

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

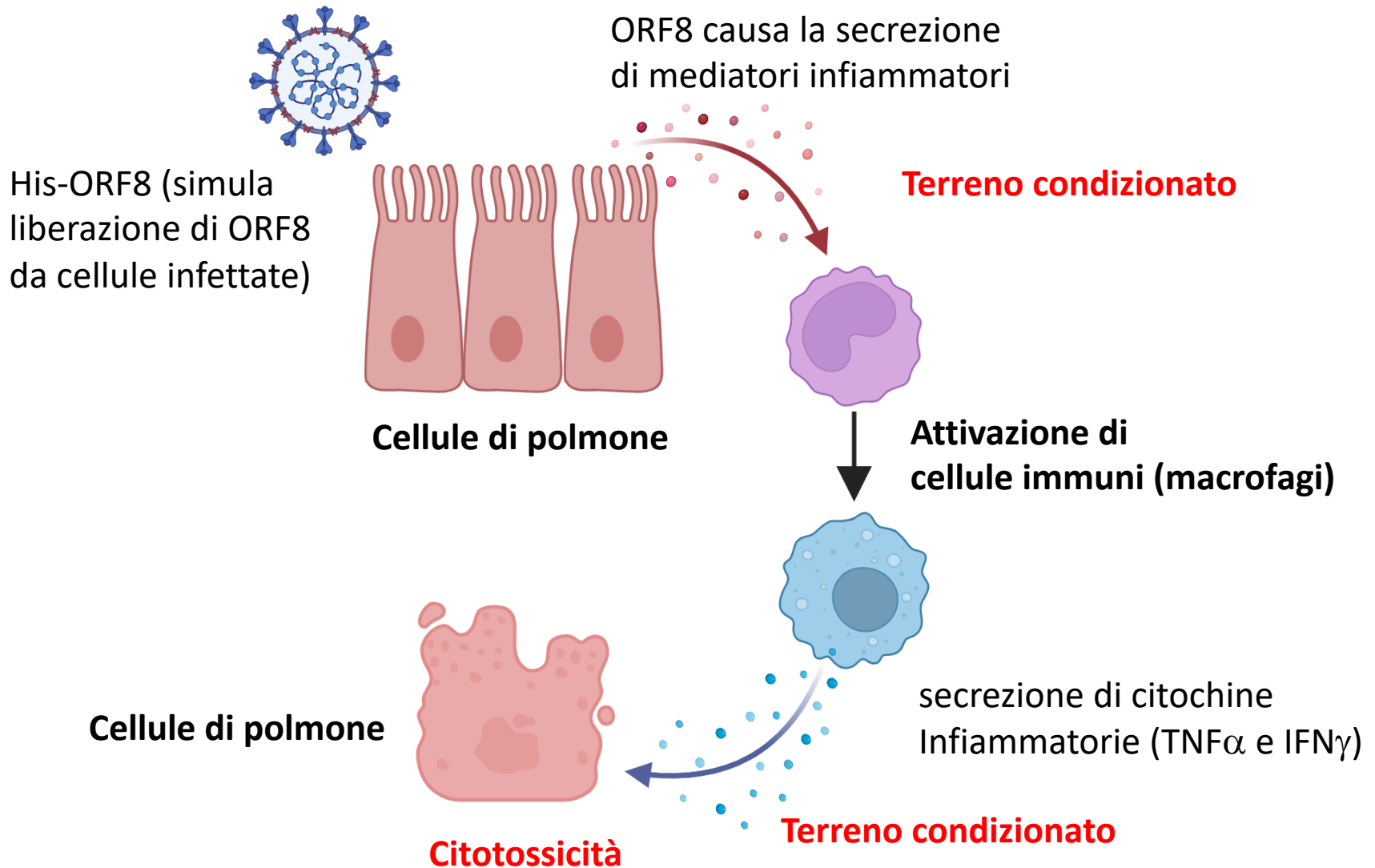
Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 11

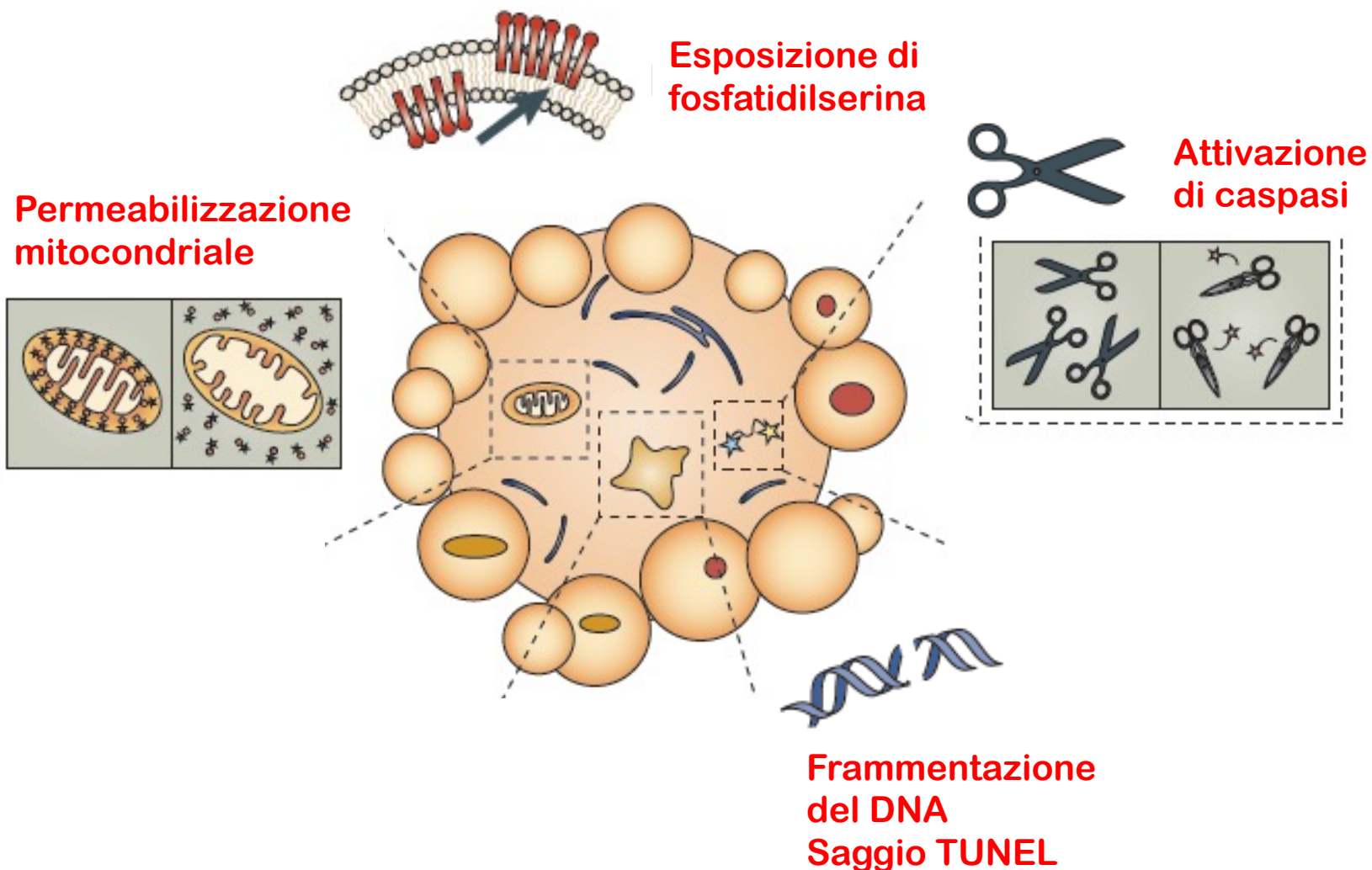
ESPERIMENTO 2:

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

ESPERIMENTO 2)



