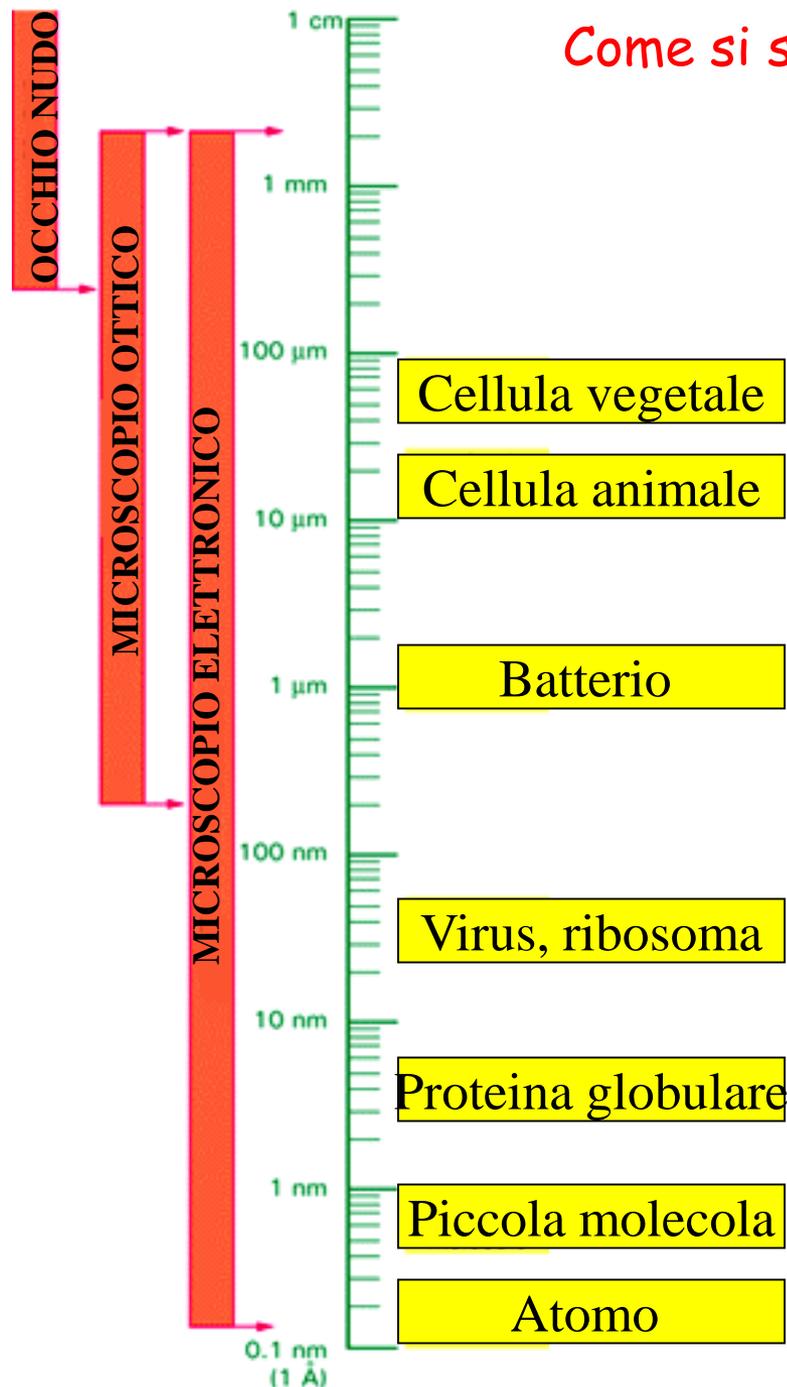


Come si studiano le cellule e le macromolecole

La microscopia



Il potere di risoluzione

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, nel microscopio ottico e in quello elettronico. In microscopia si usano comunemente le seguenti unità di lunghezza:

