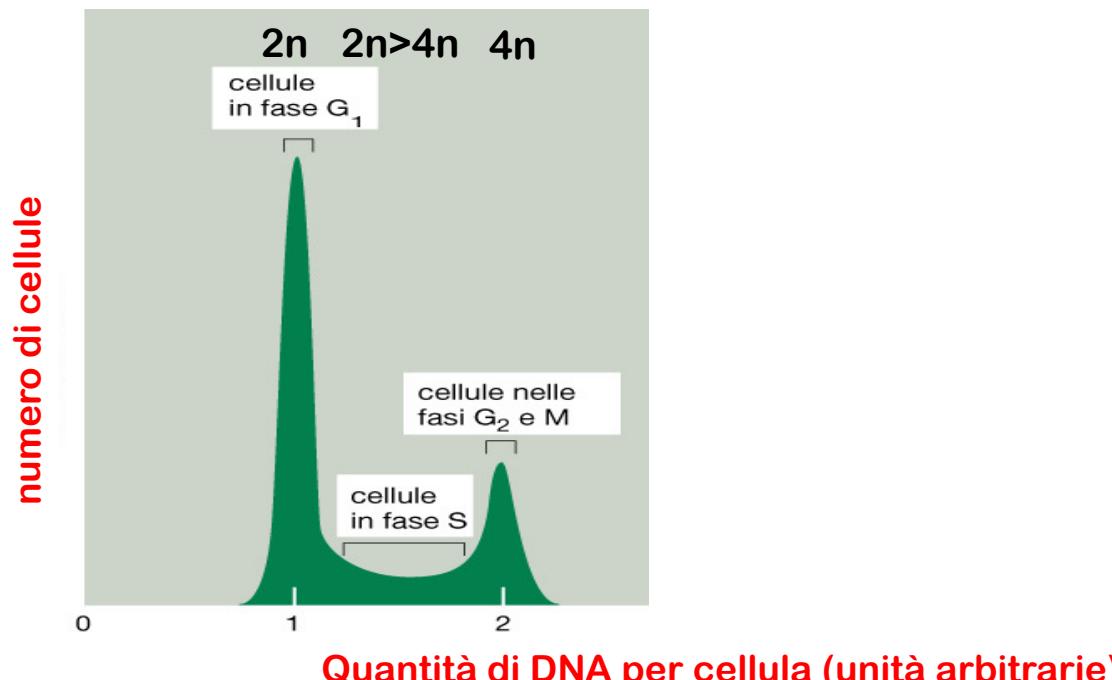
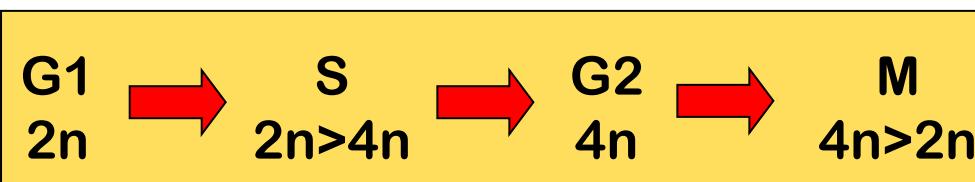
- 1) Cells not expressing either A or B
- 2) Cells expressing only B
- 3) Cells expressing only A
- 4) Cells expressing both A and B

Analisi multiparametriche: saggi annexin V /PI



ANALISI del CICLO CELLULARE al CITOFLUORIMETRO

Il CONTENUTO di DNA di ciascuna cellula varia durante la progressione del ciclo cellulare: mediante citofluorimetria è possibile analizzare singole cellule di una popolazione valutandone il contenuto di DNA



