

# Tecniche di laboratorio per lo studio delle macromolecole

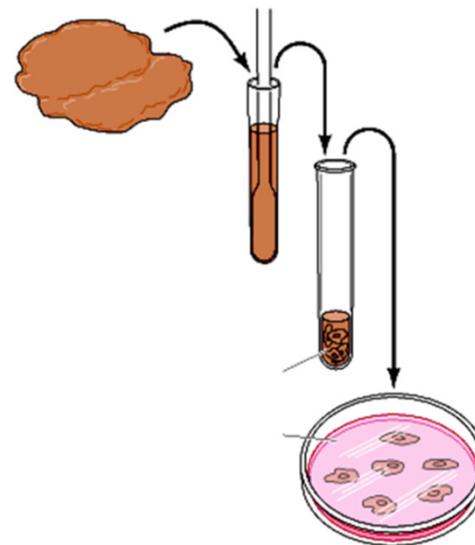
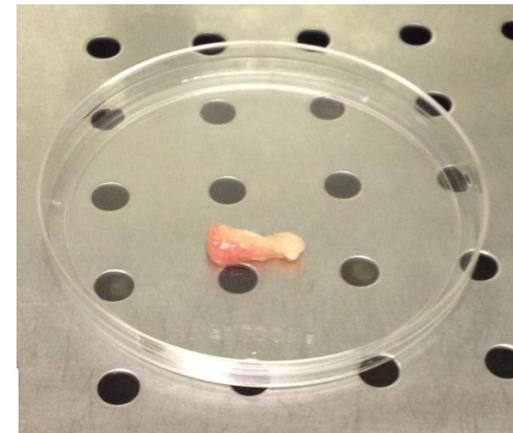
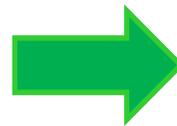
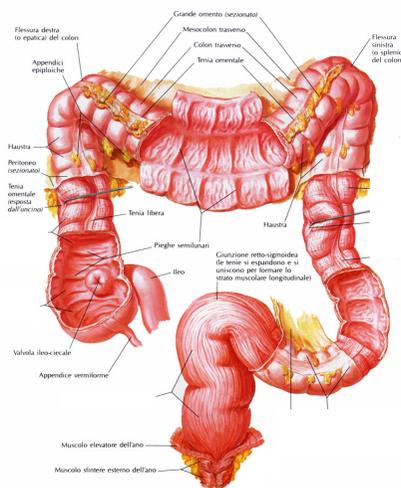
**Paola Rizzo**  
**3 Novembre 2016**

# Perché studiare le macromolecole

- Presenza di un virus (DNA del virus) in un tessuto per comprendere il ruolo nello sviluppo di una patologia – presenza di HPV nel tumore del collo uterino
- Analisi di DNA per stabilire la presenza di geni mutati causa di tumori, cardiomiopatie
- Valutare i livelli di espressione di una proteina in un tessuto per comprendere se è legata alla progressione di una patologia (placche amiloidi nel cervello di malati di Alzheimer)
- Livelli circolanti di lipoproteine che trasportano colesterolo



# Analisi di biopsia da uno dei distretti del colon: identificare una possibile mutazione del gene ras

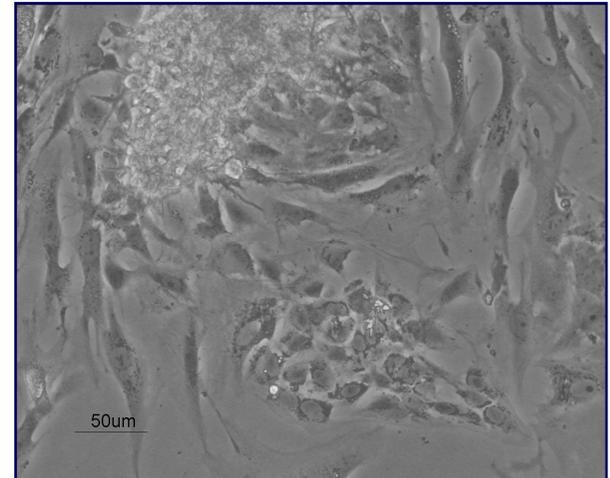
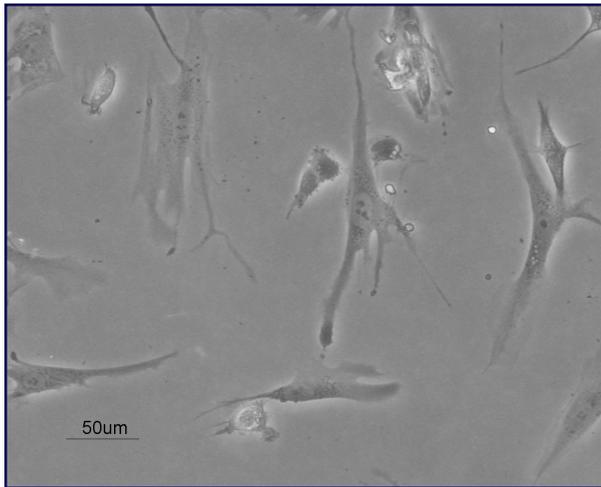
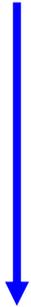
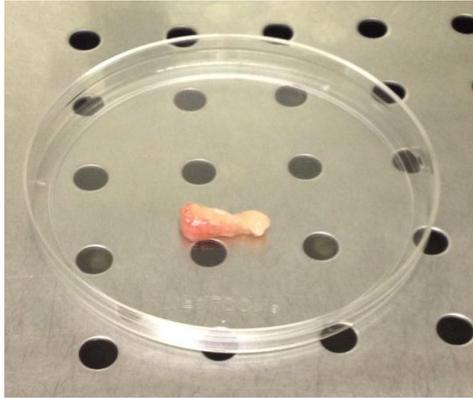


## 1) Crescita di cellule animali in coltura

### Composizione di un tipico mezzo adatto alla coltivazione di cellule di mammifero

<i>Amminoacidi</i>	<i>Vitamine</i>	<i>Sali</i>	<i>Vari</i>	<i>Proteine (necessarie nei mezzi privi di siero chimicamente definiti)</i>
Arginina Cistina Fenilalanina	Biotina Colina Folato	NaCl KCl NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Glucosio Penicillina Streptomicina	Insulina Transferrina Fattori di crescita specifici
Glutammina Isoleucina Leucina Leucina Lisina Metionina Tirosina Treonina Tryptofano Valina	Nicotinammide Panotenato Piridossale Riboflavina Tiamina	NaHCO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub>	Rosso fenolo Siero intero	

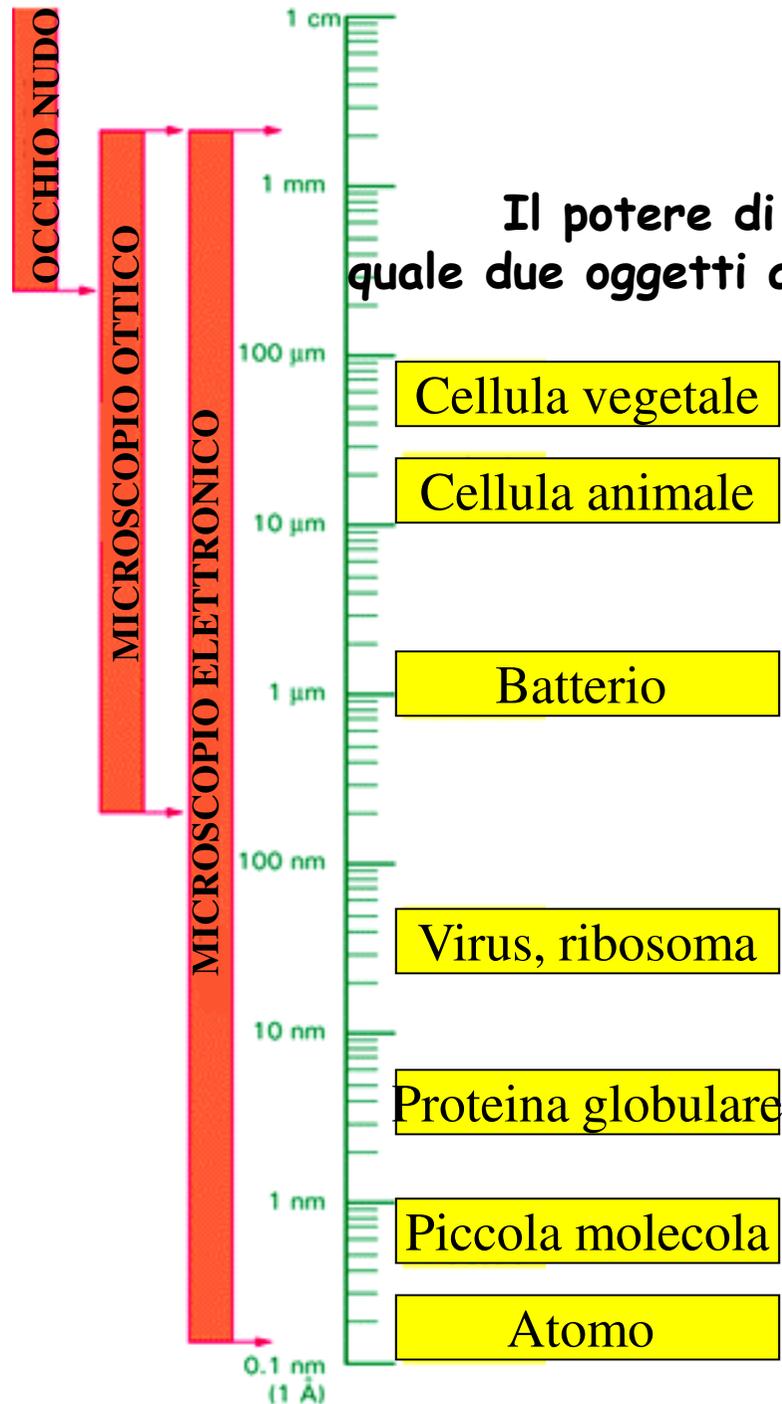
## Colture Cellulari primarie



Cellule Confluenti

## La microscopia

Il potere di risoluzione è la minima distanza alla quale due oggetti appaiono separati (occhio umano 100 micron)



Le dimensioni delle cellule e dei loro componenti su scala logaritmica; si indicano le dimensioni degli oggetti che possono essere facilmente risolti ad occhio nudo (100 micron), nel microscopio ottico (200 nanometri) e in quello elettronico 0.2 nanometri). In microscopia si usano comunemente le seguenti unità di lunghezza:

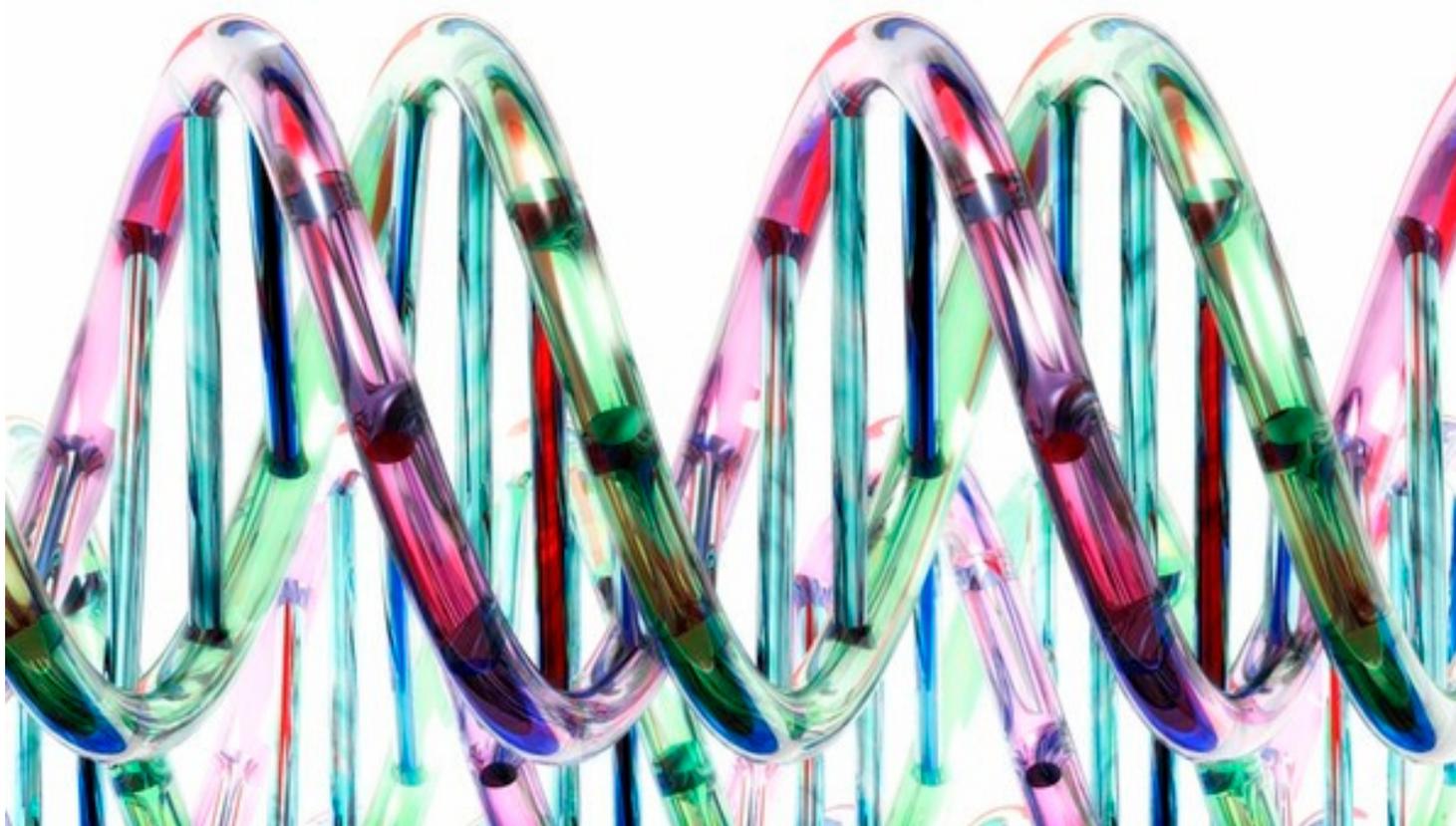
$$\mu\text{m (micrometro)} = 10^{-6} \text{ m}$$

$$\text{nm (nanometro)} = 10^{-9} \text{ m}$$

$$\text{Å (ångström, non più in uso nel S.I.)} = 10^{-10} \text{ m}$$



# Analisi di acidi nucleici (macromolecole costituite da nucleotidi)





## Estrazione di acidi nucleici

Il DNA e l'RNA possono essere estratti da cellule procariotiche e eucariotiche.

Bisogna avere un materiale di partenza:

- ✓ **Batteri**
- ✓ **Diversi tessuti biologici (animali o vegetali)**
- ✓ **Cellule derivate dai diversi tessuti biologici**
  - ✓ **Liquidi biologici (plasma/siero)**



## Estrazione DNA

### 1. Rottura e lisi delle membrane cellulari (Proteinasi)



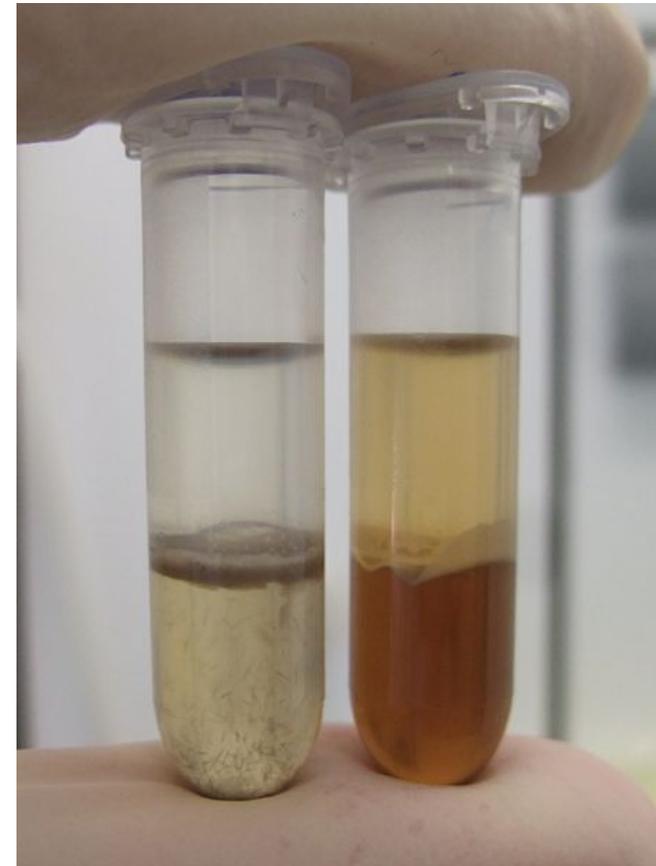


## Estrazione DNA

### 2. Eliminazione di lipidi, proteine e carboidrati (*Fenolo-Cloroformio Isoamilico*)

Si ottengono diverse fasi:

- ✓ **Superiore** contiene gli acidi nucleici
- ✓ **Interfase** di proteine denaturate
- ✓ **Inferiore** contiene lipidi e proteine con amminoacidi idrofobici





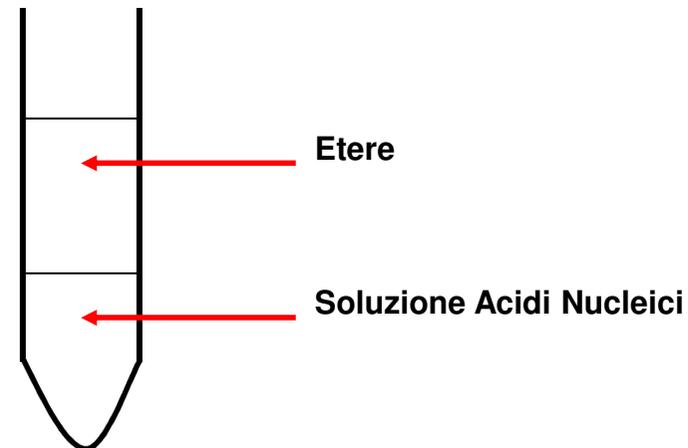
## Estrazione DNA

### 3. Eliminare residui di fenolo (Etere)

Durante la centrifugazione l'etere localizzato nella parte superiore del tubo viene allontanato

**La soluzione risultante costituisce la miscela di acidi nucleici**

**Aggiunta di Sali ed Etanolo precipita il DNA**





## Estrazione DNA

### 4. Purificazione (Etanolo)

Dopo una centrifugata,  
si crea un pellet di DNA

Il pellet andrà risospeso in H<sub>2</sub>O

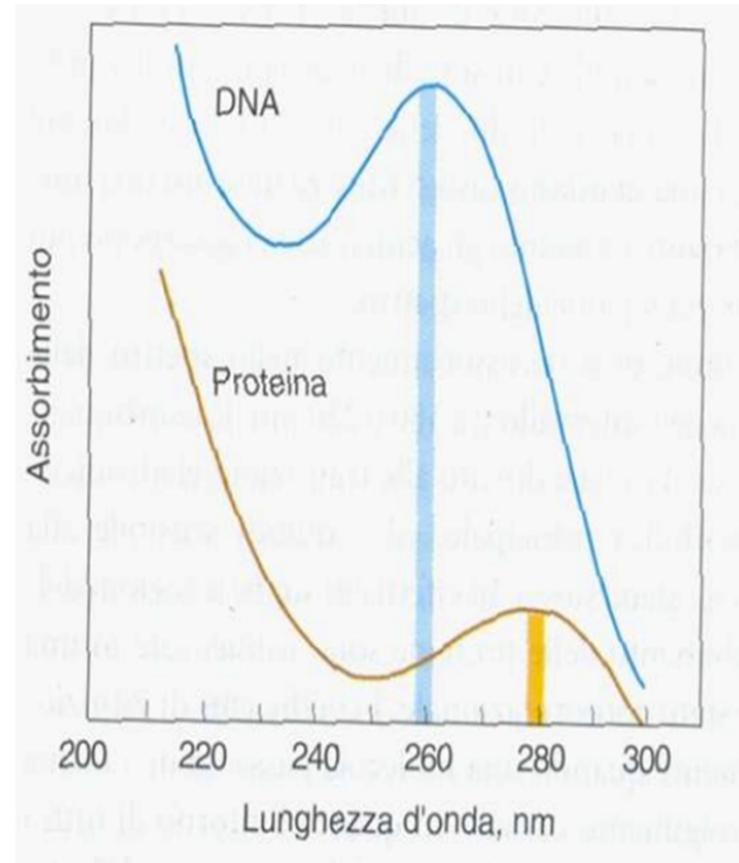




## Estrazione DNA

### 5. Quantificazione attraverso analisi spettrofotometrica

1 OD<sub>260</sub> Unit = 50µg/ml for dsDNA  
1 OD<sub>260</sub> Unit = 40µg/ml ssRNA



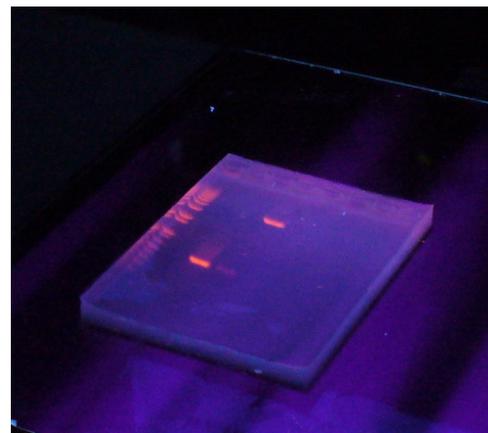
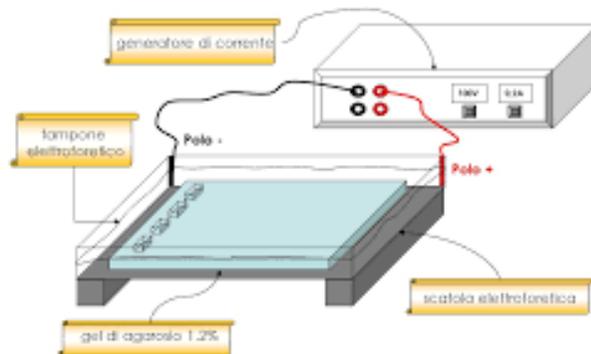
La quantità di luce assorbita è proporzionale alla concentrazione del DNA/RN,