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

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

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

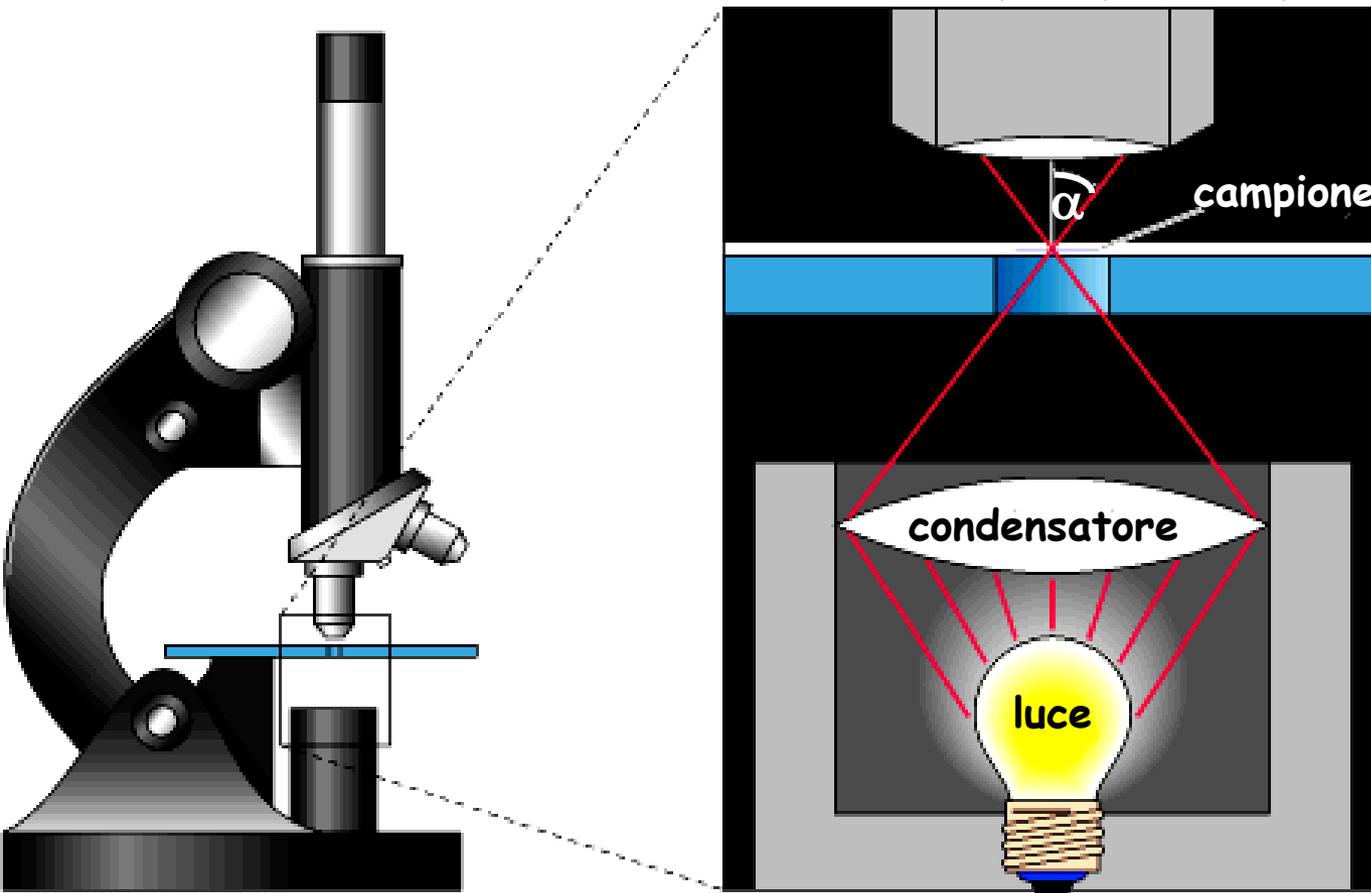
Come si studiano le cellule e le macromolecole

Microscopia ottica

Il limite di risoluzione del M.O. è di circa $0,2 \mu\text{m}$. Significa che due oggetti separati da una distanza minore di $0,2 \mu\text{m}$ non sono distinguibili.

