

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - microscopia confocale

Microscopia confocale

The diagram illustrates the confocal microscopy process. On the left, a photograph shows a confocal microscope setup. The main diagram shows a 3D sample (Camplione) being scanned by a laser to create optical sections (Sezione ottica). These sections are then processed by a computer to create a 3D reconstruction (Ricostruzione tridimensionale).

1

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - microscopia confocale

Esempio di analisi con focale: vedi il filmato corrispondente

The diagram illustrates the confocal microscopy process. It shows a laser beam hitting a sample, creating a focal spot. The resulting image is processed by a computer to create a 3D reconstruction. The diagram includes a grid of images showing the reconstruction process.

MICROSCOPIA CONFOCALE

LASER

COMPUTER
SCANSIONE IN
IMMAGINE

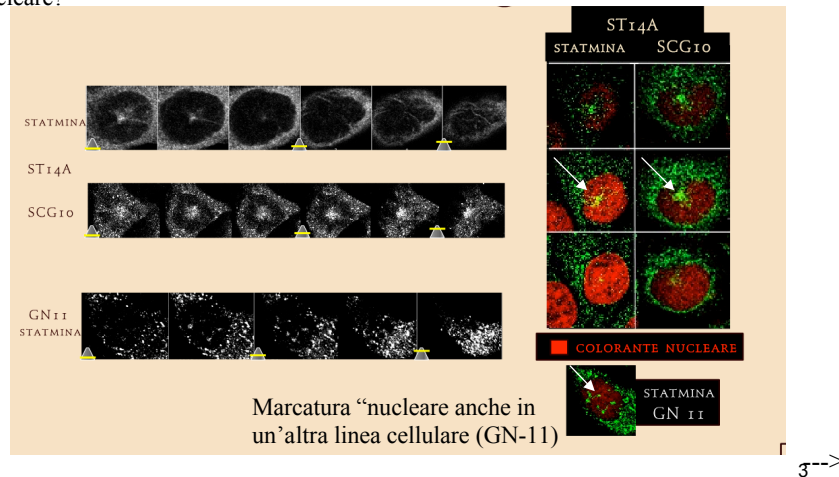
Vedi filmato

2

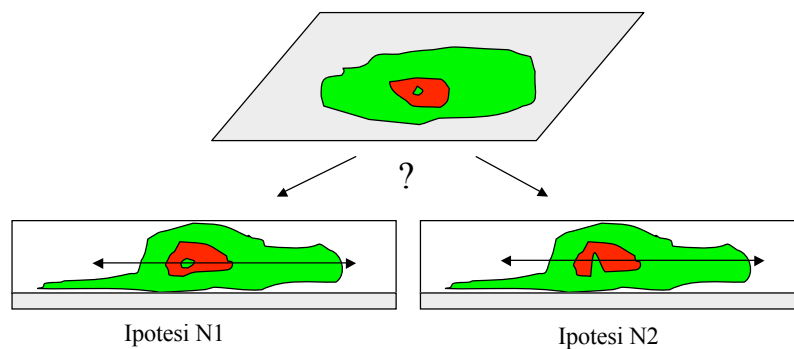
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Studio di caso:

Dalla figura sottostante si vede che l'immunofluorescenza verde per le proteine "statmina" e "SCG10" nelle cellule ST14 è essenzialmente citoplasmatica. Si nota però anche dell'immunofluorescenza in mezzo al rosso della marcatura nucleare. Le due proteine in questione oltre alla loro localizzazione citoplasmatica hanno anche una localizzazione nucleare?



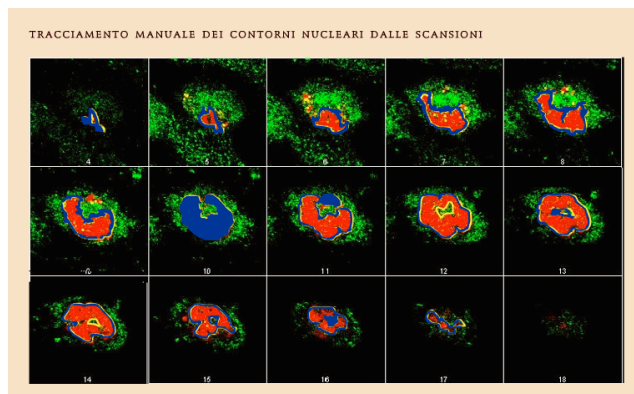
La stessa immagine vista da "sopra" (anche se al microscopio confocale può risultare da due situazioni diversi: Una localizzazione nucleare "vera" (ipotesi N.1) oppure una localizzazione nucleare "artefattuale" (ipotesi N.2)



Per rispondere alla domanda: "quale delle due ipotesi si applica alla localizzazione di statmina e SCG10?", è stata fatta una ricostruzione tridimensionale della morfologia del nucleo basata sull'analisi d'immagine della marcatura rossa per la cromatina.

