

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

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

7

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 e caricamento "positivo";

2. Elettroforesi;

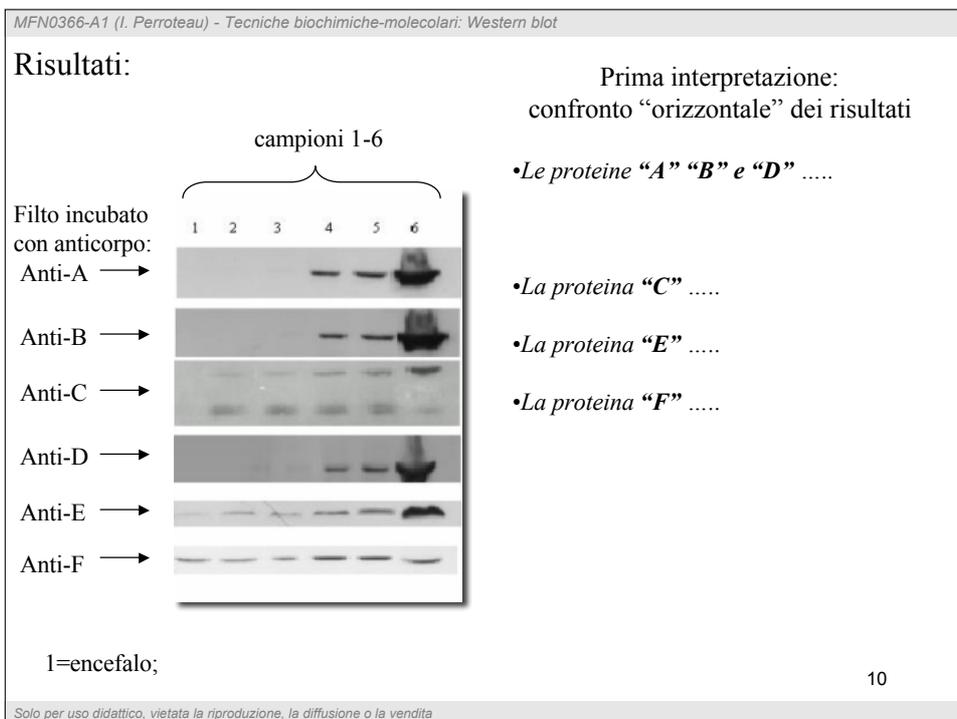
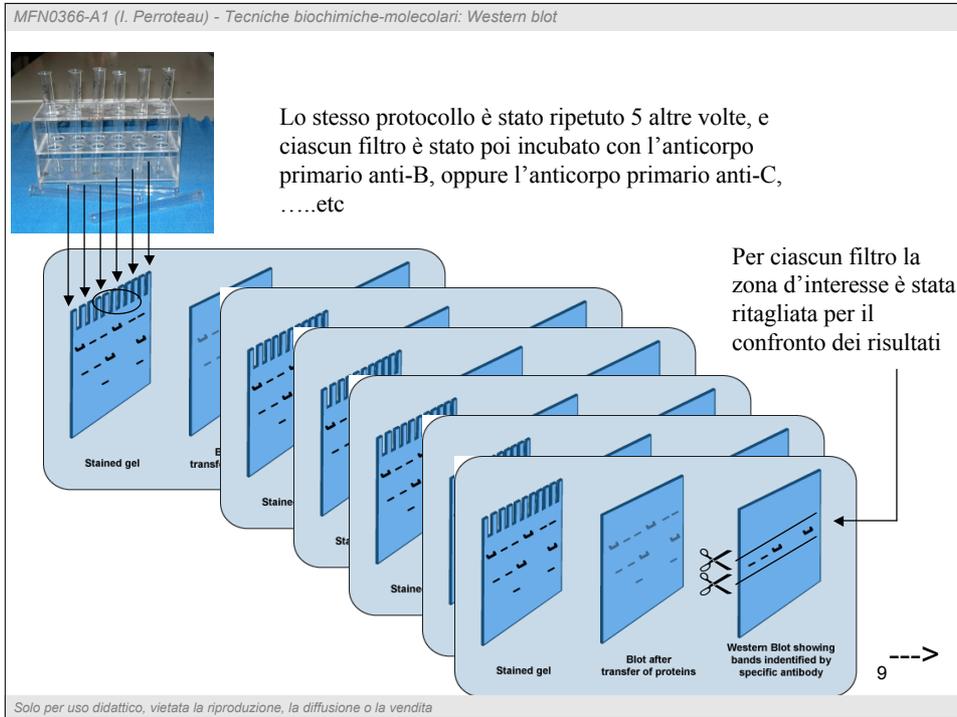
3. trasferimento dal gel di elettroforesi al filtro ("blot"),