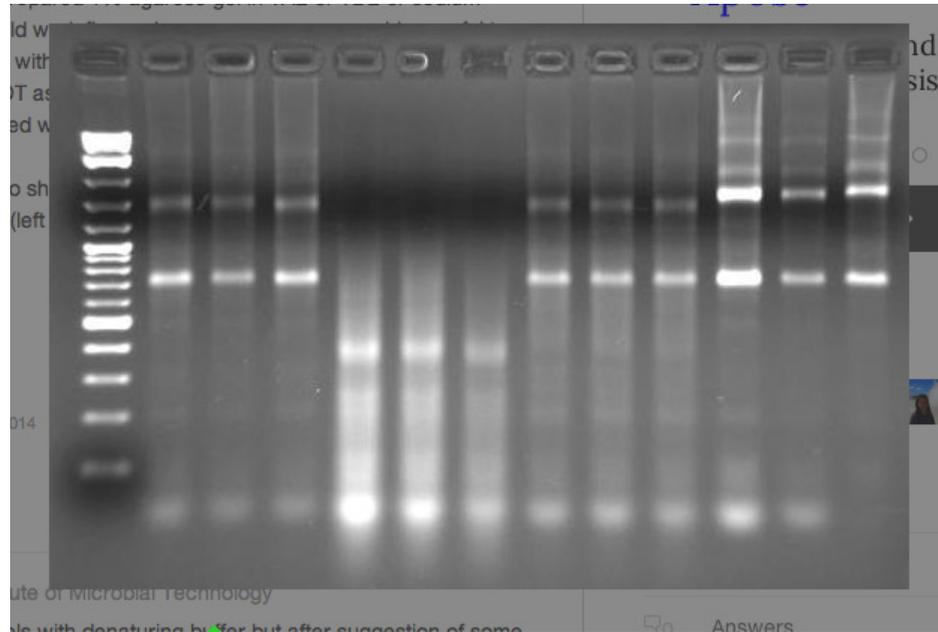
## Estrazione DNA

### 5. Verifica che l'acido nucleico sia intatto: Gel d'agarosio

#### ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO



**Gel agarosio: Visibile solo ribosomale RNA che ci dice che l'RNA non è degradato in singoli nucleotidi**



RNA non degradato

RNA degradato



## PCR – Polymerase Chain Reaction (K. Mullis, 1993)

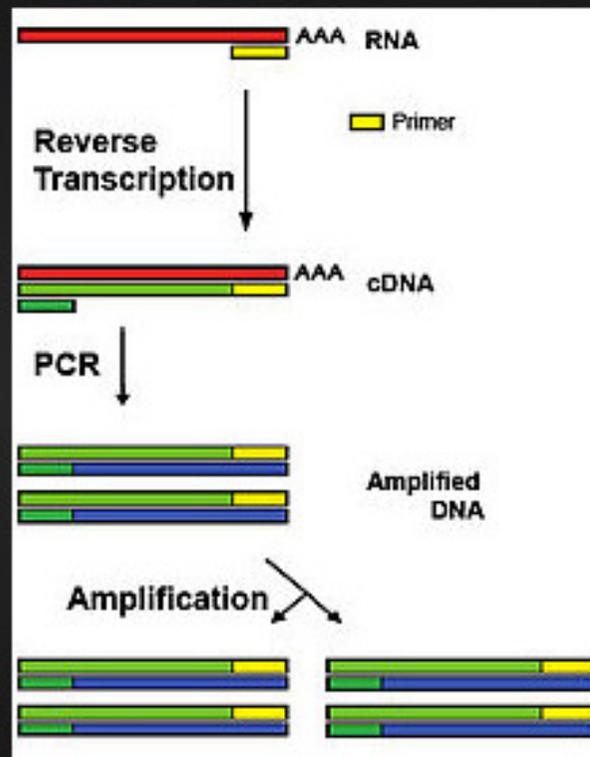


**Permette di ricostruire in vitro la duplicazione cellulare e di ottenere rapidamente più copie di un gene o di una regione di DNA in presenza di due oligonucleotidi di innesco (primers) fiancheggianti la sequenza bersaglio**

# Applicazioni della PCR

- **Verificare se nel nostro DNA sono presenti sequenze virali o batteriche**
- **Verificare se nel nostro DNA è presente una certa mutazione (puntiforme o una traslocazione)**
- **Caratterizzare il DNA per stabilirne la provenienza (medicina legale)**
- **Se stiamo lavorando con RNA, dopo averlo «copiato» in cDNA possiamo verificare se un determinato gene è espresso (quindi se è presente il cDNA (RNA di interesse))**

# L'enzima trascrittasi inversa sintetizza un filamento di DNA a partire da RNA

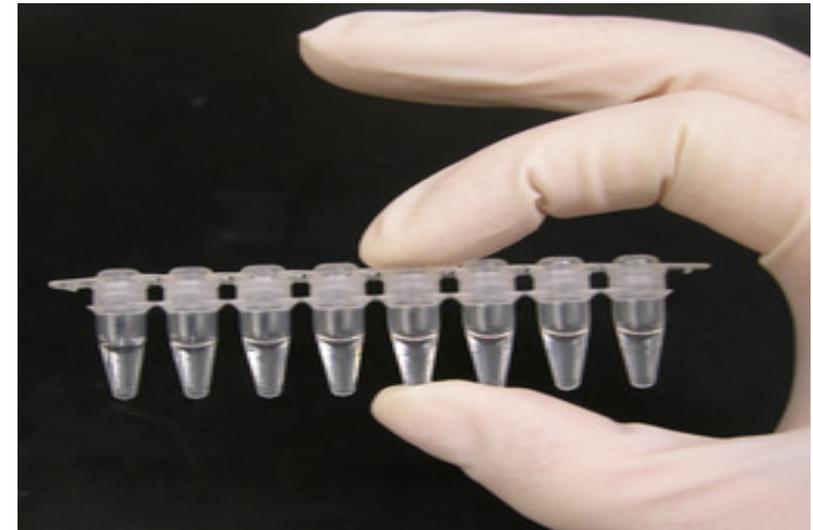




## PCR – Polymerase Chain Reaction

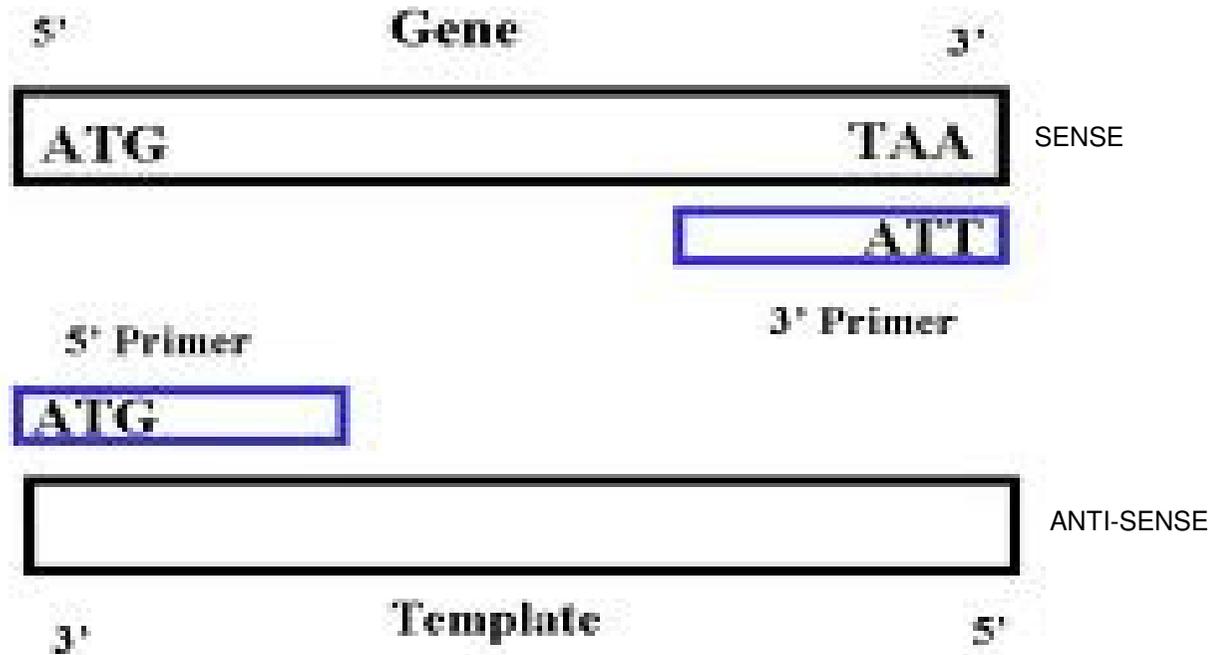
*La reazione avviene in provetta in una miscela costituita da:*

- **Tampone** (KCl 50mM, Tris-HCl 10mM, pH=8,3);
- **dNTPs** (BASI AZOTATE (adenina, guanina, timina, citosina)): il substrato sul quale lavora la polimerasi per la costruzione *ex novo* dei filamenti di DNA;
- **2 primers sintetici a singola elica!!!!**
- **DNA polimerasi**
- **TEMPLATO** (DNA)





## PRIMERS

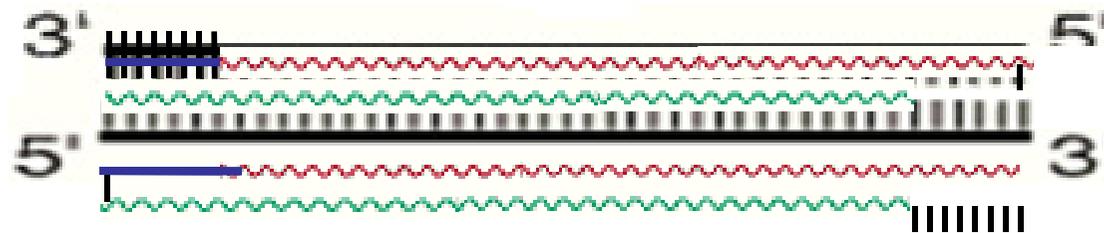


*I primer sono complementari alla sequenza da amplificare e sono di circa 17-30 nt*