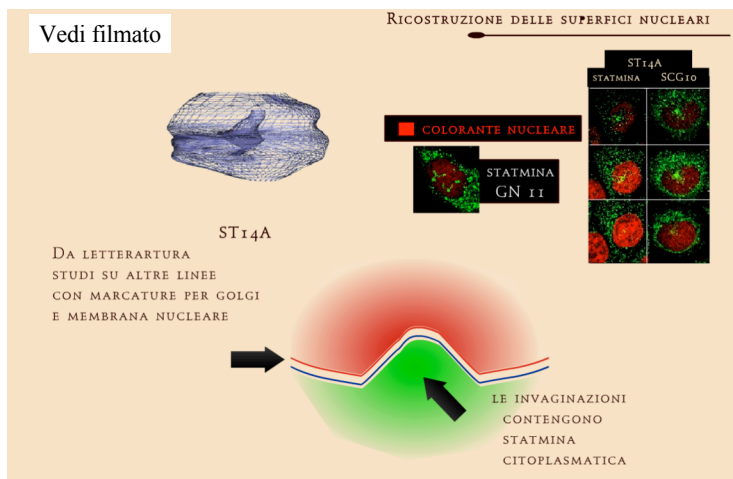
4-->

vedi il filmato della ricostruzione tridimensionale.



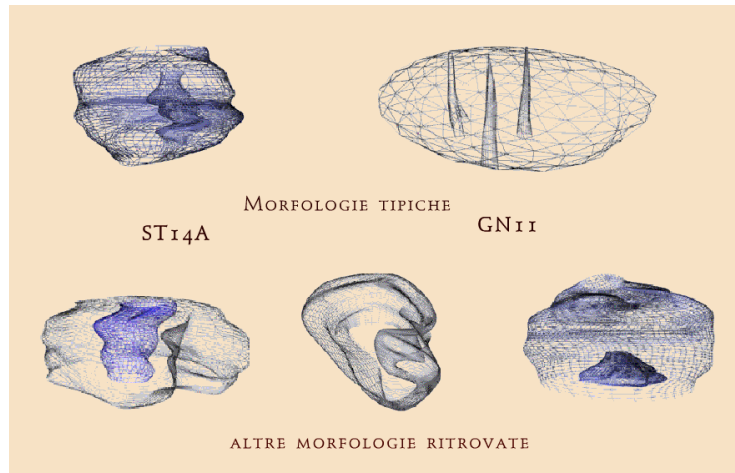
5-->

Risposta alla domanda: la marcatura verde non corrisponde ad una vera localizzazione intracellulare della proteina riconosciuta ma ad un artefatto dovuto alla morfologia del nucleo che comprende delle invaginazione dell'involucro nucleare.



6-->

Ricostruzione tridimensionale di nuclei di altre linee cellulari che presentano anche loro delle invaginazioni dell'involucro nucleare



