

Colorazioni istologiche
Immunoistochimica
Immunofluorescenza
Immunogold



Tecniche che richiedono
la fissazione del
preparato (cellule o
sezioni di tessuto)
= materiale morto

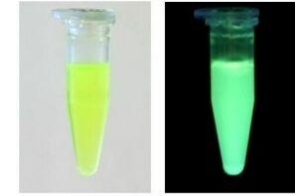
GFP



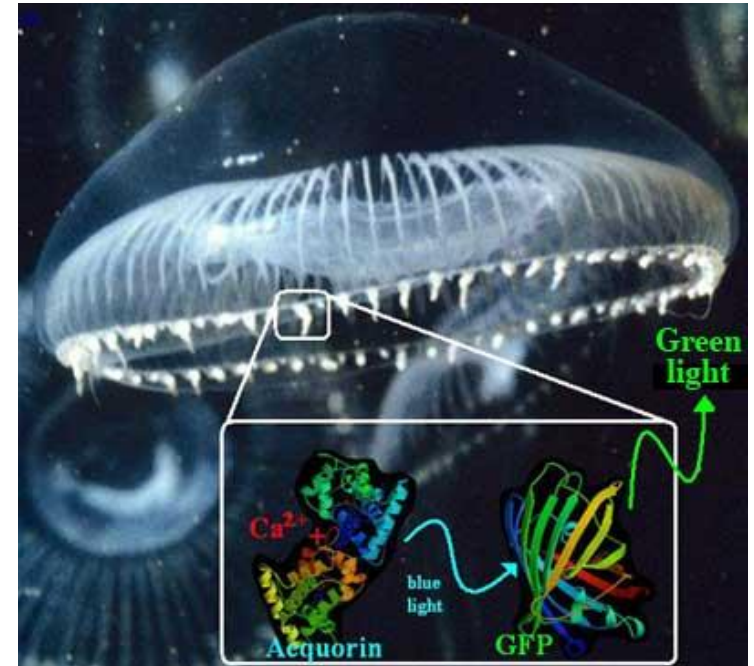
Tecniche che non
richiedono fissazione,
compatibili con cellule
o tessuti vivi

GFP

Green Fluorescent Protein



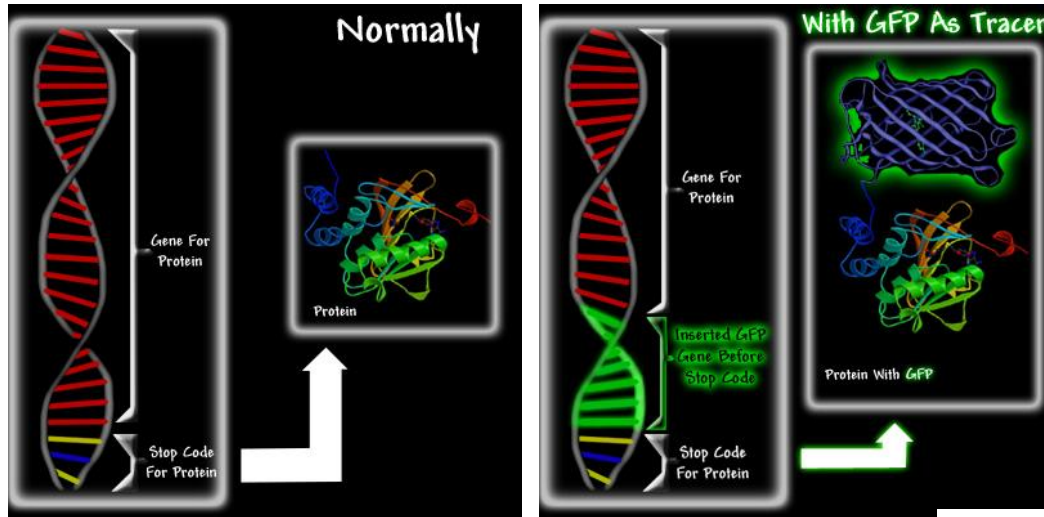
La **GFP** è una proteina della medusa *Aequorea victoria*, localizzata nei suoi organi bioluminescenti. In tali organi un'altra proteina, l'**aequorina**, può emettere luce blu quando è attivata dal calcio. La luce blu a sua volta colpisce la GFP, che così emette luce fluorescente verde



<http://gfp.conncoll.edu/>

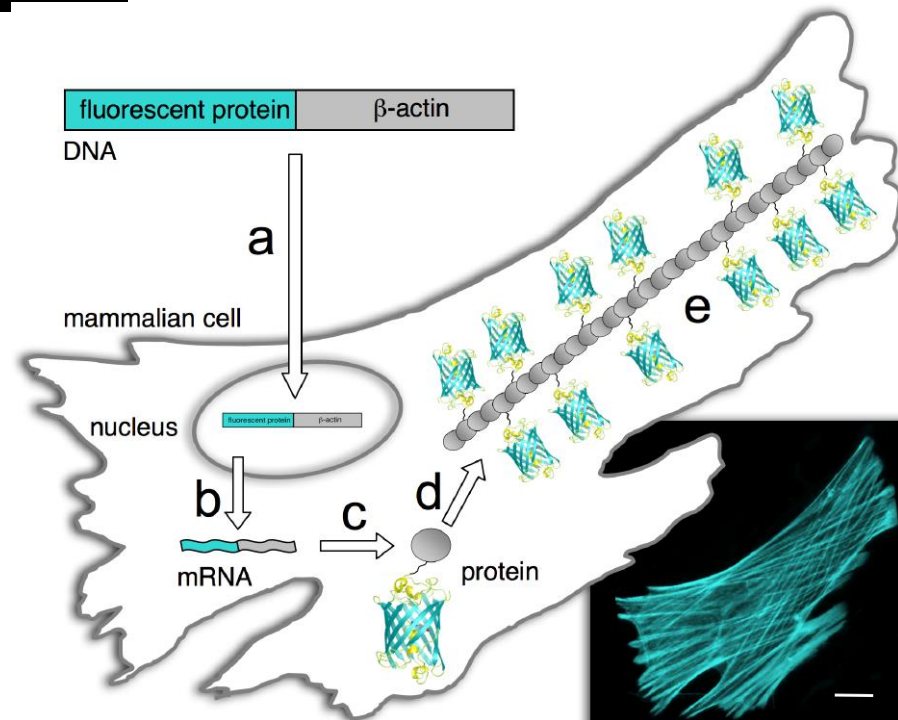
La GFP è una proteina di piccole dimensioni, possiede alta stabilità termica, resistenza a proteasi e cambiamenti di pH e non risulta tossica alle cellule. **Ciò la rende adatta ad essere espressa in un gran numero di cellule e organismi diversi.**

La GFP può essere fusa ad un'altra proteina, senza che le proprietà di entrambe risultino modificate



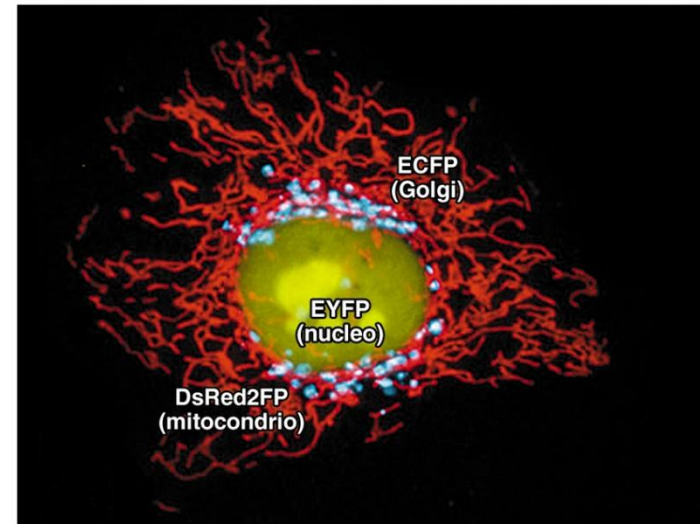
← proteina di fusione

La sequenza di una proteina di fusione contenente GFP può essere trasferita ("transfettata") in una cellula, dove potrà essere espressa e quindi osservata grazie alla fluorescenza verde (es.: proteina di fusione GFP/ β -actina).



