

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - microscopia confocale

Microscopia confocale

Sezione ottica

Campione

Singole sezioni ottiche

Ricostruzione tridimensionale

1

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - microscopia confocale

Esempio di analisi con focale: vedi il filmato corrispondente

MICROSCOPIA CONFOCALE

LASER

COMPUTER SCANSIONE IN IMMAGINE

Vedi filmato

2

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - microscopia confocale e analisi d'immagine

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?

Marcatura "nucleare anche in un'altra linea cellulare (GN-11)

3-->

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - microscopia confocale e analisi d'immagine

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)

Ipotesi N1

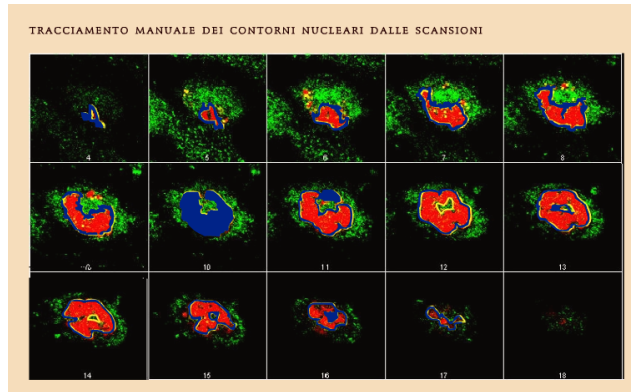
Ipotesi N2

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-->

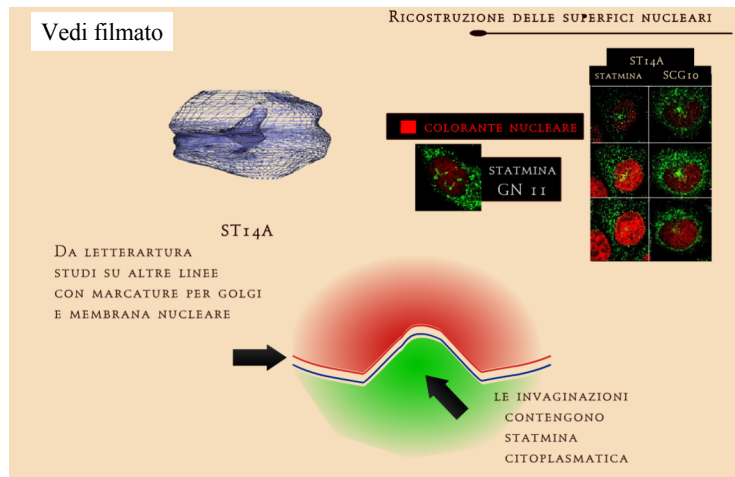
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

vedi il filmato della ricostruzione tridimensionale.