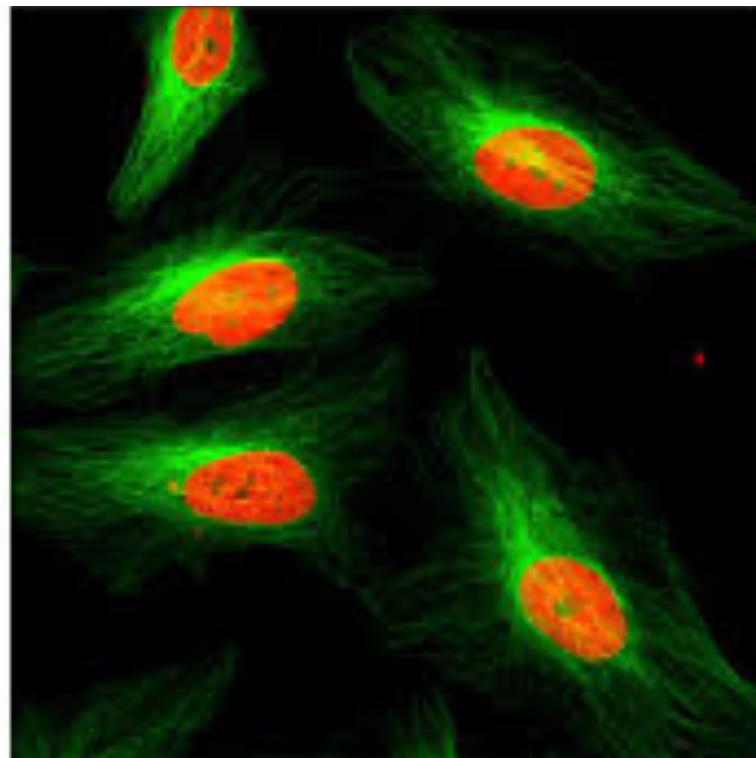
G0/G1 S G2/M

2n 2n>4n 4n>2n

COME POSSIAMO MISURARE IL CONTENUTO DI DNA?

Si fissano e permeabilizzano le cellule e quindi si incubano con **propidio ioduro** (intercalante del DNA).

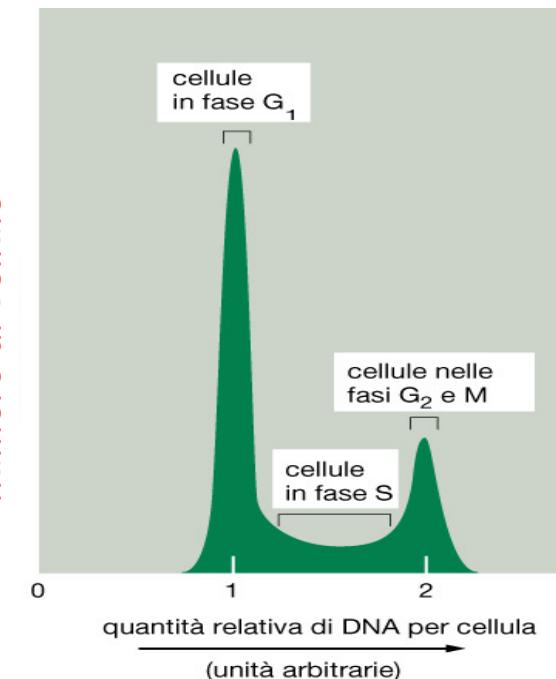
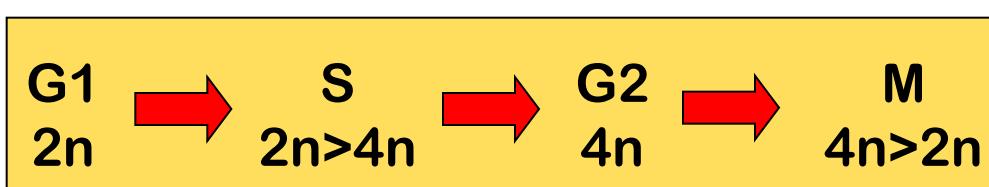
L'intensità di fluorescenza emessa da una singola cellula è direttamente proporzionale al suo contenuto di DNA.



ANALISI del CICLO CELLULARE ai CITOFLUORIMETRO: ANALISI del CONTENUTO DI DNA CELLULARE

Le cellule vengono tripsinizzate, risospese, permeabilizzate e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (**fluorescenza rossa**):