$0,61 \lambda$ —————> lunghezza d'onda luce visibile = $0,5 \mu\text{m}$

Risoluzione = $\frac{0,61 \lambda}{NA}$ —————> apertura numerica : può essere immaginata come le dimensioni del cono di luce che entra nella lente del microscopio dopo essere passata attraverso il campione



Può essere al max 90°
 $\text{sen}90 = 1$

$$NA = \eta \text{ sen } \alpha$$

Indice di rifrazione:
Aria = 1
Olio = 1,4

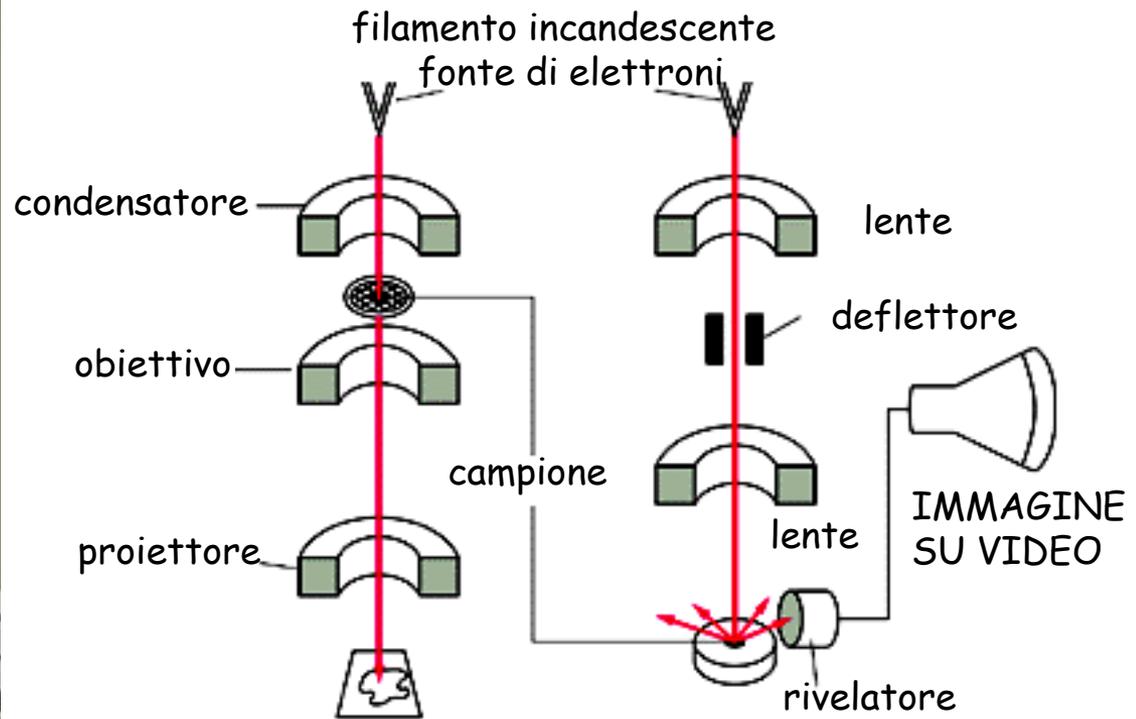
allora

$$\text{Risoluzione} = \frac{0,61 \times 0,5}{1,4} = 0,22 \mu\text{m}$$

Come si studiano le cellule e le macromolecole

La microscopia elettronica

In condizioni ottimali il potere di risoluzione del microscopio elettronico è di 0,2 nm. Di fatto è di 1-2 nm.



