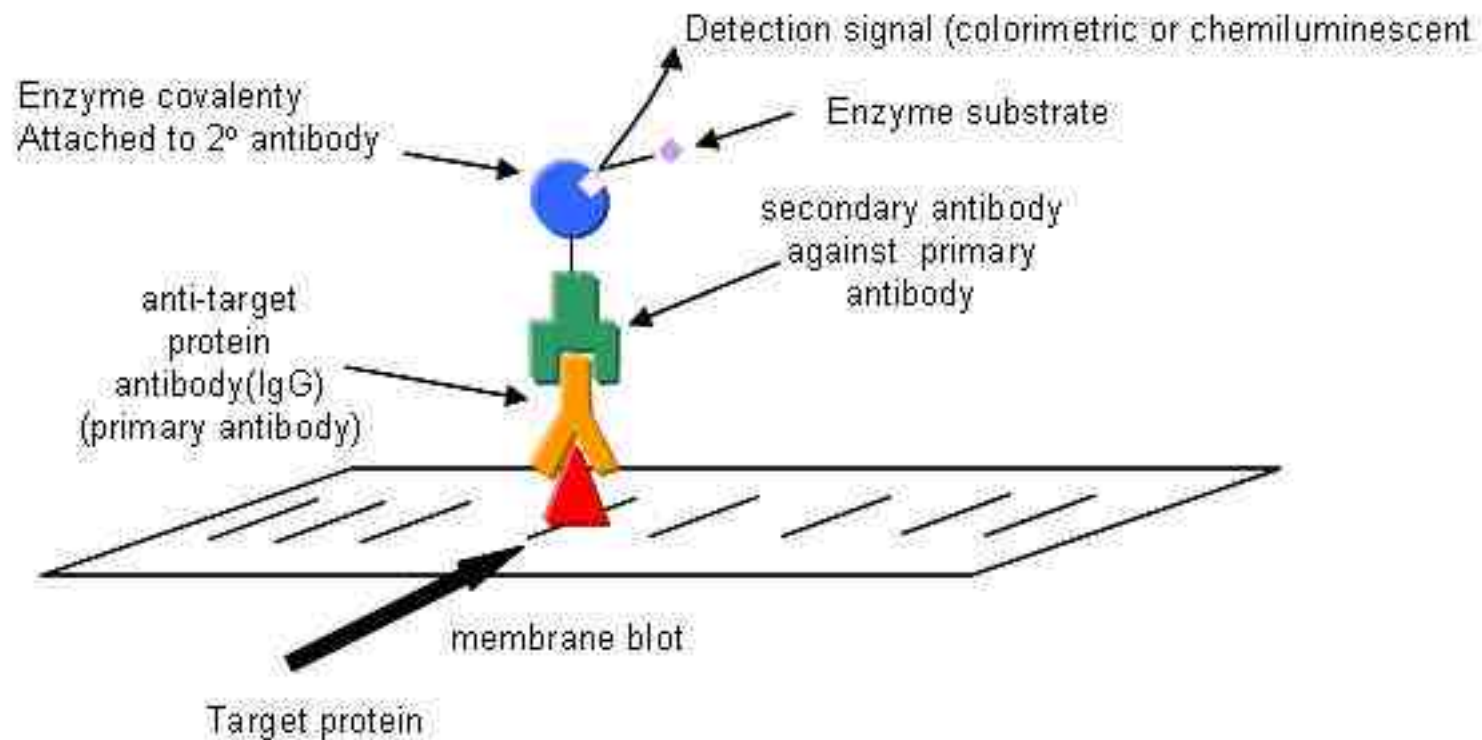
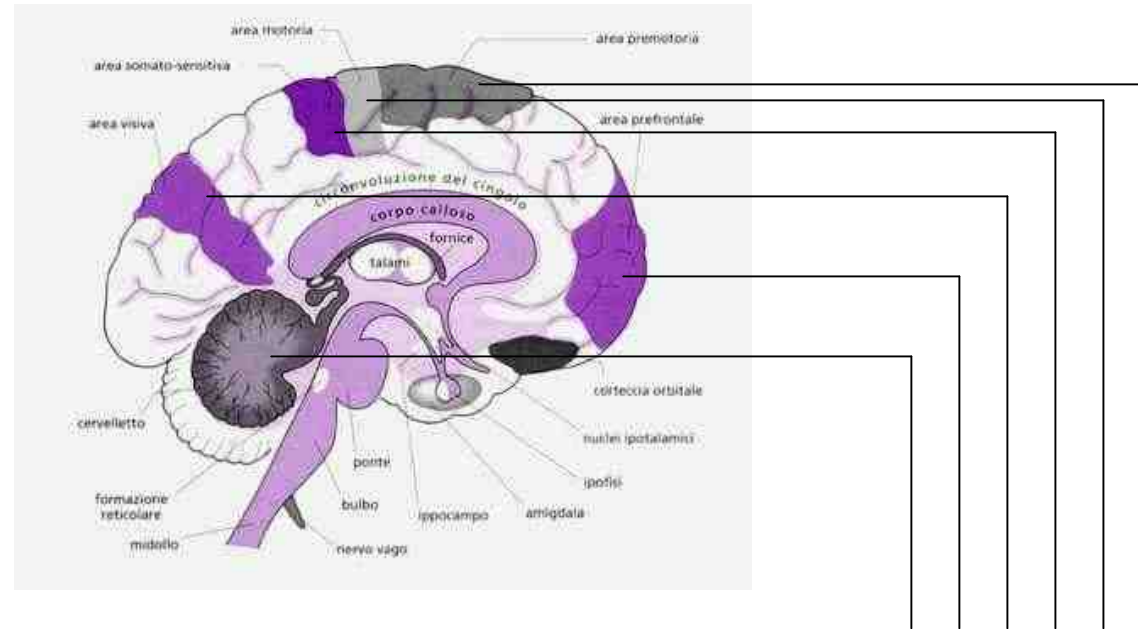


Anticorpo primario ---> anticorpo secondario coniugato all'enzima ---> reazione di bioluminescenza ---> luce che impressiona una lastra fotografica



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



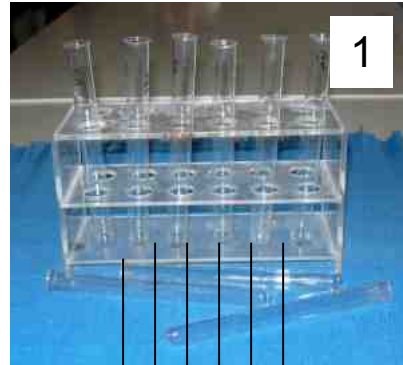
1. Estrazione delle proteine da ciascun campione