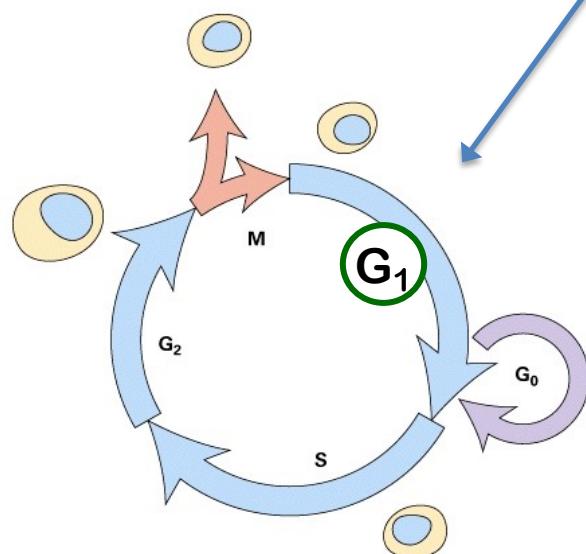
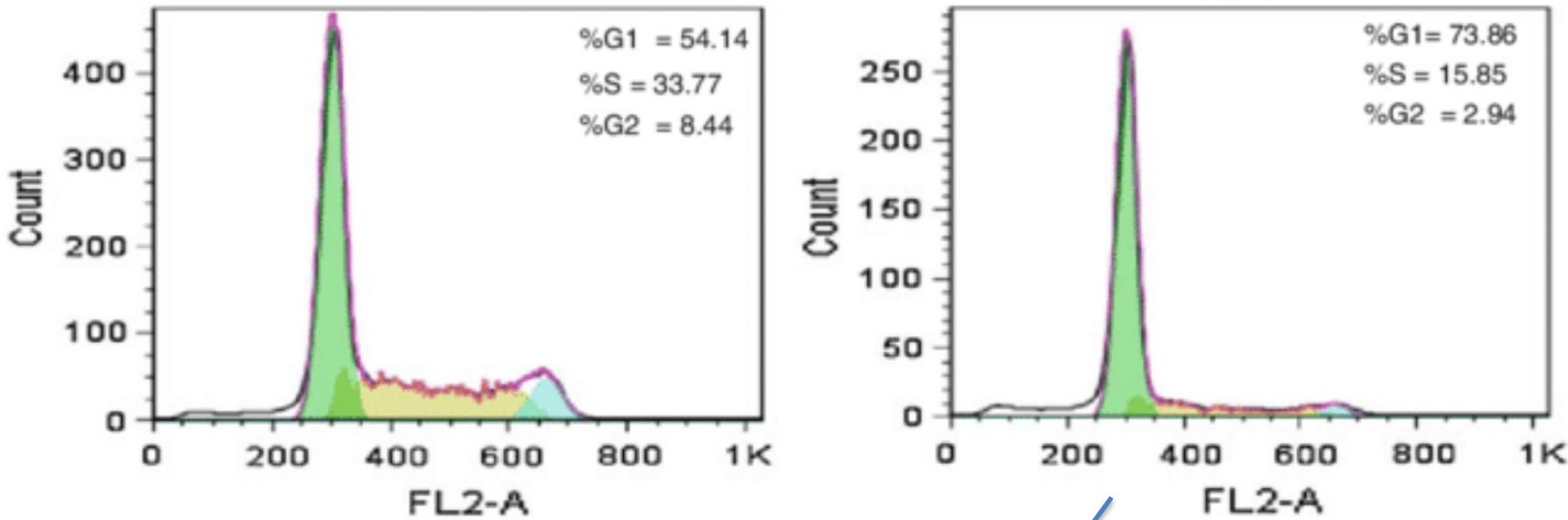
in ciascuna cellula **l'intensità** di fluorescenza è proporzionale alla **quantità** di DNA