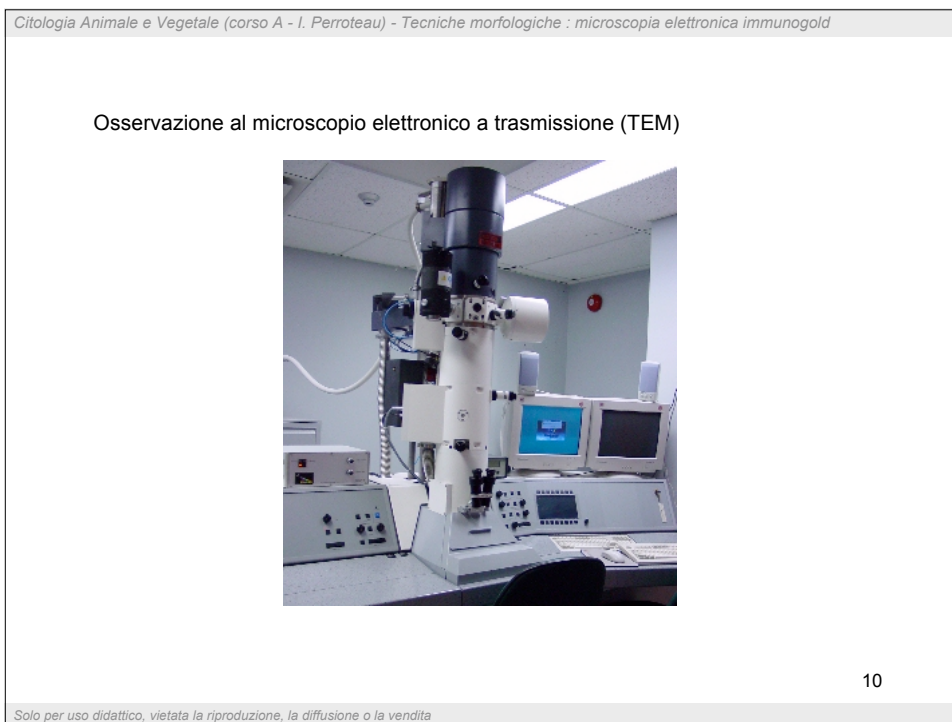
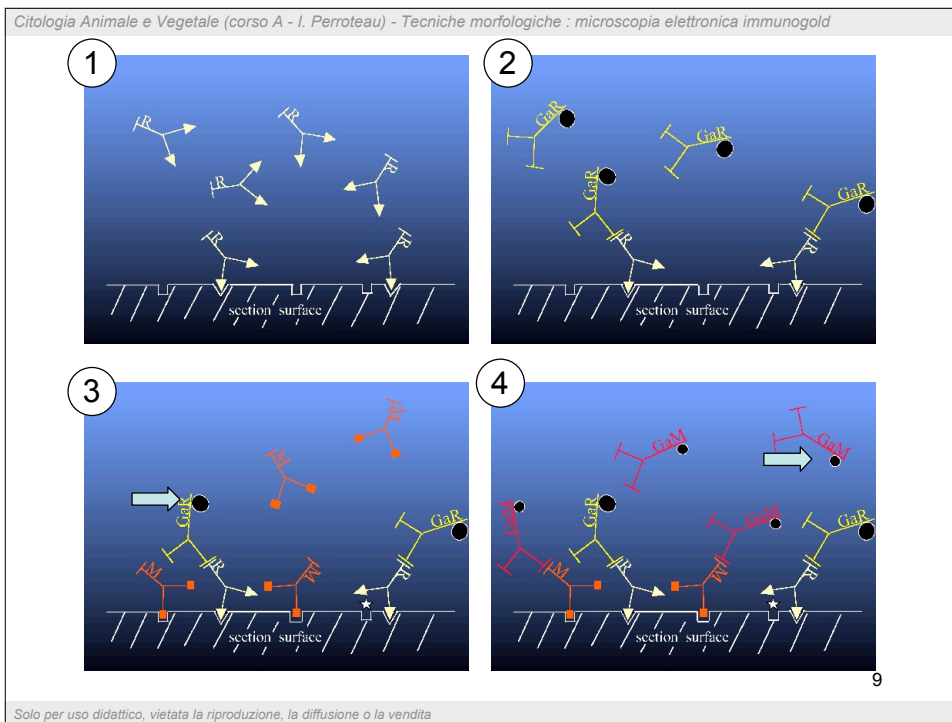
7

Microscopia elettronica

Immunogold: marcature singole o doppie analizzate al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Sezioni fini, utilizzate per incubazioni con anticorpi primari e anticorpi secondari come nel caso dell'immunofluorescenza ma in questo caso gli anticorpi secondari sono coniugati con particelle d'oro (opache agli elettroni) di diametro diverso

8

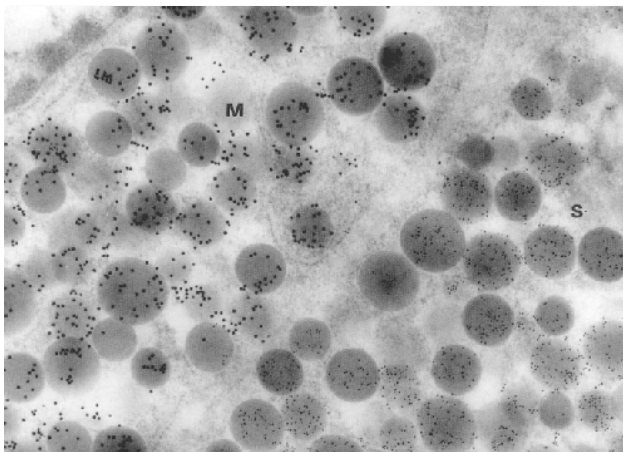


Esempio marcatura doppia immunogold esaminata al TEM.

Sezione di ipofisi analizzata con un anticorpo primario anti-prolattina rivelato con un anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro di 20 nm di diametro e con un anticorpo primario anti-ormone di crescita rivelato con un anticorpo secondario coniugato a particelle d'oro di 10 nm di diametro.

A sinistra cellula le cui vescicole di secrezione sono marcate con particelle d'oro di 20 nm di diametro maggiore: questa cellula contiene prolattina: si tratta di una cellula "mammatrofa" (M).