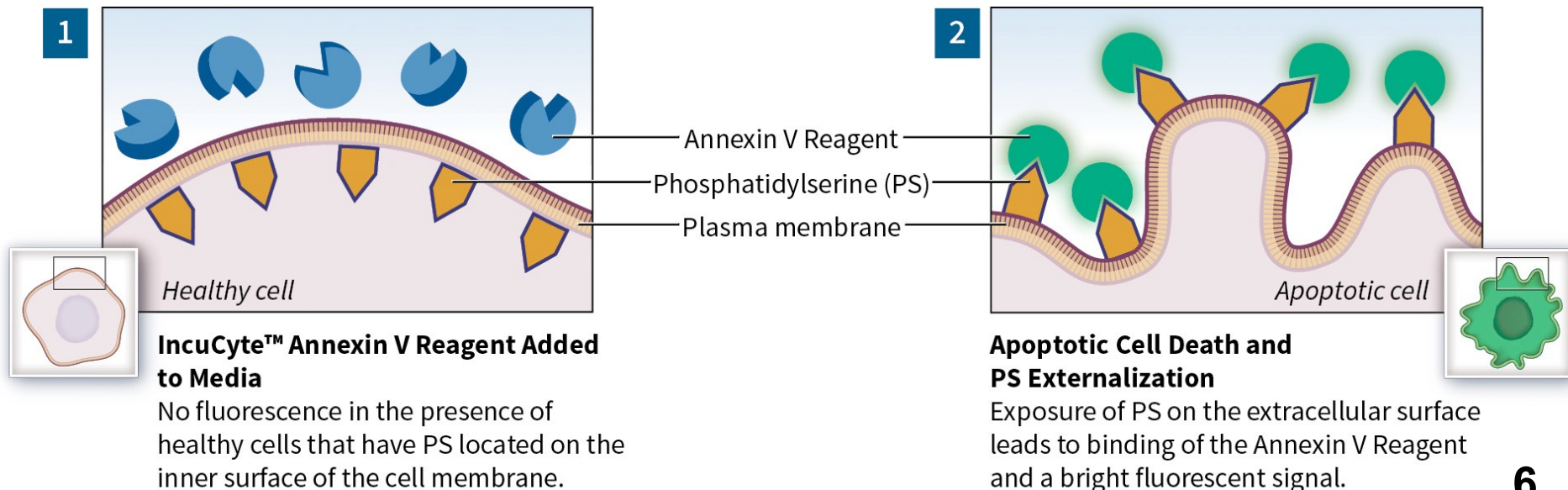
APOPTOSI: SAGGI per valutare diversi EVENTI



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

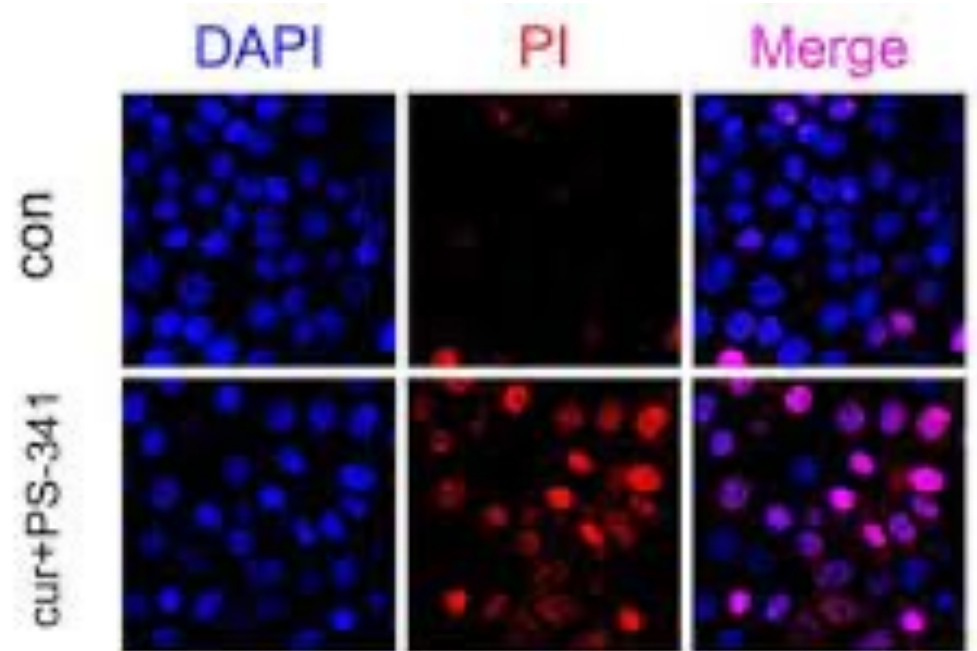
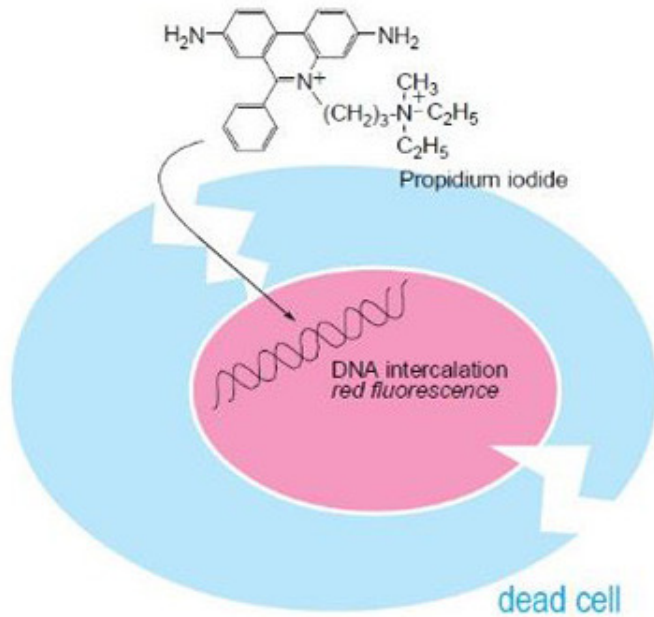
Le cellule apoptotiche espongono **fosfatidilserina** (PS) al foglietto **esterno** della membrana plasmatica. L'**annexina V** lega la PS.

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



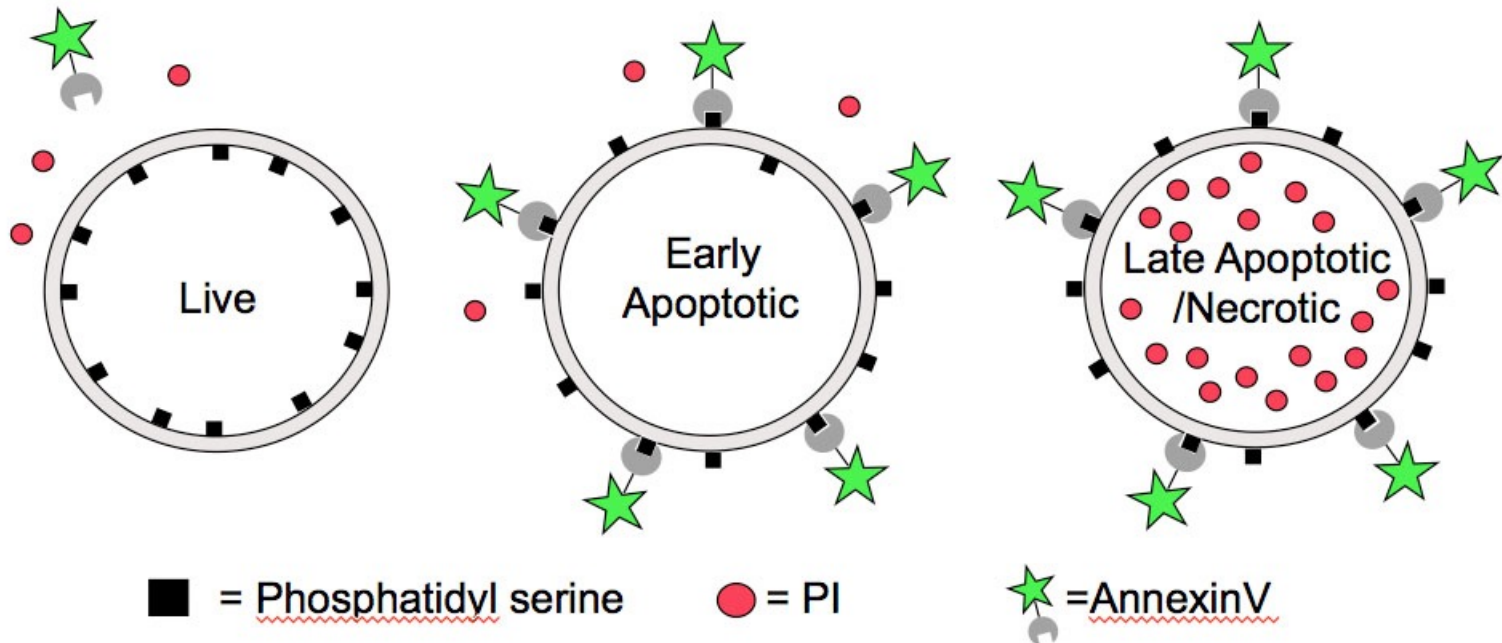
Morte cellulare infiammatoria: perdita dell'integrità di membrana