G0/G1 S G2/M
 $2n$ $2n > 4n$ $4n > 2n$

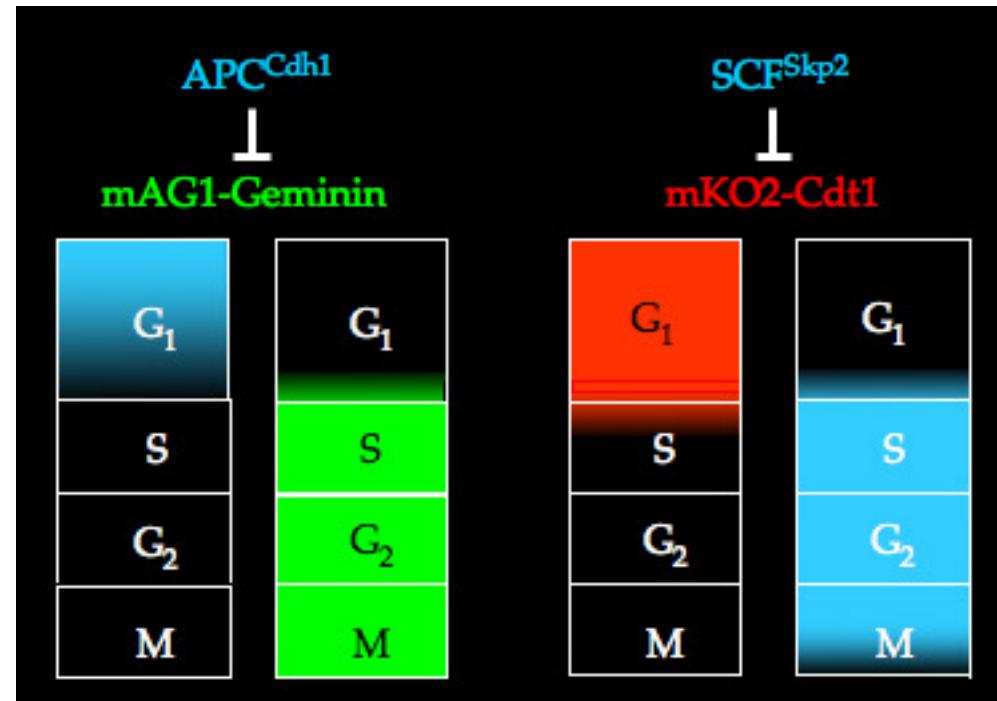
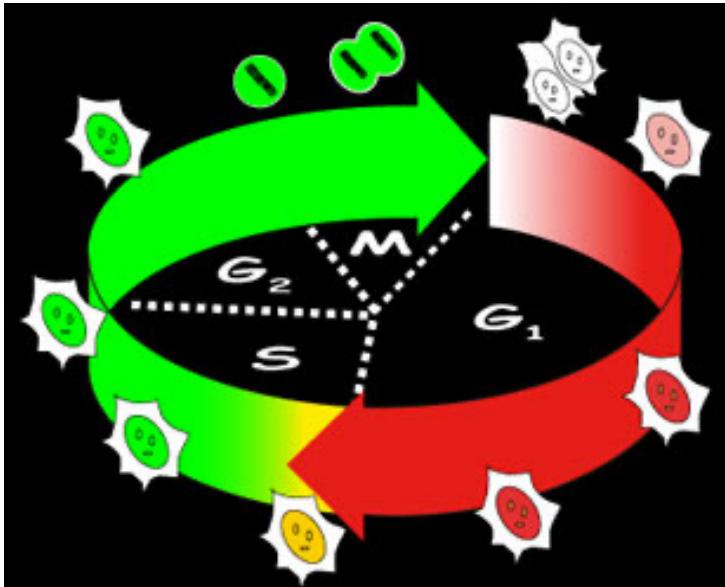
intensità di fluorescenza