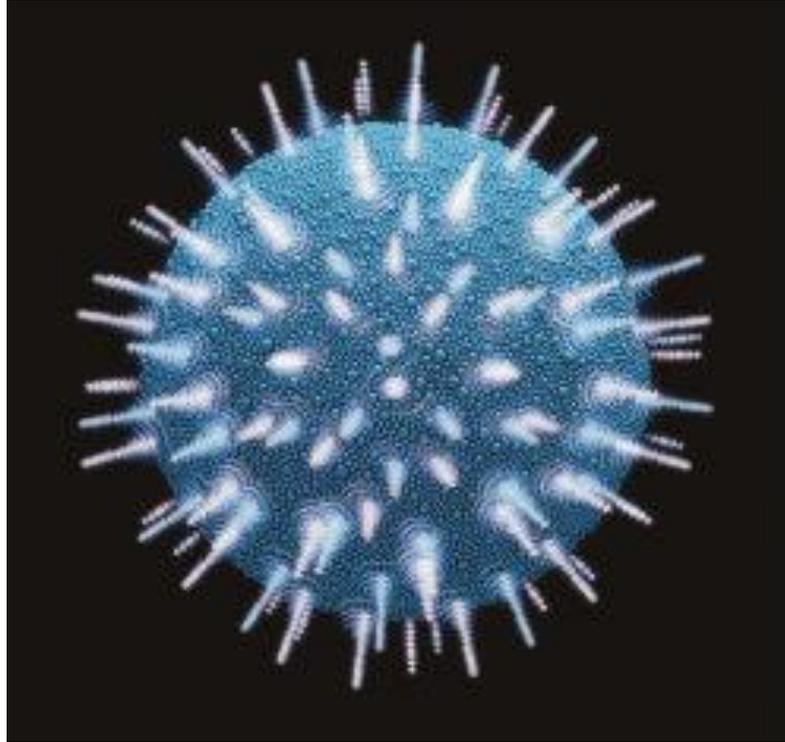
M. E.
A TRASMISSIONE

M. E.
A SCANSIONE

Come si studiano le cellule e le macromolecole

La microscopia elettronica

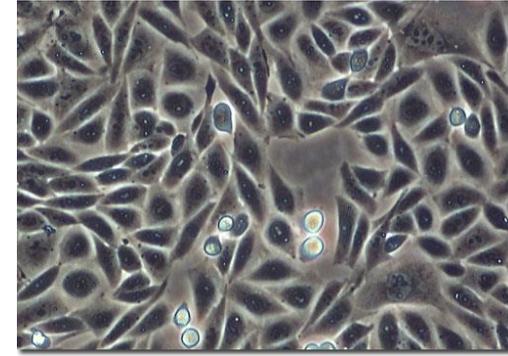
Permette di vedere, ad esempio, i virus



HIV (human immunodeficiency virus)

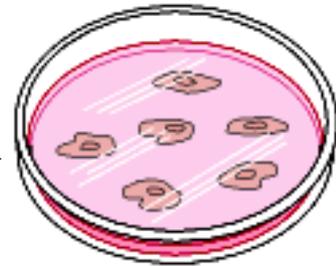
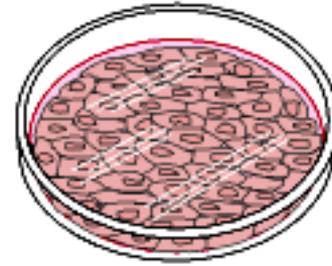
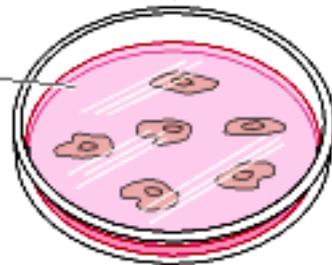
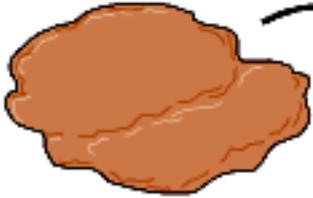
Come si studiano le cellule e le macromolecole

Crescita di cellule animali in coltura



Cellule di ovaio di criceto

Tessuto



Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule.

Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Sospensione cellulare

Mezzo liquido

Le cellule di questa coltura primaria si attaccano alla piastra e crescono fino a coprirne la superficie.