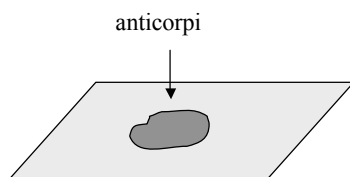
A sinistra le vescicole sono marcate con particelle d'oro di diametro inferiore (10 nm): si tratta di una cellula "somatotrofa" (S) le cui vescicole di secrezione contengono l'ormone di crescita.



Tecniche immunologiche:

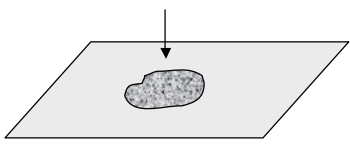
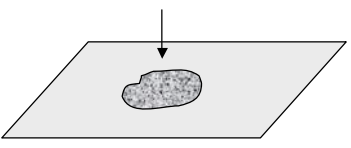
Interazioni anticorpo-antigene

Altre interazioni ?



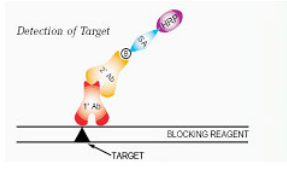
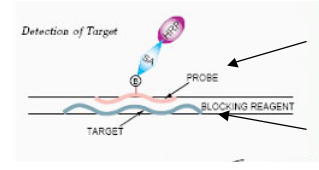
Risultato:
localizzazione di proteine

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: Ibridazione in situ

<p>Tecniche immunologiche: Interazioni anticorpo-antigene</p> <p style="text-align: center;">anticorpi</p>  <p>Risultato: localizzazione di proteine</p>	<p>Tecniche ibridazione in situ Interazioni ac nucleici-ac. nucleici</p> <p style="text-align: center;">“sonda” di DNA singolo filamento</p>  <p>Risultato: localizzazione di RNAm oppure di sequenze di DNA</p>
---	--

13

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: ibridazione in situ - immunostochimica

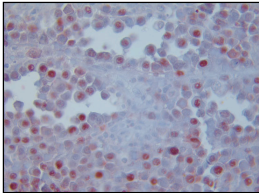
<p style="text-align: center;">Immunohistochemistry</p> <p>Antibody (protein) ↓ Antigen (protein)</p> 	<p style="text-align: center;">Hybridazione in situ</p> <p>RNA probe (nucleic acid) ↓ mRNA (nucleic acid)</p> 
--	---

14

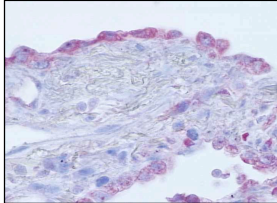
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: ibridazione in situ - immunistoichimica

Ibridazione in situ



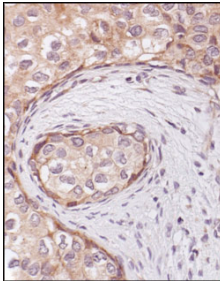
Ibridazione in situ per RNA del virus Epstein-Barr (EBER) in un linfoma plasmablastico di un paziente positivo al. Marcatura marrone dei nuclei delle cellule infette EBER.



Ibridazione in situ per mRNA di SP-A su sezione di adenoma polmonare

Immunistoichimica

Sezioni di carcinoma mammario marcate con anticorpo AKT2

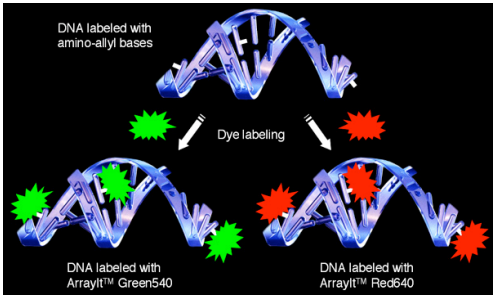


15

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: fluorescenza ibridazione in situ

FISH (fluorescence in situ hybridization): tecnica utilizzata in citogenetica



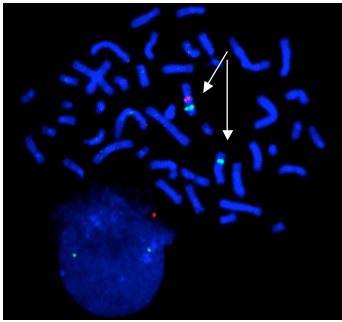
DNA labeled with amino-allyl bases

Dye labeling

DNA labeled with ArrayIt™ Green540

DNA labeled with ArrayIt™ Red640

Ibridazione della sonda su 2 cromosomi metafasici omologhi




16

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari

Esempio di tecniche biochimiche- molecolari comunemente utilizzate da chi studia la biologia delle cellule e dei tessuti