06 bct 27/10/10

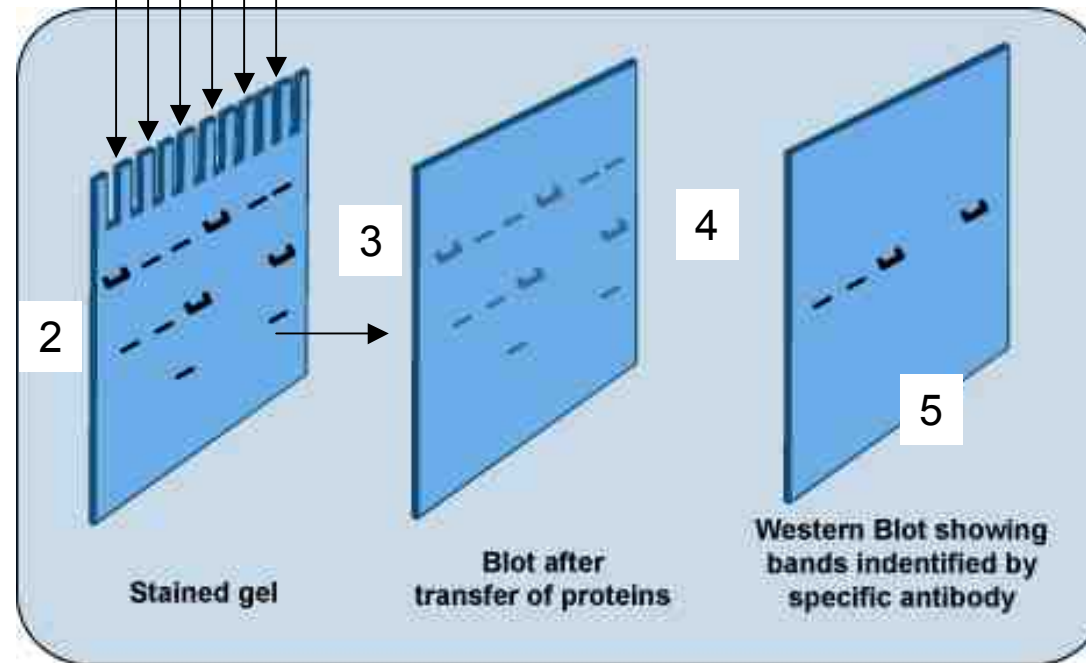
2

1. Estrazione delle proteine e caricamento "positivo";



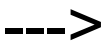
2. Elettroforesi;

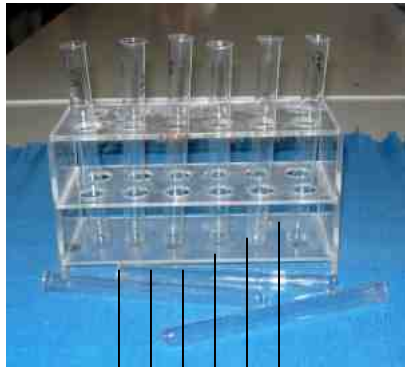
3. trasferimento dal gel di elettroforesi al filtro ("blot"),



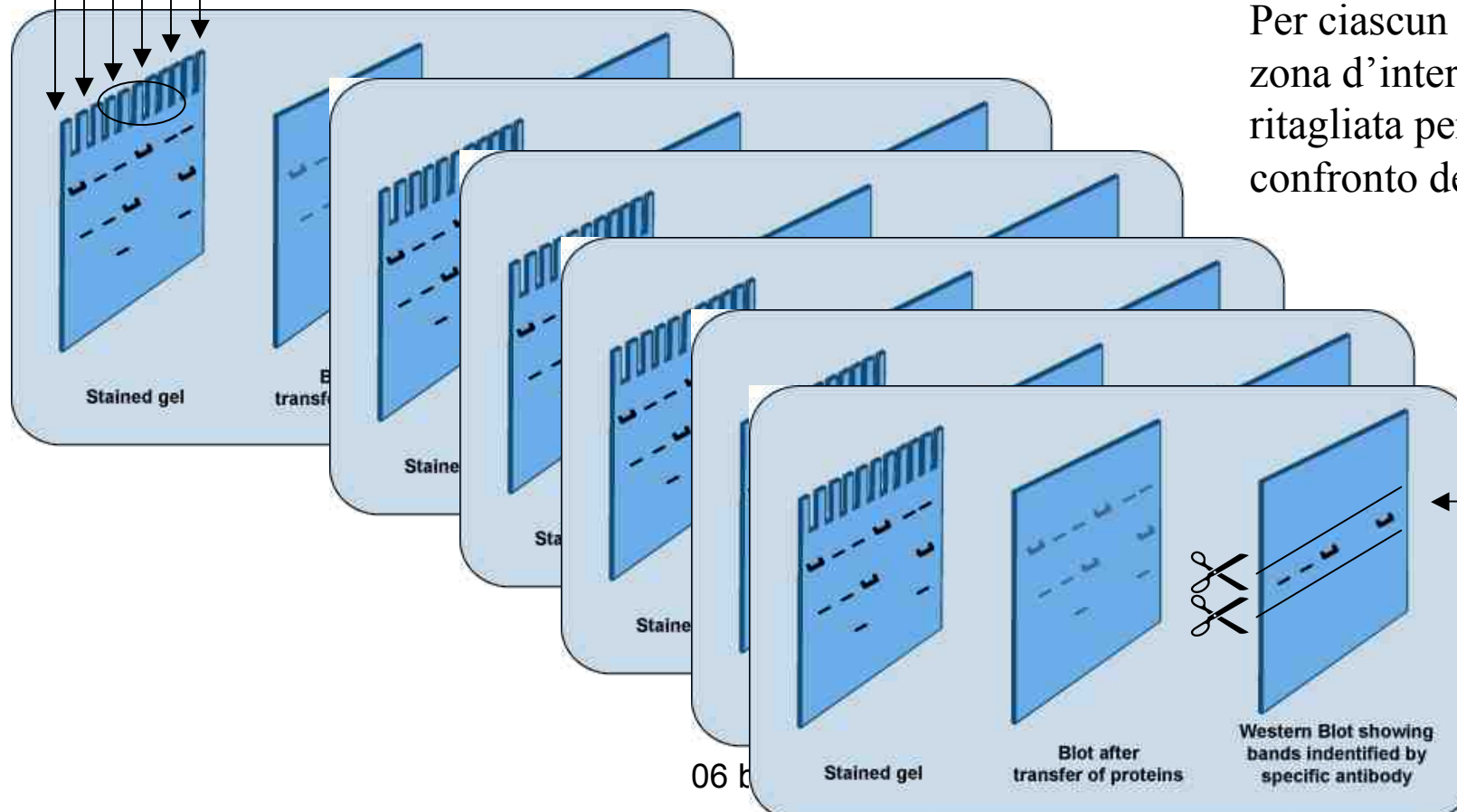
4. incubazione del filtro con l'anticorpo primario per rivelare la proteina "A", lavaggio, incubazione con adeguato anticorpo secondario coniugato all'enzima, lavaggio, bioluminescenza ed esposizione della lastra fotografica