Coltura primaria

Coltura secondaria

Le cellule possono quindi essere rimosse dalla piastra di coltura e ripiastrate a densità minore per formare una coltura secondaria.

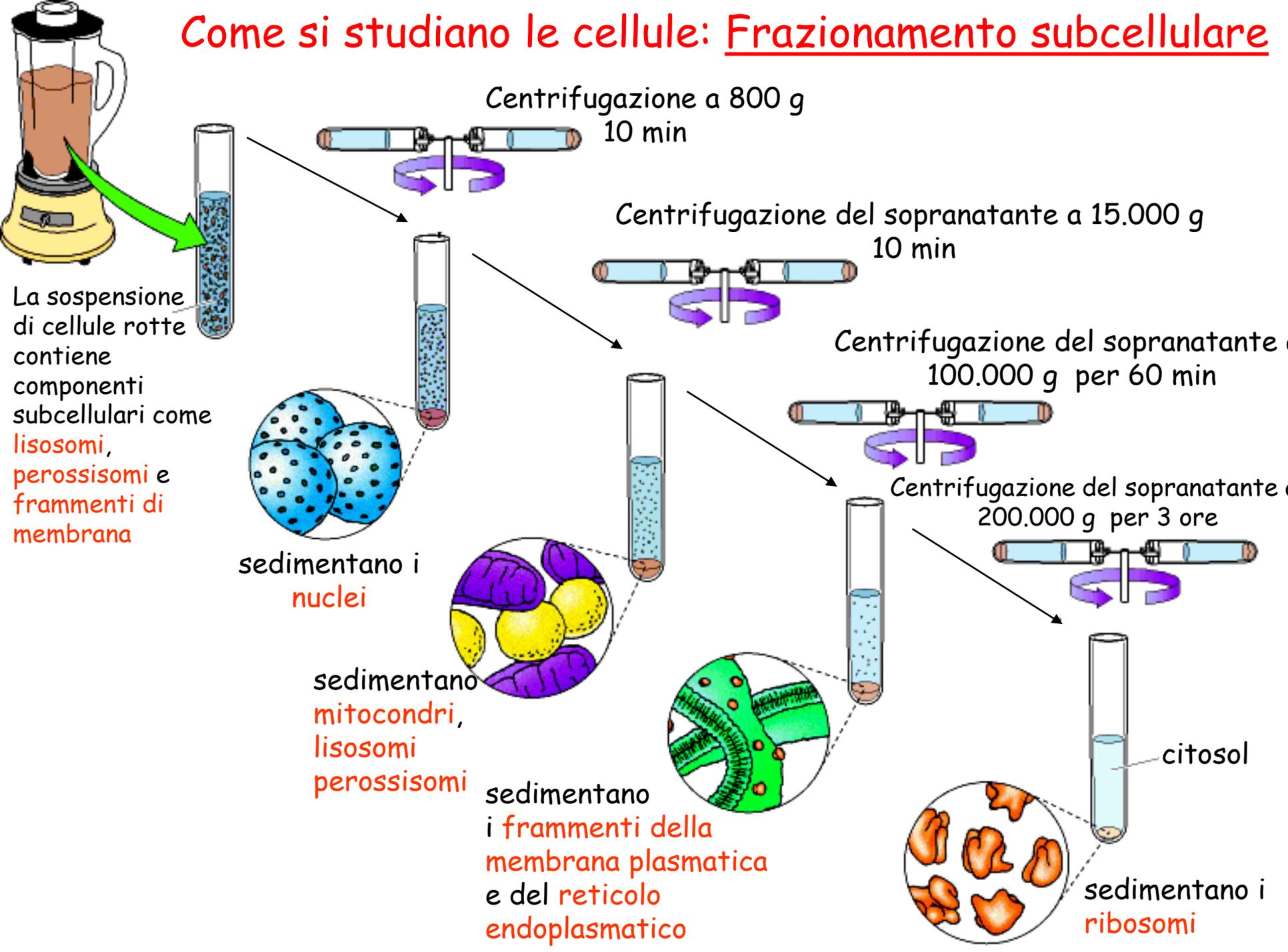
Come si studiano le cellule e le macromolecole