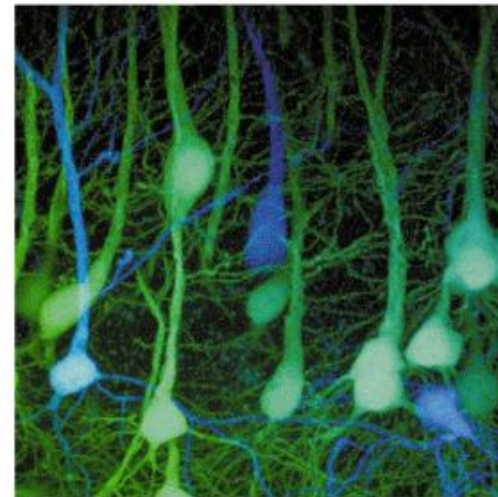
Recentemente sono state trovate varianti della GFP, con fluorescenza gialla, rossa, azzurra, etc...

Immagine al microscopio confocale di una cellula co-transfettata con vettori contenenti le sequenze delle proteine fluorescenti **EYFP** (*Enhanced Yellow Fluor. Protein*, **ECFP** (*Enhanced Cyan Fl. Pr.*), e **DsRed2FP** fuse, rispettivamente, con **proteine nucleari** (fluorescenza gialla), proteine **dell'apparato di Golgi** (fluorescenza azzurra), e **mitocondriali** (fluorescenza rossa).



OOBA © 2007 edl.ermes milano

Sezione di cervello di un topo in cui sono visibili 2 tipi di neuroni fluorescenti: quelli colorati in blu e quelli in verde. Questo topo deriva dall'accoppiamento di topi transgenici i cui neuroni sono marcati rispettivamente con ciascuna delle due proteine fluorescenti



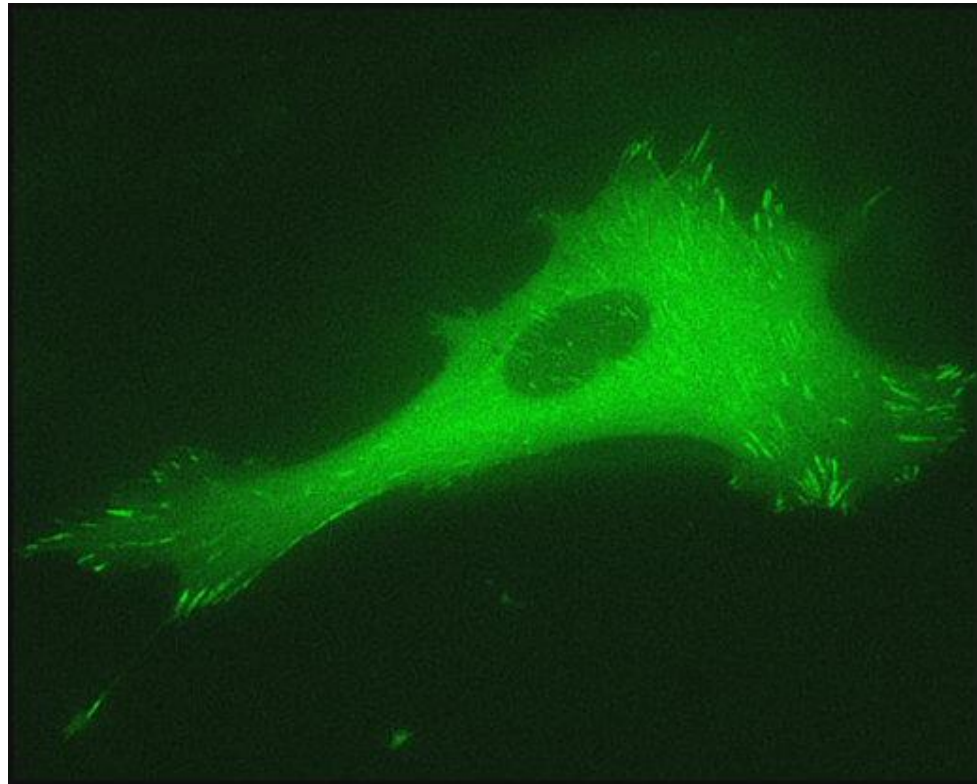
***Time-lapse* video-microscopia di cellule in coltura contenenti proteine di fusione (Caderina-GFP)**

La marcatura con GFP della proteina “caderina” permette di vederne la distribuzione in vivo in cellule epiteliali transfettate. Con la time-lapse microscopy è possibile seguirne gli spostamenti (vedi VIDEO su Moodle).

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

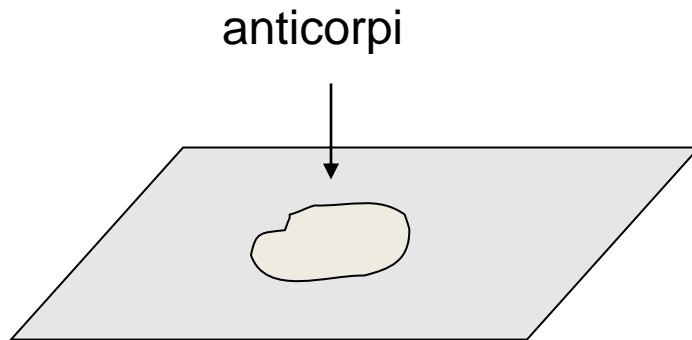
Osservare la ridistribuzione della proteina di fusione nel momento in cui la cellula isolata entra in contatto con le altre (maggiore concentrazione nei punti di adesione tra le cellule).





Come possiamo studiare la localizzazione di mRNA specifici?

Tecniche immunologiche:
Interazioni anticorpo-antigene



Risultato:
localizzazione di proteine

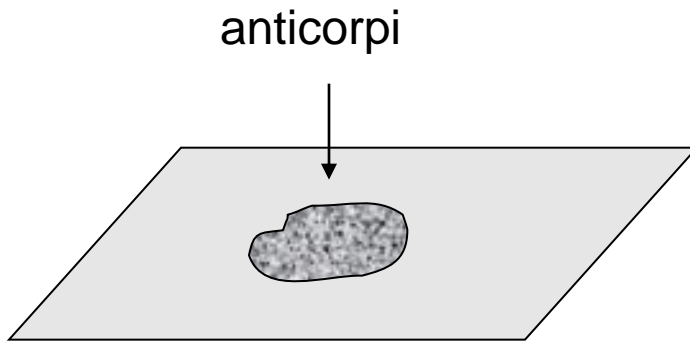
Quali tecniche?



Risultato:
localizzazione di mRNA

Tecniche immunologiche:

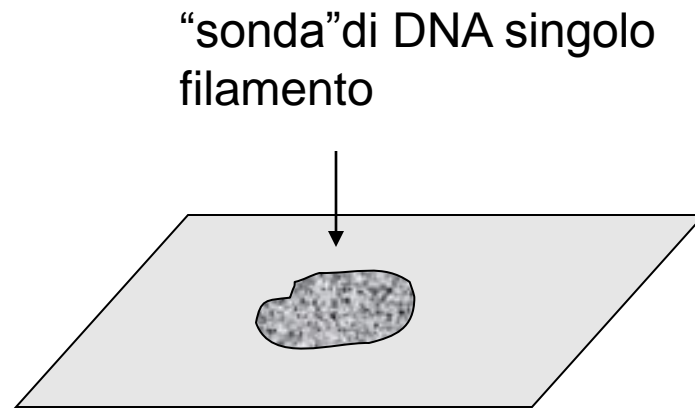
Interazioni anticorpo-antigene



Risultato:
localizzazione di proteine

Tecniche ibridazione *in situ*

Interazioni ac. nucleici-ac. nucleici



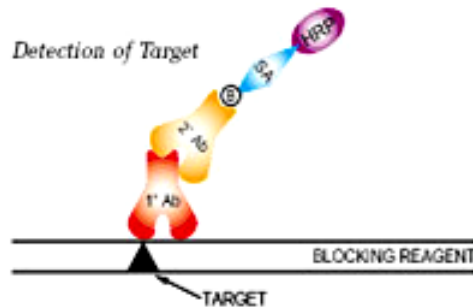
Risultato:
localizzazione di mRNA

Immunohistochemistry

Antibody
(protein)