Es. ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN COLTURA



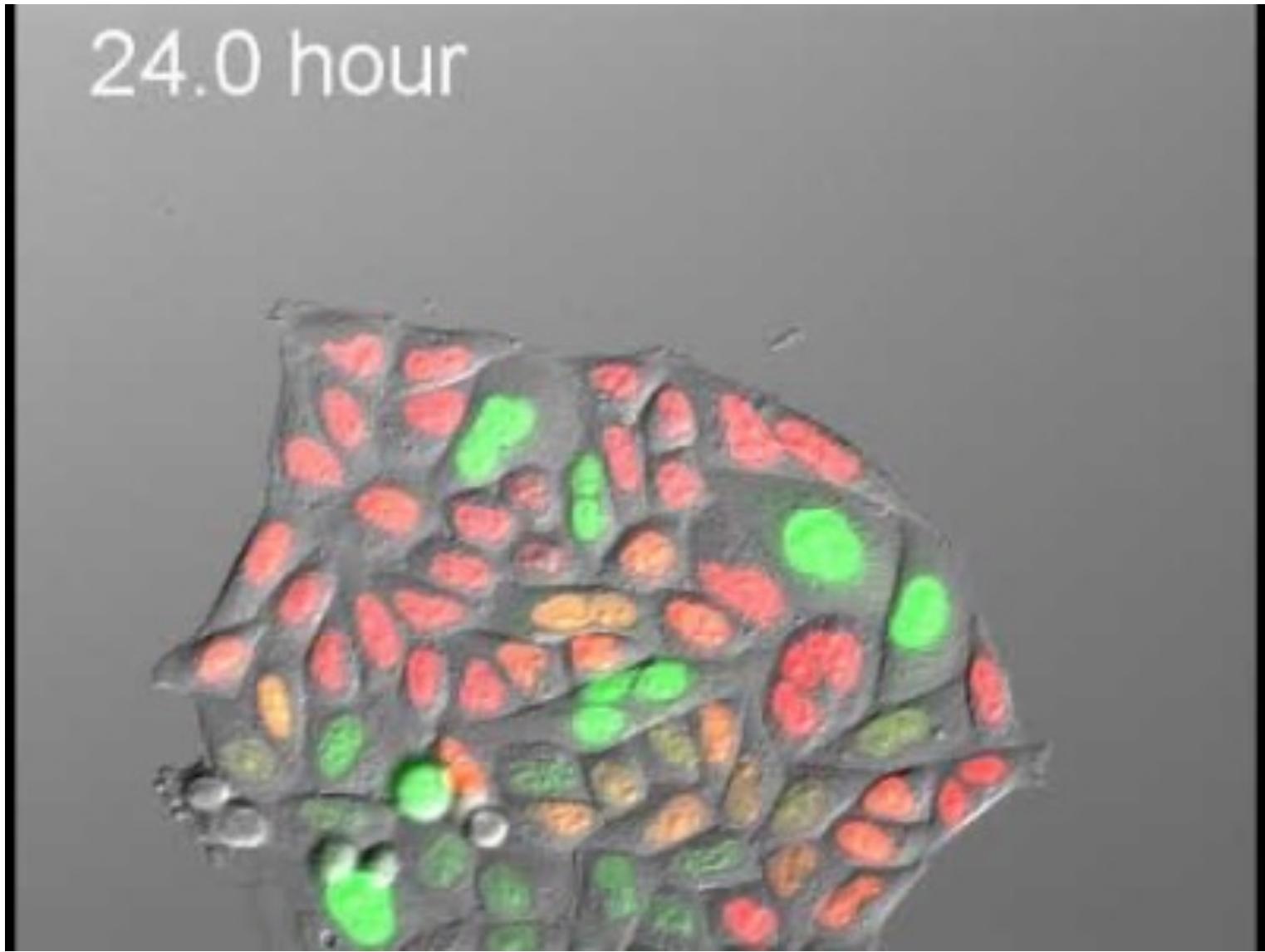
Analisi REALTIME del ciclo cellulare – Sistema FUCCI

FUCCI: Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator

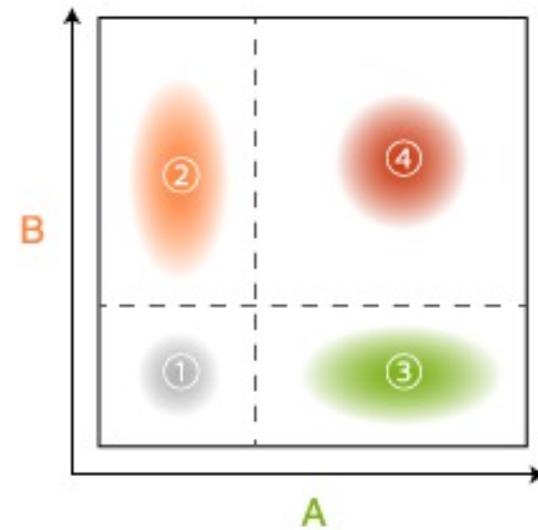
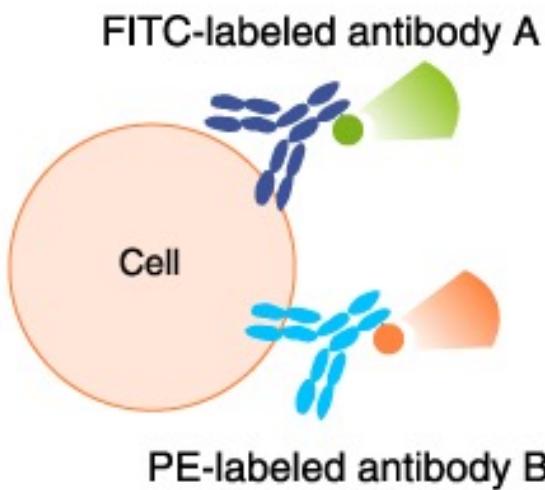