Crescita di cellule animali in coltura

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

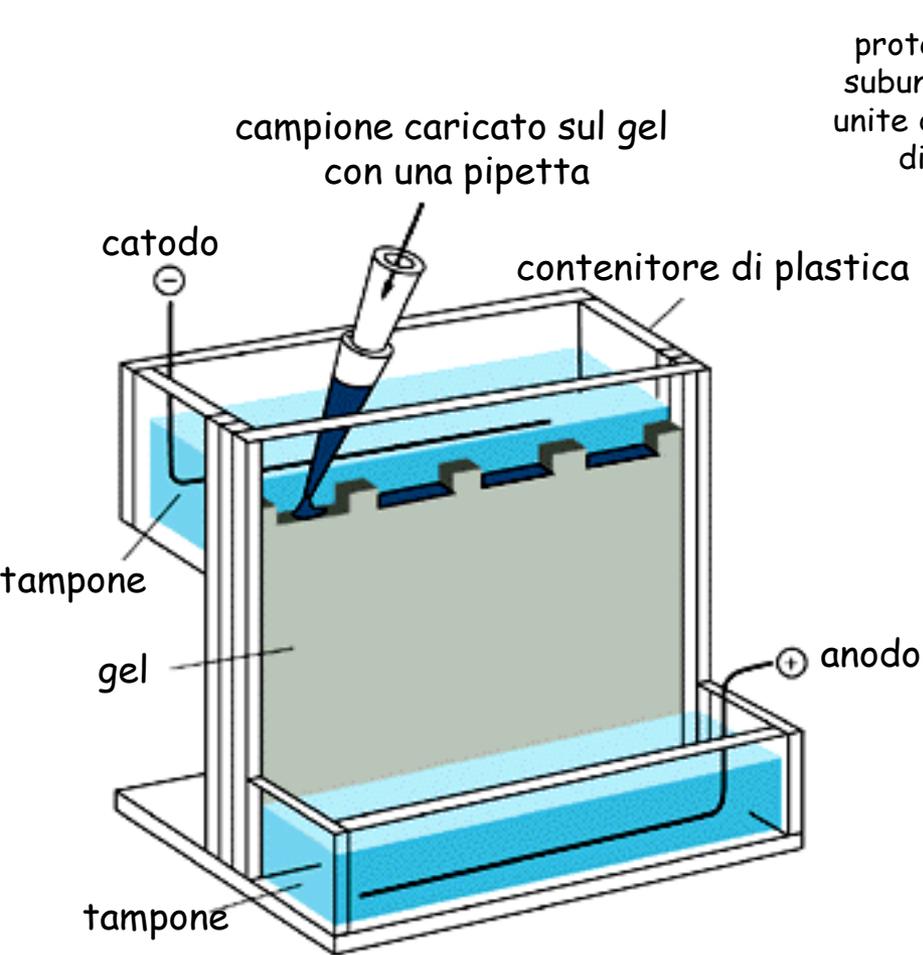
<i>Amminoacidi</i>	<i>Vitamine</i>	<i>Sali</i>	<i>Vari</i>	<i>Proteine (necessarie nei mezzi privi di siero chimicamente definiti)</i>
Arginina Cistina Fenilalanina Glutammina Isoleucina Leucina Leucina Lisina Metionina Tirosina Treonina Tryptofano Valina	Biotina Colina Folato Nicotinammide Panotenato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