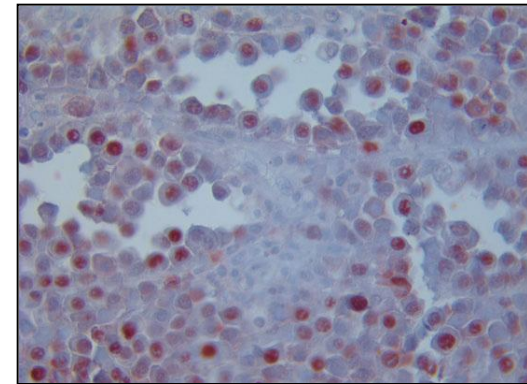
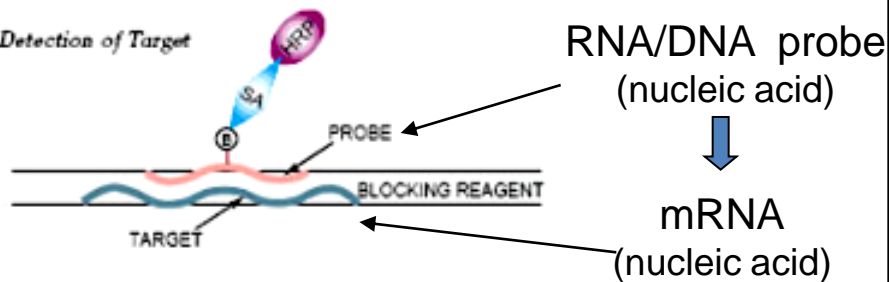


Antigen
(protein)

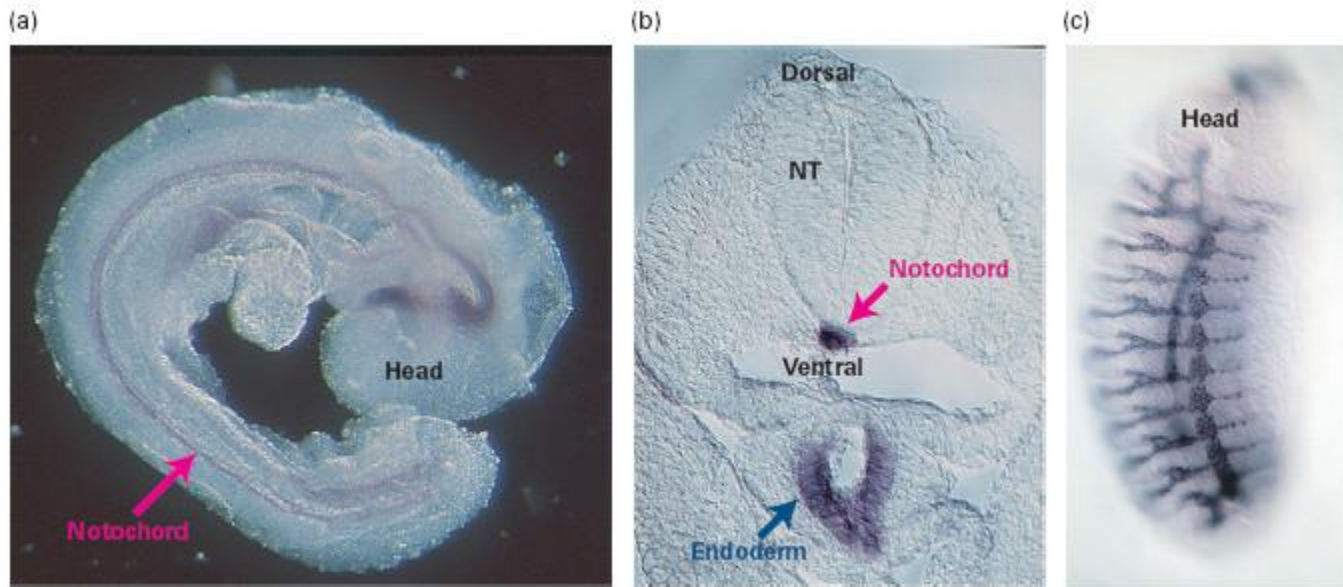


In situ hybridization

Detection of Target



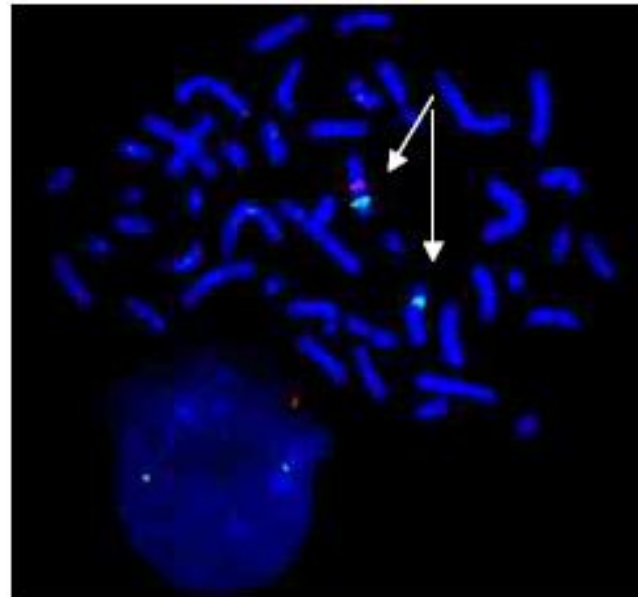
Ibridazione *in situ* per l'RNA del virus Epstein-Barr (EBER) in un linfoma plasmablastico di un paziente. Marcatura marrone dei nuclei delle cellule infette EBER.



In situ hybridization can detect activity of specific genes in whole and sectioned embryos. The specimen is permeabilized by treatment with detergent and a protease to expose the mRNA to the probe. A DNA or RNA probe, specific for the mRNA of interest, is made with nucleotide analogs containing chemical groups that can be recognized by antibodies. After the permeabilized specimen has been incubated with the probe under conditions that promote hybridization, the excess probe is removed with a series of washes. The specimen is then incubated in a solution containing an antibody that binds to the probe. This antibody is covalently joined to a reporter enzyme (e.g., horseradish peroxidase or alkaline phosphatase) that produces a colored reaction product. After excess antibody has been removed, substrate for the reporter enzyme is added. A colored precipitate forms where the probe has hybridized to the mRNA being detected. (a) A whole mouse embryo at about 10 days of development probed for *Sonic hedgehog* mRNA. The stain marks the notochord (red arrow), a rod of mesoderm running along the future spinal cord. (b) A section of a mouse embryo similar to that in part (a). The dorsal/ventral axis of the neural tube (NT) can be seen, with the *Sonic hedgehog*-expressing notochord (red arrow) below it and the endoderm (blue arrow) still farther ventral. (c) A whole *Drosophila* embryo probed for an mRNA produced during trachea development. The repeating pattern of body segments is visible. Anterior (head) is up; ventral is to the left. [Courtesy of L. Milenkovic and M. P. Scott.]