Cdt1: DNA replication licensing factor
Geminin: inhibitor of Cdt1

<https://www.youtube.com/watch?v=3BrXQq4qDq8>



ANALISI MULTIPARAMETRICHE: IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE



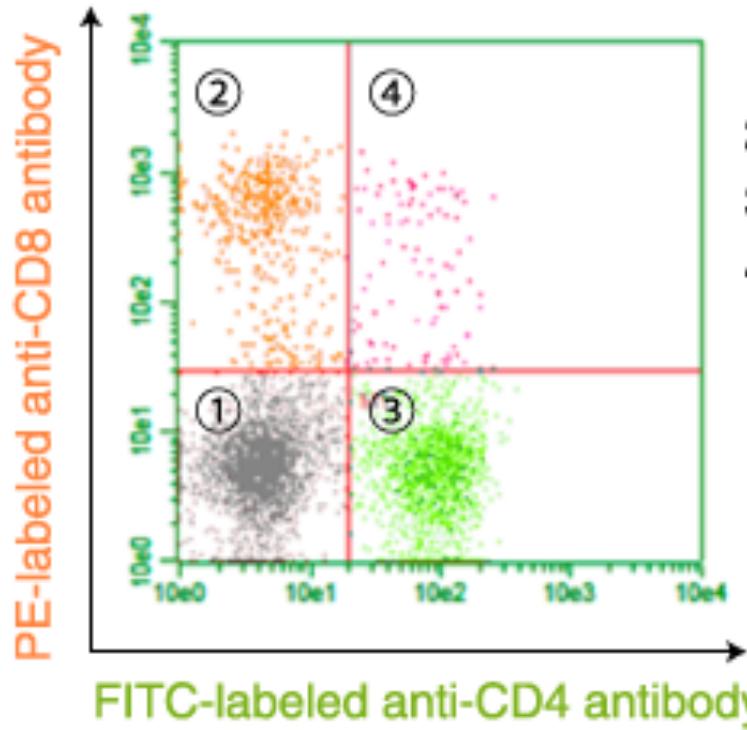
PE-labeled anti-CD8 antibody

FITC-labeled anti-CD4 antibody

Esempio: immunofenotipizzazione di popolazioni linfocitarie

PE-labeled anti-CD8 antibody