Specificità di riconoscimento

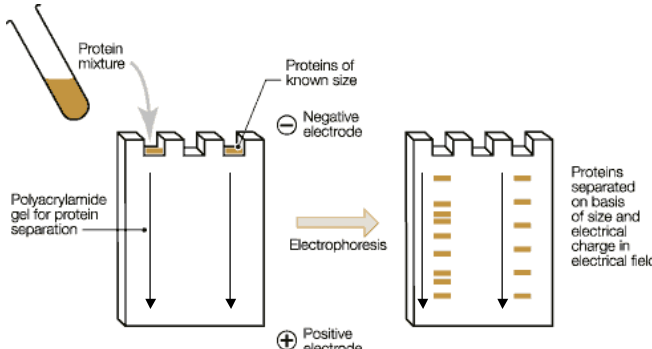
	Extrazione	Specificità di riconoscimento
Western blotting <i>proteine</i>	<i>proteine</i>	Antigene-anticorpo
Northern blotting <i>mRNA</i>	<i>mRNA</i>	Ibridazione di acidi nucleici
Southern blotting <i>DNA</i>	DNA	Ibridazione di acidi nucleici

17

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

1. Estrazione delle proteine e caricamento positivo;
2. Separazione delle proteine mediante corsa elettroforetica su gel



Le proteine dell'estratto, tutte caricate negativamente durante l'estrazione, sono depositate nel pozzetto. Dopo applicazione della corrente elettrica migrano dunque verso il polo positivo. La separazione avviene in funzione del peso molecolare di ciascuna proteina. Quelle più piccole, di più basso peso molecolare, migrano più rapidamente all'interno delle "maglie" del gel verso il polo positivo.

18

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

3. Trasferimento delle proteine dal gel di elettroforesi al filtro: "Blot"

Al termine dell'elettroforesi, si procede con il "blotting", cioè il trasferimento dal gel di elettroforesi ad un supporto più maneggevole ed idoneo all'incubazioni con gli anticorpi: il filtro (assomiglia ad un foglio di carta della dimensione del gel)

Proteins separated on basis of size and electrical charge in electrical field

Lay gel on filter

Blotting

Separated proteins transferred from gel to filter

Add antibodies labelled with a dye to filter

19

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

4. Incubazione del filtro con anticorpi e rivelazione

Il filtro è poi incubato in presenza dell'anticorpo primario, lavato, incubato in presenza di anticorpo secondario coniugato ad un enzima che permette una reazione luminescente. La rivelazione avviene ponendo una lastra fotografica sul filtro, la luminescenza impressiona la lastra. Dopo sviluppo fotografico della lastra, le "macchie" nere corrispondono alla presenza della proteina d'interesse (antigene).

Separated proteins transferred from gel to filter

Add antibodies labelled with a dye to filter

Antibody sticks only to protein of interest

Protein of interest can be visualised

5. Risultato finale: lastra fotografica "impressionata"

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

Anticorpo primario ---> anticorpo secondario coniugato all'enzima ---> reazione di bioluminescenza ---> luce che impressiona una lastra fotografica

Copyright 2006 Molecular Station

21

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

Esempio: Nell'encefalo, quale (i) delle 6 regioni d'interesse contengono le proteine A, B, C, D, E e F?

Prelievo delle 6 regioni:
campione 1-6

1. Estrazione delle proteine da ciascun campione

22

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

1. Estrazione delle proteine e caricamento "positivo";

2. Elettroforesi;

3. trasferimento dal gel di elettroforesi al filtro ("blot"),

4. incubazione del filtro con l'anticorpo primario per rivelare la proteina "A", lavaggio, incubazione con adeguato anticorpo secondario coniugato all'enzima, lavaggio, bioluminescenza ed esposizione della lastra fotografica