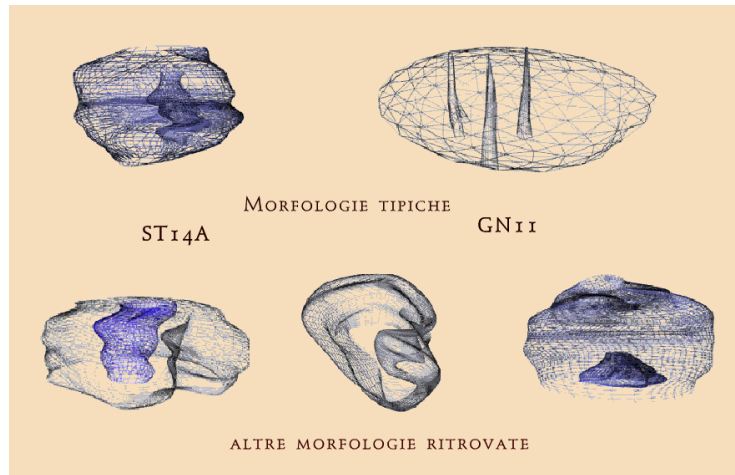
5-->

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



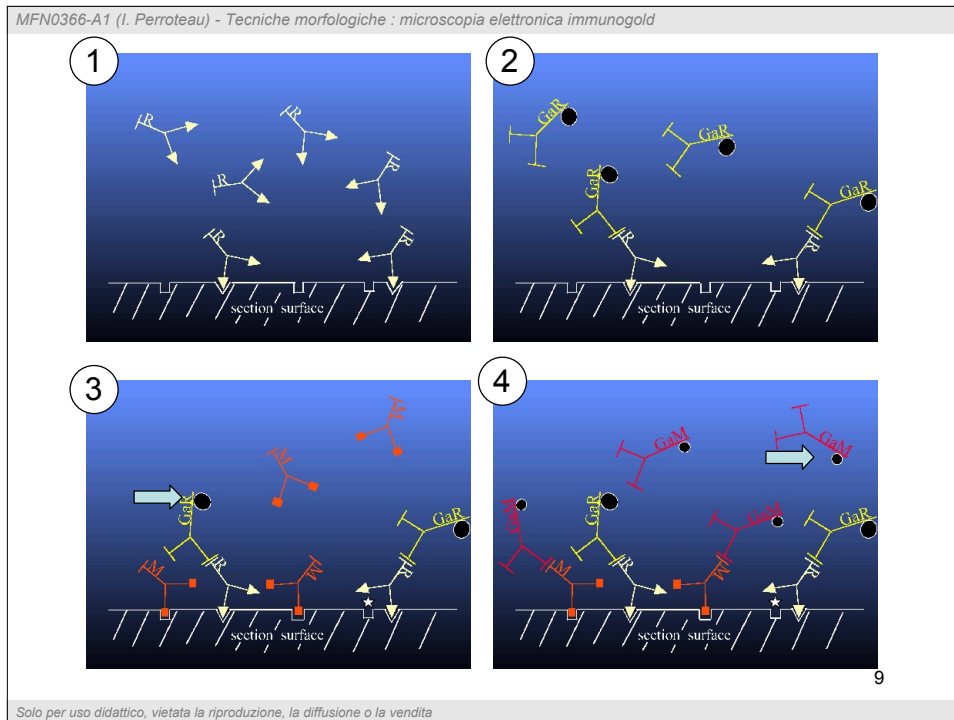
7

Microscopia elettronica

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

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

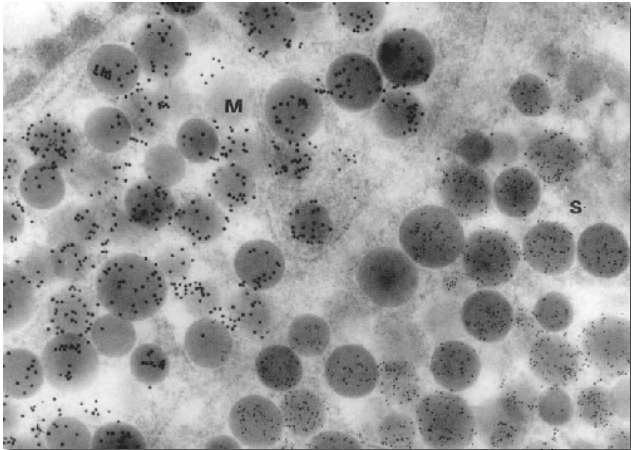


MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche : microscopia elettronica immunogold

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 "mammotrofa" (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.



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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche

Colorazioni istologiche Immunoistochimica Immunofluorescenza Immunogold	GFP
↓	↓
Tecniche che richiedono la fissazione del preparato (cellule o sezioni di tessuto) = materiale morto	Tecniche che non richiedono compatibili con cellule o tessuti vivi