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

Ibridazione della sonda fluorescente su 2 cromosomi metafasici omologhi



dalle sezioni di tessuto/cellule intere ... alle molecole in provetta

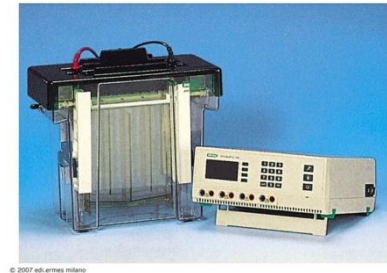
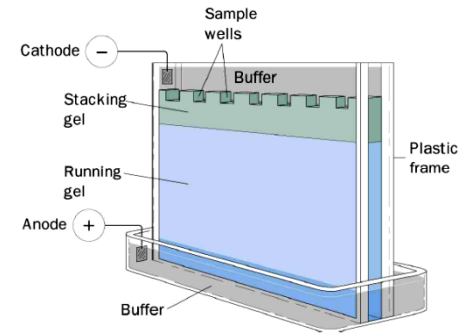
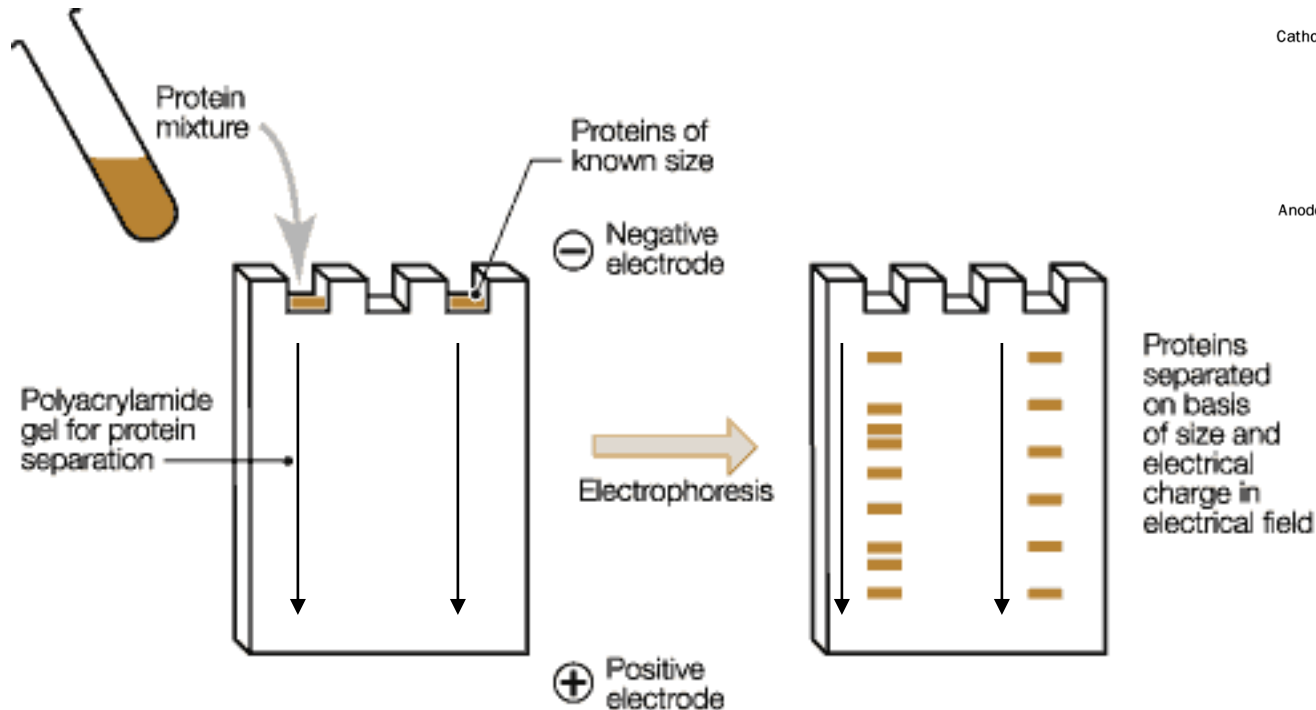


Tecniche biochimico-molecolari comunemente utilizzate da chi studia la biologia delle cellule e dei tessuti

	<u>Estrazione</u>	<u>Specificità di riconoscimento</u>
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

WESTERN BLOTTING

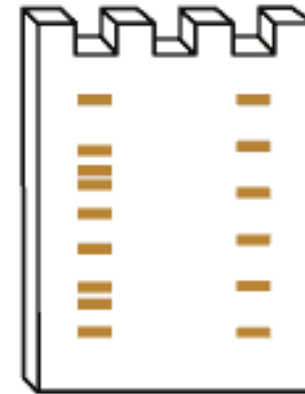
1. Estrazione delle proteine
2. Separazione delle proteine mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide



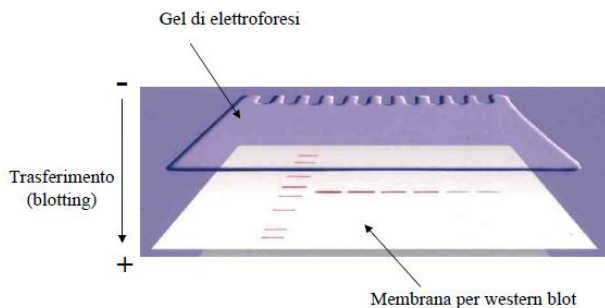
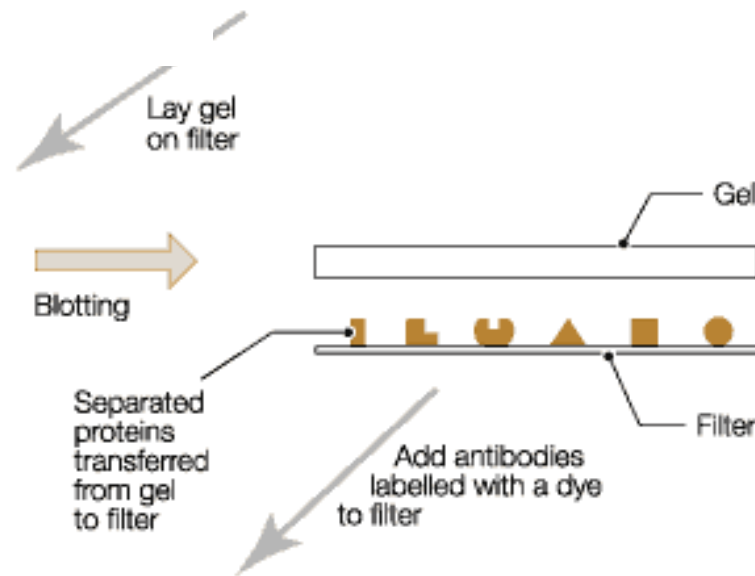
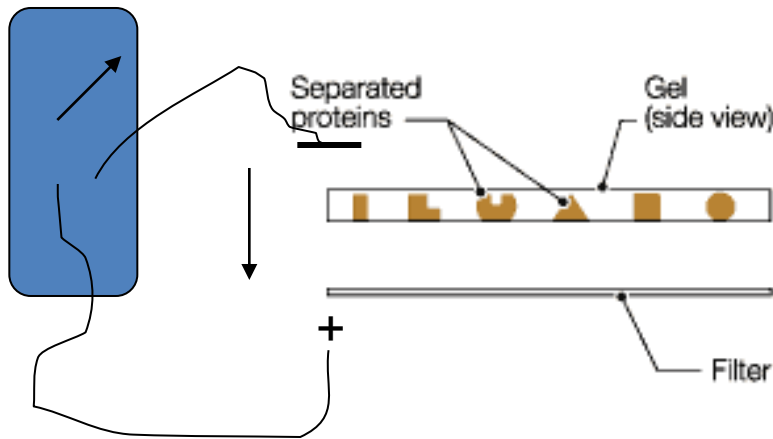
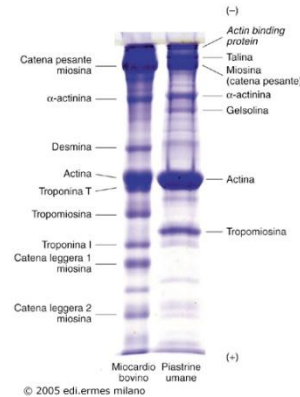
Un campione (estratto proteico) contenente una miscela di proteine diverse, tutte caricate negativamente (con SDS), viene immesso nel pozzetto e viene poi sottoposto ad un campo elettrico. Le proteine migreranno verso il polo positivo (in basso). La separazione avviene in funzione del peso molecolare di ciascuna proteina. Quelle più piccole, di più basso peso molecolare, migrano più rapidamente all'interno delle "maglie" del gel verso il polo positivo.