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



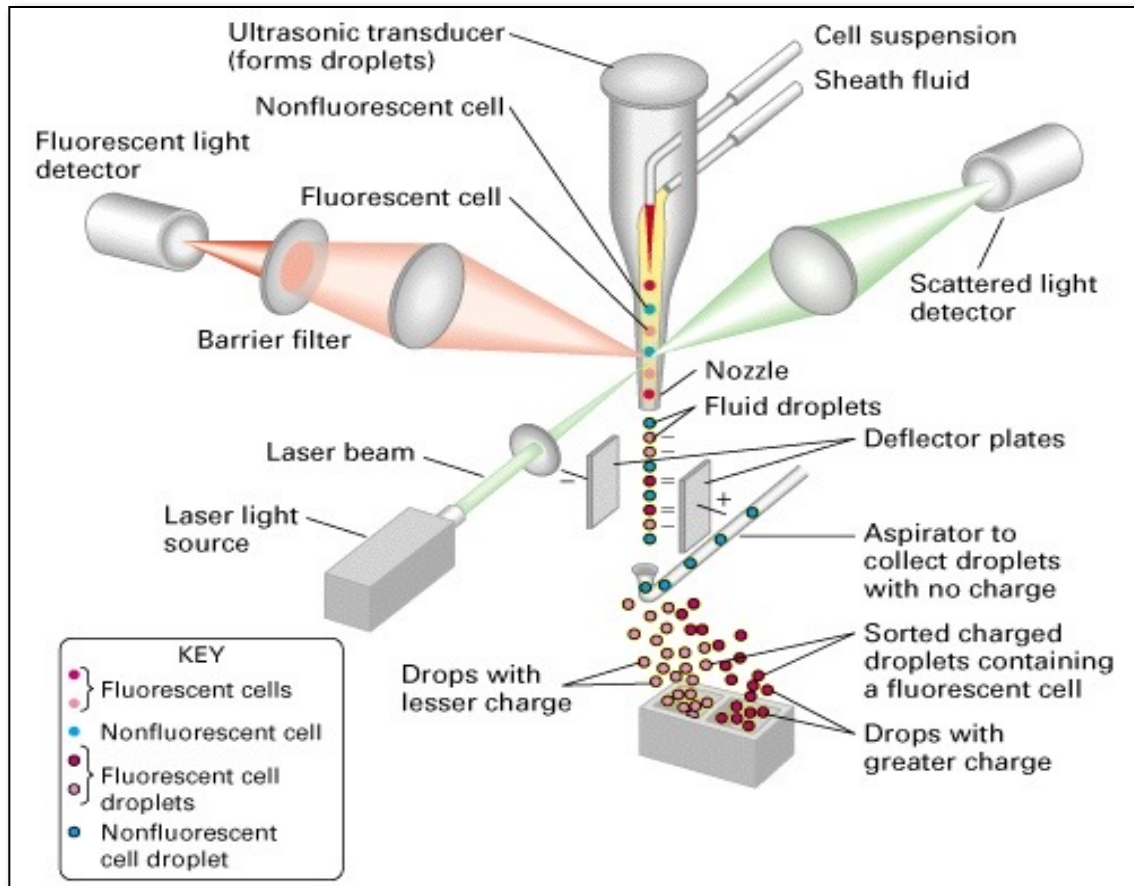
L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di morte infiammatoria: il colorante può penetrare nella cellula

Saggi cell-based: SCELTA DELLO STRUMENTO

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



CITOFUORIMETRO:



Il citofluorimetro valuta:

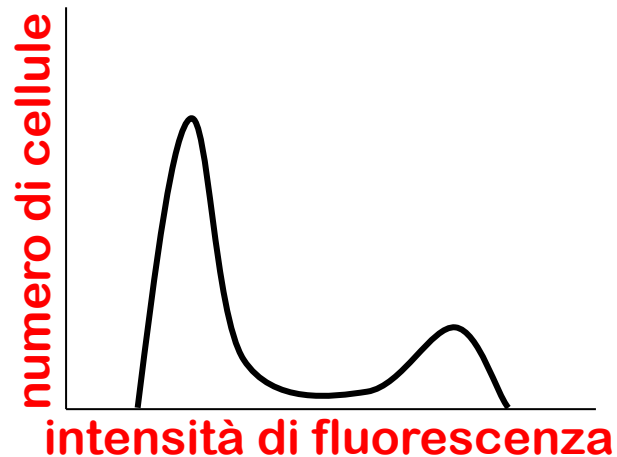
- numero di cellule
- forma cellulare
- intensità di fluorescenza

■ Si può effettuare una colorazione con :

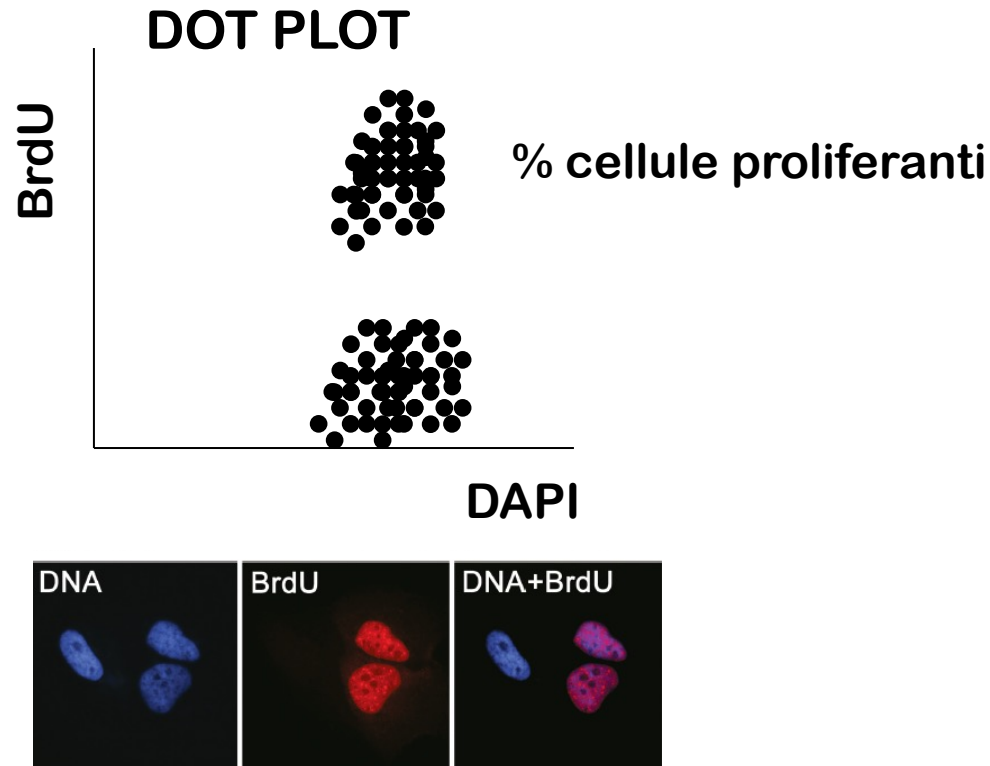
sostanze fluorescenti compresi intercalanti degli acidi nucleici e anticorpi

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

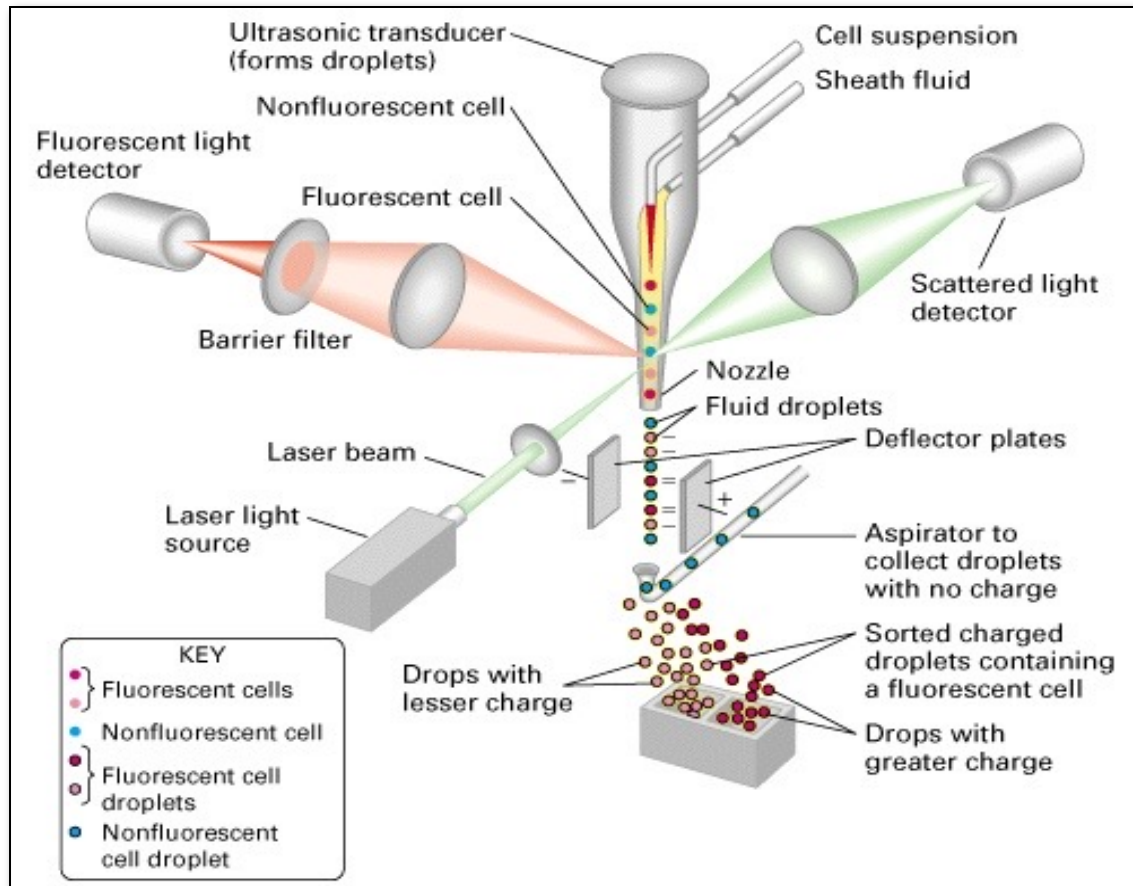
- 1) **istogrammi**, in cui un parametro (es. l'intensità di fluorescenza) è riportato in funzione del numero di cellule