5. Lastra fotografica dopo sviluppo

23

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

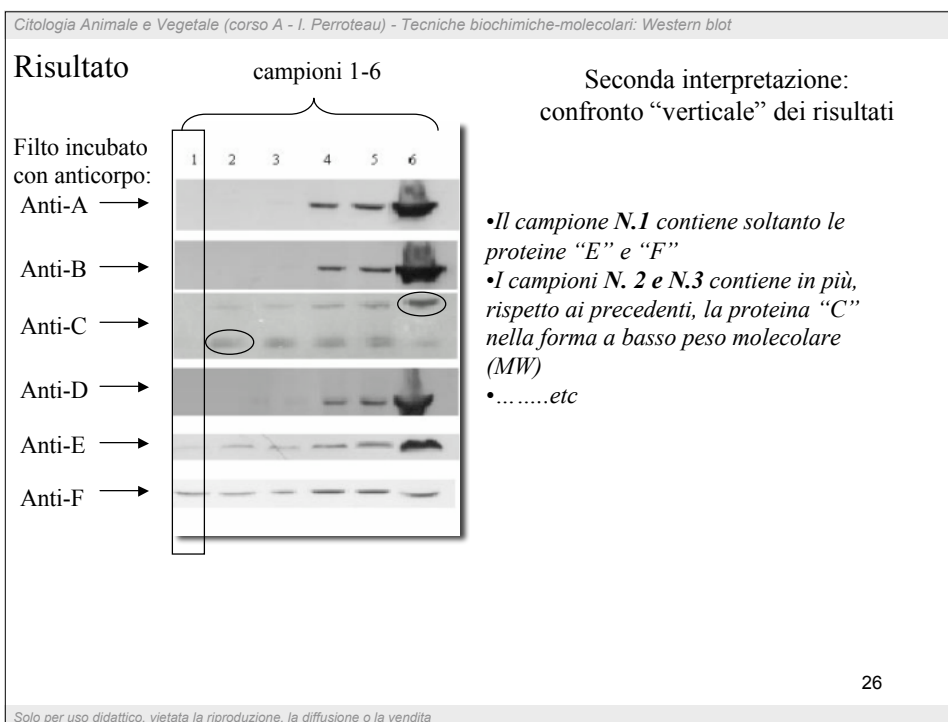
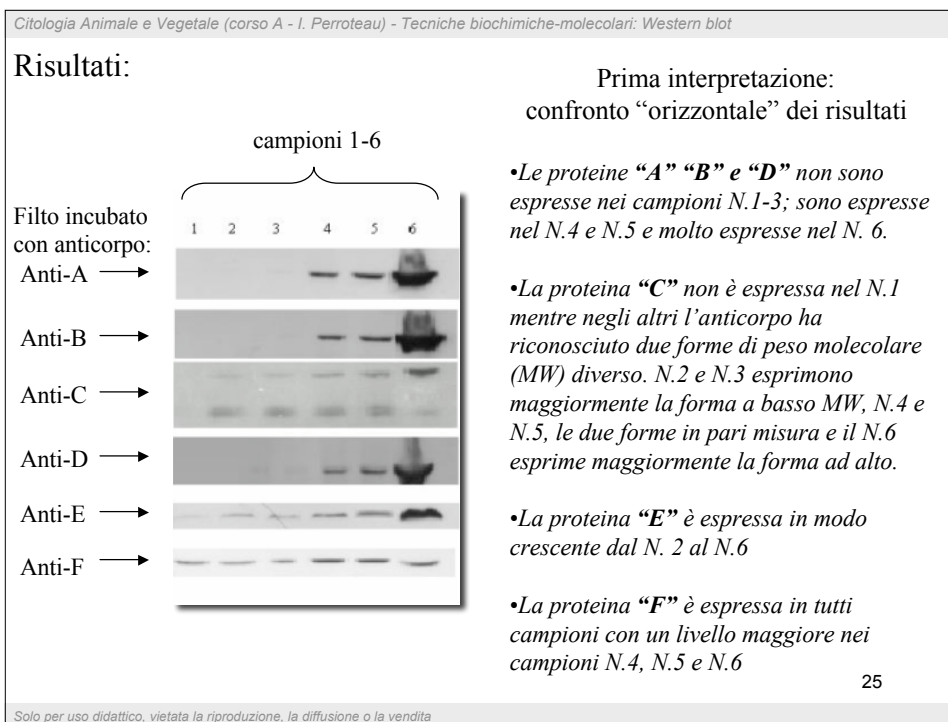
Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

Lo stesso protocollo è stato ripetuto 5 altre volte, e ciascun filtro è stato poi incubato con l'anticorpo primario anti-B, oppure l'anticorpo primario anti-C,etc

Per ciascun filtro la zona d'interesse è stata ritagliata per il confronto dei risultati

24

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita



Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Northern blot - Southern blot

Northern e Southern: molto simile a Western blot nei principi. Rivelazione con sonde di acidi nucleici complementari marcati con enzimi o fluorescenti (simile a quelle utilizzate per ibridazione in situ)

Northern

Estrazione degli RNA*

↓

Elettrophoresi*

↓

Blot*

↓

ibridazione

↓

rivelazione

Southern

Estrazione del DNA*

↓

Elettrophoresi*

↓

Blot*

↓

ibridazione

↓

rivelazione

(*) rispetto a quanto visto dettagliatamente per le proteine, apparecchi e protocolli sono diversi i principi sono comuni

27

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot - Northern blot - Southern blot

Apparenze simili: necessità di leggere e capire le legende delle figure per saper interpretare i risultati