06 bct 27/10/10

3 

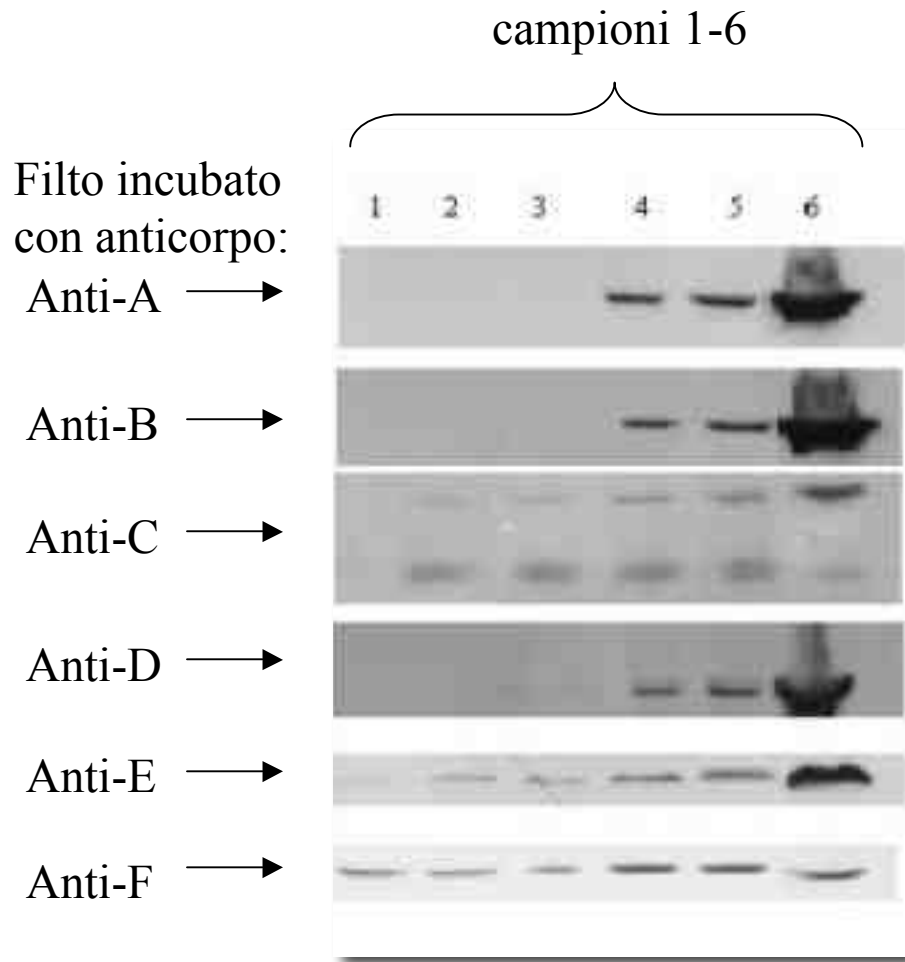


Lo stesso protocollo è stato ripetuto 5 altre volte, e ciascun filtro è stato poi incubato con l'anticorpo primario anti-B, oppure l'anticorpo primario anti-C,etc



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

Risultati:



Prima interpretazione:
confronto “orizzontale” dei risultati

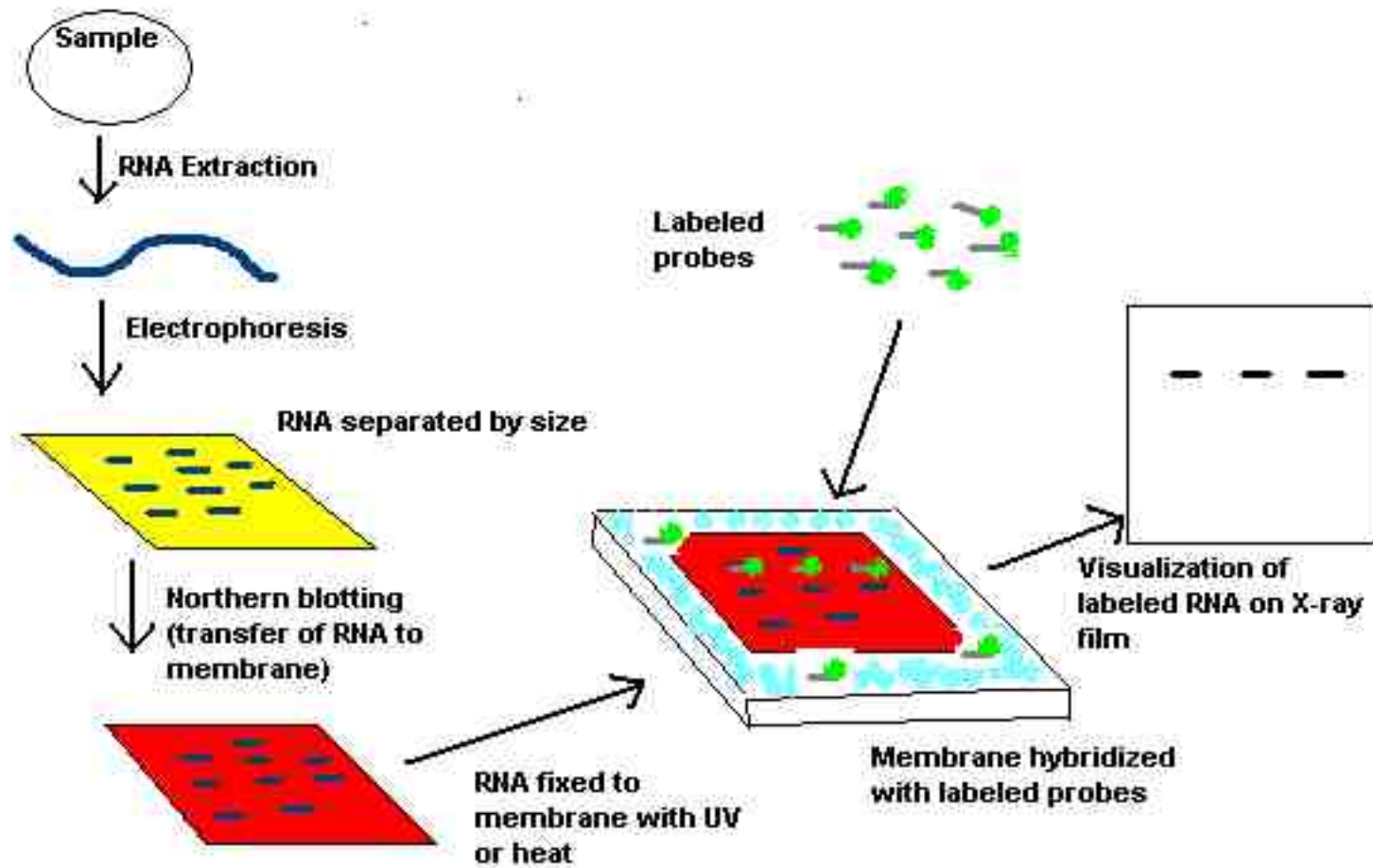
- *Le proteine “A” “B” e “D”*
- *La proteina “C”*
- *La proteina “E”*
- *La proteina “F”*