12

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - GFP

Green Fluorescent Protein

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

13

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - GFP

Plasmide con sequenza per GFP

```

      SepI      AseI      PvuII
      |||      |||      |||
ACGCCCAATACGCAACCGCCCTCCCCGGCGTGGCCGATTCAATAATGCAGCTGGCACGACAGTT
TCCGGGTATCGCTTGGCGGAGAGGGCGCCGCAACCGCTAAGTAATACGTGACGATATCCGTGCCAA
      10      20      30      40      50      60      70

      AseI
TCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCCCCAC
AGGGCTGACCTTTCGCCCTCACTCCGCTGCGGTTAATACACTCAATCGAGTGAGTAATCCGTGGGGTC
      80      90      100     110     120     130     140

      BsrBI
GCTTACACTTATGCTCCGGCTGATGTGTGGAAATGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAA
CGAAATGTGAATACGAAGCCGAGCAACACACTTAACACTCGCTATATGTTAAGGTGTCTCTT
      150     160     170     180     190     200     210

      SalI      XbaI      BamHI      SmaI      KpnI
      |||      |||      |||      |||      |||
ACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCTGACGCTGACACTAGAGGATCCCGGTACCGG
TGTGATCTGCTACTAATCGCGTTCGAACGTACGACCTCCAGCTGAGATCTCTTAGGGCCCATGGCC
      220     230     240     250     260     270     280

      SphI      Sse8387I      BspMI      XmaI      AgeI
      |||      |||      |||      |||      |||
TAGAAAAATGAGTAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATCTTGTGAATTAGATGGTGA
ATCTTTTACTCATTTCCTCTTCTGAAAAGTCACTCAACAGGGTTAAGAACAACTTAATCTACCCT
      290     300     310     320     330     340     350

      GsuI
TGTAAATGGGCACAAATTTCTGTCTAGTGGAGGGGTGAAGGTGATGCAACAATACGGAAAACCTACCCTT
ACAATTACCCTGTGTTAAAGACAGTCACCTCTCCCACTCCACTACGTGTATATGCTTTTGAATGGGAA
      360     370     380     390     400     410     420

      NcoI      MscI
AAATTTATTGCCTACTGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCCAACACTTGCCTACTTCTCTTATGGTG
TTTAAATAACCTGATGACCTTTTATGGACAAGGTACCGGTTGTGAACAGTATGAAGAAATACAC
      430     440     450     460     470     480     490

      NdeI
TTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTCAAGAGTGCCATGCCGAAGG
AAGTTACGAAAAGTCTATGGGCTATGATATACTTTGCCCTACTGAAAAGTTCTACGGTACGGGCTCC
      500     510     520     530     540     550     560

      BsrGI      PmlI
TTATGTACAGGAAGAACTATATTTTCAAGATGACGGGAACTACAAGACACGCTGCTGAGTCAAGTTT
AATACATGCTCTTCTGATATAAAAAGTTTACTGCCCCTTGATGTTCTGTGCAAGGCTTCACTTCAA
      570     580     590     600     610     620     630

      .....etc
    
```

14

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - GFP

GFP e tecnologie ricombinanti:

Sequenza nucleotidica che codifica per la GFP (GFP) → Trascrizione e traduzione → fotoni → Fluorescenza della proteina GFP

Plasmide con sequenza per GFP → Transfezione →

(A) Sovrapposizione tra immagine a contrasto di fase e immagine a fluorescenza: 2 cellule esprimono la proteina GFP. Le cellule sono vive. In campo scuro, la proteina fluorescente GFP si conferma come prevalentemente localizzata nel citoplasma. (B): GFP, (C) marcatore nucleare, (D) sovrapposizione (merge) di B e C.

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - GFP

Con costrutti di fusione, la GFP permette di seguire in modo dinamico la localizzazione intracellulare di proteine. Esempio: proteina di fusione tra GFP e istone H3

1 La sequenza nucleotidica che codifica per H3 (rettangolo blu) viene inserita "in frame" nel plasmide che codifica per la GFP

2 Trasfezione del plasmide di fusione. Le cellule trasfettate esprimono la proteina di fusione che è nella prima parte l'istone H3 e nella seconda parte la GFP. La proteina di fusione è la proteina H3 con la "lampadina" attaccata.