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

5. Lastra fotografica dopo sviluppo

8

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



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

Risultati:

campioni 1-6

Filto incubato con anticorpo:

Anti-A →

Anti-B →

Anti-C →

Anti-D →

Anti-E →

Anti-F →

**Prima interpretazione:
confronto “orizzontale” dei risultati**

- Le proteine “A” “B” e “D” non sono espresse nei campioni N.1-3; sono espresse nel N.4 e N.5 e molto espresse nel N. 6.
- La proteina “C” non è espressa nel N.1 mentre negli altri l’anticorpo ha riconosciuto due forme di peso molecolare (MW) diverso. N.2 e N.3 esprimono maggiormente la forma a basso MW, N.4 e N.5, le due forme in pari misura e il N.6 esprime maggiormente la forma ad alto.
- La proteina “E” è espressa in modo crescente dal N. 2 al N.6
- La proteina “F” è espressa in tutti campioni con un livello maggiore nei campioni N.4, N.5 e N.6

11

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

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

Risultato

campioni 1-6

Filto incubato con anticorpo:

Anti-A →

Anti-B →

Anti-C →

Anti-D →

Anti-E →

Anti-F →

**Seconda interpretazione:
confronto “verticale” dei risultati**

- Il campione N.1 ...
- I campioni N. 2 e N.3 ...
-etc

12

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

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

Risultato

campioni 1-6

Filto incubato con anticorpo:

Anti-A →

Anti-B →

Anti-C →

Anti-D →

Anti-E →

Anti-F →

•Il campione N.1 contiene soltanto le proteine "E" e "F"

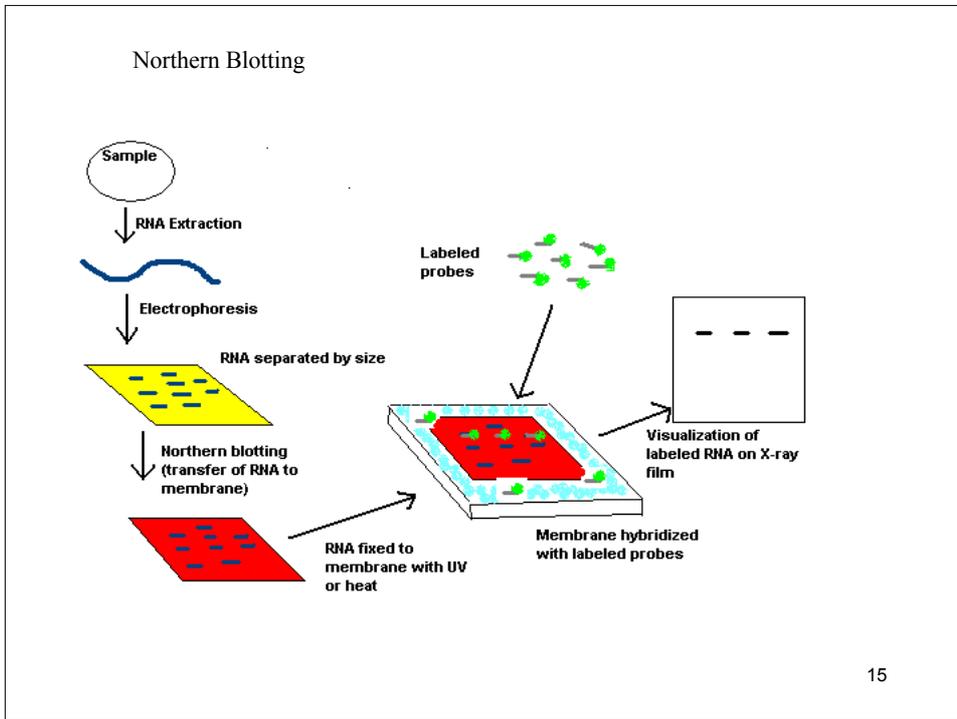
•I campioni N. 2 e N.3 contiene in più, rispetto ai precedenti, la proteina "C" nella forma a basso peso molecolare (MW)