1=encefalo;

Northern Blotting

Southern Blotting

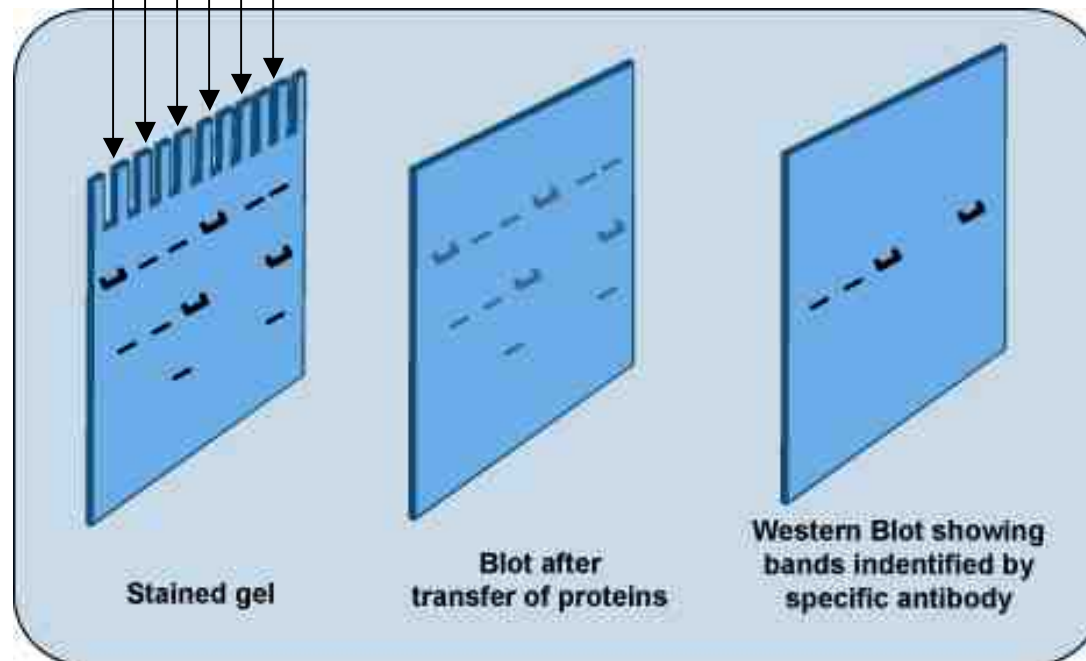
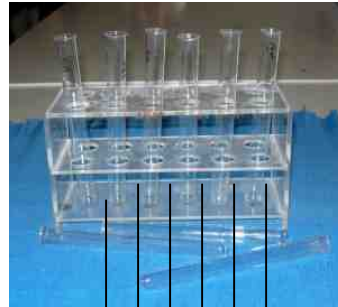
Northern Blotting



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

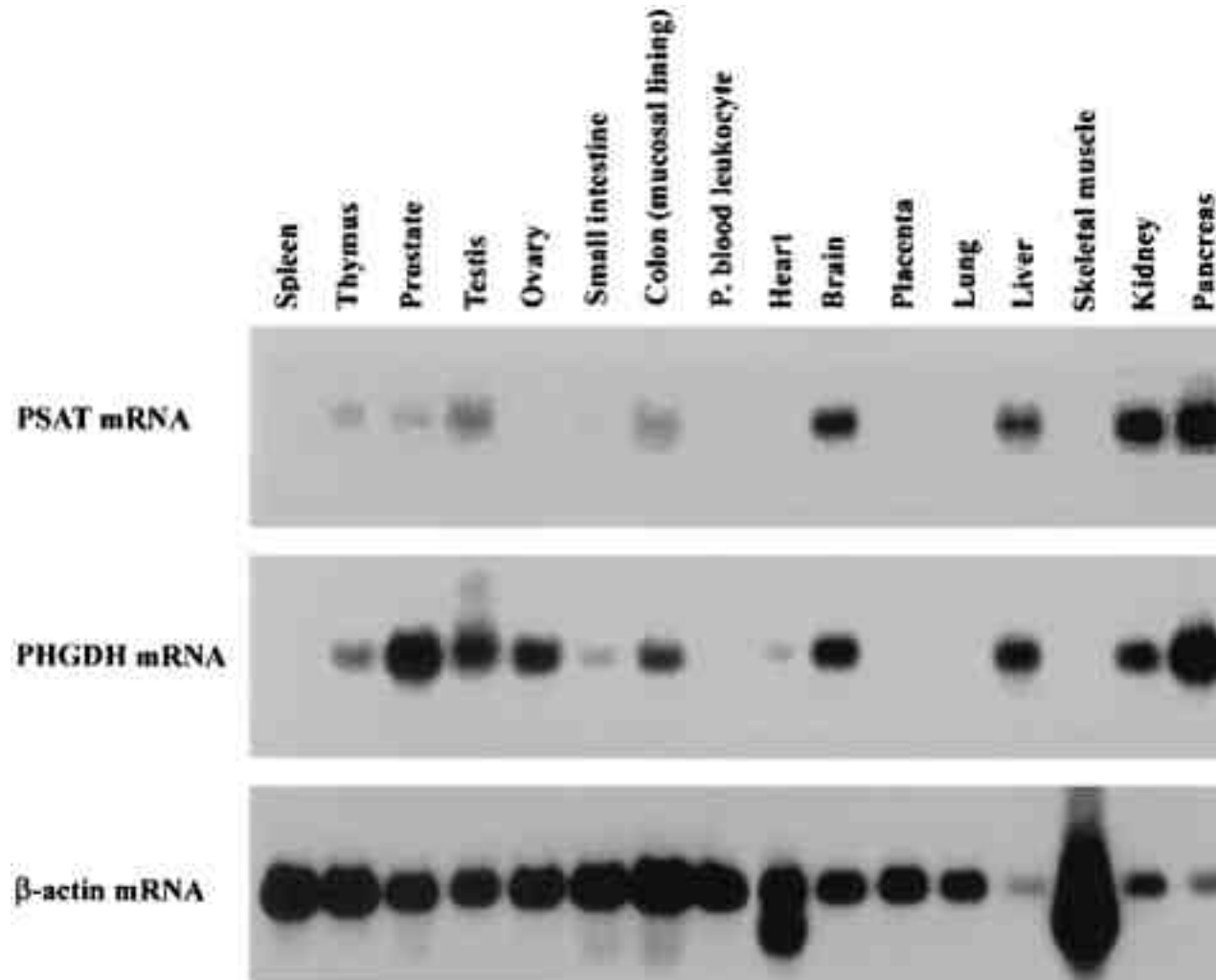
Estrazione degli RNA*
↓
Elettroforesi*
↓
Blot*
↓
ibridazione
↓
rivelazione