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'incubazione con gli anticorpi: una **membrana di nylon o di nitrocellulosa** (assomiglia ad un foglio di carta della dimensione del gel)

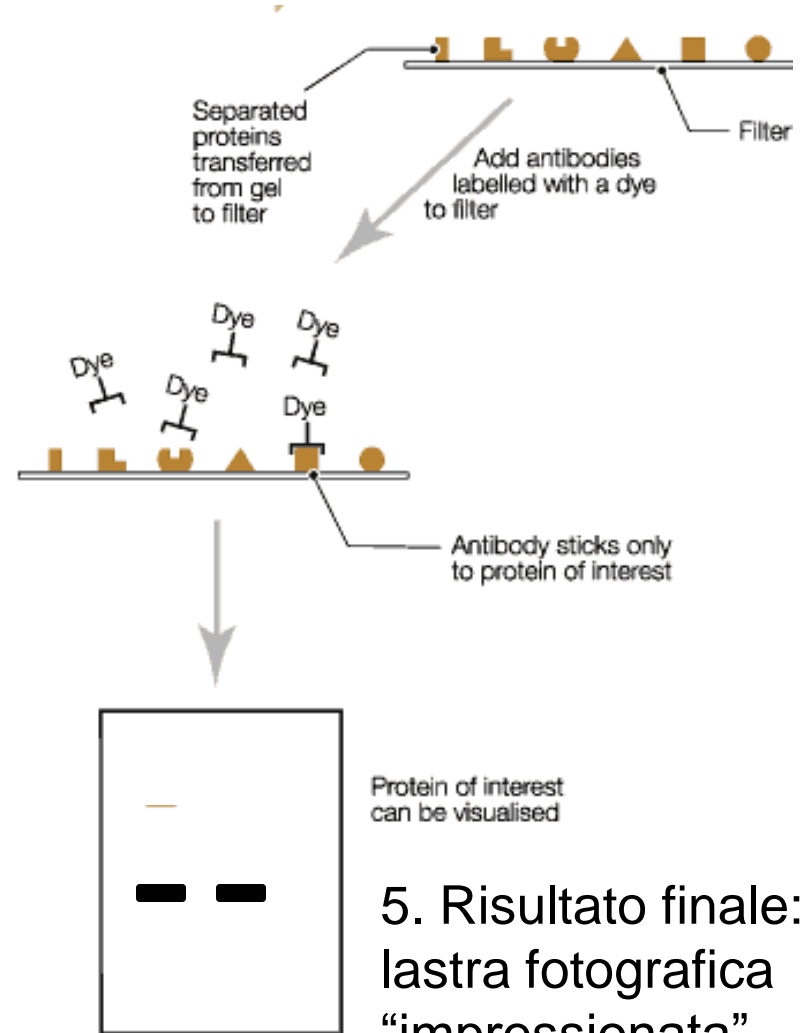
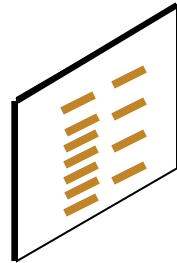
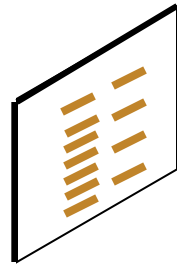


Proteins separated on basis of size and electrical charge in electrical field



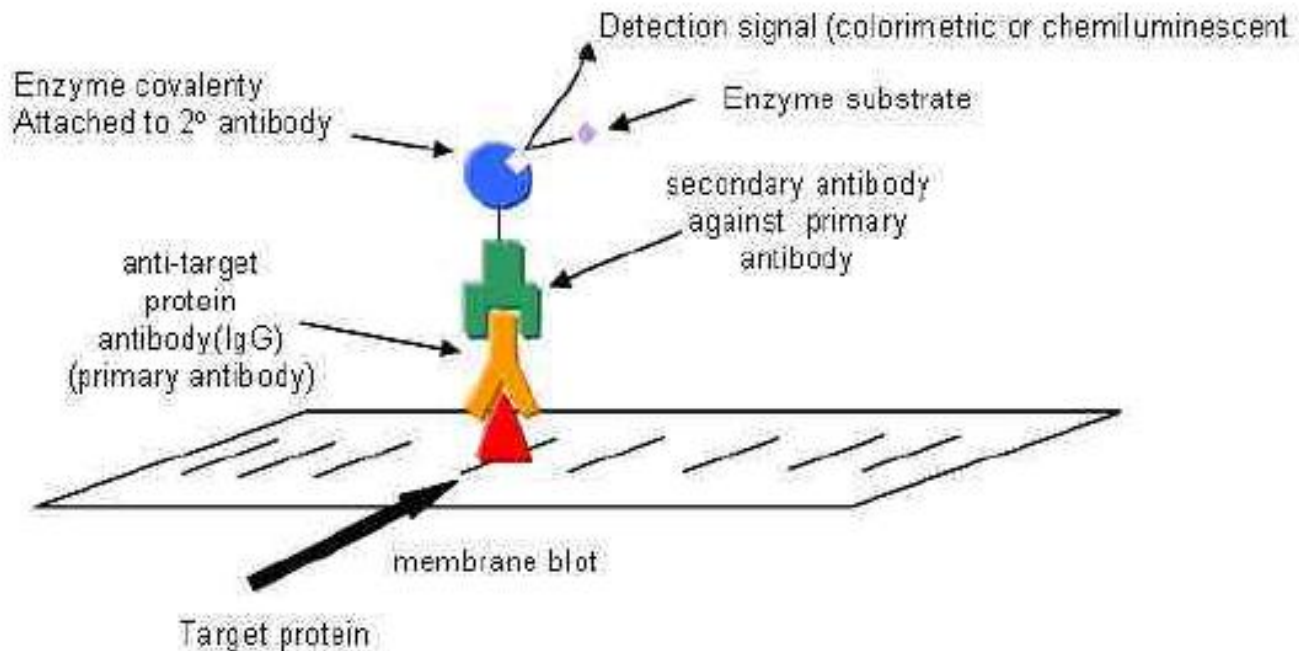
4. Incubazione della membrana con anticorpi e rivelazione

La membrana è poi incubata con l'anticorpo primario, lavata, incubata con l'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 lo sviluppo fotografico della lastra, si potranno osservare eventuali bande nere che corrispondono alla presenza della proteina studiata (antigene).



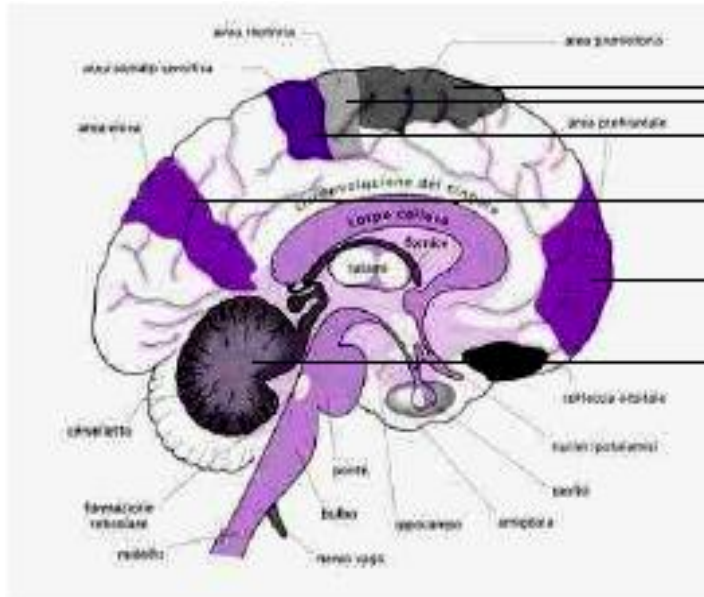
5. Risultato finale:
lastra fotografica
“impressionata”

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



Esempio: analisi dell'espressione di diverse proteine in 6 distinte regioni cerebrali