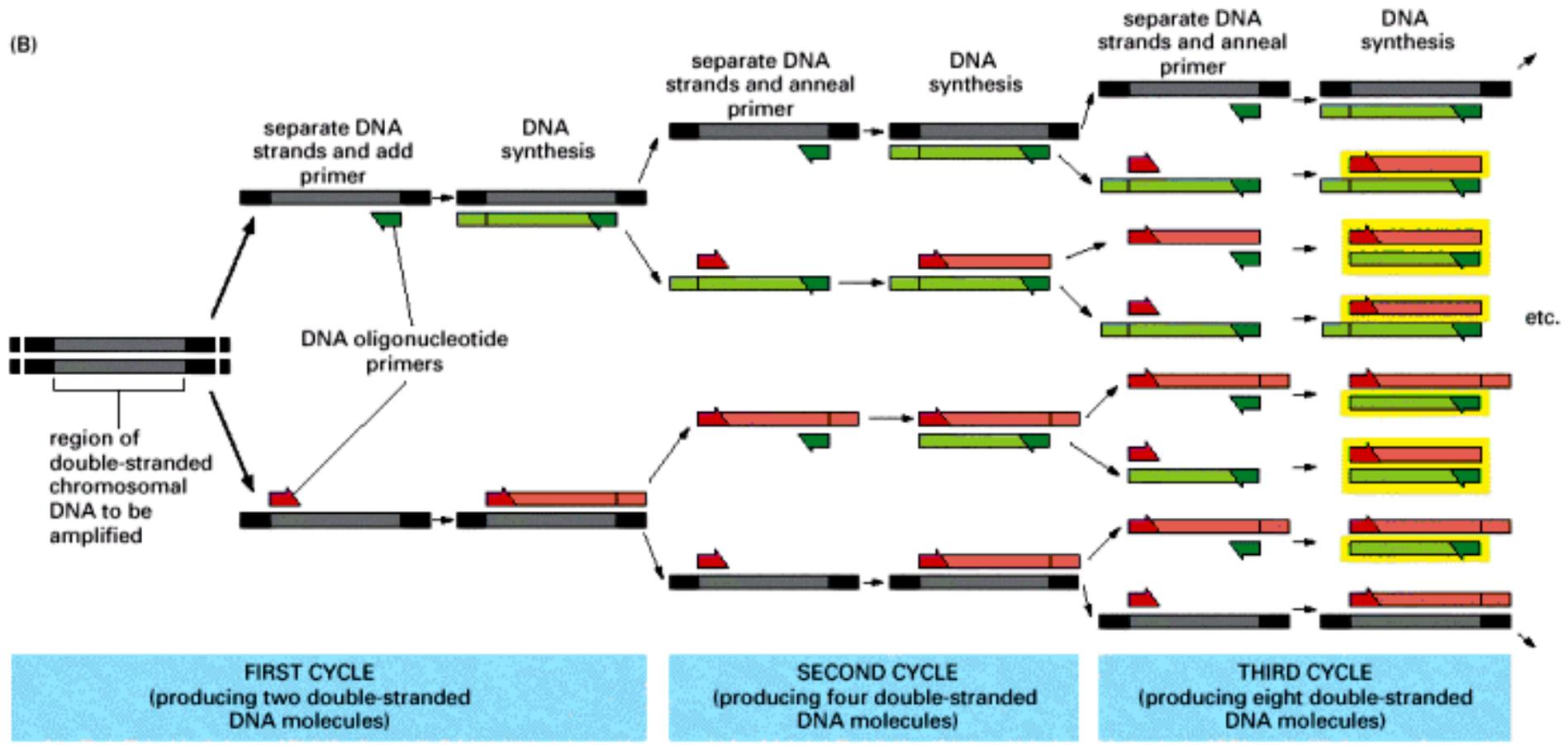
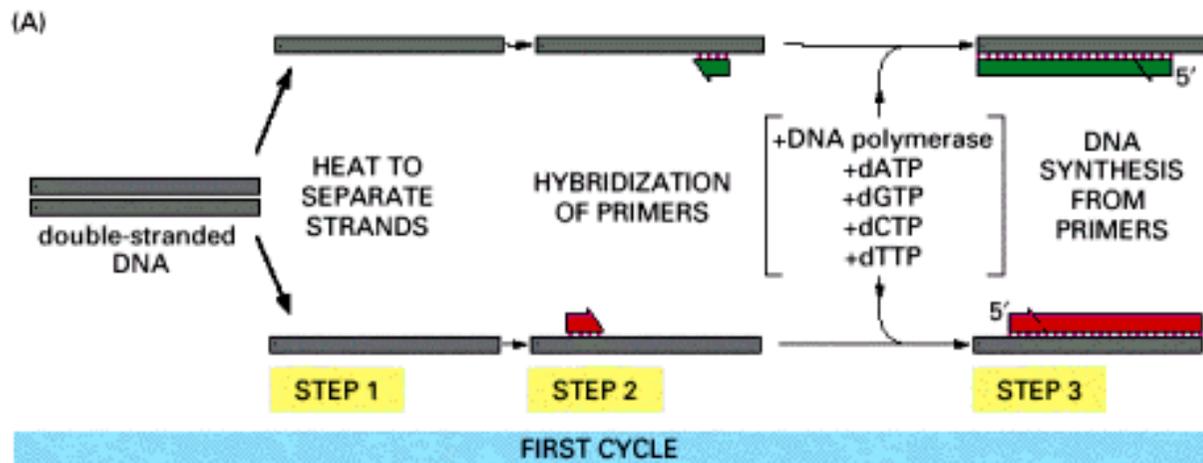


## FASI DELLA PCR

ANNEALING  
DIPARTIMENTO DI GENETICA  
~ 50 °C



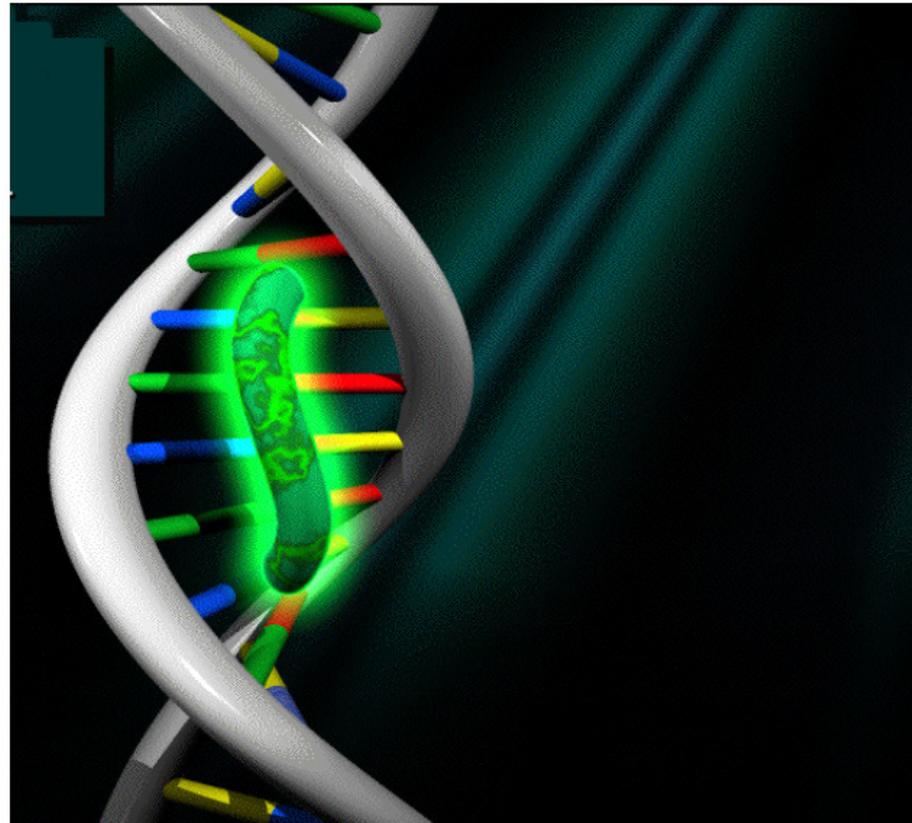
# PCR: Polymerase Chain Reaction





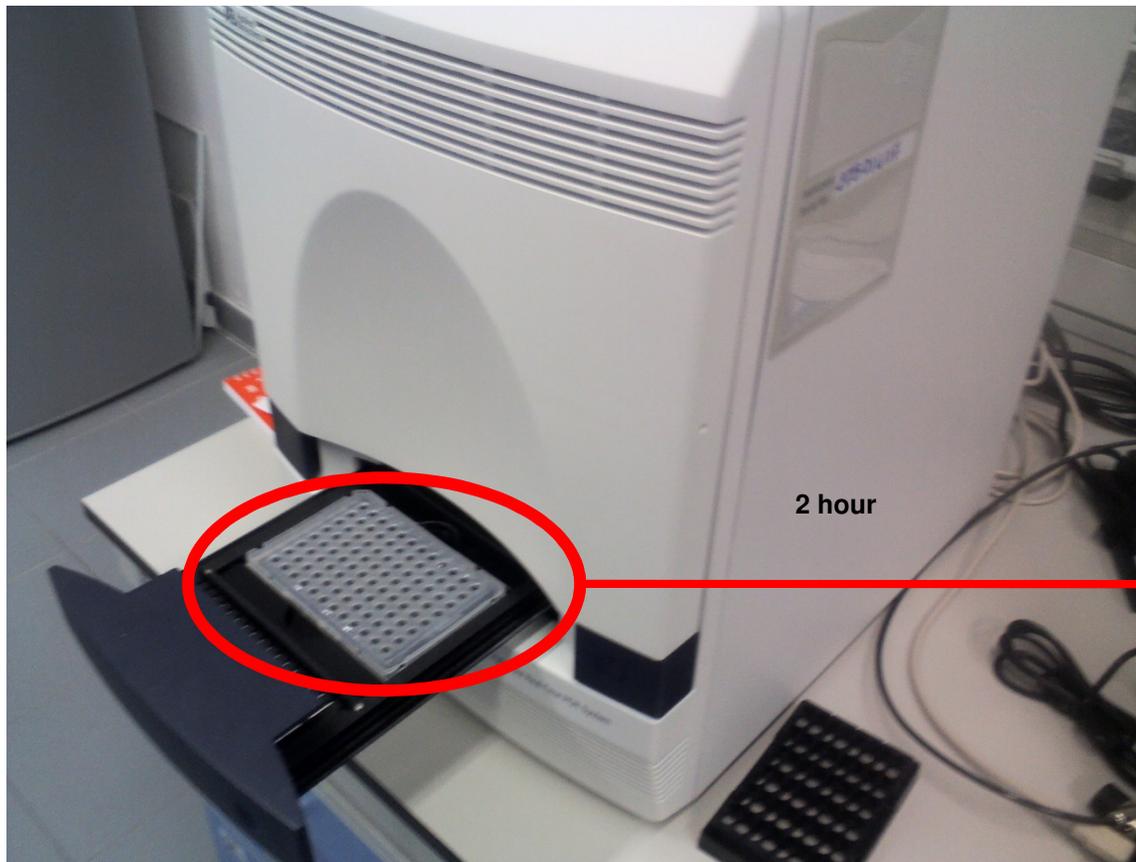
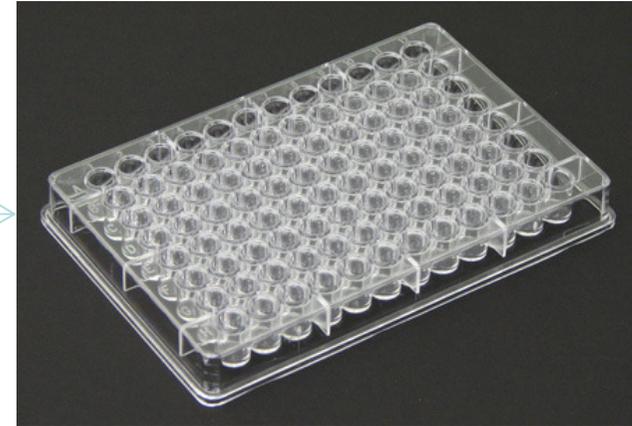
## SYBR Green

Utilizza una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA





## REAL TIME PCR



## computer analysis



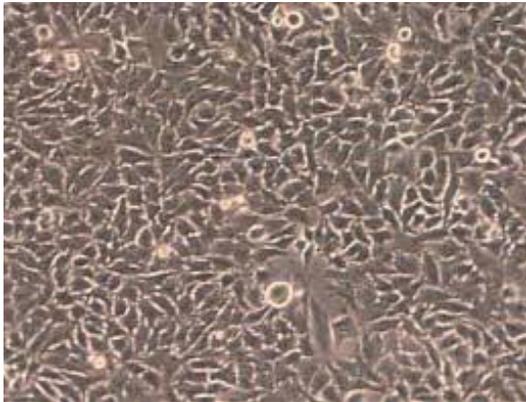


# LE PROTEINE

- a) Sono ***macromolecole*** costituite dall' unione di un gran numero di unità elementari: gli ***amminoacidi***
- b) ***Ciascuna proteina*** ha una ***propria struttura tridimensionale*** che la rende capace di svolgere specifiche funzioni biologiche



1



Cellule a confluenza

2



Si staccano dalla fiasca (Trypsina)