Southern

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

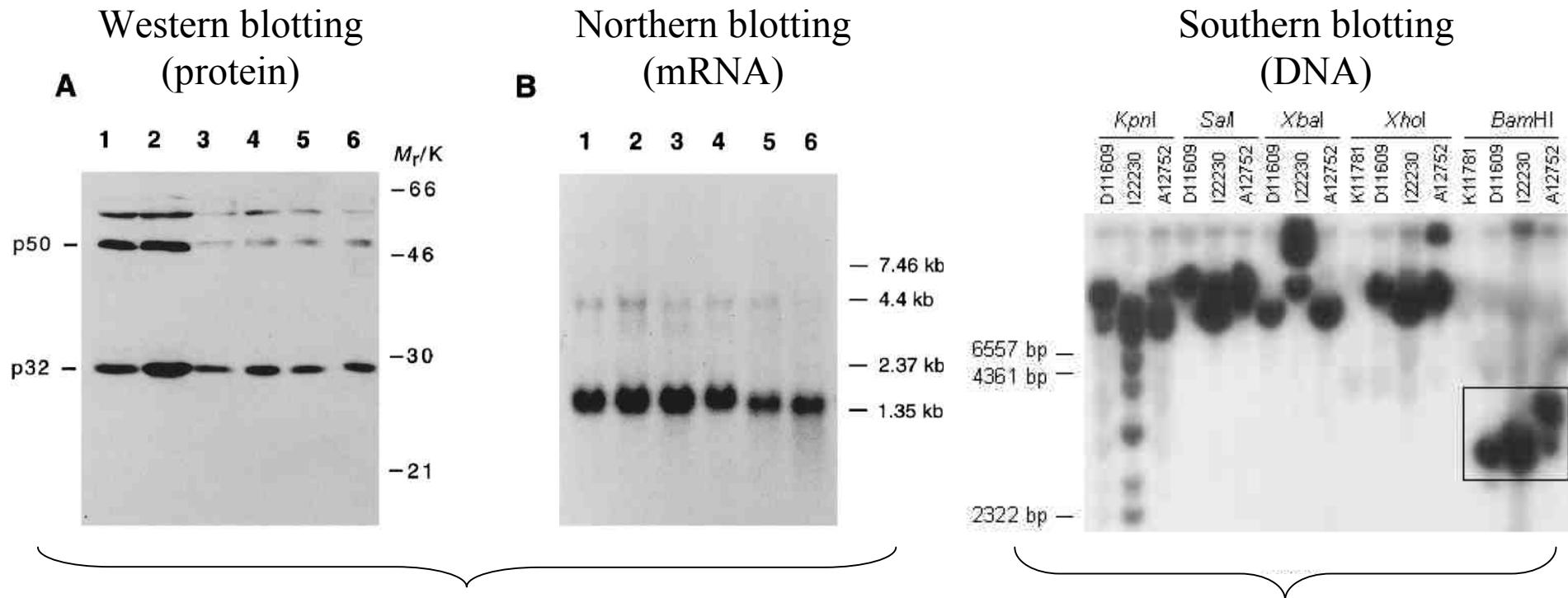
(*) rispetto a quanto visto dettagliatamente per le proteine, apparecchi e protocolli sono diversi i principi sono comuni 06 bct 27/10/10



06 bct 27/10/10

9

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



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)

06 bct 27/10/10

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

10

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)

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

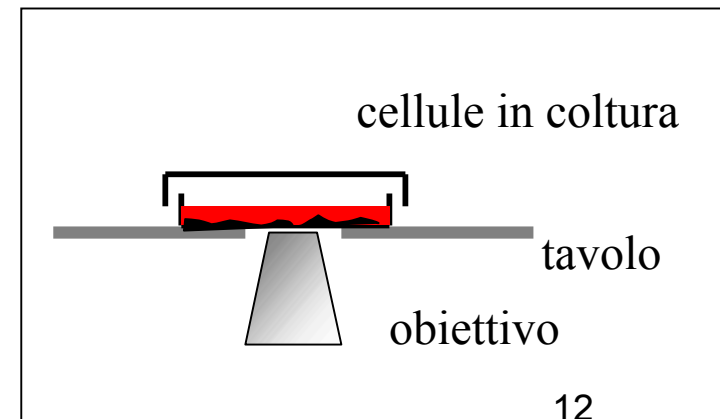


---> Contrasto di fase: permette l'osservazione di cellule non colorate (vive)