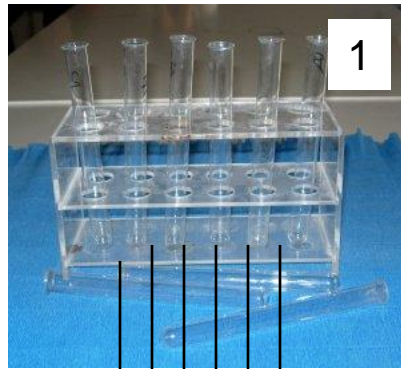
Prelievo delle 6 regioni = campioni 1-6



1. Estrazione delle proteine da ciascun campione

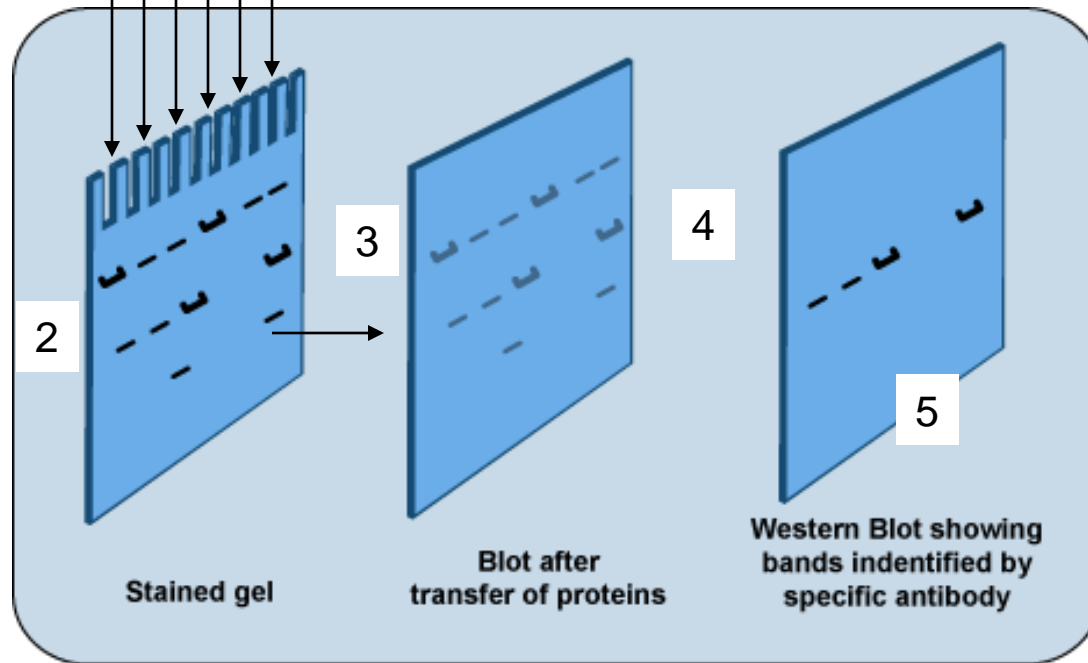


1. Estrazione delle proteine e caricamento "positivo";



2. Elettroforesi;

3. Trasferimento dal gel di elettroforesi alla membrana ("blot"),



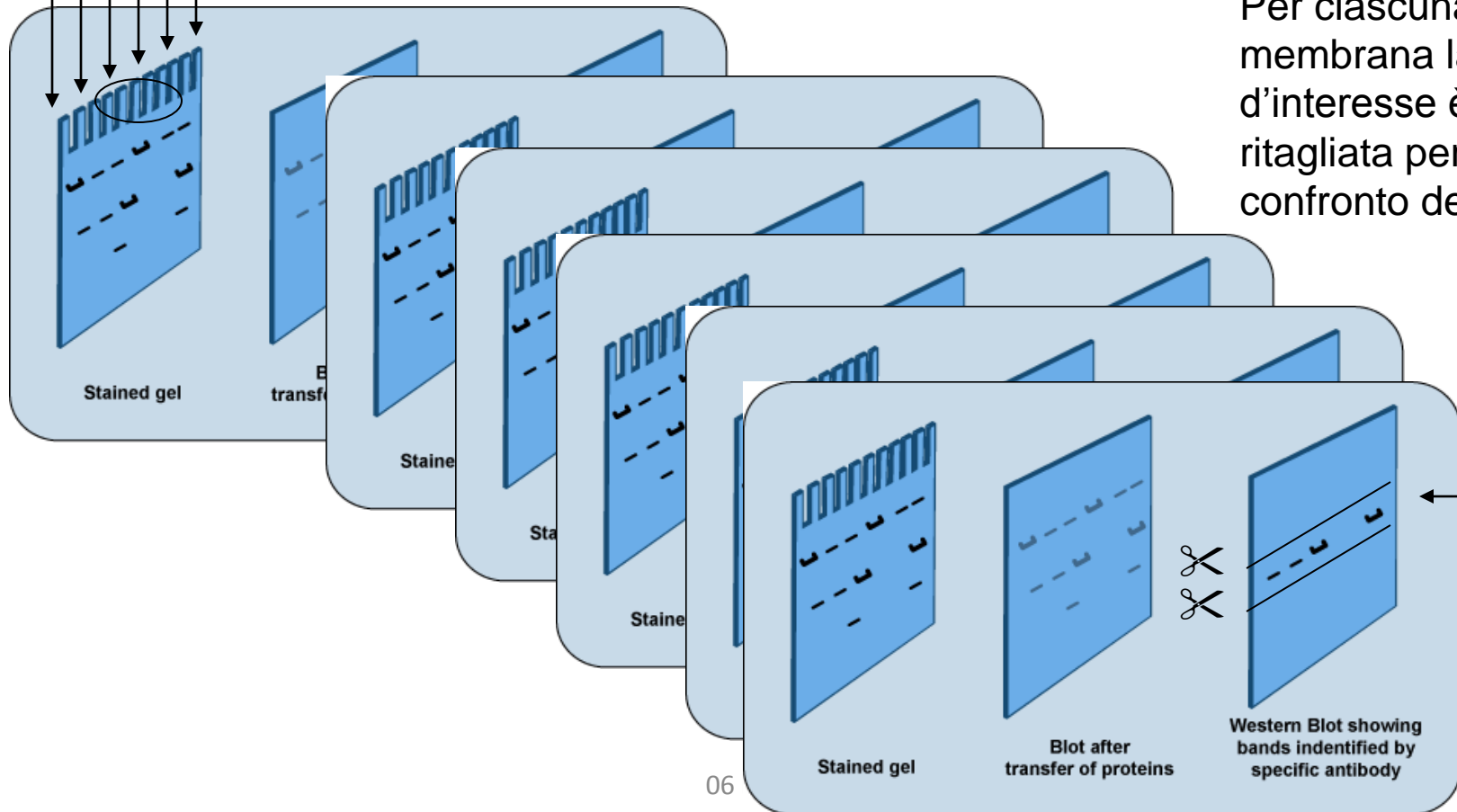
5. Lastra fotografica dopo lo sviluppo

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

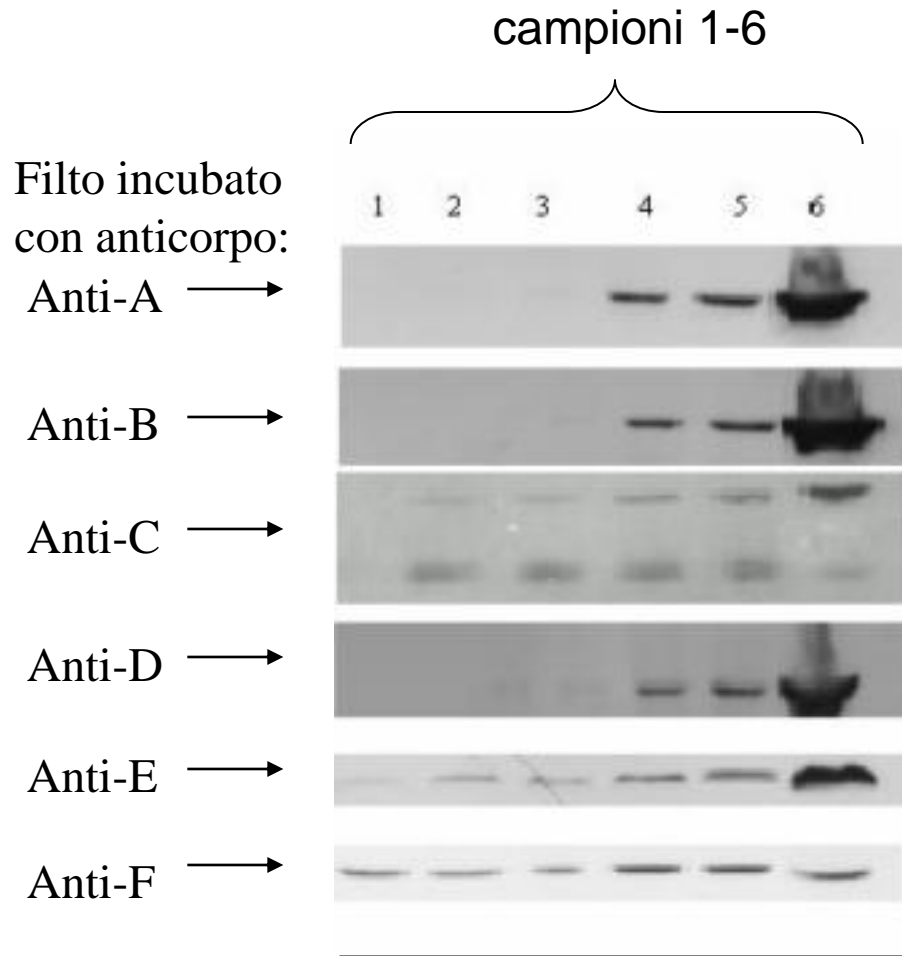
---->

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 ciascuna membrana la zona d'interesse è stata ritagliata per il confronto dei risultati



Presentazione dei Risultati:



Prima interpretazione:

confronto “orizzontale” dei risultati

• *La proteina “C”*

• *La proteina “E”*

• *La proteina “F”*

Seconda interpretazione: confronto verticale

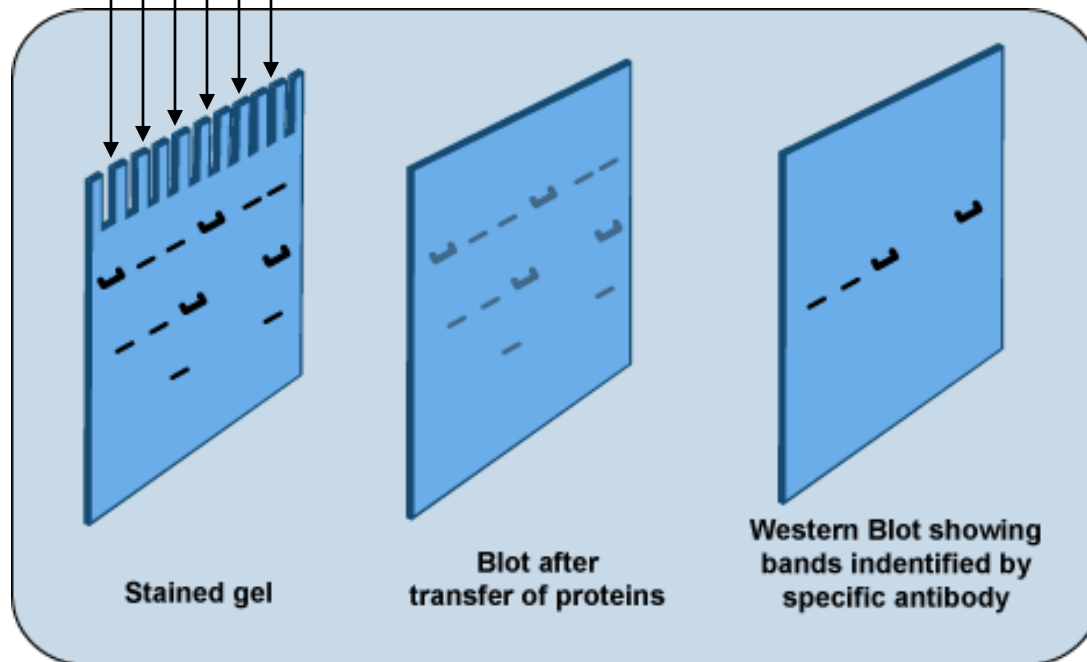
• *Le proteine “A” “B” e “D” mostrano un pattern di espressione simile*

Northern e Southern blotting

sono molto simili al Western blot nei principi. Rivelazione con sonde di acidi nucleici complementari marcati con enzimi o fluorescenti (simili a quelle utilizzate per ibridazione *in situ*)

Northern

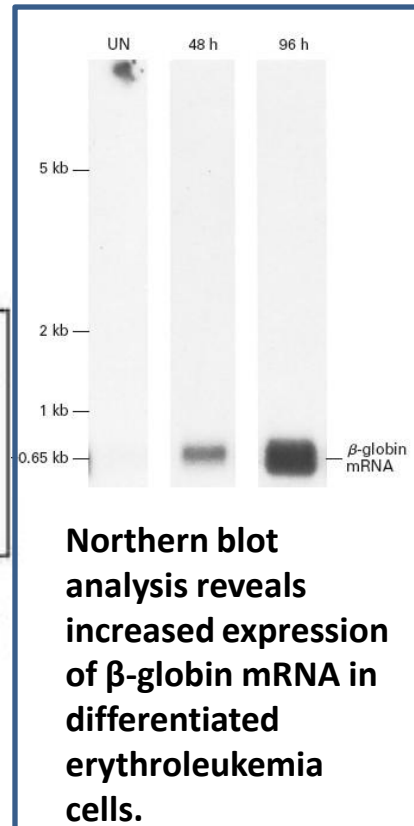
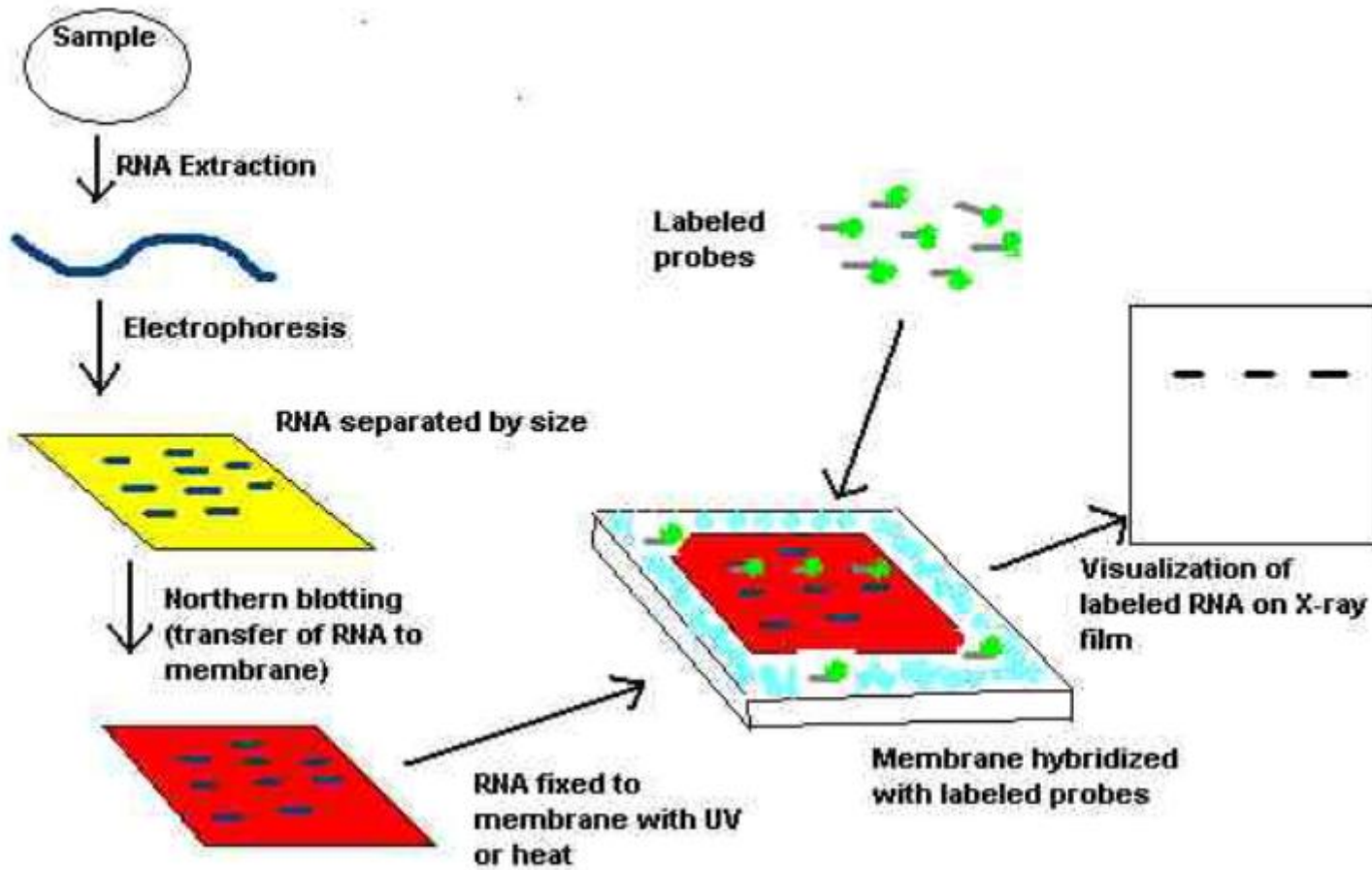
Estrazione degli RNA*
↓
Elettroforesi*
↓
Blot*
↓
ibridazione
↓
rivelazione