3



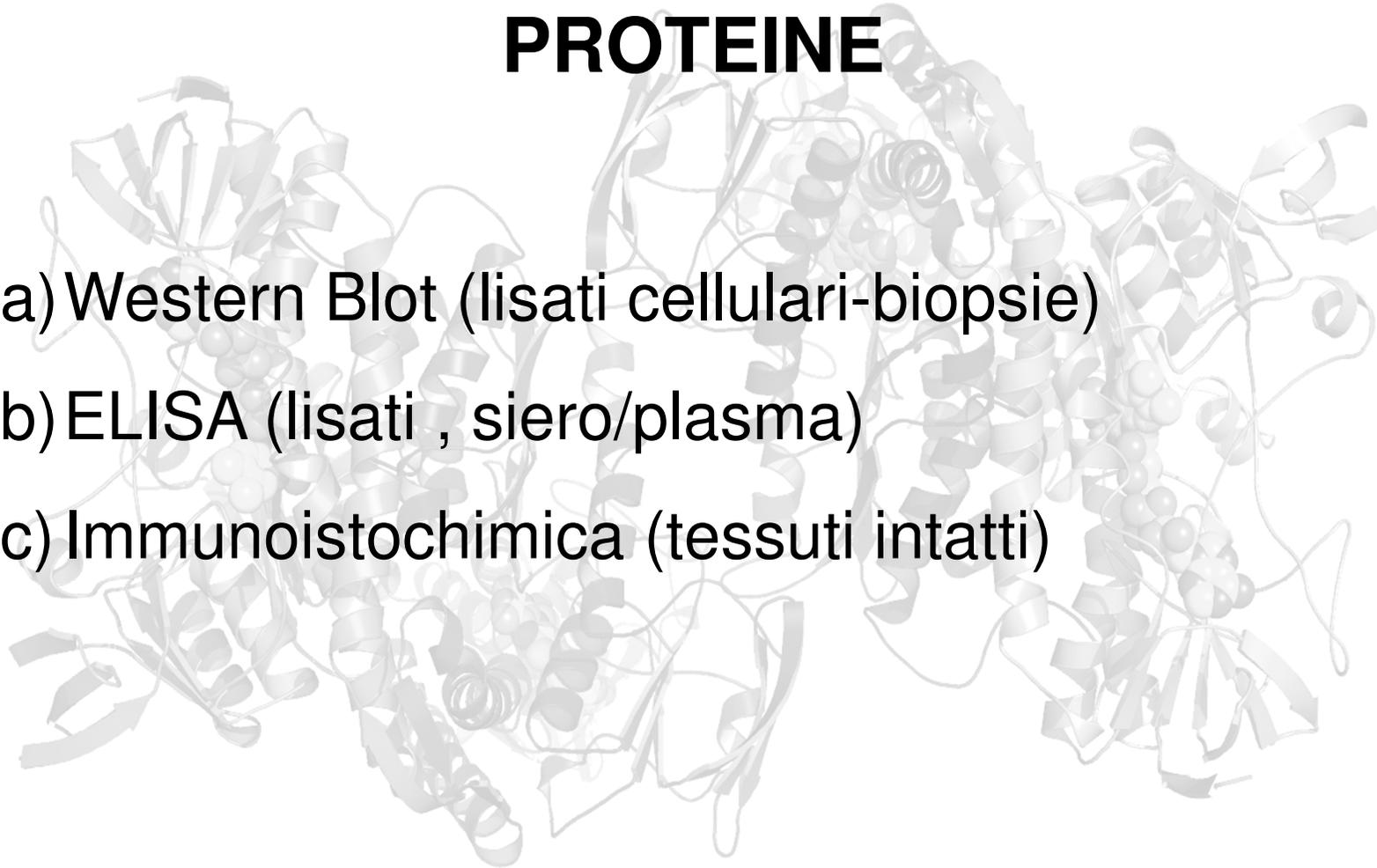
Cellule staccate (in sospensione)

4. Per provocare la lisi cellulare e rendere disponibili le proteine si usano detergenti che dissolvono le membrane in soluzioni tampone a pH fisiologico (LISATO CELLULARE)



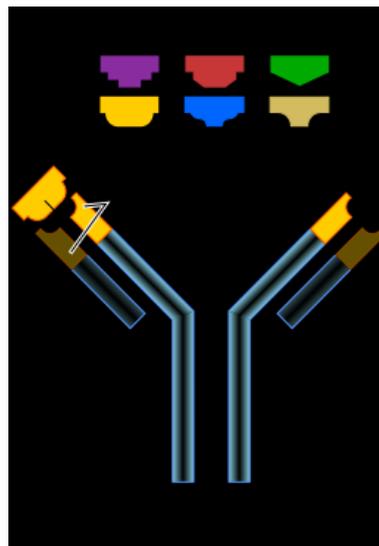
# METODI DI RILEVAZIONE DELLE PROTEINE

- a) Western Blot (lisati cellulari-biopsie)
- b) ELISA (lisati , siero/plasma)
- c) Immunohistochimica (tessuti intatti)



# Cosa sono gli anticorpi

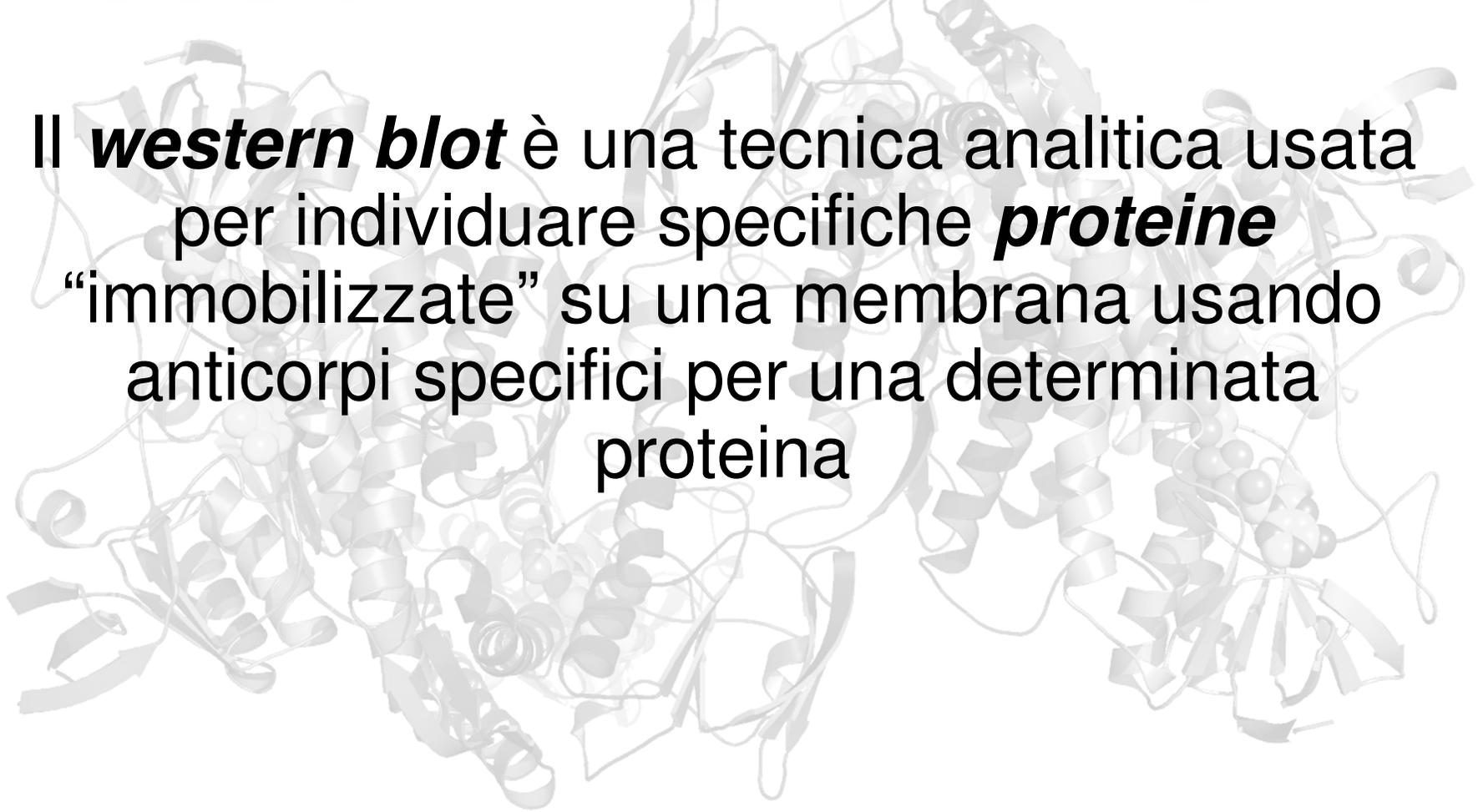
- Proteine prodotte da un organismo che riconoscono e legano proteine di agenti patogeni (batteri, virus, cellule estranee) contribuendo alla loro eliminazione.
- Esercitano quindi un ruolo protettivo.
- Prodotti dalle plasmacellule- derivano dai linfociti B
- Gli anticorpi che usiamo in laboratorio vengono ottenuti da conigli o topi iniettati con la proteina di interesse (immunizzati)



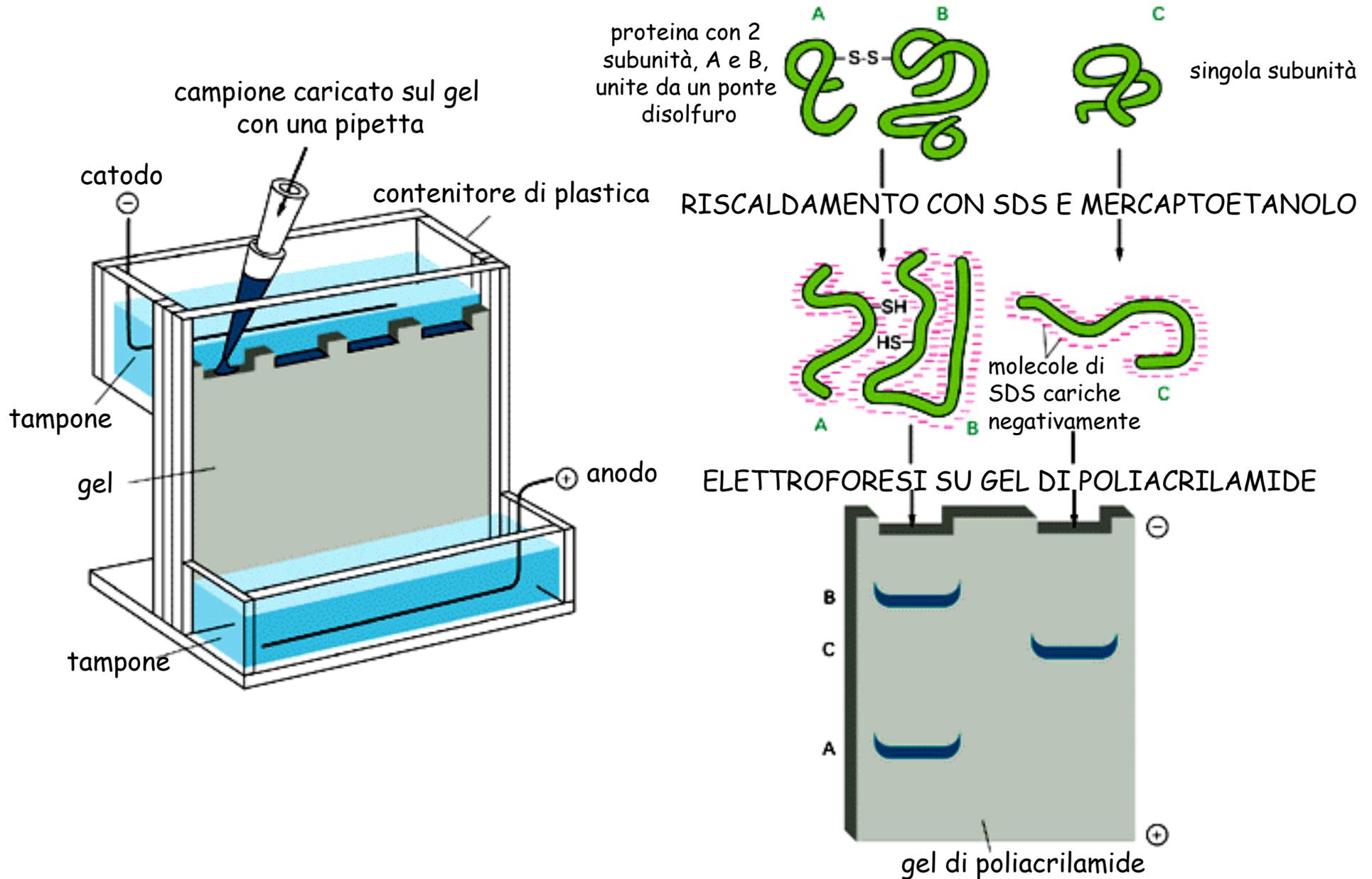


# COS'è IL WESTERN BLOT?

Il ***western blot*** è una tecnica analitica usata per individuare specifiche ***proteine*** “immobilizzate” su una membrana usando anticorpi specifici per una determinata proteina