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

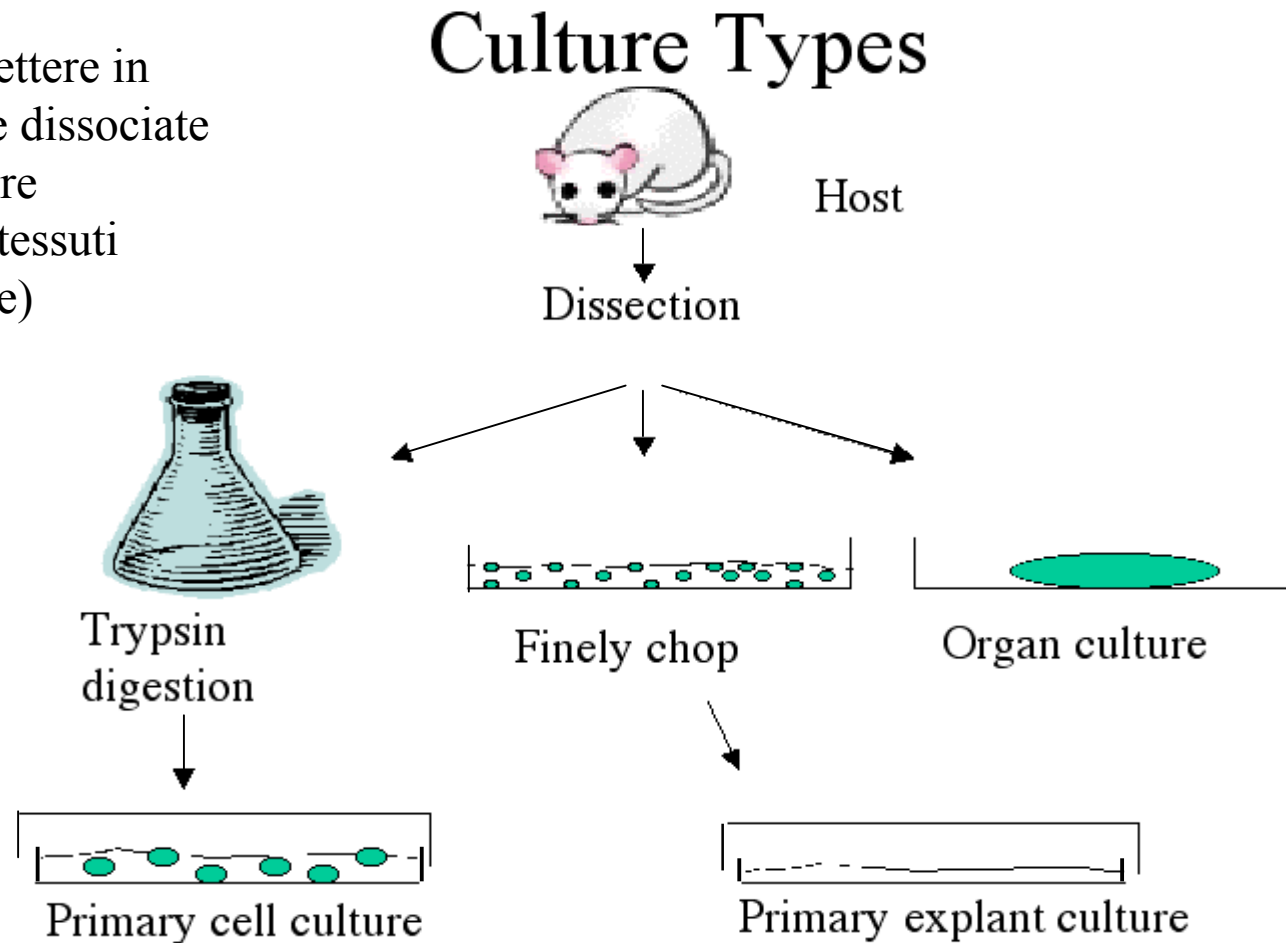
- 1) L'obiettivo è separato soltanto dal fondo della piastra di coltura
- 2) la piastra o la fiasca non deve essere aperta e rimane sterile e l'osservazione avviene fuori dalla cappa sterile

06 bct 27/10/10



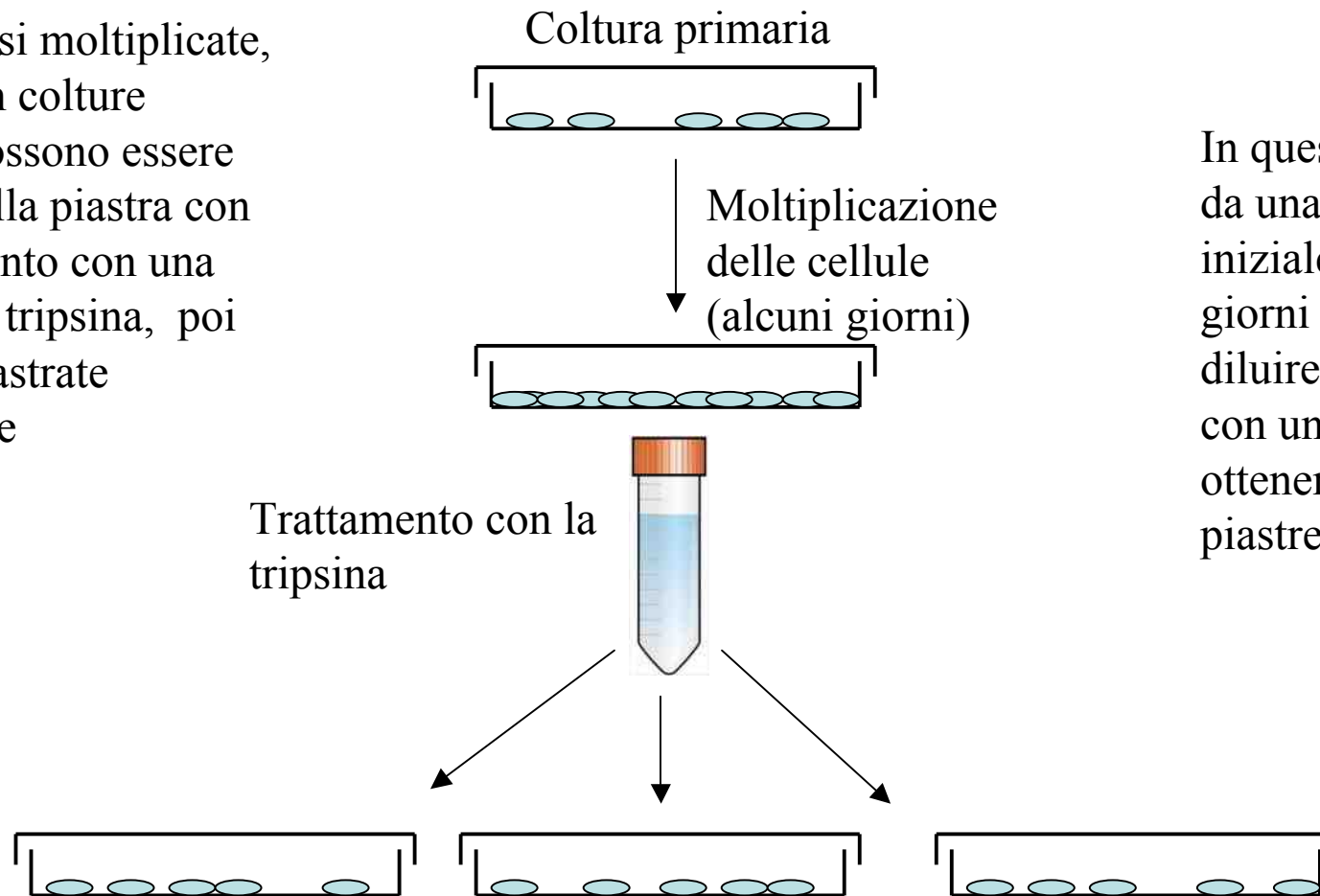
Il tessuto di partenza può essere “sano” oppure una biopsia di tessuto ammalato, ad esempio da un tumore