•.....etc

13

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

Northern Blotting



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

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*

↓

Elettrophoresi*

↓

Blot*

↓

ibridazione

↓

rivelazione

Southern

Estrazione del DNA*

↓

Elettrophoresi*

↓

Blot*

↓

ibridazione

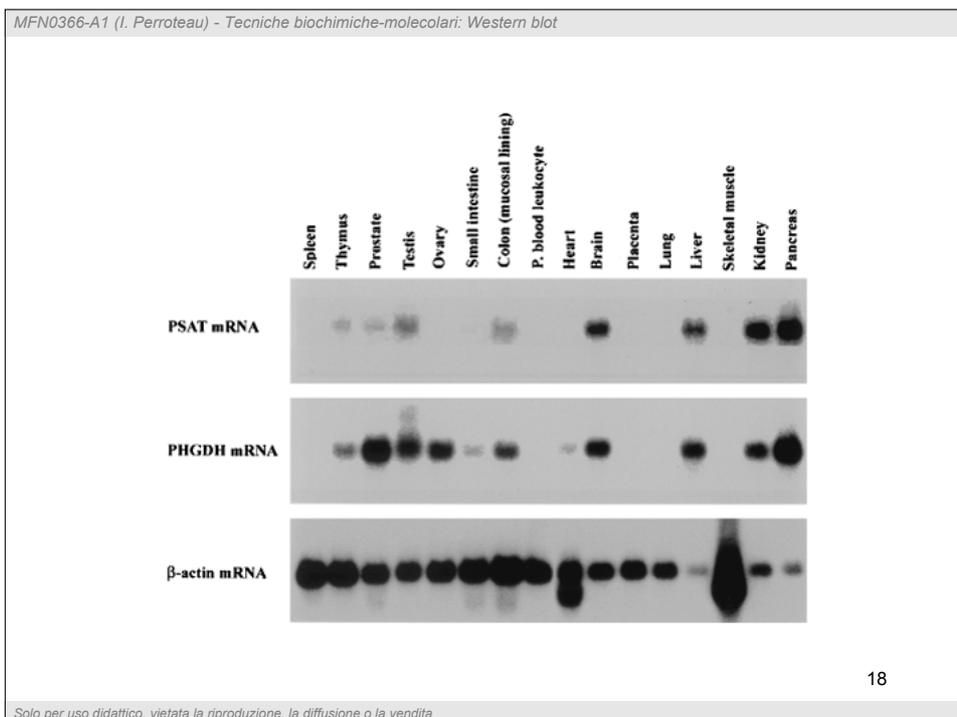
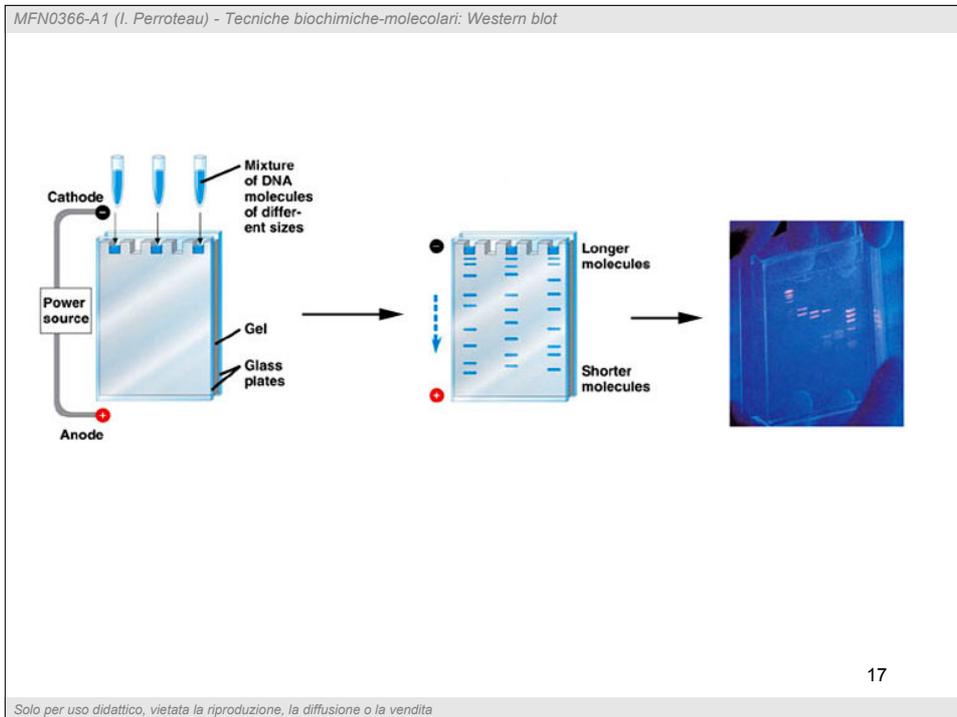
↓