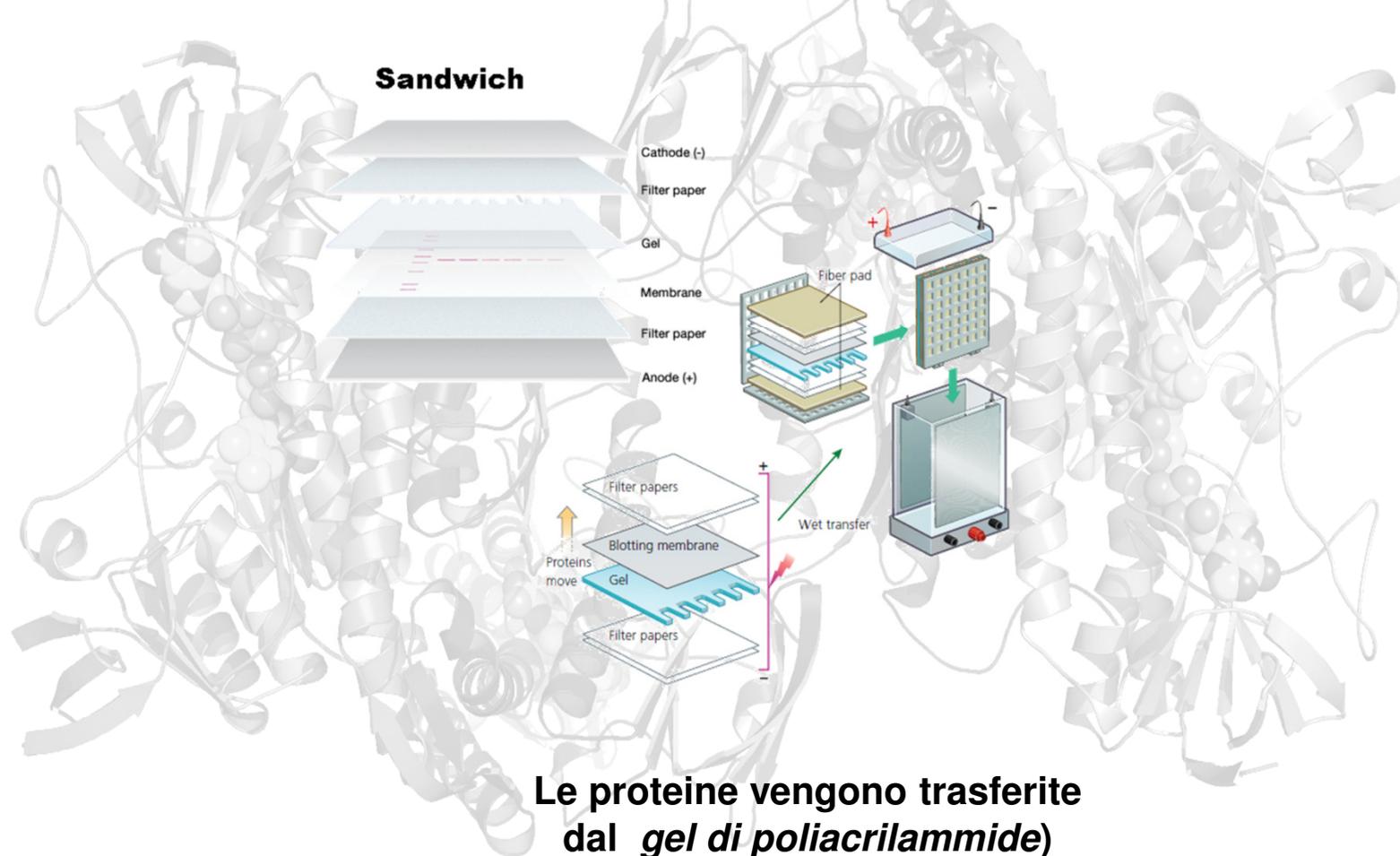


Le dimensioni e la composizione in subunità di una **proteina** possono essere determinate mediante **elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)**





# TRASFERIMENTO

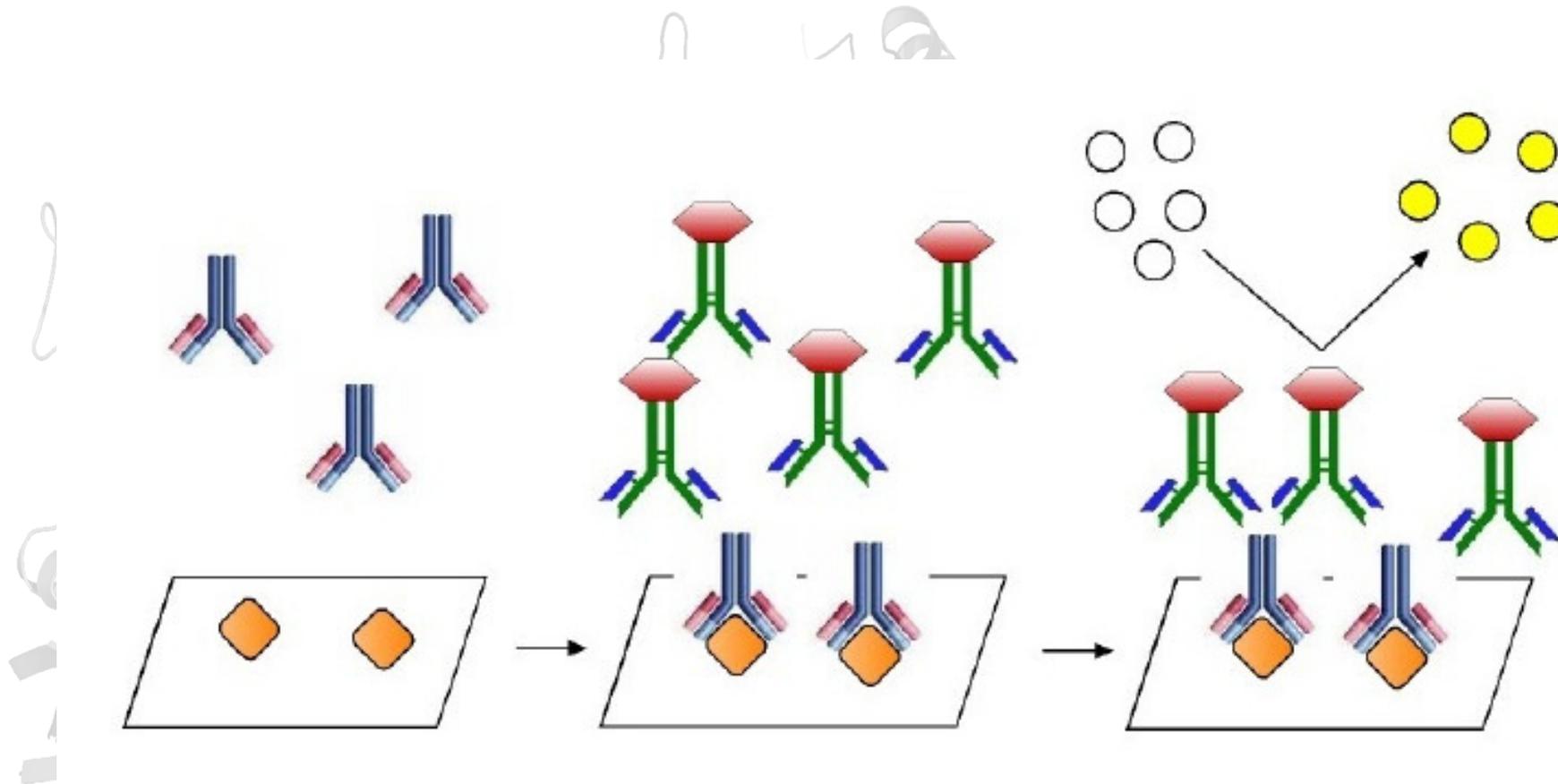


Le proteine vengono trasferite  
dal *gel di poliacrilammide*)

ad una membrana PVDF  
(*polivinilidenfluoruro*)

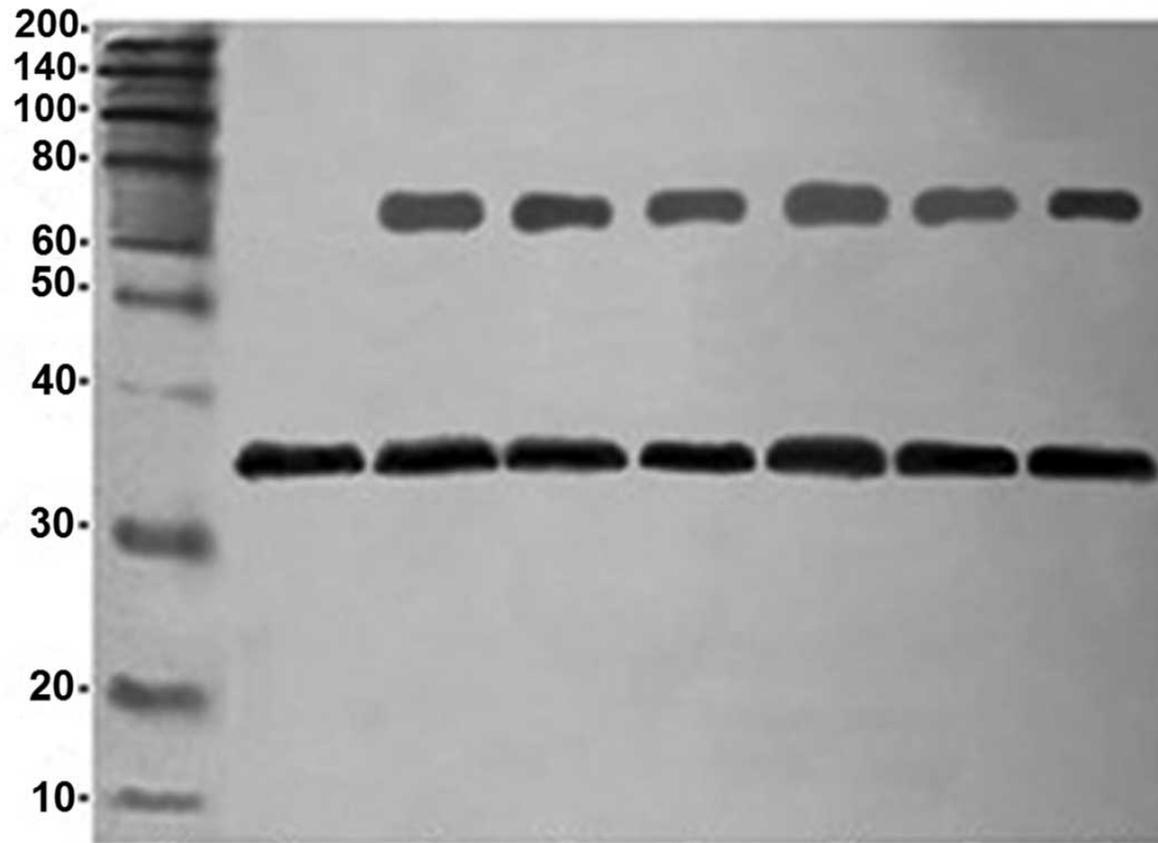


# Protein detection



- **Anticorpo primario (azzurro)**
- **Anticorpo secondario (verde) legato ad un enzima (rosso) che agendo su un substrato conduce ad emissione di luce**