Western blotting (protein)

A

Northern blotting (mRNA)

B

Southern blotting (DNA)

Queste due tecniche mi permettono di rispondere a domande correlate fra di loro: espressione di proteine e espressione di mRNA. (per semplificare: legame tra trascrizione e traduzione)

Questa tecnica mi permette di rispondere ad altri tipi di domande: mutazioni, delezioni, amplificazioni, polimorfismi (biologia forense)


28

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Colture cellulari

Colture cellulari

Provette, pipette e reagenti sterili Mezzo di coltura (rosso perché con indicatore di pH)



Fiasche e piastre idonei alle colture cellulari



Manipolazioni in condizioni di sterilità (sotto cappa)

29

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Colture cellulari

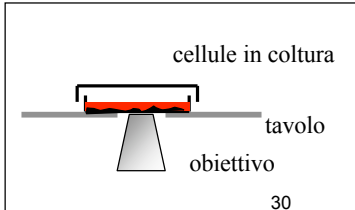
Osservazione delle cellule in colture: Microscopio rovesciato a contrasto di fase

---> Contrasto di fase: permette l'osservazione di cellule non colorate (vive)

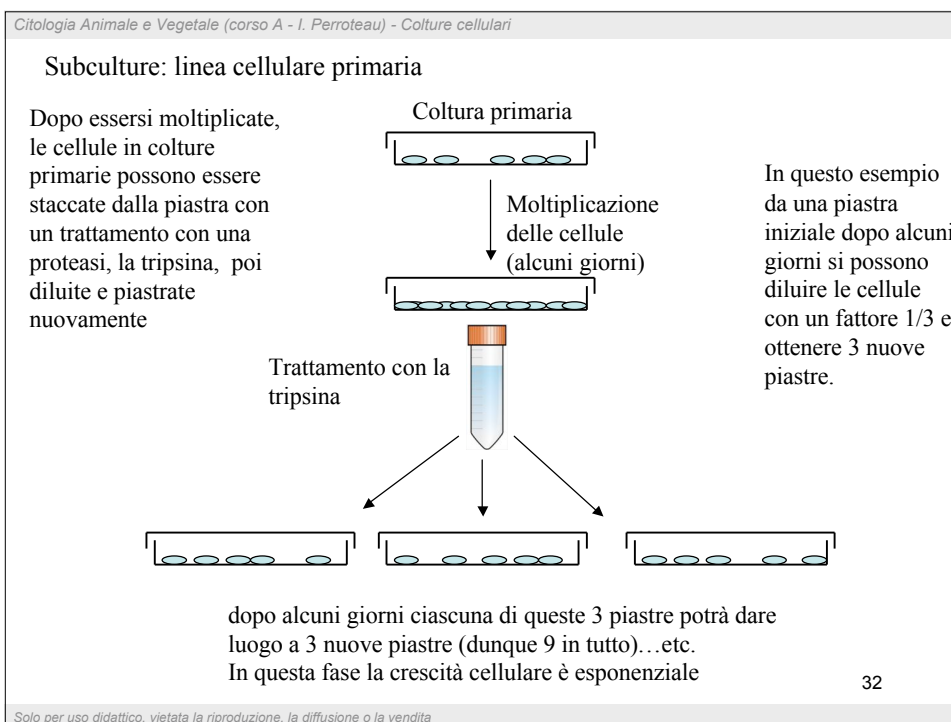
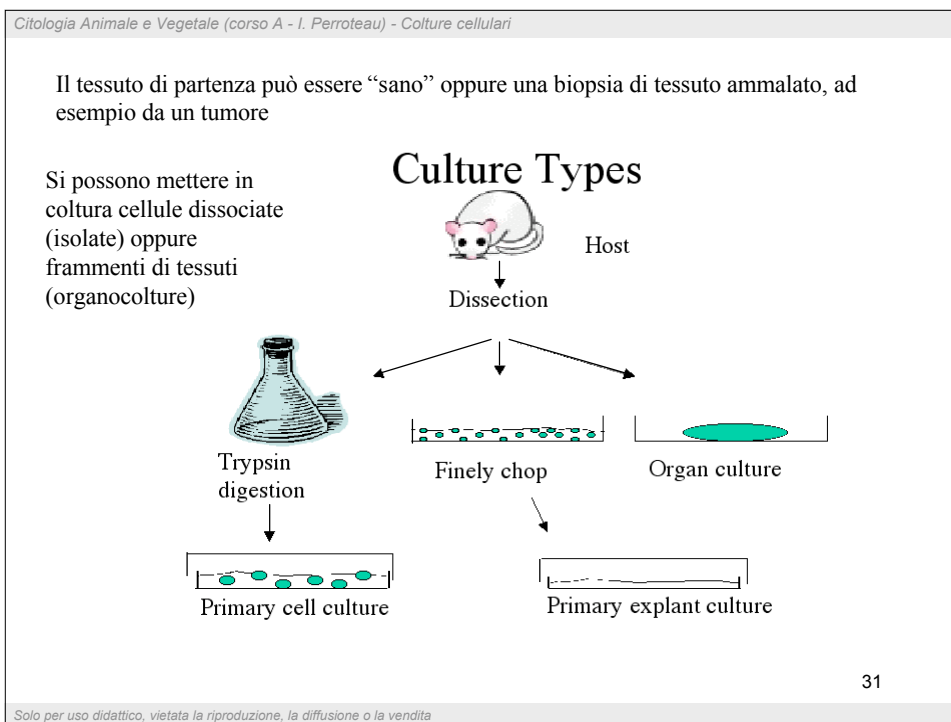
---> Rovesciato: obiettivi sotto il tavolo porta oggetto