Si possono mettere in coltura cellule dissociate (isolate) oppure frammenti di tessuti (organoculture)



Subculture: linea cellulare primaria

Dopo essersi moltiplicate, le cellule in colture primarie possono essere staccate dalla piastra con un trattamento con una proteasi, la tripsina, poi diluite e piastrate nuovamente



In questo esempio da una piastra iniziale dopo alcuni giorni si possono diluire le cellule con un fattore 1/3 e ottenere 3 nuove piastre.

dopo alcuni giorni ciascuna di queste 3 piastre potrà dare luogo a 3 nuove piastre (dunque 9 in tutto)...etc.
In questa fase la crescita cellulare è esponenziale

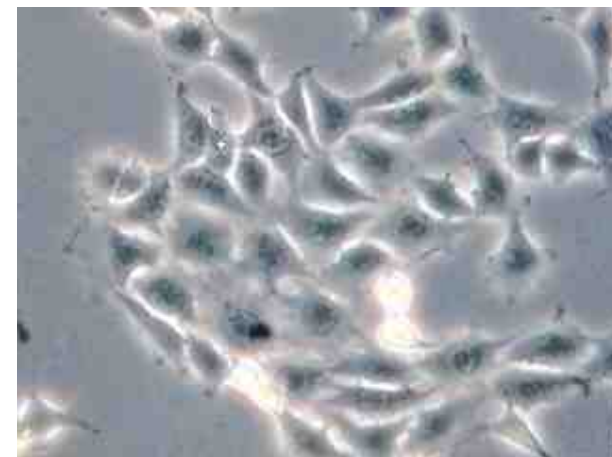
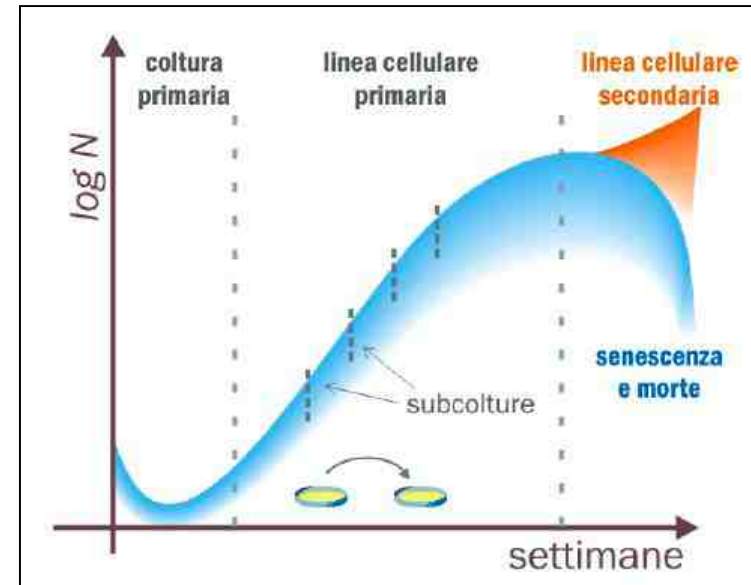
06 oct 27/10/10

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.

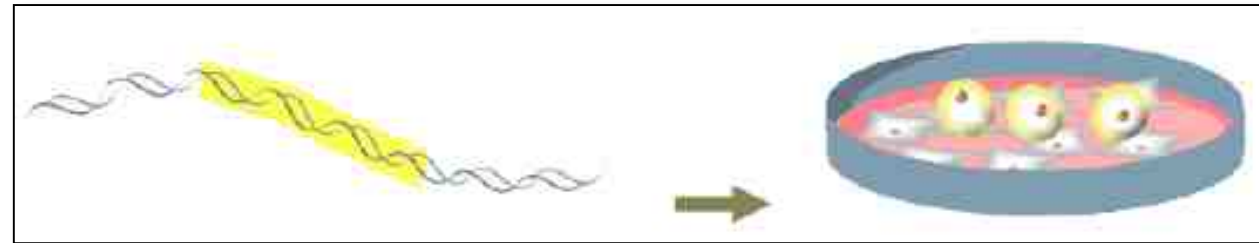
Colture primarie preparate a partire da biopsie tumorali producono più facilmente linee cellulari secondarie. Queste linee secondarie possono essere costituite da cellule immortalizzate ma non tumorali oppure da cellule a loro volta tumorali.