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



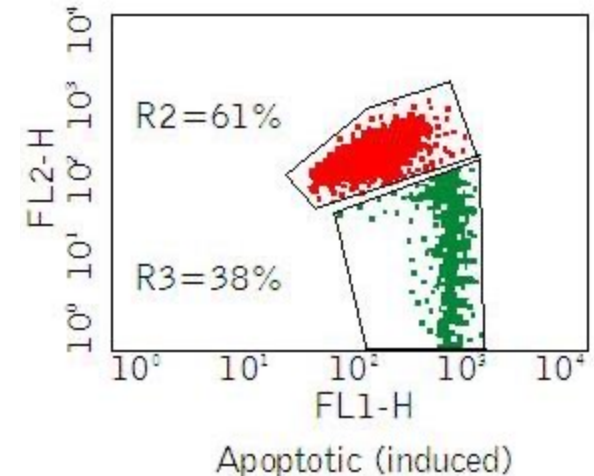
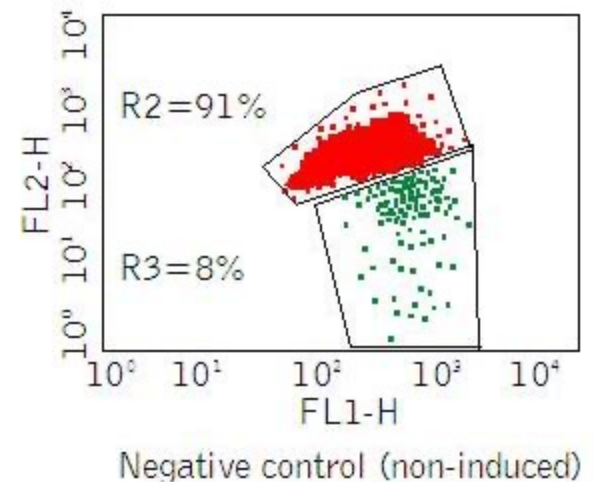
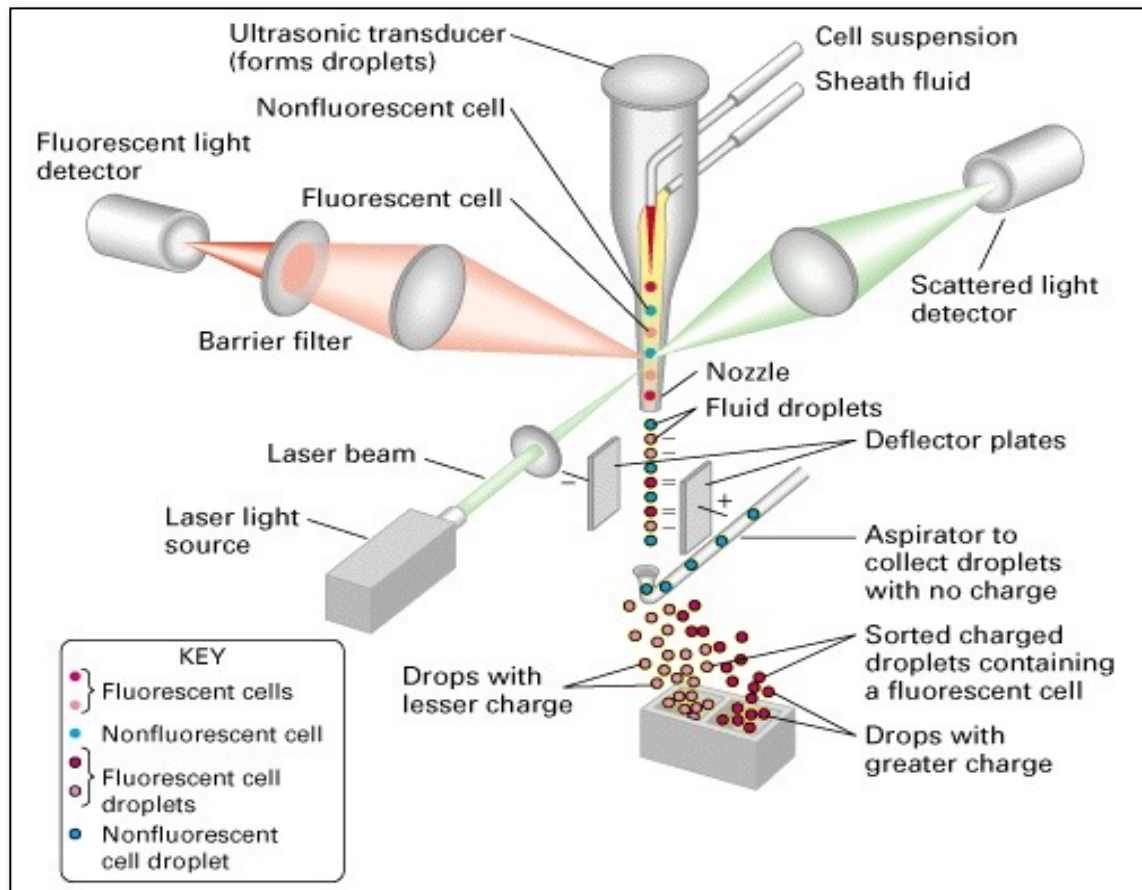
Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



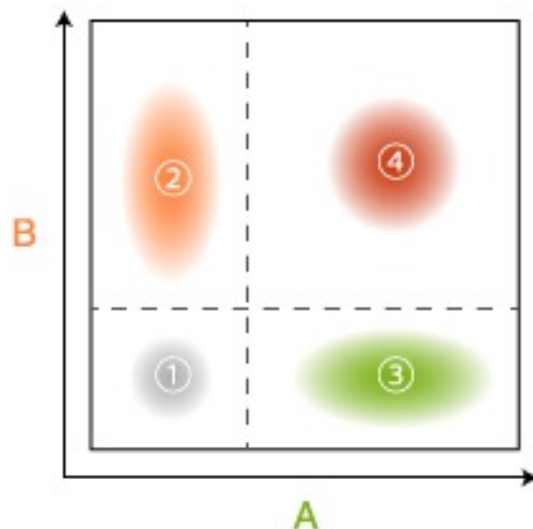
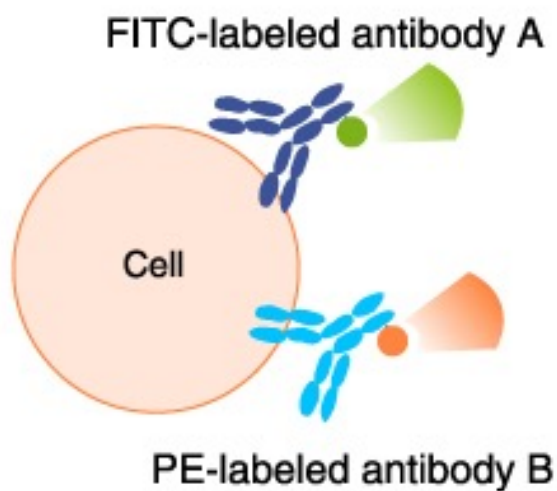
- Si può effettuare una colorazione con :
 1. sostanze fluorescenti (es. Annexina V/PI, JC1)
 2. substrati fluorescenti per le caspasi
 3. Nucleotidi per saggio TUNEL

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

Es colorazione con colorante mitocondriale **JC1** e conta delle cellule rosse/verdi