- 1) L'obiettivo è separato dsoltanto dal fondo della piastra di coltura
- 2) la piastra o la fiasca non deve essere aperta e rimane sterile e l'osservazione avviene fuori dalla cappa sterile



30

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

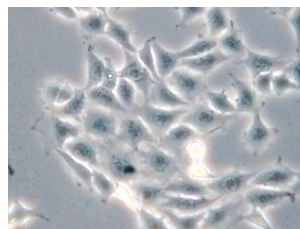
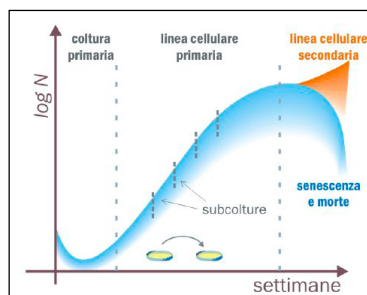


Le cellule “normali” in coltura hanno una vita finita e vanno incontro a senescenza e a morte.

Alcune cellule però possono sopravvivere e dare luogo ad una linea cellulare secondaria.

La linea cellulare secondaria è costituita da cellule che hanno la capacità di dividersi all'infinito e per questo motivo la linea cellulare secondaria viene considerata come immortalizzata.

Colture primarie preparate a partire da biopsie tumorali producono più facilmente linee cellulari secondarie. Queste linee secondarie possono essere costituite da cellule immortalizzate ma non tumorali oppure da cellule a loro volta tumorali.



33


Le colture cellulari rappresentano un modello di studio di tutte le funzioni cellulari (fisiologiche o patologiche): differenziamento cellulare (cellule staminali), proliferazione, migrazione, organizzazione tridimensionali, morte cellulare, interazioni cellulari, metabolismo, studio e sviluppo di farmaci, di biomateriali....

Le cellule in coltura possono anche essere modificate geneticamente tramite l'inserimento, in forma transiente o nel genoma della cellula ospite, di informazione genetica esogena. I metodi che permettono di fare entrare il DNA esogeno nelle cellule ospite si chiamano: “Trasfezioni”

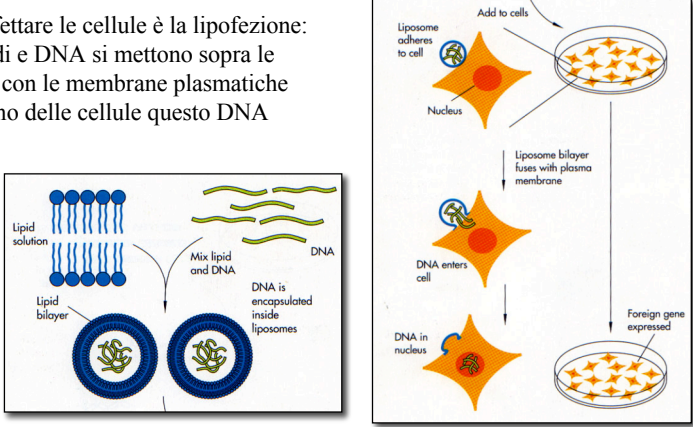
34

Citologia Animale e Vegetale (corso A - I. Perroteau) - Colture cellulari

Trasfezioni



Un metodo per trasfettare le cellule è la lipofezione: miscele di fosfolipidi e DNA si mettono sopra le cellule e si fondono con le membrane plasmatiche rilasciando all'interno delle cellule questo DNA esogeno.



35

Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

Preparare le prossime lezioni:

GFP

Nucleo (Colombo pp.237-244)

Struttura della cromatina interfaseica (Colombo pp.252-259)

Struttura del nucleolo (Colombo pp. 286-287)