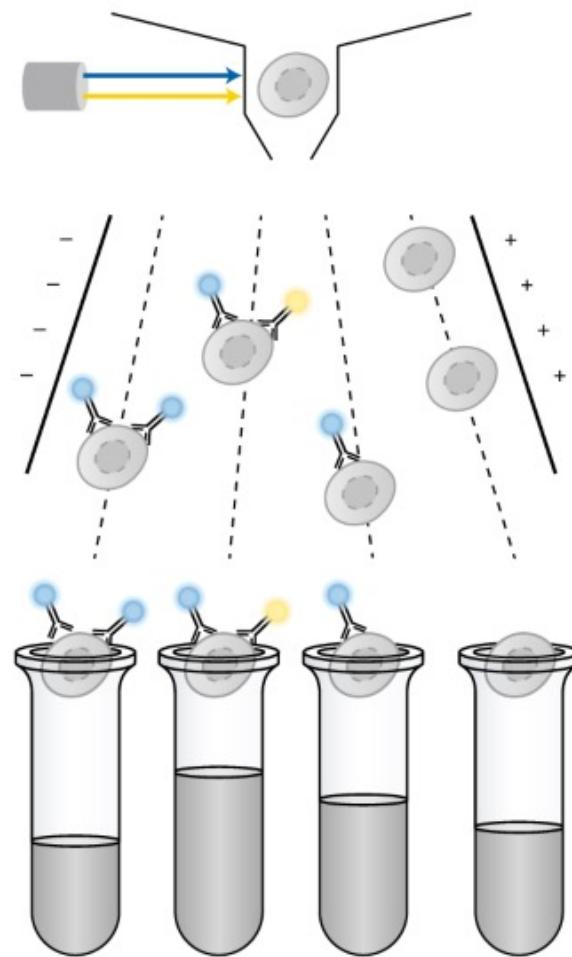
FITC-labeled anti-CD4 antibody



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

FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER – FACS

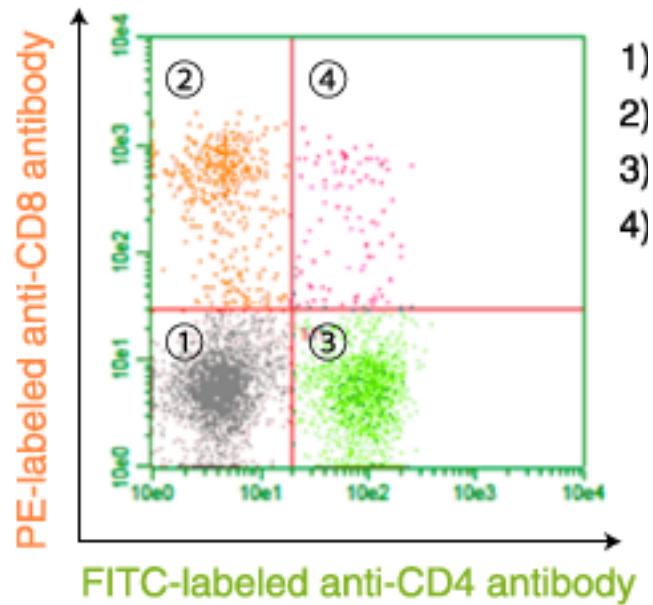
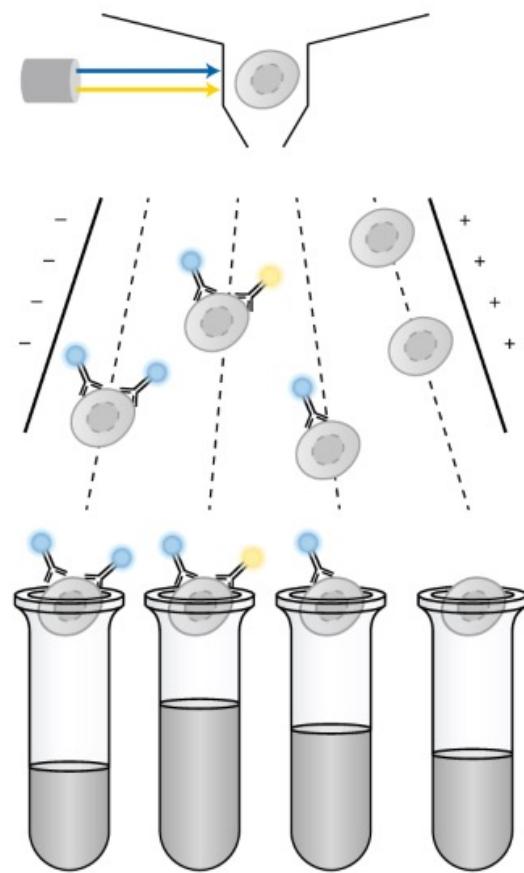
**per l' immunopurificazione di popolazioni cellulari
mediante anticorpi specifici per antigeni di superficie.**