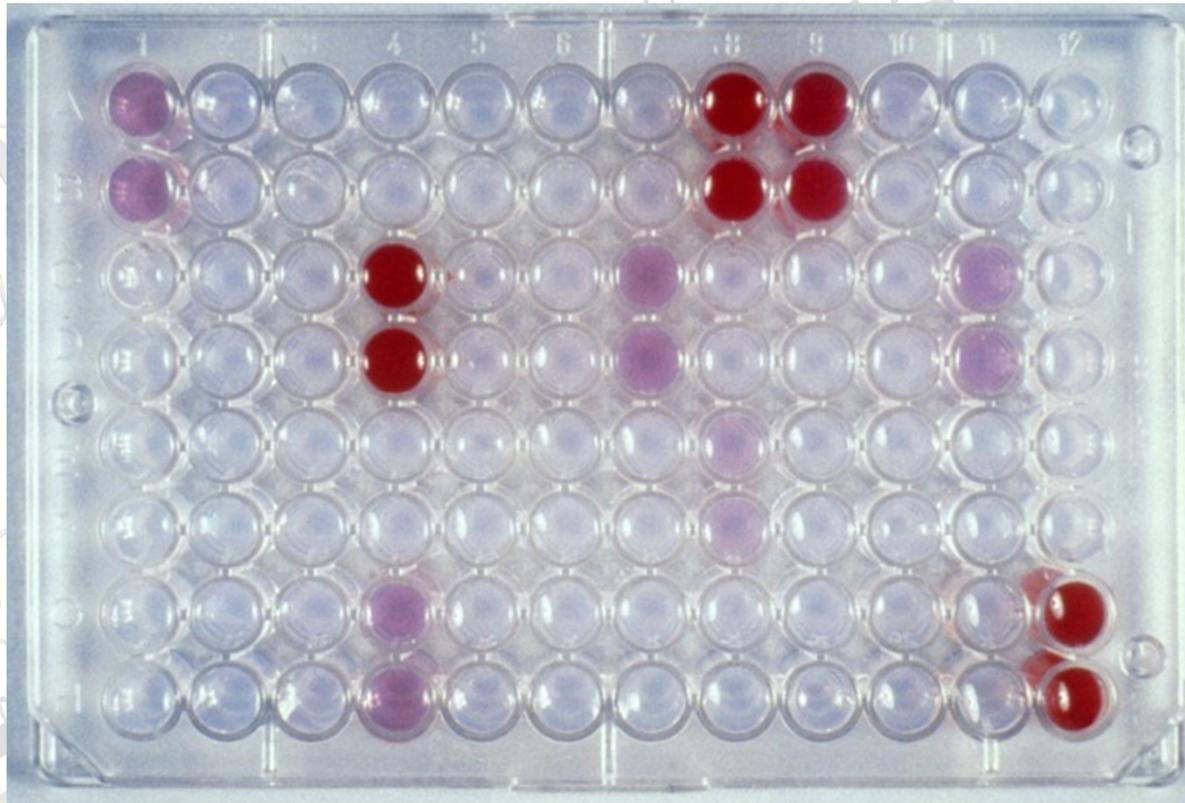






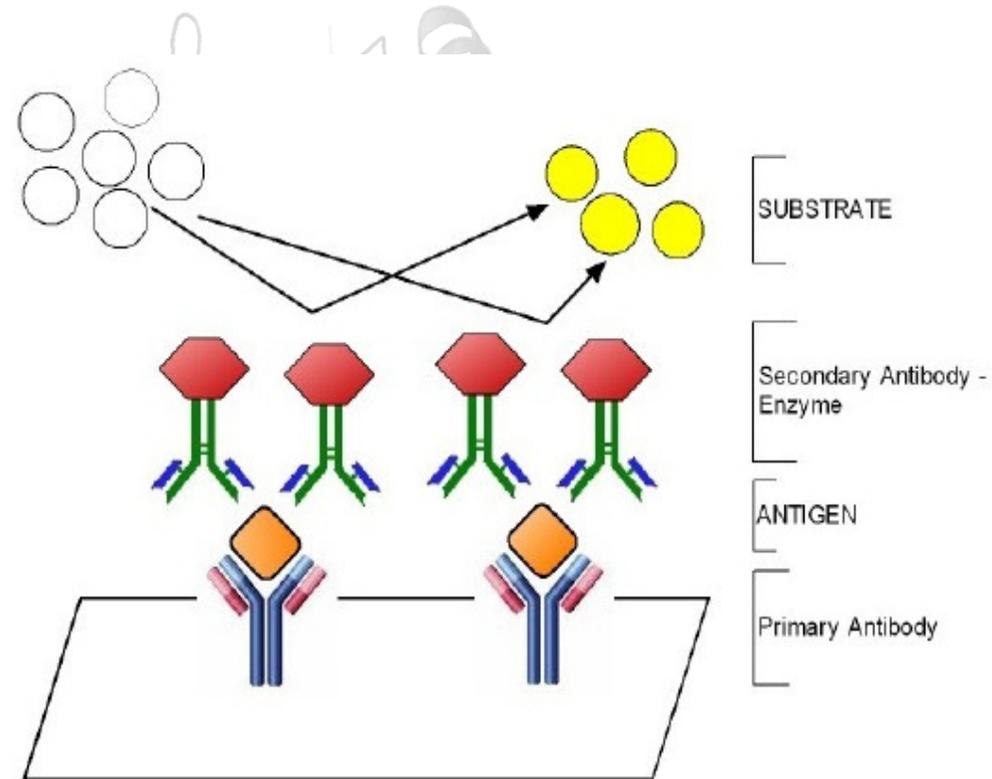
# **COS'E' L' ELISA**

## **ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**



**Tecnica che usa variazioni di colore per identificare le sostanze in analisi (citochine infiammatorie nel siero, proteine virali nel siero)**

**E' necessario almeno un anticorpo con elevata specificità verso la proteina di interesse**

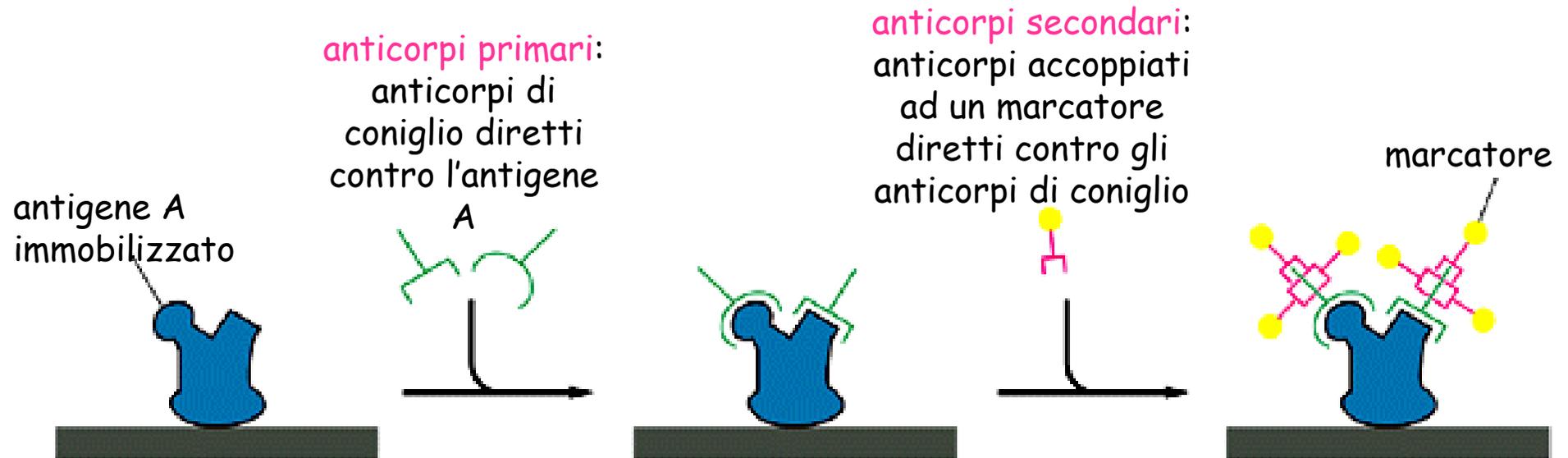


- **Utilizzo di un enzima specifico per identificare il complesso anticorpo-proteina di interesse**
- **L'enzima converte il substrato in un prodotto colorato indicando la presenza del legame ricercato**

**IMMUNOISTOCHIMICA (IHC)** Utilizzata per determinare specifici componenti e visualizzarne la distribuzione nella cellula o in un tessuto

La preparazione del campione consiste nella **fissazione** e cioè nel trattamento del frammento d'organo con procedimenti chimici o fisici capaci di preservare e stabilizzare i costituenti dei tessuti, inattivando nel contempo gli enzimi autolitici.

## Necessari anticorpi possono essere usati per rivelare molecole specifiche

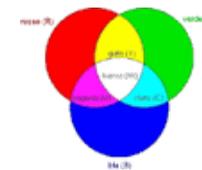
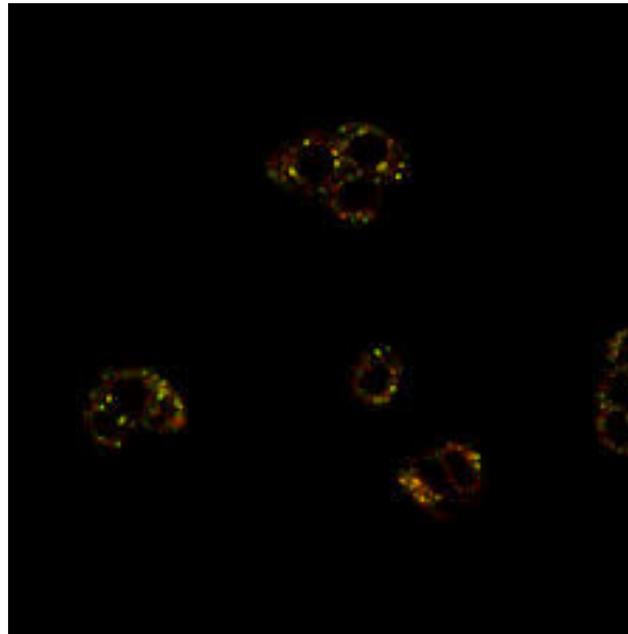
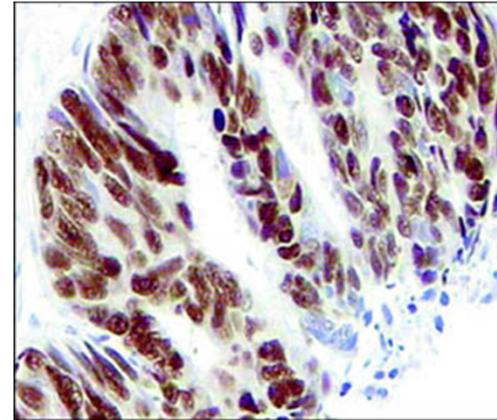
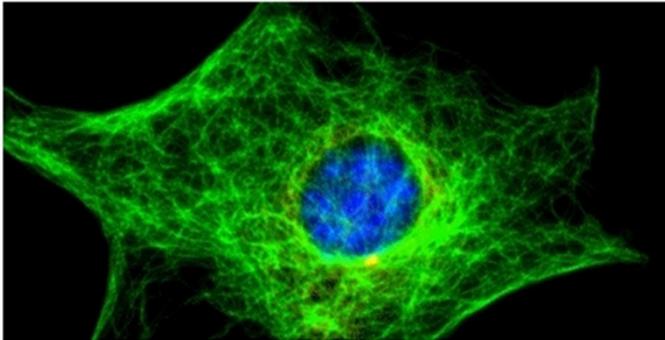


**Immunoistochimica indiretta.** Il metodo è molto sensibile perché l'anticorpo primario è a sua volta riconosciuto da molte molecole dell'anticorpo secondario. L'anticorpo secondario è accoppiato covalentemente ad un marcatore che lo rende facilmente rilevabile. Marcatori usati comunemente comprendono fluoresceina o rodamina (per la microscopia e fluorescenza) l'enzima perossidasi di rafano (per la microscopia ottica convenzionale o per la microscopia elettronica), la proteina contenete ferritina o sfere di oro colloidale ( per la microscopia elettronica) e gli enzima fosfatasi alcalina o perossidasi (per la rivelazione biochimica).