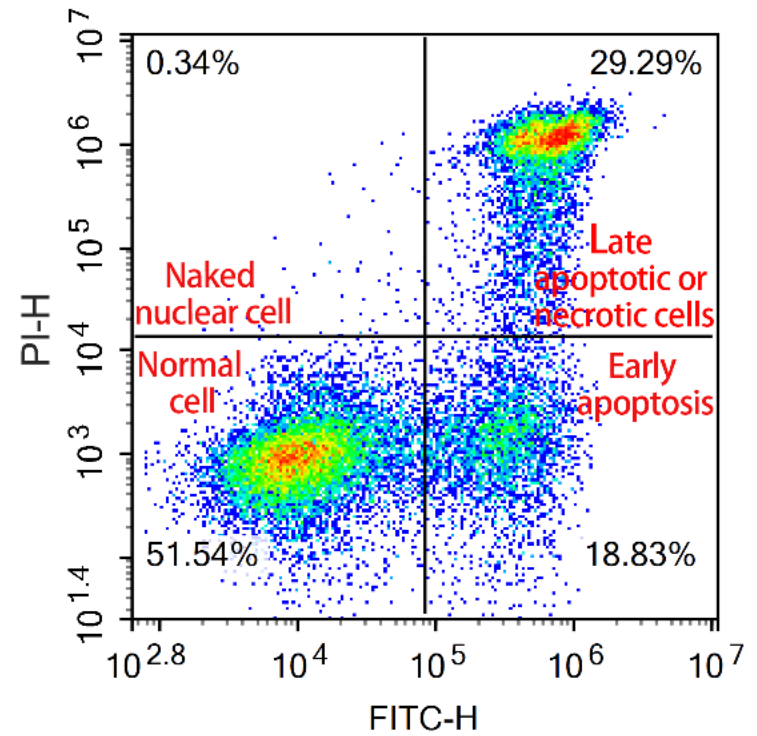
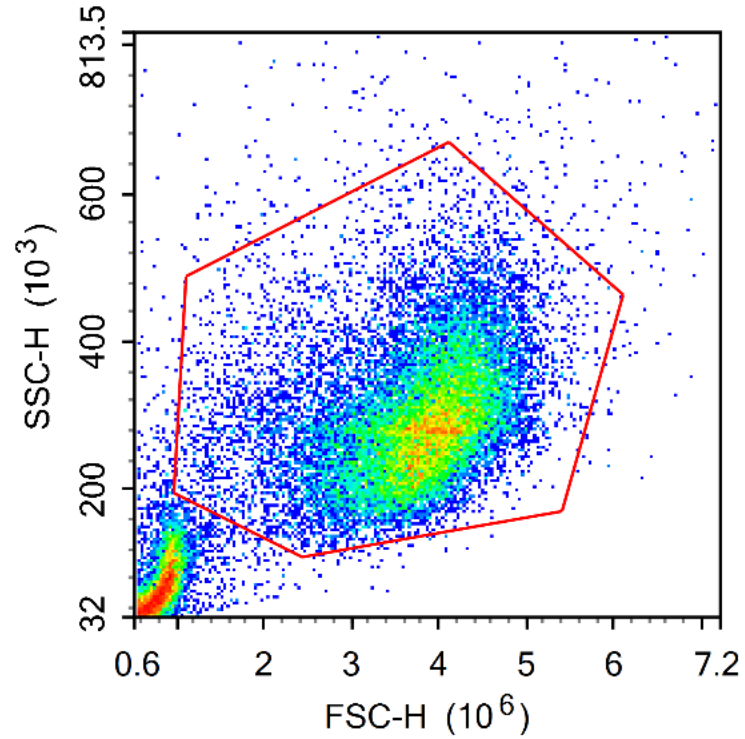


ANALISI MULTIPARAMETRICHE di popolazioni cellulari eterogenee



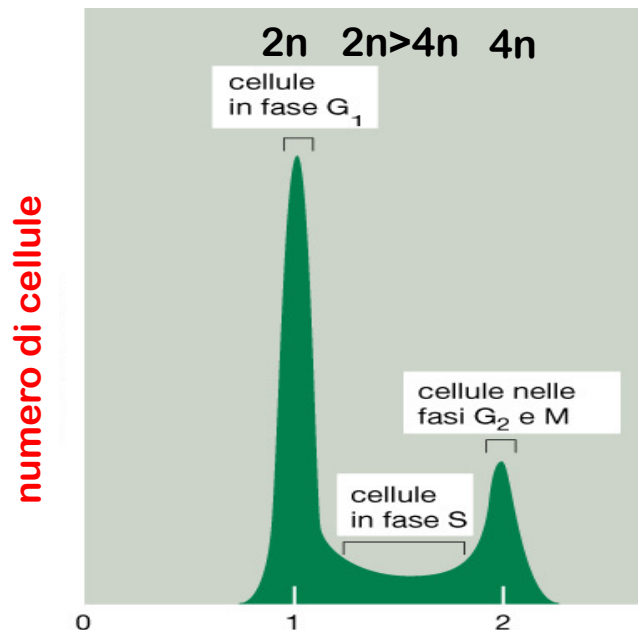
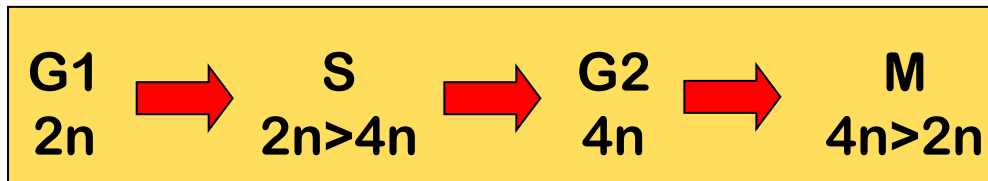
- 1) Cells not expressing either A or B
- 2) Cells expressing only B
- 3) Cells expressing only A
- 4) Cells expressing both A and B

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



Quantità di DNA per cellula (unità arbitrarie)

G0/G1
 $2n$

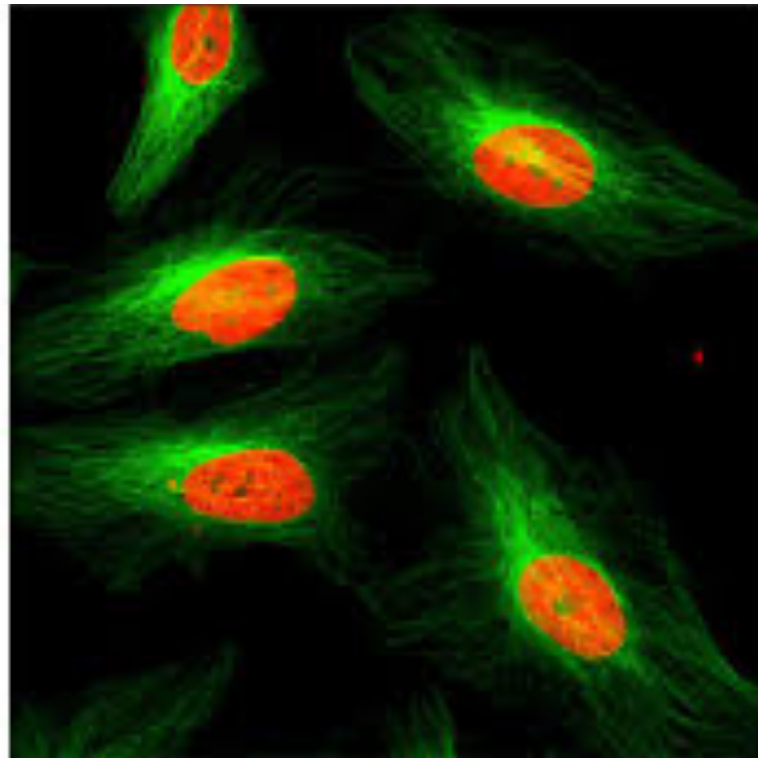
S
 $2n \rightarrow 4n$

G2/M
 $4n \rightarrow 2n$

COME POSSIAMO MISURARE IL CONTENUTO DI DNA?

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

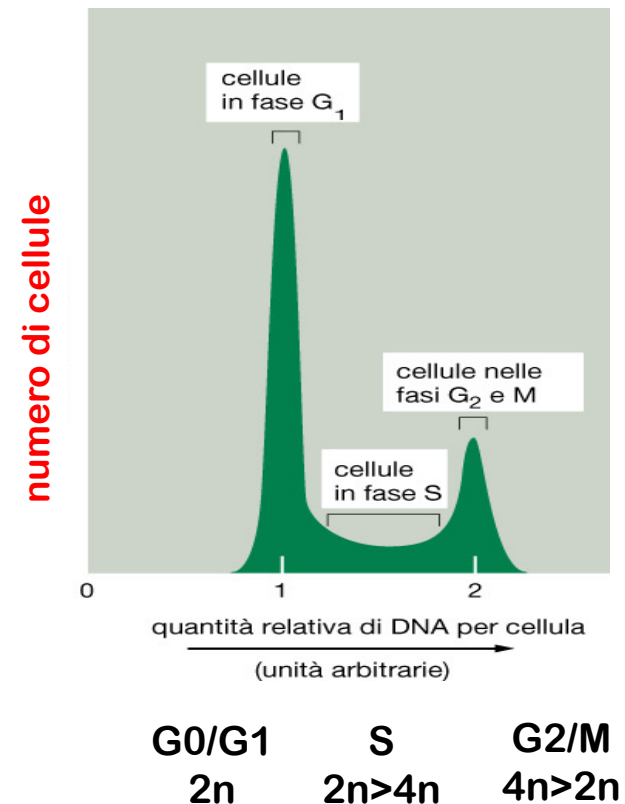
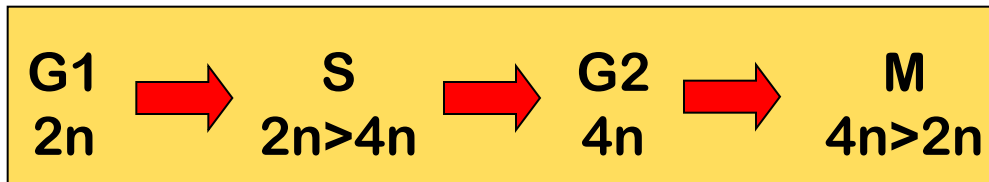
L'intensità di fluorescenza emessa da una singola cellula è direttamente proporzionale al suo contenuto di DNA.