rivelazione

(*). rispetto a quanto visto dettagliatamente per le proteine, apparecchi e protocolli sono diversi i principi sono comuni

16

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



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

Southern Blotting

19

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

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

I. Digestion of genomic DNA (—) using a restriction enzyme (▲) that recognizes specific short sequences of DNA (restriction sites). The resulting segments of DNA (—) are called "restriction fragments."

A probe (★), a labeled segment of DNA, is hybridized (attached) to complementary DNA sequences in the restriction fragments to allow visualization.

Example A

Normal control

Example B

Ablation of restriction site 2 due to single base pair change

Example C

Large deletion of DNA

Example D

Large insertion of DNA

II. Visualization of length of labeled restriction fragments that have been separated by molecular weight using gel electrophoresis

Molecular Weight

20kb

15kb

10kb

5kb

1kb

Gel Electrophoresis

Normal-length restriction fragment on both chromosomes (Example A) and on one chromosome of a pair (Examples B, C, D)

Abnormal-length restriction fragments indicating the presence of a mutation on one chromosome of each pair

20

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Colture cellulari

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)

23

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Colture cellulari

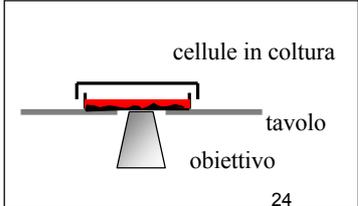
Osservazione delle cellule in colture: Microscopio rovesciato a contrasto di fase



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

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

- 1) L'obiettivo è separato dsoltanto 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



cellule in coltura
tavolo
obiettivo

24

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Colture cellulari

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)

Culture Types

Host
Dissection

Trypsin digestion
Primary cell culture

Finely chop
Primary explant culture

Organ culture

25

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

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Colture cellulari

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.

Cultura primaria

Moltiplicazione delle cellule (alcuni giorni)

Trattamento con la tripsina

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

26

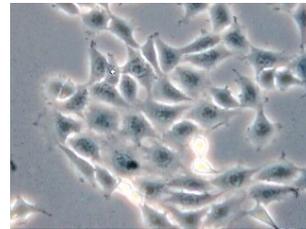
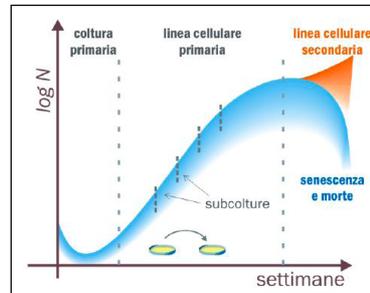
Solo per uso didattico, vietata la riproduzione, la diffusione o la vendita

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....

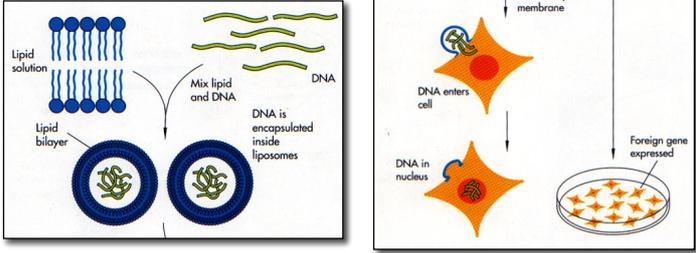
Le cellule in coltura possono anche essere modificate geneticamente tramite l'inserimento, in forma transiente o nel genoma della cellula ospite, di informazione genetica esogena. I metodi che permettono di fare entrare il DNA esogeno nelle cellule ospite si chiamano: “Trasfezioni”

MFN0366-A1 (I. Perroteau) - Colture cellulari

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.



29

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

Preparare le prossime lezioni:

Nucleo (Colombo pp.237-244)

Struttura della cromatina interfaseica (Colombo pp.252-259)

Struttura del nucleolo (Colombo pp. 286-287)