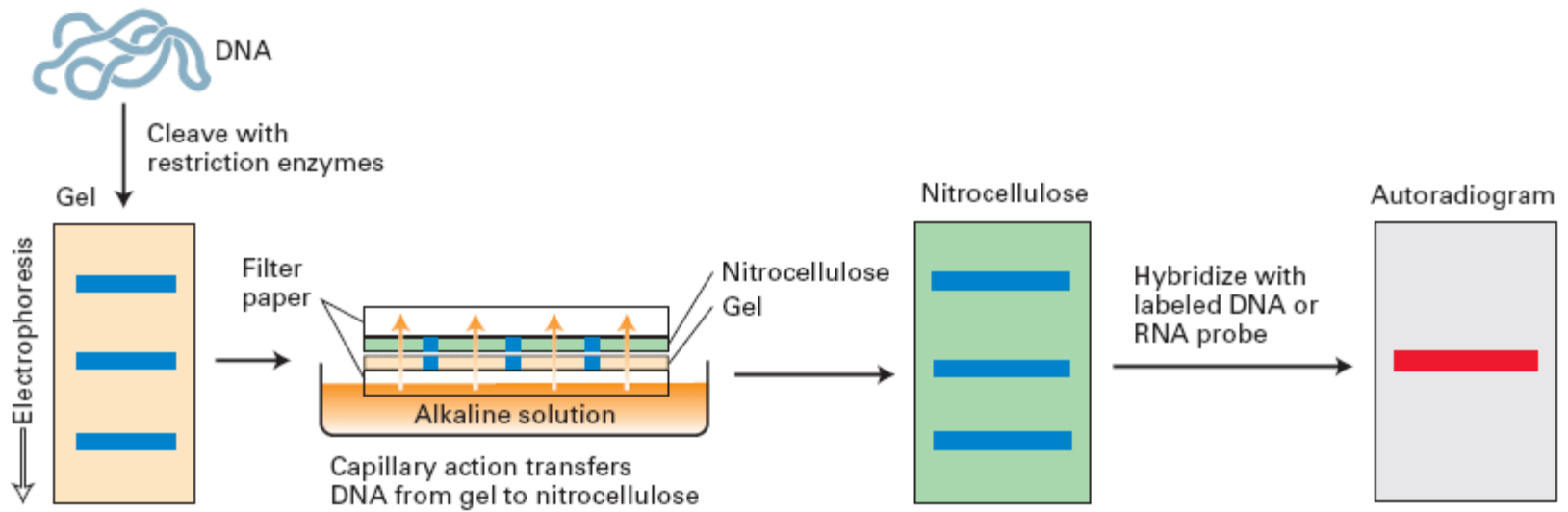
Southern

Estrazione del DNA*
↓
Elettroforesi*
↓
Blot*
↓
ibridazione
↓
rivelazione

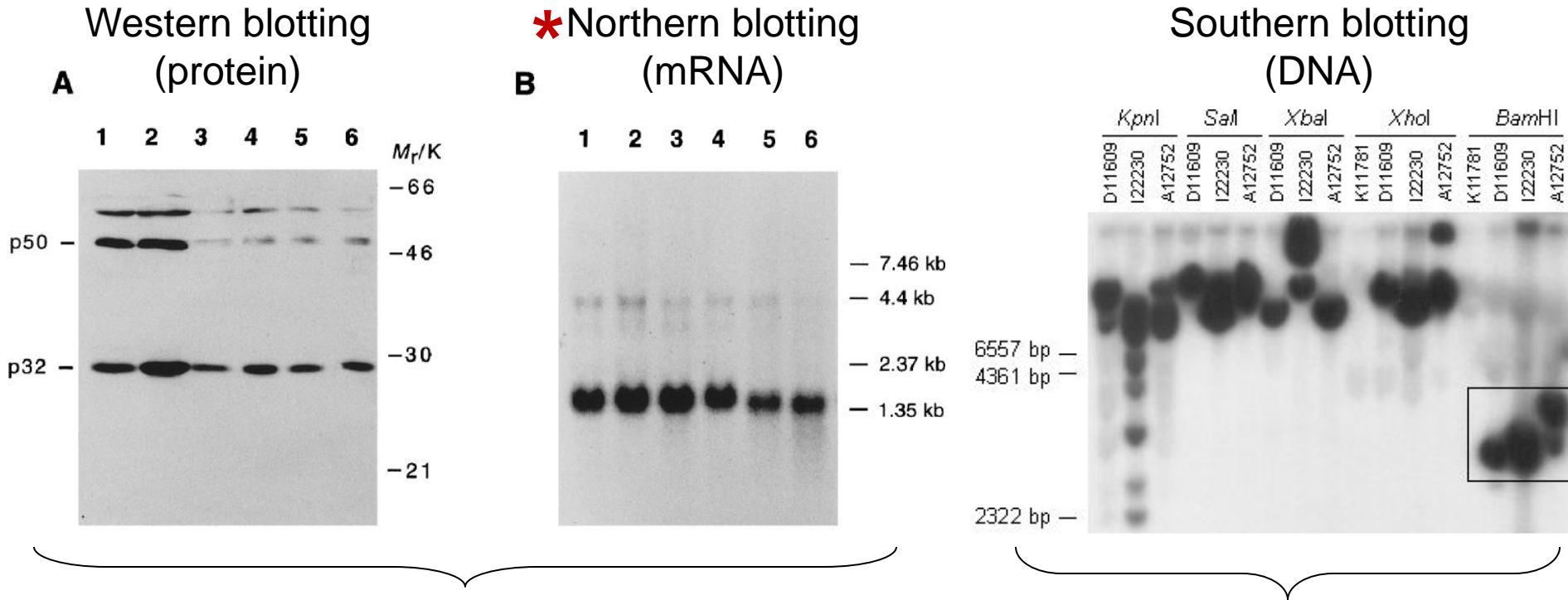
NORTHERN BLOTTING



SOUTHERN BLOTTING



I risultati di Western, Northern e Southern in apparenza si assomigliano, attenzione a non confonderli!! Leggere sempre le didascalie delle figure



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

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

* Il Northern oggi è sempre più spesso sostituito dalla tecnica dell'RT-PCR, anch'essa impiegata per determinare l'espressione di specifici mRNA da un estratto di RNA totale. Data la sensibilità di questa tecnica, si può partire da campioni molto piccoli.