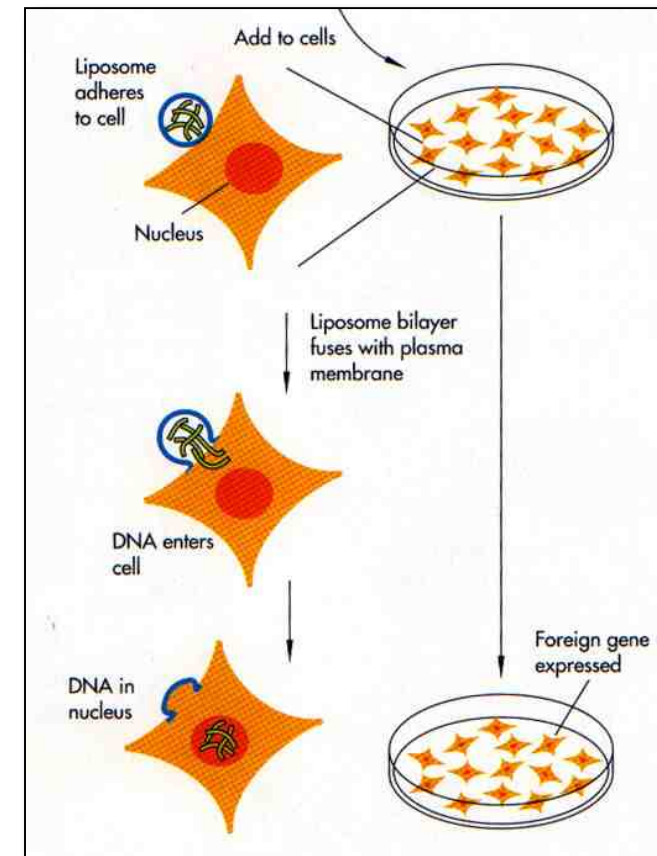
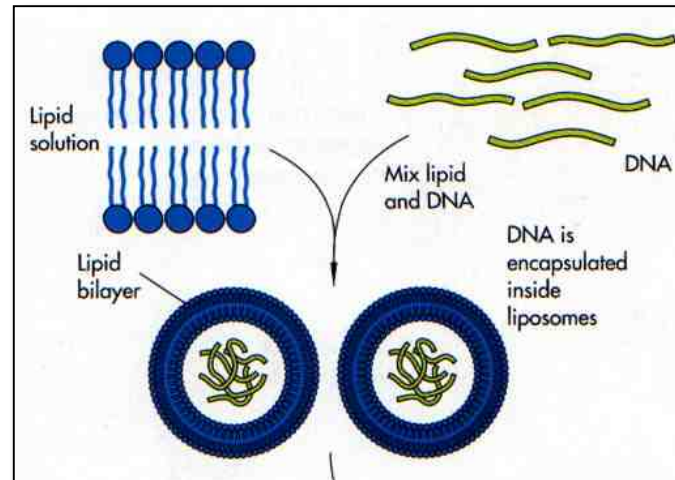
Le colture cellulari rappresentano un modello di studio di tutte le funzioni cellulari (fisiologiche o patologiche): differenziamento cellulare (cellule staminali), proliferazione, migrazione, organizzazione tridimensionali, morte cellulare, interazioni cellulari, metabolismo, studio e sviluppo di farmaci,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

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.



Il nucleo

Learning Objectives for "Eukaryotic Cell Structure: The Nucleus"

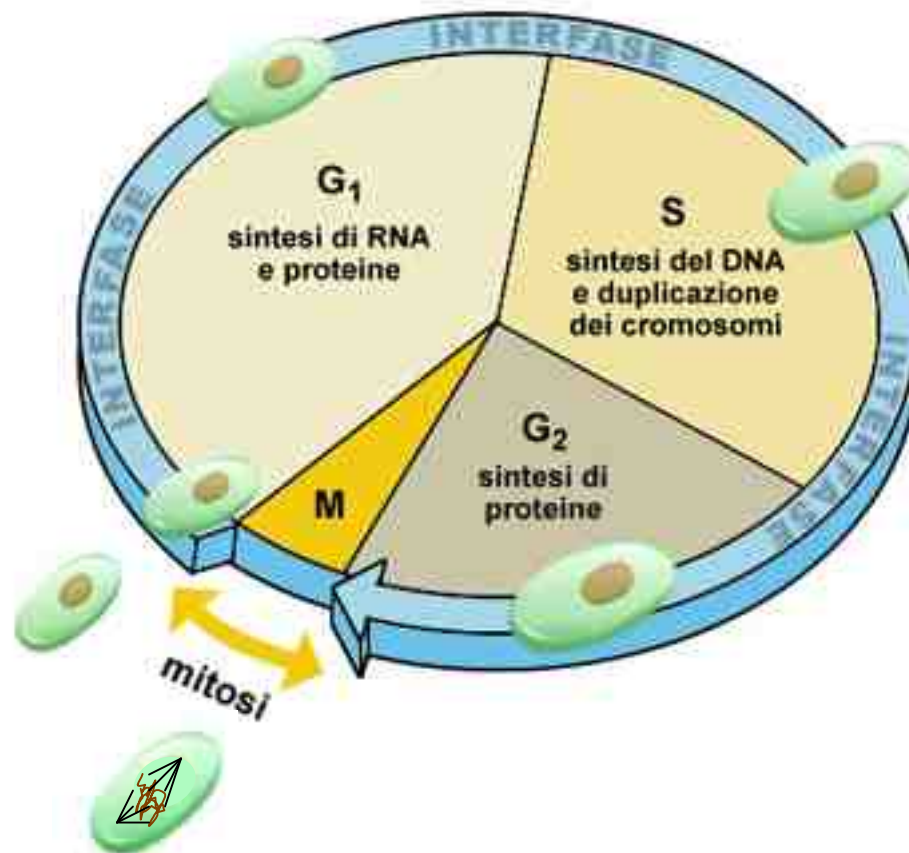
After completing this section you should be able to perform the following objectives.

1. Describe the structure and the function of the nucleus in eukaryotic cells.
2. Define the following:
 - a. nuclear envelope
 - b. nuclear envelope pores
 - c. nucleoplasm
 - d. nucleolus
 - e. nucleosome
 - f. chromatin

06 bct 27/10/10

19

Il nucleo è presente durante l'interfase

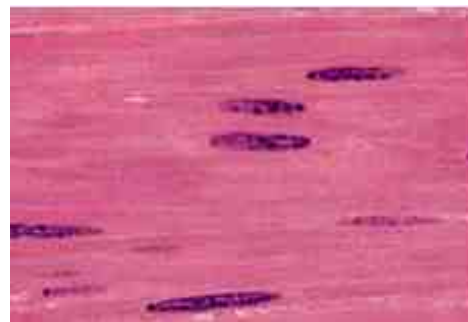


L'interfase è il periodo di tempo del ciclo cellulare che intercorre tra una mitosi e la successiva nelle cellule eucariotiche.

Citologia del nucleo

Il nucleo è facilmente evidenziabile in una cellula tuttavia ...

- Può avere aspetti diversi
- Non è presente durante tutto il ciclo cellulare
- Può mancare in alcune cellule
- Oltre alla forma sono variabili anche per la dimensione, la localizzazione nella cellula e l'intensità di colorazione



27/1