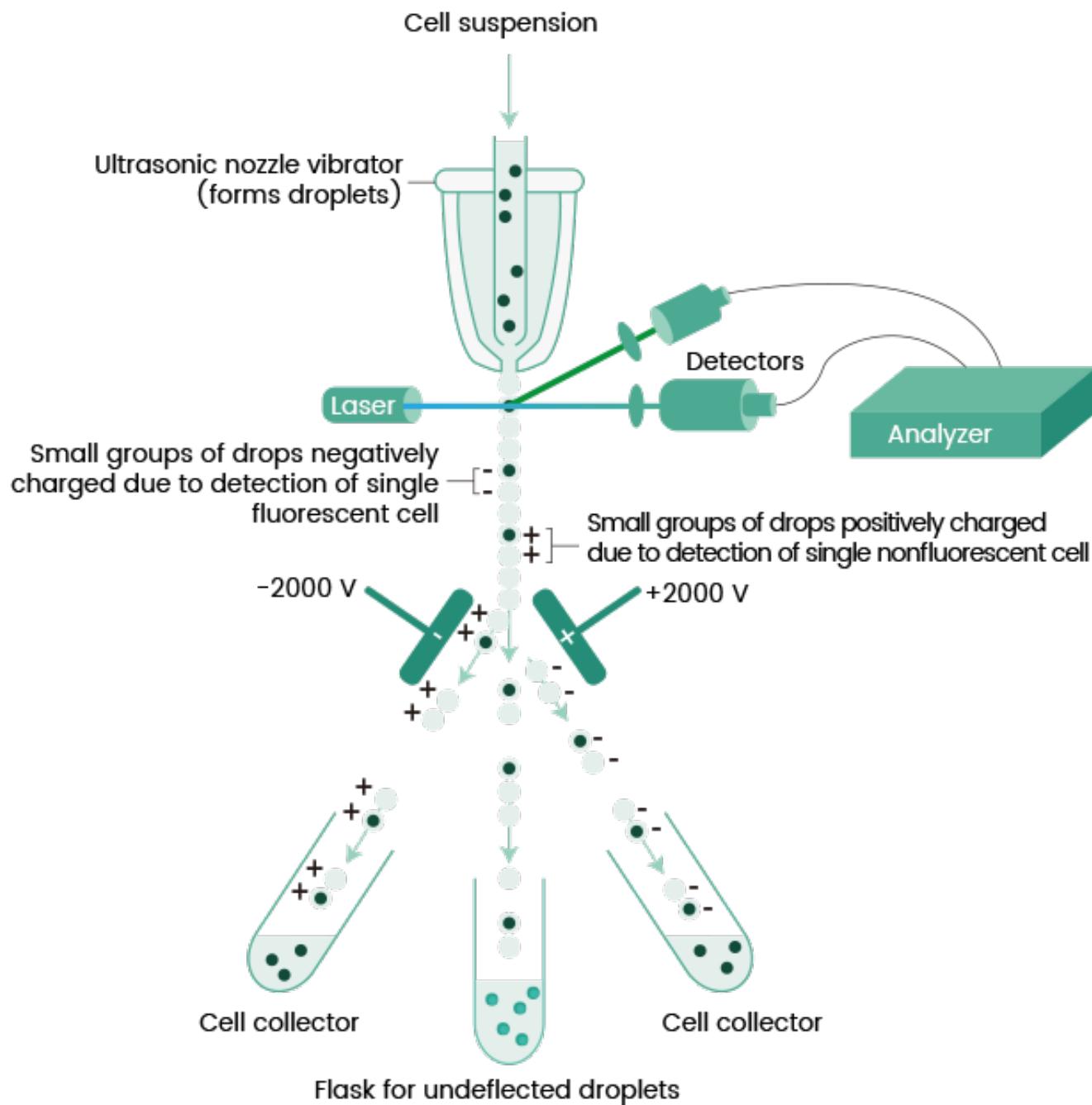


Popolazione cellulare eterogenea



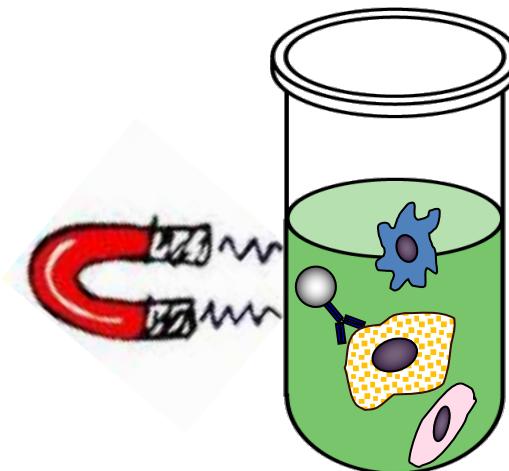
Marcatura con anticorpi per
antigeni di membrana



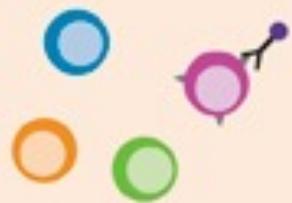


Alternativa: immunopurificazione magnetica

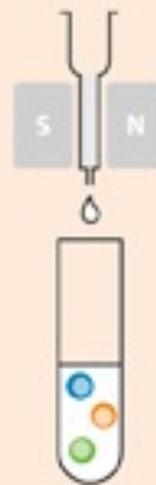
Uso di anticorpi specifici per antigeni di superficie coniugati a microbeads magnetiche.



Magnetic labeling



Magnetic separation



Elution of the labeled cells