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

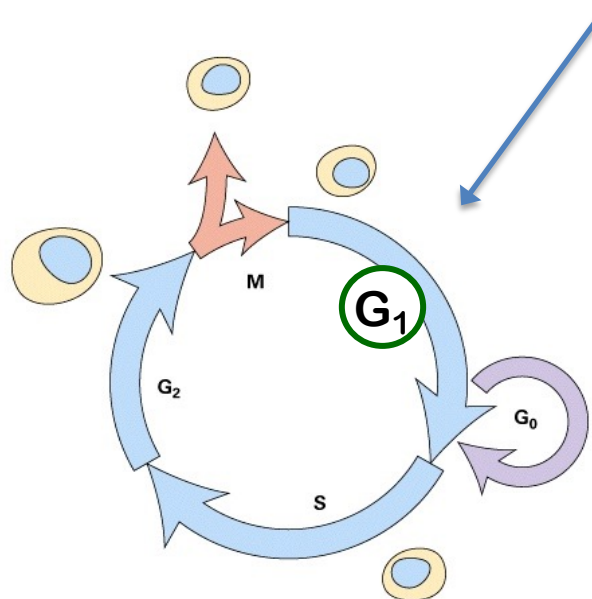
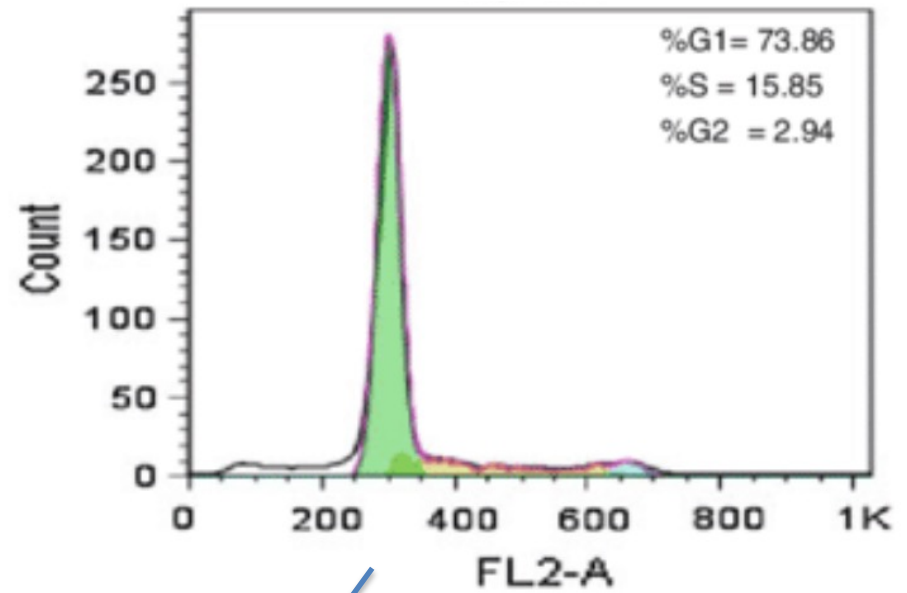
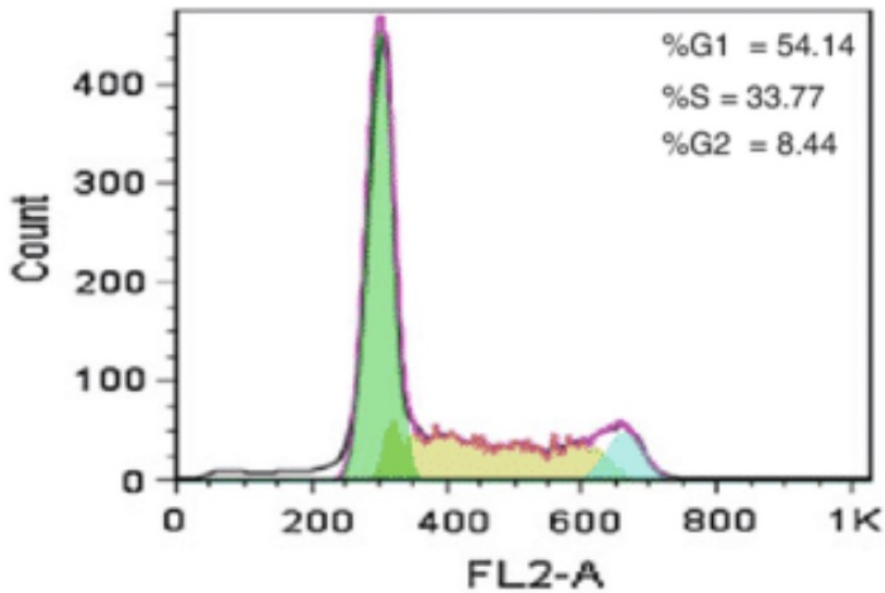
Le cellule vengono tripsinizzate, risospese, permeabilizzate e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (**fluorescenza rossa**):

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



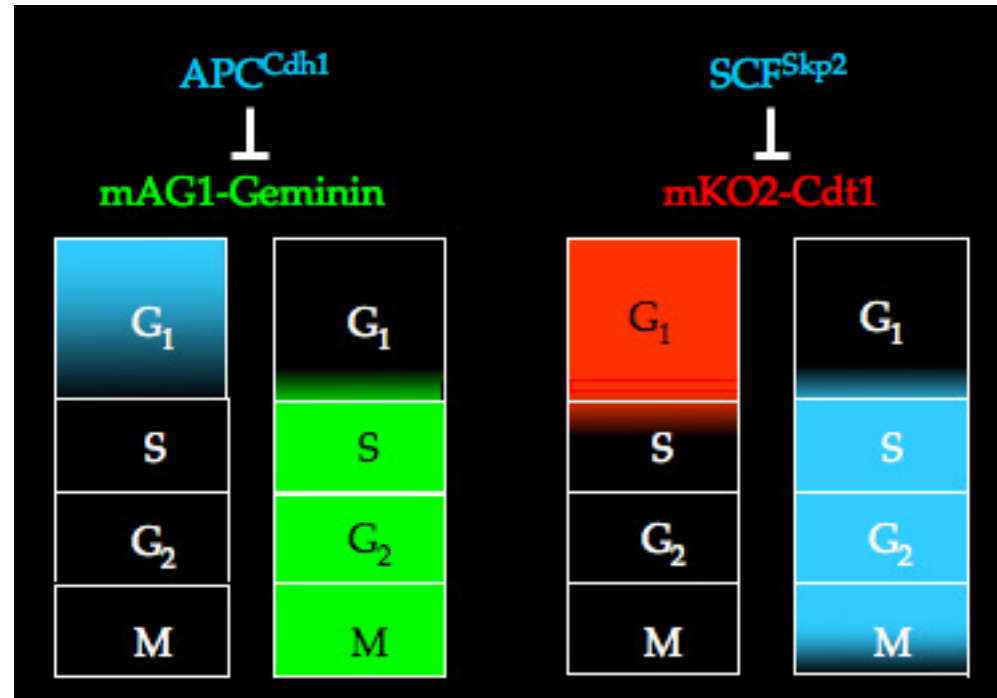
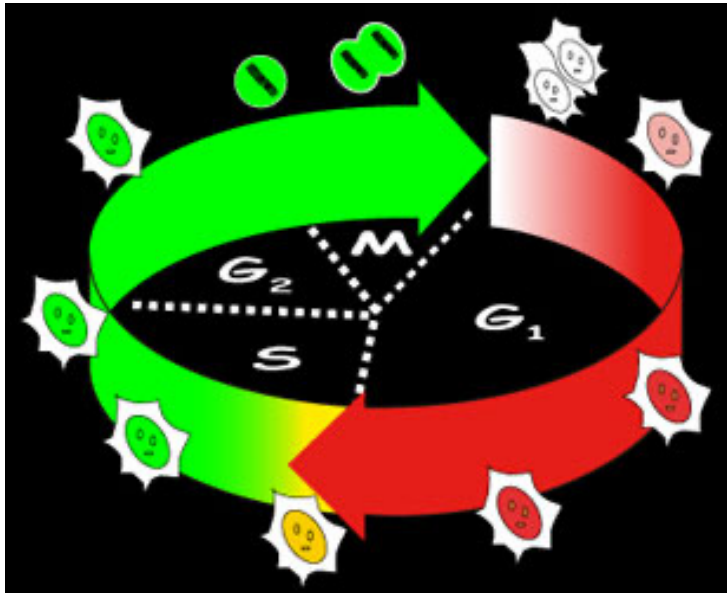
intensità di fluorescenza