Come si studiano le cellule: Frazionamento subcellulare

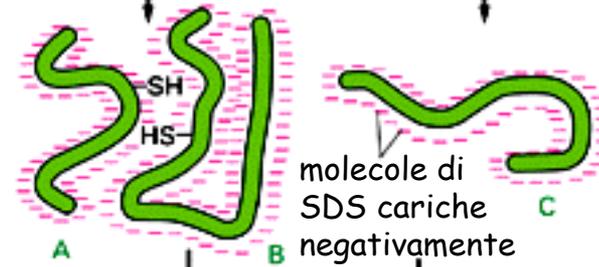


Come si studiano le macromolecole: le proteine

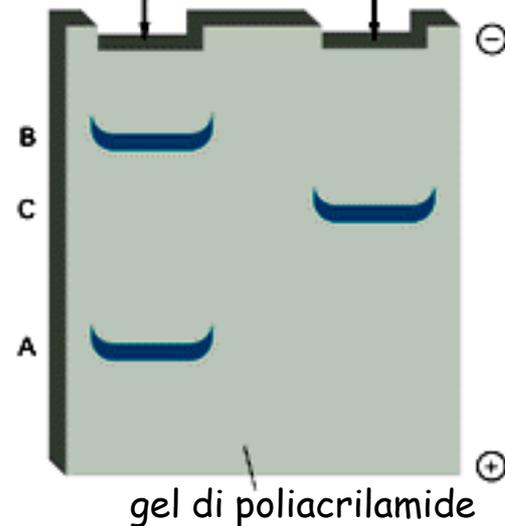
Le dimensioni e la composizione in subunità di una proteina possono essere determinate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in SDS (SDS-PAGE)



RISCALDAMENTO CON SDS E MERCAPTOETANOLO



ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE



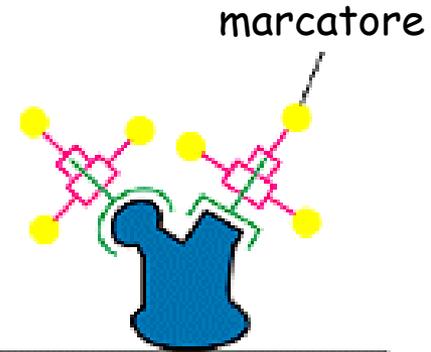
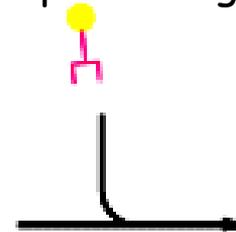
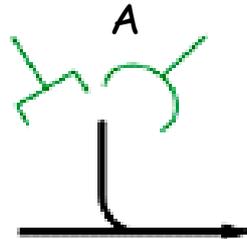
Identificazione e studio delle molecole all'interno delle cellule

Gli anticorpi possono essere usati per rivelare e isolare molecole specifiche

anticorpi primari:
anticorpi di coniglio diretti contro l'antigene

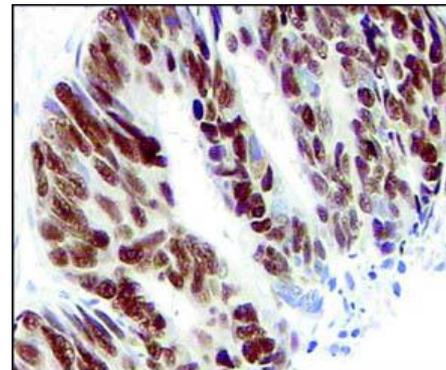
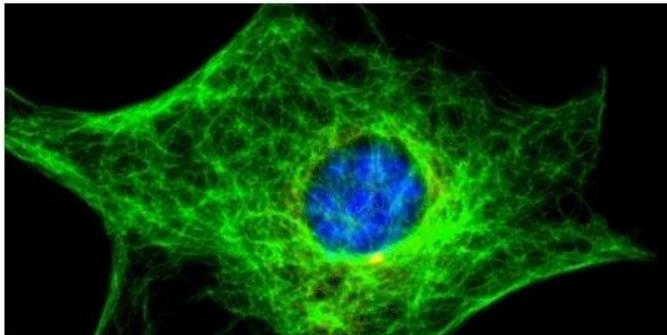
anticorpi secondari:
anticorpi accoppiati ad un marcatore diretti contro gli anticorpi di coniglio

antigene A immobilizzato



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).

Immunofluorescenza.
Fibroblasti embrionali di topo T3T; tubulina in verde e DNA in blu



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