# IMMUNOISTOCHIMICA (IHC)

Sovraespressione di p53 mutata in cellule metastatiche epatiche provenienti da un tumore colonrettale umano.

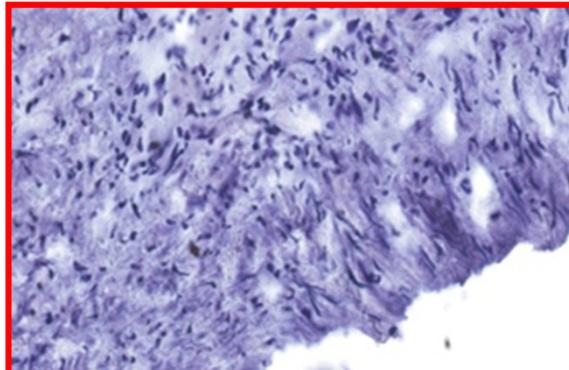
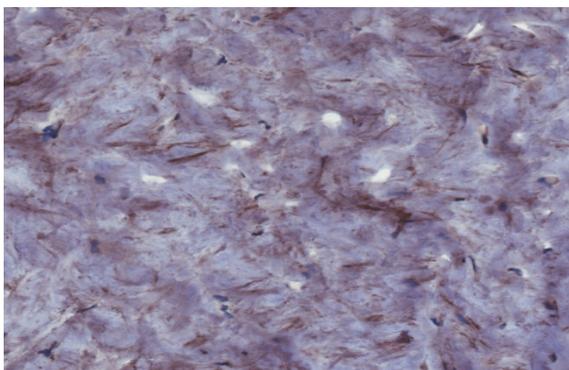
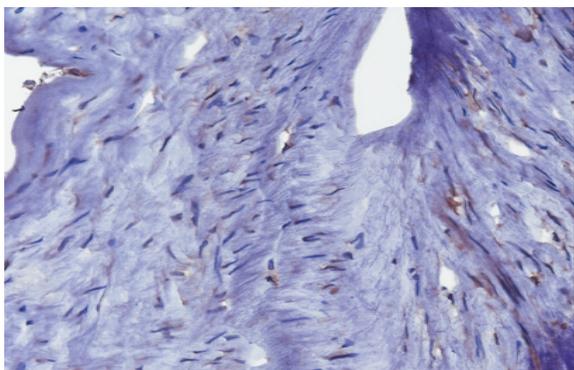
Fibroblasti embrionali di topo;  
tubulina in verde e DNA in blu



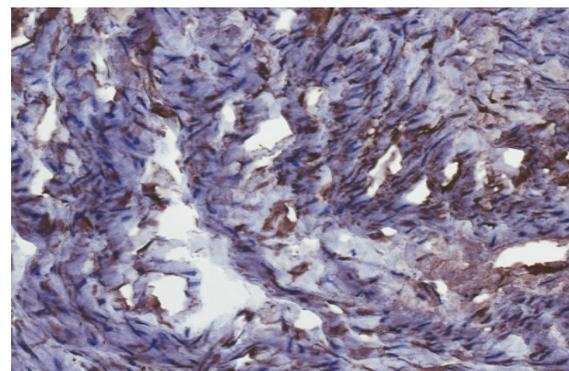
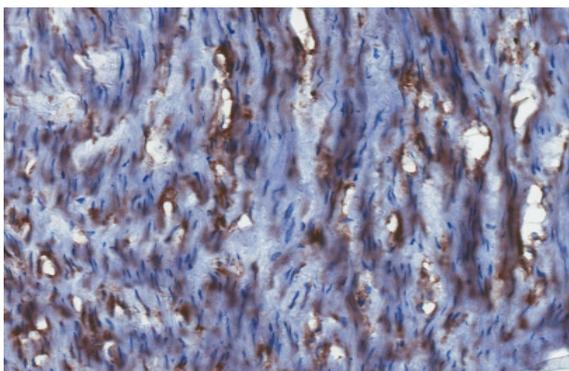
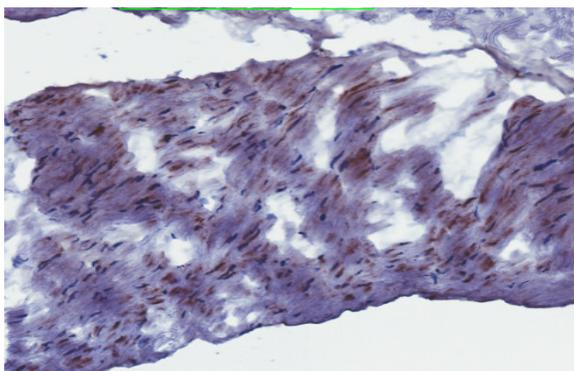
L'immagine ottenuta al microscopio confocale) mostra come sia presente una colocalizzazione (in giallo) della molecola D1 ( in verde) e dell'EGFR (rosso)

**A**

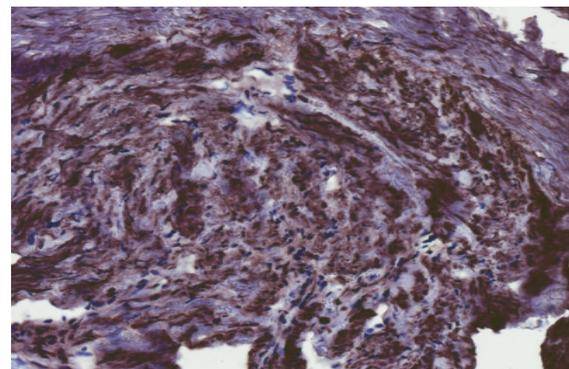
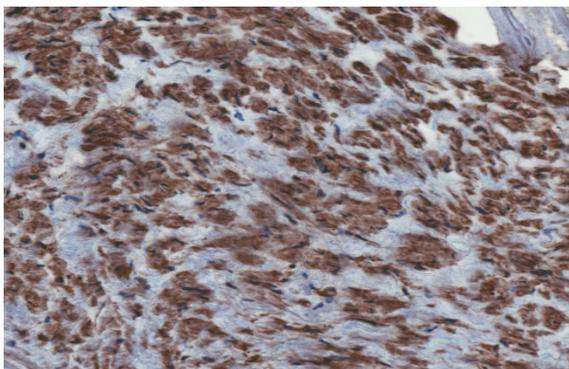
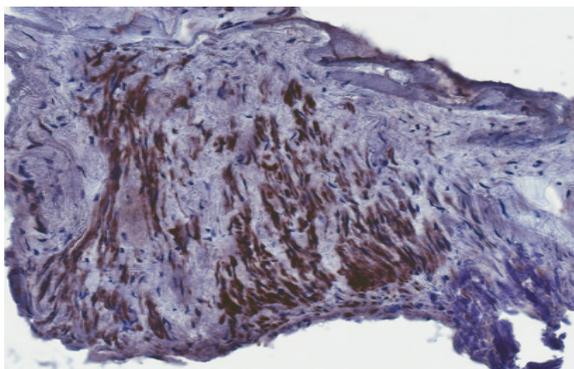
**LO**



**MEDIUM**



**HIGH**  
**H**



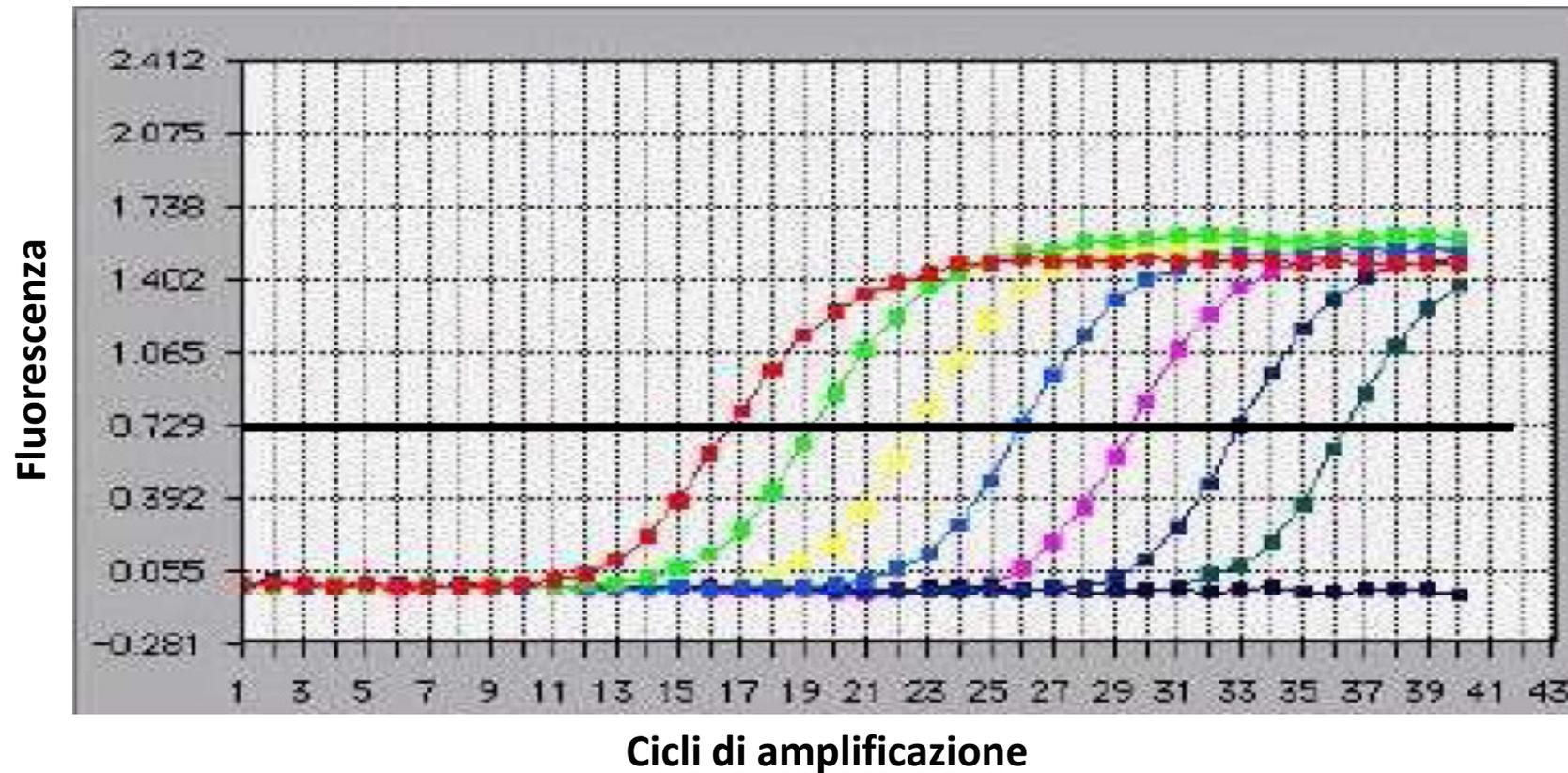
**N1IC**

**NOTCH 1**

**NOTCH 3**



## Curve di amplificazione



Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione il cui CT (Threshold Cycle) è inversamente proporzionale alla quantità di template iniziale