Es. ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN CULTURA



Analisi REALTIME del ciclo cellulare – Sistema FUCCI

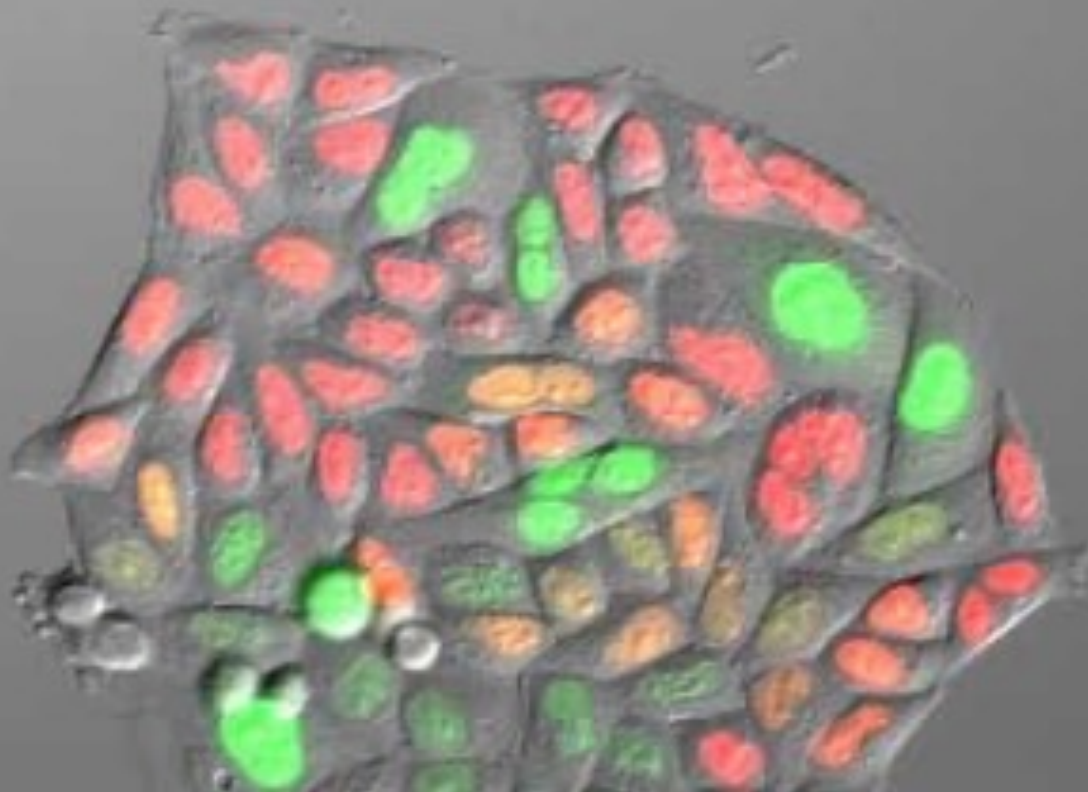
FUCCI: Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator



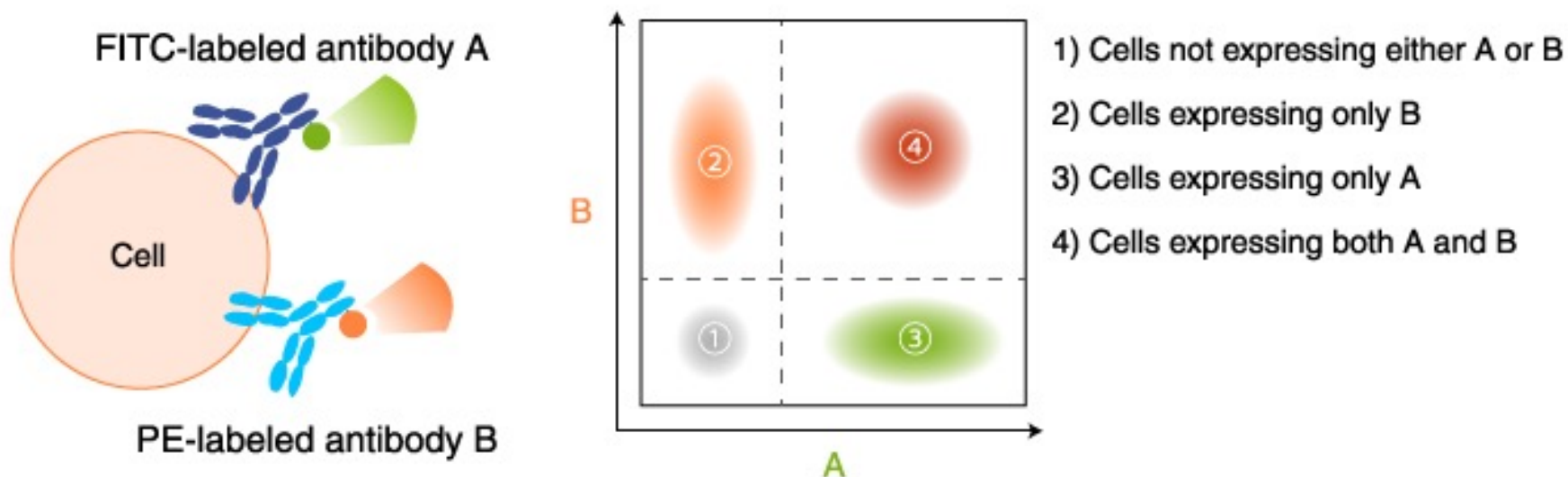
Cdt1: DNA replication licensing factor
Geminin: inhibitor of Cdt1

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

24.0 hour



ANALISI MULTIPARAMETRICHE: IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE



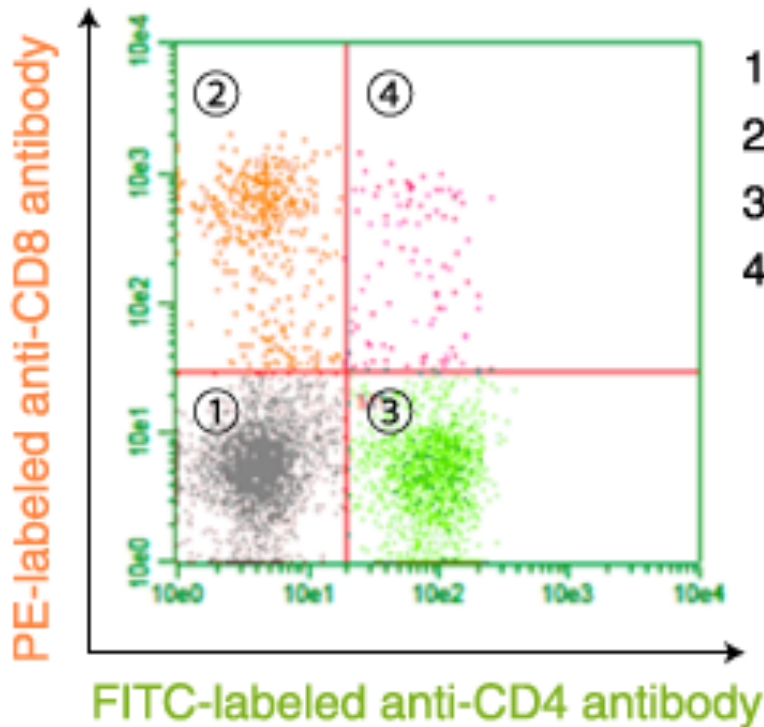
PE-labeled anti-CD8 antibody

FITC-labeled anti-CD4 antibody

Esempio: immunofenotipizzazione di popolazioni linfocitarie

PE-labeled anti-CD8 antibody

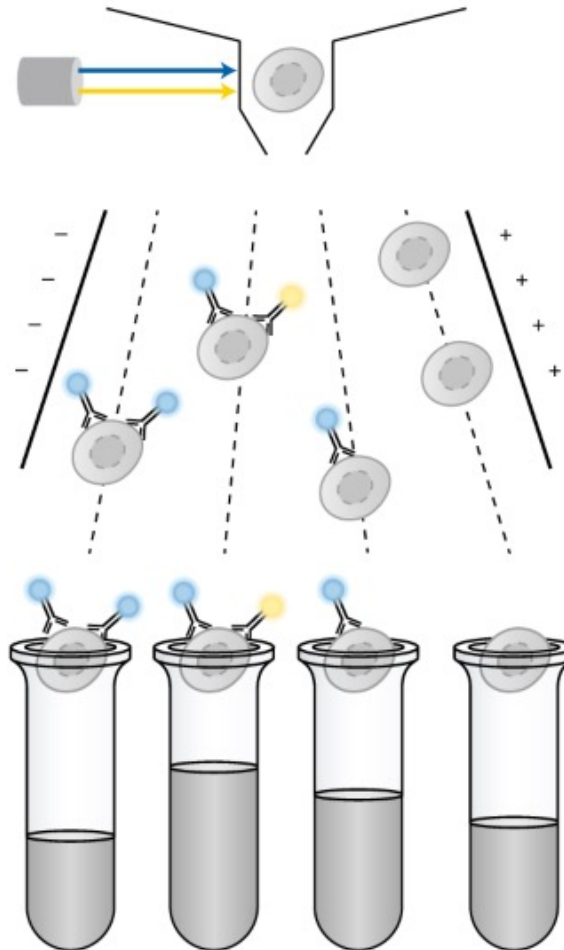
FITC-labeled anti-CD4 antibody



- 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

Sample: mouse splenocytes

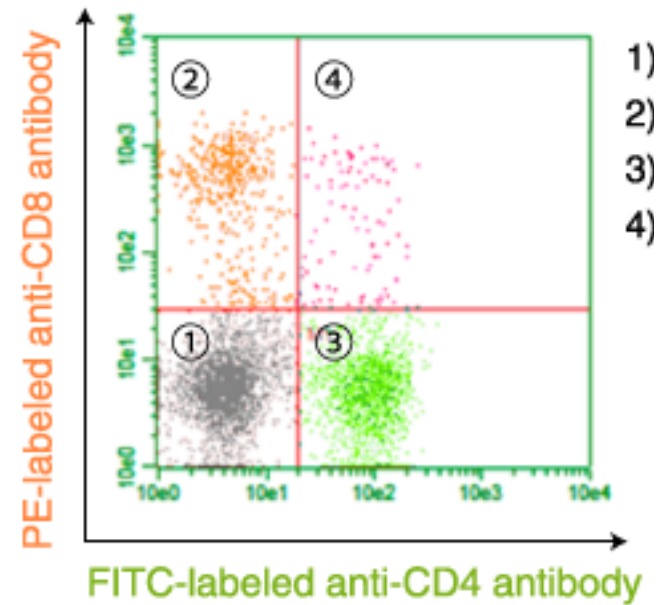
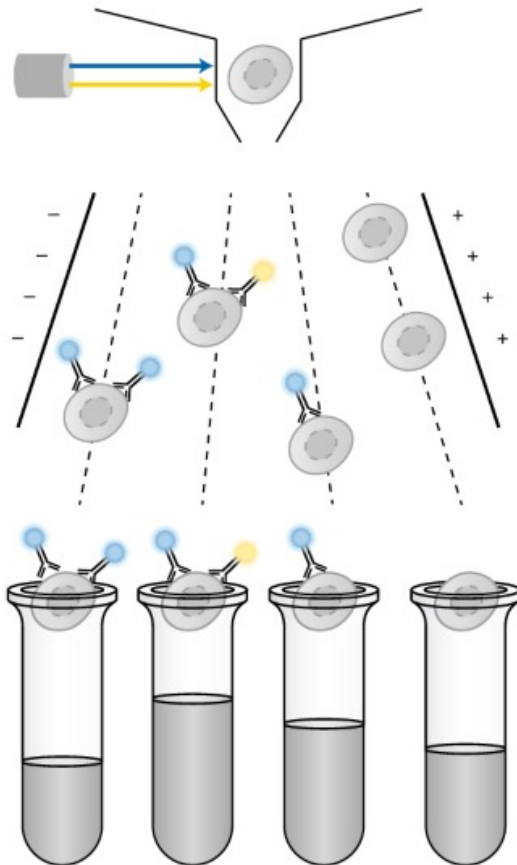
FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER – FACS per l'immunopurificazione di popolazioni cellulari mediante anticorpi specifici per antigeni di superficie.

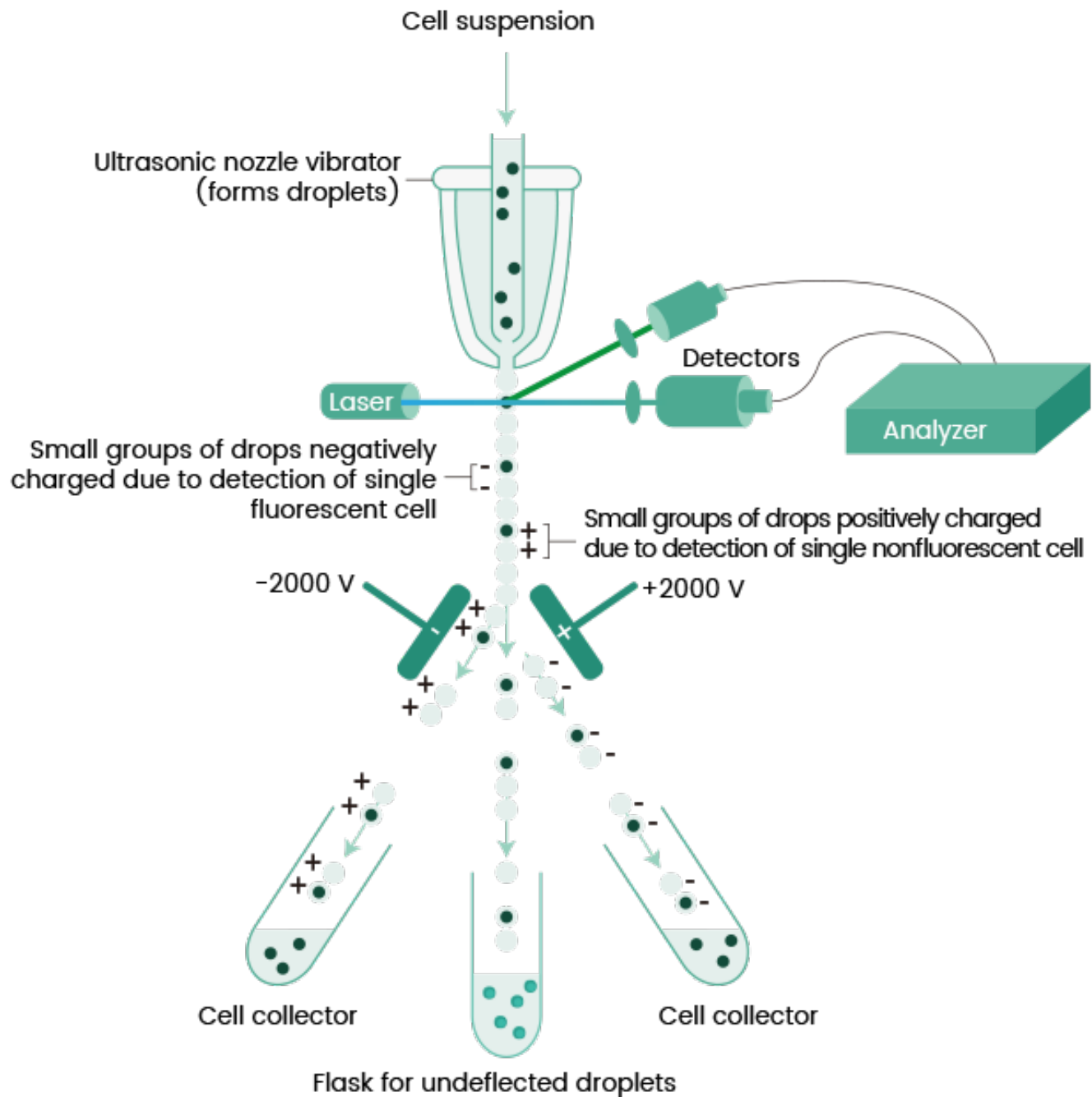


Popolazione cellulare eterogenea



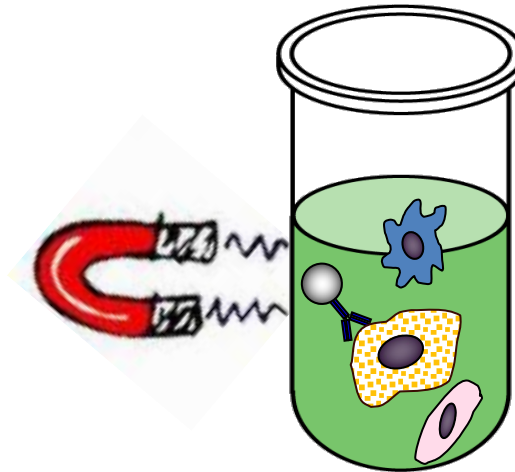
Marcatura con anticorpi per antigeni di membrana





Alternativa: immunopurificazione magnetica

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



Magnetic labeling



Magnetic separation



Elution of the labeled cells