3 La fluorescenza della proteina di fusione testimonia della sua localizzazione. La parte che corrisponde a H3 è riconosciuta dai sistemi di trasporto dal citoplasma verso il nucleo (l'istone H3 svolge la sua attività nel nucleo) e di conseguenza la fluorescenza è tutta nucleare. B-D: localizzazione della GFP sola. E-G localizzazione della proteina di fusione GFP-H3

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

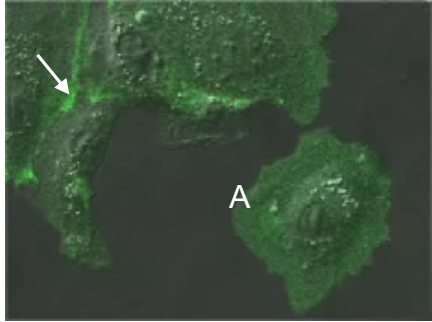
MFN0366-A1 (I. Perroteau) - GFP

Time-lapse: video microscopia di cellule in coltura al microscopio rovesciato a fluorescenza

Esempio:
Time lapse della proteina di fusione GFP-caderina in cellule epiteliali in coltura.

Notare la localizzazione diffusa della fluorescenza nella cellula isolata: la proteina di fusione è localizzata sulla membrana plasmatica.

Osservare la redistribuzione della proteina di fusione e la sua concentrazione nei punti di interazione tra le cellule.



Vedi filmato

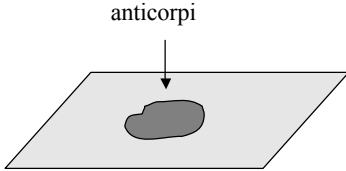
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche

Tecniche immunologiche:

Interazioni anticorpo-antigene

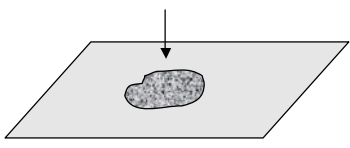
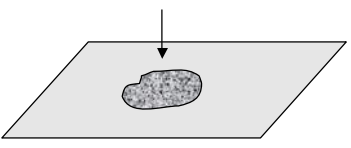
Altre interazioni ?



Risultato:
localizzazione di proteine

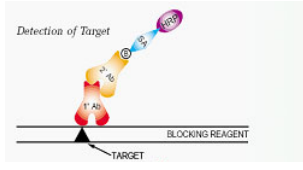
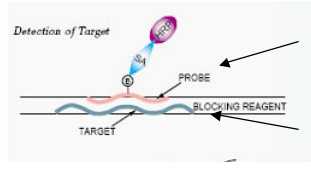
18

MFN0366-A1 (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>
---	--

19

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: ibridazione in situ - immunoistochimica

<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> 
--	---

20

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: ibridazione in situ - immunoistochimica

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

Immunoistochimica

Sezioni di carcinoma mammario marcate con anticorpo AKT2

21

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche morfologiche: fluorescenza ibridazione in situ

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


Ibridazione della sonda su 2 cromosomi metafasici omologhi

22

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

MFN0366-A1 (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

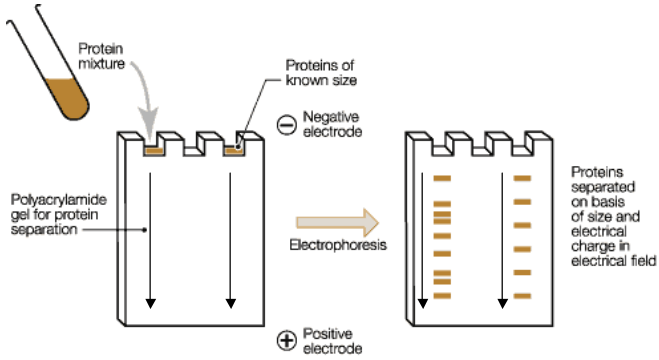
	Extrazione	Specificità di riconoscimento
Western blotting <i>proteine</i>	<i>proteine</i>	Antigene-anticorpo
Northern blotting <i>mRNA</i>	<i>mRNA</i>	Ibridazione di acidi nucleici
Southern blotting <i>DNA</i>	DNA	Ibridazione di acidi nucleici

23

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Tecniche biochimiche-molecolari: Western blot

1. Estrazione delle proteine
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.

24

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

MFN0366-A1 (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

25

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

MFN0366-A1 (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